

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037487**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.02

(21) Номер заявки
201890572

(22) Дата подачи заявки
2016.08.22

(51) Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)

(54) БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

(31) **62/209,000; 62/240,131; 62/247,906;
62/249,497**

(32) **2015.08.24; 2015.10.12; 2015.10.29;
2015.11.02**

(33) **US**

(43) **2018.10.31**

(86) **PCT/IB2016/055012**

(87) **WO 2017/033121 2017.03.02**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ГЛЭКСОСМИТКЛАЙН
ИНТЕЛЛЕКТУАЛ ПРОПЕРТИ (NO.2)
ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:

**Монк Мирна А., Бам Нрендра Б.,
Дэлли Дженнифер, Спатара Мишель
(US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) **MANALI MUKHERJEE ET AL.:** "Anti-IL5 therapy for asthma and beyond", WORLD ALLERGY ORGANIZATION JOURNAL, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 7, no. 1, 4 December 2014 (2014-12-04), page 32, XP021205455, ISSN: 1939-4551, DOI: 10.1186/1939-4551-7-32 abstract; tables 1, 2

WO-A2-2009068649

TYTHER RAYMOND ET AL.: "Quality Issues Arising from Post-translational Modification of Recombinant Antibodies", 1 January 2011 (2011-01-01), ANTIBODY EXPRESSION AND PRODUCTION, PAGE(S) 293-303, XP009192400, abstract page 293, last paragraph page 294, paragraph 1 - paragraph 2 the whole document

HUI F. LIU ET AL.: "Recovery and purification process development for

monoclonal antibody production", MABS, vol. 2, no. 5, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 480-499, XP055027612, ISSN: 1942-0862, DOI:10.4161/mabs.2.5.12645 page 485, right-hand column, paragraph 3; figure 1 page 487, right-hand column, paragraph 2; table 2

WO-A1-2014158231

KANG XUEZHEN ET AL.: "Monoclonal antibody heterogeneity analysis and deamidation monitoring with high-performance cation-exchange chromatofocusing using simple, two component buffer systems", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1283, 31 January 2013 (2013-01-31), pages 89-97, XP028995261, ISSN: 0021-9673, DOI:10.1016/J.CHROMA.2013.01.101 abstract

ANDREW M. GOETZE ET AL.: "Assessing monoclonal antibody product quality attribute criticality through clinical studies", MABS, vol. 2, no. 5, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 500-507, XP055317650, US ISSN: 1942-0862, DOI:10.4161/mabs.2.5.12897 abstract page 500, right-hand column, paragraph 2 - page 501, left-hand column, paragraph 1

MARKUS HABERGER ET AL.: "Assessment of chemical modifications of sites in the CDRs of recombinant antibodies", MABS, vol. 6, no. 2, 17 January 2014 (2014-01-17), pages 327-339, XP055202269, ISSN: 1942-0870, DOI:10.4161/mabs.27876 abstract

CHARTRAIN M. ET AL.: "Development and production of commercial therapeutic monoclonal antibodies in mammalian cell expression systems: An overview of the current upstream technologies", CURRENT PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 9, no. 6, 1 December 2008 (2008-12-01), pages 447-467, XP008116146, ISSN: 1389-2010, DOI:10.2174/138920108786786367 table 2 the whole document

(57) Изобретение относится к композициям для лечения заболеваний, опосредованных интерлейкином 5 (IL-5), и к связанным с ними способам.

037487 B1

037487 B1

Область техники

Настоящее раскрытие относится к композициям для лечения заболеваний, опосредованных интерлейкином 5 (IL-5), и к связанным с ними способам.

Уровень техники

IL-5 играет роль в ряде различных заболеваний, таких как астма, тяжелая эозинофильная астма, тяжелая астма, неконтролируемая эозинофильная астма, эозинофильная астма, субэозинофильная астма, хроническая обструктивная болезнь легких, эозинофильный гранулематоз с полиангиитом, гиперэозинофильный синдром, полипоз носа, буллезный пемфигоид и эозинофильный эзофагит. Эти серьезные заболевания затрагивают сотни миллионов людей во всем мире.

Меполизумаб является моноклональным антителом, которое связывается с растворимым IL-5 и блокирует растворимый IL-5 от его связывания с рецептором. Структура IL-5 указывает на то, что это секретируемый белок, и нет никаких признаков присутствия каких-либо связанных с мембраной форм IL-5 на каком-либо типе клеток. Таким образом, эффекторные функции Fc не являются частью механизма действия меполизумаба. На основе механизма действия и фармакокинетических свойств меполизумаба установили, что имеется два функциональных домена, вовлеченных в биологическую активность этого моноклонального антитела. Это а) связывание с IL-5 в области, определяющей комплементарность (CDR), которое обеспечивает механизм действия; и б) связывание с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) в Fc-области, которое определяет период полужизни. Благодаря обширным исследованиям характеристик, проводимым на протяжении разработки продукта, было установлено, что дезамидирование, окисление и агрегация являются критическими качественными особенностями меполизумаба. Важно отметить, что было установлено, что эти варианты должны поддерживаться на конкретном уровне для обеспечения соответствующей биологической функции.

Таким образом, существует потребность в композициях, пригодных для поддержания биологической функции меполизумаба и для лечения заболевания, опосредованного IL-5. Такие композиции и связанные с ними способы представлены настоящим раскрытием.

Сущность изобретения

Одним из аспектов раскрытия является композиция, содержащая антитело, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2, или вариант антитела, имеющий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности тяжелой цепи, и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности легкой цепи, где композиция содержит $\leq 80\%$ кислых вариантов антител.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая антитело, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2, или вариант антитела, имеющий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности тяжелой цепи, и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности легкой цепи, где композиция содержит $\leq 80\%$ кислых вариантов антител и $\leq 20\%$ агрегированных вариантов антител.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая антитело, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2, или вариант антитела, имеющий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности тяжелой цепи, и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности легкой цепи, где композиция содержит $\leq 25\%$ дезамидированного варианта антитела по N31 аминокислотной последовательности легкой цепи и $\leq 20\%$ агрегированных вариантов антител.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая антитело, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2, или вариант антитела, имеющий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности тяжелой цепи, и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности легкой цепи, где композиция содержит $\leq 25\%$ дезамидированных вариантов антител по N31 аминокислотной последовательности легкой цепи; $\leq 55\%$ окисленных вариантов антител по M64 аминокислотной последовательности тяжелой цепи; $\leq 3\%$ окисленных вариантов антител по W52 аминокислотной последовательности тяжелой цепи и $\leq 20\%$ агрегированных вариантов антител.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая антитело, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2, или вариант антитела, имеющий аминокислотную

последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности тяжелой цепи, и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности легкой цепи, где композиция содержит $\leq 25\%$ дезамидированных вариантов антител по N31 аминокислотной последовательности легкой цепи; $< 35\%$ дезамидированных вариантов антител по N386 аминокислотной последовательности тяжелой цепи и $\leq 20\%$ агрегированных вариантов антител.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая антитело, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2, или вариант антитела, имеющий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности тяжелой цепи, и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности легкой цепи, где композиция содержит $\leq 25\%$ дезамидированных вариантов антител по N31 аминокислотной последовательности легкой цепи; $\leq 35\%$ дезамидированных вариантов антител по N386 аминокислотной последовательности тяжелой цепи; $\leq 55\%$ окисленных вариантов антител по M64 аминокислотной последовательности тяжелой цепи, по M254 аминокислотной последовательности тяжелой цепи, по M430 аминокислотной последовательности тяжелой цепи; $\leq 3\%$ окисленных вариантов антител по W52 аминокислотной последовательности тяжелой цепи и $\leq 20\%$ агрегированных вариантов антител.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая очищенный препарат моноклонального антитела и буферный агент, где pH композиции составляет от 6,8 до 7,2, где буферным агентом является гистидин, фосфат, лимонная кислота, цитрат или его соль, где очищенный препарат содержит изоформы, представленные пиком 65, пиком 78, пиком 88, пиком 92, основным пиком и пиком 112, изображенными на фиг. 1, где антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, и где антитело продуцируется клеткой яичника китайского хомячка.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая очищенный препарат моноклонального антитела и буферный агент, где pH композиции составляет от 6,8 до 7,2, где буферным агентом является фосфат или его соль, где очищенный препарат содержит изоформы, представленные пиком 65, пиком 78, пиком 88, пиком 92, основным пиком и пиком 112, изображенными на фиг. 1, где антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, и где антитело продуцируется клеткой яичника китайского хомячка.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая: а) антитело против IL-5, содержащее последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 1, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2; и б) основную форму антитела, содержащую белок в количестве, превышающем или равном 50% белка в композиции, измеренном с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая: а) антитело против IL-5, содержащее последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 1, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2; б) основную форму антитела, содержащую белок в количестве, превышающем или равном 50% белка в композиции, измеренном с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции; и в) кислые формы антитела, содержащие примерно от 20% примерно до 45% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая: а) антитело против IL-5, содержащее последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 1, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2; б) основную форму антитела, содержащую белок в количестве, превышающем или равном 50% белка в композиции, измеренном с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции; и в) форму антитела как основания, содержащую примерно от 1% примерно до 15% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая: а) антитело против IL-5, содержащее последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислот-

окисленного остатка метионина в положении 82, окисленного остатка метионина в положении 85, окисленного остатка цистеина в положении 222, окисленного остатка метионина в положении 254, окисленного остатка метионина в положении 360 и окисленного остатка метионина в положении 430; и

b) модифицированную форму аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 2, содержащую по меньшей мере одну модификацию аминокислотного остатка, выбранную из группы, состоящей из дезамидированного остатка аспарагина в положении 31, окисленного остатка метионина в положении 4 и окисленного остатка цистеина в положении 220.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая популяцию антител против IL-5, имеющих

a) модифицированную форму аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, приведенную в SEQ ID NO: 1, содержащую по меньшей мере одну модификацию аминокислотного остатка, выбранную из группы, состоящей из дезамидированного остатка аспарагина в положении 299, дезамидированного остатка аспарагина в положении 317 и дезамидированного остатка аспарагина в положении 386; и

b) модифицированную форму аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, приведенную в SEQ ID NO: 2, содержащую дезамидированный остаток аспарагина в положении 31.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая популяцию антител против IL-5, имеющих

a) модифицированную форму аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 1, содержащую по меньшей мере одну модификацию аминокислотного остатка, выбранную из группы, состоящей из окисленного остатка триптофана в положении 52, окисленного остатка метионина в положении 64, окисленного остатка метионина в положении 82, окисленного остатка метионина в положении 85, окисленного остатка цистеина в положении 222, окисленного остатка метионина в положении 254, окисленного остатка метионина в положении 360 и окисленного остатка метионина в положении 430; и

b) модифицированную форму аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 2, содержащую по меньшей мере один остаток, выбранный из группы, состоящей из окисленного остатка метионина в положении 4 и окисленного остатка цистеина в положении 220.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая

a) антитело против IL-5, содержащее последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 1, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2; и

b) основную форму антитела, содержащую белок в количестве, превышающем или равном 20% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая

a) антитело против IL-5, содержащее последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 1, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2;

b) основную форму антитела, содержащую белок в количестве, превышающем или равном 20% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции; и

c) кислые формы антитела, содержащие примерно до 80% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - репрезентативная электроферограмма капиллярного изоэлектрического фокусирования (cIEF) эталонной стандартной (RS) композиции, содержащей меполизумаб;

фиг. 2 - репрезентативные электроферограммы CIEF эталонной стандартной композиции, содержащей меполизумаб (контроль), и различных партий композиций, содержащих меполизумаб, подвергнутых трехдневной форсированной деградации при pH 9;

фиг. 3 - полный вид репрезентативной хроматограммы эксклюзионной хроматографии (SEC) композиции RS, содержащей меполизумаб;

фиг. 4 - развернутый вид репрезентативной хроматограммы SEC композиции RS, содержащей меполизумаб;

фиг. 5 - репрезентативная хроматограмма SEC-многоугловое рассеяние лазерного света (MALS) композиции RS, содержащей меполизумаб;

фиг. 6 - репрезентативная хроматограмма SEC-MALS партии композиции, содержащей меполизумаб;

фиг. 7 - репрезентативные хроматограммы SEC композиции RS, содержащей меполизумаб, и для разных партий композиций, содержащих меполизумаб, подвергнутых стрессовому воздействию pH 3,5 на 7 день.

Подробное описание изобретения

Настоящее раскрытие относится к композиции для лечения заболеваний, опосредованных интерлейкином 5 (IL-5), и связанному с ней объекту.

Используемый в настоящем описании термин "астма" означает воспалительное заболевание дыхательных путей, характеризующееся обратимым нарушением дыхания и бронхоспазмом. Обычными симптомами являются хрипы, кашель, судороги и нехватка воздуха.

В способах раскрытия "астма" может представлять собой "тяжелую эозинофильную астму". Пациенты с тяжелой эозинофильной астмой могут иметь астму и эозинофилы крови в количестве, превышающем или равном 300 эозинофилам на 1 мкл крови за последние 12 месяцев. Пациенты с тяжелой эозинофильной астмой могут удовлетворять одному или более критериям, описанным в табл. 1.

Таблица 1

<p>Пациент страдает тяжелой эозинофильной астмой, если он удовлетворяет следующим критериям:</p> <p>1) Пациент имеет клинические особенности тяжелой рефрактерной астмы, аналогичные тем, которые указаны в American Thoracic Society Workshop on Refractory Asthma (162 Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2341 (2000) в течение ≥ 12 месяцев.</p> <p>2) Пациент имеет убедительно подтвержденное требование для регулярного лечения с использованием высокой дозы ICS (ингаляционные кортикостероиды) (т.е. ≥ 880 мкг/сутки флутиказона пропионата или эквивалента ежедневно), поддерживающих OCS (пероральные кортикостероиды) в течение последних 12 месяцев.</p> <p>3) Пациент имеет убедительно подтвержденную необходимость контролирующего лекарственного средства, например, бета-2-агониста длительного действия, антагониста рецептора лейкотриена или теофиллина за последние 12 месяцев.</p> <p>4) Пациент страдает постоянным нарушением дыхания, о чем свидетельствует $FEV_1 < 80\%$ до бронходилататора, предсказанная зарегистрированная или максимальная суточная вариабельность потока $> 20\%$ на 3-ий или в последующие дни.</p> <p>5) Пациент страдает воспалением дыхательных путей, которое, вероятно, является эозинофильным по своему характеру, о чем свидетельствует одна из следующих характеристик, присутствующая в настоящее время или подтвержденная в предыдущие 12 месяцев:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Повышенный уровень эозинофилов периферической крови ≥ 300/мкл, который связан с астмой или - Эозинофилы мокроты $\geq 3\%$ или - Выдыхаемый оксид азота ≥ 50 частей на миллиард или - Быстрое ухудшение контроля над астмой (на основе подтвержденной клинической истории или объективных измерений) после сокращения на $\leq 25\%$ регулярной поддерживающей дозы ингаляционной или пероральной дозы кортикостероидов за предыдущие 12 месяцев <p>8) Пациент имеет ранее подтвержденную историю двух или более обострений астмы, требующих лечения пероральными или системными кортикостероидами за предыдущие 12 месяцев до этого, несмотря на использование высоких доз ICS и дополнительных контролирующих лекарственных средств. Для пациентов, получающих поддерживающие OCS с помощью высоких доз ICS вместе с контролирующим лекарственным средством, лечение OCS для обострений должно было проходить с двукратным или большим увеличением дозы OCS.</p> <p>9) Пациент страдает астмой, подтвержденной следующим:</p> <ul style="list-style-type: none"> - обратимость дыхательных путей ($FEV_1 \geq 12\%$ и 200 мл) в настоящее время или подтвержденная в предыдущие 12 месяцев или - гиперчувствительность дыхательных путей (провокационная концентрация, вызывающая 20%-ное снижение FEV_1 с метахолином < 8 мг/мл, или провокационная доза, вызывающая 20%-ное снижение FEV_1 с гистамином $< 7,8$ мкмоль), подтвержденная в течение предыдущих 12 месяцев или - Изменчивость дыхания клинического $FEV_1 \geq 20\%$ между двумя обследованиями, подтвержденная за предыдущие 12 месяцев (FEV_1, зарегистрированный во время обострения, недействителен) или - Изменчивость дыхания, о чем свидетельствует $> 20\%$ суточной изменчивости пикового потока, наблюдаемая на 3-ий или в последующие дни.
--

Важно отметить, что пациенты с тяжелой эозинофильной астмой в соответствии с этими критериями могут иметь содержание эозинофилов в крови менее 150 на 1 мкл крови в начале лечения. Меполизумаб представляет собой моноклональное антитело, содержащее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2. Меполизумаб и антигенсвязывающие белки, в частности молекулы антител, содержащие CDR тяжелой цепи и CDR легкой цепи меполизумаба, могут использоваться для лечения тяжелой эозинофильной астмы в соответствии со способами раскрытия. Например, меполизумаб или родственные ему антигенсвязывающие белки могут быть показаны для дополнительной поддерживающей терапии тяжелой эозинофильной астмы, идентифицированной у пациентов по эозинофилам крови, превышающим или равным 300 клеток/мкл в течение последних 12 месяцев, и/или по эозинофилам крови, превышающим или равным 150 клеток/мкл в начале лечения, и/или по эозинофилам крови, составляющим менее чем 150 клеток/мкл в начале лечения. Альтернативно, меполизумаб или родственные ему антигенсвязывающие белки могут быть показаны для дополнительной поддерживающей терапии тяжелой эозинофильной астмы, идентифицированной у пациентов по эозинофилам крови, превышающим или равным 300 клеткам/мкл в течение последних 12 месяцев, и/или по эозинофилам крови, превышающим или равным 150 клеткам/мкл в начале лечения. Меполизумаб или родственные ему антигенсвязывающие белки могут быть показаны для дополнительной поддерживающей терапии тяжелой эозинофильной астмы, идентифицированной у пациентов по эозинофилам крови, превышающим или равным 300 клеткам/мкл в течение последних 12 месяцев, и/или по эозинофилам крови, составляющим менее чем 150 клеток/мкл в начале лечения. Возраст таких пациентов может составлять от 12 лет и старше. Лечение меполизумабом может уменьшать обострения астмы у пациентов (например, пациентов с историей обострения). Способы раскрытия могут быть использованы, когда показано лечение меполизумабом (т.е. такое лечение меполизумабом может быть объединено со способами раскрытия). Лечение меполизумабом может

a) уменьшить частоту обострения. По сравнению с плацебо лечение меполизумабом, например, 100 мг на пациента подкожно или 75 мг на пациента внутривенно может снизить степень 1) клинически значимых обострений, 2) обострений, требующих госпитализации или посещения ED, и 3) обострений, требующих госпитализации. Это преимущество может потенциально привести к снижению заболеваемости и смертельных исходов вследствие астмы;

b) снизить ежедневную дозу ОКС: лечение меполизумабом, например, 100 мг на пациента подкожно или 75 мг на пациента внутривенно может позволить пациентам снизить суточную дозу сопутствующего кортикостероида без потери контроля над астмой. Пациенты, получавшие меполизумаб, могут достичь среднего процентного снижения на 50% от исходного уровня суточной дозы перорального кортикостероида (ОКС) против 0% для пациентов, получавших плацебо. Кроме того, 54% пациентов, получавших меполизумаб, могут достичь снижения дозы ОКС до 5 мг по сравнению с 32% пациентов, получавших плацебо ($p=0,025$);

c) улучшить функции легких: клинически значимые изменения FEV1 до и после бронходилататора могут быть продемонстрированы при лечении меполизумабом, например, 100 мг на пациента подкожно или 75 мг на пациента внутривенно по сравнению с плацебо. Любые улучшения функции легких имеют особое клиническое значение в этой популяции пациентов, так как большинство из них получает максимальную терапию астмы, включая высокие дозы ИКС (ингаляционные кортикостероиды) и/или ОКС плюс контролирующее лекарственное средство;

d) улучшить контроль астмы: статистически значимые и клинически значимые улучшения могут наблюдаться в ACQ-5 с меполизумабом, например, 100 мг на пациента подкожно или 75 мг на пациента внутривенно по сравнению с плацебо, что свидетельствует о том, что пациенты могут достичь контроля астмы при добавлении меполизумаба к их существующей терапии астмы;

e) улучшить качество жизни: статистически значимые и клинически значимые изменения в оценках SGRQ могут быть продемонстрированы с помощью меполизумаба, как, например, 100 мг на пациента подкожно или 75 мг на пациента внутривенно по сравнению с плацебо. Пациенты могут испытывать заметное улучшение симптомов астмы и способны выполнять повседневную деятельность;

f) получить устойчивость эффективности и фармакодинамического эффекта: в течение периода лечения продолжительностью 32 и/или 52 недели устойчивое сокращение обострения астмы и эозинофилов крови и улучшение функции легких, контроля астмы и качества жизни без развития устойчивости к лечению и

g) снизить эозинофилы крови. Лечение композициями, включающими меполизумаб, такими как 100 мг меполизумаба на пациента подкожно или 75 мг на пациента внутривенно может приводить к быстрому снижению эозинофилов крови (приблизительно 80% по первой оценке на 4-й неделе после начала лечения, например, от 250-290 до 40-60 клеток/мкл и т.д.).

В способах раскрытия "астма" может представлять собой "тяжелую астму". Пациенты с тяжелой астмой удовлетворяют определению тяжелой астмы, описанной в Руководстве европейского респираторного общества/Американского торакального общества (ERS/ATS) для тяжелой астмы. Таким образом, тяжелая астма представляет собой астму, которая требует лечения рекомендуемыми препаратами, пред-

ложенными для лечения астмы "Глобальной инициативы по бронхиальной астме" (GINA) стадии 4-5 (высокие дозы ингаляционных кортикостероидов [ICS] плюс β 2-агонист длительного действия [LABA] или модификатор лейкотриена/теофиллин) в течение предыдущего года, или системные кортикостероиды (CS) в течение $\geq 50\%$ предыдущего года для поддержания контроля астмы пациента. Лечение композициями, содержащими меполизумаб, можно использовать для лечения тяжелой астмы в соответствии со способами раскрытия.

В способах раскрытия "астма" может представлять собой "неконтролируемую эозинофильную астму". Пациенты с неконтролируемой эозинофильной астмой удовлетворяют критериям, описанным в табл. 2.

Таблица 2

<p>Пациент имеет неконтролируемую эозинофильную астму, если он удовлетворяет следующим критериям:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Пациент имеет историю диагностированной астмы по меньшей мере в течение предыдущих 12 месяцев. 2) Пациенту было предписано ежедневно использовать среднюю дозу или высокую дозу ICS (ингаляционный кортикостероид) плюс LABA (бета-агонисты длительного действия) по меньшей мере в предыдущие 12 месяцев. 3) Доза для пациента других контролирующих лекарственных средств для контроля астмы должна быть стабильной в течение по меньшей мере предыдущих 30 дней. 4) Пациент имеет как минимум 2 подтвержденных обострения астмы в течение предыдущих 12 месяцев, которые требовали использования системной пульс-терапии кортикостероидами.
--

Лечение композициями, содержащими меполизумаб, можно использовать для лечения неконтролируемой эозинофильной астмы в соответствии со способами раскрытия.

В способах раскрытия "астма" может представлять собой "эозинофильную астму". Пациенты с неконтролируемой эозинофильной астмой удовлетворяют критериям, описанным в табл. 3.

Таблица 3

<p>Пациент имеет эозинофильную астму, если он удовлетворяет следующим критериям:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Пациент имеет предыдущий диагноз астмы. 2) У пациента было по меньшей мере 1 обострение астмы, требующее перорального, внутримышечного (im) или внутривенного (iv) введения кортикостероидов в течение по меньшей мере 3 дней в течение предыдущих 12 месяцев. 3) Текущий уровень эозинофилов в крови пациента составляет по меньшей мере 400/мкл. 4) Обратимость дыхательных путей пациента составляет по меньшей мере 12% до введения бета-агониста. 5) Показатель ACQ пациента составляет по меньшей мере 1,5.
<p>6) Пациент принимает ингаляционный флутиказон в дозе по меньшей мере 440 мкг или ее эквивалент ежедневно. Допускается постоянное пероральное использование кортикостероидов (не более чем 10 мг/сутки преднизона или его эквивалента). Базовая схема терапии астмы пациента (включая, но не ограничиваясь ими, ингаляционные кортикостероиды, пероральные кортикостероиды до максимальной дозы 10мг преднизона в сутки или эквивалентно, антагонисты лейкотриена, ингибиторы 5-липосигеназы или кромолин) должна быть стабильной в течение предыдущих 30 дней.</p>

В способах раскрытия "астма" может представлять собой "субэозинофильную астму". Пациенты с неконтролируемой эозинофильной астмой удовлетворяют критериям, описанным в табл. 4.

<p>Пациент имеет субэозинофильную астму, если он удовлетворяет следующим критериям:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Пациент имеет предыдущий диагноз астмы. 2) У пациента было по меньшей мере 1 обострение астмы, требующее перорального, внутримышечного (im) или внутривенного (iv) введения кортикостероидов в течение по меньшей мере 3 дней в течение предыдущих 12 месяцев. 3) Текущий уровень эозинофилов в крови пациента составляет по меньшей мере 400/мкл. 4) Обратимость дыхательных путей пациента составляет по меньшей мере 12% до введения бета-агониста. 5) Показатель ACQ пациента составляет по меньшей мере 1,5. 6) Пациент принимает ингаляционный флутиказон в дозе, составляющей по меньшей мере 440 мкг или эквивалентно ежедневно. Допускается постоянное использование перорального кортикостероида (не более чем 10 мг/сутки преднизона или эквивалентно). Базовая схема терапии астмы пациента (включая, но не ограничиваясь ими, ингаляционные кортикостероиды, пероральные кортикостероиды до максимальной дозы 10мг преднизона в сутки или эквивалентно, антагонисты лейкотриена, ингибиторы 5-липоксигеназы или кромолин) должна быть стабильной в течение предыдущих 30 дней.

Лечение композициями, содержащими меполизумаб, можно использовать для лечения субэозинофильной астмы и может также использоваться для лечения субэозинофильной астмы в соответствии со способами раскрытия.

Используемый в настоящем описании термин "буллезный пемфигоид" (BP) означает острое или хроническое аутоиммунное заболевание кожи, включающее образование волдырей, более известных как буллы, в пространстве между эпидермисом кожи и дермой. BP является наиболее распространенным аутоиммунным заболеванием кожи. Пожилые люди характерно подвержены этому заболеванию (>70 лет) с ежегодной заболеваемостью от 5 до 35 случаев на 1 млн. Частота возникновений BP резко возрастает в среднем на 17% в год. BP часто начинается с чрезвычайно зудящих поражений кожи, напоминающих экзему или крапивницу, до появления везикул и волдырей. У 10-30% пациентов BP также включает слизистую оболочку полости рта. Тяжесть заболевания может быть определена с помощью показателя интенсивности аутоиммунных буллезных кожных заболеваний (ABSIS), который оценивает вовлеченную область, а также активность заболевания. Заболевание связано с аутоиммунным ответом на структурные компоненты комплексов соединительной адгезии, что приводит к повреждению дермаль-эпидермального соединения с образованием субэпидермального пузыря. Конкретно, были идентифицированы аутореактивные ответы В- и Т-клеток против гемидесмосомных антигенов BP180 и BP230. Уровни аутоантител к BP180 в сыворотке отражают тяжесть и активность заболевания. Т-клетки представляют собой CD4+ клетки памяти, продуцирующие цитокины Th1 и Th2, в основном IL-4, IL-5 и IL-13. IL-5, а также эотаксин высоко представлены в содержимом волдыря. Продуцирование IL-5 действительно связано с эозинофилией крови и значительной инфильтрацией эозинофилов на коже пациентов с BP. Эозинофилы, как полагают, критически связаны с образованием волдырей, выделяя токсичные белки гранул (ESP, MBP) и протеолитические ферменты.

Используемый в настоящем описании термин "эозинофильный эзофагит" (ЕоЕ) означает аллергическое воспалительное состояние пищевода, в которое вовлечены эозинофилы. Симптомы представляют собой затрудненное проглатывание, задержку пищевых остатков и изжогу. ЕоЕ характеризуется плотным инфильтратом из лейкоцитов эозинофильного типа в эпителиальной оболочке пищевода. Считается, что ЕоЕ является аллергической реакцией на поглощаемую пищу, в основе которой лежит важная роль эозинофилов в аллергических реакциях. Диагностическая панель ЕоЕ может использоваться для диагностики ЕоЕ. ЕоЕ также может быть диагностирован, если гастроэзофагеальный рефлюкс не отвечает на 6-недельное испытание с использованием высокодозовых ингибиторов протонного насоса (PPI) дважды в сутки, или если отрицательная амбулаторная рН-метрия исключила гастроэзофагеальную рефлюксную болезнь (GERD). Эндоскопически в стенке пищевода можно увидеть гребни, борозды или кольца. Иногда в пищеводе могут встречаться несколько колец, что приводит к термину "гофрированный пищевод" или "кошачий пищевод" из-за сходства колец с пищеводом кошки. Наличие белых экссудатов в пищеводе также указывает на диагноз. По биопсии, сделанной во время эндоскопии, в поверхностном эпителии обычно можно наблюдать многочисленные эозинофилы. Для постановки диагноза требуется минимум 15 эозинофилов в поле зрения при большом увеличении. Эозинофильное воспаление не ограничивается только пищеводом и распространяется по всему желудочно-кишечному тракту. Также могут присутствовать глубоко дегранулированные эозинофилы, а также микроабсцессы и расширение базального слоя. Рентгенологически термин "кольцевидный пищевод" использовался для изображения эозинофильного эзофагита на исследованиях с бариевой взвесью для контраста с изображением переходных поперечных складок, иногда наблюдаемых при эзофагеальном рефлюксе (называемом "кошачий пищевод").

Лечение композициями, содержащими меполизумаб, можно использовать для лечения COPD в соответствии со способами раскрытия.

Пациенты с "хронической обструктивной болезнью легких" (COPD) могут удовлетворять одному или более из следующих критериев: а) предшествующий диагноз COPD: пациенты с клинически подтвержденной историей COPD в течение по меньшей мере 1 года в соответствии с определением Американского торакального общества/Европейского респираторного общества; б) тяжесть COPD: могут присутствовать пациенты со следующими характеристиками: измеренное соотношение до и после сальбутамола объема форсированного выдоха за одну секунду /форсированной жизненной емкости (FEV_1/FVC) $<0,7$ для подтверждения диагноза COPD; измеренный после сальбутамола $FEV_1 >20\%$ и $\leq 80\%$ от прогнозируемых нормальных значений, рассчитанных с использованием эталонных уравнений Национальной программы проверки здоровья и питания (NHANES) III; в) история обострений: убедительно подтвержденная история (например, проверка медицинской карты) за 12 месяцев: по меньшей мере два умеренных обострения COPD. Умеренное определяется как использование системных кортикостероидов (IM, внутривенно или перорально) и/или лечение антибиотиками или по меньшей мере одно серьезное обострение COPD. Тяжесть определяется как необходимость госпитализации. Примечание: по меньшей мере одно обострение должно было произойти, когда пациент принимал ингаляционный кортикостероид (ICS) вместе с β_2 -агонистом длительного действия (LABA) и антагонистом мускариновой кислоты длительного действия (LAMA). Примечание: раннее использование антибиотиков индивидуально не квалифицируется как умеренное обострение, если только это не было сделано специально для лечения ухудшающихся симптомов COPD; и d) сопутствующая терапия COPD: убедительно подтвержденная необходимость оптимизированного стандарта лечения (SoC) с использованием базовой терапии, которое включает ICS плюс 2 дополнительных лекарственных средства COPD (т.е. тройная терапия) за 12 месяцев до этого и удовлетворяет следующим критериям: непосредственно перед посещением лечащего врача как минимум 3 месяца использования ингаляционного кортикостероида (в дозе >500 мкг/сутки эквивалента дозы флутиказона пропионата) плюс; или LABA и LAMA.

Лечение композициями, содержащими меполизумаб, можно использовать для лечения COPD в соответствии со способами раскрытия.

Используемый в настоящем описании термин "эозинофильный гранулематоз с полиангиитом" (EGPA) означает аутоиммунное состояние, которое вызывает воспаление кровеносных сосудов малого и среднего размера (васкулит) у лиц с аллергической гиперчувствительностью дыхательных путей (атопия). EGPA также можно назвать синдромом Чурга-Стросса (CSS) или аллергическим гранулематозом. EGPA обычно проявляется в три стадии. Ранняя (продромальная) стадия характеризуется воспалением дыхательных путей; почти у всех пациентов наблюдается астма и/или аллергический ринит. Вторая стадия характеризуется аномально высоким количеством эозинофилов (гиперэозинофилия), что приводит к повреждению тканей, чаще всего в легких и пищеварительном тракте. Третья стадия состоит из васкулита, который может в конечном итоге привести к гибели клеток и может быть опасным для жизни.

Пациенты с EGPA могут удовлетворять одному или более из следующих критериев: а) астма; б) уровень эозинофилов в крови превышает 10% от дифференциального количества лейкоцитов; в) наличие мононейропатии или полинейропатии; д) незафиксированные легочные инфильтраты; е) наличие аномалий околоносовых пазух; и f) гистологические данные, касающиеся экстравазкулярных эозинофилов. Для целей классификации считают, что пациент будет иметь EGPA, если по меньшей мере четыре из предыдущих шести критериев являются положительными.

Лечение композициями, содержащими меполизумаб, можно использовать для лечения EGPA в соответствии со способами раскрытия. Композиции раскрытия могут вводиться пациенту EGPA в количестве 300 мг один раз каждые 4 недели.

Термин "гиперэозинофильный синдром" (HES), используемый в настоящем описании, означает заболевание, характеризующееся постоянно повышенным количеством эозинофилов (≥ 1500 эозинофилов/ $мм^3$) в крови в течение по меньшей мере шести месяцев без какой-либо понятной причины с участием либо сердца, нервной системы, либо костного мозга.

Пациенты с гиперэозинофильным синдромом могут удовлетворять одному или более из следующих критериев: а) подтвержденная история гиперэозинофильного синдрома; б) количество эозинофилов крови превышает 1500 клеток в течение 6 месяцев; в) признаки и симптомы участия системы органов; и d) никаких признаков паразитарных, аллергических или других причин эозинофилии после всесторонней оценки.

Лечение композициями, содержащими меполизумаб, можно использовать для лечения гиперэозинофильного синдрома в соответствии со способами раскрытия. Композиции раскрытия могут вводиться пациенту с гиперэозинофильным синдромом в количестве 300 мг один раз каждые 4 недели.

Используемый в настоящем описании термин "полипоз носа" означает заболевание, характеризующееся наличием полипов носовой полости. Такие полипы могут находиться в верхней полости носа и/или могут возникать изнутри остиомеатального комплекса.

Пациенты с полипозом носа могут удовлетворять одному или более из следующих критериев: а)

подтвержденная история полипоза носа; или b) носовые полипы, очевидные при обследовании (например, эндоскопическое обследование).

Лечение композициями, содержащими меполизумаб, можно использовать для лечения полипоза носа в соответствии со способами раскрытия. Композиции раскрытия могут вводиться пациенту с полипозом носа в количестве 750 мг один раз каждые 4 недели.

Используемый в настоящем описании термин "антитело" относится к молекулам с иммуноглобулиноподобным доменом (например, IgG, IgM, IgA, IgD или IgE) и включает моноклональные, рекомбинантные, поликлональные, моноклональные, рекомбинантные, поликлональные, химерные, человеческие и гуманизированные молекулы этого типа. Моноклональные антитела могут быть получены с помощью клона эукариотической клетки, экспрессирующей антитело. Моноклональные антитела также могут продуцироваться эукариотической клеточной линией, которая может рекомбинантно экспрессировать тяжелую цепь и легкую цепь антитела за счет наличия кодирующих их последовательностей нуклеиновых кислот, введенных в клетку. Методы получения антител из различных эукариотических клеточных линий, таких как клетки яичника китайского хомячка, гибридомы или иммортализованные клетки-продуценты антител, имеющие животное (например, человеческое) происхождение, хорошо известны.

Антитело может быть получено из крысы, мыши, приматов (например, яванской макаки, низших узконосых обезьян или человекообразных приматов), человека или из других источников, как, например, с помощью полученных с использованием методов молекулярной биологии нуклеиновых кислот, которые кодируют молекулу антитела.

Антитело может содержать константную область, которая может быть любого изотипа или подкласса. Константная область может относиться к IgG-изотипу, например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или его вариантам. Константная область антигенсвязывающего белка может относиться к IgG1.

Антигенсвязывающий белок может содержать одну или более модификаций, выбранных из мутированного константного домена, так что антитело обладает улучшенными эффекторными функциями/ADCC и/или активацией комплемента.

Антитело может быть способно связываться с целевым антигеном. Примеры таких целевых антигенов включают человеческий IL-5, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11.

Примером антитела является меполизумаб, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2. Меполизумаб связывается с человеческим IL-5 и антагонизирует его активность.

Меполизумаб является рекомбинантным гуманизированным моноклональным антителом (IgG1, κ). Меполизумаб имеет две легкие и две тяжелые цепи.

Тяжелая цепь меполизумаба кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, приведенной в SEQ ID NO: 13. Тяжелая цепь меполизумаба содержит 449 аминокислот с расчетной молекулярной массой, составляющей приблизительно 49 кДа. Прогнозируемая зрелая аминокислотная последовательность тяжелой цепи для меполизумаба представляет собой

QVTLRESGPAIVKPTOTLTLTCTVSGESLTSYSVHWVROPPGKGLEWLGVIWASGGTDY
NSALMSRLSISKDTSENOVVLMTNMDPVDTATYYCARDPPSSLLRLDYWGRGTPVTVSSASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHNTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
 TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN*STYRVVSVLTVLHQD
 WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
 IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
 LSLSPGK (SEQ ID NO: 1)

В вышеприведенной аминокислотной последовательности тяжелой цепи каркасы тяжелой цепи и CDR согласно определению Kabat идентифицированы как подчеркнутый зигзагообразной линией каркас 1, подчеркнутый сплошной линией CDR1, подчеркнутый зигзагообразной линией каркас 2, подчеркнутый сплошной линией CDR2, подчеркнутый зигзагообразной линией каркас 3, подчеркнутый сплошной линией CDR3 и подчеркнутый зигзагообразной линией каркас 4 в порядке от аминокислотной области к С-концевой области представленной последовательности. В вышеуказанной аминокислотной последовательности тяжелой цепи звездочка справа от символа для однобуквенного аминокислотного кода указывает, что аминокислотный остаток слева может быть сайтом N-гликозилирования.

Легкая цепь меполизумаба кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, приведенной в SEQ ID NO: 14. Легкая цепь меполизумаба содержит 220 аминокислотных остатков с молекулярной массой приблизительно 24 кДа. Аминокислотная последовательность зрелой легкой цепи

DI V M T O S P D S L A V S I G E R A T I N C K S S O S L L N S G N O K N Y L A W Y O O K P G O P P K L L I Y G A S T
R E S G V P D R E S G S G S G T D F T L T I S S L O A E D V A V Y Y C O N V H S F P F T E G G G T K L E I K R T V A A P S V F I
F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 2)

В аминокислотной последовательности легкой цепи, приведенной выше, каркасы легкой цепи и CDR в соответствии с определением Kabat идентифицированы как подчеркнутый зигзагообразной линией каркас 1, подчеркнутый сплошной линией CDR1, подчеркнутый зигзагообразной линией каркас 2, подчеркнутый сплошной линией CDR2, подчеркнутый зигзагообразной линией каркас 3, подчеркнутый сплошной линией CDR3 и подчеркнутый зигзагообразной линией каркас 4 в порядке от аминопроксимальной области к С-концевой области представленной последовательности.

Тяжелые и легкие цепи меполизумаба ковалентно связаны с помощью одной дисульфидной связи, а тяжелые цепи связаны друг с другом двумя дисульфидными связями, приводя к получению типичной молекулы IgG. Обе тяжелые цепи могут быть гликозилированы по аспарагину 299 со сложными 2-антенарными олигосахаридами. Прогнозируемая молекулярная масса полипептида составляет примерно 146 кДа, а прогнозируемая молекулярная масса углеводов составляет приблизительно 3 кДа, что дает общую оценочную молекулярную массу, составляющую для меполизумаба 149,2 кДа. Кодированный меполизумаб содержит 1338 аминокислотных остатков (220 аминокислотных остатков на легкую цепь, 449 аминокислотных остатков на тяжелую цепь). Основное pI меполизумаба составляет примерно 8,7-9,1. Равновесная константа диссоциации (KD) для молекулярного взаимодействия меполизумаба и человеческого IL-5, измеренная с использованием стандартных анализов поверхностного плазмонного резонанса, составляет менее чем $2,29 \times 10^{-11}$ М.

Меполизумаб может быть предоставлен в виде лиофилизированного порошка, содержащего антигено и вспомогательные вещества, который может быть восстановлен с помощью фармацевтически приемлемого носителя (например, стерильной воды). Затем эту восстановленную фармацевтическую композицию можно вводить либо подкожно, либо внутривенно (например, с последующим разбавлением). Меполизумаб можно также вводить в виде жидкой композиции, содержащей антигено, вспомогательные вещества и фармацевтически приемлемый носитель. Затем эту жидкую фармацевтическую композицию можно вводить либо подкожно, либо внутривенно (например, с последующим разбавлением).

Используемый в настоящем описании термин "вариант антигена" означает антигено, которое отличается от исходного антигена в силу, по меньшей мере, модификации одной аминокислоты (например, при наличии другой боковой цепи у аминокислоты), посттрансляционной модификации или другой модификации по меньшей мере одной тяжелой цепи, легкой цепи или их комбинации, что приводит к структурному изменению (например, к другой боковой цепи аминокислоты, к другой посттрансляционной модификации или к другой модификации) относительно родительского антигена.

Меполизумаб является примером такого родительского антигена. Структурные изменения могут быть определены прямо различными методами, хорошо известными в данной области, такими как LC-MS, прямое секвенирование, или могут быть определены косвенно с помощью таких методов, как изоэлектрическое фокусирование и т.п. Такие методы хорошо известны специалистам в данной области техники.

Используемый в настоящем описании термин "IL-5" означает человеческий IL-5, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11.

Используемый в настоящем описании термин "специфично связывается" в отношении антигенсвязывающих белков означает, что антигенсвязывающий белок связывается с целевым антигеном, а также с дискретным доменом или с дискретной аминокислотной последовательностью в целевом антигене при отсутствии или с незначительным связыванием с другими (например, неродственными) белками. Однако этот термин не исключает того факта, что антигенсвязывающие белки также могут быть перекрестно-реактивными с близкородственными молекулами (например, с высокой степенью идентичности последовательностей или из другого рода или вида). Антигенсвязывающие белки, представленные в настоящем описании, могут связываться с человеческим IL-5 или с человеческим рецептором IL-5 с аффинностью, которая по меньшей мере в 2, 5, 10, 50, 100 или в 1000 раз выше аффинности, с которой они связываются с близкородственными молекулами.

Аффинность связывания (KD) взаимодействия антигенсвязывающий белок-целевой антиген может составлять 1 мМ или менее, 100 нМ или менее, 10 нМ или менее, 2 нМ или менее или 1 нМ или менее. Альтернативно, KD может составлять от 5 до 10 нМ; или от 1 до 2 нМ. KD может составлять от 1 до 500 мкМ; или от 500 пМ до 1 нМ. Аффинность связывания антигенсвязывающего белка определяется константой ассоциации (Ka) и константой диссоциации (Kd) ($KD=Kd/Ka$). Аффинность связывания может быть измерена с помощью BIACORE™, например, путем захвата тестируемого антигена на поверхность сенсора с покрытием в виде протеином-А и путем обеспечения потока целевого антигена по этой поверхности. Альтернативно, аффинность связывания может быть измерена с помощью FORTEBIO, например, с помощью рецептора тестируемого антигена, захваченного на иглу с покрытием из протеина-А

и путем обеспечения потока целевого антигена по этой поверхности.

K_d может составлять $1 \times 10^{-3} \text{ Mc}^{-1}$ или менее, $1 \times 10^{-4} \text{ Mc}^{-1}$ или менее или $1 \times 10^{-5} \text{ Mc}^{-1}$ или менее. K_d может составлять от 1×10^{-5} до $1 \times 10^{-4} \text{ Mc}^{-1}$ или от 1×10^{-4} до $1 \times 10^{-3} \text{ Mc}^{-1}$. Медленная K_d может приводить к медленной диссоциации комплекса антигенсвязывающий белок-целевой антиген и к улучшенной нейтрализации целевого антигена.

Используемый в настоящем описании термин "антигенспецифичная связывающая активность" означает антигенсвязывающую активность, измеренную с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Специфичную для IL-5 связывающую активность можно определить с помощью SPR с использованием прибора BIACORE™, например, выполняемого в режиме связывания. Это связывающая активность, деленная на общее содержание белка (например, меполизумаба) в образце.

Используемый в настоящем описании термин "FcRn-связывающая активность" означает активность связывания неонатального рецептора Fc (FcRn), измеренную с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Связывание FcRn можно определить с помощью прибора BIACORE™. Это активность связывания с рецептором FcRn, деленная на общую концентрацию белка в образце.

Метод SPR для антигенспецифичного связывания и связывания FcRn использует эталонный стандарт меполизумаба. Эталонный стандарт меполизумаба можно использовать в анализах для получения пригодности системы и данных сопоставимости образцов, чтобы гарантировать, что методы выполняются надлежащим образом. Эталонный стандарт может позволить создать калибровочную кривую, и концентрации образцов интерполируются по кривой.

Например, эталонный стандарт представляет собой композицию, содержащую SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В другом варианте осуществления эталонный стандарт представляет собой композицию, содержащую SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, и 98% или более варианта HC с делетированным C-концевым лизином, и 95% или более варианта HC с N-концевым пироглутаматом. В следующем варианте осуществления эталонный стандарт представляет собой композицию, содержащую SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, и 98% или более варианта HC с C-концевым лизином, 95% или более варианта HC с N-концевым пироглутаматом и 6% или менее дезамидированного варианта. В другом варианте осуществления эталонный стандарт представляет собой композицию, содержащую SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, и 98% или более варианта HC с C-концевым лизином, 95% или более варианта HC с N-концевым пироглутаматом, 6% или менее дезамидированного варианта, 4% или менее варианта, окисленного по метионину или цистеину, и 0,1% варианта, окисленного по триптофану. В следующем варианте осуществления эталонный стандарт представляет собой композицию, содержащую SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, и 98% или более HC с C-концевым лизином, 95% или более варианта HC с N-концевым пироглутаматом, 6% или менее дезамидированного варианта, 4% или менее варианта, окисленного по метионину или цистеину, и 0,1% варианта, окисленного по триптофану, и 0,4% или менее агрегированного варианта. В другом варианте осуществления эталонный стандарт представляет собой композицию, содержащую изоформы, представленные пиком 65, пиком 78, пиком 88, пиком 92, основным пиком и пиком 112, изображенными на фиг. 1. В одном варианте осуществления эталонный стандарт представляет собой композицию, содержащую SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, примерно 62,9% основного пика, примерно 35,9% кислого пика, примерно 1,2% пика, соответствующего основанию, примерно 99,6% мономера, примерно 0,4% агрегата, примерно 0% фрагмента, примерно 0,8% HC с дезамидированным N317, примерно 5,5% HC с дезамидированным N386, примерно 5,2% HC с дезамидированным N31, примерно 0,2% HC с дезамидированным N299, примерно 0,9% HC с окисленным M64, примерно 3,5% HC с окисленным M254, примерно 0,5% HC с окисленным M360, примерно 0,5% HC с окисленным M430, примерно 0,3% HC с окисленными M82 и M85, примерно 0,2% LC с окисленным M4, примерно 0,0% LC с окисленным C220, примерно 0,1% HC с окисленным W52, 98% или более HC с C-концевым лизином, и 95% или более HC с C-концевым пироглутаматом.

В одном варианте осуществления композиция обладает IL-5-специфичной связывающей активностью, составляющей $\geq 0,7$; и FcRn-связывающей активностью $\geq 70\%$. Например, антигенспецифичное связывание антигена находится в диапазоне от 0,7 до 1,3; и/или связывание FcRn находится в диапазоне от 70 до 130% по сравнению с эталонным стандартом, который устанавливается как 1 IL-5-специфичной активности связывания и 100% FcRn-связывающей активности.

Соотношение ED_{50} нейтрализации IL-5 представляет собой ED_{50} стандартного эталонного антитела (например, стандарта антитела меполизумаба, содержащего аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2), деленную на ED_{50} образца антитела (например, образца варианта меполизумаба или образца изготовленной партии композиции, содержащей антитело меполизумаба, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2).

Под "выделенным" подразумевается, что молекула, такая как антигенсвязывающий белок или нуклеиновая кислота, удаляется из среды, в которой она может быть обнаружена в природе. Например, молекула может быть очищена от веществ, с которыми она обычно существует в природе. Например, масса молекулы в образце может составлять 95% от общей массы.

Термины "VH" и "VL" используются в настоящем описании для обозначения вариативной области

тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающего белка соответственно.

"CDR" определяются как аминокислотные последовательности области, определяющей комплементарность, антигенсвязывающего белка. Это гипервариабельные области тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. В вариабельной части иммуноглобулина имеются три тяжелые цепи и три CDR легкой цепи (или области CDR). Таким образом, используемый в настоящем описании термин "CDR" относится ко всем трем CDR тяжелой цепи, всем трем CDR легкой цепи, всем CDR тяжелой и легкой цепи или по меньшей мере к одной CDR, и где по меньшей мере одна CDR представляет собой CDRH3. Каркасные области следуют за каждой из этих областей CDR. Приемлемые области каркаса 1, каркаса 2 и каркаса 3 вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи легко распознаются специалистами в данной области техники. Приемлемые константные области тяжелой цепи (включая шарнирные области) и константные области легкой цепи также легко распознаются специалистами в данной области техники. Приемлемые изоформы антител также легко распознаются специалистами в области техники.

В теле всего настоящего описания аминокислотные остатки в последовательностях вариабельных доменов и в последовательностях полноразмерных антител нумеруются в соответствии с правилами нумерации по Kabat. Аналогично, термины "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3", используемые в описании, соответствуют правилам нумерации по Kabat.

Специалистам в данной области техники будет очевидно, что существуют альтернативные правила нумерации аминокислотных остатков в последовательностях вариабельных доменов и в последовательностях полноразмерных антител. Существуют также альтернативные правила нумерации для последовательностей CDR, например те, которые указаны в соответствии с правилами нумерации Chothia. Структура и сворачивание белков антитела могут означать, что другие остатки считаются частью CDR-последовательности и являются такими, как это понимают специалисты в данной области.

Другие правила нумерации для последовательностей CDR, доступные для квалифицированного специалиста, включают методы "AbM" (университет Бата) и "контакт" (университетский колледж в Лондоне). Минимальная область перекрытия, использующая по меньшей мере два из методов Kabat, Chothia, AbM и контактов, может быть определена для обеспечения "минимальной единицы связывания". Минимальная единица связывания может быть субчастью CDR.

В табл. 5 ниже представлено одно определение, использующее каждое правило нумерации для каждого CDR или единицы связывания. Схема нумерации Kabat используется в табл. 5 для обозначения аминокислотной последовательности вариабельного домена. Следует отметить, что некоторые из определений CDR могут варьироваться в зависимости от используемой отдельной публикации.

Таблица 5

	Kabat CDR	Chothia CDR	AbM CDR	«Контакт» CDR	Минимальная единица связывания
H1	31-35/35A/35B	26-32/33/34	26-35/35A/35B	30-35/35A/35B	31-32
H2	50-65	52-56	50-58	47-58	52-56
H3	95-102	95-102	95-102	93-101	95-101
L1	24-34	24-34	24-34	30-36	30-34
L2	50-56	50-56	50-56	46-55	50-55
L3	89-97	89-97	89-97	89-96	89-96

"Процент идентичности" между искомой последовательностью нуклеиновой кислоты и предметной последовательностью нуклеиновой кислоты представляет собой значение "идентичности", выраженное в процентах, которое рассчитывается по алгоритму BLASTN, когда предметная последовательность нуклеиновой кислоты имеет 100%-ное перекрытие с искомой последовательностью нуклеиновой кислоты после осуществления парного выравнивания BLASTN. Такие парные выравнивания BLASTN между искомой последовательностью нуклеиновой кислоты и предметной последовательностью нуклеиновой кислоты выполняются с использованием стандартных параметров алгоритма BLASTN, доступных на веб-сайте Национального центра биотехнологического института, с отключенным фильтром для областей с низкой степенью сложности. Важно отметить, что искомая последовательность может быть описана последовательностью нуклеиновой кислоты, идентифицированной в одном или более пунктах формулы изобретения.

Последовательности нуклеиновых кислот, которые могут быть полезными и включены в композиции и связанные с ними способы раскрытия, могут иметь примерно от 85 примерно до 100%, примерно от 90 примерно до 100%, примерно от 95 примерно до 100%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% и примерно 100% идентичности с последовательностями нуклеиновой кислоты, идентифицированными в раскрытии (например, с нуклеиновыми кислотами, кодирующими тяжелую цепь антитела или легкую цепь антитела). В раскрытии процент идентичности между описанными последовательностями нуклеиновой кислоты может включать любой дискретный субдиапазон диапазонов процента идентичности, указанных выше (например, любой диапазон целых значений внутри определенного диапазона или дискретные субзначения в определенном диапазоне).

"Процент идентичности" между искомой аминокислотной последовательностью и предметной аминокислотной последовательностью представляет собой значение "идентичности", выраженное в процентах, которое рассчитывается по алгоритму BLASTP, когда предметная аминокислотная последовательность имеет 100%-ное искомое перекрытие с искомой аминокислотной последовательностью после парного выравнивания BLASTP. Такие парные выравнивания BLASTP между искомой аминокислотной последовательностью и предметной аминокислотной последовательностью выполняются с использованием стандартных параметров алгоритма BLASTP, доступных на веб-сайте Национального центра биотехнологического института, при отключенном фильтре для областей с низкой степенью сложности. Важно отметить, что искомая последовательность может быть описана аминокислотной последовательностью, идентифицированной в одном или более пунктах формулы изобретения.

Аминокислотные последовательности, которые могут быть полезны и включены в композиции, и связанные с ними способы раскрытия могут иметь примерно от 85 примерно до 100%, примерно от 90 примерно до 100%, примерно от 95 примерно до 100%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% и примерно 100% идентичности с аминокислотными последовательностями, идентифицированными в раскрытии (например, с тяжелой цепью антитела или с легкой цепью антитела). В раскрытии процент идентичности между описанными аминокислотными последовательностями может включать в себя любой дискретный субдиапазон диапазона процентов идентичности, указанных выше (например, любой диапазон целых значений в определенном диапазоне или дискретные субзначения в определенном диапазоне).

Каждый из терминов "пептид", "полипептид", "белок" и "пептидная цепь" относится к молекуле, содержащей два или более аминокислотных остатка. Пептид может быть мономерным или полимерным.

В данной области хорошо известно, что некоторые аминокислотные замены считаются "консервативными". Аминокислоты делятся на группы на основании общих свойств боковой цепи, и замены внутри групп, которые сохраняют всю или, по существу, всю аффинность связывания антигенсвязывающего белка, рассматриваются как консервативные замены. См. табл. 6. Раскрытые в настоящем описании антигенсвязывающие белки могут содержать такие "консервативные" аминокислотные замены.

Таблица 6

Боковая цепь	Члены
Гидрофобные	met, ala, val, leu, ile
Нейтральные гидрофильные	cys, ser, thr
Кислые	asp, glu
Со свойствами основания	asn, gln, his, lys, arg
Остатки, которые влияют на ориентацию цепей	gly, pro
Ароматические	trp, tyr, phe

Используемый в настоящем описании термин "фармацевтическая композиция" означает композицию, подходящую для введения пациенту.

Фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, могут содержать очищенные препараты антитела, представленного в настоящем описании.

Например, фармацевтический препарат может содержать очищенный препарат антитела, как представлено в настоящем описании, в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Как правило, такие фармацевтические композиции содержат фармацевтически приемлемый носитель, как известно и необходимо в соответствии с приемлемой фармацевтической практикой. Примеры таких носителей включают стерилизованные носители, такие как физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы, необязательно забуференный подходящими буферами до pH в диапазоне 5-8.

Фармацевтические композиции могут быть введены инъекцией или инфузией (например, внутривенной, внутривенной, внутримышечной, подкожной, внутримышечной или интрапортальной). Такие композиции соответственно не содержат видимых твердых частиц. Фармацевтические композиции могут содержать от 1 мг до 10 г антигенсвязывающего белка, например от 5 мг до 1 г антигенсвязывающего белка. Альтернативно, композиция может содержать от 5 до 500 мг антигенсвязывающего белка, например, от 5 до 50 мг.

Методы получения таких фармацевтических композиций хорошо известны специалистам в данной области. Фармацевтические композиции могут содержать от 1 мг до 10 г антигенсвязывающего белка в стандартной лекарственной форме, необязательно вместе с инструкциями по применению. Фармацевтические композиции могут быть лиофилизированы (высушенные вымораживанием) для восстановления перед введением в соответствии с методами, хорошо известными или очевидными специалистам в данной области. В тех случаях, когда антитела относятся к изотипу IgG1, в фармацевтическую композицию может быть добавлен хелатор меди, такой как цитрат (например, цитрат натрия) или ЭДТА или гистидин, для снижения степени деградацией антител этого изотипа, опосредованной медью. Фармацевтические композиции могут также содержать солибулизатор, такой как аргинин, поверхностно-активное вещество/агент антиагрегации, такой как полисорбат 80, и инертный газ, такой как азот, для замены кислорода в свободном пространстве.

Используемый в настоящем описании термин "терапевтически эффективное количество" означает количество агента (такого как антитело или фармацевтическая композиция), которое обеспечивает терапевтическую пользу при лечении или терапии одного или более симптомов состояния, подлежащего лечению (такого как астма, тяжелая эозинофильная астма, неконтролируемая эозинофильная астма, эозинофильная астма, субэозинофильная астма, хроническая обструктивная болезнь легких, эозинофильный гранулематоз с полиангиитом (EGPA), гиперэозинофильный синдром и полипоз носа). Примеры такого лечения или терапии одного или более симптомов астмы, включая тяжелую эозинофильную астму, неконтролируемую эозинофильную астму, эозинофильную астму или субэозинофильную астму, включают 1) уменьшение частоты обострений астмы; 2) уменьшение времени до первого клинически значимого обострения, требующего пероральных или системных кортикостероидов, госпитализации и/или посещения отделения неотложной помощи (ED); 3) уменьшение частоты обострений, требующих госпитализации (включая интубацию и прием в отделение интенсивной терапии) или посещения ED; 4) уменьшение времени до первого обострения, требующего госпитализации или посещения ED; 5) изменение от исходного уровня клинического FEV₁ до бронходилататора; 6) изменение от исходного уровня клинического FEV₁ после бронходилататора; 7) изменение от исходного уровня в оценках опросника по контролю астмы (ACQ); 8) улучшенная легочная функция, определяемая спирометрией (например, жизненная емкость (VC), форсированная жизненная емкость (FVC), объем форсированного выдоха (FEV) в интервалы времени 0,5, 1 (FEV₁), 2 и 3 с, скорость форсированного выдоха 25-75% (FEF 25-75) и максимальная произвольная вентиляция (MW) суммарная емкость легких, идеальный объем, остаточный объем, объем выдыхаемого резерва, объем резерва вдоха, мощность вдоха, жизненная емкость вдоха, жизненная емкость, функциональная остаточная емкость, остаточный объем, выраженный в процентах от общей массы легких, объем альвеолярного газа, фактический объем легкого, включая объем проводящих дыхательных путей, форсированная жизненная емкость и т.д.); и 9) уменьшение обострений астмы, требующих стероидов для контроля (таких как пероральные стероиды или подобные стероидам преднизон, преднизолон и т.д., вводимые любым путем). Такое уменьшение обострений астмы, требующих стероидов для контроля, может представлять собой уменьшение приблизительно на 50% обострений, требующих стероидов (например, пероральных стероидов).

Терапевтически эффективные количества и схемы лечения обычно определяют эмпирически и могут зависеть от таких факторов, как возраст, масса и состояние здоровья пациента, а также заболевание или расстройство, подлежащие лечению. Такие факторы находятся в компетенции лечащего врача.

Доза антигенсвязывающего белка, вводимого пациенту, обычно составляет от 1 мкг/кг до 150 мг/кг, от 0,1 до 100 мг/кг, от 0,5 до 50 мг/кг, от 1 до 25 мг/кг, примерно от 0,3 примерно до 3 мг/кг или от 1 до 10 мг/кг массы тела пациента. Например, доза может составлять 10, 30 или 60 мг/кг. Доза может также составлять от 10 до 110 мг/кг, от 15 до 25 мг/кг или от 15 до 100 мг/кг. Антигенсвязывающий белок может быть введен, например, парентерально, подкожно, внутривенно или внутримышечно. Дозы могут также вводиться в зависимости от пациента, например, примерно от 20 мг на одного пациента примерно до 750 мг на одного пациента, примерно от 75 мг на пациента примерно до 750 мг на одного пациента, примерно от 20 мг на пациента примерно до 200 мг на пациента. Доза может представлять собой любой дискретный субдиапазон в этих диапазонах доз. Например, доза (например, доза меполизумаба или фармацевтической композиции, содержащей меполизумаб) также может быть введена подкожно пациенту в расчете на одного пациента, как, например, примерно 100 мг на одного пациента (например, один раз каждые четыре недели) или 300 мг на одного пациента (или другие вводимые дозы могут быть введены подкожно, при условии, что достигается такая же или сопоставимая биодоступность, как при внутривенном введении, например, три дозы по 100 мг на одного пациента для достижения общей дозы, вводимой подкожно по 300 мг на одного пациента).

Диапазоны любого типа, представленные в настоящем описании, включают в себя все значения в пределах определенного диапазона и значения, касающиеся конечной точки для определенного диапазона.

Если целесообразно, эффективную суточную дозу терапевтической композиции можно вводить в виде двух, трех, четырех, пяти, шести или более доз, вводимых отдельно через соответствующие интервалы в течение суток, необязательно, в стандартных лекарственных формах.

Введение дозы может осуществляться медленной непрерывной инфузией в течение периода от 2 до 24 ч, как, например, от 2 до 12 ч или от 2 до 6 ч. Такое введение может приводить к уменьшению побочных эффектов.

Введение дозы может повторяться один или несколько раз по мере необходимости, например три раза в день, один раз в день, один раз в два дня, один раз в неделю, один раз в каждые 14 дней, один раз в месяц, один раз в 3 месяца, один раз каждые 4 месяца, один раз каждые 6 месяцев или один раз в 12 месяцев. Антигенсвязывающие белки могут быть введены с помощью поддерживающей терапии, например, один раз в неделю в течение 6 месяцев и более. Антигенсвязывающие белки могут быть введены с помощью прерывистой терапии, например, в течение периода времени от 3 до 6 месяцев, а затем без дозы в течение 3-6 месяцев с последующим введением антигенсвязывающих белков снова в течение 3-6 месяцев и т.д. по циклу.

Например, дозу можно вводить подкожно один раз каждые 14 или 28 дней в виде нескольких доз в

каждый день введения. В одном варианте осуществления дозировка композиции составляет 100 мг один раз каждые 4 недели (28 дней).

Антигенсвязывающий белок может вводиться пациенту таким образом, чтобы терапия была направлена на конкретный сайт.

Антигенсвязывающий белок в способах раскрытия может использоваться в комбинации с одним или более другими терапевтически активными агентами, такими как антитела или низкомолекулярные ингибиторы.

Используемый в настоящем описании термин "лечение" и его грамматические вариации означает терапевтическую терапию. В отношении конкретного состояния лечение означает: (1) улучшение состояния одного или более биологических проявлений состояния, (2) препятствие а) одному или более моментам в биологическом каскаде, который приводит к состоянию или отвечает за него, или б) одному или более биологическим проявлениям состояния, (3) облегчение одного или более симптомов, эффектов или побочных эффектов, связанных с состоянием или его лечением, (4) замедление прогрессирования состояния или одного или более биологических проявлений состояния или (5) предотвращение наступления одного или более биологических проявлений состояния. Профилактическая терапия также рассматривается. Специалисту в данной области будет понятно, что "предотвращение" не является абсолютным термином. В медицине подразумевается, что "предотвращение" относится к профилактическому введению лекарственного средства для существенного уменьшения вероятности или тяжести состояния или его биологического проявления или для отсрочки начала такого состояния или его биологического проявления.

Термины "индивидуум", "объект" и "пациент" используются в настоящем описании взаимозаменяемо. Пациентом, как правило, является человек. Объектом может быть также млекопитающее, такое как мышь, крыса или примат (например, мартышка или обезьяна). Объектом может быть животное, не являющееся человеком. Антигенсвязывающие белки, композиции и способы раскрытия также имеют ветеринарное применение. Подлежащим лечению объектом может быть фермерское животное, например корова или бык, овца, свинья, вол, коза или лошадь, или может быть домашним животным, таким как собака или кошка. Животное может быть любого возраста или может быть зрелым взрослым животным.

Лечение может быть терапевтическим, профилактическим или превентивным. Объектом будет тот, кто в нем нуждается. Те, кто нуждается в лечении, могут включать индивидуумов, уже страдающих определенным заболеванием, в дополнение к тем, у кого заболевание может развиться в будущем.

Таким образом, способы, антигенсвязывающие белки и композиции раскрытия, представленные в настоящем описании, могут быть использованы для профилактического или превентивного лечения, если это указано. В этом случае способы, антигенсвязывающие белки и композиции раскрытия могут быть использованы для предотвращения или отсрочки начала одного или более аспектов или симптомов заболевания. Объект может быть бессимптомным. Объект может иметь генетическую предрасположенность к заболеванию. Профилактически эффективное количество антигенсвязывающего белка вводится такому индивидууму. Профилактически эффективное количество представляет собой количество, которое предотвращает или отсрочивает начало одного или более аспектов или симптомов представленного в настоящем описании заболевания.

Способы, антигенсвязывающие белки и композиции раскрытия необязательно влияют на полное излечение или устранение каждого симптома или проявления заболевания, чтобы при этом быть жизнеспособным терапевтическим лечением. В данной области признается, что лекарственные средства, которые используют в качестве терапевтических агентов в способах лечения, и могут снизить тяжесть данного болезненного состояния, но не обязательно отменяют каждое проявление заболевания, следует рассматривать как полезные терапевтические агенты. Точно так же профилактически вводимое лечение необязательно является полностью эффективным в предотвращении возникновения заболевания, чтобы при этом быть жизнеспособным профилактическим агентом. Простое снижение воздействия болезни (например, уменьшение количества или тяжести ее симптомов или повышение эффективности другого лечения или создание другого благоприятного эффекта) или снижение вероятности возникновения заболевания (например, отсрочка начала заболевания) или ухудшение состояния объекта, является достаточным.

Одним из аспектов изобретения является композиция, содержащая антитело, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2, или вариант антитела, имеющий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности тяжелой цепи, и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности легкой цепи, где композиция содержит $\leq 80\%$ кислых вариантов антител.

В одном варианте осуществления композиция обладает а) $\geq 0,7$ IL-5-специфичным связыванием с антигеном; и/или б) $\geq 70\%$ связывания с FcRn. IL-5-специфичное связывание антигена, такое как связывание с человеческим IL-5, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, можно

измерить, используя стандартные анализы, такие как поверхностный плазмонный резонанс (например, BIACORE™), которые хорошо известны в данной области техники. Связывание FcRn можно аналогичным образом измерить с использованием стандартных анализов, таких как поверхностный плазмонный резонанс (например, BIACORE™), которые хорошо известны в данной области техники.

В другом варианте осуществления а) антигенспецифичное связывание находится в диапазоне от 0,70 до 1,30; и/или б) связывание FcRn находится в диапазоне от 70 до 130%. В некоторых вариантах осуществления антигенспецифичное связывание может находиться в диапазоне примерно от 0,9 до 1,1, от 0,75 примерно до 1, примерно от 0,7 примерно до 0,8, примерно 0,7, примерно от 0,91 примерно до 0,95, примерно от 0,994 примерно до 0,997 или примерно от 0,7 примерно до 0,9. В некоторых вариантах осуществления связывание FcRn находится в диапазоне примерно от 70 примерно до 100%, примерно от 100 примерно до 130%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90%, примерно 100%, примерно 110%, примерно 120%, примерно от 80 примерно до 90%, примерно от 80 примерно до 100%, примерно от 100 примерно до 110%, примерно от 110 примерно до 120%, примерно от 120 примерно до 130%, примерно от 80 примерно до 120%, примерно от 90 примерно до 110%.

В одном варианте осуществления композиция содержит $\leq 80\%$ кислых вариантов антител. Например, композиция может содержать $\leq 75\%$, $\leq 70\%$, $\leq 65\%$, $\leq 60\%$, $\leq 55\%$, $\leq 50\%$ или $\leq 45\%$ кислых вариантов антител.

В другом варианте осуществления композиция содержит $\leq 35\%$ дезамидированных вариантов антител.

В другом варианте осуществления композиция содержит $\leq 25\%$ дезамидированных вариантов антител аминокислотной последовательности легкой цепи по N31. Например, композиция может содержать $\leq 22,5\%$, $\leq 20\%$, $\leq 7,5\%$, $\leq 15\%$, $\leq 12,5$, $\leq 10\%$ или $\leq 7,5\%$ дезамидированных вариантов антитела по N31 аминокислотной последовательности легкой цепи.

В другом варианте осуществления композиция содержит $\leq 35\%$ дезамидированного варианта антитела по N386 аминокислотной последовательности тяжелой цепи. Например, композиция может содержать $\leq 32,5\%$, $\leq 30\%$, $\leq 25,5\%$ или $\leq 20\%$, $\leq 17,5\%$, $\leq 15\%$, $\leq 12,5\%$, $\leq 10\%$ или $\leq 7,5\%$ дезамидированных вариантов антител по N386 аминокислотной последовательности тяжелой цепи.

В другом варианте осуществления композиция содержит $\leq 55\%$ окисленных вариантов антител.

В другом варианте осуществления композиция содержит $\leq 55\%$ окисленных вариантов антител в любом одном или в комбинации положений а) M64 аминокислотной последовательности тяжелой цепи; б) M254 аминокислотной последовательности тяжелой цепи; и/или с) M430 аминокислотной последовательности тяжелой цепи. Например, композиция может содержать $\leq 50\%$, $\leq 45\%$, $\leq 40\%$, $\leq 35\%$, $\leq 30\%$ или $\leq 25\%$, $\leq 20\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$ или $\leq 5\%$ окисленных вариантов антитела в положении M64, M254 и/или M430 аминокислотной последовательности тяжелой цепи.

В другом варианте осуществления композиция содержит $\leq 3\%$ окисленных вариантов антител в положении W52 аминокислотной последовательности тяжелой цепи. Например, композиция может содержать $\leq 2,5\%$, $\leq 2\%$, $\leq 1,5\%$, $\leq 1\%$, $\leq 0,5\%$, $\leq 0,4\%$, $\leq 0,3\%$, $\leq 0,25\%$, $\leq 0,2\%$, $\leq 0,15\%$ или $\leq 0,1\%$ окисленных вариантов антител в положении W52 аминокислотной последовательности тяжелой цепи.

В другом варианте осуществления количество дезамидированного антитела и/или количество окисленного варианта определяют с помощью пептидного картирования LC-MS/MS.

В другом варианте осуществления композиция содержит $\leq 20\%$ агрегированных вариантов антител. Например, композиция может содержать $\leq 17,5\%$, $\leq 15\%$, $\leq 12,5$, $\leq 10\%$, $\leq 7,5\%$, $\leq 5\%$ или $\leq 4\%$ агрегированных вариантов. Композиции могут содержать агрегированные антитела в количестве, меньшем или равном 3%, 2%, 1% или 0,5%. Композиция может содержать мономерные антитела в количестве, большем или равном 98%.

В другом варианте осуществления агрегированные варианты антител содержат димер. Такое агрегированное антитело может содержать две молекулы антитела (например, две молекулы антитела IgG1).

В другом варианте осуществления количество агрегированного варианта антитела определяют с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC). Методы осуществления эксклюзионной хроматографии и измерения размера молекулы белка хорошо известны в данной области.

В другом варианте осуществления композиция содержит $\geq 50\%$ вариантов антитела с делетированным С-концевым лизином в положении K449 аминокислотной последовательности тяжелой цепи. Например, композиция может содержать $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, ≥ 75 , $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$ или $\geq 95\%$ вариантов антитела с делетированным С-концевым лизином в положении K449 аминокислотной последовательности тяжелой цепи.

В другом варианте осуществления композиция содержит $\geq 50\%$ вариантов антител с N-концевым пироглутаматом в аминокислотной последовательности тяжелой цепи. Например, композиция может содержать $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, ≥ 75 , $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$ или $\geq 95\%$ вариантов антител с N-концевым пироглутаматом в аминокислотной последовательности тяжелой цепи.

В другом варианте осуществления композиция содержит белок клетки-хозяин (HCP). HCP может

иметь происхождение из СНО-клетки. НСР представляет собой примесь, связанную с процессом, в отличие от веществ, связанных с продуктом меполизумаба (например, меполизумаб плюс варианты меполизумаба). Промышленные стандартные допустимые пределы для НСР могут составлять до 100 м.д. (равно 100 нг/мг). Содержание НСР в композиции, представленной в настоящем описании, может составлять ≤ 50 нг/мг, ≤ 40 нг/мг, ≤ 30 нг/мг или ≤ 20 нг/мг. Например, содержание НСР в композиции может составлять ≤ 10 нг/мг. В конкретном варианте осуществления содержание НСР в композиции может составлять ≤ 5 нг/мг или ≤ 2 нг/мг.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая антитело, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2, или вариант антитела, имеющий аминокислотную последовательность тяжелую цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности тяжелой цепи, и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности легкой цепи, где композиция содержит $\leq 80\%$ кислых вариантов антител и $\leq 20\%$ агрегированных вариантов антител.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая антитело, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2, или вариант антитела, имеющий аминокислотную последовательность тяжелую цепь, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности тяжелой цепи, и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности легкой цепи, где композиция содержит $\leq 25\%$ дезамидированных вариантов антител в положении N31 аминокислотной последовательности легкой цепи и $\leq 20\%$ агрегированных вариантов антител.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая антитело, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2, или вариант антитела, имеющий аминокислотную последовательность тяжелую цепь, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности тяжелой цепи, и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности легкой цепи, где композиция содержит $\leq 25\%$ дезамидированных вариантов антител в положении N31 аминокислотной последовательности легкой цепи; $\leq 55\%$ окисленных вариантов антител в положении M64 аминокислотной последовательности тяжелой цепи; $\leq 3\%$ окисленных вариантов в положении W52 аминокислотной последовательности тяжелой цепи и $\leq 20\%$ агрегированных вариантов антител.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая антитело, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2, или вариант антитела, имеющий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности тяжелой цепи, и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности легкой цепи, где композиция содержит $\leq 25\%$ дезамидированных вариантов антител в положении N31 аминокислотной последовательности легкой цепи; $\leq 35\%$ дезамидированных вариантов антител в положении N386 аминокислотной последовательности тяжелой цепи и $\leq 20\%$ агрегированных вариантов антител.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая антитело, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2, или вариант антитела, имеющий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности тяжелой цепи, и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности легкой цепи, где композиция содержит $\leq 25\%$ дезамидированных вариантов антител в положении N31 аминокислотной последовательности легкой цепи; $\leq 35\%$ дезамидированных вариантов антител в положении N386 аминокислотной последовательности тяжелой цепи; $\leq 55\%$ окисленных вариантов антител в положении M64 аминокислотной последовательности тяжелой цепи, в положении M254 аминокислотной последовательности тяжелой цепи, в положении M430 аминокислотной последовательности тяжелой цепи; $\leq 3\%$ окисленных вариантов антител в положении W52 аминокислотной последовательности тяжелой цепи и $\leq 20\%$ агрегированных вариантов антител.

Композиции раскрытия могут дополнительно содержать буферный агент, выбранный из группы, состоящей из гептагидрата двухосновного фосфата натрия, фосфата, лимонной кислоты, цитрата, фосфата натрия, фосфата калия, цитрата натрия и гистидина, обеспечивая рН от 6,8 до 7,2 или рН от 6,2 до 6,6, причем значение рН 6,3 является предпочтительным. Буфер в композициях раскрытия может присутствовать в диапазоне примерно от 10 до 30 мМ, примерно 10-20 мМ, примерно 20 мМ или примерно 15,5 мМ. Например, буфер в композициях раскрытия присутствует в количестве, составляющем примерно 20

мМ или примерно 15,5 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия.

Композиции раскрытия могут содержать буферные агенты в виде гептагидрата двухосновного фосфата натрия и лимонной кислоты, обеспечивающие рН от 6,2 до 6,6 включительно, при этом значение рН 6,3 является предпочтительным. Буферный агент в виде гептагидрата двухосновного фосфата натрия может присутствовать в диапазоне примерно от 15-16,4 мМ, и буферный агент в виде лимонной кислоты может присутствовать в диапазоне примерно от 3,8-4,9 мМ. Например, композиции раскрытия могут содержать примерно 15,5 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия и примерно 4,5 мМ моногидрата лимонной кислоты.

Композиции раскрытия могут дополнительно содержать сахар. Композиции раскрытия могут дополнительно содержать сахарозу. Сахароза может присутствовать в композициях раскрытия в диапазоне примерно от 5-20% мас./об.; примерно 10-15% мас./об., примерно 11-13% мас./об. или примерно 12% мас./об.

Композиции раскрытия могут дополнительно содержать полисорбат 80. Полисорбат 80 может присутствовать в диапазоне примерно от 0,01-0,1% мас./об. Например, полисорбат 80 может присутствовать в композициях раскрытия в количестве примерно 0,02% мас./об. или примерно 0,05% мас./об.

Композиции раскрытия могут дополнительно содержать ЭДТА. ЭДТА может присутствовать в диапазоне примерно от 0,01-0,1 мМ. Например, ЭДТА может присутствовать в количестве, составляющем примерно 0,05 мМ.

В одном варианте осуществления композиции раскрытия дополнительно содержат 20 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 12% мас./об. сахарозы и 0,05% мас./об. полисорбата 80.

В другом варианте осуществления композиции раскрытия дополнительно содержат 15,5 мМ двухосновного фосфата натрия, 3,9 мМ моногидрата лимонной кислоты, 12% мас./об. сахарозы, 0,02% мас./об. полисорбата 80 и 0,05 мМ ЭДТА.

Композиции раскрытия могут содержать водный жидкий состав при рН 6,2, содержащий 16,1 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 3,9 мМ моногидрата лимонной кислоты, 12% мас./об. сахарозы, 0,02% мас./об. полисорбата 80 и 0,05 мМ ЭДТА.

Композиции раскрытия могут содержать водный жидкий состав при рН 6,2, содержащий 15,2 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 4,8 мМ моногидрата лимонной кислоты, 12% мас./об. сахарозы, 0,02% мас./об. полисорбата 80 и 0,05 мМ ЭДТА.

Композиции раскрытия могут содержать водный жидкий состав при рН 6,4, содержащий 15,8 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 4,2 мМ моногидрата лимонной кислоты, 12% мас./об. сахарозы, 0,02% мас./об. полисорбата 80 и 0,05 мМ ЭДТА.

Композиции раскрытия могут содержать водный жидкий состав при рН 6,6, содержащий 16,3 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 3,7 мМ моногидрата лимонной кислоты, 12% мас./об. сахарозы, 0,02% мас./об. полисорбата 80 и 0,05 мМ ЭДТА.

Композиции раскрытия могут содержать водный жидкий состав при рН 6,3, содержащий 15,5 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 4,5 мМ моногидрата лимонной кислоты, 12% мас./об. сахарозы, 0,02% мас./об. полисорбата 80 и 0,05 мМ ЭДТА. Важно отметить, что стадия тангенциальной фильтрации и ультрафильтрации примера 1 ниже может быть скорректирована для получения композиций раскрытия, таких как композиция раскрытия, содержащая 15,5 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 4,5 мМ моногидрата лимонной кислоты, 12% мас./об. сахарозы, 0,02% мас./об. полисорбата 80, 0,05 мМ ЭДТА при рН 6,3 или другие подобные жидкие составы.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая очищенный препарат моноклонального антитела и буферный агент, где рН композиции составляет от 6,8 до 7,2, где буферным агентом является гистидин, фосфат, лимонная кислота, цитрат или его соль, где очищенный препарат содержит изоформы, представленные пиком 65, пиком 78, пиком 88, пиком 92, основным пиком и пиком 112, изображенными на фиг. 1, где антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, и где антитело продуцируется клеткой яичника китайского хомячка. В композиции тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95, 96, 96,88, 97, 98 или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1. В композиции легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98%, 98,63 или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2.

В одном варианте осуществления буферный агент представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из гептагидрата двухосновного фосфата натрия, фосфата, лимонной кислоты и цитрата.

В другом варианте осуществления буферным агентом является фосфат натрия, фосфат калия или цитрат натрия.

В другом варианте осуществления композиция дополнительно содержит сахар, углевод и/или соль.

В другом варианте осуществления композиция содержит сахарозу.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая очищенный препарат моноклонального антитела и буферный агент, где рН композиции составляет от 6,8 до 7,2, где буферным агентом является фосфат или его соль, где очищенный препарат содержит изоформы, представленные пиком 65, пиком 78, пиком 88, пиком 92, основным пиком и пиком 112, изображенными на фиг. 1, где антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, и где антитело продуцируется клеткой яичника китайского хомячка.

В другом варианте осуществления буферный агент представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из гептагидрата двухосновного фосфата натрия, фосфата, лимонной кислоты и цитрата.

В другом варианте осуществления композиция дополнительно содержит сахар.

В другом варианте осуществления сахар представляет собой сахарозу.

В другом варианте осуществления композиция содержит полисорбат 80.

В другом варианте осуществления композиция содержит один состав, выбранный из первого состава, включающего 20 мМ гептагидрат двухосновного фосфата натрия, 12% мас./об. сахарозы и 0,05% мас./об. полисорбата 80; и второго состава, включающего 15,5 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 3,9 мМ моногидрата лимонной кислоты, 12% мас./об. сахарозы, 0,02% мас./об. полисорбата 80 и 0,05 мМ ЭДТА; и третьего состава, включающего 26 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 15% мас./об. сахарозы и 0,065% мас./об. полисорбата 80. Композиция может иметь рН примерно от 6,8 примерно до 7,2, примерно от 6,1 примерно до 6,5 или примерно от 6 примерно до 6,6.

В другом варианте осуществления антитело имеет константу диссоциации, равную или меньшую чем примерно $3,5 \times 10^{-41}$ М для человеческого интерлейкина-5, имеющего аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая а) антитело против IL-5, содержащее последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 1, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2; и б) основную форму антитела, содержащую белок в количестве, превышающем или равном 50% белка в композиции, измеренном с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции. Основная форма антитела может также содержать белок в количестве, превышающем или равном 57,9%, 59,4% и 60% белка в композиции, измеренном с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции.

В другом варианте осуществления основная форма антитела содержит по меньшей мере один окисленный аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по триптофану 52, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 64, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 82, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 85, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по цистеину 222, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 254, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 360, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 430, аминокислотного остатка легкой цепи, окисленного по метионину 4, и аминокислотного остатка легкой цепи, окисленного по цистеину 220.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая а) антитело против IL-5, содержащее последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 1, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2; б) основную форму антитела, содержащую белок в количестве, превышающем или равном 50% белка в композиции, измеренном с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции; и с) кислые формы антитела, содержащие белок в количестве примерно от 20% примерно до 45% белка в композиции, измеренном с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции. Кислые формы антитела могут также содержать белок в количестве, превышающем или равном 37,6%, 37,8%, 38,4% и 39,8% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции. Общая площадь кислого пика, определяемая сIEF, может достигать до 72% и сохранять 0,74 IL-5-специфичного связывания и 80% связывания FcRn.

В другом варианте осуществления кислые формы антитела содержат по меньшей мере один пик, выбранный из группы, состоящей из пика 65 кислой формы, пика 78 кислой формы, пика 88 кислой формы и пика 92 кислой формы.

В другом варианте осуществления кислые формы антитела содержат по меньшей мере один дезамидированный аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аминокислотного остатка тяжелой цепи, дезамидированного по аспарагину 299, аминокислотного остатка тяжелой цепи, дезамидированного по аспарагину 317, аминокислотного остатка тяжелой цепи, дезамидированного по аспарагину 386, и аминокислотного остатка легкой цепи, дезамидированного по аспарагину 31. Допустимый

уровень дезамидирования в LC N31 превышает или равен 17% или превышает или равен 17,4%, как измерено с помощью пептидного картирования LC MS/MS). Допустимый уровень дезамидирования в HC 386 превышает или равен 30%, как измерено с помощью пептидного картирования LC MS/MS). Приемлемым верхним уровнем может быть уровень конкретного варианта, который позволяет молекулам антител в композиции сохранять антигенсвязывающую активность примерно от 0,7 примерно до 1,3, как измерено с помощью SPR, и FcRn-связывающую активность примерно от 70% примерно до 130%, как измерено с помощью SPR, или другие антигенсвязывающие активности или значения или диапазоны FcRn-связывающей активности, раскрытые в настоящем описании.

В другом варианте осуществления кислые формы антитела содержат по меньшей мере один окисленный аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по триптофану 52, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 64, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 82, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 85, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по цистеину 222, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 254, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 360, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 430, аминокислотного остатка легкой цепи, окисленного по метионину 4, и аминокислотного остатка легкой цепи, окисленного по цистеину 220. Приемлемые уровни окисления остатков тяжелой цепи антитела, измеренные с помощью пептидного картирования LC-MS/MS, могут составлять примерно 50% для HC M64, M254 и M430 и примерно 3% для HC W52. Приемлемым верхним уровнем может быть уровень конкретного варианта, который позволяет молекулам антител в композиции сохранять антигенсвязывающую активность примерно от 0,7 примерно до 1,3, как измерено с помощью SPR, и FcRn-связывающую активность примерно от 70% примерно до 130%, как измерено с помощью SPR, или другие антигенсвязывающие активности или значения или диапазоны FcRn-связывающей активности, раскрытые в настоящем описании.

В другом варианте осуществления основная форма антитела содержит по меньшей мере один окисленный аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по триптофану 52, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 64, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 82, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 85, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по цистеину 222, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 254, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 360, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 430, аминокислотного остатка легкой цепи, окисленного по метионину 4, и аминокислотного остатка легкой цепи, окисленного по цистеину 220; и кислые формы антитела содержат по меньшей мере один окисленный аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по триптофану 52, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 64, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 82, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 85, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по цистеину 222, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 254, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 360, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 430, аминокислотного остатка легкой цепи, окисленного по метионину 4, и аминокислотного остатка легкой цепи, окисленного по цистеину 220.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая а) антитело против IL-5, содержащее последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 1, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2; б) основную форму антитела, содержащую белок в количестве, превышающем или равном 50% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции; и с) форму антитела как основания, содержащую примерно от 1% примерно до 15% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции. Форма антитела как основания также может содержать белок в количестве, превышающем или равном 2,2% и 2,3% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции.

В другом варианте осуществления форма антитела как основания содержит форму как основание в виде пика 112.

В другом варианте осуществления форма антитела как основания содержит тяжелую цепь, имеющую C-концевой остаток, который представляет собой глицин 448.

В другом варианте осуществления формы антитела как основания содержат по меньшей мере один окисленный аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по триптофану 52, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 64, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 82, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 85, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по цистеину 222, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 254, амино-

жет содержать аминокислотную последовательность, имеющую 93%, 94% или 94,11% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая а) антитело против IL-5, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность CDRH1, приведенную в SEQ ID NO: 5, аминокислотную последовательность CDRH2, приведенную в SEQ ID NO: 6, и аминокислотную последовательность CDRH3, приведенную в SEQ ID NO: 7; и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность CDRL1, приведенную в SEQ ID NO: 8, аминокислотную последовательность CDRL2, приведенную в SEQ ID NO: 9, и аминокислотную последовательность CDRL3, приведенную в SEQ ID NO: 10; и б) окисленные формы антитела, содержащие аминокислотный остаток тяжелой цепи, окисленный по метионину 64.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая а) антитело против IL-5, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность CDRH1, приведенную в SEQ ID NO: 5, аминокислотную последовательность CDRH2, приведенную в SEQ ID NO: 6, и аминокислотную последовательность CDRH3, приведенную в SEQ ID NO: 7; и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность CDRL1, приведенную в SEQ ID NO: 8, аминокислотную последовательность CDRL2, приведенную в SEQ ID NO: 9, и аминокислотную последовательность CDRL3, приведенную в SEQ ID NO: 10; и б) окисленные формы антитела, содержащие аминокислотный остаток тяжелой цепи, окисленный по метионину 64; и с) дезамидированные формы антитела, содержащие аминокислотный остаток легкой цепи, дезамидированный по аспарагину 31.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая

а) антитело против IL-5, содержащее последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, и последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4; и

б) дезамидированные формы антитела, содержащие аминокислотный остаток легкой цепи, дезамидированный по аспарагину 31. В композиции вариабельная область тяжелой цепи может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 95% или 95,57% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3. В композиции вариабельная область легкой цепи может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 98% или 98,31% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая

а) антитело против IL-5, содержащее последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, и последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4; и

б) окисленные формы антитела, содержащие по меньшей мере один остаток, выбранный из группы, состоящей из аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по триптофану 52, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 64, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 82, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 85, и аминокислотного остатка легкой цепи, окисленного по метионину 4.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая

а) антитело против IL-5, содержащее последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, и последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4;

б) дезамидированные формы антитела, содержащие аминокислотный остаток легкой цепи, дезамидированный по аспарагину 31; и

с) окисленные формы антитела, содержащие по меньшей мере один остаток, выбранный из группы, состоящей из аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по триптофану 52, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 64, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 82, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 85, и аминокислотного остатка легкой цепи, окисленного по метионину 4.

В другом варианте осуществления общая концентрация белка составляет примерно 75 мг/мл. Общая концентрация белка может также составлять любую пару значений или одно значение в диапазоне примерно от 75 примерно до 150 мг/мл, например, примерно от 75 примерно до 100 мг/мл, примерно от 67,3 примерно до 87,5 мг/мл, примерно от 76 г белка/л примерно до 82 г белка/л, примерно от 46 г белка/л примерно до 66 г белка/л или примерно 100 мг/мл. В композициях чистота антител против человеческого IL-5 в образце превышает или равна 97,0%, 96%, 95% или 80%, 85%.

В другом варианте осуществления композиция дополнительно содержит а) основную форму антитела, содержащую белок в количестве, превышающем или равном 50% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции.

В другом варианте осуществления композиция дополнительно содержит а) основную форму анти-

тела, содержащую белок в количестве, превышающем или равном 50% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции; и b) кислые формы антитела, содержащие примерно от 20 примерно до 45% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции.

В другом варианте осуществления композиция дополнительно содержит а) основную форму антитела, содержащую белок в количестве, превышающем или равном 50% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции; и b) форму антитела как основания, содержащую примерно от 1 примерно до 15% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции.

В другом варианте осуществления композиция дополнительно содержит а) основную форму антитела, содержащую белок в количестве, превышающем или равном 50% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции; b) кислые формы антитела, содержащие примерно от 20 примерно до 45% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции; и c) форму антитела как основания, содержащую примерно от 1 примерно до 15% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая популяцию антител против IL-5, имеющих а) модифицированную форму аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 1, включающую по меньшей мере одну модификацию аминокислотного остатка, выбранную из группы, состоящей из N-концевого остатка пироглутамата в положении 1, C-концевого аминокислотного остатка глицина в положении 448, дезамидированного остатка аспарагина в положении 299, дезамидированного остатка аспарагина в положении 317, дезамидированного остатка аспарагина в положении 386, окисленного остатка триптофана в положении 52, окисленного остатка метионина в положении 64, окисленного остатка метионина в положении 82, окисленного остатка метионина в положении 85, окисленного остатка цистеина в положении 222, окисленного остатка метионина в положении 254, окисленного остатка метионина в положении 360 и окисленного остатка метионина в положении 430; и b) модифицированную форму аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 2, включающей по меньшей мере одну модификацию аминокислотного остатка, выбранную из группы, состоящей из дезамидированного остатка аспарагина в положении 31, окисленного остатка метионина в положении 4 и окисленного остатка цистеина в положении 220.

В другом варианте осуществления композиция содержит а) примерно более чем или равно 92% популяции содержит N-концевой остаток пироглутамата в положении 1 тяжелой цепи антитела, b) примерно более чем или равно 90% популяции содержит C-концевой аминокислотный остаток глицин в положении 448 тяжелой цепи антитела, c) менее чем или равно 6% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 386 тяжелой цепи антитела; d) примерно менее чем или равно 1,5% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 64 тяжелой цепи антитела, e) примерно менее чем или равно 4,5% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 254 тяжелой цепи антитела, f) примерно менее чем или равно 0,8% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 430 тяжелой цепи антитела и g) примерно менее чем или равно 6,6% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 31 легкой цепи антитела.

В другом варианте осуществления композиция содержит а) примерно от 92 примерно до 99% популяции содержит N-концевой остаток пироглутамата в положении 1 тяжелой цепи антитела, b) примерно от 95 примерно до 99,5% популяции содержит C-концевой аминокислотный остаток глицина в положении 448 тяжелой цепи антитела, c) примерно от 0,3 примерно до 1,5% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 317 тяжелой цепи антитела, d) примерно от 1,5 примерно до 4,5% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 386 тяжелой цепи антитела; e) примерно от 0,5 примерно до 1,5% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 64 тяжелой цепи антитела, f) примерно от 0,2 примерно до 1,5% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 82 тяжелой цепи антитела или окисленный остаток метионина в положении 85 тяжелой цепи антитела, g) примерно от 2,5 примерно до 3,5% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 254 тяжелой цепи антитела, h) примерно от 0,4 примерно до 0,8% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 430 тяжелой цепи антитела, i) примерно от 3,3 примерно до 6,6% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 31 легкой цепи антитела и j) примерно от 0,1 примерно до 1% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 4 легкой цепи антитела.

В другом варианте осуществления композиция содержит а) от 93,7 до 98,6% популяции содержит N-концевой остаток пироглутамата в положении 1 тяжелой цепи антитела, b) от 97,6 до 99,2% популяции содержит C-концевой аминокислотный остаток глицина в положении 448 тяжелой цепи антитела, c) примерно от 0,4 примерно до 1,2% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 317 тяжелой цепи антитела, d) примерно от 1,6 примерно до 4,2% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 386 тяжелой цепи антитела; e) примерно от 0,7 примерно до 0,9% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 64 тяжелой цепи антитела, f)

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая популяцию антител против IL-5, имеющих а) модифицированную форму аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 1, содержащую по меньшей мере одну модификацию аминокислотного остатка, выбранную из группы, состоящей из окисленного остатка триптофана в положении 52, окисленного остатка метионина в положении 64, окисленного остатка метионина в положении 82, окисленного остатка метионина в положении 85, окисленного остатка цистеина в положении 222, окисленного метионина в положении 254, окисленного остатка метионина в положении 360 и окисленного остатка метионина в положении 430; и б) модифицированную форму аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 2, содержащую по меньшей мере одну модификацию аминокислотного остатка, выбранную из группы, состоящей из окисленного остатка метионина в положении 4 и окисленного остатка цистеина в положении 220.

В другом варианте осуществления композиция содержит а) примерно от 0,5 примерно до 1,5% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 64 тяжелой цепи антитела, б) примерно от 0,2 примерно до 1,5% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 82 тяжелой цепи антитела или окисленный остаток метионина в положении 85 тяжелой цепи антитела, с) примерно от 2,5 примерно до 3,5% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 254 тяжелой цепи антитела, d) примерно от 0,4 примерно до 0,8% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 430 тяжелой цепи антитела и е) примерно от 0,1 примерно до 1% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 4 легкой цепи антитела.

В другом варианте осуществления композиция содержит а) примерно от 0,7 примерно до 0,9% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 64 тяжелой цепи антитела, б) примерно от 0,3 примерно до 1,1% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 82 тяжелой цепи антитела или окисленный остаток метионина в положении 85 тяжелой цепи антитела, с) примерно от 2,6 примерно до 3,3% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 254 тяжелой цепи антитела, d) примерно от 0,5 примерно до 0,7% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 430 тяжелой цепи антитела и е) примерно от 0,2 примерно до 0,8% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 4 легкой цепи антитела.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая а) антитело против IL-5, содержащее последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 1, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2; и б) основную форму антитела, содержащую белок в количестве, превышающем или равном 20% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая а) антитело против IL-5, содержащее последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 1, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2; б) основную форму антитела, содержащую белок в количестве, превышающем или равном 20% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции; и с) кислые формы антитела, содержащие примерно до 80% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции.

В другом варианте осуществления композиция предназначена для лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из астмы, тяжелой эозинофильной астмы, тяжелой астмы, неконтролируемой эозинофильной астмы, эозинофильной астмы, субэозинофильной астмы, хронической обструктивной болезни легких, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом, гиперэозинофильного синдрома, полипоза носа, буллезного пемфигоида и эозинофильного эзофагита.

Другой вариант осуществления представляет собой способ лечения заболевания у пациента, включающий стадии а) идентификации пациента с заболеванием, выбранным из группы, состоящей из астмы, тяжелой эозинофильной астмы, тяжелой астмы, неконтролируемой эозинофильной астмы, эозинофильной астмы, субэозинофильной астмы, хронической обструктивной болезни легких, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом, гиперэозинофильного синдрома, полипоза носа, буллезного пемфигоида и эозинофильного эзофагита; и б) введения терапевтически эффективного количества композиции раскрытия пациенту; в результате чего заболевание пациента подвергается лечению.

Другим вариантом осуществления является способ получения композиции раскрытия, включающий стадии а) экспрессии в клетке-хозяине антитела, имеющего аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 1, и аминокислотной последовательности легкой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 2, или варианта антитела, имеющего аминокислотную последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности тяжелой цепи, и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности легкой цепи; б) выращивания клеток при pH примерно от 6,75 примерно до 7; с) сбора супернатанта клеточной культуры; d) помещения супернатанта клеточной культуры в контакт со

смолой протеина А или смолой протеина G для связывания молекул антитела; е) элюирования молекул антитела из смолы с получением первого элюата; ф) обработки первого элюата при рН примерно от 3,3 примерно до 3,7 в течение примерно от 15 примерно до 240 мин с получением обработанного первого элюата; г) помещения обработанного первого элюата в контакт с анионообменной смолой при рН нагрузки примерно от 8,3 примерно до 8,7; h) сбора второго элюата (поток через элюат) из анионообменной смолы и выдерживания его в течение приблизительно 96 ч или менее; и) обработки второго элюата гуанидином и сульфатом аммония с получением раствора; j) помещения раствора в контакт со слоем хроматографической смолы гидрофобного взаимодействия при отношении нагрузки, составляющем примерно от 12 г белка/на 1 л смолы примерно до 27 г белка/на 1 л смолы; к) элюирования третьего элюата, содержащего молекулы антитела, из хроматографической смолы гидрофобного взаимодействия с объемом градиента элюирования, составляющим примерно от 9 объемов слоя смолы примерно до 11 объемов слоя смолы, и с остановкой пика для элюирования примерно от 17% от максимальной высоты пика примерно до 23% от максимальной высоты пика; и l) приготвления состава третьего элюата; в результате чего получали композицию раскрытия. В способах раскрытия может использоваться любая последовательность нуклеиновой кислоты, подходящая для экспрессии антитела, имеющего аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2, или варианта антитела, имеющего аминокислотную последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности тяжелой цепи, и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности легкой цепи. Например, последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14 может быть использована для экспрессии антитела в эукариотической клетке. Альтернативно, другие последовательности нуклеиновых кислот с различными последовательностями, которые кодируют (например, из-за использования альтернативных кодонов) аминокислотную последовательность тяжелой цепи антитела, приведенную в SEQ ID NO: 1, или аминокислотную последовательность легкой цепи антитела, приведенную в SEQ ID NO: 2. В способах раскрытия дезамидирование можно контролировать выращиванием клеток при рН примерно от 6,75 примерно до 7. В способах раскрытия дезамидирование можно контролировать выращиванием клеток в течение примерно от 12 до 18 дней до клеточного возраста *in vitro*, меньшего или равного 166 дням. В способах раскрытия дезамидирование можно контролировать, помещая обработанный первый элюат в контакт с анионообменной смолой при рН нагрузки примерно от 8,3 примерно до 8,7 и собирая второй элюат из анионообменной смолы и выдерживая его в течение примерно 96 ч или менее. В способах раскрытия агрегацию можно контролировать во время хроматографии быстрого потока фенолсефарозы™, помещая раствор в контакт с слоем хроматографической смолы гидрофобного взаимодействия при загрузке примерно от 12 г белка/на 1 л смолы примерно до 27 г белка/на 1 л смолы; элюируя третий элюат, содержащий молекулы антитела, из хроматографической смолы гидрофобного взаимодействия, с градиентом объема элюирования примерно от 9 объемов слоя смолы примерно до 11 объемов слоя смолы и остановкой пика для элюирования примерно от 17% от максимальной высоты пика примерно до 23% максимальной высоты пика. Агрегация также может быть ограничена после конечной фильтрации, наполнения и замораживания фармацевтических композиций раскрытия в течение времени, меньшего или равного примерно 6 ч. Важно отметить, что любая из стадий раскрытых способов может быть опущена или объединена для получения композиций раскрытия.

При получении антитела могут произойти посттрансляционные модификации. Они могут включать расщепление определенных лидерных последовательностей, добавление различных компонентов сахара в различные сайты гликозилирования, дезамидирование (например, по остатку аспарагина или глутамина), окисление (например, по метионину, триптофану или свободному остатку цистеина), перестановку дисульфидной связи, изомеризацию (например, при остатке аспарагиновой кислоты), обрезание C-концевого лизина (например, из одной или обеих тяжелых цепей) и N-концевую циклизацию глутамина (например, в тяжелой и/или легкой цепи).

Композиция антитела может содержать

(i) антитело (т.е. антитело, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2); и

(ii) варианты антител, которые включают одно или более или комбинацию из следующего: варианты заряда (например, кислые и основные варианты), варианты аминокислотных последовательностей и структурные варианты антител (например, агрегированные и фрагментированные варианты).

Кислые варианты антитела или антитела как основания можно охарактеризовать и отличить от антител в зависимости от их общего кислого или основного заряда. Например, распределение заряда композиции антитела может быть детектировано с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования (IEF) или ионообменной хроматографии. Кислые варианты могут включать дезамидированные варианты антител, гликозилированные варианты антител, сиалилированные варианты антител и окисленные варианты антител. Окисление цистеина и триптофана в варианте антитела приводит к сдвигу pI (т.е. разности зарядов) и детектируется с другими вариантами кислых антител. Модификация метио-

нина в варианте антитела может контролироваться изменением связывания антигена или с помощью картирования пептидов, например, с помощью LC-MS/MS.

Дезамидирование представляет собой ферментативную реакцию, в первую очередь превращающую аспарагин (N) в изоаспарагиновую кислоту (изоаспартат) (изо-D) и аспарагиновую кислоту (аспартат) (D) при отношении приблизительно 3:1. Поэтому эта реакция дезамидирования связана с изомеризацией аспартата (D) до изоаспартата. И дезамидирование аспарагина, и изомеризация аспартата включают промежуточное образование сукцинимиды. В гораздо меньшей степени дезамидирование может происходить с остатками глутамина аналогичным образом. Дезамидирование может происходить в CDR, в Fab (не CDR-область) или в Fc-области.

Дезамидирование вызывает изменение заряда антитела, так что дезамидированные варианты антитела являются кислыми по сравнению с обычным антителом. Композиция антитела может содержать $\leq 35\%$ дезамидированного антитела. Например, N31 легкой цепи можно дезамидировать до изо-D, D или сукцинимиды. Композиция антитела может содержать $\leq 25\%$ дезамидированного варианта антитела в положении 31 легкой цепи. Это может привести к изменению одной аминокислоты в последовательности легкой цепи антитела, например в $\leq 25\%$ композиции антитела.

Например, N386 тяжелой цепи можно дезамидировать до изо-D, D или сукцинимиды. Композиция антитела может включать $\leq 35\%$ дезамидированного варианта антитела в положении 386 тяжелой цепи. Это может привести к изменению одной аминокислоты в последовательности тяжелой цепи антитела, например в $\leq 35\%$ композиции антитела. Композиция может содержать смесь вариантов антител. События дезамидирования могут быть кумулятивными, так что дезамидируются два или более остатков аспарагина. Следовательно, композиция антитела может содержать по меньшей мере одно изменение аминокислоты в последовательности тяжелой цепи антитела и/или по меньшей мере одно изменение аминокислоты в последовательности тяжелой цепи антитела. Например, композиция антитела может включать дезамидированный вариант антитела в положении 31 варианта легкой цепи и дезамидированный вариант антитела в положении 386 тяжелой цепи.

Окисление может происходить при производстве и хранении (т.е. в присутствии окислительных условий) и приводит к ковалентной модификации белка, индуцированной либо прямо реакционноспособными видами кислорода, либо косвенно путем реакции со вторичными побочными продуктами окислительного стресса. Окисление происходит в основном по остаткам метионина, но может происходить по триптофану и свободным остаткам цистеина. Окисление может происходить в CDR, в области Fab-области (не CDR) или в Fc-области.

Окисление может вызвать изменение заряда антитела, так что окисленные варианты антител являются кислыми по сравнению с антителом. Некоторые окисленные варианты антитела имеют тот же заряд, что и антитело. Композиция антитела может содержать $\leq 55\%$ окисленного варианта антитела. Например, может быть окислен любой из остатков M64, M254 и/или M430 тяжелой цепи или их комбинация. Композиция антитела может содержать $\leq 55\%$ окисленного варианта антитела по любому из остатков M64, M254 и/или M430 тяжелой цепи или в их комбинации. Например, может быть окислен W52 тяжелой цепи. Композиция антитела может содержать $\leq 3\%$ окисленного варианта антитела по W52 тяжелой цепи.

Композиция может содержать смесь вариантов антител. Следовательно, композиция антитела может содержать по меньшей мере одно изменение аминокислоты в последовательности тяжелой цепи антитела и/или по меньшей мере одно изменение аминокислоты в последовательности тяжелой цепи антитела. Например, композиция антитела может содержать дезамидированный вариант антитела в положении 31 легкой цепи; и/или дезамидированный вариант антитела в положении 386 тяжелой цепи; и/или окисление по любому из остатков M64, M254 и/или M430 и/или W52 тяжелой цепи или в их комбинации.

Перегруппировка дисульфидных связей может происходить в процессе производства и основных условий хранения. При определенных обстоятельствах дисульфидные связи могут разрываться или образовываться некорректно, приводя к непарным остаткам цистеина (-SH). Эти свободные (непарные) сульфгидрилы (-SH) могут способствовать перетасовке.

N-концевой глутамин (Q) и глутамат (глутаминовая кислота) (E) в тяжелой цепи и/или легкой цепи, вероятно, образуют пироглутамат (pGlu) посредством циклизации. Считается, что большая часть образования pGlu происходит в производственном биореакторе, но он также может быть образован неферментативно в зависимости от pH и температуры условий обработки и хранения. Циклизация N-концевых Q или E обычно наблюдается в природных человеческих антителах. Композиция антител, представленная в настоящем описании, может содержать $\geq 50\%$ pGlu на N-конце антитела. pGlu может присутствовать в тяжелой цепи. Это может привести к изменению одной аминокислоты в последовательности тяжелой или легкой цепи антитела, например в $\geq 50\%$ композиции антитела.

Композиция может содержать смесь вариантов антител. Изменения последовательности могут быть кумулятивными, так что композиция содержит два или более изменений последовательности в тяжелой и/или легкой цепи. Следовательно, композиция антитела может содержать по меньшей мере одно изменение аминокислоты в последовательности тяжелой цепи антитела и/или по меньшей мере одно измене-

ние аминокислоты в последовательности тяжелой цепи антитела. Например, композиция антитела может содержать дезамидированный вариант антитела в положении 31 легкой цепи; и/или дезамидированный вариант антитела в положении 386 тяжелой цепи; и/или окисление по любому из положений M64, M254 и/или M430 и/или W52 тяжелой цепи или в их комбинации; и/или pGlu на N-конце тяжелой и/или легкой цепей.

Отсечение C-концевого лизина является ферментативной реакцией, катализируемой карбоксипептидазами, и обычно наблюдается в рекомбинантных и природных человеческих антителах. Варианты этого процесса включают удаление лизина из одной или обеих тяжелых цепей, связанное с клеточными ферментами рекомбинантной клетки-хозяина. При введении человеку/пациенту может произойти удаление любых оставшихся C-концевых лизинов. Композиция антитела, представленная в настоящем описании, может содержать >50% вариантов антител с делетированным C-концевым лизином на C-конце антитела. K449 может быть делетирован в одной или в обеих тяжелых цепях антитела. Таким образом, существует два варианта антител: с единственной делецией лизина в тяжелой цепи и с двойной делецией лизина в тяжелой цепи. Антитело (т.е. антитело, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2) содержит оба лизина интактных/присутствующих. Это может привести к изменению одной аминокислоты в последовательности тяжелой цепи антитела, например, в $\geq 50\%$ композиции антитела.

Композиция может содержать смесь вариантов антител. Например, композиция антитела может содержать дезамидированный вариант антитела в положении 31 легкой цепи; и/или дезамидированный вариант антитела в положении 386 тяжелой цепи; и/или окисление в любом из остатков M64, M254 и/или M430 и/или W52 тяжелой цепи или в их комбинации; и/или pGlu на N-конце тяжелой и/или легкой цепи; и/или вариант с делетированным C-концевым лизином.

Агрегированные или фрагментированные варианты антител можно охарактеризовать и отличить от антител на основании их размера.

Например, распределение по размерам композиции антитела можно детектировать с использованием эксклюзионной хроматографии (SEC).

Композиция антитела может содержать $\leq 20\%$ агрегированного антитела. Агрегированный вариант антитела может содержать димер. Композиция может содержать смесь вариантов антител. Например, композиция антитела может содержать дезамидированный вариант антитела в положении 31 легкой цепи; и/или дезамидированный вариант антитела в положении 386 тяжелой цепи; и/или окисление в любом из остатков M64, M254 и/или M430 и/или W52 тяжелой цепи или в их комбинации; и/или pGlu на N-конце тяжелой и/или легкой цепи; и/или вариант с делетированным C-концевым лизином; и/или агрегированный вариант антитела.

Описанные композиции могут быть подвергнуты или подверглись одной или более посттрансляционным модификациям. Модификация может происходить в CDR, варибельной каркасной области или в константной области. Модификация может привести к изменению заряда молекулы. Посттрансляционные модификации и изменения в первичной аминокислотной последовательности, описанные выше, не приводят к значительным изменениям в антигенсвязывающей аффинности, биологической активности, PK/PD, агрегации, иммуногенности или связывания с Fc-рецептором композиций. Композиции, по существу, не содержат загрязняющих веществ.

Композиция антитела, содержащая антитела и варианты антител, описанные выше, сохраняет специфическое связывание антигена и/или связывание FcRn. Например, композиция антитела, содержащая антитело или варианты антитела, описанные выше, имеет $\geq 0,7$ PL-5-специфичного связывания; и/или $\geq 70\%$ связывания FcRn. Таким образом, эти уровни (%) вариантов могут быть переносимы в композиции антител без влияния на функцию.

Композиции, представленные в настоящем описании, могут быть получены любыми стандартными методами. Например, композиции могут быть экспрессированы и очищены из рекомбинантных экспрессирующих систем. В одном варианте осуществления композицию получают способом культивирования клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии полипептида, содержащего SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, где композицию экспрессируют и необязательно очищают и необязательно включают в состав фармацевтической композиции.

Для получения композиций можно использовать ряд различных систем экспрессии и режимов очистки. Как правило, клетки-хозяева трансформируются рекомбинантным экспрессирующим вектором, кодирующим антитело. Можно использовать широкий диапазон клеток-хозяев, включая эукариотические клеточные линии млекопитающих (например, CHO, Perc6, HEK293, HeLa, NSO). Подходящие клетки-хозяева включают клетки млекопитающих, такие как CHO (например, CHO-K1 и CHO-DG44).

Клетка-хозяин может быть выделенной клеткой-хозяином. Клетка-хозяин обычно не является частью многоклеточного организма (например, растения или животного). Клетка-хозяин может быть клеткой-хозяином организма, отличного от человека.

В данной области известны соответствующие векторы клонирования и экспрессии для использования с клетками-хозяевами эукариот или млекопитающих и способы клонирования.

Клетки могут культивироваться в условиях, которые способствуют экспрессии антитела. Например, для культивирования клеток используют производственный биореактор. Объем производственного биореактора может составлять (i) примерно 20000 л, примерно 10000 л; примерно 5000 л; примерно 2000 л; примерно 1000 л или примерно 500 л; или (ii) от 500 до 20000 л; от 500 до 10000 л; от 500 до 5000 л; от 1000 до 10000 л или от 2000 до 10000 л. Например, клетки могут культивироваться в производственном биореакторе при pH от 6,75 до 7. Альтернативно, клетки могут культивироваться в производственном биореакторе в течение примерно от 12 примерно до 18 дней. Альтернативно, клетки могут культивироваться в производственном биореакторе при pH примерно от 6,75 до pH 7 в течение примерно от 12 примерно до 18 дней. Эта стадия культивирования может помочь контролировать уровень дезамидированных вариантов антител, например, для снижения уровня дезамидированных вариантов антител.

Композиция может быть выделена и очищена с помощью обычных способов очистки белка. Например, композицию можно собирать непосредственно из культуральной среды. Сбор клеточной культуральной среды может быть осуществлен путем осветления, например, путем центрифугирования и/или глубоинной фильтрации. Восстановление композиции следует за очисткой для обеспечения достаточной чистоты.

При очистке могут быть использованы одна или более стадий хроматографии, например одна или более хроматографических смол; и/или одна или более стадий фильтрации. Например, для очистки композиции можно использовать аффинную хроматографию с использованием смол, таких как протеин А, G или L. Альтернативно или дополнительно для очистки композиции может быть использована такая ионообменная смола, как катионообменная. Альтернативно или дополнительно для очистки композиции может быть использована хроматографическая смола гидрофобного взаимодействия.

Альтернативно, стадии очистки включают стадию аффинной хроматографической смолы с последующей стадией катионообменной смолы с последующей стадией хроматографической смолы гидрофобного взаимодействия.

Например, собранные клетки помещают в контакт со смолой протеина А. Раствор, содержащий композицию, можно элюировать из смолы протеина А и обработать при pH от 3,3 до 3,7 в течение 15-240 мин. Эта стадия использования смолы с протеином А может помочь контролировать уровень агрегированных вариантов антител, например, для снижения уровня агрегированных вариантов антител.

Раствор, содержащий композицию, затем может быть дополнительно очищен путем глубоинной фильтрации и/или двухслойной фильтрации.

Альтернативно или дополнительно может использоваться анионообменная смола. Раствор, содержащий композицию, может быть помещен в контакт с анионообменной смолой (например, анионообменная хроматография быстрого потока на Q-сефарозе™) при pH загрузки от 8,3 до 8,7. Раствор, содержащий композицию, можно элюировать из анионообменной смолы и выдерживать в течение 96 ч или менее. Эта стадия использования анионообменной смолы может помочь контролировать уровень дезамидированных вариантов антител, например, использоваться для снижения уровня дезамидированных вариантов антител.

Необязательно, гуанидин и/или сульфат аммония могут быть добавлены к раствору, содержащему композицию, и выдерживаются в течение 15-240 мин.

Альтернативно или дополнительно, может быть использована хроматографическая смола гидрофобного взаимодействия. Раствор, содержащий композицию, может быть помещен в контакт с хроматографической смолой гидрофобного взаимодействия (например, при хроматографии быстрого потока на фенилсефарозе™) при соотношении загрузки от 12 до 27 г белка/на 1 л смолы. Например, раствор, содержащий композицию, можно элюировать, используя объем градиента элюирования (объем слоя, BV) примерно от 9 примерно до 11. Во время элюирования из хроматографической смолы гидрофобного взаимодействия можно использовать остановку пика элюирования (% от максимальной высоты пика) примерно от 17 примерно до 23. Эта стадия использования хроматографической смолы гидрофобного взаимодействия может помочь контролировать уровень агрегированных вариантов антител, например, для снижения уровня агрегированных вариантов антител.

Затем раствор, содержащий композицию, можно фильтровать для удаления вируса. Раствор, содержащий композицию, может затем быть приготовлен с концентрацией антитела, составляющей примерно от 76 г белка/л примерно до 82 г белка/л или примерно до 100 г белка/л. Раствор, содержащий композицию, может быть заполнен в контейнеры и заморожен. Аликвоты раствора, содержащего композицию, могут быть лиофилизированы. Лиофилизат может быть восстановлен добавлением воды для получения композиции, содержащей белок в количестве 75 мг/л, моноклонального антитела мезолизумаба против IL-5 и 20 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 12% мас./об. сахарозы и 0,05% мас./об. полисорбата 80 при pH примерно от 6,8 примерно до 7,2.

В другом варианте осуществления композицию раскрытия получают с использованием этого способа получения композиции раскрытия.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая очищенный препарат моноклонального антитела и буферный агент, где pH композиции составляет от 6,2 до 6,6, где буферным агентом яв-

ляется гистидин, фосфат, лимонная кислота, моногидрат лимонной кислоты, цитрат или его соль, где очищенный препарат содержит изоформы, представленные пиком 65, пиком 78, пиком 88, пиком 92, основным пиком и пиком 112, изображенными на фиг. 1, где антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую менее 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, и где антитело продуцируется клеткой яичника китайского хомячка.

Другим аспектом раскрытия является композиция, содержащая очищенный препарат моноклонального антитела и буферный агент, где pH композиции составляет от 6,2 до 6,6, где буферным агентом является фосфат или его соль, причем очищенный препарат содержит изоформы, представленные пиком 65, пиком 78, пиком 88, пиком 92, основным пиком и пиком 112, изображенными на фиг. 1, где антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, и где антитело продуцируется клеткой яичника китайского хомячка.

В другом варианте осуществления композиции раскрытия буферный агент представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из гептагидрата двухосновного фосфата натрия, фосфата и лимонной кислоты.

В другом варианте осуществления композиции раскрытия содержит один состав, выбранный из первого состава, содержащего 16,1 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 3,9 мМ лимонной кислоты, 12% мас./об. сахарозы, 0,02% мас./об. полисорбата 80 и 0,05 мМ ЭДТА; второго состава, содержащего 15,2 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 4,8 мМ лимонной кислоты, 12% мас./об. сахарозы, 0,02% мас./об. полисорбата 80 и 0,05 мМ ЭДТА; третьего состава, содержащего 15,8 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 4,2 мМ лимонной кислоты, 12% мас./об. сахарозы, 0,02% мас./об. полисорбата 80 и 0,05 мМ ЭДТА; четвертого состава, содержащего 16,3 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 3,7 мМ лимонной кислоты, 12% мас./об. сахарозы, 0,02% мас./об. полисорбата 80 и 0,05 мМ ЭДТА; и пятого состава, содержащего 15,5 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 4,5 мМ лимонной кислоты, 12% мас./об. сахарозы, 0,02% мас./об. полисорбата 80 и 0,05 мМ ЭДТА.

Таким образом, раскрытие включает:

1) композиция, содержащая антитело, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2, или вариант антитела, имеющий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности тяжелой цепи, и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности легкой цепи, где композиция содержит $\leq 80\%$ кислых вариантов антитела;

2) композиция по п.1, отличающаяся тем, что композиция обладает:

a) $\geq 0,7$ IL-5-специфичным связыванием антигена; и/или

b) $\geq 70\%$ связывания с FcRn;

3) композиция по п.2, отличающаяся тем, что

a) антигенспецифичное связывание находится в диапазоне от 0,7 до 1,3; и/или

b) связывание с FcRn находится в диапазоне от 70 до 130%;

4) композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что композиция содержит $\leq 35\%$ дезамидированных вариантов антитела;

5) композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что композиция содержит $\leq 25\%$ дезамидированных вариантов антитела в положении N31 аминокислотной последовательности легкой цепи;

6) композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что композиция содержит $\leq 35\%$ дезамидированных вариантов антитела в положении N386 аминокислотной последовательности тяжелой цепи;

7) композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что композиция содержит $\leq 55\%$ окисленных вариантов антитела в любом из следующих положений или в их комбинации:

a) M64 аминокислотной последовательности тяжелой цепи;

b) M254 аминокислотной последовательности тяжелой цепи и/или

c) M430 аминокислотной последовательности тяжелой цепи;

8) композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что композиция содержит $\leq 3\%$ окисленных вариантов антитела в положении W52 аминокислотной последовательности тяжелой цепи;

9) композиция по любому из пп.4-8, отличающаяся тем, что количество дезамидированного варианта антитела и/или количество окисленного варианта определяют с помощью пептидного картирования LC-MS/MS;

очищенный препарат содержит изоформы, представленные пиком 65, пиком 78, пиком 88, пиком 92, основным пиком и пиком 112, изображенными на фиг. 1,

антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, и

антитело продуцируется клеткой яичника китайского хомячка;

21) композиция по п.20, отличающаяся тем, что буферный агент представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из гептагидрата двухосновного фосфата натрия, фосфата, лимонной кислоты и цитрата;

22) композиция по п.20, отличающаяся тем, что буферный агент представляет собой фосфат натрия, фосфат калия или цитрат натрия;

23) композиция по п.20, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит сахар, углевод и/или соль;

24) композиция по п.23, отличающаяся тем, что композиция содержит сахарозу;

25) композиция, содержащая очищенный препарат моноклонального антитела и буферный агент, где рН композиции составляет от 6,8 до 7,2, буферным агентом является фосфат или его соль, очищенный препарат содержит изоформы, представленные пиком 65, пиком 78, пиком 88, пиком 92, основным пиком и пиком 112, изображенными на фиг. 1,

антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, и

антитело продуцируется клеткой яичника китайского хомячка;

26) композиция по п.25, отличающаяся тем, что буферный агент представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из гептагидрата двухосновного фосфата натрия, фосфата, лимонной кислоты и цитрата;

27) композиция по п.26, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит сахар;

28) композиция по п.27, отличающаяся тем, что сахар представляет собой сахарозу;

29) композиция по п.28, содержащая полисорбат 80;

30) композиция по п.29, содержащая один состав, выбранный из первого состава, содержащего 20 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 12% мас./об. сахарозы и 0,05% мас./об. полисорбата 80; второго состава, содержащего 15,5 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 3,9 мМ моногидрата лимонной кислоты, 12% мас./об. сахарозы, 0,02% мас./об. полисорбата 80 и 0,05 мМ ЭДТА; и третьего состава, содержащего 26 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 15% мас./об. сахарозы и 0,065% мас./об. полисорбата 80;

31) композиция по п.29, отличающаяся тем, что антитело имеет константу диссоциации, равную или меньшую чем примерно $3,5 \times 10^{-41}$ М для человеческого интерлейкина-5, имеющего аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11;

32) композиция по п.31, отличающаяся тем, что концентрация моноклональных антител составляет примерно 75 или примерно 100 мг/мл;

33) композиция по п.30, отличающаяся тем, что антитело имеет константу диссоциации, равную или меньшую чем примерно $3,5 \times 10^{-41}$ М для человеческого интерлейкина-5, имеющего аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11;

34) композиция по п.33, отличающаяся тем, что концентрация моноклональных антител составляет примерно 75 или примерно 100 мг/мл;

35) композиция, содержащая

а) антитело против IL-5, содержащее последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 1, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2; и

б) основную форму антитела, содержащую белок в количестве, превышающем или равном 50% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции;

36) композиция по п.35, где основная форма антитела содержит по меньшей мере один окисленный аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по триптофану 52, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 64, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 82, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 85, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по цистеину 222, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 254, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 360, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окислен-

с) дезамидированные формы антитела, содержащие аминокислотный остаток легкой цепи, дезамидированный по аспарагину 31;

67) композиция, содержащая:

а) антитело против IL-5, содержащее последовательность варибельной области тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, и последовательность варибельной области легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4; и

б) дезамидированные формы антитела, содержащие аминокислотный остаток легкой цепи, дезамидированный по аспарагину 31;

68) композиция, содержащая:

а) антитело против IL-5, содержащее последовательность варибельной области тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, и последовательность варибельной области легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4; и

б) окисленные формы антитела, содержащие по меньшей мере один остаток, выбранный из группы, состоящей из аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по триптофану 52, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 64, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 82, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 85, и аминокислотного остатка легкой цепи, окисленного по метионину 4;

69) композиция, содержащая:

а) антитело против IL-5, содержащее последовательность варибельной области тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, и последовательность варибельной области легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4;

б) дезамидированные формы антитела, содержащие аминокислотный остаток легкой цепи, дезамидированный по аспарагину 31; и

с) окисленные формы антитела, содержащие по меньшей мере один остаток, выбранный из группы, состоящей из аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по триптофану 52, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 64, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 82, аминокислотного остатка тяжелой цепи, окисленного по метионину 85, и аминокислотного остатка легкой цепи, окисленного по метионину 4;

70) композиция, содержащая популяцию антител против IL-5, имеющих

а) модифицированную форму аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 1, включающую по меньшей мере одну модификацию аминокислотного остатка, выбранную из группы, состоящей из N-концевого остатка пироглутамата в положении 1, C-концевого аминокислотного остатка глицина в положении 448, дезамидированного остатка аспарагина в положении 299, дезамидированного остатка аспарагина в положении 317, дезамидированного остатка аспарагина в положении 386, окисленного остатка триптофана в положении 52, окисленного остатка метионина в положении 64, окисленного остатка метионина в положении 82, окисленного остатка метионина в положении 85, окисленного остатка цистеина в положении 222, окисленного остатка метионина в положении 254, окисленного остатка метионина в положении 360 и окисленного остатка метионина в положении 430; и

б) модифицированную форму аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 2, включающую по меньшей мере одну модификацию аминокислотного остатка, выбранную из группы, состоящей из дезамидированного остатка аспарагина в положении 31, окисленного остатка метионина в положении 4 и окисленного остатка цистеина в положении 220;

71) композиция по п.70, отличающаяся тем, что

а) примерно более чем или ровно 92% популяции содержит N-концевой остаток пироглутамата в положении 1 тяжелой цепи антитела,

б) примерно более чем или ровно 90% популяции содержит C-концевой аминокислотный остаток глицина в положении 448 тяжелой цепи антитела,

с) менее чем или ровно 6% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 386 тяжелой цепи антитела;

д) примерно менее чем или ровно 1,5% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 64 тяжелой цепи антитела,

е) примерно менее чем или ровно 4,5% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 254 тяжелой цепи антитела,

ф) примерно менее чем или ровно 0,8% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 430 тяжелой цепи антитела и

г) примерно менее чем или ровно 6,6% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 31 легкой цепи антитела;

72) композиция по п.71, отличающаяся тем, что

- a) примерно от 93,7 примерно до 98,6% популяции содержит N-концевой остаток пироглутамата в положении 1 тяжелой цепи антитела,
- b) примерно от 97,6 примерно до 99,2% популяции содержит C-концевой аминокислотный остаток глицина в положении 448 тяжелой цепи антитела,
- c) примерно от 0,4 примерно до 1,2% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 317 тяжелой цепи антитела,
- d) примерно от 1,6 примерно до 4,2% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 386 тяжелой цепи антитела;
- e) примерно от 0,7 примерно до 0,9% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 64 тяжелой цепи антитела,
- f) примерно от 0,3 примерно до 1,1% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 82 тяжелой цепи антитела или окисленный остаток метионина в положении 85 тяжелой цепи антитела,
- g) примерно от 2,6 примерно до 3,3% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 254 тяжелой цепи антитела,
- h) примерно от 0,5 примерно до 0,7% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 430 тяжелой цепи антитела,
- i) примерно от 3,4 примерно до 6,5% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 31 легкой цепи антитела и
- j) примерно от 0,2 примерно до 0,8% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 4 легкой цепи антитела;
- 73) композиция, содержащая популяцию антител против IL-5, имеющих
- a) модифицированную форму аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 1, включающую по меньшей мере одну модификацию аминокислотного остатка, выбранную из группы, состоящей из дезамидированного остатка аспарагина в положении 299, дезамидированного остатка аспарагина в положении 317, дезамидированного остатка аспарагина в положении 386, окисленного остатка триптофана в положении 52, окисленного остатка метионина в положении 64, окисленного остатка метионина в положении 82, окисленного остатка метионина в положении 85, окисленного остатка цистеина в положении 222, окисленного остатка метионина в положении 254, окисленного остатка метионина в положении 254, окисленного остатка метионина в положении 360 и окисленного остатка метионина в положении 430; и
- b) модифицированную форму аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 2, включающую по меньшей мере одну модификацию аминокислотного остатка, выбранную из группы, состоящей из дезамидированного остатка аспарагина в положении 31, окисленного остатка метионина в положении 4 и окисленного остатка цистеина в положении 220;
- 74) композиция по п.73, отличающаяся тем, что
- a) примерно от 0,3 примерно до 1,5% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 317 тяжелой цепи антитела,
- b) примерно от 1,5 примерно до 4,5% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 386 тяжелой цепи антитела;
- c) примерно от 0,5 примерно до 1,5% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 64 тяжелой цепи антитела,
- d) примерно от 0,2 примерно до 1,5% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 82 тяжелой цепи антитела или окисленный остаток метионина в положении 85 тяжелой цепи антитела,
- e) примерно от 2,5 примерно до 3,5% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 254 тяжелой цепи антитела,
- f) примерно от 0,4 примерно до 0,8% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 430 тяжелой цепи антитела,
- g) примерно от 3,3 примерно до 6,6% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 31 легкой цепи антитела и
- h) примерно от 0,1 примерно до 1% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 4 легкой цепи антитела;
- 75) композиция по п.74, отличающаяся тем, что
- a) примерно от 0,4 примерно до 1,2% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 317 тяжелой цепи антитела,
- b) примерно от 1,6 примерно до 4,2% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 386 тяжелой цепи антитела;
- c) примерно от 0,7 примерно до 0,9% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 64 тяжелой цепи антитела,
- d) примерно от 0,3 примерно до 1,1% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 82 тяжелой цепи антитела или окисленный остаток метионина в положении 85 тяжелой цепи ан-

титела,

е) примерно от 2,6 примерно до 3,3% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 254 тяжелой цепи антитела,

ф) примерно от 0,5 примерно до 0,7% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 430 тяжелой цепи антитела,

г) примерно от 3,4 примерно до 6,5% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 31 легкой цепи антитела и

h) примерно от 0,2 примерно до 0,8% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 4 легкой цепи антитела;

76) композиция, содержащая популяцию антител против IL-5, имеющих

а) модифицированную форму аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 1, содержащую по меньшей мере одну модификацию аминокислотного остатка, выбранную из группы, состоящей из дезамидированного остатка аспарагина в положении 299, дезамидированного остатка аспарагина в положении 317 и дезамидированного остатка аспарагина в положении 386; и

б) модифицированную форму аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 2, содержащую дезамидированный остаток аспарагина в положении 31;

77) композиция по п.76, отличающаяся тем, что

а) примерно от 0,3 примерно до 1,5% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 317 тяжелой цепи антитела,

б) примерно от 1,5 примерно до 4,5% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 386 тяжелой цепи антитела; и

с) примерно от 3,3 примерно до 6,6% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 31 легкой цепи антитела;

78) композиция по п.77, отличающаяся тем, что

а) примерно от 0,4 примерно до 1,2% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 317 тяжелой цепи антитела,

б) примерно от 1,6% примерно до 4,2% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 386 тяжелой цепи антитела; и

с) примерно от 3,4 примерно до 6,5% популяции содержит дезамидированный остаток аспарагина в положении 31 легкой цепи антитела;

79) композиция, содержащая популяцию антител против IL-5, имеющих

а) модифицированную форму аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 1, содержащую по меньшей мере одну модификацию аминокислотного остатка, выбранную из группы, состоящей из окисленного остатка триптофана в положении 52, окисленного остатка метионина в положении 64, окисленного остатка метионина в положении 82, окисленного остатка метионина в положении 85, окисленного остатка цистеина в положении 222, окисленного остатка метионина в положении 254, окисленного остатка метионина в положении 360 и окисленного остатка метионина в положении 430; и

б) модифицированную форму аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 2, содержащую по меньшей мере одну модификацию аминокислотного остатка, выбранную из группы, состоящей из окисленного остатка метионина в положении 4 и окисленного цистеина в положении 220;

80) композиция по п.79, отличающаяся тем, что

с) примерно от 0,5 примерно до 1,5% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 64 тяжелой цепи антитела,

д) примерно от 0,2 примерно до 1,5% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 82 тяжелой цепи антитела или окисленный остаток метионина в положении 85 тяжелой цепи антитела,

е) примерно от 2,5 примерно до 3,5% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 254 тяжелой цепи антитела,

ф) примерно от 0,4 примерно до 0,8% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 430 тяжелой цепи антитела и

г) примерно от 0,1 примерно до 1% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 4 легкой цепи антитела;

81) композиция по п.80, отличающаяся тем, что

а) примерно от 0,7 примерно до 0,9% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 64 тяжелой цепи антитела,

б) примерно от 0,3 примерно до 1,1% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 82 тяжелой цепи антитела или окисленный остаток метионина в положении 85 тяжелой цепи антитела,

с) примерно от 2,6 примерно до 3,3% популяции содержит окисленный остаток метионина в поло-

жении 254 тяжелой цепи антитела,

d) примерно от 0,5 примерно до 0,7% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 430 тяжелой цепи антитела и

e) примерно от 0,2 примерно до 0,8% популяции содержит окисленный остаток метионина в положении 4 легкой цепи антитела;

82) композиция, содержащая:

a) антитело против IL-5, содержащее последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 1, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2; и

b) основную форму антитела, содержащую белок в количестве, превышающем или равном 20% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции;

83) композиция, содержащая:

a) антитело против IL-5, содержащее последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 1, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2;

b) основную форму антитела, содержащую белок в количестве, превышающем или равном 20% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции; и

c) кислые формы антитела, содержащие примерно до 80% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции;

84) Композиция по любому из предыдущих пунктов, для лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из астмы, тяжелой эозинофильной астмы, тяжелой астмы, неконтролируемой эозинофильной астмы, эозинофильной астмы, субэозинофильной астмы, хронической обструктивной болезни легких, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом, гиперэозинофильного синдрома, полипоза носа, буллезного пемфигоида и эозинофильного эзофагита;

85) способ лечения заболевания у пациента, включающий стадии:

a) идентификация пациента с заболеванием, выбранным из группы, состоящей из астмы, тяжелой эозинофильной астмы, тяжелой астмы, неконтролируемой эозинофильной астмы, эозинофильной астмы, субэозинофильной астмы, хронической обструктивной болезни легких, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом, гиперэозинофильного синдрома, полипоза носа, буллезного пемфигоида и эозинофильного эзофагита; и

b) введение пациенту терапевтически эффективного количества композиции по любому из предыдущих пунктов;

в результате чего заболевание пациента подвергается лечению;

86) композиция по пп.20-83, отличающаяся тем, что композиция обладает:

a) $\geq 0,7$ IL-5-специфичного связывания антигена и/или

b) $\geq 70\%$ связывания FcRn;

87) композиция по пп.20-83, отличающаяся тем, что

a) антигенспецифичное связывание находится в диапазоне от 0,7 до 1,3; и/или

b) связывание FcRn находится в диапазоне от 70 до 130%;

88) композиция по пп.20-83, отличающаяся тем, что композиция содержит $\leq 20\%$ агрегированных вариантов антител;

89) композиция по пп.20-83, отличающаяся тем, что агрегированный вариант антитела содержит димер;

90) способ получения композиции по пп.1-83, включающий стадии:

a) экспрессия в клетке-хозяине антитела, имеющего аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2, или варианта антитела, имеющего аминокислотную последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности тяжелой цепи, и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности легкой цепи;

b) выращивание клеток при pH примерно от 6,75 примерно до 7 в течение примерно от 12 примерно до 18 дней до клеточного возраста *in vitro*, составляющего менее чем или равного 166 дням;

c) сбор супернатанта клеточной культуры;

d) помещение супернатанта клеточной культуры в контакт со смолой протеина А или смолой протеина G для связывания молекул антитела;

e) элюирование молекул антитела из смолы с получением первого элюата;

f) обработка первого элюата при pH примерно от 3,3 примерно до 3,7 в течение примерно от 15

примерно до 240 мин с получением обработанного первого элюата;

g) помещение обработанного первого элюата в контакт с анионообменной смолой при рН загрузки примерно от 8,3 примерно до 8,7;

h) сбор второго элюата из анионообменной смолы и поддержания его в течение примерно 96 ч или менее;

i) обработка второго элюата гуанидином и сульфатом аммония с получением раствора;

j) помещение раствора в контакте со слоем хроматографической смолы гидрофобного взаимодействия при отношении загрузки примерно от 12 г белка/на 1 л смолы примерно до 27 г белка /на 1 л смолы;

к) элюирование третьего элюата, содержащего молекулы антитела, из хроматографической смолы гидрофобного взаимодействия, с градиентом объема элюирования примерно от 9 объемов слоя смолы примерно до 11 объемов слоя смолы и остановкой пика элюирования примерно от 17% от максимальной высоты пика примерно до 23% максимальной высоты пика; и

l) приготовление состава третьего элюата;

в результате чего получают композицию по пп.1-83;

91) композиция по пп.1-83, полученная способом по п.90;

92) композиция, содержащая очищенный препарат моноклонального антитела и буферный агент,

где рН композиции составляет от 6,2 до 6,6,

где буферным агентом является гистидин, фосфат, лимонная кислота, моногидрат лимонной кислоты, цитрат или его соль,

где очищенный препарат содержит изоформы, представленные пиком 65, пиком 78, пиком 88, пиком 92, основным пиком и пиком 112, изображенными на фиг. 1,

где антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, и

где антитело продуцируется клеткой яичника китайского хомячка;

93) композиция по п.92, отличающаяся тем, что буферный агент представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из гептагидрата двухосновного фосфата натрия, фосфата, лимонной кислоты и моногидрата лимонной кислоты;

94) композиция по п.92, отличающаяся тем, что буферный агент представляет собой фосфат натрия, фосфат калия, лимонную кислоту, моногидрат лимонной кислоты или цитрат натрия;

95) композиция по п.92, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит сахар, углевод и/или соль;

96) композиция по п.95, отличающаяся тем, что композиция содержит сахарозу;

97) композиция, содержащая очищенный препарат моноклонального антитела и буферный агент,

где рН композиции составляет от 6,2 до 6,6,

где буферным агентом является фосфат или его соль,

где очищенный препарат содержит изоформы, представленные пиком 65, пиком 78, пиком 88, пиком 92, основным пиком и пиком 112, изображенными на фиг. 1,

где антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, и

где антитело продуцируется клеткой яичника китайского хомячка;

98) композиция по п.97, отличающаяся тем, что буферный агент представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из гептагидрата двухосновного фосфата натрия, фосфата, лимонной кислоты, моногидрата лимонной кислоты и цитрата;

99) композиция по п.98, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит сахар;

100) композиция по п.99, где сахар представляет собой сахарозу;

101) композиция по п.100, содержащая полисорбат 80;

102) композиция по п.101, содержащая состав, выбранный из первого состава, содержащего 16,1 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 3,9 мМ моногидрата лимонной кислоты, 12% мас./об. сахарозы, 0,02% мас./об. полисорбата 80 и 0,05 мМ ЭДТА; второго состава, содержащего 15,2 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 4,8 мМ моногидрата лимонной кислоты, 12% мас./об. сахарозы, 0,02% мас./об. полисорбата 80 и 0,05 мМ ЭДТА; третьего состава, содержащего 15,8 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 4,2 мМ моногидрата лимонной кислоты, 12% мас./об. сахарозы, 0,02% мас./об. полисорбата 80 и 0,05 мМ ЭДТА; четвертого состава, содержащего 16,3 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 3,7 мМ моногидрата лимонной кислоты, 12% мас./об. сахарозы, 0,02% мас./об. полисорбата 80 и 0,05 мМ ЭДТА; и пятого состава, содержащего 15,5 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 4,5 мМ моногидрата лимонной кислоты, 12% мас./об. сахарозы, 0,02% мас./об. полисорбата 80 и 0,05 мМ ЭДТА;

103) композиция по п.101, отличающаяся тем, что антитело имеет константу диссоциации, равную

или меньшую чем примерно $3,5 \times 10^{-11}$ М для человеческого интерлейкина-5, имеющего аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11;

104) композиция по п.101, отличающаяся тем, что концентрация моноклонального антитела составляет примерно 75 мг/мл или примерно 100 мг/мл;

105) композиция по п.102, отличающаяся тем, что антитело имеет константу диссоциации, равную или меньшую чем примерно $3,5 \times 10^{-41}$ М для человеческого интерлейкина-5, имеющего аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11;

106) композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что антитело присутствует в концентрации примерно от 75 примерно до 100 мг/мл;

107) композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит один из следующих или их комбинацию:

а) буферный агент, выбранный из группы, состоящей из гептагидрата двухосновного фосфата натрия, фосфата, цитрата, фосфата натрия, фосфата калия, цитрата натрия и гистидина, обеспечивая рН от 6,8 до 7,2; и/или

b) сахар; и/или

c) полисорбат 80; и/или

d) ЭДТА;

108) композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит один из следующих или их комбинацию:

а) буферный агент, выбранный из группы, состоящей из гептагидрата двухосновного фосфата натрия, фосфата, цитрата, моногидрата лимонной кислоты, фосфата натрия, фосфата калия, цитрата натрия и гистидина, обеспечивая рН от 6,2 до 6,6; и/или

b) сахар; и/или

c) полисорбат 80; и/или

d) ЭДТА;

109) композиция по любому из пп.1-108 для применения в терапии;

35) композиция по любому из пп.1-108 для применения при лечении астмы, тяжелой эозинофильной астмы, тяжелой астмы, неконтролируемой эозинофильной астмы, эозинофильной астмы, субэозинофильной астмы, хронической обструктивной болезни легких, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом, гиперэозинофильного синдрома, полипоза носа, буллезного пемфигоида и эозинофильного эзофагита.

Примеры

Пример 1. Приготовление композиции.

Получали несколько партий композиции, содержащей моноклональное антитело меполизумаб против IL-5.

Инокулят клеток яичника китайского хомячка, стабильно трансфецированных конструктами экспрессирующего вектора, содержащими последовательности нуклеиновой кислоты, приведенные в SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, культивировали в биореакторах объемом 5000 л, содержащих жидкую культуральную среду. Зрелое антитело, кодируемое этими нуклеиновыми кислотами, представляет собой меполизумаб и содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2.

Биореакторы работали при температуре примерно от 34,5 примерно до 35,5°C. Воздух и кислород барботировали в культуральную среду и поддерживали рН примерно от 6,75 до 7. Продолжительность культивирования составляла примерно от 12 до 18 дней. Возраст клеток *in vitro* (дни культуры от первоначального оттаивания банка основных клеток до сбора) составлял 166 дней или менее. После этого очищенный супернатант клеточной культуры собирали центрифугированием и глубинной фильтрацией клеточной культуральной среды. Затем этот осветленный супернатант подвергали хроматографии с протеином А и примеси пропускали через эту хроматографическую колонку. Связанный белок, включая молекулы антитела, затем элюировали из колонки с протеином А, обрабатывали при рН от 3,3 до 3,7 в течение примерно 15-240 мин. Этот обработанный препарат затем доводили до рН примерно от 4,3 до 4,7 и выдерживали в течение примерно от 20 до 1110 мин. Этот обработанный препарат затем осветляли через фильтрационный модуль глубинного фильтра и двухслойный фильтр 0,5/0,2 мкм. Отфильтрованный препарат затем подвергали анионообменной хроматографии с быстрым потоком на Q-SEPHAROSE™ при рН загрузки примерно от 8,3 до 8,7 и элюировали из хроматографической колонки. Этот элюат выдерживали в течение примерно 96 ч или менее. Затем добавляли гуанидин и сульфат аммония. Гуанидин добавляли до концентрации примерно от 1,8 до 2,2 М и выдерживали в течение примерно 15-240 мин. Затем этот раствор подвергали хроматографии на фенилсефарозе™ с быстрым потоком при соотношении загрузки примерно от 12 г белка/на 1 л смолы примерно до 27 г/л смолы, с градиентом объема элюирования (объемы слоя, BV) примерно от 9 примерно до 11 и с порогом элюирования (% от максимальной высоты пика) примерно от 17 примерно до 23. Затем фильтрацию вируса проводили с использованием фильтра Planova 20N для удаления вируса. Затем этот фильтрат доводили до целевой концентрации, составляющей примерно от 46 г белка /на 1 л примерно до 66 г белка /1 л, объем нерасфасованной лекарст-

венной формы (BDS) готовили путем тангенциальной фильтрации и ультрафильтрационного обмена с раствором, содержащим примерно 20 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия и 12% мас./об. сахарозы. Затем этот раствор доводили до целевой концентрации примерно от 76 г белка/л примерно до 82 г белка/л и добавляли примерно 0,05% мас./об. полисорбата 80. Этот раствор затем фильтровали через фильтры PES 0,5/0,2 мкм, контейнеры с раствором заполняли и замораживали. Продукт лекарственного средства готовили с использованием стерильного процесса производства, включающего оттаивание и объединение контейнеров для сыпучих материалов с последующей фильтрацией сыпучего материала во флаконы, лиофилизацией, закупориванием и обжатием с использованием способов производства, хорошо известных в данной области. Окончательный вид лекарственного препарата представляет собой лиофилизированный лекарственный препарат в одноразовом флаконе.

Лиофилизат из каждой полученной партии восстанавливали добавлением воды с получением композиции, содержащей 100 мг/мл белка, моноклонального антитела меполизумаба против IL-5 и 26 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия, 15% мас./об. сахарозы и 0,065% мас./об. полисорбата 80 при pH примерно от 6,8 примерно до 7,2.

Пример 2. Характеристика композиции.

Охарактеризованы образцы из партий композиции, содержащие моноклональное антитело против IL-5, полученное, как описано выше.

Капиллярное изоэлектрическое фокусирование (сIEF) последовательно демонстрировало присутствие шести изоформ антитела в композиции (например, эталонный стандарт композиции (RS) 101245722) (см. фиг. 1). Эти изоформы представляют собой изоформы пика 65, пика 78, пика 88, пика 92, основного пика и пика 112, изображенные на фиг. 1. Образцы композиции подвергали сIEF с использованием стандартных методов, pI 7,9 и pI 9,46 были включены в образцы, подлежащие анализу сIEF. Электроферограмма сIEF, изображенная на фиг. 1, является репрезентативной для композиции из нескольких партий.

Электроферограмма демонстрирует, что композиция содержит основную форму, кислые формы и формы антитела как основания. Основную форму можно увидеть на фиг. 1, а в некоторых случаях также идентифицируется в виде пика 100. Кислые формы антитела соответствуют пику 65, пику 78, пику 88 и пикам 92 форм фиг. 1. Формы антитела как основания соответствуют формам пика 112 фиг. 1.

Формула, используемая для оценки пиков, представлена ниже

$$\text{peakname} = \text{int} \{ (\text{pI}_{\text{Peak}} - 8) / (\text{pI}_{\text{Main}} - 8) * 100 \}$$

где int = целое и

pI_{Peak} = pI пика, который подлежит определению.

В табл. 7 представлено соглашение об определении пиков для электроферограмм сIEF композиции, содержащей моноклональное антитело против IL-5. Название пиков, определенных, как представлено в настоящем описании, должно быть проверено на основе наблюдаемой электрофоретической/хроматографической картины. Пики, которые не попадают в диапазоны, представленные в настоящем описании, должны обрабатываться в соответствии с приведенной выше формулой.

Таблица 7

Идентификация пиков сIEF

	Пик	Пик	Пик	Пик	Пик	Пик	Пик	Пик
Пики с								
Временем удержания выше чем	62	75	85	89	100	103	109	120
Временем удержания менее чем	68	81	91	95	100	109	115	126
Опубликовано в виде пика	Пик 65	Пик 78	Пик 88	Пик 92	Пик 100	Пик 106	Пик 112	Пик 123

Проводили интегральный анализ пиков электроферограммы. См. табл. 1.

Общая площадь пика в выбранных cIEF электрогераграммах различных партий композиций

MDS1 Партия			MDS2 Партия		
T04L009	T04M001	T04N002	T0414001 (PPQ11)	T0414002 (PPQ12)	T0414003 (PPQ13)
Заряд изоформ согласно cIEF					
Площадь пика 61,2% для основной формы; 37,5% для всех кислых форм; 1,2% для всех оснований	Площадь пика 63,9% для основной формы; 34,4% для всех кислых форм; 1,6% для всех оснований	Площадь пика 60,6% для основной формы; 38% для всех кислых форм; 1,3% для всех оснований	Площадь пика 58,1% для основной формы; 37,1% для всех кислых форм; 4,9% для всех оснований	Площадь пика 61,8% для основной формы; 34,1% для всех кислых форм; 4% для всех оснований	Площадь пика 62,3% для основной формы; 33% для всех кислых форм; 4,7% для всех оснований

Это показало, что основная форма превышает или равна 50% от общей площади пика в образцах (при этом также наблюдаются значения примерно от 58,1 до 62,3%). Это также показало, что кислые формы составляли меньше или равны 45% от общей площади пика в образцах (при этом наблюдались также значения примерно от 20 примерно до 45%, например 32,2% и 40,7%). Формы в виде основания составляют примерно от 1 примерно до 15% от общей площади пика в образцах (при этом также наблюдаются значения примерно от 1,2 примерно до 4,9%).

Затем фракции пиков основной формы, кислой формы и формы как основания, производимых cIEF, анализировали с помощью анализов слабого катионного обмена (WCX), трипсинового картирования пептидов и жидкостной хроматографии-масс-спектрологии/масс-спектрологии (LC-MS/MS). Для этих анализов использовали стандартные методы.

Эти результаты WCX, трипсинового картирования пептидов и LC-MS/MS продемонстрировали, что фракция пика основной формы содержала две модификации mAb IgG1. Таким образом, в аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела SEQ ID NO: 99,6% N-концевого глутамина (Gln, Q) подвергались циклизации до пироглутаминовой кислоты (pGlu) и 99,9% C-концевого лизина тяжелой цепи (HC) (Lys, K) 449 отщепляли. Как правило, уровень pGlu в тестируемых партиях составлял >95%, а уровень HC без C-концевого K449 составлял >98%.

Эти результаты WCX, трипсинового картирования пептидов и LC-MS/MS также продемонстрировали для пиков кислых форм, что наблюдали сдвиг массы в один дальтон, характерный для дезамидирования. Картирование пептидов LC-MS/MS продемонстрировало, что пики кислых форм содержат смесь дезамидированных видов антител. Дезамидирование наблюдалось преимущественно в аминокислотной последовательности HC N386, приведенной в SEQ ID NO: 1, и в аминокислотной последовательности LC N31, приведенной в SEQ ID NO: 2. Более низкий уровень дезамидирования наблюдали также в аминокислотной последовательности HC N317, приведенной в SEQ ID NO: 1.

В целом, эти экспериментальные данные продемонстрировали, что аспарагиновые остатки аминокислотной последовательности HC N317, HC N386, HC N299, приведенной в SEQ ID NO: 1, и аминокислотной последовательности LC N31, приведенной в SEQ ID NO: 2, были восприимчивы к дезамидированию.

Эти результаты WCX, трипсинового картирования пептидов и LC-MS/MS продемонстрировали, что пики форм в виде оснований, которые антитело образует в этом пике, имели по меньшей мере один интактный C-концевой аминокислотный остаток лизина. Виды антител с интактными лизинами по сравнению с другими формами, в которых они отсутствуют, будут мигрировать в основной области из-за дополнительных положительных зарядов этих остатков. Таким образом, основные формы, такие как пик 112, соответствуют формам антител, в которых одна или обе аминокислотные последовательности тяжелой цепи имеют аминокислотную последовательность C-концевого лизина, приведенную в последовательности SEQ ID NO: 1.

Первичное секвенирование композиции, содержащей моноклональное антитело против IL-5, также осуществляли стандартными методами LC-MS/MS. Эти анализы исследовали первичную структуру и аминокислотную последовательность молекул антитела в композиции. В частности, эти анализы продемонстрировали, какие аминокислотные остатки были дезамидированы, окислены, циклизированы или отсутствовали в антителе против IL-5, и какой их процент в популяции антител против IL-5 (например, экспрессировали из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 13 и последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 14) присутствует в композиции (см. табл. 9).

Первичная последовательность антител с помощью пептидного картирования LC-MS/MS

MDS1 Партия			MDS2 Партия		
T04L009	T04M001	T04N002	T0414001 (PPQ11)	T0414002 (PPQ12)	T0414003 (PPQ13)
Первичная последовательность, определенная пептидным картированием LC-MS/MS					
Деаμιди́рование	Деаμιди́рование	Деаμιди́рование	Деаμιди́рование	Деаμιди́рование	Деаμιди́рование
1% тяжелой цепи (HC или N) аспарагин (N) 317 ; 1,9% HC N386; 5,8% легкой цепи (LC или L) N31	1,1% HC N317; 2,2% HC N386; 6,5% LC N31	1,1% HC N317; 1,6% HC N386; 6,2% LC N31	1,1% HC N317; 1,7% HC N386; 5,6% LC N31	1,2% HC N317; 1,6% HC N386; 6,5% LC N31	1,1% HC N317; 1,9% HC N386; 6,2% LC N31
HC 1-5 pGlu 93,7%; HC 449 Lys удален 99,2%	HC 1-5 pGlu 94,6%; HC 449 Lys удален 98,4%	HC 1-5 pGlu 94,0%; HC 449 Lys удален 97,6%	HC 1-5 pGlu 93,7%; HC 449 Lys удален 99,2%	HC 1-5 pGlu 94,6%; HC 449 Lys удален 98,9%	HC 1-5 pGlu 95,3%; HC 449 Lys удален 98,5%
Окисление 0,9% HC метионин (M) 64; 1,1% HC M82/85; 3,0% HC M254; 0,7% HC M360; 0,6% HC M430; 0,8% LC M4	Окисление =1,0% HC M64; 0,7% HC M82/85 ; 2,9% HC M254; 0,5% HC M360; 0,6% HC M430; 0,4% LC M4	Окисление =0,8% HC M64; 0,8% HC M82/85; 3,1% HC M254; 0,5% HC M360; 0,6% HC M430; 0,5% LC M4	Окисление =0,7% HC M64; 0,7% HC M82/85; 2,6% HC M254; 0,4% HC M360; 0,5% HC M430; 0,3% LC M4	Окисление =0,8% HC M64; 0,7% HC M82/85; 2,7% HC M254; 0,4% HC M360; 0,5% HC M430; 0,4% LC M4	Окисление =0,7% HC M64; 0,7% HC M82/85; 2,7% HC M254; 0,5% HC M360; 0,6% HC M430; 0,5% LC M4

Варианты антител.

Меполизумаб связывается с растворимым IL-5 и блокирует растворимый IL-5 от связывания с его рецептором. Структура IL-5 указывает на секретируемый белок, и нет никаких признаков каких-либо связанных с мембраной форм IL-5 в любом типе клеток. Таким образом, эффекторные функции Fc не являются частью механизма действия меполизумаба (МДМ). На основе свойств МДМ и РК меполизумаба установили, что в биологическую функцию этого антитела вовлечены две функции: связывание с IL-5 через CDR и связывание с рецептором FcRn через Fc-область.

Посредством обширных исследований характеристик, проведенных выше и изложенных ниже, было определено, что, по меньшей мере, деаμιди́рование, окисление и агрегация могут приводить к получению вариантов антител в композиции меполизумаба, и эти варианты могут влиять на функцию меполизумаба. Конкретные уровни этих вариантов должны сохраняться для обеспечения надлежащей биологической функции. Функция представлена в настоящем описании в пределах допустимого диапазона удельной антигенсвязывающей активности 0,7-1,3 (связывание IL5) и 70-130% связывания с FcRn. Таким образом, стадии для идентификации вариантов антител, которые влияют на функцию, включают следующее: (i) образуется ли вариант антитела, (ii) влияет ли вариант на функцию, и (iii) какой уровень варианта может приводить к получению функциональной композиции.

Функция.

Связывание IL-5: проводили статистический анализ для расчета приемлемого диапазона функциональной активности связывания антигена с использованием всех данных о высвобождении лекарственного средства (ЛС) и лекарственного продукта (ЛП), полученных к настоящему моменту. Рассчитанный статистический диапазон сравнивали с клиническим опытом и оценивали на основе известного влияния вариантов, связанных с продуктом, на эффективность. На основе этого анализа допустимый диапазон функциональной активности связывания антигена во время высвобождения и в конце срока годности является антигенспецифичным связыванием, составляющим 0,7-1,3.

IL-5-специфичное связывание определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIACORE™, выполняемого в режиме связывания. Этот анализ SPR способен детектировать снижение связывания антигена, что является следствием изменений в меполизумабе и вариантах меполизумаба, связанных с эффективностью.

SPR используется для определения антигенспецифичной активности связывания меполизумаба.

Сначала эталонный стандарт меполизумаба вводили на поверхность сенсорного чипа CM5, содержащего иммобилизованный протеин А, и затем вводили разведенный белок IL-5 с фиксированной концентрацией, что позволяло IL-5 связываться с захваченным образцом меполизумаба. Концентрацию меполизумаба, связанного с IL-5, известного как функциональное связывание меполизумаба с IL-5, определяли из соответствующей контрольной стандартной калибровочной кривой меполизумаба. Результат SPR регистрировали как концентрацию функционального связывания меполизумаба с IL-5, деленную на общую концентрацию белка.

Связывание с FcRn: активность связывания меполизумаба с неонатальным рецептором Fc (FcRn) также измеряли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием прибора BIACORE™. Было определено, что приемлемый диапазон функциональной активности связывания FcRn составляет 70-130%, что основано на результатах, полученных к настоящему моменту при разработке продукта меполизумаба, известных переменных анализа и результатах, полученных для аналогичных продуктов mAb.

Fc-область меполизумаба связывается с FcRn, и это взаимодействие отражает длительный период полужизни меполизумаба в сыворотке (средний конечный период полужизни = 20 дней). В анализе SPR использовали сенсорный чип нитрилтриуксусной кислоты (NTA), содержащий иммобилизованные рецепторы FcRn, для захвата меполизумаба фиксированной концентрации. Сначала Ni²⁺ вводили при фиксированной концентрации и захватывали на сенсорном чипе NTA путем хелатирования Ni²⁺ через NTA. Затем рецептор FcRn вводили с фиксированной концентрацией, а 6х гистидиновая метка на С-конце α-цепи рецептора FcRn связывалась с Ni²⁺, который ранее был захвачен. Меполизумаб, который был разработан в пределах кривой стандартного диапазона концентраций, затем инъецировали по поверхности сенсорного чипа NTA, содержащего захваченный рецептор FcRn. Концентрацию меполизумаба, связанного с рецептором FcRn, экстраполировали из соответствующей контрольной стандартной калибровочной кривой меполизумаба. Результат SPR регистрировали как концентрацию функционального связывания меполизумаба с рецептором FcRn, деленную на общую концентрацию белка.

Метод SPR для специфичного связывания антигена и связывания FcRn использует эталонный стандарт меполизумаба. Эталонный стандарт меполизумаба просто используется в анализах для получения данных пригодности системы и данных сравнения образцов, чтобы гарантировать, что методы выполняются надлежащим образом. Эталонный стандарт позволяет создать калибровочную кривую, а концентрации образцов интерполируются по кривой.

Кислые варианты.

Затем проводили исследования форсированной деградации для определения влияния повышенного уровня кислых вариантов, например дезамидирования, на функцию/эффективность антитела, т.е. связывание антигена и активность FcRn-связывания.

В исследованиях с форсированной деградацией при pH 9 композицию доводили до pH 9 с помощью 6N гидроксида натрия и инкубировали в течение 30 дней при 40°C. Образцы собирали в дни 0, 3, 7, 14 и 30 и сравнивали с композицией, не подвергнутой стрессу, которую использовали в качестве контроля. Затем образцы, подвергнутые стрессу pH 9, анализировали с помощью cIEF. Результаты представлены в табл. 10 и на фиг. 1 (день 0 и день 3). Композиция, подвергнутая стрессу pH 9, деградировала за пределами возможностей анализа cIEF на 14-й день; поэтому в табл. 10 показаны только результаты до момента времени, соответствующего 7 дням. При условиях стресса pH 9 в течение 3 дней наблюдали, что общая кислая область составляет 74,4% и 71,9% для двух различных партий композиции.

Таблица 10

Краткий обзор данных cIEF для исследований форсированной деградации при pH 9

Условия	Способ первичного производства / Партия	День	Площадь (%)		
			Основной пик	Общий пик кислой формы	Общий пик основанная
Контроль			62,9	35,9	1,2
Повышенное pH 9	MDS1 T004L003S	0	62,5	36,1	1,4
		3	24,8	74,4	0,8
		7	8,3	91,7	
	MDS2 T0413010	0	63,7	33,3	3
		3	26,9	71,9	1,2
		7	11,4	88,3	0,3

Образцы для исследования форсированной деградации при pH 9 композиций из различных партий затем тестировали на антигенспецифичную активность связывания (табл. 11) и активность связывания FcRn (табл. 12) с использованием стандартных методов поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Таблица 11

Сводная информация об антигенспецифичной активности (например, активность связывания IL-5 человека), измеренная с помощью SPR при pH 9 форсированной деградации образцов композиции из различных партий

Условие	Первичный процесс производства/Партия	День	Антигенспецифичная активность связывания
Повышенное pH 9	MDS1 T04L003S	0	0,96
		3	0,74
		7	0,60
	MDS2 T0413010	0	0,94
		3	0,74
		7	0,62

Таблица 12

Связывание FcRn, измеренное с помощью SPR при исследовании форсированной деградации образцов композиции pH 9 из различных партий

Условие	Первичный процесс производства/Партия	День	FcRn Связывание (%)
Повышенное pH 9	MDS1 T04L003S	0	91
		3	84
		7	82
	MDS2 T0413010	0	86
		3	82
		7	80

IL5-специфичная активность связывания на 3-й день (т.е. примерно 72-74% кислого варианта) составляла 0,74 для обеих партий композиции, подвергнутых форсированной деградации при pH 9. Активность связывания FcRn составляла 82% и 80%, соответственно, для обеих партий композиции, подвергнутой форсированной деградации при pH 9. Эти значения были в пределах критериев приемлемости для каждого анализа. Критерий приемлемости антигенспецифичной активности связывания составляет 0,70-1,30, а критерий приемлемости связывания FcRn составляет 70-130%. Таким образом, кислый вариант может составлять примерно до 74% для сохранения функции композиции меполизумаба.

Дезамидирование.

Исследования форсированной деградации могут определять, какие остатки, которые, по-видимому, восприимчивы к дезамидированию, фактически дезамидируются, и влияет ли дезамидированный вариант на функцию, и какие уровни дезамидирования приемлемы в композиции для поддержания функции. Остатки аспарагина, которые были экспериментально определены как восприимчивые к дезамидированию, представляют собой HC N317, HC N386, HC N299 и LC N31. Были проведены исследования форсированной деградации для определения влияния повышенного уровня дезамидирования LC N31 в аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 2, на антигенсвязывающую активность. В этих исследованиях композиции из разных партий доводили до pH 9 с помощью 6N гидроксида натрия и инкубировали в течение 30 дней при 40°C. Образцы собирали в дни 0, 3, 7, 14 и 30 и сравнивали с композицией, не подвергнутой стрессовому воздействию (например, с эталонным стандартом), которая использовалась в качестве контроля. Образцы со стрессовым воздействием pH 9 тестировали с помощью пептидного картирования LC-MS/MS. Результаты представлены в табл. 13. Когда меполизумаб выдерживали при pH 9 в течение 3 дней, то уровень дезамидированного LC N31 в аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 2, составлял 17,4% и 16,8% для разных партий композиции. См. табл. 13. Данные связывания антигена и FcRN для меполизумаба, который выдерживали при pH 9 в течение 3 дней, представлены в табл. 11 и 12.

Процент дезамидирования с помощью пептидного картирования LC-MS/MS при исследовании форсированной деградации с pH 9 образцов композиции из разных партий на 3-й день

Условие	Первичный процесс производства/Партия	Дезамидирование (%)			
		HC N317	HC N386	LC N31	HC N299
контроль		0,8	5,5	5,2	0,2
Повышенное pH 9	MDS1 T04L003S	0,9	28,2	17,4	1,3
	MDS2 T0413010	1,0	27,8	16,8	1,3

Таким образом, в день 3 удельная антигенсвязывающая активность 0,74 (табл. 11) и FcRn-связывающая активность 84 и 82% (табл. 12) демонстрируют, что дезамидирование по N31 примерно до 17% и дезамидирование по N386 примерно до 28% (табл. 13) может поддерживать функциональную композицию в приемлемом диапазоне удельной антигенсвязывающей активности 0,70-1,30 и активности связывания FcRn на уровне 70-130%.

Окисление.

Были проведены исследования форсированной деградации для экспериментального исследования восприимчивости метионина и других аминокислотных остатков в тяжелых и легких цепях антитела к окислению. Исследования форсированной деградации могут определять, какие остатки, которые, по видимому, подвержены окислению, действительно окисляются, и влияет ли окисленный вариант на функцию, и какие уровни окисления приемлемы в композиции для поддержания функции/эффективности (связывание антигена и/или FcRn связывание).

Образцы композиции инкубировали с 0,1% перекисью водорода (H₂O₂) в течение 48 ч при комнатной температуре (RT) для индуцирования окисления. Образцы собирали через 0, 6, 12, 24 и 48 ч. Их сравнивали с композицией, не подвергнутой стрессовому воздействию (например, с эталонным стандартом), которая использовалась в качестве контроля. Из этих исследований было определено, что остатки метионина (M), наиболее подверженные окислению, включают HC M64, HC M82, HC M85, HC M254, HC M360, HC M430 аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 1, и LC M4 аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 2. Остатки метионина (M), наиболее подверженные окислению, включают M64, который расположен в CDR2 HC; M2 54 и M430, которые расположены в кармане связывания FcRn и протеина A в Fc-области; и M360 аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 1. Остатки метионина, подверженные окислению, в меньшей степени включали HC M4, HC M82 и HC M85 аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 1. Кроме того, было определено, что LC C220 аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 2, подвержен окислению в условиях химического воздействия. Важно отметить, что LC C220 и HC C222 образуют межцепочечную дисульфидную связь, которая соединяет тяжелую и легкую цепи.

Уровни сульфоксида в результате окисления метионина и сульфокислоты в результате окисления цистеина измеряли с использованием пептидного картирования LC-MS/MS и суммировали в табл. 14. HC M64, M254, M360 и M430 были более чем на 70% окислены через 48 ч после инкубации с 0,1% перекисью водорода (H₂O₂).

Процент окисления, определяемый картированием пептидов LC-MS/MS в исследуемых образцах композиции из разных партий после обработки H₂O₂ в течение 48 ч

Первичный процесс производства	BDS Партия	Окисление (%)						
		HC M64	HC M254	HC M360	HC M430	HC M82 и 85	LC M4	LC C220
Контроль		0,9	3,5	0,5	0,5	0,3	0,2	0
MDS1	T04L003S	72,9	99,9	98,5	95,6	3,2	0,8	7,6
MDS2	T0413010	85,6	99,8	98,1	98,7	3,5	1	7,2

Антигенспецифичное связывание с антителами в композиции измеряли с помощью SPR. Это продемонстрировало большее снижение удельной антигенсвязывающей активности в течение 48 ч в разных партиях, подвергнутых стрессовому воздействию H₂O₂, как описано в табл. 15. Это уменьшение связывания антигена коррелирует с относительно более высокими уровнями окисления M64, наблюдаемыми с помощью пептидного картирования LC-MS/MS. Антигенспецифичные активности связывания в тестируемых образцах из разных партий композиции уменьшались примерно на 15 и 32% соответственно.

Когда окисленный меполизумаб составлял 85,6%, то антигенспецифичная активность связывания все еще сохранялась на уровне 0,57. Использовали линейную зависимость между кумулятивными уровнями окисления в меполизумабе и удельной антигенсвязывающей активностью, и в худшем случае было определено, что HC M64 может быть примерно на 50% окислен, и при этом антитела в композиции будут сохранять антигенсвязывающую активность в диапазоне 0,7-1,3.

Таблица 15

Антигенспецифичная активность связывания, измеренная SPR в разных партиях композиции, подвергнутых обработке H_2O_2 в течение 48 ч

Первичный процесс производства/Партия	Условие	Время (часы)	Антигенспецифичная активность связывания
MDS1 T04L003S	Контроль окисления	0	0,92
		48	0,92
	0,1% H_2O_2	0	0,91
		48	0,76
MDS2 T0413010	Контроль окисления	0	0,96
		48	0,96
	0,1% H_2O_2	0	0,89
		48	0,57

Профили FcRn-связывающей активности образцов, подвергнутых стрессовому воздействию H_2O_2 , из разных партий композиции были очень сходны с существенным снижением FcRn-связывающей активности в течение 48 ч по сравнению с контрольными (необработанный эталонный стандарт), как представлено в табл. 16. HC M254 и HC M430 расположены в Fc-области, и, как было показано, окисление приводит к уменьшению связывания FcRn. На основе результатов картирования пептидов, полученных во время исследований форсированной деградации, когда композицию химически окисляли с помощью H_2O_2 в течение 48 ч, уровни окисленных HC M254 и HC M430, наблюдаемые в разных партиях, составляли $\geq 95\%$. Результаты связывания FcRn показали приблизительно 80%-ное снижение связывания антигена FcRn в образцах, подвергнутых воздействию H_2O_2 , из разных партий композиции. Когда окисленный меполизумаб составлял $\geq 90\%$, то FcRn-связывающая активность все еще сохранялась на уровне 22%. Использовали линейную зависимость между кумулятивными уровнями окисления в меполизумабе и FcRn-связывающей активностью, и в худшем случае было определено, что HC M254 и HC M430 могут быть окислены на 50%, и при этом антитела в композиции будут сохранять активность связывания FcRn в диапазоне 70-130%.

Таблица 16

FcRn-связывающая активность, измеряемая с помощью SPR в разных партиях композиции, подвергнутых обработке H_2O_2 в течение 48 ч

Первичный процесс производства/Партия	Условие	Время (часы)	FcRn-связывающая активность (%)
MDS1 T04L003S	Контроль окисления	0	97
		48	94
	0,1% H_2O_2	0	79
		48	22
MDS2 T0413010	Контроль окисления	0	97
		48	98
	0,1% H_2O_2	0	77
		48	17

Было проведено исследование фотостабильности для определения влияния индуцированного светом окисления триптофана на антигенсвязывающую активность антител в разных партиях композиции. Продемонстрировали, что триптофан W52 в тяжелой цепи антитела подвержен окислению. Для этих исследований композицию из разных партий подвергали воздействию 1,8 млн·Лк·ч видимого света в течение приблизительно 60 ч при 25°C для индуцирования фотостресса. Образцы, собранные в 0, 3, 7, 14 и 30 ч, сравнивали с эталонным стандартом композиции, не подвергнутым стрессовому воздействию, который использовали в качестве контроля. Уровень диокисления/кинурина, возникающий в результате окисления триптофана, был очень похож в разных партиях композиции, подвергнутых воздействию света, как показано в табл. 17. Повышенное окисление HC W52 детектировали через 60 ч воздействия света.

Таблица 17

Процент окисления, измеренный с помощью пептидного картирования LC-MS/MS в разных партиях композиции после фотостресса в течение 60 ч

Первичный процесс производства/Партия	Уровень окисления (%)	
	W52 (+32 Да)	W52 (+4 Да)
Контроль	0,1	0
MDS1 T04L003S	3,3	3,4
MDS2 T0413010	3,5	4,6

Профили антигенспецифичной активности связывания антител в различных партиях композиции, подвергнутой фотострессу, выявили снижение удельной антигенсвязывающей активности с течением времени. Данные суммированы в табл. 18. Когда окисленный меполизумаб составлял приблизительно 7%, то антигенспецифичная активность связывания все еще сохранялась на уровне 0,53. Использовали линейную зависимость между кумулятивными уровнями окисления триптофана в меполизумабе и антигенспецифичной активностью связывания, и было определено, что в худшем случае W52 может быть окислен на 3%, а антитела в композиции будут сохранять антигенсвязывающую активность в диапазоне 0,7-1,3.

Таблица 18

Антигенспецифичная активность связывания, измеренная SPR в разных партиях композиции после воздействия фотостресса в течение 60 ч

Первичный процесс производства/Партия	Условие	День	Антигенспецифичная активность связывания
MDS1 T04L003S	Контроль фотостресса	0	0,89
		60	0,89
	Фотостресс	0	0,89
		60	0,53
MDS2 T0413010	Контроль фотостресса	0	0,93
		60	0,93
	Фотостресс	0	0,93
		60	0,55

Таким образом, для поддержания функции (связывание IL-5 и/или связывание FcRn), HC M64 может окисляться до 50%, HC M254 и HC M430 могут окисляться до 50%, а W52 может быть окислен до 3%.

Агрегация.

Распределение по размерам антител в композиции контролировали с использованием стандартных методов не денатурирующей эксклюзионной хроматографии (SEC). В профиле SEC композиции RS детектировали три пика, как показано на фиг. 3 и фиг. 4. Основной пик, соответствующий 7,9 мин с относительной процентной площадью 99,4% был идентифицирован как мономер; минорный пик, соответствующий приблизительно 6,7 минутам с относительной процентной площадью 0,5% был идентифицирован как агрегат. Второй минорный пик наблюдали в некоторых партиях, элюируя после основного пика, что указывает на присутствие фрагмента. Как правило, этот пик ниже аналита SEC QL 0,1.

Пик агрегата дополнительно характеризовали с использованием SEC с детектированием многоуглового рассеяния света (MALS) и аналитическим ультрацентрифугированием (AUC). Результаты продемонстрировали, что профили SEC-MALS содержат пик раннего элюирования (димер) и пик более позднего элюирования (мономер), как показано на фиг. 5, для композиции RS, и на фиг. 6 для другой партии композиции. Линия, которая пересекает направление каждого пика, представляет собой молекулярную массу детектируемого образца и положение пика димера, которое незаметно на хроматограммах из-за низкого содержания димера в образцах.

Данные SEC-MALS использовали для расчета молярной массы мономеров и димеров антител. Полученная молекулярная масса мономеров в композиции RS и для другой партии композиции была сопоставима с теоретической массой мономера меполизумаба 148760 кДа, как показано в табл. 19. Детектировали изменчивость молекулярной массы, наблюдаемой для димера, из-за низкого уровня этого типа, присутствующего в образце.

Таблица 19

SEC-MALS анализ мономеров в композиции RS и для другой партии композиции		
Образец	Молекулярная масса (кДа)	
меполизумаба	Мономер	Димер
Эталонный стандарт RS 101245722	147	304
Партия T0413010	147	340

В качестве дополнительной методики для метода на основе фракций, в том числе SEC, использовали интегральный анализ площади скорости седиментации под кривой (AUC) для подтверждения отсут-

ствия нарушений равновесия самоассоциации или исключения агрегатов более высокого порядка из хроматографического разделения. Результаты AUC-анализа показали, что распределение с (s) содержит один доминирующий вид (основной пик), идентифицированный как мономер, с коэффициентом седиментации как для партии RS композиции, так и для другой партии композиции, составляющим 2,81S; и один пик агрегата, идентифицированный как димер, с коэффициентом седиментации 4,87S для партии RS композиции и 5,1S для другой партии композиции, как показано в табл. 20. Разница в значениях коэффициента седиментации между PRS и BDS не считается существенной и объясняется низким содержанием димера в образцах. Единственный вид с высокой молекулярной массой был димером, что согласуется с результатами SEC-UV и SEC-MALS.

Таблица 20

AUC анализ различных партий композиции

Образец меполизумаба (n=3)	Коэффициент седиментации S		Молекулярная масса кДа		Представленность	
	Monomer	Dimer	Мономер	Димер	Мономер	Димер
PRS 101245722	2,81	4,87	137	336	99,1%	0,9%
BDS T0413003	2,81	5,1	136	353	99,3%	0,7%

Коэффициенты седиментации, определенные для мономера и димера, были меньше, чем традиционно наблюдаемые значения для моноклональных антител IgG1. Состав меполизумаба содержит 12% мас./об. сахарозы, что приводит к получению высоковязкого образца, который вызывает более низкие коэффициенты седиментации, наблюдаемые для этих молекул антител в композиции. Результаты анализов SEC-UV, SEC-MALS и AUC демонстрируют, что видами агрегатов в композиции являются димеры антител.

Для исследования влияния агрегата на антигенсвязывающую активность было проведено исследование с низким pH в отношении композиций из разных партий. Образцы композиций из разных партий доводили до pH 3,5 с помощью 5N соляной кислоты. Затем образцы с pH, доведенным до 3,5, инкубировали в течение 30 дней при 40°C для индуцирования химических модификаций. Образцы, собранные в дни 0, 3, 7, 14 и 30, сравнивали с образцом RS композиции, не подвергнутому стрессовому воздействию, который использовали в качестве контроля. В результате продемонстрировали, что при химическом воздействии на композицию при низком pH 3,5 агрегация является одним из основных путей деградации.

Профили деградации SEC образцов композиции, подвергнутых стрессовому воздействию при pH 3,5, представлены на фиг. 7 и суммированы в табл. 21. При условиях стресса с низким pH 3,5 разные скорости агрегации наблюдали между различными партиями композиции. Однако к 30-му дню обе партии композиции достигали равновесия и имели аналогичные уровни агрегации. Это различие в скорости агрегации между различными партиями объясняется более высоким уровнем ковалентного димера по сравнению с нековалентным димером в партиях. Более медленная скорость агрегации, наблюдаемая в партии MDS1 композиции, объясняется более высокой долей нековалентного димера по сравнению с его долей в партии MDS2; нековалентные димеры ассоциируют и диссоциируют до достижения равновесия, что может замедлить общую скорость образования агрегатов.

Таблица 21

Суммированные данные SEC для партии RS композиции, не подвергнутой воздействию, и для партий композиции, подвергнутых pH-стрессу

Условие	Первичный процесс производства/Партия	День	Площадь (%)		
			Мономер	Агрегат	Фрагмент
контроль			99,6	0,4	0
Низкое pH 3,5	MDS1 T004L003S	0	99	1	0
		3	81,4	14,3	4,2
		7	59,3	35,4	5,2
		14	47,9	44,4	7,7
		30	36,8	51,2	12
	MDS2 T0413010	0	98,4	1,6	0,1
		3	56,5	40,5	3,1
		7	48,3	46,9	4,8
		14	41,9	50,7	7,4
		30	34	54,4	11,5

Профили антигенспецифичной активности связывания образцов партий, подвергнутых стрессу pH 3,5 продемонстрировали снижение удельной антигенсвязывающей активности во времени, как суммировано в табл. 22.

Таблица 22

Суммированные данные об антигенспецифичной активности связывания, измеренной с помощью SPR в образцах партий композиций, подвергнутых рН-стрессу

Условие	Первичный процесс производства/Партия	День	Антигенспецифичная активность связывания (мг/мл)
Низкое рН 3, 5	MDS1 T04L003S	0	0,92
		3	0,56
		7	0,43
	MDS2 T0413010	0	0,95
		3	0,57
		7	0,43

Профили FcRn-связывающей активности образцов партий композиций, подвергнутых стрессу рН 3,5, продемонстрировали снижение FcRn-связывающей активности с течением времени, как суммировано в табл. 23.

Таблица 23

Суммированные данные связывания FcRn, измеренные с помощью SPR, в партиях композиций, подвергнутых рН-стрессу

Условие	Первичный процесс производства/Партия	День	FcRn Связывание (%)
Низкое рН 3, 5	MDS1 T04L003S	0	90
		3	54
		7	46
	MDS2 T0413010	0	86
		3	51
		7	43

Таким образом, в табл. 21-23 показано, что происходит приблизительно 50%-ное уменьшение связывания антигена и связывания FcRn, когда в образце присутствует примерно 40% агрегатов. Когда меполизумаб агрегирован приблизительно на 40%, то удельная антигенсвязывающая активность все еще сохраняется на уровне 0,57, а активность связывания FcRn сохраняется на уровне 51% (табл. 22 MDS2, день 3). Наблюдали несколько другой профиль деградации для содержания агрегатов между MDS1 и MDS2 на 3-й день (табл. 21) из-за разных соотношений ковалентного и нековалентного димера.

Линейную зависимость между агрегацией в меполизумабе и антигенспецифичной и FcRn-связывающей активностью использовали из MDS2, и было определено, что в худшем случае агрегаты меполизумаба могут составлять 20%, а антигена в композиции будут сохранять антигенсвязывающую активность в диапазоне 0,70-1,30 и FcRn-связывающую активность на уровне 70-130%.

Таким образом, возможно, что антитела в композиции, содержащей меполизумаб, будут на 20% агрегированы и при этом сохраняют активность связывания IL-5 в диапазоне 0,7-1,3 и активность связывания FcRn в диапазоне 70-130%.

НСП.

Остаточный уровень белка клетки-хозяина CHO в композиции меполизумаба измеряли с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Этот метод использует антитела, полученные против нативных антигенов клеточной линии CHO, выращенной в условиях, которые имитируют условия технологического процесса меполизумаба.

Было установлено, что для композиции меполизумаба приемлемый диапазон для содержания НСП составляет ≤ 10 нг/мг. Этот диапазон получен из данных высвобождения, сгенерированных к настоящему времени, и представляет собой истинную аналитическую и технологическую изменчивость. 37 различных партий лекарственного средства имели следующее содержание НСП: 1,1 нг/мг (2 партии), 1 нг/мг (5 партий), 0,9 нг/мг (1 партия), 0,8 нг/мг (3 партии), 0,7 нг/мг (1 партия), 0,6 (1 партия), 0,5 нг/мг (1 партия), $<0,5$ нг/мг (4 партии), <1 нг/мг (19 партий).

Таким образом, существует две преобладающие функции, связанные с биологической активностью меполизумаба: связывание с IL-5 через CDR и связывание с рецептором FcRn через Fc-область.

Посредством обширных исследований характеристик, проведенных выше, было определено, что конкретные дезамидированные варианты антител, конкретные окисленные варианты антител и агрегированные варианты антител могут влиять на функцию композиции меполизумаба. Поэтому необходимо поддерживать конкретные уровни этих вариантов для обеспечения надлежащей функции/эффективности.

Пример 3. Список последовательностей в произвольной форме.

Подчеркивание ниже идентифицирует последовательности CDR в соответствии с определением CDR Kabat в вариабельных областях тяжелой и легкой цепи антител или последовательностях нуклеиновой кислоты, кодирующих эти последовательности CDR. Например, в SEQ ID NO: 1 каркасы и CDR представлены как каркас 1 обычным текстом, подчеркнута CDR1, каркас 2 обычным текстом, подчерк-

нута CDR2, каркас 3 обычным текстом, подчеркнута CDR3 и каркас 4 обычным текстом в порядке от N-концевой проксимальной области до C-концевой области последовательности. Звездочки справа от символа для однобуквенного аминокислотного кода указывают, что аминокислотный остаток слева является сайтом N-гликозилирования. Эта схема используется, например, в SEQ ID NO: 1-4, 11, 12 и 19-22 и т.д. N-концевые остатки метионина, изображенные в этих последовательностях, могут отщепляться. Таким образом, последовательности, изображающие N-концевой остаток метионина, также следует рассматривать как описывающие расщепленные версии этих белков, лишенные такого N-концевого остатка метионина. Последовательности нуклеиновых кислот представлены в виде ДНК-последовательностей нуклеиновой кислоты и включают остатки нуклеиновой кислоты "t", соответствующая РНК-последовательность также должна рассматриваться как описанная, так что остатки нуклеиновой кислоты "t" также можно рассматривать как описание остатка нуклеиновой кислоты "u". Кроме того, 5'-проксимальный стартовый кодон "atg" и 3'-проксимальные стоп-кодоны "taa", "tag" и "tga" были опущены из кДНК-последовательностей нуклеиновой кислоты, приведенных ниже. Например, это относится к SEQ ID NO: 31-34 и т.д.

Полноразмерная тяжелая цепь меполизумаба

SEQ ID NO: 1

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTVSGFSLTSYSVHWVRQPPGKGLEWLGVIWASGGTDY
NSALMSRLSISKDTSRNQVVLMTNMDPVDATATYYCARDPPSSLLRLDYWGRGTPVTVSSASTK
 GPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLCGPSVFLFPPKPKD
 TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN*STYRVVSVLTVLHQD
 WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
 IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
 LSLSPGK

Полноразмерная легкая цепь меполизумаба

SEQ ID NO: 2

DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNVHSPFPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVVLNLFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLL
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

VH МЕПОЛИЗУМАБА

SEQ ID NO: 3

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTVSGFSLTSYSVHWVRQPPGKGLEWLGVIWASGGTDY
NSALMSRLSISKDTSRNQVVLMTNMDPVDATATYYCARDPPSSLLRLDYWGRGTPVTVSS

VL МЕПОЛИЗУМАБА

SEQ ID NO: 4

DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNVHSPFPTFGGGTKLEIK

CDRH1 МЕПОЛИЗУМАБА

SEQ ID NO: 5

SYSVH

CDRH2 МЕПОЛИЗУМАБА

SEQ ID NO: 6

VIWASGGTDYNSALMS

CDRH3 МЕПОЛИЗУМАБА

SEQ ID NO: 7

DPPSSLLRLDY

CDRL1 МЕПОЛИЗУМАБА

SEQ ID NO: 8

KSSQSLNLSGNQKNYLA

CDRL2 МЕПОЛИЗУМАБА

SEQ ID NO: 9

GASTRES

CDRL3 МЕПОЛИЗУМАБА

SEQ ID NO: 10

QNVHSFPFT

Человеческий IL-5 (зрелый белок)

SEQ ID NO: 11

IPTEIPTSALVKETLALLSTHRTLLIANETLRIPVPVHKNHQLCTEEIFQGIGTLESQT
VQGGTVERLFLKNLSLIKKYIDGQKKKCGEERRRVNQFLDYLQEFGLVMNTEWIIIES

Субъединица α человеческого рецептора IL-5 и 30 форма 1 (зрелый белок)

SEQ ID NO: 12

DLLPDEKISLPPVNFITIKVTGLAQVLLQWKPNPDQEQRVNLEQVVKINAPKEDDYET
RITESKCVTILHKGFSASVRTILQNDHSLASSWASAEHAPPGSPGTSIVNLTCTTNTTEDNY
SRLRSYQVSLHCTWLVTDAPEdTQYFLYYRYGSWTEECQEYSKDTLGRNIACWFPRTFILSKG
RDWLAVLVNGSSKHSAIRPFDQLFALHAIDQINPPLNVTAEIEGTRLSIQWEKPVSAFPIHCFD
YEVKIHNTRNGYLQIEKLMTNAFISIIDDLSKYDVQVRAAVSSMCREAGLWSEWSQPIYVGNDE
HKPLREWFVIVIMATICFILLILSLICKICHLWIKLFPPIAPAKSNIKDLFVTTNYEKAGSSET
EIEVICYIEKPGVETLEDSVF

ДНК, кодирующая полноразмерную тяжелую цепь меполизумаба

SEQ ID NO: 13

caggttaccctgcgtgaatccggtccggcactagttaaaccgaccagaccctgacggt
aacctgcaccgtctccggttctccctgacgagctatagtgtaactgggtccgtcagccgccc
ggtaaaggctctagaatggctgggtgtaatatgggctagtgaggcacagattataattcggtc
tcatgtcccgtctgtcgatatccaaagacacctcccgtaccaggttggtctgaccatgactaa
catggaccgggtgacaccgctacctactgctgagatcccccttcttcttactacgg
cttgactactgggtcggtggtacccagttaccgtgagctcagctagtagccaagggcccatcgg
tcttccccctggcaccctcctccaagagcaccctctgggggacagcggccctgggtgctggt
caaggactacttccccgaaccgggtgacggtgctggtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtg
cacaccttccccggtgctctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgc
cctccagcagcttgggacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaaacaccaa
gggtggacaagagagttgagcccaaatcttgtagacaaaactcacacatgccaccgtgccagca
cctgaactcctgggggaccgtcagtccttcttccccccaaaaccaaggacaccctcatga
tctccccgaccctgaggtcaccatgctggtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaa
gttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcag
tacaacagcagctaccgtggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggca
aggagtacaagtgaaggctctccaacaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcaa
agccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccccggaggagatgacc
aagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagt
gggagagcaatgggacgggagaaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacgg
ctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttc
tcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctc
cgggtaag

ДНК, кодирующая полноразмерную легкую цепь меполизумаба
SEQ ID NO: 14

gatatcgtgatgaccagctctccagactcgctagctgtgtctctctggcgagagggccac
catcaactgcaagagctctcagagctgttaaacagtggaatcaaaagaactacttggcctgg
tatcagcagaaacccgggcagcctcctaagttgctcatttacggggcgctcactagggaaatctg
gggtacctgaccgattcagtgggcagcgggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagcct
gcaggctgaagatgtggcagtatactactgtcagaatgttcatagttttccattcacgttcggc
ggagggaccaagttggagatcaaactgactgtggcgggccatctgtcttcatcttcccgccat
ctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctgaataacttctatcccag
agaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtc
acagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcag
actacgagaaacacaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcac
aaagagcttcaacaggggagagtggt

Изобретение полностью описано настоящим, специалисту в данной области техники будет очевидно, что в него могут быть внесены многие изменения и модификации, не отходя при этом от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело против IL-5, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 2, и вариант антитела, имеющий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности тяжелой цепи, и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности легкой цепи, где композиция содержит $\leq 80\%$ вариантов кислых антител, при этом антитело против IL-5 обладает IL-5-специфической антигенсвязывающей и FcRn-связывающей активностью.

2. Композиция по п.1, где композиция содержит основную форму антитела, содержащую белок в количестве, превышающем или равном 20% белка в композиции, измеренном с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции.

3. Композиция по п.2, где основная форма антитела содержит белок в количестве, превышающем или равном 50% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции.

4. Композиция по п.3, где кислые формы антитела содержат примерно от 20 примерно до 45% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции.

5. Композиция по п.3, где композиция содержит форму антитела как основания, содержащую примерно от 1 примерно до 15% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции.

6. Композиция по п.3, где кислые формы антитела содержат примерно от 20 примерно до 45% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции; и композиция содержит форму антитела как основания, содержащую примерно от 1 примерно до 15% белка в композиции, измеренного с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования композиции.

7. Композиция по любому из пп.1-6, где композиция содержит $\leq 20\%$ агрегированных вариантов антител.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая очищенный препарат моноклонального антитела и буферный агент,

где pH композиции составляет от 6,8 до 7,2,

буферным агентом является гистидин, фосфат или цитрат или его соль,

очищенный препарат содержит изоформы, представленные пиком 65, пиком 78, пиком 88, пиком 92, основным пиком и пиком 112, изображенными на фиг. 1,

антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2,

антитело продуцируется клеткой яичника китайского хомячка и

антитело против IL-5 обладает IL-5-специфической антигенсвязывающей и FcRn-связывающей ак-

тивностью.

9. Композиция по п.8, где буферным агентом является фосфат или его соль.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело против IL-5, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, как представлено в SEQ ID NO: 2, и вариант антитела, имеющий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности тяжелой цепи, и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности легкой цепи, где композиция содержит $\leq 25\%$ вариантов дезамидированного антитела в положении N31 аминокислотной последовательности легкой цепи, где антитело против IL-5 обладает IL-5-специфической антигенсвязывающей и FcRn-связывающей активностью.

11. Композиция по п.10, где композиция содержит $\leq 35\%$ вариантов дезамидированного антитела в положении N386 аминокислотной последовательности тяжелой цепи.

12. Композиция по п.10 или 11, где композиция содержит $\geq 50\%$ вариантов антитела с делетированным C-концевым лизином в положении K449 аминокислотной последовательности тяжелой цепи.

13. Композиция по любому из пп.10-12, в которой композиция содержит $\leq 55\%$ окисленных вариантов антител в положении M64 аминокислотной последовательности тяжелой цепи и $\leq 3\%$ окисленных вариантов в положении W52 аминокислотной последовательности тяжелой цепи и $\leq 20\%$ агрегированных вариантов антител.

14. Композиция по любому из пп.10-13, где композиция содержит $\leq 55\%$ окисленных вариантов антител в положении M254 аминокислотной последовательности тяжелой цепи, $\leq 55\%$ окисленных вариантов антител в положении M360 аминокислотной последовательности тяжелой цепи и $\leq 55\%$ окисленных вариантов антител в положении M430 аминокислотной последовательности тяжелой цепи.

15. Композиция по любому из пп.10-14, где композиция содержит $\leq 20\%$ агрегированных вариантов антител.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая:

а) антитело против IL-5, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность CDRH1, приведенную в SEQ ID NO: 5, аминокислотную последовательность CDRH2, приведенную в SEQ ID NO: 6, и аминокислотную последовательность CDRH3, приведенную в SEQ ID NO: 7; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность CDRL1, приведенную в SEQ ID NO: 8, аминокислотную последовательность CDRL2, приведенную в SEQ ID NO: 9, и аминокислотную последовательность CDRL3, приведенную в SEQ ID NO: 10; и

б) 25% или менее дезамидированных форм антитела, содержащих аминокислотный остаток легкой цепи, дезамидированный по аспарагину 31, где антитело против IL-5 обладает IL-5-специфической антигенсвязывающей и FcRn-связывающей активностью.

17. Композиция по п.16, где композиция содержит окисленные формы антитела, содержащие по меньшей мере одну, выбранную из группы, состоящей из 3% или менее окисленных форм антитела, содержащих аминокислотный остаток тяжелой цепи, окисленный по триптофану 52, и 55% или менее окисленных форм антитела, содержащих аминокислотный остаток тяжелой цепи, окисленный по метионину 64.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая:

а) антитело против IL-5, содержащее последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, и последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4; и

б) 25% или менее дезамидированных форм антитела, содержащих аминокислотный остаток легкой цепи, дезамидированный по аспарагину 31, где антитело против IL-5 обладает IL-5-специфической антигенсвязывающей и FcRn-связывающей активностью.

19. Композиция по п.18, где композиция содержит окисленные формы антитела, содержащие по меньшей мере одну, выбранную из группы, состоящей из 3% или менее окисленных форм антитела, содержащих аминокислотный остаток тяжелой цепи, окисленный по триптофану 52, и 55% или менее окисленных форм антитела, содержащих аминокислотный остаток тяжелой цепи, окисленный по метионину 64.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию антител против IL-5, содержащую:

а) антитело против IL-5, содержащее последовательность тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и последовательность легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2;

б) модифицированную форму аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 1, содержащую по меньшей мере одну модификацию или комбинацию модификации аминокислотного остатка, выбранную из N-концевого остатка пироглутамата в положении 1, C-концевого остатка глицина в положении 448, дезамидированного остатка аспарагина в положении 386,

окисленного остатка триптофана в положении 52, окисленного остатка метионина в положении 64, окисленного остатка метионина в положении 254, окисленного остатка метионина в положении 360 и окисленного остатка метионина в положении 430; и

с) модифицированную форму аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, приведенной в SEQ ID NO: 2, содержащую дезамидированный остаток аспарагина в положении 31 в количестве $\leq 25\%$ от общей популяции,

где антитело против IL-5 обладает IL-5-специфической антигенсвязывающей и FcRn-связывающей активностью.

21. Композиция по п.20, где композиция содержит $\geq 92\%$ аминоконцевого пироглутаматного остатка в аминокислотном остатке 1, $\geq 90\%$ карбоксиконцевого глицинового аминокислотного остатка в аминокислотном остатке 448, $\leq 6\%$ дезамидированного аспарагинового остатка в положении 386, $\leq 1\%$ окисленного остатка триптофана в положении 52, $\leq 1,5\%$ окисленного остатка метионина в положении 64, $\leq 4,5\%$ окисленного метионина в положении 254, $\leq 0,8\%$ окисленного остатка метионина в положении 430 и $\leq 6,6\%$ дезамидированного остатка аспарагина в аминокислоте в положении 31.

22. Композиция по любому из пп.1-20, где композиция содержит $\leq 22,5\%$, $\leq 20\%$, $\leq 17,5\%$, $\leq 15\%$, $\leq 12,5\%$, $\leq 10\%$ или $\leq 7,5\%$ вариантов дезамидированных антител в положении N31 аминокислотной последовательности легкой цепи.

23. Композиция по п.22, где композиция содержит 3,3-6,6% вариантов дезамидированного антитела в положении N31 аминокислотной последовательности легкой цепи.

24. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что концентрация антитела составляет примерно от 75 примерно до 100 мг/мл.

25. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит один или комбинацию

(а) буферного агента, выбранного из группы, состоящей из гептагидрата двухосновного фосфата натрия, фосфата, цитрата, фосфата натрия, фосфата калия, цитрата натрия и гистидина, обеспечивая рН от 6,8 до 7,2; и/или

(b) сахара; и/или

(c) полисорбата 80; и/или

(d) ЭДТА.

26. Композиция по любому из пп.1-24, где композиция содержит водный жидкий состав, содержащий 100 мг/мл антитела и

(а) 15,5 мМ двухосновного гептагидрата фосфата натрия и 4,5 мМ моногидрата лимонной кислоты при рН 6,3,

(b) 12% мас./об. сахарозы,

(c) 0,02 мас./об. полисорбата 80 и

(d) 0,05 мМ ЭДТА.

27. Композиция по любому из пп.1-24, где композиция содержит лиофилизат, который может быть восстановлен добавлением воды с получением композиции, содержащей 75 мг/мл антитела и

(а) 20 мМ двухосновного гептагидрата фосфата натрия при рН от 6,8 до 7,2,

(b) 12% мас./об. сахарозы и

(c) 0,05 мас./об. полисорбата 80.

28. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что композиция обладает по меньшей мере 0,7 IL-5-специфичной антигенсвязывающей активностью; и/или по меньшей мере 70% FcRn-связывающей активностью по сравнению с эталонной стандартной композицией, содержащей SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 и 98% или более варианта НС с делетированным С-концевым лизином и 95% или более варианта НС с N-концевым пироглутаматом, 6% или менее дезамидированного варианта, 4% или менее варианта, окисленного по метионину или цистеину, 0,1% варианта, окисленного по триптофану, и 0,4% или менее агрегированного варианта.

29. Композиция по любому из пп.1-28 и фармацевтически приемлемый носитель.

30. Способ лечения заболевания пациента, включающий стадии:

а) идентификация пациента с заболеванием, выбранным из группы, состоящей из астмы, тяжелой эозинофильной астмы, тяжелой астмы, неконтролируемой эозинофильной астмы, эозинофильной астмы, субэозинофильной астмы, хронической обструктивной болезни легких, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом, гиперэозинофильного синдрома, полипоза носа, буллезного пемфигоида и эозинофильного эзофагита; и

с) введение терапевтически эффективного количества композиции по любому из предыдущих пунктов пациенту.

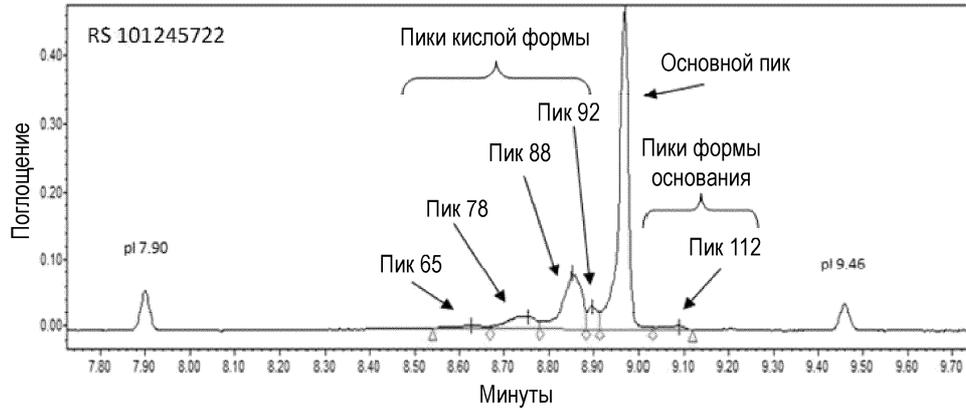
31. Способ по п.30, отличающийся тем, что композицию вводят в дозе, составляющей 100 мг один раз каждые 4 недели.

32. Способ по п.30, где заболевание у субъекта представляет собой эозинофильный гранулематоз с полиангиитом, и где композицию вводят субъекту в дозе 300 мг один раз каждые 4 недели.

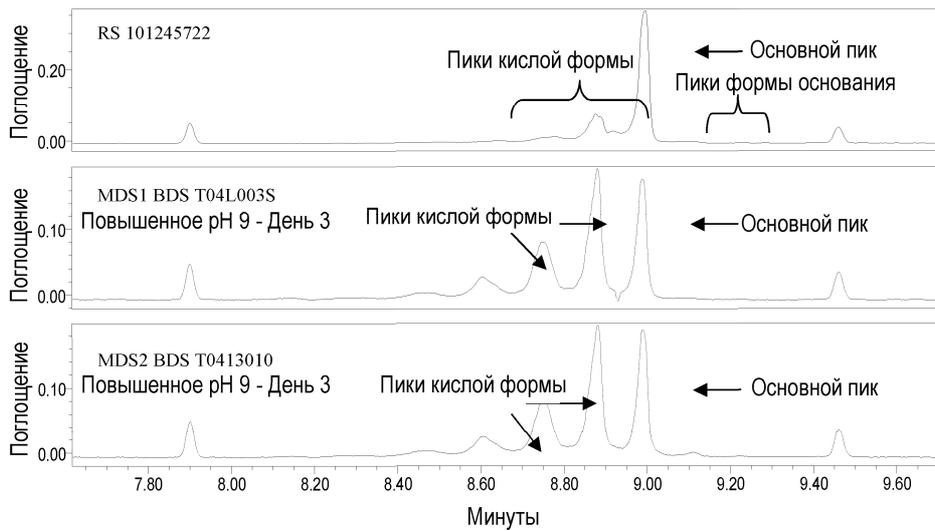
33. Способ по п.30, где заболевание у субъекта представляет собой гиперэозинофильный синдром, и где композицию вводят субъекту в дозе 300 мг один раз каждые 4 недели.

34. Применение композиции по любому одному из пп.1-29 для лечения заболеваний, опосредованных интерлейкином 5 (IL-5).

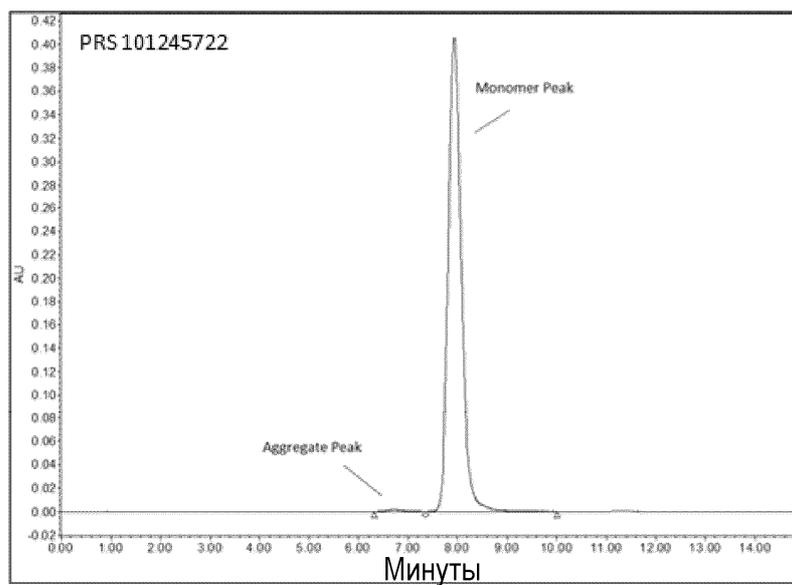
35. Применение композиции по п.34 для лечения астмы, тяжелой эозинофильной астмы, тяжелой астмы, неконтролируемой эозинофильной астмы, эозинофильной астмы, субэозинофильной астмы, хронической обструктивной болезни легких, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом, гиперэозинофильного синдрома, полипоза носа, буллезного пемфигоида и эозинофильного эзофагита.



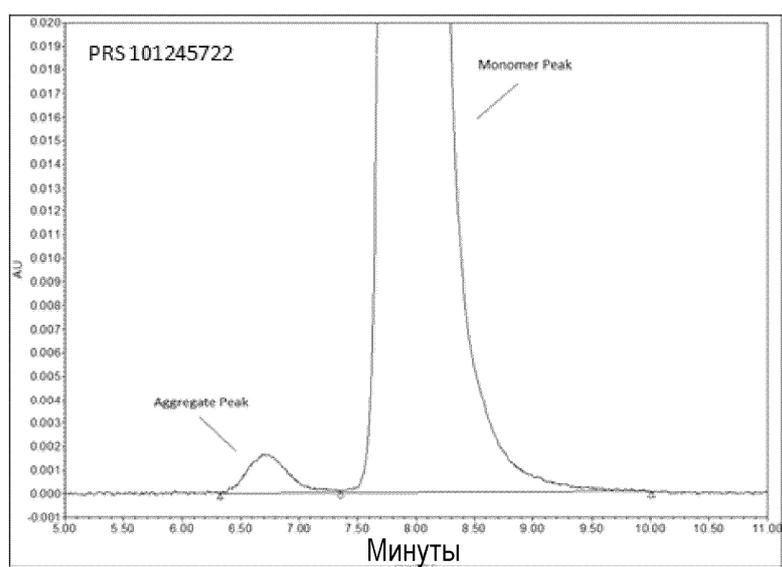
Фиг. 1



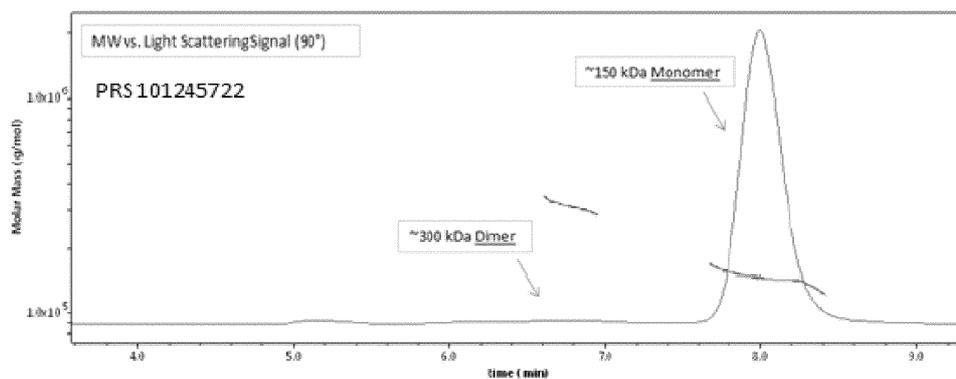
Фиг. 2



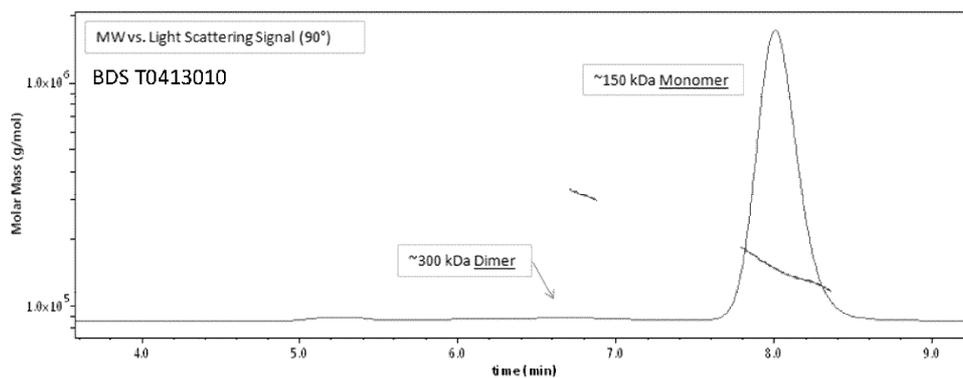
Фиг. 3



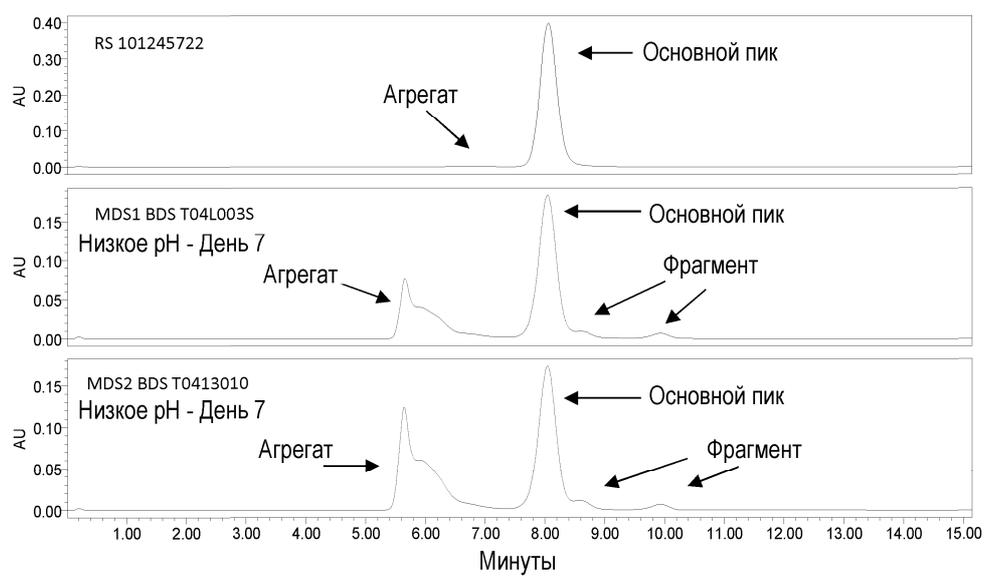
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

