

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202393465** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2024.04.04**

(22) Дата подачи заявки  
**2022.08.25**

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*C07K 16/24* (2006.01)  
*A61K 38/17* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 37/00* (2006.01)

---

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ АНТИТЕЛА К IL4R И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) **202110988008.3**

(32) **2021.08.26**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2022/114652**

(87) **WO 2023/025217 2023.03.02**

(71) Заявитель:

**ЧИА ТАЙ ТЯНЬЦИН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛ ГРУП КО.,  
ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:

**Чэн Яньцзюй, Ли Инчунь, Кун  
Линцзе, Го Сяолу, Чжао Вэй (CN)**

(74) Представитель:

**Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,  
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)**

---

(57) В настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция антитела к IL4R (рецептор интерлейкина 4) и ее применение. Фармацевтическая композиция содержит антитело к IL4R или его антигенсвязывающий фрагмент и буферный агент; и фармацевтическая композиция может дополнительно содержать поверхностно-активное вещество и стабилизатор.

**202393465**  
**A1**

**202393465**

**A1**

## ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ АНТИТЕЛА К IL4R И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области препарата и, в частности, к стабильной фармацевтической композиции, содержащей антитело к IL4R (рецептор интерлейкина 4) или его антигенсвязывающий фрагмент, и применению фармацевтической композиции для лечения и/или предотвращения заболевания, связанного с чрезмерной передачей сигналов IL4 и/или IL13.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Аллергические заболевания, связанные с воспалением 2 типа, такие как атопический дерматит, анафилаксия, аллергический ринит и аллергическая астма, поражают более 3 миллиардов человек во всем мире и демонстрируют постоянно растущую заболеваемость. Согласно гигиенической гипотезе, высокая заболеваемость частично объясняется отсутствием воздействия инфекционных агентов из-за повышения уровня жизни, что делает иммунную систему более чувствительной к определенным аллергенам, обычно безвредным (Stephen J. Galli et al., (2008) *Nature* 454(7203):445-454). Интерлейкин 4 (IL4 или IL-4) и IL-13 являются двумя ключевыми факторами иммунитета 2 типа и должны стимулировать большинство ключевых маркеров, связанных с воспалением 2 типа, например, продукцию иммуноглобулина E и рекрутинг клеток врожденного иммунитета в очагах воспаления (Gruning G et al., (1998) *Science* 282: 2261-2263; Rankin JA et al., (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7821-7825; Wills-Karp M et al., (1998) *Science* 282: 2258-2261).

IL-4 и IL-13 регулируют функциональность клеток и активируют механизм транскрипции путем связывания с рецепторами клеточной поверхности. В частности, IL-4 сначала связывается с цепью IL-4R $\alpha$  с пикомолярной аффинностью, а затем рекрутирует IL-2R $\gamma$  ( $\gamma$ c) (общая гамма-цепь) с образованием комплекса рецептора I типа или рекрутирует IL-13R $\alpha$ 1 с образованием комплекса рецептора II типа. Было обнаружено, что негематопоэтические клетки не демонстрируют экспрессии или демонстрируют недостаточную экспрессию  $\gamma$ c, но демонстрируют высокую экспрессию IL-13R $\alpha$ 1, тогда как лимфоциты этого не демонстрируют. Клетки костного мозга являются промежуточными из двух типов клеток. Рецепторные комплексы II типа также могут быть образованы путем связывания IL-13 с цепью IL-13R $\alpha$ 1 (с наномолярной аффинностью) и дополнительного рекрутирования цепи IL-4R $\alpha$ . Кроме того, IL-13 также способен связываться с IL-13R $\alpha$ 2 с пикомолярной аффинностью для инициирования формирования рецептора-приманки (Igna

G. Luzina et al., (2012) *J Leukoc Biol* 92(4):753-764). После образования комплекса рецептора IL-4 активируются внутриклеточные сигнальные молекулы, при этом сигнальные пути STAT6 (сигнальный белок и активатор транскрипции 6) и IRS (субстрат инсулинового рецептора) активируются в ответ на рецептор IL-4 I типа, тогда как рецептор IL-4 II типа существенно не активирует IRS (Heller NM et al., (2008) *Sci Signal* 1(51):ra17-ra17). Передача сигналов STAT6 важна для дифференцировки клеток T<sub>H</sub>2 и продукции IL-4, в то время как IRS может активировать сигнальные пути PI3K и mTOR (Gadani SP et al., (2012) *J Immunol* 189:4213-4219). Исследования показали, что чрезмерная передача сигналов IL-4 и/или IL-13 может вызывать аллергические заболевания. Также было обнаружено, что ингибиторы STAT6 ингибируют рост клеток рака предстательной железы (Nappo G et al., (2017) *Oncogenesis* 6(5):e342). Таким образом, было разработано несколько терапевтических антител, которые модулируют опосредованную IL-4 и/или IL-13 передачу сигналов, например, антитело дупилумаб к IL4R.

Лекарственные средства на основе антител для субъектов-людей должны сохранять свою биологическую активность и стабильность во время хранения и последующего применения, но лекарственные средства на основе антител имеют большую молекулярную массу и сложные структуры и подвержены деградации, агрегации, нежелательным химическим модификациям и т. д., поэтому становятся нестабильными. Соответственно, в данной области техники существует потребность в стабильной фармацевтической композиции антитела (например, фармацевтической композиции антитела к IL4R), которая преодолевает вышеупомянутые дефекты, обладает более длительным сроком хранения и подходит для производства и введения пациентам. Однако, когда антитела присутствуют в высокой концентрации, все еще требуется решить такие проблемы, как высокая агрегация, осмотическое давление выше физиологического уровня и, в частности, низкая способность к инъекции из-за повышенной вязкости.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

В настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент в высокой концентрации, имеющей приемлемую вязкость. Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению не приводит к высокому уровню агрегации.

В настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая: (a) антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент, (b) буферный агент, (c) поверхностно-активное вещество и (d) стабилизатор.

В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента в вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет от 30 до 300 мг/мл, от 50 до 250 мг/мл, от 70 до 200 мг/мл, от 100 до 180 мг/мл, от 120 до 180 мг/мл, от 120 до 150 мг/мл или от 150 до 180 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента в вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет около 150 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента в вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет около 175 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления примеры концентрации антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента в вышеупомянутой фармацевтической композиции включают, но не ограничиваются ими: около 70 мг/мл, около 80 мг/мл, около 90 мг/мл, около 100 мг/мл, около 110 мг/мл, около 120 мг/мл, около 125 мг/мл, около 130 мг/мл, около 135 мг/мл, около 140 мг/мл, около 145 мг/мл, около 150 мг/мл, около 155 мг/мл, около 160 мг/мл, около 165 мг/мл, около 170 мг/мл, около 175 мг/мл, около 180 мг/мл, около 190 мг/мл или около 200 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления примеры буферного агента в вышеупомянутой фармацевтической композиции включают фосфатный буферный агент, ацетатный буферный агент или буферный агент на основе гистидиновой соли. Предпочтительно примеры буферного агента в вышеупомянутой фармацевтической композиции включают буферный агент на основе гистидиновой соли. В некоторых конкретных вариантах осуществления примеры фосфатного буферного агента включают натрий-фосфатный буферный агент или калий-фосфатный буферный агент, примеры ацетатного буферного агента включают натрий-ацетатный буферный агент, калий-ацетатный буферный агент или буферный агент на основе ацетата натрия и уксусной кислоты, и примеры буферного агента на основе гистидиновой соли включают буферный агент на основе гистидина и соляной кислоты, буферный агент на основе гистидина и уксусной кислоты, буферный агент на основе гистидин-гистидин гидрохлорида или буферный агент на основе гистидин гидрохлорида.

В некоторых конкретных вариантах осуществления натрий-фосфатный буферный агент содержит динатрия гидрофосфат и натрия дигидрофосфат. В некоторых конкретных вариантах осуществления буферный агент на основе ацетата натрия и уксусной кислоты содержит ацетат натрия и уксусную кислоту. В некоторых конкретных вариантах осуществления буферный агент на основе гистидин-гистидин гидрохлорида содержит гистидин и гистидин гидрохлорид.

В некоторых вариантах осуществления концентрация буферного агента в вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет от 1 до 100 мМ, от 2 до 80 мМ, от 4 до 60 мМ, от 8 до 40 мМ, от 10 до 30 мМ, от 10 до 20 мМ или от 20 до 30 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация буферного агента в вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет около 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления примеры концентрации буферного агента в вышеупомянутой фармацевтической композиции включают, но не ограничиваются ими: около 8 мМ, около 9 мМ, около 10 мМ, около 11 мМ, около 12 мМ, около 13 мМ, около 14 мМ, около 15 мМ, около 16 мМ, около 17 мМ, около 18 мМ, около 19 мМ, около 20 мМ, около 21 мМ, около 22 мМ, около 23 мМ, около 24 мМ, около 25 мМ, около 26 мМ, около 27 мМ, около 28 мМ, около 30 мМ, около 32 мМ, около 34 мМ, около 36 мМ, около 38 мМ или около 40 мМ.

В некоторых вариантах осуществления рН буферного агента в вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет от 4 до 7, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5,3 до 6,5, от 5,3 до 6,3, от 5,3 до 5,8 или от 5,8 до 6,3. В некоторых вариантах осуществления рН буферного агента в вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет около 5,8. В некоторых вариантах осуществления рН буферного агента в вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет около 6. В некоторых вариантах осуществления рН буферного агента в вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет около 5. В некоторых вариантах осуществления примеры рН буферного агента в вышеупомянутой фармацевтической композиции включают, но не ограничиваются ими: около 5, около 5,1, около 5,2, около 5,3, около 5,4, около 5,5, около 5,6, около 5,7, около 5,8, около 5,9, около 6, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4, около 6,5, около 6,6, около 6,7, около 6,8, около 6,9 или около 7.

В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество в вышеупомянутой фармацевтической композиции выбрано из полисорбата (например, полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 81 или полисорбата 85), полоксамера (например, полоксамера 181, полоксамера 188 или полоксамера 407), полиэтиленгликоля, полигидроксисоединения и т.п. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество в вышеупомянутой фармацевтической композиции представляет собой полисорбат 80. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество в вышеупомянутой фармацевтической композиции представляет собой полисорбат 20.

В некоторых вариантах осуществления концентрация в вышеупомянутой фармацевтической композиции поверхностно-активного вещества составляет от 0,01 до 2 мг/мл, от 0,05 до 1 мг/мл, от 0,1 до 0,8 мг/мл, от 0,2 до 0,6 мг/мл или от 0,2 до 0,4 мг/мл. В

некоторых вариантах осуществления концентрация поверхностно-активного вещества в вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет около 0,4 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления примеры концентрации поверхностно-активного вещества в вышеупомянутой фармацевтической композиции включают, но не ограничиваются ими: около 0,05 мг/мл, около 0,06 мг/мл, около 0,07 мг/мл, около 0,08 мг/мл, около 0,09 мг/мл, около 0,1 мг/мл, около 0,2 мг/мл, около 0,3 мг/мл, около 0,4 мг/мл, около 0,5 мг/мл, около 0,6 мг/мл, около 0,7 мг/мл, около 0,8 мг/мл, около 0,9 мг/мл или около 1 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления стабилизатор в вышеупомянутой фармацевтической композиции выбран из одного или более из трегалозы, маннита, сахарозы, аргинина или их фармацевтически приемлемой соли, пролина и хлорида натрия. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор в вышеупомянутой фармацевтической композиции содержит сахарозу. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор в вышеупомянутой фармацевтической композиции содержит аргинин или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор в вышеупомянутой фармацевтической композиции содержит пролин. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор в вышеупомянутой фармацевтической композиции содержит хлорид натрия. Примеры фармацевтически приемлемой соли аргинина включают аргинин гидрохлорид или аргинин ацетат. В некоторых конкретных вариантах осуществления стабилизатор в вышеупомянутой фармацевтической композиции содержит сахарозу и аргинин гидрохлорид. В некоторых конкретных вариантах осуществления стабилизатор в вышеупомянутой фармацевтической композиции содержит пролин и хлорид натрия. В некоторых конкретных вариантах осуществления стабилизатор в вышеупомянутой фармацевтической композиции содержит сахарозу, пролин и хлорид натрия.

В некоторых вариантах осуществления концентрация сахарозы в вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет от 10 до 100 мг/мл, от 20 до 80 мг/мл, от 30 до 60 мг/мл, от 40 до 50 мг/мл или от 50 до 60 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация сахарозы в вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет около 50 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления примеры концентрации сахарозы в вышеупомянутой фармацевтической композиции включают, но не ограничиваются ими: около 20 мг/мл, около 22 мг/мл, около 24 мг/мл, около 26 мг/мл, около 28 мг/мл, около 30 мг/мл, около 32 мг/мл, около 34 мг/мл, около 36 мг/мл, около 38 мг/мл, около 40 мг/мл, около 42 мг/мл, около 44 мг/мл, около 46 мг/мл, около 48 мг/мл, около 50 мг/мл, около 52 мг/мл, около 54 мг/мл, около 56 мг/мл, около 58 мг/мл, около 60 мг/мл, около 62 мг/мл,

около 64 мг/мл, около 66 мг/мл, около 68 мг/мл, около 70 мг/мл, около 72 мг/мл, около 74 мг/мл, около 76 мг/мл, около 78 мг/мл или около 80 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления концентрация аргинина или его фармацевтически приемлемой соли (например, аргинин гидрохлорид) в вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет от 10 до 100 мМ, от 20 до 80 мМ, от 30 до 60 мМ, от 40 до 50 мМ или от 50 до 60 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация аргинина или его фармацевтически приемлемой соли (например, аргинин гидрохлорид) в вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет около 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления примеры концентрации аргинина или его фармацевтически приемлемой соли (например, аргинин гидрохлорид) в вышеупомянутой фармацевтической композиции включают, но не ограничиваются ими: около 20 мМ, около 22 мМ, около 24 мМ, около 26 мМ, около 28 мМ, около 30 мМ, около 32 мМ, около 34 мМ, около 36 мМ, около 38 мМ, около 40 мМ, около 42 мМ, около 44 мМ, около 46 мМ, около 48 мМ, около 50 мМ, около 52 мМ, около 54 мМ, около 56 мМ, около 58 мМ, около 60 мМ, около 62 мМ, около 64 мМ, около 66 мМ, около 68 мМ, около 70 мМ, около 72 мМ, около 74 мМ, около 76 мМ, около 78 мМ или около 80 мМ.

В некоторых вариантах осуществления концентрация пролина в вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет от 60 до 600 мМ, от 80 до 500 мМ, от 100 до 450 мМ, от 120 до 400 мМ, от 150 до 350 мМ, от 200 до 350 мМ или от 250 до 350 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация пролина в вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет около 250 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация пролина в вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет около 350 мМ. В некоторых вариантах осуществления примеры концентрации пролина в вышеупомянутой фармацевтической композиции включают, но не ограничиваются ими: около 120 мМ, около 130 мМ, около 140 мМ, около 150 мМ, около 160 мМ, около 170 мМ, около 180 мМ, около 190 мМ, около 200 мМ, около 210 мМ, около 220 мМ, около 230 мМ, около 240 мМ, около 250 мМ, около 260 мМ, около 270 мМ, около 280 мМ, около 290 мМ, около 300 мМ, около 310 мМ, около 320 мМ, около 330 мМ, около 340 мМ, около 350 мМ, около 360 мМ, около 370 мМ, около 380 мМ, около 390 мМ или около 400 мМ.

В некоторых вариантах осуществления концентрация хлорида натрия в вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет от 1 до 80 мМ, от 2 до 60 мМ, от 4 до 50 мМ, от 8 до 40 мМ, от 10 до 30 мМ или от 10 до 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация хлорида натрия в вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет около 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления примеры

концентрации хлорида натрия в вышеупомянутой фармацевтической композиции включают, но не ограничиваются ими: около 8 мМ, около 9 мМ, около 10 мМ, около 11 мМ, около 12 мМ, около 13 мМ, около 14 мМ, около 15 мМ, около 16 мМ, около 17 мМ, около 18 мМ, около 19 мМ, около 20 мМ, около 21 мМ, около 22 мМ, около 23 мМ, около 24 мМ, около 25 мМ, около 26 мМ, около 27 мМ, около 28 мМ, около 29 мМ, около 30 мМ, около 32 мМ, около 34 мМ, около 36 мМ, около 38 мМ или около 40 мМ.

В некоторых вариантах осуществления рН вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет от 4 до 7, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5,3 до 6,5, от 5,3 до 6,3, от 5,3 до 5,8 или от 5,8 до 6,3. В некоторых вариантах осуществления рН вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет около 5,8. В некоторых вариантах осуществления рН вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет около 6. В некоторых вариантах осуществления рН вышеупомянутой фармацевтической композиции составляет около 5. В некоторых вариантах осуществления примеры рН вышеупомянутой фармацевтической композиции включают, но не ограничиваются ими: около 5, около 5,1, около 5,2, около 5,3, около 5,4, около 5,5, около 5,6, около 5,7, около 5,8, около 5,9, около 6, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4, около 6,5, около 6,6, около 6,7, около 6,8, около 6,9 или около 7.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) фосфатный буферный агент, ацетатный буферный агент и/или буферный агент на основе гистидиновой соли; (c) полисорбат 80 или полисорбат 20; и (d) трегалозу, маннит, сахарозу, аргинин или их фармацевтически приемлемую соль, пролин и/или хлорид натрия.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) фосфатный буферный агент или буферный агент на основе гистидиновой соли; (c) полисорбат 80; и (d) сахарозу, аргинин или их фармацевтически приемлемую соль, пролин и/или хлорид натрия.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) буферный агент на основе гистидиновой соли; (c) полисорбат 80; и (d) сахарозу и аргинин или их фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) буферный агент на основе гистидиновой соли; (c) полисорбат 80; и (d) сахарозу, пролин и хлорид натрия.



В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) буферный агент на основе гистидиновой соли; (c) полисорбат 80; и (d) пролин и хлорид натрия.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент; (b) буферный агент на основе гистидиновой соли; (c) полисорбат 80; и (d) пролин.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) от 30 до 300 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от 1 до 100 мМ буферного агента; (c) от 0,01 до 2 мг/мл поверхностно-активного вещества; и (d) стабилизатор, включая трегалозу, маннит, сахарозу, аргинин или его фармацевтически приемлемую соль, пролин и/или хлорид натрия, где рН фармацевтической композиции составляет от 4 до 7, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5,3 до 6,5, от 5,3 до 6,3, от 5,3 до 5,8 или от 5,8 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) от 50 до 250 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от 2 до 80 мМ буферного агента; (c) от 0,05 до 1 мг/мл поверхностно-активного вещества; и (d) стабилизатор, включая трегалозу, маннит, сахарозу, аргинин или его фармацевтически приемлемую соль, пролин и/или хлорид натрия, где рН фармацевтической композиции составляет от 4 до 7, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5,3 до 6,5, от 5,3 до 6,3, от 5,3 до 5,8 или от 5,8 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) от 70 до 200 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от 4 до 60 мМ буферного агента; (c) от 0,1 до 0,8 мг/мл поверхностно-активного вещества; и (d) стабилизатор, включая трегалозу, маннит, сахарозу, аргинин или его фармацевтически приемлемую соль, пролин и/или хлорид натрия, где рН фармацевтической композиции составляет от 4 до 7, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5,3 до 6,5, от 5,3 до 6,3, от 5,3 до 5,8 или от 5,8 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) от 100 до 180 мг/мл или от 120 до 180 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от 8 до 40 мМ или от 10 до 30 мМ буферного агента; (c) от 0,2 до 0,6 мг/мл поверхностно-активного вещества; и (d) стабилизатор, включая трегалозу, маннит, сахарозу, аргинин или его фармацевтически приемлемую соль, пролин и/или хлорид натрия, где рН фармацевтической композиции составляет от 4 до 7, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5,3 до 6,5, от 5,3 до 6,3, от 5,3 до 5,8 или от 5,8 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) от 120 до 150 мг/мл или от 150 до 180 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от 10 до 20 mM или от 20 до 30 mM буферного агента; (c) от 0,2 до 0,4 мг/мл поверхностно-активного вещества; и (d) стабилизатор, включая трегалозу, маннит, сахарозу, аргинин или его фармацевтически приемлемую соль, пролин и/или хлорид натрия, где pH фармацевтической композиции составляет от 4 до 7, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5,3 до 6,5, от 5,3 до 6,3, от 5,3 до 5,8 или от 5,8 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) от 30 до 300 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от 1 до 100 mM фосфатного буферного агента, ацетатного буферного агента или буферного агента на основе гистидиновой соли; (c) от 0,01 до 2 мг/мл полисорбата 80 или полисорбата 20; и (d) от 10 до 100 мг/мл сахарозы, от 10 до 100 mM аргинина или его фармацевтически приемлемой соли, от 60 до 600 mM пролина и/или от 1 до 80 mM хлорида натрия, где pH фармацевтической композиции составляет от 4 до 7, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5,3 до 6,5, от 5,3 до 6,3, от 5,3 до 5,8 или от 5,8 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) от 50 до 250 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от 2 до 80 mM фосфатного буферного агента, ацетатного буферного агента или буферного агента на основе гистидиновой соли; (c) от 0,05 до 1 мг/мл полисорбата 80 или полисорбата 20; и (d) от 20 до 80 мг/мл сахарозы, от 20 до 80 mM аргинина или его фармацевтически приемлемой соли, от 80 до 500 mM пролина и/или от 2 до 60 mM хлорида натрия, где pH фармацевтической композиции составляет от 4 до 7, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5,3 до 6,5, от 5,3 до 6,3, от 5,3 до 5,8 или от 5,8 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) от 70 до 200 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от 4 до 60 mM фосфатного буферного агента, ацетатного буферного агента или буферного агента на основе гистидиновой соли; (c) от 0,1 до 0,8 мг/мл полисорбата 80 или полисорбата 20; и (d) от 30 до 60 мг/мл сахарозы, от 30 до 60 mM аргинина или его фармацевтически приемлемой соли, от 100 до 450 mM или от 120 до 400 mM пролина и/или от 4 до 50 mM хлорида натрия, где pH фармацевтической композиции составляет от 4 до 7, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5,3 до 6,5, от 5,3 до 6,3, от 5,3 до 5,8 или от 5,8 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) от 100 до 180 мг/мл или от 120 до 180 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от 8 до 40 mM или от 10 до 30 mM фосфатного

буферного агента, ацетатного буферного агента или буферного агента на основе гистидиновой соли; (с) от 0,2 до 0,6 мг/мл полисорбата 80 или полисорбата 20; и (d) от 40 до 50 мг/мл сахарозы, от 40 до 50 мМ аргинина или его фармацевтически приемлемой соли, от 150 до 350 мМ пролина и/или от 8 до 40 мМ хлорида натрия, где рН фармацевтической композиции составляет от 4 до 7, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5,3 до 6,5, от 5,3 до 6,3, от 5,3 до 5,8 или от 5,8 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (а) от 120 до 150 мг/мл или от 150 до 180 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от 10 до 20 мМ или от 20 до 30 мМ фосфатного буферного агента, ацетатного буферного агента или буферного агента на основе гистидиновой соли; (с) от 0,2 до 0,4 мг/мл полисорбата 80 или полисорбата 20; и (d) от 50 до 60 мг/мл сахарозы, от 50 до 60 мМ аргинина или его фармацевтически приемлемой соли, от 200 до 350 мМ или от 250 до 350 мМ пролина и/или от 10 до 30 мМ или от 10 до 20 мМ хлорида натрия, где рН фармацевтической композиции составляет от 4 до 7, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5,3 до 6,5, от 5,3 до 6,3, от 5,3 до 5,8 или от 5,8 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (а) от 30 до 300 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от 1 до 100 мМ фосфатного буферного агента или буферного агента на основе гистидиновой соли; (с) от 0,01 до 2 мг/мл полисорбата 80; и (d) от 60 до 600 мМ пролина и от 1 до 80 мМ хлорида натрия и, необязательно, от 10 до 100 мг/мл сахарозы, где рН фармацевтической композиции составляет от 4 до 7, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5,3 до 6,5, от 5,3 до 6,3, от 5,3 до 5,8 или от 5,8 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (а) от 50 до 250 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от 2 до 80 мМ фосфатного буферного агента или буферного агента на основе гистидиновой соли; (с) от 0,05 до 1 мг/мл полисорбата 80; и (d) от 80 до 500 мМ пролина и от 2 до 60 мМ хлорида натрия и, необязательно, от 20 до 80 мг/мл сахарозы, где рН фармацевтической композиции составляет от 4 до 7, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5,3 до 6,5, от 5,3 до 6,3, от 5,3 до 5,8 или от 5,8 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (а) от 70 до 200 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от 4 до 60 мМ фосфатного буферного агента или буферного агента на основе гистидиновой соли; (с) от 0,1 до 0,8 мг/мл полисорбата 80; и (d) от 100 до 450 мМ или от 120 до 400 мМ пролина и от 4 до 50 мМ хлорида натрия и, необязательно, от 30 до 60 мг/мл сахарозы, где рН фармацевтической композиции

составляет от 4 до 7, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5,3 до 6,5, от 5,3 до 6,3, от 5,3 до 5,8 или от 5,8 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) от 100 до 180 мг/мл или от 120 до 180 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от 8 до 40 мМ или от 10 до 30 мМ фосфатного буферного агента или буферного агента на основе гистидиновой соли; (c) от 0,2 до 0,6 мг/мл полисорбата 80; и (d) от 150 до 350 мМ пролина и от 8 до 40 мМ хлорида натрия и, необязательно, от 40 до 50 мг/мл сахарозы, где рН фармацевтической композиции составляет от 4 до 7, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5,3 до 6,5, от 5,3 до 6,3, от 5,3 до 5,8 или от 5,8 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) от 120 до 150 мг/мл или от 150 до 180 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) от 10 до 20 мМ или от 20 до 30 мМ фосфатного буферного агента или буферного агента на основе гистидиновой соли; (c) от 0,2 до 0,4 мг/мл полисорбата 80; и (d) от 200 до 350 мМ или от 250 до 350 мМ пролина и от 10 до 30 мМ или от 10 до 20 мМ хлорида натрия и, необязательно, от 50 до 60 мг/мл сахарозы, где рН фармацевтической композиции составляет от 4 до 7, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5,3 до 6,5, от 5,3 до 6,3, от 5,3 до 5,8 или от 5,8 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) 150 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) 20 мМ буферного агента гистидин-гистидин гидрохлорид; (c) 0,4 мг/мл полисорбата 80; и (d) 50 мг/мл сахарозы и 50 мМ аргинина гидрохлорид, где рН фармацевтической композиции составляет 5,8.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) 150 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) 20 мМ буферного агента гистидин-гистидин гидрохлорид; (c) 0,4 мг/мл полисорбата 80; и (d) 250 мМ пролина и 20 мМ хлорида натрия, где рН фармацевтической композиции составляет 5,8.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) 150 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента; (b) 20 мМ буферного агента гистидин-гистидин гидрохлорид; (c) 0,4 мг/мл полисорбата 80; и (d) 350 мг/мл пролина, где рН фармацевтической композиции составляет 5,8.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая фармацевтическая композиция содержит: (a) 150 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего

фрагмента; (b) 20 mM буферного агента гистидин-гистидин гидрохлорид; (c) 0,4 мг/мл полисорбата 80; и (d) 50 мг/мл сахарозы, 250 mM пролина и 20 mM хлорида натрия, где pH фармацевтической композиции составляет 5,8.

В дополнительном варианте осуществления антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент в вышеупомянутой фармацевтической композиции содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 (определяющая комплементарность область 1) переменной области тяжелой цепи, CDR2 переменной области тяжелой цепи и CDR3 переменной области тяжелой цепи, где CDR1 переменной области тяжелой цепи, CDR2 переменной области тяжелой цепи и CDR3 переменной области тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичные аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно.

В необязательном варианте осуществления антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент в вышеупомянутой фармацевтической композиции содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, 8 или 9. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 8 представляет собой:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSSWRQAPGKGLVX<sub>1</sub>VX<sub>2</sub>TINS  
NGGSTSYPDVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWG  
QGTLVTVSS, где, X<sub>1</sub> = W и X<sub>2</sub> = S, X<sub>1</sub> = L и X<sub>2</sub> = A или X<sub>1</sub> = W и X<sub>2</sub> = A.

В дополнительном варианте осуществления антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент в вышеупомянутой фармацевтической композиции содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 переменной области легкой цепи, CDR2 переменной области легкой цепи и CDR3 переменной области легкой цепи, где CDR1 переменной области легкой цепи, CDR2 переменной области легкой цепи и CDR3 переменной области легкой цепи содержат аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичные аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно.

В необязательном варианте осуществления антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент в вышеупомянутой фармацевтической композиции содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную

последовательность, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10, 11 или 12. Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 11 представляет собой:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKAPKX<sub>1</sub>LX<sub>2</sub>YNAKTL AEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGQGTKVEIK, где, X<sub>1</sub> = L и X<sub>2</sub> = I, X<sub>1</sub> = F и X<sub>2</sub> = V или X<sub>1</sub> = F и X<sub>2</sub> = I.

В необязательном варианте осуществления антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент в вышеупомянутой фармацевтической композиции содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, каждая из которых содержит CDR1, CDR2 и CDR3, где CDR1 переменной области тяжелой цепи, CDR2 переменной области тяжелой цепи, CDR3 переменной области тяжелой цепи, CDR1 переменной области легкой цепи, CDR2 переменной области легкой цепи, CDR3 переменной области легкой цепи содержат аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичные аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6, соответственно.

В необязательном варианте осуществления антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент в вышеупомянутой фармацевтической композиции содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, каждая из которых содержит: (1) аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 7 и 10, соответственно; (2) аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 8 и 11, соответственно, где в SEQ ID NO: 8, X<sub>1</sub> = W и X<sub>2</sub> = S; (3) аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 8 и 12, соответственно, где в SEQ ID NO: 8, X<sub>1</sub> = W и X<sub>2</sub> = S; (4) аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 9 и 11, соответственно; (5) аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны

аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 9 и 12, соответственно; (6) аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 8 и 11, соответственно, где в SEQ ID NO: 8,  $X_1 = L$  и  $X_2 = A$ ; (7) аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 8 и 12, соответственно, где в SEQ ID NO: 8,  $X_1 = L$  и  $X_2 = A$ ; (8) аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 8 и 11, соответственно, где в SEQ ID NO: 8,  $X_1 = W$  и  $X_2 = A$ ; или (9) аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 8 и 12, соответственно, где в SEQ ID NO: 8,  $X_1 = W$  и  $X_2 = A$ .

Аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 8 представляет собой:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMVSRVQAPGKGLVX<sub>1</sub>VX<sub>2</sub>TINS  
NGGSTSYPSVKGKRFITSRDIAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWG  
QGTLVTVSS;

аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 11 представляет собой:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPKAPKX<sub>1</sub>LX<sub>2</sub>YNAKTL  
AEGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGQGTKVEIK, где,  $X_1 = L$  и  $X_2 = I$ ,  $X_1 = F$  и  $X_2 = V$  или  $X_1 = F$  и  $X_2 = I$ .

В дополнительном варианте осуществления антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент в вышеупомянутой фармацевтической композиции содержит: тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи, где С-конец переменной области тяжелой цепи связан с N-концом константной области тяжелой цепи, и С-конец переменной области легкой цепи связан с N-концом константной области легкой цепи; переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи содержат аминокислотные последовательности, описанные выше; константная область тяжелой цепи представляет собой константную область IgG4 человека, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, и константная область легкой цепи представляет собой константную

область к человека, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14.

В необязательном варианте осуществления антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент в вышеупомянутой фармацевтической композиции может представлять собой полноразмерное антитело, например, изотип полноразмерного антитела IgG1, IgG2 или IgG4, предпочтительно изотип полноразмерного антитела IgG4. В других вариантах осуществления антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент в вышеупомянутой фармацевтической композиции может представлять собой одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv) антитела или фрагмент антитела, такой как фрагмент Fab или F(ab')<sub>2</sub>.

В необязательном варианте осуществления антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент в вышеупомянутой фармацевтической композиции представляет собой антитело C2C1A1A1 в патентной заявке № PCT/CN2021077784.

В настоящем изобретении дополнительно предложен способ получения вышеупомянутой фармацевтической композиции, включающий приведение в контакт вышеупомянутого антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента с буферным агентом, например, перенос антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента в буферный агент, включающий фосфатный буферный агент, ацетатный буферный агент или буферный агент на основе гистидиновой соли и т. д., и способ дополнительно включает: добавление поверхностно-активного вещества и стабилизатора без конкретного порядка, где стабилизатор включает трегалозу, маннит, сахарозу, аргинин или его фармацевтически приемлемую соль, пролин и/или хлорид натрия, и поверхностно-активное вещество включает полисорбат, полоксамер, полиэтиленгликоль или полигидроксисоединение.

В настоящем изобретении дополнительно предложен способ получения лиофилизированной композиции, содержащей антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий лиофилизацию вышеупомянутой фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления лиофилизацию проводили способами, хорошо известными в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, предварительное замораживание, первичную сушку и вторичную сушку. Специалистам в данной области техники понятно, что любой способ удаления воды из фармацевтической композиции по настоящему изобретению подходит для применения в настоящем изобретении.

В настоящем изобретении дополнительно предложен лиофилизированный препарат, содержащий антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент, полученный вышеупомянутым способом получения лиофилизированного препарата.



В настоящем изобретении дополнительно предложен лиофилизированный препарат, содержащий антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент, способный образовывать вышеупомянутую фармацевтическую композицию при восстановлении.

В настоящем изобретении дополнительно предложено изделие, включающее контейнер, содержащий вышеупомянутую фармацевтическую композицию или вышеупомянутый лиофилизированный препарат.

Фармацевтическую композицию или лиофилизированный препарат по настоящему изобретению можно вводить в соответствии с известными способами, например, путем инъекции или инфузии в течение определенного периода времени подходящим образом, например, подкожным, внутривенным, внутрибрюшинным, внутримышечным, внутриартериальным, внутриочаговым или внутрисуставным путями, местно, путем ингаляции или путем замедленного или отсроченного высвобождения. Фармацевтическая композиция или лиофилизированный препарат по настоящему изобретению могут быть разбавлены подходящим разбавителем до подходящей концентрации перед введением для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа).

В настоящем изобретении предложен способ снижения передачи сигналов IL4 и/или IL13 у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, лиофилизированного препарата или готового изделия по настоящему изобретению. IL4 сигнализирует через рецепторы, содержащие IL-4R $\alpha$  и  $\gamma$ s, тогда как IL13 сигнализирует через рецепторы, содержащие IL-4R $\alpha$  и IL13 R $\alpha$ 1. Передача сигналов IL4 и/или IL13 проявляется активацией и/или пролиферацией В-клеток, эозинофилов и/или макрофагов, пролиферацией фибробластов и пролиферацией гладкомышечных клеток (например, пролиферацией гладкомышечных клеток дыхательных путей и т. д.).

В настоящем изобретении предложен способ снижения иммунного ответа типа 2 у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, лиофилизированного препарата или готового изделия по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении предложен способ лечения заболевания, связанного с избыточной передачей сигналов IL4 и/или IL13 у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, лиофилизированного препарата или готового изделия по настоящему изобретению. Заболевание, связанное с избыточной передачей сигналов IL4 и/или IL13, представляет собой аллергическое заболевание, неограничивающие примеры которого

включают атопический дерматит, анафилаксию, аллергический ринит или аллергическую астму.

В настоящем изобретении предложен способ лечения опухоли, связанной с повышенной активацией STAT6 у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, лиофилизированного препарата или изделия по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления опухоль включает солидную опухоль или несолидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления примеры опухоли включают, но не ограничиваются ими, меланому, рак легкого, рак почки, рак предстательной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак яичников и уротелиальный рак.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и примеров, которые, однако, не следует рассматривать как ограничивающие. Содержание всех документов, записей Genbank, патентов и раскрытых патентных заявок, цитируемых в настоящем изобретении, явно включено в настоящее изобретение посредством ссылки.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для лучшего понимания настоящего изобретения термины определены в настоящем документе. Другие определения указаны в подробном описании. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, которое обычно подразумевается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

«Буферный агент» относится к фармацевтически приемлемому веществу или смеси веществ, способным поддерживать pH фармацевтической композиции в желаемом диапазоне pH. Примеры буферных агентов, подходящих для применения в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают фосфатные буферные агенты, ацетатные буферные агенты или буферные агенты на основе гистидиновой соли.

«Фосфатный буферный агент» представляет собой буферный агент, содержащий фосфат-ионы, например, буферный агент, содержащий фосфорную кислоту и/или фосфат, где фосфорная кислота включает фосфорную кислоту и/или ее гидрат, а фосфат включает фосфат и/или его гидрат. Примеры фосфатного буферного агента включают, но не ограничиваются ими, натрий-фосфатный буферный агент или калий-фосфатный буферный агент и предпочтительно фосфатный буферный агент представляет собой натрий-

фосфатный буферный агент. В одном конкретном примере натрий-фосфатный буферный агент содержит моногидрат дигидрофосфата натрия ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) и додекагидрат гидрофосфата динатрия ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ).

«Ацетатный буферный агент» представляет собой буферный агент, содержащий ионы ацетата, например, буферный агент, содержащий уксусную кислоту и/или ацетат, где уксусная кислота включает уксусную кислоту и/или ее гидрат, а ацетат включает ацетат и/или его гидрат. Примеры ацетатного буферного агента включают, но не ограничиваются ими, калий-ацетатный буферный агент, аммоний-ацетатный буферный агент, натрий-ацетатный буферный агент или буферный агент на основе ацетата натрия и уксусной кислоты, и предпочтительно ацетатный буферный агент представляет собой буферный агент на основе ацетата натрия и уксусной кислоты. Буферный агент на основе ацетата натрия и уксусной кислоты содержит уксусную кислоту и ацетат натрия, где уксусная кислота включает уксусную кислоту и/или ее гидрат, а ацетат натрия включает ацетат натрия и/или его гидрат. В одном конкретном примере буферный агент на основе ацетата натрия и уксусной кислоты содержит уксусную кислоту и тригидрат ацетата натрия ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ).

«Буферный агент на основе гистидиновой соли» представляет собой буферный агент, содержащий ионы гистидина, например, буферный агент, содержащий гистидин и/или гистидиновую соль, где гистидин включает гистидин и/или его гидрат, а гистидиновая соль включает гистидиновую соль и/или ее гидрат. Примеры буферного агента на основе гистидиновой соли включают буферный агент на основе гистидина и соляной кислоты, буферный агент на основе гистидина и уксусной кислоты, гистидин-гистидин гидрохлорида или буферный агент на основе гистидин гидрохлорида, и предпочтительно буферный агент на основе гистидиновой соли представляет собой буферный агент на основе гистидин-гистидин гидрохлорида. Гистидин-гистидин гидрохлорид содержит гистидин и гистидин гидрохлорид, где гистидин включает гистидин и/или его гидрат, и гистидин гидрохлорид включает гистидин гидрохлорид и/или его гидрат. В одном конкретном примере буферный агент на основе гистидина и гистидин гидрохлорида включает гистидин и гистидин гидрохлорид моногидрат ( $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ).

«Стабилизатор» относится к фармацевтически приемлемому веществу или смеси веществ для поддержания стабильности активного ингредиента в фармацевтической композиции. В настоящем изобретении стабилизатор также может быть использован в качестве понизителя вязкости и/или изотонизирующего агента и т.д.

«Фармацевтическая композиция» предназначена для охвата продукта, содержащего конкретный активный ингредиент (например, антитело), необязательно в определенном количестве, а также любого продукта, который является прямым или косвенным результатом объединения конкретных активных ингредиентов, необязательно в определенных количествах. Назначение фармацевтической композиции состоит в том, чтобы создать активный ингредиент, подходящий для получения и введения пациентам и сохранить биологическую активность и/или стабильность при хранении и последующем применении. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой водорастворимую инъекцию, включая, но не ограничиваясь ими, водорастворимый препарат, не лиофилизированный, или водорастворимый препарат, полученный путем восстановления лиофилизированного порошка. В некоторых других вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой лиофилизированный препарат. В настоящем описании «фармацевтическая композиция» и «препарат» не являются взаимоисключающими.

«Стабильная» или «стабилизированная» фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию, в которой активный ингредиент (например, антитело) по существу сохраняет свою физическую и/или химическую стабильность и/или биологическую активность во время хранения. Различные аналитические методы определения стабильности активного ингредиента известны в данной области техники, например, рассмотрены в *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) и Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10:29-90 (1993). Стабильность может быть измерена при выбранных температурах и в других условиях хранения в течение выбранного периода времени. Например, активный ингредиент «сохраняет свою физическую стабильность» в фармацевтической композиции, если он не демонстрирует значительного увеличения агрегации, осаждения и/или денатурации при визуальном осмотре цвета и/или прозрачности, или при измерении с помощью рассеяния ультрафиолетового света, эксклюзионной хроматографии (SEC), дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) и дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF). Предпочтительно, когда используется фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, 10% или менее, 5% или менее, 4% или менее активного ингредиента образует агрегаты (также называемые высокомолекулярными примесями), при измерении, например, с помощью SEC или любого другого подходящего способа измерения образования агрегатов. Активный ингредиент (например, антитело) «сохраняет свою химическую стабильность» в фармацевтической композиции, если активный ингредиент не проявляет значительных химических

изменений. Химическую стабильность можно оценить путем обнаружения и количественного определения химически измененных форматов антитела. Процессы, которые часто изменяют химическую структуру белка, включают гидролиз или усечение (что оценивается такими методами, как эксклюзионная хроматография и SDS-PAGE-электрофорез (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия)), окисление (что оценивается такими методами, как пептидное картирование в сочетании с масс-спектрометрией или MALDI/TOF/MS (времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией)), дезамидирование (что оценивается такими методами, как ионообменная хроматография, капиллярная изоэлектрическая фокусировка, пептидное картирование и измерение изоаспарагиновой кислоты) и изомеризацию (что оценивается путем измерения содержания изоаспарагиновой кислоты, путем пептидного картирования и т. д.). Активный ингредиент (например, антитело) «сохраняет свою биологическую активность» в течение заданного периода в фармацевтической композиции, как определено, например, с помощью анализа связывания антигена, если биологическая активность активного ингредиента в течение заданного периода находится в пределах заданного диапазона биологической активности, проявляемой при получении фармацевтической композиции.

«Макромолекулярные примеси» или «агрегаты» относятся к общему термину для примесей, имеющих молекулярную массу, превышающую молекулярную массу рассматриваемого активного ингредиента (например, антитела).

«Вариант заряда» относится к вариантам антитела, которые подвергаются гликозилированию, дезамидированию, окислению и/или изомеризации и т. д., и которые прямо или косвенно вызывают изменения зарядов молекул антитела. Эти варианты заряда могут быть обнаружены с помощью капиллярного изоэлектрического фокусирующего электрофореза (CIEF) и катионообменной хроматографии (CEX-HPLC) и т. д.

Формы единственного числа используются в настоящем документе для обозначения одного или более (то есть, по меньшей мере одного) объекта. Например, «фармацевтическая композиция» относится к одной фармацевтической композиции или более чем к одной фармацевтической композиции.

Термин «около» или «приблизительно» означает, что числовое значение находится в пределах допустимого диапазона погрешности для конкретного значения, определенного специалистами в данной области техники, и числовое значение частично зависит от того, как выполняется измерение или определение (то есть, пределы измерительной системы). Например, «около» или «приблизительно» в данной области техники может означать стандартное отклонение в пределах 1 или более 1. В альтернативном варианте «около» или

«приблизительно» означает диапазон  $\pm 15\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$  или  $\pm 1\%$ . Более того, особенно для биологической системы или процесса, этот термин может относиться не более к одному порядку величины или не более в 5 раз большему значению. Если не указано иное, «около XX» или «приблизительно XX» или «по существу содержащее XX» относится к числовому значению в пределах приемлемого диапазона ошибок для конкретного значения «XX» (включая само числовое значение «XX», а также те, которые находятся в пределах приемлемого диапазона ошибок для определения цифрового значения специалистами в данной области техники).

Как описано в настоящем документе, любой диапазон пропорций, диапазон соотношений или целочисленный диапазон следует толковать как включающий значение любого целого числа в пределах указанного диапазона и включающий, при необходимости, его доли (например, одну десятую и одну сотую целого числа), если не указано иное.

В настоящем изобретении, если из контекста не следует иное, слова «содержать», «включать» и «включать в себя» будут интерпретироваться как включающие этапы или элементы или группу этапов или элементов, но не исключая любые другие этапы или элементы или группы этапов или элементов. «Состоящий из...» означает содержащий и ограниченный тем, что следует за фразой «состоящий из...». Таким образом, фраза «состоящий из...» означает, что указанные элементы являются требуемыми или необходимыми и что никакие другие элементы не могут присутствовать. «По существу состоящий из...» означает содержащий любой указанный элемент, который следует за указанной фразой, и ограниченный другими элементами, которые не мешают или которые являются благоприятными для активности или эффектов указанных элементов, как подробно описано в настоящем описании. Таким образом, фраза «по существу состоящий из...» означает, что указанные элементы являются требуемыми или необходимыми, но другие элементы являются необязательными и могут присутствовать или отсутствовать в зависимости от того, влияют ли они на активность или эффекты указанных элементов.

Термин «IL4R $\alpha$ » относится к субъединице  $\alpha$  рецептора интерлейкина 4. Термин «IL4R $\alpha$ » включает варианты, изоформы, гомологи, ортологи и паралоги. Например, в некоторых случаях антитело, специфичное к белку IL4R $\alpha$  человека, может перекрестно реагировать с белком IL4R $\alpha$  вида, отличного от человека (например, обезьяны). В других вариантах осуществления антитело, специфичное к белку IL4R $\alpha$  человека, может быть полностью специфичным к белку IL4R $\alpha$  человека и не вступает в перекрестную реакцию с белками других видов или других типов или может вступать в перекрестную реакцию с IL4R $\alpha$ , полученным от некоторых других видов, но не от всех других видов.

Термин «IL4R $\alpha$  человека» относится к белку IL4R $\alpha$ , имеющему аминокислотную последовательность человека, например, аминокислотную последовательность IL4R $\alpha$  человека с регистрационным № Genbank NP\_001244335.1. Термины «IL4R $\alpha$  яванского макака» и «IL4R $\alpha$  обезьяны мармозетки» относятся к последовательностям IL4R $\alpha$ , имеющим, например, аминокислотные последовательности с регистрационными № Genbank EHH60265.1 и NP\_001244161.1, соответственно.

Термин «антитело» в настоящем документе включает полноразмерные антитела и любой их антигенсвязывающий фрагмент или одну цепь. Полноразмерное антитело представляет собой гликопротеин, содержащий две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные дисульфидными связями. Каждая из тяжелых цепей состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно V<sub>H</sub>) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>. Каждая из легких цепей состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно V<sub>L</sub>) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена C<sub>L</sub>. Области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> также могут быть разделены на гиперпеременные области, известные как определяющие комплементарность области (CDR), которые разделены более консервативными каркасными областями (FR). Каждая V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелых цепей и легких цепей содержат связывающие домены, которые взаимодействуют с антигенами. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

В данном документе «антигенсвязывающий фрагмент» антитела (или сокращенно «фрагмент антитела») относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, белком IL4R $\alpha$ ). Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществлена с помощью фрагментов полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых «антигенсвязывающим фрагментом» антитела, включают: (i) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub> и C<sub>H1</sub>; (ii) фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидной связью в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из V<sub>H</sub> и C<sub>H1</sub>; (iv) фрагмент Fv, состоящий из V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub> одного плеча антитела; (v) фрагмент dAb, состоящий из V<sub>H</sub> (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546); (vi) выделенные определяющие комплементарность области (CDR); и (vii) нанотело, переменную область тяжелой цепи, содержащую один

вариабельный домен и два константных домена. Кроме того, хотя два домена  $V_L$  и  $V_H$  фрагмента Fv кодируются различными генами, они могут быть соединены с помощью синтетического линкера с помощью рекомбинантных средств в одну белковую цепь, в которой  $V_L$  и  $V_H$  спариваются с образованием одновалентной молекулы (называемой одноцепочечным Fv (scFv); см., например, Bird et al., (1988) Science 242:423-426; и Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также включены в термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела. Эти фрагменты антител могут быть получены с использованием общепринятых методик, известных специалистам в данной области техники, и фрагменты могут быть подвергнуты функциональному скринингу с использованием того же способа, что и полноразмерные антитела.

В данном документе термин «выделенное антитело» относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, обладающих различной антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с белком IL4R $\alpha$ , по существу не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от белка IL4R $\alpha$ ). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с белком IL4R $\alpha$  человека, может быть перекрестно реагирующим с другими антигенами, такими как белок IL4R $\alpha$  других видов. Кроме того, выделенное антитело по существу не содержит других клеточных материалов и/или химических веществ.

В данном документе термин «мышинное антитело» относится к антителу, в котором каркасные области и CDR в вариабельной области получены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии мыши. Кроме того, если указанное антитело содержит константную область, указанная константная область также происходит из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии мыши. Антитело мыши в настоящем изобретении может содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии мыши (например, мутации, введенные случайными или точечными мутациями *in vitro* или соматическими мутациями *in vivo*). Однако термин «мышинное антитело», используемый в данном документе, не включает антитела, в которых последовательности CDR других видов млекопитающих вставлены между последовательностями каркасной области мыши.

«Химерное антитело» относится к антителу, полученному путем объединения генетического материала нечеловеческого происхождения с генетическим материалом человеческого происхождения. Или, в более общем плане, химерное антитело относится к антителу, которое объединяет генетические вещества одного вида с генетическими веществами другого вида.



В данном документе термин «гуманизированное антитело» относится к антителу вида, отличного от человека, последовательность белка которого была модифицирована для увеличения его сходства с природным человеческим антителом. В некоторых конкретных примерах «гуманизированное антитело» содержит определяющие комплементарность области (CDR), полученные из антитела нечеловеческого происхождения, и каркасные области (FR) и константные области, полученные из антитела человека.

Термин «изотип» относится к классу антител, кодируемых генами константной области тяжелой цепи (например, IgM или IgG1).

Фразы «антиген-распознающее антитело» и «антитело, специфичное к антигену/антитело, обладающее специфичностью к антигену» используются в настоящем документе взаимозаменяемо с термином «антитело, специфически связывающееся с антигеном».

В данном документе антитело «специфически связывающееся с IL4R $\alpha$  человека» относится к антителу, которое связывается с белком IL4R $\alpha$  человека (и, возможно, с белком IL4R $\alpha$  одного или более видов, отличных от человека), но по существу не связывается с белками, отличными от IL4R $\alpha$ . Предпочтительно антитело связывается с IL4R $\alpha$  человека с «высокой аффинностью», то есть связывается с IL4R $\alpha$  человека со значением  $K_D$   $5,0 \times 10^{-8}$  М или менее, предпочтительно  $1,0 \times 10^{-8}$  М или менее и более предпочтительно  $7,0 \times 10^{-9}$  М или менее.

В данном документе термин «по существу не связывается с» белком или клеткой относится к отсутствию связывания с белком или клеткой или отсутствию связывания с белком или клеткой с высокой аффинностью, то есть связыванию с белком или клеткой со значением  $K_D$  (константа диссоциации)  $1,0 \times 10^{-6}$  М или более, предпочтительно  $1,0 \times 10^{-5}$  М или более, более предпочтительно  $1,0 \times 10^{-4}$  М или более, еще более предпочтительно  $1,0 \times 10^{-3}$  М или более и еще более предпочтительно  $1,0 \times 10^{-2}$  М или более.

Термин «высокая аффинность» для антител IgG относится к тому, что антитело имеет значение  $K_D$  для антигена  $1,0 \times 10^{-6}$  М или менее, предпочтительно  $5,0 \times 10^{-8}$  М или менее, более предпочтительно  $1,0 \times 10^{-8}$  М или менее, еще более предпочтительно  $7,0 \times 10^{-9}$  М или менее и еще более предпочтительно  $1,0 \times 10^{-9}$  М или менее. Однако для других изо типов антител «высокоаффинное» связывание может отличаться. Например, для изо типа IgM «высокоаффинное» связывание относится к тому, что антитело имеет значение  $K_D$   $1,0 \times 10^{-6}$  М или менее, предпочтительно  $1,0 \times 10^{-7}$  М или менее и более предпочтительно  $1,0 \times 10^{-8}$  М или менее.

В данном документе термин « $K_{ассоц}$ » или « $K_a$ » относится к скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, и термин « $K_{дис}$ » или « $K_d$ » относится к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. В данном документе термин « $K_D$ » относится к константе диссоциации, которая представляет собой отношение  $K_d$  к  $K_a$  (т.е.  $K_d/K_a$ ) и выражается в молярной концентрации (M). Значение  $K_D$  антитела может быть определено с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. Предпочтительный способ определения значения  $K_D$  антитела включает использование поверхностного плазмонного резонанса, предпочтительно с использованием биосенсорной системы, такой как система *Viacore*<sup>TM</sup>.

Термин « $EC_{50}$ », также известный как полумаксимальная эффективная концентрация, относится к концентрации антитела, которая индуцирует ответ на полпути между исходным уровнем и максимумом после определенного времени воздействия. Термин « $IC_{50}$ », также известный как полумаксимальная ингибирующая концентрация, относится к концентрации антитела, которая ингибирует специфическую биологическую или биохимическую функцию на 50% по сравнению со случаем, когда антитело отсутствует.

Термин «субъект» включает любого человека или животное, не являющееся человеком. Термин «животное, не являющееся человеком» включает всех позвоночных, таких как млекопитающие и немлекопитающие, такие как приматы, не являющиеся человеком, овцы, собаки, кошки, коровы, лошади, куры, земноводные и рептилии; млекопитающие, такие как приматы, не являющиеся человеком, овцы, собаки, кошки, коровы и лошади, являются предпочтительными.

Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству антитела по настоящему изобретению, достаточному для предотвращения или облегчения симптомов, связанных с заболеваниями или состояниями (например, рак), и/или уменьшения тяжести заболеваний или патологических состояний. Следует понимать, что терапевтически эффективное количество связано с заболеванием, подлежащим лечению, где фактическое эффективное количество может быть легко определено специалистами в данной области техники.

Термин «идентичность» относится к сходству последовательностей между двумя полинуклеотидными последовательностями или между двумя полипептидами. Сравнение последовательностей между двумя последовательностями и определение процентной идентичности может быть проведено с помощью алгоритма BLASTN/BLASTP на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации США с настройками по умолчанию.

Термины «Хп» и «Хаа» являются эквивалентными и относятся к неопределенной аминокислоте, объем которой определен последующими определениями в соответствующем описании.

Аспекты настоящего изобретения более подробно описаны ниже.

Антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент

Антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент в настоящем изобретении специфически связывается с IL4R $\alpha$  человека с сопоставимой, если не лучшей аффинностью/способностью связывания, чем зарегистрированные антитела к IL4R $\alpha$  (например, дупилумаб).

Антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению способно блокировать связывание IL4R $\alpha$  с IL4 или IL13-IL13R $\alpha$ 1, тем самым блокируя соответствующую внутриклеточную передачу сигнала, с сопоставимой или превосходящей блокирующей активностью с зарегистрированными антителами к IL4R $\alpha$  (например, дупилумабом).

Предпочтительно, антитело к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению представляет собой гуманизированное моноклональное антитело. Дополнительно или альтернативно, антитело к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению может представлять собой, например, мышинное, химерное или человеческое моноклональное антитело.

Антитело к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению представляет собой моноклональное антитело со структурными и химическими свойствами, как описано ниже и в примерах. Идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой/легкой цепи антител приведены в таблице 1 ниже. Некоторые антитела имеют одинаковые V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub>. Константная область тяжелой цепи антитела может представлять собой константную область тяжелой цепи IgG4 человека, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, и константная область легкой цепи антитела может представлять собой константную область к человека, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14.

Таблица 1. Идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой/легкой цепи

| Антитело | VH-<br>CD<br>R1 | VH-<br>CD<br>R2 | VH-<br>CDR3 | VH | VL-<br>CDR1 | VL-<br>CDR2 | VL-<br>CD<br>R3 | VL |
|----------|-----------------|-----------------|-------------|----|-------------|-------------|-----------------|----|
| C2C1A1A1 | 1               | 2               | 3           | 7  | 4           | 5           | 6               | 10 |

|                    |  |  |  |  |  |  |  |   |
|--------------------|--|--|--|--|--|--|--|---|
| huC2C1A1A<br>1-V1  |  |  |  | 8, X <sub>1</sub> =W,<br>X <sub>2</sub> =S |  |  |  | 11, X <sub>1</sub> =L,<br>X <sub>2</sub> =I |
| huC2C1A1A<br>1-V2  |  |  |  | 8, X <sub>1</sub> =W,<br>X <sub>2</sub> =S |  |  |  | 12  |
| huC2C1A1A<br>1-V3  |  |  |  | 8, X <sub>1</sub> =W,<br>X <sub>2</sub> =S |  |  |  | 11, X <sub>1</sub> =F,<br>X <sub>2</sub> =V |
| huC2C1A1A<br>1-V4  |  |  |  | 8, X <sub>1</sub> =W,<br>X <sub>2</sub> =S |  |  |  | 11, X <sub>1</sub> =F,<br>X <sub>2</sub> =I |
| huC2C1A1A<br>1-V5  |  |  |  | 9  |  |  |  | 11, X <sub>1</sub> =L,<br>X <sub>2</sub> =I |
| huC2C1A1A<br>1-V6  |  |  |  | 9  |  |  |  | 12  |
| huC2C1A1A<br>1-V7  |  |  |  | 9  |  |  |  | 11, X <sub>1</sub> =F,<br>X <sub>2</sub> =V |
| huC2C1A1A<br>1-V8  |  |  |  | 9  |  |  |  | 11, X <sub>1</sub> =F,<br>X <sub>2</sub> =I |
| huC2C1A1A<br>1-V9  |  |  |  | 8, X <sub>1</sub> =L,<br>X <sub>2</sub> =A |  |  |  | 11, X <sub>1</sub> =L,<br>X <sub>2</sub> =I |
| huC2C1A1A<br>1-V10 |  |  |  | 8, X <sub>1</sub> =L,<br>X <sub>2</sub> =A |  |  |  | 12  |
| huC2C1A1A<br>1-V11 |  |  |  | 8, X <sub>1</sub> =L,<br>X <sub>2</sub> =A |  |  |  | 11, X <sub>1</sub> =F,<br>X <sub>2</sub> =V |
| huC2C1A1A<br>1-V12 |  |  |  | 8, X <sub>1</sub> =L,<br>X <sub>2</sub> =A |  |  |  | 11, X <sub>1</sub> =F,<br>X <sub>2</sub> =I |
| huC2C1A1A<br>1-V13 |  |  |  | 8, X <sub>1</sub> =W,<br>X <sub>2</sub> =A |  |  |  | 11, X <sub>1</sub> =L,<br>X <sub>2</sub> =I |
| huC2C1A1A<br>1-V14 |  |  |  | 8, X <sub>1</sub> =W,<br>X <sub>2</sub> =A |  |  |  | 12  |
| huC2C1A1A<br>1-V15 |  |  |  | 8, X <sub>1</sub> =W,<br>X <sub>2</sub> =A |  |  |  | 11, X <sub>1</sub> =F,<br>X <sub>2</sub> =V |
| huC2C1A1A<br>1-V16 |  |  |  | 8, X <sub>1</sub> =W,<br>X <sub>2</sub> =A |  |  |  | 11, X <sub>1</sub> =F,<br>X <sub>2</sub> =I |

CDR варибельной области тяжелой цепи и CDR варибельной области легкой цепи в Таблице 1 были определены согласно системе нумерации по Кабату (Kabat). Однако, как

хорошо известно в данной области техники, CDR также могут быть определены с помощью других систем нумерации, таких как система/способ нумерации по Чотиа, IMGT, AbM или по Контакту на основе последовательности вариабельной области тяжелой/легкой цепи. Если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент определены конкретными последовательностями CDR, объем антитела охватывает антитело или их антигенсвязывающие фрагменты, определенные последовательностями CDR, определенными любой системой нумерации в данной области техники (например, по Чотиа, IMGT, AbM или системой нумерации по Контакту).

Последовательности  $V_H$  и  $V_L$  (или последовательности CDR) других антител к IL4R $\alpha$ , которые связываются с IL4R $\alpha$  человека, могут быть «смешаны и спарены» с последовательностями  $V_H$  и  $V_L$  (или последовательностями CDR) антитела к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению. Предпочтительно, когда цепи  $V_H$  и  $V_L$  (или CDR в этих цепях) смешиваются и спариваются, последовательность  $V_H$  в конкретной паре  $V_H/V_L$  замещена структурно аналогичной последовательностью  $V_H$ . Аналогичным образом, предпочтительно заменять последовательность  $V_L$  в конкретной паре  $V_H/V_L$  структурно аналогичной последовательностью  $V_L$ .

Следовательно, в одном варианте осуществления антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению содержит:

- (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в Таблице 1; и
- (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в Таблице 1, или  $V_L$  другого антитела к IL4R $\alpha$ , где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с IL4R $\alpha$  человека.

В другом варианте осуществления антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению содержит:

- (a) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, указанные в Таблице 1; и
- (b) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельных областей легкой цепи, указанные в Таблице 1, или CDR другого антитела к IL4R $\alpha$ , где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с IL4R $\alpha$  человека.

В другом варианте осуществления антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент в настоящем изобретении содержит CDR2 вариабельной области тяжелой цепи антитела к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению и CDR других антител, которые связываются с IL4R $\alpha$  человека, например, CDR1 и/или CDR3 из вариабельной области тяжелой цепи

и/или CDR1, CDR2 и/или CDR3 из вариабельной области легкой цепи другого антитела к IL4R $\alpha$ .

Кроме того, в данной области техники хорошо известно, что независимо от доменов CDR1 и/или CDR2 домены CDR3 могут индивидуально определять специфичность связывания антитела с гомологичным антигеном, и что множество антител с одинаковой специфичностью связывания могут быть прогностически получены на основе общей последовательности CDR3.

Соответственно, в другом варианте осуществления антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент в настоящем изобретении содержит CDR2 вариабельной области тяжелой цепи антитела к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению и по меньшей мере CDR3 вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи антитела к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению, или CDR3 вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи другого антитела к IL4R $\alpha$ , где антитело специфически связывается с IL4R $\alpha$  человека. Такие антитела предпочтительно (a) конкурируют с антителом к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению за связывание с IL4R $\alpha$ ; (b) сохраняют функциональные свойства антитела к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению; (c) связываются с тем же эпитопом, что и антитело к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению; и/или (d) имеют сходную аффинность связывания с антителами к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению. В другом варианте осуществления антитело к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению может дополнительно содержать CDR2 вариабельной области легкой цепи антитела к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению или CDR2 вариабельной области легкой цепи другого антитела к IL4R $\alpha$ , где антитело специфически связывается с IL4R $\alpha$  человека. В другом варианте осуществления антитело к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению может дополнительно содержать CDR1 вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи антитела к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению, или CDR1 вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи другого антитела к IL4R $\alpha$ , где антитело специфически связывается с IL4R $\alpha$  человека.

В другом варианте осуществления антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент в настоящем изобретении содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи, каждая из которых содержит CDR1, CDR2 и CDR3, где последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 отличаются от последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 антитела к IL4R $\alpha$  в настоящем изобретении, и различие получено из одной или более консервативных модификаций. В данной области техники будет понятно, что некоторые консервативные модификации последовательности не устраняют антигенсвязывающую способность. См., например, Brummell et al., (1993) *Biochem* 32:1180-

8; de Wildt et al., (1997) Prot. Eng. 10:835-41; Komissarov et al., (1997) J. Biol. Chem. 272:26864-26870; Hall et al., (1992) J. Immunol. 149:1605-12; Kelley and O'Connell (1993) Biochem. 32:6862-35; Adib-Conquy et al., (1998) Int. Immunol. 10:341-6 and Beers et al., (2000) Clin. Can. Res. 6:2835-43.

Соответственно, в одном варианте осуществления антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержит переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи, каждая из которых содержит CDR1, CDR2 и CDR3, где:

(a) CDR1 переменной области тяжелой цепи содержит последовательность, указанную в Таблице 1, и/или ее консервативные модификации; и/или

(b) CDR2 переменной области тяжелой цепи содержит последовательности, указанные в Таблице 1, и/или их консервативные модификации; и/или

(c) CDR3 переменной области тяжелой цепи содержит последовательность, указанную в Таблице 1, и/или ее консервативные модификации; и/или

(d) CDR1, и/или CDR2, и/или CDR3 переменной области легкой цепи содержат последовательности, указанные в Таблице 1; и/или их консервативные модификации и

(e) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с IL4R $\alpha$  человека.

В данном документе термин «консервативная модификация последовательности» относится к аминокислотной модификации, которая существенно не влияет или не изменяет характеристику связывания антитела. Такие консервативные модификации включают аминокислотные замены, вставки и делеции. Модификации могут быть введены в антитело по настоящему изобретению с использованием стандартных методик, известных в данной области техники, например, точечной мутации и PCR-опосредованной (PCR - полимеразная цепная реакция) мутации. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, в которых аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим схожую боковую цепь. Группы аминокислотных остатков, имеющие сходные боковые цепи, известны в данной области техники. Такие группы аминокислотных остатков включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин и гистидин), аминокислоты с кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота), аминокислоты с незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин и триптофан), аминокислоты с неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин и метионин), аминокислоты с  $\beta$ -разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин и

изолейцин) и аминокислоты с ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан и гистидин). Таким образом, один или более аминокислотных остатков в области CDR антитела против IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению могут быть заменены другими аминокислотными остатками из той же группы боковой цепи, и полученное антитело может быть протестировано на сохранение функции (то есть функции, описанной выше) с помощью функциональных анализов, описанных в настоящем изобретении.

Фармацевтическая композиция, лиофилизированный препарат или изделие по настоящему изобретению имеют широкое применение *in vitro* и *in vivo*, относящееся, например, к лечению заболевания, связанного с чрезмерной передачей сигналов IL4 и/или IL13.

В одном аспекте антитела к IL4R $\alpha$  или их антигенсвязывающие фрагменты могут блокировать связывание IL4R $\alpha$  с IL4 или IL13-IL13R $\alpha$ 1, чтобы снизить иммунитет 2 типа. Настоящее изобретение относится к способу лечения аллергического заболевания, связанного с иммунитетом 2 типа у субъекта, включающему: введение субъекту фармацевтической композиции, лиофилизированного препарата или готового изделия по настоящему изобретению. Аллергическое заболевание может представлять собой атопический дерматит, анафилаксию, аллергический ринит или аллергическую астму.

В другом аспекте передача сигналов IL4 или IL13 может активировать STAT6, и было обнаружено, что ингибиторы STAT6 способны ингибировать рост раковых клеток. Настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, включающему: введение субъекту фармацевтической композиции, лиофилизированного препарата или готового изделия по настоящему изобретению. Неограничивающие примеры опухоли включают, но не ограничиваются ими, меланому, рак легкого, рак почки, рак предстательной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак яичников и уротелиальный рак.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу снижения или ингибирования активации клеток в ответ на IL-4 или IL-13 у субъекта. В некоторых вариантах осуществления ингибирование активации включает ингибирование продукции или секреции цитокина. В некоторых вариантах осуществления ингибирование активации включает ингибирование пролиферации. Клетки, которые реагируют на IL-4 путем активации гибридного рецептора IL-4R $\alpha$ / $\gamma$ c, включают, но не ограничиваются ими, В-клетки, эозинофилы и макрофаги. Клетки, которые реагируют на IL-13 путем активации гибридного рецептора IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1, включают, но не ограничиваются ими, фибробласты и гладкомышечные клетки. Соответственно, в одном варианте осуществления



настоящего изобретения предложен способ ингибирования пролиферации гладкомышечных клеток. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ ингибирования пролиферации фибробластов.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие. Все графические материалы по настоящему изобретению и все ссылки, последовательности Genbank, патенты и раскрытые патентные описания, процитированные в настоящем документе, явно включены в настоящий документ посредством ссылки.

### Примеры

Способы получения и очистки антитела к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению описаны в патентной заявке № PCT/CN2021077784, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

**Пример 1** Анализ аффинности антител к IL4R $\alpha$  с помощью поверхностного плазмонного резонанса BIACORE

Аффинность связывания и кинетику связывания антител к IL4R $\alpha$  (mAb) в настоящем изобретении характеризовали с помощью системы Biacore T200 (GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания, США).

Вкратце, IgG козы против человека (GE Healthcare, кат. № BR100839, Human Antibody Capture Kit) ковалентно присоединяли к чипу CM5 (чипу, покрытому карбоксиметилированным декстраном) через первичную аминогруппу с использованием стандартного набора для связывания аминов, поставляемого Biacore (GE Healthcare, Питтсбург, штат Пенсильвания, США). Не прореагировавшие части на поверхности биосенсора блокировали этаноламином. Затем антитело к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению при 66,67 нМ и эталонное антитело к IL4R $\alpha$  (дупилумаб, или DUPIXENT<sup>®</sup> или VM) при 10 мкг/мл направляли через чип со скоростью потока 10 мкл/мин. Рекомбинантный белок IL4R $\alpha$ -his человека (полученный собственными силами, аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 15), белок IL4R $\alpha$ -his яванского макака (Sino Biological Inc., кат. № 90897-C08H), или белок IL4R $\alpha$ -his мартышки (индивидуализированный продукт от Sino Biological Inc., обозначенный как cal-IL4R $\alpha$ -his, аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 16), серийно разбавленный буфером HBS EP (поставляемый Biacore), направляли через чип со скоростью потока 30 мкл/мин. Кинетику связывания антиген-антитело отслеживали в течение 2 мин, а кинетику диссоциации отслеживали в течение 10 мин. Кривые ассоциации

и диссоциации подгоняли в соответствии с моделью связывания Ленгмюра 1:1 с использованием программного обеспечения для оценки ВИА и определяли значения  $K_D$ ,  $K_a$  и  $K_d$ .

## Пример 2 Связывающая активность антител к IL4R $\alpha$ с IL4R $\alpha$

Связывающую активность антител к IL4R $\alpha$  в настоящем изобретении с IL4R $\alpha$  определяли с помощью ELISA (иммуоферментный анализ) с захватом, проточной цитометрии (FACS) и непрямого ELISA.

### 2.1 Анализ ELISA с захватом

Вкратце, аффинно очищенный IgG козы против человека (Fc $\gamma$ -фрагмент-специфический, Jackson Immunoresearch, кат. № 109-005-098) в PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) в концентрации 2 мкг/мл иммобилизовали на 96-луночном планшете при 100 мкл/лунку и инкубировали в течение ночи при 4 °C. Планшет промывали один раз промывочным буфером (PBS + 0,05% мас./об. Tween-20 (твин-20), PBST (PBS + Tween-20), а затем блокировали при 37 °C в течение 2 часов путем добавления 200 мкл/лунку блокирующего буфера (PBST, содержащего 5% мас./об. обезжиренного молока). Планшет снова промывали, и последовательно добавляли антитела к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению, эталон или отрицательный контроль hIgG (человеческий иммуноглобулин для внутривенной инъекции (pH 4), Hualan Biological Engineering Inc.), разбавленные в 5 раз от 66,7 нМ в PBST, содержащем 2,5% мас./об. обезжиренного молока, при 100 мкл на лунку. Планшет инкубировали в течение 40 мин при 37 °C и промывали 4 раза. Биотинилированный белок IL4R $\alpha$ -his человека (полученный собственными силами, аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 15, растворенный в PBST, содержащем 2,5% мас./об. обезжиренного молока в концентрации 0,14 нМ) добавляли при 100 мкл/лунку в 96-луночный планшет, покрытый антителами к IL4R $\alpha$ . Планшет инкубировали при 37 °C в течение 40 минут и промывали 4 раза. Добавляли 100 мкл/лунку меченного HRP (пероксидаза хрена) стрептавидина (разведенный в соотношении 1:10000 в PBST, Jackson Immuno Research, кат. № 016-030-084) и планшет инкубировали при 37 °C в течение еще 40 мин. После окончательной промывки добавляли 100 мкл/лунку субстрата ELISA TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) (Innogens, кат. № TMB-S-002) и планшет инкубировали. Через 10 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл/лунку 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при 25 °C и измеряли поглощение при 450 нм. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Graphpad Prism и фиксировали значения EC<sub>50</sub>.

### 2.2

### Клеточный анализ FACS на связывание

Активность связывания антител к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению с IL4R $\alpha$ , экспрессируемым на поверхности клеток 293F-IL4R $\alpha$ , определяли с помощью проточной цитометрии (FACS). Вкратце, клетки 293F (ThermoFisher Inc., кат. № 11625019) трансфицировали плазмидной конструкцией pCMV-T-P, содержащей нуклеотиды, кодирующие IL4R $\alpha$  человека (аминокислотные остатки 1-825 Uniprot # P24394-1) между EcoRI и XbaI. Стабильный пул клеток (обозначенный как 293F-IL4R $\alpha$ ) был выбран для последующего клеточного анализа FACS на связывание и клеточного анализа FACS на блокирование лиганда. Клетки 293F-IL4R $\alpha$  собирали из колб для культивирования клеток, дважды промывали и ресуспендировали в буфере FACS (фосфатный буферный солевой раствор (PBS), содержащий 2% об./об. фетальной бычьей сыворотки). Затем в 96-луночный планшет, содержащий  $2 \times 10^5$  клеток/лунку, добавляли антитела к IL4R $\alpha$  или контрольный образец, серийно разведенный в 4 раза в буфере FACS от 80 нМ при 100 мкл/лунку. Планшет инкубировали на ледяной бане в течение 40 мин. После того, как клетки дважды промывали буфером FACS, меченное R-фиикоэритрином аффиноочищенного IgG козы против человека (Fcy-фрагмент-специфический, Jackson Immunoresearch, кат. № 109-115-098, 1:1000, разбавленный в буфере FACS) добавляли по 100 мкл/лунку. После инкубации при 4 °C в течение 40 минут в темноте клетки трижды промывали и ресуспендировали в буфере FACS. Значения флуоресценции измеряли с использованием Becton Dickinson FACS Canto II-HTS. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Graphpad Prism и фиксировали значения EC<sub>50</sub>.

### 2.3 Анализ непрямого ELISA

Антитела к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению тестировали на перекрестную реактивность с белком IL4R $\alpha$  яванского макака или белком cal-IL4R $\alpha$ -his. Вкратце, белок IL4R $\alpha$ -his яванского макака (Sino Biological Inc., кат. № 90897-C08H) в карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,6) в концентрации 2 мкг/мл или белка cal-IL4R $\alpha$ -his (Sino Biological Inc., индивидуальный продукт, кат. № BAX2) в карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,6) при 0,2 мкг/мл иммобилизовали на 96-луночном планшете при 100 мкл/лунку и инкубировали при 37 °C в течение 2 часов. Планшет промывали один раз промывочным буфером (PBS + 0,05% мас./об. Tween-20, PBST), а затем блокировали при 37 °C в течение 2 часов путем добавления 200 мкл/лунку блокирующего буфера (PBST, содержащего 5% мас./об. обезжиренного молока). Планшет снова промывали и добавляли антитела к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению или контроль, серийно разбавленные в 5 раз от 66,7 до 0,004 нМ в PBST, содержащем 2,5% мас./об. обезжиренного молока, по 100 мкл на лунку. Планшет инкубировали в течение 40 мин при 37 °C. Планшеты промывали 4 раза и меченный пероксидазой аффинно очищенный фрагмент F(ab')<sub>2</sub> IgG козы против человека

(Fcγ-фрагмент-специфический, Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-036-098, 1:5000, разбавленный в буфере PBST) добавляли по 100 мкл/лунку. Планшет инкубировали в течение 40 мин при 37 °С. После окончательной промывки планшет добавляли ТМВ (Innogens) по 100 мкл/лунку для инкубации. Через 3-10 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл/лунку 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при 25 °С и измеряли поглощение при 450 нм. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Graphpad Prism и фиксировали значения EC<sub>50</sub>.

Пример 3 Блокирующая активность антител к IL4Rα в отношении IL4Rα-маркировки или взаимодействия IL4Rα-IL4

### 3.1 Анализ ELISA на блокирование лиганда

Способность антител к IL4Rα по настоящему изобретению блокировать взаимодействие IL4-IL4Rα определяли с помощью конкурентного ELISA. Вкратце, белок IL4Rα-his человека (полученный собственными силами, аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 15) в PBS при 2 мкг/мл иммобилизовали на 96-луночном планшете при 100 мкл/лунку и инкубировали в течение ночи при 4 °С. На следующий день планшет промывали промывочным буфером (PBS + 0,05% мас./об. Tween-20, PBST) перед добавлением PBST, содержащего 5% мас./об. обезжиренного молока. Затем планшет инкубировали при 37 °С в течение 2 часов для блокирования. Затем планшет снова промывали промывочным буфером.

Антитело к IL4Rα в настоящем изобретении или контроле последовательно разбавляли в 4 раза от 80 нМ в буфере PBST, содержащем 2,5% мас./об. обезжиренного молока, добавляли по 100 мкл/лунку в планшет, покрытый IL4Rα, и совместно инкубировали с белком IL4Rα-his человека в течение 40 мин при 37 °С. Планшет промывали 4 раза промывочным буфером перед 0,56 нМ биотинилированного белка IL4 человека (Sino Biological Inc., кат. № 11846-HNAE) добавляли по 100 мкл на лунку. Затем планшет инкубировали в течение 40 мин при 37 °С. Планшет снова промывали промывочным буфером перед помеченным HRP стрептавидином (1:10000, разведенным в буфере PBST, Jackson ImmunoResearch, кат. № 016-030-084) по 100 мкл/лунку. Затем планшет инкубировали в течение 40 мин при 37 °С. Планшет снова промывали промывочным буфером. Наконец, добавляли ТМВ и реакцию останавливали добавлением 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Измеряли оптическую плотность при 450 нм. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Graphpad Prism и фиксировали значения IC<sub>50</sub>.

### 3.2

### Анализ ELISA на блокирование эталона

Способность антител к IL4R $\alpha$  в настоящем изобретении блокировать эталонное IL4-IL4R $\alpha$  человека определяли с помощью конкурентного ELISA. Вкратце, эталон в PBS в концентрации 2 мкг/мл иммобилизовали на 96-луночном планшете при 100 мкл/лунку и инкубировали в течение ночи при 4 °C. На следующий день планшет промывали промывочным буфером (PBS + 0,05% мас./об. Tween-20, PBST) перед добавлением PBST, содержащего 5% мас./об. обезжиренного молока. Затем планшет инкубировали при 37 °C в течение 2 часов для блокирования. Во время блокирования 96-луночного планшета антитела к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению или контрольный образец последовательно разбавляли в 4 раза от 100 нМ биотинилированным белком IL4R $\alpha$ -his человека (полученным собственными силами, аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 15, растворенным в PBST, содержащем 2,5% мас./об. обезжиренного молока в концентрации 0,55 нМ) и инкубировали при 25 °C в течение 40 мин. После промывки планшета смесь антитело/IL4R $\alpha$ -his добавляли в количестве 100 мкл/лунку на планшет, покрытый эталоном. Планшет инкубировали при 37 °C в течение 40 мин и промывали промывочным буфером. Меченный HRP стрептавидин добавляли по 100 мкл/лунку и планшет инкубировали при 37 °C в течение 40 мин для обнаружения биотинилированного IL4R $\alpha$  человека, связанного с планшетом. Затем планшет снова промывали промывочным буфером. Наконец, добавляли TMB и реакцию останавливали добавлением 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Измеряли оптическую плотность при 450 нм. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Graphpad Prism и фиксировали значения IC<sub>50</sub>.

### 3.3 Клеточный анализ FACS на блокирование лиганда

Блокирующий эффект антител к IL4R $\alpha$  на активность связывания белка IL4 с поверхностью клетки IL4R $\alpha$  оценивали с помощью проточной цитометрии (FACS) с использованием клеток 293F-IL4R $\alpha$ , полученных выше.

Вкратце, клетки 293F-IL4R $\alpha$  собирали из колб для культивирования клеток, дважды промывали и ресуспендировали в буфере FACS (PBS, содержащий 2% об./об. фетальной бычьей сыворотки). Затем в 96-луночный планшет, содержащий 1×10<sup>5</sup> клеток/лунку, добавляли антитела к IL4R $\alpha$  или контрольный образец, серийно разведенный в 4 раза в буфере FACS от 80 нМ по 100 мкл/лунку. Планшет инкубировали на ледяной бане в течение 40 мин. Планшет дважды промывали буфером FACS перед 1,67 нМ биотинилированного белка IL4 человека (Sino Biological Inc., кат. № 11846-HNAE) добавляли по 100 мкл на лунку. Затем планшет инкубировали при 4 °C в течение 40 мин в темноте. Планшет дважды промывали буфером FACS перед помеченным R-фикоэритрином стрептавидином (1:500, разведенным в буфере FACS, Jackson Immunoresearch, кат. № 016-110-084) по 100 мкл/лунку. Затем планшет инкубировали при 4 °C в течение 40 мин в темноте. Клетки

дважды промывали и ресуспендировали в буфере FACS. Значения флуоресценции измеряли с использованием Becton Dickinson FACS Canto II-HTS. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Graphpad Prism и фиксировали значения IC<sub>50</sub>.

#### Пример 4 Клеточный функциональный анализ антител к IL4R $\alpha$

IL4 и IL13 могут связываться с IL4R $\alpha$  и индуцировать фосфорилирование STAT6 в клетках HEK293T-IL4R $\alpha$ -STAT6-STAT6LUC-LB2. Фосфорилирование STAT6 имеет решающее значение в сигнальном пути IL4/IL13.

Вкратце, клетки HEK293T (ATCC CRL-11268), естественно экспрессирующие IL13R $\alpha$ 1, стабильно трансфицировали плазмидной конструкцией pcDNA3.1-Puro (YouBio biological inc. кат. № VT9222) плазмидные конструкции (имеющие нуклеотиды, кодирующие IL4R $\alpha$  человека между BamHI и XhoI), плазмиду STAT6 (Sino Biological Inc., кат. № HG13190-NH; содержащий нуклеотиды, кодирующие STAT6 человека между KpnI и XbaI), и плазмиду STAT6-Luc репортерного гена люциферазы STAT6 (Yeasen Biological Inc., кат. № 11588ES03) для получения клеток HEK293T-IL4R $\alpha$ -STAT6-STAT6LUC-LB2 собственными силами. Затем для всех последующих функциональных анализов отбирали одиночную клетку клон LB2.

Изучали ингибирующее действие антител к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению на фосфорилирование STAT6, индуцированное IL4 и IL13.

Вкратце, клетки HEK293T-IL4R $\alpha$ -STAT6-STAT6LUC-LB2 в логарифмической фазе ресуспендировали в культуральной среде (RPMI1640 (Мемориальный институт Розуэлл-Парка) + 10% FBS) и высевали на 96-луночный планшет по 100 мкл/лунку, каждая лунка содержала  $5 \times 10^5$  клеток. Антитела к IL4R $\alpha$  по настоящему изобретению или контроля (включая антитело к CD22, полученное собственными силами), серийно разбавленные в 5 раз от 100 нМ, добавляли по 50 мкл на лунку. Планшет инкубировали в течение 30 мин при 37 °C. Белок IL4 (600 пг/мл, Sino Biological Inc., кат. № 11846-HNAE) или белка IL13 (50 нг/мл, Sino Biological Inc., кат. № 10369-HNAC) добавляли при 50 мкл на лунку и инкубировали при 37 °C в течение 20 мин. Планшет центрифугировали и дважды промывали окрашивающим буфером (полученным собственными силами, DPBS + 0,5% мас./об. BSA + 2 мМ EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота)) перед фиксирующим буфером (BD Biosciences Inc., кат. № 5545655) добавляли по 50 мкл на лунку. Затем планшет инкубировали при 4 °C в течение 30 мин. Клетки дважды промывали буфером для пермеабиллизации (BD Biosciences Inc., кат. № 558050) добавляли по 200 мкл на лунку. Затем клетки инкубировали в течение 30 мин на ледяной бане. Планшет трижды промывали окрашивающим буфером. Антитело к pSTAT6 (20-кратное разведение из исходного

раствора pSTAT6, BD Biosciences Inc., кат. № 562079), и планшет выдерживали на льду в течение 60 мин. Планшеты, наконец, дважды промывали, прежде чем клетки ресуспендировали в окрашивающем буфере. Значения флуоресценции измеряли с использованием Becton Dickinson FACS Canto II-HTS. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Graphpad Prism и фиксировали значения IC<sub>50</sub>.

#### Пример 5 Получение и характеристика химерного антитела

Вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи мышинового моноклонального антитела к IL4R $\alpha$  секвенировали, а идентификаторы последовательностей приведены в таблице 1.

Вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи мышинового моноклонального антитела C2C1A1A1 к IL4R $\alpha$  клонировали в вектор, содержащий константную область тяжелой цепи IgG4 человека (SEQ ID NO: 13), и вектор, содержащий константную область легкой цепи к человека (SEQ ID NO: 14), соответственно, где С-конец вариабельных областей был связан с N-концом соответствующих константных областей.

Вектор, содержащий нуклеотиды, кодирующие вариабельную область тяжелой цепи, связанную с константной областью тяжелой цепи IgG4 человека, и вектор, содержащий нуклеотиды, кодирующие вариабельную область легкой цепи, связанную с константной областью легкой цепи к человека, временно трансфицировали в 50 мл суспензии клеток 293F с 1 мг/мл PEI в соотношении конструкция легкой цепи: конструкция тяжелой цепи 60%:40%.

После шести дней культивирования в встряхиваемых колбах собирали клеточный супернатант, и клетки в супернатанте собирали центрифугированием и фильтровали через фильтр 0,22 мкм для выделения иммуноглобулина. Химерное антитело очищали с помощью аффинной хроматографии с белком А. Вкратце, колонка с белком А сефарозой (Bestchrom (Shanghai) Biosciences, кат. № AA0273) промывали 5-10 объемами колонки буфера PBS. Супернатант клеток загружали в колонку с белком А сефарозой перед промывкой колонки буфером PBS до тех пор, пока абсорбция белка не достигала исходного уровня. Колонку промывали буфером для элюирования (0,1 М глицин-HCl, pH 2,7), и элюат немедленно собирали в пробирки объемом 1,5 мл и нейтрализовали буфером для нейтрализации (1 М трис-HCl, pH 9,0). Фракции, содержащие иммуноглобулин, объединяли и диализировали в течение ночи при 4 °C в PBS.

Очищенные антитела измеряли с помощью ELISA с захватом, конкурентного ELISA, анализа аффинности BIAcore, клеточного анализа FACS на связывание и

клеточного функционального анализа в соответствии с протоколами в примерах выше. Для мышиногo C2C1A1A1 протоколы обнаружения модифицировали на основе предыдущего примера, как описано ниже:

Для ELISA с захватом, IgG козы против человека заменяли на 2 мкг/мл IgG козы против мыши (Fcγ-фрагмент-специфический, Jackson ImmunoResearch, кат. № 115-005-008), 100 мкл/лунку;

Для BIAcore IgG козы против человека был заменен IgG козы против мыши (GE Healthcare, кат. № BR100838, набор для захвата мышиногo антитела), ковалентно связанное с чипом CM5;

Для клеточного анализа FACS на связывание меченного R-фикоэритрином аффинно очищенного IgG козы против человека заменяли на меченный R-фикоэритрином аффинно очищенного фрагмент F(ab')<sub>2</sub> IgG козы против мыши (Jackson ImmunoResearch, кат. № 115-116-146) по 100 мкл/лунку.

Результаты показаны в таблице 2, и данные показывают, что химерное антитело имеет сходную аффинность/емкость связывания и блокирующую активность с его исходным антителом мыши.

Таблица 2. Связывающая и функциональная активность химерного антитела

| Идентификатор mAb (моноклональное антитело) | Анализ ELISA с захватом IL4R человека (EC <sub>50</sub> , нМ) | BIAcore аффинность с IL4R человека (K <sub>D</sub> , М) | Клеточный анализ FACS на связывание (EC <sub>50</sub> , нМ) | Анализ ELISA на блокирование IL4-IL4Rα (IC <sub>50</sub> , нМ) | Функциональный клеточный анализ  |   |
|---|---|---|---|--|--|---|
|   |   |   |   |  | Ингибирование IL4-индуцированного фосфорилирования STAT6 (IC <sub>50</sub> , нМ) | Ингибирование IL13-индуцированного фосфорилирования STAT6 (IC <sub>50</sub> , нМ) |
| Мышиное C2C1A1A1                            | 0,03  | 1,195E-10   | 0,31  | 1,89   | 0,19   | 0,27  |
| Химерное C2C1A1A1                           | 0,05  | 5,219E-10   | 0,63  | 3,12   | 0,27   | 0,56  |
| Эталон                                      | 0,05  | 4,656E-10   | 0,46  | 2,06   | 0,37   | 0,48  |

Пример 6 Гуманизация моноклонального антитела к IL4Rα



Мышиное антитело C2C1A1A1 к IL4R $\alpha$  было гуманизировано и дополнительно охарактеризовано. Гуманизацию мышиного антитела проводили с использованием установленного способа прививки CDR, как описано ниже.

Чтобы выбрать акцепторный каркас для гуманизации мышиного антитела C2C1A1A1, последовательности переменных областей легкой и тяжелой цепи каждого мышиного антитела подвергали BLAST-тестированию против базы данных генов иммуноглобулина человека. Антитело зародышевой линии человека с наивысшей гомологией было выбрано в качестве акцепторного каркаса для гуманизации. CDR переменной области тяжелой/легкой цепи мышиного антитела встраивали в выбранный каркас, а остатки в каркасных областях дополнительно подвергали обратной мутации с получением большего количества переменных областей тяжелой/легкой цепи-кандидатов. В общей сложности было получено 16 иллюстративных гуманизированных антител C2C1A1A1, обозначенных как huC2C1A1A1-V1 - huC2C1A1A1-V16. Идентификаторы последовательностей переменной области тяжелой/легкой цепи приведены в таблице 1.

Вектор, содержащий нуклеотиды, кодирующие гуманизованную переменную область тяжелой цепи, связанную с константной областью тяжелой цепи IgG4 человека (SEQ ID NO: 13), и вектор, содержащий нуклеотиды, кодирующие гуманизованную переменную область легкой цепи, связанную с константной областью легкой цепи человека (SEQ ID NO: 14), временно трансфицировали в 50 мл суспензии клеток 293F с 1 мг/мл PEI в соотношении конструкция легкой цепи:конструкция тяжелой цепи 60%:40%.

После шести дней культивирования в встряхиваемых колбах собирали клеточный супернатант, и клетки в супернатанте собирали центрифугированием и фильтровали через фильтр 0,22 мкм для выделения иммуноглобулина. Антитело очищали с помощью аффинной хроматографии с белком А. Вкратце, колонка с белком А сефарозой (Westchrom (Shanghai) Biosciences, кат. № AA0273) промывали 5-10 объемами колонки буфера PBS. Супернатант клеток загружали в колонку с белком А сефарозой перед промывкой колонки буфером PBS до тех пор, пока абсорбция белка не достигала исходного уровня. Колонку промывали буфером для элюирования (0,1 М глицин-HCl, pH 2,7), и элюат немедленно собирали в пробирки объемом 1,5 мл и нейтрализовали буфером для нейтрализации (1 М трис-HCl, pH 9,0). Фракции, содержащие иммуноглобулин, объединяли и диализировали в течение ночи при 4 °C в PBS.

Пример 7      Характеристика гуманизированных антител

Согласно протоколу в приведенных выше примерах, аффинность связывания гуманизированных антител с IL4R $\alpha$  человека оценивали с помощью методики Biacore, и значения  $K_a$ ,  $K_d$  и  $K_D$  определяли и обобщали в таблице 3.

Таблица 3. Аффинность связывания гуманизированных моноклональных антител C2C1A1A1

| mAb                                       | Кинетика Biacore       |                   |                   |             |            |                 |
|---|------------------------|-------------------|-------------------|-------------|------------|-----------------|
|   | IL4R $\alpha$ человека |                   |                   |             |            |                 |
|   | $K_a$ (1/Mc)           | $K_d$ (1/s)       | $K_D$ (M)         | Начало (RU) | Конец (RU) | Диссоциация (%) |
| Химерное C2C1A1A1                         | 3,29E+05               | менее<br>1,00E-05 | менее<br>3,04E-11 | 67,1        | 65,8       | минус 1,94 %    |
| Супернатант, содержащий химерный C2C1A1A1 | 3,64E+05               | 4,04E-05          | 1,11E-10          | 40          | 40,4       | 1,00 %          |
| huC2C1A1A1-V1                             | 1,29E+05               | менее<br>1,00E-05 | менее<br>7,73E-11 | 43,9        | 44         | 0,23 %          |
| huC2C1A1A1-V2                             | 2,26E+05               | менее<br>1,00E-05 | менее<br>4,42E-11 | 50,4        | 50,3       | минус 0,20 %    |
| huC2C1A1A1-V3                             | 2,57E+05               | менее<br>1,00E-05 | менее<br>3,89E-11 | 48,6        | 48,3       | минус 0,62 %    |
| huC2C1A1A1-V4                             | 4,55E+05               | менее<br>1,00E-05 | менее<br>2,20E-11 | 49,5        | 49,6       | 0,20 %          |
| huC2C1A1A1-V5                             | 2,65E+06               | 7,50E-05          | 2,83E-11          | 65,8        | 64,3       | минус 2,28 %    |
| huC2C1A1A1-V6                             | 3,83E+05               | менее<br>1,00E-05 | менее<br>2,61E-11 | 50,9        | 50,6       | минус 0,59 %    |
| huC2C1A1A1-V7                             | 2,63E+05               | менее<br>1,00E-05 | менее<br>3,80E-11 | 60,5        | 60,1       | минус 0,66 %    |
| huC2C1A1A1-V8                             | 2,78E+05               | менее<br>1,00E-05 | менее<br>3,60E-11 | 65,2        | 64,4       | минус 1,23 %    |
| huC2C1A1A1-V9                             | 1,97E+05               | менее<br>1,00E-05 | менее<br>5,07E-11 | 41,2        | 41,1       | минус 0,24 %    |

|                |           |                   |                   |      |      |              |
|----------------|-----------|-------------------|-------------------|------|------|--------------|
| huC2C1A1A1-V10 | 3,29E+05  | менее<br>1,00E-05 | менее<br>3,04E-11 | 64,9 | 63,9 | минус 1,54 % |
| huC2C1A1A1-V11 | 3,30E+05  | менее<br>1,00E-05 | менее<br>3,03E-11 | 54,2 | 53,7 | минус 0,92 % |
| huC2C1A1A1-V12 | 3,02E+05  | 1,42E-05          | 4,70E-11          | 53,1 | 52,1 | минус 1,88 % |
| huC2C1A1A1-V13 | 1,193E+05 | менее<br>1,00E-05 | менее<br>8,38E-11 | 36,4 | 36,7 | 0,82 %       |
| huC2C1A1A1-V14 | 1,53E+05  | менее<br>1,00E-05 | менее<br>6,54E-11 | 50,1 | 50,5 | 0,80 %       |
| huC2C1A1A1-V15 | 2,30E+05  | менее<br>1,00E-05 | менее<br>4,35E-11 | 69   | 69,2 | 0,29 %       |
| huC2C1A1A1-V16 | 2,96E+05  | менее<br>1,00E-05 | менее<br>3,38E-11 | 47,3 | 47,1 | минус 0,42 % |
| Эталон         | 3,33E+05  | 6,25E-05          | 1,88E-10          | 71,9 | 70   | минус 2,64 % |

---


$$\text{Диссоциация (\%)} = (\text{Конец (RU)} - \text{Начало (RU)}) / \text{Начало (RU)}$$

Результаты показывают, что гуманизированные антитела имеют сходную аффинность связывания с IL4R $\alpha$  человека с химерным антителом, и по сравнению с эталоном все гуманизированные антитела huC2C1A1A1 демонстрировали более высокую аффинность связывания с IL4R $\alpha$  человека.

В соответствии с протоколом в приведенных выше примерах гуманизированные антитела huC2C1A1A1-V14 и huC2C1A1A1-V15 дополнительно анализировали с помощью Biacore, ELISA с захватом, непрямого ELISA, клеточного анализа FACS на связывание, конкурентного ELISA, клеточного анализа FACS на блокирование лиганда и функционального клеточного анализа.

Также исследовали термическую стабильность гуманизированного антитела huC2C1A1A1-V15. Вкратце, T<sub>m</sub> (температура плавления) определяли с помощью анализа теплового сдвига белка с использованием набора GloMelt™ Thermal Shift Protein Stability Kit (Biotium, кат. № 33022-T, кат. № 181214). Вкратце, краситель GloMelt™ размораживали до комнатной температуры. Флакон, содержащий краситель, перемешивали на мешалке и центрифугировали. Затем 5 мкл 200-кратного красителя добавляли к 95 мкл PBS для получения 10-кратного красителя. В реакционную систему добавляли 2 мкл 10× красителя и 10 мкг гуманизированного антитела и добавляли PBS, чтобы довести общий объем реакции до 20 мкл. Центрифужные пробирки, содержащие краситель и антитела, ненадолго

центрифугировали и помещали в термоциклер для PCR в реальном времени (Roche, LightCycler 480 II), в котором параметры программы кривой плавления показаны в Таблице 4. Результаты показаны в таблицах 5-1, 5-2 и 5-3, и данные демонстрируют, что гуманизированные антитела C2C1A1A1 демонстрируют сопоставимую, если не лучшую аффинность/активность связывания с IL4R $\alpha$  человека и способность блокировать IL4R $\alpha$ -IL4/IL13 по сравнению с эталоном.

Таблица 4. Параметры для программы кривой плавления

| Профильные процедуры     | Температура | Скорость изменения | Продолжительность |
|--------------------------|-------------|--------------------|-------------------|
| Первоначальное удержание | 25 °C       | Нет данных         | 30 с              |
| Кривая плавления         | 25-99 °C    | 0,1 °C/с           | нет данных        |

Таблица 5-1. Связывающая активность и функциональная активность гуманизированных моноклональных антител

| Идентификатор<br>mAb | Анализ связывания                        |                              |   |                                     |  |
|----------------------|--|------------------------------|---|-------------------------------------|--|
|                      | IL4R $\alpha$ -his человека              |                              |   | IL4R $\alpha$ -his яванского макака |  |
|                      | ELISA с захватом (EC <sub>50</sub> , нМ) | Віасоре (K <sub>D</sub> , М) | Клеточный анализ FACS на связывание (EC <sub>50</sub> , нМ) | Віасоре (K <sub>D</sub> , М)        | Непрямой ELISA (EC <sub>50</sub> , нМ) |
| Химерное C2C1A1A1    | 0,05                                     | 3,88E-10                     | 0,33  | Слабое связывание                   | 0,60                                   |
| huC2C1A1A1-V15       | 0,05                                     | 4,47E-10                     | 0,31  | Слабое связывание                   | 0,52                                   |
| huC2C1A1A1-V14       | 0,06                                     | 6,42E-10                     | 0,39  | Слабое связывание                   | 0,68                                   |
| Эталон               | 0,05                                     | 7,46E-10                     | 0,40  | Нет связывания                      | 0,67                                   |

Таблица 5-2. Связывающая активность и функциональная активность гуманизированных моноклональных антител

| Идентификатор mAb | Анализ связывания            |                               | Конкурентный ELISA  |   | Клеточный анализ FACS на блокирование лиганда (IC <sub>50</sub> , нМ) |
|-------------------|------------------------------|-------------------------------|---|---|---|
|                   | IL4R $\alpha$ -his           |                               | Анализ  | Анализ  |   |
|                   | Обезьяны мармозетки          | Непрямой                      | ELISA на блокирование IL4-IL4R $\alpha$ (IC <sub>50</sub> нМ) | ELISA на блокирование эталона (IC <sub>50</sub> , нМ) |   |
|                   | Вiacore (K <sub>D</sub> , М) | ELISA (EC <sub>50</sub> , нМ) |   |   |   |
| Химерное C2C1A1A1 | Слабое связывание            | 0,62                          | 2,46  | 0,17  | 0,48  |
| huC2C1A1A1-V15    | Слабое связывание            | 0,41                          | 2,03  | 0,16  | 0,50  |
| huC2C1A1A1-V14    | Слабое связывание            | 0,55                          | 2,17  | 0,17  | 0,58  |
| Эталон            | Нет связывания               | 1,72                          | 1,74  | 0,19  | 0,42  |

Таблица 5-3. Связывающая активность и функциональная активность гуманизированных моноклональных антител

| Идентификатор mAb | Клеточный функциональный анализ (IC <sub>50</sub> , нМ) |   | T <sub>m</sub> (температура плавления, °C) |                 |
|-------------------|---|---|--|-----------------|
|                   | Ингибирование   | Ингибирование                               |  |                 |
|                   | IL4-индуцированного фосфорилирования STAT6              | IL13-индуцированного фосфорилирования STAT6 | T <sub>m1</sub>                            | T <sub>m2</sub> |
|                   |   |   |  |                 |

|                   |      |      |               |      |
|-------------------|------|------|---------------|------|
| Химерное C2C1A1A1 | 0,26 | 0,39 | *             | *    |
| huC2C1A1A1-V15    | 0,61 | 0,60 | нет<br>данных | 72,0 |
| huC2C1A1A1-V14    | 0,64 | 0,73 | 65,5          | 74,0 |
| Эталон            | 0,70 | 0,84 | *             | *    |

Примечание: «\*» означает, что испытания еще не проводились.

#### Пример 8 Получение и скрининг фармацевтических композиций

Метод обнаружения:

(1) Эксклюзионная хроматография (SEC-UPLC): для определения чистоты антител в образце; использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию Thermo Vanquish F с колонкой Waters ACQUITY UPLC Protein BEH SEC Column (200 Å, 1,7 мкм, 4,6 мм×300 мм) и с предколонкой Waters ACQUITY UPLC Protein BEH SEC Guard Column (200 Å, 1,7 мкм, 4,6 мм×30 мм); элюирование проводили с использованием 50 ммоль/л фосфатного буфера + 200 ммоль/л раствора хлорида натрия (pH 7,0) в качестве подвижной фазы, а длина волны обнаружения составляла 280 нм. Процентное содержание макромолекулярных примесей и мономера иммуноглобулина рассчитывали путем нормализации площади.

(2) Дифференциальная сканирующая флуориметрия (DSF): температуру разворачивания (T<sub>m</sub>) образцов измеряли на анализаторе стабильности белка (NanoTemper, Prometheus NT.48); 10 мкл образца переносили в камеру для образцов с помощью капиллярной трубки и измеряли по следующей программе: начальная температура сканирования составляла 25 °С, конечная температура сканирования составляла 95 °С, а скорость изменения температуры составляла 0,3 °С/мин.

(3) Образцы анализировали на вязкость на вискозиметре HVROC-S (Rheosense, μVISC) с автоматическим режимом и фиксировали результаты анализа.

(4) Капиллярное изоэлектрическое фокусирование с визуализацией всей колонки (iCIEF): для определения вариантов заряда образца; устройство капиллярного изоэлектрического фокусирующего электрофореза для визуализации (ProteinSimple iCE3), система быстрой автоматической характеристики белка (Protein Simple, Maurice), капилляр кремнезема с покрытием (Protein Simple) и ультрафиолетовый детектор были приняты для обнаружения при длине волны 280 нм в ультрафиолетовом диапазоне. Продолжительность введения образца была установлена на 60 секунд, продолжительность предварительного фокусирования была установлена на 1 минуту при 1500 В, и продолжительность

фокусирования была установлена на 10 минут при 300 В. Процентную площадь пика вариантов заряда рассчитывали путем нормализации площади пика.

Получение буферных агентов:

(1) Буферный агент на основе гистидин-гистидин гидрохлорида содержит гистидин и гистидин гидрохлорид; в конкретном примере буферный агент на основе гистидин-гистидин гидрохлорида содержит гистидин и гистидин гидрохлорид моногидрат; например, 20 мМ буферного агента на основе гистидина и гистидин гидрохлорида (pH 5,8) состоит из около 1,17 мг/мл гистидина и около 2,62 мг/мл гистидин гидрохлорида моногидрата;

(2) Натрий-фосфатный буферный агент содержит динатрия гидрофосфат и натрия дигидрофосфат; в конкретном примере натрий-фосфатный буферный агент содержит натрия дигидрофосфат моногидрат и динатрия гидрофосфат додекагидрат; например, 20 мМ натрий-фосфатного буферного агента (pH 6,0) получали из около 2,539 мг/мл натрия дигидрофосфата моногидрата и около 0,573 мг/мл динатрия гидрофосфата додекагидрата;

(3) Буферный агент на основе ацетата натрия и уксусной кислоты содержит ацетат натрия и уксусную кислоту; в конкретном примере буферный агент на основе ацетата натрия и уксусной кислоты содержит тригидрат ацетата натрия и уксусную кислоту; например, 20 мМ буферного агента ацетат натрия-уксусная кислота (pH 6,0) получали из около 2,605 мг/мл тригидрата ацетата натрия и около 0,141 мг/мл уксусной кислоты.

Антитело против IL4R $\alpha$  (huC2C1A1A1-V15) переносили путем ультрафильтрации в буферные агенты, указанные в Таблице 6, и концентрировали. Затем добавляли поверхностно-активные вещества и стабилизаторы в соответствии с таблицей 6. После смешивания смесь фильтровали через фильтрующую мембрану с диаметром пор 0,22 мкм для стерилизации и аликвотировали во флаконы. Флаконы закрывали пробками и крышками. Результаты SEC-UPLC фармацевтических композиций F1-F4 показаны в таблице 7, где увеличение содержания макромолекулярных примесей F4 (с 1,36 до 5,66%) было выше, чем у F1-F3 после 1 месяца хранения при 40 °C.

Таблица 6. Компоненты фармацевтических композиций

| №  | Антитело к IL4R $\alpha$ | Буферный агент          | Поверхностно-активное вещество | Стабилизатор      |
|----|--------------------------|-------------------------|--------------------------------|-------------------|
| F1 | 175 мг/мл                | 20 мМ гистидин-гистидин | 0,4 мг/мл полисорбата 80       | 50 мг/мл сахарозы |

|    |           |   |                          |                   |
|----|-----------|---|--------------------------|-------------------|
|    |           | гидрохлорида, pH 5,0                          |                          |                   |
| F2 | 175 мг/мл | 20 мМ гистидин-гистидина гидрохлорида, pH 6,0 | 0,4 мг/мл полисорбата 80 | 50 мг/мл сахарозы |
| F3 | 175 мг/мл | 20 мМ фосфата натрия, pH 6,0                  | 0,4 мг/мл полисорбата 80 | 50 мг/мл сахарозы |
| F4 | 175 мг/мл | 20 мМ ацетат натрия-уксусной кислоты, pH 6,0  | 0,4 мг/мл полисорбата 80 | 50 мг/мл сахарозы |

Таблица 7. Результаты SEC-UPLC фармацевтических композиций

| Образец | Точки пробоотбора | SEC-UPLC (%)              |              |
|---------|-------------------|---------------------------|--------------|
|         |                   | Макромолекулярные примеси | Основной пик |
| F1      | День 0            | 0,77                      | 99,02        |
|         | 40 °С, неделя 1   | 1,29                      | 97,37        |
|         | 40 °С, неделя 2   | 1,57                      | 96,26        |
|         | 40 °С, месяц 1    | 2,46                      | 93,68        |
| F2      | День 0            | 0,95                      | 98,84        |
|         | 40 °С, неделя 1   | 1,5                       | 98,27        |
|         | 40 °С, неделя 2   | 1,9                       | 97,44        |
|         | 40 °С, месяц 1    | 2,42                      | 96,83        |
| F3      | День 0            | 1,35                      | 98,44        |
|         | 40 °С, неделя 1   | 2,16                      | 96,93        |
|         | 40 °С, неделя 2   | 2,44                      | 96,54        |
|         | 40 °С, месяц 1    | 3,37                      | 95,46        |
| F4      | День 0            | 1,36                      | 98,44        |
|         | 40 °С, неделя 1   | 2,43                      | 97,34        |
|         | 40 °С, неделя 2   | 2,10                      | 96,35        |
|         | 40 °С, месяц 1    | 5,66                      | 93,45        |

В качестве иллюстрации в качестве буферного агента был выбран 20 мМ гистидин-гистидин гидрохлорида. Антитело к IL4R $\alpha$  (huC2C1A1A1-V15) переносили путем



ультрафильтрации в буферные агенты, указанные в таблице 8, и концентрировали. Затем добавляли поверхностно-активные вещества и стабилизаторы в соответствии с таблицей 8. После смешивания смесь фильтровали через фильтрующую мембрану с диаметром пор 0,22 мкм для стерилизации и аликвотировали во флаконы. Флаконы закрывали пробками и крышками. Результаты Tm и SEC-UPLC фармацевтических композиций F5-F7 показаны в таблице 9, где увеличение содержания макромолекулярных примесей F6 было наименьшим после 1 месяца хранения при 40 °С.

Таблица 8. Компоненты фармацевтических композиций

| №  | Антитело к IL4R $\alpha$ | Буферный агент                               | Поверхностно-активное вещество | Стабилизатор      |                            |                      |
|----|--------------------------|--|--------------------------------|-------------------|----------------------------|----------------------|
|    |                          |  |                                |                   |                            |                      |
| F5 | 150 мг/мл                | 20 мМ гистидин-гистидин гидрохлорида, pH 5,8 | 0,4 мг/мл полисорбата 80       | 50 мг/мл сахарозы | 50 мМ аргинин гидрохлорида | /                    |
| F6 | 150 мг/мл                | 20 мМ гистидин-гистидин гидрохлорида, pH 5,8 | 0,4 мг/мл полисорбата 80       | /                 | 250 мМ пролина             | 20 мМ хлорида натрия |
| F7 | 150 мг/мл                | 20 мМ гистидин-гистидин гидрохлорида, pH 5,8 | 0,4 мг/мл полисорбата 80       | 50 мг/мл сахарозы | 250 мМ пролина             | 20 мМ хлорида натрия |

«/» означает отсутствие.

Таблица 9. Результаты Tm и SEC-UPLC фармацевтических композиций

| Образец | Точки пробоотбора | Tm (°C)   |      | SEC-UPLC (%)              |              |
|---------|-------------------|-----------|------|---------------------------|--------------|
|         |                   | Tm начала | Tm 1 | Макромолекулярные примеси | Основной пик |
| F5      | День 0            | 60,0      | 64,4 | 0,79                      | 98,28        |
|         | 40 °С, неделя 1   | *         | *    | 1,12                      | 98,04        |

|    |                 |      |      |      |       |
|----|-----------------|------|------|------|-------|
|    | 40 °С, неделя 2 | *    | *    | 1,34 | 97,68 |
|    | 40 °С, месяц 1  | *    | *    | 1,59 | 97,27 |
|    | 2-8 °С, месяц 1 | *    | *    | 0,83 | 98,3  |
| F6 | День 0          | 60,0 | 64,3 | 0,81 | 98,35 |
|    | 40 °С, неделя 1 | *    | *    | 1,25 | 97,82 |
|    | 40 °С, неделя 2 | *    | *    | 1,46 | 97,52 |
|    | 40 °С, месяц 1  | *    | *    | 1,42 | 97,44 |
|    | 2-8 °С, месяц 1 | *    | *    | 0,86 | 98,32 |
| F7 | День 0          | 60,6 | 65,2 | 0,76 | 98,52 |
|    | 40 °С, неделя 1 | *    | *    | 1,19 | 97,88 |
|    | 40 °С, неделя 2 | *    | *    | 1,42 | 97,58 |
|    | 40 °С, месяц 1  | *    | *    | 1,74 | 97,2  |
|    | 2-8 °С, месяц 1 | *    | *    | 0,86 | 98,35 |

Примечание: «\*» означает, что испытания еще не проводились.

В качестве иллюстрации в качестве буферного агента был выбран 20 мМ гистидин-гистидин гидрохлорида. Антитело к IL4R $\alpha$  (huC2C1A1A1-V15) переносили путем ультрафильтрации в буферные агенты, указанные в таблице 10, и концентрировали. Затем добавляли поверхностно-активные вещества и стабилизаторы в соответствии с таблицей 10. После смешивания смесь фильтровали через фильтрующую мембрану с диаметром пор 0,22 мкм для стерилизации и аликвотировали во флаконы. Флаконы закрывали пробками и крышками. Результаты T<sub>m</sub>, вязкости и SEC-UPLC и iCIEF фармацевтических композиций F8 и F9 показаны в таблице 11, где F8 продемонстрировал более низкую вязкость, чем F9.

Таблица 10. Компоненты фармацевтических композиций

| №  | Антитело к IL4R $\alpha$ | Буферный агент                               | Поверхностно-активное вещество | Стабилизатор   |                      |
|----|--------------------------|--|--------------------------------|----------------|----------------------|
|    |                          |  |                                |                |                      |
| F8 | 150 мг/мл                | 20 мМ гистидин-гистидин гидрохлорида, pH 5,8 | 0,4 мг/мл полисорбата 80       | 250 мМ пролина | 20 мМ хлорида натрия |
| F9 | 150 мг/мл                | 20 мМ гистидин-гистидин гидрохлорида, pH 5,8 | 0,4 мг/мл полисорбата 80       | 350 мМ пролина | /                    |

«/» означает отсутствие.

Таблица 11. Результаты T<sub>m</sub>, вязкости и SEC-UPLC и iCIEF фармацевтических композиций

| Образец | Точки пробоотбора | T <sub>m</sub> (°C)   |                 | Вязкость (мПа•с) | SEC-UPLC (%)              |              | iCIEF (%)       |              |                   |
|---------|-------------------|-----------------------|-----------------|------------------|---------------------------|--------------|-----------------|--------------|-------------------|
|         |                   | T <sub>m</sub> начала | T <sub>m1</sub> |                  | Макромолекулярные примеси | Основной пик | Кислые варианты | Основной пик | Основные варианты |
| F8      | День 0            | 59,4                  | 63,8            | 12,46            | 0,89                      | 98,76        | 16,0            | 74,6         | 9,4               |
|         | 40 °C, неделя 1   | *                     | *               | *                | 1,29                      | 98,27        | 19,3            | 70,0         | 10,7              |
|         | 40 °C, месяц 1    | *                     | *               | *                | 1,67                      | 97,17        | 31,6            | 59,9         | 8,6               |
|         | 2-8 °C, неделя 1  | *                     | *               | *                | 0,95                      | 98,73        | /               | /            | /                 |
|         | 2-8 °C, месяц 1   | *                     | *               | *                | 0,98                      | 98,67        | 18,8            | 71,0         | 10,2              |
|         | 2-8 °C, месяц 3   | *                     | *               | *                | 0,91                      | 98,7         | 19,9            | 71,3         | 8,8               |
|         | 2-8 °C, месяц 6   | *                     | *               | *                | 1,07                      | 98,58        | 20,7            | 69,1         | 10,2              |
| F9      | День 0            | 60,4                  | 64,7            | 15,98            | 0,77                      | 98,99        | 15,7            | 74,9         | 9,4               |
|         | 40 °C, неделя 1   | *                     | *               | *                | 1,24                      | 98,4         | 19,1            | 70,8         | 10,1              |
|         | 40 °C, месяц 1    | *                     | *               | *                | 1,47                      | 97,78        | 33,4            | 59,0         | 7,6               |
|         | 2-8 °C, неделя 1  | *                     | *               | *                | 1,00                      | 98,66        | /               | /            | /                 |
|         | 2-8 °C, месяц 1   | *                     | *               | *                | 0,96                      | 98,72        | 20,4            | 70,6         | 8,9               |
|         | 2-8 °C, месяц 3   | *                     | *               | *                | 0,92                      | 98,7         | 19,5            | 69,7         | 10,8              |
|         | 2-8 °C, месяц 6   | *                     | *               | *                | 1,08                      | 98,44        | 20,1            | 70,7         | 9,2               |

|  |         |  |  |  |  |  |  |  |  |
|--|---------|--|--|--|--|--|--|--|--|
|  | месяц 6 |  |  |  |  |  |  |  |  |
|--|---------|--|--|--|--|--|--|--|--|

Примечание: «\*» означает, что испытания еще не проводились.

Хотя настоящее изобретение было описано в сочетании с одним или более вариантами осуществления, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается такими вариантами осуществления, а предназначено для охвата всех альтернатив, модификаций и эквивалентов, включенных в сущность и объем прилагаемой формулы изобретения. Все ссылки, цитируемые в данном документе, включены в своем полном объеме посредством ссылки.

Информация о последовательности согласно настоящему изобретению обобщена в таблице 12 ниже.

Таблица 12. Информация о последовательности

|  |
|--|
| Описание   |
| Последовательность/SEQ ID NO.  |
| VH-CDR1 мышинового, химерного и гуманизированного C2C1A1A1<br>TYGMS (SEQ ID NO: 1)   |
| VH-CDR2 мышинового, химерного и гуманизированного C2C1A1A1<br>TINSNGGSTSYPSVK (SEQ ID NO: 2)   |
| VH-CDR3 мышинового, химерного и гуманизированного C2C1A1A1<br>FFRFRNAMDY (SEQ ID NO: 3)  |
| VL-CDR1 мышинового, химерного и гуманизированного C2C1A1A1<br>RTSENIYSYLA (SEQ ID NO: 4)   |
| VL-CDR2 мышинового, химерного и гуманизированного C2C1A1A1<br>NAKTLAE (SEQ ID NO: 5)   |
| VL-CDR3 мышинового, химерного и гуманизированного C2C1A1A1<br>QHYYGPPTWT (SEQ ID NO: 6)  |
| VH мышинового и химерного C2C1A1A1<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTSTYGMWVRQTPDKRLELVATINSNG<br>GSTSYPSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMFYCARFFRFRNAMDYW<br>GQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 7) |
| VH мышинового C2C1A1A1<br>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCT<br>GAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTACTTATGGCATGTCTTG  |

GGTTCGCCAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTTGGTTCGCAACCATTAATAGTA  
 ATGGTGGTAGTACCAGTTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCC  
 AGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGA  
 GGACACAGCCATGTTTTACTGTGCAAGATTTTTCCGCTTTAGGAATGCTATGGA  
 CТАCTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 17)

VH химерного C2C1A1A1

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGAGGATCCC  
 TGAAGCTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCACATACGGCATGTCTT  
 GGGTGAGACAGACCCCTGATAAGAGACTGGAGCTGGTGGCCACCATCAACAG  
 CAACGGCGGCAGCACCAGCTACCCCGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCT  
 CCAGAGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGTCCAGCCTGAAGAGC  
 GAGGATACAGCCATGTTCTACTGTGCCAGGTTCTTTAGGTTTCAGAAATGCCATG  
 GACTACTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACAGTGAGCAGC (SEQ ID NO: 18)

VH huC2C1A1A1-V1 - huC2C1A1A1-V4

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMWVRQAPGKGLVX<sub>1</sub>VX<sub>2</sub>TINSN  
 GGSTSYPDVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDY  
 WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 8) X<sub>1</sub> = W, X<sub>2</sub> = S

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMWVRQAPGKGLVWVSTINSN  
 GGSTSYPDVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDY  
 WGQGTLLTVSS

VH huC2C1A1A1-V5 - huC2C1A1A1-V8

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMWVRQSPDKRLEWVSTINSNG  
 GSTSYPDVKGRFTISRDNKNTLYLQMRSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYW  
 GQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 9)

VH huC2C1A1A1-V9 - huC2C1A1A1-V12

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMWVRQAPGKGLVX<sub>1</sub>VX<sub>2</sub>TINSN  
 GGSTSYPDVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDY  
 WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 8) X<sub>1</sub> = L, X<sub>2</sub> = A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMWVRQAPGKGLVLVATINSNG  
 GSTSYPDVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYW  
 GQGTLLTVSS

VH huC2C1A1A1-V13 - huC2C1A1A1-V16

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMWVRQAPGKGLVX<sub>1</sub>VX<sub>2</sub>TINSN  
 GGSTSYPDVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDY  
 WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 8) X<sub>1</sub> = W, X<sub>2</sub> = A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMWVRQAPGKGLVWVATINSN  
GGSTSYPD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDY  
WGQGLVTVSS  
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCCGGCGGCTCTCT  
GAGACTGAGCTGCGCTGCCTCCGGCTTCACCTTTAGCACCTACGGCATGAGCT  
GGGTGAGACAAGCCCCGGCAAAGGACTGGTGTGGGTGGCTACCATCAACAG  
CAACGGCGGCTCCACAAGCTACCCCGACAGCGTGAAGGGAAGATTCACCATCT  
CTAGAGACAACGCCAAGAACACACTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAGAGCC  
GAAGACACCGCTGTGTACTACTGCGCTAGATTCTTTAGATTTAGAAACGCCATG  
GACTACTGGGGCCAAGGCACACTGGTGACAGTGTCTCTCC (SEQ ID NO: 19)

VL мышиногo и химерногo C2C1A1A1

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRTSENIYSYLA WYQQKQKSPQFLVYNAKTLAE  
GVPSRFSGSGSGTQFSLNINSLQSEDFGSYYCQHYYGPPTWTFGGGTKLEIK (SEQ  
ID NO: 10)

VL мышиногo C2C1A1A1

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACT  
GTCACCATCACATGTCGAACAAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTAT  
CAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGTTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCTT  
AGCAGAAGGTGTGCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTT  
CTCTGAATATCAACAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAAC  
ATTATTATGGTCTCCACGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATC  
AAA (SEQ ID NO: 20)

VL химерногo C2C1A1A1

GACATCCAGATGACACAGAGCCCCGCCAGCCTGTCCGCCTCCGTTGGAGAGAC  
CGTGACCATCACCTGTAGGACCTCCGAGAATATCTACAGCTACCTGGCCTGGT  
ATCAACAGAAGCAGGGCAAGTCCCCTCAGTTTCTGGTGTACAACGCCAAGACC  
CTGGCCGAGGGCGTGCCCTCTAGGTTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCCAGTT  
CAGCCTGAATATCAACAGCCTGCAGAGCGAGGACTTTGGCAGCTACTACTGTC  
AGCACTACTACGGCCCTCCACCTGGACATTTGGCGGCAGCACAAAGCTGGAG  
ATCAAG (SEQ ID NO: 21)

VL huC2C1A1A1-V1, huC2C1A1A1-V5, huC2C1A1A1-V9 - huC2C1A1A1-V13

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRTSENIYSYLA WYQQKPGKAPKX<sub>1</sub>LX<sub>2</sub>YNAKTL  
AEGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGQGTKVEIK  
(SEQ ID NO: 11) X<sub>1</sub> = L, X<sub>2</sub> = I

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYNAKTLAE  
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGQGTKVEIK

VL huC2C1A1A1-V2, huC2C1A1A1-V6, huC2C1A1A1-V10 и huC2C1A1A1-V14  
DIQMTQSPSSLSASVGQRVTITCRTSENIYSYLAWYQQKQKPPRFLIYNAKTLAE  
GVPSRFSGSGSGTEFTLTITSLQAEDFGVYYCQHYYGPPTWTFGPGTKLEIK (SEQ  
ID NO: 12)

VL huC2C1A1A1-V3, huC2C1A1A1-V7, huC2C1A1A1-V11 и huC2C1A1A1-V15  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKAPKX<sub>1</sub>LX<sub>2</sub>YNAKTL  
AEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGQGTKVEIK  
(SEQ ID NO: 11) X<sub>1</sub> = F, X<sub>2</sub> = V  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKAPKFLVYNAKTLAE  
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGQGTKVEIK  
GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTCTCTGAGCGCTTCCGTGGGAGATAG  
AGTGACCATCACATGCAGAACCTCCGAGAACATCTACAGCTATCTGGCTTGGT  
ATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGTTCCTGGTGTACAACGCCAAGACA  
CTGGCTGAGGGCGTGCCTAGCAGATTCAGCGGCTCCGGCAGCGGCACAGACTT  
TACACTGACAATCAGCTCTCTGCAACCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCA  
GCACTACTATGGCCCCCTACATGGACCTTTGGCCAAGGCACCAAGGTGGAGA  
TCAAG (SEQ ID NO: 22)

VL huC2C1A1A1-V4, huC2C1A1A1-V8, huC2C1A1A1-V12 и huC2C1A1A1-V16  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKAPKX<sub>1</sub>LX<sub>2</sub>YNAKTL  
AEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGQGTKVEIK  
(SEQ ID NO: 11) X<sub>1</sub> = F, X<sub>2</sub> = I  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKAPKFLIYNAKTLAE  
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGQGTKVEIK

Константная область тяжелой цепи химерных и гуманизированных антител  
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV  
LQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAP  
EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ  
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL  
DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID  
NO: 13)  
GCCAGCACAAAGGGCCCTTCCGTGTTTCCCCTGGCCCCCTGCAGCAGGAGCAC  
CTCTGAGTCCACCGCCGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGACC

CGTGACCGTGAGCTGGAATTCCGGCGCCCTGACATCCGGCGTGACACACCTTCC  
CCGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACAGCCTGAGCTCCGTGGTGACAGTG  
CCTTCCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACATGTAATGTGGATCACAAGCCC  
AGCAACACAAAGGTGGATAAGAGAGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCC  
TCCCTGTCTGCCCCAGAGTTCCTGGGGCGGCCCTCTGTGTTCTGTTCCTCCCT  
AAGCCCAAGGACACACTGATGATCTCCAGGACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGT  
GGTGGACGTGAGCCAGGAGGACCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGATG  
GCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACAAAGCCAGAGAGGAGCAGTTTAATTC  
CACATACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACG  
GCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGAGCAACAAGGGCCTGCCTTCCTCCATCGAG  
AAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCCCAGGTGTACACAC  
TGCTCCCAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTG  
GTGAAGGGCTTCTACCCTAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCA  
GCCCCGAGAATAACTACAAGACAACACCCCCCGTGCTGGATTCCGATGGCAGCT  
TCTTTCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGATAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGCAAT  
GTGTTCACTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAA  
GAGCCTGTCCCTGAGCCTGGGCAAGTGA (SEQ ID NO: 23)

Константная область легкой цепи химерных и гуманизированных антител

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES  
VTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC\*  
(SEQ ID NO: 14)

CGTACGGTGGCGGCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG  
AAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG  
GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGA  
GAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC  
CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAG  
TCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG  
TGTTGA (SEQ ID NO: 24)

IL4R $\alpha$ -his человека

MGWLCSGLLPVSCLVLLQVASSGNMKVLQEPTCVSDYMSISTCEWKMNPTNC  
STELRLLYQLVFLLEAHTCIPENGGAGCVCHLLMDDVVSADNYTLDLWAGQQ  
LLWKGSFKPSEHVKPRAPGNLTVHTNVSDTLLL TWSNPYPPDNYLYNHLTYAVNI  
WSENDPADFRIYNVTYLEPSLRIAASTLKSIGSYRARVRAWAQCYNNTWSEWSPST  
KWHNSYREPFQHHHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 15)

IL4R $\alpha$ -his обезьяны мармозетки



MGWLCSGLLFPVSYLVLLQVAGSGSMKVLQEPTCVSDYISLSTCEWKMGGPTNCS  
AELRLVYQLVFLISETNMCVPENNGAAGCVCHLFMEDMVGADNYTLDLWAGQQ  
LLWKGSFKPSEHVKPKAPENLTVYTNVSETLLLWVSNPYPPDNYLYEKLTAVNI  
WNENDPTDSRIYDVITYQEPTLRIAASTLKSGVSYRARVRAWAQSINSTWSEWSPS  
TKWYNAYKEPFKHHHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 16)

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая: (a) антитело к IL4R $\alpha$  (рецептор интерлейкина 4-альфа) или его антигенсвязывающий фрагмент, (b) буферный агент, (c) поверхностно-активное вещество и (d) стабилизатор.

2. Фармацевтическая композиция по п. 1, где антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 (определяющая комплементарность область 1) вариабельной области тяжелой цепи, CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, CDR1 вариабельной области легкой цепи, CDR2 вариабельной области легкой цепи и CDR3 вариабельной области легкой цепи; CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, CDR1 вариабельной области легкой цепи, CDR2 вариабельной области легкой цепи и CDR3 вариабельной области легкой цепи содержат аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85% идентичные аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6, соответственно.

3. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2, где антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, 8 или 9, где аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 8 представляет собой:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGM<sub>SWVRQAPGKGLVX<sub>1</sub>VX<sub>2</sub></sub>TINS  
NGGSTSY<sub>PDSVKGRFTISRDN</sub>AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWG  
QGTLVTVSS, где в SEQ ID NO: 8, X<sub>1</sub> = W и X<sub>2</sub> = S, X<sub>1</sub> = L и X<sub>2</sub> = A или X<sub>1</sub> = W и X<sub>2</sub> = A;  
и/или

антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10, 11 или 12, где аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 11 представляет собой:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLA<sub>WYQQKPGKAPKX<sub>1</sub>LX<sub>2</sub></sub>YNAKTL  
AEGVPSRFSGSGSGTDFLT<sub>LISS</sub>LQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGGTKVEIK, где в  
SEQ ID NO: 11, X<sub>1</sub> = L и X<sub>2</sub> = I, X<sub>1</sub> = F и X<sub>2</sub> = V или X<sub>1</sub> = F и X<sub>2</sub> = I.

4. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-3, где антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи; вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная

область легкой цепи содержат: (1) аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85% идентичные аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 7 и 10, соответственно; (2) аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85% идентичные аминокислотным последовательностям, представленными в SEQ ID NO: 8 и 11, соответственно, где в SEQ ID NO: 8,  $X_1 = W$  и  $X_2 = S$ ; (3) аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85% идентичные аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 8 и 12, соответственно, где в SEQ ID NO: 8,  $X_1 = W$  и  $X_2 = S$ ; (4) аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85% идентичные аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 9 и 11, соответственно; (5) аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85% идентичные аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 9 и 12, соответственно; (6) аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85% идентичные аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 8 и 11, соответственно, где в SEQ ID NO: 8,  $X_1 = L$  и  $X_2 = A$ ; (7) аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85% идентичные аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 8 и 12, соответственно, где в SEQ ID NO: 8,  $X_1 = L$  и  $X_2 = A$ ; (8) аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85% идентичные аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 8 и 11, соответственно, где в SEQ ID NO: 8,  $X_1 = W$  и  $X_2 = A$  или (9) аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 85% идентичные аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 8 и 12, соответственно, где в SEQ ID NO: 8,  $X_1 = W$  и  $X_2 = A$ ;

где аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 8 представляет собой:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMWVRQAPGKGLVX<sub>1</sub>VX<sub>2</sub>TINS  
NGGSTSYPSVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWG  
QGTLVTVSS;

где аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 11 представляет собой:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPKX<sub>1</sub>LX<sub>2</sub>YNAKTL  
AEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGGGTKVEIK, где в  
SEQ ID NO: 11,  $X_1 = L$  и  $X_2 = I$ ,  $X_1 = F$  и  $X_2 = V$  или  $X_1 = F$  и  $X_2 = I$ .

5. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-4, где антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14.

6. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-5, где концентрация антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента составляет от 30 до 300 мг/мл, от 50 до 250 мг/мл, от 70 до 200 мг/мл, от 100 до 180 мг/мл, от 120 до 180 мг/мл, от 120 до 150 мг/мл или от 150 до 180 мг/мл.

7. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-6, где буферный агент включает фосфатный буферный агент, ацетатный буферный агент или буферный агент на основе гистидиновой соли; предпочтительно, фосфатный буферный агент представляет собой натрий-фосфатный буферный агент, ацетатный буферный агент представляет собой буферный агент на основе ацетата натрия и уксусной кислоты, и/или буферный агент на основе гистидиновой соли представляет собой буферный агент на основе гистидин-гистидин гидрохлорида;

необязательно, концентрация буферного агента составляет от 1 до 100 мМ, от 2 до 80 мМ, от 4 до 60 мМ, от 8 до 40 мМ, от 10 до 30 мМ, от 10 до 20 мМ или от 20 до 30 мМ.

8. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-7, где поверхностно-активное вещество содержит полисорбат 80 или полисорбат 20;

необязательно, концентрация поверхностно-активного вещества составляет от 0,01 до 2 мг/мл, от 0,05 до 1 мг/мл, от 0,1 до 0,8 мг/мл, от 0,2 до 0,6 мг/мл или от 0,2 до 0,4 мг/мл.

9. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-8, где стабилизатор выбран из одного или более из трегалозы, маннита, сахарозы, аргинина или их фармацевтически приемлемой соли, пролина и хлорида натрия;

необязательно, концентрация сахарозы составляет от 10 до 100 мг/мл, от 20 до 80 мг/мл, от 30 до 60 мг/мл, от 40 до 50 мг/мл или от 50 до 60 мг/мл; концентрация аргинина или его фармацевтически приемлемой соли составляет от 10 до 100 мМ, от 20 до 80 мМ, от 30 до 60 мМ, от 40 до 50 мМ или от 50 до 60 мМ; концентрация пролина составляет от 60 до 600 мМ, от 80 до 500 мМ, от 100 до 450 мМ, от 120 до 400 мМ, от 150 до 350 мМ, от 200 до 350 мМ или от 250 до 350 мМ; и/или концентрация хлорида натрия составляет от 1 до 80 мМ, от 2 до 60 мМ, от 4 до 50 мМ, от 8 до 40 мМ, от 10 до 30 мМ или от 10 до 20 мМ.

10. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-9, рН которой составляет от 4 до 7, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5,3 до 6,5, от 5,3 до 6,3, от 5,3 до 5,8 или от 5,8 до 6,3.

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-10, которая содержит:

(a) от 30 до 300 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента,

(b) от 1 до 100 мМ буферного агента,

(c) от 0,01 до 2 мг/мл поверхностно-активного вещества и

(d) стабилизатор, включающий трегалозу, маннит, сахарозу, аргинин или их фармацевтически приемлемую соль, пролин и/или хлорид натрия,

где рН фармацевтической композиции составляет от 4 до 7, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5,3 до 6,5, от 5,3 до 6,3, от 5,3 до 5,8 или от 5,8 до 6,3;

необязательно, фармацевтическая композиция содержит:

(a) от 30 до 300 мг/мл антитела к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающего фрагмента,

(b) от 1 до 100 мМ фосфатного буферного агента, ацетатного буферного агента или буферного агента на основе гистидиновой соли,

(c) от 0,01 до 2 мг/мл полисорбата 80 или полисорбата 20 и

(d) от 10 до 100 мг/мл сахарозы, от 10 до 100 мМ аргинина или его фармацевтически приемлемой соли, от 60 до 600 мМ пролина и/или от 1 до 80 мМ хлорида натрия,

где рН фармацевтической композиции составляет от 4 до 7, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5,3 до 6,5, от 5,3 до 6,3, от 5,3 до 5,8 или от 5,8 до 6,3.

12. Лиофилизированный препарат, содержащий антитело к IL4R $\alpha$  или его антигенсвязывающий фрагмент, где лиофилизированный препарат получен лиофилизацией фармацевтической композиции по любому из пп. 1-11; или лиофилизированный препарат способен образовывать фармацевтическую композицию по любому из пп. 1-11 после восстановления.

13. Способ лечения аллергического заболевания, связанного с избыточной передачей сигналов IL4 и/или IL13 у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 1-11 или лиофилизированной композиции по п. 12;

предпочтительно, аллергическое заболевание представляет собой атопический дерматит, анафилаксию, аллергический ринит или аллергическую астму.

14. Способ лечения опухоли, ассоциированной с повышенной активацией STAT6 (сигнальный белок и активатор транскрипции 6) у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 1-11 или лиофилизированной композиции по п. 12;

предпочтительно, опухоль представляет собой солидную опухоль; более предпочтительно, опухоль представляет собой меланому, рак легкого, рак почки, рак предстательной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак яичников и/или уротелиальный рак.

15. Способ снижения передачи сигналов IL4 и/или IL13 или снижения иммунного ответа типа 2 у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 1-11 или лиофилизированной композиции по п. 12;

предпочтительно, передача сигналов IL-4 и/или IL-13 проявляется активацией и/или пролиферацией В-клеток, эозинофилов и/или макрофагов, пролиферацией фибробластов и

пролиферацией гладкомышечных клеток; предпочтительно, пролиферация гладкомышечных клеток представляет собой пролиферацию гладкомышечных клеток дыхательных путей.