

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201591133 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2015.10.30

(22) Дата подачи заявки
2013.12.09

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

(54) СОСТАВЫ В ВИДЕ РАСТВОРА СКОНСТРУИРОВАННЫХ АНТИТЕЛ К IL-23p19

(31) 61/737,035

(32) 2012.12.13

(33) US

(86) PCT/US2013/073825

(87) WO 2014/093203 2014.06.19

(71) Заявитель:
МЭРК ШАРП ЭНД ДОМЕ КОРП.
(US)

(72) Изобретатель:
Каши Рамеш С., Бадкар Аникет (US)

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(57) Изобретение предусматривает составы в виде высококонцентрированного раствора антитела hum13B8-b к интерлейкину-23 p19 (IL-23p19) человека и их применение при лечении различных заболеваний.

A1

201591133

201591133

A1

P12961809EA

СОСТАВЫ В ВИДЕ РАСТВОРА СКОНСТРУИРОВАННЫХ АНТИТЕЛ К IL-23p19

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0001] Настоящее изобретение в целом относится к составам в виде высококонцентрированного раствора терапевтических антител и их применению при лечении различных нарушений.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Интерлейкин-23 (IL-23) представляет собой гетеродимерный цитокин, состоящий из двух субъединиц: p19, которая присуща только IL-23, и p40, которая является общей с интерлейкином-12 (IL-12). Субъединица p19 структурно близка с IL-6, гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (G-CSF), и субъединицей p35 IL-12. IL-23 опосредует передачу сигнала путем связывания с гетеродимерным рецептором, содержащим две субъединицы: IL-23R, присущую только рецептору IL-23, и IL-12R β 1, которая является общей с рецептором IL-12. В ряде ранних исследований было продемонстрировано, что последствия генетически обусловленной недостаточности p40 (мышь, нокаутная по p40; p40КО-мышь) были более серьезными, чем наблюдаемые при недостаточности p35, например, у p35КО-мыши. Эти результаты впоследствии были объяснены открытием IL-23 и пониманием того, что p40КО препятствует экспрессии не только IL-12, но также IL-23. См., например, Oppmann *et al.* (2000) *Immunity* 13:715-725; Wiekowski *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166:7563-7570; Parham *et al.* (2002) *J. Immunol.* 168:5699-708; Frucht (2002) *Sci STKE* 2002, E1-E3; Elkins *et al.* (2002) *Infection Immunity* 70:1936-1948).

[0003] Недавние исследования, проводимые с использованием p40КО-мышей, показали, что блокирование как IL-23, так и IL-12 является

эффективным средством лечения различных воспалительных и аутоиммунных нарушений. Однако, блокирование IL-12 посредством p40, как оказалось, приводит к нежелательным системным последствиям, таким как повышенная восприимчивость к инфекциям, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, или повышенному риску развития опухолей. Bowman *et al.* (2006) *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19:245; Langowski *et al.* (2006) *Nature* 442:461. Соответственно, специфичное блокирование субъединицы p19 из IL-23 является предпочтительным при лечении заболеваний человека, потому что оно противодействует патогенной воспалительной активности IL-23, не нарушая полезной активности IL-12, *например*, в борьбе с инфекциями и при иммунологическом надзоре.

[0004] Терапевтические антитела можно применять для блокирования активности цитокинов. Существенным ограничением в применении антител в качестве терапевтического средства *in vivo* является иммуногенность антител. В случае моноклональных антител, полученных от видов, отличных от человека, многократное применение у людей приводит к выработке иммунного ответа против терапевтического антитела. Такой иммунный ответ, как минимум, ведет к потере терапевтической эффективности и, теоретически, к смертельному ответу в виде анафилактического шока. Соответственно, антитела с пониженной иммуногенностью для человека, такие как гуманизированные или полностью человеческие антитела, являются предпочтительными при лечении субъектов-людей. Иллюстративные терапевтические антитела к IL-23p19 раскрыты в публикации заявки на патент США № 2007/0009526, а также в международных патентных публикациях №№ WO 2007/076524, WO 2007/024846, WO 2007/147019 и WO 2009/043933, раскрытия которых этим включены посредством ссылки в их полноте. Дополнительные гуманизированные антитела к IL-23p19 раскрыты в заявках, принадлежащих тому же правообладателю, опубликованных как международные патентные публикации №№ WO 2008/103432 и WO 2008/103473, и в заявке на патент США № 2007/0048315, принадлежащей тому же правообладателю, раскрытия которых этим включены посредством ссылки в их полноте.

[0005] Антитела-лекарственные средства для применения у людей могут несколько отличаться аминокислотной последовательностью их константных доменов или последовательностям их каркасных участков в пределах переменных доменов, но они, как правило, наиболее существенно отличаются последовательностями CDR. Даже антитела, связывающиеся с тем же белком, тем же полипептидом, или даже, теоретически, с тем же эпитопом, могут содержать совершенно разные последовательности CDR. Терапевтические антитела для применения у людей также могут быть получены из последовательности антитела зародышевой линии человека или из последовательностей антител зародышевого линии животного, отличного от человека (*например*, грызуна), таких как в гуманизированных антителах, что ведет к еще большему разнообразию потенциальных последовательностей CDR. Эти различия в последовательностях приводят к различной стабильности в растворе и различной восприимчивости к параметрам раствора. Кроме того, небольшие изменения в расположении аминокислот или изменения одного или нескольких аминокислотных остатков могут привести к существенно отличающейся стабильности антител и подверженности путям деградации, обусловленным последовательностью. Как следствие, в настоящее время не представляется возможным прогнозировать условия раствора, необходимые для оптимизации стабильности антитела. Каждое антитело должно быть изучено по отдельности для определения оптимального состава в виде раствора. Bhambhani *et al.* (2012) *J. Pharm. Sci.* 101:1120.

[0006] Кроме того, антитела представляют собой белки с относительно большой молекулярной массой (приблизительно 150000 Да), например, по сравнению с другими терапевтическими белками, такими как гормоны и цитокины. Как следствие, для достижения требуемых молярных концентраций лекарственного средства зачастую необходимо вводить дозы с относительно высокими весовыми количествами антител-лекарственных средств. Кроме того, зачастую желательно вводить антитела-лекарственные средства подкожно, так как это делает возможным самостоятельное введение. Самостоятельное введение позволяет избегать затрат времени и средств, связанных с визитом в медицинское учреждение для введения, *например*, внутривенно. Доставка при подкожном

введении ограничена объемом раствора, который на практике может быть доставлен в место инъекции в виде однократной инъекции, которая обычно составляет от приблизительно 1 до 1,5 мл. Самостоятельное подкожное введение обычно осуществляется с применением предварительно наполненного шприца или автоинжектора, наполненного жидким составом лекарственного средства в виде раствора, а не в лиофилизированной форме, чтобы исключить для пациента необходимость ресуспендировать лекарственное средство перед инъекцией. Для доставки более высоких доз лекарственного средства такое ограничение объема выдвигает на первый план разработку составов в виде высококонцентрированного раствора. Однако такие высокие концентрации антител проявляют эффекты макромолекулярного сгущения и увеличение белок-белковых взаимодействий, приводящих к физической неустойчивости, такой как опалесценция, самоассоциация, агрегация, разворачивание и разделение фаз. Такие высококонцентрированные растворы антител также могут проявлять высокую вязкость (*например*, больше 10 сантипуаз), что снижает проходимость через иглу в предварительно наполненных шприцах и автоинжекторных устройствах. Антитела-лекарственные средства должны оставаться стабильными во время хранения для обеспечения эффективности и однородности дозирования, поэтому очень важно, чтобы любой выбранный состав поддерживал требуемые свойства, такие как высокая концентрация, прозрачность и приемлемая вязкость, и также сохранял эти свойства и эффективность лекарственного средства в течение приемлемо длительного срока хранения при обычных условиях хранения.

[0007] Как следствие, существует потребность в стабильных составах в виде высококонцентрированного раствора терапевтических антител, таких как антитела, которые связываются с IL-23p19 человека. Такие стабильные составы в виде раствора предпочтительно будут проявлять стабильность в течение от нескольких месяцев до нескольких лет при условиях, типичных для хранения лекарственных средств для самостоятельного введения, *т.е.* при температуре холодильника в шприце, что приводит к длительному сроку хранения соответствующего готового лекарственного средства. Такие стабильные составы

в виде высококонцентрированного раствора могут обеспечить возможность фасовки антитела-лекарственного средства для высококонцентрированной подкожной инъекции, вводимой самостоятельным введением.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] Настоящее изобретение предусматривает составы в виде высококонцентрированного раствора гуманизированного антитела 13B8-b к IL-23p19 («hum13B8-b»). Антитело hum13B8-b состоит из двух идентичных легких цепей с последовательностью SEQ ID NO: 2 и двух идентичных тяжелых цепей с последовательностью SEQ ID NO: 1.

[0009] В одном варианте осуществления состав в виде раствора содержит гуманизированное антитело hum13B8-b к IL-23p19, гистидиновый буфер с pH 6,0 ($\pm 0,3$), сахарозу и полисорбат 80. В другом варианте осуществления состав в виде раствора содержит гуманизированное антитело 13B8-b к IL-23p19, приблизительно 10 мМ гистидинового буфера с pH 6,0 ($\pm 0,3$), приблизительно 7% сахарозы и приблизительно 0,05% полисорбата 80. В следующем варианте осуществления состав в виде раствора содержит гуманизированное антитело 13B8-b к IL-23p19, 10 мМ гистидинового буфера с pH 6,0 ($\pm 0,3$), 7% сахарозы и 0,05% полисорбата 80.

[0010] В различных вариантах осуществления составы в виде раствора по настоящему изобретению содержат по меньшей мере 50, 80, 90, 100, 110 или 120 мг/мл антитела hum13B8-b. В других вариантах осуществления составы в виде раствора по настоящему изобретению содержат приблизительно 80-120 мг/мл антитела hum13B8-b, 80-120 мг/мл антитела hum13B8-b, приблизительно 100 мг/мл антитела hum13B8-b и 100 мг/мл антитела hum13B8-b.

[0011] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения с применением составов в виде высококонцентрированного раствора антитела hum13B8-b к IL-23p19 по настоящему изобретению для лечения нарушений, в том числе без ограничения воспалительного заболевания,

аутоиммунного заболевания, пролиферативных нарушений, рака, инфекционного заболевания (*например*, бактериальной, микобактериальной, вирусной или грибковой инфекции, в том числе хронических инфекций), артрита, псориаза, псориатического артрита, энтезита, анкилозирующего спондилита, воспалительного заболевания кишечника, в том числе болезни Крона и язвенного колита, рассеянного склероза, увеита, реакции «трансплантат против хозяина», системной красной волчанки и диабета. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к составам в виде высококонцентрированного раствора антитела hum13B8-b к IL-23p19 для применения при лечении этих же нарушений. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению составов в виде высококонцентрированного раствора антитела hum13B8-b к IL-23p19 при производстве лекарственного препарата для применения при лечении этих же нарушений.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0012] На фиг. 1 представлены данные, применяемые для определения оптимального буфера и условий pH для составов, содержащих hum13B8-b. На фиг. 1A представлена температура разворачивания, определенная с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), и чистота в процентах, измеренная с помощью RP-HPLC, для различных составов антитела с концентрацией 1 мг/мл, и на фиг. 1B представлены мономер в процентах и пики позднего элюирования в процентах, измеренные с помощью HP-SEC, в зависимости от pH для нескольких различных буферов (ацетатный, цитратный, фосфатный и Tris). Краткие обсуждения DSC и HP-SEC предоставлены в примерах 2 и 3, соответственно.

[0013] На фиг. 1C - 1E представлены различные свойства составов с 10 mM цитрата в зависимости от pH, в том числе опалесценция (OD_{350}), распределение гидродинамического размера (нм), измеренное с помощью динамического светорассеяния (DLS), и температура плавления, определенная с помощью DSC,

соответственно. Краткие обсуждения DLS и DSC предоставлены в примерах 4 и 2, соответственно.

[0014] На фиг. 1F и 1G представлены процентная доля пиков позднего элюирования и процентная доля главного пика, соответственно, с течением времени, определенные с помощью высокоэффективной ионообменной хроматографии (HP-IEX). Краткое обсуждение HP-IEX предоставлено в примере 5.

[0015] На фиг. 1H и 1I представлены опалесценция (OD_{350}) и гидродинамический размер (нм), измеренный с помощью динамического светорассеяния (DLS), соответственно, для составов с низкой концентрацией антитела (1 мг/мл) в нескольких буферах при различных pH, тогда как на фиг. 1J представлено распределение гидродинамического размера (нм) для составов с большей концентрацией антител (50 и 100 мг/мл), определенное с помощью DLS. Краткое обсуждение DLS предоставлено в примере 4.

[0016] На фиг. 1K представлена процентная доля пиков позднего элюирования в различных буферах при различных pH с течением времени, определенных с помощью HP-SEC. Краткое обсуждение HP-SEC предоставлено в примере 3.

[0017] На фиг. 2A и 2B представлена температура разворачивания, определенная с помощью DSC, а также изменения в опалесценции, соответственно, для составов с hum13B8-b, содержащих различные наполнители (100 mM NaCl, 7% сахарозы, 7% трегалозы и 6% маннита). DS обозначено лекарственное вещество. Краткое обсуждение DSC предоставлено в примере 2.

[0018] На фиг. 3A и 3B представлено антитело в процентах и пики раннего элюирования в процентах, определенные с помощью HP-SEC, соответственно, и на фиг. 3C представлена опалесценция до и после пяти дней встряхивания в зависимости от присутствия или отсутствия поверхностно-активного вещества (0,05% полисорбата 20, 0,05% полисорбата 80 или Pluronic F-68). Значение после

5 дней встряхивания для образца без поверхностно-активного вещества (NS) на самом деле превышает 3, и, таким образом, сильно выходит за шкалу. Краткое обсуждение HP-SEC предоставлено в примере 3.

[0019] На фиг. 4 представлена стабильность составов антитела с ацетатом и гистидином, содержащих 10 мМ буфера, 7% сахарозы и 0,05% полисорбата 80 при хранении в различных условиях. Образцы хранили в виде образцов по 1,5 мл в стеклянных флаконах на 2,0 мл. На фиг. 4А представлена стабильность препаратов антитела с концентрацией 50 и 100 мг/мл, исходя из процентной доли мономерного антитела, измеренной с помощью HP-SEC, при хранении при 5°C (относительная влажность окружающей среды) или при условиях RH4 (40°C, относительная влажность 75%). Краткое обсуждение HP-SEC предоставлено в примере 3.

[0020] Фиг. 4В - 4D представляют собой графики содержания мономера в процентах, HMW-соединения и LMW-соединения, соответственно, определенных с помощью HP-SEC, при различных условиях хранения, "25Н" обозначает хранение при 25°C, относительной влажности 60%. Обратите внимание, что ординаты (оси времени) на фиг. 4В - 4D не подчинены линейной функции. Краткое обсуждение HP-SEC предоставлено в примере 3.

[0021] Фиг. 4Е и 4F представляют собой графики результатов экспериментов HP-IEХ, которые отслеживают стабильность антител путем измерения процентных долей главного пика и кислотных вариантов, соответственно. Краткое обсуждение HP-IEХ предоставлено в примере 5.

[0022] Фиг. 4G - 4I представляют собой графики опалесценции после хранения при 5°C, 25°C (25Н) и 40°C (RH4), соответственно. На фиг. 4J и 4K представлено окисление, измеренное с помощью пептидного картирования, после хранения при RH4 (40°C, относительная влажность 75%) и 5°C, и при 40°C и 5°C, соответственно. Краткое обсуждение пептидного картирования предоставлено в примере 6.

[0023] Фиг. 4L и 4M представляют собой графики разворачивания на основании экспериментов DSC с составами с ацетатом и гистидином, соответственно, для исходных образцов и образцов, хранившихся 4,5 месяца при 5°C или условиях RH4. Краткое обсуждение DSC предоставлено в примере 2.

[0024] Стабильность составов с 10 mM ацетатом и 10 mM гистидином измеряли как содержание мономера в процентах и как содержание высокомолекулярного соединения в процентах, измеренное с помощью HP-SEC. Стабильность измеряли для образцов, хранившихся при 5°C ($\pm 3^\circ\text{C}$), 25H (25°C, относительная влажность 60%) или RH4 (40°C, относительная влажность 75%). Результаты представлены на фиг. 4A и 4B. Краткое обсуждение HP-SEC предоставлено в примере 3.

[0025] На фиг. 5 представлены данные о стабильности составов с антителом по настоящему изобретению при хранении в виде лекарственного вещества в контейнерах Celsius® Pak со слоем, контактирующим с жидкостью, из этилен-винил-ацетата (EVA) на 30 мл. Данные представлены для составов, содержащих 10 mM гистидинового буфера (pH 6,0), 7% сахарозы, 0,05% полисорбата 80 и антитело hum13B8-b. Фиг. 5A - 5C представляют собой графики концентрации белка, биологической активности (измеренной с помощью функционального анализа на клетках) и биологической активности (измеренной с помощью ELISA), соответственно, для трех различных препаратов hum13B8-b (партии A, B и C). Краткие обсуждения определения концентрации белка, функциональных анализов на клетках и ELISA предоставлены в примерах 7, 8 и 9, соответственно.

[0026] Фиг. 5D - 5G представляют собой графики результатов экспериментов HP-IEX, которые отслеживают стабильность антитела путем измерения процентных долей кислотных вариантов, главного пика, следующего за главным пиком соединения и основных вариантов, соответственно. Краткое обсуждение HP-IEX предоставлено в примере 5.

[0027] На фиг. 5H представлен мономер в процентах, измеренный с помощью HP-SEC. Краткое обсуждение HP-SEC предоставлено в примере 3.

[0028] На фиг. 5I и 5J представлена чистота при измерении главного пика в процентах с помощью невосстанавливающего CE-SDS или тяжелых и легких цепей в процентах с помощью восстанавливающего CE-SDS, соответственно. Краткое обсуждение CE-SDS предоставлено в примере 10.

[0029] 5K и 5L представлены HMW- и LMW-соединения в процентах, соответственно, определенные с помощью HP-SEC. Краткое обсуждение HP-SEC предоставлено в примере 3.

[0030] На фиг. 6 представлены дополнительные данные о стабильности составов с антителом по настоящему изобретению (партии антитела А и В) при хранении в виде лекарственного вещества в контейнерах Celsius® Pak со слоем, контактирующим с жидкостью, из этилен-винил-ацетата (EVA) на 30 мл. Данные представлены для составов, содержащих 10 мМ гистидинового буфера (pH 6,0), 7% сахарозы, 0,05% полисорбата 80 и антитело hum13B8-b. Фиг. 6А и 6В представляют собой графики биологической активности, измеренной с помощью ELISA и измеренной с помощью функционального анализа на клетках, соответственно. Краткие обсуждения ELISA и функционального анализа на клетках предоставлены в примерах 9 и 8, соответственно.

[0031] Фиг. 6С - 6Е представляют собой графики содержания мономера в процентах, HMW-соединения и LMW-соединения, соответственно, определенного с помощью HP-SEC при различных условиях хранения. Краткое обсуждение HP-SEC предоставлено в примере 3.

[0032] На фиг. 6F и 6G представлена чистота при измерении главного пика в процентах с помощью невосстанавливающего CE-SDS или тяжелых и легких цепей в процентах с помощью восстанавливающего CE-SDS, соответственно. Краткое обсуждение CE-SDS предоставлено в примере 10.

[0033] Фиг. 6Н - 6К представляют собой графики с результатами экспериментов HP-IEХ, которые отслеживают стабильность антитела путем измерения процентных долей кислотных вариантов, главного пика, следующего за главным пиком соединения и основных вариантов, соответственно. Краткое обсуждение HP-IEХ предоставлено в примере 5.

[0034] На фиг. 7 представлены данные о стабильности составов с антителом по настоящему изобретению при хранении при 5°C (3°C) в виде готовой лекарственной формы в единичных дозах в предварительно наполненных шприцах, при концентрации антитела 100 мг/мл и объеме заполнения 1,0 мл. Фиг. 7А представляет собой график концентрации белка для четырех различных препаратов hum13В8-b (партии D, E, F, G и H), определенной с помощью поглощения УФ. Краткое обсуждение определения концентрации белка предоставлено в примере 7.

[0035] Фиг. 7В и 7С представляют собой графики биологической активности, измеренной с помощью функционального анализа на клетках и измеренной с помощью ELISA, соответственно, у четырех различных препаратов hum13В8-b (партии E, F, G и H). Краткие обсуждения функционального анализа на клетках и ELISA предоставлены в примерах 8 и 9, соответственно.

[0036] Фиг. 7D - 7F представляют собой графики содержания НМW-соединения, мономера и LMW-соединения в процентах, соответственно, определенного с помощью HP-SEC. Краткое обсуждение HP-SEC предоставлено в примере 3.

[0037] Фиг. 7G - 7J представляют собой графики результатов экспериментов HP-IEХ, которые отслеживают стабильность антитела путем измерения процентной доли главного пика, кислотных вариантов, основных вариантов и следующего за главным пиком соединения, соответственно. Краткое обсуждение HP-IEХ предоставлено в примере 5.

[0038] На фиг. 7K и 7L представлена чистота при измерении главного пика в процентах с помощью невосстанавливающего CE-SDS или тяжелых и легких цепей в процентах с помощью восстанавливающего CE-SDS, соответственно. Краткое обсуждение CE-SDS предоставлено в примере 10.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0039] Применяемые в данном документе, в том числе в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа слов включают соответствующие ссылки на их множественное число, если из контекста явно не следует иное. В таблице 10 ниже приведен перечень идентификаторов последовательности, применяемых в данной заявке. Если не указано иное, белки и субъекты, которые упоминаются в данном документе, представляют собой белки человека и субъектов-людей, а не другого вида. Применяемое в данном документе «на фиг. X» обозначает все индивидуальные фигуры XA - XZ в совокупности.

[0040] Все ссылки, приведенные в данном документе, включены посредством ссылки в том же объеме, как если бы каждая отдельная публикация, запись базы данных (*например*, последовательности GenBank или записи GeneID), патентная заявка или патент были конкретно и индивидуально отмечены, как включенные посредством ссылки. Цитирование ссылок в данном документе не предназначено для признания того, что ссылка представляет собой соответствующий прототип, и не считается каким-либо признанием, касающимся содержания или даты этих публикаций или документов.

I. Определения

[0041] «Пролиферативная активность» охватывает активность, которая способствует, т.е. необходима для, или которая специфически связана, *например*, с нормальным делением клеток, а также раком, опухолями, дисплазией, трансформацией клеток, метастазированием и ангиогенезом.

[0042] Применяемое в данном документе выражение «гипервариабельный участок» относится к аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за связывание с антигеном. Гипервариабельный участок содержит аминокислотные остатки из «определяющих комплементарность участков» или «CDR» (*например*, остатки 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) и 89-97 (CDRL3) в вариабельном домене легкой цепи и остатков 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) и 95-102 (CDRH3) в вариабельном домене тяжелой цепи (Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) и/или такие остатки из «гипервариабельной петли» (*т.е.* остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи (Chothia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917)). Применяемое в данном документе выражение остатки «каркасного участка» или «FR»-остатки относится к остаткам вариабельного домена, отличным от остатков гипервариабельного участка, определенных в данном документе как CDR-остатки. Нумерация вышеупомянутых остатков относится к системе нумерации Кабат и не обязательно точно соответствует нумерации последовательности в сопутствующем перечне последовательностей.

[0043] «Иммунное состояние» или «иммунное нарушение» охватывает, *например*, патологическое воспаление, воспалительное нарушение и аутоиммунное нарушение или заболевание. «Иммунное состояние» также относится к инфекциям, стойким инфекциям и пролиферативным состояниям, таким как рак, опухоли и ангиогенез, в том числе инфекциям, опухолям и видам рака, которые устойчивы к уничтожению иммунной системой. «Раковое состояние» включает, *например*, рак, раковые клетки, опухоли, ангиогенез и предраковые состояния, такие как дисплазия.

[0044] «Воспалительное нарушение» означает нарушение или патологическое состояние, при котором к патологии приводит, в целом или частично, *например*, изменение числа, изменение скорости миграции или изменение активации клеток иммунной системы. Клетки иммунной системы

включают, *например*, Т-клетки, В-клетки, моноциты или макрофаги, антиген-представляющие клетки (APC), дендритные клетки, микроглию, NK-клетки, NKT-клетки, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки или любую другую клетку, специфически связанную с иммунологическими процессами, *например*, цитокин-продуцирующие эндотелиальные или эпителиальные клетки.

[0045] Применяемые в данном документе концентрации должны быть истолкованы как приблизительные в пределах диапазонов, обычно связанных с такими концентрациями при производстве фармацевтических составов. В частности, концентрации не обязательно должны быть точными, но могут отличаться от заявленных концентраций в пределах допустимых отклонений, как правило, предполагаемых для лекарственных средств, изготовленных в соответствии с GMP. Аналогично, значения pH являются приблизительными в пределах допустимых отклонений, как правило, предполагаемых для лекарственных средств, изготовленных в соответствии с GMP и хранящихся при обычных условиях хранения. Например, составы с гистидином по настоящему изобретению упоминаются, как характеризующиеся pH 6,0, но, как правило, допустимое отклонение составляет pH 6,0 ($\pm 0,3$). Если не указано иное, процентные концентрации представляют собой весовые концентрации.

II. Составы в виде высококонцентрированного раствора антитела

[0046] Типичные терапевтические моноклональные антитела состоят из четырех полипептидов: двух легких цепей (*например*, длиной в 214 аминокислот) и двух тяжелых цепей (*например*, длиной в 446 аминокислот). Каждая цепь, в свою очередь, состоит из вариабельного домена и константного домена. Вариабельные домены антитела hum13B8-b к IL-23p19 состоят из 108 и 116 аминокислот легких и тяжелых цепей, соответственно, а константные домены состоят из 106 и 330 аминокислот. Специфичность антитела относительно своей мишени в значительной степени определяется последовательностями, входящими в так называемые «гипервариабельные» или «определяющие комплементарность» участки (CDR), по три из которых находятся в

вариабельных доменах каждой из тяжелых и легких цепей. CDR могут отличаться по длине у различных антител, но в hum13B8-b CDR состоят из 44 аминокислот в тяжелых цепях и 27 аминокислот в легкой цепи. CDR-остатки являются высоко вариабельными в различных антителах и могут происходить из последовательностей зародышевой линии человека (в случае полностью человеческих антител), или последовательностей зародышевой линии животного, отличного от человека (*например*, грызуна). Каркасные участки также могут существенно отличаться у различных антител. Константные участки будут отличаться в зависимости от того, имеет ли выбранное антитело лямбда (λ)- или каппа (κ)-легкую цепь и в зависимости от класса (или изотипа) (IgA, IgD, IgE, IgG или IgM) и подкласса (*например*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) антитела. Общая масса молекулы антитела составляет приблизительно 150000 Да, она состоит из приблизительно 650 аминокислот, 224 из которых находятся в вариабельных доменах, в том числе 71 аминокислота в «гипервариабельных» участках, с константными доменами, варьирующими в зависимости от класса, подклассе, и константными доменами легкой цепи.

[0047] Антитело по настоящему изобретению (mAb hum13B8-b к IL-23p19) также отличается от многих недавно разработанных терапевтических антител тем, что является гуманизированным, а не полностью человеческим. Как следствие, последовательности CDR получены из последовательностей зародышевой линии животного, отличного от человека (в данном случае, мыши), а не последовательностей зародышевой линии человека. Последовательности зародышевой линии содержат набор последовательностей, из которых получают последовательности CDR антитела, помимо изменений, происходящих вследствие соматической гипермутации, и, как следствие, можно ожидать, что CDR, полученные на основании зародышевой линии мыши будут системно отличаться от полученных на основании зародышевой линии человека. Это, по сути, является основой для применения иммунной системы других видов для выработки антител, так как применение других видов увеличивает потенциальное разнообразие в получаемых последовательностях CDR. Применение последовательностей зародышевой линии человека зачастую

оправдано на том основании, что последовательности CDR из зародышевых линий человека будут менее иммуногенными для людей, чем полученные от других видов, что отражает лежащее в основе предположение, что CDR будут системно отличаться в зависимости от их вида происхождения. Хотя увеличение разнообразия CDR увеличивает вероятность обнаружения антител с требуемыми свойствами, такими как высокая аффинность, это дополнительно увеличивает трудности в разработке стабильного состава в виде раствора полученного антитела.

[0048] Даже антитела, которые связываются с тем же антигеном, могут значительно отличаться последовательностью и не обязательно более тесно близки по последовательности, чем антитела к полностью независимым антигенам. Например, вариабельные домены антитела по настоящему изобретению (hum13B8-b) характеризуются только приблизительно 50-60% идентичностью последовательности с другим специфичным антителом CNTO 1959 к IL-23p19 (SEQ ID NO: 116 и 106 из патента США № 7993645). CNTO 1959 представляет собой полностью человеческое антитело. Из-за низкого сходства последовательности нельзя предполагать, что химические свойства антител и, таким образом, их восприимчивость к деградации будут сходными, несмотря на их общую мишень.

[0049] Как было продемонстрировано выше, антитела представляют собой крупные, очень сложные комплексы полипептидов, подвергаемые различным формам деградации и нестабильности в растворе. Разнообразие последовательности и, таким образом, структуры антител дает начало широкому диапазону химических свойств. Помимо очевидных отличий в специфичности связывания антигена, обусловленных последовательностью, антитела проявляют варьирующую восприимчивость к различным путям деградации, агрегации и преципитации. Боковые цепи аминокислот отличаются присутствием или отсутствием реакционноспособных групп, таких как карбокси- (D, E), амино- (K), амидная (N, Q), гидроксильная (S, T, Y), сульфгидрильная (C), тиоэфирная (M) группы, а также потенциально химически реакционноспособными центрами на

остатках гистидина, фенилаланина и пролина. Боковые цепи аминокислот, непосредственно вовлеченные во взаимодействия при связывании антигена, являются очевидными кандидатами на инактивацию путем модификации боковой цепи, но деградация в других положениях также может влиять на такие факторы, как пространственная ориентация CDR (*например*, изменения остатков каркасного участка), эффекторная функция (*например*, изменения в Fc-участке - см., *например*, Liu *et al.* (2008) *Biochemistry* 47:5088) или самоассоциация/агрегация.

[0050] Антитела подвергаются каким-либо из ряда потенциальных путей деградации. Окисление остатков метионина в антителах, в частности в CDR, может создавать проблему, если оно нарушает связывание антигена. Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116: 731; Lam *et al.* (1997) *J. Pharm. Sci.* 86:1250. Другие потенциальные пути деградации включают дезамидирование аспарагина (Harris *et al.* (2001) *Chromatogr., B* 752:233; Vlasak *et al.* (2009) *Anal. Biochem.* 392:145), окисление триптофана (Wei *et al.* (2007) *Anal. Chem.* 79:2797), цистеинилирование (Banks *et al.* (2008) *J. Pharm. Sci.* 97:775), гликирование (Brady *et al.* (2007) *Anal. Chem.* 79:9403), образование пироглутамата (Yu *et al.* (2006) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42:455), перестановку дисульфидных связей (Liu *et al.* (2008) *J. Biol. Chem.* 283:29266) и гидролиз (Davagnino *et al.* (1995) *J. Immunol. Methods* 185:177). Обсуждение в Ionescu & Vlasak (2010) *Anal. Chem.* 82:3198. См. также Liu *et al.* (2008) *J. Pharm. Sci.* 97:2426. Некоторые потенциальные пути деградации зависят не только от присутствия специфичного аминокислотного остатка, но также и от окружающей последовательности. Дезамидирование и образование изоаспартата может возникать в результате самопроизвольной внутримолекулярной перегруппировки пептидной связи после (в направлении C-конца) остатков N или D, при этом последовательности N-G и D-G является особенно восприимчивыми. Reissner & Aswad (2003) *CMLS Cell. Mol. Life Sci.* 60:1281.

[0051] Во время хранения антитела также подвергаются неферментативной фрагментации, зависимой от последовательности. Vlasak & Ionescu (2011) *mAbs* 3:253. Присутствие реакционноспособных боковых цепей, таких как D, G, S, T, C

или N, может приводить к реакциям внутримолекулярного расщепления, которые разрезают полипептидный скелет. Такие реакции гидролиза, обусловленные последовательностью, как правило, сильно зависят от pH. Там же. Антитела также могут подвергаться агрегации, зависимой от последовательности, например, если CDR включают большое количество гидрофобных остатков. Perchiacca *et al.* (2012) *Prot. Eng. Des. Selection* 25:591. Агрегация представляет собой особенную проблему в случае антител, которые необходимо составлять в высоких концентрациях для подкожного введения, и это даже привело некоторых к модифицированию последовательности антитела путем добавления заряженных остатков для повышения растворимости. Там же.

[0052] Отражая разнообразие потенциальных проблем стабильности антител, обусловленных последовательностью, потенциальные составы с антителами также являются разнообразными. Ряд различных переменных следует индивидуально оптимизировать для каждого нового антитела. Составы могут варьировать, например, по концентрации антител, буферу, pH, присутствию или отсутствию поверхностно-активного вещества, присутствию или отсутствию средств тоничности (ионных или неионогенных), присутствию или отсутствию средства для молекулярного сгущения. Коммерчески доступные терапевтические антитела поставляются на рынок в широком диапазоне составов в виде раствора в фосфатном буфере (*например*, адалимумаб), фосфатном/глициновом буфере (*например*, базиликсумаб), Tris-буфере (*например*, ипилимумаб), гистидиновом (*например*, устекинумаб), буфере на основе цитрата натрия (*например*, ритуксимаб); и в диапазоне от pH 4,7 (*например*, цертолизумаб) и pH 5,2 (*например*, адалимумаб) до pH 7,0-7,4 (*например*, цетуксимаб). Они также доступны в составах, необязательно содержащих эдетат динатрия (*например*, алемтузумаб), маннит (*например*, ипилимумаб), сорбит (*например*, голимумаб), сахарозу (*например*, устекинумаб), хлорид натрия (*например*, ритуксимаб), хлорид калия (*например*, алемтузумаб) и трегалозу (*например*, ранибизумаб); все это вместе с полисорбатом-80 в диапазоне от 0,001% (*например*, абциксимаб) до 0,1% (*например*, адалимумаб) и без него.

[0053] Иллюстративные составы с антителом описаны в патентах США №№ 7691379 (mAb MEDI-528 к IL-9); 7592004 (даклизумаб к IL-2-рецептору); 7705132 (панитумумаб к EGFR) и 7635473 (бапинецумаб к Aβ). Дополнительные иллюстративные составы с антителом можно найти в публикациях заявок на патент США №№ 2010/00021461 (натализумаб к α4-интегрину); 2009/0181027 (устекинумаб к IL-12/IL-23); 2009/0162352 (ритуксимаб к CD20); 2009/0060906 (антитело к IL-13); 2008/0286270 (паливизумаб к RSV) и 2006/0088523 (пертузумаб к Her2). При этом, дополнительные составы описаны в Daugherty & Mrsyn (2006) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58:686; Wang *et al.* (2007) *J. Pharm. Sci.* 96:1; и Lam *et al.* (1997) *J. Pharm. Sci.* 86:1250.

[0054] Изменчивость последовательности, которая является основой специфичности антитела, лежит в основании иммунного ответа. Эта изменчивость приводит к химической неоднородности полученных антител, что приводит к широкому диапазону потенциальных путей деградации. Огромное количество составов с антителом, разработанных на сегодняшний день, свидетельствует о том, что для обеспечения оптимальной стабильности составы должны быть индивидуально оптимизированы для каждого конкретного антитела. На самом деле, всякое и каждое коммерческое терапевтическое антитело, одобренное для применения у людей, до настоящего времени характеризовалось уникальным, отличающимся составом.

III. Биологическая активность гуманизированного антитела к IL-23

[0055] Составы в виде раствора mAb hum13B8-b к IL-23p19 по настоящему изобретению найдут применение при лечении нарушений, при которых, как ожидается, будет полезен селективный антагонизм с проведением сигнала IL-23. Воспалительные заболевания кожи, суставов, ЦНС, а также пролиферативные нарушения вызывают аналогичные иммунные ответы, таким образом, блокирование IL-23 должно обеспечить подавление этих опосредованных иммунным ответом воспалительных нарушений, не нарушая способность хозяина бороться с системными инфекциями. Противодействие IL-23 должно уменьшать

воспаление, связанное с воспалительным заболеванием кишечника, болезнью Крона, язвенным колитом, ревматоидным артритом, псориазическим артритом, псориазом, анкилозирующим спондилитом, реакцией «трансплантат против хозяина», атопическим дерматитом и различными другими аутоиммунными и воспалительными нарушениями. Применение ингибиторов IL-23 также будет обеспечивать ингибирование пролиферативных нарушений, *например*, рака и аутоиммунных нарушений, *например*, рассеянного склероза, сахарного диабета I типа и SLE. Обозначение роли IL-23 в этих различных нарушениях можно найти в следующих опубликованных заявках согласно PCT: WO 04/081190, WO 04/071517, WO 00/53631 и WO 01/18051. Ингибиторы IL-23 также могут найти применение при лечении инфекций, в том числе хронических инфекций, таких как бактериальные, микобактериальные, вирусные и грибковые инфекции. См. патент США № 8263080 и публикацию международной заявки WO 2008/153610.

[0056] Составы в виде высококонцентрированного раствора по настоящему изобретению включают антитела, которые сохраняют биологическую активность при хранении в течение длительных периодов времени. Применяемое в данном документе выражение «биологически активный» относится к антителу или фрагменту антитела, который способен связываться требуемый эпитоп антигена и прямо или косвенно оказывать биологический эффект. Как правило, такие эффекты происходят в результате неспособности IL-23 связываться с его рецептором. Применяемое в данном документе выражение «специфичный» относится к селективному связыванию антитела с эпитопом антигена-мишени. Антитела можно испытывать на специфичность связывания путем сравнения связывания антитела с IL-23 со связыванием с неподходящим антигеном или смесью антигенов при заданном наборе условий. Если антитело связывается с IL-23 по меньшей мере в 10, а предпочтительно в 50 раз интенсивнее, чем с неподходящим антигеном или смесью антигенов, то оно считается специфичным. Антитело, которое связывается с IL-12, не является IL-23-специфичным антителом. Антитело, которое «специфично связывается» с IL-23p19, не связывается с белками, которые не содержат последовательности, происходящие от IL-23p19, *т.е.* применяемая в данном документе «специфичность» относится к

специфичности к IL-23p19, а не любым другим последовательностям, которые могут присутствовать в рассматриваемом белке. Например, применяемое в данном документе антитело, которое «специфично связывается» с IL-23p19, обычно будет связываться с FLAG®-hIL-23p19, который представляет собой белок слияния, содержащий IL-23p19 и пептидную метку FLAG®, но не будет связываться с пептидной меткой FLAG® отдельно или при ее слиянии с белком, отличным от IL-23p19.

[0057] Специфично связывающие IL-23 соединения по настоящему изобретению могут ингибировать любую его биологическую активность, в том числе без ограничения выработку IL-1 β и TNF перитонеальными макрофагами и IL-17 Т-клетками T_H17. См. Langrish *et al.* (2004) *Immunol. Rev.* 202:96-105. Антитела к IL-23p19 также будут способны ингибировать экспрессию генов IL-17A, IL-17F, CCL7, CCL17, CCL20, CCL22, CCR1 и GM-CSF. См. Langrish *et al.* (2005) *J. Exp. Med.* 201:233-240. Специфически связывающие IL-23 соединения по настоящему изобретению также будут блокировать способность IL-23 усиливать пролиферацию или выживание T_H17-клеток. Cua and Kastelein (2006) *Nat. Immunol.* 7:557-559. Ингибирующая активность сконструированных антител к IL-23p19 будет полезна при лечении воспалительных, аутоиммунных и пролиферативных нарушений. Примеры таких нарушений описаны в публикациях патентных заявок согласно PCT №№ WO 04/081190, WO 04/071517, WO 00/53631 и WO 01/18051.

Составы в виде высококонцентрированного раствора по настоящему изобретению пригодны, например, для хранения и доставки антитела hum13B8-b к IL-23p19 для применения при лечении или профилактике нарушения, связанного с повышенной активностью IL-23 или IL-23p19, такого как Th17-опосредованные заболевания, аутоиммунные или хронические воспалительные нарушения или виды рака.

IV. Составы в виде раствора гуманизированного антитела 13B8-b к IL-23p19

[0058] Настоящее изобретение предусматривает составы в виде высококонцентрированного раствора антитела hum13B8-b к IL-23p19, которое состоит из двух идентичных легких цепей с последовательностью SEQ ID NO: 2 и двух идентичных тяжелых цепей с последовательностью SEQ ID NO: 1, и которое раскрыто в одновременно заявленном, принадлежащем тому же правообладателю патенте США № 8293883, раскрытие которого этим включено посредством ссылки во всей полноте. Последовательность гуманизированной легкой цепи 13B8 (с константным участком каппа) предусмотрена в SEQ ID NO: 2, и переменный домен легкой цепи содержит остатки 1-108 из этой последовательности. Последовательность гуманизированной тяжелой цепи 13B8 (с $\gamma 1$ -константным участком) предусмотрена в SEQ ID NO: 1, и переменный домен тяжелой цепи содержит остатки 1-116 из этой последовательности.

[0059] Последовательности тяжелой и легкой цепи (SEQ ID NO: 1 и 2) предусмотрены без сигнальных последовательностей. Иллюстративные сигнальные последовательности тяжелой и легкой цепи предусмотрены в SEQ ID NO: 12 и 13, соответственно. Сигнальные последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие сигнальные последовательности, могут быть добавлены к N-концу соответствующих цепей антитела для создания белка-предшественника для секреции из клетки-хозяина. Также можно применять альтернативные сигнальные последовательности и некоторые можно найти в “SPdb: a Signal Peptide Database.” Choo *et al.* (2005) *BMC Bioinformatics* 6:249.

[0060] Гибридома, экспрессирующая исходное антитело 13B8, была депонирована в соответствии с Будапештским договором в Американской коллекции типовых культур (ATCC - Манассас, Вирджиния, США) 17 августа 2006 года под номером доступа PTA-7803. Связь между исходным антителом 13B8 и hum13B8-b подробно изложена в принадлежащем тому же правообладателю патенте США № 8293883.

[0061] Составы в виде раствора по настоящему изобретению разрабатывали с применением по меньшей мере восьми различных партий антитела 13B8-b, полученных на клетках яичника китайского хомячка (CHO) в культуре в масштабе 500-2000 л.

[0062] Изучали целый диапазон условий начального раствора для состава в виде раствора по настоящему изобретению. Эксперименты проводили с различными буферами, такими как ацетатный, цитратный, гистидиновый, TRIS и фосфатный, при pH в диапазоне от 4,0 до 8,8. Испытывали наполнители, такие как сахароза, трегалоза и маннит, при различных концентрациях NaCl (и, таким образом, различной ионной силе) и включении поверхностно-активного вещества полисорбат 80. Поводили скрининг составов с использованием опалесценции путем определения оптической плотности при 350 нм. Агрегацию измеряли с помощью высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (HP-SEC), динамического светорассеяния (DLS) и аналитического ультрацентрифугирования (AUC). Биохимическую стабильность измеряли с помощью высокоэффективной ионообменной хроматографии (HP-IEC) и термическую стабильность измеряли с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC).

[0063] Эксперименты с начальным предварительным составом hum13B8-b с концентрацией 1 мг/мл выявили, что чистота в процентах, измеренная с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC), увеличивалась до приблизительно pH 6,0, а затем оставалась стабильной до pH 8,8. См. фиг. 1 А. Однако температура разворачивания антитела достигла максимального значения при приблизительно pH 5. См. фиг. 1 А. Сравнение между видами буфера, ацетатным, цитратным, фосфатным и TRIS, показало, что цитратный буфер при pH 5,5 продемонстрировал самую высокую процентную долю мономера и самую низкую процентную долю пиков позднего элюирования. См. фиг. 1В. Хотя оптимальную биохимическую и биофизическую стабильность наблюдали в цитратном буфере при pH 5,5, концентрация антитела в цитратном буфере больше 65 мг/мл приводила к существенной опалесценции

(данные не представлены). Опалесценция является нежелательной из-за возможности снижения одобрения пациентом, что представляет особую проблему для лекарственного средства, которое может составляться для самостоятельного введения. Хотя данная опалесценция была обратима при разбавлении и снижении pH до 4,8 в цитратном буфере (фиг. 1C), и снижение pH также снижало гидродинамический диаметр (фиг. 1D), снижение pH также снижало термическую и биохимическую стабильность раствора, что отражалось повышенной долей форм с низкой температурой плавления (фиг. 1E), повышенным накоплением пиков позднего элюирования с течением времени, как измерено с помощью HP-SEC (фиг. 1F), и снижением главного пика с течением времени, как измерено с помощью HP-IEC (фиг. 1G).

[0064] В дальнейшем гистидин рассматривали в качестве альтернативной буферной системы в попытке снизить опалесценцию и самоассоциацию без снижения термической и биохимической стабильности. Готовили образцы в 10 mM ацетате (pH 4,8 и 5,6), 10 mM цитрате (pH 4,8, 5,5 и 6,0) и 10 mM гистидине (pH 5,5 и 6,0). Определяли опалесценцию и гидродинамический диаметр с помощью OD₃₅₀ и DFS, соответственно. См. фиг. 1H и 1I. Замена цитрата на ацетат или гистидин свела к минимуму опалесценцию и снизила самоассоциацию без ослабления биохимической стабильности. При более высоких концентрациях антитела (от 50 до 100 мг/мл) составы с ацетатом (pH 5,5) и гистидином (pH 6,0) были прозрачными и не характеризовались повышенным гидродинамическим размером, что наблюдали при применении цитрата (pH 5,5). См. фиг. 1J. Составы с цитратом и ацетатом при низком pH (4,8) также приводили к повышенному накоплению пиков позднего элюирования при хранении в условиях RH4 (40°C, относительная влажность 75%), как измерено с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC). См. фиг. 1K.

[0065] Различные наполнители (100 mM NaCl, 7% сахарозы, 7% трегалозы и 6% маннита) также испытывали в отношении их влияния на температуру разворачивания (фиг. 2A) и опалесценцию (фиг. 2B). Семь процентов сахарозы добавляли для придания составу изотоничности, для снижения опалесценции и

повышения термической стабильности (повышения T_m). Также испытывали поверхностно-активные вещества полисорбат-20 (PS20), полисорбат-80 (PS80) и PFURONIC® F-68 в отношении их влияния на агрегацию (фигуры 3A и 3B) и опалесценцию (фиг. 3C). Полисорбат 80 добавляли для минимизации агрегации вследствие стресса, индуцированного перемешиванием.

[0066] Эти результаты привели к изменению предпочтительной буферной системы. Антитело к IL-23 демонстрировало самоассоциацию и опалесценцию при высоких концентрациях в цитрате с pH 5,5 и pH 6,0. Замена цитрата на ацетат (pH 5,5) или гистидин (pH 6,0) минимизировала опалесценцию без ослабления термической и биохимической стабильности. Сахарозу (7%) добавляли для придания составам изотоничности. Сахароза (7%) также снижала опалесценцию и повышала термическую стабильность (повышение T_m), и снижала процентную долю потери мономера во время ускоренных исследований стабильности (данные не представлены). Полисорбат 80 (0,05%) добавляли для минимизации агрегации вследствие стресса при встряхивании.

[0067] Состав на основе гистидина, содержащий 10 mM гистидина (pH 6,0), 7% сахарозы и 0,05% PS-80 выбрали в качестве предпочтительного высококонцентрированного состава с hum13B8-b. Различные свойства раствора, в том числе вязкость, плотность, осмолярность и размер частиц определяли для состава с 10 mM гистидина (pH 6,0). См. таблицу 1. Наблюдаемая вязкость при комнатной температуре (5,65 сП) является приемлемой для применения в предварительно наполненных шприцах и автоинжекторах.

Таблица 1

Свойства раствора состава с гистидином

Свойство раствора	Гистидин (pH 6,0)
Вязкость (сП)	5,65 (25°C) 14,46 (5°C)
Плотность (г/см ³)	1,06
Осмолярность	266
Частицы, не видимые невооруженным глазом	25 (>10 мкм) 2 (>25 мкм)

V. Стабильность составов в виде высококонцентрированного раствора гуманизированного антитела 13B8-b к IL-23p 19

[0068] Изучали долгосрочную стабильность выбранных составов по настоящему изобретению после 3-24 месяцев хранения при различных условиях хранения. Образцы инкубировали в стеклянных ампулах на 2 мл (фиг. 4), в контейнерах на 30 мл (хранение нерасфасованного лекарственного средства) (фиг. 5 и 6), или в предварительно наполненных шприцах (коммерческая упаковка с однократной дозой) (фиг. 7) при различных температурах и уровнях влажности. Образцы анализировали на присутствие деградации и агрегации продуктов такими способами, как высокоэффективная эксклюзионная хроматография (HP-SEC), ионообменная хроматография (HP-IEC), капиллярный электрофорез с SDS (CE-SDS, восстанавливающий и не восстанавливающий) и пептидное картирование. Стабильность антитела измеряли с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). Биологическую активность оценивали с помощью ELISA-связывания IL-23 и функционального анализа на клетках. Концентрацию антитела определяли по поглощению УФ при 280 нм. Опалесценцию определяли путем измерения оптической плотности при 350 нм (OD₃₅₀). Результаты представлены на фиг. 4-7.

[0069] В первой серии экспериментов образцы объемом 1,5 мл помещали в стеклянные ампулы на 2,0 мл и анализировали после хранения при различных условиях. Результаты представлены на фиг. 4. Наблюдали незначительную деградацию или агрегацию в образцах, которые хранили при 5°C и влажности окружающей среды, что соответствует обычным условиям в холодильнике. Фиг. 4A - 4F. Условия ускоренной деградации, такие как RH4 (40°C, относительная влажность 75%), включенные в качестве положительного контроля относительно деградации образца, продемонстрировали ожидаемые потерю мономера и увеличение деградации и агрегации продуктов, начиная с первой временной точки (один месяц). Фиг. 4A - 4F. Опалесценция была стабильной при 5°C (фиг. 4G), но усиливалась при 25°C и 40°C (фиг. 4H и 4I). Аналогично, окисление было минимальным при 5°C, но существенным при условиях RH4 или при 40°C. Фиг.

4J и 4K. Эти результаты указывают на то, что хотя в ходе экспериментов была возможность обнаружить деградацию с помощью ряда анализов, о чем свидетельствуют, *например*, результаты для условий RH4, хранение в обычных условиях в холодильнике приводило к незначительной потере или отсутствию потери качества продукта в течение по меньшей мере приблизительно девяти месяцев хранения.

[0070] Во второй серии экспериментов образцы помещали в контейнеры на 30 мл CELSIUS®-Pak со слоем, контактирующим с жидкостью, из этилен-винил-ацетата (EVA) (Sartorius, Гёттинген, Германия) и анализировали после хранения при различных условиях. Результаты представлены на фиг. 5 и 6. Эти эксперименты были запланированы, в первую очередь, для оценки стабильности лекарственного вещества при обычных условиях хранения нерасфасованного лекарственного средства.

[0071] Образцы хранения нерасфасованного лекарственного средства хранили при трех условиях замораживания (-80°C , -45°C и -20°C) и в холодильнике (2° - 8°C). Типичные данные предоставлены на фиг. 5 для образцов, которые хранили при 5°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) и -45°C в течение до 18 месяцев. Небольшое повышение концентрации наблюдали через 12 месяцев хранения (фиг. 5A), по-видимому из-за испарения из контейнеров для хранения у образцов при 5°C . В отношении биологической активности не наблюдали никаких существенных изменений (фиг. 5B и 5C), и белок-связанные примеси, продукты деградации и агрегаты в целом были в пределах нормы в период до 18 месяцев, в частности, для образцов, которые хранили замороженными при -45°C (фиг. 5D - 5F).

[0072] Стабильность при хранении нерасфасованного лекарственного средства также оценивали при более высоких температурах. Типичные данные предоставлены на фиг. 6 для образцов, которые хранили при 5°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$), 25°C , 25H, 40°C и RH4 в течение до 12 месяцев. Образцы в холодильнике продемонстрировали стабильную биологическую активность в течение 12 месяцев, в то время как образцы, которые хранили при комнатной температуре

(25°C), фактически продемонстрировали явное повышение биологической активности, и этот эффект, вероятно, связан с повышением концентрацией вследствие испарения. Фиг. 6А и 6В. Образцы были стабильными в течение 12 месяцев при хранении при 5°C, но содержание белок-связанных примесей (продуктов деградации и агрегатов) повысилось с течением времени для образцов, которые хранили при 25°C и 25Н, и значительно повысилось для образцов, которые хранили при 40°C и RH4 (условия ускоренной деградации). Фиг. 6С - 6К.

[0073] В третьей серии экспериментов образцы 1 мл состава с антителом при концентрации 100 мг/мл помещали в шприцы (предварительно наполненные шприцы BD Нупак Physiolis) и анализировали после хранения при различных условиях. Результаты представлены на фиг. 7 для образцов, которые хранили при 5°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) в течение до 24 месяцев. Концентрации антитела оставались практически без изменений (фиг. 7А), так же как и биологическая активность (фиг. 7В и 7С). Уровни высокомолекулярного соединения, мономера в процентах, низкомолекулярного соединения, пика главного антитела в процентах, кислотных вариантов, основных вариантов, следующего за главным пиком соединения, главного IgG и тяжелых и легких цепей (фиг. 7D - 7L, соответственно) все остались практически стабильными в течение по меньшей мере 12-24 месяцев.

[0074] Эксперименты на долгосрочную стабильность, представленные на фиг. 4-7, выявили, что состав hum13B8-b с гистидином по настоящему изобретению является стабильным с точки зрения как биологической активности, так и физической целостности при высоких концентрациях антитела при обычных условиях хранения, или замороженным в виде раствора нерасфасованного лекарственного средства, или в холодильнике, например, в виде предварительно наполненного шприца.

[0075] Подразумевается, что результаты, полученные при условиях ускоренной деградации, таких как RH4 и 25Н, и других условиях повышенной температуры, только иллюстрируют возможные продукты и пути распада для

антитела hum13B8-b и не отражают скорость деградации антитела, предназначенного для терапевтического применения. Основные пути деградации hum13B8-b, обнаруженные при условиях ускоренной деградации, включают потерю чистоты, наблюдаемую с помощью CE-SDS, повышение содержания HMW- и LMW-соединений и снижение процентной доли мономера, определяемые с помощью HP-SEC. Кроме того, с помощью HP-IEC выявили повышение содержания кислотных вариантов и следующего за главным пиком соединения с уменьшением содержания основных вариантов и главного пика. Длительное хранение составов в виде раствора антител-лекарственных средств, таких как hum13B8-b, при повышенной температуре является маловероятным. Долгосрочное хранение hum13B8-b, например, возможно при хранении в контейнерах CELSIUS®-Pak с замораживанием при -45°C , при этом характеристики качества, связанные с условиями, как ожидается, остаются стабильными в течение по меньшей мере 18 месяцев. Предварительно наполненные шприцы или автоинжекторы, содержащие индивидуальные дозы hum13B8-b, возможно хранить при температуре приблизительно 5°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) и также ожидается, что они остаются стабильными в течение по меньшей мере 18 месяцев.

VI. Определение дозы и способ введения

[0076] Хотя составы в виде высококонцентрированного раствора по настоящему изобретению являются особенно подходящими для подкожного введения высоких доз, такие составы также можно вводить другими способами. Подходящие способы введения могут включать, например, пероральный, ректальный, трансмукозальный или введение через слизистую кишечника; парентеральную доставку, в том числе внутримышечную, внутрикожную, интрамедуллярную инъекции, а также интратекальную, прямую внутрижелудочковую, внутривенную, внутрибрюшинную, интраназальную или внутриглазную инъекции.

[0077] В качестве альтернативы, можно применять местное, а не системное введение антитела, например, с помощью инъекции антитела непосредственно в сустав, пораженный артритом, или в индуцированное патогеном поражение, характеризующееся иммунопатологией, часто в виде состава-депо или состава с медленным высвобождением. Кроме того, можно вводить антитела в виде системы нацеленной доставки лекарственного средства, например, в липосоме, покрытой ткань-специфичным антителом, нацеленным, например, на сустав, пораженный артритом, или индуцированное патогеном поражение, характеризующееся иммунопатологией. Липосомы будут нацеливаться на пораженную ткань и селективно поглощаться ею.

[0078] Подкожное введение можно осуществлять с помощью инъекции с применением шприца, автоинжектора, шприца-ручки или безыгольного устройства для инъекций.

[0079] Хотя составы в виде высококонцентрированного раствора по настоящему изобретению являются особенно предпочтительными для применений, требующих высокой концентрации антитела, не существует причин, чтобы нельзя было применять составы при более низких концентрациях в условиях, когда высокие концентрации не требуются или нежелательны. Более низкие концентрации антитела могут применяться для подкожного введения низких доз или других способов введения (например, внутривенного введения), когда объем, который может быть доставлен, составляет более 1 мл. Такие низкие концентрации могут включать 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1 мг/мл или менее.

[0080] Выбор схемы введения для терапевтического средства зависит от нескольких факторов, в том числе уровня обменных процессов в сыворотке или тканях субъекта, уровня симптомов, иммунного статуса субъекта и доступности клеток-мишеней в биологической матрице. Предпочтительно, схема введения обеспечивает максимальное количество терапевтического средства, доставляемого пациенту, с учетом приемлемого уровня побочных эффектов. Соответственно, количество доставляемого биологического средства частично

зависит от конкретного субъекта и тяжести состояния, подлежащего лечению. Доступно руководство по выбору подходящих доз антител, цитокинов и малых молекул. См., например, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom *et al.* (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon *et al.* (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz *et al.* (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky *et al.* (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602; Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57th Ed); Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002).

[0081] Определение подходящей дозы производится врачом, например, с применением параметров или факторов, известных или предполагаемых в данной области техники, влияющих на лечение или предположительно влияющих на лечение. Подходящая доза («терапевтически эффективное количество») белка будет зависеть, например, от состояния, подлежащего лечению, тяжести и течения состояния, введения белка в профилактических или терапевтических целях, предыдущей терапии, истории болезни пациента и реакции на белок, типа применяемого белка и усмотрения лечащего врача. В некоторых случаях выбирают низкую начальную дозу и после этого дозировку увеличивают небольшими шагами, пока не будет достигнут требуемый или оптимальный терапевтический эффект с учетом любых отрицательных побочных эффектов. Важные диагностические критерии включают такие, которые относятся к симптомам, например, воспаления или уровня продуцируемых воспалительных цитокинов. Белок вводят пациенту подходящим способом один раз или несколько раз. Белок можно вводить отдельно или в сочетании с другими лекарственными средствами или способами терапии.

[0082] Антитела можно вводить путем непрерывной инфузии или путем приема доз с интервалами, как например, один раз в день, 1-7 раз в неделю, один

раз в неделю, раз в две недели, ежемесячно, раз в два месяца, раз в квартал, раз в полгода или раз в год и т.д. Предпочтительным протоколом дозирования является такой, включающий максимальную дозу или частоту дозирования, который позволяет избежать значительных нежелательных побочных эффектов. Общая недельная доза, как правило, составляет по меньшей мере 0,05 мкг/кг, 0,2 мкг/кг, 0,5 мкг/кг, 1 мкг/кг, 10 мкг/кг, 100 мкг/кг, 0,2 мг/кг, 1,0 мг/кг, 2,0 мг/кг, 10 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг веса тела или больше. См., например, Yang *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 349:427-434; Herold *et al.* (2002) *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698; Liu *et al.* (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67:451-456; Portielji *et al.* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:133-144.

VII. Способы применения

[0083] Настоящее изобретение предусматривает составы в виде высококонцентрированного раствора mAb hum13B8-b к IL-23p19 человека для применения при лечении воспалительных нарушений и состояний, например, центральной нервной системы, периферической нервной системы и желудочно-кишечного тракта, а также аутоиммунных и пролиферативных нарушений.

[0084] Составы по настоящему изобретению можно применять при лечении, например, рассеянного склероза (MS), в том числе рецидивирующе-ремиттирующего MS и первичного прогрессирующего MS, болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (также известного как ALS; болезнь Лу Герига), ишемического повреждения головного мозга, прионных заболеваний и ВИЧ-ассоциированного слабоумия, а также невропатической боли, посттравматической невропатии, синдрома Гийена-Барре (GBS), периферической полинейропатии и регенерации нерва.

[0085] Составы по настоящему изобретению также можно применять при лечении воспалительных заболеваний кишечника, например, болезни Крона, язвенного колита, глютеновой болезни и синдрома раздраженной толстой кишки. Их также можно применять при лечении воспалительных нарушений, таких как

реакция «трансплантат против хозяина», псориаз, атопический дерматит, артрит, в том числе ревматоидный артрит, остеоартрит и псориатический артрит; аутоиммунных нарушений, таких как системная красная волчанка и диабет I типа, и пролиферативных нарушений, таких как рак. См., например, публикации патентных заявок согласно PCT №№ WO 04/081190, WO 04/071517, WO 00/53631 и WO 01/18051.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Состав в виде раствора

[0086] В одном варианте осуществления состав в виде раствора hum13B8-b по настоящему изобретению предусмотрен в виде раствора антитела с концентрацией 100 мг/мл в объеме 1,0 мл в предварительно наполненном шприце или автоинжекторе. Объем 1,0 мл представляет собой извлекаемый объем, а не объем наполнения, который может включать достаточный избыток для обеспечения доставки полной дозы в 1,0 мл. Иллюстративная пропись для состава объемом 1,0 мл по настоящему изобретению приведена в таблице 2. В одном варианте осуществления партию лекарственного продукта получают в масштабе 15-30 л или приблизительно 15000-30000 доз.

Таблица 2

Состав в виде раствора объемом 1,0 мл

Компонент	Степень чистоты	Количество
hum13B8-b	спецификация продукта	100 мг
L-гистидин	Ph.Eur./USP	0,683 мг
L-гистидин HCl	Ph.Eur.	1,17 мг
Полисорбат 80	Ph.Eur./NF/JP	0,500 мг
Сахароза	Ph.Eur./NF/JP	70,0 мг
Вода для инъекций	USP	в достаточном количестве

[0087] В некоторых вариантах осуществления количества буферных компонентов (L-гистидин и L-гистидин HCl) несколько отклоняются от весовых количеств, указанных в таблице 2, из-за необходимости доведения pH до приблизительно 6,0. В частности, в некоторых вариантах осуществления для доведения pH до требуемого значения приблизительно 6,0 добавляли больше или меньше либо кислотной, либо основной формы гистидина по сравнению с количествами, приведенными в таблице 2. В еще одних вариантах осуществления добавляли приблизительно такие количества L-гистидина и L-гистидина HCl, как указано в таблице 2, для получения значения pH близкого, но немного выше 6,0, и затем добавляли HCl для снижения pH полученного состава до приблизительно 6,0.

Пример 2

Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC)

[0088] Для отслеживания термической стабильности антител в составах по настоящему изобретению применяли дифференциальную сканирующую калориметрию Валериана Плотникова (DSC). С помощью DSC непосредственно измеряют тепловые изменения, которые происходят в белках во время контролируемого повышения или снижения температуры. Белок в растворе находится в равновесии между природной (свернутой) конформацией и его денатурированным (развернутым) состоянием. DSC применяется для определения температуры, при которой 50% белка денатурирует (средняя точка теплового перехода, T_m). Белки с более высоким значением T_m , в целом, являются более стабильными. Например, кривая DSC предоставлена на фиг. 1E, на которой продемонстрировано два перехода, первый (T_{m1}) происходит при приблизительно 64-70°C, в зависимости от pH, а второй, главный переход (T_{m2}) при приблизительно 80°C. Главный переход можно отнести к разворачиванию Fc-фрагмента. Тепловые события, предшествующие главному переходу (*т.е.* при более низкой температуре), возможны из-за разворачивания ряда других доменов в пределах антитела (*например*, Fab), что согласуется с предполагаемыми

структурными элементами антител IgG1, описанными в литературе. Vermeer (2000) *Biophys. J.* 78:394.

Пример 3

Высокоэффективная эксклюзионная хроматография (HP-SEC)

[0089] Процентную долю высокомолекулярного соединения (HMW), низкомолекулярного соединения (LMW) и мономера в составах с hum13B8-b по настоящему изобретению определяли с помощью HP-SEC. Исследуемый раствор разбавляли и разделяли с помощью HPLC с применением эксклюзионной колонки (YMC-pack Diol-200, размер пор 200 Å, 300 x 8,0 мм, 5 мкм или эквивалентная; YMC Co. Ltd., Киото, Япония). Для определения процентной доли мономера, HMW-соединения и LMW-соединения применяли площади пиков.

[0090] Пики элюирования из SEC характеризовали с применением многоугольного лазерного светорассеяния (SEC-MALLS), которое можно применять для оценки молекулярной массы и отслеживания агрегатов. После отделения пика мономера от фрагментов и агрегатов на SEC-колонке, образец пропускали через ультрафиолетовый (УФ) детектор, детектор MALLS и детектор показателя преломления (RI), что давало возможность расчета концентрации анализируемого вещества и последующую оценку его молекулярной массы (MW). Интенсивность светорассеяния (определяли с помощью MALLS) пропорционально произведению концентрации белка (определяли с помощью RI) и молекулярной массы. С помощью SEC-MALLS продемонстрирован преобладающий главный пик с молекулярной массой приблизительно 138 кДа. Это довольно хорошо соответствует рассчитанной теоретической молекулярной массе мономера hum13B8-b, а также массе мономера hum13B8-b, определенной с помощью масс-спектрометрии, принимая во внимание хроматографического разрешения SEC и точности определения светорассеяния. Высокомолекулярное соединение (HMW1), которое характеризуется молекулярной массой приблизительно 300 кДа, вероятно, представляет собой димерное соединение. Второй пик HMW (HMW2), который наблюдали не во всех партиях, содержит

соединение с расчетной молекулярной массой приблизительно 465 кДа, что соответствует тримерному соединению. Обнаруживали низкомолекулярное соединение (LMW) с приблизительно молекулярной массой 108-117 кДа, которое может представлять собой продукт фрагментации, например, продукт фрагментации в шарнирной области.

Пример 4

Динамическое светорассеяние (DLS)

[0091] Динамическое светорассеяние (DLS) представляет собой методику, которая может дать представление о профиле распределения моноклональных антител по размеру в диапазоне от 0,5 нм до 6 мкм в растворе. Моноклональное антитело hum13B8-b демонстрирует средний гидродинамический диаметр приблизительно 9,5 нм по интенсивности (и 6,5 нм по объему). Это согласуется со значениями для других моноклональных антител. Составы с большей ионной силой обычно имеют меньшие гидродинамические диаметры, чем составы с низкой ионной силой, и на них могут влиять другие параметры, такие как буфер и pH. См. фиг. 1I и 1J. Антитела в составах по настоящему изобретению фактически являются монодисперсными. Гидродинамический диаметр антител по настоящему изобретению является обратимым, о чем свидетельствуют эксперименты, в которых антитело разводили в буфере более высокой или более низкой ионной силы (данные не представлены). Эти результаты позволяют предполагать, что гидродинамический диаметр будет уравниваться местным окружением в месте инъекции при введении субъекту.

Пример 5

Высокоэффективная катионообменная хроматография (HP-IEC)

[0092] Заряженные варианты hum13B8-b обнаруживали с помощью HP-IEC, которая основана на электростатических взаимодействиях между белками в образце и зарядами, иммобилизованными на смоле. Положительно заряженные варианты hum13B8-b связываются с отрицательно заряженной

смолой на катионообменной колонке со слабым катионом (Dionex ProPac WCX-10, 4 x 250 мм или эквивалентная; ThermoScientific, Бэннокберн, Иллинойс, США) и отделяются с помощью HPLC. Антитело элюируют путем повышения pH и концентрации солей, эффективно понижая заряд вариантов антитела и заменяя их ионами с эквивалентным зарядом. Присутствие hum13B8-b и вариантов в элюенте определяют с помощью УФ-детекции. Для определения процентной доли кислотных вариантов, главного пика, следующего за главным пиком и основных вариантов применяли площади пиков.

[0093] Все соединения, обнаруженные перед главным пиком, элюирующимся приблизительно в 23 минуты, относятся к кислотным вариантам, в то время как те, которые элюируются после главного пика, относятся к основным вариантам. Анализ кислотных вариантов и кислотных пиков выявил, что они не имеют ни N-, ни C-концевых модификаций, в то время как главный пик демонстрирует полное отщепление лизина на C-конце и полное образование пироглутамата на N-конце. Главный пик сохраняет полную биологическую активность. Следующее за главным пиком демонстрирует полное отщепление лизина и ограниченное α -амидирование пролина на C-конце, полное образование пироглутамата на N-конце, окисление Met251 и Met427 и проявляет сниженную активность, измеренную с помощью ELISA-связывания. Основной пик 1 демонстрирует полное отщепление лизина и некоторую степень α -амидирования пролина на C-конце, и полное образование пироглутамата на N-конце. Основной пик 3, наиболее распространенный из основных пиков, демонстрирует полное отщепление лизина на C-конце и неполное образование пироглутамата на N-конце. Основные варианты демонстрируют полное отщепление лизина и различные уровни α -амидирования пролина на C-конце, и от неполного до полного образования пироглутамата на N-конце. Большинство заряженных вариантов сохраняет биологическую активность.

Пример 6

Пептидное картирование

[0094] Пептидное картирование предоставляет информацию о первичной структуре hum13B8-b и может быть применено для оценки того, имело ли место окисление. Для увеличения охвата последовательности для описания hum13B8-b применяли пептидные карты, полученные с помощью двух разных ферментов. Первым было пептидное картирование после расщепления эндопротеиназой Lys-C. Пептидную карту получали с помощью обработки образца hum13B8-b гуанидина гидрохлоридом для денатурации белка и 1,4-дителиотреитолом (DTT) для восстановления дисульфидных связей. Затем образцы обрабатывали иодацетамидом (IAM) для алкилирования свободных тиолов, образовавшихся после обработки DTT. Затем образцы расщепляли эндопротеиназой Lys-C. Анализ полученных пептидов проводили с применением обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (Xbridge C18, 5 мкм, размер пор 130 Å, 2,1x150 мм или эквивалентная; Waters Corporation, Милфорд, Массачусетс, США), сопряженной с масс-спектрометрией с электрораспылением. Пептидные последовательности, происходящие из легких (L) и тяжелых (H) цепей, а также их массы, которые определяли с применением масс-спектрометрии, приведены в таблице 3. Время удерживания определяли по поглощению ультрафиолета при 214 нм во время хроматографирования в течение 90 минут. Массы корректировали с учетом алкилирования остатков цистеина путем добавления чистой массы 57 Да на остаток IAM-алкилированного цистеина. Пять пептидов, происходящие из определяющего комплементарность участка (CDR) hum13B8-b, представляют особый интерес. Также обнаруживали пептиды с обычными посттрансляционными модификациями, такие как пептид тяжелой цепи с пироглутаматом на N-конце, усеченный на C-конце по лизину пептид тяжелой цепи и несколько метионин-окисленных и дезамидированных пептидов. Ни одна из этих модификаций не обнаружена в CDR молекулы. Обычные эксперименты по пептидному картированию могут выполняться без применения масс-спектрометрии и время удерживания наблюдаемых пиков можно применять

для сравнения образцов, таких как образец для определения стабильности (исследуемый) и контрольный (эталонный) образец.

[0095] Второй способ пептидного картирования, использующий расщепление трипсином, разрабатывали для усиления охвата остатков 64-120 тяжелой цепи, которая не была хорошо представлена в пептидной карте, полученной с помощью Lys-C. В дополнение к сайту отщепления С-конца по остаткам лизина, который является общим с эндопротеиназой С, трипсин также отщепляет С-конец по остаткам аргинина (если следующий остаток не является Р), что приводит к образованию набора более мелких пептидов. Пептиды, образовавшиеся из остатков от 64 до 120 тяжелой цепи, обнаруживали с помощью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии, сопряженной с обнаружением при поглощении УФ и масс-спектрометрией (для аннотации пиков). Соответствующие пептидные фрагменты hum13B8-b, после расщепления трипсином, представлены в таблице 3.

Таблица 3

Пептидное картирование с помощью эндопротеиназы Lys-C и трипсина

Цепь	Пептид	Время удерживания (мин.)	Наблюдаемая масса (Да)	Примечания
H	13-19	17,15	685,42	
H	334-337	8,94	447,27	
H	213-217	13,12	599,37	
H	14-19	17,15	557,32	
H	409-413	23,95	574,34	
H	439-445	35,96	659,35	С-конец-К
H	326-333	37,23	837,50	
H	1-12	41,37	1267,68	1pE
H	340-359	43,49	2310,19	
H	338-359	43,49	2509,32	
H	133-146	43,81	1320,68	
H	414-438	45,04	3059,36	окисленный M427

Цепь	Пептид	Время удерживания (мин.)	Наблюдаемая масса (Да)	Примечания
H	360-369	47,39	1160,62	
H	121-132	47,97	1185,65	
H	274-287	50,08	1676,80	
H	414-438	52,65	3043,37	
H	370-391	56,90	2544,09	N383 изоD
H	370-391	57,27	2543,10	
H	370-391	58,13	2544,10	N383 D
H	248-273	60,30	2970,41	окисленный M251
H	392-408	62,47	1872,92	
H	248-273	63,11	2954,42	
H	288-316	70,98	5066,36	
H	288-316	71,19	4904,28	
H	288-316	71,39	4758,17	
H	222-247	71,74	2843,43	
H	274-325	73,05	6096,43	
H	222-245	73,88	2618,29	
H	147-209	82,40	6712,66	
H	13-63	93,78	5696,78	
H	20-63	95,45	5029,36	полученный из CDR
H	24-63	96,01	4555,12	полученный из CDR
L	184-188	9,76	624,28	
L	208-214	19,92	868,36	
L	104-107	22,96	487,30	
L	146-149	26,46	559,32	полученный из CDR
L	150-169	29,11	2134,95	
L	191-207	39,01	1874,92	
L	46-52	40,79	833,51	полученный из CDR
L	170-183	47,39	1501,76	
L	108-126	64,81	2101,11	
L	1-42	68,14	4765,28	
L	127-145	68,79	2125,05	
L	1-39	68,90	4483,13	
L	53-103	77,20	5559,57	полученный из CDR

Пример 7

Концентрация белка с помощью УФ-спектроскопии

[0096] Концентрацию белка антитела hum13B8-b в составах в виде раствора по настоящему изобретению определяли с помощью УФ-спектроскопии. Определение основано на поглощении УФ-света при 280 нм аминокислотами, такими как остатки триптофана, тирозина и цистеина. Поглощение при 280 нм корректировали на светорассеяние с применением данных поглощения при 320 нм. Способ включает гравиметрическое разбавление образца в воде и регистрацию УФ-спектра для установления поглощения при 280 нм и поглощения при 320 нм. Эти значения поглощения и экспериментально определенный коэффициент экстинкции $1,44 \text{ мл мг}^{-1} \text{ см}^{-1}$ применяли для вычисления концентрации hum13B8-b.

Пример 8

Биологическая активность - функциональный анализ на клетках

[0097] Функциональный анализ на клетках разрабатывали для оценки способности hum13B8-b в составах по настоящему изобретению блокировать биологическую активность IL-23 человека. Этот анализ оценивает способность hum13B8-b ингибировать IL-23-индуцированную активацию STAT3 в IL-23-реактивной клеточной линии (Kit 225). Серийные разведения эталонного материала hum13B8-b и испытуемого образца инкубировали с фиксированной концентрацией IL-23 человека с последующей инкубацией с IL-23-реактивными клетками Kit225. Ингибирование фосфорилирования STAT3 с помощью hum13B8-b измеряли в клеточных лизатах с помощью ELISA с применением пары иммобилизованное антитело к STAT3 и идентифицирующее антитело к p-STAT3, с последующей инкубацией с конъюгированным с пероксидазой антителом к IgG и добавлением хемилюминесцентного субстрата. Кривую ингибирования ответа («стандартная кривая») получали с применением четырехпараметрической логистической функции нелинейной регрессии, где

значение IC50 представляет собой концентрацию антитела к IL-23, которая ингибирует 50% максимального ответа. Относительную активность испытуемого образца оценивали путем сравнения кривой ингибирования ответа для исследуемого образца со стандартной кривой и рассчитывали как процент от эталона. Значения относительной активности для нескольких повторов одного и того же образца объединяли в одно сообщаемое значение - геометрическое среднее относительной активности.

Пример 9

Биологическая активность - ELISA-связывания

[0098] Аффинность hum13B8-b в составах по настоящему изобретению в отношении IL-23 человека оценивали в ELISA-равновесном связывании, в котором серийные разведения эталонного материала и испытуемых образцов наносили на аналитические планшеты, покрытые цитокином IL-23 человека. Этот анализ можно применять, например, для оценки сохранения биологической активности в различных потенциальных терапевтических составах. Относительную активность испытуемого образца оценивали путем сравнения кривой доза-ответ испытуемого образца с кривой доза-ответ эталонного материала и рассчитывали как процент от эталона.

[0099] ELISA выполняли с помощью способов, хорошо известных в данной области. Вкратце, серийные разведения hum13B8-b в виде состава по настоящему изобретению добавляли в лунки титрационного микропланшета, предварительно покрытого белком IL-23 человека, а затем блокировали. После периода инкубирования лунки промывали и добавляли реагент-обнаруживающее антитело в виде конъюгированного с пероксидазой антитела козы к IgG (Fc) человека. Лунки снова промывали и добавляли хемилюминесцентный субстрат пероксидазы. Сигнал считывали с помощью регистрации хемилюминесценции. Сигмоидальную кривую доза-ответ получали с применением четырехпараметрической логистической функции нелинейной регрессии, где значение EC50 представляет собой концентрацию, необходимую для достижения

50% сигнала максимального связывания IL-23. Относительную биологическую активность рассчитывали путем сравнения результатов, полученных для испытуемых образцов, со стандартной кривой, основанной на уровнях сигналов, полученных для эталонного образца. Результаты представлены в виде процента биологической активности относительно таковой для раствора эталонного антитела. Значения относительной активности для нескольких повторов одного и того же образца объединяли в одно сообщаемое значение - геометрическое среднее относительной активности.

Пример 10

Капиллярный электрофорез с SDS (CE-SDS)

[00100] Капиллярный электрофорез с додецилсульфатом натрия (CE-SDS) разделяет белки, исходя из размера. CE-SDS можно выполнять в невосстанавливающих условиях или в восстанавливающих условиях. Невосстанавливающий CE-SDS отделяет интактные антитела от других соединений в образце, тогда как восстанавливающий CE-SDS отделяет диссоциированные тяжелые и легкие цепи друг от друга, а также от других потенциальных соединений в образце. См., например, Rustandi *et al.* (2008) *Electrophoresis* 29:3612.

[00101] Невосстанавливающий CE-SDS предусматривает тепловую денатурацию образцов антитела hum13B8-b в присутствии N-этилmaleимида для алкилирования свободных остатков цистеина и SDS. Затем образец разделяют в капиллярной колонке, содержащей сменную полимерную матрицу с SDS, которая обеспечивает фильтрующую селективность для разделения. Все пики в испытуемом образце объединяли и площади пиков использовали для определения процентной доли главного IgG (интактного антитела) в образце.

[00102] Восстанавливающий CE-SDS предусматривает тепловую денатурацию образцов антитела hum13B8-b в присутствии 2-меркаптоэтанола для восстановления дисульфидных связей и SDS. Затем образец разделяют в

капиллярной колонке, содержащей сменную полимерную матрицу с SDS, которая обеспечивает фильтрующую селективность для разделения. Все пики в испытуемом образце объединяли и площади пиков использовали для определения процентной доли интактных тяжелых и легких цепи в hum13B8-b.

Пример 11

Аналитическое ультрацентрифугирование с определением скорости седиментации (SV-AUC)

[00103] SV-AUC применяли для исследования четвертичной структуры антитела hum13B8-b в составах по настоящему изобретению. SV-AUC измеряет скорость, с которой молекулы оседают под действием центробежной силы. Эта скорость седиментации дает информацию о молекулярной массе молекул, присутствующих в образце. Hum13B8-b преимущественно оседает в виде одного соединения с коэффициентом седиментации ($s_{20,w}$) 7,0S. Это соединений характеризуется расчетной молекулярной массой приблизительно 150 кДа, что соответствует ожидаемой молекулярной массе мономера. Фрикционное отношение, которое зависит от гидратации и формы макромолекулы, является аналогичным у разных партий.

Пример 12

Длительная стабильность составов с антителами

[00104] Получали дополнительные данные по долгосрочной стабильности составов с антителами по настоящему изобретению. Иллюстративные данные о стабильности до 24 месяцев представлены ниже в таблицах 4 - 9 для партий E и D.

Условия хранения	5С						
Партия D	Временной интервал испытания на стабильность (месяцы)						
Испытание	Начальное	1М	3М	6М	12М	18М	24М
Анализ - УФ (поглощение при 280 нм), мг/мл	95,1	96,1	100,4	99,4	93,6	97,7	103,8
HP-IEХ [%]							
Кислотные варианты	10,1	10,2	10,2	10,6	9,3	11,5	11,6
Пик кислотный 1	9,7	9,8	10,7	10,5	10,7	11,4	11,5
Предшествующее главному пику							
Главный пик	63,2	63,3	62,3	62,0	62,2	60,3	60,4
Следующее за главным пиком							
Пик основной 1	9,3	8,9	8,9	9,2	9,7	9,0	8,7
Пик основной 2	3,9	4,0	4,4	3,9	2,9	3,4	3,1
Основные варианты	3,8	3,2	3,5	3,8	5,3	3,9	4,0
Другие	ND	0,6	ND	ND	ND	0,5	0,6
HP-SEC [%]							
Условия хранения	5С						
Партия D	Временной интервал испытания на стабильность (месяцы)						
Испытание	Начальное	1М	3М	6М	12М	18М	24М
Высокомолекулярное соединение	0,79	0,83	0,95	0,51	0,84	1,16	1,24
Мономер	99,2	99,1	99,0	99,5	98,9	98,6	98,5
Пики позднего элюирования	NQ	0,11	0,07	NQ	0,25	<QL	0,27
НПАС (частиц/мл)							
2 мкм	2827	1805	11905	3701	2895	1081	1879
5 мкм	292	168	1474	712	612	201	644
10 мкм	35	32	326	211	168	36	123
25 мкм	0	1	13	9	6	2	4
ND - не обнаружено; NQ - не определено количественно; QL - предел количественного определения; 5С: 5°С (± 3°С); QL = 0,25%							

Таблица 5

Условия хранения	25H				
Партия D	Временной интервал испытания на стабильность (месяцы)				
Испытание	Начальное	1M	3M	6M	12M
Анализ - УФ (поглощение при 280 нм), мг/мл	95,1	96,4	98,6	102,8	96,3
HP-IEХ [%]					
Кислотные варианты	10,1	11,5	15,3	18,5	25,4
Пик кислотный 1	9,7	11,6	13,8	14,8	17,9
Предшествующее главному пику					
Главный пик	63,2	60,3	56,0	51,7	42,2
Следующее за главным пиком					
Пик основной 1	9,3	9,5	8,5	8,7	8,7
Пик основной 2	3,9	3,3	2,2	1,7	1,6
Основные варианты	3,8	3,8	3,6	4,5	4,2
Другие	ND	ND	0,5	ND	ND
HP-SEC [%]					
Высокомолекулярное соединение	0,79	1,47	2,05	1,35	2,69
Мономер	99,2	98,4	97,7	97,9	96,2
Пик позднего элюирования	NQ	0,14	0,30	0,77	1,15
ND - не обнаружено; NQ - не определено количественно; 25H: 25°C/относительная влажность 60%					

Таблица 6

Условия хранения	RH4			
Партия D	Временной интервал испытания на стабильность (месяцы)			
Испытание	Начальное	1M	3M	6M
Анализ - УФ (поглощение при 280 нм), мг/мл	95,1	95,0	103,6	102,7
HP-IEХ [%]				
Кислотные варианты	10,1	20,4	46,3	58,4
Пик кислотный 1	9,7	15,9	17,8	15,0
Предшествующее главному пику				
Главный пик	63,2	49,4	24,7	15,8

Следующее за главным пиком				
Пик основной 1	9,3	8,2	5,0	5,8
Пик основной 2	3,9	1,5	1,8	ND
Основные варианты	3,8	3,7	4,4	5,0
Другие	ND	0,8	ND	ND
HP-SEC [%]				
Высокомолекулярное соединение	0,79	2,34	4,91	3,68
Мономер	99,2	97,1	93,3	93,3
Пики позднего элюирования	NQ	0,56	1,74	3,00
ND - не обнаружено; NQ - не определено количественно; RH4: 40°C/относительная влажность 75%				

Таблица 7

Условия хранения	5C						
Партия E	Временной интервал испытания на стабильность (месяцы)						
Испытание	Начальное	1M	3M	6M	12M	18M	24M
Анализ - УФ (поглощение при 280 нм) [мг/мл]	94,1	97,5	97,3	99,0	91,9	101,3	98,2
HP-IEХ [%]							
Кислотные варианты	8,1	7,7	7,8	8,0	7,9	8,5	8,6
Пик кислотный 1	8,3	8,8	8,8	8,8	9,1	9,5	9,6
Предшествующее главному пику							
Главный пик	66,0	66,0	66,0	65,8	65,6	65,2	65,2
Следующее за главным пиком							
Пик основной 1	9,5	9,5	9,7	9,8	9,9	9,4	9,4
Пик основной 2	4,3	4,7	4,2	4,0	3,7	3,6	3,3
Основные варианты	3,3	3,3	3,4	3,5	3,6	3,4	3,4
Другие	0,5	ND	ND	ND	ND	0,5	0,5
HP-IEХ [%]							
Кислотные варианты	16,9	NT	17,2	17,8	18,2	NT	19,1
Главный пик	63,8	NT	63,5	62,7	63,1	NT	63,3
Следующее за главным пиком	2,0	NT	2,1	2,4	2,1	NT	1,9
Основные варианты	17,3	NT	17,1	17,0	16,8	NT	15,8

ELISA-связывание Активность относительно контроля [%]	112	NT	NT	96	NT	NT	NT
ELISA-связывание Активность относительно контроля [%]	NT	NT	NT	NT	98	100	103
Биологическая активность при функциональном анализе на клетках	NT	NT	NT	NT	113	106	90
HP-SEC [%]							
Высокомолекулярное соединение	0,21	0,27	0,17	0,37	0,37	0,46	0,51
Мономер	99,8	99,7	99,8	99,5	99,5	99,3	99,3
Пики позднего элюирования	NQ	0,05	NQ	0,13	<QL	<QL	< QL
HP-SEC [%]							
Высокомолекулярное соединение	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0,47
Мономер	NT	NT	NT	NT	NT	NT	99,2
Пики позднего элюирования	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0,36
Условия хранения	5C						
Партия E	Временной интервал испытания на стабильность (месяцы)						
Испытание	Исходная	1М	3М	6М	12М	18М	24М
НІАС [частиц/мл]							
2 мкм	1646	2307	2759	2240	5752	923	4491
5 мкм	199	343	524	240	1352	265	1733
10 мкм	15	96	136	30	275	48	585
25 мкм	0	3	4	1	15	0	11
CE-SDS (невосстанавливающий) [%]							
Общая чистота	NT	NT	NT	NT	NT	NT	96,6
CE-SDS (восстанавливающий) [%]							
Общая чистота	NT	NT	NT	NT	NT	NT	96,6

ND - не обнаружено; NQ - не определено количественно; NT - не испытывали; QL - предел количественного определения; QL = 0,25%; 5C: 5°C (± 3°C)

Таблица 8

Условия хранения	25H				
Партия E	Временной интервал испытания на стабильность (месяцы)				
Испытание	Начальное	1M	3M	6M	12M
Анализ - УФ (поглощение при 280 нм) [мг/мл]	94,1	98,0	98,2	96,0	92,9
HP-IEХ [%]					
Кислотные варианты	8,1	9,1	10,9	14,5	20,0
Пик кислотный 1	8,3	9,4	11,2	13,6	16,8
Предшествующее главному пику					
Главный пик	66,0	64,3	61,8	56,8	49,5
Следующее за главным пиком					
Пик основной 1	9,5	9,6	9,9	9,5	7,7
Пик основной 2	4,3	4,1	2,3	1,8	0,9
Основные варианты	3,3	3,4	3,5	3,8	3,9
Другие	0,5	ND	ND	ND	1,1
ELISA-связывание Активность относительно контроля [%]	112	NT	NT	99	NT
ELISA-связывание Активность относительно контроля [%]	NT	NT	NT	NT	105
Биологическая активность при функциональном анализе на клетках	NT	NT	NT	NT	103
HP-SEC [%]					
Высокомолекулярное соединение	0,21	0,51	0,49	1,19	1,87
Мономер	99,8	99,4	99,1	98,3	97,6
Низкомолекулярное соединение	NQ	0,12	0,43	0,50	0,86
ND - не обнаружено; NT - не испытывали; NQ - не определено количественно; 25H: 25°C/относительная влажность 60%					

Таблица 9

Условия хранения	RH4			
Партия E	Временной интервал испытания на стабильность (месяцы)			
Испытание	Начальное	1M	3M	6M
Анализ - УФ (поглощение при 280 нм) [мг/мл]	94,1	94,9	98,4	95,5
HP-IEC [%]				
Кислотные варианты	8,1	18,5	36,3	56,7
Пик кислотный 1	8,3	15,1	19,4	16,5
Предшествующее главному пику				
Главный пик	66,0	51,6	32,6	16,9
Следующее за главным пиком				
Пик основной 1	9,5	8,8	7,3	5,5
Пик основной 2	4,3	1,7	0,4	ND
Основные варианты	3,3	3,6	4,1	4,4
Другие	0,5	0,7	ND	ND
ELISA-связывание Активность относительно контроля [%]	112	NT	NT	104
HP-SEC [%]				
Высокомолекулярное соединение	0,21	1,39	1,66	4,86
Мономер	99,8	98,1	96,7	92,7
Низкомолекулярное соединение	NQ	0,51	1,60	2,44
ND - не обнаружено; NQ - не определено количественно; NT - не испытывали; RH4: 40°C/относительная влажность 75%				

[00105] В таблице 10 перечислены последовательности в перечне последовательностей.

Таблица 10

Идентификаторы последовательностей

SEQ ID NO:	Описание
1	HC hum13B8-b
2	LC hum13B8-b
3	CDRH1 13B8-b
4	CDRH2 13B8-b
5	CDRH3 13B8-b
6	CDRL1 13B8-b
7	CDRL2 13B8-b
8	CDRL3 13B8-b
9	IL-23p19 человека
10	ДНК HC hum13B8-b
11	ДНК LC hum13B8-b
12	Сигнальная последовательность тяжелой цепи
13	Сигнальная последовательность легкой цепи

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> МЕРК ШАРП энд ДОУМ Корп.
 Каши, Рамеш
 Бадкар, Аникет

<120> Составы в виде раствора сконструированных антител к IL-23p19

<130> 23364

<150> US 61/737035

<151> 2012-12-13

<160> 13

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 446

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Каркасные участки человека, CDR грызуна

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(116)

<223> Вариабельный домен

<400> 1

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ile	Phe	Ile	Thr	Tyr
			20					25					30		

Trp	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			

Gly	Gln	Ile	Phe	Pro	Ala	Ser	Gly	Ser	Ala	Asp	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55				60					

Glu	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80

Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	

Ala	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
			100					105					110		

Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
		115					120					125			

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 2

<211> 214

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Каркасные участки человека, CDR грызуна

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(108)

<223> Вариабельный домен

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 3
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Mus musculus

<400> 3

Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr Trp Met Thr
1 5 10

<210> 4
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR грызуна с одной аминокислотной заменой

<400> 4

Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 5
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Mus musculus

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr
1 5

<210> 6
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Mus musculus

<400> 6

Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Mus musculus

<400> 7

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Mus musculus

<400> 8

Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe Thr
1 5

<210> 9
<211> 170
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 9

Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln Cys Gln Gln
1 5 10 15

Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His Pro Leu Val
20 25 30

Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr Thr Asn Asp
35 40 45

Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln Gly Leu Arg
50 55 60

Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly Leu Ile Phe
65 70 75 80

Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu Pro Ser Leu
85 90 95

Leu Pro Asp Ser Pro Val Gly Gln Leu His Ala Ser Leu Leu Gly Leu
100 105 110

Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr Gln Gln Ile
115 120 125

Pro Ser Leu Ser Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu Leu Arg Phe
130 135 140

Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala Ala Arg Val
145 150 155 160

Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Ser Pro
165 170

<210> 10
<211> 1398
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Константные и каркасные участки человека, CDR грызуна

<400> 10
atggctgtgc tggggctgct gttctgcctg gtgacattcc caagctgtgt gctgtcccag 60
gtgcagctgg tgcagtctgg cgctgaggtg aagaagcctg ggcctccgt gaaggtctcc 120
tgcaaggctt ctggctacat cttcatcacc tactggatga cctgggtgcg gcaggccoct 180
ggccaggggc tggagtggat gggccagatc ttccctgcc aaggctctgc agactacaac 240
gagaagttcg aaggcagagt caccatgacc acagacacat ccaccagcac agcctacatg 300
gagctgagga gcctgagatc tgacgacacc gccgtgtatt actgtgccag aggcggtggc 360
ggattcgctt actggggcca gggcacctg gtcaccgtct ccagcgctag caccaagggc 420
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcgggccctg 480
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 540
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggt gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 600
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 660
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaata ttgtgacaaa 720
actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctctc 780
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg 840
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcggtg 900
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 960
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 1020

gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1080
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag	1140
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag	1200
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1260
tcctttcttc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	1320
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc	1380
ctgtctccgg gtaaataga	1398

<210> 11
 <211> 702
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Константные и каркасные участки человека, CDR грызуна

<400> 11	
atggctccag tgcagctgct ggggctgctg gtgctgttcc tgccagccat gagatgtgat	60
atccagatga cccagtctcc atcctccctg tctgcctctg tgggcgacag agtgaccatc	120
acctgcagga ccagcgagaa catctacagc tacctggcct ggtatcagca gaagccaggg	180
aaggccccta agctgctgat ctataacgcc aagaccctgg ctgaaggggt gccatccagg	240
ttcagcggca gcggctctgg gacagacttc accctgacca tcagcagcct gcagcctgag	300
gacttcgcca cctactactg tcagcaccac tacggaattc cattcacctt cggccagggc	360
accaaggtgg agatcaagcg tacggtggct gcaccatctg tgttcatctt cctccatct	420
gatgagcagc tgaagtctgg aactgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctatccc	480
agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggat aacgccctcc agagcggcaa ctcccaggag	540
agcgtgacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg	600
agcaaagcag actacgagaa acacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca tcagggcctg	660
agcagccccg tgacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aa	702

<210> 12
 <211> 19
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus

<400> 12

Met	Ala	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Phe	Cys	Leu	Val	Thr	Phe	Pro	Ser	Cys
1				5					10					15	

Val Leu Ser

<210> 13
<211> 19
<212> БЕЛОК
<213> Rattus norvegicus

<400> 13

Met	Ala	Pro	Val	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Val	Leu	Phe	Leu	Pro	Ala
1				5					10					15	

Met Arg Cys

Первоначально поданная
формула изобретения

Формула изобретения

1. Состав в виде раствора антитела hum13B8-b к IL-23p19, содержащий:

- a) по меньшей мере 50 мг/мл антитела hum13B8-b к IL-23p19;
- b) 10 mM гистидинового буфера, pH 6,0;
- c) 0,05% полисорбата 80 и
- d) 7% сахарозы,

где указанное антитело hum13B8-b содержит:

- i) полипептид легкой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 2; и
- ii) полипептид тяжелой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1.

2. Состав в виде раствора по п. 1, содержащий по меньшей мере 80 мг/мл антитела hum13B8-b к IL-23p19.

3. Состав в виде раствора по п. 2, содержащий по меньшей мере 100 мг/мл антитела hum13B8-b к IL-23p19.

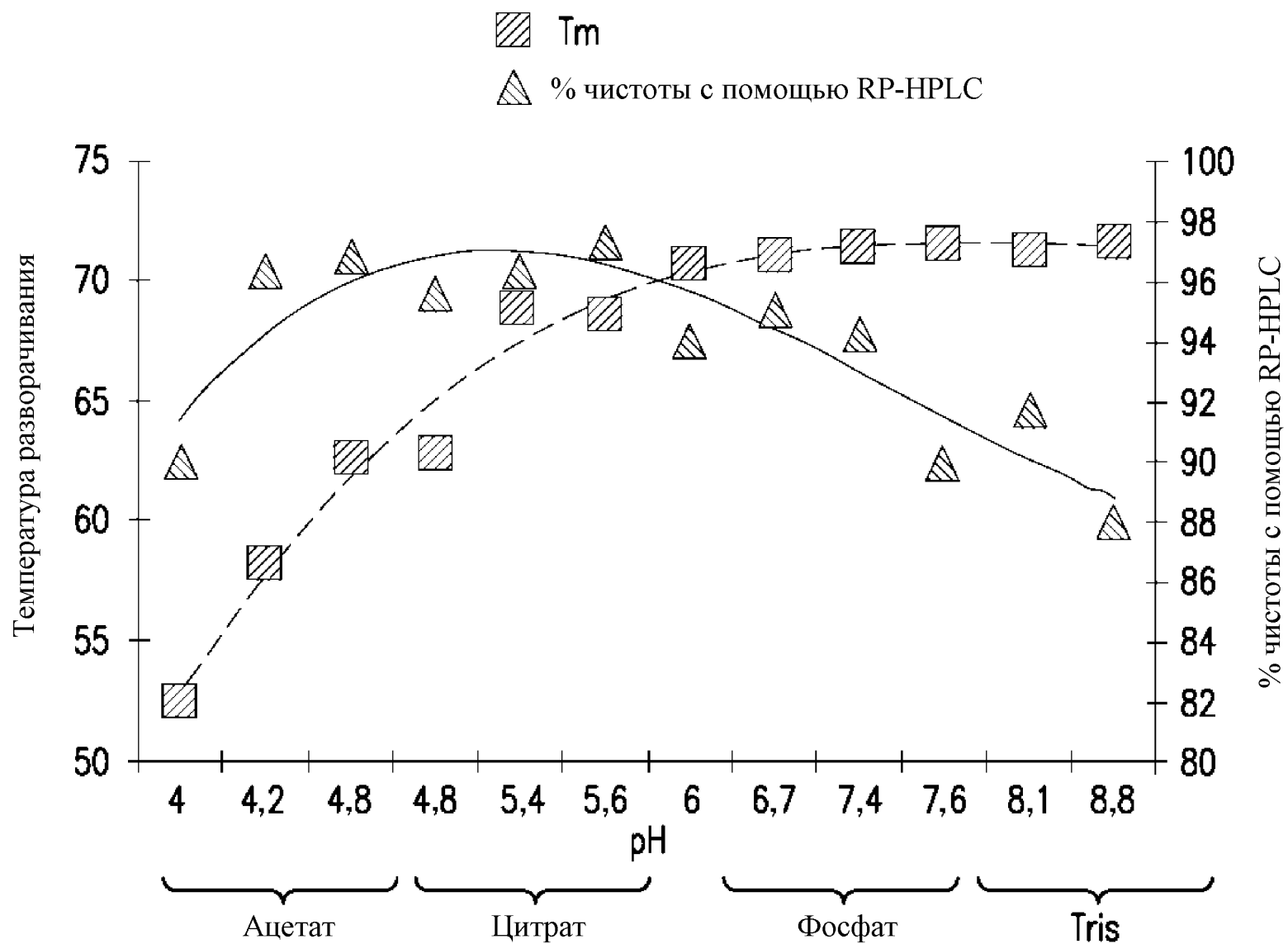
4. Состав в виде раствора по п. 1, содержащий 80-120 мг/мл антитела hum13B8-b к IL-23p19.

5. Состав в виде раствора по п. 4, содержащий приблизительно 100 мг/мл антитела hum13B8-b к IL-23p19.

6. Способ лечения аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или пролиферативного нарушения, включающий введение состава в виде раствора по любому из пп. 1-5 субъекту, который нуждается в этом.

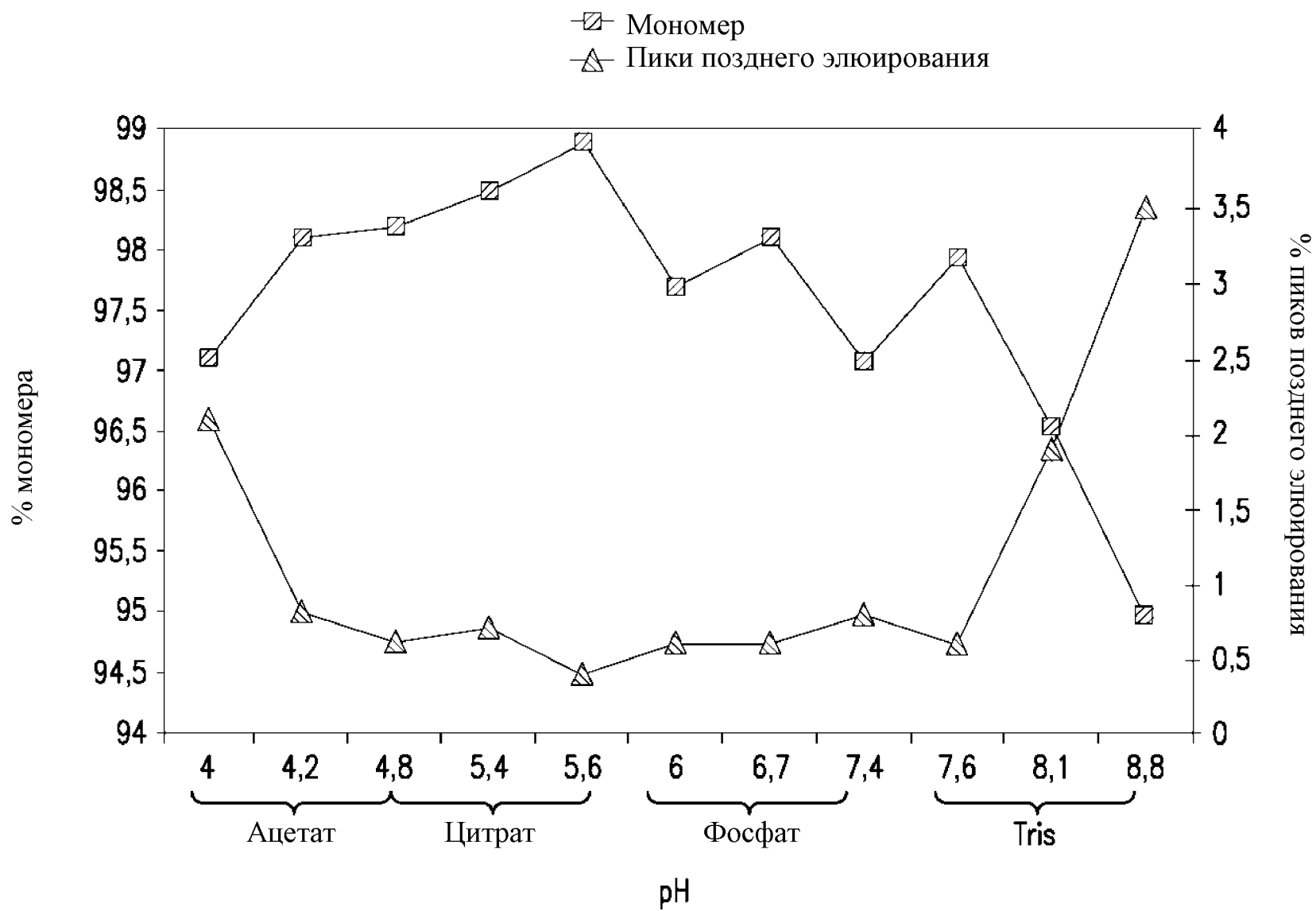
7. Состав в виде раствора по любому из пп. 1-5 для применения при лечении аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или пролиферативного нарушения.

8. Применение состава в виде раствора по любому из пп. 1-5 при производстве лекарственного препарата для лечения аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или пролиферативного нарушения.

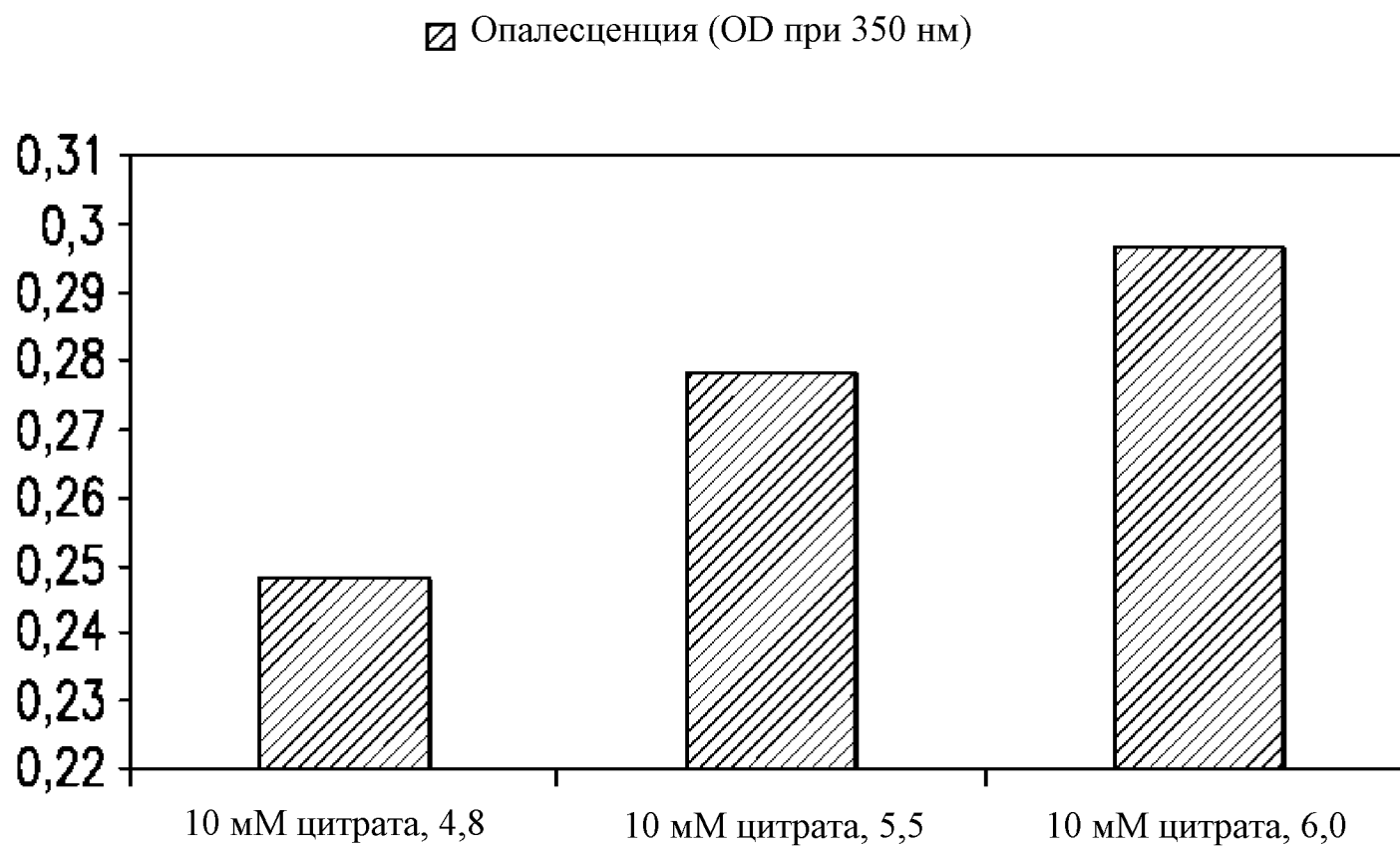


ФИГ. 1А

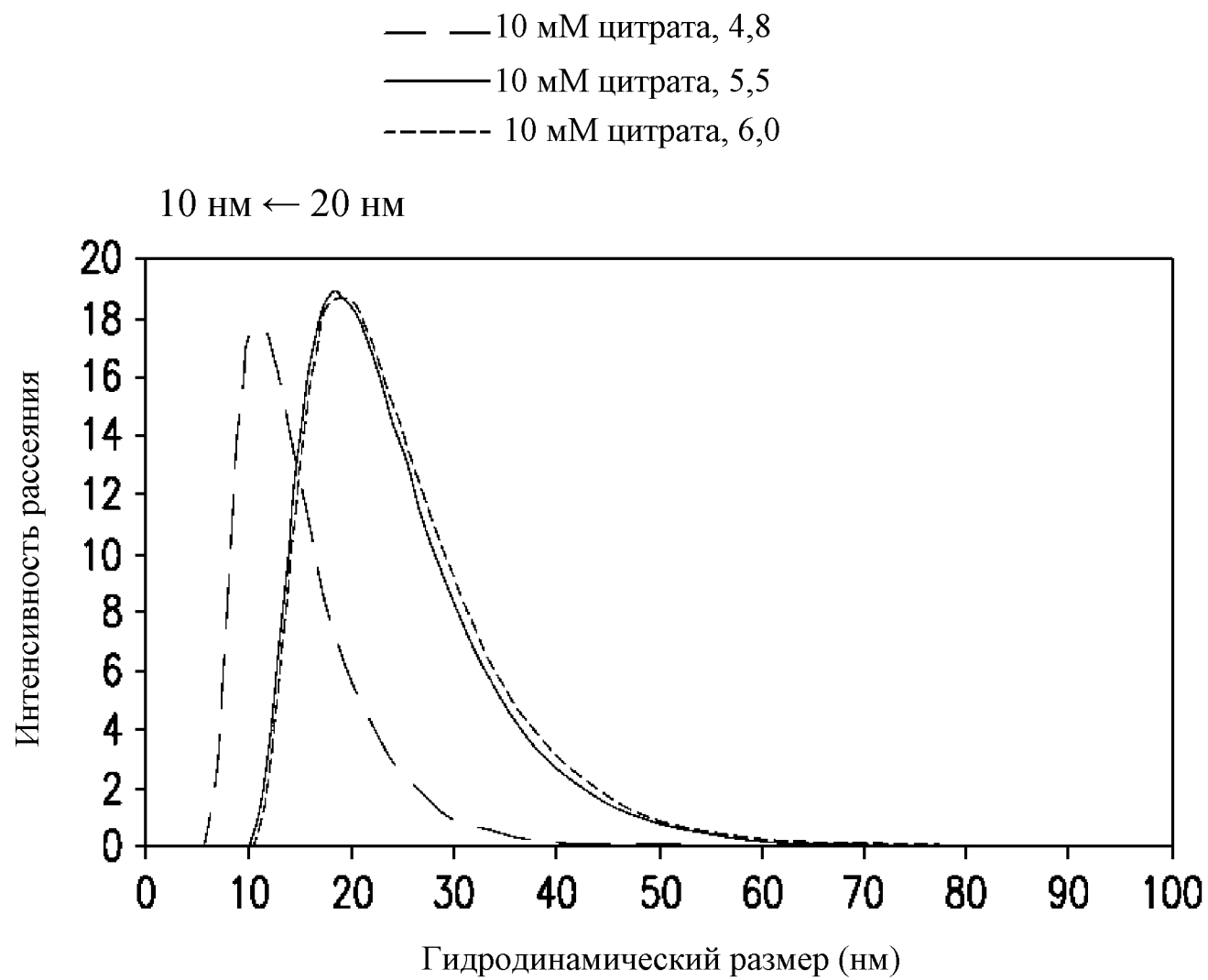
2/46



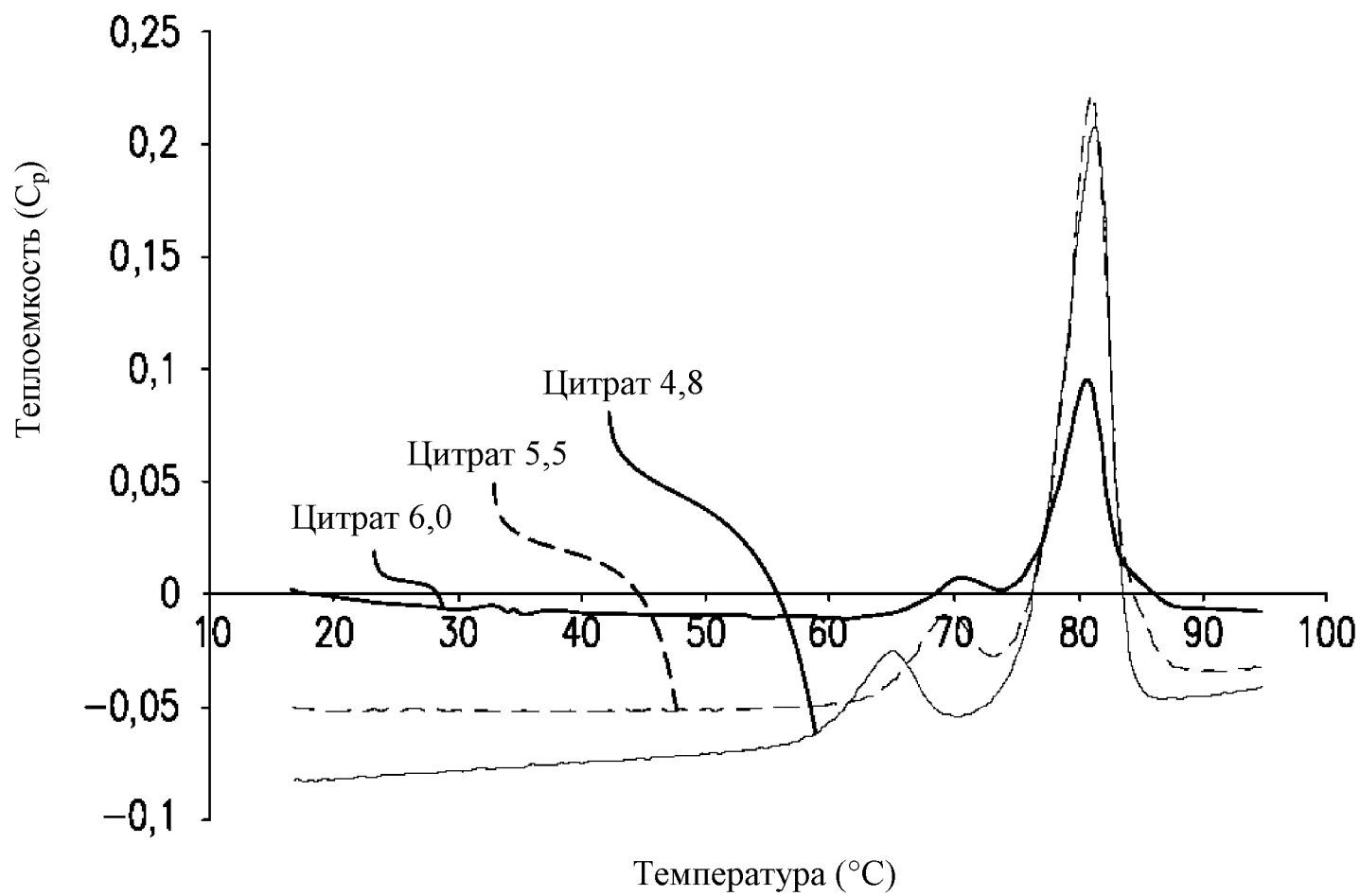
ФИГ. 1В



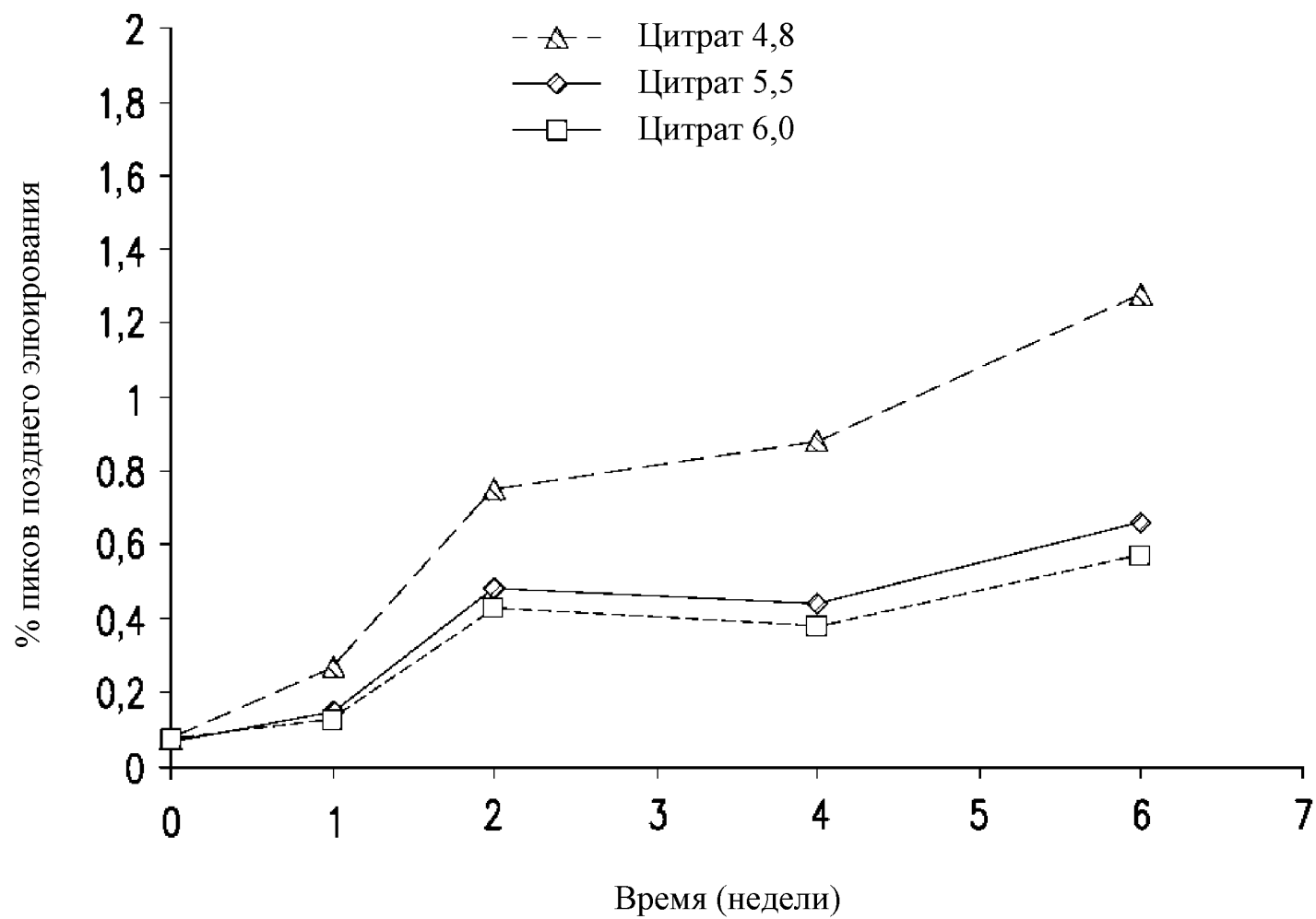
ФИГ. 1С



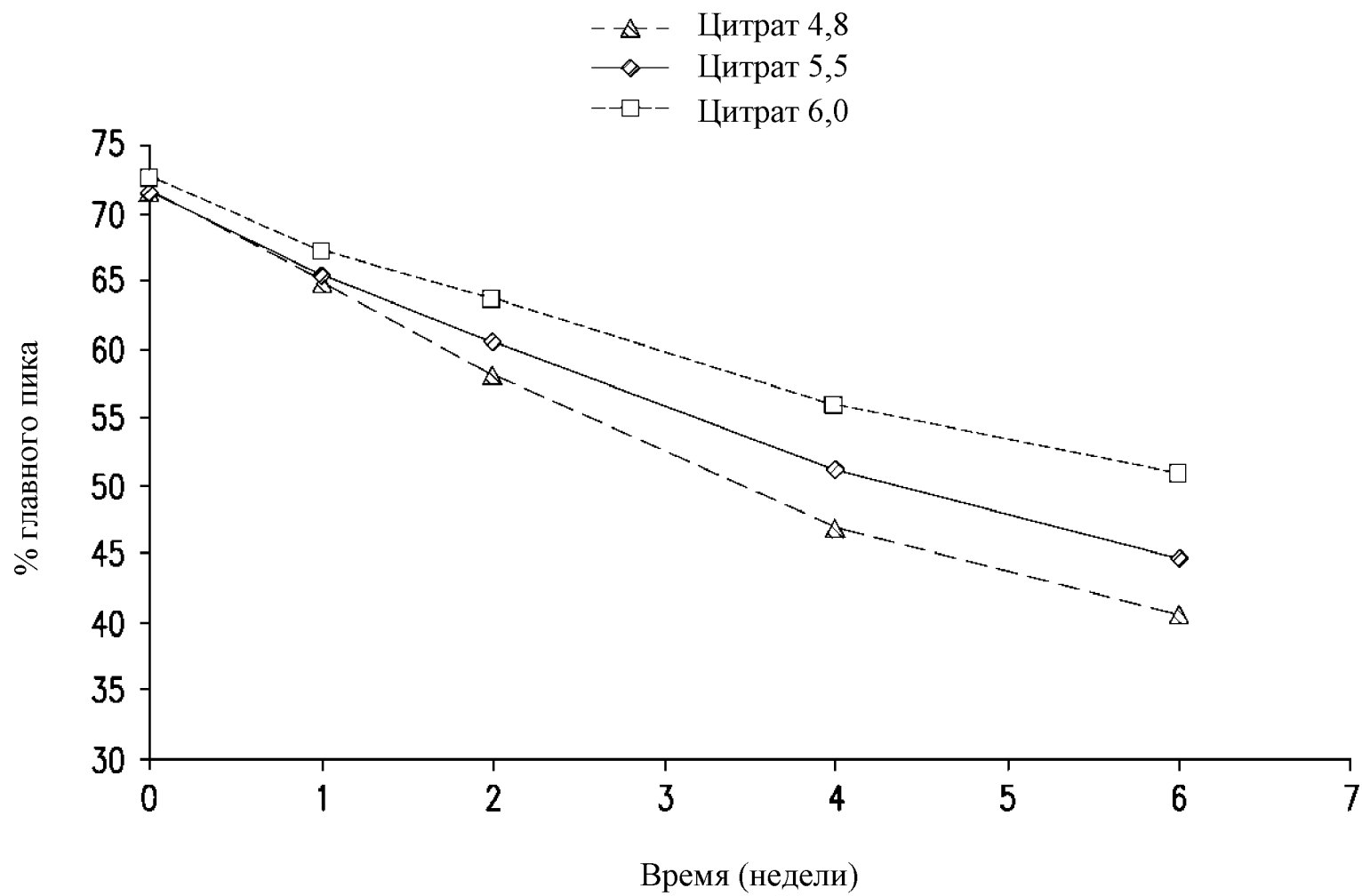
ФИГ. 1D



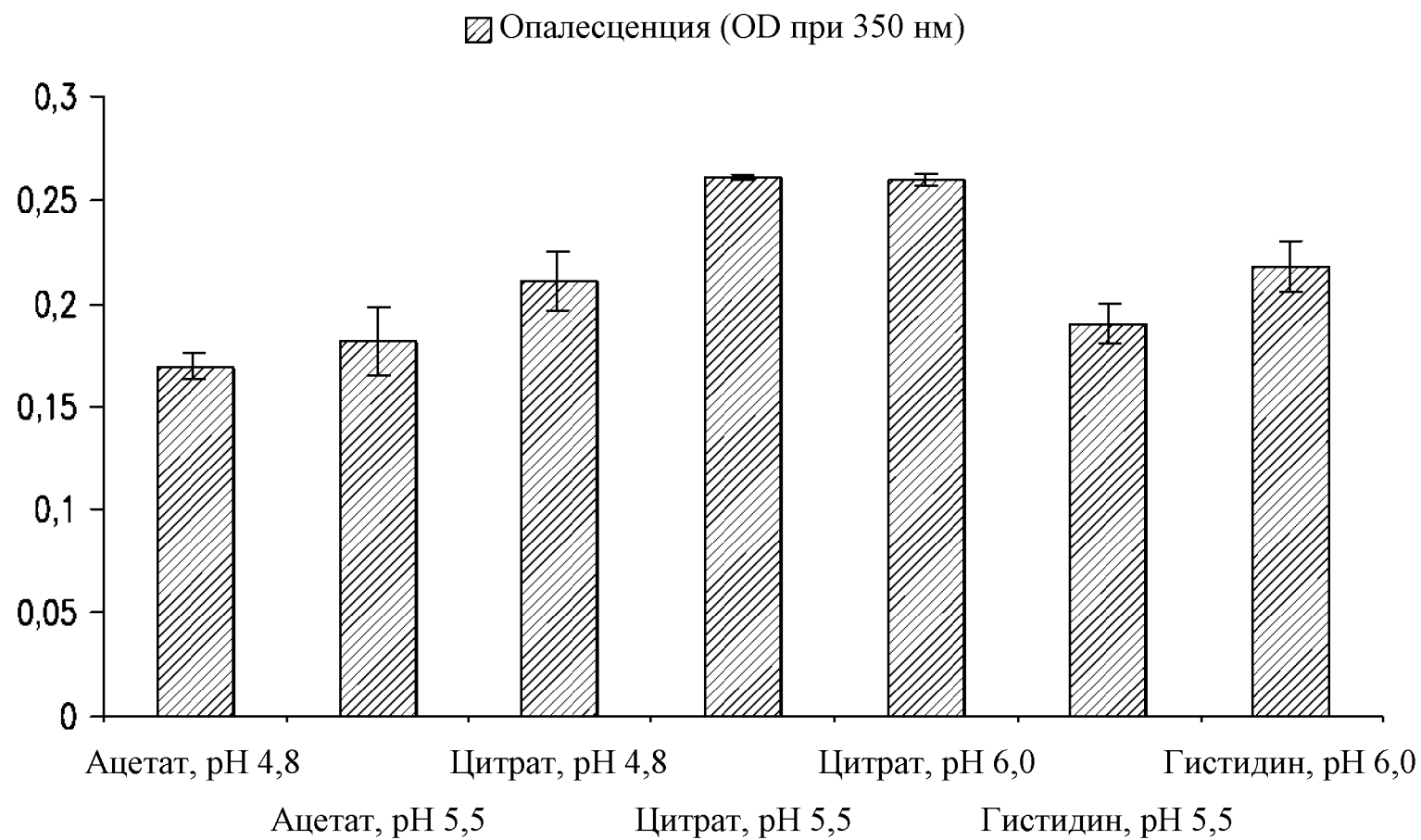
ФИГ. 1Е



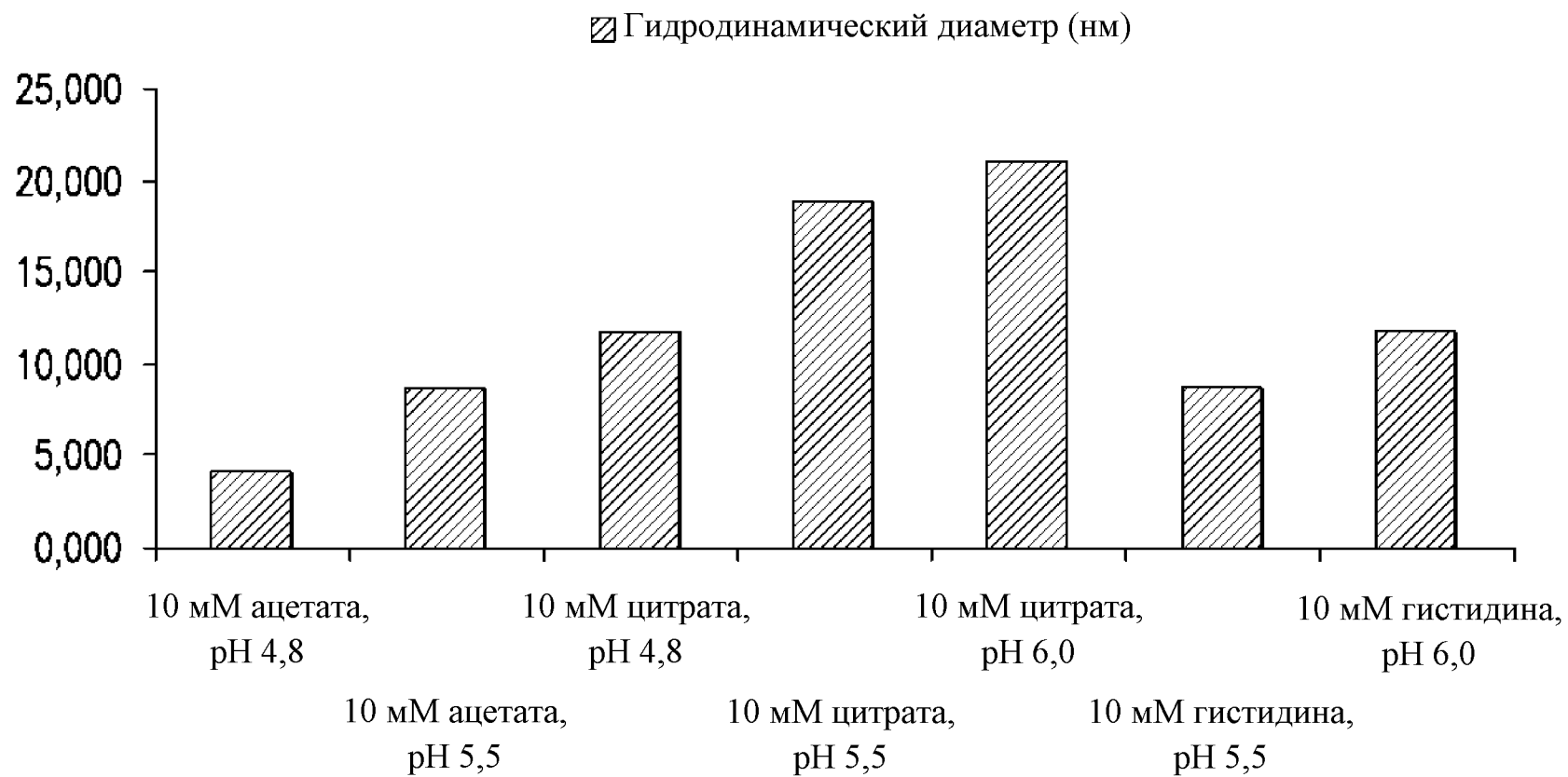
ФИГ. 1F



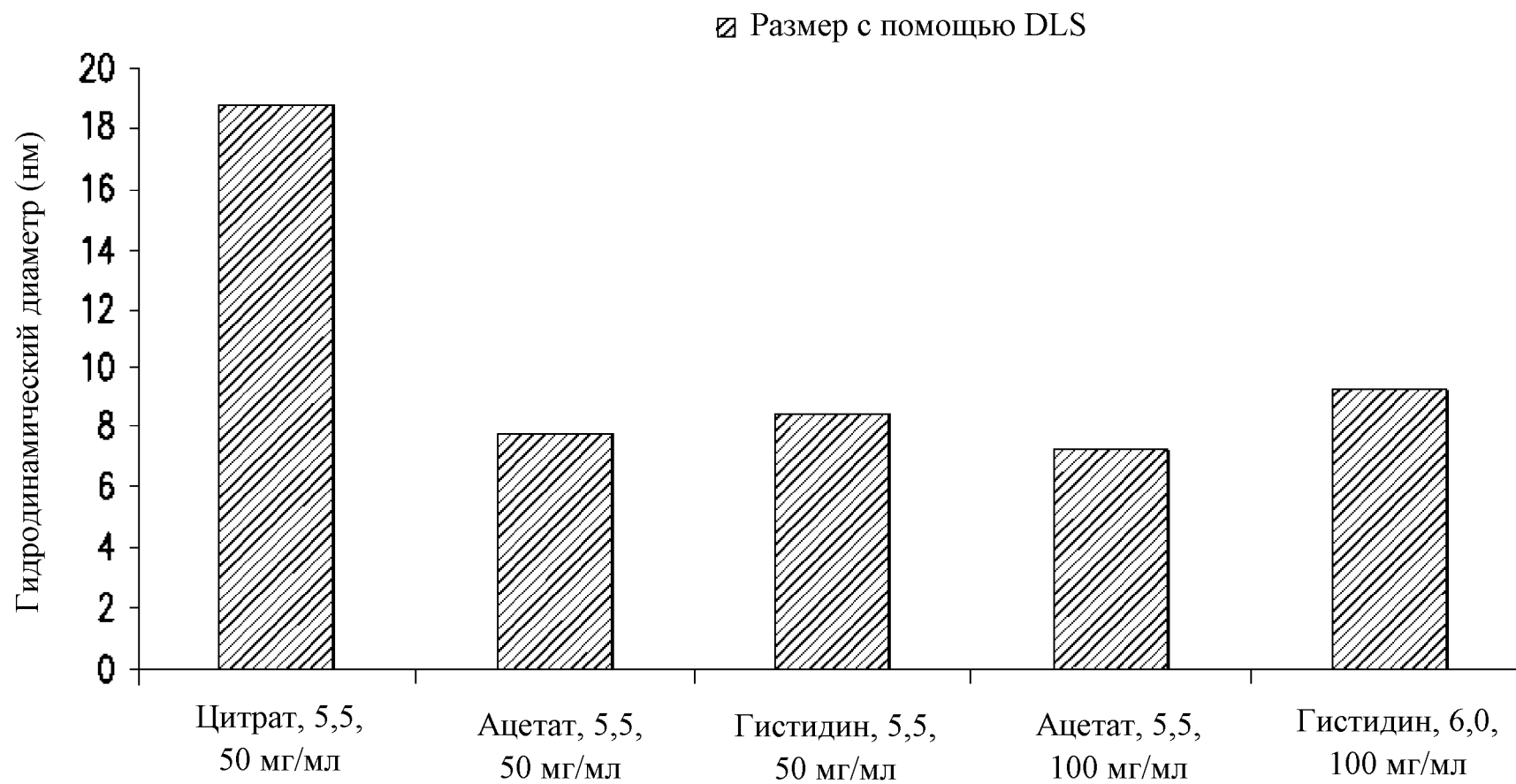
ФИГ. 1G



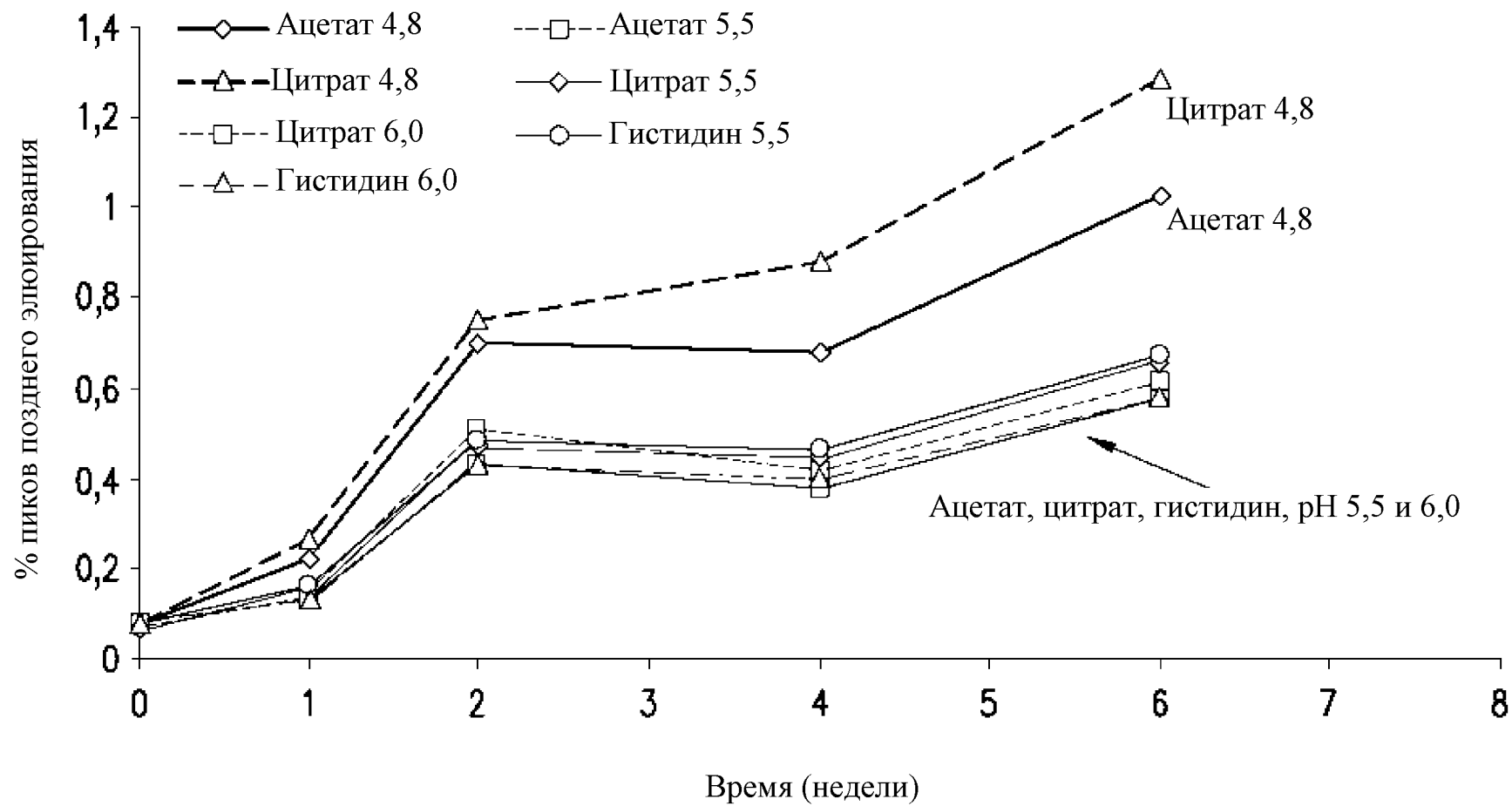
ФИГ. 1Н



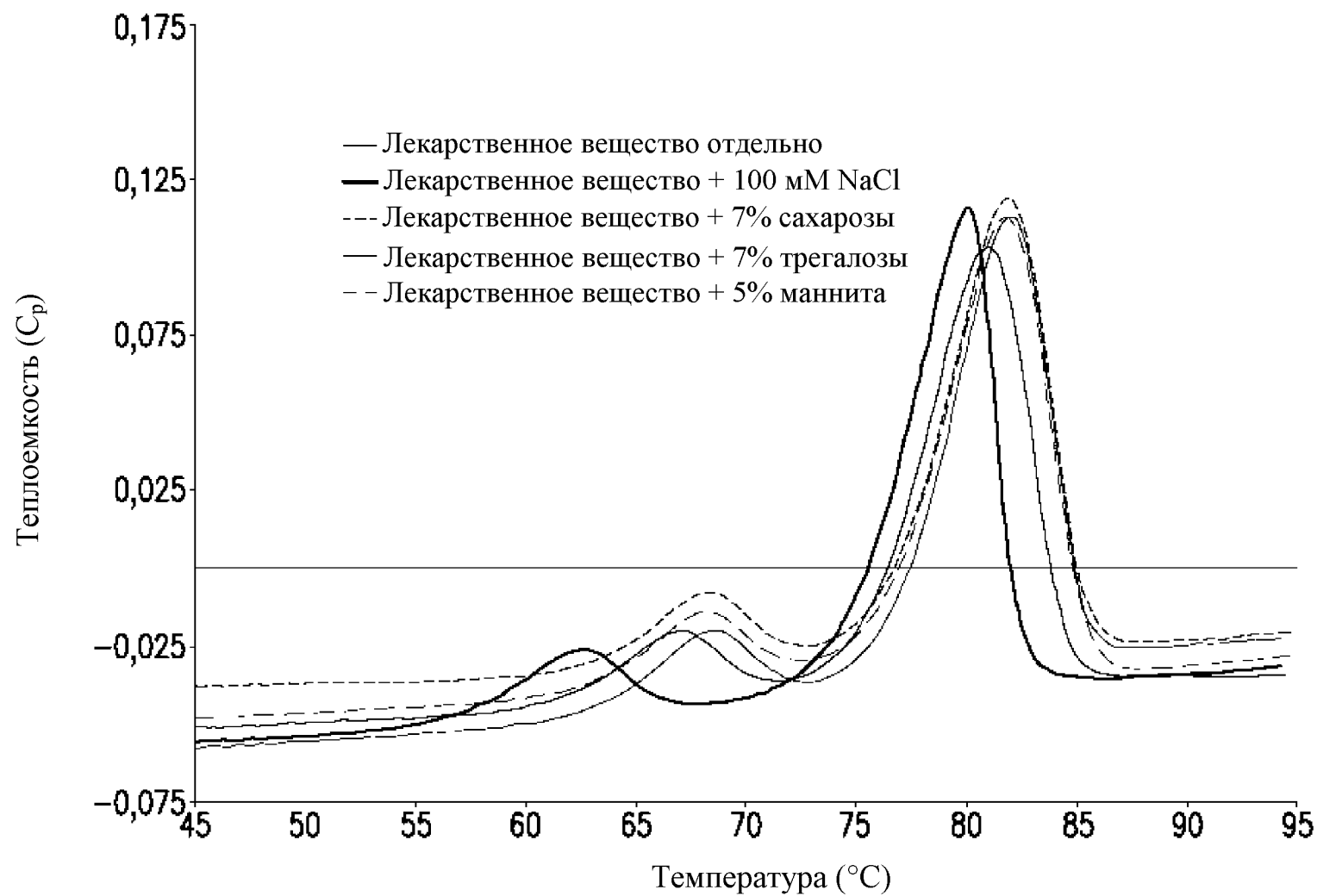
ФИГ. 11



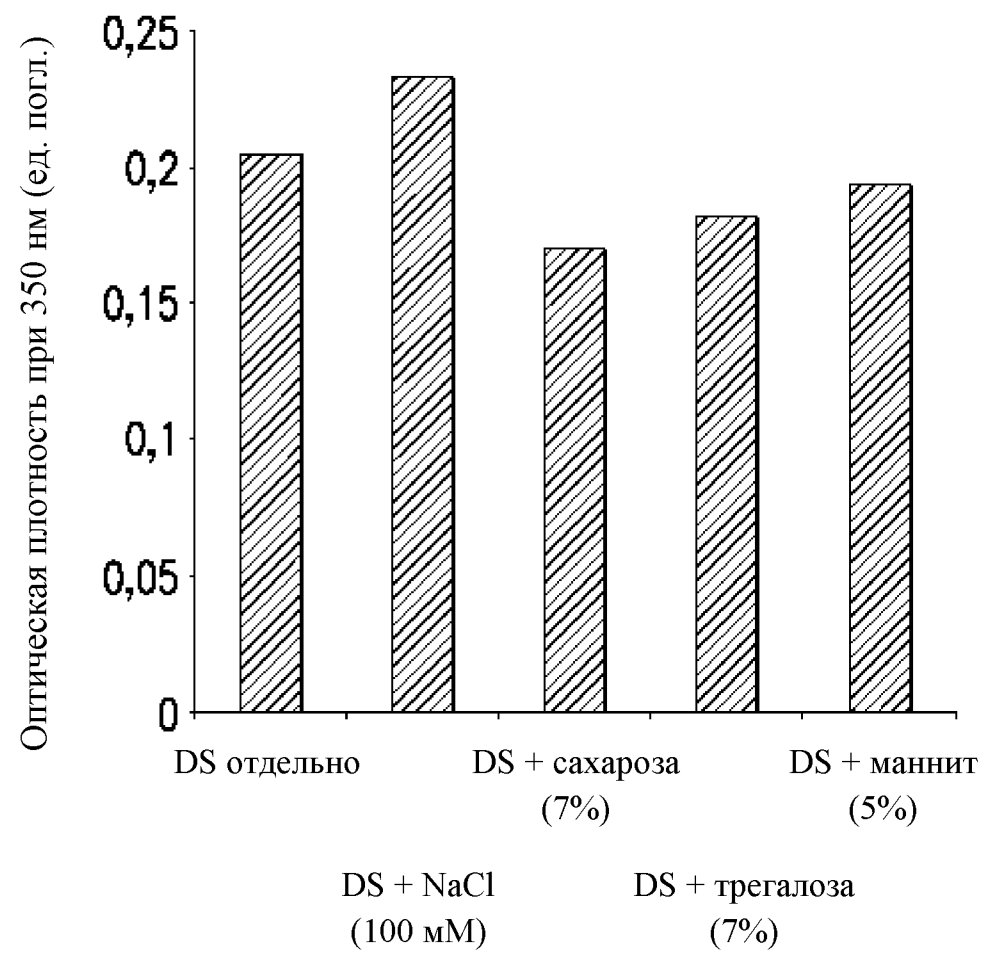
ФИГ. 1J



ФИГ. 1К

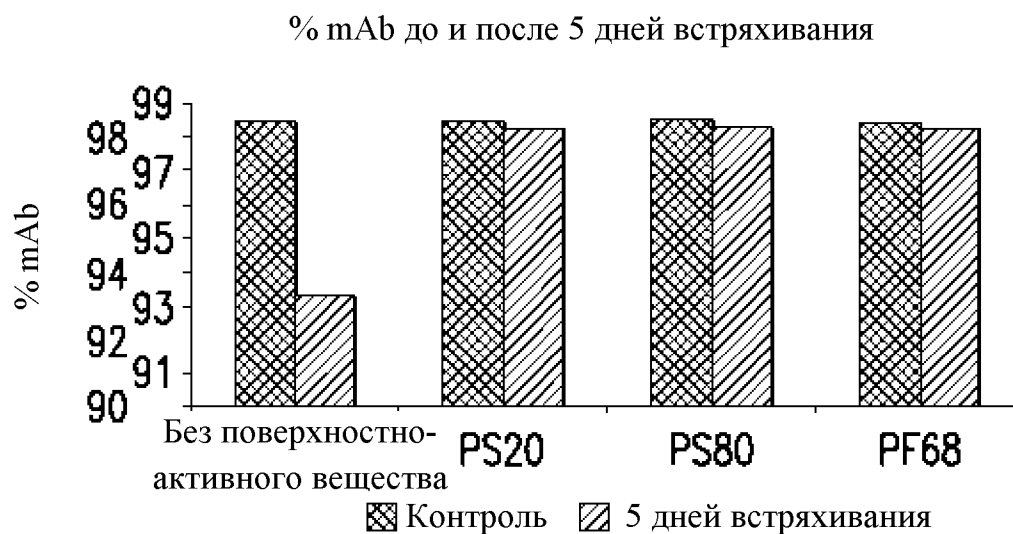


ФИГ. 2А



ФИГ. 2В

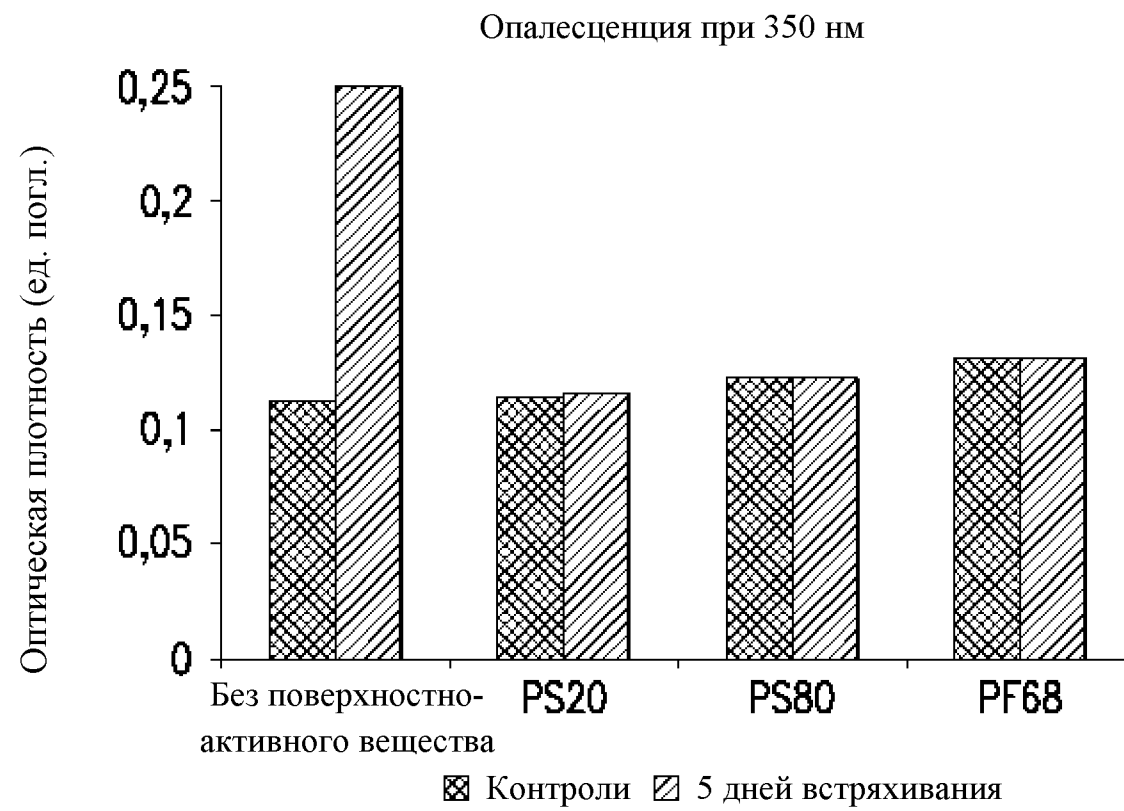
14/46



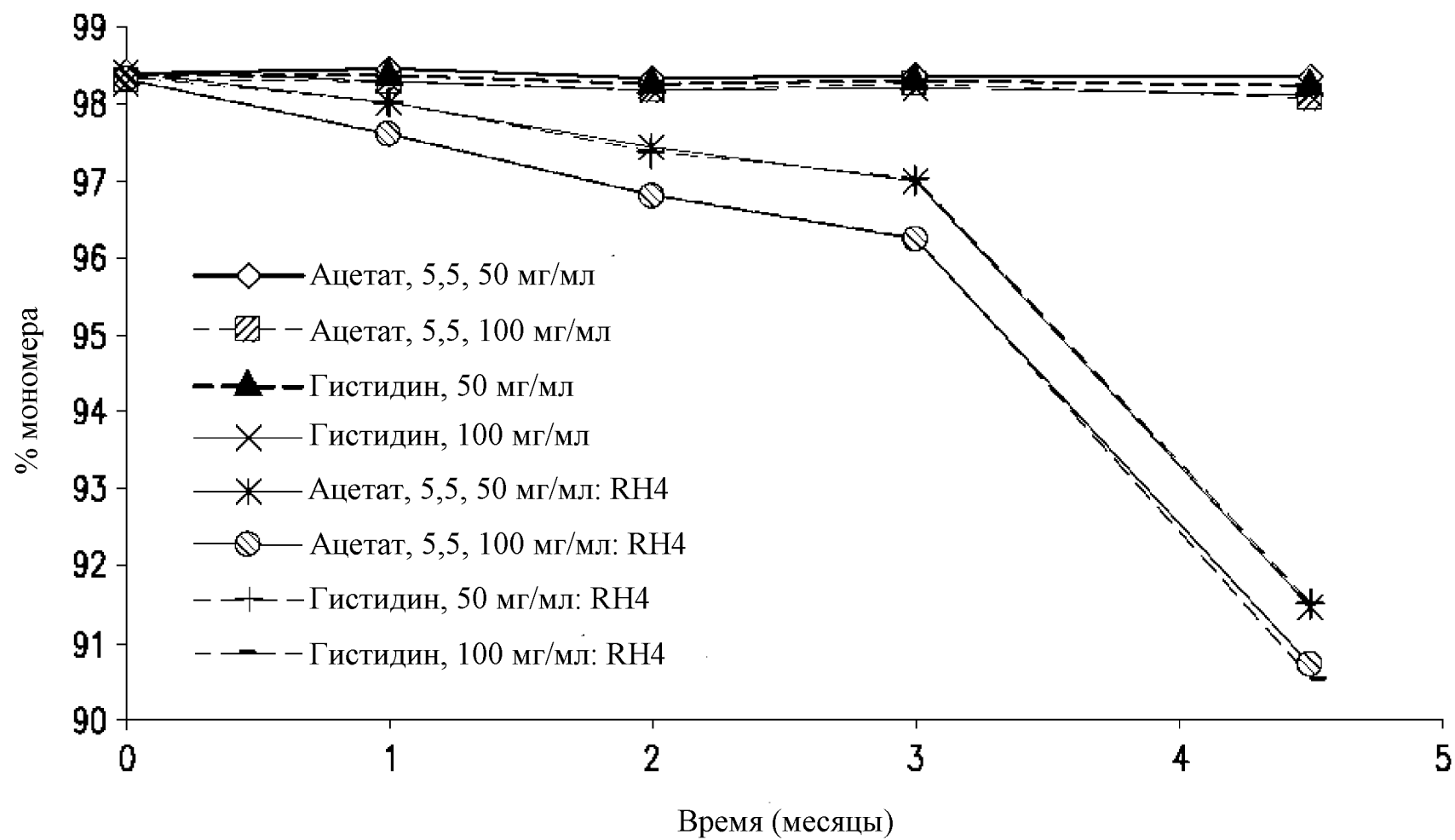
ФИГ. 3А



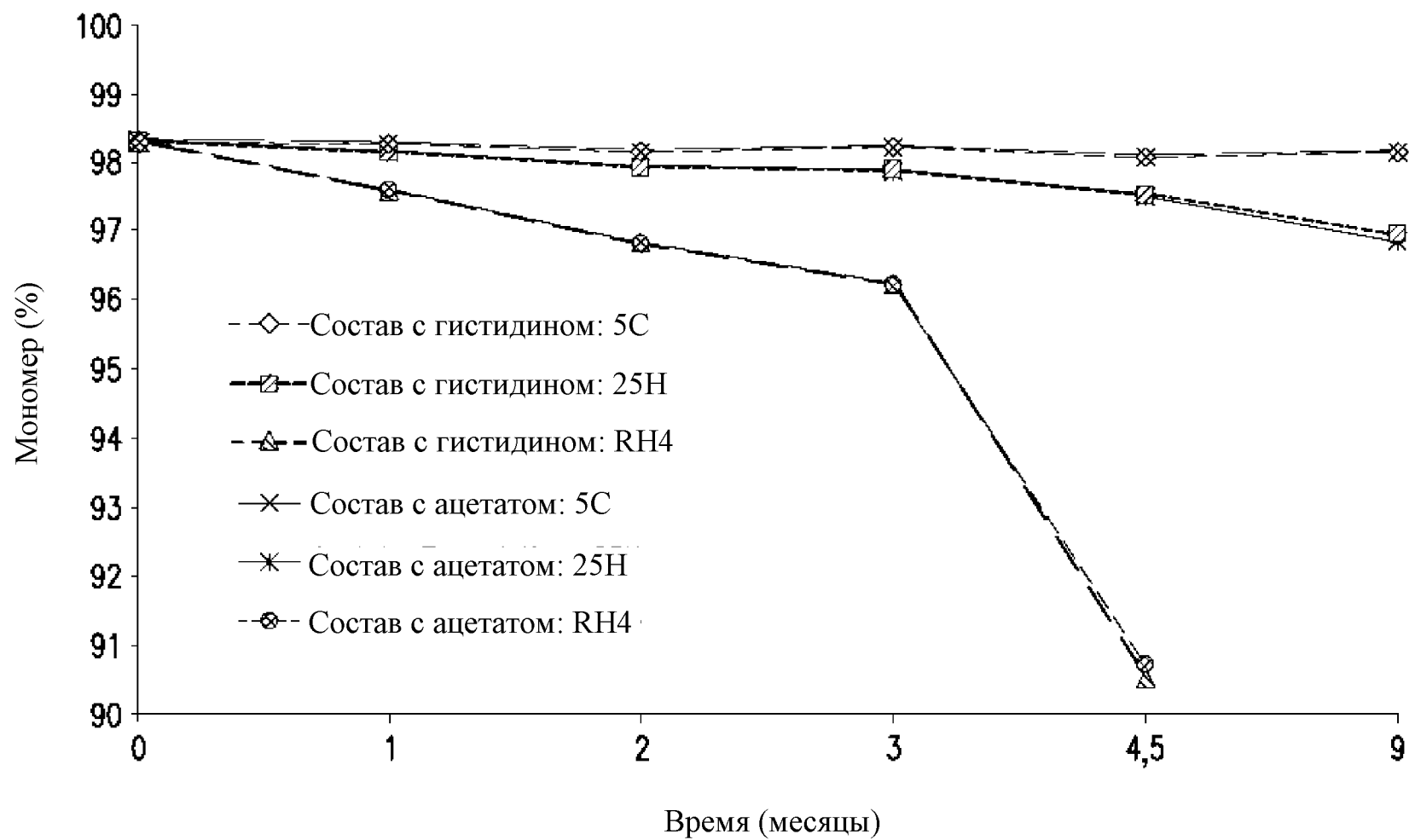
ФИГ. 3В



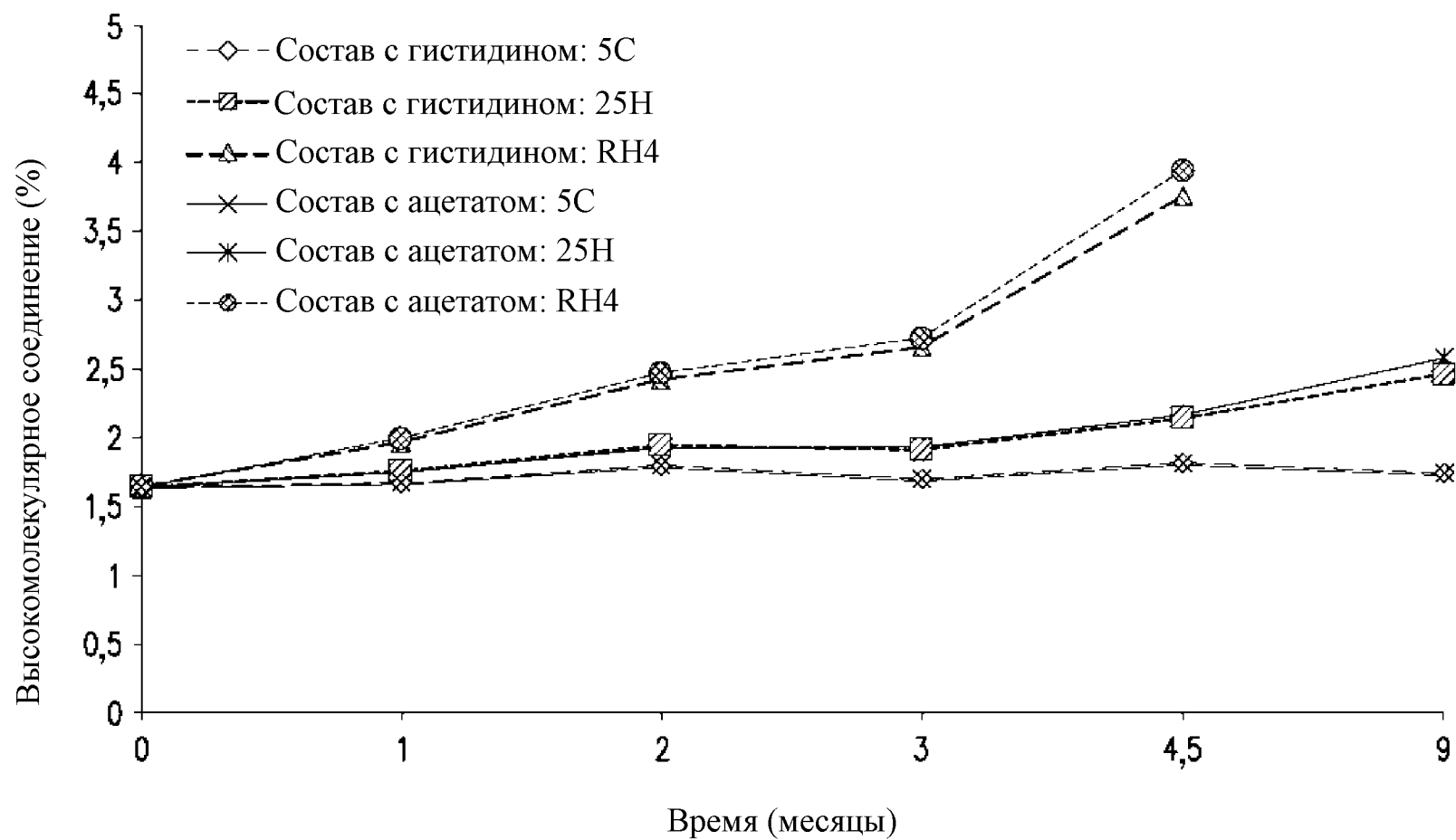
ФИГ. 3С



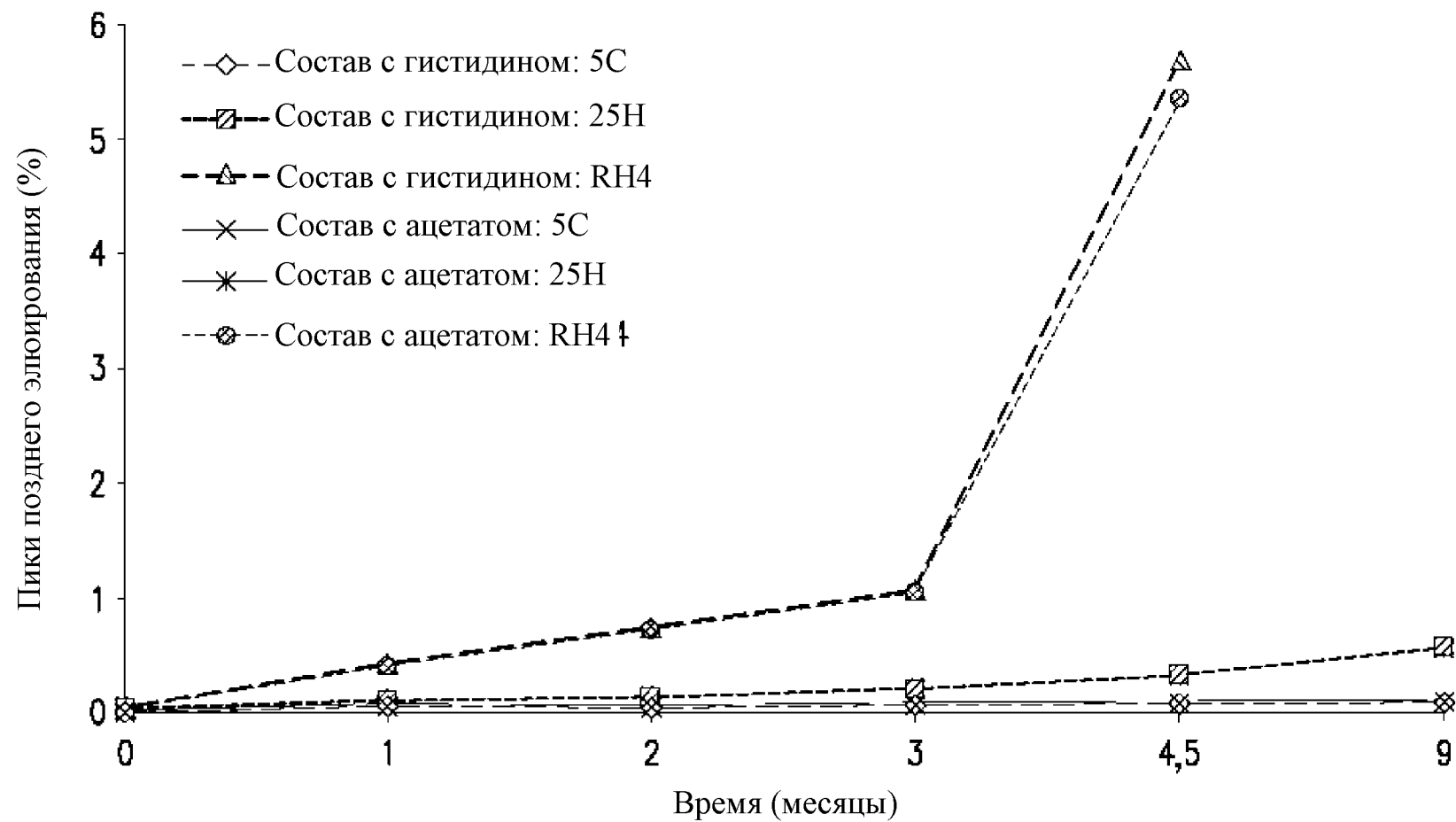
ФИГ. 4А



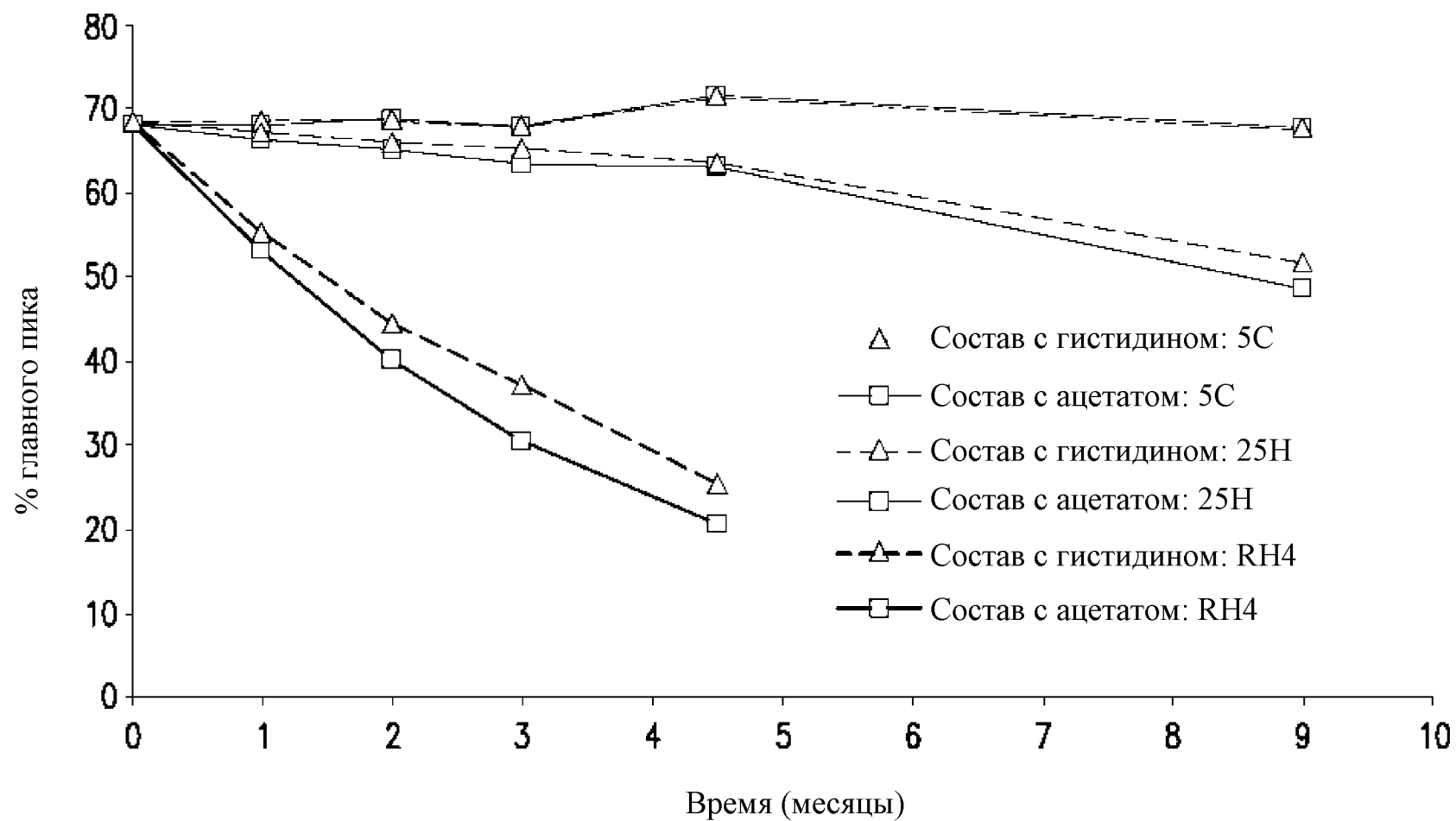
ФИГ. 4В



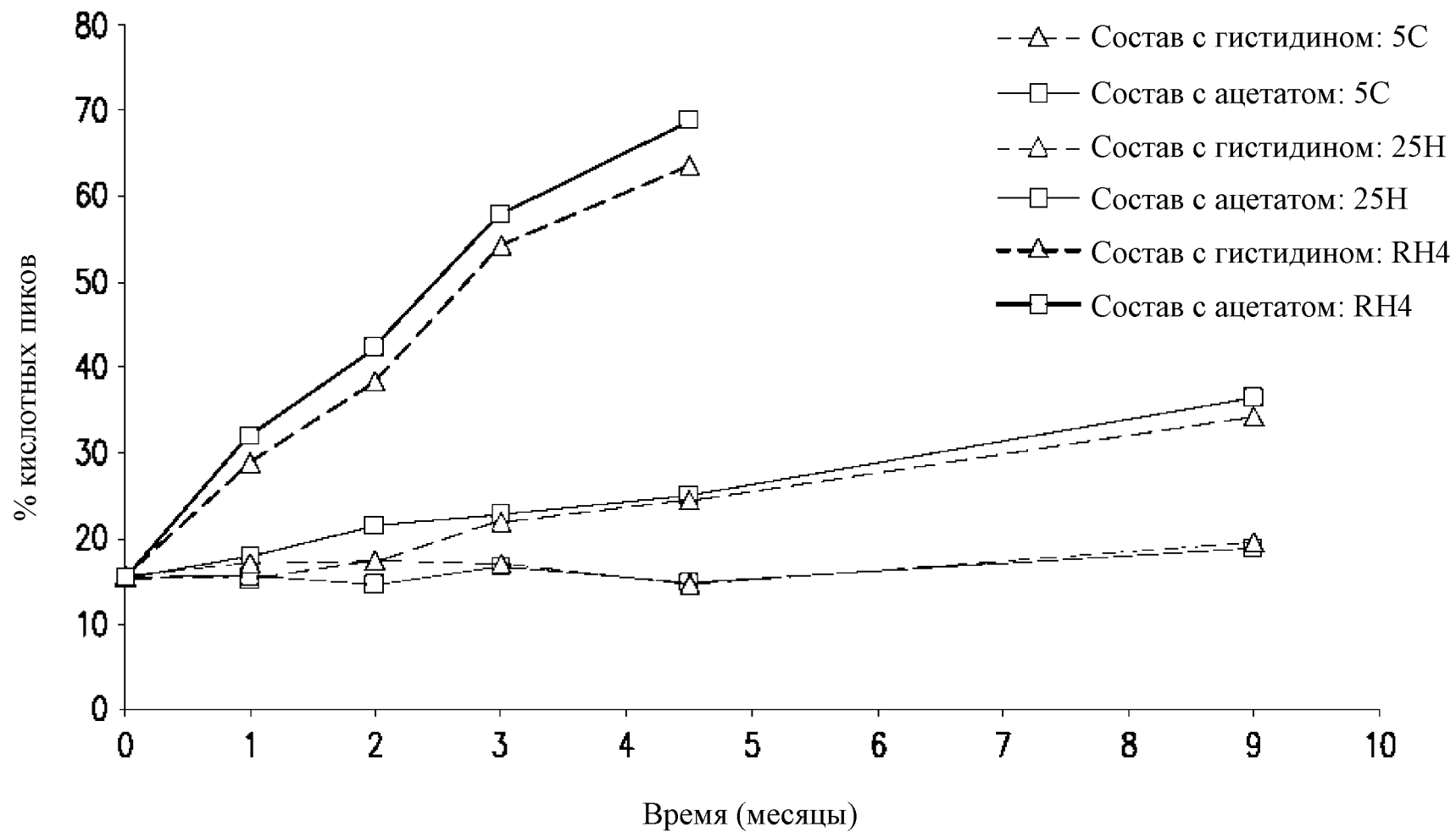
ФИГ. 4С



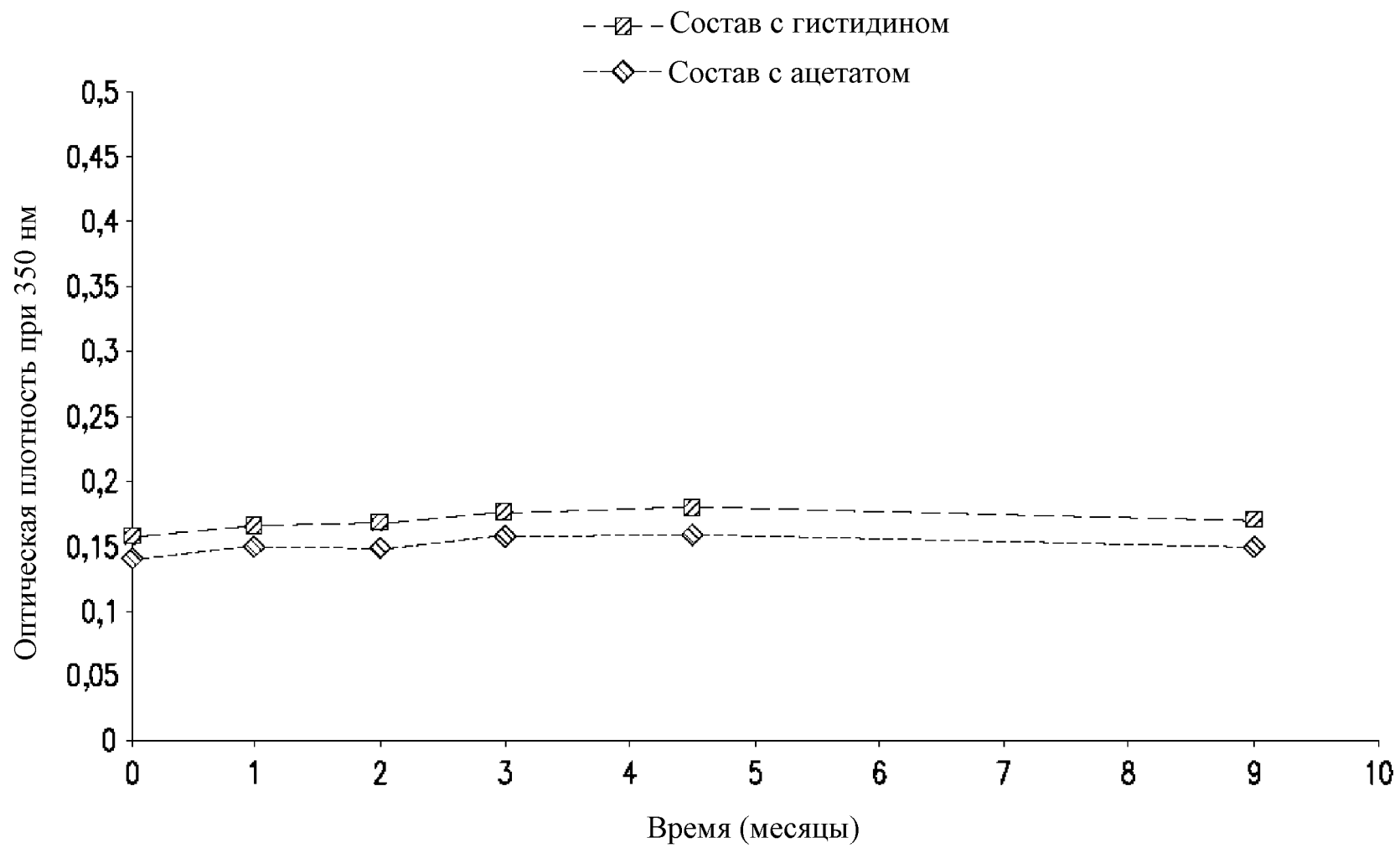
ФИГ. 4D



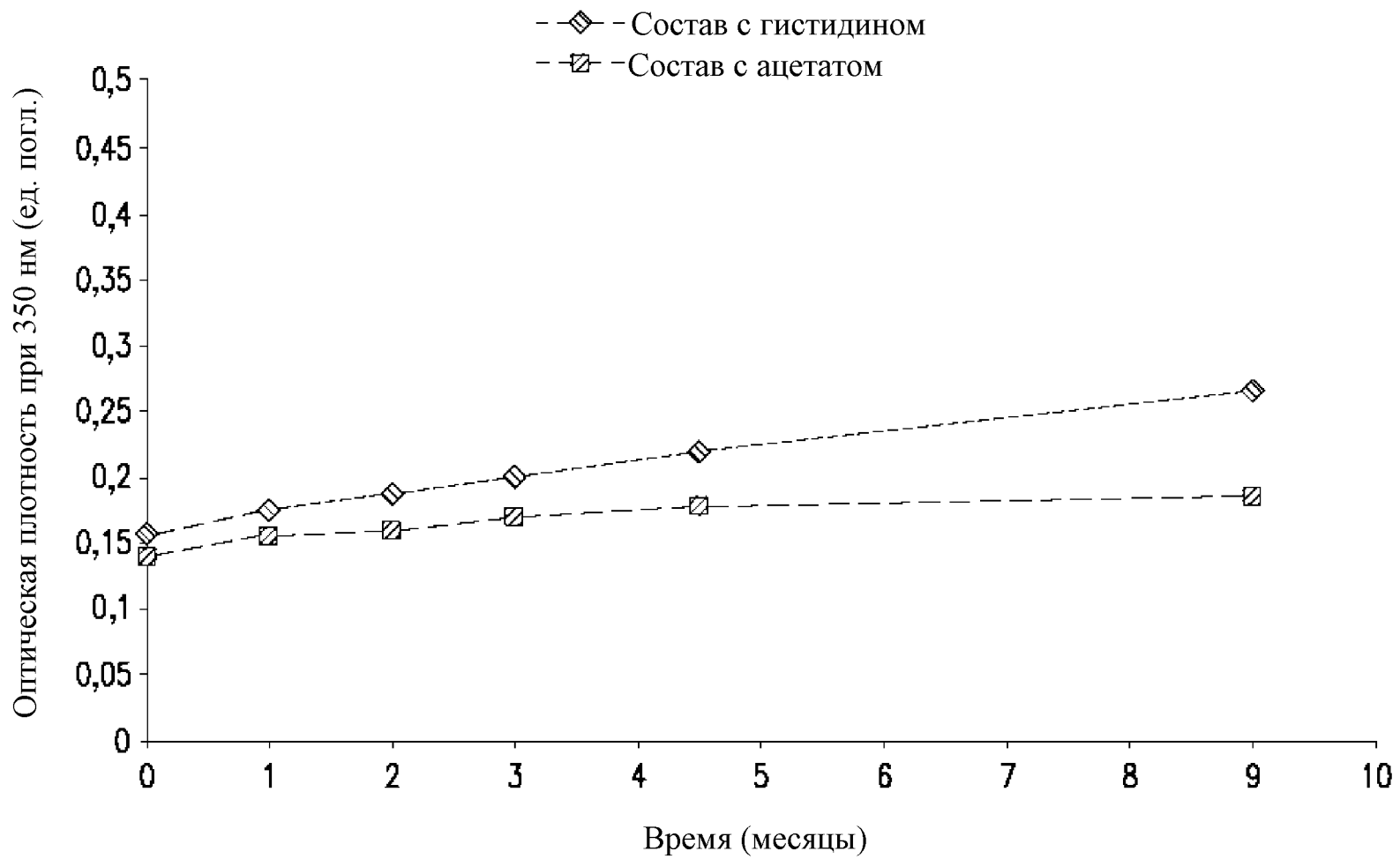
ФИГ. 4Е



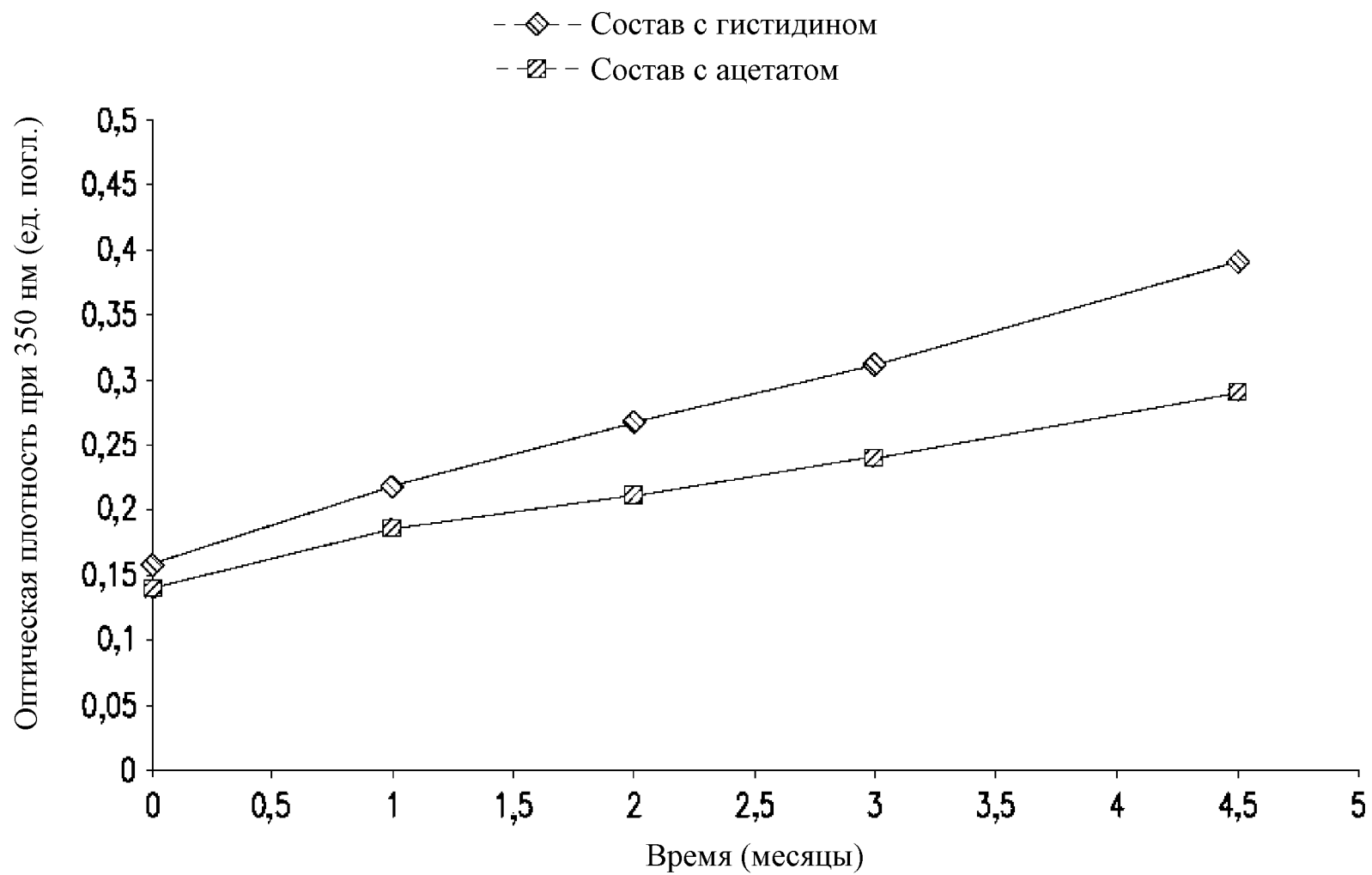
ФИГ. 4F



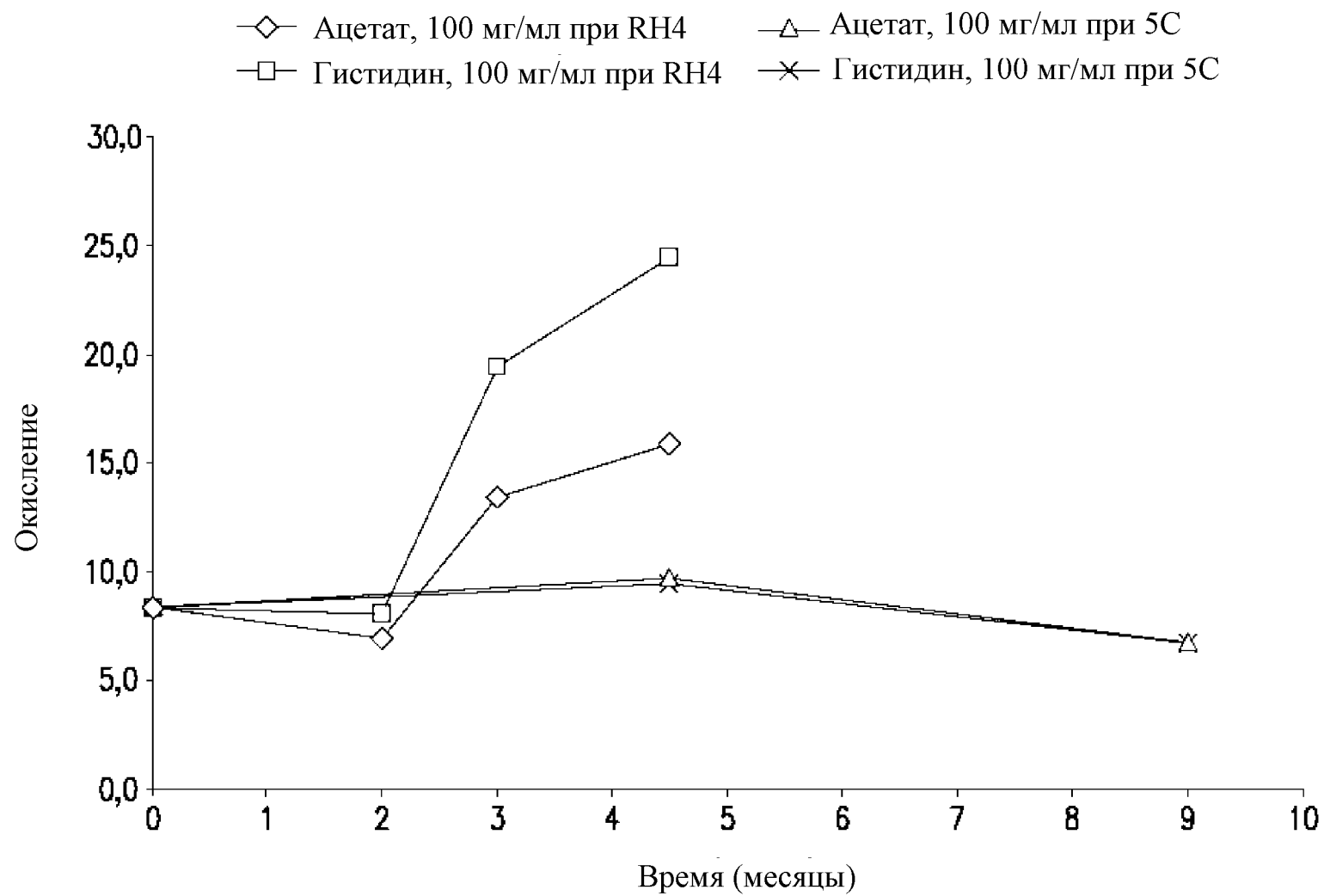
ФИГ. 4G



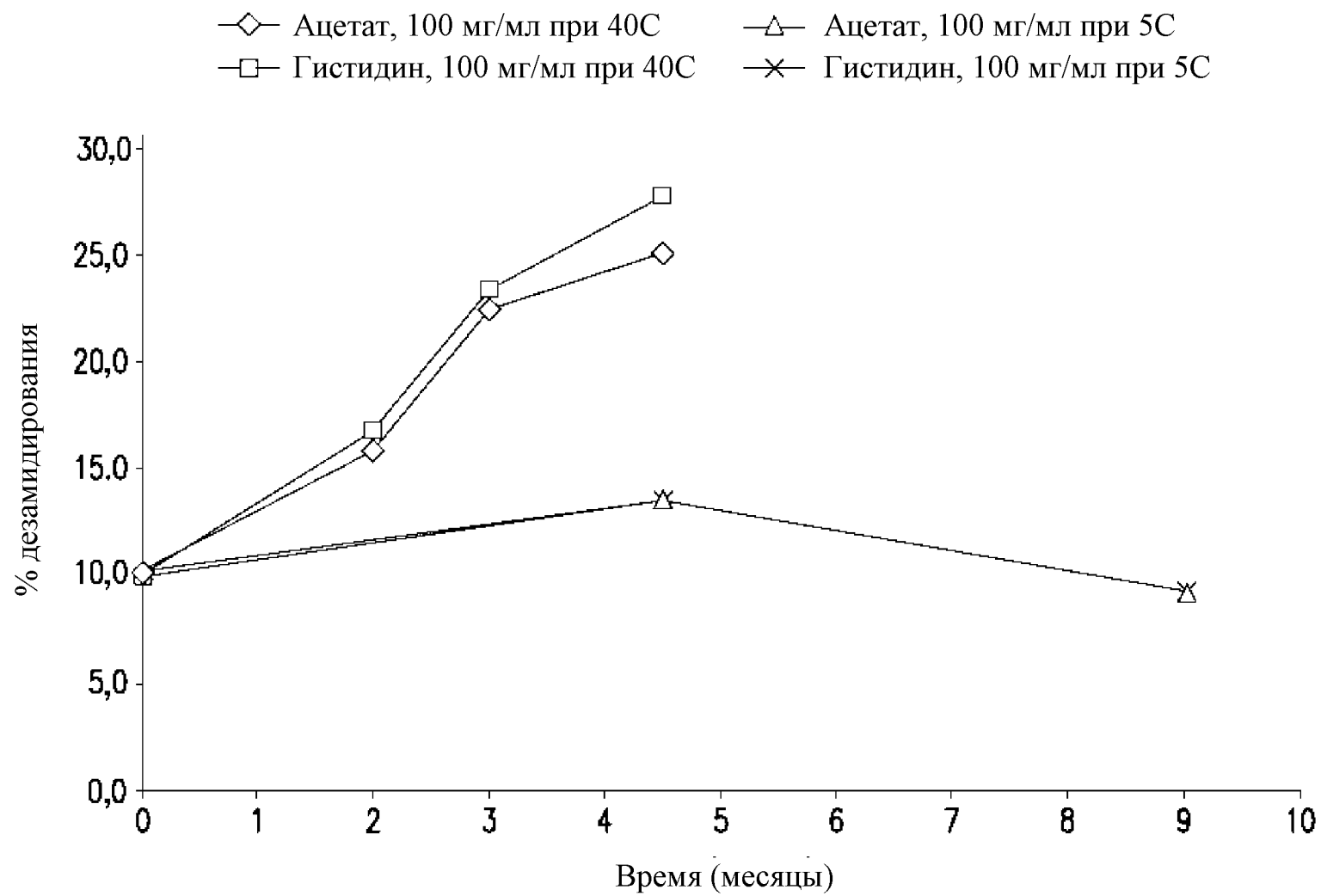
ФИГ. 4Н



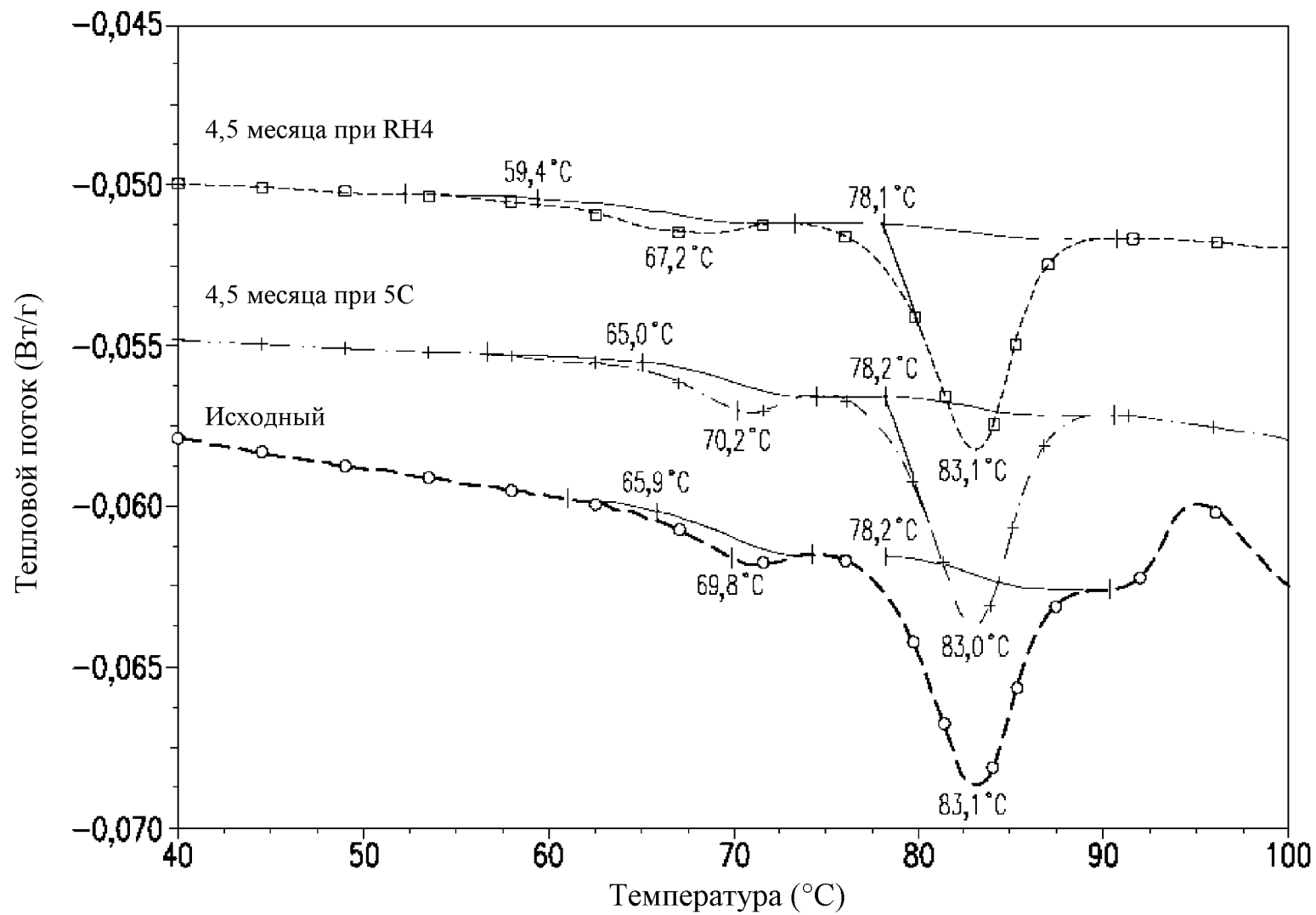
ФИГ. 4I



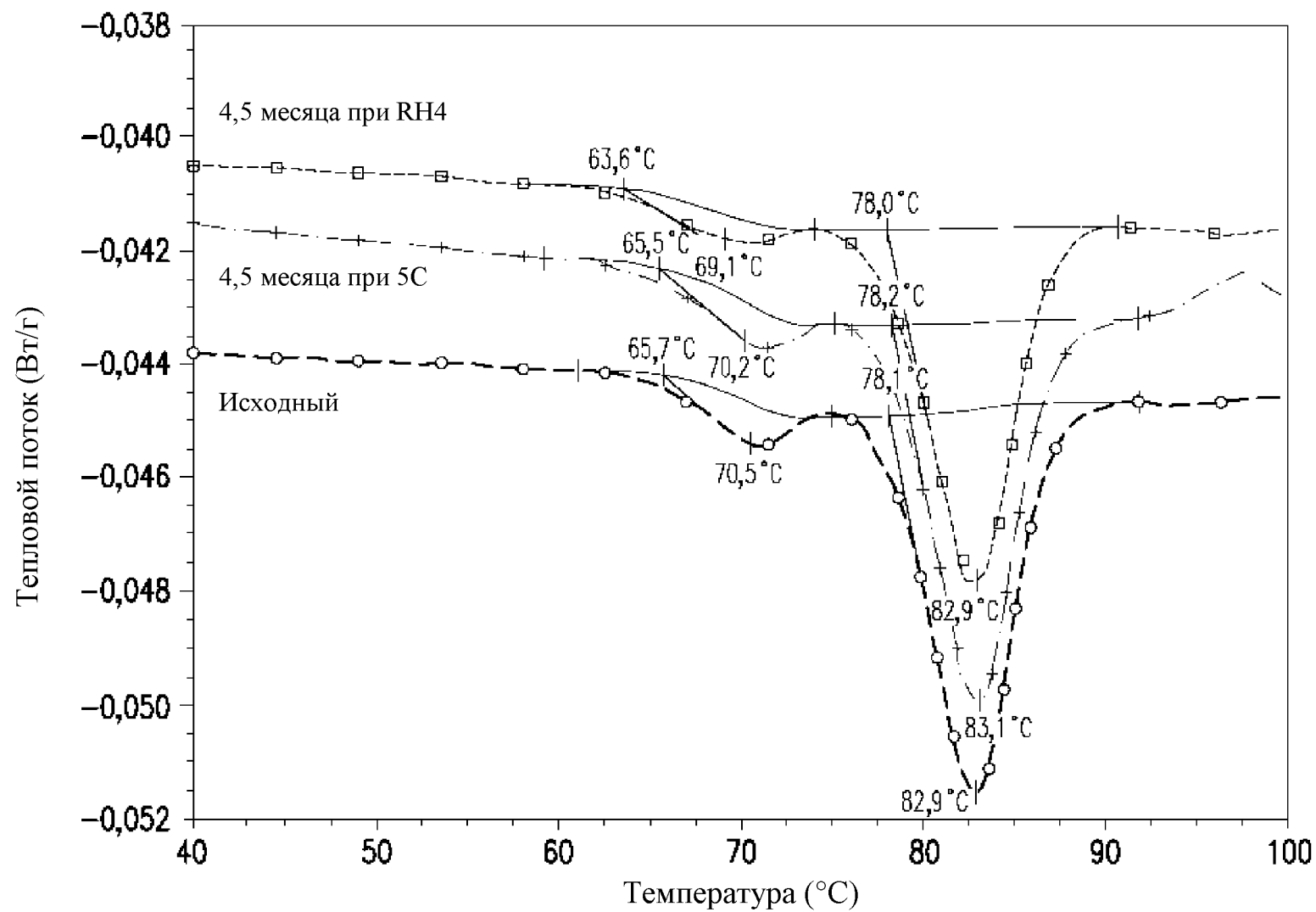
ФИГ. 4J



ФИГ. 4К

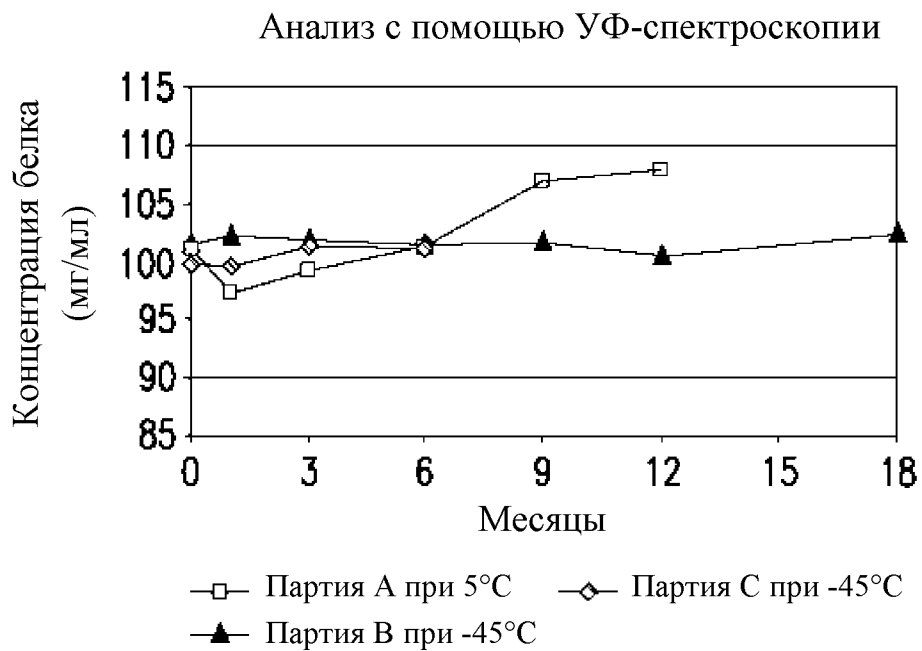


ФИГ. 4L

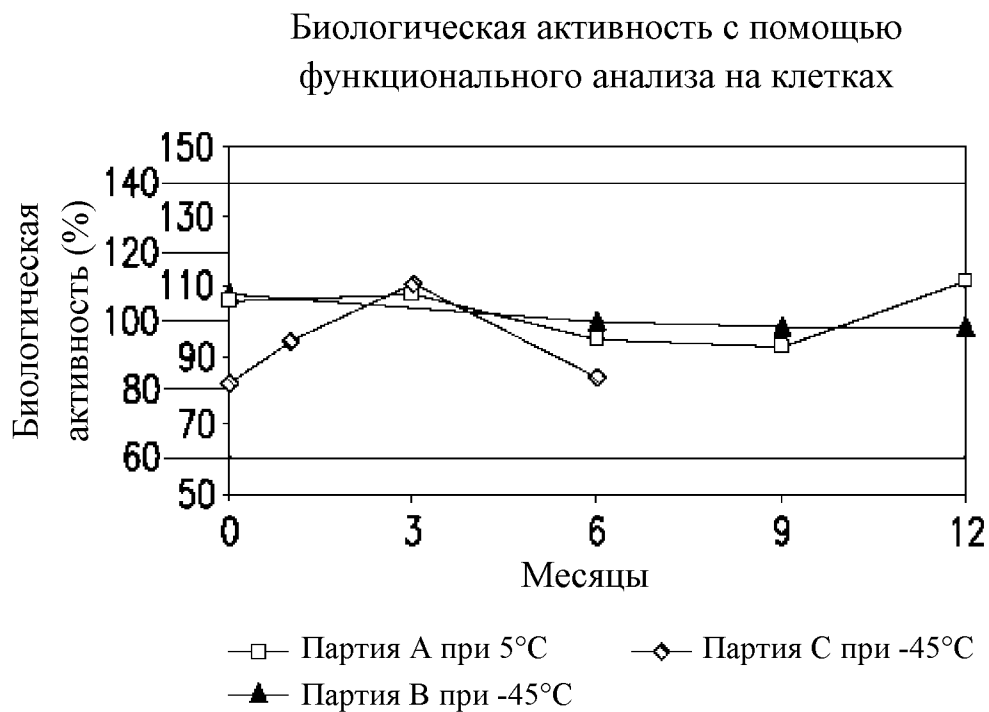


ФИГ. 4М

29/46

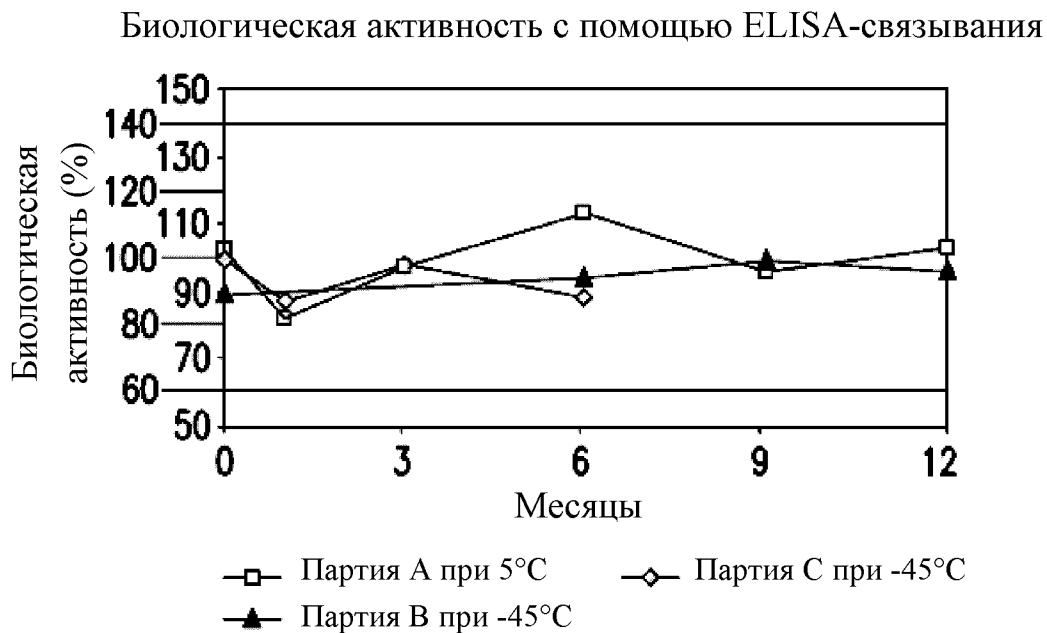


ФИГ. 5А

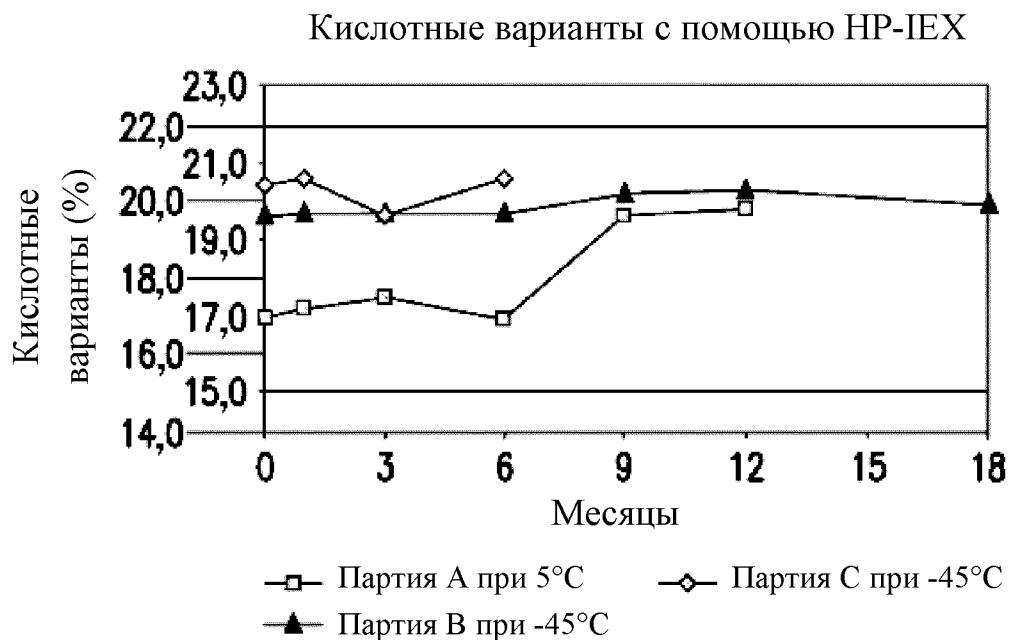


ФИГ. 5В

30/46

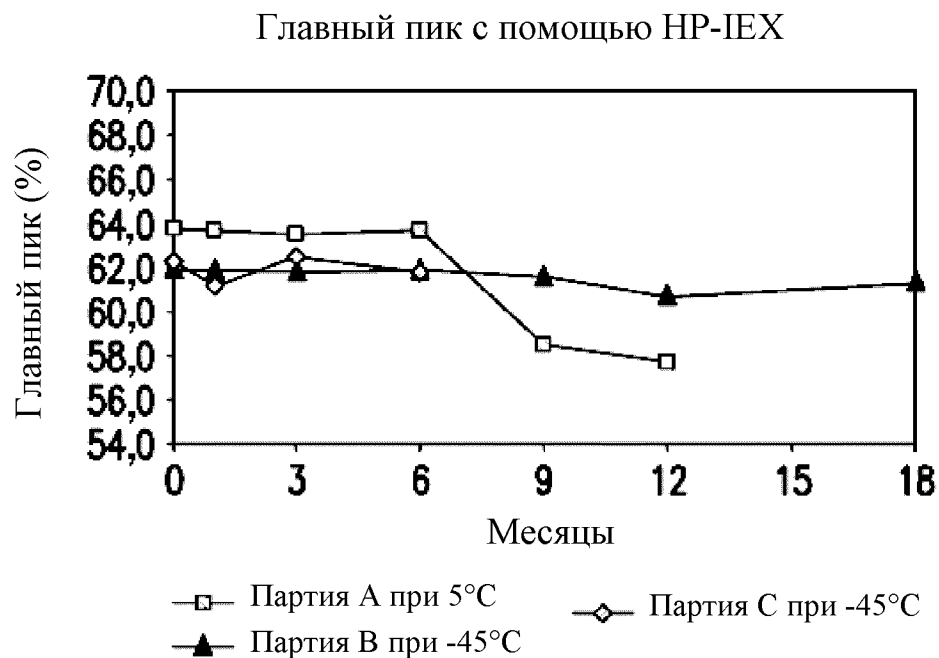


ФИГ. 5C

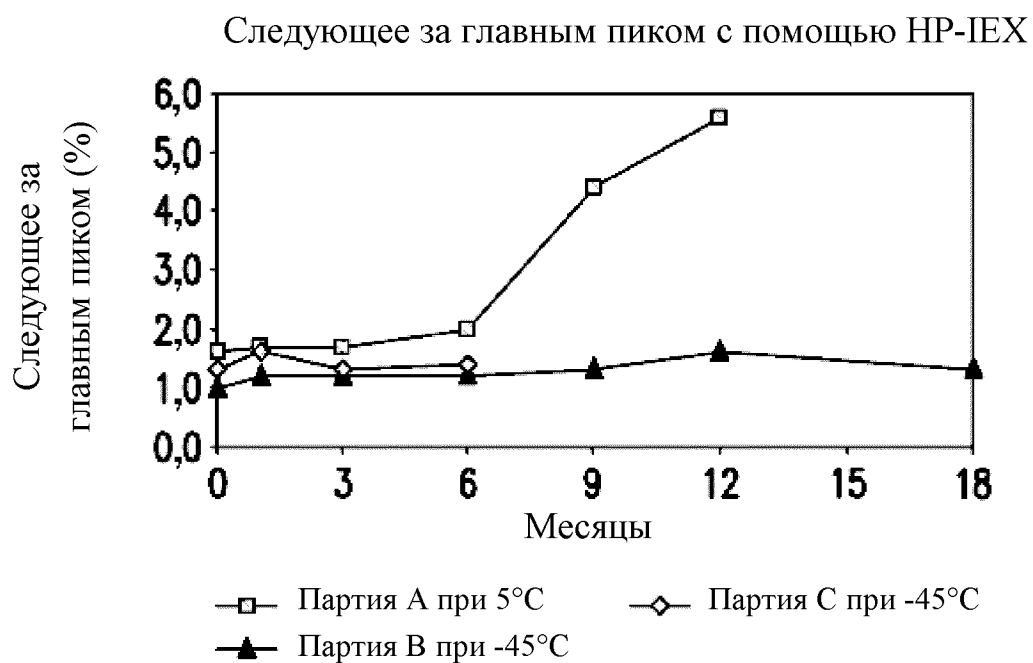


ФИГ. 5D

31/46

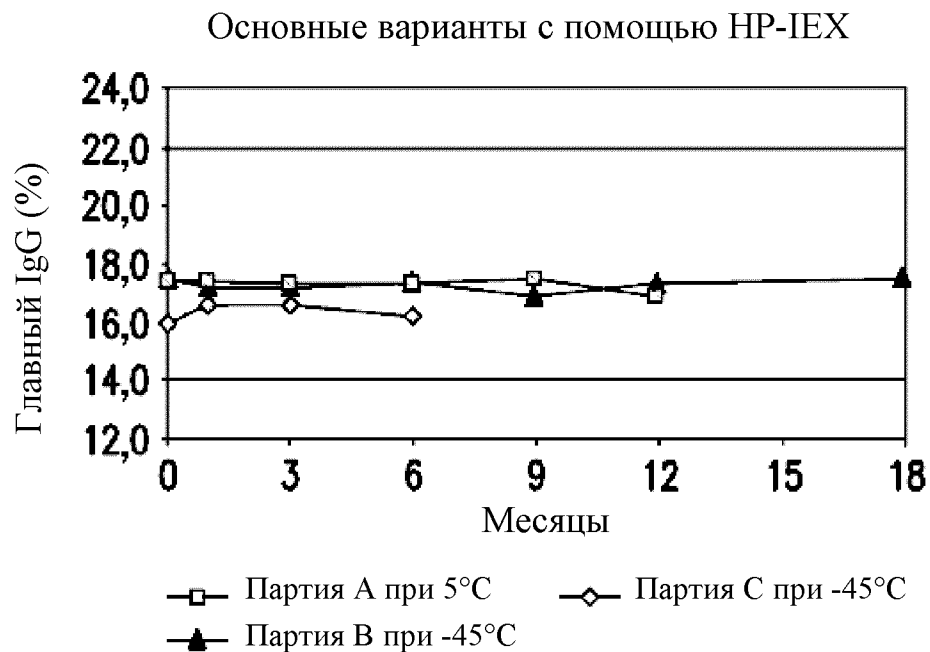


ФИГ. 5Е

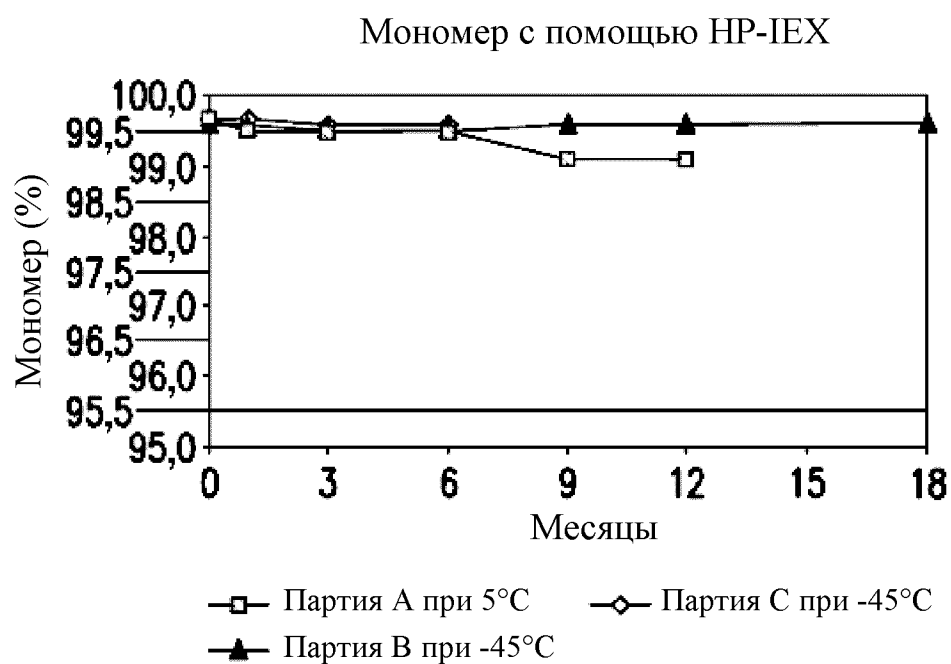


ФИГ. 5F

32/46

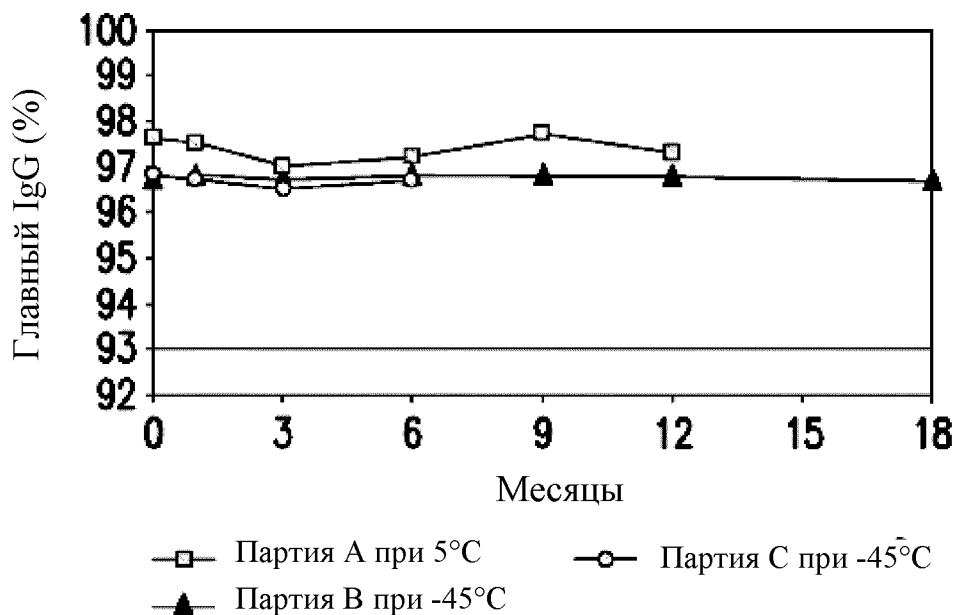


ФИГ. 5G



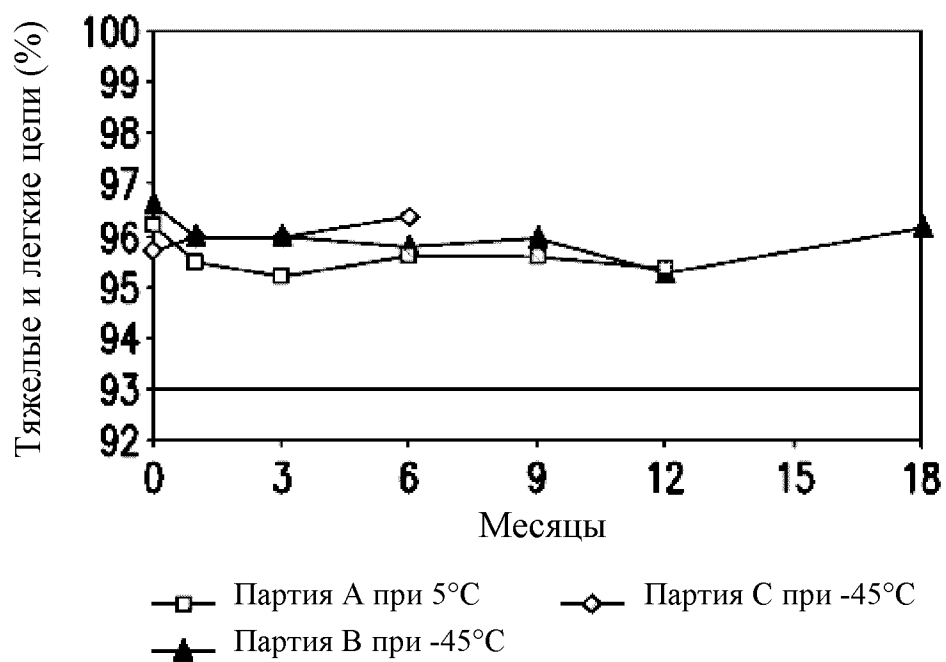
ФИГ. 5H

Чистота с помощью невосстанавливающего CE-SDS



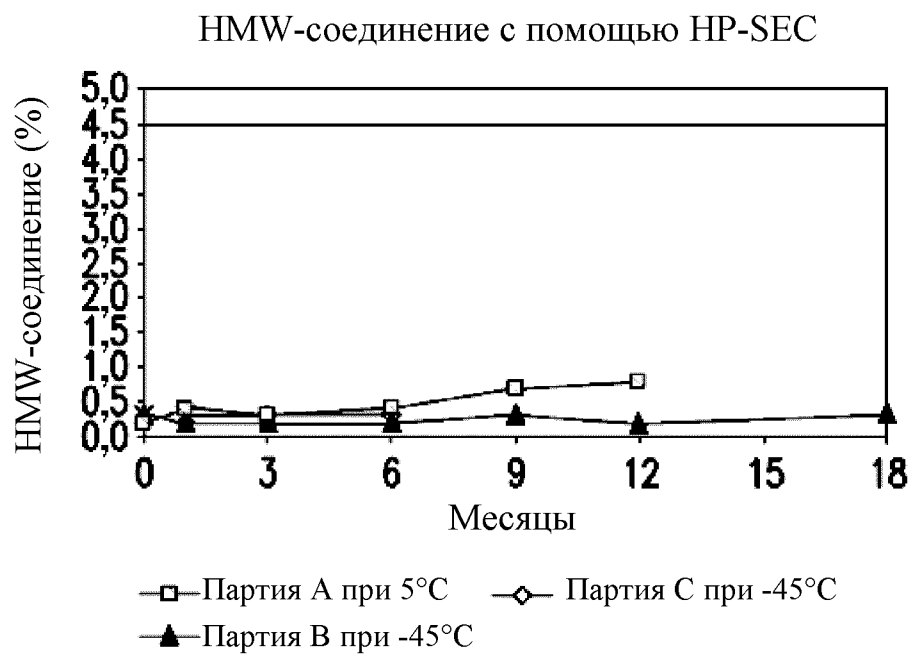
ФИГ. 5I

Чистота с помощью восстанавливающего CE-SDS

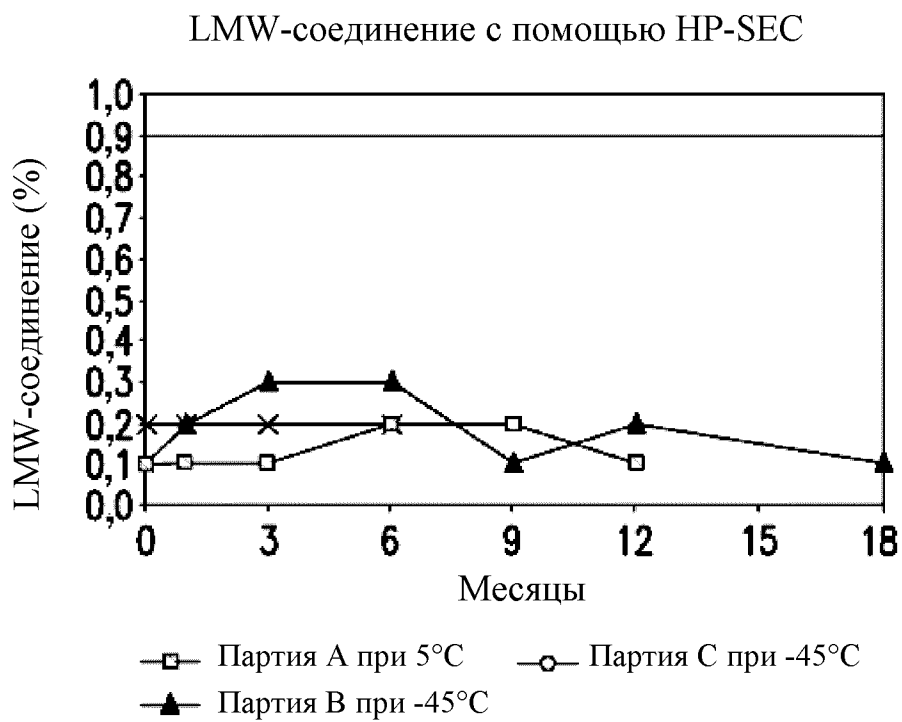


ФИГ. 5J

34/46

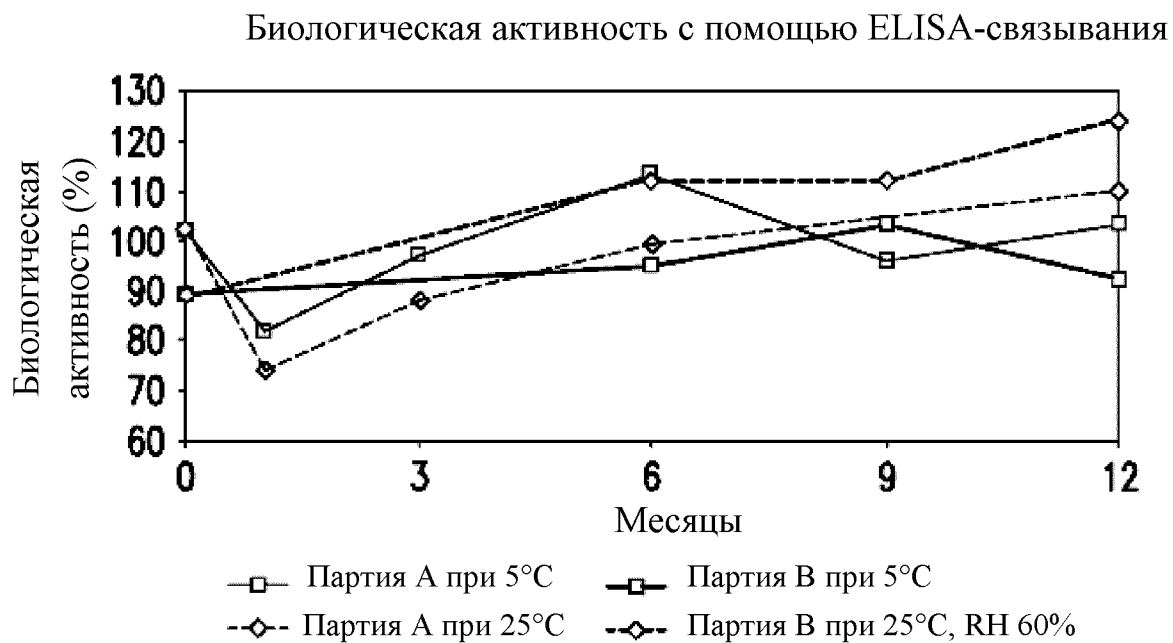


ФИГ. 5K

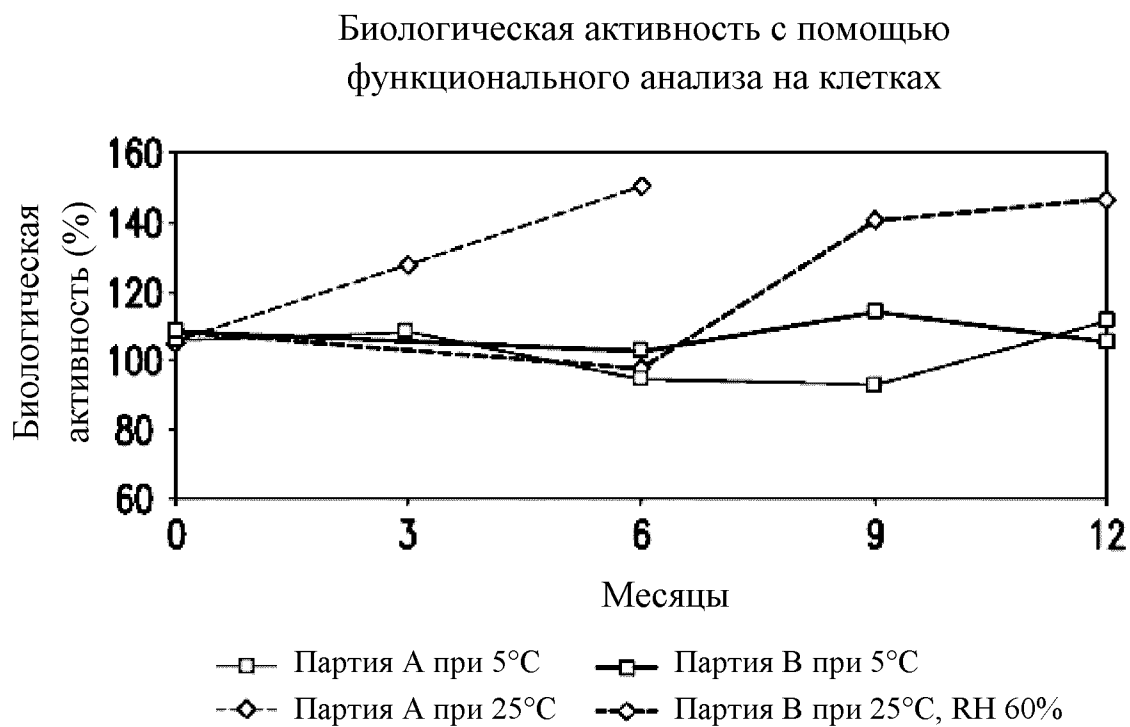


ФИГ. 5L

35/46

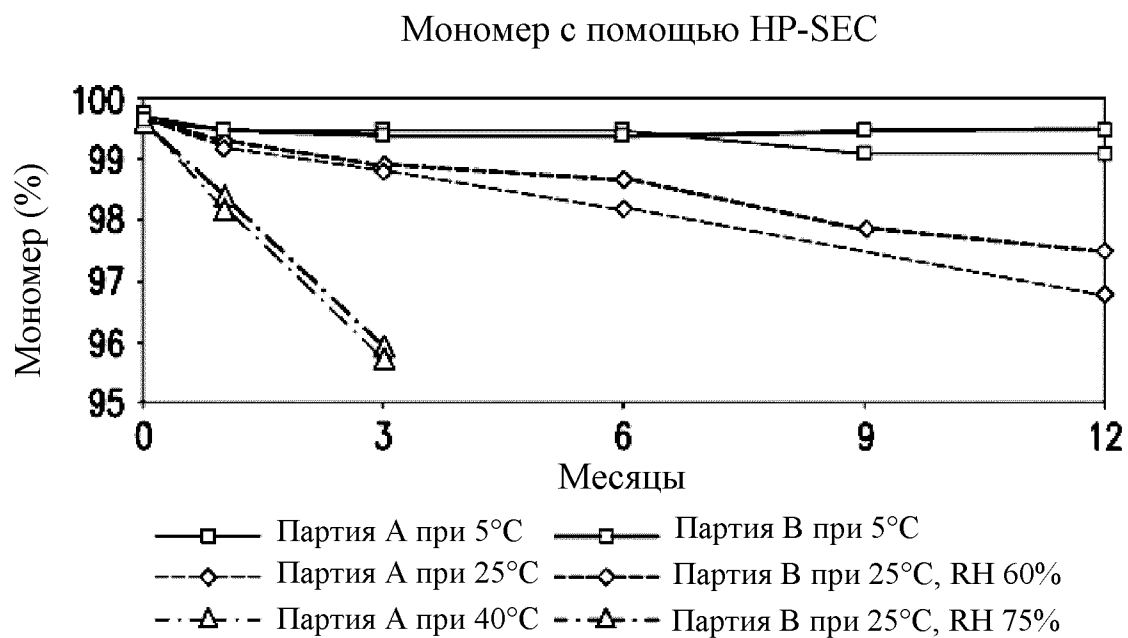


ФИГ. 6А

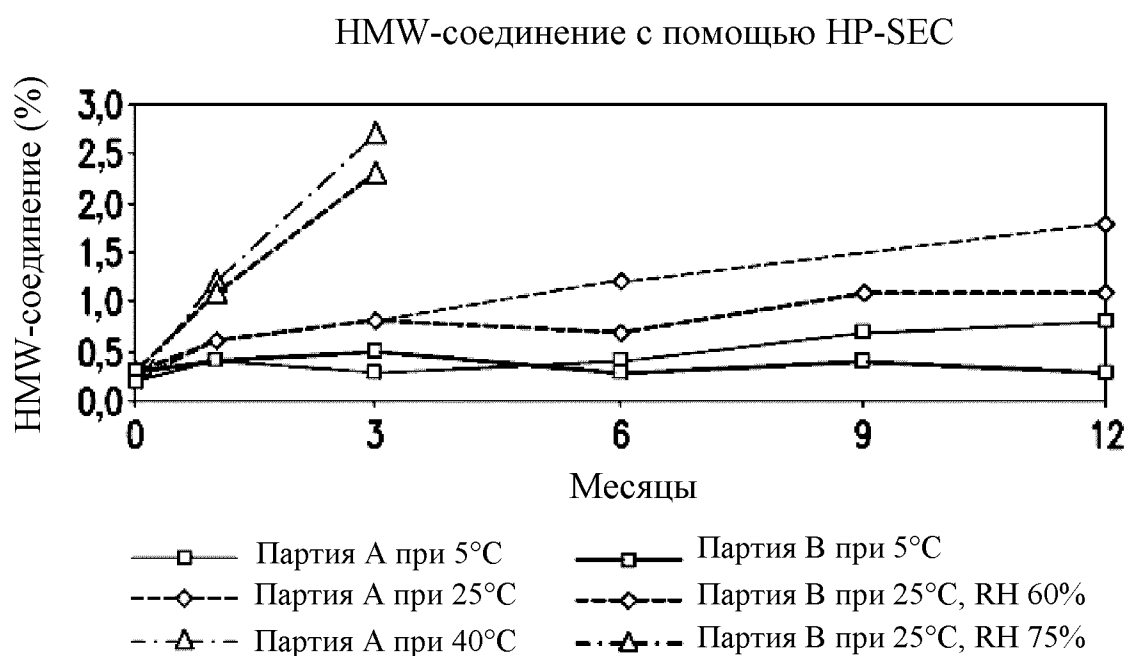


ФИГ. 6В

36/46

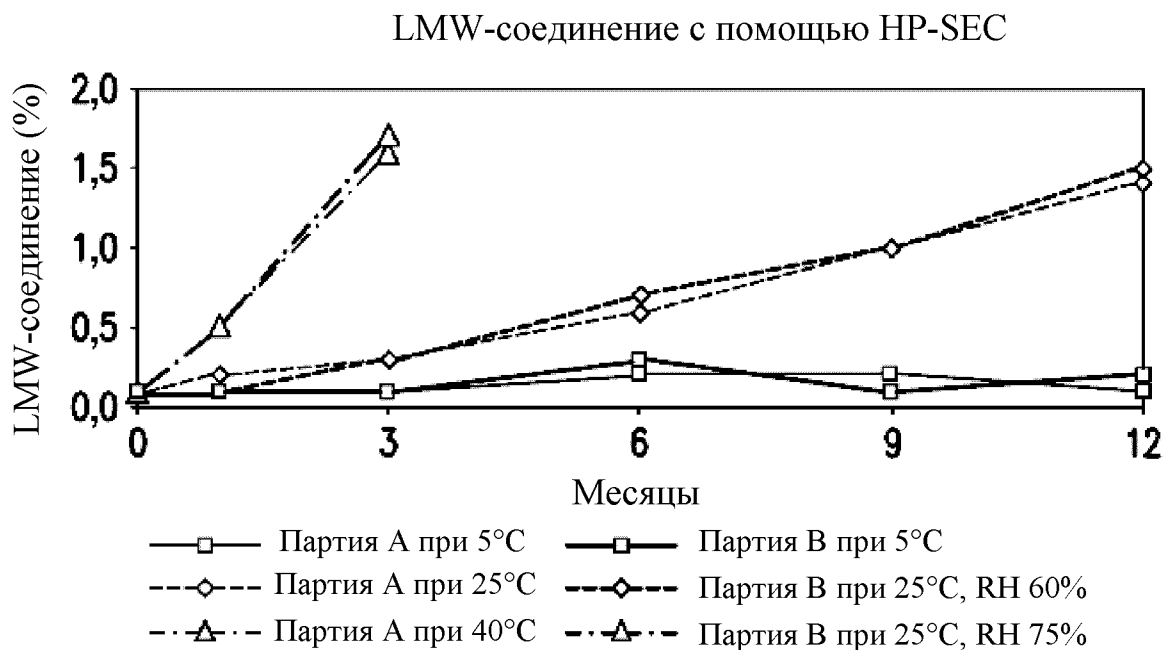


ФИГ. 6C

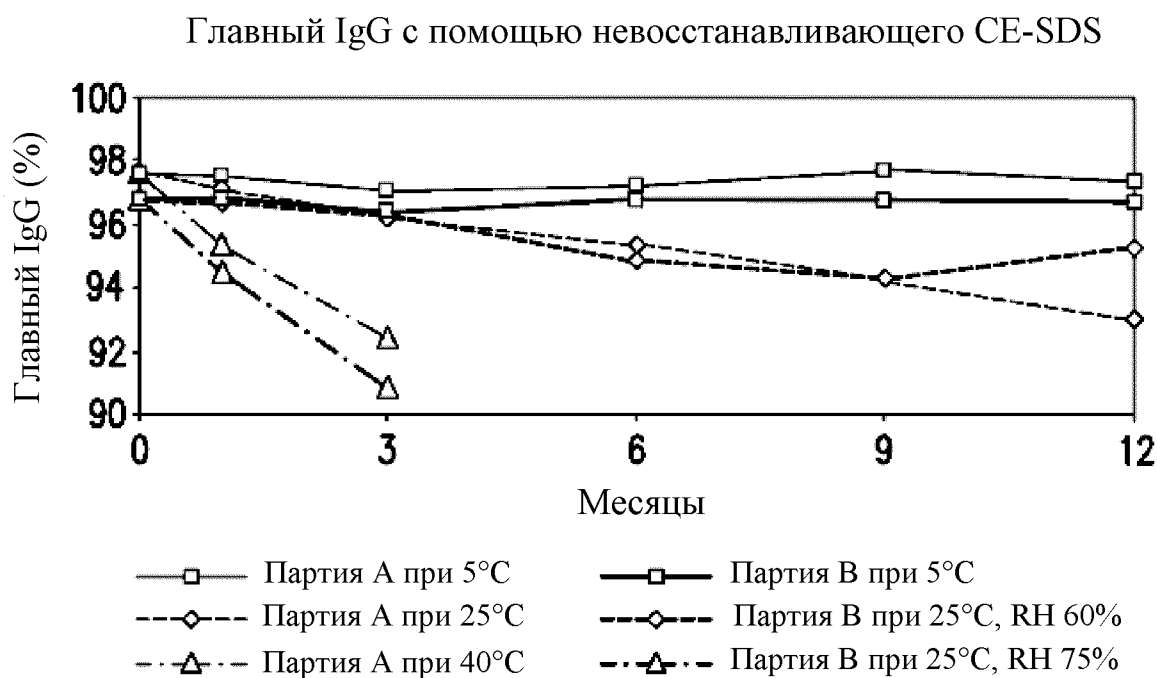


ФИГ. 6D

37/46

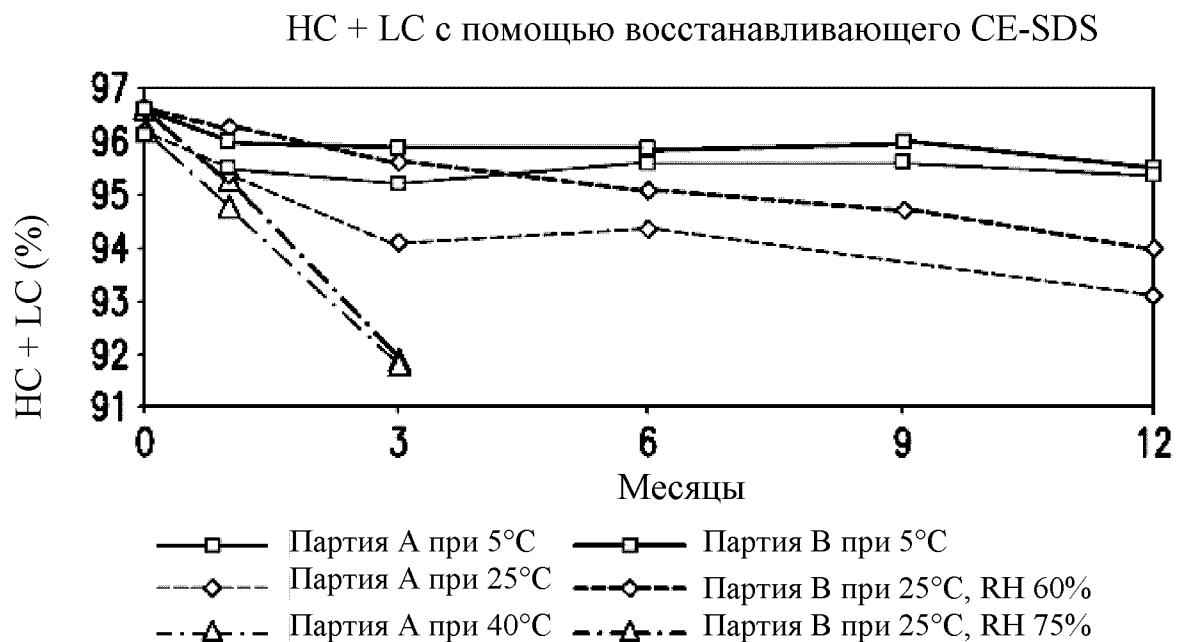


ФИГ. 6Е

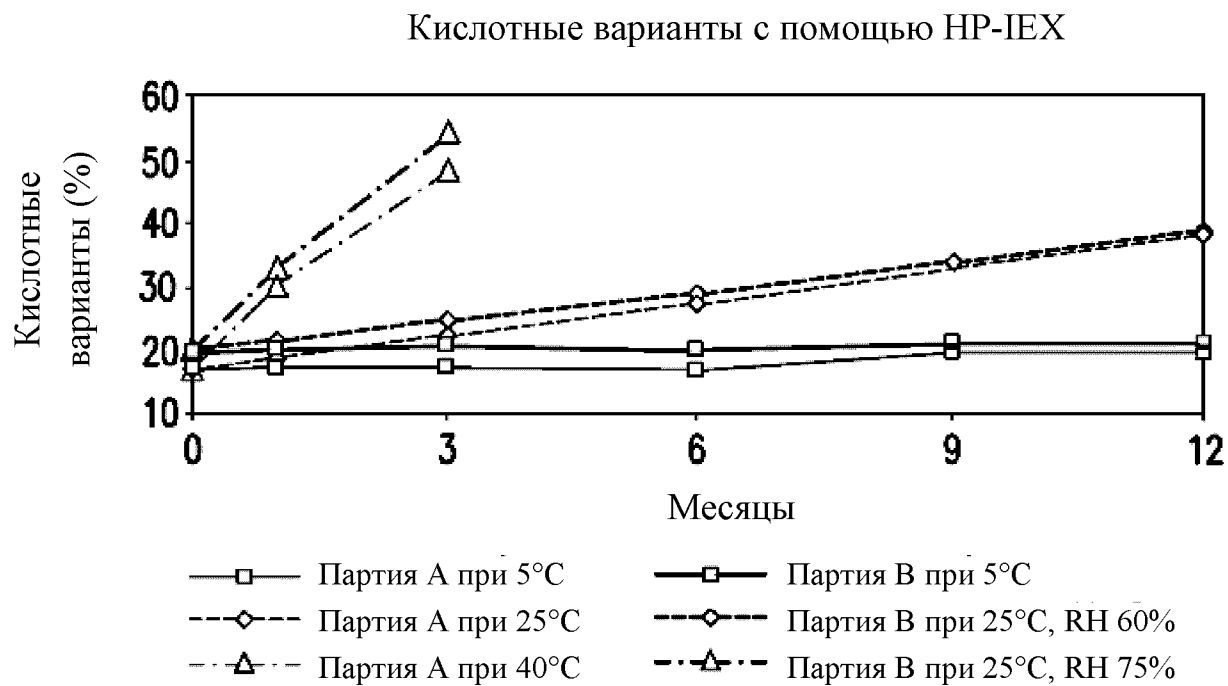


ФИГ. 6F

38/46

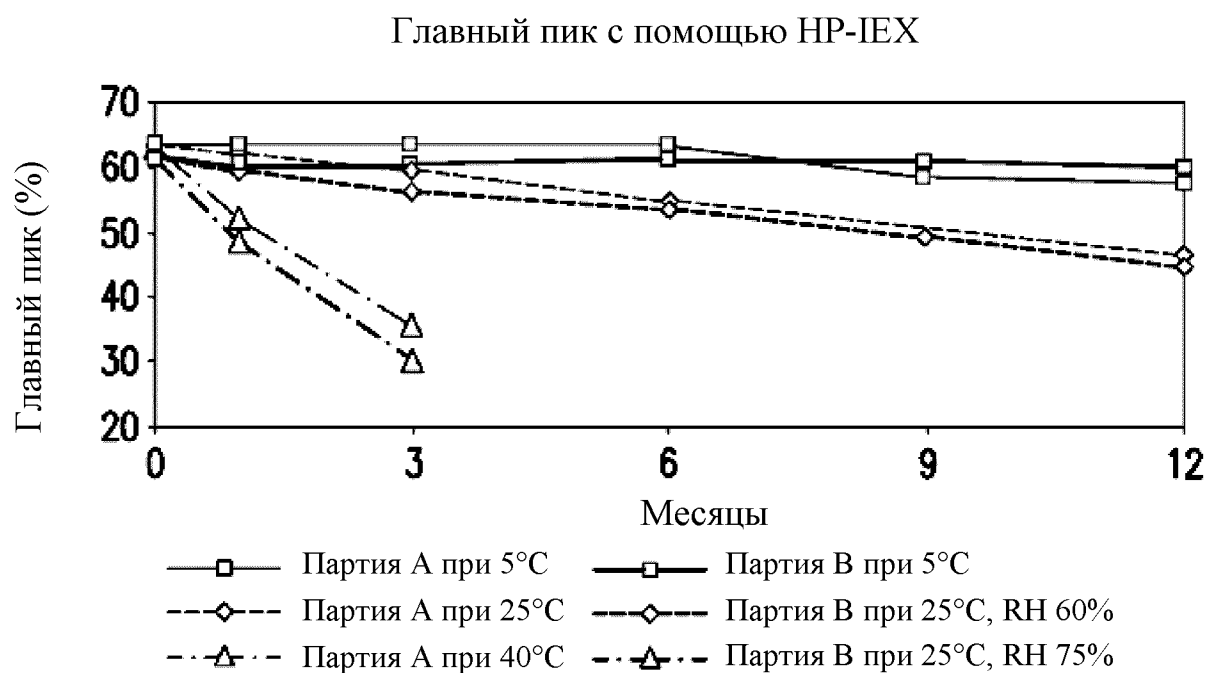


ФИГ. 6Г

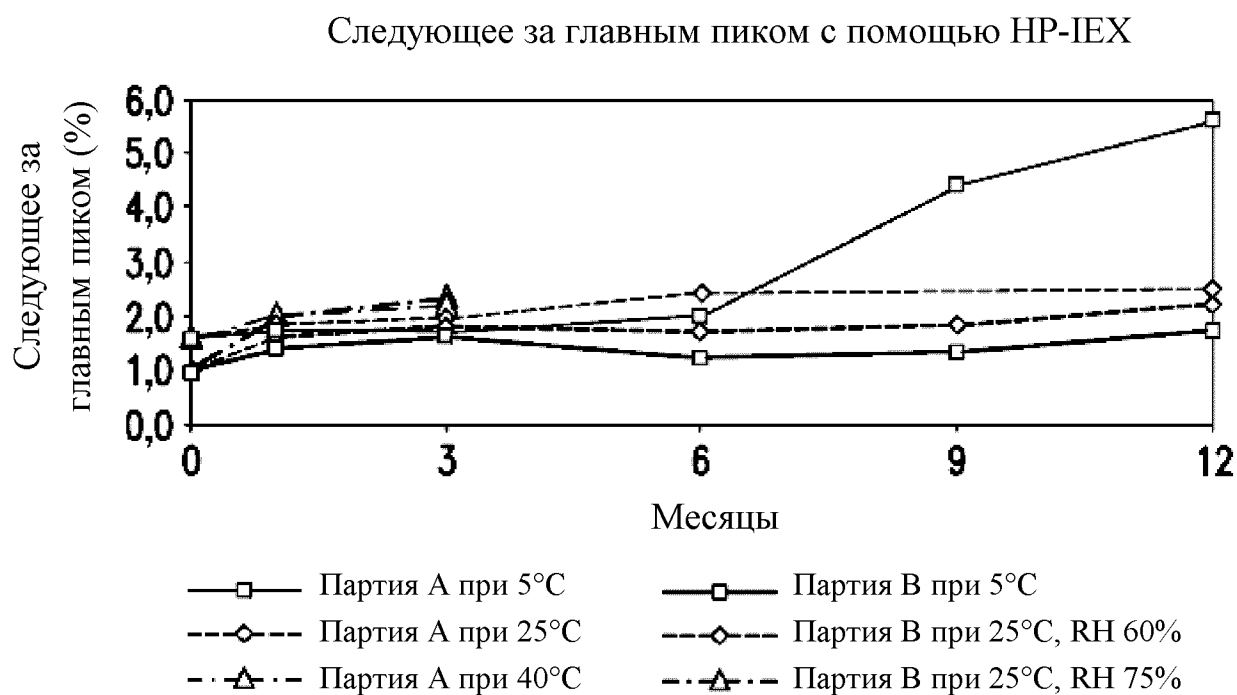


ФИГ. 6Н

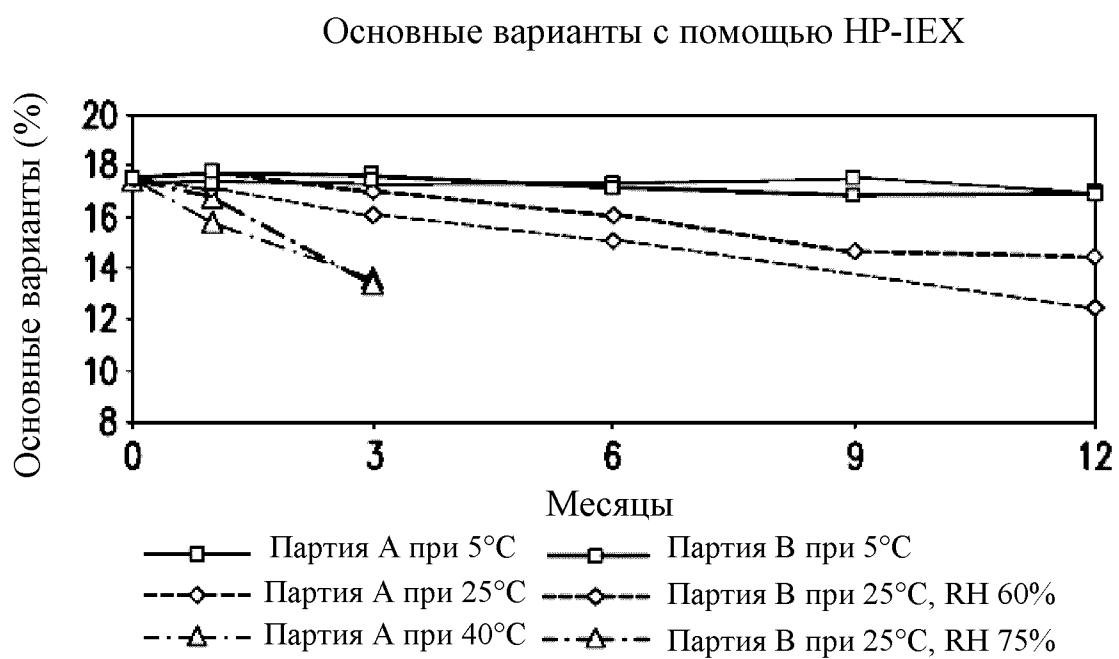
39/46



ФИГ. 6I

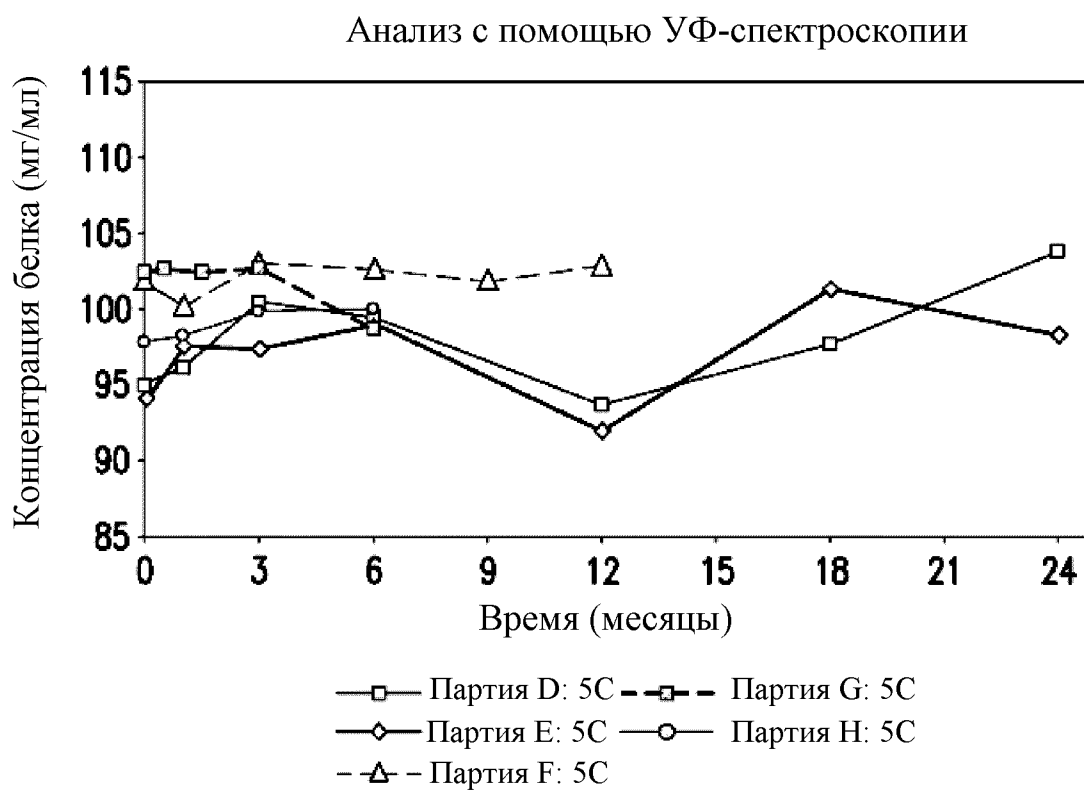


ФИГ. 6J

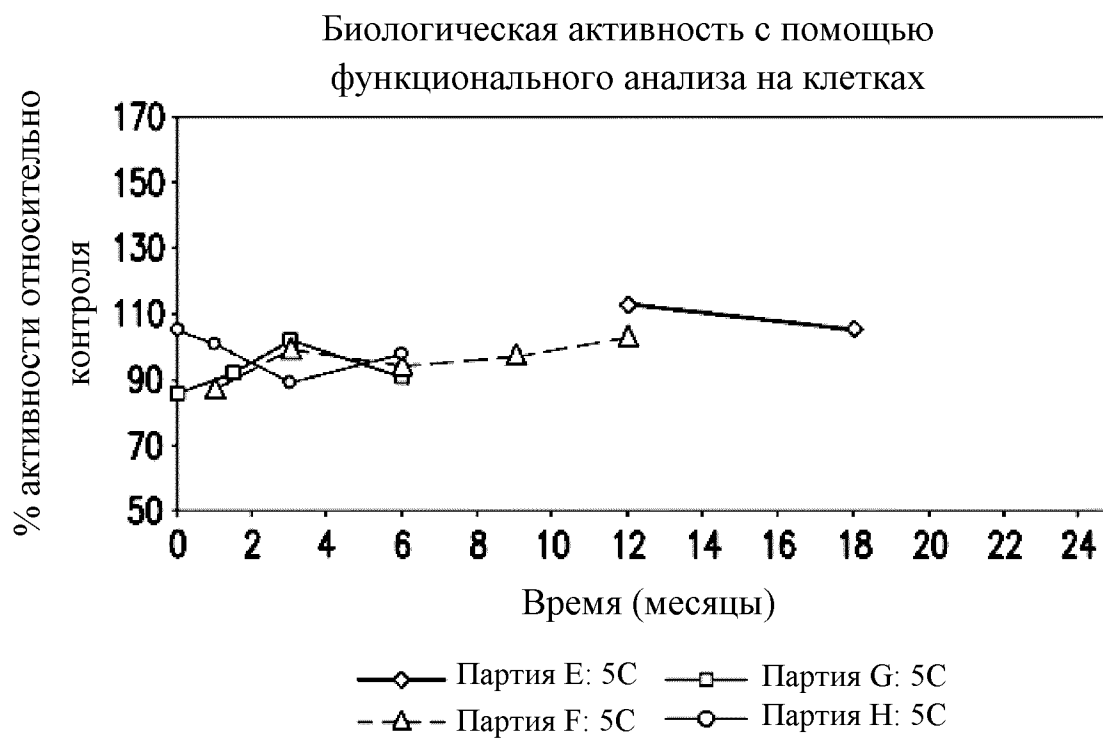


ФИГ. 6К

41/46



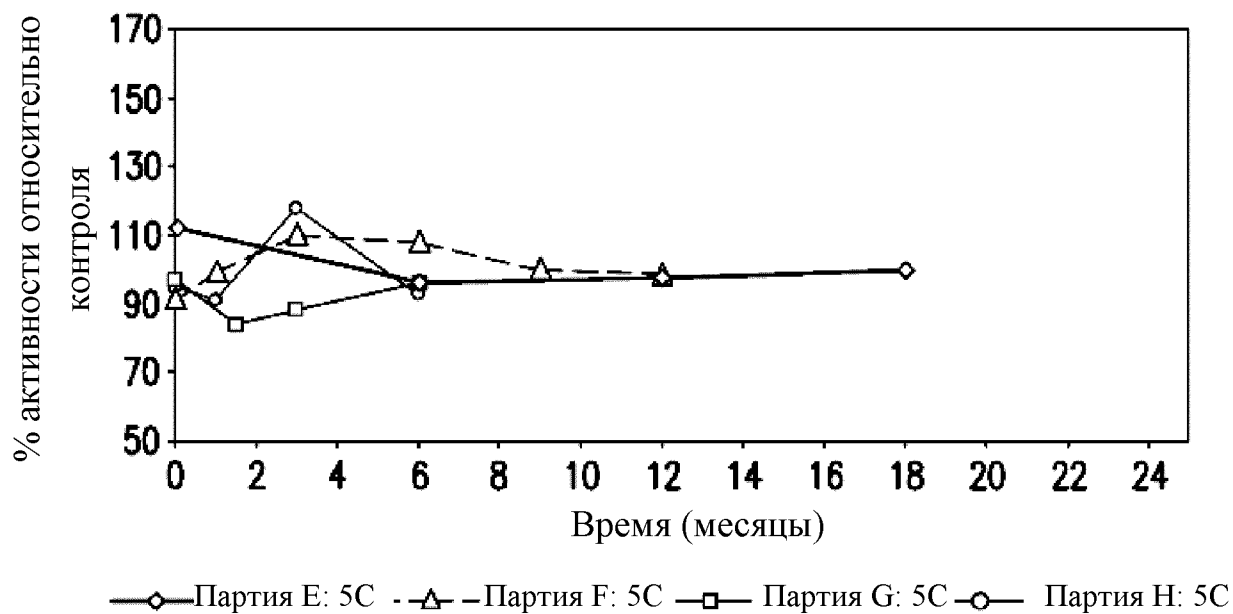
ФИГ. 7А



ФИГ. 7В

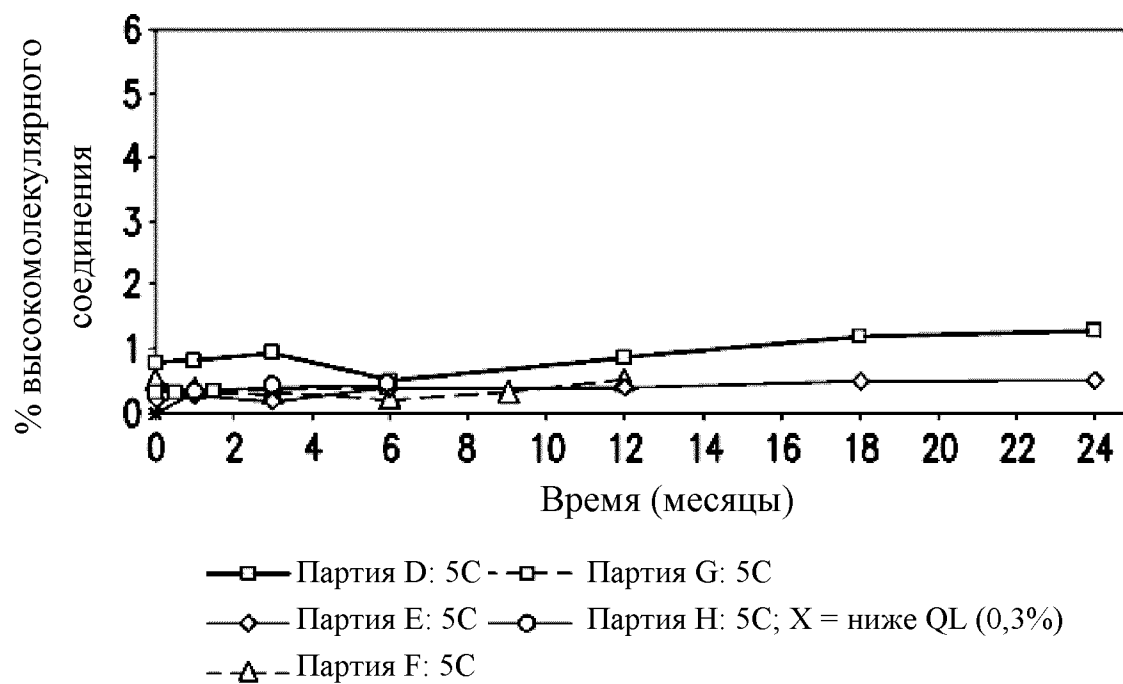
42/46

Биологическая активность с помощью ELISA-связывания



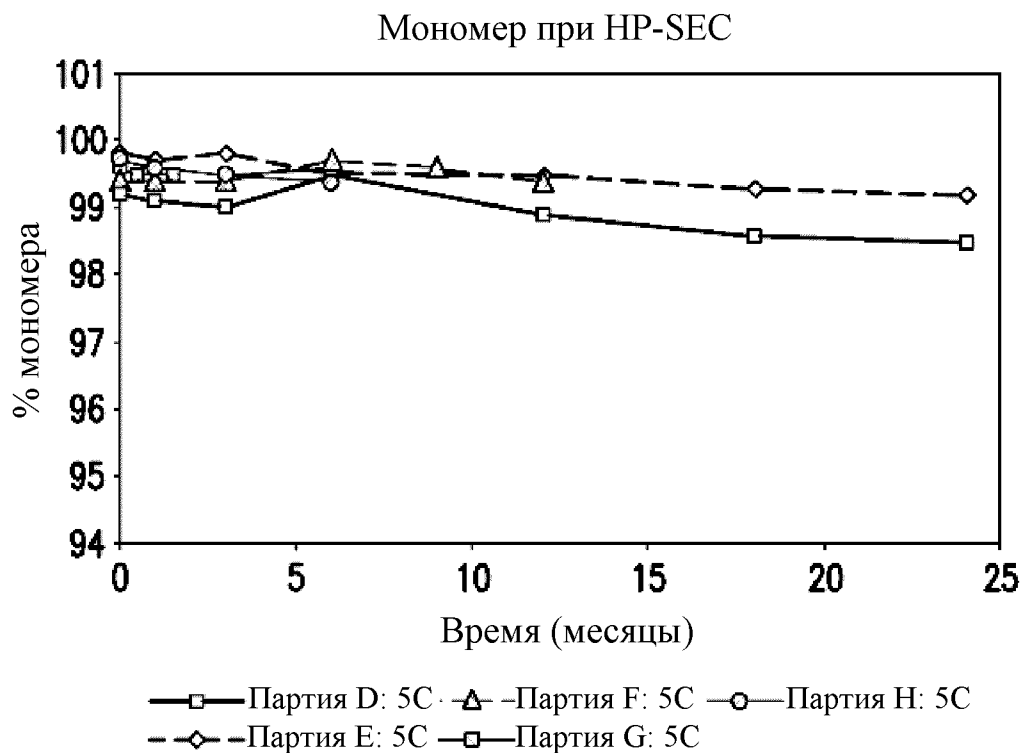
ФИГ. 7С

Высокомолекулярное соединение при HP-SEC

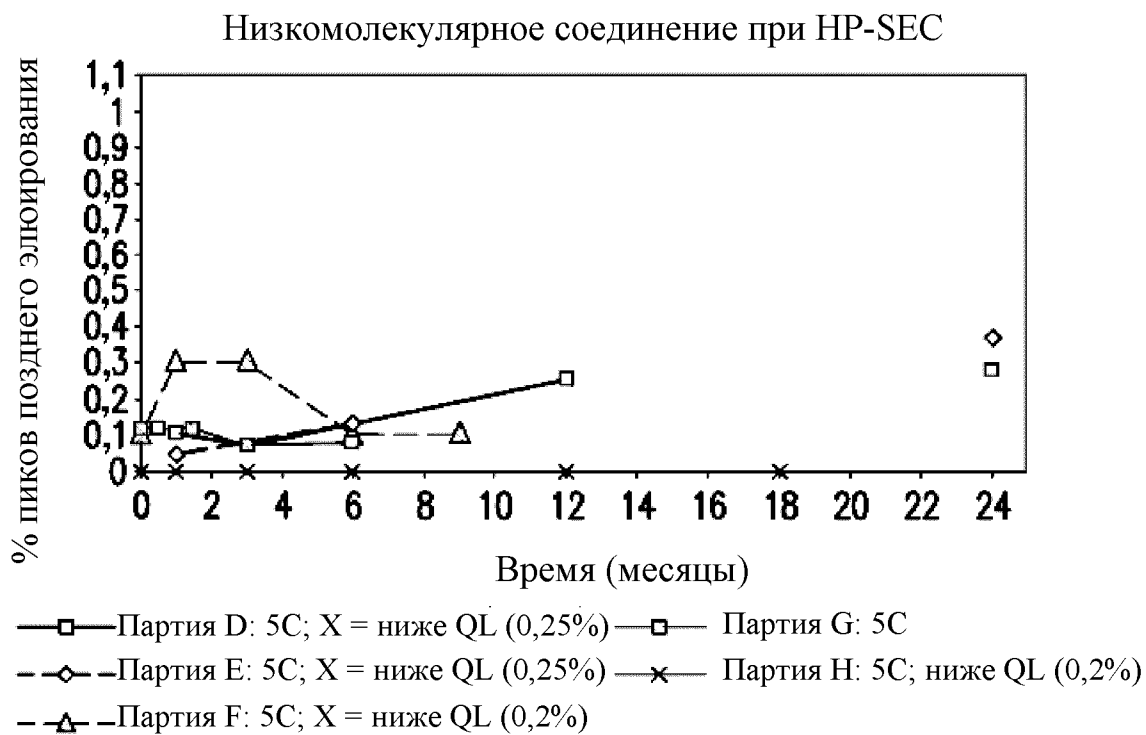


ФИГ. 7D

43/46

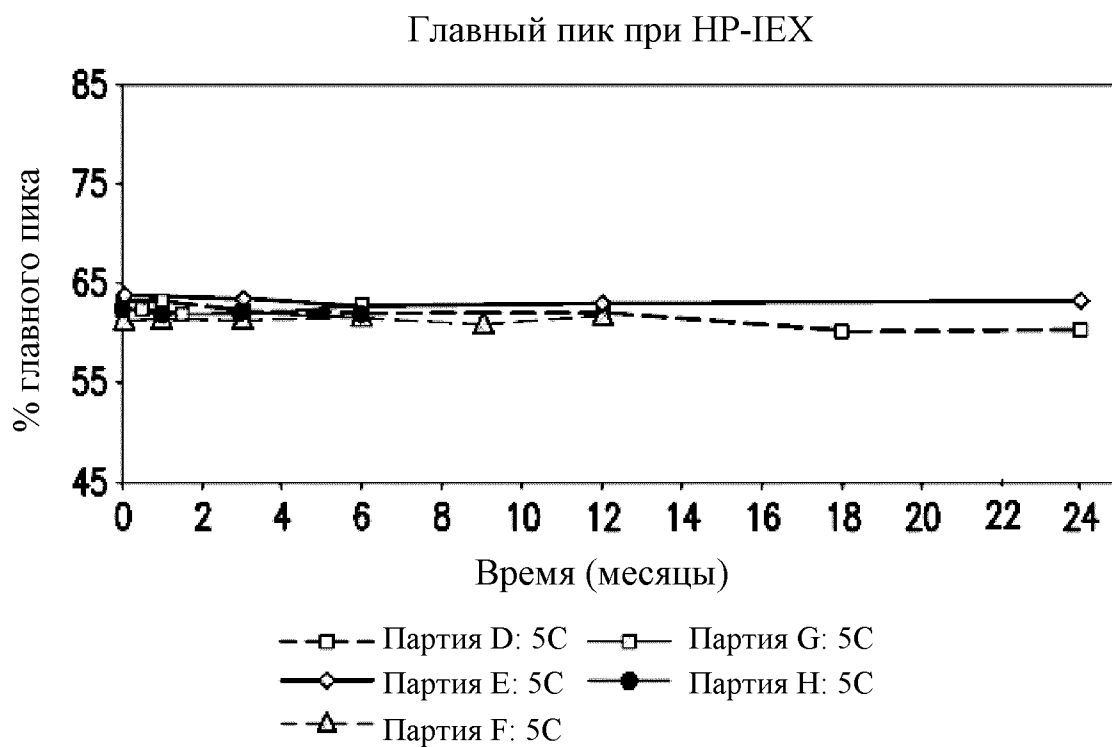


ФИГ. 7E



ФИГ. 7F

44/46

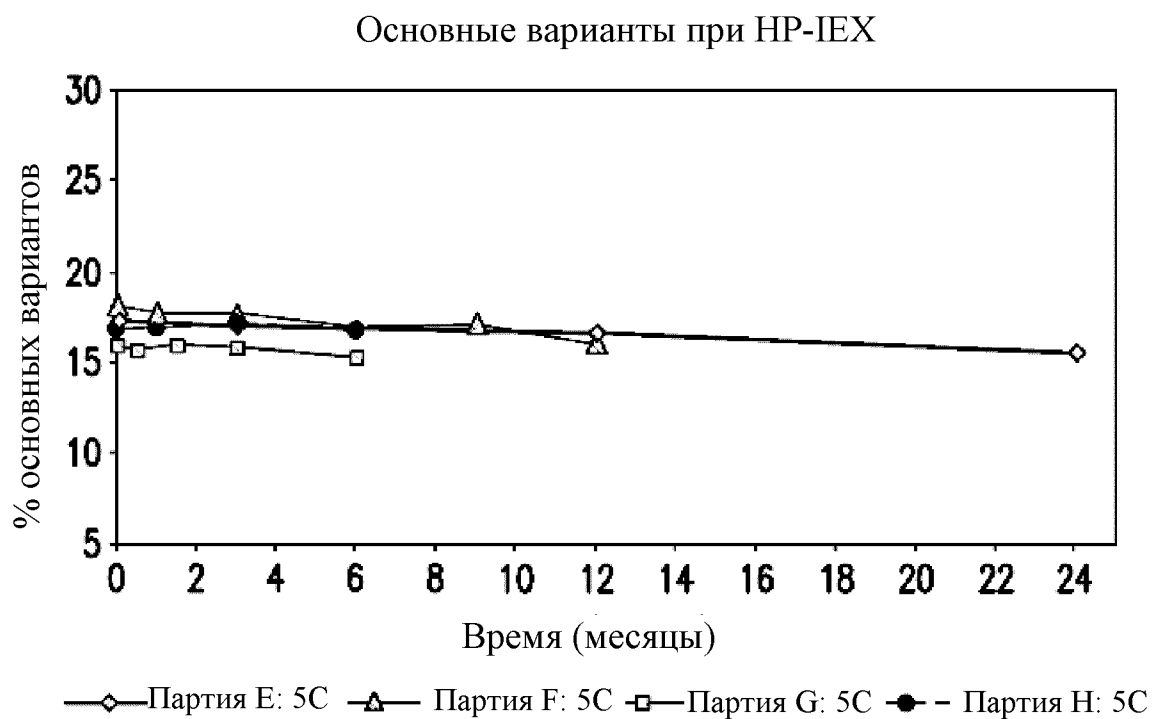


ФИГ. 7G

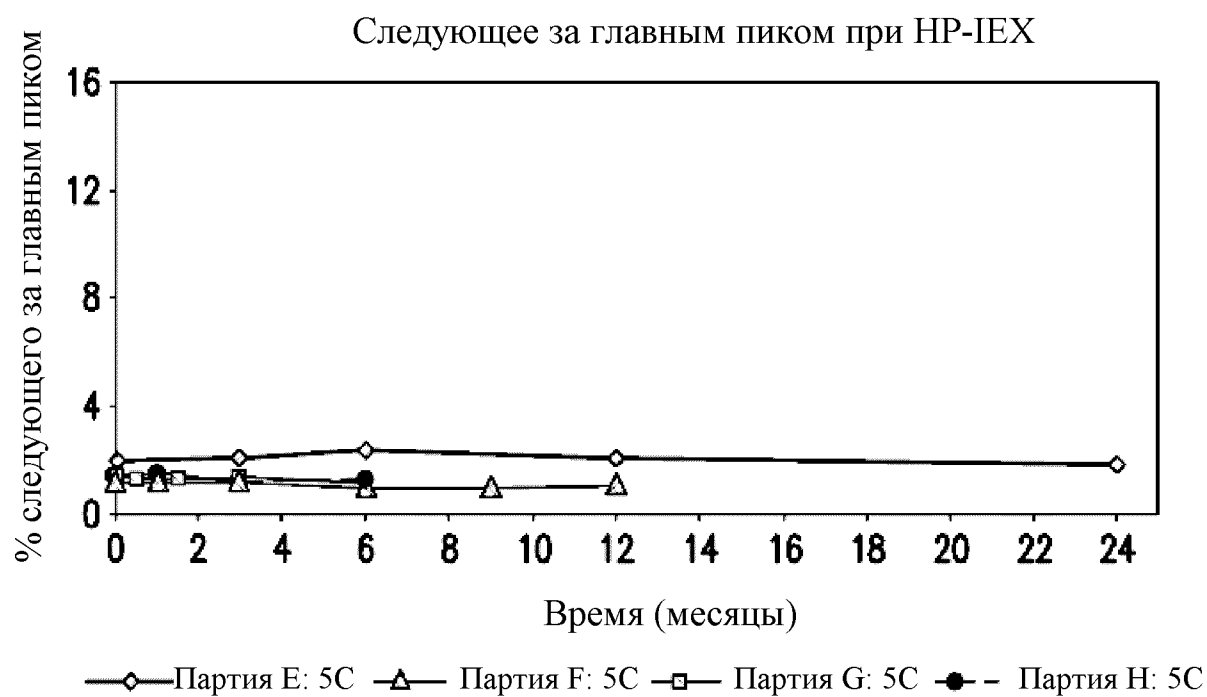


ФИГ. 7H

45/46

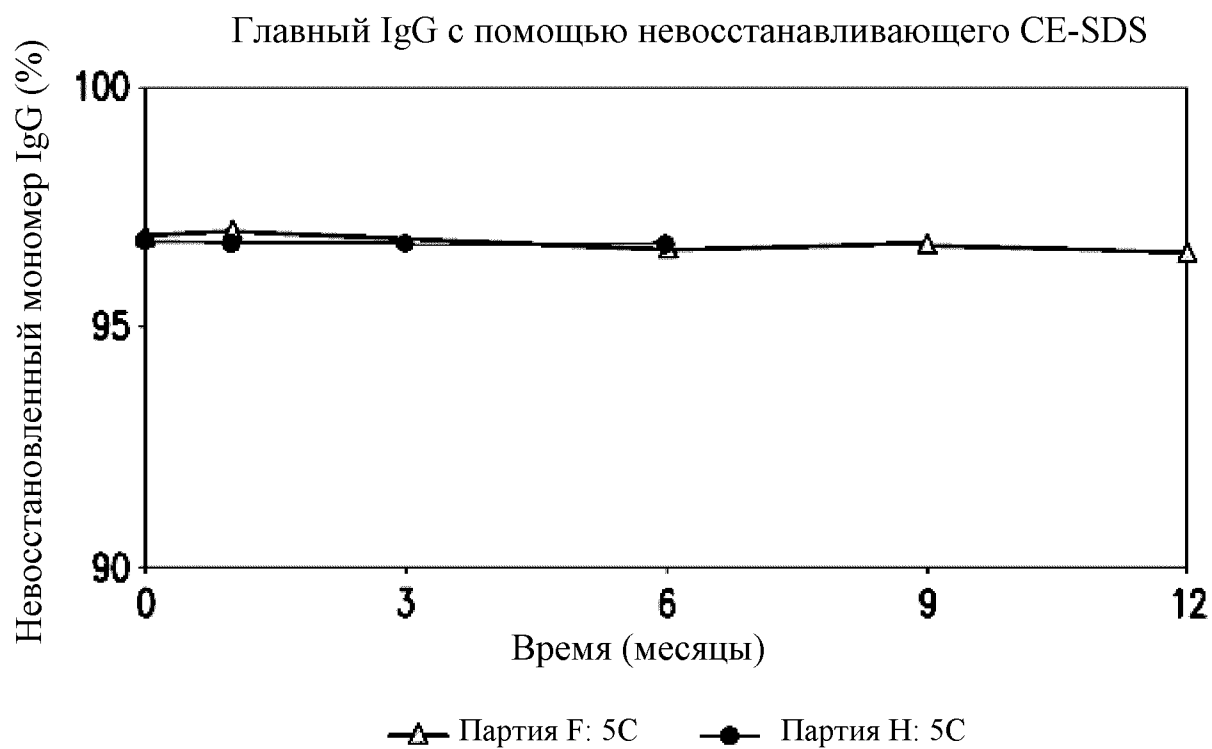


ФИГ. 7I

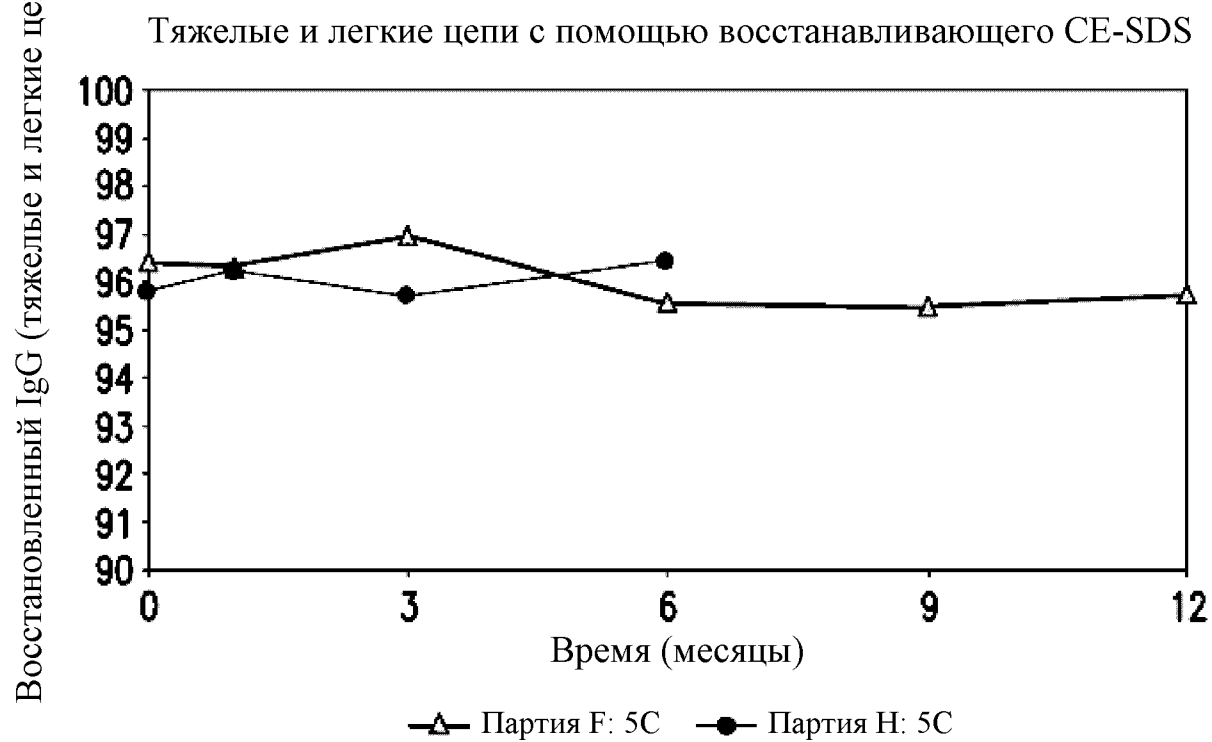


ФИГ. 7J

46/46



ФИГ. 7К



ФИГ. 7L