

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490150 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.29

(51) Int. Cl. C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.07.08

(54) СПОСОБЫ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ
АНТИТЕЛ К ФНО

(31) 63/219,901

(32) 2021.07.09

(33) US

(86) PCT/IB2022/056342

(87) WO 2023/281463 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 ФНО, таких как антитело к ФНО голимумаб, и конкретных фармацевтических композиций такого антитела.

A1

202490150

202490150

A1

СПОСОБЫ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ К ФНО

5

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

10 [00001] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронной форме в виде перечня последовательностей в формате XML с именем файла «JBI6004 Sequence Listing.xml», датой создания 29 июня 2022 г. и размером 57 Кб. Представленный перечень последовательностей является частью описания и полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 [00002] Настоящее изобретение относится к способам производства антител к ФНО, таких как антитело к ФНО голимумаб, и конкретных фармацевтических композиций такого антитела.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

20 [00003] ФНО-альфа — это растворимый гомотример из белковых субъединиц с молекулярной массой 17 кДа. Кроме того, существует мембранно-связанная форма-предшественник ФНО с молекулярной массой 26 кДа.

25 [00004] Клетки, отличные от моноцитов или макрофагов, также продуцируют ФНО-альфа. Например, человеческие немоноцитарные опухолевые клеточные линии, Т-лимфоциты периферической крови CD4⁺ и CD8⁺, а также некоторые культивируемые линии Т- и В-клеток продуцируют ФНО-альфа.

[00005] ФНО-альфа обладает провоспалительной активностью, которая приводит к повреждению тканей, такому как деградация хряща и кости, к индукции молекул адгезии, индукции прокоагулянтной активности на клетках эндотелия сосудов, повышению адгезии нейтрофилов и лимфоцитов и стимулированию высвобождения

фактора активации тромбоцитов из макрофагов, нейтрофилов и клеток эндотелия сосудов.

[00006] ФНО-альфа связывали с инфекциями, иммунными расстройствами, неопластическими патологиями, аутоиммунными патологиями и патологическими реакциями «трансплантат против хозяина». Связь ФНО-альфа с онкологическими и инфекционными заболеваниями часто обусловлена состоянием катаболизма организма-хозяина. Пациенты с онкологическими заболеваниями страдают от потери массы тела, обычно обусловленной анорексией.

[00007] Обширное истощение, связанное с онкологическими и другими заболеваниями, известно как «кахексия». Кахексия включает прогрессирующие снижение массы тела, анорексию и устойчивую потерю безжировой массы тела в ответ на появление злокачественного образования. Кахексическое состояние приводит к повышению онкологической заболеваемости и смертности. Существуют доказательства того, что ФНО-альфа играет роль в кахексии, вызванной онкологическими и инфекционными заболеваниями и другими катаболическими состояниями.

[00008] Считается, что ФНО-альфа оказывает особое влияние на грамотрицательный сепсис и эндотоксический шок, включая лихорадку, слабость, анорексию и кахексию. Эндотоксин сильно активирует продукцию моноцитов/макрофагов и секрецию ФНО-альфа и других цитокинов. ФНО-альфа и другие цитокины, продуцируемые моноцитами, опосредуют метаболические и нейрогормональные ответы на эндотоксин. Введение эндотоксина людям-добровольцам приводит к возникновению острого заболевания с гриппоподобными симптомами, включая лихорадку, тахикардию, повышенную скорость метаболизма и высвобождение гормонов стресса. Уровень ФНО-альфа в кровотоке увеличивается у пациентов, страдающих грамотрицательным сепсисом.

[00009] Таким образом, ФНО-альфа вовлечен в воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания, вирусные, бактериальные и паразитарные инфекции, злокачественные опухоли и/или нейродегенеративные заболевания, и его используют в качестве мишени для специфической биологической терапии таких заболеваний, как ревматоидный артрит и болезнь Крона. В открытых исследованиях с использованием моноклональных антител к ФНО-альфа отмечены благоприятные эффекты с

подавлением воспаления и успешным повторным лечением при рецидиве ревматоидного артрита и при болезни Крона. Благоприятные результаты также отмечены в рандомизированных двойных слепых плацебо-контролируемых исследованиях при ревматоидном артрите с подавлением воспаления.

5 [00010] Показано, что нейтрализующие антисыворотки или моноклональные антитела (мАт) к ФНО у не относящихся к человеку млекопитающих предотвращают нежелательные физиологические изменения и не допускают гибели после введения летальной дозы при экспериментальной эндотоксемии и бактериемии. Этот эффект продемонстрирован, например, в анализах летальности на грызунах и в моделях
10 патологии на приматах.

[00011] Были описаны предполагаемые связывающиеся с рецептором локусы человеческого ФНО, и связывающиеся с рецептором локусы ФНО-альфа состоят из аминокислот 11–13, 37–42, 49–57 и 155–157 в ФНО.

[00012] Химерные, поликлональные (например, антисыворотки) и/или
15 моноклональные антитела (мАт) и их фрагменты (например, продукты протеолитического расщепления или полученные из них слитные белки) от не относящихся к человеку млекопитающих являются потенциальными терапевтическими агентами, которые исследуют в некоторых случаях для лечения определенных заболеваний. Однако такие антитела или фрагменты могут индуцировать иммунный
20 ответ при введении человеку. Такой иммунный ответ может приводить к опосредованному иммунными комплексами выведению антител или фрагментов из кровообращения, и делать повторное введение неприемлемым для терапии, и тем самым снижать терапевтический эффект для пациента и ограничивать повторное введение антитела или фрагмента. Например, повторное введение антител или фрагментов,
25 содержащих нечеловеческие участки, может приводить к появлению сывороточной болезни и/или анафилаксии. Чтобы предотвратить эти и другие проблемы, применяли ряд подходов для снижения иммуногенности таких антител и их участков, включая химеризацию и гуманизацию, что хорошо известно в данной области. Однако эти и другие подходы по-прежнему могут приводить к получению антител или фрагментов,
30 имеющих некоторую иммуногенность, низкую аффинность, низкую авидность или проблемы с клеточной культурой, увеличением масштаба, производством и/или низким выходом продукта. Таким образом, такие антитела или фрагменты могут не подходить идеально для производства или применения в качестве терапевтических белков.

[00013] Соответственно, существует потребность в обеспечении антител к ФНО или их фрагментов для применения в качестве терапевтических средств для лечения заболеваний, опосредованных ФНО альфа.

5

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00014] 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.

[00015] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены антитела к ФНО, содержащие: (i) аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:36; и (ii) аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:37, причем олигосахаридный профиль антител к ФНО имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 82,0\%$ до $\leq 94,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 5,6\%$ до $\leq 18,0\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 25,6\%$ до $\leq 42,2\%$, G1F от $\geq 31,2\%$ до $\leq 43,6\%$ и G2F от $\geq 5,6\%$ до $\leq 14,2\%$, и при этом антитела к ФНО получают способом производства, который контролирует олигосахаридный профиль антител к ФНО, 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 ФНО в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ФНО.

[00016] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены антитела к ФНО, содержащие: (i) аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:36; и (ii) аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:37, причем олигосахаридный профиль антител к ФНО имеет общее

30

содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 82,0\%$ до $\leq 94,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 5,6\%$ до $\leq 18,0\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 25,6\%$ до $\leq 42,2\%$, G1F от $\geq 31,2\%$ до $\leq 43,6\%$ и G2F от $\geq 5,6\%$ до $\leq 14,2\%$, и при этом антитела к ФНО являются биопрепаратами второго эшелона и антитела к ФНО получают способом производства, который контролирует олигосахаридный профиль антител к ФНО, 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 ФНО в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ФНО.

[00017] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ получения лекарственного вещества (ЛВ) или лекарственного продукта (ЛП), содержащего антитела к ФНО, содержащие: (i) аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:36; и (ii) аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:37, причем олигосахаридный профиль антител к ФНО является контролируемым и олигосахаридный профиль антител к ФНО имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 82,0\%$ до $\leq 94,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 5,6\%$ до $\leq 18,0\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 25,6\%$ до $\leq 42,2\%$, G1F от $\geq 31,2\%$ до $\leq 43,6\%$ и G2F от $\geq 5,6\%$ до $\leq 14,2\%$, при этом способ получения 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 ФНО в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ФНО.

[00018] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ получения лекарственного вещества (ЛВ) или лекарственного продукта (ЛП), содержащего антитела к ФНО, содержащие: (i) аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:36; и (ii) аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:37, причем антитела к ФНО являются

биопрепаратами второго эшелона, и при этом олигосахаридный профиль антител к ФНО является контролируемым и олигосахаридный профиль антител к ФНО имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 82,0\%$ до $\leq 94,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 5,6\%$ до $\leq 18,0\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 25,6\%$ до $\leq 42,2\%$, G1F от $\geq 31,2\%$ до $\leq 43,6\%$ и G2F от $\geq 5,6\%$ до $\leq 14,2\%$, при этом способ получения 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

10 $\geq 10,0$ 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 ФНО в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ФНО.

[00019] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ получения лекарственного вещества (ЛВ) или лекарственного

15 продукта (ЛП), содержащего антитела к ФНО, содержащие: (i) аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:36; и (ii) аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:37, причем олигосахаридный профиль антител к ФНО является контролируемым и олигосахаридный профиль антител к ФНО имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 82,0\%$ до $\leq 94,4\%$,

20 общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 5,6\%$ до $\leq 18,0\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 25,6\%$ до $\leq 42,2\%$, G1F от $\geq 31,2\%$ до $\leq 43,6\%$ и G2F от $\geq 5,6\%$ до $\leq 14,2\%$, при этом способ получения включает:

культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания указанных концентраций

25 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 ФНО в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ФНО, и при этом концентрации марганца и меди в среде с определенным химическим составом

30 определяют с использованием масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС).

[00020] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ получения лекарственного вещества (ЛВ) или лекарственного

продукта (ЛП), содержащего антитела к ФНО, содержащие: (i) аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:36; и (ii) аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:37, причем олигосахаридный профиль антител к ФНО является контролируемым и олигосахаридный профиль антител к ФНО имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 82,0\%$ до $\leq 94,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 5,6\%$ до $\leq 18,0\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 25,6\%$ до $\leq 42,2\%$, G1F от $\geq 31,2\%$ до $\leq 43,6\%$ и G2F от $\geq 5,6\%$ до $\leq 14,2\%$, при этом способ получения 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 ФНО в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ФНО, и при этом концентрации марганца и меди в среде с определенным химическим составом контролируют путем добавления к среде с определенным химическим составом с помощью 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 $Cu(OAc)_2$.

[00021] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ получения лекарственного вещества (ЛВ) или лекарственного продукта (ЛП), содержащего антитела к ФНО, содержащие: (i) аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:36; и (ii) аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:37, причем олигосахаридный профиль антител к ФНО является контролируемым и олигосахаридный профиль антител к ФНО имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 82,0\%$ до $\leq 94,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 5,6\%$ до $\leq 18,0\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 25,6\%$ до $\leq 42,2\%$, G1F от $\geq 31,2\%$ до $\leq 43,6\%$ и G2F от $\geq 5,6\%$ до $\leq 14,2\%$, при этом способ получения 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 ФНО в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ФНО, и при этом виды олигосахаридов определяют с помощью жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ).

5 [00022] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ получения лекарственного вещества (ЛВ) или лекарственного продукта (ЛП), содержащего антитела к ФНО, содержащие: (i) аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:36; и (ii) аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:37, причем олигосахаридный профиль антител к ФНО является контролируемым и олигосахаридный профиль антител к ФНО
10 имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 82,0\%$ до $\leq 94,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 5,6\%$ до $\leq 18,0\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 25,6\%$ до $\leq 42,2\%$, G1F от $\geq 31,2\%$ до $\leq 43,6\%$ и G2F от $\geq 5,6\%$ до $\leq 14,2\%$, при этом способ получения включает:
15 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 ФНО в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ФНО, 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).

25 [00023] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая антитела к ФНО, содержащие: (i) аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:36; и (ii) аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:37, причем олигосахаридный профиль антител к ФНО является контролируемым и олигосахаридный профиль антител к ФНО имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 82,0\%$ до $\leq 94,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 5,6\%$ до $\leq 18,0\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 25,6\%$ до $\leq 42,2\%$, G1F от $\geq 31,2\%$ до $\leq 43,6\%$ и G2F от $\geq 5,6\%$ до $\leq 14,2\%$, и при этом антитела к ФНО получают способом, включающим: культивирование
30

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 ФНО в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ФНО.

[00024] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая антитела к ФНО, содержащие: (i) аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:36; и (ii) аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:37, причем антитела к ФНО являются биопрепаратами второго эшелона, и при этом олигосахаридный профиль антител к ФНО является контролируемым и олигосахаридный профиль антител к ФНО имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 82,0\%$ до $\leq 94,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 5,6\%$ до $\leq 18,0\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 25,6\%$ до $\leq 42,2\%$, G1F от $\geq 31,2\%$ до $\leq 43,6\%$ и G2F от $\geq 5,6\%$ до $\leq 14,2\%$, и при этом антитела к ФНО получают способом, включающим: 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 ФНО в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ФНО.

[00025] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая антитела к ФНО, содержащие: (i) аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:36; и (ii) аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:37, причем олигосахаридный профиль антител к ФНО является контролируемым и олигосахаридный профиль антител к ФНО имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 82,0\%$ до $\leq 94,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 5,6\%$ до $\leq 18,0\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 25,6\%$ до $\leq 42,2\%$, G1F от $\geq 31,2\%$ до $\leq 43,6\%$ и G2F от $\geq 5,6\%$ до $\leq 14,2\%$, и при этом антитела к ФНО получают способом, включающим: 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 ФНО в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ФНО, и при этом концентрации марганца и меди в среде с определенным химическим составом определяют с использованием масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС).

[00026] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая антитела к ФНО, содержащие: (i) аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:36; и (ii) аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:37, причем олигосахаридный профиль антител к ФНО является контролируемым и олигосахаридный профиль антител к ФНО имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 82,0\%$ до $\leq 94,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 5,6\%$ до $\leq 18,0\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 25,6\%$ до $\leq 42,2\%$, G1F от $\geq 31,2\%$ до $\leq 43,6\%$ и G2F от $\geq 5,6\%$ до $\leq 14,2\%$, и при этом антитела к ФНО получают способом, включающим: 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 ФНО в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ФНО, и при этом концентрации марганца и меди в среде с определенным химическим составом контролируют путем добавления к среде с определенным химическим составом с помощью 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 $Cu(OAc)_2$.

[00027] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая антитела к ФНО, содержащие: (i) аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:36; и (ii) аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:37, причем

олигосахаридный профиль антител к ФНО является контролируемым и олигосахаридный профиль антител к ФНО имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 82,0\%$ до $\leq 94,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 5,6\%$ до $\leq 18,0\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 25,6\%$ до $\leq 42,2\%$, G1F от $\geq 31,2\%$ до $\leq 43,6\%$ и G2F от $\geq 5,6\%$ до $\leq 14,2\%$, и при этом антитела к ФНО получают способом, включающим: 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 ФНО в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ФНО, и при этом виды олигосахаридов определяют с помощью жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ).

15 [00028] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая антитела к ФНО, содержащие: (i) аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:36; и (ii) аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:37, причем олигосахаридный профиль антител к ФНО является контролируемым и олигосахаридный профиль антител к ФНО имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 82,0\%$ до $\leq 94,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 5,6\%$ до $\leq 18,0\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 25,6\%$ до $\leq 42,2\%$, G1F от $\geq 31,2\%$ до $\leq 43,6\%$ и G2F от $\geq 5,6\%$ до $\leq 14,2\%$, и при этом антитела к ФНО получают способом, включающим: 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 ФНО в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ФНО, 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).

ОПИСАНИЕ ФИГУР

[00029] На **Фиг. 1** показано графическое представление, демонстрирующее анализ способности мАт TNV в супернатантах клеток гибридомы ингибировать связывание ФНО- α с рекомбинантным ФНО-рецептором. Различные количества супернатантов клеток гибридомы, содержащих известные количества мАт TNV, предварительно инкубировали с фиксированной концентрацией (5 нг/мл) 125 I-меченного ФНО- α . Смесь переносили в 96-луночные планшеты Optiplates, которые были предварительно покрыты p55-SF2, рекомбинантным слитным белком рецептора ФНО/IgG. Количество ФНО- α , связавшегося с рецептором p55 в присутствии мАт, определяли после отмывки от несвязанного материала и подсчета с помощью гамма-счетчика. Хотя в этих экспериментах исследовали восемь образцов мАт TNV, для простоты не показаны три мАт, которые по данным анализов последовательностей ДНК были идентичны одному из других мАт TNV. Каждый образец испытывали в двух повторностях. Представленные результаты отражают репрезентативные данные, полученные в ходе двух независимых экспериментов.

[00030] На **Фиг. 2А–Б** показаны последовательности ДНК переменных областей тяжелой цепи мАт TNV. Показанный ген зародышевой линии представляет собой ген DP-46. TNV обозначает, что показанная последовательность представляет собой последовательность TNV14, TNV15, TNV148 и TNV196. Первые три нуклеотида в последовательности TNV определяют кодон инициации трансляции Met. Точки в последовательностях генов мАт TNV обозначают, что нуклеотид аналогичен нуклеотиду в последовательности зародышевой линии. Первые 19 нуклеотидов (подчеркнуты) последовательностей TNV соответствуют олигонуклеотиду, используемому для ПЦР-амплификации переменной области. Трансляция аминокислот (однобуквенные аббревиатуры), начиная со зрелого мАт, показана только для гена зародышевой линии. Три CDR-домена в трансляции аминокислот зародышевой линии отмечены жирным шрифтом и подчеркнуты. Линии, обозначенные TNV148(B), обозначают, что показанная последовательность относится как к TNV148, так и к TNV148B. Гэпы в последовательности ДНК зародышевой линии (CDR3) были связаны с тем, что последовательность неизвестна или не существует в гене зародышевой линии в данный момент времени. В тяжелых цепях мАт TNV используется соединительная область J6.

[00031] На **Фиг. 3** показаны последовательности ДНК переменных областей легкой цепи мАт TNV. Показанный ген зародышевой линии является репрезентативным членом семейства V_H/38K человеческих генов зародышевой линии переменной области цепи каппа. Точки в последовательностях генов мАт TNV обозначают, что нуклеотид аналогичен нуклеотиду в последовательности зародышевой линии. Первые 16 нуклеотидов (подчеркнуты) последовательностей TNV соответствуют олигонуклеотиду, используемому для ПЦР-амплификации переменной области. Аминокислотная трансляция зрелого мАт (однобуквенные сокращения) показана только для гена зародышевой линии. Три CDR-домена в трансляции аминокислот зародышевой линии отмечены жирным шрифтом и подчеркнуты. Линии, обозначенные TNV148(B), обозначают, что показанная последовательность относится как к TNV148, так и к TNV148B. Гэпы в последовательности ДНК зародышевой линии (CDR3) связаны с тем, что последовательность неизвестна или не существует в гене зародышевой линии. В легких цепях мАт TNV используют соединительную последовательность J3.

[00032] На **Фиг. 4** показаны выведенные аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи мАт TNV. Показанные аминокислотные последовательности (однобуквенные сокращения) выведены из последовательности ДНК, определенной как из неклонированных продуктов ПЦР, так и из клонированных продуктов ПЦР. Аминокислотные последовательности показаны разделенными на домены секреторной сигнальной последовательности (signal), каркасной области (FW) и определяющей комплементарность области (CDR). Аминокислотная последовательность гена зародышевой линии DP-46 показана в верхней линии для каждого домена. Точки показывают, что аминокислота в мАт TNV идентична гену зародышевой линии. TNV148(B) означает, что показанная последовательность относится как к TNV148, так и к TNV148B. TNV означает, что показанная последовательность относится ко всем мАт TNV, если не показана другая последовательность. Штриховые линии в последовательности зародышевой линии (CDR3) означают, что последовательности не известны или отсутствуют в гене зародышевой линии.

[00033] На **Фиг. 5** показаны выведенные аминокислотные последовательности переменных областей легкой цепи мАт TNV. Показанные аминокислотные последовательности (однобуквенные сокращения) выведены из последовательности

ДНК, определенной как из неклонированных продуктов ПЦР, так и из клонированных продуктов ПЦР. Аминокислотные последовательности показаны разделенными на домены секреторной сигнальной последовательности (signal), каркасной области (FW) и определяющей комплементарность области (CDR). Аминокислотная

5 последовательность гена легкой цепи зародышевой линии V_g/38K-типа показана в верхней линии для каждого домена. Точки показывают, что аминокислота в мАт TNV идентична гену зародышевой линии. TNV148 (B) означает, что показанная последовательность относится как к TNV148, так и к TNV148B. «Все» означает, что показанная последовательность относится к TNV14, TNV15, TNV148, TNV148B и

10 TNV186.

[00034] На **Фиг. 6** показаны схематические изображения экспрессирующих тяжелую и легкую цепи плазмид, которые применяют для получения rTNV148B-экспрессирующих клеток С466. p1783 — плазида тяжелой цепи, а p1776 — плазида легкой цепи. Домены, кодирующие вариабельную и константную области rTNV148B, показаны черными

15 прямоугольниками. Энхансеры иммуноглобулинов в интронах J-C показаны серыми прямоугольниками. Показаны значимые сайты рестрикции. Ориентация плазмидов показана таким образом, что транскрипция генов антител проходит в направлении по часовой стрелке. Плазида p1783 имеет длину 19,53 т.п.н., а плазида p1776 имеет длину 15,06 т.п.н. Известны полные нуклеотидные последовательности обеих плазмид.

20 Последовательность, кодирующая вариабельную область в p1783, может быть легко заменена другой последовательностью вариабельной области тяжелой цепи путем замены рестриционного фрагмента BsiWI/BstBI. Последовательность, кодирующая вариабельную область в p1776, может быть заменена другой последовательностью вариабельной области путем замены рестриционного фрагмента SalI/AflII.

25 [00035] На **Фиг. 7** показано графическое представление анализов кривых роста пяти продуцирующих rTNV148B клеточных линий. Культуры инициировали на 0 день, высевая клетки во флаконы T75 в среде I5Q+MNX с плотностью жизнеспособных клеток $1,0 \times 10^5$ клеток/мл в объеме 30 мл. Используемые в этих исследованиях клеточные культуры находились в непрерывной культуре с момента проведения трансфекции и

30 субклонирования. В последующие дни клетки в T-флаконах тщательно ресуспендировали и извлекали аликвоту культуры 0,3 мл. Исследования кривых роста завершали, когда количество клеток падало ниже $1,5 \times 10^5$ клеток/мл. Количество живых клеток в аликвоте определяли по исключению трипанового синего, а оставшуюся часть аликвоты хранили

для последующего определения концентрации мАт. Твердофазный ИФА для определения человеческого IgG проводили одновременно на всех аликвотах образцов.

[00036] На **Фиг. 8** показано графическое представление сравнения скоростей роста клеток в присутствии различных концентраций МНХ для селекции. Клеточные субклоны С466А и С466В размораживали в среде, не содержащей МНХ (IMDM, 5 % FBS, 2 mM глутамина) и культивировали в течение еще двух дней. Впоследствии обе клеточные культуры разделяли на три культуры, которые или не содержали МНХ, или содержали $0,2 \times$ МНХ или $1 \times$ МНХ. Через день в свежие флаконы Т75 высевали культуры с начальной плотностью 1×10^5 клеток/мл и подсчитывали клетки с интервалами 24 часа в течение одной недели. Время удвоения в течение первых 5 дней рассчитывали по формуле в SOP PD32.025, и эти данные показаны над столбцами.

[00037] На **Фиг. 9** показаны графические изображения стабильности продукции мАт с течением времени для двух продуцирующих гТNV148В клеточных линий. Субклоны клеток, находившиеся в непрерывной культуре с момента проведения трансфекции и субклонирования, использовали для запуска длительных серийных культур в 24-луночных культуральных чашках. Клетки культивировали в среде I5Q с селекцией по МНХ и без нее. Клетки непрерывно пересеивали путем деления культур каждые 4–6 дней для поддержания новых жизнеспособных культур, в то время как предыдущие культуры расходовали. Аликвоты супернатанта расходных клеток собирали вскоре после вывода культур в расход и хранили до определения концентраций мАт. Твердофазный ИФА для определения человеческого IgG проводили одновременно на всех аликвотах образцов.

[00038] На **Фиг. 10** показаны изменения массы тела у мышей Tg 197, использующихся в качестве модели артрита, в ответ на антитела к ФНО настоящего изобретения, по сравнению с контролями из примера 4. В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 в зависимости от пола и массы тела были распределены в одну из 9 групп лечения и получали одну внутрибрюшинную болюсную дозу PBS Дульбекко (D-PBS) или антитела к ФНО настоящего изобретения (TNV14, TNV148 или TNV196) в дозе 1 мг/кг или 10 мг/кг. При анализе массы тела как изменения относительно состояния до введения дозы животные, получавшие 10 мг/кг сА2, демонстрировали устойчиво более высокий прирост массы тела, чем животные, получавшие D-PBS, в течение всего исследования. Этот прирост массы тела был значимым на неделях 3–7.

Животные, получавшие 10 мг/кг TNV148, также достигали значимого увеличения массы тела на 7 неделе исследования.

[00039] На **Фиг. 11А–В** представлено прогрессирующее течение заболевания, по данным индекса артрита, как представлено в примере 4. Индекс артрита в группе, получавшей 10 мг/кг сА2, был ниже по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS, начиная с 3 недели и далее на протяжении всей оставшейся части исследования (неделя 7). У животных, получавших 1 мг/кг TNV14, и у животных, получавших 1 мг/кг сА2, не наблюдали значимого снижения индекса артрита (AI) через 3 недели по сравнению с группой, получавшей D-PBS. При сравнении каждой из групп с другими, получавшими сходные дозы (10 мг/кг сА2 по сравнению с 10 мг/кг TNV14, 148 и 196), между группами лечения, получавшими 10 мг/кг, не было значимых различий. При сравнении групп лечения 1 мг/кг, доза 1 мг/кг TNV148 показала существенно более низкий AI, чем 1 мг/кг сА2 через 3, 4 и 7 недель. AI в группе, получавшей 1 мг/кг TNV148 был также существенно ниже, чем в группе, получавшей 1 мг/кг TNV14, через 3 и 4 недели. Хотя антитело TNV196 демонстрировало значимое снижение AI вплоть до 6 недели исследования (по сравнению с группой, получавшей D-PBS), антитело TNV148 было единственным лечением с дозой 1 мг/кг, которое сохраняло достоверный эффект по завершении исследования.

[00040] На **Фиг. 12** показаны изменения массы тела у мышей Tg 197, использующихся в качестве модели артрита, в ответ на антитела к ФНО настоящего изобретения, по сравнению с контролями из примера 5. В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 были распределены в одну из 8 групп лечения на основании массы тела и получали внутривенную болюсную дозу контрольного препарата (D-PBS) или антитела (TNV14, TNV148) в дозе 3 мг/кг (неделя 0). Инъекции повторяли для всех животных на 1, 2, 3 и 4 неделях. Эффективность испытуемого препарата оценивали в группах 1–6. Образцы сыворотки, полученные от животных групп 7 и 8, оценивали на индукцию иммунного ответа и на фармакокинетический клиренс TNV14 или TNV148 на неделях 2, 3 и 4.

[00041] На **Фиг. 13А–В** представлены графики, демонстрирующие прогрессирующее течение заболевания в примере 5 по данным индекса артрита. Индекс артрита в группе, получавшей 10 мг/кг сА2, был существенно ниже по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS, начиная с 2 недели и далее на протяжении всей оставшейся части исследования (неделя 5). Животные, получавшие 1 мг/кг или 3 мг/кг сА2, и животные,

получавшие 3 мг/кг TNV14, не продемонстрировали какого-либо значимого снижения AI в какой-либо момент на протяжении исследования по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS. Животные, получавшие 3 мг/кг TNV148, демонстрировали значимое снижение по сравнению с группой, получавшей D-PBS, начиная с недели 3 и вплоть до недели 5. Животные, получавшие 10 мг/кг сA2, демонстрировали значимое снижение AI по сравнению с обеими более низкими дозами (1 мг/кг и 3 мг/кг) сA2 на 4 и 5 неделях исследования, а также значение было также существенно ниже, чем у животных, получавших TNV14, на 3–5 неделях. Хотя, по-видимому, между группами лечения 3 мг/кг, не было значимых различий, AI у животных, получавших лечение 3 мг/кг TNV14, в некоторых временных точках был существенно выше, чем у животных, получавших 10 мг/кг, а животные, получавшие TNV148, не отличались существенно от животных, получавших 10 мг/кг сA2.

[00042] На **Фиг. 14** показаны изменения массы тела у мышей Tg 197, использующихся в качестве модели артрита, в ответ на антитела к ФНО настоящего изобретения, по сравнению с контролями из примера 6. В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 были распределены, в зависимости от пола и массы тела, в одну из 6 групп лечения и получали одну внутривенную болюсную дозу антитела (сA2 или TNV148) в дозе 3 мг/кг или 5 мг/кг. В этом исследовании использовали контрольные группы D-PBS и 10 мг/кг сA2.

[00043] На **Фиг. 15** представлено прогрессирование тяжести заболевания, оцениваемое по индексу артрита, как показано в примере 6. Во всех группах лечения наблюдалась некоторая защита в ранние сроки, причем 5 мг/кг сA2 и 5 мг/кг TNV148 демонстрировали значимое снижение AI на 1–3 неделе, и во всех группах лечения наблюдалось значимое снижение на 2 неделе. Позднее в этом исследовании у животных, получавших 5 мг/кг сA2, наблюдалась некоторая защита со значимым снижением на 4, 6 и 7 неделях. Низкая доза (3 мг/кг) как сA2, так и TNV148 приводила к значимому снижению на 6 неделе, и во всех группах лечения наблюдалось значимое снижение на 7 неделе. Ни одна из групп лечения не смогла сохранить значимое снижение по завершении исследования (неделя 8). Ни на одном из сроков не было обнаружено значимых различий между любыми группами лечения (за исключением контрольной группы, получавшей физиологический раствор).

[00044] На **Фиг. 16** показаны изменения массы тела у мышей Tg 197, использующихся в качестве модели артрита, в ответ на антитела к ФНО настоящего изобретения, по

сравнению с контролями из примера 7. Сравнение эффективности однократного внутрибрюшинного введения антитела TNV148 (полученного из клеток гибридомы) и rTNV148B (полученного из трансфицированных клеток). В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 были распределены, в зависимости от пола и массы тела, в одну из 9 групп лечения и получали одну внутрибрюшинную болюсную дозу PBS Дульбекко (D-PBS) или антитела (TNV148, rTNV148B) в дозе 1 мг/кг.

[00045] На **Фиг. 17** представлено прогрессирование тяжести заболевания, оцениваемое по индексу артрита, как показано в примере 7. Индекс артрита в группе, получавшей 10 мг/кг сА2, был ниже по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS, начиная с 4 недели и далее на протяжении всей оставшейся части исследования (неделя 8). Как группа, получавшая TNV148, так и группа, получавшая 1 мг/кг сА2, показали значимое снижение AI на 4 неделе. Хотя предыдущее исследование (P-099-017) показало, что TNV148 был несколько более эффективным в плане снижения индекса артрита после однократного внутрибрюшинного болюсного введения в дозе 1 мг/кг, данное исследование показало, что AI для обеих групп, получавших варианты антитела TNV, была несколько выше. Хотя (за исключением недели 6) группа, получавшая 1 мг/кг сА2, не давала существенного увеличения по сравнению с группой, получавшей 10 мг/кг сА2, а группы, получавшие TNV148, давали существенное увеличение на 7 и 8 неделях, не было отмечено значимых различий в AI между группой, получавшей 1 мг/кг сА2, 1 мг/кг TNV148 и 1 мг/кг TNV148B, в любой момент исследования.

[00046] На **Фиг. 18** показан обзор 9 стадий производственного процесса получения голиумаба.

[00047] На **Фиг. 19** показана блок-схема производственного процесса стадии 1 для стадий предварительного культивирования и размножения, включая контроли рабочего процесса и тесты мониторинга процесса.

[00048] На **Фиг. 20** показана блок-схема стадий производственного процесса стадии 2, включая элементы управления процессом и тесты мониторинга процесса.

[00049] **Фиг. 21** показана репрезентативная хроматограмма ВЭЖХ для эталонного стандарта голиумаба с использованием анионообменной ВЭЖХ с нормальной фазой с детектированием флуоресценции. Помечены пики, связанные с различными соединениями. * указывает на пик системы, не связанный с голиумабом.

- [00050] На **Фиг. 22** показан характерный профиль электроферограммы КИЭФ голимумаба, где четыре основных пика обозначены как С, 1, 2 и 3, а один малый пик обозначен как В. Также обозначены внутренние стандарты рI 7.6 и 9.5. Также показано графическое изображение, представляющее общее соотношение между пиками КИЭФ и уменьшением отрицательного заряда/степени сиалирования.
- [00051] На **Фиг. 23** представлено отклонение показателей клеточной культуры по плотности жизнеспособных клеток (VCD) в биореакторах объемом 500 и 1000 литров на стадии 2 производства голимумаба. Среднестатистическое среднее значение показано сплошной жирной черной линией, плюс и минус 2 стандартных отклонения от среднего значения обозначены пунктирными линиями, а культуры клеток с отклонениями показаны более тонкими серыми линиями. Черные и серые стрелки указывают на точку «плеча» среднего исторического значения и биореакторов с отклонениями соответственно.
- [00052] На **Фиг. 24** представлено отклонение показателей клеточной культуры по % жизнеспособных в биореакторах объемом 500 и 1000 литров на стадии 2 производства голимумаба. Среднестатистическое среднее значение показано сплошной жирной черной линией, плюс и минус 2 стандартных отклонения от среднего значения обозначены пунктирными линиями, а культуры клеток с отклонениями показаны более тонкими серыми линиями.
- [00053] На **Фиг. 25** показан схематический обзор некоторых видов первичных N-связанных олигосахаридов в IgG голимумаба. 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 GalTI) (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 соединения с концевой сиаловой кислотой (S1 и S2) являются заряженными соединениями, а соединения без концевой сиаловой 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.
- [00054] На **Фиг. 26** показано общее количество нейтральных и общее количество заряженных олигосахаридов в партиях голимумаба в среде AGT (до замены), AGT

после замены и SUP-AGT3 в хронологическом порядке для разных партий. Средние значения в % общего количества для среднестатистических партий AGT до замены показаны сплошными линиями, а верхний и нижний пределы спецификации — пунктирными линиями.

5 [00055] На **Фиг. 27** показан % от общего количества отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F (**A**), G1F (**B**) и G2F (**B**) в партиях голимумаба в среде AGT (до замены), AGT 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 —
10 пунктирными линиями.

[00056] **Фиг. 28** демонстрирует влияние увеличения концентрации меди на уровни G0F и общих нейтральных элементов для голимумаба.

[00057] **Фиг. 29** демонстрирует уровни марганца для различных партий сред в хронологическом порядке. Данные идентифицированы на основе используемой среды, например AGT до замены, AGT после замены и SUP-AGT3. Среднее значение для среднестатистических партий AGT до замены показано сплошной линией, а верхний и нижний пределы спецификации — пунктирными линиями.

[00058] **Фиг. 30** демонстрирует уровни хрома для различных партий сред в хронологическом порядке. Данные идентифицированы на основе используемой среды, например AGT до замены, AGT после замены и SUP-AGT3.
20

[00059] **Фиг. 31** демонстрирует уровни меди для различных партий сред в хронологическом порядке. Данные идентифицированы на основе используемой среды, например AGT до замены, AGT после замены и SUP-AGT3. Среднее значение для среднестатистических партий AGT до замены показано сплошной линией, а верхний и нижний пределы спецификации — пунктирными линиями. Средние значения для партий среды AGT после замены и SUP-AGT3 также показаны сплошными линиями. Следует отметить, что во многих партиях AGT после замены значения были меньше нижнего предела обнаружения для анализа для меди (< 1 мкг/л) и просто представлены в графическом виде как 1 мкг/л.
25

30 [00060] На **Фиг. 32** показаны профили плотности жизнеспособных клеток (VCD) в клеточной культуре (стадия 2) для среднего значения партий SUP-AGT3 (серые квадраты) в сравнении со средним значением среднестатистических партий AGT до

замены (черные круги) и средним значением партий AGT после замены (черные треугольники) голимумаба. Для среднестатистических партий AGT до замены $\pm 3SD$ представлено в виде пунктирных линий.

- 5 [00061] **Фиг. 33** демонстрирует жизнеспособность (%) клеточной культуры (стадия 2) для среднего значения партий SUP-AGT3 (серые квадраты) в сравнении со средним значением среднестатистических партий AGT до замены (черные круги) и средним значением партий AGT после замены (черные треугольники) голимумаба. Для среднестатистических партий AGT до замены $\pm 3SD$ представлено в виде пунктирных линий.
- 10 [00062] На **Фиг. 34** показаны средние кумулятивные уровни IgG в культуре клеток (стадия 2) для среднего значения партий SUP-AGT3 (серые треугольники) в сравнении со средним значением среднестатистических партий AGT до замены (черные квадраты) и средним значением партий AGT после замены (черные круги) голимумаба. Для среднестатистических партий AGT до замены $\pm 3SD$ представлено в виде пунктирных
- 15 линий.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

- [00063] В настоящем изобретении обеспечены композиции, содержащие антитела к ФНО, имеющие тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC),
- 20 содержащую SEQ ID NO:37, а также способы получения таких антител к ФНО.

- [00064] В контексте настоящего документа термины «антитело к фактору некроза опухоли альфа», «антитело к ФНО», «участок антитела к ФНО» или «фрагмент антитела к ФНО» и/или «вариант антитела к ФНО» и т. п. включают любой белок или пептид, содержащий по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, такую как, без
- 25 ограничений, по меньшей мере одна определяющая комплементарность (CDR) область тяжелой или легкой цепи, либо ее лиганд-связывающий участок, переменная область тяжелой цепи или легкой цепи, константная область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасная область или любая их часть, либо по меньшей мере один участок рецептора или связывающего белка ФНО, который можно встраивать в антитело настоящего
- 30 изобретения. Такое антитело необязательно дополнительно воздействует на специфичный лиганд, например, без ограничений, такое антитело модулирует, снижает, повышает, выступает антагонистом, выступает агонистом, уменьшает, ослабляет,

блокирует, ингибирует, уничтожает и/или препятствует по меньшей мере одной активности или связыванию ФНО, либо активности или связыванию рецептора ФНО *in vitro*, *in situ* и/или *in vivo*. В качестве не имеющего ограничительного характера примера приемлемое антитело к ФНО, его определенный участок или вариант настоящего изобретения может связываться с по меньшей мере одной молекулой ФНО или ее определенными участками, вариантами или доменами. Приемлемое антитело к ФНО, его определенный участок или вариант может также необязательно влиять на по меньшей мере один вид активности или функции ФНО, например, без ограничений, синтез РНК, ДНК или белка, высвобождение ФНО, сигнализацию рецептора ФНО, расщепление мембранного ФНО, активность ФНО, продукцию и/или синтез ФНО. 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 ФНО млекопитающего. Например, изобретение охватывает фрагменты антитела, способные связываться с ФНО или его участками, включая, без ограничений, фрагменты Fab (например, после расщепления папаином), Fab' (например, после расщепления пепсином и частичного восстановления) и F(ab')₂ (например, после расщепления пепсином), F_{ab} (например, после расщепления плазмином), pFc' (например, после расщепления пепсином или плазмином), F_d (например, после расщепления пепсином, частичного восстановления и реагрегации), F_v или scF_v (например, полученные способами молекулярной биологии) (см., например, Colligan, Immunology, выше).

25 [00065] Такие фрагменты могут быть получены путем ферментативного расщепления, синтеза или рекомбинации, известными в данной области и/или описанными в настоящем документе. Антитела могут также быть получены в различных укороченных формах с использованием генов антител, в которые были введены один или более стоп-кодона ближе к концу от сайта естественной остановки.

30 Например, возможно создание комбинированного гена, кодирующего участок тяжелой цепи F(ab')₂, который может включать последовательности ДНК, кодирующие домен СН₁ и/или шарнирную область тяжелой цепи. Различные участки антител можно

химически соединять стандартными способами или получать в виде единого белка способами генной инженерии.

[00066] 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.

[00067] Можно также применять биспецифические (например, DuoBody®), гетероспецифические, гетероконъюгатные или подобные антитела, которые представляют собой моноклональные, предпочтительно человеческие или гуманизированные антитела, обладающие специфичностью связывания с по меньшей мере двумя различными антигенами. В данном случае одна из специфичностей связывания относится к по меньшей мере одному белку ФНО, а другая — к любому другому антигену. Способы получения биспецифических антител известны специалистам в данной области. Обычно рекомбинантная продукция биспецифических антител основана на коэкспрессии двух пар тяжелая цепь / легкая цепь

иммуноглобулинов, причем две тяжелые цепи обладают различными видами специфичности (Milstein and Cuello, Nature 305:537 (1983)). Из-за случайного распределения тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов эти гибридомы (квадромы) образуют смесь из 10 различных возможных молекул антител, причем только одна из них имеет правильную биспецифическую структуру. Очистка 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.

[00068] 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, каждые из которых могут связываться с отдельным эпитопом.

[00069] 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.

[00070] 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.

[00071] 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.

[00072] Можно использовать другие стратегии, такие как стимулирование 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 № 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, 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.

[00073] В дополнение к вышеописанным способам, биспецифические антитела можно 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 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 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), дитиозэритритол (ДТЕ), глутатион, трис(2-карбоксиил)фосфин (ТСЕР), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстанавливающий агент выбран из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиил)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.

[00074] Специфичные к ФНО антитела (также называемые антителами к ФНО), используемые в способах и композициях настоящего изобретения, могут необязательно характеризоваться высокой аффинностью связывания с ФНО, причем необязательно и предпочтительно они имеют низкую токсичность. В частности, в настоящем изобретении используют антитело, определенный фрагмент или вариант изобретения, причем отдельные компоненты, такие как переменная область, константная область и каркас, по отдельности и/или в совокупности, необязательно и предпочтительно имеют низкую иммуногенность. Антитела, которые можно использовать в изобретении, необязательно

характеризуются способностью оказывать лечебное действие на пациентов в течение продолжительного периода с поддающимся измерению ослаблением симптомов и низкой и/или приемлемой токсичностью. Низкая или допустимая иммуногенность и/или высокая аффинность, а также другие приемлемые свойства могут способствовать достижению терапевтических результатов. 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).

[00075] **Полезные свойства.** Выделенные нуклеиновые кислоты настоящего изобретения можно использовать для продукции по меньшей мере одного антитела к ФНО, 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 ФНО состояния, выбранного из, без ограничений, по меньшей мере одного из иммунного нарушения или заболевания, сердечно-сосудистого нарушения или заболевания, инфекционного, злокачественного и/или неврологического нарушения или заболевания.

[00076] Такой способ может включать введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к ФНО, в клетку, ткань, орган, организм животного или пациента, которым 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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. Все цитируемые в

настоящем документе публикации или патенты 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).

[00077] **Антитела настоящего изобретения.** По меньшей мере одно антитело к ФНО настоящего изобретения, содержащее все переменные области CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:1, 2 и 3 и/или все переменные области CDR легкой цепи SEQ ID NO:4, 5 и 6, можно необязательно получать с помощью клеточной линии, смешанной клеточной линии, immortalized клетки или клональной популяции immortalized 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.

[00078] Человеческие антитела, специфичные к человеческим белкам ФНО или их фрагментам, можно получать в ответ на соответствующий иммуногенный антиген, такой как выделенный белок ФНО и/или его участок (включая синтетические молекулы, такие как синтетические пептиды). Другие специфичные или общие антитела млекопитающих можно получать аналогичным образом. Получение иммуногенных антигенов и продукцию моноклонального антитела можно выполнять любым приемлемым способом.

[00079] В одном подходе гибридомы получают путем слияния приемлемой импортизированной клеточной линии (например, клеточной линии миеломы, такой как, без ограничений, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, > 243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A, или т. п., или гетеромиеломы, продукты их слияния, или любую клетку, или гибридную клетку, производную из них, или любую другую приемлемую клеточную линию, известную в данной области). См., например, www.atcc.org, www.lifetech.com. и т. п., причем антителопродуцирующие клетки, такие как, без ограничений, выделенные или клонированные клетки селезенки, периферической крови, лимфы, миндалин или другие иммунные или клетки, содержащие В-клетки, или любые другие клетки, экспрессирующие константные, или переменные, или каркасные области или CDR-последовательности тяжелой или легкой цепи, в виде эндогенной или гетерологичной нуклеиновой кислоты, в виде рекомбинантных или эндогенных, относящихся к вирусам, бактериям, водорослям, прокариотам, амфибиям, насекомым, рептилиям, рыбам, млекопитающим, грызунам, лошадям, птицам, козам, овцам, приматам, эукариотам геномных ДНК, кДНК, рДНК, митохондриальных ДНК или РНК, ДНК или РНК хлоропластов, гяРНК, мРНК, тРНК, одно-, двух-или трехцепочечных, гибридизированных и т. п., или любых их комбинаций. См., например, Ausubel, выше, и Colligan, Immunology, выше, глава 2, полностью включенные в настоящий документ путем ссылки.

[00080] Клетки, продуцирующие антитела, можно также получать из периферической крови или предпочтительно из селезенки или лимфатических узлов человека или других приемлемых животных, которые были иммунизированы интересующим антигеном. Для экспрессии гетерологичной или эндогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, 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).

[00081] 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, 5 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; 10 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); EP 614 989 (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; 15 PCT/US91/07149 (Ixsys); или стохастически полученных пептидов или белков — US 5723323, 5763192, 5814476, 5817483, 5824514, 5976862, WO 86/05803, EP 590 689 (Ixsys, в настоящее время, Applied Molecular Evolution (AME); все включены в настоящий документ путем ссылки), или способами, основанными на иммунизации трансгенных животных (например, мышей SCID, см. Nguyen et al., Microbiol. Immunol. 20 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 25 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)); отбор В-клеток (Steenbakkers et al., Molec. Biol. Reports 19:125–134 (1994); Jonak et al., Progress Biotech, Vol. 5, In Vitro 30

Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands (1988)).

[00082] 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, примата (исключая человека) или других млекопитающих. Эти аминокислотные остатки человеческого происхождения часто называют «импортированными» остатками, поскольку их обычно берут из «импортированных» переменных, константных или других доменов известной человеческой последовательности. Описание известных последовательностей Ig человека приведено, например, на веб-сайтах:

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;

www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm;

www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;

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

www.antibodyresource.com/;

mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html. www.immunologylink.com/;

pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/~hcl/;

www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/;

www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp;

www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html;

www.isac-net.org/sites_geo.html; aximt1.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html;

baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/;

www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html;

imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/;

abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;

www.unizh.ch/~honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/;

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

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

www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;

www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html;

www.jerini.de/fr_products.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. 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.

5 [00083] 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. Как правило, сохраняются целиком или частично

10 нечеловеческие или человеческие последовательности CDR, а нечеловеческие последовательности переменных и константных областей замещают человеческими или другими аминокислотами. Антитела могут также быть необязательно гуманизированы с сохранением высокой аффинности к антигену и других благоприятных биологических свойств. Для достижения этой цели гуманизированные

15 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,

20 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, остатки FR могут быть выбраны и скомбинированы из

25 консенсусной и импортированной последовательностей так, чтобы получить требуемую характеристику антитела, такую как повышенную аффинность к целевому (-ым) антигену (-ам). В целом остатки CDR напрямую и в очень значительной степени влияют на связывание с антигеном. Гуманизацию или конструирование антител настоящего

30 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); Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc.

Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993), патентах США №: 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5,766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539; 4816567, PCT: 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.

[00084] Антитело к ФНО можно также необязательно создавать путем иммунизации трансгенного животного (например, мыши, крысы, хомяка, примата (за исключением человека) и т. п.), способных продуцировать набор человеческих антител, как описано в настоящем документе и/или как известно специалистам в данной области. Клетки, которые продуцируют человеческие антитела к ФНО, можно выделять из организма таких животных и иммортализовать с использованием приемлемых способов, таких как описанные в настоящем документе.

[00085] 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, 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, Bruggemann *et al.* EP 0438 474 B1, Lonberg *et al.* EP 0814 259 A2, Lonberg *et al.* GB 2 272 440 A, в Lonberg *et al.* *Nature* 368:856–859 (1994), Taylor *et al.*, *Int. Immunol.* 6(4): 579–591 (1994), Green *et al.*, *Nature Genetics* 7:13–21 (1994), Mendez *et al.*, *Nature Genetics* 15:146–156 (1997), Taylor *et al.*, *Nucleic Acids Research* 20(23):6287–6295 (1992), Tuailon *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 90(8):3720–3724 (1993), Lonberg *et al.*, *Int Rev Immunol* 13(1):65–93 (1995) и Fishwald *et al.*, *Nat Biotechnol* 14(7):845–851 (1996), причем все полностью включены в настоящий документ путем ссылки). По существу эти мыши имеют по меньшей мере одну содержащую трансген ДНК из по меньшей мере одного локуса человеческого иммуноглобулина, который функционально перестроен или который можно подвергать функциональной перестройке. Эндогенный локус

иммуноглобулина у таких мышей можно разрушать или делетировать, чтобы лишить животное способности продуцировать антитела, кодируемые эндогенными генами.

[00086] Скрининг антител на специфичность связывания со сходными белками или фрагментами удобно проводить с использованием библиотек пептидного дисплея.

5 Данный способ включает скрининг больших наборов пептидов для выявления отдельных пептидов, имеющих требуемую функцию или структуру. Скрининг антител в библиотеках пептидных дисплеев 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

10 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

15 конкретную отображаемую пептидную последовательность. Такие способы описаны в патентных публикациях РСТ № 91/17271, 91/18980, 91/19818 и 93/08278. 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

20 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

25 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.

30 [00087] Антитела настоящего изобретения можно также получать с использованием по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к ФНО, для создания трансгенных животных или млекопитающих, таких как козы, коровы, лошади, овцы 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.

5 [00088] Антитела настоящего изобретения можно дополнительно получать с использованием по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к ФНО, для создания трансгенных растений и культур клеток растений (например, без ограничений, табака и маиса), которые продуцируют такие антитела, их определенные участки или варианты в органах растений или полученных из них клеточных
10 культурах. В качестве не имеющего ограничительного характера примера трансгенные листья табака, экспрессирующие рекомбинантные белки, успешно использовали для получения больших количеств рекомбинантных белков, например, с использованием индуцируемого промотора. См., например, Cramer et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240:95-118 (1999) и приведенные в этой публикации ссылки. Кроме того, трансгенный
15 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
20 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
25 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. См. также по существу применительно к экспрессии антител в растениях, без ограничений, каждый из
30 приведенных выше источников, полностью включенный в настоящий документ путем ссылки.

[00089] Антитела настоящего изобретения могут связываться с человеческим ФНО в широком интервале аффинностей (K_D). В предпочтительном варианте осуществления

по меньшей мере одно человеческое мАт настоящего изобретения может необязательно связываться с человеческим ФНО с высокой аффинностью. Например, мАт человека может связываться с человеческим ФНО с показателем K_D , равным около 10^{-7} или менее М, например, без ограничений, $0,1-9,9$ (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.

[00090] Аффинность или avidность 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, рН). 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.

[00091] **Молекулы нуклеиновых кислот.** Используя приведенную в настоящем документе информацию, такую как нуклеотидные последовательности, кодирующие по меньшей мере 70–100% смежных аминокислот по меньшей мере одной из SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, их указанные фрагменты, варианты или консенсусные последовательности, или депонированный вектор, содержащий по меньшей мере одну из этих последовательностей, может быть получена молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения, кодирующая по меньшей мере одно антитело к ФНО, содержащее все переменные области CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:1, 2 и 3 и/или все переменные области CDR легкой цепи SEQ ID NO:4, 5 и 6, с использованием способов, описанных в настоящем документе или известных специалистам в данной области.

[00092] 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 некодирующей цепью, также называемой обратной цепью.

[00093] Выделенные молекулы нуклеиновых кислот настоящего изобретения могут включать молекулы нуклеиновых кислот, содержащие открытую рамку считывания (ORF), необязательно с одним или более интронами, например, без ограничений, для по меньшей мере одного определенного участка по меньшей мере одного CDR, такого как CDR1, CDR2 и/или CDR3 по меньшей мере одной тяжелой цепи (например, SEQ ID NO: 1-3) или легкой цепи (например, SEQ ID NO: 4-6); молекулы нуклеиновых кислот, содержащие кодирующую последовательность антитела к ФНО или 10 вариабельной области (например, SEQ ID NO:7,8); и молекулы нуклеиновых кислот, которые содержат последовательность нуклеотидов, по существу отличающуюся от нуклеотидных последовательностей, описанных выше, но которая, тем не менее, вследствие врожденности генетического кода кодирует по меньшей мере одно антитело к ФНО, как описано в настоящем документе и/или известно специалистам в данной 15 области. Разумеется, генетический код хорошо известен специалистам в данной области. Следовательно, для специалиста будет стандартной процедурой создание таких вырожденных вариантов нуклеиновых кислот, кодирующих специфичные антитела к ФНО настоящего изобретения. См., например, Ausubel, et al., выше, и такие варианты нуклеиновых кислот включены в настоящее изобретение. Не имеющие 20 ограничительного характера примеры выделенных молекул нуклеиновых кислот настоящего изобретения включают SEQ ID NO:10, 11, 12, 13, 14, 15, соответствующие не имеющим ограничительного характера примерам нуклеиновой кислоты, кодирующей соответственно HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, вариабельную область HC и вариабельную область LC.

[00094] Как указано в настоящем документе, молекулы нуклеиновых кислот настоящего изобретения, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к ФНО, могут включать, без ограничений, молекулу, отдельно кодирующую аминокислотную последовательность фрагмента антитела; кодирующую последовательность для полноразмерного антитела или его участка; кодирующую 30 последовательность для антитела, фрагмента или участка, а также дополнительные последовательности, такие как кодирующая последовательность для по меньшей мере 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.

[00095] **Полинуклеотиды, селективно гибридизующиеся с описанным в настоящем документе полинуклеотидом.** В настоящем изобретении обеспечены выделенные нуклеиновые кислоты, которые в условиях селективной гибридизации гибридизуются с полинуклеотидом, описанным 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.

[00096] 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.

[00097] Необязательно полинуклеотиды настоящего изобретения кодируют по меньшей мере часть антитела, кодируемого полинуклеотидами, описанными в настоящем документе. Полинуклеотиды настоящего изобретения 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.

10 [00098] **Конструирование нуклеиновых кислот.** Как хорошо известно специалистам в данной области, выделенные нуклеиновые кислоты настоящего изобретения можно получать с помощью (а) способов рекомбинации, (b) способов синтеза, (с) способов очистки или их комбинаций.

[00099] Нуклеиновые кислоты могут для удобства содержать последовательности, дополнительные к полинуклеотиду настоящего изобретения. Например, в нуклеиновую кислоту можно встраивать сайт множественного клонирования, содержащий один или более сайтов эндонуклеазной рестрикции, чтобы облегчить выделение полинуклеотида. Кроме того, можно встраивать транскрибируемые последовательности, чтобы облегчить выделение транскрибированного полинуклеотида настоящего изобретения. К примеру, удобным средством очистки белков настоящего изобретения служит введение последовательности маркера гексагистидина. Нуклеиновая кислота настоящего изобретения, за исключением кодирующей последовательности, может необязательно представлять собой вектор, адаптер или линкер для клонирования и/или экспрессии полинуклеотида настоящего изобретения.

25 [00100] В такие клонирующие и/или экспрессионные последовательности можно добавлять дополнительные последовательности, чтобы оптимизировать их функцию при клонировании и/или экспрессии, способствовать выделению полинуклеотида или 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*).

[00101] **Рекомбинантные способы конструирования нуклеиновых кислот.** Композиции выделенных нуклеиновых кислот настоящего изобретения, таких как РНК,

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

[00102] **Способы скрининга и выделения нуклеиновых кислот.** Скрининг библиотеки кДНК или геномной ДНК можно проводить с помощью зонда на основании последовательности полинуклеотида 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.

[00103] **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.

[00104] 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 антисмысловую 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).

[00105] Например, технологию полимеразной цепной реакции (ПЦР) можно использовать для амплификации последовательностей полинуклеотидов настоящего изобретения, 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.

[00106] **Синтетические способы конструирования нуклеиновых кислот.** Выделенные нуклеиновые кислоты настоящего изобретения можно также 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.

[00107] **Рекомбинантные экспрессионные кассеты.** В настоящем изобретении дополнительно обеспечены рекомбинантные экспрессионные кассеты, содержащие нуклеиновую кислоту настоящего изобретения. Последовательность нуклеотидов настоящего изобретения, например последовательность кДНК или геномную последовательность, кодирующую антитело настоящего изобретения, можно использовать для конструирования рекомбинантной экспрессионной кассеты, которую можно вводить в по меньшей мере одну требуемую клетку-хозяина. Рекомбинантная экспрессионная кассета, как правило, содержит полинуклеотид настоящего изобретения, функционально связанный с регуляторными последовательностями инициации транскрипции, которые направляют транскрипцию полинуклеотида в предназначенной для нее клетке-хозяине. Для направления экспрессии нуклеиновых кислот настоящего изобретения можно применять как гетерологичные, так и негетерологичные (т. е. эндогенные) промоторы.

[00108] 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 настоящего изобретения таким образом, чтобы стимулировать или подавлять экспрессию полинуклеотида настоящего изобретения. Например, эндогенные промоторы можно изменять *in vivo* или *in vitro* путем мутации, делеции и/или замены.

[00109] **Векторы и клетки-хозяева.** Настоящее изобретение также относится к векторам, включающим выделенные молекулы нуклеиновых кислот настоящего изобретения, клеткам-хозяевам, созданным методом геной инженерии с применением рекомбинантных векторов, и к выработке по меньшей мере одного антитела к ФНО с применением хорошо известных специалистам рекомбинантных способов. См., например,

Sambrook et al., упомянутое; Ausubel, et al., упомянутое; причем каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

[00110] 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.

[00111] Вставку ДНК необходимо функционально связывать с пригодным промотором. Экспрессионные конструкции дополнительно содержат сайты для инициации и терминации транскрипции, а в транскрибируемой области — сайт связывания рибосомы для трансляции. Кодированный участок зрелых транскриптов, экспрессируемых конструктами, предпочтительно содержит сайт инициации трансляции в начале, а также терминирующий кодон (например, UAA, UGA или UAG), надлежащим образом расположенный в конце транслируемой мРНК, причем для экспрессии в клетках млекопитающих или эукариот предпочтительны UAA и UAG.

[00112] 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 конструкта в клетку-хозяина можно осуществлять путем трансфекции посредством фосфата кальция, DEAE-декстрана, катионных липидов, электропорации, трансдукции, инфекции или других известных способов. Такие способы описаны в данной области, например, в Sambrook, упомянутое, главы 1–4 и 16–18; Ausubel, упомянутое, главы 1, 9, 13, 15, 16.

[00113] По меньшей мере одно антитело настоящего изобретения можно экспрессировать в модифицированной форме, такой как слитный 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.

[00114] Специалистам в данной области известно множество экспрессирующих систем, доступных для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей белок настоящего изобретения.

[00115] В альтернативном варианте осуществления нуклеиновые кислоты настоящего изобретения можно экспрессировать в клетке-хозяине путем запуска (путем манипуляции) 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.

[00116] Примером клеточных культур, используемых для получения антител, их определенных участков или вариантов, являются клетки млекопитающих. Системы клеток млекопитающих часто используют в виде монослоев клеток, однако можно также использовать суспензии клеток млекопитающих или биореакторы. В данной области разработано несколько приемлемых линий клеток-хозяев, способных экспрессировать интактные гликозилированные белки, в частности линии клеток COS-1 (например, ATCC CRL 1650), COS-7 (например, ATCC CRL-1651), HEK293, ВНК21 (например, ATCC CRL-10), CHO (например, ATCC CRL 1610) и BSC-1 (например, ATCC CRL-26), клетки Cos-7, клетки CHO, клетки her G2, клетки P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 293, клетки HeLa и т. п., например, производства Американской коллекции типовых культур, г. Манассас, штат Вирджиния, США (www.atcc.org). Предпочтительные клетки-хозяева включают клетки лимфоидного происхождения, такие как миеломные и лимфомные клетки. Более

предпочтительны клетки-хозяева P3X63Ag8.653 (каталожный номер ATCC CRL-1580) и клетки SP2/0-Ag14 (каталожный номер ATCC CRL-1851). В особенно предпочтительном варианте осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку линий P3X63Ab8.653 или SP2/0-Ag14.

5 [00117] Экспрессионные векторы для таких клеток могут включать одну или более из следующих последовательностей для контроля экспрессии, таких как, без ограничений, точка начала репликации; промотор (например, поздние или ранние промоторы SV40, промотор CMV (патенты США № 5,168,062; 5,385,839), промотор HSV tk, промотор pgk (фосфоглицераткиназа), промотор EF-1 alpha (патент США 10 № 5,266,491), по меньшей мере один промотор человеческого иммуноглобулина; энхансер и/или информационные сайты для процессинга, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования (например, сайт присоединения поли-А большого Т-Ag SV40) и последовательности терминаторов транскрипции. См., например, Ausubel et al., упомянутое; Sambrook et al., упомянутое.

15 Для продукции нуклеиновых кислот или белков настоящего изобретения используют и другие известные и/или поставляемые клетки, например, по каталогу «Американская коллекция типовых культур клеточных линий и гибридом» (www.atcc.org), либо из других известных или коммерческих источников.

[00118] В случае использования эукариотических клеток-хозяев в вектор, как 20 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 25 (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.

[00119] Очистка антитела. Антитело к ФНО может быть извлечено и очищено из 30 рекомбинантных клеточных культур хорошо известными способами, включающими, без ограничений, очистку на белке А, осаждение сульфатом аммония или спиртом, экстрагирование кислотой, анионо- или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, гидрофобную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию на гидроксилпатите и хроматографию на лектине.

Для очистки можно также использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). См., например, Colligan, *Current Protocols in Immunology*, или *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997–2001), например, главы 1, 4, 6, 8, 9, 10, причем каждая полностью включена в настоящий документ путем

5 ссылки.

[00120] Антитела 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

10 хозяина, используемого в способе рекомбинантной продукции, антитело настоящего изобретения 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,

15 18 и 20, Colligan, *Protein Science*, упомянутое, главы 12–14, причем все публикации полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

Антитела к ФНО

[00121] Выделенные антитела настоящего изобретения, содержащие все переменные области CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, 2 и 3 и/или все переменные

20 области CDR легкой цепи SEQ ID NO: 4, 5 и 6, включают аминокислотные последовательности антител, описанные в настоящем документе, кодируемые любым приемлемым полинуклеотидом, либо любого выделенного или полученного антитела. Предпочтительно человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с человеческим ФНО и таким образом частично или по существу полностью

25 нейтрализует по меньшей мере один вид биологической активности белка. Антитело, или его определенный участок или вариант, которые частично или предпочтительно по существу нейтрализуют по меньшей мере один вид биологической активности по меньшей мере одного белка или фрагмента ФНО, может связывать белок или фрагмент и таким образом ингибировать активности, опосредованные связыванием ФНО с

30 рецептором к ФНО или с другими зависимыми от ФНО или опосредованные им механизмами. В контексте настоящего документа термин «нейтрализующее антитело» относится к антителу, которое может ингибировать зависимость от ФНО активность на около 20–120%, предпочтительно на по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65,

70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% или более в зависимости от способа анализа. Способность антитела к ФНО ингибировать зависимость от ФНО активность предпочтительно оценивают с помощью по меньшей мере одного приемлемого способа анализа белка ФНО или его рецептора, как описано в настоящем документе и/или как известно специалистам в данной области. Человеческое антитело изобретения может представлять собой антитело любого класса (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD и т. п.) или изотипа и может содержать легкую цепь каппа или лямбда. В одном варианте осуществления человеческое антитело содержит тяжелую цепь или определенный фрагмент IgG, например по меньшей мере один из изотипов IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Антитела этого типа можно получать с использованием трансгенной мыши или другого трансгенного не относящегося к человеку млекопитающего, содержащего трансгены по меньшей мере одной человеческой легкой цепи (например, IgG, IgA) и IgM (например, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$)), как описано в настоящем документе и/или как известно специалистам в данной области. В другом варианте осуществления человеческое антитело к человеческому ФНО содержит тяжелую цепь IgG1 и легкую цепь IgG1.

[00122] 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*: февраль 2018 г., 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». Как представлено в настоящем документе, SIMPONI® (голимумаб) представляет собой оригинальное инновационное референтное антитело к ФНО, которое было одобрено

FDA на основании успешных клинических исследований. Голиумаб продается в США с 2009 года.

[00123] По меньшей мере одно антитело изобретения связывает по меньшей мере один определенный эпитоп, специфичный к по меньшей мере одному белку ФНО, 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 указанного белка, причем данный эпитоп предпочтительно содержит по меньшей мере один внеклеточный, растворимый, гидрофильный, внешний или цитоплазматический участок указанного белка. По меньшей мере один определенный эпитоп может содержать любую комбинацию из по меньшей мере одной последовательности аминокислот, состоящей из по меньшей мере 1–3 аминокислот, и до полного определенного участка из последовательных аминокислот с SEQ ID NO:9.

[00124] По существу человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения содержит антигенсвязывающую область, которая содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR1, CDR2 и CDR3) человека или вариант по меньшей мере одной вариабельной области тяжелой цепи и по меньшей мере одной определяющей комплементарность области человека (CDR1, CDR2 и CDR3) или вариант по меньшей мере одной вариабельной области легкой цепи. В качестве не налагающего ограничения примера антитело или антигенсвязывающий участок или вариант могут содержать по меньшей мере одну CDR3 тяжелой цепи, имеющую последовательность аминокислот SEQ ID NO:3, и/или CDR3 легкой цепи, имеющую последовательность аминокислот SEQ ID NO:6. В конкретном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут иметь антигенсвязывающую область, которая содержит по меньшей мере часть по меньшей мере одной CDR тяжелой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и/или CDR3), имеющую последовательность аминокислот, соответствующую CDR 1, 2 и/или 3 (например, SEQ ID NO:1, 2 и/или 3). В другом конкретном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий участок или вариант может иметь антигенсвязывающую область, которая содержит по меньшей мере участок по меньшей мере одной CDR легкой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и/или CDR3), имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую CDR 1, 2 и/или 3 (например, SEQ ID NO: 4, 5, и/или 6). В предпочтительном варианте осуществления три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента

имеют последовательность аминокислот соответствующей CDR по меньшей мере одного из мАт TNV148, TNV14, TNV15, TNV196, TNV118, TNV32, TNV86, описанных в настоящем документе. 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.

[00125] Специфичное антитело к ФНО может содержать по меньшей мере одну из переменных областей тяжелой или легкой цепи, имеющую определенную аминокислотную последовательность. Например, в предпочтительном варианте осуществления антитело к ФНО содержит по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, необязательно имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 и/или по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, необязательно имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, причем антитела, которые связываются с ФНО человека и которые содержат определенный переменный участок тяжелой или легкой цепей, могут быть получены 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 локуса легкой цепи человеческого иммуноглобулина, который может подвергаться функциональной перестройке, можно иммунизировать человеческим ФНО или его фрагментом, чтобы индуцировать продукцию антител. Если требуется, можно выделять клетки, продуцирующие антитела, и можно получать гибридомы или другие иммортализованные 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.

[00126] 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. Предпочтительно

такие антитела или антигенсвязывающие фрагменты и антитела, содержащие такие цепи или области CDR, могут связываться с человеческим ФНО с высокой аффинностью (например, с K_D равной 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 замену одной аминокислоты на другую в пределах следующих групп: лизин (K), аргинин (R) и гистидин (H); аспарат (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.

15 [00127] **Коды аминокислот.** Аминокислоты, составляющие антитела к ФНО настоящего изобретения, часто обозначают аббревиатурами. Наименования аминокислот можно обозначать с помощью однобуквенного кода аминокислоты, трехбуквенного кода, названия или кодона (-ов) из трех нуклеотидов, что хорошо известно специалистам в данной области (см. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of The Cell*, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994):

| ОДНОБУКВЕН- НЫЙ КОД | ТРЕХБУКВЕН- НЫЙ КОД | НАЗВАНИЕ | КОДОН (-Ы) ИЗ ТРЕХ НУКЛЕОТИДОВ |
|------------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| A | Ala | Аланин | GCA, GCC, GCG, GCU |
| C | Cys | Цистеин | UGC, UGU |
| D | Asp | Аспарагиновая кислота | GAC, GAU |
| E | Glu | Глутаминовая кислота | GAA, GAG |
| F | Phe | Фенилаланин | UUC, UUU |
| G | Gly | Глицин | GGA, GGC, GGG, GGU |
| H | His | Гистидин | CAC, CAU |
| I | Ile | Изолейцин | AUA, AUC, AUU |
| K | Lys | Лизин | AAA, AAG |
| L | Leu | Лейцин | UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU |
| M | Met | Метионин | AUG |
| N | Asn | Аспарагин | AAC, AAU |
| P | Pro | Пролин | CCA, CCC, CCG, CCU |
| Q | Gln | Глутамин | CAA, CAG |
| R | Arg | Аргинин | AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU |
| S | Ser | Серин | AGC, AGU, UCA, UCC, |

| ОДНОБУКВЕН- НЫЙ КОД | ТРЕХБУКВЕН- НЫЙ КОД | НАЗВАНИЕ | КОДОН (-Ы) ИЗ ТРЕХ НУКЛЕОТИДОВ |
|------------------------|------------------------|-----------|-----------------------------------|
| | | | 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 |

[00128] Антитело к ФНО настоящего изобретения может включать одну или более аминокислотных замен, делеций или добавлений вследствие естественных мутаций либо действий человека, описанных в настоящем документе.

5 [00129] Несомненно, число аминокислотных замен, которое может произвести квалифицированный специалист, зависит от многих факторов, включая описанные выше. Вообще говоря, число замен, вставок или делеций аминокислот любого данного антитела к ФНО, 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
10 нем, как указано в настоящем документе.

[00130] Специалисты в данной области могут идентифицировать аминокислоты в антителе к ФНО настоящего изобретения, 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
15 точечных мутаций аланина в каждом остатке в молекуле. Впоследствии полученные мутантные молекулы испытывают на биологическую активность, такую как, без ограничений, по меньшей мере одна активность по нейтрализации ФНО. Критичные для связывания с антителом сайты можно также идентифицировать путем анализа
20 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)).

[00131] Антитела к ФНО настоящего изобретения могут включать, без ограничений, по меньшей мере один участок, последовательность или комбинацию, выбранные из от 1
25 до всех последовательных аминокислот, из по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6.

[00132] Антитело к ФНО может необязательно дополнительно содержать полипептид из по меньшей мере одной из 70–100% последовательных аминокислот по меньшей мере одной из SEQ ID NO:7, 8.

5 [00133] В одном варианте осуществления последовательность аминокислот цепи иммуноглобулина или ее участок (например, вариабельная область, CDR) имеет идентичность около 70–100% (например, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 или любой интервал, или значение в нем) с последовательностью аминокислот соответствующей цепи по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO:7, 8. Например, аминокислотную
10 последовательность вариабельной области легкой цепи можно сравнивать с последовательностью SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи можно сравнивать с SEQ ID NO: 7. 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,
15 известного специалистам в данной области.

[00134] Примеры последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей представлены в SEQ ID NO: 7, 8. Антитела настоящего изобретения или их определенные варианты могут содержать любое число остатков смежных аминокислот из антитела настоящего изобретения, причем это число выбрано из группы целых чисел в
20 интервале 10–100% от числа последовательных остатков в антителе к ФНО. 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
25 представлять собой любое целое число, выбранное из группы, состоящей из 1–20, например по меньшей мере 2, 3, 4 или 5.

[00135] Согласно определению специалистов в данной области, настоящее изобретение включает по меньшей мере одно биологически активное антитело настоящего изобретения. Биологически активные антитела обладают удельной
30 активностью, составляющей по меньшей мере 20%, 30% или 40%, предпочтительно по меньшей мере 50%, 60% или 70% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%, 90% или 95–1000% 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.

[00136] 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.

[00137] Модифицированные антитела и антигенсвязывающие фрагменты изобретения могут содержать одну или более органических функциональных групп, которые имеют прямую или непрямую ковалентную связь с антителом. Каждая органическая функциональная группа, связанная с антителом или с антигенсвязывающим фрагментом изобретения, может независимо представлять собой гидрофильную полимерную группу, группу жирной кислоты или группу сложного эфира жирной кислоты. В контексте настоящего документа термин «жирная кислота» охватывает одноосновные и двухосновные карбоновые кислоты. В контексте настоящего документа термин «гидрофильная полимерная группа» обозначает органический полимер, обладающий лучшей растворимостью в воде, чем в октане. Например, полилизин лучше растворяется в воде, чем в октане. Таким образом, антитело, модифицированное путем ковалентного присоединения полилизина, включено в изобретение. Гидрофильные полимеры, приемлемые для модификации антител изобретения, могут быть линейными или разветвленными, и включают, например, полиалкангликоли (например, PEG, монометоксиполиэтиленгликоль (mPEG), PPG и т. п.), углеводы (например, декстран, целлюлозу, олигосахариды, полисахариды и т. п.), полимеры гидрофильных аминокислот (например, полилизин,

полиаргинин, полиаспартат и т. п.), оксиды полиалканов (например, полиэтиленоксид, полипропиленоксид и т. п.) и поливинилпирролидон. Гидрофильный полимер, модифицирующий антитело изобретения, предпочтительно имеет молекулярную массу от около 800 до около 150 000 дальтон, как отдельный фрагмент молекулы. Например, PEG₅₀₀₀ и PEG_{20,000}, где нижний индекс означает среднюю молекулярную массу полимера в дальтонах. Гидрофильная полимерная группа может иметь от одного до около шести заместителей — групп алкила, жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты. Гидрофильные полимеры с замещающей группой жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты можно получать с применением приемлемых способов. Например, полимер, содержащий аминокгруппу, может быть связан с карбоксилатом жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты, а активированный карбоксилат (например, активированный N,N-карбонилдиимидазолом) на жирной кислоте или сложном эфире жирной кислоты может быть связан с гидроксильной группой полимера.

[00138] 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, n-додеканоат (C₁₂, лаурат), n-тетрадеканоат (C₁₄, мирилат), n-октадеканоат (C₁₈, стеарат), n-эйкозаноат (C₂₀, арахидат), n-докозаноат (C₂₂, бегенат), n-триаконтаноат (C₃₀), n-тетрааконтаноат (C₄₀), *цис*-Δ⁹-октадеканоат (C₁₈, олеат), полностью *цис*-Δ^{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.

[00139] Модифицированные человеческие антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно получать с помощью приемлемого способа, например путем реакции с одним или более модифицирующими агентами. В контексте настоящего документа термин «модифицирующий агент» относится к приемлемой органической группе (например, гидрофильному полимеру, жирной кислоте, сложному эфиру жирной кислоты), которая содержит активирующую группу. «Активирующая группа» означает химический фрагмент или функциональную группу, которые при подходящих условиях

могут вступать в реакцию со второй химической группой и, таким образом, образовывать ковалентную связь между модифицирующим агентом и второй химической группой. Например, к реагирующим с амином активирующим группам относятся электрофильные группы, такие как тозилат, мезилат, галоген (хлор, бром, фтор, йод), сложные эфиры N-гидроксисукцинимидила (NHS) и т. п. Активирующие группы, способные реагировать с тиолами, включают, например, малеимид, йодацетил, акрилолил, дисульфиды пиридила, тиол 5-тиол-2-нитробензойной кислоты (TNB-тиол) и т. п. Функциональная группа альдегида может быть связана с амин- или гидразид-содержащими молекулами, а группа азида может реагировать с трехвалентной фосфорной группой с образованием фосфорамидатных или фосфоримидных связей. Приемлемые способы введения активирующих групп в молекулы известны специалистам в данной области (см., например, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)). Активирующая группа может быть связана с органической группой (например, гидрофильным полимером, жирной кислотой, эфиром жирной кислоты) прямо или через линкерное звено, например двухвалентную группу C₁–C₁₂, в которой один или более атомов углерода могут быть замещены гетероатомом, таким как кислород, азот или сера. Приемлемые линкерные звенья включают, например, тетраэтиленгликоль, $-(CH_2)_3-$, $-NH-(CH_2)_6-NH-$, $-(CH_2)_2-NH-$ и $-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH-NH-$. 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 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, публикацию Thompson, *et al.*, WO 92/16221, содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки).

[00140] Модифицированные антитела изобретения можно получать путем реакции человеческого антитела или антигенсвязывающего фрагмента с модифицирующим агентом. Например, органические функциональные группы могут быть связаны с

антителом неспецифично к сайту с помощью реагирующего с амином модифицирующего агента, например сложного эфира NHS и PEG. Модифицированные человеческие антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно также получать путем восстановления дисульфидных связей (например, внутрицепочечных дисульфидных связей) антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

Восстановленное антитело или антигенсвязывающий фрагмент может впоследствии взаимодействовать с реагирующим с тиолом модифицирующим агентом с получением модифицированного антитела изобретения. Модифицированные человеческие антитела 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.*, *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).

[00141] **Антиидиотипические антитела к композициям антитела к ФНО.** Помимо моноклональных или химерных антител к ФНО настоящее изобретение также относится к антиидиотипическому (анти-Id) антителу, специфичному к таким антителам изобретения.

Антитело к Id представляет собой антитело, распознающее уникальные детерминанты, по существу связанные с антигенсвязывающей областью другого антитела. Анти-Id-антитело можно получать путем иммунизации животного того же вида и генетического типа (например, линии мышей), что и источник Id-антитела, антителом или его CDR-содержащей областью. Иммунизированное животное будет распознавать идиотипические детерминанты иммунизирующего антитела и будет продуцировать анти-Id-антитело. Анти-Id-антитело можно также применять в качестве «иммуногена» для индукции иммунного ответа у еще одного животного, получая так называемое анти-анти-Id-антитело.

[00142] **Композиции антитела к ФНО.** В настоящем изобретении также обеспечена по меньшей мере одна композиция антитела к ФНО, содержащая 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 ФНО, 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

5 аминокислотной последовательности антитела к ФНО, выбранной из группы, состоящей из 70–100% последовательных аминокислот с SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или определенных их фрагментов, доменов или вариантов. Предпочтительные композиции антитела к ФНО включают по меньшей мере одну или две

10 полноразмерных последовательности, фрагмента, домена или варианта участков, содержащих по меньшей мере одну CDR или LBP из последовательности антитела к ФНО с 70–100% сходством с последовательностью SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, или их указанными фрагментами, доменами или вариантами. Предпочтительные композиции дополнительно содержат, например, 40–99% по меньшей мере одной из 70–100%

15 последовательностей с SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 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 или коллоидах, как известно специалистам в данной области или описано в настоящем документе.

[00143] Композиции антитела к ФНО настоящего изобретения могут

20 дополнительно содержать по меньшей мере одно приемлемое и эффективное количество композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к ФНО, вводимое в клетку, ткань, орган, животного или пациента, нуждающегося в такой модуляции, лечении или терапии, и необязательно

25 дополнительно включать по меньшей мере одно средство, выбранное из по меньшей мере одного антагониста ФНО (например, без ограничений, антитела к ФНО или его фрагмента, растворимого рецептора ФНО или его фрагмента, их слитых белков, или низкомолекулярного антагониста ФНО), противоревматического лекарственного средства (например, метотрексата, ауранофина, ауротиоглюкозы, азатиоприна, этанерцепта, тиомалата золота-натрия, гидроксихлорохина сульфата, лефлуномида,

30 сульфасалзина), миорелаксанта, наркотического лекарственного средства, нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), анальгетика, анестезирующего лекарственного средства, седативного лекарственного средства, лекарственного средства местной анестезии, нервно-мышечного блокатора,

противомикробного лекарственного средства (например, аминогликозида, противогрибкового лекарственного средства, противопаразитарного лекарственного средства, противовирусного лекарственного средства, карбапенема, цефалоспорина, фторхинолона, макролида, пенициллина, сульфонида, тетрациклина, другого

5 противомикробного лекарственного средства), противопсориатического лекарственного средства, кортикостероида, анаболического стероида, лекарственного средства для лечения сахарного диабета, минерала, диетического лекарственного средства, тиреоидного агента, витамина, гормона регуляции кальция, лекарственного средства против диареи, лекарственного средства против кашля, противорвотного

10 лекарственного средства, лекарственного средства против язвы, слабительного лекарственного средства, 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,

15 модулятора рецепторов эстрогена, мидриатика, лекарственного средства циклоплегии, алкилирующего агента, антиметаболита, ингибитора митоза, радиофармацевтического лекарственного средства, антидепрессанта, агента против мании, антипсихотического лекарственного средства, анксиолитического лекарственного средства, снотворного лекарственного средства, симпатомиметика, возбуждающего лекарственного средства,

20 донепезила, такрина, лекарственного средства для лечения астмы, бета-агониста, стероида для ингаляции, ингибитора лейкотриена, метилксантина, кромолина, адреналина или его аналога, дорназы альфа (Pulmozyme), цитокина или антагониста цитокина. Не имеющие ограничительного характера примеры таких цитокинов

25 включают, без ограничений, любой из от IL-1 до IL-23. 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.

30 [00144] Такие противораковые или противоиnфекционные средства могут также включать молекулы токсина, которые ассоциированы, связаны, объединены в один состав или вводятся совместно с по меньшей мере одним антителом настоящего изобретения. Эффект токсина может быть необязательно направлен на селективное

уничтожение патологической клетки или ткани. Патологическая клетка может представлять собой раковую клетку или другую клетку. Такие токсины могут представлять собой, без ограничений, очищенный или рекомбинантный токсин или фрагмент токсина, содержащий по меньшей мере один функциональный

5 цитотоксический домен токсина, например, выбранный из по меньшей мере одного из рицина, дифтерийного токсина, токсина яда или бактериального токсина. Термин «токсин» также включает как эндотоксины, так и экзотоксины, продуцируемые любыми естественными, мутантными или рекомбинантными бактериями или вирусами, которые могут вызывать любое патологическое состояние у человека и других млекопитающих,

10 включая токсический шок, который может приводить к летальному исходу. Такие токсины могут включать, без ограничений, энтеротоксигенный термолабильный энтеротоксин (LT) *E. coli*, термостабильный энтеротоксин (ST), цитотоксин *Shigella*, энтеротоксины *Aeromonas*, токсин-1 синдрома токсического шока (TSST-1), стафилококковый энтеротоксин А (SEA), В (SEB) или С (SEC), стрептококковые

15 энтеротоксины и т. п. Такие бактерии включают, без ограничений, штаммы видов энтеротоксигенной *E. coli* (ETEC), энтерогеморрагической *E. coli* (например, штаммы серотипа 0157:H7), виды *Staphylococcus* (например, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*), виды *Shigella* (например, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* и *Shigella sonnei*), виды *Salmonella* (например, *Salmonella typhi*, *Salmonella cholera-suis*,

20 *Salmonella enteritidis*), виды *Clostridium* (например, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*), виды *Camphlobacter* (например, *Camphlobacter jejuni*, *Camphlobacter fetus*), виды *Helicobacter*, (например, *Helicobacter pylori*), виды *Aeromonas* (например, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*), *Pleisomonas shigelloides*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* (например, *Vibrio cholerae*, *Vibrio*

25 *parahemolyticus*), *Klebsiella*, *Pseudomonasaeruginosa* и *Streptococci*. См., например, публикации Stein, ed., INTERNAL MEDICINE, 3rd ed., pp 1–13, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans et al., eds., Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 2d. Ed., pp 239–254, Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell et al, Principles and Practice of Infectious Diseases, 3d. Ed., Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow et al, eds., *The Merck Manual*, 16th edition, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Wood et al,

30 FEMS Microbiology Immunology, 76:121–134 (1991); Marrack et al, Science, 248:705–711 (1990), содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

[00145] Соединения, композиции или комбинации антител к ФНО, 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 ФНО, фрагмент или вариант, как хорошо известно специалистам в данной области или описано в настоящем документе.

[00146] Фармацевтические эксципиенты и добавки, используемые в представленной 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.

[00147] 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.

[00148] Композиции антитела к ФНО 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 трометамин или фосфата. Предпочтительными буферами для применения в настоящих композициях являются соли органических кислот, такие как цитрат.

[00149] Композиции антитела к ФНО изобретения могут дополнительно включать полимерные эксципиенты/добавки, такие как поливинилпирролидоны, фикоиллы (полимерный сахар), декстраты (например, циклодекстрины, такие как 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин), полиэтиленгликоли, ароматизаторы, противомикробные агенты, подсластители, антиоксиданты, антистатические агенты, поверхностно-активные вещества (например, полисорбаты, такие как TWEEN-20 и TWEEN-80), липиды (например, фосфолипиды, жирные кислоты), стероиды (например, холестерин) и хелатирующие агенты (например, ЭДТА).

[00150] Эти и дополнительные известные фармацевтические эксципиенты и/или добавки, приемлемые для применения в композициях антител к ФНО, их участков или вариантов в соответствии с настоящим изобретением, известны специалистам в данной области, например перечислены в публикациях Remington: The Science & Practice of Pharmacy, 19th ed., Williams & Williams, (1995) и 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.

[00151] **Составы.** Как указано выше, в изобретении обеспечены стабильные составы, которые предпочтительно представляют собой фосфатный буфер с физиологическим раствором или выбранной солью, а также консервированные растворы и составы, содержащие консервант, а также консервированные составы для многократного применения, пригодные для фармацевтического или ветеринарного применения,

содержащие по меньшей мере одно антителио к ФНО 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

5 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

10 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

15 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.

20 [00152] Как отмечено выше, в изобретении обеспечено промышленное изделие, содержащее упаковочный материал и по меньшей мере один флакон, содержащий раствор по меньшей мере одного специфического антителио к ФНО с предписанными буферами и/или консервантами, необязательно в водном разбавителе, причем

25 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 часа или дольше. Изобретение дополнительно содержит промышленное изделие, содержащее упаковочный материал, первый флакон, содержащий лиофилизированное

30 по меньшей мере одно антителио к ФНО, 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 по меньшей мере антителио к ФНО в водном разбавителе с образованием раствора, который можно хранить в течение периода в двадцать четыре часа или

дольше.

[00153] По меньшей мере одно антитело к ФНО, 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.

[00154] Диапазон количества по меньшей мере одного антитела к ФНО в продукте настоящего изобретения включает количества, которые после разведения (при использовании влажной/сухой системы) достигают концентраций от около 1,0 мкг/мл до около 1000 мг/мл, хотя меньшие и большие концентрации приемлемы и зависят от предполагаемой несущей среды для введения, например, составы раствора различаются для способов с трансдермальным пластырем, введением через легкие, через слизистые оболочки, или осмотическим способом, или с помощью микродозатора.

[00155] 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.

[00156] Предпочтительно в разбавитель можно необязательно добавлять другие эксципиенты, например изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, средства, усиливающие консервацию. Изотонические агенты, такие как глицерин, широко используют в известных концентрациях. Для улучшения контроля pH предпочтительно добавляют физиологически приемлемый буфер. Составы могут охватывать широкий диапазон pH, такой как от около pH 4 до около pH 10, с предпочтительным интервалом от около pH 5 до около pH 9 и наиболее предпочтительно от около pH 6,0 до около pH 8,0. Составы настоящего изобретения предпочтительно имеют pH от около 6,8 до около 7,8. Предпочтительные буферы включают фосфатные буферы, наиболее предпочтительно фосфат натрия, в частности фосфатно-солевой буфер (PBS).

[00157] 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 F68 (блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена) и PEG (полиэтиленгликоль), или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20 или 80, либо полксамер 184 или 188, полиолы Pluronic®, другие блок-сополимеры, и хелатирующие вещества, такие как ЭДТА и ЭГТА. Эти добавки, в частности, используют, если для введения состава применяют насос или пластиковый контейнер. Наличие фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества снижает склонность белка к агрегации.

[00158] Составы настоящего изобретения можно получать способом, включающим смешивание по меньшей мере одного антитела к ФНО 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 и тимеросала натрия, или их смесей в водном разбавителе. Смешивание по меньшей мере одного антитела к ФНО и консерванта в водном разбавителе осуществляют с помощью стандартных процедур растворения и смешивания. Например, для получения приемлемого состава соединяют отмеренное количество по меньшей мере одного антитела к ФНО в буферном растворе с необходимым консервантом в буферном растворе в количествах, достаточных для получения требуемых концентраций белка и консерванта. Варианты этого процесса понятны специалисту в данной области. Например, для оптимизации с учетом концентрации и применяемого способа введения можно изменять такие факторы, как порядок добавления компонентов, внесение дополнительных добавок, температура и рН, при которых получают состав.

[00159] Заявленные составы можно предоставлять пациентам в виде прозрачных растворов или двойных флаконов, в том числе флакона с лиофилизированным по меньшей мере одним антителом к ФНО, которое разводят содержащимися во втором флаконе водой, консервантом и/или эксципиентами, предпочтительно фосфатным буфером и/или физиологическим раствором и выбранной солью, в водном разбавителе. Либо один флакон с раствором, либо двойной флакон с составом, предполагающим смешивание, можно использовать многократно, и их достаточно для одного или

множества циклов лечения пациента, что может быть более удобным по сравнению с существующим в настоящее время режимом лечения.

[00160] Настоящие заявленные промышленные изделия используют в течение периода от немедленного введения до двадцати четырех часов или дольше.

5 Соответственно, заявленные в настоящем документе промышленные изделия обеспечивают значимые преимущества для пациентов. Составы изобретения можно необязательно 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 может быть предусмотрена этикетка, на которой
10 сказано, 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, полугод, полутора и/или двух лет.

[00161] Растворы по меньшей мере одного антитела к ФНО по изобретению можно
15 получать способом, который включает смешивание по меньшей мере одного антитела в водном разбавителе. Смешивание осуществляют с помощью стандартных процедур растворения и смешивания. Например, чтобы получить приемлемый разбавитель, отмеренное количество по меньшей мере одного антитела в воде или буфере соединяют в количествах, достаточных для получения требуемых концентраций белка и необязательно
20 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.

[00162] Заявленные продукты можно предоставлять пациентам в виде прозрачных
25 растворов или двух флаконов, в том числе флакона с по меньшей мере одним лиофилизированным антителом к ФНО, 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
30 удобным по сравнению с существующим в настоящее время режимом лечения.

[00163] Заявленные продукты можно предоставлять пациентам не напрямую, а посредством поставки в аптеки, клиники или другие такие учреждения и организации в

виде прозрачных растворов или двух флаконов, содержащих флакон с по меньшей мере одним лиофилизированным антителом к ФНО, 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.

[00164] Общепризнанные устройства, содержащие эти системы с одним флаконом, включают устройства для инъекций типа шприца-ручки, такие как BD Pens, BD Autojector[®], Humaject[®], NovoPen[®], B-D[®]Pen, AutoPen[®] и OptiPen[®], GenotropinPen[®], Genotronorm Pen[®], Humatro Pen[®], Reco-Pen[®], Roferon Pen[®], Biojector[®], Iject[®], J-tip Needle-Free Injector[®], Intraject[®], Medi-Ject[®], например, изготовленные или разработанные компаниями Becton Dickenson (Франклин Лейкс, штат Нью-Джерси, США, www.bectondickenson.com), Disetronic (Бургдорф, Швейцария, www.disetronic.com), Bioject, г. Портленд, штат Орегон, США (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (г. Питерборо, Великобритания, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp. (г. Миннеаполис, штат Миннесота, 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[®].

[00165] Изделия, заявленные в настоящем документе, могут включать 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 предусматривает инструкции для пациента по разведению по меньшей мере одного антитела к ФНО в водном разбавителе с получением раствора и по использованию раствора в течение периода 2–24 часов или дольше в случае двух флаконов — влажного/сухого, с продуктом. Для одного флакона с продуктом в виде раствора, на упаковке указывают, что такой раствор можно использовать в течение периода 2–24 часов или дольше. Заявленные в настоящем документе продукты предназначены для использования человеком в фармацевтических целях.

[00166] Составы настоящего изобретения можно получать способом, который включает смешивание по меньшей мере одного антитела к ФНО и выбранного буфера, предпочтительно фосфатного буфера, содержащего физиологический раствор или выбранную соль. Смешивание по меньшей мере одного антитела и буфера в водном разбавителе осуществляют с помощью 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.

[00167] Заявленные стабильные или консервированные составы можно предоставлять пациентам в виде прозрачных растворов или двух флаконов, в том числе флакона с по меньшей мере одним лиофилизированным антителом к ФНО, которое разводят содержащимися во втором флаконе консервантом или буфером и эксципиентами в водном разбавителе. Либо один флакон с раствором, либо двойной флакон с составом, предполагающим смешивание, можно использовать многократно, и их достаточно для одного или множества циклов лечения пациента, что может быть более удобным по сравнению с существующим в настоящее время режимом лечения.

[00168] По меньшей мере одно антитело к ФНО в стабильных или консервированных составах или растворах, описанных в настоящем документе, в соответствии с настоящим изобретением можно вводить пациенту с помощью разных способов доставки, включая п/к или в/м инъекцию; трансдермальное введение, введение в легкие, через слизистую оболочку, посредством имплантата, осмотического дозатора, кассеты, микродозатора или других способов, признанных специалистами в данной области, как хорошо известно в данной области.

[00169] **Терапевтические варианты применения.** В настоящем изобретении также предложен способ модулирования или лечения по меньшей мере одного связанного с ФНО заболевания в клетке, ткани, органе, организме животного или пациента, как известно специалистам в данной области или описано в настоящем документе, с использованием по меньшей мере одного двойного антитела к интегрину настоящего изобретения.

[00170] В настоящем изобретении также предложен способ модулирования или лечения по меньшей мере одного заболевания, связанного с ФНО, в клетке, ткани, органе, у животного или у пациента, включая, без ограничений, по меньшей мере одно из ожирения, иммунного заболевания, сердечно-сосудистого заболевания, инфекционного заболевания, злокачественного заболевания или неврологического заболевания.

[00171] В настоящем изобретении также предложен способ модулирования или лечения по меньшей мере одного связанного с иммунной системой заболевания в клетке, ткани, органе, у животного или у пациента, включая, без ограничений, по меньшей мере одно из следующих: ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит с системными проявлениями, анкилозирующий спондилит, язва желудка, серонегативные артропатии, остеоартрит, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, системная красная волчанка, антифосфолипидный синдром, иридоциклит/увеит/неврит зрительного нерва, идиопатический легочный фиброз, системный васкулит / гранулематоз Вегенера, саркоидоз, орхит / обратные процедуры вазэктомии, аллергические/атопические заболевания, астма, аллергический ринит, экзема, аллергический контактный дерматит, аллергический конъюнктивит, пневмонит с гиперчувствительностью, трансплантация, отторжение трансплантатов органов, болезнь «трансплантат против хозяина», синдром системной воспалительной реакции, синдром сепсиса, грам-положительный сепсис, грам-отрицательный сепсис, сепсис с отрицательными результатами посева, грибковый сепсис, нейтропеническая лихорадка, уросепсис, менингококкемия, травма/кровотечение, ожоги, воздействие ионизирующего облучения, острый панкреатит, синдром респираторного дистресса взрослых, алкогольный гепатит, хронические воспалительные патологические состояния, саркоидоз, болезнь Крона, серповидно-клеточная анемия, диабет, нефроз, атопические заболевания, реакции гиперчувствительности, аллергический ринит, сенная лихорадка, длительный ринит, конъюнктивит, эндометриоз, астма, крапивница, системная анафилаксия, дерматит, злокачественная анемия, гемолитическое заболевание, тромбоцитопения, отторжение трансплантата любого органа или ткани, отторжение трансплантата почки, отторжение трансплантата сердца, отторжение трансплантата печени, отторжение трансплантата поджелудочной железы, отторжение трансплантата легкого, отторжение трансплантата костного мозга (ТКМ), отторжение аллотрансплантата кожи, отторжение трансплантата хряща, отторжение трансплантата

кости, отторжение трансплантата тонкой кишки, отторжение имплантата тимуса плода, отторжение трансплантата паращитовидной железы, отторжение ксенотрансплантата любого органа или ткани, отторжение аллотрансплантата, реакции гиперчувствительности антирецепторов, болезнь Грейвса, болезнь Рейно,

5 инсулинорезистентный сахарный диабет типа В, астма, злокачественная миастения, опосредованная антителом цитотоксичность, реакции гиперчувствительности типа III, системная красная волчанка, синдром POEMS (синдром полинейропатии, органомегалии, эндокринопатии, моноклональной гаммапатии, изменения кожи), полинейропатия, органомегалия, эндокринопатия, моноклональная гаммапатия,

10 синдром изменения кожи, антифосфолипидный синдром, пузырчатка, склеродермия, смешанное заболевание соединительной ткани, идиопатическая болезнь Аддисона, сахарный диабет, хронический активный гепатит, первичный билиарный цирроз, витилиго, васкулит, синдром кардиотомии после ИМ, гиперчувствительность типа IV, контактный дерматит, пневмонит с гиперчувствительностью, отторжение

15 аллотрансплантата, гранулемы, вызванные внутриклеточными организмами, чувствительность к лекарственного средства метаболическая/ идиопатическая, болезнь Вильсона, гемахроматоз, дефицит альфа-1-антитрипсина, диабетическая ретинопатия, тиреодит Хасимото, остеопороз, первичный билиарный цирроз, тиреодит, энцефаломиелит, кахексия, муковисцидоз, хроническое заболевание легких у

20 новорожденных, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), семейный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, дерматологические состояния, псориаз, алопеция, нефротический синдром, нефрит, гломерулонефрит, острая почечная недостаточность, гемодиализ, уремия, токсичность, преэклампсия, терапия ОКТЗ, терапия антителом к CD3, терапия цитокинами, химиотерапия, лучевая терапия

25 (например, включая, без ограничений, астению, анемию, кахексию и т. п.), хроническая интоксикация салицилатами и т. п. См., например, Merck Manual, 12th–17th Editions, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., eds., Second Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000), каждая публикация полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

30 [00172] В настоящем изобретении также предложен способ модулирования или лечения по меньшей мере одного сердечно-сосудистого заболевания в клетке, ткани, органе, организме животного или пациента, включая, без ограничений, по меньшей мере одно из следующих: синдром оглушенного миокарда, инфаркт миокарда,

застойная сердечная недостаточность, инсульт, ишемический инсульт, кровоизлияние, артериосклероз, атеросклероз, рестеноз, диабетическое артериосклеротическое заболевание, гипертензия, артериальную гипертензия, реноваскулярная гипертензия, обморок, шок, сифилис сердечно-сосудистой системы, сердечная недостаточность, легочное сердце, первичная легочная гипертензия, сердечные аритмии, предсердная эктопическая активность, трепетание предсердий, фибрилляция предсердий (устойчивая или пароксизмальная), постперфузионный синдром, воспалительный ответ на искусственное кровообращение, хаотическая или многоочаговая тахикардия предсердий, регулярная тахикардия с узкими комплексами QRS, специфические аритмии, мерцание желудочков, аритмии пучка Гиса, атриовентрикулярная блокада, блокада ножки пучка Гиса, ишемические заболевания миокарда, ишемическая болезнь коронарных артерий, стенокардия, инфаркт миокарда, кардиомиопатия, дилатационная застойная кардиомиопатия, рестриктивная кардиомиопатия, заболевания клапанов сердца, эндокардит, болезнь перикарда, опухоли сердца, аневризмы аорты и периферических сосудов, расслоение аорты, воспаление аорты, окклюзия брюшной аорты и ее ветвей, болезни периферических сосудов, окклюзионные артериальные расстройства, атеросклеротические заболевания периферийных сосудов, облитерирующий тромбоангиит, функциональные расстройства периферических артерий, явление и болезнь Рейно, акроцианоз, эритромелалгия, заболевания вен, венозный тромбоз, варикозные вены, артериовенозная фистула, лимфедема, липедема, неустойчивая стенокардия, реперфузионное повреждение, постгемодиализный синдром, ишемическо-реперфузионное повреждение и т. п. Такой способ может необязательно содержать введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к ФНО, в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в таком модулировании, лечении или терапии.

[00173] Настоящее изобретение также относится к способу модулирования или лечения по меньшей мере одного инфекционного заболевания в клетке, ткани, органе, организме животного или пациента, включая, без ограничений, по меньшей мере одно из следующих заболеваний: острая или хроническая бактериальная инфекция, острые и хронические паразитарные или инфекционные процессы, включая бактериальные, вирусные и грибковые инфекции, ВИЧ-инфекцию / ВИЧ-нейропатию, менингит, гепатит (А, В или С или т. п.), септический артрит, перитонит, пневмония, эпиглоттит,

e. coli 0157:h7, гемолитический уремический синдром/тромболитическая
 тромбоцитопеническая пурпура, малярия, геморрагическая лихорадка денге,
 лейшманиоз, проказа, синдром токсического шока, стрептококковый миозит, газовая
 гангрена, микобактериальный туберкулез, внутриклеточные инфекции mycobacterium
 5 avium, пневмония, вызванная Pneumocystis carinii, воспалительное заболевание тазовых
 органов, орхит/эпидидимит, легионелла, болезнь Лайма, грипп А, вирус Эпштейна-
 Барр, вирус-ассоциированный гемафагоцитарный синдром, вирусный
 энцефалит / асептический менингит и т.п.

[00174] Настоящее изобретение также относится к способу модулирования или
 10 лечения по меньшей мере одного злокачественного заболевания в клетке, ткани,
 органе, организме животного или пациента, включая, помимо прочего, по меньшей
 мере одно из следующего: лейкоз, острый лейкоз, острый лимфобластный лейкоз
 (ОЛЛ), В-клеточный, Т-клеточный или FAB-ОЛЛ, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ),
 хронический миелоцитарный лейкоз (ХМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз
 15 (ХЛЛ), волосатоклеточный лейкоз, миелодипластический синдром (МДС), лимфома,
 болезнь Ходжкина, злокачественная лимфома, неходжкинская лимфома, лимфома
 Беркитта, множественная миелома, саркома Капоши, колоректальная карцинома,
 карцинома поджелудочной железы, карцинома носоглотки, злокачественный
 гистиоцитоз, паранеопластический синдром / гиперкальциемия злокачественной
 20 опухоли, солидные опухоли, аденокарциномы, саркомы, злокачественная меланома,
 гемангиома, метастатическое заболевание, связанная с раком резорбция костной ткани,
 связанная с раком боль в костной ткани и т. п.

[00175] В настоящем изобретении также предложен способ модулирования или
 25 лечения по меньшей мере одного неврологического заболевания в клетке, ткани,
 органе, организме животного или пациента, включая, без ограничений, по меньшей
 мере одно из: нейродегенеративных заболеваний, рассеянного склероза, мигрени,
 комплекса СПИД-деменции, демиелинизирующих заболеваний, таких как рассеянный
 склероз и острый поперечный миелит; экстрапирамидальные и мозжечковые
 расстройства, такие как поражения кортикоспинальной системы; расстройства
 30 базальных ганглиальных или мозжечковые расстройства; гиперкинетические
 двигательные расстройства, такие как хорей Хантингтона и старческая хорей;
 расстройства движений, вызванных лекарственными средствами, такие как
 расстройства, индуцированные лекарственными средствами, блокирующими

рецепторы дофамина в ЦНС; гипокинетические двигательные расстройства, такие как болезнь Паркинсона; прогрессирующий супрануклеарный парез взора; структурные поражения мозжечка; спинально-мозжечковые дегенерации, такие как спинальная атаксия, атаксия Фридерейха, дегенерация в коре мозжечка, мультисистемные дегенерации (Менсела, Дежерина — Томаса, Ши — Дрегера и Мачадо — Джозефа); системные расстройства (болезнь Рефсума, абеталипопротемиа, атаксия, телеангиэктазия и митохондриальное мультисистемное расстройство); основные демиелинизирующие расстройства, такие как рассеянный склероз, острый поперечный миелит; и расстройства мотонейронов, такие как нейрогенные мышечные атрофии (дегенерация клеток переднего рога, например амиотрофический боковой склероз, детская спинальная мышечная атрофия и юношеская спинальная мышечная атрофия); болезнь Альцгеймера; синдром Дауна в среднем возрасте; диффузная болезнь с тельцами Леви; старческая деменция с тельцами Леви; синдром Вернике — Корсакова; хронический алкоголизм; болезнь Крейцфельда — Якоба; подострый склерозирующий панэнцефалит, болезнь Галлервордена — Шпатца; и деменция боксеров, и т. п. Такой способ может необязательно включать введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к ФНО, или определенную часть или вариант, в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в таком модулировании, лечении или терапии. См., например, публикацию Merck Manual, 16th Edition, Merck & Company, Rahway, NJ (1992).

[00176] Любой способ настоящего изобретения может включать введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело к ФНО, в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в таком модулировании, лечении или терапии. Такой способ может необязательно дополнительно включать совместное введение или применение комбинированной терапии для лечения таких иммунных заболеваний или расстройств, причем введение указанного по меньшей мере одного антитела к ФНО, его определенного участка или варианта, дополнительно включает введение (перед, одновременно и/или после) по меньшей мере одного средства, выбранного из по меньшей мере одного антагониста ФНО (например, без ограничений, антитела к ФНО или его фрагмента, растворимого рецептора ФНО или его фрагмента, их гибридных белков, или низкомолекулярного антагониста ФНО), противоревматического

лекарственного средства (например, метотрексата, ауранофина, ауротиоглюкозы, азатиоприна, этанерцепта, тиомалата золота-натрия, сульфата гидроксихлорохина, лефлуномида, сульфасалзина), миорелаксанта, наркотического лекарственного средства, нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), анальгетика, 5 анестезирующего лекарственного средства, седативного лекарственного средства, лекарственного средства местной анестезии, нервно-мышечного блокатора, противомикробного лекарственного средства (например, аминогликозида, противогрибкового лекарственного средства, противопаразитарного лекарственного средства, противовирусного лекарственного средства, карбапенема, цефалоспорина, 10 фторхинолона, макролида, пенициллина, сульфонамида, тетрациклина, другого противомикробного лекарственного средства), противопсориатического лекарственного средства, кортикостероида, анаболического стероида, лекарственного средства для лечения сахарного диабета, минерала, диетического лекарственного средства, тиреоидного лекарственного средства, витамина, гормона регуляции кальция, 15 лекарственного средства против диареи, лекарственного средства против кашля, противорвотного лекарственного средства, лекарственного средства против язвы, слабительного лекарственного средства, антикоагулянта, эритропоэтина (например, эпоэтина альфа), филграстима (например, G-CSF, Neupogen), сарграмостима (GM-CSF, Leukine), иммунизации, иммуноглобулина, иммунодепрессанта (например, 20 базиликсимаба, циклоспорина, даклизумаба), гормона роста, заместительной гормональной терапии, модулятора рецепторов эстрогена, мидриатика, лекарственного средства циклоплегии, алкилирующего агента, антимаболита, ингибитора митоза, радиофармацевтического лекарственного средства, антидепрессанта, лекарственного средства против мании, антипсихотического лекарственного средства, 25 анксиолитического лекарственного средства, снотворного лекарственного средства, симпатомиметика, возбуждающего лекарственного средства, донепезила, такрина, лекарственного средства для лечения астмы, бета-агониста, стероида для ингаляции, ингибитора лейкотриена, метилксантина, кромолина, адреналина или его аналога, дорназы альфа (Pulmozyme), цитокина или антагониста цитокина. Приемлемые 30 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.

[00177] К антагонистам ФНО, приемлемым для композиций, комбинированной терапии, совместного введения, устройств и/или способов настоящего изобретения (дополнительно включающим по меньшей мере одно антитело, его указанную часть и вариант настоящего изобретения), относятся, без ограничений, антитела к ФНО, их антигенсвязывающие фрагменты и молекулы рецепторов, которые специфически связываются с ФНО; соединения, которые предотвращают и/или ингибируют синтез ФНО, высвобождение ФНО или его действие на клетки-мишени, например талидомид, тенитап, ингибиторы фосфодиэстеразы (например, пентоксифиллин и ролипрам), агонисты аденозиновых рецепторов A2b и усилители аденозиновых рецепторов A2b; соединения, которые предотвращают и/или ингибируют сигнализацию ФНО-рецептора, такие как ингибиторы митоген-активируемых киназ (МАР); соединения, которые блокируют и/или ингибируют расщепление мембранного ФНО, такие как ингибиторы металлопротеиназы; соединения, которые блокируют и/или ингибируют активность ФНО, такие как ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ) (например, каптоприл); и соединения, которые блокируют и/или ингибируют продукцию ФНО и/или синтез ФНО, такие как ингибиторы МАР-киназ.

[00178] В настоящем документе «антитело к фактору некроза опухоли», «антитело к ФНО», «антитело к ФНО α » или его фрагмент и т. п. уменьшает, блокирует, ингибирует, уничтожает или нарушает активность ФНО α в условиях *in vitro*, *in situ* и/или предпочтительно *in vivo*. Например, приемлемое человеческое антитело к ФНО настоящего изобретения может связываться с ФНО α и включает антитела к ФНО, их антигенсвязывающие фрагменты, а также их определенные мутанты или домены, которые специфически связываются с ФНО α . Приемлемое антитело к ФНО или его фрагмент также могут уменьшать, блокировать, устранять, не допускать, предотвращать и/или ингибировать синтез РНК, ДНК или белка ФНО, высвобождение ФНО, сигнализацию рецептора ФНО, расщепление мембранного ФНО, активность ФНО, продукцию и/или синтез ФНО.

[00179] Химерное антитело сA2 состоит из антигенсвязывающей вариабельной области высокоаффинного нейтрализующего мышинового антитела типа IgG1 к человеческому ФНО α , обозначенного как A2, и константных областей человеческого IgG1, каппа-иммуноглобулина. Область Fc человеческого IgG1 улучшает эффекторную функцию аллогенного антитела, увеличивает его период полувыведения из сыворотки и уменьшает иммуногенность антитела. Авидность и эпитопная специфичность

химерного антитела сА2 обусловлены вариабельной областью мышиноного антитела А2. В конкретном варианте осуществления предпочтительным источником нуклеиновых кислот, кодирующих вариабельную область мышиноного антитела А2, является гибридная клеточная линия А2.

5 [00180] Химерное антитело А2 (сА2) дозозависимым образом нейтрализует цитотоксический эффект как природного, так и рекомбинантного человеческого ФНО α . С помощью анализов связывания химерного антитела сА2 и рекомбинантного человеческого ФНО α было рассчитано, что константа аффинности химерного антитела сА2 составляет $1,04 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Предпочтительные способы определения специфичности и
10 аффинности моноклональных антител посредством конкурентного ингибирования можно найти в публикациях Harlow, *et al.*, *antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988; Colligan *et al.*, eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, New York, (1992–2000); Kozbor *et al.*, *Immunol. Today*, 4:72–79 (1983); Ausubel *et al.*, eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York (1987–2000); и Muller, *Meth. Enzymol.*, 92:589–601 (1983), содержание которых полностью включено в настоящий документ
15 путем ссылки.

[00181] В конкретном варианте осуществления мышиноное моноклональное антитело А2 продуцируется клеточной линией, обозначенной как с134А. Химерное антитело сА2
20 продуцируется клеточной линией, обозначенной с168А.

[00182] Дополнительные примеры моноклональных антител к ФНО, которые можно использовать в настоящем изобретении, описаны в данной области (см., например, патент США № 5,231,024; Möller, A. *et al.*, *Cytokine* 2(3):162–169 (1990); заявку на патент США № 07/943,852 (подана 11 сентября 1992 г.); Rathjen *et al.*,
25 Международную публикацию № WO 91/02078 (опубликована 21 февраля 1991 г.); Rubin *et al.*, патентную публикацию ЕРО № 0 218 868 (опубликована 22 апреля 1987 г.); Yone *et al.*, патентную публикацию ЕРО № 0 288 088 (26 октября 1988 г.); Liang, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 137:847–854 (1986); Meager, *et al.*, *Hybridoma* 6:305–311 (1987); Fendly *et al.*, *Hybridoma* 6:359–369 (1987); Bringman, *et al.*, *Hybridoma* 6:489–507
30 (1987); and Hirai, *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 96:57–62 (1987), содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки).

[00183] **Молекулы рецептора ФНО.** Предпочтительными молекулами рецептора ФНО, используемыми в настоящем изобретении, являются молекулы, которые связываются с ФНО α с высокой аффинностью (см. например, Feldmann *et al.*, международная патентная публикация WO 92/07076 (опубликована 30 апреля 1992 г.); Schall *et al.*, *Cell* 61:361–370 (1990); и Loetscher *et al.*, *Cell* 61:351–359 (1990), ссылки на которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки) и необязательно обладают низкой иммуногенностью. В частности, в настоящем изобретении используют находящиеся на клеточной поверхности рецепторы к ФНО массой 55 кДа (p55 ФНО-R) и массой 75 кДа (p75 ФНО-R). Усеченные формы этих рецепторов, содержащие внеклеточные домены (ECD) рецепторов или их функциональные участки (см. например, Cogogan *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 223:831–840 (1994)), также используют в настоящем изобретении. Усеченные формы рецепторов к ФНО, содержащие ECD, обнаруживают в моче и сыворотке в виде ингибирующих связывающих ФНО α , белков массой 30 кДа и 40 кДа (Engelmann, H. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265:1531–1536 (1990)).

15 Мультимерные молекулы рецептора к ФНО, гибридные молекулы иммунорецепторов к ФНО и их производные, фрагменты или участки представляют собой дополнительные примеры молекул рецептора к ФНО, используемых в способах и композициях настоящего изобретения. Молекулы рецептора к ФНО, которые можно использовать в изобретении, характеризуются своей способностью обеспечивать лечение пациентов в течение длительных периодов с хорошим или отличным облегчением симптомов и 20 низкой токсичностью. Низкая иммуногенность и/или высокая аффинность, а также другие неидентифицированные свойства могут способствовать достижению терапевтических результатов.

[00184] Мультимерные молекулы рецепторов к ФНО, используемые в настоящем изобретении, содержат ECD целиком, или функциональный участок ECD двух или более рецепторов к ФНО, связанных посредством одного или более полипептидных линкеров или других непептидных линкеров, таких как полиэтиленгликоль (PEG). Мультимерные молекулы могут дополнительно содержать сигнальный пептид секретлируемого белка для управления экспрессией мультимерной молекулы. Эти 30 мультимерные молекулы и способы их получения описаны в заявке на патент США № 08/437,533 (поданной 9 мая 1995 г.), содержимое которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

- [00185] Гибридные иммунорецепторные молекулы к ФНО, используемые в способах и композициях настоящего изобретения, содержат по меньшей мере одну часть одной или более молекул иммуноглобулина и целую молекулу или функциональный участок одного или более рецепторов к ФНО. Эти гибридные иммунорецепторные молекулы могут быть собраны в виде мономеров или гетеро- или гомомультимеров. Гибридные иммунорецепторные молекулы могут также быть одновалентными или мультивалентными. Примером такой гибридной гибридная молекула иммунорецептора к ФНО является слитный белок рецептор ФНО/IgG. Гибридные иммунорецепторные молекулы к ФНО и способы их получения описаны в данной области (Lesslauer *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 21:2883-2886 (1991); Ashkenazi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10535-10539 (1991); Peppel *et al.*, *J. Exp. Med.* 174:1483-1489 (1991); Kolls *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:215-219 (1994); Butler *et al.*, *Cytokine* 6(6):616-623 (1994); Baker *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24:2040-2048 (1994); Beutler *et al.*, патента США № 5,447,851; и заявке на патент США № 08/442,133 (поданной 16 мая 1995 года), каждая из которых полностью включена в настоящий документ путем ссылки). Способы получения гибридных иммунорецепторных молекул можно также найти в публикациях Caron *et al.*, патент США № 5,116,964; Caron *et al.*, патент США № 5,225,538; и Caron *et al.*, *Nature* 337:525-531 (1989), ссылки на которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки.
- [00186] Функциональный эквивалент, производное, фрагмент или область молекулы рецептора ФНО относится к участку молекулы рецептора ФНО или к участку последовательности молекулы рецептора ФНО, которая кодирует молекулу рецептора ФНО, и имеет достаточный размер и последовательность для функционального сходства с молекулами рецептора ФНО, которые могут быть использованы в настоящем изобретении (например, связываются с ФНО α с высокой аффинностью и обладают низкой иммуногенностью). Функциональный эквивалент молекулы рецептора к ФНО также включает модифицированные молекулы рецептора к ФНО, функционально сходные с молекулами рецептора к ФНО, которые можно использовать в настоящем изобретении (например, связываются с ФНО α с высокой аффинностью и обладают низкой иммуногенностью). Например, функциональный эквивалент молекулы рецептора к ФНО может содержать «молчащий» кодон или одну или более аминокислотных замен, делеций или добавлений (например, замена одной кислой аминокислоты на другую кислую аминокислоту; или замену одного кодона,

кодирующего ту же или другую гидрофобную аминокислоту, на другой кодон, кодирующий гидрофобную аминокислоту). См. публикацию Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, New York (1987–2000).

5 [00187] Термин «цитокины» включают любой известный цитокин. См., например, CopewithCytokines.com. Термин «антагонисты цитокинов» включают, без ограничений, любое антитело, фрагмент или миметик, любой растворимый рецептор, фрагмент или миметик, любой низкомолекулярный антагонист или любую их комбинацию.

[00188] **Терапевтические способы лечения.** Любой способ настоящего изобретения может включать способ лечения обусловленного ФНО заболевания, включающий введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей антитело к ФНО, в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в таком модулировании, лечении или терапии. Такой способ может необязательно дополнительно включать совместное введение или применение комбинированной терапии для лечения таких иммунных заболеваний или расстройств, причем введение указанного по меньшей мере одного антитела к ФНО, его 15 определенного участка или варианта, дополнительно включает введение (перед, одновременно и/или после) по меньшей мере одного средства, выбранного из по меньшей мере одного антагониста ФНО (например, без ограничений, антитела к ФНО 20 или его фрагмента, растворимого рецептора ФНО или его фрагмента, их гибридных белков, или низкомолекулярного антагониста ФНО), противоревматического лекарственного средства (например, метотрексата, ауранофина, ауротиоглюкозы, азатиоприна, этанерцепта, тиомалата золота-натрия, сульфата гидроксихлорохина, лефлуномида, сульфасалзина), миорелаксанта, наркотического лекарственного 25 средства, нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), анальгетика, анестезирующего лекарственного средства, седативного лекарственного средства, лекарственного средства местной анестезии, нервно-мышечного блокатора, противомикробного лекарственного средства (например, аминогликозида, противогрибкового лекарственного средства, противопаразитарного лекарственного средства, противовирусного лекарственного средства, карбапенема, цефалоспорина, 30 фторхинолона, макролида, пенициллина, сульфонамида, тетрациклина, другого противомикробного лекарственного средства), противопсориатического лекарственного средства, кортикостероида, анаболического стероида, лекарственного

средства для лечения сахарного диабета, минерала, диетического лекарственного средства, тиреоидного лекарственного средства, витамина, гормона регуляции кальция, лекарственного средства против диареи, лекарственного средства против кашля, противорвотного лекарственного средства, лекарственного средства против язвы,

5 слабительного лекарственного средства, антикоагулянта, эритропоэтина (например, эпоэтина альфа), филграстима (например, G-CSF, Neupogen), сарграмостима (GM-CSF, Leukine), иммунизации, иммуноглобулина, иммунодепрессанта (например, базиликсимаба, циклоспорина, даклизумаба), гормона роста, заместительной

10 гормональной терапии, модулятора рецепторов эстрогена, мидриатика, лекарственного средства циклоплегии, алкилирующего агента, антимераболита, ингибитора митоза, радиофармацевтического лекарственного средства, антидепрессанта, лекарственного средства против мании, антипсихотического лекарственного средства,

15 анксиолитического лекарственного средства, снотворного лекарственного средства, симпатомиметика, возбуждающего лекарственного средства, донепезила, такрина, лекарственного средства для лечения астмы, бета-агониста, стероида для ингаляции, ингибитора лейкотриена, метилксантина, кромолина, адреналина или его аналога, дорназы альфа (Pulmozyme), цитокина или антагониста цитокина.

[00189] Как правило, лечение патологических состояний осуществляют путем введения эффективного количества или дозы по меньшей мере одной композиции

20 антитела к ФНО, которая суммарно в среднем содержит от по меньшей мере около 0,01 до 500 миллиграммов по меньшей мере одного антитела кФНО на килограмм массы тела пациента на дозу, а предпочтительно от по меньшей мере около 0,1 до 100 миллиграммов

25 антителана килограмм массы тела пациента за одно или множество введений, в зависимости от конкретной активности, присущей композиции. В альтернативном варианте осуществления эффективная концентрация в сыворотке может составлять 0,1–

30 5000 мкг/мл сыворотки за одно или множество введений. Приемлемые дозы известны медицинским специалистам и, разумеется, зависят от конкретного болезненного состояния, удельной активности вводимой композиции и конкретного пациента, получающего лечение. В некоторых случаях для достижения требуемого терапевтического

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

[00190] Предпочтительные дозы могут необязательно включать 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и/или 100–500 мг/кг за введение, или любой интервал, значение или часть этого диапазона, либо количество для достижения в сыворотке концентрации 0,1, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5, 2,9, 3,0, 3,5, 3,9, 4,0, 4,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 20, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14,0, 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 $\mu\text{г}/\text{мл}$ сыворотки за однократное или многократное введение, или любой интервал, значение или часть этого диапазона.

[00191] 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, доза от 0,1 до 50 и предпочтительно от 0,1 до 10 миллиграммов на килограмм за одно введение или в лекарственной форме с замедленным высвобождением будет эффективной для достижения требуемых результатов.

[00192] В качестве не налагающего ограничения примера, лечение людей или животных можно проводить в виде однократного или периодического введения по меньшей мере одного антитела настоящего изобретения 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 в альтернативном или дополнительном варианте осуществления 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 в альтернативном или дополнительном варианте осуществления в по меньшей мере 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 любой их комбинации с введением однократной, инфузионной или повторных доз.

- 5 [00193] Лекарственные формы (композиция), приемлемые для внутреннего введения, обычно содержат от около 0,1 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.
- 10 [00194] Для парентерального введения антитела лекарственная форма может представлять собой раствор, суспензию, эмульсию или лиофилизированный порошок вместе с фармацевтически приемлемым носителем для парентерального введения или отдельно от носителя. Примерами таких носителей являются вода, физиологический раствор, раствор Рингера, раствор глюкозы и человеческий сывороточный альбумин 1–
15 10%. Кроме того, можно применять липосомы и безводные среды, например нелетучие масла. Носитель или лиофилизированный порошок может содержать добавки, способствующие изотоничности (например, хлорид натрия, маннит) и химической стабильности (например, буферы и консерванты). Состав стерилизуют известными или приемлемыми методиками.
- 20 [00195] Приемлемые фармацевтические носители описаны в последнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, которое является стандартным источником ссылок в данной области.
- [00196] **Альтернативные способы введения.** В соответствии с настоящим изобретением для введения фармацевтически эффективных количеств по меньшей мере
25 одного антитела к ФНО настоящего изобретения можно применять множество известных и разработанных способов ведения. Далее описано введение через легкие, однако в соответствии с настоящим изобретением можно также применять другие способы введения, дающие приемлемые результаты.
- [00197] Антитела к ФНО настоящего изобретения можно доставлять в носителе в
30 виде раствора, эмульсии, коллоида или суспензии, либо в виде сухого порошка с применением любого из множества устройств и способов, приемлемых для введения

путем ингаляции или другими способами, описанными в настоящем документе или известными специалистам в данной области.

[00198] **Парентеральные составы и введение.** Составы для парентерального введения могут в качестве обычных эксципиентов содержать стерильную воду, физиологический раствор, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения, гидрогенизированные нафталины и т. п. Водные или масляные суспензии для инъекций можно получать с использованием подходящего эмульгатора или увлажнителя и суспендирующего агента известными способами. Для инъекций можно использовать нетоксичный, пригодный для неперорального введения, разбавляющий агент, например водный раствор, или 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.

[00199] **Альтернативные способы доставки.** Изобретение дополнительно относится к введению по меньшей мере одного антителя к ФНО путем парентерального, подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутрисуставного, внутрибронхиального, внутрибрюшинного, интракапсулярного, внутрихрящевого, внутриполостного, интрацелиального, внутримозжечкового, внутрижелудочкового, в толстую кишку, интрацервикального, внутрижелудочного, внутripеченочного, интрамиокардиального, внутрикостного, внутритазового, интраперикардиального, внутрибрюшинного, интраплеврального, в предстательную железу, внутрилегочного, интраректального, интраренального, интраретинального, интраспинального, интрасиновиального, внутригрудного, внутриматочного, внутрипузырного, болюсного, вагинального, ректального, буккального, подъязычного, интраназального или чрескожного введения. Композицию по меньшей мере одного антителя к ФНО можно

готовить 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. 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 окислителями, 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).

[00200] **Легочное/назальное введение.** При введении через легкие предпочтительно по меньшей мере одну композицию антитела к ФНО доставляют в виде частиц, размер которых эффективно достигает нижних дыхательных путей легких или пазух. В соответствии с изобретением по меньшей мере одно антитело к ФНО может быть доставлено с помощью любого из множества ингаляционных или назальных устройств, известных специалистам и предназначенных для введения терапевтического агента ингаляцией. Такие устройства, предназначенные для нанесения аэрозольных препаратов в полость пазухи или альвеол пациента, включают ингаляторы отмеренных доз, небулайзеры, генераторы сухого порошка, распылители и т. п. В данной области также известны другие устройства, приемлемые для направленного легочного или назального введения антител. Во всех таких устройствах можно использовать составы, приемлемые для введения антитела в виде аэрозоля. Такие аэрозоли могут содержать либо растворы (как водный, так и неводный), либо

твердые частицы. Ингаляторы отмеренных доз, такие как Ventolin[®], как правило, используют газ-пропеллент и требуют приведения в действие во время вдоха (см., например, WO 94/16970, WO 98/35888). Сухие порошковые ингаляторы, такие как Turbuhaler[™] (Astra), Rotahaler[®] (Glaxo), Diskus[®] (Glaxo), ингалятор Spiros[™] (Dura),
5 устройства, продаваемые компанией Inhale Therapeutics, и порошковый ингалятор Spinhaler[®] (Fisons), используют технологию активации смешанного порошка дыханием (US 4668218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, US 5458135 Inhale, WO 94/06498 Fisons, которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки). Небулайзеры, такие как AERx[™] Aradigm, небулайзер
10 Ultravent[®] (Mallinckrodt) и небулайзер Acorn II[®] (Marquest Medical Products) (US 5404871 Aradigm, WO 97/22376), которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки, обеспечивают аэрозоли из растворов, тогда как ингаляторы отмеренных доз, сухие порошковые ингаляторы и т. п. образуют аэрозоли с мелкими частицами. Эти имеющиеся в продаже ингаляционные устройства приведены в
15 качестве примеров конкретных устройств, пригодных для применения настоящего изобретения, и не ограничивают объем изобретения. Предпочтительно доставлять композицию, содержащую по меньшей мере одно антитело к ФНО, с помощью ингалятора сухого порошка или распылителя. Ингаляционное устройство для введения по меньшей мере одного антитела настоящего изобретения имеет несколько
20 желательных признаков. Например, преимуществом является надежность, воспроизводимость и точность доставки ингаляционным устройством. Ингаляционное устройство может необязательно доставлять небольшие сухие частицы, например менее приблизительно 10 мкм, предпочтительно приблизительно 1–5 мкм, для обеспечения хорошей пригодности для вдыхания.

25 [00201] **Введение композиций антител к ФНО в виде спрея.** Спрей, включающий белок композиции антител к ФНО, может быть получен путем пропускания суспензии или раствора по меньшей мере одного антитела к ФНО через сопло под давлением. Размер и конфигурация сопла, применяемое давление и скорость подачи жидкости могут быть выбраны таким образом, чтобы достичь требуемого
30 выхода и размера частиц. Например, электрораспыление можно производить с помощью электрического поля в комбинации с подачей через капилляр или сопло. Преимуществом является то, что частицы по меньшей мере одного белка композиции антитела к ФНО, доставляемые распылителем, имеют размер частиц менее около

10 мкм, предпочтительно в диапазоне от около 1 мкм до около 5 мкм и наиболее предпочтительно от около 2 мкм до около 3 мкм.

[00202] Составы с по меньшей мере одним белком композиции антитела к ФНО, приемлемые для применения с распылителем, как правило, включают белок композиции антител в водном растворе в концентрации от около 0,1 мг до около 100 мг по меньшей мере одного белка композиции антител к ФНО на мл раствора или мг/г, или в любом интервале или значении в нем, например, без ограничений, 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, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/мл, или мг/г. Препарат может включать такие агенты, как эксципиент, буфер, изотонический агент, консервант, поверхностно-активное вещество и предпочтительно цинк. Состав может также включать эксципиент или агент для стабилизации белка композиции антител, такой как буфер, восстанавливающий агент, белок-наполнитель или углевод. К белкам-наполнителям, используемым для получения композиций антител, относятся альбумин, протамин или т. п. К типичным углеводам, используемым для получения белков композиций антител, относятся сахароза, маннит, лактоза, трегалоза, глюкоза или т. п. Состав с белком композиции антител может также включать поверхностно-активное вещество, которое может уменьшать или предотвращать индуцированную на поверхности агрегацию белка композиции антител, вызванную распылением раствора с распылением аэрозоля. Можно использовать различные традиционные поверхностно-активные вещества, такие как полиоксиэтиленовые эфиры жирных кислот и спирты, и полиоксиэтиленсорбитановые эфиры жирных кислот. Количества, как правило, будут лежать в диапазоне от 0,001 до 14% от массы состава. Наиболее предпочтительными поверхностно-активными веществами для целей настоящего изобретения являются полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат, полисорбат 80, полисорбат 20 или т. п. В состав могут также быть включены известные в данной области дополнительные агенты, предназначенные для получения белка, такого как антитела к ФНО, или их указанные участки или варианты.

[00203] **Введение композиций антител к ФНО с помощью небулайзера.** Белок композиции антител можно вводить с помощью небулайзера, такого как струйный небулайзер или ультразвуковой небулайзер. Как правило, в струйном небулайзере для создания высокоскоростной струи воздуха через отверстие используют источник сжатого воздуха. По мере расширения газа за соплом образуется область низкого давления, под действием которой раствор белка, содержащего композицию антител,

засасывается через капиллярную трубку, соединенную с резервуаром с жидкостью. На выходе из капиллярной трубки поток жидкости разделяется на нестабильные волокна и капли и образуют аэрозоль. Для получения требуемых рабочих характеристик данного струйного небулайзера можно использовать диапазон конфигураций, скоростей потока и типов дефлекторов. В ультразвуковом небулайзере высокочастотная электрическая энергия преобразуется в вибрационную механическую энергию, обычно при помощи пьезоэлектрического преобразователя. Эта энергия подается на состав белка композиции антител либо напрямую, либо через связующую жидкость, в результате чего образуется аэрозоль, содержащий белок композиции антител. Преимуществом является то, что частицы композиции антитела к ФНО, доставляемые небулайзером, имеют размер частиц менее около 10 мкм, предпочтительно в диапазоне от около 1 мкм до около 5 мкм и наиболее предпочтительно от около 2 мкм до около 3 мкм.

[00204] Составы с по меньшей мере одним антителом к ФНО, приемлемые для использования с небулайзером, струйным или ультразвуковым, как правило, имеют концентрацию от около 0,1 мг до около 100 мг по меньшей мере одного белка антител к ФНО на миллилитр раствора. Препарат может включать такие агенты, как эксципиент, буфер, изотонический агент, консервант, поверхностно-активное вещество и предпочтительно цинк. Состав может также включать эксципиент или агент для стабилизации по меньшей мере одного белка композиции антитела к ФНО, такой как буфер, восстанавливающий агент, белок-наполнитель или углевод. К белкам-наполнителям, используемым для получения по меньшей мере одного белка композиции антитела к ФНО, относятся альбумин, протамин или т. п. К типичным углеводам, используемым для получения по меньшей мере одного антитела к ФНО, относятся сахароза, маннит, лактоза, трегалоза, глюкоза или т. п. Состав с по меньшей мере одним антителом к ФНО может также включать поверхностно-активное вещество, которое может уменьшать или предотвращать индуцированную на поверхности агрегацию по меньшей мере одного антитела к ФНО, вызванную атомизацией раствора с образованием аэрозоля. Можно использовать различные традиционные поверхностно-активные вещества, такие как полиоксиэтиленовые эфиры жирных кислот и спирты, и полиоксиэтиленсорбитановые эфиры жирных кислот. Количества, как правило, будут лежать в диапазоне от 0,001 до 4% от массы состава. Наиболее предпочтительными поверхностно-активными веществами для целей настоящего изобретения являются полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат, полисорбат 80, полисорбат

20 или т. п. В препарат белка, такого как белок антитела, могут также быть включены известные специалистам в данной области дополнительные агенты.

[00205] **Введение композиций антител к ФНО с помощью ингалятора**

5 **отмеренных доз.** В ингаляторе отмеренных доз (MDI) пропеллент, по меньшей мере одно антитело к ФНО и любые эксципиенты или другие добавки содержатся в резервуаре в виде смеси, содержащей сжиженный сжатый газ. Приведение в действие дозирующего клапана высвобождает смесь в виде аэрозоля, предпочтительно с частицами размером менее около 10 мкм, предпочтительно от около 1 мкм до около 5 мкм и наиболее предпочтительно от около 2 мкм до около 3 мкм. Требуемый размер частиц аэрозоля можно получить с
10 использованием состава белка композиции антитела, полученного различными способами, известными специалистам в данной области, включая помол в струйной мельнице, распылительную сушку, конденсацию при критической температуре или т. п. Предпочтительные ингаляторы отмеренных доз включают ингаляторы с использованием пропеллента гидрофторуглерода, производимые компаниями 3М или Glaxo.

15 [00206] Составы с по меньшей мере одним антителом к ФНО для применения в ингаляторе отмеренных доз обычно включают мелкодисперсный порошок, содержащий по меньшей мере одно антитело к ФНО в виде суспензии в неводной среде, например суспензии в пропелленте, полученной с помощью поверхностно-активного вещества. Пропеллент может представлять собой любой традиционно используемый для этой
20 цели материал, такой как хлорфторуглерод, гидрохлорфторуглерод, гидрофторуглерод или углеводород, в том числе трихлорфторметан, дихлордифторметан, тетрафтордихлорэтанол и 1,1,1,2-тетрафторэтан, HFA-134 а (гидрофторалкан-134а), HFA-227 (гидрофторалкан-227) или т. п. Пропеллент предпочтительно представляет собой гидрофторуглерод. Поверхностно-активное вещество может быть выбрано для
25 стабилизации по меньшей мере одного антитела к ФНО в виде суспензии в пропелленте для защиты активного агента от химического разложения и т. п. Приемлемые поверхностно-активные вещества включают сорбитантриолеат, соевый лецитин, олеиновую кислоту или т. п. В некоторых случаях предпочтительными являются аэрозоли растворов, в которых используют растворители, такие как этанол. В
30 состав также могут быть включены известные специалистам в данной области дополнительные агенты, применяемые для получения препаратов белка.

[00207] Специалисту в данной области будет понятно, что способы настоящего изобретения могут быть достигнуты путем введения через легкие по меньшей мере

одной композиции антитела к ФНО через устройства, не описанные в настоящем документе.

[00208] **Пероральные составы и способ введения.** Препараты для перорального применения основаны на одновременном введении вспомогательных веществ (например, резорцинов и неионных поверхностно-активных веществ, таких как полиоксиэтиленолеиловый эфир и н-гексадецилполиэтиленовый эфир) для искусственного увеличения проницаемости стенок кишечника, а также на одновременном введении ингибиторов ферментов (например, ингибиторов трипсина поджелудочной железы, диизопропилфторфосфата (DFF) и тразилола) для ингибирования ферментативного расщепления. Активное составляющее твердой лекарственной формы для перорального введения можно смешивать с по меньшей мере одной добавкой, включая сахарозу, лактозу, целлюлозу, маннит, трегалозу, рафинозу, мальтит, декстран, крахмалы, агар, аргинаты, хитины, хитозаны, пектины, трагакантовую камедь, гуммиарабик, желатин, коллаген, казеин, альбумин, синтетический или полусинтетический полимер и глицерид. Эти лекарственные формы могут также содержать добавки другого (-их) типа (-ов), например неактивный разбавитель, смазывающее вещество, такое как стеарат магния, парабен, консервант, такой как сорбиновая кислота, аскорбиновая кислота, α -токоферол, антиоксидант, такой как цистеин, дезинтегратор, связующее вещество, загуститель, буферный агент, подсластитель, ароматизатор, отдушка и т. п.

[00209] Таблетки и пилюли можно дополнительно обрабатывать с получением препаратов с кишечнорастворимым покрытием. Жидкие препараты для перорального введения включают эмульсию, сироп, эликсир, суспензию и раствор, подходящие для медицинского применения. Эти препараты могут содержать неактивные разбавители, обычно используемые в указанной области техники, например воду. В качестве систем доставки инсулина и гепарина также описаны липосомы (патент США № 4,239,754). В последнее время для доставки фармацевтических препаратов используют микросферы из искусственных полимеров смешанных аминокислот (протеиноидов) (патент США № 4,925,673). Кроме того, в данной области известны соединения-носители, описанные в патенте США № 5,879,681 и патенте США № 5,5,871,753, и используемые для перорального введения биологически активных веществ.

[00210] **Составы и способ введения через слизистую.** Для абсорбции через слизистые оболочки композиции и способы введения по меньшей мере одного антитела к ФНО включают эмульсию, содержащую множество субмикронных частиц,

мукоадгезивную макромолекулу, биоактивный пептид и непрерывную водную фазу, которая способствует абсорбции через слизистые оболочки за счет достижения адгезии частиц эмульсии к слизистой оболочке (патент США № 5,514,670). Способы введения через слизистые оболочки, приемлемые для введения эмульсий настоящего изобретения, могут включать роговичный, конъюнктивальный, буккальный, 5 сублингвальный, назальный, вагинальный, легочный, желудочный, кишечный и ректальный способы введения. Составы для вагинального или ректального введения, например суппозитории, в качестве эксципиентов могут содержать, например, полиалкиленгликоли, вазелин, масло какао и т. п. Составы для интраназального 10 введения могут быть твердыми и содержать в качестве эксципиентов, например, лактозу, или могут представлять собой водные или масляные растворы для закапывания в нос. К эксципиентам для буккального введения относятся сахара, стеарат кальция, стеарат магния, прежелатинизированный крахмал и т. п. (патент США № 5,849,695).

15 [00211] **Чрескожные составы и способ введения.** Для чрескожного введения по меньшей мере одно антители к ФНО инкапсулируют в устройство доставки, такое как липосомы или полимерные наночастицы, микрочастицы, микрокапсулы или микросферы (в совокупности называемые микрочастицами, если не указано иное). Известен ряд приемлемых устройств, в том числе микрочастицы, изготовленные из синтетических 20 полимеров, таких как полигидроксикислоты, такие как полимолочная кислота, полигликолевая кислота и их сополимеры, полиортоэферы, полиангидриды, полифосфазены, и натуральные полимеры, такие как коллаген, полиаминокислоты, альбумин и другие белки, альгинат и другие полисахариды и их комбинации (патент США № 5,814,599).

25 [00212] **Пролонгированное введение и составы.** Иногда может потребоваться доставка соединения настоящего изобретения субъекту в течение длительных периодов времени, например в течение периодов от одной недели до одного года, путем однократного введения. Можно использовать различные лекарственные формы с медленным высвобождением, депо или имплантаты. Например, лекарственная форма 30 может содержать фармацевтически приемлемую нетоксичную соль соединений, которая имеет низкую степень растворимости в физиологических жидкостях, например (а) соль присоединения кислоты с многоосновной кислотой, такой как фосфорная кислота, серная кислота, лимонная кислота, винная кислота, дубильная кислота, памоевая кислота,

альгиновая кислота, полиглутаминовая кислота, нафталинмоно-или дисульфоновая кислота, полигалактуроновая кислота и т. п.; (b) соль многовалентного катиона металла, например цинка, кальция, висмута, бария, магния, алюминия, меди, кобальта, никеля, кадмия и т. п., или с органическим катионом, образованным из, например, N,N'-

5 дибензилэтилендиамином или этилендиамином; или (c) комбинации (a) и (b), например соль таннат цинка. Кроме того, соединения настоящего изобретения или

предпочтительно относительно нерастворимая соль, такая как описанные выше, могут

10 быть получены в виде геля, например геля моностеарата алюминия с, например, кунжутным маслом, приемлемого для инъекций. Особенно предпочтительными солями являются соли цинка, соли танната цинка, соли памоата цинка и т. п. Другой тип

депонирующего состава с замедленным высвобождением для инъекций будет содержать

соединение или соль, диспергированные для инкапсулирования в медленно

разлагающемся нетоксичном неантигенном полимере, таком как полимер полимолочная

кислота / полигликолевая кислота, например, как описано в патенте США № 3,773,919.

15 Соединения или предпочтительно относительно нерастворимые соли, такие как описанные выше, можно также готовить в виде пеллет из силастика с холестериновым матриксом, в частности, для применения у животных. В литературе также известны

другие препараты для медленного высвобождения, депонирования или имплантации,

20 например газовые или жидкие липосомы (патент США №5,770,222 и публикация «Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems», J. R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1978).

[00213] Приведенное выше описание изобретения по существу дополнительно разъясняется далее с помощью примеров, которые представлены в качестве иллюстрации и не являются ограничивающими.

25 **Пример 1. Клонирование и экспрессия антитела к ФНО в клетках млекопитающих.**

[00214] Типичный экспрессионный вектор млекопитающих содержит по меньшей мере один промоторный элемент, опосредующий инициацию транскрипции мРНК, последовательность, кодирующую антитело, и сигналы, необходимые для терминации

30 транскрипции и полиаденилирования транскрипта. К дополнительным элементам относятся энхансеры, последовательности Козака и интроны, фланкированные донорным и акцепторным сайтами для сплайсинга РНК. Высокоэффективной транскрипции можно достигать с помощью ранних и поздних промоторов из SV40, длинных концевых повторов

(LTR) из ретровирусов, например RSV, HTLV1, HIV1, и раннего промотора цитомегаловируса (CMV). Однако можно также использовать элементы клеток (например, промотор актина человека). Приемлемые экспрессионные векторы для применения на практике настоящего изобретения включают, например, такие векторы, как pIRES1neo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN или pLNCX (Clontech Labs, г. Пало-Альто, штат Калифорния, США), pcDNA3.1 (+/-), pcDNA/Zeo (+/-) или pcDNA3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), PSVL и PMSG (Pharmacia, г. Уппсала, Швеция), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) и pBC12MI (ATCC 67109). Клетки-хозяева млекопитающих, которые можно применять, включают клетки человека Hela 293, H9 и клетки Jurkat, мышинные клетки NIH3T3 и C127, Cos 1, Cos 7 и CV 1, клетки перепела QC1-3, мышинные L-клетки и клетки яичника китайского хомячка (CHO).

[00215] В альтернативном варианте осуществления ген можно экспрессировать в стабильных клеточных линиях, содержащих ген, интегрированный в хромосому. Котрансфекция с селективным маркером, таким как dhfr, gpt, неомицин или гигромицин, допускает идентификацию и выделение трансфицированных клеток.

[00216] Трансфицированный ген можно также амплифицировать для экспрессии больших количеств кодированного антитела. Маркер DHFR (дигидрофолатредуктаза) используют для развития клеточных линий, несущих несколько сотен или даже несколько тысяч копий интересующего гена. Другим используемым селективным маркером является фермент глутаминсинтаза (GS) (Murphy, et al., Biochem. J. 227: 277–279 (1991); Bebbington, et al., Bio/Technology 10: 169–175 (1992)). С использованием таких маркеров клетки млекопитающих выращивают в селективной среде и отбирают клетки с наивысшей устойчивостью. Такие клеточные линии содержат амплифицированный (-ые) ген (-ы), интегрированный (-ые) в хромосому. Для продуцирования антител часто используют клетки яичника китайского хомячка (CHO) и клетки NSO.

[00217] Экспрессионные векторы pC1 и pC4 содержат сильный промотор (LTR) вируса саркомы Рауса (Cullen, et al., Molec. Cell. Biol. 5: 438–447 (1985)) с фрагментом энхансера CMV (Boshart, et al., Cell 41: 521–530 (1985)). Сайты множественного клонирования, например сайты расщепления рестриктазами BamHI, XbaI и Asp718, облегчают клонирование интересующего гена. Кроме 3'-интрона векторы содержат сигнал полиаденилирования и сигнал терминации гена препроинсулина крысы.

[00218] **Клонирование и экспрессия в клетках СНО.** Для экспрессии антитела к ФНО используют вектор рС4. Плазмида рС4 является производным плазмиды рSV2-dhfr (каталожный номер ATCC 37146). Плазмида содержит мышинный ген DHFR под контролем раннего промотора SV40. Клетки яичника или другие клетки китайского хомячка, не имеющие дигидрофолатной активности, трансфицированные указанными плазмидами, можно отбирать, выращивая клетки в селективной среде (например, альфа минус MEM, Life Technologies, г. Гайтерсбург, штат Мэриленд, США) с добавлением химиотерапевтического препарата метотрексата. Амплификация генов DHFR в клетках, устойчивых к метотрексату (MTX), хорошо описана раньше (см., например, F. W. Alt, et al., *J. Biol. Chem.* 253:1357-1370 (1978); J. L. Hamlin and C. Ma, *Biochem. et Biophys. Acta* 1097: 107–143 (1990); M. J. Page and M. A. Sydenham, *Biotechnology* 9: 64–68 (1991)). В клетках, выращенных при возрастающих концентрациях MTX, развивается устойчивость к этому лекарственному средству путем чрезмерного продуцирования фермента-мишени, DHFR, в результате амплификации гена DHFR. Если к гену DHFR присоединить второй ген, как правило, происходит его коамплификация и сверхэкспрессия. Специалистам в данной области известно, что такой подход можно использовать для разработки клеточных линий, несущих более 1000 копий амплифицированного (-ых) гена (-ов). Затем, когда метотрексат отменяют, получают клеточные линии, содержащие амплифицированный ген, интегрированный в одну или более хромосом клетки-хозяина.

[00219] Плазмида рС4 содержит для экспрессии интересующего гена сильный промотор длинного концевго повтора (LTR) вируса саркомы Рауса (Cullen, et al., *Molec. Cell. Biol.* 5:438–447 (1985)) плюс фрагмент, выделенный из энхансера немедленно раннего гена цитомегаловируса человека (CMV) (Boshart, et al., *Cell* 41:521–530 (1985)). После промотора расположены сайты расщепления рестрикционных ферментов BamHI, XbaI и Asp718, которые позволяют интегрировать гены. Позади этих сайтов клонирования плазмида содержит 3'-интрон и сайт полиаденилирования гена препроинсулина крысы. Для экспрессии можно также использовать другие высокоэффективные промоторы, например промотор бета-актина человека, ранние или поздние промоторы SV40 или длинные концевые повторы других ретровирусов, например ВИЧ и HTLV. Системы экспрессии генов Tet-Off и Tet-On от компании Clontech и подобные системы можно использовать для регулируемой экспрессии ФНО в клетках млекопитающих (M. Gossen, and H. Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551 (1992)). Для полиаденилирования

мРНК можно также использовать другие сигналы, например, из гормона роста человека или генов глобинов. Стабильные клеточные линии, несущие интересующий ген, интегрированный в хромосомы, можно также отбирать после котрансфекции с селективным маркером, таким как *gpt*, G418 или гигромицин. Преимуществом является применение сначала более одного селективного маркера, например G418 плюс метотрексат.

5 [00220] Плазмиду pC4 расщепляют рестриктазами и впоследствии дефосфорилируют с использованием кишечной фосфатазы телят в ходе процедур, известных специалистам в данной области. Затем выделяют вектор из 1% агарозного геля.

10 [00221] Впоследствии ДНК, кодирующую выделенные вариабельную и константную области, и дефосфорилированный вектор лигируют с помощью ДНК-лигазы T4. Затем трансформируют клетки *E. coli* HB101 или XL-1 Blue, и идентифицируют бактерии, содержащие фрагмент, встроенный в плазмиду pC4, с помощью, например, анализа рестрикционным ферментом.

15 [00222] Для трансфекции используют клетки яичника китайского хомячка (CHO), лишенные активности гена DHFR. Экспрессионную плазмиду pC4 (5 μ г) котранфицируют с 0,5 μ г плазмиды pSV2-нео с помощью липофектина. Плазида pSV2-нео содержит доминантный селективный маркер, ген нео из Tn5, который кодирует фермент, придающий устойчивость к группе антибиотиков, включая G418. Клетки высевают в среду альфа минус MEM с добавлением 1 μ г/мл G418. Через 2 дня клетки обрабатывают трипсином и высевают в планшеты для клонирования гибридом (Greiner, Германия) в среде альфа минус MEM с добавлением 10, 25 или 50 нг/мл метотрексата и 1 μ г/мл G418. Через около 10–14 дней отдельные клоны обрабатывают трипсином и впоследствии высевают в 6-луночные чашки Петри или 10-мл флаконы с добавлением различных концентраций метотрексата (50 нМ, 100 нМ, 200 нМ, 400 нМ, 800 нМ). Затем клоны, растущие при самых высоких концентрациях метотрексата, переносят в новые 6-луночные планшеты, содержащие еще более высокие концентрации метотрексата (1 мМ, 2 мМ, 5 мМ, 10 мМ, 20 мМ). Такую же процедуру повторяют до тех пор, пока не получают клоны, растущие при концентрации 100–200 мМ. Экспрессию требуемого генного продукта анализируют, например, методом электрофореза белков в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) и вестерн-блоттинга, или методом анализа ВЭЖХ с обращенной фазой.

20

25

30

Пример 2. Создание высокоаффинных человеческих моноклональных антител IgG, реагирующих с человеческим ФНО, с использованием трансгенных мышей

[00223] **Сводная информация.** Использовали трансгенных мышей, имеющих гены человеческих тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов для получения

5 высокоаффинных полностью человеческих моноклональных антител, которые можно использовать в терапевтических целях для ингибирования действия ФНО и соответственно лечения одного или более ФНО-опосредованных заболеваний.

Гибридных мышей (СВА/J x C57/BL6/J) F₂, имеющих трансгены человеческих

10 переменного и константного участков антител как тяжелой, так и легкой цепей, иммунизируют человеческим рекомбинантным ФНО (Taylor et al., Intl. Immunol. 6:579-591 (1993); Lonberg, et al., Nature 368:856–859 (1994); Neuberger, M., Nature Biotech. 14:826 (1996); Fishwild, et al., Nature Biotechnology 14:845–851 (1996)).

Посредством нескольких слияний удалось получить одну или более панелей полностью

15 человеческих реактивных в отношении ФНО моноклональных антител IgG. Полностью человеческие антитела к ФНО были дополнительно охарактеризованы. Все они относятся к типу IgG1к. Обнаружено, что такие антитела имеют константы аффинности в диапазоне от 1×10^9 до 9×10^{12} . Благодаря неожиданно высоким аффинностям эти полностью человеческие моноклональные антитела оказываются приемлемыми кандидатами для терапевтического применения при заболеваниях, патологиях или

20 расстройствах, связанных с ФНО.

[00224] **Сокращения.** BSA — бычий сывороточный альбумин; CO₂ — диоксид углерода; DMSO — диметилсульфоксид; EIA — иммуноферментный анализ; FBS — эмбриональная бычья сыворотка; H₂O₂ — перекись водорода; HRP — пероксидаза хрена; в/д — внутридермально; Ig — иммуноглобулин; ФНО — фактор некроза

25 опухоли альфа; в/б — внутрибрюшинно; в/в — внутривенно; Мат или МАт — моноклональное антитело; OD — оптическая плотность; OPD — дигидрохлорид о-фенилендиамина; PEG — полиэтиленгликоль; PSA — пенициллин, стрептомицин, амфотерицин; КТ — комнатная температура; п/к — подкожно; об./об. — объем на объем; масс./об. — масса на объем.

30 **Материалы и методы**

[00225] **Животные.** Трансгенные мыши, способные экспрессировать человеческие антитела, известны специалистам в данной области (и предлагаются к продаже,

например, компанией GenPharm International, г. Сан-Хосе, штат Калифорния, США; Abgenix, Фримонт, штат Калифорния, США и т. д.), и они экспрессируют человеческие иммуноглобулины, а не мышиный IgM или Igk. Например, такие трансгенные мыши содержат трансгены человеческой последовательности, которые подвергают соединению $V(D)J$, переключению класса тяжелых цепей и соматической мутации для создания набора иммуноглобулинов человеческой последовательности (Lonberg, et al., Nature 368:856–859 (1994)). Трансген легкой цепи может быть получен, например, частично из клона искусственной хромосомы дрожжей, включающего почти половину $V\kappa$ -участка человеческой зародышевой линии. Кроме того, трансген тяжелой цепи может кодировать человеческие константные области μ и $\gamma 1$ (Fishwild, et al., Nature Biotechnology 14:845–851 (1996)) и/или $\gamma 3$. Мышей, полученных из соответствующих генотипических линий, можно использовать в процессах иммунизации и слияния для создания полностью человеческих моноклональных антител к ФНО.

[00226] **Иммунизация.** Для создания человеческих гибридом к ФНО можно использовать одну или более схем иммунизации. Первые несколько слияний можно выполнять по приведенному ниже примеру протокола иммунизации, но можно использовать и другие аналогичные известные протоколы. Несколько самок и/или хирургически кастрированных трансгенных самцов мышей возрасте 14–20 недель иммунизируют в/б или в/д, используя 1–1000 мкг рекомбинантного человеческого ФНО, эмульгированного с равным объемом TITERMAX, или полным адъювантом Фрейнда в конечном объеме 100–400 мкл (например, 200). Каждой мыши могут также необязательно давать 1–10 мкг в 100 мкл физиологического раствора в каждый из 2 участков п/к введения. Впоследствии мышей можно иммунизировать через 1–7, 5–12, 10–18, 17–25 и/или 21–34 дней в/б (1–400 мкг) и п/к (1–400 мкг x 2) ФНО, эмульгированным с равным объемом TITERMAX или неполным адъювантом Фрейнда. Через 12–25 и 25–40 дней у мышей вызывали кровотечение путем ретроорбитальной пункции без антикоагулянта. Впоследствии крови дают свернуться при КТ в течение одного часа, собирают сыворотку и титруют с помощью EIA-анализа на ФНО в соответствии с известными способами. Слияния выполняют, когда повторные инъекции не вызывают увеличения титра. В это время мышам путем в/в введения можно вводить бустерную инъекцию 1–400 мкг ФНО, разведенного в 100 мкл физиологического раствора. Через три дня мышей можно умерщвлять посредством смещения шейных позвонков, извлекать селезенки в асептических условиях и

погружать их в 10 мл холодного фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В (PSA). Спленоциты собирают путем стерильной перфузии селезенки при помощи PSA-PBS. Клетки однократно промывают в холодном PSA-PBS, подсчитывают с использованием вытеснения трипанового синего и ресуспендируют в среде RPMI 1640, содержащей 25 мМ Hepes.

[00227] **Слияние клеток.** Слияние можно проводить при соотношении 1:1 к 1:10 клеток мышинной миеломы и жизнеспособных клеток селезенки в соответствии, например, с известными специалистами способами. В качестве не имеющего ограничительного характера примера клетки селезенки и клетки миеломы можно совместно гранулировать. Впоследствии осадок можно медленно ресуспендировать в течение более 30 секунд в 1 мл раствора PEG/PBS с концентрацией 50% (мас/об) (PEG с молекулярной массой 1450, Sigma) при температуре 37 °С. Затем слияние можно останавливать путем медленного добавления 10,5 мл среды RPMI 1640, содержащей 25 мМ Hepes (37 °С) в течение 1 минуты. Слитые клетки центрифугируют в течение 5 минут при 500–1500 об/мин. Впоследствии клетки ресуспендировали в среде НАТ (среда RPMI 1640, содержащая 25 мМ Hepes, 10% сыворотки Fetal Clone I (Hyclone), 1 мМ пирувата натрия, 4 мМ L-глутамин, 10 мкг/мл гентамицин, 2,5% культуральной добавки Origen (Fisher), 10% 653-кондиционированной среды RPMI 1640 / Hepes, 50 мкМ 2-меркаптоэтанола, 100 мкМ гипоксантина, 0,4 мкМ аминокперина и 16 мкМ тимидина), а впоследствии наносили в объеме 200 мкл/лунка на пятнадцать 96-луночных плоскодонных планшетов для тканевых культур. Впоследствии планшеты помещали в увлажненный инкубатор 37 °С, содержащий 5% CO₂ и 95% воздуха, на 7–10 суток.

[00228] **Обнаружение человеческих антител к ФНО IgG в сыворотке крови мышей.** Для скрининга сыворотки мышей на наличие человеческих антител IgG, специфичных к человеческому ФНО, можно использовать твердофазный EIA. Если коротко, планшеты можно оставлять покрываться в растворе ФНО в PBS (2 мкг/мл) на ночь. После промывки в 0,15 М солевом растворе, содержащем 0,02% (об./об.) Tween 20, лунки можно блокировать 1% (масс./об.) BSA в PBS, 200 мкл/лунка в течение 1 часа при КТ. Планшеты немедленно используют или замораживают при -20 °С для будущего использования. Разведенные растворы мышинной сыворотки инкубируют на планшетах, покрытых ФНО, по 50 мкл/лунка при КТ в течение 1 часа. Планшеты промывали и

впоследствии зондировали в объеме 50 мкл/лунка меченными HRP козьими антителами к человеческому IgG, специфичными к Fc, разведенными 1 : 30 000 в 1% BSA-PBS в течение 1 часа при КТ. Планшеты снова промывали и в течение 15 минут при комнатной температуре добавляли по 100 мкл/лунка раствора цитрат-фосфатного субстрата (0,1 М лимонной кислоты и 0,2 М фосфата натрия, 0,01% H₂O₂ и 1 мг/мл OPD). Впоследствии добавляют стоп-реагент (4N раствор серной кислоты) в количестве 25 мкл/лунку и регистрируют оптическую плотность при 490 нм с помощью автоматизированного планшетного спектрофотометра.

[00229] **Обнаружение полностью человеческих иммуноглобулинов в супернатантах гибридомы.** Положительные по росту гибридомы, секретирующие полностью человеческие иммуноглобулины, можно обнаруживать с помощью приемлемого EIA-анализа. Если коротко, на лунки 96-луночных планшетов с выпуклым дном (VWR, 610744) можно наносить 10 мкг/мл козьего анти-человеческого IgG к Fc в натрий-карбонатном буфере на ночь при 4 °С. Планшеты промывают и блокируют 1% BSA-PBS в течение одного часа при 37 °С и немедленно используют или замораживают при -20 °С. Неразбавленные супернатанты гибридомы инкубируют на планшетах в течение одного часа при 37 °С. Планшеты промывали и зондировали меченными HRP козьими антителами к каппа-цепи иммуноглобулина человека, разведенными 1:10 000 в 1% BSA-PBS, в течение одного часа при 37 °С. Впоследствии планшеты инкубируют с раствором субстрата, как описано выше.

[00230] **Определение реакционной способности полностью человеческого антитела к ФНО.** Как указано выше, гибридомы можно одновременно анализировать на реактивность к ФНО с помощью приемлемого анализа RIA или другого анализа. Например, супернатанты инкубировали на планшетах с Fc козьими антителами к человеческому Fc IgG, как описано выше, промывали, а впоследствии зондировали радиоактивно-меченным ФНО с подсчетом соответствующих количеств на лунку в течение 1 часа при КТ. Лунки дважды промывают PBS и количественно оценивают связанный радиоактивно-меченный ФНО с помощью приемлемого счетчика.

[00231] Гибридомы, секретирующие человеческое антитело IgG1к к ФНО, могут быть размножены в клеточной культуре и последовательно субклонированы путем предельного разведения. Полученные клональные популяции можно размножать и криоконсервировать в среде для замораживания (95% FBS, 5% DMSO) и хранить в жидком азоте.

- [00232] **Изотипирование.** Определение изотипа антител может быть выполнено с помощью EIA в формате, аналогичном используемому для скрининга мышинной иммунной сыворотки на специфические титры. ФНО можно наносить на 96-луночные планшеты, как описано выше, и очищенное антитело в концентрации 2 мкг/мл можно инкубировать на планшете в течение одного часа при КТ. Планшет промывают и тестируют меченым HRP козьим антителом к человеческому IgG₁ или меченым HRP козьим антителом к человеческому IgG₃, разведенным в соотношении 1:4000 в 1% BSA-PBS в течение одного часа при КТ. Планшет снова промывают и инкубируют с раствором субстрата, как описано выше.
- 10 [00233] **Кинетика связывания человеческих антител к человеческому ФНО с человеческим ФНО.** Характеристики связывания антител можно соответствующим образом оценивать, например, с помощью EIA-технологии с захватом ФНО и VIAcore. Определенные концентрации очищенных человеческих антител к ФНО можно оценивать на связывание с планшетами EIA, покрытыми 2 мкг/мл ФНО, в описанных выше анализах. Впоследствии можно представлять значения оптической плотности в виде полулогарифмических графиков, демонстрирующих относительную эффективность связывания.
- 15 [00234] Количественные константы связывания можно получать, например, следующим способом или любым другим известным приемлемым способом. Чип VIAcore CM-5 (карбоксиметил) помещают в устройство VIAcore 2000. Буфер HBS (0,01 М HEPES, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% об./об. поверхностно-активного вещества P20, pH 7,4) пропускают через проточную кювету чипа со скоростью 5 мкл/мин до получения стабильной фоновой линии. Раствор (100 мкл) 15 мг EDC (N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида гидрохлорид) в 200 мкл воды добавляли к 100 мкл раствора 2,3 мг NHS (N-гидроксисукцинимид) в 200 мкл воды. На чип наносят 40 (сорок) мкл полученного раствора. На чип наносят шесть мкл раствора человеческого ФНО (15 мкг/мл в 10 мМ ацетата натрия, pH 4,8), что приводит к увеличению приблизительно на 500 RU. Буфер меняют на подвижный буфер TBS/Ca/Mg/BSA (20 мМ Tris, 0,15 М хлорида натрия, 2 мМ хлорида кальция, 2 мМ ацетата магния, 0,5% Triton X-100, 25 мкг/мл BSA, pH 7,4) и пропускают через чип в течение ночи для уравнивания и гидролиза или кэпирования любых непрореагировавших сложных эфиров сукцинимидов.
- 20
- 25
- 30

[00235] Антитела растворяют в подвижном буфере при концентрациях 33,33, 16,67, 8,33 и 4,17 нМ. Скорость потока довели до 30 мкл/мин, а температуру прибора до 25 °С. Для кинетических прогонов используют две проточные кюветы, причем на одной из них иммобилизован ФНО (образец), а вторая является недериватизированной (холостая). По 120 мкл каждой концентрации антитела пропускают через проточные кюветы со скоростью 30 мкл/мин (фаза ассоциации) с последующим непрерывным пропусканием потока буферного раствора в течение 360 секунд (фаза диссоциации). Поверхность чипа регенерируют (комплекс фактор некроза опухоли альфа/диссоциированного антитела) путем двух последовательных инъекций 2М гуанидинтиоцианата по 30 мкл каждая.

[00236] Анализ данных проводят с использованием BIA 3.0 или CLAMP 2.0, как известно специалистам в данной области. Для каждой концентрации антитела пустую сенсограмму вычитают из сенсограммы образца. Общую аппроксимацию выполняли как для диссоциации (K_d, c^{-1}), так и для ассоциации ($k_a, \text{моль}^{-1} c^{-1}$) и вычисляли константу диссоциации ($K_D, \text{моль}$) (k_d/k_a). Если аффинность антитела настолько высока, что значения RU захваченного антитела составляют > 100 , проводят дополнительные разведения антитела.

Результаты и обсуждение

[00237] **Получение моноклональных антител к человеческому ФНО.** Проводят несколько слияний, и для каждого слияния выполняют посев в 15 планшет (1440 лунок/слияние), что дает несколько десятков антител, специфичных к человеческому ФНО. Обнаружено, что некоторые из них состоят из комбинации человеческих и мышиных цепей Ig. Оставшиеся гибридомы секретируют антитела к ФНО, состоящие только из человеческих тяжелых и легких цепей. Ожидается, что все человеческие гибридомы будут относиться к типу IgG1к.

[00238] **Кинетика связывания человеческих антител к человеческому ФНО.** Анализ методом твердофазного ИФА подтверждает, что очищенные антитела из большинства или всех этих гибридом связываются с ФНО концентрационно-зависимым образом. На Фиг. 1–2 показаны результаты относительной эффективности связывания этих антител. В этом случае измеряют avidность антитела к его распознаваемому антигену (эпитопу). Следует отметить, что при связывании ФНО непосредственно с планшетом для EIA возможна денатурация белка, и кажущиеся

аффинности связывания не могут отражать связывание с неденатурированным белком. В диапазоне концентраций обнаруживается пятидесятипроцентное связывание.

[00239] Количественные константы связывания получали с помощью анализа ВІАcore человеческих антител, и результаты показали, что некоторые из человеческих
5 моноклональных антител имеют очень высокую аффинность с K_D в диапазоне от 1×10^9 до 7×10^{12} .

Выводы

[00240] Несколько слияний выполняли с использованием спленоцитов от гибридных
10 мышей, содержащих трансгены человеческих антител переменного и константного участков, иммунизированных человеческим ФНО. Был создан набор из нескольких полностью человеческих реактивных к ФНО моноклональных антител IgG изотипов IgG1к. Полностью человеческие антитела к ФНО были дополнительно
15 охарактеризованы. Несколько полученных антител имеют константы аффинности в диапазоне от 1×10^9 до 9×10^{12} . Благодаря неожиданно высоким аффинностям эти полностью человеческие моноклональные антитела оказываются приемлемыми для терапевтического применения при ФНО-зависимых заболеваниях, патологиях или сходных состояниях.

Пример 3. Создание человеческих моноклональных антител IgG, реагирующих с человеческим ФНО- α .

[00241] **Сводная информация.** Гибридных мышей (СВА/J x C57BL/6J) F₂ (1–4),
20 имеющих трансгены человеческих переменного и константного участков антител как тяжелой, так и легкой цепей, иммунизировали рекомбинантным человеческим ФНО- α . В результате одного слияния, GenTNV, получали восемь полностью человеческих моноклональных антител IgG1к, которые связываются с иммобилизованным
25 рекомбинантным человеческим ФНО α . Вскоре после идентификации восемь клеточных линий передавали молекулярным биологам для дополнительного определения характеристик. Поскольку эти мАт являются полностью человеческими по последовательности, ожидается, что они будут у людей менее иммуногенными, чем антитела сА2 (Remicade).

[00242] **Сокращения.** BSA — бычий сывороточный альбумин; CO₂ — диоксид углерода; DMSO — диметилсульфоксид; EIA — иммуноферментный анализ; FBS — эмбриональная бычья сыворотка; H₂O₂ — перекись водорода; HC — тяжелая цепь;

HRP — пероксидаза хрена; в/д — внутридермально; Ig — иммуноглобулин; ФНО — фактор некроза опухоли альфа; в/б — внутрибрюшинно; в/в — внутривенно; мАт — моноклональное антитело; OD — оптическая плотность; OPD — дигидрохлорид офенилендиамина; PEG — полиэтиленгликоль; PSA — пенициллин, стрептомицин, амфотерицин; КТ — комнатная температура; п/к — подкожно; ФНО- α — фактор некроза опухоли альфа; об./об. — объем на объем; масс./об. — масса на объем.

[00243] **Введение.** Для создания полностью человеческих моноклональных антител, специфичных к рекомбинантному ФНО- α человека, использовали трансгенных мышей, имеющих человеческие гены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. Есть надежда, что эти уникальные антитела можно использовать, поскольку сА2 (Remicade) используют для терапевтического ингибирования воспалительных процессов, связанных с опосредованным ФНО- α заболеванием, и при этом присутствует полезный эффект увеличения периода полувыведения из сыворотки и уменьшения побочных эффектов, связанных с иммуногенностью.

15 **Материалы и способы**

[00244] **Животные.** В GenPharm International были разработаны трансгенные мыши, экспрессирующие человеческие иммуноглобулины, но не мышьиные IgM или Igk. Эти мыши имеют функциональные трансгены человеческих антител, которые подвергают соединению $V(D)J$, переключению класса тяжелых цепей и соматической мутации для создания набора антиген-специфических человеческих иммуноглобулинов (1). Трансгены легкой цепи частично получены из клона искусственной хромосомы дрожжей, который включает в себя почти половину человеческого локуса V_k зародышевой линии. Кроме нескольких генов V_H трансген тяжелой цепи (HC) кодирует как человеческие константные области μ , так и человеческие константные области $\gamma 1$ (2) и/или $\gamma 3$. В процессе иммунизации и слияния для создания моноклональных антител, описанных в настоящем документе, использовали мышь, полученную из генотипической линии HCo12/KCo5.

[00245] **Очистка человеческого ФНО- α .** ФНО- α человека очищали из супернатанта тканевой культуры клеток C237A с помощью аффинной хроматографии на колонке, заполненной слитным белком рецептор ФНО- α -Fc (p55-sf2) (5), связанным с сефарозой 4B (Pharmacia). Супернатант клеток смешивали с одной девятой его объема 10-кратного PBS Дульбекко (D-PBS) и пропускали через колонку при 4 °C со скоростью 4 мл/мин. Впоследствии колонку промывали PBS, и элюировали ФНО- α .

0,1 М цитратом натрия, pH 3,5, и нейтрализовали 2М трис-HCl, pH 8,5. Очищенный ФНО- α заменяли на буфер в 10 mM Tris, 0,12 М хлорида натрия pH 7,5 и фильтровали через шприцевой фильтр на 0,2 мкм.

[00246] **Иммунизация.** Самку мыши GenPharm в возрасте приблизительно 5 16 недель иммунизировали в/б (200 мкл) и в/д (100 мкл в основании хвоста), используя суммарно 100 мкг ФНО- α (партия JG102298 или JG102098), эмульгированного равным объемом адьюванта Titermax, в дни 0, 12 и 28. У мыши вызывали кровотечение в дни 10 21 и 35 путем ретроорбитальной пункции без антикоагулянта. Кровь оставляли для свертывания при КТ на один час и сыворотку собирали и титровали с помощью твердофазного EIA на ФНО- α . Слияние, именуемое GenTNV, проводили после того, как мыши отдыхали в течение семи недель после инъекции в день 28. Мышам с титром IgG человека, равным 1:160, против ФНО- α , проводили конечную бустерную в/в инъекцию 50 мкг ФНО- α , разведенного в 100 мкл физиологического раствора. Через 15 три дня мышь умерщвляли посредством смещения шейных позвонков, селезенку извлекали в асептических условиях и погружали в 10 мл холодного фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В (PSA). Спленциты собирали путем стерильной перфузии селезенки PSA-PBS. Клетки однократно промывали в холодном PSA-PBS, подсчитывали с использованием счетчика Культера и ресуспендировали в среде RPMI 20 1640, содержащей 25 mM Hepes.

[00247] **Клеточные линии.** Несекретирующий партнер по слиянию мышинной миеломы (линия 653) получала группа Cell Biology Services (CBS) 14 мая 1997 г. от группы по разработке продуктов компании Centocor. Клеточную линию размножали в среде RPMI (JRH Biosciences) с добавлением 10% (об./об.) FBS (Cell Culture Labs), 25 1 mM пирувата натрия, 0,1 mM NEAA, 2 mM L-глутамина (все производства JRH Biosciences) и криоконсервировали в 95% FBS и 5% DMSO (Sigma), а затем хранили в морозильнике с жидким азотом, в паровой фазе в CBS. Клеточный банк был стерильным (компания QQuality Control Centocor, Malvern) и не содержал микоплазм (Bionique Laboratories). Клетки до слияния поддерживали в логарифмической фазе 30 культуры. Перед слиянием их промывали в PBS, подсчитывали и определяли жизнеспособность (> 95%) посредством исключения красителя трипанового синего.

[00248] ФНО- α человека получали при помощи рекомбинантной клеточной линии, именуемой C237A, и полученной в подразделении Molecular Biology компании

Centocor. Клеточную линию размножали в среде IMDM (JRH Biosciences) с добавлением 5% (об./об.) FBS (Cell Culture Labs), 2 мМ L-глутамин (все производства JRH Biosciences) и 0,5 мкг/мл микофеноловой кислоты и криоконсервировали в 95% FBS и 5% DMSO (Sigma), впоследствии хранили в морозильнике с жидким азотом в паровой фазе в CBS (13). Клеточный банк был стерильным (компания QQuality Control Centocor, Malvern) и не содержал микоплазм (Bionique Laboratories).

[00249] **Слияние клеток.** Слияние клеток проводили при соотношении 1:1 клеток мышинной миеломы 653 и жизнеспособных клеток мышинной селезенки. Если коротко, клетки селезенки и клетки миеломы совместно осаждали. Осадок медленно ресуспендировали в течение 30 секунд в 1 мл раствора 50% (масс./об.) PEG/PBS (молекулярная масса PEG 1450 г/моль, Sigma) при 37 °С. Слияние останавливали путем медленного добавления 10,5 мл среды RPMI (без добавок) (JRH) (37 °С) в течение 1 минуты. Клетки центрифугировали в течение 5 минут при 750 об/мин. Впоследствии клетки ресуспендировали в среде НАТ (среда RPMI/HEPES, содержащая 10% фетальную бычью сыворотку (JRH), 1 мМ пирувата натрия, 2 мМ L-глутамин, 10 мкг/мл гентамицин, 2,5% культуральной добавки Origen (Fisher), 50 мкМ 2-меркаптоэтанола, 1% 653-кондиционированную среду RPMI, 100 мкМ гипоксантина, 0,4 мкМ аминоптерина и 16 мкМ тимидина), а впоследствии высевали по 200 мкл/лунка в пяти 96-луночных плоскодонных планшетах для тканевых культур. Впоследствии планшеты помещали в увлажненный инкубатор при 37 °С, содержащий 5% CO₂ и 95% воздуха, на 7–10 дней.

[00250] **Обнаружение человеческих антител IgG к ФНО-α в сыворотке крови мышей.** Для скрининга сыворотки мышей на наличие человеческих антител IgG, специфичных к человеческому ФНО-α, использовали твердофазный EIA. Если коротко, планшеты оставляли покрываться в растворе ФНО-α в PBS (1 мкг/мл) на ночь. После промывки в 0,15 М солевом растворе, содержащем 0,02% (об./об.) Tween 20, лунки блокировали 1% (масс./об.) BSA в PBS, 200 мкл/лунка в течение 1 часа при КТ. Планшеты либо немедленно использовали, либо замораживали при -20 °С для будущего использования. Сыворотку крови мыши инкубировали в двукратных серийных разведениях на планшетах, покрытых человеческим ФНО-α, по 50 мкл/лунка при КТ в течение 1 часа. Планшеты промывали и впоследствии зондировали в объеме 50 мкл/лунка мечеными HRP козьими антителами к человеческому IgG, специфичными к Fc (Accurate), разведенными 1:30 000 в 1% BSA-PBS в течение 1 часа при КТ. Планшеты снова промывали и в течение 15 минут при комнатной температуре

добавляли по 100 мкл/лунка раствора цитрат-фосфатного субстрата (0,1 М лимонной кислоты и 0,2 М фосфата натрия, 0,01% H_2O_2 и 1 мг/мл OPD). Впоследствии добавляли стоп-реагент (4N раствор серной кислоты) в количестве 25 мкл/лунку и регистрировали оптическую плотность при 490 нм с помощью автоматизированного планшетного спектрофотометра.

[00251] **Обнаружение полностью человеческих иммуноглобулинов в супернатантах гибридомы.** Поскольку мышь GenPharm способна образовывать мышьиные и человеческие иммуноглобулиновые цепи, для тестирования жизнеспособных клонов гибридомы использовали два отдельных теста EIA на присутствие как человеческих легких, так и человеческих тяжелых цепей. Планшеты покрывали, как описано выше, и неразбавленные супернатанты гибридомы инкубировали на планшетах в течение одного часа при 37 °С. Планшеты промывали и зондировали либо конъюгированными с HRP козьими антителами к каппа-цепи человеческого антитела (Southern Biotech), разведенными 1:10 000 в 1% BSA-HBSS, либо конъюгированными с HRP козьими антителами к человеческому IgG, разведенными до 1:30 000 в 1% BSA-HBSS, в течение одного часа при 37 °С. Впоследствии планшеты инкубировали с раствором субстрата, как описано выше. Клоны гибридомы, которые не давали положительного сигнала как в формате с каппа-цепью человека, так и в формате антитела к человеческому IgG с Fc EIA, отбрасывали.

[00252] **Изотипирование.** Определение изотипа антител выполняли с помощью EIA в формате, аналогичном используемому для скрининга мышьиной иммунной сыворотки на специфические титры. Планшеты для EIA покрывали козьими антителами к человеческому IgG (H+L) в концентрации 10 :г/мл в натрий-карбонатном буфере в течение ночи при 4 EC и блокировали, как описано выше. Чистые супернатанты культур из 24 лунок инкубировали на планшете в течение одного часа при КТ. Планшет промывали и зондировали мечеными HRP козьими антителами к человеческому IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄ (сайт связывания), разведенными в соотношении 1:4000 в 1% BSA-PBS, в течение одного часа при комнатной температуре. Планшет снова промывали и инкубировали с раствором субстрата, как описано выше.

[00253] **Результаты и обсуждение.** Создание полностью человеческих моноклональных антител к ФНО- α человека. Одно слияние, называемое GenTNV, выполнял для мыши GenPharm, иммунизированной рекомбинантным белком ФНО- α человека. После данного слияния отсеяли 196 жизнеспособных гибридов. Было

выявлено восемь гибридных клеточных линий, секретирующих полностью человеческие антитела IgG, реагирующие с ФНО- α человека. Каждая из этих восьми клеточных линий секретирует иммуноглобулины человеческого изотипа IgG1к, и все субклонировали дважды путем предельного разведения для получения стабильных клеточных линий (однородность > 90%). Названия клеточных линий и соответствующие С-кодовые обозначения приведены в таблице 1. Каждую клеточную линию замораживали в исследовательских клеточных банках на 12 флаконов, хранимых в жидком азоте.

[00254] Родительские клетки, собранные из лунок 24-луночной культуральной чашки каждой из восьми клеточных линий, были переданы в группу Molecular Biology в 18.02.99 для трансфекции и дополнительного определения характеристик.

Таблица 1. Обозначения клеточных линий GenTNV

| Название | С-кодовое обозначение |
|------------------------|------------------------------|
| GenTNV14.17.12 | C414A |
| GenTNV15.28.11 | C415A |
| GenTNV32.2.16 | C416A |
| GenTNV86.14.34 | C417A |
| GenTNV118.3.36 | C418A |
| GenTNV122.23.2 | C419A |
| GenTNV148.26.12 | C420A |
| GenTNV196.9.1 | C421A |

Заключение

[00255] Слияние GenTNV проводили с использованием спленоцитов гибридной мыши, имеющей трансгены вариабельной и константной областей антител человека, которая была иммунизирована рекомбинантным ФНО- α человека, полученным в компании Centocor. Получали восемь полностью человеческих, реагирующих на ФНО- α моноклональных антител IgG изотипа IgG1к. Родительские клеточные линии были переданы в группу Molecular Biology для дальнейшего определения характеристик и разработки. Одно из этих новых человеческих антител можно использовать в

противовоспалительном препарате, благодаря потенциальному преимуществу уменьшения иммуногенности и аллергических осложнений по сравнению с Remicade.

Пример 4. Клонирование и подготовка клеточных линий, экспрессирующих человеческое антитело к ФНО- α

5 [00256] **Сводная информация.** Было обнаружено, что панель из восьми человеческих моноклональных антител (мАт) с обозначением TNV связывается с
10 иммобилизованным ФНО- α человека с очевидно высокой авидностью. Было показано, что семь из восьми мАт эффективно блокируют связывание человеческого ФНО- α с рекомбинантным рецептором к ФНО. Анализ последовательности ДНК, кодирующей семь мАт, подтвердил, что все мАт имели человеческие V-области.
Последовательности ДНК также продемонстрировали, что три пары мАт были идентичны друг другу так, что исходная панель из восьми мАт содержала только четыре различных мАт, обозначенных как TNV14, TNV15, TNV148 и TNV196. На основании анализа выявленных аминокислотных последовательностей мАт и
15 результатов по данным по нейтрализации ФНО- α *in vitro* для дальнейшего исследования отбирали мАт TNV148 и TNV14.

[00257] Поскольку при поиске по базе данных остаток пролина в положении 75 (каркасная область 3) в тяжелой цепи TNV148 не был обнаружен в этом положении в других человеческих антителах той же подгруппы, был проведен сайт-направленный
20 мутагенез ДНК для кодирования остатка серина в этом положении, чтобы он соответствовал известным каркасным последовательностям e зародышевой линии.
Модифицированное серином мАт обозначали как TNV148B. ПЦР-амплифицированную ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой и легкой цепей TNV148B и TNV14, клонировали во вновь полученные экспрессионные векторы, основанные на недавно
25 клонированных генах тяжелой и легкой цепей другого человеческого мАт (12B75), описанного в заявке на патент США № 60/236,827, поданной 7 октября 2000 г., озаглавленной «IL-12 Antibodies, Compositions, Methods and Uses», опубликованной как WO 02/12500, которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

[00258] Клетки P3X63Ag8.653 (653) или клетки миеломы мышей Sp2/0–Ag14 (Sp2/0)
30 трансфицировали соответствующими экспрессионными плазмидами тяжелой и легкой цепей и отсеивали посредством двух циклов субклонирования клеточных линий, получая высокие уровни рекомбинантных мАт TNV148B и TNV14 (rTNV148B и rTNV14). Оценки

кривых роста и стабильности продукции мАт с течением времени показали, что трансфицированные 653-клоны С466D и С466С стабильно продуцировали приблизительно 125 :г/мл мАт гТNV148В в отработанных культурах, а трансфицированные Sp2/0-клоны 1.73-12-122 (С467А) стабильно продуцировали приблизительно 25 :г/мл мАт гТNV148В в отработанных культурах. Аналогичные анализы показали, что трансфицированный Sp2/0-клон С476А продуцировал 18 :г/мл гТNV14 в отработанных культурах.

[00259] **Введение.** Ранее было показано, что панель из восьми мАт, полученных от иммунизированных человеческим ФНО- α мышей GenPharm/Medarex (генотип HCo12/KCo5), связывается с ФНО- α человека и имеет полностью человеческий изотип IgG1 каппа. Для определения в примерах мАт настоящего изобретения возможности наличия ФНО- α -нейтрализующей активности использовали простой анализ связывания и оценивали их способность блокировать связывание ФНО- α с рекомбинантным рецептором ФНО. На основании этих результатов данных о последовательности ДНК и определения характеристик *in vitro* нескольких мАт для дальнейшего определения характеристик отбирали мАт TNV148.

[00260] Последовательности ДНК, кодирующие мАт TNV148, клонировали, модифицировали для встраивания в экспрессионные векторы генов, которые кодируют приемлемые константные участки, внедряли в хорошо охарактеризованные клетки мышинных миелом 653 и Sp2/0 и отсеивали трансфицированные клеточные линии, пока не выявляли субклоны, которые продуцировали в 40 раз больше мАт, чем исходная гибридная клеточная линия.

Материалы и способы

[00261] **Реагенты и клетки.** Реагент TRIZOL был приобретен у компании Gibco BRL. Протеиназа К была получена от компании Sigma Chemical Company. Обратную транскриптазу приобретали в компании Life Sciences, Inc. ДНК-полимеразу Taq получали от компании Perkin Elmer Cetus или Gibco BRL. Рестрикционные ферменты приобретали у New England Biolabs. Набор для очистки QIAquick PCR приобретали у компании Qiagen. Набор для сайт-направленного мутагенеза QuikChange был приобретен у компании Stratagene. Наборы для получения минипрепаратов плазмид Wizard и ингибитор РНКаз RNasin приобретали в компании Promega. Планшеты Optiplates были приобретены у компании Packard. ¹²⁵Йод был приобретен у компании Amersham. Создаваемые на заказ олигонуклеотиды приобретали у компании

Keystone/Biosource International. Названия, идентификационные номера и последовательности олигонуклеотидов, используемых в данной работе, показаны в таблице 2.

Таблица 2. Олигонуклеотиды, используемые для клонирования, конструирования или определения последовательности генов мАт TNV

[00262] Аминокислоты, кодируемые олигонуклеотидом 5'14s и HuH-J6, показаны над последовательностью. Аминокислотный остаток «М» представляет собой кодон начала трансляции. Подчеркнутые последовательности в олигонуклеотидах 5'14s и HuH-J6 обозначают сайты рестрикции BsiWI и BstBI соответственно. Слеш в HuH-J6 соответствует границе экзон/интрон. Следует отметить, что олигонуклеотиды, последовательность которых соответствует минус-нити, записаны в ориентации 3'–5'.

| Название | ИД | Последовательность |
|---------------------|-----|---|
| HG1-4b | 119 | 3'-TTGGTCCAGTCGGACTGG-5' (SEQ ID NO:10) |
| HG1-5b | 354 | 3'-CACCTGCACTCGGTGCTT-5' (SEQ ID NO: 11) |
| HG1hg | 360 | 3'-CACTGTTTTGAGTGTGTACGGGCTTAAGTT-5' (SEQ ID NO:12) |
| HG1-6 | 35 | 3'-GCCGCACGTGTGGAAGGG-5' (SEQ ID NO:13) |
| HCK1-3E | 117 | 3'-AGTCAAGGTCGGACTGGCTTAAGTT-5' (SEQ ID NO:14) |
| HuK-3'Hd | 208 | 3'-GTTGTCCCCTCTCACAATCTTCGAATTT-5' (SEQ ID NO:15) |
| HVKRNAseq | 34 | 3'-GGCGGTAGACTACTCGTC-5' (SEQ ID NO:16) |
| BsiWI M D W T W S I | | (SEQ ID NO:17) |
| 5'14s | 366 | 5'-TTTCGTACGCCACCATGGACTGGACCTGGAGCATC-3' (SEQ ID NO:18) |
| 5'46s | 367 | 5'-TTTCGTACGCCACCATGGGGTTTGGGCTGAGCTG-3' (SEQ ID NO:19) |
| 5'47s | 368 | 5'-TTTCGTACGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCATG-3' (SEQ ID NO:20) |
| 5'63s | 369 | 5'-TTTCGTACGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTC-3' (SEQ ID NO:21) |
| 5'73s | 370 | 5'-TTTCGTACGCCACCATGGGGTCAACCGCCATCCTC-3' (SEQ ID NO:22) |

| Название | ИД | Последовательность |
|----------------|-------------------------|---|
| T V T V S S | BstBI (SEQ ID NO:23) | |
| HuH-J6 | 388 | 3'-GTGCCAGTGGCAGAGGAGTCCATTC <u>AAGCTTAAGTT</u> -5' (SEQ ID NO:24) |
| SalI M D M R V | (SEQ ID NO:25) | |
| LK7s | 362 | 5'-TTT <u>GTCGAC</u> ACCCATGGACATGAGGGTCC(TC)C-3' (SEQ ID NO:26) |
| L Vgs | 363 | 5'-TTT <u>GTCGAC</u> ACCCATGGAAGCCCCAGCTC-3' (SEQ ID NO:27) |
| T K V D I K | (SEQ ID NO: 28) | Afl2 |
| HuL-J3 | 380 | 3' <u>CTGGTTTAC</u> СТАТАGTTTG/CATTCAG <u>AATTC</u> GGCGCCTTT (SEQ ID NO:29) |
| V148-QC1 | 399 | 5'-CATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATC-3' (SEQ ID NO:30) |
| V148-QC2 | 400 | 3'-GTAGAGGTCTCTGTTAaGGTTCTTGTGCGACATAG-5' (SEQ ID NO:31) |

[00263] Получали один флакон с замороженными клетками мышинной миеломы 653. Флакон размораживали на этот же день и размножали в Т-флаконах в среде IMDM, 5% FBS, 2 mM глутамин (среда). Эти клетки поддерживали в непрерывной культуре до трансфицирования через 2–3 недели при помощи ДНК антитела к ФНО- α , описанной в настоящем документе. Некоторые культуры собирали через 5 суток после оттаивания, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 95% FBS, 5% DMSO, аликвотировали в 30 флаконов, замораживали и хранили для дальнейшего применения. Аналогичным образом получали один флакон с замороженными клетками мышинной миеломы Sp2/0. Флакон размораживали, подготавливали к новой заморозке, как описано выше, и хранили замороженные флаконы в морозильных боксах СВС АА и АВ. Эти клетки размораживали и использовали для всех трансфекций Sp2/0, описанных в настоящем документе.

[00264] **Анализ на ингибирование связывания ФНО с рецептором.**
Супернатанты гибридомных клеток, содержащие мАт TNV, использовали для анализа способности мАт блокировать связывание 125 I-меченого ФНО- α с рекомбинантным слитным белком рецептора к ФНО p55-sf2 (Scallon et al. (1995) *Cytokine* 7:759–770). На планшеты Optiplates добавляли 50 μ l p55-SF2 в концентрации 0,5 μ g/ml в PBS, чтобы покрыть лунки в течение одного часа инкубации при 37 °C. Готовили серийные

разведения восьми супернатантов клеток TNV в круглодонных 96-луночных планшетах с использованием PBS/ 0,1% BSA в качестве разбавителя. Супернатант клеток, содержащий мАт к IL-18, использовали в качестве отрицательного контроля, а такой же супернатант антител к IL-18 с добавлением сА2 (химерное антитело к ФНО, Remicade, патент США № 5,770,198, полностью включенный в настоящий документ путем ссылки) использовали в качестве положительного контроля. ¹²⁵I-меченный ФНО-α (58 :Кю/:г, D. Shealy) добавляли к 100 :л супернатанта клеток с конечной концентрацией ФНО-α 5 нг/мл. Смесь предварительно инкубировали в течение одного часа при КТ. Планшеты Optiplates с нанесенным покрытием промывали для удаления несвязанного p55-sf2 и в планшеты Optiplates переносили 50 :л смеси ¹²⁵I-ФНО-α/супернатант клеток. Через 2 ч при КТ планшеты Optiplates трижды промывали PBS-Tween. Добавляли 100 :л реактива Microscint-20 и определяли число импульсов в минуту с использованием гамма-счетчика TopCount.

[00265] **Аmplификация V-генов и анализ последовательности ДНК.** Клетки гибридомы промывали один раз в PBS, а затем добавляли реагент TRIZOL для подготовки РНК. Количество клеток от 7×10^6 до $1,7 \times 10^7$ ресуспендировали в 1 мл TRIZOL. Пробирки энергично встряхивали после добавления 200 мкл хлороформа. Клетки инкубировали при 4 °С в течение 10 минут. Водную фазу переносили в новую микроцентрифужную пробирку и добавляли равный объем изопропанола. Пробирки энергично встряхивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Впоследствии клетки центрифугировали при 4°С в течение 10 минут. Осадок однократно промывали 1 мл 70% этанола и кратковременно высушивали в вакуумной сушилке. Осадки РНК ресуспендировали в 40 мкл обработанной DEPC воды. Качество препаратов РНК определяли путем фракционирования 0,5 мкл в 1% агарозном геле. РНК хранили в морозильной камере при температуре -80 °С до использования.

[00266] Для получения кДНК тяжелой и легкой цепей получали смеси, которые содержали 3 мкл РНК и 1 мкг олигонуклеотида 119 (тяжелая цепь) или олигонуклеотида 117 (легкая цепь) (см. таблицу 1) в объеме 11,5 мкл. Смесь инкубировали при 70° С в течение 10 минут на водяной бане и впоследствии охлаждали на льду в течение 10 минут. Получали отдельную смесь, состоящую из 2,5 мкл 10-кратного буфера обратной транскриптазы, 10 мкл 2,5 mM dNTP, 1 мкл обратной транскриптазы (20 единиц) и 0,4 мкл ингибитора рибонуклеазы RNasin (1 единица). 13,5 μл этой смеси добавляли к 11,5 μл охлажденной смеси РНК/олигонуклеотид и

реакционную смесь инкубировали в течение 40 минут при 42 °С. Впоследствии реакционную смесь для синтеза кДНК хранили в морозильной камере при -20 °С до использования.

[00267] Неочищенные кДНК тяжелой и легкой цепей использовали в качестве матриц для ПЦР-амплификации последовательностей, кодирующих переменную область. Одновременно тестировали пять пар олигонуклеотидов (366/354, 367/354, 368/354, 369/354 и 370/354, таблица 1) на способность праймировать амплификацию ДНК тяжелой цепи. Две пары олигонуклеотидов (362/208 и 363/208) одновременно тестировали на способность праймировать амплификацию ДНК легкой цепи. ПЦР проводили с использованием 2 единиц Taq ДНК-полимеразы PLATINUM™ высокой точности (HIFI) в общем объеме 50 мкл. Каждая реакционная смесь включала в себя 2 мкл реакционной смеси кДНК, по 10 пмоль каждого олигонуклеотида, 0,2 мМ dNTP, 5 мкл 10X буфера HIFI и 2 мМ сульфата магния. Программа термоциклера была следующей: 95 °С в течение 5 минут, затем 30 циклов (94 °С в течение 30 секунд, 62 °С в течение 30 секунд, 68 °С в течение 1,5 минут). Впоследствии выполняли конечную инкубацию при 68 °С в течение 10 минут.

[00268] Для подготовки ПЦР-продуктов для прямого секвенирования ДНК их очищали с использованием набора QIAquick™ PCR Purification Kit в соответствии с протоколом производителя. ДНК элюировали из центрифужной колонки, используя 50 мкл стерильной воды, а впоследствии высушивали до объема 10 мкл с помощью вакуумной сушилки. Затем готовили реакционные смеси для секвенирования ДНК, содержащие 1 мкл очищенного продукта ПЦР, 10 мкМ олигонуклеотидного праймера, 4 мкл готовой реакционной смеси BigDye Terminator™ и 14 мкл стерильной воды до общего объема 20 мкл. Продукты ПЦР тяжелых цепей, полученные с использованием пары олигонуклеотидов 367/354, секвенировали с использованием олигонуклеотидных праймеров 159 и 360. Продукты ПЦР легких цепей, полученные с использованием пары олигонуклеотидов 363/208, секвенировали с использованием олигонуклеотидов 34 и 163. Программа термоциклера для секвенирования представляла собой 25 циклов (96°С в течение 30 секунд, 50°С в течение 15 секунд, 60°С в течение 4 минут), а затем выдерживание в течение ночи при 4°С. Продукты реакции фракционировали через полиакриламидный гель и детектировали с использованием ДНК-секвенатора ABI 377.

[00269] **Сайт-направленный мутагенез для замены аминокислоты.** Один нуклеотид в последовательности ДНК варибельной области тяжелой цепи TNV148 изменяли, чтобы заменить Pro⁷⁵ остатком серина в мАт TNV148. Были разработаны и заказаны комплементарные олигонуклеотиды 399 и 400 (таблица 1) для такого

5 изменения с использованием способа сайт-направленного мутагенеза QuikChange™ в соответствии с описанием производителя. Два олигонуклеотида сначала фракционировали через 15% полиакриламидный гель и очищали основные полосы. Реакции мутагенеза проводили с использованием либо 10 нг, либо 50 нг плазмидной

10 матрицы тяжелой цепи TNV148 (p1753), 5 мкл 10-кратного реакционного буфера, 1 мкл смеси dNTP, 125 нг праймера 399, 125 нг праймера 400 и 1 мкл ДНК-полимеразы Pfu. Добавляли стерильную воду для доведения общего объема до 50 мкл. Впоследствии реакционную смесь инкубировали в термоциклере, запрограммированном на инкубацию при 95 °С в течение 30 секунд, а затем проводили 14 циклов с

15 последовательными инкубациями при 95 °С в течение 30 секунд, 55 °С в течение 1 минуты, 64 °С в течение 1 минуты и 68 °С в течение 7 минут с последующим инкубированием при 30 °С в течение 2 минут (1 цикл). Данные реакции были разработаны для включения мутагенных олигонуклеотидов в идентичные по остальным

20 параметрам вновь синтезированные плазмиды. Для избавления от исходных плазмид TNV148 образцы инкубировали при 37°С в течение 1 часа после добавления 1 мкл эндонуклеазы DpnI, которая расщепляет только исходную метилированную плазмиду. Один мкл реакционной смеси впоследствии использовали для трансформации *E. coli* Epicurian Coli XL1-Blue стандартными способами теплового шока и

25 трансформированные бактерии, идентифицированные после посева на планшеты с агаром с LB-ампициллином. Плазмидные минипрепараты готовили с использованием наборов Wizard™ в соответствии с инструкциями производителя. После элюирования пробы из колонки Wizard™ плазмидную ДНК осаждали этанолом для дополнительной очистки плазмидной ДНК, а впоследствии ресуспендировали в 20 мкл стерильной

30 воды. Впоследствии выполняли анализ последовательностей ДНК для идентификации плазмидных клонов, имеющих требуемое изменение основания, и для подтверждения того, что в кодирующую последовательность TNV148 не были случайно введены другие изменения в основаниях. Один мкл плазмиды подвергали реакции циклического секвенирования, проводимой с использованием 3 мкл смеси BigDye, 1 мкл прямого

праймера pUC19 и 10 мкл стерильной воды, используя те же параметры, что описаны в разделе 4.3.

[00270] **Конструирование экспрессионных векторов из генов 12В75.** Выполняли несколько этапов с рекомбинантной ДНК для получения нового человеческого экспрессионного вектора IgG1 и нового человеческого экспрессионного вектора каппа из ранее клонированных геномных копий генов тяжелой и легкой цепей, кодирующих 12В75 соответственно, которые описаны в заявке на патент США № 60/236,827, поданной 7 октября 2000 г., озаглавленной «IL-12 Antibodies, Compositions, Methods and Uses», опубликованной под номером WO 02/12500, которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки. Конечные векторы были разработаны с возможностью простого одноэтапного замещения существующих последовательностей варибельной области на любую соответствующим образом сконструированную ПЦР-амплифицированную варибельную область.

[00271] Для модификации гена тяжелой цепи 12В75 в плазмиде p1560 фрагмент BamHI/HindIII размером 6,85 т.п.н., содержащий промотор и варибельную область, переносили из p1560 в pUC19 с получением p1743. Благодаря меньшему размеру этой плазмиды по сравнению с p1560 можно было использовать мутагенез QuikChange™ (с использованием олигонуклеотидов BsiWI-1 и BsiWI-2) для введения уникального сайта клонирования BsiWI непосредственно ближе к 5' концу от сайта инициации трансляции в соответствии с протоколом производителя. Полученная плазида была названа p1747. Для введения сайта BstBI на 3'-конец варибельной области был создан 5'-олигонуклеотидный праймер с сайтами SalI и BstBI. Данный праймер использовали с обратным праймером pUC для амплификации фрагмента 2,75 т. п. н. из p1747. Впоследствии фрагмент обратно клонировали в сайт SalI природного происхождения в варибельной области 12В75 и сайт HindIII, в результате чего был внедрен уникальный сайт BstBI. Полученный промежуточный вектор, обозначенный p1750, может принимать фрагменты варибельной области с концами BsiWI и BstBI. Для получения версии вектора тяжелой цепи, в котором константная область также является производной от гена 12В75, вставку BamHI-HindIII в p1750 переносили в pBR322, чтобы получить сайт EcoRI после сайта HindIII.

Впоследствии полученную плазмиду p1768 расщепляли при помощи HindIII и EcoRI и лигировали с фрагментом HindIII-EcoRI размером 5,7 т.п.н. из p1744, получали субклон путем клонирования большого фрагмента BamHI-BamHI из p1560 в pBC. Затем полученную плазмиду (p1784) использовали в качестве вектора для фрагментов кДНК

антитела TNV с концами BsiWI и BstBI. Была проведена дополнительная работа по получению экспрессионных векторов p1788 и p1798, которые включают константную область IgG1 из гена 12B75 и отличаются друг от друга тем, насколько большую часть J-C интрона тяжелой цепи 12B75 они содержат.

- 5 [00272] Для модификации гена легкой цепи 12B75 в плазмиде p1558 фрагмент SalI/AflII размером 5,7 т.п.н., содержащий промотор 12B75 и переменную область, переносили из p1558 в сайты XhoI/AflII плазмиды L28. Эта новая плазида, p1745, обеспечила матрицу меньшего размера для стадии мутагенеза. Олигонуклеотиды (C340salI и C340sal2) использовали для введения уникального сайта рестрикции SalI на
- 10 5'-конце переменной области посредством мутагенеза QuikChange™. Полученный промежуточный вектор (p1746) имел уникальные сайты рестрикции SalI и AflII, в которые могут быть клонированы фрагменты переменной области. Любой фрагмент переменной области, клонированный в p1746, предпочтительно соединяется с 3'-
- 15 половиной гена легкой цепи 12B75, который можно использовать для этой цели, олигонуклеотиды VАНН-1 и VАНН-2 отжигали друг с другом с образованием двухцепочечного линкера, содержащего сайты рестрикции BsiWI, AflII, HindII и NotI, и имеющие концы, которые можно лигировать в сайты KpnI и SacI. Данный линкер клонировали между сайтами KpnI и SacI в pBC с получением плазмиды p1757.
- 20 Фрагмент из 7,1 т. п. н., содержащий константную область легкой цепи 12B75, созданный путем расщепления p1558 при помощи AflII, с последующим частичным расщеплением HindIII, клонировали между сайтами AflII и HindII p1757 с получением p1762. Данная новая плазида содержала уникальные сайты для BsiWI и AflII, в которые может быть перенесен фрагмент BsiWI/AflII, содержащий промотор и
- 25 переменные участки, с объединением двух половин гена.

- [00273] Клонирование кДНК и сборка экспрессионных плазмид. Все реакционные смеси для ОТ-ПЦР (см. выше) обрабатывали ферментом Klenow для дополнительного заполнения концов ДНК. ПЦР-фрагменты тяжелой цепи расщепляли рестрикционными ферментами BsiWI и BstBI и впоследствии клонировали между сайтами BsiWI и BstBI
- 30 плазмиды L28 (L28 использовали, поскольку промежуточный вектор на основе 12B75 p1750 еще не был получен). Анализ ДНК-последовательностей клонированных вставок показал, что полученные конструкторы были правильными и что в ходе ПЦР-амплификации ошибки не были внесены. Назначенные идентификационные номера для

данных L28-плазмидных конструкторов (для TNV14, TNV15, TNV148, TNV148B и TNV196) показаны в таблице 3.

[00274] Вставки BsiWI/BstBI для тяжелых цепей TNV14, TNV148 и TNV148B переносили из вектора L28 во вновь полученный промежуточный вектор, p1750.

- 5 Назначенные идентификационные номера данных промежуточных плазмид приведены в таблице 2. Этот этап клонирования и последующие этапы не выполняли для TNV15 и TNV196. Варибельные области впоследствии переносили в два разных человеческих вектора экспрессии IgG1. Для переноса варибельных областей в ранее использованный вектор IgG1, p104, от Centocor использовали рестрикционные ферменты EcoRI и HindIII. Полученные экспрессионные плазмиды, которые кодируют IgG1 аллотипа Gm(f+), обозначали p1781 (TNV14), p1782 (TNV148) и p1783 (TNV148B) (см. таблицу 2). Варибельные области также клонировали ближе к 5'-концу от константной области IgG1, полученной из гена 12B75 (GenPharm). Эти экспрессионные плазмиды, которые кодируют IgG1 аллотипа G1m(z), также перечислены в таблице 3.

15 **Таблица 3. Идентификационные номера плазмид для различных плазмид тяжелых и легких цепей**

[00275] Вектор L28 или вектор pBC представляют собой клон исходной кДНК антитела. Вставки в данных плаزمидках переносили в неполный вектор на основе 12B75 для получения промежуточных плазмид. В результате одной дополнительной стадии переноса получали конечные экспрессионные плазмиды, которые либо внедряли в клетки после линейаризации, либо использовали для очистки вставок генов мАт перед трансфицированием клеток. (Н/В) = не выполняли

| Gm(f+) | G1m(z) | | | |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Вектор 128 | Промежуточная | | Экспрессия | |
| мАт | <u>ID плазмиды</u> | <u>ID плазмиды</u> | <u>ID плазмиды</u> | <u>ID плазмиды</u> |
| <i>Тяжелые цепи</i> | | | | |
| TNV14 | p1751 | p1777 | p1781 | p1786 |
| TNV15 | p1752 | (ND) | (ND) | (ND) |
| TNV148 p1753 | p1778 | p1782 | p1787 | |
| TNV148B p1760 | p1779 | p1783 | p1788 | |
| TNV196 p1754 | (ND) | (ND) | (ND) | |
| Вектор pBC | Промежуточная | | Экспрессия | |
| <u>ID плазмиды</u> | <u>ID плазмиды</u> | <u>ID плазмиды</u> | | |
| <i>Легкие цепи</i> | | | | |

| | | | |
|--------|-------|-------|-------|
| TNV14 | p1748 | p1755 | p1775 |
| TNV15 | p1748 | p1755 | p1775 |
| TNV148 | p1749 | p1756 | p1776 |
| TNV196 | p1749 | p1756 | p1776 |

[00276] Продукты ПЦР легких цепей расщепляли рестрикционными ферментами SalI и SacII и впоследствии клонировали между сайтами SalI и SacII плазмиды pBC. Две различные версии легких цепей, отличающиеся одной аминокислотой, были обозначены p1748 и p1749 (таблица 2). Анализ последовательностей ДНК подтвердил, что данные конструкторы имели правильные последовательности. Впоследствии фрагменты SalI/AflIII в p1748 и p1749 клонировали между сайтами SalI и AflIII промежуточного вектора p1746 для получения p1755 и p1756 соответственно. Эти 5'-половины генов легкой цепи затем соединяли с 3'-половинами гена путем переноса фрагментов BsiWI/AflIII из p1755 и p1756 во вновь полученный конструктор p1762 с получением конечных экспрессионных плазмид p1775 и p1776 соответственно (таблица 2).

[00277] Трансфекции клеток, скрининг и субклонирование. Всего провели 15 трансфекций клеток мышшиной миеломы различными плазмидами экспрессии TNV (см. таблицу 3 в разделе «Результаты и обсуждение»). Эти трансфекции различались следующим: (1) были ли клетки-хозяева Sp2/0 или 653; (2) была ли константная область тяжелой цепи кодирована предыдущим вектором IgG1 Centocor или константной областью тяжелой цепи 12B75; (3) являлось ли мАт TNV148B, TNV148, TNV14 или новой комбинацией HC/LC; (4) была ли ДНК линеаризованной плазмидой или очищенной вставкой гена антитела; и (5) наличием или отсутствием полной последовательности интрона J-C в гене тяжелой цепи. Кроме того, повторяли несколько трансфекций, чтобы повысить вероятность скрининга большого числа клонов.

[00278] Клетки Sp2/0 и 653 трансфицировали смесью ДНК тяжелой и легкой цепей (по 8–12 :г каждая) путем электропорации в стандартных условиях, как описано ранее (Knight DM et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:1443–1453). Для трансфекций с номерами 1, 2, 3 и 16 соответствующие экспрессионные плазмиды перед трансфекцией линеаризовали путем расщепления рестрикционным ферментом. Например, рестрикционные ферменты SalI и NotI использовали для линеаризации TNV148B плазмиды тяжелой цепи p1783 и плазмиды легкой цепи p1776 соответственно. Для

остальных трансфекций ДНК-вставки, содержащие только ген мАт, отделяли от плазмидного вектора путем расщепления плазмид тяжелой цепи с помощью BamHI и плазмид легкой цепи с помощью BsiWI и NotI. Впоследствии генные вставки мАт очищали с помощью электрофореза в агарозном геле и очищающих смол Qiex. Клетки, трансфицированные очищенными вставками генов, одновременно трансфицировали 3–5 :г линейризованной плазмиды pSV2gpt (p13) в качестве источника селективного маркера. После электропорации клетки высевали на 96-луночные планшеты для тканевых культур в IMDM, 15% FBS, 2 mM глутамина и инкубировали при 37 °C в инкубаторе с 5% CO₂. Через двое суток добавляли равный объем IMDM, 5% FBS, 2 mM глутамина, реагент для селекции 2 × МНХ (1 X МНХ = 0,5 :г/мл микофеноловой кислоты, 2,5 :г/мл гипоксантина, 50 :г/мл ксантина), и планшеты инкубировали в течение дополнительных 2–3 недель до образования колоний.

[00279] Клеточные супернатанты, собранные из лунок с колониями, анализировали на человеческий IgG методом твердофазного ИФА, согласно описанию. Если коротко, различные разведения супернатантов клеток инкубировали в 96-луночных планшетах для ЕІА, покрытых поликлональным козьим антителом к человеческому Fc-фрагменту IgG и впоследствии связанный человеческий IgG обнаруживали с использованием конъюгированного с щелочной фосфатазой козьего антитела к человеческому IgG(H+L) и соответствующих цветных субстратов. Стандартные кривые, для которых в качестве стандарта использовали такое же очищенное мАт, что и измеряемое в супернатантах клеток, строили для каждого планшета ЕІА для проведения количественного анализа человеческого IgG в супернатантах. Клетки колоний, которые, по-видимому, продуцировали в основном человеческие IgG, пересевали в 24-луночные планшеты для дополнительного определения продукции в отработанных культурах, а затем идентифицировали наиболее продуктивные родительские клоны.

[00280] Родительские клоны с наибольшей продукцией субклонировали для идентификации субклонов с большей продукцией и для получения более гомогенной клеточной линии. 96-луночные планшеты для тканевых культур засевали по одной клетке на лунку или по четыре клетки на лунку в IMDM, 5% FBS, 2 mM глутамина, 1 × МНХ и инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение от 12 до 20 дней до тех пор, пока колонии не становились видимыми. Супернатанты клеток собирали из лунок, содержащих по одной колонии на лунку, и анализировали с помощью твердофазного ИФА, как описано выше. Отобранные колонии пересевали на 24-

луночные планшеты и позволяли культурам отработать, после чего идентифицировали наиболее продуктивные субклоны путем количественного определения уровней IgG человека в супернатантах. Этот процесс повторяли после второго цикла субклонирования отобранных субклонов первого цикла. В качестве клеточных линий для разработки отбирали наилучшие субклоны второго цикла.

[00281] Определение характеристик клеточных субклонов. Отбирали наилучшие субклоны второго цикла и строили кривые роста для оценки уровней продукции мАт и характеристик роста клеток. Во флаконы T75 засеивали по 1×10^5 клеток/мл в 30 мл IMDM, 5 % FBS, 2 mM глутамина и $1 \times \text{МНХ}$ (или бессывороточной среды). Отбирали аликвоты по 300 мкл с интервалами 24 ч и определяли плотность живых клеток.

Анализы продолжали до тех пор, пока число живых клеток не оказывалось менее 1×10^5 клеток/мл. Собранные аликвоты клеточных супернатантов анализировали на концентрацию присутствующих антител. Анализы методом твердофазного ИФА проводили с использованием в качестве стандартов гTNV148В или гTNV14 JG92399.

Образцы инкубировали в течение 1 часа на планшетах для ИФА, покрытых поликлональным козьим антителом к человеческому Fc IgG и связанное мАт, обнаруживали конъюгированным с щелочной фосфатазой козьим антителом к человеческому IgG(H+L), в разведении 1:1000.

[00282] Для двух клеточных линий также проводили анализ разных кривых роста для сравнения темпов роста в присутствии различных количеств реагента для селекции МНХ. Клеточные линии С466А и С466В размораживали в среде без МНХ (IMDM, 5% FBS, 2 mM глутамина) и культивировали в течение двух дополнительных дней. Впоследствии обе клеточные культуры делили на три культуры, которые не содержали МНХ, содержали $0,2 \times \text{МНХ}$ или $1 \times \text{МНХ}$ ($1 \times \text{МНХ} = 0,5 \text{ :г/мл}$ микофеноловой кислоты, $2,5 \text{ :г/мл}$ гипоксантина, 50 :г/мл ксантина). Через день в свежие флаконы T75 высевали культуры с начальной плотностью 1×10^5 клеток/мл и подсчитывали клетки с интервалами 24 часа в течение одной недели. Аликвоты для продукции мАт не собирали. Для этих образцов вычисляли время удвоения с использованием формулы, представленной в SOP PD32.025.

[00283] Выполняли дополнительные исследования для оценки стабильности продукции мАт с течением времени. Культуры выращивали в 24-луночных планшетах в среде IMDM, 5% FBS, 2 mM глутамина с реагентом для селекции МНХ или без него. Культуры разделяли на свежие культуры каждый раз, когда они становились конфлюэнтными, и старым культурам давали возможность отработать. В это время

отбирали аликвоту супернатанта и хранили при 4 °С. Аликвоты отбирали в течение периода 55–78 дней. В конце данного периода супернатанты тестировали на количество присутствующего антитела, антителами к человеческому Fc IgG, как описано выше.

Результаты и обсуждение.

5 Ингибирование связывания ФНО с рекомбинантным рецептором

[00284] Проводили простой анализ связывания, чтобы определить, способны ли восемь мАт TNV, содержащихся в супернатанте клеток гибридомы, блокировать связывание ФНО- α с рецептором. Концентрации мАт TNV в соответствующих супернатантах клеток сначала определяли стандартным анализом методом твердофазного ИФА на человеческий IgG. Впоследствии рекомбинантный слитный белок рецептор ФНО p55/IgG, p55-sf2, наносили на планшеты для EIA, и давали возможность ^{125}I -меченому ФНО- α связаться с рецептором p55 в присутствии различных количеств мАт TNV. Как показано на Фиг. 1, все, кроме одного (TNV122), из восьми мАт TNV эффективно блокировали связывание ФНО- α с рецептором с p55. Фактически, мАт TNV оказались более эффективными с точки зрения ингибирования связывания ФНО- α , чем мАт положительного контроля, сА2, которые были добавлены в супернатант гибридомы отрицательного контроля. Эти результаты были интерпретированы как показывающие, что мАт TNV блокируют биологическую активность ФНО- α в клеточных анализах и *in vivo*, и, следовательно, были необходимы дополнительные анализы.

Анализ последовательности ДНК

Подтверждение того, что РНК кодируют человеческие мАт

[00285] В качестве первой стадии характеристики семи мАт TNV (TNV14, TNV15, TNV32, TNV86, TNV118, TNV148 и TNV196), которые продемонстрировали активность в плане блокирования ФНО- α в анализе связывания с рецептором, из семи гибридных клеточных линий выделяли общую РНК. Впоследствии каждый образец РНК использовали для получения кДНК тяжелой или легкой цепей человеческого антитела, которая включала полную сигнальную последовательность, полную последовательность варибельной области и часть последовательности константной области каждого мАт. Эти продукты-кДНК впоследствии амплифицировали в ПЦР-реакциях, а ПЦР-амплифицированную ДНК напрямую секвенировали без предварительного клонирования фрагментов. Секвенированная кДНК тяжелой цепи

была более чем на 90% идентична одному из пяти человеческих генов зародышевой линии, присутствующих у мышей, DP-46 (Фиг. 2). Аналогичным образом секвенированные кДНК легкой цепи были на 100 или 98 % идентичными одному из человеческих генов зародышевой линии, присутствующих у мышей (Фиг. 3). Эти результаты подтверждали, что молекулы РНК, транскрибированные в кДНК и секвенированные, кодировали тяжелые цепи человеческого антитела и легкие цепи человеческого антитела. Следует отметить, что, поскольку вариабельные области были ПЦР-амплифицированы с использованием олигонуклеотидов, которые картируются на 5'-конце последовательности, кодирующей сигнальную последовательность, первые несколько аминокислот сигнальной последовательности могут не быть фактической последовательностью исходных продуктов трансляции TNV, а представлять собой фактические последовательности рекомбинантных мАт TNV.

Уникальные нейтрализующие мАт

[00286] Анализы последовательностей кДНК целых вариабельных областей как тяжелой, так и легкой цепей каждого мАт показали, что TNV32 идентичен TNV15, TNV118 идентичен TNV14 и TNV86 идентичен TNV148. Результаты анализа связывания с рецепторами соответствовали анализам последовательностей ДНК, т. е. и TNV86, и TNV148 были приблизительно в 4 раза более эффективными, чем и TNV118, и TNV14, в плане блокирования связывания ФНО. Следовательно, последующая работа была сфокусирована только на четырех уникальных мАт TNV, TNV14, TNV15, TNV148 и TNV196.

Родство четырех мАт

[00287] Результаты определения последовательности ДНК показали, что гены, кодирующие тяжелые цепи четырех мАт TNV, были высоко гомологичны друг другу, и, по-видимому, каждый из них происходил из одного и того же гена зародышевой линии DP-46 (Фиг. 2). Кроме того, поскольку все последовательности CDR3 тяжелой цепи имеют настолько высокое сходство и одинаковую длину, а также поскольку все они используют экзон J6, очевидно, что они возникают в результате одной перестройки гена VDJ с последующими соматическими изменениями, благодаря которым каждое мАт становится уникальным. Анализы последовательностей ДНК показали, что среди четырех мАт были только два разных гена легких цепей (Фиг. 3). Кодирующие последовательности вариабельной области легкой цепи TNV14 и TNV15 идентичны

друг другу и репрезентативной последовательности зародышевой линии из семейства V γ /38K человеческих каппа-цепей. Кодирующие последовательности легкой цепи TNV148 и TNV196 идентичны друг другу, но отличаются от последовательности зародышевой линии в двух нуклеотидных положениях (Фиг. 3).

5 [00288] Определенные аминокислотные последовательности четырех мАт выявили родство этих реальных мАт. Четыре мАт содержат четыре разные тяжелые цепи (Фиг. 4), но только две разные легкие цепи (Фиг. 5). Различия между последовательностями мАт TNV и последовательностями зародышевой линии в основном ограничены доменами CDR, но три тяжелые цепи мАт также отличались от
10 последовательности зародышевой линии каркасных участков (Фиг. 4). В сравнении с каркасными областями антитела, кодируемыми зародышевой линией DP-46, TNV14 было таким же, TNV15 отличалось одной аминокислотой, TNV148 отличалось двумя аминокислотами, а TNV196 отличалось тремя аминокислотами.

[00289] Клонирование кДНК, сайт-специфический мутагенез и сборка конечных экспрессионных плазмид. Клонирование кДНК. На основании последовательности ДНК ПЦР-амплифицированных переменных областей были заказаны новые олигонуклеотиды для выполнения еще одного цикла ПЦР-амплификации для адаптации кодирующей последовательности, клонируемой в экспрессионные векторы. В случае тяжелых цепей продукты этого второго цикла ПЦР расщепляли
20 рестрикционными ферментами BsiWI и BstBI и клонировали в плазмидный вектор L28 (идентификационные номера плазмид показаны в таблице 2). В случае легких цепей продукты второго цикла ПЦР расщепляли с помощью SalI и AflII и клонировали в плазмидный вектор pBC. Впоследствии индивидуальные клоны секвенировали для подтверждения того, что их последовательности были идентичны предыдущей
25 последовательности, полученной путем прямого секвенирования продуктов ПЦР, что позволяет выявить наиболее распространенный нуклеотид в каждом положении в потенциально гетерогенной популяции молекул.

[00290] **Сайт-специфический мутагенез для изменения TNV148.** Неизменно наблюдали, что мАт TNV148 и TNV196 были в четыре раза более эффективными, чем
30 следующее по эффективности мАт (TNV14), в плане нейтрализации биологической активности ФНО- α . Однако, как описано выше, каркасные последовательности тяжелой цепи TNV148 и TNV196 отличались от каркасных последовательностей зародышевой линии. Сравнение последовательности тяжелой цепи TNV148 с другими человеческими

антителами показало, что множество других человеческих мАт содержит остаток Пе в положении 28 в каркасе 1 (учитывается только зрелая последовательность), в то время как в качестве остатка Pro в положении 75 в каркасе 3 использовали необычную аминокислоту в этом положении.

5 [00291] Аналогичное сравнение для тяжелой цепи TNV196 показывает, что три аминокислоты, которыми она отличается от последовательности зародышевой линии каркасной области 3, могут быть редкими в человеческих мАт. Существует возможность того, что из-за этих различий TNV148 и TNV196 могут стать иммуногенными при введении человеку. Поскольку антитело TNV148 имело только
10 один рассматриваемый аминокислотный остаток, и этот остаток, как полагают, является неважным для связывания ФНО- α , использовали методику сайт-специфического мутагенеза для изменения одного нуклеотида в кодирующей последовательности тяжелой цепи TNV148 (в плазмиде p1753) так, чтобы кодировать остаток Ser зародышевой линии вместо остатка Pro в положении 75. Полученная
15 плазида названа p1760 (см. таблицу 2). Полученный ген и мАт назвали TNV148B, чтобы отличать его от исходного гена TNV148 (см. Фиг. 5).

[00292] **Сборка конечных экспрессионных плазмид.** Были подготовлены новые экспрессионные векторы антител, основанные на генах тяжелой и легкой цепей 12B75, предварительно клонированных как геномные фрагменты. Хотя были получены
20 различные плазмиды экспрессии TNV (см. таблицу 2), в каждом случае фланкирующие последовательности со стороны 5'-конца, промотор и интронный энхансер получали из соответствующих генов 12B75. В случае плазмид для экспрессии легких цепей из гена легкой цепи 12B75 также получали полный интрон J-C, кодирующую последовательность константной области, и фланкирующую последовательность со
25 стороны 3'-конца. В случае плазмид для экспрессии тяжелых цепей, позволяющих получать конечные продуктивные клеточные линии (p1781 и p1783, см. ниже), последовательности, кодирующие константную область человеческого IgG1, получали из ранее использованного экспрессионного вектора (p104) Centocor. Важно отметить, что описанные в настоящем документе конечные продуктивные клеточные линии
30 экспрессируют другой аллотип (Gm(f+)) мАт TNV, отличный от аллотипа исходных полученных из гибридомы мАт TNV (G1m(z)). Это связано с тем, что ген 12B75 тяжелой цепи, полученный от мышей GenPharm, кодирует остаток Arg на C-конце домена CH1, тогда как экспрессионный вектор IgG1-Centocor, p104, кодирует остаток

Lys в этом положении. Были получены другие плазмиды для экспрессии тяжелых цепей (например, p1786 и p1788), в которых интрон J-C, полная последовательность, кодирующая константный участок, и фланкирующая последовательность со стороны 3'-конца были получены из гена 12B75 тяжелой цепи, но клеточные линии, трансфицированные данными генами, не были отобраны в качестве продукционных клеточных линий. Векторы были тщательно разработаны для обеспечения одноэтапного клонирования будущих ПЦР-амплифицированных V-областей, что позволяет получить конечные экспрессионные плазмиды.

[00293] ПЦР-амплифицированную кДНК варибельной области переносили из векторов L28 или pBC в векторы промежуточной стадии на основе 12B75, которые предоставляли промоторную область и часть интрона J-C (идентификационные номера плазмид см. в таблице 2). Рестрикционные фрагменты, содержащие 5'-половину генов антитела, впоследствии переносили из этих векторов промежуточной стадии в конечные экспрессионные векторы, предоставляющие 3'-половину соответствующих генов с образованием конечных экспрессионных плазмид (идентификационные номера плазмид см. в таблице 2).

[00294] Трансфекции и субклонирование клеток. Экспрессионные плазмиды либо линейаризовали путем расщепления рестриктазами, либо генные вставки антител в каждой плазмиде очищали от каркасов плазмиды. Клетки мышинной миеломы Sp2/0 и 653 трансфицировали при помощи ДНК тяжелой и легкой цепей путем электропорации. Проводили пятнадцать различных трансфекций, большая часть которых была уникальной по следующим показателям: антитело, конкретные характеристики генов антитела, находились ли гены на линейаризованных цельных плаزمидках или очищенных генных вставках и по линии клеток-хозяев (сводные данные в таблице 4). Супернатанты клеток от клонов, устойчивых к микофеноловой кислоте, анализировали методом твердофазного ИФА на присутствие человеческого IgG и количественно оценивали с использованием очищенного rTNV148B для построения эталонной калибровочной кривой.

Клеточные линии с наибольшей продукцией rTNV148B

[00295] Десять наиболее эффективно продуцирующих родительских линий 653 после rTNV148B-трансфекции 2 (продуцирующих 5–10 :г/мл в отработанных 24-луночных культурах) субклонировали для скрининга на более высокопродуцирующие

клеточные линии и получения более гомогенной популяции клеток. Два субклона родительской линии 2.320, 2.320-17 и 2.320-20 продуцировали приблизительно 50 :г/мл в отработанных 24-луночных культурах, что представляло собой увеличение в 5 раз по сравнению с родительской линией. Второй цикл субклонирования субклонированных

5 линий 2.320-17 и 2.320-20

[00296] Показаны идентификационные номера плазмид тяжелой и легкой цепей, которые кодируют каждое мАт. В случае трансфекций, выполненных с использованием очищенных вставок гена мАт, в качестве источника селективного маркера gpt использовали плазмиду p13 (pSV2gpt). Константные области тяжелой цепи кодировали

10 либо тем же экспрессионным вектором человеческого IgG1, который применяли для кодирования антитела Remicade («старый»), либо константными областями, содержащимися в гене тяжелой цепи (GenPharm/Medarex) 12B75 («новый»). H1/L2 означает «новое» мАт, состоящее из тяжелой цепи TNV14 и легкой цепи TNV148.

15 Плазмиды p1783 и p1801 отличаются только тем, насколько большую часть интрона J-С содержат их гены тяжелой цепи. Справа показаны номера трансфекций, которые образуют первое число общих названий клеточных клонов. Описанные здесь линии rTNV148В-продуцирующих клеток С466 (А, В, С, D) и С467А получены из трансфекционных номеров 2 и 1 соответственно. rTNV14-продуцирующая клеточная линия С476А получена из номера 3 трансфекции.

20 **Таблица 4. Сводные данные по трансфекциям клеток**

| Плазмиды | НС | ДНК | | | |
|----------------------|------------------|---------------|---------------|--------------|------------|
| <u>№ трансфекции</u> | | | | | |
| <u>мАт</u> | <u>НС/LC/gpt</u> | <u>вектор</u> | <u>формат</u> | <u>Sp2/0</u> | <u>653</u> |
| rTNV148B | 1783/1776 | старый | линейный | 1 | 2 |
| rTNV14 | 1781/1775 | старый | линейный | 3 | - |
| rTNV148B | 1788/1776/13 | новый | вставка | 4,6 | 5,7 |
| rTNV14 | 1786/1775/13 | новый | вставка | 8,10 | 9,11 |
| rTNV148 | 1787/1776/13 | новый | вставка | 12 | 17 |
| rH1/L2 | 1786/1776/13 | новый | вставка | 13 | 14 |
| rTNV148B | 1801/1776 | старый | линейный | 16 | |

[00297] Анализы методом твердофазного ИФА супернатантов отработанных культур в 24-луночных планшетах показали, что все эти субклоны второго цикла производили от 98 до 124 :г/мл, что по меньшей мере в 2 раз превышало субклоны первого цикла. Этим 653 клеточным линиям были присвоены С-кодовые обозначения, показанные в таблице 5.

[00298] Три наиболее эффективно продуцирующие родительские линии Sp2/0 из rTNV148B трансфекции 1 были субклонированы. Два цикла субклонирования родительской линии 1.73 привели к выявлению клона, продуцирующего 25 :г/мл в отработанных культурах в 24-луночных культурах. Данная клеточная линия Sp2/0 была обозначена как С467А (таблица 5).

[15] Клеточные линии с наибольшей продукцией rTNV14

[00299] Три наиболее эффективно продуцирующие родительские линии Sp2/0 после rTNV14-трансфекции 3 были субклонированы один раз. Было обнаружено, что субклон 3.27-1 является наиболее эффективным продуцентом в отработанных 24-луночных культурах с продукцией 19 :г/мл. Данная клеточная линия была обозначена как С476А (таблица 5).

Таблица 5. Сводные данные по отобранным продуцирующим клеточным линиям и их С-коды

[00300] Первая цифра названий исходных клонов указывает на то, на какой клеточной линии проводили трансфекцию. Все описанные в настоящем документе клеточные линии с С-кодами получали путем трансфекции полными плазмидами тяжелой и легкой цепей, линеаризованными рестрикционными ферментами.

| Происхождение | Отработанные 24-луночные ___ | | | | |
|---------------|------------------------------|----------------|-------|---------------|------------|
| | мат | исходного гена | Код С | Клетка-хозяин | Экспрессия |
| rTNV148B | 2.320-17-36 | | С466А | 653 | 103:г/мл |
| 2.320-20-111 | С466В | 653 | | 102 :г/мл | |
| 2.320-17-4 | С466С | 653 | | 98:г/мл | |
| 2.320-20-99 | С466D | 653 | | 124:г/мл | |
| 1.73-12-122 | С467А | Sp2/0 | | 25:г/мл | |
| rTNV14 | 3.27-1 | С476А | | Sp2/0 | 19:г/мл |

Определение характеристик субклонированных клеточных линий

[00301] Для более точного определения характеристик роста клеточной линии и определения уровней продукции мАт в более широком масштабе проводили анализ кривых роста с использованием культур во флаконах Т75. Результаты показали, что каждая из четырех клеточных линий С466 достигала пиковой плотности клеток в диапазоне от $1,0 \times 10^6$ до $1,25 \times 10^6$ клеток/мл и максимального уровня накопления мАт в диапазоне от 110 до 140 :г/мл (Фиг. 7). Напротив, наиболее эффективно продуцирующий субклон Sp2/0, С467А, достигал пиковой плотности клеток $2,0 \times 10^6$ клеток/мл и максимальных уровней накопления мАт 25 :г/мл (Фиг. 7). Анализ кривой роста не проводили на гТNV14-продуцирующей клеточной линии С476А.

[00302] Был проведен дополнительный анализ кривой роста для сравнения темпов роста при различных концентрациях реагента для селекции МНХ. Это сравнение было сделано по последним наблюдениям, что клетки С466, культивированные в отсутствие МНХ, очевидно, быстрее растут, чем те же клетки, культивированные при нормальном количестве МНХ ($1 \times$). Поскольку цитотоксические концентрации соединений, таких как микофеноловая кислота, как правило, измеряют порядками величины, было сочтено, что использование более низкой концентрации МНХ может приводить к значимому сокращению времени удвоения клеток без ущерба для стабильности продукции мАт. Клеточные линии С466А и С466В культивировали в следующих условиях: без МНХ, с $0,2 \times$ МНХ или $1 \times$ МНХ. Подсчет живых клеток производили с интервалами 24 часа в течение 7 дней. Результаты показали зависимость от концентрации МНХ скорость роста клеток (Фиг. 8). Клеточная линия С466А демонстрировала время удвоения 25,0 часа при $1 \times$ МНХ, но всего лишь 20,7 часа без МНХ. Аналогичным образом, для клеточной линии С466В время удвоения составило 32,4 часа при $1 \times$ МНХ, но составило всего 22,9 часа без МНХ. Важно отметить, что время удвоения обеих клеточных линий при $0,2 \times$ МНХ было более сходным с наблюдаемым при концентрации $1 \times$ МНХ (Фиг. 8). Эти данные повышают вероятность того, что увеличения продуктивности клеток в биореакторах, для которых важным параметром является время удвоения, можно достичь при использовании меньшего количества МНХ. Однако, хотя результаты исследования стабильности (см. ниже) свидетельствуют, что клеточная линия С466D способна стабильно продуцировать гТNV148В в течение по меньшей мере 60 дней даже в отсутствие МНХ, исследование стабильности также показало более высокие уровни

продукции мАт при культивировании клеток в присутствии МНХ по сравнению с отсутствием МНХ.

[00303] Для оценки продукции мАт различными клеточными линиями в течение приблизительно 60 дней проводили исследования стабильности в культурах, которые содержали или не содержали селекционный реагент МНХ. Не все клеточные линии поддерживали высокий уровень продукции мАт. Спустя всего две недели культивирования продукция у клона С466А была приблизительно на 45% меньше, чем в начале исследования. Продукция у клона С466В также существенно падала. Однако клоны С466С и С466D сохраняли довольно стабильную продукцию, причем С466D демонстрировал самые высокие абсолютные уровни продукции (Фиг. 9).

Заключение

[00304] Из исходной панели из восьми человеческих мАт против человеческого ФНО- α было выбрано антитело TNV148В в соответствии с несколькими критериями, которые включали белковую последовательность и эффективность нейтрализации ФНО, а также TNV14. Получали клеточные линии, продуцирующие более 100 :г/мл гTNV148В и 19 :г/мл гTNV14.

Пример 5. Исследование на мышах с артритом с использованием антител к ФНО и контролей с использованием однократной болюсной инъекции

[00305] В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 в зависимости от пола и массы тела были распределены в одну из 9 групп лечения и получали одну внутрибрюшинную болюсную дозу PBS Дульбекко (D-PBS) или антитела к ФНО настоящего изобретения (TNV14, TNV148 или TNV196) в дозе 1 мг/кг или 10 мг/кг.

[00306] РЕЗУЛЬТАТЫ При анализе массы тела как изменения относительно состояния до введения дозы животные, получавшие 10 мг/кг сА2, демонстрировали устойчиво более высокий прирост массы тела, чем животные, получавшие D-PBS, в течение всего исследования. Этот прирост массы тела был значимым на неделях 3–7. Животные, получавшие 10 мг/кг TNV148, также достигали значимого увеличения массы тела на 7 неделе исследования. (См. фиг. 10).

[00307] На Фиг. 11А–В представлено прогрессирование тяжести заболевания по данным индекса артрита. Индекс артрита в группе, получавшей 10 мг/кг сА2, был ниже по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS, начиная с 3 недели и далее

на протяжении всей оставшейся части исследования (неделя 7). У животных, получавших 1 мг/кг TNV14, и у животных, получавших 1 мг/кг сА2, не наблюдали значимого снижения индекса артрита (AI) через 3 недели по сравнению с группой, получавшей D-PBS. При сравнении каждой из групп с другими, получавшими сходные дозы (10 мг/кг сА2 по сравнению с 10 мг/кг TNV14, 148 и 196), между группами 5 лечения, получавшими 10 мг/кг, не было значимых различий. При сравнении групп лечения 1 мг/кг, доза 1 мг/кг TNV148 показала существенно более низкий AI, чем 1 мг/кг сА2 через 3, 4 и 7 недель. AI в группе, получавшей 1 мг/кг TNV148 был также существенно ниже, чем в группе, получавшей 1 мг/кг TNV14, через 3 и 4 недели. Хотя 10 антитело TNV196 демонстрировало значимое снижение AI вплоть до 6 недели исследования (по сравнению с группой, получавшей D-PBS), антитело TNV148 было единственным лечением с дозой 1 мг/кг, которое сохраняло достоверный эффект по завершении исследования.

Пример 6. Исследование на мышцах с артритом с использованием антител к ФНО и контролей в качестве многократных болюсных доз

[00308] В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 были распределены в одну из 8 групп лечения на основании массы тела и получали внутрибрюшинную болюсную дозу контрольного препарата (D-PBS) или антитела (TNV14, TNV148) в дозе 3 мг/кг (неделя 0). Инъекции повторяли для всех животных на 1, 2, 3 и 4 неделях. Эффективность испытуемого препарата оценивали в группах 1–6. Образцы сыворотки, полученные от животных групп 7 и 8, оценивали на индукцию иммунного ответа и на фармакокинетический клиренс TNV14 или TNV148 на неделях 2, 3 и 4.

[00309] РЕЗУЛЬТАТЫ При анализе массы тела как изменения относительно уровня до введения препарата значимых отличий не было выявлено. Животные, получавшие 10 мг/кг сА2, демонстрировали устойчиво более высокий прирост массы тела, чем животные, получавшие D-PBS, в течение всего исследования. (См. Фиг. 12).

[00310] На Фиг. 13А–В представлено прогрессирование тяжести заболевания по данным индекса артрита. Индекс артрита в группе, получавшей 10 мг/кг сА2, был существенно ниже по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS, начиная с 2 недели и далее на протяжении всей оставшейся части исследования (неделя 5). Животные, получавшие 1 мг/кг или 3 мг/кг сА2, и животные, получавшие 3 мг/кг

TNV14, не продемонстрировали какого-либо значимого снижения AI в какой-либо момент на протяжении исследования по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS. Животные, получавшие 3 мг/кг TNV148, демонстрировали значимое снижение по сравнению с группой, получавшей D-PBS, начиная с недели 3 и вплоть до недели 5. Животные, получавшие 10 мг/кг сА2, демонстрировали значимое снижение AI по сравнению с обеими более низкими дозами (1 мг/кг и 3 мг/кг) сА2 на 4 и 5 неделях исследования, а также значение было также существенно ниже, чем у животных, получавших TNV14, на 3–5 неделях. Хотя, по-видимому, между группами лечения 3 мг/кг, не было значимых различий, AI у животных, получавших лечение 3 мг/кг TNV14, в некоторых временных точках был существенно выше, чем у животных, получавших 10 мг/кг, а животные, получавшие TNV148, не отличались существенно от животных, получавших 10 мг/кг сА2.

Пример 7. Исследование на мышях с артритом с использованием антител к ФНО и контролей, вводимых в виде однократной внутривнутрибрюшинной болюсной дозы

[00311] В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 были распределены, в зависимости от пола и массы тела, в одну из 6 групп лечения и получали одну внутривнутрибрюшинную болюсную дозу антитела (сА2 или TNV148) в дозе 3 мг/кг или 5 мг/кг. В этом исследовании использовали контрольные группы D-PBS и 10 мг/кг сА2.

[00312] При анализе массы тела как изменения относительно уровня перед введением дозы препарата, все виды лечения обеспечили сходный прирост массы. Животные, получавшие либо 3, либо 5 мг/кг TNV148, либо 5 мг/кг сА2, значимо набирали массу тела в начале исследования (на 2 и 3 неделях). Только животные, получавшие TNV148, сохраняли значимый прирост массы в более поздние моменты времени. Животные, получавшие 3, так и 5 мг/кг TNV148, демонстрировали значимый прирост через 7 недель, а у животных, получавших 3 мг/кг TNV148, значимое повышение наблюдалось и через 8 недель после инъекции. (См. Фиг. 14).

[00313] На Фиг. 15 представлено прогрессирование тяжести заболевания по данным индекса артрита. Во всех группах лечения наблюдалась некоторая защита в ранние сроки, причем 5 мг/кг сА2 и 5 мг/кг TNV148 демонстрировали значимое снижение AI на 1–3 неделе, и во всех группах лечения наблюдалось значимое снижение на 2 неделе. Позднее в этом исследовании у животных, получавших 5 мг/кг сА2,

наблюдалась некоторая защита со значимым снижением на 4, 6 и 7 неделях. Низкая доза (3 мг/кг) как сА2, так и TNV148 приводила к значимому снижению на 6 неделе, и во всех группах лечения наблюдалось значимое снижение на 7 неделе. Ни одна из групп лечения не смогла сохранить значимое снижение по завершении исследования (неделя 8). Ни на одном из сроков не было обнаружено значимых различий между любыми группами лечения (за исключением контрольной группы, получавшей физиологический раствор).

Пример 8. Исследование на мышах с артритом с использованием антител к ФНО и контролей, вводимых в виде однократной внутрибрюшинной болюсной дозы, со сравнением между антителом к ФНО и модифицированным антителом к ФНО

[00314] Сравнение эффективности однократного внутрибрюшинного введения антитела TNV148 (полученного из клеток гибридомы) и rTNV148B (полученного из трансфицированных клеток). В возрасте приблизительно 4 недель экспериментальные мыши Tg197 были распределены, в зависимости от пола и массы тела, в одну из 9 групп лечения и получали одну внутрибрюшинную болюсную дозу PBS Дульбекко (D-PBS) или антитела (TNV148, rTNV148B) в дозе 1 мг/кг.

[00315] При анализе массы тела как изменения относительно состояния до введения дозы животные, получавшие 10 мг/кг сА2, демонстрировали устойчиво более высокий прирост массы тела, чем животные, получавшие D-PBS, в течение всего исследования. Этот прирост массы был значимым на неделях 1 и неделях 3–8. Животные, получавшие 1 мг/кг TNV148, также достигали значимого прироста массы тела на 5, 6 и 8 неделях исследования. (См. Фиг. 16).

[00316] На Фиг. 17 представлено прогрессирование тяжести заболевания по данным индекса артрита. Индекс артрита в группе, получавшей 10 мг/кг сА2, был ниже по сравнению с контрольной группой, получавшей D-PBS, начиная с 4 недели и далее на протяжении всей оставшейся части исследования (неделя 8). Как группа, получавшая TNV148, так и группа, получавшая 1 мг/кг сА2, показали значимое снижение AI на 4 неделе. Хотя предыдущее исследование (P-099-017) показало, что TNV148 был несколько более эффективным в плане снижения индекса артрита после однократного внутрибрюшинного болюсного введения в дозе 1 мг/кг, данное исследование показало, что AI для обеих групп, получавших варианты антитела TNV, была несколько выше. Хотя (за исключением недели 6) группа, получавшая 1 мг/кг сА2, не давала

существенного увеличения по сравнению с группой, получавшей 10 мг/кг сА2, а группы, получавшие TNV148, давали существенное увеличение на 7 и 8 неделях, не было отмечено значимых различий в АІ между группой, получавшей 1 мг/кг сА2, 1 мг/кг TNV148 и 1 мг/кг TNV148В, в любой момент исследования.

5 **Пример 9. Промышленные способы изготовления препарата SIMPONI® (голимумаб)**

Справочные сведения о препарате голимумаб

[00317] Терапия ингибиторами ФНО- α успешно применялась при лечении воспалительных артритов, но ранние ингибиторы ФНО имели ограничения, связанные с безопасностью, режимом дозирования, стоимостью и/или иммуногенностью. Для устранения некоторых ограничений разработано полностью человеческое моноклональное антитело к ФНО- α , получившее название SIMPONI® (голимумаб). Голимумаб (также известный как CNTO 148 и rTNV148В) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело с изотипом тяжелой цепи иммуноглобулина G 1 (IgG1) (аллотип G1m[z]) и изотипом легкой цепи каппа. Голимумаб имеет тяжелую цепь (HC), имеющую SEQ ID NO:36, и легкую цепь (LC), имеющую SEQ ID NO:37. Молекулярная масса голимумаба составляет от 149 802 до 151 064 дальтон.

[00318] Голимумаб образует высокоаффинные, стабильные комплексы как с растворимыми, так и с трансмембранными биоактивными формами фактора некроза опухоли человека альфа (ФНО- α) с высокой аффинностью и специфичностью, что предотвращает связывание ФНО- α с его рецепторами и нейтрализует биологическую активность ФНО- α . Связывания с другими лигандами суперсемейства ФНО- α не наблюдали; в частности, голимумаб не связывает или не нейтрализует человеческий лимфотоксин. ФНО α синтезируется главным образом активированными моноцитами, макрофагами и Т-клетками в виде трансмембранного белка, который самоассоциируется с образованием биоактивного гомотримера, быстро высвобождающегося с поверхности клетки путем протеолиза. Связывание ФНО α с ФНО-рецепторами p55 или p75 приводит к кластеризации цитоплазматических доменов рецептора и инициирует сигнализацию. Фактор некроза опухоли α был идентифицирован как ключевой сигнальный цитокин, который продуцируется в ответ на различные стимулы и вследствие этого стимулирует воспалительный ответ

посредством активации пути каспаза-зависимого апоптоза и ядерного фактора транскрипции (NF)- κ B и активирующего белка-1 (AP-1). Фактор некроза опухоли α также модулирует иммунный ответ за счет его роли в организации иммунных клеток внутри зародышевых центров. Повышенная экспрессия ФНО- α была связана с хроническими воспалительными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит (РА), а также с спондилоартропатиями, такими как псориатический артрит (ПА) и анкилозирующий спондилит (АС), и является важным медиатором воспаления и структурного повреждения суставов, характерного для этих заболеваний.

Клинические испытания с использованием голимумаба

10 [00319] В глобальном рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании фазы 3 голимумаб вводили подкожно (п/к) субъектам с анкилозирующим спондилитом (АС) (исследование C0524T09), голимумаб демонстрировал эффективность в улучшении признаков и симптомов, физической функции и качества жизни, обусловленного состоянием здоровья (HRQOL), у 15 субъектов, страдающих анкилозирующим спондилитом (АС). Кроме того, анализ безопасности показал, что голимумаб п/к в целом хорошо переносился и продемонстрировал профиль безопасности, аналогичный профилю безопасности, наблюдаемому при применении других ингибиторов ФНО- α .

[00320] Учитывая известную безопасность и эффективность голимумаба при п/к 20 введении предположили, что голимумаб при в/в введении также будет иметь приемлемый профиль безопасности, соответствующий другим ингибиторам ФНО- α , применяющимся при ревматических заболеваниях, таких как РА, ПА и АС. Голимумаб для внутривенного введения окончательно изучали в исследовании фазы 3 (CNTO148ART3001), результаты которого легли в основу одобрения препарата для лечения РА. Исследование 25 CNTO148ART3001 представляло собой рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое многоцентровое 2-стороннее исследование эффективности и безопасности в/в применения голимумаба в дозе 2 мг/кг в виде инфузий с введением в течение периода свыше 30 ± 10 минут на неделю 0, 4, а затем каждые 8 недель (к8н), у 30 субъектов с активным РА, несмотря на сопутствующую терапию метотрексатом (MTX). Субъектов с активным РА, несмотря на МТ, рандомизировали для получения либо инфузий плацебо, либо голимумаба внутривенно, вводимого в дозе 2 мг/кг в недели 0, 4 и каждые 8 недель до недели 24. Начиная с недели 24, всем субъектам вводили в/в голимумаб до недели 100. Продemonстрировано, что голимумаб при в/в введении

обеспечивал значительные преимущества в улучшении признаков и симптомов РА, физической функции и качества жизни, обусловленного состоянием здоровья, а также замедление прогрессирования структурного повреждения. Голимумаб, вводимый внутривенно при лечении РА (CNT0148ART3001), показал высокую эффективность и приемлемый профиль безопасности при низкой частоте реакций на инфузии.

[00321] Недавно спланированы два исследования фазы 3 для оценки эффективности и безопасности голимумаба при внутривенном (в/в) введении в лечении субъектов с активным анкилозирующим спондилитом (АС) и активным псориатическим артритом (ПА). Проводят оценку способа введения у субъектов, поскольку доступные настоящее время ингибиторы ФНО- α для в/в введения имеют ограничения, связанные с иммуногенностью и реакциями на инфузию и для них требуется более длительное время инфузии (от 60 до 120 минут) по сравнению с длительностью инфузий голимумаба для в/в введения, составляющим 30 ± 10 минут. Пациенты также могут предпочитать поддерживающую схему в/в введения голимумаба, чем более частые п/к введения препаратов.

Обзор производственного процесса

[00322] Simponi (голимумаб) изготавливают в ходе процесса, состоящего из 9 стадий, который включает непрерывное перфузионное культивирование клеток с последующей очисткой. Обзор производственного процесса представлен на Фиг. 18.

[00323] 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.

[00324] 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

НЕК), клетки почки новорожденного хомячка (клетки ВНК), клетки мышино-миеломы (например, клетки NS0 и клетки Sp2/0) и клетки человеческой сетчатки (например, клетки PER.C6).

[00325] Используемые в настоящем документе термины «среда с определенным химическим составом» или «среды с определенным химическим составом» относятся к 5 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 10 компоненты растительного или животного происхождения (например, белки, полипептиды и т. д.). Среды 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 15 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, триэтаноламин и т. п. В контексте настоящего описания среда с определенным химическим составом содержит не более чем микромолярное количество любого иона металла. К примерам доступных 20 в продаже сред с заданным химическим составом относятся, без ограничений, среда CD Hybridoma Medium и среда CD Hybridoma AGT™ Medium от компании ThermoFisher, различные среды типа модифицированной по способу Дульбекко среды Игла (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 25 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.

[00326] Используемый в настоящем документе термин «биореактор» относится к 30 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, рН и температуру, необязательно контролируют в течение периода культивирования. Биореактор может состоять из
- 5 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.
- 10 Объем производственного биореактора, как правило, составляет по меньшей мере 500 литров и может составлять 1000, 2500, 5 000, 8 000, 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.
- 15 [00327] Прекультивирование, размножение клеток и продукцию клеток выполняют на стадиях 1 и 2. На стадии 1 иницируют прекультивирование из одного флакона с рабочим банком клеток трансфицированных клеток Sp2/0, экспрессирующих последовательности ТЦ и ЛЦ голимумаба, клетки размножают в культуральных колбах, одноразовых культуральных мешках, и либо в перфузионном биореакторе для
- 20 выращивания посевного материала вместимостью 50 л, оборудованным внутренним центробежным фильтром, либо в перфузионном биореакторе для выращивания посевного материала вместимостью 200 л, оборудованным системой удержания клеток с мембранной фильтрацией с переменным тангенциальным потоком (АТФ). Клетки культивируют до тех пор, пока не будут получены плотность и объем клеток,
- 25 необходимые для посева в производственный биореактор вместимостью 500 л или 1000 л. На стадии 2 клеточную культуру непрерывно перфузируют в производственном биореакторе вместимостью 500 л или 1000 л с использованием системы АТФ. Из системы АТФ собирают пермеат клеточной культуры (урожай), клетки возвращают в биореактор и культуру пополняют свежей средой. Биомасса, удаленная из биореактора,
- 30 может быть объединена с извлеченным из системы АТФ сбором, а затем очищена для получения объединенного сбора для дальнейшей обработки.
- [00328] Очистку голимумаба из сбора клеточной культуры выполняют на стадиях 3–8 с помощью комбинации этапов аффинной и ионообменной хроматографии и этапов

для инактивации или удаления потенциального вирусного загрязнения (обработка растворителем/моющим средством и фильтрация для удаления вируса). На стадии 3 сбор и/или объединенный сбор процеживают и очищают с использованием аффинной хроматографии на белке А. Полученный элюат прямого захвата продукта (DPC) замораживают до дальнейшей обработки. Элюаты ПСП фильтруют и объединяют в пул на стадии 4 после размораживания, а затем на стадии 5 обрабатывают три-н-бутилфосфатом (TNBP) и полисорбатом 80 (PS 80) для инактивации любых потенциально присутствующих вирусов в липидной оболочке.

5 [00329] На стадии 6 из продукта голимумаба удаляют реагенты TNBP и PS 80 и примеси с помощью катионообменной хроматографии. Продукт голимумаба дополнительно очищают с помощью анионообменной хроматографии на стадии 7 для удаления ДНК, потенциально присутствующих вирусов и примесей. На стадии 8 очищенный продукт голимумаба разбавляют и фильтруют через удерживающий вирусы фильтр.

15 [00330] Окончательное получение голимумаба выполняют на стадии 9. Продукт голимумаба концентрируют на этапе ультрафильтрации, а на этапе диафильтрации добавляют эксципиенты состава и удаляют внутривыпускные буферные соли. Добавляют PS 80 и промежуточное соединение фильтруют в поликарбонатные контейнеры для хранения в замороженном виде в форме нерасфасованного препарата (НП).

20

Подробное описание культивирования клеток в производственном процессе

Стадия 1

Прекультивирование и размножение

25 [00331] Первой стадией в продукции Simponi (голимумаб) является инициация прекультивирования из флакона с рабочим банком клеток (WCB) трансфицированных клеток Sp2/0, экспрессирующих последовательности ТЦ и ЛЦ голимумаба, и последующее размножение клеточной культуры в культуральных колбах, одноразовых культуральных мешках и в биореакторе для выращивания посевного материала

30 вместимостью 50 л или 200 л. Клетки культивируют до тех пор, пока не будут получены плотность и объем клеток, необходимые для посева в производственный биореактор вместимостью 500 л или 1000 л. Блок-схема стадии 1, показывающая этапы

предварительного культивирования и размножения с контролями в процессе выполнения и тестами мониторинга процесса, представлена на Фиг. 19.

Процедура производства

[00332] Кριοфлаконе из WCB размораживают и разбавляют до плотности посева 0,2-0,4 жизнеспособных клеток (ЖК) $\times 10^6$ /мл средой с заданным химическим составом, обогащенной 6 мМ L-глутамина, 0,5 мг/л микофенольной кислоты, 2,5 мг/л гипоксантина и 50 мг/л ксантина (среда CD-A). Жизнеспособность культуры при размораживании должна составлять $\geq 50\%$. Первоначальный пассаж поддерживают в культуральной(-ых) колбе(-ах) в увлажненном инкубаторе с CO_2 , температуру и CO_2 контролируют. Культуру инкубируют в течение 2-3 дней до получения минимальной клеточной плотности $0,6 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл.

[00333] Масштабирования достигают путем последовательного размножения культуры в культуральных флаконах и одноразовых культуральных мешках. Каждый пассаж начинали с клеточной плотности $0,2-0,4 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл путем разведения средой CD-A. Пассажи инкубируют в течение 2-3 дней на каждом этапе размножения до получения минимальной плотности клеток $0,6 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл. После достижения достаточного объема культуры в одноразовом пакете для культивирования при $\geq 0,8 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл и $\geq 80\%$ жизнеспособности культуры, культуру можно засеивать в биореактор для выращивания посевного материала вместимостью 50 л или 200 л.

[00334] Образцы каждого пассажа прекультивирования отбирают для определения плотности жизнеспособных клеток (VCD), жизнеспособности культуры и микроскопического исследования. Перед посевом в биореактор для выращивания посевного материала вместимостью 50 л или 200 л образцы прекультивируют для оценки бионагрузки. Прекультивирование можно поддерживать в течение максимум 30 дней после размораживания. Прекультивирование прекращают при обнаружении микробного загрязнения или превышении максимальной продолжительности. Резервная прекультура может быть сохранена при посеве в биореактор для выращивания посевного материала или может быть инициирована при размораживании нового флакона с РБК. Резервную прекультуру размножают, как описано выше, и подвергают воздействию при тех же параметрах внутрипроизводственного контроля и функционирования, что и первичные культуры. Резервную прекультуру могут

поддерживать и использовать для посева в биореактор для выращивания посевного материала вместимостью 50 л или 200 л при необходимости.

[00335] Когда прекультура соответствует критериям посева, содержимое одноразового(-ых) культурального(-ых) мешка(-ов) для культивирования переносят в биореактор для выращивания посевного материала вместимостью 50 л или 200 л для достижения плотности посева $\geq 0,3 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл. Биореактор для выращивания посевного материала вместимостью 50 л или 200 л подпитывают культуральной средой CD-A и до достижения полного рабочего объема, эксплуатируют в режиме перфузии. Для поддержания клеточного роста контролируют pH, температуру и концентрацию растворенного кислорода культуры. Культуру в биореакторе для выращивания посевного материала вместимостью 50 л или 200 л размножают до получения клеточной плотности $\geq 2,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл, при $\geq 80\%$ жизнеспособности культуры. На протяжении всего процесса забирают образцы культуры из биореактора для выращивания посевного материала вместимостью 50 л или 200 л для определения VCD, жизнеспособности культуры и микроскопического исследования. Перед посевом в производственный биореактор вместимостью 500 л или 1000 л отбирают образцы из биореактора для выращивания посевного материала вместимостью 50 л или 200 л для оценки бионагрузки. Если показатель VCD в образцах из биореактора для выращивания посевного материала вместимостью 50 л или 200 л достигает $\geq 2,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл, а производственный биореактор вместимостью 500 л или 1000 л не готов к посеву, можно продолжить перфузионное культивирование клеток до максимальной продолжительности культивирования, составляющей 6 дней после посева в биореактор для выращивания посевного материала вместимостью 50 л и 7 дней после посева в биореактор для выращивания посевного материала вместимостью 200 л. Эксплуатацию биореактора для выращивания посевного материала вместимостью 50 л или 200 л прекращают при обнаружении микробного загрязнения или превышении максимальной продолжительности.

Стадия 2

30 Продукция биореактора

[00336] Второй стадией производственного процесса является перфузионное культивирование клеток в производственном биореакторе вместимостью 500 л или 1000 л.

Фильтрат (сбор) клеточной культуры забирают из производственного биореактора, в то время как клетки удерживаются с помощью устройства удержания клеток с мембранной фильтрацией с переменным тангенциальным потоком (АТФ), после чего культуру пополняют свежей средой. Блок-схема, изображающая процесс производства в биореакторе вместимостью 500 л или 1000 л, представлена на Фиг. 20.

Процедура производства

[00337] Посев в производственном биореакторе вместимостью 500 л или 1000 л выполняют путем переноса содержимого биореактора для выращивания посевного материала вместимостью 50 л или 200 л в производственный биореактор вместимостью 500 л или 1000 л, содержащий среду с заданным химическим составом, обогащенную 6 мМ L-глутамина, 0,5 мг/л микофенольной кислоты, 2,5 мг/л гипоксантина и 50 мг/л ксантина (среда CD-A). Переносимый объем должен быть достаточным, чтобы получить плотность посева $\geq 0,3 \times 10^6$ жизнеспособных клеток /мл. Культуры поддерживают при температуре 34,0–38,0 °С, рН 6,80–7,40 и концентрации растворенного кислорода 10–80%. Отбор образцов проводят в течение всего процесса культивирования в производственном биореакторе вместимостью 500 л или 1000 л для контроля плотности жизнеспособных клеток (VCD), жизнеспособности культуры, бионагрузки и концентрации иммуноглобулина G (IgG).

[00338] После посева скорость подачи среды в культуру увеличивают в соответствии с предварительно заданным графиком до тех пор, пока не будет достигнута максимальная скорость подачи. Максимальную скорость подачи поддерживают на уровне 0,80–1,50 объемов реактора в сутки. При достижении полного рабочего объема биореактора запускают перфузия с помощью системы АТФ для выделения клеток из фильтрата. Фильтрат непрерывно отбирают через фильтр АТФ, в то время как клеточная культура циркулирует между системой АТФ и биореактором. Фильтрат АТФ собирают в контейнеры для биопроцесса (BPC).

[00339] Среду, подаваемую в биореактор, меняют с CD-A на среду с заданным химическим составом, обогащенную 6 мМ L-глутамина, 0,5 мг/л микофеноловой кислоты, 2,5 мг/л гипоксантина, 50 мг/л ксантина и 10 мМ ацетата натрия (среда CDH-B), когда VCD достигает $\geq 8,5 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл, но не позднее чем через 15 день после посева в биореактор вместимостью 500 л или 1000 л. Плотность жизнеспособных клеток в биореакторе контролируют до целевой концентрации,

составляющей по меньшей мере $12,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл при помощи регулируемого потока для удаления биомассы из культуры.

[00340] Биомассу, удаленную из биореактора, можно выбросить или объединить с фильтратом ATF и очистить путем фильтрации.

5 [00341] Фильтрат ATF обозначают как поток среды сбора. В поток среды сбора прибавляют этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) до достижения концентрации 5–20 мМ. Сбор хранят в контейнерах для биопроцесса (BPC) в среде с температурой 2–8 °C в течение максимального периода времени 21 дней после извлечения из биореактора. Перед прямым связыванием продукта отбирали образцы из контейнеров для биопроцесса для каждого сбора для контроля концентрации IgG, эндотоксина и бионагрузки (стадия 3).

10 [00342] Операция по перфузионному культивированию клеток в производственном биореакторе вместимостью 500 л или 1000 л продолжают до 60 дней после посева. В последний день работы производственного биореактора вместимостью 500 л или 15 1000 л отбирают образцы культуры для тестирования на микоплазму и занесенный вирус. Концентрацию IgG в биореакторе контролировали и регистрировали только для информации.

Введение в стратегию управления производством

20 [00343] Была разработана стратегия управления производством для поддержания постоянства характеристик лекарственного вещества (ЛВ) и лекарственного препарата (ЛП) голимумаба в отношении олигосахаридного профиля, а также для контроля плотности жизнеспособных клеток (VCD), жизнеспособности клеток (%) и производительности в ходе крупномасштабного коммерческого производства.. Гликозилирование голимумаба отслеживают в качестве внутрипроизводственного 25 контроля нерасфасованного препарата (НП) на стадии 9 производственного процесса с указанием верхних и нижних пределов для среднего % общего количества нейтральных олигосахаридов, % общего количества заряженных олигосахаридов и % отдельных видов нейтральных олигосахаридов, G0F, G1F и G2F. Используемые в настоящем документе термины «лекарственное вещество» (сокращенно «ЛВ») и «лекарственный 30 препарат» (сокращенно «ЛП») относятся к 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.

[00344] Вкратце, стратегия управления производством обеспечивает контроль олигосахаридного профиля голимумаба 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 $\leq 1,8$ 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, 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 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 голимумаба, полученный с использованием настоящей стратегии управления производством, содержит антитела к ФНО, причем олигосахаридный профиль антител к ФНО имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 82,0\%$ до $\leq 94,4\%$, общее содержание видов заряженных олигосахаридов от $\geq 5,6\%$ до $\leq 18,0\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 25,6\%$ до $\leq 42,2\%$, G1F от $\geq 31,2\%$ до $\leq 43,6\%$ и G2F от $\geq 5,6\%$ до $\leq 14,2\%$. Стратегия управления производством также обеспечивает поддержание 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.

[00345] Стратегия управления была инициирована после выявления нетипичных тенденций в показателях VCD и % жизнеспособности при работе биореактора для производства голимумаба на двух разных производственных площадках. Затронутые производственные партии из биореакторов демонстрировали образование плеча при более низких значениях VCD (Фиг. 23) и более низкий % жизнеспособности в течение длительного периода времени, в основном на поздней стадии (Фиг. 24), по сравнению со среднестатистическими тенденциями. Кроме того, было установлено, что олигосахаридные профили в затронутых партиях голимумаба были смещены по сравнению со среднестатистическими тенденциями. В затронутых партиях голимумаба уровни общих нейтральных и общих заряженных олигосахаридов были соответственно выше и ниже среднестатистических значений, но в пределах установленных пределов (Фиг. 26). Кроме того, дополнительная оценка отдельных видов олигосахаридов (Фиг. 27) показала, что в большинстве затронутых партий наблюдались изменения в содержании терминальной галактозы (например, увеличение содержания агалактозы (G0F) и снижение содержания моногалактозы (G1F) и дигалактозы (G2F) в олигосахаридах) с сопутствующей тенденцией к снижению содержания сиаловой кислоты в составе N-связанных олигосахаридов, что привело к снижению количества отрицательно заряженных сиалилированных видов.

[00346] После тщательного исследования был сделан вывод, что изменение среды с определенным химическим составом стало первопричиной изменения олигосахаридного

профиля и сдвигов в VCD, % жизнеспособности. 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 % жизнеспособности. В частности, было установлено, что более низкая концентрация металлических микроэлементов Mn^{2+} (марганца) в трихлориде железа является основной причиной изменения олигосахаридного профиля, а более низкая концентрация металлических микроэлементов Cu^{2+} (меди) в трихлориде железа является основной причиной изменения VCD, % жизнеспособности 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.

[00347] Замена трихлорида железа произошла из-за изменения производственного процесса подрядчиком, поставившим хлорид железа, который должен был производить соль железа более высокой чистоты, и расследование показало, что это изменение привело к снижению следовых уровней марганца, хрома и меди, которые присутствуют в трихлориде железа в качестве неизмеряемых примесей. Добавление в среду Mn^{2+} (марганец) и Cr^{3+} (хром) частично восстановило VCD и % жизнеспособности, но для полного восстановления VCD, % жизнеспособности и продуктивности потребовалось добавление Cu^{2+} (медь). Первоначально предполагалось, что уровень Cr^{3+} (хром) также может быть основным фактором изменения олигосахаридного профиля, VCD и/или % жизнеспособности, 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, % жизнеспособности и соответствующему изменению общей продуктивности.

[00348] Стратегия управления производством позволила устранить проблемы, связанные с изменением олигосахаридного профиля, VCD, % жизнеспособности 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 добавили только марганец и хром, чтобы получить среду, называемую в настоящем документе SUP-AGT. Затем в SUP-AGT добавили медь на основе анализа

среднестатистических коммерческих сред, упоминаемых в настоящем документе как AGT до замены, и на основе многочисленных мелкомасштабных исследований была создана новая среда SUP-AGT3 с указанными концентрациями марганца и меди.

5 Способы

Способы определения плотности жизнеспособных клеток (VCD) и % жизнеспособности

[00349] 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 способы определения VCD и % жизнеспособности с использованием гемоцитометра и исключения трипанового синего.

Способы определения композиции олигосахаридов

[00350] Композицию олигосахаридов голимумаба определяют способом ВЭЖХ с использованием системы для ВЭЖХ Agilent серии 1100/1200 с программным 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 антракиловой кислотой, очищают посредством фильтрации с использованием нейлоновых фильтров с размером пор 0,45 мкм и анализируют посредством нормально-фазовой анионообменной ВЭЖХ с флуоресцентным выявлением. 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 соответствии результатами, полученными ранее из детальных описаний. Характерная хроматограмма ВЭЖХ для эталонного препарата голимумаба показана на Фиг. 21.

[00351] 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 нейтральных элементов и общего содержания заряженных гликанов. Другие незаряженные частицы

5 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 содержание заряженных гликанов представляет

10 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.

[00352] Смесь стандартов олигосахаридов (G0F, G2F, G2F + N-ацетилнейраминная кислота (NANA) и G2F + 2NANA) анализируют параллельно в качестве положительного

15 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

20 выполнения процедуры картирования олигосахаридов применяют следующие критерии приемлемости системы и приемлемости анализа (исследуемый препарат) для получения верного результата:

Критерии пригодности системы:

- 25 • 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 .
- Общая площадь пика гликана для референтного препарата голимумаба должна быть в $\geq 1,5$ раза больше площади основного пика гликана для предварительно меченого G0F.
- 30 • Если какой-либо пик гликана эталонного стандарта выходит за пределы шкалы, эталонный стандарт вводится повторно с меньшим объемом впрыска.

- Время удерживания пика G0F в референтном препарате голимумаба должно находиться в пределах 0,4 мин относительно времени удерживания G0F в референтных препаратах олигосахаридов.

Критерии приемлемости анализа:

- 5
- При исследовании холостого образца не должно наблюдаться пиков, элюирующихся совместно с заданными пиками олигосахаридов голимумаба.
 - Общая площадь пика гликанов каждого исследуемого препарата должна быть в $\geq 1,5$ раза больше площади основного пика гликана для предварительно меченого стандарта G0F.
- 10
- Если пик гликана в любом образце выходит за пределы, то этот образец повторно впрыскивают с меньшим объемом введенной пробы вместе с предварительно меченым стандартом G0F, референтными препаратами олигосахаридов, холостым образцом и референтным препаратом нормального объема.
- 15
- 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 считают недействительным

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

[00353] 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, используемой для получения различных партий голимумаба.

- 25
- 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® 350X ICP-MS (PerkinElmer). Для жидкостного химического расщепления используют различные кислоты и окислители.

- 30
- 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 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 Фармакопеи США (USP).

[00354] Ниже показан специализированный способ расщепления, разработанный для определения концентрации металлов в средах с определенным химическим составом, которые анализируются методом ИСП-МС. Способы могут быть адаптированы для порошка сухой среды или гидратированных образцов среды (1 г образца = 1 мл гидратированного образца).

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).
- 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 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.
- 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.

*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®).
- 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.
- 5 - Пластиковые наконечники для дозирования перед использованием трижды промывают реагентом.
- Образцы анализировали с помощью ИСП-МС в течение 2 недель после расщепления.
- 10 - 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.).

Реагенты и стандарты

- деионизированная вода (DIW), не содержащая металлов, $> 18,0 \text{ M}\Omega$;
- 15 • 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;
- 20 • 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;
- концентрированный (30% об./об.) H_2O_2
- 25 • DIW, HNO_3 и HCl регулярно тестируют, чтобы гарантировать отсутствие загрязнения

Капиллярное изоэлектрическое фокусирование

[00355] Капиллярное изоэлектрическое фокусирование (КИЭФ) разделяет белки на основе общего заряда или изоэлектрической точки (pI). Способ применяют для

30 отслеживания распределения изоформ на основе заряда в голимумабе. В отличие от процедур ИЭФ на основе геля, КИЭФ обеспечивает количественную меру присутствующих заряженных соединений. Кроме того, КИЭФ обеспечивает

повышенное разрешение, чувствительность и воспроизводимость по сравнению со способом на основе геля. Процедура КИЭФ разделяет изоформы Simponi (голимумаба)

35 на основе заряда от 4 до 6 с почти исходным разрешением, тогда как ИЭФ на основе геля разделяет только от 4 до 5 соединений с частичным разрешением. Характерная электрофореграмма КИЭФ голимумаба показана на Фиг. 22, где четыре основных пика обозначены как С, 1, 2 и 3, а малый пик обозначен как В. Также показано графическое

изображение, на котором представлено общее соотношение между пиками КИЭФ и уменьшением отрицательного заряда/степени сиаилирования.

- [00356] Анализ КИЭФ проводят на имеющемся в продаже анализаторе для КИЭФ, который оборудован автоматическим пробоотборником и способен поддерживать
- 5 температуру пробы $\leq 10,5$ °С при температуре окружающей среды ≤ 30 °С, например, как автоматический пробоотборник Alcott (GP Instruments, Inc.). В анализе используется капилляр с внутренней стенкой, покрытой диоксидом кремния, без полиимидного
- 10 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 (рН 3-10) и узкого диапазона (рН 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.
- 15 [00357] Перед каждым анализом заданная температура автоматического пробоотборника устанавливается на 4 °С, автоматический пробоотборник предварительно охлаждается в течение по меньшей мере 30 минут, а температура
- о окружающей среды в лаборатории поддерживается на уровне ≤ 30 °С. Предварительно обработанный исследуемый препарат и эталонный стандарт, флаконы с образцами,
- 20 вставки флаконов, реагенты, используемые при анализе, включая очищенную воду, исходный раствор, содержащий N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) (который оптимизирует фокусировку внутри капилляра), амфолиты, маркеры рI 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,
- 25 регистрируют время добавления исходного раствора и контролируют экспозицию ТЕМЕД. 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 6).

Таблица 6. 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 |

[00358] После впрыскивания проб в капилляр с помощью поршневого насоса на капилляр воздействуют электрическим полем (3 кВ) в течение 8 мин, формируя градиент рН, и изоформы голимумаба на основе заряда разделяются в соответствии с их изоэлектрической точкой (рI). Изоформы белка в капилляре обнаруживают путем визуализации по всей длине капилляра при 280 нм, а данные представлены в виде электрофореграммы в зависимости от значения рI 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 среднее значение рI и средний процент площади пика всех пиков после двух впрыскиваний \geq LOQ, а также значение Δ рI по сравнению с референтным стандартом и сумма процентов площади пиков С, 1, 2 и 3.

15 **Определение характеристик изоформ голимумаба, разделенных с помощью КИЭФ**

[00359] Стандартный профиль КИЭФ голимумаба содержит четыре основных пика, помеченных как С, 1, 2 и 3, и малый пик В, как показано на характерной электрофореграмме (Фиг. 22). В отношении голимумаба основным источником вариабельности в профиле КИЭФ является дезаминирование и изомеризация аспарагина тяжелой цепи 43 (НС Asn43). Щелочной пик 3 при КИЭФ представляет собой недезаминированную НС Asn43, а также дезаминированную изоаспарагиновую кислоту тяжелой цепи 43 (НС изоAsp43), тогда как более кислые пики представляют собой дезаминированную НС Asp43 и степень сиалилирования. Прогнозируемые

идентичности различных пиков КИЭФ приведены в таблице 7. Анализ КИЭФ используют в качестве общего контроля гетерогенности заряда голимумаба, а в качестве основного анализа для контроля дезамидирования используют другой анализ.

Таблица 7. Прогнозируемая идентичность пиков, наблюдаемых на электрофореграмме КИЭФ нерасфасованного препарата (НП)^a

5

| Пик КИЭФ | Идентификация основных соединений | Идентификация второстепенных соединений |
|--|-----------------------------------|--|
| В | 2 HC Asp43, 2 SA | HC Asp43, HC isoAsp43, 3 SA 2 HC isoAsp43, 4 SA |
| С | 2 HC Asp43, 1 SA | HC Asp43, HC isoAsp43, 2 SA 2 HC isoAsp43, 3 SA |
| 1 | 2 HC Asp43 | HC Asp43, HC isoAsp43, 1 SA 2 HC isoAsp43, 2 SA |
| 2 | HC Asp43, HC isoAsp43 | 2 HC isoAsp43, 1 SA HC Asp43, HC Asn43 |
| 3 | 2 HC isoAsp43 | HC isoAsp43, HC Asn43 |
| ^a SA представляет собой сиаловую кислоту; варианты, содержащие HC Asn43 вместо Asp43 или isoAsp43, также присутствуют в низких концентрациях, но они не включены в таблицу. | | |

Профили клеточных культур с отклонениями

[00360] На стадии 2 процесса культивирования клеток продолжительность производства в биореакторах объемом 500 литров или 1000 литров составляет 60 дней подряд. В контролируемом процессе производства биореактор инокулируют при плотности жизнеспособных клеток (VCD) 0,3 млн клеток на мл или выше, а затем VCD экспоненциально увеличивается до 13–14 млн клеток на мл. В этот момент экспоненциальный рост клеток прекращается, и далее скорость роста клеток снижается. Переход от экспоненциального роста к более низкой скорости роста (см. стрелки на Фиг. 23) в настоящем документе называется образованием «плеча». Как отмечалось выше, VCD и % жизнеспособности культуры смещаются в партиях клеточных культур с отклонениями, как показано на Фиг. 23 и Фиг. 24 соответственно.

15

[00361] В биореакторах со сдвигом VCD плечо VCD возникало раньше: клетки росли экспоненциально до 8–13 млн клеток на мл, а затем начинали формировать «плечо» на

более ранних этапах процесса. Кроме того, в большинстве биореакторов за более ранним образованием плеча следовал глубокий провал в профиле VCD. Как следствие, целевой показатель VCD в 16,0 млн клеток на мл был достигнут позже в производственном цикле биореактора, примерно на 40–50 день стадии. Вследствие более позднего достижения целевой плотности клеток, удаление биомассы начиналось позже, и поэтому % жизнеспособности культуры в конце производственного цикла был ниже, чем в типичных среднестатистических партиях. Таким образом, жизнеспособность в смещенных биореакторах оставалась на уровне около 20–40% к концу биореакторного процесса, см. Фиг. 24. Однако ни один из биореакторов, в которых наблюдалось изменение % жизнеспособности культуры, не достиг критерия прекращения работы (жизнеспособность < 8% в течение трех дней подряд).

[00362] Кроме того, изменение VCD и % жизнеспособности культуры в партиях клеточных культур с отклонениями привело к снижению продуктивности, измеряемой суммарным количеством полученного IgG (Фиг. 34).

15 **Олигосахаридный профиль с отклонениями**

[00363] Голимумаб N-гликозилирован в одном участке каждой тяжелой цепи, на аспарагине 306. Эти N-связанные структуры олигосахаридов могут представлять собой любые из группы 2-антеннальных олигосахаридов, связанных с белком посредством первичного амина остатка аспарагина, но на голимумабе они состоят в основном из 2-антеннальных коровых фукозилированных соединений с гетерогенностью 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). Гликозилирование голимумаба отслеживают в качестве контроля процесса на стадии 9 производства, при этом на месте применяются спецификации для общего содержания незаряженных олигосахаридов, общего содержания заряженных олигосахаридов и отдельных незаряженных олигосахаридов G0F, G1F и G2F. На Фиг. 25 представлен схематический обзор некоторых видов первичных N-связанных олигосахаридов в IgG голимумаба. Также показана роль некоторых ферментов в процессе созревания гликозилирования, включая роли некоторых двухвалентных катионов (например, Mn^{2+} и Cu^{2+}), в этих ферментативных процессах.

[00364] В ходе исследования влияния изменения характеристик культуры оценивали изменения общего количества нейтральных и заряженных олигосахаридов и уровней отдельных олигосахаридов молекулы голимумаба. Необработанные хроматограммы и дальнейший анализ данных показал, что в то время как данные 5 нерасфасованного препарата (НП) для партий с отклонениями были в пределах спецификации для % общего количества нейтральных и общего количества заряженных олигосахаридов, показатели большинства партий были явно выше и ниже исторических средних значений для общего количества нейтральных и общего количества заряженных олигосахаридов соответственно (Фиг. 26). Кроме того, 10 наблюдались значительные сдвиги в уровнях отдельных нейтральных олигосахаридов, которые находились вне спецификаций. Фактически большинство партий НП с отклонениями демонстрировали сдвиг за пределы спецификаций для G0F, G1F и G2F (Фиг. 27).

[00365] Снижение изменений в олигосахаридном профиле играет ключевую роль, 15 поскольку изменения профиля олигосахаридов рекомбинантного моноклонального антитела могут существенно влиять на биологические функции антитела. Например, биологические исследования показали, что распределение различных гликоформ в области Fc может существенно влиять на эффективность, стабильность антитела и эффекторную функцию (*J. Biosci. Bioeng.* 2014 117(5):639–644; *Bio-Process Int.* 2011, 20 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 (ADCC) и комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), двух важных механизмах, с помощью которых антитела опосредуют уничтожение клеток-мишеней через 25 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 активность (*Antibodies.* 2013 2(3):392–414). В результате данных биологических 30 последствий вследствие изменений профиля олигосахаридов регуляторные органы требуют контролировать структуру гликозилирования антител, чтобы гарантировать соблюдение спецификаций выпуска для получения последовательного, безопасного и эффективного препарата.

Определение проблемы

[00366] После тщательного и всестороннего исследования был сделан вывод, что изменение среды с определенным химическим составом стало основной причиной сдвигов в профиле олигосахаридов, VCD, % жизнеспособности и продуктивности. Эту среду с определенным химическим составом получают в виде порошка, произведенного по 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 профилях олигосахаридов, VCD, % жизнеспособности 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 железа 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.

20

Устранение последствий с помощью дополненной среды AGT

Разработка SUP-AGT

[00367] Предварительные мелкомасштабные исследования показали, что добавление в среду марганца и хрома может привести профили олигосахаридов в соответствие 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 голимуаба 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

30

получить среду с определенным химическим составом, содержащую заданные пределы Mn^{2+} (марганца) и хрома.

[00368] Эта среда AGT, дополненная марганцем и хромом, обозначается в данном документе как SUP-AGT. Порошок среды SUP-AGT получали в крупномасштабном объеме и впоследствии использовали для производства голимумаба в промышленных масштабах на различных производственных площадках в биореакторах объемом 500 и 1000 литров. Оценка партий голимумаба, произведенных с использованием среды SUP-AGT, показала, что среда SUP-AGT не полностью восстановила VCD, % жизнеспособности и продуктивности, но показала эффективность в восстановлении среднестатистического олигосахаридного профиля, например уровней G0F, G1F, G2F (данные не показаны).

[00369] 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. 25, 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 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 (ST6GalII) (Фиг. 25), 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 и заряженные виды. Результаты данного исследования подтверждают гипотезу о том, что изменение концентрации Mn^{2+} в AGT,

связанное с использованием более чистой формы трихлорида железа, стало основной причиной изменений/тенденций в свойствах олигосахаридов.

Разработка SUP-AGT3

5 [00370] Сдвиги в профилях олигосахаридов голиумаба 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, % жизнеспособности и продуктивности до среднестатистических тенденций. Анализ, проведенный в ходе исследования, показал, что снижение уровня Cu_{2+} (меди) является наиболее вероятной первопричиной изменения VCD и % жизнеспособности, 10 поэтому для оценки эффекта от добавления меди в среду SUP-AGT были проведены исследования в уменьшенном масштабе.

[00371] Растворы микроэлементов, содержащие медь, использовали для проведения серии уменьшенных по масштабу экспериментов со средой SUP-AGT, в которую добавляли медь в количестве 0,3 ч/млрд (0,3 мкг/литр), 0,75 ч/млрд 15 (0,75 мкг/литр) и 1,5 ч/млрд (1,5 мкг/литр). Также включали контроль без добавления меди. Целевая концентрация меди для стандартной среды AGT без добавок составляла 0,83 ч/млрд. Исследования уменьшенного масштаба продемонстрировали дозозависимый эффект: увеличение концентрации меди приводило к увеличению VCD, % жизнеспособности и продуктивности (данные не показаны). Результаты 20 исследований в уменьшенном масштабе также сравнивали со среднестатистическими нормами, и было установлено, что, хотя более высокие концентрации меди имеют тенденцию к улучшению VCD и % жизнеспособности, добавление 0,3 мкг/литр меди в SUP-AGT показала эффективность, близкую к среднестатистическим значениям.

[00372] Влияние концентрации меди на олигосахаридный профиль также оценивали 25 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 общего количества нейтральных веществ (Фиг. 28) и снижением уровней G1F и G2F (данные не показаны). Как показано на Фиг. 25, известно, что медь оказывает ингибирующее действие на 30 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 олигосахаридного профиля голиумаба, но при этом с достаточным содержанием меди для поддержания оптимального роста, жизнеспособности и продуктивности клеток.

[00373] В результате дополнительных мелкомасштабных исследований и множественного регрессионного анализа результатов экспериментов, в которых варьировались концентрации марганца и меди, было установлено, что вариации G0F и вариации общего количества нейтральных веществ могут 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 голиумаба с 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.

[00374] 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).

[00375] 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 $\text{Cu}(\text{OAc})_2$. 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 в рецептуру SUP-AGT3 не добавлялись новые или другие компоненты. Определенные и контролируемые пределы для марганца и меди были установлены на основе среднестатистических данных, а также 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

[00376] Для оценки уровней марганца, хрома и меди в различных партиях сред, включая SUP-AGT3, первоначальную среду AGT «до замены» до замены трихлорида железа, среду AGT «после замены», использованную для производства партий голиумаба с отклонениями, и SUP-AGT, 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. 29, Фиг. 30 и Фиг. 31 соответственно. Следует отметить, что отдельную партию среды объединяют с одной или более другими партиями среды для производства голиумаба 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.

[00377] 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. 29). Таким образом, был сделан вывод, что концентрация марганца в SUP-AGT3 хорошо контролируется и находится в диапазоне среднестатистических значений среды AGT до замены.

[00378] 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. 31). 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 голимумаба, 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 в рабочем порядке, поэтому объединенные партии также соответствовали спецификации при производстве голимумаба 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) и эти значения представлены в графическом виде как мкг/л на Фиг. 31.

15 **Производство промышленной партии с использованием SUP-AGT3**

Олигосахаридный профиль с использованием SUP-AGT3

[00379] На основании положительных результатов анализа металлических микроэлементов среда SUP-AGT3 была включена в процесс промышленного производства голимумаба 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 DPC, созданные для разных биореакторов, использовали для производства трех разных партий голимумаба. Как показано на Фиг. 26 и Фиг. 27 (последние 3 точки данных на каждой фигуре), голимумаб, полученный с использованием среды SUP-AGT3, содержит общее количество видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 82,0\%$ до $\leq 94,4\%$, общее количество видов заряженных олигосахаридов от $\geq 5,6\%$ до $\leq 18,0\%$ и отдельные виды нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 25,6\%$ до $\leq 42,2\%$, G1F $\geq 31,2\%$ до $\leq 43,6\%$ и G2F $\geq 5,6\%$ до $\leq 14,2\%$.

Продуктивность и эффективность процесса культивирования клеток на стадии 2

30 [00380] Для оценки продуктивности биореактора с SUP-AGT3 сравнивали VCD, % жизнеспособности и кумулятивный уровень IgG для различных партий из биореактора с SUP-AGT3 со средними показателями для партий до замены AGT и средними

показателями для партий после замены AGT. Данные показывают, что производство с SUP-AGT3 восстановило VCD и % жизнеспособности до уровня, близкого к среднестатистическому (Фиг. 32 и Фиг. 33 соответственно). Кроме того, производство голимумаба с использованием SUP-AGT3 восстанавливало общую продуктивность, измеренную с помощью совокупного IgG (Фиг. 34).

Заключение

[00381] Таким образом, как описано выше, была разработана стратегия управления производством для поддержания постоянства характеристик лекарственного вещества (ЛВ) и лекарственного препарата (ЛП) голимумаба в отношении олигосахаридного профиля, а также для контроля плотности жизнеспособных клеток (VCD), % жизнеспособности и продуктивности в ходе крупномасштабного производства. ЛВ или ЛП, полученный способом по настоящему изобретению, содержит антитела к ФНО млекопитающих, имеющие тяжелую цепь (НС), содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 36, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 37, причем олигосахаридный профиль антител к ФНО содержит общее количество видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 82,0\%$ до $\leq 94,4\%$, общее количество видов заряженных олигосахаридов от $\geq 5,6\%$ до $\leq 18,0\%$ и отдельные виды нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 25,6\%$ до $\leq 42,2\%$, G1F от $\geq 31,2\%$ до $\leq 43,6\%$ и G2F от $\geq 5,6\%$ до $\leq 14,2\%$. Олигосахаридный профиль ЛВ и ЛП контролируется с использованием среды 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. Кроме того, стратегия управления производством позволяет поддерживать плотность жизнеспособных клеток (VCD), % жизнеспособности и продуктивность клеток в процессе производства голимумаба в сравнении со среднестатистическими нормами. Олигосахаридные профили голимумаба определяли методом ВЭЖХ, а концентрации марганца и меди в среде измеряли с помощью масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитела к ФНО, содержащие: (i) аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:36; и (ii) аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:37, причем олигосахаридный профиль антитела к ФНО имеет общее
5 содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 82,0\%$ до $\leq 94,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 5,6\%$ до $\leq 18,0\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 25,6\%$ до $\leq 42,2\%$, G1F от $\geq 31,2\%$ до $\leq 43,6\%$ и G2F от $\geq 5,6\%$ до $\leq 14,2\%$, и при этом антитело к ФНО получают способом производства, который контролирует олигосахаридный профиль антитела к ФНО, причем способ
10 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 ФНО в эукариотических клетках, причем
15 концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антитела к ФНО.
2. Антитело к ФНО по п. 1, которое является биопрепаратом второго эшелона.
3. Способ производства лекарственного вещества (ЛВ) или лекарственного продукта (ЛП), содержащего антитело к ФНО, содержащие: (i) аминокислотную
20 последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:36; и (ii) аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:37, причем олигосахаридный профиль антитела к ФНО является контролируемым и олигосахаридный профиль антитела к ФНО имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 82,0\%$ до $\leq 94,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 5,6\%$ до $\leq 18,0\%$ и
25 содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 25,6\%$ до $\leq 42,2\%$, G1F от $\geq 31,2\%$ до $\leq 43,6\%$ и G2F от $\geq 5,6\%$ до $\leq 14,2\%$, и при этом антитело к ФНО получают способом, включающим: культивирование эукариотических клеток в среде с определенным химическим составом, контролируемой на предмет содержания
указанных концентраций металлических микроэлементов марганца и меди, состоящих
30 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 ФНО в эукариотических клетках, причем

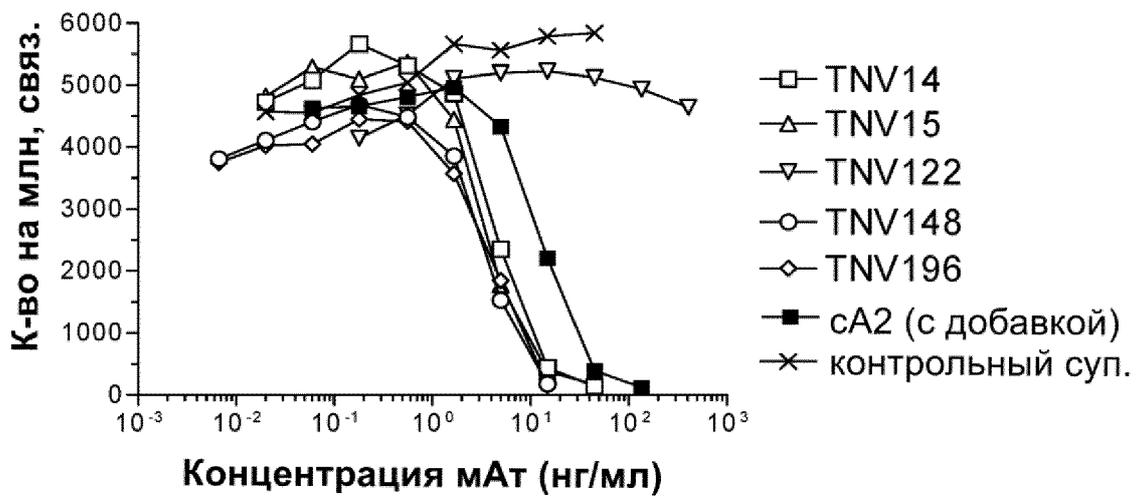
концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антитела к ФНО.

4. Способ производства по п. 3, в котором концентрации марганца и меди в среде с определенным химическим составом определяют с использованием масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС).
5. Способ по п. 3, в котором концентрации 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 $Cu(OAc)_2$.
6. Способ производства по п. 3, в котором виды олигосахаридов определяют с помощью жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ).
7. Способ производства по п. 3, 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).
8. Способ производства по п. 7, в котором антитело к ФНО является биопрепаратом второго эшелона.
9. Композиция, содержащая антитела к ФНО, содержащие: (i) аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO:36; и (ii) аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO:37, причем олигосахаридный профиль антител к ФНО является контролируемым и олигосахаридный профиль антител к ФНО имеет общее содержание видов нейтральных олигосахаридов от $\geq 82,0\%$ до $\leq 94,4\%$, общее содержание заряженных олигосахаридов от $\geq 5,6\%$ до $\leq 18,0\%$ и содержание отдельных видов нейтральных олигосахаридов G0F от $\geq 25,6\%$ до $\leq 42,2\%$, G1F от $\geq 31,2\%$ до $\leq 43,6\%$ и G2F от $\geq 5,6\%$ до $\leq 14,2\%$, и при этом антитела к ФНО получают способом, включающим: 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 ФНО в эукариотических клетках, причем концентрации марганца и меди эффективны при контроле олигосахаридного профиля антител к ФНО.

- 5 10. Композиция по п. 9, в которой концентрации марганца и меди в среде с определенным химическим составом определяют с использованием масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС).
11. Композиция по п. 9, в которой концентрации марганца и меди в среде с определенным химическим составом контролируют путем добавления к среде с
10 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 $Cu(OAc)_2$.
12. Композиция по п. 9, в которой виды олигосахаридов определяют с помощью
15 жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ).
13. Композиция по п. 9, 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).
- 20 14. Композиция по п. 9, в которой антитела к ФНО являются биопрепаратами второго эшелона.

ФИГ. 1



ФИГ. 2А

TNVs ATGGGGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTCCTCGTTGCTCTTTAAGA

зародышевая Q V Q L V E S G G G V
 линия CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG
 TNVs GGTGTCCAGTGT.....
 TNV148 (B) GGTGTCCAGTGT.....A.....

зародышевая V Q P G R S L R L S C A A S G
 линия GTCCAGCCTGGGAGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA
 TNV

зародышевая F T F S S Y A M H W V R Q A P
 линия TTCACSTTCAGTAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCA
 TNV14, 15
 TNV148 (B)T.....
 TNV196C.....

зародышевая G K G L E W V A V I S Y D G S
 линия GGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGC
 TNV14A...C.T.....T
 TNV15T.....T.....T
 TNV148 (B)C.....T...G.....
 TNV196T.....

зародышевая N K Y Y A D S V K G R F T I S SEQ ID NO: 7 прол. →
 линия AATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCC SEQ ID NO: 34 прол. →
 TNV14 .GC...A.G....G.....A.....
 TNV15 ..C...A.G.....C.....
 TNV148 (B)A.G.....
 TNV196A.G.C.....G.....

ФИГ. 3

TNV ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCCTCCTGCTACTCTGGCTC

зародышевая E I V L T Q S P A T
 линия GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACC
 TNV CCAGATACCACCGGA.....

Зродышевая L S L S P G E R A T L S C R A
 линия CTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC
 TNV

Зродышевая S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P
 линия AGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT
 TNV14, 15

TNV148, 196.....TA.....

Зродышевая G Q A P R L L I Y D A S N R A
 линия GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCC
 TNV

Зродышевая T G I P A R F S G S G S G T D
 линия ACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC
 TNV

Зродышевая F T L T I S S L E P E D F A V
 линия TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTT
 TNV

Зродышевая Y Y C Q Q R S N W P P F T F G SEQ ID NO:8
 линия TATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCATTCACTTTCGGC SEQ ID NO:35
 TNVA.....

Зродышевая P G T K V D I K R
 линия CCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGT
 TNV

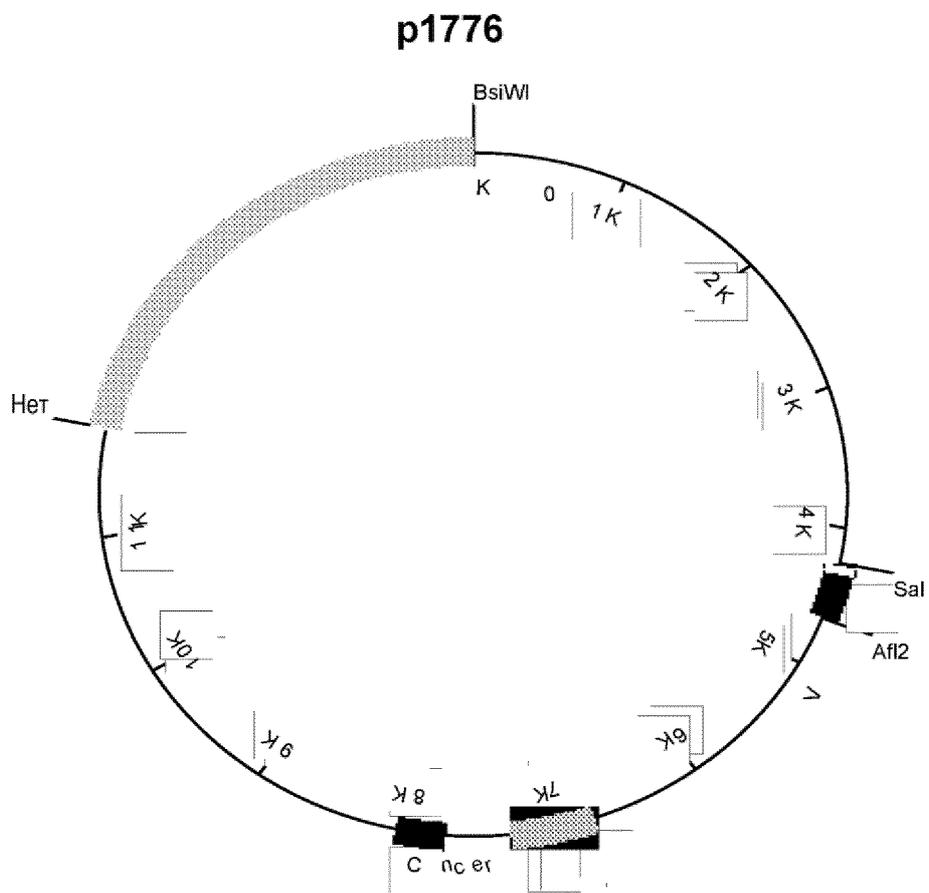
ФИГ. 4

| | | | |
|-------------|---------------------------------|--------|---------------|
| зародышевая | | | |
| линия | <u>MGFGLSWVFLVALLRGVQC</u> | СИГНАЛ | SEQ ID NO. 32 |
| TNV | | | |
| зародышевая | | | |
| линия | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS | FR1 | SEQ ID NO. 7 |
| TNV | | | |
| TNV148 (B) |I.. | | |
| зародышевая | | | |
| линия | SYAMH | CDR1 | SEQ ID NO. 1 |
| TNV | | | |
| зародышевая | | | |
| линия | WVRQAPGKGLEWVA | FR2 | SEQ ID NO. 7 |
| TNV | | | |
| TNV148 (B) |N..... | | |
| зародышевая | | | |
| линия | VISYDGSNKYYADSVKG | CDR2 | SEQ ID NO. 2 |
| TNV14 | I.L....S.K.....D | | |
| TNV15 | F.L.....K..... | | |
| TNV148 (B) | FM.....K..... | | |
| TNV196 | F.....KS..... | | |
| зародышевая | | | |
| линия | RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR | FR3 | SEQ ID NO. 7 |
| TNV14 | | | |
| TNV15 |A..... | | |
| TNV148 |P..... | | |
| TNV148B | | | |
| TNV196 | ...V.....F.....F..... | | |
| зародышевая | | | |
| линия | -----YYYYYGMDV | | |
| TNV14 | DRGISAGGN..... | CDR3 | SEQ ID NO. 3 |
| TNV15 | ...V...N..... | | |
| TNV148 (B) | ...A...N..... | | |
| TNV196 | ...G...N..... | | |
| зародышевая | | | |
| линия | WGQGTTVTVSS | J6 | SEQ ID NO. 7 |
| TNV | | | |

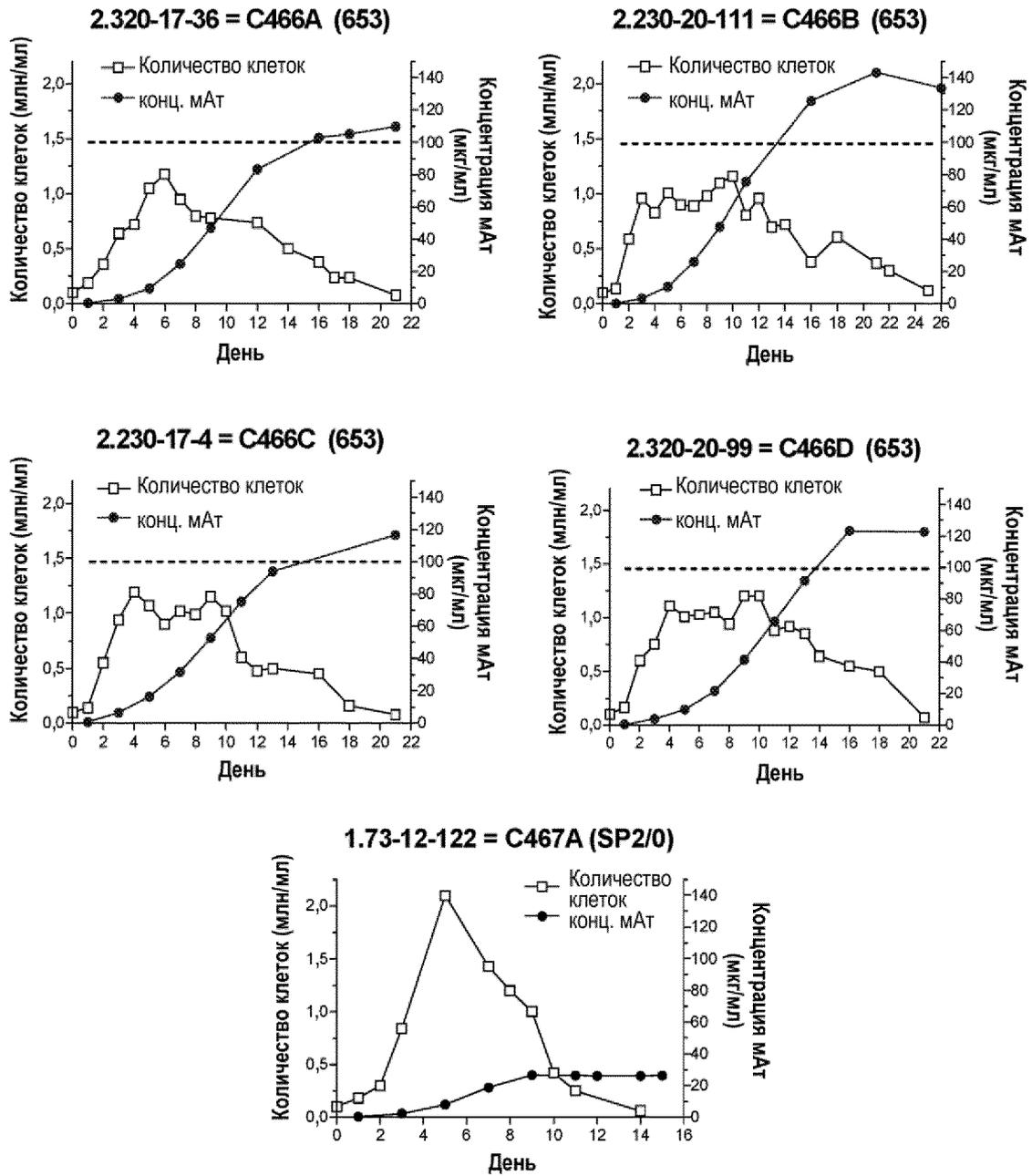
ФИГ. 5

| | | | |
|-------------|----------------------------------|--------|---------------|
| TNV | MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG | СИГНАЛ | SEQ ID NO. 33 |
| зародышевая | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC | FR1 | SEQ ID NO. 8 |
| линия TNV | | | |
| зародышевая | | CDR1 | SEQ ID NO. 4 |
| линия | RASQSVSSYLA | | |
| TNV14 | | | |
| TNV15 | | | |
| TNV148 (B) |Y..... | | |
| TNV196 |Y..... | | |
| зародышевая | WYQQKPGQAPRLLIY | FR2 | SEQ ID NO. 8 |
| линия TNV | | | |
| зародышевая | DASNRAT | CDR2 | SEQ ID NO. 5 |
| линия TNV | | | |
| зародышевая | GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC | FR3 | SEQ ID NO. 8 |
| линия TNV | | | |
| зародышевая | QQRSNWPPFT | CDR3 | SEQ ID NO. 6 |
| линия TNV | | | |
| зародышевая | FGPGTKVDIK | J3 | SEQ ID NO. 8 |
| линия TNV | | | |

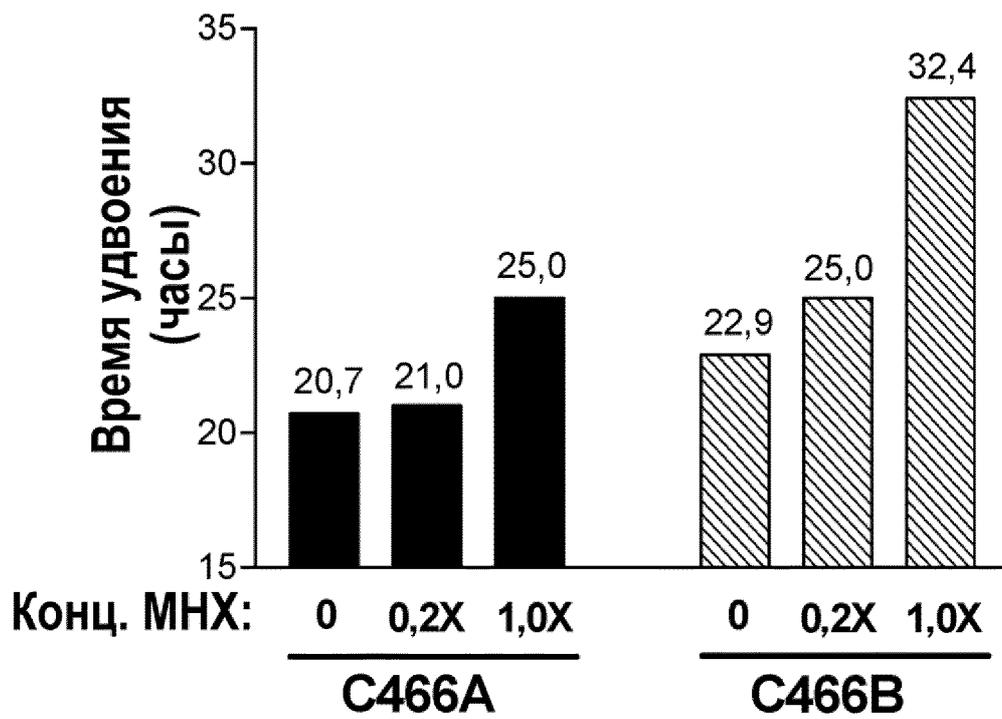
ФИГ. 6



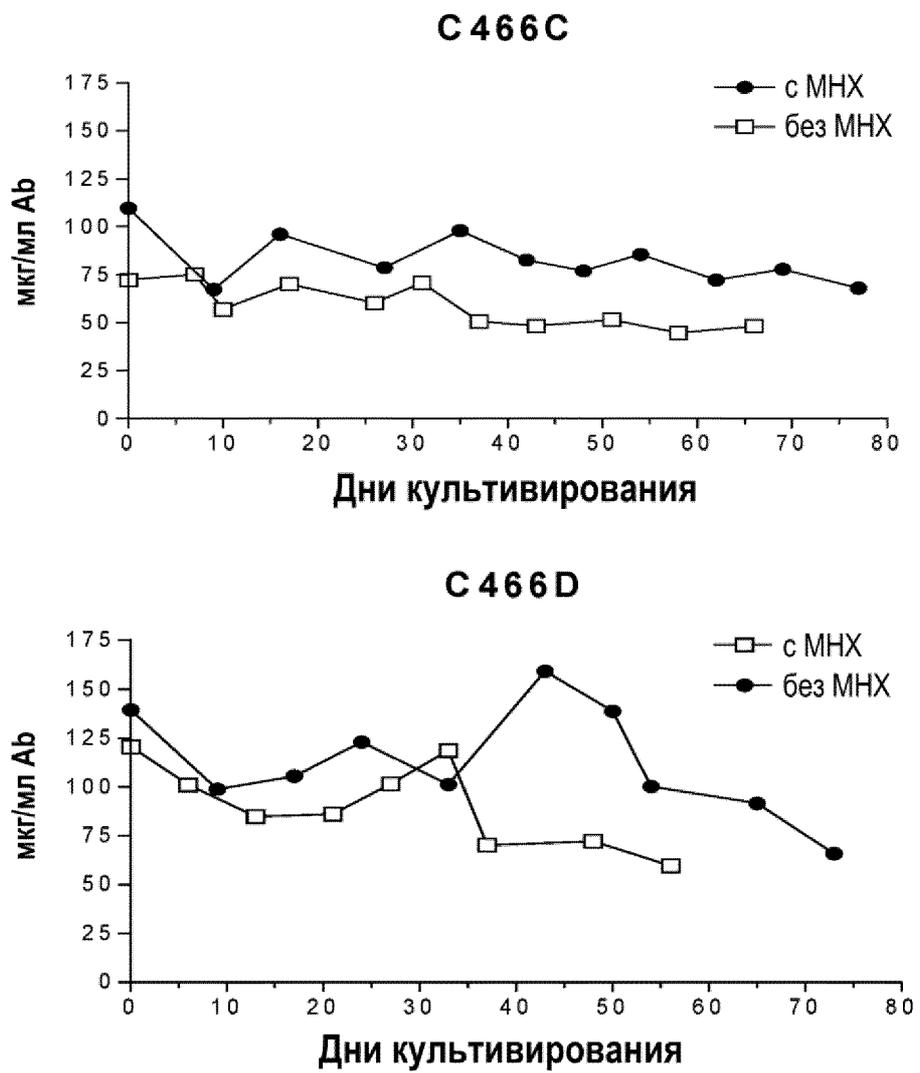
ФИГ. 7



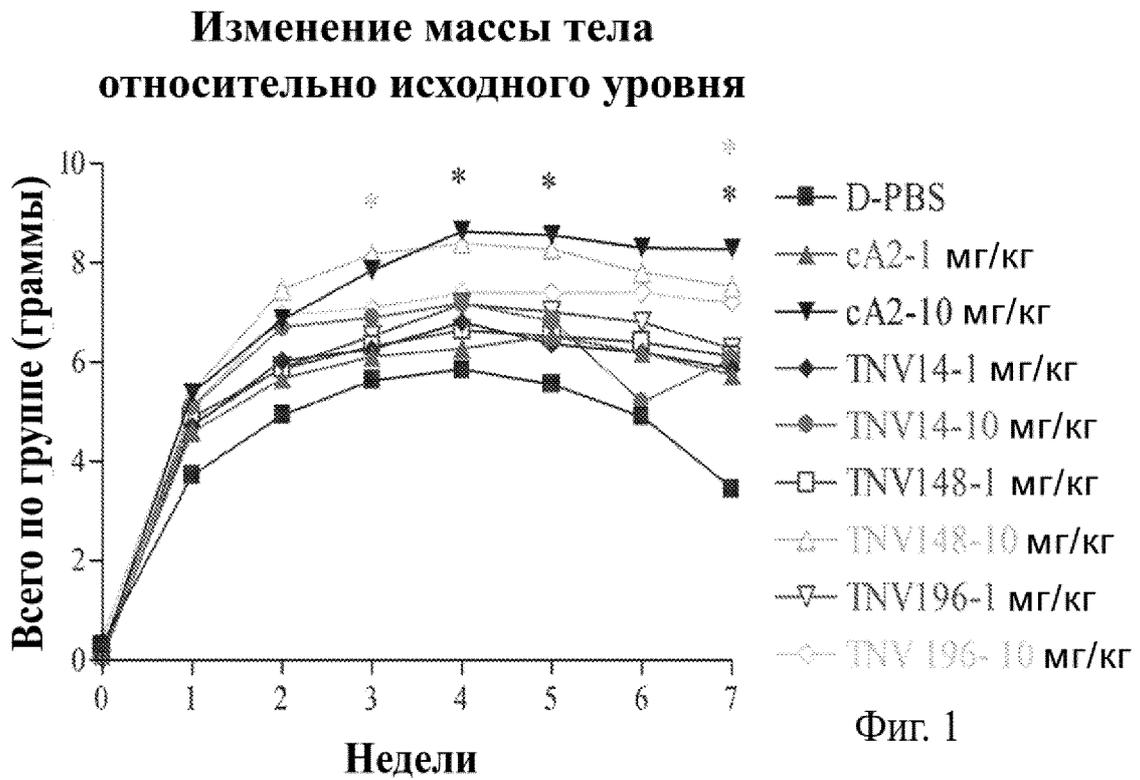
ФИГ. 8



ФИГ. 9

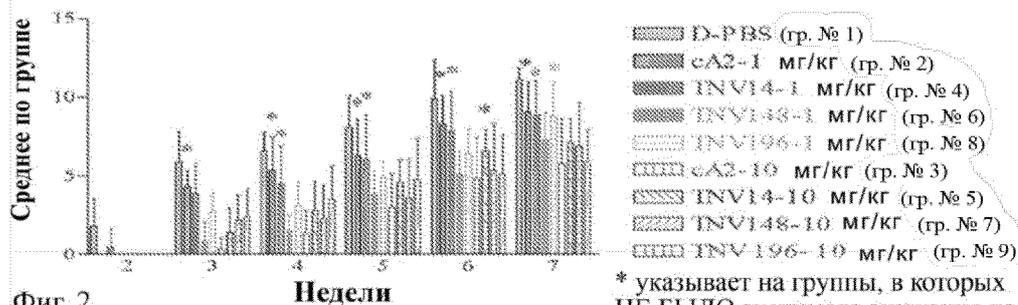


ФИГ. 10



ФИГ. 11А

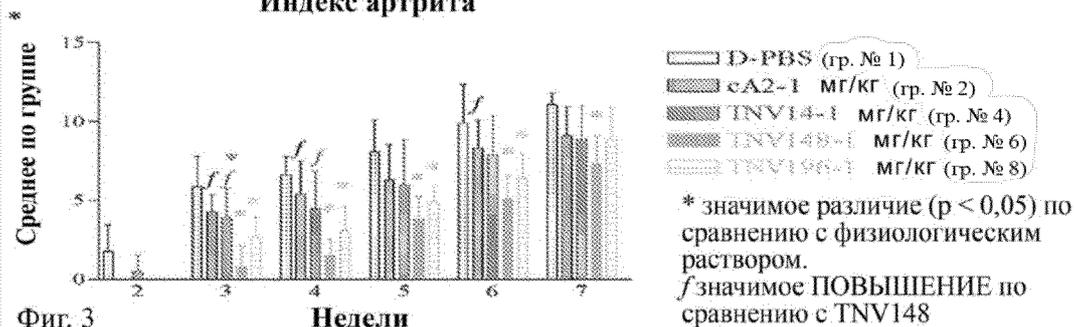
Индекс артрита



Фиг. 2

ФИГ. 11Б

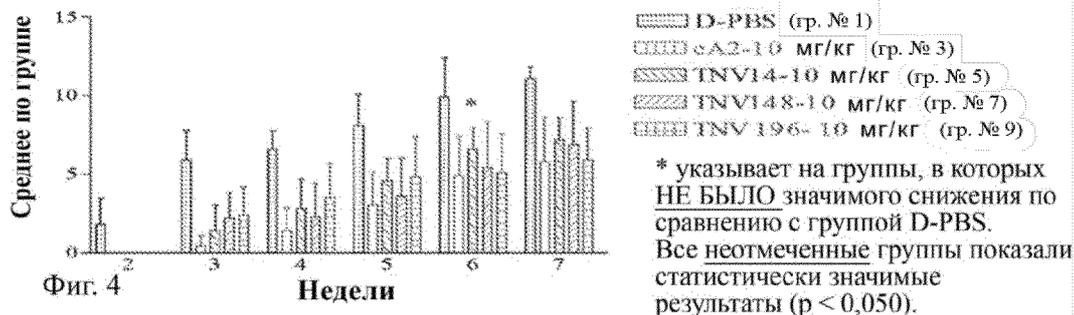
Индекс артрита



Фиг. 3

ФИГ. 11В

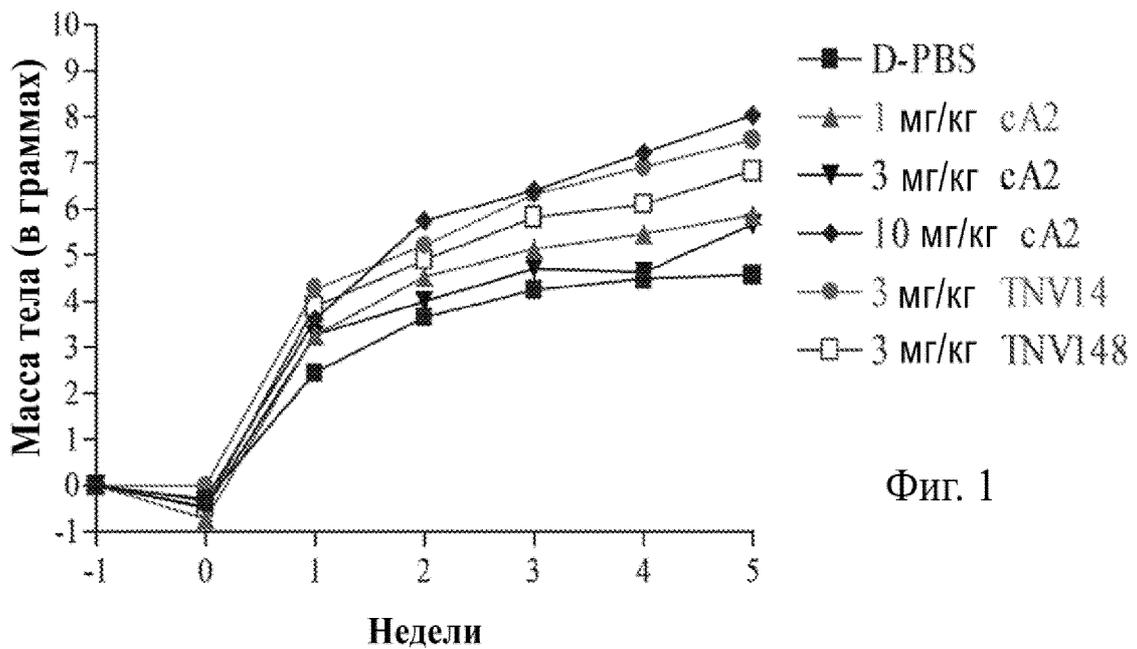
Индекс артрита



Фиг. 4

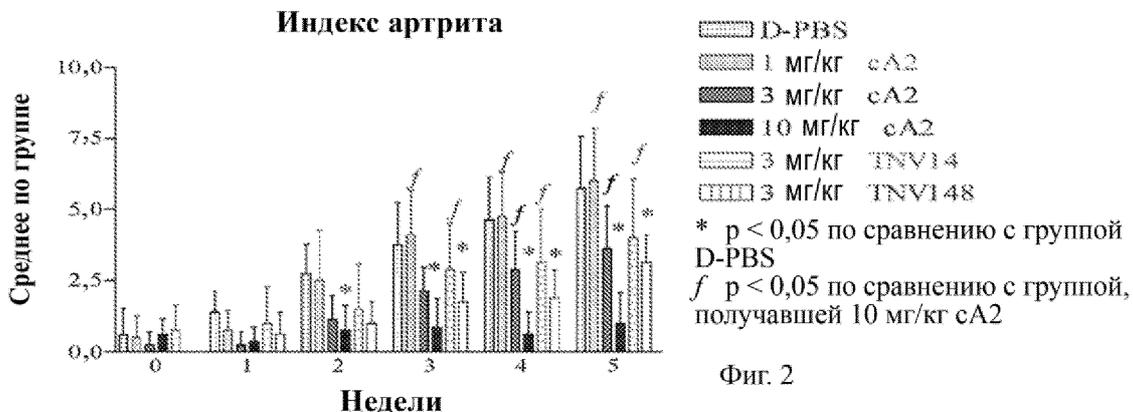
ФИГ. 12

**Изменение массы тела
(среднее по группе)**

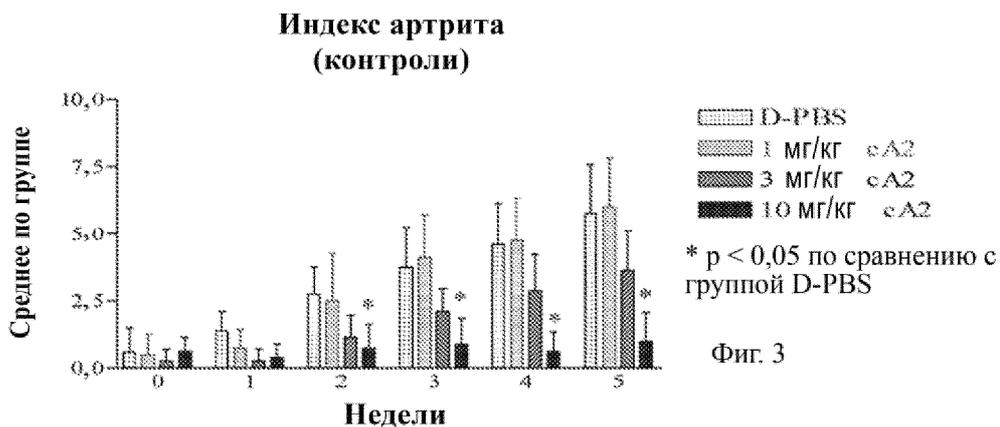


Фиг. 1

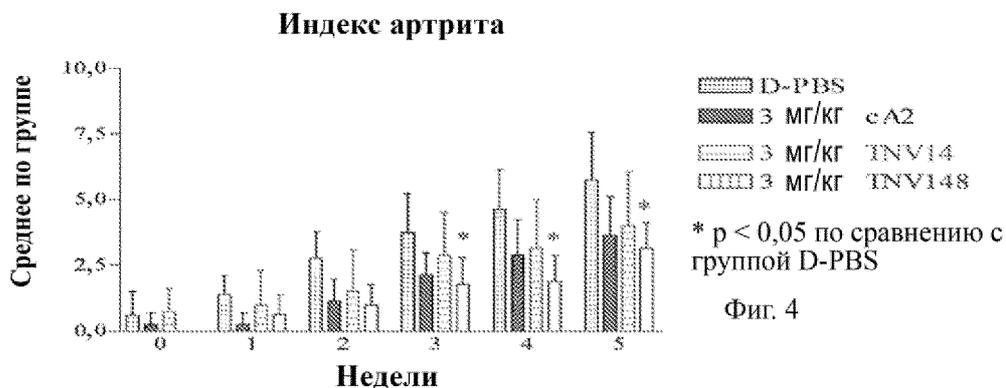
ФИГ. 13А



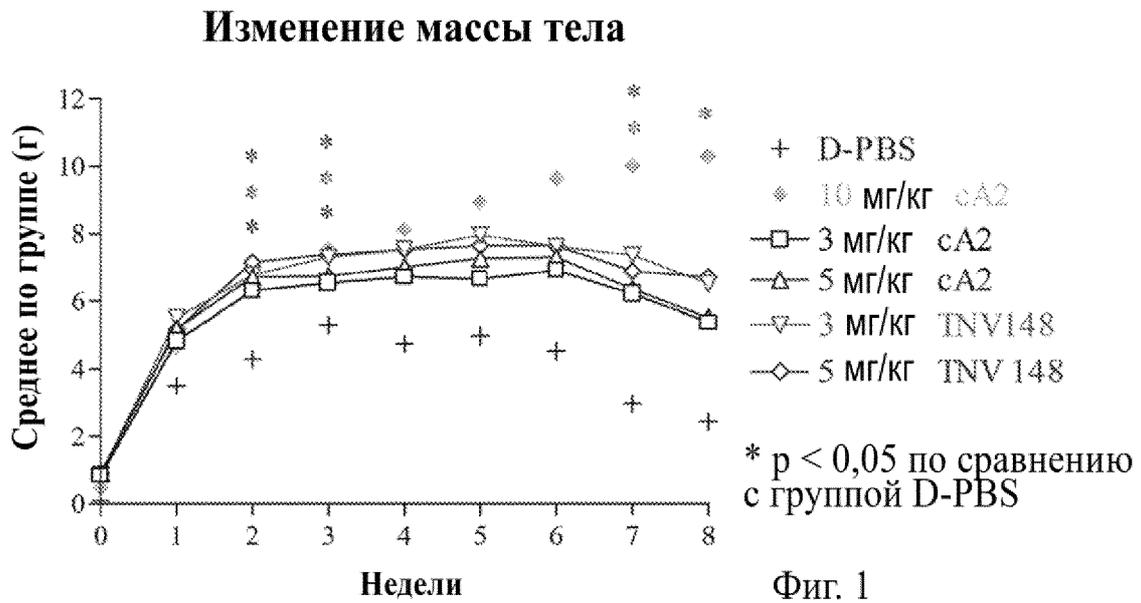
ФИГ. 13Б



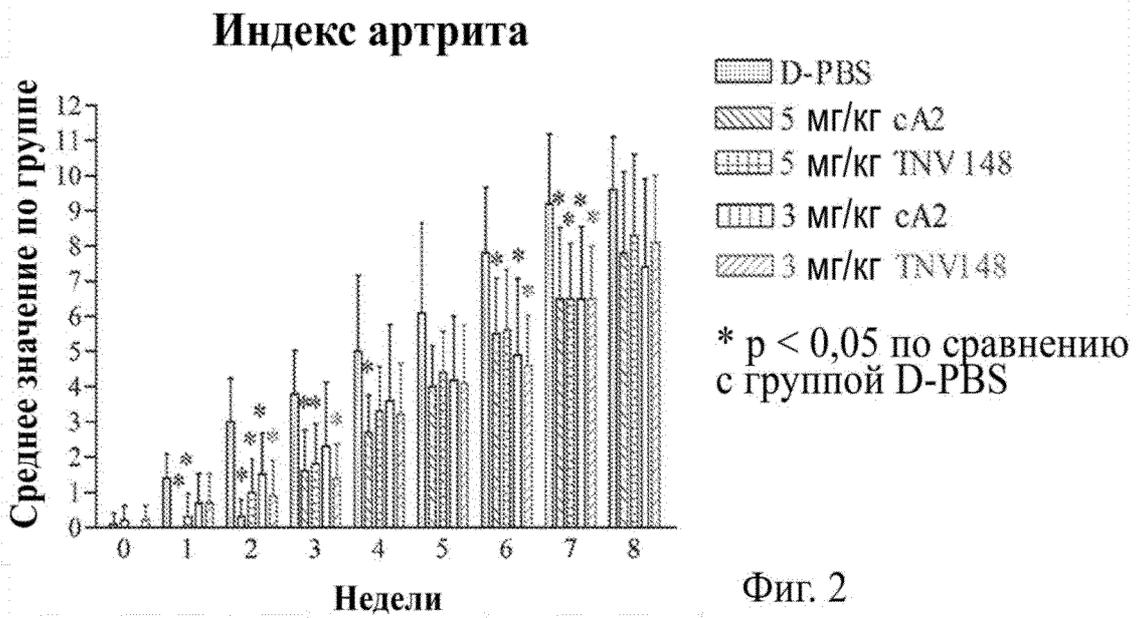
ФИГ. 13В



ФИГ. 14

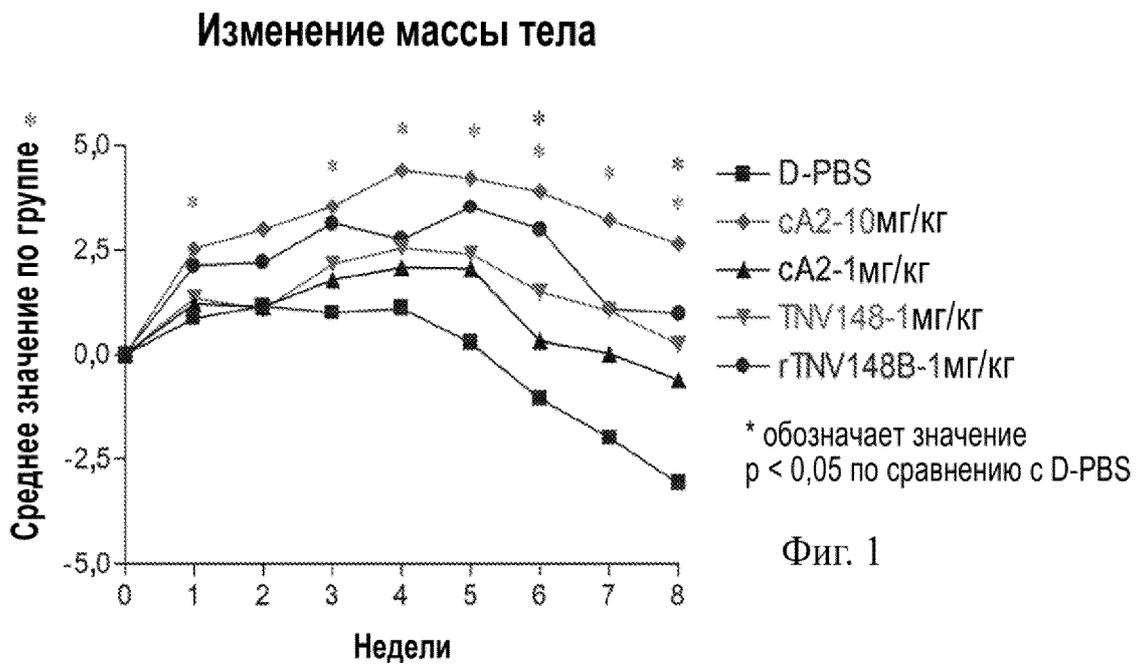


ФИГ. 15



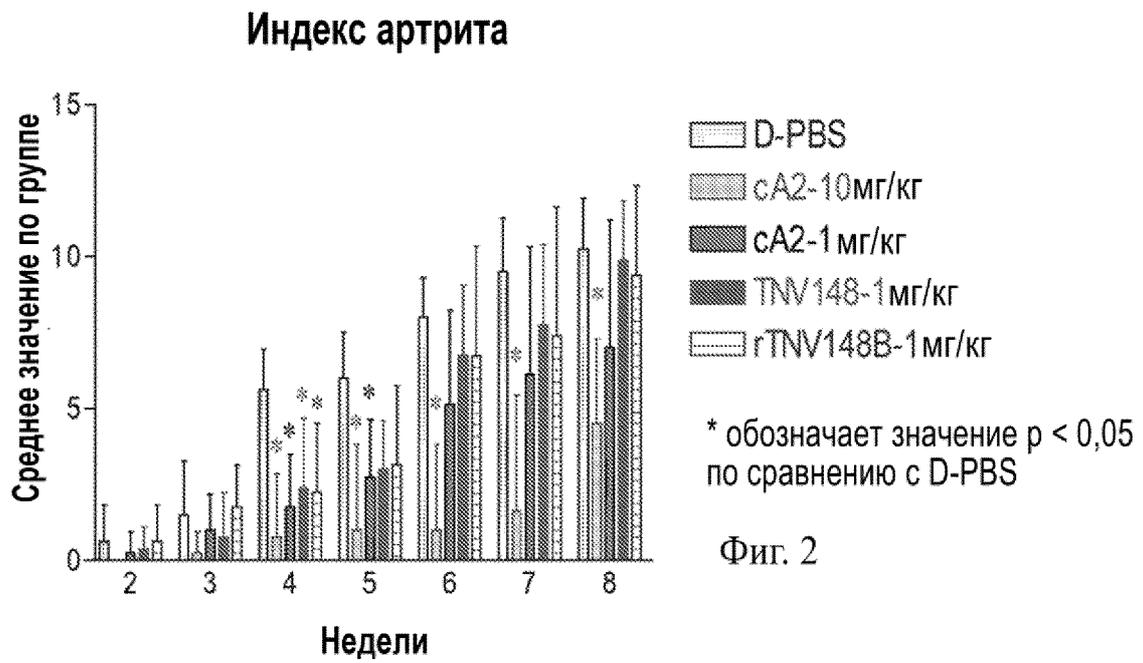
Фиг. 2

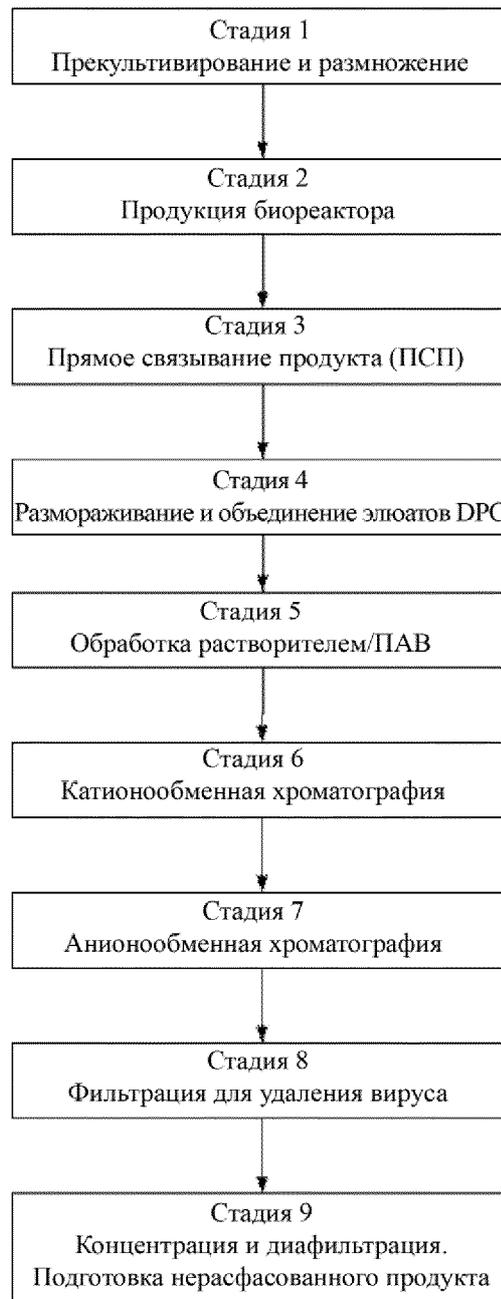
ФИГ. 16



Фиг. 1

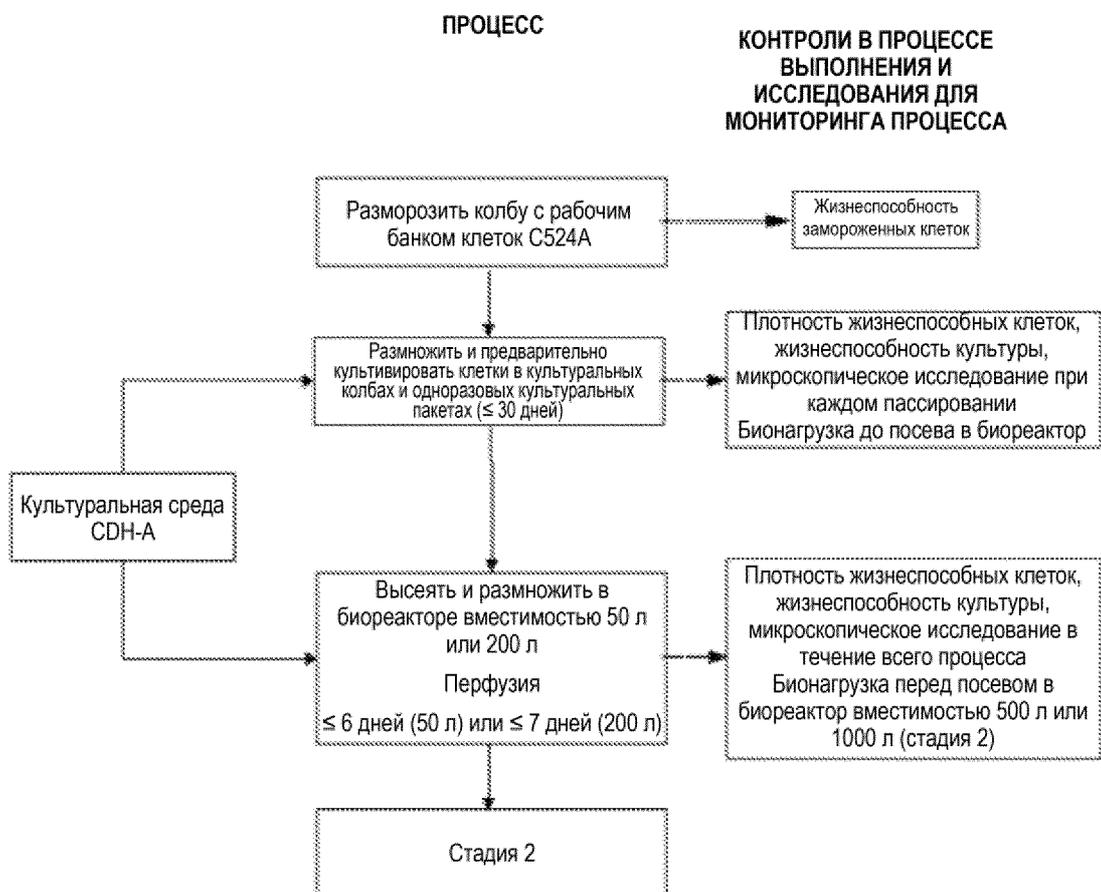
ФИГ. 17



ФИГ. 18**Обзор производственного процесса****Стадии процесса**

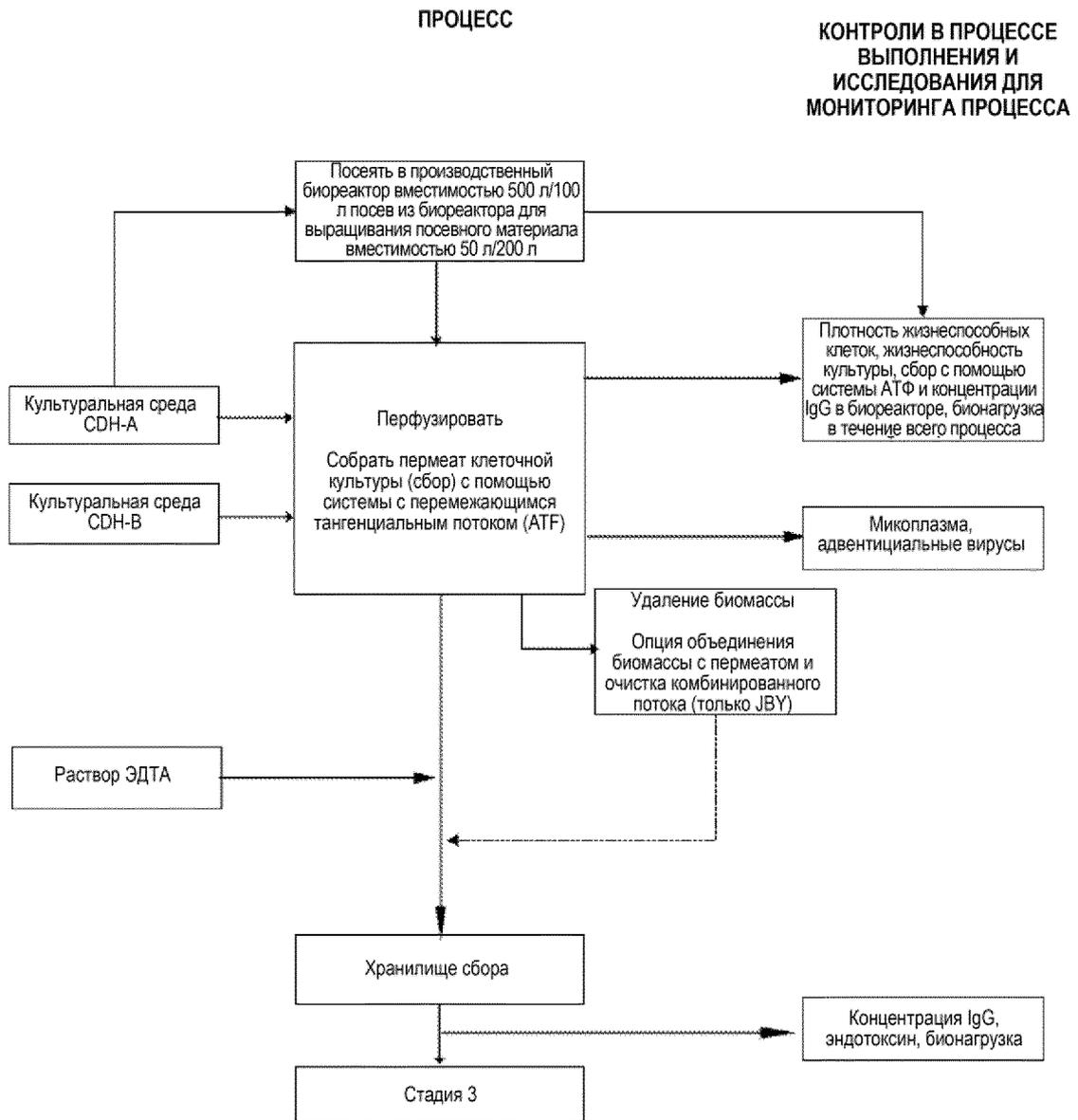
ФИГ. 19

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



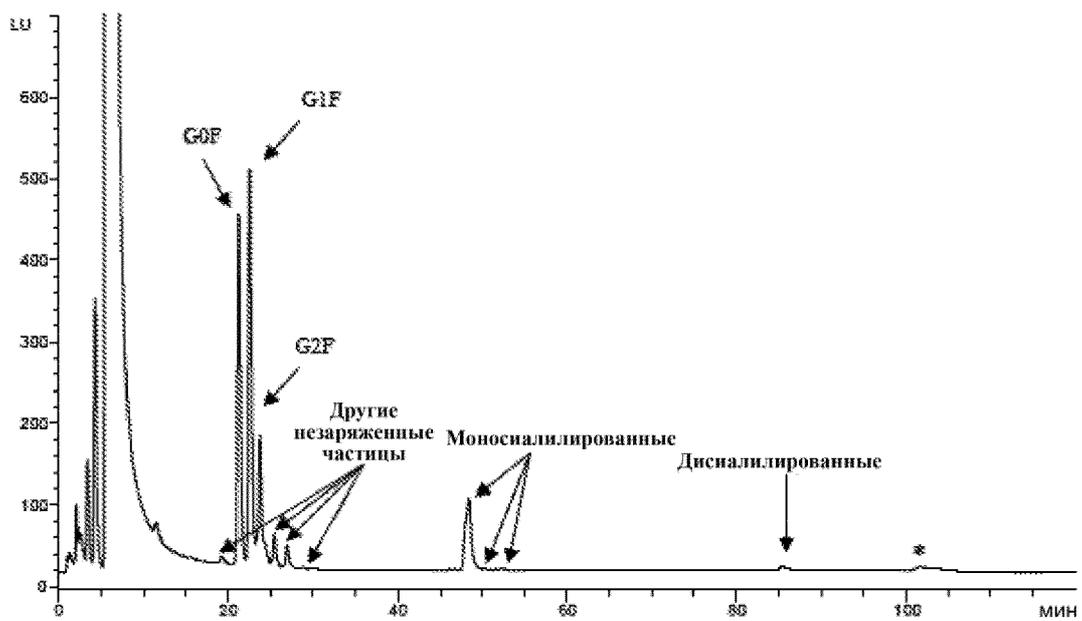
ФИГ. 20

Этап 2 Технологическая схема потока



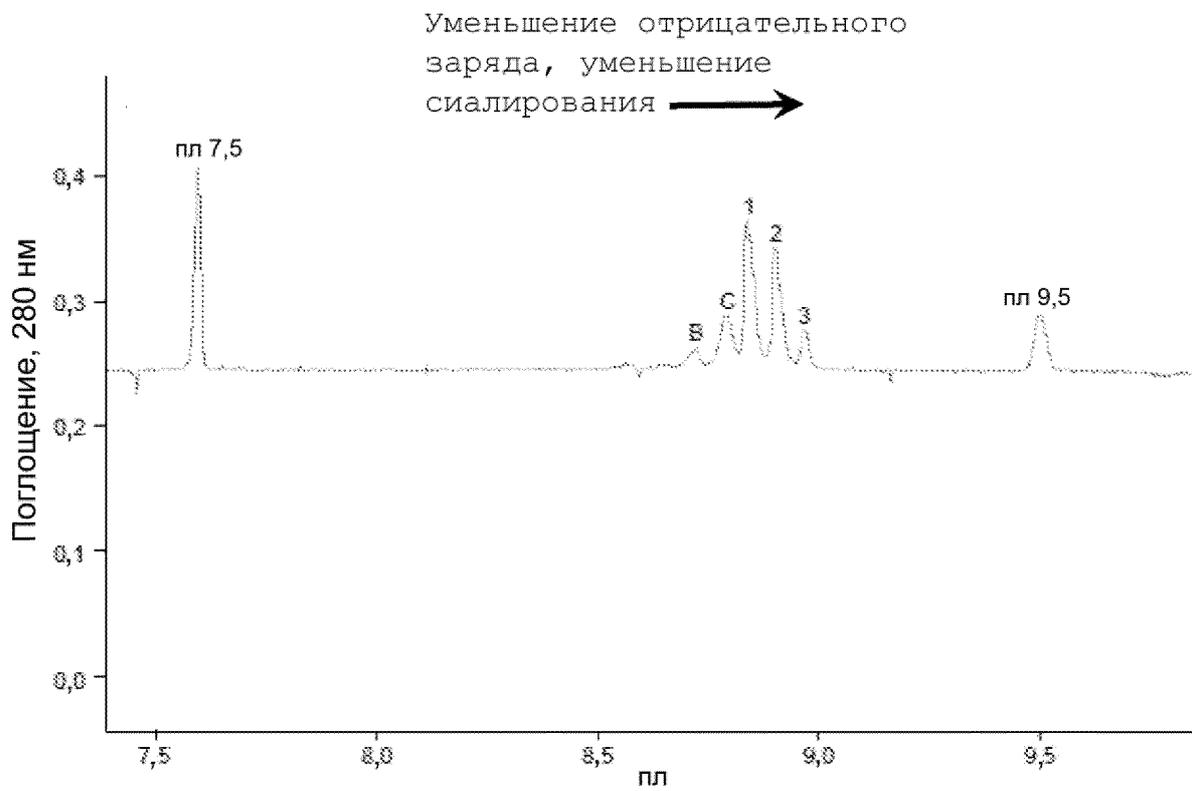
ФИГ. 21

Репрезентативная хроматограмма ВЭЖХ для голимумаба



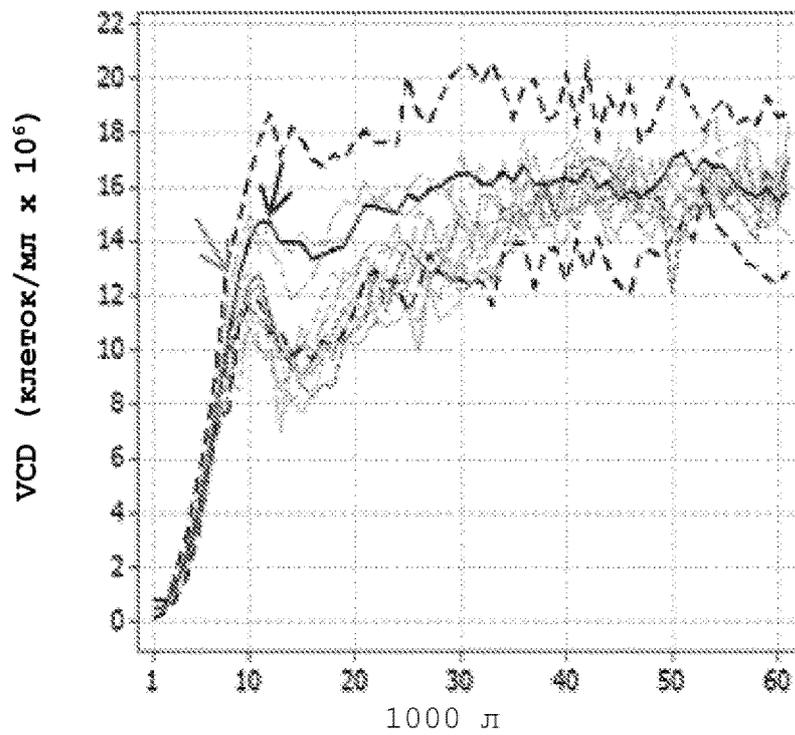
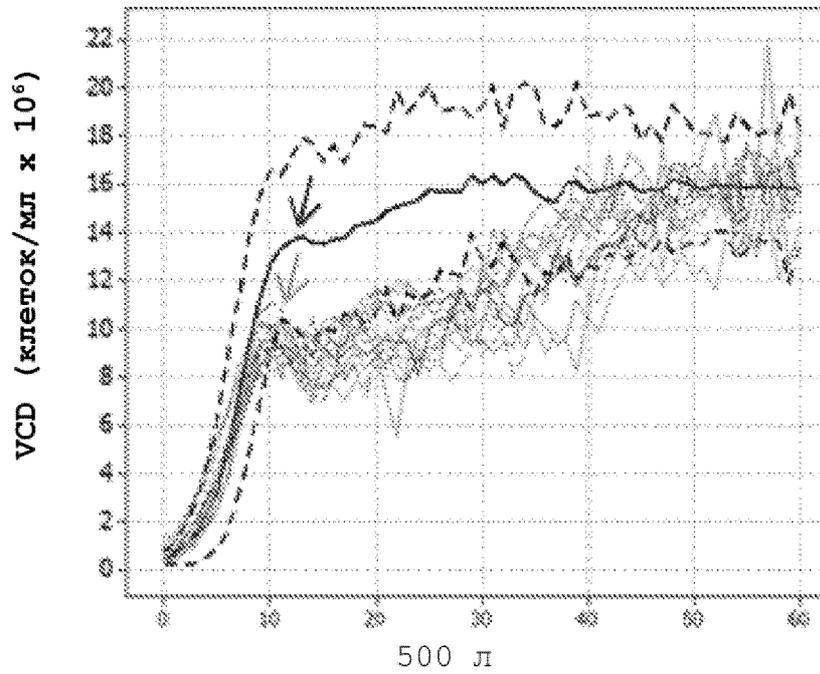
ФИГ. 22

Характерный профиль электроферограммы КИЭФ для голимумаба



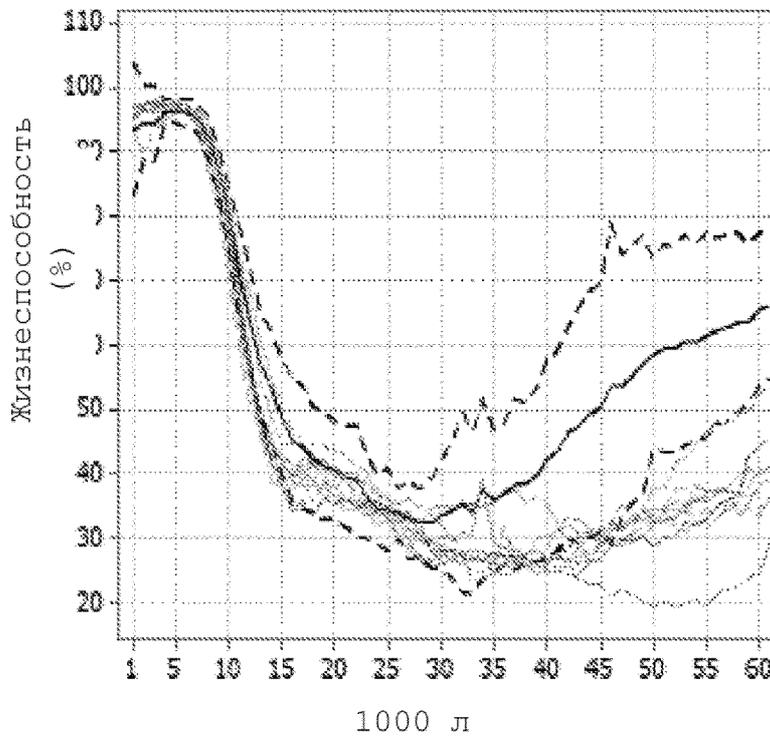
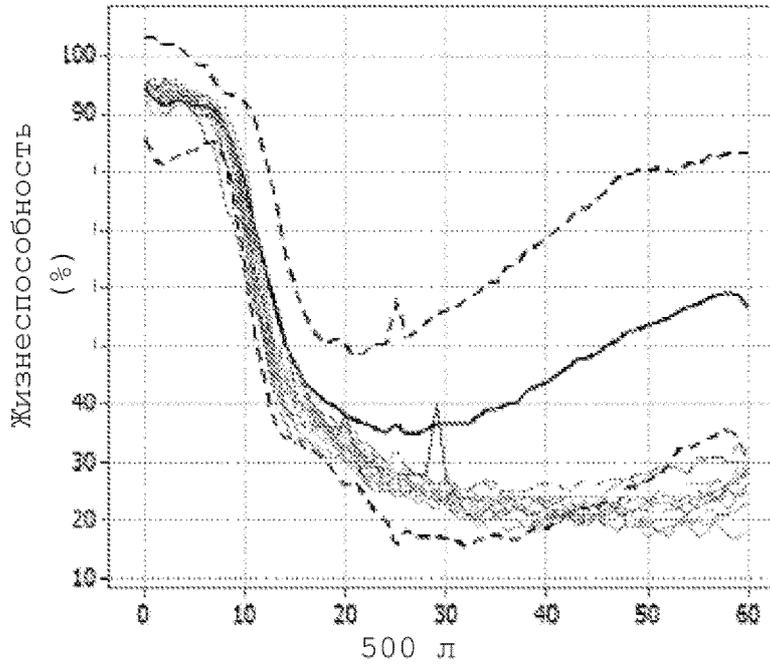
ФИГ. 23

Плотность жизнеспособных клеток (VCD) в
клеточной культуре (стадия 2)



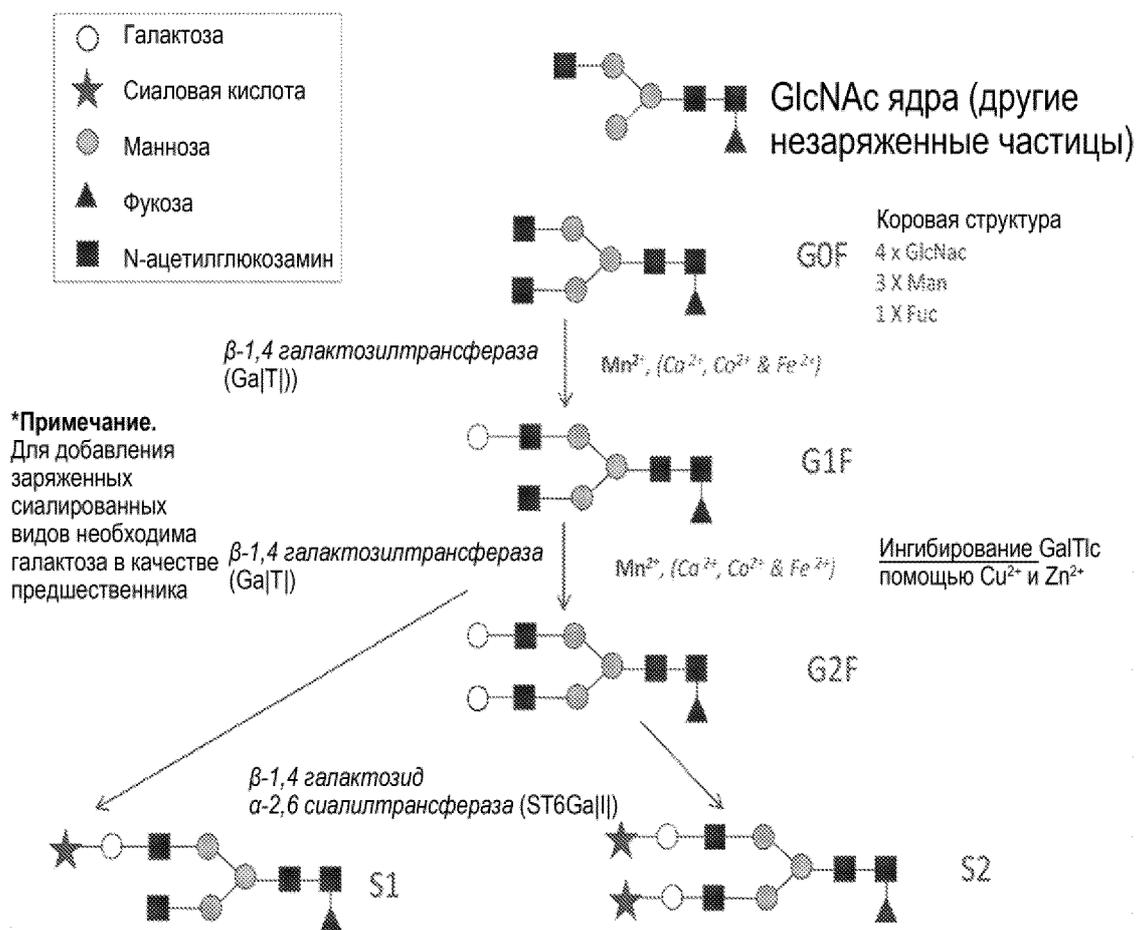
ФИГ. 24

% жизнеспособности в клеточной культуре (стадия 2)



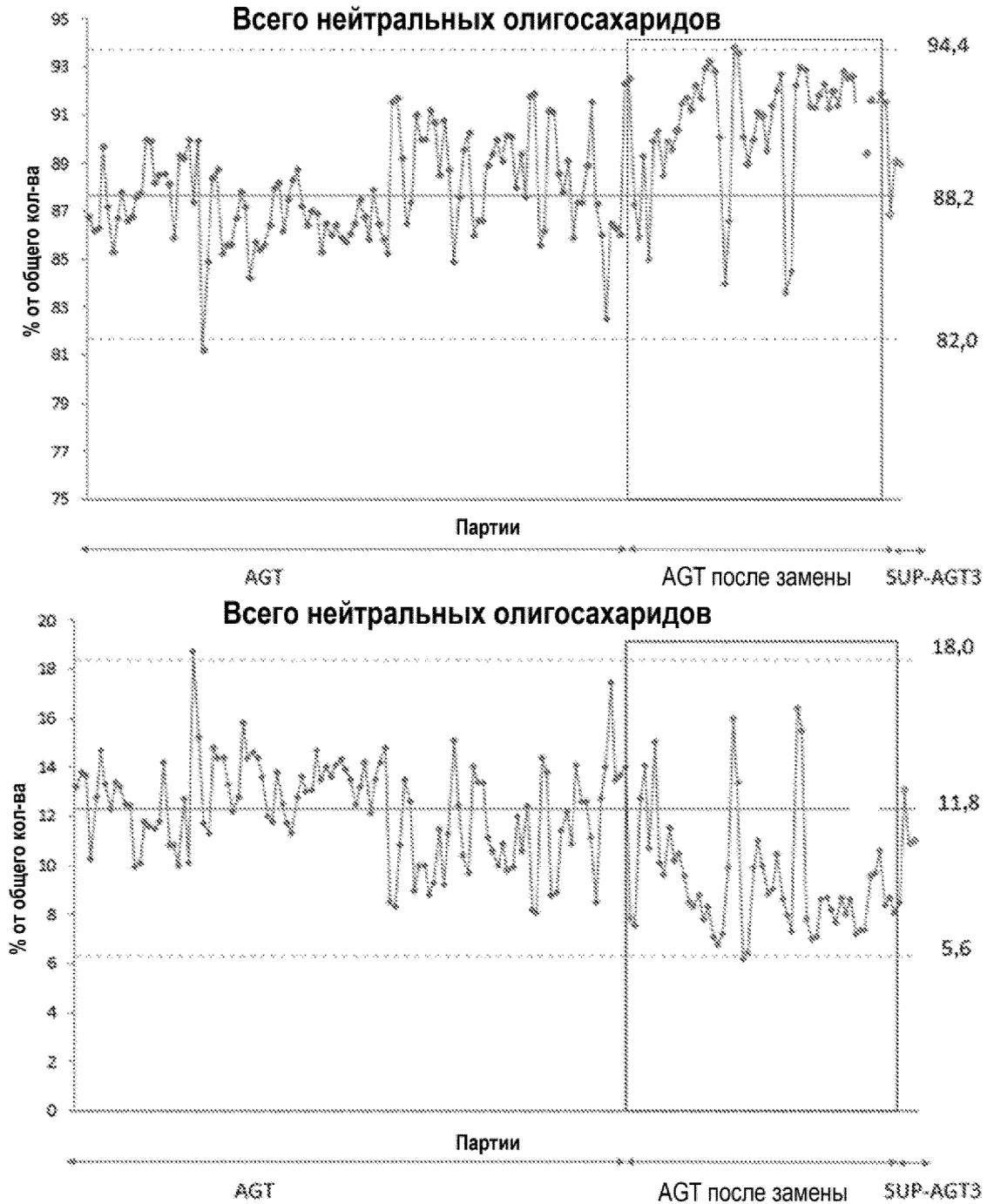
ФИГ. 25

Схема основных видов N-связанных олигосахаридов в голimumabe

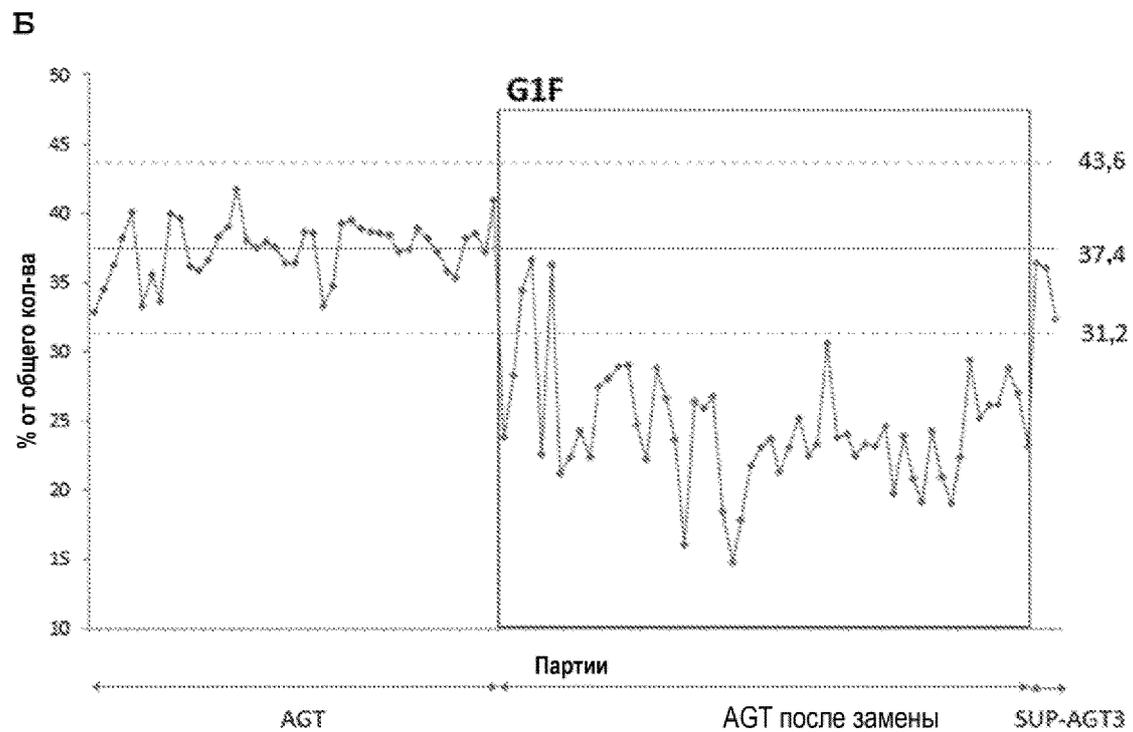
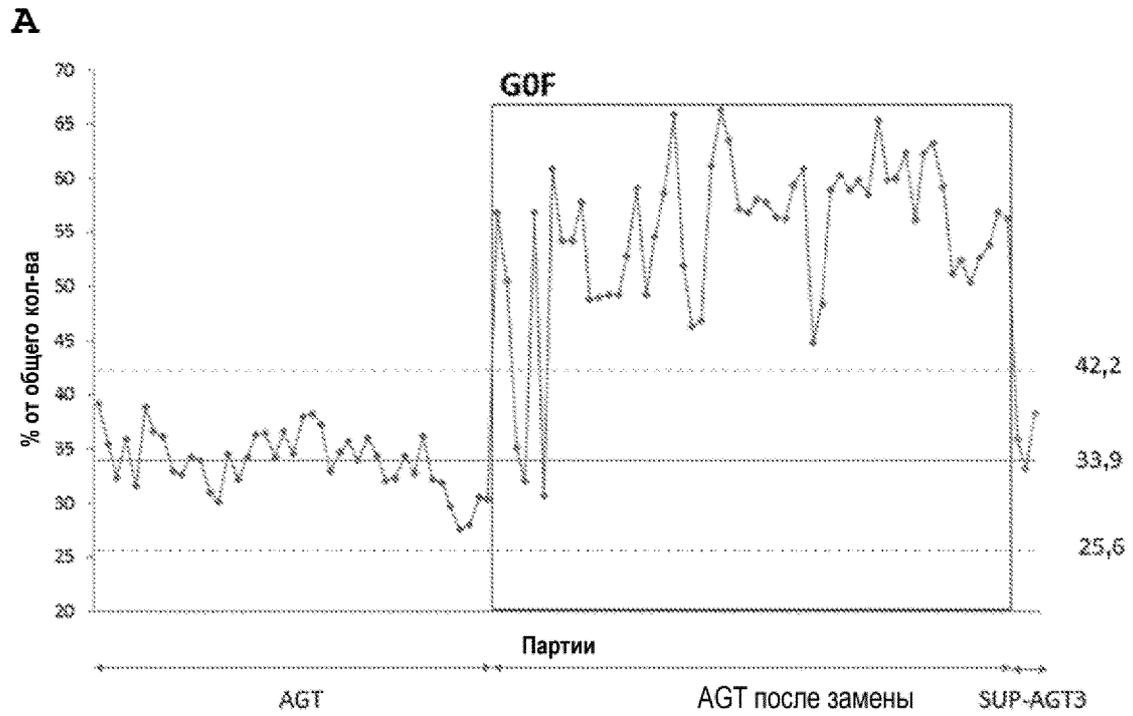


ФИГ. 26

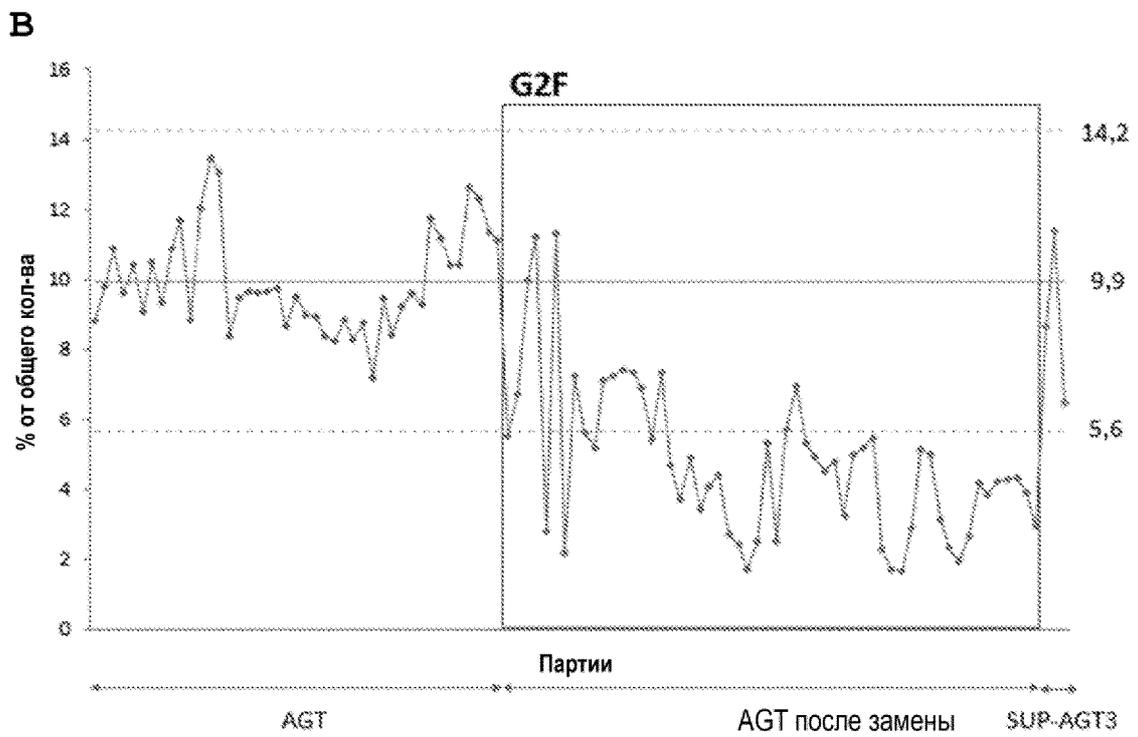
Общее содержание нейтральных и заряженных олигосахаридов



ФИГ. 27

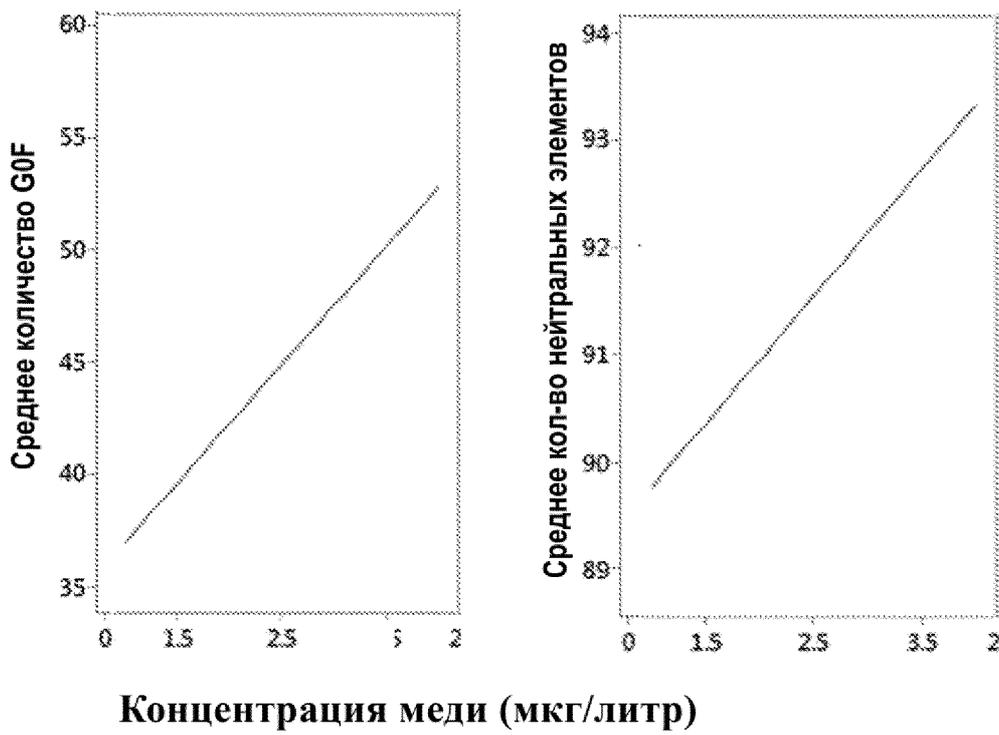


ФИГ. 27 (продолжение)



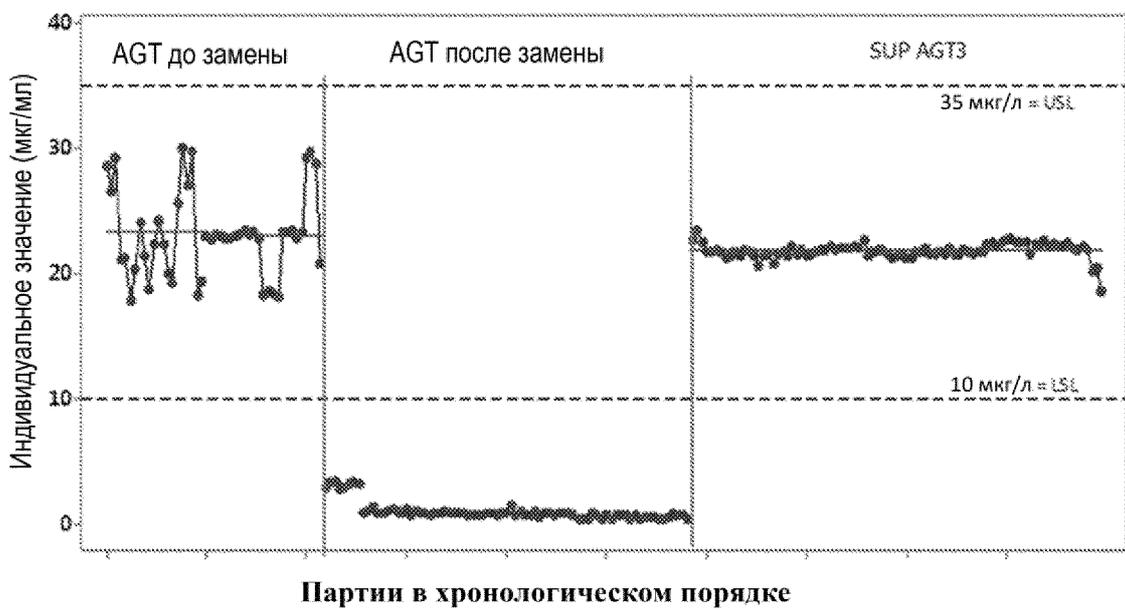
ФИГ. 28

**Влияние меди на GOF и общий уровень
нейтральных элементов**



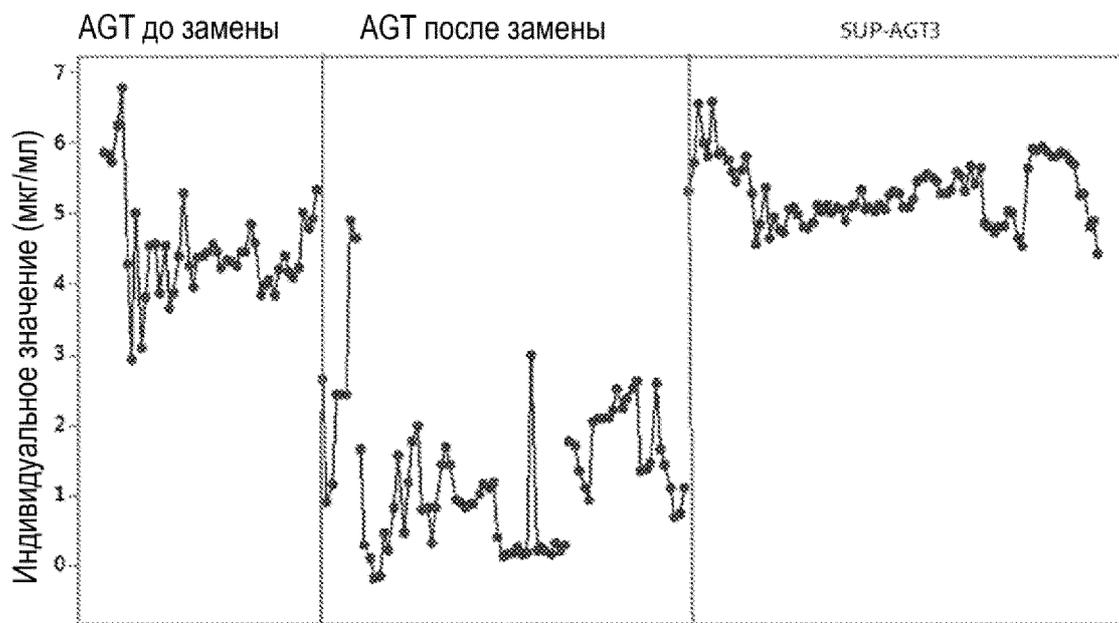
ФИГ. 29

Уровни марганца (мкг/л) для среды АГТ



ФИГ. 30

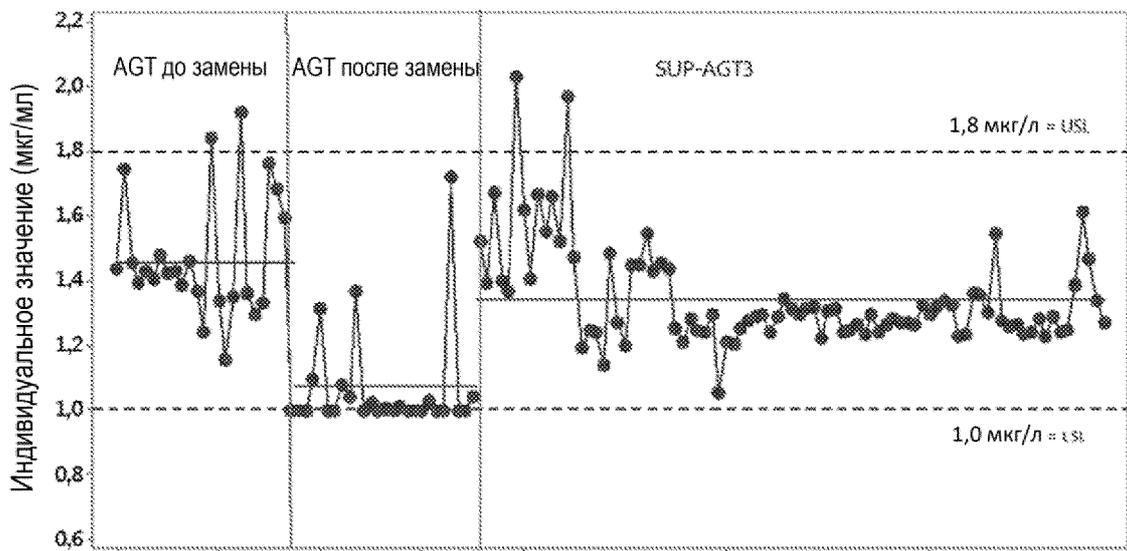
Уровни хрома (мкг/л) для среды АГТ



Партии в хронологическом порядке

ФИГ. 31

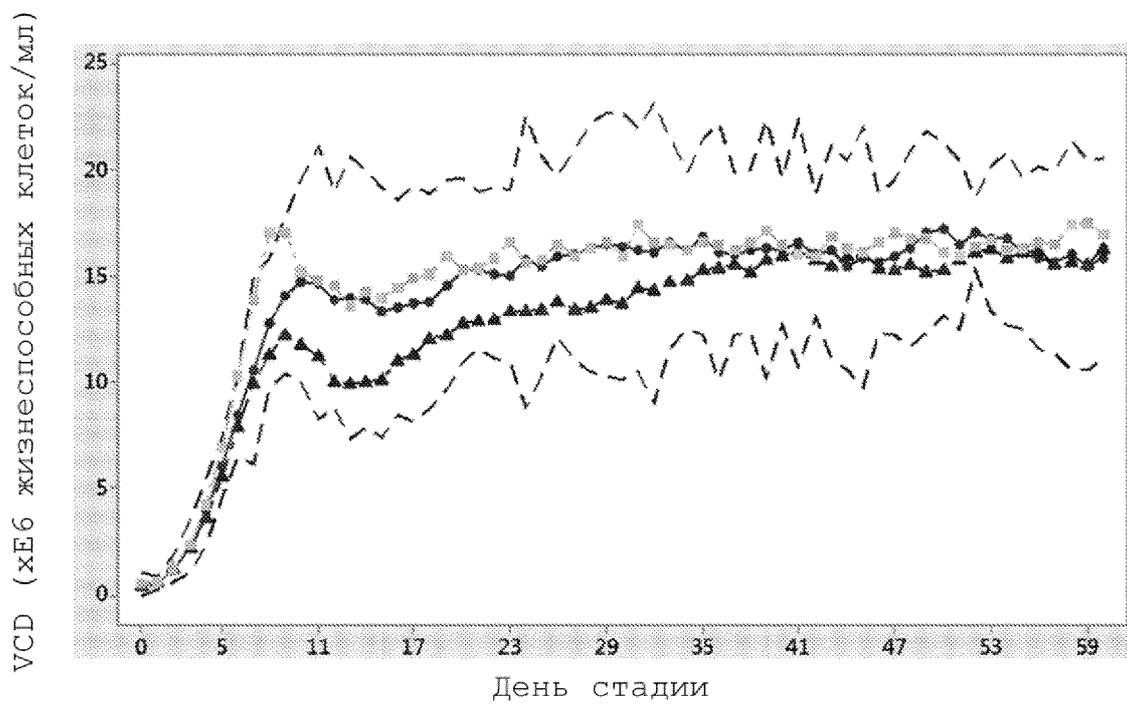
Уровни меди (мкг/л) для среды AGT



Партии в хронологическом порядке

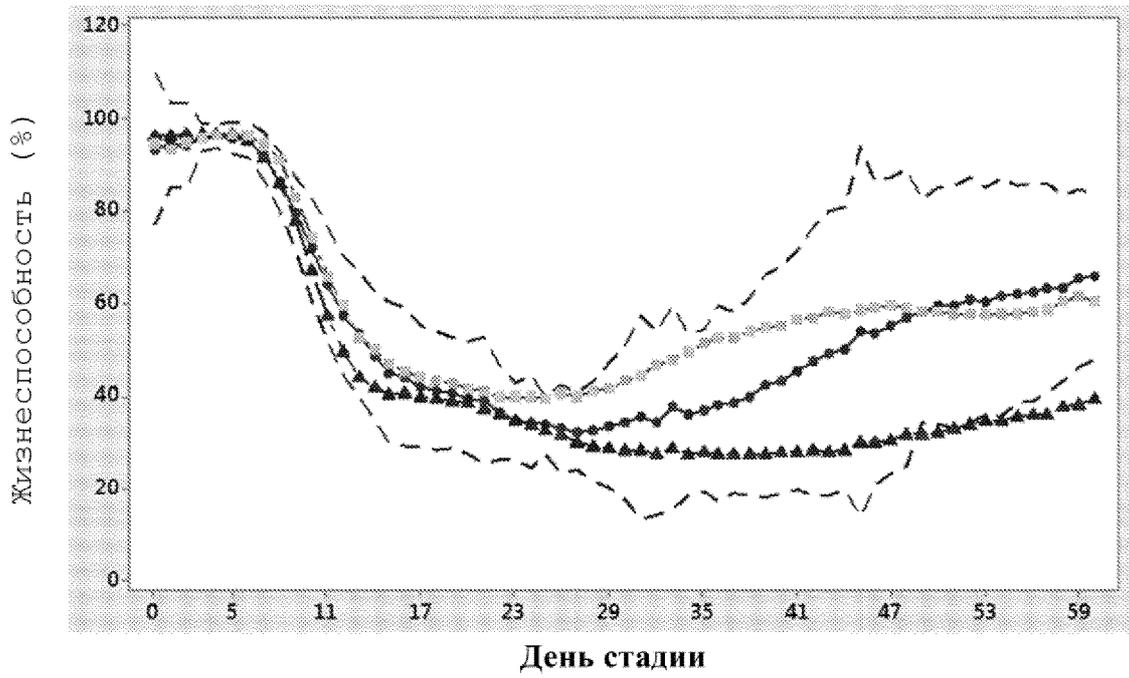
ФИГ. 32

VCD в зависимости от дня стадии



ФИГ. 33

Жизнеспособность (%) в зависимости от дня стадии



ФИГ. 34

Кумулятивные уровни IgG в зависимости от дня стадии

