

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202491650

(13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.09.17

(51) Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2023.01.18

(54) НЕБУЛИЗАЦИЯ Fab-ФРАГМЕНТОВ

(31) 2200592.0

(32) 2022.01.18

(33) GB

(86) PCT/EP2023/051073

(87) WO 2023/139090 2023.07.27

(71) Заявитель:  
АРДЖЕНКС БВ (BE)

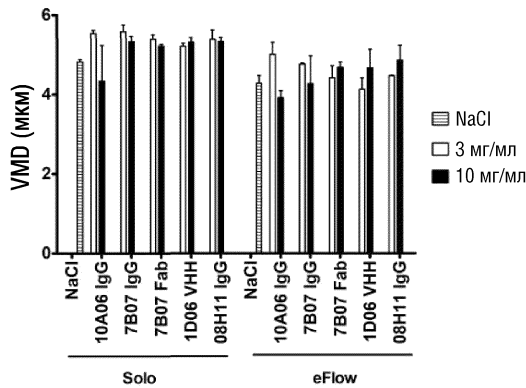
(72) Изобретатель:

Эзе-Вурк'х Натали (FR), Ван Дер  
Вонинг Поль Себастьян, Персье Жан-  
Мишель (BE)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам лечения заболевания или состояния, ассоциированного с присутствием или образованием кристаллов галектина-10, где способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей Fab-фрагмент, который связывает галектин-10, где композицию вводят в виде аэрозоля. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, и небулайзерам, содержащим указанные фармацевтические композиции. Фармацевтические композиции могут быть полезны для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с присутствием или образованием кристаллов галектина-10, такого как астма или муковисцидоз.



A1

202491650

202491650

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581113EA/042

### НЕБУЛИЗАЦИЯ FAV-ФРАГМЕНТОВ

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим Fav-фрагмент, который связывается с галектином-10, где композиция приготовлена в виде состава для аэролизации. Изобретение также относится к способам лечения заболевания или состояния, ассоциированного с присутствием или образованием кристаллов галектина-10, и фармацевтическим композициям для применения в таких способах. Способы включают введение фармацевтической композиции в виде аэрозоля, например, с помощью небулайзера. Изобретение также относится к небулайзерам, содержащим фармацевтические композиции.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Астма является хроническим воспалительным заболеванием проводящих дыхательных путей, которым страдают 300 миллионов человек во всем мире. Патологически заболевание характеризуется эозинофилией дыхательных путей и чрезмерным образованием загустевшей слизи, что у некоторых пациентов может привести к фатальным эозинофильным воспалительным реакциям, таким как необратимая обструкция мелких дыхательных путей.

При эозинофильной астме в эпителии дыхательных путей количество эозинофилов сильно увеличивается, что может привести к их гибели с образованием внеклеточных эозинофильных ловушек (ЕЕТоз). В процессе ЕЕТоза эозинофилы высвобождают ядерный хроматин вместе с белком галектин-10. При высокой концентрации внеклеточный галектин-10 начинает кристаллизоваться, образуя характерные бесцветные кристаллы, называемые кристаллами Шарко-Лейдена (CLC). Было обнаружено, что эти CLC повышают иммунитет типа 2 у астматиков и способствуют увеличению вязкоэластичности слизи и прикреплению пробки слизи к эпителию дыхательных путей. CLC также наблюдаются в тканях и секретах человека на фоне эозинофильной воспалительной реакции, такой как миелолейкоз, аллергические и паразитарные заболевания и эозинофильный муковисцидоз.

Авторы настоящего изобретения ранее показали, что антитела к галектину-10 способны растворять CLC (WO2019/197675). Имеются сообщения о том, что кристаллы галектина-10 могут вызывать провоспалительную реакцию *in vivo* и каким образом эту реакцию можно подавить путем введения антител к галектину-10, способных нарушать кристаллизацию галектина-10. Важно отметить, что антитела к галектину-10 оказались способными растворять CLC из образцов слизи пациентов. В совокупности это является демонстрацией того, как можно использовать агенты, нацеленные на кристаллизацию галектина-10, для лечения состояний и расстройств, при которых патология связана с наличием CLC.

CLC присутствуют в слизи этих пациентов и, следовательно, в просвете

дыхательных путей. Соответственно, единственным эффективным способом, позволяющим добраться до этих CLC, является локальная доставка в дыхательные пути. Аэрозольную доставку обычно используют для доставки небольших молекул лекарственных веществ; однако введение белков путем ингаляции встречается редко. В частности, что касается моноклональных антител (mAb), остается много проблем с точки зрения аэрозольной технологии и технологии приготовления лекарственных средств. Аэрозольная доставка оказывает физическое воздействие на mAb, которые могут вызывать изменения в конформации белков, таким образом потенциально снижая их биологическую активность, делая их иммуногенными.

Небулайзеры являются наиболее широко используемыми ингаляторами, генерирующими аэрозоли из белковых растворов; однако они не были достаточно успешными из-за наблюдаемых более низких уровней активности, частичной деградации белков и более высоких уровней агрегации (Respaud et al. 2014; mAbs; 6(5):1347-1355). Эти агрегаты могут приводить к потере терапевтической активности, и при попытке уменьшить образование агрегатов может возникнуть необходимость в оптимизации составов. Соответственно, существует потребность в дальнейшем совершенствовании доставки белковых терапевтических агентов путем ингаляции.

### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Разработка методов лечения антителами, подходящих для доставки путем ингаляции, оказалась сложной задачей для разработчиков лекарственных средств. При аэрозольной доставке антитела оказывается значительное физическое воздействие, часто приводящее к образованию агрегатов. Это может приводить к снижению биологической активности и повышению иммуногенности, вызванной реакцией антител на лекарственное средство (ADA). Авторы настоящего изобретения установили, что аэрозольная доставка Fab-фрагментов приводит к образованию незначительного количества белковых агрегатов, и во многих случаях к их отсутствию. В частности, было обнаружено, что Fab-фрагмент, полученный из полноразмерного IgG, может быть успешно аэрозольно доставлен, тогда как аэрозольная доставка полноразмерного аналога IgG приводит к агрегации. Как указано в настоящем описании, аэрозольно доставленные Fab-фрагменты, которые связываются с галектином-10, не только образуют малое количество агрегатов, но также сохраняют свою биологическую активность и эффективность. В частности, эти аэрозольно доставленные Fab-фрагменты по-прежнему связываются с галектином-10 и сохраняют способность сольбилизовать кристаллы галектина-10 (CLC). Следовательно, фармацевтические составы, содержащие Fab-фрагменты, могут быть приготовлены без необходимости добавления поверхностно-активных веществ, либо путем добавления поверхностно-активного вещества в низких концентрациях.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, для применения в способе лечения заболевания или состояния, ассоциированного с присутствием или образованием кристаллов галектина-10, где способ включает введение

нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, где композицию вводят в виде аэрозоля.

Во втором родственном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, ассоциированного с присутствием или образованием кристаллов галектина-10, где способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, где композицию вводят в виде аэрозоля.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние, ассоциированное с присутствием или образованием кристаллов галектина-10, выбирают из группы, состоящей из: астмы; хронического риносинусита; целиакии; гельминтной инфекции; эозинофильного воспаления желудочно-кишечного тракта; муковисцидоза (CF); аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АВРА); васкулита Черджа-Стросса; хронической эозинофильной пневмонии; и острого миелоидного лейкоза. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления заболевание или состояние, ассоциированное с присутствием или образованием кристаллов галектина-10, представляет собой астму или муковисцидоз (CF).

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент ингибирует кристаллизацию галектина-10, когда связывается с растворимым галектином-10, и/или способствует растворению кристаллического галектина-10, когда связывается с кристаллическим галектином-10. В некоторых вариантах осуществления кристаллический галектин-10 представляет собой кристаллы Шарко-Лейдена (CLC).

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент связывается с человеческим галектином-10. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления Fab-фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL),

где домен VH содержит:

HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 4 (GLRVGVLGFDY);

HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 3 (AINAGGGSTSYADSVKG); и

HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2 (SYAMS); и

где домен VL содержит:

LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 8 (QVWDGSAAV);

LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7 (ADEYRPE); и

LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6 (DGNNIGSKSAQ).

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где:

домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, которая идентична ей на по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 98% или 99%, и

домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, которая идентична ей на по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 98% или 99%.

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент содержит варибельный домен тяжелой цепи (VH) и варибельный домен легкой цепи (VL), где:

домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1

(EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINA  
GGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLRVGVLFQFDYW  
GQGTLLTVSS);

и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5

(SYELTQPLSVSVALGQATARITCDGNNIGSKSAQWYQQKPGQAPVLVIYADEYRP  
EGIPERFSGSNSGNTATLTISRAGDEADYYCQVWDGSAAVFGGGTQLTVL).

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент является гуманизированным, приведенным к зародышевой линии (germlined) или деиммунизированным.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят субъекту путем ингаляции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в виде аэрозоля с помощью небулайзера, дозирующего ингалятора под давлением (pMDI), ингалятора сухого порошка, ингалятора мягкого тумана или интеллектуального ингалятора. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в виде аэрозоля с помощью небулайзера. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в виде аэрозоля с помощью струйного небулайзера, ультразвукового небулайзера или сетчатого небулайзера.

В некоторых вариантах осуществления до введения фармацевтическая композиция представляет собой жидкий водный состав. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления наполнитель представляет собой жидкий наполнитель, необязательно растворитель или водный растворитель.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит поверхностно-активное вещество в количестве менее 5%, менее 2%, менее 1%, менее 0,5%, менее 0,1%, менее 0,05%, менее 0,02% или менее 0,01%. В некоторых альтернативных вариантах осуществления композиция не содержит поверхностно-активное вещество.

В некоторых вариантах осуществления концентрация Fab-фрагмента в композиции составляет от примерно 1 до примерно 20 мг/мл, от примерно 1 до примерно 15 мг/мл, от примерно 1 до примерно 10 мг/мл, от примерно 1 до примерно 5 мг/мл, от примерно 2 до примерно 10 мг/мл, от примерно 3 до примерно 10 мг/мл, от примерно 4 до примерно 10 мг/мл или от примерно 5 до примерно 10 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация Fab-фрагмента в композиции составляет примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления размер частиц в аэрозоле составляет менее

30 мкм, менее 25 мкм, менее 10 мкм, менее 2 мкм, менее 1 мкм, менее 0,5 мкм, менее 0,4 мкм, менее 0,3 мкм, менее 0,2 мкм или менее 0,1 мкм. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления размер частиц в аэрозоле составляет менее 2 мкм.

В некоторых вариантах осуществления концентрация частиц в аэрозоле составляет менее  $2 \times 10^5$ , менее  $1 \times 10^5$ , менее  $2 \times 10^4$  или менее  $1 \times 10^4$  общего количества частиц/мл.

В некоторых вариантах осуществления концентрация частиц размером более 2 мкм в аэрозоле составляет менее  $1 \times 10^5$ , менее  $5 \times 10^4$ , менее  $2 \times 10^4$ , менее  $1 \times 10^4$ , менее  $1 \times 10^3$  или менее  $1 \times 10^2$  частиц  $>2$  мкм/мл.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, где композиция приготовлена в виде состава для аэрозолизации.

Описанные выше варианты осуществления, относящиеся к фармацевтическим композициям первого и второго аспектов изобретения, в равной степени применимы к фармацевтической композиции третьего аспекта.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к небулайзеру, содержащему любую из представленных в настоящем описании фармацевтических композиций. В некоторых вариантах осуществления предлагается небулайзер, содержащий фармацевтическую композицию, содержащую Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, где композиция приготовлена в виде состава для аэрозолизации.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ**

На фиг. 1 показан анализ размера аэрозольных капель методом лазерной дифракции. Исходные данные представлены на фиг. 1А. Каждый образец тестировали в двух концентрациях (3 и 10 мг/мл), а аэрозолизацию осуществляли с помощью двух разных устройств: Aerogen® Solo и Pari eFlow®. Эксперименты проводили в трех повторах с использованием трех устройств Aerogen® Solo и трех устройств Pari eFlow®, которые идентифицировали по серийным номерам. На гистограмме на фиг. 1В показан средний диапазон среднего объема (VMD) при небулизации каждого образца в двух концентрациях (3 и 10 мг/мл).

На фиг. 2 показана концентрация белка в образце до небулизации (3 и 10 мг/мл) и после небулизации с помощью двух разных устройств: Aerogen® Solo и Pari eFlow®. Исходные данные представлены на фиг. 2А. Эксперименты проводили в трех повторах с использованием трех устройств Aerogen® Solo и трех устройств Pari eFlow®, которые идентифицировали по серийным номерам. На гистограмме на фиг. 2В показан средний диапазон изменения концентрации (%) после небулизации тестируемых антител/фрагментов.

На фиг. 3 показано влияние небулизации на образование агрегатов. Агрегаты детектировали методом проточной цитометрии (FCM) и выражали в виде среднего количества частиц/мл после небулизации с помощью устройства Aerogen® Solo или устройства Pari eFlow®. Среднее количество частиц только с буфером вычитали из

значения, полученного для образца. Количество частиц на мл выражали в виде общего количества частиц и частиц с эквивалентным диаметром  $>2$  мкм,  $>10$  мкм и  $>25$  мкм. На фиг. 3В черные и белые кружки представляют данные после небулизации для концентрации 10 мг/мл и 3 мг/мл, соответственно.

На фиг. 4 показан анализ динамического светорассеяния (DLS) образцов до и после небулизации. Для каждого образца представлены параметры основного пика. При необходимости (в случае мультимодального распределения), перед проведением нового анализа оставшиеся образцы фильтровали.

На фиг. 5 показано процентное содержание мономеров, измеренное методом SEC-HPLC в образцах до и после небулизации. Результаты на фиг. 5А выражены в виде среднего массового процента мономеров и соединений с высокой молекулярной массой (HMW). На гистограмме на фиг. 5В показан процент соединений с высокой молекулярной массой. Образцы анализировали до небулизации (1) и после небулизации с помощью устройства Aerogen® Solo (2) и Pari eFlow® (3).

На фиг. 6 показана концентрация белка для каждого из тестируемых клонов Fab до и после небулизации с помощью небулайзера с вибрирующей сеткой Aerogen Solo. Эксперимент проводили в трех повторах с использованием трех разных устройств Aerogen Solo. На фиг. 6А и 6В представлены два независимых эксперимента.

На фиг. 7 представлен обзор результатов динамического светорассеяния (DLS) для всех клонов Fab до и после небулизации через сетку в момент T0 и после 4-недельного хранения при  $+5^{\circ}\text{C}$  (4W). Все образцы подвергали предварительной фильтрации (0,2 мкм).

На фиг. 8 показано количество невидимых невооруженным глазом (невидимых) частиц, определенных методом проточной цитометрии (FCM), для всех подвергнутых небулизации Fab (верхняя левая панель, общее количество частиц/мл; верхняя правая панель, частицы размером  $>2$  мкм/мл; нижняя левая панель, частицы  $>10$  мкм/мл; нижняя правая панель, частицы размером  $>25$  мкм/мл; кружки - до небулизации; квадраты - после небулизации).

На фиг. 9 показана связывающая активность, оцененная методом SPR (Biacore 3000), для всех протестированных Fab после небулизации. Было обнаружено, что все клоны полностью функциональны без потери выраженной в процентах относительной активности по отношению к не подвергнутому стрессовому воздействию эталонному материалу (до небулизации) каждого клона.

На фиг. 10 показан процент чистоты, оцененный методом SEC-HPLC, для всех подвергнутых небулизации Fab.

На фиг. 11 показан процент чистоты, оцененный с помощью капиллярного геле-электрофореза (cGE), для всех подвергнутых небулизации Fab. На фиг. 11А показан % чистоты интактного Fab в нередуцирующих условиях, и на фиг. 11В показан % общей чистоты Fab в редуцирующих условиях.

На фиг. 12 показана эффективность тестируемых Fab 18C06, 20H09, 23H09 и 24F02\_N53A (и 7B07\_N53A) в отношении растворения кристаллов GAL10.

На фиг. 13 показана эффективность тестируемых Fab 18C06, 20H09 и 23H09 (и 7B07\_N53A) до и после 4-недельного хранения при +5°C в отношении растворения кристаллов GAL10 после небулизации (анализ 1).

На фиг. 14 показана эффективность тестируемых Fab 23H09 и 24F02\_N53A до и после 4-недельного хранения при +5°C в отношении растворения кристаллов GAL10 после небулизации (анализ 2).

На фиг. 15 показаны глобальные оценки риска DRB1 для набора из 44 коммерчески доступных терапевтических антител. Человеческие антитела показаны серыми столбцами, гуманизированные - светло-серыми столбцами и химерные - темно-серыми столбцами. Результаты показаны для протестированных Fab: 18C06, 20H09, 23H09 и 24F02\_N53A.

На фиг. 16 показан процент доноров с ответом на IFN $\gamma$  (левая панель) и IL-5 (правая панель) (DFR2x и DFReq обозначают статистический анализ, использованный в Lonza).

На фиг. 17 показано ранжирование ответов на IFN $\gamma$  (верхняя панель) и IL-5 (нижняя панель) четырех протестированных молекул в тестируемой популяции из 31 донора (DFR2x и DFReq обозначают статистические анализы, использованные в Lonza).

На фиг. 18 представлен обзор протестированных свойств Fab после небулизации.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

### **А. Определения**

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, в котором их обычно понимает специалист в области техники, к которой относится изобретение. Без ограничения каких-либо терминов ниже приведены дополнительные пояснения некоторых терминов, используемых в настоящем описании.

В контексте настоящего описания термин галектин-10 (или Gal10 или Gal-10) относится к небольшому гидрофобному гликансвязывающему белку, который самокристаллизуется с образованием кристаллов Шарко-Лейдена. Галектин-10 также называют кристаллическим белком Шарко-Лейдена (CLCP), эозинофильной лизофосфолипазой и лизолецитин-ацилгидролазой. Термин «галектин-10» является достаточно широким и охватывает человеческий белок и гомологи любых видов. Gal10 является членом семейства галектинов, характеризующимся галактозосвязывающими доменами. Разные члены этого семейства, как было показано, положительно или отрицательно модулируют несколько стадий воспаления. Этот небольшой самокристаллизирующийся гидрофобный белок (всего 16,5 кДа) локализован в цитоплазме эозинофилов. Этот белок является одним из наиболее распространенных эозинофильных компонентов, составляя 7-10% от общего клеточного белка. Важно отметить, что ген Gal10 обнаружен только у людей и приматов. У Gal10 отсутствует секретлируемый сигнальный пептид и трансмембранный домен. Он высвобождается во время гибели клеток с образованием эозинофильных внеклеточных ловушек (ЕЕТоз).

Аминокислотная последовательность полноразмерного человеческого галектина-10



представлена в SEQ ID NO: 9 (см. ниже). Эта последовательность соответствует последовательности, депонированной в базе данных UniProt как человеческий галектин-10 с номером доступа Q05315. Термин «галектин-10» также охватывает встречающиеся в природе варианты человеческой последовательности, например вариант Ala→Val в положении 28.

SEQ ID NO: 9

1	10	20	30	40	50
MSLLPVPYTE AASLSTGSTV TIKGRPLACF LNEPYLQVDF HTEMKEESDI					
	60	70	80	90	100
VFHFQVCFGR RVVMNSREYG AWKQQVESKN MPFQDQGEFE LSISVLPDKY					
	110	120	130	140	
QVMVNGQSSY TFDHRIKPEA VKMVQVWRDI SLTKFNVSYL KR					

В контексте настоящего описания термины «кристаллы галектина-10» или «кристаллы Шарко-Лейдена» (CLC) используются взаимозаменяемо для обозначения кристаллов, образованных галектином-10. Кристаллы, образуемые галектином-10, обычно представляют собой бипирамидальные гексагональные кристаллы длиной примерно 20-40 мкм и шириной примерно 2-4 мкм. Эти кристаллы связаны с эозинофильными воспалительными заболеваниями.

В контексте настоящего описания термин антитело или иммуноглобулин относится к структурам, содержащим легкие и тяжелые цепи с межцепочечной ковалентной связью между ними или без нее. Термин «иммуноглобулин» включает полипептид, содержащий комбинацию двух тяжелых и двух легких цепей, независимо от того, обладает он какой-либо значимой специфической иммунореактивностью или нет. «Антитела» относятся к таким комплексам, которые обладают значительной известной специфической иммунореактивностью по отношению к представляющему интерес антигену (в данном случае галектину-10). Термин «антитела к галектину-10» используется в настоящем описании для обозначения антител, которые проявляют иммунологическую специфичность в отношении белка галектина-10, включая человеческий галектин-10 и в некоторых случаях его видовые гомологи.

Общий термин «иммуноглобулин» включает пять разных классов антител, которые можно различать биохимически. Обсуждение ниже, как правило, относится к классу молекул иммуноглобулинов IgG. Что касается IgG, то иммуноглобулины содержат две идентичные легкие полипептидные цепи с молекулярной массой примерно 23000 дальтон и две идентичные тяжелые цепи с молекулярной массой от 53000 до 70000. Эти четыре цепи соединены дисульфидными связями в «Y» конфигурации, где легкие цепи охватывают снаружи тяжелые цепи, начиная от устья «Y» и продолжаясь далее через переменную область.

Легкие цепи антитела подразделяются на каппа или лямбда ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ). Каждый класс тяжелых цепей может быть связан либо с каппа-, либо с лямбда-легкой цепью. В общем

случае, легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, а «хвостовые» части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, если иммуноглобулины продуцированы либо гибридомами, В-клетками, либо генетически модифицированными клетками-хозяевами. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности проходят от N-конца на раздвоенных концах Y-конфигурации до C-конца нижнего участка каждой цепи. Специалистам в данной области техники будет понятно, что тяжелые цепи подразделяются на гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  или  $\epsilon$ ), а некоторые из их также подразделяются на подклассы (например,  $\gamma 1$ - $\gamma 4$ ). Именно природа этой цепи определяет «класс» антитела: IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и т.д., хорошо охарактеризованы и, как известно, придают функциональную специализацию. Специалист в данной области легко различит модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов с учетом настоящего описания.

Варибельная область антитела обеспечивает способность селективно распознавать эпитопы на антигенах и специфически связываться с ними. Иными словами, VL домен и VH домен антитела объединяются, образуя варибельную область, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий сайт. Эта четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, присутствующий на конце каждого плеча Y. Более конкретно, антигенсвязывающий сайт определяется тремя определяющими комплементарность областями (CDR) на каждой из VH и VL цепей.

В контексте настоящего описания термин антитело VHH или антитело, содержащее только тяжелые цепи, относится к типу антитела, продуцируемому только видами семейства Camelidae, которые включают верблюдов, лам, альпака. Антитела, содержащие только тяжелые цепи, или антитела VHH, состоят из двух тяжелых цепей и лишены легких цепей. Каждая тяжелая цепь имеет варибельный домен на N-конце, и эти варибельные домены называются доменами «VHH», что позволяет отличить их от варибельных доменов тяжелых цепей обычных гетеротетрамерных антител, т.е. доменов VH, описанных выше.

В контексте настоящего описания термины «варибельная область» или «варибельный домен» используются взаимозаменяемо и имеют эквивалентное значение. Термин «варибельный» указывает на тот факт, что некоторые участки варибельных доменов VH и VL имеют последовательности, которые сильно различаются среди антител и используются каждым конкретным антителом для связывания со своим целевым антигеном, определяя специфичность конкретного антитела. Однако варибельность неравномерно распределена по варибельным доменам антител. Она сосредоточена в трех сегментах, называемых «гиперварибельными петлями», в каждом домене VL и домене VH, которые составляют часть антигенсвязывающего сайта. Первая, вторая и третья гиперварибельные петли домена легкой цепи VLambda обозначены в настоящем описании как L1( $\lambda$ ), L2( $\lambda$ ) и L3( $\lambda$ ) и могут быть определены как содержащие остатки 24-33

(L1( $\lambda$ ), состоящая из 9, 10 или 11 аминокислотных остатков), 49-53 (L2( $\lambda$ ), состоящая из 3 остатков) и 90-96 (L3( $\lambda$ ), состоящая из 5 остатков) в домене VL (Morea et al., Methods 20:267-279 (2000)). Первая, вторая и третья гипервариабельные петли домена легкой цепи V<sub>Карра</sub> обозначены в настоящем описании как L1( $\kappa$ ), L2( $\kappa$ ) и L3( $\kappa$ ) и могут быть определены как содержащие остатки 25-33 (L1( $\kappa$ ), состоящая из 6, 7, 8, 11, 12 или 13 остатков), 49-53 (L2( $\kappa$ ), состоящая из 3 остатков) и 90-97 (L3( $\kappa$ ), состоящая из 6 остатков) в домене VL (Morea et al., Methods 20:267-279 (2000)). Первая, вторая и третья гипервариабельные петли домена VH обозначены в настоящем описании как H1, H2 и H3 и могут быть определены как содержащие остатки 25-33 (H1, состоящая из 7, 8 или 9 остатков), 52-56 (H2, состоящая из 3 или 4 остатков) и 91-105 (H3, сильно варьирующая по длине) в домене VH (Morea et al., Methods 20:267-279 (2000)).

Если не указано иное, термины L1, L2 и L3 относятся к первой, второй и третьей гипервариабельным петлям домена VL, соответственно, и охватывают гипервариабельные петли, полученные как из изоформ V<sub>Карра</sub>, так и из V<sub>lambda</sub>. Термины H1, H2 и H3 относятся к первой, второй и третьей гипервариабельным петлям домена VH, соответственно, и охватывают гипервариабельные петли, полученные из любого из известных изоформ тяжелой цепи, включая  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$  или  $\mu$ .

Каждая из гипервариабельных петель L1, L2, L3, H1, H2 и H3 может содержать часть «определяющей комплементарности области» или «CDR», как определено ниже. Термины «гипервариабельная петля» и «определяющая комплементарность область» не являются строго синонимичными, поскольку гипервариабельные петли (HV) определяются на основе структуры, тогда как определяющие комплементарность области (CDR) определяются на основе вариабельности последовательности (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1983), и в некоторых доменах VH и VL границы HV и CDR могут различаться.

CDR доменов VL и VH обычно могут быть определены как содержащие следующие аминокислоты: остатки 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в вариабельном домене легкой цепи и остатки 31-35 или 31-35b (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в вариабельном домене тяжелой цепи; (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Таким образом, HV могут содержаться в соответствующих CDR, и ссылки на «гипервариабельные петли» доменов VH и VL, используемые в настоящем описании, следует интерпретировать как включающие также соответствующие CDR, и наоборот, если не указано иное.

Более консервативные части вариабельных доменов называются каркасным участком (FR), как определено ниже. Вариабельные домены нативной тяжелой и легкой цепей содержат по четыре FR (FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно), в основном имеющие конфигурацию  $\beta$ -листа, соединенную тремя гипервариабельными петлями. Гипервариабельные петли в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной

близости с помощью FR и вместе с гипервариабельными петлями другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител. Структурный анализ антител выявил взаимосвязь между последовательностью и формой связывающего сайта, образованного определяющими комплементарность областями (Chothia et al., J. Mol. Biol. 227:799-817 (1992)); Tramontano et al., J. Mol. Biol, 215:175-182 (1990)). Несмотря на высокую вариабельность последовательностей, пять из шести петель принимают лишь небольшой набор конформаций основной цепи, называемый «каноническими структурами». Эти конформации определяются, во-первых, длиной петель и, во-вторых, наличием ключевых остатков в определенных положениях петель и в каркасных участках, определяющих конформацию, посредством их упаковки, водородных связей или способности принимать необычные конформации основной цепи.

В настоящем описании термин CDR или определяющая комплементарность область означает несмежные антигенсвязывающие сайты, обнаруженные в вариабельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепей. Эти конкретные области были описаны Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) и Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991), и Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), и MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), при этом определения перекрываются или имеют подмножества аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Для сравнения представлены аминокислотные остатки, которые охватывают CDR, согласно определению в каждом из указанных выше документов. Предпочтительно термин «CDR» представляет собой CDR, определенный по Kabat на основе сравнения последовательностей.

Таблица 1: Определения CDR

	Определения CDR		
	Kabat <sup>1</sup>	Chothia <sup>2</sup>	MacCallum <sup>3</sup>
V <sub>H</sub> CDR1	31-35	26-32	30-35
V <sub>H</sub> CDR2	50-65	53-55	47-58
V <sub>H</sub> CDR3	95-102	96-101	93-101
V <sub>L</sub> CDR1	24-34	26-32	30-36
V <sub>L</sub> CDR2	50-56	50-52	46-55
V <sub>L</sub> CDR3	89-97	91-96	89-96

<sup>1</sup>Нумерация остатков соответствует номенклатуре Kabat et al., см. выше.

<sup>2</sup>Нумерация остатков соответствует номенклатуре Chothia et al., см. выше.

<sup>3</sup>Нумерация остатков соответствует номенклатуре MacCallum et al., см. выше.

В настоящем описании термин «каркасный участок» или «область FR» включает аминокислотные остатки, которые являются частью вариабельной области, но не являются частью CDR (например, согласно определению CDR по Kabat). Следовательно, каркасный участок вариабельной области имеет в длину примерно 100-120 аминокислот,

но включает только те аминокислоты, которые находятся за пределами CDR. В конкретном примере переменного домена тяжелой цепи и CDR, определенных по Kabat et al., каркасный участок 1 соответствует переменному домену, охватывающему аминокислоты 1-30; каркасный участок 2 соответствует переменному домену, охватывающему аминокислоты 36-49; каркасный участок 3 соответствует переменному домену, охватывающему аминокислоты 66-94, и каркасный участок 4 соответствует домену переменной области, начиная от аминокислоты 103 и до конца переменной области. Каркасные участки легкой цепи разделены аналогичным образом каждой из CDR переменной области легкой цепи. Аналогично, используя определение Chothia et al. или McCallum et al. для CDR границы каркасных участков разделены концами соответствующих CDR, как описано выше. В предпочтительных вариантах осуществления CDR определены по Kabat.

Во встречающихся в природе антителах в каждом мономерном антителе присутствуют шесть CDR, которые представляют собой короткие несмежные последовательности аминокислот, расположенные особым образом, таким что, когда антитело принимает свою трехмерную конфигурацию в водной среде, образуется антигенсвязывающий сайт. Остальные переменные домены тяжелой и легкой цепей демонстрируют более низкую межмолекулярную изменчивость аминокислотной последовательности и называются каркасными участками. Каркасные участки принимают в основном конформацию  $\beta$ -листа, а CDR образуют петли, которые соединяют, а в некоторых случаях являются частью структуры  $\beta$ -листа. Таким образом, эти каркасные участки действуют как каркас, который обеспечивает расположение шести CDR в правильной ориентации посредством межцепочечных нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий сайт, образованный позиционированными CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу на иммунореактивном антигене. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с эпитопом на иммунореактивном антигене. Специалист в данной области может легко определить положение CDR.

В контексте настоящего описания термин Fab или Fab-фрагмент относится к молекуле, состоящей из тяжелой цепи и легкой цепи, где легкая цепь состоит из домена VL и одного константного домена (CL, C $\kappa$  или C $\lambda$ ), а тяжелая цепь состоит только из домена VH и домена CH1. Fab-фрагмент обычно представляет собой одно плечо Y-образной молекулы иммуноглобулина. Fab-фрагмент может быть получен из молекулы иммуноглобулина под действием фермента папаина. Папаин расщепляет молекулы иммуноглобулина в шарнирной области с образованием двух Fab-фрагментов и отдельной Fc-области. Fab-фрагмент не следует рассматривать как полноразмерную молекулу антитела.

В контексте настоящего описания термин «гуманизирующие замены» относится к аминокислотным заменам, при которых аминокислотный остаток, присутствующий в определенном положении в домене VH или VL антитела или его фрагмента (например,

антитела или фрагмента к галектину-10, полученного из верблюдовых), заменен аминокислотным остатком, который находится в эквивалентном положении в эталонном домене VH или VL человека. Эталонный домен VH или VL человека может представлять собой домен VH или VL, кодируемый зародышевой линией человека. Гуманизирующие замены могут быть сделаны в каркасных участках и/или CDR антител или фрагментов, определенных в настоящем описании.

В контексте настоящего описания термин «гуманизированный вариант» относится к варианту антитела, которое содержит одну или более «гуманизирующих замен» относительно эталонного антитела, где часть эталонного антитела (например, домен VH и/или домен VL или его части, содержащие по меньшей мере одну CDR) содержит аминокислоту, полученную из вида, отличного от человека, и «гуманизирующие замены» происходят в аминокислотной последовательности, полученной из вида, отличного от человека.

В контексте настоящего описания термин «вариант, приведенный к зародышевой линии (germlined)» относится, в частности, к «гуманизированным вариантам», в которых «гуманизирующие замены» приводят к замене одного или более аминокислотных остатков, присутствующих в определенном(ых) положении(ях) в домене VH или VL антитела или фрагмента (например, антитела, полученного из верблюдовых, или фрагмента к галектину-10), на аминокислотный остаток, который находится в эквивалентном положении в эталонном домене VH или VL человека, кодируемом зародышевой линией человека. Для любого данного «варианта, приведенного к зародышевой линии» предназначенные для замены аминокислотные остатки, заменяемые в таком варианте, обычно берут исключительно или преимущественно из одного домена VH или VL, кодируемого зародышевой линией человека. Термины «гуманизированный вариант» и «вариант, приведенный к зародышевой линии» часто используются в настоящем описании взаимозаменяемо. Введение одной или более «гуманизирующих замен» в домен VH или VL, полученный из верблюдовых (например, из ламы), приводит к получению «гуманизированного варианта» домена VH или VL, полученного из верблюдовых (ламы). Если замененные аминокислотные остатки происходят преимущественно или исключительно из одной последовательности домена VH или VL, кодируемой зародышевой линией человека, то результатом может быть «приведенный к человеческой зародышевой линии вариант» домена VH или VL, полученного из верблюдовых (ламы).

В контексте настоящего описания термин «деиммунизированный» или «деиммунизация» относится к идентификации в связывающей молекуле Т-клеточного эпитопа с последующим его удалением. Обычно, хотя и не обязательно, процесс деиммунизации осуществляют в варибельной области антитела или его фрагмента. В этом случае также, часто, но не всегда обязательно, этот процесс выполняют в каркасном участке и, следовательно, за пределами областей CDR. Удаление Т-клеточного эпитопа обычно достигается путем замены одной или более аминокислот, кодирующих Т-

клеточный эпитоп. Таким образом, последовательность превращают в последовательность, отличную от Т-клеточного эпитопа. Деиммунизированная переменная область обычно содержит 1-5 аминокислотных замен. Замещенные аминокислоты выбирают таким образом, чтобы это не приводило к существенному изменению третичной структуры переменной области. Поэтому замещаемую аминокислоту обычно выбирают из той же группы аминокислот (т.е. нейтральных, заряженных положительно, заряженных отрицательно, липофильных). Аминокислоту, находящуюся в той же группе, заменяют аминокислотой, которая в структурно близком человеческом антителе находится в переменной области в том же или аналогичном положении.

Для применения у людей деиммунизацию связывающей молекулы обычно выполняют путем модификации тяжелой цепи максимум в 5 местах, легкой цепи - максимум в 5 местах или в обоих цепях. Деиммунизация переменной области является общепринятым методом и всегда дает связывающую молекулу с пониженной вероятностью индукции иммунного ответа у человека. Число аминокислотных замен, необходимых для достижения этого результата, обычно составляет менее 5 в каждой цепи. Часто замены 1, 2 или 3 аминокислот в каждой цепи достаточно для получения связывающей молекулы с пониженной вероятностью индукции иммунного ответа у человека по сравнению с немодифицированной(ыми) последовательностью(ями). Fab-фрагмент по изобретению предпочтительно представляет собой гуманизированный или деиммунизированный Fab-фрагмент.

В контексте настоящего описания термин «% идентичности последовательностей» относится к степени сходства между двумя последовательностями. Процент идентичности последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен путем сравнения этих двух последовательностей, выровненных оптимальным образом, при этом сравниваемая аминокислотная последовательность может содержать добавления или делеции по отношению к эталонной последовательности для оптимального выравнивания этих двух последовательностей. Процент идентичности вычисляют путем определения количества идентичных положений, в которых аминокислотные остатки идентичны в двух последовательностях, деления этого количества идентичных положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения полученного результата на 100 для получения процента идентичности этих двух последовательностей. Например, можно использовать программу BLAST «BLAST 2 Sequences» (Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Let. 174:247-250), доступную на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, с использованием параметров, заданных по умолчанию (в частности, для параметров «штраф за открытие пробела»: 5 и «штраф за удлинение пробела»: 2; выбранная матрица представляет собой, например, матрицу «BLOSUM 62», предложенную программой). Процент идентичности двух сравниваемых последовательностей вычисляется непосредственно программой.

В контексте настоящего описания термин «аэрозолизация» относится к распылению вещества (такого как лекарственное средство) в виде аэрозоля, при этом аэрозоль представляет собой суспензию мелких твердых частиц или капель жидкости в воздухе или другом газе. Терапевтическая доставка аэрозолей в легкие может осуществляться с помощью небулайзеров, дозирующих ингаляторов под давлением (рMDI) и других устройств (например, ингаляторов сухого порошка, ингаляторов мягкого тумана и интеллектуальных ингаляторов).

В контексте настоящего описания термин «небулизация» относится к процессу введения лекарственного средства непосредственно путем ингаляции с помощью небулайзера, который превращает жидкое лекарственное средство в аэрозоль, который пациент может вдыхать через дыхательную маску или мундштук. Небулайзер представляет собой устройство, используемое для превращения жидкости в мелкую струю аэрозоля с помощью кислорода, сжатого воздуха или ультразвуковой вибрации. Существует три основных типа небулайзеров: струйные небулайзеры, в которых для создания аэрозоля используется сжатый газ; ультразвуковые небулайзеры, в которых для создания аэрозоля используются высокочастотные вибрации; и сетчатые небулайзеры (также известные как небулайзеры с вибрирующей сеткой), в которых вибрирующий элемент проталкивает жидкость через очень мелкую сетку с образованием аэрозоля.

В контексте настоящего описания термин поверхностно-активное вещество относится к веществам, которые абсорбируются поверхностями или межфазными поверхностями с уменьшением поверхностного или межфазного натяжения. Эти агенты способствуют смачиванию и диспергированию гидрофобных активных фармацевтических ингредиентов и обычно действуют путем уменьшения межфазного натяжения между твердыми веществами и жидкостями в суспензиях. Поверхностно-активные вещества часто используются для предотвращения образования агрегатов в биологических составах. Полисорбаты являются наиболее широко используемыми поверхностно-активными веществами в фармацевтической промышленности. Например, их добавляют при приготовлении составов ингаляционных кортикоидов (флутиказона и будесонида) для облегчения диспергирования или растворения лекарственных средств во время небулизации. Однако использование поверхностно-активных веществ в качестве эмульгаторов, солюбилизаторов, стабилизаторов суспензии и смачивающих агентов в предназначенных для введения людям или животным составах может привести к значительным изменениям биологической активности активного агента в этом составе. Молекулы поверхностно-активных веществ, включенные в состав, могут оказывать воздействие несколькими способами, например, путем воздействия на дезагрегацию и растворение твердых лекарственных форм, путем контроля скорости осаждения лекарственных средств, вводимых в виде раствора, путем увеличения проницаемости мембран и воздействия на их целостность, путем изменения активности ферментов, метаболизирующих лекарственные средства, и путем воздействия на связывание лекарственного средства с участком рецептора.



В контексте настоящего описания термин «аэрозольная капля» относится к каплям, которые образуются после аэрозолизации фармацевтической композиции. Размер капель аэрозоля можно измерить, например, методом лазерной дифракции, чтобы определить, находится ли большинство образующихся капель аэрозоля в требуемом диапазоне размеров, пригодных для вдыхания. Размер капель аэрозоля является важной характеристикой эффективности аэрозоля. Капли слишком большого размера не достигают нижних дыхательных путей, тогда как капли слишком маленького размера выдыхаются. Например, небулизированные растворы должны создавать капли аэрозоля диаметром от 1 до 5 мкм, что является оптимальным диапазоном размеров капель аэрозоля для осаждения в нижних дыхательных путях. Аналитические инструменты позволяют измерять и отображать распределение капель по размерам в образце. Размер капель аэрозоля часто выражают в терминах массового медианного аэродинамического диаметра (MMAD). MMAD определяют в виде диаметра, относительно которого 50% капель являются более крупными, а 50% являются более мелкими. Распределение по размерам также может быть выражено в виде среднего объемного диаметра (VMD), который представляет собой величину размера капель, которая делит популяцию на две равные половины. VMD напрямую связан с массовым медианным диаметром (MMD) через плотность капель. VMD относится к среднему размеру капель (медиане), при котором половина объема аэрозоля приходится на более мелкие капли, а половина объема приходится на более крупные капли, чем капли медианного размера. Например, VMD (DV0,5), равный 50 мкм, означает, что половина объема приходится на капли размером менее 50 мкм, а половина объема приходится на капли размером более 50 мкм.

В контексте настоящего описания термины «размер частиц» и «концентрация частиц» относятся к размеру и количеству белковых частиц или белковых агрегатов, присутствующих в содержащем белок растворе или аэрозоле. Размер частиц и концентрация частиц могут быть измерены в жидком образце до аэрозолизации, и также могут быть измерены в образце, который был аэрозолизирован, собран и затем конденсирован. В идеальном случае фармацевтические композиции для применения в терапии должны содержать небольшое количество или вообще не содержать белковых частиц или белковых агрегатов как до, так и после аэрозолизации. Эти частицы могут быть видимыми (т.е. макроскопическими) или могут быть невидимыми. Для определения как размера частиц, так и концентрации частиц доступны различные методы, включая, без ограничения, динамическое светорассеяние и проточную цитометрию. Концентрация частиц может быть указана в виде общего количества частиц на мл образца. Концентрация частиц также может быть указана в виде количества частиц определенного размера на мл образца или количества частиц с размером, превышающим определенный размер, на мл образца.

#### В. Fab-фрагменты, которые связываются с галектином-10

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10. Авторы настоящего изобретения

установили, что Fab-фрагмент является предпочтительным форматом для аэрозолизации. Как указано в настоящем описании, Fab-фрагменты могут быть подвергнуты аэрозолизации с образованием небольшого количества агрегатов или, в некоторых случаях, без образования агрегатов.

В настоящем изобретении предусмотрено использование любого Fab-фрагмента, который связывается с галектином-10. Fab-фрагмент преимущественно связывается с человеческим галектином-10. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент связывается с человеческим галектином-10. Аминокислотная последовательность полноразмерного человеческого галектина-10 представлена в SEQ ID NO: 9. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент связывается с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент связывается со встречающимся в природе вариантом человеческого галектина-10. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент связывается со встречающимся в природе вариантом аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент связывается с человеческим галектином-10 и галектином-10 яванского макака.

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, связывается с эпитопом, содержащим одну или более аминокислот на межфазной поверхности кристаллической упаковки галектина-10, предпочтительно человеческого галектина-10. Указанный эпитоп может содержать одну или более, две или более, три или более, четыре или более, пять или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из: Ser2, Leu3, Leu4, Tyr8, Thr9, Glu10, Ala11, Ala12, Ser13, Thr16, Thr42, Glu43, Met44, Lys45, Asp49, Ile50, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Leu96, Pro97, Asp98, Lys99, Gln101, Met103, Gly106, Gln107, Ser108, Ser109, Tyr110, Thr111, Asp113, His114, Arg115, Ile116, Lys117, Ala120, Gln125, Thr133, Lys134, Phe135, Asn136, Val137, Ser138, Tyr139, Leu140 и Lys141. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент связывается с эпитопом, содержащим Tyr69, или эпитопом, содержащим аминокислоту, соседнюю с Tyr69. В предпочтительных вариантах осуществления Fab-фрагмент связывается с эпитопом, содержащим Tyr69. Альтернативно или дополнительно, Fab-фрагмент может связываться с эпитопом, содержащим одну или более аминокислот, находящихся на межфазной поверхности димеризации галектина-10. В таких вариантах осуществления Fab-фрагмент может связываться с эпитопом, содержащим одну или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из: Pro5, Pro7, Leu27, Ala28, Cys29, Leu31, Asn32, Glu33, Pro34, Tyr35, Gln37, His41, Glu46, Glu47, Gln55, Arg60, Arg61, Arg67, Trp72, Gln75, Trp127, Arg128 и Asp129. Аминокислотные остатки или положения галектина-10 определены со ссылкой на последовательность человеческого белка, идентифицированную в настоящем описании как SEQ ID NO: 9.

После аэрозолизации Fab-фрагмент сохраняет способность связываться с галектином-10. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент связывается с

галектином-10 после аэрозолизации с тем же или аналогичным средством связывания, что и Fab-фрагмент до аэрозолизации. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент связывается с галектином-10 после аэрозолизации на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% относительно средства связывания Fab-фрагмента до аэрозолизации. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент связывается с галектином-10 после аэрозолизации на 90% или более относительно средства связывания Fab-фрагмента до аэрозолизации.

Fab-фрагмент может связываться с эпитопом галектина-10 и тем самым экранировать межфазную поверхность кристаллической упаковки галектина-10. Межфазная поверхность кристаллической упаковки галектина-10 представляет собой участок поверхности, состоящий из аминокислот, которые контактируют с одной или более соседними молекулами галектина-10 в кристаллической решетке. Связываясь с эпитопом галектина-10, который служит для защиты межфазной поверхности кристаллической упаковки галектина-10, Fab-фрагмент нарушает кристаллизацию галектина-10. Отсюда следует, что Fab-фрагменты могут полностью или частично экранировать межфазную поверхность кристаллической упаковки, при этом Fab-фрагмент нарушает кристаллизацию галектина-10. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент способствует растворению галектина-10, когда связывается с кристаллическим галектином-10. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент ингибирует кристаллизацию галектина-10, когда связывается с растворимым галектином-10. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент способствует растворению кристаллического галектина-10, когда связывается с кристаллическим галектином-10, и ингибирует кристаллизацию галектина-10, когда связывается с растворимым галектином-10.

Антагонистические свойства Fab-фрагментов в отношении галектина-10, раскрытые в настоящем описании, можно измерить с помощью представленных в настоящем описании анализов. Например, Fab-фрагменты, которые связываются с галектином-10, можно инкубировать с растворимым галектином-10 в экспериментальных условиях, благоприятствующих кристаллизации галектина-10, и можно измерить способность Fab-фрагментов ингибировать этот процесс. Ингибирующую активность Fab-фрагментов, которые связываются с галектином-10, можно измерить и сравнить с контролем, например, Fab-фрагментом, который не связывается с галектином-10. Ингибирующую активность Fab-фрагмента, который связывается с галектином-10, также можно измерить и сравнить с контролем, который представляет собой галектин-10-связывающую молекулу без активности, ингибирующей кристаллизацию. Fab-фрагмент, связывающийся с галектином-10, может ингибировать кристаллизацию галектина-10 на 100% относительно контроля, на 90% относительно контроля, на 80% относительно контроля, на 70% относительно контроля.

Альтернативно, Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, можно инкубировать с предварительно сформированными кристаллами галектина-10, и может быть измерена способность Fab-фрагментов растворять кристаллы в течение подходящего

периода времени. Кристаллы галектина-10 могут представлять собой рекомбинантные кристаллы, образованные из рекомбинантного галектина-10, полученного *in vitro*. Альтернативно, кристаллы галектина-10 могут представлять собой кристаллы, полученные из образца пациента, например кристаллы, полученные из полипов в полостях носа или пазухах пациента. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагменты, которые связываются с галектином-10, могут обладать способностью растворять предварительно сформированные кристаллы галектина-10 в течение периода времени длительностью до 10 часов, до 12 часов, до 14 часов, до 16 часов, до 18 часов, до 20 часов. Fab-фрагменты, связывающиеся с галектином-10, могут растворять кристаллы полностью, т.е. на 100%. Альтернативно, Fab-фрагменты, которые связываются с галектином-10, могут с течением времени растворять до более 50% кристаллов, до более 60% кристаллов, до более 70% кристаллов, до более 80% кристаллов, до более 90% кристаллов.

После аэрозолизации Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, сохраняет способность растворять кристаллический галектин-10, когда связывается с ним, и/или ингибировать кристаллизацию галектина-10, когда связывается с растворимым галектином-10. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент способствует растворению кристаллического галектина-10 после аэрозолизации в той же или аналогичной степени, что и Fab-фрагмент до аэрозолизации. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент способствует растворению кристаллического галектина-10 после аэрозолизации на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% по сравнению с Fab-фрагментом до аэрозолизации. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент ингибирует кристаллизацию растворимого галектина-10 после аэрозолизации в той же или аналогичной степени, что и Fab-фрагмент до аэрозолизации. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент ингибирует кристаллизацию растворимого галектина-10 после аэрозолизации на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% по сравнению с Fab-фрагментом до аэрозолизации.

#### С. Примеры Fab-фрагментов, которые связываются с галектином-10

В настоящем описании представлены типичные Fab-фрагменты, которые связываются с галектином-10 и которые предусмотрены для использования в настоящем изобретении. Эти Fab-фрагменты являются предпочтительными Fab-фрагментами для применения в соответствии с изобретением. Типичные Fab-фрагменты, которые связываются с галектином-10, могут быть определены исключительно в отношении их структурных характеристик, описанных ниже.

Предпочтительным Fab-фрагментом, который связывается с галектином-10 и который предусмотрен для использования в настоящем изобретении, является клон 24F02\_N53A, представленный в настоящем описании.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL),

где домен VH содержит:

HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 4 (GLRVGVLGFDY);  
HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 3  
(AINAGGGSTSYADSVKG); и

HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2 (SYAMS); и  
где домен VL содержит:

LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 8 (QVWDGSAAV);  
LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7 (ADEYRPE); и  
LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6 (DGNNIGSKSAQ).

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где:

домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 98% или 99%, и

домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 98% или 99%.

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где:

домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1  
(EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINA  
GGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCAKGLRVGVLGFDYW  
GQGTLLTVSS);

и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5  
(SYELTQPLSVSVALGQATARITCDGNNIGSKSAQWYQQKPGQAPVLVIYADEYRP  
EGIPERFSGSNSGNTATLTISRAGDEADYYCQVWDGSAAVFGGGTQLTVL).

Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10 и который предусмотрен для использования в настоящем изобретении, представляет собой клон 24F02, представленный в настоящем описании.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL),

где домен VH содержит:

HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 4 (GLRVGVLGFDY);  
HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 25  
(AINNGGGSTSYADSVKG); и

HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2 (SYAMS); и  
где домен VL содержит:

LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 8 (QVWDGSAAV);  
LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7 (ADEYRPE); и  
LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6 (DGNNIGSKSAQ).

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент содержит переменный

домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где:

домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или аминокислотную последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 98% или 99%, и

домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 98% или 99%.

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент содержит вариабельный домен области тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где:

домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 (EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINN GGGSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAGLRVGV LGFDYWG QGTLVTVSS);

и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (SYELTQPLSVSVALGQTARITCDGNNIGSKSAQWYQQKPGQAPVLVIYADEYRP EGIPERFSGSNSGNTATLTISR A QAGDEADYYCQVWDGSAAVFGGGTQLTVL).

Фрагмент Fab, который связывается с галектином-10 и который предусмотрен для использования в настоящем изобретении, представляет собой клон 18C06, представленный в настоящем описании.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL),

где домен VH содержит:

HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 13 (GGATVWGRFH DY);

HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 12 (GINSGDGSSVKG); и

HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 11 (SFAMS); и

где домен VL содержит:

LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 17 (GCYDSK LSTYV);

LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 16 (NANNRAS); и

LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 15 (TGSSSNIGSGSYLS).

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где:

домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 98% или 99%, и

домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 или аминокислотную последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 98% или 99%.

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где:

домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10

(EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMSWVRQAPGKGLEWVSGINSG DGSSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGATVWGRFH DYWGQGT L VTVSS);

и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14

(QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGSGSYLSWYQQLPGTAPKLLIYNANN RASGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCGCYDSKLSYVFGGGTKLTVL).

Фрагмент Fab, который связывается с галектином-10 и который предусмотрен для использования в настоящем изобретении, представляет собой клон 20H09, представленный в настоящем описании.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL),

где домен VH содержит:

HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 21 (THGIGTLGFGS)

HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 20 (AIKWHRITYYADSVKG);

и

HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 19 (SYDMS); и

где домен VL содержит:

LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 8 (QVWDGSAAV);

LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7 (ADEYRPE); и

LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6 (DGNNIGSKSAQ).

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где:

домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 98% или 99%, и

домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 98% или 99%.

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где:

домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18

(EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYDMSWVRQAPGKGLEWVSAIKWH RITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATTHGIGTLGFGSWGQ GTLVTVSS);

и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5

(SYELTQPLSVSVALGQTARITCDGNNIGSKSAQWYQQKPGQAPVLVIYADEYRP EGIPERFSGSNSGNTATLTISRAGDEADYYCQVWDGSAAVFGGGTQLTVL).

Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10 и который предусмотрен для использования в настоящем изобретении, представляет собой клон 23H09, представленный в настоящем описании.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL),

где домен VH содержит:

HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 21 (THGIGTLGFGS);

HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 23 (AIAQFQHWYYADSVKG); и

HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 19 (SYDMS); и

где домен VL содержит:

LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 8 (QVWDGSAAV);

LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7 (ADEYRPE); и

LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6 (DGNNIGSKSAQ).

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где:

домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или аминокислотную последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 98% или 99%, и

домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 98% или 99%.

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где:

домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22

(EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYDMSWVRQAPGKGLEWVSAIAQFQHWYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATTHGIGTLGFGSWGQGLVTVSS);

и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

(SYELTQPLSVSVALGQTARITCDGNNIGSKSAQWYQQKPGQAPVLVIYADEYRPEGIPERFSGSNSGNTATLTISRAGDEADYYCQVWDGSAAVFGGGTQLTVL).

Для вариантов осуществления, в которых домены Fab-фрагментов определены через конкретный процент идентичности последовательности эталонной последовательности, домены VH и/или VL могут иметь последовательности CDR, идентичные последовательностям, присутствующим в эталонной последовательности, а изменения могут присутствовать только в каркасных участках.

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагменты к галектину-10, представленные в настоящем описании, могут быть получены из верблюдовых. Например, Fab-фрагменты к галектину-10 могут быть выбраны из иммунных библиотек, полученных способом, включающим стадию иммунизации верблюдовых целевой мишенью, т.е. галектином-10. Верблюдовых можно иммунизировать целевым белком или его полипептидным фрагментом, или молекулой мРНК или молекулой кДНК, экспрессирующей белок или его полипептидный фрагмент. Способы получения антител



или фрагментов у верблюдовых и отбора антител или фрагментов, нацеленных на предпочтительные мишени из иммунных библиотек верблюдовых, описаны, например, в международной заявке на патент № WO2010/001251, включенной в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагменты к галектину-10 могут быть получены из верблюдовых, поскольку они содержат по меньшей мере одну гипервариабельную (HV) петлю или определяющую комплементарность область, полученную из домена VH или домена VL представителей семейства Camelidae. В частности, Fab-фрагменты галектина-10 могут содержать домены VH и/или VL или их CDR, полученные путем активной иммунизации галектином-10 беспородных верблюдовых, например ламы.

Термин «полученный из» в этом контексте подразумевает структурное родство в том смысле, что HV или CDR Fab-фрагментов имеют аминокислотную последовательность (или ее минорные варианты), которая изначально кодировалась геном иммуноглобулина Camelidae. Однако это не обязательно подразумевает определенную взаимосвязь с точки зрения процесса производства, используемого для получения Fab-фрагментов.

Fab-фрагменты, полученные из верблюдовых, могут быть получены из любых представителей верблюдовых, включая, среди прочего, ламу, дромадера, альпака, викунию, гуанако или верблюда.

Fab-фрагменты, содержащие домены VH и VL представителей Camelidae или их CDR, обычно представляют собой рекомбинантно экспрессируемые полипептиды и могут быть химерными полипептидами. Термин «химерный полипептид» относится к искусственному (не встречающемуся в природе) полипептиду, созданный путем соединения двух или более пептидных фрагментов, которые в противном случае не являются смежно расположенными. Это определение включает «видовые» химерные полипептиды, созданные путем соединения пептидных фрагментов, кодируемых двумя или более видами, например фрагментов верблюда и человека.

В некоторых вариантах осуществления из представителей семейства Camelidae может быть получен полноразмерный домен VH и/или полноразмерный домен VL. Затем домен VH верблюдовых и/или домен VL верблюдовых может быть подвергнут методам белковой инженерии, с помощью которых в аминокислотную последовательность верблюдовых вводят одну или более аминокислотных замен, вставок или делеций. Эти генно-инженерные изменения предпочтительно включают аминокислотные замены относительно последовательности верблюдовых. Такие изменения включают процесс «гуманизации» или «приведения к зародышевой линии (germlining)», при котором один или более аминокислотных остатков в домене VH или VL, кодируемом верблюдовыми, заменяют эквивалентными остатками из гомологичного домена VH или VL, кодируемого человеком.

Выделенные домены VH и VL верблюдовых, полученные путем активной

иммунизации верблюдовых (например, ламы) галектином-10, можно использовать в качестве основы для конструирования Fab-фрагментов к галектину-10 в соответствии с настоящим изобретением. Взяв за основу интактные домены VH и VL верблюдовых, можно ввести одну или более аминокислотных замен, вставок или делеций, которые отличаются от исходной последовательности верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления такие замены, вставки или делеции могут присутствовать в каркасных участках домена VH и/или домена VL.

В других вариантах осуществления предложены «химерные» молекулы, содержащие домены VH и VL верблюдовых (или их сконструированные варианты) и один или более константных доменов из антитела, не относящегося к верблюдовым, например константные домены, кодируемые человеком (или их сконструированные варианты). В таких вариантах осуществления предпочтительно, чтобы и домен VH, и домен VL были получены от одного и того же вида верблюдовых, например, как VH, так и VL могут быть получены от *Llama glama*, или как VH, так и VL могут быть получены от *Llama pacos* (до введения генно-инженерных изменений аминокислотной последовательности). В таких вариантах осуществления как домен VH, так и домен VL могут быть получены от одного животного, в частности, от одного животного, которое было активно иммунизировано представляющим интерес антигеном.

В качестве альтернативы генно-инженерным изменениям в первичной аминокислотной последовательности доменов VH и/или VL верблюдовых отдельные гипервариабельные петли или CDR верблюдовых, или их комбинации могут быть выделены из доменов VH/VL верблюдовых и перенесены в альтернативную (т.е. не относящуюся к Camelidae) структуру, например, каркас VH/VL человека посредством прививки CDR.

В неограничивающих вариантах осуществления приведенные в качестве примера Fab-фрагменты к галектину-10, имеющие последовательности CDR, VH и/или VL, представленные в настоящем описании, могут содержать домены CH1 и/или домены CL (из тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно) с аминокислотной последовательностью, которая является полностью или по существу человеческой. Для молекул, предназначенных для терапевтического применения человеком, вся константная область или по меньшей мере ее часть обычно является полностью или по существу человеческой аминокислотной последовательностью. Следовательно, один или оба домена CH1 и домена CL Fab-фрагментов, раскрытых в настоящем описании, могут иметь полностью или по существу человеческую аминокислотную последовательность. В контексте константной области гуманизированного Fab-фрагмента термин «по существу человеческий» относится к аминокислотной последовательности, идентичной человеческой константной области на по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99%.

#### D. Терапевтическое применение

Представленные в настоящем описании Fab-фрагменты способны растворять

кристаллический галектин-10 и/или ингибировать кристаллизацию растворимого галектина-10 и, следовательно, полезны в способах профилактики и лечения заболеваний и состояний, при которых патология связана с образованием/присутствием кристаллов Шарко-Лейдена (CLC). При использовании в качестве лекарственных средств Fab-фрагменты, которые связываются с галектином-10, обычно готовят в виде фармацевтических композиций. Соответственно, фармацевтические композиции по изобретению, содержащие Fab-фрагмент, который связывается с галектином 10, можно использовать в способе лечения заболевания или состояния, ассоциированного с присутствием или образованием кристаллов галектина-10.

В первом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, для применения в способе лечения заболевания или состояния, ассоциированного с присутствием или образованием кристаллов галектина-10, где способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, где композицию вводят в виде аэрозоля.

Во втором родственном аспекте изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, ассоциированного с присутствием или образованием кристаллов галектина-10, где способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, где композицию вводят в виде аэрозоля.

Важно отметить, что все варианты осуществления, описанные в отношении терапевтического применения, в равной степени применимы как к первому, так и ко второму аспектам изобретения.

В предпочтительных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, представляет собой фармацевтическую композицию, раскрытую в других местах настоящего описания.

Заболевание или состояние, подлежащее лечению, может представлять собой любое заболевание или состояние, ассоциированное с присутствием или образованием кристаллов галектина-10. Заболевание или состояние, подлежащее лечению, может представлять собой любое заболевание или состояние, ассоциированное с наличием или образованием CLC.

В некоторых вариантах осуществления нуждающимся в этом субъектом может быть пациент с диагностированным заболеванием или состоянием, ассоциированным с присутствием или образованием кристаллов галектина-10. В других вариантах осуществления нуждающимся в этом субъектом может быть пациент, идентифицированный как «подверженный риску» развития заболевания или состояния, ассоциированного с присутствием или образованием кристаллов галектина-10. Для пациентов с заболеванием или состоянием, характеризующимся наличием кристаллов галектина-10, способы лечения обычно включают введение фармацевтической

композиции, содержащей Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10 и который способен растворять кристаллы галектина-10, присутствующих в тканях пациента. Для пациентов, идентифицированных как «группа риска» развития заболевания или состояния, характеризующегося образованием кристаллов галектина-10, способы профилактики могут включать введение фармацевтической композиции, содержащей Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10 и который способен ингибировать кристаллизацию галектина-10.

Кристаллы галектина-10 или CLC были найдены у пациентов с рядом заболеваний и состояний. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления заболевание или состояние, ассоциированное с присутствием или образованием кристаллов галектина-10, может быть выбрано из группы, состоящей из: астмы; хронического риносинусита; целиакии; гельминтной инфекции; эозинофильного воспаления желудочно-кишечного тракта; муковисцидоза (CF); аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АВРА); васкулита Черджа-Стросса; хронической эозинофильной пневмонии; и острого миелоидного лейкоза. В особенно предпочтительных вариантах осуществления заболеванием или состоянием, ассоциированным с присутствием или образованием кристаллов галектина-10, является астма или муковисцидоз (CF).

Как отмечалось выше, кристаллы галектина-10 или CLC ассоциированы, в частности, с заболеваниями или состояниями, характеризующимися эозинофильным воспалением. В предпочтительных вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, используются для лечения нарушений или состояний, ассоциированных с эозинофильным воспалением.

В настоящем описании способ «лечения» заболевания или состояния означает лечение заболевания или состояния и/или облегчение или устранение симптомов, ассоциированных с заболеванием или состоянием, приводящее к облегчению страданий пациента.

В контексте настоящего описания термин «терапевтически эффективное количество» означает количество или дозу Fab-фрагмента, присутствующего в фармацевтической композиции, достаточные для оказания терапевтического эффекта, например, количество или дозу Fab-фрагмента, которые необходимы для устранения или по меньшей мере облегчения симптомов, ассоциированных с заболеванием или состоянием. Соответствующее количество или доза может быть определена врачом по мере необходимости. Например, доза может быть скорректирована на основе таких факторов, как размер или вес подлежащего лечению субъекта, возраст подлежащего лечению субъекта, общее физическое состояние подлежащего лечению субъекта, состояние, подлежащее лечению, и путь введения.

Для клинического применения в некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят нуждающемуся в этом субъекту в виде одной или более доз, где концентрация Fab-фрагмента составляет от примерно 0,1 мг/кг массы тела до примерно 20 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления

фармацевтическую композицию вводят нуждающемуся в этом субъекту в виде одной или более доз, где концентрация Fab-фрагмента составляет от примерно 0,1 мг/кг массы тела до примерно 10 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят нуждающемуся в этом субъекту в виде одной или более доз, где концентрация Fab-фрагмента составляет от примерно 0,5 мг/кг массы тела до примерно 10 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят нуждающемуся в этом субъекту в виде одной или более доз, где концентрация Fab-фрагмента составляет от примерно 1 мг/кг массы тела до примерно 10 мг/кг массы тела.

#### Е. Фармацевтический состав

При использовании в качестве лекарственных средств Fab-фрагменты, которые связываются с галектином-10, обычно готовят в виде фармацевтических композиций. Таким образом, объем изобретения включает фармацевтические композиции, содержащие Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10.

В первом аспекте изобретения, как уже описано выше, предлагается фармацевтическая композиция, содержащая Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, для применения в способе лечения заболевания или состояния, ассоциированного с присутствием или образованием кристаллов галектина-10, где способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, где композицию вводят в виде аэрозоля.

В родственном третьем аспекте предлагается фармацевтическая композиция, содержащая Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, где композиция приготовлена в виде состава для аэрозолизации.

Важно отметить, что все варианты осуществления, описанные в отношении фармацевтических составов, в равной степени применимы как к первому, так и к третьему аспектам изобретения.

В контексте настоящего описания термин «приготовлена в виде состава для аэрозолизации» означает, что фармацевтическая композиция пригодна для аэрозолизации, например, путем небулизации. Активный ингредиент, присутствующий в фармацевтической композиции, например Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, после аэрозолизации должен оставаться фармакологически активным, доставляться в легкие к соответствующему месту воздействия и оставаться там до достижения желаемого фармакологического эффекта без активации механизма клиренса легких. Фармацевтическая композиция, приготовленная в виде состава для аэрозолизации, может иметь физиологические pH и осмолярность, что позволяет избежать раздражения, кашля и бронхokonстрикции легких при вдыхании. Физические свойства лекарственных форм могут влиять на скорость аэрозолизации и размер капель аэрозоля. Фармацевтическая композиция может иметь вязкость, ионную силу и/или поверхностное натяжение, которые являются особенно подходящими для аэрозолизации. Например, фармацевтическая композиция может содержать агенты, повышающие вязкость, и/или

может содержать электролиты для уменьшения воздействия поверхностного заряда, что позволяет уменьшить размер распыляемых капель для эффективного нацеливания на легкие. Фармацевтическая композиция может содержать агенты для защиты активного белка от протеолиза в легких.

В некоторых вариантах осуществления до аэролизации фармацевтическая композиция представляет собой жидкий водный состав. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления до аэролизации фармацевтическая композиция представляет собой водную жидкую композицию, содержащую фосфатно-солевой буфер. В некоторых вариантах осуществления до аэролизации фармацевтическая композиция представляет собой неводный жидкий состав. В некоторых вариантах осуществления до аэролизации фармацевтическая композиция представляет собой суспензию. В некоторых вариантах осуществления до аэролизации фармацевтическая композиция представляет собой порошок.

Фармацевтическая композиция может содержать поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активные вещества способствуют смачиванию и диспергированию гидрофобных активных фармацевтических ингредиентов и обычно действуют за счет снижения межфазного натяжения между твердыми веществами и жидкостями в суспензиях. Поверхностно-активные вещества часто используются для предотвращения образования агрегатов в биологических составах. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит одно или более поверхностно-активных веществ. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит одно или более поверхностно-активных веществ в концентрации от 0,001% до 0,1% мас./об. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит одно или более поверхностно-активных веществ в концентрации примерно 0,02% мас./об. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит одно или более поверхностно-активных веществ в концентрации менее 0,05% мас./об. Специалисту в данной области известны коммерчески доступные поверхностно-активные вещества для использования в фармацевтических композициях, включая, без ограничения, полисорбаты, сложные эфиры сорбитана, олеиновую кислоту, соевый лецитин, лаурилсульфат натрия, докузат натрия, фосфатидилхолин, полиоксиэтилен-15-гидроксистеарат, полиоксиэтиленалкиловые эфиры, Brij-35®, Твин-20, Твин-80, полисорбат 20 и полисорбат 80. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит полисорбат 20. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит менее 0,05% полисорбата 20. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит примерно 0,02% полисорбата 20. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит Твин 80. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит менее 0,05% Твин 80. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит примерно 0,02% Твин 80.

Как показано в приведенных в настоящем описании примерах, при аэролизации

фармацевтические композиции по настоящему изобретению генерируют небольшое количество белковых частиц и, таким образом, показано, что они менее чувствительны к агрегации. В результате отсутствует необходимость в добавлении поверхностно-активного вещества в фармацевтические композиции по изобретению, либо поверхностно-активные вещества могут быть добавлены лишь в небольших количествах. Это может быть особенно полезным, поскольку данные свидетельствуют о том, что присутствие поверхностно-активных веществ может оказывать отрицательное влияние на молекулярную целостность антител в терапевтических составах (Maillet et al. 2007; *Pharmaceutical Research*; 25(6):1318-1326).

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция не содержит поверхностно-активное вещество. В других вариантах осуществления композиция содержит поверхностно-активное вещество в количестве менее 0,05%, менее 0,01%, менее 0,002% или менее 0,001% мас./об.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит Fab-фрагмент. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10. Фармацевтическая композиция может содержать любой из Fab-фрагментов, раскрытых в настоящем описании. Особенно предпочтительно, чтобы фармацевтическая композиция содержала Fab-фрагмент, представленный в настоящем описании как 24F02\_N53A.

Соответственно, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит Fab-фрагмент, содержащий переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL),

где домен VH содержит:

HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 4 (GLRVGVLGFDY);

HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 3 (AINAGGGSTSYADSVKG); и

HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2 (SYAMS); и

где домен VL содержит:

LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 8 (QVWDGSAAV);

LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7 (ADEYRPE); и

LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6 (DGNNIGSKSAQ).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит Fab-фрагмент, содержащий переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где:

домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 98% или 99%, и

домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, 95%,

97%, 98% или 99%.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит Fab-фрагмент, содержащий переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где:

домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1

(EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINA  
GGGTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLRVGVLFQDYW  
GQGTLVTVSS);

и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5

(SYELTQPLSVSVALGQATARITCDGNNIGSKSAQWYQQKPGQAPVLVIYADEYRP  
EGIPERFSGSNSGNTATLTISRAGDEADYYCQVWDGSAAVFGGGTQLTVL).

Fab-фрагмент должен присутствовать в фармацевтической композиции в подходящей концентрации, чтобы быть фармакологически эффективным. Слишком высокие концентрации лекарственного средства могут вызвать пенообразование в некоторых устройствах для небулизации, что делает аэролизацию неэффективной или даже невозможной. Следовательно, концентрация Fab-фрагмента должна быть достаточной для ограничения агрегации белка как до, так и после аэролизации, а также для предотвращения вспенивания или образования пузырей композиции в устройстве для аэролизации.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтической композиции концентрация Fab-фрагмента в композиции составляет от примерно 1 до примерно 20 мг/мл, от примерно 1 до примерно 15 мг/мл, от примерно 1 до примерно 10 мг/мл, от примерно 1 до примерно 5 мг/мл, от примерно 2 до примерно 10 мг/мл, от примерно 3 до примерно 10 мг/мл, от примерно 4 до примерно 10 мг/мл или от примерно 5 до примерно 10 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтической композиции концентрация Fab-фрагмента в композиции составляет примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мг/мл.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фармацевтической композиции концентрация Fab-фрагмента в композиции составляет примерно 3 мг/мл. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фармацевтической композиции концентрация Fab-фрагмента в композиции составляет примерно 10 мг/мл.

Объем изобретения включает фармацевтические композиции, содержащие раскрытый в настоящем описании Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями или наполнителями. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления наполнитель представляет собой жидкий наполнитель, необязательно растворитель или водный растворитель.

Фармацевтически приемлемые наполнители, которые можно использовать в



составе композиций, включают, без ограничения: ионообменники, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, буферные вещества, такие как фосфаты, цитрат натрия, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как сульфат протамина, гидрофосфат динатрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, полиэтиленгликоль, полиакрилаты, воски, полиэтилен-полиоксипропиленовые блок-полимеры, ланолин, глицерин, солюбилизующие агенты, такие как этанол, циклодекстрин, стабилизаторы, такие как полисорбат 20, полисорбат 80, PVP K30, Solutol® и загустители, такие как сахароза.

В представленных в настоящем описании примерах используется базовый состав, содержащий либо 3 мг/мл, либо 10 мг/мл Fab-фрагмента в фосфатно-солевом буфере (Дульбекко), дополненном 0,02% полисорбата 20 или Твина 80. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, приготовленная в виде состава для аэролизации, содержит Fab-фрагмент и поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат 20. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, приготовленная в виде состава для аэролизации, содержит Fab-фрагмент и поверхностно-активное вещество, такое как Твин 80. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, приготовленная в виде состава для аэролизации, содержит Fab-фрагмент и поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат 20, в фосфатно-солевом буфере. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, приготовленная в виде состава для аэролизации, содержит Fab-фрагмент и поверхностно-активное вещество, такое как Твин 80, в фосфатно-солевом буфере. В конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция, приготовленная в виде состава для аэролизации, содержит Fab-фрагмент в концентрации 1-10 мг/мл и поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат 20, в концентрации 0,01-0,05%. В конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция, приготовленная в виде состава для аэролизации, содержит Fab-фрагмент в концентрации 1-10 мг/мл и поверхностно-активное вещество, такое как Твин 80, в концентрации 0,01-0,05%. В конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция, приготовленная в виде состава для аэролизации, содержит Fab-фрагмент в концентрации 1-10 мг/мл и поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат 20, в концентрации 0,01-0,05% в фосфатно-солевом буфере. В конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция, приготовленная в виде состава для аэролизации, содержит Fab-фрагмент в концентрации 1-10 мг/мл и поверхностно-активное вещество, такое как Твин 80, в концентрации 0,01-0,05% в фосфатно-солевом буфере.

#### Е. Путь введения

Фармацевтические композиции по изобретению предназначены для доставки в

проводящие дыхательные пути в виде аэрозолей. Проводящие дыхательные пути включают нос, глотку, гортань, трахею, бронхи и бронхиолы. Эти структуры образуют непрерывный канал для прохождения воздуха в легкие и из них. Терапевтический эффект аэрозольной терапии зависит от дозы осажденного препарата и его распределения в легких. Для введения ингаляционных лекарственных средств доступны различные ингаляторы. Большинство ингаляционных лекарственных средств вводят с помощью дозирующих ингаляторов под давлением (pMDI), ингаляторов сухого порошка или небулайзеров. Однако существуют и другие устройства, такие как ингаляторы мягкого тумана и интеллектуальные ингаляторы.

Дозирующие ингаляторы (MDI) являются основой терапии астмы и COPD во всем мире. MDI представляют собой ручные устройства карманного размера для доставки лекарственных средств за счет энергии сжатого пропеллента для генерации аэрозоля. Они содержат лекарственное средство в растворе или суспензии в пропелленте или в смеси пропеллента и сорастворителя. MDI доставляют небольшие дозированные количества лекарственного средства либо непосредственно пациентам, либо через дополнительные устройства, такие как спейсеры или клапанные камеры хранения (VHC). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в виде аэрозоля с помощью дозирующего ингалятора, такого как дозирующий ингалятор под давлением (pMDI).

Ингалятор сухого порошка (DPI) представляет собой устройство, которое доставляет лекарственное средство в легкие в виде сухого порошка. DPI обычно используются для лечения респираторных заболеваний, таких как астма, бронхит, эмфизема и COPD. Аэрозоли сухого порошка создаются путем пропускания воздуха через аликвоту сыпучего порошка. Поскольку DPI активируются при дыхании, отпадает необходимость в синхронизации вдоха и активации. Однако диспергирование порошка на вдыхаемые частицы зависит от создания турбулентного потока в ингаляторе. Большинство систем дозирования порошков требуют использования вещества-носителя. Этот носитель смешивают с лекарственным средством, чтобы порошок мог легче выйти из устройства. Используемые носители обычно включают лактозу и глюкозу. В некоторых вариантах осуществления, в которых фармацевтическая композиция находится в виде порошка, фармацевтическую композицию вводят в виде аэрозоля с помощью ингалятора сухого порошка (DPI).

Небулайзер преобразует лекарственное средство из жидкости в туман, чтобы его можно было вдохнуть в легкие. Небулайзеры состоят из основания, в котором находится воздушный компрессор, небольшого контейнера для жидкого лекарственного средства и трубки, соединяющей воздушный компрессор с контейнером, содержащим лекарственное средство. Над контейнером с лекарственным средством находится мундштук или маска, используемая для вдыхания тумана. Существует три основных типа небулайзеров: струйные небулайзеры, в которых для создания аэрозоля используется сжатый газ; ультразвуковые небулайзеры, которые создают аэрозоль посредством высокочастотных

вибраций; и сетчатые небулайзеры, в которых жидкость проходит через очень мелкую сетку, образуя аэрозоль. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в виде аэрозоля с помощью небулайзера. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в виде аэрозоля с помощью струйного небулайзера. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в виде аэрозоля с помощью ультразвукового небулайзера. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в виде аэрозоля с помощью сетчатого небулайзера.

В соответствии с четвертым аспектом изобретения предлагается небулайзер, содержащий фармацевтическую композицию, раскрытую в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления предлагается небулайзер, содержащий фармацевтическую композицию, содержащую Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, где композиция приготовлена в виде состава для аэрозолизации.

Каждое устройство для аэрозолизации генерирует аэрозоль лекарственного средства по-разному, например, путем генерации капель аэрозоля разного размера, с помощью разных способов вывода лекарственного средства и осаждения и распределения этого средства в легких. Поэтому может возникнуть необходимость в адаптации фармацевтической композиции к характеристикам конкретного используемого устройства для ингаляции.

Капли аэрозоля, образующиеся при аэрозолизации, должны иметь размер, необходимый для осаждения в легких. Обычно для осаждения в более мелких дыхательных путях и альвеолах требуются капли аэрозоля размером от 1 до 5 мкм. Более того, капли аэрозоля должны быть максимально монодисперсными, что увеличивает осаждение в желаемом месте, предназначенном для воздействия, и повышает эффективность лечения. Размер капель аэрозоля можно измерить методом лазерной дифракции, и обычно его указывают либо в виде среднего объемного диаметра (VMD), либо в виде медианного аэродинамического диаметра (MMAD). Как показано в примере 1 (фиг. 1), аэрозолизация фармацевтических композиций, представленных в настоящем описании, приводит к образованию капель аэрозоля, размер которых необходим для осаждения в легких. В частности, VMD после распыления составов антител с помощью устройства Aerogen® Solo составляет 4,8 мкм, а VMD после распыления с помощью устройства Pari eFlow® составляет 4,3 мкм.

В процессе аэрозолизации белки в фармацевтических композициях подвергаются стрессу под воздействием физических сил, таких как силы сдвига и нагревание, а также большой межфазной поверхности двух сред воздух-жидкость, которая может изменить конформацию и/или структуру белка посредством денатурации, химических модификаций (окисление, дезамидирование) и агрегирования. Ограничения, связанные с конкретным устройством, такие как силы сдвига, создаваемые струйными небулайзерами, и повышение температуры, возникающее в ультразвуковых небулайзерах, также могут привести к деградации белка и увеличению количества нежелательных агрегатов.

Наличие белковых агрегатов может оказывать существенное влияние на качество продукта с точки зрения биологической активности и иммуногенности. Неблагоприятные иммунные реакции, такие как реакция антител к лекарственному средству (ADA), могут привести к клиническим последствиям, таким как анафилаксия, сокращение периода полувыведения лекарственного средства и нейтрализация терапевтического белка. Таким образом, важно иметь возможность контролировать уровень белковых агрегатов после аэролизации и ограничивать их количество.

Размер белковых агрегатов может варьировать от микроскопических до макроскопических. Эти невидимые и видимые частицы можно обнаружить в белоксодержащих растворах с помощью многочисленных методов, традиционно используемых в данной области техники. Биохимические анализы для мониторинга белковых агрегатов часто основаны на ультрацентрифугировании, эксклюзионной хроматографии, гель-электрофорезе, динамическом светорассеянии, цитометрии или измерениях мутности. Как описано в примерах настоящего описания, фармацевтические композиции могут быть подвергнуты небулизации, а капли аэрозоля могут быть собраны и конденсированы, что позволит провести анализ частиц раствора, подвергнутого небулизации. В приведенных в настоящем описании примерах размер и концентрация частиц определяют, используя комбинацию динамического светорассеяния с цитометрией; однако понятно, что для детектирования и количественного определения белковых агрегатов после аэролизации можно использовать и другие хорошо известные методы. Важно отметить, что количество видимых и невидимых частиц должно быть как можно меньшим. В частности, количество частиц диаметром более 2 мкм должно быть как можно более низким, поскольку частицы такого размера часто связаны с иммуногенностью и тяжелыми реакциями ADA.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления размер частиц в аэрозоле составляет менее 30 мкм, менее 25 мкм, менее 10 мкм, менее 2 мкм, менее 1 мкм, менее 0,5 мкм, менее 0,4 мкм, менее 0,3 мкм, менее 0,2 мкм или менее 0,1 мкм. Предпочтительно, размер частиц в аэрозоле составляет менее 2 мкм.

Размер частиц в этом случае может относиться к размеру всех частиц (белковых агрегатов), присутствующих в подвергнутом аэролизации образце, или может относиться к размеру большинства частиц (белковых агрегатов), присутствующих в подвергнутом аэролизации образце. Например, подвергнутая аэролизации композиция с размером частиц менее 2 мкм может означать, что все частицы в аэрозоле имеют диаметр менее 2 мкм. Альтернативно, подвергнутая аэролизации композиция с размером частиц менее 2 мкм может означать, что большинство частиц в аэрозоле имеют диаметр менее 2 мкм, например 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% всех частиц аэрозоля имеют диаметр менее 2 мкм.

Концентрацию частиц (агрегатов) можно определить количественно в виде общего количества частиц на мл. Предпочтительно, чтобы общее количество частиц, образующихся после аэролизации, составляло менее  $1 \times 10^5$  частиц на мл. Концентрацию

частиц также можно определить количественно в виде количества частиц определенного размера, например количества частиц размером более 2 мкм на мл, или более 10 мкм/мл, или более 25 мкм/мл.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления концентрация частиц в аэрозоле составляет менее  $2 \times 10^5$ , менее  $1 \times 10^5$ , менее  $2 \times 10^4$  или менее  $1 \times 10^4$  общего количества частиц/мл.

В некоторых вариантах осуществления концентрация частиц размером более 2 мкм в аэрозоле составляет менее  $1 \times 10^5$ , менее  $5 \times 10^4$ , менее  $2 \times 10^4$ , менее  $1 \times 10^4$ , менее  $1 \times 10^3$  или менее  $1 \times 10^2$  частиц  $>2$  мкм/мл.

Для лучшего понимания далее приведено описание изобретения со ссылкой на неограничивающие примеры.

### **ПРИМЕРЫ**

#### Пример 1: Влияние небулизации на образование агрегатов - сравнение Fab с IgG и VHH

Одной из проблем небулизации биологических препаратов, таких как антитела, является образование агрегатов. Эти агрегаты могут иметь разные функциональные характеристики и вызывать образование антител к лекарственному средству. Соответственно, в примере 1 оценивается влияние небулизации на образование агрегатов.

Целью настоящего исследования было оценить стабильность и биологическую активность пяти разных полноразмерных антител или фрагментов антител в двух разных концентрациях, приготовленных в PBS, содержащем 0,02% Твин 80, после небулизации с помощью двух сетчатых небулайзеров (коммерчески доступных).

В эксперименте сравнивали количество агрегатов после небулизации трех IgG, одного Fab и одного VHH. Каждый образец тестировали в концентрации 3 мг/мл и 10 мг/мл. В эксперимент был включен клон 7B07 в формате Fab, клон 7B07 в соответствующем формате IgG, два дополнительных IgG (клон 10A06 и клон 08H11) и VHH (клон 1D06).

После доставки замороженные образцы хранили при температуре  $-20^\circ\text{C}$ . Перед небулизацией аликвоты (одного и того же антитела) объединяли в 15 мл полипропиленовой конической пробирке, и раствор хранили при  $4^\circ\text{C}$ . Определяли концентрацию белка, которую при необходимости доводили до 3 или 10 мг/мл с помощью PBS, дополненного 0,02% Твин 80. Образец фильтровали с помощью шприцевого фильтра Minisart® High Flow с размером пор 0,22 мкм (Sartorius). Белок концентрировали, подвергали визуальному осмотру, и до и после небулизации выполняли анализ образца методами динамического светорассеяния (DLS), проточной цитометрии (FCM) и эксклюзионной хроматографии (SEC).

Небулизацию осуществляли с помощью двух разных коммерчески доступных небулайзеров с вибрирующей сеткой в базовой комплектации; небулайзер Aerogen® Solo и электронный небулайзер PARI eFlow®. Оба устройства представляют собой активные небулайзеры с вибрирующей сеткой, которые преобразуют растворы лекарственных

средств в мелкие капли аэрозоля. Подобно другим активным устройствам, пластина с отверстиями вибрирует с высокой частотой и, пропуская раствор через отверстия в пластине, генерирует капли аэрозоля. Каждый образец подвергали небулизации по три раза с помощью трех разных сетчатых генераторов Pari eFlow®. Перед небулизацией антител определяли характеристики каждого сетчатого небулайзера, используя 0,9% раствор NaCl, методом лазерной дифракции (без ингаляционной камеры и закрытой ячейки), которые оказались сопоставимыми (средний объемный диаметр=5,6 мкм). Аналогичным образом три разных устройства-генератора аэрозоля Aerogen® Solo использовали в трех повторах. Перед распылением составов определяли характеристики трех сетчатых небулайзеров, используя 0,9% раствор NaCl, методом лазерной дифракции (без закрытых ячеек), которые оказались сопоставимыми (средний объемный диаметр устройств s0087 и s0094=4,8 мкм, и средний объемный диаметр устройства s0210=4,9 мкм).

Каждый образец подвергали небулизации и контролировали время небулизации. Капли аэрозоля собирали с помощью 15 мл полипропиленовой конической трубки (код: 352097, Dominique Dutscher), расположенной непосредственно перед вибрирующей сеткой, оставляя достаточно места для образования аэрозоля и обеспечивая конденсацию раствора после небулизации. Этот дополнительный этап конденсации на поверхности пробирки может быть стрессовым для белка и, таким образом, является худшим случаем по сравнению с тем, что может произойти *in vivo*. Сбор аэрозоля выполняли в ламинарном потоке.

Процесс промывки и небулизации был одинаковым для двух устройств.

Этапы:

1. Погружение сетки и других частей небулайзера в ванночку с раствором Surfanios premium в концентрации 5 мл/л горячей водопроводной воды, непродолжительное перемешивание и ожидание в течение 5-10 мин.
2. Тщательная промывка сетки и других частей небулайзера горячей водопроводной водой.
3. Небулизация 3 мл горячей водопроводной воды.
4. Небулизация 1,2 мл (для Aerogen® Solo) или 2×1,2 мл (для Pari eFlow®) PBS, pH 7,2, отфильтрованного через 0,22 мкм фильтр.
5. Небулизация 1,2 мл деминерализованной воды, отфильтрованной через 0,22 мкм фильтр, и сбор аэрозоля.
6. Проверка методом FCM, что количество частиц не превышает установленный лабораторией предел (<200 частиц для Aerogen® Solo и <300 частиц для Pari eFlow®). При необходимости повторение действий, начиная с этапа 4 или этапа 1.
7. Небулизация 1,2 мл буфера PBS, дополненного 0,02% Твин 80, отфильтрованного через 0,22 мкм фильтр.
8. Небулизация 1,2 мл образца.
9. Новый цикл с другим образцом, начиная с этапа 1.

Все операции небулизации осуществляли с помощью одного и того же контроллера: USB Aerogen или eBase Controller. Эти контроллеры обеспечивают непрерывный процесс небулизации. Время небулизации измеряли для определения скорости потока каждого устройства/образца (скорость потока=время распыления/1,2 мл).

### 1.1 Гранулометрическое распределение

Эксперименты по лазерной дифракции выполняли с помощью прибора Spraytec™ (Malvern Instruments Ltd.). Этот метод использовали для определения размера капель аэрозоля, генерируемых небулайзерами. Лазерная дифракция позволяет измерить VMD (средний объемный диаметр), средний размер сферической аэрозольной частицы. Для характеристики устройства использовали 1 мл 0,9% NaCl или 0,5 мл растворов антител. Эксперименты выполняли при комнатной температуре (20-25°C) и с закрытой ячейкой или без нее, соответственно, для проб или контроля. В закрытой ячейке капли аэрозоля отсасывались насосом при постоянной аспирации со скоростью воздушного потока 30 л/мин на противоположной стороне струи аэрозоля.

Аэрозоли анализировали методом лазерной дифракции. Контроль устройства с 0,9% NaCl выполняли без закрытых ячеек, в результате чего получали VMD для Aerogen® Solo и Pari eFlow®, равные 4,8 и 5,6, соответственно.

Для состава Ab лазерную дифракцию выполняли с закрытыми ячейками, что не оказало влияния на VMD после распыления с помощью Aerogen® Solo, но привело к уменьшению VMD до 4,3 мкм при распылении с помощью Pari eFlow® (фиг. 1).

Между различными составами Ab и солевыми растворами (с закрытыми ячейками) не наблюдали никаких существенных различий в размере капель аэрозоля.

### 1.2 Концентрация белка

Концентрацию белка определяли до и после небулизации путем измерения величины поглощения раствора объемом 2 мкл при 280 нм с помощью Nanodrop 2000 от Thermo Fisher Scientific.

Образцы перед небулизацией фильтровали, и концентрацию белка измеряли с помощью спектрофотометра. При необходимости, перед небулизацией концентрации довели до 3 или 10 мг/мл. После небулизации измеряли концентрации белка для определения любых потерь биологического материала во время небулизации. Исходные данные и изменения концентрации до и после небулизации показаны на фиг. 2. Концентрация до и после небулизации изменялась в пределах от -12% до +12%.

### 1.3 Визуальный осмотр частиц

Растворы антител до и после небулизации оценивали в 15 мл полипропиленовой конической пробирке на наличие видимых частиц при естественном освещении.

До небулизации и после фильтрации частицы во флаконах не наблюдались. После небулизации в большинстве образцов наблюдали видимые частицы (табл. 2). Примечательно, что после небулизации видимые частицы Fab 7B07 не наблюдались (в отличие от полноразмерного IgG 7B07).

Примечательно, что небулизация 1D06 VHH привела к образованию множества

видимых частиц, и растворы были более мутными по сравнению с другими образцами. В некоторых образцах и при использовании только буфера в резервуарах устройств наблюдали образование пены.

Таблица 2. Визуальный осмотр раствора антител после небулизации

Образец Концентрация Дата	Сетчатое устройство	Визуальный аспект	Образец Концентрация Дата	Сетчатое устройство	Визуальный аспект
10A06 IgG 3 мг/мл 23/05/2019	Solo	Белые волокна	10A06 IgG 10 мг/мл 29/05/2019	Solo	Белые волокна
	eFlow	Отсутствие частиц		eFlow	Белые частицы
7B07 IgG 3 мг/мл 04/06/2019	Solo	Белые волокна	7B07 IgG 10 мг/мл 11/06/2019	Solo	Белые волокна или белые частицы
	eFlow	Белые частицы		eFlow	Белые волокна или Белые частицы
7B07 Fab 3 мг/мл 06/06/2019	Solo	Отсутствие частиц	7B07 Fab 10 мг/мл 12/06/2019	Solo	2 Белые волокна или Отсутствие частиц
	eFlow	Отсутствие частиц		eFlow	Отсутствие частиц
1D06 VНН 3 мг/мл 19/06/2019	Solo	Белые частицы, мутный раствор solution	1D06 VНН 10 мг/мл 20/06/2019	Solo	Белые частицы, мутный раствор
	eFlow	Белые частицы, мутный раствор		eFlow	Белые частицы, мутный раствор
08H11 IgG 3 мг/мл 26/06/2019	Solo	Отсутствие частиц	08H11 IgG 10 мг/мл 27/06/2019	Solo	Отсутствие частиц
	eFlow	Отсутствие частиц		eFlow	Отсутствие частиц

#### 1.4. Невидимые частицы, определенные методом проточной цитометрии (FCM)

Проточная цитометрия (прибор Flow-Imaging FC200S, Occhio) представляет собой метод визуализации, применяемый для детектирования и измерения невидимых и видимых частиц в белоксодержащих растворах.

Перед каждым анализом аппарат промывали деминерализованной отфильтрованной водой. Для выполнения оценки количество измеренных частиц не должно было превышать 100. 250 мкл каждого образца (только буфер и раствор антител) анализировали с помощью FCM до и после небулизации. Среднее количество частиц с буфером на сетке вычитали из значения в образце. Количество частиц на мл выражали для частиц с эквивалентным диаметром >2 мкм, >10 мкм и >25 мкм.

Образцы анализировали методом FCM до и непосредственно после небулизации. Результаты представлены на фиг. 3. Общее количество частиц должно быть по возможности более низким. Предпочтительно общее количество частиц не должно превышать  $1 \times 10^5$  общего количества частиц/мл. Эти данные впервые показали, что биологические препараты в формате Fab имеют пониженную склонность к агрегации при



небулизации.

Перед анализом оценивали фон +/- подвергаемого небулизации буфера (PBS с 0,02% Твин 80). Результаты показали, что до небулизации общее количество частиц составляло в среднем 1208. После небулизации среднее количество частиц увеличилось до 3918 и 10203 для устройств Aerogen® Solo и Pari eFlow®, соответственно.

До небулизации образцы содержали малое количество частиц. После небулизации количество частиц (>2 мкм) обычно увеличивалось и зависело от образцов. В целом частиц было больше при концентрации 10 мг/мл, чем при концентрации 3 мг/мл, за исключением 1D06 VNH.

В случае полноразмерного IgG: 10A06 показал наибольшее количество частиц (в среднем 104381 и 97476 при концентрации 3 мг/мл для устройств Aerogen® Solo и Pari eFlow®, соответственно). IgG 8H11 генерировал наименьшее количество частиц (в среднем 1160 и 1737 частиц при 3 мг/мл и 9,744 и 776 при 10 мг/мл после небулизации с помощью устройств Aerogen® Solo и Pari eFlow®, соответственно).

По сравнению с IgG 7B07 формат Fab генерировал более низкое количество частиц (>2 мкм) после небулизации (при 3 мг/мл, 2349 и 3183 и при 10 мг/мл, 6040 и 20353 для устройств Aerogen® Solo и Pari eFlow®, соответственно). Наихудшим образцом оказался VNH 1D06, в котором было обнаружено наибольшее количество частиц (>2 мкм) (2149534 и 1874236 частиц при концентрации 10 мг/мл для устройств Aerogen® Solo и Pari eFlow®, соответственно).

В большинстве случаев уровень частиц был выше после небулизации через сетку устройства Pari eFlow® по сравнению с устройством Aerogen® Solo.

#### 1.5. Субмикронные частицы, определенные методом динамического рассеяния света (DLS).

Эксперименты по динамическому светорассеянию выполняли при 25°C с помощью прибора Dynapro Nanostar® с лазером 659 нм/100 мВт при угле детектирования 90° (Wyatt Technology, Europe GmbH) для определения профиля распределения растворов по размерам до и после небулизации. 100 мкл образца помещали в одноразовую кювету (UVette 80, Eppendorf). Для каждого образца выполняли 10 захватов по 7 секунд каждый. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения Dynamics® (7.1.5.6). Образцы с менее чем 70% успешных захватов считались «не подлежащими оценке», согласно рекомендациям производителя. В этом случае растворы фильтровали через 0,45 мкм фильтр. Фильтр динамических данных устанавливали следующим образом: базовый предел:  $\pm 0,01$ , и максимальный SOS: 100. Результаты выражали в процентах по массе мономера и других частиц. Анализ дал несколько параметров, включая гидродинамический радиус молекулы, полидисперсность и индекс полидисперсности. Полидисперсность относится к уровню однородности размеров частиц. Уровень гомогенности считается высоким, когда процент полидисперсности составляет менее 15%. Индекс полидисперсности основан на анализе кумулянтов. Он сопоставим с шириной распределения, деленной на среднее значение.

Образцы анализировали методом DLS до и непосредственно после небулизации. Результаты представлены на фиг. 4. До небулизации процентное содержание основных частиц в растворе (основной пик) было сопоставимым для всех составов. Радиус основного пика соответствовал размеру белка.

После небулизации большинство образцов не удалось проанализировать методом DLS, вероятно, из-за количества крупных частиц (как показал метод FCM). Образцами, которые можно было анализировать, были IgG 08H11 в концентрации 3 и 10 мг/мл, Fab 7B07 в концентрации 3 мг/мл для двух устройств и Fab 7B07 в концентрации 10 мг/мл после небулизации с помощью устройства Aerogen® Solo.

Когда в результате анализа образцов получали мультимодальное распределение без фильтрации, их анализировали после фильтрации через 0,45 мкм фильтр. Однако применение фильтрации не улучшило результаты DLS, поскольку значительная часть образцов после фильтрации имела мультимодальное распределение. Никаких существенных изменений процента полидисперсности и PDI не наблюдали. В целом результаты DLS совпали с результатами FCM.

#### 1.6. Однородность размера, определенная методом SEC-HPLC

После разведения образца до 1 мг/мл и фильтрации через 0,22 мкм фильтр выполняли анализы методом эксклюзионной хроматографии (SEC) в системе Ultimate™ 3000 UHPLC с возможностью непрерывной оценки в реальном времени. 50 мкг каждого образца вводили с помощью автосэмплера Ultimate™ в колонку Agilent Technologies (Santa Clara, CA) Bio SEC-3 (3 мкм, 300 Å, 7,8×300 мм), и разделение выполняли при скорости потока 1 мл/мин. Буфером для элюирования был PBS с pH 7,2, и УФ-детектирование осуществляли при 280 нм с помощью детектора с диодной матрицей Ultimate™ (Thermo Fisher Scientific). Результаты выражены в процентах мономеров и частиц с более высокой молекулярной массой (HMWS).

Образцы анализировали методом эксклюзионной хроматографии до и после небулизации. Результаты представлены на фиг. 5. До небулизации все составы и концентрации различались по массовому проценту основных частиц в растворе (основной пик). IgG 7B07 показал пик мономера ниже 95%. После небулизации процент мономеров в некоторых образцах снизился. После небулизации потеря полноразмерного IgG 7B07 была наиболее значительной, в частности, при концентрации 3 мг/мл. В большинстве случаев устройство не оказывало никакого воздействия.

#### 1.7 Заключение

Целью данного исследования была оценка стабильности различных антител к галектину-10 при небулизации. Были изучены три IgG, один Fab и один VHH. Результаты показали, что после небулизации профиль агрегации зависит от антитела. IgG 8H11 и Fab 7B07 оказались наиболее стабильными при небулизации, вызывая агрегацию в меньшей степени. VHH 1D06 был наиболее нестабильным, что приводило к высокому уровню агрегации.

Небулизацию образцов осуществляли с помощью двух сетчатых небулайзеров:

устройства Aerogen® Solo и Pari eFlow®. Между двумя системами не наблюдали существенной разницы в профиле агрегации, хотя устройство Aerogen® Solo имело тенденцию генерировать меньшее количество агрегатов. Небулизация образца показала, что устройство Aerogen® Solo вызывало небольшое снижение концентрации белка, имело более низкую скорость потока и генерировало капли немного более крупного размера, чем устройство Pari eFlow®.

Небулизацию образцов осуществляли в двух концентрациях: 3 и 10 мг/мл. Большее количество невидимых агрегатов (FCM) обычно наблюдали при 10 мг/мл, чем при 3 мг/мл. В целом данные показали, что среди пяти протестированных молекул форма Fab 7B07 была наиболее стабильной при небулизации. Действительно, методы сканирования различных совокупных популяций показали, что небулизация этого фрагмента антитела индуцировала образование небольшого количества частиц после сбора.

#### Пример 2: Влияние небулизации на стабильность различных Fab-фрагментов

В этом исследовании оценивали некоторые физико-химические характеристики четырех клонов Fab к галектину-10, способных солюбилизовать CLC. Молекулы, оцениваемые в формате Fab, представляли собой клоны: 18C06, 20H09, 23H09 и 24F02\_N53A (дополнительные подробности получения и характеристики Fab см. в примере 3 ниже).

В качестве образца сравнения также использовали клон 7B07\_N53A в формате Fab. Fab 7B07\_N53A является родственным Fab 7B07, протестированному в приведенном выше примере 1, но разработан путем включения мутации N53A, снижающей вероятность дезамидирования. Было обнаружено, что Fab 7B07\_N53A является менее стабильным, чем Fab 7B07, но полностью эффективным в отношении растворения CLC *in vitro*. Поэтому 7B07\_N53A был включен для выбранных условий и моментов времени в целях сравнения.

Все четыре клон, описанные в этом исследовании, имеют общую часть VH+CH1, CH2 и CH3; три клон (20H09, 23H09 и 24F02\_N53A) имеют общую легкую цепь, которая является родительской LC 7B07\_N53A, тогда как один клон (18C06) имеет свою собственную легкую цепь.

Не содержащие эндотоксин линии Fab, приведенные к зародышевой линии, приобретали у компании U-Protein Express (UPX), Utrecht, The Netherlands. Молекулы Fab к галектину-10 очищали и доставляли в argenx с помощью UPX в PBS-буфере Дульбекко, содержащем 0,02% полисорбата 20. Белки и буферы для лекарственных форм доставляли в виде материала, отфильтрованного через 0,22 мкм фильтры. Полученный материал хранили в UPX при температуре 2-8°C и отправляли в компанию argenx при температуре 2-8°C. По прибытии очищенный материал всех клонов хранили при 2-8°C в течение 48 часов, и концентрацию белка доводили до 10 мг/мл, используя исходный буфер для приготовления в асептических условиях.

Все четыре Fab оценивали на стабильность после небулизации. Стресс при небулизации с помощью сетчатых небулайзеров и его влияние на физико-химические свойства клонов оценивали в трех повторах до (T0) и после 4-недельного хранения при

+5°C (T4W). Все аэрозолированные растворы (включая растворы лекарственных форм) полностью характеризовали в оба момента времени.

Небулизацию каждого клона осуществляли с помощью активного вибрационного сетчатого небулайзера Aerogen Solo, который преобразует раствор лекарственного средства во вдыхаемый аэрозоль. Для каждого клона использовали три разных устройства для каждого момента времени, и результаты регистрировали согласно серийному номеру устройства (небулайзера). В случае загрязнения устройства, о чем свидетельствовало более длительное, чем обычно, время небулизации для заданного размера аликвоты, использовали запасные устройства того же типа для завершения небулизации с помощью трех устройств.

Небулизацию клонов 18C06, 20H09, 23H09 и 7B07\_N53A осуществляли с помощью устройств Aerogen Solo с серийными номерами #1690, #0125 и #0259. Клон 24F02\_N53A, небулизацию которого осуществляли на более позднем этапе, оценивали после небулизации с помощью тех же устройств, но, поскольку наблюдалось некоторое засорение устройства #0125, использовали дополнительное устройство с номером #1512. Чтобы связать результаты по аэрозолированным белкам с этим четвертым устройством, использованным в исследовании, небулизацию аликвот клонов 20H09 и 23H09 также осуществляли с помощью этого четвертого устройства вместе с клоном 24F02\_N53A. Результаты проиллюстрированы в виде среднего значения трехкратных измерений на устройство, если не указано иное.

Сводная таблица, демонстрирующая несколько основных характеристик протестированных Fab (до стрессового воздействия любого типа), представлена в таблице 3.

Таблица 3: Обзор свойств Fab к галектину-10

Признак	Критерии (Целевые)	g18C06	g20H09	g23H09	g24F02_N53A	(g7B07_N53A)
Формат	Fab	Fab	Fab	Fab	Fab	Fab
Идентичность с человеческим	% идентичности с V-областью человеческой зародышевой линии	100%	98.8%	98.8%	100%	98.8%
Иммуногенность	Балл EpiBase: балл иммуногенности у человека	человек низкий	человек низкий	человек низкий	человек низкий	NT
Перекрест	перекрестная	нет	нет	есть	есть	нет

<b>ная реактивность</b>	<b>реактивность с Суно</b>					
<b>Связывающая активность</b>	<b>KD (средство)</b> $\leq 15$ нМ	есть (1,3 нМ)	нет (17,7 нМ)	есть (5,3 нМ)	есть (1,4 нМ)	нет (145,0 нМ)
	<b>kd (диссоциация)</b> $\leq 5E-03/c$	есть (4,9E-04/c)	нет (4,7E-02/c)	есть (3,1E-03/c)	есть (1,8E-03/c)	нет (79,0E-03/c)
<b>Изоэлектрическая точка (pI)</b>	<b>Результат</b>	9,55	8,32	7,47	8,03	NT

NT: не тестировалось

### 2.1 Концентрация белка

Концентрацию белка оценивали при A280 нм (Nanodrop). Явное уменьшение концентрации белка наблюдали во всех аэрозолированных растворах всех клонов. Как показано на фиг. 6, это происходило при использовании всех небулайзеров в оба момента времени, T0 и T4W, после хранения в условиях охлаждения. Независимые измерения подтвердили эту тенденцию.

### 2.2 Визуальный осмотр частиц

Визуальный осмотр образцов всех клонов выполняли два человека в моменты времени T0 и T4W до и после небулизации (в 0,5 мл прозрачные стеклянные флаконы вносили по 1,5 мл). Перед небулизацией растворы оценивали на наличие видимых частиц, но ни в одном из проверенных клонов частицы не были обнаружены. Растворы, аэрозолированные в T0, не содержали видимых частиц, за исключением клон 23H09. После небулизации в 4W в аликвотах 23H09 и 24F02\_N53A наблюдали белые частицы, тогда как в 18C06 и 20H09 частицы не были обнаружены. Аэрозолизация вызывала вспенивание перед сетчатым вибрационным модулем в резервуаре (табл. 4).

Таблица 4. Визуальный осмотр клонов до и после небулизации через сетку

<b>Образец</b>	<b>Осмотр до небулизации</b>	<b>Устройство Aerogen Solo, серийный №</b>	<b>Осмотр раствора после небулизации</b>	<b>Осмотр устройства после небулизации</b>
<b>g18C06 T0</b>	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	1690	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	В резервуаре пена перед сеткой

		0125	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	В резервуаре пена перед сеткой
		0259	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	В резервуаре пена перед сеткой
<b>g18C06 T4W</b>	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	1690	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	В резервуаре пена перед сеткой
		0125	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	В резервуаре пена перед сеткой
		0259	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	В резервуаре пена перед сеткой
<b>g20H09 T0</b>	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	1690	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	В резервуаре пена перед сеткой
		0125	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	В резервуаре пена перед сеткой
		0259	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	В резервуаре пена перед сеткой
<b>g20H09 T4W</b>	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	1690	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	В резервуаре пена перед сеткой
		0125	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	В резервуаре пена перед сеткой
		0259	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	В резервуаре пена перед сеткой

<b>g23H09 T0</b>	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	1690	Белые агрегаты (+)	В резервуаре пена перед сеткой
		0125	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	В резервуаре пена перед сеткой
		0259	Белые агрегаты (+)	В резервуаре пена перед сеткой
<b>g23H09 T4W</b>	Агрегаты отсутствуют Агрегаты отсутствуют	1690	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	В резервуаре пена перед сеткой
		0125	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	В резервуаре пена перед сеткой
		0259	Белые агрегаты (+)	В резервуаре пена перед сеткой
<b>g7B07_N53A T4W</b>	Прозрачный Агрегаты отсутствуют	1690	Белые агрегаты (+)	В резервуаре пена перед сеткой
		0125	Белые агрегаты (+)	В резервуаре пена перед сеткой
		0259	Белые агрегаты (+)	В резервуаре пена перед сеткой
<b>g24F02_N53 A T0</b>	Агрегаты отсутствуют	1690	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	В резервуаре пена перед сеткой
		0125	Белые агрегаты (++)	Не оценивали
		0259	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	В резервуаре пена перед сеткой
		1512	Агрегаты отсутствуют Прозрачный	В резервуаре пена перед сеткой
<b>g24F02_N53 A T4W</b>	Агрегаты отсутствуют	1690	Белые агрегаты (+)	В резервуаре пена перед сеткой

	Прозрачный	0125	Белые агрегаты (++)	Не оценивали
		0259	Белые агрегаты (+)	В резервуаре пена перед сеткой
		1512	Белые агрегаты (+)	В резервуаре пена перед сеткой

+: 2-5 агрегатов;

++: 5-15 агрегатов;

Solo 0125 - устройство, в котором наблюдали аномальные результаты.

### 2.3. Невидимые частицы, определенные методом динамического рассеяния света (DLS).

Все клоны и образцы составов анализировали методом DLS в моменты времени T0 и T4W до и после небулизации. Измерения выполняли в трех повторах для каждого состава с помощью прибора DynaPro Nanostart. Массовый процент, гидродинамический радиус молекулы, процент полидисперсности (%PD) и индекс полидисперсности (PDI) использовали для мониторинга профилей распределения субмикронных частиц в растворе. Для проведения анализа все растворы образцов в оба момента времени фильтровали (0,2 мкм) до и после небулизации.

Оценку выполняли путем сравнения предназначенных для небулизации белков до и непосредственно после небулизации (фиг. 7). До небулизации массовое содержание основных частиц в растворе (мономера) для всех клонов составляло более 99,9%. Аналогично, для клонов 18C06 и 24F02\_N53A (вместе с 7B07\_N53A) массовый процент основных видов после небулизации превышал 99,9%, а присутствие немномерных видов было незначительным. Данные, полученные для клонов 20H09 и 23H09 после небулизации, оказались непригодными для оценки из-за повышенного уровня частиц. Для всех Fab радиус основного пика соответствовал ожидаемому размеру белка.

### 2.4. Невидимые частицы, определенные методом проточной цитометрии (FCM)

Проточную цитометрию (FCM) выполняли с помощью прибора Flow-Imaging FC200S, Occhio, для детектирования и измерения в растворах частиц размером от 1 до 100 мкм. Перед каждым анализом аппарат тщательно промывали аликвотами деминерализованной отфильтрованной воды. В качестве теста для оценки пригодности системы каждый анализ проводили после того, как результаты измерения показывали общее количество частиц в этих аликвотах <100. Количество частиц на мл выражали в виде общего количества частиц и в виде частиц с эквивалентным диаметром >2 мкм, >10 мкм и >25 мкм.

Все клоны измеряли до и после небулизации в момент времени T0 и после 4-недельного хранения при 5°C (T4W). Как указано выше, для завершения оценки все образцы фильтровали (0,2 мкм). Образцы буфера, используемые в этих двух временных точках, также фильтровали (до и после небулизации). Все приведенные здесь значения



FCM представляют собой среднее значение, полученное в результате использования трех устройств (по три измерения на устройство) после вычитания среднего значения частиц (общего количества и количества частиц каждой категории), содержащихся в буфере для лекарственной формы, для всех устройств (по три измерения на устройство).

На первом этапе выполняли одновременную небулизацию всех клонов Fab 18C06, 20H09, 23H09 и 7B07\_N53A, тогда как небулизацию клона Fab 24F02\_N53A осуществляли на более позднем этапе после замены загрязненного устройства (#0125). Небулизацию растворов клонов с первого этапа, независимо от и получения, также распыляли с помощью нового устройства, используемого для клона 24F02\_N53A (#01215), с целью возможности сопоставления этапов распыления и результатов.

Как показано на фиг. 8, после небулизации Fab 18C06 и 24F02\_N53A как в T0, так и в T4W (вместе с 7B07\_N53A) показали более низкое количество частиц во всех категориях размеров по сравнению с другими образцами. Количество невидимых частиц, полученные в ходе экспериментов по небулизации, приведено в Таблице 5, где представлено общее количество частиц/мл и количество частиц размером >2 мкм/мл, поскольку эта последняя категория включает частицы, которые потенциально способны вызывать иммуногенность при введении лекарственного средства путем ингаляции.

Тесты по оценке невидимых и субмикронных частиц выявили необходимость оптимизации состава. Клон 24F02\_N53A имел относительно более низкое и более стабильное количество частиц всех категорий после хранения в течение 4 недель и небулизации. Клон 23H09 продемонстрировал относительно более высокое количество частиц всех категорий после небулизации по сравнению с клоном 24F02\_N53A, включая частицы размером >2 мкм, категорию, которая часто связана с иммуногенностью и тяжелыми реакциями ADA, которые могут угрожать безопасности, эффективности и ухудшать фармакокинетику препарата.

Таблица 5: Обзор результатов по оценке невидимых частиц, выраженных в виде общего количества частиц/мл и части размером >2 мкм/мл

\* звездочка указывает на совокупные значения, включая устройство № 0125, которое имело загрязнение, приводящее к аномальным результатам.

Момент времени	g18C06	g20H09	g23H09	g24F02_N53 A	g7B07_N53 A
<b>Общее количество частиц/мл</b>					
<b>T0</b>	6,547	1,476	302	2,456	NA
<b>T0 после небулизации</b>	16,201	212,723	241,257	26,741*/ 21,550	NA
<b>T4W при +5°C</b>	266	14,063	854	2,606	1,827

<b>T4W после небулизации</b>	23,363	452,413*/ 291,462	302,794*/ 292,352	25,941*/ 19,713	12,104
<b>Количество частиц размером &gt;2 мкм/мл</b>					
<b>T0</b>	559	292	139	642	NA
<b>T0 после небулизации</b>	2,204	28,532	31,724	6,160*/ 4,721	NA
<b>T4W при +5°C</b>	137	1,576	397	442	802
<b>T4W после небулизации</b>	3,992	75,862*/ 49,344	37,270*/ 32,911	7,111*/ 4,328	3,118

### 2.5 Активность связывания галектина-10 по результатам метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

Функционально-активную концентрацию подвергнутых небулизации растворов оценивали методом SPR на приборе Biacore 3000. Все образцы оценивали методами, отвечающими стандартным квалификационным критериям. Аликвоты тестировали при заранее определенных тестовых концентрациях по кривым титрования эталонных образцов (T0) и в присутствии образцов контроля качества (QC).

Как показано на фиг. 9, все подвергнутые небулизации клоны оказались полностью функциональными без каких-либо потерь в проценте относительной активности по отношению к эталонному материалу каждого клона, который не был подвергнут стрессовым воздействиям. Стрессовое воздействие при распылении не оказало никакого влияния на активность клонов ни в точке T0, ни после 4-недельного хранения при +5°C.

### 2.6 Однородность по размеру по результатам SE-HPLC

Однородность оценивали методом SE-HPLC с помощью хроматографической системы Agilent 1260 Infinity II, оборудованной четвертичным насосом, автоматическим инжектором, онлайн-дегазатором и детектором DAD, колонкой и автосемплером с термостатом (21°C), установленным на 6°C. Детектор устанавливали одновременно на длины волн 280 нм и 214 нм для мониторинга вариантов размера. Образцы анализировали до и после небулизации в обеих временных точках, T0 и T4W.

Как показано на фиг. 10, после небулизации оцененная однородность по размеру всех четырех клонов Fab находилась на уровне более 97% независимо от временных точек или используемого устройства. Процент общей агрегации (% видов HMW) и общей фрагментации (% видов LMW) оставался на очень низком уровне во всех случаях, т.е. ниже 3% в виде общего процента немономерных частиц.

Все аликвоты фильтровали перед небулизацией в обеих временных точках T0 и T4W. Фильтрацию выполняли, поскольку раствор имел повышенное количество частиц согласно результатам измерения методом DLS (раздел 2.3). Как следствие, приведенные здесь результаты SEC для подвергнутых небулизации клонов следует интерпретировать

главным образом с точки зрения качества. На фигурах можно видеть, что все клоны оставались относительно стабильными после небулизации через сетку даже после 4-недельного хранения в условиях охлаждения.

### 2.7 Чистота по cGE

Чистоту по cGE оценивали с помощью технологии встроенной в чип лаборатории с использованием биоанализатора Expert 2100 (Agilent). Образцы анализировали в редуцирующих и нередуцирующих условиях до и после небулизации.

Как показано на фиг. 11, стресс во время распыления не оказывает влияния на чистоту клона Fab, за исключением клона 18C06, который имел самые низкие показатели чистоты. Это соответствует всем предыдущим анализам, даже для материала, не подвергнутого стрессовым воздействиям. Этот клон не смог продемонстрировать чистоту основного пика более 90% в нередуцирующих условиях, при этом небулизация не оказывала дополнительного стрессового воздействия. У остальных клонов чистота в нередуцирующих условиях превышала 90% независимо от времени проведения небулизации (фиг. 11, верхняя панель). В редуцирующих условиях все молекулы продемонстрировали чистоту более 95% (фиг. 11, нижняя панель).

### 2.8 Посттрансляционные модификации (PTM)

Структурную характеристику всех клонов Fab выполняли на уровне белков и пептидов с помощью нескольких аналитических методов (icIEF, МС с онлайн-обессоливанием, RPLC-UV-MS на восстановленном белке, карта пептида, полученная с помощью RPLC-MS после расщепления трипсином). Клоны анализировали на PTM после небулизации как в точке T0, так и после 4-недельного хранения при +5°C (T4W). Во всех случаях анализы выполняли параллельно с контрольным эталонным материалом (предварительная небулизация), не подверженным стрессовым воздействиям, для каждого клона.

После небулизации никаких серьезных проблем в отношении клонов выявлено не было. Основные выводы суммированы ниже:

- Аминокислотная последовательность четырех клонов Fab подтверждена на уровне белка по молекулярной массе каждого интактного Fab (LC и VH+CH1), при этом охват пептидной последовательности составил 100%.

- Структурная целостность Fab до и после стрессового воздействия осталась без изменений и была подтверждена анализами картирования интактных белков и пептидов, результаты которых продемонстрировали и подтвердили наличие (меж- и внутрицепочечных) ожидаемых дисульфидных мостиков. Только 18C06 (все образцы, включая контрольный) имел свободный цистеин в LC вместо ожидаемого мостика с частью VH+CH1 и обнаруженный альтернативный дисульфидный мостик, образованный между двумя близко расположенными цистеинами в LC.

- Во всех клонах окисление после небулизации осталось на уровне <1%.

- После небулизации специфические для сайта события, такие как изомеризация и дезамидирование, в целом остались без изменений во всех клонах.

### 2.9 Эффективность - анализ растворения кристаллов

В ходе этого исследования все клоны Fab оценивали на способность растворять кристаллы GAL10 *in vitro*. Для этой цели в лаборатории Charles Rivers Laboratories (CRL), Leiden, The Netherlands, был разработан и стандартизирован анализ растворения кристаллов (CDA) для оценки биологической активности клонов Fab до и после небулизации. Цель заключалась в оценке, может ли небулизация до/после хранения оказать воздействие на (био)активность клонов, приводящее к потере эффективности растворения кристаллов GAL10.

Для всех Fab анализ выполняли в двух независимых экспериментах при наличии соответствующих контролей. Для клонов, небулизацию которых осуществляли с помощью трех устройств, аэрозолитированный белок из одного общего устройства анализировали путем построения кривой по 8 точкам с разными концентрациями (Solo #0125), а из оставшихся двух устройств анализ выполняли при заранее выбранной фиксированной концентрации, во всех случаях выполняли два независимых анализа. Образцы после 4-недельного хранения при +5°C анализировали путем построения кривой по 8 точкам с разными концентрациями для всех клонов. Результаты, представленные здесь, взяты из анализов, в которых размер большинства кристаллов превышал 10 мкм (10-15 мкм).

На фиг. 12 показана способность образцов четырех клонов Fab, не подвергнутых стрессовым воздействиям, растворять кристаллы GAL10. Наряду с материалом, который не подвергали стрессовому воздействию, активность всех клонов тестировали после воздействия на них описанных выше стрессовых условий для оценки, способны ли указанные клоны сохранять свою эффективность после хранения и/или после небулизации. Клоны 18C06, 20H09 и 23H09 тестировали параллельно на первом этапе (анализ 1, фиг. 13), и для сравнения использовали клон 7B07\_N53A. Клон 24F02\_N53A анализировали параллельно с клоном 23H09 во втором этапе (анализ 2, фиг. 14).

Как показано на фиг. 12, 13 и 14, все клоны, независимо от приложенного стрессового воздействия, оставались способными полностью растворять кристаллы галектина-10 на протяжении всего анализа. Следовательно, сравнение клонов было сосредоточено главным образом на первых временных точках до 5 часов, когда можно было выявить и оценить разницу в активности. Анализ показал, что клоны 23H09 и 24F02\_N53A оказались наиболее эффективными молекулами среди четырех клонов. На фиг. 14 представлены результаты анализа 2 с параллельным сравнением этих двух наиболее эффективных клонов. Во всех независимо выполненных экспериментах и независимо от размеров осажденных кристаллов клон 24F02\_N53A всегда был наиболее эффективным в растворении кристаллов *in vitro*. Температура или стрессовое воздействие, вызванное небулизацией, не влияли на его способность растворять кристаллы по сравнению с материалом, не подвергавшимся стрессовому воздействию. Результаты этого анализа по мониторингу эффективности растворения кристаллов позволили ранжировать клоны по их эффективности, от наиболее до наименее эффективных, следующим образом:

24F02\_N53 > 23H09 > 20C06 > 18C06.

Клон 24F02\_N53A показал некоторое преимущество по сравнению с 23H09. Несмотря на то, что оба клона способны удалять кристаллы *in vitro*, при одновременном тестировании этих двух клонов в двух независимых экспериментах клон 24F02\_N53A продемонстрировал более высокую скорость растворения и удаления кристаллизованного белка.

### 2.10 Иммуногенность

Материал по всем клонам, не содержащий эндотоксинов, был отправлен в Lonza, Slough, UK, для оценки риска иммуногенности на платформе Lonza Eribase®, которая включает оценку *in silico* и клеточную оценку *in vitro*.

При оценке на платформе Lonza Eribase® *in silico* используется алгоритм скрининга аминокислотных последовательностей клонов на наличие потенциальных иммуногенных эпитопов, включая аллотипы, которые могут быть задействованы, и главный комплекс гистосовместимости, путем измерения показателя HLA-DRB1.

В ходе анализа эти аллотипы также оценивали относительно их частот в глобальной популяции (фиг. 15), и на основании показателя иммуногенности клоны ранжировали от наименее к наиболее иммуногенному следующим образом:

$g24F02\_N53 < [g23H09, g18C06] < g20H09$

Эти результаты также подтверждали с помощью анализа на платформе Lonza Eribase *in vitro*. Вкратце, клоны оценивали на Т-клеточные ответы, индуцированные в РВМС, полученные от 31 здорового донора. Оценку скрининга осуществляли при детектировании и подсчете стимулированных клеток IFN $\gamma$  и IL-5 для определения количества доноров, у которых наблюдали Т-клеточный ответ в качестве риска появления нежелательного иммунного ответа (фиг. 16), а также его величины относительно тестируемой популяции (фиг. 17).

Как показано на соответствующих фиг. (фиг. 16, фиг. 17), все Fab продемонстрировали низкую способность индуцировать иммунные ответы. Среди четырех клонов клоны 23H09 и 18C06 продемонстрировали самую высокую частоту появления ответа на IFN $\gamma$ , тогда как самую высокую частоту появления ответа на IL-5 наблюдали у клонов Fabs 18C06 и 20H09. Во всех случаях и при всех статистических подходах клон g24F02\_N53A оказался молекулой с наименьшей частотой индукции нежелательного Т-клеточного ответа, и, таким образом, этот клон считается клоном с наименьшим риском.

### 2.11 Краткое описание результатов

Проведена оценка четырех клонов Fab, приведенных к зародышевой линии, и все четыре клон продемонстрировали улучшенные характеристики по сравнению с клоном 7B07\_N53A, из которого они были получены. Краткое изложение результатов представлено на фиг. 18.

Небулизация всех клонов не оказала существенного влияния на концентрацию белка и чистоту по данным SE-HPLC и cGE (редуцирующие и нередуцирующие условия),

активность связывания по SPR, посттрансляционные модификации и растворение кристаллов галактина-10 *in vitro*. На основании данных по стабильности, полученных при небулизации до и после 4-недельного хранения, все клоны продемонстрировали сопоставимые характеристики без каких-либо серьезных отклонений от набора целевых критериев.

Что касается иммуногенности клонов анти-GAL10 Fab, соответствующая оценка риска показала преимущество клона 24F02\_N53A, который также является более благоприятным с точки зрения более низкого показателя иммуногенности, хотя разница с 23H09 оказалась незначительной. Та же самая картина получена при сравнении двух клонов на идентичность с человеческой последовательностью (таблица 3), при этом клон 24F02\_N53A имеет 100% идентичность.

Анализ невидимых и субмикронных частиц (с помощью DLS и FCM) продемонстрировал необходимость оптимизации состава (фиг. 7), поскольку даже не подверженные стрессовым воздействиям образцы клона 23H09 (а также 20H09) оказались высокогетерогенными, имели мультимодальное распределение и были непригодными для использования. Небулизация усилила эти явления для всех категорий частиц, при этом клон 24F02\_N53A продемонстрировал относительно низкое и стабильное количество частиц после 4-недельного хранения и небулизации. По сравнению с 24F02\_N53A, клон 23H09 продемонстрировал более высокие показатели во всех категориях после небулизации (таблица 5). Хотя существует необходимость в оптимизации состава для аэрозолизации для доставки лекарственного средства посредством ингаляции, в целом клон 24F02\_N53A оказался более подходящим с учетом более низкого количества частиц, особенно категории частиц размером >2 мкм, которая часто связана с иммуногенностью и тяжелыми реакциями ADA, которые могут угрожать безопасности, эффективности препарата и могут ухудшать его фармакокинетику.

Судя по результатам активности, полученным до стрессового воздействия, оказываемого при небулизации (Фиг. 12), а также после хранения и аэрозолизации с помощью небулайзера с вибрирующей сеткой (фиг. 14), клон 24F02\_N53A имеет преимущество относительно 23H09. Для всех параллельно протестированных образцов, независимо от анализа, 24F02\_N53A продемонстрировал более высокую эффективность растворения кристаллов галактина-10 по сравнению с клоном 23H09, хотя все клоны оказались способными удалять кристаллизованный белок *in vitro*.

### **Пример 3: Получение и характеристика Fab-фрагментов к галектину-10**

В ходе предыдущей кампании по детектированию был идентифицирован клон 7B07. Этот клон показал наилучшую эффективность растворения рекомбинантных CLC и продемонстрировал соответствующие свойства связывания. Однако дальнейшие исследования стабильности выявили сайт дезамидирования (N53G54) в CDR2 тяжелой цепи, ответственный за резкое снижение связывания и активности после инкубации при 37°C. Создавали варианты клона 7B07 (g7B07), приведенные к зародышевой линии, в которых выполняли рандомизацию N53 и G54, но все мутации, включая клон 7B07\_N53A,

приводили к явному снижению связывающих свойств. Однако способность этих мутантных клонов 7B07 растворять рекомбинантные CLC сохранялась.

Следовательно, были инициированы три исследовательские кампании для идентификации клона анти-Gal10 с хорошими параметрами эффективности, родства связывания и стабильности. Этих кампании были направлены на поиск вариантов клонов, которые связываются с аналогичным эпитопом, как клон 7B07, поскольку этот клон оказался наиболее эффективным и связывался с уникальным эпитопом. Предполагалось, что, если клон связывается с аналогичным эпитопом, как клон 7B07, то будет достигнута аналогичная эффективность. Первая кампания была направлена на поиск клона в доступных иммунных библиотеках, который связывается с аналогичным эпитопом («кампания по поиску 7B07 эпитопа»). Во второй кампании последовательности CDR2\_VH рандомизировали по 6 положениям, включая N53 и G54, для идентификации клонов с хорошими связывающими характеристиками и не содержащими сайт дезамидирования («кампания по рандомизации g7B07\_CDR2\_VH»). В третьей кампании был применен подход перегруппировки тяжелой цепи для поиска клонов, которые спариваются с легкой цепью 7B07 и обеспечивают хорошее сродство к Gal10 и повышенную стабильность («Кампания по перегруппировке тяжелой цепи»).

После проведения исследовательских кампаний для дальнейшего изучения были идентифицированы четыре клона: 18C06, 24F02\_N53A, 23H09 и 20H09.

### 3.1 Процессы приведения к зародышевой линии, перегруппировки и получения клонов с человеческим Fab-остовом

Для гуманизации и повторного клонирования в человеческий Fab-остов были отобраны четыре клона для их дальнейшей характеристики. Чтобы снизить иммуногенность анти-Gal10 клонов, полученных от лам, с целью приведения к зародышевой линии инициировали переменные области (VH и VL) путем прививки определяющей комплементарность (CDR) области в каркас (FW), наиболее схожий с таковым человеческой зародышевой линии. Для идентификации последовательности человеческой зародышевой линии с наибольшей идентичностью V-области выбранных клонов использовали программное обеспечение AbAligner и Antibody Extractor версии № 8.1. Был разработан вариант 24F02 для удаления потенциального сайта дезамидирования (pos53\_CDR2\_VH), расположенного точно в том же положении, что и в клоне 7B07. По этой причине положение N53 мутировали на A.

### 3.2 Подтверждение связывающих свойств клонов Fab

Человеческий Gal10-связывающие свойства выбранных клонов Fab анализировали методом захвата с помощью системы Biacore 3000. Было решено применить две концентрации выбранных клонов Fab к человеческому Gal10-His, иммобилизованному на чипе CM5, покрытом моноклональным анти-His. В качестве контроля в начале и в конце опыта вводили клоны 7B07 и 7B07\_N53A.

Выбранные клоны, выделенные в ходе трех разных исследовательских кампаний, показали аналогичные или более высокие скорость диссоциации и сродство, чем клон

7B07. Среди этой панели клон, выделенный в ходе кампании по поиску 7B07 эпитопа (18C06), продемонстрировал наилучшую скорость диссоциации, в 9,8 раз более превышающую таковую у клона g7B07. Уникальный клон, выделенный с помощью метода перегруппировки тяжелых цепей (g24F02), и его сконструированный вариант (g24F02\_N53A) продемонстрировали очень схожие связывающие способности, демонстрируя, что удаление сайта дезамидирования, обнаруженного в положении 53, не влияет на связывающие свойства. При скорости ассоциации  $7,1-8,3 \text{ E}+05$ , скорости диссоциации  $1,6\text{E}-03 \text{ 1/с}$  и уровне сродства  $2,0-2,3 \text{ нМ}$  эти клоны показали улучшение скорости ассоциации в 1,6-1,9 раза, скорости диссоциации в 2,8 раза и уровня сродства в 4,7 раза по сравнению с клоном g7B07. Наконец, два клона, выделенные в ходе кампании рандомизации CDR2 (20H09 и 23H09), показали разные связывающие свойства, что соответствует данным скрининга. Клон g23H09 имел аналогичную скорость ассоциации, в 2,8 раза более высокое сродство ( $3,9 \text{ нМ}$ ) и в 1,8 раза более высокую скорость диссоциации, чем у клона g7B07. Тогда как скорость диссоциации клона g20H09 была более высокой в 3 раза, но сродство было аналогичным таковому клона g7B07. Как и ожидалось, все клоны показали более высокое сродство и скорость диссоциации по сравнению со сконструированным вариантом g7B07\_N53A ( $k_d 7,8\text{E}-02 \text{ 1/с}$ ,  $K_D 143,5 \text{ нМ}$ ).

Таблица 6: Характеристика связывающих свойств выбранных клонов зародышевой линии на Biacore 3000

Характеристика очищенного Fab (2 концентрации)					
Конструкции	R <sub>max</sub> (RU)	k <sub>a</sub> (1/Мс)	k <sub>d</sub> (1/с)	K <sub>D</sub> (нМ)	Кратность уменьшения k <sub>d</sub> vs g7B07
g18C06	815	$4,1\text{E}+05$	$4,8\text{E}-04$	1,2	9,8
g23H09	1037	$6,5\text{E}+05$	$2,5\text{E}-03$	3,9	1,8
g20H09	797	$8,6\text{E}+05$	$1,5\text{E}-02$	17,5	0,3
g24F02	745	$8,3\text{E}+05$	$1,6\text{E}-03$	2,0	2,8
g24F02_N53A	751	$7,1\text{E}+05$	$1,6\text{E}-03$	2,3	2,8
g7B07 (среднее значение)	698	$4,2\text{E}+05$	$4,7\text{E}-03$	11,1	1,0
g7B07_N53A (среднее значение)	178	$6,4\text{E}+05$	$7,8\text{E}-02$	143,5	0,06

Для подтверждения того, что выбранные клоны связываются с эпитопом клона 7B07, клоны в формате человеческого Fab анализировали в отношении связывания эпитопа относительно 7B07 (человеческий Fab). Для этой цели субоптимальную концентрацию биотинилированного клона 7B07 в формате человеческого Fab добавляли в планшет, покрытый Gal10, предварительно инкубированный с выбранными клонами. Процент конкуренции с 7B07 указан в таблице 7. Мотавизумаб (Mota) в человеческом Fab-остове использовали в качестве отрицательного контроля (0% конкуренции). Клон 7B07 использовали в конкурентном анализе в качестве положительного контроля с конкурентным значением 100%. Античеловеческий клон 1D11 (связывающийся с



остатком тирозина 69) включали в тестируемую панель в качестве отрицательного контроля в отношении конкуренции с 7B07 за связывание с Gal10, поскольку известно, что 1D11 связывается с противоположной стороной Gal10 (включая тирозин 69) относительно того сайта, где происходит связывание 7B07. В соответствии с данными скрининга было обнаружено, что все выбранные клоны конкурируют с 7B07 за связывание с Gal10.

Таблица 7: Биннинг эпитопов выбранного анти-Gal10 клона относительно человеческого Fab 7B07, биотинилированного, выполненный с помощью ELISA

Клоны (hFab)	Биннинг эпитопов	
	Среднее значение OD	% Конкуренции относительно g7B07-Biot
g18C06	0,05	105,3
g24F02	0,26	96,5
g24F02_N53A	0,20	99,0
g20H09	0,33	93,2
g23H09	0,31	94,3
g7B07	0,18	100,0
Mota-hFab	2,51	0,0
1D11-hFab	1,55	41,0
Буфер	2,37	6,0

Свойства связывания Gal10 человека и яванского макака у выбранных клонов Fab анализировали с помощью метода захвата в системе Biacore 3000. Для этой цели использовали два подхода. В первом случае для захвата Gal10-His яванского макака (изоформа WGS) на чип CM5, покрытый моноклональным анти-His, наносили две концентрации выбранного клона Fab. Во втором подходе на той же установке использовали серийное разведение Gal10 His человека или яванского макака (изоформа WGS).

На первом этапе перекрестную реактивность клона яванского макака тестировали путем введения двух концентраций захваченного Gal10 яванского макака (изоформа WGS). По сравнению с предыдущими данными, полученными с использованием полного формата антител, клон g7B07 и его сконструированный вариант g7B07\_N53A показали слабое связывание с изоформой Gal10 WGS яванского макака (KD 69 нМ для g7B07 hFab против 1,5 нМ для g7B07 mIgG1). Среди тестируемой панели клон g20H09 продемонстрировал плохую способность связывания антигена яванского макака, тогда как клон g18C06 не показал связывания. Однако клоны g23H09, g24F02 и его сконструированный вариант g24F02\_N53A показали хорошую перекрестную реактивность по отношению к Gal10 яванского макака. Дальнейшая характеристика перекрестной реактивности этих клонов по отношению к Gal10 яванскими макака позволила выделить клоны g24F02\_N53A и g23H09. Фактически, эти два клона показали сродство к человеческому Gal10, равное 1,4 нМ и 5,34 нМ, и сродство к Gal10 яванского макака, равное 8,0 и 9,9 нМ, соответственно. Кроме того, эти два клона (g23H09 и

g24F02\_N53A) продемонстрировали в 1,7 и 6,3 раза более высокое сродство, и в 1,9-3,5 раз более высокую скорость диссоциации, чем у клона g7B07. Мутация Asn в положении 53 в CDR2 g24F02\_VH не привела к уменьшению связывания с Gal10 человека или яванского макака, демонстрируя аналогичные показатели сродства и скорости диссоциации. В соответствии с данными скрининга, клон g18C06 показал наилучшее сродство (1,27 нМ) к человеческому Gal10 и скорость диссоциации (4,9E-04 1/с) по сравнению с тестовой панелью, но он не связывался с Gal10 яванского макака. Интересно, что рандомизация 6 аминокислот в CDR2 g7B07\_VH, приводящая к образованию g23H09, показала увеличение перекрестной реактивности с родительским клоном по отношению к Gal10 яванского макака. Однако клон g20H09, выделенный в ходе аналогичной исследовательской кампании, в ходе которой были рандомизированы 3 аминокислоты в CDR2, не показал такого усиления перекрестной реактивности по отношению к Gal10 яванского макака, свидетельствуя о ключевой роли аминокислот, введенных в CDR2 клона g23H09, которые привели к улучшенному связыванию с Gal10 яванского макака.

Таблица 8: Характеристика свойств связывания с Gal10 человека и яванского макака (изоформа WGS) у выбранных клонов с человеческим Fab-остовом с помощью системы Viacore

Клоны (hFab)	Определение сродства (SPR)							
	Человеческий Gal10-His				Gal10-His яванского макака (WGS изоформа)			
	ka (1/Мс)	kd (1/с)	Амплитуда R0 (RU) 30 нМ	K <sub>D</sub> (М)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	Амплитуда R0 (RU) 30 нМ	K <sub>D</sub> (М)
g7B07	6,7E+05	6,0E-03	607	9,08	1,9E+06	1,3E-01	64	69,5
g7B07_N53A	5,4E+05	7,9E-02	119	145,00	5,1E+05	2,1E-01	30	417,0
g23H09	5,9E+05	3,1E-03	722	5,34	9,5E+05	9,5E-03	589	9,9
g18C06	3,8E+05	4,9E-04	598	1,27	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
g24F02	1,1E+06	1,6E-03	644	1,49	1,4E+06	7,8E-03	566	5,4
g24F02_N53A	1,3E+06	1,8E-03	647	1,43	1,1E+06	8,8E-03	544	8,0

### 3.3 Подтверждение стабильности клонов Fab

Чтобы избежать проблемы, аналогичные возникшей в случае с клоном 7B07, когда после стресс-тестирования сайт дезамидирования в CDR2 варибельного домена тяжелой цепи привел к явному снижению связывающей активности и эффективности, анализировали стабильность выбранных клонов. С этой целью было проведено кратковременное ускоренное исследование в режиме стрессовых температур. В этом исследовании образцы, подвергнутые стрессу, инкубировали в течение двух недель при 37°C, а затем анализировали их связывающие свойства (Biacore выполняли в argenx) и эффективность (растворение CLC осуществляли в VIB) параллельно с образцами, не подвергнутыми стрессовым воздействиям (T0). Для анализа связывающих свойств образцов выбранных клонов, подвергшихся двухнедельному температурному стрессу, оптимизировали метод, осуществляемый на Biacore 3000. Вкратце, калибраторы и QC точки определяли до температурного стресса. Связывающие свойства подвергнутых стрессовому воздействию образцов определяли относительно точки калибровки и выражали в процентах относительной активности (% RA).

Как показано в таблице 9, после двухнедельной инкубации при 37°C клоны 18C06 и 24F02\_N53A оказались наиболее стабильными с такой же связывающей способностью, как и у образцов, не подвергшихся температурному стрессу (106% и 99% RA, соответственно). Кроме того, снижения связывающей активности после двухнедельной инкубации при 37°C также не наблюдали у немодифицированного варианта 24F02, что является свидетельством того, что дезамидирование в положении 53 не оказывает никакого влияния на связывающие свойства. Клоны 23H09 и 20H09 показали пониженную связывающую способность после инкубации при 37°C с 78% и 86% RA через две недели, соответственно. Однако это снижение связывания на 14% и 22% можно рассматривать либо как находящееся в пределах ошибки анализа, либо как необходимость в более длительном исследовании влияния температурного стресса.

Таблица 9: Анализ связывающих свойств образцов выбранных клонов, подвергнутых температурному стрессу

Клоны	из	% Относительная активность (RA) на Biacore	
		T0	T2W
g18C06	Эпитоп, подобный 7B07	108	106
g20H09	CDR2 случайный (X3)	110	86
g23H09	CDR2 случайный (X6)	98	78
g24F02	Перегруппировка тяжелой цепи	101	175*
g24F02_N53A	Перегруппировка тяжелой цепи	98	99

### 3.4 Подтверждение эффективности клонов Fab

Способность подвергнутых температурному стрессу образцов выбранных клонов с человеческим Fab-остовом растворять рекомбинантные CLC тестировали в лабораториях Charles River Laboratories. Клон 1D11 использовали в качестве эталона для корректировки вариаций между анализами. Растворение кристаллов контролировали с течением времени

с помощью InCell 2200 через 2, 5, 7 и 16 часов инкубации. Кристаллы, сгенерированные до проведения экспериментов, имели разные размеры CLC: от 5-10 мкм (опыт 2) до 10-20 мкм (опыт 1). В соответствии с предыдущими наблюдениями, размер кристаллов оказывает сильное влияние на эффективность соединения, а CLC размером 10-20 мкм позволяет лучше различать клоны. Данные о растворении CLC, полученные в лабораториях Charles River, показали, что оба клона 20H09 и 23H09, выделенные в ходе кампании рандомизации CDR2, оказались наиболее эффективными клонами в панели (таблица 10). Действительно, эти клоны были способны растворять 59,6% и 68,6% рекомбинантных CLC в течение 2 часов (опыт 1). В целом, через 5 часов инкубации большинство клонов (кроме 1D11) смогли солубилизовать ~90% CLC. Положительный контроль, клон 1D11, показал самую низкую эффективность растворения кристаллов с растворением 20% и 36% CLC через 2 и 5 часов инкубации, соответственно.

В соответствии с другими результатами оценки стабильности (связывание), образцы клонов 18C06, 20H09 и 23H09, подвергшиеся температурному стрессу, показали такую же эффективность, как и не подвергнутые стрессовым воздействиям образцы.

Таблица 10: Характеристика способности образцов выбранных клонов, подвергшихся температурному стрессу (человеческий Fab), растворять рекомбинантные CLC в системе визуализации клеток в лабораториях Charles River Laboratories

Размер кристаллов (мкм)	Эффективность растворения CLC							
	10-20		5-10		10-20		5-10	
	Этап 1_2ч		Этап 2_2ч		Этап 1_5ч		Этап 2_5ч	
Клоны	T0	2W	T0	2W	T0	2W	T0	2W
g18C06	36,6	43,4	81,4	81,4	76,8	78,8	92,1	91,4
g23H09	59,6	52,9	87,9	85,6	84,1	80,6	94,0	90,9
g20H09	68,6	70,0	91,0	86,7	91,4	88,8	93,7	93,6
1D11	20,5	/	62,1	/	36,2	/	85,0	/

Поскольку клон 24F02\_N53A появился в группе позже, способность этого клона растворять рекомбинантный CLC не могла быть проверена в лабораториях Charles River. Однако способность 24F02\_N53A растворять рекомбинантные CLC была проанализирована с помощью конфокального микроскопа с вращающимся диском в VIB. Для этого человеческие Fab-фрагменты инкубировали с предварительно полученными CLC, и растворение кристалла контролировали с течением времени. В соответствии с данными по оценке связывания, образец, подвергнутый температурному стрессу (2 недели при 37°C), показал эффективность, аналогичную эффективности образцов, не подвергнутых стрессовому воздействию (таблица 11), что свидетельствует о двухнедельной стабильности этого клона при 37°C. Фактически, протестированные образцы этого клона показали 50% растворение CLC в течение 43-46 минут. Независимо от того, подвергся ли 24F02 стрессовому воздействию при 37°C или нет, эффективность этого клона была аналогичной, немного более низкой, эффективности клона 7B07.

Таблица 11: Продолжительность солубилизации рекомбинантных кристаллов

Шарко-Лейдена (CLC) под воздействием температурного стресса образцов клона 24F02\_N53A (hFab) на конфокальном микроскопе с вращающимся диском

Клоны (hFab)	Анализ растворения CLC (временной интервал)	
	50% растворение (мин)	90% растворение (мин)
g7B07	34,44	135,1
g24F02_N53A_T0	43,7*	>170
g24F02_N53A_2W	45,95*	>170

\* Кривая, построенная по неполным данным

### 3.5 Последовательности клонов Fab

	<b>g24F02_N53A</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
<b>VH</b>	EVQLLES <span style="text-decoration: underline">GG</span> GLVQP <span style="text-decoration: underline">GG</span> SLRLSCAASGFTF <span style="text-decoration: underline">SS</span> YAMSWVRQAPG KGLEWVSA <span style="text-decoration: underline">IN</span> AGGGSTSYADSVKGRFTISRDN <span style="text-decoration: underline">SK</span> NTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAK <span style="text-decoration: underline">GLRV</span> GV <span style="text-decoration: underline">LGF</span> DYWGQGT <span style="text-decoration: underline">L</span> TVSS	1
<b>HCDR1</b>	SYAMS	2
<b>HCDR2</b>	AINAGGGSTSYADSVKG	3
<b>HCDR3</b>	GLRVGV <span style="text-decoration: underline">LGF</span> DY	4
<b>VL</b>	SYELTQPLSVSVALGQTARITCD <span style="text-decoration: underline">GNNIG</span> SKSAQWYQQKPGQAP VLVIYA <span style="text-decoration: underline">DEYR</span> PEGIPERFSGSNSGNTATLTISRAGDEADYYC QVWDGSA <span style="text-decoration: underline">AV</span> FGGGT <span style="text-decoration: underline">Q</span> LTVL	5
<b>LCDR1</b>	DGNNIGSKSAQ	6
<b>LCDR2</b>	ADEYRPE	7
<b>LCDR3</b>	QVWDGSA <span style="text-decoration: underline">AV</span>	8
	<b>g18C06</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
<b>VH</b>	EVQLLES <span style="text-decoration: underline">GG</span> GLVQP <span style="text-decoration: underline">GG</span> SLRLSCAASGFTF <span style="text-decoration: underline">SS</span> FAMSWVRQAPG KGLEWVSG <span style="text-decoration: underline">IN</span> SGDGSSVKG <span style="text-decoration: underline">R</span> FTISRDN <span style="text-decoration: underline">SK</span> NTLYLQMN <span style="text-decoration: underline">SL</span> RAE DTAVYYCAKGGATVWGRF <span style="text-decoration: underline">HDY</span> WGQGT <span style="text-decoration: underline">L</span> TVSS	10
<b>HCDR1</b>	SFAMS	11
<b>HCDR2</b>	GINS <span style="text-decoration: underline">GDG</span> SSVKG	12
<b>HCDR3</b>	GGATVWGRF <span style="text-decoration: underline">HDY</span>	13
<b>VL</b>	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTG <span style="text-decoration: underline">SSSNIG</span> SGSYLSWYQQLPGT APKLLIY <span style="text-decoration: underline">NANN</span> RASGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAED EADYYCGCYDSK <span style="text-decoration: underline">LSTY</span> V <span style="text-decoration: underline">V</span> FGGGT <span style="text-decoration: underline">K</span> LTVL	14
<b>LCDR1</b>	TG <span style="text-decoration: underline">SSSNIG</span> SGSYLS	15
<b>LCDR2</b>	NANNRAS	16
<b>LCDR3</b>	GCYDSK <span style="text-decoration: underline">LSTY</span> V	17
	<b>g20H09</b>	<b>SEQ ID NO:</b>

<b>VH</b>	EVQLLES <span>GGGLVQPGGSLRLS</span> CAASGFTFR <span>SYDMS</span> WVRQAPG KGLEWVSAIKWHRITYYADSVKGRFTISRDN <span>SKNTLYLQ</span> MNS LRAEDTAVYYCATTHGIGTLGFGSWGQGT <span>LVTVSS</span>	18
<b>HCDR1</b>	SYDMS	19
<b>HCDR2</b>	AIKWHRITYYADSVKG	20
<b>HCDR3</b>	THGIGTLGFGS	21
<b>VL</b>	SYELTQPLSVSVALGQTARITCDGNNIGSKSAQWYQQKPGQAP VLVIYADEYRPEGIPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYYC QVWDGSAAVFGGGTQ <span>LTVL</span>	5
<b>LCDR1</b>	DGNNIGSKSAQ	6
<b>LCDR2</b>	ADEYRPE	7
<b>LCDR3</b>	QVWDGSAAV	8
	<b>g23H09</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
<b>VH</b>	EVQLLES <span>GGGLVQPGGSLRLS</span> CAASGFTFR <span>SYDMS</span> WVRQAPG KGLEWVSAIAQFQHWTYYADSVKGRFTISRDN <span>SKNTLYLQ</span> M NSLRAEDTAVYYCATTHGIGTLGFGSWGQGT <span>LVTVSS</span>	22
<b>HCDR1</b>	SYDMS	19
<b>HCDR2</b>	AIAQFQHWTYYADSVKG	23
<b>HCDR3</b>	THGIGTLGFGS	21
<b>VL</b>	SYELTQPLSVSVALGQTARITCDGNNIGSKSAQWYQQKPGQAP VLVIYADEYRPEGIPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYYC QVWDGSAAVFGGGTQ <span>LTVL</span>	5
<b>LCDR1</b>	DGNNIGSKSAQ	6
<b>LCDR2</b>	ADEYRPE	7
<b>LCDR3</b>	QVWDGSAAV	8
	<b>g24F02</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
<b>VH</b>	EVQLLES <span>GGGLVQPGGSLRLS</span> CAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAINNGGGSTSYADSVKGRFTISRDN <span>SKNTLYLQ</span> MN SLRAEDTAVYYCAKGLRVGVLGFDYWGQGT <span>LVTVSS</span>	24
<b>HCDR1</b>	SYAMS	2
<b>HCDR2</b>	AINNGGGSTSYADSVKG	25
<b>HCDR3</b>	GLRVGVLGFDY	4
<b>VL</b>	SYELTQPLSVSVALGQTARITCDGNNIGSKSAQWYQQKPGQAP VLVIYADEYRPEGIPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYYC QVWDGSAAVFGGGTQ <span>LTVL</span>	5
<b>LCDR1</b>	DGNNIGSKSAQ	6
<b>LCDR2</b>	ADEYRPE	7
<b>LCDR3</b>	QVWDGSAAV	8

Объем настоящего изобретения не ограничивается представленными в описании конкретными вариантами осуществления. Действительно, из приведенного выше описания и сопровождающих фигур специалистам в данной области техники станут очевидными различные модификации изобретения в дополнение к представленным в настоящем описании. Предполагается, что такие модификации попадают в объем прилагаемой формулы изобретения. Более того, все аспекты и варианты осуществления изобретения, представленные в настоящем описании, считаются широко применимыми и

комбинируемыми с любыми другими приведенными ниже вариантами осуществления, включая те, которые взяты из других аспектов изобретения (в том числе отдельно), в зависимости от ситуации.

В настоящем описании приведены ссылки на различные публикации и патентные заявки, раскрытия которых включены в описание во всей своей полноте посредством ссылки.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, для применения в способе лечения заболевания или состояния, ассоциированного с присутствием или образованием кристаллов галектина-10, где способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, где композицию вводят в виде аэрозоля.

2. Способ лечения заболевания или состояния, ассоциированного с присутствием или образованием кристаллов галектина-10, где способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, где композицию вводят в виде аэрозоля.

3. Фармацевтическая композиция для применения по п.1 или способ по п.2, где заболевание или состояние, ассоциированное с присутствием или образованием кристаллов галектина-10, выбирают из группы, состоящей из: астмы; хронического риносинусита; целиакии; гельминтной инфекции; эозинофильного воспаления желудочно-кишечного тракта; муковисцидоза (CF); аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АВРА); васкулита Черджа-Стросса; хронической эозинофильной пневмонии; и острого миелоидного лейкоза.

4. Фармацевтическая композиция для применения или способ по п.3, где заболеванием или состоянием, ассоциированным с присутствием или образованием кристаллов галектина-10, является астма или муковисцидоз (CF).

5. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.1-4 или способ по любому из пп.2-4, где фармацевтическую композицию вводят субъекту путем ингаляции.

6. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.1-5 или способ по любому из пп.2-5, где Fab-фрагмент ингибирует кристаллизацию галектина-10, когда связывается с растворимым галектином-10, и/или способствует растворению кристаллического галектина-10, когда связывается с кристаллическим галектином-10.

7. Фармацевтическая композиция для применения или способ по п.6, где кристаллический галектин-10 представляет собой кристаллы Шарко-Лейдена (CLC).

8. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.1-7 или способ по любому из пп.2-7, где Fab-фрагмент связывается с человеческим галектином-10.

9. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.1-8 или способ по любому из пп.2-8, где Fab-фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL),

где домен VH содержит:

HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 4 (GLRVGVLGFDY);

HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 3 (AINAGGGSTSYADSVKG); и

HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2 (SYAMS); и



и где домен VL содержит:

LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 8 (QVWDGSAAV);

LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7 (ADEYRPE); и

LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6 (DGNNIGSKSAQ).

10. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.1-9 или способ по любому из пп.2-9, где Fab-фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где:

домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 98% или 99%, и

домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 98% или 99%.

11. Фармацевтическая композиция для применения или способ по п.10, где Fab-фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где:

домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1

(EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINA  
GGGTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLRVGVLGFDYW  
GQGTLVTVSS);

и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5

(SYELTQPLSVSVALGQTARITCDGNNIGSKSAQWYQQKPGQAPVLVIYADEYRP  
EGIPERFSGSNSGNTATLTISRAGDEADYYCQVWDGSAAVFGGGTQLTVL).

12. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.1-11 или способ по любому из пп.2-11, где Fab-фрагмент является гуманизированным, приведенным к зародышевой линии (germlined) или деиммунизированным.

13. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.1-12 или способ по любому из пп.2-12, где размер частиц в аэрозоле составляет менее 30 мкм, менее 25 мкм, менее 10 мкм, менее 2 мкм, менее 1 мкм, менее 0,5 мкм, менее 0,4 мкм, менее 0,3 мкм, менее 0,2 мкм или менее 0,1 мкм.

14. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.1-13 или способ по любому из пп.2-13, где концентрация частиц в аэрозоле составляет менее  $2 \times 10^5$ , менее  $1 \times 10^5$ , менее  $2 \times 10^4$  или менее  $1 \times 10^4$  общего количества частиц/мл.

15. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.1-14 или способ по любому из пп.2-14, где концентрация частиц размером более 2 мкм в аэрозоле составляет менее  $1 \times 10^5$ , менее  $5 \times 10^4$ , менее  $2 \times 10^4$ , менее  $1 \times 10^4$ , менее  $1 \times 10^3$  или менее  $1 \times 10^2$  частиц размером  $>2$  мкм/мл.

16. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.1-15 или способ по любому из пп.2-15, где фармацевтическую композицию вводят в виде аэрозоля с помощью небулайзера, дозирующего ингалятора под давлением (pMDI), ингалятора

сухого порошка, ингалятора мягкого тумана или интеллектуального ингалятора.

17. Фармацевтическая композиция для применения или способ по п.16, где фармацевтическую композицию вводят в виде аэрозоля с помощью небулайзера.

18. Фармацевтическая композиция для применения или способ по п.17, где небулайзер представляет собой струйный небулайзер, ультразвуковой небулайзер или сетчатый небулайзер.

19. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.1-18 или способ по любому из пп.2-18, где перед введением композиция представляет собой жидкий водный состав.

20. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.1-19 или способ по любому из пп.2-19, где композиция содержит поверхностно-активное вещество в количестве менее 5%, менее 2%, менее 1%, менее 0,5%, менее 0,1%, менее 0,05%, менее 0,02% или менее 0,01%.

21. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.1-19 или способ по любому из пп.2-19, где композиция не содержит поверхностно-активное вещество.

22. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.1-21 или способ по любому из пп.2-21, где концентрация Fab-фрагмента в композиции составляет от примерно 1 до примерно 20 мг/мл, от примерно 1 до примерно 15 мг/мл, от примерно 1 до примерно 10 мг/мл, от примерно 1 до примерно 5 мг/мл, от примерно 2 до примерно 10 мг/мл, от примерно 3 до примерно 10 мг/мл, от примерно 4 до примерно 10 мг/мл или от примерно 5 до примерно 10 мг/мл.

23. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.1-21 или способ по любому из пп.2-21, где концентрация Fab-фрагмента в композиции составляет примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 мг/мл.

24. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.1-23 или способ по любому из пп.2-23, где композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

25. Фармацевтическая композиция для применения или способ по п.24, где наполнитель представляет собой жидкий наполнитель, необязательно растворитель или водный растворитель.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, где композиция приготовлена в виде состава для аэролизации.

27. Фармацевтическая композиция по п.26, где композиция представляет собой жидкий водный состав.

28. Фармацевтическая композиция по п.26 или п.27, где композиция содержит поверхностно-активное вещество в количестве менее 5%, менее 2%, менее 1%, менее 0,5%, менее 0,1%, менее 0,05%, менее 0,02% или менее 0,01%.

29. Фармацевтическая композиция по п.26 или п.27, где композиция не содержит

поверхностно-активное вещество.

30. Фармацевтическая композиция по любому из пп.26-29, где концентрация Fab-фрагмента в композиции составляет от примерно 1 до примерно 20 мг/мл, от примерно 1 до примерно 15 мг/мл, от примерно 1 до примерно 10 мг/мл, от примерно 1 до примерно 5 мг/мл, от примерно 2 до примерно 10 мг/мл, от примерно 3 до примерно 10 мг/мл, от примерно 4 до примерно 10 мг/мл или от примерно 5 до примерно 10 мг/мл.

31. Фармацевтическая композиция по любому из пп.26-29, где концентрация Fab-фрагмента в композиции составляет примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 мг/мл.

32. Фармацевтическая композиция по любому из пп.26-31, где композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

33. Фармацевтическая композиция по п.32, где наполнитель представляет собой жидкий наполнитель, необязательно растворитель или водный растворитель.

34. Фармацевтическая композиция по любому из пп.26-33, где Fab-фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL),

где домен VH содержит:

HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 4 (GLRVGVLGFDY);

HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 3 (AINAGGGSTSYADSVKG); и

HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2 (SYAMS); и

где домен VL содержит:

LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 8 (QVWDGSAAVF);

LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7 (ADEYRPE); и

LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6 (DGNNIGSKSAQ).

35. Небулайзер, содержащий фармацевтическую композицию по любому из пп.26-34.

## **ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**(по ст. 34 для сведения)**

1. Фармацевтическая композиция, содержащая Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, для применения в способе лечения заболевания или состояния, ассоциированного с присутствием или образованием кристаллов галектина-10,

где способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции,

где композицию вводят в виде аэрозоля,

при этом заболевание или состояние, ассоциированное с присутствием или образованием кристаллов галектина-10, выбирают из группы, состоящей из: астмы; хронического риносинусита; целиакии; гельминтной инфекции; эозинофильного воспаления желудочно-кишечного тракта; муковисцидоза (CF); аллергического бронхолегочного аспергиллеза (ABPA); васкулита Черджа-Стросса; хронической эозинофильной пневмонии; и острого миелоидного лейкоза.

2. Способ лечения заболевания или состояния, ассоциированного с присутствием или образованием кристаллов галектина-10, где способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей Fab-фрагмент, который связывается с галектином-10, где композицию вводят в виде аэрозоля.

3. Способ по п.2, где заболевание или состояние, ассоциированное с присутствием или образованием кристаллов галектина-10, выбирают из группы, состоящей из: астмы; хронического риносинусита; целиакии; гельминтной инфекции; эозинофильного воспаления желудочно-кишечного тракта; муковисцидоза (CF); аллергического бронхолегочного аспергиллеза (ABPA); васкулита Черджа-Стросса; хронической эозинофильной пневмонии; и острого миелоидного лейкоза.

4. Фармацевтическая композиция для применения по п.1 или способ по п.2 или п.3, где заболевание или состояние, ассоциированное с присутствием или образованием кристаллов галектина-10, представляет собой астму или муковисцидоз (CF).

5. Фармацевтическая композиция для применения по любому из п.1 или п.4 или способ по любому из пп.2-4, где фармацевтическую композицию вводят субъекту путем ингаляции.

6. Фармацевтическая композиция для применения по любому из п.1 или пп.4-5, или способ по любому из пп.2-5, где Fab-фрагмент ингибирует кристаллизацию галектина-10, когда связывается с растворимым галектином-10, и/или способствует растворению кристаллического галектина-10, когда связывается с кристаллическим галектином-10.

7. Фармацевтическая композиция для применения или способ по п.6, где кристаллический галектин-10 представляет собой кристаллы Шарко-Лейдена (CLC).

8. Фармацевтическая композиция для применения по любому из п.1 или пп.4-7 или способ по любому из пп.2-7, где Fab-фрагмент связывается с человеческим галектином-10.

9. Фармацевтическая композиция для применения по любому из п.1 или пп.4-8, или

способ по любому из пп.2-8, где Fab-фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL),

где домен VH содержит:

HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 4 (GLRVGVLGFDY);

HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 3 (AINAGGGSTSYADSVKG);

и

HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2 (SYAMS); и

где домен VL содержит:

LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 8 (QVWDGSAAV);

LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7 (ADEYRPE); и

LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6 (DGNNIGSKSAQ).

10. Фармацевтическая композиция для применения по любому из п.1 или пп.4-9 или способ по любому из пп.2-9, где Fab-фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где:

домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 98% или 99%, и

домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, идентичную ей на по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 98% или 99%.

11. Фармацевтическая композиция для применения или способ по п.10, где Fab-фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где:

домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1

(EVQLLESGLVQPGLSLRSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINAGGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLRVGVLGFDYWGGTLVTVSS);

и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5

(SYELTQPLSVSVALGQTARITCDGNNIGSKSAQWYQQKPGQAPVLIYADEYRPEGIPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQVWDGSAAVFGGGTQLTVL).

12. Фармацевтическая композиция для применения по любому из п.1 или пп.4-11 или способ по любому из пп.2-11, где Fab-фрагмент является гуманизированным, приведенным к зародышевой линии (germlined) или деиммунизированным.

13. Фармацевтическая композиция для применения по любому из п.1 или пп.4-12 или способ по любому из пп.2-12, где размер частиц в аэрозоле составляет менее 30 мкм, менее 25 мкм, менее 10 мкм, менее 2 мкм, менее 1 мкм, менее 0,5 мкм, менее 0,4 мкм, менее 0,3 мкм, менее 0,2 мкм или менее 0,1 мкм.

14. Фармацевтическая композиция для применения по любому из п.1 или пп.4-13 или способ по любому из пп.2-13, где концентрация частиц в аэрозоле составляет менее  $2 \times 10^5$ , менее  $1 \times 10^5$ , менее  $2 \times 10^4$  или менее  $2 \times 10^4$  общего количества частиц/мл.

15. Фармацевтическая композиция для применения по любому из п.1 или пп.4-14 или способ по любому из пп.2-14, где концентрация частиц размером более 2 мкм в аэрозоле составляет менее  $1 \times 10^5$ , менее  $5 \times 10^4$ , менее  $2 \times 10^4$ , менее  $1 \times 10^4$ , менее  $1 \times 10^3$  или менее  $1 \times 10^2$  частиц размером  $>2$  мкм/мл.

16. Фармацевтическая композиция для применения по любому из п.1 или пп.4-15 или способ по любому из пп.2-15, где фармацевтическую композицию вводят в виде аэрозоля с помощью небулайзера, дозирующего ингалятора под давлением (pMDI), ингалятора сухого порошка, ингалятора мягкого тумана или интеллектуального ингалятора.

17. Фармацевтическая композиция для применения или способ по п.16, где фармацевтическую композицию вводят в виде аэрозоля с помощью небулайзера.

18. Фармацевтическая композиция для применения или способ по п.17, где небулайзер представляет собой струйный небулайзер, ультразвуковой небулайзер или сетчатый небулайзер.

19. Фармацевтическая композиция для применения по любому из п.1 или пп.4-18 или способ по любому из пп.2-18, где до введения композиция представляет собой жидкий водный состав.

20. Фармацевтическая композиция для применения по любому из п.1 или пп.4-19 или способ по любому из пп.2-19, где композиция содержит поверхностно-активное вещество в количестве менее 5%, менее 2%, менее 1%, менее 0,5%, менее 0,1%, менее 0,05%, менее 0,02% или менее 0,01%.

21. Фармацевтическая композиция для применения по любому из п.1 или пп.4-19 или способ по любому из пп.2-19, где композиция не содержит поверхностно-активное вещество.

22. Фармацевтическая композиция для применения по любому из п.1 или пп.4-21 или способ по любому из пп.2-21, где концентрация Fab-фрагмента в композиции составляет от примерно 1 до примерно 20 мг/мл, от примерно 1 до примерно 15 мг/мл, от примерно 1 до примерно 10 мг/мл, от примерно 1 до примерно 5 мг/мл, от примерно 2 до примерно 10 мг/мл, от примерно 3 до примерно 10 мг/мл, от примерно 4 до примерно 10 мг/мл или от примерно 5 до примерно 10 мг/мл.

23. Фармацевтическая композиция для применения по любому из п.1 или пп.4-21 или способ по любому из пп.2-21, где концентрация Fab-фрагмента в композиции составляет примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 мг/мл.

24. Фармацевтическая композиция для применения по любому из п.1 или пп.4-23 или способ по любому из пп.2-23, где композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

25. Фармацевтическая композиция для применения или способ по п.24, где наполнитель представляет собой жидкий наполнитель, необязательно растворитель или водный растворитель.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая Fab-фрагмент, который связывается

с галектином-10, где композиция приготовлена в виде состава для аэролизации.

27. Фармацевтическая композиция по п.26, где композиция представляет собой жидкий водный состав.

28. Фармацевтическая композиция по п.26 или п.27, где композиция содержит поверхностно-активное вещество в количестве менее 5%, менее 2%, менее 1%, менее 0,5%, менее 0,1%, менее 0,05%, менее 0,02% или менее 0,01%.

29. Фармацевтическая композиция по п.26 или п.27, где композиция не содержит поверхностно-активное вещество.

30. Фармацевтическая композиция по любому из пп.26-29, где концентрация Fab-фрагмента в композиции составляет от примерно 1 до примерно 20 мг/мл, от примерно 1 до примерно 15 мг/мл, от примерно 1 до примерно 10 мг/мл, от примерно 1 до примерно 5 мг/мл, от примерно 2 до примерно 10 мг/мл, от примерно 3 до примерно 10 мг/мл, от примерно 4 до примерно 10 мг/мл или от примерно 5 до примерно 10 мг/мл.

31. Фармацевтическая композиция по любому из пп.26-29, где концентрация Fab-фрагмента в композиции составляет примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 мг/мл.

32. Фармацевтическая композиция по любому из пп.26-31, где композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

33. Фармацевтическая композиция по п.32, где наполнитель представляет собой жидкий наполнитель, необязательно растворитель или водный растворитель.

34. Фармацевтическая композиция по любому из пп.26-33, где Fab-фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где домен VH содержит:

HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 4 (GLRVGVLGFDY);

HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 3 (AINAGGGSTSYADSVKG);

и

HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2 (SYAMS); и

где домен VL содержит:

LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 8 (QVWDGSAAVF);

LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 7 (ADEYRPE); и

LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 6 (DGNNIGSKSAQ).

35. Небулайзер, содержащий фармацевтическую композицию по любому из пп.26-

34.

## ФИГ.1

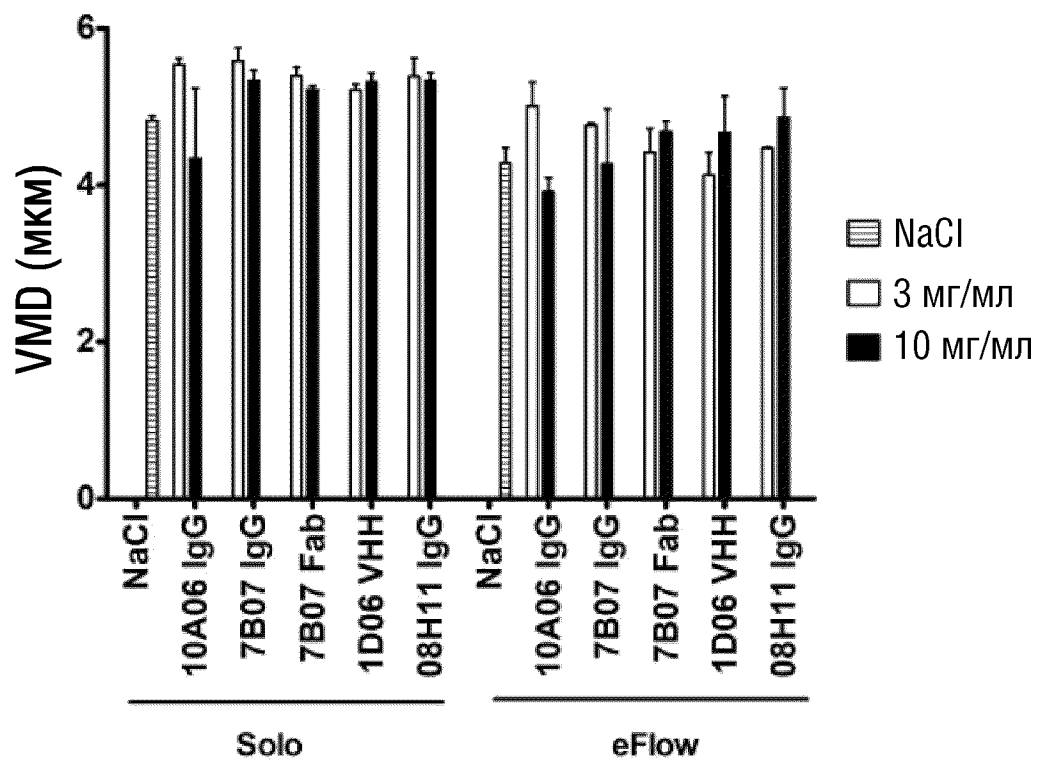
А.

	Сетчатое устройство	Объем (мл)	VMD (мкм)	Среднее значение	SD		Сетчатое устройство	Объем (мл)	VMD (мкм)	Среднее значение	SD
<b>10A06 IgG 3 мг/мл</b>	S 0087	0.5	5.62	5.52	0.11	<b>10A06 IgG 10 мг/мл</b>	S 0087	0.5	5.32	5.07	0.22
	S 0094	0.5	5.54				S 0094	0.5	4.89		
	S 0210	0.5	5.41				S 0210	0.5	5.01		
	ef4732	0.5	5.24	4.50	0.67		ef4732	0.5	3.92	3.96	0.12
	ef4778	0.5	4.34	ef4778	0.5		4.10				
ef5263	0.5	3.92	ef5263	0.5	3.86						
<b>7B07 IgG 3 мг/мл</b>	S 0087	0.5	5.75	5.60	0.15	<b>7B07 IgG 10 мг/мл</b>	S 0087	0.5	5.47	5.31	0.17
	S 0094	0.5	5.45				S 0094	0.5	5.13		
	S 0210	0.5	5.59				S 0210	0.5	5.33		
	ef4732	0.5	4.79	4.66	0.21		ef4732	0.5	4.25	4.50	0.41
	ef4778	0.5	4.42	ef4778	0.5		4.27				
ef5263	0.5	4.77	ef5263	0.5	4.97						
<b>7B07 Fab 3 мг/мл</b>	S 0087	0.5	5.51	5.41	0.09	<b>7B07 Fab 10 мг/мл</b>	S 0087	0.5	5.27	5.23	0.04
	S 0094	0.5	5.39				S 0094	0.5	5.22		
	S 0210	0.5	5.33				S 0210	0.5	5.19		
	ef4732	0.5	4.72	4.45	0.26		ef4732	0.5	4.68	4.66	0.17
	ef4778	0.5	4.42	ef4778	0.5		4.47				
ef5263	0.5	4.21	ef5263	0.5	4.82						
<b>1D06 VHH 3 мг/мл</b>	S 0087	0.5	5.29	5.22	0.06	<b>1D06 VHH 10 мг/мл</b>	S 0087	0.25	5.43	5.27	0.20
	S 0094	0.5	5.22				S 0094	0.25	5.32		
	S 0210	0.5	5.16				S 0210	0.25	5.05		
	ef4732	0.5	4.13	4.20	0.19		ef4732	0.25	4.10	4.63	0.52
	ef4778	0.5	4.42	ef4778	0.25		4.67				
ef5263	0.5	4.05	ef5263	0.115	5.13						
<b>08H11 IgG 3 мг/мл</b>	S 0087	0.5	5.62	5.44	0.17	<b>08H11 IgG 10 мг/мл</b>	S 0087	0.5	5.43	5.33	0.10
	S 0094	0.5	5.30				S 0094	0.5	5.33		
	S 0210	0.5	5.39				S 0210	0.5	5.23		
	ef4732	0.5	4.43	4.46	0.03		ef4732	0.5	4.63	4.91	0.31
	ef4778	0.5	4.47	ef4778	0.5		5.24				
ef5263	0.5	4.49	ef5263	0.5	4.86						



## ФИГ.1 (продолжение)

В.



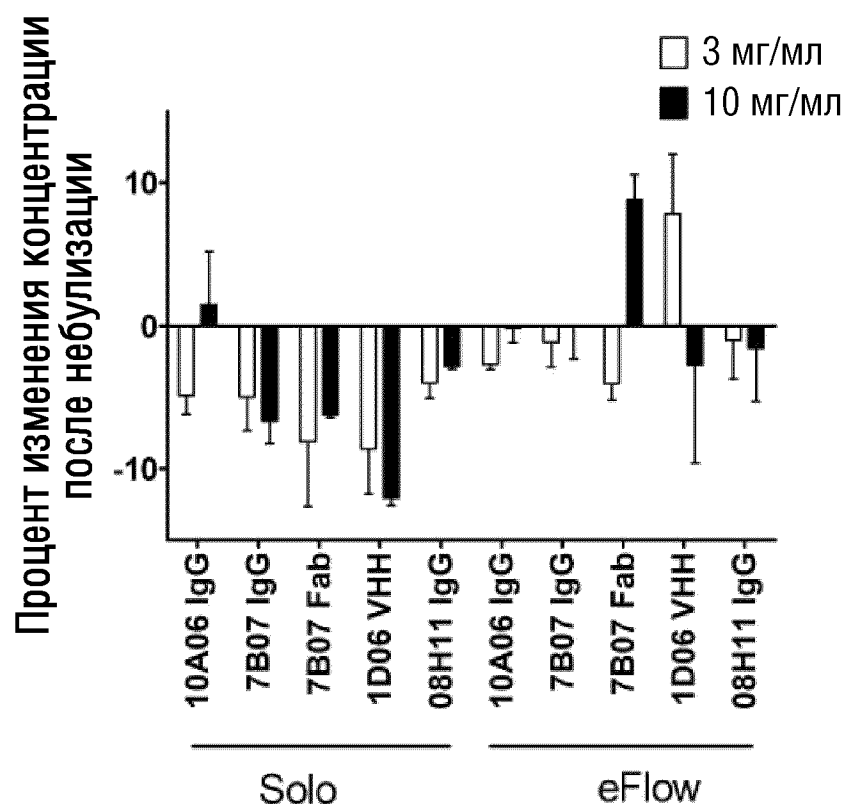
## ФИГ.2

А.

Концентрация образца	Состояние	Концентрация (нанокапли)				
		Анализ #			Среднее значение	SD
		S0087 или ef4732	S0094 или ef4778	S0210 или ef5263		
10A06 IgG 3 мг/мл	До небулизации	2.800			<b>2.800</b>	
	Solo	2.627	2.663	2.852	<b>2.714</b>	<b>0.121</b>
	eFlow	2.887	2.714	2.725	<b>2.775</b>	<b>0.097</b>
7B07 IgG 3 мг/мл	До небулизации.	2.862			<b>2.862</b>	
	Solo	2.719	2.888	2.653	<b>2.753</b>	<b>0.121</b>
	eFlow	2.829	2.876	2.780	<b>2.828</b>	<b>0.048</b>
7B07 Fab 3 мг/мл	До небулизации	3.018			<b>3.018</b>	
	Solo	2.789	2.773	2.637	<b>2.733</b>	<b>0.083</b>
	eFlow	2.957	2.861	2.897	<b>2.905</b>	<b>0.049</b>
1D06 VNH 3 мг/мл	До небулизации	3.054			<b>3.054</b>	
	Solo	3.304	2.694	2.791	<b>2.930</b>	<b>0.328</b>
	eFlow	3.421	3.292	3.190	<b>3.301</b>	<b>0.115</b>
08H11 IgG 3 мг/мл	До небулизации	3.063			<b>3.063</b>	
	Solo	2.941	2.942	2.908	<b>2.931</b>	<b>0.020</b>
	eFlow	3.051	3.033	2.949	<b>3.011</b>	<b>0.054</b>
10A06 IgG 10 мг/мл	До небулизации	10.187			<b>10.187</b>	
	Solo	10.720	10.340	10.340	<b>10.467</b>	<b>0.219</b>
	eFlow	10.070	10.170	10.190	<b>10.143</b>	<b>0.064</b>
7B07 IgG 10 мг/мл	До небулизации	10.543			<b>10.543</b>	
	Solo	9.676	10.290	9.841	<b>9.936</b>	<b>0.318</b>
	eFlow	10.580	10.540	10.300	<b>10.473</b>	<b>0.151</b>
7B07 Fab 10 мг/мл	До небулизации	9.200			<b>9.200</b>	
	Solo	8.630	8.920	8.610	<b>8.720</b>	<b>0.173</b>
	eFlow	10.170	9.040	10.010	<b>9.740</b>	<b>0.611</b>
1D06 VNH 10 мг/мл	До небулизации	10.063			<b>10.063</b>	
	Solo	8.799	8.856	8.851	<b>8.835</b>	<b>0.032</b>
	eFlow	9.981	9.787	9.095	<b>9.621</b>	<b>0.466</b>
08H11 IgG 10 мг/мл	До небулизации	8.870			<b>8.870</b>	
	Solo	8.600	8.620	8.700	<b>8.640</b>	<b>0.053</b>
	eFlow	8.840	8.730	8.400	<b>8.657</b>	<b>0.229</b>

## ФИГ.2 (продолжение)

В.



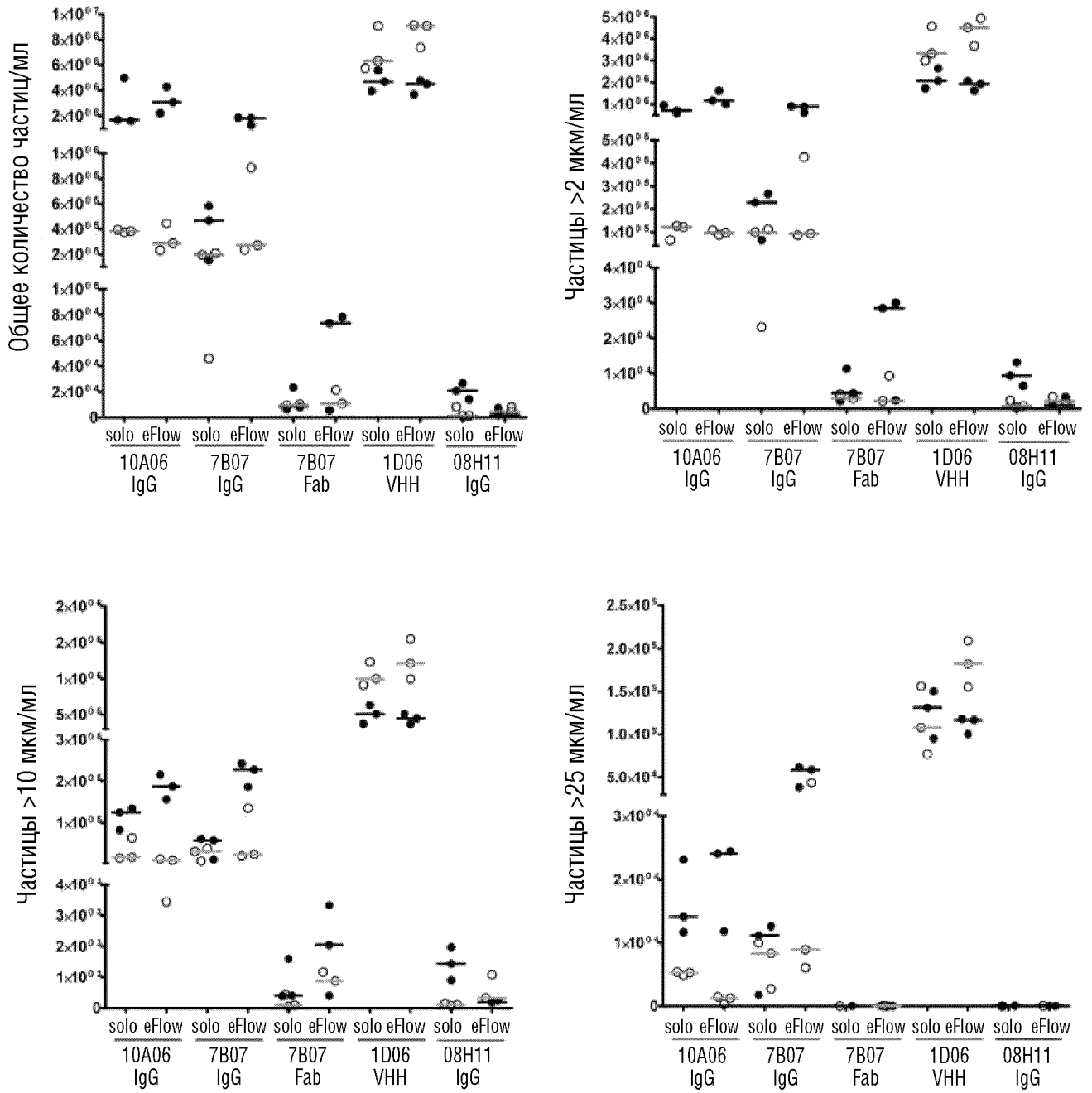
## ФИГ.3

А.

Концентрация образца	Небулизация	Общее количество частиц		Количество частиц > 2 мкм/мл		Количество частиц > 10 мкм/мл		Количество частиц > 25 мкм/мл	
		Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
10A06 IgG 3 мг/мл	До небулизации	0		0		0		0	
	Solo	383207	10850	104381	34386	33224	27065	5177	278
	eFlow	321870	110833	97476	10327	9632	5527	1017	621
10A06 IgG 10 мг/мл	До небулизации	0		0		0		0	
	Solo	2753693	1919302	753400	184905	114307	27472	16312	6049
	eFlow	3183233	1043899	1267978	319144	186634	29849	20127	7216
7B07 IgG 3 мг/мл	До небулизации	0		35		0		0	
	Solo	150120	90212	78105	47815	27169	15741	7010	3809
	eFlow	465469	366817	201900	195015	60896	64539	19567	20946
7B07 IgG 10 мг/мл	До небулизации	2821		245		1		0	
	Solo	400079	224236	187094	107200	44614	27596	8523	5882
	eFlow	1643272	329390	803316	158601	218911	29194	53004	12758
7B07 Fab 3 мг/мл	До небулизации	9		0		41		10	
	Solo	6427	6089	2349	2242	196	205	9	20
	eFlow	10342	11575	3183	5800	605	742	36	49
7B07 Fab 10 мг/мл	До небулизации	0		259		19		0	
	Solo	12667	9385	6040	4768	797	693	8	19
	eFlow	52558	40718	20353	15539	1925	1468	53	20
1D06 VНН 3 мг/мл	До небулизации	325		456		105		26	
	Solo	7048602	1783407	3633281	831006	1049703	165525	113673	39937
	eFlow	8537314	996423	4378338	642301	1255850	277770	182314	26847
1D06 VНН 10 мг/мл	До небулизации	2162		673		2		0	
	Solo	4737225	805312	2149534	459367	506185	130560	125365	27988
	eFlow	4317241	569197	1874236	222907	444181	69657	111474	9893
08H11 IgG 3 мг/мл	До небулизации	0		0		0		0	
	Solo	3753	4010	1160	1076	112	36	3	12
	eFlow	4136	4351	1737	1964	463	564	5	55
08H11 IgG 10 мг/мл	До небулизации	0		0		0		0	
	Solo	20666	6283	9744	3348	1436	535	62	35
	eFlow	1978	5507	776	2813	82	229	14	19

## ФИГ.3 (продолжение)

В.



# ФИГ.4

Образец Формат Концентрации	Состояние	Проанализированы непосредственно после небулизации				Проанализированы после фильтрации через 45 мкм фильтр				Кол-во анализируемых образцов	
		Радиус (нм)	Масса (%)	Полидисперсность (%)	Кол-во анализируемых образцов	Радиус (нм)	Масса (%)	Полидисперсность (%)	Кол-во анализируемых образцов		
10A06 IgG 3 мг/мл	До небулизации. Solo eFlow	5.58	100.00%	15.90%	0.37	-	-	-	-	-	
		Мультимодальное распределение				4.97	99.90%	14.03%	0.21	3/3	
		Мультимодальное распределение				5.05	99.90%	10.80%	0.18	1/3	
10A06 IgG 10 мг/мл	До небулизации Solo eFlow	5.15	100%	19.40%	0.05	-	-	-	-	-	
		Мультимодальное распределение				Мультимодальное распределение				0/3	
		Мультимодальное распределение				Мультимодальное распределение				0/3	
7B07 IgG 3 мг/мл	До небулизации Solo eFlow	5.43	100.00%	11.90%	0.05	-	-	-	-	-	
		Мультимодальное распределение				5.82	99.80%	11.20%	0.20	1/3	
		Мультимодальное распределение				5.82	99.80%	11.20%	0.20	1/3	
7B07 IgG 10 мг/мл	До небулизации Solo eFlow	7.02	100.00%	19.40%	0.09	-	-	-	-	-	
		Мультимодальное распределение				5.90	99.60%	17.10%	0.25	2/3	
		Мультимодальное распределение				Мультимодальное распределение				0/3	
7B07 Fab 3 мг/мл	До небулизации Solo eFlow	2.95	100.00%	20.20%	0.05	-	-	-	-	-	
		3.33	100.00%	11.10%	0.19	2/3	3.12	100.00%	14.20%	0.22	1/1
		3.27	100.00%	11.50%	0.18	1/3	3.29	100.00%	11.70%	0.24	1/2
7B07 Fab 10 мг/мл	До небулизации Solo eFlow	3.62	100.00%	9.90%	0.03	-	-	-	-	-	
		3.34	100.00%	11.43%	0.21	3/3	Образцы, проанализированные без фильтрации				
		Мультимодальное распределение				3.74	100.00%	14.05%	0.22	2/3	
1D06 VHH 3 мг/мл	До небулизации Solo eFlow	1.98	100.00%	10.00%	0.17	-	-	-	-	-	
		Мультимодальное распределение				Мультимодальное распределение				0/3	
		Мультимодальное распределение				1.59	100.00%	27.00%	0.20	2/3	
1D06 VHH 10 мг/мл	До небулизации Solo eFlow	2.00	100.00%	9.40%	0.92	-	-	-	-	-	
		Мультимодальное распределение				Мультимодальное распределение				0/3	
		Мультимодальное распределение				1.90	100.00%	9.20%	1.02	1/3	
08H11 IgG 3 мг/мл	До небулизации Solo eFlow	5.48	100.00%	21.30%	0.06	-	-	-	-	-	
		6.01	99.90%	19.20%	0.24	1/3	5.16	99.80%	16.80%	0.24	2/2
		5.51	99.80%	23.50%	0.30	1/3	Мультимодальное распределение				
08H11 IgG 10 мг/мл	До небулизации Solo eFlow	5.87	99.60%	16.90%	0.09	-	-	-	-	-	
		6.70	92.23%	16.13%	0.22	3/3	Образцы, проанализированные без фильтрации				
		6.40	99.85%	20.30%	0.25	2/3	Мультимодальное распределение				

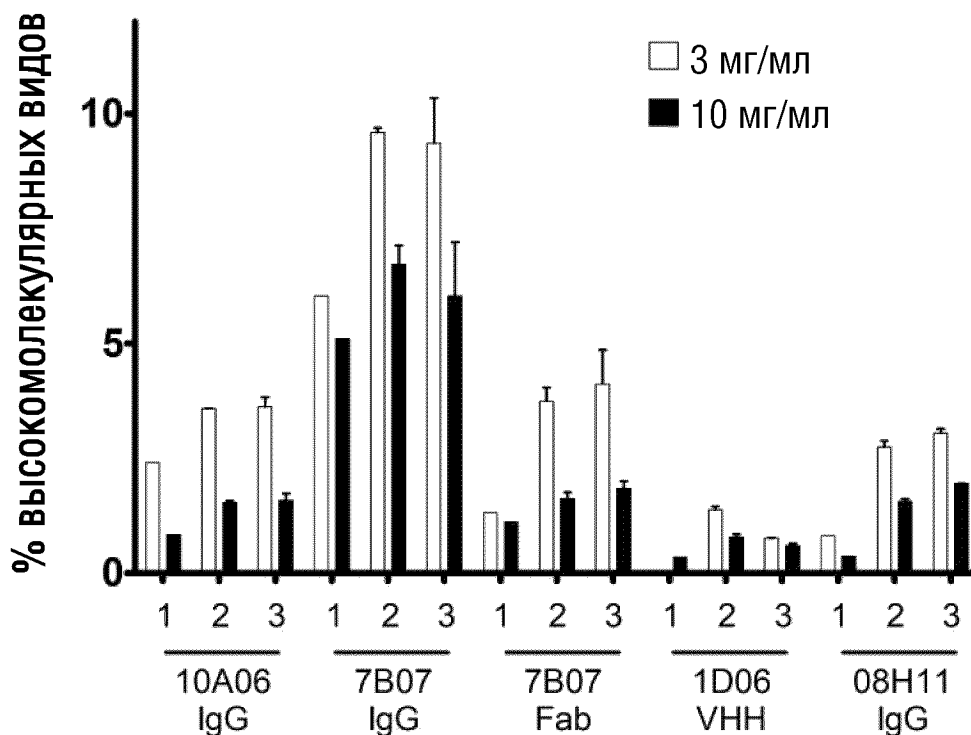
7/23

## ФИГ.5

А.

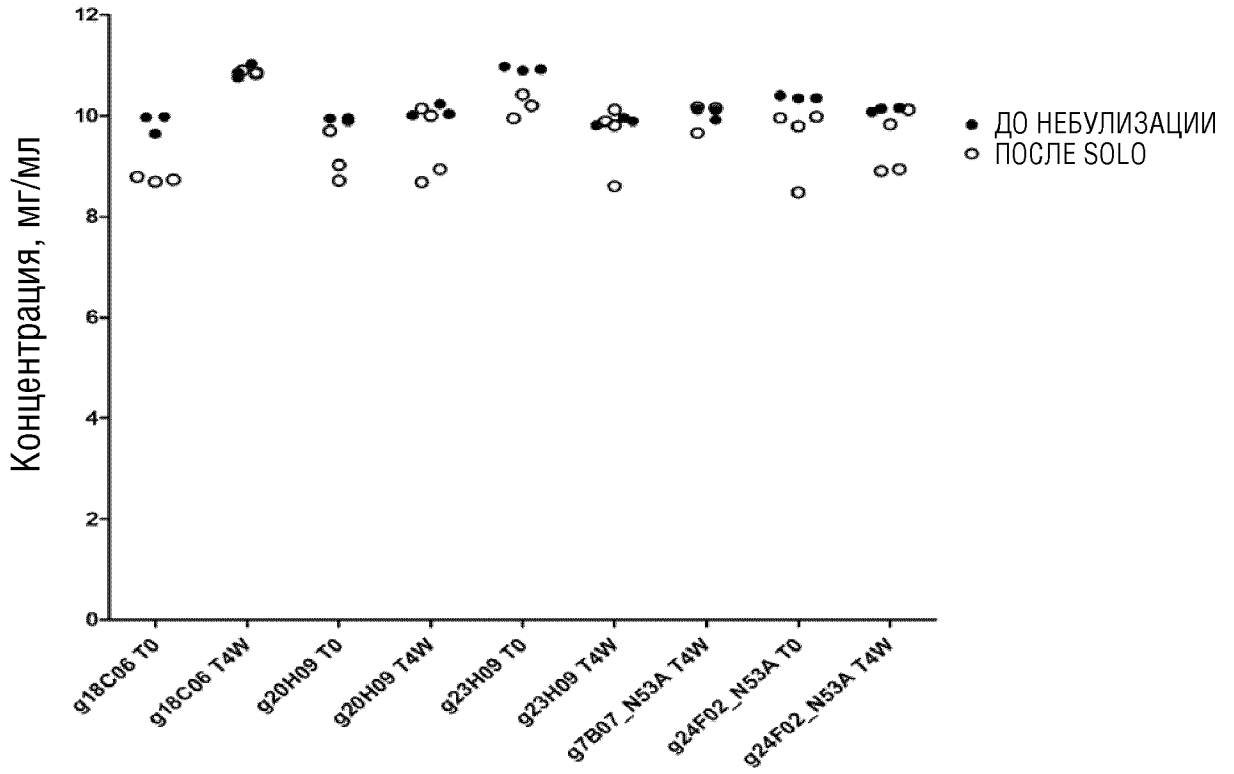
Концентрация образца	Состояние	% мономеров				%HMW			
		3 мг/мл		10 мг/мл		3 мг/мл		10 мг/мл	
		Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
10A06 IgG 3 мг/мл	До небулизации	97.600		99.160		2.403		0.838	
	Solo	96.490	0.130	98.477	0.060	3.509	0.127	1.526	0.061
	eFlow	96.373	0.200	98.417	0.145	3.624	0.197	1.584	0.141
7B07 IgG 3 мг/мл	До небулизации	93.970		94.890		6.027		5.109	
	Solo	90.380	0.061	93.490	0.747	9.621	0.063	6.514	0.748
	eFlow	90.897	1.383	93.683	0.781	9.104	1.386	6.316	0.782
7B07 Fab 3 мг/мл	До небулизации	98.680		98,890		1.325		1.106	
	Solo	96.183	0.197	98,383	0.145	3.815	0.198	1.616	0.145
	eFlow	96.150	1.169	98,143	0.136	3.851	1.168	1.854	0.135
1D06 VHH 3 мг/мл	До небулизации	100.000		99,650		0.000		0.350	
	Solo	98.630	0.085	99,203	0.047	1.369	0.086	0.796	0.049
	eFlow	99.267	0.055	99,393	0.031	0.730	0.056	0.604	0.028
08H11 IgG 3 мг/мл	До небулизации	99.190		99.630		0.806		0.368	
	Solo	97.323	0.241	98.430	0.046	2.679	0.240	1.571	0.043
	eFlow	96.980	0.137	98.133	0.144	3.022	0.137	1.868	0.143

В.



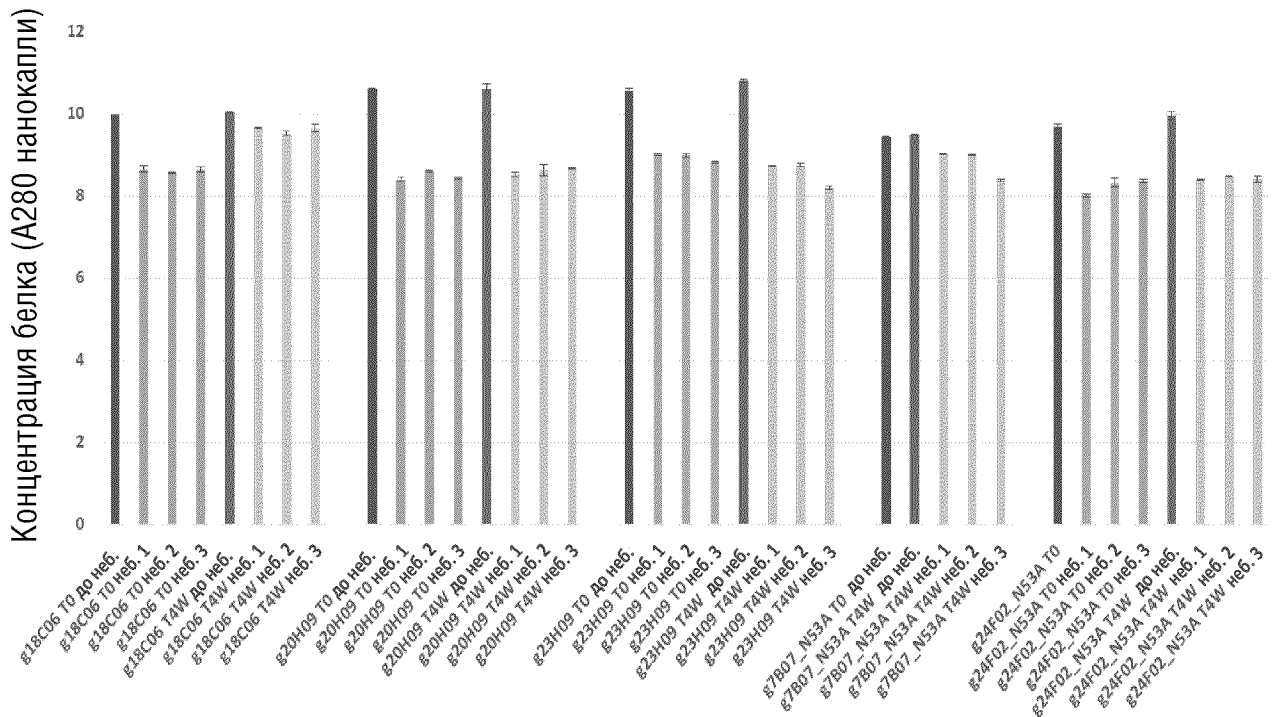
ФИГ.6

A.



B.

Концентрация белка, (A280)\_образцы после небулизации





# ФИГ.7

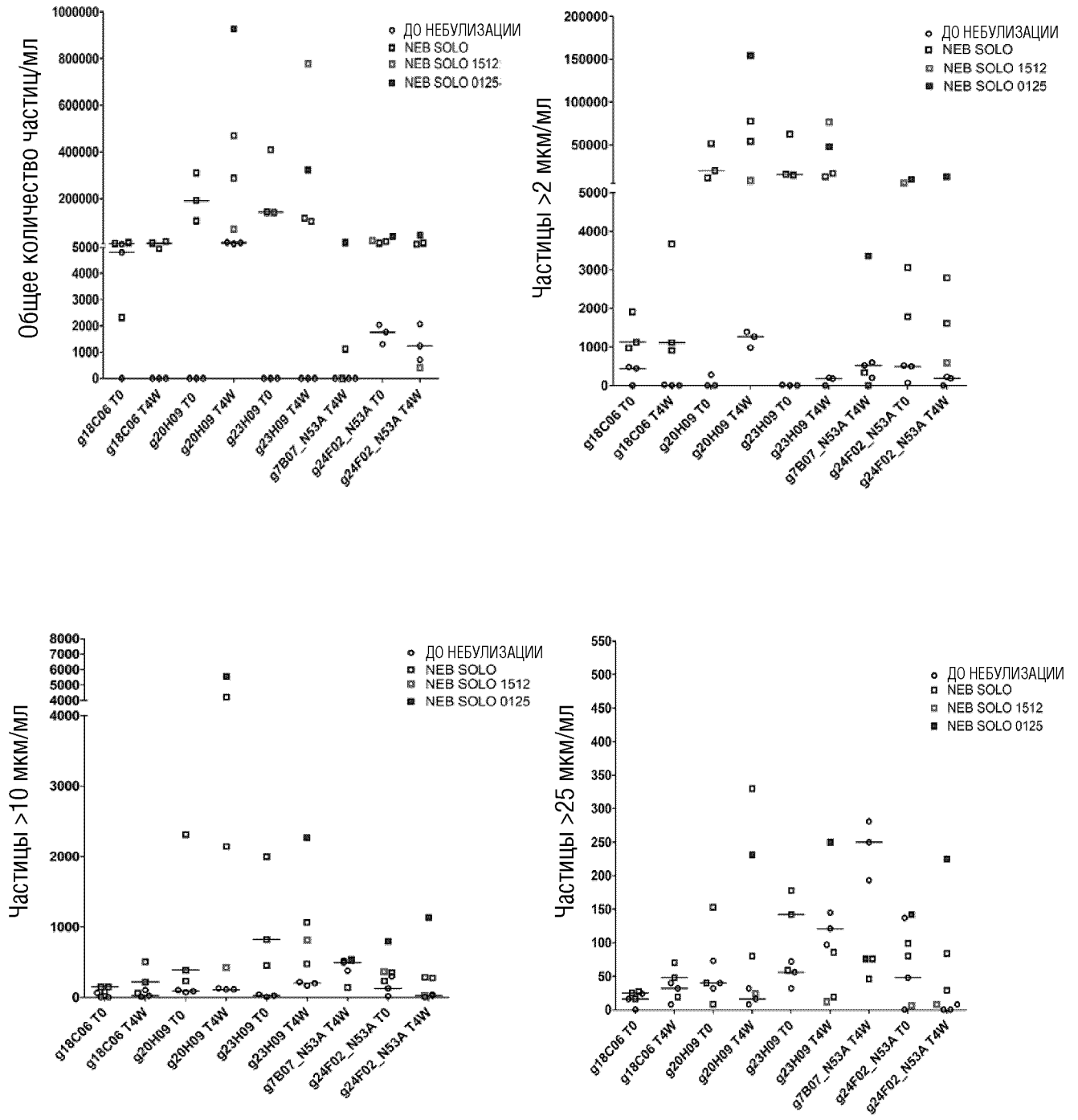
Образец	Solo	Радиус (нм)	Диапазон радиуса (нм)	Масса (%)	Диапазон массы (%)	Pd (%)	Диапазон PDI (%)	PDI	Диапазон (PDI)	Кол-во образцов с несколькими пиками (мультимодальное распределение)	Количество не пригодных для использования образцов
g18C06 T0	До	3.3	3.2 - 3.5	100	100	11.8	11.0 - 12.7	0.12	0.11 - 0.13	1/3	0/3
	1690	3.3	3.1 - 3.6	100	100	9.4	6.4 - 11.1	0.09	0.06 - 0.11	1/3	0/3
	0125	3.4	3.2 - 3.7	99.9	99.7 - 100	8.0	7.0 - 9.2	0.08	0.07 - 0.09	1/3	0/3
	0259	3.2	2.6 - 3.7	100	100	9.1	8.2 - 10.0	0.09	0.08 - 0.10	1/3	0/3
g18C06 T4W	До	3.3	3.2 - 3.4	100	100	13.4	8.7 - 20.4	0.13	0.09 - 0.20	0/3	0/3
	1690	3.4	3.3 - 3.4	99.9	99.8 - 100	11.0	10.5 - 11.8	0.11	0.10 - 0.12	1/3	1/3
	0125	3.3	3.1 - 3.8	99.9	99.7 - 100	5.9	5.0 - 7.6	0.06	0.05 - 0.08	1/3	0/3
	0259	3.4	3.2 - 3.5	100	99.9 - 100	11.5	9.1 - 13.7	0.12	0.09 - 0.14	3/3	0/3
g20H09 T0	До	3.7	3.6 - 3.9	99.9	99.9 - 100	13.2	11.3 - 14.6	0.13	0.11 - 0.15	3/3	0/3
	1690	НЕ ПРИГОДНЫЙ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ									
	0125										
	0259										
g20H09 T4W	До	3.6	3.6 - 3.7	100	100	12.5	11.6 - 14.3	0.13	0.12 - 0.14	3/3	0/3
	1690	НЕ ПРИГОДНЫЙ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ									
	0125										
	0259										
	1512										
g23H09 T0	До	3.5	3.4 - 3.7	100	100	11.3	10.4 - 11.9	0.11	0.1 - 0.12	3/3	0/3
	1690	НЕ ПРИГОДНЫЙ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ									
	0125										
	0259										
g23H09 T4W	До	3.5	3.3 - 3.6	99.9	99.8 - 100	16.0	11.4 - 18.4	0.16	0.11 - 0.18	1/3	0/3
	1690	НЕ ПРИГОДНЫЙ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ									
	0125										
	0259										
	1512										

10/23

## ФИГ.7 (продолжение)

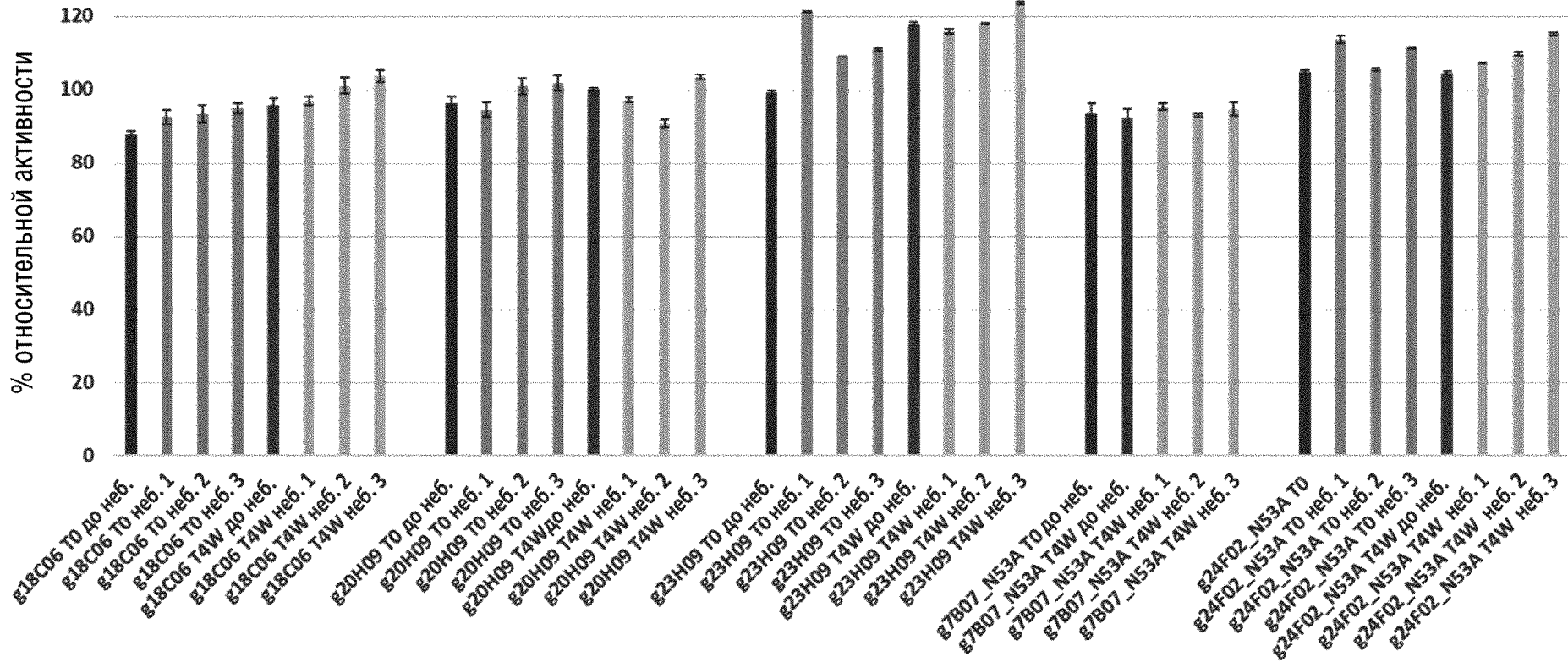
<b>g7B07_</b> <b>N53A</b> <b>T4W</b>	До	3.4	3.3 - 3.5	100	100	11.9	11.8 - 12	0.12	0.12	0/3	0/3
	1690	3.3	3.2 - 3.3	100	100	11.0	10.2 - 12.3	0.11	0.10 - 0.12	2/3	0/3
	0125	3.4	3.3 - 3.4	100	100	11.2	11.3 - 12.4	0.12	0.11 - 0.12	3/3	0/3
	0259	3.4	3.3 - 3.6	100	100	15.6	10.6 - 25.6	0.16	0.11 - 0.26	1/3	0/3
<b>g24F02_</b> <b>N53A TO</b>	До	3.5	3.4 - 3.5	100	100	12.2	11.9 - 12.7	0.12	0.12 - 0.13	0/3	0/3
	1690	3.5	3.4 - 3.6	100	100	11.5	10.9 - 11.9	0.12	0.11 - 0.12	0/3	0/3
	0125	3.4	3.4	100	100	12.1	11.8 - 12.6	0.12	0.12 - 0.13	2/3	0/3
	0259	3.5	3.5 - 3.6	99.9	99.8 - 100	11.8	11.5 - 12.0	0.12	0.11 - 0.12	3/3	0/3
	1512	3.5	3.4 - 3.7	100	100	11.4	10.7 - 12.0	0.12	0.11 - 0.12	3/3	0/3
<b>g24F02_</b> <b>N53A</b> <b>T4W</b>	До	3.5	3.5	100	100	16.4	11.9 - 20.0	0.16	0.12 - 0.20	0/3	0/3
	1690	3.4	3.4 - 3.5	99.9	99.8 - 100	11.8	11.7 - 11.9	0.12	0.12	2/3	0/3
	0125	3.4	3.4 - 3.5	100	99.9 - 100	14.2	11.7 - 18.6	0.14	0.12 - 0.19	3/3	0/3
	0259	3.5	3.4 - 3.5	100	100	13.0	12.0 - 14.5	0.13	0.12 - 0.14	1/3	0/3
	1512	3.4	3.4 - 3.5	99.9	99.8 - 100	11.9	11.8 - 11.9	0.12	0.12	2/3	0/3

ФИГ.8



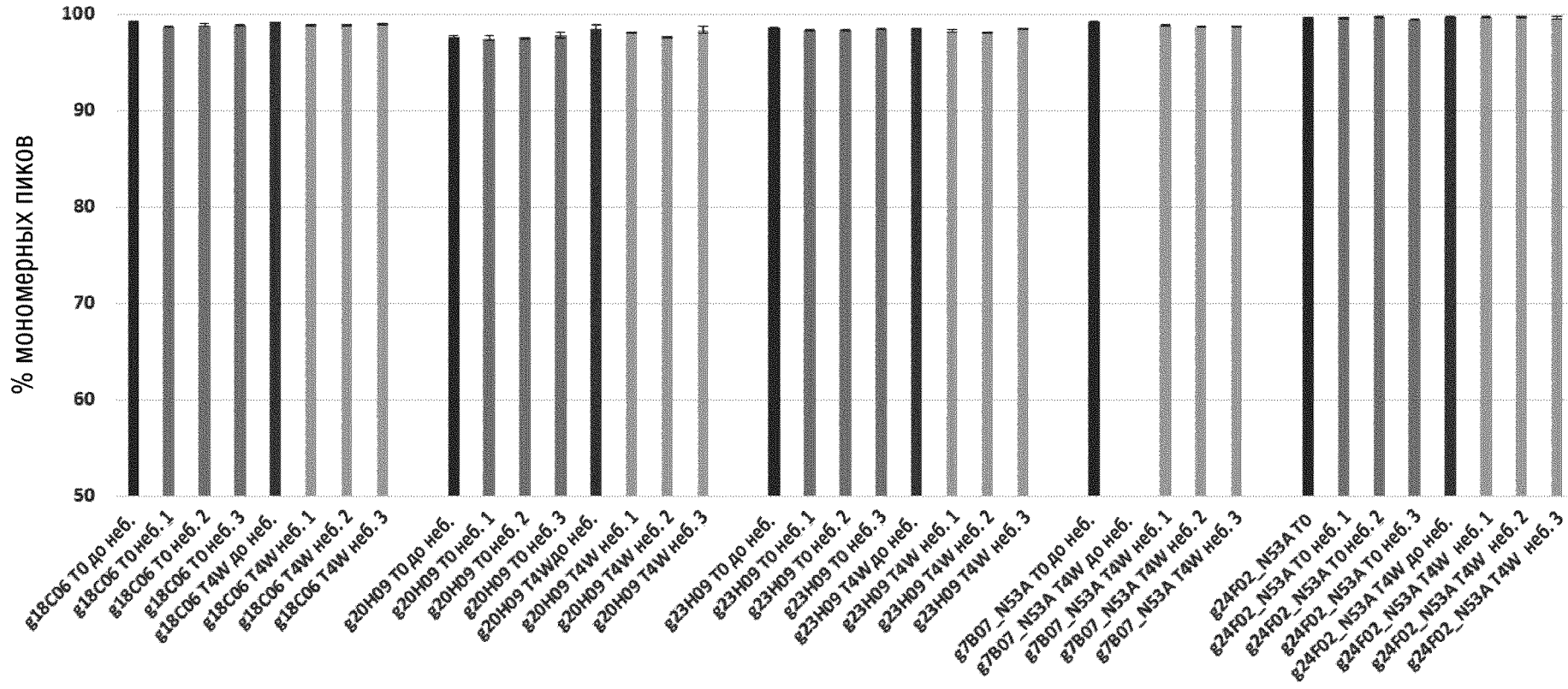
# ФИГ.9

Средство связывания образцов после небулизации согласно SPR



# ФИГ.10

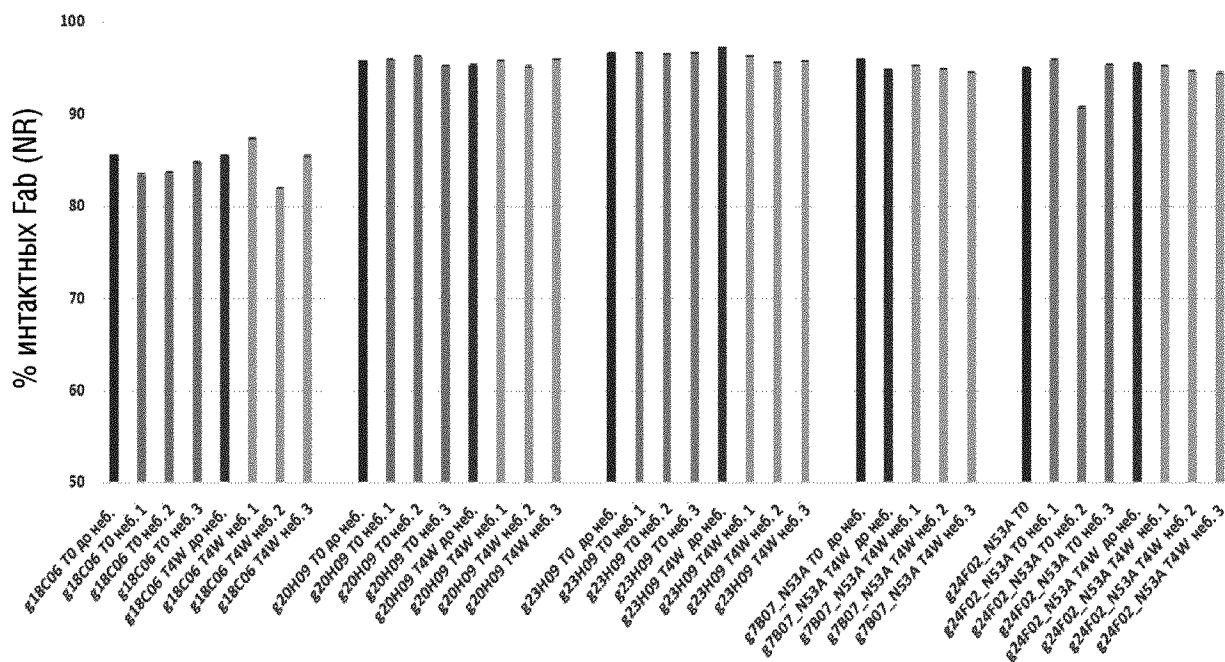
% мономерных образцов после небулизации согласно SE-HPLC



## ФИГ.11

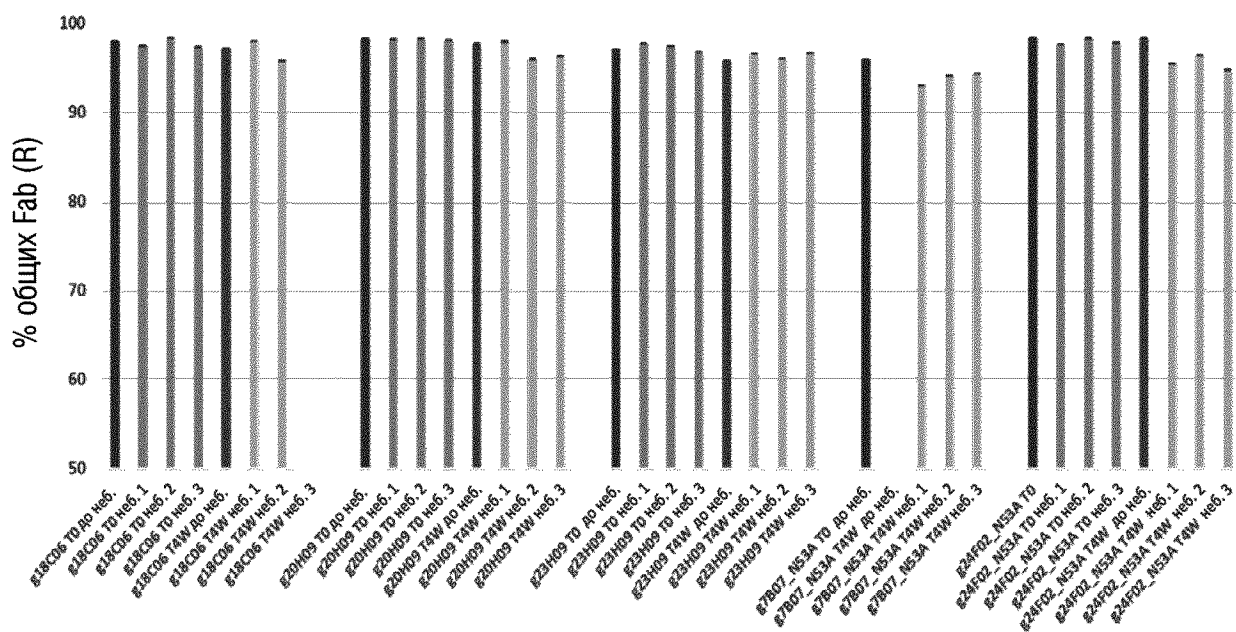
А.

Чистота образцов после небулизации согласно сGE (нередуцирующие условия)

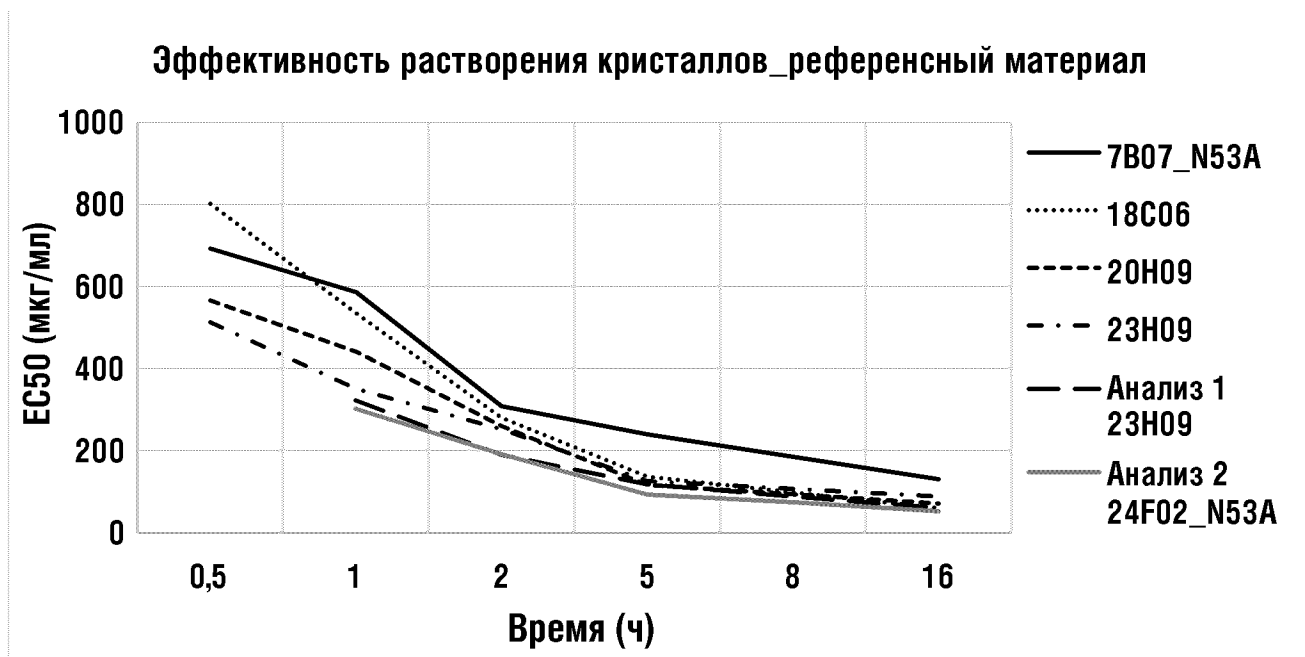


В.

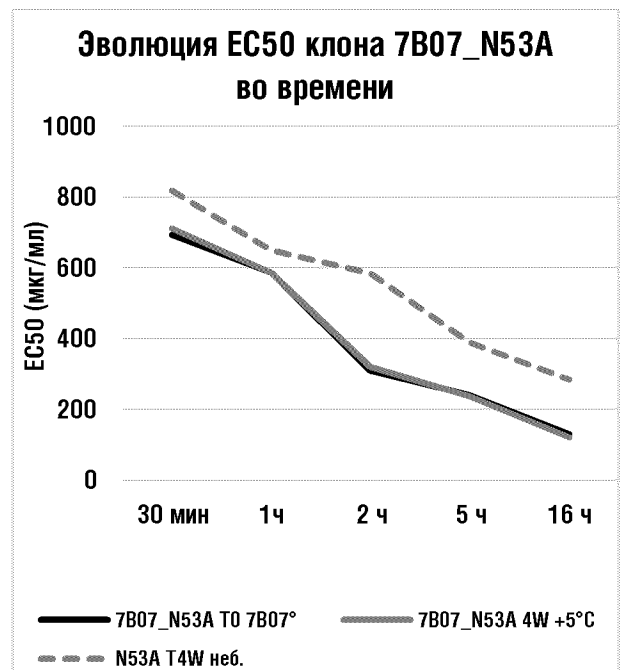
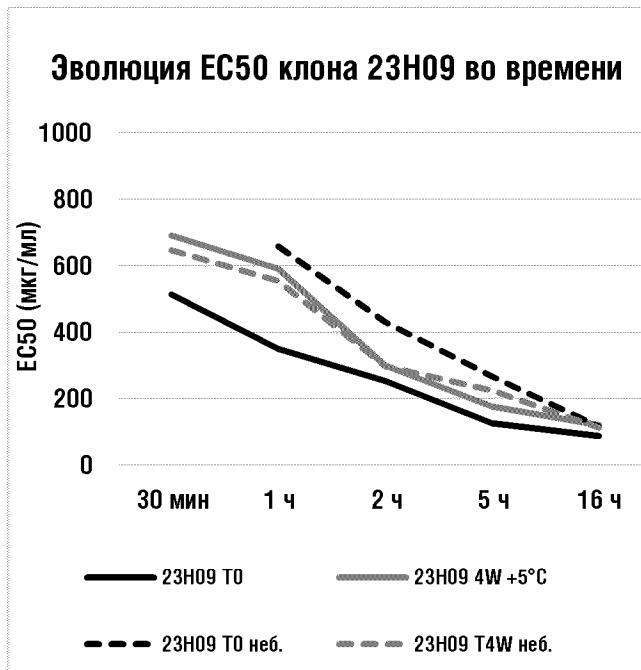
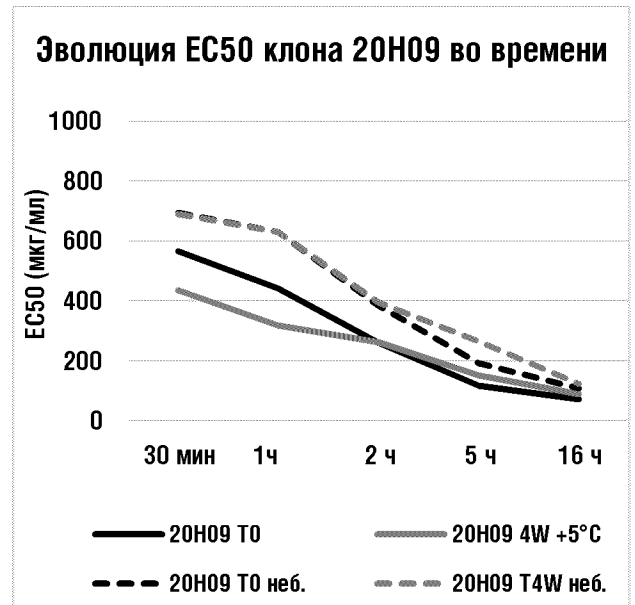
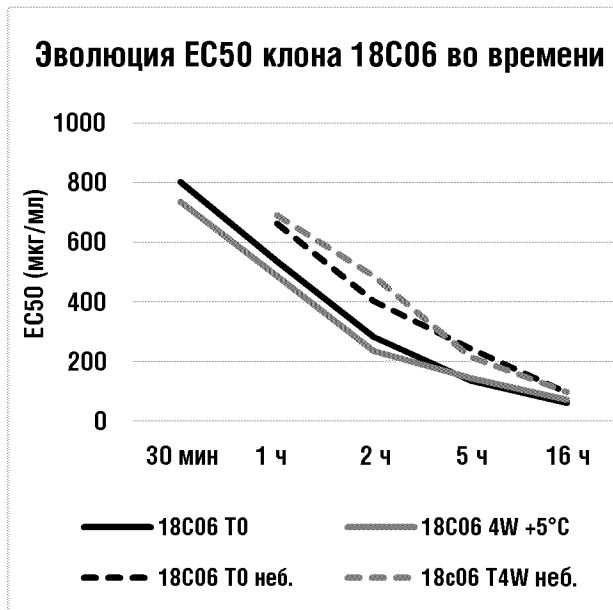
Чистота образцов после небулизации согласно сGE (редуцирующие условия)



ФИГ.12

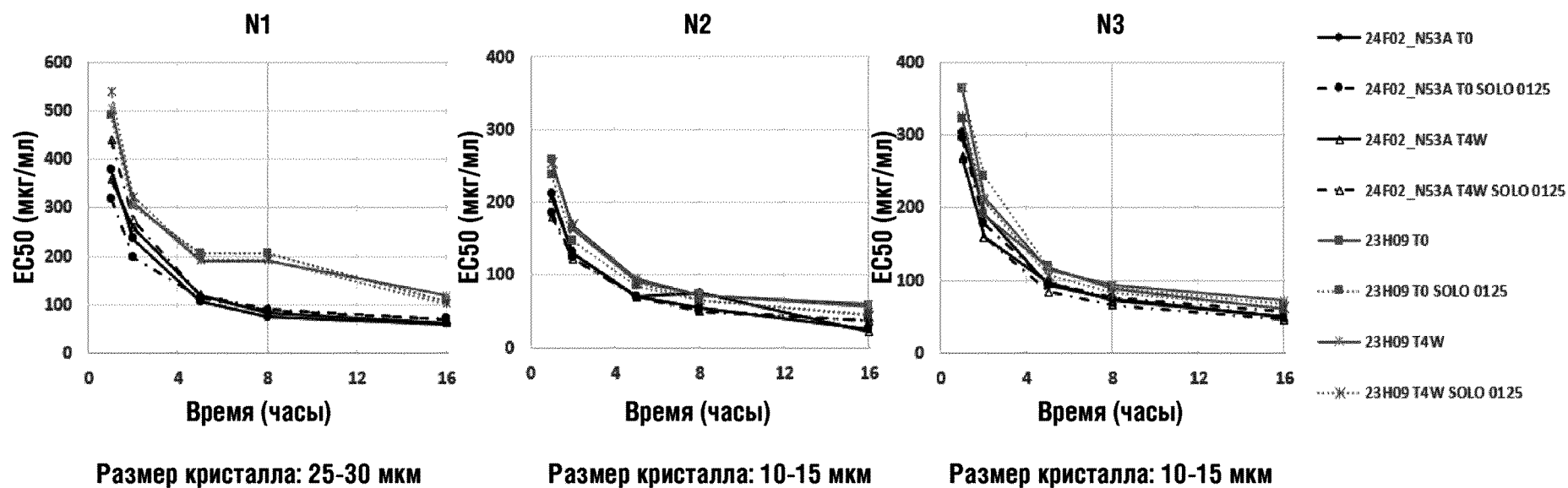


ФИГ.13

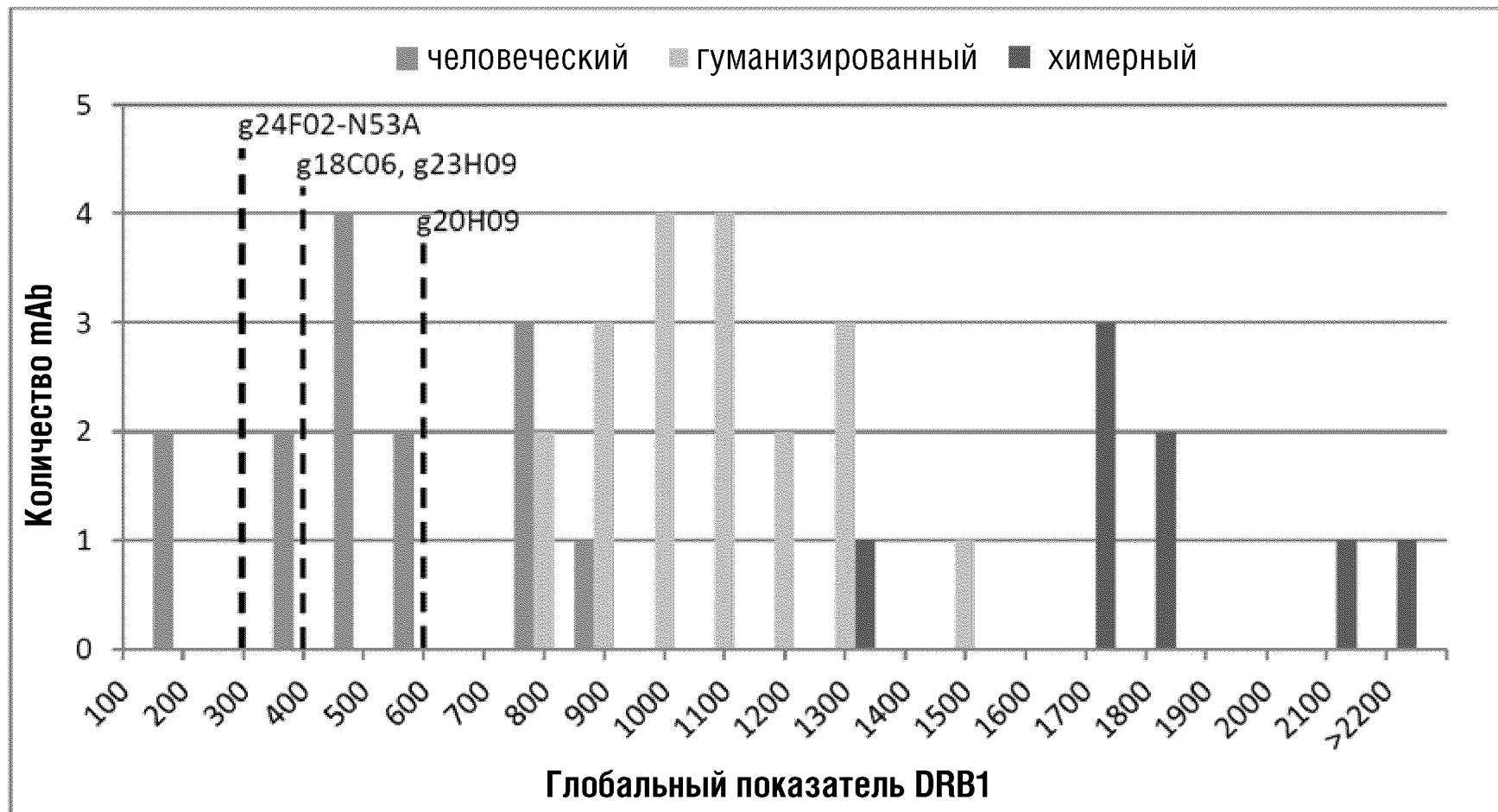




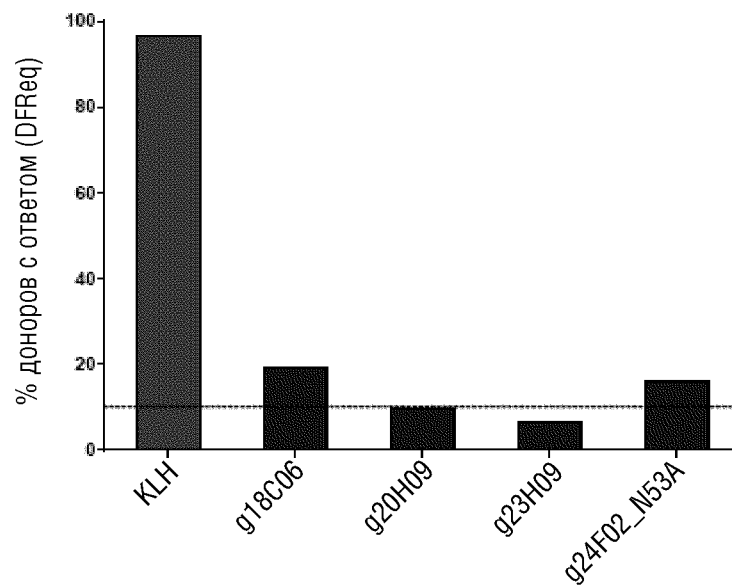
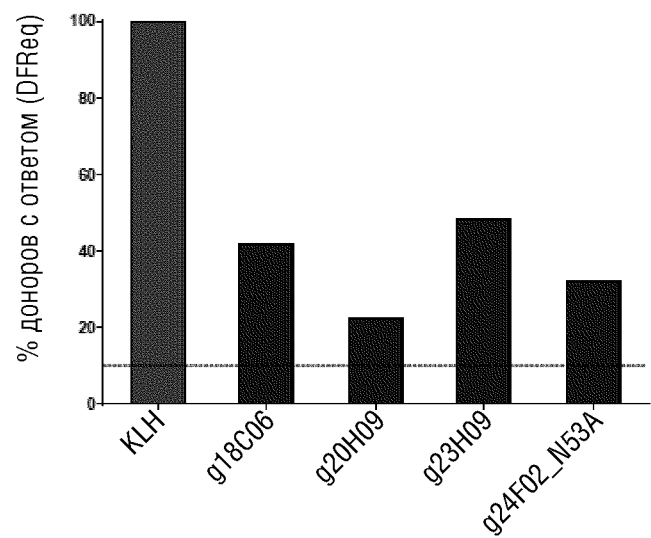
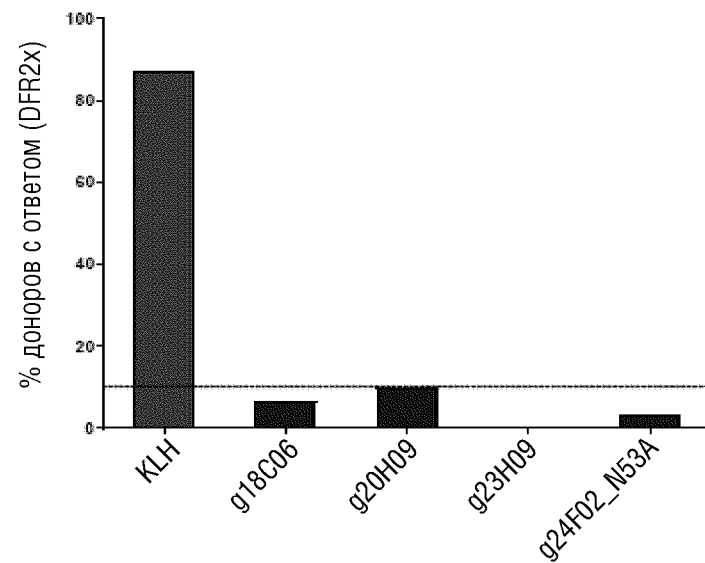
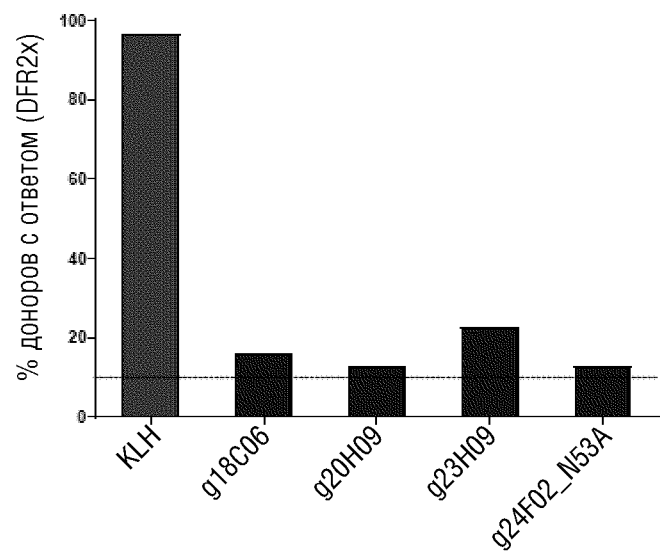
# ФИГ.14



ФИГ.15

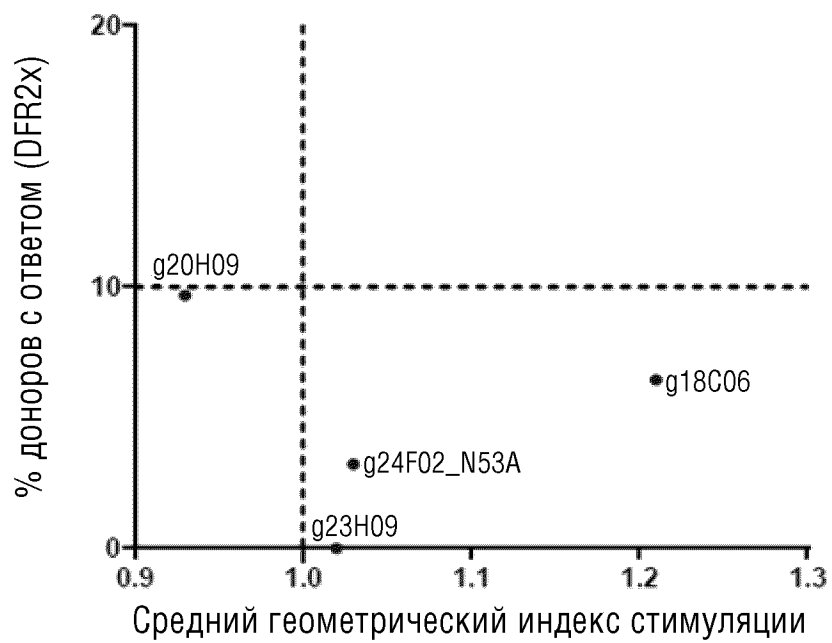
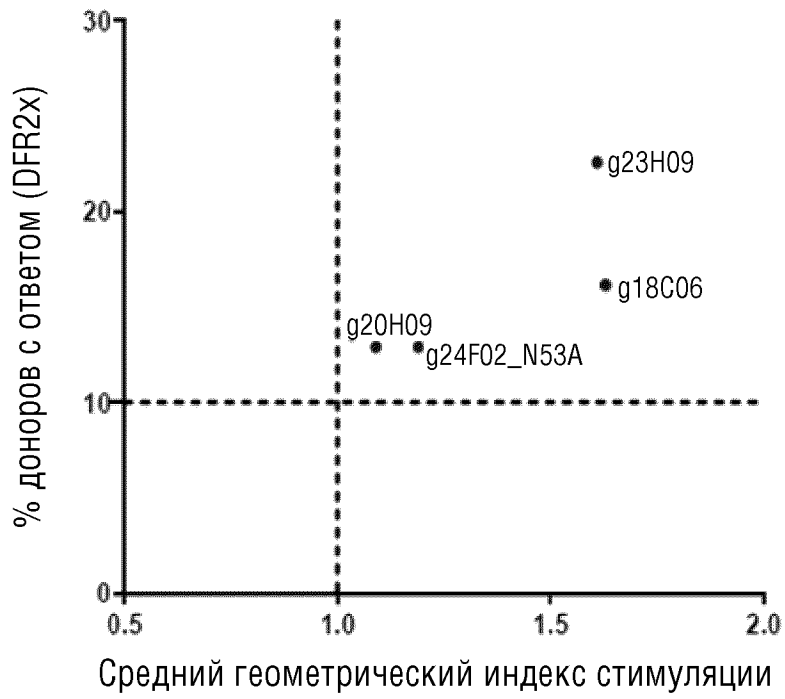


ФИГ.16



20/23

ФИГ.17



# ФИГ.18

Признак	Критерий/целевой	g24F02_N53A	g23H09	g20H09	g18C06	g7B07_N53A
<b>Связывающая активность</b>	Менее 20% потеря относительной активности образца после распыления TW4 согласно SPR по сравнению с эталонным образцом T0	Нет - 111%	Нет - 119%	Нет - 97%	Нет - 101%	Нет - 94%
<b>Эффективность (растворение кристаллов рекомбинантного Gal10)</b>	Менее 20% потеря относительной активности образца после распыления TW4 согласно SPR по сравнению с материалом, неподверженным стрессу, T0(при 2 часа инкубации)	Нет – 120%	Нет - 85% (Анализ 1) -91% (Анализ 2)	Да – 66%	Да – 58%	Да – 53%
	EC50 мкг/мл: материал, не подверженный стрессовому воздействию T0 (через 2 часа инкубации)	Анализ 2: 191	Анализ 1: 252 Анализ 2: 190	Анализ 1: 260	Анализ 1: 281	Анализ 1: 309
	EC50 мкг/мл: материал, подверженный стрессовому воздействию T0 (TW4 после небулизации, через 2 часа инкубации)	Анализ 2: 159	Анализ 1: 297 Анализ 2: 209	Анализ 1: 395	Анализ 1: 485	Анализ 1: 584
<b>Чистота (SE-HPLC/CE-SDS)</b>	≥90% основного пика (мономер), ≤10% видов HMW и LMW	Да	Да	Да	SE-HPLC: Да CE-SDS: Нет, 87% мономеров	Да
<b>Посттрансляционная модификация</b>	Основные уязвимые сайты в последовательности после небулизации	Нет (незначительное количество в LC-CDRs)	Нет	Нет	Нет	Нет
<b>Невидимые частицы (DLS)</b>	Диапазон RDI (T4W) до/после небулизации  Масса основного пика (после небулизации в T0 и T4W)	PDI: 0.12/ 0.12-0.14  Незначительное количество немномерных видов (< 0.1%)	PDI: 0.16/ NA  Не пригодный для использования	PDI: 0.13/ NA  Не пригодный для использования	PDI: 0.13 / 0.06-0.12  Незначительное количество немномерных видов (< 0.1%)	PDI: 0.12/ 0.11-0.16  Незначительное количество немномерных видов (< 0.1%)
<b>Невидимые частицы (FCM)</b>	Общее количество/мл  T0 (до/после небулизации)	  2,456/ 21,550	  302/ 241,257	  1,476/ 212,723	  6,547/ 16,201	  NA/ NA

## ФИГ.18 (продолжение)

	T4W (до/после небулизации )	2,606/ 19,713	854/ 292,352	14,063/ 291,462	266/ 23,363	1,827/ 12,104
	>2 мкм/мл					
	T0 (до/после небулизации )	642/ 4,732	139/ 31,724	292/ 28,532	559/ 2,204	NA/ NA
	T4W (до/после небулизации )	442/ 4,328	397/ 32,911	1,576/ 49,344	137/ 3,992	802/ 3,118