

COMPOSICIONES DE ANTICUERPOS ANTI-TSLP Y USOS DE LAS MISMAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de los EE.UU. N.º 63/178,938, presentada el 23 de abril de 2021, que se incorpora por la presente como referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

La presente solicitud se refiere, en general, a composiciones que comprenden el anticuerpo anti-TSLP tezepelumab y derivados del mismo que comprenden atributos de calidad del anticuerpo.

ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN

La linfopoyetina estromal tímica (TSLP), una citocina derivada de células epiteliales producida en respuesta a estímulos ambientales y proinflamatorios, conduce a la activación de múltiples células inflamatorias y vías respiratorias posteriores (Soumelis *et al.* Nat Immunol 2002;3: 673-80; Allakhverdi *et al.* J Exp Med 2007;204: 253-8). La TSLP aumenta en las vías respiratorias de los pacientes con asma y se correlaciona con la expresión de quimiocina y citocina Th2 (Shikotra *et al.* J Allergy Clin Immunol 2012;129: 104-11 e1-9) y la gravedad de la enfermedad (Ying *et al.* J Immunol 2005;174: 8183-90; Ying *et al.* J Immunol 2008;181: 2790-8). Si bien la TSLP es central para la regulación de la inmunidad de Th2, también puede tener un rol clave en otras vías de inflamación y, por lo tanto, ser importante para múltiples fenotipos de asma.

Tezepelumab es un anticuerpo monoclonal (mAb) de inmunoglobulina humana de G2 (IgG2) que se une a TSLP, e impide su interacción con el complejo receptor de TSLP. Se apreciará que tezepelumab es un heterotetrámero que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, y que comprende dos sitios de unión a TSLP. Un estudio de prueba de concepto realizado en pacientes con asma leve, atópica, demostró que tezepelumab inhibe las respuestas asmáticas tempranas y tardías y reprime los biomarcadores de inflamación de Th2 luego de un estímulo de inhalación de alérgenos (Gauvreau, *et al.* N Engl J Med 2014;370: 2102-10).

SUMARIO

El monitoreo de las terapéuticas de anticuerpos en la formulación a lo largo del tiempo es importante para determinar las condiciones de almacenamiento que reducen cualquier descomposición de la terapéutica y mantienen la integridad del producto. La presente divulgación proporciona un estudio de los atributos de un anticuerpo anti-TSLP que puede cambiar a lo largo del tiempo durante la fabricación y el almacenamiento, incluyendo los

atributos que pueden ser beneficiosos o perjudiciales para la tolerabilidad y/o la potencia del anticuerpo.

En un aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende tezepelumab y uno o más derivados de tezepelumab, en donde el uno o más derivados de tezepelumab comprenden un derivado de isomerización, y en donde la cantidad del derivado de isomerización en la composición es menos de aproximadamente el 30%, en donde tezepelumab comprende (A) un dominio variable de cadena ligera que comprende: (i) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 3; (ii) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 4; y (iii) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 5; y (B) un dominio variable de cadena pesada que comprende: (i) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 6; (ii) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 7 y (iii) una secuencia de aminoácidos CDR3 de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 8.

En diversas realizaciones, la cantidad del derivado de isomerización en la composición es menos de aproximadamente el 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o el 1%. En diversas realizaciones, la cantidad del derivado de isomerización en la composición es desde aproximadamente el 0.5% hasta aproximadamente el 13%. En diversas realizaciones, la cantidad de derivado de isomerización en la composición es desde aproximadamente el 1% hasta el 12%, el 2% hasta el 10% o aproximadamente el 4% hasta el 7%. En diversas realizaciones, el derivado de isomerización comprende una modificación en la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada o la cadena ligera (CDR). En diversas realizaciones, el derivado de isomerización comprende un cambio en el residuo de CDR de cadena pesada D54 de SEQ ID NO: 7, y/o residuo de CDR de cadena ligera D49, D50 o D52 de SEQ ID NO: 4 en cualquiera o ambas cadenas de región variable. En diversas realizaciones, el derivado de isomerización comprende isomerización en D54 en una cantidad de menos de aproximadamente el 5%. En diversas realizaciones, el derivado de isomerización comprende isomerización en D54 en una cantidad de menos de aproximadamente el 4%, 3%, 2% o el 1%. En diversas realizaciones, el derivado de isomerización comprende isomerización en uno o más de los residuos D49, D50 o D52 de SEQ ID NO: 4 en una cantidad de menos de aproximadamente el 26%. En diversas realizaciones, el derivado de isomerización comprende isomerización en uno o más de los residuos D49, D50 o D52 de SEQ ID NO: 4 en una cantidad de menos de aproximadamente el 25%, 20%, 18%, 15%, 13%, 10%, 7%, 5%, 3% o el 2%. En diversas realizaciones, el derivado de isomerización es ácido isoaspártico (isoAsp), aspartato cíclico (cAsp), succinimida o un producto intermedio de isomerización. En diversas

realizaciones, el derivado de isomerización es ácido isoaspártico (isoAsp) o aspartato cíclico (cAsp). En diversas realizaciones, la cantidad del derivado de isomerización en la composición se determina mediante mapeo de péptidos reducido. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una
 5 composición que comprende más del 30% del derivado de isomerización, en donde dicha potencia comprende una capacidad de inhibir la unión de TSLPR biotinilado inmovilizado en una perla donante a TSLP-His inmovilizado en una perla aceptora. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 30% del derivado de isomerización, en donde dicha
 10 potencia comprende la capacidad de inhibir la unión de TSLPR expresada en la superficie de una Célula Stat/BaF/HTR que codifica un gen informador de luciferasa Stat, cuya expresión es indicativa de la unión de TSLP a TSLPR.

Una composición que comprende tezepelumab y uno o más derivados de tezepelumab, en donde el uno o más derivados de tezepelumab comprenden un derivado de desamidación,
 15 y en donde la cantidad del derivado de desamidación en la composición es menos de aproximadamente el 15%, en donde tezepelumab comprende: (A) un dominio variable de cadena ligera que comprende: (i) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 3; (ii) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 4; y (iii) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera
 20 expuesta en SEQ ID NO: 5; y (B) un dominio variable de cadena pesada que comprende: (i) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 6; (ii) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 7 y (iii) una secuencia de aminoácidos CDR3 de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 8. En diversas realizaciones, la cantidad del derivado de desamidación en la composición es menos de
 25 aproximadamente el 15%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 7%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 4%, aproximadamente el 3%, aproximadamente el 2% o aproximadamente el 1%. En diversas realizaciones, la cantidad del derivado de desamidación en la composición es desde aproximadamente el 0.5% hasta aproximadamente el 13%. En diversas realizaciones, la cantidad del derivado de desamidación en la composición
 30 está entre aproximadamente el 0.5%-10%, aproximadamente el 1% y el 8%, aproximadamente el 2% y el 7% o aproximadamente el 3% y el 6%. En diversas realizaciones, el derivado de desamidación comprende residuo de asparagina desamidada N25/N26 en LCDR1 expuesta en SEQ ID NO: 3, residuo N316 en la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 13, y/o residuo N385/390 en la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 13. En diversas realizaciones, el
 35 derivado de desamidación comprende desamidación en N25/N26 en una cantidad de menos de

aproximadamente el 3%. En diversas realizaciones, el derivado de desamidación comprende desamidación en una o más de N316, y/o N385/390 en una cantidad de menos de aproximadamente el 13%. En diversas realizaciones, el derivado de desamidación es asparagina desamidada o un producto intermedio de desamidación. En diversas realizaciones, la cantidad del derivado de desamidación en la composición se determina mediante mapeo de péptidos reducido. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 15% del derivado de desamidación, en donde dicha potencia comprende una capacidad de inhibir la unión de TSLPR biotinilado inmovilizado en una perla donante a TSLP-His inmovilizado en una perla aceptora. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 15% del derivado de desamidación, en donde dicha potencia comprende la capacidad de inhibir la unión de TSLPR expresada en la superficie de una Célula Stat/BaF/HTR que codifica un gen informador de luciferasa Stat, cuya expresión es indicativa de la unión de TSLP a TSLPR.

La divulgación también proporciona una composición que comprende tezepelumab y uno o más derivados de tezepelumab, en donde el uno o más derivados de tezepelumab comprenden un derivado de oxidación, y en donde la cantidad del derivado de oxidación en la composición es menos de aproximadamente el 7%, en donde tezepelumab comprende (A) un dominio variable de cadena ligera que comprende: (i) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 3; (ii) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 4; y (iii) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 5; y (B) un dominio variable de cadena pesada que comprende: (i) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 6; (ii) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 7 y (iii) una secuencia de aminoácidos CDR3 de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 8.

En diversas realizaciones, la cantidad del derivado de oxidación es menos de aproximadamente el 6%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 4%, aproximadamente el 3%, aproximadamente el 2% o aproximadamente el 1%. En diversas realizaciones, la cantidad del derivado de oxidación en la composición está entre aproximadamente el 0.4% y aproximadamente el 7%, aproximadamente el 1% y aproximadamente el 6%, aproximadamente el 2% y aproximadamente el 5% o aproximadamente el 0.4% y aproximadamente el 4%. En diversas realizaciones, el derivado de oxidación comprende oxidación en uno o más de los residuos de metionina de cadena pesada M34 de HCDR1 expuestos en SEQ ID NO: 6, o el residuo M253 o M359 en la región constante de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 13, o

el residuo de triptófano de cadena pesada W52 en HCDR2 expuesto en SEQ ID NO: 7, W90 de LCDR3 expuesto en SEQ ID NO: 5, o W102 en HCDR3 expuesto en SEQ ID NO: 8, en cualquiera o ambas cadenas pesadas. En diversas realizaciones, el derivado de oxidación comprende oxidación en uno o más residuos de metionina de cadena pesada M34, M253, M359, en cualquiera o ambas cadenas pesadas, opcionalmente en donde la oxidación es en una cantidad de menos de aproximadamente el 7%. En diversas realizaciones, el derivado de oxidación comprende oxidación en uno o más residuos de triptófano W52, W90 o W102, en cualquiera o ambas cadenas pesadas, opcionalmente en donde la oxidación es en una cantidad de menos de aproximadamente el 3%. En diversas realizaciones, la cantidad del derivado de oxidación en la composición se determina mediante mapeo de péptidos reducido. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 7% del derivado de oxidación, en donde dicha potencia comprende una capacidad de inhibir la unión de TSLPR biotinilado inmovilizado en una perla donante a TSLP-His inmovilizado en una perla aceptora. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 7% del derivado de oxidación, en donde dicha potencia comprende la capacidad de inhibir la unión de TSLPR expresada en la superficie de una Célula Stat/BaF/HTR que codifica un gen informador de luciferasa Stat, cuya expresión es indicativa de la unión de TSLP a TSLPR.

En otra realización, la divulgación proporciona una composición que comprende tezepelumab y uno o más derivados de tezepelumab, en donde el uno o más derivados de tezepelumab comprenden un derivado de glicosilación, y en donde la cantidad del derivado de glicosilación en la composición es menos de aproximadamente el 40%, en donde tezepelumab comprende (A) un dominio variable de cadena ligera que comprende: (i) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 3; (ii) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 4; y (iii) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 5; y (B) un dominio variable de cadena pesada que comprende: (i) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 6; (ii) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 7 y (iii) una secuencia de aminoácidos CDR3 de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 8.

En diversas realizaciones, la cantidad de derivado de glicosilación en la composición es menos de aproximadamente el 35%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 9%, aproximadamente el 8% aproximadamente el 7%, aproximadamente

el 6%, o aproximadamente el 5%. En diversas realizaciones, la cantidad de derivado de glicosilación en la composición está entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 35%, aproximadamente el 3% y aproximadamente el 30%, aproximadamente el 5% y aproximadamente el 25%, aproximadamente el 10% y aproximadamente el 20%. En diversas realizaciones, el derivado de glicosilación comprende alteración de la glicosilación de tezepelumab en el residuo N298 de SEQ ID NO: 13, en una o ambas cadenas pesadas. En diversas realizaciones, el derivado de glicosilación comprende afucosilación o alteración de la glicosilación de tezepelumab a restos con alto contenido de manosa o restos de galactosilo. En diversas realizaciones, el derivado de glicosilación comprende derivado afucosilado en una cantidad de menos de aproximadamente el 5%. En diversas realizaciones, el derivado de glicosilación comprende restos de galactosilo en una cantidad de menos de aproximadamente el 30%. En diversas realizaciones, el derivado de glicosilación comprende restos de alto contenido de manosa en una cantidad de menos de aproximadamente el 5%. En diversas realizaciones, la cantidad del derivado de glicosilación en la composición se determina mediante el método de mapa de glucano. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 40% de los derivados de glicosilación, en donde dicha potencia comprende una capacidad de inhibir la unión de TSLPR biotinilado inmovilizado en una perla donante a TSLP-His inmovilizado en una perla aceptora. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 40% de los derivados de glicosilación, en donde dicha potencia comprende la capacidad de inhibir la unión de TSLPR expresada en la superficie de una Célula Stat/BaF/HTR que codifica un gen informador de luciferasa Stat, cuya expresión es indicativa de la unión de TSLP a TSLPR.

Los derivados de glicosilación también pueden asociarse con la función efectora y la eliminación de anticuerpos (se apreciará que una menor eliminación de anticuerpos puede indicar una vida media más larga; en este sentido, se entenderá que un anticuerpo o una composición de anticuerpo que tenga “menos depuración” que un anticuerpo o una composición de anticuerpo de referencia se refiere a una semivida numéricamente más larga que el anticuerpo o la composición de anticuerpo de referencia). En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen menos eliminación de anticuerpos y/o mayor tolerabilidad que una composición que comprende más de aproximadamente el 15%, aproximadamente el 13%, aproximadamente el 11%, aproximadamente el 8% o aproximadamente el 6% de derivados de glicosilación de alto contenido de manosa. En varias realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen menos eliminación de

anticuerpos y/o mayor tolerabilidad que una composición que comprende más de aproximadamente 25%, aproximadamente 23% (por ejemplo, aproximadamente 23.1%), aproximadamente 21%, aproximadamente 18%, aproximadamente 15%, aproximadamente 13%, aproximadamente 11%, aproximadamente 8%, aproximadamente 6%, o

5 aproximadamente 5% de derivados de glicosilación de manosa alta. En varias realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen menos eliminación de anticuerpos y/o mayor tolerabilidad que una composición que comprende más de aproximadamente 23.1% de derivados de glicosilación de manosa alta. En varias realizaciones, un aumento de las especies de manosa alta de 5% a 23.1% resulta en no más de 1.7% o 10% de aumento en el depuración

10 de los derivados de tezepelumab y tezepelumab.

Se proporciona además una composición que comprende tezepelumab y uno o más derivados de isoforma de disulfuro del mismo, en donde el uno o más derivados de isoforma de disulfuro comprenden una isoforma de IgG2-B y/o una isoforma de IgG2-A/B, y en donde la cantidad de la isoforma de disulfuro en la composición es menos de aproximadamente el 75%.

15 En diversas realizaciones, la cantidad de isoforma de disulfuro en la composición es menos de aproximadamente el 70%, aproximadamente el 65, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 15%,

20 aproximadamente el 10%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 4%, aproximadamente el 3%, aproximadamente el 2% o aproximadamente el 1%.

En diversas realizaciones, el uno o más derivados de isoforma de disulfuro comprenden una isoforma de IgG2-B. En diversas realizaciones, la cantidad de la isoforma de IgG2-B es menos de aproximadamente el 5%. En diversas realizaciones, el uno o más derivados de

25 isoforma de disulfuro comprenden una isoforma de IgG2-A/B. En diversas realizaciones, la cantidad de la isoforma de IgG2-A/B en la composición es menos de aproximadamente el 75%. En diversas realizaciones, la cantidad de la isoforma de IgG2-A/B en la composición es desde aproximadamente el 38% hasta aproximadamente el 43%. En diversas realizaciones, la cantidad de derivados de isoforma de disulfuro en la composición se determina mediante

30 cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa no reducida (RP-HPLC).

También se contempla una composición que comprende tezepelumab y uno o más derivados de tezepelumab, en donde el uno o más derivados de tezepelumab son especies de alto peso molecular (HMW), y en donde la cantidad de las especies de HMW en la composición es menos de aproximadamente el 20%, en donde tezepelumab comprende (A) un dominio

35 variable de cadena ligera que comprende: (i) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de

cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 3; (ii) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 4; y (iii) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 5; y (B) un dominio variable de cadena pesada que comprende: (i) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 6; (ii) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 7 y (iii) una secuencia de aminoácidos CDR3 de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 8.

En diversas realizaciones, las especies de HMW en la composición es menos de aproximadamente el 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o el 1%. En diversas realizaciones, la cantidad de las especies de HMW en la composición es desde aproximadamente el 0.5% hasta aproximadamente el 13%, aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 11%, aproximadamente el 2% hasta aproximadamente el 10%, o aproximadamente el 3% hasta aproximadamente el 8% o aproximadamente el 4% hasta aproximadamente el 7%. En diversas realizaciones, la cantidad de las especies de HMW en la composición es de aproximadamente el 1.7% o menos. En diversas realizaciones, la cantidad de las especies de HMW en la composición es de aproximadamente el 1.4% o menos. En diversas realizaciones, las especies de HMW comprenden un dímero de tezepelumab.

En diversas realizaciones, la cantidad de especies de HMW en la composición se determina mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño (SE-HPLC), ultracentrifugación de velocidad de sedimentación (SV-AUC) o electroforesis capilar de dodecilsulfato de sodio reducido (rCE-SDS). En diversas realizaciones, la SE-HPLC es SE-ultra HPLC (SE-UHPLC) o SE-HPLC con dispersión de luz estática (SE-HPLC-SLS). En diversas realizaciones, la SE-HPLC es SE-UHPLC. En diversas realizaciones, cuando la SE-HPLC es la SE-UHPLC, las proteínas se separan isocráticamente usando una fase móvil que comprende fosfato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 250 mM a pH 6.8. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 20% de especies de HWM, en donde dicha potencia comprende una capacidad de inhibir la unión de TSLPR biotinilado inmovilizado en una perla donante a TSLP-His inmovilizado en una perla aceptora. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 20% de especies de HWM, en donde dicha potencia comprende la capacidad de inhibir la unión de TSLPR expresada en la superficie de una Célula Stat/BaF/HTR que codifica un gen informador de luciferasa Stat, cuya expresión es indicativa de la unión de TSLP a TSLPR.

En varias realizaciones de la composición, (a) el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una potencia y/o tolerabilidad mayor que una composición que comprende más del 40% de los derivados de la glicosilación, donde dicha potencia comprende una capacidad de inhibir la unión de TSLPR biotinilado inmovilizado en una perla donante a TSLP-
 5 HIS inmovilizado en una perla aceptora o una capacidad de inhibir la unión de TSLPR expresado en la superficie de una célula Stat/BAF/HTR que codifica un gen reportero de Stat luciferasa, la expresión de la cual es indicativa de unión de TSLP a TSLPR; o (b) el tezepelumab y los derivados de tezepelumab no comprenden más del 15% de manosa alta, y tienen menos depuración que una composición que tiene manosa alta mayor del 15%.

10 En varias realizaciones de la composición, (a) el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una potencia y/o tolerabilidad mayor que una composición que comprende más del 40% de los derivados de la glicosilación, donde dicha potencia comprende una capacidad de inhibir la unión de TSLPR biotinilado inmovilizado en una perla donante a TSLP-
 15 HIS inmovilizado en una perla aceptora o una capacidad de inhibir la unión de TSLPR expresado en la superficie de una célula Stat/BAF/HTR que codifica un gen reportero de Stat luciferasa, la expresión de la cual es indicativa de unión de TSLP a TSLPR; o (b) el tezepelumab y los derivados de tezepelumab no comprenden más del 25% de manosa alta, y tienen menos depuración que una composición que tiene manosa alta mayor del 25%.

También se proporciona una composición que comprende tezepelumab y uno o más
 20 derivados de tezepelumab, en donde uno o más derivados de tezepelumab comprenden un fragmento de tezepelumab, y en donde la cantidad del fragmento de tezepelumab en la composición es menor que aproximadamente 15%, en donde tezepelumab comprende (A) un dominio variable de cadena ligera que comprende: (i) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 3; (ii) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de
 25 cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 4; y (iii) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 5; y (B) un dominio variable de cadena pesada que comprende: (i) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 6; (ii) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 7 y (iii) una secuencia de aminoácidos CDR3 de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO:
 30 8.

En diversas realizaciones, la cantidad de fragmentos en la composición es menos de aproximadamente el 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o el 1%. En diversas realizaciones, la cantidad de los fragmentos en la composición es desde aproximadamente el 0.5% hasta aproximadamente el 13%, aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 11%,
 35 aproximadamente el 2% hasta aproximadamente el 10%, o aproximadamente el 3% hasta

aproximadamente el 8% o aproximadamente el 4% hasta aproximadamente el 7%. En diversas realizaciones, los fragmentos de tezepelumab son especies de bajo peso molecular (LMW) o peso molecular medio (MMW), o combinaciones de los mismos. En diversas realizaciones, los fragmentos son especies de bajo peso molecular de menos de aproximadamente 25 kD. En diversas realizaciones, los fragmentos son especies de peso molecular medio que tienen un peso molecular entre aproximadamente 25 y 50 kD. En diversas realizaciones, la cantidad de fragmento de tezepelumab en la composición se determina mediante electroforesis capilar reducida con dodecilsulfato de sodio (rCE-SDS). En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 20% de fragmentos de tezepelumab, en donde dicha potencia comprende una capacidad de inhibir la unión de TSLPR biotinilado inmovilizado en una perla donante a TSLP-His inmovilizado en una perla aceptora. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 15% de fragmentos de tezepelumab, en donde dicha potencia comprende la capacidad de inhibir la unión de TSLPR expresada en la superficie de una Célula Stat/BaF/HTR que codifica un gen informador de luciferasa Stat, cuya expresión es indicativa de la unión de TSLP a TSLPR.

Se proporciona en el presente documento una composición que comprende tezepelumab y uno o más derivados de tezepelumab, en donde los derivados de tezepelumab comprenden derivados de isomerización, derivados de desamidación, derivados de oxidación, derivados de glicosilación, especies de HMW, fragmentos, isómeros de disulfuro o combinaciones de los mismos, en donde la composición tiene una o más de las siguientes características: (a) la cantidad de derivados de isomerización en la composición es de aproximadamente el 30% o menos tal como se mide mediante mapeo de péptidos reducido; (b) la cantidad de derivados de desamidación en la composición es de aproximadamente el 15% o menos tal como se mide mediante mapeo de péptidos; (c) la cantidad de derivados de oxidación en la composición es aproximadamente el 7% o menos tal como se mide mediante mapeo de péptidos reducido; (d) la cantidad de derivados de glicosilación en la composición es aproximadamente el 75% o menos tal como se mide mediante mapeo de glucano; (e) la cantidad de isómeros de disulfuro en la composición es de aproximadamente el 40% o menos tal como se mide mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa no reducida (RP-HPLC); (f) la cantidad de especies de HMW en la composición es de aproximadamente el 20% o menos tal como se mide mediante SE-HPLC; y/o (g) la cantidad de fragmentos en la composición es de aproximadamente el 20% o menos tal como se mide mediante rCE-SDS.

En diversas realizaciones, el tezepelumab comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 10 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 12.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para evaluar la calidad de una composición de tezepelumab, que comprende: obtener una composición de tezepelumab que contiene tezepelumab y uno o más derivados de tezepelumab; medir la cantidad de uno o más derivados de tezepelumab en la composición, en donde los derivados de tezepelumab comprenden derivados de isomerización, derivados de desamidación, derivados de oxidación, glicosilación v, derivados de isoforma de disulfuro, especies de HMW, fragmentos, o combinaciones de los mismos; comparar la cantidad medida del uno o más derivados de tezepelumab con un criterio de referencia predeterminado; y preparar una formulación farmacéutica o producto farmacéutico de la composición de tezepelumab si la comparación indica que se cumple el criterio de referencia predeterminado. En diversas realizaciones, la cantidad de derivados de isomerización se mide y el criterio de referencia predeterminado es de aproximadamente el 30% o menos. En diversas realizaciones, la cantidad de isomerización en la composición de tezepelumab se mide mediante mapeo de péptidos reducido. En diversas realizaciones, la cantidad de derivados de desamidación se mide y el criterio de referencia predeterminado es de aproximadamente el 15% o menos. En diversas realizaciones, la cantidad de desamidación en la composición de tezepelumab se mide mediante mapeo de péptidos reducido. En diversas realizaciones, la cantidad de derivados de oxidación se mide y el criterio de referencia predeterminado es de aproximadamente el 7% o menos. En diversas realizaciones, la cantidad de oxidación en la composición de tezepelumab se mide mediante mapeo de péptidos reducido. En diversas realizaciones, la cantidad de derivados de glicosilación se mide y el criterio de referencia predeterminado es de aproximadamente el 40% o menos. En diversas realizaciones, la cantidad de glicosilación en la composición de tezepelumab se mide mediante mapeo de glucano. En diversas realizaciones, la cantidad de derivados de isoforma de disulfuro se mide y el criterio de referencia predeterminado es de aproximadamente el 75% o menos. En diversas realizaciones, la cantidad de isoforma de disulfuro en la composición de tezepelumab se mide mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa no reducida (RP-HPLC). En diversas realizaciones, la cantidad de especies de HMW se mide y el criterio de referencia predeterminado es de aproximadamente el 20% o menos. En diversas realizaciones, la cantidad de especies de HMW se mide mediante SE-HPLC. En diversas realizaciones, la cantidad de fragmentos se mide y el criterio de referencia predeterminado es de aproximadamente el 15% o menos. En diversas realizaciones, la cantidad de fragmentos en la composición de tezepelumab se mide mediante rCE-SDS.

En diversas realizaciones, la composición de tezepelumab se obtiene a partir de una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) que expresa un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de SEQ ID NO: 10 y un ácido nucleico que codifica una cadena ligera de SEQ ID NO: 12.

5 En diversas realizaciones, la inmunoglobulina, anticuerpo o proteína de unión a antígeno es un anticuerpo humano. En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2. En diversas realizaciones, el tezepelumab o derivado del mismo se une específicamente a un polipéptido TSLP tal como se expone en los aminoácidos 29-159 de SEQ ID NO: 2. En diversas realizaciones, ambos sitios de unión de tezepelumab o derivados del mismo tienen una unión
10 idéntica a TSLP.

En varias realizaciones, el tezepelumab o su derivado une TSLP con una afinidad que no supera numéricamente los 10^{-8} M kD.

Se contempla además una composición que comprende tezepelumab o derivados del mismo como se describe en el presente documento y un portador, excipiente o diluyente
15 farmacéuticamente aceptable.

La divulgación también proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica el dominio variable de la cadena ligera, el dominio variable de la cadena pesada, o ambos, del tezepelumab o derivado del mismo descrito en el presente documento.

20 La divulgación contempla además un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico que codifica tezepelumab tal como se describe en el presente documento. También se proporciona una célula huésped que comprende el vector de expresión.

Además, se contempla en el presente documento un método para producir una composición que comprende tezepelumab o derivados del mismo que se une específicamente
25 a un polipéptido TSLP que comprende los aminoácidos 29-159 de SEQ ID NO: 2, que comprende incubar la célula huésped en condiciones que le permitan expresar la inmunoglobulina, la proteína de unión a antígeno o el anticuerpo, en el que dicha célula huésped comprende (i) un vector de expresión recombinante que codifica el dominio variable de cadena ligera de la proteína de unión a antígeno de como se describe en este documento y un vector
30 de expresión recombinante que codifica el dominio variable de cadena pesada de la proteína de unión a antígeno como se describe en este documento, o (ii) un vector de expresión recombinante que codifica tanto el dominio variable de cadena ligera como el dominio variable de cadena pesada de tezepelumab.

También se proporciona en el presente documento un método para tratar una
35 enfermedad inflamatoria en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad

terapéuticamente eficaz de una composición que comprende tezepelumab y derivados del mismo. En diversas realizaciones, la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en: asma, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), esofagitis eosinofílica (EoE), pólipos nasales, urticaria crónica espontánea, enfermedad
5 impulsada por Ig, nefropatía por IgA, nefritis lúpica, gastritis eosinofílica, sinusitis crónica sin pólipos nasales y fibrosis pulmonar idiopática (FPI). En diversas realizaciones, el asma es asma leve, moderada o severa. En diversas realizaciones, el asma es asma grave. En varias realizaciones, el asma es eosinofílica o no eosinofílica.

En diversas realizaciones, el método comprende administrar la composición a un
10 intervalo de cada 2 semanas o cada 4 semanas. En diversas realizaciones, la composición se administra durante un período de al menos 4 meses, 6 meses, 9 meses, 1 año o más.

En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2. En diversas realizaciones, el tezepelumab o derivados de tezepelumab comprenden una región variable de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera expuesta
15 en SEQ ID NO: 12, y comprende uno o más de los atributos descritos en el presente documento.

La divulgación también proporciona una composición que comprende tezepelumab y derivados del mismo tal como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria. En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona el uso de una composición que comprende tezepelumab y derivados del mismo tal
20 como se describe en el presente documento en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad inflamatoria.

También se contemplan jeringuillas, por ejemplo, jeringuillas de un solo uso o precargadas, recipientes estériles sellados, por ejemplo, viales, frascos, recipientes, y/o kits o paquetes que comprenden cualquiera de los anticuerpos o composiciones anteriores,
25 opcionalmente con instrucciones de uso adecuadas. En diversas realizaciones, la administración es a través de jeringuilla cargada previamente o autoinyector. En diversas realizaciones, el auto-inyector es un dispositivo Ypsomed YpsoMate®.

Se entiende que cada característica o realización, o combinación, descrita en el presente documento es un ejemplo ilustrativo y no limitativo de cualquiera de los aspectos de la invención
30 y, como tal, está pensado para ser combinable con cualquier otra característica o realización, o combinación, descrita en el presente documento. Por ejemplo, cuando las características se describen con un lenguaje como "una realización", "algunas realizaciones", "ciertas realizaciones", "otras realizaciones", "realizaciones ilustrativas específicas", y/u "otra realización", cada uno de estos tipos de realizaciones es un ejemplo no limitante de una
35 característica que está pensada para ser combinada con cualquier otra característica, o

combinación de características, descritas en el presente documento sin tener que enumerar cada combinación posible. Estas características o combinaciones de características se aplican a cualquiera de los aspectos de la invención. Cuando se divulgan ejemplos de valores que se encuentran dentro de intervalos, cualquiera de estos ejemplos se contempla como posibles extremos de un intervalo, se contemplan todos y cada uno de los valores numéricos entre dichos extremos y se prevén todas y cada una de las combinaciones de extremos superiores e inferiores.

Los encabezados en el presente documento son para la comodidad del lector y no pretenden ser limitantes. Otros aspectos, realizaciones y variaciones de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada y/o de los dibujos y/o de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

Las **Figuras 1A-1F** son una serie de gráficos de apalancamiento que representan las relaciones entre la potencia e IsoAsp de CDR total (Figuras 1A y 1D), especies de HMW (Figuras 1B y 1E) y oxidación de Trp de CDR total (Figuras 1C y 1F).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La estructura de tezepelumab se elucidó a partir de una variedad de técnicas biológicas, bioquímicas y biofísicas para proporcionar una comprensión de su estructura y propiedades funcionales y la evaluación de atributos de calidad críticos.

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos usados en esta solicitud, incluidas la memoria descriptiva y las reivindicaciones, tienen las definiciones que se proporcionan a continuación.

Tal como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, los artículos indefinidos «un/una» y los artículos definidos «el/la» incluyen los referentes en plural así como en singular a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que comúnmente se entiende por uno de los expertos ordinarios en la técnica a la que pertenece la presente divulgación.

Las expresiones «alrededor de» o «aproximadamente» significan un error aceptable para un valor particular determinado por un experto en la técnica, lo que dependerá parcialmente de cómo se mida o determine el valor. En determinadas realizaciones, las expresiones «alrededor de» o «aproximadamente» significan dentro de 1, 2, 3, o 4 desviaciones estándar. En determinadas realización, las expresiones «alrededor de» o «aproximadamente» significan dentro de 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0.5 %, o 0.05 % de un valor o intervalo dado. Cuando las expresiones «alrededor de» o «aproximadamente» preceden al primer valor numérico en una serie de dos o más valores

numéricos, se entenderá que las expresiones «alrededor de» o «aproximadamente» se aplican a cada uno de los valores numéricos en esa serie.

El término “enfermedad inflamatoria” se refiere a una condición médica que implica inflamación anormal causada por el sistema inmunitario que ataca las células o tejidos del propio cuerpo, lo que puede resultar en dolor crónico, enrojecimiento, hinchazón, rigidez y daño a los tejidos normales. Las enfermedades inflamatorias incluyen, por ejemplo, asma, úlcera péptica crónica, tuberculosis, periodontitis, sinusitis, hepatitis activa, espondilitis anquilosante, artritis reumatoide, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, osteoartritis, aterosclerosis, lupus eritematoso sistémico, dermatitis atópica, esofagitis eosinofílica (EoE), pólipos nasales, urticaria espontánea crónica, enfermedad impulsada por Ig (como nefropatía IgA y nefritis lúpica), gastritis eosinofílica, sinusitis crónica sin pólipos nasales, fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y similares. En aspectos ejemplares, la enfermedad inflamatoria es asma, dermatitis atópica o EPOC. En aspectos de ejemplo, la enfermedad inflamatoria es asma, en algunas realizaciones, el asma es asma severa, asma eosinofílico o no eosinofílico, o asma eosinófilo bajo.

El término «asma», tal como se usa en la presente, se refiere a asma no eosinofílico y eosinofílico, alérgico o no alérgico.

La expresión «asma alérgico», tal como se usa en la presente, se refiere a asma desencadenado por uno o más alérgenos. Dichos pacientes tienen un nivel de inmunoensayo de enzima de fluorescencia (FEIA) de IgE positivo con respecto a uno o más alérgenos que desencadenan una respuesta asmática. Normalmente, el asma más alérgica se asocia a la inflamación de tipo Th2.

La expresión «asma no alérgico» se refiere a pacientes que tienen recuentos de eosinófilos bajos, Th2 bajos o IgE bajos en el momento del diagnóstico. Usualmente, un paciente que tiene «asma no alérgico» es negativo en el inmunoensayo de enzima de fluorescencia (FEIA) de IgE en respuesta a un panel de alérgenos, que incluyen alérgenos específicos de la región. Además del recuento de IgE bajo, estos pacientes tienen recuentos de eosinófilos bajos o nulos y recuentos de Th2 bajos en el momento del diagnóstico.

La expresión «asma grave», tal como se usa en la presente, se refiere a un asma que requiere un tratamiento de alta intensidad (por ejemplo, GINA etapa 4 y etapa 5) para mantener un buen control, o donde no se logra un buen control a pesar del tratamiento de alta intensidad (GINA, Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Global Initiative for Asthma (GINA) diciembre 2012).

El término “asma eosinofílica”, tal como se usa en la presente, se refiere a un paciente asmático que tiene un recuento de eosinófilos en sangre de detección menor o igual a 300

células/ μ L, o menor o igual a 250 células/ μ L. El asma “eosinófila baja” se refiere a pacientes asmáticos que tienen menos de 250 células/ μ L de sangre o suero. Alternativamente, el asma “eosinófila baja” se refiere a los pacientes asmáticos que tienen menos de 300 células/ μ L de sangre o suero.

5 Una “citocina T auxiliar (Th) 1” o “citocina específica Th1” se refiere a las citocinas que son expresadas (intracelular y/o secretadas) por las células T Th1, e incluyen IFN-g, TNF-A e IL-12. Una “citocina Th2” o “citocina específica de Th2” se refiere a citocinas que se expresan (de forma intracelular y/o secretadas) por linfocitos T Th2, e incluyen IL-4, IL-5, IL-13, y IL-10. Una «citocina Th17» o «citocina específica de Th17» se refiere a citocinas que se expresan (de
10 forma intracelular y/o secretadas) por linfocitos T Th17, e incluyen IL-17A, IL-17F, IL-22, y IL-21. Determinadas poblaciones de linfocitos Th17 expresan IFN-g y/o IL-2 además de las citocinas Th17 enumeradas en la presente. Una citocina polifuncional CTL incluye iFN-g, TNF-a, IL-2 e IL-17.

Las expresiones «se une específicamente» es «específico del antígeno», es «específico para», «agente de unión selectivo», «agente de unión específico», «antígeno diana» o es «inmunorreactor» con un antígeno se refieren a un anticuerpo o polipéptido que se une a un antígeno diana con mayor afinidad que otros antígenos de similar secuencia. Se contempla en la presente que el agente específicamente se une a proteínas diana útiles en la identificación de tipos celulares inmunitarios, por ejemplo, un antígeno de superficie (por ejemplo, receptor de
20 linfocito T, CD3), una citocina (por ejemplo, TSLP, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IFN-g, TNF-a) y similares. En diversas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente al antígeno diana, pero puede reaccionar de forma cruzada con un ortólogo de una especie estrechamente relacionada, por ejemplo, un anticuerpo puede unirse a una proteína humana y también a una proteína de primate estrechamente relacionada. En diversas realizaciones, la inmunoglobulina,
25 proteína de unión a antígeno o fragmento de la misma, o anticuerpo o fragmento de la misma específico para TLSP se une con una Kd que es numéricamente inferior o igual a 10^{-8} M. En diversas realizaciones, un anticuerpo anti-TSLP descrito en el presente documento se une al menos con una afinidad (Kd) de 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, 10^{-13} M o menos.

El término “anticuerpo” se refiere a una glicoproteína tetramérica que consiste en dos
30 cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, cada una de las cuales comprende una región variable y una región constante. “Cadenas Pesadas” y “Cadenas Ligeras” se refieren a cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina canónica de longitud completa (véase por ejemplo, Immunobiology, 5ª Edición (Janeway y Travers et al., Eds., 2001). Las porciones de unión a antígeno se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante o por escisión enzimática
35 o química de anticuerpos intactos.

Las proteínas de unión a antígeno incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y proteínas similares a anticuerpos que pueden tener cambios estructurales en la estructura de los anticuerpos tetraméricos canónicos. Las “variantes” de anticuerpo se refieren a las proteínas de unión al antígeno o a sus fragmentos que pueden tener cambios estructurales en la
 5 secuencia o función del anticuerpo en comparación con un anticuerpo progenitor que tiene una secuencia conocida. Las variantes de anticuerpos incluyen regiones V con un cambio en las regiones constantes, o, alternativamente, añadiendo regiones V a regiones constantes, opcionalmente de una manera no canónica. Los ejemplos incluyen anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos con regiones V adicionales), fragmentos de anticuerpos
 10 que pueden unirse a un antígeno (por ejemplo, Fab', F'(ab)2, FV, anticuerpos de cadena única, diacuerpos), péptidos biparatópicos y recombinantes que comprenden lo anterior siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada.

Los fragmentos de anticuerpos incluyen partes que se unen a antígenos del anticuerpo, que incluyen inter alia, Fab, Fab', F(ab')2, FV, anticuerpo de dominio (DAB), fragmentos de
 15 región de determinación de complementariedad (CDR), regiones de unión de anticuerpos injertados con CDR, anticuerpos de cadena única (scFv), fragmentos de anticuerpos de cadena única, anticuerpos quiméricos, diacuerpos, tricuerpos, tetracuerpos, minicuerpo, anticuerpo lineal; anticuerpo recombinante quelante, un tricuerpo o bicuerpo, un intracuerpo, un nanocuerpo, un pequeño inmunofármaco modular (SMIP), una proteína de fusión de
 20 inmunoglobulina de dominio de unión a antígenos, anticuerpos de dominio único (incluido el anticuerpo camelizado), un anticuerpo que contenga VHH, o una variante o un derivado del mismo, y polipéptidos que contienen por lo menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir antígeno específico que se une al polipéptido, tal como uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis secuencias de CDR, siempre y cuando el anticuerpo retenga la actividad
 25 biológica deseada.

“Derivado de anticuerpos” como se utiliza en la presente se refiere a anticuerpos, proteínas de unión a antígenos o fragmentos de los mismos que comprenden uno o más atributos descritos en la presente, que pueden caracterizarse en términos de su identidad química, modificación química o tipo de atributo estructural (por ejemplo, especie, fragmento o
 30 isoforma de HMW) y exhibe la actividad biológica deseada.

«Valencia» se refiere a la cantidad de sitios de unión a antígenos en cada anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se dirige a un epítipo. Una molécula de IgG de longitud completa típica o F(ab)2 es «bivalente» en cuanto a que tiene dos sitios de unión a dianas idénticos. Un fragmento de anticuerpo «monovalente» tal como F(ab)' o scFc tiene un solo sitio de unión a

antígenos. Las proteínas de unión a antígenos trivalentes o tetravalentes también pueden modificarse para ser multivalentes.

El “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que se presentan naturalmente y que pueden estar presentes en cantidades menores.

El término “inhibe la actividad de TSLP” incluye la inhibición de cualquiera de los siguientes: unión de TSLP a su receptor; proliferación, activación o diferenciación de células que expresan TSLPR en presencia de TSLP; inhibición de la producción de citocinas Th2 en un ensayo de polarización en presencia de TSLP; activación o maduración de células dendríticas en presencia de TSLP; y liberación de citocinas de mastocitos en presencia de TSLP. Véanse, por ejemplo, la patente de los EE.UU. 7982016 B2, columna 6 y Ejemplo 8 y documento US 2012/0020988 A1, Ejemplos 7-10.

El término “muestra” o “muestra biológica” se refiere a una muestra obtenida de un sujeto para su uso en los métodos actuales, e incluye orina, sangre completa, plasma, suero, saliva, esputo, biopsias de tejido, líquido cefalorraquídeo, células mononucleares de sangre periférica con estimulación in vitro, células mononucleares de sangre periférica sin estimulación in vitro, tejidos linfoides intestinales con estimulación in vitro, tejidos linfoides intestinales sin estimulación in vitro, lavado intestinal, lavado bronquioalveolar, lavado nasal y esputo inducido.

Los términos «tratar» y «tratamiento» se refieren a eliminar, reducir, suprimir o mejorar, temporal o permanentemente, parcial o completamente, un síntoma, manifestación o evolución clínica de un evento, enfermedad o afección asociados con un trastorno inflamatorio descrito en la presente. Como se reconoce en el campo pertinente, los fármacos empleados como agentes terapéuticos pueden reducir la gravedad de un estado de enfermedad dado, pero no es necesario anular todas las manifestaciones de la enfermedad para ser considerados como agentes terapéuticos útiles. De manera similar, no es necesario que un tratamiento administrado profilácticamente sea completamente eficaz en la prevención del comienzo de una afección para constituir un agente profilácticamente viable. Basta con reducir el impacto de una enfermedad (por ejemplo, reduciendo la cantidad o gravedad de los síntomas, o aumentando la eficacia de otro tratamiento, o produciendo otro efecto beneficioso), o reducir la probabilidad de que aparezca o empeore la enfermedad en un sujeto. Una realización de la invención se refiere a un método para determinar la eficacia del tratamiento que comprende administrar a un paciente un agente terapéutico en una cantidad y durante un tiempo suficiente para inducir una mejora sostenida con respecto al valor de referencia de un indicador que refleja la gravedad del trastorno particular.

La expresión «cantidad terapéuticamente eficaz» se refiere a una cantidad de agente terapéutico que es eficaz para mejorar o reducir los síntomas o signos asociados con una enfermedad o trastorno.

TSLP

5 La linfopoyetina estromal tímica (TSLP) es una citocina derivada de células epiteliales que se produce como respuesta a estímulos proinflamatorios y controla las respuestas inflamatorias alérgicas principalmente a través de su actividad en las células dendríticas (Gilliet, J Exp Med. 197: 1059-1067, 2003; Soumelis, Nat Immunol. 3: 673-680, 2002; Reche, J Immunol. 167: 336-343, 2001), mastocitos (Allakhverdi, J Exp Med. 204: 253-258, 2007) y CD34+ células progenitoras (Swedin *et al.* Pharmacol Ther 2017;169: 13-34). Las señales de TSLP a través de un receptor heterodimérico que consiste en la cadena alfa del receptor de interleucina (IL)-7 (IL-7R α) y un receptor tipo cadena γ común (TSLPR) (Pandey, Nat Immunol. 1: 59-64, 2000; Park, J Exp Med. 192: 659-669, 2000).

ARNm de TSLP humano (Brightling *et al.*, J Allergy Clin Immunol 2008;121: 5-10; quiz 1-2; Ortega *et al.* N Engl J Med 2014;371: 1198-207) y los niveles de proteínas (Ortega *et al.*, citado anteriormente) aumentan en las vías respiratorias de los individuos asmáticos en comparación con los controles, y la magnitud de esta expresión se correlaciona con la gravedad de la enfermedad (Brightling *et al.*, citado anteriormente). Estudios recientes demostraron asociación de un solo polimorfismo de nucleótido en el locus TSLP humano con la protección 15 contra el asma, asma atópica e hiperreactividad de las vías respiratorias, lo que sugiere que la regulación diferencial de la expresión génica de TSLP podría influir en la susceptibilidad de la enfermedad (Ortega *et al.* N Engl J Med 2014;371: 1198-207; To *et al.* BMC Public Health 2012;12: 204). Estos datos sugieren que el direccionamiento a TSLP puede inhibir múltiples 20 vías biológicas implicadas en el asma.

Estudios no clínicos anteriores de TSLP sugirieron que después de la liberación de TSLP de las células epiteliales de las vías respiratorias o las células estromales, este activa los mastocitos, células dendríticas y linfocitos T para liberar citocinas Th2 (por ejemplo, IL-4/13/5). Los datos humanos publicados recientemente demostraron una buena correlación entre el gen de TSLP tisular y la expresión de proteínas, una puntuación de firma génica de Th2 y eosinófilos 25 tisulares en asma grave. Por lo tanto, una terapia dirigida a anti-TSLP puede ser eficaz en pacientes asmáticos con inflamación de tipo Th2 (Shikotra *et al.* J Allergy Clin Immunol. 129(1): 104-11, 2012).

Los datos de otros estudios sugieren que el TSLP puede promover la inflamación de las vías respiratorias a través de vías independientes de Th2 tales como la interferencia entre el 35 músculo liso de las vías respiratorias y los mastocitos (Allakhverdi *et al.* J Allergy Clin Immunol.

123(4): 958-60, 2009; Shikotra *et al*, *citado anteriormente*). El TSLP también pueden promover la inducción de linfocitos T para diferenciarse en células productoras de citocina Th-17 con un aumento resultante en la inflamación neutrofílica comúnmente observada en el asma más grave (Tanaka *et al*, Clin Exp Allergy. 39(1): 89-100, 2009). Estos datos y otras pruebas emergentes
 5 sugieren que el bloqueo de TLP puede servir para suprimir múltiples vías biológicas, incluyendo, pero no limitado a, las que involucran citocinas Th2 (IL-4/13/5).

Anticuerpos

Se contempla que los anticuerpos o derivados de anticuerpos o proteínas de unión a antígeno específicas para TSLP son útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias,
 10 incluido el asma, como asma grave, asma eosinofílica, asma no eosinofílica/baja eosinofílica y otras formas de asma descritas en el presente documento. dermatitis atópica, EoE, and COPD.

Los agentes de unión específicos tales como anticuerpos y derivados o fragmentos de anticuerpos que se unen a su antígeno diana, por ejemplo, TSLP, son útiles en los métodos y composiciones de la divulgación. En una realización, el agente de unión específico es un
 15 anticuerpo. Los anticuerpos pueden ser monoclonales (MAb); recombinantes; quiméricos; humanizados, tales como injertados con región determinante de complementariedad (CDR); humanos; variantes de anticuerpos que incluyen de cadena simple; y/o biespecíficos; así como fragmentos; variantes; o derivados de estos. Los fragmentos de anticuerpo incluyen las partes del anticuerpo que se unen a un epítipo en el polipéptido de interés. Los ejemplos de dichos
 20 fragmentos incluyen fragmentos Fab y F(ab') generados mediante escisión enzimática de anticuerpos de longitud completa. Otros fragmentos de unión incluyen los generados mediante técnicas de ADN recombinante, tales como la expresión de plásmidos recombinantes que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican regiones variables de anticuerpo.

Los anticuerpos monoclonales se pueden modificar para su uso como productos
 25 terapéuticos o de diagnóstico. Una realización es un anticuerpo "quimérico" donde una parte de la cadena pesada (H) y/o cadena ligera (L) es idéntica u homóloga a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que la cadena o las cadenas restantes son idénticas u homólogas a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de otras
 30 especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos. También se incluyen fragmentos de dichos anticuerpos siempre que presenten la actividad biológica deseada. Véanse las patentes de EE. UU. n.º 4,816,567; Morrison *et al.*, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851-55.

En otra realización, un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo "humanizado". En la
 35 técnica se conocen métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Véanse las patentes de

EE. UU. n. ° 5,585,089 y 5,693,762. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos de una fuente que es no humana. Se puede realizar la humanización por ejemplo, usando métodos descritos en la técnica (Jones *et al.*, 1986, Nature 321: 522-25; Riechmann *et al.*, 1998, Nature 332: 323-27; Verhoeyen *et al.*, 1988, Science 239: 1534-36), sustituyendo al menos una parte de una región determinante de complementariedad de roedor para las regiones correspondientes de un anticuerpo humano.

La invención también abarca variantes y derivados de anticuerpos humanos (incluyendo fragmentos de anticuerpos) que se unen a TSLP. Usar animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena tales como anticuerpos se producen mediante inmunización con un antígeno polipéptido (es decir, con al menos 6 aminoácidos contiguos), opcionalmente conjugados con un portador. Véase, p. ej., Jakobovits *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 2551-55; Jakobovits *et al.*, 1993, Nature 362: 255-58; Bruggermann *et al.*, 1993, Year in Immuno. 7: 33. Véanse también la solíc. de PCT N.ºs PCT/US96/05928 y PCT/US93/06926. Se describen métodos adicionales en la patente de EE. UU. N.ºs 5.545.807, solíc. de PCT N° PCT/US91/245 y PCT/GB89/01207, y Patente Europea N° 546073B1 y 546073A1. Los anticuerpos humanos también se pueden producir mediante la expresión de ADN recombinante en células hospedadoras o mediante la expresión en células de hibridoma como se describe en la presente.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y/o variantes y derivados de anticuerpos quiméricos, injertados con CDR y humanizados se producen normalmente mediante métodos recombinantes. Se introducen ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos en células hospedadoras y se expresan usando materiales y procedimientos descritos en la presente. En una realización preferida, los anticuerpos se producen en células hospedadoras de mamífero, tales como células CHO. Los anticuerpos monoclonales (por ejemplo, humanos) se pueden producir mediante la expresión de ADN recombinante en células hospedadoras o mediante la expresión en células de hibridoma como se describe en la presente. Otros ejemplos de células de mamíferos incluyen líneas celulares inmortalizadas disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA), que incluyen, además de células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células 293 de riñón epitelial humano. Además, se pueden elegir líneas celulares o sistemas huésped apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento del tezepelumab o derivados de tezepelumab. Pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, la glucosilación y fosforilación del producto

génico. Estas incluyen células CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murino que no produce endógenamente ninguna cadena de inmunoglobulina funcional), SP20, CRL7030 y HsS78Bst. También se pueden usar líneas de células humanas desarrolladas inmortalizando linfocitos humanos. La línea celular humana PER.C6® (Janssen; Titusville, NJ) se puede utilizar también para producir anticuerpos monoclonales de forma recombinante.

A modo de ejemplo, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab que tienen los atributos moleculares descritos en el presente documento pueden obtenerse seleccionando un clon celular que expresa el tezepelumab o un derivado de tezepelumab que tiene los atributos moleculares. Pueden usarse métodos de ADN recombinante para producir tal tezepelumab o derivados de tezepelumab. Por ejemplo, el ADN que codifica la cadena pesada y la cadena ligera del tezepelumab o los derivados de tezepelumab pueden insertarse en un vector de expresión adecuado (o vectores, por ejemplo, un vector para la cadena pesada y otro para la cadena ligera), que se pueden transfectar en una célula huésped adecuada, tal como una célula de una línea celular de mamífero. Se conocen en la técnica vectores de expresión adecuados que contienen, por ejemplo, un polinucleótido que codifica el polipéptido tezepelumab unido a un promotor. El vector de expresión se puede transferir a una célula huésped mediante técnicas convencionales y las células transfectadas se pueden cultivar para producir los anticuerpos. Opcionalmente, las células hospedantes pueden modificarse por ingeniería para modular los atributos moleculares. Por ejemplo, para modular la fucosilación, las células competentes para la glicosilación pueden modificarse genéticamente para alterar la actividad de una fucosiltransferasa o un transportador de GDP-fucosa de Golgi. A modo de ejemplo, la ingeniería de líneas celulares para modular la glicosilación se describe en PCT Pub. n.º WO 2015/116315.

Pueden seleccionarse clones que produzcan tezepelumab o derivados de tezepelumab que comprenden los atributos moleculares relevantes. A modo de ejemplo, se puede realizar un método establecido basado en placas de microtitulación de generación y crecimiento de clones. Cientos de células heterogéneas agrupadas pueden clasificarse en cultivos unicelulares a través de procesos como la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o la dilución limitativa. Después de permitir que se recuperen en poblaciones sanas y estables, estas células derivadas clonalmente se pueden analizar y se eligen poblaciones seleccionadas para análisis adicionales. Para un análisis más detallado, las células clónicas pueden cultivarse en recipientes pequeños, como tubos de centrifugación, placas de 24 pocillos o placas de 96 pocillos profundos, que se cultivan en un “cultivo celular a pequeña escala” (por ejemplo, un proceso de 10 días alimentado por lotes). En este proceso a pequeña escala, periódicamente se añaden bolos de nutrientes y se obtienen diferentes medidas de crecimiento y viabilidad

celular. Cientos o incluso miles de estas culturas a pequeña escala pueden estar en paralelo. Al final del cultivo (por ejemplo, el décimo día), se recolectan las células para ensayos y análisis. Opcionalmente, el método basado en placa de microtitulación de generación y crecimiento de clones (por ejemplo, subclonación) puede sustituirse con el uso de una herramienta de
 5 detección automática o parcialmente automatizada de alto rendimiento y alto contenido, tal como el sistema optoelectrónico de generación y análisis de líneas celulares Berkeley Lights Beacon™, por ejemplo. Opcionalmente, pueden usarse métodos de selección de alto rendimiento y herramientas de aprendizaje automático para acelerar la selección de clones que producen los atributos moleculares relevantes (véase, por ejemplo, PCT Pub. N.º WO
 10 2020/223422).

El anticuerpo anti-TSLP tezepelumab se describe en la patente de EE. UU. n.º 7.982.016 y la solicitud de patente de EE. UU. n.º 15/951.602.

La proteína de unión al antígeno anti-TSLP (incluyendo fragmentos de la misma) útil en los presentes métodos comprende un anticuerpo anti-TSLP que comprende a. un dominio
 15 variable de cadena ligera que comprende: i. una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 3; ii. una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 4; iii. una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 5; y b. un dominio variable de cadena pesada que
 20 comprende: i. una secuencia de CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 6; ii. una secuencia de CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 7, y iii. una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8; en donde el anticuerpo o derivado de anticuerpo se une
 25 específicamente a un polipéptido TSLP tal como se expone en los aminoácidos 29-159 de SEQ ID NO: 2.

También se contempla un anticuerpo o derivado del anticuerpo que comprende a. un dominio variable de cadena ligera que se selecciona del grupo que consiste en: i. una secuencia de aminoácidos al menos 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 12; ii. una secuencia de aminoácidos
 30 codificada por una secuencia de polinucleótidos que es al menos 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 11; iii. una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido que se hibrida, en condiciones moderadamente estrictas, con el complemento de un polinucleótido que consiste en la SEQ ID NO: 11; y, b. un dominio variable de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en: i. una secuencia de aminoácidos al menos 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 10; ii.
 35 una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de polinucleótidos que es al menos

80 % idéntica a la SEQ ID NO: 9; iii. una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido que se hibrida, en condiciones moderadamente estrictas, con el complemento de un polinucleótido que consiste en la SEQ ID NO: 9; o c. un dominio variables de cadena ligera de (a) y un dominio variable de cadena pesada de (b), donde el anticuerpo o el derivado del anticuerpo se une específicamente a un polipéptido TSLP, tal como se establece en los aminoácidos 29-159 de la SEQ ID NO: 2.

Tezepelumab es un ejemplo de anticuerpo anti-TSLP con: a. un dominio variable de cadena ligera que comprende: i. una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 3; ii. una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 4; iii. una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 5; y b. un dominio variable de cadena pesada que comprende: i. una secuencia de CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 6; ii. una secuencia de CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 7, y iii. una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8.

Tezepelumab también comprende un dominio variable de cadena ligera con la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 12, codificada por una secuencia de polinucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 11; y un dominio variable de cadena pesada con la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 10, codificada por una secuencia de polinucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 9.

En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-TSLP o el derivado del anticuerpo de este es bivalente y se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo recombinante, un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, un anticuerpo de cadena simple, un anticuerpo monomérico, un diacuerpo, un triacuerpo, un fragmento Fab, un anticuerpo IgG1, un anticuerpo IgG2, un anticuerpo IgG3 y un anticuerpo IgG4.

En diversas realizaciones, el derivado de del anticuerpo anti-TSLP se selecciona del grupo que consiste en un diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, fragmento Fab, anticuerpo de un solo dominio, scFv, donde la dosis se ajusta de modo que los sitios de unión sean equimolares con respecto a los dosificados mediante anticuerpos bivalentes.

Se contempla que el anticuerpo o el derivado de del anticuerpo sea un anticuerpo IgG2. Los ejemplos de secuencias para una región constante de IgG2 humana se encuentran disponibles en la base de datos Uniprot como Uniprot número P01859, que se incorpora en la presente por referencia. La información, que incluye la información de las secuencias para otras

regiones constantes de cadena ligera y pesada de anticuerpos, también se encuentra disponible públicamente a través de la base de datos Uniprot, así como en otras bases de datos conocidas para los expertos en el área de la producción y modificación genética de anticuerpos. Tezepelumab es un anticuerpo IgG2. La secuencia de la cadena pesada y la cadena ligera de longitud completa de tezepelumab, incluyendo la cadena IgG2, se expone en SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente.

En determinadas realizaciones, los derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos glicosilados tetraméricos en donde la cantidad y/o el tipo de sitios de glicosilación se han alterado en comparación con las secuencias de aminoácidos de un polipéptido original. En determinadas realizaciones, las variantes comprenden una cantidad mayor o menor de sitios de glicosilación unidos a N que la proteína nativa. Como alternativa, las sustituciones que eliminan esta secuencia eliminarán una cadena de carbohidratos unidos a N existente. También se proporciona una reorganización de las cadenas de carbohidratos unidos a N existente en donde se eliminan uno o más sitios de glucosilación unidos a N (típicamente los de origen natural) y se crean uno o más sitios unidos a N nuevos. Las variantes de anticuerpos adicionales incluyen variantes de cisteína, en donde se eliminan uno o más residuos de cisteína o se sustituyen con otro aminoácido (por ejemplo, serina) en comparación con la secuencia de aminoácidos original. Las variantes de cisteína pueden ser útiles cuando los anticuerpos se deben plegar nuevamente en una conformación biológicamente activa tal como después del aislamiento de cuerpos de inclusión insolubles. Las variantes de cisteína generalmente tienen menos residuos de cisteína que la proteína nativa, y típicamente tienen un número par para minimizar las interacciones resultantes de cisteínas no emparejadas.

Los expertos en la técnica pueden determinar las sustituciones deseadas de aminoácidos (conservadoras o no conservadoras) en el momento que se deseen dichas sustituciones. En determinadas realizaciones, se pueden usar sustituciones de aminoácidos para identificar restos de anticuerpos importantes para el TSLP humano, o para aumentar o disminuir la afinidad de los anticuerpos con el TSLP humano descrito en la presente.

De acuerdo con determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos preferidas son las que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteraran las afinidades de unión, (4) inhiben la formación de especies de alto peso molecular (HMW) y/o (5) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o propiedades funcionales de tales polipéptidos. De acuerdo con determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos simples o múltiples (por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos conservadoras) pueden realizarse en la secuencia de origen natural (en determinadas realizaciones, en la parte del polipéptido fuera de los dominios que

forman contactos intermoleculares). En determinadas realizaciones, típicamente, una sustitución de aminoácidos conservadora no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (por ejemplo, una sustitución de aminoácidos no debería tender a romper la hélice que se manifiesta en la secuencia original, ni a desorganizar otros tipos de estructuras secundarias que caracterizan la secuencia original). Se describen ejemplos de estructuras polipeptídicas secundarias y terciarias reconocidas en la técnica en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton *et al.* *Nature* 354: 105 (1991), que se incorporan cada uno en el presente documento por referencia.

Métodos de elaboración

Las composiciones de tezepelumab de la divulgación pueden prepararse expresando de manera recombinante ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada y la cadena ligera en una célula hospedadora, purificando parcialmente o purificando tezepelumab de los cultivos de células hospedadoras o de lisados de células hospedadoras y analizando las composiciones resultantes para uno o más de los derivados de tezepelumab detallados en el presente documento, de acuerdo con los métodos descritos en más detalle a continuación.

Para la producción recombinante de tezepelumab o derivados de tezepelumab, uno o más ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada (por ejemplo, polipéptido de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10) y la cadena ligera (por ejemplo, polipéptido de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12) se insertan en uno o más vectores de expresión. El ácido nucleico que codifica la cadena pesada y el ácido nucleico que codifica la cadena ligera pueden insertarse en un solo vector de expresión o pueden insertarse en vectores de expresión separados. El término “vector de expresión” o “construcción de expresión”, tal como se utiliza en la presente, se refiere a una molécula de ADN recombinante que contiene una secuencia de codificación deseada y secuencias de control de ácidos nucleicos apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia de codificación operativamente vinculada en una célula huésped particular. Un vector de expresión puede incluir secuencias que afectan o controlan la transcripción, la traducción y en caso de que haya intrones presentes, afectan al corte y empalme del ARN de una región codificante unida operablemente al mismo. Las secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión en procariotas incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, un sitio de unión a ribosomas y posiblemente otras secuencias. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, potenciadores, y señales de terminación y poliadenilación. Una secuencia de péptido señal secretora también puede estar codificada, opcionalmente, por el vector de

expresión, unida operativamente a la secuencia codificante de interés, de modo que el polipéptido expresado pueda secretarse por la célula hospedadora recombinante, para un aislamiento más fácil del polipéptido de interés a partir de la célula, si se desea. Los vectores también pueden incluir uno o más genes marcadores de selección para facilitar la selección de las células hospedadoras en las que se han introducido los vectores. Los ácidos nucleicos a modo de ejemplo que codifican las cadenas pesada y ligera de tezepelumab, así como secuencias de péptido señal adecuadas y otros componentes para vectores de expresión para tezepelumab de expresión recombinante, se describen en la Patente de los EE.UU. 7.982.016, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad, y se expone en SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 11 en el presente documento.

Después de que se haya construido el vector de expresión y de que se hayan insertado las una o más moléculas de ácido nucleico que codifican los componentes de cadena pesada y ligera de tezepelumab o derivado del mismo en los sitios adecuados del vector o los vectores, pueden insertarse el vector o los vectores completados en una célula hospedadora adecuada para la amplificación y/o la expresión de polipéptido. La transformación de un vector de expresión para tezepelumab o derivado del mismo en una célula huésped seleccionada puede lograrse por métodos muy conocidos que incluyen la transfección, infección, coprecipitación con fosfato de calcio, electroporación, microinyección, lipofección, transfección mediada por DEAE-dextrano u otras técnicas conocidas. El método seleccionado será en parte una función del tipo de celda huésped que se utilizará. Estos métodos y otros métodos adecuados se conocen bien por el experto en la materia y se exponen, por ejemplo, en Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel *et al.* (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989).

Una célula huésped, cuando se cultiva en condiciones adecuadas, sintetiza tezepelumab o derivado del mismo que puede recolectarse posteriormente del medio de cultivo (si la célula hospedadora lo secreta en el medio) o directamente de la célula hospedadora que lo produce (si no se secreta). La selección de una célula huésped apropiada dependerá de varios factores, tales como los niveles de expresión deseados, las modificaciones de polipéptidos que son deseables o necesarias para la actividad (tales como glicosilación o fosforilación) y la facilidad de doblarse en una molécula biológicamente activa.

Las células huésped ejemplares incluyen procariote, levaduras o células de eucariote superiores. Las células huésped procariotas incluyen eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella*

typhimurium, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacillus*, tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *Pseudomonas*, y *Streptomyces*. Los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura son hospedadores de clonación o expresión adecuados para polipéptidos recombinantes. *Saccharomyces cerevisiae* o la levadura de cerveza común es el utilizado más comúnmente de entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, muchos de otros géneros, especies y cepas se pueden adquirir fácilmente y son útiles en el presente documento, tales como *Pichia*, por ejemplo, *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces*, *Yarrowia*; *Candida*; *Trichoderma reesia*; *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, hospedadores *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células hospedadoras para la expresión de anticuerpos glucosilados pueden proceder de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovíricas y las células huésped de insectos tolerantes correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Diversas cepas víricas para la transfección de tales células son de acceso público, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*.

Las células hospedadoras vertebradas también son hospedadores adecuados y la producción recombinante de anticuerpo a partir de dichas células se ha convertido en procedimiento rutinario. Las líneas celulares de mamíferos disponibles como huéspedes para la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC), incluyendo pero no limitado a células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHOK1 (ATCC CCL61), DXB-11, DG-44, y células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 77: 4216, 1980); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo en suspensión, (Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36: 59, 1977); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251, 1980); células renales de mono (CV1 ATCC CCL 70); células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células renales de canino (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); ATCC CCL células de hepatoma humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT

060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y Acad. Sci.* 383: 44-68, 1982); células MRC 5 o células FS4; células de mieloma de mamífero y varias líneas celulares diferentes. Las células CHO son, en algunas realizaciones, células hospedadoras preferidas para expresar tezepelumab o derivados del mismo.

5 Las células hospedadoras se transforman o transfectan con los vectores de expresión descritos anteriormente para la producción de tezepelumab o derivados del mismo y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea adecuado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las células hospedadoras usadas para producir tezepelumab o derivados del mismo pueden
10 cultivarse en una variedad de medios. Los medios comercializados tales como el medio de Ham F10 (Sigma), medio esencial mínimo (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58: 44, 1979; Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102: 255, 1980; Patentes de los Estados Unidos N.º 4,767,704; 4,657,866;
15 4,927,762; 4,560,655; o 5,122,469; documentos WO 90/03430; o WO 87/00195 pueden usarse como medios de cultivos para células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina
20 y timidina), antibióticos (tales como el fármaco Gentamycin™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario también puede ser incluido en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y
25 similares, son aquellas utilizadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para un experto.

Tras el cultivo de las células hospedadoras, puede producirse el anticuerpo intracelularmente, en el espacio periplásmico o secretarse directamente al medio. En caso de que el anticuerpo se produzca de manera intracelular, como primera etapa, se lisan las células
30 hospedadoras (por ejemplo, mediante cizalladura mecánica, choque osmótico o métodos enzimáticos) y los restos en partículas (por ejemplo, células hospedadoras y fragmentos lisados) se retiran, por ejemplo, mediante centrifugación, microfiltración o ultrafiltración. En caso de que el anticuerpo se secrete al medio de cultivo, el anticuerpo puede separarse de las células hospedadoras mediante centrifugación o microfiltración y opcionalmente, concentrarse
35 posteriormente mediante ultrafiltración. Tezepelumab o derivados del mismo puede purificarse

adicionalmente o purificarse parcialmente usando, por ejemplo, una o más etapas de cromatografía, tales como cromatografía de afinidad (por ejemplo, cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de interacción hidrófoba o cromatografía en modo mixto.

Una vez que se produce o se obtiene una composición de tezepelumab, puede evaluarse la composición en cuanto a la presencia y la cantidad de uno o más derivados de tezepelumab descritos en el presente documento, incluyendo los derivados de isomerización (incluyendo los productos intermedios de isomerización de los mismos), derivados de desamidación (incluyendo los productos intermedios de desamidación de los mismos), derivados de oxidación, derivados de glicosilación, derivados de isoforma de disulfuro y derivados de tamaño (por ejemplo, especies o fragmentos de HMW). Por consiguiente, la presente divulgación incluye métodos para evaluar la calidad de una composición de tezepelumab, que comprende obtener una composición de tezepelumab que contiene tezepelumab y uno o más derivados de tezepelumab; medir la cantidad de uno o más derivados de tezepelumab en la composición; comparar la cantidad medida de uno o más derivados de tezepelumab con un criterio de referencia predeterminado; y preparar una formulación farmacéutica o producto farmacéutico de la composición de tezepelumab si la comparación indica que se cumple el criterio de referencia predeterminado. En algunas realizaciones, los métodos comprenden uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete de: (1) medir la cantidad de derivados de isomerización (incluyendo productos intermedios de isomerización de los mismos) en la composición, (2) medir la cantidad de derivados de desamidación (incluyendo productos intermedios de desamidación de los mismos) en la composición, (3) medir la cantidad de derivados de oxidación en la composición, (4) medir la cantidad de derivados de glicosilación en la composición, (5) medir la cantidad de derivados de isoforma de disulfuro en la composición, (6) medir la cantidad de especies de HMW en la composición, y/o (7) medir la cantidad de fragmentos en la composición. En determinadas realizaciones, se realizan todas las siete medidas en una composición de tezepelumab.

El criterio de referencia predeterminado para cada derivado de tezepelumab puede ser una cantidad umbral o un rango de cantidades del derivado que no afecte significativamente la potencia y/o la tolerabilidad de la composición de tezepelumab, por ejemplo, activación inducida del receptor TSLP. Por ejemplo, el criterio de referencia predeterminado para cada derivado de tezepelumab puede ser cualquiera de los límites o rangos dados a conocer en el presente documento para cada uno de los derivados, ya que las composiciones de tezepelumab con estos límites/rango de los derivados tenían una potencia y/o tolerabilidad comparables a las

composiciones de tezepelumab evaluadas en ensayos clínicos y ha demostrado tener eficacia clínica. Se apreciará que los criterios de referencia predeterminados descritos en el presente documento pueden especificarse antes del comienzo de un método como se describe en el presente documento.

5 En ciertas realizaciones de los métodos, en caso de que la cantidad medida del derivado de tezepelumab en la composición cumpla con el criterio de referencia predeterminado, puede clasificarse la composición de tezepelumab como aceptable y avanzar a la etapa siguiente en el proceso de fabricación o distribución, tal como, por ejemplo, preparando una formulación farmacéutica de la composición (por ejemplo, mediante combinación con uno o más excipientes o diluyentes); preparando un producto farmacéutico de la composición (por ejemplo, rellenando
10 viales, jeringas, autoinyectores u otros recipientes o dispositivos de suministro); empaquetando la composición con instrucciones de uso, diluyentes y/o dispositivos de suministro; o liberando la composición para venta comercial o para su envío a distribuidores. En algunas realizaciones de los métodos, se prepara una formulación farmacéutica de la composición de tezepelumab en caso de que la cantidad medida del derivado de tezepelumab cumpla con el criterio de
15 referencia predeterminado. En otras realizaciones de los métodos, se prepara un producto farmacéutico de la composición de tezepelumab en caso de que la cantidad medida del derivado de tezepelumab cumpla con el criterio de referencia predeterminado. Los métodos para preparar formulaciones farmacéuticas y productos farmacéuticos de composiciones de tezepelumab se describen con más detalle a continuación. En caso de que la cantidad medida del derivado de
20 tezepelumab en la composición no cumpla con el criterio de referencia predeterminado, en algunas realizaciones de los métodos, la composición de tezepelumab puede clasificarse como no aceptable y desecharse, destruirse o someterse a etapas de fabricación adicionales, tales como purificación adicional para retirar o reducir la cantidad del derivado de tezepelumab en la
25 composición, de tal forma que se cumple el criterio de referencia predeterminado.

 En una realización, los métodos para evaluar la calidad de una composición de tezepelumab comprenden obtener una composición de tezepelumab que contiene tezepelumab y derivados de tezepelumab de isomerización (incluyendo productos intermedios de isomerización de los mismos); medir la cantidad de los derivados de isomerización en la
30 composición; comparar la cantidad medida de los derivados de isomerización con un criterio de referencia predeterminado; y preparar una formulación farmacéutica o producto farmacéutico de la composición de tezepelumab si la comparación indica que se cumple el criterio de referencia predeterminado. El criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de isomerización en una composición de tezepelumab puede ser menos de
35 aproximadamente el 30%, por ejemplo, menos de aproximadamente el 25%, aproximadamente

el 20% o menos, aproximadamente el 17% o menos, aproximadamente el 15% o menos, aproximadamente el 12% o menos, aproximadamente el 10% o menos, aproximadamente el 8% o menos, aproximadamente el 6% o menos, o aproximadamente el 4% o menos. En una realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de isomerización en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 15% o menos. En otra realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de isomerización en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 13% o menos. En otra realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de isomerización en una composición de tezepelumab es menos de aproximadamente el 10%, aproximadamente el 8%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 3% o aproximadamente el 2%. En algunas realizaciones, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de isomerización en una composición de tezepelumab puede ser un rango de cantidades, por ejemplo, desde aproximadamente el 0.5% hasta aproximadamente el 13% de una composición de tezepelumab, desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 10% de una composición de tezepelumab, o desde aproximadamente el 0.5% hasta aproximadamente el 5% de una composición de tezepelumab. En otra realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivado de isomerización en una composición de tezepelumab es menos de aproximadamente el 5%, 4%, 3%, 2% o el 1% de isomerización en D54 de SEQ ID NO: 7 en cualquiera o ambas cadenas de región variable. En diversas realizaciones, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivado de isomerización en una composición de tezepelumab es menos de aproximadamente el 13%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 8%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 3% o aproximadamente el 2% de isomerización en una o más de D49, D50 o D52 de SEQ ID NO: 4. En determinadas realizaciones, se mide la cantidad de derivados de isomerización en una composición de tezepelumab mediante mapeo de péptidos reducido.

En una realización, los métodos para evaluar la calidad de una composición de tezepelumab comprenden obtener una composición de tezepelumab que contiene tezepelumab y derivados de desamidación de tezepelumab (incluyendo productos intermedios de desamidación de los mismos); medir la cantidad de los derivados de desamidación en la composición; comparar la cantidad medida de los derivados de desamidación con un criterio de referencia predeterminado; y preparar una formulación farmacéutica o producto farmacéutico de la composición de tezepelumab si la comparación indica que se cumple el criterio de referencia predeterminado. El criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de desamidación en una composición de tezepelumab puede ser menos de aproximadamente el 15%, por ejemplo aproximadamente el 13% o menos, aproximadamente

el 10% o menos, aproximadamente el 8% o menos, aproximadamente el 6% o menos, aproximadamente el 4% o menos, aproximadamente el 3% o menos, aproximadamente el 2% o menos, o aproximadamente el 1% o menos. En una realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de desamidación en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 7% o menos. En otra realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivado de desamidación sin una composición de tezepelumab es de aproximadamente el 5% o menos. En otra realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de desamidación en una composición de tezepelumab es de aproximadamente el 2% o menos. En algunas realizaciones, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de desamidación en una composición de tezepelumab puede ser un rango de cantidades, por ejemplo, desde aproximadamente el 0.4% hasta aproximadamente el 10% de una composición de tezepelumab, desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 7% de una composición de tezepelumab, o desde aproximadamente el 0.1% hasta aproximadamente el 4% de una composición de tezepelumab. En diversas realizaciones, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de desamidación en una composición de tezepelumab es menos de aproximadamente el 3% de desamidación en N25/N26 en LCDR1 expuesta en SEQ ID NO: 3. En diversas realizaciones, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de desamidación en una composición de tezepelumab es menos de aproximadamente el 13% de desamidación en N316 en la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 13, y/o N385/390 en la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 13. En determinadas realizaciones, se mide la cantidad de derivados de desamidación en una composición de tezepelumab mediante mapeo de péptidos reducido.

En una realización, los métodos para evaluar la calidad de una composición de tezepelumab comprenden obtener una composición de tezepelumab que contiene tezepelumab y derivados de oxidación de tezepelumab; medir la cantidad de los derivados de oxidación en la composición; comparar la cantidad medida de los derivados de oxidación con un criterio de referencia predeterminado; y preparar una formulación farmacéutica o producto farmacéutico de la composición de tezepelumab si la comparación indica que se cumple el criterio de referencia predeterminado. El criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de oxidación en una composición de tezepelumab puede ser menos de aproximadamente el 7% o menos, aproximadamente el 6% o menos, aproximadamente el 4% o menos, aproximadamente el 3% o menos, aproximadamente el 2% o menos, o aproximadamente el 1% o menos. En una realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de oxidación en una composición de tezepelumab es

aproximadamente el 7% o menos. En otra realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de oxidación en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 5% o menos. En otra realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de oxidación en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 3% o menos. En algunas realizaciones, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de oxidación en una composición de tezepelumab puede ser un rango de cantidades, por ejemplo, desde aproximadamente el 0.1% hasta aproximadamente el 7% de una composición de tezepelumab, desde aproximadamente el 0.4% hasta aproximadamente el 5% de una composición de tezepelumab, o desde aproximadamente el 0.8% hasta aproximadamente el 3% de una composición de tezepelumab. En otra realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de oxidación en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 7% o menos de oxidación en W102 en HCDR3 expuesta en SEQ ID NO: 8, o aproximadamente el 6% o menos, o aproximadamente el 5% o menos, o aproximadamente el 3% o menos. En determinadas realizaciones, se mide la cantidad de derivados de oxidación en una composición de tezepelumab mediante mapeo de péptidos reducido.

En una realización, los métodos para evaluar la calidad de una composición de tezepelumab comprenden obtener una composición de tezepelumab que contiene tezepelumab y derivados de glicosilación de tezepelumab; medir la cantidad de los derivados de glicosilación en la composición; comparar la cantidad medida de los derivados de glicosilación con un criterio de referencia predeterminado; y preparar una formulación farmacéutica o producto farmacéutico de la composición de tezepelumab si la comparación indica que se cumple el criterio de referencia predeterminado. El criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de glicosilación en una composición de tezepelumab puede ser menos de aproximadamente el 40%, por ejemplo aproximadamente el 35% o menos, aproximadamente el 30% o menos, aproximadamente el 25% o menos, aproximadamente el 20% o menos, aproximadamente el 17% o menos, aproximadamente el 15% o menos, aproximadamente el 12% o menos, aproximadamente el 10% o menos, aproximadamente el 8% o menos, aproximadamente el 6% o menos, o aproximadamente el 4% o menos. En una realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de glicosilación en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 30% o menos. En otra realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de glicosilación en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 20% o menos. En otra realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de glicosilación en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 15% o menos. En otra realización, el

criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de glicosilación en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 10% o menos. En algunas realizaciones, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de glicosilación en una composición de tezepelumab puede ser un rango de cantidades, por ejemplo, desde

5 aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 40% de una composición de tezepelumab, desde aproximadamente el 4% hasta aproximadamente el 30% de una composición de tezepelumab, desde aproximadamente el 2% hasta aproximadamente el 20% de una composición de tezepelumab, o desde aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 15% de una composición de tezepelumab. En diversas realizaciones, el criterio de referencia

10 predeterminado para la cantidad de derivados de glicosilación en una composición de tezepelumab es glicosilación con alto contenido de manosa en la composición de aproximadamente el 17% o menos, aproximadamente el 15% o menos, aproximadamente el 12% o menos, aproximadamente el 10% o menos, aproximadamente el 8% o menos, aproximadamente el 5% o menos, o aproximadamente el 4% o menos. En varias realizaciones,

15 el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de glicosilación en una composición de tezepelumab es la glicosilación alta de manosa en la composición de aproximadamente 25% o menos, aproximadamente 23% o menos (por ejemplo, aproximadamente 23.1% o menos), aproximadamente 21% o menos, aproximadamente 19% o menos, aproximadamente 17% o menos, aproximadamente 15% o menos, aproximadamente

20 12% o menos, aproximadamente 10% o menos, aproximadamente 8% o menos, aproximadamente 6% o menos, aproximadamente 5% o menos, o aproximadamente 4% o menos. En varias realizaciones, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de glicosilación en una composición de tezepelumab es la glicosilación alta de manosa en la composición de aproximadamente 23.1% o menos. En diversas realizaciones, el

25 criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de glicosilación en una composición de tezepelumab es galactosilación en la composición de aproximadamente el 30% o menos, aproximadamente el 25% o menos, aproximadamente el 20% o menos, aproximadamente el 17% o menos, aproximadamente el 15% o menos, aproximadamente el 12% o menos, aproximadamente el 10% o menos, aproximadamente el 8% o menos,

30 aproximadamente el 5% o menos, o aproximadamente el 4% o menos. En diversas realizaciones, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de glicosilación en una composición de tezepelumab es glicosilación afucosilada de aproximadamente el 5% o menos, aproximadamente el 4% o menos, aproximadamente el 3% o menos, aproximadamente el 2% o menos, aproximadamente el 1% o menos. En determinadas

realizaciones, se mide la cantidad de derivados de glicosilación en una composición de tezepelumab mediante mapeo de glucano.

En una realización, los métodos para evaluar la calidad de una composición de tezepelumab comprenden obtener una composición de tezepelumab que contiene tezepelumab y derivados de tezepelumab de isoforma de disulfuro; medir la cantidad de los derivados de isoforma de disulfuro en la composición; comparar la cantidad medida de la isoforma de disulfuro con un criterio de referencia predeterminado; y preparar una formulación farmacéutica o producto farmacéutico de la composición de tezepelumab si la comparación indica que se cumple el criterio de referencia predeterminado. El criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de isoforma de disulfuro en una composición de tezepelumab puede ser menos de aproximadamente el 75%, por ejemplo aproximadamente el 70% o menos, aproximadamente el 65% o menos, aproximadamente el 55% o menos, aproximadamente el 50% o menos, aproximadamente el 45% o menos, aproximadamente el 40% o menos, aproximadamente el 35% o menos, aproximadamente el 30% o menos, aproximadamente el 25% o menos, aproximadamente el 20% o menos, aproximadamente el 17% o menos, aproximadamente el 15% o menos, aproximadamente el 12% o menos, aproximadamente el 10% o menos, aproximadamente el 8% o menos, aproximadamente el 6% o menos, o aproximadamente el 4% o menos. En una realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de isoforma de disulfuro en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 50% o menos. En una realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de isoforma de disulfuro en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 35% o menos. En una realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de isoforma de disulfuro en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 25% o menos. En una realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de isoforma de disulfuro en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 15% o menos. En otra realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de isoforma de disulfuro en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 10% o menos. En otra realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de isoforma de disulfuro en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 8% o menos. En algunas realizaciones, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de isoforma de disulfuro en una composición de tezepelumab puede ser un rango de cantidades, por ejemplo, desde aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 70% de una composición de tezepelumab, desde aproximadamente el 15% hasta aproximadamente el 50% de una composición de tezepelumab, o desde aproximadamente el 20% hasta aproximadamente el 40% de una composición de tezepelumab.

En una realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de isoforma de disulfuro en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 50% o menos de isoforma de IgG2-A/B. En una realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de derivados de isoforma de disulfuro en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 5% o menos de isoforma de IgG2-B. En determinadas realizaciones, se mide la cantidad de derivados de isoforma de disulfuro en una composición de tezepelumab mediante HPLC de fase inversa.

En otra realización, los métodos para evaluar la calidad de una composición de tezepelumab comprenden obtener una composición de tezepelumab que contiene tezepelumab y especies de HMW de tezepelumab; medir la cantidad de las especies de HMW en la composición; comparar la cantidad medida de las especies de HMW con un criterio de referencia predeterminado; y preparar una formulación farmacéutica o producto farmacéutico de la composición de tezepelumab si la comparación indica que se cumple el criterio de referencia predeterminado. El criterio de referencia predeterminado para la cantidad de especies de HMW en una composición de tezepelumab puede ser menos de aproximadamente el 20%, por ejemplo aproximadamente el 15% o menos, aproximadamente el 12% o menos, aproximadamente el 10% o menos, aproximadamente el 9% o menos, aproximadamente el 8% o menos, aproximadamente el 7% o menos, aproximadamente el 6% o menos, aproximadamente el 5% o menos o aproximadamente el 4% o menos. El criterio de referencia predeterminado para la cantidad de especies de HMW en una composición de tezepelumab puede ser menos de aproximadamente el 3.0%, por ejemplo aproximadamente el 2.5% o menos, aproximadamente el 2.4% o menos, aproximadamente el 2.3% o menos, aproximadamente el 2.2% o menos, aproximadamente el 2.1% o menos, aproximadamente el 2.0% o menos, aproximadamente el 1.8% o menos, aproximadamente el 1.6% o menos, aproximadamente el 1.4% o menos, aproximadamente el 1.2% o menos, aproximadamente el 1.0% o menos, aproximadamente el 0.8% o menos, aproximadamente el 0.6% o menos, o aproximadamente el 0.4% o menos. En una realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de especies de HMW en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 2.5% o menos. En otra realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de especies de HMW en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 1.7% o menos. En otra realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de especies de HMW en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 1.4% o menos. Aún en otra realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de especies de HMW en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 1.2% o menos. En otra realización más, el criterio de referencia

predeterminado para la cantidad de especies de HMW en una composición de tezepelumab es de aproximadamente un 0.6% o menor. El criterio de referencia predeterminado para la cantidad de especies de HMW en una composición de tezepelumab puede, en algunas realizaciones, ser un rango de cantidades, por ejemplo desde aproximadamente el 0.3% hasta aproximadamente el 2.4% de una composición de tezepelumab, desde aproximadamente el 0.6% hasta aproximadamente el 2.1% de una composición de tezepelumab, desde aproximadamente el 0.4% hasta aproximadamente el 1.2% de una composición de tezepelumab, o desde aproximadamente el 0.6% hasta aproximadamente el 1.4% de una composición de tezepelumab. En determinadas realizaciones, se mide la cantidad de especies de HMW en una composición de tezepelumab mediante SE-HPLC, por ejemplo, mediante SE-UHPLC, SE-HPLC-SLS, o ultracentrifugación con velocidad de sedimentación (SV-AUC).

En otra realización, los métodos para evaluar la calidad de una composición de tezepelumab comprenden obtener una composición de tezepelumab que contiene tezepelumab y fragmentos (por ejemplo, LMW o MMW) de tezepelumab; medir la cantidad de los fragmentos en la composición; comparar la cantidad medida de los fragmentos con un criterio de referencia predeterminado; y preparar una formulación farmacéutica o producto farmacéutico de la composición de tezepelumab si la comparación indica que se cumple el criterio de referencia predeterminado. El criterio de referencia predeterminado para la cantidad de especies de HMW en una composición de tezepelumab puede ser aproximadamente el 15% o menos, aproximadamente el 12% o menos, aproximadamente el 10% o menos, aproximadamente el 9% o menos, aproximadamente el 8% o menos, aproximadamente el 7% o menos, aproximadamente el 6% o menos, aproximadamente el 5% o menos o aproximadamente el 4% de menos. El criterio de referencia predeterminado para la cantidad de fragmentos en una composición de tezepelumab puede ser menos de aproximadamente el 3.0%, por ejemplo, aproximadamente el 2.5% o menos, aproximadamente el 2.4% o menos, aproximadamente el 2.3% o menos, aproximadamente el 2.2% o menos, aproximadamente el 2.1% o menos, aproximadamente el 2.0% o menos, aproximadamente el 1.8% o menos, aproximadamente el 1.6% o menos, aproximadamente el 1.4% o menos, aproximadamente el 1.2% o menos, aproximadamente el 1.0% o menos, aproximadamente el 0.8% o menos, aproximadamente el 0.6% o menos, o aproximadamente el 0.4% o menos. En una realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de fragmentos en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 2.5% o menos. En otra realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de fragmentos en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 1.7% o menos. En otra realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de fragmentos en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 1.4% o menos. Aún

en otra realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de fragmentos en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 1.2% o menos. Todavía en otra realización, el criterio de referencia predeterminado para la cantidad de fragmentos en una composición de tezepelumab es aproximadamente el 0.6% o menos. El criterio de referencia predeterminado para la cantidad de fragmentos en una composición de tezepelumab puede, en algunas realizaciones, ser un rango de cantidades, por ejemplo, desde aproximadamente el 0.3% hasta aproximadamente el 2.4% de una composición de tezepelumab, desde aproximadamente el 0.6% hasta aproximadamente el 2.1% de una composición de tezepelumab, desde aproximadamente el 0.4% hasta aproximadamente el 1.2% de una composición de tezepelumab, o desde aproximadamente el 0.6% hasta aproximadamente el 1.4% de una composición de tezepelumab. En determinadas realizaciones, se mide la cantidad de fragmentos en una composición de tezepelumab mediante rCE-SDS.

En ciertas realizaciones de los métodos de la invención, los métodos comprenden:

- (a) obtener una composición de tezepelumab que contiene tezepelumab y uno o más derivados de tezepelumab, en donde los derivados de tezepelumab comprenden derivados de isomerización, derivados de desamidación, derivados de oxidación, glicosilación v, derivados de isoforma de disulfuro, especies de HMW, fragmentos o combinaciones de los mismos;
- (b) evaluar la composición de tezepelumab realizando uno o más de los siguientes:
 - (i) medir la cantidad de derivados de isomerización en la composición mediante mapeo de péptidos reducido y comparar la cantidad medida con un criterio de referencia predeterminado de aproximadamente el 30% o menos;
 - (ii) medir la cantidad de derivados de desamidación en la composición mediante mapeo de péptidos reducido y comparar la cantidad medida con un criterio de referencia predeterminado de aproximadamente el 15% o menos;
 - (iii) medir la cantidad de derivados de oxidación en la composición mediante mapeo de péptidos reducido y comparar la cantidad medida con un criterio de referencia predeterminado de aproximadamente el 7% o menos;
 - (iv) medir la cantidad de derivados de glicosilación en la composición mediante mapeo de glucano y comparar la cantidad medida con un criterio de referencia predeterminado de aproximadamente el 40% o menos;
 - (vi) medir la cantidad de derivados de isoforma de disulfuro en la composición mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa no reducida (RP-HPLC) y comparar la cantidad medida con un criterio de referencia predeterminado de aproximadamente el 75% o menos;

(vi) medir la cantidad de especies de HMW en la composición mediante los picos previos en SE-HPLC y comparar la cantidad medida con un criterio de referencia predeterminado de aproximadamente el 20% o menos; y/o

5 (vii) medir la cantidad de fragmentos en la composición mediante los picos previos en rCE-SDS y comparar la cantidad medida con un criterio de referencia predeterminado de aproximadamente el 15% o menos

y

10 (c) preparar una formulación farmacéutica o un producto farmacéutico de la composición de tezepelumab en caso de que la comparación o las comparaciones en la etapa (b) indiquen que se cumple el criterio/los criterios de referencia predeterminados. En algunas realizaciones, se realizan todas las etapas (b)(i), (b)(ii), (b)(iii), (b)(iv), b)(v), (b)(vi), y b)(vii). En otras realizaciones, se realizan solo las etapas (b)(vi) y (b)(vii). En determinadas realizaciones, se realizan las etapas (b)(iv), (b)(vi) y (b)(vii).

Identificación de atributos que contribuyen a la unión a proteínas

15 Con el fin de determinar los atributos que contribuyen a la actividad y la unión a proteínas, el anticuerpo anti-TSLP tezepelumab, tal como se describe en el presente documento, se coloca en una condición que conduce a un cambio en su estructura, por ejemplo, un cambio en la estructura de un aminoácido del componente terapéutico de proteína, lo que conduce a la formación de un derivado de la proteína terapéutica. En aspectos ejemplares, la

20 estructura cambiada de un aminoácido se conoce como un “atributo” y puede caracterizarse en términos de su identidad química o tipo de atributo y ubicación dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína de unión al antígeno, por ejemplo, la posición del aminoácido en el que está presente el atributo. Por ejemplo, los restos de asparagina y glutamina son susceptibles de desamidación. Una asparagina desamidada en la posición 10 de una secuencia

25 de aminoácidos de proteína es un ejemplo de un atributo. En la Tabla A. se proporciona una lista de tipos de atributos ejemplares para determinados aminoácidos. Como tal, una “estructura” tal como se utiliza en la presente puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en un tipo de atributo enumerado en la Tabla A, o una combinación de dos o más tipos de atributos enumerados en la Tabla A. Se entenderá que los atributos son ejemplos de estructuras, y a

30 menos que se indique lo contrario, dondequiera que una “estructura” se mencione en la presente, un atributo se contempla como un ejemplo de la estructura. Por ejemplo, las especies de alto peso molecular (HMW) y los fragmentos también son ejemplos de atributos.

Tabla A

<u>Tipo de atributo ilustrativo</u>	<u>Resto de aminoácido</u>
desamidación	Asn, Gln

5	desaminación	Glu, Ser, Gly
	glucación, hidroxilisina	Lys
	glicosilación	Asn
	ciclación	Gln N-terminal, Glu N-terminal
	oxidación	Met, Trp, His
	isomerización	Asp
	fragmentación/recorte	Asp/Pro

Como inmunoglobulina o fragmento de la misma, la proteína de unión a anticuerpos o antígenos, tal como tezepelumab, comprende múltiples aminoácidos, un anticuerpo o proteína de unión a antígenos descritos en este documento puede tener más de un atributo (por ejemplo, más de un aminoácido que tenga una estructura cambiada) y puede describirse en términos de su perfil de atributos. Tal como se utiliza en la presente, el término “perfil de atributo” se refiere a una lista de los atributos de una proteína de unión a antígenos. En diversos casos, el perfil de atributos proporciona la identidad química o el tipo de atributo, por ejemplo, desamidación, opcionalmente, con respecto a la estructura nativa de la proteína terapéutica. En diversos casos, el perfil de atributos proporciona la ubicación del atributo, por ejemplo, la posición del aminoácido en el que está presente el atributo. Un perfil de atributos en algunos aspectos proporciona una descripción de todos los atributos presentes en la proteína de unión a antígeno. En otros aspectos, un perfil de atributos proporciona una descripción de un subconjunto de atributos presentes en la proteína. Por ejemplo, un perfil de atributos puede proporcionar solo aquellos atributos que están presentes en una porción particular de la proteína, por ejemplo, la región constante, la región variable, las CDR (tales como las tres CDR de cadena ligera y las tres CDR de cadena pesada). Una especie de una proteína terapéutica tal como un anticuerpo o una proteína de unión a antígeno se caracteriza por los atributos presentes en la proteína. Una especie de anticuerpo o proteína de unión a antígeno puede diferir de otra especie de la misma proteína por tener un perfil de atributos diferente. Cuando dos proteínas terapéuticas tienen perfiles de atributos distintos, las proteínas terapéuticas representan dos especies distintas o derivados de la proteína terapéutica. Cuando dos proteínas terapéuticas tienen perfiles de atributos idénticos, las proteínas terapéuticas se consideran la misma especie o derivado de la proteína terapéutica.

En diversos casos, la inmunoglobulina, el anticuerpo o la proteína de unión a antígeno se colocan en una condición que conduce a un cambio en su estructura, por ejemplo, la formación de uno o más atributos, y el cambio en la estructura puede alterar la afinidad de la proteína terapéutica por su diana. En varios aspectos, la inmunoglobulina, el anticuerpo o la proteína de unión a antígeno se colocan en una condición que conduce a un cambio en su

estructura, por ejemplo, la formación de uno o más atributos, y el cambio en la estructura reduce la afinidad de la proteína de unión a antígeno por su diana. La afinidad reducida en algunos aspectos conduce a una pérdida parcial o total de la capacidad de la inmunoglobulina, el anticuerpo o la proteína de unión a antígeno para interactuar con (por ejemplo, unirse a) una diana. En varios casos, la pérdida parcial o total de la capacidad de la inmunoglobulina, anticuerpo o proteína de unión al antígeno para interactuar con (por ejemplo, unirse a) un objetivo reduce en última instancia la eficacia de la proteína de unión al antígeno. En casos alternativos, la inmunoglobulina, el anticuerpo o la proteína de unión al antígeno se colocan en una condición que conduce a un cambio en su estructura, por ejemplo, la formación de uno o más atributos, y el cambio en la estructura no altera la afinidad de la inmunoglobulina, el anticuerpo o proteína de unión a antígeno para su diana. En diversos aspectos, el cambio de estructura no reduce la afinidad de la proteína por su diana. Sin quedar ligados a teoría particular alguna, los métodos de la presente divulgación distinguen ventajosamente con precisión y exactitud los atributos de una inmunoglobulina, anticuerpo o proteína de unión a antígeno que afectan una interacción entre la inmunoglobulina, anticuerpo o proteína de unión a antígeno y el objetivo de los atributos que no afectan la interacción.

En diversos aspectos, una composición del presente documento comprende una población de especies o derivados de la inmunoglobulina, proteína de unión a antígeno o fragmento de la misma, o anticuerpo o fragmento de la misma. En diversos casos, la población es una población homogénea de inmunoglobulina, proteína de unión a antígeno o fragmento de la misma, o anticuerpo o fragmento de la misma, opcionalmente, cada una de las proteínas presentes en la muestra de la composición es la misma especie o derivado. En diversos casos, la población es una población heterogénea que comprende al menos dos especies diferentes o derivados de la inmunoglobulina, proteína de unión a antígeno o fragmento de la misma, o anticuerpo o fragmento del mismo que tiene un atributo descrito en el presente documento. En diversos aspectos, la población heterogénea comprende al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7 o más especies diferentes o derivados de la inmunoglobulina, proteína de unión a antígeno o fragmento de la misma, o anticuerpo o fragmento del mismo. Opcionalmente, la población heterogénea comprende más de 7, más de 8, más de 9, más de 10, más de 20, más de 30, más de 40, más de 50 especies distintas o derivados de la proteína. Cada especie o derivado de la población en algunos aspectos tiene un perfil de atributos exclusivo. En casos a modo de ejemplo, las especies de inmunoglobulina, proteína de unión a antígeno o fragmento de la misma, o anticuerpo o fragmento de la misma son las únicas proteínas presentes en la composición. En algunos aspectos, la composición comprende (i) la población de inmunoglobulina, proteína de unión a antígeno o fragmento de la

misma, o anticuerpo o fragmento de la misma inmunoglobulina, proteína de unión al antígeno o fragmento de la misma, o anticuerpo o fragmento de la misma y (ii) un portador, diluyente, excipiente farmacéuticamente aceptable o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, al menos el 80%, 85%, 90%, 95% o el 99% de inmunoglobulina, proteína de unión a antígeno o fragmento de la misma, o anticuerpo o fragmento de la misma de la población heterogénea comprende un atributo tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, no más del 20%, 15%, 10%, 5%, o el 1% de inmunoglobulina, proteína de unión a antígeno o fragmento de la misma, o anticuerpo o fragmento de la misma de la población heterogénea comprende un atributo tal como se describe en el presente documento.

10 Separación

En realizaciones ejemplares, la presente divulgación comprende métodos para separar una mezcla que comprende diferentes especies del antígeno en al menos dos fracciones. En algunos aspectos, la mezcla se separa en múltiples (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más) fracciones. En algunos aspectos, la etapa de separación de los métodos actualmente divulgados conserva el plegamiento nativo, la estructura de orden superior y la capacidad de unión de la proteína de unión a antígeno y su diana. En varios aspectos, la mezcla se separa en una fracción no unida que comprende proteínas u objetivos de unión de antígeno o anticuerpo no unido y una fracción unida comprende complejos de proteína-objetivo de unión a antígeno/anticuerpo.

Se conocen en la técnica métodos y técnicas adecuados para separar mezclas en fracciones. Véase, por ejemplo, Coskun, North Clin Istanb 3(2): 156-160 (2016); Snyder *et al.*, Practical HPLC Method Development, 2ª ed., John Wiley & Sons, Inc. 1997; Snyder *et al.*, Introduction to Modern Liquid Chromatography, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2010; Heftmann, Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods, 6ª ed., Volumen 69A, Elsevier, Ámsterdam, Países Bajos, 2004; Mori y Barth, Size Exclusion Chromatography, Springer-Verlag, Berlín, 1999. En algunos aspectos, la separación se basa en la carga, tal como, por ejemplo, la cromatografía de intercambio iónico, el enfoque isoeléctrico capilar (cIEF) y/o la electroforesis de zona capilar (CZE) o se basa en la hidrofobicidad, tal como, por ejemplo, la separación en fase inversa (RP; por ejemplo, RP-HPLC) y la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC-HPLC). En diversos aspectos, la separación se basa en el tamaño tal como, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC; por ejemplo, SE-HPLC), electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), electroforesis capilar con dodecilsulfato de sodio (CE-SDS). Los métodos descritos en el presente documento se utilizan para detectar la oxidación de producto de restos Met o Trp, la fragmentación/recorte, la isomerización de Asp, la desamidación, la

formación de ácido piroglutámico en el extremo N. En diversas realizaciones, la mezcla se separa en al menos dos fracciones usando una técnica que separa los componentes de una mezcla según el tamaño, la carga, la hidrofobicidad, la afinidad por una molécula de captura o una combinación de los mismos. En diversos casos, la técnica es cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía de afinidad, precipitación usando perlas o células, fraccionamiento de flujo libre (FFF), cromatografía de intercambio iónico (IEX), cromatografía de intercambio catiónico (CEX), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) o ultracentrifugación (UC). Opcionalmente, la mezcla se separa en al menos dos fracciones usando una técnica que separa los componentes de una mezcla basándose en el tamaño, opcionalmente, en donde la técnica es cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

En diversos aspectos, la mezcla se separa en al menos dos fracciones usando una técnica que separa los componentes de una mezcla basándose en la afinidad por una molécula de captura unida a un soporte sólido, opcionalmente, una perla o una célula. En diversos casos, la mezcla se separa (i) añadiendo la mezcla a un recipiente, por ejemplo, un tubo, que comprende perlas unidas a la molécula de captura o células que expresan en su superficie la molécula de captura, (ii) centrifugando el recipiente (por ejemplo, un tubo) para obtener un sobrenadante y un sedimento, (iii) recolectando el sobrenadante del sedimento para obtener la fracción no unida, (iv) liberando la fracción unida del sedimento con una solución, (v) centrifugando el recipiente (por ejemplo, un tubo) que comprende el sedimento y la solución para obtener un segundo sobrenadante que comprende la fracción unida y un segundo sedimento que comprende las perlas o células, y (vi) recolectando el segundo sobrenadante para obtener la fracción unida. En algunos aspectos la mezcla se separa (i) añadiendo la mezcla a una columna que comprende perlas unidas a la molécula de captura para obtener un flujo continuo y una fracción unida (ii) recolectando el flujo continuo para obtener la fracción no unida, (iii) liberando la fracción unida de las perlas con una solución y recolectando la solución que comprende la fracción unida. Los soportes sólidos adecuados incluyen, por ejemplo, perlas, resina, papel, opcionalmente, hechos de celulosa, sílice, alúmina, vidrio, plástico o una combinación de los mismos. En aspectos ilustrativos, la molécula de captura unida al soporte sólido es una proteína. La molécula de captura puede ser idéntica a la diana. Ventajosamente, la molécula de captura no se limita a ninguna molécula en particular.

En diversas realizaciones del método de identificación de atributos de una inmunoglobulina, la proteína de unión a antígeno (por ejemplo, tezepelumab) o diana que afectan una interacción entre la proteína de unión a antígeno y la diana, para cada fracción no unida y fracción unida, el método comprende identificar y cuantificar la abundancia de cada atributo presente en una especie o derivado de la proteína o diana de unión a antígeno, en

donde, cuando la abundancia de un atributo en la fracción no unida es mayor que la abundancia del atributo en la fracción unida, el atributo afecta negativamente la interacción entre la proteína de unión al antígeno y la diana. En diversos aspectos, el método comprende el uso de un espectrómetro de masas para identificar y cuantificar la abundancia de cada atributo de la especie de la proteína de unión a antígeno o diana en cada una de la fracción unida y no unida.

En diversas realizaciones del método de determinación de un efecto de un atributo conocido presente en una especie de proteína de unión a antígeno o diana sobre una interacción entre la proteína de unión a antígeno y la diana, el método comprende para cada una de la fracción no unida y la fracción unida, cuantificar la abundancia del atributo conocido, en donde, cuando la abundancia del atributo conocido en la fracción no unida es mayor que la abundancia del atributo conocido en la fracción unida, el atributo conocido tiene un efecto negativo sobre la interacción entre la proteína de unión a antígeno y la diana. En diversos aspectos, el método comprende usar un espectrómetro de masas para cuantificar la abundancia del atributo conocido en cada una de la fracción no unida y la fracción unida.

La estabilidad se refiere a la resistencia a las modificaciones químicas de los residuos de aminoácidos y las modificaciones biofísicas de las proteínas, como la formación de especies de HMW durante las condiciones de estrés que pueden producirse durante la fabricación, el almacenamiento y/o condiciones de estrés adicionales o alternativas. Para los métodos e inmunoglobulinas, las proteínas de unión a antígenos y los fragmentos de las realizaciones descritas en la presente, las especies de “estabilidad” y/o “HMW” pueden determinarse mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Una composición que comprende la inmunoglobulina, la proteína de unión a antígeno o el fragmento o derivado puede separarse mediante SEC, tal como SEC-UV. La SEC puede usar una fase móvil que comprende fosfato de sodio 100 mM y NaCl 250 mM (pH 6.8), el caudal puede ajustarse a 0.5 ml/min, la temperatura de la columna puede ajustarse a 37°C, el tiempo de ejecución puede ser 35 minutos, y el muestreador automático puede ajustarse a 4°C. Un ejemplo de una columna adecuada para SEC incluye una columna en gel que comprende partículas de sílice que comprenden un grupo funcional diol y que tiene un diámetro medio de 5 µm y un tamaño de poro medio de aproximadamente 25 nM (disponible comercialmente, por ejemplo, como una columna G3000SWxl de TOSOH Bioscience). Para SEC-UV, la detección por espectrometría ultravioleta/visible (UV/VIS) puede realizarse a 214 nm y 280 nm. Se apreciará que después de la separación, los picos que representan el monómero y las especies de HMW pueden eluirse en diferentes momentos en el perfil de elución de SEC.

Después del análisis SEC, puede realizarse opcionalmente el mapeo de péptidos, y pueden identificarse las modificaciones de péptidos asociadas con las especies unidas y no

unidas, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento y/o en la Publicación Internacional n.º WO 2020/247790. Para el mapeo de péptidos, las fracciones eluidas pueden recolectarse usando un filtro con un límite de peso molecular (por ejemplo, superior a 10 kDa) y eluirse con un tampón de elución de guanidina 7.5 M. Para determinar las modificaciones químicas que afectan la unión al antígeno, la inmunoglobulina estresada (o la proteína de unión al antígeno o un fragmento de la misma) y el antígeno pueden mezclarse y separarse en el complejo unido al antígeno que eluye primero y en la inmunoglobulina no unida que eluye más tarde (o la proteína de unión al antígeno o un fragmento de la misma). Para determinar las modificaciones químicas que impactan o se correlacionan con HMW, pueden recolectarse especies monoméricas y HMW.

Se apreciará que la “afinidad” o “unión” puede ser determinada por resonancia de plasmón superficial (SPR), interferometría de bio-capa, o también por experimentos de afinidad de unión SEC como se describe en la presente. A menos que se indique lo contrario en la presente o se requiera lo contrario por el contexto científico, se entenderá que la “afinidad” se refiere a la afinidad medida por SPR. El valor de Kd puede medirse mediante SPR usando un sistema de biosensor tal como un sistema BIAcore®. El análisis con el sistema BIAcore® puede comprender analizar la unión y disociación de un antígeno (por ejemplo, TSLP) de chips con moléculas inmovilizadas (por ejemplo, inmunoglobulina anti-TSLP, proteína de unión a antígeno o fragmento de la misma tal como se describe en el presente documento) en su superficie. Los complejos de unión con $K_d < 10^{-6}M$ pueden detectarse usando SPR. En diversas realizaciones, la SPR puede llevarse a cabo a 20°C, 25°C, 30°C o 37°C.

Composiciones

Se apreciará que la numeración de los residuos en tezepelumab se basa en las secuencias variables de cadena pesada y cadena ligera expuestas en SEQ ID NO: 10 y 12, respectivamente, así como la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo de longitud completa establecidas en SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente.

En diversas realizaciones, se proporciona una composición que comprende tezepelumab y uno o más derivados de tezepelumab, comprendiendo cada uno: una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3; una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4; una secuencia de CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5; una secuencia de CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6; una secuencia de CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7; y una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8, en donde los derivados comprenden al menos uno de: derivados de isomerización, derivados de desamidación, derivados de oxidación, derivados de glicosilación, especies de HMW, fragmentos, derivados de isoforma de disulfuro, o combinaciones de los mismos. En diversas realizaciones, la composición comprende

5 tezepelumab y uno o más derivados de tezepelumab, comprendiendo cada uno una secuencia de aminoácidos de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 10 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO: 12.

Los derivados de isomerización comprenden la alteración de residuos de ácido aspártico. La isomerización a modo de ejemplo en ácido aspártico incluye ácido isoaspártico

10 (isoAsp), aspartato cíclico (cAsp), succinimida u otros productos intermedios de isomerización. El derivado de isomerización en la composición puede comprender un derivado en la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada o la cadena ligera (CDR) o dentro de otras partes de la región variable. En diversas realizaciones, la isomerización está en la CDR. El derivado de isomerización comprende un cambio en la CDR de cadena pesada D54 de SEQ

15 ID NO: 7, y/o CDR D49, D50 o D52 de cadena ligera de SEQ ID NO: 4 en cualquiera o ambas cadenas de región variable. En diversas realizaciones, la cantidad del derivado de isomerización en la composición es desde aproximadamente el 0.5% hasta aproximadamente el 30%, o aproximadamente el 0.5% hasta el 13%. En algunas realizaciones, la composición comprende tezepelumab y derivados del mismo en donde la isomerización en D54 está en una cantidad de

20 menos de aproximadamente el 5%, y/o en donde la isomerización en uno o más de D49, D50 o D52 en una cantidad de menos de aproximadamente el 13%. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 30% del derivado de isomerización, en donde dicha potencia comprende una capacidad de inhibir la unión de TSLPR biotinilado inmovilizado en una

25 perla donante a TSLP-His inmovilizado en una perla aceptora. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 30% del derivado de isomerización, en donde dicha potencia comprende la capacidad de inhibir la unión de TSLPR expresada en la superficie de una Célula Stat/BaF/HTR que codifica un gen informador de luciferasa Stat, cuya expresión es

30 indicativa de la unión de TSLP a TSLPR.

Los derivados de desamidación comprenden la alteración de residuos de asparagina. Los derivados de desamidación a modo de ejemplo incluyen desamidación completa y productos intermedios de desamidación. El derivado de desamidación en la composición puede comprender asparagina desamidada N25/N26 en LCDR1 expuesta en SEQ ID NO: 3, N316 en

35 la región variable de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 13, y/o N385/390 en la región

variable de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 13. En diversas realizaciones, la composición comprende un derivado de desamidación que comprende desamidación en N25/N26 en una cantidad de menos de aproximadamente el 3%, y/o desamidación en uno o más de N316, y/o N385/390 en una cantidad de menos de aproximadamente el 13%. En algunas realizaciones, la cantidad del derivado de desamidación en la composición está entre aproximadamente el 0.5%-10%. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 15% del derivado de desamidación, en donde dicha potencia comprende una capacidad de inhibir la unión de TSLPR biotinilado inmovilizado en una perla donante a TSLP-His inmovilizado en una perla aceptora. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 15% del derivado de desamidación, en donde dicha potencia comprende la capacidad de inhibir la unión de TSLPR expresada en la superficie de una Célula Stat/BaF/HTR que codifica un gen informador de luciferasa Stat, cuya expresión es indicativa de la unión de TSLP a TSLPR.

Los derivados de oxidación comprenden la alteración de uno o más residuos de metionina o triptófano en la proteína. Los derivados de oxidación a modo de ejemplo incluyen oxidación completa o intermedios de oxidación. El derivado de oxidación en la composición puede comprender oxidación en una o más de metionina de cadena pesada M34 de HCDR1 expuesta en SEQ ID NO: 6, o M253 o M359 en la región constante de cadena pesada expuesta en SEQ ID NO: 13, o el triptófano de cadena pesada W52 en HCDR2 expuesta en SEQ ID NO: 7, W90 de LCDR3 expuesto en SEQ ID NO: 5, o W102 en HCDR3 expuesto en SEQ ID NO: 8, en cualquiera o ambas cadenas pesadas (o cadenas ligeras, según sea aplicable). Por ejemplo, el derivado de oxidación en la composición puede comprender oxidación en una o más de metionina de cadena pesada M34 de HCDR1 expuesta en SEQ ID NO: 6, triptófano de cadena pesada W52 en HCDR2 expuesta en SEQ ID NO: 7, cadena ligera W90 de LCDR3 expuesta en SEQ ID NO: 5, o cadena pesada W102 en HCDR3 expuesta en SEQ ID NO: 8 en cualquiera o ambas cadenas pesadas (o cadenas ligeras, según sea aplicable). En diversas realizaciones, el derivado de oxidación comprende oxidación en una o más de metionina de cadena pesada M34, M253, M359, en cualquiera o ambas cadenas pesadas, opcionalmente en donde la oxidación es en una cantidad de menos de aproximadamente el 7%. En diversas realizaciones, el derivado de oxidación comprende oxidación en uno o más de triptófano W52, W90, o W102 en cualquiera o ambas cadenas pesadas, opcionalmente en donde la oxidación está en una cantidad de menos de aproximadamente el 7%, opcionalmente menos de aproximadamente el 5%, o menos de aproximadamente el 3%. En algunas realizaciones, la cantidad del derivado de

oxidación en la composición está entre aproximadamente el 0.4% y aproximadamente el 7%. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 7% del derivado de oxidación, en donde dicha potencia comprende una capacidad de inhibir la unión de TSLPR biotinilado inmovilizado en una perla donante a TSLP-His inmovilizado en una perla aceptora. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 7% del derivado de oxidación, en donde dicha potencia comprende la capacidad de inhibir la unión de TSLPR expresada en la superficie de una Célula Stat/BaF/HTR que codifica un gen informador de luciferasa Stat, cuya expresión es indicativa de la unión de TSLP a TSLPR.

Los derivados de alto peso molecular comprenden la agregación de anticuerpos, ya sea en dímeros o agregados de proteínas más grandes. Las especies de HMW contempladas en el presente documento incluyen dímeros y oligómeros de tezepelumab. En diversas realizaciones, las especies de HMW son un dímero. En diversas realizaciones, los dímeros están asociados de forma covalente o no covalente. En diversas realizaciones, la cantidad de las especies de HMW en la composición es de aproximadamente el 1.7% o menos, aproximadamente el 1.6% o menos, aproximadamente el 1.5% o menos, aproximadamente el 1.4% o menos, aproximadamente el 1.3% o menos, aproximadamente el 1.2% o menos, aproximadamente el 1.1% o menos, aproximadamente el 1.0% o menos, aproximadamente el 0.9% o menos, aproximadamente el 0.8% o menos, aproximadamente el 0.7% o menos, aproximadamente el 0.6% o menos, aproximadamente el 0.5% o menos, o aproximadamente el 0.4% o menos. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 20% de especies de HWM, en donde dicha potencia comprende una capacidad de inhibir la unión de TSLPR biotinilado inmovilizado en una perla donante a TSLP-His inmovilizado en una perla aceptora. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 20% de especies de HWM, en donde dicha potencia comprende la capacidad de inhibir la unión de TSLPR expresada en la superficie de una Célula Stat/BaF/HTR que codifica un gen informador de luciferasa Stat, cuya expresión es indicativa de la unión de TSLP a TSLPR.

Los derivados de fragmentos de tezepelumab incluyen productos de proteínas que pueden ser escindidos por peptidasas internas durante la producción o producidos por otras etapas en el proceso de producción. Los fragmentos de tezepelumab incluyen especies de bajo peso molecular (LMW), por ejemplo, menos de aproximadamente 25 kD, o especies de peso molecular medio (MMW), por ejemplo, entre 25 y 50 kD, o combinaciones de las mismas. En

diversas realizaciones, la cantidad de los fragmentos en la composición es de aproximadamente el 1.7% o menos, aproximadamente el 1.6% o menos, aproximadamente el 1.5% o menos, aproximadamente el 1.4% o menos, aproximadamente el 1.3% o menos, aproximadamente el 1.2% o menos, aproximadamente el 1.1% o menos, aproximadamente el 1.0% o menos, aproximadamente el 0.9% o menos, aproximadamente el 0.8% o menos, aproximadamente el 0.7% o menos, aproximadamente el 0.6% o menos, aproximadamente el 0.5% o menos, o aproximadamente el 0.4% o menos. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 15% de especies de fragmentos, en donde dicha potencia comprende una capacidad de inhibir la unión de TSLPR biotinilado inmovilizado en una perla donante a TSLP-His inmovilizado en una perla aceptora. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 15% de especies de fragmentos, en donde dicha potencia comprende la capacidad de inhibir la unión de TSLPR expresada en la superficie de una Célula Stat/BaF/HTR que codifica un gen informador de luciferasa Stat, cuya expresión es indicativa de la unión de TSLP a TSLPR.

Los derivados de glicosilación de tezepelumab comprenden la alteración del perfil de los residuos de azúcar que se pueden aplicar después de la traducción a los residuos de asparagina en la región Fc de un anticuerpo. Los derivados de glicosilación a modo de ejemplo incluyen la afucosilación, la aplicación de restos de galactosilo (galactosilación) y la aplicación de restos altos en manosa a la asparagina. Los derivados de glicosilación contemplados en el presente documento son cambios en los residuos de azúcar en la asparagina N298 en la región Fc expuestos en SEQ ID NO: 13, en una o ambas de las cadenas pesadas. En diversas realizaciones, la cantidad de derivado de glicosilación en la composición es menos de aproximadamente el 40%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 10% o aproximadamente el 5%. En algunas realizaciones, el derivado de glicosilación comprende derivados afucosilados en una cantidad de menos de aproximadamente el 5%, aproximadamente el 4%, aproximadamente el 3%, o aproximadamente el 2%. En diversas realizaciones, el derivado de glicosilación comprende restos de galactosilo en una cantidad de menos de aproximadamente el 30%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 10% o aproximadamente el 5%. En varias realizaciones, el derivado de la glicosilación comprende altas porciones de manosa en una cantidad de aproximadamente 25% o menos, aproximadamente 23% o menos (por ejemplo, aproximadamente 23.1% o menos), aproximadamente 21% o

menos, aproximadamente 19% o menos, aproximadamente 17% o menos, aproximadamente 15% o menos, aproximadamente 12% o menos, aproximadamente 10% o menos, aproximadamente 8% o menos, aproximadamente 5% o menos, o aproximadamente 4% o menos. En varias realizaciones, los derivados de la glicosilación comprenden altas porciones de manosa en una cantidad de aproximadamente 23.1% o menos. En diversas realizaciones, el derivado de glicosilación comprende restos con alto contenido de manosa en una cantidad de menos de aproximadamente el 5%, aproximadamente el 4%, aproximadamente el 3%, aproximadamente el 2% o aproximadamente el 1%. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 40% de los derivados de glicosilación, en donde dicha potencia comprende una capacidad de inhibir la unión de TSLPR biotinilado inmovilizado en una perla donante a TSLP-His inmovilizado en una perla aceptora. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 40% de los derivados de glicosilación, en donde dicha potencia comprende la capacidad de inhibir la unión de TSLPR expresada en la superficie de una Célula Stat/BaF/HTR que codifica un gen informador de luciferasa Stat, cuya expresión es indicativa de la unión de TSLP a TSLPR. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab comprenden no más del 15%, 13%, 11%, 8% o 5% de alto contenido de manosa y tienen menos eliminación (y/o una semivida más larga) que una composición que tiene más del 15% de alto contenido de manosa. En varias realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab comprenden no más de aproximadamente 25%, aproximadamente 23%, aproximadamente 21%, aproximadamente 19%, aproximadamente 17%, aproximadamente 15%, aproximadamente 13%, aproximadamente 11%, aproximadamente 8%, o aproximadamente 5% de manosa alta, y tienen menos depuración (y/o una vida media más larga) que una composición con manosa más alta de aproximadamente 25%. En varias realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab no comprenden más de 23.1% de manosa alta, y tienen menos depuración (y/o una vida media más larga) que una composición con manosa más alta de aproximadamente 23.1%. El porcentaje alto contenido de manosa puede determinarse mediante HILIC.

Tezepelumab o derivados de tezepelumab con “menos depuración” se refiere a que la cantidad de depuración del cuerpo (sangre o suero) es menor en comparación con la eliminación de anticuerpos de referencia, por ejemplo, tezepelumab u otro anticuerpo IgG2. La depuración de los derivados de tezepelumab o tezepelumab puede ser menor que 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15% o más de los niveles de depuración en comparación con el anticuerpo de referencia. La “vida media más larga” de los derivados de

tezepelumab o tezepelumab se refiere a la duración del tiempo que el anticuerpo es detectable en el cuerpo (sangre o suero) siendo más larga en comparación con la vida media de un anticuerpo de referencia, por ejemplo, tezepelumab u otro anticuerpo IgG2, en el cuerpo. La semivida de los derivados de tezepelumab o tezepelumab puede ser 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15% o más que la semivida del anticuerpo de referencia.

En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una potencia y/o tolerabilidad mayor que una composición que comprende más de 40%, 35%, 30%, 25%, 23%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5% o 4% de los derivados de glicosilación.

La potencia y/o la tolerabilidad de los derivados de glicosilación también pueden estar asociadas con la función efectora y la eliminación de anticuerpos. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen menos eliminación de anticuerpos y/o mayor tolerabilidad que una composición que comprende más de aproximadamente el 15%, aproximadamente el 13%, aproximadamente el 11%, aproximadamente el 8% o aproximadamente el 6% de derivados de glicosilación de alto contenido de manosa. En varias realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen menos eliminación de anticuerpos y/o mayor tolerabilidad que una composición que comprende más de aproximadamente 25%, aproximadamente 23%, aproximadamente 19%, aproximadamente 17%, aproximadamente 15%, aproximadamente 13%, aproximadamente 11%, aproximadamente 8% o aproximadamente 6% derivados de glucosilación de manosa alta. En varias realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen menos eliminación de anticuerpos y/o mayor tolerabilidad que una composición que comprende más de aproximadamente 23.1% de derivados de glicosilación de manosa alta.

La heterogeneidad estructural de disulfuro es inherente a las moléculas de IgG2 recombinantes y naturales, que contienen 18 enlaces disulfuro: 6 entre cadenas y 12 dentro de la cadena. Los péptidos bisagra: bisagra contienen cuatro enlaces disulfuro; en la estructura clásica de IgG2-A. A diferencia de la estructura clásica de IgG2-A, el isómero IgG2-B contiene enlaces simétricos que conectan dos copias de los péptidos Fab (C_H1-C_L -bisagra) con dos copias del péptido bisagra. IgG2-A/B es una forma intermedia, que incorpora características parciales tanto de IgG2-A como de IgG2-B, definida por una disposición asimétrica que implica un brazo Fab unido covalentemente a dos copias del péptido bisagra a través de enlaces disulfuro. Los derivados de isoforma de disulfuro comprenden una isoforma de IgG2-B y/o una isoforma de IgG2-A/B. En diversas realizaciones, la cantidad del derivado de isoforma de disulfuro en la composición menos del 75%. En algunas realizaciones, cuando el derivado

comprende una isoforma de IgG2-B, la cantidad del derivado de isoforma de disulfuro en la composición es menos de aproximadamente el 20%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 10%, o aproximadamente el 5%. En algunas realizaciones, cuando el derivado comprende una isoforma de IgG2-A/B, la cantidad de la isoforma de IgG2-A/B en la

5 composición es menos de aproximadamente el 75%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 45% o aproximadamente el 35%. En diversas realizaciones, la cantidad de la isoforma de IgG2-A/B en la composición es desde aproximadamente el 38% hasta aproximadamente el 43%. En diversas realizaciones, el

10 tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o tolerabilidad que una composición que comprende más del 75% de los derivados de isoforma de disulfuro, en donde dicha potencia comprende una capacidad de inhibir la unión de TSLPR biotinilado inmovilizado en una perla donante a TSLP-His inmovilizado en una perla aceptora. En diversas realizaciones, el tezepelumab y los derivados de tezepelumab tienen una mayor potencia y/o

15 tolerabilidad que una composición que comprende más del 75% de los derivados de isoforma de disulfuro, en donde dicha potencia comprende la capacidad de inhibir la unión de TSLPR expresada en la superficie de una Célula Stat/BaF/HTR que codifica un gen informador de luciferasa Stat, cuya expresión es indicativa de la unión de TSLP a TSLPR.

En diversas realizaciones, la composición tiene una o más de las siguientes

20 características:

- (a) la cantidad de derivados de isomerización en la composición es aproximadamente el 30% o menos tal como se mide mediante mapeo de péptidos reducido;
- (b) la cantidad de derivados de desamidación en la composición es aproximadamente el 15% o menos tal como se mide mediante mapeo de péptidos;
- 25 (c) la cantidad de derivados de oxidación en la composición es aproximadamente el 7% o menos tal como se mide mediante mapeo de péptidos reducido;
- (d) la cantidad de derivados de glicosilación en la composición es aproximadamente el 40% o menos tal como se mide mediante mapeo de glucano;
- (e) la cantidad de derivados de isoforma de disulfuro en la composición es
- 30 aproximadamente el 75% o menos tal como se mide mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa no reducida (RP-HPLC);
- (f) la cantidad de especies de HMW en la composición es aproximadamente el 20% o menos tal como se mide mediante SE-HPLC; y/o
- (g) la cantidad de fragmentos en la composición es aproximadamente el 15% o menos
- 35 tal como se mide mediante rCE-SDS.

En algunas realizaciones, la composición es parte de una formulación descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición es un principio activo usado para producir una formulación tal como se describe en el presente documento.

Métodos de administración

5 En un aspecto, los métodos de la presente descripción incluyen una etapa de administrar un anticuerpo anti-TSLP terapéutico o un derivado del anticuerpo descrito en la presente, opcionalmente en un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica es una composición estéril.

10 Se contemplan en el presente documento métodos para tratar una enfermedad, estado o trastorno inflamatorio, tal como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), dermatitis atópica, esofagitis eosinofílica (EoE), pólipos nasales, urticaria espontánea crónica, enfermedad provocada por Ig, nefropatía por IgA, nefritis lúpica, gastritis eosinofílica, sinusitis crónica sin pólipos nasales y fibrosis pulmonar idiopática (IPF) con un anticuerpo anti-TSLP o proteína de unión a antígeno o fragmentos de los mismos tal como se describe en el presente
15 documento. En diversas realizaciones, la enfermedad, afección o trastorno es asma, que incluye asma grave, asma eosinofílica o no eosinofílica y asma con eosinófilos bajos.

El asma es un trastorno inflamatorio crónico de las vías respiratorias. Cada año, el asma representa un estimado de 1.1 millones de visitas de pacientes ambulatorios, 1.6 millones de visitas a salas de emergencia, 444 000 internaciones (Defrances *et al*, 2008) disponible en: El
20 sitio web de los Centros para el Control de Enfermedades, www.cdc.gov/nchs/data/nhsr/nhsr005.pdf, y 3.500 muertes en los EE. UU. En personas susceptibles, la inflamación asmática provoca episodios recurrentes de sibilancias, disnea, opresión en el pecho y tos. Se cree que la etiología del asma es multifactorial, influenciada por mecanismos ambientales genéticos (To *et al.*, BMC Public Health 2012;12: 204; Chung *et al.*
25 Eur Respir J 2014;43: 343-73), siendo los alérgenos ambientales una causa importante (Chung *et al.*, citado anteriormente; Pavord ID, *et al.*, NPJ Prim Care Respir Med 2017;27: 17). La mayoría de los casos surgen cuando una persona se torna hipersensible a alérgenos (atopía). La atopía está caracterizada por un aumento en la expresión de linfocitos Th2 y citocinas Th2 y la producción de IgE. Se cree que aproximadamente 10 millones de pacientes en Estados
30 Unidos padece asma inducida por alergia. A pesar de las opciones terapéuticas disponibles, el asma sigue siendo un problema de salud importante. En el mundo, el asma actualmente afecta aproximadamente 300 millones de personas; para el 2020, se espera que el asma afecte 400 millones de personas (Partridge, Eur Resp Rev. 16: 67-72, 2007).

La inhalación de alérgenos por asmáticos atópicos induce algunas manifestaciones de
35 asma, incluida obstrucción de flujo de aire reversible, hiperreactividad de vías respiratorias e

inflamación de flujo de aire basofílico y eosinofílico. La exposición a inhalación de alérgenos se ha tornado el modelo predominante de asma en muchas especies (Bates *et al.*, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 297(3): L401-10, 2009; Diamant *et al.*, J Allergy Clin Immunol. 132(5): 1045-1055, 2013.)

5 Se han identificado diferentes subtipos de asma que son refractarios al tratamiento con esteroides. Los eosinófilos son células inflamatorias importantes en el asma alérgica que está mediada de forma característica por linfocitos T CD4+ de tipo Th2. La inflamación neutrofílica de las vías respiratorias está asociada con el tratamiento con corticosteroides en asma grave y se puede mediar por linfocitos T de tipo Th1 o Th17 (Mishra *et al.* Dis. Model. Mech. 6: 877-888, 10 2013).

Las medidas de diagnóstico y evaluación del asma incluyen las siguientes: inflamación de las vías respiratorias evaluada mediante el uso de una prueba estandarizada de una fracción de respiración única de óxido nítrico exhalado (FeNO) (American Thoracic Society; ATS, Am J Respir Crit Care Med. 171(8): 912-30, 2005). La espirometría se realiza según las directrices de 15 ATS/European Respiratory Society (ERS) Miller *et al.*, Eur Respir J. 26(1): 153-61, 2005). La prueba de espirometría posterior al broncodilatador (post-BD) se evalúa después de que el sujeto haya realizado la espirometría pre-BD. La broncodilatación máxima se induce mediante el uso de SABA tal como albuterol (dosis medida de 90 µg) o salbutamol (dosis medida de 100 µg) o equivalente con un dispositivo espaciador para un máximo de 8 bocanadas totales 20 (Sorkness *et al.*, J Appl Physiol. 104(2): 394-403, 2008). El mayor FEV₁ pre-Bd y post-BD obtenidos después de 4, 6 u 8 bocanadas se usa para determinar la reversibilidad y para el análisis. El Cuestionario de Control del Asma (ACQ) 6 es un cuestionario reportado por el paciente que evalúa los síntomas del asma (es decir, vigilia nocturna, síntomas al despertar, limitación de la actividad, falta de aliento, sibilancias) y uso diario de broncodilatadores de 25 rescate y FEV₁ (Juniper *et al.*, Oct 1999). El ACQ-6 es una versión más corta del ACQ que omite la medición de FEV₁ de la puntuación original de ACQ. La puntuación promedia de ACQ es el promedio de las respuestas. Las puntuaciones promedias ≤ 0.75 indican asma bien controlada, las puntuaciones entre 0.75 y ≤ 1.5 indican asma parcialmente controlada, y una puntuación > 1.5 indica asma descontrolada (Juniper *et al.*, Respir Med. 100(4): 616-21, 2006). Los cambios 30 individuales de al menos 0.5 se consideran clínicamente significativos (Juniper *et al.*, Respir Med. 99(5): 553-8, 2005). El cuestionario de calidad de vida con asma, estandarizado (AQLQ[S])+12 (AQLQ(S)+12) es un cuestionario de 32 elementos que mide el HRQoL experimentado por los pacientes de asma (Juniper *et al.*, Chest. 115(5): 1265-70, mayo 1999). El diario de asma también se usa para la evaluación.

La Publicación de Patente de Estados Unidos US-2018-0296669 (incorporada en la presente como referencia) revela que el tratamiento con un anticuerpo anti-TSLP es eficaz para reducir los síntomas del asma en una población sin eosinófilos/eosinófilos bajos, como está en una población con eosinófilos altos. También se contempla un método para reducir la frecuencia de las exacerbaciones del asma en un sujeto.

En la presente, también se contemplan métodos para tratar el asma en un sujeto con un perfil de asma con Th2 alto o un perfil de asma con Th2 bajo. Se contempla que un antagonista de TSLP que inhibe la unión de la proteína TSLP a su complejo receptor tratará de manera eficaz una población de asma con eosinófilos bajos, así como el anticuerpo descrito en la presente. De manera similar, se contempla que un antagonista de TSLP que inhibe la unión de TSLP a su complejo receptor será eficaz para el tratamiento de poblaciones de asma con Th2 bajo. También se contemplan métodos para tratar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en un sujeto que comprenden administrar un anticuerpo anti-TSLP o un derivado de anticuerpo o una proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento. Se contempla que el sujeto que va a tratarse es ser humano. El sujeto puede ser un adulto, un adolescente o un niño.

Las composiciones del anticuerpo terapéutico (o derivado del anticuerpo) se pueden administrar al paciente en múltiples sitios. Las múltiples administraciones pueden realizarse de forma simultánea o pueden administrarse durante un período de tiempo. En determinados casos es beneficioso proporcionar un flujo continuo de la composición terapéutica. Se puede administrar una terapia adicional basándose en un período, por ejemplo, por hora, día, semana, cada 2 semanas, cada 3 semanas, por mes o a un intervalo mayor.

En diversas realizaciones, las cantidades de agente terapéutico, tales como un anticuerpo bivalente con dos sitios de unión a TSLP, en una dosificación dada pueden variar de acuerdo con el tamaño del individuo al que se administra la terapia así como las características del trastorno que se trata.

En tratamientos ilustrativos, el anticuerpo anti-TSLP o el derivado del anticuerpo se administra en un intervalo de dosis de alrededor de 70 mg a alrededor de 280 mg por dosis diaria. Por ejemplo, la dosis se puede administrar en alrededor de 70 mg, 210 mg o 280 mg. En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-TSLP o el derivado del anticuerpo se puede administrar en una dosis de 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 o 280 mg por dosis. Estas concentraciones se pueden administrar como una forma de dosificación única o como dosis múltiples. Las dosis anteriores se proporcionan cada dos semanas o cada cuatro semanas. En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-TSLP o el derivado del anticuerpo se administra en una única dosis de 70 mg

5 cada dos semanas o cada cuatro semanas. En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-TSLP o el derivado del anticuerpo se administra en una única dosis de 210 mg cada dos semanas o cada cuatro semanas. En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-TSLP o el derivado del anticuerpo se administra en una única dosis de 280 mg cada dos semanas o cada cuatro semanas.

Para los derivados del anticuerpo, las cantidades de derivado de anticuerpo deben ser tales que la cantidad de sitios de unión a TSLP que se encuentran en la dosis tengan una cantidad equimolar de sitios de unión a TSLP con respecto al anticuerpo bivalente canónico descrito anteriormente.

10 Se contempla que el anticuerpo anti-TSLP o el derivado del anticuerpo se administra cada 2 semanas o cada cuatro semanas durante un período de al menos 4 meses, 6 meses, 9 meses, 1 año o más. En diversas realizaciones, la administración es subcutánea o intravenosa.

Se contempla que el tratamiento con el anticuerpo anti-TSLP o el derivado del anticuerpo disminuye los eosinófilos en sangre, esputo, fluido bronquioalveolar o los pulmones del sujeto.

15 También se contempla que la administración cambia los recuentos en células en el sujeto de una población de Th2 alta a una población de Th2. Se contempla además que la administración del anticuerpo anti-TSLP mejora una o más mediciones del asma, en un sujeto, que se seleccionan del grupo que consiste en volumen espiratorio forzado (FEV), reversibilidad de FEV1, capacidad vital forzada (FVC), FeNO, puntuación del cuestionario de control del asma 6 y puntuación de AQLQ(S)+12.

La mejora en el asma se puede medir como uno o más de los siguientes: reducción en la AER (tasa de exacerbación anualizada), reducción en las internaciones/exacerbaciones graves de asma, cambio con respecto a los valores de referencia (aumento) en el tiempo transcurrido hasta la primera exacerbación de asma (luego del inicio del tratamiento con el anticuerpo anti-TSLP), disminución con respecto al placebo en la proporción de sujetos con una o más exacerbaciones de asma o exacerbaciones graves durante el transcurso del tratamiento, por ejemplo, 52 semanas, cambio con respecto a los valores de referencia (aumento) en FEV1 y FVC (previo al broncodilatador y posterior al broncodilatador), cambio con respecto a los valores de referencia (disminución) en los eosinófilos en sangre o esputo (o eosinófilos en los pulmones si se obtiene fluido BAL o biopsia), cambio con respecto a los valores de referencia (disminución) en FeNO, cambio con respecto a los valores de referencia (disminución) en IgE, mejora en los síntomas del asma y control según se mide mediante PRO, que incluye ACQ y variantes, AQLQ y variantes, SGRQ, y diarios de síntomas del asma, cambio (disminución) en el uso de medicación de rescate, disminución en el uso de corticosteroides sistémicos,

25

30

35

disminución en la relación celular de Th2/Th1 en sangre. La mayoría/todas estas mediciones

deberían realizarse en la población total y subpoblaciones que incluyen eosinófilos altos y bajos (mayor o igual que 250 es alto; menor que 250 es bajo), alérgico y no alérgico, Th2 alto y bajo, periestina alta y baja (en comparación con la mediana del valor), y FeNO alto y bajo (mayor o igual que 24 o menor que 24).

- 5 También se contempla en la presente descripción la administración de múltiples agentes, tales como una composición de anticuerpo junto con un segundo agente tal como se describe en la presente, que incluye, de modo no taxativo, un agente antiinflamatorio o terapia para el asma.

- 10 Sin embargo, se contempla que, en diversas realizaciones, la administración reduce la frecuencia o los niveles de terapia administrada conjuntamente en el sujeto. Las terapias administradas conjuntamente ilustrativas incluyen, de modo no taxativo, inhalación de corticosteroides (ICS), agonista β_2 de acción prolongada (LABA), antagonistas de los receptores de leucotrieno (LTRA), anti-muscarínicos de acción prolongada (LAMA), cromonas, agonista β_2 de acción corta (SABA), y corticosteroides orales o teofilina. En diversas
15 realizaciones, la administración elimina la necesidad de terapia con corticosteroides.

Formulaciones

- En algunas realizaciones, la descripción contempla el uso de composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TSLP o derivado del anticuerpo junto con un diluyente, portador, solubilizante, emulsionante,
20 conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Además, la descripción proporciona métodos para tratar a un sujeto mediante la administración de dicha composición farmacéutica.

- En determinadas realizaciones, los materiales de formulación aceptables preferentemente no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica puede contener
25 materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o de liberación, la absorción o la penetración de la composición. En dichas realizaciones, los materiales de formulación adecuados incluyen, de modo no taxativo, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina);
30 antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrógeno sulfito sódico); soluciones amortiguadoras (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes espesantes (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); rellenos;
35 monosacáridos; disacáridos; y otros carbohidratos (tales como glucosa, sacarosa, manosa o

dextrinas); proteínas (tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, saborizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrofílicos (tal como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones que forman sales (tal como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); solventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como Pluronic, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbato tales como polisorbato 20, polisorbato, tritón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes mejoradores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes mejoradores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, preferentemente cloruro de sodio o de potasio, manitol sorbitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Véase, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18.a Edición, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

Un vehículo adecuado o portador puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en las composiciones para la administración parenteral. Otros ejemplos de vehículos adicionales son suero salino tamponado neutro o suero salino mezclado con seroalbúmina. En realizaciones específicas, las composiciones farmacéuticas comprenden tampón Tris con un pH de aproximadamente 7.0-8.5 o tampón acetato con un pH de aproximadamente 4.0-5.5 y pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado del mismo.

Los componentes de formulación están presentes preferiblemente a concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. En determinadas realizaciones, se usan tampones para mantener la composición a pH fisiológico o a un pH ligeramente menor, normalmente en un intervalo de pH de aproximadamente 4.5 a aproximadamente 8. Incluyendo aproximadamente 4.5, aproximadamente 4.6, aproximadamente 4.7, aproximadamente 4.8, aproximadamente 4.9, aproximadamente 5.0, aproximadamente 5.1, aproximadamente 5.2, aproximadamente 5.3, aproximadamente 5.4, aproximadamente 5.5, aproximadamente 5.6, aproximadamente 5.7, aproximadamente 5.8, aproximadamente 5.9, aproximadamente 6.0, aproximadamente 6.1, aproximadamente 6.2, aproximadamente 6.3, aproximadamente 6.4, aproximadamente 6.5, aproximadamente 6.6, aproximadamente 6.7, aproximadamente 6.8, aproximadamente 6.9, aproximadamente 7.0, aproximadamente 7.1, aproximadamente 7.2, aproximadamente 7.3, aproximadamente 7.4, aproximadamente 7.5, aproximadamente 7.6, aproximadamente 7.7, aproximadamente 7.8, aproximadamente 7.9, y aproximadamente 8.0.

En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-TSLP o derivado del anticuerpo está en una formulación que contiene acetato, y uno o más de prolina, sacarosa, polisorbato 20 o polisorbato 80. En diversas realizaciones, la formulación comprende acetato 5-50 mM, menos de o igual a prolina al 3% (p/v), polisorbato 20 al 0.015% (w/v) $\pm$ 0.005% (p/v) o polisorbato 80, a pH entre 4.9 y 6.0. Opcionalmente, el anticuerpo o derivado de anticuerpo está en una concentración de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 150 mg/ml. La formulación puede almacenarse entre -20°C y -70°C. En la Solicitud Internacional N.º PCT/US2021/018561, incorporada en el presente documento como referencia, se describen ejemplos de formulaciones anti-TSLP que comprenden estos excipientes.

En realizaciones alternativas, el anticuerpo anti-TSLP o derivado de anticuerpo está en una formulación que contiene un tensioactivo y al menos un aminoácido básico o una de sus sales. En casos a modo de ejemplo, el aminoácido básico es arginina o histidina. En diversas realizaciones, la sal es glutamato de arginina o glutamato de histidina, opcionalmente en una concentración de desde 10 hasta 200 mM. Opcionalmente, la formulación comprende además prolina. En realizaciones alternativas, el anticuerpo anti-TSLP o derivado de anticuerpo está en una formulación que contiene un tensioactivo y calcio o una de sus sales. En diversas realizaciones, la sal es glutamato de calcio, opcionalmente en una concentración desde 15 mM hasta aproximadamente 150 mM. Opcionalmente, la formulación comprende además prolina. En varias realizaciones, el tensioactivo es el polisorbato 20 o el polisorbato 80 o una mezcla de los mismos. Opcionalmente, el anticuerpo o derivado de anticuerpo está a una concentración de más de aproximadamente 110 mg/ml, o más de aproximadamente 140 mg/ml. En la Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/US2021/017880, incorporada en el presente documento como referencia, se describen ejemplos de formulaciones anti-TSLP que comprenden estos excipientes.

Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas a usarse pueden proporcionarse en forma de una solución acuosa libre de pirógenos parenteralmente aceptable que comprende el anticuerpo anti-TSLP deseado o derivado del mismo en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para la inyección parenteral es el agua destilada estéril en la que el anticuerpo se formula como una solución isotónica estéril conservada de forma adecuada. En determinadas realizaciones, la preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tales como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poli(láctico) o ácido poli(glucólico)), perlas o liposomas, que pueden proporcionar una liberación controlada o sostenida del producto que puede suministrarse mediante inyección de depósito. En determinadas realizaciones, también puede usarse ácido hialurónico, que tiene el efecto de

promover la duración sostenida en la circulación. En determinadas realizaciones, pueden utilizarse dispositivos de administración de fármacos implantables para introducir el anticuerpo. En diversas realizaciones, la administración puede ser mediante jeringa precargada o autoinyector. En diversas realizaciones, el auto-inyector es Ypsomed YpsoMate®. En diversas realizaciones, el auto-inyector se da a conocer en los documentos WO 2018/226565, WO 2019/094138, WO 2019/178151, WO 20120/072577, WO2020/081479, WO 2020/081480, PCT/US20/70590, PCT/US20/70591, PCT/US20/53180, PCT/US20/53179, PCT/US20/53178, o PCT/US20/53176.

Kits

Como aspecto adicional, la divulgación incluye kits que comprenden uno o más compuestos o composiciones envasadas de manera que faciliten su uso para practicar los métodos de la divulgación. En una realización, un kit de ese tipo incluye un compuesto o composición descritos en el presente documento, empaquetados en un recipiente tal como una botella o recipiente sellado, con una etiqueta adherida al recipiente o incluida en el paquete que describe el uso del compuesto o composición en la práctica del método. Preferiblemente, el compuesto o composición está empaquetada en forma de dosificación unitaria. El kit puede incluir además un dispositivo adecuado para administrar la composición de acuerdo con una vía de administración específica o para practicar un ensayo de selección. Preferiblemente, el kit contiene una etiqueta que describe el uso de la composición de anticuerpo.

Otros aspectos y detalles de la divulgación serán evidentes a partir de los siguientes ejemplos, que pretenden ser ilustrativos y no limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1-Identificación de los Atributos de Tezepelumab

Tezepelumab es un anticuerpo monoclonal humano de longitud completa de la subclase IgG2 producido en células de ovario de hámster chino (CHO). Consta de 2 cadenas pesadas (HC) y 2 cadenas ligeras (LC) de la subclase lambda. Las cadenas pesada y ligera están unidas covalentemente a través de enlaces disulfuro. Se realizó una caracterización bioquímica, biofísica y biológica de tezepelumab para brindar una comprensión completa de sus propiedades estructurales y funcionales y permitir una evaluación de los atributos de los anticuerpos que pueden afectar la unión y la potencia.

Materiales y métodos

AMG 157 y residuos lábiles que pueden impactar la unión: La secuencia de aminoácidos de AMG157 como secuencia A5 (y como cadenas H5, L5) y también varios otros anticuerpos de unión a TSLP se describieron previamente en la patente US 7.982.016 B2.

La masa molecular del anticuerpo con glicosilación A2G0F/A2G0F (C6500 H9998 O2068 N1734 S52) es 147189,4 Da, incluyendo el piroglutamato N-terminal de cadena pesada y el K-terminal C eliminados. TSLP contenía el 74% de especies monoméricas, el 23% diméricas y el 3% tetraméricas.

5 *Mapeo de péptidos:* El mapeo de péptidos de las muestras de tezepelumab se realizó utilizando el procedimiento de preparación de muestras que incluye replegamiento con guanidina, reducción y alquilación de enlaces disulfuro, intercambio de tampón y digestión con tripsina sobre péptidos adecuados para análisis por LC-MS, como se describe en (Ren *et al.*, *Anal.Biochem.* 392: 12-21 (2009)). Brevemente, una muestra comprendiendo tezepelumab se
10 diluyó hasta aproximadamente 1 mg/ml en 0.5 ml de tampón de desnaturalización de pH 7. (clorhidrato de guanidina (GdnHCl) 7.5 M y Tris 0.25 M). La reducción se logró con la adición de 3 µl de ditioneitol (DTT) 0.5 M seguido de 30 min de incubación a temperatura ambiente. La carboximetilación se logró con la adición de 7 µl de ácido yodoacético (IAA forma siglada de *iodoacetic acid*) 0.5 M. La reacción se llevó a cabo en oscuridad durante 15 min a temperatura
15 ambiente. El exceso de IAA se inactivó con la adición de 4 µl de DTT 0.5 M. A las muestras de tezepelumab reducido y alquilado se le cambió el tampón a un tampón de digestión de pH 7.5 (Tris 0.1 M o bicarbonato de amonio 0.1 M) usando una columna NAP-5 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.). Se disolvió tripsina liofilizada en agua hasta una concentración final de 1 mg/ml. La digestión se inició con la adición de la solución de tripsina de 1 mg/ml a las
20 muestras de tezepelumab reducido, alquilado y con el tampón cambiado para lograr una relación de enzima/sustrato de 1: 25. La digestión se llevó a cabo a 37 °C durante 30 min. La digestión final se inactivó con la adición de 5 µl de FA al 20 %. El análisis del mapeo de péptidos por LC-MS/MS de las muestras de tezepelumab digeridas se realizó en un sistema de UHPLC 1290 de Agilent conectado a un espectrómetro de masas Q-Exactive Biopharma de Thermo Scientific
25 como se describe en (Ren *et al.*, 2009, *citado anteriormente*). Los datos brutos de LC-MS/MS adquiridos y las secuencias del tezepelumab y la diana se utilizaron para identificar y cuantificar las modificaciones mediante el programa informático MassAnalyzer (Zhang, *Anal.Chem.* 81: 8354-8364 (2009)).

30 *SE-UHPLC:* La muestra de tezepelumab se cargó en una columna analítica SE-UHPLC (columna BEH200, tamaño de partícula de 1.7 µm de tamaño de partícula, 4.6 mm × 150 mm, Waters Corporation) y se separaron las proteínas de manera isocrática usando una fase móvil que comprende fosfato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 250 mM a pH 6.8. El eluyente se

monitoreó mediante absorbancia UV a 280 nm. La columna se operó a temperatura ambiente y la fase móvil se aplicó a la columna a un caudal de 0.4 ml/min.

5 *RP-HPLC no reducida:* Las muestras de tezepelumab se analizaron mediante RP-HPLC usando una columna Waters BEH300 C4 (tamaño de partícula de 1.7 μ m, 2.1 mm x 50 mm) y se eluyó usando una fase móvil que contenía TFA al 0.1% y un gradiente de 1-propanol a 75°C. Se monitoreó la absorbancia a 215 nm.

10 *CE-SDS reducida:* Las muestras de tezepelumab se analizan mediante rCE-SDS. Las muestras se desnaturalizaron y se redujeron por calentamiento en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) y β -mercaptoetanol a pH 6.5 antes de la inyección electrocinética en un capilar de sílice fundido desnudo relleno con tampón de gel de SDS a 25°C. La absorbancia se monitoreó a 220 nm.

15 *CEX-UHPLC:* Se cargaron las muestras de sustancia farmacológica de tezepelumab en una columna analítica de CEX-HPLC (BioPro SP-F, 5 μ m de tamaño de partícula, 4.6 mm x 100 mm, YMC America, Inc.). La fase móvil A contenía fosfato de sodio 20 mM a pH 6.6 y la fase móvil B consistía en fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 mM, a pH 6.6. Las proteínas se separaron usando un gradiente lineal de sal generado con un 5% a 12% de fase móvil B de 0 min a 4 min, a 23% de fase móvil B a los 18 min, hasta fase móvil B al 100% a los 18.5 min hasta 20.5 min y de nuevo a fase móvil B al 5% a los 21 min hasta 25 min. El eluyente se monitoreó mediante absorbancia UV a 280 nm. La columna se operó a 28°C y la fase móvil se aplicó a la columna a un caudal de 0.6 ml/min.

20 *Mapeo de Glucano:* El mapeo de N-glucanos es una técnica analítica en la que los oligosacáridos unidos a los residuos de asparagina se liberan a través de la escisión enzimática. Los oligosacáridos libres se derivatizan posteriormente con una etiqueta fluorescente para su detección y cuantificación. Los oligosacáridos marcados se resuelven mediante cromatografía líquida de interacción hidrófila (HILIC) con detección de fluorescencia para generar un perfil de glucano. En este método, se somete tezepelumab a digestión enzimática con N-glucosidasa F (PNGasa F), que escinde específicamente el enlace entre la N-acetilglucosamina (GlcNAc) del oligosacárido y el residuo de asparagina. Los oligosacáridos liberados se etiquetan con ácido 2-aminobenzoico (2-AA) mediante aminación reductora. Después de una etapa de limpieza por centrifugación, los oligosacáridos se separan mediante HILIC en un sistema de cromatografía

líquida de ultra rendimiento (UPLC). Se calculan los % de áreas de pico relativas de las principales especies de oligosacáridos.

Potencia: La potencia de las composiciones de tezepelumab que comprenden los atributos descritos en el presente documento se observó mediante un bioensayo de unión de receptor-ligando y/o un bioensayo basado en células de genes indicadores.

Ensayo de Unión de Receptor-Ligando: Este ensayo proporciona una medida proximal de la actividad de tezepelumab y refleja directamente el mecanismo de acción molecular de tezepelumab, que consiste en unirse a TSLP y evitar que se una al receptor de TSLP (TSLPR). Este método proporciona una medida cuantitativa de la capacidad de tezepelumab para inhibir la unión de TSLP a TSLPR. Tezepelumab se une al ligando TSLP-His recombinante (TSLP-His) e inhibe su unión al receptor TSLP biotinilado (TSLPR). El ensayo de potencia es un ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificado (Alfa) basado en perlas que detecta interacciones biomoleculares. El ensayo contiene dos tipos de perlas: perlas aceptoras y perlas donadoras. Las perlas donadoras se recubren con un hidrogel que contiene ftalocianina, un fotosensibilizador y estreptavidina. Las perlas aceptoras están recubiertas con un hidrogel que contiene derivados de tioxiógeno y quelato de níquel. Las perlas donantes se unen a TSLPR biotinilado a través de la interacción entre estreptavidina y biotina, y que las perlas aceptoras se unen a TSLP marcado con histidina debido a la interacción entre el quelato de níquel y la histidina. Cuando TSLP-His y TSLPR biotinilado se unen entre sí, las perlas aceptoras y las perlas donadoras se acercan. Cuando se aplica un láser a este complejo, las perlas donadoras convierten el oxígeno ambiental en oxígeno singlete. Si las perlas están muy cerca, se produce una transferencia de energía a las perlas aceptoras, lo que da como resultado la producción de luminiscencia que se mide en un lector de placas equipado con capacidades de detección de señales AlphaScreen®. Tezepelumab se une a TSLP-His y evita que se una a TSLPR biotinilado, lo que reduce la producción de luminiscencia de manera dependiente de la dosis. La actividad de la muestra de prueba se determina comparando la respuesta de la muestra de prueba con la respuesta obtenida para el estándar de referencia. Se apreciará que el Ensayo de Unión de Receptor-Ligando descrito en este párrafo es un ensayo adecuado para determinar la capacidad de una composición para inhibir la unión de TSLPR biotinilado inmovilizado en una perla donante a TSLP-His inmovilizado en una perla aceptora.

Bioensayo del gen indicador basado en células: La proteína de linfopoyetina estromal tímica humana (TSLP) que se une al complejo del receptor de TSLP humano (TSLPR) expresado en la superficie de células BaF murinas estables induce la activación de Stat 5 y la proliferación celular. Este método utiliza la línea celular murina BaF/hu HTR que se cotransfectó con plásmidos que codifican el gen indicador de luciferasa Stat y el gen resistente a la

blastocidina. Cuando las células Stat/BaF/HTR se incuban con TSLP humano recombinante, se produce la transducción de señales después de la unión al TSLPR, lo que da como resultado un aumento de la actividad de la luciferasa. AMG 157 antagoniza la actividad inducida por TSLP del TSLPR, inhibiendo así la respuesta de luciferasa mediada por TSLP. Este método mide el efecto inhibitorio dependiente de la dosis del estándar de referencia AMG 157 y las muestras de prueba en células Stat/BaF/HTR estimuladas con TSLP. Después de la incubación con TSLP y tezepelumab, las células se tratan con un reactivo que contiene un detergente (para la lisis celular) y luciferina, un sustrato para la luciferasa. La reacción de luciferasa con luciferina da como resultado una luminiscencia que se mide en un luminómetro. La producción de luciferasa en células indicadoras en respuesta a la estimulación con TSLP se cuantifica mediante la lectura de luminiscencia después de la adición del sustrato de luciferasa. El grado de inhibición de la activación de la actividad indicadora de luciferasa inducida por TSLP es proporcional a la cantidad de tezepelumab. La actividad biológica de la muestra de prueba se determina comparando la respuesta de la muestra de prueba con el estándar de referencia. Se apreciará que el ensayo de gen indicado basado en células descrito en este párrafo es un ensayo adecuado para determinar la capacidad de una composición para inhibir la unión de TSLPR expresado en la superficie de una célula Stat/BaF/HTR que codifica un gen indicador de luciferasa Stat., cuya expresión es indicativa de la unión de TSLP a TSLPR.

Resultados

La caracterización bioquímica de tezepelumab identificó anticuerpos de tezepelumab modificados que podrían aislarse de las preparaciones de tezepelumab y después del almacenamiento del principio activo, incluyendo los derivados de isomerización, derivados de desamidación, derivados de oxidación, especies de alto peso molecular, especies fragmentadas, especies parcialmente reducidas, derivados de glucano con alto contenido de manosa o derivado de isoforma de disulfuro. Estos atributos se evaluaron por su impacto potencial en la potencia y tolerabilidad de tezepelumab.

Isomerización: La isomerización del ácido aspártico se evaluó mediante mapeo de péptidos reducidos con LC-MS/MS. Los residuos de ácido aspártico, ya sean nativos o formados por desamidación de Asn, pueden experimentar isomerización a través de un producto intermedio de imida cíclica. La isomerización puede afectar la unión objetivo y la eficacia en función de la proximidad de un residuo modificado a CDR. Los niveles nativos de isomerización en tezepelumab se evaluaron mediante análisis espectrométrico de masas de estudios de mapeo de péptidos. La isomerización a HC CDR2 Asp⁵⁴ y LC CDR3 Asp^{91/95} no se observó en nivel significativo en principio activo. Los estudios de degradación forzada por exposición térmica mostraron que LC CDR2 Asp^{49/50} es sensible a la isomerización a temperaturas

elevadas. Además, los niveles de isomerización de HC CDR2 Asp⁵⁴ también mostraron un aumento menor (<2%) a temperatura elevada. Por lo tanto, los sitios de isomerización predominantes se identificaron como LC CDR Asp^{49/50} y HC CDR Asp⁵⁴ a 10% y 2% tras 5 semanas de degradación forzada térmica (40°C).

5 La isomerización de Asp^{49/50} en la CDR2 de cadena ligera se observó a aproximadamente 0.2% en principio activo. La isomerización a HC CDR2 Asp⁵⁴ y LC CDR3 Asp^{91/95} no se observó en nivel significativo en principio activo.

10 Los lotes de productos usados en los ensayos clínicos al final de la vida útil se monitorearon para determinar niveles de impurezas, tales como especies de HMW, fragmentos, isomerización, etc., y se compararon con las impurezas en la liberación inicial del mismo lote. Un aumento de las impurezas a lo largo del tiempo permite el cálculo de la exposición clínica del sujeto a los niveles de impurezas y la determinación de los efectos de estos atributos en la seguridad del producto, y proporciona una medida de la tolerabilidad de las impurezas en el principio activo. Por ejemplo, un estudio clínico de tezepelumab utilizó un principio activo que

15 se dosificó hasta el último mes de su vida útil clínica de 36 meses. El uso de producto terminado envejecido combinado con dosis más altas y más frecuentes expuso a los pacientes a niveles más altos de sustancias relacionadas con el producto e impurezas relacionadas con el producto que con lotes nuevos de productos terminados. La exposición elevada se debió principalmente al aumento de la dosis acumulada por mes de tratamiento (por ejemplo, a través de la inyección subcutánea de 420 mg de Q14D), en comparación con una dosis de inyección subcutánea

20 mensual de 210 mg.

 La dosis clínica de 420 mg cada dos semanas por inyección subcutánea es aproximadamente 4 veces mayor que la dosis mensual de 210 mg. A partir de esta dosis programada, se calculó que la exposición sistémica en el régimen de dosis más alta, tal como

25 se expresa en el “área bajo la curva” (AUC) o la concentración sérica máxima ($C_{\text{máx}}$), es 3.2X a 3.7X más, respectivamente, que la dosis clínica más baja. Según el protocolo del estudio clínico, las pruebas de anticuerpos se realizarían solo si hubiera un cambio inesperado en la exposición o posibles eventos de seguridad relacionados con los anticuerpos anti-fármacos. Estos resultados no se observaron y el fármaco fue bien tolerado.

30 Basándose en la dosis y los niveles de atributos estimados en el momento de la administración en este ensayo clínico, se estimaron los niveles de exposición de los atributos a los pacientes del ensayo clínico y se evaluó la tolerabilidad. Por ejemplo, el % atributo en el producto terminado (por ejemplo, HWM) puede multiplicarse por los multiplicadores de exposición clínica para determinar los niveles de atributo equivalente % en un lote de producto

35 administrado a la dosis propuesta de 210 mg de Q28D.

Para la isomerización, la isomerización total calculada de hasta el 30%, basándose en una dosis de 210 mg de Q28D, no se asoció con ningún problema relacionado con la seguridad *in vivo*. La isomerización calculada de D49/D50 o D52 del 26% basándose en una dosis de 210 mg de Q28D no se asoció con ningún problema de seguridad *in vivo*, mientras que la isomerización calculada de D54 del 4% basándose en una dosis de 210 mg de Q28D no se asoció con ningún problema de seguridad *in vivo*.

Oxidación: La oxidación se evaluó usando un mapa de péptidos tripticos reducidos LC-MS. La oxidación en un residuo de metionina (Met) es una modificación postraducciona que puede surgir potencialmente como resultado de la exposición al oxígeno y/o agentes oxidantes químicos, así como a la fotoexposición. Tezepelumab contiene 8 residuos Met en cada cadena pesada (Met², Met³⁴, Met⁸³, Met¹¹⁷, Met²⁵³, Met³⁵⁹, Met³⁹⁸, Met⁴²⁹). No hay residuos de Met en la cadena ligera. Solo un residuo de Met, Met³⁴, está ubicado en la región determinante de la complementariedad (CDR). Se observaron niveles de oxidación bajos pero detectables en los residuos Met², Met¹¹⁷, Met²⁵³, Met³⁵⁹, Met³⁹⁸ de cadena pesada (Tabla 1). La oxidación de metionina en CDR puede afectar potencialmente a la potencia, sin embargo, no se observó oxidación en Met³⁴ de la región CDR. El grado de oxidación se estimó mediante mapa peptídico reducido con detección espectrométrica de masas (ESI-MS). Se usó la inferencia de la intensidad relativa de las especies oxidadas y no oxidadas para calcular el porcentaje relativo; sin embargo, este enfoque se considera semicuantitativo debido a las posibles diferencias en las eficiencias de ionización y la coelución de las especies que interfieren. Se usó el análisis de tezepelumab bajo oxidación forzada para dilucidar la susceptibilidad de sitios específicos de la molécula a la oxidación.

Tabla 1. Niveles de Oxidación de Metionina en el Principio Activo Tezepelumab

Residuo	Oxidación	Bucle (Elemento)
Met ²	~1%	V _H (Fab)
Met ¹¹⁷	~1%	CH ₁ (Fab)
Met ²⁵³	~2%	CH ₂ (Fc)
Met ³⁵⁹	~3%	CH ₂ (Fc)
Met ³⁹⁸	~1%	CH ₃ (Fc)
Met ⁴²⁹	< 1%	CH ₃ (Fc)

La oxidación química forzada mostró que el orden de sensibilidad para la metionina de cadena pesada es Met¹¹⁷>Met²⁵³>Met²>Met⁴²⁹ lo que indica que Met¹¹⁷ y Met²⁵³ son los sitios con la mayor exposición al disolvente. De manera similar a los estudios de oxidación química anteriores, los estudios de fotodegradación establecieron las sensibilidades relativas de los residuos de Met de cadena pesada a la oxidación inducida por la luz de la siguiente manera:

Met²⁵³>Met¹¹⁷>Met³⁹⁸>Met³⁵⁹. El nivel de oxidación de Met34 está por debajo del nivel de cuantificación y, dada la secuencia y el plegamiento de la molécula, sugiere que este residuo no está disponible para la oxidación. Además, los estudios de fotodegradación mostraron un aumento en los niveles de oxidación de los residuos de triptófano en el orden de Trp¹⁰²>Trp⁵⁶>Trp⁵²>Trp⁹⁰, lo que indica que la región variable de cadena pesada Trp¹⁰² y cadena ligera Trp⁵⁶ son los sitios con mayor exposición a la luz (Tabla 2).

Tabla 2. Niveles de Oxidación de Triptófano en el Principio Activo Tezepelumab

Residuo	Oxidación	Bucle (Elemento)
Trp ⁵⁶	< 1%	V _L (Fab)
Trp ¹⁰²	< 1%	V _H (Fab, CDR3)
Trp ¹⁵⁰	< 1%	CH ₁ (Fab)
Trp ²⁷⁸	~ 2%	CH ₂ (Fc)

La oxidación observada al final de la vida útil EOS (valor máximo 36 meses 2-8C más 2 meses 30C) mostró oxidación en HCDR a W52 de aproximadamente el 0.2% y oxidación a W102 del 1.1%. La oxidación del principio detectó del 0.3 al 0.5 % de W102 oxidado. Basándose en la dosis y los niveles de atributos estimados en el momento de la administración en un ensayo clínico en humanos, se estimaron los niveles de exposición de atributos a los pacientes del ensayo clínico. El W102 oxidado calculado de hasta el 6-7 % basándose en una dosis de 210 mg de Q28D no se asoció con ningún problema de seguridad *in vivo*. La oxidación del triptófano puede producirse a temperatura elevada y bajo una exposición extrema a la luz ultravioleta y visual. La oxidación de triptófano CDR causada por condiciones extremas se asocia con una reducción moderada de la potencia. Existe una fuerte correlación entre la oxidación del triptófano y el índice de color amarillo.

Desamidación: La desamidación de la asparagina se evaluó usando el mapeo de péptidos tripticos con LC-MS. Los niveles nativos de desamidación en tezepelumab se evaluaron mediante análisis ESI-MS/MS de estudios de mapeo de péptidos. Solo se observaron bajos niveles de desamidación en los residuos Asn³¹⁶ y Asn³⁸⁵ de la cadena pesada (Tabla 3). No se observó desamidación en otros sitios, incluyendo Asn⁵⁷ y Asn^{25/26} en la CDR2 de cadena pesada y la CDR1 de cadena ligera, respectivamente en el principio activo.

Tabla 3. Niveles de Desaminación de Asparagina en el Principio Activo Tezepelumab

Residuo	Desamidación	Bucle (Elemento)
Asn ³¹⁶	< 1%	CH ₂ (Fc)
Asn ³⁸⁵	2%	CH ₃ (Fc)

Se usó el análisis de tezepelumab en condiciones de desamidación forzada para evaluar la susceptibilidad de los sitios de moléculas específicas a la desamidación. A un pH fisiológico

de 7.4, se determinó que los sitios más susceptibles eran Asn³⁹⁰ y Asn³⁸⁵ (Principio activo al 3%; EOS, al 5%), mientras que se identificó un sitio menor en Asn³¹⁶ (Principio activo al 0.09-0.1%; EOS, al 0.4%), todos los cuales están ubicados en la región Fc. La desamidación en la región CDR variable de LC en Asn²⁵ solo se observó a un nivel bajo (Principio activo, del 0.1 al 0.2%; EOS, al 0.4%). Basándose en la dosis y los niveles de atributos estimados en el momento de la administración en un ensayo clínico en humanos, se estimaron los niveles de exposición de atributos a los pacientes del ensayo clínico. La desamidación calculada en Asn²⁵ hasta el 2% (basándose en una dosis de 210 mg de Q28D) no se asoció con ningún problema de seguridad *in vivo*, y la desamidación calculada en Asn^{385/390} de hasta el 13% (basándose en una dosis de 210 mg de Q28D) no se asoció con ningún problema de seguridad *in vivo*.

Glicosilación: La glicosilación es relevante para la función efectora del anticuerpo y la unión del anticuerpo a los receptores Fc en la superficie de las células y la glicosilación alterada puede interferir con una o más de estas funciones. La función efectora incluye la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP).

Se espera que el tezepelumab contenga un único sitio de N glicosilación en ASN²⁹⁸ en cada cadena pesada en función de la presencia de una secuencia consenso, así como la caracterización histórica de los anticuerpos monoclonales IgG2 producidos a partir de cultivos de células de mamíferos. Los sitios de glicosilación se evaluaron mediante la comparación de mapas de péptidos de tripsina con y sin tratamiento con PNGaseF. PNGaseF escinde restos de glucanos complejos, híbridos y con alto contenido de manosa entre el residuo de N-acetilglucosamina del extremo reductor del glucano y el residuo de Asn de la estructura principal peptídica. Las composiciones de especies en el mapa de glucanos N-ligados se determinaron acoplando la salida de la separación cromatográfica a un espectrómetro de masas Orbitrap.

La caracterización exhaustiva del complemento de glucano de tezepelumab demuestra la presencia de estructuras biantenarias unidas a N con diversos grados de galactosilación terminal como especies predominantes y altos niveles (aproximadamente 95) de fucosilación. En la Tabla 4 se muestra la distribución de glucanos de cada principio activo CEX, determinado por HILIC.

Tabla 4. Área del pico% de glucanos del Principio Activo (DS) Tezepelumab

Muestra	Fucosilada		Sialilado	
	(%)	Alto contenido de Manosa (%)	β-Galactosilada (%)	(%)
DS	93.8	3.9	22.8	0.1

La población de derivados de glucano de tezepelumab contiene especies galactosiladas (DS 19.9-28.6 %), especies afucosiladas (DS 1.1-1.2 %) y 3.9-4.8 especies con alto contenido

de manosa en el DS (predominantemente como oligomanosa 5). Basándose en la dosis y los niveles de atributos estimados en el momento de la administración en un ensayo clínico en humanos, se estimaron los niveles de exposición de atributos a los pacientes del ensayo clínico. Las especies afucosiladas calculadas de hasta aproximadamente el 5%, las especies galactosiladas calculadas de hasta el 75-90% y los derivados con alto contenido de manosa calculados de hasta el 14 al 18 % no se asociaron con ningún problema de seguridad *in vivo*; todas las estimaciones se basan en una dosis de 210 mg de Q28D.

Para investigar el efecto biológico de la eliminación de glucanos ligados a N, se trató tezepelumab con PNGaseF, se purificó y se analizó mediante el ensayo de unión de receptor-ligando y el bioensayo del gen indicador basado en células (Tabla 5). Estos resultados demuestran que la eliminación de los N-glucanos no tiene efecto sobre tezepelumab en ninguno de los ensayos de potencia.

Tabla 5. Actividad Biológica de Tezepelumab Desglicosilado

Condición de evaluación	Ensayo de Unión de Receptor- Ligando	Bioensayo del gen indicador basado en células
	%Potencia Relativa*	%Potencia Relativa*
Deglicosilado	112	98

*Valor medio de 3 repeticiones

Los niveles de glucanos con alto contenido de manosa pueden impactar potencialmente la semivida del producto y las condiciones del proceso para el biorreactor de producción pueden influir en los niveles de alto contenido de manosa. El impacto de los parámetros del proceso del biorreactor de producción sobre el alto nivel de manosa se evaluó en estudios de caracterización del proceso con el pH identificado como el principal parámetro del proceso que impacta el alto contenido de manosa. El rango aceptable de pH se estableció para respaldar niveles altos contenidos de manosa constantes. Los niveles altos de contenido de manosa en los estudios de caracterización del proceso fueron $\leq 7.5\%$.

Ejemplo 2-Derivados de tamaño

Además de los cambios químicos a nivel de aminoácidos de tezepelumab, también son posibles los derivados que tienen agregados o fragmentos.

La masa total esperada de la estructura principal peptídica de tezepelumab intacto, suponiendo la presencia de 2 cadenas ligeras no modificadas, 2 cadenas pesadas piroglutamizadas N-terminales y 18 disulfuros es de 144.298 Da. Además, el tezepelumab nativo contiene un solo sitio de glicosilación unido a N en Asn²⁹⁸ en cada una de las dos cadenas pesadas. La masa teórica de tezepelumab glicosilado intacto con 2 copias del glucano en

Asn298, 2 copias del derivado Gly C-terminal de cadena pesada predominante y 2 copias de la piroglutamina N-terminal de cadena pesada predominante es de 147.189 Da. El tratamiento de tezepelumab intacto con PNGaseF elimina la N-glicosilación con un aumento concomitante de 1 Da por cadena de la masa polipeptídica debido a la conversión del Asn portador de glucano en un residuo de Asp y reduce la heterogeneidad del espectro de masas desconvolucionado. La masa teórica del material desglicosilado es de 144.300 Da.

La heterogeneidad de tamaño es una propiedad intrínseca de las proteínas a través de la acción de la escisión química o enzimática, así como la autoasociación a través de diversos mecanismos. Los derivados de tamaño potencial pueden incluir: Especies de alto peso molecular (HMW) a través de la autoasociación para formar especies más grandes que el monómero (dímero, especies oligoméricas de orden superior). El HMW puede formarse mediante asociación no covalente, asociación covalente reducible y/o asociación covalente no reducible; Especies de bajo peso molecular (LMW) a través del truncamiento del esqueleto polipeptídico y/o ensamblaje incompleto de los constituyentes de la subunidad (es decir, cadena ligera y cadena pesada).

La heterogeneidad de tamaño de tezepelumab se evaluó mediante los siguientes métodos analíticos: Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento de exclusión por tamaño (SE-UHPLC) para evaluar el tamaño y la pureza en condiciones nativas; Ultracentrifugación de velocidad de sedimentación (SV-AUC) y SE-HPLC con detección de dispersión de luz estática (SLS) para proporcionar una evaluación adicional de la masa molar; Electroforesis capilar de dodecilsulfato de sodio reducido (rCE-SDS) para determinar el tamaño y la pureza en condiciones reductoras y desnaturizantes. Los derivados separados incluyen fragmentos, enlaces covalentes no reducibles, polipéptidos que carecen de glicosilación normal o que contienen sitios de glicosilación adicionales; electroforesis capilar de dodecilsulfato de sodio no reducido (nrCE-SDS) para determinar el tamaño y la pureza en condiciones desnaturizantes. Los derivados separados incluyen moléculas parcialmente ensambladas, fragmentos, enlaces covalentes.

Los resultados de estas técnicas analíticas indicaron que: El fármaco de tezepelumab se compone predominantemente de monómero, con niveles bajos de dímero y especies de bajo peso molecular, según los resultados de SE-UHPLC, SE-HPLC-SLS y ultracentrifugación analítica de velocidad de sedimentación (SV-AUC). Se observan niveles bajos de especies de BPM en condiciones desnaturizantes (nrCE-SDS) y en condiciones reducidas y desnaturizantes (rCE-SDS). Según los resultados de rCE-SDS, tezepelumab se reduce a componentes predominantemente HC y LC con niveles menores de especies fragmentadas y HMW. Estos incluyen LMW (menor que LC), especies de peso molecular medio (MMW, más

pequeño que HC, pero más grande que LC) y HMW (más grande que HC). Las especies de LMW (por ejemplo, menos de 25 kD) y especies de MMW (entre aproximadamente 25 y 50 kD) se detectaron colectivamente como fragmentos y se observaron en menos del 2% en la preparación de tezepelumab [DS: < 0.4% (98.7-99% para HC+LC); EOS: 1.5% (97.3-97.5%% para HC+LC)].

La heterogeneidad de tamaño de tezepelumab se monitorea mediante SE-UHPLC no desnaturalizante, que es un método de control en proceso y una parte del programa de prueba de estabilidad y liberación de principio activo y producto terminado. El método se realiza en condiciones no desnaturalizantes para resolver las especies de HMW del pico principal del monómero. El principio activo tezepelumab se analizó mediante SE-UHPLC en una columna Waters BEH200 de 4.6 x 150 mm y tamaño de partícula de 1.7 mm en fase móvil con fosfato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 6.8 a un caudal de 0.4 ml/min y detección a 280 absorbancia nm. El perfil está dominado por la presencia de un pico principal (área porcentual relativa 99.6%), eluyendo a aproximadamente 2.8 minutos. Un pico menor, que se observa mejor en el cromatograma mejorado 20X, eluye antes que el pico principal con un tiempo de retención de aproximadamente 2.2 minutos. Este pico contiene tezepelumab HMW y tiene un porcentaje de área relativa de 0.4%, tal como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Porcentaje de Área de Pico del Principio Activo Tezepelumab mediante SE-UHPLC

Identificación de pico	Área Relativa %
Pico principal	99.6
HMW	0.4

En general, las especies de HMW se detectaron en el principio activo (DS) en aproximadamente 0.3-0.6 %, pero en EOS en 1.7 %, por ejemplo, ≤ 1.4 % de HMW (liberación) y ≤ 1.7 HMW (Estabilidad). Basándose en la dosis y los niveles de atributos estimados en el momento de la administración en un ensayo clínico en humanos, se estimaron los niveles de exposición de atributos a los pacientes del ensayo clínico. Las especies de HMW calculadas de hasta el 20% de HMW (basándose en una dosis de 210 mg de Q28D) no se asociaron con ningún problema relacionado con la seguridad *in vivo*.

Se utilizó rCE-SDS para evaluar la cadena pesada y la cadena ligera, así como las especies de LMW y MMW. El electroferograma rCE-SDS para tezepelumab se presenta en los valores de área de pico% que se muestran en la Tabla 7. Estos datos demuestran que tezepelumab está compuesto por una cadena pesada y una cadena ligera unidas por disulfuro. En el principio activo tezepelumab, los picos menores observados en las regiones de LMW y MMW se encuentran dentro del ruido de referencia y la variabilidad del método. De acuerdo con

los resultados de SE-UHPLC, casi no se observaron especies de LMW o MMW. Basándose en la dosis y los niveles de atributos estimados en el momento de la administración en un ensayo clínico en humanos, se estimaron los niveles de exposición de atributos a los pacientes del ensayo clínico. Las especies de fragmentos calculadas de hasta el 15% basándose en una dosis de 210 mg de Q28D no se asociaron con ningún problema de seguridad *in vivo*.

Tabla 7. Porcentaje de Área de Pico del Principio Activo Tezepelumab mediante rCE-SDS

Identificación de pico	Área Relativa %
LC + HC	98.7
LMW	< LOQ*
MMW	< LOQ*
NGHC	0.6
HMW	0.4

*LOQ = 0.3 %

CE-SDS también puede realizarse en condiciones no reductoras para evaluar la presencia de especies no monoméricas. Esta técnica se realiza en condiciones desnaturizantes para desplegar la proteína e interrumpir las asociaciones no covalentes y es particularmente útil para la detección de especies de moléculas parciales y moléculas intactas parcialmente reducidas, es decir, aquellas que carecen de uno o más de los 2 constituyentes de cadena ligera y 2 de cadena pesada o los respectivos enlaces entre cadenas esperados de un anticuerpo monomérico. Se han informado especies que consisten en 2 cadenas pesadas asociadas con una sola cadena ligera (HHL) o una sola cadena pesada asociada con una sola cadena ligera (HL, también conocida como media molécula) a partir de determinadas condiciones de cultivo celular (Trexler-Schmidt M, *et al*, 2010). Tezepelumab se desnaturizó calentándolo en presencia de SDS y N-etilmaleimida a pH 6.5 antes de la inyección electrocinética en un capilar de sílice fundida desnuda (50 mm DI x 30.2 cm) cargado de tampón de gel SDS a 25°C. El voltaje de inyección fue de 10.0 kV, el voltaje de separación fue de 15.0 kV y la absorbancia se monitoreó a 220 nm. Los datos demuestran que el fármaco tezepelumab se compone predominantemente de monómeros de cadenas pesadas y cadenas ligeras unidas por disulfuro, con niveles bajos de especies más pequeñas que comprenden menos del 4.5% de la distribución (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de Área de Pico del Principio Activo Tezepelumab mediante nrCE-SDS

Identificación de pico	Área Relativa %
Pico Principal, monómero HC+LC	95.5
Pre-Picos, especies más pequeñas	4.5

La adición de detección de dispersión de luz estática (SLS) al método SE-HPLC permite la determinación de la masa molar para picos individuales en el cromatograma. La intensidad de la luz dispersada por una especie eluida es proporcional tanto a la concentración como al peso molecular de la especie. La intensidad de la absorbancia UV (280 nm) es proporcional a la concentración de proteína. La masa molar de cada especie liberadora puede ser determinada por el software del fabricante del instrumento utilizando la intensidad de dispersión de luz y la concentración para cada pico. El principio activo tezepelumab se analizó mediante cromatografía SE-HPLC junto con detección de dispersión de luz multiángulo en línea usando un sistema Agilent 1100 HPLC con una columna TSK-GEL G3000SWxl, tamaño de partícula de 5 μ m, 7.8 mm de DI x 300 mm de longitud. Los detectores usados fueron un detector de Wyatt Heleos II, un detector Wyatt Optilab TrEX RI y un detector UV de Agilent con una longitud de onda a 280 nm. Se llevaron a cabo los ciclos de SE-HPLC a temperatura ambiente, con fosfato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 250 mM, tampón de pH 6.8 $\pm$ 0.1 como fase móvil y el caudal fue de 0.5 ml/min.

El perfil UV y las masas molares correspondientes calculadas a partir de los datos de SLS generados para el principio activo tezepelumab muestran que la masa molar del pico principal es de 145 kDa, muy de acuerdo con la masa teórica del monómero de tezepelumab (147 kDa). La masa molar para el pico que eluye antes del monómero promedia 284 kDa, muy de acuerdo con la masa teórica del dímero de tezepelumab (294 kDa), lo que indica que la mayoría de las especies de HMW son dímeros de tezepelumab (Tabla 9).

Tabla 9. Peso Molecular del Pico principal y mayor de HMW del principio activo tezepelumab determinado por SE-HPLC-SLS

Identificación de pico	Peso Molecular (kDa) ^a
Monómero	145 $\pm$ 0.2
Dímero (HMW)	284 $\pm$ 6

Se evaluó la potencia de la fracción HMW enriquecida (enriquecida en dímero de tezepelumab) y el pico principal (que contiene principalmente monómero) mediante el ensayo de unión receptor-ligando y el bioensayo del gen informador basado en células. Los resultados muestran una reducción en la potencia según lo determinado por el ensayo de unión del

receptor-ligando y el bioensayo del gen informador basado en células, al 64% y 62% de la actividad de tezepelumab, respectivamente (Tabla 10).

Tabla 10. Determinación de potencia de fracciones SE-UHPLC

5	Descripción de la muestra	Ensayo de unión a receptor-ligando	Bioensayo del gen indicador basado en células
		% Potencia relativa	% Potencia Relativa
10	HMW	64	62
	Pico principal	108	96

Se esperaba este resultado, ya que la autoasociación impone restricciones estéricas y puede dar lugar a cambios conformacionales, que a su vez pueden afectar a la unión. Pueden ocurrir mayores tasas de formación de agregados a temperaturas elevadas, pH bajo, pH fisiológico, exposición a la luz ultravioleta y visual. La caracterización biológica determinó que las especies de HMW mostraron una potencia reducida. Solo se detectó una reducción en la potencia *in vitro* cuando se enriquecieron a niveles significativamente superiores a las cantidades detectadas en condiciones normales de procesamiento y almacenamiento.

Isoformas de Disulfuro: Tezepelumab es un anticuerpo de la subclase IgG2 y, por lo tanto, se espera que muestre isoformas y derivados estructurales mediados por disulfuro (Wypych *et al.*, Journal of Biological Chemistry, Vol. 283(23): 16194-16205, 2008; Dillon *et al.*, Journal of Biological Chemistry, Vol. 283(23): 16206-16215, 2008). La heterogeneidad estructural de disulfuro es inherente a las moléculas de IgG2 recombinantes y naturales, que contienen 18 enlaces disulfuro: 6 entre cadenas y 12 dentro de la cadena (Wang *et al.*, 2007; Zhang y Czupryn, 2002). La conectividad de los enlaces disulfuro detectados en tezepelumab se aclaró utilizando diferentes enfoques según el número de enlaces presentes en los péptidos no reducidos. Para los péptidos que contenían un solo enlace disulfuro, se usó la comparación de mapas de péptidos tripticos reducidos y no reducidos para asignar la conectividad disulfuro.

A diferencia de la estructura clásica de IgG2-A, la isoforma de IgG2-B contiene enlaces simétricos que conectan dos copias de los péptidos Fab (C_H1-C_L-bisagra) con dos copias del péptido bisagra. IgG2-A/B representa una forma intermedia, que incorpora características parciales tanto de IgG2-A como de IgG2-B, definida por una disposición asimétrica que implica un brazo Fab unido covalentemente a dos copias del péptido bisagra a través de enlaces disulfuro (Wypych *et al.*, Journal of Biological Chemistry, Vol. 283(23): 16194-16205, 2008; Dillon

et al., Journal of Biological Chemistry, Vol. 283(23): 16206-16215, 2008; Zhang *et al.*, Anal Chem., Vol. 82(3): 1090-1099, 2010).

Los péptidos enlazados con disulfuro se identificaron en el principio activo no fraccionado mediante mapeo de péptido usando endoproteasa tripsina en condiciones no reductoras y reductoras. La salida de la separación de RP-HPLC se acopló a un espectrómetro de masas de ionización por electropulverización (ESI-MS) para el análisis de masas además de la detección UV. La digestión no reducida se trató posteriormente con un agente reductor [clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP)] y se volvió a analizar usando las mismas condiciones. Cada péptido unido a disulfuro del mapa de péptidos trípticos no reducidos del principio activo tezepelumab se analizó para determinar sus péptidos constituyentes mediante espectrometría de masas en condiciones reductoras. En conjunto, la caracterización de los péptidos unidos a disulfuro designados de A a H elucidaron los enlaces entre residuos Cys específicos, resumidos en la Tabla 11, que confirman la presencia de la estructura disulfuro clásica, IgG2-A.

Tabla 11. Conectividad IgG2-A confirmada para los péptidos A a H

Péptido unido a disulfuro	Péptidos constituyentes	Enlaces Cys-Cys identificados (Péptidos)	Bucle (Elemento)
A	(H3)/(H12)	Cys ²² (H3) – Cys ⁹⁶ (H12)	V _H (Fab)
B	(H15)/(H16)	Cys ¹⁴⁹ (H15) – Cys ²⁰⁵ (H16)	C _{H1} (Fab)
C	(L2)/(L5)	Cys ²² (L2) – Cys ⁸⁷ (L5)	V _L (Fab)
D	(L8)/(L14)	Cys ¹³⁶ (L8) – Cys ¹⁹⁵ (L14)	C _L (Fab)
E	(H14)/(L15)	Cys ¹³⁶ (H14) – Cys ²¹³ (L15)	Inter HC-LC
F	(H22)/(H27)	Cys ²⁶² (H22) – Cys ³²² (H27)	C _{H2} (Fc)
g	(H35)/(H40)	Cys ³⁶⁸ (H35) – Cys ⁴²⁶ (H40)	C _{H3} (Fc)
H	(H20)/(H20)	Cys ²²⁴ (H20) – Cys ²²⁴ (H20) Cys ²²⁵ (H20) – Cys ²²⁵ (H20) Cys ²²⁸ (H20) – Cys ²²⁸ (H20) Cys ²³¹ (H20) – Cys ²³¹ (H20)	Bisagra

Los mapas de péptidos trípticos no reducidos también mostraron la presencia del derivado de IgG2-B. Se realizó una confirmación adicional del derivado de disulfuro de IgG2-B mediante RP-HPLC no reducida. En conjunto, la caracterización de los péptidos A a D unidos por disulfuro, los péptidos F a G, así como el péptido I elucidaron los enlaces entre residuos Cys específicos, resumidos en la Tabla 12, que confirman la presencia de la estructura de isoforma disulfuro, IgG2-B.

Tabla 12. Conectividad IgG2-B confirmada para los péptidos A a D, F a G e I

Péptido unido a disulfuro	Péptidos constituyentes	Enlaces Cys-Cys identificados (Péptidos)	Bucle (Elemento)
A	(H3)/(H12)	Cys ²² (H3) – Cys ⁹⁶ (H12)	V _H (Fab)
B	(H15)/(H16)	Cys ¹⁴⁹ (H15) – Cys ²⁰⁵ (H16)	C _{H1} (Fab)
C	(L2)/(L5)	Cys ²² (L2) – Cys ⁸⁷ (L5)	V _L (Fab)
D	(L8)/(L14)	Cys ¹³⁶ (L8) – Cys ¹⁹⁵ (L14)	C _L (Fab)
F	(H22)/(H27)	Cys ²⁶² (H22) – Cys ³²² (H27)	C _{H2} (Fc)
g	(H35)/(H40)	Cys ³⁶⁸ (H35) – Cys ⁴²⁶ (H40)	C _{H3} (Fc)
I		Cys ²²⁴ (H20) – Cys ²¹³ (L15)	Forma de IgG2-B
	(H20)/(L15)	Cys ¹³⁶ (H14) – Cys ²²⁵ (H20)	
	(H14)/(H20)	Cys ²²⁸ (H20) – Cys ²²⁸ (H20)	
	(H20)/(H20)	Cys ²³¹ (H20) – Cys ²³¹ (H20)	
	(H20)/(H20)		

La presencia de la isoforma estructural IgG2-A/B también se encontró en los mapas de péptidos tripticos no reducidos de tezepelumab. La confirmación adicional del derivado de isoforma de disulfuro de IgG2-A/B se realiza a través de RP-HPLC no reducida. En conjunto, la caracterización de los péptidos A a G unidos por disulfuro y el péptido J elucidaron los enlaces entre residuos de Cys específicos, como se resume en la Tabla 13, lo que confirma la presencia de la estructura de isoforma disulfuro, IgG2-A/B.

Tabla 13. Conectividad IgG2-A/B confirmada para los péptidos A a G y J

Péptido unido a disulfuro	Péptidos constituyentes	Enlaces Cys-Cys identificados (péptidos)	Bucle (Elemento)
A	(H3)/(H12)	Cys ²² (H3) – Cys ⁹⁶ (H12)	V _H (Fab)
B	(H15)/(H16)	Cys ¹⁴⁹ (H15) – Cys ²⁰⁵ (H16)	C _{H1} (Fab)
C	(L2)/(L5)	Cys ²² (L2) – Cys ⁸⁷ (L5)	V _L (Fab)
D	(L8)/(L14)	Cys ¹³⁶ (L8) – Cys ¹⁹⁵ (L14)	C _L (Fab)
E	(H14)/(L15)	Cys ¹³⁶ (H14) – Cys ²¹³ (L15)	Inter HC-LC
F	(H22)/(H27)	Cys ²⁶² (H22) – Cys ³²² (H27)	C _{H2} (Fc)
g	(H35)/(H40)	Cys ³⁶⁸ (H35) – Cys ⁴²⁶ (H40)	C _{H3} (Fc)
J	(H14)/(H20)	Cys ¹³⁶ (H14) – Cys ²²⁴ (H20)	Forma de IgG2-A/B
	(H20)/(L15)	Cys ²²⁴ (H20) – Cys ²¹³ (L15)	
	(H20)/(H20)	Cys ²²⁵ (H20) – Cys ²²⁵ (H20)	
	(H20)/(H20)	Cys ²²⁸ (H20) – Cys ²²⁸ (H20)	
	(H20)/(H20)	Cys ²³¹ (H20) – Cys ²³¹ (H20)	

La comparación del mapeo de péptidos trípticos reducidos y no reducidos reveló la presencia de los péptidos enlazados por disulfuro esperados para la estructura de IgG2-A predominante, así como péptidos que portan conectividad asociados con las isoformas estructurales de disulfuro de IgG2-A/B e IgG2-B adicionales. El nivel relativo de isoformas de disulfuro en tezepelumab oscila entre aproximadamente 3.4-4.2% IgG2-B, 39.2-42% IgG2-A/B, y 54.2-57.1% IgG2-A basándose en RP-HPLC. Basándose en la dosis y los niveles de atributos estimados en el momento de la administración en un ensayo clínico en humanos, se estimaron los niveles de exposición de atributos a los pacientes del ensayo clínico. Los derivados de isoforma disulfuro calculados IgG2-B de hasta el 15 % basándose en una dosis de 210 mg Q28D, y los derivados de isoforma disulfuro calculados IgG2-A/B de hasta el 75 % basándose en una dosis de 210 mg Q28D no se asociaron con ningún problema de seguridad *in vivo*. La potencia de las isoformas de disulfuro se evaluó mediante el enriquecimiento de las isoformas principales en el principio activo, IgG2-A, IgG2-A/B e IgG2-B usando CEX-UHPLC. Los resultados demostraron que dentro de la capacidad del ensayo, todas las isoformas mostraron una potencia completa.

Ejemplo 3-Análisis de apalancamiento de atributos y potencia

Se realizó un análisis estadístico utilizando el modelo de regresión de mínimos cuadrados para evaluar la relación entre las especies de HMW, CDR isoAsp en D49D50 y la oxidación total de CDR. El análisis se basó en estos atributos determinados a partir del análisis de degradación forzada descrito en el Ejemplo 1.

El análisis se realizó con mediciones de potencia usando el bioensayo de gen informador basado en células descrito en el presente documento (Figuras 1A-C) y también con mediciones de potencia usando el ensayo de unión de ligando-receptor descrito en el presente documento (Figuras 1D-F). Las relaciones identificadas entre los atributos fueron comparables para ambos ensayos de potencia. Se identificaron correlaciones negativas estadísticamente significativas entre las especies de HMW y la oxidación total de CDR trp (Figuras 1B-C y 1E-F). Las relaciones entre CDR IsoAsp D49D50 y la potencia no alcanzaron significación estadística.

Ejemplo 4: Modelado farmacocinético (PK) y especies con alto contenido de manosa

Se utilizó un procedimiento de modelado para estimar el impacto potencial de un aumento en % de manosa alta (HM) en la depuración de tezepelumab. El modelo asumió una semivida de 24.5 días (perfil PK de dosis IV de tezepelumab en un estudio clínico) y una constante de tasa aumentada de 0.035 día⁻¹ para la forma HM de tezepelumab basada en la tasa de disminución HM% de un anticuerpo monoclonal de referencia IgG2 después de una dosis IV única. La constante de tasa aumentada de una forma de HM de anticuerpo monoclonal IgG2 de referencia tiene el valor más alto analizado hasta la fecha y se eligió como una

estimación conservadora de la semivida de tezepelumab HM. El perfil PK se modeló hasta 122.5 días (el equivalente a 5 semividas) y no se usó ninguna corrección para emparejamiento preferencial. Tal como se muestra en la **Tabla 14** a continuación, se modeló una relación entre niveles de HM y el aumento estimado en la eliminación de tezepelumab.

5 **Tabla 14: Altos niveles de manosa e impacto estimado en la eliminación**

10	Niveles de HM	Aumento Estimado en la Eliminación
	5 %	N/A
	8 %	1.7 %
	11 %	3.3 %
	13 %	4.4 %
	15 %	5.5 %
	18 %	7.2 %
	21 %	9.4 %
15	23.1 %	10.0 %

Estos resultados indican que la composición de tezepelumab con 5% o menos de especies de HM mostró poco o ningún aumento en la depuración, y aproximadamente 23% de especies de HM en una composición de tezepelumab resultó en aproximadamente un 10% de aumento en la eliminación de anticuerpos.

20 Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes discutidas y citadas en la presente se incorporan como referencia en sus totalidades. Se sobreentiende que la invención que se da a conocer no se limita a la metodología, protocolos y materiales particulares descritos ya que estos pueden variar. También se sobreentiende que la terminología utilizada en la presente es con el fin de describir realizaciones particulares solamente y no se pretende que limite el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

25 Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento. Se pretende que tales equivalentes estén abarcados por las siguientes reivindicaciones.

30

35