

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392599** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.12.25

(22) Дата подачи заявки
2022.04.19

(51) Int. Cl. *C07K 16/24* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

(54) **ФАВ К TSLP С ПОВЫШЕННОЙ СТАБИЛЬНОСТЬЮ**

(31) 21169183.7

(32) 2021.04.19

(33) EP

(86) PCT/EP2022/060236

(87) WO 2022/223514 2022.10.27

(71) Заявитель:
МЕДИММУН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:

Колбэк Роланд Вильгельм (US), Коэн
Эмма Сюзанн, Хантингтон Кэтрин
Юджини (GB)

(74) Представитель:

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

(57) Настоящее изобретение относится к Fab к TSLP с улучшенной стабильностью, нуклеиновым кислотам, кодирующим указанный Fab, клеткам-хозяевам и вектору, содержащему указанные нуклеиновые кислоты, и способам применения указанных Fab при лечении патологических состояний, связанных с TSLP.

A1

202392599

202392599

A1

ФАБ К TSLP С ПОВЫШЕННОЙ СТАБИЛЬНОСТЬЮ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к Fab к TSLP с улучшенной стабильностью, нуклеиновым кислотам, кодирующим указанный Fab, клеткам-хозяевам и вектору, содержащему указанные нуклеиновые кислоты, и способам применения указанных Fab при лечении заболеваний.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Стромальный лимфопоэтин тимуса (TSLP) представляет собой цитокин, который передает сигналы через гетеродимерный рецептор, состоящий из субъединицы IL-7Ra и TSLP-R, уникального компонента, гомологичного общей подобной у-рецептору цепи (Pandey et al., *Nat. Immunol.* 2000, 1(1):59-64). TSLP экспрессируется эпителиальными клетками тимуса, легких, кожи, кишечника и миндалин, а также гладкомышечными клетками дыхательных путей, фибробластами легких и стромальными клетками (Edwards, 2008, *Drug news & perspectives* 21, 312-316; He and Geha, 2010, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1183, 13-24; Reche et al., 2001, *Journal of immunology* 167, 336-343).

Эти клетки продуцируют TSLP в ответ на провоспалительные стимулы, а TSLP запускает аллергические воспалительные реакции посредством своей активности на ряде врожденных иммунных клеток, включая дендритные клетки (Soumelis et al., 2002, *Nature immunology* 3, 673-680), моноциты (Reche et al., 2001, *Journal of immunology* 167, 336-343), и тучные клетки (Allakhverdi et al., 2007, *The Journal of Experimental Medicine* 204, 253-258). Популяции клеток с наиболее высокой известной экспрессией как TSLP-R, так и IL-7Ra представляют собой миелоидные дендритные клетки (Reche et al., 2001, *Journal of immunology* 167, 336-343).

TSLP может способствовать пролиферации наивных Т-клеток и стимулировать их дифференцировку в Th2-клетки, экспрессирующие высокие уровни IL-4, IL-5 и IL-13 (Omori and Ziegler, 2007, *Journal of immunology* 178, 1396-1404). Высокий уровень экспрессии TSLP был обнаружен в эпителиальных клетках астматических легких и поражениях кожи при хроническом атопическом дерматите, что указывает на роль TSLP в аллергическом воспалении (Ziegler and Artis, 2010, *Nature immunology* 11, 289-293). Более поздние данные указывают на участие TSLP в дифференцировке Th17-клеток и воспалительных процессах, вызванных Th17 (Hartgring et al., 2011, *Arthritis and rheumatism* 63, 1878-1887; Tanaka et al., 2009, *Clinical and experimental allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 39, 89-100; Wu et al., 2014, *Journal of molecular and cellular cardiology* 76, 33-45). Хроническая аллергическая (атопическая) астма часто

характеризуется воспалением Th2-типа, тогда как неаллергическое астматическое воспаление является преимущественно нейтрофильным со смешанным цитокиновым окружением Th1 и Th17. Последствия хронического воспаления при астме включают гиперреактивность бронхов (BHR), перепроизводство слизи, ремоделирование стенок дыхательных путей и сужение дыхательных путей (Lambrecht and Hammad, 2014, *Nature immunology* 16, 45-56). Было показано, что TSLP участвует в иницировании и поддержании/усилении аллергического астматического ответа (Wang et al., 2006, *Immunity* 24, 827-838). Совсем недавно было обнаружено, что сигналинг TSLP необходим для ответа Т-клеток памяти на локальной антигенной стимуляции (Wang et al., 2015, *The Journal of allergy and clinical immunology* 135, 781-791 e783).

Тезепелумаб представляет собой моноклональное антитело (мкАт) человеческого иммуноглобулина G2 (IgG2), которое связывается с TSLP, предотвращая его взаимодействие с комплексом TSLP-рецептор. Исследование по проверке концепции с участием пациентов с легкой атопической астмой показало, что тезепелумаб ингибирует немедленные и поздние астматические реакции и подавляет биомаркеры воспаления Th2-типа после ингаляционного воздействия аллергена. Исследование по оценке тезепелумаба у взрослых и подростков с тяжелой неконтролируемой астмой (NCT03347279) недавно завершилось и достигло основной конечной точки — снижения годовой частоты обострений астмы (AERR) [Временные рамки: от исходного уровня до 52-й недели].

CSJ117 представляет собой мощный фрагмент нейтрализующего антитела к стромального лимфопоэтина тимуса человека (TSLP), разработанный в виде специально разработанного порошка PulmoSol™ в твердых капсулах для доставки в легкие с помощью ингалятора сухого порошка (Gauvrea *et al* ERS 2020 56: Suppl. 64, 3690).

Таким образом, нацеливание на TSLP при лечении воспалительных заболеваний, таких как астма, клинически подтверждено. Применение антагонистов TSLP в виде ингаляций является весьма интересным, учитывая, что большинство больных астмой привыкли к самолечению посредством ингаляций.

Настоящее изобретение направлено на развитие уже имеющихся вариантов лечения, в частности, путем ингаляции этого нового класса лекарственных средств.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В рамках настоящего изобретения было обнаружено, что внесение множественных мутаций в домен CN1 тезепелумаба и преобразование молекулы в Fab снижает агрегацию в условиях «ускоренного старения» (в 1 x ФСБ, при 45°C в течение двух недель). Исследования стабильности методом «ускоренного старения» в 1 x ФСБ иногда

используются в качестве грубой примерной оценки стабильности в сыворотке *in vivo*.

Период полужизни большинства антител, вводимых для лечения, превышает 14 дней (две недели). Fab могут быть предпочтительнее моноклональных антител для ингаляционной доставки, учитывая их меньший размер и улучшенное биораспределение в легких после аэрозольирования. Несмотря на ингаляционное введение, стабильность в сыворотке по-прежнему является важным фактором для белковых антагонистов, вводимых в легкие, поскольку большая часть активного агента может в конечном итоге попасть в сыворотку. Таким образом, улучшенная стабильность при «ускоренном старении» иллюстративных Fab может быть выгодной при использовании при лечении патологических состояний, связанных с TSLP.

Соответственно, в одном аспекте изобретение относится к Fab, содержащему тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:2.

В еще одном аспекте изобретение относится к Fab, содержащему тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:2.

В еще одном аспекте изобретение относится к Fab, содержащему тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:1, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:2.

В еще одном аспекте изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей описанный в данном документе Fab.

В еще одном аспекте изобретение относится к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе.

В еще одном аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту или вектор, описанные в данном документе.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу лечения, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества Fab, описанного в данном документе.

В еще одном аспекте изобретение относится к описанному в данном документе Fab для применения в терапии.

В еще одном аспекте изобретение относится к применению описанного в данном документе Fab в терапии.

В другом аспекте изобретение относится к применению описанного в данном

документе Fab при производстве лекарственного препарата для применения в терапии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **Фиг. 1** показан 2-недельный анализ стабильности методом «ускоренного старения» тезепелумаба в концентрации ~ 1 мг/мл в 1 x ФСБ при 4°C (А) и 45°C (В). На графике показаны кривые для тезепелумаба по HP-SEC после инкубации при каждой температуре в течение заданного времени. В таблице (С) указаны % потери мономера и % образования агрегатов для тезепелумаба, а также результаты для IgG1 изотипического контроля NIP228.

На **Фиг. 2** показан 2-недельный анализ стабильности методом «ускоренного старения» ~ 0,8 мг/мл Fab1 в 1 x ФСБ при 4°C (А) и 45°C (В). На графике показаны кривые для Fab1 по HP-SEC после инкубации при каждой температуре в течение заданного времени. В таблице (С) указаны % потери мономера и % образования агрегатов для Fab1, а также результаты для Fab изотипического контроля R347.

На **Фиг. 3** показано связывание Fab 1 с TSLP человека по измерениям с помощью KinExA.

На **Фиг. 4** показано связывание Fab₁ с TSLP яванского макака по измерениям с помощью KinExA

На **Фиг. 5** показано конкурентное связывание Fab 1 с TSLP человека в качестве показателя с использованием анализа HTRF

На **Фиг. 6** показано, что Fab 1 ингибирует высвобождение CCL17 из PBMC, стимулированных TSLP

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определение

Следует отметить, что термины в форме единственного числа объекта относятся к одному или большему количеству объектов; например, понимают, что «Fab к TSLP» представляет собой один или более Fab к TSLP.

Термин «антитело» применяется в самом широком смысле и включает различные структуры антител, включая, но не ограничиваясь этим, моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, до тех пор, пока они демонстрируют необходимую антигенсвязывающую активность.

«Фрагменты антитела» включают антигенсвязывающие части антитела, включая, среди прочего, Fab, Fab', F(ab')₂, F_v, доменное антитело (dAb), фрагменты в виде определяющих комплементарность областей (CDR), антитела с трансплантированными

CDR, одноцепочечные антитела (scFv), фрагменты одноцепочечных антител, химерные антитела, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, линейные антитела; хелатирующее рекомбинантное антитело, тритело или битело, интраантитело, наноантитело, малый модульный иммунофармацевтический препарат (SMIP), слитый белок иммуноглобулина с антигенсвязывающим доменом, однодоменные антитела (включая верблюжье антитело), антитело, содержащее VHH, или вариант или его производное, и полипептиды, которые содержат по меньшей мере часть иммуноглобулина, достаточную для обеспечения специфического связывания антигена с полипептидом, например, одну, две, три, четыре, пять или шесть последовательностей CDR, при условии, что антитело сохраняет желаемую биологическую активность.

«Fab» относится к фрагменту антитела, содержащему пару VH-CH1 и VL-CL. Термин охватывает Fab, содержащие варианты неканонических последовательностей, такие как аминокислотные замены, делеции или вставки внутри Fab за пределами областей последовательности, обычно связанных с высокой вариабельностью последовательности. Например, варианты Fab включают Fab, содержащие неканонические аминокислоты или изменения последовательности в каркасных областях VH или VL или в доменах CH1 или CL. Такие изменения могут включать присутствие неканонических цистеинов или других производных аминокислот, которые можно использовать для конъюгации указанных вариантов Fab с гетерологичными фрагментами. Другие подобные изменения включают присутствие неканонических полипептидных линкеров, которые представляют собой полипептидные последовательности, образующие ковалентные мостики между двумя доменами. Например, вариант Fab может содержать линкерный полипептид, который ковалентно присоединяет домен CH1 к домену VL или домен CL к домену VH, так что Fab может экспрессироваться в виде одной полипептидной цепи.

«Клетки-хозяйева» относятся к клеткам, которые содержат векторы, сконструированные с использованием методов рекомбинантной ДНК и кодирующие по меньшей мере один гетерологичный ген. В описаниях способов выделения Fab к TSLP из рекомбинантных хозяйев термины «клетка» и «культура клеток» используются взаимозаменяемо для обозначения источника Fab к TSLP, если явно не указано иное. Другими словами, выделение полипептида из «клеток» может означать как выделение из центрифугированных целых клеток, так и из клеточной культуры, содержащей и среду, и суспендированные клетки.

«Выделенный» относится к полипептиду, антителу, полинуклеотиду, вектору, клетке или композиции, которые находятся в форме, не встречающейся в природе.

Выделенные полипептиды, антитела, полинуклеотиды, векторы, клетки или композиции включают те, которые были очищены до такой степени, что они больше не присутствуют в той форме, в которой они находятся в природе. В некоторых аспектах выделенные антитело, полинуклеотид, вектор, клетка, или композиция являются по существу чистой.

«Фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической активности активного ингредиента (например, Fab к TSLP, описанного в данном документе), и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться данная композиция. Такая композиция может быть стерильной.

«Полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота», используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к полимерам нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или азотистые основания, и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть включен в полимер ДНК- или РНК-полимеразой. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Предыдущее описание относится ко всем полинуклеотидам, упомянутым в данном документе, включая РНК и ДНК.

«Рекомбинантный» полипептид или белок относится к полипептиду или белку, полученному с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Полученные рекомбинантным путем полипептиды и белки, экспрессируемые в сконструированных клетках-хозяевах, считаются выделенными для целей изобретения, как и нативные или рекомбинантные полипептиды, которые были разделены, фракционированы или частично или по сути очищены с помощью любой подходящей методики. Полипептиды, описанные в данном документе, могут быть получены рекомбинантным путем с использованием способов, известных в данной области техники. В качестве альтернативы белки и пептиды, описанные в настоящем документе, могут быть синтезированы химическим путем.

«Субъект», или «индивид», или «животное», или «пациент», или «млекопитающее» означает любого субъекта, особенно субъекта-млекопитающего, для которого требуется диагностика, прогноз или терапия, за исключением случаев, когда субъект определен как «здоровый субъект». К млекопитающим относятся люди; домашние животные; домашний скот; например, собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и так далее. Предпочтительно субъект представляет собой человека.

Термины «лечить» или «лечение» обозначают как терапевтическое лечение, так и

профилактические или превентивные меры, причем целью является предотвращение или замедление (облегчение) нежелательного физиологического изменения или расстройства. Благоприятные или желаемые клинические результаты включают, помимо прочего, облегчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т. е. не ухудшение) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное смягчение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), обнаруживаемую или необнаруживаемую. «Лечение» также может означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если лечение не проводится. Лица, нуждающиеся в лечении, включают тех, кто уже имеет патологическое состояние или нарушение, а также тех, кто склонен к патологическому состоянию или нарушению, или тех, у кого патологическое состояние или нарушение необходимо предупредить.

«Терапевтически эффективное количество» относится к количеству Fab к TSLP, описанного в данном документе, или другого лекарственного средства, эффективного для «лечения» заболевания или нарушения у субъекта или млекопитающего.

«TSLP» относится к стромальному лимфопоэтину тимуса. TSLP представляет собой цитокин, который передает сигналы через гетеродимерный рецептор, состоящий из субъединицы IL-7Ra и TSLP-R, уникального компонента, гомологичного общей подобной гамма-рецептору цепи (Pandey et al., Nat. Immunol. 2000, 1(1):59-64). TSLP экспрессируется эпителиальными клетками тимуса, легких, кожи, кишечника и миндалин, а также гладкомышечными клетками дыхательных путей, фибробластами легких и стромальными клетками (Edwards, 2008, Drug news & perspectives 21, 312-316; He and Geha, 2010, Annals of the New York Academy of Sciences 1183, 13-24; Reche et al., 2001, Journal of immunology 167, 336-343). Эти клетки продуцируют TSLP в ответ на провоспалительные стимулы, а TSLP запускает аллергические воспалительные реакции посредством своей активности на ряде врожденных иммунных клеток, включая дендритные клетки (Soumelis et al, 2002, Nature immunology 3, 673-680), моноциты (Reche et al., 2001, Journal of immunology 167, 336-343), и тучные клетки (Allakhverdi et al., 2007, The Journal of Experimental Medicine 204, 253-258). Популяции клеток с наиболее высокой известной экспрессией как TSLP-R, так и IL-7Ra представляют собой миелоидные дендритные клетки (Reche et al, 2001, Journal of immunology 167, 336-343).

TSLP может способствовать пролиферации наивных Т-клеток и стимулировать их дифференцировку в Th2-клетки, экспрессирующие высокие уровни IL-4, IL-5 и IL-13 (Omori and Ziegler, 2007, Journal of immunology 178, 1396-1404). Высокий уровень

экспрессии TSLP был обнаружен в эпителиальных клетках астматических легких и поражениях кожи при хроническом атопическом дерматите, что указывает на роль TSLP в аллергическом воспалении (Ziegler and Artis, 2010, *Nature Immunology* 11, 289-293). Более поздние данные указывают на участие TSLP в дифференцировке Th17-клеток и воспалительных процессах, вызванных Th17 (Hartgring et al, 2011, *Arthritis and rheumatism* 63, 1878-1887; Tanaka et al, 2009, *Clinical and experimental allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 39, 89-100; Wu et al, 2014, *Journal of molecular and cellular cardiology* 76, 33-45). Хроническая аллергическая (атопическая) астма часто характеризуется воспалением Th2-типа, тогда как неаллергическое астматическое воспаление является преимущественно нейтрофильным со смешанным цитокиновым окружением Th1 и Th17. Последствия хронического воспаления при астме включают гиперреактивность бронхов (BHR), перепроизводство слизи, ремоделирование стенок дыхательных путей и сужение дыхательных путей (Lambrecht and Hammad, 2014, *Nature immunology* 16, 45-56). Было показано, что TSLP участвует в иницировании и поддержании/усилении аллергического астматического ответа (Wang et al., 2006, *Immunity* 24, 827-838). Совсем недавно было обнаружено, что сигналинг TSLP необходим для ответа Т-клеток памяти на локальной антигенной стимуляции (Wang et al., 2015, *The Journal of allergy and clinical immunology* 135, 781-791 e783).

«Вектор» означает конструкцию, которая способна доставлять и, в некоторых аспектах, экспрессировать один или более представляющих интерес ген или последовательность в клетку-хозяин. Примеры векторов включают, но не ограничиваются ими, вирусные векторы, векторы экспрессии голый ДНК или РНК, векторы плазмид, космид или фагов, векторы экспрессии ДНК или РНК, связанные с катионными конденсирующими агентами, векторы экспрессии ДНК или РНК, инкапсулированные в липосомы, и некоторые эукариотические клетки, такие как клетки-продуценты.

Fab к TSLP

Изобретение относится к Fab, содержащему тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:2.

В еще одном аспекте изобретение относится к Fab, содержащему тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:2.

В еще одном аспекте изобретение относится к Fab, содержащему тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, и легкую

цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:2.

Примеры показывают, что Fab с этими характеристиками последовательности обладает улучшенной стабильностью в условиях «ускоренного старения» для исследований стабильности по сравнению с полноразмерным антителом со сходными последовательностями доменов VH и VL. Иллюстративный Fab с улучшенной стабильностью обозначается в данном документе как Fab 1.

В некоторых случаях изобретение относится к Fab, который имеет стабильность, эквивалентную Fab 1. В некоторых случаях эквивалентная стабильность представляет собой эквивалентную стабильность в условиях «ускоренного старения» для исследований стабильности. В некоторых случаях условия «ускоренного старения» для исследований стабильности включают 1 X ФСБ при 45°C в течение двух недель. В некоторых случаях концентрация Fab в условиях «ускоренного старения» составляет ~0,8 мг/мл.

В некоторых случаях Fab содержит тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1. В некоторых случаях Fab содержит тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1. В некоторых случаях Fab обладает стабильностью, эквивалентной Fab 1.

В некоторых случаях Fab содержит легкую цепь, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2. В некоторых случаях Fab содержит легкую цепь, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2. В некоторых случаях Fab обладает стабильностью, эквивалентной Fab 1.

В некоторых случаях Fab содержит тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, и легкую цепь, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2. В некоторых случаях Fab обладает стабильностью, эквивалентной Fab 1.

В некоторых случаях Fab содержит тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, и легкую цепь, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2. В некоторых случаях Fab обладает стабильностью, эквивалентной Fab 1.

В некоторых случаях изобретение относится к антигенсвязывающему фрагменту, содержащему тяжелую цепь SEQ ID NO:1.

В некоторых случаях изобретение относится к антигенсвязывающему фрагменту, содержащему тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент обладает стабильностью, эквивалентной Fab 1.

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент обладает стабильностью, эквивалентной Fab 1.

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, и легкую цепь, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент обладает стабильностью, эквивалентной Fab 1.

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, и легкую цепь, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент обладает стабильностью, эквивалентной Fab 1.

Нуклеотиды

Настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам (или «полинуклеотидам»), которые кодируют Fab и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе.

Полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут дополнительно включать дополнительные нуклеиновые кислоты, кодирующие, например, сигнальный пептид для

управления секрецией кодируемого полипептида, описанного в данном документе.

Полинуклеотиды могут быть получены или изготовлены любым способом, известным в данной области техники. Например, если нуклеотидная последовательность Fab известна, полинуклеотид, кодирующий Fab к TSLP, может быть собран из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, как описано Kutmeier et al., *Bio Techniques* 17:242 (1994)), что, вкратце, включает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей Fab к TSLP, отжиг и лигирование этих олигонуклеотидов, а затем амплификацию лигированных олигонуклеотидов с помощью ПЦР.

Альтернативно, полинуклеотид, кодирующий Fab к TSLP, может быть получен из нуклеиновой кислоты из подходящего источника. Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую Fab, недоступен, но последовательность Fab известна, нуклеиновую кислоту, кодирующую Fab, можно химически синтезировать или получить из подходящего источника, например, путем ПЦР-амплификации с использованием синтетических праймеров, гибридизующихся с 3'- и 5'-концами последовательности или путем клонирования с использованием олигонуклеотидного зонда, специфичного для конкретной представляющей интерес последовательности. Амплифицированные нуклеиновые кислоты, полученные с помощью ПЦР, можно затем клонировать в реплицируемые векторы клонирования с использованием любого метода, хорошо известного в данной области.

После того как нуклеотидная последовательность и соответствующая аминокислотная последовательность Fab определены, его нуклеотидной последовательностью можно манипулировать с использованием методов, хорошо известных в данной области техники для манипулирования нуклеотидными последовательностями, например, технологий рекомбинантных ДНК, сайт-направленного мутагенеза, ПЦР и т. д. (см., например, методы, описанные в Sambrook et al. (1990) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) and Ausubel et al., eds. (1998) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, NY), которые оба полностью включены в данный документ посредством ссылки), для создания Fab, имеющих другую аминокислотную последовательность, например, для создания аминокислотных замен, делеций и/или вставок.

Полинуклеотид, кодирующий Fab, может состоять из любого полирибонуклеотида или полидезоксирибонуклеотида, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. Например,

полинуклеотид, кодирующий Fab к TSLP, может состоять из одно- и двухцепочечной ДНК, ДНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечной РНК, и РНК, представляющей собой смесь одно- и двухцепочечных областей, гибридных молекул, содержащих ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, что более типично, двухцепочечными или смесью одно- и двухцепочечных областей. Кроме того, полинуклеотид, кодирующий указанный Fab, может состоять из трехцепочечных областей, содержащих РНК или ДНК, или РНК, и ДНК. Полинуклеотид, кодирующий Fab к TSLP, может также содержать одно или более модифицированных азотистых оснований или каркасов ДНК или РНК, модифицированных для стабильности или по другим причинам. «Модифицированные» азотистые основания включают, например, тритилированные азотистые основания и необычные азотистые основания, такие как инозин. В ДНК и РНК можно внести различные модификации; таким образом, «полинуклеотид» охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы.

Выделенный полинуклеотид, кодирующий неприродный вариант полипептида, полученного из иммуноглобулина (например, часть тяжелой цепи или часть легкой цепи иммуноглобулина), может быть создан путем введения одной или более нуклеотидных замен, добавлений или делеций в нуклеотидную последовательность иммуноглобулина таким образом, что в кодируемый белок вводятся одна или более аминокислотных замен, добавлений или делеций. Мутации могут быть введены стандартными методами, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Предпочтительно консервативные аминокислотные замены осуществляются в одном или нескольких заменимых аминокислотных остатках.

Способы производства

Полинуклеотиды, кодирующие Fab к TSLP или антигенсвязывающие фрагменты, обычно встраивают в вектор экспрессии для введения в клетки-хозяева, которые можно использовать для получения желаемого количества Fab. По существу, сюда включены вектор экспрессии, содержащий полинуклеотиды, кодирующие Fab, определенный в данном документе, и клетка-хозяин, содержащая указанный вектор экспрессии.

Для рекомбинантной экспрессии Fab или антигенсвязывающего фрагмента требуется создание вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, который кодирует Fab. После получения полинуклеотида, кодирующего Fab по настоящему изобретению, вектор для продукции Fab можно получить с помощью технологии рекомбинантной ДНК с использованием методик, хорошо известных в данной области техники.

Последовательности ДНК, кодирующие Fab, могут быть получены либо одновременно, либо раздельно с использованием обратной транскриптазы и ДНК-полимеразы в соответствии с хорошо известными методами. ПЦР может быть инициирована консенсусными праймерами константной области или более специфическими праймерами на основе опубликованных последовательностей ДНК и аминокислот. ПЦР также можно использовать для выделения клонов ДНК, кодирующих переменные области легких и тяжелых цепей антитела. В этом случае библиотеки можно проверять с помощью консенсусных праймеров или более крупных гомологичных зондов, таких как зонды константной области мыши.

Таким образом, в данном документе описаны способы получения белка путем экспрессии полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую Fab. Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, можно использовать для конструирования векторов экспрессии, содержащих кодирующие последовательности Fab к TSLP и соответствующие сигналы контроля транскрипции и трансляции. Эти методы включают, например, методы рекомбинантной ДНК *in vitro*, методы синтеза и методы генетической рекомбинации *in vivo*. Таким образом, изобретение обеспечивает реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую Fab по настоящему изобретению, функционально связанную с промотором.

Для целей настоящего изобретения можно использовать многочисленные системы векторов экспрессии. Например, в одном классе векторов используются элементы ДНК, полученные из вирусов животных, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус полиомы, аденовирус, вирус коровьей оспы, бакуловирус, ретровирусы (RSV, MMTV или MOMLV) или вирус SV40. Другие включают применение полицистронных систем с участками внутренней посадки рибосомы. Кроме того, клетки, интегрировавшие ДНК в свои хромосомы, можно отбирать путем введения одного или более маркеров, которые позволяют отбирать трансфицированные клетки-хозяева. Маркер может обеспечивать прототрофию по отношению к ауксотрофному хозяину, устойчивость к биоцидам (например, антибиотикам) или устойчивость к тяжелым металлам, таким как медь. Селектируемый маркерный ген может быть либо непосредственно связан с последовательностями ДНК, подлежащими экспрессии, либо введен в ту же клетку путем котрансформации. Дополнительные элементы также могут быть необходимы для оптимального синтеза мРНК. Эти элементы могут включать сигнальные последовательности, сигналы сплайсинга, а также транскрипционные промоторы,

энхансеры и сигналы терминации.

В настоящем изобретении можно использовать любой вектор экспрессии, который способен вызывать экспрессию в эукариотических клетках. Примеры подходящих векторов включают, помимо прочего, плазмиды pCDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF 1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, и pZeoSV2 (доступен от Invitrogen, Сан-Диего, штат Калифорния) и плазмиду pCI (доступна от Promega, Мэдисон, штат Висконсин). В широком смысле, скрининг большого количества трансформированных клеток для выявления тех, которые экспрессируют необходимые молекулы

В более общем смысле, после получения вектора или последовательности ДНК, кодирующей Fab, вектор экспрессии может быть введен в соответствующую клетку-хозяина. Введение плазмиды в клетку-хозяина можно осуществить различными методами, хорошо известными специалистам в данной области. К ним относятся, помимо прочего, трансфекция (включая электрофорез и электропорацию), слияние протопластов, осаждение фосфатом кальция, слияние клеток с ДНК в оболочке, микроинъекция и инфицирование интактным вирусом. См., Ridgway (1988) "Mammalian Expression Vectors" in *Vectors*, ed. Rodriguez and Denhardt (Butterworths, Boston, Mass.), Chapter 24.2, pp. 470-472. Как правило, введение плазмиды хозяину осуществляется посредством электропорации. Клетки-хозяева, несущие экспрессирующую конструкцию, выращивают в условиях, подходящих для продукции Fab к TSLP, и анализируют на синтез белка. Иллюстративные методы анализа включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) или сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS), иммуногистохимию и т. п.

Вектор экспрессии переносится в клетку-хозяина обычными методами, а трансфицированные клетки затем культивируются обычными методами для получения Fab к TSLP для применения в способах, описанных в данном документе. Таким образом, изобретение включает клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий Fab по изобретению, например, тяжелую или легкую цепь, или варибельную область тяжелой или легкой цепи, функционально связанный с гетерологичным промотором.

В одном случае предложена культуральная среда, содержащая указанную клетку-хозяина. В одном случае предложен ферментационный сосуд, содержащий указанную культуральную среду.

В некоторых случаях культуральная среда и ферментационный сосуд подходят для осуществления способа получения Fab, определенного в данном документе.

Для экспрессии описанных в данном документе Fab к TSLP можно использовать различные векторные системы экспрессии-хозяина. Такие системы экспрессии-хозяина представляют собой средства, с помощью которых представляющие интерес кодирующие последовательности могут быть получены и впоследствии очищены, но также представляют собой клетки, которые могут при трансформации или трансфекции соответствующими нуклеотидными кодирующими последовательностями экспрессировать молекулу по настоящему изобретению *in situ*. Они включают, но не ограничиваются ими, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli*, *B. subtilis*), трансформированные векторами экспрессии рекомбинантной ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими кодирующие последовательности; дрожжи (например, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии дрожжей, содержащими кодирующие последовательности; системы клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирусом), содержащими кодирующие последовательности; системы растительных клеток, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV, вирусом табачной мозаики, TMV) или трансформированные рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например, плазмидой Ti), содержащими кодирующие последовательности; или системы клеток млекопитающих (например, клетки COS, CHO, BLK, 293, 3T3), содержащие рекомбинантные экспрессионные конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотионеина) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор 7,5 кДа вируса коровьей оспы).

Для экспрессии Fab используют бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, и более предпочтительно эукариотические клетки. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), в сочетании с вектором, таким как основной промежуточный элемент промотора раннего гена цитомегаловируса человека, представляют собой эффективную систему экспрессии антител (Foering et al., *Gene* 45: 101 (1986); Cockett et al, *Bio/Technology* 8:2 (1990)).

Линия клеток-хозяев, используемая для экспрессии белка, часто имеет происхождение от млекопитающих; специалистам в данной области техники приписывают способность предпочтительно определять конкретные линии клеток-хозяев, которые лучше всего подходят для экспрессии в них желаемого генного продукта. Иллюстративные линии клеток-хозяев включают, помимо прочего, CHO (яичник китайского хомячка), DG44 и

DUXB13 (линии яичника китайского хомяка, минус DHFR), HELA (карцинома шейки матки человека), CVI (линия почек обезьяны), COS (производное CVI с Т-антигеном SV40), VERO, ВНК (почка хомячка), MDCK, 293, WI38, R1610 (фибробласт китайского хомячка), BALBC/3Т3 (фибробласт мыши), НАК (линия почки хомяка), SP2/0 (миелома мыши), РЗ-Х63-Аg3.653 (миелома мыши), ВFA-1c1BPT (бычьи эндотелиальные клетки), RAJI (лимфоциты человека) и 293 (почка человека). Линии клеток-хозяев обычно доступны у коммерческих компаний, в Американской коллекции тканевых культур или в опубликованной литературе.

Кроме того, можно выбрать штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию вставленных последовательностей или модифицирует и процессирует продукт гена желаемым специфическим образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важными для функционирования белка. Различные клетки-хозяева обладают характерными и специфическими механизмами посттрансляционного процессинга и модификации белков и продуктов генов. Для обеспечения правильной модификации и процессинга экспрессируемого чужеродного белка можно выбрать подходящие линии клеток или системы хозяев. С этой целью можно использовать эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным механизмом для правильного процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования продукта гена.

Для длительного производства с высоким выходом рекомбинантных белков, стабильная экспрессия является предпочтительной. Например, можно сконструировать линии клеток, которые стабильно экспрессируют Fab к TSLP. Вместо того чтобы использовать векторы экспрессии, которые содержат вирусные сайты инициации репликации, клетки-хозяева могут быть трансформированы ДНК под контролем соответствующих контрольных элементов экспрессии (например, промотор, энхансер, последовательности, терминаторы транскрипции, сайты полиаденилирования и т. д.), и селективного маркера. После введения чужеродной ДНК сконструированные клетки могут расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде с последующим переносом на селективную среду. Селектируемый маркер в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость к селекции и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в свои хромосомы и расти с образованием очагов, которые в свою очередь можно клонировать и увеличивать до клеточных линий. Этот способ можно с успехом использовать для создания линий клеток, которые стабильно экспрессируют Fab к TSLP.

Можно использовать ряд систем селекции, включая, помимо прочего, гены

тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler et al., Cell 13:223 (1977)), гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (Szybalska and Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992)), и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy et al., Cell 22:817 (1980)) могут быть использованы в tk-, hgprrt- или aprt-клетках, соответственно. Кроме того, устойчивость к антиметаболитам можно использовать в качестве основы для селекции следующих генов: dhfr, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1521 (1981)); gpt, который придает устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan and Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2012 (1981)); neo, который придает устойчивость к аминогликозиду G-418 Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 52:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); и Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217 (1993); TIB TECH 13(5): 155-215 (May, 1993); и hygro, который придает устойчивость к гигромицину (Santerre et al., Gene 30: 141 (1984)). Способы, широко известные в области технологии рекомбинантной ДНК, которые можно использовать, описаны в Ausubel et al. (1993) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY); Kriegler (1990) "Gene Transfer and Expression" in A Laboratory Manual (Stockton Press, NY); Dracopoli et al. (eds) (1994) Current Protocols in Human Genetics (John Wiley & Sons, NY) Chapters 12 and 13; Colberre-Garapin et al. (1981) J. Mol. Biol. 150: 1, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки.

Уровни экспрессии Fab можно повысить путем амплификации векторов (обзор см. Bebbington and Hentschel (1987) "The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning" (Academic Press, NY) Vol. 3. Когда маркер в векторной системе, экспрессирующий Fab к TSLP, является амплифицируемым, увеличение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина, приведет к увеличению количества копий маркерного гена. Поскольку амплифицированная область ассоциирована с геном Fab к TSLP, продукция Fab к TSLP также будет увеличиваться (Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3:251 (1983)).

Производство *in vitro* позволяет масштабировать производство для получения больших количеств желаемых полипептидов. Методы культивирования клеток млекопитающих в условиях культуры тканей известны в данной области техники и включают гомогенную суспензионную культуру, например, в эрлифтном реакторе или в реакторе непрерывного действия с мешалкой, или в иммобилизованной или захваченной клеточной культуре, например, в полых волокнах, микрокапсулах, на агарозных микрогранулах или керамических картриджах. При необходимости и/или желании

растворы полипептидов можно очистить обычными методами хроматографии, например, гель-фильтрацией, ионообменной хроматографией, хроматографией на DEAE-целлюлозе или (иммуно)аффинной хроматографией, например, после предпочтительного биосинтеза синтетического полипептида шарнирной области или до или после стадии хроматографии гидрофобных взаимодействий, описанной в данном документе.

Гены, кодирующие Fab к TSLP по настоящему изобретению, также могут экспрессироваться в клетках животных, отличных от млекопитающих, таких как клетки насекомых, бактерий или дрожжей или растений. Бактерии, которые легко поглощают нуклеиновые кислоты, включают представителей энтеробактерий, таких как штаммы *Escherichia coli* или *Salmonella*; *Bacillaceae*, такие как *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, и *Haemophilus influenzae*. Кроме того, следует понимать, что при экспрессии в бактериях гетерологичные полипептиды обычно становятся частью телец включения. Гетерологичные полипептиды необходимо выделить, очистить и затем собрать в функциональные молекулы. Если необходимо получить четырехвалентные формы антител, то субъединицы самособираются в четырехвалентные антитела (WO 02/096948 A2).

В бактериальных системах может быть предпочтительно выбран ряд векторов экспрессии в зависимости от предполагаемого применения экспрессируемого Fab к TSLP. Например, когда необходимо получить большое количество такого белка для создания фармацевтических композиций Fab, могут понадобиться векторы, которые обеспечивают высокий уровень экспрессии легко очищаемых продуктов слитого белка. Такие векторы включают, но не ограничиваются ими, вектор экспрессии *E.coli* pUR278 (Ruther et al., EMBO J. 2: 1791 (1983)), в котором кодирующая последовательность может быть лигирована отдельно в вектор в рамке считывания с кодирующей областью *lacZ*, таким образом, что продуцируется слитый белок; векторы pIN (Inouye and Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109 (1985); Van Heeke and Schuster, *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509 (1989)); и тому подобное. Векторы pGEX также можно использовать для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион-S-трансферазой (GST). В целом, такие слитые белки являются растворимыми и могут быть легко очищены из лизируемых клеток посредством абсорбции и связывания с матриксными глутатион-агарозными частицами и затем элюированы в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX разработаны для включения сайтов расщепления тромбином и протеазой фактора Ха, так чтобы клонируемый продукт целевого гена мог быть высвобожден из GST-группировки.

Помимо прокариотов, также можно использовать эукариотические микроорганизмы. *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные пекарские дрожжи, наиболее

часто используются среди эукариотических микроорганизмов, хотя широко доступен ряд других штаммов, например, *Pichia pastoris*.

Для экспрессии в *Saccharomyces* обычно используется, например, плаزمида YRp7 (Stinchcomb et al, Nature 282:39 (1979); Kingsman et al, Gene 7: 141 (1979); Tschemper et al, Gene 10: 151 (1980)). Эта плазмида уже содержит ген TRP1, который обеспечивает селективный маркер для мутантного штамма дрожжей, лишенного способности расти в среде с триптофаном, например, ATCC № 44076 или PEP4-1 (Jones, Genetics 85: 12 (1977)). Наличие повреждения *trp1* как характеристики генома дрожжевой клетки-хозяина обеспечивает эффективную среду для обнаружения трансформации путем роста в отсутствие триптофана.

В системе насекомых вирус ядерного полиэдроза *Autographa California* (AcNPV) обычно используется в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов. Вирус выращивают в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодированная Fab последовательность может быть клонирована отдельно в несущественные области (например, ген полиэдрина) вируса и помещена под контроль промотора AcNPV (например, промотора полиэдрина).

После рекомбинантной экспрессии Fab по настоящему изобретению его можно очистить любым известным в данной области техники способом для очистки молекулы иммуноглобулина, например, с помощью хроматографии (например, ионообменной, аффинной, в частности, аффинной к специфическому антигену после белка А, и гель-фильтрационной хроматографии), центрифугирования, дифференциальной растворимости или любой другой стандартной методики очистки белков. Альтернативно, предпочтительный способ повышения аффинности антител по настоящему изобретению описан в публикации патентной заявки США № 2002 0123057 А1.

Способы лечения

Данное изобретение также относится к способам лечения, включающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества Fab к TSLP или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых случаях способ предназначен для лечения патологических состояний, связанных с TSLP.

Данное изобретение также относится к Fab к TSLP или фармацевтическим композициям, описанным в данном документе, для применения в терапии. В некоторых случаях терапия представляет собой лечение патологического состояния, связанного с TSLP.

Данное изобретение также относится к применению Fab к TSLP или фармацевтических композиций при производстве лекарственного препарата для

применения в лечении заболевания. В некоторых случаях заболевание представляет собой патологическое состояние, связанное с TSLP.

Данное изобретение также относится к применению Fab к TSLP или фармацевтических композиций в терапии. В некоторых случаях терапия представляет собой лечение патологического состояния, связанного с TSLP.

В некоторых случаях патологическое состояние, связанное с TSLP, представляет собой воспалительное состояние, связанное с TSLP. В некоторых случаях воспалительное состояние, связанное с TSLP, выбрано из астмы, сепсиса, септического шока, атопического дерматита, аллергического ринита, аллергического риносинусита, аллергического конъюнктивита, эозинофильного эзофагита, ревматоидного артрита, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), астмы, перекрестного синдрома «астма-ХОБЛ» (ACOS), хронического бронхита, эмфиземы, хронического риносинусита с полипами полости носа или без них, васкулита, РТПХ, увеита, хронической идиопатической крапивницы, синусита или панкреатита.

В некоторых случаях воспалительное состояние, связанное с TSLP, представляет собой астму.

Астма представляет собой сложное и гетерогенное воспалительное заболевание дыхательных путей, характеризующееся вариабельными и повторяющимися симптомами, обратимой обструкцией дыхательных путей и бронхоспазмом.

Симптомы астмы могут включать хрипы, кашель, сдавленность в груди и одышку. Симптомы могут быть вызваны воздействием аллергенов или раздражителей. Астму можно классифицировать как атопическую (экзогенную) или неатопическую (эндогенную) в зависимости от того, вызваны ли симптомы аллергенами (атопическая) или нет (неатопическая). Обострение при остром течении астмы обычно называют «приступом астмы». Другие проявления, которые могут возникать во время приступа астмы, включают напряжение вспомогательных дыхательных мышц (грудино-ключично-сосцевидной и лестничной мышц шеи), может наблюдаться парадоксальный пульс (пульс, который ослабевает на вдохе и усиливается на выдохе), а также гиперинфляция грудной клетки. Синий цвет кожи и ногтей может возникнуть из-за недостатка кислорода. В дополнение к этим положительным терапевтическим ответам, субъект, проходящий лечение Fab к TSLP, может испытывать положительный эффект или улучшение одного или более из этих симптомов, связанных с заболеванием.

Клинический ответ можно оценить с помощью методов скрининга, таких как магнитно-резонансная томография (МРТ), рентгеновская томография, компьютерная

томография (КТ), проточная цитометрия или сортировка клеток с активированной флуоресценцией (FACS), гистология, макропатология и биохимический анализ крови, включая, помимо прочего, изменения, выявляемые с помощью ELISA, RIA, хроматографии и т. п.

Описанный в данном документе Fab можно использовать в сочетании с любой известной терапией воспалительных заболеваний, включая любой агент или комбинацию агентов, которые, как известно, полезны или которые использовались или используются в настоящее время для лечения воспалительных заболеваний, например, астмы или ХОБЛ. Иллюстративные активные агенты, которые можно вводить в сочетании с Fab, описанным в данном документе, включают, помимо прочего, ингаляционные кортикостероиды (ICS), бронходилататоры (включая бета-агонисты длительного действия (LABA), антимускариновые антагонисты длительного действия (LAMA), бета-агонист короткого действия (SABA) и мускариновые β_2 -агонисты (MABA)), антигистаминные препараты, антилейкотриены, ингибиторы PDE-4, ингибиторы янус-киназы и ингибиторы фосфоинозитид-3-киназы.

Термин «комбинация» относится либо к фиксированной комбинации в единичной дозированной форме, либо к комбинированному введению, при котором Fab к TSLP и партнер по комбинации (например, другое лекарственное средство, также называемое «терапевтическим агентом» или «совместно применяемым агентом») можно вводить независимо одновременно или отдельно в течение интервалов времени, особенно если эти интервалы времени позволяют партнерам по комбинации проявлять кооперативный, например, синергетический эффект. Отдельные компоненты могут быть упакованы в набор или по отдельности. Один или оба компонента (например, порошки или жидкости) могут быть восстановлены или разбавлены до желаемой дозы перед введением. Термины «совместное введение» или «комбинированное введение» и т. п., используемые в данном документе, предназначены для охвата введения выбранного партнера по комбинации одному субъекту, нуждающемуся в этом, (например, пациенту) и предназначены для включения схем лечения, в которых агенты не обязательно вводят одним и тем же путем или в одно и то же время. В контексте данного документа термин «фармацевтическая комбинация» означает продукт, полученный в результате смешивания или комбинирования более чем одного терапевтического агента, и включает как фиксированные, так и нефиксированные комбинации терапевтических агентов. Термин «фиксированная комбинация» означает, что терапевтические агенты, например и Fab к TSLP, и партнера по комбинации вводят пациенту одновременно в виде монопрепарата или дозы. Термин

«нефиксированная комбинация» означает, что терапевтические агенты, например, Fab к TSLP и партнера по комбинации, вводят пациенту как отдельные объекты либо одновременно, параллельно или последовательно, без конкретных ограничений по времени, причем такое введение обеспечивает терапевтически эффективные уровни двух соединений в организме пациента. Последнее также относится к коктейльной терапии, например, введение трех или более терапевтических агентов.

Термин «комбинированная терапия» относится к введению двух или более терапевтических агентов для лечения терапевтического состояния или расстройства, описанного в настоящем изобретении. Такое введение включает совместное введение этих терапевтических агентов по существу одновременно, например, в одной капсуле с фиксированным соотношением активных ингредиентов. Альтернативно такое введение включает совместное введение в нескольких или в отдельных контейнерах (например, таблетках, капсулах, порошках и жидкостях) для каждого активного ингредиента. Порошки и/или жидкости могут быть восстановлены или разбавлены до желаемой дозы перед введением. Кроме того, такое введение также включает последовательное применение каждого типа терапевтического агента либо приблизительно в одно и то же время, либо в разное время. В любом случае схема лечения будет обеспечивать благоприятные эффекты комбинации лекарственных средств при лечении патологических состояний или нарушений, описанных в данном документе.

Композиции

Fab к TSLP в медицинских целях и способах, описанных в данном документе, можно вводить субъекту в форме фармацевтической композиции.

В некоторых случаях любые ссылки в данном документе на «Fab к TSLP» могут также относиться к фармацевтической композиции, содержащей Fab к TSLP.

В некоторых случаях Fab к TSLP или его фармацевтическая композиция может вводиться человеку или другому животному в соответствии с вышеупомянутыми способами лечения/медицинского применения в количестве, достаточном для оказания терапевтического эффекта.

В некоторых случаях Fab к TSLP или его фармацевтическую композицию можно вводить такому человеку или другому животному в традиционной лекарственной форме, приготовленной путем объединения Fab к TSLP с обычным фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем в соответствии с известными методами.

Специалистам в данной области техники известно, что форма и характер фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя определяются количеством

активного ингредиента, с которым он должен быть объединен, способом введения и другими хорошо известными факторами.

В некоторых случаях фармацевтические композиции составляются так, чтобы они содержали фармацевтически приемлемый, нетоксичный, стерильный носитель, такой как физиологический раствор, нетоксичные буферы, консерванты и тому подобное. В некоторых случаях фармацевтическая композиция может включать стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Подходящие составы для применения в терапевтических способах, описанных в данном документе, описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16th ed. (1980).

В некоторых случаях путь введения Fab к TSLP или его фармацевтической композиции может быть, например, пероральным, парентеральным, ингаляционным или местным. В некоторых случаях в контексте данного документа термин «парентеральный» включает, например, внутривенное, внутриартериальное, внутривнутрибрюшинное, внутримышечное, подкожное, ректальное или вагинальное введение.

В некоторых случаях Fab к TSLP или его фармацевтическую композицию можно вводить посредством назального аэрозоля или ингаляции.

В некоторых случаях перечисленные в данном документе компоненты для получения указанной фармацевтической композиции могут быть упакованы и проданы в виде набора. В некоторых случаях такой набор будет иметь этикетки или листки-вкладыши, указывающие, что соответствующие фармацевтические композиции могут применяться для лечения субъекта, страдающего от заболевания или нарушения или предрасположенного к нему.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Исследования стабильности проводили для тезепелумаба в 1 x ФСБ при 4°C или 45°C. Растворы, содержащие тезепелумаб в концентрации 1 мг/мл, хранили при каждом условии в течение двух недель.

Результаты показывают, что через 2 недели при 45°C (Фиг. 1) в D-ФСБ наблюдали 10-процентную потерю мономера. % потери мономера, % агрегации и % фрагментации рассчитывали путем количественного определения площади под кривой (AUC) по хроматограммам, полученным с помощью HP-SEC. В зависимости от объема элюирования пики были отнесены к мономерам, агрегатам или продуктам фрагментации. AUC может быть рассчитана с помощью стандартных аналитических инструментов, поставляемых с программным обеспечением для анализа HP SEC.

Был сконструирован Fab, содержащий определяющие комплементарные области тяжелых и легких цепей (CDR) тезепелумаба с множественными мутациями в домене CH1. Этот Fab обозначается в данном документе как Fab 1. Стабильность Fab 1 анализировали, как описано выше для тезепелумаба. Результаты приведены на Фиг. 2.

Неожиданно Fab 1 продемонстрировал улучшенные свойства стабильности в условиях «ускоренного старения» для исследований стабильности (1 x ФСБ при 45°C) при хранении при концентрации 0,8 мг/мл в течение двух недель.

Пример 2. Fab₁ связывается с TSLP человека и яванского макака с аффинностью в пиколярном диапазоне

Аффинность связывания Fab₁ с TSLP, определенная с помощью BIAcore

Специфичность и аффинность Fab 1 к рекомбинантным TSLP человека и яванского макака, экспрессируемым в клетках млекопитающих, определяли с использованием прибора Biacore 8K SPR (GE Healthcare, Литл-Чалфонт, Бакс, Великобритания).

Биосенсорные чипы C1 серии S, наборы для иммобилизации по аминокислотной группе, буферные растворы на основе HEPES и буферы для регенерации были получены от GE Healthcare и использовали в соответствии с инструкциями производителя. Для получения поверхностей со стрептавидином использовали лиофилизированный стрептавидин, восстановленный в D-ФСБ. Вкратце, стрептавидин разводили до 4 мкг*мл⁻¹ в 10 мМ ацетате натрия, pH 4,5, и ковалентно иммобилизовали на трех поверхностях проточной ячейки биосенсорного чипа C1 серии S с помощью стандартных методов иммобилизации по аминокислотной группе. Была получена конечная поверхность со стрептавидином в 170 единиц ответа (RU). Реагенты для иммобилизации по аминокислотной группе также использовали для получения контрольной поверхности без иммобилизованного стрептавидина, которая служила эталонной поверхностью внутри каждой проточной кюветы. Затем титровали меченный на N-конце биотинилированный TSLP (человека и яванского макака) на каждой поверхности со стрептавидином, чтобы обеспечить связывание <100 RU Fab1 при насыщении (R_{max}). Низкий уровень связывания аналита гарантировал минимизацию артефактов, вызванных транспортом масс, особенно в сочетании с относительно быстрыми скоростями анализа, 50 мкл*мин⁻¹, используемыми на этапах кинетических измерений. Разведения (многоцикловая кинетика) мономеризованного Fab1 (2-кратные разведения в буфере HBS-EP+ в диапазоне от 1,25 до 20 нМ) инъецировали при скорости потока 50 мкл*мин⁻¹ в течение 2 минут ассоциации и 10 минут диссоциации. Многократные инъекции только буфера производились в одних и тех же условиях на протяжении всего эксперимента, чтобы обеспечить возможность обработки окончательных наборов

сенсограмм с использованием двойного эталона.

Поверхность чипа полностью регенерировали путем пропускания двух 30-секундных импульсов 10 мМ глицина, рН 1,7. Аффинность связывания и кинетику определяли с использованием модели Ленгмюра 1:1.

Результаты, представленные в таблице 1, демонстрируют, что Fab₁ связывается с иммобилизованными TSLP человека и яванского макака с одинаковой аффинностью (в пределах 2 раз; 46 пМ и 88 пМ, соответственно).

Таблица 1. Аффинность Fab1 к TSLP человека и яванского макака с использованием VIAcore

Аналит	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
TSLP человека	2,39 E6	1,11 E-4	46,3
TSLP яванского макака	1,75 E6	1,55 E-4	88,4

Аффинность связывания определяют с помощью анализа кинетического исключения (KinExA).

Аффинность связывания Fab 1 в жидкой фазе (K_D) с TSLP человека и яванского макака также определяли с использованием прибора KinExA 3200 (Sapidyne Instruments, Бойсе, штат Айдахо, США), и полученные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения KinExA Pro версии 4.1.11. Методология KinExA была достаточно подробно описана (Darling and Brault, 2004).

Fab 1 предварительно смешивали с различными концентрациями каждого из TSLP человека и яванского макака до достижения равновесия (по меньшей мере 12 концентраций каждого TSLP человека и яванского макака получали с использованием метода 2-кратного серийного разведения). Затем количество свободного Fab 1 измеряли с помощью прибора KinExA путем захвата свободного Fab с помощью частиц, покрытых TSLP человека, отмывания несвязавшегося материала и обнаружения связанного Fab 1 флуориметрически с использованием коммерческого видоспецифического антитела (меченное Alexa Fluor 647 мышинное антитело, специфичное к человеческим тяжелой и легкой цепям, (Jackson Immunoresearch 209-605-088)). K_D Fab 1 для TSLP человека была получена путем глобальной аппроксимации 1:1 к трем наборам данных, полученным на основе титрования TSLP человека в растворах с фиксированной концентрацией Fab₁ до 1000 пМ (закрашенные ромбы), 500 пМ (перевернутые закрашенные треугольники) или 40 пМ (незакрашенные квадраты) (Фиг. 3). K_D Fab 1 для TSLP яванского макака была получена путем глобальной аппроксимации 1:1 к двум наборам данных, полученным на основе

титрования TSLP яванского макака в растворах с фиксированной концентрацией Fab₁ до 1000 пМ (закрашенные ромбы) или 40 пМ (незакрашенные квадраты) (Фиг. 4).

Количество свободного Fab 1, обнаруженного при каждой концентрации TSLP человека и яванского макака, было отображено на графике в зависимости от концентрации титруемого TSLP (Фиг. 3 и 4, соответственно). Для расчета равновесной константы диссоциации (K_D) использовали программу KinExA. Результаты, представленные в таблице 2, демонстрируют, что Fab₁ связывается с TSLP человека с аффинностью, в 1,7 раза большей, чем с TSLP яванского макака в свободном растворе.

Таблица 2. Аффинность Fab₁ к TSLP человека и яванского макака в жидкой фазе с использованием KinExA

Лиганд	Аффинность (K _D), пМ
TSLP человека	8,0 (95% ДИ 6,27-10,01 пМ)
TSLP яванского макака	13,6 (95% ДИ 9,07-19,22 пМ)

Пример 3. Fab1 и тезепелумаб связываются с TSLP со схожими характеристиками связывания

Характеристики связывания Fab 1 с TSLP человека непосредственно сравнивали с тезепелумабом.

Активность связывания Fab 1 *in vitro* определяли с помощью анализа связывания TSLP: мкАт, в котором используется метод гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF®, Cisbio International), основанный на гомогенном резонансном переносе энергии флуоресценции (FRET). Стрептавитин-криплат использовали для обнаружения биотинилированного TSLP. Вкратце, образцы немеченого Fab 1 титровались в анализе HTRF, для того чтобы они конкурировали с меченым DyLight тезепелумабом за связывание с биотинилированным His-Avi TSLP человека. Также был проведен конкурентный анализ с использованием немеченого тезепелумаба и тезепелумаба, меченого DyLight, в качестве положительного контроля.

Результаты демонстрируют, что Fab 1 конкурирует за связывание с huTSLP с тезепелумабом и связывается с TSLP человека с такой же активностью, как и тезепелумаб (IC₅₀: Fab₁ – 0,38 нМ; тезепелумаб – 0,23 нМ – Фиг. 5).

Пример 4. Fab 1 нейтрализует активность TSLP в анализе мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC)

Затем определяли, имеет ли связывание Fab 1 с TSLP функциональную блокирующую активность в анализе первичных клеток путем измерения индуцированного TSLP высвобождения CCL17 из PBMC после обработки Fab 1.

Кровь получали от здоровых доноров в рамках программы донорства крови, организованной компанией MedImmune, Кембридж, Великобритания. Мононуклеары периферической крови выделяли с помощью стандартной процедуры с использованием градиента фиколла. Вкратце, 20 мл крови, разведенной ФСБ (10 мл крови:30 мл ФСБ), наносили на 15 мл фиколла. Пробирки центрифугировали при 400 g в течение 40 минут при комнатной температуре без остановки. Слои PBMC собирали и клетки дважды промывали 50 мл ФСБ. PBMC подсчитывали с помощью гемоцитометра и трипанового синего для исключения мертвых клеток и ресуспендировали в культуральной среде (RPMI с 10% фетальной телячьей сыворотки и 1% пенициллина/стрептомицина) перед посевом в 96-луночный планшет. Клетки стимулировали TSLP (0,5 нг/мл) в присутствии TSLP-связывающего фрагмента антитела Fab₁ в течение 48 часов. Анализы также проводили с использованием TSLP-связывающего антитела тезепелумаба в качестве положительного контроля. Через 48 часов супернатанты удаляли и анализировали на выработку CCL17 с использованием R&D duoset ELISA в соответствии с протоколом производителя. Эксперименты проводились с использованием материала от шести доноров в трех независимых экспериментах.

Результаты демонстрируют, что Fab 1 ингибирует выработку CCL17 из PBMC с IC₅₀ 1,39 нМ (Фиг. 6).

Последовательности

SEQ ID NO:1 (тяжелая цепь Fab 1)

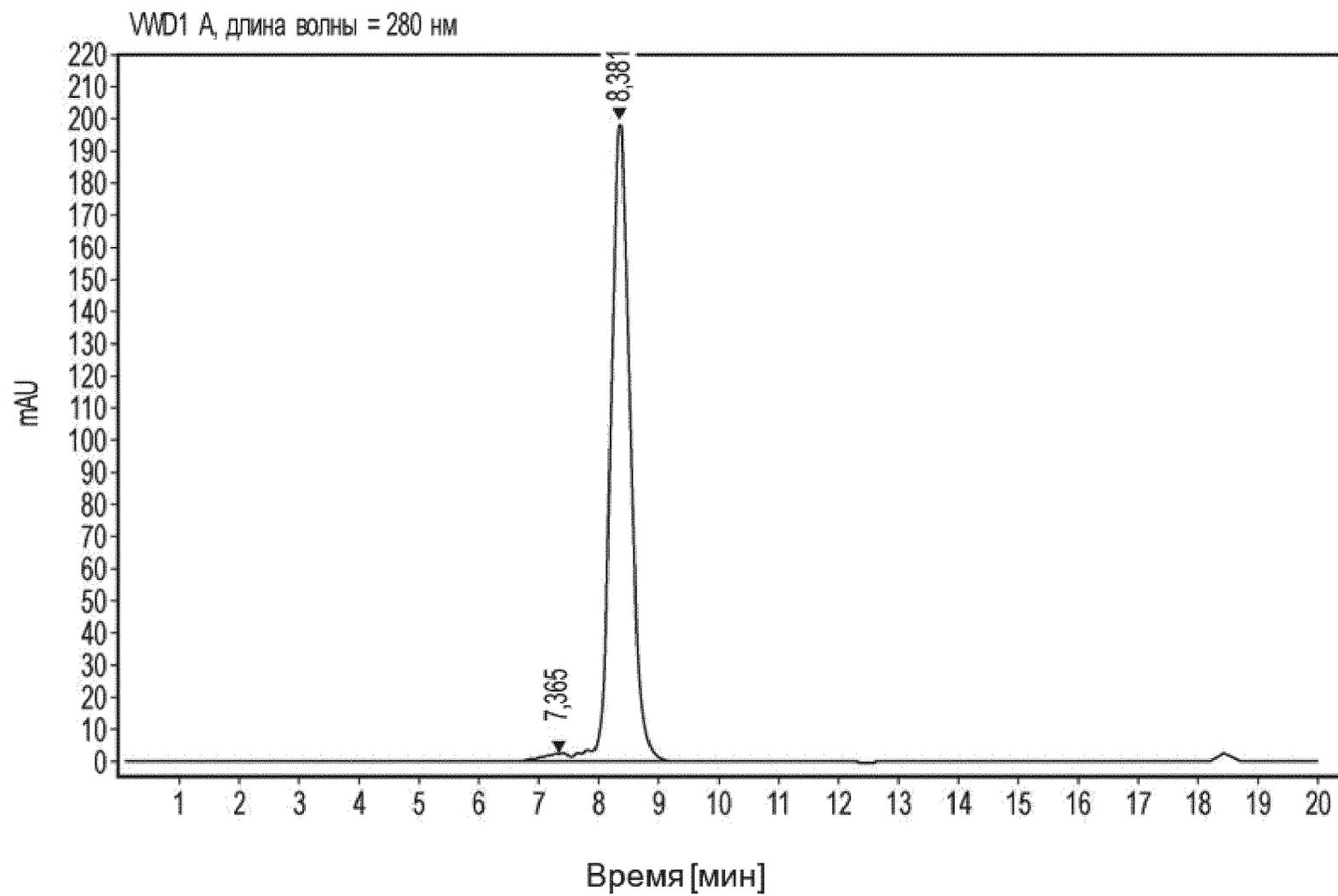
QMQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
 YDGSNKHYADSVKGRFTITRDNSKNTLNLQMNSLRAEDTAVYYCARAPQWELVHEAF
 DIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK

SEQ ID NO:2 (легкая цепь Fab 1)

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNLGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDDSDR
 PSWIPERFSGSNSGNTATLTISRGEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGQPK
 AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN
 NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

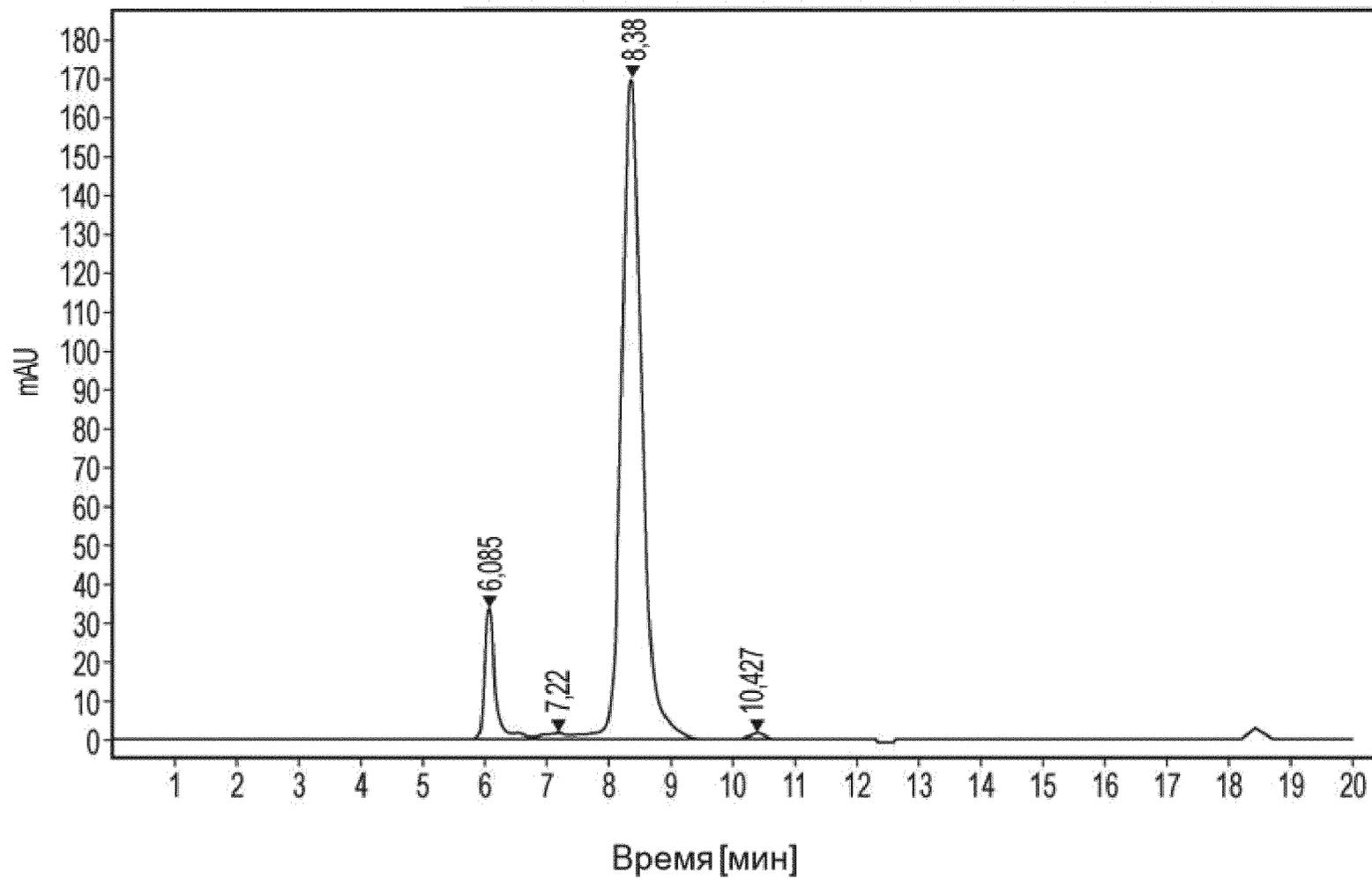
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Fab, содержащий тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:2.
2. Fab, содержащий тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:2.
3. Fab, содержащий тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:1, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:2.
4. Fab по любому из пп. 1–3, причем Fab представляет собой Fab IgG1.
5. Fab по любому из пп. 1–4, причем Fab является стабильным при 45°C в течение периода по меньшей мере двух недель.
6. Fab по п. 5, причем Fab является стабильным в 1 X ФСБ при концентрации 0,8 мг/мл.
7. Fab по любому из предшествующих пунктов, причем Fab демонстрирует потерю мономера менее 10% после инкубации при 45°C в 1 X ФСБ в течение 2 недель, при этом мономер определяют методом HP-SEC.
8. Фармацевтическая композиция, содержащая Fab по любому из пп. 1–7.
9. Нуклеиновая кислота, кодирующая Fab по любому из пп. 1–7.
10. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 9.
11. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 9 или вектор по п. 10.
12. Способ получения Fab по любому из пп. 1–7, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 7, экспрессию Fab и очистку Fab.
13. Fab, полученный с помощью способа по п. 12.
14. Fab по любому из пп. 1–7 для применения в терапии.
15. Fab по любому из пп. 1–7 для применения при лечении патологического состояния, связанного с TSLP.
16. Fab для применения по п. 15, отличающийся тем, что патологическое состояние, связанное с TSLP, представляет собой астму.



Фиг. 1А

VWD1 A, длина волны = 280 нм

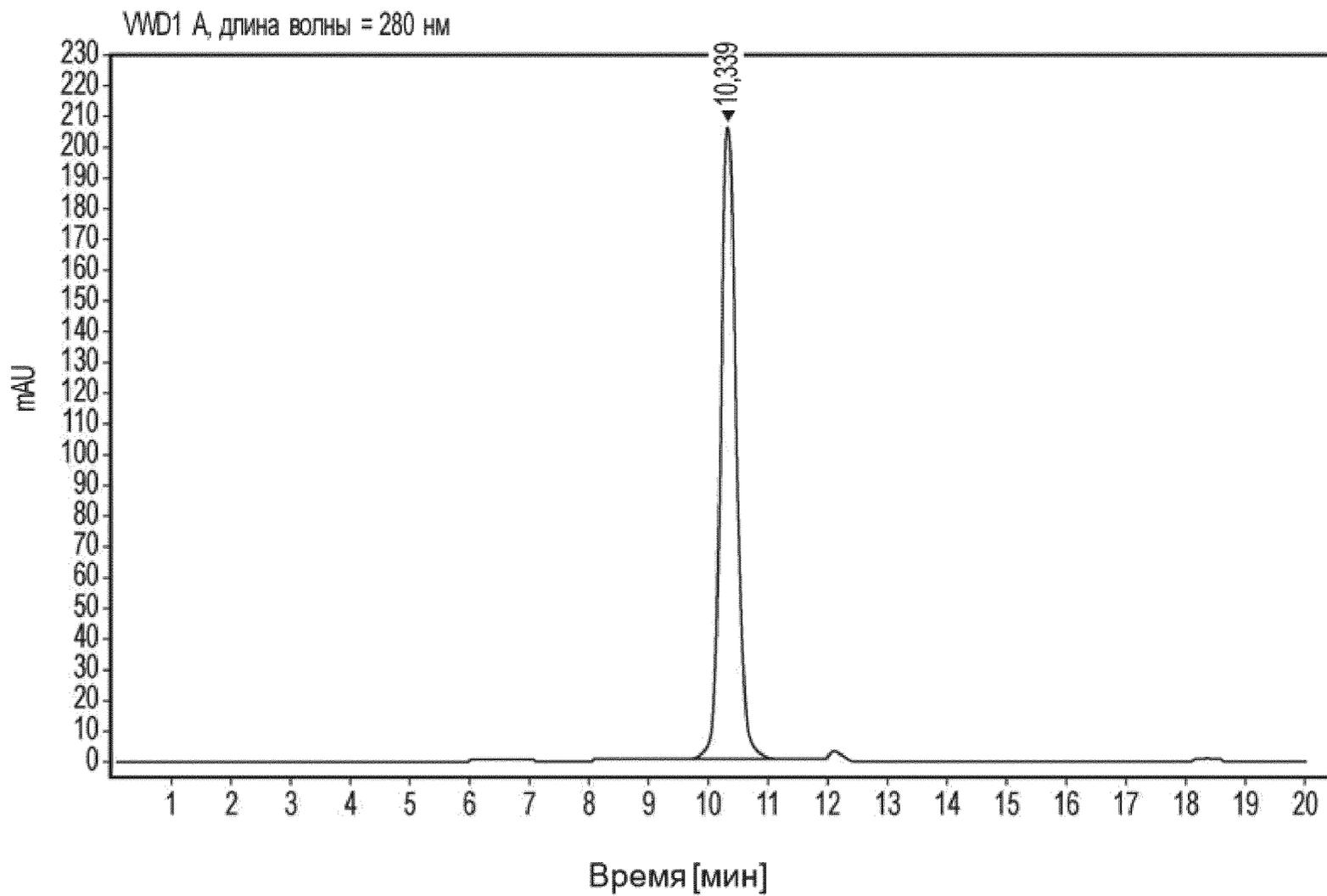


Время [мин]

Фиг. 1В

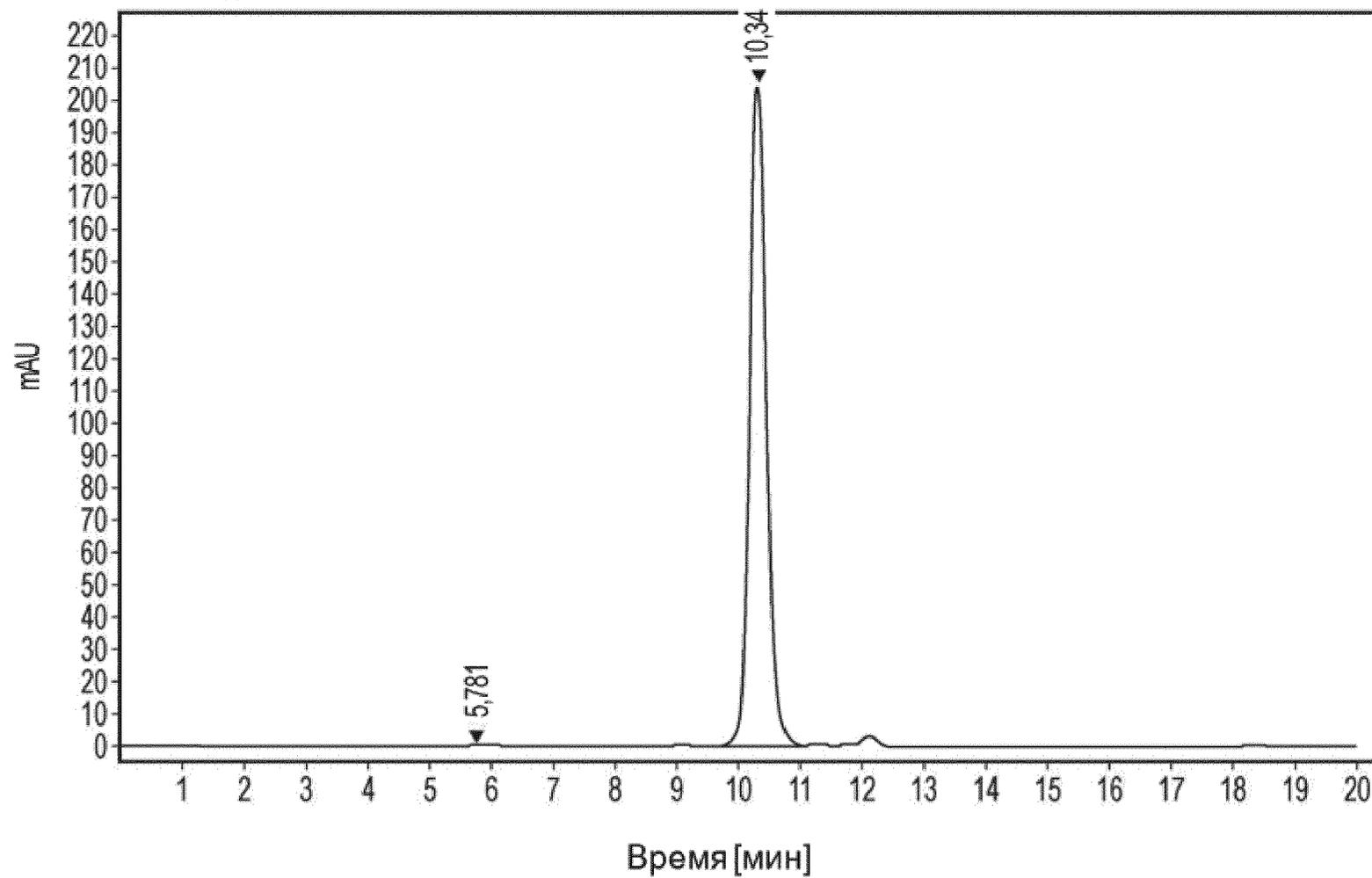
IgG	Удерживание мономера (мин)	T = 2 недели при 4°C в D-PBS в концентрации 1 мг/мл			T = 2 недели при 45°C в D-PBS в концентрации 1 мг/мл		
		% мономера	% агрегатов	% фрагмента	% потери мономера	% увеличения кол-ва агрегатов	% увеличения кол-ва фрагментов
hIgG2 Тезепелумаб	8,38	98,08	1,92	0	9,96	9,35	0,61
hIgG1 NIP228	8,32	99,35	0	0,65	0,89	0	0,89

Фиг. 1С



Фиг. 2А

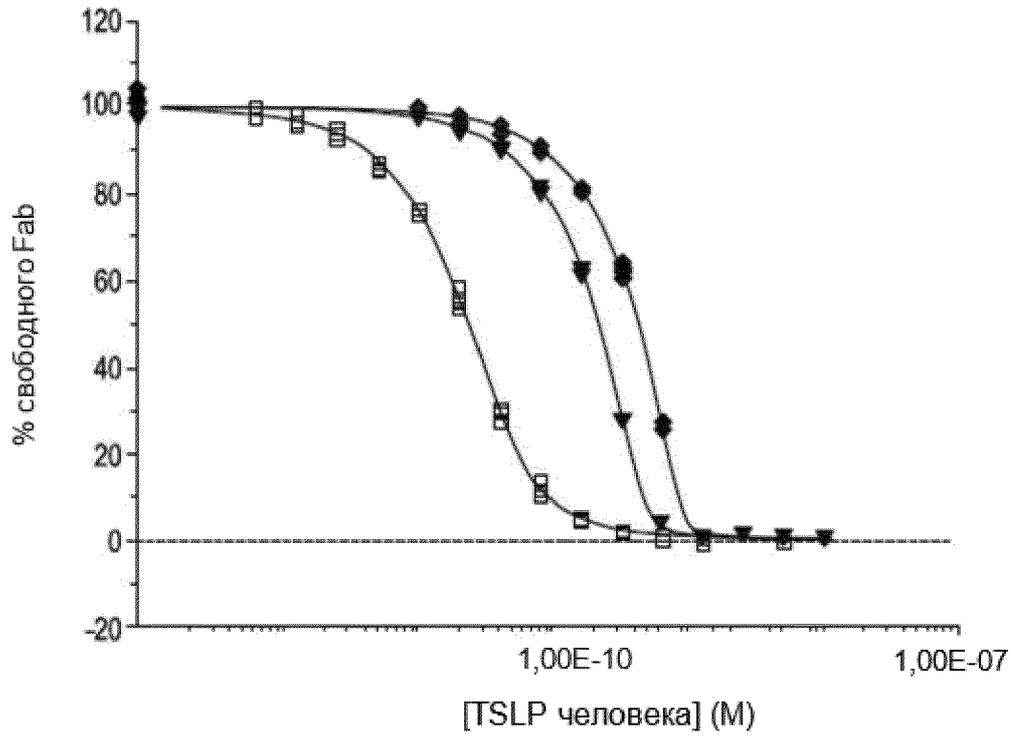
VWD1 A, длина волны = 280 нм



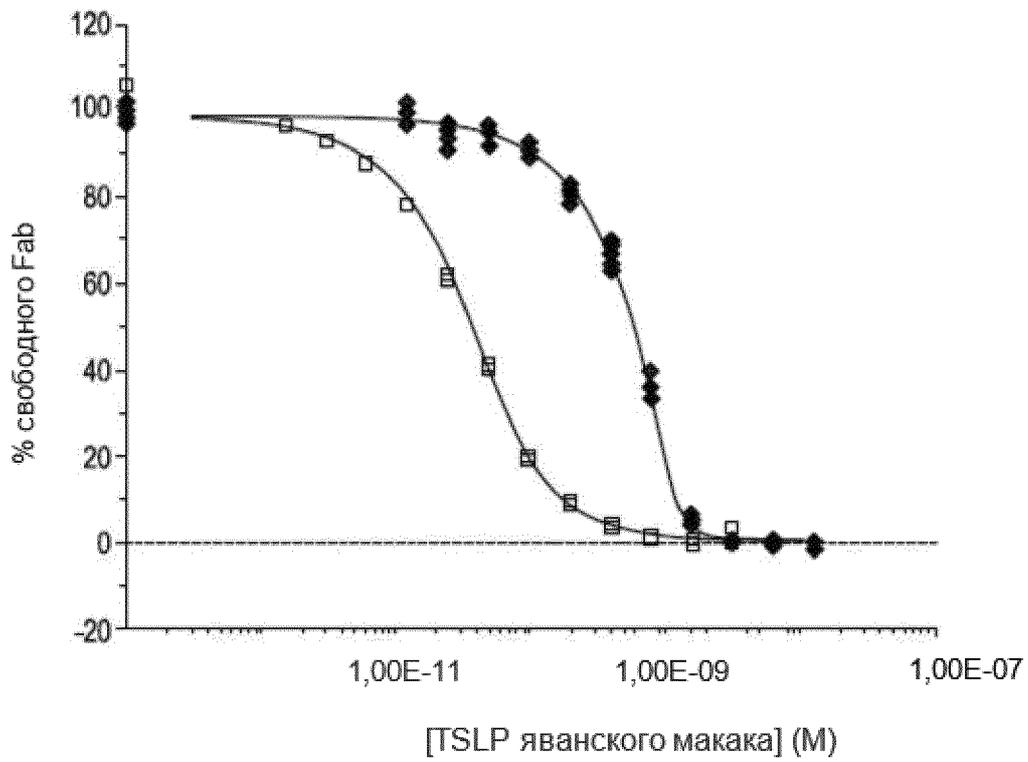
Фиг. 2В

IgG	Концентрация (мг/мл)	Удерживание мономера (мин)	T = 2 недели при 4°C в D-PBS			T = 2 недели при 45°C в D-PBS		
			% мономера	% агрегатов	% фрагмента	% потери мономера	% увеличения кол-ва агрегатов	% увеличения кол-ва фрагментов
Fab 1	0,76	10,3	100	0	0	0,23	0,23	0
Fab R347	0,46	10,3	100	0	0	0	0	0

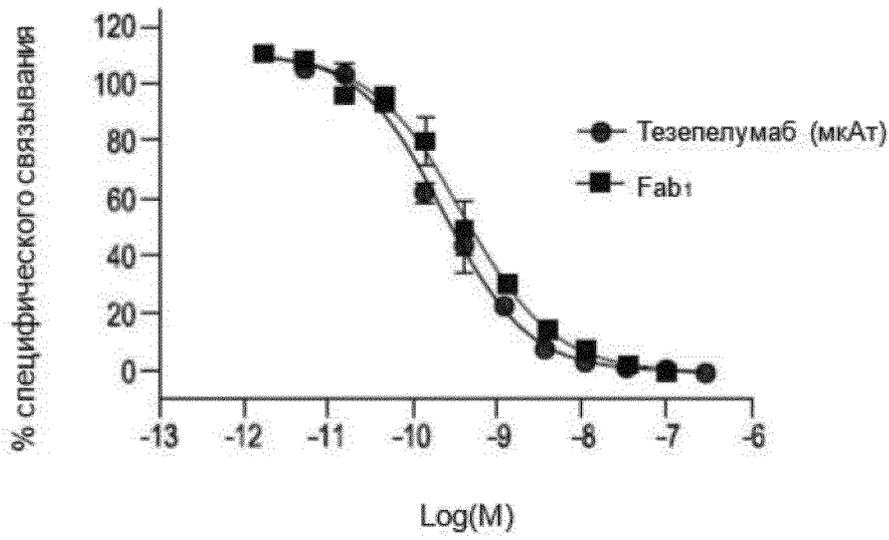
Фиг. 2С



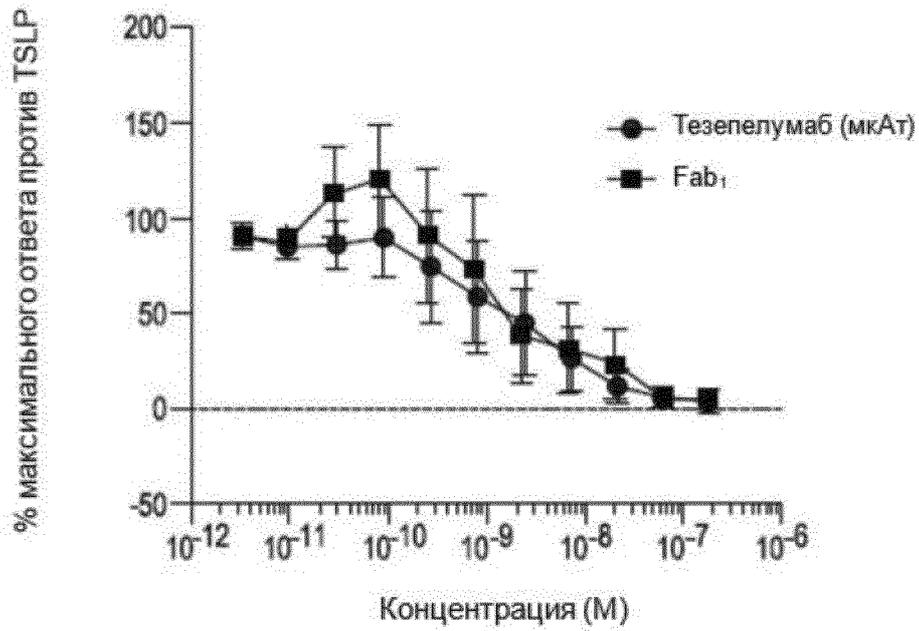
ФИГ. 3



ФИГ. 4



Фиг. 5



Фиг. 6