

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192507** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.04.07

(51) Int. Cl. *C07K 14/54* (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.03.12

(54) **СПОСОБЫ ПРОИЗВОДСТВА КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ К IL12/IL23**

(31) 62/818,359

(72) Изобретатель:

(32) 2019.03.14

Барнтаус Кристофер, Гангули

(33) US

Субиной (US), Груневелд Мартен

(86) PCT/IB2020/052247

(NL), Лопес, мл., Мануэль А., Недвед

(87) WO 2020/183418 2020.09.17

Майкл, Смит Кевин Д. (US)

(71) Заявитель:

(74) Представитель:

ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

Медведев В.Н. (RU)

(57) Способы производства для получения антител к IL-12/IL-23p40, например антитела к IL-12/IL-23p40 устекинумаб, в клетках СНО и специфических фармацевтических композиций антитела полезны при лечении различных заболеваний.

**Обзор производственного процесса, стадии
процесса**



202192507

A1

A1

202192507

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-570824EA/022

СПОСОБЫ ПРОИЗВОДСТВА КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ К

IL12/IL23

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Данная заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде посредством EFS-Web как перечень последовательностей в формате ASCII с именем файла JBI6056WOPCT1SEQLIST.txt с датой создания 5 марта 2020 г. и размером 14 000 байт. Перечень последовательностей, представленный посредством EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способам производства антител к IL-12/IL-23p40, например антитела к IL-12/IL-23p40 устекинумаб, и конкретных фармацевтических композиций антител.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Интерлейкин (IL)-12 представляет собой секретируемый гетеродимерный цитокин, состоящий из 2 связанных дисульфидной связью гликозилированных белковых субъединиц, обозначенных как p35 и p40 в соответствии с приблизительными молекулярными массами. IL-12 продуцируется главным образом антигенпредставляющими клетками и стимулирует клеточно-опосредованный иммунитет посредством связывания с двухцепочечным рецепторным комплексом, который экспрессируется на поверхности Т-клеток или естественных киллерных клеток (ЕК). Цепь бета-1 рецептора IL-12 (IL-12R β 1) связывается с субъединицей p40 IL-12, обеспечивая первичное взаимодействие между IL-12 и его рецептором. Однако именно связывание IL-12p35 со второй цепью рецептора, IL-12R β 2, возбуждает внутриклеточный сигнал (например, фосфорилирование STAT4) и активацию несущей рецептор клетки (Presky et al, 1996). Считается, что сигнализация IL-12, происходящая одновременно с представлением антигена, вызывает дифференцировку Т-клеток к фенотипу Т-хелпер 1 (Th1), характеризующемуся продукцией гамма-интерферона (IFN- γ) (Trinchieri, 2003). Считается, что клетки Th1 стимулируют иммунитет к некоторым внутриклеточным патогенам, генерируют изотипы антител с фиксацией комплемента и участвуют в иммунном надзоре за опухолями. Таким образом, IL-12 считается важным компонентом иммунных механизмов защиты хозяина.

Было обнаружено, что белковая субъединица p40 IL-12 может также соединяться с отдельной белковой субъединицей, обозначенной как p19, с образованием нового цитокина, IL-23 (Orpman et al, 2000). Сигнализация IL-23 также осуществляется через двухцепочечный рецепторный комплекс. Поскольку субъединица p40 является общей для IL-12 и IL-23, следовательно, цепь IL-12R β 1 также является общей для IL-12 и IL-23.

Однако именно связывание IL-23p19 со вторым компонентом комплекса рецептора IL-23, IL-23R, возбуждает специфичную внутриклеточную сигнализацию IL-23 (например, фосфорилирование STAT3) и последующую продукцию IL-17 Т-клетками (Parham et al, 2002; Aggarwal et al. 2003). Недавние исследования показали, что биологические функции IL-23 отличаются от таковых IL-12, несмотря на структурное сходство между двумя цитокинами (Langrish et al, 2005).

Ненормальную регуляцию IL-12 и популяций клеток Th1 связывали со многими иммуноопосредованными заболеваниями, поскольку нейтрализация IL-12 антителами эффективна для животных моделей лечения псориаза, рассеянного склероза (РС), ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, инсулинозависимого сахарного диабета (1-го типа) и увеита (Leonard et al, 1995; Hong et al, 1999; Malfait et al, 1998; Davidson et al, 1998). Также было показано, что IL-12 играет решающую роль в патогенезе СКВ в двух независимых мышинных моделях системной красной волчанки (Kikawada et al. 2003; Dai et al. 2007).

Системная красная волчанка (СКВ) представляет собой сложное хроническое гетерогенное аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, которое может поражать практически любую систему органов, течение которого характеризуется периодическими улучшениями и ухудшениями состояния. Согласно некоторым исследованиям системная красная волчанка наблюдается у женщин до 9 раз чаще чем у мужчин. Наиболее часто заболевание возникает в детородном возрасте (15-45 лет). Заболевание более распространено среди пациентов афро-карибского, азиатского и латиноамериканского происхождения. При СКВ иммунная система атакует клетки и ткани организма, что приводит к воспалению и повреждению тканей, что может нанести вред сердцу, суставам, коже, легким, кровеносным сосудам, печени, почкам и нервной системе. У приблизительно половины пациентов с диагностированной СКВ существует угроза поражения внутренних органов. Для диагностики такой угрозы может потребоваться несколько лет. К некоторым основным жалобам пациентов с впервые диагностированной волчанкой относится боль в суставах (62%) и кожные проявления (фоточувствительность; 20%) с последующей устойчивой лихорадкой и слабостью. По оценкам ежегодно частота волчанки варьируется от 1,8 до 7,6 случаев на 100 000, а во всем мире распространенность находится в диапазоне от 14 до 172 случаев на 100 000 людей. У пациентов с заболеванием легкой степени наблюдаются преимущественно кожные высыпания и боли в суставах. В таких случаях им требуется менее агрессивная терапия; схемы лечения включают нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), противомаларийные препараты (например, гидроксихлорохин, хлорохин или хинакрин) и/или низкие дозы кортикостероидов. При более тяжелом течении заболевания пациенты могут страдать различными серьезными расстройствами в зависимости от пораженных систем органов, включая волчаночный нефрит с потенциальной почечной недостаточностью, эндокардит или миокардит, пневмонит, осложнения беременности, инсульт, неврологические осложнения, васкулит и цитопению с сопутствующим риском кровотечения или

инфекции. Распространенные способы лечения заболевания тяжелой степени включают иммуномодулирующие агенты, такие как метотрексат (МТК), азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин, высокие дозы кортикостероидов, биологические В-клеточные цитотоксические агенты или В-клеточные модуляторы, а также другие иммуномодуляторы. У пациентов с тяжелой формой СКВ ожидаемая продолжительность жизни сокращается на срок от 10 до 30 лет в основном из-за осложнений заболевания, стандартной терапии и/или ускоренного атеросклероза. Кроме того, СКВ оказывает существенное влияние на качество жизни, работоспособность, а также на расходы на медицинские услуги. Существующие методы лечения СКВ, как правило, являются цитотоксическими или иммуномодулирующими и могут иметь значительный риск для безопасности. Более новые способы лечения СКВ обеспечивают лишь незначительные преимущества по сравнению со стандартной терапией. Таким образом, существует большая неудовлетворенная потребность в новых альтернативных видах лечения, которые могут обеспечить значительную пользу при этом заболевании, не вызывая высокого риска для безопасности.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Варианты осуществления изобретения определены, соответственно, независимыми и зависимыми пунктами формулы изобретения, прилагаемыми к настоящему документу, которые для краткости включены в настоящий документ путем ссылки. Другие варианты осуществления, признаки и преимущества различных аспектов изобретения очевидны из приведенного ниже подробного описания в сочетании с прилагаемыми на фигурах чертежами.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются антитела к IL-12/IL-23p40, экспрессированные в клетках яичника китайского хомячка (клетки CHO). «Антитела к IL-12/IL-23p40», как определено в изобретении, включают антитела, имеющие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из: (i) тяжелая цепь (HC), содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкая цепь (LC), содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; (ii) аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 8; и (iii) аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3 и аминокислотные последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, экспрессированные в клетках яичника китайского хомячка (клетки CHO).

В определенных вариантах осуществления олигосахаридный профиль антител к IL-12/IL-23p40 включает общее количество видов нейтральных олигосахаридов > 99,0% и общее количество видов заряженных олигосахаридов < 1,0%. В других вариантах осуществления (i) олигосахаридный профиль антител к IL-12/IL-23p40 содержит общее количество видов нейтральных олигосахаридов > 99,0%, общее количество видов заряженных олигосахаридов < 1,0% и отдельные виды нейтральных олигосахаридов G0F

> 70,0%, G1F < 20,0% и G2F < 5,0%; (ii) олигосахаридный профиль, включающий общее количество видов нейтральных олигосахаридов > 99,0% и общее количество видов заряженных олигосахаридов < 1,0%, а также процент площади пика 3 электрофореграммы капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF) антител к IL-12/IL-23p40 составляет > 70,0%; (iii) антитела к IL-12/IL-23p40 не содержат видов дисаилированного гликана, как определено с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или анализа пониженной массы (RMA); (iv) антитела к IL-12/IL-23p40 имеют более длительный период полужизни по сравнению с антителами к IL-12/IL-23p40, экспрессированными в клетках Sp2/0; и /или (v) антитела к IL-12/IL-23p40 представляют собой биоаналог (антитела, одобренные регуляторным органом и /или данные, полученные в ходе исследований устекинумаба) устекинумаба (лекарственный препарат продается компанией Janssen Biotech, Inc. под названием Stelara®).

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ производства антител к IL-12/IL-23p40, включающий: а. культивирование клеток яичника китайского хомячка (клетки СНО); б. экспрессию антител к IL-12/IL-23p40 в клетках СНО; и с. очистку антител к IL-12/IL-23p40, причем (i) олигосахаридный профиль антител к IL-12/IL-23p40 содержит общее количество видов нейтральных олигосахаридов > 99,0% и общее количество видов заряженных олигосахаридов < 1,0%; (ii) олигосахаридный профиль антител к IL-12/IL-23p40 содержит общее количество видов нейтральных олигосахаридов > 99,0%, общее количество видов заряженных олигосахаридов < 1,0% и отдельные виды нейтральных олигосахаридов G0F > 70,0%, G1F < 20,0% и G2F < 5,0%; (iii) олигосахаридный профиль, включающий общее количество видов нейтральных олигосахаридов > 99,0% и общее количество видов заряженных олигосахаридов < 1,0%, и процент площади пика 3 электрофореграммы капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF) антител к IL-12/IL-23p40 составляет > 70,0%; (iv) антитела к IL-12/IL-23p40 не содержат видов дисаилированного гликана, как определено с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или анализа пониженной массы (RMA); (v) антитела к IL-12/IL-23p40 имеют более длительный период полужизни по сравнению с антителами к IL-12/IL-23p40, экспрессированными в клетках Sp2/0; и/или (vi) антитела к IL-12/IL-23p40 являются биоаналогом устекинумаба.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается композиция, содержащая антитела к IL-12/IL-23p40, причем (i) олигосахаридный профиль антител к IL-12/IL-23p40 содержит общее количество видов нейтральных олигосахаридов > 99,0% и общее количество видов заряженных олигосахаридов < 1,0%; (ii) олигосахаридный профиль антител к IL-12/IL-23p40 содержит общее количество видов нейтральных олигосахаридов > 99,0%, общее количество видов заряженных олигосахаридов < 1,0% и отдельные виды нейтральных олигосахаридов G0F > 70,0%, G1F < 20,0% и G2F < 5,0%; (iii) олигосахаридный профиль, включающий общее количество видов нейтральных олигосахаридов > 99,0% и общее количество видов заряженных

олигосахаридов < 1,0%, и процент площади пика 3 электрофореграммы капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF) антител к IL-12/IL-23p40 составляет > 70,0%; (iv) антитела к IL-12/IL-23p40 не содержат видов дисиаилированного гликана, как определено с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или анализа пониженной массы (RMA); (v) антитела к IL-12/IL-23p40 имеют более длительный период полужизни по сравнению с антителами к IL-12/IL-23p40, экспрессированными в клетках Sp2/0; и/или (vi) антитела к IL-12/IL-23p40 являются биоаналогом устекинумаба.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **Фиг. 1** представлен общий обзор 10 стадий процесса производства устекинумаба.

На **Фиг. 2** показана блок-схема 1-ой стадии процесса изготовления для этапов предварительного культивирования и размножения, включая внутривыпускной контроль и тесты производственного мониторинга.

На **Фиг. 3** показана блок-схема 2-ой стадии процесса изготовления, включая внутривыпускной контроль и тесты технологического мониторинга.

На **Фиг. 4** показана репрезентативная хроматограмма ВЭЖХ для анализа олигосахаридов устекинумаба, продуцированного в клетках Sp2/0.

На **Фиг. 5** показан репрезентативный масс-спектр после деконволюции для анализа IRMA устекинумаба, продуцированного в клетках Sp2/0.

На **Фиг. 6** показан репрезентативный профиль электрофореграммы сIEF устекинумаба, экспрессированного в клетках Sp2/0. Также показано графическое изображение, представляющее общее соотношение между пиками сIEF и уменьшением отрицательного заряда/степени сиаилирования, и помечены пики А, В, 1, 2, 3 и С.

На **Фиг. 7** представлен схематический обзор некоторых видов основных N-связанных олигосахаридов в IgG устекинумаба. Также показана роль некоторых ферментов в процессе созревания гликозилирования и роль некоторых двухвалентных катионов (например, Mn^{2+} в качестве кофактора и Cu^{2+} в качестве ингибитора GalT1, см., например, *Biotechnol Bioeng.* 2007 Feb 15;96(3):538-49; *Curr Drug Targets.* 2008 Apr;9(4):292-309; *J Biochem Mol Biol.* 2002 May 31;35(3):330-6). Следует отметить, что соединения с концевой сиаловой кислотой (S1 и S2) являются заряженными, а соединения без концевой сиаловой кислоты (G0F, G1F и G2F) - нейтральными. Образование заряженных соединений зависит от наличия галактозы в G1F и G2F, добавленной ферментом GalT1.

На **Фиг. 8** показана репрезентативная хроматограмма ВЭЖХ для анализа олигосахаридов устекинумаба, продуцированного в клетках CHO. Хеш-метки указывают на все пики выше исходного уровня, выявленные программным обеспечением для анализа, а скобки с метками указывают на группы пиков, представляющих общее количество видов нейтральных олигосахаридов, общее количество видов заряженных олигосахаридов и моносиаилированных олигосахаридов.

На **Фиг. 9** показан репрезентативный профиль электрофореграммы сIEF устекинумаба, экспрессированного в клетках СНО. Также показано графическое изображение, представляющее общее соотношение между пиками сIEF и уменьшением отрицательного заряда/степени сиаилирования, и помечены пики 1, 2, 3 и С.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

В контексте настоящего документа термины «антитело к IL-12», «антитело к IL-23», «антитело к IL-12/23p40», «антитело к IL-12/IL-23p40», «антитело IL-12/23p40», «антитело IL-12/IL-23p40», «часть антитела» или «фрагмент антитела» и/или «вариант антитела» и т. п. включают любую молекулу, содержащую белок или пептид, которая содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, такую как, без ограничения, по меньшей мере одна определяющая комплементарность область (CDR) тяжелой или легкой цепи, или ее часть, связывающая лиганд, вариабельная область тяжелой цепи или легкой цепи, константная область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасная область, или любая их часть, или по меньшей мере одна часть рецептора IL-12 и/или IL-23, или связывающего их белка, который можно встраивать в антитело по настоящему изобретению. Необязательно такое антитело дополнительно воздействует на специфичный лиганд, например, без ограничения, такое антитело может модулировать, снижать, повышать, выступать антагонистом, выступать агонистом, уменьшать, ослаблять, блокировать, ингибировать, уничтожать и/или препятствовать по меньшей мере одной активности или связыванию IL-12/23, либо активности или связыванию рецептора IL-12/23 *in vitro*, *in situ* и/или *in vivo*. В качестве не налагающего ограничения примера приемлемое антитело к IL-12/23p40, его определенная часть или вариант по настоящему изобретению может связываться по меньшей мере с одной молекулой IL-12/23 или ее определенными частями, вариантами или доменами. Приемлемое антитело к IL-12/23p40, его определенная часть или вариант также может необязательно влиять на по меньшей мере один вид активности или функцию IL-12/23, например, без ограничения, на синтез РНК, ДНК или белка, выделение IL-12/23, передачу сигнала рецептора IL-12/23, расщепление IL-12/23 на мембране, активность IL-12/23, продукцию и/или синтез IL-12/23.

При использовании в настоящем документе термины «антитело» или «антитела» относятся к молекулам биоаналогов антител, утвержденным в соответствии с Законом о ценовой конкуренции и инновациях биологических лекарств 2009 г. (закон ВРСІ) и аналогичными законами и нормативами во всем мире. В соответствии с законом ВРСІ может быть продемонстрировано, что антитело является биоаналогом, если данные показывают, что оно «очень схоже» с эталонным продуктом, несмотря на незначительные различия в клинически неактивных компонентах, и «ожидается», что оно даст тот же клинический результат, что и эталонный продукт, с точки зрения безопасности, чистоты и активности (Endocrine Practice: февраль 2018 г., Vol. 24, No. 2, pp. 195-204). Эти молекулы-биоаналоги антител обеспечивают по сокращенной схеме утверждения, при

которой заявитель полагается на клинические данные эталонного продукта изобретателя для получения одобрения регулирующих органов. По сравнению с исходным эталонным изобретенным антителом, которое было одобрено FDA на основании успешных клинических исследований, молекула-биоаналог антитела в настоящем документе называется «биопрепаратом второго эшелона». В соответствии с настоящим документом STELARA® (устекинумаб) представляет собой исходное эталонное изобретенное антитело к IL-12/23p40, которое было одобрено FDA на основании успешных клинических исследований. Устекинумаб доступен в продаже в США с 2009 г.

Предполагается, что термин «антитело» будет дополнительно охватывать антитела, фрагменты расщепления, их определенные участки и варианты, включая миметики антител, или содержать участки антител, которые имитируют структуру и/или функцию антитела или его определенного фрагмента или участка, включая одноцепочечные антитела и их фрагменты. Функциональные фрагменты включают антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с IL-12/23 млекопитающего. Например, изобретение охватывает фрагменты антитела, способные связываться с IL-12/23 или их участками, включая, без ограничений, фрагменты Fab (например, после расщепления папаином), Fab' (например, после расщепления пепсином и частичного восстановления) и F(ab')₂ (например, после расщепления пепсином), Fc_{ab} (например, после расщепления плазмином), pFc' (например, после расщепления пепсином или плазмином), Fd (например, после расщепления пепсином, частичного восстановления и реагрегации), Fv или scFv (например, методами молекулярной биологии) (см., например, Colligan, Immunology, упомянутую выше).

Такие фрагменты можно получать путем ферментативного расщепления, способами синтеза или рекомбинации, известными в данной области и/или описанными в настоящем документе. Антитела можно также продуцировать в различных укороченных формах с помощью генов антител, в которых один или более стоп-кодонов были введены выше естественного сайта терминации. Например, возможно создание комбинированного гена, кодирующего участок тяжелой цепи F(ab')₂, который может включать последовательности ДНК, кодирующие домен C_{H1} и/или шарнирную область тяжелой цепи. Различные участки антител можно химически соединять обычными способами или можно получать в виде единого белка способами генной инженерии.

В контексте настоящего документа термин «человеческое антитело» относится к антителу, в котором по существу каждая часть белка (например, CDR, каркас, домены C_L, C_H (например, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}), шарнир, домены V_L, V_H) является по существу неиммуногенной у человека, лишь с незначительными изменениями или вариациями последовательности. «Человеческое антитело» также может представлять собой антитело, которое получено из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека, или близко соответствует им. Человеческие антитела могут включать остатки аминокислот, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфичным мутагенезом in

vitro, или соматической мутацией *in vivo*). Часто это означает, что человеческое антитело является по существу неиммуногенным у человека. Человеческие антитела классифицируют в группы на основании сходства их аминокислотных последовательностей. Таким образом, посредством поиска по сходству последовательностей можно выбирать антитело со сходной линейной последовательностью в качестве темплата для создания человеческого антитела. Аналогично антитела определенного примата (обезьяна, павиан, шимпанзе и т. д.), грызуна (мышь, крыса, кролик, морская свинка, хомяк и т. п.) и других млекопитающих определяют особенностями антител такого вида, подрода, рода, подсемейства и семейства. Химерные антитела могут дополнительно включать любую комбинацию, указанную выше. Из-за таких изменений или вариаций необязательно и предпочтительно сохраняется или ослабевает иммуногенность у человека или другого вида относительно немодифицированных антител. Таким образом, человеческое антитело отличается от химерного или гуманизированного антитела.

Следует отметить, что человеческое антитело может быть спродуцировано не относящимся к человеку животным, либо прокариотической или эукариотической клеткой, которая способна экспрессировать функционально перестроенные гены человеческих иммуноглобулинов (например, тяжелую цепь и/или легкую цепь). Когда человеческое антитело является одноцепочечным антителом, оно может дополнительно содержать линкерный пептид, который отсутствует в нативных человеческих антителах. Например, Fv может содержать линкерный пептид, такой как от двух до около восьми остатков глицина или других аминокислот, который соединяет переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. Считается, что такие линкерные пептиды имеют человеческое происхождение.

Антитела к ПЛ-12/23p40 (также называемые антителами против ПЛ-12/23p40) (или антитела к ПЛ-23), используемые в способах и композициях по настоящему изобретению, необязательно могут характеризоваться высокой аффинностью связывания с ПЛ-12/23p40 (или с ПЛ-23), и необязательно и предпочтительно имеют низкую токсичность. В частности, в настоящем изобретении используют антитело, определенный фрагмент или вариант изобретения, причем отдельные компоненты, такие как переменная область, константная область и каркас, по отдельности и/или в совокупности, необязательно и предпочтительно имеют низкую иммуногенность. Антитела, которые можно использовать в изобретении, необязательно характеризуются способностью оказывать лечебное действие на пациентов в течение продолжительного периода с поддающимся измерению ослаблением симптомов и низкой и/или приемлемой токсичностью. Низкая или допустимая иммуногенность и/или высокая аффинность, а также другие приемлемые свойства могут способствовать достижению терапевтических результатов. Под «низкой иммуногенностью» в настоящем документе понимают индукцию значимых ответов антител НАНА, НАСА или НАМА у менее чем около 75% или предпочтительно у менее чем около 50% получающих лечение пациентов и/или индукцию низких титров у

получающих лечение пациентов (менее чем около 300, предпочтительно менее чем около 100, по результатам измерения иммуноферментным анализом с двойным антигеном) (см. публикацию Elliott et al., Lancet 344:1125-1127 (1994), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки). Термин «низкая иммуногенность» также можно определить как возникновение поддающихся титрованию уровней антител против антитела к IL-12 у пациентов, которых лечили антителом к IL-12, встречающееся у менее чем 25% получающих лечение пациентов, предпочтительно у менее чем 10% получающих лечение пациентов, при рекомендованной дозе в течение рекомендованного курса терапии в период лечения.

В контексте настоящего документа термин «человеческое антитело» относится к антителу, в котором по существу каждая часть белка (например, CDR, каркас, домены C_L, C_H (например, C_H1, C_H2 и C_H3), шарнир, (V_L, V_H)) является по существу неиммуногенной у человека, лишь с незначительными изменениями или вариациями последовательности. Аналогично антитела определенного примата (обезьяна, павиан, шимпанзе и т. д.), грызуна (мышь, крыса, кролик, морская свинка, хомяк и т. п.) и других млекопитающих определяют особенностями антител такого вида, подрода, рода, подсемейства, семейства. Химерные антитела дополнительно включают любую комбинацию, указанную выше. Из-за таких изменений или вариаций необязательно и предпочтительно сохраняется или ослабевает иммуногенность у человека или другого вида относительно немодифицированных антител. Таким образом, человеческое антитело отличается от химерного или гуманизированного антитела. Следует отметить, что человеческое антитело может быть спродуцировано не относящимся к человеку животным, либо прокариотической или эукариотической клеткой, которая способна экспрессировать функционально перестроенные гены человеческих иммуноглобулинов (например, тяжелую цепь и/или легкую цепь). Когда человеческое антитело является одноцепочечным антителом, оно может дополнительно содержать линкерный пептид, который отсутствует в нативных человеческих антителах. Например, Fv может содержать линкерный пептид, такой как от двух до около восьми остатков глицина или других аминокислот, который соединяет переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. Считается, что такие линкерные пептиды имеют человеческое происхождение.

Можно также применять биспецифические (например, DuoBody®), гетероспецифические, гетероконъюгатные или подобные антитела, которые представляют собой моноклональные, предпочтительно человеческие или гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания с по меньшей мере двумя различными антигенами. Способы получения биспецифических антител известны специалистам в данной области. Обычно рекомбинантная продукция биспецифических антител основана на коэкспрессии двух пар тяжелая цепь/легкая цепь иммуноглобулинов, причем две тяжелые цепи обладают различными видами специфичности (Milstein and Cuello, Nature 305:537 (1983)). Из-за случайного распределения тяжелых и легких цепей

иммуноглобулинов эти гибридомы (квадромы) образуют смесь из 10 различных возможных молекул антител, причем только одна из них имеет правильную биспецифическую структуру. Очистка нужной молекулы, которую обычно выполняют с помощью аффинной хроматографии, может быть затруднительной и иметь низкий выход продукта, и для облегчения продукции биспецифических антител были разработаны различные стратегии.

Полноразмерные биспецифические антитела можно получать, например, путем обмена Fab-плечами (или обмена полумолекулами) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами, посредством введения в СНЗ-интерфейс тяжелой цепи в каждой полумолекуле замен, способствующих образованию гетеродимера из двух полумолекул антител, имеющих разную специфичность, либо *in vitro* в бесклеточной среде, либо с использованием коэкспрессии. Реакция обмена Fab-плечами является результатом реакции дисульфидной изомеризации и диссоциации-ассоциации СНЗ-доменов. Восстановлены дисульфидные мостики тяжелых цепей в шарнирных областях исходных моноспецифических антител. Полученные свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител образуют дисульфидный мостик тяжелых цепей с цистеиновыми остатками второй исходной молекулы моноспецифического антитела, и одновременно происходит высвобождение СНЗ-доменов исходных антител и переформирование путем диссоциации-ассоциации. СНЗ-домены Fab-плеч можно конструировать с возможностью обеспечения гетеродимеризации, а не гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-плеча или полумолекулы, каждое из которых могут связываться с отдельным эпитопом.

Термин «гомодимеризация» в настоящем документе обозначает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих идентичные аминокислотные последовательности СНЗ. Термин «гомодимер» в настоящем документе обозначает антитело, имеющее две тяжелые цепи с идентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

Термин «гетеродимеризация» в настоящем документе обозначает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих неидентичные аминокислотные последовательности СНЗ. Термин «гетеродимер» в настоящем документе обозначает антитело, имеющее две тяжелые цепи с неидентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

Для получения полноразмерных биспецифических антител можно использовать стратегию «выступ во впадину» (см., например, международную публикацию РСТ № WO 2006/028936). Вкратце выбранные аминокислоты, образующие интерфейс между доменами СНЗ в человеческом IgG, можно подвергать мутации в положениях, влияющих на взаимодействия доменов СНЗ и тем самым способствовать образованию гетеродимера. Аминокислоту с короткой боковой цепью (впадина) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном, а аминокислоту с длинной боковой цепью (выступ) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном. После совместной экспрессии двух антител в результате предпочтительного взаимодействия тяжелой цепи с «впадиной» и тяжелой

цепи с «выступом» образуется гетеродимер. Примерами пар замен в СНЗ, образующих выступ и впадину, являются (указано как модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

Можно использовать другие стратегии, такие как стимулирование гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических взаимодействий путем введения замен положительно заряженных остатков на одной поверхности СНЗ и отрицательно заряженных остатков на другой поверхности СНЗ, как описано в патентной публикации США № US2010/0015133; патентной публикации США No. US2009/0182127; патентной публикации США № US2010/028637 или патентной публикации США No. US2011/0123532. В других стратегиях гетеродимеризацию можно стимулировать путем следующих замен (указано модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F или T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в патентной публикации США № US2012/0149876 или патентной публикации США No. US2013/0195849.

В дополнение к вышеописанным способам биспецифические антитела можно создавать *in vitro* в бесклеточной среде посредством введения асимметричных мутаций в СНЗ-участках двух моноспецифических гомодимерных антител и образования биспецифических гетеродимерных антител из двух исходных моноспецифических гомодимерных антител в восстановительных условиях, что способствует изомеризации дисульфидной связи, в соответствии со способами, описанными в публикации международной патентной заявки No. WO2011/131746. В способах первое моноспецифическое двухвалентное антитело и второе моноспецифическое двухвалентное антитело конструируют с возможностью обладания определенными заменами в домене СНЗ, способствующими стабильности гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных для обеспечения подверженности цистеинов в шарнирной области изомеризации дисульфидной связи; получая таким образом биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Условия инкубации можно оптимально возвращать к невосстанавливающим. К примерам пригодных для использования восстанавливающих агентов относятся 2-меркаптоэтиламин (2-MEA), дитиотреитол (DTT), дитиоэритритол (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиэтил)фосфин (TCSEF), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстанавливающий агент выбран из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиэтил)фосфина. Например, можно использовать инкубирование в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20 °C в присутствии по меньшей

мере 25 мМ 2-МЕА или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при уровне рН 5-8, например при рН=7,0 или при рН=7,4.

В настоящем документе термины «эффективность» или «эффективный» в контексте дозы, схемы дозирования, лечения или способа относятся к эффективности конкретной дозы, схемы дозирования или схемы лечения. Эффективность можно измерять на основании изменений течения заболевания в ответ на введение агента настоящего изобретения. Например, антитело к IL12/23p40 или к IL23 настоящего изобретения (например, антитело к IL12/23p40 устекинумаб) вводят субъекту в количестве и в течение времени, которых достаточно для индукции улучшения, предпочтительно стойкого улучшения, в отношении по меньшей мере одного показателя, который отражает тяжесть расстройства, подлежащего лечению. Для определения, достаточно ли количества и времени лечения, оценивают различные показатели, отражающие степень патологии, заболевания или состояния субъекта. Такие показатели включают, например, клинически признанные показатели тяжести заболевания, симптомов или проявлений рассматриваемого расстройства. Степень улучшения по существу определяет врач, который может определить это на основании признаков, симптомов, биопсий или результатов других тестов, и который может также использовать анкеты, предлагаемые субъекту, такие как анкеты оценки качества жизни, разработанные для данного заболевания.

Термин «безопасность» в отношении дозы, схемы дозирования, лечения или способа с использованием антитела к IL12/23p40 или к IL23 настоящего изобретения (например, антитела к IL12/23p40 устекинумаба) относится к благоприятному соотношению риск : польза с приемлемой частотой и/или приемлемой тяжестью возникающих в процессе лечения неблагоприятных явлений (называемых НЯ или НЯВЛ (неблагоприятные явления, возникшие в ходе лечения)) по сравнению со стандартным лекарственным препаратом или другим препаратом сравнения. Неблагоприятное явление - это неблагоприятное медицинское событие у пациента, которому ввели лекарственный препарат. В частности, термин «безопасный» в отношении дозы, схемы дозирования или лечения антителом к IL-12/23p40 или к IL-23 настоящего изобретения относится к приемлемой частоте и/или приемлемой тяжести неблагоприятных явлений, связанных с введением антитела, если их возникновение считается возможно, вероятно или очень вероятно связанным с применением антитела к IL-12/23p40 или к IL-23.

Полезные свойства

Выделенные нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению можно использовать для продукции по меньшей мере одного антитела к IL-12/23p40 (или к IL-23), или его определенного варианта, которые можно использовать для определения эффекта в клетке, ткани, органе или у животного (включая млекопитающих и человека), для диагностики, отслеживания, модулирования, лечения, ослабления, профилактики возникновения или для уменьшения симптомов по меньшей мере одного связанного с IL-12/23 состояния, выбранного из, без ограничения, по меньшей мере одного из иммунного

нарушения или заболевания, сердечно-сосудистого нарушения или заболевания, инфекционного, злокачественного и/или неврологического нарушения или заболевания, либо другого известного или определенного состояния связанного с IL-12/23.

Такой способ может содержать введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к IL-12/23p40 (или к IL-23) в клетку, ткань, орган, организм животного или пациента, которому требуется такое модулирование, лечение, ослабление, предотвращение или уменьшение симптомов, эффектов или механизмов. Эффективное количество может содержать количество от около 0,001 до 500 мг/кг для однократного (например, болюсного), многократного или непрерывного введения, или для достижения концентрации в сыворотке крови 0,01-5000 мкг/мл при однократном, многократном или непрерывном введении, или любой эффективный интервал или значение, как установлено и определено с применением известных способов, описанных в настоящем документе или известных специалистам в соответствующих областях.

Ссылки

Все цитируемые в настоящем документе публикации или патенты, будь они указаны конкретно или нет, полностью включены в настоящий документ путем ссылки, поскольку они показывают уровень развития на момент настоящего изобретения и/или предоставляют описание и необходимую информацию для настоящего изобретения. К публикациям относятся любые научные или патентные публикации, или любая информация, доступная на любых носителях, включая все форматы записи, электронные и печатные форматы. Следующие ниже источники полностью включены в настоящий документ путем ссылки: Ausubel, et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

Антитела настоящего изобретения. Продукция и генерация

По меньшей мере одно антитело к IL-12/23p40 (или к IL-23), применяемое в способе настоящего изобретения, может быть необязательно получено в клеточной линии, смешанной клеточной линии, иммортализованной клетке или клональной популяции иммортализованных клеток, как хорошо известно специалистам в данной области. См., например, публикации Ausubel, et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), каждая из которых полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Предпочтительным антителом к IL-12/23p40 является устекинумаб (STELARA®), имеющее аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO:7, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO:8, и аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO: 3; и аминокислотные последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6. Предпочтительным антителом к IL-23 является гуселькумаб (также называемый CNTO1959). Другие антитела к IL-23 имеют последовательности, перечисленные в настоящем документе, и описанные в патенте США № 7,935,344, содержание которого полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

Человеческие антитела, специфичные к белкам IL-12/23p40 или IL-23 человека или их фрагментам, можно получать в ответ на подходящий иммуногенный антиген, такой как выделенный белок IL-12/23p40, белок IL-23 и/или их участок (включая синтетические молекулы, такие как синтетические пептиды). Другие специфичные или общие антитела млекопитающих можно получать аналогичным образом. Получение иммуногенных антигенов и продукцию моноклонального антитела можно выполнять любым приемлемым способом.

В одном подходе гибридомы продуцируют путем слияния приемлемой иммортализованной клеточной линии (например, клеточной линии миеломы, такой как, без ограничений, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, L243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WENI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMALWA, NEURO 2A и т. п., или гетеромиелом, их продуктов слияния или любых клеток или слитых клеток, полученных из них, или любой другой приемлемой клеточной линии, известной в данной области) (см., например, www.atcc.org, www.lifetech.com. и т. п.), с продуцирующими антитела клетками, такими как, без ограничений, выделенные или клонированные клетки селезенки, периферической крови, лимфы, миндалин или другие иммунные клетки, или клетки с В-клетками или любыми другими клетками, экспрессирующими последовательности константной, или вариабельной, или каркасной областей, или CDR тяжелой или легкой цепи, в виде либо эндогенной, либо гетерологичной нуклеиновой кислоты, в виде рекомбинантной или эндогенной геномной ДНК, кДНК, рДНК, митохондриальной ДНК или РНК, хлоропластной ДНК или РНК, гетерогенной ядерной (гя) РНК, мРНК, тРНК, одно-, двух- или трехцепочечной, гибридной и т. п. или любой их комбинации, происходящей из вирусов, бактерий, водорослей, прокариот, земноводных, насекомых, рептилий, рыб, млекопитающих, грызунов, лошадей, овец, коз, баранов, приматов, эукариот. См., например, Ausubel, выше, и Colligan, Immunology, выше, глава 2, полностью включенные в настоящий документ путем ссылки.

Клетки, продуцирующие антитела, можно также получать из периферической крови или предпочтительно из селезенки или лимфатических узлов человека или других приемлемых животных, которые были иммунизированы интересующим антигеном. Для

экспрессии гетерологичной или эндогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, его определенный фрагмент или вариант настоящего изобретения, можно также использовать любую другую приемлемую клетку-хозяина. Слитые клетки (гибридомы) или рекомбинантные клетки можно выделять с помощью селективных условий культивирования или других известных приемлемых способов и клонировать путем предельного разведения или сортировки клеток или других известных способов. Клетки, продуцирующие антитела с требуемой специфичностью, могут быть выбраны с помощью приемлемого анализа (например, ИФА).

Можно применять другие приемлемые способы продукции или выделения антител требуемой специфичности, включая, без ограничений, способы отбора рекомбинантного антитела из библиотеки пептидов или белков (например, без ограничений, библиотеки дисплея бактериофагов, рибосом, олигонуклеотидов, РНК, кДНК или т. п.; например, производства компаний Cambridge antibody Technologies, гр. Кембриджшир, Великобритания; MorphoSys, с. Мартинсрайд/к. Планегг, Германия; Biovation, г. Абердин, Шотландия, Великобритания; BioInvent, г. Лунд, Швеция; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Хома, г. Беркли, штат Калифорния, США; Ixsys. См., например, EP 368,684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260 (12.05.94); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; PCT/US94/1234; WO92/18619; WO96/07754; (Scripps); WO96/13583, WO97/08320 (MorphoSys); WO95/16027 (BioInvent); WO88/06630; WO90/3809 (Dyax); US 4,704,692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Affymax); WO89/06283; EP 371 998; EP 550 400; (Хома); EP 229 046; PCT/US91/07149 (Ixsys); или стохастически полученных пептидов или белков - US 5723323, 5763192, 5814476, 5817483, 5824514, 5976862, WO 86/05803, EP 590 689 (Ixsys, предварительная публикация в Applied Molecular Evolution (AME); все включены в настоящий документ путем ссылки)), или способами, основанными на иммунизации трансгенных животных (например, мышей SCID, см. Nguyen et al., Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997); Sandhu et al., Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118 (1996); Eren et al., Immunol. 93:154-161 (1998), каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки, как и смежные патенты и заявки), которые способны продуцировать набор человеческих антител, как известно специалистам в данной области и/или описано в настоящем документе. Такие способы включают, без ограничений, рибосомный дисплей (Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942 (May 1997); Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135 (Nov. 1998)); технологии продукции антител из одиночной клетки (например, способ получения антител из отобранных лимфоцитов (SLAM) (патент США № 5,627,052, Wen et al., J. Immunol. 17:887-892 (1987); Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996)); микрокаплю в геле и проточную цитометрию (Powell et al., Biotechnol. 8:333-337 (1990); One Cell Systems, г. Кембридж, штат Массачусетс, США; Gray et al., J. Imm. Meth. 182:155-163 (1995); Kenny et al., Bio/Technol. 13:787-790 (1995)); отбор В-клеток (Steenbakkers et al., Molec. Biol. Reports 19:125-134 (1994); Jonak et

al., Progress Biotech, Vol. 5, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands (1988)).

Кроме того, можно применять и хорошо известные специалистам в данной области способы конструирования или гуманизации нечеловеческих или человеческих антител. По существу гуманизованное или модифицированное геной инженерией антитело имеет один или более аминокислотных остатков из источника, не относящегося к человеку, например, без ограничений, мыши, крысы, кролика, приматов (исключая человека) или других млекопитающих. Эти аминокислотные остатки нечеловеческого происхождения заменяют остатками, которые часто называют «импортированными» остатками, поскольку их обычно берут из «импортированных» переменных, константных или других доменов известной человеческой последовательности.

Описание известных последовательностей Ig человека приведено, например, на веб-сайтах:

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi;
www.ncbi.nih.gov/igblast;
www.atcc.org/phage/hdb.html;
www.mrc-cpe.cam.ac.uk/ALIGNMENTS.php;
www.kabatdatabase.com/top.html; [ftp.ncbi.nih.gov/repository/kabat](ftp://ncbi.nih.gov/repository/kabat);
www.sciquest.com;
www.abcam.com;
www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;
www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html;
www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm;
www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab;
www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html;
www.mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html;
www.immunologylink.com; pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html;
www.appliedbiosystems.com;
www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody;
www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html;
www.biodesign.com;
www.cancerresearchuk.org;
www.biotech.ufl.edu;
www.isac-net.org; baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html;
www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu;
www.mrc-cpe.cam.ac.uk;
www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; <http://>
www.bioinf.org.uk/abs; antibody.bath.ac.uk;
www.unizh.ch;
www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s;

www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.html;
www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/ГАННП.html;
www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;
www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;
www.jerini.de;

см. также Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), каждый из которых полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Как известно специалистам в данной области, такие импортированные последовательности можно применять для снижения иммуногенности или для снижения, усиления или модификации связывания, аффинности, скорости ассоциации, скорости диссоциации, avidности, специфичности, периода полужизни или любой другой приемлемой характеристики. В целом остатки CDR напрямую и в очень значительной степени влияют на связывание с антигеном. Соответственно, сохраняются частично или все нечеловеческие или человеческие последовательности CDR, а нечеловеческие последовательности переменных и константных областей можно заменять человеческими или иными аминокислотами.

Антитела можно также необязательно гуманизировать или конструировать человеческие антитела с сохранением высокой аффинности к антигену и иных благоприятных биологических свойств. Для достижения этой цели гуманизированные (или человеческие) антитела можно необязательно получать в процессе анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с помощью трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулина являются общедоступными и известными специалистам в данной области. Существуют компьютерные программы, демонстрирующие и отображающие вероятные трехмерные конформационные структуры выбранных потенциальных последовательностей иммуноглобулина. Исследование этих изображений позволяет анализировать вероятную роль остатков в функционировании иммуноглобулиновой последовательности кандидата, т. е. проводить анализ остатков, которые влияют на способность иммуноглобулина кандидата связывать свой антиген. Таким образом, из типичных совпадающих и импортированных последовательностей можно выбирать и комбинировать остатки каркасной области (FR) так, чтобы получить требуемую характеристику антитела, например, повышенную аффинность к целевому (-ым) антигену (-ам).

Кроме того, человеческое специфическое антитело к IL-12/23p40 (или антитело к IL-23), применяемое в способе настоящего изобретения, может содержать каркас легкой цепи зародышевой линии человека. В конкретных вариантах осуществления последовательность легкой цепи зародышевой линии выбрана из последовательностей VK человека, включая без ограничений A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, L1, L10, L11, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22,

L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, O1, O11, O12, O14, O18, O2, O4 и O8. В определенных вариантах осуществления этот каркас легкой цепи зародышевой линии человека выбран из V1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-2, V1-20, V1-22, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V2-1, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17, V2-19, V2-6, V2-7, V2-8, V3-2, V3-3, V3-4, V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, V4-6, V5-1, V5-2, V5-4 и V5-6.

В других вариантах осуществления человеческое специфическое антитело к IL-12/23p40 (или к IL-23), применяемое в способе настоящего изобретения, может содержать каркас тяжелой цепи зародышевой линии человека. В конкретных вариантах осуществления этот каркас тяжелой цепи зародышевой линии человека выбран из VH1-18, VH1-2, VH1-24, VH1-3, VH1-45, VH1-46, VH1-58, VH1-69, VH1-8, VH2-26, VH2-5, VH2-70, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64, VH3-66, VH3-7, VH3-72, VH3-73, VH3-74, VH3-9, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-4, VH4-59, VH4-61, VH5-51, VH6-1 и VH7-81.

В конкретных вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи и/или вариабельная область тяжелой цепи содержит каркасную область или по меньшей мере участок каркасной области (например, содержащий 2 или 3 подобласти, такие как FR2 и FR3). В определенных вариантах осуществления по меньшей мере FRL1, FRL2, FRL3 или FRL4 является полностью человеческим. В других вариантах осуществления по меньшей мере FRH1, FRH2, FRH3 или FRH4 является полностью человеческим. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере FRL1, FRL2, FRL3 или FRL4 представляет собой последовательность зародышевой линии (например, зародышевой линии человека) или содержит типичные совпадающие последовательности человека для данной каркасной области (широко доступные из источников известных последовательностей Ig человека, описанных выше). В других вариантах осуществления по меньшей мере FRH1, FRH2, FRH3 или FRH4 представляет собой последовательность зародышевой линии (например, зародышевой линии человека) или содержит типичные совпадающие последовательности человека для данной каркасной области. В предпочтительных вариантах осуществления каркасная область представляет собой полностью человеческую каркасную область.

Гуманизацию или конструирование антител настоящего изобретения можно выполнять с помощью любого известного способа, такого как, без ограничений, способ, описанный в: Winter (Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993), патентах США №: 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5,766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539; 4816567, PCT: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, причем каждый полностью включен

в настоящий документ путем ссылки, включая приведенные в нем ссылки.

В определенных вариантах осуществления антитело содержит измененную (например, мутантную) область Fc. Например, в некоторых вариантах осуществления область Fc была изменена для ослабления или усиления эффекторных функций антитела. В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой изотип, выбранный из IgM, IgA, IgG, IgE или другого изотипа. Альтернативно или дополнительно можно использовать сочетание модификаций аминокислот с одной или более дополнительными модификациями аминокислот, которые изменяют связывание с C1q и/или функцию комплементзависимой цитотоксичности в области Fc молекулы, связывающей IL-23. Особый интерес может представлять такой начальный полипептид, который связывается с C1q и проявляет комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Полипептиды с исходной активностью связывания с C1q, необязательно дополнительно обладающие способностью опосредовать CDC, можно модифицировать так, чтобы одна или обе этих активности усиливались. Модификации аминокислот, которые приводят к изменению C1q и/или модифицируют его функцию комплементзависимой цитотоксичности, описаны, например, в публикации WO0042072, которая включена в настоящий документ путем ссылки.

Как описано выше, возможно конструировать область Fc человеческого специфического антитела к IL-12/23p40 (или к IL-23) настоящего изобретения с измененной эффекторной функцией, например, путем модификации связывания с C1q и/или связывания с FcγR и, таким образом, изменения активности комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) и/или активности антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). «Эффекторные функции» отвечают за активацию или уменьшение биологической активности (например, у субъекта). Примеры эффекторных функций включают без ограничений: связывание с C1q; CDC; связывание с Fc-рецептором; ADCC; фагоцитоз; угнетение рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток; BCR) и т. д. Для таких эффекторных функций может потребоваться, чтобы область Fc была объединена со связывающим доменом (например, переменным доменом антитела), и можно их оценивать с помощью различных анализов (например, анализ связывания Fc, анализ ADCC, анализ CDC и т. д.).

Например, возможно генерировать вариант области Fc человеческого антитела к IL-12/23p40 (или к IL-23) с улучшенным связыванием C1q и с улучшенным связыванием FcγRIII (например, обладающий и повышенной активностью ADCC, и повышенной активностью CDC). В альтернативном варианте осуществления, если требуется снизить или устранить эту эффекторную функцию, можно конструировать вариант области Fc со сниженной активностью CDC и/или со сниженной активностью ADCC. В других вариантах осуществления можно повысить только одну из этих активностей и необязательно также снизить другую активность (например, создать вариант области Fc с повышенной активностью ADCC, но со сниженной активностью CDC, и наоборот).

Мутации Fc можно также вводить в конструкции для изменения их взаимодействия

с неонатальным рецептором Fc (FcRn) и улучшения их фармакокинетических свойств. Была описана коллекция вариантов Fc человека с улучшенным связыванием с FcRn (Shields et al., 2001). Картирование с высоким разрешением связывающего участка на IgG1 человека для FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn и создание вариантов IgG1 с улучшенным связыванием с FcγR (J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

Другой тип аминокислотной замены служит для изменения модели гликозилирования области Fc человеческого специфического антитела к IL-12/23p40 (или к IL-23). Гликозилирование области Fc является, как правило, либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное гликозилирование относится к присоединению углеводной группы к боковой цепи остатка аспарагина. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров: N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы, к гидроксикарбонильной группе, чаще всего к серину или треонину, хотя также можно воспользоваться 5-гидроксипролином или 5-гидроксилизином. Распознаваемые последовательности для ферментативного присоединения углеводного звена к пептидным последовательностям с боковой цепью аспарагина представляют собой аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, причем X - любая аминокислота, за исключением пролина. Таким образом, наличие любой из этих пептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования.

Модель гликозилирования можно изменять, например, путем удаления одного или более сайтов гликозилирования, находящихся в полипептиде, и/или добавлением одного или более сайтов гликозилирования, которые отсутствуют в полипептиде. Добавление сайтов гликозилирования к области Fc человеческого специфического антитела к IL-23 удобно проводить путем изменения аминокислотной последовательности так, что она содержит одну или более из описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Иллюстративный вариант гликозилирования имеет замену аминокислотного остатка Asn 297 в тяжелой цепи. Изменение также можно проводить добавлением или заменой одного или более из остатков серина или треонина в последовательности исходного полипептида (для сайтов O-связанного гликозилирования). Кроме того, замена Asn 297 на Ala может приводить к удалению одного из сайтов гликозилирования.

В определенных вариантах осуществления человеческое специфическое антитело к IL-12/23p40 (или к IL-23) настоящего изобретения экспрессируется в клетках, которые экспрессируют бета-(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnT III) так, что GnT III присоединяет GlcNAc к человеческому антителу к IL-12/23p40 (или к IL-23). Способы продукции антител таким путем представлены в WO/9954342, WO/03011878, патентной публикации 20030003097A1 и публикации Umana et al., Nature Biotechnology, 17: 176-180, Feb. 1999; каждая из которых конкретно полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Человеческое антитело к IL-12/23p40 (или к IL-23) можно также необязательно генерировать путем иммунизации трансгенного животного (например, мыши, крысы,

хомяка, примата, не относящегося к человеку и т. п.), способных продуцировать набор человеческих антител, как описано в настоящем документе и/или как известно специалистам в данной области. Клетки, которые продуцируют человеческие антитела к PL-12/23p40 (или к PL-23), можно выделять из организма таких животных и иммортализовать с помощью подходящих способов, таких как описаны в настоящем документе.

Трансгенных мышей, которые могут продуцировать набор человеческих антител, связывающихся с человеческими антигенами, можно создавать известными способами (например, без ограничений, описанными в патентах США №: 5,770,428, 5,569,825, 5,545,806, 5,625,126, 5,625,825, 5,633,425, 5,661,016 и 5,789,650, выданных Lonberg et al.; выданных Jakobovits et al. WO 98/50433, Jakobovits et al. WO 98/24893, Lonberg et al. WO 98/24884, Lonberg et al. WO 97/13852, Lonberg et al. WO 94/25585, Kucherlapate et al. WO 96/34096, Kucherlapate et al. EP 0463 151 B1, Kucherlapate et al. EP 0710 719 A1, Surani et al. патент США № 5,545,807, Bruggemann et al. WO 90/04036, Bruggemann et al. EP 0438 474 B1, Lonberg et al. EP 0814 259 A2, Lonberg et al. GB 2 272 440 A, в Lonberg et al. Nature 368:856-859 (1994), Taylor et al., Int. Immunol. 6(4):579-591 (1994), Green et al, Nature Genetics 7:13-21 (1994), Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997), Taylor et al., Nucleic Acids Research 20(23):6287-6295 (1992), Tuailon et al., Proc Natl Acad Sci USA 90(8):3720-3724 (1993), Lonberg et al., Int Rev Immunol 13(1):65-93 (1995) и Fishwald et al., Nat Biotechnol 14(7):845-851 (1996), причем каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки). По существу такие мыши имеют по меньшей мере одну содержащую трансген ДНК из по меньшей мере одного локуса человеческого иммуноглобулина, который функционально перестроен или который можно подвергать функциональной перестройке. Эндогенный локус иммуноглобулина у таких мышей можно разрушать или делетировать, чтобы таким образом лишить животное способности продуцировать антитела, кодируемые эндогенными генами.

Скрининг антител на специфичность связывания со сходными белками или фрагментами удобно проводить с использованием библиотек пептидного дисплея. Данный способ включает скрининг больших наборов пептидов для выявления отдельных пептидов, имеющих желательную функцию или структуру. Скрининг антител в библиотеках пептидного дисплея хорошо известен специалистам в данной области. Длина отображаемых пептидных последовательностей может составлять от 3 до 5000 или более аминокислот, зачастую длина составляет 5-100 аминокислот и часто длина составляет от около 8 до 25 аминокислот. В дополнение к способам получения пептидных библиотек прямым химическим синтезом, было описано несколько способов с рекомбинантными ДНК. Один из таких способов предусматривает отображение пептидной последовательности на поверхности бактериофага или клетки. Каждый бактериофаг или клетка содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую конкретную отображаемую пептидную последовательность. Такие способы описаны в патентных публикациях РСТ № 91/17271, 91/18980, 91/19818 и 93/08278.

Другие системы для создания пептидных библиотек имеют аспекты как способов химического синтеза *in vitro*, так и рекомбинантных способов. См. патентные публикации РСТ № 92/05258, 92/14843 и 96/19256. См. также патенты США № 5,658,754; и 5,643,768. В продаже имеются библиотеки пептидных дисплеев, векторы и наборы для скрининга таких производителей, как Invitrogen (г. Карлсбад, штат Калифорния, США) и Cambridge antibody Technologies (гр. Кембриджшир, Великобритания). См., например, патенты США № 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456, выданные Enzon; 5223409, 5403484, 5571698, 5837500, выданные Duax, 5427908, 5580717, выданные Affymax; 5885793, выданный Cambridge antibody Technologies; 5750373, выданный Genentech, 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493, 5698417, выданные Xoma, Colligan, выше; Ausubel, выше; или Sambrook, выше, каждый из указанных патентов и публикаций полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Антитела, применяемые в способе настоящего изобретения, можно также получать с помощью по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к IL-12/23p40 (или к IL-23), с получением трансгенных животных или млекопитающих, таких как козы, коровы, лошади, овцы, кролики и т. п., которые продуцируют такие антитела в своем молоке. Таких животных можно создавать с помощью известных способов. См., например, без ограничений, патенты США № 5,827,690; 5,849,992; 4,873,316; 5,849,992; 5,994,616; 5,565,362; 5,304,489 и т. п., каждый из которых полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Антитела, применяемые в способе настоящего изобретения, можно дополнительно получать с использованием по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к IL-12/23p40 (или к IL-23), с получением трансгенных растений и культур клеток растений (например, без ограничений, табака и маиса), которые продуцируют такие антитела, их определенные участки или варианты в органах растений или в клеточных культурах из них. В качестве не имеющего ограничительного характера примера трансгенные листья табака, экспрессирующие рекомбинантные белки, успешно использовали для получения больших количеств рекомбинантных белков, например, с использованием индуцируемого промотора. См., например, Cramer et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240: 95-118 (1999) и приведенные в этой публикации ссылки. Кроме того, трансгенный маис использовали для экспрессии белков млекопитающих на уровне промышленного производства, причем их биологическая активность была эквивалентна активности белков, которые продуцировали в других системах рекомбинации или очищали из природных источников. См., например, Hood et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 464:127-147 (1999) и приведенные в этой публикации ссылки. Антитела, включая и фрагменты антител, такие как одноцепочечные антитела (scFv), также продуцировали в больших количествах из семян трансгенных растений, в том числе из семян табака и клубней картофеля. См., например, Conrad et al., *Plant Mol. Biol.* 38:101-109 (1998) и приведенные в этой публикации ссылки. Таким образом, антитела настоящего

изобретения можно также продуцировать с использованием трансгенных растений в соответствии с известными способами. См. также, например, Fischer et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30:99-108 (Oct., 1999), Ma et al., *Trends Biotechnol.* 13:522-7 (1995); Ma et al., *Plant Physiol.* 109:341-6 (1995); Whitlam et al., *Biochem. Soc. Trans.* 22:940-944 (1994); и приведенные в этих публикациях ссылки. Каждый из вышеуказанных источников полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Антитела, применяемые в способе по настоящему изобретению, могут связываться с человеческим IL-12/IL-23p40 или IL-23 в широком интервале аффинности (K_D). В предпочтительном варианте осуществления mAb человека может необязательно связываться с человеческим IL-12/IL-23p40 или IL-23 с высокой аффинностью. К примеру, mAb человека может связываться с человеческим IL-12/IL-23p40 или IL-23 с показателем K_D , равным или меньшим чем около 10^{-7} М, например, без ограничения, 0,1-9,9 (или в любом интервале, или с любым значением в нем) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} или в любом интервале, или с любым значением в нем.

Аффинность или авидность антитела для антигена можно определять экспериментально любым приемлемым способом (см., например, Berzofsky, et al., *Antibody-Antigen Interactions in Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kuby, *Janis Immunology*, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992); а также способами, описанными в настоящем документе). Измеренная аффинность конкретного взаимодействия антитело-антиген может изменяться в зависимости от измерения в разных условиях (например, концентрации солей, pH). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания антигена (например, K_D , K_a , K_d) предпочтительно выполнять в стандартизованных растворах антитела и антигена и в стандартизованном буфере, таком как буфер, описанный в настоящем документе.

Молекулы нуклеиновых кислот

Используя приведенную в настоящем документе информацию, например нуклеотидные последовательности, кодирующие по меньшей мере 70-100% последовательных аминокислот по меньшей мере одной из переменных областей или CDR-областей легкой или тяжелой цепи, описанных в настоящем документе, наряду с другими последовательностями, описанными в настоящем документе, их определенные фрагменты, варианты или консенсусные последовательности или депонированный вектор, содержащий по меньшей мере одну из этих последовательностей, молекулу нуклеиновой кислоты настоящего изобретения, кодирующую по меньшей мере одно антитело к IL-12/IL-23p40 или IL-23, можно получать способами, описанными в настоящем документе или известными специалистам в данной области.

Молекулы нуклеиновых кислот настоящего изобретения могут иметь форму РНК, такой как мРНК, гяРНК, тРНК или любой другой формы, или форму ДНК, включая, без ограничений, кДНК и геномную ДНК, полученные путем клонирования, путем синтеза или любых их комбинаций. ДНК может быть трехцепочечной, двухцепочечной, одноцепочечной или комбинированной. Любая часть по меньшей мере одной цепи ДНК

или РНК может быть кодирующей цепью, также известной как прямая цепь, или некодирующей цепью, также называемой обратной цепью.

Выделенные молекулы нуклеиновых кислот, применяемые в способе настоящего изобретения, могут включать молекулы нуклеиновых кислот, содержащие открытую рамку считывания (ORF), необязательно с одним или более интронов, например, без ограничений, для по меньшей мере одного определенного участка по меньшей мере одной CDR, такой как CDR1, CDR2 и/или CDR3 по меньшей мере одной тяжелой цепи или легкой цепи; молекулы нуклеиновых кислот, содержащие кодирующую последовательность для антитела к IL-12/IL-23p40 или IL-23 или вариабельной области; и молекулы нуклеиновых кислот, которые содержат последовательность нуклеотидов, по существу отличающуюся от последовательностей нуклеотидов, описанных выше, но которая, тем не менее, вследствие вырожденности генетического кода кодирует по меньшей мере одно антитело к IL-12/IL-23p40 или к IL-23, как описано в настоящем документе и/или известно специалистам в данной области. Разумеется, генетический код хорошо известен специалистам в данной области. Следовательно, для специалиста будет стандартной процедурой создание подобных вырожденных вариантов нуклеиновых кислот, кодирующих специфичные антитела к IL-12/IL-23p40 или к IL-23, применяемые в способе по настоящему изобретению. См., например, Ausubel, et al., выше, и такие варианты нуклеиновых кислот включены в настоящее изобретение. Не имеющие ограничительного характера примеры выделенных молекул нуклеиновых кислот включают нуклеиновые кислоты, кодирующие соответственно HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 и LC CDR3.

Как указано в настоящем документе, молекулы нуклеиновых кислот, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к IL-12/IL-23p40 или к IL-23, могут включать, без ограничения, таковую, отдельно кодирующую последовательность аминокислот фрагмента антитела; кодирующую последовательность для полноразмерного антитела или его участка; кодирующую последовательность для антитела, фрагмента или участка, а также дополнительные последовательности, такие как кодирующая последовательность по меньшей мере для одного сигнального лидерного или слитого пептида при наличии или в отсутствие вышеуказанных дополнительных кодирующих последовательностей, таких как по меньшей мере один интрон, вместе с дополнительными некодирующими последовательностями, включающими без ограничений некодирующие 5'- и 3'-последовательности, такие как транскрибируемые нетранслируемые последовательности, которые участвуют в транскрипции, процессинге мРНК, включая сигналы сплайсинга и полиаденилирования (например, связывание рибосом и стабильность мРНК); дополнительную кодирующую последовательность, которая кодирует дополнительные аминокислоты, такие как аминокислоты, которые обеспечивают дополнительную функциональность. Таким образом, кодирующая антитело последовательность может быть слита с маркерной последовательностью, такой как последовательность, кодирующая пептид, что облегчает очистку слитого антитела,

содержащего фрагмент или участок антитела.

Селективная гибридизация полинуклеотидов с описанным в настоящем документе полинуклеотидом

В способе настоящего изобретения применяют выделенные нуклеиновые кислоты, которые в условиях селективной гибридизации образуют гибридный полинуклеотид, описанный в настоящем документе. Таким образом, полинуклеотиды настоящего варианта осуществления можно применять для выделения, обнаружения и/или количественного определения нуклеиновых кислот, содержащих такие полинуклеотиды. Например, полинуклеотиды настоящего изобретения можно использовать для идентификации, выделения или амплификации частичных или полноразмерных клонов в депонированной библиотеке. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды представляют собой последовательности геномной ДНК или кДНК, выделенные или иным образом комплементарные к кДНК из библиотеки нуклеиновых кислот человека или млекопитающего.

Библиотека кДНК предпочтительно содержит по меньшей мере 80% полноразмерных последовательностей, более предпочтительно по меньшей мере 85% или 90% полноразмерных последовательностей и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% полноразмерных последовательностей. Библиотеки кДНК можно нормализовать для увеличения представительства редких последовательностей. Для последовательностей с низкой или умеренной идентичностью относительно комплементарных последовательностей гибридизацию обычно, но не исключительно осуществляют в условиях низкой или умеренной жесткости. Для последовательностей с большей идентичностью необязательно применяют условия средней и высокой жесткости. Условия низкой жесткости допускают селективную гибридизацию последовательностей с уровнем идентичности около 70%, и их можно применять для идентификации ортологических или паралогических последовательностей.

Необязательно полинуклеотиды будут кодировать по меньшей мере участок антитела. Полинуклеотиды охватывают последовательности нуклеотидов, которые можно использовать для селективной гибридизации с полинуклеотидом, кодирующим антитело настоящего изобретения. См., например, Ausubel, выше; Colligan, выше, каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Конструирование нуклеиновых кислот

Как хорошо известно специалистам в данной области, выделенные нуклеиновые кислоты можно получать с помощью (а) способов рекомбинации, (b) способов синтеза, (c) способов очистки и/или (d) их сочетаний.

Нуклеиновые кислоты могут для удобства содержать последовательности, дополнительные к полинуклеотиду настоящего изобретения. Например, в нуклеиновую кислоту можно встраивать сайт множественного клонирования, содержащий один или более сайтов эндонуклеазной рестрикции, чтобы облегчить выделение полинуклеотида. Кроме того, можно встраивать транслируемые последовательности, чтобы облегчить

выделение транслированного полинуклеотида настоящего изобретения. К примеру, удобным средством очистки белков настоящего изобретения служит введение последовательности маркера гексагистидина. Нуклеиновая кислота по настоящему изобретению, за исключением кодирующей последовательности, может необязательно представлять собой вектор, адаптер или линкер для клонирования и/или экспрессии полинуклеотида настоящего изобретения.

В такие клонирующие и/или экспрессионные последовательности можно добавлять дополнительные последовательности, чтобы оптимизировать их функцию при клонировании и/или экспрессии, способствовать выделению полинуклеотида или улучшать введение полинуклеотида в клетку. Использование векторов клонирования, экспрессионных векторов, адаптеров и линкеров хорошо известно специалистам в данной области (см., например, Ausubel выше; или Sambrook, выше).

Рекомбинантные способы конструирования нуклеиновых кислот

Композиции выделенных нуклеиновых кислот, таких как РНК, кДНК, геномная ДНК или любая их комбинация, можно получать из биологических источников с помощью любого числа способов клонирования, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления для идентификации желательной последовательности в библиотеке кДНК или геномной ДНК используют олигонуклеотидные зонды, которые селективно гибридизуются в жестких условиях с полинуклеотидами настоящего изобретения. Выделение РНК и конструирование библиотек кДНК и геномных библиотек хорошо известно специалистам в данной области. (см., например, Ausubel выше; или Sambrook, выше).

Способы скрининга и выделения нуклеиновых кислот

Скрининг библиотеки кДНК или геномной ДНК можно проводить с помощью зонда на основе последовательности полинуклеотида, применяемого в способе настоящего изобретения, такого как описанные в настоящем документе. Зонды можно использовать для гибридизации с последовательностями геномной ДНК или кДНК, чтобы выделять гомологичные гены в тех же самых или разных организмах. Специалистам в данной области должно быть понятно, что для анализа можно использовать различные степени жесткости гибридизации; и что жесткой может быть либо гибридизация, либо среда для отмывки. По мере того как условия гибридизации становятся более жесткими, требуемая для образования дуплекса степень комплементарности между зондом и мишенью возрастает. Жесткость условий можно контролировать одним или более из следующих параметров: температура, ионная сила, рН и присутствие частично денатурирующего растворителя, такого как формамид. Например, жесткость условий гибридизации обычно изменяют путем смены полярности раствора реагентов, например посредством изменения концентрации формамида в интервале от 0 до 50%. Степень комплементарности (идентичности последовательностей), необходимая для детектируемого связывания, варьирует в соответствии с жесткостью среды для гибридизации и/или среды для отмывки. Оптимальная степень комплементарности

составляет 100%, или 70-100%, или любой интервал, или значение в нем. Однако следует понимать, что небольшие вариации последовательностей в зондах и праймерах возможно компенсировать путем уменьшения строгости среды гибридизации и/или среды для промывания.

Способы амплификации РНК или ДНК хорошо известны специалистам в данной области и могут применяться в соответствии с настоящим изобретением без лишних экспериментов на основании представленных в настоящем документе инструкций и рекомендаций.

Известные способы амплификации ДНК или РНК включают, без ограничений, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и связанные с ней процессы амплификации (см., например, патенты США № 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159, 4,965,188, выданные Mullis, et al.; 4,795,699 и 4,921,794, выданные Tabor, et al.; 5,142,033, выданный Innis; 5,122,464, выданный Wilson, et al.; 5,091,310, выданный Innis; 5,066,584, выданный Gyllensten, et al.; 4,889,818, выданный Gelfand, et al.; 4,994,370, выданный Silver, et al.; 4,766,067, выданный Biswas; 4,656,134, выданный Ringold), и опосредованную РНК амплификацию, в которой используют в качестве матрицы для синтеза двухцепочечной ДНК обратную РНК к последовательности-мишени (патент США № 5,130,238, выданный Malek, et al, с торговым названием NASBA), полное содержание всех этих ссылок включено в настоящий документ путем ссылки. (см., например, Ausubel выше; или Sambrook, выше).

Например, технологию полимеразной цепной реакции (ПЦР) можно использовать для амплификации последовательностей полинуклеотидов, применяемых в способе по настоящему изобретению, и связанных с ними генов прямо из библиотек геномной ДНК или кДНК. ПЦР и другие способы амплификации *in vitro* можно также использовать, например, для клонирования последовательностей нуклеотидов, кодирующих белки, которые требуется экспрессировать, чтобы применять зонды нуклеиновых кислот для обнаружения наличия желательной мРНК в пробах, секвенирования нуклеиновых кислот или иных целей. Примеры способов, достаточные для определения специалистам в данной области способов амплификации *in vitro*, можно найти в Berger, выше, Sambrook, выше, и Ausubel, выше, а также в Mullis, et al., патенте США № 4,683,202 (1987); и Innis, et al., PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990). Имеющиеся в продаже наборы для амплификации геномной последовательности ПЦР известны специалистам в данной области. См., например, набор Advantage-GC Genomic PCR Kit (Clontech). Кроме того, возможно использование, например, белка 32 гена Т4 (Boehringer Mannheim) для увеличения выхода реакции при ПЦР длинных фрагментов.

Синтетические способы конструирования нуклеиновых кислот

Выделенные нуклеиновые кислоты, применяемые в способе по настоящему изобретению, также можно получать прямым химическим синтезом с помощью известных способов (см., например, Ausubel, et al., выше). Химическим синтезом по существу получают одноцепочечный олигонуклеотид, который можно преобразовать в

двухцепочечную ДНК путем гибридизации с комплементарной последовательностью либо полимеризации с ДНК-полимеразой и одиночной цепью в качестве матрицы. Специалистам в данной области известно, что химический синтез ДНК может ограничиваться последовательностями длиной в 100 или более оснований, однако можно лигировать короткие последовательности, получая более длинные последовательности.

Кассеты рекомбинантной экспрессии

В настоящем изобретении применяются кассеты рекомбинантной экспрессии, содержащие нуклеиновую кислоту. Последовательность нуклеотидов, например последовательность кДНК или геномную последовательность, кодирующую антитело для применения в способе настоящему изобретению, можно использовать для конструирования кассеты рекомбинантной экспрессии, которую можно вводить по меньшей мере в одну желаемую клетку-хозяина. Кассета рекомбинантной экспрессии, как правило, содержит полинуклеотид, функционально связанный с регуляторными последовательностями инициации транскрипции, которые направляют трансляцию полинуклеотида в предназначенной для нее клетке-хозяине. Для направления экспрессии нуклеиновых кислот могут применяться как гетерологичные, так и негетерологичные (т. е. эндогенные) промоторы.

В некоторых вариантах осуществления выделенные нуклеиновые кислоты, которые служат в качестве промотора, энхансера или других элементов, можно встраивать в соответствующее положение (выше, ниже или в интроне) негетерологичной формы полинуклеотида по настоящему изобретению таким образом, чтобы стимулировать или подавлять экспрессию полинуклеотида. Например, эндогенные промоторы можно изменять *in vivo* или *in vitro* путем мутации, делеции и/или замены.

Векторы и клетки-хозяева

Настоящее изобретение также относится к векторам, которые включают выделенные молекулы нуклеиновых кислот, клеткам-хозяевам, которые получены методами геной инженерии с рекомбинантными векторами, и к получению по меньшей мере одного антитела к IL-23 с помощью рекомбинантных методов, которые хорошо известны в данной области. См., например, Sambrook et al., выше; Ausubel, et al., выше; каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Полинуклеотиды можно необязательно соединять с вектором, содержащим селективный маркер для размножения в организме-хозяине. Как правило, плазмидный вектор вводят в осадок, такой как осадок фосфата кальция, или в комплекс с заряженным липидом. Если в качестве вектора используют вирус, его можно упаковывать *in vitro* с помощью приемлемой упаковочной клеточной линии и впоследствии вводить внутрь клеток-хозяев.

Вставку ДНК необходимо функционально связывать с пригодным промотором. Экспрессионные конструкции дополнительно содержат сайты для инициации и терминации транскрипции, а в транскрибируемой области - сайт связывания рибосомы для трансляции. Кодировующий участок зрелых транскриптов с экспрессией конструктами

предпочтительно содержит инициирующий трансляцию в начале и терминирующий кодон (например, UAA, UGA или UAG), надлежащим образом расположенный в конце транслируемой мРНК, причем для экспрессии клеток млекопитающих или эукариот предпочтительны UAA и UAG.

Экспрессионные векторы предпочтительно, но необязательно включают по меньшей мере один селективный маркер. Такие маркеры включают, например, без ограничений, гены устойчивости к метотрексату (MTX), дигидрофолатредуктазе (DHFR, патенты США № 4,399,216; 4,634,665; 4,656,134; 4,956,288; 5,149,636; 5,179,017, ампициллину, неомицину (G418), микофеноловой кислоте или глутаминсинтетазе (GS) (патенты США №: 5,122,464; 5,770,359; 5,827,739) для культуры эукариотических клеток и гены устойчивости к тетрациклину или ампициллину для культивирования в *E. coli* и других бактериях или прокариотах (вышеуказанные патенты полностью включены в настоящий документ путем ссылки). Пригодные культуральные среды и условия для вышеуказанных клеток-хозяев известны в данной области. Приемлемые векторы, разумеется, известны специалистам в данной области. Введение векторного конструкта в клетку-хозяина можно осуществлять путем трансфекции посредством фосфата кальция, DEAE-декстрана, катионных липидов, электропорации, трансдукции, инфекции или других известных способов. Такие способы описаны в данной области, например, в Sambrook, упомянутое, главы 1-4 и 16-18; Ausubel, упомянутое, главы 1, 9, 13, 15, 16.

По меньшей мере одно антитело, применяемое в способе настоящего изобретения, можно экспрессировать в модифицированной форме, такой как гибридный белок, и оно может включать не только сигналы секреции, но также и дополнительные гетерологичные функциональные области. Например, к N-концу антитела можно добавлять область дополнительных аминокислот, особенно заряженные аминокислоты, для повышения стабильности и персистенции антитела в клетке-хозяине, а также в ходе очистки или в ходе последующих манипуляций и хранения. Кроме того, к антителу настоящего изобретения для упрощения очистки можно добавлять пептидные звенья. Такие области можно удалять перед получением антитела или по меньшей мере одного его фрагмента. Такие способы описаны в многочисленных стандартных лабораторных руководствах, например, Sambrook, упомянутое, главы 17.29-17.42 и 18.1-18.74; Ausubel, упомянутое, главы 16, 17 и 18.

Специалисты в данной области знают множество экспрессирующих систем, доступных для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, применяемый в способе настоящего изобретения. В альтернативном варианте осуществления нуклеиновые кислоты можно экспрессировать в клетке-хозяине путем запуска (путем процедуры) в клетке-хозяине, которая содержит эндогенную ДНК, кодирующую антитело. Такие способы хорошо известны в данной области, например, как описано в патентах США № 5,580,734, 5,641,670, 5,733,746 и 5,733,761, которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

К клеткам, используемым для получения антител, их определенных частей или

вариантов, относятся клетки млекопитающих. Системы клеток млекопитающих часто культивируют в виде клеточных монослоев, но клетки также можно адаптировать для выращивания в суспензии, например, во встряхиваемых колбах или биореакторах. В данной области разработано несколько приемлемых линий клеток-хозяев, способных экспрессировать интактные гликозилированные белки, и к ним относятся, например, COS-1 (например, ATCC® CRL1650), COS-7 (например, ATCC® CRL-1651), HEK293, BHK21 (например, ATCC® CCL-10), BSC-1 (например, ATCC® CCL-26), клетки яичника китайского хомячка (CHO), Her G2, P3X63Ag8.653, Sp2/0-Ag14, HeLa и т. п., которые можно получить, например, в American Type Culture Collection, г. Манассас, штат Вирджиния (www.atcc.org). В некоторых вариантах осуществления к клеткам-хозяевам относятся клетки CHO и клетки лимфоидного происхождения, такие как миеломные и лимфомные клетки, например клетки CHO-K1, клетки P3X63Ag8.653 (ATCC® CRL-1580) и клетки Sp2/0-Ag14 (ATCC® CRL-1581).

Экспрессионные векторы для таких клеток могут включать одну или более из следующих последовательностей для контроля экспрессии, таких как, без ограничений, точка начала репликации; промотор (например, поздние или ранние промоторы SV40, промотор CMV (патенты США № 5,168,062; 5,385,839), промотор HSV tk, промотор pgk (фосфоглицераткиназа), промотор EF-1-альфа (патент США № 5,266,491), по меньшей мере один промотор человеческого иммуноглобулина; энхансер и/или информационные сайты для процессинга, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования (например, сайт присоединения поли-А большого Т-Ag SV40) и последовательности терминаторов транскрипции. См., например, Ausubel et al., упомянутое; Sambrook et al., упомянутое. Для получения нуклеиновых кислот или белков по настоящему изобретению можно использовать и другие известные и/или поставляемые клетки, например по каталогу American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (www.atcc.org), либо из других известных или коммерческих источников.

В случае использования эукариотических клеток-хозяев в вектор обычно встраивают последовательности полиаденилирования или терминации транскрипции. Например, в качестве последовательности терминации можно использовать последовательность полиаденилирования из гена бычьего гормона роста. Возможно также добавление последовательностей для точного сплайсинга транскрипта. Примером последовательности сплайсинга служит интрон VP1 из SV40 (Sprague, et al., J. Virol. 45:773-781 (1983)). Кроме того, в вектор можно добавлять последовательности генов для контроля репликации в клетке-хозяине, известные в данной области.

Клеточные линии CHO

Несмотря на доступность нескольких других линий клеток млекопитающих, большинство производимых в настоящее время рекомбинантных терапевтических белков получают в клетках яичника китайского хомячка (CHO) (Jayapal KP, et al. (Jayapal KP, et al. Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. Chem Eng Prog. 2007; 103:40-47; Kunert R, Reinhart D., Advances in recombinant antibody manufacturing. Appl

Microbiol Biotechnol. 2016;100(8):3451-61). К их преимуществам относятся, например, хороший рост в виде прикрепленных клеток или в суспензии, способность адаптироваться к бессывороточным средам и средам с определенным химическим составом, высокая продуктивность и сформированная история одобрения регулирующих органов на продукцию терапевтических рекомбинантных белков. Они также очень легко поддаются генетическим модификациям, и способы трансфекции клеток, экспрессии рекомбинантного белка и селекции клонов хорошо охарактеризованы. Клетки CHO также могут обеспечивать совместимые с человеческим организмом посттрансляционные модификации. В настоящем документе термин «клетки CHO» включает, например, без ограничений, CHO-DG44, CHO-K1, CHO-M, CHO-S, CHO GS knockout, а также их модификации и производные.

Клонирование и экспрессия в клетках CHO.

Одним из векторов, часто используемых для экспрессии в клетках CHO, является pC4. Плазмида pC4 является производной от плазмиды pSV2-dhfr (ATCC® 37146). Плазмида содержит мышинный ген DHFR под контролем раннего промотора SV40. Клетки яичника китайского хомячка или другие клетки, не имеющие дигидрофолатной активности, трансфицированные указанными плазмидами, можно отбирать, выращивая клетки в селективной среде (например, альфа минус MEM, Life Technologies, г. Гейтерсберг, штат Мэриленд) с добавлением химиотерапевтического препарата метотрексата. Амплификация генов DHFR в клетках, устойчивых к метотрексату (MTX), хорошо описана раньше (см., например, F. W. Alt, et al., *J. Biol. Chem.* 253:1357-1370 (1978); J. L. Hamlin and C. Ma, *Biochem. et Biophys. Acta* 1097:107-143 (1990); and M. J. Page and M. A. Sydenham, *Biotechnology* 9:64-68 (1991)). В клетках, выращенных при возрастающих концентрациях MTX, развивается устойчивость к этому лекарственному средству путем чрезмерного продуцирования фермента-мишени, DHFR, в результате амплификации гена DHFR. Если к гену DHFR присоединить второй ген, как правило, происходит его коамплификация и сверхэкспрессия. Специалистам в данной области известно, что такой подход можно использовать для разработки клеточных линий, несущих более 1000 копий амплифицированного (-ых) гена (-ов). Затем, когда метотрексат отменяют, получают клеточные линии, содержащие амплифицированный ген, интегрированный в одну или более хромосом клетки-хозяина.

Плазмида pC4 содержит для экспрессии интересующего гена сильный промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса саркомы Рауса (Cullen, et al., *Molec. Cell. Biol.* 5:438-447 (1985)) плюс фрагмент, выделенный из энхансера немедленно-раннего гена цитомегаловируса человека (CMV) (Boshart, et al., *Cell* 41:521-530 (1985)). После промотора расположены сайты расщепления рестрикционных ферментов BamHI, XbaI и Asp718, которые позволяют интегрировать гены. Позади этих сайтов клонирования плазмида содержит 3'-интрон и сайт полиаденилирования гена препроинсулина крысы. Для экспрессии можно также использовать другие высокоэффективные промоторы, например промотор бета-актина человека, ранние или поздние промоторы SV40 или

длинные концевые повторы других ретровирусов, например ВИЧ и HTLV1. Системы экспрессии генов Tet-Off и Tet-On от компании Clontech и подобные системы можно также использовать для регулируемой экспрессии белков в клетках млекопитающих (M. Gossen, and H. Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551 (1992)). Для полиаденилирования мРНК можно также использовать другие сигналы, например, из гормона роста человека или генов глобинов. Стабильные клеточные линии, несущие интересующий ген, интегрированный в хромосомы, можно также отбирать после котрансфекции с селективным маркером, таким как gpt, G418 или гигромицин. Преимуществом является применение сначала более одного селективного маркера, например G418 плюс метотрексат.

Очистка антитела

Антитело к IL-12/IL-23p40 или к IL-23 можно выделять из рекомбинантных клеточных культур и очищать хорошо известными способами, включая, без ограничений, очистку с помощью белка А, осаждение сульфатом аммония или этанолом, экстракцию кислотой, анионо- или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, гидрофобную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию на гидроксипатите и хроматографию на лектине. Для очистки можно также использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). См., например, Colligan, Current Protocols in Immunology, или Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), например, главы 1, 4, 6, 8, 9, 10, причем каждая полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Антитела, применяемые в способе настоящего изобретения, включают очищенные естественным путем продукты, продукты химического синтеза и продукты, получаемые при помощи рекомбинантных технологий из эукариотических клеток-хозяев, включая, например, клетки дрожжей, высших растений, насекомых и млекопитающих. В зависимости от хозяина, используемого в способе рекомбинантной продукции, антитело может быть гликозилированным или может быть негликозилированным, причем гликозилированное антитело является предпочтительным. Такие способы описаны в многочисленных стандартных лабораторных руководствах, например Sambrook, выше, разделы 17.37-17.42; Ausubel, выше, главы 10, 12, 13, 16, 18 и 20, Colligan, Protein Science, выше, главы 12-14, все публикации полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

Антитела к IL-12/IL-23p40 или к IL-23

Антитело к IL-12/IL-23p40 или к IL-23 по настоящему изобретению включает любой белок или пептид, содержащий молекулу, которая содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, такую как, без ограничения, по меньшей мере один связывающий лиганд участок (LBP), такой как, без ограничения, определяющая комплементарность область (CDR) тяжелой или легкой цепи, или ее связывающий лиганд участок, переменный участок тяжелой или легкой цепи, каркасную область (например, FR1, FR2, FR3, FR4 или их фрагмент, дополнительно необязательно содержащие по

меньшей мере одну замену, вставку или делецию), константную область тяжелой или легкой цепи (например, содержащую по меньшей мере один C_{H1} , шарнир 1, шарнир 2, шарнир 3, шарнир 4, C_{H2} или C_{H3} , или их фрагмент, дополнительно необязательно содержащие по меньшей мере одну замену, вставку или делецию), или любую их часть, которую можно встроить в антитело. Антитело может включать антитела любого млекопитающего, такого как, без ограничений, человек, мышь, кролик, крыса, грызун, примат, или любую их комбинацию и т. п. или может быть получено из них.

Выделенные антитела, применяемые в способе по настоящему изобретению, содержат последовательности аминокислот антител, описанных в настоящем документе, кодируемые любым приемлемым полинуклеотидом, или любое выделенное или полученное антитело. Человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с человеческим IL-12/IL-23p40 или IL-23 и, таким образом, частично или значительно нейтрализует по меньшей мере один вид биологической активности этого белка. Антитело, или его определенный участок, или вариант, которое частично или предпочтительно нейтрализует по меньшей мере одну биологическую активность по меньшей мере одного белка или фрагмента IL-12/IL-23p40 или IL-23, может связывать белок или фрагмент и, таким образом, ингибировать активности, опосредуемые связыванием IL-12/IL-23p40 или IL-23 с рецептором к IL-12 и/или IL-23, или с другими зависимыми от IL-12/IL-23p40 или IL-23 или опосредуемыми им механизмами. В контексте настоящего документа термин «нейтрализующее антитело» относится к антителу, которое может ингибировать зависимую от IL-12/IL-23p40 или от IL-23 активность на около 20-120%, предпочтительно по меньшей мере на около 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% или более, в зависимости от метода анализа. Способность антитела к IL-12/IL-23p40 или IL-23 ингибировать зависимую от IL-12/IL-23p40 или IL-23 активность предпочтительно оценивают с помощью по меньшей мере одного приемлемого метода анализа белка IL-12/IL-23p40 или IL-23 или его рецептора, как описано в настоящем документе и/или как известно специалистам в данной области. Человеческое антитело может представлять собой антитело любого класса (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD и т. п.) или изоформа и может содержать легкую цепь каппа или лямбда. В одном варианте осуществления человеческое антитело содержит тяжелую цепь или определенный фрагмент IgG, например, по меньшей мере один из изоформ IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (например, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$). Антитела этого типа можно получать с использованием трансгенной мыши или другого трансгенного не относящегося к человеку млекопитающего, содержащего трансгены по меньшей мере одной человеческой легкой цепи (например, IgG, IgA и IgM), как описано в настоящем документе и/или как известно специалистам в данной области. В другом варианте осуществления человеческое антитело к IL-23 содержит тяжелую цепь IgG1 и легкую цепь IgG1.

Антитело связывается с по меньшей мере одним определенным эпитопом, специфичным по меньшей мере к одному белку IL-12/IL-23p40 или IL-23, его

субъединице, фрагменту, участку или любой их комбинации. По меньшей мере один эпитоп может содержать по меньшей мере одну область связывания с антителом, которая содержит по меньшей мере один участок белка, причем данный эпитоп предпочтительно содержит по меньшей мере один внеклеточный, растворимый, гидрофильный, внешний или цитоплазматический участок белка.

По существу человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит антигенсвязывающую область, которая содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR1, CDR2 и CDR3) человека или вариант по меньшей мере одной варибельной области тяжелой цепи и по меньшей мере одной определяющей комплементарности области человека (CDR1, CDR2 и CDR3) или вариант по меньшей мере одной варибельной области легкой цепи. Последовательности CDR можно получать из последовательностей зародышевой линии человека, или они могут обладать близким сходством с последовательностями зародышевой линии. Например, можно использовать CDR из синтетической библиотеки, полученной из исходных не относящихся к человеку CDR. Эти CDR можно образовывать из исходной не относящейся к человеку последовательности путем встраивания консервативных замен. В другом конкретном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий участок или вариант может иметь антигенсвязывающую область, которая содержит по меньшей мере участок по меньшей мере одной CDR легкой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и/или CDR3), имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую CDR 1, 2 и/или 3.

Такие антитела можно получать путем химического связывания различных участков (например, CDR, каркасной области) антитела с помощью обычных способов получения и экспрессии молекулы (т. е. одной или более) нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело, с помощью обычных способов технологии рекомбинантных ДНК или с помощью другого приемлемого способа.

Специфическое антитело к IL-12/IL-23p40 или IL-23 может содержать по меньшей мере одну из варибельных областей тяжелой или легкой цепи, имеющую определенную аминокислотную последовательность. Например, в предпочтительном варианте осуществления антитело к IL-12/IL-23p40 или IL-23 содержит антитело к IL-12/IL-23p40 с варибельной областью тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, и варибельной областью легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8. Специфическое антитело к IL-12/IL-23p40 или IL-23 может также содержать по меньшей мере одну из тяжелой или легкой цепи, имеющей определенную аминокислотную последовательность. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело к IL-12/IL-23p40 или IL-23 включает антитело к IL-12/IL-23p40 с тяжелой цепью, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11. Антитела, которые связываются с человеческим IL-12/IL-23p40 или IL-23 и которые содержат определенную варибельную область тяжелой или легкой цепи, можно получать приемлемыми способами, такими как фаговый дисплей (Katsube, Y., et al., Int J Mol. Med.,

1(5):863-868 (1998)), или способами, в которых используют трансгенные животные, известными специалистам в данной области и/или описанными в настоящем документе. Например, трансгенную мышь, содержащую функционально перестроенный трансген тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина и трансген, содержащий ДНК из локуса легкой цепи человеческого иммуноглобулина, который можно подвергать функциональной перестройке, можно иммунизировать человеческим IL-12/IL-23p40 или IL-23 или его фрагментом для индуцирования продукции антител. При желании можно выделять клетки, продуцирующие антитела, и можно получать гибридомы или другие иммортализованные клетки, продуцирующие антитела, как описано в настоящем документе и/или известно специалистам в данной области. В альтернативном варианте осуществления антитело, определенный участок или вариант можно экспрессировать в приемлемой клетке-хозяине с помощью кодирующей нуклеиновой кислоты или ее участка.

Изобретение также относится к антителам, антигенсвязывающим фрагментам, цепям иммуноглобулина и областям CDR, содержащим аминокислоты в последовательности, по существу совпадающей с аминокислотной последовательностью антитела, описанной в настоящем документе. Такие антитела или антигенсвязывающие фрагменты и антитела, содержащие такие цепи или области CDR, могут предпочтительно связываться с человеческим IL-12/IL-23p40 или IL-23 с высокой аффинностью (например, с K_D около 10^{-9} М или менее). Аминокислотные последовательности, по существу совпадающие с последовательностями, описанными в настоящем документе, включают последовательности, содержащие консервативные аминокислотные замены, а также делеции и/или вставки аминокислот. Консервативной аминокислотной заменой называется замена первой аминокислоты на вторую аминокислоту, физические и/или химические свойства которой (например, заряд, структура, полярность, гидрофобность/гидрофильность) сходны со свойствами первой аминокислоты. Консервативные замены включают без ограничений замену одной аминокислоты на другую в пределах следующих групп: лизин (K), аргинин (R) и гистидин (H); аспарат (D) и глутамат (E); аспарагин (N), глутамин (Q), серин (S), треонин (T), тирозин (Y), K, R, H, D и E; аланин (A), валин (V), лейцин (L), изолейцин (I), пролин (P), фенилаланин (F), триптофан (W), метионин (M), цистеин (C) и глицин (G); F, W и Y; C, S и T.

Коды аминокислот

Аминокислоты, составляющие антитела к IL-12/IL-23p40 или к IL-23 по настоящему изобретению, часто обозначают аббревиатурами. Наименования аминокислот можно обозначать с помощью однобуквенного кода аминокислоты, трехбуквенного кода, названия или кодона (-ов) из трех нуклеотидов, что хорошо известно специалистам в данной области (см. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of The Cell*, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994).

ОДНОБУКВЕННЫЙ	ТРЕХБУКВЕННЫЙ	НАЗВАНИЕ	КОДОН (-Ы) ИЗ
---------------	---------------	----------	---------------

КОД	КОД		ТРЕХ НУКЛЕОТИДОВ
A	Ala	Аланин	GCA, GCC, GCG, GCU
C	Cys	Цистеин	UGC, UGU
D	Asp	Аспарагиновая кислота	GAC, GAU
E	Glu	Глутаминовая кислота	GAA, GAG
F	Phe	Фенилаланин	UUC, UUU
G	Gly	Глицин	GGA, GGC, GGG, GGU
H	His	Гистидин	CAC, CAU
I	Ile	Изолейцин	AUA, AUC, AUU
K	Lys	Лизин	AAA, AAG
L	Leu	Лейцин	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
M	Met	Метионин	AUG
N	Asn	Аспарагин	AAC, AAU
P	Pro	Пролин	CCA, CCC, CCG, CCU
Q	Gln	Глутамин	CAA, CAG
R	Arg	Аргинин	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
S	Ser	Серин	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
T	Thr	Треонин	ACA, ACC, ACG, ACU
V	Val	Валин	GUA, GUC, GUG, GUU
W	Trp	Триптофан	UGG
Y	Tyr	Тирозин	UAC, UAU

Последовательности

Пример последовательностей антител к IL-12/IL-23p40, STELARA® (устекинумаб)

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области тяжелой цепи 1 (CDRH1) антитела к IL-12/IL-23p40: (SEQ ID NO:1)

TYWLG

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области тяжелой цепи 2 (CDRH2) антитела к IL-12/IL-23p40: (SEQ ID NO:2)

IMSPVDSDIRYSPSFQG

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области тяжелой цепи 3 (CDRH3) антитела к IL-12/IL-23p40: (SEQ ID NO:3)

RRPGQGYFDF

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области легкой цепи 1 (CDRL1) антитела к IL-12/IL-23p40: (SEQ ID NO:4)

RASQGISSWLA

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области легкой цепи 2 (CDRL2) антитела к IL-12/IL-23p40: (SEQ ID NO:5)

AASSLQS

Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области легкой цепи 3 (CDRL3) антитела к IL-12/IL-23p40: (SEQ ID NO:6)

QQYNIYPYT

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела к IL-12/IL-23p40 (подчеркнуты CDR): (SEQ ID NO:7)

1 EVQLVQSGAE VKKPGESLKI SCKGSGYSFT TYWLGWVRQM PGKGLDWIGI
MSPVDSDIRY

61 SPSFQGQVTM SVDKSITTAY LQWNSLKASD TAMYYCARRR
PGQGYFDFWG QGTLVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела к IL-12/IL-23p40 (подчеркнуты CDR): (SEQ ID NO:8)

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ICRASOGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA
ASSLQSGVPS

61 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNIYPYTFGQ GTKLEIKR

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела к IL-12/IL-23p40 (подчеркнуты CDR): (SEQ ID NO:10)

1 EVQLVQSGAE VKKPGESLKI SCKGSGYSFT TYWLGWVRQM PGKGLDWIGI
MSPVDSDIRY

61 SPSFQGQVTM SVDKSITTAY LQWNSLKASD TAMYYCARRR
PGQGYFDFWG QGTLVTVSSS

121 STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH
TFPAVLQSSG

181 LYSLSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKRVKPK SCDKTHTCPP
CPAPELLGGP

241 SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY
VDGVEVHNAK TKPREEQYNS

301 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK

AKGQPREPQV YTLPPSRDEL

361 TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQ

421 QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность легкой цепи антитела к IL-12/IL-23p40
(подчеркнуты CDR): (SEQ ID NO:11)

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRV ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA
ASSLQSGVPS

61 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNIYPYTFGQ GTKLEIKRTV
AAPSVFIFPP

121 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ
ESVTEQDSKD STYLSSTLT

181 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

Аминокислотная последовательность IL-12

Аминокислотная последовательность человеческого интерлейкина (IL)-12 с альфа-
и бета-субъединицами: (SEQ ID NO:9)

1 RNLPVATPDP GMFPC LHHSQ NLLRAVS NML QKARQTLEFY PCTSEEDHE
DITKDKTSTV

61 EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK
MYQVEFKTMN

121 AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK
IKLCILLHAF

181 RIRAVTIDRV MSYLNASIWE LKKDVYVVEL DWYPDAPGEM
VVLTCDTPEE DGITWTLDQS

241 SEVLGSGKTL TIQVKEFGDA GQYTCHKGGE VLSHSLLLLH KKEDGIWSTD
ILKDQKEPKN

301 KTFLRCEAKN YSGRFTCWVL TTISTDLTFS VKSSRGSSDP QGVTCGAATL
SAERVGRDNK

361 EYEYSVECQE DSACPAEES LPIEVMVDAV HKLKYENYTS SFFIRDIIPK
DPPKNLQLKP

421 LKNSRQVEVS WEYPDTWSTP HSYFSLTFCV QVQGKSKREK
KDRVFTDKTS ATVICRKNAS

481 ISVRAQDRYY SSSWSEWASV PCS

Антитело к IL-12/IL-23p40 или к IL-23, применяемое в способе настоящего
изобретения, может включать одну или более аминокислотных замен, делеций или
добавлений вследствие естественных мутаций либо действий человека, описанных в
настоящем документе.

Число аминокислотных замен, которое может произвести квалифицированный
специалист, зависит от многих факторов, включая описанные выше. Говоря по существу,
количество аминокислотных замен, вставок или делеций для любого данного антитела к

IL-12/IL-23p40 или к IL-23, фрагмента или варианта будет составлять не более 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, например 1-30, или любой интервал, или значение в нем, как указано в настоящем документе.

Специалисты в данной области могут идентифицировать аминокислоты в специфическом антителе к IL-12/IL-23p40 или IL-23, которые необходимы для его функции, известными способами, такими как сайт-направленный мутагенез или сканирующий аланином мутагенез (например, Ausubel, см. выше главы 8, 15; Cunningham and Wells, *Science* 244:1081-1085 (1989)). Последняя процедура предполагает добавление точечных мутаций аланина в каждом остатке в молекуле. Полученные мутантные молекулы впоследствии испытывают на биологическую активность, такую как, без ограничений, по меньшей мере одна активность по нейтрализации IL-12/IL-23p40 или IL-23. Критичные для связывания с антителом сайты можно также идентифицировать путем анализа структуры, например путем кристаллизации, ядерного магнитного резонанса или фотоаффинного мечения (Smith, et al., *J. Mol. Biol.* 224:899-904 (1992) и de Vos, et al., *Science* 255:306-312 (1992)).

Антитела к IL-12/IL-23p40 или IL-23 могут включать, без ограничений, по меньшей мере один участок, последовательность или комбинацию, выбранные из от 5 до всех последовательных аминокислот из по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 или 11.

Антитела к IL-12/IL-23p40 или IL-23 или установленные участки или варианты могут включать, без ограничений, по меньшей мере один участок, последовательность или комбинацию, выбранные из по меньшей мере 3-5 последовательных аминокислот с указанными выше SEQ ID NO; 5-17 последовательных аминокислот указанных выше SEQ ID NO., 5-10 последовательных аминокислот указанных выше SEQ ID NO., 5-11 последовательных аминокислот указанных выше SEQ ID NO., 5-7 последовательных аминокислот указанных выше SEQ ID NO; 5-9 последовательных аминокислот указанных выше SEQ ID NO.

Антитело к IL-12/IL-23p40 или IL-23 может дополнительно необязательно содержать полипептид из по меньшей мере одной из 70-100% из числа 5, 17, 10, 11, 7, 9, 119, 108, 449 или 214 последовательных аминокислот с указанными выше SEQ ID NO. В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность цепи иммуноглобулина или ее участок (например, варибельная область, CDR) имеет идентичность около 70-100% (например, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, или любой интервал, или значение в нем) с аминокислотной последовательностью соответствующей цепи по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO, указанных выше. Например, аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи можно сравнивать с последовательностью с указанными выше SEQ ID NO, или аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи можно сравнивать с указанными выше SEQ ID NO. 70-100% идентичности аминокислот (например, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99,

100 или любой интервал, или значение в нем) предпочтительно определяют с помощью приемлемого компьютерного алгоритма, известного специалистам в данной области.

«Идентичностью», как известно специалистам в данной области, называется соотношение между двумя или более полипептидными последовательностями, или двумя или более полинуклеотидными последовательностями, определяемое путем сравнения этих последовательностей. В данной области «идентичность» также означает степень родства последовательностей между полипептидными или полинуклеотидными последовательностями, как определено по сопоставлению цепочек таких последовательностей. «Идентичность» и «подобие» можно легко подсчитать известными способами, включая, без ограничений, описанные в *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; и *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; и Carillo, H., and Lipman, D., *Siam J. Applied Math.*, 48:1073 (1988). Кроме того, выраженную в процентах идентичность можно получать на основании сопоставлений последовательностей аминокислот и нуклеотидов, генерированных с заданными по умолчанию настройками компонента AlignX в пакете программ Vector NTI Suite 8.0 (Informax, г. Фредерик, штат Мэриленд, США).

Предпочтительные способы определения идентичности предназначены для создания наилучшего соответствия между тестируемыми последовательностями. Способы определения идентичности и подобия систематизированы в общедоступных компьютерных программах. Предпочтительные компьютерные программные способы определения идентичности и подобия между двумя последовательностями включают, без ограничений, пакет программ GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN и FASTA (Atschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.* 215:403-410 (1990)). Программа BLAST X общедоступна от NCBI и других источников (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBINLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)). Для определения идентичности также можно использовать хорошо известный алгоритм Smith Waterman.

Предпочтительные параметры сравнения полипептидных последовательностей включают следующие:

(1) Алгоритм: Needleman and Wunsch, *J. Mol Biol.* 48:443-453 (1970). Матрица сравнения: BLOSSUM62 из Hentikoff and Hentikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 89:10915-10919 (1992)

Штраф за гэн: 12

Штраф за длину гэпа: 4

Программа, используемая с данными параметрами, находится в общем доступе как программа «гэпа» от Genetics Computer Group, Мэдисон, штат Висконсин, США.

Указанные выше параметры являются параметрами по умолчанию для сравнений пептидных последовательностей (с отсутствием штрафа за концевые гэпы).

Предпочтительные параметры для сравнения полинуклеотидов включают следующие:

(1) Алгоритм: Needleman and Wunsch, J. Mol Biol. 48:443-453 (1970).

Матрица сравнения: совпадения=+10, несовпадение=0

Штраф за гэп: 50

Штраф за длину гэпа: 3

Доступно как: программа «гэпа» от Genetics Computer Group, Мэдисон, штат Висконсин, США. Указанные параметры являются параметрами по умолчанию для сравнений последовательностей нуклеотидов.

В качестве примера, полинуклеотидная последовательность может быть идентичной другой последовательности, то есть на 100% идентичной, или может включать до определенного целого числа изменений нуклеотидов по сравнению с эталонной последовательностью. Такие изменения выбирают из группы, состоящей из делеции, замены, включая транзицию и трансверсию, или вставки по меньшей мере одного нуклеотида, и при этом изменения могут иметь место в 5'- или 3'-концевых положениях эталонной последовательности нуклеотидов, или где-нибудь между этими концевыми положениями, и могут быть либо рассеянными поодиночке среди нуклеотидов в эталонной последовательности, либо быть собранными в одну или более последовательных групп в пределах эталонной последовательности. Число изменений нуклеотидов определяют умножением общего числа нуклеотидов в последовательности на число, определяющее соответственный процент идентичности (поделенный на 100), а затем вычитают этот результат из общего числа нуклеотидов в последовательности, или:

$$n.\text{sub}.n.\text{ltorsim}.x.\text{sub}.n -(x.\text{sub}.n.y),$$

где $n.\text{sub}.n$ - число изменений нуклеотидов, $x.\text{sub}.n$ - общее число нуклеотидов в последовательности, и y равен, например, 0,70 для 70%, 0,80 для 80%, 0,85 для 85%, 0,90 для 90%, 0,95 для 95% и т. п., и при этом любой нецелый результат умножения $x.\text{sub}.n$ на y округляют с уменьшением до ближайшего целого числа, прежде чем вычесть его из $x.\text{sub}.n$.

Изменения полинуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO выше, могут создавать нонсенс-, миссенс-мутации или мутации сдвига рамки считывания в данной кодирующей последовательности и тем самым изменять полипептид, кодируемый полинуклеотидом, после таких изменений. Аналогичным образом, полипептидная последовательность может быть идентична приведенной выше эталонной последовательности SEQ ID NO, т. е. на 100% идентичной, или может включать в себя до определенного целого числа изменений аминокислот по сравнению с эталонной последовательностью таким образом, что процент идентичности составляет менее 100%. Такие изменения выбраны из группы, состоящей из делеции, замены, включая консервативную и неконсервативную замену, или вставки по меньшей мере одной

аминокислоты, и при этом изменения могут иметь место в положениях на аминном или карбоксильном конце эталонной полипептидной последовательности, или где-нибудь между этими концевыми положениями, и могут быть либо рассеянными поодиночке среди аминокислот в эталонной последовательности, либо быть собранными в одну или более последовательных групп в пределах эталонной последовательности. Число изменений аминокислот для данного процента идентичности определяют умножением общего числа аминокислот в приведенной выше SEQ ID NO на численный процент от соответствующего процента идентичности (поделенный на 100), а затем вычитают этот результат из общего числа аминокислот в приведенной выше SEQ ID NO или: $n \cdot \text{seq.id.no} \cdot \text{sim} \cdot x \cdot \text{seq.id.no} - (x \cdot \text{seq.id.no} \cdot y)$, где « $n \cdot \text{seq.id.no}$ » представляет собой число изменений аминокислот, « $x \cdot \text{seq.id.no}$ » представляет собой общее число аминокислот в SEQ ID No, указанных выше, а « y » составляет, например, 0,70 для 70%, 0,80 для 80%, 0,85 для 85% и т. д., и при этом любое нецелое полученное число « $x \cdot \text{seq.id.no}$ » и « y » округляют с уменьшением до ближайшего целого числа, прежде чем вычесть его из « $x \cdot \text{seq.id.no}$ ».

Примеры последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей и их участков представлены в вышеуказанных SEQ ID NO. Антитела настоящего изобретения или их конкретные варианты могут содержать любое количество смежных аминокислотных остатков из антитела настоящего изобретения, причем это число выбрано из группы целых чисел в интервале 10-100% от числа последовательных остатков в антителе к IL-12/IL-23p40 или к IL-23. Длина данной подпоследовательности последовательных аминокислот необязательно составляет по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 или более аминокислот, или любой интервал, или значение в нем. Кроме того, количество таких подпоследовательностей может представлять собой любое целое число, выбранное из группы, состоящей из 1-20, например по меньшей мере 2, 3, 4 или 5.

Согласно определению специалистов в данной области настоящее изобретение включает по меньшей мере одно биологически активное антитело настоящего изобретения. Биологически активные антитела обладают удельной активностью, составляющей по меньшей мере 20%, 30% или 40%, и предпочтительно по меньшей мере 50%, 60% или 70%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%, 90% или 95-100% или более (включая без ограничений вплоть до 10-кратного увеличения удельной активности) от активности нативного (несинтетического), эндогенного или родственного ему и известного антитела. Способы качественного и количественного анализа ферментативной активности и субстратной специфичности хорошо известны специалистам в данной области.

В другом аспекте изобретение относится к человеческим антителам и антигенсвязывающим фрагментам, как описано в настоящем документе, которые модифицируют путем ковалентного присоединения органической функциональной группы. Такая модификация позволяет создавать антитело или антигенсвязывающий фрагмент с улучшенными фармакокинетическими свойствами (например, увеличенным

периодом полужизни *in vivo* в сыворотке). В качестве органической функциональной группы можно использовать линейную или разветвленную гидрофильную полимерную группу, группу жирной кислоты или группу сложного эфира жирной кислоты. В конкретных вариантах осуществления гидрофильная полимерная группа может иметь молекулярную массу от около 800 до около 120 000 дальтон и представлять собой полиалкангликоль (например, полиэтиленгликоль (PEG), полипропиленгликоль (PPG)), углеводный полимер, аминокислотный полимер или поливинилпирролидон, а группа жирной кислоты или группа сложного эфира жирной кислоты может содержать от около восьми до около сорока атомов углерода.

В настоящем документе термин «период полужизни» означает, что концентрация лекарства в плазме (например, терапевтического антитела к IL-12/IL-23p40 устекинумаб) уменьшается наполовину после одного периода полувыведения. Следовательно, в каждом последующем периоде полужизни выводится меньшее количество лекарственного средства. После одного периода полужизни количество лекарственного средства, оставшееся в организме, составляет 50%, после двух периодов полужизни 25% и т. д. Период полужизни лекарственного средства зависит от его клиренса и объема распределения. Считается, что период полужизни не зависит от количества лекарственного средства в организме.

Модифицированные антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут содержать одну или более органических звеньев, которые имеют прямую или непрямую ковалентную связь с антителом. Каждая органическая функциональная группа, связанная с антителом или с антигенсвязывающим фрагментом изобретения, может независимо представлять собой гидрофильную полимерную группу, группу жирной кислоты или группу сложного эфира жирной кислоты. В контексте настоящего документа термин «жирная кислота» охватывает одноосновные и двухосновные карбоновые кислоты. В контексте настоящего документа термин «гидрофильная полимерная группа» обозначает органический полимер, обладающий лучшей растворимостью в воде, чем в октане. Например, полилизин лучше растворяется в воде, чем в октане. Таким образом, антитело, модифицированное путем ковалентного присоединения полилизина, включено в изобретение. Гидрофильные полимеры, приемлемые для модификации антител изобретения, могут быть линейными или разветвленными, и включают, например, полиалкангликоли (например, PEG, монометоксиполиэтиленгликоль (mPEG), PPG и т. п.), углеводы (например, декстран, целлюлозу, олигосахариды, полисахариды и т. п.), полимеры гидрофильных аминокислот (например, полилизин, полиаргинин, полиаспартат и т. п.), оксиды полиалканов (например, полиэтиленоксид, полипропиленоксид и т. п.) и поливинилпирролидон. Гидрофильный полимер, модифицирующий антитело изобретения, предпочтительно имеет молекулярную массу от около 800 до около 150 000 дальтон, как отдельный фрагмент молекулы. Например, PEG₅₀₀₀ и PEG_{20,000}, где нижний индекс означает среднюю молекулярную массу полимера в дальтонах. Гидрофильная полимерная группа может иметь от одного до около шести заместителей - групп алкила,

жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты. Гидрофильные полимеры с замещающей группой жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты можно получать с применением приемлемых способов. Например, полимер, содержащий аминогруппу, может быть связан с карбоксилатом жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты, а активированный карбоксилат (например, активированный N, N-карбонилдиимидазолом) на жирной кислоте или сложном эфире жирной кислоты может быть связан с гидроксильной группой полимера.

Жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот, приемлемые для модификации антител изобретения, могут быть насыщенными или могут содержать одну или более ненасыщенных связей. Жирные кислоты, приемлемые для модификации антител изобретения, включают, например, n-додеcanoат (C₁₂, лаурат), n-тетрадеcanoат (C₁₄, мирилат), n-октадеcanoат (C₁₈, стеарат), n-эйкозаноат (C₂₀, арахидат), n-докозаноат (C₂₂, бегенат), n-триаконтаноат (C₃₀), n-тетрааконтаноат (C₄₀), *cis*- Δ^9 -октадеcanoат (C₁₈, олеат), полностью *cis*- $\Delta^{5,8,11,14}$ -эйкозатетраеноат (C₂₀, арахидонат), октандикарбоновую кислоту, тетрадекандикарбоновую кислоту, октадекандикарбоновую кислоту, докозандикарбоновую кислоту и т. п. Приемлемые сложные эфиры жирных кислот включают сложные моноэфиры дикарбоновых кислот, содержащие линейную или разветвленную группу низшего алкила. Группа низшего алкила может содержать от одного до около двенадцати, предпочтительно от одного до около шести атомов углерода.

Модифицированные человеческие антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно получать с помощью приемлемого способа, например путем реакции с одним или более модифицирующими агентами. В контексте настоящего документа термин «модифицирующий агент» относится к приемлемой органической группе (например, гидрофильному полимеру, жирной кислоте, сложному эфиру жирной кислоты), которая содержит активирующую группу. «Активирующая группа» означает химический фрагмент или функциональную группу, которые при подходящих условиях могут вступать в реакцию со второй химической группой и таким образом образовывать ковалентную связь между модифицирующим агентом и второй химической группой. Например, к реагирующим с амином активирующим группам относятся электрофильные группы, такие как тозилат, мезилат, галоген (хлор, бром, фтор, йод), сложные эфиры N-гидроксисукцинимидила (NHS) и т. п. Активирующие группы, способные реагировать с тиолами, включают, например, малеимид, йодацетил, акрилолил, дисульфиды пиридила, тиол 5-тиол-2-нитробензойной кислоты (TNB-тиол) и т. п. Функциональная группа альдегида может быть связана с амин- или гидразид-содержащими молекулами, а группа азида может реагировать с трехвалентной фосфорной группой с образованием фосфорамидатных или фосфоримидных связей. Приемлемые способы введения активирующих групп в молекулы известны специалистам в данной области (см., например, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)). Активирующая группа может быть связана с органической группой (например, гидрофильным полимером, жирной кислотой, эфиром жирной кислоты) прямо или через

линкерное звено, например двухвалентную группу C₁-C₁₂, в которой один или более атомов углерода могут замещаться гетероатомом, таким как кислород, азот или сера. Приемлемые линкерные звенья включают, например, тетраэтиленгликоль, -(CH₂)₃-, -NH-(CH₂)₆-NH-, -(CH₂)₂-NH- и -CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH-NH-. Модифицирующие агенты, которые содержат линкерную функциональную группу, можно получать, например, путем реакции моно-Вос-алкилдиамин (например, моно-Вос-этилендиамина, моно-Вос-диаминогексана) с жирной кислотой в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC) с образованием амидной связи между свободным амином и карбоксилатом жирной кислоты. Защитную группу Вос можно удалять из продукта путем обработки трифторуксусной кислотой (TFA) с открытием первичного амина, который может быть связан с другим карбоксилатом, как описано выше, или он может вступать в реакцию с малеиновым ангидридом с замыканием полученного продукта в цикл и получением активированного малеимидного производного жирной кислоты (См., например, Thompson, et al., WO 92/16221, содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки).

Модифицированные антитела можно получать путем реакции человеческого антитела или антигенсвязывающего фрагмента с модифицирующим агентом. Например, органические функциональные группы могут быть связаны с антителом неспецифично к сайту с помощью реагирующего с амином модифицирующего агента, например сложного эфира NHS и PEG. Модифицированные человеческие антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно также получать путем восстановления дисульфидных связей (например, внутрицепочечных дисульфидных связей) антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Восстановленное антитело или антигенсвязывающий фрагмент может впоследствии взаимодействовать с реагирующим с тиолом модифицирующим агентом с получением модифицированного антитела изобретения. Модифицированные человеческие антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие органическую функциональную группу, которая связано с определенными участками антитела настоящего изобретения, можно получать с помощью приемлемых способов, таких как обратный протеолиз (Fisch et al., *Bioconjugate Chem.*, 3: 147-153 (1992); Werlen et al., *Bioconjugate Chem.*, 5: 411-417 (1994); Kumaran et al., *Protein Sci.* 6(10):2233-2241 (1997); Itoh et al., *Bioorg. Chem.*, 24(1): 59-68 (1996); Capellas et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4): 456-463 (1997)), а также способов, описанных в Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996).

В способе настоящего изобретения также применяют композицию антител к IL-12/IL-23p40 или к IL-23, содержащую по меньшей мере одно, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть или более антител к IL-12/IL-23p40 или к IL-23, как описано в настоящем документе и/или известно специалистам в данной области, представленных в виде не встречающейся в природе композиции, смеси или формы. Такие композиции представляют собой композиции неприродного происхождения, содержащие по меньшей

мере один или два полноразмерных, имеющих С- и/или N-концевую делецию варианта, домена, фрагмента или определенных варианта аминокислотной последовательности антитела к IL-12/IL-23p40 или IL-23, выбранной из группы, состоящей из 70-100% последовательных аминокислот с указанными выше SEQ ID NO или определенных их фрагментов, доменов или вариантов. Предпочтительные композиции антител к IL-12/IL-23p40 или IL-23 включают по меньшей мере один или два полноразмерных фрагмента, домена или варианта, таких как по меньшей мере один содержащий CDR или LBP участок последовательности антитела к IL-12/IL-23p40 или IL-23, описанного в настоящем документе, например, 70-100% последовательностей с указанными выше SEQ ID NO или их определенных фрагментов, доменов или вариантов. Предпочтительные композиции дополнительно содержат, например, 40-99% по меньшей мере одной из 70-100% последовательностей с указанными выше SEQ ID NO и т. д. или их определенных фрагментов, доменов или вариантов. Процентные доли такой композиции определяют по массе, объему, концентрации, молярности или моляльности в жидких или сухих растворах, смесях, суспензиях, эмульсиях, частицах, порошке или коллоидах, как известно специалистам в данной области или описано в настоящем документе.

Композиции антител, содержащие дополнительные терапевтически активные вещества

Композиции антител, применяемые в способе настоящего изобретения, необязательно могут дополнительно содержать эффективное количество по меньшей мере одного соединения или белка, выбранного из по меньшей мере одного лекарственного средства (ЛС) против инфекции, ЛС для сердечно-сосудистой системы (ССС), ЛС для центральной нервной системы (ЦНС), ЛС для автономной нервной системы (АНС), ЛС для дыхательного тракта, ЛС для желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), гормонального ЛС, ЛС для баланса жидкости или электролитов, гематологического ЛС, противоопухолевого ЛС, иммуномодулирующего ЛС, ЛС для глаз, ушей или носа, ЛС для местного применения, питательного ЛС и т. п. Такие лекарственные средства хорошо известны специалистам в данной области, включая составы, показания, дозы и введение для каждого представленного в настоящем описании лекарственного средства (см., например, Nursing 2001 Handbook of Drugs, 21st edition, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; Health Professional's Drug Guide 2001, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ; Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., ed., Appleton & Lange, Stamford, CT, каждая из публикаций полностью включена в настоящий документ путем ссылки).

Примером лекарственных средств, которые можно комбинировать с антителами для способа настоящего изобретения, является противомикробное лекарственное средство, которое может представлять собой по меньшей мере одно средство, выбранное из амебицидов, или по меньшей мере одного из противопротозойных, противогельминтных, противогрибковых, противомаларийных, противотуберкулезных средств, или по меньшей мере одного из противолепрозных средств, аминогликозидов,

пенициллинов, цефалоспоринов, тетрациклинов, сульфонамидов, фторхинолонов, противовирусных, макролидных противоинфекционных средств и прочих противоинфекционных средств. Гормональное лекарственное средство может быть по меньшей мере одним, выбранным из кортикостероидов, андрогенов, или по меньшей мере одним из анаболических стероидов, эстрогенов, или по меньшей мере одним из прогестина, гонадотропина, антидиабетического лекарственного средства, или по меньшей мере одним из глюкоагона, тиреоидного гормона, антагониста тиреоидного гормона, гормона гипофиза и подобного паратгормону лекарственного средства. По меньшей мере один цефалоспорин может представлять собой по меньшей мере один, выбранный из цефаклора, цефадроксила, цефазолина натрия, цефдинира, гидрохлорида цефепима, цефиксима, цефметазола натрия, цефоницида натрия, цефоперазона натрия, цефотаксима натрия, цефотетана динатрия, цефокситина натрия, цефподоксима проксетила, цефпрозила, цефтазидима, цефтибутена, цефтизоксима натрия, цефтриаксона натрия, цефуроксима аксетила, цефуроксима натрия, гидрохлорида цефалексина, моногидрата цефалексина, цефрадина и лоракарбефа.

По меньшей мере один кортикостероид может представлять собой по меньшей мере один, выбранный из бетаметазона, ацетата бетаметазона или фосфата бетаметазона натрия, фосфата бетаметазона натрия, кортизона ацетата, дексаметазона, ацетата дексаметазона, фосфата дексаметазона натрия, ацетата флудрокортизона, гидрокортизона, ацетата гидрокортизона, ципионата гидрокортизона, фосфата гидрокортизона натрия, сукцината гидрокортизона натрия, метилпреднизолона, ацетата метилпреднизолона, сукцината метилпреднизолона натрия, преднизолона, ацетата преднизолона, преднизолона фосфата натрия, тебутата преднизолона, преднизона, триамцинолона, ацетонида триамцинолона и диацетата триамцинолона. По меньшей мере один андроген или анаболический стероид может представлять собой по меньшей мере один, выбранный из даназола, флюоксиместерона, метилтестостерона, деканоата нандролона, фенпропионата нандролона, тестостерона, ципионата тестостерона, энантата тестостерона, пропионата тестостерона и тестостерона в трансдермальной системе.

Данный по меньшей мере один иммунодепрессант может быть по меньшей мере одним, выбранным из азатиоприна, базиликсимаба, циклоспорина, даклизумаба, иммуноглобулина лимфоцитов, муромонаба CD3, микофенолята мофетила, гидрохлорида микофенолята мофетила, сиролимуса, 6-меркаптопурина, метотрексата, мизорибина и такролимуса.

По меньшей мере одно противоинфекционное лекарственное средство местного действия может представлять собой по меньшей мере одно средство, выбранное из ацикловира, амфотерицина В, крема с азелаиновой кислотой, бацитрацина, бутконазола нитрата, фосфата клиндамицина, клотримазола, нитрата эконазола, эритромицина, сульфата гентамицина, кетоназола, ацетата мафенида, метронидазола (местного действия), нитрата миконазола, мупироцина, гидрохлорида нафтифина, сульфата неомицина, нитрофуразона, нистатина, сульфадиазина серебра, гидрохлорида

тербинафина, терконазола, гидрохлорида тетрациклина, тиоконазола и толнафтата. По меньшей мере одно лекарственное средство против чесотки или педикулицид может представлять собой по меньшей мере одно средство, выбранное из кротамитона, линдана, перметрина и пиретринов. По меньшей мере один кортикостероид для местного применения может представлять собой по меньшей мере один, выбранный из дипропионата бетаметазона, валерата бетаметазона, пропионата клобетазола, дезонида, дезоксиметазона, дексаметазона, фосфата дексаметазона натрия, диацетата дифлоразона, ацетонида флуоцинолона, флуоцинонида, флурандренолида, флутиказона пропионата, галционида, гидрокортизона, ацетата гидрокортизона, бутирата гидрокортизона, валерата гидрокортизона, фууроата мометазона и ацетонида триамцинолона (См., например, стр. 1098-1136 в Nursing 2001 Drug Handbook.)

Композиции антител к IL-12/IL-23p40 или к IL-23 могут дополнительно содержать по меньшей мере одно из любых приемлемых и эффективных количеств композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к IL-12/IL-23p40 или к IL-23, которое приводят в контакт (или вводят в них) с клеткой, тканью, органом, животным или пациентом, нуждающимся в таком модулировании, лечении или терапии, дополнительно необязательно содержащей по меньшей мере одно средство, выбранное из по меньшей мере одного антагониста ФНО (например, без ограничений, химического или белкового антагониста ФНО, моноклонального или поликлонального антитела к ФНО или фрагмента, растворимого рецептора ФНО (например, p55, p70 или p85) или фрагмента, их слитых полипептидов или низкомолекулярного антагониста ФНО, например связывающего ФНО белка I или II (TBP-I или TBP-II), нерелимонмаба, инфликсимаба, этернацепта, CDP-571, CDP-870, афелимомаба, ленерцепта и т. п.), противоревматического лекарственного средства (например, метотрексата, ауранофина, ауортиоглюкозы, азатиоприна, этанерцепта, тиомалата золота-натрия, сульфата гидроксихлорохина, лефлуномида, сульфасалзина), иммунизации, иммуноглобулина, иммунодепрессанта (например, базиликсимаба, циклоспорина, даклизумаба), цитокина или антагониста цитокина. Не имеющие ограничительного характера примеры таких цитокинов включают без ограничений любой из от IL-1 до IL-23 и др. (например, IL-1, IL-2 и т. д.). Приемлемые дозировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition*, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), каждая из публикаций полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Соединения, композиции или комбинации антител к IL-12/IL-23p40 или к IL-23, применяемые в способе настоящего изобретения, могут дополнительно содержать по меньшей мере одно из любых приемлемых вспомогательных веществ, таких как, без ограничений, разбавитель, связующее вещество, стабилизатор, буферы, соли, липофильные растворители, консервант, адьювант или т. п. Предпочтительными являются фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества. Не имеющие ограничительного

характера примеры таких стерильных растворов и способы их получения хорошо известны специалистам в данной области, например, без ограничений, описаны в Gennago, Ed., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990. Фармацевтически приемлемые носители могут быть выбраны обычным способом, исходя из приемлемости для пути введения, растворимости и/или стабильности композиции, содержащей антитело к ПЛ-23, фрагмент или вариант, как хорошо известно специалистам в данной области или описано в настоящем документе.

Фармацевтические эксципиенты и добавки, используемые в представленной композиции, включают, без ограничений, белки, пептиды, аминокислоты, липиды и углеводы (например, сахара, включая моносахариды, ди-, три-, тетра- и олигосахариды; производные сахаров, такие как альдиты, альдоновые кислоты, этерифицированные сахара и т. п.; и полисахариды или полимеры сахаров), которые могут присутствовать отдельно или в комбинации, составляя отдельно или в комбинации 1-99,99% по массе или по объему. Примеры белковых эксципиентов включают сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин (HSA), рекомбинантный человеческий альбумин (гНА), желатин, казеин и т. п. Типичные компоненты аминокислот/антител, которые могут также выполнять буферную функцию, включают аланин, глицин, аргинин, бетаин, гистидин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, цистеин, лизин, лейцин, изолейцин, валин, метионин, фенилаланин, аспартам и т. п. Одной предпочтительной аминокислотой является глицин.

Углеводные эксципиенты, приемлемые для применения в изобретении, включают, например, моносахариды, такие как фруктоза, мальтоза, галактоза, глюкоза, D-манноза, сорбоза и т. п.; дисахариды, такие как лактоза, сахароза, трегалоза, целлобиоза и т. п.; полисахариды, такие как рафиноза, мелицитоза, мальтодекстрины, декстраны, крахмалы и т. п.; и альдиты, такие как маннит, ксилит, мальтит, лактит, ксилит, сорбит (глюцит), миоинозит и т. п. Предпочтительными углеводными эксципиентами для применения в настоящем изобретении являются маннит, трегалоза и рафиноза.

Композиции антител к ПЛ-12/ПЛ-23p40 или ПЛ-23 могут также включать буфер или агент, регулирующий pH; как правило, буфер представляет собой соль, полученную из органической кислоты или основания. Репрезентативные буферы включают соли органических кислот, такие как соли лимонной кислоты, аскорбиновой кислоты, глюконовой кислоты, угольной кислоты, винной кислоты, янтарной кислоты, уксусной кислоты или фталевой кислоты; буферы Трис, гидрохлорида трометамин или фосфата. Предпочтительными буферами для использования в настоящих композициях являются соли органических кислот, такие как цитрат.

Дополнительно композиции антител к ПЛ-12/ПЛ-23p40 или ПЛ-23 могут включать полимерные эксципиенты/добавки, такие как поливинилпирролидоны, фиколлы (полимерный сахар), декстраты (например, циклодекстрины, такие как 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин), полиэтиленгликоли, ароматизаторы, противомикробные агенты, подсластители, антиоксиданты, антистатические агенты, поверхностно-активные

вещества (например, полисорбаты, такие как ТВИН-20 и ТВИН-80), липиды (например, фосфолипиды, жирные кислоты), стероиды (например, холестерин) и хелатирующие агенты (например, ЭДТА).

Эти и дополнительные известные фармацевтические эксципиенты и/или добавки, приемлемые для применения в композициях антител к IL-12/IL-23p40 или к IL-23, участков или вариантов в соответствии с настоящим изобретением, известны специалистам в данной области, например, перечислены в Remington: The Science & Practice of Pharmacy, 19th ed., Williams & Williams, (1995) и в Physician's Desk Reference, 52nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки. Предпочтительными материалами-носителями или эксципиентами являются углеводы (например, сахараиды и альдиты) и буферы (например, цитрат) или полимерные агенты. Примером молекулы-носителя является мукополисахарид, гиалуроновая кислота, которую можно использовать для внутрисуставного введения.

Составы

Как указано выше, в изобретении обеспечены стабильные составы, которые предпочтительно содержат фосфатно-солевой раствор или выбранную соль, а также консервированные растворы и составы, содержащие консервант, а также консервированные составы для многократного применения, пригодные для фармацевтического или ветеринарного применения, содержащие по меньшей мере одно антитело к IL-12/IL-23p40 или к IL-23 в фармацевтически приемлемом составе. Консервированные составы содержат по меньшей мере один консервант, известный или необязательно выбранный из группы, состоящей из по меньшей мере одного фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, нитрита фенилртути, феноксиэтанола, формальдегида, хлорбутанола, хлорида магния (например, гексагидрата), алкилпарабена (метил-, этил-, пропил-, бутил- и т. п.), хлорида бензалкония, хлорида бензэтония, дегидроацетата и тимеросала натрия, или их смесей в водном разбавителе. Как известно специалистам в данной области, можно использовать любую приемлемую концентрацию или смесь, такую как 0,001-5%, или любой интервал, или значение в нем, например, без ограничений, 0,001, 0,003, 0,005, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,3, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, или любой интервал, или значение в нем. Не имеющие ограничительного характера примеры включают отсутствие консервантов, 0,1-2% м-крезола (например, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,1-3% бензилового спирта (например, 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5%), 0,001-0,5% тимеросала (например, 0,005, 0,01%), 0,001-2,0% фенола (например, 0,05, 0,25, 0,28, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,0005-1,0% алкилпарабена (-ов) (например, 0,00075, 0,0009, 0,001, 0,002, 0,005, 0,0075, 0,009, 0,01, 0,02, 0,05, 0,075, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 0,9, 1,0%) и т. п.

Как отмечалось выше, в методе изобретения применяют промышленное изделие,

содержащее упаковочный материал и по меньшей мере один флакон, содержащий раствор по меньшей мере одного антитела к ПЛ-12/ПЛ-23p40 или к ПЛ-23 с предписанными буферами и/или консервантами, необязательно в водном разбавителе, причем указанный упаковочный материал содержит этикетку с указанием, что такой раствор можно хранить в течение периода 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 часов или дольше. В изобретении дополнительно применяют промышленное изделие, содержащее упаковочный материал, первый флакон, содержащий лиофилизированное антитело к ПЛ-12/ПЛ-23p40 или к ПЛ-23, и второй флакон, содержащий водный разбавитель, состоящий из предписанного буфера или консерванта, причем указанный упаковочный материал содержит этикетку с инструкцией для пациента о том, как разводить антитело к ПЛ-12/ПЛ-23p40 или к ПЛ-23 в водном разбавителе с образованием раствора, который можно хранить в течение периода двадцати четырех часов или дольше.

Антитело к ПЛ-12/ПЛ-23p40 или к ПЛ-23, применяемое в соответствии с настоящим изобретением, можно продуцировать рекомбинантными способами, в том числе из клетки млекопитающего или трансгенных препаратов, либо его можно очищать из других биологических источников, как описано в настоящем документе или как известно специалистам в данной области.

Диапазон количества антитела к ПЛ-12/ПЛ-23p40 или к ПЛ-23 включает количества, которые после разведения (при использовании влажной/сухой системы) достигают концентраций от около 1,0 мкг/мл до около 1000 мг/мл, хотя пригодны меньшие и большие концентрации, и они зависят от предполагаемой несущей среды для введения, например составы раствора различаются для способов с трансдермальным пластырем, введением через легкие, через слизистые оболочки, или осмотическим способом, или с помощью микродозатора.

Дополнительно водный разбавитель предпочтительно необязательно содержит фармацевтически приемлемый консервант. Предпочтительные консерванты включают выбранные из группы, состоящей из фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, алкилпарабена (метил-, этил-, пропил-, бутил- и т. п.), хлорида бензалкония, хлорида бензэтония, дегидроацетата и тимеросала натрия или их смесей. Концентрации консерванта, применяемой в составе, должно быть достаточно для обеспечения противомикробного действия. Такие концентрации зависят от выбранного консерванта, и квалифицированный специалист в данной области без труда определяет ее.

Предпочтительно в разбавитель можно необязательно добавлять другие эксципиенты, например изотонические агенты, буферы, антиоксиданты и средства, усиливающие консервацию. Изотонические агенты, такие как глицерин, широко используют в известных концентрациях. Для улучшения контроля рН предпочтительно добавляют физиологически приемлемый буфер. Составы могут охватывать широкий диапазон рН, такой как от около рН 4 до около рН 10, с предпочтительным интервалом от около рН 5 до около рН 9 и наиболее предпочтительно от около рН 6,0 до около рН 8,0. Составы настоящего изобретения предпочтительно имеют рН от около 6,8 до около 7,8.

Предпочтительные буферы включают фосфатные буферы, наиболее предпочтительно фосфат натрия, в частности фосфатно-солевой буфер (PBS).

Для уменьшения агрегации в составы или композиции можно необязательно добавлять другие добавки, такие как фармацевтически приемлемые солюбилизаторы, например твин-20 (полиоксиэтилен (20) сорбитанмонолаурат), твин-40 (полиоксиэтилен (20) сорбитанмонопальмитат), твин-80 (полиоксиэтилен (20) сорбитанмоноолеат), Pluronic F68 (блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена) и ПЭГ (полиэтиленгликоль), или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20 или 80, либо полоксамер 184 или 188, полиолы Pluronic®, другие блок-сополимеры, и хелатирующие вещества, такие как ЭДТА и ЭГТА. Эти добавки, в частности, используют, если для введения состава применяют насос или пластиковый контейнер. Наличие фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества снижает склонность белка к агрегации.

Составы можно получать в процессе, который включает смешивание по меньшей мере одного антитела к IL-12/IL-23p40 или к IL-23 и консерванта, выбранного из группы, состоящей из фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, алкилпарабена (метил, этил, пропил, бутил и т. п.), хлорида бензалкония, хлорида бензэтония, дегидроацетата натрия и тимеросала, или их смесей в водном разбавителе. Смешивание по меньшей мере одного специфического антитела к IL-12/IL-23p40 или IL-23 и консерванта в водном разбавителе осуществляют с помощью стандартных процедур растворения и смешивания. Например, для получения приемлемого состава, отмеренное количество по меньшей мере одного антитела к IL-12/IL-23p40 или к IL-23 в буферном растворе соединяют с требуемым консервантом в буферном растворе в количествах, достаточных для получения требуемых концентраций белка и консерванта. Варианты этого способа понятны специалисту в данной области. Например, для оптимизации с учетом концентрации и применяемого способа введения можно изменять такие факторы, как порядок добавления компонентов, внесение дополнительных добавок, температура и pH, при которых получают состав.

Составы можно предоставлять пациентам в виде прозрачных растворов или двух флаконов, включающих флакон с лиофилизированным специфическим антителом к IL-12/IL-23p40 или IL-23, которое разводят содержащимися во втором флаконе водой, консервантом и/или эксципиентами, предпочтительно фосфатным буфером и/или физиологическим раствором и выбранной солью, в водном разбавителе. Либо один флакон с раствором, либо два флакона с составом, предполагающим смешивание, можно использовать многократно, и их достаточно для одного или множества циклов лечения пациента, что может быть более удобным по сравнению с существующим в настоящее время режимом лечения.

Настоящие промышленные изделия используют как для немедленного введения, так и в течение периода двадцати четырех часов или дольше. Соответственно, заявленные в настоящем документе промышленные изделия обеспечивают значимые преимущества

для пациентов. Составы изобретения можно необязательно безопасно хранить при температурах от около 2 °С до около 40 °С и сохранять биологическую активность белка в течение продолжительных периодов времени, в связи с чем на упаковке может быть этикетка с указанием, что раствор можно хранить и/или использовать в течение периода 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 или 96 часов или более. При использовании разбавителя с консервантом на такой этикетке может быть указан срок годности до 1-12 месяцев, полугод, полутора и/или двух лет.

Растворы специфического антитела к IL-12/IL-23p40 или IL-23 можно получать процессом, который включает смешивание по меньшей мере одного антитела в водном разбавителе. Смешивание осуществляют с помощью обычных процедур растворения и смешивания. Например, чтобы получить приемлемый разбавитель, отмеренное количество по меньшей мере одного антитела в воде или буфере соединяют в количествах, достаточных для получения требуемых концентраций белка и необязательно консерванта или буфера. Варианты этого способа понятны специалисту в данной области. Например, для оптимизации с учетом концентрации и применяемого способа введения можно изменять такие факторы, как порядок добавления компонентов, внесение дополнительных добавок, температура и рН, при которых получают состав.

Заявленные продукты можно предоставлять пациентам в виде прозрачных растворов или двух флаконов, включающих флакон с по меньшей мере одним лиофилизированным специфическим антителом к IL-12/IL-23p40 или IL-23, которое разводят содержащимся во втором флаконе водным разбавителем. Либо один флакон с раствором, либо два флакона с составом, предполагающим смешивание, можно использовать многократно, и их достаточно для одного или множества циклов лечения пациента, что более удобно по сравнению с существующим в настоящее время режимом лечения.

Заявленные продукты можно предоставлять пациентам не напрямую, а посредством поставки в аптеки, клиники или другие такие учреждения и организации прозрачных растворов или двух флаконов, содержащих флакон с по меньшей мере одним лиофилизированным специфическим антителом к IL-12/IL-23p40 или IL-23, которое разводят содержащимся во втором флаконе водным разбавителем. В этом случае объем прозрачного раствора может составлять до одного литра или даже больший объем, тем самым обеспечивая большой сосуд, из которого в аптеке или клинике можно дозировать малыми порциями раствор по меньшей мере одного антитела, однократно или многократно, для переливания во флаконы меньшего размера и предоставления покупателям и/или пациентам.

Общепризнанные устройства, содержащие системы с одним флаконом, включают устройства для инъекций типа шприца-ручки, такие как BD Pens, BD Autojector®, Humaject®, NovoPen®, B-D®Pen, AutoPen® и OptiPen®, GenotropinPen®, Genotronorm Pen®, Humatro Pen®, Reco-Pen®, Roferon Pen®, Biojector®, Iject®, J-tip Needle-Free Injector®, Intraject®, Medi-Ject®, Smartject,® например, изготовленные или разработанные

компаниями Becton Dickenson (г. Франклин Лейкс, шт. Нью-Джерси, США, www.bectondickenson.com), Disetronic (г. Бургдорф, Швейцария, www.disetronic.com); Bioject, г. Портланд, штат Орегон, США (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (г. Питерборо, Великобритания, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp. (г. Миннеаполис, шт. Миннесота, США, www.mediject.com), и подобные приемлемые устройства. Признанные устройства, содержащие системы из двух флаконов, включают такие системы шприца-ручки для разведения лиофилизированного лекарственного средства в картридже для введения разведенного раствора, например HumatroPen®. Примеры других приемлемых устройств включают предварительно заполненные шприцы, автоинжекторы, безыгольные инжекторы и безыгольные наборы для внутривенного вливания.

Продукты могут включать в себя упаковочный материал. В дополнение к информации по требованию контролирующих органов, на упаковочном материале также указывают условия, при которых можно использовать продукт. Упаковочный материал настоящего изобретения содержит инструкции для пациента, если применимо, по разведению по меньшей мере одного антитела к IL-12/IL-23p40 или к IL-23 в водном разбавителе с получением раствора, а также по использованию раствора в течение периода 2-24 часов или дольше в случае двух флаконов, влажного/сухого, с продуктом. Для одного флакона с продуктом в виде раствора, предварительно заполненного шприца или автоинжектора на упаковке указывают, что такой раствор можно использовать в течение периода 2-24 часов или дольше. Продукты предназначены для использования человеком в фармацевтических целях.

Составы, применяемые в способе настоящего изобретения, можно получать в ходе процесса, который включает смешивание антитела к IL-12/IL-23p40 или к IL-23 и выбранного буфера, предпочтительно фосфатного буфера, содержащего физиологический раствор или выбранную соль. Смешивание антитела к IL-23 и буфера в водном разбавителе осуществляют с использованием стандартных процедур растворения и смешивания. Например, чтобы получить приемлемый состав, отмеренное количество по меньшей мере одного антитела в воде или буфере соединяют с требуемым буферным агентом в воде в количествах, достаточных для получения требуемых концентраций белка и буфера. Варианты этого способа понятны специалисту в данной области. Например, для оптимизации с учетом концентрации и применяемого способа введения можно изменять такие факторы, как порядок добавления компонентов, внесение дополнительных добавок, температура и pH, при которых получают состав.

В способе изобретения предлагаются фармацевтические композиции, содержащие различные составы, полезные и приемлемые для введения пациенту, человеку или животному. Такие фармацевтические композиции получают с использованием воды в «стандартном состоянии» в качестве разбавителя, и путем обычных способов, хорошо известных обычным специалистам в данной области. Например, сначала можно предоставить буферные компоненты, такие как гистидин и гистидина моногидрохлорида

гидрат, с последующим добавлением подходящего, не конечного объема водного разбавителя, сахарозы и полисорбата-80 в «стандартном состоянии». Затем можно добавлять выделенное антитело. Наконец, объем фармацевтической композиции доводят до требуемого конечного объема в условиях «стандартного состояния» добавлением в качестве разбавителя воды. Специалисты в данной области определяют ряд других способов, приемлемых для получения фармацевтических композиций.

Фармацевтические композиции могут представлять собой водные растворы или суспензии, содержащие указанную массу каждого компонента на единицу объема воды, или имеющие в «стандартном состоянии» указанный pH. При использовании в настоящем документе термин «стандартное состояние» означает температуру $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ и давление 1 атмосфера. Термин «стандартное состояние» не используется в данной области для обозначения одного признанного набора температур или давления, но вместо этого является эталонным состоянием, которое определяет температуру и давление, установленные для описания раствора или суспензии с определенной композицией в эталонных условиях «стандартного состояния». Это связано с тем, что объем раствора частично зависит от температуры и давления. Специалисты в данной области поймут, что фармацевтические композиции, эквивалентные описанным в настоящем документе, можно продуцировать при других значениях температуры и давления. Эквивалентны ли такие фармацевтические композиции описанным в настоящем документе, следует определять в условиях «стандартного состояния», определенных выше (например, температура $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ и давление 1 атмосфера).

Важно отметить, что такие фармацевтические композиции могут содержать массы компонентов «около» определенного значения (например, «около 0,53 мг L-гистидина») на единицу объема фармацевтической композиции или иметь значения pH около определенного значения. Масса компонента, присутствующего в фармацевтической композиции, или значение pH находится «около» данного численного значения, если выделенное антитело, присутствующее в фармацевтической композиции, способно связываться с пептидной цепью при нахождении выделенного антитела в фармацевтической композиции или после удаления выделенного антитела из фармацевтической композиции (например, при разведении). Иначе говоря, значение, такое как значение массы компонента или значение pH, составляет «около» заданного численного значения при сохранении и обнаружении активности связывания выделенного антитела после помещения выделенного антитела в фармацевтическую композицию.

Для определения, связываются ли специфические mAb к IL-12/IL-23p40 или IL-23 с аналогичными или отличающимися эпитопами и/или конкурируют ли они друг с другом, проводят анализ конкурентного связывания. Антитела наносят по отдельности на планшеты для ИФА на твердой фазе в виде покрытия. Добавляют конкурирующие mAb с последующим добавлением биотинилированных hrIL-12 или IL-23. Для положительного контроля в качестве конкурирующего mAb используют то же mAb, что и для покрытия («самоконкуренция»). Связывание с IL-12/IL-23p40 или IL-23 определяют с помощью

стрептавидина. Эти результаты показывают, распознают ли mAb аналогичные или частично перекрывающиеся эпитопы на PL-12/PL-23p40 или PL-23.

Один аспект способа настоящего изобретения предусматривает введение пациенту фармацевтической композиции, содержащей

В одном варианте осуществления фармацевтических композиций концентрация выделенного антитела составляет от около 77 до около 104 мг на мл фармацевтической композиции. В другом варианте осуществления фармацевтических композиций pH составляет от около 5,5 до около 6,5.

Стабильные или консервированные составы можно предоставлять пациентам в виде прозрачных растворов или двух флаконов, содержащих флакон с по меньшей мере одним лиофилизированным антителом к PL-23, которое разводят содержащимися во втором флаконе консервантом или буфером и эксципиентами в водном разбавителе. Либо один флакон с раствором, либо два флакона с составом, предполагающим смешивание, можно использовать многократно, и их достаточно для одного или множества циклов лечения пациента, что более удобно по сравнению с существующим в настоящее время режимом лечения.

С помощью других составов или способов стабилизации антител к PL-23 можно получать содержащее антитело средство, отличное от прозрачного раствора лиофилизированного порошка. К непрозрачным растворам относятся составы, содержащие взвешенные частицы, причем указанные частицы представляют собой композиции, содержащие антитело к PL-23 в структуре с варьирующим размером, и известны под различными названиями, такими как микросферы, микрочастицы, наночастицы, наносферы или липосомы. Такие относительно однородные, по существу сферические, составы в виде частиц, содержащие активное вещество, можно формировать путем связывания водной фазы, содержащей активное вещество и полимер, с неводной фазой, с последующим испарением неводной фазы и слиянием частиц из водной фазы, как описано в патенте США № 4,589,330. Пористые микрочастицы можно получать с помощью первой фазы, содержащей активное вещество и полимер, диспергированные в непрерывном растворителе, и посредством удаления указанного растворителя из суспензии способом сублимационной сушки либо разбавления, экстракции и осаждения, как описано в патенте США № 4,818,542. Предпочтительными полимерами для таких препаратов являются естественные или синтетические сополимеры, либо полимеры, выбранные из группы, состоящей из желатинового агара, крахмала, арабиногалактана, альбумина, коллагена, полигликолевой кислоты, полимолочной кислоты, гликолид-L(-)-лактида, поли(эпсилон-капролактона), поли(эпсилон-капролактон-СО-молочной кислоты), поли(эпсилон-капролактон-СО-гликолевой кислоты), поли(бета-гидроксимасляной кислоты), полиэтиленоксида, полиэтилена, поли(алкил-2-цианакрилата), поли(гидроксиэтилметакрилата), полиамидов, поли(аминокислот), поли(2-гидроксиэтил-DL-аспартамида), поли(эфира мочевины), поли(L-фенилаланин/этиленгликоль/1,6-диизоцианатгексана) и поли(метилметакрилата). Наиболее предпочтительными

полимерами являются полиэфиры, такие как полигликолевая кислота, полимолочная кислота, гликолид-L(-)-лактид, поли(эпсилон-капролактон), поли(эпсилон-капролактон-СО-молочная кислота) и поли(эпсилон-капролактон-СО-гликолевая кислота). Растворители, используемые для растворения полимера и/или активного вещества, включают: воду, гексафторизопропанол, метиленхлорид, тетрагидрофуран, гексан, бензол или полуторагидрат гексафторацетона. Процесс диспергирования содержащей активное вещество фазы со второй фазой может включать принудительный пропуск первой фазы через отверстие в сопле для образования капель.

Составы в виде сухого порошка можно получать иными способами помимо лиофилизации, например, путем распылительной сушки, экстракции растворителя испарением или осаждения кристаллической композиции, за которыми следуют одна или несколько стадий удаления водного или неводного растворителя. Получение препарата антитела путем распылительной сушки описано в патенте США № 6,019,968. Композиции антитела в виде сухого порошка можно получать путем распылительной сушки растворов или суспензий антитела и необязательно эксципиентов в растворителе в условиях, обеспечивающих получение вдыхаемого сухого порошка. Растворители могут включать полярные соединения, такие как вода и этанол, которые можно легко высушивать. Стабильность антитела можно усилить путем выполнения процедуры распылительной сушки в отсутствие кислорода, например, под слоем азота или с применением азота в качестве сушильного газа. Другой относительно сухой состав является дисперсией множества перфорированных микроструктур, диспергированных в суспензионной среде, обычно содержащей пропеллент гидрофторалкан, как описано в WO 9916419. Стабилизированные дисперсии можно вводить в легкие пациента с помощью ингалятора мерных доз. Оборудование, используемое для промышленного производства лекарственного средства путем распылительной сушки, выпускается Buchi Ltd. или Niro Corp.

Антитело к ПЛ-23, в стабильных или консервированных составах или растворах, описанных в настоящем документе, в соответствии с настоящим изобретением можно вводить пациенту с помощью разных способов доставки, включая подкожную или внутримышечную инъекцию; трансдермальное введение, введение в легкие, через слизистую оболочку, посредством имплантата, осмотического дозатора, кассеты, микродозатора или других способов, признанных специалистами в данной области, как хорошо известно в данной области.

Терапевтическое применение

В настоящем изобретении также предложен способ модуляции или лечения волчанки в клетке, ткани, органе, у животного или у пациента, известный специалистам в данной области или описанный в настоящем документе, с применением по меньшей мере одного антитела к ПЛ-23 настоящего изобретения, например, путем введения или приведения в контакт клетки, ткани, органа, животного или пациента с терапевтически эффективным количеством специфического антитела к ПЛ-12/ПЛ-23p40 или ПЛ-23.

Любой способ настоящего изобретения может включать в себя введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей антитело к IL-23, в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в таком модулировании, лечении или терапии. Такой способ может необязательно дополнительно включать совместное введение или применение комбинированной терапии для лечения таких заболеваний или расстройств, причем введение указанного по меньшей мере одного антитела к IL-23, его определенного участка или варианта, дополнительно включает введение (до, одновременно и/или после) по меньшей мере одного средства, выбранного из по меньшей мере одного антагониста ФНО (например, без ограничения, химического или белкового антагониста ФНО, моноклонального или поликлонального антитела к ФНО или его фрагмента, растворимого рецептора ФНО (например, р55, р70 или р85) или его фрагмента, их слитых полипептидов, или низкомолекулярного антагониста ФНО, например связывающего ФНО белка I или II (TBP-I или TBP-II), нерелимонмаба, инфликсимаба, этернацепта (Enbrel™), адалимулаба (Humira™), CDP-571, CDP-870, афелимомаба, ленерцепта и т. п.), противоревматического ЛС (например, метотрексата, ауранофина, ауротиоглюкозы, азатиоприна, золота-натрия тиомалата, гидроксихлорохина сульфата, лефлуномида, сульфасалзина), миорелаксанта, наркотического ЛС, нестероидного противовоспалительного препарата (НСПВП), анальгетика, анестезирующего ЛС, седативного ЛС, ЛС местной анестезии, нервно-мышечного блокатора, противомикробного ЛС (например, аминогликозида, противогрибкового ЛС, противопаразитарного ЛС, противовирусного ЛС, карбапенема, цефалоспорина, фторхинолона, макролида, пенициллина, сульфонида, тетрациклина, другого противомикробного ЛС), противопсориатического ЛС, кортикостероида, анаболического стероида, ЛС для лечения сахарного диабета, минерала, диетического ЛС, тиреоидного ЛС, витамина, гормона регуляции кальция, ЛС против диареи, ЛС против кашля, противорвотного ЛС, ЛС против язвы, слабительного ЛС, антикоагулянта, эритропозтина (например, эпоэтина альфа), филграстима (например, G-CSF, Neupogen), сарграмостима (GM-CSF, Leukine), иммунизации, иммуноглобулина, иммунодепрессанта (например, базиликсимаба, циклоспорина, даклизумаба), гормона роста, заместительной гормональной терапии, модулятора рецепторов эстрогена, мидриатика, циклоплегического ЛС, алкилирующего агента, антимаболита, ингибитора митоза, радиофармацевтического ЛС, антидепрессанта, ЛС против мании, антипсихотического ЛС, анксиолитического ЛС, снотворного, симпатомиметика, возбуждающего ЛС, донепезила, такрина, ЛС для лечения астмы, бета-агониста, стероида для ингаляции, ингибитора лейкотриенов, метилксантина, кромолина, эпинефрина или его аналога, дорназы альфа (Pulmozyme), цитокина или антагониста цитокина. Приемлемые дозировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000); *Nursing 2001 Handbook of Drugs*, 21st edition, Springhouse Corp.,

Springhouse, PA, 2001; Health Professional's Drug Guide 2001, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ, все из которых полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

Терапевтические способы лечения

Как правило, лечение волчанки осуществляют путем введения эффективного количества или дозы композиции антитела к IL-12/23p40 или к IL-23, которая полностью, в среднем, содержит от по меньшей мере около 0,01 до 500 миллиграммов антитела к IL-12/23p40 или к IL-23 на килограмм массы пациента в одной дозе и, предпочтительно, от по меньшей мере около 0,1 до 100 миллиграммов антитела на килограмм массы пациента за одно или несколько введений в зависимости от удельной активности активного агента, содержащегося в композиции. В альтернативном варианте осуществления эффективная концентрация в сыворотке может составлять 0,1-5000 $\mu\text{г}/\text{мл}$ сыворотки за одно или множество введений. Приемлемые дозы известны медицинским специалистам и, разумеется, зависят от конкретного болезненного состояния, удельной активности вводимой композиции и конкретного пациента, получающего лечение. В некоторых случаях для достижения требуемого терапевтического количества может потребоваться выполнение повторного введения, т. е. повторных отдельных введений конкретной контролируемой или измеренной дозы, причем отдельные введения повторяют до достижения требуемой суточной дозы или эффекта.

Предпочтительные дозы могут необязательно включать 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и/или 100-500 мг/кг за одно введение, или любой интервал, значение или часть этого диапазона, или количество для достижения в сыворотке концентрации 0,1, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5, 2,9, 3,0, 3,5, 3,9, 4,0, 4,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 20, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14,0, 14,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 12, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14, 14,5, 15, 15,5, 15,9, 16, 16,5, 16,9, 17, 17,5, 17,9, 18, 18,5, 18,9, 19, 19,5, 19,9, 20, 20,5, 20,9, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 и/или 5000 $\mu\text{г}/\text{мл}$ сыворотки за однократное или многократное введение, или любой интервал, значение или часть этого диапазона.

В альтернативном варианте осуществления вводимые дозы могут варьироваться в зависимости от известных факторов, таких как фармакодинамические показатели конкретного агента, режим и способ его введения; возраст, состояние здоровья и масса реципиента; природа и степень выраженности симптомов, тип сопутствующего лечения, частота введения и требуемый эффект. Обычно доза активного ингредиента составляет от около 0,1 до 100 мг на килограмм массы тела. Как правило, от 0,1 до 50 и

предпочтительно от 0,1 до 10 миллиграмм на килограмм за одно введение или в лекарственной форме с замедленным высвобождением будет эффективно для достижения желаемых результатов.

В качестве не налагающего ограничения примера, лечение людей или животных можно проводить в виде однократного или периодического введения по меньшей мере одного антитела по настоящему изобретению в дозе от 0,1 до 100 мг/кг, например, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг в сутки, по меньшей мере в одни из суток 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40, либо, альтернативно или дополнительно, по меньшей мере на одной из недель 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 или 52, либо, альтернативно или дополнительно, по меньшей мере в один год из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, либо в любом их сочетании, с введением однократной, инфузионной или повторных доз.

Лекарственные формы (композиция), приемлемые для внутреннего введения, обычно содержат от около 0,001 мг до около 500 мг активного ингредиента на единицу или контейнер. В этих фармацевтических композициях активный ингредиент обычно присутствует в количестве около 0,5-99,999% масс. в расчете на общую массу композиции.

Для парентерального введения антитела лекарственная форма может представлять собой раствор, суспензию, эмульсию, частицу, порошок или лиофилизированный порошок вместе с фармацевтически приемлемым носителем для парентерального введения или отдельно от носителя. Примерами таких носителей являются вода, физиологический раствор, раствор Рингера, раствор глюкозы и человеческий сывороточный альбумин 1-10%. Кроме того, можно применять липосомы и безводные среды, например нелетучие масла. Носитель или лиофилизированный порошок может содержать добавки, способствующие изотоничности (например, хлорид натрия, маннит) и химической стабильности (например, буферы и консерванты). Состав стерилизуют известными или приемлемыми способами.

Приемлемые фармацевтические носители описаны в последнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, которое является стандартным источником ссылок в данной области.

Альтернативные способы введения

В соответствии с настоящим изобретением для введения фармацевтически эффективных количеств антитела к ПЛ-23 можно применять множество известных и разработанных способов ведения. Далее описано введение через легкие, однако в соответствии с настоящим изобретением можно также применять другие способы введения, дающие приемлемые результаты. Антитела к ПЛ-12/ПЛ-23p40 или к ПЛ-23 настоящего изобретения можно доставлять в носителе в виде раствора, эмульсии,

коллоида или суспензии, либо в виде сухого порошка с применением любого из множества устройств и способов, приемлемых для введения путем ингаляции или другими способами, описанными в настоящем документе или известными специалистам в данной области.

Парентеральные составы и введение

Составы для парентерального введения могут в качестве обычных эксципиентов содержать стерильную воду, физиологический раствор, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения, гидрогенизированные нафталины и т. п. Водные или масляные суспензии для инъекций можно получать с использованием подходящего эмульгатора или увлажнителя и суспендирующего агента известными способами. Для инъекций можно использовать нетоксичный, пригодный для неперорального введения, разбавляющий агент, например водный раствор, стерильный раствор для инъекций или суспензию в растворителе. В качестве пригодной несущей среды или растворителя допустимо использовать воду, раствор Рингера, изотонический раствор и т. п.; в качестве обычного растворителя или суспендирующего растворителя можно использовать стерильное нелетучее масло. Для этого можно использовать нелетучее масло и жирную кислоту любого вида, включая природные или синтетические либо полусинтетические жирные масла или жирные кислоты; природные или синтетические либо полусинтетические моно-, ди- или триглицериды. Парентеральное введение известно в данной области и включает, без ограничений, общепринятые средства инъекции, пневматическое безыгольное инъекционное устройство, описанное в патенте США № 5,851,198, и лазерный перфоратор, описанный в патенте США № 5,839,446, полностью включенные в настоящий документ путем ссылки.

Альтернативные способы доставки

Изобретение дополнительно относится к введению антитела к IL-12/IL-23p40 или к IL-23 путем парентерального, подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутрисуставного, внутрибронхиального, внутрибрюшного, интракапсулярного, внутривисцерального, внутриполостного, интрацелиального, внутримозжечкового, желудочного, в толстую кишку, интрацервикального, желудочного, внутривисцерального, интрамиокардиального, внутрикостного, внутритазового, интраперикардиального, внутрибрюшинного, интраплеврального, в предстательную железу, внутрилегочного, интаректального, интареального, интаретинального, интраспинального, интрасиновиального, внутригрудного, внутриматочного, внутрипузырного, в пораженные ткани, болюсного, вагинального, ректального, буккального, подъязычного, интраназального или чрескожного введения. Композицию антитела к IL-12/IL-23p40 или к IL-23 можно получать для применения парентеральным (подкожным, внутримышечным или внутривенным) или любым другим способом введения, в частности, в форме жидких растворов или суспензий; для применения вагинальным или ректальным способом введения, в частности, в мягких формах, таких как, без ограничений, кремы и суппозитории; для трансбуккального или подъязычного

введения, например, без ограничений, в форме таблеток или капсул; или для интраназального введения, например, без ограничений, в форме порошков, капель в нос или аэрозолей, либо в виде определенных агентов; или для введения трансдермально, например, без ограничений, в виде систем доставки в геле, мази, лосьоне, суспензии или пластыре с химическими ускорителями, такими как диметилсульфоксид, либо для модификации структуры кожи, либо для повышения концентрации лекарственного средства в трансдермальном пластыре (Junginger, et al. In "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., Eds., pp. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994, публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки), или с окисляющими агентами, которые облегчают нанесение составов, содержащих белки и пептиды, на кожу (WO 98/53847), или с применением электрического поля для создания временных траекторий доставки, например, путем электропорации, или для ускорения движения заряженных лекарственных средств через кожу, например, путем ионофореза, или применения ультразвука, например сонофореза (патенты США № 4,309,989 и 4,767,402) (приведенные выше публикации и патенты полностью включены в настоящий документ путем ссылки).

Приведенное выше описание изобретения по существу дополнительно разъясняется далее с помощью примеров, которые представлены в качестве иллюстрации и не являются ограничивающими. Дополнительные подробности изобретения иллюстрируются следующими ниже не имеющими ограничительного характера примерами. Описание всех цитат в спецификации прямо включено в настоящий документ путем ссылки.

Пример. Производственные процессы для получения STELARA® (устекинумаба)

Предпосылки создания изобретения

STELARA® (устекинумаб) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело G1-каппа, которое связывается с высокой аффинностью и специфичностью с общей субъединицей p40 человеческих цитокинов интерлейкина (IL)-12 и IL-23. Устекинумаб содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10 и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11; аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 8; аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; и аминокислотные последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6. Связывание устекинумаба с субъединицей IL-12/23p40 блокирует связывание IL-12 или IL-23 с рецептором IL-12Rβ1 на поверхности натуральных киллеров и Т-клеток CD4⁺, ингибирует внутриклеточную сигнализацию IL-12 и IL-23 и последующую активацию и продукцию цитокинов. Аномальная регуляция IL-12 и IL-23 ассоциируется со множеством иммуноопосредованных заболеваний.

На сегодняшний день устекинумаб получил разрешение на продажу во всем мире, включая страны Северной Америки, Европы, Южной Америки и Азиатско-Тихоокеанского региона, для лечения взрослых пациентов, включая пациентов с

хроническим бляшковидным псориазом средней или тяжелой степени и/или активным псориазическим артритом, болезнью Крона (БК) и язвенным колитом (ЯК). Устекинумаб также оценивают в исследовании фазы 3 для лечения активной системной красной волчанки (СКВ).

Обзор производственного процесса

STELARA® (устекинумаб) производят в ходе 10-стадийного процесса, который включает непрерывное перфузионное культивирование клеток с последующей очисткой. Обзор производственного процесса представлен на Фиг. 1.

Используемые в настоящем документе термины «культура», «культивирование», «культивированный» и «клеточная культура» относятся к популяции клеток, которая суспендирована в среде в условиях, приемлемых для выживания и/или роста популяции клеток. Как будет очевидно из контекста обычным специалистам в данной области, эти термины, используемые в настоящем документе, также относятся к комбинации, включающей популяцию клеток и среду, в которой популяция суспендирована. Клеточная культура включает в себя, например, клетки, выращенные способами порционного культивирования, культивирования с подпиткой или перфузионного культивирования клеток и т. п. В некоторых вариантах осуществления культура клеток представляет собой культуру клеток млекопитающих.

Клеточные линии для применения в настоящем изобретении включают клеточные линии млекопитающих, включая, без ограничений, клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO), человеческие эмбриональные клетки почек (клетки НЕК), клетки почки новорожденного хомячка (клетки ВНК), клетки мышины миеомы (например, клетки NS0 и клетки Sp2/0) и клетки человеческой сетчатки (например, клетки PER.C6).

Используемые в настоящем документе термины «среда с заданным химическим составом», «среда с определенным химическим составом», «гибридная среда с определенным химическим составом» или «среда с определенным химическим составом для гибридом» относятся к синтетической среде для выращивания, в которой известен характер и концентрация всех компонентов. Среды с заданным химическим составом не содержат бактериальных, дрожжевых, животных или растительных экстрактов, сыворотки или плазмы животных, хотя они могут включать или не включать в себя отдельные компоненты растительного или животного происхождения (например, белки, полипептиды и т. д.). Среды с заданным химическим составом могут содержать неорганические соли, такие как фосфаты, сульфаты и т. п., необходимые для поддержания роста. Источник углерода является заданным и, как правило, представляет собой сахар, такой как глюкоза, лактоза, галактоза и т. п., или другие соединения, такие как глицерин, лактат, ацетат и т. п. Хотя в некоторых средах с определенным химическим составом в качестве буфера также используют фосфатные соли, можно использовать другие буферы, такие как цитрат, триэтаноламин и т. п. К примерам доступных в продаже сред с заданным химическим составом относятся, без ограничений, среда ThermoFisher's CD Hybridoma Medium и среда CD Hybridoma AGT™ Medium, различные среды типа

Dulbecco's Modified Eagle's (DME) (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc), питательная смесь Ham's Nutrient Mixture (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc), их комбинации и т. п. Способы получения сред с заданным химическим составом известны в данной области, например, в патентах США №№ 6,171,825 и 6,936,441, WO 2007/077217 и публикациях заявок на патент США №№ 2008/0009040 и 2007/0212770.

Используемый в настоящем документе термин «биореактор» относится к любому сосуду, используемому для выращивания клеточной культуры. Биореактор может быть любого размера, при условии что его можно использовать для культивирования клеток. В определенных вариантах осуществления такие клетки представляют собой клетки млекопитающих. Как правило, биореактор будет иметь объем по меньшей мере 1 литр и может иметь объем 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5 000, 8 000, 10 000, 12 000 литров или более или любой промежуточный объем. Внутренние условия биореактора, в том числе, помимо прочего, pH и температуру, необязательно контролируют в течение периода культивирования. Биореактор может состоять из любого материала, который подходит для содержания культур клеток млекопитающих, суспендированных в среде в условиях культивирования, соответствующих настоящему изобретению, включая стекло, пластик или металл. Используемый в настоящем документе термин «производственный биореактор» относится к готовому биореактору, используемому при производстве интересующего полипептида или гликопротеина. Объем производственного биореактора, как правило, составляет по меньшей мере 500 литров и может составлять 1000, 2500, 5 000, 8 000, 10 000, 12 000 литров или более или любой промежуточный объем. Специалист в данной области будет знать и сможет выбрать приемлемые биореакторы для применения на практике в настоящем изобретении.

Предварительное культивирование, размножение и продукцию устекинумаба выполняют на стадии 1 и стадии 2. На стадии 1 иницируют предварительное культивирование из одного или более флаконов из рабочего клеточного банка, содержащего трансфицированные клетки Sp2/0, экспрессирующие последовательности HC и LC устекинумаба, размножают клетки в культуральных флаконах, одноразовых культуральных мешках и затравочном биореакторе объемом 100 л. Клетки культивируют до получения клеточной плотности и объема, необходимых для посева в производственный биореактор объемом 500 л. На стадии 2 клеточную культуру перфузируют в производственном биореакторе объемом 500 л, используя систему удержания клеток с полволоконным фильтром и переменным тангенциальным потоком (ATF). Из системы ATF собирают пермеат клеточной культуры (урожай), клетки удерживают в биореакторе и культуру пополняют свежей средой. Урожай из одного или более производственных биореакторов объемом 500 л можно объединять на стадии 3. Урожай очищают с помощью аффинной хроматографии со смолой MabSelect с белком А. Полученный элюат прямого захвата продукта (DPC) замораживают до дальнейшей обработки.

Очистку устекинумаба с помощью DPC выполняют на 4-8-й стадиях с помощью

ионообменной хроматографии и других стадий для инактивации или удаления потенциальных вирусных загрязнений (обработка растворителем/детергентом [S/D] и фильтрация для удаления вирусов). Элюаты для DPC на стадии 4 размораживают, объединяют и фильтруют, на стадии 5 инкубируют с три-н-бутилфосфатом (TNBP) и обрабатывают полисорбатом 80 S/D для инактивации любых присутствующих вирусов в липидной оболочке. Реагенты TNBP и полисорбат 80, агрегаты и примеси удаляют из устекинумаба на стадии 6 с использованием катионообменной хроматографии на сефарозе SPXL®. Устекинумаб на стадии 7 дополнительно очищают с использованием анионообменной хроматографии на сефарозе QXL® для удаления ДНК, вирусов и примесей. На стадии 8 очищенный устекинумаб разбавляют и фильтруют через задерживающий вирусы фильтр (NFP®).

Получение предварительно подготовленной массы (PFB) и подготовленной массы (FB) устекинумаба выполняют на стадиях 9 и 10 соответственно. На стадии 9 на стадии ультрафильтрации устекинумаб концентрируют, а на стадии диафильтрации добавляют согласно составу эксципиенты и удаляют функциональные буферные соли. На стадии 10 к устекинумабу PFB добавляют полисорбат 80 с получением FB. FB фильтруют в поликарбонатные контейнеры для хранения в замороженном состоянии. Замороженный FB упаковывают в изолированные контейнеры с сухим льдом для транспортировки к месту производства лекарственного препарата.

Подробное описание культивирования клеток в крупномасштабном производственном процессе

Стадия 1

Прекультивирование и размножение

Первой стадией производства устекинумаба является инициация предварительного культивирования из флакона рабочего клеточного банка (WCB) с трансфицированными клетками Sp2/0, экспрессирующими последовательности HC и LC устекинумаба, и размножение в культуральных флаконах, одноразовых культуральных мешках и затравочном биореакторе объемом 100 л. Клетки культивируют до получения клеточной плотности и объема, необходимых для посева в производственный биореактор объемом 500 л. Блок-схема процесса предварительного культивирования и размножения, представлена на Фиг. 2.

Процедура производства

Один или более хранящихся в криобанке флаконов WCB размораживают и разбавляют средой с заданным химическим составом (CD) для гибридом с добавлением 6 mM L-глутамина, 0,5 мг/л микофеноловой кислоты, 2,5 мг/л гипоксантина и 50 мг/л ксантина (CDH-A). Жизнеспособность культуры должна составлять $\geq 45\%$. Клетки далее разводят средой CDH-A во флаконе для культивирования до плотности посева от 0,2 до $0,5 \times 10^6$ жизнеспособных клеток (VC)/мл. Предварительное культивирование выполняют в CO₂-инкубаторе с увлажнением, при условиях температуры, концентрации CO₂ и с перемешиванием в пределах диапазонов, определенных в записи для партии.

Предварительную культуру инкубируют в течение ≤ 3 дней до получения минимальной плотности клеток $\geq 0,6 \times 10^6$ VC/мл и жизнеспособности культуры $\geq 50\%$. Предварительную культуру последовательно размножают, пересеивая в культуральные флаконы, а затем в культуральные мешки в качестве способа увеличения масштаба для посева в биореактор объемом 100 л. Во время фазы размножения культуры каждая стадия инкубации занимает ≤ 3 дней для достижения условий посева, для чего требуется плотность клеток $\geq 0,6 \times 10^6$ VC/мл и жизнеспособность культуры $\geq 80\%$. Плотность посева при каждом пересеивании составляет от 0,2 до $0,5 \times 10^6$ VC/мл в культуральных флаконах и от 0,2 до $0,6 \times 10^6$ VC/мл культуральных мешках. При каждом посеве отбирают пробы для определения плотности жизнеспособных клеток (VCD), жизнеспособности культуры и микроскопического исследования. Перед посевом в затравочный биореактор объемом 100 л отбирают пробу предварительной культуры для оценки биологической нагрузки.

Размножение предварительной культуры можно поддерживать в течение максимум 30 дней после размораживания. Предварительные культуры, не использованные в течение 30 дней, выбрасывают. При необходимости можно поддерживать и применять для посева в другой затравочный биореактор объемом 100 л резервные предварительные культуры, размноженные, как описано выше, и подвергнутые тому же технологическому мониторингу, контрольным исследованиям и воздействию тех же параметров процесса, что и основные предварительные культуры.

Когда предварительная культура будет соответствовать критериям посева, содержимое культурального (-ых) мешка (-ов) переносят в затравочный биореактор объемом 100 л, содержащий среду CDH-A, ориентируясь на плотность посева $\geq 0,3 \times 10^6$ VC/мл. pH, температуру и концентрацию растворенного кислорода в затравочном биореакторе удерживают в пределах диапазонов, определенных в записи партии. Культуру размножают до получения плотности клеток $\geq 1,5 \times 10^6$ VC/мл и жизнеспособности культуры $\geq 80\%$. На протяжении всего процесса из затравочного биореактора отбирают пробы культуры для определения плотности жизнеспособных клеток (VCD), жизнеспособности культуры и микроскопического исследования. Перед посевом в производственный биореактор объемом 500 л отбирают пробы культуры для определения биологической нагрузки.

Когда VCD в затравочном биореакторе достигнет $\geq 1,5 \times 10^6$ VC/мл, культуру можно использовать для посева в производственный биореактор объемом 500 л. С другой стороны, из затравочного биореактора объемом 100 л можно забрать часть культуры, а оставшуюся культуру можно развести свежей средой. В результате такого процесса отбора и пополнения культуре дают размножиться до достижения достаточной клеточной плотности для посева в производственный биореактор объемом 500 л. Максимальная продолжительность культивирования в биореакторе объемом 100 л составляет 9 дней после посева.

Стадия 2

Продукция биореактора

На стадии 2 клеточную культуру непрерывно перфузируют в производственном биореакторе объемом 500 л с использованием системы удержания клеток с половолоконным фильтром и переменным тангенциальным потоком (ATF). Из системы ATF собирают пермеат клеточной культуры (урожай), клетки возвращают в биореактор и культуру пополняют свежей средой. Блок-схема технологических процессов в биореакторе представлена на Фиг. 3.

Процедура производства

Посев в производственный биореактор объемом 500 л выполняют путем переноса содержимого затравочного биореактора объемом 100 л в производственный биореактор объемом 500 л, содержащий среду CD (с заданным химическим составом) для гибридом с добавлением 6 мМ L-глутамин, 0,5 мг/л микофеноловой кислоты, 2,5 мг/л гипоксантина и 50 мг/л ксантина (CDH-A). Перенесенный объем должен быть достаточным для достижения целевой плотности посева $\geq 0,3 \times 10^6$ жизнеспособных клеток (VC)/мл. Культуру поддерживают при температуре от 34 до 38 °С, рН от 6,8 до 7,6 и концентрации растворенного кислорода (DO) от 1 до 100%.

Иницируют непрерывную перфузию и культуру отбирают из биореактора объемом 500 л в систему ATF для отделения клеток от пермеата. Пермеат фильтруют через фильтр ATF 0,2 μ m и собирают в виде сбора в биотехнологические контейнеры (BPC). Клетки возвращают в биореактор и подают свежую среду CDH-A для поддержания постоянного объема культуры. В ходе производственного цикла контролируют плотность жизнеспособных клеток (VCD), жизнеспособность культуры, рН, DO, температуру и содержание иммуноглобулина G (IgG). Скорость перфузии постепенно увеличивают пропорционально VCD до достижения целевой скорости приблизительно одного объема биореактора в день. Скорость перфузии удерживают таким образом, чтобы она не превышала 1,20 объемов биореактора в день. Удерживание в системе ATF отслеживают для облегчения отключения фильтра ATF прежде, чем задержка IgG на фильтре превысит 50%.

Когда VCD в биореакторе объемом 500 л достигнет $8,0 \times 10^6$ VC/мл или на 10-й день, в зависимости от того, что наступит раньше, целевое значение рН снижают с 7,2 до 7,1. Удаление биомассы начинают либо на 20-й день, либо в момент достижения значения VCD, равного $12,0 \times 10^6$ VC/мл, в зависимости от того, что наступит раньше. Биомассу удаляют из производственного биореактора объемом 500 л в BPC-контейнеры со скоростью до 20% объемов биореактора в день. Из каждого урожая отбирают пробы для определения биологической нагрузки.

Непрерывное перфузионное культивирование клеток в биореакторе объемом 500 л продолжают до 46 дней после посева. В конце производства из культуры берут пробы для анализа на микоплазму и занесенный вирус. Сбор может храниться в течение ≤ 30 дней при температуре от 2 до 8 °С после извлечения из биореактора.

Описание мелкомасштабного производства устекинумаба, экспрессированного в клетках CHO

Получение клеток СНО, экспрессирующих устекинумаб

Клеточная линия СНО была первоначально создана Т.Т. Паком (Т.Т. Puck) из яичника взрослого китайского хомячка. СНО-K1 (ATCC® CCL-61) является субклоном родительской клеточной линии СНО без гена синтеза пролина. СНО-K1 также был депонирован в европейской коллекции клеточных культур СНО-K1 (ECACC 85051005). Главный банк клеток (ГБК) СНО-K1, 024 М, был создан в Celltech Biologics (в настоящее время Lonza Biologics) и использован для адаптации СНО-K1 к суспензионной культуре и бессывороточной среде. Адаптированную клеточную линию назвали СНОK1SV. Клеточная линия СНОK1SV была дополнительно адаптирована в среде, не содержащей белков, для создания ГБК клеток, обозначенных как 269-М. Клетки, полученные из ГБК 269-М, трансфицировали, как описано ниже, для создания клеточных линий СНО, экспрессирующих устекинумаб.

Клеточные линии создавали, размножали и выдерживали в увлажненном инкубаторе при 37 °С и 5% CO₂ с использованием планшетов для культивирования клеток и встряхиваемых колб. Регулярная плотность посева во встряхиваемых колбах составляла 3×10^5 жизнеспособных клеток на мл (VC/мл). Все культуры во встряхиваемых колбах поддерживали при 130 оборотах в минуту (об/мин) с орбитой 25 мм и культуры в глубоколоночном планшете на 96 лунок (DW, Thermo Scientific, г. Уолтем, шт. Массачусетс, США, кат. № 278743) поддерживали при 800 об/мин с орбитой 3 мм.

Клоны СНО, экспрессирующие устекинумаб, создавали с использованием среды, идентифицированной как MACH-1, среды собственного производства с химически определенным составом для клеточной культуры СНО. Базальной средой для обычного пассажа линии клеток-хозяев СНО была среда MACH-1 с добавлением 6 мМ L-глутамин (Invitrogen, г. Карлсбад, шт. Калифорния, США, кат. № 25030-081). Клетки СНО, трансфицированные геном глутамин-синтетазы (ГС), выращивали в среде MACH-1+MSX, если не указано иное, которая представляет собой MACH-1 с добавлением 25 мМ L-метионинсульфоксимином (MSX, Sigma, г. Сент-Луис, шт. Миссури, США, кат. № M5379-1G) для ингибирования функции глутамин-синтетазы. Для экспериментов со встряхиваемой колбой и биореактором с болюсной подпиткой клетки культивировали в среде MACH-1+F8, которая представляет собой MACH-1 с добавлением 8 г/кг F8 (добавка патентованных усилителей роста) для дальнейшей поддержки роста клеток и производства антител. В экспериментах с использованием встряхиваемой колбы и биореактора применяли патентованную питательную среду.

ДНК, кодирующую интересующие гены, клонировали в плазмиду двойной экспрессии гена глутамин-синтетазы (ГС) (Lonza Biologics). Экспрессия генов тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) была инициирована отдельными промоторами цитомегаловируса человека (hCMV-MIE). Маркер отбора гена ГС, управляемый промотором вируса SV40, позволяет отобрать трансфицированные клетки в среде без глутамин в присутствии MSX.

Перед каждой трансфекцией 1 аликвоту плазмидной ДНК, содержащей области,

кодирующее как НС, так и LC устекинумаба, линеаризовали расщеплением рестрикционным ферментом. Аликвоту линеаризованной ДНК, 15 μg , трансфицировали в аликвоту 1×10^7 клеток, используя манипулятор электроклеток ВТХ ЕСМ 830 (Harvard Apparatus, г. Холлистон, шт. Массачусетс, США). Клетки подвергали 3-кратной электропорации под напряжением 250 вольт с длительностью импульсов 15 миллисекунд и интервалами между импульсами 5 секунд в кювете с шириной зазора 4 мм. Трансфицированные клетки переносили во встряхиваемую колбу, содержащую MACH-1+L-глутамин, и инкубировали в течение 1 дня. Трансфекцию центрифугировали, затем ресуспендировали в MACH-1+25 μM MSX для отбора и переносили во встряхиваемые колбы для инкубации в течение 6 суток.

После химического отбора клетки высевали в суспензию отдельных клеток в специальной среде MethoCult без глутамина, содержащей 2,5% (масс./об.) метилцеллюлозы в базовой среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM) (Methocult, StemCell Technologies, Inc., г. Ванкувер, шт. Британская Колумбия, США, кат. № 03899). Рабочий раствор также содержал 30% (об./об.) диализованной гамма-облученной эмбриональной бычьей сыворотки (dFBS.IR, Hyclone, г. Логан, шт. Юта, США, кат. № SH30079.03), 1x добавку ГС (SAFC, г. Сент-Луис, шт. Миссури, США, кат. № 58672-100M), 1,5 мг конъюгата Alexa Fluor 488 без животных компонентов (Protein G, Invitrogen, г. Карлсбад, шт. Калифорния, США, кат. № C47010), 25 μM MSX, среду Игла, модифицированную по способу Дульбекко с F12 (DMEM/F12, Gibco/Invitrogen, г. Карлсбад, шт. Калифорния, США, кат. № 21331-020) и клеточную суспензию.

Белок G распознает моноклональные антитела человека и связывается с IgG, который секретируется клетками. Белок G конъюгирован с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 таким образом, что клеточные колонии, секретирующие большинство антител, будут демонстрировать самые высокие уровни флуоресценции. После инкубации в течение 12-18 дней колонии с наивысшими уровнями флуоресценции собирали в 96-луночные планшеты с 100 μl MACH-1+MSX, содержащей феноловый красный индикатор, с использованием прибора для отбора колоний ClonePix FL (Molecular Devices, г. Саннивейд, шт. Калифорния, США) и инкубировали без встряхивания в течение 5-7 дней. Через 5-7 дней клетки из 96-луночного планшета размножали путем добавления к 50-100 μl содержащей феноловый красный индикатор MACH-1+MSX в 96-глубоколуночном планшете (Thermo Scientific, г. Уолтем, шт. Массачусетс, США, кат. № 278743) и встряхивали при 800 об/мин с орбитой 3 мм. 96-глубоколуночные планшеты (96DW) подпитывали и через 7 дней после посева в 96DW титровали с помощью прибора Octet (ForteBio, г. Менло-Парк, шт. Калифорния). 10 лучших культур, соответствующих наивысшим титрам избыточного роста партии в 96DW, размножали во встряхиваемых колбах в MACH-1+MSX и создавали банки замороженных клеток с клетками, суспендированными в среде MACH-1+MSX, содержащей 10% DMSO.

Культивирование клеток для мелкомасштабного производства

Как и при крупномасштабном производстве устекинумаба, экспрессированного в

клетках Sp2/0, предварительное культивирование, размножение и продуцирование клеток при мелкомасштабном производства устекинумаба, экспрессированного в клетках яичника китайского хомячка (клетки CHO), выполняется на стадиях 1 и 2. На стадии 1 предварительное культивирование иницируют из единственного клеточного банка трансфицированных клеток CHO, экспрессирующих последовательности HC и LC устекинумаба, и клетки размножают в культуральных колбах. Клетки культивируют до получения клеточной плотности и объема, необходимых для посева в производственный биореактор объемом 10 л. На стадии 2 клеточная культура прогоняется в режиме периодического культивирования с подпиткой в производственном биореакторе объемом 10 л. В течение 15-дневной работы биореактора в культуру при необходимости добавляют концентрированную подпитку на основе глюкозы и аминокислот. По завершении работы производственного биореактора урожай клеточной культуры очищается для удаления биомассы и фильтруется для дальнейшей обработки.

Очистка при мелкомасштабном производстве

Стадии очистки при мелкомасштабном производстве устекинумаба идентичны стадиям при крупномасштабном производстве, за исключением фильтрации вируса на стадии 8, которая отсутствует в мелкомасштабном производстве. Вкратце, для мелкомасштабного производства очистка устекинумаба из сбора клеточной культуры выполняется на стадиях 3-7 путем комбинации этапов аффинной и ионообменной хроматографии, а также этапов инактивации или удаления потенциального вирусного заражения (обработка растворителем/детергентом и удаление вируса). На стадии 3 сбор и/или объединенный сбор процеживают и очищают с использованием аффинной хроматографии на белке А. Полученный элюат прямого захвата продукта (DPC) замораживают до дальнейшей обработки. Элюаты ПСП фильтруют и объединяют в пул на стадии 4 после размораживания, а затем на стадии 5 обрабатывают три-н-бутилфосфатом (TNBP) и полисорбатом 80 (PS 80) для инактивации любых потенциально присутствующих вирусов в липидной оболочке.

На стадии 6 из продукта устекинумаба удаляют реагенты TNBP и PS 80, а также примеси с помощью катионообменной хроматографии. Продукт устекинумаба дополнительно очищают с помощью анионообменной хроматографии на стадии 7 для удаления ДНК, потенциально присутствующих вирусов и примесей. Как отмечалось выше, фильтрацию на стадии 8 с помощью фильтра, задерживающего вирус, исключали из процесса очистки продукта устекинумаба, полученного из CHO.

Окончательное получение предварительно подготовленного нерасфасованного препарата устекинумаба (PFB) и нерасфасованного препарата (FB) проводят на стадиях 9 и 10 соответственно (см. Стадии крупномасштабного производства). На стадии 9 на этапе ультрафильтрации продукт устекинумаба концентрируют, а на этапе диафильтрации добавляют согласно составу эксципиенты и удаляют функциональные буферные соли. Полисорбат 80 добавляют к предварительно подготовленному нерасфасованному препарату устекинумаба на стадии 10 для получения нерасфасованного препарата, и

нерасфасованный препарат фильтруют в поликарбонатных контейнерах для хранения в замороженном состоянии.

Способы

Способы определения плотности жизнеспособных клеток (VCD) и % жизнеспособности

Общее количество клеток на мл, жизнеспособных клеток/мл (VCD) и % жизнеспособности обычно определяют с помощью анализатора жизнеспособности клеток Beckman Coulter Vi-CELL-XR с использованием протоколов, программного обеспечения и реагентов, предоставляемых производителем. Альтернативно также применяется автоматизированная система подсчета клеток CEDEX. Однако также следует отметить, что специалистам в данной области хорошо известны и другие способы определения VCD и % жизнеспособности с использованием гемоцитометра и вытеснения трипанового синего.

Анализ биологической активности

Биоактивность устекинумаба определяется нейтрализацией индуцированной IL-12 продукции интерферона-гамма (IFN- γ) чувствительной к IL-12 линией естественных киллеров человека, NK-92MI (ATCC® CRL-2408). Устекинумаб связывается с субъединицей p40 IL-12 и препятствует взаимодействию с IL-12R β 1 на клеточной поверхности NK-клеток. Это приводит к блокаде IL-12-опосредованной продукции IFN- γ (Aggeletopoulou I, et al. Interleukin 12/interleukin 23 pathway: Biological basis and therapeutic effect in patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2018;24(36):4093-4103). Вкратце, способ анализа включает инкубацию клеток NK-92MI с рекомбинантным человеческим IL-12 (rhIL-12) и сравнение уровней IFN- γ , секретируемых клетками в присутствии и в отсутствие устекинумаба. Уровни IFN- γ количественно определяют с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА) с применением антитела к IFN- γ (см., например, Jayanthi S, et al. Modulation of Interleukin-12 activity in the presence of heparin. *Sci Rep.* 2017;7(1):5360).

Способы определения состава олигосахаридов

Композиция олигосахаридов по ВЭЖХ

Композиция N-связанных олигосахаридов устекинумаба определяется методом нормально-фазовой анионообменной ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием с использованием системы ВЭЖХ Agilent серии 1100/1200 с программным обеспечением Chemstation/Chemstore. Для количественного определения значений относительного количества гликанов N-связанные олигосахариды сначала отщепляют от восстановленного и денатурированного тестового образца N-гликаназой (ПНГаза F). Высвобожденные гликаны метят антралиловой кислотой, очищают посредством фильтрации с использованием нейлоновых фильтров с размером пор 0,45 мкм и анализируют посредством ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием. Хроматограмма ВЭЖХ служит картой, которую можно использовать для определения подлинности и определения значений относительного количества N-связанных олигосахаридов,

присутствующих в образце. Гликаны идентифицируются путем соэлюирования со стандартами олигосахаридов и по времени удерживания в соответствии с накопленными результатами обширных исследований. Репрезентативная хроматограмма ВЭЖХ устекинумаба показана на Фиг. 4.

Количество каждого гликана определяют путем интегрирования площади пика и выражают в процентах от общей площади пика гликана (площадь пика, %). Результаты представлены в отношении G0F, G1F, G2F, общего содержания нейтральных элементов и общего содержания заряженных гликанов. Другие нейтральные составляющие представляют собой сумму всех интегрированных пиков между 17 и 35 минутами, за исключением пиков, соответствующих G0F, G1F и G2F. Общее количество нейтральных гликанов - это сумма G0F, G1F, G2F и других нейтральных веществ. Общее количество заряженных гликанов представляет собой сумму всех пиков моносиалированных гликанов, элюируемых между 42 и 55 минутами, и всех пиков ди-сиалированных гликанов, элюируемых между 78 и 90 минутами.

Смесь стандартов олигосахаридов (G0F, G2F, G2F+N-ацетилнейраминавая кислота (NANA) и G2F+2NANA) анализируют параллельно в качестве положительного контроля реакции мечения, в качестве стандартов для идентификации пиков и в качестве меры пригодности системы. Растворенные олигосахариды компании Prozyme, G0F (№ по кат. GKC-004301), G2F (№ по кат. GKC-024301), SA1F (№ по кат. GKC-124301) и SA2F (№ по кат. GKC-224301) или эквивалентные, используются в качестве стандартов сравнения. Для целей определения пригодности системы также используют холостой отрицательный контроль способа и предварительно меченый стандарт G0F. Для получения достоверного результата во время картирования олигосахаридов применяются следующие критерии пригодности системы и анализа (исследуемого образца):

Критерии пригодности системы:

Разрешение (USP) между пиками G0F и G2F в стандарте олигосахаридов должно составлять $\geq 3,0$.

Число теоретических тарелок (метод касательных) для пика G0F в стандартах олигосахаридов должно составлять ≥ 5000 .

Общая площадь пика гликанов для эталонного стандарта устекинумаба должна в $\geq 1,5$ раз превышать основную площадь пика гликанов для предварительно меченого G0F.

Если какой-либо пик гликана эталонного стандарта выходит за пределы шкалы, эталонный стандарт вводится повторно с меньшим объемом впрыска.

Время удержания пика G0F в эталонном стандарте устекинумаба должно находиться в пределах 0,4 мин от времени удержания G0F в стандартах олигосахаридов.

Критерии приемлемости анализа:

Слепая проба не должна иметь детектируемых пиков, которые соэлюируются с назначенными пиками олигосахаридов в устекинумабе.

Общая площадь пика гликанов каждого исследуемого образца должна превышать площадь основного пика гликана предварительно маркированного стандарта G0F в $\geq 1,5$

раз.

Если какой-либо пик гликана образца выходит за пределы шкалы, этот образец повторно вводят с меньшим объемом впрыска вместе с предварительно маркированным G0F, стандартами олигосахаридов, слепой пробой и эталонным стандартом с нормальным объемом.

Время удержания пика G0F в каждом исследуемом образце должно находиться в пределах 0,4 мин от времени удержания пика G0F в стандартах олигосахаридов.

Если анализ не соответствует каким-либо критериям приемлемости, он считается недействительным.

Композиция олигосахаридов по данным IRMA

Метод IdeS-RMA (IRMA) позволяет дифференцировать основные гликоформы с помощью анализа пониженной массы (RMA) после ферментативной обработки иммуноглобулина G (IgG) с помощью FabRICATOR®, фермента, разрушающего IgG *Streptococcus pyogenes* (IdeS), доступного для приобретения у Genovis AB (SKU: A0-FR1-050). См. также, например, патент США №: 7,666,582. Анализ пониженной массы (RMA) включает восстановление дисульфидных связей в антителах с последующим анализом интактной массы тяжелой цепи антитела и присоединенных к ней фрагментов гликана. Некоторые антитела демонстрируют большую степень гетерогенности вследствие наличия N-концевых модификаций, таких как образование пироглутамата и карбоксилирование. Следовательно, восстановление дисульфидов и измерение массы тяжелой цепи приводят к сложной картине деконволютированных пиков. Таким образом, в некоторых областях применения протеолитическая генерация фрагментов антитела является желательной по сравнению с генерацией легких и тяжелых цепей с использованием восстанавливающих агентов, таких как дитиотреитол (DTT). Традиционно папаин и пепсин используются для получения фрагментов антител, что является трудоемким процессом. Расщепление IgG пепсином требует обширной оптимизации и выполняется при низком кислотном pH. Папаину необходим активатор, и как F(ab')₂, так и Fab могут быть получены в зависимости от условий реакции, что приводит к гетерогенному пулу фрагментов. Эти недостатки могут быть устранены использованием нового фермента FabRICATOR®. Процедура расщепления очень быстрая, простая и, что важно, не требует оптимизации. Ее проводят при нейтральном pH, генерируя точные фрагменты F(ab')₂ и Fc. Дальнейшего разложения или перерасщепления не наблюдается, как это обычно бывает с другими протеолитическими ферментами, такими как пепсин или папаин. Важно отметить, что, поскольку FabRICATOR® расщепляет дисульфидные мостики в тяжелой цепи только на C-конце, этап восстановления не требуется, и получают интактный F(ab')₂ и два остаточных фрагмента Fc.

Определения

H: гексоза (манноза, глюкоза и галактоза)

Man5: манноза 5

N: N-ацетилгексозамин (N-ацетилглюкозамин и N-ацетилгалактозамин)

F: фукоза

S: сиаловая кислота (N-ацетилнейраминовая кислота (NANA) и N-гликолилнейраминовая кислота (NGNA))

G0: асиало-агалакто-афукозилированный биантенарный олигосахарид

G0F: асиало-агалакто-фукозилированный биантенарный олигосахарид

G1: асиало-моногогалактозилированный-афукозилированный биантенарный олигосахарид

G1F: асиало-моногогалактозилированный-фукозилированный биантенарный олигосахарид

G2: асиало-дигалактозилированный-афукозилированный биантенарный олигосахарид

G2F: асиало-дигалактозилированный-фукозилированный биантенарный олигосахарид

GlcNAc: N-ацетил-D-глюкозамин

Lys: Лизин

-Lys: Усеченная тяжелая цепь (остаток C-концевого лизина отсутствует)

+Lys: Тяжелая цепь, содержащая C-концевой лизин

ppm: частей на миллион

Оборудование

Масс-спектрометр Thermo Scientific Q Exactive (Plus)

Система ВЭЖХ Agilent 1200

Колонка Applied Biosystems POROS R2/10 2,1 mmD × 100 mmL

Программное обеспечение Thermo Scientific Q Exactive Tune

Программное обеспечение Thermo Scientific Protein Deconvolution

Аналитические весы с погрешностью измерения до 0,01 мг

Вортекс-миксер, любая подходящая модель

Водяная баня или нагревательный блок, любая подходящая модель

Калиброванный термометр - от 10 до 110 °C, любая подходящая модель

Обычные пипетки

Микроцентрифуга, любая подходящая модель

Процедура

Расщепление образцов IdeS

образцы (эквивалентные 50 мкг IgG).

добавляют 1 мкл (50 единиц) фермента IdeS к 50 мкг IgG, непродолжительно перемешивают на вортексе, замедляют вращение и инкубируют при 37 °C в течение 30 минут (базовый фермент в концентрации 5000 единиц на 100 мкл. 1 единица фермента полностью расщепляет 1 мкг IgG за 30 минут при 37 °C).

замедляют скорость вращения образцов и переносят их во флаконы для ЖХ-МС и загружают флаконы с образцами в автоматический пробоотборник Agilent 1200

Метод ЖХ-МС

Приготовление раствора

Подвижная фаза А (0,1% муравьиной кислоты (FA) в сверхчистой воде). Добавляют 999 мл сверхчистой воды в колбу для подвижной фазы ВЭЖХ объемом 1 л, добавляют 1 мл FA и перемешивают. Этот раствор можно хранить при КТ в течение 2 месяцев.

Подвижная фаза В (0,1% FA, 99,9% ацетонитрил). Добавляют 999 мл ацетонитрила в колбу для подвижной фазы ВЭЖХ объемом 1 л, добавляют 1 мл FA и перемешивают. Этот раствор можно хранить при КТ в течение 2 месяцев.

Метод ЖХ

Колонка: Applied Biosystems POROS R2/10 2,1 ммD × 100 ммL

Температура колонки: 60 °C

Температура автоматического пробоотборника: 4 °C

Скорость потока: 300 мкл/мин

Объем введенной пробы: 5 мкл

Подвижная фаза А: 0,1% FA в сверхчистой воде

Подвижная фаза В: 0,1% FA в ацетонитриле

Таблица 1: Таблица градиентов ЖХ

Время (мин)	%, подвижная фаза В
0,0	10
6,0	30
11,9	42
12,0	95
15,9	95
16,0	10
21,0	10

Метод МС

Параметры сканирования:

Тип сканирования: Полная МС

Диапазон сканирования: 700-3500 масса/заряд

Фрагментация: Внутренний идентификатор источника питания (CID) 35,0 эВ

Разрешение: 17 500

Полярность: Положительная

Фиксированная масса: Вкл., масса/заряд, 445,12002

Целевая часть AGC: 3e6

Максимальное время введения: 250

Источник HESI:

Скорость потока защитного газа: 32

Расход вспомогательного газа: 7

Расход продувочного газа: 0

Напряжение распыления (kV): 4,20

Темп. капилляра (°C): 280

РЧ-уровень S-линзы: 55,0

Темп. нагревателя (°C): 80

Анализ данных

Относительное содержание каждого обнаруженного соединения гликанов регистрируют на основе анализа масс-спектров после деконволюции. На Фиг. 5 показан реперзентативный масс-спектр после деконволюции для анализа IRMA устекинумаба, продуцированного в клетках Sp2/0. Основные структуры, определенные с помощью анализа IRMA, включают, например, G0 (H3N4), G0F (H3N4F1), G1F-GlcNAc (H4N3F1), H5N3, G1 (H4N4), H5N3F1, G1F (H4N4F1), G2 (H5N4), G2F (H5N4F1), G1FS (H4N4F1S1), H6N4F1, G2FS (H5N4F1S1), H7N4F1, H6N4F1S1, G2FS2 (H5N4F1S2). Отслеживается процентная доля каждой из этих структур. Измеренная пиковая интенсивность представляет собой процент каждой структуры после нормализации (% от общего назначения). Гликаны, для которых наблюдаемая масса выходит за пределы порогового значения массового отклонения 100 частей на миллион, не включены в расчеты, например, (*G1F-GlcNAc-Lys, *H5N3-Lys, *G1-Lys, *H5N3F1-Lys и *G2-Lys). Как отмечено, они обозначены звездочкой (*). Кроме того, Man5-Lys не всегда обнаруживается в спектрах, поскольку он имеет очень низкую интенсивность, тем не менее, он учитывается в расчетах при наличии. Процентное содержание гликана рассчитывается по результатам определения на обеих изоформах Fc-фрагмента с концевым лизином и без него, например, процентное содержание G0F составляет (%G0F - Lys + %G0F+Lys). Структуры, обнаруженные только на одной из изоформ тяжелой цепи, обозначены двумя звездочками (**), например, **G1F-GlcNAc -Lys, **H5N3 -Lys, **H5N4 -Lys и **H5N3F1 +Lys. Большинство этих структур мало распространены и не могут быть отделены от соседних пиков с более высокой интенсивностью или находятся ниже возможностей обнаружения по этому методу.

***Примечание.** Различия между методами ВЭЖХ и IRMA (например, см. таблицу 2 ниже) могут быть связаны с соэлюированием соединений в ВЭЖХ и, возможно, с недостаточной оценкой некоторых сиалилированных соединений по данным IRMA, поскольку некоторые из интенсивностей очень близки к пределу возможностей обнаружения по методу IRMA.

Таблица 2: Сравнение численности гликанов для IRMA и ВЭЖХ в репрезентативном образце устекинумаба, продуцированном в клетках Sp2/0

Группа гликанов	IRMA, %	ВЭЖХ, %
G0F	21,6	25,0
G1F	28,5	33,2
G2F	9,2	7,8
Другие нейтральные олигосахариды	11,4	5,9
Всего нейтральных олигосахаридов	70,7	71,9

Моносиалилированные	25,0	25,9
Дисиалилированные	4,3	2,2
Общее количество заряженных олигосахаридов	29,3	28,1

Капиллярное изоэлектрическое фокусирование

Капиллярное изоэлектрическое фокусирование (сIEF) разделяет белки на основе общего заряда или изоэлектрической точки (pI). Метод используется для мониторинга распределения изоформ на основе заряда в устекинумабе. В отличие от процедур IEF на основе геля, сIEF обеспечивает количественное измерение присутствующих заряженных частиц. Кроме того, сIEF демонстрирует повышенное разрешение, чувствительность и воспроизводимость по сравнению с методом на основе геля. Анализ проводят на имеющемся в продаже анализаторе сIEF для визуализации, оснащенном автоматическим пробоотборником, способным поддерживать температуру образца $\leq 10,5^{\circ}\text{C}$ в окружающей среде $\leq 30^{\circ}\text{C}$, таком как автоматический пробоотборник Alcott (GP Instruments, Inc.). В анализе используется капилляр из диоксида кремния с внутренней стенкой без полиимидного покрытия на внешней стороне, что позволяет детектировать всю колонку. Кроме того, используется раствор анолита разбавленной фосфорной кислоты и метилцеллюлозы, раствор католита гидроксида натрия и метилцеллюлозы и определенная смесь амфолитов широкого диапазона (pH 3-10) и узкого диапазона (pH 8-10,5). В анализе используется предварительная обработка как исследуемых образцов, так и эталонного стандарта (RS) карбоксипептидазой В (СРВ), которая удаляет С-концевой лизин тяжелой цепи и устраняет неоднозначности, вносимые присутствием нескольких С-концевых вариантов. Репрезентативная электрофореграмма устекинумаба, экспрессированного в клетках Sp2/0, представлена на Фиг. 6, а репрезентативная электрофореграмма устекинумаба, экспрессированного в клетках СНО, представлена на Фиг. 9.

Перед каждым анализом заданная температура автоматического пробоотборника устанавливается на 4°C . Автоматический пробоотборник предварительно охлаждается в течение по меньшей мере 30 минут, а температура окружающей среды в лаборатории поддерживается на уровне $\leq 30^{\circ}\text{C}$. Предварительно обработанный исследуемый препарат и эталонный стандарт, флаконы с образцами, вставки флаконов, реагенты, используемые при анализе, включая очищенную воду, исходный раствор, содержащий N, N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED) (который оптимизирует фокусировку внутри капилляра), амфолиты, маркеры pI 7,6 и 9,5 для внутренних стандартов и метилцеллюлозу (МЦ) перед началом приготовления образца выдерживают на льду в течение по меньшей мере 30 минут. Образцы готовят на льду и регистрируют время добавления исходного раствора и контролируют воздействие TEMED. Анализ должен быть завершен в течение 180 минут после добавления. Контрольные образцы для проверки пригодности системы вводят однократно, а тестовые образцы и эталонный стандарт вводят дважды в соответствии с таблицей последовательностей, приведенной ниже (таблица 3).

Таблица 3: Последовательность отбора образца

Название образца	Положение флакона для	Число инъекций
------------------	-----------------------	----------------

	отбора образца	
Пригодность системы	1	1
Пусто	2	1
Контрольный СРВ	3	1
RS, обработанный СРВ	4	2
Образец 1, обработанный СРВ	5	2
RS, обработанный СРВ	6	2

После того как образцы вводятся в капилляр с помощью шприцевого насоса, электрическое поле (3 кВ) применяется к капилляру в течение 8 минут, образуя градиент рН, и заряженные изоформы устекинумаба разделяются в соответствии с их изоэлектрической точкой (рI). Изоформы белка в капиллярной трубке обнаруживают путем визуализации всего капилляра при 280 нм, а данные представлены в виде электрофореграммы в зависимости от значения рI по сравнению со значением А280. Значения рI присваивают путем сравнения с внутренними стандартами рI (рI 7,6 и 9,5) с помощью программного обеспечения прибора, а площади пиков определяют с помощью электрофореграммы, используя стандартное программное обеспечение для сбора данных. Приведены средний рI и средний процент площади пика от повторных инъекций всех пиков \geq LOD, значение Δ рI по сравнению с эталонным стандартом и процент площади пиков.

Внедрение в стратегии управления производством

Во время крупномасштабного коммерческого производства разработаны стратегии управления производством для поддержания стабильных характеристик лекарственного вещества (ЛВ) и лекарственного препарата (ЛП) терапевтических белков (например, терапевтических антител, таких как устекинумаб) в отношении профиля олигосахаридов, биоактивности (активности) и/или других характеристик ЛВ и ЛП (например см. характеристики, указанные в таблице 4 и таблице 5). Например, гликозилирование устекинумаба отслеживают в качестве внутрипроизводственного контроля нерасфасованного препарата (FB) на стадии 10 производственного процесса, с указанием верхних и нижних пределов для среднего % общего количества нейтральных олигосахаридов, % общего количества заряженных олигосахаридов и % отдельных видов нейтральных олигосахаридов, G0F, G1F и G2F. Используемые в настоящем документе термины «лекарственное вещество» (сокращенно «ЛВ») и «лекарственный препарат» (сокращенно «ЛП») относятся к композициям для использования в качестве коммерческих препаратов, например, в клинических испытаниях или в качестве продаваемых на рынке лекарств. ЛВ представляет собой активный ингредиент, который предназначен для обеспечения фармакологической активности или другого прямого эффекта при диагностике, лечении, смягчении или профилактике заболевания или для воздействия на структуру или любую функцию человеческого организма. Нерасфасованный препарат (FB), получаемый в процессе производства, представляет собой лекарственное вещество

(ЛВ). ЛП (также называемый лекарственным средством, лекарственным препаратом или лекарством) - это лекарственное средство, используемое для диагностики, лечения, смягчения или предотвращения заболевания или для воздействия на структуру или любую функцию человеческого организма. ЛП представляет собой ЛВ, которое было получено в качестве лекарственного средства для продажи и/или введения пациенту.

Как показано в таблице 4, существуют лишь очень небольшие различия в % мономера, % чистоты и % биологической активности устекинумаба, продуцируемого клетками Sp2/0 и CHO. Однако существуют существенные различия в профилях cIEF, обусловленные преимущественно различиями в профиле олигосахаридов устекинумаба, продуцируемого клетками Sp2/0 и CHO. Для сравнения профилей cIEF для устекинумаба, продуцированного клетками Sp2/0 и CHO, см. также, например, Фиг. 6 и Фиг. 9.

Таблица 4: Репрезентативное сравнение выбранных характеристик устекинумаба, экспрессированного в клетках Sp2/0 и CHO

Тест	Параметр	Клетки Sp2/0	Клетки CHO
ДВ-ЭКС-ВЭЖХ	Мономер, %	99,75%	99,40%
	Агрегат, %	0,23%	0,57%
	Фрагмент, %	<LOD	<LOD
Редуцированный cSDS	Чистота, %	98,9%	98,2%
Не редуцированный cSDS	Чистота, %	98,9%	97,3%
Биоактивность	Биоактивность, %	Н/П	96% ^a
cIEF	пик А	0,6%	<LOD
	пик В	3,9%	<LOD
	пик 1	12,6%	5,5%
	пик 2	28,7%	15,8%
	пик 3	53,6%	76,9%
	пик С	0,8%	1,7%
<LOD - ниже предела обнаружения			
Н/П - не применимо к эталонному материалу, продуцированному в клетках Sp2/0			
^a В сравнении с эталонным материалом, экспрессированным в клетках Sp2/0			

Олигосахаридный профиль устекинумаба

Устекинумаб N-гликозилирован по одному сайту на каждой тяжелой цепи аспарагина 299. Эти N-связанные олигосахаридные структуры могут быть любыми из группы биантенарных олигосахаридных структур, связанных с белком через первичный амин остатка аспарагина, но на устекинумабе они состоят в основном из биантенарных кор-фукозилированных видов с неоднородностью галактозы и сиаловой кислоты.

Основные отдельные виды олигосахаридов включают, например, «G0F», асиало, агалакто кор-фукозилированный биантенарный гликан, «G1F», асиало, моногалакто кор-фукозилированный биантенарный гликан и «G2F», асиало, дигалакто кор-фукозилированный биантенарный гликан. На Фиг. 7 представлен схематический обзор некоторых видов первичных N-связанных видов олигосахаридов в IgG устекинумаба. Также показана роль некоторых ферментов в процессе созревания гликозилирования, включая роли некоторых двухвалентных катионов (например, Mn^{2+} и Cu^{2+}) в этих ферментативных процессах.

ВЭЖХ представляет собой аналитическую процедуру, которая используется для анализа гликозилирования устекинумаба в процессе производства. Для анализа методом ВЭЖХ гликаны сначала ферментативно отщепляют от тяжелой цепи, а затем маркируют флуоресцентной меткой для обеспечения обнаружения. В данном способе можно различать незаряженные пики G0F, G1F и G2F, а также подмножество меньших нейтральных пиков. Кроме того, также можно наблюдать пики дифференциально сиалилированного материала (Фиг. 4). Другим способом анализа олигосахаридов является IRMA, способ анализа с пониженной массой (RMA) с использованием фермента *Streptococcus pyogenes*, расщепляющего иммуноглобулин G (IdeS), который позволяет дифференцировать основные гликоформы после ферментативной обработки иммуноглобулина G (IgG). На Фиг. 5 показан реперзентативный масс-спектр после деконволюции для анализа IRMA устекинумаба, подуцированного в клетках Sp2/0. В случае устекинумаба существует также прямая связь между степенью сиалилирования структур олигосахаридов и гетерогенностью заряда, определенная с помощью cIEF, IRMA или ВЭЖХ (см., например, Фиг. 4, Фиг. 5, Фиг. 6, Фиг. 8 и Фиг. 9).

Контроль профиля олигосахаридов

Контроль профиля олигосахаридов играет ключевую роль, поскольку изменения профиля олигосахаридов рекомбинантного моноклонального антитела могут существенно влиять на биологические функции антитела. Например, биологические исследования показали, что распределение различных гликоформ в области Fc может существенно влиять на эффективность, стабильность антитела и эффекторную функцию (J. Biosci. Bioeng. 2014 117(5):639-644; Bio-Process Int. 2011, 9(6):48-53; Nat. Rev. Immunol. 2010, 10(5):345-352). В частности, афукозилирование (J. Mol. Biol. 368:767-779) и галактозилирование (Biotechnol. Prog. 21:1644-1652) могут играть важную роль в антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) и комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), двух важных механизмах, с помощью которых антитела опосредуют уничтожение клеток-мишеней через иммунную функцию. Кроме того, высокие уровни маннозы отрицательно влияют на эффективность путем увеличения клиренса антитела (Glycobiology. 2011, 21(7):949-959), а содержание сиаловой кислоты может влиять на противовоспалительную активность (Antibodies. 2013 2(3):392-414). В результате данных биологических последствий вследствие изменений профиля олигосахаридов регуляторные органы требуют контролировать структуру

гликозилирования антител, чтобы гарантировать соблюдение спецификаций выпуска для получения последовательного, безопасного и эффективного препарата.

Профиль олигосахаридов - влияние экспрессии в различных клетках

Двумя широко используемыми линиями клеток-хозяев грызунов для рекомбинантной экспрессии антител являются клетки яичников китайского хомячка (СНО) и клетки миеломы мышей (например, клетки Sp2/0). Клетки СНО экспрессируют рекомбинантные антитела, которые могут практически не содержать гликанов сиаловой кислоты, а гликаны могут быть фукозилированы на 99%. В противоположность этому, клетки миеломы мышей экспрессируют рекомбинантные антитела, которые могут содержать до 50% сиаловой кислоты и по существу содержат меньше фукозы. Эти различия могут оказывать существенное влияние на активность антитела *in vivo*, например, было показано, что такие различия могут влиять на структуру Fc-части молекулы и тем самым изменять эффекторные функции антитела, такие как антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) и комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC) (см. например, патент США № US8975040). Например, сниженная активность ADCC отмечалась для повышенных сиалилированных (заряженных) гликанов Fc (Scallon et al., *Mol Immunol* 2007; 44:1524-34), а повышенная активность ADCC отмечалась для антител с дефицитом фукозы (Shields et al., *J Biol Chem.* 2002;277:26733-26740; Shinkawa et al., *J Biol Chem.* 2003;278:3466-3473).

Кроме того, антитела, продуцируемые в клетках СНО и Sp2/0, могут иметь значительные различия в уровнях двух эпитопов гликанов: галактоза- α -1,3-галактозы (α -gal) и сиалилированного N-гликана Neu5Gc- α -2-6-галактозы (Neu5Gc). Например, было показано, что клетки СНО могут экспрессировать антитела с неопределяемыми уровнями или лишь следами α -Gal и Neu5Gc, тогда как клетки Sp2/0 могут экспрессировать намного более высокие уровни двух структур гликанов (Yu et al., *Sci Rep.* 2016 Jan 29;7:20029). Напротив, люди генетически лишены гена биосинтеза α -gal, а ген, ответственный за продукцию Neu5Gc, необратимо мутирован у всех людей. В результате α -Gal и Neu5Gc не продуцируются у людей. Более того, присутствие этих эпитопов гликанов, не относящихся к человеку, на терапевтических антителах может вызывать нежелательные иммунные реакции в определенных популяциях из-за более высоких уровней ранее существующих антител к α -Gal и Neu5Gc. Например, при применении цетуксимаба сообщалось об анафилактических ответах, опосредованных IgE к α -гал (Chung, C. H. et al., *N Engl J Med.* 2008 Mar 13;358(11):1109-17), а также о наличии циркулирующих антител к Neu5Gc, способствующих клиренсу цетуксимаба (Ghaderi et al., *Nat Biotechnol.* 2010 Aug;28(8):863-7).

Также сообщалось, что устекинумаб, экспрессируемый в клетках Sp2/0, содержит более высокие уровни Neu5Gc по сравнению с рядом других антител. Анализ методом вестерн-блоттинга показал, что препараты антител к Neu5Gc с высокой моноспецифичностью к Neu5Gc не связывались с устекинумабом, обработанным ферментом PNGase F, который удаляет почти 100% N-гликана. (Yu et al., *Sci Rep.* 2016 Jan

29;7:20029). Дальнейший анализ также показал, что препараты антител к Neu5Gc не могли связывать устекинумаб только с одним Neu5Gc (моносиалилированным на одной области Fc), но могли связывать антитела с двумя - четырьмя Neu5Gc. Не было определено, может ли антитело к Neu5Gc связываться с двумя Neu5Gc, расположенными на двух различных областях Fc одного и того же антитела (моносиалилированный на обеих областях Fc), или только с дисиалилированным N-гликаном на одной области Fc антитела, но, независимо от их распределения, было установлено, что для связывания с антителом к Neu5Gc требуются по меньшей мере два остатка Fc Neu5Gc.

Олигосахаридный профиль устекинумаба, экспрессированного в клетках Sp2/0 и клетках СНО

Сводные данные ВЭЖХ, полученные из нескольких коммерческих производственных циклов устекинумаба, показали, что ЛВ или ЛП, продуцируемые в клетках Sp2/0, содержат общее количество видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее количество видов заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и отдельные виды нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$. Более того, процент площади пика 3 на электрофореграмме капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF) устекинумаба, продуцированного в клетках Sp2/0, составляет от $\geq 39,8\%$ до $\leq 64,4\%$. Как показано в таблице 5 и таблице 6, на основании анализа IRMA или ВЭЖХ олигосахаридный профиль устекинумаба, продуцированного в клетках СНО, сильно отличается от профиля устекинумаба, продуцированного в клетках Sp2/0, для общего количества видов нейтральных, общего количества видов заряженных и отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F, G1F и G2F. Эти различия очевидны на репрезентативных хроматограммах ВЭЖХ устекинумаба, продуцированного в клетках Sp2/0 и клетках СНО, как показано на Фиг. 4 и Фиг. 8 соответственно. По сравнению с устекинумабом, продуцируемым в клетках Sp2/0, профиль олигосахаридов для устекинумаба, продуцируемого в клетках СНО, смещен в сторону очень низких уровней заряженных гликанов и более высоких уровней нейтральных гликанов, которые преимущественно представляют собой G0F. Олигосахаридный профиль для устекинумаба, продуцируемого в клетках СНО, содержит общее количество видов нейтральных олигосахаридов $> 99,0\%$, общее количество видов заряженных олигосахаридов $< 1,0\%$ и индивидуальные виды нейтральных олигосахаридов G0F $> 70,0\%$, G1F $< 20,0\%$ и G2F $< 5,0\%$. Процент площади пика 3 на электрофореграмме капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF) устекинумаба, продуцируемого в клетках СНО, составляет $> 70,0\%$. Кроме того, для устекинумаба, продуцируемого в клетках СНО, с помощью IRMA или ВЭЖХ не было обнаружено никаких видов дисиалилированных гликанов, а уровни моносиалилированных гликанов на основании анализа ВЭЖХ были очень низкими и не определялись с помощью анализа IRMA (см., например, таблицу 5 и Фиг. 8).

Таблица 5: Репрезентативные результаты анализа IRMA и ВЭЖХ общих

нейтральных, общих заряженных и других выбранных видов олигосахаридов для устекинумаба, продуцированного в клетках Sp2/0 и клетках CHO

Гликаны	IRMA		ВЭЖХ	
	Sp2/0	CHO	Sp2/0	CHO
G0F	26,7	71,0	25,0	78,0
G1F	29,2	13,3	33,2	15,2
G2F	8,6	1,5	7,8	2,2
Другой нейтральный	11,0	14,2	5,9	4,2
Общее количество нейтральных	75,5	100,0	71,9	99,6
Моносиалилированные	20,9	0,0	25,9	0,4
Дисиалилированные	3,5	0,0	2,2	<LOD
Общее количество заряженных	24,5	0,0	28,1	0,4
<LOD - ниже предела обнаружения				
Числа приведены в % от общего значения				

Таблица 6: Репрезентативные результаты анализа IRMA отдельных видов олигосахаридов для устекинумаба, продуцированного в клетках Sp2/0 и клетках CHO

Гликан	Клетки Sp2/0 % от общего назначения	Клетки CHO % от общего назначения
G0F	26,7	71,0
G1F	29,2	13,3
G2F	8,6	1,5
G0	2,9	10,1
G1FS	9,7	0,0
H6N4F1	1,6	0,0
G2FS	7,4	0,0
H7N4F1	0,9	0,0
H6N4F1S1	3,9	0,0
G2FS2	3,5	0,0
*Man5 +Lys	0,7	0,9
*G1F-GlcNAc +Lys	1,1	0,6
*H5N3 +Lys	0,8	0,8
*G1 +Lys	1,5	1,2
*G2 +Lys	0,4	0,2
**G1F-GlcNAc -Lys	0,0	0,0
**H5N3 -Lys	0,0	0,0
**G1 -Lys	0,0	0,0
**H5N4 -Lys	0,0	0,5
**H5N3F1 +Lys	1,0	0,0

Заключение

Таким образом, как описано выше, разработаны стратегии производственного контроля для поддержания стабильных характеристик лекарственного вещества (ЛВ) и лекарственного препарата (ЛП) терапевтических белков в отношении профиля олигосахаридов и/или других характеристик ЛВ или ЛП (например, ЛВ и/или ЛП, содержащих терапевтическое антитело устекинумаб). В частности, контроль профиля олигосахаридов терапевтических антител играет ключевую роль, поскольку изменения профиля олигосахаридов могут существенно влиять на биологические функции антитела. Точкой контроля профиля олигосахаридов терапевтических антител является выбор клеточного организма-хозяина для экспрессии терапевтических антител. Как представлено в настоящем документе, устекинумаб, экспрессированный в клетках Sp2/0, содержит антитела к IL-12/IL-23p40, имеющие тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11; аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 8; аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; и аминокислотные последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6; причем олигосахаридный профиль антител к IL-12/IL-23p40 содержит общее количество видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее количество видов заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и отдельные виды нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$. Более того, процент площади пика 3 на электрофореграмме капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF) антител к IL-12/IL-23p40, продуцированных в клетках Sp2/0, составляет от $\geq 39,8\%$ до $\leq 64,4\%$.

Напротив, в случае устекинумаба, продуцируемого в клетках СНО, олигосахаридный профиль смещен в сторону очень низких уровней заряженных гликанов и более высоких уровней нейтральных гликанов, которые преимущественно представляют собой G0F. Олигосахаридный профиль для устекинумаба, продуцируемого в клетках СНО, содержит антитела к IL-12/IL-23p40, имеющие тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11; аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 8; аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3 и аминокислотные последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6; причем олигосахаридный профиль антител к IL-12/IL-23p40 содержит общее количество видов нейтральных олигосахаридов $> 99,0\%$, общее количество видов заряженных олигосахаридов $< 1,0\%$ и отдельные виды нейтральных олигосахаридов G0F $> 70,0\%$, G1F $< 20,0\%$ и G2F $< 5,0\%$; Процент площади пика 3 на

электрофореграмме капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF) устекинумаба, продуцируемого в клетках CHO, составляет > 70,0%. Кроме того, для устекинумаба, продуцируемого в клетках CHO, не было обнаружено никаких видов дисиаилированных гликанов с помощью IRMA или ВЭЖХ, а уровни моносиалилированных гликанов были очень низкими на основании анализа ВЭЖХ и не определялись с помощью анализа IRMA. В случае устекинумаба, продуцируемого клетками CHO, снижение сиалилированных видов в целом и снижение Neu5Gc в особенности может обеспечить преимущество за счет сокращения нежелательных иммуногенных ответов при введении человеку. Например, пониженные уровни Neu5Gc могут снижать клиренс, так что антитела к IL-12/23p40, продуцируемые в клетках CHO, будут иметь более длительный период полужизни по сравнению с антителами к IL-12/23p40, экспрессированными в клетках Sp2/0, особенно в популяциях пациентов с более высокими уровнями антител к Neu5Gc.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело к IL-12/IL-23p40, содержащее аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из: (i) тяжелая цепь (HC), содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкая цепь (LC), содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; (ii) аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 8; и (iii) аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3 и аминокислотные последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, причем антитело к IL-12/IL-23p40 экспрессировано в клетках яичника китайского хомячка (клетки CHO).

2. Антитело к IL-12/IL-23p40 по п. 1, в котором олигосахаридный профиль антитела к IL-12/IL-23p40 содержит общее количество видов нейтральных олигосахаридов > 99,0% и общее количество видов заряженных олигосахаридов < 1,0%.

3. Антитело к IL-12/IL-23p40 по п. 2, в котором олигосахаридный профиль антитела к IL-12/IL-23p40 дополнительно содержит отдельные виды нейтральных олигосахаридов G0F > 70,0%, G1F < 20,0% и G2F < 5,0%.

4. Антитело к IL-12/IL-23p40 по п. 2, в котором процент площади пика 3 на электрофореграмме капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF) антитела к IL-12/IL-23p40 составляет > 70,0%.

5. Антитело к IL-12/IL-23p40 по п. 2, которое не содержит видов дисиаилированного гликана, как определено с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или анализа пониженной массы (RMA).

6. Антитело к IL-12/IL-23p40 по любому из пп. 1-5, которое имеет более длительный период полужизни по сравнению с антителом к IL-12/IL-23p40 с идентичными последовательностями тяжелой цепи и легкой цепи аминокислот, экспрессированным в клетках Sp2/0.

7. Антитело к IL-12/IL-23p40 по любому из пп. 1-5, которое содержит биоаналог.

8. Способ производства антитела к IL-12/IL-23p40, содержащий аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из: (i) тяжелая цепь (HC), содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкая цепь (LC), содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; (ii) аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 8; и (iii) аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3 и аминокислотные последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, включающий стадии:

a. культивирование клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO) с нуклеотидами, кодирующими антитело к IL-12/IL-23p40;

b. экспрессия антитела к IL-12/IL-23p40 в клетке CHO; и

с. очистка антитела к IL-12/IL-23p40.

9. Способ производства по п. 8, в котором олигосахаридный профиль антитела к IL-12/IL-23p40 содержит общее количество видов нейтральных олигосахаридов $> 99,0\%$ и общее количество видов заряженных олигосахаридов $< 1,0\%$, и

10. Способ производства по п. 9, в котором олигосахаридный профиль антитела к IL-12/IL-23p40 дополнительно содержит отдельные виды нейтральных олигосахаридов G0F $> 70,0\%$, G1F $< 20,0\%$ и G2F $< 5,0\%$.

11. Способ производства по п. 9, в котором процент площади пика 3 на электрофореграмме капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF) антитела к IL-12/IL-23p40 составляет $> 70,0\%$.

12. Способ производства по п. 9, в котором антитело к IL-12/IL-23p40 не содержит видов дисаилированного гликана, как определено с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или анализа пониженной массы (RMA).

13. Способ производства по любому из пп. 8-12, в котором антитело к IL-12/IL-23p40 имеет более длительный период полужизни по сравнению с антителом к IL-12/IL-23p40 с идентичными последовательностями тяжелой цепи и легкой цепи аминокислот, экспрессированным в клетках Sp2/0.

14. Способ производства по любому из пп. 8-12, в котором антитело к IL-12/IL-23p40 является биоаналогом.

15. Композиция, которая содержит антитело к IL-12/IL-23p40, включающее аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из: (i) тяжелая цепь (HC), содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкая цепь (LC), содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; (ii) аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 8; и (iii) аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3 и аминокислотные последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, причем антитело к IL-12/IL-23p40 экспрессировано в клетках яичника китайского хомячка (клетки CHO).

16. Композиция по п. 15, в которой олигосахаридный профиль антитела к IL-12/IL-23p40 содержит общее количество видов нейтральных олигосахаридов $> 99,0\%$ и общее количество видов заряженных олигосахаридов $< 1,0\%$.

17. Композиция по п. 16, в которой олигосахаридный профиль антитела к IL-12/IL-23p40 дополнительно содержит отдельные виды нейтральных олигосахаридов G0F $> 70,0\%$, G1F $< 20,0\%$ и G2F $< 5,0\%$.

18. Композиция по п. 16, в которой процент площади пика 3 на электрофореграмме капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF) антитела к IL-12/IL-23p40 составляет $> 70,0\%$.

19. Композиция по п. 16, в которой антитело к IL-12/IL-23p40 не содержит видов дисаилированного гликана, как определено с помощью высокоэффективной

жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

20. Композиция по любому из пп. 15-19, в которой антитело к ПЛ-12/ПЛ-23p40 имеет более длительный период полужизни по сравнению с антителом к ПЛ-12/ПЛ-23p40 с идентичными последовательностями тяжелой цепи и легкой цепи аминокислот, экспрессированным в клетках Sp2/0.

21. Композиция по любому из пп. 15-19, в которой антитело к ПЛ-12/ПЛ-23p40 является биоаналогом.

По доверенности

Рис. 1
Обзор производственного процесса, стадии
процесса

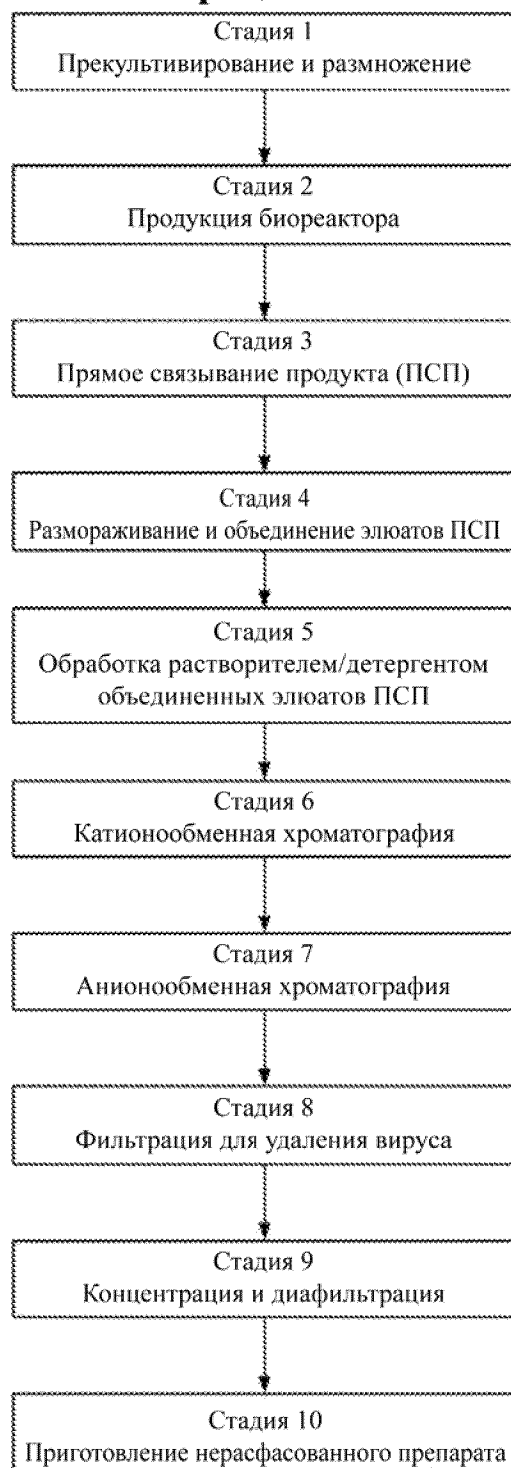


Рис. 2

Стадия 1. Схема технологического процесса для предварительного культивирования и размножения клеток



Рис. 3

Стадия 2. Схема технологического процесса

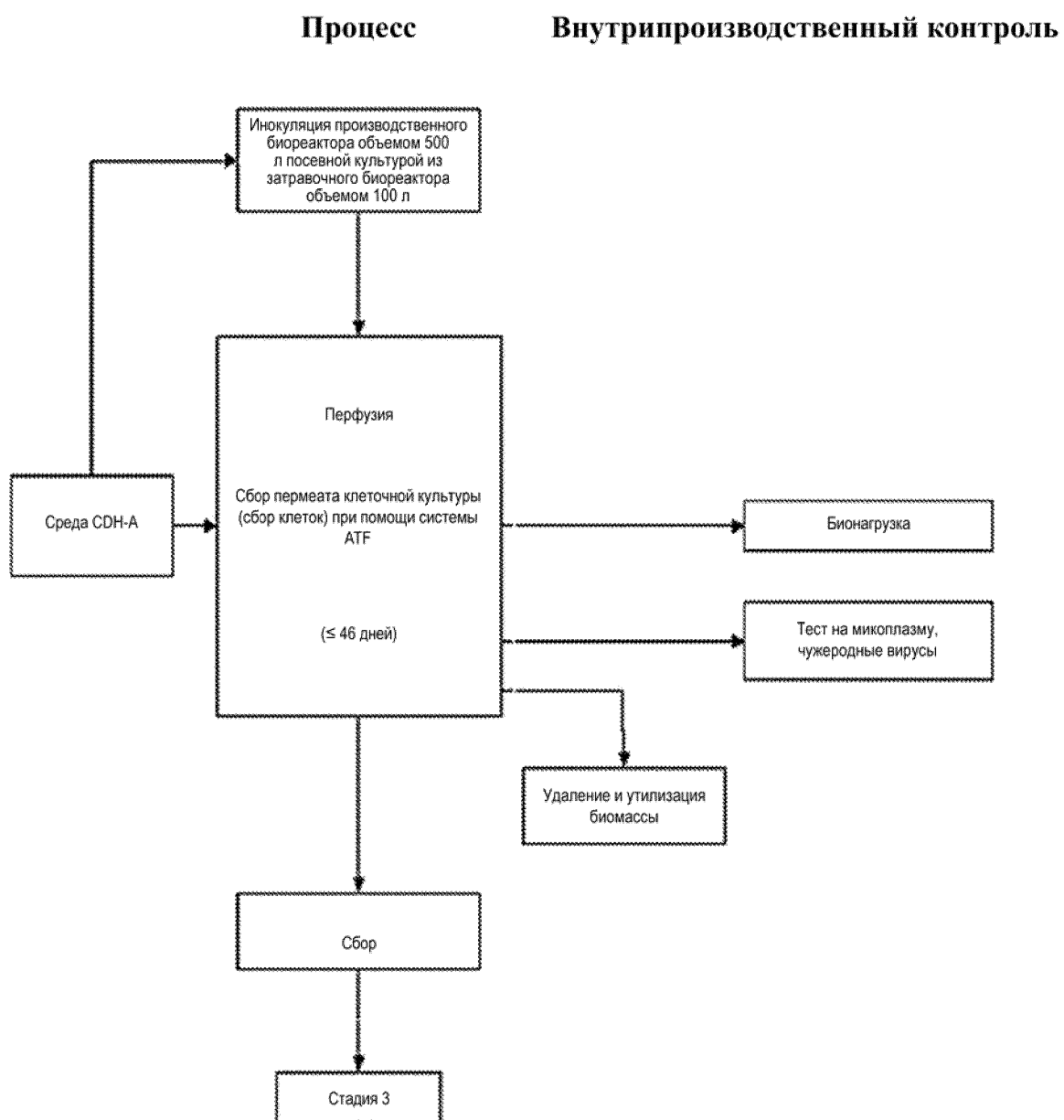


Рис. 4

Репрезентативная хроматограмма ВЭЖХ для анализа олигосахаридов устекинумаба, продуцируемого в клетках Sp2/0

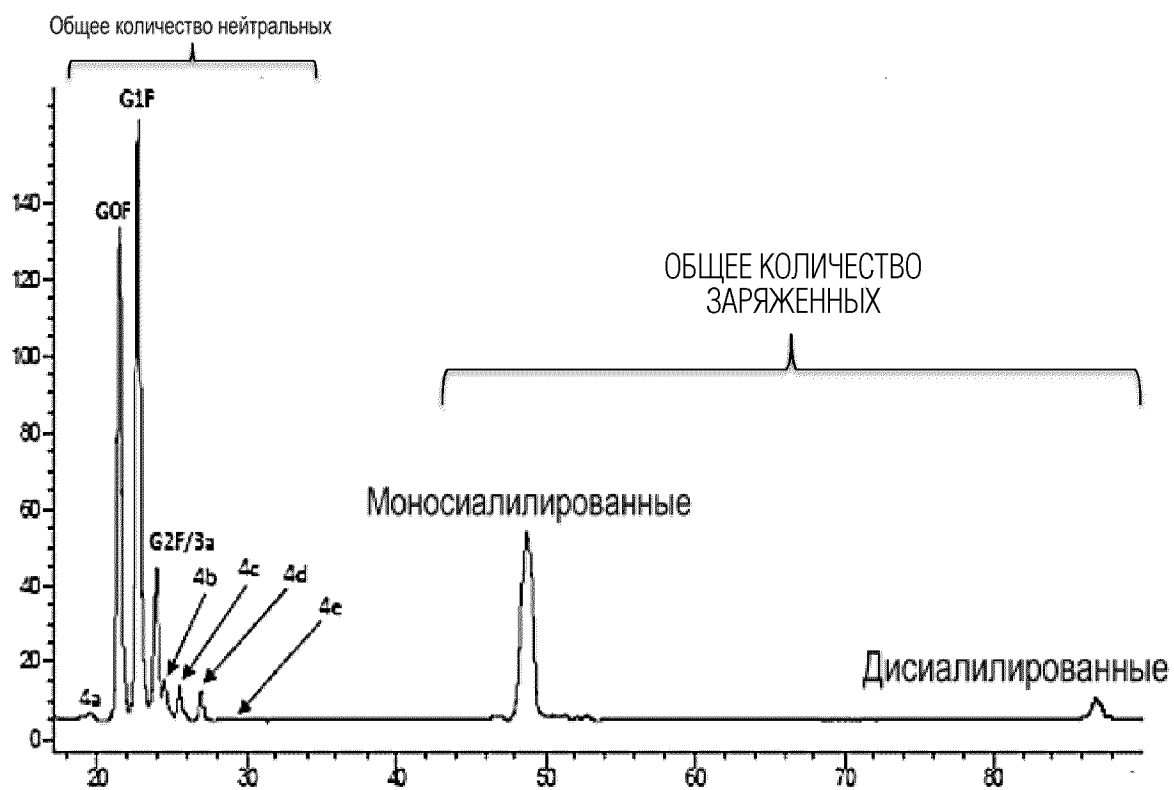


Рис. 5

Репрезентативный масс-спектр после деконволюции для анализа IRMA устекинумаба, продуцируемого в клетках Sp2/0

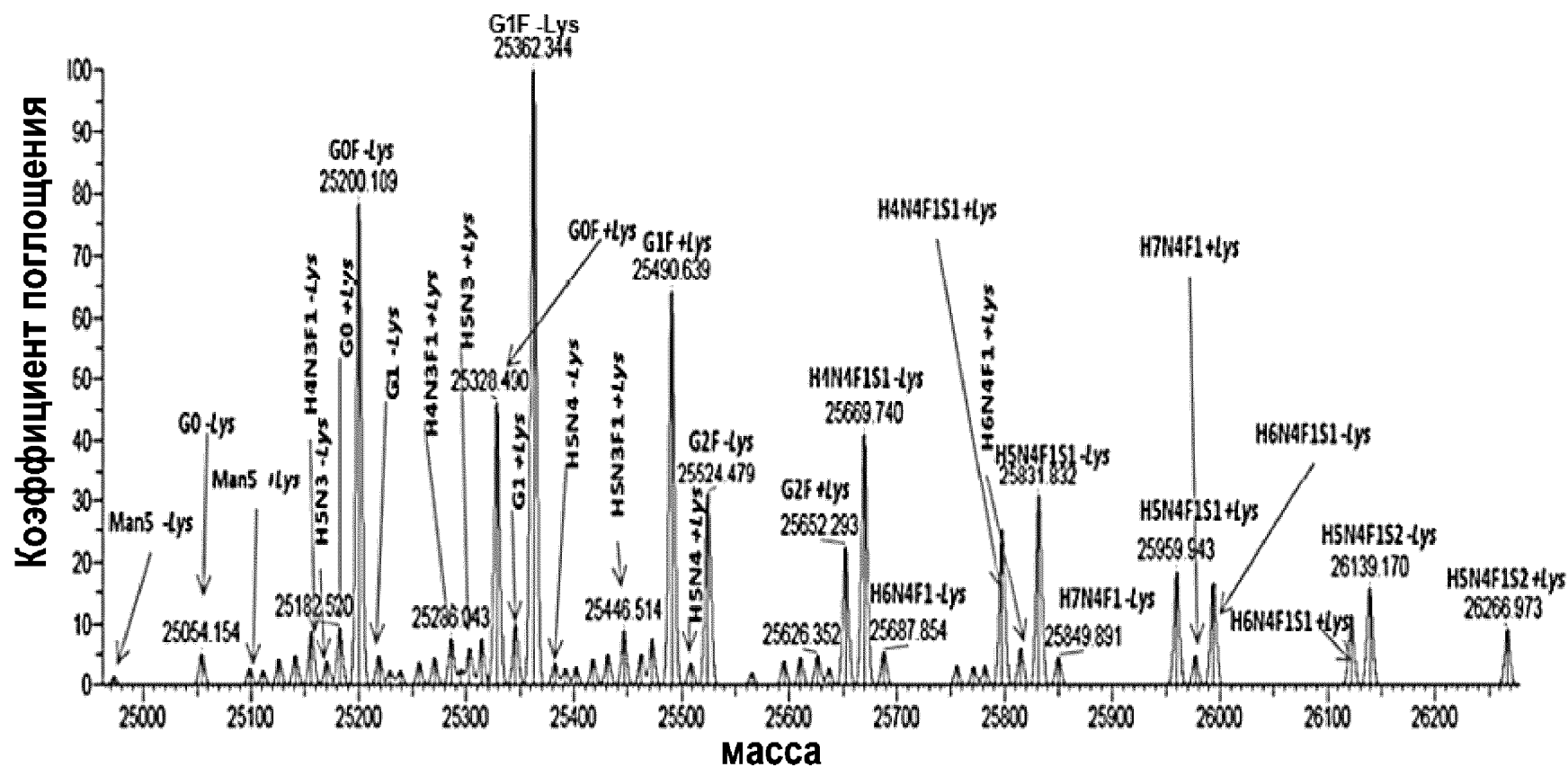


Рис. 6

Репрезентативный профиль электрофореграммы сIEF для устекинумаба, продуцируемого в клетках Sp2/0

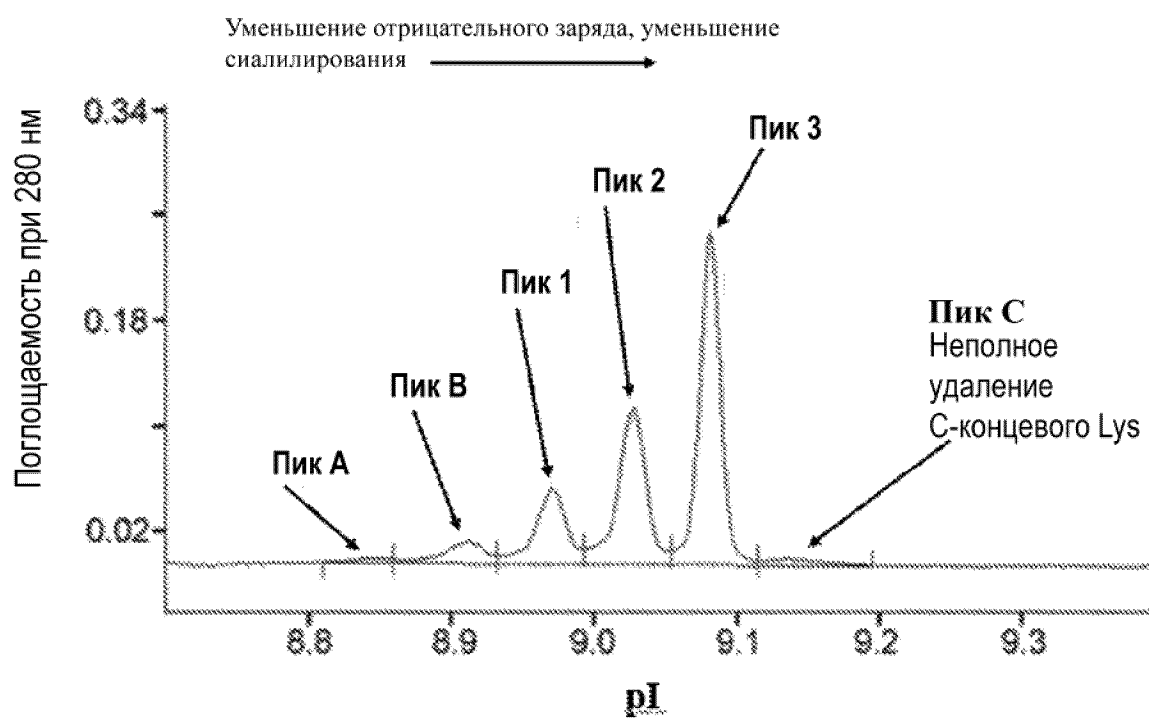


Рис. 7

Схема основных видов N-связанных олигосахаридов в IgG устекиномаба

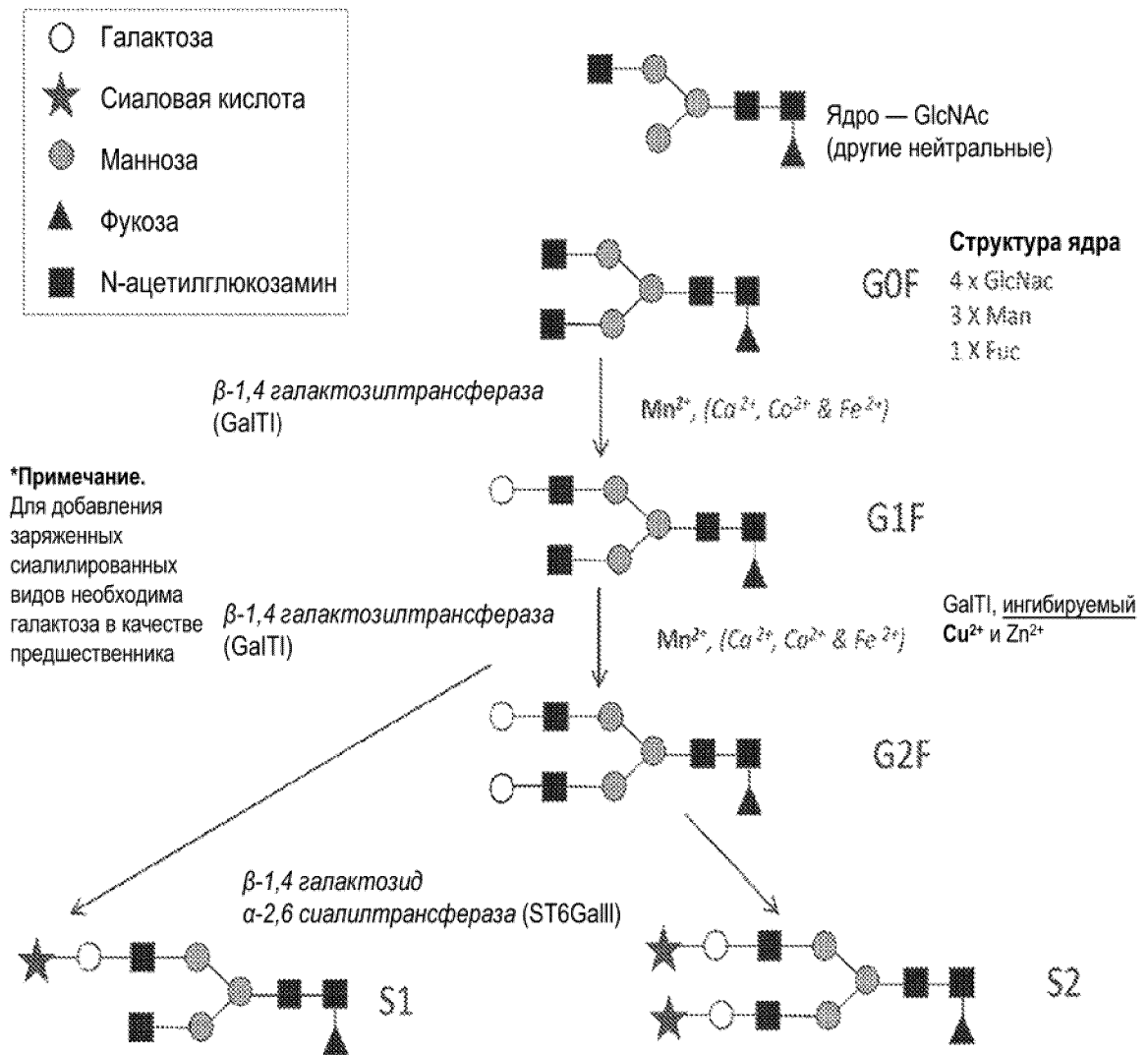


Рис. 8

Репрезентативная хроматограмма ВЭЖХ для анализа олигосахаридов устекинумаба, продуцируемого в клетках CHO

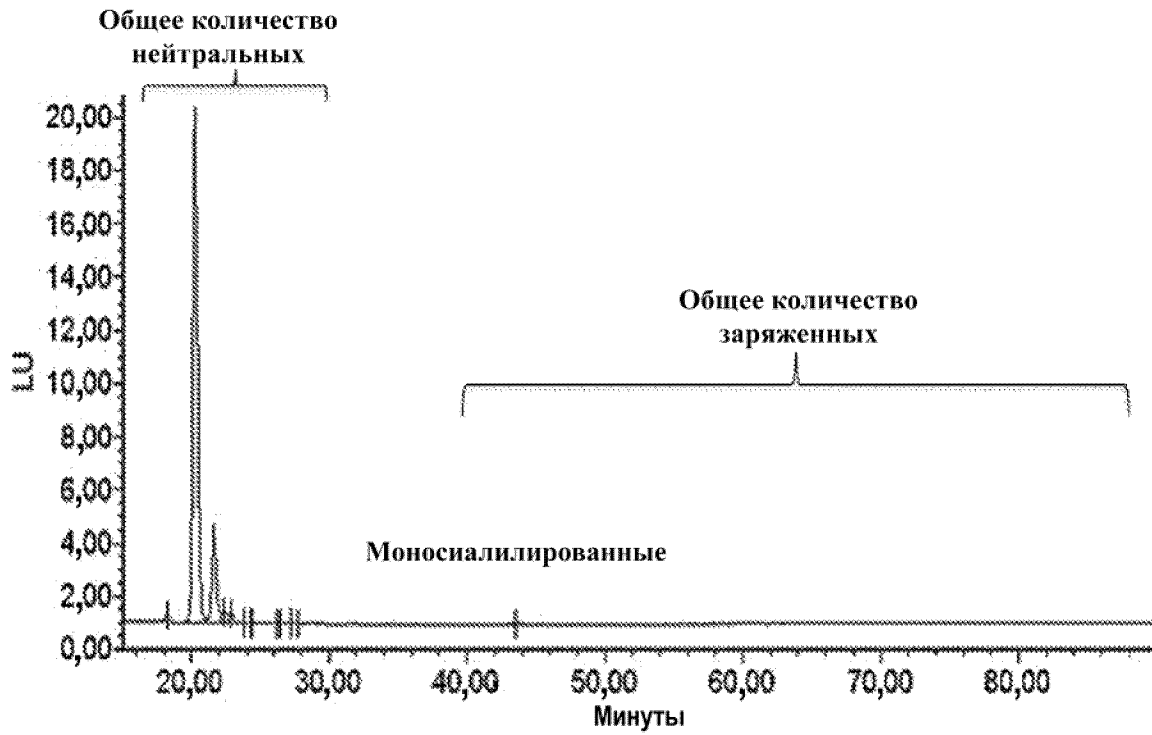


Рис. 9
Репрезентативный профиль
электрофореграммы cIEF для устекинумаба,
продуцируемого в клетках CHO

