

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040272**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.05.16

(21) Номер заявки
201892190

(22) Дата подачи заявки
2017.03.28

(51) Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) ЛЕЧЕНИЕ ПСОРИАЗА АНТИТЕЛОМ К ИЛ-12 И/ИЛИ ИЛ-23 С ВОЗРАСТАНИЕМ ИНТЕРВАЛА МЕЖДУ ВВЕДЕНИЯМИ ДОЗЫ

(31) 62/314,697

(32) 2016.03.29

(33) US

(43) 2019.04.30

(86) PCT/US2017/024544

(87) WO 2017/172771 2017.10.05

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Чеврир Марк, Фарахи Камяр, Йилдин Ньюман (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) KENNETH B. GORDON ET AL.: "A Phase 2 Trial of Guselkumab versus Adalimumab for Plaque Psoriasis", NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, THE - NEJM -, vol. 373, no. 2, 9 July 2015 (2015-07-09), pages 136-144, XP055268322, ISSN: 0028-4793, DOI: 10.1056/NEJMoal501646, abstract

Anonymous: "NCT02207231: A Study of Guselkumab in the Treatment of Participants With Moderate to Severe Plaque-Type Psoriasis", 22 February 2016 (2016-02-22), XP055387867, Retrieved from the Internet: URL: https://clinicaltrials.gov/archive/NCT02207231/2016_02_22 [retrieved on 2017-07-04], pages 1, 9

Anonymous: "NCT02207244 A Study of Guselkumab in the Treatment of Participants With Moderate to Severe Plaque-Type Psoriasis With Randomized Withdrawal and Retreatment", on 2016_03_07: ClinicalTrials.gov Archive, 7 March 2016 (2016-03-07), XP055387878, Retrieved from the Internet: URL: https://clinicaltrials.gov/archive/NCT02207244/2016_03_07 [retrieved on 2017-07-04], pages 1, 10

(57) Способ лечения у пациента заболевания, связанного с ИЛ-12/23, с применением возрастающего интервала между введениями дозы, включающий возрастание интервала между введениями пациенту дозы антитела к ИЛ-12/ИЛ-23, причем антитело вводят в начальной дозе и через 4 недели, через 16 недель и через 28 недель и увеличивают интервал между введениями дозы через 28 недель до увеличенного интервала, например один раз каждые 16, 20 или 24 недели.

B1

040272

040272

B1

Область применения изобретения

Настоящее изобретение относится к способам лечения заболевания, связанного с ИЛ-12/23, с помощью антитела, которое связывается с белками ИЛ-12 человека и/или ИЛ-23 человека, с применением особых схем введения. В частности, оно относится к определению возрастающего интервала между введениями дозы (или поддерживающей дозы) при подкожном введении антитела к ИЛ-12/23p40 и особым фармацевтическим композициям антитела, например устекинумаба, которые являются безопасными и эффективными для введения пациентам с заболеванием, связанным с ИЛ-12/23.

Предпосылки создания изобретения

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

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

Ненормальную регуляцию ИЛ-12 и популяций клеток ТГ1 связывали со многими опосредованными иммунной системой заболеваниями, поскольку нейтрализация ИЛ-12 антителами эффективна для лечения животных моделей псориаза, рассеянного склероза (РС), ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, инсулинозависимого сахарного диабета (1-го типа) и увеита (Leonard et al., 1995; Hong et al., 1999; Malfait et al., 1998; Davidson et al., 1998). Однако поскольку эти исследования были нацелены на общую субъединицу p40, *in vivo* происходила нейтрализация как ИЛ-12, так и ИЛ-23. Поэтому было неясно, какой из двух цитокинов: ИЛ-12 или ИЛ-23 опосредовал заболевание, и необходимо ли ингибировать оба цитокина, чтобы достичь подавления заболевания. Дополнительные исследования на дефицитных по ИЛ-23p19 мышах или с нейтрализацией ИЛ-23 специфичными антителами подтвердили, что ингибирование ИЛ-23 может обеспечить положительный результат, эквивалентный стратегиям против ИЛ-12p40 (Cua et al., 2003, Murphy et al., 2003, Venson et al., 2004). Таким образом, существует доказательство роли ИЛ-12 и ИЛ-23 в опосредованном иммунной системой заболевании.

Псориаз является хроническим опосредованным иммунной системой кожным расстройством со значительными сопутствующими заболеваниями, такими как псориазический артрит (PsA), депрессия, сердечно-сосудистые заболевания, гипертензия, ожирение, сахарный диабет, метаболический синдром и болезнь Крона. Бляшечная форма псориаза является наиболее распространенной формой заболевания и проявляется в виде четко ограниченных эритематозных поражений, покрытых серебристо-белыми чешуйками. Бляшки сопровождаются зудом, болезненностью и часто обезображивают, причем у значительной части пациентов с псориазом бляшки локализуются на руках/ногтях, лице, стопах и половых органах. Таким образом, псориаз может становиться физическим и психосоциальным бременем, которое выходит за пределы физических дерматологических симптомов и мешает повседневной деятельности. Например, псориаз отрицательно влияет на семейные, супружеские, социальные и трудовые отношения, связан с повышенной частотой депрессии и возрастанием суицидальных склонностей.

При гистологической характеристике псориазических поражений обнаруживаются утолщенный эпидермис, возникающий в результате нарушений пролиферации и дифференцировки кератоцитов, а также инфильтрация через дерму и совместное размещение Т-лимфоцитов CD3+ и дендритных клеток. Хотя этиология псориаза полностью не определена, анализ генов и белков показал, что ИЛ-12, ИЛ-23 и их последователи чрезмерно экспрессированы в псориазических поражениях, а некоторые могут коррелировать с тяжестью течения псориаза. Некоторые виды терапии, применяемые при лечении псориаза,

модулируют уровни ИЛ-12 и ИЛ-23, что предположительно способствует их эффективности. Клетки Th1 и Th17 могут продуцировать эффекторные цитокины, которые индуцируют продукцию вазодилаторов, хемоаттрактантов и экспрессию молекул адгезии на эндотелиальных клетках, которые, в свою очередь, способствуют привлечению моноцитов и нейтрофилов, инфильтрации Т-клеток, неоваскуляризации, а также активации кератоцитов и гиперплазии. Активированные кератоциты могут продуцировать хемоаттрактантные факторы, которые стимулируют направленную миграцию нейтрофилов, моноцитов, Т-клеток и дендритных клеток, тем самым возбуждая цикл воспаления и гиперпролиферацию кератоцитов.

Были опубликованы результаты трех клинических исследований фазы 3 антитела к ИЛ-12/23, устекинумаба, при лечении бляшечного псориаза средней и тяжелой степени. Применение устекинумаба, который вводили подкожной инъекцией на неделях 0 и 4, а затем один раз каждые 12 недель, показало быстрый и устойчивый клинический ответ по результатам оценки индекса площади поверхности псориаза и степени тяжести - утвержденного средства оценки эффективности при псориазе. В исследовании фазы 3 проводили сравнение устекинумаба с этанерцептом, антагонистом фактора некроза опухоли (ФНО) и наблюдали, что у пациентов с псориазом средней или тяжелой степени эффективность устекинумаба превосходила таковую этанерцепта в течение периода 12 недель. В двух клинических исследованиях фазы 3: Phoenix I и Phoenix II, период полужизни устекинумаба составлял приблизительно 3 недели. Частота иммунного ответа против устекинумаба находилась в пределах 3-5%. Кроме того, отмеченные неблагоприятные явления были относительно легкими, причем большинство явлений включали восприимчивость к легким инфекциям, таким как назофарингит и инфекции верхних дыхательных путей. В течение 12 недель терапии частота инфицирования у пациентов, получавших лечение устекинумабом, была не выше частоты инфицирования у пациентов, получавших плацебо; частота инфицирования не возрастала и при введении повышенных доз устекинумаба, по сравнению с введением низких доз. Кроме того, частоты серьезных инфекций, сердечно-сосудистых явлений, реакций в месте инъекции и злокачественных новообразований были низкими. Взятые вместе клинические наблюдения применения устекинумаба для лечения псориаза подтвердили его первый статус в своем классе и подтвердили фундаментальную роль ИЛ-12 и/или ИЛ-23 в патогенезе псориаза.

Изложение сущности изобретения

В первом аспекте изобретение относится к способу лечения у пациента заболевания, связанного с ИЛ-12/23, включающему подкожное введение пациенту антитела к ИЛ-12 и/или к ИЛ-23, например антитела к ИЛ-12/23p40 (ИЛ-12/23p40), причем антитело к ИЛ-12/23p40 вводят в начальной дозе, в последующей дозе через 4 недели и с интервалом введения дозы один раз каждые 12 недель, причем этот интервал (поддерживающий интервал) увеличивают через 28 недель после начальной дозы. Увеличенный интервал между введениями дозы может быть установленным интервалом или изменяться на основании того, когда пациент испытывает возврат заболевания после отмены или увеличения интервала введения терапевтического антитела, например при псориазе на основании изменения индекса глобальной оценки псориаза (PGA) и/или индекса распространения и тяжести псориаза (PASI). В одном варианте осуществления интервал между введениями дозы через 28 недель увеличивают с одного раза каждые 12 недель до одного раза каждые 16, 20 или 24 недели в дозах 45 или 90 мг.

В одном варианте осуществления заболевание, связанное с ИЛ-12/23, выбрано из группы, состоящей из псориаза, псориазического артрита, волчанки, сахарного диабета, болезни Крона, язвенного колита и других воспалительных заболеваний кишечника, саркоидоза, анкилозирующего спондилита (AS) и осевого спондилоартрита (nrAxSpA). В предпочтительном варианте осуществления заболевание, связанное с ИЛ-12/23, представляет собой псориаз. В другом варианте осуществления заболевание, связанное с ИЛ-12/23, представляет собой псориазический артрит.

Изобретение также относится к способу лечения псориаза у пациента, включающему подкожное введение пациенту антитела к ИЛ-12/23p40 - устекинумаба (Stelara®), причем устекинумаб вводят в начальной дозе, через 4 недели после начальной дозы, с интервалом между введениями дозы один раз каждые 12 недель до 28 недель после начальной дозы, а затем вводят один раз каждые 16, 20 или 24 недели.

Кроме того, композиция, применяемая в способе по настоящему изобретению, содержит фармацевтическую композицию, содержащую антитело к ИЛ-12/23p40 в количестве от около 1,0 мкг/мл до около 1000 мг/мл, конкретно, дозу 45 или 90 мг. В предпочтительном варианте осуществления антитело к ИЛ-12/23p40 представляет собой устекинумаб (Stelara®). В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит выделенное антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40, которое связывается с пептидной цепью, содержащей остаток 1-88 с последовательностью SEQ ID NO: 9; от около 0,27 до около 0,80 мг L-гистидина на миллилитр фармацевтической композиции; от около 0,69 до около 2,1 мг L-гистидина моногидрохлорида моногидрата на миллилитр фармацевтической композиции; от около 0,02 до около 0,06 мг полисорбата-80 на миллилитр фармацевтической композиции; и от около 65 до около 87 мг сахарозы на миллилитр фармацевтической композиции; причем разбавитель представляет собой воду в стандартном состоянии.

В другом аспекте изобретения фармацевтическая композиция содержит выделенное антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40, которое имеет (i) последовательности аминокислот CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, SEQ

ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 и (ii) последовательности аминокислот CDR легкой цепи SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; от около 0,27 до около 0,80 мг L-гистидина на миллилитр фармацевтической композиции; от около 0,69 до около 2,1 мг L-гистидина моногидрохлорида моногидрата на миллилитр фармацевтической композиции; от около 0,02 до около 0,06 мг полисорбата-80 на миллилитр фармацевтической композиции; и от около 65 до около 87 мг сахарозы на миллилитр фармацевтической композиции; причем разбавитель представляет собой воду в стандартном состоянии.

Другой аспект способа по настоящему изобретению содержит введение фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40, которое имеет последовательность аминокислот вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и последовательность аминокислот вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 8; от около 0,27 до около 0,80 мг L-гистидина на миллилитр фармацевтической композиции; от около 0,69 до около 2,1 мг L-гистидина моногидрохлорида моногидрата на миллилитр фармацевтической композиции; от около 0,02 до около 0,06 мг полисорбата-80 на миллилитр фармацевтической композиции; и от около 65 до около 87 мг сахарозы на миллилитр фармацевтической композиции; причем разбавитель представляет собой воду в стандартном состоянии.

Другой аспект способа представляет собой введение фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40, которое имеет (i) последовательности аминокислот CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 и (ii) последовательности аминокислот CDR легкой цепи SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; около 0,53 мг L-гистидина на миллилитр фармацевтической композиции; около 1,37 мг L-гистидина моногидрохлорида моногидрата на миллилитр фармацевтической композиции; около 0,04 мг полисорбата-80 на миллилитр фармацевтической композиции и около 76 мг сахарозы на миллилитр фармацевтической композиции; причем разбавитель представляет собой воду в стандартном состоянии.

Дополнительный аспект способа представляет собой введение фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40, которое имеет последовательность аминокислот вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и последовательность аминокислот вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 8, причем выделенное антитело связывается с пептидной цепью, содержащей остатки 1-88 с последовательностью SEQ ID NO: 9; около 0,53 мг L-гистидина на миллилитр фармацевтической композиции; около 1,37 мг L-гистидина моногидрохлорида моногидрата на миллилитр фармацевтической композиции; около 0,04 мг полисорбата-80 на миллилитр фармацевтической композиции и около 76 мг сахарозы на миллилитр фармацевтической композиции; причем разбавитель представляет собой воду в стандартном состоянии.

В другом аспекте способ представляет собой введение фармацевтической композиции, содержащей связывающее соединение, которое конкурирует за связывание с описанными выше антителами, необязательно на остатках 1-88 последовательности SEQ ID NO: 9; от около 0,27 до около 0,80 мг L-гистидина на миллилитр фармацевтической композиции; от около 0,69 до около 2,1 мг L-гистидина моногидрохлорида моногидрата на миллилитр фармацевтической композиции; от около 0,02 до около 0,06 мг полисорбата-80 на миллилитр фармацевтической композиции и от около 65 до около 87 мг сахарозы на миллилитр фармацевтической композиции; причем разбавитель представляет собой воду в стандартном состоянии.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показана молекулярная структура связанного комплекса ИЛ-12/p40 Fab, в ленточном представлении.

На фиг. 2 показан сайт связывания (эпитоп) mAb p40, представленный на поверхности молекул, в поверхностном и ленточном представлении. Домен D1 и Fv для ясности выделены за пределами структуры комплекса. Показана молекулярная поверхность домена D1 из p40. Часть Fv фрагмента Fab показана в виде лент. Левая панель: вид снизу сайта связывания антитела, т. е. эпитопа. Средняя панель: вид под углом ~90° относительно вида на левой панели. Правая панель: Ленточное представление остатков эпитопа.

На фиг. 3 показан результат оценки методом ELISA связывания антитела к ИЛ-12p40 с различными единичными мутантами p40.

На фиг. 4 показана относительная аффинность связывания mAb к p40 с различными мутантами p40.

На фиг. 5 показана схема исследования устекинумаба на фазе 3b в рандомизированном, двойном слепом, многоцентровом исследовании с контролем активным препаратом, с 4-недельным периодом скрининга, вводным периодом с лечением в открытом режиме с недели 0 до недели 28, периодом лечения в двойном слепом режиме с недели 28 до недели 104, периодом после лечения до недели 116 и последующим наблюдением для надежности путем беседы по телефону или посещения центра исследования на неделе 124.

На фиг. 6 показана процентная доля субъектов, достигавших оценки "очищение" (0) или "минимальный" (1) по шкале PGA при посещениях от недели 28 до недели 112 в исследовании CNTO1275PSO3009.

На фиг. 7 показана процентная доля субъектов, достигавших ответа 75 баллов по шкале PASI при посещениях от недели 28 до недели 112 в исследовании CNTO1275PSO3009.

На фиг. 8 показаны ответы "очищение" (0) по PGA с течением времени от недели 28 до недели 112.

На фиг. 9 показана процентная доля субъектов, достигавших ответа 90 баллов по шкале PASI при посещениях от недели 28 до недели 112 в исследовании CNTO1275PSO3009.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

В контексте настоящего документа способ лечения псориаза содержит введение выделенных, рекомбинантных и/или синтетических человеческих антител к ИЛ-12, ИЛ-23 и ИЛ-12/23p40, применение диагностических и терапевтических композиций, способов и устройств.

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

Предполагается, что термин "антитело" также будет охватывать антитела, фрагменты их расщепления, их определенные части и варианты, включая антитела, имитирующие или содержащие части антител, которые имитируют структуру и/или функцию антитела или его определенного фрагмента или части, включая одноцепочечные антитела и их фрагменты. Функциональные фрагменты включают связывающие антиген фрагменты, которые связываются с ИЛ-12/23 млекопитающего. Например, настоящее изобретение охватывает фрагменты антител, способные связываться с ИЛ-12/23, или их части, включая, без ограничения, фрагменты Fab (например, после расщепления папаином), Fab' (например, после расщепления пепсином и частичного восстановления) и F(ab')₂ (например, после расщепления пепсином), F(ab) (например, после расщепления плазмином), pFc' (например, после расщепления пепсином или плазмином), Fd (например, после расщепления пепсином, частичного восстановления и агрегации), Fv или scFv (например, методами молекулярной биологии) (см., например, Colligan, Immunology, упомянутое).

Такие фрагменты можно продуцировать путем ферментативного расщепления, методами синтеза или рекомбинации, известными в данной области и/или описанными в настоящем документе. Антитела также можно продуцировать в различных укороченных формах, пользуясь генами антител, в которых один или более стоп-кодонов были вставлены выше естественного сайта терминации. Например, возможно создание комбинированного гена, кодирующего часть тяжелой цепи F(ab')₂, который включает последовательности ДНК, кодирующие домен C_H1 и/или шарнирную область тяжелой цепи. Различные части антител можно химически соединять обычными методами или получать в виде единого белка методами генной инженерии.

В контексте настоящего документа термин "человеческое антитело" относится к антителу, в котором по существу каждая часть белка (например, CDR, каркас, домены C_L, C_H (например, C_H1, C_H2, C_H3), шарнир, домены V_L, V_H) является по существу неиммуногенной у человека, лишь с незначительными изменениями или вариациями последовательности. "Человеческое антитело" также может представлять собой антитело, которое получено из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека, или близко соответствует им. Человеческие антитела могут включать остатки аминокислот, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфичным мутагенезом *in vitro*, или соматической мутацией *in vivo*). Часто это означает, что человеческое антитело является по существу неиммуногенным у человека. Человеческие антитела классифицируют в группы на основании сходства их последовательностей аминокислот. Таким образом, пользуясь поиском по сходству последовательностей, можно выбрать антитело со сходной линейной последовательностью в качестве матрицы для создания человеческого антитела. Аналогично, антитела определенного примата (обезьяна, павиан, шимпанзе и т. д.), грызуна (мышь, крыса, кролик, морская свинка, хомяк и др.) и других млекопитающих определяются особенностями антител такого вида, подрода, рода, подсемейства и семейства. Дополнительно химерные антитела могут включать любое сочетание, указанное выше. Такие изменения или вариации необязательно и предпочтительно сохраняют

или ослабляют иммуногенность у человека или другого вида относительно немодифицированных антител. Таким образом, человеческое антитело отличается от химерного или гуманизированного антитела.

Следует отметить, что человеческое антитело может продуцироваться животным (исключая человека), либо прокариотической или эукариотической клеткой, которая способна экспрессировать функционально перестроенные гены человеческих иммуноглобулинов (например, тяжелую цепь и/или легкую цепь). Дополнительно, если человеческое антитело является одноцепочечным антителом, оно может содержать линкерный пептид, которого не имеется в нативных человеческих антителах. Например, Fv может содержать линкерный пептид, такой как от двух до около восьми остатков глицина или других аминокислот, который соединяет вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи. Считается, что такие линкерные пептиды имеют человеческое происхождение.

Можно также применять биспецифичные, гетероспецифичные, гетероконъюгатные или подобные антитела, которые представляют собой моноклональные, предпочтительно человеческие или гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания по меньшей мере с двумя различными антигенами. В данном случае одна из специфичностей связывания предназначена для по меньшей мере одного белка ИЛ-12/23, а другая - для любого другого антигена. Методы получения биспецифичных антител известны специалистам в данной области. Обычно в основе рекомбинантного получения биспецифичных антител лежит коэкспрессия двух пар тяжелая цепь/легкая цепь иммуноглобулинов, где две тяжелые цепи обладают различными специфичностями (Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)). Из-за случайного распределения тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов эти гибридомы (квадромы) образуют смесь из 10 различных возможных молекул антител, причем только одна из них имеет правильную биспецифичную структуру. Очистка правильной молекулы, которую обычно выполняют путем аффинной хроматографии, является довольно трудоемким процессом с низким выходом продукта. Аналогичные процедуры описаны, например, в WO 93/08829, патентах США № 6210668, 6193967, 6132992, 6106833, 6060285, 6037453, 6010902, 5989530, 5959084, 5959083, 5932448, 5833985, 5821333, 5807706, 5643759, 5601819, 5582996, 5496549, 4676980, публикациях WO 91/00360, WO 92/00373, EP 03089, Trauneker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991), Suresh et al., Methods in Enzymology 121: 210 (1986), каждая из которых полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Антитела к ИЛ-12/23p40 (также называемые антителами против ИЛ-12/23p40) (или антитела к ИЛ-23), используемые в способах и композициях по настоящему изобретению, необязательно могут характеризоваться высокой аффинностью связывания с ИЛ-12/23p40 (или с ИЛ-23), и необязательно и предпочтительно имеют низкую токсичность. В частности, в настоящем изобретении можно использовать антитело, определенный фрагмент или вариант по этому изобретению, где отдельные компоненты, такие как вариабельная область, константная область и каркас, отдельно и/или совместно, необязательно и предпочтительно имеют низкую иммуногенность. Антитела, которые можно использовать в настоящем изобретении, необязательно характеризуются своей способностью оказывать лечебное действие на пациентов в течение продолжительного периода, с поддающимся измерению ослаблением симптомов и низкой и/или приемлемой токсичностью. Низкая или допустимая иммуногенность и/или высокая аффинность, а также другие приемлемые свойства, могут способствовать достижению терапевтических результатов. Под "низкой иммуногенностью" в настоящем документе понимается индуцирование значительных ответов антител НАНА, НАСА или НАМА у менее чем около 75%, или предпочтительно у менее чем около 50% получающих лечение пациентов, и/или индуцирование низких титров у получающих лечение пациентов (менее чем около 300, предпочтительно менее чем около 100, по результатам измерения иммуноферментным анализом с двойным антигеном) (см. публикацию Elliott et al., Lancet 344: 1125-1127 (1994), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки). Термин "низкая иммуногенность" также можно определить как возникновение поддающихся титрованию уровней антител против антитела к ИЛ-12 у пациентов, которых лечили антителом к ИЛ-12, встречающееся у менее чем 25% получающих лечение пациентов, предпочтительно у менее чем 10% получающих лечение пациентов, при рекомендованной дозе в течение рекомендованного курса терапии в период лечения.

Полезные свойства

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

Такой способ может содержать введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) в клетку, ткань, орган, организм животного или пациента, которым требуется такое модулирование, лечение, ослабление, предотвращение или уменьшение симптомов, эффектов или механизмов. Эффективное коли-

чество может содержать количество от около 0,001 до 500 мг/кг для однократного (например, болюсно-го), многократного или непрерывного введения, или для достижения концентрации в сыворотке 0,01-5000 мкг/мл при однократном, многократном или непрерывном введении, или составлять любой эффективный интервал или значение, как установлено и определено с применением известных способов, описанных в настоящем документе или известных специалистам в соответствующих областях.

Ссылки

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

Антитела по настоящему изобретению.

Продукция и генерация

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

Предпочтительное антитело к ИЛ-12/23p40 представляет собой устекинумаб (Stelara®), который имеет последовательность аминокислот вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и последовательность аминокислот вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 8, а также имеет последовательности аминокислот CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; и последовательности аминокислот CDR легкой цепи SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6. Предпочтительным антителом к ИЛ-23 (которое специфично связывается с ИЛ-23, но не с ИЛ-12) является гуселькумаб (также называемый CNTO1959, который содержит последовательности вариабельной области SEQ ID NO: 106 и 116, описанный в патенте США № 7935344, содержание которого полностью включено в настоящий документ путем ссылки) и другие антитела, описанные в патенте США № 7935344.

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

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

Клетки, продуцирующие антитела, можно также получать из периферической крови или, предпочтительно, из селезенки или лимфатических узлов человека или других приемлемых животных, которые

были иммунизированы интересующим антигеном. Для экспрессии гетерологичной или эндогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, определенный фрагмент или его вариант по настоящему изобретению, можно также использовать любую другую приемлемую клетку-хозяина. Слитые клетки (гибридомы) или рекомбинантные клетки можно выделять с помощью селективных условий культуры или других известных приемлемых методов, и клонировать путем предельного разведения, или сортировки клеток, или других известных методов. Клетки, продуцирующие антитела с желаемой специфичностью, можно выбирать с помощью приемлемого анализа (например, ELISA).

Можно применять другие приемлемые методы продукции или выделения антител требуемой специфичности, включая, без ограничения, методы отбора рекомбинантного антитела из библиотеки пептидов или белков (например, без ограничения, библиотеки дисплея бактериофагов, рибосом, олигонуклеотидов, РНК, кДНК и т. п.; например, доступной от компаний Cambridge antibody Technologies, Кембриджшир, Великобритания; MorphoSys, Мартинсрайд/Планегг, Германия; Biovation, Абердин, Шотландия, Великобритания; BioInvent, Лунд, Швеция; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Хома, Беркли, штат Калифорния, США; Ixsys. См., например, EP 368684, PCT/GB 91/01134; PCT/GB 92/01755; PCT/GB 92/002240; PCT/GB 92/00883; PCT/GB 93/00605; US 08/350260 (12.05.94); PCT/GB94/01422; PCT/GB 94/02662; PCT/GB 97/01835; (CAT/MRC); WO 90/14443; WO 90/14424; WO 90/14430; PCT/US 94/1234; WO 92/18619; WO 96/07754; (Scripps); WO 96/13583, WO 97/08320 (MorphoSys); WO 95/16027 (BioInvent); WO 88/06630; WO90/3809 (Dyax); US 4,704,692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Affymax); WO89/06283; EP 371998; EP 550400; (Хома); EP 229046; PCT/US 91/07149 (Ixsys); или стохастически полученных пептидов или белков - US 5723323, 5763192, 5814476, 5817483, 5824514, 5976862, WO 86/05803, EP 590689 (Ixsys, в настоящее время Applied Molecular Evolution (AME), все включены в настоящий документ путем ссылки)), или методами, имеющими в основе иммунизацию трансгенных животных (например, мышей SCID, см. Nguyen et al., Microbiol. Immunol. 41: 901-907 (1997); Sandhu et al., Crit. Rev. Biotechnol. 16: 95-118 (1996); Eren et al., Immunol. 93: 154-161 (1998), каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки, как и смежные патенты и заявки), которые способны продуцировать набор человеческих антител, как известно специалистам в данной области и/или описано в настоящем документе. Такие методы включают, без ограничения, рибосомный дисплей (Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 4937-4942 (May 1997); Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 14130-14135 (Nov. 1998)); технологии продукции антител из одной клетки (например, метод получения антител из отобранных лимфоцитов (SLAM) (патент США № 5,627,052, Wen et al., J. Immunol. 17: 887-892 (1987); Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-7848 (1996)); микрокаплю в геле и проточную цитометрию (Powell et al., Biotechnol. 8: 333-337 (1990); One Cell Systems, Кембридж, штат Массачусетс, США; Gray et al., J. Imm. Meth. 182: 155-163 (1995); Kenny et al., Bio/Technol. 13: 787-790 (1995)); отбор В-клеток (Steenbakkers et al., Molec. Biol. Reports 19: 125-134 (1994); Jonak et al., Progress Biotech, Vol. 5, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands (1988)).

Также можно применять и хорошо известные специалистам в данной области методы конструирования или гуманизации нечеловеческих или человеческих антител. По существу, гуманизованное или конструированное антитело имеет один или более остатков аминокислот из источника, исключая человека, например, без ограничения, мыши, крысы, кролика, приматов (исключая человека) или других млекопитающих. Эти остатки аминокислот нечеловеческого происхождения заменяют остатками, которые часто называют "импортированными" остатками, поскольку их обычно берут из "импортированных" вариативных, константных или других доменов известной человеческой последовательности.

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

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi;

www.ncbi.nih.gov/igblast; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/ALIGNMENTS.php;

www.kabatdatabase.com/top.html;

ftp.ncbi.nih.gov/repository/kabat;

www.sciquest.com;

www.abcam.com;

www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;

www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html;

www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm;

www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab;
www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html;
mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html;
www.immunologylink.com; pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html;
www.appliedbiosystems.com; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody;
www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com;
www.cancerresearchuk.org; www.biotech.ufl.edu; www.isac-net.org;
baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu;
www.mrc-cpe.cam.ac.uk;
www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; http://www.bioinf.org.uk/abs;
antibody.bath.ac.uk; www.unizh.ch; www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s;
www.nimr.mrc.ac.uk/CC/caewg/caewg.html;
www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TANHP.html;
www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;
www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.jerini.de; см.
 также Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983),

все полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

Как известно специалистам в данной области, такие импортированные последовательности можно применять для снижения иммуногенности или для снижения, усиления или модификации связывания, аффинности, скорости ассоциации, скорости диссоциации, авидности, специфичности, периода полужизни или любой другой подходящей характеристики. Как правило, остатки в области CDR прямо и в наибольшей степени участвуют во влиянии на связывание антигена. Соответственно сохраняются частично или все нечеловеческие или человеческие последовательности CDR, а нечеловеческие последовательности переменных и константных областей можно заменять человеческими или иными аминокислотами.

Антитела также можно необязательно гуманизировать, или конструировать человеческие антитела с сохранением высокой аффинности к антигену и иных благоприятных биологических свойств. Для достижения этой цели гуманизированные (или человеческие) антитела можно необязательно получать в процессе анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с помощью трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов широко доступны и известны специалистам в данной области. Существуют компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают возможные трехмерные конформационные структуры выбранных вариантов последовательностей иммуноглобулинов. Рассмотрение этих изображений позволяет анализировать вероятную роль остатков в функционировании варианта последовательности иммуноглобулина, то есть провести анализ остатков, которые влияют на способность варианта иммуноглобулина к связыванию со своим антигеном. Таким образом, из типичных совпадающих и импортированных последовательностей можно выбирать и комбинировать остатки каркасной области (FR) так, чтобы получить желаемую характеристику антитела, например, повышенную аффинность к целевому антигену (антигенам).

Кроме того, человеческое антитело к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23), применяемое в способе по настоящему изобретению, может содержать каркас легкой цепи зародышевой линии человека. В конкретных вариантах осуществления последовательность легкой цепи зародышевой линии выбрана из последовательностей VK человека, включая, без ограничения, A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, L1, L10, L11, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22, L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, O1, O11, O12, O14, O18, O2, O4 и O8. В определенных вариантах осуществления этот каркас легкой цепи зародышевой линии человека выбран из V1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-2, V1-20, V1-22, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V2-1, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17, V2-19, V2-6, V2-7, V2-8, V3-2, V3-3, V3-4, V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, V4-6, V5-1, V5-2, V5-4 и V5-6.

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

В конкретных вариантах осуществления переменная область легкой цепи и/или переменная об-

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

Гуманизацию или конструирование антител по настоящему изобретению, можно выполнять с помощью любого известного метода, такого как, без ограничения, методы, описанные в: Winter (Jones et al., *Nature* 321: 522 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239: 1534 (1988)), Sims et al., *J. Immunol.* 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901 (1987), Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.* 151: 2623 (1993), патентах США №: 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5,766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539; 4816567, PCT: US 98/16280, US 96/18978, US 91/09630, US 91/05939, US 94/01234, GB 89/01334, GB 91/01134, GB 92/01755; WO 90/14443, WO 90/14424, WO 90/14430, EP 229246, каждый полностью включен в настоящий документ путем ссылки, включая приведенные в нем ссылки.

В определенных вариантах осуществления антитело содержит измененную (например, мутантную) область Fc. Например, в некоторых вариантах осуществления область Fc была изменена для ослабления или усиления эффекторных функций антитела. В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой изотип, выбранный из IgM, IgA, IgG, IgE или другого изотипа. Альтернативно или дополнительно можно использовать сочетание модификаций аминокислот с одной или более дополнительными модификациями аминокислот, которые изменяют связывание с C1q и/или функцию зависимой от комплемента цитотоксичности в области Fc молекулы, связывающей ИЛ-12. Особый интерес может представлять такой начальный полипептид, который связывается с C1q и проявляет зависимость от комплемента цитотоксичность (CDC). Полипептиды с исходной активностью связывания с C1q, необязательно дополнительно обладающие способностью опосредовать CDC, можно модифицировать так, чтобы одна или обе этих активности усиливались. Модификации аминокислот, которые приводят к изменению C1q и/или модифицируют его функцию зависимой от комплемента цитотоксичности, описаны, например, в публикации WO 0042072, которая включена в настоящий документ путем ссылки.

Как описано выше, возможно конструировать область Fc человеческого антитела к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) по настоящему изобретению с измененной эффекторной функцией, например, путем модификации связывания с C1q и/или связывания с FcγR и, таким образом, изменения активности зависимой от комплемента цитотоксичности (CDC) и/или активности зависимой от антитела клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). "Эффекторные функции" отвечают за активацию или уменьшение биологической активности (например, у субъекта). Примеры эффекторных функций включают, без ограничения: связывание с C1q; CDC; связывание с рецептором Fc; ADCC; фагоцитоз; понижающую регуляцию рецепторов на клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток; BCR) и т.д. Для таких эффекторных функций может потребоваться, чтобы область Fc была объединена со связывающим доменом (например, вариабельным доменом антитела), и можно их оценивать с помощью различных анализов (например, анализ связывания Fc, анализ ADCC, анализ CDC и т.д.).

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

Мутации Fc также можно вводить в конструкции для изменения их взаимодействия с неонатальным рецептором Fc (FcRn) и улучшения их фармакокинетических свойств. Была описана коллекция вариантов Fc человека с улучшенным связыванием с FcRn (Shields et al., (2001). High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR, *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604).

Другой тип замены аминокислот служит для изменения модели гликозилирования области Fc человеческого антитела к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23). Гликозилирование области Fc является, как правило,

либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное гликозилирование относится к присоединению углеводного звена к боковой цепи остатка аспарагина. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из Сахаров: N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы, к гидроксиаминокислоте, чаще всего к серину или треонину, хотя также можно воспользоваться 5-гидроксипролином или 5-гидроксилизинном.

Распознаваемые последовательности для ферментативного присоединения углеводного звена к пептидным последовательностям с боковой цепью аспарагина представляют собой аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X - любая аминокислота, за исключением пролина. Таким образом, наличие любой из этих пептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования.

Модель гликозилирования можно изменять, например, путем удаления одного или более сайтов гликозилирования, находящихся в полипептиде, и/или добавлением одного или более сайтов гликозилирования, которые отсутствуют в полипептиде. Добавление сайтов гликозилирования к области Fc человеческого антитела к ИЛ-12/23р40 (или к ИЛ-23) удобно проводить путем изменения последовательности аминокислот так, чтобы она содержала одну или более из описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Иллюстративный вариант гликозилирования имеет замену аминокислотного остатка Asn 297 в тяжелой цепи. Изменение также можно проводить добавлением или заменой одного или более из остатков серина или треонина в последовательности исходного полипептида (для сайтов O-связанного гликозилирования). Кроме того, замена Asn 297 на Ala может привести к удалению одного из сайтов гликозилирования.

В некоторых вариантах осуществления человеческое антитело к ИЛ-12/23р40 (или к ИЛ-23) по настоящему изобретению экспрессируется в клетках, где экспрессирована бета-(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза III (GnT III) так, что GnT III присоединяет GlcNAc к человеческому антителу к ИЛ-12. Способы продукции антител таким путем представлены в WO/9954342, WO/03011878, патентной публикации 20030003097A1 и публикации Umana et al., Nature Biotechnology, 17: 176-180, Feb. 1999; все из которых конкретно полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

Антитело к ИЛ-12/23р40 (или к ИЛ-23) также можно необязательно генерировать путем иммунизации трансгенного животного (например, мыши, крысы, хомяка, примата (исключая человека) и т. п.), способных продуцировать набор человеческих антител, как описано в настоящем документе и/или как известно специалистам в данной области. Клетки, которые продуцируют человеческие антитела к ИЛ-12/23р40 (или к ИЛ-23), можно выделять из организма таких животных и иммортализовать с помощью подходящих способов, таких как описаны в настоящем документе.

Трансгенных мышей, которые могут продуцировать набор человеческих антител, связывающихся с человеческими антигенами, можно создавать известными способами (например, без ограничения, описанными в патентах США № 5770428, 5569825, 5545806, 5625126, 5625825, 5633,425, 5,661,016 и 5,789,650 выданных Lonberg et al.; выданных Jakobovits et al. WO 98/50433, Jakobovits et al. WO 98/24893, Lonberg et al. WO 98/24884, Lonberg et al. WO 97/13852, Lonberg et al. WO 94/25585, Kucherlapate et al. WO 96/34096, Kucherlapate et al. EP 0463151 B1, Kucherlapate et al. EP 0710719 A1, Surani et al. патент США № 5545807, Bruggemann et al. WO 90/04036, Bruggemann et al. EP 0438474 B1, Lonberg et al. EP 0814259 A2, Lonberg et al. GB 2 272 440 A, в Lonberg et al. Nature 368: 856-859 (1994), Taylor et al., Int. Immunol. 6(4): 579-591 (1994), Green et al, Nature Genetics 7: 13-21 (1994), Mendez et al., Nature Genetics 15: 146-156 (1997), Taylor et al., Nucleic Acids Research 20(23): 6287-6295 (1992), Tuailon et al., Proc Natl Acad Sci USA 90(8): 3720-3724 (1993), Lonberg et al., Int Rev Immunol 13(1): 65-93 (1995) и Fishwald et al., Nat Biotechnol 14(7): 845-851 (1996), каждый из которых полностью включен в настоящий документ путем ссылки). По существу, такие мыши содержат по меньшей мере одну содержащую трансген ДНК из по меньшей мере одного локуса человеческого иммуноглобулина, который функционально перестроен, или который может подвергаться функциональной перестройке. Эндогенный локус иммуноглобулина у таких мышей можно разрушить или подвергнуть делеции, чтобы таким образом лишить животное способности продуцировать антитела, кодируемые эндогенными генами.

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

Другие системы для генерации библиотек пептидов имеют аспекты как методов химического син-

теза *in vitro*, так и методов рекомбинации. См. патентные публикации РСТ № 92/05258, 92/14843 и 96/19256. См. также патенты США № 5658754 и 5643768. В продаже доступны библиотеки пептидных дисплеев, векторы и комплекты для скрининга таких производителей, как Invitrogen (г. Карлсбад, штат Калифорния, США) и Cambridge antibody Technologies (Кембриджшир, Великобритания). См., например, патенты США № 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456, выданные Enzon; 5223409, 5403484, 5571698, 5837500, выданные Duax, 5427908, 5580717, выданные Affymax; 5885793, выданный Cambridge antibody Technologies; 5750373, выданный Genentech, 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493, 5698417, выданные Хомы, Colligan, упомянутое; Ausubel, упомянутое; или Sambrook, упомянутое, каждый из указанных патентов и публикаций полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Антитела, применяемые в способе по настоящему изобретению, также можно получать с использованием по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к ИЛ-12/23р40 (или к ИЛ-23), для создания трансгенных животных или млекопитающих, таких как козы, коровы, лошади, овцы, кролики и т. п., которые продуцируют такие антитела в своем молоке. Таких животных можно создавать с помощью известных методов. См., например, без ограничения, патенты США № 5827690; 5849992; 4873316; 5849992; 5994616; 5565362; 5304489 и т.п., каждый из которых полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Антитела, применяемые в способе по настоящему изобретению, дополнительно можно получать с использованием по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к ИЛ-12/23р40 (или к ИЛ-23), для создания трансгенных растений и культур клеток растений (например, без ограничения, табака и маиса), которые продуцируют такие антитела, их определенные части или варианты в органах растений или в клеточных культурах из них. В качестве не налагающего ограничения примера трансгенные листья табака, экспрессирующие рекомбинантные белки, успешно использовали для получения больших количеств рекомбинантных белков, например, с использованием индуцибельного промотора. См., например, Cramer et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240: 95-118 (1999) и приведенные в этой публикации ссылки. Также и трансгенный маис использовали для экспрессии белков млекопитающих на промышленных уровнях продукции, причем их биологическая активность была эквивалентной белкам, которые продуцировали в других системах рекомбинации или очищали из природных источников. См., например, Hood et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 464: 127-147 (1999) и приведенные в этой публикации ссылки. Антитела, включая и фрагменты антител, такие как одноцепочечные антитела (scFv), также продуцировали в больших количествах из семян трансгенных растений, в том числе из семян табака и клубней картофеля. См., например, Conrad et al., *Plant Mol. Biol.* 38: 101-109 (1998) и приведенные в этой публикации ссылки. Таким образом, антитела по настоящему изобретению также можно продуцировать с использованием трансгенных растений в соответствии с известными методами. См. также, например, Fischer et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30: 99-108 (Oct., 1999), Ma et al., *Trends Biotechnol.* 13: 522-7 (1995); Ma et al., *Plant Physiol.* 109: 341-6 (1995); Whitelam et al., *Biochem. Soc. Trans.* 22: 940-944 (1994); и приведенные в этих публикациях ссылки. Каждый из вышеуказанных источников полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

Антитела, применяемые в способе по настоящему изобретению, могут связываться с человеческим ИЛ-12/23р40 (или ИЛ-23) в широком интервале аффинности (K_D). В предпочтительном варианте осуществления mAb человека необязательно может связываться с человеческим ИЛ-12/23р40 (или ИЛ-23) с высокой аффинностью. К примеру, mAb человека может связываться с человеческим ИЛ-12/23р40 (или ИЛ-23) с показателем K_D , равным или меньшим чем около 10^{-7} М, например, без ограничения, 0,1-9,9 (или в любом интервале, или с любым значением в нем) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} или в любом интервале, или с любым значением в нем.

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

Молекулы нуклеиновых кислот

С использованием представленной в настоящем документе информации, например, последовательностей нуклеотидов, кодирующих по меньшей мере 70-100% последовательных аминокислот в по меньшей мере одной из вариабельных областей или CDR легкой или тяжелой цепи, с последовательностями SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, среди других последовательностей, описанных в настоящем документе, их определенных фрагментов, вариантов или типичных совпадающих последовательностей, или депонированного вектора, содержащего по меньшей мере одну из этих последовательностей, можно получать молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, кодирующую по меньшей мере одно анти-

тело к ИЛ-12, применяя способы, описанные в настоящем документе или известные специалистам в данной области.

Молекулы нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут иметь форму РНК, такой как мРНК, гяРНК, тРНК или любой другой формы, или форму ДНК, включая, без ограничения, кДНК и геномную ДНК, полученные путем клонирования, путем синтеза или любых их сочетаний. ДНК может быть трехцепочечной, двухцепочечной, одноцепочечной или комбинированной. Любая часть по меньшей мере одной цепи ДНК или РНК может быть кодирующей цепью, также известной как прямая цепь, или некодирующей цепью, также называемой обратной цепью.

Выделенные молекулы нуклеиновых кислот, применяемые в способе по настоящему изобретению, могут включать молекулы нуклеиновых кислот, содержащие открытую рамку считывания (ORF), необязательно с одним или более интронами, например, без ограничения, по меньшей мере для одной определенной части по меньшей мере одного CDR, такого как CDR1, CDR2 и/или CDR3 по меньшей мере одной тяжелой цепи (например, SEQ ID NO: 1-3) или легкой цепи (например, SEQ ID NO: 4-6); молекулы нуклеиновых кислот, содержащие кодирующую последовательность для антитела к ИЛ-12/23p40 или варибельной области (например, варибельных областей легкой и тяжелой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 7 и 8); и молекулы нуклеиновых кислот, которые содержат последовательность нуклеотидов, по существу отличающуюся от последовательностей нуклеотидов, описанных выше, но которая, тем не менее, вследствие вырожденности генетического кода кодирует по меньшей мере одно антитело к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23), как описано в настоящем документе и/или известно специалистам в данной области. Разумеется, генетический код хорошо известен специалистам в данной области. Следовательно, для специалиста будет стандартной процедурой создание подобных вырожденных вариантов нуклеиновых кислот, кодирующих специфичные антитела к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23), применяемые в способе по настоящему изобретению. См., например, Ausubel, et al., упомянутое. Такие варианты нуклеиновых кислот включены в настоящее изобретение. Не налагающие ограничения примеры выделенных молекул нуклеиновых кислот включают нуклеиновые кислоты, кодирующие соответственно HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 и LC CDR3.

Как указано в настоящем документе, молекулы нуклеиновых кислот, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23), могут включать, без ограничения, таковую, отдельно кодирующую последовательность аминокислот фрагмента антитела; кодирующую последовательность для целого антитела или его части; кодирующую последовательность для антитела, фрагмента или части, а также дополнительные последовательности, такие как кодирующая последовательность по меньшей мере для одного сигнального лидерного или слитого пептида с наличием или отсутствием вышеупомянутых дополнительных кодирующих последовательностей, таких как по меньшей мере один интрон, вместе с дополнительными некодирующими последовательностями, включая, без ограничения, некодирующие 5'- и 3'-последовательности, такие как транскрибируемые нетранслируемые последовательности, которые участвуют в транскрипции, процессинге мРНК, включая сигналы сплайсинга и полиаденилирования (например, связывание рибосом и стабильность мРНК); дополнительную кодирующую последовательность, которая кодирует дополнительные аминокислоты, такие как аминокислоты, которые обеспечивают дополнительную функциональность. Так, кодирующую антитело последовательность можно сливать с маркерной последовательностью, такой как последовательность, кодирующая пептид, что облегчает очистку слитого антитела, содержащего фрагмент или часть антитела.

Селективная гибридизация полинуклеотидов с полинуклеотидом, как описано в настоящем документе

В способе по настоящему изобретению применяются выделенные нуклеиновые кислоты, которые в условиях селективной гибридизации образуют гибридный полинуклеотид, описанный в настоящем документе. Таким образом, полинуклеотиды по настоящему варианту осуществления можно применять для выделения, обнаружения и/или количественного определения нуклеиновых кислот, содержащих такие полинуклеотиды. Например, полинуклеотиды по настоящему изобретению можно использовать для идентификации, выделения или амплификации частичных либо полноразмерных клонов в депонированной библиотеке. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды являются последовательностями геномной ДНК или кДНК, выделенными или иным образом комплементарными к кДНК из библиотеки нуклеиновых кислот человека или млекопитающего.

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

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

Конструирование нуклеиновых кислот

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

Нуклеиновые кислоты могут для удобства содержать последовательности, дополнительные к полинуклеотиду по настоящему изобретению. Например, в нуклеиновую кислоту можно вставить сайт множественного клонирования, содержащий один или более сайтов эндонуклеазной рестрикции, чтобы облегчить выделение полинуклеотида. Кроме того, можно вставить транслируемые последовательности, чтобы облегчить выделение транслированного полинуклеотида по настоящему изобретению. К примеру, удобным средством очистки белков по настоящему изобретению служит введение последовательности маркера гексагистидина. Нуклеиновая кислота по настоящему изобретению, за исключением кодирующей последовательности, может необязательно являться вектором, адаптером или линкером для клонирования и/или экспрессии полинуклеотида по настоящему изобретению.

В такие клонирующие и/или экспрессирующие последовательности можно добавить дополнительные последовательности, чтобы оптимизировать их функцию при клонировании и/или экспрессии, способствовать выделению полинуклеотида или улучшить введение полинуклеотида в клетку. Использование векторов клонирования, векторов экспрессии, адаптеров и линкеров хорошо известно специалистам в данной области. (См., например, Ausubel упомянутое; или Sambrook, упомянутое).

Рекомбинантные методы конструирования нуклеиновых кислот

Выделенные композиции нуклеиновых кислот, таких как РНК, кДНК, геномная ДНК или любое их сочетание, можно получать из биологических источников с помощью любого числа методов клонирования, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления зонды олигонуклеотидов, которые селективно гибридизуются в жестких условиях с полинуклеотидами по настоящему изобретению, используют для идентификации желательной последовательности в библиотеке кДНК или геномной ДНК. Выделение РНК и конструирование библиотек кДНК и геномных библиотек хорошо известно специалистам в данной области. (См., например, Ausubel упомянутое; или Sambrook, упомянутое).

Методы скрининга и выделения нуклеиновых кислот

Скрининг библиотеки кДНК или геномной ДНК можно проводить с помощью зонда на основе последовательности полинуклеотида, применяемого в способе по настоящему изобретению, такого как описанные в настоящем документе. Зонды можно использовать для гибридизации с последовательностями геномной ДНК или кДНК, чтобы выделять гомологичные гены в тех же самых или разных организмах. Специалисты в данной области поймут, что для анализа можно использовать различные степени строгости гибридизации; и что строгой может быть либо гибридизация, либо промывная среда. По мере того как условия гибридизации становятся более строгими, требуемая для образования дуплекса степень комплементарности между зондом и мишенью возрастает. Жесткость условий можно контролировать одним или более из следующих параметров: температура, ионная сила, рН и присутствие частично денатурирующего растворителя, такого как формамид. Например, жесткость условий гибридизации обычно изменяют путем смены полярности раствора реагентов, например, через изменение концентрации формамида в интервале от 0 до 50%. Степень комплементарности (идентичности последовательностей), необходимая для детектируемого связывания, варьирует в соответствии со строгостью среды для гибридизации и/или среды для промывания. Оптимальная степень комплементарности составляет 100%, или от 70 до 100%, или любой интервал, или значение в нем. Однако следует понимать, что небольшие вариации последовательностей в зондах и праймерах возможно компенсировать путем уменьшения строгости среды гибридизации и/или среды для промывания.

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

Известные методы амплификации ДНК или РНК включают, без ограничения, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и связанные с ней процессы амплификации (см., например, патенты США № 4683195, 4683202, 4800159, 4965188, выданные Mullis, et al.; 4795699 и 4921794, выданные Tabor, et al; 5142033, выданный Innis; 5122464, выданный Wilson, et al.; 5091310, выданный Innis; 5066584, выданный Gyllensten, et al; 4889818, выданный Gelfand, et al; 4994370, выданный Silver, et al; 4766067, выданный Biswas; 4656134, выданный Ringold), и опосредованную РНК амплификацию, в которой используют обратную РНК к последовательности-мишени в качестве матрицы для синтеза двухцепочечной ДНК (патент США № 5130238, выданный Malek, et al, с торговым названием NASBA), полное содержание всех этих ссылок включено в настоящий документ путем ссылки. (См., например, Ausubel упомянутое; или

Sambrook, упомянутое).

Например, технологию полимеразной цепной реакции (ПЦР) можно использовать для амплификации последовательностей полинуклеотидов, применяемых в способе по настоящему изобретению, и связанных с ними генов прямо из библиотек геномной ДНК или кДНК. ПЦР и другие методы амплификации *in vitro* также могут применяться, например, для клонирования последовательностей нуклеотидов, кодирующих белки, которые требуется экспрессировать, с целью приготовления зондов нуклеиновых кислот для обнаружения наличия желательной мРНК в пробах, секвенирования нуклеиновых кислот или иных целей. Примеры методов, достаточные для указания специалистам в данной области способов амплификации *in vitro*, можно найти в Berger, упомянутое, Sambrook, упомянутое, и Ausubel, упомянутое, а также в Mullis, et al., патенте США № 4683202 (1987); и Innis, et al., PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990). Имеющиеся в продаже наборы для амплификации геномной последовательности ПЦР известны специалистам в данной области. См., например, набор Advantage-2C Genomic PCR Kit (Clontech). Кроме того, возможно использование, например, белка 32 гена T4 (Boehringer Mannheim) для увеличения выхода реакции при ПЦР длинных фрагментов.

Синтетические методы конструирования нуклеиновых кислот Выделенные нуклеиновые кислоты, применяемые в способе по настоящему изобретению, также можно получать прямым химическим синтезом с помощью известных методов (см., например, Ausubel, et al., упомянутое). Химическим синтезом обычно продуцируют одноцепочечный олигонуклеотид, который можно преобразовать в двухцепочечную ДНК путем гибридизации с комплементарной последовательностью либо полимеризации с ДНК-полимеразой и одиночной цепью в качестве матрицы. Специалистам в данной области известно, что химический синтез ДНК может ограничиваться последовательностями длиной в 100 или более оснований, однако можно лигировать короткие последовательности, получая более длинные последовательности.

Кассеты рекомбинантной экспрессии

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

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

Векторы и клетки-хозяева

Настоящее изобретение также относится к векторам, которые включают выделенные молекулы нуклеиновых кислот, клеткам-хозяевам, которые получены методами генной инженерии с рекомбинантными векторами, и к продукции по меньшей мере одного антитела к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) с помощью рекомбинантных методов, которые хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Sambrook et al. упомянутое; Ausubel, et al., упомянутое; каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Полинуклеотиды можно необязательно соединять с вектором, содержащим селективируемый маркер, с целью размножения в клетке-хозяине. Как правило, плазмидный вектор вводят в осадок, такой как осадок фосфата кальция, или в комплекс с заряженным липидом. Если в качестве вектора используют вирус, то его можно упаковать *in vitro* с помощью пригодной упаковывающей линии клеток, а затем ввести в клетки-хозяева.

Вставку ДНК необходимо функционально связать с пригодным промотором. Экспрессионные конструкторы дополнительно содержат сайты для инициации и терминации транскрипции, а в транскрибируемой области - сайт связывания рибосомы для трансляции. Кодированная часть зрелых транскриптов, экспрессируемая конструкторами, предпочтительно содержит иницирующий трансляцию в начале, и терминирующий кодон (например, UAA, UGA или UAG), надлежащим образом расположенный в конце транслируемой мРНК, причем для экспрессии клеток млекопитающих или эукариот предпочтительны UAA и UAG.

Экспрессионные векторы предпочтительно, но необязательно включают по меньшей мере один отбираемый маркер. Такие маркеры включают, например, без ограничения, гены устойчивости к метотрексату (MTX), дигидрофолатредуктазе (DHFR, патенты США № 4399216; 4634665; 4656134; 4956288; 5149636; 5179017, ампициллину, неомицину (G418), микофеноловой кислоте или глутаминсинтетазе (GS) (патенты США № 5122464; 5770359; 5827739) для культуры эукариотических клеток, и гены устойчивости к тетрациклину или ампициллину для культивирования в *E. coli* и других бактериях или прока-

риотах (вышеуказанные патенты полностью включены в настоящий документ путем ссылки). Пригодные питательные среды и условия для вышеуказанных клеток-хозяев известны специалистам в данной области. Приемлемые векторы, разумеется, известны специалистам в данной области. Введение векторного конструкта в клетку-хозяина может осуществляться путем трансфекции посредством фосфата кальция, DEAE-декстрана, катионных липидов, электропорации, трансдукции, инфекции или других известных методов. Такие методы описаны в данной области, например, в Sambrook, упомянутое, главы 1-4 и 16-18; Ausubel, упомянутое, главы 1, 9, 13, 15, 16.

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

Специалисты в данной области знают множество экспрессирующих систем, доступных для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, применяемый в способе по настоящему изобретению. Альтернативно, нуклеиновые кислоты можно экспрессировать в клетке-хозяине путем запуска (путем процедуры) в клетке-хозяине, которая содержит эндогенную ДНК, кодирующую антитело. Такие методы хорошо известны специалистам в данной области, например, описаны в патентах США № 5580734, 5641670, 5733746 и 5733761, полностью включенных в настоящий документ путем ссылки.

Примером клеточных культур, используемых для получения антител, их определенных частей или вариантов, являются клетки млекопитающих. Системы клеток млекопитающих часто используются в виде монослоев клеток, однако также можно использовать суспензии клеток млекопитающих или биореакторы. В данной области разработано несколько подходящих линий клеток-хозяев, способных экспрессировать интактные гликозилированные белки, в частности, линии клеток COS-1 (например, ATCC CRL 1650), COS-7 (например, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (например, ATCC CRL-10), CHO (например, ATCC CRL 1610) и BSC-1 (например, ATCC CRL-26), клетки Cos-7, клетки CHO, клетки hep G2, клетки P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 293, клетки HeLa и т.п., например, производства American Type Culture Collection, Манассас, штат Вирджиния, США (www.atcc.org). Предпочтительные клетки-хозяева включают клетки лимфоидного происхождения, такие как миеломные и лимфомные клетки. Более предпочтительны клетки-хозяева P3X63Ag8.653 (каталожный номер ATCC CRL-1580) и клетки SP2/0-Ag14 (каталожный номер ATCC CRL-1851). В особенно предпочтительном варианте осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку линий P3X63Ab8.653 или SP2/0-Ag14.

Экспрессионные векторы для таких клеток могут включать одну или более из следующих последовательностей для контроля экспрессии, таких как, без ограничения, точка начала репликации; промотор (например, поздние или ранние промоторы SV40, промотор CMV (патенты США № 5168062; 5385839), промотор HSV tk, промотор pgk (фосфоглицераткиназа), промотор EF-1-альфа (патент США № 5266491), по меньшей мере один промотор человеческого иммуноглобулина; энхансер и/или информационные сайты для процессинга, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования (например, сайт присоединения поли-А большого T-Ag SV40) и последовательности терминаторов транскрипции. См., например, Ausubel et al., упомянутое; Sambrook et al., упомянутое. Для продукции нуклеиновых кислот или белков по настоящему изобретению можно использовать и другие известные и/или поставляемые клетки, например по каталогу American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (www.atcc.org), либо из других известных или коммерческих источников.

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

Очистка антитела

Антитело к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) можно выделять из рекомбинантных клеточных культур и очищать хорошо известными методами, включая, без ограничения, очистку с помощью белка А, осаждение сульфатом аммония или этанолом, экстракцию кислотой, анионо- или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, гидрофобную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию на гидроксапатите и хроматографию на лектине. Для очистки можно также использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). См., например, Colligan, Current Protocols in Immunology, или Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), на-

пример, главы 1, 4, 6, 8, 9, 10, каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

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

Антитела к ИЛ-12/ИЛ-23р40

Антитело к ИЛ-12/23р40 (или к ИЛ-23) по настоящему изобретению включает любой белок или пептид, содержащий молекулу, которая содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, такую как, без ограничения, по меньшей мере один связывающий лиганд участок (LBP), такой как, без ограничения, определяющая комплементарность область (CDR) тяжелой или легкой цепи, или ее связывающий лиганд участок, вариабельный участок тяжелой или легкой цепи, каркасную область (например, FR1, FR2, FR3, FR4 или их фрагмент, дополнительно необязательно содержащие по меньшей мере одну замену, вставку или делецию), константную область тяжелой или легкой цепи (например, содержащую по меньшей мере один C_H1, шарнир 1, шарнир 2, шарнир 3, шарнир 4, C_H2 или C_H3, или их фрагмент, дополнительно необязательно содержащие по меньшей мере одну замену, вставку или делецию), или любую их часть, которую можно встроить в антитело. Антитело может включать или быть получено из любого млекопитающего, такого как, без ограничения, человек, мышь, кролик, крыса, грызун, примат или любое их сочетание и т.п.

Выделенные антитела, применяемые в способе по настоящему изобретению, содержат последовательности аминокислот антител, описанных в настоящем документе, кодируемые любым приемлемым полинуклеотидом, или любое выделенное или полученное антитело. Предпочтительно, человеческое антитело или связывающий антиген фрагмент связывается с человеческим ИЛ-12/23 или ИЛ-23 и, таким образом, частично или значительно нейтрализует по меньшей мере один вид биологической активности этого белка. Антитело, или его определенная часть, или вариант, которое частично или значительно нейтрализует по меньшей мере один вид биологической активности по меньшей мере одного белка или фрагмента ИЛ-12 или ИЛ-23, может связывать белок или фрагмент и, таким образом, ингибировать активности, опосредуемые связыванием ИЛ-12 или ИЛ-23 с рецептором к ИЛ-12 или ИЛ-23, или с другими зависимыми от ИЛ-12 или опосредуемыми им механизмами. В контексте настоящего документа термин «нейтрализующее антитело» относится к антителу, которое может ингибировать зависимость от ИЛ-12 или ИЛ-23 активность приблизительно на 20-120%, предпочтительно по меньшей мере на около 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% или более, в зависимости от метода анализа. Способность антитела к ИЛ-12/23р40 ингибировать зависимость от ИЛ-12/23 активность предпочтительно оценивают с помощью по меньшей мере одного приемлемого метода анализа белка ИЛ-12/23 или его рецептора, как описано в настоящем документе и/или как известно специалистам в данной области. Человеческое антитело может представлять собой антитело любого класса (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD и т.п.) или изотипа, и может содержать легкую цепь каппа или лямбда. В одном варианте осуществления человеческое антитело содержит тяжелую цепь или определенный фрагмент IgG, например, по меньшей мере одного из изотипов IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (например, γ 1, γ 2, γ 3, γ 4). Антитела этого типа можно получать с использованием трансгенной мыши или другого трансгенного млекопитающего (исключая человека), содержащего трансгены по меньшей мере одной человеческой легкой цепи (например, IgG, IgA и IgM), как описано в настоящем документе и/или как известно специалистам в данной области. В другом варианте осуществления человеческое антитело к человеческому ИЛ-12/23р40 (или к ИЛ-23) содержит тяжелую цепь IgG1 и легкую цепь IgG1.

Антитело связывает по меньшей мере один определенный эпитоп, специфичный по меньшей мере для одного белка ИЛ-12/23, его субъединицы, фрагмента, части или любого их сочетания. По меньшей мере один эпитоп может содержать по меньшей мере одну область связывания с антителом, которая содержит по меньшей мере одну часть белка, причем данный эпитоп предпочтительно содержит по меньшей мере одну внеклеточную, растворимую, гидрофильную, внешнюю или цитоплазматическую часть белка. По меньшей мере один определенный эпитоп может содержать любое сочетание из по меньшей мере одной последовательности аминокислот, состоящей по меньшей мере из 1-3 аминокислот, и до полной определенной части из последовательных аминокислот с SEQ ID NO: 9, например, остатков аминокислот 15, 17-21, 23, 40-43, 45-47, 54-56 и 58-62.

По существу, человеческое антитело или связывающий антиген фрагмент содержит связывающую антиген область, которая содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR1, CDR2 и CDR3) человека или вариант из по меньшей мере одной вариабельной области тяжелой цепи и по меньшей мере одной определяющей комплементарность области человека (CDR1, CDR2 и

CDR3), или вариант из по меньшей мере одной вариабельной области легкой цепи. Последовательности CDR можно получать из последовательностей зародышевой линии человека, или они могут обладать близким сходством с последовательностями зародышевой линии. Например, можно использовать CDR из синтетической библиотеки, полученной из исходных нечеловеческих CDR. Эти CDR можно образовывать, путем встраивания консервативных замен, из исходной нечеловеческой последовательности. В качестве не налагающего ограничения примера, антитело или связывающая антиген часть или вариант могут содержать по меньшей мере одну CDR3 тяжелой цепи, имеющую последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, и/или CDR3 легкой цепи, имеющую последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6. В конкретном варианте осуществления антитело или связывающий антиген фрагмент могут иметь связывающую антиген область, которая содержит по меньшей мере часть по меньшей мере одной CDR тяжелой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и/или CDR3), имеющую последовательность аминокислот, соответствующую CDR 1, 2 и/или 3 (например, SEQ ID NO: 1, 2 и/или 3). В другом конкретном варианте осуществления антитело или связывающая антиген часть или вариант могут иметь связывающую антиген область, которая содержит по меньшей мере часть по меньшей мере одной CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и/или CDR3), имеющую последовательность аминокислот, соответствующую CDR 1, 2 и/или 3.

Такие антитела можно получать путем химического связывания различных частей (например, CDR, каркасов) антитела с помощью обычных методов, приготовления и экспрессии молекулы (т. е. одной или более) нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело, с помощью обычных методов технологии рекомбинантной ДНК, или с помощью другого подходящего метода.

Антитело к ИЛ-12/2 Зр40 (или к ИЛ-23) может содержать по меньшей мере одну из вариабельных областей тяжелой или легкой цепи, имеющую определенную последовательность аминокислот. Например, в предпочтительном варианте осуществления антитело к ИЛ-12/23р40 содержит по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, необязательно имеющую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 7, и/или по меньшей мере одну вариабельную область легкой цепи, необязательно имеющую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 8. Антитела, которые связываются с человеческим ИЛ-12/23 и которые содержат определенную вариабельную область тяжелой или легкой цепи, можно получать приемлемыми методами, такими как фаговый дисплей (Katsube Y., et al., *Int J Mol. Med.*, 1(5): 863-868 (1998)), или методами, в которых используются трансгенные животные, известными специалистам в данной области и/или описанными в настоящем документе. Например, трансгенную мышь, содержащую функционально перестроенный трансген тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина и трансген, содержащий ДНК из локуса легкой цепи человеческого иммуноглобулина, который может подвергаться функциональной перестройке, можно иммунизировать человеческим ИЛ-12/23 или его фрагментом с целью добиться продукции антител. По желанию, можно выделить клетки, продуцирующие антитела, и можно приготовить гибридомы или другие иммортализируемые клетки, продуцирующие антитела, как описано в настоящем документе и/или известно специалистам в данной области. Альтернативно, антитело, определенную часть или вариант можно экспрессировать в приемлемой клетке-хозяине с помощью кодирующей нуклеиновой кислоты или ее части.

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

Коды аминокислот

Аминокислоты, составляющие антитела к ИЛ-12/23р40 (или к ИЛ-23) по настоящему изобретению, часто обозначают аббревиатурами. Наименования аминокислот можно указывать с помощью однобуквенного кода аминокислоты, трехбуквенного кода, названия или кодона (-ов) из трех нуклеотидов, что хорошо известно специалистам в данной области (см. Alberts B., et al., *Molecular Biology of The Cell*, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994):

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

Антитело к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23), применяемое в способе по настоящему изобретению, может включать одну или более замен, делеций или добавлений аминокислот вследствие естественных мутаций либо действий человека, описанных в настоящем документе.

Число замен аминокислот, которое может произвести квалифицированный специалист, зависит от многих факторов, включая описанные выше. Вообще говоря, число замен, вставок или делеций аминокислот для любого данного антитела к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23), фрагмента или варианта будет составлять не более 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, например 1-30, или любой интервал, или значение в нем, как указано в настоящем документе.

Аминокислоты в антителе к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23), которые необходимы для его функции, можно идентифицировать известными специалистам в данной области методами, такими как направленный на сайт мутагенез или сканирующий аланин мутагенез (например, Ausubel, упомянутое, главы 8, 15; Cunningham and Wells, Science 244: 1081-1085 (1989)). Последняя процедура предполагает добавление точечных мутаций аланина в каждом остатке в молекуле. Полученные мутантные молекулы затем испытывают на биологическую активность, такую как, без ограничения, по меньшей мере одну активность по нейтрализации ИЛ-12 или ИЛ-23. Критичные для связывания с антителом сайты также можно идентифицировать путем анализа структуры, например, путем кристаллизации, ядерного магнитного резонанса или фотоаффинного мечения (Smith, et al., J. Mol. Biol. 224: 899-904 (1992) и de Vos, et al., Science 255: 306-312 (1992)). Остатки на антителе к ИЛ-12/23p40, участвующие в связывании с ИЛ-12, были идентифицированы на основе совместной кристаллической структуры антитела к ИЛ-12/23p40 и антигена ИЛ-12p40. Они показаны ниже в табл.5.

Антитела к ИЛ-12/23p40 могут включать, без ограничения, по меньшей мере одну часть, последовательность или сочетание, выбранные из от 5 до всех последовательных аминокислот, из по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6.

Антитела к ИЛ-12/23p40, или определенные части или варианты могут включать, без ограничения, по меньшей мере одну часть, последовательность или сочетание, выбранное из по меньшей мере 3-5 последовательных аминокислот из SEQ ID NO: 1, 5-17 последовательных аминокислот из SEQ ID NO: 2, 5-10, последовательных аминокислот из SEQ ID NO: 3, 5-11, последовательных аминокислот из SEQ ID NO: 4, 5-7, последовательных аминокислот из SEQ ID NO: 5, 5-9, последовательных аминокислот из SEQ ID NO: 6, Leu21, Lys76, Met83, Ser85 из SEQ ID NO: 7.

Антитело к ИЛ-12/23p40 может необязательно дополнительно содержать полипептид из по мень-

шей мере одной из 70-100% из числа 5, 17, 10, 11, 7, 9, 119 или 108 последовательных аминокислот в по меньшей мере одной из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В одном варианте осуществления последовательность аминокислот цепи иммуноглобулина или ее части (например, переменная область, CDR) имеет идентичность около 70-100% (например, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 или любой интервал, или значение в нем) с последовательностью аминокислот соответствующей цепи по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. Например, последовательность аминокислот переменной области легкой цепи можно сравнить с последовательностями SEQ ID NO: 4, 5, 6 или 8, или последовательность аминокислот CDR3 тяжелой цепи можно сравнить с последовательностями SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 7. Предпочтительно, 70-100% идентичности аминокислот (например, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 или любой интервал, или значение в нем) определяют с помощью приемлемого компьютерного алгоритма, известного специалистам в данной области.

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

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

Предпочтительные параметры сравнения полипептидных последовательностей включают следующие:

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

Штраф за гэл: 12

Штраф за длину гэпа: 4.

Программа, используемая с данными параметрами, является общедоступной как программа «гэпа» от Genetics Computer Group, Мэдисон, штат Висконсин, США. Указанные выше параметры являются параметрами по умолчанию для сравнений пептидных последовательностей (с отсутствием штрафа за концевые гэпы).

Предпочтительные параметры для сравнения полинуклеотидов включают следующие:

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

Матрица сравнения: совпадения=+ 10, несовпадение=0.

Штраф за гэл: 50

Штраф за длину гэпа: 3.

Доступна как программа "гэпа" от Genetics Computer Group, Мэдисон, штат Висконсин, США. Указанные параметры являются параметрами по умолчанию для сравнений последовательностей нуклеотидов.

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

изменений нуклеотидов определяют умножением общего числа нуклеотидов в последовательности на число, определяющее соответственный процент идентичности (поделенный на 100), а затем вычитают этот результат из общего числа нуклеотидов в последовательности, или

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

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

Изменения полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид с SEQ ID NO: 7, могут привести к мутации без смысла, с ошибочным смыслом или со сдвигом рамки считывания в данной кодирующей последовательности и, тем самым, к изменению полипептида, закодированного полинуклеотидом, следующим после таких изменений. Подобным образом, полипептидная последовательность может быть идентичной эталонной последовательности с SEQ ID NO: 7, то есть на 100% идентичной, или может включать до определенного целого числа изменений аминокислот по сравнению с эталонной последовательностью так, что процент идентичности составляет менее чем 100%. Такие изменения выбирают из группы, состоящей из делеции, замены, включая консервативную и неконсервативную замену, или вставки по меньшей мере одной аминокислоты, и при этом изменения могут иметь место в положениях на аминном или карбоксильном конце эталонной полипептидной последовательности, или где-нибудь между этими концевыми положениями, и могут быть либо рассеянными поодиночке среди аминокислот в эталонной последовательности, либо быть собранными в одну или более последовательных групп в пределах эталонной последовательности. Число изменений аминокислот для данного % идентичности определяют умножением общего числа аминокислот в SEQ ID NO: 7 на число, определяющее соответственный процент идентичности (поделенный на 100), а затем вычитают этот результат из общего числа аминокислот в SEQ ID NO: 7, или

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

где $n.\text{sub.a}$ - число изменений аминокислот, $x.\text{sub.a}$ - полное число аминокислот в SEQ ID NO: 7, и y равен, например, 0,70 для 70%, 0,80 для 80%, 0,85 для 85% и т.д., и где любой нецелый результат умножения $x.\text{sub.a}$ на y округляют с уменьшением до ближайшего целого числа, прежде чем вычесть его из $x.\text{sub.a}$.

Примеры последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей и их частей представлены в SEQ ID NO: 1-8. Антитела по настоящему изобретению или их конкретные варианты могут содержать любое число последовательных остатков аминокислот из антитела по настоящему изобретению, причем это число выбрано из группы целых чисел в интервале 10-100% от числа последовательных остатков в антителе к ИЛ-12. Необязательно длина данной подпоследовательности последовательных аминокислот составляет по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 или более аминокислот, или любой интервал, или значение в нем. Кроме того, число таких подпоследовательностей может составлять любое целое число, выбираемое из группы, состоящей из от 1 до 20, например по меньшей мере 2, 3, 4 или 5.

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

В другом аспекте изобретение относится к человеческим антителам и связывающим антиген фрагментам, как описано в настоящем документе, которые модифицируют путем ковалентного присоединения органического звена. Такая модификация позволяет создать антитело или связывающий антиген фрагмент с улучшенными фармакокинетическими свойствами (например, увеличенным периодом полужизни *in vivo* в сыворотке). В качестве органического звена можно использовать линейную или разветвленную гидрофильную полимерную группу, группу жирной кислоты или группу эфира жирной кислоты. В некоторых вариантах осуществления гидрофильная полимерная группа может иметь молекулярную массу от около 800 до около 120000 Да и представлять собой полиалкангликоль (например, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полипропиленгликоль (ППГ)), углеводный полимер, аминокислотный полимер или поливинилпиролон, а группа жирной кислоты или группа эфира жирной кислоты может содержать от около восьми до около сорока атомов углерода.

Модифицированные антитела и связывающие антиген фрагменты могут содержать одну или более органических звеньев, которые ковалентно связаны, прямо или непрямо, с антителом. Каждое органическое звено, связанное с антителом или со связывающим антиген фрагментом по настоящему изобретению, может независимо представлять собой гидрофильную полимерную группу, группу жирной кислоты или группу эфира жирной кислоты. В контексте настоящего документа термин "жирная кислота" охва-

тывает одноосновные и двухосновные карбоновые кислоты. В контексте настоящего документа термин "гидрофильная полимерная группа" обозначает органический полимер, обладающий лучшей растворимостью в воде, чем в октане. Например, полилизин лучше растворим в воде, чем в октане. Так, антитело, модифицированное путем ковалентного присоединения полилизина, охватывается настоящим изобретением. Гидрофильные полимеры, приемлемые для модификации антител по настоящему изобретению, могут быть линейными или разветвленными, и включают, например, полиалкангликоли (например, ПЭГ, монометоксиполиэтиленгликоль (МПЭГ), ПППГ и т.п.), углеводы (например, декстран, целлюлозу, олигосахариды, полисахариды и т.п.), полимеры гидрофильных аминокислот (например, полилизин, полиаргинин, полиаспартат и т.п.), оксиды полиалканов (например, полиэтиленоксид, полипропиленоксид и т.п.) и поливинилпирролидон. Гидрофильный полимер, модифицирующий антитело по настоящему изобретению, предпочтительно имеет молекулярную массу от около 800 до около 150000 Да, как отдельный фрагмент молекулы. Например, ПЭГ₅₀₀₀ и ПЭГ₂₀₀₀, где нижний индекс означает среднюю молекулярную массу полимера в дальтонах. Гидрофильная полимерная группа может иметь от одного до около шести заместителей - групп алкила, жирной кислоты или эфира жирной кислоты. Гидрофильные полимеры с замещающей группой жирной кислоты или эфира жирной кислоты можно получать с применением приемлемых методов. Например, полимер, содержащий аминогруппу, можно соединить с карбоксилатом жирной кислоты или эфира жирной кислоты, а активированный карбоксилат (например, активированный N,N-карбонилдиимидазолом) на жирной кислоте или эфире жирной кислоты можно соединить с гидроксильной группой полимера.

Жирные кислоты и эфиры жирных кислот, приемлемые для модификации антител по настоящему изобретению, могут быть насыщенными или могут содержать одну или более ненасыщенных связей. Жирные кислоты, приемлемые для модификации антител по настоящему изобретению, включают, например, n-додеcanoат (C₁₂, лаурат), n-тетрадеcanoат (C₁₄, мирилат), n-октадеcanoат (C₁₈, стеарат), n-эйкозаноат (C₂₀, арахидат), n-докозаноат (C₂₂, бегенат), n-триаконтаноат (C₃₀), n-тетрааконтаноат (C₄₀), цис-Δ⁹-октадеcanoат (C₁₈, олеат), полностью цис-Δ^{5,8,11,14}-эйкозатетраеноат (C₂₀, арахидонат), октандикарбоновую кислоту, тетрадекандикарбоновую кислоту, октадекандикарбоновую кислоту, докозандикарбоновую кислоту и т.п. Приемлемые эфиры жирных кислот включают моноэфиры дикарбоновых кислот, содержащие линейную или разветвленную группу низшего алкила. Группа низшего алкила может содержать от одного до около двенадцати, предпочтительно от одного до около шести, атомов углерода.

Модифицированные человеческие антитела и связывающие антиген фрагменты можно получать с помощью приемлемого метода, например, путем реакции с одним или более модифицирующими агентами. В контексте настоящего документа термин "модифицирующий агент" означает приемлемую органическую группу (например, гидрофильный полимер, жирную кислоту, эфир жирной кислоты), которая содержит активирующую группу. "Активирующая группа" означает химическое звено или функциональную группу, которые при подходящих условиях могут вступать в реакцию со второй химической группой, при этом образуя ковалентную связь между модифицирующим веществом и второй химической группой. Например, к реагирующим с амином активирующим группам относятся электрофильные группы, такие как тозилат, мезилат, галоген (хлор, бром, фтор, йод), эфиры N-гидроксиsuccинимида (NHS) и т.п. Активирующие группы, способные реагировать с тиолами, включают, например, малеимид, йод-ацетил, акрилолил, дисульфиды пиридила, тиол 5-тиол-2-нитробензойной кислоты (TNB-тиол) и т.п. Функциональная группа альдегида может соединяться с амин- или гидразид-содержащими молекулами, а группа азида может реагировать с трехвалентной фосфорной группой с образованием фосфорамидатных или фосфоримидных связей. Приемлемые методы введения активирующих групп в молекулы известны специалистам в данной области (см., например, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)). Активирующая группа может быть связана с органической группой (например, гидрофильным полимером, жирной кислотой, эфиром жирной кислоты) прямо или через линкерное звено, например двухвалентную группу C₁-C₁₂, в которой один или более атомов углерода могут замещаться гетероатомом, таким как кислород, азот или сера. Приемлемые линкерные звенья включают, например, тетраэтиленгликоль, -(CH₂)₃-, -NH-(CH₂)₆-NH-, -(CH₂)₂-NH- и -CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-NH-. Модифицирующие агенты, которые содержат соединительное звено, можно получать, например, путем реакции моно-Вос-алкилдиамин (например, моно-Вос-этилендиамина, моно-Вос-диаминогексана) с жирной кислотой в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) с образованием амидной связи между свободным амином и карбоксилатом жирной кислоты. Защитную группу Вос можно удалить из продукта путем обработки трифторуксусной кислотой (TFA) с открытием первичного амина, который можно соединить с другим карбоксилатом, как описано выше, или он может реагировать с малеиновым ангидридом с замыканием полученного продукта в цикл и получением активированного малеимидного производного жирной кислоты. (См., например, Thompson, et al., WO 92/16221, содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки).

Модифицированные антитела можно продуцировать путем реакции человеческого антитела или связывающего антиген фрагмента с модифицирующим агентом. Например, органические звенья можно связать с антителом неспецифично к сайту с помощью реагирующего с амином модифицирующего агента, например, эфира NHS и ПЭГ. Модифицированные человеческие антитела или связывающие антиген

фрагменты также можно получать путем восстановления дисульфидных связей (например, внутрицепочечных дисульфидных связей) антитела или связывающего антиген фрагмента. Восстановленное антитело или связывающий антиген фрагмент затем может взаимодействовать с реагирующим с тиолом модифицирующим агентом с получением модифицированного антитела по настоящему изобретению.

Модифицированные человеческие антитела и связывающие антиген фрагменты, содержащие органическое звено, которое связано с определенными участками антитела по настоящему изобретению, можно получать с помощью приемлемых методов, таких как обратный протеолиз (Fisch et al., *Bioconjugate Chem.*, 3: 147-153 (1992); Werlen et al., *Bioconjugate Chem.*, 5: 411-417 (1994); Kumaran et al., *Protein Sci.* 6(10): 2233-2241 (1997); Itoh et al., *Bioorg. Chem.*, 24(1): 59-68 (1996); Capellas et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4): 456-463 (1997)), а также методов, описанных в Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996).

В способе по настоящему изобретению также применяют композицию антител к ИЛ-12/23p40, содержащую по меньшей мере одно, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть или более антител к ИЛ-12/23p40, как описано в настоящем документе и/или известно специалистам в данной области, представленных в виде не встречающейся в природе композиции, смеси или формы. Такие композиции представляют собой не встречающиеся в природе композиции, содержащие по меньшей мере один или два полноразмерных варианта, варианта с C- и/или N-концевой делецией, домена, фрагменты или определенных варианта последовательности аминокислот антитела к ИЛ-12/23p40, выбранной из группы, состоящей из 70-100% последовательных аминокислот из SEQ ID NO: 7 или 8, или их определенных фрагментов, доменов или вариантов. Предпочтительные композиции антител к ИЛ-12/23p40 включают по меньшей мере один или два полноразмерных варианта, фрагмента, домена или варианта частей участков, содержащих по меньшей мере одну CDR или LBP, последовательности антитела к ИЛ-12/23p40, описанного в настоящем документе, например, 70-100% последовательностей SEQ ID NO: 1-6, 7 или 8, или их определенных фрагментов, доменов или вариантов. Дополнительно предпочтительные композиции содержат, например, 40-99% по меньшей мере одного из 70-100% из SEQ ID NO: 1-6, 7 или 8 и т.п., или их определенных фрагментов, доменов или вариантов. Процентные доли подобной композиции определяют по массе, объему, концентрации, молярности или моляльности в жидких или сухих растворах, смесях, суспензиях, эмульсиях, частицах, порошке или коллоидах, как известно специалистам в данной области или описано в настоящем документе.

Композиции антител, содержащие дополнительные терапевтически активные вещества

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

Примером ЛС, которое можно комбинировать с антителами для способа по настоящему изобретению, является противомикробное ЛС, которое может быть по меньшей мере одним, выбранным из амбицидов, или по меньшей мере одним из противопротозойных, противогельминтных, противогрибковых, противомаларийных, противотуберкулезных средств, или по меньшей мере одним из противовирусных средств, аминогликозидов, пенициллинов, цефалоспоринов, тетрациклинов, сульфонамидов, фторхинолонов, противомикробных, макролидных противомикробных средств и прочих противомикробных средств. Гормональное ЛС может быть по меньшей мере одним, выбранным из кортикостероидов, андрогенов, или по меньшей мере одним из анаболических стероидов, эстрогенов, или по меньшей мере одним прогестинном, гонадотропином, антидиабетическим ЛС, или по меньшей мере одним из глюкагона, тиреоидного гормона, антагониста тиреоидного гормона, гормона гипофиза и подобного паратгормону ЛС. По меньшей мере один цефалоспорин может быть по меньшей мере одним, выбранным из цефаклора, цефадроксила, цефазолина натрия, цефдинира, цефепима гидрохлорида, цефиксима, цефметазола натрия, цефоницида натрия, цефоперазона натрия, цефотаксима натрия, цефотетана динатрия, цефокситина натрия, цефподоксима проксетила, цефпрозила, цефтазидима, цефтибутена, цефтизоксима натрия, цефтриаксона натрия, цефуроксима аксетила, цефуроксима натрия, цефалексина гидрохлорида, цефалексина моногидрата, цефрадина и лоракарбефа.

По меньшей мере один кортикостероид может быть по меньшей мере одним, выбранным из бетаметазона, бетаметазона ацетата или бетаметазона натрия фосфата, бетаметазона натрия фосфата, кортизона

ацетата, дексаметазона, дексаметазона ацетата, дексаметазона натрия фосфата, флудрокортизона ацетата, гидрокортизона, гидрокортизона ацетата, гидрокортизона ципионата, гидрокортизона натрия фосфата, гидрокортизона натрия сукцината, метилпреднизолон, метилпреднизолон ацетата, метилпреднизолон натрия сукцината, преднизолон, преднизолон ацетата, преднизолон натрия фосфата, преднизолон тебутата, преднизон, триамцинолон, триамцинолон ацетонида и триамцинолон диацетата. По меньшей мере один андроген или анаболический стероид может быть по меньшей мере одним, выбранным из даназола, флюоксиместерона, метилтестостерона, нандролона деканоата, нандролона фенпропионата, тестостерона, тестостерона ципионата, тестостерона энантата, тестостерона пропионата и тестостерона в трансдермальной системе.

По меньшей мере один иммунодепрессант может быть по меньшей мере одним, выбранным из азатиоприна, базиликсимаба, циклоспорина, даклизумаба, иммуноглобулина лимфоцитов, муромонаба CD3, микофенолята мофетила, микофенолята мофетила гидрохлорида, сиролимуса и такролимуса.

По меньшей мере одно противомикробное ЛС местного действия может быть по меньшей мере одним, выбранным из ацикловира, амфотерицина В, крема с азелаиновой кислотой, бацитрацина, бутконазола нитрата, клиндамицина фосфата, клотримазола, эконазола нитрата, эритромицина, гентамицина сульфата, кетоконазола, мафенида ацетата, метронидазола (местного действия), миконазола нитрата, мупироцина, нафтифина гидрохлорида, неомицина сульфата, нитрофуразона, нистатина, серебра сульфадиазина, тербинафина гидрохлорида, терконазола, тетрациклина гидрохлорида, тиокконазола и толнафтата. По меньшей мере одно ЛС против чесотки или педикулицид может быть по меньшей мере одним, выбранным из кротамитона, линдана, перметрина и пиретринов. По меньшей мере один кортикостероид для местного применения может быть по меньшей мере одним, выбранным из бетаметазона дипропионата, бетаметазона валерата, клобетазола пропионата, дезонида, дезоксиметазона, дексаметазона, дексаметазона натрия фосфата, дифлоразона диацетата, флуоцинолона ацетонида, флуоцинонида, флурандренолида, флутиказона пропионата, галционида, гидрокортизона, гидрокортизона ацетата, гидрокортизона бутирата, гидрокортизона валерата, мометазона фууроата и триамцинолона ацетонида. (См., например, стр. 1098-1136 в Nursing 2001 Drug Handbook.)

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

Соединения, композиции или комбинации антител к ИЛ-12/23p40, применяемые в способе по настоящему изобретению, могут дополнительно содержать по меньшей мере одно из любых приемлемых вспомогательных веществ, таких как, без ограничения, разбавитель, связующее вещество, стабилизатор, буферы, соли, липофильные растворители, консервант, адъювант и т. п. Предпочтительными являются фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества. Не налагающие ограничения примеры таких стерильных растворов и методы их приготовления хорошо известны специалистам в данной области, например, без ограничения, описаны в Gennaro, Ed., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990. Фармацевтически приемлемые носители можно выбрать обычным способом, исходя из приемлемости для пути введения, растворимости и/или стабильности композиции, содержащей антитело к ИЛ-12/23p40, фрагмент или вариант, как хорошо известно специалистам в данной области или описано в настоящем документе.

Фармацевтические эксципиенты и добавки, используемые в представленной композиции, включают, без ограничения, белки, пептиды, аминокислоты, липиды и углеводы (например, сахара, включая моносахариды, ди-, три-, тетра- и олигосахариды; производные Сахаров, такие как альдиты, альдоновые кислоты, этерифицированные сахара и т.п.; и полисахариды или полимеры Сахаров), которые могут присутствовать отдельно или в сочетании, составляя отдельно или в сочетании 1-99,99% по массе или по объему. Примеры белковых эксципиентов включают сывороточный альбумин, такой как человеческий

сывороточный альбумин (HSA), рекомбинантный человеческий альбумин (гНА), желатин, казеин и т.п. Типичные компоненты аминокислот/антител, которые также могут выполнять буферную функцию, включают аланин, глицин, аргинин, бетаин, гистидин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, цистеин, лизин, лейцин, изолейцин, валин, метионин, фенилаланин, аспартам и т.п. Одной предпочтительной аминокислотой является глицин.

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

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

Дополнительно композиции антител к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) могут включать полимерные эксципиенты/добавки, такие как поливинилпирролидоны, фикоиллы (полимерный сахар), декстраты (например, циклодекстрины, такие как 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин), полиэтиленгликоли, ароматизаторы, противомикробные агенты, подсластители, антиоксиданты, антистатические агенты, поверхностно-активные вещества (например, полисорбаты, такие как ТВИН-20 и ТВИН-80), липиды (например, фосфолипиды, жирные кислоты), стероиды (например, холестерин) и хелатирующие агенты (например, ЭДТА).

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

Составы

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

Как отмечалось выше, в изобретении применяют промышленное изделие, содержащее упаковочный материал и по меньшей мере один флакон, содержащий раствор по меньшей мере одного антитела к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) с предписанными буферами и/или консервантами, необязательно в водном разбавителе, причем указанный упаковочный материал содержит этикетку с указанием, что такой раствор можно хранить в течение периода 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 ч или дольше. В изобретении дополнительно применяют промышленное изделие, содержащее упаковочный материал, первый флакон, содержащий лиофилизированное антитело к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23), и второй

флакон, содержащий водный разбавитель, состоящий из предписанного буфера или консерванта, причем указанный упаковочный материал содержит этикетку с инструкцией для пациента о том, как разводить антитело к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) в водном разбавителе с образованием раствора, который можно хранить в течение периода двадцати четырех часов или дольше.

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

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

Предпочтительно водный разбавитель необязательно содержит фармацевтически приемлемый консервант. Предпочтительные консерванты включают таковые, выбранные из группы, состоящей из фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, алкилпарабена (метил-, этил-, пропил-, бутил- и т.п.), бензалкония хлорида, бензэтония хлорида, натрия дегидроацетата и тимеросала, или их смесей. Концентрация консерванта, применяемая в составе, должна быть достаточной для достижения противомикробного действия. Такая концентрация зависит от выбранного консерванта и без труда определяется квалифицированным специалистом.

Предпочтительно, в разбавитель необязательно добавляют другие эксципиенты, например, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты и средства, усиливающие консервацию. Изотонические агенты, такие как глицерин, широко используются в известных концентрациях. Предпочтительно, добавляют физиологически приемлемый буфер для улучшения контроля pH. Составы могут охватывать широкий диапазон pH, такой как от около pH 4 до около pH 10, с предпочтительным интервалом от около pH 5 до около pH 9, и наиболее предпочтительный интервал от около pH 6,0 до около pH 8,0. Предпочтительно составы по настоящему изобретению имеют pH от около 6,8 до около 7,8. Предпочтительные буферы включают фосфатные буферы, наиболее предпочтительно натрия фосфат, в частности фосфатно-солевой буфер (PBS).

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

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

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

Настоящие промышленные изделия пригодны для введения как немедленно, так и в течение периода 24 ч или дольше. Соответственно заявляемые в настоящем документе промышленные изделия обеспечивают значительные преимущества для пациентов. Составы по настоящему изобретению необязательно

могут безопасно храниться при температуре от около 2 до около 40°C, сохраняя биологическую активность белка в течение продолжительных периодов времени, в связи с чем на упаковке допускается этикетка, указывающая, что раствор можно хранить и/или использовать в течение периода 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, или 96 ч или более. Если используется разбавитель с консервантом, то на этикетке может быть указан срок годности до 1-12 месяцев, полугод, полутора и/или двух лет.

Растворы антитела к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) можно получать в процессе, который содержит смешивание по меньшей мере одного антитела в водном разбавителе. Смешивание осуществляют с помощью обычных процедур растворения и смешивания. Например, чтобы приготовить приемлемый разбавитель, отмеренное количество по меньшей мере одного антитела в воде или буфере соединяют в количествах, достаточных для получения желаемых концентраций белка и, необязательно, консерванта или буфера. Вариации этого процесса понятны обычному специалисту в данной области. Например, для оптимизации с учетом концентрации и применяемого способа введения можно изменять такие факторы, как порядок добавления компонентов, внесение дополнительных добавок, температура и pH, при которых приготавливают состав.

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

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

Общепризнанные устройства, содержащие системы с одним флаконом, включают устройства для инъекций типа шприца-ручки, такие как BD Pens, BD Autoject[®], Humaject[®], NovoPen[®], B-D[®]Pen, AutoPen[®] и OptiPen[®], GenotropinPen[®], GenotroNorm Pen[®], Humatro Pen[®], Reco-Pen[®], Roferon Pen[®], Biojector[®], Iject[®], J-tip Needle-Free Injector[®], Intraject[®], Medi-Ject[®], Smartject[®], например, изготовленные или разработанные компаниями Becton Dickinson (Франклин Лейке, штат Нью-Джерси, США, www.bectondickenson.com), Disetronic (Бургдорф, Швейцария, www.disetronic.com; Bioject, г. Портленд, штат Орегон, США (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (г. Питерборо, Великобритания, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp. (г. Миннеаполис, штат Миннесота, США, www.mediject.com), и подобные приемлемые устройства. Признанные устройства, содержащие системы из двух флаконов, включают такие системы шприца-ручки для разведения лиофилизованного лекарственного средства в картридже для введения разведенного раствора, например HumatroPen[®]. Примеры других приемлемых устройств включают предварительно заполненные шприцы, автоинжекторы, безыгольные инжекторы и безыгольные наборы для внутривенного вливания.

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

Составы, применяемые в способе по настоящему изобретению, можно получать в процессе, который содержит смешивание антитела к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) и выбранного буфера, предпочтительно фосфатного буфера, содержащего физиологический раствор или выбранную соль. Смешивание антитела к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) и буфера в водном разбавителе осуществляют с использованием обычных процедур растворения и смешивания. Например, чтобы приготовить приемлемый состав, отмеренное количество по меньшей мере одного антитела в воде или буфере соединяют с желаемым буферным агентом в воде в количествах, достаточных для получения желаемых концентраций белка и буфера. Вариации этого процесса понятны обычному специалисту в данной области. Например, для оптимизации с учетом концентрации и применяемого способа введения можно изменять такие факторы, как порядок добавления компонентов, внесение дополнительных добавок, температура и pH, при которых приготавливают состав.

В способе изобретения предлагаются фармацевтические композиции, содержащие различные составы, полезные и приемлемые для введения пациенту, человеку или животному. Такие фармацевтические композиции приготавливают с использованием воды в "стандартном состоянии" в качестве разбавителя и путем обычных методов, хорошо известных обычным специалистам в данной области. Например, сначала можно предоставить буферные компоненты, такие как гистидин и гистидина моногидрохлорида гидрат, с последующим добавлением подходящего, не конечного объема водного разбавителя, сахарозы и полисорбата-80 в "стандартном состоянии". Затем можно добавлять выделенное антитело. Наконец, объем фармацевтической композиции доводят до желаемого конечного объема в условиях "стандартного состояния" добавлением в качестве разбавителя воды. Специалисты в данной области поймут ряд других способов, подходящих для приготовления фармацевтических композиций.

Фармацевтические композиции могут представлять собой водные растворы или суспензии, содержащие указанную массу каждого компонента на единицу объема воды или имеющие в "стандартном состоянии" указанный рН. В контексте настоящего документа, термин "стандартное состояние" означает температуру $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ и давление 0,1 мегапаскаля (1 атмосфера). Термин "стандартное состояние" не используется в данной области для обозначения одного признанного набора температур или давления, но вместо этого является эталонным состоянием, которое определяет температуру и давление, установленные для описания раствора или суспензии с определенной композицией в эталонных условиях "стандартного состояния". Это связано с тем, что объем раствора частично зависит от температуры и давления. Специалисты в данной области поймут, что фармацевтические композиции, эквивалентные описанным в настоящем документе, можно продуцировать при других значениях температуры и давления. Эквивалентны ли такие фармацевтические композиции описанным в настоящем документе, следует определять в условиях "стандартного состояния" определенных выше (например, температура $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ и давление 0,1 мегапаскаля (1 атм)).

Важно отметить, что такие фармацевтические композиции могут содержать массы компонентов "около" определенного значения (например, "около 0,53 мг L-гистидина") на единицу объема фармацевтической композиции, или иметь значения рН около определенного значения. Масса компонента, присутствующего в фармацевтической композиции, или значение рН составляют "около" данного численного значения, если выделенное антитело, присутствующее в фармацевтической композиции, способно связывать пептидную цепь, содержащую остатки 1-88 с последовательностью SEQ ID NO: 9, в то время, как в фармацевтической композиции присутствует выделенное антитело, или после того, как выделенное антитело было удалено из фармацевтической композиции (например, путем разбавления). Иначе говоря, значение, такое как значение массы компонента или значение рН, составляет "около" заданного численного значения, когда активность связывания выделенного антитела сохраняется и обнаруживается после помещения выделенного антитела в фармацевтическую композицию.

Для определения того, связываются ли mAb к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) с подобными или разными эпитопами и/или конкурируют ли они друг с другом, проводят анализ конкурентного связывания. Антитела наносят по отдельности на планшеты для ИФА на твердой фазе как покрытие. Добавляют конкурирующие mAb с последующим добавлением биотинилированных hgИЛ-12/23p40. Для положительного контроля в качестве конкурирующего mAb используют то же mAb, что и для покрытия ("самоконкуренция"). Связывание ИЛ-12/23p40 определяют с помощью стрептавидина. Эти результаты показывают, распознают ли mAb подобные или частично перекрывающиеся эпитопы на ИЛ-12/23p40.

Один аспект способа по настоящему изобретению содержит введение пациенту фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело, которое связывается с пептидной цепью, содержащей остатки 1-88 с последовательностью SEQ ID NO: 9; от около 0,27 до около 0,80 мг L-гистидина на миллилитр фармацевтической композиции; от около 0,69 до около 2,1 мг L-гистидина моногидрохлорида моногидрата на миллилитр фармацевтической композиции; от около 0,02 до около 0,06 мг полисорбата-80 на миллилитр фармацевтической композиции; и от около 65 до около 87 мг сахарозы на миллилитр фармацевтической композиции; причем разбавитель представляет собой воду в стандартном состоянии.

Другой аспект настоящего изобретения содержит введение фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело, имеющее (i) последовательности аминокислот CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; и (ii) последовательности аминокислот CDR легкой цепи SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, причем выделенное антитело связывается с пептидной цепью, содержащей остатки 1-88 с последовательностью SEQ ID NO: 9; от около 0,27 до около 0,80 мг L-гистидина на миллилитр фармацевтической композиции; от около 0,69 до около 2,1 мг L-гистидина моногидрохлорида моногидрата на миллилитр фармацевтической композиции; от около 0,02 до около 0,06 мг полисорбата-80 на миллилитр фармацевтической композиции и от около 65 до около 87 мг сахарозы на миллилитр фармацевтической композиции; причем разбавитель представляет собой воду в стандартном состоянии.

Другой аспект способа по настоящему изобретению содержит введение пациенту фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело к ИЛ-12/23p40, имеющее последовательность аминокислот тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и последовательность аминокислот легкой цепи SEQ ID NO: 8,

причем выделенное антитело связывается с пептидной цепью, содержащей остатки 1-88 с последовательностью SEQ ID NO: 9; от около 0,27 до около 0,80 мг L-гистидина на миллилитр фармацевтической композиции; от около 0,69 до около 2,1 мг L-гистидина моногидрохлорида моногидрата на миллилитр фармацевтической композиции; от около 0,02 до около 0,06 мг полисорбата-80 на миллилитр фармацевтической композиции; и от около 65 до около 87 мг сахарозы на миллилитр фармацевтической композиции; причем разбавитель представляет собой воду в стандартном состоянии.

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

Другой аспект способа по настоящему изобретению содержит введение пациенту фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело к ИЛ-12/23p40, имеющее (i) последовательности аминокислот CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 и (ii) последовательности аминокислот CDR легкой цепи SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, причем выделенное антитело связывается с пептидной цепью, содержащей остатки 1-88 с последовательностью SEQ ID NO: 9; около 0,53 мг L-гистидина на миллилитр фармацевтической композиции; около 1,37 мг L-гистидина моногидрохлорида моногидрата на миллилитр фармацевтической композиции; около 0,04 мг полисорбата-80 на миллилитр фармацевтической композиции; и около 76 мг сахарозы на миллилитр фармацевтической композиции; причем разбавитель представляет собой воду в стандартном состоянии.

Дополнительный аспект способа по настоящему изобретению содержит введение пациенту фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело к ИЛ-12/23p40, имеющее последовательность аминокислот тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и последовательность аминокислот легкой цепи SEQ ID NO: 8, причем выделенное антитело связывается с пептидной цепью, содержащей остатки 1-88 с последовательностью SEQ ID NO: 9; около 0,53 мг L-гистидина на миллилитр фармацевтической композиции; около 1,37 мг L-гистидина моногидрохлорида моногидрата на миллилитр фармацевтической композиции; около 0,04 мг полисорбата-80 на миллилитр фармацевтической композиции и около 76 мг сахарозы на миллилитр фармацевтической композиции; причем разбавитель представляет собой воду в стандартном состоянии.

В одном варианте осуществления концентрация выделенного антитела составляет около 90 мг на миллилитр фармацевтической композиции. В другом варианте осуществления этих фармацевтических композиций pH составляет около 6,0. Другим аспектом настоящего изобретения является введение фармацевтической композиции, содержащей антитело, которое конкурирует за связывание с антителом к ИЛ-12/23p40, описанным в настоящем документе, например, связывается с пептидной цепью, содержащей остатки 1-88 с последовательностью SEQ ID NO: 9; от около 0,27 до около 0,80 мг L-гистидина на миллилитр фармацевтической композиции; от около 0,69 до около 2,1 мг L-гистидина моногидрохлорида моногидрата на миллилитр фармацевтической композиции; от около 0,02 до около 0,06 мг полисорбата-80 на миллилитр фармацевтической композиции; и от около 65 до около 87 мг сахарозы на миллилитр фармацевтической композиции; причем разбавитель представляет собой воду в стандартном состоянии.

Стабильные или консервированные составы можно предоставлять пациентам в виде прозрачных растворов или двух флаконов, содержащих флакон с по меньшей мере одним лиофилизированным антителом к ИЛ-12/23p40, которое разводят содержащимися во втором флаконе консервантом или буфером и эксципиентами в водном разбавителе. Либо один флакон с раствором, либо два флакона с составом, предполагающим смешивание, можно использовать многократно, и их достаточно для одного или нескольких циклов лечения пациента, что более удобно по сравнению с существующим в настоящее время режимом лечения.

Другие составы или способы стабилизации антител к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) могут приводить к получению содержащего антитело средства, отличного от прозрачного раствора лиофилизированного порошка. К непрозрачным растворам относятся, в частности, составы, содержащие взвешенные частицы, которые являются композициями, содержащими антитело к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) в структурах с варьирующими размерами, и известны как микросферы, микрочастицы, наночастицы, наносферы или липосомы. Такие относительно однородные, по существу сферические, составы в виде частиц, содержащие активное вещество, можно формировать путем связывания водной фазы, содержащей активное вещество и полимер, с неводной фазой, с последующим испарением неводной фазы и слиянием частиц из водной фазы, как описано в патенте США № 4589330. Пористые микрочастицы можно получать, применяя первую фазу, содержащую активное вещество и полимер, диспергированные в непрерывном растворителе, и удаляя названный растворитель из суспензии методом сублимационной сушки либо разбавления, экстракции и осаждения, как описано в патенте США № 4818542. Предпочтительными полимерами для таких препаратов являются естественные или синтетические сополимеры, либо полимеры, выбранные из группы, состоящей из желатинового агара, крахмала, арабиногалактана, альбумина, коллагена, полиглицоловой кислоты, полимолочной кислоты, гликолил-L(-)-лактида, поли(эпсилон-капролактона), поли(эпсилон-капролактон-СО-молочной кислоты), поли(эпсилон-капролактон-СО-гликолевой кислоты), поли(В-гидроксимасляной кислоты), полиэтиленоксида, полиэтилена, поли(алкил-2-цианакрилата), поли(гидроксиэтилметакрилата), полиамидов, поли(аминокислот), поли(2-гидроксиэтил-DL-аспарта-

мида), поли(эфира мочевины), поли(L-фенилаланин/этиленгликоль/1,6-диизоцианатгексана) и поли(метилметакрилата). Наиболее предпочтительными полимерами являются полиэферы, такие как полигликолевая кислота, полимолочная кислота, гликолид-L(-)-лактид, поли(эпсилон-капролактон), поли(эпсилон-капролактон-СО-молочная кислота) и поли(эпсилон-капролактон-СО-гликолевая кислота). Растворители, пригодные для растворения полимера и/или активного вещества, включают: воду, гексафторизопропанол, метилхлорид, тетрагидрофуран, гексан, бензол или гексафторацетона полуторный гидрат. Процесс диспергирования содержащей активное вещество фазы со второй фазой может включать принудительный пропуск первой фазы через отверстие в сопле для образования капель.

Составы в виде сухого порошка можно получать иными методами помимо лиофилизации, например, путем распылительной сушки, экстракции растворителя испарением или осаждения кристаллической композиции, за которыми следуют одна или несколько стадий удаления водного или неводного растворителя. Приготовление препарата антителя путем распылительной сушки описано в патенте США № 6019968. Композиции антителя в виде сухого порошка можно получать путем распылительной сушки растворов или суспензий антителя и необязательно, эксципиентов, в растворителе в условиях, обеспечивающих получение вдыхаемого сухого порошка. Растворители могут включать полярные соединения, такие как вода и этанол, которые можно легко высушивать. Стабильность антителя можно усилить путем выполнения процедуры распылительной сушки в отсутствии кислорода, например, под слоем азота или с применением азота в качестве сушильного газа. Другой относительно сухой состав является дисперсией множества перфорированных микроструктур, диспергированных в суспензионной среде, обычно содержащей пропеллент гидрофторалкан, как описано в WO 9916419. Стабилизированные дисперсии можно вводить в легкие пациента с помощью ингалятора мерных доз. Оборудование, используемое для промышленного производства ЛС путем распылительной сушки, выпускается Buchi Ltd. или Niro Corp.

Антитело к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) в стабильных или консервированных составах или растворах, описанных в настоящем документе, в соответствии с настоящим изобретением можно вводить пациенту с помощью разных способов доставки, включая подкожную или внутримышечную инъекцию; трансдермально, в легкие, через слизистую оболочку, посредством имплантата, осмотического дозатора, кассеты, микродозатора или других способов, признанных специалистами в данной области, как хорошо известно в данной области.

Терапевтическое применение

В настоящем изобретении также предлагается способ модулирования или лечения по меньшей мере одного заболевания, связанного с ИЛ-12/23, в клетке, ткани, органе, у животного или у пациента, известный специалистам в данной области или описанный в настоящем документе, с применением по меньшей мере одного антителя к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) по настоящему изобретению, например, путем введения или воздействия терапевтически эффективного количества антителя к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) на клетку, ткань, орган, животное или пациента. В настоящем изобретении также предлагается способ модулирования или лечения по меньшей мере одного заболевания, связанного с ИЛ-12/23, в клетке, ткани, органе, у животного или у пациента, включая, без ограничения, по меньшей мере одно из ожирения, иммунного заболевания, сердечно-сосудистого заболевания, инфекционного заболевания, злокачественного заболевания или неврологического заболевания.

В настоящем изобретении также предлагается способ модулирования или лечения по меньшей мере одного иммунного заболевания, связанного с ИЛ-12/23, в клетке, ткани, органе, у животного или у пациента, включая, без ограничения, по меньшей мере одно из следующих: псориаз, псориатический артрит, ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит с системными проявлениями, анкилозирующий спондилит, язва желудка, серонегативные артропатии, остеоартрит, остеолит, асептическое расшатывание ортопедических имплантатов, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, системная красная волчанка, антифосфолипидный синдром, иридоциклит/увеит/неврит зрительного нерва, идиопатический легочный фиброз, системный васкулит/гранулематоз Вегенера, саркоидоз, орхит/обратные процедуры вазэктомии, аллергические/атопические заболевания, астма, аллергический ринит, экзема, аллергический контактный дерматит, аллергический конъюнктивит, пневмонит с гиперчувствительностью, трансплантация, отторжение трансплантатов органов, болезнь "трансплантат против хозяина", синдром системной воспалительной реакции, синдром сепсиса, грамположительный сепсис, грамотрицательный сепсис, сепсис с отрицательными результатами посева, грибковый сепсис, нейтропеническая лихорадка, уросепсис, менингококкемия, травма/кровотечение, ожоги, воздействие ионизирующего облучения, острый панкреатит, синдром респираторного дистресса взрослых, ревматоидный артрит, алкогольный гепатит, хронические воспалительные патологические состояния, саркоидоз, болезнь Крона, серповидно-клеточная анемия, диабет, нефроз, атопические заболевания, реакции гиперчувствительности, аллергический ринит, сенная лихорадка, длительный ринит, конъюнктивит, эндометриоз, астма, крапивница, системная анафилаксия, дерматит, злокачественная анемия, гемолитическое заболевание, тромбоцитопения, отторжение трансплантата любого органа или ткани, отторжение трансплантата почки, отторжение трансплантата сердца, отторжение трансплантата печени, отторжение трансплантата поджелудочной железы, отторжение трансплантата легкого, отторжение трансплантата костного мозга (ТКМ), отторжение аллотрансплантата ко-

жи, отторжение трансплантата хряща, отторжение трансплантата кости, отторжение трансплантата тонкой кишки, отторжение имплантата тимуса плода, отторжение трансплантата паращитовидной железы, отторжение ксенотрансплантата любого органа или ткани, отторжение аллотрансплантата, реакции гиперчувствительности антирецепторов, болезнь Грейвса, болезнь Рейно, инсулинорезистентный сахарный диабет типа В, астма, злокачественная миастения, опосредованная антителом цитотоксичность, реакции гиперчувствительности типа III, синдром POEMS (синдром полинейропатии, органомегалии, эндокринопатии, моноклональной гаммапатии, изменения кожи), полинейропатия, органомегалия, эндокринопатия, моноклональная гаммапатия, синдром изменения кожи, антифосфолипидный синдром, пузырчатка, склеродермия, смешанное заболевание соединительной ткани, идиопатическая болезнь Аддисона, сахарный диабет, хронический активный гепатит, первичный билиарный цирроз, витилиго, васкулит, синдром кардиотомии после ИМ, гиперчувствительность типа IV, контактный дерматит, пневмонит с гиперчувствительностью, отторжение аллотрансплантата, гранулемы, вызванные внутриклеточными организмами, чувствительность к ЛС метаболическая/ идиопатическая, болезнь Вильсона, гемахроматоз, дефицит альфа-1-антитрипсина, диабетическая ретинопатия, тиреоидит Хасимото, остеопороз, оценка состояния гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, первичный билиарный цирроз, тиреоидит, энцефаломиелит, кахексия, муковисцидоз, хроническое заболевание легких у новорожденных, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), семейный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, дерматологические состояния, алопеция, нефротический синдром, нефрит, гломерулонефрит, острая почечная недостаточность, гемодиализ, уремия, токсичность, преэклампсия, терапия ОКТЗ, терапия антителом к CD3, терапия цитокинами, химиотерапия, лучевая терапия (например, включая, без ограничения, астению, анемию, кахексию и т. п.), хроническая интоксикация салицилатами и т. п. См., например, Merck Manual, 12th-17th Editions, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., eds., Second Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000), каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки. Такой способ может необязательно содержать введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к ФНО, или определенную часть или вариант, в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в таком модулировании, лечении или терапии. См., например, Merck Manual, 16th Edition, Merck & Company, Rahway, NJ (1992).

В настоящем изобретении также предлагается способ модулирования или лечения псориаза, псориатического артрита, болезни Крона, других воспалительных заболеваний кишечника, волчанки, саркоидоза, АС или pAхSpA, среди прочих заболеваний, перечисленных выше как связанных с ИЛ-12/23, в клетке, ткани, органе, у животного или у пациента, включая, без ограничения, по меньшей мере одно из иммунного заболевания, сердечно-сосудистого заболевания, инфекционного, злокачественного и/или неврологического заболевания. Такой способ может необязательно содержать введение эффективного количества по меньшей мере одной композиции или фармацевтической композиции, содержащей антитело к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23), в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в таком модулировании, лечении или терапии.

Любой способ по настоящему изобретению может содержать введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей антитело к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23), в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в таком модулировании, лечении или терапии. Такой способ может необязательно дополнительно включать совместное введение или применение комбинированной терапии для лечения таких заболеваний или расстройств, причем введение указанного по меньшей мере одного антитела к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23), его определенной части или варианта, дополнительно содержит введение (перед, одновременно и/или после) по меньшей мере одного средства, выбранного из по меньшей мере одного антагониста ФНО (например, без ограничения, химического или белкового антагониста ФНО, моноклонального или поликлонального антитела к ФНО или его фрагмента, растворимого рецептора ФНО (например, p55, p70 или p85) или его фрагмента, их слитых полипептидов, или низкомолекулярного антагониста ФНО, например связывающего ФНО белка I или II (ТВР-1 или ТВР-II), нерелимонмаба, инфликсимаба, этернацепта (EnbrelTM), адалимулаба (HumiraTM), CDP-571, CDP-870, афелимомаба, ленерцепта и т.п.), противоревматического ЛС (например, метотрексата, ауранофина, ауриотиоглюкозы, азатиоприна, золота-натрия тиомалата, гидроксихлорохина сульфата, лефлуномида, сульфасалзина), миорелаксанта, наркотического ЛС, нестероидного противовоспалительного препарата (НСПВП), анальгетика, анестезирующего ЛС, седативного ЛС, ЛС местной анестезии, нервно-мышечного блокатора, противомикробного ЛС (например, аминогликозида, противогрибкового ЛС, противопаразитарного ЛС, противовирусного ЛС, карбапенема, цефалоспорина, фторхинолона, макролида, пенициллина, сульфонамида, тетрациклина, другого противомикробного ЛС), противопсориатического ЛС, кортикостероида, анаболического стероида, ЛС для лечения сахарного диабета, минерала, диетического ЛС, тиреоидного ЛС, витамина, гормона регуляции кальция, ЛС против диареи, ЛС против кашля, противорвотного ЛС, ЛС против язвы, слабительного ЛС, антикоагулянта, эритропоэтина (например, эпоэтина альфа), филграстима (например, G-CSF, Neupogen), сарграмостима (GM-CSF, Leukine), иммунизации, иммуноглобулина, иммунодепрессанта (например, базиликсимаба, циклоспорина, даклизумаба), гормона роста, заместительной гормональной терапии, модулятора рецепторов эстрогена, мид-

риатика, ЛС циклоплегии, алкилирующего агента, антиметаболита, ингибитора митоза, радиофармацевтического ЛС, антидепрессанта, ЛС против мании, антипсихотического ЛС, анксиолитического ЛС, снотворного ЛС, симпатомиметика, возбуждающего ЛС, донепезила, такрина, ЛС для лечения астмы, бета-агониста, стероида для ингаляции, ингибитора лейкотриена, метилксантина, кромолина, адреналина или его аналога, дорназы альфа (Pulmozyme), цитокина или антагониста цитокина. Приемлемые дозировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000); *Nursing 2001 Handbook of Drugs*, 21st edition, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; *Health Professional's Drug Guide 2001*, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ, все из которых полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

Терапевтические способы лечения

Как правило, лечение патологических состояний осуществляют путем введения эффективного количества или дозы композиции антитела к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23), которая полностью, в среднем, содержит от по меньшей мере около 0,01 до 500 мг антитела к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) на килограмм массы пациента в одной дозе и предпочтительно от по меньшей мере около 0,1 до 100 мг антитела на килограмм массы пациента за одно или несколько введений, в зависимости от удельной активности активного агента, содержащегося в композиции. Альтернативно, эффективная концентрация в сыворотке может составлять 0,1-5000 мкг/мл сыворотки за одно или несколько введений. Подходящие дозы известны медицинским специалистам и, разумеется, зависят от конкретного болезненного состояния, удельной активности вводимой композиции и конкретного пациента, получающего лечение. В некоторых случаях для достижения желаемого терапевтического количества может потребоваться выполнение повторного введения, т.е. повторных отдельных введений конкретной контролируемой или измеренной дозы, причем отдельные введения повторяют до достижения желаемой суточной дозы или эффекта.

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

Альтернативно, вводимые дозы могут варьировать в зависимости от известных факторов, таких как фармакодинамические показатели конкретного агента, способ и путь его введения; возраст, состояние здоровья и масса реципиента; природа и степень выраженности симптомов, тип сопутствующего лечения, частота введения и желаемый эффект. Обычно доза активного ингредиента составляет от около 0,1 до 100 мг на килограмм массы тела. Как правило, от 0,1 до 50 и, предпочтительно, от 0,1 до 10 мг на килограмм, за одно введение или в лекарственной форме с замедленным выделением, будет эффективно для достижения желаемых результатов.

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

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

Для парентерального введения антитела лекарственная форма может представлять собой раствор, суспензию, эмульсию, частицы, порошок или лиофилизированный порошок вместе с фармацевтически приемлемым носителем для парентерального введения или отдельно от носителя. Примерами таких но-

сителей являются вода, физиологический раствор, раствор Рингера, раствор глюкозы и человеческий сывороточный альбумин 1-10%. Для этих целей также можно применять липосомы и безводные среды, например нелетучие масла. Носитель или лиофилизированный порошок может содержать добавки, способствующие изотоничности (например, хлорид натрия, маннит) и химической стабильности (например, буферы и консерванты). Состав стерилизуют известными или приемлемыми методами.

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

Альтернативные способы введения

В соответствии с настоящим изобретением для введения фармацевтически эффективных количеств антитела к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) можно применять множество известных и разработанных способов введения. Далее описано введение через легкие, однако в соответствии с настоящим изобретением также можно применять другие способы введения, дающие приемлемые результаты. Антитела к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) по настоящему изобретению можно доставлять в носители в виде раствора, эмульсии, коллоида или суспензии, либо в виде сухого порошка с применением любого из множества устройств и способов, приемлемых для введения путем ингаляции или другими способами, описанными в настоящем документе или известными специалистам в данной области.

Парентеральные составы и введение

Составы для парентерального введения могут в качестве обычных эксципиентов содержать стерильную воду, физиологический раствор, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения, гидрогенизированные нафталины и т.п. Водные или масляные суспензии для инъекций можно получать с использованием подходящего эмульгатора или увлажнителя и суспендирующего агента известными способами. Для инъекций можно использовать нетоксичный, пригодный для не перорального введения, разбавляющий агент, например водный раствор, стерильный раствор для инъекций или суспензию в растворителе. В качестве пригодной несущей среды или растворителя допустимо использовать воду, раствор Рингера, изотонический раствор и т.п.; в качестве обычного растворителя или суспендирующего растворителя можно использовать стерильное нелетучее масло. Для этих целей можно использовать нелетучее масло и жирную кислоту любого вида, включая природные или синтетические либо полусинтетические жирные масла или жирные кислоты; природные или синтетические либо полусинтетические моно-, ди- или триглицериды. Парентеральное введение известно в данной области и включает, без ограничения, общепринятые средства инъекции, пневматическое безыгольное инъекционное устройство, описанное в патенте США № 5851198, и лазерный перфоратор, описанный в патенте США № 5839446, полностью включенные в настоящий документ путем ссылки.

Альтернативные способы доставки

Изобретение дополнительно относится к введению антитела к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) путями введения парентерального, подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутрисуставного, внутрибронхиального, внутрибрюшного, интракапсулярного, внутриваггинального, внутриполостного, интрацелиального, внутримозжечкового, внутрижелудочкового, в толстую кишку, интрацервикального, внутрижелудочного, внутрипеченочного, интрамиокардиального, внутрикостного, внутритазового, интраперикардального, внутрибрюшинного, интраплеврального, в предстательную железу, внутрилегочного, интра ректального, интрауретрального, интраокулярного, интраспинального, интрасиновиального, внутригрудного, внутриматочного, внутрипузырного, в пораженные ткани, болюсного, вагинального, ректального, буккального, подязычного, интраназального или чрескожного. Композицию антитела к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) можно приготовить для применения парентеральным (подкожным, внутримышечным или внутривенным) или любым другим способом введения, в частности, в форме жидких растворов или суспензий; для применения вагинальным или ректальным способом введения, в частности, в полутвердых формах, таких как, без ограничения, кремы и суппозитории; для буккального или сублингвального введения, например, без ограничения, в форме таблеток или капсул; или для интраназального введения, например, без ограничения, в форме порошков, капель в нос или аэрозолей, либо в виде определенных агентов; или для введения трансдермально, например, без ограничения, в виде систем доставки в геле, мази, лосьоне, суспензии или пластыре с химическими ускорителями, такими как диметилсульфоксид, либо для модификации структуры кожи, либо для повышения концентрации лекарственного средства в трансдермальном пластыре (Junginger, et al. In "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., Eds., pp. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994, публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки), или с окисляющими агентами, которые облегчают нанесение составов, содержащих белки и пептиды, на кожу (WO 98/53847), или с применением электрического поля для создания временных траекторий доставки, например, путем электропорации, или для ускорения движения заряженных лекарственных средств через кожу, например, путем ионофореза, или применения ультразвука, например, сонофореза (патенты США № 4309989 и 4767402) (приведенные выше публикации и патенты полностью включены в настоящий документ путем ссылки).

Приведенное выше общее описание изобретения дополнительно разъясняется далее с помощью примеров, которые представлены в качестве иллюстрации и не являются ограничивающими. Дополнительные подробности изобретения иллюстрируются следующими ниже не налагающими ограничения

примерами. Раскрытие всех цитат в спецификации прямо включено в настоящий документ путем ссылки.

Пример 1. Клонирование и экспрессия антитела к ИЛ-12 в клетках млекопитающих

Типичный экспрессионный вектор млекопитающих содержит по меньшей мере один промоторный элемент, опосредующий инициацию транскрипции мРНК, последовательность, кодирующую антитело, и сигналы, необходимые для терминации транскрипции и полиаденилирования транскрипта. К дополнительным элементам относятся энхансеры, последовательности Козака и интроны, фланкированные донорным и акцепторным сайтами для сплайсинга РНК. Высокоэффективной транскрипции можно достичь с ранним и поздним промоторами из SV40, длинными концевыми повторами (LTR) из ретровирусов, например RSV, HTLV1, HIV1, и ранним промотором цитомегаловируса (CMV). Однако также можно использовать элементы клеток (например, промотор актина человека). Приемлемые экспрессионные векторы для применения на практике настоящего изобретения включают, например, такие векторы, как pIRESneo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN или pLNCX (Clontech Labs, г. Пало-Альто, штат Калифорния, США), pcDNA3.1 (+/-), pcDNA/Zeo (+/-) или pcDNA3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), PSVL и PMSG (Pharmacia, г. Уппсала, Швеция), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) и pBC12MI (ATCC 67109). Клетки млекопитающих, которые можно использовать, включают клетки человека HeLa 2 93, H9 и клетки Jurkat, мышинные клетки NIH3T3 и C127, Cos 1, Cos 7 и CV 1, клетки перепела QC1-3, мышинные L-клетки и клетки яичника китайского хомячка (CHO). Альтернативно, ген можно экспрессировать в стабильных клеточных линиях, содержащих ген, интегрированный в хромосому. Котрансфекция с селективируемым маркером, таким как dhfr, gpt, неомицин или гигромицин, допускает идентификацию и выделение трансфицированных клеток.

Трансфицированный ген также можно амплифицировать для экспрессии больших количеств кодируемого антитела. Маркер DHFR (дигидрофолатредуктаза) используют для развития клеточных линий, несущих несколько сотен или даже несколько тысяч копий интересующего гена. Другим используемым селективируемым маркером является фермент глутаминсинтаза (GS) (Murphy, et al., *Biochem. J.* 227: 277-279 (1991); Bebbington, et al., *Bio/Technology* 10: 169-175 (1992)). С использованием таких маркеров клетки млекопитающих выращивают в селективной среде, и отбирают клетки с наивысшей устойчивостью. Такие клеточные линии содержат амплифицированный(е) ген(ы), интегрированный(е) в хромосому. Для продуцирования антител часто используют клетки яичника китайского хомячка (CHO) и клетки NSO.

Экспрессионные векторы pC1 и pC4 содержат сильный промотор (LTR) вируса саркомы Рауса (Cullen, et al., *Molec. Cell. Biol.* 5: 438-447 (1985)) с фрагментом энхансера CMV (Boshart, et al., *Cell* 41: 521-530 (1985)). Сайты множественного клонирования, например сайты расщепления рестриктазами BamHI, XbaI и Asp718, облегчают клонирование интересующего гена. Кроме 3'-интрона, векторы содержат сигнал полиаденилирования и сигнала терминации гена препроинсулина крысы.

Клонирование и экспрессия в клетках CHO

Для экспрессии антитела к ИЛ-12/23p40 используют вектор pC4. Плазмида pC4 является производным плазмиды pSV2-dhfr (каталожный номер ATCC 37146). Плазмида содержит мышинный ген DHFR под контролем раннего промотора SV40. Клетки яичника или другие клетки китайского хомячка, не имеющие дигидрофолатной активности, трансфицированные указанными плазмидами, можно отбирать, выращивая клетки в селективной среде (например, альфа минус MEM, Life Technologies, г. Гайтерсбург, штат Мэриленд, США) с добавлением химиотерапевтического препарата метотрексата. Амплификация генов DHFR в клетках, устойчивых к метотрексату (MTX), хорошо описана раньше (см., например, F. W. Alt, et al., *J. Biol. Chem.* 253: 1357-1370 (1978); J. L. Hamlin and C Ma, *Biochem. et Biophys. Acta* 1097: 107-143 (1990); M. J. Page and M. A. Sydenham, *Biotechnology* 9: 64-68 (1991)). В клетках, выращенных при возрастающих концентрациях MTX, развивается устойчивость к этому ЛС путем чрезмерного продуцирования фермента-мишени, DHFR, в результате амплификации гена DHFR. Если к гену DHFR присоединить второй ген, как правило, происходит его коамплификация и сверхэкспрессия. Специалистам в данной области известно, что такой подход можно использовать для разработки клеточных линий, несущих более 1000 копий амплифицированного(ых) гена(ов). Затем, когда метотрексат отменяют, получают клеточные линии, содержащие амплифицированный ген, интегрированный в одну или более хромосом клетки-хозяина.

Для экспрессии можно использовать высокоэффективные промоторы, помимо сильного промотора длинного концевого повтора (LTR) вируса саркомы Рауса, например, b-актиновый промотор человека, ранний или поздний промоторы SV40, или длинные концевые повторы из других ретровирусов, например ВИЧ и HTLV1. Системы экспрессии генов Tet-Off и Tet-On от компании Clontech и подобные системы можно использовать для регулируемой экспрессии ИЛ-12 в клетках млекопитающих (M. Gossen, and H. Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551 (1992)). Для полиаденилирования мРНК также можно использовать другие сигналы, например, из гормона роста человека или генов глобинов. Стабильные клеточные линии, несущие интересующий ген, интегрированный в хромосомы, также можно отбирать после котрансфекции с селективируемым маркером, таким как gpt, G418 или гигромицин. Преимуществом является использование вначале более одного селективируемого маркера, например G418 плюс метотрексат. Плазмиду pC4 расщепляют рестриктазами, а затем дефосфорилируют с использованием кишечной фосфатазы теленка с помощью процедур, известных специалистам в данной области. Затем выделяют

вектор из 1% агарозного геля.

Используют последовательность ДНК, кодирующую полное антитело ИЛ-12/23p40, соответствующую областям CDR HC и LC антитела ИЛ-12/23p40 по настоящему изобретению, каждой, согласно стадиям известного метода. В этом конструкте также используется выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая приемлемую константную область человека (т.е. области HC и LC).

Затем ДНК, кодирующую выделенные переменную и константную области, и дефосфорилированный вектор лигируют с помощью ДНК-лигазы T4. Затем трансформируют клетки *E. coli* HB101 или XL-1 Blue, и идентифицируют бактерии, содержащие фрагмент, встроенный в плазмиду pC4, с помощью, например, анализа рестрикционным ферментом.

Для трансфекции используют клетки яичника китайского хомячка (CHO), лишенные активности гена DHFR. Экспрессионную плазмиду pC4 (5 микрограммов) котрансфицируют с 0,5 микрограмма плазмиды pSV2-neo с помощью липофектина. Плазида pSV2-neo содержит доминантный селективируемый маркер, ген neo из Tn5, который кодирует фермент, придающий устойчивость к группе антибиотиков, включая G418. Клетки высевают в среду альфа минус MEM с добавлением 1 мкг/мл G418. Через 2 дня клетки обрабатывают трипсином и высевают в планшеты для клонирования гибридом (Greiner, Германия) в среде альфа минус MEM с добавлением 10, 25 или 50 нг/мл метотрексата и 1 мкг/мл G418. Приблизительно через 10-14 дней отдельные клоны обрабатывают трипсином, после чего высевают в 6-луночные чашки Петри или 10-мл флаконы с добавлением различных концентраций метотрексата (50, 100, 200, 400, 800 нМ). Затем клоны, растущие при самых высоких концентрациях метотрексата, переносят в новые 6-луночные планшеты, содержащие еще более высокие концентрации метотрексата (1, 2, 5, 10, 20 мМ). Такую же процедуру повторяют до тех пор, пока не получают клоны, растущие при концентрации 100-200 мМ. Экспрессию желаемого генного продукта анализируют, например, методом электрофореза белков в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) и вестерн-блоттинга, или методом анализа ВЭЖХ с обращенной фазой.

Пример 2. Сравнение терапевтической эффективности антител к ИЛ-12p35 и к ИЛ-12/23p40 в мышинной модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ)

Краткое изложение

Этот набор исследований был проведен для изучения терапевтической эффективности специфичной нейтрализации ИЛ-12 или ИЛ-12/ИЛ-23 в мышинной модели рассеянного склероза экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (ЭАЭ).

Нейтрализующие крысиные моноклональные антитела (mAb) к антигенам мыши, специфичные в отношении субъединицы p35 ИЛ-12, или субъединицы p40, общей для ИЛ-12 и ИЛ-23, вводили либо перед индуцированием заболевания, до начала заболевания, либо после развития заболевания. Во всех случаях терапевтический потенциал демонстрировало только антитело к p40. Эти данные свидетельствуют о том, что ИЛ-23 является преимущественным фактором патогенеза заболевания в этой аутоиммунной модели.

Сокращения:

ИЛ	Интерлейкин
mAb	Моноклональное антитело
ЭАЭ	Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит
Th	Хелперные Т-клетки
ИФН γ	Гамма-интерферон
cs	Балл клинической оценки
МВР	Основной белок миелина
ФК	Фармакокинетика

Введение

Биологически активный ИЛ-12 существует как гетеродимер, состоящий из 2 ковалентно связанных субъединиц массой 35 (p35) и 40 (p40) килодальтон. Несколько линий доказательств показали, что ИЛ-12 может индуцировать надежные иммунные ответы Th1, которые характеризуются продуцированием ИФН γ и ИЛ-2 Т-клетками CD4⁺. Считается, что неуместные ответы Th1 и, таким образом, экспрессия ИЛ-12, коррелируют со многими опосредованными иммунной системой заболеваниями, такими как рассеянный склероз, ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника, зависимый от инсулина сахарный диабет и увеит. В моделях на животных было показано, что нейтрализация ИЛ-12 облегчает иммунно опосредованное заболевание. Однако в этих исследованиях ИЛ-12 нейтрализовали через субъединицу p40. Недавнее описание ИЛ-23 (1), гетеродимерного цитокина, который также имеет субъединицу p40, показало важность определения того, были ли предыдущие выводы сделаны в связи с активностью ИЛ-12 или ИЛ-23. Для этого провели сравнение специфичной нейтрализации p35 и p40 в мышинной модели аутоиммунного состояния -при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (ЭАЭ).

Нейтрализующие антитела, специфичные в отношении ИЛ-12p35, не влияли на прогрессирование ЭАЭ. Напротив, нейтрализация ИЛ-12 и ИЛ-23 с помощью mAb к p40 подавляла клинические признаки ЭАЭ, независимо от того, вводили ли антитело раньше дифференцировки Th1, или после нее. Эти данные свидетельствуют о том, что активность лечения антителом к p40 при ЭАЭ основана исключительно на нейтрализации ИЛ-23.

Методы и материалы

Мыши

В фармакокинетических анализах использовали самок мышей линии C3H/HEB/FEJ (Jackson Laboratories, г. Бар-Харбор, штат Мэн, США). Для исследований ЭАЭ самок мышей линии B10.PL (H-2^u) приобретали в Jackson Laboratories, и использовали в возрасте 6-8 недель. Всех животных содержали в соответствии с директивами Организационного комитета по содержанию и использованию животных (IACUC), согласно утвержденным протоколам.

Антитела

Гибридомы C17.8 (крысиное антитело к мышинному ИЛ-12/ИЛ-23p40, IgG2a) и C18.2 (крысиное антитело к мышинному ИЛ-12p35, IgG2a) приобретали у Dr. Giorgio Trinchieri и в Wistar Institute (г. Филадельфия, штат Пенсильвания, США). В компании Harlan Bioproducts (г. Индианаполис, штат Индиана, США) получали асцитную жидкость, и очищали ее с помощью аффинной очистки на белке G.

ФК в сыворотке крысиных антител к антигенам мыши

Самок мышей C3H/HEB/FEJ с массой приблизительно 20-25 граммов взвешивали по отдельности, и вводили им внутривенно (в/в) одну дозу 5 мг/кг антитела (C17.8, C18.2), меченого ¹²⁵I, при этом вводили постоянную дозу объема на мышь, составляющую 10 мл/кг. У мышей под анестезией отбирали кровь из ретро-орбитальной области через 30 мин, 6 и 24 ч, 4, 7, 11 и 18 дней. Образцы крови оставляли отстаиваться при комнатной температуре по меньшей мере 30 мин, но не более 1 ч, после чего центрифугировали со скоростью приблизительно 2500-3500 об/мин в течение 10-15 мин. В аликвотах каждого образца сыворотки объемом приблизительно по 50 мкл подсчитывали ¹²⁵I, используя счетчик LKB Com-pugamma 1282 (Wallac, г. Гейтерсберг, штат Мэриленд, США). Также подсчитывали аликвоты инъекций по 10 мл. Рассчитывали среднюю долю инъецированных импульсов на каждый момент времени и умножали на общее количество вводимого антитела в мг, чтобы определить общее количество мг, оставшееся в сыворотке на каждый момент времени. Данные показаны в виде среднего количества mAb в мг в сыворотке \pm ст. откл. при наличии в каждой группе 5-10 животных.

Индукция и оценка баллов ЭАЭ

Для индукции ЭАЭ самкам мышей линии B10.PL вводили подкожно в четыре участка на спине всего 100 мкл полного адьюванта Фрейнда (CFA) (содержащего 200 мкг *Mycobacterium tuberculosis* штамма Jаmаіса) в комбинации с 200 мкг основного белка миелина (MBP) морской свинки (Sigma). Во время иммунизации и через 48 ч мышам также вводили в/б 200 нг коклюшного токсина (List Biological, г. Кэмпбелл, штат Калифорния), в 0,2 мл фосфатно-солевого буферного раствора (PBS). В назначенные дни мыши получали в/б инъекции моноклональных антител C17.8 (антитело к ИЛ-12p40) или C18.2 (антитело к ИЛ-12p35), разведенных в PBS, в дозе 100 мг/кг (C18.2) или 20 мг/кг (C17.8). Контрольным мышам вводили PBS или крысиный IgG (Biosource) в дозе 20 мг/кг в PBS.

Животным, у которых наблюдались клинические признаки, проводили клиническую оценку баллов следующим образом: 1 - вялый хвост или хромающая походка при тонусе хвоста; 2 - хромающая походка с вялым хвостом (атаксия); 2,5 - атаксия с частичным параличом конечности; 3 - полный паралич одной конечности; 3,5 - полный паралич одной конечности с частичным параличом второй конечности; 4 - полный паралич двух конечностей; 4,5 - умирающее; 5 - смерть. Животные с оценкой 5 не были включены в среднесуточный анализ клинических признаков в течение оставшейся продолжительности эксперимента. Суточные КО усредняли для группы, и описывали как среднюю частоту, день начала, наивысшую КО в остром периоде, кумулятивную КО, КО/день, количество рецидивов и тяжесть рецидива \pm СПС (стандартная погрешность среднего). Значения кумулятивной КО на группу рассчитывали путем усреднения суммы баллов клинической оценки за день для отдельных животных. КО/день рассчитывали путем деления кумулятивной КО на количество дней, на протяжении которых животное оставалось в исследовании. При определении среднего дня начала животных, у которых не развился ЭАЭ, не включали в анализ. При определении средней максимальной КО мышам, у которых не развился ЭАЭ, присваивали значение "0" и включали их в анализ. Рецидивы определяли по снижению клинической оценки на полный балл, продолжавшемуся в течение по меньшей мере 2 дней наблюдения, за которым следовало увеличение клинической оценки на полный балл в течение по меньшей мере 2 дней наблюдения.

Результаты и обсуждение

Антитела к p35 и к p40 имеют одинаковую фармакокинетику.

Для установления показателей клиренса антитела к p40 и антитела к p35 нормальным мышам вводили однократную дозу 5 мг/кг антител, меченых ¹²⁵I, и в течение 11 дней после введения антител измеряли их уровни циркуляции. Антитело к p35 и антитело к p40 имели перекрывающуюся фармакокинетику, демонстрируя одинаковые показатели клиренса у нормальных мышей (2). Ожидаемый показатель

клиренса для каждого mAb составляет приблизительно 7-10 дней. Хотя это исследование представляет собой исследование ФК однократной дозы, полученные данные поддерживают введение один раз в неделю для исследований *in vivo*.

Только введение антитела к р40 перед индуцированием ЭАЭ имеет защитное действие.

Для определения сравнительных ролей ИЛ-12 и ИЛ-23 в иммунно опосредованных заболеваниях, авторы использовали мышиную модель рассеянного склероза - рецидивирующий экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ). После индуцирования ЭАЭ путем введения основного белка миелина (МВР) в адьюванте мышам линии B10.PL, у них обычно наблюдается начальный эпизод паралича (острое заболевание), затем происходит частичное либо полное выздоровление, и наблюдается прогрессирование множественных рецидивов и/или развитие хронического ЭАЭ. Долгое время предполагалось, что ЭАЭ зависит от экспрессии ИЛ-12, поскольку считалось, что ИЛ-12 является первичным медиатором дифференцировки Th0 в Th1. Однако, чтобы выявить потенциальную роль ИЛ-23 в индуцировании ЭАЭ, за один день до проведения иммунизации ЭАЭ (день -1) были созданы нейтрализующие концентрации антител к р40 (ИЛ-12 и ИЛ-23) или антител к р35 (только ИЛ-12). Начало заболевания у животных может различаться; поэтому процедуру повторяли позже, через 7 и 14 дней, чтобы гарантировать, что во время дифференцировки Th1, присутствовали антитела к р35 и к ИЛ-р40. Несколько исследований нейтрализации *in vitro* продемонстрировали, что mAb к р40 в 5 раз более эффективно в отношении нейтрализации ИЛ-12, чем mAb к р35 (данные не показаны). Поэтому дозу mAb к р35 во всех экспериментах ЭАЭ корректировали так, чтобы она была в 5 раз выше, чем доза антитела к р40. В двух отдельных экспериментах у мышей, которым вводили крысиное антитело изотипического контроля IgG (20 мг/кг) или антитело к р35 (100 мг/кг), не наблюдалось защиты от заболевания. Важно отметить, что периферическое введение неспецифического контрольного антитела (IgG крысы) не изменяло клинического течения заболевания по сравнению с мышами с ЭАЭ, которым не выполняли такое введение. В обоих исследованиях у мышей, которым вводили mAb к р40 (20 мг/кг), наблюдалось почти полное ингибирование клинических признаков ЭАЭ. Примечательно, что подавление заболевания длилось дольше ожидаемого показателя клиренса антитела, до 70 дней после индукции ЭАЭ. В каждом эксперименте только у одного животного, получившего антитело к р40, наблюдались клинические признаки ЭАЭ в течение двух последовательных дней, причем у каждого животного наблюдалось позднее начало и значительно меньшие клинические оценки в остром периоде, кумулятивные клинические оценки, а также отсутствие рецидивов заболевания (табл.1). Эти результаты показывают, что нейтрализация ИЛ-12 и ИЛ-23 через общую субъединицу р40 обеспечивала почти полную защиту от ЭАЭ. Напротив, специфичная нейтрализация только ИЛ-12 посредством антитела к р35 оказалась неэффективной. Эти данные явно свидетельствуют о том, что ЭАЭ не опосредуется ИЛ-12.

Только введение антитела к р40 непосредственно перед началом заболевания имеет защитное действие.

Хотя профилактическое лечение полностью защищало мышей от ЭАЭ, оставалось определить, будет ли специфичная нейтрализация ИЛ-12 защищать и дальше, после установления популяции Th1 *in vivo*. Поэтому в отдельном наборе экспериментов через десять дней после индукции ЭАЭ, но до начала заболевания, мышам вводили либо контрольное антитело (IgG крысы), либо моноклональные антитела к р35 или к р40. Поскольку типичные иммунные ответы возникают в пределах 7 дней, этот момент времени должен отражать влияние mAb к ИЛ-12 или к ИЛ-23 на дифференцированные клетки Th1. Начало ЭАЭ у животных может различаться, поэтому процедуру повторяли позже, через 7 и 14 дней, чтобы гарантировать, что во время начала заболевания присутствовали антитела к р35 и антитела к р40. В двух отдельных экспериментах мыши, которым вводили крысиное антитело изотипического контроля (20 мг/кг) или антитело к р35(100 мг/кг), не были защищены от заболевания по сравнению с мышами с ЭАЭ, которым не выполняли такое введение. Однако мыши, которым вводили mAb к р40 (20 мг/кг), были в значительной степени защищены от ЭАЭ. Как показано в ранее описанных исследованиях, подавление заболевания наблюдалось задолго до времени, необходимого для клиренса периферически введенного антитела, и до 70 дней после индукции ЭАЭ. Учитывая, что антитело не вводили раньше, чем произошла дифференцировка Th1(день 10), неудивительно, что заболеваемость, день начала и самая высокая клиническая оценка во время острого ЭАЭ во всех группах не различались (табл.2). Однако в обоих экспериментах мыши, получавшие антитело к р40, имели значительно меньшие кумулятивные клинические оценки, клинические оценки за день и тяжесть рецидивов.

Только введение антитела к р40 во время установившегося ЭАЭ имеет защитное действие.

Наиболее сложным, но клинически значимым препятствием для любой терапии является подавление установившегося заболевания.

Поэтому был проведен еще один набор экспериментов, в которых мышам иммунизировали для развития ЭАЭ, а затем в ходе течения заболевания делили на группы лечения. Приблизительно через 30 дней после индукции ЭАЭ у мышам происходило прогрессирование с развитием острой фазы заболевания. В это время животных разделяли на группы с сопоставимыми кумулятивными и ежедневными клиническими оценками. Процедуру повторяли позже, через 7 и 14 дней, чтобы гарантировать наличие антител в нейтрализующих концентрациях во время перехода заболевания из острой фазы в хроническую или в фазу течения с ремиссиями и рецидивами. Только введение антитела к р40 (20 мг/кг) облегчало

течение заболевания по сравнению с введением животным антитела изотипического контроля (20 мг/кг) или антитела к р35 (100 мг/кг). Подавление заболевания наблюдалось до 80 дней после индукции ЭАЭ. В обоих экспериментах анализ от первого дня лечения до дня 80 показал, что у мышей, получавших антитело к р40, наблюдались меньшие кумулятивные клинические оценки, клинические оценки за день и наименьшая максимальная клиническая оценка после лечения. Эти данные свидетельствуют о том, что ИЛ-23 может не только опосредовать дифференцировку Th1 (табл. 1) и индукцию ЭАЭ (табл. 2), но что ИЛ-23 также вносит вклад в эффекторную фазу хронических иммунно опосредованных (например, аутоиммунных) ответов (табл. 3). Поэтому введение антитела р40 может обеспечивать терапию в любое время прогрессирования иммунно опосредованных заболеваний.

Выводы

Понимание роли ИЛ-12 в иммунной функции было основано на исследованиях субъединицы р40 ИЛ-12. Поэтому параллельное сравнение нейтрализации субъединицы р35, специфичной для ИЛ-12, и субъединицы р40, общей для ИЛ-12 и ИЛ-23, проводили на животной модели аутоиммунного заболевания. Нейтрализация посредством антитела к р40 значительно ингибировала ЭАЭ при введении mAb в любой момент времени. Однако специфичная нейтрализация ИЛ-12 была абсолютно неэффективной. Поэтому данные, полученные авторами исследования, показывают, что ИЛ-12 не вносит вклад в эту аутоиммунную модель, и ожидается, что ИЛ-23 является более заметным медиатором аутоиммунных ответов Т-клеток.

Пример 3. Эпитоп для нейтрализации р40

Краткое изложение

Эпитоп для нейтрализующего антитела (mAb к ИЛ-12/23р40) против субъединицы р40 в ИЛ-12 и ИЛ-23 человека определяли на основе кристаллической структуры комплекса Fab/ИЛ-12. Эпитоп расположен на домене D1 (остатки 1-88) субъединицы р40 в ИЛ-12 человека. Эта область отдалена от интерфейса р40/р35 и, как ожидается, также будет доступна на субъединице р40 в ИЛ-23. Остатки, участвующие в связывании антигена и антитела, являются прерывистыми (табл. 4) и содержат уникальный конформационный эпитоп. Антитела к этому эпитопу или его частям и соседним областям приведут к блокированию функций ИЛ-12 и ИЛ-23, опосредованных через эту часть субъединицы р40.

Введение

Было показано, что полностью человеческое моноклональное антитело (mAb к р40), направленное против человеческого ИЛ-12/23р40, является мощным нейтрализатором функции ИЛ-12 и ИЛ-23. Было показано, что mAb к р40 связывается с субъединицей р40 и блокирует связывание обоих цитокинов с их рецепторами. Поскольку субъединица р40 является общей для ИЛ-12 и ИЛ-23, подробные взаимодействия между ИЛ-12 и mAb к р40 определяют важный общий нейтрализующий эпитоп, что, в свою очередь, может проливать свет на взаимодействия цитокинов и рецепторов.

Определение эпитопа на основе кристаллической структуры р40 Fab/ИЛ-12 mAb к ИЛ-12/ИЛ-23р40 продуцировали в культуре из клеточной линии млекопитающих и очищали на колонке с использованием белка А. mAb к ИЛ-12/ИЛ-23р40 (70 мг) расщепляли папаином (0,25 единицы папаина на один миллиграмм IgG) в буфере для активации (0,03 М фосфата натрия, 0,15 М NaCl, 0,01 М ЭДТА, 0,0072 М L-цистеина, pH 7,0) при 37°C в течение 2 ч. Расщепление отслеживали методом масс-спектрометрии с поверхностной лазерной десорбцией/ионизацией (SELDI). Для остановки расщепления пользовались йодацетамидом (0,5 М). Fc удаляли с помощью иммобилизованного белка G. Затем очищали Fab р40 посредством гель-фильтрации на колонке Superdex 200 16/60. Получали в целом 44 мг очищенного Fab р40 и анализировали его чистоту с помощью SDS-PAGE.

Рекомбинантный человеческий ИЛ-12 получали в культуре стабильно трансфицированной клеточной линии, чрезмерно экспрессирующей субъединицы р40 и р35, и очищали на аффинной колонке с mAb к р40. Собирали белковые фракции и подвергали диализу в 10 mM трис, 100 mM NaCl, pH 7,4, и концентрировали до 2,5 мг/мл. ИЛ-12 дегликозилировали путем инкубации с несколькими комбинациями ферментов для дегликозилирования (PNG-аза F, сиаладаза, эндо-О-гликозидаза, α -, β -галактозидаза, α -маннозидаза, фукозидаза [около 5 мЕд-10 Ед /100 мкг белка]) в течение 3 дней при 37°C в атмосфере аргона.

Дегликозилированные ИЛ-12 смешивали с избытком Fab р40. Комплекс ИЛ-12/Fab р40 очищали с помощью гель-фильтрационной хроматографии в 10 mM трис, 50 mM NaCl, pH 7,4. Выделенный комплекс концентрировали до приблизительно 4 мг/мл. Комплекс ИЛ-12/Fab р40 кристаллизовали, используя метод диффузии пара в сидячей капле, путем сочетания вышеуказанного раствора белкового комплекса в соотношении 1:1 по объему с резервуарным раствором 50 mM трис, pH 7,0, 16% ПЭГ-3350. В пределах двух недель при 16°C появились кристаллы кубической, пирамидальной или стержнеобразной формы с типичным размером 50-150 мкм.

Кристаллы собирали и пропитывали в маточном растворе с добавлением 30% этиленгликоля, и мгновенно замораживали в жидком азоте для сбора рентгенографических данных. Наилучший набор данных был собран (360°, 0,5°/кадр, 10 с экспозиции на кадр) до дифракционного предела 2,8 Å в усовершенствованном источнике фотонного излучения (APS), лаборатория Argonne National Laboratory (Ax-

as-ComCat). Данные дифракции обрабатывали с помощью программ Denzo и ScalePack. (Otwinowski & Minor, *Methods Enzymol.* 276: 307-326). Пространственная группа для этой кристаллической формы представляет собой $P2_12_12_1$ с размерами ячейки $a=116,8 \text{ \AA}$, $b=55,77 \text{ \AA}$, $c=182,96 \text{ \AA}$, и $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$. Имеется 27 141 независимое отражение, и данные были на $\sim 90\%$ полными при $3,0 \text{ \AA}$ ($I/\sigma=5,2$, $R_{\text{sym}}=9\%$).

Кристаллическая структура была решена путем молекулярного замещения, как реализовано в программе CNX (Accelrys, штат Калифорния, США). Моделями поиска были опубликованная структура ИЛ-12 (код 1F45 в базе данных белков PDB) для ИЛ-12 и модель гомологии для Fab p40, основанная на кристаллической структуре Fab (код 1VGE в PDB). Молекулярные модели для ИЛ-12 и Fab p40 проверяли визуально и корректировали вручную с помощью программы XtalView. Уточнение структуры выполняли с помощью программы CNX. Молекулярные модели были проверены с помощью программы InsightII (Accelrys, штат Калифорния, США). На фиг. 1 показана молекулярная структура связанного комплекса ИЛ-12/Fab p40 в ленточном представлении.

На фиг. 2 показан сайт связывания mAb к p40 (эпитоп p40) на поверхности молекул в поверхностном и ленточном представлении. Остатки связывающего эпитопа определены как любая открытая поверхность остатков p40 (относительная доступность растворителя составляет 0,1 или выше) для любых атомов в пределах 4 \AA от любых атомов антитела, в соответствии с общепринятым соглашением. Доступность поверхностей рассчитывали с помощью программы ICM (Molsoft, штат Калифорния, США), используя параметры по умолчанию. Остатки, содержащие связывающий эпитоп mAb к p40 на ИЛ-12 p40, перечислены в табл. 4, вместе с их площадями открытой поверхности (sf) и показателями относительной доступности (коэффициент sf). Определение площади открытой поверхности остатка аминокислоты в контексте белка общепринято в данной области. В частности, молекулу воды с радиусом $1,4 \text{ \AA}$ прокатывают по поверхности белка, и размер площади, полученный с помощью такого расчета для конкретного остатка, присваивают площади открытой поверхности этого остатка. Кроме того, имеется полная площадь поверхности для аминокислоты в полностью расширенной конформации. Доступность поверхности (коэффициент sf) тогда представляет собой отношение площади открытой поверхности к стандартной площади поверхности. Эти два значения, взятые вместе, дают нам представление о том, открыт ли остаток на поверхности белка.

Из табл. 4 и фиг. 2 (правая панель) видно, что сайт связывания на p40 является прерывистым и состоит из большого количества открытых на поверхности остатков, которые распределены по неправильной поверхности. Взаимодействие антитело-антиген покрывает в общей сложности 1758 \AA^2 доступной поверхности на ИЛ-12 и mAb к p40. По-видимому, во взаимодействиях доминируют три солевых мостика: R59(H)-E59(p40), R98(H)-E45(p40) и R99(H)-D62(p40). Кроме того, существует вклад во взаимодействие антитело-антиген, обусловленный гидрофобными или Ван-дер-Ваальсовыми силами.

Остатки на антителе к ИЛ-12p40, участвующие в связывании с ИЛ-12, которые идентифицированы в нашем исследовании на основе сокристаллической структуры, показаны в табл. 5 ниже. Все открытые на поверхности остатки в антителе к p40, с любыми атомами в пределах 4 \AA от субъединицы p40, считаются частью этих связывающих остатков. Консервативные изменения в любом одном или более из этих остатков могут продуцировать мутантные антитела, которые имеют сходную эффективность. Примеры таких консервативных замен включают, без ограничения, R59K, R98K и R99K в VH (например, в SEQ ID NO: 7) и D1E в VL (например, в SEQ ID NO: 8).

Кроме того, в каждом положении, показанном в табл.5, можно осуществить мутагенез насыщения (например, изменение последовательности аминокислот дикого типа (ДТ) на любую другую аминокислоту, за возможным исключением цистеина) для идентификации мутаций, вызывающих повышенную, пониженную или по существу подобную активность полученного антитела (например, связывание). Связывание полученного антитела с субъединицей p40 можно испытывать в соответствии с любым подходящим анализом связывания. Мутагенез насыщения можно применять, например, для создания более или менее эффективного антитела, либо такого же по эффективности антитела, имеющего другие свойства, то есть свойства, отличные от эффективности, возникающие в результате изменения последовательности варьируемых областей (например, размера или других структурных изменений варьируемой области).

Мутагенез насыщения также можно проводить с внесением более одной замены, например, в двух, трех или более положениях для каждого эксперимента. Это можно сделать в виде отдельных клонов или библиотек, с последующим отбором или скринингом в подходящем формате, например, в формате фагового дисплея. Кроме того, одиночные или комбинированные мутации в положениях, указанных в табл.5, которые желательны для регулирования активности, можно объединять с созданием дополнительных комбинационных мутантов с аналогичной или лучшей эффективностью.

Преимущества

Сайт связывания mAb на p40 отдален от сайта ассоциации p40/p35 (фиг. 1). Субъединица p19 ИЛ-23 эволюционно связана с p35 ИЛ-12 со значительной гомологией последовательностей. Вероятно, что p19 ассоциирована с p40 таким же образом, как и p35. Поэтому область связывания mAb на p40 также отдалена от места взаимодействия p40/p19 в ИЛ-23. Эпитоп, идентифицированный в настоящем изобретении,

одинаково доступен как в ИЛ-12, так и в ИЛ-23; таким образом, неудивительно, что mAb к p40 может активно блокировать функции обоих цитокинов.

ИЛ-12 (p40/p35) и ИЛ-23 (p40/p19) взаимодействуют со своими соответствующими рецепторами (ИЛ-12R β 1/ β 2 и ИЛ-12R β 1/ИЛ-23R) схожим образом. Они индуцируют схожие сигнальные каскады. Однако подробности взаимодействия цитокинов и рецепторов на молекулярном уровне не определены с ясностью. Недавно определенный эпитоп mAb к p40 может представлять собой биологически важный сайт взаимодействия между семейством цитокинов ИЛ-12 с их общим рецептором ИЛ-12R β 1. Следовательно, этот эпитоп является важной мишенью для терапевтического вмешательства с применением моноклональных антител, пептидов, рекомбинантных белков, малых молекул и других природных или синтетических агентов.

Пример 4. Картирование эпитопа mAb к p40 на ИЛ-12p40 с помощью мутационного анализа

Краткое изложение

Для подтверждения связывающего эпитопа проводили анализ связывания мутантов ИЛ-12p40 с mAb к ИЛ-12/ИЛ-23p40 методом ИФА на твердой фазе. На основе кристаллической структуры комплекса p40 Fab/ИЛ-12 было создано 7 одиночных мутантов и 2 двойных мутанта. Мутированные остатки расположены в области контакта с Fab p40 в домене I (D1) субъединицы p40. Относительная аффинность связывания показала, что три отрицательно заряженных остатка - E45, E59 и D62 - вносят значительный вклад во взаимодействие связывания с mAb к p40. Вклад других остатков - M23, L40 и S43 - слабее, но является заметным. Этот мутационный анализ подтверждает, что mAb к p40 распознает домен I субъединицы p40, а остатки E45, E59, D62, M23, L40 и S43 являются частью связывающего эпитопа.

Материалы и методы

В исследованиях использованы семь одиночных мутантов человеческого p40: M23T, L40T, S43R, E45A, E45R, E59R и D62R, и два двойных мутанта: S43R/E45A и S43R/E45R. В качестве контроля использовали человеческий p40 дикого типа. Мутанты p40 временно экспрессировали в клетках HEK293E. Для анализов связывания использовали супернатанты.

Вкратце, на планшеты MSD с высоким связыванием (Meso Scale Discovery, штат Мэриленд, США) наносили как покрытие по 5 мкл моноклонального антитела захвата (5 мкг/мл) при комнатной температуре на 1 ч. Моноклональное антитело захвата распознает субъединицу p40, но не конкурирует с mAb к p40. В каждую лунку добавляли по сто пятьдесят (150) мкл 5% блокирующего буфера MSD Blocker A и культивировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты трижды промывали 0,1 М буфером HEPES (pH 7,4). Эти планшеты для ИФА на твердой фазе с нанесенным на них белком инкубировали с 25 мкл супернатантов (разведенных 1: 10 в 0,1 М буфере HEPES, pH 7,4) различных временно экспрессированных мутантов p40 в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты трижды промывали 0,1 М буфером HEPES (pH 7,4). В микролуны вносили по двадцать пять (25) мкл mAb к p40, меченого MSD Sulfo-TAG, в различных концентрациях в интервале от 0 до 20 мкг/мл.

После 2 ч инкубации со встряхиванием при комнатной температуре планшеты 3 раза промывали 0,1 М буфером HEPES (pH 7,4). В каждую лунку вносили по сто пятьдесят (150) мкл разбавленного буфера для считывания MSD Read Buffer T и анализировали планшеты с помощью устройства SECTOR для считывания (MSD).

Результаты

Как показано на фиг. 3, каждая из мутаций E45R, E59R и D62R значительно уменьшала аффинность связывания мутанта p40 с mAb к p40, по сравнению с p40 дикого типа. E45A имела значительное, но менее сильное влияние на связывание, по сравнению с E45R. Каждая из мутаций M23T, L40T и S43R имела умеренный эффект при связывании.

Относительную аффинность связывания mAb к ИЛ-12/ИЛ-23p40 с различными мутантными белками дополнительно анализировали с помощью анализа захвата. Как показано на фиг. 4, каждая из мутаций E45R, E59R и D62R почти полностью отменяла связывание с антигеном. Каждая из других мутаций в интерфейсе, M23T, L40T и S43R, уменьшала связывание приблизительно на 40%. Мутация E45A уменьшала связывание на около 70%.

Становится ясно, что применение настоящего изобретения на практике может отличаться от приведенного в предшествующем описании и примерах. Многочисленные модификации и вариации настоящего изобретения возможны в свете вышеизложенных идей, и следовательно, остаются в рамках прилагаемой формулы изобретения.

Таблица 1. Клинические оценки ЭАЭ при нейтрализации ИЛ-12 и ИЛ-23, начатой в день -1 (перед дифференцировкой Th1)

Группа	Заболе- ваемость	Смертность	День начала болезни	Наивысшая КО в острый период ^a	Кумуля- тивная КО ^b	КО/ день	Кол-во реци- дивов	Тяжесть реци- дива
<i>P-2001-</i>								
<i>060</i>								
Крысинный			30,5 ±		71,4 ±	1,2 ±	1,3 ±	3,6 ±
IgG	13/13	4/13	3,2	3,6 ± 0,3	14,1	0,2	0,2	0,2
Анти-р35	11/13	8/13	29,6 ±	3,5 ± 0,5	45,5 ±	0,8 ±	1,2 ±	4,0 ±
			3,4		11,5	0,2	0,1	0,3
Анти-р40	1/13	0/13	40,0	0,1	1,2 ±	0,0 ±	0,0 ±	0,0 ±
					0,5	0,0	0,0	0,0
<i>P-2001-</i>								
<i>079</i>								
Без			24,7 ±		110,4 ±	1,7 ±	1,0 ±	3,8 ±
проце- дуры	6/7	0/7	2,7	3,2 ± 0,6	20,4	0,3	0,4	0,1
Крысинный			29,1 ±		90,6 ±	1,5 ±	0,3 ±	4,7 ±
IgG	9/9	2/9	2,9	3,8 ± 0,2	10,1	0,1	0,2	0,3
Анти-р35	10/10	1/10	30,0 ±	3,9 ± 0,2	94,9 ±	1,4 ±	0,7 ±	3,9 ±
			2,6		17,8	,2	0,3	0,2
Анти-р40	1/10	0/10	61,0	0,3	1,6 ±	0,0 ±	0,0 ±	0,0 ±
					1,1	0,0	0,0	0,0

^a клиническая оценка (КО)^b кумулятивная КО

Мышам выполняли введение, как описано выше, и анализировали клинические оценки с дня 0 до 70 дней после индукции ЭАЭ. Данные показаны в виде среднего показателя на группу ± СПС.

Таблица 2. Клинические оценки ЭАЭ при нейтрализации ИЛ-12 и ИЛ-23, начатой в день 10 (после дифференцировки Th1)

Группа	Заболе- ваемость	Смерт- ность	День начала болезни	Наивысшая КО в острый период ^a	Кумуля- тивная КО ^b	КО/ день	Кол-во реци- дивов	Тяжесть реци- дива
<i>P-2001-037</i>								
Без			30,6 ±		51,5 ±	0,8 ±	0,3 ±	3,3 ±
проце- дуры	7/8	0/8	2,7	3,2 ± 0,5	14,4	0,2	0,2	0,8
Крысинный			25,9 ±		74,7 ±	1,2 ±	0,6 ±	3,7 ±
IgG	9/10	0/10	2,7	2,7 ± 0,5	15,8	0,2	0,2	0,4
Анти-р35	9/10	0/10	25,8 ±	2,5 ± 0,4	58,8 ±	1,0 ±	0,7 ±	3,2 ±
			2,6		15,6	0,2	0,3	0,3
Анти-р40	6/7	0/7	34,7 ±	1,6 ± 0,5	14,9 ±	0,2 ±	0,3 ±	1,5 ±

			6,3		7,5	0,1	0,2	0,5
<i>P-2001-053</i>								
Без процедуры	8/9	2/9	15,8 ±	2,1 ± 0,6	56,4 ±	0,9 ±	0,6 ±	3,3 ±
			2,2		19,1	0,3	0,3	0,5
Крысиный IgG	9/10	4/10	20,0 ±	3,8 ± 0,5	70,1 ±	1,3 ±	0,3 ±	4,2 ±
			2,5		17,7	0,2	0,2	0,4
Анти-р35	10/10	1/10	16,5 ±	3,2 ± 0,3	93,8 ±	1,4 ±	0,8 ±	3,2 ±
			1,1		15,7	0,2	0,2	0,3
Анти-р40	10/10	2/10	13,6 ±	2,7 ± 0,5	23,2 ±	0,4 ±	0,4 ±	2,0 ±
			1,1		7,9	0,1	0,3	0,4
^a клиническая оценка (КО)								
^b кумулятивная КО								

Мышам выполняли введение в дни 10, 17 и 24, и анализировали клинические оценки с дня 0 до 70 дней после индукции ЭАЭ. Данные показаны в виде среднего показателя на группу ± СПС.

Таблица 3. Клинические оценки ЭАЭ при нейтрализации ИЛ-12 и ИЛ-23, начатой в день 30 (во время установившегося ЭАЭ)

От первого введения до 80 дней после индукции ЭАЭ

Группа	Перед Тх ^a	Смертность	Кумулятивная КО ^b	КО/день	Максимальная	Минимальная	Кол-во рецидивов	Тяжесть рецидива
					КО	КО		
<i>P-2002-01</i>								
Без процедуры	2,7 ±	1/5	132,9 ±	3,3 ±	4,1 ±	2,4 ±	0,6 ±	3,7 ±
	0,6		29,3	0,3	0,2	0,5	0,4	0,0
Анти-р35	2,3 ±	1/5	135,9 ±	2,7 ±	3,8 ±	1,8 ±	2,0 ±	3,7 ±
	0,7		16,5	0,3	0,4	0,3	0,4	0,3
Анти-р40	2,0 ±	1/6	75,6 ±	1,9 ±	2,8 ±	1,0 ±	0,7 ±	2,5 ±
	0,2		16,1	0,3	0,5	0,4	0,3	1,0
<i>P-2002-093</i>								
Крысиный IgG	1,7 ±	1/5	87,7 ±	2,1 ±	3,7 ±	1,2 ±	1,5 ±	3,8 ±
	0,8		16,4	0,2	0,4	0,5	0,5	1,0
Анти-р35	1,9 ±	1/5	98,2 ±	2,2 ±	3,7 ±	1,4 ±	1,5 ±	3,3 ±
	0,7		9,7	0,1	0,4	0,4	0,3	0,2
Анти-р40	2,4 ±	0/5	71,7 ±	1,5 ±	2,9 ±	0,8 ±	1,3 ±	2,7 ±
	0,8		21,	0,4	0,6	0,5	0,3	0,6

^a средняя клиническая оценка в группе в первый день введения (Тх)

^b клиническая оценка (КО)

Таблица 4. Остатки, способствующие связыванию эпитопа mAb к p40 на ИЛ-12/p40

Номер	Остаток	sf	Коэффициент sf
15	Trp	94,2	0,36
17	Pro	69,3	0,46
18	Asp	132,9	0,86
19	Ala	27,7	0,22
20	Pro	131,5	0,88
21	Gly	18,7	0,21
23	Met	142,4	0,66
40	Leu	32,7	0,16
41	Asp	69	0,45
42	Gln	145,8	0,77
43	Ser	58,2	0,46
45	Glu	139,2	0,74
46	Val	95,8	0,57
47	Leu	95	0,48
54	Thr	77,2	0,51
55	Ile	32,7	0,17
56	Gln	111	0,58
58	Lys	69,2	0,32
59	Glu	83,2	0,44
60	Phe	113,3	0,51
61	Gly	68,2	0,77
62	Asp	41,3	0,27

Таблица 5. Остатки на mAb к p40, участвующие в связывании с эпитопом ИЛ-12/p40

Остатки тяжелой цепи	1. Остатки легкой цепи
S28	D1
T31	S30
Y32	W32
W33	Y49
D57	S56
R59	N92
R98	I93
R99	Y94
R100	
F101	
G102	
Q103	

Пример 5. Результаты клинических исследований с возрастанием интервалов между введениями дозы

Устекинумаб изучали в рандомизированном, двойном слепом, многоцентровом исследовании фазы 3b с контролем активным препаратом, с 4-недельным периодом скрининга, вводным периодом с открытым лечением с недели 0 до недели 28, периодом лечения в двойном слепом режиме с недели 28 до недели 104, периодом после лечения до недели 116 и последующим наблюдением для надежности путем беседы по телефону или посещения центра исследования на неделе 124 (см. фиг. 5: "Схема исследования"). Название исследования: "Рандомизированное, двойное слепое, многоцентровое исследование фазы 3b с контролем активным препаратом, для оценки тактики с индивидуальным подбором введения поддерживающей дозы у субъектов с бляшечным псориазом средней и тяжелой степени (PSTELLAR)", с номером протокола: CNT01275PSO3009. На фиг. 5: НО=пациент с отсутствием эффекта лечения на в данный момент времени; Р=рандомизация пациентов с наличием эффекта лечения [определяются как имеющие оценку PGA < 2] на неделе 28 (субъектам с отсутствием эффекта лечения [определяются как имеющие оценку PGA ≤ 2] на неделе 28 будет прекращено введение дальнейших инъекций исследуемого агента; за ними будут наблюдать для надежности в течение по меньшей мере 20 недель после последней инъекции исследуемого агента, после чего их выведут из исследования); УСТ=устекинумаб; Нд=недели.

Всех субъектов, включенных в исследование, подвергали воздействию устекинумаба. При каждом посещении для введения инъекции до недели 28 субъектам с исходной массой тела 100 кг вводили одну инъекцию (устекинумаб 45 мг), а субъектам с исходной массой тела > 100 кг вводили 2 инъекции (устекинумаб 45 мг+устекинумаб 45 мг). При каждом посещении для введения инъекции от недели 28 до недели 104 субъектам с исходной массой тела ≤ 100 кг вводили одну инъекцию (устекинумаб 45 мг или плацебо), а субъектам с исходной массой тела > 100 кг, вводили 2 инъекции (устекинумаб 45 мг+устекинумаб 45 мг, или плацебо+плацебо) в зависимости от распределения в группу по варианту лечения и посещения для инъекции (см. табл. 7: "График введения исследуемого агента"). В ходе исследования вводили дозу исследуемого агента, которую определили на основании исходной массы тела. На неделе 28 пациентов с наличием эффекта лечения, определенных как субъекты с PGA с очищением (0) или минимальными проявлениями (1), рандомизировали в соотношении 4 к 1 в 2 группы, а всех пациентов с отсутствием эффекта (оценка PGA > 2) вывели из исследования.

Группа 1 (n=76): Начиная с недели 28, субъекты получали поддерживающую дозу устекинумаба

через фиксированные интервалы 1 р/12 нд до конца исследования (т. е. на неделях 28, 40, 52, 64, 76, 88 и 100).

Группа 2 (n=302): Начиная с недели 28, субъектам вводили поддерживающую дозу через индивидуально подобранные интервалы. Период между инъекциями исследуемого ЛС увеличивали с помощью инъекций плацебо, чтобы определить индивидуально подобранный интервал между введениями поддерживающей дозы. Интервал между введениями дозы исследуемого ЛС для каждого субъекта определяли путем оценки сохранения эффекта лечения без получения инъекции исследуемого ЛС с шагом 4 недели до тех пор, пока не наблюдалась потеря эффекта по оценке PGA. В этот момент времени для субъектов принимали интервал между введениями дозы ЛС, определенный как самый долгий интервал, за время которого сохранялся эффект по оценке PGA (т.е. на 4 недели короче, чем в момент времени, когда отмечали потерю эффекта), либо максимальный интервал между введениями дозы, составляющий 24 недели, если эффект сохранялся в течение 24 недель. Таким образом, у субъектов из группы 2 были исследованы четыре разных интервала между введениями дозы, при этом соответственные группы по варианту лечения были обозначены как группы 2a, 2b, 2c и 2d.

а) Субъекты с первой потерей эффекта (оценка PGA \leq 2) через 16 недель после инъекции на неделе 16 (посещение на неделе 32) будут получать устекинумаб 1 р/12 нд на посещениях для введения дозы, начиная с недели 32 и до недели 104 (т.е. на неделях 32, 44, 56, 68, 80, 92 и 104).

б) Субъекты с первой потерей эффекта (оценка PGA \leq 2) через 20 недель после инъекции на неделе 16 (посещение на неделе 36) будут получать устекинумаб 1 р/16 нд на посещениях введения дозы, начиная с недели 36 и до недели 104 (т.е. на неделях 36, 52, 68, 84 и 100).

в) Субъекты с первой потерей эффекта (оценка PGA \leq 2) через 24 недели после инъекции на неделе 16 (посещение на неделе 40) будут получать устекинумаб 1 р/20 нд на посещениях введения дозы, начиная с недели 40 и до недели 104 (т. е. на неделях 40, 60, 80 и 100).

д) Субъекты без потери эффекта (оценка по шкале PGA $<$ 2) в течение 24 недель после инъекции на неделе 16 (посещение на неделе 40) будут получать устекинумаб 1 р/24 нд на посещениях введения дозы, начиная с недели 40 и до недели 104 (т. е. на неделях 40, 64 и 88).

Во время периода лечения в двойном слепом режиме субъекты из групп 1 и 2 получали инъекции плацебо, сколько было необходимо для сохранения маскировки интервала между введениями дозы. Субъекты в группе 2 должны были получать за время рандомизированного периода исследования не менее 3 циклов введений поддерживающей дозы через индивидуально подобранные интервалы (см. табл. 7: "График введения исследуемого агента").

Рандомизация: На неделе 28 субъекты со статичной оценкой PGA с очищением (0) или минимальными проявлениями (1) были рандомизированы, по методу случайной перестановки блоков, в соотношении 1: 4 либо в группу 1 (утвержденная схема введения поддерживающей дозы 1 р/12 нд), либо в группу 2 (схема введения поддерживающей дозы с индивидуально подобранными интервалами). Рандомизация была стратифицирована по исходной массе тела субъекта [\leq 100 кг или $>$ 100 кг] и по оценке PGA [0 или 1] на неделе 28.

Продолжительность лечения/продолжительность испытания:

Субъектам вводили исследуемый агент с недели 0 до недели 104.

После этого за субъектами наблюдали в течение по меньшей мере дополнительных 20 недель, с последним посещением в рамках исследования на неделе 124.

Первичный набор анализов на эффективность: Первичный анализ эффективности проводили для всех субъектов, рандомизированных на неделе 28 в одну из двух групп по схемам лечения (группа 1 или группа 2).

Первичные параметры эффективности/первичный момент времени

Первичной конечной точкой является число посещений, на которых субъекты достигли статичной оценки PGA с очищением (0) или минимальными проявлениями (1) между неделями 88 и неделями 112 (интервал оценки), для субъектов, рандомизированных на неделе 28. Оценочные посещения проводили каждые 4 недели на протяжении интервала оценки.

Основные вторичные параметры эффективности

Доля субъектов со статичной оценкой PGA очищение (0) или минимальные проявления (1) и ее 95% доверительный интервал по посещениям с недели 28 до недели 112, для субъектов, рандомизированных на неделе 28.

Число посещений, к которым субъекты, рандомизированные на неделе 28, достигли эффекта лечения по оценке PASI 75 между неделями 88 и неделями 112.

Доля субъектов с индексом PASI 75 баллов и ее 95% доверительный интервал по посещениям с недели 28 до недели 112, для субъектов, рандомизированных на неделе 28.

Ожидаемый размер эффекта и планируемый размер выборки

На основании данных, полученных в исследовании PHOENIX 1 и PHOENIX 2, ожидалось, что приблизительно 35% из 500 набранных в исследование субъектов не будут соответствовать критериям рандомизации на неделе 28, из-за прекращения участия в исследовании до недели 28 или отсутствия эффек-

та на неделе 28 в виде оценки PGA очищение (0) или минимальные проявления (1). Прогнозируемые 325 субъектов, подходящих для рандомизации на неделе 28 в соотношении 1: 4, обеспечивали бы приблизительно 65 субъектов в группе 1 (введение поддерживающей дозы 1 р/12 нед) и приблизительно 260 субъектов в группе 2 (введение поддерживающей дозы через индивидуально подобранные интервалы).

Исследование планировали для оценки частоты эффектов в 2 группах поддерживающего введения устекинумаба у более чем 300 субъектов. Всего приблизительно 325 рандомизированных субъектов обеспечивали бы 95% доверительный интервал от 64,9 до 85,9% вокруг эффекта 75% в группе 1 (n=65; введение поддерживающей дозы 1 р/12 нед) и 95% доверительный интервал от 54,0% до 66,0% вокруг эффекта 60% в группе 2 (n=260; введение поддерживающей дозы через индивидуально подобранные интервалы) во время периода оценки между неделями 8 и 112.

Главная цель:

Главная цель этого исследования состояла в том, чтобы оценить влияние продления интервалов между введениями поддерживающей дозы до более длительных, чем каждые 12 недель (1 р/12 нед), на клиническую эффективность устекинумаба.

Краткий обзор основных результатов

CNTO1275PSO3009 представляет собой рандомизированное, двойное слепое, многоцентровое исследование фазы 3в с контролем активным препаратом на взрослых субъектах в возрасте от ≥ 18 до ≤ 80 лет с бляшечным псориазом средней и тяжелой степени, определенным по оценке PGA ≥ 3 и с вовлечением площади поверхности тела (BSA) по меньшей мере 10%, которые были кандидатами для проведения фототерапии или системного лечения псориаза.

Исследование началось с выявления первого субъекта 8 марта 2012 г. Всего было выявлено 611 субъектов, из которых в исследование набрали 478 субъектов, и на неделе 28 провели рандомизацию 378 субъектов в две группы по варианту лечения: в одной вводили поддерживающую дозу по схеме с фиксированным интервалом 1 р/12 недель (группа 1), а во второй вводили поддерживающую дозу по схеме с индивидуально подобранными интервалами (группа 2). Исследование проводили в 42 центрах в США. Итоговая база данных включает данные, полученные до недели 124 для всех набранных в исследование субъектов. Первому субъекту дозу препарата вводили 22 марта 2012 г. Рандомизация первого субъекта состоялась 4 октября 2012 г., а рандомизация последнего субъекта состоялась 16 сентября 2013 г.

Всего было выявлено 611 субъектов, и окончательно набрали в исследование 478 субъектов. Всего 378 пациентов с наличием эффекта лечения (PGA 0/1) прошли рандомизацию на неделе 28 (доля рандомизации составляет 80%). Эта доля рандомизации была выше, чем ожидалось, что могло быть частично обусловлено субъективным характером оценки PGA на неделе 28. Итоговая база данных включала данные, полученные до недели 124 для всех набранных в исследование субъектов.

Распределение субъектов по группам лечения и возможность оценки субъектов

Всего 478 субъектов было набрано в исследование, и они получали лечение устекинумабом во время вводного периода с открытой этикеткой на неделях 0-28 в соответствии с утвержденными в США рекомендациями по дозированию на основе массы тела (устекинумаб 45 мг, n=308; устекинумаб 90 мг, n=170). Всего 378 субъектов были рандомизированы на неделе 28 в 2 группы: группа введения поддерживающей дозы с фиксированным интервалом каждые 12 недель (группа 1), и группа введения поддерживающей дозы с индивидуально подобранными интервалами (группа 2). При соотношении рандомизации 1: 4, всего 76 субъектов были рандомизированы в группу 1, и 302 субъекта были рандомизированы в группу 2. Распределение пациентов в группе 2, получавшей поддерживающую дозу в каждом из 4 возможных интервалов между введениями дозы, было следующим: 1 р/12 нед, n=84; 1 р/16 нед, n=61; 1 р/20 нед, n=51 и 1 р/24 нед, n=84.

Демографические данные субъектов

Из всех набранных в исследование субъектов большинство принадлежало к европеоидной расе (84,9%), 63,0% участников были мужского пола, и медианный возраст составлял 46 лет. Из всех рандомизированных субъектов большинство принадлежало к европеоидной расе (76,7% в группе 1 и 89,4% в группе 2) и мужскому полу (57,9% в группе 1 и 63,6% в группе 2). Медианный возраст составлял 42 года в группе 1 и 46 лет в группе 2.

Характеристики заболевания у субъектов

Для всех набранных субъектов, в начале исследования медианная продолжительность псориаза составляла 13,3 года, медианный процент вовлеченной площади поверхности тела (BSA) составлял 19,0%, медианный индекс PASI составлял 16,0 балла. Всего у 35,8% субъектов оценка PGA составляла ≥ 4 баллов, что соответствовало тяжелой степени заболевания; таким образом, у большинства субъектов была умеренная степень заболевания, что определялось исходной оценкой PGA 3. Исходные характеристики заболевания у рандомизированных субъектов в группах 1 и 2 были по существу сравнимыми и были сходны с характеристиками заболевания во всей набранной в исследование популяции. Однако субъекты в группе 1 в среднем имели большую продолжительность заболевания (17,5 года) и больший исходный показатель BSA пораженной кожи (21,0%) по сравнению с субъектами в группе 2 (11,8 года и 17,0% BSA соответственно).

Анамнез медикаментозного лечения псориаза у субъектов

Из всех включенных в исследование субъектов 32,4% ранее проходили фототерапию, 35,4% ранее получали обычную системную терапию (включая PUVA, метотрексат, ацитретин, циклоспорин, микофенолата мофетил) и 31,0% ранее получали терапию биопрепаратами. По существу, среди субъектов рандомизированных в группы 1 и 2, наблюдались сходные пропорции. Из всех включенных в исследование субъектов 69,0% ранее не получали терапию биопрепаратами. Предыдущее применение обычных агентов системной терапии было немного выше у субъектов в группе 1 (39,5%) по сравнению с группой 2 (31,1%). Более высокая доля субъектов в группе 2 (74,5%) по сравнению с группой 1 (64,5%) ранее не получала терапию биопрепаратами.

Прекращение применения исследуемого агента

Во время открытого периода (с недели 0 до недели 28) 20,9% (100/478) включенных в исследование субъектов прекратили применение исследуемого агента. По существу сходные доли субъектов прекратили применение исследуемого агента в группе с дозой 45 мг (19,8%) и в группе с дозой 90 мг (22,9%). Наиболее частой причиной прекращения применения препарата была невозможность достижения статичной оценки PGA очищение (0) или минимальные проявления (1) на неделе 28 [12,1% (58/478)], чтобы соответствовать переходу в рандомизированную часть исследования. Во время периода рандомизированного введения дозы (с недели 28 до недели 104) 22,2% (84/378) рандомизированных субъектов прекратили применение исследуемого агента. Наиболее частой причиной прекращения применения исследуемого агента была невозможность последующего наблюдения субъектов (7,9%) в группе 1 и неблагоприятное явление (5,0%) или отзыв согласия (5,0%) у субъектов в группе 2.

Во время периода рандомизированного лечения (с недели 28 до недели 104) 22,2% (84/378) рандомизированных субъектов прекратили применение исследуемого агента. Показатели прекращения применения препарата в группах 1 и 2 были сходными (таблица 8). Наиболее частой причиной прекращения применения исследуемого агента была невозможность последующего наблюдения субъектов (7,9%) в группе 1 и неблагоприятное явление (5,0%) или отзыв согласия (5,0%) у субъектов в группе 2.

Выводы об эффективности

Первичная конечная точка

В группе 2 было меньше посещений (средняя разность составляла -0,46), на которых субъекты получали оценку PGA очищение (0) или минимальные проявления (1) (PGA 0/1) в интервале оценки с недели 88 до недели 112, по сравнению с группой 1 (в среднем, в группе 1 было 4,5 посещения с оценкой PGA 0/1, а в группе 2 было 4,1 посещения с оценкой PGA 0/1).

Следует отметить, что в течение этого интервала в группе 1 (55,3%) наблюдалась большая доля субъектов с оценкой по шкале PGA 0/1 во время всех 7 посещений в интервале оценки, по сравнению с группой 2 (38,1%).

Вторичные конечные точки

В группе 2 было меньше посещений (средняя разность составляла -0,32), на которых субъекты получали оценку PASI 75 в период между неделями 88 и неделями 112, по сравнению с группой 1 (в среднем, в группе 1 было 5,8 посещения с оценкой PASI 75, а в группе 2 было 5,4 посещения с оценкой PASI 75). Количество посещений, на которых субъекты имели эффект лечения PASI 75 в период интервала оценки, было одинаковым в группе 1 (69,7%) и группе 2 (66,9%).

Эффекты лечения с течением времени после рандомизации

Во время периода определения интервала между введениями дозы (с недели 28 до недели 40) частота эффектов с оценкой PGA 0/1 снижалась в обеих группах 1 и 2. Как и ожидалось, более значительное снижение наблюдалось в группе 2 по сравнению с группой 1, поскольку определение индивидуально подобранных интервалов между введениями дозы было основано на ухудшении состояния субъектов в группе 2. После недели 40 частота эффекта по оценке PGA в обеих группах по существу сохранялась до недели 112. Частота эффекта на большинстве посещений была немного выше в группе 1 по сравнению с группой 2.

В целом, с недели 28 до недели 112 модели эффектов по оценке PASI 75 отражали эффекты по оценке PGA.

Доли субъектов, достигших эффектов по оценкам PGA очищение (0), PASI 90 или PASI 100 до недели 112, были по существу выше в группе 1 по сравнению с группой 2. Величина различий между группами 1 и 2 была выше для этих конечных точек по сравнению с конечными точками PGA 0/1 и PASI 75.

Выводы о безопасности

Для рандомизированных участников исследования в составе 378 субъектов, с недели 28 до недели 124:

Доля субъектов, испытывавших 1 или более неблагоприятное явления (НЯ), была сравнимой в двух группах лечения (72,4% в группе 1 и 72,8% в группе 2).

Наиболее часто отмечались НЯ в системно-органном классе (SOC) инфекционных и паразитарных заболеваний, как для группы 1 (46,1%) так и для группы 2 (48,7%; 48,1% совокупно для групп 1 и 2); наиболее частыми НЯ в этом SOC были инфекции верхних дыхательных путей (ИВДП) (27,6% в группе 1 и 19,5% в группе 2) и назофарингит (9,2% в группе 1 и 13,2% в группе 2).

Доля субъектов с одним или более серьезными неблагоприятными явлениями (СНЯ) составила 9,2% в группе 1 и 7,0% в группе 2.

Доли субъектов, которые прекратили применение исследуемого агента из-за одного или более НЯ (ППНЯ), составили 6,6% в группе 1 и 5,6% в группе 2.

Доли субъектов с одной или более инфекциями были сравнимыми в двух группах (48,7% в группе 1 и 45,7% в группе 2). Наиболее частыми инфекциями в объединенной группе были ИВДП (27,6% в группе 1 и 19,5% в группе 2) и назофарингит (9,2% в группе 1 и 13,2% в группе 2).

У субъектов из группы 1 не было отмечено серьезных инфекций; серьезные инфекции были отмечены у 3 субъектов в группе 2.

Исследователи сообщали о двух тяжелых сердечно-сосудистых НЯ (ССНЯ): 1 инфаркт миокарда (у субъекта, получавшего дозу 90 мг в группе 2 с интервалом между введениями дозы 1 р/24 недели) и 1 инсульт (у субъекта, получавшего дозу 45 мг в группе 2 с интервалом между введениями дозы 1 р/24 недели).

Из 378 рандомизированных субъектов у 10 было зарегистрировано по меньшей мере одно злокачественное новообразование: у 6 субъектов - немеланомный рак кожи (NMSC) и еще у 4 субъектов - другие злокачественные новообразования.

У субъектов в группе 1 не было зарегистрировано реакций в месте инъекции (ISR). В группе 22,0% инъекций плацебо и 0,4% инъекций препарата в дозе 45 мг сопровождалась ISR; все они имели слабую интенсивность.

Значительные отклонения от нормы общего и биохимического анализов крови встречались редко.

Для общей популяции из 478 субъектов, набранных в исследование, с недели 0 до недели 124:

За время исследования было зарегистрировано две смерти. 1 смерть наступила по естественным причинам, а другая вследствие острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). Во время открытого периода не было зарегистрировано ни одной смерти (с недели 0 до недели 28).

До недели 124 у 39 субъектов (8,2% всей набранной в исследование популяции) наблюдалось одно или более СНЯ.

Серьезные инфекции были зарегистрированы у 7 субъектов (1,5%).

Не было зарегистрировано каких-либо оппортунистических инфекций или случаев активного туберкулеза (ТВ).

До недели 124 7,3% субъектов из всех набранных в исследование субъектов прекратили применение исследуемого агента из-за 1 или более НЯ.

Во время проведения исследования не было зарегистрировано возможных анафилактических или возможных болезненных сывороточных реакций, связанных с применением устекинумаба.

Всего у 12 набранных в исследование субъектов (2,5%) было зарегистрировано одно или более злокачественных новообразований (включая NMSC и другие злокачественные новообразования): у 5 субъектов - базальноклеточная карцинома (БСС), у 4 субъектов - плоскоклеточная карцинома кожи (ССК), у 6 субъектов - другие злокачественные новообразования.

У 3 субъектов было зарегистрировано 3 МАСЕ (0,6%): инфаркт миокарда у 2, и инсульт у 1.

Выводы

Эффективность, как правило, лучше поддерживалась у пациентов с наличием эффекта лечения на неделе 28, рандомизированных в группу с фиксированным интервалом введения поддерживающей дозы (1 р/12 нед), по сравнению с рандомизированными в группу введения поддерживающей дозы с индивидуально подобранными интервалами (1 р/12 нед, 1 р/16 нед, 1 р/20 нед, или 1 р/24 нед), особенно для конечных точек эффективности с высоким уровнем (PGA 0, PASI 90 или PASI 100).

В течение периода исследования не наблюдалось никаких новых сигналов безопасности, и выводы о безопасности были сходными между двумя рандомизированными группами.

Выполнение других анализов для лучшего определения профилей субъектов в группе 2, у которых сохранялся устойчивый эффект лечения при более длительных интервалах между введениями дозы, путем анализов РНК и ДНК, продолжается.

Степень воздействия

Представлена сводная информация о кумулятивной дозе устекинумаба, полученной рандомизированными субъектами с недели 28 до недели 124. Среднее число введений исследуемого ЛС было таким, как ожидалось для каждой схемы лечения и периода времени (6,1 для группы 1 и 4,1 для группы 2).

Анализ первичной конечной точки

Первичная конечная точка

Первичной конечной точкой этого исследования является число посещений, на которых субъекты имели статичную оценку PGA очищение (0) или минимальные проявления (1) между неделями 88 и неделей 112 (интервал оценки), для субъектов, рандомизированных на неделе 28 в группы 1 и 2.

Интервал оценки включал всего 7 посещений, которые проводили каждые 4 недели. Среднее число посещений (95% доверительный интервал) в которых субъекты имели статичную оценку PGA очищение (0) или минимальные проявления (1) во время интервала оценки, вычисляли для группы 1 и группы 2. С предположением нормальных распределений был предоставлен 95% доверительный интервал различия

средних показателей для первичной конечной точки.

Число посещений, на которых субъекты достигли оценки PGA (0) или минимальные проявления (1) между неделями 88 и неделей 112, суммировано в табл. 9 ниже.

В группе 2 было меньше посещений (средняя разница составляла -0,46), на которых субъекты имели оценку PGA очищение (0) или минимальные проявления (1) во время интервала оценки, по сравнению с группой 1. Кроме того, в группе 1 (55,3%) наблюдалась большая доля субъектов с оценкой PGA очищение (0) или минимальные проявления (1) во время всех 7 посещений во время интервала оценки, по сравнению с группой 2 (38,1%). Интересно отметить, что в течение этого интервала в группе 1 (55,3%) наблюдалась большая доля субъектов с оценкой PGA 0/1 во время всех 7 посещений во время интервала оценки, по сравнению с группой 2 (38,1%). Кроме того, доли субъектов, у которых не было посещений с эффектом лечения по оценке PGA очищение (0) или минимальные проявления (1) во время интервала оценки, были сходными для группы 1 (22,4%) и группы 2 (24,2%).

Анализ в подгруппах

В общем, не было существенной разницы в числе посещений, на которых субъекты достигли статичной оценки PGA очищение (0) или минимальные проявления (1) (PGA 0/1) во время интервала оценки в разных анализируемых подгруппах групп 1 и 2. Подгруппы определяли на основании исходных демографических характеристик, исходных характеристик заболевания и анамнеза медикаментозного лечения. Небольшая изменчивость наблюдалась в числе посещений, на которых субъекты в некоторых подгруппах достигли оценки PGA 0/1 между неделями 88 и неделей 112; наблюдаемая изменчивость может быть обусловлена ограниченным размером выборки в каждой подгруппе.

Анализ основной вторичной конечной точки (точек)

Основные вторичные анализы доли субъектов (95% доверительный интервал) с эффектом лечения по оценке PGA очищение (0) или минимальные проявления (1) или по оценке PASI 75 с течением времени проводили на основании эффективности у подлежащих оценке субъектов, рандомизированных на неделе 28, в соответствии с распределением в группу по варианту лечения, независимо от фактического полученного лечения. Для основных вторичных конечных точек числа посещений, на которых субъекты достигли эффекта лечения по оценке PASI 75 во время интервала оценки между неделями 88 и неделей 112, применяли те же правила обработки пропущенных данных, которые применяли в первичном анализе, так чтобы в анализ были включены все рандомизированные субъекты.

Эффекты лечения по оценке PGA очищение (0) или минимальные проявления (1) с недели 28 до недели 112 в популяции рандомизированных субъектов

Эффекты лечения по оценке PGA очищение (0) или минимальные проявления (1) с течением времени с недели 28 до недели 112 для групп 1 и 2 суммированы на фиг. 6. Во время периода определения интервала между введениями дозы (с недели 28 до недели 40) частота эффектов с оценкой PGA 0/1 снижалась в обеих группах (фиг. 6; данные не опубликованы). Как и ожидалось, более значительное снижение наблюдалось в группе 2 по сравнению с группой 1, поскольку определение индивидуально подобранных интервалов между введениями дозы было основано на ухудшении состояния субъектов в группе 2. На неделе 40 доли субъектов, достигших оценки PGA 0/1, составили 67,1% для группы 1 и 56,4% для группы 2. После недели 40 была отмечена некоторая периодичность эффектов, основанная на вариациях в моменты времени между инъекциями 1 р/12 недель, как это наблюдалось в предыдущих клинических испытаниях устекинумаба, причем более заметная в группе 1. Тем не менее, частота эффектов в целом поддерживалась на посещениях "между" 1 р/12 недель (например, на неделе 40, 52, 64 и т. п.), на которые назначалась следующая инъекция устекинумаба. Частота эффектов для группы 2 также по существу поддерживалась с течением времени до недели 112. Частота эффектов на большинстве посещений была немного выше в группе 1, по сравнению с группой 2 (фиг. 6).

Число посещений, к которым субъекты, рандомизированные на неделе 28, достигли эффекта лечения по оценке PASI 75 между неделями 88 и неделей 112.

Число посещений во время интервала оценки, на которых субъекты имели эффект лечения по оценке PASI 75, суммировано в табл. 10 ниже. Подобно соответствующим анализам, основанным на эффектах лечения по оценке PGA, в группе 2 было немного меньше посещений, на которых субъекты имели эффект по оценке PASI 75, по сравнению с группой 1 (средняя разница составляла -0,32 посещения); в среднем, группа 1 имела 5,8 посещения с оценкой PASI 75, а группа 2 имела 5,4 посещения с оценкой PASI 75. Более того, наблюдались аналогичные доли пациентов с эффектом по оценке PASI 75 в группе 1 (69,7%) и группе 2 (66,9%) для каждого возможного числа посещений с эффектом (составляющего от 0 до 7).

Подобные результаты для числа посещений во время интервала оценки, на которых субъекты имели эффект по оценке PASI 75, наблюдались в анализах подгрупп.

Доля субъектов с эффектом лечения по оценке PASI 75 по посещениям с недели 28 до недели 112 для субъектов, рандомизированных на неделе 28

Частота эффектов лечения по оценке PASI 75 с течением времени с недели 28 до недели 112 суммирована на фиг. 7. В общем, модель эффектов лечения по оценке PASI 75 с течением времени с недели 28 до недели 112 сравнима с эффектами по оценке PGA 0/1 (фиг. 6; данные не опубликованы). Однако

снижение частоты эффектов по оценке PASI 75 во время периода определения интервала между введениями дозы с недели 28 до недели 40 менее сравнимо с наблюдениями для эффектов по оценке PGA в этот период. После недели 40 частота эффектов для группы 1 и группы 2 по существу сохранялась до недели 112. Частота эффектов в группе 1 на большинстве посещений с недели 44 до недели 112 была немного выше в группе 1, по сравнению с группой 2. Отмечалось, что модель введения с периодичностью 1 p/12 недель для эффектов по оценке PASI 75, которая была более выраженной для группы 1, аналогична тому, что наблюдалось для эффектов по оценке PGA 0/1. Поскольку шкала PASI включает оценку как площади поверхности тела, так и качественных элементов (эритема, шелушение, уплотнение), она может служить более основательным представлением общей нагрузки заболевания с течением времени, по сравнению с использованием только шкалы PGA, в которой учитываются только качественные особенности псориаза.

Другие вторичные конечные точки эффекта лечения по оценке PGA

Оценка PGA, очищение (0) и оценка PGA легкая степень или улучшение (≤ 2) с недели 28 до недели 112 для субъектов, рандомизированных на неделе 28

Частота эффектов лечения по оценке PGA очищение (0) с течением времени с недели 28 до недели 112 суммирована на фиг. 8. Разделение между кривыми эффекта лечения для группы 1 (схема введения поддерживающей дозы устекинумаба 1 p/12 нед) и группы 2 (схема введения поддерживающей дозы устекинумаба с индивидуально подобранными интервалами) было заметным уже на первом посещении после рандомизации (неделя 32), причем частота эффектов с течением времени для группы 1 была последовательно выше этого показателя в группе 2. Различия в эффектах по оценке PGA 0 между двумя группами были более выраженными, чем для эффектов по оценкам PGA 0/1 или PASI 75, особенно в более поздние моменты времени. Оценки PGA легкая степень или улучшение ($\text{PGA} \leq 2$) с течением времени с недели 28 до недели 112 были сопоставимы для обеих групп и в целом были стабильными с течением времени.

Эффекты лечения по оценке PGA с недели 28 до недели 112 для субъектов, которым вводили поддерживающую дозу по схеме с индивидуально подобранными интервалами (группа 2)

Оценки PGA очищение (0), оценки PGA очищение (0) или минимальные проявления (1) и оценки PGA легкая степень или улучшение (≤ 2) с недели 28 до недели 112 определяли в группе 2 (данные не опубликованы). Что касается эффектов по оценке PGA очищение (0) и очищение или минимальные проявления (0 или 1), как и ожидалось, у субъектов в группе 2, в подгруппах применения препарата 1 p/20 недель и 1 p/24 недели наблюдалась лучшая эффективность, чем у субъектов группы 2, в подгруппах применения препарата 1 p/12 недель и 1 p/16 недели. Кроме того, данные показывают, что у более чем 25% пациентов с изначальным наличием эффекта лечения, рандомизированных в группу 2, в конечном итоге интервал между введениями дозы увеличился до 1 p/24 недели, и у большинства этих субъектов эффект с течением времени сохранялся.

Другие вторичные конечные точки эффекта лечения по оценке PASI

Эффекты лечения по оценке PASI с недели 28 до недели 112 для субъектов, которым вводили поддерживающую дозу по схеме с индивидуально подобранными интервалами (группа 2):

Здесь определяют оценки PASI 50, PASI 75, PASI 90 и PASI 100 с течением времени с недели 28 до недели 112 для группы 2 (данные не опубликованы). Что касается эффектов по оценке PASI 75, PASI 90 и PASI 100, как и ожидалось, у субъектов в группе 2, в подгруппе со схемой лечения 1 p/24 недели наблюдалась лучшая эффективность, чем у субъектов в других подгруппах группы 2.

Число посещений, к которым субъекты с введением поддерживающей дозы по схеме с индивидуально подобранными интервалами (группа 2), имели эффект лечения по оценке PASI 75 между неделями 88 и неделей 112

Результаты для числа посещений, на которых субъекты из группы 2 имели эффект по оценке PASI 75 между неделями 28 и неделей 112, суммированы в табл. 11 ниже. Среднее число посещений, на которых субъекты имели эффект по оценке PASI 75 между неделями 88 и неделей 112, повышалось параллельно с удлинением интервала между введениями дозы.

Эффекты лечения по оценке PASI 90 с недели 28 до недели 112 для субъектов, рандомизированных на неделе 28

Частота эффектов по оценке PASI 90 с недели 28 до недели 112 суммирована на фиг. 9 (данные не опубликованы). Разделение между кривыми эффекта лечения для группы 1 (схема введения поддерживающей дозы устекинумаба 1 p/12 нед) и группы 2 (схема введения поддерживающей дозы устекинумаба с индивидуально подобранными интервалами) также наблюдалось, начиная с первого посещения после рандомизации (неделя 32), сохраняясь до недели 108 (фиг. 9). Доля субъектов, которые достигли эффекта по оценке PASI 90 и у которых он сохранялся, была выше в группе 1, по сравнению с группой 2. Разделение между кривыми эффекта по оценке PASI 90 для группы 1 и группы 2 более выражено, по сравнению с результатами для кривых эффекта по оценкам PGA 0/1 и PASI 75.

Безопасность

Оценки безопасности сосредоточены в двойной слепой части исследования, длящейся с недели 28 до недели 124, поскольку можно выполнить сравнения между рандомизированными группами по вари-

анту лечения. Также представлены вспомогательные данные до недели 124. В табл. 12 ниже представлен обзор ключевых результатов в отношении безопасности с недели 28 до недели 124.

Все неблагоприятные явления

У получавших лечение субъектов, рандомизированных на неделе 28, с недели 28 до недели 124:

Доли субъектов, испытывавших 1 или более НЯ, были сходными в группе 1 (72,4%) и группе 2 (72,8%); см. табл. 12 (данные не опубликованы). Наиболее часто отмечались НЯ в системно-органном классе (SOC) инфекционных и паразитарных заболеваний, как для группы 1 (46,1%) так и для группы 2 (48,7%; 48,1% совокупно для групп 1 и 2).

Наиболее частыми НЯ в этом SOC были ИВДП (27,6% в группе 1 и 19,5% в группе 2) и назофарингит (9,2% в группе 1 и 13,2% в группе 2).

Для всех включенных в исследование субъектов, с недели 0 до недели 124:

Всего 72,6% субъектов испытывали 1 или более НЯ. Аналогично, наиболее часто регистрируемыми были НЯ в SOC инфекционных и паразитарных заболеваний (49,8%), причем наиболее часто регистрируемые НЯ представлены ИВДП (19,9%) и назофарингитом (13,8%).

Случаи смерти, другие серьезные неблагоприятные явления и другие значительные неблагоприятные явления

Случаи смерти

За время до недели 124 было зарегистрировано два случая смерти. У одного субъекта (001009010) смерть наступила по естественным причинам. Этому субъекту вводили устекинумаб в дозе 90 мг, и он был рандомизирован в группу 1 с фиксированным интервалом введения 1 р/12 недель.

Другой субъект (001029005) умер вследствие острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). У этого субъекта перед включением в исследование наблюдалось повышенное число тромбоцитов, и через 2 года после введения первой дозы исследуемого препарата у него диагностировали ОМЛ. Этому субъекту вводили устекинумаб в дозе 90 мг, и он входил в группу 2, подгруппу с индивидуально подобранным интервалом 1 р/12 недель.

Другие серьезные неблагоприятные явления

Доли получавших лечение субъектов, рандомизированных на неделе 28, которые испытывали одно или более серьезных неблагоприятных явлений (СНЯ) до недели 124, было низким как в группе 1 (9,2%), так и в группе 2 (7,0%) (табл. 5). Не наблюдалось определенной модели СНЯ, и большинство СНЯ были зарегистрированы как одиночные и изолированные события. Из всех набранных в исследование субъектов 8,2% (39/478) испытывали 1 или более СНЯ в период с недели 0 до недели 124 (данные не опубликованы).

Неблагоприятные явления, которые привели к прекращению применения исследуемого агента

Из получавших лечение рандомизированных субъектов, доли субъектов, которые прекратили применение исследуемого агента между неделями 28 и неделями 124 из-за одного или более НЯ (ППНЯ), были низкими (6,6% в группе 1, 5,6% в группе 2) [см. табл. 12]. Не наблюдалось определенной модели НЯ, которая приводила к прекращению применения препарата, и большинство явлений были зарегистрированы как одиночные.

Из всех набранных в исследование субъектов 7,3% прекратили применение исследуемого агента из-за 1 или более НЯ между неделями 0 и неделями 124 (данные не опубликованы).

Инфекции, серьезные инфекции и инфекции, требующие лечения Из получавших лечение рандомизированных субъектов, сравнимые доли субъектов в группах 1 и 2 (48,7% и 45,7% соответственно; табл. 5) испытывали одну или более инфекций с недели 28 до недели 124. Наиболее частыми инфекциями были ИВДП (27,6% субъектов в группе 1 и 19,5% в группе 2) и назофарингит (9,2% субъектов в группе 1 и 13,2% в группе 2). В группе 1 не было зарегистрировано серьезных инфекций, а у субъектов в группе 2 были зарегистрированы 3 серьезные инфекции (табл. 12). Зарегистрированные серьезные инфекции включали 1 случай бактериальной инфекции, 1 случай цистита и 1 случай инфекции мочевыводящих путей. Инфекции, требующие лечения пероральными или парентеральными антимикробными препаратами, были зарегистрированы у 18 из 76 (23,7%) субъектов в группе 1 и у 70 из 302 (23,2%) субъектов в группе 2 (см. табл. 12). В целом, наиболее частым типом инфекции, требовавшим лечения, была ИВДП (5,3% в группе 1; 5,0% в группе 2).

Из всех набранных в исследование субъектов 47,3% испытывали 1 или более инфекций между неделями 0 и неделями 124 (данные не опубликованы). Наиболее часто регистрируемыми инфекциями были ИВДП (19,9%) и назофарингит (11,7%). Доля субъектов с одной или более серьезными инфекциями составила 1,5% (данные не опубликованы). Не сообщалось о случаях активного ТВ или оппортунистических инфекциях до недели 124.

Реакции в месте инъекции

С недели 28 до недели 124 среди субъектов в группе 1 не было зарегистрировано реакций в месте инъекции (ISR) ни при введении плацебо, ни при введении препарата в дозе 45 мг. Среди субъектов группы 2 наблюдалось 6 ISR, связанных с введением плацебо (2,0%), и 1 ISR в результате введения устекинумаба 45 мг (0,4%). Все зарегистрированные ISR имели легкую степень (данные не опубликованы).

Возможные анафилактические или возможные болезненные сывороточные реакции, связанные с применением устекинумаба

Ни один субъект до недели 124 не испытывал возможную анафилактическую реакцию или возможную болезненную сывороточную реакцию, связанную с применением исследуемого агента.

Злокачественные новообразования

Из получавших лечение рандомизированных субъектов у 10 зарегистрировано по меньшей мере одно злокачественное новообразование между неделями 28 и неделями 124 (табл. 12). У шести из 378 (1,6%) субъектов наблюдался немеланомный рак кожи (NMSC), включая 2 из 76 (2,6%) субъектов в группе 1 и 4 из 302 субъектов в группе 2 (1,3%).

У четырех из 378 (1,1%) получавших лечение рандомизированных субъектов зарегистрированы другие типы злокачественных новообразований. У одного из 76 (1,3%) субъектов в группе 1 имелся переходно-клеточный рак мочевого пузыря (доза 45 мг). У троих из 302 (1,0%) субъектов в группе 2 наблюдалось злокачественное новообразование, включая по 1 случаю каждого из рака поджелудочной железы (доза 45 мг), острого миелоидного лейкоза (доза 90 мг) и хронического миелоидного лейкоза (доза 90 мг).

Из всех набранных в исследование субъектов со злокачественными новообразованиями (включая NMSC и другие злокачественные новообразования) у 2,5% (12/478) злокачественные новообразования были зарегистрированы между неделями 0 и неделями 124. Кроме описанного выше, у получавших лечение рандомизированных субъектов было зарегистрировано три случая NMSC и 2 случая других злокачественных новообразований (1 случай рака толстого кишечника (доза 90 мг) и 1 случай рака предстательной железы (доза 90 мг)).

Сердечно-сосудистые явления

Исследователи сообщали о двух МАСЕ у получавших лечение рандомизированных пациентов с недели 28 до недели 124. У одного субъекта из группы 2 (субъект 001050002), получавшего устекинумаб в дозе 90 мг, в подгруппе с интервалом 1 р/24 недели, возник инфаркт миокарда, и у 1 субъекта из группы 2 (субъект 001027002), получавшего устекинумаб в дозе 45 мг, также в подгруппе с интервалом 1 р/24 недели, возник инсульт. Исследователи сообщили еще об одном МАСЕ, инфаркте миокарда, у субъекта, получавшего устекинумаб в дозе 45 мг (субъект 001029007), который произошел перед неделей 28.

Лабораторные показатели

У некоторых субъектов наблюдались значительные отклонения от нормы лабораторных показателей общего анализа крови, однако частота возникновения значительных отклонений от нормы лабораторных показателей была, по существу, низкой и сравнимой между группами 1 и 2 в период с недели 28 до недели 124 (данные не опубликованы). Наиболее часто регистрируемым значительным отклонением от нормы лабораторных показателей общего анализа крови было снижение числа лимфоцитов (5,3% [20/378]). Значительные отклонения от нормы лабораторных показателей общего анализа крови, происходившие более чем в 1 случае, наблюдались только в группе 2 и включали увеличение числа лейкоцитов (0,3%), снижение числа лимфоцитов (1,3%) и увеличение числа эозинофилов (0,3%).

У некоторых субъектов также наблюдались значительные отклонения от нормы биохимических показателей крови (данные не опубликованы). Частота значительных отклонений от нормы лабораторных показателей была по существу низкой в обеих группах 1 и 2. Единственным значительным отклонением от нормы, которое происходило более чем в 1 случае, было повышение активности щелочной фосфатазы, АЛТ, АСТ, и уровня общего билирубина, все из которых наблюдались с низкой частотой у субъектов в группе 2. Наиболее частым значительным отклонением от нормы, наблюдавшимся в обеих группах 1 и 2, была повышенная активность АЛТ (3,2% [12/378]).

Иммуногенность

В популяции, получавшей лечение устекинумабом, из подлежащих исследованию проб до недели 124, у 63 из 455 (13,8%) пациентов был получен положительный результат анализа на антитела к устекинумабу. Этот процент является сходным среди пациентов, получавших дозу 45 мг (n=41; 13,9%), и у получавших дозу 90 мг (n=22; 13,7%), как в группе 1 (n=7; 9,2%) так и в группе 2 (n=32; 10,6%). Большинство пациентов с наличием антител (33 из 63) имели титры $\leq 1:800$. Большинство выработанных антител (у положительных по антителам пациентов с достаточными образцами сыворотки) смогли нейтрализовать биологическую активность устекинумаба *in vitro* (47 из 62, 75,8%). При испытании интервалов между введениями дозы, которые позволяли снижать концентрации устекинумаба между инъекциями ниже количественно определяемых уровней (которые приближались к множественным циклам отмены и возобновления), не было выявлено повышенной способности к образованию антител против ЛС. Эти результаты свидетельствуют об отсутствии повышенного риска иммуногенности при возрастании интервала между введениями дозы до 24 недель.

Прогнозируемое значение PGA=0 на неделе 28

Пациенты из группы 2, у которых стабильно сохранялись клинические эффекты лечения с течением времени при 24-недельном интервале между введениями, как правило, демонстрировали высокие уровни эффекта по самым строгим критериям в течение начального вводного периода лечения. Поскольку высокая доля пациентов из подгруппы с 24-недельным интервалом между введениями дозы имела на неделе

28 оценку PGA 0 (табл.6), была признана полезность этого параметра эффекта лечения как прогнозирующего маркера способности сохранения клинического эффекта с этим интервалом. Получение на неделе 28 оценки PGA=0 коррелировало с PPV 60% в отношении сохранения оценки PGA 0 или 1 с любым интервалом между введениями дозы, превышающим 12 недель (например, 16 недель, 20 недель, 24 недели) для \leq пяти из семи посещений в периоде оценки с недели 88 до недели 112. Кроме того, PPV 44% соответствовал сохранению оценки PGA 0 или 1 при любом интервале между введениями дозы, превышающем 12 недель, на всех семи посещениях. Получение оценки PGA=0 на неделе 28 коррелировало с PPV 44% и 32% соответственно, для PGA 0 для \leq пяти из семи посещений периода оценки с недели 88 до недели 112, и всех семи посещений. Чувствительность и специфичность для этих определений варьировали в интервале 61-75%, как показано в табл.6.

Таблица 6. Возможность по оценке PGA=0 на неделе 28 прогнозировать долгосрочный эффект лечения при введении дозы 1 p/12-24 нд, в зависимости от эффекта среди всех пациентов, рандомизированных на неделе 28

интервал между введениями поддерживающей дозы	Чувствительность Специфичность			
	(TPR) ^a	(FPR) ^b	PPV ^c	NPV ^d
введение поддерживающей дозы 1 p/24 нд				
≥ 5 посещений	75%	72%	44% ^a	91% ^b
7 посещений	75%	69%	32% ^a	93% ^b
введение поддерживающей дозы 1 p/20 нд или 1 p/24 нд				
≥ 5 посещений	66%	74%	53%	83%
7 посещений	69%	70%	41%	88%
введение поддерживающей дозы > 1 p/12 нд ^e				
≥ 5 посещений	61%	75%	60%	76%
7 посещений	63%	70%	44%	88%

^a Чувствительность, или "коэффициент истинных положительных результатов" (TPR), представляет собой долю пациентов, исключая подгруппы введения поддерживающей дозы 1 p/12 нд или 1 p/24 нд, которую возможно правильно идентифицировать с помощью прогнозирующего маркера или критерия.

^b Специфичность, или "коэффициент истинных отрицательных результатов" (TNR), представляет собой долю пациентов, которую необходимо исключить из прогнозируемой группы, что предполагается, если прогнозирующий маркер отрицателен.

^c PPV представляет вероятность данного исхода, если прогнозирующий маркер является положительным, то есть вероятность положительного результата после проведения анализа. В качестве дополнительного объяснения, эти конкретные PPV основаны на наблюдении, что 117/302 пациентов из группы 2 имели оценку PGA=0 на неделе 28, и 51/117 (44%) пациентов получали поддерживающие дозы 1 p/24 нд и имели оценку PGA < 2 на пяти или более посещениях с недели 88 до недели 112. Подобным образом, 38/117 (32%) таких пациентов из группы 2 с введением препарата 1 p/24 нд имели оценку PG>

^d NPV представляет вероятность отрицательного исхода, если прогнозирующий маркер отрицателен, то есть вероятность отрицательного результата после проведения анализа. В качестве дополнительного объяснения, эти конкретные NPV получены в результате наблюдения, что 17/185 пациентов из группы 2, с оценкой PGA=1 на неделе 28, получали лечение с введениями поддерживающей дозы 1 p/24 нд, и имели оценку PGA < 2 на пяти или более посещениях (NPV=[185-17]/185=91%), а 13/185 пациентов имели PGA < 2 на всех семи посещениях (NPV=[185-13]/185=93%), с недели 88 до недели 112.

^e > 1 p/12 нд включает интервал между введениями поддерживающей дозы 1 p/16 нд, 1 p/20 нд, 1 p/24 нд.

FPR - коэффициент ложноположительных результатов, NPV отрицательное прогностическое значение, PGA - глобальная оценка врачом, PPV - положительное прогностическое значение, 1 p/12/16/20/24 нд - каждые 12/16/20/24 недель, TPR - коэффициент истинных положительных результатов

Таблица 7. График введения исследуемого агента

Открытый вводный период Недели			Субъекты со статичной оценкой PGA очищение (0) или минимальные проявления (1) будут рандомизированы на неделе 28 в 1 из 2 групп по варианту лечения. Группа 1 будет получать препарат в соответствии с утвержденной схемой введения поддерживающей дозы. В группе 2 схема введения поддерживающей дозы будет определяться временем потери эффекта лечения (определяется как оценка PGA ≥ 2). ^a	Период лечения в двойном слепом режиме (Недели)																				
0	4	16		28 ^b	32 ^b	36 ^b	40 ^b	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100	104	
А	А	А	Группа 1: введение поддерживающей дозы в соответствии с утвержденной схемой (устекинумаб 1 р/12 нд, начиная с недели 28)	А	Р	Р	А	Р	А	Р	Р	А	Р	А	Р	Р	А	Р	А	Р	А	Р	Р	А
А	А	А	Группа 2а: если потеря эффекта лечения произойдет к неделе 16 после инъекции на неделе 16 (т. е. к посещению на неделе 32), то субъекты будут получать устекинумаб 1 р/12 нд, начиная с недели 32	Р	А	Р	Р	А	Р	А	Р	Р	А	Р	А	Р	Р	А	Р	А	Р	А	Р	А
А	А	А	Группа 2б: если потеря эффекта лечения произойдет к неделе 20 после инъекции на неделе 16 (т. е. к посещению на неделе 36), то субъекты будут получать устекинумаб 1 р/16 нд, начиная с недели 36	Р	Р	А	Р	Р	А	Р	Р	Р	А	Р	Р	А	Р	Р	А	Р	Р	А	Р	Р
А	А	А	Группа 2с: если потеря эффекта лечения произойдет к неделе 24 после инъекции на неделе 16 (т. е. к посещению на неделе 40), то субъекты будут получать устекинумаб 1 р/20 нд, начиная с недели 40	Р	Р	Р	А	Р	Р	Р	А	Р	Р	Р	А	Р	Р	Р	А	Р	Р	Р	А	Р
А	А	А	Группа 2д: если потеря эффекта лечения не произойдет к неделе 24 после инъекции на неделе 16 (т. е. к посещению на неделе 40), то субъекты будут получать устекинумаб 1 р/24 нд, начиная с недели 40	Р	Р	Р	А	Р	Р	Р	Р	А	Р	Р	Р	Р	А	Р	Р	Р	А	Р	Р	Р
А	= Лечение активным препаратом устекинумабом в дозе 45 мг (для субъектов с массой тела ≤ 100 кг) или в дозе 90 мг (для субъектов с массой тела > 100 кг)																							
Р	= Плацебо																							
	= Отсутствие введения исследуемого агента																							

^a Субъектам, не достигшим статичной оценки PGA очищение (0) или минимальные проявления (1) на неделе 28, или прекратившим применение исследуемого агента перед неделей 28, которые не получили все 3 инъекции исследуемого агента перед неделей 28 (т. е. инъекции на неделе 0, 4, 16), будет прекращено введение дальнейших инъекций исследуемого агента, за ними будут наблюдать для надежности в течение по меньшей мере 20 недель после последней инъекции исследуемого агента, после чего их исключат из исследования.

^b На этих посещениях оценку PGA необходимо вводить в программу IVRS/IWRS. На этих посещениях особое внимание следует уделять срокам посещений, чтобы обеспечить возможность введения исследуемого агента на основе активности заболевания.

Примечание. При каждом применимом посещении субъекты получают от 1 до 2 инъекций. Субъекты с массой тела ≤ 100 кг получают 1 инъекцию (45 мг устекинумаба или плацебо), а субъекты с массой тела > 100 кг получают 2 инъекции (45 мг устекинумаба+45 мг устекинумаба или плацебо+плацебо), в зависимости от группы по варианту лечения, в которую они распределены, и от посещения. В ходе исследования будут использовать дозу исследуемого агента, определенную на основании исходной массы тела.

Таблица 8

Таблица 8 Число субъектов, прекративших применение исследуемого агента с недели 28 до недели 104; все субъекты, рандомизированные на неделе 28 (исследование CNT01275PSO3009)							
	Группа 1: схема введения поддерживающей дозы устекинумаба 1 р/12 нд	Группа 2: схема введения поддерживающей дозы устекинумаба с индивидуально подобранными интервалами					Всего
		Все рандомизированные субъекты	1 р/	1 р/	1 р/	1 р/	
			12 нд	16 нд	20 нд	24 нд	
Выборка для анализа: все субъекты, рандомизированные на неделе 28	76	302	84	61	51	84	378
Субъекты, прекратившие применение исследуемого агента	17 (22,4%)	67 (22,2%)	17 (20,2%)	7 (11,5%)	7 (13,7%)	14 (16,7%)	84 (22,2%)
Причина прекращения							
Неблагоприятное явление	4 (5,3%)	15 (5,0%)	4 (4,8%)	3 (4,9%)	2 (3,9%)	3 (3,6%)	19 (5,0%)
Смерть	1 (1,3%)	0	0	0	0	0	1 (0,3%)
Отсутствие эффективности	2 (2,6%)	8 (2,6%)	4 (4,8%)	2 (3,3%)	1 (2,0%)	1 (1,2%)	10 (2,6%)
Невозможность последующего наблюдения	6 (7,9%)	12 (4,0%)	3 (3,6%)	0	3 (5,9%)	3 (3,6%)	18 (4,8%)
Беременность	0	3 (1,0%)	1 (1,2%)	0	0	0	3 (0,8%)
Нарушение протокола	0	4 (1,3%)	1 (1,2%)	0	0	0	4 (1,1%)
Прекращение исследования спонсором	0	0	0	0	0	0	0
Отзыв согласия	2 (2,6%)	15 (5,0%)	3 (3,6%)	1 (1,6%)	0	6 (7,1%)	17 (4,5%)
Прочее	2 (2,6%)	10 (3,3%)	1 (1,2%)	1 (1,6%)	1 (2,0%)	1 (1,2%)	12 (3,2%)

[TSIDS01B.RTF] [CNT01275\PSO3009\DR_WEEK_124\RE_WEEK_124_CSR\PREPROD\TSIDS01B.SAS] 30SEP2015, 10:53

Таблица 9

Число посещений, на которых субъекты достигли оценки PGA очищение (0) или минимальные проявления (1) между недель 88 и недель 112; все субъекты, рандомизированные на неделе 28 (исследование CNT01275PSO3009)

	Группа 1: схема введения поддерживающей дозы устекинумаба 1 р/12 нд	Группа 2: схема введения поддерживающей дозы устекинумаба с индивидуально подобранными интервалами
Выборка для анализа: все субъекты, рандомизированные на неделе 28	76	302
N ^a	76	302
Среднее (Станд. откл.)	4,5 (3,07)	4,1 (2,93)
95% доверительный интервал среднего ^b	(3,81; 5,21)	(3,72; 4,39)
Медиана	7,0	5,0
Интервал	(0; 7)	(0; 7)
Интервал IQ	(1,0; 7,0)	(1,0; 7,0)
Разница между группами по варианту лечения		-0,46
Доверительный интервал ^b 95%		(-1,20; 0,29)
Число посещений, на которых субъекты достигли оценки PGA очищение (0) или минимальные проявления (1)		
0	17 (22,4%)	73 (24,2%)
1	6 (7,9%)	19 (6,3%)
2	2 (2,6%)	17 (5,6%)
3	3 (3,9%)	17 (5,6%)
4	2 (2,6%)	16 (5,3%)
5	2 (2,6%)	20 (6,6%)
6	2 (2,6%)	23 (7,6%)
7	42 (55,3%)	117 (38,7%)

^a После применения правил неэффективности лечения данные субъектов с пропущенными данными между неделями 88 и 112 обрабатывали следующим образом:

(1) Если пропущенное посещение было промежуточным, то пропущенное значение заменяли средневзвешенным значением, в зависимости от отдаленности доступных значений до и после пропущенного посещения (для посещений были приняты линейные отношения). Полученный балл округляли до ближайшего целого числа.

(2) Если пропущенное посещение не было промежуточным, т.е. после пропущенного посещения не было доступных данных, то для замены пропущенных данных применяли метод переноса вперед последнего наблюдения.

^b 95% доверительный интервал был основана на нормальной аппроксимации.

Таблица 10

		[TEFFGA01A.RTF]	
		[CNT01275\PSO3009\DBR_WEEK_124\RE_WEEK_124_CSR\PROD\TEFFGA01A.SAS] 01OCT2015,	
		14:17	
Таблица 10 Число посещений, к которым субъекты достигли эффекта			
лечения по оценке PASI 75 между неделями 88 и недель 112; все			
субъекты, рандомизированные на неделе 28 (исследование			
CNT01275PSO3009)			
		Группа 1: схема	Группа 2: схема введения
		введения	поддерживающей дозы
		поддерживающей дозы	устекинумаба с
		устекинумаба 1 р/12	индивидуально
		нд	подобранными интервалами
Выборка для анализа:			
все субъекты,		76	302
рандомизированные на			
неделе 28			
N ^a		76	302
Среднее (Станд.		5,8 (2,31)	5,4 (2,61)
откл.)			
95% доверительный		(5,23; 6,29)	(5,15; 5,74)
интервал среднего ^b			
Медиана		7,0	7,0
Интервал		(0; 7)	(0; 7)
Интервал IQ		(6,0; 7,0)	(5,0; 7,0)
Разница между			-0,32
группами по варианту			
лечения			
Доверительный			(-0,96; 0,33)
интервал ^b 95%			
Число посещений, к			
которым субъекты			
имели эффект лечения			
PASI 75			
0		7 (9,2%)	43 (14,2%)
1		2 (2,6%)	7 (2,3%)
2		0	8 (2,6%)
3		5 (6,6%)	5 (1,7%)
4		1 (1,3%)	9 (3,0%)
5		2 (2,6%)	11 (3,6%)
6		6 (7,9%)	17 (5,6%)
7		53 (69,7%)	202 (66,9%)

^a После применения правил неэффективности лечения данные субъектов с пропущенными данными между неделями 88 и 112 обрабатывали следующим образом:

(1) Если пропущенное посещение было промежуточным, то пропущенное значение заменяли средневзвешенным значением, в зависимости от отдаленности доступных значений до и после пропущенного посещения (для посещений были приняты линейные отношения).

(2) Если пропущенное посещение не было промежуточным, т.е. после пропущенного посещения не было доступных данных, то для замены пропущенных данных применяли метод переноса вперед последнего наблюдения.

^b 95% доверительный интервал был основана на нормальной аппроксимации.

Таблица 11

[TEFFPASI01.RTF]

[CNT01275\PSO3009\DBR_WEEK_124\RE_WEEK_124_CSR\PROD\TEFFPASI01.SAS]

01ОСТ2015, 14:16

Таблица 11 Число посещений, к которым субъекты достигли эффекта лечения по оценке PASI 75 с недели 88 до недели 112; Субъекты, рандомизированные на неделе 28 в группу со схемой введения поддерживающей дозы устекинумаба с индивидуально подобранными интервалами (исследование CNT01275PSO3009)

Группа 2: схема введения поддерживающей дозы устекинумаба с индивидуально подобранными интервалами

1 p/12	1 p/16	1 p/20	1 p/24	Все рандомизированные субъекты
нд	нд	нд	нд	

Выборка для анализа:

субъекты,

распределенные на неделе 28 в группу со схемой введения поддерживающей дозы устекинумаба с индивидуально подобранными интервалами

N ^a	84	61	51	84	302
Среднее (Станд. откл.)	4,7 (3,03)	5,2 (2,73)	5,6 (2,37)	6,3 (1,67)	5,4 (2,61)
95% доверительный интервал среднего ^b	(4,07; 5,38)	(4,53; 5,93)	(4,92; 6,25)	(5,97; 6,70)	(5,15; 5,74)
Медиана	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Интервал	(0; 7)	(0; 7)	(0; 7)	(0; 7)	(0; 7)
Интервал IQ	(1,0; 7,0)	(3,0; 7,0)	(5,0; 7,0)	(7,0; 7,0)	(5,0; 7,0)

Число посещений, к которым субъекты имели эффект лечения PASI 75

0	20 (23,8%)	9 (14,8%)	5 (9,8%)	3 (3,6%)	43 (14,2%)
1	3 (3,6%)	1 (1,6%)	2 (3,9%)	1 (1,2%)	7 (2,3%)
2	3 (3,6%)	4 (6,6%)	1 (2,0%)	0	8 (2,6%)
3	0	2 (3,3%)	0	3 (3,6%)	5 (1,7%)
4	2 (2,4%)	3 (4,9%)	2 (3,9%)	2 (2,4%)	9 (3,0%)
5	2 (2,4%)	0	4 (7,8%)	5 (6,0%)	11 (3,6%)
6	8 (9,5%)	2 (3,3%)	6 (11,8%)	1 (1,2%)	17 (5,6%)
7	46 (54,8%)	40 (65,6%)	31 (60,8%)	69 (82,1%)	202 (66,9%)

^a После применения правил неэффективности лечения данные субъектов с пропущенными данными между неделями 88 и 112 обрабатывали следующим образом:

(1) Если пропущенное посещение было промежуточным, то пропущенное значение заменяли средневзвешенным значением, в зависимости от отдаленности доступных значений до и после пропущенного посещения (для посещений приняты линейные отношения).

(2) Если пропущенное посещение не было промежуточным, т.е. после пропущенного посещения не было доступных данных, то для замены пропущенных данных применяли метод переноса вперед последнего наблюдения.

^b 95% доверительный интервал был основана на нормальной аппроксимации.

Таблица 12

		[TEFPASI04.RTF]						
		[CNT01275\PSO3009\DBR_WEEK_124\RE_WEEK_124_CSR\PROD\TEFPASI04.SAS]						
		01OCT2015, 14:16						
Таблица 12 Краткий обзор ключевых выводов о безопасности с недели 28 до недели 124; Субъекты, получавшие лечение, рандомизированные на неделе 28 (исследование CNT01275PSO3009)		Группа 2: схема введения поддерживающей дозы устекинумаба с индивидуально подобранными интервалами						
		Группа 1: схема введения поддерживающей дозы устекинумаба 1 p/12 нд		Все рандомизированные субъекты				Всего
			1 p/12 нд	1 p/16 нд	1 p/20 нд	1 p/24 нд		
Выборка для анализа: субъекты, получавшие лечение, рандомизированные на неделе 28		76	302	84	61	51	84	378
Средняя продолжительность последующего наблюдения (нд)		85,9	84,2	87,2	89,9	90,1	90,9	84,6
Среднее воздействие (число введений) инъекций до и после недели 28		14,6	14,6	15,3	15,7	15,7	15,9	14,6
Субъекты, прекратившие применение исследуемого агента из-за 1 или более неблагоприятных явлений		5 (6,6%)	17 (5,6%)	5 (6,0%)	3 (4,9%)	2 (3,9%)	3 (3,6%)	22 (5,8%)
Субъекты с 1 или более:								
Неблагоприятными явлениями		55 (72,4%)	220 (72,8%)	62 (73,8%)	54 (88,5%)	35 (68,6%)	62 (73,8%)	275 (72,8%)
Серьезными неблагоприятными явлениями		7 (9,2%)	21 (7,0%)	6 (7,1%)	2 (3,3%)	2 (3,9%)	9 (10,7%)	28 (7,4%)
Общие инфекции		37 (48,7%)	138 (45,7%)	45 (53,6%)	38 (62,3%)	19 (37,3%)	35 (41,7%)	175 (46,3%)
- Серьезные инфекции		0	3 (1,0%)	2 (2,4%)	0	1 (2,0%)	0	3 (0,8%)
- Требующие лечения		18 (23,7%)	70 (23,2%)	22 (26,2%)	20 (32,8%)	12 (23,5%)	15 (17,9%)	88 (23,3%)
Злокачественное новообразование		3 (3,9%)	7 (2,3%)	3 (3,6%)	1 (1,6%)	1 (2,0%)	1 (1,2%)	10 (2,6%)
МАСЕ *		0	2 (0,7%)	0	0	0	2 (2,4%)	2 (0,5%)

* МАСЕ: инфаркт миокарда (ИМ), инсульт или смерть по причине сердечно-сосудистой патологии

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO: 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Thr Tyr Trp Leu Gly

1 5

SEQ ID NO: 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ile Met Ser Pro Val Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

SEQ ID NO: 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Arg Arg Pro Gly Gln Gly Tyr Phe Asp Phe
 1 5 10

SEQ ID NO: 4

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

SEQ ID NO: 5

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

SEQ ID NO: 6

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

SEQ ID NO: 7

<211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Leu Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ile Met Ser Pro Val Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Met Ser Val Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

040272

Ala Arg Arg Arg Pro Gly Gln Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

SEQ ID NO: 8
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

SEQ ID NO: 9

040272

<211> 503
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu
 1 5 10 15
 His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys
 20 25 30
 Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp
 35 40 45
 His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu
 50 55 60
 Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr
 65 70 75 80
 Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe
 85 90 95
 Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr
 100 105 110
 Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys
 115 120 125
 Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu
 130 135 140
 Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser
 145 150 155 160
 Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu
 165 170 175

Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser
 180 185 190
 Tyr Leu Asn Ala Ser Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val
 195 200 205
 Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr
 210 215 220
 Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln Ser
 225 230 235 240
 Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys Glu
 245 250 255

 Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val Leu
 260 265 270
 Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp Ser
 275 280 285
 Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu
 290 295 300
 Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp Leu
 305 310 315 320
 Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg Gly
 325 330 335
 Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser Ala
 340 345 350
 Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys
 355 360 365
 Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu
 370 375 380
 Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Ser
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu
 405 410 415
 Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp Glu
 420 425 430
 Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe
 435 440 445
 Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val
 450 455 460
 Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser
 465 470 475 480
 Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu
 485 490 495
 Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser
 500

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения у пациента псориаза с применением возрастающего интервала между введениями дозы или поддерживающей дозы, включающий введение пациенту антитела к ИЛ-12 и ИЛ-23, где антитело содержит последовательность аминокислот варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и последовательность аминокислот варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 8, в начальной дозе, дозе через 4 недели после введения начальной дозы и дозе один раз каждые 12 недель в течение 24 недель после введения начальной дозы и с возрастанием интервала между введениями дозы через 28 недель после введения начальной дозы до интервала между введениями дозы каждые 24 недели после идентификации пациента, как отвечающего на лечение антителом через 28 недель после введения начальной дозы, где доза составляет 45 или 90 мг.

2. Способ по п.1, в котором стадия идентификации пациента, как отвечающего на лечение антителом включает определение и идентификацию пациента, как имеющего индекс распространенности и тя-

жести псориаза (PASI) 75 или глобальную оценку врачом псориаза (PGA) 0 или 1 балл.

3. Способ по п.1, в котором антитело к ИЛ-12 и ИЛ-23, вводимое пациенту, представляет собой устекинумаб.

4. Способ по п.1, в котором у пациента не проявляется повышенный риск иммуногенности.

5. Способ по п.1, в котором через 28 недель после начального лечения пациент имеет индекс PASI 75, PASI 90 или оценку PGA 0 или 1 балл.

6. Способ по п.1, в котором через 52 недели после начального лечения пациент имеет индекс PASI 75, PASI 90 или PGA 0 или 1 балл.

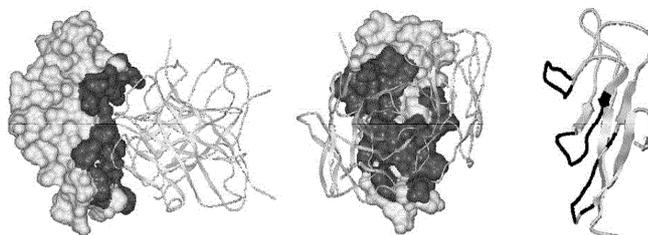
7. Способ по п.1, в котором через 108, 112 и/или 116 недель после начального лечения пациент имеет индекс PASI 75, PASI 90 или оценку PGA 0 или 1 балл.

8. Способ по п.1, в котором антитело вводят в составе фармацевтической композиции, содержащей антитело, которое содержит последовательность аминокислот вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и последовательность аминокислот вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 8, около 0,53 мг L-гистидина на миллилитр фармацевтической композиции; около 1,37 мг L-гистидина моногидрохлорида моногидрата на миллилитр фармацевтической композиции; около 0,04 мг полисорбата 80 на миллилитр фармацевтической композиции; около 76 мг сахарозы на миллилитр фармацевтической композиции и воду в качестве разбавителя в стандартном состоянии.

9. Способ лечения у пациента псориаза с применением возрастающего интервала между введениями дозы или поддерживающей дозы, включающий введение пациенту фармацевтической композиции, содержащей антитело к ИЛ-12 и ИЛ-23, в начальной дозе, дозе через 4 недели после введения начальной дозы и дозе один раз каждые 12 недель в течение 24 недель после введения начальной дозы и с возрастанием интервала между введениями дозы через 28 недель после введения начальной дозы до интервала между введениями дозы каждые 24 недели после идентификации пациента, как отвечающего на лечение антителом через 28 недель после введения начальной дозы, где доза составляет 45 мг или 90 мг, и в котором фармацевтическая композиция содержит антитело, которое содержит последовательности аминокислот CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; и последовательности аминокислот CDR легкой цепи SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, около 0,53 мг L-гистидина на миллилитр фармацевтической композиции; около 1,37 мг L-гистидина моногидрохлорида моногидрата на миллилитр фармацевтической композиции; около 0,04 мг полисорбата 80 на миллилитр фармацевтической композиции; около 76 мг сахарозы на миллилитр фармацевтической композиции и воду в качестве разбавителя в стандартном состоянии.

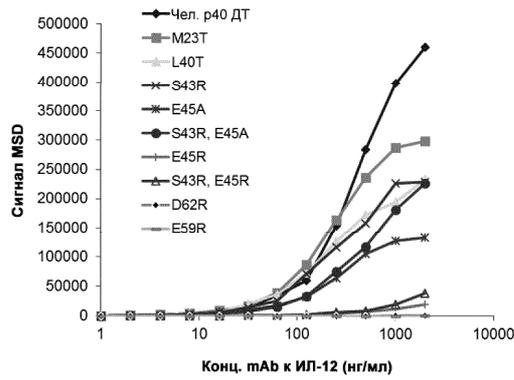


Фиг. 1



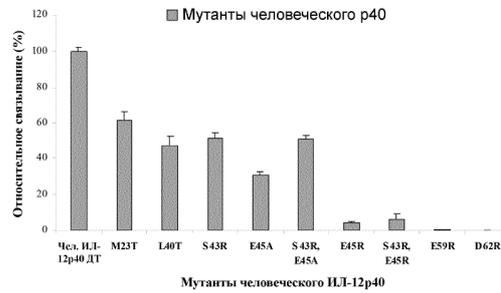
Фиг. 2

тАб к ИЛ-12 связывается с мутантами человеческого ИЛ-12р40

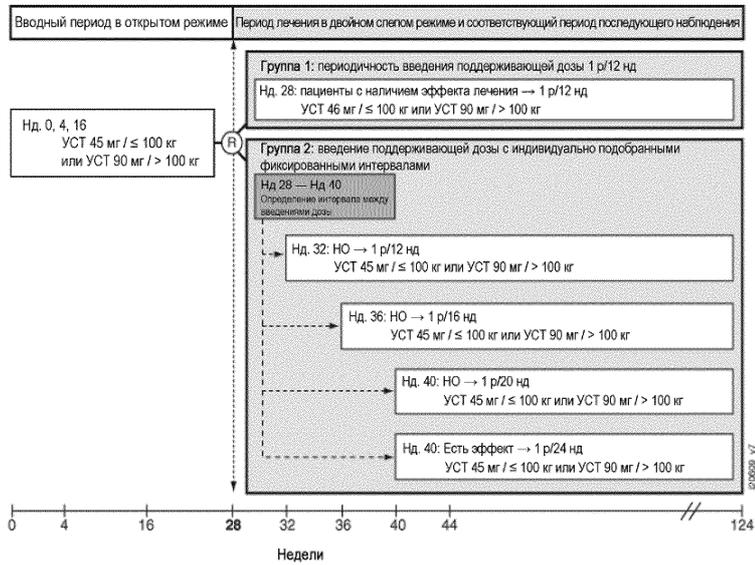


Фиг. 3

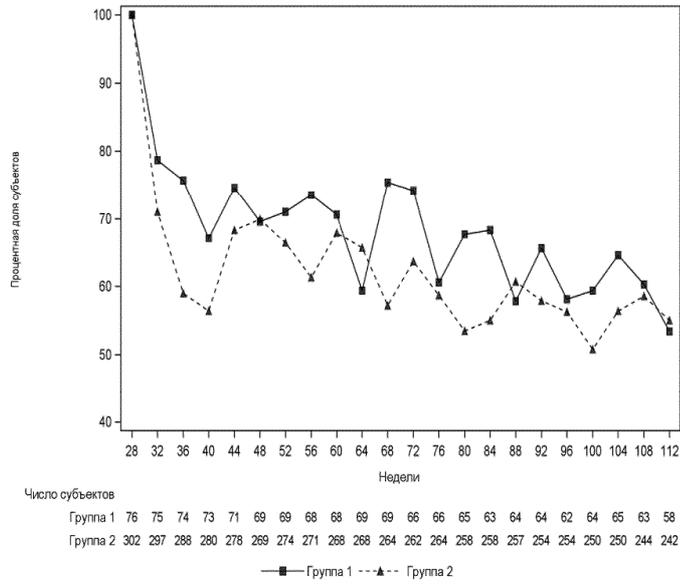
CNTO 1275 связывается с мутантами человеческого ИЛ-12р40



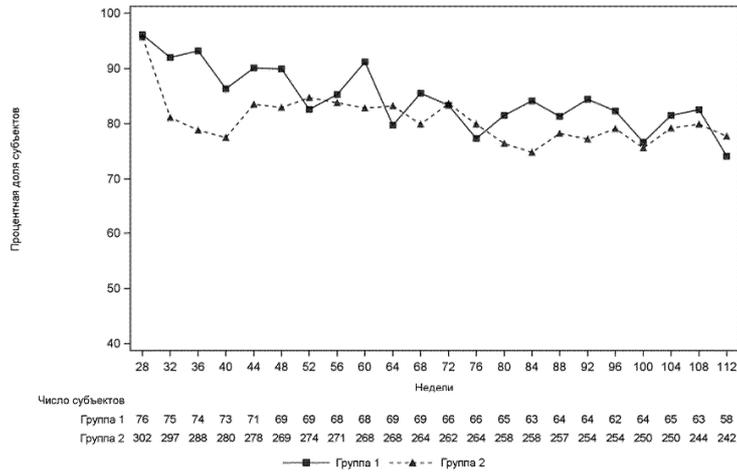
Фиг. 4



Фиг. 5



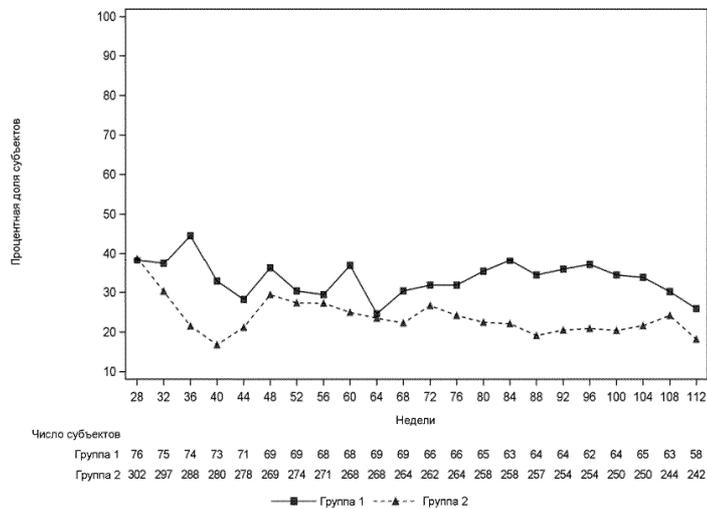
Фиг. 6



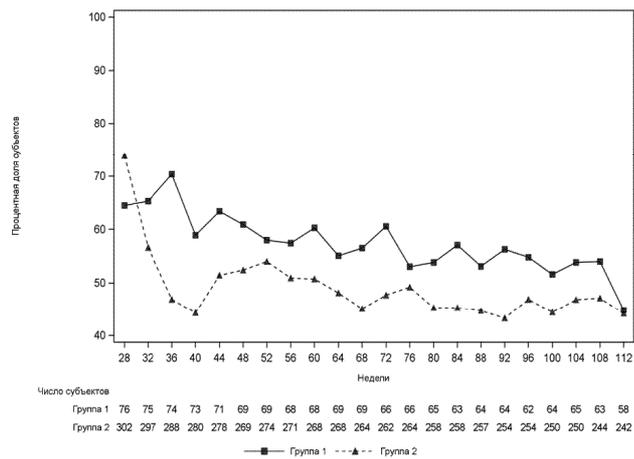
Группа 1 = схема введения поддерживающей дозы устекinumаба 1 р/12 нед. Группа 2 = схема введения поддерживающей дозы устекinumаба с индивидуально подобранными интервалами

[GEFPAS01.RTF] [CNT01275\PSO3009\DBR_WEEK_124\RE_WEEK_124_CSR\PROD\GEFPAS01.SAS] 01OCT2015, 14:12

Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

