

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392983 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.28

(51) Int. Cl. C07K 16/06 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.04.22

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА К TSLP

(31) 63/178,915

(32) 2021.04.23

(33) US

(86) PCT/US2022/025999

(87) WO 2022/226342 2022.10.27

(88) 2022.12.01

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Бондаренко Павел, Ши Люцин, Чжан
Хао (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение в целом относится к композициям или вариантам антитела к TSLP тезепелумаба, характеризующимся увеличенной стабильностью по сравнению с тезепелумабом при хранении в течение длительных периодов времени.

A1

202392983

202392983

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579523EA/042

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА К TSLP

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета по предварительной заявке на патент США № 63/178915, поданной 23 апреля 2021 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ МАТЕРИАЛА, ПОДАННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[2] Перечень последовательностей, который является частью настоящего раскрытия, подается одновременно с описанием в виде текстового файла. Названием текстового файла, содержащего перечень последовательностей, который был создан 12 апреля 2022 года и размер которого составляет 32649 байтов, является "55581_Seqlisting.txt". Содержание перечня последовательностей включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[3] Настоящая заявка в целом относится к композициям и вариантам антитела к TSLP тезепелумаба, характеризующимся увеличенной стабильностью по сравнению с тезепелумабом при хранении в течение длительных периодов времени.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[4] Тимический стромальный лимфопоэтин (TSLP), который представляет собой цитокин из эпителиальных клеток, продуцируемый в ответ на стимулы окружающей среды и провоспалительные стимулы, приводит к активации множества воспалительных клеток и нисходящих сигнальных путей (Soumelis et al. *Nat Immunol* 2002;3:673-80; Allakhverdi et al. *J Exp Med* 2007;204:253-8). Уровень TSLP увеличен в дыхательных путях пациентов с астмой и коррелирует с экспрессией цитокинов Th2-типа и хемокинов (Shikotra et al. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:104-11 e1-9), и тяжестью заболевания (Ying et al. *J Immunol* 2005;174:8183-90; Ying et al. *J Immunol* 2008;181:2790-8). При том, что TSLP имеет центральное значение в регуляции Th2-опосредованного иммунитета, он также может играть ключевую роль в других путях воспаления и, следовательно, иметь отношение к различным фенотипам астмы.

[5] Тезепелумаб представляет собой моноклональное антитело (mAb) иммуноглобулин G2 человека (IgG2), которое связывается с TSLP, предотвращая его взаимодействие с рецепторным комплексом TSLP. Исследование для подтверждения правильности концепции с участием пациентов с легкой атопической астмой продемонстрировало, что тезепелумаб ингибирует ранние и поздние астматические реакции и подавляет биомаркеры Th2-воспаления после провокационной пробы с вдыхаемым аллергеном (Gauvreau, et al. *N Engl J Med* 2014;370:2102-10).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[6] Мониторинг терапевтических средств на основе антител в составе в течение

длительного времени важен для определения условий хранения, в которых снижается любое разрушение терапевтического средства и поддерживается целостность продукта. В настоящем изобретении предусмотрено исследование характерных особенностей антитела к TSLP, которые могут изменяться со временем при хранении, и характерных особенностей, которые могут быть благоприятными или пагубными для стабильности антитела.

[7] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, содержащие (A) переменный домен легкой цепи, содержащий: (i) последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3; (ii) последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4, и (iii) последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5, и (B) переменный домен тяжелой цепи, содержащий: (i) последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6; (ii) последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с мутацией по меньшей мере одному из следующих остатков D54 или G55, представленную под SEQ ID NO: 7, и (iii) последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8. В различных вариантах осуществления HCDR2 имеет последовательность VIWYX₁X₂SNKHYADSVKG (SEQ ID NO: 13), где X₁ представляет собой D или E, а X₂ представляет собой G или A. В различных вариантах осуществления HCDR2 имеет следующую последовательность: VIWYEGSNKHYADSVKG (SEQ ID NO: 14), VIWYDASNKHYADSVKG (SEQ ID NO: 15) или VIWYEASNKHYADSVKG (SEQ ID NO: 16).

[8] В различных вариантах осуществления мутация в HCDR2 представляет собой D54E. В различных вариантах осуществления мутация в HCDR2 представляет собой G55A. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, необязательно содержат мутацию по меньшей мере одному из следующих остатков LCDR2 D49, D50 или S51 в SEQ ID NO: 4. В различных вариантах осуществления мутация LCDR2 представляет собой одну или несколько из D49E, D50E или S51A. В различных вариантах осуществления LCDR2 имеет последовательность X₁X₂X₃DRPS, где X₁ представляет собой D или E, X₂ представляет собой D или E, и X₃ представляет собой S или A (SEQ ID NO: 17). В различных вариантах осуществления LCDR2 имеет следующую последовательность: ESDRPS (SEQ ID NO: 18), DESDRPS (SEQ ID NO: 19), EESDRPS (SEQ ID NO: 20), DDADRPS (SEQ ID NO: 21), DEADRPS (SEQ ID NO: 22), EDADRPS (SEQ ID NO: 23) или EEADRPS (SEQ ID NO: 24).

[9] В различных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или

антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, содержащие (A) переменный домен легкой цепи, содержащий: (i) последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3; (ii) последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с мутацией по меньшей мере одному из следующих остатков D49, D50 или S51 в SEQ ID NO: 4; и (iii) последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5; и (B) переменный домен тяжелой цепи, содержащий: (i) последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6; (ii) последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7, и (iii) последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8.

[10] В различных вариантах осуществления LCDR2 имеет последовательность $X_1X_2X_3DRPS$, где X_1 представляет собой D или E, X_2 представляет собой D или E, и X_3 представляет собой S или A (SEQ ID NO: 17). LCDR2 необязательно имеет следующую последовательность: ESDRPS (SEQ ID NO: 18), DESDRPS (SEQ ID NO: 19), EESDRPS (SEQ ID NO: 20), DDADRPS (SEQ ID NO: 21), DEADRPS (SEQ ID NO: 22), EDADRPS (SEQ ID NO: 23) или EEADRPS (SEQ ID NO: 24). В различных вариантах осуществления мутация в LCDR2 представляет собой D49E. В различных вариантах осуществления мутация в LCDR2 представляет собой D50E. В различных вариантах осуществления мутация в LCDR2 представляет собой S51A. В различных вариантах осуществления иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, необязательно содержат мутацию по одному из следующих остатков D54 или G55 в HCDR2, представленной под SEQ ID NO: 7. В различных вариантах осуществления мутация в HCDR2 представляет собой одну или несколько из D54E или G55A в SEQ ID NO: 7. В различных вариантах осуществления HCDR2 имеет последовательность VIWYX₁X₂SNKHYADSVKG (SEQ ID NO: 13), где X_1 представляет собой D или E, а X_2 представляет собой G или A. В различных вариантах осуществления HCDR2 имеет следующую последовательность: VIWYEGSNKHYADSVKG (SEQ ID NO: 14), VIWYDASNKHYADSVKG (SEQ ID NO: 15) или VIWYEASNKHYADSVKG (SEQ ID NO: 16).

[11] В различных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, содержащие (A) переменный домен легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из: i. последовательности аминокислот, на по меньшей мере 80% идентичной SEQ ID NO: 12; ii. последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 11; или iii. последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизируется в условиях умеренной жесткости с

последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из SEQ ID NO: 11; или (B) варибельный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из: i. последовательности аминокислот, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 10; ii. последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 9; или iii. последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизируется в условиях умеренной жесткости с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из SEQ ID NO: 9; или (C) варибельный домен легкой цепи согласно (A) и варибельный домен тяжелой цепи согласно (B), где иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, сохраняют одну или несколько из CDR антигенсвязывающих белков или их фрагмента, связывающихся с TSLP, и содержат мутацию по одному или нескольким из D54 или G55 в HCDR2 под SEQ ID NO: 7 или D49, D50 или S51 в LCDR2 под SEQ ID NO: 4.

[12] В различных вариантах осуществления иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 25-28, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 29-36.

[13] В различных вариантах осуществления иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, включают в себя антигенсвязывающий белок, связывающийся с TSLP, выбранный из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, моноклонального антитела, рекомбинантного антитела, антигенсвязывающего фрагмента антитела, одноцепочечного антитела, мономерного антитела, диатела, триатела, тетратела, Fab-фрагмента, антитела IgM, антитела IgG1, антитела IgG2, антитела IgG3 и антитела IgG4.

[14] В различных вариантах осуществления иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или антитело представляет собой человеческое антитело. В различных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG2. В различных вариантах осуществления иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, специфично связываются с полипептидом TSLP, представленным аминокислотами 29-159 в SEQ ID NO: 2. В различных вариантах осуществления оба связывающихся участка иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента, связывающихся с TSLP, характеризуются идентичным связыванием с TSLP.

[15] В различных вариантах осуществления иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, связываются с TSLP с аффинностью, соответствующей K_d ,

численно составляющей не более 10^{-8} М.

[16] Дополнительно рассматривается композиция, содержащая иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель.

[17] В настоящем изобретении также предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую переменный домен легкой цепи, переменный домен тяжелой цепи или их оба в иммуноглобулине, антигенсвязывающем белке или антителе, описанных в данном документе.

[18] В настоящем изобретении дополнительно рассматривается рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или антитело, связывающиеся с TSLP, описанные в данном документе. Также предусмотрена клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии.

[19] Дополнительно в данном документе рассматривается способ получения иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента, которые специфично связываются с полипептидом TSLP, содержащим аминокислоты 29-159 из SEQ ID NO: 2, включающий инкубацию клетки-хозяина в условиях, которые позволяют ей экспрессировать иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или антитело, где указанная клетка-хозяин содержит (i) рекомбинантный вектор экспрессии, кодирующий переменный домен легкой цепи антигенсвязывающего белка, описанного в данном документе, и рекомбинантный вектор экспрессии, кодирующий переменный домен тяжелой цепи антигенсвязывающего белка, описанного в данном документе, или (ii) рекомбинантный вектор экспрессии, кодирующий как переменный домен легкой цепи, так и переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или антитела, описанного в данном документе.

[20] В различных вариантах осуществления иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, характеризуются увеличенной стабильностью при 25°C по сравнению с иммуноглобулином, антигенсвязывающим белком или его фрагментом или антителом или его фрагментом, связывающимися с TSLP, имеющими аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12. В различных вариантах осуществления иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, характеризуются увеличенной стабильностью при 40°C спустя 4 недели по сравнению с иммуноглобулином, антигенсвязывающим белком или его фрагментом или антителом или его фрагментом, связывающимися с TSLP, имеющими аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12. В различных вариантах осуществления иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, характеризуются уменьшенным

количеством высокомолекулярных соединений при 40°C спустя 4 недели по сравнению с антигенсвязывающим белком или его фрагментом, связывающимися с TSLP, имеющими аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12.

[21] В различных вариантах осуществления иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, характеризовались уменьшенной изомеризацией при 50°C по сравнению с иммуноглобулином, антигенсвязывающим белком или его фрагментом или антителом или его фрагментом, связывающимися с TSLP, имеющими аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12.

[22] В различных вариантах осуществления менее 2% иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента, связывающихся с TSLP, демонстрируют изомеризацию спустя по меньшей мере 2 недели (необязательно спустя по меньшей мере 1 месяц, спустя по меньшей мере 2 месяца, спустя по меньшей мере 3 месяца, спустя по меньшей мере 4 месяца, спустя по меньшей мере 5 месяцев или спустя по меньшей мере 6 месяцев) хранения при приблизительно 25°C, как определено с помощью SEC, например, SEC комплекса антитело-антиген. В различных вариантах осуществления менее 2% антигенсвязывающего белка или его фрагмента демонстрируют изомеризацию спустя от приблизительно 22 месяцев до приблизительно 36 месяцев хранения при от 2°C до 8°C и после этого по меньшей мере 2 недели, или по меньшей мере 1 месяц, или по меньшей мере 2 месяца, или по меньшей мере 3 месяца хранения при приблизительно 25°C, как определено с помощью SEC.

[23] В данном документе также предусмотрен способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента, описанных в данном документе, или композиций на их основе. В различных вариантах осуществления воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из астмы, атопического дерматита, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), эозинофильного эзофагита (EoE), назальных полипов, хронической спонтанной крапивницы, заболевания, обусловленного Ig, IgA-нефропатии, волчаночного нефрита, эозинофильного гастрита, хронического синусита без назальных полипов и идиопатического легочного фиброза (IPF). В различных вариантах осуществления астма представляет собой легкую, умеренную или тяжелую астму. В различных вариантах осуществления астма представляет собой тяжелую астму. В различных вариантах осуществления астма представляет собой эозинофильную или неэозинофильную астму.

[24] В различных вариантах осуществления способ включает введение композиции с интервалом каждые 2 недели или каждые 4 недели. В различных вариантах осуществления композицию вводят в течение периода, составляющего по меньшей мере 4 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев, 1 год или больше.

[25] В различных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения композиции, содержащей множество моноклональных антител к TSLP или их антигенсвязывающих фрагментов, каждое из которых содержит: последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3; последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4; последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5; последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6; последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7; и последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8, при этом способ включает обогащение композиции моноклональными антителами IgG2 к TSLP, которые содержат по меньшей мере один из L-аспартата в положении 54 HC по сравнению с изоаспартатом (isoAsp) или циклическим аспартатом (cAsp) в HCDR2, представленной под SEQ ID NO: 7; неокисленного W102 HC по сравнению с окисленным W102 в HCDR3, представленной под SEQ ID NO: 8; L-аспартата в положении 49 или положении 50 LC по сравнению с isoAsp или cAsp в LCDR2, представленной под SEQ ID NO: 4; N65 LC по сравнению с дезамидированным N65 в LC, представленной под SEQ ID NO: 12; или L-аспартата в положении 91 LC в LCDR3, представленной под SEQ ID NO: 5, по сравнению с isoAsp или cAsp. cAsp также известен как сукцинимид, характеризующийся потерей H₂O по сравнению с Asp или isoAsp.

[26] В различных вариантах осуществления менее 2,0% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D54 HC. В различных вариантах осуществления не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D54 HC. В различных вариантах осуществления не более 2% моноклональных антител к TSLP содержат окисленный W102 HC. В различных вариантах осуществления менее 2,0% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D49 или D50 LC. В различных вариантах осуществления не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D49 или D50 LC. В различных вариантах осуществления не более 0,5% моноклональных антител к TSLP содержат дезамидированный N65 LC. В различных вариантах осуществления не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D91 LC.

[27] Дополнительно рассматривается композиция, содержащая моноклональные антитела к TSLP, каждое из которых содержит последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3; последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4; последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5; последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную

последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6; последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7; и последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8, при этом композиция характеризуется ограниченным содержанием изомеризованного D54 HC (SEQ ID NO: 7) и/или ограниченным содержанием изомеризованного D49 или D50 LC (SEQ ID NO: 4), эффективным для связывания моноклональных антител к TSLP из композиции с TSLP с K_d , которая численно меньше или равняется 10^{-8} М.

[28] Также предусмотрена композиция, содержащая моноклональные антитела IgG2 к TSLP, каждое из которых содержит последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3; последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4; последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5; последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6; последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7; и последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8, где справедливо по меньшей мере одно из следующего: не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D54 HC; не более 2% моноклональных антител к TSLP содержат окисленный W102 HC; не более 6,7% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D49 или D50 LC; не более 0,5% моноклональных антител к TSLP содержат дезамидированный N65 LC или не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D91 LC. В различных вариантах осуществления не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D54 HC. В различных вариантах осуществления не более 2% моноклональных антител к TSLP содержат окисленный W102 HC. В различных вариантах осуществления не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованные D49 LC или D50 LC. В различных вариантах осуществления не более 0,5% моноклональных антител к TSLP содержат дезамидированный N65 LC. В различных вариантах осуществления не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D91 LC.

[29] Также предусмотрена композиция, содержащая моноклональные антитела IgG2 к TSLP, каждое из которых содержит последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3; последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4; последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5; последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6; последовательность CDR2

тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7; и последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8, где справедливо по меньшей мере одно из следующего: не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D54 HC; не более 2% моноклональных антител к TSLP содержат окисленный W102 HC; не более 12,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D49 или D50 LC; не более 0,5% моноклональных антител к TSLP содержат дезамидированный N65 LC или не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D91 LC. В различных вариантах осуществления не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D54 HC. В различных вариантах осуществления не более 2% моноклональных антител к TSLP содержат окисленный W102 HC. В различных вариантах осуществления не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованные D49 LC или D50 LC. В различных вариантах осуществления не более 0,5% моноклональных антител к TSLP содержат дезамидированный N65 LC. В различных вариантах осуществления не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D91 LC.

[30] В различных вариантах осуществления антитело к TSLP содержит комбинацию из L-аспартата в D54 HC и L-аспартата в D49 или D50 LC. В различных вариантах осуществления антитело к TSLP обогащено L-аспартатом в D54 HC в по меньшей мере 6 раз по сравнению с уровнями isoAsp.

[31] В различных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG2. В различных вариантах осуществления антитело к TSLP содержит переменную область тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 25-28, и переменную область легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 29-36, и содержит одну или несколько модификаций последовательности, описанных в данном документе.

[32] В настоящем изобретении также предусмотрена композиция, содержащая моноклональные антитела к TSLP, каждое из которых содержит последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3; последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4; последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5; последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6; последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7; и последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8, где справедливо по меньшей мере одно из следующего: более 98% моноклональных антител к TSLP в композиции содержат L-аспартат в положении 54 HC по сравнению с isoAsp или cAsp в положении 54 (SEQ ID NO: 7); по меньшей мере 99% моноклональных антител к TSLP в композиции

содержат неокисленный W102 HC по сравнению с окисленным W102 (SEQ ID NO: 8); по меньшей мере 97% моноклональных антител к TSLP в композиции содержат L-аспартат в положении 49 или положении 50 LC по сравнению с isoAsp или cAsp в положении 49 или 50 (SEQ ID NO: 4); по меньшей мере 99,1% моноклональных антител к TSLP в композиции содержат N65 LC по сравнению с дезамидированным N65 LC (SEQ ID NO: 12); или по меньшей мере 99,1% моноклональных антител к TSLP в композиции содержат L-аспартат в положении 91 LC по сравнению с isoAsp или cAsp в положении 91 (SEQ ID NO: 5).

[33] В настоящем изобретении также предусмотрена композиция, содержащая антитело к TSLP или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, для применения в лечении воспалительного заболевания, описанного в данном документе. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено применение композиции, содержащей антитело к TSLP или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, в получении лекарственного препарата для лечения воспалительного заболевания.

[34] Также рассматриваются шприцы, например, одноразовые или предварительно заполненные шприцы, стерильные герметичные контейнеры, например, флаконы, бутылка, сосуд, и/или наборы или упаковки, содержащие любые из вышеуказанных антител или композиций, необязательно с подходящими инструкциями по применению.

[35] Понятно, что каждый признак, или вариант осуществления, или комбинация, описанные в данном документе, представляют собой неограничивающий иллюстративный пример любого из аспектов настоящего изобретения, и, следовательно, предполагается, что они могут использоваться в комбинации с любым другим признаком, или вариантом осуществления, или комбинацией, описанными в данном документе. Например, если признаки описаны с помощью таких формулировок, как "один вариант осуществления", "некоторые варианты осуществления", "определенные варианты осуществления", "дополнительный вариант осуществления", "конкретные иллюстративные варианты осуществления" и/или "другой вариант осуществления", каждый из данных типов вариантов осуществления представляет собой неограничивающий пример признака, который предполагается для использования в комбинации с любым другим признаком или комбинацией признаков, описанными в данном документе, без необходимости перечисления каждой возможной комбинации. Такие признаки или комбинации признаков применимы к любому из аспектов настоящего изобретения. В случаях, где раскрываются примеры значений, находящихся в пределах диапазонов, любые из данных примеров рассматриваются как возможные конечные точки диапазона, рассматриваются все без исключения числовые значения между такими конечными точками, и предусматриваются все без исключения комбинации верхних и нижних конечных точек.

[36] Заголовки в данном документе предназначены для удобства читателя и не предполагаются как ограничивающие. Дополнительные аспекты, варианты осуществления и видоизменения настоящего изобретения будут очевидны из подробного описания, и/или

графических материалов, и/или формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[37] На фигуре 1 проиллюстрирован поток операций по определению характеристик остатков и модификаций, которые потенциально влияют на связывание, определяемое с помощью анализа аффинного связывания методом SEC AMG157 (40C4W), подвергнутого тепловому стрессу, и TSLP. Показан анализ последовательности *in silico* (вверху). Несколько мутаций остатков с модификациями рассматривались как улучшающие стабильность AMG157 при комнатной температуре (внизу).

[38] На фигуре 2 показано относительное обилие потенциальных характерных особенностей в образцах T0, 40C4W и 22M5C+2M25C AMG157, определенное с помощью SEC комплекса антиген-антитело. Было предсказано, что эти характерные особенности потенциально влияют на стабильность TSLP в соответствии с анализом последовательности *in silico* (как показано на фигуре 1). Белыми, черными и серыми столбцами представлены процентные доли модификаций в образцах T0, 40C4W и 22M5C+2M25C AMG157 соответственно. Показанная штриховая линия представляет 2%.

[39] На фигуре 3А показаны профили SEC-UV для AMG157 T0, AMG157 40C4W, TSLP, смеси AMG157 T0+TSLP и смеси AMG157 40C4W+TSLP. В зависимости от формы пика и молекулярной массы выделяют пять областей пиков SEC-UV. Пик 3 представляет фракцию AMG157, связанную с TSLP, а пик 5 соответствует несвязанной фракции AMG157. Графическое изображение каждого отнесенного пика показано поверх соответствующего пика. На фигуре 3В показаны процентные доли модификаций для пяти характерных особенностей в связанной и несвязанной фракциях при анализе связывания методом SEC.

[40] На фигуре 4 представлена вулканная диаграмма, на которой показано, как характерные особенности AMG157 распределены в статистическом анализе влияния на связывание с TSLP. Характерные особенности, отображаемые в правом верхнем углу, представляют собой модификации AMG157, которые потенциально влияют на связывание с TSLP. По оси X показано значение \log_2 кратности изменения между несвязанной и связанной фракциями, а по оси Y показано значение $-\log_{10}$ р-значения, которое представляет статистическую значимость. Серая зона считается фоном.

[41] На фигурах 5А и 5В показаны процентные доли модификаций для связанной и несвязанной фракций AMG157 по 10 остаткам, которые считались потенциально важными на основании анализа последовательности *in silico*. Однако SEC комплекса антитело-антиген выявила, что соотношение модификаций в несвязанной и связанной фракциях статистически не отличается. Была выдвинута гипотеза, что модификации не влияют на связывание, измеряемое с помощью способа SEC комплекса антитело-антиген. На фигурах 5А и 5В процентная шкала составляет 0-50% и 0-1% соответственно.

[42] На фигуре 6 показаны профили SEC-UV для AMG157 T0, 40°C4W и 50°C1W. Профили SEC-UV для AMG157 T0, 40°C4W и 50°C1W показаны черной сплошной линией, синей точечной линией и красной штриховой линией соответственно. На

основании времени элюирования и теоретической молекулярной массы AMG157 пик, элюируемый в момент времени $\sim 10,5$ мин, относят к высокомолекулярным соединениям AMG157 (HMW), а пик, элюируемый в момент времени $\sim 15,5$ мин, относят к мономеру AMG157. Согласно значениям интегрированной площади пиков процентная доля HMW-соединений в 40°C4W и 50°C1W составляет $\sim 9\%$ и 67% соответственно и указана слева вверху на фигуре.

[43] На фигуре 7A показана вулканная диаграмма, на которой показано, как характерные особенности AMG157 после воздействия стресса 50C1W распределяются между HMW и мономерными соединениями, а также представлена статистическая значимость. Характерные особенности, отображаемые в правом верхнем углу, представляют собой модификации AMG157, которые коррелируют с образованием HMW в 50C1W. По оси X показано значение \log_2 кратности изменения между HMW и мономерными соединениями, а по оси Y показано значение $-\log_{10}$ р-значения, которое представляет статистическую значимость. Серая зона считается фоновым шумом, но также может содержать истинные значения с меньшей достоверностью. На фигуре 7B показаны процентные доли 20 модификаций в HMW-соединениях и мономерных соединениях образца AMG157 50C1W. Эти 20 модификаций включают статистически значимые модификации из верхнего правого белого угла (7 модификаций, обозначенных звездочками) и модификации из соседней "серой зоны со значимостью, близкой к статистической". Каждая из этих 20 модификаций характеризуется относительно высокими значениями кратности изменения и значимости. Сумма $-\log_{10}$ р-значения и значения \log_2 кратности изменения для этих 20 модификаций составляла $> 4,6$.

[44] На фигуре 8A показаны измерения уровней изомеризации путем пептидного картирования и измерения активности лекарственного вещества антитела и антитела, подвергавшегося стрессу в течение 4 недель при 40°C. На фигуре 8B показан профиль СЕХ-HPLC антитела. На фигуре 8C показаны результаты традиционного способа определения характеристик СЕХ-фракций образца AMG157 40°C4W в отношении химических модификаций путем пептидного картирования и в отношении относительной активности. На фигуре 8D показаны результаты исследований долговременной стабильности, достигающих окончания срока годности.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[45] Дополнительно предполагается, что лечение тезепелумабом может приводить к устранению суточной активности заболевания и увеличению количества пациентов, не принимающих стероиды, или снижению необходимости в применении стероидов при лечении воспалительных заболеваний, таких как астма.

[46] Если не указано иное, то следующие термины, используемые в настоящей заявке, включая описание и формулу изобретения, имеют определения, представленные ниже.

[47] Как используется в описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного и множественного числа включают определяемые объекты как во

множественном, так и в единственном числе, если контекст явно не указывает на иное.

[48] Если не указано иное, то все используемые в данном документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понятно специалисту средней квалификации в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Следующие литературные источники предоставляют специалисту общее определение многих терминов, используемых в настоящем изобретении, включая без ограничения: Singleton et al., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY* (2d Ed. 1994); *THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY* (Walker Ed., 1988); *THE GLOSSARY OF GENETICS*, 5th Ed., R. Rieger et al. (Eds.), Springer Verlag (1991) и Hale & Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY* (1991).

[49] Термины "приблизительно" или "примерно" означают допустимую погрешность для конкретного значения, определенного специалистом средней квалификации в данной области техники, которая частично зависит от того, как значение измеряется или определяется. В определенных вариантах осуществления термин "приблизительно" или "примерно" означает в пределах 1, 2, 3 или 4 стандартных отклонений. В определенных вариантах осуществления термин "приблизительно" или "примерно" означает в пределах 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,05% от указанного значения или диапазона. Всякий раз, когда термин "приблизительно" или "примерно" предшествует первому числовому значению в ряду из двух или более числовых значений, подразумевается, что термин "приблизительно" или "примерно" применим к каждому из числовых значений в данном ряду.

[50] Термин "воспалительное заболевание" относится к медицинскому состоянию, предусматривающему аномальное воспаление, вызванное атакой иммунной системы на собственные клетки или ткани организма, что может приводить к хронической боли, покраснению, отеку, скованности и повреждению нормальных тканей. Воспалительные заболевания включают, например, астму, хроническую пептическую язву, туберкулез, периодонтит, синусит, активный гепатит, анкилозирующий спондилоартрит, ревматоидный артрит, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), болезнь Крона, язвенный колит, остеоартрит, атеросклероз, системную красную волчанку, атопический дерматит, эозинофильный эзофагит (ЕоЕ), назальные полипы, хроническую спонтанную крапивницу, заболевание, обусловленное Ig (такое как IgA-нефропатия и волчаночный нефрит), эозинофильный гастрит, хронический синусит без назальных полипов, идиопатический легочный фиброз (IPF) и т. п. В иллюстративных аспектах воспалительное заболевание представляет собой астму, атопический дерматит или COPD. В иллюстративных аспектах воспалительное заболевание представляет собой астму, и в некоторых случаях астма представляет собой тяжелую астму, эозинофильную астму, неэозинофильную астму или астму с низким уровнем эозинофилов.

[51] Используемый в данном документе термин "астма" относится к аллергической, неаллергической, эозинофильной и неэозинофильной астме.

[52] Термин "аллергическая астма", используемый в данном документе, относится

к астме, которая вызывается одним или несколькими вдыхаемыми аллергенами. Такие пациенты характеризуются положительным уровнем IgE согласно флуоресцентному иммуноферментному анализу (FEIA) в отношении одного или нескольких аллергенов, которые вызывают астматическую реакцию. Обычно в большинстве случаев аллергическая астма ассоциирована с воспалением Th2-типа.

[53] Термин "неаллергическая астма" относится к пациентам, которые характеризуются низким уровнем эозинофилов, низким уровнем Th2 или низким уровнем IgE на момент постановки диагноза. Пациент, у которого имеется "неаллергическая астма", обычно характеризуется отрицательным результатом в отношении IgE согласно флуоресцентному иммуноферментному анализу (FEIA) в ответ на панель аллергенов, включающую регионально-специфические аллергены. В дополнение к низкому уровню IgE эти пациенты часто характеризуются низкими количествами эозинофилов или их отсутствием, а также низкими количествами Th2 на момент постановки диагноза.

[54] Термин "тяжелая астма", используемый в данном документе, относится к астме, которая требует высокоинтенсивного лечения (например, шага 4 и шага 5 согласно GINA) для поддержания надлежащего контроля, или в тех случаях, когда надлежащий контроль не достигается, несмотря на высокоинтенсивное лечение (GINA, Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы. Глобальная инициатива по бронхиальной астме (GINA), декабрь 2012 г.).

[55] Термин "эозинофильная астма", используемый в данном документе, относится к пациенту с астмой, у которого при скрининге количество эозинофилов в крови меньше или равняется 300 клеток/мкл или меньше или равняется 250 клеток/мкл. "Астма с низким уровнем эозинофилов" относится к пациентам с астмой, у которых имеется менее 250 клеток/мкл крови или сыворотки крови. В качестве альтернативы астма с "низким уровнем эозинофилов" относится к пациентам с астмой, у которых имеется менее 300 клеток/мкл крови или сыворотки крови.

[56] "Цитокин, продуцируемый Т-хелперами (Th) 1 типа" или "Th1-специфический цитокин" относится к цитокинам, которые экспрессируются (внутриклеточно и/или секретируются) Т-клетками Th1 и включают IFN-g, TNF-а и IL-12. "Цитокин Th2-типа" или "Th2-специфический цитокин" относится к цитокинам, которые экспрессируются (внутриклеточно и/или секретируются) Т-клетками Th2, включающим IL-4, IL-5, IL-13 и IL-10. "Цитокин Th17-типа" или "Th17-специфический цитокин" относится к цитокинам, которые экспрессируются (внутриклеточно и/или секретируются) Т-клетками Th17, включающим IL-17A, IL-17F, IL-22 и IL-21. Определенные популяции клеток Th17 экспрессируют IFN-g и/или IL-2 в дополнение к цитокинам Th17-типа, перечисленным в данном документе. Цитокин полифункциональных CTL включает IFN-g, TNF-а, IL-2 и IL-17.

[57] Термины "специфично связывает", "антигенспецифичный", "специфичный в отношении", "селективное связывающее средство", "специфичное связывающее средство", "антиген-мишень" или "иммунореактивный" в отношении антигена относятся к

антителу или полипептиду, которые связывают антиген-мишень с большей аффинностью, чем другие антигены со сходной последовательностью. В данном документе предполагается, что средство специфично связывает белки-мишени, применимые в идентификации типов иммунных клеток, например, поверхностный антиген (например, T-клеточный рецептор, CD3), цитокин (например, TSLP, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IFN-g, TNF- α) и т. п. В различных вариантах осуществления антитело специфично связывает антиген-мишень, но может перекрестно реагировать с ортологом из близкородственного вида, например, антитело может представлять собой человеческий белок, а также связывать белок близкородственного примата. В различных вариантах осуществления иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, специфичные в отношении TSLP, связываются с Kd, которая численно меньше или равняется 10^{-8} M. В различных вариантах осуществления антитело к TSLP, описанное в данном документе, связывается с аффинностью (Kd), составляющей по меньшей мере 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, 10^{-13} M или меньше.

[58] Термин "антитело" относится к тетрамерному гликопротеину, который состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, каждая из которых содержит вариабельную область и константную область. "Тяжелые цепи" и "легкие цепи" относятся к по сути полноразмерным каноническим легким и тяжелым цепям иммуноглобулинов (см., например, Immunobiology, 5th Edition (Janeway and Travers et al., Eds., 2001). Антигенсвязывающие части могут быть получены посредством методик рекомбинантных ДНК либо посредством ферментативного или химического расщепления интактных антител.

[59] Антигенсвязывающие белки включают антитела, фрагменты антител и антителоподобные белки, которые могут иметь структурные изменения в структуре канонических тетрамерных антител. "Варианты" антител относятся к антигенсвязывающим белкам или их фрагментам, которые могут иметь структурные изменения в последовательности или функции антитела по сравнению с исходным антителом, имеющим известную последовательность. Варианты антител содержат V-области с изменением константных областей или в качестве альтернативы предусматривают добавление V-областей к константным областям, необязательно неканоническим образом. Примеры включают полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела с дополнительными V-областями), фрагменты антител, которые способны связывать антиген (например, Fab', F'(ab)₂, Fv, одноцепочечные антитела, диатела), бипаратопные и рекомбинантные пептиды, содержащие вышеуказанное, при условии, что они характеризуются требуемой биологической активностью.

[60] Фрагменты антител включают антигенсвязывающие части антител, в том числе, среди прочего, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, доменное антитело (dAb), фрагменты областей, определяющих комплементарность (CDR), антигенсвязывающие области с пересаженными CDR, одноцепочечные антитела (scFv), фрагменты одноцепочечных

антител, химерные антитела, диатела, триатела, тетратела, миниантитело, линейное антитело; хелатирующее рекомбинантное антитело, триспецифическое антитело или биспецифическое антитело, интратело, нанотело, малое модульное иммунофармацевтическое средство (SMIP), слитый белок на основе антигенсвязывающего домена иммуноглобулина, однодоменные антитела (включая камелизированное антитело), антитело, содержащее V_HH, или его вариант или производное, а также полипептиды, которые содержат по меньшей мере часть иммуноглобулина, которая является достаточной для обеспечения специфического связывания антигена с полипептидом, как, например, одну, две, три, четыре, пять или шесть последовательностей CDR, при условии, что антитело сохраняет требуемую биологическую активность.

[61] "Валентность" относится к количеству антигенсвязывающих участков в каждом антителе или фрагменте антитела, которые нацеливаются на эпитоп. Типичная полноразмерная молекула IgG или F(ab)₂ является "бивалентной" в том смысле, что она содержит два идентичных участка связывания мишени. "Моновалентный" фрагмент антитела, такой как F(ab)' или scFc, имеет один антигенсвязывающий участок. Тривалентные или тетравалентные антигенсвязывающие белки также могут быть сконструированы таким образом, чтобы они были поливалентными.

[62] "Моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по сути гомогенных антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах.

[63] Термин "ингибирует активность TSLP" включает ингибирование любого одного или нескольких из следующего: связывания TSLP с его рецептором; пролиферации, активации или дифференцировки клеток, экспрессирующих TSLPR, в присутствии TSLP; ингибирования продуцирования цитокинов Th2-типа в поляризационном анализе в присутствии TSLP; активации или созревания дендритных клеток в присутствии TSLP; а также высвобождения цитокинов тучными клетками в присутствии TSLP. См., например, патент США 7982016 B2, столбец 6 и пример 8, и US 2012/0020988 A1, примеры 7-10.

[64] Термин "образец" или "биологический образец" относится к пробе, полученной от субъекта для применения в способах по настоящему изобретению, и включает мочу, цельную кровь, плазму крови, сыворотку крови, слюну, мокроту, биоптаты тканей, спинномозговую жидкость, мононуклеарные клетки периферической крови со стимуляцией *in vitro*, мононуклеарные клетки периферической крови без стимуляции *in vitro*, лимфоидные ткани кишечника со стимуляцией *in vitro*, лимфоидные ткани кишечника без стимуляции *in vitro*, жидкость кишечного лаважа, жидкость бронхоальвеолярного лаважа, жидкость назального лаважа и индуцированную мокроту.

[65] Термины "лечить", "осуществление лечения" и "лечение" относятся к устранению, ослаблению, подавлению или уменьшению интенсивности проявлений,

временно либо постоянно, частично либо полностью, клинического симптома, проявления или прогрессирования явления, заболевания или состояния, ассоциированного с воспалительным нарушением, описанным в данном документе. Как признается в соответствующей области техники, лекарственные средства, используемые в качестве терапевтических средств, могут снижать тяжесть указанного болезненного состояния, но не обязательно должны устранять каждое проявление заболевания, чтобы считаться применимыми терапевтическими средствами. Аналогичным образом, вводимое в целях профилактики средство лечения не обязательно должно быть полностью эффективным при предупреждении появления состояния, чтобы представлять собой действенное профилактическое средство. Простое снижение влияния заболевания (например, путем снижения количества или тяжести его симптомов, или путем увеличения эффективности другого лечения, или путем достижения другого благоприятного эффекта) или снижение вероятности того, что заболевание появится или усугубится у субъекта, является достаточным. Один вариант осуществления настоящего изобретения направлен на способ определения эффективности лечения, включающий введение пациенту терапевтического средства в количестве и в течение периода времени, достаточных для того, чтобы индуцировать стойкое улучшение по сравнению с исходным уровнем показателя, который отражает тяжесть конкретного нарушения.

[66] Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству терапевтического средства, которое является эффективным для уменьшения интенсивности проявлений или облегчения симптомов или признаков заболевания, ассоциированных с заболеванием или нарушением.

TSLP

[67] Тимический стромальный лимфопоэтин (TSLP) представляет собой цитокин из эпителиальных клеток, который продуцируется в ответ на провоспалительные стимулы и запускает аллергические воспалительные реакции, главным образом посредством своей активности в отношении дендритных клеток (Gilliet, *J Exp Med.* 197:1059-1067, 2003; Soumelis, *Nat Immunol.* 3:673-680, 2002; Reche, *J Immunol.* 167:336-343, 2001), тучных клеток (Allakhverdi, *J Exp Med.* 204:253-258, 2007) и CD34+ клеток-предшественников (Swedin et al. *Pharmacol Ther* 2017;169:13-34). TSLP передает сигнал посредством гетеродимерного рецептора, состоящего из альфа-цепи рецептора интерлейкина (IL)-7 (IL-7R α) и рецептора, подобного общей γ -цепи (TSLPR) (Pandey, *Nat Immunol.* 1:59-64, 2000; Park, *J Exp Med.* 192:659-669, 2000).

[68] Уровни мРНК (Brightling et al., *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:5-10; quiz 1-2; Ortega et al., *N Engl J Med* 2014;371:1198-207) и белка TSLP человека (Ortega et al., выше) увеличены в дыхательных путях индивидуумов с астмой по сравнению с контролями, и величина этой экспрессии коррелирует с тяжестью заболевания (Brightling et al., выше). Недавние исследования продемонстрировали связь однонуклеотидного полиморфизма в локусе TSLP человека с защитой от астмы, атопической астмы и гиперреактивности дыхательных путей, что позволяет предположить, что дифференциальная регуляция

экспрессии гена TSLP может оказывать влияние на восприимчивость к заболеванию (Ortega et al. *N Engl J Med* 2014;371:1198-207; To et al. *BMC Public Health* 2012;12:204). Эти данные позволяют предположить, что нацеливание на TSLP может ингибировать несколько биологических сигнальных путей, вовлеченных в развитие астмы.

[69] Более ранние неклинические исследования TSLP позволяли предположить, что после высвобождения TSLP из эпителиальных клеток или стромальных клеток дыхательных путей он активирует тучные клетки, дендритные клетки и Т-клетки с высвобождением ими цитокинов Th2-типа (например, IL-4/13/5). Недавно опубликованные данные, полученные с участием людей, продемонстрировали хорошую корреляцию между экспрессией гена и белка TSLP в тканях, баллом сигнатуры генов Th2 и уровнем эозинофилов в тканях при тяжелой астме. Следовательно, терапия, нацеливающаяся на TSLP, может быть эффективной у пациентов с астмой с воспалением Th2-типа (Shikotra et al., *J Allergy Clin Immunol.* 129(1):104-11, 2012).

[70] Данные из других исследований позволяют предположить, что TSLP может способствовать воспалению дыхательных путей посредством Th2-независимых сигнальных путей, таких как перекрестное взаимодействие между гладкомышечными и тучными клетками дыхательных путей (Allakhverdi et al., *J Allergy Clin Immunol.* 123(4):958-60, 2009; Shikotra et al., выше). TSLP также может способствовать индуцированию дифференцировки Т-клеток в клетки, продуцирующие цитокины Th17-типа, в результате чего происходит усиление нейтрофильного воспаления, обычно наблюдаемого при более тяжелой форме астмы (Tanaka et al., *Clin Exp Allergy.* 39(1):89-100, 2009). Эти данные и другие появляющиеся свидетельства позволяют предположить, что блокирование TSLP может служить для подавления множества биологических сигнальных путей, включая без ограничения те, в которых участвуют цитокины Th2-типа (IL-4/13/5).

Антитела

[71] Предполагается, что антитела, или варианты антител, или антигенсвязывающие белки, специфичные в отношении TSLP, применимы в лечении астмы, в том числе тяжелой астмы, эозинофильной астмы, неэозинофильной астмы/астмы с низким уровнем эозинофилов и других форм астмы, описанных в данном документе, атопического дерматита и COPD.

[72] Специфичные связывающие средства, такие как антитела и варианты или фрагменты антител, которые связываются с их антигеном-мишенью, например, TSLP, применимы в способах по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления специфичное связывающее средство представляет собой антитело. Антитела могут быть моноклональными (MAb); рекомбинантными; химерными; гуманизированными, такими как антитела с пересаженными областями, определяющими комплементарность (CDR); человеческими; представлять собой варианты антител, в том числе одноцепочечные и/или биспецифические; а также их фрагменты; варианты или производные. Фрагменты антител содержат те части антитела, которые связываются с эпитопом на полипептиде,

представляющем интерес. Примеры таких фрагментов включают Fab- и F(ab')-фрагменты, полученные посредством ферментативного расщепления полноразмерных антител. Другие связывающие фрагменты включают в себя фрагменты, полученные посредством методик рекомбинантных ДНК, таких как экспрессия рекомбинантных плазмид, содержащих последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие переменные области антител.

[73] Моноклональные антитела могут быть модифицированы для применения в качестве терапевтических средств или диагностических средств. Один вариант осуществления представляет собой "химерное" антитело, в котором часть тяжелой (H) и/или легкой (L) цепи идентична или гомологична соответствующей последовательности в антителах, полученных из определенного вида или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, тогда как остальная(остальные) часть(части) цепи(цепей) идентична(идентичны) или гомологична(гомологичны) соответствующей последовательности в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител. Также включены фрагменты таких антител, при условии, что они характеризуются требуемой биологической активностью. См. патент США № 4816567; Morrison et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-55.

[74] В другом варианте осуществления моноклональное антитело представляет собой "гуманизованное" антитело. Способы гуманизации антител, отличных от человеческих, хорошо известны из уровня техники. См. патенты США №№ 5585089 и 5693762. Как правило, гуманизованное антитело имеет один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из источника, отличного от человеческого. Гуманизацию можно осуществлять, например, с применением способов, описанных в уровне техники (Jones et al., 1986, Nature 321:522-25; Riechmann et al., 1998, Nature 332:323-27; Verhoeven et al., 1988, Science 239:1534-36), посредством замены по меньшей мере части области, определяющей комплементарность, грызуна на соответствующие области человеческого антитела.

[75] Настоящее изобретение также охватывает варианты человеческих антител (включая фрагменты антител), которые связывают TSLP. С использованием трансгенных животных (например, мышей), которые способны продуцировать репертуар человеческих антител при отсутствии продуцирования эндогенных иммуноглобулинов, такие антитела получают посредством иммунизации полипептидным антигеном (т. е. имеющим по меньшей мере 6 смежных аминокислот), необязательно конъюгированным с носителем. См., например, Jakobovits et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:2551-55; Jakobovits et al., 1993, Nature 362:255-58; Bruggermann et al., 1993, Year in Immuno. 7:33. См. также заявки согласно PCT №№ PCT/US96/05928 и PCT/US93/06926. Дополнительные способы описаны в патенте США № 5545807, заявках согласно PCT №№ PCT/US91/245 и PCT/GB89/01207, а также в Европейских патентах №№ 546073B1 и 546073A1. Человеческие антитела также могут быть получены посредством экспрессии рекомбинантной ДНК в клетках-хозяевах или посредством экспрессии в клетках

гибридомы, как описано в данном документе.

[76] Химерные, содержащие пересаженные CDR и гуманизированные антитела и/или варианты антител обычно получают рекомбинантными способами. Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, вводят в клетки-хозяева и экспрессируют с применением материалов и процедур, описанных в данном документе. В предпочтительном варианте осуществления антитела получают в клетках-хозяевах, являющихся клетками млекопитающих, таких как клетки CHO. Моноклональные (например, человеческие) антитела могут быть получены посредством экспрессии рекомбинантной ДНК в клетках-хозяевах или посредством экспрессии в клетках гибридомы, как описано в данном документе.

[77] Антитело к TSLP тезепелумаб описано в патенте США № 7982016 и в заявке на патент США № 15/951602. В ходе данного исследования было обнаружено, что при хранении в стрессовых условиях, например, при 40°C в течение 4 недель (40C4W) или 50°C в течение одной недели (50C1W), остатки в антителе тезепелумабе подвергаются изменениям, таким как изомеризация, дезамидирование или окисление, которые являются пагубными для стабильности антитела. Остатки, идентифицированные как источники сниженной стабильности в CDR (SEQ ID NO: 3-8) или в варибельной области (SEQ ID NO: 10 и 12) антитела к TSLP тезепелумаба, включают M34 CDRH1, W52 CDRH2, D54 CDRH2, N57 CDRH2, D62 CDRH2, W102 CDRH3, N25 FRH1, N26 FRH1, D49 CDRL2, D50 CDRL2, N65 FRL2, W90 CDRL3, D91 CDRL3, S92, S93, S94 CDRL3, D95 CDRL3. Нумерация остатков в тезепелумабе приведена на основе последовательностей тяжелой и легкой цепи, представленных под SEQ ID NO: 10 и 12 соответственно.

[78] Антигенсвязывающий белок, связывающийся с TSLP (в том числе его фрагменты), применимый в способах по настоящему изобретению, включает в себя антитело к TSLP, содержащее а. варибельный домен легкой цепи, содержащий: i. последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3; ii. последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4; iii. последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5; и б. варибельный домен тяжелой цепи, содержащий: i. последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6; ii. последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7; и iii. последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8, где антитело или вариант антитела специфично связывается с полипептидом TSLP, представленным аминокислотами 29-159 в SEQ ID NO: 2.

[79] Также рассматриваются антитело или вариант антитела, содержащие а. варибельный домен легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из: i. последовательности аминокислот, на по меньшей мере 80% идентичной SEQ ID NO: 12; ii.

последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 11; iii. последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизируется в условиях умеренной жесткости с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из SEQ ID NO: 11; и b. варибельный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из: i. последовательности аминокислот, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 10; ii. последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 9; iii. последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизируется в условиях умеренной жесткости с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из SEQ ID NO: 9; или c. варибельный домен легкой цепи согласно (a) и варибельный домен тяжелой цепи согласно (b), где антитело или вариант антитела специфично связывается с полипептидом TSLP, представленным аминокислотами 29-159 в SEQ ID NO: 2.

[80] Тезепелумаб представляет собой иллюстративное антитело к TSLP, имеющее :

a. i. последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3; ii. последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4; iii. последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5; и b. варибельный домен тяжелой цепи, содержащий: i. последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6; ii. последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7; и iii. последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8.

[81] Тезепелумаб также содержит варибельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12; кодируемый полинуклеотидной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 11; и варибельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10, кодируемый полинуклеотидной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 9.

[82] Тезепелумаб представляет собой антитело IgG2. Последовательность полноразмерной тяжелой цепи и легкой цепи тезепелумаба, включая цепь IgG2, изложены под SEQ ID NO: 37 и 38 соответственно.

[83] В различных вариантах осуществления антитело к TSLP или его вариант антитела являются бивалентными и выбраны из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, моноклонального антитела, рекомбинантного антитела, антигенсвязывающего фрагмента антитела, одноцепочечного антитела, мономерного антитела, диатела, триатела, тетратела, Fab-фрагмента, антитела

IgG1, антитела IgG2, антитела IgG3 и антитела IgG4.

[84] В различных вариантах осуществления вариант антитела к TSLP выбран из группы, состоящей из диатела, триатела, тетраатела, Fab-фрагмента, однодоменного антитела, scFv, где дозу корректируют таким образом, чтобы связывающие участки были эквимоллярны связывающим участкам во вводимых дозах бивалентных антител.

[85] Предполагается, что антитело или вариант антитела представляет собой антитело IgG2. Иллюстративные последовательности константной области IgG2 человека, доступные в базе данных UniProt под номером UniProt P01859, включены в данный документ посредством ссылки. Информация, в том числе информация о последовательностях других константных областей тяжелой и легкой цепей антител, также общедоступна в базе данных UniProt, а также в других базах данных, хорошо известных специалистам в области конструирования и получения антител.

[86] В определенных вариантах осуществления производные антител включают тетрамерные гликозилированные антитела, где количество и/или тип сайтов гликозилирования были изменены по сравнению с аминокислотными последовательностями исходного полипептида. В определенных вариантах осуществления варианты содержат большее или меньшее количество сайтов N-связанного гликозилирования, чем нативный белок. В качестве альтернативы замены, которые приводят к устранению этой последовательности, будут приводить к удалению существующей N-связанной углеводной цепи. Также предусмотрена перегруппировка N-связанных углеводных цепей, где один или несколько сайтов N-связанного гликозилирования (как правило, тех, которые встречаются в природе) удаляются, и образуются один или несколько новых сайтов N-связанного гликозилирования. Дополнительные предпочтительные варианты антител включают цистеиновые варианты, где один или несколько остатков цистеина удалены или заменены другой аминокислотой (например, серином) по сравнению с исходной аминокислотной последовательностью. Цистеиновые варианты могут быть применимы, если антитела должны подвергаться рефолдингу в биологически активную конформацию, как, например, после выделения нерастворимых телец включения. Как правило, цистеиновые варианты имеют меньше остатков цистеина, чем нативный белок, и обычно содержат их четное число, что позволяет сводить к минимуму взаимодействия, обусловленные неспаренными остатками цистеина.

[87] Требуемые аминокислотные замены (консервативные либо неконсервативные) могут быть определены специалистами в данной области техники тогда, когда такие замены требуются. В определенных вариантах осуществления аминокислотные замены можно использовать для идентификации важных остатков антител к TSLP человека или для увеличения или уменьшения аффинности описанных в данном документе антител к TSLP человека.

[88] Согласно определенным вариантам осуществления предпочтительными аминокислотными заменами являются замены, которые: (1) приводят к снижению

восприимчивости к протеолизу, (2) приводят к снижению восприимчивости к окислению, (3) приводят к изменению показателей аффинности связывания, (4) приводят к ингибированию образования высокомолекулярных (НМВ) соединений и/или (5) придают другие физико-химические или функциональные свойства таким полипептидам или модифицируют их. Согласно определенным вариантам осуществления одна или несколько аминокислотных замен (в определенных вариантах осуществления консервативных аминокислотных замен) могут быть осуществлены во встречающейся в природе последовательности (в определенных вариантах осуществления в части полипептида за пределами домена(доменов), образующего(образующих) межмолекулярные контакты). В определенных вариантах осуществления консервативная аминокислотная замена обычно не может приводить к существенному изменению структурных характеристик исходной последовательности (например, замещающая аминокислота не должна проявлять тенденцию к разрыву спирали, которая встречается в исходной последовательности, или к нарушению других типов вторичной структуры, которые характеризуют исходную последовательность). Примеры известных из уровня техники вторичных и третичных структур полипептидов описаны в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)) и Thornton et al. *Nature* 354:105 (1991), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

Идентификация характерных особенностей, вносящих вклад в стабильность и связывание белка

[89] Для определения характерных особенностей, которые вносят вклад в связывание и активность белка, антигенсвязывающий белок, связывающийся с TSLP, описанный в данном документе, помещают в условия, приводящие к изменению его структуры, например, к изменению структуры аминокислоты терапевтического белка, что приводит к образованию соединения терапевтического белка. В иллюстративных аспектах измененная структура аминокислоты называется "характерной особенностью" и может быть охарактеризована с точки зрения ее химической идентичности или типа и местоположения характерной особенности в аминокислотной последовательности антигенсвязывающего белка, например, положения аминокислоты, в которой присутствует характерная особенность. Например, остатки аспарагина и глутамина восприимчивы к дезамидированию. Дезамидированный аспарагин в положении 10 аминокислотной последовательности белка является примером характерной особенности. Перечень иллюстративных типов характерных особенностей для конкретных аминокислот представлен в таблице А. Таким образом, "структура", используемая в данном документе, может включать тип характерной особенности, перечисленной в таблице А, или комбинацию двух или более типов характерных особенностей, перечисленных в таблице А, состоять по существу из них или состоять из них. Следует понимать, что характерные особенности являются примерами структур, и, если не указано иное, во всех случаях,

когда в данном документе упоминается "структура", характерная особенность рассматривается в качестве примера структуры. Например, высокомолекулярные соединения (HMW) и фрагменты также являются примерами характерных особенностей.

[90] Таблица А

<u>Иллюстративный тип характерной особенности</u>	<u>Аминокислотный остаток</u>
Дезамидирование	Asn, Gln
Дезаминирование	Glu, Ser, Gly
Гликирование, гидроксизин	Lys
Гликозилирование	Asn
Циклизация	N-концевой Gln, N-концевой Glu
Окисление	Met, Trp, His
Изомеризация	Asp
Фрагментация/отсечение	Asp/Pro

[91] Поскольку иммуноглобулин или его фрагмент, антитело или антигенсвязывающий белок содержат множество аминокислот, антитело или антигенсвязывающий белок, описанные в данном документе, могут иметь более одной характерной особенности (например, более одной аминокислоты с измененной структурой) и могут быть описаны с точки зрения своего профиля характерных особенностей. Используемый в данном документе термин "профиль характерных особенностей" относится к перечню характерных особенностей антигенсвязывающего белка. В различных случаях в профиле характерных особенностей представлены химическая идентичность или тип характерной особенности, например, дезамидирование, необязательно по сравнению с нативной структурой терапевтического белка. В различных случаях в профиле характерных особенностей представлено местоположение характерной особенности, например, положение аминокислоты, в которой присутствует характерная особенность. В некоторых аспектах в профиле характерных особенностей представлено описание всех характерных особенностей, присутствующих в антигенсвязывающем белке. В других аспектах в профиле характерных особенностей представлено описание подмножества характерных особенностей, присутствующих в белке. Например, в профиле характерных особенностей могут быть представлены только те характерные особенности, которые присутствуют в конкретной части белка, например, в константной области, переменной области, CDR. Соединение терапевтического белка, такого как антитело или антигенсвязывающий белок, характеризуется наличием характерной(характерных) особенности(особенностей), присутствующей(присутствующих) в белке. Соединение антигенсвязывающего белка может отличаться от другого соединения того же белка, имея другой профиль характерных особенностей. В случае, когда два терапевтических белка имеют отличающиеся профили характерных особенностей, эти терапевтические белки представляют собой два различных соединения терапевтического белка. В случае, когда

два терапевтических белка имеют идентичные профили характерных особенностей, эти терапевтические белки считаются одним и тем же соединением терапевтического белка.

[92] В различных случаях иммуноглобулин, антитело или антигенсвязывающий белок помещают в условия, приводящие к изменению его структуры, например, к образованию одной или нескольких характерных особенностей, и это изменение структуры приводит к изменению аффинности терапевтического белка к его мишени. В различных аспектах иммуноглобулин, антитело или антигенсвязывающий белок помещают в условия, приводящие к изменению его структуры, например, к образованию одной или нескольких характерных особенностей, и это изменение структуры приводит к снижению аффинности антигенсвязывающего белка к его мишени. Снижение аффинности в некоторых аспектах приводит к частичной или полной потере способности иммуноглобулина, антитела или антигенсвязывающего белка взаимодействовать с мишенью (например, связываться с ней). В различных случаях частичная или полная потеря способности иммуноглобулина, антитела или антигенсвязывающего белка взаимодействовать с мишенью (например, связываться с ней) в конечном итоге приводит к снижению эффективности антигенсвязывающего белка. В альтернативных случаях иммуноглобулин, антитело или антигенсвязывающий белок помещают в условия, приводящие к изменению его структуры, например, к образованию одной или нескольких характерных особенностей, и это изменение структуры не приводит к изменению аффинности иммуноглобулина, антитела или антигенсвязывающего белка к своей мишени. В различных аспектах изменение структуры не приводит к снижению аффинности белка к его мишени. Без ограничения какой-либо конкретной теорией, способы по настоящему изобретению преимущественно позволяют четко и точно проводить различия между теми характерными особенностями иммуноглобулина, антитела или антигенсвязывающего белка, которые влияют на взаимодействие между иммуноглобулином, антителом или антигенсвязывающим белком и мишенью, и характерными особенностями, не влияющими на это взаимодействие.

[93] В различных аспектах композиция в данном документе содержит популяцию соединений иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента. В различных случаях популяция представляет собой гомогенную популяцию иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента, при этом необязательно каждый из белков, присутствующих в образце композиции, относится к одному и тому же соединению. В различных случаях популяция представляет собой гетерогенную популяцию, содержащую по меньшей мере два разных соединения иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента, имеющих характерную особенность, описанную в данном документе. В различных аспектах гетерогенная популяция содержит по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6 или более различных соединений иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента.

Гетерогенная популяция необязательно содержит более 7, более 8, более 9, более 10, более 20, более 30, более 40, более 50 различных соединений белка. Каждое соединение в популяции в некоторых аспектах имеет уникальный профиль характерных особенностей. В иллюстративных случаях соединения иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента являются единственными белками, присутствующими в композиции. В некоторых аспектах композиция содержит (i) иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент из популяции, иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент и (ii) фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, наполнитель или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента в гетерогенной популяции содержат характерную особенность, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления не более 20%, 15%, 10%, 5% или 1% иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента в гетерогенной популяции содержат характерную особенность, описанную в данном документе.

[94] В иллюстративных вариантах осуществления способ включает приложение стресса к образцу иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента. В различных случаях стресс может представлять собой любое условие, которое приводит к по меньшей мере одному изменению в структуре аминокислоты иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента, или антитела или его фрагмента, или мишени, например, стресс может представлять собой любое условие, которое приводит к образованию по меньшей мере одной характерной особенности в аминокислоте иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента, или антитела или его фрагмента, или мишени. Стресс необязательно приводит к изменению структуры более чем одной аминокислоты иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента, или антитела или его фрагмента, или мишени, например, стресс приводит к образованию более чем одной характерной особенности (например, по меньшей мере или приблизительно 2, по меньшей мере или приблизительно 3, по меньшей мере или приблизительно 4, по меньшей мере или приблизительно 5, по меньшей мере или приблизительно 6, по меньшей мере или приблизительно 7, по меньшей мере или приблизительно 8, по меньшей мере или приблизительно 9, по меньшей мере или приблизительно 10 или более характерных особенностей). Стресс в различных случаях приводит к образованию одной или нескольких характерных особенностей, которые отсутствуют в иммуноглобулине, антигенсвязывающем белке или его фрагменте, или антителе или его фрагменте, или мишени до приложения стресса. Соответственно, в некоторых аспектах приложение стресса приводит к образованию соединений иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента, или антитела или его фрагмента, или мишени, которые

отсутствовали в образце до приложения стресса.

[95] В иллюстративных аспектах стресс представляет собой воздействие повышенных температур, например, до 25 градусов С, 40 градусов С, 50 градусов С, необязательно в одном или нескольких буферах или составах. В иллюстративных случаях такое воздействие повышенных температур имитирует программу ускоренного стресса.

[96] Стресс необязательно вызывает разрушение или диссоциацию от приблизительно 5% до приблизительно 30%, от приблизительно 10% до приблизительно 30%, от приблизительно 15% до приблизительно 30%, от приблизительно 20% до приблизительно 30%, от приблизительно 25% до приблизительно 30%, от приблизительно 5% до приблизительно 25%, от приблизительно 5% до приблизительно 20%, от приблизительно 5% до приблизительно 15% или от приблизительно 5% до приблизительно 10% комплексов, образованных между иммуноглобулином, антителом или антигенсвязывающим белком и мишенью. В различных аспектах стресс вызывает снижение уровня взаимодействий между иммуноглобулином, антигенсвязывающим белком или его фрагментом или антителом или его фрагментом и их мишенью. В некоторых аспектах стресс вызывает снижение взаимодействий на от приблизительно 10% до приблизительно 50% (например, от приблизительно 10% до приблизительно 45%, от приблизительно 10% до приблизительно 40%, от приблизительно 10% до приблизительно 35%, от приблизительно 10% до приблизительно 30%, от приблизительно 10% до приблизительно 25%, от приблизительно 10% до приблизительно 20%, от приблизительно 10% до приблизительно 15%, от приблизительно 10% до приблизительно 40%, от приблизительно 10% до приблизительно 35%, от приблизительно 10% до приблизительно 30%, от приблизительно 10% до приблизительно 25%, от приблизительно 10% до приблизительно 20% или от приблизительно 10% до приблизительно 15%) по сравнению с взаимодействиями в соответствующих условиях без стресса. В некоторых аспектах стресс вызывает увеличение K_D антитела или антигенсвязывающего белка для его мишени, причем K_D ассоциируется с более слабым связыванием. В некоторых аспектах стресс вызывает увеличение количества несвязанного антитела или антигенсвязывающего белка на от 10% до приблизительно 50% (например, от приблизительно 10% до приблизительно 45%, от приблизительно 10% до приблизительно 40%, от приблизительно 10% до приблизительно 35%, от приблизительно 10% до приблизительно 30%, от приблизительно 10% до приблизительно 25%, от приблизительно 10% до приблизительно 20%, от приблизительно 10% до приблизительно 15%, от приблизительно 10% до приблизительно 40%, от приблизительно 10% до приблизительно 35%, от приблизительно 10% до приблизительно 30%, от приблизительно 10 до приблизительно 25%, от приблизительно 10% до приблизительно 20% или от приблизительно 10% до приблизительно 15%). Без ограничения какой-либо конкретной теорией, стресс, прилагаемый в раскрытых в данном документе способах, приводит к образованию соединений антител или антигенсвязывающих белков более быстрым и более надежным, воспроизводимым образом с получением обилия и разнообразия

соединений для усовершенствованного обнаружения соединений, которые могут образовываться в ходе изготовления, хранения и циркуляции в организме человека (внутривенном пространстве или подкожном пространстве у субъекта-человека).

[97] **Разделение**

[98] В иллюстративных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают разделение смеси, содержащей различные соединения антигена, на по меньшей мере две фракции. В некоторых аспектах смесь разделяют на несколько (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) фракций. В некоторых аспектах в ходе стадии разделения в раскрытых в данном документе способах сохраняются нативная укладка, структура высокого порядка и связывающая способность антигенсвязывающего белка и его мишени. В различных аспектах смесь разделяют на несвязанную фракцию, содержащую несвязанные антитела, или антигенсвязывающие белки, или мишени, и связанную фракцию, содержащую комплексы антитело/антигенсвязывающий белок-мишень.

[99] Подходящие способы и методики разделения смесей на фракции известны из уровня техники. См., например, Coskun, *North Clin Istanb* 3(2): 156-160 (2016); Snyder et al., *Practical HPLC Method Development*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc. 1997; Snyder et al., *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2010; Heftmann, *Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods*, 6th ed., Volume 69A, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2004; Mori and Barth, *Size Exclusion Chromatography*, Springer-Verlag, Berlin, 1999. В некоторых аспектах разделение происходит на основании заряда, как, например, в ионообменной хроматографии, капиллярном изоэлектрическом фокусировании (cIEF) и/или капиллярном зонном электрофорезе (CZE), или на основании гидрофобности, как, например, при разделении в обращенно-фазовой хроматографии (RP; например, RP-HPLC) и хроматографии гидрофобных взаимодействий (HIC-HPLC). В различных аспектах разделение происходит на основании размера, как, например, в эксклюзионной хроматографии (SEC; например, SE-HPLC), электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE), капиллярном электрофорезе с додецилсульфатом натрия (CE-SDS). Описанные в данном документе способы применяют для обнаружения окисления продукта по остаткам Met или Trp, фрагментации/отсечения, изомеризации Asp, дезамидирования, образования пироглутаминовой кислоты на N-конце. В различных вариантах осуществления смесь разделяют на по меньшей мере две фракции с использованием методики, в которой компоненты смеси разделяются на основании размера, заряда, гидрофобности, аффинности к захватывающей молекуле или их комбинации. В различных случаях эта методика представляет собой эксклюзионную хроматографию (SEC), аффинную хроматографию, осаждение с использованием гранул или клеток, фракционирование в свободном потоке (FFF), ионообменную хроматографию (IEX), катионообменную хроматографию (CEX), хроматографию гидрофобных взаимодействий (HIC) или ультрацентрифугирование (UC). Смесь необязательно

разделяют на по меньшей мере две фракции с использованием методики, в которой компоненты смеси разделяются на основании размера, где методика необязательно представляет собой эксклюзионную хроматографию (SEC).

[100] В различных аспектах смесь разделяют на по меньшей мере две фракции с использованием методики, в которой компоненты смеси разделяются на основании аффинности к захватывающей молекуле, связанной с твердой подложкой, необязательно гранулой или клеткой. В различных случаях смесь разделяют посредством (i) добавления смеси в контейнер, например, пробирку, содержащую гранулы, связанные с захватывающей молекулой, или клетки, экспрессирующие на своей поверхности захватывающую молекулу, (ii) центрифугирования контейнера (например, пробирки) с получением надосадочной жидкости и осадка, (iii) сбора надосадочной жидкости из осадка с получением несвязанной фракции, (iv) высвобождения связанной фракции из осадка с помощью раствора, (v) центрифугирования контейнера (например, пробирки), содержащего осадок и раствор, с получением второй надосадочной жидкости, содержащей связанную фракцию, и второго осадка, содержащего гранулы или клетки, и (vi) сбора второй надосадочной жидкости с получением связанной фракции. В некоторых аспектах смесь разделяют посредством (i) добавления смеси в колонку, содержащую гранулы, связанные с захватывающей молекулой, с получением проточной и связанной фракций, (ii) сбора проточной фракции с получением несвязанной фракции, (iii) высвобождения связанной фракции из гранул с помощью раствора и сбора раствора, содержащего связанную фракцию. Подходящие твердые подложки включают, например, гранулы, смолу, бумагу, необязательно изготовленную из целлюлозы, кремнезем, глинозем, стекло, пластик или их комбинацию. В иллюстративных аспектах захватывающая молекула, связанная с твердой подложкой, представляет собой белок. Захватывающая молекула может быть идентична мишени. Захватывающая молекула преимущественно не ограничена какой-либо конкретной молекулой.

[101] В различных вариантах осуществления способа идентификации характерных особенностей иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или мишени, которые влияют на взаимодействие между антигенсвязывающим белком и мишенью, для каждой из несвязанной фракции и связанной фракции способ включает идентификацию и количественное определение обилия каждой характерной особенности, присутствующей в соединении антигенсвязывающего белка или мишени, где в случае, если обилие характерной особенности в несвязанной фракции превышает обилие характерной особенности в связанной фракции, характерная особенность отрицательно влияет на взаимодействие между антигенсвязывающим белком и мишенью. В различных аспектах способ включает использование масс-спектрометра для идентификации и количественного определения обилия каждой характерной особенности соединения антигенсвязывающего белка или мишени в каждой из несвязанной фракции и связанной фракции.

[102] В различных вариантах осуществления способа определения эффекта

известной характерной особенности, присутствующей в соединении антигенсвязывающего белка или мишени, в отношении взаимодействия между антигенсвязывающим белком и мишенью способ включает для каждой из несвязанной фракции и связанной фракции количественное определение обилия известной характерной особенности, где в случае, если обилие известной характерной особенности в несвязанной фракции превышает обилие известной характерной особенности в связанной фракции, известная характерная особенность оказывает отрицательный эффект в отношении взаимодействия между антигенсвязывающим белком и мишенью. В различных аспектах способ включает использование масс-спектрометра для количественного определения обилия известной характерной особенности в каждой из несвязанной фракции и связанной фракции.

[103] Стабильность относится к устойчивости к химическим модификациям аминокислотных остатков и биофизическим модификациям белка, таким как образование НМW-соединений в стрессовых условиях, которые могут иметь место в ходе изготовления, хранения, и/или дополнительных или альтернативных стрессовых условиях. Для способов и иммуноглобулинов, антигенсвязывающих белков и их фрагментов согласно вариантам осуществления, описанным в данном документе, "стабильность" и/или "НМW-соединения" могут быть определены с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC). Композиция, содержащая иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или фрагмент, может быть разделена с помощью SEC, например, SEC-UV. В SEC может использоваться подвижная фаза, содержащая 100 мМ фосфата натрия и 250 мМ NaCl (pH 6,8), скорость потока может быть установлена на 0,5 мл/мин, температура колонки может быть установлена на 37°C, время прогона может составлять 35 минут, а автоматический пробоотборник может быть установлен на 4°C. Пример подходящей колонки для SEC включает колонку с гелем, содержащую частицы кремнезема, содержащие диольную функциональную группу и имеющие средний диаметр 5 мкм и средний размер пор приблизительно 25 нМ (коммерчески доступную, например, в качестве колонки G3000SWxl от TOSOH Bioscience). В случае SEC-UV детекцию методом спектрометрии в ультрафиолетовой/видимой области спектра (UV/VIS) можно осуществлять при 214 нм и 280 нм. Следует принимать во внимание, что после разделения пики, представляющие мономерные и НМW-соединения, могут элюироваться в разные моменты времени в SEC-профиле элюирования.

[104] В случае определения стабильности композиция для SEC-анализа может содержать подвергнутый стрессу иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или фрагмент, который может подвергаться стрессу при повышенной температуре в течение определенного периода времени, как, например, при 40°C в течение четырех недель. Следует отметить, что температура 40°C в течение четырех недель в целом хорошо экстраполируется на исследование стабильности в течение срока годности иммуноглобулинов, антигенсвязывающих белков и их фрагментов (исследование стабильности в течение срока годности обычно продолжается 2 года при 2-8°C (2Y4C) и

после этого 1 месяц при комнатной температуре, которая составляет 25°C или 30°C в зависимости от географического положения). Дополнительно или в качестве альтернативы ультрафиолетовый свет (клк/ч холодного белого света и 10 Вт/м² UVA-света при 25°C в течение 7 дней), экстремальный pH ($\text{pH} \geq 8$ или $\leq 3,6$) или окисляющие реагенты (например, 0,1% H₂O₂ при 25°C в течение 5 часов) можно использовать в качестве стрессоров. Если в данном документе не указано иное или иное не требуется в соответствии с научным контекстом, стресс для целей исследования "стабильности" понимают как относящийся к 40°C в течение четырех недель. Дополнительную информацию о стрессорах и SEC-анализе можно найти, например, в международной публикации № WO 2020/247790, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[105] После SEC-анализа необязательно можно провести пептидное картирование и можно идентифицировать модификации пептидов, ассоциированные со связанными и несвязанными соединениями, например, как описано в данном документе и/или в международной публикации № WO 2020/247790. Для пептидного картирования элюируемые фракции можно собирать с использованием фильтра с порогом отсечения по молекулярной массе (например, больше 10 кДа) и элюировать 7,5 М гуанидиновым элюирующим буфером. Для определения химических модификаций, влияющих на связывание с антигеном, подвергнутый стрессу иммуноглобулин (или антигенсвязывающий белок или его фрагмент) и антиген могут быть смешаны вместе и разделены на элюируемый раньше комплекс, связанный с антигеном, и элюируемый позже несвязанный иммуноглобулин (или антигенсвязывающий белок или его фрагмент). Для определения химических модификаций, влияющих на HMW или коррелирующих с ними, могут быть собраны мономерные и HMW-соединения. В описанном исследовании использовался форсированный тепловой стресс и связанные с ним разрушения антитела при 40°C в течение 1 месяца (40C1M). Подвергнутое стрессу антитело смешивали с его мишенью (TSLP), и смесь разделяли с помощью SEC на комплекс антитело-мишень и несвязанное антитело. Следует отметить два ограничения этого применяемого способа SEC комплекса антитело-антиген. Стресс 40C1M может приводить к более существенным разрушениям по сравнению с разрушениями при комнатной температуре 25°C или 30°C. Также разрушение/модификация по одному остатку может вызвать модификацию по другому остатку за счет дальних аллостерических взаимодействий. Этот эффект может усиливаться при более высокой температуре, поскольку структура будет более податлива к динамическим движениям. Также описанный способ SEC комплекса антитело-антиген позволяет анализировать все соединения в образцах. Это отличается от традиционного способа, включающего разделение методом СЕХ на отдельные пики с последующим определением характеристик, в котором собранные соединения определяются более четко, а соединения "между главными пиками" с двумя и более модификациями на молекулу избегаются.

[106] Следует принимать во внимание, что "аффинность" или "связывание" можно

определить с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), биослойной интерферометрии или также с помощью экспериментов по определению аффинности связывания методом SEC, как описано в данном документе. Если в данном документе не указано иное или иное не требуется в соответствии с научным контекстом, "аффинность" понимают как относящуюся к аффинности, измеренной с помощью SPR. Значение K_d можно измерить методом SPR с помощью биосенсорной системы, такой как система VIAcore®. Анализ с помощью системы VIAcore® может включать анализ связывания и диссоциации антигена (например, TSLP) на чипах с иммобилизованными молекулами (например, иммуноглобулином, антигенсвязывающим белком или его фрагментом, связывающимися с TSLP, описанными в данном документе) на их поверхности. С помощью SPR можно обнаружить связывающие комплексы с $K_d < 10^{-6}$ М. В различных вариантах осуществления SPR можно проводить при 20°, 25°, 30° или 37°C.

Композиции

[107] В различных вариантах осуществления предусмотрена композиция, содержащая множество иммуноглобулинов, антигенсвязывающих белков или их фрагментов или антител или их фрагментов, связывающихся с TSLP, каждое из которых содержит последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3; последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4; последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5; последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6; последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7; и последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8, содержащую по меньшей мере один из L-аспартата в положении 54 HC в SEQ ID NO: 7, в котором не содержится ни изоаспартат (isoAsp), ни циклический аспартат (cAsp); неокисленного W102 HC в SEQ ID NO: 8; L-аспартата в положении 49 или положении 50 LC в SEQ ID NO: 7, в котором не содержится ни isoAsp, ни cAsp; N65 LC, представленного в SEQ ID NO: 12, в котором не содержится дезамидированный N65; или L-аспартата в положении 91 LC в SEQ ID NO: 5, в котором не содержится ни isoAsp, ни cAsp.

[108] В различных вариантах осуществления предусмотрена композиция, содержащая множество моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, связывающихся с TSLP, каждое из которых содержит последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3; последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4; последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5; последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную

последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6; последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7; и последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8, содержащую по меньшей мере один из L-аспартата в положении 54 HC в SEQ ID NO: 7, в котором не содержится ни изоаспартат (isoAsp), ни циклический аспартат (cAsp); неокисленного W102 HC в SEQ ID NO: 8; L-аспартата в положении 49 или положении 50 LC в SEQ ID NO: 4, в котором не содержится ни isoAsp, ни cAsp; дезамидированного N65 LC в SEQ ID NO: 12 или L-аспартата в положении 91 LC в SEQ ID NO: 5, в котором не содержится ни isoAsp, ни cAsp.

[109] В различных вариантах осуществления не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D54 HC. В различных вариантах осуществления не более 2% моноклональных антител к TSLP содержат окисленный W102 HC. В различных вариантах осуществления не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D50 LC. В различных вариантах осуществления не более 0,5% моноклональных антител к TSLP содержат дезамидированный N65 LC. В различных вариантах осуществления не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D91 HC. В различных вариантах осуществления антитело к TSLP содержит комбинацию из L-аспартата в 54 HC и L-аспартата в 49 или 50 LC. В различных вариантах осуществления антитело к TSLP обогащено L-аспартатом в 54 HC в по меньшей мере 6 раз по сравнению с уровнями isoAsp. В различных вариантах осуществления антитело к TSLP представляет собой антитело IgG2.

[110] В одном аспекте композиция содержит иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, содержащие (A) переменный домен легкой цепи, содержащий: (i) последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3; (ii) последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4; и (iii) последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5; и (B) переменный домен тяжелой цепи, содержащий: (i) последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6; (ii) последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с мутацией по по меньшей мере одному из следующих остатков D54 или G55, представленную под SEQ ID NO: 7; и (iii) последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8. В различных вариантах осуществления HCDR2 имеет последовательность VIWYX₁X₂SNKHYADSVKG, где X₁ представляет собой D или E, и X₂ представляет собой G или A (SEQ ID NO: 13). HCDR2 необязательно имеет следующую последовательность: VIWYEGSNKHYADSVKG (SEQ ID NO: 14), VIWYDASNKHYADSVKG (SEQ ID NO: 15)

или VIWYEASNKHYADSVKG (SEQ ID NO: 16).

[111] В различных вариантах осуществления мутация в HCDR2 представляет собой D54E. В различных вариантах осуществления мутация в HCDR2 представляет собой G55A. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, необязательно содержат мутацию по меньшей мере одному из следующих остатков LCDR2 D49, D50 или S51 в SEQ ID NO: 4. В различных вариантах осуществления мутация LCDR2 представляет собой одну или несколько из D49E, D50E или S51A. В различных вариантах осуществления LCDR2 имеет последовательность $X_1X_2X_3DRPS$, где X_1 представляет собой D или E, X_2 представляет собой D или E, и X_3 представляет собой S или A (SEQ ID NO: 17). LCDR2 необязательно имеет следующую последовательность: EDSDRPS (SEQ ID NO: 18), DESDRPS (SEQ ID NO: 19), EESDRPS (SEQ ID NO: 20), DDADRPS (SEQ ID NO: 21), DEADRPS (SEQ ID NO: 22), EDADRPS (SEQ ID NO: 23) или EEADRPS (SEQ ID NO: 24).

[112] В различных вариантах осуществления композиция содержит иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, содержащие (A) варибельный домен легкой цепи, содержащий: (i) последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3; (ii) последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с мутацией по меньшей мере одному из следующих остатков D49, D50 или S51 в SEQ ID NO: 4; и (iii) последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5; и (B) варибельный домен тяжелой цепи, содержащий: (i) последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6; (ii) последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7, и (iii) последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8.

[113] В различных вариантах осуществления LCDR2 имеет последовательность $X_1X_2X_3DRPS$ (SEQ ID NO: 17), где X_1 представляет собой D или E, X_2 представляет собой D или E, и X_3 представляет собой S или A. LCDR2 необязательно имеет следующую последовательность: EDSDRPS (SEQ ID NO: 18), DESDRPS (SEQ ID NO: 19), EESDRPS (SEQ ID NO: 20), DDADRPS (SEQ ID NO: 21), DEADRPS (SEQ ID NO: 22), EDADRPS (SEQ ID NO: 23) или EEADRPS (SEQ ID NO: 24). В различных вариантах осуществления мутация в LCDR2 представляет собой D49E. В различных вариантах осуществления мутация в LCDR2 представляет собой D50E. В различных вариантах осуществления мутация в LCDR2 представляет собой S51A. В различных вариантах осуществления иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, необязательно содержат мутацию по одному из следующих остатков D54 или G55 в HCDR2, представленной под SEQ ID NO: 7. В

различных вариантах осуществления мутация в HCDR2 представляет собой одну или несколько из D54E или G55A в SEQ ID NO: 7. В различных вариантах осуществления HCDR2 имеет последовательность VIWYX₁X₂SNKHYSVKG, где X₁ представляет собой D или E, и X₂ представляет собой G или A (SEQ ID NO: 13). HCDR2 необязательно имеет следующую последовательность: VIWYEGSNKHYSVKG (SEQ ID NO: 14), VIWYDASNKHYSVKG (SEQ ID NO: 15) или VIWYEASNKHYSVKG (SEQ ID NO: 16).

[114] В различных вариантах осуществления композиция содержит иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, содержащие (A) варибельный домен легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из: i. последовательности аминокислот, на по меньшей мере 80% идентичной SEQ ID NO: 12; ii. последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 11; или iii. последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизируется в условиях умеренной жесткости с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из SEQ ID NO: 11; или (B) варибельный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из: i. последовательности аминокислот, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 10; ii. последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 9; или iii. последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизируется в условиях умеренной жесткости с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из SEQ ID NO: 9; или (C) варибельный домен легкой цепи согласно (A) и варибельный домен тяжелой цепи согласно (B), где иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, сохраняют одну или несколько из CDR антигенсвязывающих белков или их фрагмента, связывающихся с TSLP, и содержат мутацию по одному или нескольким из D54 или G55 в HCDR2 под SEQ ID NO: 7 или D49, D50 или S51 в LCDR2 под SEQ ID NO: 4.

[115] В различных вариантах осуществления иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность

QMQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRITYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYX₁X₂SNKHYSVKGRFTITRDNSKNTLNLQMNSLRAEDTAVYYCARAPQWELVHEAFDIWGQGMVTVSS (SEQ ID NO: 25) (HCDR2 выделена подчеркиванием),

[116] где X₁ представляет собой D или E, и X₂ представляет собой G или A, необязательно

QMQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRITYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYEGSNKHYSVKGRFTITRDNSKNTLNLQMNSLRAEDTAVYYCARAPQWELVHEAFDIWG

QGTMTVSS (SEQ ID NO: 26); или
 QMQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRITYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDAS
NKHYADSVKGRFTITRDNSKNTLNLQMNSLRAEDTAVYYCARAPQWELVHEAFDIWG
 QGTMTVSS (SEQ ID NO: 27); или

QMQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRITYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIW
YEASNKHYADSVKGRFTITRDNSKNTLNLQMNSLRAEDTAVYYCARAPQWELVHEAF
 DIWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 28), или их смеси.

[117] В различных вариантах осуществления иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNLGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYX₁X₂X₃D
RPSWIPERFSGSNSGNTATLTISRGEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL
 (SEQ ID NO: 29) (LCDR1-3 выделены подчеркиванием),

[118] где X₁ представляет собой D или E, X₂ представляет собой D или E, и X₃ представляет собой S или A, необязательно SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNLGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYEDSDRPSWIPE
RFSGSNSGNTATLTISRGEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 30); или

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNLGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYEDSDRP
SWIPERFSGSNSGNTATLTISRGEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL (SEQ
 ID NO: 31); или

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNLGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYEESDRP
SWIPERFSGSNSGNTATLTISRGEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL (SEQ
 ID NO: 32); или

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNLGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDADR
PSWIPERFSGSNSGNTATLTISRGEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL (SEQ
 ID NO: 33); или

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNLGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDEADR
PSWIPERFSGSNSGNTATLTISRGEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL (SEQ
 ID NO: 34); или

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNLGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYEDADR
PSWIPERFSGSNSGNTATLTISRGEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL (SEQ
 ID NO: 35); или

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNLGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYEEADR
PSWIPERFSGSNSGNTATLTISRGEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL (SEQ
 ID NO: 36); или их смеси.

[119] Также предусмотрена композиция, содержащая моноклональные антитела к TSLP, каждое из которых включает в себя антитело к TSLP, имеющее последовательности, описанные в данном документе, например, одну или несколько CDR,

представленных под SEQ ID NO: 3-8 и SEQ ID NO: 13-24, и одну или несколько переменных областей, представленных под SEQ ID NO: 10 и 12 и SEQ ID NO: 25-36, при этом композиция характеризуется ограниченным содержанием изомеризованного D54 HC и/или ограниченным содержанием изомеризованного D49 или D50 LC, эффективным для связывания моноклональных антител к TSLP из композиции с TSLP с Kd, которая численно меньше или равняется 10^{-8} M. В различных вариантах осуществления антитело к TSLP, описанное в данном документе, связывается с аффинностью (Kd), составляющей по меньшей мере 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, 10^{-13} M или меньше.

[120] Также предусмотрена композиция, содержащая моноклональные антитела к TSLP, каждое из которых включает в себя антитело к TSLP, имеющее последовательности, описанные в данном документе, например, CDR, представленные под SEQ ID NO: 3-8 или SEQ ID NO: 13-24, и/или переменные области, представленные под SEQ ID NO: 10 и 12 или SEQ ID NO: 25-36, при этом композиция содержит моноклональные антитела IgG2 к TSLP, где справедливо по меньшей мере одно из следующего: не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D54 HC; не более 2% моноклональных антител к TSLP содержат окисленный W102 HC; не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D50 LC; не более 0,5% моноклональных антител к TSLP содержат дезамидированный N65 LC или не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D91 LC.

[121] В некоторых вариантах осуществления композиция является частью состава, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой лекарственное вещество, применяемое для получения состава, описанного в данном документе.

Способы введения

[122] В одном аспекте способы по настоящему изобретению включают стадию введения терапевтического антитела к TSLP или варианта антитела, описанного в данном документе, необязательно в фармацевтически приемлемом носителе или наполнителе. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой стерильную композицию.

[123] В данном документе рассматриваются способы лечения воспалительного заболевания, состояния или нарушения, такого как астма, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), атопический дерматит, эозинофильный эзофагит (EoE), назальные полипы, хроническая спонтанная крапивница, заболевание, обусловленное Ig, IgA-нефропатия, волчаночный нефрит, эозинофильный гастрит, хронический синусит без назальных полипов и идиопатический легочный фиброз (IPF), с помощью антитела или антигенсвязывающего белка или его фрагментов, связывающихся с TSLP, описанных в данном документе. В различных вариантах осуществления заболевание, состояние или нарушение представляет собой астму, в том числе тяжелую астму, эозинофильную или неэозинофильную астму и астму с низким уровнем эозинофилов.

[124] Астма представляет собой хроническое воспалительное нарушение со

стороны дыхательных путей. Согласно оценкам ежегодно астма является причиной 1,1 миллиона амбулаторных визитов, 1,6 миллиона визитов в отделение неотложной помощи, 444000 случаев госпитализации (Defrances et al, 2008. Доступно на веб-сайте Центров по контролю и профилактике заболеваний, www.cdc.gov/nchs/data/nhsr/nhsr005.pdf), а также 3500 случаев смерти в США. У индивидуумов, предрасположенных к заболеванию, астматическое воспаление вызывает повторяющиеся приступы хрипа, удушья, чувства стеснения в груди и кашля. Считается, что этиология астмы является многофакторной, и на нее влияют как генетические механизмы, так и механизмы окружающей среды (To et al., BMC Public Health 2012;12:204; Chung et al. Eur Respir J 2014;43:343-73), при этом важной причиной являются аллергены окружающей среды (Chung et al., выше; Pavord ID, et al., NPJ Prim Care Respir Med 2017;27:17). Большинство случаев возникает тогда, когда человек становится гиперчувствительным к аллергенам (атопия). Атопия характеризуется увеличением количества клеток Th2, а также экспрессии цитокинов Th2-типа и продуцирования IgE. Считается, что у примерно 10 миллионов пациентов в США имеется астма, индуцированная аллергией. Несмотря на доступные варианты терапии, астма продолжает оставаться серьезной проблемой для здравоохранения. Во всем мире астмой в настоящее время поражены примерно 300 миллионов человек; ожидается, что к 2020 г. астмой будут поражены 400 миллионов человек (Partridge, Eur Resp Rev. 16:67-72, 2007).

[125] Вдыхание аллергена у пациентов с atopической астмой индуцирует некоторые проявления астмы, в том числе обратимую обструкцию дыхательных путей, гиперреактивность дыхательных путей, а также эозинофильное и базофильное воспаление дыхательных путей. Провокационная проба с вдыхаемым аллергеном стала преобладающей моделью астмы у многих видов (Bates et al., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 297(3):L401-10, 2009; Diamant et al., J Allergy Clin Immunol. 132(5):1045-1055, 2013.)

[126] Были выявлены различные подтипы астмы, рефрактерные к лечению стероидами. Эозинофилы являются важными воспалительными клетками при аллергической астме, которая характерным образом опосредуется CD4+ Т-клетками Th2-типа. Нейтрофильное воспаление дыхательных путей ассоциировано с лечением кортикостероидами при тяжелой астме и может быть опосредовано Т-клетками Th1- или Th17-типа (Mishra et al., Dis. Model. Mech. 6:877-888, 2013).

[127] Меры диагностики и оценки астмы включают следующее. Воспаление дыхательных путей оценивали с применением стандартизированного теста для определения фракции оксида азота в выдыхаемом воздухе при одиночном вдохе (FeNO) (Американское торакальное общество; ATS, Am J Respir Crit Care Med. 171(8):912-30, 2005). Спирометрию проводят в соответствии с рекомендациями ATS/Европейского респираторного общества (ERS) (Miller et al, Eur Respir J. 26(1):153-61, 2005). Спирометрическое тестирование после приема бронходилататора (после BD) оценивали после проведения субъекту спирометрии перед BD. Максимальную бронходилатацию индуцировали с применением SABA, такого как альбутерол (отмеренная доза в 90 мкг)

или сальбутамол (отмеренная доза в 100 мкг) или их эквивалент, с помощью спейсерного устройства на максимум 8 полных впрыскиваний (Sorkness et al, J Appl Physiol. 104(2):394-403, 2008). Самое высшее значение FEV₁ до и после приема BD, полученное после 4, 6 или 8 впрыскиваний, использовали для определения обратимости и для анализа. Опросник по контролю над астмой (ACQ) 6 представляет собой заполняемый пациентами опросник, в котором оцениваются симптомы астмы (т. е. ночные пробуждения, симптомы при пробуждении, ограничение активности, одышка, хрипы), а также ежедневный прием бронходилататора в качестве средства резервной терапии и FEV₁ (Juniper et al, Oct 1999 г.). ACQ-6 представляет собой сокращенную версию ACQ, в которой измерение FEV₁ исключено из исходного балла ACQ. Средний балл ACQ представляет собой среднее значение ответов. Средние баллы $\leq 0,75$ указывают на хорошо контролируемую астму, баллы от 0,75 до $\leq 1,5$ указывают на частично контролируемую астму, и балл $> 1,5$ указывает на неконтролируемую астму (Juniper et al, Respir Med. 100(4):616-21, 2006). Индивидуальные изменения, составляющие по меньшей мере 0,5, считаются клинически значимыми (Juniper et al, Respir Med. 99(5):553-8, 2005). Стандартизированный опросник оценки качества жизни у больных астмой (AQLQ[S])+12 (AQLQ(S)+12) представляет собой опросник из 32 пунктов, с помощью которого измеряется HRQoL, наблюдаемое у пациентов с астмой (Juniper et al, Chest. 115(5):1265-70, May 1999). Для оценки также используется дневник астмы для ежедневного заполнения.

[128] В родственной публикации заявки на патент США US-2018-0296669 (включенной в данный документ посредством ссылки) раскрывается, что лечение с помощью антитела к TSLP является эффективным при ослаблении симптомов астмы в популяции с отсутствием/низким уровнем эозинофилов, как и в популяции с высоким уровнем эозинофилов. Также рассматривается способ снижения частоты обострений астмы у субъекта.

[129] Также в данном документе рассматриваются способы лечения астмы у субъекта, характеризующегося профилем астмы с высоким количеством Th2 или профилем астмы с низким количеством Th2. Предполагается, что антагонист TSLP, который ингибирует связывание белка TSLP с его рецепторным комплексом, будет обеспечивать эффективное лечение популяции с астмой с низким уровнем эозинофилов, как и антитело, описанное в данном документе. Аналогичным образом предполагается, что антагонист TSLP, который ингибирует связывание TSLP с его рецепторным комплексом, будет эффективным при лечении популяций с астмой с низким количеством Th2. Также рассматриваются способы лечения хронического обструктивного заболевания легких (COPD) у субъекта, включающие введение антитела, или варианта антитела, или антигенсвязывающего белка, связывающихся с TSLP, описанных в данном документе. Предполагается, что субъектом, подлежащим лечению, является человек. Субъект может быть взрослым, подростком или ребенком.

[130] Композиции на основе терапевтического антитела (или варианта антитела) могут быть доставлены пациенту в несколько участков. Несколько введений можно

проводить одновременно или можно вводить в течение определенного периода времени. В определенных случаях благоприятным является обеспечение непрерывного потока терапевтической композиции. Дополнительное средство терапии можно вводить периодически, например, один раз в час, один раз в день, один раз в неделю, каждые 2 недели, каждые 3 недели, один раз в месяц или с более длительным интервалом.

[131] В различных вариантах осуществления количества терапевтического средства, такого как бивалентное антитело, имеющее два участка связывания TSLP, в указанной дозировке могут варьироваться в зависимости от габаритов индивидуума, которому вводят средство терапии, а также от характеристик нарушения, подвергаемого лечению.

[132] В иллюстративных способах лечения антитело к TSLP или вариант антитела вводят в диапазоне доз от приблизительно 70 мг до приблизительно 280 мг на суточную дозу. Например, даваемая доза может составлять приблизительно 70 мг, 210 мг или 280 мг. В различных вариантах осуществления антитело к TSLP или вариант антитела можно вводить в дозе, составляющей 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 или 280 мг на дозу. Эти концентрации можно вводить в виде одной лекарственной формы или в виде нескольких доз. Вышеуказанные дозы вводятся каждые две недели или каждые четыре недели. В различных вариантах осуществления антитело к TSLP или вариант антитела вводят в однократной дозе, составляющей 70 мг, каждые две недели или каждые четыре недели. В различных вариантах осуществления антитело к TSLP или вариант антитела вводят в однократной дозе, составляющей 210 мг, каждые две недели или каждые четыре недели. В различных вариантах осуществления антитело к TSLP или вариант антитела вводят в однократной дозе, составляющей 280 мг, каждые две недели или каждые четыре недели.

[133] Для вариантов антител количество варианта антитела должно быть таким, чтобы количество участков связывания TSLP, содержащихся в дозе, было эквимолярным количеству участков связывания TSLP в каноническом бивалентном антителе, описанном выше.

[134] Предполагается, что антитело к TSLP или вариант антитела вводят каждые 2 недели или каждые 4 недели в течение периода по меньшей мере 4 месяцев, 6 месяцев, 9 месяцев, 1 года или больше. В различных вариантах осуществления введение является подкожным или внутривенным.

[135] Предполагается, что лечение с помощью антитела к TSLP или варианта антитела обеспечивает уменьшение уровня эозинофилов в крови, мокроте, бронхоальвеолярной жидкости или легких субъекта. Также предполагается, что введение обеспечивает сдвиг количества клеток у субъекта от популяции с высоким количеством Th2 к популяции с низким количеством Th2. Дополнительно предполагается, что введение антитела к TSLP обеспечивает улучшение одного или нескольких показателей астмы у субъекта, выбранных из группы, состоящей из объема форсированного выдоха (FEV), обратимости FEV1, форсированной жизненной емкости легких (FVC), FeNO, балла

опросника по контролю над астмой-6 и балла AQLQ(S)+12.

[136] Улучшение течения астмы можно измерить по одному или нескольким из следующего: снижения AER (годовой частоты обострений), снижения количества случаев госпитализации/тяжелых обострений астмы, изменения относительно исходного уровня (увеличения) времени до первого обострения астмы (после начала лечения с помощью антитела к TSLP), уменьшения по сравнению с плацебо доли субъектов с одним или несколькими обострениями или тяжелыми обострениями астмы в ходе лечения, например, в течение 52 недель, изменения относительно исходного уровня (увеличения) FEV1 и FVC (перед приемом бронходилататора и после приема бронходилататора), изменения относительно исходного уровня (уменьшения) количества эозинофилов в крови и мокроте (или легочных эозинофилов, если получены биоптат или жидкость BAL), изменения относительно исходного уровня (уменьшения) FeNO, изменения относительно исходного уровня (уменьшения) IgE, улучшения симптомов и контроля астмы согласно измерению посредством PRO, в том числе ACQ и вариантов, AQLQ и вариантов, SGRQ и дневников симптомов астмы, изменения (уменьшения) приема лекарственных препаратов резервной терапии, уменьшения приема системных кортикостероидов, уменьшения соотношения клеток Th2/Th1 в крови. Большинство/все из этих измерений следует проводить в общей популяции и субпопуляциях, в том числе с высоким и низким уровнями эозинофилов (превышающий или равняющийся 250 является высоким; составляющий меньше 250 является низким), с аллергическим и неаллергическим заболеванием, с высоким и низким количествами Th2, с высоким и низким уровнями периостина (по сравнению с медианным значением) и с высоким и низким показателями FeNO (превышающим или равняющимся 24 или составляющим меньше 24).

[137] В настоящем изобретении также рассматривается введение нескольких средств, таких как композиция на основе антитела в сочетании со вторым средством, описанным в данном документе, в том числе без ограничения противовоспалительным средством или средством терапии астмы.

[138] Однако предполагается, что в различных вариантах осуществления введение обеспечивает снижение частоты применения или уровней совместно вводимого средства терапии у субъекта. Иллюстративные совместно вводимые средства терапии включают без ограничения ингаляционные кортикостероиды (ICS), β 2-агонисты длительного действия (LABA), антагонисты лейкотриеновых рецепторов [LTRA], антимускариновые препараты длительного действия [LAMA], кромоны, β 2-агонисты короткого действия (SABA) и теофиллин или кортикостероиды для перорального применения. В различных вариантах осуществления введение устраняет потребность в кортикостероидной терапии.

Составы

[139] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении рассматривается применение фармацевтических композиций, содержащих терапевтически эффективное количество антитела к TSLP или варианта антитела вместе с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем, солюбилизатором,

эмульгатором, консервантом и/или адьювантом. Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения субъекта путем введения такой фармацевтической композиции.

[140] В определенных вариантах осуществления приемлемые материалы для составления предпочтительно являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать материалы для составления, предназначенные для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмоляльности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникающей способности композиции. В таких вариантах осуществления подходящие материалы для составления включают без ограничения аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин); противомикробные средства; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как борат, бикарбонат, Tris-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты); объемообразующие средства (такие как маннит или глицин); хелатирующие средства (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)); комплексообразующие средства (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, сахароза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); красители, ароматизаторы и разбавители; эмульгаторы, гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как хлорид бензалкония, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие средства; поверхностно-активные вещества или смачивающие средства (такие как плуроники, PEG, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапол); средства, повышающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); средства, повышающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); средства доставки; разбавители; наполнители и/или фармацевтические адьюванты. См. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A. R. Gennaro, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

[141] Подходящими средой или носителем могут являться вода для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственная спинномозговая жидкость, возможно дополненная другими материалами, традиционно используемыми в композициях для парентерального введения. Нейтральный забуференный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином, являются

дополнительными иллюстративными средами. В конкретных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат Tris-буфер с рН, составляющим приблизительно 7,0-8,5, или ацетатный буфер с рН, составляющим приблизительно 4,0-5,5, и могут дополнительно содержать сорбит или его подходящий заменитель.

[142] Компоненты состава предпочтительно присутствуют в концентрациях, которые приемлемы для участка введения. В определенных вариантах осуществления используют буферы для поддержания композиции при физиологическом рН или при немного более низком рН, обычно при рН в диапазоне от приблизительно 4,5 до приблизительно 8. Он включает приблизительно 4,5, приблизительно 4,6, приблизительно 4,7, приблизительно 4,8, приблизительно 4,9, приблизительно 5,0, приблизительно 5,1, приблизительно 5,2, приблизительно 5,3, приблизительно 5,4, приблизительно 5,5, приблизительно 5,6, приблизительно 5,7, приблизительно 5,8, приблизительно 5,9, приблизительно 6,0, приблизительно 6,1, приблизительно 6,2, приблизительно 6,3, приблизительно 6,4, приблизительно 6,5, приблизительно 6,6, приблизительно 6,7, приблизительно 6,8, приблизительно 6,9, приблизительно 7,0, приблизительно 7,1, приблизительно 7,2, приблизительно 7,3, приблизительно 7,4, приблизительно 7,5, приблизительно 7,6, приблизительно 7,7, приблизительно 7,8, приблизительно 7,9 и приблизительно 8,0.

[143] В различных вариантах осуществления антитело к TSLP или вариант антитела находится в составе, содержащем ацетат и одно или несколько из пролина, сахарозы, полисорбата 20 или полисорбата 80. В различных вариантах осуществления состав содержит 5-50 мМ ацетата, пролин в концентрации, которая меньше или равняется 3% (вес/об.), 0,015% (вес/об.) \pm 0,005% (вес/об.) полисорбата 20 или полисорбата 80 при рН от 4,9 до 6,0. Антитело или фрагмент антитела необязательно представлены в концентрации от приблизительно 100 до приблизительно 150 мг/мл. Состав может храниться при от -20° до -70°C . Иллюстративные составы на основе антител к TSLP, содержащие эти вспомогательные вещества, описаны в международной заявке № PCT/US2021/018561, включенной в данный документ посредством ссылки.

[144] В альтернативных вариантах осуществления антитело к TSLP или вариант антитела находится в составе, содержащем поверхностно-активное вещество и по меньшей мере одну основную аминокислоту или ее соль. В иллюстративных случаях основная аминокислота представляет собой аргинин или гистидин. В различных вариантах осуществления соль представляет собой глутамат аргинина или глутамат гистидина, необязательно в концентрации от 10 до 200 мМ. Состав необязательно дополнительно содержит пролин. В альтернативных вариантах осуществления антитело к TSLP или вариант антитела находится в составе, содержащем поверхностно-активное вещество и кальций или его соль. В различных вариантах осуществления соль представляет собой глутамат кальция, необязательно в концентрации от 15 мМ до приблизительно 150 мМ. Состав необязательно дополнительно содержит пролин. В различных вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет

собой полисорбат 20 или полисорбат 80 или их смесь. Антитело или фрагмент антитела необязательно представлены в концентрации более чем приблизительно 110 мг/мл или более чем приблизительно 140 мг/мл. Иллюстративные составы на основе антител к TSLP, содержащие эти вспомогательные вещества, описаны в международной заявке на патент № PCT/US2021/017880, включенной в данный документ посредством ссылки.

[145] Если предполагается парентеральное введение, то терапевтические композиции для применения могут предусматриваться в виде апиrogenного приемлемого для парентерального введения водного раствора, содержащего желаемое антитело к TSLP в фармацевтически приемлемой среде. Особенно подходящей средой для парентеральной инъекции является стерильная дистиллированная вода, в которой антитело составлено в виде стерильного изотонического раствора, сохраняемого должным образом. В определенных вариантах осуществления получение может предусматривать составление требуемой молекулы с таким средством, как инъецируемые микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулы или липосомы, которые могут обеспечивать контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который может быть доставлен посредством депо-инъекции. В определенных вариантах осуществления также может применяться гиалуроновая кислота, обладающая эффектом содействия пролонгированному пребыванию в кровотоке. В определенных вариантах осуществления имплантируемые устройства для доставки лекарственных средств можно применять для введения антитела. В различных вариантах осуществления введение может осуществляться с помощью предварительно заполненного шприца или автоинъектора. В различных вариантах осуществления автоинъектор представляет собой устройство Ypsomed YpsoMate®. В различных вариантах осуществления автоинъектор раскрыт в WO 2018/226565, WO 2019/094138, WO 2019/178151, WO 20120/072577, WO2020/081479, WO 2020/081480, PCT/US20/70590, PCT/US20/70591, PCT/US20/53180, PCT/US20/53179, PCT/US20/53178 или PCT/US20/53176.

Наборы

[146] В качестве дополнительного аспекта настоящее изобретение включает наборы, которые содержат одно или несколько соединений или композиций, упакованных таким образом, чтобы облегчить их применение для практического осуществления способов по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления такой набор содержит соединение или композицию, описанные в данном документе, упакованные в контейнер, такой как герметичная бутылка или сосуд, с этикеткой, прикрепленной к контейнеру или помещенной в упаковку, на которой описано применение соединения или композиции при практическом осуществлении способа. Соединение или композиция предпочтительно упакованы в виде стандартной лекарственной формы. Набор может дополнительно содержать устройство, подходящее для введения композиции в соответствии с конкретным путем введения или для практического осуществления скринингового анализа. Набор предпочтительно содержит этикетку, на которой описано

применение композиции на основе антитела.

[147] Дополнительные аспекты и подробности настоящего изобретения станут очевидными из следующих примеров, которые предполагаются как иллюстративные, а не ограничивающие.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

[148] Тезепелумаб (AMG157) тестировали в отношении его стабильности и способности образовывать HMW-соединения при высоких стрессовых температурах. Тезепелумаб подвергали воздействию условий температурного стресса, вводя антитело в состав при 37°C и увеличивая температуру до условий, описанных ниже. Характерные особенности, влияющие на связывание и стабильность, определяли с помощью эксклюзионной хроматографии и пептидного картирования.

Материалы и способы

[149] AMG157 и лабильные остатки, потенциально влияющие на связывание. Аминокислотная последовательность AMG157 в виде последовательности A5 (и в виде цепей H5, L5), а также некоторые другие антитела, связывающие TSLP, ранее были описаны в патенте США 7982016 B2.

[150] Молекулярная масса антитела с гликозилированием A2G0F/A2G0F (C6500 H9998 O2068 N1734 S52) составляет 147189,4 Да, включая удаленный N-концевой пироглутамат и C-концевой К тяжелой цепи. TSLP содержал 74% мономерных, 23% димерных и 3% тетрамерных соединений.

[151] Оценка последовательности *in silico* после молекулярной оценки позволила идентифицировать несколько остатков в CDR, которые являются потенциально восприимчивыми к химическим модификациям, которые могут влиять на связывание и активность. Были рассмотрены эти остатки из CDR, а также несколько других остатков из каркасных областей, и они включают желаемые целевые диапазоны, полученные на основании текущего понимания (фигура 1, сверху). Остатки в CDR и их распространенные модификации выбраны в качестве возможных характерных особенностей, поскольку они могут потенциально влиять на связывание с мишенью и активность.

[152] Способ идентификации химических модификаций, влияющих на связывание; эксклюзионная хроматография (SEC) и сбор фракций. После инкубации смесь AMG157 разделяли с помощью SEC с использованием колонки G3000SWxl TOSOH Bioscience, ID 7,8 мм x 30 см (№ по каталогу 08541, TOSOH Bioscience, Сан-Франциско, Калифорния), и подвижная фаза содержала 100 mM фосфата натрия и 250 mM NaCl (pH 6,8). Скорость потока устанавливали на уровне 0,5 мл/мин, температуру колонки устанавливали на 37°C, время прогона составляло 35 минут, а автоматический пробоотборник устанавливали на 4°C. Детекцию методом спектрометрии в ультрафиолетовой/видимой области спектра (UV/VIS) осуществляли при 214 нм и 280 нм. Элюируемые фракции собирали с использованием фильтра с порогом отсечения по молекулярной массе больше 10 кДа и

элюировали 7,5 М гуанидиновым элюирующим буфером. Элюированные фракции подвергали подготовке образцов для пептидного картирования, описанного ниже.

[153] SEC комплекса антитела и лиганда с последующим определением характеристик с помощью LC-MS/MS позволяет определить соотношение модификаций в связанной и несвязанной фракциях антитела. Этот способ отличается от способа SEC, с помощью которого обычно обнаруживают агрегацию белков, например, проводят различия между мономерами, димерами и т. д., поскольку он позволяет обнаружить связывание между антителом и лигандом, а не только агрегацию самого антитела. Эксперимент по определению аффинности связывания методом SEC начинали со смешивания белка AMG157 с его мишенью. При разделении смесей антитело-антиген методом SEC-UV пики, представляющие связанный комплекс терапевтического белка, лиганд и несвязанный терапевтический белок, содержащий характерные особенности, элюировались в разное время в SEC-профиле элюирования. Это позволило собирать фракции связанного комплекса антитело-антиген и несвязанного антитела. После расщепления собранных фракций трипсином и их анализа с использованием способа LC-MS/MS строили графики обилия характерных особенностей терапевтических белков в связанной и несвязанной фракциях. Также строили вулканную диаграмму с \log_2 кратности изменения по оси x и $-\log_{10}$ p-значения по оси y. \log_2 кратности изменения представляет соотношение характерных особенностей в несвязанной/связанной фракциях, которое указывает на то, насколько характерная особенность влияет на связывание терапевтического белка с лигандом. Отрицательный \log_{10} p-значения представляет меру достоверности представленной кратности изменения.

[154] *Способ идентификации химических модификаций, влияющих на агрегацию при 50°C.* Аналогичный подход применяли для исследования характерных особенностей высокомолекулярных (HMW) соединений и мономерных соединений в образце AMG157 50°C1W. SEC-UV AMG157 50°C1W с последующим определением характеристик с помощью LC-MS/MS позволяет определить соотношение модификаций в HMW- и мономерной фракциях антитела. После разделения методом SEC пики, представляющие мономерные и HMW-соединения с идентифицированными характерными особенностями, могут элюироваться в разное время в SEC-профиле элюирования. HMW- и мономерные фракции AMG157 50°C1W собирали, расщепляли и анализировали с использованием способов LC-MS/MS. Строили графики обилия характерных особенностей терапевтических белков в HMW- и мономерных формах антитела. Также строили вулканную диаграмму с \log_2 кратности изменения по оси x и $-\log_{10}$ p-значения по оси y. \log_2 кратности изменения представляет соотношение характерных особенностей в HMW-/мономерной фракциях, которое указывает на то, насколько характерная особенность влияет на образование HMW-формы антитела. Отрицательный \log_{10} p-значения представляет меру достоверности кратности изменения.

[155] *Пептидное картирование.* Пептидное картирование собранных фракций осуществляли с использованием процедуры подготовки образцов, включающей

рефолдинг с гуанидином, восстановление и алкилирование дисульфидных связей, замену буфера и расщепление трипсином на пептиды, подходящие для анализа методом LC-MS, как описано в (Ren *et al.*, *Anal. Biochem.* 392: 12-21 (2009)). Вкратце, образец, содержащий AMG157, разбавляли до приблизительно 1 мг/мл в 0,5 мл денатурирующего буфера с pH 7,5 (7,5 М гидрохлорида гуанидина (GdnHCl) и 0,25 М Tris). Восстановление осуществляли путем добавления 3 мкл 0,5 М дитиотреитола (DTT) с последующей 30-минутной инкубацией при комнатной температуре. Карбоксиметилирование осуществляли путем добавления 7 мкл 0,5 М йодуксусной кислоты (IAA). Реакцию проводили в темноте в течение 15 мин при комнатной температуре. Избыток IAA гасили путем добавления 4 мкл 0,5 М DTT. Восстановленные и алкилированные образцы AMG157 подвергали замене буфера в буфере для расщепления с pH 7,5 (0,1 М Tris или 0,1 М бикарбоната аммония) с использованием колонки NAP-5 (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси, США). Лиофилизированный трипсин растворяли в воде до конечной концентрации 1 мг/мл. Расщепление начинали с добавления 1 мг/мл раствора трипсина к восстановленным, алкилированным и подвергнутым замене буфера образцам антитела 1 до достижения соотношения фермент/субстрат 1:25. Расщепление проводили при 37°C в течение 30 мин. Конечный продукт расщепления гасили путем добавления 5 мкл 20% FA. Анализ расщепленных образцов антител методом пептидного картирования с помощью LC-MS/MS проводили на системе для UHPLC Agilent 1290, соединенной с масс-спектрометром Q-Exactive BioPharma от Thermo Scientific, как описано в (Ren *et al.*, *Anal. Biochem.* 392:12-21, 2009). Полученные необработанные данные LC-MS/MS и последовательности AMG157 использовали для идентификации и количественного определения модификаций с помощью программного обеспечения MassAnalyzer (Zhang, *Anal. Chem.* 81: 8354-8364 (2009)).

[156] Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) является одним из традиционных подходов, с помощью которого можно измерить аффинность связывания связывающих комплексов. С помощью SPR можно обнаружить связывающий комплекс с $K_d < 10^{-6}$ М. В отличие от этого, эксперименты по определению аффинности связывания методом SEC позволяют измерять $K_d < 10^{-8}$ М для комплекса антитело/лиганд. Более слабосвязанные комплексы (с $K_d > 10^{-8}$ М) диссоциируют на колонке для SEC. В результате молекулы антитела и лиганда элюируются по отдельности как несвязанные соединения.

[157] При воздействии на тезепелумаб стресса при 50°C в течение одной недели (1W) образовывалась очень большая процентная доля (~ 67%) высокомолекулярных (HMW) соединений. HMW-соединения содержали высокую процентную долю химических модификаций, включая изомеризацию и дезамидирование по нескольким остаткам, в особенности изомеризацию D91 LC. Изомеризация D91 резко увеличивалась до ~ 23% в HMW-фракции по сравнению с 1% в мономерной.

[158] Также оценивали влияние 4-недельного воздействия стресса при 40°C в течение четырех недель (40C4W) на связывание тезепелумаба с TSLP. С использованием

анализа аффинного связывания методом SEC, а затем пептидного картирования для анализа выбирали пять характерных особенностей (например, химических модификаций) AMG157, которые потенциально влияют на связывание с TSLP: изомеризацию D54 HC, окисление W102 HC, изомеризацию D49 или D50 LC, дезамидирование N65 LC и изомеризацию D91 LC (фигура 3). В случае с парой D49 или D50 было сложно провести различия во влиянии на связывание между этими двумя остатками, поскольку оба из них вносят вклад в связывание. Влияние на связывание имело следующий порядок: D54 > W102 > D49/D50 > N65 > D91. Только для одной из модификаций (изомеризация D49 или D50 LC) может наблюдаться превышение обнаруживаемого уровня, составляющего 2%, после тестирования в условиях окончания срока годности, которые были установлены как 2 года при 5°C и после этого 2 месяца при 25°C (2Y5C+2M25C). Связывание становилось слабее, чем $K_d=10^{-8}$ M, относительно типичной равновесной константы диссоциации комплекса антитело-антиген $K_d=10^{-10}$ M, что приводило к диссоциации комплекса антитело-антиген на колонке для SEC и отдельному элюированию двух молекул. Этот способ продемонстрировал хорошую корреляцию с традиционным способом определения характеристик СЕХ-фракций, который выявил, что изомеризация D54 HC сильно коррелирует с потерей активности согласно измерению с помощью клеточного анализа.

[159] Для проверки пригодности способа пептидного картирования *in silico* были предсказаны лабильные остатки в CDR и смежных областях, что позволяет предположить, что 16 модификаций (характерных особенностей) тезепелумаба (AMG157), вероятно, будут иметь место и могут влиять на связывание AMG157 с TSLP. Пептидное картирование проводили на образцах AMG157 T0 и 40C4W, и идентифицировали 16 предсказанных модификаций. Пептид, содержащий D62 HC, характеризовался недостаточным извлечением, и изомеризация D62 HC не могла быть надежно количественно определена. Результаты пептидного картирования подтвердили, что способ пептидного картирования позволяет обнаружить все модификации, за исключением D62 HC, и пригоден для данного исследования (фигура 2).

[160] Несколько мутаций, являющихся возможными характерными особенностями антитела (остатков с химическими модификациями и последующих остатков), были предложены для повышения стабильности при комнатной температуре, включая D54E HC, G55A HC, D49E или D50E LC, S51A LC. В патенте США № 7982016 раскрыто антитело к TSLP в виде последовательности A5 (а также в виде цепей H5, L5), которые представлены в CDR под SEQ ID NO: 3-8.

[161] При воздействии на тезепелумаб стресса 50C1W образовывалась очень большая процентная доля (~ 67%) НМВ-соединений. НМВ-соединения содержали высокую процентную долю химических модификаций, включая изомеризацию и дезамидирование по нескольким остаткам, в особенности изомеризацию D91 LC и D54 HC, что позволяет предположить, что НМВ-фракция может характеризоваться более низкой активностью вследствие химических модификаций (характерных особенностей), влияющих на связывание. Также НМВ-соединения в образце тезепелумаба 40C4W

оставались неизменными после связывания, что позволяет предположить, что они не участвовали в связывании с TSLP.

Результаты

[162] В общей сложности рассматриваются 15 модификаций в качестве потенциальных модифицирующих характерных особенностей при связывании AMG157 с TSLP на основании анализа последовательности *in silico* (фигура 1). Пептидное картирование применяли для измерения процентной доли предсказанных характерных особенностей в образцах AMG157 T0 и 40°C4W (фигура 2). 40°C4W соответствует сроку годности жидкого состава (4°C2Y) и рассматривается как приемлемое условие изготовления и хранения. Модификации, представленные на уровне > 2% при приемлемых условиях изготовления и хранения, представляют собой изомеризацию D54 HC, дезамидирование N57 HC, изомеризацию D62 HC и изомеризацию D49D50 LC, однако не все эти модификации влияют на связывание с TSLP.

[163] *Химические модификации AMG157, влияющие на связывание с TSLP.* Анализ аффинного связывания методом SEC AMG157 40°C4W и TSLP применяли для экспериментального определения остатков и модификаций, влияющих на связывание. Профили SEC-UV позволяют предположить, что после воздействия стресса 40°C4W несвязанный AMG157, элюируемый через 15,5 минуты, составляет менее 10%, что указывает на то, что потеря активности должна составлять менее 10%, что хорошо согласуется с измерениями активности (фигура 8A). Исходя из времени элюирования и теоретической молекулярной массы AMG157 (147 кДа) и TSLP (16 кДа), пик, элюируемый через 14 минут, был отнесен к комплексу, содержащему 1 антитело и 2 молекулы TSLP, пик через 15 минут - к комплексу, содержащему 1 антитело и 1 молекулу TSLP. В других экспериментах с использованием тех же условий SEC и детектора многоугольного светорассеяния (MALS) идентифицировали сходные по массе комплексы, элюируемые в эти моменты времени. Также наблюдали крупные комплексы, элюируемые через от ~ 10,5 до 12,5 минуты, в случаях, когда AMG157 T0 или 40°C4W связывается с TSLP (фигура 3A). Эти результаты можно объяснить тем, что TSLP содержал 23% димерных и 3% тетрамерных соединений (см. раздел "Материалы и способы"), которые могут потенциально перекрестно связывать несколько антител, что приводит к образованию более крупных комплексов. Можно отметить, что определение биологических характеристик основных СЕХ-фракций позволило выявить уменьшение связывания рецептора с лигандом и активности репортерного гена в клеточном анализе (фигура 8С). Определение биологических характеристик (включая пептидное картирование) позволило идентифицировать изомеризацию аспарагиновой кислоты в CDR и несколько других модификаций, которыми обогащены основные СЕХ-фракции, в том числе агрегацию фрагментированных соединений (HMW), частично восстановленные соединения, высокоманнозные и афукозилированные гликаны, окисление Met вне CDR, C-концевой лизин и N-концевой сигнальный пептид тяжелой цепи, изоформу А с дисульфидными связями. Способ, включающий SEC комплекса антитело-антиген,

использовали в качестве ортогонального подхода для оценки химических модификаций антитела, влияющих на связывание с TSLP, и модификаций, не влияющих на связывание, и проведения различия между ними.

[164] SEC комплекса AMG157 40°C4W и TSLP с последующим определением характеристик с помощью LC-MS/MS позволяли определить соотношение модификаций в несвязанной (5) и связанной (3) фракциях AMG157. При статистической значимости с $p < 0,03$ пять остатков рассматривались в качестве существенных характерных особенностей: изомеризация D54 HC, окисление W102 HC, изомеризация D49 или D50 LC, дезамидирование N65 LC и изомеризация D91 LC. В случае с парой D49D50 было сложно провести различия во влиянии и определить, какой из этих двух остатков является мутантным, поскольку оба из них вносят вклад в связывание. Относительное обилие каждой модификации обобщенно представлено на фигуре 3B. Все пять характерных особенностей представлены на уровне ниже 10% в связанной и несвязанной фракциях AMG157. Наибольшее различие (соотношение или кратность изменения) в процентных долях модификаций между связанной и несвязанной фракциями обнаружено в случае изомеризации D54 HC в AMG157. Обилие изомеризации D54 HC в связанной и несвязанной фракциях составляет $\sim 0,5\%$ и $\sim 3,5\%$ соответственно. Изомеризация D49D50 LC демонстрирует наиболее высокую процентную долю ($\sim 6,2\%$) в несвязанных фракциях AMG157 40°C4W.

[165] Аспартат (D) восприимчив к изомеризации в имеющемся мотиве DG в HCDR2, но проявляет это в меньшей степени в другой конфигурации, если один из остатков изменен, например, при замене G на A или D на E. Аналогичным образом, в LCDR2 имеется мотив DDSDRPS, в котором аспартат(остатки аспартата) восприимчив(восприимчивы) к изомеризации, поэтому изменения в остатках предлагаются для улучшения стабильности, например, при замене D на E или S на A.

[166] На фигуре 4 показана вулканная диаграмма для определения существенных характерных особенностей при связывании AMG157 40°C4W с TSLP. На статистическом графике \log_2 (несвязанное/связанное) указывает на силу связывания, которая имеет порядок $D54 > W102 > D49D50 > N65 > D91$. Согласно оценкам равновесная константа диссоциации (K_d) несвязанного AMG157 с TSPH становилась $K_d > 10^{-8}$ M, и в этот момент разрушенное антитело диссоциировало на колонке от TSLP. Несвязанный AMG157 демонстрировал гораздо более слабое связывание по сравнению с типичной K_d AMG157 в диапазоне нМ. В способе анализа аффинного связывания методом SEC изомеризация D54 демонстрировала наиболее высокую кратность изменения % несвязанного/% связанного (значение 6) с высокой достоверностью идентификации (p -значение= 4×10^{-4}). В комбинации с моделированием характерных особенностей AMG157 эксперименты по анализу аффинного связывания методом SEC указывали на то, что несколько мутаций, являющихся существенными характерными особенностями (остатки с химическими модификациями и последующие остатки), могут приводить к повышению стабильности при комнатной температуре, включая D54E HC, G55A HC, D49D50E LC и S51A LC

(фигура 1, нижняя панель).

[167] В качестве возможных характерных особенностей были перечислены остатки и модификации, проявляющие потенциальное влияние на связывание (изомеризация D54 HC, окисление W102 HC, изомеризация D49D50 LC, дезамидирование N65 LC и изомеризация D91 LC). С другой стороны, несколько других остатков, рассматриваемых в качестве возможных характерных особенностей, не влияли на связывание согласно способу анализа аффинности методом SEC. На фигуре 5 обобщенно представлено относительное обилие 11 модификаций в связанной и несвязанной фракциях AMG157 40°C4W, для которых не наблюдалось статистически значимое изменение между связанной и несвязанной фракциями (фигуры 1 и 4). Также, за исключением окисления M34 HC и изомеризации D62 HC, все процентные доли модификаций составляют менее 1% после 4-недельного стресса при 40°C в составе, что указывает на то, что они не будут составлять значительную процентную долю модификаций.

[168] Характерные особенности несвязанного антитела, элюируемого через 15,6 минуты (пик 5), по сравнению с комплексами, элюируемыми через 10,5-12,5 минуты (пики 1+2), были такими же, как и в пике 5 по сравнению с пиком 3, но с худшими статистическими показателями. Это указывает на то, что крупные комплексы представляют собой комплексы антитело-TSLP.

[169] Настоящие результаты согласуются с кристаллической структурой Fab AMG157, связывающегося с TSLP, что позволяет предположить, что D54 HC, W102 HC и D49 LC находятся на близком расстоянии от TSLP (в пределах 6 Å) и, по всей вероятности, напрямую задействованы в связывании. Следует упомянуть, что образование изоаспартата (D54 HC, D49D50 LC, D91) приводит к удлинению основной цепи (и укорочению боковой цепи), что изменяет положение и ориентацию этих и близлежащих остатков. Это может приводить к потере связывания. Для измерения расстояний выбирали ближайшие атомы комплекса без учета возможной природы взаимодействия (гидрофобное, водородная связь, солевой мостик). Таким образом, после изомеризации в D49D50 LC, N65 LC и D91 LC могут иметь место дальние аллостерические эффекты, приводящие к потере связывания с TSLP.

[170] *Корреляция с традиционным подходом.* Согласно традиционному подходу образец AMG157 40°C4W разделяли с помощью CEX на главную и три основные фракции, которые собирали и для которых определяли характеристики в отношении химических модификаций путем пептидного картирования и в отношении относительной активности. Относительную активность измеряли с помощью клеточного анализа и анализа связывания. Результаты анализов указывали на то, что основная фракция 3 содержала 39% изомеризации D54, а ее активность в клеточном анализе составляла всего 61%, что указывает на то, что данная химическая модификация влияет на активность в данном клеточном анализе. Этот результат хорошо согласуется с данными анализа аффинного связывания методом SEC с TSLP, в котором было идентифицировано, что изомеризация D54 HC характеризуется наибольшим соотношением в несвязанной и

связанной фракциях и оказывает наибольшее влияние на связывание.

[171] *Химические модификации, коррелирующие с агрегацией при 50°C.* Процентная доля НМW-соединений составляла ~ 9% в образце AMG157 40°C4W. При воздействии на AMG157 стресса 50°C1W образовывалась очень большая процентная доля (~ 67%) НМW-соединений, что позволяет предположить частичное разворачивание молекулы антитела при данной температуре. После разделения с помощью SEC НМW- и мономерные соединения в AMG157 50°C1W собирали и анализировали с помощью пептидного картирования. Путем применения сходного статистического подхода, используемого при измерении аффинного связывания методом SEC, строили вулканную диаграмму для оценки характерных особенностей, участвующих в образовании НМW-соединений AMG157 (фигура 6А). В правом верхнем углу вулканной диаграммы представлены семь характерных особенностей, которые, по-видимому, являются существенными для образования НМW со статистической значимостью (отмечены звездочкой на фигуре 6В). Показатели обилия этих и нескольких других модификаций из "серой зоны со значимостью, близкой к статистической" наносили на график для НМW- и мономеров (фигура 6В). Изомеризация, дезамидирование и образование сукцинимида (потеря H₂O) составляют большинство модификаций, сильно коррелирующих с образованием НМW. Например, изомеризация D91 LC резко увеличивалась до ~ 23% в НМW-фракции по сравнению с 1% в мономерной. Другая модификация, потенциально влияющая на связывание - изомеризация D54 HC - была представлена на уровне 10% в НМW-фракции в сравнении с 2% в мономерной. Иными словами, каждая из изомеризации D91 LC и изомеризации D54 HC коррелируют с образованием НМW-соединений. Высокие уровни химических модификаций, влияющих на связывание в НМW-фракции, позволяют предположить, что она может характеризоваться более низкой активностью по сравнению с мономерной фракцией. Кроме того, НМW-соединения AMG157, элюируемые из SEC через 10,5 минуты, оставались "неиспользованными" после связывания с TSLP, что дополнительно позволяет предположить, что НМW-соединения характеризуются слабым связыванием. Следует отметить, что НМW-соединения AMG157 40°C4W имеют большой размер и элюируются в самом конце разделения по размеру.

[172] Предполагаемое частичное разворачивание и наблюдаемое резкое увеличение образования НМW-соединений в AMG157 после воздействия 50°C1W, вероятно, делают доступными остатки, которые не являются доступными и не модифицируются в типичном процессе. Использование материалов, подвергнутых стрессу 40°C4W, которые образуют меньше НМW-соединений и модификаций, должно быть более иллюстративным для типичного процесса.

[173] В целом, способ анализа аффинного связывания методом SEC позволил экспериментально определить остатки и модификации, влияющие на связывание AMG157 с TSLP. При статистической значимости с $p < 0,03$ изомеризация D54 HC, окисление W102 HC, изомеризация D49 или D50 LC, дезамидирование N65 LC и изомеризация D91 LC, по-видимому, являются существенными характерными особенностями AMG157,

связывающегося с TSLP. Модификации, влияющие на связывание с высокой статистической значимостью и представленные на уровне более 2% после воздействия 40°C4W, представляют собой изомеризацию D54 HC и D50 LC. Следует отметить, что изомеризация D49/50 не коррелирует с потерей активности в других исследованиях, таких как биологические анализы, и настоящие результаты в условиях сильного стресса могут быть артефактом способа. Химические модификации коррелируют с образованием HMW-соединений после воздействия стресса 50°C1W, в особенности с изомеризацией D91 LC. С учетом этих результатов несколько мутаций, являющихся характерными особенностями AMG157 (остатков с химическими модификациями и последующих остатков), были предложены для улучшения стабильности при комнатной температуре, включая D54E HC, G55A HC, D49E LC или D50E LC, S51A LC.

[174] Все публикации, патенты и патентные заявки, обсуждаемые и цитируемые в данном документе, настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте. Следует понимать, что раскрытое изобретение не ограничивается конкретными описанными методикой, протоколами и материалами, так как они могут варьироваться. Кроме того, следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема прилагаемой формулы изобретения.

[175] Специалистам в данной области техники будут понятны или они будут способны определить многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются приведенной ниже формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, содержащие:

(A) вариабельный домен легкой цепи, содержащий:

(i) последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3;

(ii) последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4; и

(iii) последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5; и

(B) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:

(i) последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6;

(ii) последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с мутацией по одному из следующих остатков D54 или G55, представленную под SEQ ID NO: 7, и

(iii) последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8.

2. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по п. 1, где мутация в HCDR2 представляет собой D54E.

3. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по п. 1, где мутация в HCDR2 представляет собой G55A.

4. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по любому из пп. 1-3, где HCDR2 имеет последовательность VIWYX₁X₂SNKHYADSVKG, где X₁ представляет собой D или E, и X₂ представляет собой G или A (SEQ ID NO: 13), при этом HCDR2 необязательно имеет следующую последовательность: VIWYEGSNKHYADSVKG (SEQ ID NO: 14), VIWYDASNKHYADSVKG (SEQ ID NO: 15) или VIWYEASNKHYADSVKG (SEQ ID NO: 16).

5. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по любому из пп. 1-4, необязательно содержащие мутацию по меньшей мере одному из следующих остатков D49, D50 или S51 в LCDR2 под SEQ ID NO: 4.

6. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по п. 5, где мутация представляет собой любую из D49E, D50E и/или S51A.

7. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по п. 5 или п. 6, где LCDR2 имеет

последовательность $X_1X_2X_3DRPS$, где X_1 представляет собой D или E, X_2 представляет собой D или E, и X_3 представляет собой S или A (SEQ ID NO: 17), при этом LCDR2 необязательно имеет следующую последовательность: EDSDRPS (SEQ ID NO: 18), DESDRPS (SEQ ID NO: 19), EESDRPS (SEQ ID NO: 20), DDADRPS (SEQ ID NO: 21), DEADRPS (SEQ ID NO: 22), EDADRPS (SEQ ID NO: 23) или EEADRPS (SEQ ID NO: 24).

8. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, содержащие:

(A) вариабельный домен легкой цепи, содержащий:

(i) последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3;

(ii) последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с мутацией по меньшей мере одному из следующих остатков D49, D50 или S51 в SEQ ID NO: 4; и

(iii) последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5; и

(B) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:

(i) последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6;

(ii) последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7; и

(iii) последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8.

9. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по п. 8, где мутация в LCDR2 представляет собой D49E, D50E и/или S51A.

10. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по п. 8 или п. 9, где мутация в LCDR2 представляет собой D49E.

11. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по п. 8 или п. 9, где мутация в LCDR2 представляет собой D50E.

12. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по п. 8 или п. 9, где мутация в LCDR2 представляет собой S51A.

13. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по любому из пп. 8-12, где LCDR2 имеет последовательность $X_1X_2X_3DRPS$, где X_1 представляет собой D или E, X_2 представляет собой D или E, и X_3 представляет собой S или A (SEQ ID NO: 17), при этом LCDR2 необязательно имеет следующую последовательность: EDSDRPS (SEQ ID NO: 18), DESDRPS (SEQ ID NO: 19), EESDRPS (SEQ ID NO: 20), DDADRPS (SEQ ID NO: 21),

DEADRPS (SEQ ID NO: 22), EDADRPS (SEQ ID NO: 23) или EEADRPS (SEQ ID NO: 24).

14. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по любому из пп. 8-13, необязательно содержащие мутацию по одному или нескольким из следующих остатков D54 или G55 в HCDR2, представленной под SEQ ID NO: 7.

15. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по п. 14, где мутация представляет собой любую из D54E и/или G55A в HCDR2, представленной под SEQ ID NO: 7.

16. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по п. 14 или п. 15, где HCDR2 имеет последовательность VIWYX₁X₂SNKHYSVKG, где X₁ представляет собой D или E, и X₂ представляет собой G или A (SEQ ID NO: 13), при этом HCDR2 необязательно имеет следующую последовательность: VIWYEGSNKHYSVKG (SEQ ID NO: 14), VIWYDASNKHYSVKG (SEQ ID NO: 15) или VIWYEASNKHYSVKG (SEQ ID NO: 16).

17. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по любому из пп. 1-16, содержащие:

(A) варибельный домен легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из:

i. последовательности аминокислот, на по меньшей мере 80% идентичной SEQ ID NO: 12;

ii. последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 11; или

iii. последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизируется в условиях умеренной жесткости с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из SEQ ID NO: 11; или

(B) варибельный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из:

i. последовательности аминокислот, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 10;

ii. последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидной последовательностью, которая на по меньшей мере 80% идентична SEQ ID NO: 9; или

iii. последовательности аминокислот, кодируемой полинуклеотидом, который гибридизируется в условиях умеренной жесткости с последовательностью, комплементарной полинуклеотиду, состоящему из SEQ ID NO: 9; или

(C) варибельный домен легкой цепи согласно (A) и варибельный домен тяжелой цепи согласно (B),

где иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, сохраняют CDR антигенсвязывающих белков или их фрагмента, связывающихся с TSLP.

18. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент по любому из пп. 1-17, где иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его

фрагмент, связывающиеся с TSLP, содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 25-28, легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 29-36.

19. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по любому из пп. 1-18, где иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, выбраны из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, моноклонального антитела, рекомбинантного антитела, антигенсвязывающего фрагмента антитела, одноцепочечного антитела, мономерного антитела, диатела, триатела, тетратела, Fab-фрагмента, антитела IgM, антитела IgG1, антитела IgG2, антитела IgG3 и антитела IgG4.

20. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по любому из пп. 1-18, где антигенсвязывающий белок представляет собой человеческое антитело.

21. Антитело по п. 19 или п. 20, которое представляет собой антитело IgG2.

22. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-21, где антигенсвязывающий белок или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, специфично связываются с полипептидом TSLP, представленным аминокислотами 29-159 в SEQ ID NO: 2.

23. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по любому из пп. 1-22, где оба связывающих участка антигенсвязывающего белка или его фрагмента, связывающихся с TSLP, характеризуются идентичным связыванием с TSLP.

24. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по любому из пп. 1-23, которые связываются с TSLP с аффинностью, соответствующей K_d , численно составляющей не более 10^{-8} M.

25. Композиция, содержащая иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по любому из пп. 1-24 и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель.

26. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую переменный домен легкой цепи, переменный домен тяжелой цепи или их оба в иммуноглобулине, антигенсвязывающем белке или его фрагменте или антителе или его фрагменте по любому из пп. 1-24.

27. Рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 26.

28. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 27.

29. Способ получения иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента, которые специфично связываются с полипептидом TSLP, содержащим аминокислоты 29-159 из SEQ ID NO: 2, включающий инкубацию клетки-хозяина по п. 28 в условиях, которые позволяют ей экспрессировать

иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, где указанная клетка-хозяин содержит (i) рекомбинантный вектор экспрессии, кодирующий переменный домен легкой цепи иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-24, и рекомбинантный вектор экспрессии, кодирующий переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-24, или (ii) рекомбинантный вектор экспрессии, кодирующий как переменный домен легкой цепи, так и переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-24.

30. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по любому из пп. 1-24, характеризующиеся увеличенной стабильностью при 25°C по сравнению с иммуноглобулином, антигенсвязывающим белком или его фрагментом или антителом или его фрагментом, связывающимися с TSLP, имеющими аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12.

31. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по любому из пп. 1-24, характеризующиеся увеличенной стабильностью при 40°C спустя 4 недели по сравнению с иммуноглобулином, антигенсвязывающим белком или его фрагментом или антителом или его фрагментом, имеющим аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12.

32. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по любому из пп. 1-24, характеризующиеся уменьшенным количеством высокомолекулярных соединений при 40°C спустя 4 недели по сравнению с иммуноглобулином, антигенсвязывающим белком или его фрагментом или антителом или его фрагментом, связывающимися с TSLP, имеющими аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12.

33. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по любому из пп. 1-24, где иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, характеризуются уменьшенной изомеризацией при 50°C по сравнению с иммуноглобулином, антигенсвязывающим белком или его фрагментом или антителом или его фрагментом, связывающимися с TSLP, имеющими аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12.

34. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по любому из пп. 1-24, где менее 2% иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента, связывающихся с TSLP, демонстрируют изомеризацию и/или

дезамидирование спустя по меньшей мере 2 недели (необязательно спустя по меньшей мере 1 месяц, спустя по меньшей мере 2 месяца, спустя по меньшей мере 3 месяца, спустя по меньшей мере 4 месяца, спустя по меньшей мере 5 месяцев или спустя по меньшей мере 6 месяцев) хранения при приблизительно 25°C, как определено с помощью SEC.

35. Иммуноглобулин, антигенсвязывающий белок или его фрагмент или антитело или его фрагмент, связывающиеся с TSLP, по любому из пп. 1-24, где менее 2% иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента демонстрируют изомеризацию и/или дезамидирование спустя от приблизительно 22 месяцев до приблизительно 36 месяцев хранения при от 2°C до 8°C и после этого по меньшей мере 2 недели, или по меньшей мере 1 месяц, или по меньшей мере 2 месяца хранения при приблизительно 25°C, как определено с помощью SEC.

36. Способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуноглобулина, антигенсвязывающего белка или его фрагмента или антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-24 или композиции по п. 25.

37. Способ по п. 36, где воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из астмы, атопического дерматита, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), эозинофильного эзофагита (ЕоЕ), назальных полипов, хронической спонтанной крапивницы, заболевания, обусловленного Ig, IgA-нефропатии, волчаночного нефрита, эозинофильного гастрита, хронического синусита без назальных полипов и идиопатического легочного фиброза (IPF).

38. Способ по п. 36 или п. 37, включающий введение композиции с интервалом каждые 2 недели или каждые 4 недели.

39. Способ по любому из пп. 36-38, где композицию вводят в течение периода, составляющего по меньшей мере 4 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев, 1 год или больше.

40. Способ по любому из пп. 37-39, где астма представляет собой тяжелую астму.

41. Способ по любому из пп. 37-40, где астма представляет собой эозинофильную или неэозинофильную астму.

42. Способ получения композиции, содержащей множество моноклональных антител к TSLP или их антигенсвязывающих фрагментов, каждое из которых содержит:

последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3;

последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4;

последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5;

последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6;

последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8,

при этом способ включает обогащение композиции моноклональными антителами IgG2 к TSLP или их антигенсвязывающими фрагментами с по меньшей мере одной из следующих характерных особенностей:

L-аспаратом в положении 54 HC по сравнению с изоаспаратом (isoAsp) или циклическим аспаратом (cAsp) в положении 54 HC;

неокисленным W102 HC по сравнению с окисленным W102 HC;

L-аспаратом в положении 49 или положении 50 LC по сравнению с isoAsp или cAsp в положении 49 или положении 50 LC;

N65 LC по сравнению с дезамидированным N65 LC или

L-аспаратом в положении 91 LC по сравнению с isoAsp или cAsp в положении 91 LC.

43. Способ по п. 42, где не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D54 HC.

44. Способ по п. 42 или п. 43, где не более 2% моноклональных антител к TSLP содержат окисленный W102 HC.

45. Способ по любому из пп. 42-44, где не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованные D50 LC или D49 LC.

46. Способ по любому из пп. 42-45, где не более 0,5% моноклональных антител к TSLP содержат дезамидированный N65 LC.

47. Способ по любому из пп. 42-46, где не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D91 LC.

48. Способ по любому из пп. 42-47, где антитело к TSLP представляет собой антитело IgG2.

49. Способ по любому из пп. 42-48, где антитело к TSLP содержит (i) L-аспарат в D54 HC и (ii) L-аспарат в D49 и/или D50 LC.

50. Способ по любому из пп. 42-49, где антитело к TSLP обогащено L-аспаратом в D54 HC в по меньшей мере 6 раз по сравнению с уровнями isoAsp.

51. Способ по любому из пп. 42-50, где антитело к TSLP содержит переменную область тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 12.

52. Композиция, содержащая моноклональные антитела к TSLP, каждое из которых содержит:

последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3;

последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4;

последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5;

последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6;

последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7; и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8,

при этом композиция характеризуется ограниченным содержанием изомеризованного D54 HC и/или ограниченным содержанием изомеризованного D49 или D50 LC, эффективным для связывания моноклональных антител к TSLP из композиции с TSLP с Kd, которая численно меньше или равняется 10^{-8} М.

53. Композиция, содержащая моноклональные антитела IgG2 к TSLP, каждое из которых содержит последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3; последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4; последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5; последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6; последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7; и последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8,

где справедливо по меньшей мере одно из следующего: не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D54 HC;

не более 2% моноклональных антител к TSLP содержат окисленный W102 HC;

не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованные D49 LC или D50 LC;

не более 0,5% моноклональных антител к TSLP содержат дезамидированный N65 LC или

не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D91 LC.

54. Композиция по п. 53, где не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D54 HC.

55. Композиция по п. 53 или п. 54, где не более 2% моноклональных антител к TSLP содержат окисленный W102 HC.

56. Композиция по любому из пп. 53-55, где не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованные D49 LC или D50 LC.

57. Композиция по любому из пп. 53-56, где не более 0,5% моноклональных антител к TSLP содержат дезамидированный N65 LC.

58. Композиция по любому из пп. 53-57, где не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D91 LC.

59. Композиция по любому из пп. 53-58, где антитело к TSLP представляет собой антитело IgG2.

60. Композиция по любому из пп. 53-59, где антитело к TSLP содержит комбинацию L-аспартата в 54 HC и L-аспартата в 49 LC и/или 50 LC.

61. Композиция по любому из пп. 4538-60, где антитело к TSLP обогащено L-аспартатом в 54 HC в по меньшей мере 6 раз по сравнению с уровнями isoAsp.

62. Композиция по любому из пп. 53-61, где антитело к TSLP содержит переменную область тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 12, и

где справедливо по меньшей мере одно из следующего: не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D54 HC;

не более 2% моноклональных антител к TSLP содержат окисленный W102 HC;

не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованные D49 LC или D50 LC;

не более 0,5% моноклональных антител к TSLP содержат дезамидированный N65 LC или

не более 0,9% моноклональных антител к TSLP содержат изомеризованный D91 LC.

63. Композиция, содержащая моноклональные антитела к TSLP, каждое из которых содержит последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3; последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4; последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5; последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6; последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7; и последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8, где справедливо по меньшей мере одно из следующего:

более 98% моноклональных антител к TSLP в композиции содержат L-аспарат в положении 54 HC по сравнению с isoAsp или cAsp в положении 54 HC;

по меньшей мере 99% моноклональных антител к TSLP в композиции содержат неокисленный W102 HC по сравнению с окисленным W102 HC;

по меньшей мере 97% моноклональных антител к TSLP в композиции содержат L-аспарат в положении 49 или 50 LC по сравнению с isoAsp или cAsp в положении 49 или положении 50 LC;

по меньшей мере 99,1% моноклональных антител к TSLP в композиции содержат N65 LC по сравнению с дезамидированным N65 LC; или

по меньшей мере 99,1% моноклональных антител к TSLP в композиции содержат L-аспарат в положении 91 LC по сравнению с isoAsp или cAsp в положении 91 LC.

Фигура 1

Возможные модификации/характерные особенности
тезепелумаба

№ CDR и № FR	Мотив	Предсказанные модификации
CDR H1	M34	Окисление
CDR H2	W52	Окисление
CDR H2	D54	Изомеризация
CDR H2	N57	Дезамидирование
CDR H2	D62	Изомеризация
CDR H3	W102	Окисление
FR L1	N25	Дезамидирование
FR L1	N26	Дезамидирование
CDR L2	D49D50	Изомеризация
CDR L2	D52	Изомеризация
FR L2	N65	Дезамидирование
CDR L3	W90	Окисление
CDR L3	D91	Изомеризация
CDR L3	S92S93S94	Маннозилирование
CDR L3	D95	Изомеризация

Экспериментально измеренные характерные особенности,
потенциально влияющие на связывание с TSLP

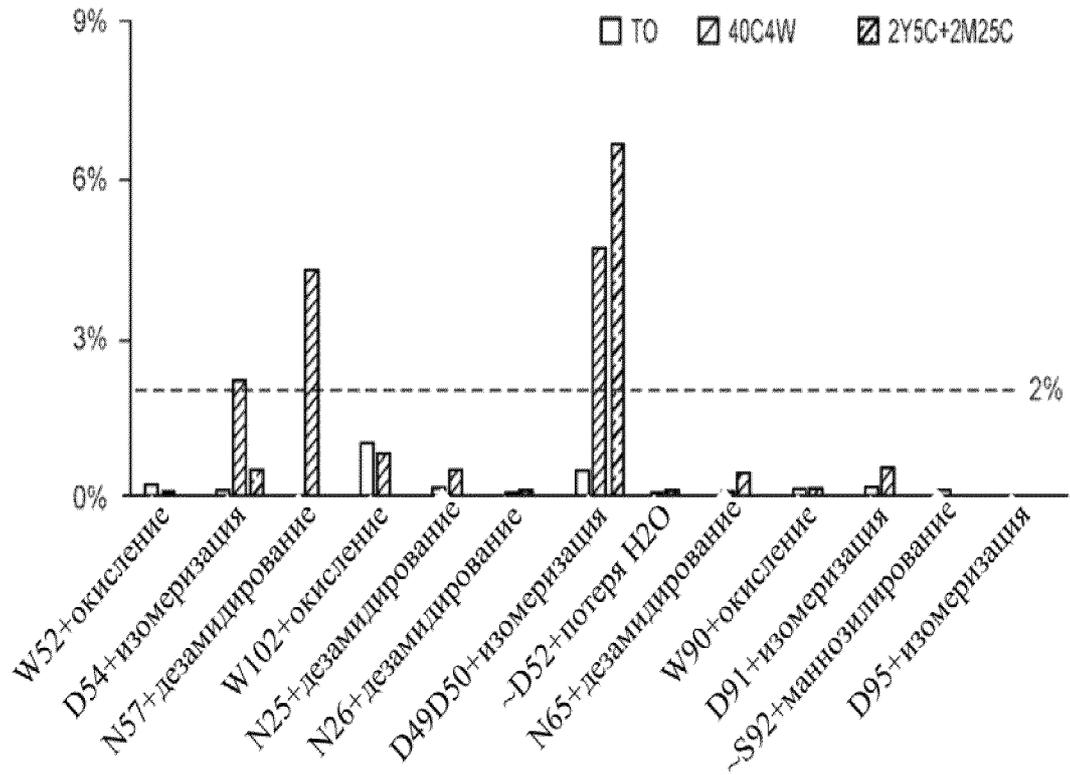
Способ определения характеристик

Анализ аффинного связывания
методом SEC AMG157,
подвергнутого стрессу при
40C4W, и его мишени TSLP с
последующей идентификацией и
количественной оценкой
характерных особенностей в
связанной и несвязанной
фракциях AMG157

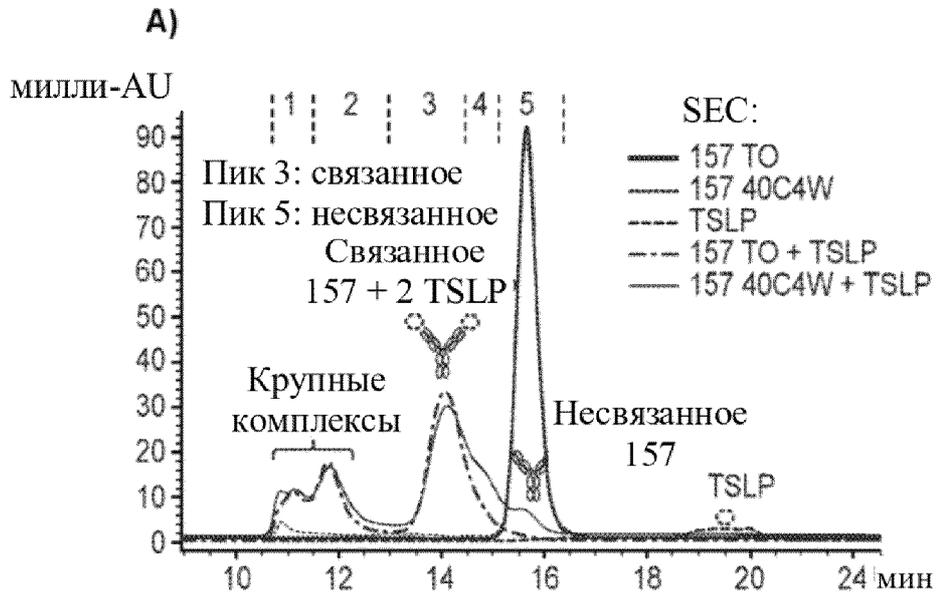
iso D54 HC
> 2% после
воздействия
⇒ 40C4W ⇒
ox W102 HC
iso D49 и
D50 LC,
> 2% после
воздействия
40C4W
deam N65
LC
iso D91 LC

Предложенные мутации
остатков/характерных особенностей для
улучшения стабильности при
комнатной температуре
D54E HC, G55A HC,
D49E, D50E LC, S51A LC

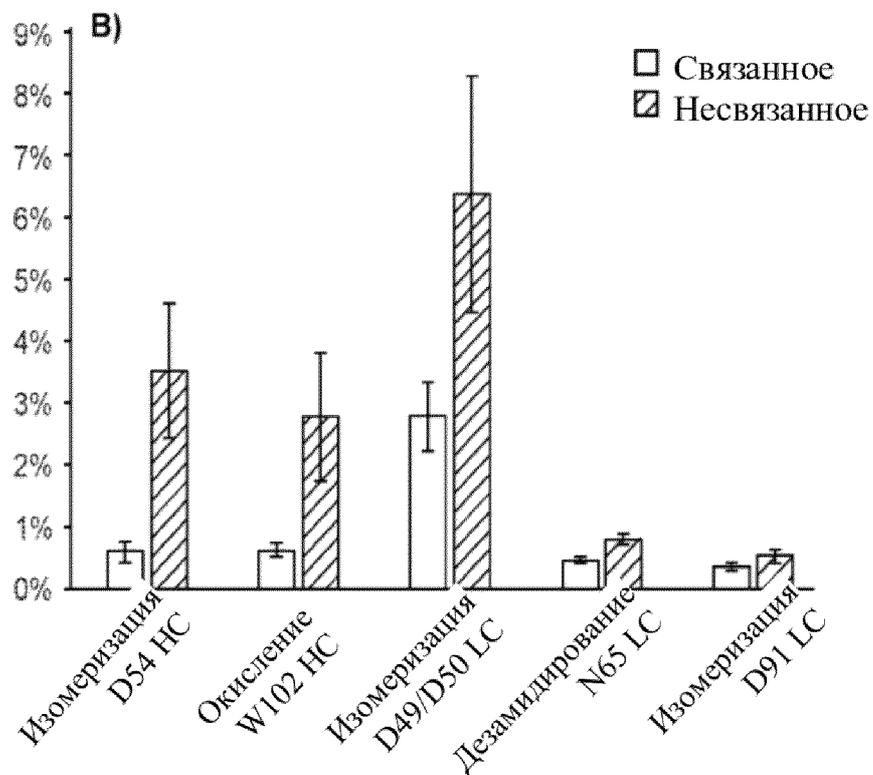
Фигура 2



Фигура 3А и фигура 3В

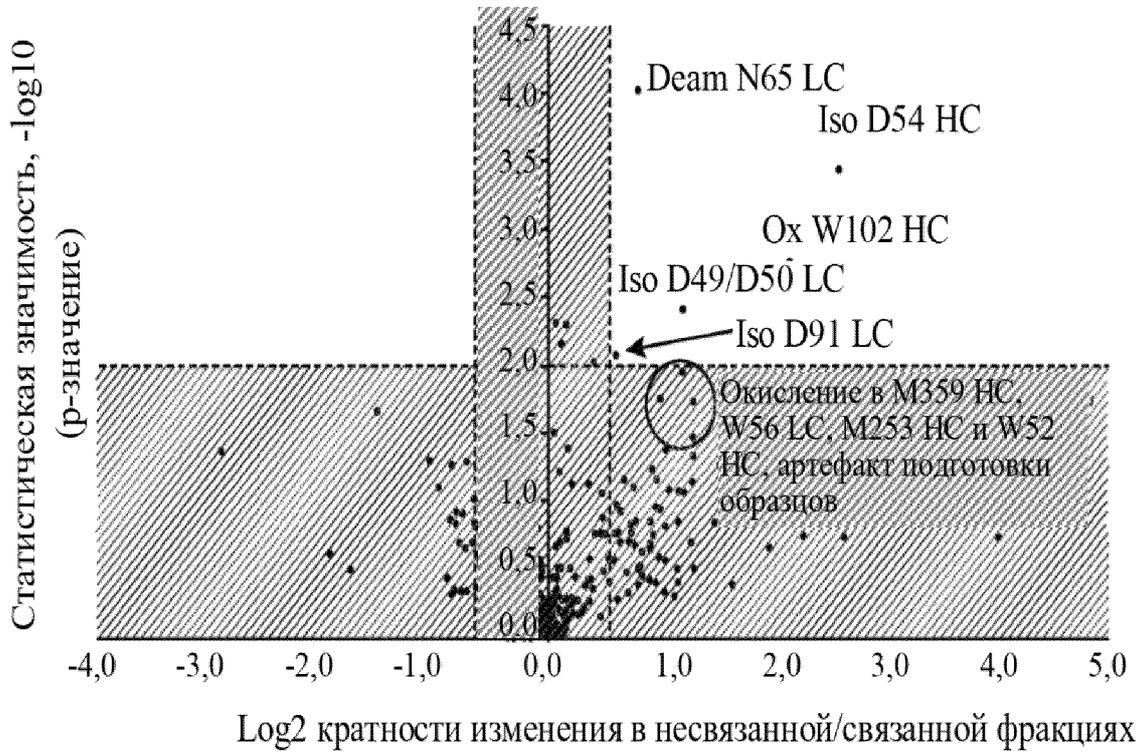


ФИГ. 3А

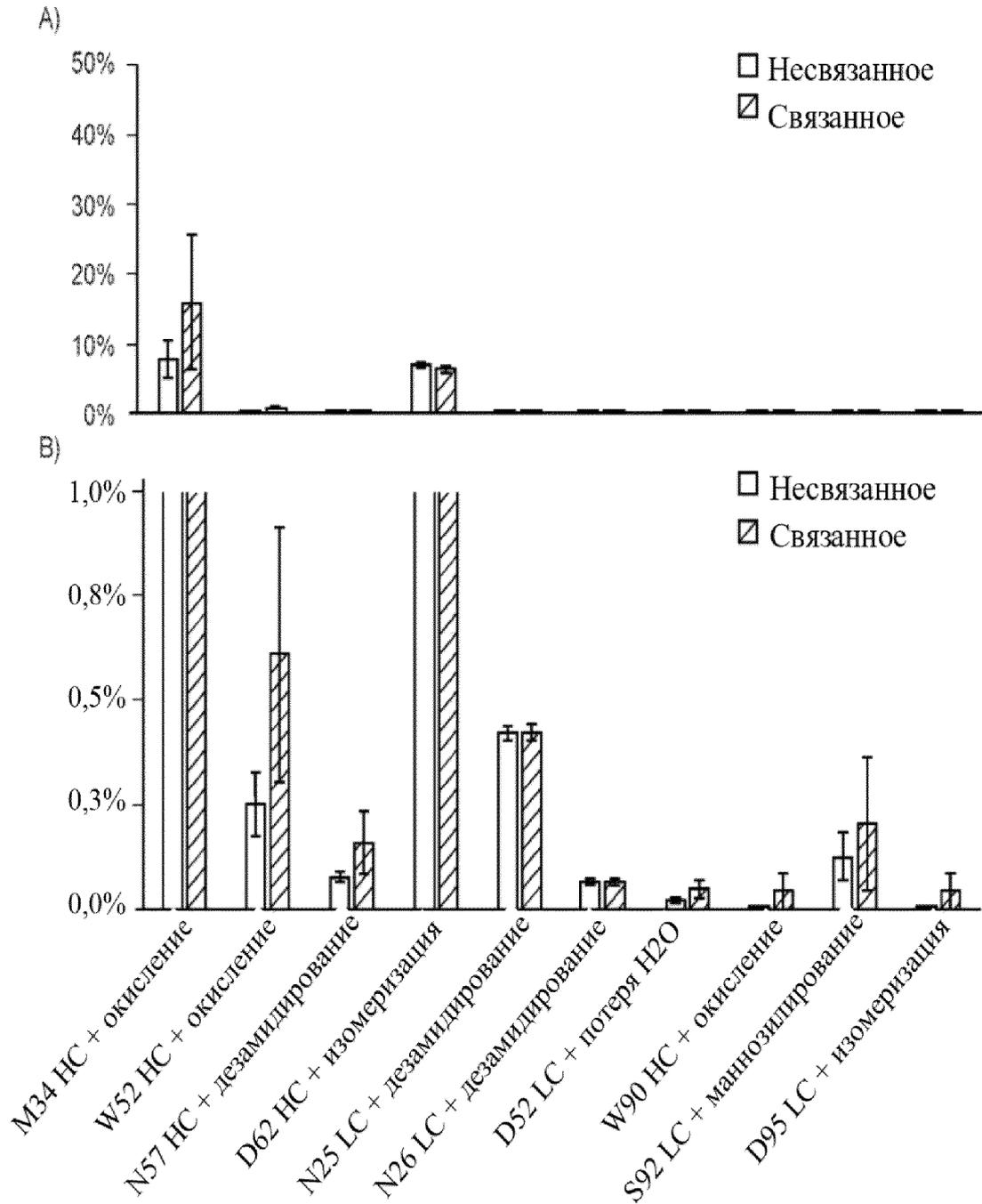


ФИГ. 3В

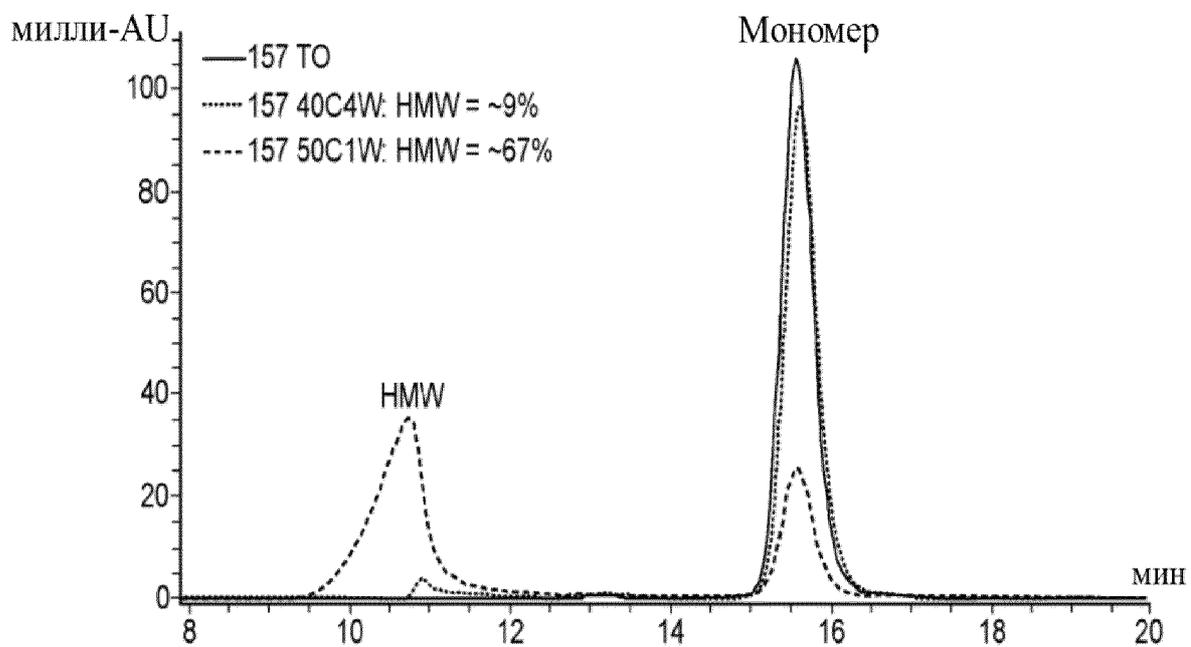
Фигура 4



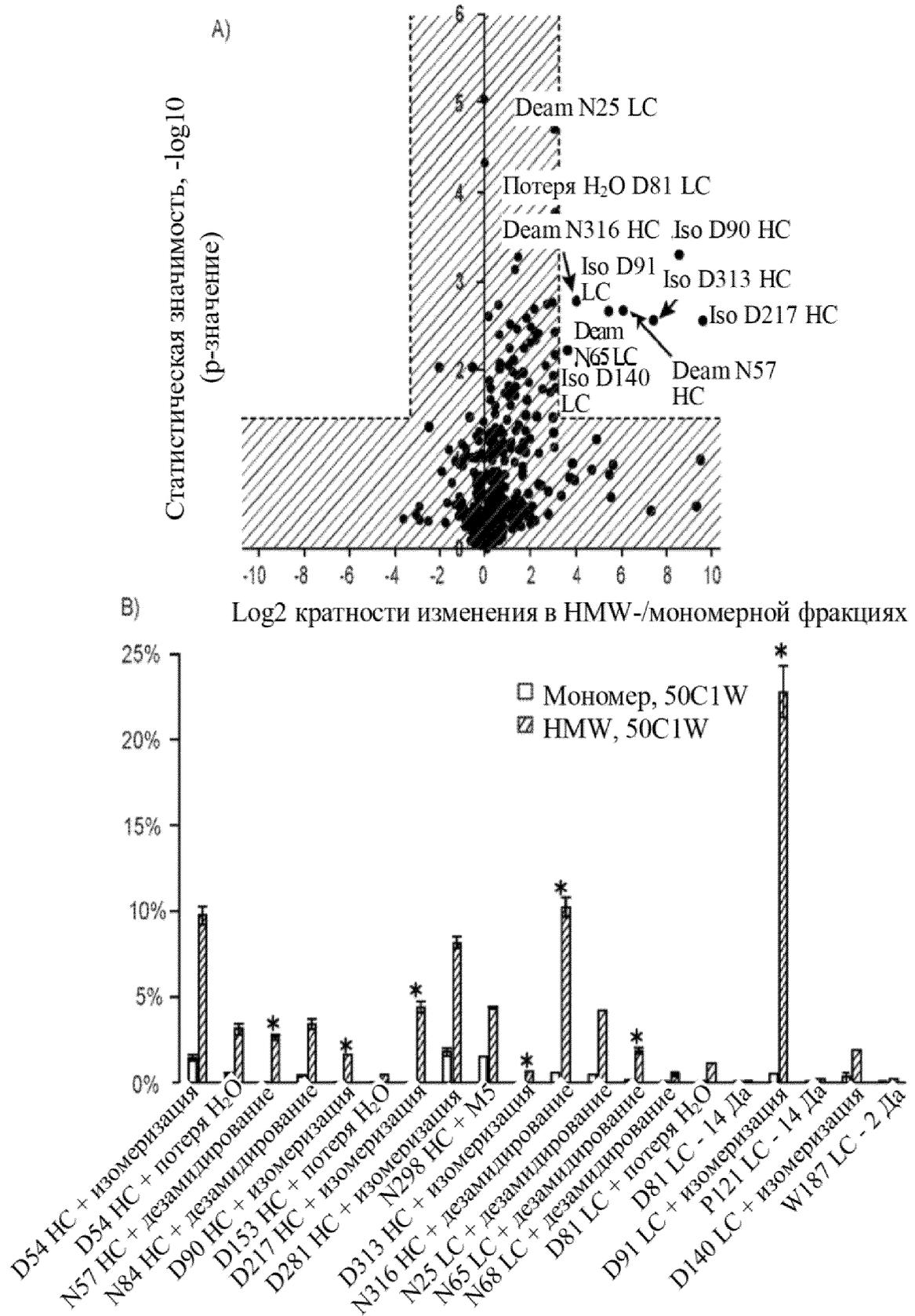
Фигура 5А и фигура 5В



Фигура 6



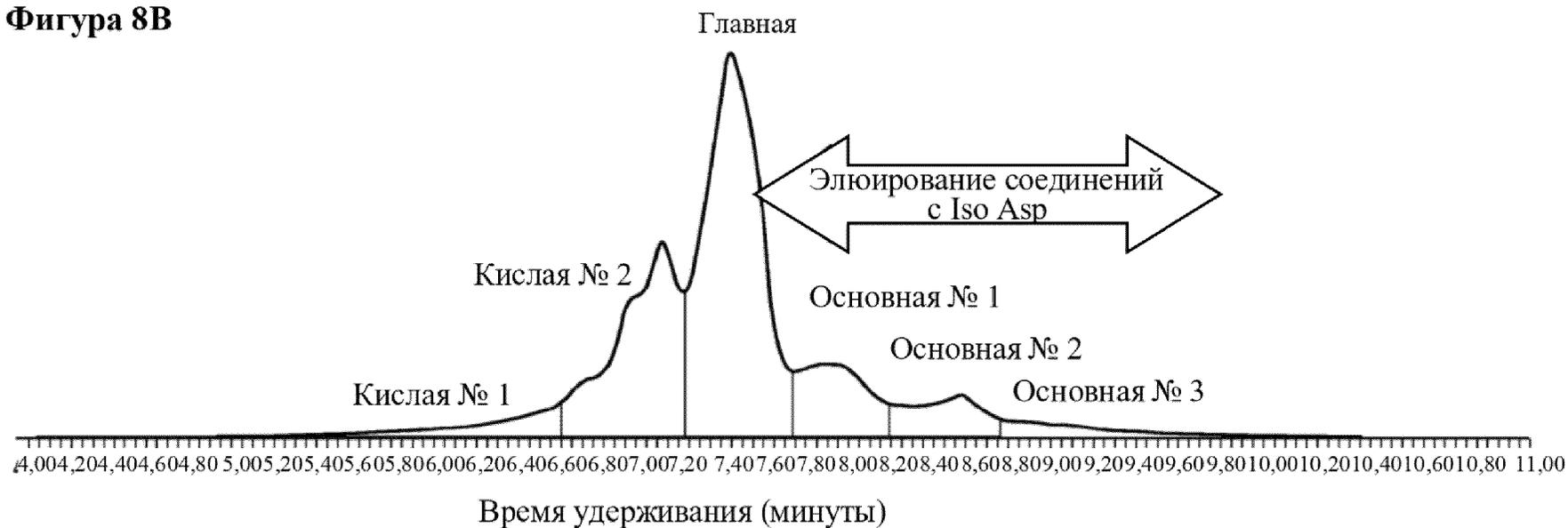
Фигура 7А и фигура 7В



Фигура 8А

ID образца/описание	% изомеризации			% относительной активности (% CV)	
	D54 HC	D49/50 LC	D91/95 LC	Связывание рецептора с лигандом	Активность репортерного гена в клеточном биологическом анализе
Лекарственное вещество AMG157	0,0	0,2	0,0	102	102
Подвергнутый стрессу образец AMG157 (4 недели при 40°C)	1,8	5,4	0,3	104	91

Фигура 8В



Фигура 8С

ID образца/описание	% изомеризации			% относительной активности (% CV)	
	D54 HC	D49/50 LC	D91/95 LC	Связывание рецептора с лигандом	Активность репортерного гена в клеточном биологическом анализе
Контроль	0,0	0,2	0,0	102	102
Подвергнутый стрессу образец (4 недели при 40°C)	1,8	5,4	0,3	104	91
Основная фракция 1 подвергнутого стрессу образца	0,1	12	0,1	101% (11%)	94% (3%)
Основная фракция 2 подвергнутого стрессу образца	0,6	8,3	0,1	83% (8%)	86% (5%)
Основная фракция 3 подвергнутого стрессу образца	39,2	1,6	0	78% (8%)	59% (7%)
Основная фракция 4 подвергнутого стрессу образца	Слишком низкий для тестирования путем пептидного картирования			59% (9%)	15% (13%)

Фигура 8D

Модификация	Эталонный стандарт	Лекарственный препарат во флаконе, партия А, 12М, 5°C	Лекарственный препарат во флаконе, партия В, 12М, 5°C	Лабораторный DP, T = 0	Лабораторный DP, 18М, 5°C	Лабораторный DP, 6М, 25°C	Стабильность DS, 22М, 5°C 2М, 25°C	Стабильность DS, 22М, 5°C 2М, 30°C
Изомеризация Asp (CDR LC, D49/D50)	0,2%	2,2%	2,7%	0,6%	3,7%	6,9%	6,7%	9,1%
Изомеризация Asp (CDR HC, D54)	0,0%	0,1%	0,1%	0,0%	0,1%	0,6%	0,5%	1,4%