

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **048285**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.11.15**

(21) Номер заявки  
**202190264**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.07.19**

(51) Int. Cl. **C07K 1/16** (2006.01)  
**C07K 1/26** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**G01N 27/447** (2006.01)

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ АНТИТЕЛ ПРОТИВ FCRN**

---

(31) **62/701,367**

(32) **2018.07.20**

(33) **US**

(43) **2021.05.20**

(86) **PCT/US2019/042615**

(87) **WO 2020/018910 2020.01.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**МОМЕНТА ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Уошберн Натаниэл Дж., Лайвосз  
Анета, Хан Назир, Чжан Чжунли,  
Шифрин Майкл (US)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) **US-A1-20180016334  
WO-A1-2018023136  
US-A1-20140308206**

---

(57) Изобретение относится к композициям, содержащим антитело против FcRn M281. Композиции включают полноразмерное, интактное антитело и его размерные варианты, не включающие две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела. Таким образом, фармацевтическая композиция M281 может включать антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где композиция содержит основной белковый компонент, имеющий молекулярную массу 140000-145000 Да, и минорный белковый компонент с молекулярной массой 118000-120000 Да.

---

**B1**

**048285**

**048285**

**B1**

### Область изобретения

Изобретение относится к композициям антител против Fc-рецепторов (FcRn).

#### Уровень техники

Многочисленные аутоиммунные и аллоиммунные заболевания опосредованы патогенными антителами. Стабильность, активность и транспорт патогенных антител зависят от неонатального Fc-рецептора (FcRn), трансмембранного белка типа I, функционирующего в качестве связывающего IgG и сывороточный альбумин внутриклеточного белка везикулярного транспорта. Например, многие фетальные и неонатальные иммунологические заболевания являются результатом переноса материнских антител от беременной женщины, в частности, беременной женщины с иммунологическим заболеванием, в плод с помощью неонатального Fc-рецептора (FcRn) человека в плаценте.

#### Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим антитело против FcRn, ("композиции M281"). Композиции включают полное, интактное антитело (т.е. антитело, имеющее две легкие цепи антитела и две тяжелые цепи антитела) и его варианты разного размера, не включающие две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела, а вместо этого включающие две тяжелые цепи антитела и только одну легкую цепь антитела. Таким образом, фармацевтическая композиция M281 может включать: антитело (LHNL), содержащее две тяжелые цепи, содержащие или состоящие из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и две легкие цепи, содержащие или состоящие из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, где композиция содержит основной белковый компонент, имеющий молекулярную массу 140000-145000 Да (например, 140500-143000 Да), и минорный белковый компонент с молекулярной массой 118000-120000 Да (например, от 119000 до 120000 Да или 119150-119350 Да), где основной компонент составляет по меньшей мере 80% (81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) по массе белка в композиции, и минорный компонент составляет по меньшей мере 0,8%, 1%, 2%, 3 мас.%, но не более 20% (19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4%) белка в композиции. Таким образом, например минорный белковый компонент с молекулярной массой 118000-120000 Да может составлять 0,8-2%, 1-2%, 0,8-3% или 1-4 мас.% белка в композиции.

В различных вариантах осуществления: основной белковый компонент составляет по меньшей мере 99 мас.% белка в композиции; минорный белковый компонент содержит вариант антитела, содержащий две тяжелые цепи и одну легкую цепь; вариант антитела содержит неспаренную тяжелую цепь (содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2), спаренную тяжелую цепь (содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2) и легкую цепь (содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1); где вариант антитела содержит неспаренную тяжелую цепь, содержащую полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, где С в положении 219 заменяют дегидроаланином; и минорный белковый компонент содержит: а) первый вариант антитела, содержащий неспаренную тяжелую цепь (содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2), спаренную тяжелую цепь (содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2) и легкую цепь (содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1); и б) второй вариант антитела, содержащий неспаренную тяжелую цепь, содержащую полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, где С в положении 219 заменяют дегидроаланином.

Настоящее изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции. Способ включает: получение композиции антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; определение того, содержит ли композиция основной белковый компонент, имеющий молекулярную массу 140000-145000 Да (например, 140500-143000 Да), и минорный белковый компонент с молекулярной массой 118000-120000 Да (например, от 119000 до 120000 Да или 119150-119350 Да); комбинирование композиции с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами для получения фармацевтической композиции, только если композиция содержит основной белковый компонент, имеющий молекулярную массу 140000-145000 Да (например, 140500-143000 Да), и минорный белковый компонент с молекулярной массой 118000-120000 Да (например, от 119000 до 120000 Да или 119150-119350 Да).

В различных аспектах способа полученная фармацевтическая композиция содержит 28-32 мг/мл антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; полученная фармацевтическая композиция содержит 9-11 мг/мл антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; способ дополнительно включает комбинирование композиции с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами для получения фармацевтической композиции, только если основной компонент составляет по меньшей мере 90 мас.% белка в композиции, и минорный компонент составляет по меньшей мере 3 мас.% белка в композиции; стадию определения, включающую электрофорез или хроматографию; и стадию получения, включающую культивирование клеток, экспрессирующих тяжелую цепь и легкую цепь.

Если не указано иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют значение, общепринято понятное специалисту в области, к которой принадлежит изобретение. Способы и материалы представлены в настоящем описании для использования в настоящем изобретении; также можно использовать другие подходящие способы и материалы, известные в этой области. Материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными, а не ограничивающими. Все публикации, патентные заявки, патенты, последовательности, записи в базах данных и другие ссылки, упомянутые в настоящем описании, включены в него в полном объеме в качестве ссылки. В случае противоречия настоящее описание, включая определения, будет обладать приоритетом.

Другие признаки и преимущества изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и фигур, а также формулы изобретения.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1 показана типичная электрофореграмма капиллярного электрофореза (CE-SDS) композиции M281 в невосстановительных условиях; преобладающий интактный IgG помечали как (2) и размерный вариант помечали как (1).

На фиг. 2 показаны репрезентативные данные о композиции M281, анализируемой посредством жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий, сопряженной с масс-спектрометрией (HILIC LC-MS); (A) УФ-хроматограмма композиции M281, анализируемой посредством жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий, где преобладающую легкую-тяжелую-тяжелую-легкую цепь помечали как (2) и размерный вариант помечали как (1); (B) хроматограмма основных пиков при масс-спектрометрии, где преобладающую легкую-тяжелую-тяжелую-легкую цепь помечали как (2) и размерные варианты помечали как (1a, время удержания 12,42 мин; 1b, время удержания 12,68 мин).

На фиг. 3A, 3B показаны типичные результаты масс-спектрометрии выбранных фракций, выделенных посредством жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий; (A) показаны результаты масс-спектрометрии фракции, содержащей показанное на фиг. 2(1a); (B) показаны результаты масс-спектрометрии фракции, содержащей показанное на фиг. 2(1b).

На фиг. 4 показана схема пептида, содержащего дисульфидный мостик, подвергаемого расщеплению трипсином, а затем подвергаемого  $\beta$ -элиминации при нагревании или восстановлении.

На фиг. 5 показана типичная электрофореграмма заряда (CE) композиции M281; основную изоформу элюировали между 3,03-3,13 мин и минорную изоформу элюировали между 3,23-3,31 мин.

На фиг. 6 показаны типичные массы выделенного образца, содержащего минорную изоформу (показанную на фиг. 5, фракцию, элюируемую между 3,23-3,31 мин), после анализа посредством разделения с помощью зонального электрофореза на микрочипе с прямой масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением.

На фиг. 7 показана схема способа, включающего разделение композиций посредством электрофореза в ПААГ с SDS, выделение выбранных размерных вариантов в каждой композиции посредством нарезки геля ПААГ с SDS, расщепление выделенных размерных вариантов трипсином и анализ массового распределения выделенных и расщепленных трипсином размерных вариантов способом Nano-LC-MS.

На фиг. 8 показаны химическое представление и молекулярные массы ожидаемых пептидов, полученных посредством расщепления трипсином (A) легкой-тяжелой-тяжелой-легкой цепи (LC-NC-NC-LC); (B) тяжелой-тяжелой-легкой цепи (NC-NC-LC); (C) тяжелой-тяжелой-легкой цепи с заменой дегидроаланином Cys219 на неспаренной тяжелой цепи.

На фиг. 9 показан количественный анализ межпочечной дисульфидной связи LC-NC-NC-LC (данные показаны синим цветом) и NC-NC-LC (данные показаны оранжевым цветом), оцениваемой для выделенных композиций, содержащих LC-NC-LC-NC, Cys-A, DeHA-A и Cys-NC-NC.

#### **Подробное описание**

Настоящее изобретение относится к новым композициям, содержащим антитело против неонатального Fc-рецептора человека (FcRn). Эти композиции можно использовать, например, для стимуляции клиренса аутоантител у индивидуума, супрессии презентации антигена у индивидуума, блокирования иммунного ответа (например, блокирования основанной на иммунных комплексах активации иммунного ответа у индивидуума) или лечения иммунологических заболеваний (например, аутоиммунных заболеваний) у индивидуума. В настоящем описании представлены композиции, содержащие указанные выше выделенное антитело и один или более размерных вариантов, где по меньшей мере 80% общего содержания белка конечной композиции составляет полностью собранная легкая-тяжелая-тяжелая-легкая цепь (LC-NC-NC-LC), имеющая молекулярную массу приблизительно от 140000 до 143000 (например, от 141750 до 141800) Да, и до 5% (4%, 3%, 2%, 1%, 0,8%) общего содержания белка составляют выбранные размерные варианты с меньшей молекулярной массой (например, от 118000 до 120000 Да).

Антитела против FcRn.

Антитела, которые можно составлять, как представлено в настоящем описании, включают антитело, имеющее последовательность легкой цепи

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTGSDVGSYNLVSQYQHPGKAPKLMYGDSEKPSGV  
 SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYAGSGIYVFGTGTQVTVLQPKAAPSVT  
 LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAAS  
 SYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 1)

и последовательность тяжелой цепи

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMGWVRQAPGKGLEWVSSIGASGSQT  
 RYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLAIGDSYWGQGTMTVTVSS  
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
 GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGG  
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
 ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR  
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK  
 SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 2).

Варианты этого антитела также можно составлять, как представлено в настоящем описании. Такие варианты включают: антитело, имеющее последовательность легкой цепи варианта SEQ ID NO: 1, имеющего 1-5 замен или делеций отдельных аминокислот (и, предпочтительно, содержащего последовательности CDR SEQ ID NO: 3-5), и последовательность тяжелой цепи варианта SEQ ID NO: 24, имеющего 1-5 замен или делеций отдельных аминокислот (и, предпочтительно, содержащего последовательности CDR SEQ ID NO: 6-8). Антитела, состоящие из варианта SEQ ID NO: 1 и варианта SEQ ID NO: 4, предпочтительно, сохраняют последовательности CDR M281:

TGTGSDVGSYNLVS (CDR1 легкой цепи; SEQ ID NO: 3);

GDSEKPS (CDR2 легкой цепи; SEQ ID NO: 4);

SSYAGSGIYV (CDR3 легкой цепи; SEQ ID NO: 5);

TYAMG (CDR1 тяжелой цепи; SEQ ID NO: 6);

SIGASGSQTRYADS (CDR2 тяжелой цепи; SEQ ID NO: 7) и

LAIGDSY (CDR3 тяжелой цепи; SEQ ID NO: 8).

В некоторых случаях легкая цепь имеет последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности в отношении

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTGSDVGSYNLVSQYQHPGKAPKLMYGDSE  
 RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYAGSGIYVFGTGTQVTVLQPKA  
 APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN  
 KYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 1).

В некоторых случаях тяжелая цепь имеет последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 95% или 98% идентичности в отношении

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMGWVRQAPGKGLEWVSSIGAS  
 GSQTRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLAIGDSYWGQGTMT  
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
 VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAP  
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
 REEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVY  
 TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK  
 LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 2).

В некоторых случаях антитело включает замены, добавления и/или делеции аминокислот в константных областях (например, Fc-области) антитела, приводящие, например, к сниженной эффекторной функции, например, снижению комплемент-зависимому цитолизу (CDC), антителозависимому клеточно-опосредованному цитолизу (ADCC) и/или антителозависимому клеточно-опосредованному фагоцитозу (ADCP) и/или снижению уничтожению В-клеток. Константные области напрямую не участвуют в связывании антитела с его мишенью, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной токсичности. В некоторых случаях антитело отличается сниженным связыванием (т.е. отсутствием связывания) с фактором комплемента C1q человека и/или Fc-рецептором на естественных киллерах (NK-клетках) человека. В других случаях антитело отличается

сниженным связыванием (т.е. отсутствием связывания) с FcγRI, FcγRIIA и/или FcγRIIIA человека. Для изменения или снижения антителозависимой эффекторной функции, такой как CDC, ADCC, ADCP и/или уничтожение В-клеток, антитела могут принадлежать к классу IgG и содержать одну или более замен аминокислот E233, L234, G236, D265, D270, E318, K320, K322, A327, A330, P331 и/или P329 (нумерация EU (Edelman et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63:78-85 (1969)) на всем протяжении описания, если не указано иначе). В некоторых случаях антитело имеет мутации L234A/L235A или D265A/N297A. В некоторых случаях антитело содержит замену аминокислоты A297N относительно последовательностей SEQ ID NO: 2, таким образом, что антитело заменено на гликозилированную форму. Ожидают, что антитела с гликозилированием по аминокислоте N297 будут связываться с комплементом или Fc-рецепторами (т.е. связываться с компонентом комплемента C1q), в то время как ожидают, что антитела с N297A (например, SEQ ID NO: 2) будут иметь очень низкое связывание с комплементом или Fc-рецепторами (т.е. связываться с компонентом комплемента C1q), что свидетельствует о низком потенциале CDC. В других случаях M281 содержит С-концевой лизин в положении остатка 446 относительно SEQ ID NO: 2. В некоторых случаях аминоконцевой Gln на легкой цепи является пирро-Gln.

Векторы, клетки-хозяева и получение антител.

Антитела против FcRn можно получать из клетки-хозяина. Термин "клетка-хозяин" относится к носителю, включающему необходимые клеточные компоненты, например, органеллы, необходимые для экспрессии полипептидов и конструкций, представленных в настоящем описании, с их соответствующих нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты можно включать в векторы нуклеиновой кислоты, которые можно встраивать в клетку-хозяина общепринятыми способами, известными в этой области (например, посредством трансформации, трансфекции, электропорации, осаждения фосфатом кальция, прямой микроинъекции, инфекции и т.д.). Выбор векторов нуклеиновой кислоты частично зависит от клеток-хозяев, подлежащих использованию. Как правило, предпочтительные клетки-хозяева имеют прокариотическое (например, бактерии) или эукариотическое (например, клетки млекопитающих) происхождение.

Конструкции вектора нуклеиновой кислоты и клетки-хозяева.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность антитела против FcRn, можно получать различными известными в этой области способами. Эти способы включают, в качестве неограничивающих примеров, олигонуклеотид-опосредованный (или сайт-специфический) мутагенез и ПЦР-мутагенез. Молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело против FcRn, можно получать стандартными способами, например, посредством синтеза гена. Альтернативно, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело против FcRn дикого типа, можно подвергать мутагенезу так, чтобы она содержала конкретные замены аминокислот, стандартными способами, известными в этой области, например, мутагенезу QuikChange™. Молекулы нуклеиновой кислоты можно синтезировать с использованием нуклеотидного синтезатора или способов ПЦР.

Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие антитело против FcRn, можно встраивать в вектор, способный реплицироваться и экспрессировать молекулы нуклеиновой кислоты в прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах. В этой области доступно множество векторов, и их можно использовать. Каждый вектор может содержать различные компоненты, которые можно корректировать и оптимизировать для совместимости с конкретной клеткой-хозяином. Например, компоненты вектора могут включать, в качестве неограничивающих примеров, участок начала репликации, ген селективного маркера, промотор, участок связывания рибосомы, сигнальную последовательность, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую интересующий белок, и последовательность терминации транскрипции.

В качестве клеток-хозяев можно использовать клетки млекопитающих. Примеры типов клеток млекопитающих включают, в качестве неограничивающих примеров, эмбриональные клетки почки человека (HEK) (например, HEK293, HEK293F), клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки HeLa, COS, PC3, Vero, MC3T3, NSO, Sp2/0, VERY, BHK, MDCK, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, T47D, NSO (линию клеток миеломы мыши, непродуцирующих эндогенно какие-либо цепи иммуноглобулинов), CRL7030 и HsS78Bst. В других случаях в качестве клеток-хозяев можно использовать клетки *E. coli*. Неограничивающие примеры штаммов *E. coli* включают *E. coli* 294(ATCC® 31,446), *E. coli* λ 1776(ATCC® 31,537), *E. coli* BL21 (DE3)(ATCC® BAA-1025) и *E. coli* RV308(ATCC® 31,608). Различные клетки-хозяева имеют характерные и специфические механизмы посттрансляционного процессинга и модификации белковых продуктов. Подходящие линии клеток или системы хозяев можно выбирать для обеспечения правильной модификации и процессинга экспрессируемого антитела против FcRn. Описанные выше экспрессирующие векторы можно встраивать в подходящие клетки-хозяева общепринятыми способами, известными в этой области, например, посредством трансформации, трансфекции, электропорации, осаждения фосфатом кальция и прямой микроинъекции. После встраивания векторов в клетки-хозяева для продукции белка клетки-хозяева культивируют в общепринятых питательных средах, модифицированных, при необходимости, для индуцирования промоторов, селекции трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности. Способы экспрессии терапевтических белков известны в этой области, см., например, Paulina Balbas, Argelia Lorence (eds.) Recombinant Gene

Expression: Reviews and Protocols (Methods in Molecular biology), Humana Press; 2<sup>nd</sup> ed. 2004 (July 20, 2004) и Vladimir Voynov and Justin A. Caravella (eds.) Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular biology) Humana Press; 2<sup>nd</sup> ed. 2012 (June 28, 2012).

Продукция белка, выделение и очистка.

Клетки-хозяева, используемые для получения антитела против FcRn, можно выращивать в средах, известных в этой области и подходящих для культивирования выбранных клеток-хозяев. Примеры подходящих сред для клеток-хозяев млекопитающих включают минимальную питательную среду (MEM), модифицированную по способу Дульбекко среду Игла (DMEM), экспрессионную среду Expi293™, DMEM, дополненную эмбриональной телячьей сывороткой (FBS), и RPMI-1640. Примеры подходящих сред для бактериальных клеток-хозяев включают бульон Луриа (LB) с необходимыми добавками, такими как средство для селекции, например, ампициллин. Клетки-хозяева культивируют при подходящих температурах, например, от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C, например, от 25°C до приблизительно 37°C, предпочтительно 37°C, и уровнях CO<sub>2</sub>, например, от 5 до 10% (предпочтительно, 8%). pH среды составляет, как правило, приблизительно от 6,8 до 7,4, например, 7,0, в зависимости, в основном, от организма-хозяина. Если в экспрессирующем векторе используют индуцибельный промотор, экспрессию белка индуцируют в условиях, подходящих для активации промотора.

Выделение белка, как правило, включает разрушение клетки-хозяина, как правило, посредством осмотического шока, обработки ультразвуком или лизиса. После разрушения клеток, клеточный детрит можно удалять посредством центрифугирования или фильтрации. Белки можно очищать дополнительно. Антитело против FcRn можно очищать любым известным в этой области способом очистки белков, например, посредством аффинной хроматографии с протеином А, другого способа хроматографии (например, ионообменной, аффинной и эксклюзионной хроматографии), центрифугирования, дифференциальной растворимости или любым другим стандартным способом очистки белков (см. Process Scale Purification of Antibodies, Uwe Gottschalk (ed.) John Wiley & Sons, Inc., 2009). В некоторых случаях антитело против FcRn можно конъюгировать с маркерными последовательностями, такими как пептид, для облегчения очистки. Примером маркерной аминокислотной последовательности является гекса-гистидиновый пептид (His-метка), связывающийся с функционализированной никелем агарозной аффинной колонкой с микромолярной аффинностью. Другие пептидные метки, которые можно использовать для очистки, включают, в качестве неограничивающих примеров, гемагглютининовую метку ("НА"), соответствующую эпитопу, полученную из белка гемагглютинина вируса гриппа.

Способы лечения и показания.

Блокирование FcRn человека с помощью фармацевтических композиций содержащих антитела против FcRn, представленные в настоящем описании, могут приносить терапевтическую пользу при заболеваниях, запускаемых аутоантителами IgG. Способность блокады FcRn индуцировать общий катаболизм IgG и удаление множества видов аутоантител, небольших циркулирующих метаболитов или липопротеинов, позволяет получать способ расширения применимости и доступности стратегии удаления аутоантител для пациентов с запускаемой аутоантителами аутоиммунной патологии. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что доминантным механизмом действия антитела против FcRn может являться повышение катаболизма патогенных аутоантител в кровотоке и снижение накопления аутоантител и иммунных комплексов в пораженных тканях.

Фармацевтические композиции можно использовать для стимуляции катаболизма и клиренса патогенных антител, например, аутоантител IgG и IgG у индивидуума, для снижения иммунного ответа, например, для блокирования основанной на иммунных комплексах активации иммунного ответа у индивидуума, и для лечения иммунологических состояний или заболеваний у индивидуума. В частности, фармацевтические композиции можно использовать для снижения или лечения основанной на иммунных комплексах активации острого или хронического иммунного ответа. Острый иммунный ответ может активироваться заболеванием, выбранным из группы, состоящей из обыкновенной пузырчатки, волчаночного нефрита, миастении гравис, синдрома Гийена-Барре, антитело-опосредованного отторжения, антифосфолипидного синдрома (например, катастрофического антифосфолипидного синдрома), опосредованного иммунными комплексами васкулита, гломерулита, каналопатии, оптикомиелита, аутоиммунной потери слуха, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), аутоиммунной гемолитической анемии (АИНА), иммунной нейтропении, дилатационной кардиомиопатии и сывороточной болезни. Хронический иммунный ответ может активироваться заболеванием, выбранным из группы, состоящей из хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (СIDP), системной красной волчанки, хронической формы нарушения, являющегося показанием для неотложного лечения, реактивных артропатий, первичного билиарного цирроза, язвенного колита и ассоциированного с антителами к цитоплазме нейтрофилов (АНКА) васкулита.

В некоторых случаях фармацевтические композиции можно использовать для снижения или лечения иммунного ответа, активируемого аутоиммунным заболеванием. Аутоиммунное заболевание можно выбирать из группы, состоящей из гнездовой алопеции, анкилозирующего спондилита, антифосфолипидного синдрома, болезни Аддисона, гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, гепатита, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, кардиомиопатии, дерматита при целиакии, синдрома хронической ус-

талости и иммунной дисфункции, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, синдрома Чарга-Стросса, рубцующегося пемфигоида, ограниченной склеродермии (синдрома CREST), болезни Холодовых агглютининов, болезни Крона, дерматомиозита, дискоидной волчанки, первичной криоглобулинемии смешанного типа, фибромиалгии, фибромиозита, болезни Грейвса, тиреоидита Хашимото, гипотиреоза, воспалительного заболевания кишечника, аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, идиопатического легочного фиброза, IgA-нефропатии, инсулинзависимого диабета, ювенильного артрита, красного плоского лишая, системной красной волчанки, болезни Меньера, смешанного заболевания соединительной ткани, рассеянного склероза, пернициозной анемии, нодозного полиартериита, полихондрита, полигландулярных синдромов, ревматической полимиалгии, полимиозита, первичной агаммаглобулинемии, первичного билиарного цирроза, псориаза, болезни Рейно, синдрома Рейтера, ревматической лихорадки, ревматоидного артрита, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, синдрома мышечной скованности, болезни Такаясу, височного артериита, язвенного колита, увеита, витилиго и гранулематоза Вегенера.

В частности, фармацевтические композиции можно использовать для снижения или лечения иммунного ответа, активируемого при системной красной волчанке, антифосфолипидном синдроме, обыкновенной пузырчатке/буллезном пемфигоиде, ассоциированном с антителом к цитоплазме нейтрофилов (ANCA) васкулите, миастении гравис или оптикомиелите.

В некоторых случаях фармацевтические композиции можно использовать для снижения риска развития анемии плода. В некоторых случаях фармацевтические композиции можно использовать для снижения или устранения потребности в IUT (внутриутробном переливании крови). В некоторых случаях фармацевтические композиции и способы можно использовать для снижения или устранения потребности в антенатальном PP+IVIg, постнатальном переливании крови, IVIg и/или фототерапии.

В некоторых случаях фармацевтические композиции можно использовать для снижения или лечения иммунного ответа, активируемого аутоиммунным заболеванием. Аутоиммунное заболевание может быть выбрано из группы, состоящей из гнездной алопеции, анкилозирующего спондилита, антифосфолипидного синдрома, болезни Аддисона, гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, гепатита, болезни Бехчета, буллезного пемфигоида, кардиомиопатии, дерматита при целиакии, синдрома хронической усталости и иммунной дисфункции, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, синдрома Чарга-Стросса, рубцующегося пемфигоида, ограниченной склеродермии (синдрома CREST), болезни Холодовых агглютининов, болезни Крона, дерматомиозита, дискоидной волчанки, первичной криоглобулинемии смешанного типа, фибромиалгии, фибромиозита, болезни Грейвса, тиреоидита Хашимото, гипотиреоза, воспалительного заболевания кишечника, аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома, идиопатического легочного фиброза, IgA-нефропатии, инсулинзависимого диабета, ювенильного артрита, красного плоского лишая, системной красной волчанки, болезни Меньера, смешанного заболевания соединительной ткани, рассеянного склероза, пернициозной анемии, нодозного полиартериита, полихондрита, полигландулярных синдромов, ревматической полимиалгии, полимиозита, первичной агаммаглобулинемии, первичного билиарного цирроза, псориаза, болезни Рейно, синдрома Рейтера, ревматической лихорадки, ревматоидного артрита, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, синдрома мышечной скованности, болезни Такаясу, височного артериита, язвенного колита, увеита, витилиго и гранулематоза Вегенера.

В некоторых случаях фармацевтические композиции можно использовать для снижения или лечения иммунного ответа у плода или новорожденного. В некоторых случаях фармацевтические композиции и способы можно использовать для снижения или лечения иммунного ответа у плода или новорожденного, активируемого аутоиммунным заболеванием у беременной матери.

В частности, фармацевтические композиции можно использовать для снижения или лечения иммунного ответа, активируемого при системной красной волчанке, антифосфолипидном синдроме, обыкновенной пузырчатке/буллезном пемфигоиде, ассоциированном с антителами к цитоплазме нейтрофилов (ANCA) васкулите, миастении гравис или оптикомиелите. В некоторых случаях фармацевтические композиции можно использовать для снижения или лечения иммунного ответа у плода или новорожденного. В некоторых случаях фармацевтические композиции и способы можно использовать для снижения или лечения иммунного ответа, активируемого при системной красной волчанке, антифосфолипидном синдроме, обыкновенной пузырчатки/буллезном пемфигоиде, ассоциированном с антителами к цитоплазме нейтрофилов (ANCA) васкулите, миастении гравис или оптикомиелите у беременной матери.

Фармацевтические композиции можно использовать в способах снижения транспорта патогенных антител (например, транспорта материнских патогенных антител IgG) через плаценту беременной женщины, повышения катаболизма патогенных антител у беременной женщины и лечения антителопосредованного усиления вирусного заболевания у плода или новорожденного посредством введения беременной женщине выделенного антитела, связывающегося с FcRn человека. Заболевания и нарушения, при которых можно получить пользу от ингибирования FcRn фармацевтическими композициями, представленными в настоящем описании, включают заболевания и нарушения у плода и/или новорожденного, вызванные переносом материнских патогенных антител (например, материнских патогенных антител IgG) через плаценту от беременной женщины плоду и/или новорожденному.

В некоторых случаях заболевания и нарушения, при которых можно получить пользу от лечения фармацевтическими композициями, представленными в настоящем описании, являются фетальными и неонатальными аллоиммунными и/или аутоиммунными нарушениями. Фетальные и неонатальные аллоиммунные нарушения являются нарушениями плода и/или новорожденного, вызванные патогенными антителами у беременной женщины. Патогенные антитела у беременной женщины могут атаковать антигены плода (например, антигены, которые плод наследует от отца), что вызывает развитие у плода или новорожденного фетального и неонатального аллоиммунного и/или аутоиммунного нарушения.

Примеры фетальных и неонатальных аллоиммунных и/или аутоиммунных нарушений, которые можно подвергать лечению, включают, в качестве неограничивающих примеров, фетальную и неонатальную аллоиммунную тромбоцитопению (FNAIT), гемолитическую болезнь плода и новорожденного (HDFN), аллоиммунную пан-тромбоцитопению, врожденную блокаду сердца, фетальный артрогрипоз, неонатальную миастению гравис, неонатальную аутоиммунную гемолитическую анемию, неонатальный антифосфолипидный синдром, неонатальный полимиозит, дерматомиозит, неонатальную системную красную волчанку, неонатальную склеродермию, болезнь Бехчета, неонатальную болезнь Грейвса, неонатальную болезнь Kawasaki, неонатальное аутоиммунное заболевание щитовидной железы и неонатальный сахарный диабет I типа.

В некоторых случаях заболевания и нарушения, при которых можно получить пользу от лечения фармацевтическими композициями, представленными в настоящем описании, являются вирусными заболеваниями, где антитела облегчают проникновение вируса в клетки-хозяева, что приводит к повышенной или усиленной инфективности в отношении клеток, например, антитело-опосредованному усилению вирусного заболевания. В некоторых случаях антитело может связываться с вирусным поверхностным белком, и комплекс антитело/вирус может связываться с FcRn на поверхности клетки посредством взаимодействия между антителом и рецептором. Затем комплекс антитело/вирус может интернализироваться в клетку. Например, вирус может проникать в клетки и/или ткани плода посредством образования комплекса с материнским антителом IgG. Материнское антитело IgG может связываться с вирусным поверхностным белком, и комплекс IgG/вирус может связываться с FcRn в синцитиотрофобластах плаценты, который затем переносит комплекс в плод.

В некоторых случаях фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, можно использовать для лечения антитело-опосредованного усиления вирусного заболевания. В некоторых случаях вирусные заболевания, усиливаемые патогенными антителами (например, патогенными антителами IgG), включают, в качестве неограничивающих примеров, вирусные заболевания, вызываемые инфекцией альфа-вирусов, инфекцией флавивирусов, инфекцией вируса Зика, инфекцией вируса чикунгунья, инфекцией вируса реки Росс, инфекцией коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома, ближневосточным респираторным синдромом, инфекцией птичьего гриппа, инфекцией вируса гриппа, инфекцией респираторно-синцитиального вируса человека, инфекцией вируса Эбола, инфекцией вируса желтой лихорадки, инфекцией вируса денге, инфекцией вируса иммунодефицита человека, инфекцией респираторно-синцитиального вируса, инфекцией хантавируса, инфекцией вируса Гета, инфекцией вируса Синдбис, инфекцией вирусов Буньямвера, инфекцией вируса лихорадки Западного Нила, инфекцией вируса японского энцефалита В, инфекцией вируса оспы кроликов, инфекцией вируса, повышающего лактатдегидрогеназу, инфекцией реовирусами, инфекцией вируса бешенства, инфекцией вируса ящура, инфекцией вируса свиного репродуктивного и респираторного синдрома, инфекцией вируса геморрагической лихорадки обезьян, инфекцией вируса инфекционной анемии лошадей, инфекцией вируса артрита-энцефалита коз, инфекцией вируса африканской чумы свиней, инфекцией лентивирусов, инфекцией ВК-паповавируса, инфекцией вируса австралийского энцефалита, инфекцией энтеровируса, инфекцией цитомегаловируса, инфекцией пневмовирусов, инфекцией морбилливирусов и инфекцией вируса кори.

Блокирование FcRn человека с помощью антител против FcRn может приносить терапевтическую пользу при заболеваниях, запускаемых патогенными антителами (например, патогенными антителами IgG). Способность блокады FcRn индуцировать общий катаболизм патогенных антител и удаление множества видов патогенных антител без нарушения сывороточного альбумина, небольших циркулирующих метаболитов или липопротеинов позволяет получать способ расширения применимости и доступности стратегии удаления патогенных антител для пациентов с аутоиммунной патологией, запускаемой патогенными антителами. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что доминантным механизмом действия антитела против FcRn может являться повышение катаболизма патогенных антител в кровотоке и снижение накопления патогенных антител и иммунных комплексов в поврежденных тканях.

Фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, можно вводить беременной женщине, имеющей риск развития заболевания, активирующего иммунный ответ у беременной женщины. В некоторых случаях беременная женщина в прошлом могла иметь заболевание, активирующее иммунный ответ у беременной женщины. В некоторых случаях беременная женщина имеет анамнез, включающий плод или новорожденного, имевшего фетальное и неонатальное аллоиммунное и/или аутоиммунное нарушение. В некоторых случаях антитела против FcRn, представленные в настоящем описании, можно вводить беременной женщине, если патогенное антитело, ассоциированное с иммунным заболеванием, определяют в биологическом образце (например, образце крови или мочи), полученном от

беременной женщины. В некоторых случаях известно, что патогенное антитело, определяемое в биологическом образце беременной женщины, связывается с антигеном плода беременной женщины (например, антигеном, который плод наследует от отца).

В некоторых случаях фармацевтические композиции можно вводить индивидууму, планирующему беременность, и имеющему риск развития заболевания, активирующего иммунный ответ у беременной женщины, и/или имевшему в прошлом заболевание, активирующее иммунный ответ у беременной женщины. В некоторых случаях индивидуум планирует беременность и имеет анамнез, включающий плод или новорожденного, имевшего фетальное и неонатальное аллоиммунное и/или аутоиммунное нарушение. В некоторых случаях антитела FcRn, представленные в настоящем описании, можно вводить индивидууму, планирующему беременность и биологический образец которого содержит патогенное антитело, ассоциированное с иммунным заболеванием.

В некоторых случаях фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, можно вводить индивидууму (например, беременной женщине) для снижения или лечения основанной на иммунных комплексах активации острого или хронического иммунного ответа у индивидуума. Острый иммунный ответ может активироваться при заболевании (например, обыкновенной пузырчатке, волчаночном нефрите, миастении гравис, синдроме Гийена-Барре, антитело-опосредованном отторжении, катастрофическом антифосфолипидном синдроме, опосредованном иммунными комплексами васкулите, гломерулите, каналопатии, оптикомиелите, аутоиммунной потере слуха, идиопатической тромбоцитопенической пурпуре, аутоиммунной гемолитической анемии, иммунной нейтропении, дилатационной кардиомиопатии, сывороточной болезни, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии, системной красной волчанке, реактивных артропатиях, первичном билиарном циррозе, язвенном колите или ассоциированном с антителами к цитоплазме нейтрофилов (ANCA) васкулите).

В некоторых случаях состав, представленный в настоящем описании, можно вводить индивидууму (например, беременной женщине) для снижения или лечения иммунного ответа, активирующегося при аутоиммунном заболевании. Аутоиммунное заболевание может являться, например, гнездой алопецией, анкилозирующим спондилитом, антифосфолипидным синдромом, буллезным эпидермолизом, мембранозной нефропатией, болезнью Аддисона, гемолитической анемией, аутоиммунной гемолитической анемией с синдромом тепловых агглютининов (wAИHA), антителамми против факторов свертывания, гепатин-индуцированной тромбоцитопенией (HCT), сенсibilизированным трансплантатом, аутоиммунным гепатитом, болезнью Бехчета, буллезным пемфигоидом, кардиомиопатией, дерматитом при целиакии, синдромом хронической усталости и иммунной дисфункции, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатией, синдромом Чарга-Стросса, рубцующимся пемфигоидом, ограниченной склеродермией (синдромом CREST), болезнью холодовых агглютининов, болезнью Крона, дерматомиозитом, дискоидной волчанкой, первичной криоглобулинемией смешанного типа, фибромиалгией, фибромиозитом, болезнью Грейвса, тиреоидитом Хашимото, гипотиреозом, воспалительным заболеванием кишечника, аутоиммунным лимфопролиферативным синдромом, идиопатическим легочным фиброзом, IgA-нефропатией, инсулинзависимым диабетом, ювенильным артритом, красным плоским лишаем, системной красной волчанкой, болезнью Меньера, смешанным заболеванием соединительной ткани, рассеянным склерозом, пернициозной анемией, нодозным полиартериитом, полихондритом, полигландулярными синдромами, ревматической полимиалгией, полимиозитом, первичной агаммаглобулинемией, первичным билиарным циррозом, псориазом, болезнью Рейно, синдромом Рейтера, ревматической лихорадкой, ревматоидным артритом, саркоидозом, склеродермией, синдромом Шегрена, синдромом мышечной скованности, болезнью Такаюсу, височным артериитом, язвенным колитом, увеитом, витилиго или гранулематозом Вегенера.

### Примеры

Настоящее изобретение дополнительно описано в следующих примерах, не ограничивающих объем изобретения, описанный в формуле изобретения.

В примерах, приведенных в настоящем описании, использовали следующие материалы и способы.

Материалы.

Получение M281. Культуру клеток, продуцирующих легкие и тяжелые цепи, очищали посредством центрифугирования и фильтрации с последующей инактивацией вируса посредством обработки детергентами. После инактивации вирусов материал наносили на колонку с протеином А для удаления технологических примесей (например, белков клетки-хозяина (НСР), ДНК и добавок для сред). Элюат наносили на анионообменную колонку и фильтр для удаления вируса. Дальнейшую фильтрацию через полиэфирсульфоновую мембрану с номинальной отсечкой по молекулярной массе 30 кДа осуществляли после удаления вируса и перед концентрированием и диафильтрацией с использованием буфера 25 мМ фосфата натрия и 25 мМ хлорида натрия при pH 6,5. Материал составляли посредством добавления трегалозы до конечной концентрации 8,7% мас./мас., и полисорбата 80 до конечной концентрации 0,01% мас./об. M281 разводили до целевой концентрации 30 мг/мл (диапазон 27-33 мг/мл) с буфера для составления (25 мМ фосфата натрия, 25 мМ хлорида натрия, 8,7% трегалозы, 0,01% мас./об., полисорбата 80, pH 6,5).

Пример 1. Определение размерных вариантов.

Размерные варианты воспроизводимо определяли в композициях, получаемых способами, представленными в настоящем описании, и содержащих антитело M281, анализируемое посредством капил-

лярного электрофореза в невосстановительных условиях с SDS (NR CE-SDS).

Результаты.

Композиции M281 получения и анализировали посредством NR CE-SDS. На электрофореграмме композиций M281, анализируемых посредством NR CE-SDS, наблюдали два отдельных пика - один пик с временем удержания 26-27 мин и другой пик с временем удержания 27,5-29 мин (фиг. 1). Последний из пиков соответствовал полностью собранной легкой-тяжелой-тяжелой-легкой цепи (LC-НС-НС-LC), в то время как первый пик соответствовал молекуле размерного варианта с более низкой массой по сравнению с тяжелой-тяжелой-легкой цепью (обозначаемой НС-НС-LC или ННЛ). Молекула размерного варианта, определяемая посредством NR CE-SDS, оставалась на уровне приблизительно 4,0-4,5% от общего содержания белка во время всех последующих стадий обработки, в партиях GMP DS и DP и во время исследования стабильности (данные не представлены). Кроме того, не наблюдали значимого изменения уровня этого размерного варианта, определяемого посредством NR CE-SDS, во время масштабирования от пилотного уровня 250 л до масштаба GMP 2000 л. Уровни этого размерного варианта. Образование размерного варианта в композициях M281 повышалось, когда композиции подвергали воздействию денатурирующих условий, таких как повышенная температура инкубации (например, от 37°C до 70°C) во время получения образца или перед анализом CE-SDS.

Пример 2. Характеризация молекулярных масс размерных вариантов, определяемых в композициях M281.

Для определения молекулярной массы размерных вариантов в композициях M281, их анализировали тремя способами, включая жидкостную хроматографию гидрофильных взаимодействий, сопряженную с масс-спектрометрией (HILIC LC-MS), разделение посредством зонального электрофореза на микрочипе с масс-спектрометрией с прямой ионизацией электрораспылением и расщепление белков трипсином в невосстановительных условиях, разделяемых посредством электрофореза в геле, с последующей наножидкостной хроматографией, сопряженной с масс-спектрометрией.

Результаты.

При анализе композиций M281 посредством HILIC LC-MS определяли пик, центрированный по времени удержания 12,5 мин на УФ-хроматограмме при разделении HILIC (фиг. 2A), разрешаемый посредством масс-спектрометрии на два вида - один пик, центрированный по времени удержания 12,42 мин, и другой пик, центрированный по времени удержания 12,68 мин (фиг. 2B). Распределение молекулярных масс для пиков с временем удержания 12,42 мин и 12,68 мин определяли посредством деконволюции массовых спектров для обоих пиков. При деконволюции массового спектра молекулы в пике при времени удержания 12,42 мин определяли множество размерных вариантов, включая доминантную молекулу массой 119277 Да (фиг. 3A). Указанная выше доминантная молекула массой 119277 Да была близка к теоретической массе 119177 Да для тяжелой-тяжелой-легкой цепи (обозначенной как НС-НС-LC или ННЛ) с дегидроаланином, замещающим цистеин в положении 219 в неспаренной тяжелой цепи, ожидаемого продукта Р-элиминации дисульфидной связи (фиг. 4). При деконволюции массового спектра молекул в пике при времени удержания 12,68 мин определяли множество размерных вариантов, включая доминантный вид массой 119329 Да (фиг. 3B). Указанный выше доминантный вид массой 119329 Да был близок к теоретической массе 119329 Да для тяжелой-тяжелой-легкой цепи (обозначаемой как НС-НС-LC или ННЛ) с цистеинилированной неспаренной тяжелой цепью.

Для дальнейшей характеристики молекулярных масс видов размерных вариантов в композициях M281, их анализировали посредством разделения с помощью зонального электрофореза на микрочипе (MZE) с масс-спектрометрией с прямой ионизацией электрораспылением (ESI-MS). На электрофореграмме разделения MZE наблюдали минорные кислые виды молекул с временем миграции приблизительно 3,23 мин (фиг. 5). При деконволюции массовых спектров молекул в пике, элюированном в области приблизительно 3,23 мин, определяли множество размерных вариантов, включая два доминантных вида молекул с молекулярными массами 119178 Да и 119332 Да. Указанные выше доминантные виды молекул были близки к теоретической массе 119177 Да для тяжелой-тяжелой-легкой цепи (ННЛ) с дегидроаланином, замещающим цистеин в положении 219 в неспаренной тяжелой цепи, и 119329 Да для тяжелой-тяжелой-легкой цепи (обозначенной как НС-НС-LC или ННЛ) с цистеинилированной неспаренной тяжелой цепью, соответственно.

Для дальнейшей характеристики молекулярных масс видов размерных вариантов в композициях M281, их разделяли посредством электрофореза в ПААГ с SDS, и две полосы, соответствующие легкой-тяжелой-тяжелой-легкой цепи и тяжелой-тяжелой-легкой цепи, вырезали из геля (как показано на фиг. 7). Выделенные фрагменты геля подвергали расщеплению трипсином в геле в невосстановительных условиях и полученные фрагменты анализировали посредством жидкостной нанохроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией (как показано на фиг. 7). Ожидаемые расщепленные трипсином пептиды и молекулярные массы показаны на фиг. 8 для легкой-тяжелой-тяжелой-легкой цепи, тяжелой-тяжелой-легкой цепи с цистеинилированной неспаренной тяжелой цепью и тяжелой-тяжелой-легкой цепи с дегидроаланином, замещающим цистеин в положении 219 (SEQ ID NO: 2) в неспаренной тяжелой цепи. Расщепленные трипсином пептиды, соответствующие последним двум видам молекул, определяли как доминантные виды в полосе при электрофорезе в ПААГ с SDS, соответствующей тяжелой-тяжелой-легкой цепи, и как минорные виды в полосе при электрофорезе в ПААГ с SDS, соответствующей легкой-тяжелой-тяжелой-легкой цепи (табл. 1 и фиг. 9).

Таблица 1

Процентные доли площади пика экстрагированной ионной хроматограммы (EIC) для каждого отдельного характерного пептида относительно всех пиков EIC всех определенных характерных пептидов

Характерный пептид (структура и молекулярная масса показаны на фиг. 8)	Полоса, вырезанная из ПААГ с SDS	
	Легкая-тяжелая-тяжелая-легкая цепь (обозначаемая как LC-НС-НС-LC или LННL)	Тяжелая-тяжелая-легкая цепь (обозначаемая как НС-НС-LC или ННL)
LC-НС-НС-LC	97,09%	9,22%
Cys-A	1,08%	52,43%
DeNA-A	1,71%	35,52%
Cys-НС-НС	0,12%	2,84%

В заключение, тремя аналитическими способами идентифицировали виды размерных вариантов в композициях M281 как имеющие молекулярные массы, схожие с цистеинилированной тяжелой-тяжелой-легкой цепью и тяжелой-тяжелой-легкой цепью с дегидроаланином.

В другом примере препарат M281 получали и подвергали тестированию стабильности после хранения при  $5\pm 3^\circ\text{C}$ . Массовый процент белка, находившегося в диапазоне 119150-119350 Да (ННL) приведен в табл. 2.

Таблица 2

Массовый процент белка массой 119150-119350 Да

Время	% масс. 119150-119350 Да
Исходно	1,0
1 месяц	1,1
3 месяца	1,1

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая основной белковый компонент антитела, содержащий легкую цепь - тяжелую цепь - тяжелую цепь - легкую цепь (LННL) с молекулярной массой 140500-143000 Да, и минорный белковый компонент антитела, содержащий тяжелую цепь - тяжелую цепь - легкую цепь (ННL) с молекулярной массой 119150-119350 Да,

где основной компонент антитела составляет 95-99 мас.% общего белка в композиции, и минорный белковый компонент антитела составляет 1-3 мас.% общего белка в композиции, и

где: (1) каждая тяжелая цепь основного белкового компонента антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 и каждая легкая цепь основного белкового компонента антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и (2) минорный белковый компонент антитела содержит: (i) первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, соединенную с легкой цепью, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и (ii) вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, где С в положении 219 заменен дегидроаланином.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, где основной белковый компонент антитела составляет 95-98 мас.% общего белка в композиции и минорный белковый компонент антитела составляет 2-2,5 мас.% общего белка в композиции.

3. Фармацевтическая композиция по п.1, где вторая тяжелая цепь компонента минорного белка антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

4. Фармацевтическая композиция по п.1, где вторая тяжелая цепь минорного белкового компонента антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, где С в положении 219 заменен на дегидроаланин.

5. Способ получения фармацевтической композиции по пп.1-4, включающий получение композиции, содержащей основной белковый компонент антитела, содержащий LННL, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

определение того, содержит ли композиция основной белковый компонент антитела, содержащий LННL и имеющий молекулярную массу 140500-143000 Да, и минорный белковый компонент антитела, содержащий ННL и имеющий молекулярную массу 119150-119350 Да;

комбинирование композиции с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами для получения фармацевтической композиции, только если композиция содержит основной белковый компонент, имеющий молекулярную массу 140500-1430000 Да, и минорный белковый компонент, имеющий молекулярную массу 119150-119350 Да.

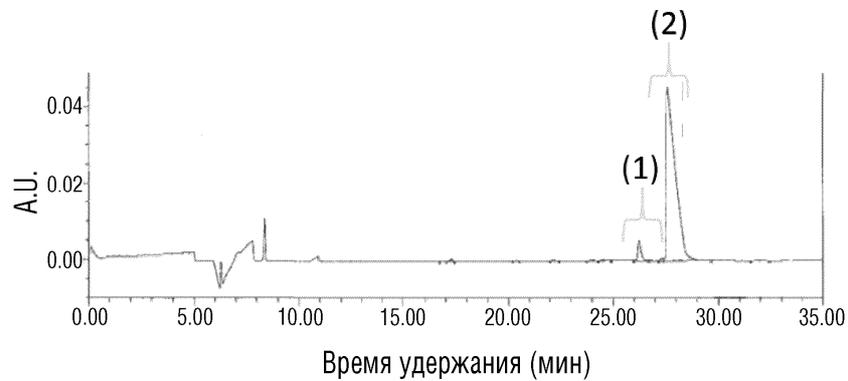
6. Способ по п.5, где полученная фармацевтическая композиция содержит 28-32 мг/мл основного белкового компонента антитела.

7. Способ по п.5, где полученная фармацевтическая композиция содержит 9-11 мг/мл основного белкового компонента антитела.

8. Способ по п.5, дополнительно включающий комбинирование композиции с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами для получения фармацевтической композиции, только если основной белковый компонент антитела составляет 95-99 мас.% основного белка в композиции, и минорный белковый компонент антитела составляет 1-3 мас.% основного белка в композиции.

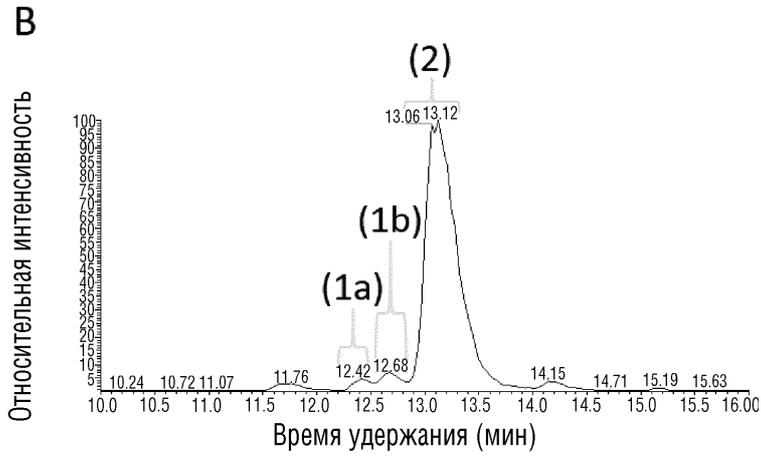
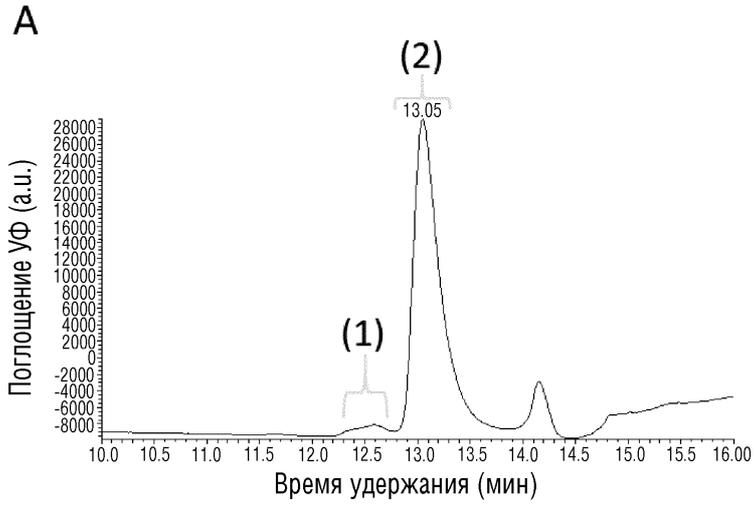
9. Способ по п.5, где стадия определения включает электрофорез или хроматографию.

10. Способ по п.5, где стадия получения включает культивирование клеток, экспрессирующих тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

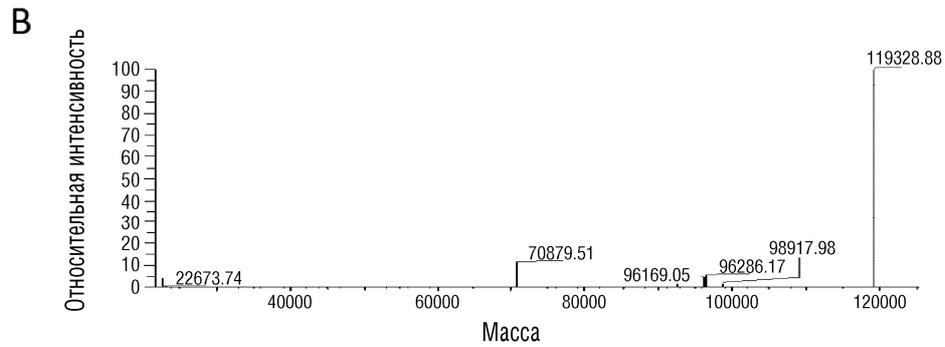
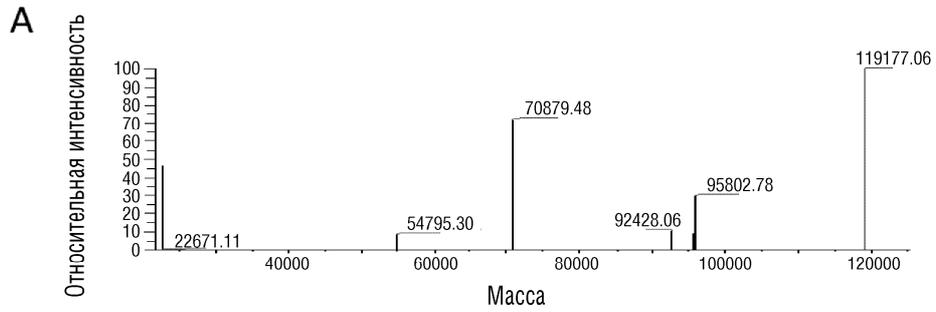


Фиг. 1

048285



Фиг. 2А, 2В

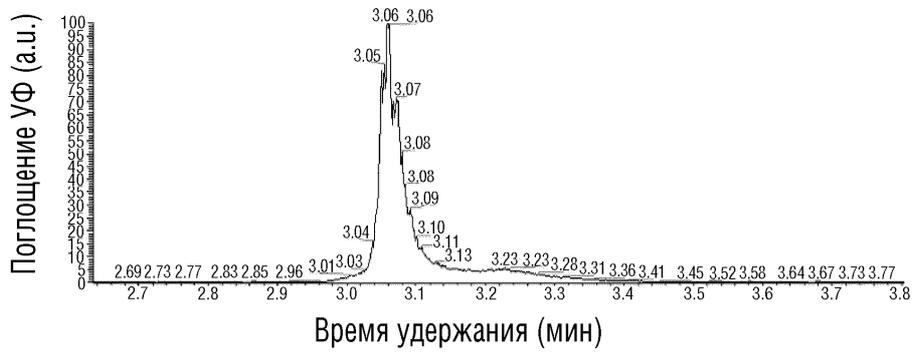


Фиг. 3А, 3В

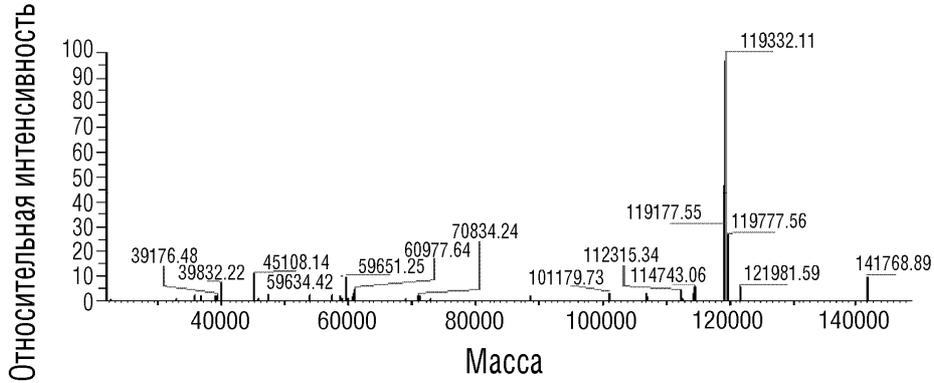


Фиг.1А

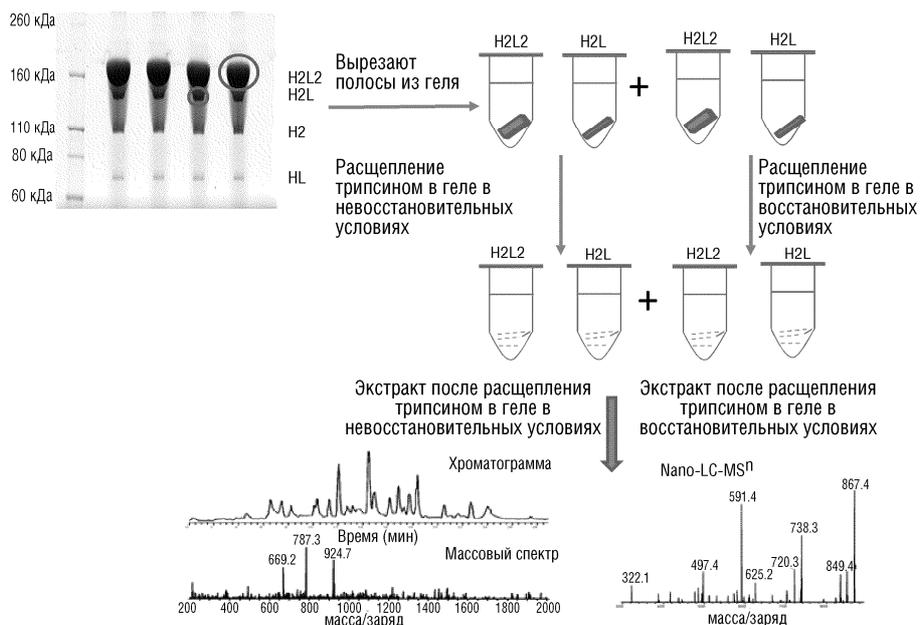
Фиг. 4



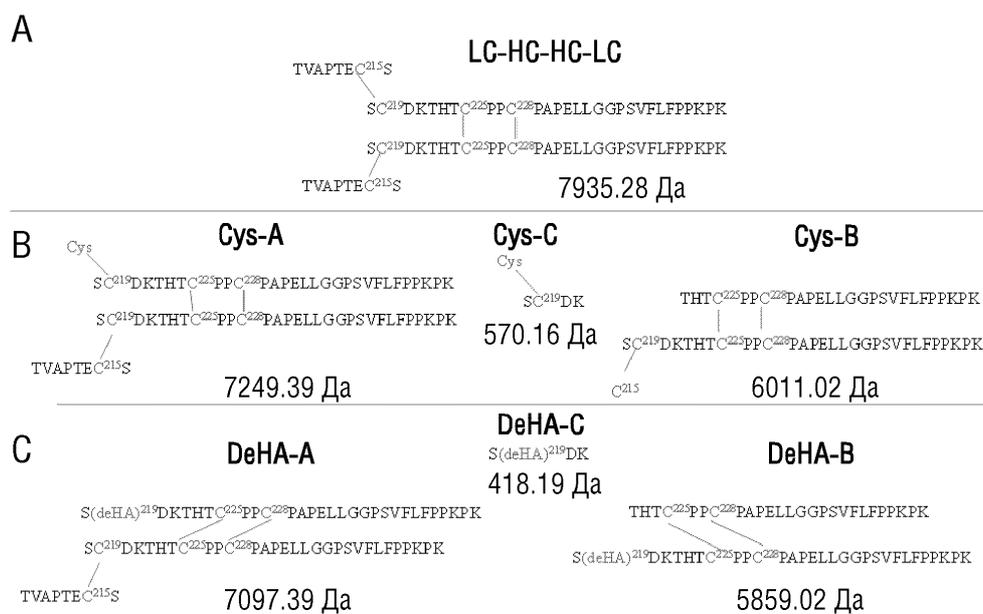
Фиг. 5



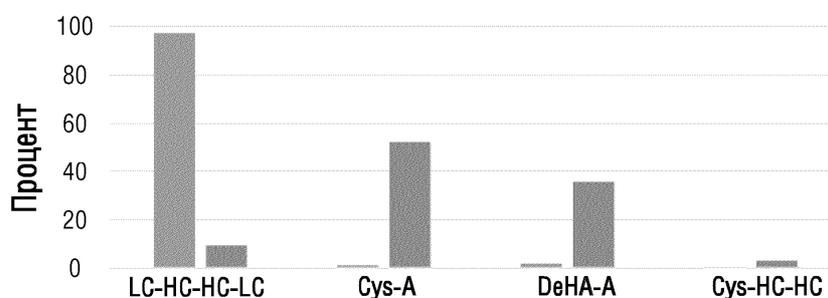
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2