

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491521 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.10.02

(51) Int. Cl. A61P 37/06 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.12.16

(54) СПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К ИЛ-23 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

(31) 63/290,987

(32) 2021.12.17

(33) US

(86) PCT/IB2022/062372

(87) WO 2023/111981 2023.06.22

(71) Заявитель:

ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US); ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТОКИО (JP)

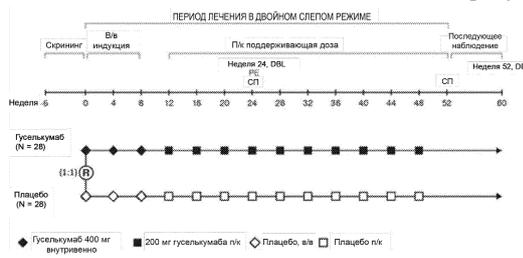
(72) Изобретатель:

Фукасава Такемичи (JP), Гао Шень
(US), Какуи Нобуказу, Кавасима
Наоко, Кимура Такаюки, Морисима
Хитоми (JP), Муноз Эрнесто, Роуз
Шон (US), Сакамото Такехико, Сато
Синити (JP), Тосо Джон (US), Укио
Ёсифуми, Ёсизаки Аюми, Чэнь
Ричуань (JP)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Способ лечения системной склеродермии у пациента включает введение антитела, специфического к ИЛ-23, например гуселькумаба, в начальной дозе и последующих дозах для того, чтобы пациент отреагировал на антитело и достиг одного или более клинических результатов.



A1

202491521

202491521

A1

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К ИЛ-23 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СИСТЕМНОЙ
СКЛЕРОДЕРМИИ

5

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА СМЕЖНЫЕ ЗАЯВКИ

**ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В
ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ**

10

[00001] Данная заявка содержит перечень последовательностей, который представлен в электронном виде посредством центра патентов при центре товарных знаков и патентов США как перечень последовательностей формата XML с именем файла «JBI6681WOPCT1 SequenceListing.xml», датой создания 12 декабря 2022 г и размером 11 Кб. Перечень последовательностей, представленный посредством Центра патентов, является частью описания и полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

15

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00002] Настоящее изобретение относится к способам лечения системной склеродермии антителом, которое связывает ИЛ-23 человека. В частности, изобретение относится к дозам и схемам дозирования, применению и способам введения специфического антитела к ИЛ-23 и специфических фармацевтических композиций, включающих антитело.

20

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00003] Системная склеродермия (ССД) — это сложное аутоиммунное заболевание, характеризующееся утолщением и уплотнением кожи и поражением внутренних органов (желудочно-кишечного тракта, сердца, легких и почек) с хроническим и часто прогрессирующим течением. Одной из клинических особенностей ССД является ее вариабельность от пациента к пациенту. Наблюдается неоднородность клинических проявлений, профилей аутоантител, прогрессирования заболевания, реакций на лечение и выживаемости. В зависимости от степени поражения кожи пациентов заболевание делят на ограниченную кожную склеродермию (Limited Cutaneous Systemic Sclerosis, lcSSc) и диффузную кожную склеродермию (Diffuse

25

30

Cutaneous Systemic Sclerosis, dcSSc). При lcSSc фиброз кожи ограничивается пальцами рук (склеродактилия), дистальными отделами конечностей и лицом. С другой стороны, у пациентов с dcSSc наблюдается фиброз кожи в зонах, включающих туловище и проксимальные части конечностей, относительно быстрое прогрессирование заболевания с обширными изменениями кожи и ранним развитием осложнений со стороны внутренних органов по сравнению с lcSSc. Системная склеродермия признана трудноизлечимым заболеванием, а число пациентов с ССД средней и тяжелой степени по данным Японского информационного центра по трудноизлечимым заболеваниям составило 26 740 в 2018 году. Распространенность ССД колебалась от 7 до 489 на миллион, а заболеваемость — от 0,6 до 122 на миллион в год во всем мире.

[00004] Системная склеродермия характеризуется высоким бременем болезни и неудовлетворенными медицинскими потребностями из-за ограниченной эффективности большинства современных методов лечения. Лекарственные средства существенно не влияют на естественное течение ССД, и для лечения заболевания в целом не одобрено никаких современных методов лечения. Испытания аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) при dcSSc продемонстрировали улучшение выживаемости, включая значительное улучшение состояния кожи, фиброза легких и качества жизни, связанного со здоровьем. Эти преимущества, однако, необходимо сопоставлять с повышенным риском смертности, связанной с трансплантацией, что ограничивает более широкое использование ТГСК в лечении ССД.

[00005] Выживаемость улучшилась за последние десятилетия и лучше всего коррелирует с клиническим подтипом заболевания (dcSSc в сравнении с lcSSc) и степенью поражения органов. Пятилетняя выживаемость среди пациентов с dcSSc значительно улучшилась: с 69% в когорте 1990–1993 гг до 84% в когорте 2000–2003 гг. Пятилетняя выживаемость среди пациентов с lcSSc оставалась очень высокой и неизменной в те же сроки (93% и 91% соответственно).

[00006] Смертность, связанная со склеродермическим почечным кризом, значительно снизилась за последние десятилетия благодаря использованию ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента. Напротив, поражение легких (интерстициальное заболевание легких (ИЗЛ) и/или легочная артериальная гипертензия) стало наиболее частой причиной смерти пациентов с ССД. В отличие от ревматоидного артрита (РА), концепция и использование модифицирующих

заболевание методов лечения, которые ослабляют или обращают вспять патологию и клинические последствия, в настоящее время не применяются при ССД.

[00007] Различные препараты используются для лечения конкретных симптомов или систем органов. Кортикостероиды в низких дозах могут помочь при уплотнении
5 кожи у пациентов с острым прогрессированием заболевания, но могут предрасполагать к почечному кризу и поэтому используются только в случае необходимости.

Нинтеданиб, ингибитор тирозинкиназы, был одобрен для лечения ИЗЛ, связанного с ССД. Различные иммунодепрессанты, включая метотрексат, азатиоприн, микофенолата мофетил и циклофосфамид, могут помочь при легочном альвеолите. Микофенолата
10 мофетил также эффективен для лечения ИЗЛ. Антагонисты рецепторов простагландин и эндотелина используются при легочной гипертензии. Блокаторы кальциевых каналов могут помочь при феномене Рейно. При пальцевой ишемии можно использовать внутривенные (в/в) инъекции простагландина E1 или простагландин или симпатоблокаторов. Рефлюкс-эзофагит купируется ингибиторами протонной помпы.

[00008] Несмотря на то, что для лечения некоторых симптомов склеродермии
15 используются разнообразные лекарства, все еще существуют высокие неудовлетворенные медицинские потребности в модифицирующих заболевание методах лечения с однозначной эффективностью и профилем безопасности при склеродермии.

[00009] Интерлейкин (ИЛ)-12 представляет собой секретируемый
20 гетеродимерный цитокин, состоящий из 2 связанных дисульфидной связью гликозилированных белковых субъединиц, обозначенных как p35 и p40 в соответствии с приблизительными молекулярными массами. ИЛ-12 продуцируется главным образом антигенпредставляющими клетками и стимулирует клеточно-опосредованный
25 иммунитет посредством связывания с двухцепочечным рецепторным комплексом, который экспрессируется на поверхности Т-клеток или естественных киллерных клеток (ЕК). Цепь бета-1 рецептора ИЛ-12 (ИЛ-12R β 1) связывается с субъединицей p40 ИЛ-12, обеспечивая первичное взаимодействие между ИЛ-12 и его рецептором. Однако именно связывание ИЛ-12p35 со второй цепью рецептора, ИЛ-12R β 2, возбуждает
30 внутриклеточный сигнал (например, фосфорилирование STAT4) и активацию несущей рецептор клетки (Presky et al, 1996). Считается, что сигнализация ИЛ-12, происходящая одновременно с представлением антигена, вызывает дифференцировку Т-клеток к фенотипу Т-хелпер 1 (Th1), характеризующемуся продукцией гамма-интерферона (ИФН 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, ИЛ-12 считается важным компонентом иммунных механизмов защиты хозяина.

[00010] Было обнаружено, что белковая субъединица p40 ИЛ-12 может также
5 соединяться с отдельной белковой субъединицей, обозначенной как p19, с
образованием нового цитокина, ИЛ-23 (Oppman et al, 2000). Сигнализация ИЛ-23 также
осуществляется через двухцепочечный рецепторный комплекс. Поскольку субъединица
p40 является общей для ИЛ-12 и ИЛ-23, следовательно, цепь ИЛ-12R β 1 также является
10 общей для ИЛ-12 и ИЛ-23. Однако именно связывание ИЛ-23p19 со вторым
компонентом комплекса рецептора ИЛ-23, ИЛ-23R, возбуждает специфичную
внутриклеточную сигнализацию ИЛ-23 (например, фосфорилирование STAT3) и
последующую продукцию ИЛ-17 Т-клетками (Parham et al, 2002; Aggarwal et al. 2003).
Недавние исследования показали, что биологические функции ИЛ-23 отличаются от
15 таковых ИЛ-12, несмотря на структурное сходство между двумя цитокинами (Langrish
et al, 2005).

[00011] Ненормальную регуляцию ИЛ-12 и популяций клеток Th1 связывали со
многими иммунноопосредованными заболеваниями, поскольку нейтрализация ИЛ-12
антителами эффективна для животных моделей лечения псориаза, рассеянного склероза
(РС), ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника,
20 инсулинозависимого сахарного диабета (1-го типа) и увеита (Leonard et al, 1995; Hong
et al, 1999; Malfait et al, 1998; Davidson et al, 1998). Однако поскольку эти исследования
были нацелены на общую субъединицу p40, *in vivo* происходила нейтрализация как ИЛ-
12, так и ИЛ-23. Поэтому было неясно, какой из двух цитокинов, ИЛ-12 или ИЛ-23,
опосредовал заболевание, и необходимо ли ингибировать оба цитокина, чтобы достичь
25 подавления заболевания. Недавние исследования на дефицитных по ИЛ-23p19 мышках
или с нейтрализацией ИЛ-23 специфичными антителами подтвердили, что
ингибирование ИЛ-23 может обеспечивать положительный результат, эквивалентный
стратегиям против ИЛ-12p40 (Cua et al, 2003, Murphy et al, 2003, Benson et al 2004).

[00012] Хотя патогенез ССД сложен и многофакторен, накопленные данные
30 свидетельствуют об участии пути ИЛ23/ИЛ-17 в патофизиологии ССД. Несколько
клинических исследований показали, что у пациентов с ССД повышен сывороточный
ИЛ-23/ИЛ-17 и кожный ИЛ-23 по сравнению со здоровыми добровольцами. У
пациентов с ССД наблюдалась корреляция между уровнями ИЛ-23 в сыворотке и
тяжестью/масштабом интерстициального поражения легких.

[00013] В описании клинического случая сообщается, что устекинумаб (mAb против ИЛ-12 и ИЛ-23) снизил уплотнение кожи у пациента с псориазом и склеродермией. В Японии продолжается клиническое исследование фазы 3 по оценке бродалумаба и антитела к ИЛ-17R у пациентов с ССД. Хотя результаты предыдущего исследования фазы 1b бродалумаба (n=8) (NCT04368403) не были общедоступны, была оценена эффективность и безопасность в исследовании фазы 1 и начато исследование фазы 3, которое продолжается в настоящее время.

[00014] В совокупности эти наблюдения дают достаточное основание для изучения роли ИЛ-23 в патогенезе ССД в этом исследовании для проверки концепции (proof-of-concept, PoC) гуселькумаба у участников с ССД.

[00015] Таким образом, в медицине остается значительная неудовлетворенная потребность в новых вариантах лечения ССД, особенно в методах терапии с новыми механизмами действия, которые потенциально могут поднять планку эффективности и максимизировать долю пациентов, достигших и поддерживающих клиническую ремиссию.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00016] В первом аспекте изобретение относится к способу лечения субъекта (пациента), страдающего ССД, включающему введение специфического антитела против ИЛ23 (также называемого антителом-субъединицей ИЛ23p19 или ИЛ23p19), например, гуселькумаба, пациенту в начальной дозе в начале лечения и в последующий период времени, предпочтительно примерно каждые 4 недели после начальной дозы, например, дозу на 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 и/или 48 неделях. Кроме того, в другом варианте осуществления изобретения введение продолжают в течение 96 недель или дольше после начала лечения.

[00017] В другом аспекте изобретение касается применения специфического антитела против ИЛ23, например, гуселькумаба, для лечения ССД у субъекта, причем антитело вводят в начальной дозе в начале лечения и через определенный временной интервал, предпочтительно примерно каждые 4 недели после первоначальной дозы, например, дозы на 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 и/или 48 неделях. Кроме того, в другом варианте осуществления изобретения введение продолжают в течение 96 недель или дольше после начала лечения.

[00018] В одном варианте осуществления субъект получает специфическое антитело против ИЛ23 (i) внутривенно в дозе 400 мг первоначально, через 4 недели

после начальной дозы и через 8 недель после начальной дозы и продолжает лечение специфическим антителом против ИЛ23, (ii) в дозе 200 мг подкожно каждые 4 недели после этого.

[00019] В другом аспекте композиция, используемая в способе согласно настоящему изобретению, включает фармацевтическую композицию, содержащую специфическое антитело к ИЛ-23.

[00020] В одном из вариантов осуществления пациенты с ССД достигают значительного улучшения клинических и/или исследовательских конечных точек, выбранных из группы, состоящей из следующего:

- 10 (i) изменение mRSS по сравнению с исходным уровнем;
- (ii) ухудшение mRSS;
- (iii) достижение значения 0,6 Индекса полного ответа на лечение dcSSc Американской коллегии ревматологов (ACR CRIS);
- (iv) изменение форсированной жизненной емкости (ФЖЕЛ) и процента прогнозируемой ФЖЕЛ по сравнению с исходным уровнем;
- 15 (v) изменение измеренной абсолютной диффузионной способности легких по монооксиду углерода (DLCO) и полученного процента прогнозируемого DLCO по сравнению с исходным уровнем;
- (vi) изменение количества язв на пальцах по сравнению с исходным уровнем у пациента с язвами на пальцах на исходном уровне;
- 20 (vii) изменение показателя опросника оценки здоровья и функционального индекса нарушения жизнедеятельности (HAQ-DI) по сравнению с исходным уровнем;
- (viii) изменение по сравнению с исходным уровнем по шкале частоты симптомов гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ);
- 25 (ix) изменение фиброзных изменений, оцененных с помощью компьютерной томографии высокого разрешения (КТВР), и ухудшение фиброзных изменений по сравнению с исходным уровнем; и

- (x) изменение оценки капилляроскопии, совокупной оценки пациента (Patient global assessment, PGA) и/или совокупной оценки врача (Physician global assessment, PhGA) по сравнению с исходным уровнем.

[00021] В предпочтительных вариантах осуществления конечные точки могут быть измерены примерно через 24, 52 или 104 недели после первоначального лечения.

[00022] В другом аспекте изобретения фармацевтическая композиция содержит выделенное антитело к ИЛ-23, которое имеет последовательности CDR, содержащие (i) аминокислотную последовательность CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; и (ii) последовательности аминокислот CDR легкой цепи SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, необязательно в композиции, содержащей 7,9% (масс./об.) сахарозы, 4,0 мМ гистидина, 6,9 мМ L-гистидина моногидрохлорида моногидрата; 0,053% (масс./об.) полисорбата 80 в фармацевтической композиции; причем разбавитель представляет собой воду в стандартном состоянии.

[00023] Другой аспект способа по изобретению содержит введение фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело к ИЛ-23, которое имеет последовательность аминокислот вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 8, необязательно в композиции, содержащей 7,9% (масс./об.) сахарозы, 4,0 мМ гистидина, 6,9 мМ L-гистидина моногидрохлорида моногидрата; 0,053% (масс./об.) полисорбата 80 в фармацевтической композиции; где разбавителем является вода в стандартном состоянии для применения при лечении пациента с ССД в соответствии с дозами и режимами дозирования, описанными в настоящем документе.

[00024] Дополнительный аспект способа по изобретению включает введение фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело к ИЛ-23, которое имеет последовательность аминокислот тяжелой цепи SEQ ID NO: 9 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 10, необязательно в композиции, содержащей 7,9% (масс./об.) сахарозы, 4,0 мМ гистидина, 6,9 мМ L-гистидина моногидрохлорида моногидрата; 0,053% (масс./об.) полисорбата 80 в фармацевтической композиции; причем разбавитель представляет собой воду в стандартном состоянии.

[00025] В дополнительном варианте осуществления изобретения способ согласно изобретению включает введение фармацевтической композиции, содержащей антитело гуселькумаб (имеющееся в продаже от компании Janssen Biotech, Inc как Tremfya®),

необязательно в композиции, содержащей 7,9% (масс./об.) сахарозы, 4,0 мМ гистидина, 6,9 мМ L-гистидина моногидрохлорида моногидрата; 0,053% (масс./об.) полисорбата 80 в фармацевтической композиции; причем разбавитель представляет собой воду в стандартном состоянии.

- 5 [00026] Подробности одного или более вариантов осуществления изобретения изложены в описании ниже. Другие особенности и преимущества будут очевидны из следующего подробного описания, фигур и прилагаемой формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

- 10 [00027] Ниже представлено описание фигур.
 [00028] На **ФИГ. 1** показан схематический обзор исследования, описанного в настоящем документе. Сокращения: DBL — блокировка базы данных IV = внутривенно; N — количество участников; PE — первичная конечная точка; R — рандомизация; п/к = подкожно; SE — вторичные конечные точки
 15 [00029] На **ФИГ. 2** показана схема исследования LTE, описанного в настоящем документе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

- 20 [00030] В настоящем документе способ лечения субъекта с ССД включает введение изолированных, рекомбинантных и/или синтетических анти-ИЛ-23-специфичных человеческих антител, а также диагностических и терапевтических композиций, способов и устройств.
 [00031] В контексте настоящего документа термины «специфичное к ИЛ-23 антитело», «антитело к ИЛ-23», «участок антитела» или «фрагмент антитела» и/или «вариант антитела» и т. п. включают любой белок или пептид, который содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, такую как, без ограничений, по меньшей мере одна определяющая комплементарность (CDR) область тяжелой или легкой цепи, либо ее связывающий лиганд участок, переменная область тяжелой цепи или легкой цепи, константная область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасная область или любая их часть, либо, по меньшей мере, один участок рецептора или связывающего белка ИЛ-23, который можно встраивать в антитело настоящего изобретения. Необязательно такое антитело дополнительно воздействует на
 25
 30

специфичный лиганд, например, без ограничений, такое антитело модулирует, снижает, повышает, выступает антагонистом, выступает агонистом, уменьшает, ослабляет, блокирует, ингибирует, уничтожает и/или препятствует по меньшей мере одной активности или связыванию ИЛ-23, либо активности или связыванию рецептора ИЛ-23 *in vitro*, *in situ* и/или *in vivo*. В качестве не имеющего ограничительного характера примера приемлемое антитело к ИЛ-23, его определенный участок или вариант настоящего изобретения может связываться с по меньшей мере одной молекулой ИЛ-23 или ее определенными участками, вариантами или доменами. Приемлемое антитело к ИЛ-23, его определенный участок или вариант также может необязательно влиять на по меньшей мере один вид активности или функции ИЛ-23, например, без ограничений, синтез РНК, ДНК или белка, высвобождение ИЛ-23, сигнализацию рецептора ИЛ-23, расщепление мембранного ИЛ-23, активность ИЛ-23, продукцию и/или синтез ИЛ-23.

[00032] 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 ИЛ-23 млекопитающего. Например, изобретение охватывает фрагменты антитела, способные связываться с ИЛ-23 или его 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), Fab_b (например, после расщепления плазмином), rFc' (например, после расщепления пепсином или плазмином), Fd (например, после расщепления пепсином, частичного восстановления и реагрегации), Fv или scFv (например, полученные способами молекулярной биологии) (см., например, Colligan, Immunology, выше).

[00033] 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.

[00034] В контексте настоящего документа термин «человеческое антитело»
5 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. Термин «человеческое антитело» также может представлять собой антитело, которое получено из последовательностей
10 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
15 существу, неиммуногенным у человека. Человеческие антитела классифицируют по группам на основании сходства их аминокислотных последовательностей. Таким образом, посредством поиска по сходству последовательностей можно выбирать антитело со сходной линейной последовательностью в качестве шаблона для создания человеческого антитела. Аналогично антитела определенного примата (обезьяна,
20 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
25 человека или другого вида относительно немодифицированных антител. Таким образом, человеческое антитело отличается от химерного или гуманизированного антитела.

[00035] Следует отметить, что человеческое антитело может быть
спродуцировано не относящимся к человеку животным, либо прокариотической или
30 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.

[00036] Можно также применять биспецифические, гетероспецифические, гетероконъюгатные или подобные антитела, которые представляют собой моноклональные, предпочтительно человеческие или гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания с по меньшей мере двумя различными антигенами. В данном случае одна из специфичностей связывания относится по меньшей мере к одному белку ИЛ-23, а другая – к любому другому антигену. 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 правильной молекулы, которую обычно выполняют путем аффинной хроматографии, является довольно трудоемким процессом с низким выходом продукта. Аналогичные процедуры описаны, например, в WO 93/08829, патентах США № 6210668, 6193967, 6132992, 6106833, 6060285, 6037453, 6010902, 5989530, 5959084, 5959083, 5932448, 5833985, 5821333, 5807706, 5643759, 5601819, 5582996, 5496549, 4676980, публикациях WO 91/00360, WO 92/00373, EP 03089, Traunecker et al., EMBO J. 10:3655 (1991), Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986), каждая из которых полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

[00037] Специфичные к ИЛ-23 антитела (также называемые антителами, специфичными к ИЛ-23) (или антителами к ИЛ-23), используемые в способах и композициях настоящего изобретения, могут необязательно характеризоваться высокой аффинностью связывания с ИЛ-23, причем необязательно и предпочтительно они 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. «Низкая иммуногенность» определяется в настоящем документе как повышение значительных реакций НАНА, НАСА или НАМА менее чем у 75%, предпочтительно менее чем у 50% пациентов, и/или повышение низких титров у пациентов (менее чем около 300, предпочтительно менее чем около 100, измеренных с помощью иммуноферментного анализа на двойной антиген) (Elliott et al., Lancet 344:1125-1127 (1994), полностью включено в настоящий документ посредством ссылки). Термин «низкая иммуногенность» также можно определить как появление титруемых уровней антител к антителу к ИЛ-23 у пациентов, получавших лечение антителом к ИЛ-23, у менее 25% получавших лечение пациентов, предпочтительно у менее 10% пациентов, получавших лечение рекомендованной дозой в течение рекомендованного курса терапии в период лечения.

[00038] Термин «безопасный», относящийся к дозе, схеме дозирования, лечению или способу с использованием антитела к ИЛ-23 по настоящему изобретению (например, антитело к ИЛ-23, гуселькумаб), обозначает относительно низкую или уменьшенную частоту и/или низкую или уменьшенную тяжесть связанных с лечением нежелательных явлений (называемых «нежелательными явлениями» (НЯ) или «связанными с лечением нежелательными явлениями» (СЛНЯ)) в результате проведенных клинических исследований, например фазы 2 клинических исследований и ранее, по сравнению со стандартным лечением или с другим препаратом, используемым для сравнения. Нежелательное явление — это неблагоприятное медицинское событие у пациента, которому ввели лекарственный препарат. В частности, термин «безопасный», относящийся к дозе, схеме дозирования или лечению с использованием антитела к ИЛ-23 по настоящему изобретению, означает относительно низкую или уменьшенную частоту и/или низкую или уменьшенную степень тяжести нежелательных явлений, связанных с введением антитела, если такой результат применения антитела к ИЛ-23 считается возможным, вероятным или очень вероятным.

Полезные свойства

[00039] Выделенные нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению можно использовать для продукции по меньшей мере одного антитела к ИЛ-23 или его определенного варианта, который можно использовать для измерения или воздействия в клетке, ткани, органе или животном (включая млекопитающих и человека), для

5 диагностики, мониторинга, модулирования, лечения, ослабления, профилактики развития или уменьшения симптомов ССД.

[00040] Такой способ может включать введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к ИЛ-23, в клетку, ткань, орган, организм животного или пациента, которым

10 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

15 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

[00041] Все цитируемые в настоящем документе публикации или патенты, будь

20 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

25 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);

30 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 по настоящему изобретению – получение и генерация

[00042] По меньшей мере одно антитело к ИЛ-23, применяемое в способе настоящего изобретения, можно необязательно продуцировать в клеточной линии, смешанной клеточной линии, иммортализованной клетке или клональной популяции 5 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., 10 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.

[00043] Предпочтительное антитело к ИЛ-23 представляет собой гуселькумаб (также называемый CNTO1959), имеющий аминокислотную последовательность 15 варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 8, а также имеющий аминокислотные последовательности области 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. Другие антитела к ИЛ-23 20 имеют последовательности, перечисленные в настоящем документе, и описаны в патенте США № 7,935,344, содержание которого полностью включено в настоящий документ путем ссылки).

[00044] Человеческие антитела, специфичные к человеческим белкам ИЛ-23 или их фрагментам, можно получать в ответ на соответствующий иммуногенный антиген, 25 такой как выделенный белок ИЛ-23 и/или его 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.

[00045] В одном подходе гибридому продуцируют путем слияния приемлемой 30 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 или 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

5 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

10 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, гибридизованной и т. п. или любой их комбинации, происходящей из вирусов, бактерий, водорослей, прокариот, земноводных, насекомых, рептилий, рыб,

15 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.

[00046] Клетки, продуцирующие антитела, можно также получать из периферической крови или предпочтительно из селезенки или лимфатических узлов

20 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

25 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).

30 [00047] 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,

Cambridgeshire, Великобритания; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, Германия; Biovation, Aberdeen, Scotland, Великобритания; BioInvent, Lund, Швеция; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Хома, Berkeley, штат Калифорния, США; Ixsys. См., например, EP 368,684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; 5 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 10 229 046; 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); причем каждая из них включена в настоящий документ путем ссылки)), или способами, основанными на иммунизации трансгенных животных (например, мышей SCID, см. 15 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), причем 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 методики 20 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 25 93:7843-7848 (1996)); микрокаплю в геле и проточную цитометрию (Powell et al., Biotechnol. 8:333-337 (1990); One Cell Systems, Cambridge, MA; Gray et al., J. Imm. Meth. 182:155-163 (1995); Kenny et al., Bio/Technol. 13:787-790 (1995)); B-cell selection (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 30 Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands (1988)).

[00048] Кроме того, можно применять и хорошо известные специалистам в данной области способы конструирования или гуманизации нечеловеческих или человеческих антител. По существу, гуманизованное или модифицированное генной 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»

5 переменных, константных или других доменов известной человеческой последовательности.

[00049] Описание известных последовательностей Ig человека приведено, например, на веб-сайтах: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi;

www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast; www.atcc.org/phage/hdb.html; [www.mrc-](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/ALIGNMENTS.php)

10 cpe.cam.ac.uk/ALIGNMENTS.php; www.kabatdatabase.com/top.html;

[ftp.ncbi.nlm.nih.gov/repository/kabat](ftp://ncbi.nlm.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;

15 www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html;

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;

20 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/caewg/caewg.html;

www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html;

25 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), причем каждый из них полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

[00050] Как известно специалистам в данной области, такие импортированные

30 последовательности можно применять для снижения иммуногенности или для снижения, усиления или модификации связывания, аффинности, скорости ассоциации, скорости диссоциации, авидности, 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.

[00051] Антитела можно также необязательно гуманизировать или
5 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
10 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
15 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
20 характеристику антитела, например повышенную аффинность к целевому (-ым) антигену (-ам).

[00052] Кроме того, человеческое антитело, специфичное к ИЛ-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
25 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,
30 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.

[00053] В других вариантах осуществления человеческое антитело, специфичное к ИЛ-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, 5 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.

[00054] В конкретных вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи и/или вариабельная область тяжелой цепи содержит каркасную область или по 10 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, 15 FRL3 или FRL4 представляет собой последовательность зародышевой линии (например, зародышевой линии человека) или содержит типичные совпадающие последовательности человека для данной каркасной области (широкодоступные из источников известных последовательностей Ig человека, описанных выше). В других вариантах осуществления по меньшей мере FRH1, FRH2, FRH3 или FRH4 представляет 20 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.

[00055] Гуманизацию или конструирование антител настоящего изобретения 25 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 №: 30 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.

[00056] 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 ИЛ-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.

[00057] Как описано выше, можно сконструировать Fc-область человеческого специфичного антитела к ИЛ-23 по настоящему изобретению с измененной эффекторной функцией, например, путем модификации связывания C1q и/или связывания FcγR и, таким образом, изменения активности комплементзависимой 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; КЗЦ; связывание с Fc-рецептором; АЗКЦ; 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, варибельным доменом антитела), и можно их оценивать с помощью различных анализов (например, анализ связывания Fc, анализ ADCC, анализ CDC и т. д.).

[00058] Например, возможно создать вариантную Fc-область человеческого антитела к ИЛ-23 (или антитела к ИЛ-23) с улучшенным связыванием C1q и с

улучшенным связыванием Fc γ RIII (например, с повышенной активностью ADCC и повышенной активностью CDC). В альтернативном варианте осуществления, если требуется снизить или устранить эту эффекторную функцию, можно конструировать вариантную Fc-область 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).

[00059] 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). High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc γ R, J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

[00060] Другой тип замены аминокислот служит для изменения модели гликозилирования области Fc человеческого антитела, специфичного к ИЛ-23. Гликозилирование области Fc является, как правило, либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное гликозилирование относится к присоединению углеводной функциональной группы к боковой цепи остатка аспарагина. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров: N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы, к гидроксиаминокислоте, 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.

[00061] 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 специфичного антитела к ИЛ-23 удобно проводить путем изменения аминокислотной

последовательности так, чтобы она содержала 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
5 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.

[00062] В некоторых вариантах осуществления человеческое антитело, специфичное к ИЛ-23, настоящего изобретения экспрессируется в клетках, в которых
10 экспрессируется бета-(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза III (GnT III) так, что GnT III присоединяет GlcNAc к человеческому антителу к ИЛ-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; причем каждая из них конкретно полностью включена в настоящий
15 документ путем ссылки.

[00063] Антитело к ИЛ-23 также можно необязательно создавать путем иммунизации трансгенного животного (например, мыши, крысы, хомяка, примата (за исключением человека) и т. п.), способных продуцировать набор человеческих антител,
20 как описано в настоящем документе и/или как известно специалистам в данной области. Клетки, которые продуцируют человеческие антитела к ИЛ-23, можно выделять из организма таких животных и иммортализовать с использованием приемлемых способов, таких как описаны в настоящем документе.

[00064] Трансгенных мышей, которые могут продуцировать набор человеческих антител, связывающихся с человеческими антигенами, можно создавать известными
25 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.
30 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 все полностью включены в настоящий документ путем ссылки). По существу эти 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 лишить животное способности продуцировать антитела, кодируемые эндогенными генами.

5 [00065] 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 требуемую 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 нуклеотидную последовательность, кодирующую конкретную отображаемую пептидную последовательность. Такие способы описаны в патентных публикациях РСТ № 91/17271, 91/18980, 91/19818 и 93/08278.

15 [00066] 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 (Carlsbad, штат Калифорния, США) и Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire, Великобритания). См., например, патенты США № 4704692, 4939666, 4946778, 25 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

Хомы, Colligan, выше; Ausubel, выше; или Sambrook, выше, каждый из указанных патентов и публикаций полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

[00067] Антитела, применяемые в способе настоящего изобретения, можно также получать с помощью по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к ИЛ-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., причем каждый из них полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

[00068] Антитела, применяемые в способе настоящего изобретения, дополнительно можно получать с использованием по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к ИЛ-23, для создания трансгенных растений и культур клеток растений (например, без ограничения, табака и маиса), которые продуцируют такие антитела, их определенные участки или варианты в органах растений или полученных из них клеточных культурах. 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.

[00069] Антитела, применяемые в способе настоящего изобретения, могут связываться с человеческим ИЛ-23 в широком интервале аффинности (K_D). В предпочтительном варианте осуществления мАТ человека необязательно может связываться с человеческим ИЛ-23 с высокой аффинностью. Например, мАТ человека может связываться с человеческим ИЛ-23 с показателем K_D , равным или меньшим около 10^{-7} М, например, без ограничений, $0,1-9,9$ (или в любом диапазоне, или с любым значением в пределах данного диапазона) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , или в любом интервале, или с любым значением в нем.

[00070] Аффинность или авидность антитела для антигена можно определять экспериментально любым приемлемым способом (см., например, Berzofsky, *et al.*, *Antibody-Antigen Interactions, Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kubu, 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

[00071] 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 определенных фрагментов, вариантов 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 ИЛ-23, можно получать способами, описанными в настоящем документе или известными специалистам в данной области.

[00072] 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, 5 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.

[00073] 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 ИЛ-23 или вариабельной области; и 15 молекулы нуклеиновых кислот, которые содержат последовательность нуклеотидов, по существу отличающуюся от нуклеотидных последовательностей, описанных выше, но которая, тем не менее, вследствие вырожденности генетического кода кодирует по меньшей мере одно антитело к ИЛ-23, как описано в настоящем документе и/или известно специалистам в данной области. Разумеется, генетический код хорошо 20 известен специалистам в данной области. Следовательно, для специалиста будет стандартной процедурой создание подобных вырожденных вариантов нуклеиновых кислот, кодирующих специфичные антитела к ИЛ-23, применяемые в способе настоящего изобретения. См., например, Ausubel, et al., выше, и такие варианты нуклеиновых кислот включены в настоящее изобретение. Не имеющие 25 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.

[00074] Как указано в настоящем документе, молекулы нуклеиновых кислот, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к ИЛ-23, могут 30 включать, без ограничений, молекулу, отдельно кодирующую аминокислотную последовательность 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

[00075] 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.

[00076] 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.

- 5 [00077] 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
- 10 ссылки.

Конструирование нуклеиновых кислот

[00078] Как хорошо известно специалистам в данной области, выделенные нуклеиновые кислоты можно получать с помощью (a) способов рекомбинации, (b) способов синтеза, (c) способов очистки и/или (d) их сочетаний.

- 15 [00079] 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
- 20 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

25 линкер для клонирования и/или экспрессии полинуклеотида настоящего изобретения.

- [00080] В такие клонирующие и/или экспрессионные последовательности можно добавлять дополнительные последовательности, чтобы оптимизировать их функцию при клонировании и/или экспрессии, способствовать выделению полинуклеотида или
- 30 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

[00081] 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

[00082] 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.

[00083] 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.

5 [00084] 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; 10 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 15 ссылки. (см., например, Ausubel выше; или Sambrook, выше).

[00085] 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 20 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 25 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 30 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

[00086] 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

[00087] В настоящем изобретении применяются кассеты рекомбинантной экспрессии, содержащие нуклеиновую кислоту. Последовательность нуклеотидов, например последовательность кДНК или геномную последовательность, кодирующую антитело для применения в способе по 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.

[00088] 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

[00089] Настоящее изобретение также относится к векторам, которые включают выделенные молекулы нуклеиновых кислот, клеткам-хозяевам, которые получены методами генной инженерии с рекомбинантными векторами, и к получению по
5 меньшей мере одного антитела к ИЛ-23 с помощью рекомбинантных методов, которые хорошо известны в данной области. См., например, Sambrook et al., выше; Ausubel, et al., выше; причем каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

[00090] Полинуклеотиды можно необязательно соединять с вектором,
10 содержащим селективный маркер для размножения в организме-хозяине. По существу 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.

[00091] Вставку ДНК необходимо функционально связывать с пригодным промотором. Экспрессионные конструкторы дополнительно содержат сайты для инициации и терминации транскрипции, а в транскрибируемой области — сайт связывания рибосомы для трансляции. Кодировующий участок зрелых транскриптов с экспрессией конструкторами предпочтительно содержит иницирующую трансляцию в
20 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.

[00092] Экспрессионные векторы предпочтительно, но необязательно включают по меньшей мере один селективный маркер. Такие маркеры включают, например, без
25 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
30 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, выше, главы 1–4 и 16–18; Ausubel, выше, главы 1, 9, 13, 15, 16.

[00093] 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, выше, главы 17.29–17.42 и 18.1–18.74; Ausubel, выше, главы 16, 17 и 18.

[00094] 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 специалистам в данной области, например, описаны в патентах США № 5,580,734, 5,641,670, 5,733,746 и 5,733,761, полностью включенных в настоящий документ путем ссылки.

[00095] Примером клеточных культур, используемых для получения антител, их определенных участков или вариантов, являются клетки млекопитающих. Системы клеток млекопитающих часто используют в виде монослоев клеток, однако можно также использовать суспензии клеток млекопитающих или биореакторы. В данной области разработано несколько приемлемых линий клеток-хозяев, способных экспрессировать интактные гликозилированные белки, в частности линии клеток COS-1 (например, ATCC CRL 1650), COS-7 (например, ATCC CRL-1651), HEK293, ВНК21 (например, ATCC CRL-10), CHO (например, ATCC CRL 1610) и BSC-1 (например, ATCC CRL-26), клетки Cos-7, клетки CHO, клетки her G2, клетки P3X63Ag8.653,

SP2/0-Ag14, 293, клетки HeLa и т. п., например, производства Американской коллекции типовых культур, г. Манассас, штат Вирджиния, США (www.atcc.org).

Предпочтительные клетки-хозяева включают клетки лимфоидного происхождения, такие как миеломные и лимфомные клетки. Более предпочтительны клетки-хозяева P3X63Ag8.653 (каталожный номер ATCC CRL-1580) и клетки SP2/0-Ag14 (каталожный номер ATCC CRL-1851). В особенно предпочтительном варианте осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку линий P3X63Ab8.653 или SP2/0-Ag14.

[00096] Экспрессионные векторы для этих 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., выше; Sambrook et al., выше. Для продукции нуклеиновых кислот или белков настоящего изобретения используют и другие известные и/или поставляемые клетки, например, по каталогу «Американская коллекция типовых культур клеточных линий и гибридом» (www.atcc.org), либо из других известных или коммерческих источников.

[00097] В случае использования эукариотических клеток-хозяев в вектор, как правило, 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.

Очистка антитела

[00098] Антитело к ИЛ-23 может быть извлечено и очищено из рекомбинантных клеточных культур хорошо известными способами, включающими, без ограничений, очистку на белке А, осаждение сульфатом аммония или спиртом, экстрагирование
 5 кислотой, анионо- или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, гидрофобную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию на гидроксилпатите 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
 10 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.

[00099] Антитела, применяемые в способе настоящего изобретения, включают очищенные естественным путем продукты, продукты химического синтеза и продукты, получаемые при помощи рекомбинантных технологий из эукариотических клеток-
 15 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
 20 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, причем все публикации полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

Антитела к ИЛ-23.

[00100] Антитело к ИЛ-23 настоящего изобретения включает любой белок или
 25 пептид, содержащий молекулу, которая содержит по меньшей мере участок молекулы иммуноглобулина, такую как, без ограничений, по меньшей мере один связывающий лиганд участок (LBP), такой как, без ограничений, определяющая комплементарность область (CDR) тяжелой или легкой цепи, или ее связывающий лиганд участок, варибельная область тяжелой или легкой цепи, каркасная область (например, FR1,
 30 FR2, FR3, FR4 или их фрагмент, дополнительно необязательно содержащие по меньшей мере одну замену, вставку или делецию), константная область тяжелой или легкой цепи (например, содержащая по меньшей мере один C_H1, шарнирную область 1,

шарнирную область 2, шарнирную область 3, шарнирную область 4, C_H2 или C_H3, или их фрагмент, дополнительно необязательно содержащие по меньшей мере одну замену, вставку или делецию), или любой их участок, который можно встроить в антитело.

Антитело может включать антитела любого млекопитающего, такого как, без

5 ограничений, человек, мышь, кролик, крыса, грызун, примат, или любую их комбинацию и т. п. или может быть получено из них.

[00101] Выделенные антитела, применяемые в способе по настоящему изобретению, содержат последовательности аминокислот антител, описанных в

настоящем документе, кодируемые любым приемлемым полинуклеотидом, или любое

10 выделенное или полученное антитело. Предпочтительно человеческое антитело или связывающий антиген фрагмент связывается с человеческим ИЛ-23 и, таким образом, частично или по существу нейтрализует по меньшей мере один вид биологической

активности этого белка. Антитело, или его определенный участок или вариант, которые частично или предпочтительно по существу нейтрализуют по меньшей мере один вид

15 биологической активности по меньшей мере одного белка или фрагмента ИЛ-23, может связывать белок или фрагмент и, таким образом, ингибировать активности, опосредованные связыванием ИЛ-23 с рецептором к ИЛ-23 или с другими зависимыми от ИЛ-23 или опосредованные им механизмами. В контексте настоящего документа

термин «нейтрализующее антитело» относится к антителу, которое может

20 ингибировать зависимую от ИЛ-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 способа анализа. Способность антитела

к ИЛ-23 ингибировать зависимую от ИЛ-23 активность предпочтительно оценивают с помощью по меньшей мере одного приемлемого способа анализа белка ИЛ-23 или его

25 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

30 изоформ IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (например, γ 1, γ 2, γ 3, γ 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 человеческого антитело к ИЛ-23 содержит тяжелую цепь IgG1 и легкую цепь IgG1.

[00102] Антитело связывает по меньшей мере один определенный эпитоп, специфичный к по меньшей мере одному белку ИЛ-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.

10 [00103] 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 комплементарность 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.

20 [00104] Такие антитела можно получать путем химического связывания различных участков (например, CDR, каркасной области) антитела с помощью стандартных способов получения и экспрессии молекулы (т. е. одной или более) нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело, с помощью стандартных способов технологии рекомбинантных ДНК или с помощью другого приемлемого способа.

30 [00105] Специфичное антитело к ИЛ-23 может содержать по меньшей мере одну из варибельных областей тяжелой или легкой цепи, имеющую определенную аминокислотную последовательность. Например, в предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело к ИЛ-23 содержит по меньшей мере одну

вариабельную область тяжелой цепи, необязательно имеющую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 7, и/или по меньшей мере одну вариабельную область легкой цепи, необязательно имеющую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 8. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления антитела к ИЛ-23

5 содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь, необязательно имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и/или по меньшей мере одну легкую цепь, необязательно имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. Антитела, которые связываются с человеческим ИЛ-23 и которые содержат определенную вариабельную область тяжелой или легкой цепи, можно получать

10 приемлемыми способами, такими как способ фагового дисплея (Katsube, Y., *et al.*, *Int J Mol. Med.*, 1(5):863–868 (1998)), или способами, в которых используют трансгенных животных, известных специалистам в данной области и/или описанных в настоящем документе. Например, трансгенную мышь, содержащую функционально перестроенный трансген тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина и трансген,

15 содержащий ДНК локуса легкой цепи человеческого иммуноглобулина, который может подвергаться функциональной перестройке, можно иммунизировать человеческим ИЛ-23 или его фрагментом, чтобы вызывать продукцию антител. Если требуется, можно выделять клетки, продуцирующие антитела, и можно получать гибридомы или другие иммортализованные клетки, продуцирующие антитела, как описано в настоящем

20 документе и/или известно специалистам в данной области. В альтернативном варианте осуществления антитела, определенный участок или вариант можно экспрессировать в приемлемой клетке-хозяине с помощью кодирующей нуклеиновой кислоты или ее участка.

[00106] Изобретение также относится к антителам, антигенсвязывающим

25 фрагментам, цепям иммуноглобулина и областям CDR, содержащим аминокислоты в последовательности, по существу, совпадающей с аминокислотной последовательностью антитела, описанной в настоящем документе. Предпочтительно такие антитела или связывающие антиген фрагменты и антитела, содержащие такие цепи или области CDR, могут связываться с человеческим ИЛ-23 с высокой

30 аффинностью (например, с K_D менее или равной около 10^{-9} М). 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); аспартат (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

10 [00107] Аминокислоты, составляющие антитела к ИЛ-23 настоящего изобретения, 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 КОД	ТРЕХБУКВЕННЫЙ КОД	НАЗВАНИЕ	КОДОН (-Ы) ИЗ 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

ОДНОБУКВЕННЫЙ КОД	ТРЕХБУКВЕННЫЙ КОД	НАЗВАНИЕ	КОДОН (-Ы) ИЗ ТРЕХ НУКЛЕОТИДОВ
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

[00108] Антитело к ИЛ-23, применяемое в способе настоящего изобретения, может включать одну или более замен, делеций или добавлений аминокислот вследствие естественных мутаций либо действий человека, описанных в настоящем документе.

5

[00109] Число аминокислотных замен, которое может произвести квалифицированный специалист, зависит от многих факторов, включая описанные выше. Вообще говоря, число замен, вставок или делеций аминокислот любого данного антитела к ИЛ-23, фрагмента или варианта будет составлять не более 40, 30, 20, 19, 18, 10 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.

10

[00110] Специалисты в данной области могут идентифицировать аминокислоты в специфическом антителе к ИЛ-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 15 244:1081–1085 (1989)). Последняя процедура предполагает добавление точечных мутаций аланина в каждом остатке в молекуле. Затем полученные мутантные молекулы испытывают на биологическую активность, такую как, без ограничения, по меньшей мере одна активность по нейтрализации ИЛ-23. Критичные для связывания с антителом сайты можно также идентифицировать путем анализа структуры, например путем 20 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)).

20

[00111] Антитела к ИЛ-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 и 6.

[00112] Антитела к ИЛ-23 или определенные участки или варианты могут включать, без ограничений, по меньшей мере один участок, последовательность или комбинацию, выбранные из по меньшей мере 3–5 последовательных аминокислот указанных 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.

[00113] Антитело к ИЛ-23 может дополнительно необязательно содержать полипептид из по меньшей мере одной из 70–100% из числа 5, 17, 10, 11, 7, 9, 119 или 108 последовательных аминокислот с указанными выше SEQ ID NO. В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность цепи иммуноглобулина или ее участок (например, вариабельная 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 вариабельной 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.

[00114] «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, 5 Gribkov, 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, сгенерированных с заданными по умолчанию настройками компонента AlignX в пакете программ Vector NTI Suite 8.0 (Informax, г. Фредерик, штат 10 Мэриленд, США).

[00115] 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 15 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., NCBI/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. 20 Biol. 215:403-410 (1990)). Для определения идентичности также можно использовать хорошо известный алгоритм Smith Waterman.

[00116] Предпочтительные параметры сравнения полипептидных последовательностей включают следующие:
(1) Алгоритм: Needleman and Wunsch, J. Mol Biol. 48:443–453 (1970). Матрица 25 сравнения: BLOSSUM62 из Hentikoff and Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 89:10915-10919 (1992)

Штраф за гэп: 12

Штраф за длину гэпа: 4

Программа, используемая с данными параметрами, находится в общем доступе как 30 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).

[00117] 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 гэта: 3

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

[00118] В качестве примера, полинуклеотидная последовательность может быть идентичной другой последовательности, то есть на 100% идентичной, или может
10 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
15 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),
20 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%,
25 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 $x.\text{sub}.n$.

[00119] 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
30 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 замен аминокислот для данного % идентичности определяют умножением общего числа аминокислот в SEQ ID NO выше на численный процент соответствующей процентной идентичности (поделенный на 100), а затем вычитают это произведение из общего числа аминокислот в SEQ ID NO выше, или: $n \cdot \text{sub.a.} / \text{torsi} \cdot \text{sim} \cdot \text{x} \cdot \text{sub.a} - (\text{x} \cdot \text{sub.a} \cdot \text{y})$, где $n \cdot \text{sub.a}$ представляет собой число изменений аминокислот, $\text{x} \cdot \text{sub.a}$ 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 число получения $\text{x} \cdot \text{sub.a}$ и y округляют с уменьшением до ближайшего целого числа, прежде чем вычесть его из $\text{x} \cdot \text{sub.a}$.

[00120] Примеры последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей и их участков представлены в вышеуказанных SEQ ID NO. Антитела настоящего изобретения или их определенные варианты могут содержать любое число остатков смежных аминокислот из антитела настоящего изобретения, причем это число выбрано из группы целых чисел в интервале 10–100% от числа последовательных остатков в антителе к ИЛ-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. Количество таких подпоследовательностей может дополнительно представлять собой любое целое число, выбранное из группы, состоящей из 1–20, например по меньшей мере 2, 3, 4 или 5.

[00121] 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.

[00122] 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 поливинилпиролон, а группа жирной кислоты или группа сложного эфира жирной кислоты может содержать от около восьми до около сорока атомов углерода.

[00123] 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
- 5 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.
- 10 Гидрофильные полимеры с замещающей группой жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты можно получать с применением приемлемых способов. Например, полимер, содержащий аминокгруппу, может быть связан с карбоксилатом жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты, а активированный карбоксилат (например, активированный N,N-карбонилдиимидазолом) на жирной кислоте или
- 15 сложном эфире жирной кислоты может быть связан с гидроксильной группой полимера.
- [00124] 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
- 20 модификации антител изобретения, включают, например, н-додеcanoат (C₁₂, лаурат), н-тетрадеcanoат (C₁₄, мирилат), н-октадеcanoат (C₁₈, стеарат), н-эйкозаноат (C₂₀, арахидат), н-докозаноат (C₂₂, бегенат), н-триаконтаноат (C₃₀), н-тетраконтанеоат (C₄₀), *цис*-Δ⁹-октадеcanoат (C₁₈, олеат), полностью *цис*-Δ^{5,8,11,14}-эйкозатетраеоат (C₂₀, арахидонат), октандикарбоновую кислоту, тетрадекандикарбоновую кислоту,
- 25 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.
- 30 [00125] 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-CH₂-NH-. Модифицирующие агенты, которые содержат линкерную функциональную группу, можно получать, например, путем реакции моно-Вос-алкилдиамина (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 полностью включено в настоящий документ путем ссылки).

[00126] 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

5 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

10 и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие органическую функциональную группу, которая связана 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

15 также способов, описанных в Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996).

[00127] В способе настоящего изобретения также применяют композицию антител к ИЛ-23, содержащую по меньшей мере одно, по меньшей мере два, по

20 меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть или более антител к ИЛ-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 не встречающиеся в природе композиции, содержащие по меньшей мере одну или две

25 аминокислотные последовательности полноразмерных антител к ИЛ-23, вариантов с делецией на С- и/или N-конце, доменов, фрагментов или специфических вариантов, выбранные из группы, состоящей из последовательностей, на 70–100% идентичных последовательностям смежных аминокислот указанных выше SEQ ID NO или специфических фрагментов, доменов или их вариантов. Предпочтительные композиции

30 антитела к ИЛ-23 включают по меньшей мере одну или две последовательности полноразмерных антител к ИЛ-23, фрагментов, доменов или вариантов с по меньшей мере одной CDR- или LBP-областью, например, последовательности, на 70–100% идентичные последовательностям указанных выше SEQ ID NO или фрагментов, доменов или их 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

[00128] 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, причем каждая из публикаций полностью включена в настоящий документ путем ссылки).

[00129] 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 противомикробных средств и прочих противомикробных 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 глюкагона, 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.

[00130] 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 флуорокортизона, 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.

[00131] По меньшей мере один иммунодепрессант может представлять собой по меньшей мере один, выбранный из азатиоприна, базиликсимаба, циклоспорина, даклизумаба, иммуноглобулина лимфоцитов, муромонаба CD3, микофенолята мофетила, микофенолята мофетила гидрохлорида, сиролимуса и такролимуса.

[00132] По меньшей мере одно противомикробное 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
 экконазола, эритромицина, сульфата гентамицина, кетокконазола, ацетата мафенида,
 метронидазола (местного действия), нитрата миконазола, мупироцина, гидрохлорида
 нафтифина, сульфата неомицина, нитрофуразона, нистатина, сульфадиазина серебра,
 5 гидрохлорида тербинафина, терконазола, гидрохлорида тетрациклина, тиокконазола 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
 10 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
 15 триамцинолона (См., например, стр. 1098–1136 в *Nursing 2001 Drug Handbook*.)
 [00133] Композиции антител к ИЛ-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 ИЛ-23,
 которое приводят в контакт (или вводят в них) с клеткой, тканью, органом, животным
 20 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, р55, р70 или
 25 р85) или фрагмента, их слитых полипептидов или низкомолекулярного антагониста
 ФНО, например связывающего ФНО белка I или II (ТВР-1 или ТВР-II), нерелимонмаба,
 инфликсимаба, этернацепта, CDP-571, CDP-870, афелимомаба, ленерцепта и т. п.),
 противоревматического лекарственного средства (например, метотрексата, ауранофина,
 аурутиоглюкозы, азатиоприна, этанерцепта, тиомалата золота-натрия, сульфата
 30 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 ИЛ-1 до ИЛ-40 и др. (например,
 ИЛ-1, ИЛ-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), причем каждая из публикаций полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

5 [00134] Соединения, композиции или комбинации антител к ИЛ-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, адъювант и т. п. Предпочтительными являются
10 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 Gennaro, Ed., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990. Фармацевтически приемлемые носители могут
15 быть выбраны обычным способом, исходя из приемлемости для пути введения, растворимости и/или стабильности композиции, содержащей антитело к ИЛ-23, фрагмент или вариант, как хорошо известно специалистам в данной области или описано в настоящем документе.

[00135] Фармацевтические эксципиенты и добавки, используемые в настоящей
20 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
25 или по объему. Примеры белковых эксципиентов включают сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин (HSA), рекомбинантный человеческий альбумин (rHA), 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,
30 лизин, лейцин, изолейцин, валин, метионин, фенилаланин, аспартам и т. п. Одной предпочтительной аминокислотой является глицин.

[00136] 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

5 и рафиноза.

[00137] Композиции антител к ИЛ-23 могут также включать в себя 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,

10 глюконовой кислоты, угольной кислоты, винной кислоты, янтарной кислоты, уксусной кислоты или фталевой кислоты; буферы Трис, гидрохлорида трометамин или фосфата. Предпочтительными буферами для применения в настоящих композициях являются соли органических кислот, такие как цитрат.

[00138] Композиции антител к ИЛ-23 могут дополнительно включать в себя

15 полимерные эксципиенты/добавки, такие как поливинилпирролидоны, фикоиллы (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

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

[00139] Эти и дополнительные известные фармацевтические эксципиенты и/или добавки, приемлемые для применения в композициях антител к ИЛ-23, их участков или вариантов в соответствии с настоящим изобретением, известны специалистам в данной

25 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

30 (например, цитрат) или полимерные агенты. Примером молекулы-носителя является мукополисахарид, гиалуроновая кислота, которую можно использовать для внутрисуставного введения.

Составы

[00140] Как указано выше, в настоящем изобретении предложены стабильные составы, которые предпочтительно содержат фосфатный буфер с физиологическим раствором или выбранной солью, 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 ИЛ-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 натрия и тимеросала 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.

[00141] Как отмечено выше, в способе изобретения применяют промышленное изделие, содержащее упаковочный материал и по меньшей мере один флакон, содержащий раствор по меньшей мере одного специфического антитела к ИЛ-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 специфичное к ИЛ-23 антитело, 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 специфичное к ИЛ-23 антитело в водном разбавителе с образованием раствора, который можно хранить в течение периода в двадцать четыре часа или дольше.

[00142] Антитело к ИЛ-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.

[00143] Диапазон количества антитела к ИЛ-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 меньшие и большие концентрации приемлемы и 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.

[00144] 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.

[00145] 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 pH предпочтительно добавляют физиологически приемлемый буфер. Составы могут охватывать широкий диапазон pH, такой как от около pH 4 до около pH 10, с предпочтительным интервалом от около pH 5 до около pH 9 и наиболее предпочтительно от около pH 6,0 до около

pH 8,0. Составы настоящего изобретения предпочтительно имеют pH от около 6,8 до около 7,8. Предпочтительные буферы включают фосфатные буферы, наиболее предпочтительно фосфат натрия, в частности фосфатно-солевой буфер (PBS).

[00146] Для уменьшения агрегации в составы или композиции можно

5 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 PEG (полиэтиленгликоль), или неионные поверхностно-
10 активные вещества, такие как полисорбат 20 или 80, либо полксамер 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.

15 [00147] Составы можно получать способом, который включает смешивание по меньшей мере одного антитела к ИЛ-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.), бензалкония хлорида, бензэтония хлорида, дегидроацетата натрия и тимеросала или их смесей в водном
20 разбавителе. Смешивание по меньшей мере одного специфичного к ИЛ-23 антитела и консерванта в водном разбавителе осуществляют с помощью стандартных процедур растворения и смешивания. Например, для получения приемлемого состава соединяют отмеренное количество по меньшей мере одного специфичного антитела к ИЛ-23 в буферном растворе с необходимым консервантом в буферном растворе в количествах,
25 достаточных для получения требуемых концентраций белка и консерванта. Варианты этого процесса 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.

30 [00148] Составы можно предоставлять пациентам в виде прозрачных растворов или двойных флаконов, включающих флакон с лиофилизированным специфическим антителом к ИЛ-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 двойной флакон 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.

5 [00149] 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 настоящего изобретения необязательно можно безопасно хранить при температуре от около 2 °С до 10 около 40 °С, причем биологическая активность белка сохраняется в течение продолжительных периодов времени, в связи с чем на упаковке допускается этикетка, указывающая, 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, 15 полугодия, полутора и/или двух лет.

[00150] Растворы специфического антитела к ИЛ-23 можно получать способом, который включает смешивание по меньшей мере одного антитела в водном разбавителе. Смешивание осуществляют с помощью стандартных процедур растворения и смешивания. Например, чтобы получить приемлемый разбавитель, 20 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 процесса понятны специалисту в данной области. Например, для оптимизации с учетом концентрации и применяемого способа введения можно изменять такие факторы, как порядок добавления 25 компонентов, внесение дополнительных добавок, температура и pH, при которых получают состав.

[00151] Заявленные продукты можно предоставлять субъектам в виде прозрачных растворов или двойного флакона, включая флакон с по меньшей мере одним лиофилизированным специфичным к ИЛ-23 антителом, которое разводят 30 содержащимся во втором флаконе водным разбавителем. Либо один флакон с раствором, либо двойной флакон 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.

[00152] Заявленные продукты можно предоставлять пациентам не напрямую, а посредством поставки в аптеки, клиники или другие такие учреждения и организации прозрачных растворов или двойных флаконов, содержащих флакон с по меньшей мере одним лиофилизированным специфическим антителом к ИЛ-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.

[00153] Общеизвестные 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 Dickinson (Франклин Лейкс, штат Нью-Джерси, США, www.bectondickenson.com), Disetronic (Бургдорф, Швейцария, www.disetronic.com), Bioject, г. Портленд, штат Орегон, США (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (г. Питерборо, Великобритания, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp. (г. Миннеаполис, штат Миннесота, США, www.mediject.com), и подобные приемлемые устройства. Признанные устройства, содержащие системы двойных флаконов, включают такие системы шприца-ручки для разведения лиофилизованного 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.

[00154] 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, если применимо, инструкции для пациента по разведению по меньшей мере одного антитела к ИЛ-23 в водном разбавителе с получением раствора и 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 используются человеком в фармацевтических целях.

5 [00155] Составы, применяемые в способе настоящего изобретения, можно получать способом, который включает смешивание антитела к ИЛ-23 и выбранного буфера, предпочтительно фосфатного буфера, содержащего физиологический раствор или выбранную соль. Смешивание антитела к ИЛ-23 и буфера в водном разбавителе осуществляют с использованием стандартных процедур растворения и смешивания.

10 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 процесса понятны специалисту в данной области. Например, для оптимизации с учетом концентрации и применяемого способа введения можно

15 изменять такие факторы, как порядок добавления компонентов, внесение дополнительных добавок, температура и рН, при которых получают состав.

[00156] В способе изобретения предлагаются фармацевтические композиции, содержащие различные составы, полезные и приемлемые для введения пациенту, человеку или животному. Такие фармацевтические композиции получают с

20 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

25 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.

30 [00157] Фармацевтические композиции могут представлять собой водные растворы или суспензии, содержащие указанную массу каждого компонента на единицу объема воды, или имеющие в «стандартном состоянии» указанный рН. При использовании в настоящем документе термин «стандартное состояние» означает температуру $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ и давление в 1 атмосферу. 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. То, 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).

[00158] 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 рН около определенного значения. Масса компонента, присутствующего в фармацевтической композиции, или значение рН 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 рН, составляет «около» заданного численного значения при сохранении и обнаружении активности связывания изолированного антитела после помещения изолированного антитела в фармацевтическую композицию.

[00159] Чтобы определить, связываются ли специфичные к ИЛ-23 мАт 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 мАт с последующим добавлением биотинилированных рекомбинантных ИЛ-23 человека. Для положительного контроля в качестве конкурирующего мАт используют то же мАт, что и для покрытия («самоконкуренция»). Связывание ИЛ-23 определяют с помощью стрептавидина. Эти результаты показывают, распознают ли мАт подобные или частично перекрывающиеся эпитопы на ИЛ-23.

[00160] Один аспект способа настоящего изобретения предусматривает введение пациенту фармацевтической композиции, содержащей

[00161] В одном варианте осуществления фармацевтических композиций концентрация изолированного антитела составляет от около 77 до около 104 мг на мл фармацевтической композиции. В другом варианте осуществления фармацевтических композиций рН составляет от около 5,5 до около 6,5.

[00162] Стабильные или консервированные составы можно предоставлять пациентам в виде прозрачных растворов или двух флаконов, содержащих флакон с по меньшей мере одним лиофилизированным антителом к ИЛ-23, которое разводят содержащимися во втором флаконе консервантом или буфером и эксципиентами в водном разбавителе. Либо один флакон с раствором, либо двойной флакон 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.

[00163] С помощью других составов или способов стабилизации антител к ИЛ-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 ИЛ-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 активный агент, можно формировать путем связывания водной фазы, содержащей активный агент 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 активный агент 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

5 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,
10 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.

[00164] Составы в виде сухого порошка можно получать иными способами
15 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
20 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 отсутствии кислорода,
25 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.
30 Оборудование, используемое для промышленного производства лекарственного средства путем распылительной сушки, выпускается Buchi Ltd. или Niro Corp.

[00165] Антитело к ИЛ-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.

5 **Терапевтическое применение**

[00166] В настоящем изобретении также предложен известный специалистам в данной области или описанный в настоящем документе способ модуляции или лечения ССД на уровне клетки, ткани, органа или на уровне организма животного или пациента с применением по меньшей мере одного антитела к ИЛ-23 по настоящему изобретению, например, путем введения в терапевтически эффективном количестве специфичного антитела к ИЛ-23 или его приведения в контакт с клеткой, тканью, органом или в целом с организмом животного или пациента.

[00167] Любой способ настоящего изобретения может включать в себя введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей антитело к ИЛ-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 ИЛ-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, p55, p70 или p85) или его фрагмента, их слитых полипептидов, или низкомолекулярного антагониста ФНО, например связывающего ФНО белка I или II (ТВР-1 или ТВР-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, сульфонамида, тетрациклина, другого противомикробного ЛС), противопсориазического ЛС, кортикостероида, анаболического стероида, ЛС для лечения сахарного диабета, минерального вещества, диетического ЛС, тиреоидного ЛС, витамина, гормона регуляции кальция, ЛС против диареи, ЛС против кашля, противорвотного ЛС, ЛС против язвы, слабительного ЛС, антикоагулянта, эритропоетина (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.

25 **Терапевтические способы лечения**

[00168] Как правило, лечение ССД осуществляют путем введения эффективного количества или дозы композиции, содержащей антитело к ИЛ-23, причем суммарное количество антитела к ИЛ-23 в этой композиции составляет в среднем в диапазоне от около 0,01 до 500 миллиграмм на килограмм массы тела пациента в одной дозе и предпочтительно от по меньшей мере около 0,1 до 100 миллиграмм антитела на килограмм массы тела пациента за одно или более введений, в зависимости от специфической активности активного агента, содержащегося в композиции. В альтернативном варианте осуществления эффективная концентрация в сыворотке

может составлять 0,1–5000 мкг/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

5 требуемого терапевтического количества может понадобиться выполнение повторного введения, т. е. повторных отдельных введений конкретной контролируемой или измеренной дозы, причем отдельные введения повторяют до достижения требуемой суточной дозы или эффекта.

[00169] Предпочтительные дозы могут необязательно включать 0,1, 0,2, 0,3, 0,4,
10 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
15 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,
20 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 мкг/мл сыворотки за
однократное или многократное введение, или любой интервал, значение или часть
этого диапазона.

25 [00170] 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
30 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.

[00171] 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.

[00172] Лекарственные формы (композиция), приемлемые для внутреннего введения, по существу, 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.

[00173] 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 методиками.

[00174] Приемлемые фармацевтические носители описаны в последнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, которое является стандартным источником ссылок в данной области.

Альтернативные способы введения

[00175] В соответствии с настоящим изобретением для введения фармацевтически эффективных количеств антитела к ИЛ-23 можно применять множество известных и разработанных способов введения. Далее описано введение через легкие, однако в соответствии с настоящим изобретением можно также применять другие способы введения, дающие приемлемые результаты. Антитела к ИЛ-23 по настоящему изобретению 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

[00176] 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

[00177] Изобретение дополнительно относится к введению антитела к ИЛ-23 путем парентерального, подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутрисуставного, внутрибронхиального, внутрибрюшного, интракапсулярного, 5 внутривлагалищного, внутриполостного, внутричревного, внутримозжечкового, внутрижелудочкового, внутрикишечного, интрацервикального, внутрижелудочного, внутрипеченочного, интрамиокардиального, внутрикостного, внутритазового, интраперикардиального, интраперитонеального, интраплеврального, в предстательную железу, внутрилегочного, интраректального, интраренального, интраретинального, 10 интраспинального, интрасиновиального, внутригрудного, внутриматочного, внутрипузырного, в пораженные ткани, болюсного, вагинального, ректального, буккального, подъязычного, интраназального или чрескожного введения. Композицию антитела к ИЛ-23 можно получать для применения парентеральным (подкожным, внутримышечным или внутривенным) или любым другим способом введения, в 15 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 20 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 25 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 30 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).

[00178] Приведенное выше описание изобретения, по существу, дополнительно разъясняется далее с помощью примеров, которые представлены в качестве иллюстрации и не являются ограничивающими. Дополнительные подробности изобретения иллюстрируют следующими ниже не имеющими ограничительного характера примерами. Описание всех цитат в спецификации прямо включено в настоящий документ путем ссылки.

Пример 1. Лечение системной склеродермии антителом к ИЛ23

10 **Многоцентровое, рандомизированное, плацебо-контролируемое, двойное слепое исследование гуселькумаба с участием пациентов с системной склеродермией, проведенное для доказательства концепции**

[00179] Гуселькумаб (CNTO1959) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело (mAb) — иммуноглобулин G1 лямбда (IgG1 λ), которое связывается с интерлейкином человека (ИЛ)-23 с высокой специфичностью и 15 аффинностью. Связывание гуселькумаба с субъединицей ИЛ-23p19 блокирует связывание внеклеточного ИЛ-23 с рецептором ИЛ-23 на клеточной поверхности, ингибируя специфичную для ИЛ-23 внутриклеточную передачу сигналов и последующую активацию и выработку цитокинов. Таким образом, гуселькумаб ингибирует биологическую активность ИЛ-23 во всех оценивавшихся исследованиях *in vitro*.

Таблица 1. ЦЕЛИ И КОНЕЧНЫЕ ТОЧКИ

Цели	Конечные точки
Первичные	
<ul style="list-style-type: none"> Оценить эффективность гуселькумаба у участников с системной склеродермией (ССД) 	<ul style="list-style-type: none"> Изменение модифицированной оценки состояния кожи по Роднану (mRSS) на 24 неделе по сравнению с исходным уровнем
Вторичные	
<ul style="list-style-type: none"> Оценить дополнительную эффективность гуселькумаба у участников с ССД. 	<ul style="list-style-type: none"> Изменение mRSS по сравнению с исходным уровнем на 52-й неделе Доля участников, у которых наблюдается ухудшение mRSS на 24-й и 52-й неделе Доля участников, получивших оценку 0,6 в Индексе комбинированного ответа Американской коллегии ревматологов при

Цели	Конечные точки
	dcSSc (ACR CRISS) на 24-й и 52-й неделе <ul style="list-style-type: none"> • Изменение форсированной жизненной емкости (ФЖЕЛ) и процента прогнозируемой ФЖЕЛ по сравнению с исходным уровнем на 24-й и 52-й неделе • Изменение по сравнению с исходным уровнем измеренной абсолютной диффузионной способности легких по монооксиду углерода (DLCO) и полученного процента прогнозируемого DLCO на 24-й и 52-й неделе • Изменение количества язв на пальцах по сравнению с исходным уровнем на 24-й и 52-й неделе у участников с язвами на пальцах в исходный момент • Изменение по сравнению с исходным уровнем показателя по опроснику оценки здоровья и функционального индекса нарушения жизнедеятельности (HAQ-DI) на 24-й и 52-й неделе
<ul style="list-style-type: none"> • Оценить безопасность и переносимость гуселькумаба у участников с ССД. 	<ul style="list-style-type: none"> • Количество и доля участников с нежелательными явлениями, возникшими во время лечения (НЯ), а также серьезными нежелательными явлениями (СНЯ) или нежелательными явлениями, представляющими особый интерес (НЯОИ) от исходного уровня до 24-й, 52-й и 104-й недель.
<ul style="list-style-type: none"> • Оценка фармакокинетики (ФК) и иммуногенности гуселькумаба. 	<ul style="list-style-type: none"> • Концентрации гуселькумаба в сыворотке крови
(ФК) и иммуногенность гуселькумаба	

Таблица 2

Цели	Конечные показатели
	<ul style="list-style-type: none"> • Частота появления антител против гуселькумаба
Поисковые	
<ul style="list-style-type: none"> • Оценить другую клиническую эффективность гуселькумаба у участников с ССД. 	<ul style="list-style-type: none"> • Время до ухудшения заболевания. Увеличение mRSS от исходного уровня на ≥ 5 и $\geq 20\%$ ИЛИ снижение на $>10\%$ от исходного уровня в процентах

Цели	Конечные показатели
	<p>прогнозируемого ФЖЕЛ</p> <ul style="list-style-type: none"> • Доля участников, у которых наблюдается снижение ФЖЕЛ по сравнению с исходным уровнем на 24-й и 52-й неделе • Доля участников, у которых наблюдается ухудшение ФЖЕЛ на 24-й и 52-й неделе • Изменение фиброзных изменений по сравнению с исходным уровнем, оцененное с помощью компьютерной томографии высокого разрешения (КТВР) на 24-й и 52-й неделе у участников с исходным фиброзом/фиброзными изменениями • Доля участников, у которых наблюдается ухудшение фиброзных изменений, оцененных с помощью КТВР на 24-й и 52-й неделе • Изменение по шкале частоты симптомов гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ) по сравнению с исходным уровнем на 24-й и 52-й неделе • Оценка капилляров ногтевого ложа на 24-й и 52-й неделе • Изменение по сравнению с исходным уровнем совокупной оценки пациента (PGA) на 24-й и 52-й неделе • Изменение по сравнению с исходным уровнем совокупной оценки врача (PhGA) на 24-й и 52-й неделе
<ul style="list-style-type: none"> • Оценка долгосрочной эффективности гуселькумаба у участников с ССД. 	<ul style="list-style-type: none"> • Изменение mRSS по сравнению с исходным уровнем на 104 неделе • Доля участников, у которых наблюдается ухудшение mRSS на 104-й неделе • Доля участников, получивших оценку 0,6 в Индексе комбинированного ответа Американской коллегии ревматологов при dcSSc (ACR CRIS) на 104 неделе • Изменение форсированной жизненной емкости (ФЖЕЛ) и процента прогнозируемой ФЖЕЛ по сравнению с исходным уровнем на 104-й неделе • Изменение по сравнению с исходным

Цели	Конечные показатели
	уровнем измеренной абсолютной диффузионной способности легких по монооксиду углерода (DLCO) и полученного процента прогнозируемого DLCO на 104 неделе
<ul style="list-style-type: none"> Оценка влияния гуселькумаба по сравнению с плацебо на фармакодинамические (ФК) параметры и биомаркеры заболевания ССД 	<ul style="list-style-type: none"> Изменение исходных уровней кожных (дополнительно) и циркулирующих (в крови) биомаркеров с течением времени для обеспечения оценки взаимодействия с мишенями при фармакодинамических (ФК) показаниях ткани/эффективности. Частота однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), связанных с путем ИЛ-23

Гипотеза

[00180] Внутренний анализ данных секвенирования рибонуклеиновой кислоты (РНК) (RNA-seq), полученных из образцов кожи пациентов с недавно возникшей ССД, показал усиление регуляции генов, связанных с ИЛ-23/ИЛ17 (анализ глобальной группы трансляционной научной медицины).

[00181] Это исследование для проверки концепции (PoC), направленное на обнаружение раннего сигнала эффективности гуселькумаба у участников с ССД по сравнению с плацебо, чтобы поддержать дальнейшую клиническую разработку.

- Нулевая гипотеза заключается в том, что разница в лечении между гуселькумабом и плацебо по первичной конечной точке = 0.
- Альтернативная гипотеза состоит в том, что разница в лечении между гуселькумабом и плацебо по первичной конечной точке $\neq 0$.

[00182] Из-за характера PoC этого исследования для проверки этой гипотезы PoC применяется двусторонний уровень альфа 0,2. Цель PoC будет считаться достигнутой, если рассчитанное значение p для проверки этой гипотезы PoC будет меньше 0,2.

Описание клинических конечных точек

Модифицированная шкала оценки состояния кожи по Роднану

[00183] mRSS — это проверенный метод физического обследования для оценки уплотнения кожи. Он коррелирует с показателями толщины кожи, полученными при

биопсии, и отражает прогноз и поражение внутренних органов, особенно на ранних стадиях заболевания. Оценка осуществляется по порядковой шкале от 0 (норма) до 3 (тяжелая индурация) на 17 участках тела с максимальным баллом 51 и используется для классификации тяжести ССД. Шкала широко применяется в качестве первичной и

5 вторичной меры исхода в рандомизированных клинических исследованиях. Эту оценку должен проводить врач, имеющий опыт и подготовку в оценке состояния кожи. Чтобы предотвратить вариабельность результатов у разных наблюдателей, оценивать состояние кожи у одного и того же участника на протяжении всего исследования должен один и тот же врач.

10 **Индекс комбинированного ответа Американской коллегии ревматологов по шкале диффузной кожной системной склеродермии**

[00184] ACR CRISS — это составной индекс ответа для клинических исследований на ранних стадиях ССД, разработанный международной группой экспертов в области ССД. Применение алгоритма ACR CRISS в рандомизированном

15 клиническом исследовании представляет собой двухэтапный процесс. Во-первых, оценка участников на соответствие критерию отсутствия улучшения. Если участники удовлетворяют этому критерию, им присваивается оценка вероятности 0,0.

Исследователи оценят, соответствует ли состояние участников таким критериям, как:

- 20
- Новый склеродермический почечный криз
 - Прогнозируемое снижение ФЖЕЛ в % $\geq 15\%$ (относительно), подтвержденное другим тестом ФЖЕЛ в течение месяца, КТВР для подтверждения ИЗЛ (если предыдущая КТВР грудной клетки не выявила ИЗЛ) и ФЖЕЛ

25

 - $< 80\%$ от прогнозируемого значения*
 - Впервые возникшая левожелудочковая недостаточность (определяемая как фракция выброса левого желудочка $< 45\%$), требующая лечения*

30

 - Впервые выявленная ЛАГ при катетеризации правых отделов сердца, требующая лечения*

* Относится к системному склерозу

[00185] Для остальных участников рассчитайте вероятность на основе изменения 5 показателей: mRSS, % от прогнозируемого ФЖЕЛ, HAQ-DI, совокупной оценки

пациента и совокупной оценки врача, где каждая мера имеет оценку вероятности от 0 до 1. Оценка ACR CRISS производится спонсором.

Функциональные тесты легких

[00186] Следующие измерения функции легких будут выполняться локально:

- 5
- ФЖЕЛ и % прогнозируемого ФЖЕЛ
 - DLCO (мл/мин/мм рт.ст.) и % от прогнозируемого DLCO (с поправкой на гемоглобин). Также будут собраны данные о насыщении кислородом.

Совокупная оценка врача

- 10 [00187] Общее состояние ССД у субъекта по оценке PhGA будет оцениваться с использованием визуальной аналоговой шкалы 10 см, где 0 — отличное и 10 — крайне плохое состояние.

Опросник оценки здоровья и функционального индекса нарушения жизнедеятельности

- 15 [00188] Стэнфордский опросник HAQ представляет собой краткий опросник для самооценки физических функций, относящихся к повседневной деятельности, по 8 областям: одевание и уход за собой, способность вставать, прием пищи, ходьба, гигиена, способность дотягиваться до предметов, брать их, и общая активность. Первоначально разработанный для лечения РА, опросник успешно применяется при
- 20 различных ревматических заболеваниях, включая идиопатическую воспалительную миопатию. В исследовании будет использоваться Стэнфордский опросник HAQ, переведенный на японский язык с культурно соответствующими модификациями вопросов из категорий способности вставать из положения сидя, лежа, самостоятельно пить, есть, и способности дотянуться до предметов.

25 Шкала частоты симптомов гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ)

- [00189] Опросник ГЭРБ представляет собой краткий опросник для оценки пищеводных симптомов ГЭРБ, валидированный на основании эндоскопического эзофагита. Первоначальная версия ГЭРБ состоит из наиболее распространенных 7
- 30 симптомов ГЭРБ, связанных с кислотным рефлюксом, и 5 симптомов, связанных с нарушением моторики, при этом более высокие баллы более показательны для

первичной ГЭРБ. Каждый балл определялся следующим образом: 0 — никогда, 1 — редко, 2 — иногда, 3 — часто и 4 — всегда.

[00190] Инструменты PRO будут предоставляться на местном языке в соответствии с местными правилами.

- 5
- Инструменты PRO должны быть доступны для регулирующих органов и для подачи в Наблюдательный совет организации (IRB) / Независимый комитет по этике (IEC), поэтому инструменты PRO или снимки экрана необходимо приложить к протоколу или предоставить в сопроводительном руководстве к приборам, которые будут представлены

10

вместе с протоколом.

 - Данные PRO и AE не будут согласованы друг с другом.

Оценка язв на пальцах

[00191] Язвы на пальцах определяются как поражение кожи на всю толщину (>3 мм в максимальном диаметре) с потерей эпителия, включая поражения, покрытые

15

струпом (примечание: ямочные рубцы и гиперкератотические поражения исключаются). Заживление определяется реэпителизацией с исчезновением боли и экссудата. Оценка язв на пальцах будет проводиться назначенным исследователем во время исследования. Количество язв и тяжесть язв будут рассчитаны со стороны спонсора.

20 Капилляроскопия ногтевого ложа

[00192] Капилляроскопия ногтевого ложа — неинвазивный метод визуализации капилляров ногтевого ложа и оценки морфологии микрососудов. Аномалии капилляров ногтевого ложа включены в критерии классификации ACR/EULAR для системной склеродермии. Аномалии капилляров ногтевого ложа оцениваются с помощью

25

соответствующей капилляроскопии. Типичные изменения капилляров ногтевого ложа при ССД включают общее количество капилляров, размер капилляров, морфологию капилляров, кровоизлияния, скорость кровотока в капиллярах и длину ногтевого ложа. Эти изменения будут рассчитаны. Будут использоваться визуальные носители.

Оценка компьютерной томографии высокого разрешения (КТВР)

[00193] Поражение легких является одной из наиболее важных причин смертности пациентов с ССД. Недавнее развитие технологии компьютерной оценки позволило обратить внимание на анализ КТ-изображений, как на метод оценки фиброзных изменений при ИЗЛ. Текстуриный анализ и подходы, основанные на компьютерном распознавании образов, могут применяться к данным визуализации и использоваться для оценки степени фиброза легких на КТ-изображениях грудной клетки. Эту оценку следует проводить на центральном уровне.

Биомаркеры

10 [00194] В ходе дополнительного исследования биомаркеров будут получены биоптаты неповрежденной кожи на неделе 0 и поврежденной кожи (на неделе 0) на неделе 0 и 24 от всех участников, давших согласие.

[00195] Данные, собранные с помощью этих образцов, будут использоваться для поисковых исследований, которые будут включать, помимо прочего, следующие цели:

- 15 • Понять молекулярные эффекты гуселькумаба.
- Понять патогенез ССД.
- Понять, почему отдельные участники могут по-разному реагировать на гуселькумаб.
- Понять влияние лечения гуселькумабом на кожу или системное воспаление.
- 20 • Разработать диагностические тесты для выявления ССД или популяций ССД, которые могут реагировать или не реагировать на лечение гуселькумабом.

ОБЩИЙ ДИЗАЙН

25 [00196] Это рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое параллельное многоцентровое интервенционное исследование для оценки эффективности гуселькумаба у мужчин и женщин в возрасте от 18 до 75 лет, включительно, с диагнозом ССД по критериям Американской коллегии ревматологов (ACR) и Европейской лиги ревматологов (EULAR) 2013 года с длительностью заболевания ≤ 36 месяцев (определяется как время от первого проявления события, не связанного с синдромом Рейно) и mRSS от ≥ 10 до ≤ 22 единиц.

[00197] Участники будут случайным образом распределены в соотношении 1:1, на основе рандомизационных страт по наличию ИЗЛ (да, нет), исходному уровню mRSS (низкий [от ≥ 10 до ≤ 15] или высокий [от ≥ 16 до ≤ 22]) и исходному статусу антител к топоизомеразе I (положительный, отрицательный), в одну из следующих групп лечения:

- Гуселькумаб (группа А): гуселькумаб в дозе 400 мг внутривенно (в/в) на 0, 4 и 8 неделе (индукция) с последующим введением гуселькумаба в дозе 200 мг подкожно (п/к) каждые 4 недели (Q4W) с 12 по 48 неделю (поддерживающая терапия).
- Плацебо (группа В): внутривенное введение соответствующего плацебо на 0, 4 и 8 неделе (индукция) с последующим подкожным введением плацебо каждые 4 недели с 12 по 48 неделю (поддерживающее лечение)

[00198] Основное исследование будет проводиться в 3 этапа: фаза скрининга не более 6 недель, 52-недельная двойная слепая экспериментальная фаза и фаза наблюдения за безопасностью с последующим визитом после экспериментальной фазы через 12 недель после получения последней дозы исследуемого препарата для сбора данных о любых НЯ со времени последнего визита в рамках исследования.

[00199] Участники, завершившие основное исследование (с 0 по 52 неделю: т. е. после оценки на 48 неделе, до оценки на 52 неделе) и которые, по мнению исследователя, могут получить пользу от продолжения лечения, будут участвовать в LTE, подписав ФИС до или на 52 неделе. Продолжительность индивидуального участия составит примерно 66 недель без LTE и 118 недель с LTE.

[00200] Запланировано три блокировки базы данных (DBL): когда все участники завершат визит на 24-й неделе (далее «DBL 24-й недели»), при окончании основного исследования (EOS) (визит на 52-й неделе для участников, которые перешли в LTE, или визит на 60-й неделе для участников, которые не перешли в LTE, далее «DBL 52-й недели») и EOS LTE (визит на 112-й неделе, далее «окончательная DBL»). Следует отметить, что если LTE будет прекращено в соответствии с рекомендацией IDC (Комитета по внутренним решениям) (раздел $\lambda.5$), будет только 2 DBL (DBL 24-й недели и 52-й недели), а данные LTE, собранные у участников, которые уже перешли в LTE на момент 24-й недели DBL, будут проанализированы после DBL на 52-й неделе вместе с данными визита на 52-й или 60-й неделе.

[00201] Ключевые оценки эффективности будут включать mRSS, оценку ACR CRIS; функциональные пробы легких: ФЖЕЛ и % прогнозируемого ФЖЕЛ, а также DLCO (мл/мин/мм рт. ст.) и % прогнозируемого DLCO (с поправкой на гемоглобин); PhGA; и PGA. Ключевые оценки безопасности включают мониторинг НЯ (включая СНЯ, НЯ, представляющие особый интерес [НЯОИ]), инфекции, реакции в месте инъекции, нежелательные явления с временной связью с инфузией, и реакции гиперчувствительности), физические осмотры, измерения жизненно важных функций, электрокардиографические измерения (ЭКГ), клинические лабораторные исследования, ИЗЛ (оцененные с помощью централизованной КТВР) и оценки на туберкулез (ТБ). Кроме того, в этом исследовании также будут проводиться оценки ФК, биомаркеров и иммуногенности.

КОЛИЧЕСТВО УЧАСТНИКОВ

[00202] В исследование будет включено в общей сложности около 56 участников, при этом в каждой группе лечения планируется по 28 участников.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ГРУППЫ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ

[00203] Участники будут случайным образом распределены в соотношении 1:1 в одну из следующих групп исследования:

- Гуселькумаб (группа А): гуселькумаб в дозе 400 мг внутривенно на 0-й, четвертой и восьмой неделе (индукция) с последующим п/к введением гуселькумаба в дозе 200 мг каждые 4 недели с 12-й по 48-ю неделю (поддерживающее лечение)
- Плацебо (группа В): внутривенное введение соответствующего плацебо на 0, 4 и 8 неделе (индукция) с последующим подкожным введением плацебо каждые 4 недели с 12 по 48 неделю (поддерживающее лечение).

[00204] Во время LTE все участники будут получать лечение гуселькумабом в LTE, как показано ниже, в зависимости от группы, в которой они участвовали в основном исследовании:

- Группа А (группа, получающая гуселькумаб, из основного исследования): гуселькумаб в дозе 200 мг подкожно и плацебо внутривенно на 52, 56 и 60 неделе исследования LTE, с последующим назначением гуселькумаба в дозе 200 мг п/к каждые 4 недели с 64 по 100 неделю исследования LTE.

- Группа В (группа, получающая плацебо, из основного исследования): плацебо п/к и гуселькумаб в дозе 400 мг в/в на 52, 56 и 60 неделе исследования LTE, а затем гуселькумаб в дозе 200 мг п/к каждые 4 недели с 64 по 100 неделю исследования LTE.

5 [00205] Продолжительность индивидуального участия составит примерно 66 недель без LTE и 118 недель с LTE.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ

[00206] Оценка эффективности будет включать в себя следующее:

- mRSS
- 10 • Оценка ACR CRIS
- Функциональные пробы легких (ФПЛ):
 - ФЖЕЛ и % прогнозируемого ФЖЕЛ
 - DLCO (мл/мин/мм рт. ст.) и % прогнозируемого DLCO (с поправкой на гемоглобин)
- 15 • PhGA
- Результаты, сообщаемые пациентом (PRO)
 - PGA
 - HAQ-DI
 - Опросник ГЭРБ
- 20 • Оценка язв на пальцах
- Капилляроскопия ногтевого ложа
- КТВР легких (центральное чтение)

ОЦЕНКА ФАРМАКОКИНЕТИКИ

25 [00207] Образцы сыворотки для определения концентраций гуселькумаба с использованием соответствующих утвержденных, специфичных и чувствительных способов будут проанализированы спонсором или с помощью установленных спонсором соответствующих методов анализа.

ОЦЕНКИ ИММУНОГЕННОСТИ

30 [00208] Будет проведен скрининг образцов сыворотки на наличие антител, связывающихся с гуселькумабом, и будет зафиксирован титр в подтвержденных положительных образцах. Образцы сыворотки, положительные на антитела против гуселькумаба, будут дополнительно охарактеризованы на наличие нейтрализующих

антител (Nabs) к гуселькумабу. Другие анализы могут быть проведены для проверки стабильности антител против гуселькумаба и/или дополнительной характеристики иммуногенности гуселькумаба.

Аутоантитела

- 5 [00209] Во время скрининга будут отбираться образцы для оценки наличия аутоантител (включая, помимо прочего, к полимеразе рибонуклеиновой кислоты [РНК], центромерам и топоизомеразе).

ФАРМАКОДИНАМИКА И УРОВНИ БИОМАРКЕРОВ

- 10 [00210] Образцы мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) и сыворотки будут браться согласно графику обследований (Schedule of Assessments, SoA) для оценки клеточных и молекулярных биомаркеров крови, чтобы можно было оценить ФД показатели взаимодействия с мишенью в тканях/эффективности.

- 15 [00211] В ходе дополнительного исследования биомаркеров будут получены биоптаты непораженной кожи на неделе 0 и пораженной кожи (на неделе 0) на неделе 0 и 24 от всех участников, давших согласие.

ФАРМАКОГЕНОМИЧЕСКИЕ ОЦЕНКИ

- 20 [00212] Образец крови для фармакогеномического исследования будет взят у участников, которые дадут отдельное согласие на этот компонент исследования, чтобы при необходимости можно было провести фармакогеномическое исследование. Участие в фармакогеномических исследованиях не является обязательным.

ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ

- 25 [00213] Оценки безопасности, проводимые при каждом исследовательском визите, будут включать оценку НЯ (во время визита и между визитами для оценки), мониторинг ИЗЛ (оцениваемый централизованно читаемой КТВР), оценку на туберкулез и другие инфекции, клинические лабораторные анализы крови (гематологические и биохимические исследования сыворотки, включая С-реактивный белок), тесты на беременность, физические осмотры, измерения ЭКГ, показатели жизнедеятельности, обзор сопутствующих препаратов и наблюдение за реакциями в
30 месте инъекции, реакциями гиперчувствительности и НЯ с временной связью с инфузией. Кроме того, для участников, имеющих отрицательный результат на

поверхностный антиген (HbsAg), положительный результат на коровье антитела (анти-НВс) и/или поверхностные антитела (анти-НВс) и отрицательный результат теста на ДНК ВГВ, количественное определение ДНК ВГВ должно контролироваться как минимум каждые 3 месяца или меньше.

5

СТАТИСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Определение размера выборки

[00214] 95% доверительный интервал (ДИ) $[-4,7, -1,7]$ изменения mRSS от исходного уровня до 6 месяцев считается клинически значимым изменением. Нижняя граница этого 95% ДИ, -4,7, была принята как ожидаемая разница между группами лечения при расчете размера выборки в этом исследовании, предполагая, что гуселькумаб позволит достичь клинически значимого изменения у большинства участников, получавших гуселькумаб.

[00215] Принимая стандартное отклонение (СО) в 8 баллов, мощность 80% при двустороннем уровне значимости 0,20 и коэффициенте рандомизации 1 : 1, для обнаружения эффекта лечения -4,7 балла потребуется в общей сложности не менее 54 участников. С учетом до двух участников, рандомизированных, но без оценки эффективности после исходного уровня, запланировано участие примерно 56 (по 28) рандомизированных участников.

Выборки для анализов

[00216] Анализ эффективности и информации об участниках будет включать всех рандомизированных участников, получивших хотя бы 1 дозу (полную или частичную) исследуемого препарата, и анализироваться на основе рандомизированных групп лечения, независимо от терапии, которую они фактически получали.

[00217] Выборка для анализа безопасности будет включать всех рандомизированных участников, которые получают хотя бы 1 дозу (частичную или полную) исследуемого препарата, и участники будут проанализированы на основе лечения, которое они получают, независимо от групп лечения, в которые их распределили.

[00218] Выборка для фармакокинетического анализа будет включать всех участников, которые получили как минимум 1 полную дозу гуселькумаба и у которых хотя бы 1 раз были получены фармакокинетические данные после введения дозы.

[00219] Выборка для анализа иммуногенности будет включать всех участников, которые получили по крайней мере 1 дозу гуселькумаба и у которых хотя бы 1 раз были получены данные об иммунном ответе после дозы.

Анализ эффективности

5 [00220] Для подведения итога большинства данных будет использоваться простая описательная сводная статистика, такая как n , среднее значение, стандартное отклонение, медиана, межквартильный диапазон, минимум и максимум для непрерывных переменных, а также количество и проценты для дискретных переменных.

10 [00221] Для первичной конечной точки (изменение mRSS по сравнению с исходным уровнем на 24 неделе) сравнение лечения будет проводиться с использованием модели со смешанными эффектами для повторных измерений (Mixed-Effect Model Repeated Measure, MMRM). Модель MMRM включает группу лечения, исходный уровень mRSS, факторы стратификации, визит, взаимосвязь между группой и визитом и взаимосвязь между исходным mRSS и визитом в качестве фиксированных
15 эффектов. Эффекты лечения будут оцениваться на основе средних значений различий по методу наименьших квадратов (least-square, LS). Будут представлены значения p для средних различий LS вместе с двусторонним 80% ДИ. При необходимости будет проведен анализ чувствительности и анализ в подгруппах для первичной конечной
20 точки. Подробности этого анализа и правила обработки данных будут указаны в плане статистического анализа (statistical analysis plan, SAP).

[00222] Все остальные конечные точки эффективности будут подытожены с течением времени по группам лечения. Сравнение лечения будет проводиться с использованием модели MMRM, в которой проводятся повторяющиеся непрерывные
25 измерения, или логистической модели, в которой имеется дихотомическая переменная ответа. Поправки на множественные сравнения для вторичных конечных точек проводиться не будут, и все значения p будут считаться номинальными. Подробные методы анализа и правила обработки данных будут представлены в SAP.

Анализ безопасности

30 [00223] Плановые оценки безопасности будут проводиться на основе выборки для анализа безопасности. Нежелательные явления, СНЯ, связанные НЯ и НЯ по степени тяжести будут подытожены по группам лечения. Более подробная информация о других НАОИ, таких как ИЗЛ, будет описана в SAP.

[00224] Лабораторные параметры и изменение выбранных лабораторных параметров (гематологических и биохимических) по сравнению с исходным уровнем, а также количество участников с отклонениями лабораторных показателей (гематологических и биохимических) на основе классификации токсичности по общим терминологическим критериям Национального института рака для нежелательных явлений (NCI-CTCAE), будут подытожены по группам лечения.

[00225] Клинически значимые отклонения ЭКГ будут оцениваться по таблицам частот. Описательная статистика значений температуры, пульса/частоты сердечных сокращений, частоты дыхания и артериального давления (систолического и диастолического), а также изменений по сравнению с исходным уровнем будет суммироваться в каждый запланированный момент времени. Будет суммирован процент участников со значениями, выходящим за пределы клинически важных пределов.

15 **Фармакокинетические анализы**

[00226] Если не указано иное, фармакокинетический анализ будет основан на выборке для фармакологического анализа. Концентрации гуселькумаба в сыворотке с течением времени будут подытожены с помощью описательной статистики в каждый номинальный момент времени отбора проб. Все концентрации в сыворотке, находящиеся ниже наименьшей количественно определяемой концентрации, или отсутствие данных будут отмечены как таковые в базе данных по концентрациям или в представлениях данных. Концентрации ниже наименьшей количественно определяемой концентрации в сводной статистике будут рассматриваться как нулевые.

[00227] Подробные правила анализа, включая исключение из анализа ФК, будут указаны в SAP.

[00228] При необходимости можно создать популяционную ФК модель. Если проводится популяционный фармакокинетический анализ, результаты будут представлены в отдельном отчете.

30 **Анализ иммуногенности**

[00229] Распространенность и титры антител против гуселькумаба будут подытоживаться в выборке для анализа иммуногенности. Будет предоставлен список

участников с положительным результатом на антитела против гуселькумаба.

Максимальные титры антител против гуселькумаба будут подытожены для участников с положительным результатом на антитела к гуселькумабу.

[00230] Частота выявления Nabs при приеме гуселькумаба будет подытожена для
5 участников, у которых обнаружены антитела к гуселькумабу и есть образцы, которые можно оценить на наличие нейтрализующих антител к гуселькумабу.

Фармакодинамические анализы

[00231] У всех субъектов будет собрана сыворотка для оценки ФД маркеров, связанных с гуселькумабом, а также маркеров, связанных с ССД. Измерения могут
10 включать, помимо прочего, уровни ИЛ-17А, ИЛ-17F, ИЛ-22, бета-дефензина-2 (BD-2) и SAA в сыворотке крови. Можно выполнить более широкое протеомное профилирование (например, с помощью метода Olink) для обнаружения биомаркеров.

[00232] Также будут браться образцы крови для выделения РВМС с целью последующего иммунофенотипического анализа с помощью многопараметрической
15 проточной цитометрии или масс-цитометрического анализа (CyTOF) для измерения популяций иммунных клеток до и во время лечения. Также может быть проведен анализ экспрессии генов; это может включать профилирование с помощью одноклеточного РНК-секвенирования (RNA-seq).

[00233] Результаты фармакодинамического/биомаркерного анализа будут
20 представлены в отдельном отчете.

Анализ биомаркеров

[00234] Характеристики изменений экспрессии генов в коже во время лечения будут анализироваться с помощью секвенирования РНК на 0-й и 24-й неделе. Если это
возможно, на 0-й неделе будет взят образец неповрежденной (непораженной) кожи; образцы поражений (на 0-й неделе) должны быть собраны как на 0-й, так и на 24-й
25 неделе. Если это возможно, можно определить характеристики тканевых иммунопатологических изменений кожи методами иммуногистохимии (ИГХ) / иммунофлуоресценции (ИФ) / гибридизации *in situ* (ISH), а также гистологического анализа (например, фиброза). Можно рассмотреть возможность
30 многопараметрического профилирования белков (например, CyTOF).

Фармакокинетический/фармакодинамический анализы

[00235] Взаимосвязь между сывороточными концентрациями гуселькумаба и показателями эффективности и/или соответствующими конечными точками БП, включая биомаркеры в крови или биоптатах кожи, при необходимости можно исследовать графически. Если наблюдается визуальная тенденция, при необходимости может быть проведен дополнительный анализ.

Фармакогеномические анализы

[00236] Генетический анализ может помочь выявить подгруппы населения, которые по-разному отвечают на препарат. Один образец ДНК на неделе 0 будет использоваться для изучения генетических факторов, которые могут влиять на молекулярные эффекты, клиническую эффективность или переносимость гуселькумаба, а также для выявления генетических факторов, связанных с ССД. Локусом интереса является ген *IL12RB1*; в этом гене был идентифицирован зарегистрированный аллель риска ССД, и существует потенциальная связь с экспрессией продукта гена (кодирующего рецептор ИЛ-23). Анализ, применяемый к образцам ДНК, может быть сосредоточен на генотипировании с использованием молекулярных массивов для сканирования полиморфизмов по всему геному. Участие во взятии образцов ДНК не является обязательным.

ИССЛЕДУЕМАЯ ПОПУЛЯЦИЯ

[00237] Скрининг для поиска пригодных для участия в исследовании участников будет проводиться в течение 6 недель до введения исследуемого препарата. Критерии включения и исключения для регистрации в исследовании участников описаны ниже. При наличии вопроса о данных критериях исследователь будет обращаться к соответствующему представителю спонсора и решать любые проблемы перед регистрацией субъекта в исследовании. Отказы от обязательств не разрешены.

1.1. Критерии включения

[00238] Чтобы быть зачисленным в исследование, каждый потенциальный участник должен соответствовать всем следующим критериям.

1. Мужчина или женщина (в зависимости от репродуктивных органов и функций, определяемых хромосомным набором).
2. от 18 до 75 лет включительно.

Тип участника и характеристики заболевания

3. Стабильный с медицинской точки зрения на основании физического осмотра, истории болезни, показателей жизнедеятельности и ЭКГ в 5 12 отведениях, выполненной при скрининге. Любые отклонения должны соответствовать основному заболеванию в исследуемой популяции, и это определение должно быть записано в первичных документах участника и подписано исследователем.
4. Стабильность с медицинской точки зрения на основании 10 клинических лабораторных анализов, проведенных при скрининге. Если результаты биохимического анализа сыворотки, включая ферменты печени, показатели свертывания крови, гематологические 15 показатели или анализ мочи, выходят за пределы нормальных референтных диапазонов, участник может быть включен только в том случае, если исследователь считает, что отклонения от нормы не являются клинически значимыми или являются приемлемыми для исследуемой популяции. Это определение должно быть записано в первичных документах участника и подписано исследователем.
5. Диагноз ССД по критериям ACR и EULAR 2013.
6. Диффузная кожная склеродермия согласно критериям ЛеРоа, т. е. 20 фиброз кожи проксимальнее локтей и коленей в дополнение к акральному фиброзу.
7. Продолжительность заболевания ≤ 36 месяцев (определяется как 25 время от первого проявления феномена Рейно).
8. ≥ 10 и ≤ 22 единиц mRSS при скрининге и на 0-й неделе.
9. ФЖЕЛ $\geq 60\%$ от прогнозируемой при скрининге.

10. DLCO $\geq 40\%$ от прогнозируемого (с поправкой на гемоглобин) при скрининге.

11. Участники, соответствующие одному из следующих критериев при отборе:

a) Увеличение mRSS на ≥ 3 единиц по сравнению с оценкой, проведенной в течение предыдущих 2–6 месяцев.*

b) Поражение 1 новой области тела с увеличением ≥ 2 единиц mRSS по сравнению с оценкой, выполненной в течение предыдущих 2–6 месяцев.*

c) Поражение 2 новых участков тела с увеличением ≥ 1 единицы mRSS по сравнению с оценкой в течение предыдущих 2–6 месяцев.*

*Без учета участников со снижением mRSS в течение 2 месяцев.

12. Критерий изменен в соответствии с поправкой 1.

12.1 Наличие результатов скрининговых лабораторных исследований в пределах указанных ниже параметров, и если 1 или более лабораторных параметров выходят за пределы указанного диапазона, разрешается однократный повторный лабораторный анализ этих параметров:

Таблица 3

a. Гемоглобин	≥ 9 г/дл	SI: ≥ 90 ммоль/л
b. Лейкоциты	$\geq 3,0 \times 10^3$ /мкл	SI: $\geq 3,0$ ГИ/л
c. Нейтрофилы	$\geq 1,5 \times 10^3$ /мкл	SI: $\geq 1,5$ ГИ/л
d. Тромбоциты	$\geq 100 \times 10^3$ /мкл	SI: ≥ 100 ГИ/л
e. Креатинин сыворотки:	$\leq 1,8$ мг/дл	SI: ≤ 159 мкмоль/л
f. Аспаратаминотрансфераза (АСТ)	$\leq 2 \times$ ВГН	
g. Аланинаминотрансфераза (АЛТ)	$\leq 2 \times$ ВГН	

Прохождение одновременной или предшествующей лекарственной терапии

13. Разрешается регулярное лечение следующими препаратами без изменения дозы или частоты:
- 5
- a) Пероральные глюкокортикоиды (средняя суточная доза преднизолона или его эквивалента ≤ 10 мг) в течение ≥ 6 недель и в стабильной дозе ≥ 2 недель до первой дозы исследуемого препарата.
- 10
- Если в настоящее время пероральные глюкокортикоиды не применяются, не допускается их применение в течение ≥ 6 недель до первой дозы исследуемого препарата.
- b) Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) или другие анальгетики в стабильной дозе за ≥ 2 недель до первой дозы исследуемого препарата.
- 15
- c) Антагонисты рецепторов эндотелина (например, бозентан, амбризентан и мацитентан) в стабильной дозе за ≥ 2 недель до первой дозы исследуемого препарата.
- 20
- d) Ингибиторы фосфодиэстеразы 5 (например, силденафил и тадалафил) в стабильной дозе за ≥ 2 недель до первой дозы исследуемого препарата.
- e) Простациклины (например, эпопростенол, илопрост и трепростинил) в стабильной дозе за ≥ 2 недель до первой дозы исследуемого препарата.
- 25
- f) Разрешенные местные препараты для лечения кожных заболеваний за ≥ 4 недель до первой дозы исследуемого препарата.

Туберкулез

- 30
14. Считаются подходящими согласно следующим критериям скрининга на туберкулез:
- a) в анамнезе отсутствует латентный или активный туберкулез, обнаруженный до проведения скрининга. Исключение делается

при котором активный туберкулез был исключен и для которого было начато соответствующее лечение латентного туберкулеза до первого применения исследуемого препарата.

5 Субъекту, у которого первый результат IGRA неопределенный, следует повторить тест. Если второй результат IGRA также является неопределенным, субъект может быть введен в исследование без лечения латентного туберкулеза, если активный туберкулез исключен, на рентгенограмме грудной
10 клетки не видно никаких отклонений, указывающих на туберкулез (активный или застарелый неактивный туберкулез), и субъект не имеет дополнительных факторов риска по туберкулезу, определенных исследователем. О таком определении необходимо незамедлительно сообщить
15 медицинскому наблюдателю спонсора, зарегистрировать в исходных документах субъекта, и под ними должен подписаться исследователь.

ПРИМЕЧАНИЕ. IGRA не требуется при скрининге участников с латентным туберкулезом в анамнезе и продолжающимся
20 лечением латентного туберкулеза или имеющих задокументированные данные о завершении соответствующего лечения. участники с документально подтвержденным адекватным лечением, как описано выше, не нуждаются в проведении дополнительного лечения латентного туберкулеза.

25 е) Рентгенограмма грудной клетки (как в задне-передней, так и в боковой проекции) менее чем за 12 недель до первого применения исследуемого препарата и ее анализ квалифицированным врачом (например, рентгенологом или пульмонологом), без признаков текущего активного туберкулеза
30 или старого неактивного туберкулеза. Компьютерная томография (КТ) грудной клетки также может быть выполнена, если исследователь сочтет это целесообразным.

Требования к половой жизни и контрацепции/барьерным способам

15. Женщины с репродуктивным потенциалом должны иметь отрицательный результат теста мочи на беременность во время скрининга и на исходном уровне исследования.

5 16. Женщина должна:

a. Не обладать репродуктивным потенциалом;

b. Обладать репродуктивным потенциалом и

10 о Использовать высокоэффективный, предпочтительно автономный, способ контрацепции (частота неудач < 1% в год при постоянном и правильном использовании) и согласиться на продолжение применения высокоэффективного способа контрацепции во время проведения исследования и в течение 12 недель после введения последней дозы до окончания соответствующего системного воздействия; исследователь должен оценить вероятность неэффективности метода контрацепции (например, несоблюдение, использование начато недавно) в отношении первой дозы исследуемого препарата.

15 Примечание. Если репродуктивный потенциал участницы изменяется после начала исследования (например, у женщины в состоянии пременопаузы наступает состояние менопаузы) или изменяется риск наступления беременности (например, женщина, не являющаяся гетеросексуально активной, становится активной), женщина должна начать использовать высокоэффективный способ контрацепции, как описано в критериях пригодности к включению и критериях исключения из списков участников.

25 30 17. Женщина должна согласиться на отказ от донорства яйцеклеток (женских половых клеток, ооцитов) для искусственного оплодотворения во время исследования и в течение 12 недель после получения последней дозы исследуемого препарата.

18. Критерий изменен в соответствии с поправкой 1.

18.1 Участники мужского пола должны согласиться со следующим во время исследования и в течение как минимум 12 недель после приема последней дозы исследуемого препарата.

- Должен согласиться не сдавать сперму для воспроизводства.
- Участник мужского пола должен надевать презерватив при любых действиях, при которых возможна передача эякулята другому человеку.
- Также участников мужского пола следует проинформировать о том, что партнерше следует использовать высокоэффективный метод контрацепции, поскольку презерватив может порваться или протечь.

Информированное согласие

19. Необходимо подписать форму информированного согласия (ФИС), в которой указано, что участник или участница понимает цели и процедуры, которые требуются для исследования, и добровольно участвует в исследовании.

20. Субъекты должны подписать отдельное информированное согласие, если он или она соглашается предоставить дополнительный образец ДНК для исследования. Отказ от предоставления согласия на взятие необязательной пробы ДНК не исключает возможности участия субъекта в клиническом исследовании.

21. Иметь возможность и с готовностью соблюдать указанные в настоящем протоколе запреты и ограничения.

1.2. Критерии исключения

[00239] Любой потенциальный участник, соответствующий любому из следующих критериев, будет исключен из исследования:

Медицинские состояния

1. Печеночная или почечная недостаточность в анамнезе (оценочный клиренс креатинина ниже 60 мл/мин); значимые сердечные, сосудистые, легочные, желудочно-кишечные, эндокринные, неврологические, гематологические, ревматологические, психиатрические или метаболические расстройства.

5
2. Наличие известных тяжелых или неконтролируемых осложнений ССД, включая кровохарканье, легочное кровотечение, почечный криз.

10

 - Наличие тяжелой легочной гипертензии, что определяется с помощью эхокардиограммы и функционального исследования легких или катетеризации правых отделов сердца. Тяжелая легочная гипертензия включает, помимо прочего, следующее:
Фракция выброса левого желудочка <40%
 - 15 • Пиковая скорость трикуспидальной регургитации (м/с) >3,4
 - Пульс в состоянии покоя <50 ударов в минуту
 - Систолическое артериальное давление < 90 мм рт. ст.
 - Данные ЭКГ, указывающие на значительные нарушения проводимости.

20
3. Наличие интерстициального заболевания легких, требующего кислородной терапии.

25
4. Наличие ревматического заболевания, кроме ССД, такого как РА, ревматическая полимиалгия (ПМР), системная красная волчанка, полимиозит/дерматомиозит, которые могут помешать оценке ССД.

30
5. Наличие диагноза, или признаков, или симптомов тяжелых, прогрессирующих или неконтролируемых почечных, печеночных, сердечных, сосудистых, легочных, желудочно-кишечных, эндокринных, неврологических, гематологических, ревматологических (за исключением ПсА), психиатрических, мочеполовых или метаболических патологических отклонений. (или, по мнению исследователя, любое другое сопутствующее

заболевание, которое подвергает участника риску при участии в этом исследовании).

- 5 6. Наличие в анамнезе серьезного ишемического события в течение 12 недель после первого приема препарата в рамках исследования.
- 10 7. Наличие в анамнезе лимфопролиферативного заболевания, включая лимфому; наличие в анамнезе моноклональной гаммапатии неопределенного значения; или признаки и симптомы, указывающие на возможное лимфопролиферативное заболевание, такое как лимфаденопатия или спленомегалия.
- 15 9. Наличие в анамнезе или в настоящее время хронического или рецидивирующего инфекционного заболевания, включая, без ограничений, хроническую почечную инфекцию, хроническую легочную инфекцию (например, бронхоэктазию), рецидивирующую инфекцию мочевыводящих путей (рецидивирующий пиелонефрит или хронический неослабевающий цистит), грибковую инфекцию (например, кожно-слизистый кандидоз, за исключением грибковых поражений ногтевого ложа) или открытые дренирующие или инфицированные кожные раны или язвы.
- 20 10. Наличие в анамнезе серьезной инфекции (например, сепсиса, пневмонии или пиелонефрита), госпитализации или введения антибиотиков внутривенно в связи с инфекцией в течение 2 месяцев до первого приема препарата в рамках исследования.
- 25 11. Наличие в анамнезе нетуберкулезной микобактериальной инфекции или клинически значимой оппортунистической инфекции (например, цитомегаловируса, пневмоцистоза, инвазивного аспергиллеза).
- 30 12. Наличие в анамнезе перед проведением скрининга латентной или активной гранулематозной инфекции, включая гистоплазмоз или кокцидиоидомикоз.

13. Наличие в анамнезе инфицирования протеза сустава или применение когда-либо антибиотиков в связи с подозрением на инфекцию протеза сустава в течение 6 месяцев после первого приема препарата в рамках исследования, если этот протез не был удален или заменен.

5

14. Наличие в анамнезе или инфицирование вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ [положительный результат серологического исследования на антитела к ВИЧ]); при наличии положительного результата теста на инфекцию вируса гепатита В (ВГВ); наличие при скрининге антитела к вирусу гепатита С (ВГС).

10

15. В течение 6 недель до исходного уровня наличие (а) подтвержденной инфекции SARS-CoV-2 (положительный тест) (коронавирусная болезнь 2019 [COVID-19]) ИЛИ (b) подозрение на инфекцию SARS-CoV-2 (клиническая признаки без документально подтвержденных результатов тестирования), ИЛИ (с) тесный контакт с человеком с известной или подозреваемой инфекцией SARS-CoV-2.

15

Исключение из этого критерия возможно, если участник имеет документально подтвержденный отрицательный результат валидированного теста на SARS-CoV-2:

20

- (i) Полученный как минимум через 2 недели после состояний (а), (b), (с), указанных выше (время от исчезновения ключевых клинических признаков, если таковые имеются, например, лихорадки, кашля, одышки)

25

И

- (ii) При отсутствии ВСЕХ состояний (а), (b), (с) выше в период между отрицательным результатом теста и визитом исходного уровня в рамках исследования

ПРИМЕЧАНИЯ об исключении, связанном с COVID.

30

- Область тестирования на COVID (на наличие вируса SARS-CoV-2 и иммунитета к нему) быстро развивается. Дополнительное тестирование может быть проведено в рамках скрининга и/или во время исследования, если исследователь сочтет это необходимым и в соответствии с действующими нормативными

актами / руководствами органов власти / стандартами медицинского обслуживания.

- Меры предосторожности: тем, у кого возможен более высокий риск тяжелого заболевания COVID-19, необходимо следовать указаниям местных органов здравоохранения при взвешивании потенциальных преимуществ и рисков участия в исследовании, а также во время участия в исследовании.

5

10

16. Наличие в течение последних 4 месяцев единичной дерматомальной сыпи опоясывающего герпеса. Наличие мультидерматомного опоясывающего герпеса (определяемого как появление поражения за пределами первичного или прилегающего дерматома) или опоясывающая инфекция центральной нервной системы.

15

20

17. Наличие злокачественной опухоли в настоящее время или наличие злокачественной опухоли в анамнезе в пределах 5 лет до проведения скрининга (за исключением немеланомного рака кожи, который был адекватно пролечен без признаков рецидива в пределах по меньшей мере 3 месяцев до получения первой дозы исследуемого препарата, или рака шейки матки *in situ*, который был пролечен без признаков рецидива в пределах по меньшей мере 3 месяцев до первого введения исследуемого препарата).

Примечание: предраковые очаги следует обсудить с медицинским наблюдателем от спонсора.

25

18. Наличие пересаженного органа, включая ТГСК (за исключением трансплантации роговицы >3 месяцев до первого приема препарата в рамках исследования).

19. Известные аллергии, гиперчувствительность или непереносимость гуселькумаба или его вспомогательных веществ.

30

Диагностические оценки

20. Серьезная операция (например, требующая наркоза и госпитализации) в течение 8 недель до скрининга, или неполное

восстановление после такой операции, или такая операция запланирована на время ожидаемого участия в исследовании.

Примечание. К участию допускаются участники с запланированными хирургическими вмешательствами, которые проводятся под местной анестезией.

5

21. Наличие в анамнезе злоупотребления наркотиками или алкоголем в соответствии с критериями Диагностического и статистического руководства по психическим расстройствам (5-е издание) в пределах 1 года до скрининга.

10

Предшествующая/сопутствующая терапия

22. Ранее проводилась терапия исследуемым или одобренным иммуномодулирующим биологическим агентом до первого введения исследуемого препарата, в том числе, помимо прочего:

15

- Терапия следующими препаратами:
 - Терапия ингибиторами ИЛ-23 (включая, помимо прочего, гуселькумаб, рисанкизумаб, тилдракизумаб, бразикумаб, мирикизумаб)
 - Ингибиторы ИЛ-12/23 (устекинумаб)
 - Ингибиторы ИЛ-17 (секукинумаб, иксекизумаб, бродалумаб)
- Терапия в течение 12 недель или 5 периодов полувыведения (в зависимости от того, что дольше):
 - Тоцилизумаб (Актемра)
 - Сирукумаб, сарилумаб, маврилимумаб, абатацепт, белимумаб
 - Ингибитор тирозинкиназы (нинтеданиб)
 - Системный и местный ингибитор Янус-киназы (например, тофацитиниб, упадацитиниб)
- Терапия в течение 1 года или 5 периодов полувыведения (в зависимости от того, что дольше):
 - Ритуксимаб

20

25

30

Примечание. Неперечисленные биологические агенты следует обсудить и согласовать с медицинским наблюдателем, назначенным спонсором.

23. Терапия:

- В течение 6 месяцев после исследуемого лечения:

5

- Любые цитотоксические агенты (циклофосфамид, хлорамбуцил, азотистый иприт или другие алкилирующие агенты)

10

- Внутривенный иммуноглобулин (ВВИГ), аферезная терапия (плазмаферез или лейкоферез)

- В течение 6 недель после первого введения исследуемого препарата:

15

- Системные иммунодепрессанты (включая, помимо прочего, циклоспорин А, азатиоприн, такролимус, сиролимус, сульфасалазин, лефлуномид с вымыванием холестирамина или микофенолата мофетил/микофеноловую кислоту)

- Внутримышечные, внутрисуставные, интрабурсальные, эпидуральные, внутриочаговые или внутривенные глюкокортикоиды

20

Любые вопросы или опасения по поводу использования этих методов лечения следует обсуждать со спонсором исследования и/или медицинским наблюдателем.

Опыт предшествующего/параллельного клинического исследования

24. Введение исследуемого препарата (включая исследуемые вакцины) в течение 3 месяцев или 5 периодов полувыведения (в зависимости от того, что дольше) или использование инвазивного исследуемого медицинского устройства в течение 3 месяцев до запланированного введения первой дозы исследуемого препарата или участие в настоящее время в клиническом исследовании.

25

30

25. Вакцинация бациллой Кальметта-Герена (БЦЖ) в течение 12 месяцев или любой другой живой бактериальной или вирусной вакциной в течение 12 недель после рандомизации.

26. Для женщины — беременность, или грудное вскармливание, или планирование беременности во время участия в данном исследовании или в пределах 12 недель после получения последней дозы исследуемого препарата.

5

27. Для мужчины — планирование зачатия ребенка во время участия в этом исследовании или в пределах 12 недель после получения последней дозы исследуемого препарата.

10

28. Какое-либо состояние, в связи с которым, по мнению исследователя, участие не будет лучшим решением для данного участника (например, ухудшит благополучие) или которое может препятствовать, ограничивать или искажать указанные в протоколе оценки.

15 **Исследуемое лечение**

[00240] Комбинированный продукт, произведенный спонсором и предназначенный для использования в этом исследовании, представляет собой предварительно заполненный шприц (PFS) в сборе с пассивным предохранителем иглы UltraSafe Plus™ (PFS-U).

20

Подготовка/обращение/хранение

[00241] При внутривенном введении готовый препарат гуселькумаб во флаконе (FVP [IV]) поставляется в виде стерильного раствора в одноразовом стеклянном флаконе, содержащем 20 мл в концентрации 10 мг/мл. Исследуемый препарат будет подготовлен для внутривенного введения на основании инструкций, предоставленных клиническим базам IPPI.

25

[00242] Для п/к введения гуселькумаб будет поставляться в виде стерильного раствора с концентрацией 100 мг/мл в одноразовом шприце PFS, собранном в пассивном предохранителе иглы UltraSafe Plus™ (PFS-U). Для п/к введения плацебо, имитирующее гуселькумаб, будет поставляться в виде стерильного раствора объемом 1 мл в одноразовом шприце PFS, собранном в PFS-U.

30

[00243] Гуселькумаб и плацебо, имитирующее гуселькумаб, должны представлять собой прозрачный раствор от бесцветного до светло-желтого цвета, который может содержать небольшие полупрозрачные частицы. Не используйте гуселькумаб или плацебо, если жидкость мутная, изменила цвет или содержит крупные

частицы. Защита от света не требуется во время подготовки и введения материала для исследования, но следует избегать прямого воздействия солнечных лучей. Во время подготовки и введения материала для исследования необходимо использовать асептические методы.

5

Пример 2. Результаты лечения пациентов с ССД.

[00244] В центре лечения системной склеродермии больницы Токийского университета в Токио, Япония, три случая псориаза обыкновенного (psoriasis vulgaris, PsV), осложненного ССД, лечили гуселькумабом, что привело к хорошему терапевтическому эффекту не только в отношении PsV, но и ССД. Во всех случаях PsV заподозрил участковый врач, который направил пациентов на тщательное обследование и лечение. Диагноз PsV у этих пациентов был подтвержден тщательным обследованием, включая патоморфологическое исследование. Кроме того, у этих пациентов наблюдалась склеродермия кожи, распространяющаяся от пальцев до плеча.

10

15 Все случаи были признаны осложненными ССД на основании критериев ACR/EULAR. Время первого появления симптомов ССД, отличных от синдрома Рейно, определяли путем анкетирования для определения продолжительности заболеваемости ССД. При дальнейшем обследовании у всех пациентов при эндоскопии желудочно-кишечного тракта была обнаружена гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ). Кроме того,

20

25 один пациент (случай № 2; таблица 4) имел легкое интерстициальное заболевание легких (ИЗЛ), обнаруженное при КТВР, с прогнозируемой процентной форсированной жизненной емкостью легких (ФЖЕЛ) и диффузионной способностью легких по монооксиду углерода (DLco) 74,7% и 88,1% соответственно. Отсутствие других осложнений, в том числе артрита, легочной гипертензии и почечных кризов,

30

подтверждено ревматологом. После этих системных оценок все пациенты желали пройти лечение биологическими препаратами против PsV. С этой целью 100 мг гуселькумаба (GUS) вводили подкожно на 0-й и 4-й неделях, а затем с 8-недельными интервалами. Во всех случаях единственным лечением, кроме GUS, были местные стероиды. Тяжесть PsV оценивали по индексу площади и тяжести псориаза (PASI), а ССД оценивали по модифицированной шкале общей толщины кожи по Роднану (MRTSS) и комбинированному индексу ответа на ССД (CRISS). Информация о пациентах и клинические данные в начале и через 6 месяцев лечения GUS представлены в таблице 4.

[00245] Во всех случаях лечение GUS привело к PASI = 0 через 6 месяцев лечения. Также наблюдалось улучшение показателей склеродермии кожи при ССД со снижением MRTSS более чем на 6 в каждом случае. CRISS также улучшился во всех случаях. Кроме того, ГЭРБ также улучшилась после введения GUS, а показатель по шкале F, мера тяжести, снизился более чем на 5 баллов. Обострений ИЗЛ за весь период лечения не было. Никаких нежелательных явлений не наблюдалось. Все пациенты предоставили письменное информированное согласие. В настоящем отчете предполагается, что терапия антителами против ИЛ-23 при ССД может быть полезной. Ожидается, что влияние терапии антителами против ИЛ-23 на ССД будет выяснено в будущих крупномасштабных исследованиях.

Таблица 4. Анамнез и клинические данные пациентов.

	Случай № 1	Случай № 2	Случай № 3
Возраст (лет)	67	68	78
Пол	Мужчины	Женщины	Мужской
Продолжительность заболевания (месяцы)			
PsV	17	24	12
ССД	10	15	6
Тип ССД	dcSSc	dcSSc	dcSSc
Профили аутоантител	RNAP	Торо I	CENP
PASI			
Исходный уровень	18	23	14
Через 6 месяцев после начала GUS	0	0	0
MRTSS			
Исходный уровень	20	14	10
Через 6 месяцев после начала GUS	14	6	2
CRISS			
Исходный уровень	0,004	0,004	0,004
Через 6 месяцев после начала GUS	0,55	0,84	0,96
ILD	—	+	—
%ФЖЕЛ (%)			
Исходный уровень	83,4	74,7	106
Через 6 месяцев после начала GUS	82,2	76,7	106
%DLco (%)			

Исходный уровень	85,2	88,1	157
Через 6 месяцев после начала GUS	86,6	90,1	158
ГЭРБ	+	+	+
F-шкала			
Исходный уровень	14	13	7
Через 6 месяцев после начала GUS	6	3	2
Синдром Рейно	+	+	+
Язвы кожи	—	—	—
Артрит	—	—	—
Легочная гипертензия	—	—	—
Лабораторные данные			
Лейк. (/мкл)			
Исходный уровень	8000	6000	4800
Через 6 месяцев после начала GUS	6000	4700	4100
Нб (г/дл)			
Исходный уровень	16,7	11,8	13,2
Через 6 месяцев после начала GUS	15,9	12,3	13,4
Тромб. ($\times 10^4$ /мкл)			
Исходный уровень	43,0	32,5	29,4
Через 6 месяцев после начала GUS	36,2	26,3	28,9
СРБ (мг/дл)			
Исходный уровень	1,12	0,20	0,11
Через 6 месяцев после начала GUS	0,25	0,07	0,04
SP-D (нг/мл)			
Исходный уровень	82,2	57,5	61,7
Через 6 месяцев после начала GUS	75,8	54,8	58,4
KL-6 (Е/мл)			
Исходный уровень	122	348	166
Через 6 месяцев после начала GUS	115	334	137

5 dcSSc — диффузная кожная склеродермия; lcSSc — ограниченная кожная склеродермия; Лейк. — лейкоциты Нб — гемоглобин; Тромб. — тромбоциты; СРР — С-реактивный белок; SP-D — поверхностно-активный белок D; KL-6 — Кревс фон ден Лунген-6; RNAP — антитело против РНК-полимеразы III; Торо I — антитело против топоизомеразы I; CENP — антитело против центромерного белка; «+» — присутствие; «-» — отсутствие.

[00246] Изобретение может быть описано ниже со ссылкой на следующие пронумерованные варианты осуществления:

5 1. Применение антитела, специфичного к ИЛ-23, для лечения системной склеродермии (ССД) у пациента, причем антитело содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, при этом указанная переменная область легкой цепи содержит:

аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области легкой цепи 1 (CDRL1) SEQ ID NO: 4;

10 Аминокислотную последовательность CDRL2 SEQ ID NO: 5; и

аминокислотную последовательность CDRL3 SEQ ID NO: 6,

причем указанная переменная область тяжелой цепи содержит:

аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области тяжелой цепи 1 (CDRH1) SEQ ID NO: 1;

15 Аминокислотную последовательность CDRH2 SEQ ID NO: 2; и

аминокислотную последовательность CDRH3 SEQ ID NO:3, и применение приводит к клиническому ответу у пациента.

20 2. Применение по варианту осуществления 1, в котором антитело вводят в начальной дозе, дозе примерно через 4 недели после начальной дозы и дозе примерно через 8 недель после начальной дозы.

3. Применение по варианту осуществления 2, в котором антитело вводят внутривенно.

25 4. Применение по варианту осуществления 1, в котором начальная доза и дозы примерно через 4 недели после начальной дозы и примерно через 8 недель после начальной дозы составляют 200 мг или 400 мг антитела.

5. Применение по варианту осуществления 4, в котором начальная доза и дозы примерно через 4 недели после начальной дозы и примерно через 8 недель составляют 400 мг антитела.

6. Применение по варианту осуществления 5, в котором антитело вводят подкожно примерно каждые 4 недели после введения дозы примерно через 8 недель после начальной дозы.

5 7. Применение по варианту осуществления 6, в котором подкожная доза составляет 200 мг антитела.

10 8. Применение варианта осуществления 1, в котором у пациента наблюдается положительный клинический ответ на лечение антителом и его идентифицируют как достигшего клинических и/или исследовательских конечных точек, при этом клиническая конечная точка представляет собой изменение по сравнению с исходным уровнем mRSS, ухудшение mRSS, достижение 0,6 балла по Индексу комбинированного ответа Американской коллегии ревматологов при dcSSc (ACR CRISS), изменение по сравнению с исходным уровнем форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ) и процент прогнозируемой ФЖЕЛ, изменение по сравнению с исходным уровнем измеренной абсолютной диффузионной способности легких по монооксиду углерода (DLCO) и полученного процента прогнозируемого DLCO, изменение по сравнению с исходным уровнем количества язв на пальцах у пациента, изменение по сравнению с исходным уровнем показателя по опроснику оценки здоровья и функционального индекса нарушения жизнедеятельности (HAQ-DI), изменение по сравнению с исходным уровнем показателя по шкале частоты симптомов гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ); изменение фиброзных изменений, оцененных с помощью компьютерной томографии высокого разрешения (КТВР), и ухудшение фиброзных изменений по сравнению с исходным уровнем; изменение оценки капилляроскопии, совокупной оценки пациента (PGA) и/или совокупной оценки врача (PhGA) по сравнению с исходным уровнем.

15

20

25 9. Применение по варианту осуществления 8, где клиническую(-ие) конечную(-ые) точку(и) измеряют примерно через 24, 52 и/или 104 недели после начального лечения.

30 10. Применение по варианту осуществления 9, в котором клиническую конечную (-ые) точку (-и) измеряют примерно через 24 недель после первоначального лечения.

11. Применение по варианту осуществления изобретения 1, в котором антитело содержит аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 8 и аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 7.

5 12. Применение по варианту осуществления изобретения 1, в котором антитело содержит аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 10 и аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 9.

10 13. Применение по варианту осуществления изобретения 11 или 12, в котором антитело находится в композиции, содержащей 7,9% (масс./об.) сахарозы, 4,0 мМ гистидина, 6,9 мМ моногидрата моногидрохлорида L-гистидина; 0,053% (масс./об.) полисорбата 80 в фармацевтической композиции; причем разбавитель представляет собой воду в стандартном состоянии.

15 14. Применение по варианту осуществления 1, дополнительно включающее применение одного или более дополнительных лекарственных средств, применяемых для лечения ССД.

20 15. Применение по варианту осуществления 14, в котором дополнительное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из: иммуносупрессорных агентов, нестероидных противовоспалительных средств (НПВС), метотрексата (MTX), антител к поверхностному маркеру В-клеток, антител к CD20, ритуксимаба, ингибиторов ФНО, кортикостероидов и костимулирующих модификаторов.

25 16. Применение антитела, специфичного к ИЛ23, для лечения умеренной и тяжелой активной склеродермии у пациента в (i) начальной внутривенной дозе 400 мг, (ii) внутривенной дозе антитела 400 мг примерно через 4 недели после начальной дозы, (iii) внутривенной дозе антитела 400 мг примерно через 8 недель после начальной дозы, и (iv) подкожной дозе антитела 200 мг примерно каждые 4 недели после внутривенного введения примерно через 8 недель после начальной дозы, при этом антитело содержит аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 8 и аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 7, и при этом у пациента наблюдается ответ на антитело, поскольку его идентифицируют как достигшего клинической конечной точки примерно через 24
30 недели после начальной дозы, причем клинической конечной точкой является

изменение по сравнению с исходным уровнем модифицированной оценки состояния кожи по Роднану (mRSS).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения системной склеродермии у пациента, включающий введение пациенту антитела, специфичного к ИЛ-23, причем антитело содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, при этом указанная переменная область легкой цепи содержит:
- аминокислотную последовательность определяющей комплементарности области легкой цепи 1 (CDRL1) SEQ ID NO: 4;
- Аминокислотную последовательность CDRL2 SEQ ID NO: 5; и
- 10 аминокислотную последовательность CDRL3 SEQ ID NO: 6, причем указанная переменная область тяжелой цепи содержит:
- аминокислотную последовательность определяющей комплементарности области тяжелой цепи 1 (CDRH1) SEQ ID NO: 1;
- Аминокислотную последовательность CDRH2 SEQ ID NO: 2; и
- 15 аминокислотную последовательность CDRH3 SEQ ID NO:3, и причем считается, что пациент ответил на лечение антителом, причем у пациента наблюдается ответ на антитело.
2. Способ по п. 1, в котором антитело вводят в начальной дозе, дозе примерно через 4 недели после начальной дозы и дозе примерно через 8 недель после начальной дозы.
- 20 3. Способ по п. 2, в котором начальная доза и дозы примерно через 4 недели после начальной дозы и примерно через 8 недель после начальной дозы составляют примерно 200 мг или примерно 400 мг антитела.
4. Способ по п. 3, в котором антитело вводят внутривенно в начальной дозе, дозе примерно через 4 недели после начальной дозы и дозе примерно через 8 недель после начальной дозы.
- 25 5. Способ по п. 4, дополнительно включающий введение поддерживающей дозы антитела примерно каждые 4 недели после введения дозы примерно через 8 недель после начальной дозы.

6. Способ по п. 5, в котором поддерживающая доза составляет около 200 мг антитела и вводится подкожно.

7. Способ по п. 1, в котором пациент продемонстрировал ответ на лечение антителом, поскольку его состояние соответствует клинической конечной точке.

5 8. Способ по п. 7, в котором клинической конечной точкой является изменение по сравнению с исходным уровнем модифицированной оценки состояния кожи по Роднану (mRSS).

9. Способ по п. 8, в котором клиническую конечную точку измеряют через примерно 24 недель после введения начальной дозы.

10 10. Способ по п. 7, в котором клиническая конечная точка выбрана из группы, состоящей из: изменения mRSS от исходного уровня, ухудшения mRSS, достижения показателя 0,6 по индексу комбинированного ответа Американской коллегии ревматологов при dcSSc (ACR CRIS), изменение от исходного уровня форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ) и прогнозируемого процента ФЖЕЛ, изменение от
15 исходного уровня измеренной абсолютной диффузионной способности легких по монооксиду углерода (DLCO) и полученного процента прогнозируемого DLCO, изменение от исходного уровня числа язв на пальцах у пациента, изменение от исходного уровня показателя по опроснику для оценки здоровья и функционального индекса нарушения жизнедеятельности (HAQ-DI).

20 11. Способ по п. 10, в котором клиническую(-ие) конечную(-ые) точку(и) измеряют примерно через 24 недели, 52 недель и/или 104 недели после начального лечения.

12. Способ по п. 11, в котором клиническую(-ие) конечную(-ые) точку(и) измеряют через примерно 24 недель после начала лечения.

25 13. Способ по п. 1, в котором антитело содержит аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 8 и аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 7.

14. Способ по п. 1, в котором антитело содержит аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 10 и аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 9.

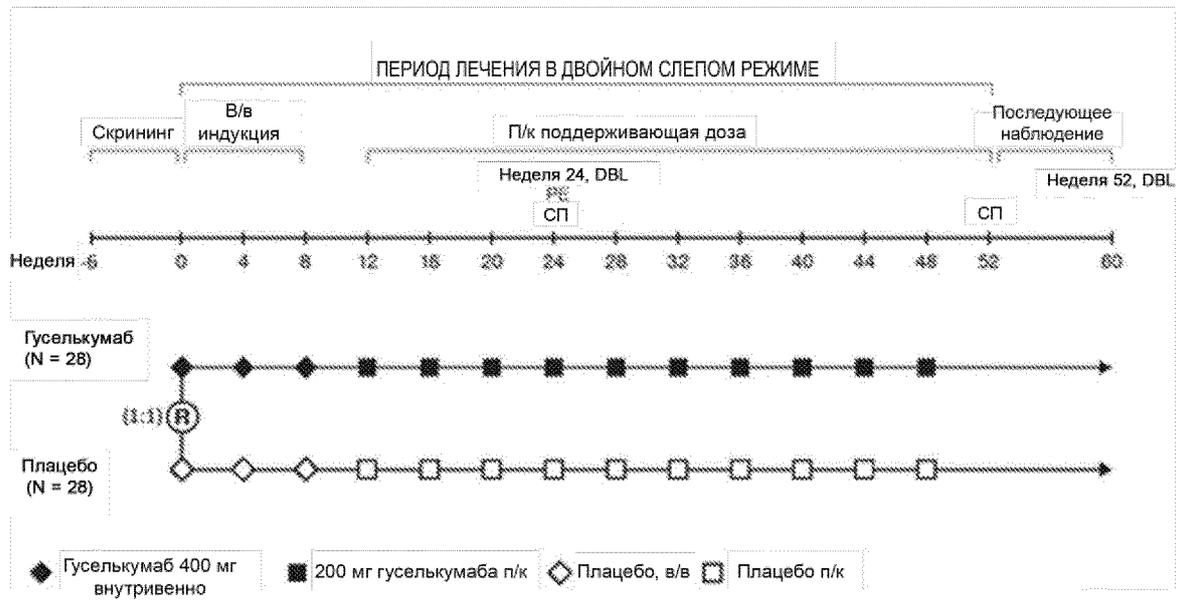
5 15. Способ по п. 13 или 14, в котором антитело находится в композиции, содержащей 7,9% (масс./об.) сахарозы, 4,0 мМ гистидина, 6,9 мМ моногидрата моногидрохлорида L-гистидина; 0,053% (масс./об.) полисорбата 80 в фармацевтической композиции; причем разбавитель представляет собой воду в стандартном состоянии.

16. Способ по п. 1, дополнительно включающий введение пациенту одного или более дополнительных лекарственных средств, применяемых для лечения ССД.

10 17. Способ по п. 16, в котором дополнительное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из: иммуносупрессорных агентов, нестероидных противовоспалительных средств (НПВС), метотрексата (MTX), антител к поверхностному маркеру В-клеток, антител к CD20, ритуксимаба, ингибиторов ФНО, кортикостероидов и костимулирующих модификаторов.

15 18. Способ лечения ССД у пациента, включающий введение пациенту (i) начальной внутривенной дозы 400 мг антитела, специфичного к ИЛ23, (ii) внутривенной дозы антитела 400 мг примерно через 4 недели после начальной дозы, (iii) внутривенной дозы антитела 400 мг примерно через 8 недель после начальной дозы и (iv) подкожной дозы антитела 200 мг примерно каждые 4 недели после введения дозы
20 примерно через 8 недель после начальной дозы, при этом антитело содержит аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 8 и аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 7, и при этом у пациента наблюдается ответ на антитело, поскольку его идентифицируют как достигшего клинической конечной точки примерно через 24
25 недели после начальной дозы, причем клинической конечной точкой является изменение по сравнению с исходным уровнем модифицированной оценки состояния кожи по Роднану (mRSS).

ФИГ. 1



ФИГ. 2

