

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034616**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

- | | |
|---|---|
| (45) Дата публикации и выдачи патента
2020.02.27 | (51) Int. Cl. <i>A61K 39/395</i> (2006.01)
<i>C12P 21/08</i> (2006.01)
<i>C07K 16/00</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки
201591133 | <i>C12P 21/04</i> (2006.01)
<i>C07H 21/04</i> (2006.01) |
| (22) Дата подачи заявки
2013.12.09 | |

(54) СТАБИЛЬНЫЙ СОСТАВ В ВИДЕ РАСТВОРА АНТИТЕЛА HUM13B8-b К IL-23p19 И СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ АУТОИММУННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ ИЛИ ПРОЛИФЕРАТИВНОГО НАРУШЕНИЯ

- | | |
|--|-------------------------------|
| (31) 61/737,035 | (56) US-A1-20110229490 |
| (32) 2012.12.13 | US-A1-20090311253 |
| (33) US | |
| (43) 2015.10.30 | |
| (86) PCT/US2013/073825 | |
| (87) WO 2014/093203 2014.06.19 | |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЭРК ШАРП ЭНД ДОМЕ КОРП.
(US) | |
| (72) Изобретатель:
Каши Рамеш С., Бадкар Аникет (US) | |
| (74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU) | |

(57) Изобретение предусматривает стабильный состав в виде раствора антитела hum13B8-b к интерлейкину-23p19 (IL-23p19) человека и его применение для лечения аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или пролиферативного нарушения, при этом стабильный состав содержит 100 мг/мл антитела hum13B8-b к IL-23p19; 10 мМ гистидинового буфера с pH 6,0 ± 0,3; 0,05% (вес./об.) полисорбата 80 и 7% (вес./об.) сахарозы, где указанное антитело hum13B8-b содержит полипептид легкой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 2; и полипептид тяжелой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1.

034616 B1

034616 B1

Область изобретения

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

Предпосылки изобретения

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-12RP1, которая является общей с рецептором IL-12. В ряде ранних исследований было продемонстрировано, что последствия генетически обусловленной недостаточности p40 (мышь, нокаутная по p40; p40KO-мышь) были более серьезными, чем наблюдаемые при недостаточности p35, например, у p35KO-мыши. Эти результаты впоследствии были объяснены открытием IL-23 и пониманием того, что p40KO 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; Fracht (2002) *Sci STKE* 2002, E1-E3; Elkins et al. (2002) *Infection Immunity* 70:1936-1948).

Недавние исследования, проводимые с использованием p40KO-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, вызванным 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.

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.

Антитела-лекарственные средства для применения у людей могут несколько отличаться аминокислотной последовательностью их константных доменов или последовательностями 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 зародышевой 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, обусловленной 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; Bhamhani et al. (2012) *J. Pharm. Sci.* 101:1120.

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 позволя-

ет 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 сП), 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.

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

Настоящее изобретение предусматривает составы в виде высококонцентрированного раствора гуманизованного 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.

В одном варианте осуществления состав в виде раствора содержит гуманизованное 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 гуманизованное 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 гуманизованное антитело 13B8-b к IL-23p19, 10 мМ гистидинового буфера с pH 6,0 ($\pm 0,3$), 7% сахарозы и 0,05% полисорбата 80.

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.

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

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.

На фиг. 1C-1E представлены различные свойства составов с 10 мМ 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.

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.

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.

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.

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 мМ NaCl, 7% сахарозы, 7% трегалозы и 6% маннита). DS обозначено лекарственное вещество. Краткое обсуждение DSC предоставлено в примере 2.

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.

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. 4A 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.

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

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

Фиг. 4G-4I представляют собой графики опалесценции после хранения при 5, 25°C (25H) 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 и 5°C соответственно. Краткое обсуждение пептидного картирования предоставлено в примере 6.

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.

Стабильность составов с 10 мМ ацетатом и 10 мМ 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.

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 этиленвинилацетата (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. 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 опре-

деления концентрации белка, функциональных анализов на клетках и ELISA предоставлены в примерах 7-9 соответственно.

Фиг. 5D-5G представляют собой графики результатов 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.

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

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

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

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 этиленвинилацетата (EVA) на 30 мл. Данные представлены для составов, содержащих 10 мМ гистидинового буфера (рН 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.

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.

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

Фиг. 6H-6K 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.

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 hum13B8-b (партии D, E, F, G и H), определенной с помощью поглощения УФ. Краткое обсуждение определения концентрации белка предоставлено в примере 7.

Фиг. 7B и 7C представляют собой графики биологической активности, измеренной с помощью функционального анализа на клетках и измеренной с помощью ELISA соответственно, у четырех различных препаратов hum13B8-b (партии E, F, G и H). Краткие обсуждения функционального анализа на клетках и ELISA предоставлены в примерах 8 и 9 соответственно.

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

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.

На фиг. 7K и 7L представлена чистота при измерении главного пика в процентах с помощью восстанавливающего 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

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 табл. 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 фиг. XА-XZ в совокупности.

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 то-

го, что ссылка представляет собой соответствующий прототип, и не считается каким-либо признанием, касающимся содержания или даты этих публикаций или документов.

I. Определения.

"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.

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.

"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.

"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 (АПК), дендритные клетки, микроглию, НК-клетки, НКТ-клетки, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки или любую другую клетку, специфически связанную с иммунологическими процессами, например цитокин-продуцирующие эндотелиальные или эпителиальные клетки.

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.

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 kappa (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.

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.

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, переменные 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.

Как было продемонстрировано выше, антитела представляют собой крупные, очень сложные комплексы полипептидов, подверженные 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 взаимодействие 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.

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 С-конца) остатков N или D, при этом последовательности N-G и D-G являются особенно восприимчивыми; Reissner & Aswad (2003) *CMLS Cell. Mol. Life Sci.* 60:1281.

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, зависи-

мой 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.

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), гистициновом (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.

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 (бапинеизумаб 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.

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 гуманизованного антитела к IL-23.

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. Противдействие 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.

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.

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 T-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 гуманизованного антитела 13B8-b к IL-23p19.

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 гуманизованной 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 гуманизованной тяжелой цепи 13B8 (с γ 1-константным участком) предусмотрена в SEQ ID NO: 1 и переменный домен тяжелой цепи содержит остатки 1-116 из этой последовательности.

Последовательности тяжелой и легкой цепей (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.

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.

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.

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).

Эксперименты с начальным предварительным составом hum13B8-b с концентрацией 1 мг/мл выявили, что чистота в процентах, измеренная с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидко-

стной хроматографии (RP-HPLC), увеличивалась до приблизительно pH 6,0, а затем оставалась стабильной до pH 8,8; см. фиг. 1A. Однако температура разворачивания антитела достигла максимального значения при приблизительно pH 5; см. фиг. 1A. 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. 1B. Хотя оптимальную биохимическую и биофизическую стабильность наблюдали в нитратном буфере при pH 5,5, концентрация антитела в нитратном 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 нитратном 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).

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.

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). 7% 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 (фиг. 3A и 3B) и опалесценцию (фиг. 3C). Полисорбат 80 добавляли для минимизации агрегации вследствие стресса, индуцированного перемешиванием.

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.

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. табл. 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-23p19.

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 PL-23 и функционального анализа на клетках. Концентрацию антитела определяли по поглощению УФ при 280 нм. Опалесценцию определяли путем измерения оптической плотности при 350 нм (OD_{350}). Результаты представлены на фиг. 4-7.

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 положительно-го контроля относительно деградации образца, продемонстрировали ожидаемые потери 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 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.

Во второй серии экспериментов образцы помещали в контейнеры на 30 мл CELSIUS®-Pak со слюем, контактирующим с жидкостью, из этиленвинилацетата (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.

Образцы хранения нерасфасованного лекарственного средства хранили при трех условиях замораживания (-80, -45 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).

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 концентрации вследствие испарения; фиг. 6A и 6B. 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 25H, и значительно повысилось для образцов, которые хранили при 40°C и RH4 (условия ускоренной деградации); фиг. 6C-6K.

В третьей серии экспериментов образцы 1 мл состава с антителом при концентрации 100 мг/мл помещали в шприцы (предварительно наполненные шприцы BD Нурак 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. 7A) так же, как и биологическая активность (фиг. 7B и 7C). 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.

Эксперименты на долгосрочную стабильность, представленные на фиг. 4-7, выявили, что состав hum13B8-b с гистицином 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.

Подразумевается, что результаты, полученные при условиях ускоренной деградации, таких как RH4 и 25H, 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 ус-

коренной 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.

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 внутривенную, внутривенную, внутривенную, интратекальную или интратекальную, прямую внутривенную, внутривенную, внутривенную, интратекальную или интратекальную инъекции.

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.

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

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.

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).

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.

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, 0,2, 0,5, 1, 10, 100 мкг/кг, 0,2, 1,0, 2,0, 10, 25, 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.

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.

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.

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 РСТ №№ WO 04/081190, WO 04/071517, WO 00/53631 и WO 01/18051.

Примеры

Пример 1. Состав в виде раствора.

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 табл. 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

В некоторых вариантах осуществления количества буферных компонентов (L-гистидин и L-гистидин HCl) несколько отклоняются от весовых количеств, указанных в табл. 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 табл. 2. В еще других вариантах осуществления добавляли приблизительно такие количества L-гистидина и L-гистидина HCl, как указано в табл. 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).

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 применяет-

ся 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. 1Е, 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).

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, 300×8,0 мм, 5 мкм или эквивалентная; YMC Co. Ltd., Киото, Япония). Для определения процентной доли мономера HMW-соединения и LMW-соединения применяли площади пиков.

Пики элюирования из SEC характеризовали с применением многоуглового 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).

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).

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, 4×250 мм или эквивалентная; Thermo Scientific, 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 основных вариантов, применяли площади пиков.

Все соединения, обнаруженные перед главным пиком, элюирующимся приблизительно в 23 мин, 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 ограничен-

ное α -амидирование пролина на С-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 С-конце, и полное образование пироглутамата на N-конце. Основной пик 3, наиболее распространенный из основных пиков, демонстрирует полное отщепление лизина на С-конце и неполное образование пироглутамата на N-конце. Основные варианты демонстрируют полное отщепление лизина и различные уровни α -амидирования пролина на С-конце, и от неполного до полного образования пироглутамата на N-конце. Большинство заряженных вариантов сохраняет биологическую активность.

Пример 6. Пептидное картирование.

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 иод-ацетамидом (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, 2,1×150 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 табл. 3. Время удерживания определяли по поглощению ультрафиолета при 214 нм во время хроматографирования в течение 90 мин. Массы корректировали с учетом алкилирования остатков цистеина путем добавления чистой массы 57 Да на остаток IAM-алкилированного цистеина. Пять пептидов, происходящих 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 С-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.

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 табл. 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	C-конец-K
H	326-333	37,23	837,50	
H	1-12	41,37	1267,68	IpE
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
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.

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.

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 хемиллюминесцентного 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.

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.

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 хемиллюминесцентный субстрат пероксидазы. Сигнал считывали с помощью регистрации хемиллюминесценции. 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).

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.

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.

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 цепей в hum13B8-b.

Пример 11. Аналитическое ультрацентрифугирование с определением скорости седиментации (SV-AUC).

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 прибли-

тельно 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.

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.

Таблица 4

Условия хранения	5C						
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	5C						
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; 5C: 5°C (± 3°C); QL = 0,25%							

Таблица 5

Условия хранения	25Н				
Партия D	Временной интервал испытания на стабильность (месяцы)				
Испытание	Начальное	1М	3М	6М	12М
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; 25Н: 25°C/относительная влажность 60%					

Таблица 6

Условия хранения	RH4			
Партия D	Временной интервал испытания на стабильность (месяцы)			
Испытание	Начальное	1М	3М	6М
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	5С						
Партия Е	Временной интервал испытания на стабильность (месяцы)						
Испытание	Начальное	1М	3М	6М	12М	18М	24М
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	5С						
Партия Е	Временной интервал испытания на стабильность (месяцы)						
Испытание	Исходная	1М	3М	6М	12М	18М	24М
НПАС [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%; 5С: 5°C (± 3°C)

Таблица 8

Условия хранения	25Н				
Партия Е	Временной интервал испытания на стабильность (месяцы)				
Испытание	Начальное	1М	3М	6М	12М
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; 25Н: 25°C/относительная влажность 60%					

Таблица 9

Условия хранения	RH4			
Партия Е	Временной интервал испытания на стабильность (месяцы)			
Испытание	Начальное	1М	3М	6М
Анализ - УФ (поглощение при 280 нм) [мг/мл]	94,1	94,9	98,4	95,5
HP-IEХ [%]				
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%				

В табл. 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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Стабильный состав в виде раствора антитела hum13B8-b к IL-23p19 для лечения аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или пролиферативного нарушения, содержащий:

- 100 мг/мл антитела hum13B8-b к IL-23p19;
- 10 мМ гистидинового буфера с pH $6,0 \pm 0,3$;
- 0,05% (вес./об.) полисорбата 80 и
- 7% (вес./об.) сахарозы,

где указанное антитело hum13B8-b содержит:

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

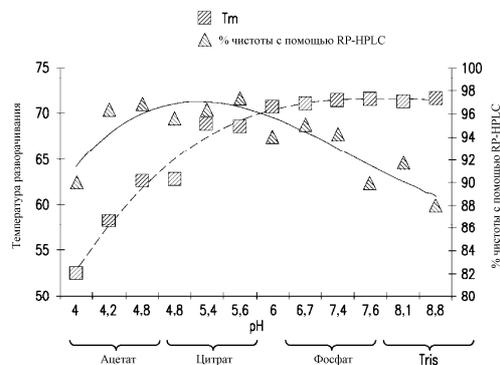
2. Способ лечения аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или пролиферативного нарушения, включающий введение стабильного состава в виде раствора по п.1 субъекту, который нуждается в этом.

3. Применение стабильного состава в виде раствора по п.1 для лечения аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или пролиферативного нарушения.

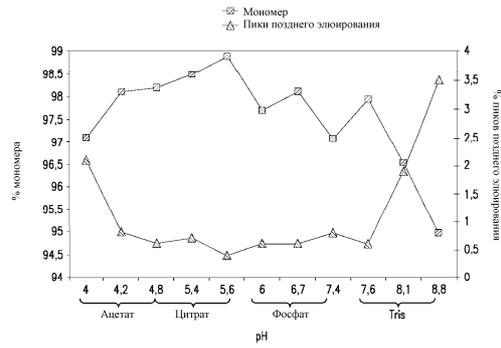
4. Способ лечения псориаза, включающий подкожное введение стабильного состава в виде раствора по п.1 с квартальными интервалами.

5. Способ лечения псориаза по п.4, где подкожное введение осуществляют с помощью инъекции с применением шприца, автоинжектора, шприца-ручки или безыгольного устройства для инъекций.

6. Применение стабильного состава в виде раствора по п.1 при производстве лекарственного препарата для лечения аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или пролиферативного нарушения.

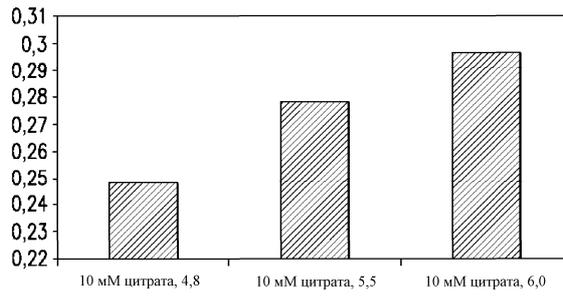


Фиг. 1А



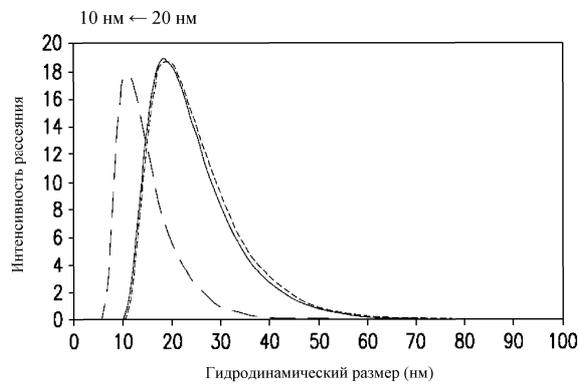
Фиг. 1В

□ Опалесценция (OD при 350 нм)

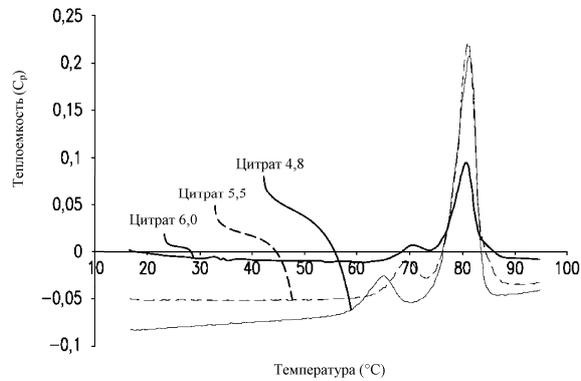


Фиг. 1С

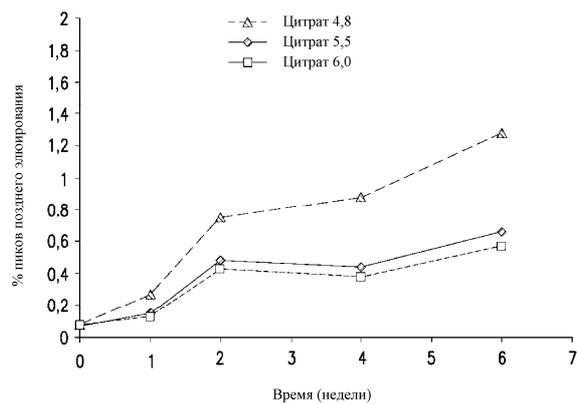
— 10 mM цитрата, 4,8
 — 10 mM цитрата, 5,5
 - - - 10 mM цитрата, 6,0



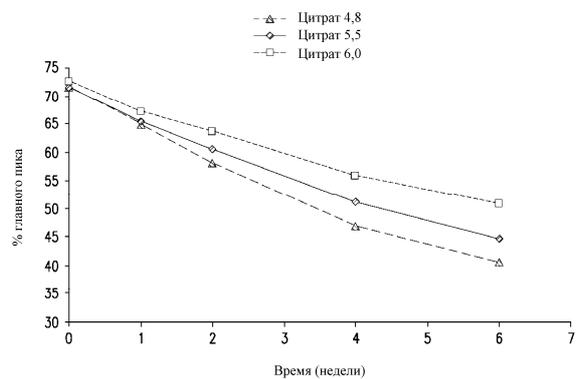
Фиг. 1D



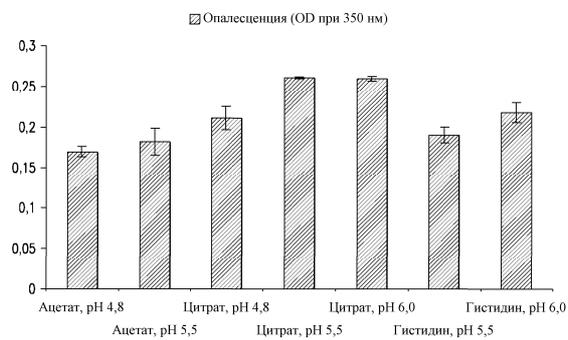
Фиг. 1Е



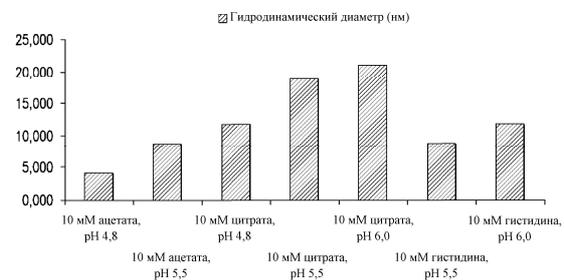
Фиг. 1F



Фиг. 1G

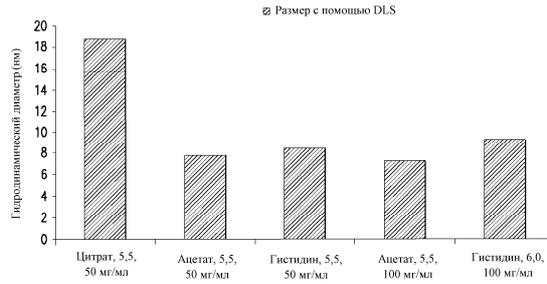


Фиг. 1H

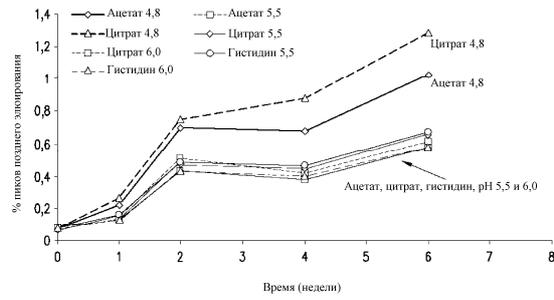


Фиг. 1I

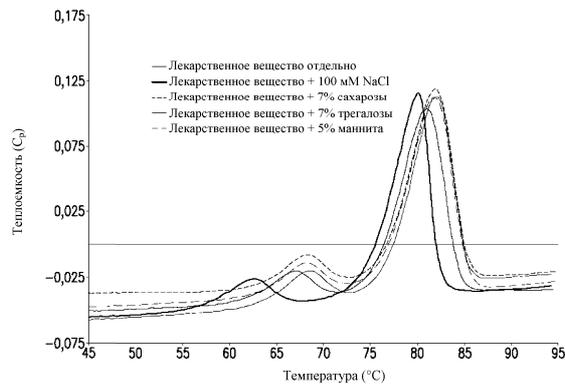
034616



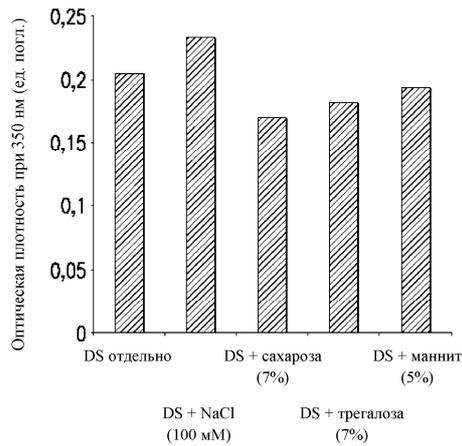
Фиг. 1J



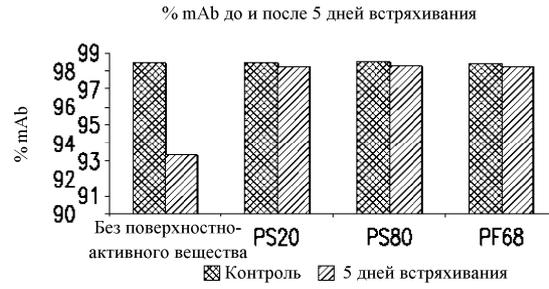
Фиг. 1K



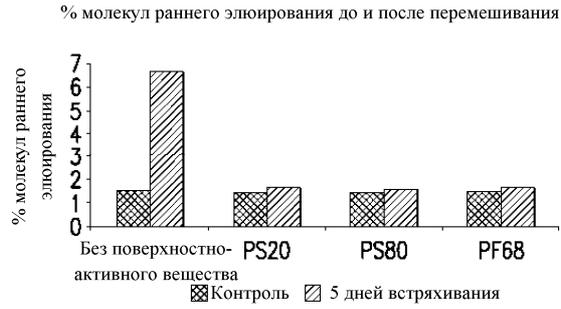
Фиг. 2A



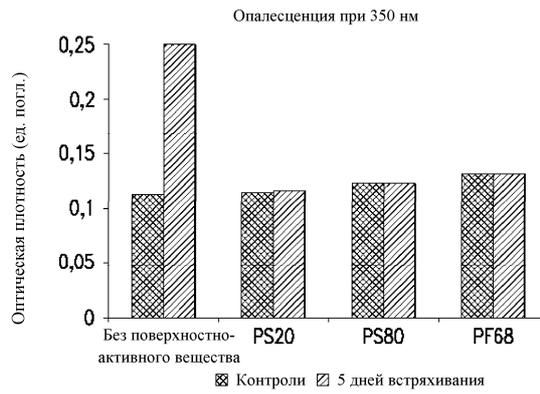
Фиг. 2B



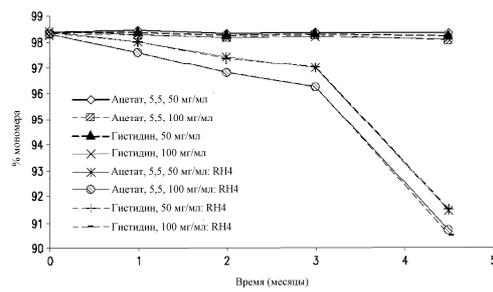
Фиг. 3А



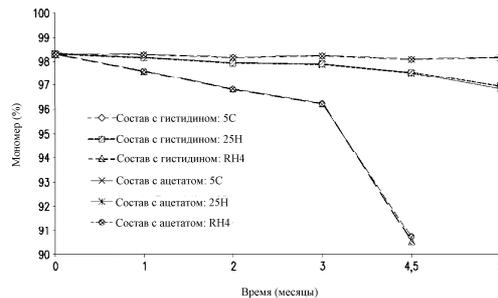
Фиг. 3В



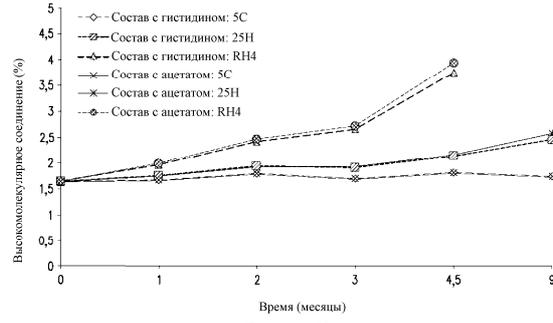
Фиг. 3С



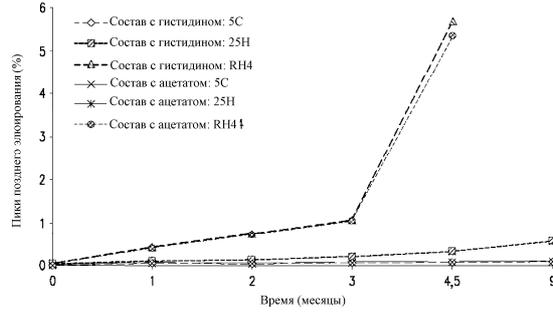
Фиг. 4А



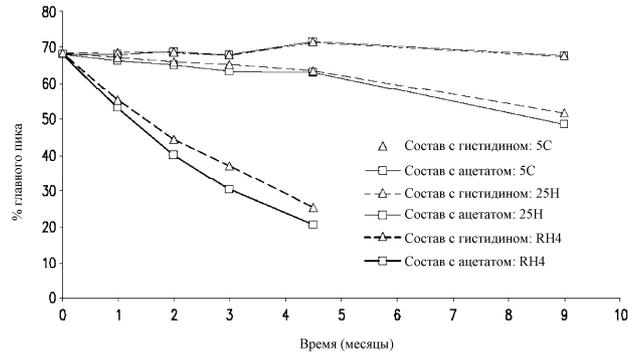
Фиг. 4В



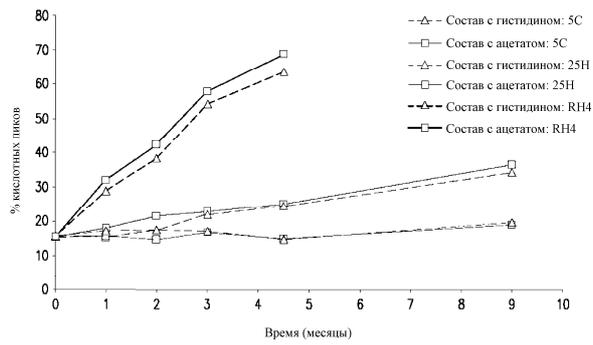
Фиг. 4С



Фиг. 4D

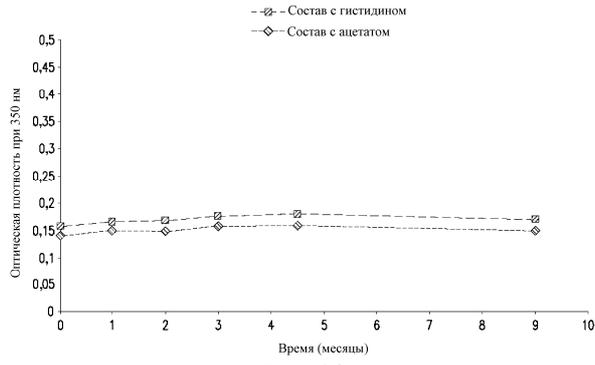


Фиг. 4Е

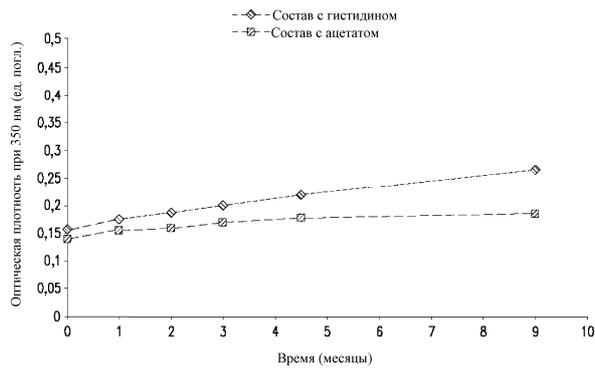


Фиг. 4F

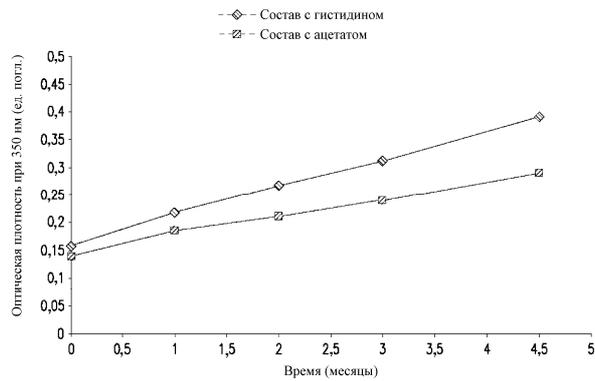
034616



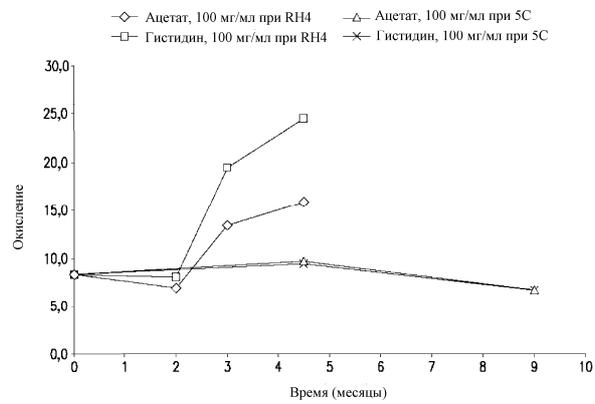
Фиг. 4Г



Фиг. 4Н

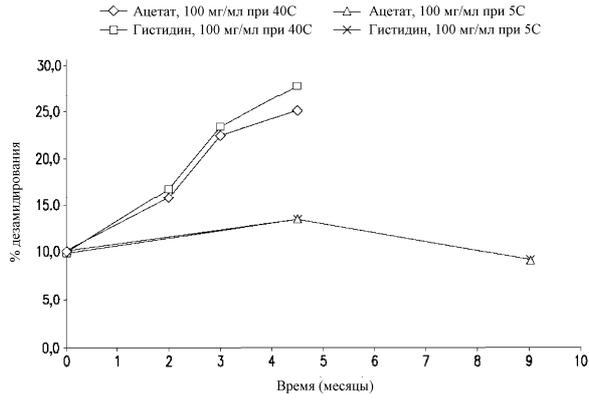


Фиг. 4И

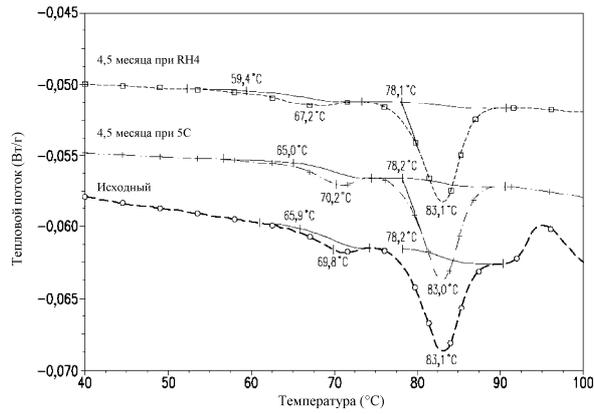


Фиг. 4J

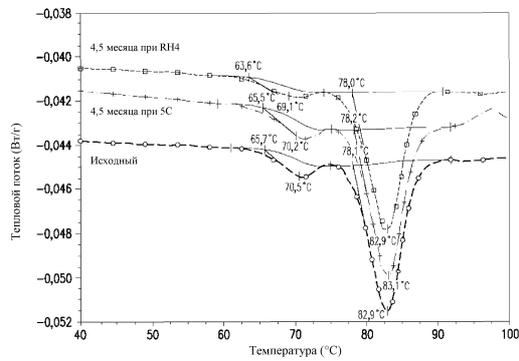
034616



Фиг. 4К

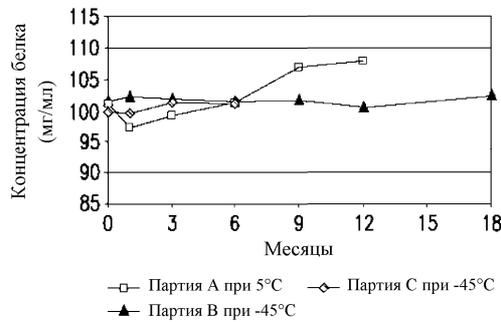


Фиг. 4Л



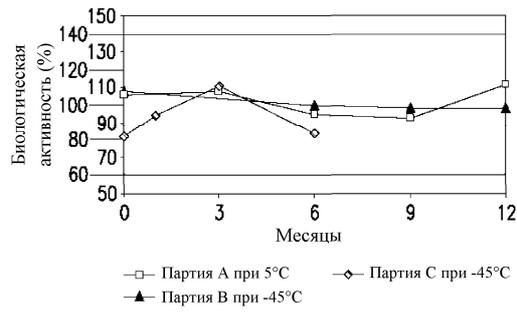
Фиг. 4М

Анализ с помощью УФ-спектроскопии



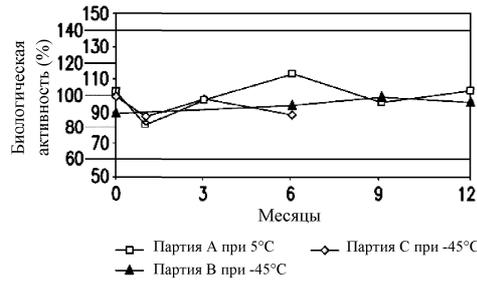
Фиг. 5А

Биологическая активность с помощью функционального анализа на клетках



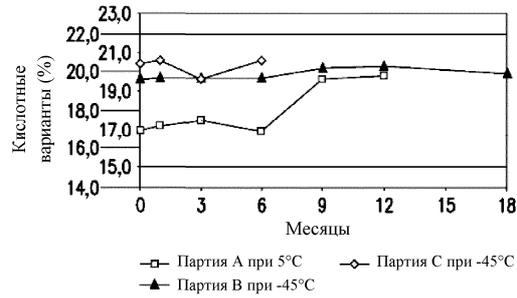
Фиг. 5В

Биологическая активность с помощью ELISA-связывания



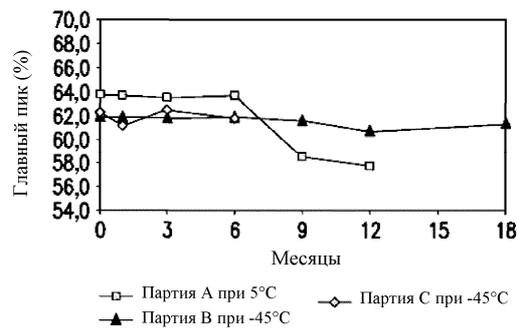
Фиг. 5С

Кислотные варианты с помощью НР-ІЕХ

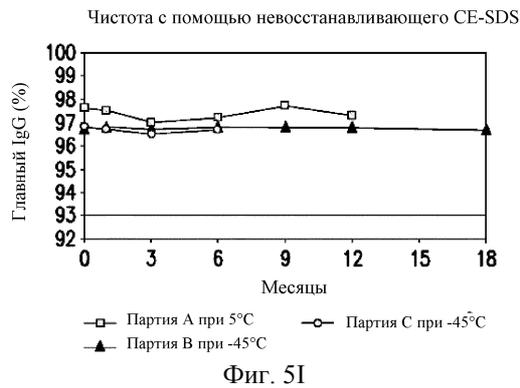
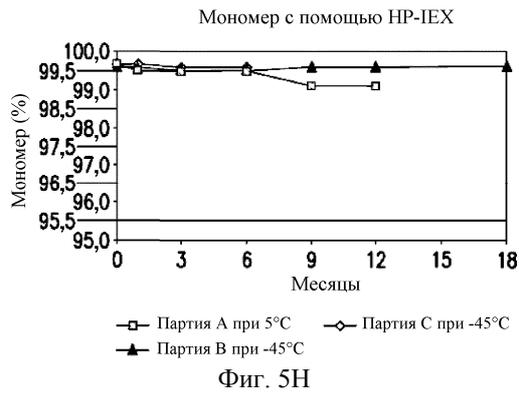
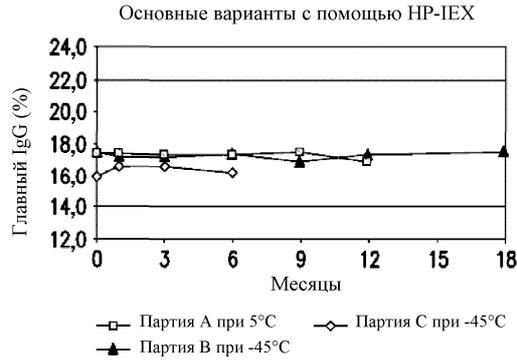
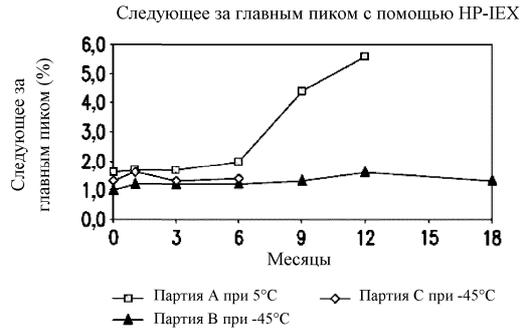


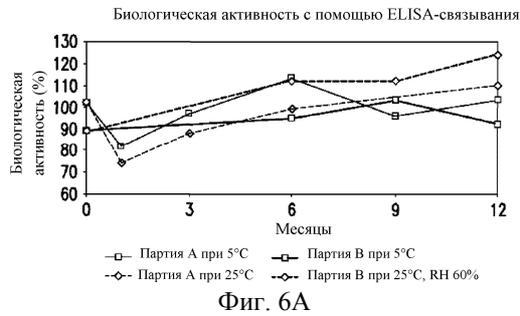
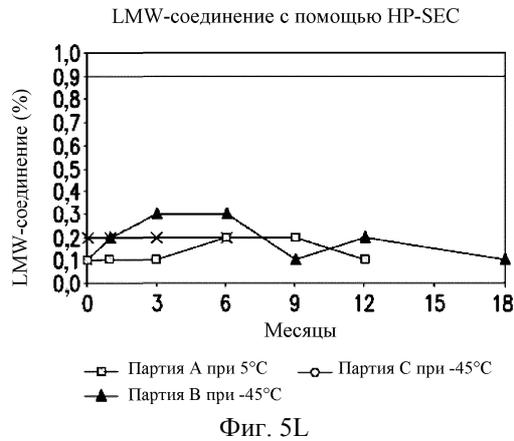
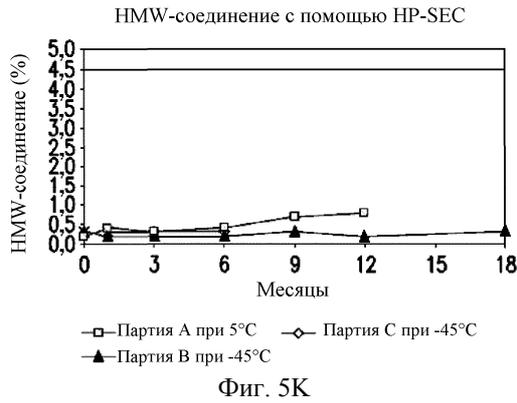
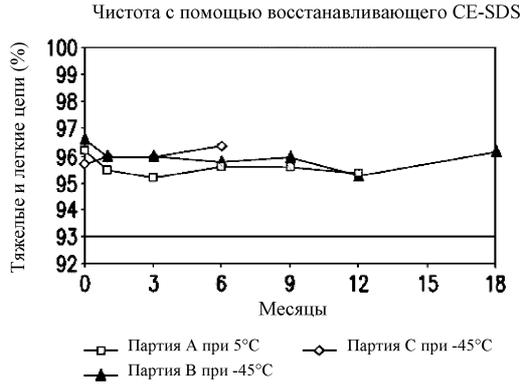
Фиг. 5D

Главный пик с помощью НР-ІЕХ

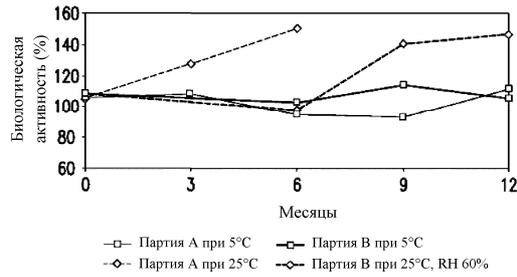


Фиг. 5Е



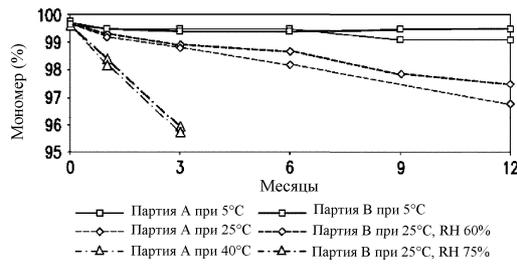


Биологическая активность с помощью функционального анализа на клетках



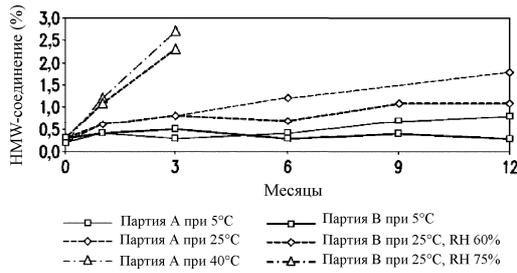
Фиг. 6В

Мономер с помощью HP-SEC



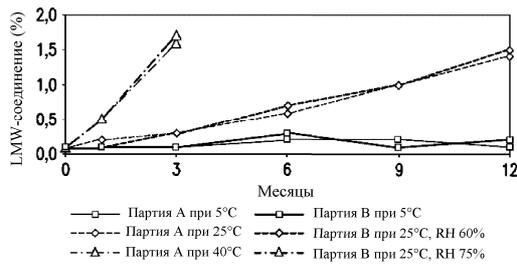
Фиг. 6С

НМВ-соединение с помощью HP-SEC



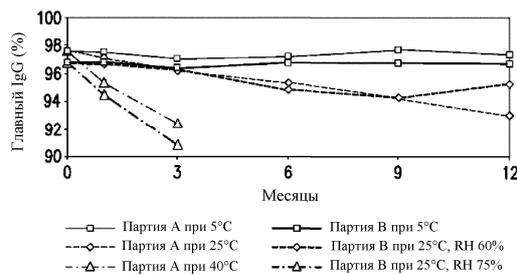
Фиг. 6Д

ЛМВ-соединение с помощью HP-SEC

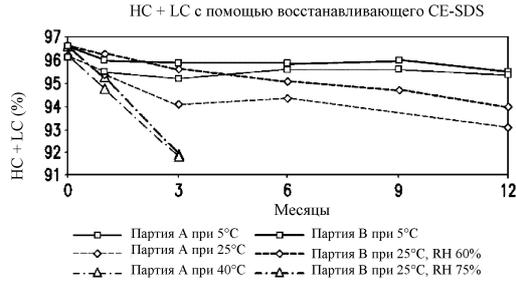


Фиг. 6Е

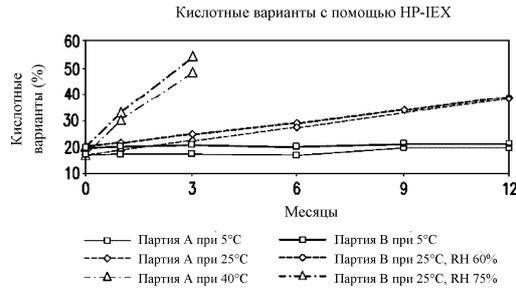
Главный IgG с помощью невосстанавливающего CE-SDS



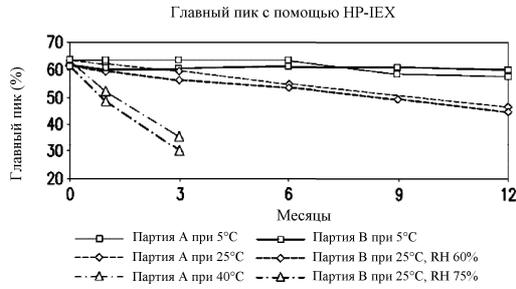
Фиг. 6Ф



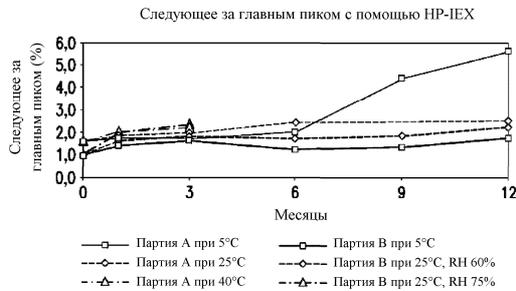
Фиг. 6G



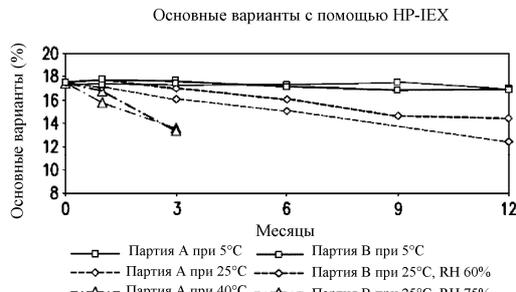
Фиг. 6H



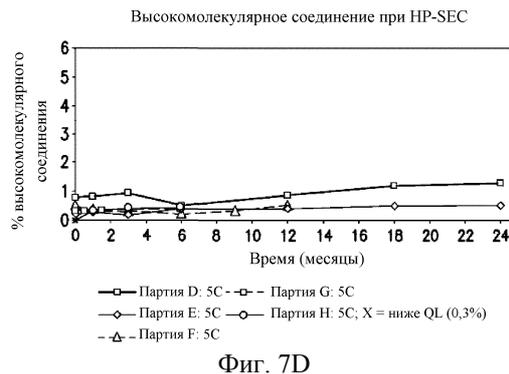
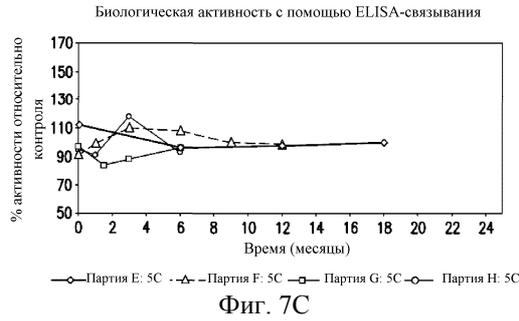
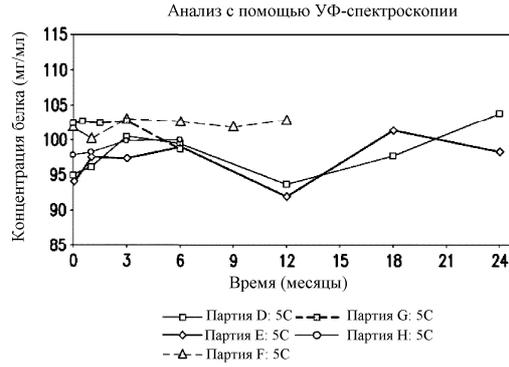
Фиг. 6I

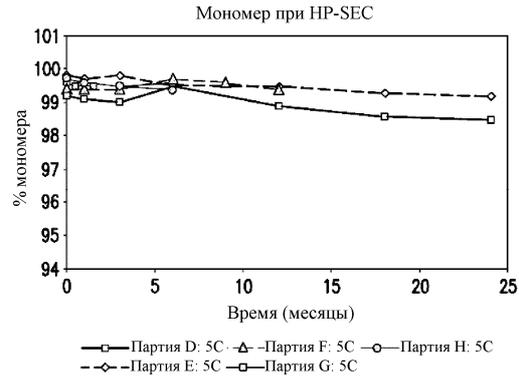


Фиг. 6J

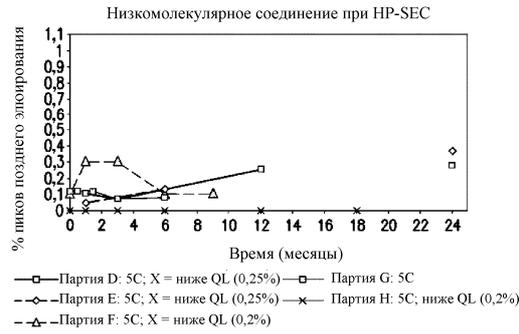


Фиг. 6K

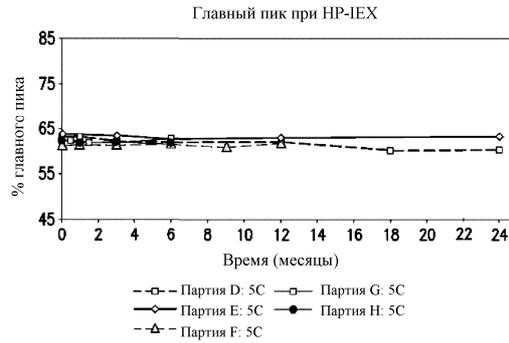




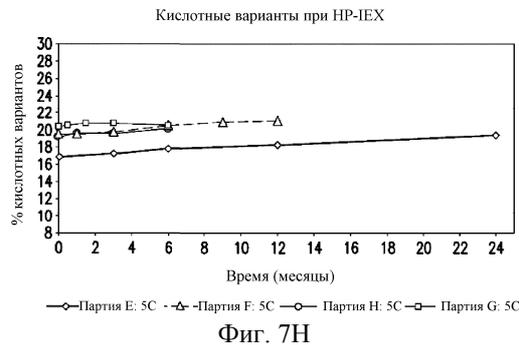
Фиг. 7Е



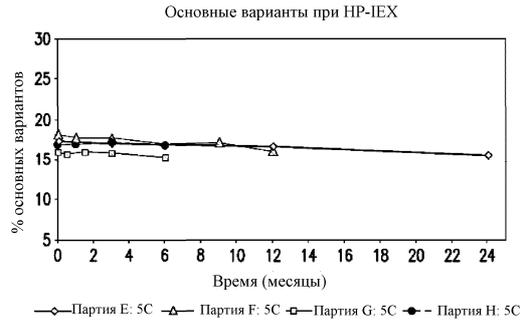
Фиг. 7F



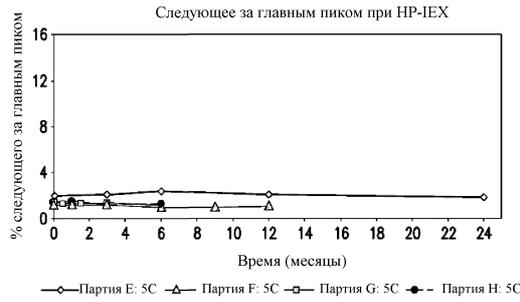
Фиг. 7G



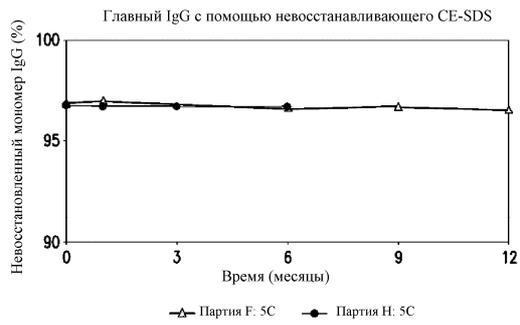
Фиг. 7H



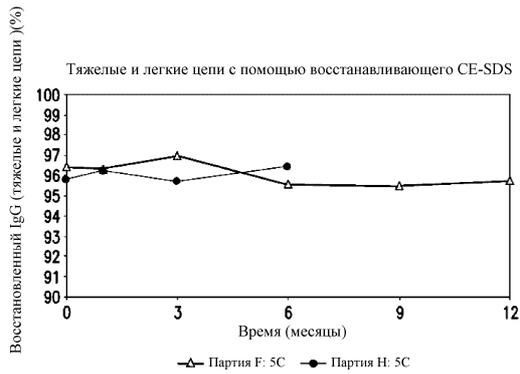
Фиг. 7I



Фиг. 7J



Фиг. 7K



Фиг. 7L

