

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490149** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.02.29

(51) Int. Cl. *C07K 16/24* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.07.08

(54) **СПОСОБЫ ПРОИЗВОДСТВА КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ К ИЛ-12/ИЛ-23**

(31) 63/219,904

(32) 2021.07.09

(33) US

(86) PCT/IB2022/056345

(87) WO 2023/281466 2023.01.12

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

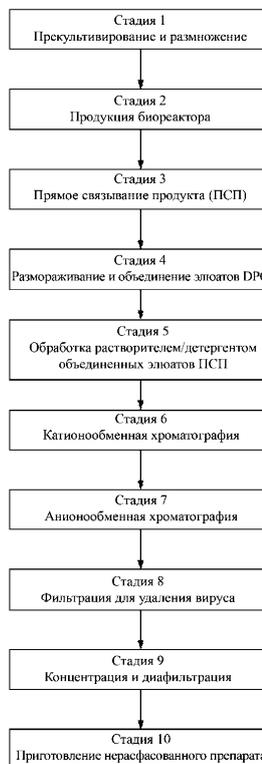
**Донлон Энн, Гордон Гэри (IE), Гучи
Чарльз Ф. (US), Хейз Ронан, Джонстон
Робин (IE), Стенворден Виллем (NL),
Туми Денис (IE)**

(74) Представитель:

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

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

Обзор производственного процесса — стадии процесса



A1

202490149

202490149

A1

СПОСОБЫ ПРОИЗВОДСТВА КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ К ИЛ-
12/ИЛ-23

5

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ
ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА СМЕЖНЫЕ ЗАЯВКИ
ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В
ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

10

[0001] Данная заявка содержит перечень последовательностей, который представлен в электронном виде как перечень последовательностей формата XML с именем файла «JBI6005 SequenceListing.xml», датой создания 29 июня 2022 г. и размером 12 Кб. Представленный перечень последовательностей является частью описания и полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

15

[0002] Настоящее изобретение относится к способам производства антител к ИЛ-12/ИЛ-23p40, например антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 устекинумаб, и конкретных фармацевтических композиций антител.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

20

[0003] Интерлейкин (ИЛ)-12 представляет собой секретлируемый гетеродимерный цитокин, состоящий из 2 связанных дисульфидной связью гликозилированных белковых субъединиц, обозначенных как p35 и p40 в соответствии с приблизительными молекулярными массами. ИЛ-12 продуцируется главным образом антигенпредставляющими клетками и стимулирует клеточно-опосредованный иммунитет посредством связывания с двухцепочечным рецепторным комплексом, который экспрессируется на поверхности Т-клеток или естественных киллерных клеток (ЕК). Цепь бета-1 рецептора ИЛ-12 (ИЛ-12R β 1) связывается с субъединицей p40 ИЛ-12, обеспечивая первичное взаимодействие между ИЛ-12 и его рецептором. Однако именно связывание ИЛ-12p35 со второй цепью рецептора, ИЛ-12R β 2, возбуждает 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

30

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.

5 [0004] 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 ИЛ-12R β 1 также является общей для ИЛ-12 и ИЛ-23. Однако именно связывание ИЛ-23p19 со вторым компонентом комплекса рецептора ИЛ-23, ИЛ-23R, возбуждает специфичную
10 внутриклеточную сигнализацию ИЛ-23 (например, фосфорилирование STAT3) и последующую продукцию ИЛ-17 Т-клетками (Parham et al, 2002; Aggarwal et al. 2003). Недавние исследования показали, что биологические функции ИЛ-23 отличаются от таковых ИЛ-12, несмотря на структурное сходство между двумя цитокинами
15 (Langrish et al, 2005).

[0005] Ненормальную регуляцию ИЛ-12 и популяций клеток Th1 связывали со многими иммунноопосредованными заболеваниями, поскольку нейтрализация ИЛ-12 антителами эффективна для животных моделей лечения псориаза, рассеянного склероза (РС), ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника,
20 инсулинозависимого сахарного диабета (1-го типа) и увеита (Leonard et al, 1995; Hong et al, 1999; Malfait et al, 1998; Davidson et al, 1998). Также было показано, что ИЛ-12 играет решающую роль в патогенезе СКВ в двух независимых мышинных моделях системной красной волчанки (Kikawada et al. 2003; Dai et al. 2007).

[0006] Системная красная волчанка (СКВ) представляет собой сложное хроническое
25 гетерогенное аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, которое может поражать практически любую систему органов, течение которого характеризуется периодическими улучшениями и ухудшениями состояния. Согласно некоторым исследованиям, системная красная волчанка наблюдается у женщин до 9 раз чаще чем у мужчин. Наиболее часто заболевание возникает в детородном возрасте (15–45 лет).
30 Заболевание более распространено среди пациентов афро-карибского, азиатского и латиноамериканского происхождения. При СКВ иммунная система атакует клетки и ткани организма, что приводит к воспалению и повреждению тканей, что может нанести вред сердцу, суставам, коже, легким, кровеносным сосудам, печени, почкам и нервной системе. У приблизительно половины пациентов с диагностированной СКВ

существует угроза поражения внутренних органов. Для диагностики такой угрозы может потребоваться несколько лет. К некоторым основным жалобам пациентов с впервые диагностированной волчанкой относится боль в суставах (62%) и кожные проявления (фоточувствительность; 20%) с последующим постоянным повышением температуры и недомоганием.³⁹ Предполагаемый ежегодный уровень заболеваемости волчанкой варьируется от 1,8 до 7,6 случаев на 100 000 человек, а распространенность в мире — от 14 до 172 случаев на 100 000 человек.³⁹ Пациенты с легкой формой заболевания имеют в основном кожные высыпания и боли в суставах и нуждаются в менее агрессивной терапии; схемы лечения включают нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), противомалярийные препараты (например, гидроксихлорохин, хлорохин или хинакрин) и/или низкие дозы кортикостероидов. При более тяжелом течении заболевания пациенты могут страдать различными серьезными расстройствами в зависимости от пораженных систем органов, включая волчаночный нефрит с потенциальной почечной недостаточностью, эндокардит или миокардит, пневмонит, осложнения беременности, инсульт, неврологические осложнения, васкулит и цитопению с сопутствующим риском кровотечения или инфекции. Распространенные способы лечения заболевания тяжелой степени включают иммуномодулирующие агенты, такие как метотрексат (МТК), азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин, высокие дозы кортикостероидов, биологические В-клеточные цитотоксические агенты или В-клеточные модуляторы, а также другие иммуномодуляторы. У пациентов с тяжелой формой СКВ ожидаемая продолжительность жизни сокращается на срок от 10 до 30 лет в основном из-за осложнений заболевания, стандартной терапии и/или ускоренного атеросклероза. Кроме того, СКВ оказывает существенное влияние на качество жизни, работоспособность, а также на расходы на медицинские услуги. Существующие методы лечения СКВ, как правило, являются цитотоксическими или иммуномодулирующими и могут иметь значительные риски безопасности. Более новые способы лечения СКВ обеспечивают лишь незначительные преимущества по сравнению со стандартной терапией. Таким образом, существует большая неудовлетворенная потребность в новых альтернативных видах лечения, которые могут обеспечить значительную пользу при этом заболевании, не вызывая высокого риска для безопасности.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Общие и предпочтительные варианты осуществления изобретения определены, соответственно, независимыми и зависимыми пунктами формулы изобретения, прилагаемыми к настоящему документу, которые для краткости включены в настоящий документ путем ссылки. Другие предпочтительные варианты осуществления, признаки и преимущества различных аспектов изобретения будут очевидны из приведенного ниже подробного описания в комбинации с прилагаемыми на фигурах чертежами.

[0008] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены антитела к ИЛ-12/23p40, содержащие: (i) аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи с SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3; и (ii) аминокислотную последовательность CDR легкой цепи с SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, причем олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$, и при этом антитела к ИЛ-12/23p40 получают способом производства, который контролирует олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40, причем способ производства включает: культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антител к ИЛ-12/23p40 в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ИЛ-12/23p40.

[0009] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены антитела к ИЛ-12/23p40, содержащие: (i) аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; и (ii) аминокислотные последовательности CDR легкой цепи с SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, причем антитела к ИЛ-12/23p40 являются биопрепаратами второго эшелона, и при этом олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и

содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$, и при этом антитела к ИЛ-12/23p40 получают способом производства, который контролирует олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40, причем способ производства включает:

5 культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антител к ИЛ-12/23p40 в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ИЛ-12/23p40.

[0010] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены антитела к ИЛ-12/23p40, содержащие: (i) аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи с SEQ ID NO:7; и (ii) аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи с SEQ ID NO:8, причем олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$, и при этом антитела к ИЛ-12/23p40 получают способом производства, который контролирует олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40, причем способ производства включает: культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антител к ИЛ-12/23p40 в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ИЛ-12/23p40.

[0011] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены антитела к ИЛ-12/23p40, содержащие: (i) аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:10; и (ii) аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:11, причем олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до

≤ 35,6% и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от ≥ 11,5% до ≤ 40,2%, G1F от ≥ 29,9% до ≤ 40,6% и G2F от ≥ 4,1% до ≤ 11,3%, и при этом антитела к ИЛ-12/23p40 получают способом производства, который контролирует олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40, причем способ производства
5 включает: культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от ≥ 10,0 мкг/литр до ≤ 35,0 мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от ≥ 1,0 мкг/литр до ≤ 1,8 мкг/литр; и экспрессию антител к ИЛ-12/23p40 в эукариотических клетках,
10 причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ИЛ-12/23p40.

[0012] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ производства лекарственного вещества (ЛВ) или лекарственного препарата (ЛП), включающий антитела к ИЛ-12/23p40, содержащие аминокислотную
15 последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:10 и аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:11, причем олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 является контролируемым и олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от ≥ 64,8% до ≤ 85,4%, общее содержание заряженных олигосахаридов от ≥ 14,4% до ≤ 35,6% и
20 содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от ≥ 11,5% до ≤ 40,2%, G1F от ≥ 29,9% до ≤ 40,6% и G2F от ≥ 4,1% до ≤ 11,3%, при этом способ включает: культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от
25 ≥ 10,0 мкг/литр до ≤ 35,0 мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от ≥ 1,0 мкг/литр до ≤ 1,8 мкг/литр; и экспрессию антител к ИЛ-12/23p40 в эукариотических клетках.

[0013] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ производства лекарственного вещества (ЛВ) или лекарственного препарата (ЛП), включающий антитела к ИЛ-12/23p40, содержащие аминокислотную
30 последовательности тяжелой цепи с SEQ ID NO:10 и аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:11, причем антитела к ИЛ-12/23p40 представляют собой биопрепарат второго эшелона, и при этом олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 является контролируемым и олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 имеет общее содержание видов нейтральных

олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$, причем способ включает: культивирование эукариотических клеток в среде с

5 определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антител к ИЛ-12/23p40 в эукариотических клетках.

[0014] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении

10 предложен способ производства лекарственного вещества (ЛВ) или лекарственного препарата (ЛП), включающий антитела к ИЛ-12/23p40, содержащие аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:10 и аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:11, причем олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 является контролируемым и % площади пика 3

15 электрофореграммы капиллярного изоэлектрического фокусирования (КИЭФ) антител к ИЛ-12/23p40 составляет от $\geq 39,8\%$ до $\leq 64,4\%$, причем способ производства включает: культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и

20 Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антител к ИЛ-12/23p40 в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ИЛ-12/23p40.

[0015] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении

25 предложен способ производства лекарственного вещества (ЛВ) или лекарственного препарата (ЛП), включающий антитела к ИЛ-12/23p40, содержащие аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:10 и аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:11, причем олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 является контролируемым и олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$, при этом способ производства

30 включает: культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных

концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антител к ИЛ-12/23p40 в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди являются эффективными при контроле олигосахаридного профиля антител к ИЛ-12/23p40, и при этом указанные концентрации металлических микроэлементов марганца и меди в среде с определенным химическим составом определяют с использованием масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС).

[0016] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ производства лекарственного вещества (ЛВ) или лекарственного препарата (ЛП), включающий антитела к ИЛ-12/23p40, содержащие аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:10 и аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:11, причем олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 является контролируемым и олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$, при этом способ включает: культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антител к ИЛ-12/23p40 в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ИЛ-12/23p40, и при этом концентрации металлических микроэлементов марганца и меди в среде с определенным химическим составом контролируют путем добавления к среде с определенным химическим составом одного или более источников марганца и меди, причем один или более источников марганца выбраны из группы, состоящей из: $MnCl_2$, $MnSO_4$, MnF_2 и MnI_2 , и один или более источников меди выбраны из группы, состоящей из: $CuSO_4$, $CuCl_2$ и $Cu(OAc)_2$.

[0017] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ производства лекарственного вещества (ЛВ) или лекарственного препарата (ЛП), включающий антитела к ИЛ-12/23p40, содержащие аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:10 и аминокислотную

последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:11, причем олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 является контролируемым и олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и

5 содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$, при этом способ производства включает: культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных концентраций

10 металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антител к ИЛ-12/23p40 в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ИЛ-12/23p40, и при этом виды олигосахаридов определяют с помощью жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ).

15 [0018] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ производства лекарственного вещества (ЛВ) или лекарственного препарата (ЛП), включающий антитела к ИЛ-12/23p40, содержащие аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:10 и аминокислотную

20 последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:11, причем олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 является контролируемым и олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$, при этом способ включает:

25 культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антител к ИЛ-12/23p40 в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди

30 эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ИЛ-12/23p40, и при этом эукариотические клетки выбирают из группы, состоящей из: клеток яичника китайского хомячка (клетки CHO), клеток сетчатки глаза человека (клетки PER.C6) и миеломных клеток мыши (клетки NS0 и клетки Sp2/0).

[0019] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая антитела к ИЛ-12/23p40, содержащие аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:10 и аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:11, причем олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$, и при этом антитела к ИЛ-12/23p40 получают способом производства, который контролирует олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40, причем способ производства включает: культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антител к ИЛ-12/23p40 в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ИЛ-12/23p40.

[0020] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая антитела к ИЛ-12/23p40, содержащие аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:10 и аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:11, причем что антитела к ИЛ-12/23p40 являются биопрепаратами второго эшелона, и при этом олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$, и при этом антитела к ИЛ-12/23p40 получают способом производства, который контролирует олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40, причем способ производства включает: культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антител к ИЛ-12/23p40 в эукариотических клетках, причем концентрации

марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ИЛ-12/23p40.

[0021] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая антитела к ИЛ-12/23p40, содержащие аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:10 и аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:11, причем % площади пика 3 электрофореграммы капиллярного изоэлектрического фокусирования (КИЭФ) антител к ИЛ-12/23p40 составляет от $\geq 39,8\%$ до $\leq 64,4\%$, и при этом антитела к ИЛ-12/23p40 получают способом производства, который контролирует олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40, при этом способ производства, включает: культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антител к ИЛ-12/23p40 в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ИЛ-12/23p40.

[0022] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая антитела к ИЛ-12/23p40, содержащие аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:10 и аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:11, причем олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$, и при этом антитела к ИЛ-12/23p40 получают способом производства, который контролирует олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40, причем способ производства включает: культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антител к ИЛ-12/23p40 в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди являются эффективными при контроле олигосахаридного профиля антител к ИЛ-12/23p40, и при этом указанные концентрации металлических микроэлементов марганца и меди в среде с

определенным химическим составом определяют с использованием масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС).

[0023] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая антитела к ИЛ-12/23p40, содержащие аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:10 и аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:11, причем олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$, и при этом антитела к ИЛ-12/23p40 получают способом производства, который контролирует олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40, причем способ производства включает: культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антител к ИЛ-12/23p40 в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ИЛ-12/23p40, и при этом указанные концентрации металлических микроэлементов марганца и меди в среде с определенным химическим составом контролируют путем добавления к среде с определенным химическим составом одного или более источников марганца и меди, причем один или более источников марганца выбраны из группы, состоящей из: $MnCl_2$, $MnSO_4$, MnF_2 и MnI_2 , и один или более источников меди выбраны из группы, состоящей из: $CuSO_4$, $CuCl_2$ и $Cu(OAc)_2$.

[0024] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая антитела к ИЛ-12/23p40, содержащие аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:10 и аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:11, причем олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$, и при этом антитела к ИЛ-12/23p40 получают способом производства, который контролирует олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40, причем способ производства включает: культивирование

эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антител к ИЛ-12/23p40 в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ИЛ-12/23p40, и при этом виды олигосахаридов определяют с помощью жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ).

[0025] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая антитела к ИЛ-12/23p40, содержащие аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:10 и аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:11, причем олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$, и при этом антитела к ИЛ-12/23p40 получают способом производства, который контролирует олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40, причем способ производства включает: культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антител к ИЛ-12/23p40 в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ИЛ-12/23p40, и при этом эукариотические клетки выбирают из группы, состоящей из: клеток яичника китайского хомячка (клетки CHO), клеток сетчатки глаза человека (клетки PER.C6) и миеломных клеток мыши (клетки NS0 и клетки Sp2/0).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0026] На **Фиг. 1** представлен общий обзор 10 стадий процесса производства устекинумаба.

[0027] На **Фиг. 2** показана блок-схема производственного процесса стадии 1 для стадий предварительного культивирования и размножения, включая внутривыпускной контроль и тесты для мониторинга процесса.

[0028] На **Фиг. 3** показана блок-схема стадий производственного процесса стадии 2, включая внутривыпускной контроль и тесты мониторинга процесса.

[0029] На **Фиг. 4** показана репрезентативная хроматограмма ВЭЖХ для анализа олигосахаридов устекинумаба.

5 [0030] На **Фиг. 5** показан репрезентативный профиль электрофореграммы КИЭФ устекинумаба. Также показано графическое изображение, представляющее общее соотношение между пиками КИЭФ и уменьшением отрицательного заряда/степени сиапирования.

10 [0031] На **Фиг. 6** показан схематический обзор некоторых видов первичных N-связанных олигосахаридов в IgG устекинумаба. Также показана роль некоторых ферментов в процессе созревания гликозилирования и роль некоторых двухвалентных катионов (например, Mn^{2+} в качестве кофактора и Cu^{2+} в качестве ингибитора GalT1) (см., например, *Biotechnol Bioeng.* 2007 Feb 15;96(3):538-49; *Curr Drug Targets.* 2008 Apr;9(4):292-309; *J Biochem Mol Biol.* 2002 May 31;35(3):330-6). Следует отметить, что
15 соединения с концевой сиапировой кислотой (S1 и S2) являются заряженными соединениями, а соединения без концевой сиапировой кислоты (G0F, G1F и G2F) являются нейтральными соединениями, но образование заряженных соединений зависит от наличия галактозы в гликанах G1F и G2F, которая добавляется за счет фермента GalT1.

20 [0032] На **Фиг. 7** показан % площади пика 3 для профиля КИЭФ партий устекинумаба для среды до замены, после замены и SUP-AGT3 в хронологическом порядке для различных партий. Средний общий % для среднестатистических партий AGT до замены показан сплошной линией, а верхний и нижний пределы спецификации — пунктирными линиями.

25 [0033] На **Фиг. 8А и 8Б** показано общее содержание нейтральных (**Фиг. 8А**) и общее содержание заряженных (**Фиг. 8Б**) видов олигосахаридов для партий устекинумаба в среде до замены, после замены и SUP-AGT3 в хронологическом порядке для различных партий. Средние значения в % общего количества для среднестатистических партий AGT до замены показаны сплошными линиями, а верхний и нижний пределы
30 спецификации — пунктирными линиями.

[0034] На **Фиг. 9А–9В** показан % от общего количества отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F (**Фиг. 9А**), G1F (**Фиг. 9Б**) и G2F (**Фиг. 9В**) в партиях устекинумаба в среде до замены, после замены и SUP-AGT3 в хронологическом порядке для разных партий. Средние значения в % для среднестатистических партий

AGT до замены показаны сплошными линиями, а верхний и нижний пределы спецификации — пунктирными линиями.

5 [0035] На **Фиг. 10** показаны уровни марганца для различных партий устекинумаба в хронологическом порядке. Данные идентифицированы на основе используемой среды, например AGT до замены, AGT после замены и SUP-AGT3. Среднее значение для среднестатистических партий показано сплошной линией, а верхний и нижний пределы спецификации — пунктирными линиями.

10 [0036] На **Фиг. 11** показаны уровни хрома для различных партий устекинумаба в хронологическом порядке. Данные идентифицированы на основе используемой среды, например AGT до замены, AGT после замены и SUP-AGT3.

15 [0037] На **Фиг. 12** показаны уровни меди для различных партий устекинумаба в хронологическом порядке. Данные идентифицированы на основе используемой среды, например AGT до замены, AGT после замены и SUP-AGT3. Среднее значение для среднестатистических партий показано сплошной линией, а верхний и нижний пределы спецификации — пунктирными линиями. Следует отметить, что во многих партиях AGT после замены значения были меньше нижнего предела анализа для меди (< 1 мкг/л) и просто представлены в графическом виде как 1 мкг/л.

20 [0038] На **Фиг. 13** показана жизнеспособность (%) клеточной культуры (стадия 2) в различных 500-литровых партиях SUP-AGT3 с устекинумабом (сплошные круги, сплошные квадраты, пустые квадраты, сплошные треугольники, пустые треугольники, сплошные ромбы и пустые ромбы). Среднее значение для среднестатистических партий AGT до замены показано сплошной линией, а $\pm 3SD$ для среднестатистических партий AGT до замены — пунктирными линиями.

25 [0039] На **Фиг. 14** показано кумулятивное количество IgG в культуре клеток (стадия 2) (в граммах) для различных 500-литровых партий SUP-AGT3 с устекинумабом (сплошные круги, сплошные квадраты, пустые квадраты, сплошные треугольники, пустые треугольники, сплошные ромбы и пустые ромбы). Среднее значение для среднестатистических партий AGT до замены показано сплошной линией, а $\pm 3SD$ для среднестатистических партий AGT до замены — пунктирными линиями.

30

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0040] В контексте настоящего документа термины «антитело к ИЛ-12», «антитело к ИЛ-23», «антитело к ИЛ-12/23p40», «антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40», «антитело ИЛ-

12/23p40», «антитело ИЛ-12/ИЛ-23p40», «часть антитела» или «фрагмент антитела» и/или «вариант антитела» и т. п. включают любую молекулу, содержащую белок или пептид, которая содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, такую как, без ограничения, по меньшей мере одна определяющая комплементарность область (complementarity determining region — CDR) 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. Необязательно такое антитело дополнительно воздействует на специфичный лиганд, например, без ограничения, такое антитело может модулировать, снижать, повышать, выступать антагонистом, выступать агонистом, уменьшать, ослаблять, блокировать, ингибировать, уничтожать и/или препятствовать по меньшей мере одной активности или связыванию 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 необязательно влиять на по меньшей мере один вид активности или функцию ИЛ-12/23, например, без ограничения, на 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, продукцию и/или синтез ИЛ-12/23.

[0041] При использовании в настоящем документе термины «антитело» или «антитела» относятся к молекулам биоаналогов антител, утвержденным в соответствии с Законом о ценовой конкуренции и инновациях биологических лекарств 2009 г. (закон ВРСІ) и аналогичными законами и нормативами во всем мире. В соответствии с законом ВРСІ может быть продемонстрировано, что антитело является биоаналогом, если данные показывают, что оно «очень схоже» с эталонным продуктом, несмотря на незначительные различия в клинически неактивных компонентах, и «ожидается», что оно даст тот же клинический результат, что и эталонный продукт, с точки зрения безопасности, чистоты и активности (Endocrine Practice: February 2018, Vol. 24, No. 2, pp. 195-204). Эти молекулы-биоаналоги антител обеспечивают по сокращенной схеме утверждения, при которой заявитель полагается на клинические данные эталонного

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

[0042] Предполагается, что термин «антитело» будет дополнительно охватывать антитела, фрагменты расщепления, их определенные участки и варианты, включая миметики антител, или содержать участки антител, которые имитируют структуру и/или функцию антитела или его определенного фрагмента или участка, включая одноцепочечные антитела и их фрагменты. Функциональные фрагменты включают антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с ИЛ-12/23 млекопитающего. Например, изобретение охватывает фрагменты антитела, способные связываться с ИЛ-12/23 или их участками, включая, без ограничений, фрагменты Fab (например, после расщепления папаином), Fab' (например, после расщепления пепсином и частичного восстановления) и F(ab')₂ (например, после расщепления пепсином), Fabc (например, после расщепления плазмином), pFc' (например, после расщепления пепсином или плазмином), Fd (например, после расщепления пепсином, частичного восстановления и реагрегации), Fv или scFv (например, методиками молекулярной биологии) (см., например, Colligan, Immunology, упомянутую выше).

[0043] Такие фрагменты можно получать путем ферментативного расщепления, способами синтеза или рекомбинации, известными в данной области и/или описанными в настоящем документе. Антитела можно также продуцировать в различных укороченных формах с помощью генов антител, в которых один или более стоп-кодона были введены выше естественного сайта терминации. Например, возможно создание комбинированного гена, кодирующего участок тяжелой цепи F(ab')₂, который может включать последовательности ДНК, кодирующие домен C_H1 и/или шарнирную область тяжелой цепи. Различные участки антител можно химически соединять стандартными способами или получать в виде единого белка способами генной инженерии.

[0044] 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. Термин «человеческое антитело» также может представлять собой антитело, которое получено из последовательностей иммуноглобулина зародышевой

5 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

10 человеческое антитело является по существу неиммуногенным у человека. Человеческие антитела классифицируют в группы на основании сходства их аминокислотных последовательностей. Таким образом, посредством поиска по сходству последовательностей можно выбирать антитело со сходной линейной последовательностью в качестве шаблона для создания человеческого антитела.

Аналогично антитела определенного примата (обезьяна, павиан, шимпанзе и т. д.), грызуна

15 (мышь, крыса, кролик, морская свинка, хомяк и т. п.) и других млекопитающих определяют особенностями антител такого вида, подрода, рода, подсемейства и семейства. Химерные антитела могут дополнительно включать любую комбинацию, указанную выше. Из-за таких изменений или вариаций необязательно и предпочтительно сохраняется или ослабевает иммуногенность у человека или другого вида относительно

20 немодифицированных антител. Таким образом, человеческое антитело отличается от химерного или гуманизированного антитела.

[0045] Следует отметить, что человеческое антитело может быть спродуцировано не относящимся к человеку животным, либо прокариотической или эукариотической клеткой, которая способна экспрессировать функционально перестроенные гены

25 человеческих иммуноглобулинов (например, тяжелую цепь и/или легкую цепь). Когда человеческое антитело является одноцепочечным антителом, оно может дополнительно содержать линкерный пептид, который отсутствует в нативных человеческих антителах. Например, Fv может содержать линкерный пептид, такой как от двух до

около восьми остатков глицина или других аминокислот, который соединяет

30 переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. Считается, что такие линкерные пептиды имеют человеческое происхождение.

[0046] 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 используют антитело, определенный фрагмент или вариант изобретения, причем отдельные компоненты, такие как переменная область, константная область и каркас, по отдельности и/или в совокупности, необязательно и предпочтительно имеют низкую иммуногенность.

Антитела, которые можно использовать в изобретении, необязательно характеризуются способностью оказывать лечебное действие на пациентов в течение продолжительного периода с поддающимся измерению ослаблением симптомов и низкой и/или приемлемой токсичностью. Низкая или допустимая иммуногенность и/или высокая аффинность, а также другие приемлемые свойства могут способствовать достижению терапевтических результатов. Под «низкой иммуногенностью» в настоящем документе понимают индукцию значительного повышения уровня антител НАНА (человеческие античеловеческие антитела), НАСА (человеческие антихимерные антитела) или НАМА (человеческие антимышинные антитела) у менее чем около 75% или предпочтительно у менее чем около 50% получающих лечение пациентов, и/или индукцию низких титров у получающих лечение пациентов (менее приблизительно 1 : 300, предпочтительно менее приблизительно 1 : 100) по результатам измерения иммуноферментным анализом методом двойных антигенов) (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 появление титруемых уровней антител к антителу к ИЛ-12 у пациентов, получавших лечение антителом к ИЛ-12, у менее 25% получавших лечение пациентов, предпочтительно у менее 10% пациентов, получавших лечение рекомендованной дозой в течение рекомендованного курса терапии в период лечения.

[0047] В контексте настоящего документа термин «человеческое антитело» относится к антителу, в котором по существу каждая часть белка (например, CDR, каркасная область, домены C_L, C_H (например, C_H1, C_H2 и C_H3), шарнир, (V_L, V_H)) является по существу неиммуногенной у человека, лишь с незначительными изменениями или вариациями последовательности. Аналогично антитела определенного примата (обезьяна, павиан, шимпанзе и т. д.), грызуна (мышь, крыса, кролик, морская свинка, хомяк и т. п.) и других млекопитающих определяются особенностями антител такого вида, подрода, рода, подсемейства, семейства. Химерные антитела дополнительно включают любую комбинацию, указанную выше. Из-за таких изменений или вариаций необязательно и предпочтительно сохраняется

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

[0048] Можно также применять биспецифические антитела, например DuoBody® (биспецифические антитела), гетероспецифические, гетероконъюгатные или подобные антитела, которые представляют собой моноклональные, предпочтительно человеческие или гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания с по меньшей мере двумя различными антигенами. Способы получения биспецифических антител известны специалистам в данной области. Обычно рекомбинантная продукция биспецифических антител основана на коэкспрессии двух пар тяжелая цепь / легкая цепь иммуноглобулинов, причем две тяжелые цепи обладают различными видами специфичности (Milstein and Cuello, Nature 305:537 (1983)). Из-за случайного распределения тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов эти гибридомы (квадромы) образуют смесь из 10 различных возможных молекул антител, причем только одна из них имеет правильную биспецифическую структуру. Очистка нужной молекулы, которую обычно выполняют с помощью аффинной хроматографии, может быть затруднительной и иметь низкий выход продукта, и для облегчения продукции биспецифических антител были разработаны различные стратегии.

[0049] Полноразмерные биспецифические антитела можно получать, например, путем обмена Fab-плечами (или обмена полумолекулами) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами, посредством введения в СНЗ-интерфейс тяжелой цепи в каждой полумолекуле замен, способствующих образованию гетеродимера из двух полумолекул антител, имеющих разную специфичность, либо *in vitro* в бесклеточной среде, либо с использованием коэкспрессии. Реакция обмена Fab-

плечами является результатом реакции дисульфидной изомеризации и диссоциации-ассоциации СНЗ-доменов. Восстановлены дисульфидные мостики тяжелых цепей в шарнирных областях исходных моноспецифических антител. Полученные свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител образуют дисульфидный мостик тяжелых цепей с цистеиновыми остатками второй исходной молекулы моноспецифического антитела, и одновременно происходит высвобождение СНЗ-доменов исходных антител и переформирование путем диссоциации-ассоциации. СНЗ-домены Fab-плеч можно конструировать с возможностью обеспечения гетеродимеризации, а не гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-плеча или полумолекулы, каждая из которых могут связываться с отдельным эпитопом.

[0050] Термин «гомодимеризация» в настоящем документе обозначает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих идентичные аминокислотные последовательности СНЗ. Термин «гомодимер» в настоящем документе обозначает антитело, имеющее две тяжелые цепи с идентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

[0051] Термин «гетеродимеризация» в настоящем документе обозначает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих неидентичные аминокислотные последовательности СНЗ. Термин «гетеродимер» в настоящем документе обозначает антитело, имеющее две тяжелые цепи с неидентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

[0052] Для получения полноразмерных биспецифических антител можно использовать стратегию «выступ во впадину» (см., например, международную публикацию РСТ № WO 2006/028936). Вкратце выбранные аминокислоты, образующие интерфейс между доменами СНЗ в человеческом IgG, можно подвергать мутации в положениях, влияющих на взаимодействия доменов СНЗ и тем самым способствовать образованию гетеродимера. Аминокислоту с короткой боковой цепью (впадина) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном, а аминокислоту с длинной боковой цепью (выступ) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном. После совместной экспрессии двух антител в результате предпочтительного взаимодействия тяжелой цепи с «впадиной» и тяжелой цепи с «выступом» образуется гетеродимер. Примерами пар замен в СНЗ, образующих выступ и впадину, являются (указано как модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи /

модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи):
 T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A,
 T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

- [0053] Можно использовать другие стратегии, такие как стимулирование
 5 гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических
 взаимодействий путем введения замен положительно заряженных остатков на одной
 поверхности СНЗ и отрицательно заряженных остатков на другой поверхности СНЗ,
 как описано в патентной публикации США № US2010/0015133; патентной
 публикации США № US2009/0182127; патентной публикации США
 10 № US2010/028637 или патентной публикации США № US2011/0123532. В других
 стратегиях гетеродимеризацию можно стимулировать путем следующих замен
 (указано модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой
 цепи / модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи):
 L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V,
 15 T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F,
 L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F или
 T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в патентной
 публикации США № US2012/0149876 или патентной публикации
 США № US2013/0195849.
- [0054] В дополнение к вышеописанным способам, биспецифические антитела можно
 20 создавать *in vitro* в бесклеточной среде посредством введения асимметричных мутаций
 в СНЗ-участках двух моноспецифических гомодимерных антител и образования
 биспецифических гетеродимерных антител из двух исходных моноспецифических
 гомодимерных антител в восстановительных условиях, что способствует изомеризации
 25 дисульфидной связи, в соответствии со способами, описанными в публикации
 международной патентной заявки № WO2011/131746. В способах первое
 моноспецифическое двухвалентное антитело и второе моноспецифическое
 двухвалентное антитело конструируют с возможностью обладания определенными
 30 заменами в домене СНЗ, способствующими стабильности гетеродимера; антитела
 инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных для обеспечения
 подверженности цистеинов в шарнирной области изомеризации дисульфидной связи;
 получая таким образом биспецифическое антитело в результате обмена Fab-плечами.
 Условия инкубации можно оптимально возвращать к невозстанавливающим. К
 примерам пригодных для использования восстанавливающих агентов относятся 2-

меркаптоэтиламин (2-МЕА), дитиотреитол (ДТТ), дитиоэритритол (ДТЕ), глутатион, трис(2-карбоксиитил)фосфин (ТСЕР), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстанавливающий агент выбран из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиитил)фосфина. Например, можно использовать инкубацию в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20 °С в присутствии по меньшей мере 25 мМ 2-МЕА или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при уровне рН 5–8, например при рН = 7,0 или при рН = 7,4.

[0055] В настоящем документе термины «эффективность» или «эффективный» в контексте дозы, схемы дозирования, лечения или способа относятся к эффективности конкретной дозы, схемы дозирования или схемы лечения. Эффективность можно измерять на основании изменений течения заболевания в ответ на введение агента настоящего изобретения. Например, антитело к ИЛ12/23р40 или к ИЛ23 по настоящему изобретению (например, антитело к ИЛ12/23р40 устекинумаб) вводят субъекту в количестве и в течение времени, которых достаточно для индукции улучшения, предпочтительно стойкого улучшения, в отношении по меньшей мере одного показателя, который отражает тяжесть расстройства, подлежащего лечению. Для определения, достаточно ли количества и времени лечения, оценивают различные показатели, отражающие степень патологии, заболевания или состояния субъекта. Такие показатели включают, например, клинически признанные показатели тяжести заболевания, симптомов или проявлений рассматриваемого расстройства. Степень улучшения, по существу, определяет врач, который может определить это на основании признаков, симптомов, биопсий или результатов других тестов, и который может также использовать анкеты, предлагаемые субъекту, такие как анкеты оценки качества жизни, разработанные для данного заболевания.

[0056] Термин «безопасность» в отношении дозы, схемы дозирования, лечения или способа с использованием антитела к ИЛ12/23р40 или к ИЛ23 настоящего изобретения (например, антитела к ИЛ12/23р40 устекинумаба) относится к благоприятному соотношению риск : польза с приемлемой частотой и/или приемлемой тяжестью возникающих в процессе лечения неблагоприятных явлений (называемых НЯ или НЯВЛ (неблагоприятные явления, возникшие в ходе лечения)) по сравнению со стандартным лекарственным препаратом или другим препаратом сравнения. Нежелательное явление — это неблагоприятное медицинское событие у пациента, которому ввели лекарственный препарат. В частности, термин «безопасный» в

отношении дозы, схемы дозирования или лечения антителом к ИЛ-12/23p40 или к ИЛ-23 настоящего изобретения относится к приемлемой частоте и/или приемлемой тяжести неблагоприятных явлений, связанных с введением антитела, если их возникновение считается возможно, вероятно или очень вероятно связанным с применением антитела к ИЛ-12/23p40 или к ИЛ-23.

Полезные свойства

[0057] 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, сердечно-сосудистого нарушения или заболевания, инфекционного, злокачественного и/или неврологического нарушения или заболевания, либо другого известного или определенного состояния связанного с ИЛ-12/23.

[0058] 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, которому требуется такое модулирование, лечение, ослабление, предотвращение или уменьшение симптомов, эффектов или механизмов. Эффективное количество может содержать количество от около 0,001 до 500 мг/кг для однократного (например, болюсного), многократного или непрерывного введения, или для достижения концентрации в сыворотке крови 0,01–5000 мкг/мл при однократном, многократном или непрерывном введении, или любой эффективный интервал или значение, как установлено и определено с применением известных способов, описанных в настоящем документе или известных специалистам в соответствующих областях.

Ссылки

[0059] Все цитируемые в настоящем документе публикации или патенты, будь они указаны конкретно или нет, полностью включены в настоящий документ путем ссылки, поскольку они показывают уровень развития на момент настоящего изобретения и/или предоставляют описание и необходимую информацию для настоящего изобретения. К

публикациям относятся любые научные или патентные публикации, или любая информация, доступная на любых носителях, включая все форматы записи, электронные и печатные форматы. Следующие ниже источники полностью включены в настоящий документ путем ссылки: Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987–2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994–2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997–2001).

10 **Антитела настоящего изобретения. Продукция и генерация**

[0060] По меньшей мере одно антитело к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23), применяемое в способе настоящего изобретения, может быть необязательно получено в клеточной линии, смешанной клеточной линии, иммортализованной клетке или клональной популяции иммортализованных клеток, как хорошо известно специалистам в данной области. См., например, публикации Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987–2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994–2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997–2001), каждая из которых полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

[0061] Предпочтительным антителом к ИЛ-12/23p40 является устекинумаб (Stelara®), имеющее аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO:7, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO:8, и аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO: 3; и аминокислотные последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6.

Предпочтительным антителом к ИЛ-23 является гуселькумаб (также называемый CNTO1959). Другие антитела к ИЛ-23 имеют последовательности, перечисленные в настоящем документе, и описаны в патенте США № 7,935,344, содержание которого полностью включено в настоящий документ путем ссылки).

[0062] 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 участок

(включая синтетические молекулы, такие как синтетические пептиды). Другие специфичные или общие антитела млекопитающих можно получать аналогичным образом. Получение иммуногенных антигенов и продукцию моноклонального антитела можно выполнять любым приемлемым способом.

5 [0063] В одном подходе гибридомы продуцируют путем слияния приемлемой иммортализованной клеточной линии (например, клеточной линии миеломы, такой как, без ограничений, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, L243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WENI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMALWA, NEURO
10 2A или т. п., или гетеромиелом, их продуктов слияния или любых клеток или слитых клеток, полученных из них, или любой другой приемлемой клеточной линии, известной в данной области) (см., например, www.atcc.org, www.lifetech.com и т. п.), с продуцирующими антитела клетками, такими как, без ограничений, выделенные или клонированные клетки селезенки, периферической крови, лимфы, миндалин или другие
15 иммунные клетки, или клетки с В-клетками или любыми другими клетками, экспрессирующими последовательности константной, или вариабельной, или каркасной областей, или CDR тяжелой или легкой цепи, в виде либо эндогенной, либо гетерологичной нуклеиновой кислоты, в виде рекомбинантной или эндогенной геномной ДНК, кДНК, рДНК, митохондриальной ДНК или РНК, хлоропластной ДНК
20 или РНК, гетерогенной ядерной (гя) РНК, мРНК, тРНК, одно-, двух- или трехцепочечной, гибридной и т. п. или любой их комбинации, происходящей из вирусов, бактерий, водорослей, прокариот, земноводных, насекомых, рептилий, рыб, млекопитающих, грызунов, лошадей, овец, коз, баранов, приматов, эукариот. См., например, Ausubel, выше, и Colligan, Immunology, выше, глава 2, полностью
25 включенные в настоящий документ путем ссылки.

[0064] 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,
30 кодирующей антитело, его определенный фрагмент или вариант настоящего изобретения, можно также использовать любую другую приемлемую клетку-хозяина. Слитые клетки (гибридомы) или рекомбинантные клетки можно выделять с помощью селективных условий культивирования или других известных приемлемых способов и клонировать путем предельного разведения или сортировки клеток или других

известных способов. Клетки, продуцирующие антитела с требуемой специфичностью, могут быть выбраны с помощью приемлемого анализа (например, ИФА).

[0065] Можно применять другие приемлемые способы продукции или выделения антител требуемой специфичности, включая, без ограничений, способы отбора рекомбинантного антитела из библиотеки пептидов или белков (например, без ограничений, библиотеки дисплея бактериофагов, рибосом, олигонуклеотидов, РНК, кДНК или т. п.; например, производства компаний Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, Великобритания; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, Германия; Biovation, Aberdeen, Scotland, Великобритания; BioInvent, Lund, Швеция; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Хома, Berkeley, штат Калифорния, США; Ixsys. См., например, EP 368,684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260 (12.05.94); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; PCT/US94/1234; WO92/18619; WO96/07754; (Scripps); WO96/13583, WO97/08320 (MorphoSys); WO95/16027 (BioInvent); WO88/06630; WO90/3809 (Dyax); US 4,704,692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Affymax); WO89/06283; EP 371 998; EP 550 400; (Хома); EP 229 046; PCT/US91/07149 (Ixsys); или стохастически полученных пептидов или белков — US 5723323, 5763192, 5814476, 5817483, 5824514, 5976862, WO 86/05803, EP 590 689 (Ixsys, предварительная публикация в Applied Molecular Evolution (AME); причем каждая из них включена в настоящий документ путем ссылки)), или способами, основанными на иммунизации трансгенных животных (например, мышей SCID, см. Nguyen et al., Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997); Sandhu et al., Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118 (1996); Eren et al., Immunol. 93:154-161 (1998), причем каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки, как и смежные патенты и заявки), которые способны продуцировать набор человеческих антител, как известно специалистам в данной области и/или описано в настоящем документе. Такие методики включают, без ограничений, рибосомный дисплей (Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942 (May 1997); Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135 (Nov. 1998)); технологии продукции антител из одиночной клетки (например, способ получения антител из отобранных лимфоцитов (SLAM) (патент США № 5,627,052, Wen et al., J. Immunol. 17:887-892 (1987); Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996)); микрокаплю в геле и проточную цитометрию (Powell et al., Biotechnol. 8:333-337 (1990); One Cell Systems, Cambridge, MA; Gray et al., J. Imm. Meth. 182:155-163 (1995); Kenny et al.,

Bio/Technol. 13:787-790 (1995)); B-cell selection (Steenbakkers et al., Molec. Biol. Reports 19:125–134 (1994); Jonak et al., Progress Biotech, Vol. 5, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands (1988)).

- 5 [0066] Кроме того, можно применять и хорошо известные специалистам в данной области способы конструирования или гуманизации нечеловеческих или человеческих антител. По существу, гуманизованное или модифицированное геной инженерией антитело имеет один или более аминокислотных остатков из источника, не относящегося к человеку, например, без ограничений, мыши, крысы, кролика,
- 10 приматов (исключая человека) или других млекопитающих. Эти аминокислотные остатки нечеловеческого происхождения заменяют остатками, которые часто называют «импортированными» остатками, поскольку их обычно берут из «импортированных» переменных, константных или других доменов известной человеческой последовательности.
- 15 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;
- 20 www.mrc-cpe.cam.ac.uk/ALIGNMENTS.php;
- www.kabatdatabase.com/top.html;
- [ftp.ncbi.nih.gov/repository/kabat](ftp://ncbi.nih.gov/repository/kabat);
- www.sciquest.com;
- www.abcam.com;
- 25 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;
- 30 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;

5 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;

www.bioinf.org.uk/abs; antibody.bath.ac.uk;

10 www.unizh.ch;

www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s;

www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.html;

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

www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;

15 www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;

www.jerini.de;

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

20 [0067] 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 приемлемой характеристики. В целом остатки CDR напрямую и в очень

25 значительной степени влияют на связывание с антигеном. Соответственно, сохраняются частично или все нечеловеческие или человеческие последовательности CDR, а нечеловеческие последовательности переменных и константных областей можно заменять человеческими или иными аминокислотами.

[0068] Антитела можно также необязательно гуманизировать или конструировать

30 человеческие антитела с сохранением высокой аффинности к антигену и иных благоприятных биологических свойств. Для достижения этой цели гуманизированные (или человеческие) антитела можно необязательно получать в процессе анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с помощью трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей.

Трехмерные модели иммуноглобулина являются общедоступными и известными специалистам в данной области. Существуют компьютерные программы, демонстрирующие и отображающие вероятные трехмерные конформационные структуры выбранных потенциальных последовательностей иммуноглобулина. Исследование этих изображений позволяет анализировать вероятную роль остатков в функционировании иммуноглобулиновой последовательности кандидата, т. е. проводить анализ остатков, которые влияют на способность иммуноглобулина кандидата связывать свой антиген. Таким образом, из типичных совпадающих и импортированных последовательностей можно выбирать и комбинировать остатки каркасной области (FR) так, чтобы получить требуемую характеристику антитела, например повышенную аффинность к целевому (-ым) антигену (-ам).

[0069] Кроме того, человеческое специфическое антитело к ИЛ-12/23p40 (или антитело к ИЛ-23), применяемое в способе настоящего изобретения, может содержать каркас легкой цепи зародышевой линии человека. В конкретных вариантах осуществления последовательность легкой цепи зародышевой линии выбрана из последовательностей VK человека, включая, без ограничений, A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, L1, L10, L11, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22, L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, O1, O11, O12, O14, O18, O2, O4 и O8. В определенных вариантах осуществления этот каркас легкой цепи зародышевой линии человека выбран из V1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-2, V1-20, V1-22, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V2-1, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17, V2-19, V2-6, V2-7, V2-8, V3-2, V3-3, V3-4, V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, V4-6, V5-1, V5-2, V5-4 и V5-6.

[0070] В других вариантах осуществления человеческое специфическое антитело к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23), применяемое в способе настоящего изобретения, может содержать каркас тяжелой цепи зародышевой линии человека. В конкретных вариантах осуществления этот каркас тяжелой цепи зародышевой линии человека выбран из VH1-18, VH1-2, VH1-24, VH1-3, VH1-45, VH1-46, VH1-58, VH1-69, VH1-8, VH2-26, VH2-5, VH2-70, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, 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.

[0071] В конкретных вариантах осуществления переменная область легкой цепи и/или переменная область тяжелой цепи содержит каркасную область или по

меньшей мере участок каркасной области (например, содержащий 2 или 3 подобласти, такие как FR2 и FR3). В определенных вариантах осуществления по меньшей мере FRL1, FRL2, FRL3 или FRL4 является полностью человеческим. В других вариантах осуществления по меньшей мере FRH1, FRH2, FRH3 или FRH4 является полностью человеческим. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере FRL1, FRL2, FRL3 или FRL4 представляет собой последовательность зародышевой линии (например, зародышевой линии человека) или содержит типичные совпадающие последовательности человека для данной каркасной области (широкодоступные 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.

[0072] Гуманизацию или конструирование антител настоящего изобретения можно выполнять с помощью любого известного способа, такого как, без ограничений, способ, описанный в: Winter (Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993), патентах США №: 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5,766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539; 4816567, PCT: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, причем каждый полностью включен в настоящий документ путем ссылки, включая приведенные в нем ссылки.

[0073] 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 применять сочетание модификаций аминокислот с одной или более дополнительными модификациями аминокислот, которые изменяют связывание с C1q и/или функцию комплементзависимой цитотоксичности в области Fc молекулы, связывающей ИЛ-23. Особый интерес может представлять такой начальный полипептид, который связывается с

C1q и проявляет комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Полипептиды с исходной активностью связывания с C1q, необязательно дополнительно обладающие способностью опосредовать CDC, можно модифицировать так, чтобы одна или обе этих активности усиливались. Модификации аминокислот, которые приводят к изменению C1q и/или модифицируют его функцию комплементзависимой цитотоксичности, описаны, например, в публикации WO0042072, которая включена в настоящий документ путем ссылки.

[0074] Как описано выше, возможно конструировать область Fc человеческого специфического антитела к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) настоящего изобретения с измененной эффекторной функцией, например, путем модификации связывания с C1q и/или связывания с FcγR и, таким образом, изменения активности комплементзависимой цитотоксичности (complement dependent cytotoxicity — CDC) и/или активности антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity — ADCC). «Эффекторные функции» отвечают за активацию или уменьшение биологической активности (например, у субъекта).

Примеры эффекторных функций включают, без ограничений: связывание с C1q; КЗЦ; связывание с Fc-рецептором; АЗКЦ; фагоцитоз; угнетение рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток; BCR) и т. д. Для таких эффекторных функций может потребоваться, чтобы область Fc была объединена со связывающим доменом (например, вариабельным доменом антитела), и можно их оценивать с помощью различных анализов (например, анализ связывания Fc, анализ ADCC, анализ CDC и т. д.).

[0075] 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). В альтернативном варианте осуществления, если требуется снизить или устранить эту эффекторную функцию, можно конструировать вариантную Fc-область со сниженной активностью CDC и/или со сниженной активностью ADCC. В других вариантах осуществления можно повысить только одну из этих активностей и необязательно также снизить другую активность (например, создать вариант области Fc с повышенной активностью ADCC, но со сниженной активностью CDC, и наоборот).

[0076] Мутации Fc можно также вводить в конструкции для изменения их взаимодействия с неонатальным рецептором Fc (FcRn) и улучшения их фармакокинетических свойств. Была описана коллекция вариантов Fc человека с

улучшенным связыванием с FcRn (Shields et al., (2001). High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR, J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

[0077] Другой тип аминокислотной замены служит для изменения модели

5 гликозилирования области Fc человеческого специфического 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 углеводной функциональной группы к боковой цепи остатка аспарагина. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров: N-
10 ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы, к гидроксиаминокислоте, чаще всего к серину или треонину, хотя также можно воспользоваться 5-гидроксипролином или 5-гидроксилизином. Распознаваемые последовательности для ферментативного присоединения углеводного звена к пептидным последовательностям с боковой цепью аспарагина представляют собой аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, причем
15 X — любая аминокислота, за исключением пролина. Таким образом, наличие любой из этих пептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования.

[0078] Модель гликозилирования можно изменять, например, путем удаления одного или более сайтов гликозилирования, находящихся в полипептиде, и/или добавлением

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

30 [0079] В определенных вариантах осуществления человеческое специфическое антитело к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) настоящего изобретения экспрессируется в клетках, которые экспрессируют бета-(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnT III) так, что GnT III присоединяет GlcNAc к человеческому антителу к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23). Способы продукции антител таким путем представлены в

WO/9954342, WO/03011878, патентной публикации 20030003097A1 и публикации Umana et al., *Nature Biotechnology*, 17: 176–180, Feb. 1999; причем каждая из них конкретно полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

[0080] Человеческое антитело к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23) можно также
5 необязательно генерировать путем иммунизации трансгенного животного (например, мыши, крысы, хомяка, примата, не относящегося к человеку и т. п.), способных продуцировать набор человеческих антител, как описано в настоящем документе и/или как известно специалистам в данной области. Клетки, которые продуцируют человеческие антитела к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23), можно выделять из организма
10 таких животных и иммортализовать подходящими способами, такими как описаны в настоящем документе.

[0081] Трансгенных мышей, которые могут продуцировать набор человеческих антител, связывающихся с человеческими антигенами, можно создавать известными способами (например, без ограничений, описанными в патентах США №: 5,770,428,
15 5,569,825, 5,545,806, 5,625,126, 5,625,825, 5,633,425, 5,661,016 и 5,789,650, выданных Lonberg et al.; выданных Jakobovits et al. WO 98/50433, Jakobovits et al. WO 98/24893, Lonberg et al. WO 98/24884, Lonberg et al. WO 97/13852, Lonberg et al. WO 94/25585, Kucherlapate et al. WO 96/34096, Kucherlapate et al. EP 0463 151 B1, Kucherlapate et al. EP 0710 719 A1, Surani et al. патент США № 5,545,807, Bruggemann et al. WO 90/04036,
20 Bruggemann et al. EP 0438 474 B1, Lonberg et al. EP 0814 259 A2, Lonberg et al. GB 2 272 440 A, в Lonberg et al. *Nature* 368:856–859 (1994), Taylor et al., *Int. Immunol.* 6(4): 579–591 (1994), Green et al., *Nature Genetics* 7:13–21 (1994), Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146–156 (1997), Taylor et al., *Nucleic Acids Research* 20(23):6287–6295 (1992), Tuailon et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 90(8):3720–3724 (1993), Lonberg et al., *Int Rev Immunol*
25 13(1):65–93 (1995) и Fishwald et al., *Nat Biotechnol* 14(7):845–851 (1996), причем все полностью включены в настоящий документ путем ссылки). По существу эти мыши имеют по меньшей мере одну содержащую трансген ДНК из по меньшей мере одного локуса человеческого иммуноглобулина, который функционально перестроен или который можно подвергать функциональной перестройке. Эндогенный локус
30 иммуноглобулина у таких мышей можно разрушать или делетировать, чтобы лишить животное способности продуцировать антитела, кодируемые эндогенными генами.

[0082] Скрининг антител на специфичность связывания со сходными белками или фрагментами удобно проводить с использованием библиотек пептидного дисплея. Данный способ включает скрининг больших наборов пептидов для выявления

отдельных пептидов, имеющих требуемую функцию или структуру. Скрининг антител в библиотеках пептидного дисплея хорошо известен специалистам в данной области. Длина отображаемых пептидных последовательностей может составлять от 3 до 5000 или более аминокислот, зачастую длина составляет 5–100 аминокислот и часто длина составляет от около 8 до 25 аминокислот. В дополнение к способам получения пептидных библиотек прямым химическим синтезом было описано несколько способов с рекомбинантными ДНК. Один из таких способов предусматривает отображение пептидной последовательности на поверхности бактериофага или клетки. Каждый бактериофаг или клетка содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую конкретную отображаемую пептидную последовательность. Такие способы описаны в патентных публикациях РСТ № 91/17271, 91/18980, 91/19818 и 93/08278.

[0083] Другие системы для создания пептидных библиотек имеют аспекты как способов химического синтеза *in vitro*, так и рекомбинантных способов. См. патентные публикации РСТ № 92/05258, 92/14843 и 96/19256. См. также патенты США № 5,658,754; и 5,643,768. В продаже имеются библиотеки пептидных дисплеев, векторы и наборы для скрининга таких производителей, как Invitrogen (Carlsbad, штат Калифорния, США) и Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire, Великобритания). См., например, патенты США № 4704692, 4939666, 4946778, 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 Хома, Colligan, упомянутое; Ausubel, выше; или Sambrook, выше, каждый из указанных патентов и публикаций полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

[0084] Антитела, применяемые в способе настоящего изобретения, можно также получать с помощью по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23), с получением трансгенных животных или млекопитающих, таких как козы, коровы, лошади, овцы, кролики и т. п., которые продуцируют такие антитела в своем молоке. Таких животных можно создавать с помощью известных способов. См., например, без ограничений, патенты США № 5,827,690; 5,849,992; 4,873,316; 5,849,992; 5,994,616; 5,565,362; 5,304,489 и т. п., причем каждый из них полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

[0085] Антитела, применяемые в способе настоящего изобретения, можно дополнительно получать с использованием по меньшей мере одной нуклеиновой

кислоты, кодирующей антитело к ИЛ-12/23p40 (или к ИЛ-23), с получением трансгенных растений и культур растительных клеток (например, без ограничений, табака и маиса), которые продуцируют такие антитела, их определенные участки или варианты в органах растений или в клеточных культурах из них. В качестве не

5 имеющего ограничительного характера примера трансгенные листья табака, экспрессирующие рекомбинантные белки, успешно использовали для получения больших количеств рекомбинантных белков, например, с использованием индуцируемого промотора. См., например, Cramer et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240:95-118 (1999) и приведенные в этой публикации ссылки. Кроме того, трансгенный

10 маис использовали для экспрессии белков млекопитающих на уровне промышленного производства, причем их биологическая активность была эквивалентна активности белков, которые продуцировали в других системах рекомбинации или очищали из природных источников. См., например, Hood et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 464:127-147 (1999) и приведенные в этой публикации ссылки. Антитела, включая и фрагменты

15 антител, такие как одноцепочечные антитела (scFv), также продуцировали в больших количествах из семян трансгенных растений, в том числе из семян табака и клубней картофеля. См., например, Conrad et al., *Plant Mol. Biol.* 38:101-109 (1998) и приведенные в этой публикации ссылки. Таким образом, антитела настоящего изобретения можно также продуцировать с использованием трансгенных растений в

20 соответствии с известными способами. См. также, например, Fischer et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30:99-108 (Oct., 1999), Ma et al., *Trends Biotechnol.* 13:522-7 (1995); Ma et al., *Plant Physiol.* 109:341-6 (1995); 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.

25 [0086] Антитела, применяемые в способе по настоящему изобретению, могут связываться с человеческим ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 в широком интервале аффинности (K_D). В предпочтительном варианте осуществления мАт человека может необязательно связываться с человеческим ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 с высокой аффинностью. К примеру, мАт человека может связываться с человеческим ИЛ-12/ИЛ-

30 23p40 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.

[0087] Аффинность или авидность антитела для антигена можно определять экспериментально любым приемлемым способом (см., например, Berzofsky, *et al.*,

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

10 Молекулы нуклеиновых кислот

[0088] Используя приведенную в настоящем документе информацию, например нуклеотидные последовательности, кодирующие по меньшей мере 70–100% последовательных аминокислот по меньшей мере одной из переменных областей или CDR-областей легкой или тяжелой цепи, описанных в настоящем документе, наряду с другими последовательностями, описанными в настоящем документе, их определенные фрагменты, варианты или консенсусные последовательности или депонированный вектор, содержащий по меньшей мере одну из этих последовательностей, молекулу нуклеиновой кислоты настоящего изобретения, кодирующую по меньшей мере одно антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23, можно получать способами, описанными в настоящем документе или известными специалистам в данной области.

[0089] Молекулы нуклеиновых кислот настоящего изобретения могут иметь форму РНК, такой как мРНК, гяРНК, тРНК или любой другой формы, или форму ДНК, включая, без ограничений, кДНК и геномную ДНК, полученные путем клонирования, путем синтеза или любых их комбинаций. ДНК может быть трехцепочечной, двухцепочечной, одноцепочечной или комбинированной. Любая часть по меньшей мере одной цепи ДНК или РНК может быть кодирующей цепью, также известной как прямая цепь, или не кодирующей цепью, также называемой обратной цепью.

[0090] Выделенные молекулы нуклеиновых кислот, применяемые в способе настоящего изобретения, могут включать молекулы нуклеиновых кислот, содержащие открытую рамку считывания (ORF), необязательно с одним или более интронов, например, без ограничений, для по меньшей мере одного определенного участка по меньшей мере одной CDR, такой как CDR1, CDR2 и/или CDR3 по меньшей мере одной тяжелой цепи или легкой цепи; молекулы нуклеиновых кислот, содержащие кодирующую последовательность для антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 или

вариабельной области; и молекулы нуклеиновых кислот, которые содержат последовательность нуклеотидов, по существу отличающуюся от последовательностей нуклеотидов, описанных выше, но которая, тем не менее, вследствие вырожденности генетического кода кодирует по меньшей мере одно антитело к ИЛ-12/ИЛ-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/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23, применяемые в способе по настоящему изобретению. См., например, Ausubel, et al., выше, и такие варианты нуклеиновых кислот включены в настоящее изобретение. Не имеющие ограничительного характера примеры выделенных молекул нуклеиновых кислот включают нуклеиновые кислоты, кодирующие соответственно HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 и LC CDR3.

[0091] Как указано в настоящем документе, молекулы нуклеиновых кислот, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23, могут включать, без ограничения, таковую, отдельно кодирующую последовательность аминокислот фрагмента антитела; кодирующую последовательность для полноразмерного антитела или его участка; кодирующую последовательность для антитела, фрагмента или участка, а также дополнительные последовательности, такие как кодирующая последовательность по меньшей мере для одного сигнального лидерного или слитого пептида при наличии или в отсутствие вышеуказанных дополнительных кодирующих последовательностей, таких как по меньшей мере один интрон, вместе с дополнительными некодирующими последовательностями, включающими без ограничений некодирующие 5'- и 3'-последовательности, такие как транскрибируемые нетранслируемые последовательности, которые участвуют в транскрипции, процессинге мРНК, включая сигналы сплайсинга и полиаденилирования (например, связывание рибосом и стабильность мРНК); дополнительную кодирующую последовательность, которая кодирует дополнительные аминокислоты, такие как аминокислоты, которые обеспечивают дополнительную функциональность. Таким образом, кодирующая антитело последовательность может быть слита с маркерной последовательностью, такой как последовательность, кодирующая пептид, что облегчает очистку слитого антитела, содержащего фрагмент или участок антитела.

Селективная гибридизация полинуклеотидов с описанным в настоящем документе полинуклеотидом

[0092] В способе настоящего изобретения применяют выделенные нуклеиновые кислоты, которые в условиях селективной гибридизации образуют гибридный полинуклеотид, описанный в настоящем документе. Таким образом, полинуклеотиды настоящего варианта осуществления можно применять для выделения, обнаружения и/или количественного определения нуклеиновых кислот, содержащих такие полинуклеотиды. Например, полинуклеотиды настоящего изобретения можно использовать для идентификации, выделения или амплификации частичных или полноразмерных клонов в депонированной библиотеке. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды представляют собой последовательности геномной ДНК или кДНК, выделенные или иным образом комплементарные к кДНК из библиотеки нуклеиновых кислот человека или млекопитающего.

[0093] Библиотека кДНК предпочтительно содержит по меньшей мере 80% полноразмерных последовательностей, более предпочтительно по меньшей мере 85% или 90% полноразмерных последовательностей и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% полноразмерных последовательностей. Библиотеки кДНК можно нормализовать для увеличения представительства редких последовательностей. Для последовательностей с низкой или умеренной идентичностью относительно комплементарных последовательностей гибридизацию обычно, но не исключительно осуществляют в условиях низкой или умеренной жесткости. Для последовательностей с большей идентичностью необязательно применяют условия средней и высокой жесткости. Условия низкой жесткости допускают селективную гибридизацию последовательностей с уровнем идентичности около 70%, и их можно применять для идентификации ортологических или паралогических последовательностей.

[0094] Необязательно полинуклеотиды будут кодировать по меньшей мере участок антитела. Полинуклеотиды охватывают последовательности нуклеотидов, которые можно использовать для селективной гибридизации с полинуклеотидом, кодирующим антитело настоящего изобретения. См., например, Ausubel, выше; Colligan, выше, каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Конструирование нуклеиновых кислот

[0095] Как хорошо известно специалистам в данной области, выделенные нуклеиновые кислоты можно получать с помощью (a) способов рекомбинации, (b) способов синтеза, (c) способов очистки и/или (d) их сочетаний.

[0096] Нуклеиновые кислоты могут для удобства содержать последовательности, дополнительные к полинуклеотиду настоящего изобретения. Например, в нуклеиновую кислоту можно встраивать сайт множественного клонирования, содержащий один или более сайтов эндонуклеазной рестрикции, чтобы облегчить выделение полинуклеотида.

5 Кроме того, можно встраивать транскрибируемые последовательности, чтобы облегчить выделение транскрибированного полинуклеотида настоящего изобретения. К примеру, удобным средством очистки белков настоящего изобретения служит введение последовательности маркера гексагистидина. Нуклеиновая кислота по настоящему изобретению, за исключением кодирующей последовательности, может необязательно
10 представлять собой вектор, адаптер или линкер для клонирования и/или экспрессии полинуклеотида настоящего изобретения.

[0097] В такие клонирующие и/или экспрессионные последовательности можно добавлять дополнительные последовательности, чтобы оптимизировать их функцию при клонировании и/или экспрессии, способствовать выделению полинуклеотида или
15 улучшать введение полинуклеотида в клетку. Использование векторов клонирования, экспрессионных векторов, адаптеров и линкеров хорошо известно специалистам в данной области (см., например, Ausubel выше; или Sambrook, выше).

Рекомбинантные способы конструирования нуклеиновых кислот

[0098] Композиции выделенных нуклеиновых кислот, таких как РНК, кДНК, геномная ДНК или любая их комбинация, можно получать из биологических источников с помощью любого числа способов клонирования, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления для идентификации желательной последовательности в библиотеке кДНК или геномной ДНК используют олигонуклеотидные зонды, которые селективно гибридизуются в жестких условиях с
25 полинуклеотидами настоящего изобретения. Выделение РНК и конструирование библиотек кДНК и геномных библиотек хорошо известно специалистам в данной области. (см., например, Ausubel выше; или Sambrook, выше).

Способы скрининга и выделения нуклеиновых кислот

[0099] Скрининг библиотеки кДНК или геномной ДНК можно проводить с помощью
30 зонда на основе последовательности полинуклеотида, применяемого в способе настоящего изобретения, такого как описанные в настоящем документе. Зонды можно использовать для гибридизации с последовательностями геномной ДНК или кДНК, чтобы выделять гомологичные гены в тех же самых или разных организмах. Специалистам в данной области должно быть понятно, что для анализа можно

использовать различные степени жесткости гибридизации; и что жесткой может быть либо гибридизация, либо среда для отмывки. По мере того как условия гибридизации становятся более жесткими, требуемая для образования дуплекса степень комплементарности между зондом и мишенью возрастает. Жесткость условий можно контролировать одним или более из следующих параметров: температура, ионная сила, рН и присутствие частично денатурирующего растворителя, такого как формамид. Например, жесткость условий гибридизации обычно изменяют путем смены полярности раствора реагентов, например посредством изменения концентрации формамида в интервале от 0 до 50%. Степень комплементарности (идентичности последовательностей), необходимая для детектируемого связывания, варьирует в соответствии с жесткостью среды для гибридизации и/или среды для отмывки. Оптимальная степень комплементарности составляет 100%, или 70–100%, или любой интервал, или значение в нем. Однако следует понимать, что небольшие вариации последовательностей в зондах и праймерах возможно компенсировать путем уменьшения строгости среды гибридизации и/или среды для промывания.

[0100] Способы амплификации РНК или ДНК хорошо известны специалистам в данной области и могут применяться в соответствии с настоящим изобретением без лишних экспериментов на основании представленных в настоящем документе инструкций и рекомендаций.

[0101] Известные способы амплификации ДНК или РНК включают, без ограничений, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и связанные с ней процессы амплификации (см., например, патенты США №№ 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159, 4,965,188, выданные Mullis, et al.; 4,795,699 и 4,921,794, выданные Tabor, et al; 5,142,033, выданный Innis; 5,122,464, выданный Wilson, et al.; 5,091,310, выданный Innis; 5,066,584, выданный Gyllensten, et al; 4,889,818, выданный Gelfand, et al; 4,994,370, выданный Silver, et al; 4,766,067, выданный Biswas; 4,656,134, выданный Ringold), и опосредованную РНК амплификацию, в которой используют в качестве матрицы для синтеза двухцепочечной ДНК обратную РНК к последовательности-мишени (патент США № 5,130,238, выданный Malek, et al, с торговым названием NASBA), полное содержание всех этих ссылок включено в настоящий документ путем ссылки. (см., например, Ausubel выше, или Sambrook, выше).

[0102] Например, технологию полимеразной цепной реакции (ПЦР) можно использовать для амплификации последовательностей полинуклеотидов, применяемых в способе по настоящему изобретению, и связанных с ними генов прямо из библиотек

геномной ДНК или кДНК. ПЦР и другие способы амплификации *in vitro* можно также использовать, например, для клонирования последовательностей нуклеотидов, кодирующих белки, которые требуется экспрессировать, чтобы применять зонды нуклеиновых кислот для обнаружения наличия желательной мРНК в пробах, секвенирования нуклеиновых кислот или иных целей. Примеры способов, достаточные для определения специалистам в данной области способов амплификации *in vitro*, можно найти в Berger, выше, Sambrook, выше, и Ausubel, выше, а также в Mullis, et al., патенте США № 4,683,202 (1987); и Innis, et al., PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990). Имеющиеся в продаже наборы для амплификации геномной последовательности ПЦР известны специалистам в данной области. См., например, набор Advantage-GC Genomic PCR Kit (Clontech). Кроме того, возможно использование, например, белка 32 гена T4 (Boehringer Mannheim) для увеличения выхода реакции при ПЦР длинных фрагментов.

Синтетические способы конструирования нуклеиновых кислот

[0103] Выделенные нуклеиновые кислоты, применяемые в способе по настоящему изобретению, также можно получать прямым химическим синтезом с помощью известных способов (см., например, Ausubel, et al., выше). Химическим синтезом по существу получают одноцепочечный олигонуклеотид, который можно преобразовать в двухцепочечную ДНК путем гибридизации с комплементарной последовательностью либо полимеризации с ДНК-полимеразой и одиночной цепью в качестве матрицы. Специалистам в данной области известно, что химический синтез ДНК может ограничиваться последовательностями длиной в 100 или более оснований, однако можно лигировать короткие последовательности, получая более длинные последовательности.

Кассеты рекомбинантной экспрессии

[0104] В настоящем изобретении применяются кассеты рекомбинантной экспрессии, содержащие нуклеиновую кислоту. Последовательность нуклеотидов, например последовательность кДНК или геномную последовательность, кодирующую антитело для применения в способе настоящему изобретению, можно использовать для конструирования кассеты рекомбинантной экспрессии, которую можно вводить по меньшей мере в одну желаемую клетку-хозяина. Кассета рекомбинантной экспрессии, как правило, содержит полинуклеотид, функционально связанный с регуляторными последовательностями инициации транскрипции, которые направляют трансляцию полинуклеотида в предназначенной для нее клетке-хозяине. Для направления

экспрессии нуклеиновых кислот могут применяться как гетерологичные, так и негетерологичные (т. е. эндогенные) промоторы.

[0105] 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.

10 **Векторы и клетки-хозяева**

[0106] Настоящее изобретение также относится к векторам, которые включают выделенные молекулы нуклеиновых кислот, клеткам-хозяевам, которые получены методами генной инженерии с рекомбинантными векторами, и к получению по меньшей мере одного антитела к ИЛ-23 с помощью рекомбинантных методов, которые хорошо известны в данной области. См., например, Sambrook et al., упомянутое; Ausubel, et al., упомянутое; причем каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

[0107] Полинуклеотиды можно необязательно соединять с вектором, содержащим селективный маркер для размножения в организме-хозяине. По существу плазмидный вектор вводят в осадок, такой как осадок фосфата кальция, или в комплекс с заряженным липидом. Если в качестве вектора используют вирус, его можно упаковывать *in vitro* с помощью приемлемой упаковочной клеточной линии и впоследствии вводить внутрь клеток-хозяев.

[0108] Вставку ДНК необходимо функционально связывать с пригодным промотором. Экспрессионные конструкторы дополнительно содержат сайты для инициации и терминации транскрипции, а в транскрибируемой области — сайт связывания рибосомы для трансляции. Кодировующий участок зрелых транскриптов с экспрессией конструкторами предпочтительно содержит иницирующую трансляцию в 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.

[0109] Экспрессионные векторы предпочтительно, но необязательно включают по меньшей мере один селективный маркер. Такие маркеры включают, например, без ограничений, гены устойчивости к метотрексату (MTX), дигидрофолатредуктазе

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

[0110] По меньшей мере одно антитело, применяемое в способе настоящего изобретения, можно экспрессировать в модифицированной форме, такой как гибридный белок, и оно может включать не только сигналы секреции, но также и дополнительные гетерологичные функциональные области. Например, к N-концу антитела можно добавлять область дополнительных аминокислот, особенно заряженные аминокислоты, для повышения стабильности и персистенции антитела в клетке-хозяине, а также в ходе очистки или в ходе последующих манипуляций и хранения. Кроме того, к антителу настоящего изобретения для упрощения очистки можно добавлять пептидные звенья. Такие области можно удалять перед получением антитела или по меньшей мере одного его фрагмента. Такие способы описаны в многочисленных стандартных лабораторных руководствах, например, Sambrook, упомянутое, главы 17.29–17.42 и 18.1–18.74; Ausubel, упомянутое, главы 16, 17 и 18.

[0111] Специалисты в данной области знают множество экспрессирующих систем, доступных для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, применяемый в способе настоящего изобретения. В альтернативном варианте осуществления нуклеиновые кислоты можно экспрессировать в клетке-хозяине путем запуска (путем процедуры) в клетке-хозяине, которая содержит эндогенную ДНК, кодирующую антитело. Такие способы хорошо известны специалистам в данной области, например, описаны в патентах США № 5,580,734, 5,641,670, 5,733,746 и 5,733,761, полностью включенных в настоящий документ путем ссылки.

[0112] Примером клеточных культур, используемых для получения антител, их определенных участков или вариантов, являются клетки млекопитающих. Системы клеток млекопитающих часто используют в виде монослоев клеток, однако можно также использовать суспензии клеток млекопитающих или биореакторы. В данной области разработано несколько приемлемых линий клеток-хозяев, способных

5 экспрессировать интактные гликозилированные белки, в частности линии клеток COS-1 (например, ATCC CRL 1650), COS-7 (например, ATCC CRL-1651), HEK293, ВНК21 (например, ATCC CRL-10), CHO (например, ATCC CRL 1610) и BSC-1 (например, ATCC CRL-26), клетки Cos-7, клетки CHO, клетки her G2, клетки P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 293, клетки HeLa и т. п., например, производства Американской коллекции

10 типовых культур, г. Манассас, штат Вирджиния, США (www.atcc.org).

Предпочтительные клетки-хозяева включают клетки лимфоидного происхождения, такие как миеломные и лимфомные клетки. Более предпочтительны клетки-хозяева P3X63Ag8.653 (каталожный номер ATCC CRL-1580) и клетки SP2/0-Ag14 (каталожный

15 номер ATCC CRL-1851). В особенно предпочтительном варианте осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку линий P3X63Ab8.653 или SP2/0-Ag14.

[0113] Экспрессионные векторы для этих клеток могут включать одну или более из следующих последовательностей для контроля экспрессии, таких как, без ограничений,

20 точка начала репликации; промотор (например, поздние или ранние промоторы SV40, промотор CMV (патенты США № 5,168,062; 5,385,839), промотор HSV tk, промотор pgk (фосфоглицераткиназа), промотор EF-1-альфа (патент США № 5,266,491), по меньшей мере один промотор человеческого иммуноглобулина; энхансер и/или информационные сайты для процессинга, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования (например, сайт присоединения поли-А

25 большого Т-Ag SV40) и последовательности терминаторов транскрипции. См., например, Ausubel et al., упомянутое; Sambrook et al., упомянутое. Для получения нуклеиновых кислот или белков по настоящему изобретению можно использовать и другие известные и/или поставляемые клетки, например по каталогу American Type

30 Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (www.atcc.org), либо из других известных или коммерческих источников.

[0114] В случае использования эукариотических клеток-хозяев в вектор, как правило, встраивают последовательности полиаденилирования или терминации транскрипции. Например, в качестве последовательности терминации можно

использовать последовательность полиаденилирования из гена бычьего гормона роста. Возможно также добавление последовательностей для точного сплайсинга транскрипта. Примером последовательности сплайсинга служит интрон VP1 из SV40 (Sprague, et al., J. Virol. 45:773-781 (1983)). Кроме того, в вектор можно добавлять последовательности генов для контроля репликации в клетке-хозяине, известные в данной области.

Очистка антитела

[0115] Антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23 можно выделять из рекомбинантных клеточных культур и очищать хорошо известными способами, включая, без ограничений, очистку с помощью белка А, осаждение сульфатом аммония или этанолом, экстракцию кислотой, анионо- или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, гидрофобную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию на гидроксипатите и хроматографию на лектине. Для очистки можно также использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). См., например, Colligan, Current Protocols in Immunology, или Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997–2001), например, главы 1, 4, 6, 8, 9, 10, причем каждая полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

[0116] Антитела, применяемые в способе настоящего изобретения, включают очищенные естественным путем продукты, продукты химического синтеза и продукты, получаемые при помощи рекомбинантных технологий из эукариотических клеток-хозяев, включая, например, клетки дрожжей, высших растений, насекомых и млекопитающих. В зависимости от хозяина, используемого в способе рекомбинантной продукции, антитело может быть гликозилированным или может быть негликозилированным, причем гликозилированное антитело является предпочтительным. Такие способы описаны в многочисленных стандартных лабораторных руководствах, например Sambrook, упомянутое, разделы 17.37–17.42; Ausubel, упомянутое, главы 10, 12, 13, 16, 18 и 20, Colligan, Protein Science, упомянутое, главы 12–14, причем все публикации полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

Антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23

[0117] Антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40 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),

5 константную область тяжелой или легкой цепи (например, содержащую по меньшей мере один C_H1, шарнир 1, шарнир 2, шарнир 3, шарнир 4, C_H2 или C_H3, или их фрагмент, дополнительно необязательно содержащие по меньшей мере одну замену, вставку или делецию), или любую их часть, которую можно встроить в антитело.

Антитело может включать антитела любого млекопитающего, такого как, без

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

[0118] Выделенные антитела, применяемые в способе по настоящему изобретению, содержат последовательности аминокислот антител, описанных в настоящем документе, кодируемые любым приемлемым полинуклеотидом, или любое выделенное

15 или полученное антитело. Человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с человеческим ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 и, таким образом, частично или значительно нейтрализует по меньшей мере один вид биологической активности этого белка. Антитело, или его определенный участок, или вариант, которое частично или предпочтительно по существу нейтрализует по меньшей мере одну биологическую

20 активность по меньшей мере одного белка или фрагмента ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23, может связывать белок или фрагмент и, таким образом, ингибировать активности, опосредуемые связыванием ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 с рецептором к ИЛ-12 и/или ИЛ-23, или с другими зависимыми от ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 или опосредуемыми им механизмами. В контексте настоящего документа термин «нейтрализующее

25 антитело» относится к антителу, которое может ингибировать зависимость от ИЛ-12/ИЛ-23p40 или от ИЛ-23 активность на около 20–120%, предпочтительно по меньшей мере на около 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% или более, в зависимости от метода анализа. Способность антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 ингибировать зависимость от ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 активность

30 предпочтительно оценивают с помощью по меньшей мере одного приемлемого метода анализа белка ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-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 человеческого антитело содержит тяжелую цепь или определенный фрагмент IgG, например, по меньшей мере один 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 не относящегося к человеку

5 млекопитающего, содержащего трансгены по меньшей мере одной человеческой легкой цепи (например, IgG, IgA и IgM), как описано в настоящем документе и/или как известно специалистам в данной области. В другом варианте осуществления человеческого антитело к ИЛ-23 содержит тяжелую цепь IgG1 и легкую цепь IgG1.

[0119] Антитело связывается с по меньшей мере одним определенным эпитопом, 10 специфичным по меньшей мере к одному белку ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23, его субъединице, фрагменту, участку или любой их комбинации. По меньшей мере один эпитоп может содержать по меньшей мере одну область связывания с антителом, которая содержит по меньшей мере один участок белка, причем данный эпитоп предпочтительно содержит по меньшей мере один внеклеточный, растворимый, 15 гидрофильный, внешний или цитоплазматический участок белка.

[0120] По существу человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит антигенсвязывающую область, которая содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR1, CDR2 и CDR3) человека или вариант по меньшей мере одной варибельной области тяжелой цепи и по меньшей 20 мере одной определяющей комплементарность области человека (CDR1, CDR2 и CDR3) или вариант по меньшей мере одной варибельной области легкой цепи. Последовательности CDR можно получать из последовательностей зародышевой линии человека, или они могут обладать близким сходством с последовательностями зародышевой линии. Например, можно использовать CDR из синтетической 25 библиотеки, полученной из исходных не относящихся к человеку CDR. Эти CDR можно образовывать из исходной не относящейся к человеку последовательности путем встраивания консервативных замен. В другом конкретном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий участок или вариант может иметь антигенсвязывающую область, которая содержит по меньшей мере участок по меньшей 30 мере одной CDR легкой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и/или CDR3), имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую CDR 1, 2 и/или 3.

[0121] Такие антитела можно получать путем химического связывания различных участков (например, CDR, каркасной области) антитела с помощью стандартных способов получения и экспрессии молекулы (т. е. одной или более) нуклеиновой

кислоты, которая кодирует антитело, с помощью стандартных способов технологии рекомбинантных ДНК или с помощью другого приемлемого способа.

[0122] Специфическое антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 может содержать по меньшей мере одну из переменных областей тяжелой или легкой цепи, имеющую определенную аминокислотную последовательность. Например, в предпочтительном варианте осуществления антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 содержит антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40 с переменной областью тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, и переменной областью легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8. Специфическое антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 может также содержать по меньшей мере одну из тяжелой или легкой цепи, имеющей определенную аминокислотную последовательность. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 включает антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40 с тяжелой цепью, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11. Антитела, которые связываются с человеческим ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 и которые содержат определенную переменную область тяжелой или легкой цепи, можно получать приемлемыми способами, такими как фаговый дисплей (Katsube, Y., *et al.*, *Int J Mol. Med.*, 1(5):863–868 (1998)), или способами, в которых используют трансгенных животных, известных специалистам в данной области и/или описанных в настоящем документе. Например, трансгенную мышь, содержащую функционально перестроенный трансген тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина и трансген, содержащий ДНК из локуса легкой цепи человеческого иммуноглобулина, который можно подвергать функциональной перестройке, можно иммунизировать человеческим ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 или его фрагментом для индуцирования продукции антител. Если требуется, можно выделять клетки, продуцирующие антитела, и можно получать гибридомы или другие immortalized клетки, продуцирующие антитела, как описано в настоящем документе и/или известно специалистам в данной области. В альтернативном варианте осуществления антитело, определенный участок или вариант можно экспрессировать в приемлемой клетке-хозяине с помощью кодирующей нуклеиновой кислоты или ее участка.

[0123] Изобретение также относится к антителам, антигенсвязывающим фрагментам, цепям иммуноглобулина и областям CDR, содержащим аминокислоты в последовательности, по существу совпадающей с аминокислотной последовательностью

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

Коды аминокислот

[0124] Аминокислоты, составляющие антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23 по настоящему изобретению, часто обозначают аббревиатурами. Наименования аминокислот можно обозначать с помощью однобуквенного кода аминокислоты, трехбуквенного кода, названия или кодона (-ов) из трех нуклеотидов, что хорошо известно специалистам в данной области (см. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of The Cell*, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994).

ОДНО-БУКВЕННЫЙ КОД	ТРЕХ-БУКВЕННЫЙ 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

ОДНО- БУКВЕН- НЫЙ КОД	ТРЕХ-БУКВЕН- НЫЙ КОД	НАЗВАНИЕ	КОДОН (-Ы) ИЗ ТРЕХ НУКЛЕОТИДОВ
R	Arg	Аргинин	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
S	Ser	Серин	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
T	Thr	Треонин	ACA, ACC, ACG, ACU
V	Val	Валин	GUA, GUC, GUG, GUU
W	Trp	Триптофан	UGG
Y	Tyr	Тирозин	UAC, UAU

Последовательности

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

5 [0125] Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области тяжелой цепи 1 (CDRH1) антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40: (SEQ ID NO:1)

TYWLG

[0126] Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области тяжелой цепи 2 (CDRH2) антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40: (SEQ ID NO:2)

10 IMSPVDSDIRYSPSFQG

[0127] Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области тяжелой цепи 3 (CDRH3) антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40: (SEQ ID NO:3)

RRPGQGYFDF

15 [0128] Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области легкой цепи 1 (CDRL1) антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40: (SEQ ID NO:4)

RASQGISSWLA

[0129] Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области легкой цепи 2 (CDRL2) антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40: (SEQ ID NO:5)

AASSLQS

20 [0130] Аминокислотная последовательность определяющей комплементарность области легкой цепи 3 (CDRL3) антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40: (SEQ ID NO:6)

QQYNIYPYT

[0131] Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 (подчеркнуты CDR): (SEQ ID NO:7)

25 1 EVQLVQSGAE VKKPGESLKI SCKGSGYSFT TYWLGWVRQM PGKGLDWIGI MSPVDSDIRY
61 SPSFQGVVTM SVDKSITTAY LQWNSLKASD TAMYYCARRR PGQGYFDFFWG QGTLVTVSS

[0132] Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 (подчеркнуты CDR): (SEQ ID NO:8)

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS

61 RFSGSGSGTD FTLTISLQP EDFATYYCQQ YNIYPYTFGQ GTKLEIKR

[0133] Аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 (подчеркнуты CDR): (SEQ ID NO:10)

1 EVQLVQSGAE VKKPGESLKI SCKGSGYSFT TYWLGWVRQM PGKGLDWIGI MSPVDSDIRY
 5 61 SPSFQGVTM SVDKSITAY LQWNSLKASD TAMYYCARRR PGQGYFDFWG QGTLVTVSSS
 121 STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFFAVLQSSG
 181 LYSLSVVTV PSSSLGTQTY ICMVNHKPSN TKVDRVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP
 241 SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
 301 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSRDEL
 10 361 TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
 421 QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

[0134] Аминокислотная последовательность легкой цепи антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 (подчеркнуты CDR): (SEQ ID NO:11)

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS
 15 61 RFSGSGSGTD FTLTISLQP EDFATYYCQQ YNIYPYTFGQ GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP
 121 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT
 181 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

Аминокислотная последовательность ИЛ-12

[0135] Аминокислотная последовательность человеческого интерлейкина (ИЛ)-12 с альфа- и бета-субъединицами: (SEQ ID NO:9)

1 RNLPVATPDP GMFPCLNHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV
 61 EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN
 121 AKLLMDPKRQ IFLDQNLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPFDYKTK IKLCILLHAF
 181 RIRAVTIDRV MSYLNASIWE LKKDVYVVEL DWYPDAPGEM VVLTCDTPEE DGITWTLDQS
 25 241 SEVLGSGKTL TIQVKEFGDA GQYTCHKGGE VLSHSLLLLH KKEDGIWSTD ILKDQKEPKN
 301 KTFRLRCEAKN YSGRFTCWWL TTISTDLTFS VKSSRGSSDP QGVTCGAATL SAERVRGDNK
 361 EYEYSVECQE DSACPAEES LPIEVMVDAV HKLKYENYTS SFFIRDIKPP DPPKNLQKPK
 421 LKNSRQVEVS WEYPDTWSTP HSYFSLTFCV QVQGKSKREK KDRVFTDKTS ATVICRKNAS
 481 ISVRAQDRYY SSSWSEWASV PCS

30 [0136] Антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23, применяемое в способе настоящего изобретения, может включать одну или более аминокислотных замен, делеций или добавлений вследствие естественных мутаций либо действий человека, описанных в настоящем документе.

[0137] Число аминокислотных замен, которое может произвести
 35 квалифицированный специалист, зависит от многих факторов, включая описанные выше. Говоря по существу, количество аминокислотных замен, вставок или делеций для любого данного антитела к ИЛ-12/ИЛ-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.

[0138] Специалисты в данной области могут идентифицировать аминокислоты в специфическом антителе к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23, которые необходимы для его функции, известными способами, такими как сайт-направленный мутагенез или сканирующий аланином мутагенез (например, Ausubel, см. выше главы 8, 15; Cunningham and Wells, *Science* 244:1081–1085 (1989)). Последняя процедура предполагает добавление точечных мутаций аланина в каждом остатке в молекуле. Полученные мутантные молекулы впоследствии испытывают на биологическую активность, такую как, без ограничений, по меньшей мере одна активность по нейтрализации ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23. Критичные для связывания с антителом сайты можно также идентифицировать путем анализа структуры, например путем кристаллизации, ядерного магнитного резонанса или фотоаффинного мечения (Smith, et al., *J. Mol. Biol.* 224:899–904 (1992) и de Vos, et al., *Science* 255:306–312 (1992)).

[0139] Антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 могут включать, без ограничений, по меньшей мере один участок, последовательность или комбинацию, выбранные из от 5 до всех последовательных аминокислот из по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 или 11.

[0140] Антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 или установленные участки или варианты могут включать, без ограничений, по меньшей мере один участок, последовательность или комбинацию, выбранные из по меньшей мере 3–5 последовательных аминокислот с указанными выше SEQ ID NO; 5–17 последовательных аминокислот указанных выше SEQ ID NO., 5–10 последовательных аминокислот указанных выше SEQ ID NO., 5–11 последовательных аминокислот указанных выше SEQ ID NO., 5–7 последовательных аминокислот указанных выше SEQ ID NO; 5–9 последовательных аминокислот указанных выше SEQ ID NO.

[0141] Антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 может дополнительно необязательно содержать полипептид из по меньшей мере одной из 70–100% из числа 5, 17, 10, 11, 7, 9, 119, 108, 449 или 214 последовательных аминокислот с указанными выше SEQ ID NO. В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность цепи иммуноглобулина или ее участок (например, варибельная область, CDR) имеет идентичность около 70–100% (например, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, или любой интервал, или значение в нем) с аминокислотной последовательностью соответствующей цепи по

меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO, указанных выше. Например, аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи можно сравнивать с последовательностью с указанными выше SEQ ID NO, или аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи можно сравнивать с указанными выше SEQ ID NO. 70–100% идентичности аминокислот (например, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 или любой интервал, или значение в нем) предпочтительно определяют с помощью приемлемого компьютерного алгоритма, известного специалистам в данной области.

[0142] «Идентичностью», как известно специалистам в данной области, называется соотношение между двумя или более полипептидными последовательностями или двумя или более полинуклеотидными последовательностями, определяемое путем сравнения этих последовательностей. В данной области «идентичность» также означает степень родства последовательностей между полипептидными или полинуклеотидными последовательностями, как определено по сопоставлению цепочек таких последовательностей. «Идентичность» и «подобие» можно легко подсчитать известными способами, включая, без ограничений, описанные в *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; и *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; и Carillo, H., and Lipman, D., *Siam J. Applied Math.*, 48:1073 (1988). Кроме того, выраженную в процентах идентичность можно получать на основании сопоставлений последовательностей аминокислот и нуклеотидов, сгенерированных с заданными по умолчанию настройками компонента AlignX в пакете программ Vector NTI Suite 8.0 (Informax, г. Фредерик, штат Мэриленд, США).

[0143] Предпочтительные способы определения идентичности предназначены для создания наилучшего соответствия между тестируемыми последовательностями. Способы определения идентичности и подобия систематизированы в общедоступных компьютерных программах. Предпочтительные компьютерные программные способы определения идентичности и подобия между двумя последовательностями включают, без ограничений, пакет программ GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN и FASTA (Atschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.* 215:403-410 (1990)). Программа BLAST X общедоступна от NCBI и других источников (BLAST

Manual, Altschul, S., et al., 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.

[0144] Предпочтительные параметры сравнения полипептидных

5 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 гэп: 12

10 Штраф за длину гэпа: 4

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

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

15 [0145] Предпочтительные параметры для сравнения полинуклеотидов

включают следующие:

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

Матрица сравнения: совпадения=+10, несовпадение=0

Штраф за гэп: 50

20 Штраф за длину гэпа: 3

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

[0146] В качестве примера, полинуклеотидная последовательность может быть

25 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

30 положениях эталонной последовательности нуклеотидов, или где-нибудь между этими

концевыми положениями, и могут быть либо рассеянными поодиночке среди

нуклеотидов в эталонной последовательности, либо быть собранными в одну или более

последовательных групп в пределах эталонной последовательности. Число изменений

нуклеотидов определяют умножением общего числа нуклеотидов в последовательности

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

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

5 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 $x.\text{sub}.n$.

10 [0147] Изменения полинуклеотидной последовательности, кодирующей SEQ ID NO выше, могут создавать нонсенс-, миссенс-мутации или мутации сдвига рамки считывания в данной кодирующей последовательности и тем самым изменять полипептид, кодируемый полинуклеотидом, после таких изменений. Аналогичным образом, полипептидная последовательность может быть идентична приведенной выше

15 эталонной последовательности SEQ ID NO, т. е. на 100% идентичной, или может включать в себя до определенного целого числа изменений аминокислот по сравнению с эталонной последовательностью таким образом, что процент идентичности составляет менее 100%. Такие изменения выбраны из группы, состоящей из делеции, замены, включая консервативную и неконсервативную замену, или вставки по меньшей

20 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

25 собранными в одну или более последовательных групп в пределах эталонной последовательности. Число изменений аминокислот для данного процента идентичности определяют умножением общего числа аминокислот в приведенной выше SEQ ID NO на численный процент от соответствующего процента идентичности (поделенный на 100), а затем вычитают этот результат из общего числа аминокислот в приведенной выше SEQ ID NO или: $n.\text{sub}.a.\text{ltorsim}.x.\text{sub}.a -(x.\text{sub}.a.y)$, где « $n.\text{sub}.a$ »

30 представляет собой число изменений аминокислот, « $x.\text{sub}.a$ » представляет собой общее число аминокислот в SEQ ID No, указанных выше, а « y » составляет, например, 0,70 для 70%, 0,80 для 80%, 0,85 для 85% и т. д., и при этом любое нецелое полученное число « $x.\text{sub}.a$ » и « y » округляют с уменьшением до ближайшего целого числа, прежде чем вычесть его из « $x.\text{sub}.a$ ».

[0148] Примеры последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей и их участков представлены в вышеуказанных SEQ ID NO. Антитела настоящего изобретения или их конкретные варианты могут содержать любое количество последовательных аминокислотных остатков из антитела настоящего изобретения, причем это число выбрано из группы целых чисел в интервале 10–100% от числа последовательных остатков в антителе к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23. Длина данной подпоследовательности последовательных аминокислот необязательно составляет по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 или более аминокислот, или любой интервал, или значение в нем. Количество таких подпоследовательностей может дополнительно представлять собой любое целое число, выбранное из группы, состоящей из 1–20, например по меньшей мере 2, 3, 4 или 5.

[0149] Согласно определению специалистов в данной области, настоящее изобретение включает по меньшей мере одно биологически активное антитело настоящего изобретения. Биологически активные антитела обладают удельной активностью, составляющей по меньшей мере 20%, 30% или 40%, и предпочтительно по меньшей мере 50%, 60% или 70%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%, 90% или 95–100% или более (включая, без ограничений, вплоть до 10-кратного увеличения удельной активности) от активности нативного (несинтетического), эндогенного или родственного ему и известного антитела. Способы качественного и количественного анализа ферментативной активности и субстратной специфичности хорошо известны специалистам в данной области.

[0150] В другом аспекте изобретение относится к человеческим антителам и антигенсвязывающим фрагментам, как описано в настоящем документе, которые модифицируют путем ковалентного присоединения органической функциональной группы. Такая модификация позволяет создавать антитело или антигенсвязывающий фрагмент с улучшенными фармакокинетическими свойствами (например, увеличенным периодом полужизни *in vivo* в сыворотке). В качестве органической функциональной группы можно использовать линейную или разветвленную гидрофильную полимерную группу, группу жирной кислоты или группу сложного эфира жирной кислоты. В конкретных вариантах осуществления гидрофильная полимерная группа может иметь молекулярную массу от около 800 до около 120 000 дальтон и представлять собой полиалкангликоль (например, полиэтиленгликоль (PEG), полипропиленгликоль (PPG)), углеводный полимер, аминокислотный полимер или поливинилпирролидон, а группа

жирной кислоты или группа сложного эфира жирной кислоты может содержать от около восьми до около сорока атомов углерода.

[0151] Модифицированные антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут содержать одну или более органических звеньев, которые имеют прямую или
5 непрямую ковалентную связь с антителом. Каждая органическая функциональная группа, связанная с антителом или с антигенсвязывающим фрагментом изобретения, может независимо представлять собой гидрофильную полимерную группу, группу жирной кислоты или группу сложного эфира жирной кислоты. В контексте настоящего документа термин «жирная кислота» охватывает одноосновные и двухосновные
10 карбоновые кислоты. В контексте настоящего документа термин «гидрофильная полимерная группа» обозначает органический полимер, обладающий лучшей растворимостью в воде, чем в октане. Например, полилизин лучше растворяется в воде, чем в октане. Таким образом, антитело, модифицированное путем ковалентного присоединения полилизина, включено в изобретение. Гидрофильные полимеры,
15 приемлемые для модификации антител изобретения, могут быть линейными или разветвленными, и включают, например, полиалкангликоли (например, PEG, монометоксиполиэтиленгликоль (mPEG), PPG и т. п.), углеводы (например, декстран, целлюлозу, олигосахариды, полисахариды и т. п.), полимеры гидрофильных аминокислот (например, полилизин, полиаргинин, полиаспартат и т. п.), оксиды
20 полиалканов (например, полиэтиленоксид, полипропиленоксид и т. п.) и поливинилпирролидон. Гидрофильный полимер, модифицирующий антитело изобретения, предпочтительно имеет молекулярную массу от около 800 до около 150 000 дальтон, как отдельный фрагмент молекулы. Например, PEG₅₀₀₀ и PEG_{20,000}, где нижний индекс означает среднюю молекулярную массу полимера в дальтонах.
25 Гидрофильная полимерная группа может иметь от одного до около шести заместителей — групп алкила, жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты. Гидрофильные полимеры с замещающей группой жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты можно получать с применением приемлемых способов. Например, полимер, содержащий аминокгруппу, может быть связан с карбоксилатом жирной
30 кислоты или сложного эфира жирной кислоты, а активированный карбоксилат (например, активированный N,N-карбонилдиимидазолом) на жирной кислоте или сложном эфире жирной кислоты может быть связан с гидроксильной группой полимера.

[0152] Жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот, приемлемые для модификации антител изобретения, могут быть насыщенными или могут содержать одну или более ненасыщенных связей. Жирные кислоты, приемлемые для модификации антител изобретения, включают, например, н-додеcanoат (C₁₂, лаурат), н-тетрадеcanoат (C₁₄, мирилат), н-октадеcanoат (C₁₈, стеарат), н-эйкозаноат (C₂₀, арахидат), н-докозаноат (C₂₂, бегенат), н-триаконтаноат (C₃₀), н-тетрааконтаноат (C₄₀), *цис*- Δ^9 -октадеcanoат (C₁₈, олеат), полностью *цис*- $\Delta^{5,8,11,14}$ -эйкозатетраеноат (C₂₀, арахидонат), октандикарбоновую кислоту, тетрадекандикарбоновую кислоту, октадекандикарбоновую кислоту, докозандикарбоновую кислоту и т. п. Приемлемые сложные эфиры жирных кислот включают сложные моноэфиры дикарбоновых кислот, содержащие линейную или разветвленную группу низшего алкила. Группа низшего алкила может содержать от одного до около двенадцати, предпочтительно от одного до около шести атомов углерода.

[0153] Модифицированные человеческие антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно получать с помощью приемлемого способа, например путем реакции с одним или более модифицирующими агентами. В контексте настоящего документа термин «модифицирующий агент» относится к приемлемой органической группе (например, гидрофильному полимеру, жирной кислоте, сложному эфиру жирной кислоты), которая содержит активирующую группу. «Активирующая группа» означает химический фрагмент или функциональную группу, которые при подходящих условиях могут вступать в реакцию со второй химической группой и, таким образом, образовывать ковалентную связь между модифицирующим агентом и второй химической группой. Например, к реагирующим с амином активирующим группам относятся электрофильные группы, такие как тозилат, мезилат, галоген (хлор, бром, фтор, йод), сложные эфиры N-гидроксисукцинимидила (NHS) и т. п. Активирующие группы, способные реагировать с тиолами, включают, например, малеимид, йодацетил, акрилолил, дисульфиды пиридила, тиол 5-тиол-2-нитробензойной кислоты (TNB-тиол) и т. п. Функциональная группа альдегида может быть связана с амин- или гидразид-содержащими молекулами, а группа азиды может реагировать с трехвалентной фосфорной группой с образованием фосфорамидатных или фосфоримидных связей. Приемлемые способы введения активирующих групп в молекулы известны специалистам в данной области (см., например, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)). Активирующая группа может быть связана с органической группой (например, гидрофильным полимером, жирной кислотой, эфиром жирной кислоты) прямо или через

линкерное звено, например двухвалентную группу C₁–C₁₂, в которой один или более атомов углерода могут замещаться гетероатомом, таким как кислород, азот или сера. Приемлемые линкерные звенья включают, например, тетраэтиленгликоль, $-(\text{CH}_2)_3-$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}-$, $-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-$ и $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}-\text{NH}-$.

5 Модифицирующие агенты, которые содержат линкерную функциональную группу, можно получать, например, путем реакции моно-Вос-алкилдиамин (например, моно-Вос-этилендиамина, моно-Вос-диаминогексана) с жирной кислотой в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC) с образованием амидной связи между свободным амином и карбоксилатом жирной кислоты. Защитную группу Вос
10 можно удалять из продукта путем обработки трифторуксусной кислотой (TFA) с открытием первичного амина, который может быть связан с другим карбоксилатом, как описано выше, или он может вступать в реакцию с малеиновым ангидридом с замыканием полученного продукта в цикл и получением активированного малеимидного производного жирной кислоты (См., например, Thompson, *et al.*, WO 92/16221,
15 содержание полностью включено в настоящий документ путем ссылки).

[0154] Модифицированные антитела можно получать путем реакции человеческого антитела или антигенсвязывающего фрагмента с модифицирующим агентом. Например, органические функциональные группы могут быть связаны с антителом неспецифично к сайту с помощью реагирующего с амином модифицирующего агента,
20 например сложного эфира NHS и PEG. Модифицированные человеческие антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно также получать путем восстановления дисульфидных связей (например, внутрицепочечных дисульфидных связей) антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Восстановленное антитело или антигенсвязывающий фрагмент может впоследствии взаимодействовать с
25 реагирующим с тиолом модифицирующим агентом с получением модифицированного антитела изобретения. Модифицированные человеческие антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие органическую функциональную группу, которая связано с определенными участками антитела настоящего изобретения, можно получать с помощью приемлемых способов, таких как обратный протеолиз (Fisch *et al.*,
30 *Bioconjugate Chem.*, 3: 147–153 (1992); Werlen *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 5: 411–417 (1994); Kumaran *et al.*, *Protein Sci.* 6(10):2233-2241 (1997); Itoh *et al.*, *Bioorg. Chem.*, 24(1): 59-68 (1996); Capellas *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4):456-463 (1997)), а также способов, описанных в Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996).

[0155] В способе настоящего изобретения также применяют композицию антител к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23, содержащую по меньшей мере одно, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть или более антител к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23, как описано в настоящем документе и/или известно специалистам в данной области, представленных в виде не встречающейся в природе композиции, смеси или формы. Такие композиции представляют собой композиции неприродного происхождения, содержащие по меньшей мере один или два полноразмерных, имеющих С- и/или N-концевую делецию варианта, домена, фрагмента или определенных варианта аминокислотной последовательности антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23, выбранной из группы, состоящей из 70–100% последовательных аминокислот с указанными выше SEQ ID NO или определенных их фрагментов, доменов или вариантов. Предпочтительные композиции антител к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 включают по меньшей мере один или два полноразмерных фрагмента, домена или варианта, таких как по меньшей мере один содержащий CDR или LBP участок последовательности антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23, описанного в настоящем документе, например, 70–100% последовательностей с указанными выше SEQ ID NO или их определенных фрагментов, доменов или вариантов. Предпочтительные композиции дополнительно содержат, например, 40–99% по меньшей мере одной из 70–100% последовательностей с указанными выше SEQ ID NO и т. д. или их определенных фрагментов, доменов или вариантов. Процентные доли такой композиции определяют по массе, объему, концентрации, молярности или моляльности в жидких или сухих растворах, смесях, суспензиях, эмульсиях, частицах, порошке или коллоидах, как известно специалистам в данной области или описано в настоящем документе.

25 **Композиции антител, содержащие дополнительные терапевтически активные вещества**

[0156] Композиции антител, применяемые в способе настоящего изобретения, необязательно могут дополнительно содержать эффективное количество по меньшей мере одного соединения или белка, выбранного из по меньшей мере одного лекарственного средства (ЛС) против инфекции, ЛС для сердечно-сосудистой системы (ССС), ЛС для центральной нервной системы (ЦНС), ЛС для автономной нервной системы (АНС), ЛС для дыхательного тракта, ЛС для желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), гормонального ЛС, ЛС для баланса жидкости или электролитов, гематологического ЛС, противоопухолевого ЛС, иммуномодулирующего ЛС, ЛС для

глаз, ушей или носа, ЛС для местного применения, питательного ЛС и т. п. Такие лекарственные средства хорошо известны специалистам в данной области, включая составы, показания, дозы и введение для каждого представленного в настоящем описании лекарственного средства (см., например, Nursing 2001 Handbook of Drugs, 21st edition, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; Health Professional's Drug Guide 2001, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ; Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., ed., Appleton & Lange, Stamford, CT, причем каждая из публикаций полностью включена в настоящий документ путем ссылки).

5 [0157] Примером лекарственных средств, которые можно комбинировать с антителами для способа настоящего изобретения, является противомикробное лекарственное средство, которое может представлять собой по меньшей мере одно средство, выбранное из амебицидов, или по меньшей мере одного из противопротозойных, противогельминтных, противогрибковых, противомаларийных, противотуберкулезных средств, или по меньшей мере одного из противолепрозных средств, аминогликозидов, пенициллинов, цефалоспоринов, тетрациклинов, сульфонамидов, фторхинолонов, 15 противовирусных, макролидных противомикробных средств и прочих противомикробных средств. Гормональное лекарственное средство может быть по меньшей мере одним, выбранным из кортикостероидов, андрогенов, или по меньшей мере одним из анаболических стероидов, эстрогенов, или по меньшей мере одним из прогестина, гонадотропина, антидиабетического лекарственного средства, или по 20 меньшей мере одним из глюкагона, тиреоидного гормона, антагониста тиреоидного гормона, гормона гипофиза и подобного паратгормону лекарственного средства. По меньшей мере один цефалоспорин может представлять собой по меньшей мере один, выбранный из цефаклора, цефадроксила, цефазолина натрия, цефдинира, гидрохлорида 25 цефепима, цефиксима, цефметазола натрия, цефоницида натрия, цефоперазона натрия, цефотаксима натрия, цефотетана динатрия, цефокситина натрия, цефподоксима проксетила, цефпрозила, цефтазидима, цефтибутена, цефтизоксима натрия, цефтриаксона натрия, цефуроксима аксетила, цефуроксима натрия, гидрохлорида цефалексина, моногидрата цефалексина, цефрадина и лоракарбефа.

30 [0158] По меньшей мере один кортикостероид может представлять собой по меньшей мере один, выбранный из бетаметазона, ацетата бетаметазона или фосфата бетаметазона натрия, фосфата бетаметазона натрия, кортизона ацетата, дексаметазона, ацетата дексаметазона, фосфата дексаметазона натрия, ацетата флуодрокортизона, гидрокортизона, ацетата гидрокортизона, ципионата гидрокортизона, фосфата

- гидрокортизона натрия, сукцината гидрокортизона натрия, метилпреднизолона, ацетата метилпреднизолона, сукцината метилпреднизолона натрия, преднизолона, ацетата преднизолона, преднизолона фосфата натрия, тебутата преднизолона, преднизона, триамцинолона, ацетонида триамцинолона и диацетата триамцинолона. По меньшей мере один андроген или анаболический стероид может представлять собой по меньшей мере один, выбранный из даназола, флюоксиместерона, метилтестостерона, деканоата нандролона, фенпропионата нандролона, тестостерона, ципионата тестостерона, энантата тестостерона, пропионата тестостерона и тестостерона в трансдермальной системе.
- 5 [0159] Данный по меньшей мере один иммунодепрессант может быть по меньшей мере одним, выбранным из азатиоприна, базиликсимаба, циклоспорина, даклизумаба, иммуноглобулина лимфоцитов, муромонаба CD3, микофенолята мофетила, гидрохлорида микофенолята мофетила, сиролимуса, 6-меркаптопурина, метотрексата, мизорибина и такролимуса.
- 10 [0160] По меньшей мере одно противомикробное лекарственное средство местного действия может представлять собой по меньшей мере одно средство, выбранное из ацикловира, амфотерицина В, крема с азелаиновой кислотой, бацитрацина, бутконазола нитрата, фосфата клиндамицина, клотримазола, нитрата эконазола, эритромицина, сульфата гентамицина, кетоназола, ацетата мафенида,
- 15 метронидазола (местного действия), нитрата миконазола, мупироцина, гидрохлорида нафтифина, сульфата неомицина, нитрофуразона, нистатина, сульфадиазина серебра, гидрохлорида тербинафина, терконазола, гидрохлорида тетрациклина, тиоконазола и толнафтата. По меньшей мере одно лекарственное средство против чесотки или педикулицид может представлять собой по меньшей мере одно средство, выбранное из
- 20 кротамитона, линдана, перметрина и пиретринов. По меньшей мере один кортикостероид для местного применения может представлять собой по меньшей мере один, выбранный из дипропионата бетаметазона, валерата бетаметазона, пропионата клобетазола, дезонида, дезоксиметазона, дексаметазона, фосфата дексаметазона натрия, диацетата дифлоразона, ацетонида флуоцинолона, флуоцинонида, флурандренолида,
- 25 флутиказона пропионата, галционида, гидрокортизона, ацетата гидрокортизона, бутирата гидрокортизона, валерата гидрокортизона, фууроата мометазона и ацетонида триамцинолона (См., например, стр. 1098–1136 в *Nursing 2001 Drug Handbook*.)
- 30 [0161] Композиции антител к ИЛ-12/ИЛ-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/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23, которое приводят в контакт (или вводят в них) с клеткой, тканью, органом, животным или пациентом, нуждающимся в таком модулировании, лечении или терапии, дополнительно необязательно содержащей по меньшей мере одно средство, выбранное из по меньшей мере одного антагониста ФНО (например, без ограничений, химического или белкового антагониста ФНО, моноклонального или поликлонального антитела к ФНО или фрагмента, растворимого рецептора ФНО (например, p55, p70 или p85) или фрагмента, их слитых полипептидов или низкомолекулярного антагониста ФНО, например связывающего ФНО белка I или II (ТВР-1 или ТВР-II), нерелимонмаба, инфликсимаба, этернацепта, CDP-571, CDP-870, афелимомаба, ленерцепта и т. п.), противоревматического лекарственного средства (например, метотрексата, ауранофина, аурутиоглюкозы, азатиоприна, этанерцепта, тиомалата золота-натрия, сульфата гидроксихлорохина, лефлуномида, сульфасалзина), иммунизации, иммуноглобулина, иммунодепрессанта (например, базиликсимаба, циклоспорина, даклизумаба), цитокина или антагониста цитокина. Не имеющие ограничительного характера примеры таких цитокинов включают, без ограничений, любой из от ИЛ-1 до ИЛ-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), причем каждая из публикаций полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

[0162] Соединения, композиции или комбинации антител к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23, применяемые в способе настоящего изобретения, могут дополнительно содержать по меньшей мере одно из любых приемлемых вспомогательных веществ, таких как, без ограничений, разбавитель, связующее вещество, стабилизатор, буферы, соли, липофильные растворители, консервант, адъювант или т. п. Предпочтительными являются фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества. Не имеющие ограничительного характера примеры таких стерильных растворов и способы их получения хорошо известны специалистам в данной области, например, без ограничений, описаны в Gennaro, Ed., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990. Фармацевтически приемлемые носители могут быть выбраны обычным способом, исходя из приемлемости для пути введения, растворимости и/или стабильности композиции, содержащей антитело к ИЛ-23,

фрагмент или вариант, как хорошо известно специалистам в данной области или описано в настоящем документе.

[0163] Фармацевтические эксципиенты и добавки, используемые в настоящей композиции, включают, без ограничений, белки, пептиды, аминокислоты, липиды и углеводы (например, сахара, включая моносахариды, ди-, три-, тетра- и олигосахариды; производные сахаров, такие как альдиты, альдоновые кислоты, этерифицированные сахара и т. п.; и полисахариды или полимеры сахаров), которые могут присутствовать отдельно или в комбинации, составляя отдельно или в комбинации 1–99,99% по массе или по объему. Примеры белковых эксципиентов включают сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин (HSA), рекомбинантный человеческий альбумин (rHA), желатин, казеин и т. п. Типичные компоненты аминокислот/антител, которые могут также выполнять буферную функцию, включают аланин, глицин, аргинин, бетаин, гистидин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, цистеин, лизин, лейцин, изолейцин, валин, метионин, фенилаланин, аспартам и т. п. Одной предпочтительной аминокислотой является глицин.

[0164] Углеводные эксципиенты, приемлемые для применения в изобретении, включают, например, моносахариды, такие как фруктоза, мальтоза, галактоза, глюкоза, D-манноза, сорбоза и т. п.; дисахариды, такие как лактоза, сахароза, трегалоза, целлобиоза и т. п.; полисахариды, такие как рафиноза, мелицитоза, мальтодекстрины, декстраны, крахмалы и т. п.; и альдиты, такие как маннит, ксилит, мальтит, лактит, ксилит, сорбит (глюцит), миоинозит и т. п. Предпочтительными углеводными эксципиентами для применения в настоящем изобретении являются маннит, трегалоза и рафиноза.

[0165] Композиции антител к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 могут также включать буфер или агент, регулирующий pH; как правило, буфер представляет собой соль, полученную из органической кислоты или основания. Репрезентативные буферы включают соли органических кислот, такие как соли лимонной кислоты, аскорбиновой кислоты, глюконовой кислоты, угольной кислоты, винной кислоты, янтарной кислоты, уксусной кислоты или фталевой кислоты; буферы Трис, гидрохлорида трометамина или фосфата. Предпочтительными буферами для применения в настоящих композициях являются соли органических кислот, такие как цитрат.

[0166] Дополнительно композиции антител к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 могут включать полимерные эксципиенты/добавки, такие как поливинилпирролидоны, фиколлы (полимерный сахар), декстраты (например, циклодекстрины, такие как 2-

гидроксипропил-β-циклодекстрин), полиэтиленгликоли, ароматизаторы, противомикробные агенты, подсластители, антиоксиданты, антистатические агенты, поверхностно-активные вещества (например, полисорбаты, такие как ТВИН-20 и ТВИН-80), липиды (например, фосфолипиды, жирные кислоты), стероиды (например, холестерин) и хелатирующие агенты (например, ЭДТА).

[0167] Эти и дополнительные известные фармацевтические эксципиенты и/или добавки, приемлемые для применения в композициях антител к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23, участков или вариантов в соответствии с настоящим изобретением, известны специалистам в данной области, например, перечислены в Remington: The Science & Practice of Pharmacy, 19th ed., Williams & Williams, (1995) и в Physician's Desk Reference, 52nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки. Предпочтительными материалами-носителями или эксципиентами являются углеводы (например, сахараиды и альдиты) и буферы (например, цитрат) или полимерные агенты. Примером молекулы-носителя является мукополисахарид, гиалуроновая кислота, которую можно использовать для внутрисуставного введения.

Составы

[0168] Как указано выше, в изобретении обеспечены стабильные составы, которые предпочтительно содержат фосфатно-солевой буферный раствор или выбранную соль, а также консервированные растворы и составы, содержащие консервант, а также консервированные составы для многократного применения, пригодные для фармацевтического или ветеринарного применения, содержащие по меньшей мере одно антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23 в фармацевтически приемлемом составе. Консервированные составы содержат по меньшей мере один консервант, известный или необязательно выбранный из группы, состоящей из по меньшей мере одного фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, нитрита фенилртути, феноксиэтанола, формальдегида, хлорбутанола, хлорида магния (например, гексагидрата), алкилпарабена (метил-, этил-, пропил-, бутил- и т. п.), хлорида бензалкония, хлорида бензэтония, дегидроацетата натрия и тимеросала или их смесей в водном разбавителе. Как известно специалистам в данной области, можно использовать любую приемлемую концентрацию или смесь, такую как 0,001–5%, или любой интервал, или значение в нем, например, без ограничений, 0,001, 0,003, 0,005, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4,

3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,3, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, или любой интервал, или значение в нем. Не имеющие ограничительного характера примеры включают отсутствие консервантов, 0,1–2% м-крезола (например, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,1–3% бензилового спирта (например, 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5%), 0,001–0,5% тимеросала (например, 0,005, 0,01%), 0,001–2,0% фенола (например, 0,05, 0,25, 0,28, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,0005–1,0% алкилпарабена (-ов) (например, 0,00075, 0,0009, 0,001, 0,002, 0,005, 0,0075, 0,009, 0,01, 0,02, 0,05, 0,075, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 0,9, 1,0%) и т. п.

[0169] Как отмечалось выше, в способе изобретения применяют промышленное изделие, содержащее упаковочный материал и по меньшей мере один флакон, содержащий раствор по меньшей мере одного антитела к ИЛ-12/ИЛ-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 часов или дольше. В изобретении дополнительно применяют промышленное изделие, содержащее упаковочный материал, первый флакон, содержащий лиофилизированное антитело к ИЛ-12/ИЛ-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/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23 в водном разбавителе с образованием раствора, который можно хранить в течение периода двадцати четырех часов или дольше.

[0170] Антитело к ИЛ-12/ИЛ-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.

[0171] Диапазон количества антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23 включает количества, которые после разведения (при использовании влажной/сухой системы) достигают концентраций от около 1,0 мкг/мл до около 1000 мг/мл, хотя 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.

- [0172] Дополнительно водный разбавитель предпочтительно необязательно содержит фармацевтически приемлемый консервант. Предпочтительные консерванты включают выбранные из группы, состоящей из фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, алкилпарабена (метил-, этил-, пропил-, бутил- и т. п.), хлорида бензалкония, хлорида бензэтония, дегидроацетата и тимеросала натрия или их смесей. Концентрации консерванта, применяемой в составе, должно быть достаточно для обеспечения противомикробного действия. Такие концентрации зависят от выбранного консерванта, и квалифицированный специалист в данной области без труда определяет ее.
- 10 [0173] Предпочтительно в разбавитель можно необязательно добавлять другие эксципиенты, например изотонические агенты, буферы, антиоксиданты и средства, усиливающие консервацию. Изотонические агенты, такие как глицерин, широко используют в известных концентрациях. Для улучшения контроля pH предпочтительно добавляют физиологически приемлемый буфер. Составы могут охватывать широкий
- 15 диапазон pH, такой как от около pH 4 до около pH 10, с предпочтительным интервалом от около pH 5 до около pH 9 и наиболее предпочтительно от около pH 6,0 до около pH 8,0. Составы настоящего изобретения предпочтительно имеют pH от около 6,8 до около 7,8. Предпочтительные буферы включают фосфатные буферы, наиболее предпочтительно фосфат натрия, в частности фосфатно-солевой буфер (PBS).
- 20 [0174] Для уменьшения агрегации в составы или композиции можно необязательно добавлять другие добавки, такие как фармацевтически приемлемые солюбилизаторы, например Tween-20 (полиоксиэтилен (20) сорбитанмонолаурат), Tween-40 (полиоксиэтилен (20) сорбитанмонопальмитат), Tween-80 (полиоксиэтилен (20) сорбитанмоноолеат), PLURONIC® (полимер) F68 (блок-сополимеры полиоксиэтилена
- 25 и полиоксипропилена) и PEG (полиэтиленгликоль), или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20 или 80, либо полочсамер 184 или 188, PLURONIC® (полимер), например полиолы, другие блок-сополимеры, и хелатирующие вещества, такие как ЭДТА и ЭГТА. Эти добавки, в частности, используют, если для введения состава применяют насос или пластиковый контейнер.
- 30 Наличие фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества снижает склонность белка к агрегации.
- [0175] Составы можно получать в процессе, который включает смешивание по меньшей мере одного антитела к ИЛ-12/ИЛ-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.), хлорида бензалкония, хлорида бензэтония, дегидроацетата натрия и тимеросала, или их смесей в водном разбавителе. Смешивание по меньшей мере одного специфического антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 и консерванта в водном разбавителе

5 осуществляют с помощью стандартных процедур растворения и смешивания.

Например, для получения приемлемого состава отмеренное количество по меньшей мере одного антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23 в буферном растворе соединяют с требуемым консервантом в буферном растворе в количествах, достаточных для получения требуемых концентраций белка и консерванта. Варианты этого процесса
10 понятны специалисту в данной области. Например, для оптимизации с учетом концентрации и применяемого способа введения можно изменять такие факторы, как порядок добавления компонентов, внесение дополнительных добавок, температура и рН, при которых получают состав.

[0176] Составы можно предоставлять пациентам в виде прозрачных растворов или
15 двух флаконов, включающих флакон с лиофилизированным специфическим антителом к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23, которое разводят содержащимися во втором флаконе водой, консервантом и/или эксципиентами, предпочтительно фосфатным буфером и/или физиологическим раствором и выбранной солью, в водном разбавителе. Либо один флакон с раствором, либо двойной флакон с составом, предполагающим
20 смешивание, можно использовать многократно, и их достаточно для одного или множества циклов лечения пациента, что может быть более удобным по сравнению с существующим в настоящее время режимом лечения.

[0177] Настоящие промышленные изделия используют как для немедленного введения, так и в течение периода двадцати четырех часов или дольше.

25 Соответственно, заявленные в настоящем документе промышленные изделия обеспечивают значимые преимущества для пациентов. Составы настоящего изобретения необязательно можно безопасно хранить при температуре от около 2 °С до около 40 °С, причем биологическая активность белка сохраняется в течение продолжительных периодов времени, в связи с чем на упаковке допускается этикетка,
30 указывающая, что раствор можно хранить и/или использовать в течение периода 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, или 96 часов, или более. При использовании разбавителя с консервантом на такой этикетке может быть указан срок годности до 1–12 месяцев, полугодом, полутора и/или двух лет.

[0178] Растворы специфического антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 можно получать процессом, который включает смешивание по меньшей мере одного антитела в водном разбавителе. Смешивание осуществляют с помощью стандартных процедур растворения и смешивания. Например, чтобы получить приемлемый разбавитель, отмеренное количество по меньшей мере одного антитела в воде или буфере соединяют в количествах, достаточных для получения требуемых концентраций белка и необязательно консерванта или буфера. Варианты этого процесса понятны специалисту в данной области. Например, для оптимизации с учетом концентрации и применяемого способа введения можно изменять такие факторы, как порядок добавления компонентов, внесение дополнительных добавок, температура и рН, при которых получают состав.

[0179] Заявленные продукты можно предоставлять пациентам в виде прозрачных растворов или двух флаконов, включающих флакон с по меньшей мере одним лиофилизированным специфическим антителом к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23, которое разводят содержащимся во втором флаконе водным разбавителем. Либо один флакон с раствором, либо двойной флакон с составом, предполагающим смешивание, можно использовать многократно, и их достаточно для одного или множества циклов лечения пациента, что может быть более удобным по сравнению с существующим в настоящее время режимом лечения.

[0180] Заявленные продукты можно предоставлять пациентам не напрямую, а посредством поставки в аптеки, клиники или другие такие учреждения и организации прозрачных растворов или двух флаконов, содержащих флакон с по меньшей мере одним лиофилизированным специфическим антителом к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или 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.

[0181] Общепринятые устройства, содержащие такие системы с одним флаконом, включают в себя устройства — шприц-ручки для доставки раствора, такие как B-D[®] (инжекторное устройство — шприц-ручка), NOVOPEN[®] (инжекторное устройство — шприц-ручка), AUTOPEN[®] (инжекторное устройство — шприц-ручка), OPTIPEN[®]

(инжекторное устройство — шприц-ручка), GENOTROPIN PEN[®] (инжекторное устройство — шприц-ручка), Biojector[®] (инжекторное устройство — шприц-ручка), Reso-Pen, Humaject, J-tip Needle-Free Injector, Intraject, Medi-Ject, например, произведенные или разработанные компаниями Becton Dickenson (г. Франклин Лейкс, штат Нью-Джерси, США, www.bectondickenson.com), Disetronic (г. Бургдорф, Швейцария, www.disetronic.com); Bioject, г. Портланд, штат Орегон, США (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (г. Питерборо, Великобритания, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp. (г. Миннеаполис, штат Миннесота, www.mediject.com).

Признанные устройства, содержащие системы из двух флаконов, включают такие системы шприца-ручки для разведения лиофилизированного лекарственного средства в картридже для введения разведенного раствора, например HUMATROPEN[®] (инжекторное устройство — шприц-ручка)

[0182] Продукты могут включать в себя упаковочный материал. В дополнение к информации по требованию контролирующих органов, на упаковочном материале также указывают условия, при которых можно использовать продукт. Упаковочный материал настоящего изобретения содержит инструкции для пациента, если применимо, по разведению по меньшей мере одного антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23 в водном разбавителе с получением раствора, а также по использованию раствора в течение периода 2–24 часов или дольше в случае двух флаконов, влажного/сухого, с продуктом. Для одного флакона с продуктом в виде раствора, предварительно заполненного шприца или автоинжектора на упаковке указывают, что такой раствор можно использовать в течение периода 2–24 часов или дольше.

Продукты используются человеком в фармацевтических целях.

[0183] Составы, применяемые в способе настоящего изобретения, можно получать в ходе процесса, который включает смешивание антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23 и выбранного буфера, предпочтительно фосфатного буфера, содержащего физиологический раствор или выбранную соль. Смешивание антитела к ИЛ-23 и буфера в водном разбавителе осуществляют с использованием стандартных процедур растворения и смешивания. Например, чтобы получить приемлемый состав, отмеренное количество по меньшей мере одного антитела в воде или буфере соединяют с требуемым буферным агентом в воде в количествах, достаточных для получения требуемых концентраций белка и буфера. Варианты этого процесса понятны специалисту в данной области. Например, для оптимизации с учетом концентрации и применяемого способа введения можно изменять такие факторы, как порядок

добавления компонентов, внесение дополнительных добавок, температура и рН, при которых получают состав.

[0184] В способе изобретения предлагаются фармацевтические композиции, содержащие различные составы, полезные и приемлемые для введения пациенту, человеку или животному. Такие фармацевтические композиции получают с использованием воды в «стандартном состоянии» в качестве разбавителя и путем обычных способов, хорошо известных обычным специалистам в данной области. Например, сначала можно предоставить буферные компоненты, такие как гистидин и гистидина моногидрохлорида гидрат, с последующим добавлением подходящего, не конечного объема водного разбавителя, сахарозы и полисорбата-80 в «стандартном состоянии». Затем можно добавлять выделенное антитело. Наконец, объем фармацевтической композиции доводят до требуемого конечного объема в условиях «стандартного состояния» добавлением в качестве разбавителя воды. Специалисты в данной области определяют ряд других способов, приемлемых для получения фармацевтических композиций.

[0185] Фармацевтические композиции могут представлять собой водные растворы или суспензии, содержащие указанную массу каждого компонента на единицу объема воды, или имеющие в «стандартном состоянии» указанный рН. При использовании в настоящем документе термин «стандартное состояние» означает температуру $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ и давление в 1 атмосферу. Термин «стандартное состояние» не используется в данной области для обозначения одного признанного набора температур или давления, но вместо этого является эталонным состоянием, которое определяет температуру и давление, установленные для описания раствора или суспензии с определенной композицией в эталонных условиях «стандартного состояния». Это связано с тем, что объем раствора частично зависит от температуры и давления. Специалисты в данной области поймут, что фармацевтические композиции, эквивалентные описанным в настоящем документе, можно продуцировать при других значениях температуры и давления. То, эквивалентны ли такие фармацевтические композиции описанным в настоящем документе, следует определять в условиях «стандартного состояния», определенных выше (например, температура $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ и давление 1 атмосфера).

[0186] Важно отметить, что такие фармацевтические композиции могут содержать массы компонентов «около» определенного значения (например, «около 0,53 мг L-гистидина») на единицу объема фармацевтической композиции или иметь значения рН около определенного значения. Масса компонента, присутствующего в

фармацевтической композиции, или значение рН находится «около» данного численного значения, если выделенное антитело, присутствующее в фармацевтической композиции, способно связываться с пептидной цепью при нахождении выделенного антитела в фармацевтической композиции или после удаления выделенного антитела из фармацевтической композиции (например, при разведении). Иначе говоря, значение, такое как значение массы компонента или значение рН, составляет «около» заданного численного значения при сохранении и обнаружении активности связывания изолированного антитела после помещения изолированного антитела в фармацевтическую композицию.

5 [0187] Для определения, связываются ли специфические мАт к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 с аналогичными или отличающимися эпитопами и/или конкурируют ли они друг с другом, проводят анализ конкурентного связывания. Антитела наносят по отдельности на планшеты для ИФА на твердой фазе в виде покрытия. Добавляют конкурирующие мАт с последующим добавлением биотинилированных hrIL-12 или 10 ИЛ-23. Для положительного контроля в качестве конкурирующего мАт используют то же мАт, что и для покрытия («самоконкуренция»). Связывание с ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23 определяют с помощью стрептавидина. Эти результаты показывают, распознают ли мАт аналогичные или частично перекрывающиеся эпитопы на ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23.

15 [0188] Один аспект способа настоящего изобретения предусматривает введение пациенту фармацевтической композиции, содержащей

[0189] В одном варианте осуществления фармацевтических композиций концентрация изолированного антитела составляет от около 77 до около 104 мг на мл фармацевтической композиции. В другом варианте осуществления фармацевтических композиций рН составляет от около 5,5 до около 6,5.

20 [0190] Стабильные или консервированные составы можно предоставлять пациентам в виде прозрачных растворов или двух флаконов, содержащих флакон с по меньшей мере одним лиофилизированным антителом к ИЛ-23, которое разводят содержащимися во втором флаконе консервантом или буфером и эксципиентами в водном разбавителе.

25 Либо один флакон с раствором, либо двойной флакон с составом, предполагающим смешивание, можно использовать многократно, и их достаточно для одного или 30 множества циклов лечения пациента, что может быть более удобным по сравнению с существующим в настоящее время режимом лечения.

[0191] С помощью других составов или способов стабилизации антител к ИЛ-23 можно получать содержащее антитело средство, отличное от прозрачного раствора лиофилизированного порошка. К непрозрачным растворам относятся составы, содержащие взвешенные частицы, причем указанные частицы представляют собой композиции, содержащие антитело к ИЛ-23 в структуре с варьирующим размером, и известны под различными названиями, такими как микросферы, микрочастицы, наночастицы, наносферы или липосомы. Такие относительно однородные, по существу, сферические, составы в виде частиц, содержащие активный агент, можно формировать путем связывания водной фазы, содержащей активный агент и полимер, с неводной фазой, с последующим испарением неводной фазы и слиянием частиц из водной фазы, как описано в патенте США № 4,589,330. Пористые микрочастицы можно получать с помощью первой фазы, содержащей активный агент и полимер, диспергированные в непрерывном растворителе, и посредством удаления указанного растворителя из суспензии способом сублимационной сушки либо разбавления, экстракции и осаждения, как описано в патенте США № 4,818,542. Предпочтительными полимерами для таких препаратов являются естественные или синтетические сополимеры, либо полимеры, выбранные из группы, состоящей из желатинового агара, крахмала, арабиногалактана, альбумина, коллагена, полигликолевой кислоты, полимолочной кислоты, гликолид-L(-)-лактида, поли(эпсилон-капролактона), поли(эпсилон-капролактон-СО-молочной кислоты), поли(эпсилон-капролактон-СО-гликолевой кислоты), поли(бета-гидроксимасляной кислоты), полиэтиленоксида, полиэтилена, поли(алкил-2-цианакрилата), поли(гидроксиэтилметакрилата), полиамидов, поли(аминокислот), поли(2-гидроксиэтил-DL-аспартамида), поли(эфира мочевины), поли(L-фенилаланин/этиленгликоль/1,6-диизоцианатгексана) и 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, используемые для растворения полимера и/или активного вещества, включают: воду, гексафторизопропанол, метилхлорид, тетрагидрофуран, гексан, бензол или полуторагидрат гексафторацетона. Процесс диспергирования содержащей активное вещество фазы со второй фазой может включать принудительный пропуск первой фазы через отверстие в сопле для образования капель.

[0192] Составы в виде сухого порошка можно получать иными способами помимо лиофилизации, например, путем распылительной сушки, экстракции растворителя испарением или осаждения кристаллической композиции, за которыми следуют одна или несколько стадий удаления водного или неводного растворителя. Получение 5 препарата антитела путем распылительной сушки описано в патенте США № 6,019,968. Композиции антитела в виде сухого порошка можно получать путем распылительной сушки растворов или суспензий антитела и необязательно эксципиентов в растворителе в условиях, обеспечивающих получение вдыхаемого сухого порошка. Растворители могут включать полярные соединения, такие как вода и этанол, которые можно легко 10 высушивать. Стабильность антитела 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 15 WO 9916419. Стабилизированные дисперсии можно вводить в легкие пациента с помощью ингалятора мерных доз. Оборудование, используемое для промышленного производства лекарственного средства путем распылительной сушки, выпускается Buchi Ltd. или Niro Corp.

[0193] Антитело к ИЛ-23, в стабильных или консервированных составах или 20 растворах, описанных в настоящем документе, в соответствии с настоящим изобретением можно вводить пациенту с помощью разных способов доставки, включая подкожную или внутримышечную инъекцию; трансдермальное введение, введение в легкие, через слизистую оболочку, посредством имплантата, осмотического дозатора, кассеты, микродозатора или других способов, признанных специалистами в данной 25 области, как хорошо известно в данной области.

Терапевтическое применение

[0194] В настоящем изобретении также предложен способ модуляции или лечения волчанки в клетке, ткани, органе, у животного или у пациента, известный специалистам в данной области или описанный в настоящем документе, с применением по меньшей 30 мере одного антитела к ИЛ-23 настоящего изобретения, например, путем введения или приведения в контакт клетки, ткани, органа, животного или пациента с терапевтически эффективным количеством специфического антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или ИЛ-23.

[0195] Любой способ настоящего изобретения может включать в себя введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей

антитело к ИЛ-23, в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в
 таком модулировании, лечении или терапии. Такой способ может необязательно
 дополнительно включать совместное введение или применение комбинированной
 5 терапии для лечения таких заболеваний или расстройств, причем введение указанного
 по меньшей мере одного антитела к ИЛ-23, его определенного участка или варианта,
 дополнительно включает введение (до, одновременно и/или после) по меньшей мере
 одного средства, выбранного из по меньшей мере одного антагониста ФНО (например,
 без ограничения, химического или белкового антагониста ФНО, моноклонального или
 поликлонального антитела к ФНО или его фрагмента, растворимого рецептора ФНО
 10 (например, p55, p70 или p85) или его фрагмента, их слитых полипептидов, или
 низкомолекулярного антагониста ФНО, например связывающего ФНО белка I или II
 (ТВР-1 или ТВР-II), нерелимонмаба, инфликсимаба, этернацепта (Enbrel™),
 адалимулаба (Humira™), CDP-571, CDP-870, афелимомаба, ленерцепта и т. п.),
 противоревматического ЛС (например, метотрексата, ауранофина, ауртиоглюкозы,
 15 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,
 20 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
 25 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
 30 рецепторов эстрогена, мидриатика, циклоплегического ЛС, алкилирующего агента,
 антиметаболита, ингибитора митоза, радиофармацевтического ЛС, антидепрессанта,
 ЛС против мании, антипсихотического ЛС, анксиолитического ЛС, снотворного,
 симпатомиметика, возбуждающего ЛС, донепезила, такрина, ЛС для лечения астмы,
 бета-агониста, стероида для ингаляции, ингибитора лейкотриенов, метилксантина,

кромоллина, эпинефрина или его аналога, дорназы альфа (Pulmozyme), цитокина или антагониста цитокина. Приемлемые дозировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket
 5 *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.

10 **Терапевтические способы лечения**

[0196] Как правило, лечение волчанки 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 миллиграммов антитела к ИЛ-12/23p40 или к ИЛ-23 на килограмм массы пациента в одной дозе и,
 15 предпочтительно, от по меньшей мере около 0,1 до 100 миллиграммов антитела на килограмм массы пациента за одно или несколько введений в зависимости от удельной активности активного агента, содержащегося в композиции. В альтернативном варианте осуществления эффективная концентрация в сыворотке может составлять 0,1–5000 мкг/мл сыворотки за одно или множество введений. Приемлемые дозы известны
 20 медицинским специалистам и, разумеется, зависят от конкретного болезненного состояния, удельной активности вводимой композиции и конкретного пациента, получающего лечение. В некоторых случаях для достижения требуемого терапевтического количества может понадобиться выполнение повторного введения, т. е. повторных отдельных введений конкретной контролируемой или измеренной дозы,
 25 причем отдельные введения повторяют до достижения требуемой суточной дозы или эффекта.

[0197] 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,
 30 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и/или 100–500 мг/кг за одно введение, или любой интервал, значение или часть этого диапазона, или количество для достижения в сыворотке концентрации 0,1, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5, 2,9, 3,0, 3,5, 3,9, 4,0, 4,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5,

7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 20, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14,0, 14,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 12, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14, 14,5, 15, 15,5, 15,9, 16, 16,5, 16,9, 17, 17,5, 17,9, 18, 18,5, 18,9, 19, 19,5, 19,9, 20, 20,5, 20,9, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 и/или 5000 мкг/мл сыворотки за однократное или многократное введение, или любой интервал, значение или часть этого диапазона.

[0198] В альтернативном варианте осуществления вводимые дозы могут варьироваться в зависимости от известных факторов, таких как фармакодинамические показатели конкретного агента, режим и способ его введения; возраст, состояние здоровья и масса реципиента; природа и степень выраженности симптомов, тип сопутствующего лечения, частота введения и требуемый эффект. Обычно доза активного ингредиента составляет от около 0,1 до 100 мг на килограмм массы тела. Как правило, от 0,1 до 50 и предпочтительно от 0,1 до 10 миллиграмм на килограмм за одно введение или в лекарственной форме с замедленным высвобождением будет эффективно для достижения желаемых результатов.

[0199] 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.

[0200] Лекарственные формы (композиция), приемлемые для внутреннего введения, по существу, содержат от около 0,001 мг до около 500 мг активного ингредиента на единицу или контейнер. В этих фармацевтических композициях активный ингредиент

обычно присутствует в количестве около 0,5–99,999% масс. в расчете на общую массу композиции.

[0201] Для парентерального введения антитела лекарственная форма может представлять собой раствор, суспензию, эмульсию, частицу, порошок или
5 лиофилизированный порошок вместе с фармацевтически приемлемым носителем для парентерального введения или отдельно от носителя. Примерами таких носителей являются вода, физиологический раствор, раствор Рингера, раствор глюкозы и человеческий сывороточный альбумин 1–10%. Кроме того, можно применять
10 липосомы и безводные среды, например нелетучие масла. Носитель или лиофилизированный порошок может содержать добавки, способствующие изотоничности (например, хлорид натрия, маннит) и химической стабильности (например, буферы и консерванты). Состав стерилизуют известными или приемлемыми методиками.

[0202] Приемлемые фармацевтические носители описаны в последнем издании
15 Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, которое является стандартным источником ссылок в данной области.

Альтернативные способы введения

[0203] В соответствии с настоящим изобретением для введения фармацевтически эффективных количеств антитела к ИЛ-23 можно применять множество известных и
20 разработанных способов ведения. Далее описано введение через легкие, однако в соответствии с настоящим изобретением можно также применять другие способы введения, дающие приемлемые результаты. Антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23 настоящего изобретения можно доставлять в носителе в виде раствора, эмульсии, коллоида или суспензии, либо в виде сухого порошка с применением любого из
25 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

[0204] Составы для парентерального введения могут в качестве обычных
30 эксципиентов содержать стерильную воду, физиологический раствор, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения, гидрогенизированные нафталины и т. п. Водные или масляные суспензии для инъекций можно получать с использованием подходящего эмульгатора или увлажнителя и суспендирующего агента известными способами. Для инъекций

можно использовать нетоксичный, пригодный для неперорального введения, разбавляющий агент, например водный раствор, стерильный раствор для инъекций или суспензию в растворителе. В качестве пригодной несущей среды или растворителя допустимо использовать воду, раствор Рингера, изотонический раствор и т. п.; в качестве обычного растворителя или суспендирующего растворителя можно использовать стерильное нелетучее масло. Для этого можно использовать нелетучее масло и жирную кислоту любого вида, включая природные или синтетические либо полусинтетические жирные масла или жирные кислоты; природные или синтетические либо полусинтетические моно-, ди- или триглицериды. Парентеральное введение известно в данной области и включает, без ограничений, общепринятые средства инъекции, пневматическое безыгольное инъекционное устройство, описанное в патенте США № 5,851,198, и лазерный перфоратор, описанный в патенте США № 5,839,446, полностью включенные в настоящий документ путем ссылки.

Альтернативные способы доставки

[0205] Изобретение дополнительно относится к введению антителя к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23 путем парентерального, подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутрисуставного, внутривнутрибронхиального, внутривнутрибрюшного, интракапсулярного, внутривнутрихрящевого, внутривнутриполостного, интрацелиального, внутривнутримозжечкового, внутривнутрижелудочкового, в толстую кишку, интрацервикального, внутривнутрижелудочного, внутривнутрипеченочного, интрамиокардиального, внутривнутрикостного, внутривнутритазового, интраперикардиального, внутривнутрибрюшинного, интраплеврального, в предстательную железу, внутривнутрилегочного, интра ректального, интра ренального, интра ретинального, интра спинального, интра синовиального, внутривнутригрудного, внутривнутриматочного, внутривнутрипузырного, в пораженные ткани, болюсного, вагинального, ректального, буккального, подъязычного, интраназального или чрескожного введения. Композицию антителя к ИЛ-12/ИЛ-23p40 или к ИЛ-23 можно получать для применения парентеральным (подкожным, внутримышечным или внутривенным) или любым другим способом введения, в частности, в форме жидких растворов или суспензий; для применения вагинальным или ректальным способом введения, в частности в мягких формах, таких как, без ограничений, кремы и суппозитории; для трансбуккального или подъязычного введения, например, без ограничений, в форме таблеток или капсул; или для интраназального введения, например, без ограничений, в форме порошков, капель в нос или аэрозолей, либо в виде определенных агентов; или для введения трансдермально, например, без ограничений, в виде систем доставки в геле, мази,

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

[0206] Приведенное выше описание изобретения по существу дополнительно разъясняется далее с помощью примеров, которые представлены в качестве иллюстрации и не являются ограничивающими. Дополнительные подробности изобретения иллюстрируют следующими ниже не имеющими ограничительного характера примерами. Описание всех цитат в спецификации прямо включено в настоящий документ путем ссылки.

Пример. Производственные процессы для получения STELARA[®] (устекинумаба)

20 Предпосылки создания изобретения

[0207] STELARA[®] (устекинумаб) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело G1-каппа, которое связывается с высокой аффинностью и специфичностью с общей субъединицей р40 человеческих цитокинов интерлейкина (ИЛ)-12 и ИЛ-23. Устекинумаб содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:10 и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11; аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO:7; и аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO:8; аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3; и аминокислотные последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6. Связывание устекинумаба с субъединицей ИЛ-12/23p40 блокирует связывание ИЛ-12 или ИЛ-23 с рецептором ИЛ-12Rβ1 на поверхности натуральных киллеров и Т-клеток CD4⁺, ингибирует внутриклеточную сигнализацию ИЛ-12 и ИЛ-23

и последующую активацию и продукцию цитокинов. Аномальная регуляция ИЛ-12 и ИЛ-23 ассоциируется со множеством иммуноопосредованных заболеваний.

[0208] На сегодняшний день устекинумаб получил разрешение на продажу во всем мире, включая страны Северной Америки, Европы, Южной Америки и Азиатско-Тихоокеанского региона, для лечения взрослых пациентов, включая пациентов с хроническим бляшковидным псориазом средней или тяжелой степени и/или активным псориатическим артритом. Устекинумаб также оценивают в исследованиях фазы 3 для болезни Крона (CD) и в предварительных исследованиях клинической эффективности для лечения активной стадии системной красной волчанки (СКВ).

10 **Обзор производственного процесса**

[0209] STELARA[®] (устекинумаб) производят в ходе 10-стадийного процесса, который включает непрерывное перфузионное культивирование клеток с последующей очисткой. Обзор производственного процесса представлен на Фиг. 1.

[0210] Используемые в настоящем документе термины «культура», «культивирование», «культивированный» и «клеточная культура» относятся к популяции клеток, которая суспендирована в среде в условиях, приемлемых для выживания и/или роста популяции клеток. Как будет очевидно из контекста обычным специалистам в данной области, эти термины, используемые в настоящем документе, также относятся к комбинации, включающей популяцию клеток и среду, в которой популяция суспендирована. Клеточная культура включает в себя, например, клетки, выращенные способами порционного культивирования, культивирования с подпиткой или перфузионного культивирования клеток и т. п. В некоторых вариантах осуществления культура клеток представляет собой культуру клеток млекопитающих.

[0211] Клеточные линии для применения в настоящем изобретении включают клеточные линии млекопитающих, включая, без ограничений, клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO), человеческие эмбриональные клетки почек (клетки HEK), клетки почки новорожденного хомячка (клетки VHK), клетки мышинной миеломы (например, клетки NS0 и клетки Sp2/0) и клетки человеческой сетчатки (например, клетки PER.C6).

[0212] Используемые в настоящем документе термины «среда с заданным химическим составом», «среда с определенным химическим составом», «гибридная среда с определенным химическим составом» или «среда с определенным химическим составом для гибридом» относятся к синтетической среде для выращивания, в которой известен характер и концентрация всех компонентов. Среды с заданным химическим

составом не содержат бактериальных, дрожжевых, животных или растительных экстрактов, сыворотки или плазмы животных, хотя они могут включать или не включать в себя отдельные компоненты растительного или животного происхождения (например, белки, полипептиды и т. д.). Среда с заданным химическим составом могут содержать неорганические соли, такие как фосфаты, сульфаты и т. п., необходимые для поддержания роста. Источник углерода является заданным и, как правило, представляет собой сахар, такой как глюкоза, лактоза, галактоза и т. п., или другие соединения, такие как глицерин, лактат, ацетат и т. п. Хотя в некоторых средах с определенным химическим составом в качестве буфера также используют фосфатные соли, можно использовать другие буферы, такие как цитрат, триэтанолламин и т. п. К примерам доступных в продаже сред с заданным химическим составом относятся, без ограничений, среда ThermoFisher's CD Hybridoma Medium и среда CD Hybridoma AGT™ Medium, различные среды типа Dulbecco's Modified Eagle's (DME) (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc), питательная смесь Ham's Nutrient Mixture (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc), их комбинации и т. п. Способы получения сред с заданным химическим составом известны в данной области, например, в патентах США №№ 6,171,825 и 6,936,441, WO 2007/077217 и публикациях заявок на патент США №№ 2008/0009040 и 2007/0212770.

[0213] Используемый в настоящем документе термин «биореактор» относится к любому сосуду, используемому для выращивания клеточной культуры. Биореактор может быть любого размера, при условии, что его можно использовать для культивирования клеток. В определенных вариантах осуществления такие клетки представляют собой клетки млекопитающих. Как правило, биореактор будет иметь объем по меньшей мере 1 литр и может иметь объем 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5 000, 8 000, 10 000, 12 000 литров или более или любой промежуточный объем. Внутренние условия биореактора, в том числе, помимо прочего, pH и температуру, необязательно контролируют в течение периода культивирования. Биореактор может состоять из любого материала, который подходит для содержания культур клеток млекопитающих, суспендированных в среде в условиях культивирования, соответствующих настоящему изобретению, включая стекло, пластик или металл. Используемый в настоящем документе термин «производственный биореактор» относится к готовому биореактору, используемому при производстве интересующего полипептида или гликопротеина. Объем производственного биореактора, как правило, составляет по меньшей мере 500 литров и может составлять 1000, 2500, 5000, 8000, 10 000, 12 000 литров или более или

любой промежуточный объем. Специалист в данной области будет знать и сможет выбрать приемлемые биореакторы для применения на практике в настоящем изобретении.

- 5 [0214] Предварительное культивирование, размножение и продукцию устекинумаба выполняют на стадии 1 и стадии 2. На стадии 1 инициируют предварительное культивирование из одного или более флаконов из рабочего клеточного банка, содержащего трансфицированные клетки Sp2/0, экспрессирующие последовательности НС и LC устекинумаба, размножают клетки в культуральных флаконах, одноразовых культуральных мешках и затравочном биореакторе объемом 100 л. Клетки
- 10 культивируют до получения клеточной плотности и объема, необходимых для посева в производственный биореактор объемом 500 л. На стадии 2 клеточную культуру перфузируют в производственном биореакторе объемом 500 л, используя систему удержания клеток с полуволоконным фильтром и переменным тангенциальным потоком (ATF). Из системы ATF собирают пермеат клеточной культуры (урожай),
- 15 клетки удерживают в биореакторе и культуру пополняют свежей средой. Урожай из одного или более производственных биореакторов объемом 500 л можно объединять на стадии 3. Урожай очищают с помощью аффинной хроматографии со смолой MabSelect с белком А. Полученный элюат прямого захвата продукта (DPC) замораживают до дальнейшей обработки.
- 20 [0215] Очистку устекинумаба с помощью DPC выполняют на 4–8-й стадиях с помощью ионообменной хроматографии и других стадий для инактивации или удаления потенциальных вирусных загрязнений (обработка растворителем/детергентом [S/D] и фильтрация для удаления вирусов). Элюаты для DPC на стадии 4 размораживают, объединяют и фильтруют, на стадии 5 инкубируют с три-н-
- 25 бутилфосфатом (TNBP) и обрабатывают полисорбатом 80 S/D для инактивации любых присутствующих вирусов в липидной оболочке. Реагенты TNBP и полисорбат 80, агрегаты и примеси удаляют из устекинумаба на стадии 6 с использованием катионообменной хроматографии на сефарозе SPXL SEPAROSE® (смола). Устекинумаб на стадии 7 дополнительно очищают с использованием анионообменной
- 30 хроматографии на сефарозе QXL SEPAROSE® (смола) для удаления ДНК, вирусов и примесей. Смолы SPXL и QXL поставляются GE Healthcare Bio-Sciences, г. Питтсбург, штат Пенсильвания, США. На стадии 8 очищенный устекинумаб разбавляют и фильтруют через задерживающий вирусы фильтр NFP (Millipore Sigma, г. Берлингтон, штат Массачусетс, США).

[0216] Получение предварительно подготовленной массы (PFB) и подготовленной массы (FB) устекинумаба выполняют на стадиях 9 и 10 соответственно. На стадии 9 на стадии ультрафильтрации устекинумаб концентрируют, а на стадии диафильтрации добавляют согласно составу эксципиенты и удаляют функциональные буферные соли.

5 На стадии 10 к устекинумабу PFB добавляют полисорбат 80 с получением FB. FB фильтруют в поликарбонатные контейнеры для хранения в замороженном состоянии. Замороженный FB упаковывают в изолированные контейнеры с сухим льдом для транспортировки к месту производства лекарственного препарата.

Подробное описание культивирования клеток в производственном процессе

10 **Стадия 1**

Прекультивирование и размножение

[0217] Первой стадией производства устекинумаба является инициация предварительного культивирования из флакона рабочего клеточного банка (WCB) с трансфицированными клетками Sp2/0, экспрессирующими последовательности HC и LC устекинумаба, и размножение в культуральных флаконах, одноразовых культуральных мешках и затравочном биореакторе объемом 100 л. Клетки культивируют до получения клеточной плотности и объема, необходимых для посева в производственный биореактор объемом 500 л. Блок-схема процесса предварительного культивирования и размножения представлена на Фиг. 2.

20 **Процедура производства**

[0218] Один или более хранящихся в криобанке флаконов WCB размораживают и разбавляют средой с заданным химическим составом (CD) для гибридом с добавлением 6 мМ L-глутамин, 0,5 мг/л микофеноловой кислоты, 2,5 мг/л гипоксантина и 50 мг/л ксантина (CDH-A). Жизнеспособность культуры должна составлять $\geq 45\%$. Клетки далее разводят средой CDH-A во флаконе для культивирования до плотности посева от 0,2 до $0,5 \times 10^6$ жизнеспособных клеток (VC)/мл. Предварительное культивирование выполняют в CO₂-инкубаторе с увлажнением, при условиях температуры, концентрации CO₂ и с перемешиванием в пределах диапазонов, определенных в записи для партии. Предварительную культуру инкубируют в течение ≤ 3 дней до

25 получения минимальной плотности клеток $\geq 0,6 \times 10^6$ VC/мл и жизнеспособности культуры $\geq 50\%$. Предварительную культуру последовательно размножают, пересеивая в культуральные флаконы, а затем в культуральные мешки в качестве способа

30 увеличения масштаба для посева в биореактор объемом 100 л. Во время фазы

размножения культуры каждая стадия инкубации занимает ≤ 3 дней для достижения условий посева, для чего требуется плотность клеток $\geq 0,6 \times 10^6$ VC/мл и жизнеспособность культуры $\geq 80\%$. Плотность посева при каждом пересеивании составляет от 0,2 до $0,5 \times 10^6$ VC/мл в культуральных флаконах и от 0,2 до 0,6 $\times 10^6$ VC/мл культуральных мешках. При каждом посеве отбирают пробы для определения плотности жизнеспособных клеток (viable cell density — VCD), жизнеспособности культуры и микроскопического исследования. Перед посевом в затравочный биореактор объемом 100 л отбирают пробу предварительной культуры для оценки биологической нагрузки.

10 [0219] Размножение предварительной культуры можно поддерживать в течение максимум 30 дней после размораживания. Предварительные культуры, не использованные в течение 30 дней, выбрасывают. При необходимости можно поддерживать и применять для посева в другой затравочный биореактор объемом 100 л резервные предварительные культуры, размноженные, как описано выше, и подвергнутые тому же технологическому мониторингу, контрольным исследованиям и воздействию тех же параметров процесса, что и основные предварительные культуры.

15 [0220] Когда предварительная культура будет соответствовать критериям посева, содержимое культурального (-ых) мешка (-ов) переносят в затравочный биореактор объемом 100 л, содержащий среду CDH-A, ориентируясь на плотность посева $\geq 0,3 \times 10^6$ VC/мл. pH, температуру и концентрацию растворенного кислорода в затравочном биореакторе удерживают в пределах диапазонов, определенных в записи партии. Культуру размножают до получения плотности клеток $\geq 1,5 \times 10^6$ VC/мл и жизнеспособности культуры $\geq 80\%$. На протяжении всего процесса из затравочного биореактора отбирают пробы культуры для определения плотности жизнеспособных клеток (VCD), жизнеспособности культуры и микроскопического исследования. Перед посевом в производственный биореактор объемом 500 л отбирают пробы культуры для определения биологической нагрузки.

25 [0221] Когда VCD в затравочном биореакторе достигнет $\geq 1,5 \times 10^6$ VC/мл, культуру можно использовать для посева в производственный биореактор объемом 500 л. С другой стороны, из затравочного биореактора объемом 100 л можно забрать часть культуры, а оставшуюся культуру можно развести свежей средой. В результате такого процесса отбора и пополнения культуре дают размножиться до достижения достаточной клеточной плотности для посева в производственный биореактор объемом

500 л. Максимальная продолжительность культивирования в биореакторе объемом 100 л составляет 9 дней после посева.

Стадия 2

Производство биореактора

5 [0222] На стадии 2 клеточную культуру непрерывно перфузируют в производственном биореакторе объемом 500 л с использованием системы удержания клеток с полуволоконным фильтром и переменным тангенциальным потоком (АТФ). Из системы АТФ собирают пермеат клеточной культуры (урожай), клетки возвращают в биореактор и культуру пополняют свежей средой. Блок-схема технологических
10 процессов в биореакторе представлена на Фиг. 3.

Процедура производства

[0223] Посев в производственный биореактор объемом 500 л выполняют путем переноса содержимого затравочного биореактора объемом 100 л в производственный биореактор объемом 500 л, содержащий среду CD (с заданным химическим составом)
15 для гибридом с добавлением 6 мМ L-глутамин, 0,5 мг/л микофеноловой кислоты, 2,5 мг/л гипоксантина и 50 мг/л ксантина (CDH-A). Перенесенный объем должен быть достаточным для достижения целевой плотности посева $\geq 0,3 \times 10^6$ жизнеспособных клеток (VC)/мл. Культуру поддерживают при температуре от 34 до 38 °С, рН от 6,8 до 7,6 и концентрации растворенного кислорода (DO) от 1 до 100%.

20 [0224] Иницируют непрерывную перфузию и культуру отбирают из биореактора объемом 500 л в систему АТФ для отделения клеток от пермеата. Пермеат фильтруют через фильтр АТФ 0,2 мкм и собирают в виде сбора в биотехнологические контейнеры (ВРС). Клетки возвращают в биореактор и подают свежую среду CDH-A для поддержания постоянного объема культуры. В ходе производственного цикла контролируют плотность жизнеспособных клеток (VCD), жизнеспособность культуры, рН, DO, температуру и содержание иммуноглобулина G (IgG). Скорость перфузии постепенно увеличивают пропорционально VCD до достижения целевой скорости приблизительно одного объема биореактора в день. Скорость перфузии удерживают таким образом, чтобы она не превышала 1,20 объемов биореактора в день.

25 30 Удерживание в системе АТФ отслеживают для облегчения отключения фильтра АТФ прежде, чем задержка IgG на фильтре превысит 50%.

[0225] Когда VCD в биореакторе объемом 500 л достигнет $8,0 \times 10^6$ VC/мл или на 10-й день, в зависимости от того, что наступит раньше, целевое значение рН снижают с 7,2

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

[0226] Непрерывное перфузионное культивирование клеток в биореакторе объемом 500 л продолжают до 46 дней после посева. В конце производства из культуры берут пробы для анализа на микоплазму и занесенный вирус. Сбор может храниться в течение ≤ 30 дней при температуре от 2 до 8 °C после извлечения из биореактора.

10 Введение в стратегию контроля производства

[0227] Была разработана стратегия управления производством для поддержания постоянства характеристик лекарственного вещества (ЛВ) и лекарственного препарата (ЛП) устекинумаба в отношении олигосахаридного профиля, а также для контроля жизнеспособности клеток и продуктивности в ходе крупномасштабного коммерческого производства. Гликозилирование устекинумаба отслеживают для нерасфасованного препарата (НП) на стадии 10 производственного процесса с указанием верхних и нижних пределов для % площади пика 3 профиля КИСФ, % общего количества нейтральных олигосахаридов, % общего количества заряженных олигосахаридов и % отдельных видов нейтральных олигосахаридов, в том числе G0F, G1F и G2F. Используемые в настоящем документе термины «лекарственное вещество» (сокращенно «ЛВ») и «лекарственный препарат» (сокращенно «ЛП») относятся к композиции или композициям для применения в качестве коммерческих лекарственных средств, например, в клинических исследованиях или в качестве зарегистрированных для продажи лекарственных средств. ЛВ представляет собой активный ингредиент, предназначенный для обеспечения фармакологической активности или другого прямого эффекта при диагностике, излечении, облегчении, лечении или профилактике заболевания или для воздействия на структуру или функцию организма. Объем нерасфасованного препарата (НП), получаемый в процессе производства, представляет собой лекарственное вещество (ЛВ). ЛП (также называемый лекарственным препаратом, препаратом, лекарством или медикаментом) представляет собой лекарственное средство, применяемое для диагностики, излечения, смягчения, лечения или профилактики заболевания или для воздействия на структуру или любую функцию тела человека. ЛП представляет собой ЛВ, которое было получено в качестве лекарственного препарата для продажи и/или введения пациенту. Используемые в настоящем документе термины «стратегия

управления производством», «стратегия производства», «стратегия управления» и «способ производства» относятся к процессам производства ЛВ или ЛП для коммерческого использования, например, в клинических испытаниях или в качестве продаваемых препаратов.

- 5 [0228] Вкратце, стратегия управления производством обеспечивает контроль олигосахаридного профиля устекинумаба путем культивирования клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных концентраций металлических микроэлементов, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до
- 10 $\leq 1,8$ мкг/литр. Используемый в настоящем документе термин «указанный» означает четкое и ясное указание на то, что концентрации марганца и меди являются обязательными и должны точно контролироваться в границах верхнего и нижнего пределов в среде с определенным химическим составом. Используемый в настоящем документе термин «контролируемый» означает тщательное регулирование,
- 15 тестирование и проверку, например тщательное взвешивание и/или измерение другими способами сырья, содержащего марганец и медь, во время производства среды, измерение конечных концентраций марганца и меди в среде с определенным химическим составом с помощью масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (IPC-MS) или других методов, и при необходимости регулирование концентраций
- 20 путем добавления к среде с определенным химическим составом соответствующего количества марганца и меди. Другой способ контроля заключается в идентификации двух или более партий сред с определенным химическим составом, которые могут быть смешаны для достижения указанных концентраций, когда одна или более партий находятся вне спецификации. ЛВ или ЛП устекинумаба, полученный с использованием
- 25 настоящей стратегии управления производством, содержит антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40, причем % площади пика 3 электрофореграммы КИЭФ антител к ИЛ-12/ИЛ-23p40 составляет от $\geq 39,8\%$ до $\leq 64,4\%$, а олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/ИЛ-23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание видов заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до
- 30 $\leq 35,6\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$. Стратегия управления производством также обеспечивает поддержание или повышение плотности жизнеспособных клеток (VCD), % жизнеспособности и производительности в биореакторах стадии 2 по сравнению со среднестатистическими значениями. В

предпочтительном способе концентрации марганца и меди определяют с использованием ИСП-МС, а олигосахаридные профили определяют с использованием метода ВЭЖХ.

[0229] Стратегия управления была инициирована после обнаружения нетипичных тенденций в работе производственного биореактора. Затронутые производственные партии в биореакторах демонстрировали формирование «плеча» при более низких значениях VCD, после чего наблюдался спад в профиле VCD по сравнению со среднестатистическими тенденциями. Это изменение в VCD также влияло на продуктивность в отношении количества продуцируемого IgG. Кроме того, было установлено, что профили КИЭФ в затронутых партиях были смещены по сравнению со среднестатистическими тенденциями. В затронутых партиях профили КИЭФ смещались в сторону увеличения % площади пика 3 (увеличение количества видов, не содержащих сиалилированных гликанов). При дальнейшем исследовании оказалось, что уровни общего количества нейтральных и общего количества заряженных олигосахаридов были соответственно выше и ниже исторических средних значений (см., например, Фиг. 7 и Фиг. 8А и 8Б). Кроме того, дополнительная оценка отдельных видов олигосахаридов показала, что в большинстве затронутых партий наблюдались изменения в содержании терминальной галактозы (увеличение содержания агалактозы (G0F) и снижение содержания моногалактозы (G1F) и дигалактозы (G2F) в олигосахаридах (см., например, Фиг. 9А–В соответственно)) с сопутствующей тенденцией к снижению содержания сиаловой кислоты в составе N-связанных олигосахаридов, что привело к снижению количества отрицательно заряженных сиалилированных видов.

[0230] После тщательного исследования был сделан вывод, что изменение среды с определенным химическим составом стало первопричиной изменения % площади пика 3 КИЭФ, олигосахаридного профиля и сдвигов в VCD и продуктивности. Конкретнее, исследование, на удивление, показало, что именно изменение только одного из компонентов клеточной среды, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (трихлорид железа), стало основной причиной изменения олигосахаридного профиля и сдвигов в VCD и продуктивности. В частности, было установлено, что более низкая концентрация металлических микроэлементов Mn^{2+} (марганца) в трихлориде железа является основной причиной изменения % площади пика 3 КИЭФ и олигосахаридного профиля, а более низкая концентрация металлических микроэлементов Cu^{2+} (меди) в трихлориде железа является основной причиной сдвигов в VCD и продуктивности. Также было

установлено, что медь играет роль в определении олигосахаридного профиля и что для обеспечения соответствия олигосахаридного профиля спецификации необходимо контролировать концентрацию и марганца, и меди.

[0231] Изменение трихлорида железа было вызвано тем, что поставщик, обеспечивающий поставку трихлорида железа, изменил технологический процесс, который должен был обеспечить получение трихлорида железа более высокой чистоты. Расследование показало, что это изменение привело к снижению следовых уровней марганца, хрома и меди, которые присутствуют в трихлориде железе в качестве неизмеряемых примесей. Добавление в среду Mn^{2+} (марганец) и Cr^{3+} (хром) частично восстановило профиль VCD, но для полного восстановления VCD и продуктивности потребовалось добавление Cu^{2+} (медь). Первоначально предполагалось, что уровень Cr^{3+} (хром) также может быть основным фактором, однако в ходе последующих мелкомасштабных исследований было установлено, что изменение концентрации марганца является основным фактором, способствующим изменению олигосахаридного профиля, при этом концентрация меди также играет роль, и что медь является основным фактором, способствующим изменению VCD и соответствующему изменению общей продуктивности.

[0232] Стратегия управления производством позволила устранить проблемы, связанные с изменением профиля КИЭФ, олигосахаридного профиля, VCD и продуктивности, путем добавления в среду с определенным химическим составом Mn^{2+} (марганца) и Cu^{2+} (меди). Стратегия управления производством была реализована на стадии 2 в промышленном масштабе. Сначала в среду с определенным химическим составом добавляли только марганец и хром, чтобы восстановить среднестатистический уровень этих металлических микроэлементов. Эта среда была названа SUP-AGT. В ходе последующих изменений в среду с определенным химическим составом добавляли марганец, хром и медь для восстановления всех трех металлических микроэлементов до их соответствующих среднестатистических уровней, основанных на результатах коммерческих масштабов и многочисленных мелкомасштабных исследований. Эта среда была названа SUP-AGT3.

30 Способы

Способы определения плотности жизнеспособных клеток (VCD) и % жизнеспособности

[0233] Общее количество клеток на мл, жизнеспособных клеток/мл (VCD) и % жизнеспособности обычно определяют с помощью анализатора жизнеспособности

клеток Beckman Coulter Vi-CELL-XR с использованием протоколов, программного обеспечения и реагентов, предоставляемых производителем. Альтернативно также применяли автоматизированную систему подсчета клеток CEDEX. Однако также следует отметить, что специалистам в данной области хорошо известны и другие

5 способы определения VCD и % жизнеспособности с использованием гемоцитометра и исключения трипанового синего.

Способы определения композиции олигосахаридов

[0234] Композицию олигосахаридов устекинумаба определяют способом ВЭЖХ с использованием системы для ВЭЖХ Agilent серии 1100/1200 с программным

10 обеспечением Chemstation/Chemstock. Для количественного определения значений относительного количества гликанов N-связанные олигосахариды сначала отщепляют от восстановленного и денатурированного тестового образца N-гликаназой (ПНГаза F). Высвобожденные гликаны метят антралиловой кислотой, очищают посредством

15 фильтрации с использованием нейлоновых фильтров с размером пор 0,45 мкм и анализируют посредством ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием. Хроматограмма ВЭЖХ служит картой, которую можно использовать для определения подлинности и

определения значений относительного количества N-связанных олигосахаридов, присутствующих в образце. Гликианы идентифицируют путем совместного элюирования со стандартами олигосахаридов и по времени удерживания в

20 соответствии результатами, полученными ранее из детальных описаний.

Репрезентативная хроматограмма ВЭЖХ устекинумаба показана на Фиг. 4.

[0235] Количество каждого гликана определяют путем интегрирования площади пика и выражают в процентах от общей площади пика гликана (площадь пика, %). Результаты представлены в отношении G0F, G1F, G2F, общего содержания

25 нейтральных элементов и общего содержания заряженных гликанов. Другие незаряженные частицы представляют собой сумму всех интегрированных пиков, элюируемых в системе в течение периода от 17 до 35 минут, за исключением пиков, соответствующих G0F, G1F и G2F. Общее количество незаряженных гликанов

представляет собой сумму G0F, G1F, G2F и других незаряженных частиц. Общее

30 содержание заряженных гликанов представляет собой сумму пиков моносиалированных гликанов, элюируемых в течение периода от 42 до 55 минут, и пиков дисиалированных гликанов, элюируемых в течение периода от 78 до 90 минут.

[0236] Смесь стандартов олигосахаридов (G0F, G2F, G2F + N-ацетилнейраминавая кислота (NANA) и G2F + 2NANA) анализируют параллельно в качестве

положительного контроля реакции мечения, в качестве стандартов для идентификации пиков и в качестве меры пригодности системы. Растворенные олигосахариды компании Prozyme, G0F (№ по кат. №. GKC-004301), G2F (кат. №. GKC-024301), SA1F (кат. GKC-124301) и SA2F (№ по кат. GKC-224301) или эквивалентные, используются в качестве стандартов сравнения. Для целей определения пригодности системы также используют холостой отрицательный контроль способа и предварительно меченый стандарт G0F. Во время выполнения процедуры картирования олигосахаридов применяют следующие критерии приемлемости системы и приемлемости анализа (исследуемый препарат) для получения верного результата:

10 **Критерии пригодности системы:**

- Разрешение (USP) между пиками G0F и G2F в стандарте олигосахаридов должно составлять $\geq 3,0$.
- Число теоретических тарелок (метод касательных) для пика G0F в стандартах олигосахаридов должно составлять ≥ 5000 .
- 15 • Общая площадь пика гликанов для эталонного стандарта устекинумаба должна в $\geq 1,5$ раз превышать основную площадь пика гликанов для предварительно меченого G0F.
- Если какой-либо пик гликана эталонного стандарта выходит за пределы шкалы, эталонный стандарт вводится повторно с меньшим объемом впрыска.
- 20 • Время удержания пика G0F в эталонном стандарте устекинумаба должно находиться в пределах 0,4 мин от времени удержания G0F в стандартах олигосахаридов.

Критерии приемлемости анализа:

- Слепая проба не должна иметь детектируемых пиков, которые соэлюируются с 25 назначенными пиками олигосахаридов в устекинумабе.
- Общая площадь пика гликанов каждого исследуемого препарата должна быть в $\geq 1,5$ раза больше площади основного пика гликана для предварительно меченого стандарта G0F.
- Если пик гликана в любом образце выходит за пределы, то этот образец повторно 30 впрыскивают с меньшим объемом введенной пробы вместе с предварительно меченым стандартом G0F, референтными препаратами олигосахаридов, холостым образцом и референтным препаратом нормального объема.

- Время удерживания пика G0F в каждом исследуемом препарате должно находиться в пределах 0,4 мин относительно времени удерживания G0F в референтных препаратах олигосахаридов.
- Если анализ не соответствует каким-либо критериям приемлемости, анализ

5

Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС)

[0237] Масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) используют для количественного определения концентраций металлического микроэлемента в частях на миллиард (ч/млрд, мкг/литр) в среде с определенным химическим составом,

10

используемой для получения различных партий устекиномаба. Вкратце, способ состоит из процедуры кислотного расщепления с целью расщепления богатых углеводами источников до диоксида углерода и воды перед введением образца в прибор ИСП-МС, такой как NEXION® (масс-спектрометр) 350X ICP-MS (PerkinElmer). Для жидкостного химического расщепления используют различные кислоты и окислители.

15

Предпочтительные комбинации включают азотную кислоту (HNO_3), пероксид водорода (H_2O_2) и хлористоводородную кислоту (HCl). Также можно использовать аналитические способы, отличные от ИСП-МС, например метод пламенной атомноабсорбционной спектрометрии (ПАЭС), атомно-эмиссионную спектрометрию с индуктивно связанной плазмой (ИСП-АЭС). Общую информацию об аналитических процедурах, подготовке

20

проб и инструментальных способах можно найти, например, в способе, представленном Управлением охраны окружающей среды США (EPA) 3050B Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils, EPA декабрь 1996 г; меморандуме EPA Use of Hydrochloric Acid (HCL) in digests for ICP-MS analysis, Управление твердых отходов и действий в чрезвычайных ситуациях EPA, 26 июля 2003 г; и главе <233> Elemental Impurities-Procedures

25

Фармакопеи США (USP).

[0238] Ниже показан специализированный способ расщепления, разработанный для определения концентрации металлов в средах с определенным химическим составом, которые анализируются методом ИСП-МС. Способ может быть адаптирован для порошка сухой среды или гидратированных образцов среды (1 г образца = 1 мл гидратированного образца).

30

Способ расщепления

- ~ 1 г образцов сухой среды ($\pm 0,5$ г, массу регистрировали до 0,001 г) или ~ 1 мл образцов раствора ($\pm 0,5$ мл, массу регистрировали до 0,001 г) добавляют в сосуд

для расщепления (в данный момент также добавляют применимые меченые растворы).

- 5
 - К образцам добавляют 5,0 мл 50% об./об. HNO_3 (азотной кислоты) и 2,5 мл концентрированного H_2O_2 и затем сосуды для расщепления немедленно накрывают полипропиленовыми прозрачными стаканчиками — H_2O_2 добавляют медленно, чтобы избежать выхода бурлящего образца наружу.
 - Образцы нагревают в течение 30 минут при $95\text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$).
 - Образцы снимают с нагревающей поверхности и дают остыть.
 - Добавляют 2,5 мл концентрированной HNO_3 и нагревают образцы в течение 10 30 минут при $95\text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$). Если образуются коричневые пары, что указывает на процесс окисления образца HNO_3 , стадию повторяют снова и снова до тех пор, пока коричневые пары не перестают выделяться из образца. Отсутствие коричневых паров указывает на полное окисление HNO_3 .
 - Образцы снимают с нагревающей поверхности и дают остыть.
- 15
 - Добавляют 2,5 мл концентрированной HNO_3 и 5 мл концентрированной HCl и нагревают образцы в течение 2 часов при $95\text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$).
 - Образцы снимают с нагревающей поверхности и дают остыть.
 - Общий объем образцов доводят до 50 мл деионизированной водой (DIW), и после этого образцы готовы к анализу.
- 20

***Примечания**

 - Весь нагрев при $95\text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$) выполняют с обратным холодильником без кипячения, закрывая образцы полипропиленовыми прозрачными стаканчиками, в предварительно нагретой системе разложения проб, например Hotblock® (нагревательное устройство).
- 25
 - Флаконы для расщепления замачивают в 5% / 5% об./об. HNO_3/HCl в течение ночи и перед использованием трижды промывают DIW.
 - Полипропиленовые прозрачные стаканчики перед использованием замачивают в 5% / 5% об./об. HNO_3/HCl в течение ночи и перед использованием трижды промывают DIW.
- 30
 - Пластиковые наконечники для дозирования перед использованием трижды промывают реагентом.
 - Образцы анализировали с помощью ИСП-МС в течение 2 недель после расщепления.

- Способы также можно адаптировать к автоматизированным процессам, например, с применением системы автоматического расщепления и выделения продукта реакции Vulcan Automated Digestion and Work-Up System (Questron Technologies Corp.).

5 Реагенты и стандарты

- деионизированная вода (DIW), не содержащая металлов, $> 18,0 \text{ M}\Omega$;
- меченые стандарты металлических микроэлементов из источников, регламентируемых Национальным институтом стандартов и технологий (NIST);
- концентрированный HNO_3 , степень чистоты химического реактива или выше, протестированный на содержание металлов;
- 10 • 50%-ный раствор HNO_3 — 500 мл DIW и медленно добавленные 500 мл HNO_3 , раствор можно хранить в течение 6 месяцев;
- концентрированная HCl , степень чистоты химического реактива или выше, протестированная на содержание металлов;
- 15 • концентрированный (30% об./об.) H_2O_2
- DIW, HNO_3 и HCl регулярно тестируют, чтобы гарантировать отсутствие загрязнения

Капиллярное изоэлектрическое фокусирование

- 20 [0239] Капиллярное изоэлектрическое фокусирование (КИЭФ) разделяет белки на основе общего заряда или изоэлектрической точки (pI). Метод используется для мониторинга распределения изоформ на основе заряда в устекинумабе. В отличие от процедур ИЭФ на основе геля, КИЭФ обеспечивает количественную меру присутствующих заряженных соединений. Кроме того, КИЭФ обеспечивает
- 25 повышенное разрешение, чувствительность и воспроизводимость по сравнению со способом на основе геля. Анализ проводят на имеющемся в продаже анализаторе КИЭФ для визуализации, оснащенном автоматическим пробоотборником, способным поддерживать температуру образца $\leq 10,5 \text{ }^\circ\text{C}$ в окружающей среде $\leq 30 \text{ }^\circ\text{C}$, таком как автоматический пробоотборник Alcott (GP Instruments, Inc.). В анализе используется
- 30 капилляр с внутренней стенкой, покрытой диоксидом кремния, без полиимидного покрытия внешней стенки для детектирования по всей длине капилляра. Кроме того, используют раствор анолита разбавленной фосфорной кислоты и метилцеллюлозы, раствор католита гидроксида натрия и метилцеллюлозы и определенную смесь

амфолитов широкого диапазона (pH 3-10) и узкого диапазона (pH 8-10,5). В анализе используется предварительная обработка как исследуемых препаратов, так и референтного стандарта (РТ) карбоксипептидазой В (СРВ), которая удаляет С-концевой лизин тяжелой цепи и устраняет неоднозначность, вызванную наличием множества С-концевых вариантов. Репрезентативная хроматограмма электрофореграмма КИЭФ устекинумаба показана на Фиг. 5.

[0240] Перед каждым анализом заданная температура автоматического пробоотборника устанавливается на 4 °С, автоматический пробоотборник предварительно охлаждается в течение по меньшей мере 30 минут, а температура окружающей среды в лаборатории поддерживается на уровне ≤ 30 °С. Предварительно обработанный исследуемый препарат и эталонный стандарт, флаконы с образцами, вставки флаконов, реагенты, используемые при анализе, включая очищенную воду, исходный раствор, содержащий N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED) (который оптимизирует фокусировку внутри капилляра), амфолиты, маркеры pI 7,6 и 9,5 для внутренних стандартов и метилцеллюлозу (МЦ) перед началом приготовления образца выдерживают на льду в течение по меньшей мере 30 минут. Образцы готовят на льду, регистрируют время добавления исходного раствора и контролируют экспозицию TEMED. Анализ должен быть завершен в течение 180 минут после добавления. Контрольные образцы для проверки пригодности системы вводят однократно, а исследуемые препараты и РП вводят дважды в соответствии с таблицей последовательностей, приведенной ниже (таблица 1).

Таблица 1. Последовательность отбора образца

Название образца	Положение флакона для отбора образца	Число впрыскиваний
Пригодность системы	1	1
Холостой	2	1
СРВ (контроль)	3	1
РП, обработанный СРВ	4	2
Обработанный СРВ образец 1	5	2
РП, обработанный СРВ	6	2

[0241] После того как образцы вводятся в капилляр с помощью шприцевого насоса, электрическое поле (3 кВ) применяется к капилляру в течение 8 минут, образуя градиент pH, и заряженные изоформы устекинумаба разделяются в соответствии с их изоэлектрической точкой (pI). Изоформы белка в капилляре обнаруживаются путем визуализации по всей длине капилляра при 280 нм, а данные представлены в виде электрофореграммы в зависимости от значения pI по сравнению со значением A280.

Значения рI присваивают путем сравнения с внутренними стандартами рI (рI 7,6 и 9,5) с помощью измерительного прибора с программным управлением, а площади пиков определяют с помощью электрофореграммы с использованием стандартного программного обеспечения для сбора данных. Приведены средний рI и средний процент площади пика от повторных инъекций всех пиков \geq LOQ, значение Δ рI по сравнению с эталонным стандартом и процент площади пиков.

Олигосахаридный профиль с отклонениями

[0242] Устекинумаб N-гликозилирован по одному сайту на каждой тяжелой цепи аспарагина 299. Эти N-связанные олигосахаридные структуры могут быть любыми из группы биантенарных олигосахаридных структур, связанных с белком через первичный амин остатка аспарагина, но на устекинумабе они состоят в основном из биантенарных кор-фукозилированных видов с неоднородностью галактозы и сиаловой кислоты. Отдельные виды олигосахаридов включают G0F (асиалоагалактогалактозилированный фукозилированный 2-антеннальный гликан), G1F (асиаломоногалактозилированный фукозилированный 2-антеннальный гликан) и G2F, (асиалодигалактофукозилированный 2-антеннальный гликан).

[0243] ВЭЖХ представляет собой аналитическую процедуру, которая используется для анализа гликозилирования устекинумаба в процессе производства. Для анализа методом ВЭЖХ гликаны сначала ферментативно отщепляют от тяжелой цепи, а затем маркируют флуоресцентной меткой для обеспечения обнаружения. В данном способе можно различать незаряженные пики G0F, G1F и G2F, а также подмножество меньших нейтральных пиков. Кроме того, также можно наблюдать пики дифференциально сиалилированного материала (Фиг. 4). Для устекинумаба также существует прямая связь между степенью сиалилирования структур олигосахаридов и гетерогенностью заряда, определяемая капиллярным изоэлектрическим фокусированием (Фиг. 5). На Фиг. 6 представлен схематический обзор некоторых видов первичных N-связанных олигосахаридов в IgG устекинумаба. Также показана роль некоторых ферментов в процессе созревания гликозилирования, включая роли некоторых двухвалентных катионов (например, Mn^{2+} и Cu^{2+}), в этих ферментативных процессах.

[0244] В ходе исследования влияния изменения характеристик культуры изменения общего количества нейтральных и заряженных олигосахаридов и уровней отдельных олигосахаридов молекулы устекинумаба оценивали методом ВЭЖХ. Исходные хроматограммы и дальнейший анализ данных показали, что большинство партий были явно выше и ниже спецификаций по общему количеству нейтральных и общему

количеству заряженных олигосахаридов соответственно (Фиг. 8А и 8Б). Кроме того, наблюдался значительный сдвиг в уровнях отдельных нейтральных олигосахаридов, которые находились вне спецификаций. Фактически все партии НП после замены демонстрировали сдвиг за пределы спецификаций для видов G0F, G1F и G2F (Фиг. 9А–
 5 В соответственно).

[0245] Снижение изменений в олигосахаридном профиле играет ключевую роль, поскольку изменения профиля олигосахаридов рекомбинантного моноклонального антитела могут существенно влиять на биологические функции антитела. Например, биологические исследования показали, что распределение различных гликоформ в
 10 области Fc может существенно влиять на эффективность, стабильность антитела и эффекторную функцию (*J. Biosci. Bioeng.* 2014 117(5):639–644; *Bio-Process Int.* 2011, 9(6):48–53; *Nat. Rev. Immunol.* 2010, 10(5):345–352). В частности, афукозилирование (*J. Mol. Biol.* 368:767–779) и галактозилирование (*Biotechnol. Prog.* 21:1644–1652) могут играть важную роль в антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности
 15 (ADCC) и комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), двух важных механизмах, с помощью которых антитела опосредуют уничтожение клеток-мишеней через иммунную функцию. Кроме того, высокие уровни маннозы отрицательно влияют на эффективность путем увеличения клиренса антитела (*Glycobiology.* 2011, 21(7):949–959), а содержание сиаловой кислоты может влиять на противовоспалительную
 20 активность (*Antibodies.* 2013 2(3):392–414). В результате данных биологических последствий вследствие изменений профиля олигосахаридов регуляторные органы требуют контролировать структуру гликозилирования антител, чтобы гарантировать соблюдение спецификаций выпуска для получения последовательного, безопасного и эффективного препарата.

25 **Определение проблемы**

[0246] После тщательного и комплексного исследования был сделан вывод, что изменение среды с определенным химическим составом стало первопричиной сдвигов в % площади пика 3 КИЭФ, олигосахаридном профиле, VCD и продуктивности. Эту среду с определенным химическим составом получают в виде порошка, произведенного по
 30 усовершенствованной технологии гранулирования (англ.: Advanced Granulation Technology, AGT), которая в настоящем документе обычно упоминается как AGT. Более конкретно, исследование первопричины показало, что изменение содержания $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (трихлорида железа), одного из более чем девяноста компонентов в AGT, было главной первопричиной сдвигов в % площади пика 3, олигосахаридных профилях, VCD и

продуктивности. Было установлено, что поставщик трихлорида железа изменил свой производственный процесс с намерением производить соль железа более высокой чистоты. Кроме того, исследование показало, что это изменение привело к снижению следовых уровней марганца, хрома и меди, которые присутствуют в трихлориде железе в качестве неизмеряемых примесей. Марганец, хром и медь добавляли в состав AGT в качестве измеряемых компонентов, но количество, связанное с трихлоридом железа, не было учтено. Таким образом, эти обстоятельства привели к снижению общего содержания марганца, хрома и меди в AGT.

10 Устранение последствий с помощью дополненной среды AGT

Разработка SUP-AGT

[0247] Предварительные мелкомасштабные исследования показали, что добавление в среду марганца и хрома могло бы привести к % площади пика 3 КИЭФ и олигосахаридные профили в соответствии со среднестатистическими нормами (данные не показаны). На основании этих предварительных мелкомасштабных исследований было принято решение восстановить среднестатистические уровни марганца и хрома для производства коммерческих партий устекинумаба путем добавления в AGT марганца и хрома. Соли марганца и хрома, используемые для добавления в среду, уже были частью существующей рецептуры среды, но добавлялись в более низких концентрациях, поэтому было необходимо добавить в среду больше солей марганца и хрома, чтобы получить среду с определенным химическим составом, содержащую заданные пределы Mn^{2+} (марганца) и Cr^{3+} (хрома).

[0248] Среда AGT, дополненная марганцем и хромом, обозначается в данном документе как SUP-AGT. Порошок среды SUP-AGT получали в большом объеме, а затем использовали для получения устекинумаба в промышленном масштабе. Оценка партий устекинумаба, произведенных с использованием среды SUP-AGT, показала, что среда SUP-AGT не полностью восстановила VCD и продуктивность, но показала эффективность в восстановлении среднестатистического % площади пика 3 КИЭФ и олигосахаридного профиля, например уровней G0F, G1F, G2F (данные не показаны).

[0249] Влияние на уровни G0F, G1F, G2F согласуется с существующими данными в литературе, которые демонстрируют установленную связь с активностью β -1,4 галактозилтрансферазы (GalTI), кофактором Mn^{2+} и гликозилированием (Фиг. 6, также см. *Biotechnol Bioeng.* 2007 Feb 15;96(3):538-49 и *Curr Drug Targets.* 2008 Apr;9(4):292-309). GalTI представляет собой мембраносвязанный фермент, расположенный в мембране

транс-Гольджи. GalTI активируется Mn^{2+} в качестве кофактора, поскольку он функционирует в рамках каскада гликозилирования. В этом каскаде GalTI добавляет остатки галактозы к основной олигосахаридной структуре G0F. Продуктами реакции являются G1F при добавлении одного остатка галактозы или G2F при добавлении второго

5 остатка галактозы к N-ацетилглюкозаминовым (GlcNAc) концам G0F. Увеличение количества заряженных олигосахаридных групп при использовании SUP-AGT согласуется с наблюдаемым уменьшением G0F и увеличением G1F и G2F, поскольку последние два являются основными предшественниками для образования олигосахаридов SA1 и SA2. Эта реакция сиалилирования катализируется β -галактозид- α -2,6-сиалилтрансферазой

10 (ST6GalII) (Фиг. 6), которая представляет собой мембраносвязанный фермент, также расположенный в транс-Гольджи. Поскольку Mn^{2+} является одним из основных кофакторов для образования G1F и G2F, а образование G1F и G2F является основным предшественником для образования отрицательно заряженных SA1 и SA2, снижение концентрации Mn^{2+} может оказывать сопутствующее влияние на степень сиалилирования

15 и заряженные виды. Результаты по % площади пика 3 отражают изменения, наблюдаемые в группах заряженных олигосахаридов. Результаты данного исследования подтверждают гипотезу о том, что изменение концентрации Mn^{2+} в AGT, связанное с использованием более чистой формы трихлорида железа, является основной причиной изменений/тенденций в % площади пика 3 КИЭФ и свойствах олигосахаридов.

20 **Разработка SUP-AGT3**

[0250] Сдвиги в профилях олигосахаридов устекинумаба были успешно устранены путем перехода на среду SUP-AGT, содержащую более высокие концентрации марганца и хрома, однако переход на SUP-AGT не привел к полному восстановлению VCD и продуктивности до среднестатистических тенденций. Анализ, проведенный в ходе

25 исследования, показал, что снижение уровня Cu_{2+} (меди) является наиболее вероятной первопричиной изменения VCD, поэтому для оценки эффекта от добавления меди в среду SUP-AGT были проведены исследования в уменьшенном масштабе.

[0251] Растворы микроэлементов, содержащие медь, использовали для проведения серии уменьшенных по масштабу экспериментов со средой AGT3, в которую

30 добавляли медь в количестве 0,2 ч/млрд (0,2 мкг/литр), 0,5 ч/млрд (0,5 мкг/литр) и 0,8 ч/млрд (0,8 мкг/литр). Исследования уменьшенного масштаба продемонстрировали дозозависимый эффект: увеличение концентрации меди сопровождалось снижением уровней G1F и G2F. Результаты исследований в уменьшенном масштабе также сравнивали со среднестатистическими нормами производительности клеточных

культур, и было установлено, что для каждого испытываемого условия VCD, % жизнеспособности и продуктивность были близки к среднестатистическим значениям.

[0252] Влияние концентрации меди на олигосахаридный профиль также оценивали в исследованиях уменьшенного масштаба, которые показали, что концентрация меди оказывает значительное дозозависимое влияние на профиль гликоформ продукта, причем повышение концентрации связано с увеличением уровня G0F и снижением уровней G1F и G2F (данные не показаны). Как показано на Фиг. 6, известно, что медь оказывает ингибирующее действие на активность β -1-4 галактозилтрансферазы и, следовательно, может оказывать ингибирующее действие на гликозилирование (см, например, *J Biochem Mol Biol.* 2002 May 31;35(3):330-6). Следует отметить, что это противоположно эффекту марганца, который, как было показано, усиливает гликозилирование с увеличением концентрации, что приводит к снижению уровня G0F и общего количества нейтральных веществ. Таким образом, был сделан вывод, что концентрация меди и марганца должна контролироваться в пределах, обеспечивающих сохранение % площади пика 3 КИЭФ и олигосахаридного профиля устекинумаба, но при этом с достаточным содержанием меди для поддержания оптимального роста, жизнеспособности и продуктивности клеток.

[0253] В результате дополнительных мелкомасштабных исследований и множественного регрессионного анализа результатов экспериментов, в которых варьировались концентрации марганца и меди, было установлено, что вариации G0F, G1F и G2F могли бы быть объяснены регрессионными моделями, в которых марганец и медь выступают в качестве переменных X. Эти данные были использованы для поиска оптимальных концентраций марганца и меди, которые обеспечивали бы получение устекинумаба с % площади пика 3 КИЭФ и олигосахаридным профилем, соответствующим спецификации, а также гарантировали бы, что VCD, % жизнеспособности и продуктивность находятся в пределах среднестатистических норм. Оптимальные концентрации металлических микроэлементов для среды с определенным химическим составом были определены как Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр.

[0254] В то время как анализ добавок к среде был завершен, производитель разработал новую версию среды AGT. По сравнению с предыдущей версией среды, процесс производства новой среды был оптимизирован с учетом последовательности добавления полиаминовых и этаноламиновых компонентов с целью улучшения стабильности срока хранения. Новая среда обозначается в настоящем документе как

AGT версии 3 (AGT3) и считается средой следующего поколения от Thermo Fisher Inc. Эта новая среда, однако, имеет те же характеристики в отношении источника трихлорида железа. Как следствие, присутствует та же проблема сниженной концентрации таких металлических микроэлементов, как Mn^{2+} (марганец) и медь (Cu^{2+}). Таким образом, среда SUP-AGT3 была создана путем добавления в новую среду AGT3 определенных и контролируемых концентраций Mn^{2+} (марганца) и Cu^{2+} (меди).

[0255] Для достижения указанных пределов можно использовать различные источники марганца и меди. Источники марганца, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают, например, один или несколько из $MnCl_2$, $MnSO_4$, MnF_2 и MnI_2 . Источники меди, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают, например, один или более из $CuSO_4$, $CuCl_2$ и $Cu(OAc)_2$. Эти источники марганца и меди могут быть в безводной или гидратированной форме, например в форме дигидрата, тетрагидрата или пентагидрата. Предпочтительным источником марганца является комбинация $MnCl_2$ (хлорид марганца) и $MnSO_4$ (сульфат марганца). Предпочтительным источником меди является собой $CuSO_4$ (сульфат меди). Преимущество использования $MnCl_2$, $MnSO_4$ и $CuSO_4$ в качестве добавок в AGT3 заключается в том, что эти компоненты уже входят в состав AGT3 в более низких концентрациях, поэтому нет необходимости добавлять в рецептуру SUP-AGT3 новые или другие компоненты. В целом, определенные и контролируемые пределы для марганца и меди были установлены на основе среднестатистических данных, коммерческих масштабов производства SUP-AG и многочисленных мелкомасштабных исследований. Для Mn^{2+} (марганца) определенные и контролируемые пределы составляют от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр, а для Cu^{2+} (меди) — от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр.

Оценка уровней марганца, хрома и меди

[0256] Для оценки уровней марганца, хрома и меди в различных средах, включая, например, среднестатистическую среду «AGT до замены» до внесения изменений в трихлорид железа, среду «AGT после замены», использованную для производства партий устекинумаба с отклонениями, и SUP-AGT3, использовали масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС). Данные по концентрации металлических микроэлементов для уровней марганца, хрома и меди для различных партий сред представлены на Фиг. 10, Фиг. 11 и Фиг. 12 соответственно. Следует отметить, что отдельную партию среды объединяют с одной или более другими партиями среды для производства истекинумаба в больших масштабах. В целом, это позволяет сгладить

некоторые различия между партиями среды, но может не исправить большие различия, которые выходят за рамки спецификации для марганца и меди, если не контролировать их концентрацию.

[0257] Концентрация марганца во всех партиях SUP-AGT3 находилась в рамках установленных и контролируемых пределов Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/л до $\leq 35,0$ мкг/л, которые применялись для всех партий SUP-AGT3, а также в пределах диапазона среднестатистических партий AGT до замены (Фиг. 10). Таким образом, был сделан вывод, что концентрация марганца в SUP-AGT3 хорошо контролируется и находится в диапазоне среднестатистических значений среды AGT до замены.

[0258] За исключением двух ранних партий среды SUP-AGT3, концентрация меди также находилась в рамках установленных и контролируемых пределов: Cu_{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/л до $\leq 1,8$ мкг/л (Фиг. 12). Несоответствие спецификации двух затронутых партий среды SUP-AGT3 было легко устранено путем смешивания этих партий с другими партиями среды SUP-AGT3, чтобы получить среду для использования в производстве истекинумаба, которая соответствовала спецификации. Таким образом, был сделан вывод, что концентрация меди для SUP-AGT3 хорошо контролируется. Следует отметить, что две партии первоначальных сред AGT до замены, которые не соответствовали спецификации, были объединены с другими партиями среды AGT до замены в рабочем порядке, поэтому объединенные партии также соответствовали спецификации при производстве устекинумаба с использованием первоначальной среды AGT до замены. Следует отметить, что во многих партиях AGT после замены значения были меньше нижнего предела обнаружения для анализа для меди (1 мкг/л). Эти значения представлены графически как 1 мкг/литр на Фиг. 12.

Производство промышленной партии с использованием SUP-AGT3

Олигосахаридный профиль с использованием SUP-AGT3

[0259] На основании положительных результатов анализа металлических микроэлементов среда SUP-AGT3 была включена в процесс промышленного производства истекинумаба на различных производственных мощностях с использованием биореакторов объемом 500 или 1000 литров. Среду использовали на всех стадиях культивирования клеток, начиная со стадии 1 (предварительное культивирование и посев в биореактор) и заканчивая стадией 2 (производственный биореактор), а продукт, созданный для разных биореакторов, использовали для производства разных партий устекинумаба. Как показано на Фиг 7, Фиг. 8А и 8Б, а также на Фиг. 9А–В, устекинумаб, полученный с использованием среды SUP-AGT3, содержит общее количество видов нейтральных

олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее количество видов заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и отдельные виды нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$. Более того, процент (%) площади пика 3 на электрофореграмме капиллярного изоэлектрического фокусирования (КИЭФ) устекинумаба, продуцированного в среде SUP-AGT3, составляет от $\geq 39,8\%$ до $\leq 64,4\%$.

Жизнеспособность и продуктивность клеток с использованием SUP-AGT3

[0260] Применение SUP-AGT3 для получения устекинумаба в промышленном процессе производства также восстанавливает или улучшает жизнеспособность и продуктивность клеток по сравнению со среднестатистическими нормами. См., например, Фиг. 13, где представлена жизнеспособность клеточной культуры стадии 2 для клеток для различных партий SUP-AGT3 устекинумаба, а на Фиг. 14 показана продуктивность клеточной культуры на стадии 2 для различных партий SUP-AGT3 устекинумаба.

15 Заключение

[0261] Таким образом, как описано выше, была разработана стратегия управления производством для поддержания постоянства характеристик лекарственного вещества (ЛВ) и лекарственного препарата (ЛП) устекинумаба в отношении олигосахаридного профиля, а также для контроля жизнеспособности и продуктивности клеток в ходе крупномасштабного производства. ЛВ или ЛП, полученные способами по настоящему изобретению, содержат антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40, имеющие тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO:10, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO:11; аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO:7; и аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO:8; аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3; и аминокислотные последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6; причем олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/ИЛ-23p40 содержит общее количество видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее количество видов заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и отдельные виды нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$. Более того, процент (%) площади пика 3 на электрофореграмме капиллярного изоэлектрического фокусирования (КИЭФ) антител к ИЛ-12/ИЛ-23p40 составляет от $\geq 39,8\%$ до $\leq 64,4\%$. Олигосахаридный профиль ЛВ и ЛП контролируется путем

культивирования эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, определяемой и контролируемой на предмет концентраций металлических микроэлементов, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессии антител к ИЛ-12/ ИЛ-23p40 в эукариотических клетках. Кроме того, стратегия управления производством позволяет поддерживать жизнеспособность и продуктивность клеток в процессе производства устекинумаба в сравнении со среднестатистическими нормами. Олигосахаридные профили устекинумаба определяли методом ВЭЖХ, а концентрации марганца и меди в среде измеряли с помощью масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к ИЛ-12/23p40, содержащее: (i) аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи с SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3; и (ii) аминокислотную последовательность CDR легкой цепи с SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, причем олигосахаридный профиль антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$, и при этом антитело к ИЛ-12/23p40 получают способом производства, который контролирует олигосахаридный профиль антитела к ИЛ-12/23p40, причем способ производства включает: культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антитела к ИЛ-12/23p40.

2. Антитело к ИЛ-12/23p40, содержащее: (i) аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO:7; и (ii) аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи с SEQ ID NO:8, причем олигосахаридный профиль антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$, и при этом антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40 получают способом производства, который контролирует олигосахаридный профиль антитела к ИЛ-12/23p40, причем способ производства включает: культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 в эукариотических

клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антитела к ИЛ-12/23p40.

3. Антитело к ИЛ-12/23p40, содержащее: (i) аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:10; и (ii) аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:11, причем олигосахаридный профиль антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$, и при этом антитело к ИЛ-12/ИЛ-23p40 получают способом производства, который контролирует олигосахаридный профиль антитела к ИЛ-12/23p40, причем способ производства включает: культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40 в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антитела к ИЛ-12/23p40.

4. Антитело к ИЛ-12/23p40 по п. 1, которое содержит биопрепарат второго эшелона.

5. Способ производства лекарственного вещества (ЛВ) или лекарственного препарата (ЛП), включающий антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40, содержащие аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:10 и аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:11, причем олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/ИЛ-23p40 является контролируемым и олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$, при этом способ включает: культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антител к ИЛ-12/ИЛ-23p40 в эукариотических клетках,

причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ИЛ-12/23p40.

6. Способ производства по п. 5, в котором процент (%) площади пика 3 на электрофореграмме капиллярного изоэлектрического фокусирования (КИЭФ) антител к ИЛ-12/ИЛ-23p40 составляет от $\geq 39,8\%$ до $\leq 64,4\%$.
7. Способ производства по п. 5, в котором определенные концентрации металлических микроэлементов марганца и меди в среде с определенным химическим составом определяют с использованием масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС).
8. Способ по п. 5, в котором концентрации металлических микроэлементов марганца и меди в среде с определенным химическим составом контролируют путем добавления к среде с определенным химическим составом одного или более источников марганца и меди, причем один или более источников марганца выбраны из группы, состоящей из: $MnCl_2$, $MnSO_4$, MnF_2 и MnI_2 , и один или более источников меди выбраны из группы, состоящей из: $CuSO_4$, $CuCl_2$ и $Cu(OAc)_2$.
9. Способ производства по п. 5, в котором виды олигосахаридов определяют с помощью жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ).
10. Способ производства по п. 5, в котором эукариотические клетки выбраны из группы, состоящей из: клеток яичника китайского хомячка (клетки CHO), клеток сетчатки глаза человека (клетки PER.C6) и миеломных клеток мыши (клетки NS0 и клетки Sp2/0).
11. Способ производства по п. 5, в котором антитела к ИЛ-12/23p40 являются биопрепаратами второго эшелона.
12. Композиция, содержащая антитела к ИЛ-12/ИЛ-23p40, содержащие аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:10 и аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:11, причем олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/23p40 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 64,8\%$ до $\leq 85,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 14,4\%$ до $\leq 35,6\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 11,5\%$ до $\leq 40,2\%$, G1F от $\geq 29,9\%$ до $\leq 40,6\%$ и G2F от $\geq 4,1\%$ до $\leq 11,3\%$, и при этом антитела к ИЛ-12/23p40 получают способом производства, который контролирует олигосахаридный профиль антител к ИЛ-12/ИЛ-23p40, причем способ производства включает: культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных

концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих из Mn^{2+} (марганец) от $\geq 10,0$ мкг/литр до $\leq 35,0$ мкг/литр и Cu^{2+} (медь) от $\geq 1,0$ мкг/литр до $\leq 1,8$ мкг/литр; и экспрессию антител к ИЛ-12/ИЛ-23p40 в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ИЛ-12/23p40.

13. Композиция по п. 12, в которой процент (%) площади пика 3 на электрофореграмме капиллярного изоэлектрического фокусирования (КИЭФ) антител к ИЛ-12/ИЛ-23p40 составляет от $\geq 39,8\%$ до $\leq 64,4\%$.

14. Композиция по п. 12, в которой определенные концентрации металлических микроэлементов марганца и меди в среде с определенным химическим составом определяют с использованием масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС).

15. Композиция по п. 12, в которой определенные концентрации металлических микроэлементов марганца и меди в среде с определенным химическим составом контролируют путем добавления к среде с определенным химическим составом одного или более источников марганца и меди, причем один или более источников марганца выбраны из группы, состоящей из: $MnCl_2$, $MnSO_4$, MnF_2 и MnI_2 , и один или более источников меди выбраны из группы, состоящей из: $CuSO_4$, $CuCl_2$ и $Cu(OAc)_2$.

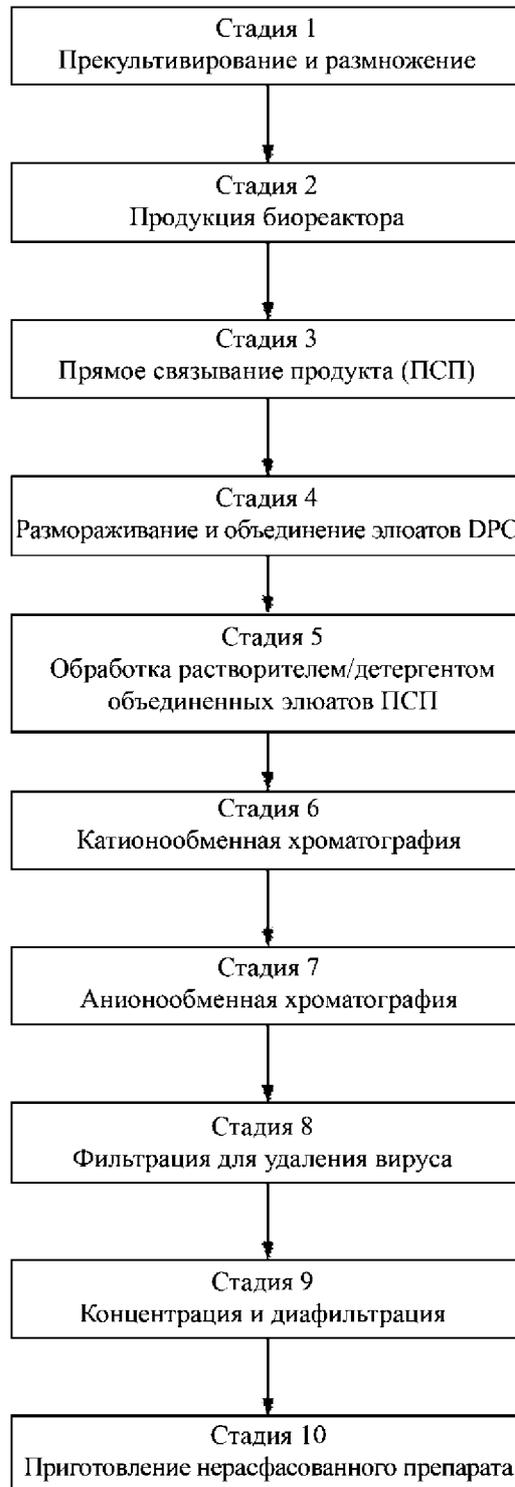
16. Композиция по п. 12, в которой виды олигосахаридов определяют с помощью жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ).

17. Композиция по п. 12, в которой эукариотические клетки выбраны из группы, состоящей из: клеток яичника китайского хомячка (клетки CHO), клеток сетчатки глаза человека (клетки PER.C6) и миеломных клеток мыши (клетки NS0 и клетки Sp2/0).

18. Композиция по п. 12, в которой антитела к ИЛ-12/23p40 являются биопрепаратами второго эшелона.

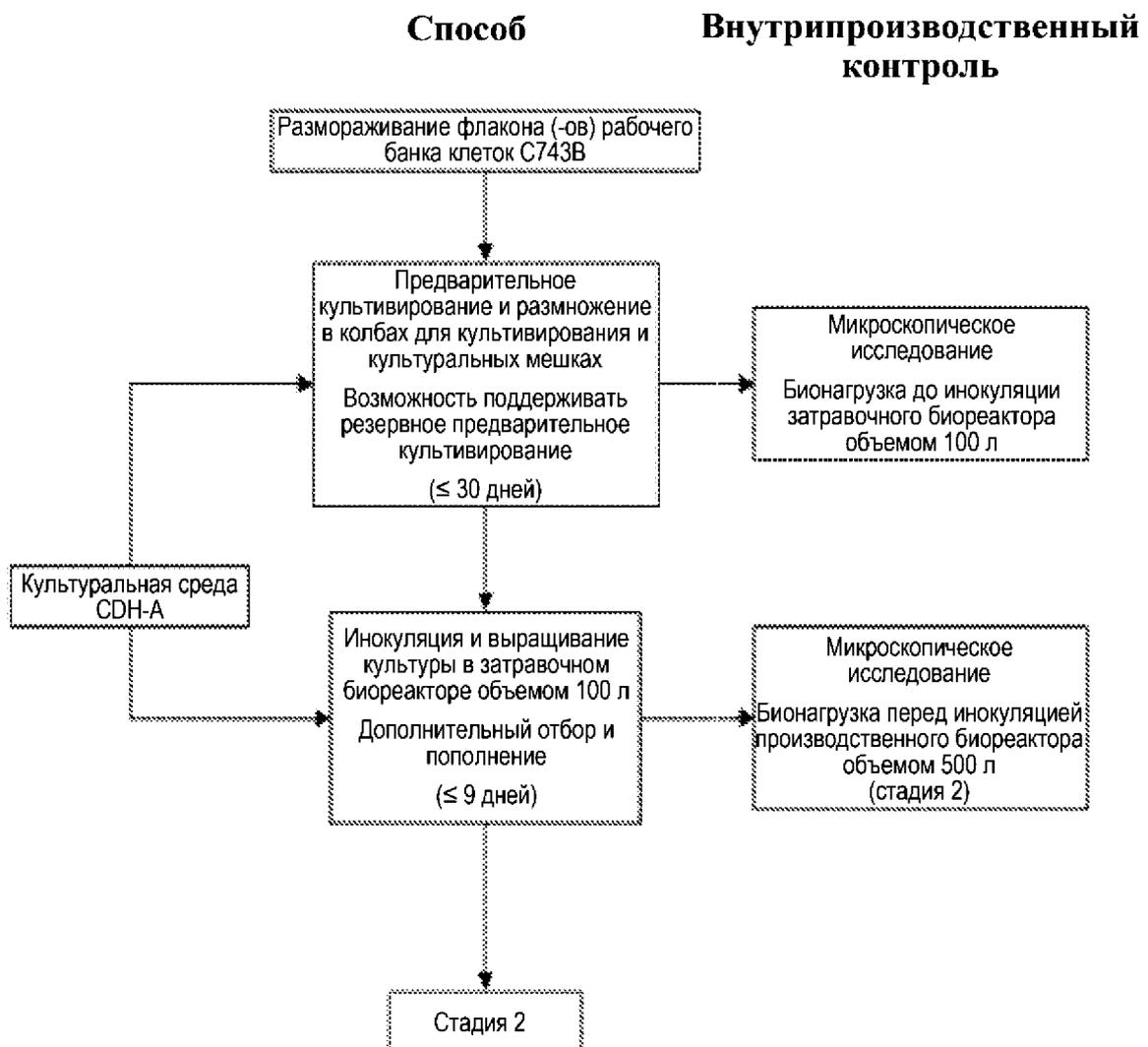
ФИГ. 1

Обзор производственного процесса — стадии процесса



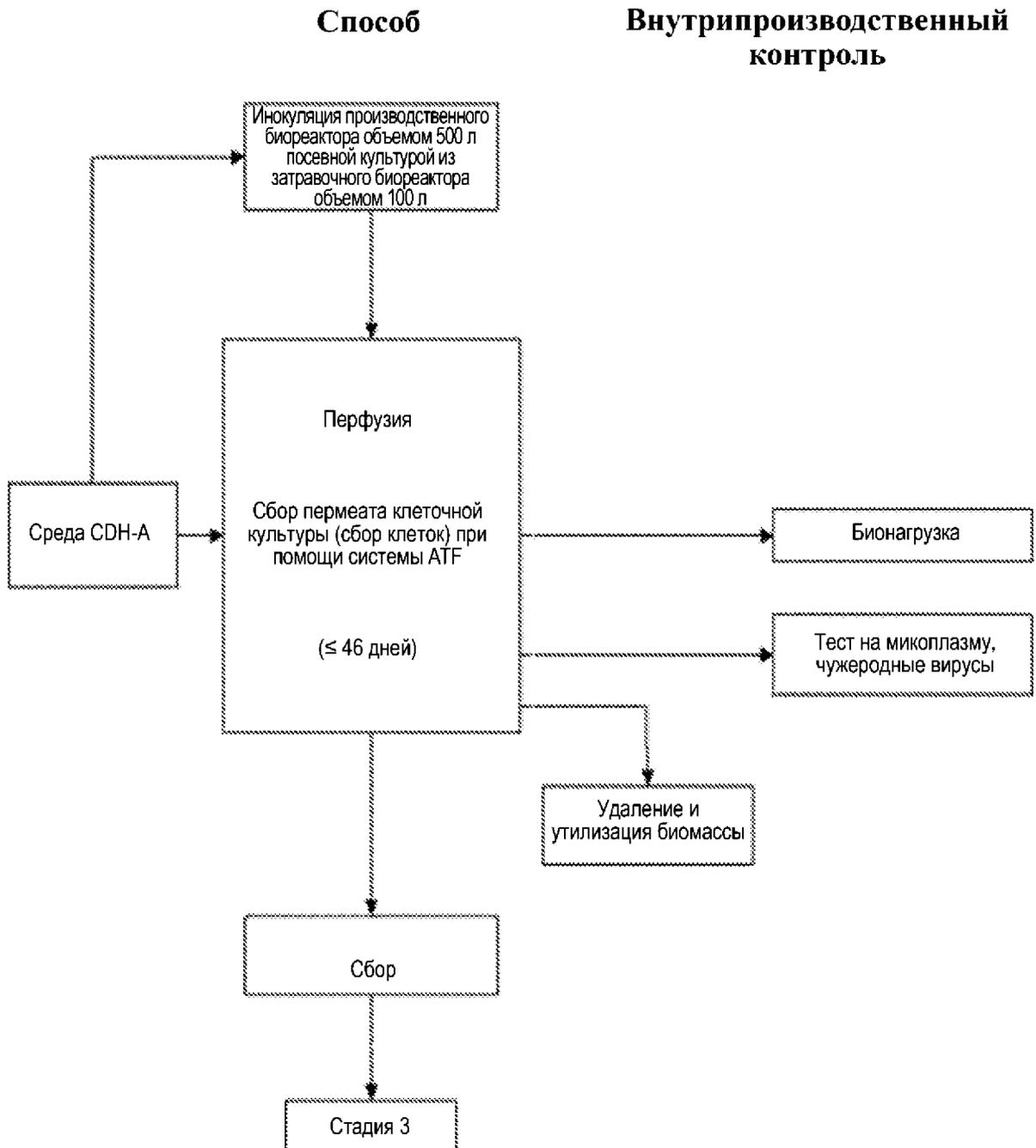
ФИГ. 2

Стадия 1. Технологическая схема потока для предварительного культивирования и размножения клеток



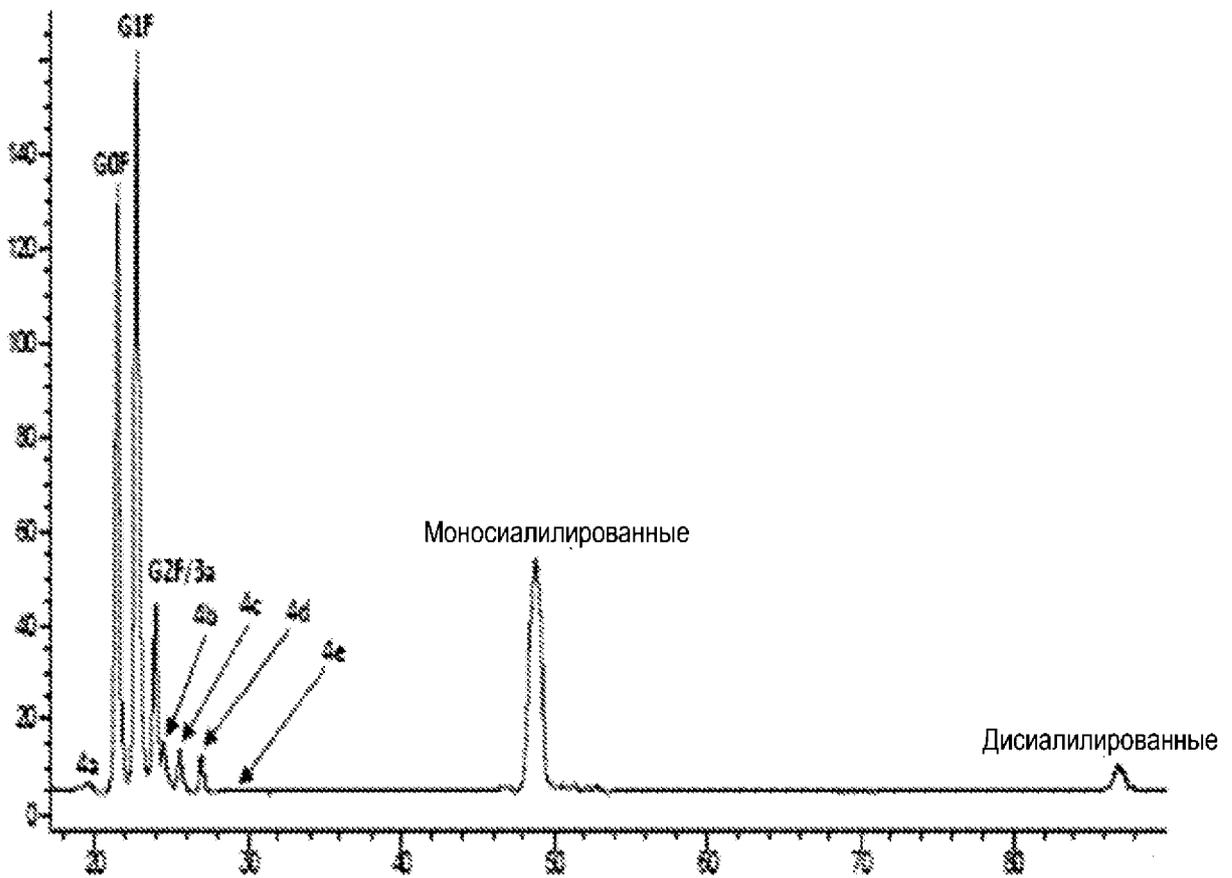
ФИГ. 3

Этап 2 Технологическая схема потока



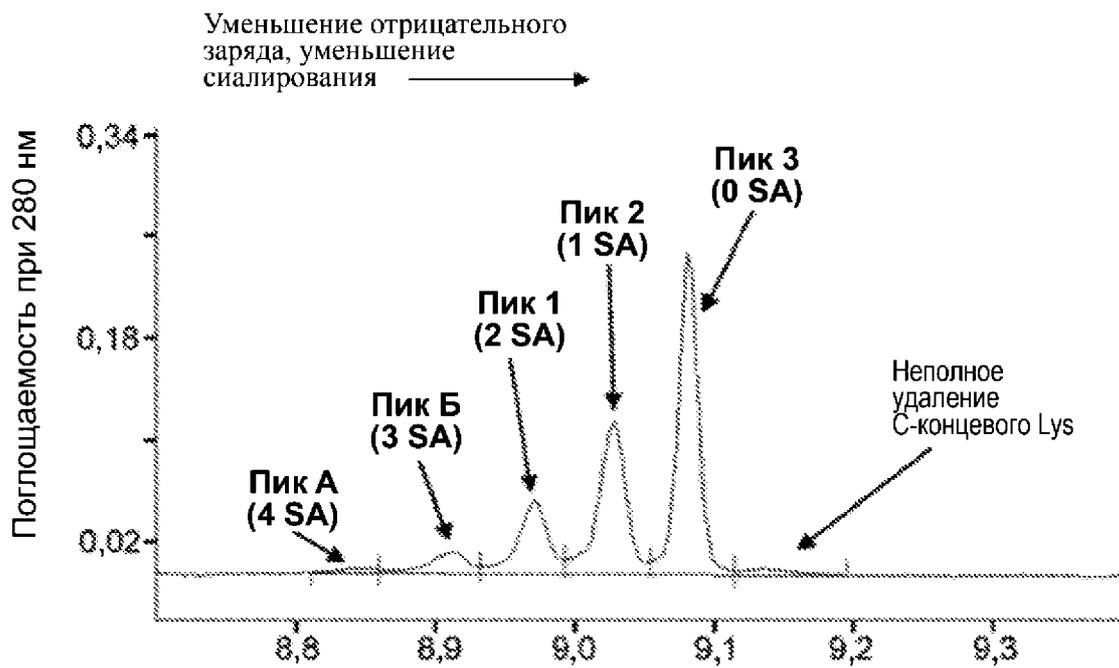
ФИГ. 4

Репрезентативная хроматограмма ВЭЖХ
для анализа олигосахаридов устекинумаба



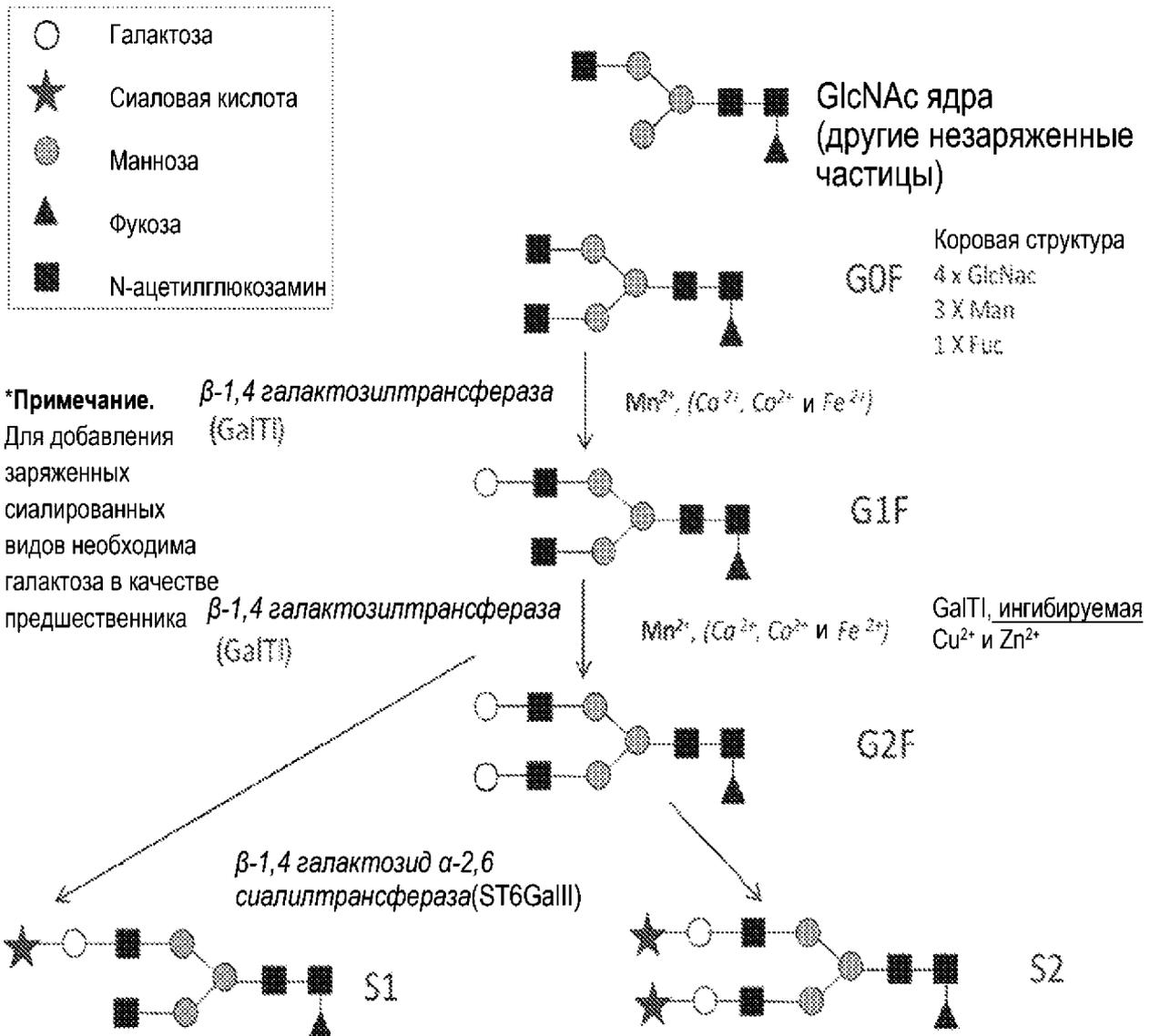
ФИГ. 5

**Репрезентативный профиль электрофореграммы
КИЭФ устекинумаба**

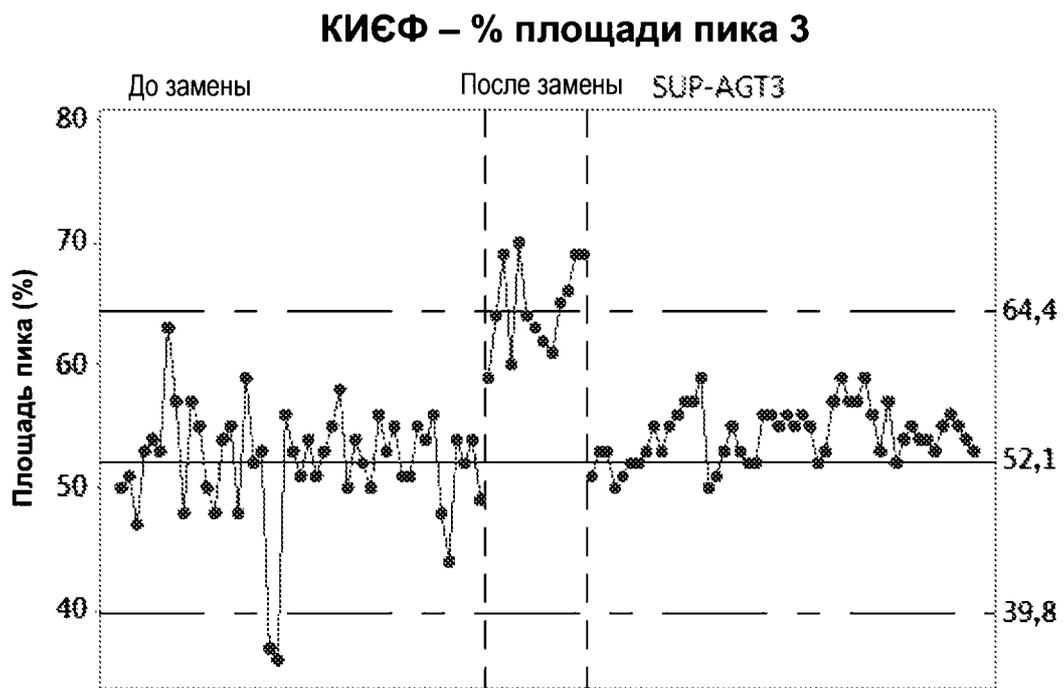


ФИГ. 6

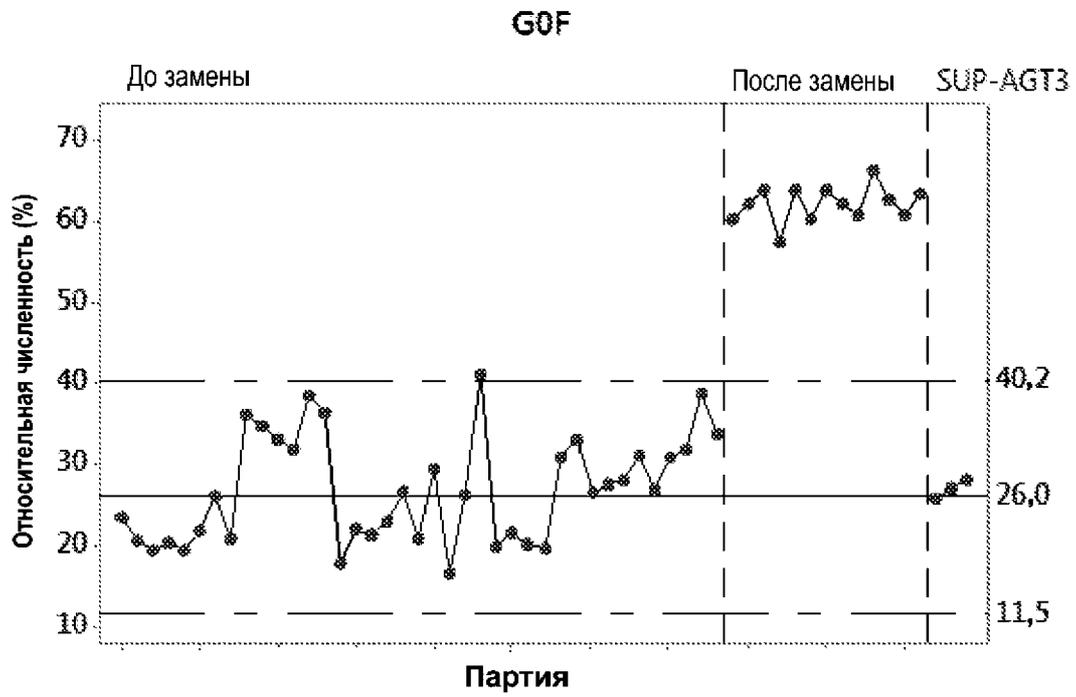
**Схема основных видов N-связанных олигосахаридов
в IgG устекинумаба**



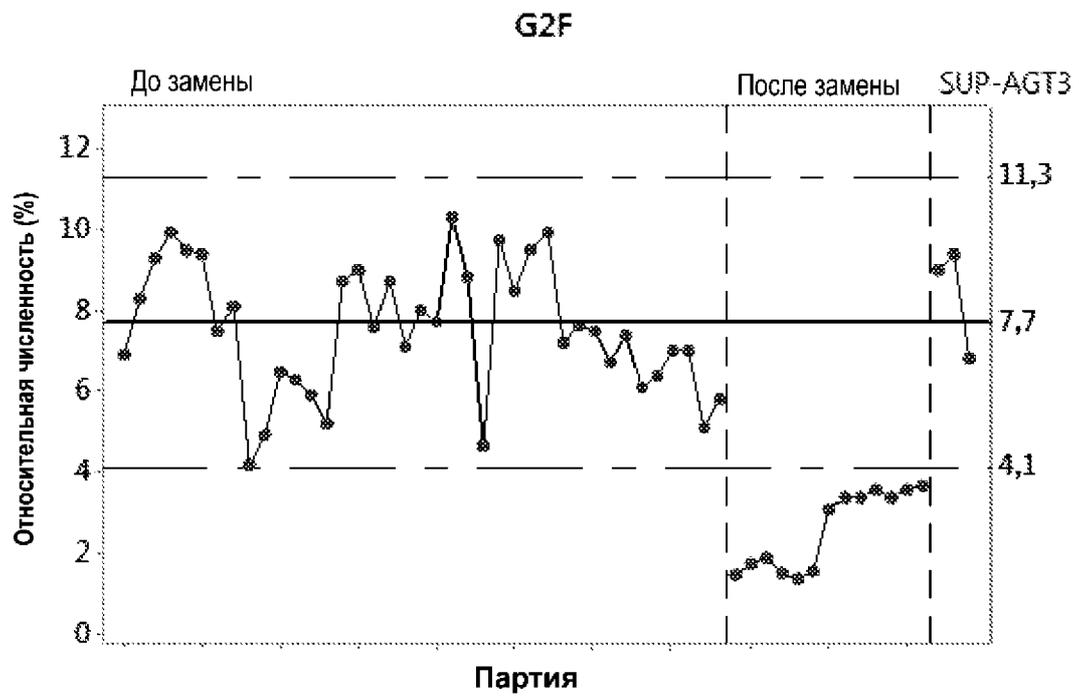
ФИГ. 7



ФИГ. 9А

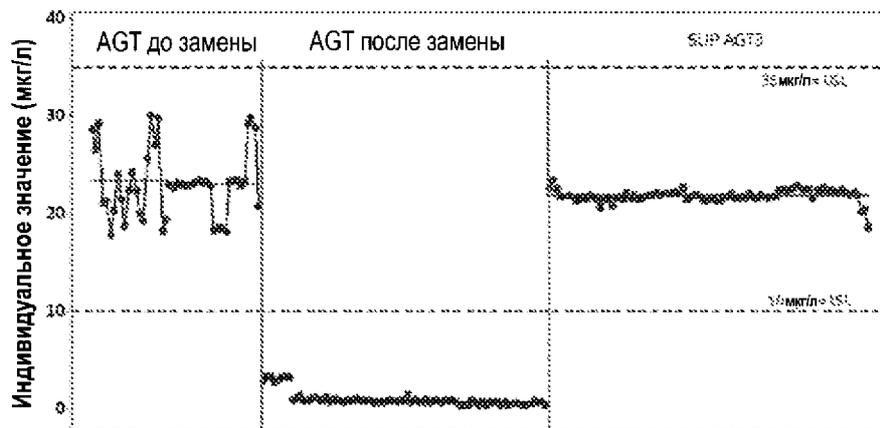


ФИГ. 9В



ФИГ. 10

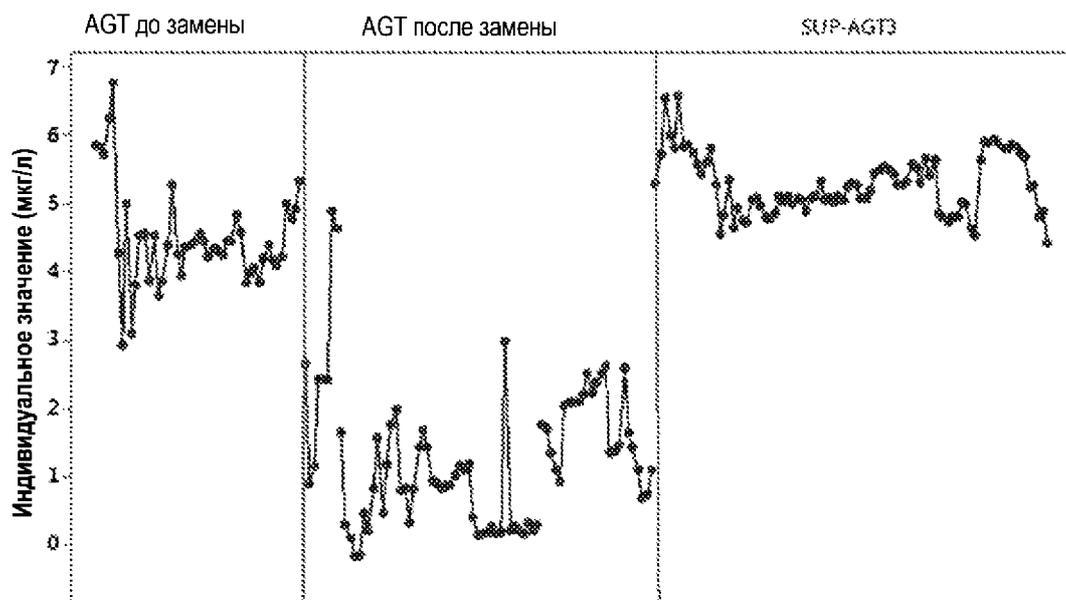
Уровни марганца (мкг/л) по АГТ



Партии в хронологическом порядке

ФИГ. 11

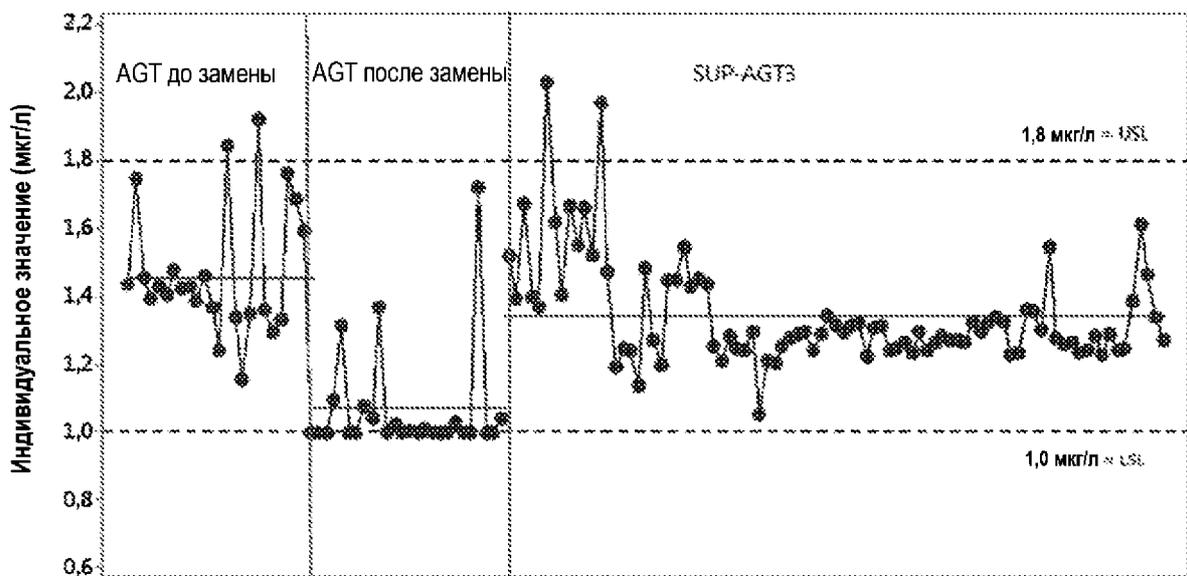
Уровни хрома (мкг/л) по АГТ



Партии в хронологическом порядке

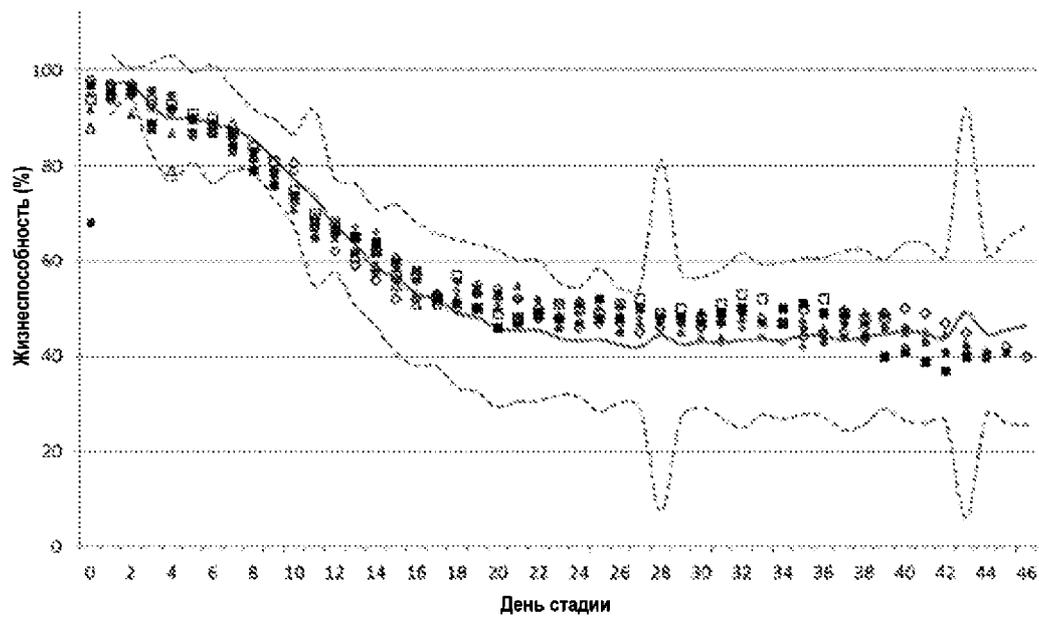
ФИГ. 12

Уровни меди (мкг/л) по АГТ



Партии в хронологическом порядке

ФИГ. 13



ФИГ. 14

