

ÖZET

**İŞLENMİŞ ANTI-IL-23P19 ANTİKORLARIN SOLÜSYON
FORMÜLASYONLARI**

- 5 Mevcut buluş, anti-insan interlökin-23 p19 (IL-23p19) antikoru hum13B8-b'nin yüksek konsantrasyonlu solüsyon formülasyonlarını ve bunların çeşitli rahatsızlıkların tedavi edilmesinde kullanımlarını sağlar.

İSTEMLER

1. Anti-IL-23p19 antikoru hum13B8-b'nin bir solüsyon formülasyonudur, aşağıdakileri içermesidir:

5

- a) en az 50 mg/ml anti-IL-23p19 antikoru hum13B8-b;
- b) 10 mM histidin tamponu, pH 6.0;
- c) %0.05 polisorbat 80; ve
- d) %7 sükroz,

10

burada söz konusu antikor hum13B8-b aşağıdakileri içerir:

- i) SEQ ID NO: 2 dizisini içeren bir hafif zincir polipeptidi; ve
- ii) SEQ ID NO: 1 dizisini içeren bir ağır zincir polipeptidi.

15

2. İstem 1'e göre solüsyon formülasyonudur, en az 80 mg/ml anti-IL-23p19 antikoru hum13B8-b içerir.

3. İstem 2'ye göre solüsyon formülasyonudur, en az 100 mg/ml anti-IL-23p19 antikoru hum13B8-b içerir.

20

4. İstem 1'e göre solüsyon formülasyonudur, 80 - 120 mg/ml anti-IL-23p19 antikoru hum13B8-b içerir.

25

5. İstem 4'e göre solüsyon formülasyonudur, 100 mg/ml anti-IL-23p19 antikoru hum13B8-b içerir.

6. Bir otoimmün hastalığın, enflamatuar hastalığın veya proliferatif rahatsızlığın tedavi edilmesinde kullanıma yönelik istemler 1-5'ten herhangi birine göre solüsyon formülasyonudur.

30

7. İstem 6'ya göre kullanıma yönelik formülasyonudur, burada formülasyon deri altından uygulanır.
- 5 8. İstem 7'ye göre kullanıma yönelik formülasyondur, burada deri altı uygulaması bir şırınga, bir otoenjektör, bir enjektör kalem veya bir iğnesiz enjeksiyon cihazı kullanılarak enjeksiyonla gerçekleştirilir.
9. İstem 6'ya göre kullanıma yönelik formülasyondur, burada formülasyon üç aylık aralıklarla uygulanır.
- 10 10. İstem 6'ya göre kullanıma yönelik formülasyondur, burada enflamatuvar hastalığı sedef hastalığıdır.

TARİFNAME
İŞLENMİŞ ANTI-IL-23P19 ANTİKORLARIN SOLÜSYON
FORMÜLASYONLARI

5 BULUŞUN SAHASI

Mevcut buluş, genel olarak terapötik antikorların yüksek konsantrasyonlu solüsyon formülasyonları ve bunların çeşitli rahatsızlıkların tedavi edilmesinde kullanımları ile ilgilidir.

10

BULUŞUN ALT YAPISI

İnterlökin-23 (IL-23), IL-23'e mahsus olan p19 ve İnterlökin-12 (IL-12) ile paylaşılan p40 olmak üzere iki alt üiteden oluşan bir heterodimerik sitokindir.

15 P19 alt ünitesi IL-6, granülosit-koloni stimüle edici faktör (G-CSF) ve IL-12'nin p35 alt ünitesi ile yapısal olarak ilgilidir. IL-23, IL-12 reseptörüne mahsus olan IL-23R ve IL-21 reseptörü ile paylaşılan IL-12R β 1 olmak üzere iki alt ünite içeren bir heterodimerik reseptöre bağlanarak sinyalleme aracılığı eder. Bir takım önceden yapılmış çalışmalar, p40'ta (p40 nakavt fare; p40KO faresi) bir genetik

20 eksikliğin sonuçlarının, *örneğin* bir p35KO faresinde p35 eksikliği ile, gözlemlenenlerden daha şiddetli olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar sonuç olarak IL-23'ün keşfedilmesi ve p40KO'nun sadece IL-12'nin değil aynı zamanda IL-23'ün ekspresyonunu da önlediğinin fark edilmesiyle açıklanmıştır. *Bakınız, örneğin*, Oppmann et al. (2000) Immunity 13:715-725; Wiekowski et al. (2001) J. Immunol. 166:7563-7570; Parham et al. (2002) J. Immunol. 168:5699-708; Frucht (2002) Sci STKE 2002, E1-E3; Elkins et al. (2002) Infection Immunity 70:1936-1948).

P40 KO farelerinin kullanımı hakkındaki son çalışmalar, hem IL-23 hem de IL-

30 12'nin blokajının çeşitli enflamatuvar ve otoimmün hastalıklarına yönelik olarak bir etkili tedavi olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, IL-12 ile p40'ın blokajının,

fırsatçı mikrobiyal enfeksiyonlara karşı arttırılmış duyarlılık veya arttırılmış tümör riski gibi istenmeyen sistemik sonuçlara sahip olduğu görülür. Bowman et al. (2006) Curr. Opin. Infect. Dis. 19:245; Langowski et al. (2006) Nature 442:461. Buna göre, *örneğin* enfeksiyonla savaşmada ve bağışıklık gözetiminde IL-12'nin faydalı aktiviteleri ile çakışmadan, IL-23'ün patojenik enflamatuvar aktivitesi ile çakıştığından, IL-23'ün p19 alt ünitesinin spesifik blokajı insan hastalığının tedavisinde tercih edilir.

Sitokin aktivitesini bloke etmek üzere terapötik antikorlar kullanılabilir. Antikorların *yaşayan organizma içinde* bir terapötik ajan olarak kullanılmasında önemli bir sınırlama antikorların immünojenikliğidir. İnsan olmayan türlerden türetilen monoklonal antikorlara yönelik olarak, insanlarda tekrarlanan kullanım, terapötik antikora karşı bir immün yanıtının üretimi ile sonuçlanır. Bu tür bir bağışıklık yanıtı bir minimumda bir terapötik etkinlik kaybı ve potansiyel olarak bir ölümcül anafilaktik yanıt ile sonuçlanır. Buna göre, hümanize edilmiş veya tamamen insan antikorları gibi insanlarda indirgenmiş immünojeniklik antikorları insan deneklerin tedavisine yönelik olarak tercih edilir. IL-23p19'a örnekleyici terapötik antikorlar, U.S. Patent Başvurusu Yayın No. 2007/0009526 ve Uluslararası Patent Yayını No'lar. WO 2007/076524, WO 2007/024846, WO 2007/147019 ve WO 2009/043933'te açıklanır. Ek hümanize edilmiş anti-IL-23p19 antikorları, Uluslararası Patent Yayını No'lar. WO 2008/103432 ve WO 2008/103473 olarak yayınlanan yaygın olarak tahsis edilmiş başvurularda ve yaygın olarak tahsis edilmiş U.S. Patent Başvurusu Yayını No. 2007/0048315'te açıklanır.

İnsanlarda kullanıma yönelik antikor ilaçları, bunların sabit alanlarının amino asit sekansında veya bunların değişken alanlar içerisindeki çerçeve sekanslarında bir miktar farklılık gösterebilir, ancak tipik olarak en dramatik olarak CDR sekanslarında farklılık gösterirler. Aynı proteine, aynı polipeptide veya potansiyel olarak aynı epitopa bile bağlanan antikorlar bile tamamen farklı CDR sekansları içerebilir. İnsanlarda kullanıma yönelik terapötik antikorlar aynı zamanda, yine

potansiyel CDR sekanslarında daha fazla çeşitliliğe yol açarak, insan germ hattı antikor dizisinden veya hümanize edilmiş antikorlarda olduğu gibi, insan olmayan (*örneğin*, kemirgen) germ hattı antikor dizilerinden de elde edilebilir. Bu sekans farklılıkları, solüsyon içinde farklı stabiliteler ve solüsyon parametrelerine farklı

5 yanıt verebilirlik ile sonuçlanır. Ek olarak, amino asitlerin düzenlenmesindeki küçük değişiklikler veya bir veya birkaç amino asit tortusundaki değişiklikler, önemli ölçüde farklı antikor stabilitesi ve sekansa özgü bozulma yollarına karşı hassaslık ile sonuçlanabilir. Sonuç olarak, antikor stabilitesini optimize etmek üzere gerekli olan solüsyon koşullarının öngörülmesi şimdiki durumda mümkün

10 değildir. Optimum solüsyon formülasyonunu belirlemek üzere her bir antikor ayrı olarak çalışılmalıdır. Bhambhani et al. (2012) J. Pharm. Sci. 101:1120.

Antikorlar, aynı zamanda, *örneğin* hormonlar ve sitokinler gibi diğer terapötik proteinler ile karşılaştırıldığında, nispeten yüksek moleküler ağırlıklı proteinlerdir

15 (~ 150.000 Da). Sonuç olarak, ilacın istenen molar konsantrasyonlarını elde etmek üzere çoğu zaman nispeten yüksek ağırlıkta antikor ilaçları miktarı ile dozlama yapılması gereklidir. Ek olarak, bu kendi kendine uygulamaya olanak sağladığından, çoğu kez antikor ilaçlarının deri altından uygulanması istenir. Kendi kendine uygulama, *örneğin* damar içinden uygulamaya yönelik olarak tıbbi

20 bir tesise ziyaretler ile ilişkili zaman ve masrafı önler. Deri altından verim, pratikte bir enjeksiyon bölgesinde genel olarak yaklaşık 1 ila 1.5 ml olan bir tek enjeksiyon halinde verilebilen solüsyon hacmi tarafından sınırlanır. Deri altından kendi kendine uygulama, tipik olarak, hastanın enjeksiyondan önce ilacı yeniden askıya alma ihtiyacını önlemek üzere, bir liyofilize formdan ziyade, ilacın

25 bir sıvı solüsyon formülasyonu ile doldurulmuş bir önceden doldurulmuş şırınga veya otoenjektör kullanılarak yerine getirilir. Daha yüksek ilaç dozların verilmesine yönelik olarak, bu hacim sınırlaması yüksek konsantrasyonlu solüsyon formülasyonlarının geliştirilmesine çok önem verir. Bununla birlikte, bu tür yüksek antikor konsantrasyonları, makromoleküler yükleme etkileri ve

30 arttırılmış protein-protein etkileşimleri sergilerler, bu, renk oynasımı, kendiliğinden birleşme, toplanma, yayılma ve faz ayrılması gibi fiziksel

stabilitesizlikler ile sonuçlanır. Bu tür yüksek konsantrasyonlu antikor solüsyonları aynı zamanda önceden doldurulmuş şırıngalarda ve otoenjektör cihazlarda şırıngalanabilirliği indirgeyen yüksek viskozite (*örneğin*, >10 santipoiz) sergileyebilir. Antikor ilaçları etkinlik ve tutarlı dozlamayı garanti altına almak üzere depolama sırasında stabil olmalıdır, bu nedenle, seçilen formülasyonun yüksek konsantrasyon, berraklık ve kabul edilebilir viskozite gibi istenen özellikleri desteklemesi ve aynı zamanda, bu özellikleri ve ilaç etkinliğini tipik depolama koşulları altında bir kabul edilebilir şekilde uzun raf ömrü boyunca muhafaza etmesi de son derece önemlidir.

10

Sonuç olarak, insan IL-23p19'a bağlanan antikorlar gibi, terapötik antikorların stabil, yüksek konsantrasyonlu solüsyon formülasyonlarına yönelik ihtiyaç mevcuttur. Bu tür stabil solüsyon formülasyonları tercih edildiği üzere, karşılık gelen ilaç ürününe yönelik bir uzun raf ömrü ile sonuçlanan, kendi kendine uygulamaya yönelik ilaçların depolanmasına yönelik tipik şartlar altında, *diğer bir ifadeyle* bir şırınga içinde buzdolabı sıcaklığında, aylar ila yıllar boyunca stabilite sergileyecektir. Bu tür stabil, yüksek konsantrasyonlu solüsyon formülasyonları, antikor ilacının, kendi kendine uygulama ile yüksek konsantrasyonlu deri altı enjeksiyonuna yönelik olarak paketlenmesine olanak sağlayacaktır.

20

Histidin tamponu pH 6, polisorbitat 80 ve süktroz içeren terapötik antikorların formülasyonları WO2008/157409, WO2012/135408 ve Nicholas Warne ED-Lehr Claus-Michael et al., (European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Vol 78, No 2, 208-212)'de açıklanır. Liyofilize edilmiş anti-IL-23p19 antikorları formülasyonları US2011/0229490'da açıklanır.

25

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Mevcut buluş, hümanize edilmiş anti-IL-23p19 antikoru 13B8-b'nin ("hum13B8-b") yüksek konsantrasyonlu solüsyon formülasyonlarını sağlar. Antikor hum13B8-b, SEQ ID NO: 2 dizisine sahip iki özdeş hafif zincir ve SEQ ID NO: 1

30

dizisine sahip iki özdeş ağır zincir içerir. Bir düzenlemede, solüsyon formülasyonu, a) en az 50 mg/ml anti-IL-23p19 antikor hum13B8-b; b) 10 mM histidin tamponu, pH 6.0; c) %0.05 polisorbitat 80; ve d) %7 süktroz içerir, burada söz konusu antikor hum13B8-b aşağıdakileri içerir:

5

- i) SEQ ID NO: 2 dizisini içeren bir hafif zincir polipeptidi; ve
- ii) SEQ ID NO: 1 dizisini içeren bir ağır zincir polipeptidi.

10 Çeşitli düzenlemelerde, mevcut buluşun solüsyon formülasyonları en az 50, 80, 90, 100, 110 veya 120 mg/ml antikor hum13B8-b içerir. Diğer düzenlemelerde, mevcut buluşun solüsyon formülasyonları yaklaşık 80 - 120 mg/ml antikor hum13B8-b, 80 - 120 mg/ml antikor hum13B8-b, yaklaşık 100 mg/ml antikor hum13B8-b ve 100 mg/ml antikor hum13B8-b içerir.

15 Başka bakış açısında, buluş, bunlarla sınırlı olmamak üzere, enflamatuvar hastalık, otoimmün hastalık, proliferatif rahatsızlıklar, kanser, enfeksiyöz hastalıklar (*örneğin*, kronik enfeksiyonlar dahil olmak üzere bakteriyel, mikobakteriyel, viral veya mantar enfeksiyonu), artrit, sedef hastalığı, psoriatik artrit, entezit, ankilozan spondilit, Crohn hastalığı ve ülseratif kolit dahil olmak üzere enflamatuvar bağırsak
20 hastalığı, çoklu skleroz, üveit, graft versus host hastalığı, sistemik lupus eritematoz ve diyabeti dahil eden rahatsızlıkları tedavi etmek üzere kullanıma yönelik olarak mevcut buluşun anti-IL-23p19 antikor hum13B8-b'nin yüksek konsantrasyonlu solüsyon formülasyonları ile ilgilidir. Yine başka bakış açısında, buluş, bu aynı rahatsızlıkların tedavisinde kullanıma yönelik olarak bir ilacın
25 imalatında anti-IL-23p19 antikor hum13B8-b'nin yüksek konsantrasyonlu solüsyon formülasyonlarının kullanımı ile ilgilidir.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

30 ŞEKİL 1, hum13B8-b'yi içeren formülasyonlara yönelik optimal tampon ve pH koşullarını belirlemek üzere kullanılan verileri gösterir. ŞEKİL 1A, çeşitli 1

- mg/mL antikor formülasyonlarına yönelik olarak, diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) tarafından belirlendiği üzere, yayılma sıcaklığını ve RP-HPLC tarafından ölçüldüğü üzere saflık yüzdesini gösterir ve ŞEKİL 1B, birkaç farklı tampona (asetat, sitrat, fosfat ve Tris) yönelik olarak bir pH fonksiyonu olarak, HP-SEC
- 5 tarafından ölçüldüğü üzere, monomer yüzdesini ve geç ayrışan piklerin yüzdesini gösterir. DSC ve HP-SEC'in kısa tartışmaları sırasıyla Örnekler 2 ve 3'te sağlanır. ŞEKİLLER 1C - 1E, sırasıyla, renk oynaşımı (OD_{350}), dinamik ışık saçılımı (DLS) tarafından ölçüldüğü üzere hidrodinamik boyut (nm) dağılımı ve DSC tarafından belirlendiği üzere erime sıcaklığı dahil olmak üzere, pH'ın bir
- 10 fonksiyonu olarak 10 mM sitrat formülasyonlarının çeşitli özelliklerini gösterir. DLS ve DSC'nin kısa tartışmaları sırasıyla Örnekler 4 ve 2'de sağlanır. ŞEKİLLER 1F ve 1G, yüksek performanslı iyon değiştirme kromatografisi (HP-IEX) tarafından belirlendiği üzere, sırasıyla, zamanla geç ayrışan piklerin yüzdesini ve ana tepe yüzdesini gösterir. HP-IEX'in kısa bir tartışması Örnek 5'te
- 15 sağlanır. ŞEKİL 1J, DLS tarafından belirlendiği üzere, daha konsantre antikor formülasyonlarına (50 ve 100 1mg/ml) yönelik olarak hidrodinamik boyut (nm) dağılımını gösterirken, ŞEKİLLER 1H ve 1I, farklı pH'larda çeşitli tamponlarda düşük konsantrasyonlu antikor formülasyonlarına (1 mg/ml) yönelik olarak,
- 20 sırasıyla, dinamik ışık saçılımı (DLS) ile ölçüldüğü üzere, renk oynaşımı (OD_{350}) ve hidrodinamik boyutu (nm) gösterir. DLS'nin kısa bir tartışması Örnek 4'te sağlanır. ŞEKİL 1K, HP-SEC tarafından belirlendiği üzere, zaman içinde farklı pH'larda çeşitli tamponlarda geç ayrışan piklerin yüzdesini gösterir. HP-SEC'in kısa bir
- 25 tartışması Örnek 3'te sağlanır. ŞEKİLLER 2A ve 2B, sırasıyla, çeşitli ekspiyanlar (100 mM NaCl, %7 sükroz, %7 trehaloz ve %6 mannitol) içeren hum13B8-b formülasyonlarına yönelik olarak, DSC tarafından belirlendiği üzere, yayılma sıcaklığını ve renk oynaşımındaki değişiklikleri gösterir. DS ilaç maddesine refere eder. DSC'nin kısa
- 30 bir tartışması Örnek 2'de sağlanır.

ŞEKİLLER 3A ve 3B, sırasıyla, HP-SEC tarafından belirlendiği üzere, antikor yüzdesini ve erken ayrılan pik yüzdesini gösterir ve Şekil 3C, yüzey aktif cismnin (%0.05 polisorbata 20, %0.05 polisorbata 80 veya Pluronic F-68) varlığının veya yokluğunun bir fonksiyonu olarak, beş günlük çalkalamadan önce ve sonra, renk oynasımını gösterir. Yüzey aktif madde içermeyen (NS) numuneye yönelik 5 Günlük Çalkalama değeri gerçekte 3'ün üzerinde ve böylece ölçeğin oldukça dışıdır. HP-SEC'in kısa bir tartışması Örnek 3'te sağlanır.

ŞEKİL 4, çeşitli koşullar altında saklandığında, 10 mM tampon, %7 sükröz ve %0.05 polisorbata 80 içeren asetat ve histidin antikor formülasyonlarının stabilitesini gösterir. Numuneler, 2.0 ml'lik cam şişelerde 1.5 ml'lik numuneler olarak saklanmıştır. ŞEKİL 4A, 5 °C'de (ortam bağıl nemi) veya RH4 koşulları altında (40 °C, %75 bağıl nem) saklandığında, HP-SEC tarafından ölçülen monomer antikor yüzdesi tarafından yansıtıldığı üzere, 50 ve 100 mg/ml antikor preparasyonlarının stabilitesini gösterir. HP-SEC'in kısa bir tartışması Örnek 3'te sağlanır.

ŞEKİLLER 4B - 4D, HP-SEC tarafından belirlendiği üzere, sırasıyla monomer yüzdesi, HMW türleri ve LMW türlerinin grafikleridir, çeşitli saklama koşulları altında "25H" 25 °C, %60 bağıl nemde saklamaya refere eder. ŞEKİLLER 4B - 4D'nin ordinatların (zaman eksenleri) doğrusal olmadığını not ediniz. HP-SEC'in kısa bir tartışması Örnek 3'te sağlanır.

ŞEKİLLER 4E ve 4F, sırasıyla ana pik ve asidik varyantların yüzdelерinin ölçülmesiyle antikor stabilitesini izleyen HP-IEX deneylerinin sonuçlarının grafikleridir. HP-IEX'in kısa bir tartışması Örnek 5'te sağlanır.

ŞEKİLLER 4G - 4I, sırasıyla, 5 °C, 25 °C (25H) ve 40 °C'de (RH4) saklamadan sonraki ışık oynasımı grafikleridir. ŞEKİLLER 4J ve 4K, sırasıyla, RH4 (40 °C, %75 bağıl nem) ve 5 °C'de ve 40 °C'de ve 5 °C'de saklamadan sonra, peptit haritalamasıyla ölçüldüğü üzere, oksidasyonu gösterir. Peptit haritalamanın kısa bir tartışması Örnek 6'da sağlanır.

ŞEKİLLER 4L ve 4M, sırasıyla, başlangıç numunelerine ve 5 °C veya RH4 koşullarında 4.5 ay saklanan numunelere yönelik olarak, asetat ve histidin

formülasyonları hakkındaki DSC deneylerinden gelen yayılma grafikleridir. DSC'nin kısa bir tartışması Örnek 2'de sağlanır.

10 mM asetat ve 10 mM histidin formülasyonlarının stabiliteyi, HP-SEC tarafından ölçüldüğü üzere, monomer yüzdesi olarak ve yüksek moleküler ağırlıklı türlerin yüzdesi olarak ölçülmüştür. Stabilite 5 °C (± 3 °C), 25H (25 °C, %60 bağıl nem) veya RH4'te (40 °C, %75 bağıl nem) saklanan numunelere yönelik olarak ölçülmüştür. Sonuçlar ŞEKİLLER 4A ve 4B'de sunulur. HP-SEC'in kısa bir tartışması Örnek 3'te sağlanır.

ŞEKİL 5, 30 mL etilen-vinil-asetat (EVA) sıvı temas katmanı Celsius® Pak torbalarında ilaç maddesi olarak saklandığında mevcut buluşun antikor formülasyonlarına yönelik stabilite verilerini sunar. Veriler, 10 mM Histidin tamponu (pH 6.0), %7 sükröz, %0.05 polisorbata 80 ve antikor hum13B8-b içeren formülasyonlara yönelik olarak sunulur. ŞEKİLLER 5A - 5C, sırasıyla, üç farklı hum13B8-b (Parçalar A, B ve C) preparasyonuna yönelik olarak protein konsantrasyonu, biyolojik potans (hücre bazlı fonksiyonel analiz tarafından ölçüldüğü üzere) ve biyolojik potans (ELISA tarafından ölçüldüğü üzere) grafikleridir. Protein konsantrasyonu belirleme, hücre bazlı fonksiyonel analizler ve ELISA'ların kısa tartışmaları sırasıyla Örnekler 7, 8 ve 9'da sağlanır.

ŞEKİLLER 5D - 5G, sırasıyla, asidik varyantlar, ana pik, ana pik sonrası türler ve bazik varyantların yüzdelerinin ölçülmesiyle antikor stabilitesini izleyen HP-IEX deneylerinin sonuçlarının grafikleridir. HP-IEX'in kısa bir tartışması Örnek 5'te sağlanır.

ŞEKİL 5H, HP-SEC tarafından ölçüldüğü üzere, monomer yüzdesini gösterir. HP-SEC'in kısa bir tartışması Örnek 3'te sağlanır.

ŞEKİLLER 5I ve 5J, sırasıyla, indirgeyici olmayan CE-SDS ile ana pikin yüzdesinin veya indirgeyici CE-SDS ile ağır ve hafif zincirlerin yüzdesinin ölçülmesiyle saflığı gösterir. CE-SDS'nin kısa bir tartışması Örnek 10'da sağlanır.

ŞEKİLLER 5K ve 5L, HP-SEC tarafından ölçüldüğü üzere, sırasıyla yüzde HMW ve LMW türlerini gösterir. HP-SEC'in kısa bir tartışması Örnek 3'te sağlanır.

ŞEKİL 6, 30 mL etilen-vinil-asetat (EVA) sıvı temas katmanı Celsius® Pak torbalarında ilaç maddesi olarak saklandığında mevcut buluşun antikor

- formülasyonlarına (antikor Parçaları A ve B) yönelik ek stabilite verileri sunar. Veriler, 10 mM Histidin tamponu (pH 6.0), %7 süktroz, %0.05 polisorbata 80 ve antikor hum13B8-b içeren formülasyonlara yönelik olarak sunulur. ŞEKİLLER 6A ve 6B, sırasıyla ELISA tarafından ölçüldüğü üzere ve hücre bazlı fonksiyonel analiz tarafından ölçüldüğü üzere biyolojik potans grafikleridir. ELISA ve hücre bazlı fonksiyonel analizlerin kısa tartışmaları sırasıyla Örnekler 9 ve 8'de sağlanır. ŞEKİLLER 6C - 6E, çeşitli saklama koşulları altında HP-SEC tarafından belirlendiği üzere sırasıyla monomer yüzdesi, HMW türleri ve LMW türlerinin yüzdelerinin grafikleridir. HP-SEC'in kısa bir tartışması Örnek 3'te sağlanır.
- 10 ŞEKİLLER 6F ve 6G, sırasıyla, indirgeyici olmayan CE-SDS ile ana pikin yüzdesinin veya indirgeyici CE-SDS ile ağır ve hafif zincirlerin yüzdesinin ölçülmesiyle saflığı gösterir. CE-SDS'nin kısa bir tartışması Örnek 10'da sağlanır. ŞEKİLLER 6H - 6K, sırasıyla, asidik varyantlar, ana pik, ana pik sonrası türler ve bazik varyantların yüzdelerinin ölçülmesiyle antikor stabilitesini izleyen HP-IEX
- 15 deneylerinin sonuçlarının grafikleridir. HP-IEX'in kısa bir tartışması Örnek 5'te sağlanır.
- ŞEKİL 7, 100 mg/ml antikor konsantrasyonunda ve 1.0 ml doldurma hacminde önceden doldurulmuş şırıngalardaki birim dozlarda ilaç ürünü olarak 5 °C'de (3 °C) saklandığında mevcut buluşun antikor formülasyonlarına yönelik stabilite verileri sunar. ŞEKİL 7A, uv emilimi tarafından belirlendiği üzere dört farklı hum13B8-b (Parçalar D, E, F, G ve H) preparasyonlarına yönelik protein konsantrasyonunun bir grafiğidir. Protein konsantrasyonu belirlemelerinin kısa bir tartışması Örnek 7'de sağlanır.
- 20 ŞEKİLLER 7B ve 7C, dört farklı hum13B8-b (Parçalar E, F, G ve H) preparasyonuna yönelik olarak, sırasıyla, hücre bazlı fonksiyonel analiz tarafından ölçüldüğü üzere ve ELISA tarafından ölçüldüğü üzere biyolojik potans grafikleridir. Hücre bazlı fonksiyonel analizleri ve ELISA'ların kısa tartışmaları sırasıyla Örnekler 8 ve 9'da sağlanır.
- 25 ŞEKİLLER 7D - 7F, HP-SEC tarafından belirlendiği üzere, sırasıyla HMW türleri, monomer ve LMW türlerinin yüzdesinin grafikleridir. HP-SEC'in kısa bir tartışması Örnek 3'te sağlanır.
- 30

ŞEKİLLER 7G - 7J, sırasıyla, ana pik, asidik varyantlar, bazik varyantlar ve ana pik sonrası türlerin yüzdelerinin ölçülmesiyle antikör stabilitesini izleyen HP-IEX deneylerinin sonuçlarının grafikleridir. HP-IEX'in kısa bir tartışması Örnek 5'te sağlanır.

- 5 ŞEKİLLER 7K ve 7L, sırasıyla, indirgeyici olmayan CE-SDS ile ana pikin yüzdesinin veya indirgeyici CE-SDS ile ağır ve hafif zincirlerin yüzdesinin ölçülmesiyle saflığı gösterir. CE-SDS'nin kısa bir tartışması Örnek 10'da sağlanır.

DETAYLI AÇIKLAMA

10

Ekli istemler dahil olmak üzere, burada kullanıldığı üzere, "bir", "bir" ve "bir" gibi tekil kelime formları, bağlam açıkça aksini belirtmediği sürece bunların karşılık gelen çoğul referanslarını içerir. Aşağıdaki Tablo 10, bu başvuruda kullanılan sekans tanımlayıcılarının bir listesini sağlar. Aksi belirtilmediği sürece, burada refere edilen proteinler ve denekler, başka türlerden ziyade insan proteinleri ve insan denekleridir. Burada kullanıldığı üzere, "ŞEKİL X", ayrı ayrı ŞEKİLLER XA – XZ'nin tümüne toplu olarak refere eder.

15

I. Tanımlar

20

"Proliferatif aktivite", kanser, tümörler, displazi, hücre transformasyonu, metastaz ve anjiyogenezin yanı sıra, *örneğin*, normal hücre bölünümünü teşvik eden, buna yönelik olarak gerekli olan veya bunlar ile spesifik olarak ilişkili olan bir aktiviteyi kapsar.

25

Burada kullanıldığı üzere, "çok değişken bölge" terimi, antijen bağlanmasıyla sorumlu olan bir antikörün amino asit kalıntılarına refere eder. Çok değişken bölge, hafif zincirli değişken alandaki bir "tamamlayıcılık belirleme bölgesinden" veya "CDR"den gelen amino asit kalıntılarını (*örneğin*, kalıntılar 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) ve 89-97 (CDRL3) ağır zincirli değişken alandaki 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) ve 95-102 (CDRH3) kalıntılarını (Kabat et al. (1991)

30

Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) ve/veya bir "çok değişken halkadan" gelen kalıntıları (*diğer bir ifadeyle*, hafif zincirli değişken alandaki 26-32 (L1), 50-52 (L2) ve 91-96 (L3) ve ağır zincirli değişken alandaki 26-32 (H1), 53-55 (H2) and 96-101 (H3) kalıntıları (Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917) içerir. Burada kullanıldığı üzere, "çerçeve" veya "FR" kalıntıları terimi, burada CDR kalıntıları olarak tanımlanan çok değişken bölge kalıntıları dışındaki değişken alan kalıntılarına refere eder. Yukarıdaki kalıntı numaralandırma, Kabat numaralandırma sistemi ile ilgilidir ve eşlik eden Sekans Listelemede sekans numaralandırmasına ayrıntılı olarak karşılık gelmesi zorunlu değildir.

"Bağışıklık koşulu" veya "bağışıklık rahatsızlığı", *örneğin*, patolojik inflamasyon, bir enflamatuar rahatsızlık ve bir otoimmün rahatsızlık veya hastalığı kapsar. "Bağışıklık koşulu" aynı zamanda, enfeksiyonlara, kalıcı enfeksiyonlara ve enfeksiyonlar, tümörler ve bağışıklık sistemi tarafından yok edilmeye direnç gösteren kanserler dahil olmak üzere kanser, tümörler ve anjiyogenez gibi proliferatif koşullara refere eder. "Kanseröz koşul" *örneğin*, kanser, kanser hücreleri, tümörler, anjiyogenez ve displazi gibi kanser öncesi koşulları içerir.

"Enflamatuar rahatsızlık", patolojinin, kısmen veya tamamen, *örneğin*, immün sistemin hücrelerinin sayısındaki bir değişiklik, göç hızındaki değişiklik veya aktivasyonundaki değişiklikten sonuçlandığı bir hastalık veya patolojik koşul anlamına gelir. Bağışıklık sisteminin hücreleri, *örneğin*, T hücreleri, B hücreleri, monositler veya makrofajlar, antijen sunan hücreler (APC'ler), dendritik hücreler, mikrogliya, NK hücreleri, NKT hücreleri, nötrofiller, eozinofiller, mast hücreleri veya spesifik olarak immünoloji ile ilişkili herhangi bir başka hücreyi, *örneğin*, sitokin üreten endotel veya epitel hücreleri, içerir.

Burada kullanıldığı üzere, konsantrasyonların, neredeyse farmasötik formülasyonların imalatında normal olarak bu tür konsantrasyonlar ile ilişkili aralıklar içerisinde olduğu şeklinde yorumlanmalıdır. Spesifik olarak,

konsantrasyonların kesin olması gerekmez, ancak GMP koşulları altında imal edilen ilaçlara yönelik olarak tipik olarak beklenen toleranslar içerisindeki belirtilen konsantrasyonlardan farklılık gösterebilir. Benzer bir şekilde, pH değerleri, neredeyse, GMP koşulları altında imal edilen ve tipik depolama koşulları altında depolanan ilaçlara yönelik olarak tipik olarak beklenen toleranslar içerisinde yer almaktadır. Örneğin, mevcut buluşun histidin formülasyonlarının 6.0'lık bir pH'a sahip olduğu şeklinde ifade edilir, ancak tipik tolerans pH 6.0'dır (± 0.3). Aksi belirtilmediği sürece, yüzde konsantrasyonları ağırlık/ağırlık konsantrasyonlarıdır.

10

II. Yüksek Konsantrasyonlu Solüsyon Antikor Formülasyonları

Tipik terapötik monoklonal antikorlar dört polipeptitten oluşur: iki hafif zincirli (*örneğin*, 214 amino asit uzunluğunda) ve iki ağır zincirli (*örneğin*, 446 amino asit uzunluğunda). Her bir zincir sırasıyla bir değişken alandan ve bir sabit alandan oluşur. Anti-IL-23p19 hum13B8-b'ye yönelik değişken alanlar, hafif ve ağır zincirlere yönelik olarak, sırasıyla, 108 ve 116 amino asittir ve sabit alanlar 106 ve 330 amino asittir. Bir antikorun hedefine yönelik spesifitesi büyük ölçüde, sözde "çok değişken" veya "tamamlayıcılık belirleyici" bölgeler (CDR'ler) içerisinde düşen diziler tarafından belirlenir, bunların üçü ağır ve hafif zincirlerin her birinin değişken alanlarında bulunur. CDR'ler uzunluk bakımından farklı antikorlar arasında değişiklik gösterebilir, ancak hum13B8-b'de CDR'ler ağır zincirler üzerinde 44 amino asit ve hafif zincir üzerinde 27 amino asit içerir. CDR kalıntıları farklı antikorlar arasında oldukça değişkendir ve insan germ hattı sekanslarından (tamamen insan antikorları durumunda) veya insan olmayan (*örneğin*, kemirgen) germ hattı sekanslarından kaynaklanabilir. Çerçeve bölgeleri aynı zamanda antikordan antikora da önemli ölçüde farklılık gösterebilir. Sabit bölgeler, seçilen antikorun bir lambda (λ) veya kappa (κ) hafif zincirine sahip olup olmamasına bağlı olarak ve antikorun (IgA, IgD, IgE, IgG veya IgM) sınıfına (veya izotipine) ve alt sınıfına (*örneğin*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) bağlı olarak değişiklik gösterecektir. Toplamların toplamı, sınıf, alt sınıf ve hafif zincirli sabit

30

alanlar bakımından değişkenlik gösteren sabit alanlar ile, "çok değişken" bölgelerdeki 71 amino asit dahil olmak üzere, 224'ü değişken alanlarda olmak üzere, yaklaşık olarak 650 amino asitten oluşan yaklaşık olarak 150,000 Da'lık bir antikor molekülüdür.

5

Mevcut buluşun antikoru (anti-IL-23p19 mAb hum13B8-b), aynı zamanda, tamamen insandan ziyade insanlaştırılmış olması bakımından, birçok yakın zamanda geliştirilen terapötik antikordan farklılık gösterir. Sonuç olarak, CDR sekansları, insan germ hattı sekanslarından ziyade, insan olmayan (bu durumda fare) germ hattı sekanslarından türetilir. Germ hattı sekansları, somatik hipermutasyondan türetilmiş değişikliklerden başka, bir antikoru CDR sekanslarının türetildeği sekans repertuarını içerir ve sonuç olarak, bir fare germ hattından başlayan elde edilen CDR'lerin, bir insan hattından başlayanlardan sistematik olarak farklılık göstermesi beklenecektir. Aslında, bu, farklı türlerin kullanımı, ortaya çıkan CDR sekanslarındaki potansiyel çeşitliliği arttırdığından, antikorları yükseltmek üzere farklı türlerdeki bağışıklık sistemlerinin kullanılmasına yönelik temeldir. İnsan germ hattı sekanslarının kullanımı, altta yatan CDR'lerin bunların köken türlerine bağlı olarak sistematik olarak farklılık göstereceği inancını yansıtan, insan germ hatlarından gelen CDR sekanslarının insanlarda diğer türlerden türetilenlere göre daha az immünojenik olması esasına bağlı olarak çoğu zaman haklı çıkarılır. CDR çeşitliliğindeki artışın yüksek afinite gibi istenen özelliklere sahip antikorları bulma olasılığını arttırmasına rağmen, ortaya çıkan antikoru bir sabit solüsyon formülasyonunun geliştirilmesindeki zorlukları daha da şiddetlendirir.

25

Aynı antijene bağlanan antikorlar bile sekans bakımından çarpıcı bir şekilde farklılık gösterebilir ve antijenleri tamamen ayırmak üzere sekans bakımından antikorlardan daha yakından ilgili olmak zorunda değildir. Örneğin, mevcut buluşun antikoru değişken alanları (hum13B8-b) sadece, başka anti-IL-23p19'e özgü antikor CNTO 1959 (U.S. Pat. No. 7,993,645'in SEQ ID NO'lar: 116 ve 106'sı) ile yaklaşık olarak %50 ila 60 sekans özdeşliğini paylaşır. CNTO

30

1959 bir tamamen insan antikorudur. Düşük sekans benzerliğine bağlı olarak, antikorların kimyasal özelliklerinin ve böylece bunların bozulmaya karşı duyarlılığının, bunların ortak hedeflerine rağmen benzer oldukları varsayılmaz.

- 5 Yukarıda gösterildiği üzere, antikorlar solüsyon içinde çeşitli bozulma ve stabilitesizlik formlarına maruz kalan büyük, oldukça karmaşık polipeptit kompleksleridir. Antikorların sekansının ve böylece yapısının, çeşitliliği çok çeşitli kimyasal özelliklere yol açar. Antijen bağlama spesifitesindeki belirgin sekansa özgü farklılıklarından başka, antikorlar, çeşitli bozucu yollara,
- 10 birikmeye ve çökmeye karşı değişiklik gösteren duyarlılık sergiler. Amino asit yan zincirleri, histidin, fenilalanin ve prolin kalıntıları üzerinde potansiyel olarak kimyasal olarak reaktif bölgelerin yanı sıra, karboksi- (D,E), amino- (K), amid- (N,Q), hidroksil- (S,T,Y), sülfhidril- (C), tiyoeter- (M) grupları gibi reaktif grupların varlığında veya yokluğunda farklılık gösterir. Doğrudan antijen bağlama
- 15 etkileşimlerinde yer alan amino asit yan zincirleri, yan zincir modifikasyonu ile etkisizleştirmeye yönelik açık adaylardır, ancak diğer pozisyonlardaki bozulma aynı zamanda, CDR'lerin sterik oryantasyonu (*örneğin*, çerçeve kalıntılarındaki değişiklikler), efektör fonksiyonu (*örneğin*, Fc bölgesinde - *bakınız, örneğin*, Liu et al. (2008) Biochemistry 47:5088) veya kendi kendine birleşme/toplanma gibi
- 20 faktörleri de etkileyebilir.

- Antikorlar, herhangi bir sayıda potansiyel bozulma yolağına maruz kalır. Metionyon kalıntılarının antikordlarda, özellikle CDR'lerde, oksidasyonu, antijen bağlanmasını bölmesi durumunda, bir problem olabilir. Presta (2005) J. Allergy
- 25 Clin. Immunol. 116: 731; Lam et al. (1997) J. Pharm. Sci. 86:1250. Diğer potansiyel bozulma yolları, asparagin deamidasyonunu (Harris et al. (2001) Chromatogr., B 752:233; Vlasak et al. (2009) Anal. Biochem. 392:145) triptofan oksidasyonunu (Wei et al. (2007) Anal. Chem. 79:2797), sisteinilasyonu (Banks et al. (2008) J. Pharm. Sci. 97:775), glikasyonu (Brady et al. (2007) Anal. Chem.
- 30 79:9403), pirolütamat oluşumunu (Yu et al. (2006) J. Pharm. Biomed. Anal. 42:455), disülfid karıştırılmasını (Liu et al. (2008) J. Biol. Chem. 283:29266) ve

- hidrolizi (Davagnino et al. (1995) J. Immunol. Methods 185:177) içerir. Ionescu & Vlasak (2010) Anal. Chem. 82:3198’de tartışılmıştır. *Bakınız aynı zamanda* Liu et al. (2008) J. Pharm. Sci. 97:2426. Bazı potansiyel bozulma yolları, sadece bir spesifik amino asit kalıntısının varlığına değil, aynı zamanda çevreleyen sekansa da bağlıdır. Deamidasyon ve izoaspartat oluşumu, N-G ve D-G sekanslarının özellikle duyarlı olmasıyla, (C-terminalinden) N veya D kalıntılarını takip eden peptit bağının bir kendiliğinden intramoleküler yeniden düzenlenmesinden ortaya çıkabilir. Reissner & Aswad (2003) CMLS Cell. Mol. Life Sci. 60:1281.
- 10 Antikorlar aynı zamanda, depolama sırasında sekansa özgü enzimatik olmayan fragmentasyona da maruz kalır. Vlasak & Ionescu (2011) mAbs 3:253. D, G.S.T, C veya N gibi reaktif yan zincirlerin varlığı, polipeptit omurgasını ayıran intramoleküler bölünme reaksiyonları ile sonuçlanabilir. Bu tür sekansa özgü hidroliz reaksiyonları tipik olarak kritik derecede pH. *Id.*’ye bağlıdır. Antikorlar aynı zamanda, örneğin CDR’ler yüksek sayıda hidrofobik kalıntıları içerdiğinde, sekansa bağlı toplanmaya uğrayabilir. Perchiacca et al. (2012) Prot. Eng. Des. Selection 25:591. Toplanma, deri altından uygulamaya yönelik olarak yüksek konsantrasyonlarda formüle edilmesi gereken antikorlara yönelik olarak özellikle problemlidir ve çözünürlük *Id.*’yi arttırmak üzere yüklü kalıntıların ilave edilmesiyle antikor sekansını modifiye etmeye bile yol açmıştır.
- 25 Potansiyel sekansa özgü stabilite sorunlarının antikorlar ile çeşitliliği yansıtıldığında, potansiyel antikor formülasyonları da çeşitlidir. Her bir yeni antikora yönelik olarak bir takım farklı değişken sipariş üzerine optimize edilmelidir. Formülasyonlar örneğin antikor konsantrasyonu, tampon, pH, yüzey aktif maddenin varlığı veya yokluğu, tonikleştirici ajanların varlığı veya yokluğu (iyonik veya noniyonik), moleküler kalabalıklaştırıcı ajanın varlığı veya yokluğu bakımından farklılık gösterebilir. Ticari olarak ulaşılabilir terapötik antikorlar, geniş bir solüsyon formülasyonları aralığında, fosfat tamponu (*örneğin*, adalimumab), fosfat/glisin tamponu (*örneğin*, baziloksumab), Tris tamponu (*örneğin*, ipilimumab), histidin (*örneğin*, ustekinumab), sodyum sitrat (*örneğin*,

rituksimab) içinde; ve pH 4.7 (*örneğin*, sertolizumab) ve pH 5.2'den (*örneğin*, adalimumab) pH 7.0-7.4'e (*örneğin*, setuksimab) kadar pazarlanır. Bunlar aynı zamanda isteğe bağlı olarak, tümü, %0.001 (*örneğin*, abciksmab) ile %0.1 (*örneğin*, adalimumab) aralığında değişen polisorbit-80 ile ve bu olmadan, 5 disodyum edetat (*örneğin*, alemtuzumab), mannitol (*örneğin*, ipilimumab), sorbitol (*örneğin*, golimumab), sükröz (*örneğin*, ustekinumab), sodyum klorür (*örneğin*, rituksimab), potasyum klorür (*örneğin*, alemtuzumab) ve trehaloz (*örneğin*, ranibizumab) içeren formülasyonlar halinde de ulaşılabilir.

10 Örnekleyici antikor formülasyonları U.S. Pat. NO'ları. 7,691,379 (anti-IL-9 mAb MEDI-528); 7,592,004 (anti-IL-2 reseptörü, daclizumab); 7,705,132 (anti-EGFR, panitumumab); ve 7,635,473'te (anti-A β ; bapineuzumab) bulunur. İlave örnekleyici antikor formülasyonları U.S. Patent Başvurusu Yayın No'ları 2010/00021461 (anti- α 4-integrin, natalizumab); 2009/0181027 (anti-IL-12/IL-23, 15 ustekinumab); 2009/0162352 (anti-CD20, ritumiksmab); 2009/0060906 (anti-IL-13); 2008/0286270 (anti-RSV, palivizumab); ve 2006/0088523'te (anti-Her2, pertuzumab) bulunur. Yine ilave formülasyonlar Daugherty & Mrsyn (2006) Adv. Drug Deliv. Rev. 58:686; Wang et al. (2007) J. Pharm. Sci. 96:1; ve Lam et al. (1997) J. Pharm. Sci. 86:1250'de açıklanır.

20

Antikor spesifisitesine yönelik temel olan sekans değişkenliği, immün yanıtının kalbindedir. Bu değişkenlik, çok çeşitli potansiyel bozulma yolları ile sonuçlanan ortaya çıkan antikorların kimyasal heterojenliğine yol açar. Şimdiye kadar geliştirilen geniş antikor formülasyonları dizisi, formülasyonların optimal 25 stabiliteyi garanti altına almak üzere her bir spesifik antikoruna yönelik olarak ayrı ayrı optimize edilmesi gerektiği gerçeğini tasdikler. Aslında, şimdiye kadar insanlarda kullanıma yönelik olarak onaylanmış her bir ve her ticari terapötik antikor bir benzersiz, farklı formülasyona sahip olmuştur.

III. Hümanize Edilmiş Anti-IL-23'ün Biyolojik Aktivitesi

Mevcut buluşun anti-IL-23p19 mAb hum13B8-b'sinin solüsyon formülasyonları, IL-23 sinyalleşmesinin seçici antagonizminin faydalı olması beklenen rahatsızlıkların tedavisinde kullanım bulacaktır. Benzer bağışıklık yanıtlarını, böylece IL-23 blokajını ortaya çıkaran proliferatif rahatsızlıkların yanı sıra cildin, eklemlerin, CNS'nin enflamatuar hastalıkları sistemik enfeksiyonlarla savaşmak üzere konak yeteneğini içermeyen, bu bağışıklık aracılı enflamatuar rahatsızlıkların inhibisyonunu sağlamalıdır. Antagonize edici IL-23, enflamatuar bağırsak hastalığı, Crohn hastalığı, ülseratif kolit, romatoid artrit, psoriatik artrit, sedef hastalığı, ankilozan spondilit, graft-versus-host hastalığı, atopik dermatit ve çeşitli diğer otoimmün ve enflamatuar rahatsızlıkları ile ilişkili iltihabı hafifletmelidir. IL-23 inhibitörlerinin kullanımı aynı zamanda, proliferatif rahatsızlıkların, *örneğin*, kanser ve otoimmün rahatsızlıkların, *örneğin*, multipl skleroz, tip I diyabet ve SLE inhibisyonunu da sağlayacaktır. Bu çeşitli rahatsızlıklarda IL-23'ün açıklamaları, aşağıdaki yayınlanmış PCT başvurularında bulunabilir: WO 04/081190; WO 04/071517; WO 00/53631; ve WO 01/18051. IL-23 inhibitörleri aynı zamanda bakteriyel, mikobakteriyel, viral ve mantar enfeksiyonları gibi kronik enfeksiyonlar dahil olmak üzere enfeksiyonların tedavisinde de kullanım bulabilir. *Bakınız* U.S. Patent No. 8,263,080 ve Int'l Başvuru Yayın WO 2008/153610.

Mevcut buluşun yüksek konsantrasyonlu solüsyon formülasyonları, uzatılmış süreler boyunca depolandığında biyolojik olarak aktiviteyi koruyan antikörleri içerir. Burada kullanıldığı üzere, "biyolojik olarak aktif" terimi, istenen antijenik epitopunu bağlayabilen ve bir biyolojik etkiyi doğrudan veya dolaylı olarak sergileyebilen bir antikör veya antikör fragmanına refere eder. Tipik olarak, bu etkiler IL-23'ün kendi reseptörünü bağlamadaki başarısızlığından kaynaklanır. Burada kullanıldığı üzere, "spesifik" terimi, antikörün hedef antijen epitopuna seçici bağlanmasına refere eder. Antikörler, bir verilen koşullar seti altında, antikörün IL-23'e bağlanmasının alakasız antijene veya antijen karışımına

bağlanmayla karşılaştırılmasıyla bağlanma spesifisitesine yönelik olarak test edilebilir. Antikorum IL-23'e ilgisiz antijen veya antijen karışımından en az 10 ve tercih edildiği üzere 50 kat daha fazla bağlanması halinde, bunun spesifik olduğu kabul edilir. IL-12'ye bağlanan bir antikor, bir IL-23'e özgü antikor değildir. IL-23p19'a "spesifik olarak bağlanan" bir antikor, IL-23p19'den türetilmiş sekansları içermeyen proteinlere bağlanmaz, *diğer bir ifadeyle*, burada kullanıldığı üzere "spesifisite", mevzu bahis proteinde mevcut olabilen herhangi bir diğer sekans değil, IL-23p19 spesifisitesi ile ilgilidir. Örneğin, burada kullanıldığı üzere, IL-23p19'a "spesifik olarak bağlanan" bir antikor tipik olarak IL-23p19 ve bir FLAG® peptid etiketini içeren bir füzyon proteini olan FLAG®-hIL-23p19'a bağlanacaktır, ancak tek başına veya IL-23p19 dışındaki bir proteine birleştirildiğinde FLAG® peptid etiketine bağlanmaz.

Mevcut buluşun IL-23'e özgü bağlayıcı bileşikleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere peritoneal makrofajlar tarafından IL-1 β ve TNF ve T_H17 T hücreleri tarafından IL-17 üretimi dahil olmak üzere bunun biyolojik aktivitelerinin herhangi birini inhibe edebilir. *Bakınız* Langrish et al. (2004) Immunol. Rev. 202:96-105. Anti-IL-23p19 antikorları aynı zamanda IL-17A, IL-17F, CCL7, CCL17, CCL20, CCL22, CCR1 ve GM-CSF'nin gen ekspresyonunu da inhibe edebilecektir. *Bakınız* Langrish et al. (2005) J. Exp. Med. 201:233-240. Mevcut buluşun IL-23'e özgü bağlayıcı bileşikleri, aynı zamanda, IL-23'ün T_H17 hücrelerinin çoğalmasını veya hayatta kalmasını artırma kabiliyetini de bloke edecektir. Cua and Kastelein (2006) Nat. Immunol. 7:557-559. İşlenmiş anti-IL-23p19 antikorlarının inhibe edici aktivitesi, enflamatuvar, otoimmün ve proliferatif hastalıkların tedavisinde faydalı olacaktır. Bu tür rahatsızlıkların örnekleri, PCT patent başvurusu yayınları WO 04/081190; WO 04/071517; WO 00/53631; ve WO 01/18051'de açıklanır.

Mevcut buluşun yüksek konsantrasyonlu solüsyon formülasyonları, örneğin, Th17 aracılı hastalıklar, otoimmün veya kronik enflamatuvar bozukluklar veya kanserler gibi, IL-23 veya IL-23p19'un yükseltilmiş aktivitesi ile ilişkili bir rahatsızlığın tedavisinde veya önlenmesinde kullanıma yönelik olarak anti-IL-23p19 antikor hum13B8-b'nin depolanmasına ve verilmesine yönelik olarak kullanışlıdır.

IV. Hümanize Edilmiş Anti-IL-23p19 Antikoru 13B8-b'nin Solüsyon Formülasyonları

- Mevcut buluş, SEQ ID NO: 2 sekansına sahip iki aynı hafif zincir ve SEQ ID NO: 1 sekansına sahip iki aynı ağır zincir içeren ve eş askıda olan, yaygın olarak atanmış U.S. Pat. No 8,293,883'te açıklanan anti-IL-23p19 antikoru hum13B8-b'nin yüksek konsantrasyonlu solüsyon formülasyonlarını sağlar. Hümanize edilmiş hafif zincir 13B8 sekansı (kappa sabit bölgesine sahip) SEQ ID NO: 2'de sağlanır ve hafif zincir değişken alanı bu sekansın 1-108 kalıntılarını içerir.
- 10 Hümanize edilmiş ağır zincir 13B8 sekansı (γ 1 sabit bölgesine sahip) SEQ ID NO: 1'de sağlanır ve ağır zincir değişken alanı bu sekansın 1-116 kalıntılarını içerir.

- Ağır ve hafif zincir sekansları (SEQ ID NO'lar: 1 ve 2) sinyal sekansları olmadan sağlanır. Örnekleyici ağır ve hafif zincir sinyal sekansları, sırasıyla SEQ ID NO'lar: 12 ve 13'te sağlanır. Sinyal dizileri veya sinyal sekanslarını kodlayan nükleik asit sekansları, bir konakçı hücreden salgılanmaya yönelik olarak bir öncül protein oluşturmak üzere ilgili antikor zincirlerinin N-ucuna eklenebilir. Aynı zamanda alternatif sinyal sekansları da kullanılabilir ve birçoğu "SPdb: a
- 20 Signal Peptide Database." Choo et al. (2005) BMC Bioinformatics 6:249'da bulunabilir.

- Ebeveyn antikoru 13B8 eksprese eden bir hibridoma, Erişim Numarası PTA-7803 altında, 17 Ağustos 2006'da Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC -
- 25 Manassas, Virginia, USA) ile Budapeşte Antlaşması uyarınca tevdi edilmiştir. Ebeveyn antikoru 13B8 ve hum13B8-b arasındaki ilişki, yaygın olarak atanmış U.S. Pat. No. 8,293,883'de detaylandırılır.

- Mevcut buluşun solüsyon formülasyonları, 500 - 2000 L ölçeğinde kültürdeki Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücrelerinden hazırlanan en az sekiz farklı antikor
- 30 13B8-b parçası kullanılarak geliştirilmiştir.

Mevcut buluşun solüsyon formülasyonuna yönelik olarak bir başlangıç solüsyonu koşulları aralığı kabul edilmiştir. Deneyler, asetat, sitrat, histidin, TRIS ve fosfat gibi çeşitli tamponlar ile 4.0 ila 8.8 aralığında değişen pH'larda yapılmıştır. Sükroz, trehaloz ve mannitol gibi ekspiyanlar, NaCl'nin çeşitli konsantrasyonları (ve böylece iyonik kuvvetler) ve yüzey aktif madde polisorbitat 80'in dahil edilmesi gibi test edilmiştir. Formülasyonlar, 350nm'de O.D.'nin belirlenmesiyle renk oynasımına bağlı olarak taranmıştır. Agregasyon, yüksek performanslı boyut dışlama kromatografisi (HP-SEC), dinamik ışık saçılımı (DLS) ve analitik ultrasantrifüjleme (AUC) tarafından ölçülmüştür. Biyokimyasal stabilite, yüksek performanslı iyon değişim kromatografisi (HP-IEX) tarafından ölçülmüştür ve termal stabilite diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) tarafından ölçülmüştür.

1 mg/mL hum13B8-b'deki başlangıç ön-formülasyon deneyleri, ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) tarafından ölçüldüğü üzere, saflık yüzdesinin yaklaşık pH 6.0'a kadar yükseldiğini ve daha sonra pH 8.8'e kadar sabit kaldığını ortaya koymuştur. *Bakınız ŞEKİL 1A*. Bununla birlikte, antikorun yayılma sıcaklığı yaklaşık pH 5'ta pik yapmıştır. *Bakınız ŞEKİL 1A*. Asetat, sitrat, fosfat ve TRIS arasındaki tampon türlerinin karşılaştırılması, pH 5.5'teki sitrat tamponunun en yüksek monomer yüzdesini ve en düşük geç ayrışan piklerin yüzdesini verdiğini göstermiştir. *Bakınız ŞEKİL 1B*. optimal biyokimyasal ve biyofiziksel stabilitenin pH 5.5'te sitrat tamponunda gözlemlenmiş olmasına rağmen, sitrat tamponu içindeki antikorun >65 mg/mL antikora konsantrasyonu, büyük ölçüde ışık oynasımına yol açmıştır (veriler gösterilmemiştir). Kendi kendine uygulamaya yönelik olarak formüle edilebilecek bir ilaca yönelik bir özel endişe olan azaltılmış hasta kabulüne yönelik potansiyel nedeniyle ışık oynasımı istenmez.

Bu ışık oynasımının seyreltme ve pH'ın sitrat tamponunda 4.8'e düşürülmesi üzerine geri dönüşlü olmasına (ŞEKİL 1C) ve aynı zamanda pH'ın düşürülmesinin hidrodinamik çapı da düşürmüş olmasına rağmen (ŞEKİL 1D), pH'ın düşürülmesi aynı zamanda, düşük erime formundaki bir arttırılmış oran ile yansıtıldığı üzere,

solüsyonun termal ve biyokimyasal stabilitesini de düşürmüştür (ŞEKİL IE), HP-SEC ile ölçüldüğü üzere, zaman içindeki geç ayrışan piklerin birikimini arttırmıştır (ŞEKİL IF) ve HP-IEX ile ölçüldüğü üzere, zaman içindeki ana piki azaltmıştır (Şekil IG).

5

Histidin daha sonra, termal ve biyokimyasal stabiliteyi azaltmadan ışık oynaşımını ve kendi kendine birleşmeyi azaltma girişiminde alternatif bir tampon sistemi olarak kabul edilmiştir. Numuneler, 10 mM asetat (pH 4.8 ve 5.6), 10 mM sitrat (pH 4.8, 5.5 ve 6.0) ve 10 mM histidin (pH 5.5 ve 6.0) içinde hazırlanmıştır. Işık oynaşımı ve hidrodinamik çap sırasıyla OD₃₅₀ ve DLS tarafından belirlenmiştir. *Bakınız ŞEKİLLER 1H ve 1I.* Sitratın asetat veya histidin ile yer değiştirilmesi, biyokimyasal stabiliteden ödün vermeden ışık oynaşımını en aza indirmiştir ve kendi kendine birleşmeyi azaltmıştır. Daha yüksek antikor konsantrasyonlarında (50 ila 100 mg/mL), asetat (pH 5.5) ve histidin (pH 6.0) formülasyonları açık olmuştur ve sitrat (pH 5.5) ile gözlemlenmiş olan arttırılmış hidrodinamik boyuta sahip olmamıştır. *Bakınız ŞEKİL 1J.* Düşük pH (4.8) sitrat ve asetat formülasyonları aynı zamanda, boyut dışlama kromatografisi (SEC) tarafından ölçüldüğü üzere, RH4 koşulları altında (40 °C, %75 bağıl nem) depolama sırasında geç ayrışan piklerin arttırılmış birikmesine yol açmıştır. *Bakınız ŞEKİL 1K.*

20

Çeşitli ekspiyanlar (100 mM NaCl,% 7 sükroz,% 7 trehaloz ve% 6 mannitol) de yayılma sıcaklığı (ŞEKİL 2A) ve ışık oynaşımı (ŞEKİL 2B) üzerindeki etkilerine yönelik olarak test edilmiştir. Formülasyonları izotonik hale getirmek üzere, ışık oynaşımını azaltmak üzere ve termal stabiliteyi arttırmak (T_m'i arttırmak) üzere yüzde yedi sükroz ilave edilmiştir. Yüzey aktif madde polisorb-20 (PS20), polisorb-80 (PS80) ve PLURONIC® F-68 de yayılma (ŞEKİL 3A ve 3B) ve ışık oynaşımı (ŞEKİL 3C) üzerindeki etkilerine yönelik olarak test edilmiştir. Agitasyon indüklü stres nedeniyle toplanmayı en aza indirmek üzere polisorb-80 ilave edilmiştir.

30

Bu sonuçlar, tercih edilen tampon sisteminde bir değişikliğe yol açmıştır. Anti IL-23, sitrat pH 5.5 ve pH 6.0'da yüksek konsantrasyonlarda kendi kendine birleşme ve ışık oynaşımı sergilemiştir. Sitratin asetat (pH 5.5) veya histidin (pH 6.0) ile yer değiştirilmesi, termal ve biyokimyasal stabiliteden ödün vermeden ışık oynaşımını en aza indirmiştir. Formülasyonları izotonik hale getirmek üzere süktroz (%7) ilave edilmiştir. Süktroz (%7) aynı zamanda ışık oynaşımını azaltmıştır ve termal stabiliteyi (arttırılmış Tm) arttırmıştır ve stabilite çalışmaları sırasında monomerdeki yüzde kaybını azaltmıştır (veriler gösterilmemiştir). Çalkalama stresi nedeniyle toplanmayı en aza indirmek üzere polisorbata 80 (%0.05) ilave edilmiştir.

10 mM histidin (pH 6.0), %7 süktroz ve %0.05 PS-80 içeren bir histidin bazlı formülasyon, hum13B8-b'nin tercih edilen yüksek konsantrasyonlu formülasyonu olarak seçilmiştir. 10 mM histidin (pH 6.0) formülasyonuna yönelik viskozite, yoğunluk, ozmolarite dahil olmak üzere çeşitli solüsyon özellikleri ve partikülatlar belirlenmiştir. *Bakınız* Tablo 1. Gözlemlenen oda sıcaklığı viskozitesi (5.65 cP), önceden doldurulmuş şırıngalarda ve otoenjektörlerde kullanıma yönelik olarak kabul edilebilirdir.

20

Tablo 1

Histidin Formülasyonun Solüsyon Özellikleri

Solüsyon Özelliği	Histidin (pH 6.0)
Viskozite (cP)	5.65 (25°C)
	14.46 (5°C)
Yoğunluk (g/cm ³)	1.06
Ozmolarite	266
Alt görünebilir partikülatlar	25 (>10 µm)
	2 (>25 µm)

V. Hümanize Edilmiş Anti-IL-23p19 Antikoru 13B8-b'nin Yüksek Konsantrasyon Solüsyon Formülasyonlarının Stabilitesi

Mevcut buluşun seçilen formülasyonların uzun dönemli stabilitesi, çeşitli depolama koşulları altında 3-24 aylık depolamadan sonra çalışılmıştır. Numuneler, çeşitli sıcaklık ve nemlilik seviyelerinde 2 ml'lik cam şişelerde (ŞEKİL 4), 30 ml'lik torbalarda (yığın depolama) (ŞEKİLLER 5 ve 6) veya önceden doldurulmuş şırıngalarda (tek dozlu ticari paketlenme) (ŞEKİL 7) inkübe edilmiştir. Numuneler, yüksek performanslı boyut dışlama kromatografisi (HP-SEC), iyon değişim kromatografisi (HP-IEX), SDS kılcal elektroforezi (CE-SDS, indirgeyici ve indirgeyici olmayan) ve peptit haritalaması gibi yöntemlerle bozulma ve toplanma ürünlerinin varlığına yönelik olarak analiz edilmiştir. Antikor stabilitesi, diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) ile ölçülmüştür. Biyolojik aktivite, IL-23 bağlayıcı ELISA ve bir hücre bazlı fonksiyonel analiz ile değerlendirilmiştir. Antikor konsantrasyonu 280 nm'de UV emilimi ile belirlenmiştir. Renk oynaşımı, 350 nm'de (OD₃₅₀) optik yoğunluğun ölçülmesiyle belirlenmiştir. Sonuçlar ŞEKİLLER 4-7'de sağlanır.

Bir birinci deney setinde, 1.5 ml numuneler 2.0 ml cam şişeler içine yerleştirilmiştir ve çeşitli koşullar altında saklandıktan sonra analiz edilmiştir. Sonuçlar ŞEKİL 4'te sunulur. Tipik soğutma koşullarına karşılık gelen 5 °C'de ve ortam nemliliğinde depolanan numunelerde çok az bozulma veya toplanma gözlemlenmiştir. ŞEKİLLER 4A - 4F. Numune bozulmasına yönelik olarak pozitif bir kontrol olarak dahil edilen RH4 (40 °C, %75 bağıl nemlilik) gibi hızlandırılmış bozulma koşulları, beklenen monomer kaybını ve hemen birinci zaman noktasında (bir ay) başlayan bozulma ve toplanma ürünlerinin yükselişini göstermiştir. ŞEKİLLER 4A - 4F. Renk oynaşımı 5 °C'de (ŞEKİL 4G) stabil olmuştur, ancak 25 °C ve 40 °C'de artmıştır (ŞEKİLLER 4H ve 4I). Oksidasyon benzer şekilde 5 °C'de minimum olmuştur, ancak RH4 koşulları altında veya 40 °C'de önemli olmuştur. ŞEKİLLER 4J ve 4K. Bu sonuçlar, deneylerin, *örneğin* RH4 sonuçları tarafından gösterildiği üzere, bir takım analizler tarafından

bozulmayı tespit edebilmesine rağmen, tipik soğutma koşulları altında depolamanın, en az dokuz aylık depolama boyunca ürün kalitesinde az kayba yol açtığını veya hiç kayba yol açmadığını belirtir.

- 5 Bir ikinci deney setinde, numuneler 30 ml etilen-vinil-asetat (EVA) sıvı temas katmanı CELSIUS®-Pak torbalarına (Sartorius, Goettingen, Almanya) yerleştirilmiştir ve çeşitli koşullar altında saklandıktan sonra analiz edilmiştir. Sonuçlar ŞEKİLLER 5 ve 6'da sunulur. Bu deneyler, esas olarak, tipik olarak yığın depolama koşulları altında ilaç maddesinin stabilitesini değerlendirmek üzere dizayn edilmiştir.

Yığın depolama numuneleri, üç donmuş koşul (-80°, -45 °C ve -20 °C) altında saklanmıştır ve soğutulmuştur (2° - 8 °C). Temsili veriler, 18 aya kadar 5°C (± 3°C) ve -45°C'de saklanan numunelere yönelik olarak ŞEKİL 5'te sağlanır.

- 15 Muhtemelen 5 °C numunelerindeki saklama torbalarındaki buharlaşma nedeniyle 12 aylık depolama (ŞEKİL 5A) boyunca konsantrasyonda hafif artışlar gözlemlenmiştir. Biyolojik aktivite (ŞEKİLLER 5B ve 5C) bağlamında hiçbir önemli eğilim mevcut olmamıştır ve protein ile ilgili safsızlıklar, bozulma ürünleri ve agregatları, özellikle -45 °C'de dondurulmuş saklanmış numunelere yönelik olarak genel olarak 18 aya kadar spesifikasyonlar içerisinde olmuştur (ŞEKİLLER 5D - 5L).

- Yüksek sıcaklıklarda yığın depolamadaki stabilite de değerlendirilmiştir. Temsili veriler, 12 aya kadar 5°C (± 3°C), 25°C, 25H, 40°C ve RH4'te saklanan numunelere yönelik olarak ŞEKİL 6'da sağlanır. Oda sıcaklığında (25°) saklanan numuneler fiili olarak buharlaşma nedeniyle muhtemelen net konsantrasyon nedeniyle bir etki olan, biyolojik poteste belirgin artışlar göstermişken, soğutulmuş numuneler 12 ay boyunca stabil biyolojik aktivite göstermiştir. ŞEKİLLER 6A ve 6B. Numuneler 5 °C'de saklandığında 12 ay boyunca stabil olmuştur, ancak protein ile ilgili safsızlıklar, (bozulma ürünleri ve agregatlar) 25 °C ve 25H'de depolanan numunelere yönelik olarak zamanla artmıştır ve 40 °C ve

RH4'te depolanan numunelere yönelik olarak çarpıcı şekilde artmıştır (hızlandırılmış bozulma koşulları). ŞEKİLLER 6C - 6K.

5 Bir üçüncü deney setinde, 1 ml 100 mg/ml antikor formülasyonu numuneleri şırıngalara (BD Hypak Physioliş Önceden Doldurulan Şırıngalar) yerleştirilmiştir ve çeşitli koşullar altında saklandıktan sonra analiz edilmiştir. Sonuçlar, 24 aya kadar 5°C'de (± 3 °C) saklanan numunelere yönelik olarak ŞEKİL 7'de sunulur. Antikor konsantrasyonları, biyolojik aktivitenin (ŞEKİLLER 7B ve 7C) yaptığı gibi, esasen değişmeden kalmıştır (ŞEKİL 7A). Yüksek moleküler ağırlıklı 10 türlerin, monomer yüzdesinin, düşük moleküler ağırlıklı türlerin, ana antikor pik yüzdesinin, asidik varyantların, bazik varyantların, ana pik sonrası türlerin, ana IgG'nin ve ağır ve hafif zincirlerin seviyelerinin tümü (sırasıyla ŞEKİLLER 7D - 7L) en az 12 - 24 ay boyunca esasen stabil kalmıştır.

15 ŞEKİLLER 4-7'de sunulan uzun dönemli stabilite deneyleri, ister yığın solüsyon içinde dondurulmuş ister, önceden doldurulmuş bir şırınga içinde olduğu gibi soğutulmuş olsun, tipik saklama koşulları altında yüksek antikor konsantrasyonlarında, hem biyolojik aktivite hem de fiziksel bütünlüğe göre, mevcut buluşun hum13B8-b'sinin histidin formülasyonunun stabil olduğunu 20 ortaya koyar.

RH4 ve 25H gibi hızlandırılmış bozulma koşulları ve diğer yüksek sıcaklık koşulları altında elde edilen sonuçların sadece antikor hum13B8-b'ye yönelik olarak olası çöküntü ürünlerini ve yolaklarını göstermesi tasarlanır ve terapötik 25 kullanıma yönelik olarak tasarlanan antikora yönelik bozulma oranlarını yansıtmaz. Hızlandırılmış bozulma koşulları sırasında bulunan hum13B8-b'ye yönelik ana bozulma yolları, CE-SDS tarafından gözlemlenen saflık kaybını, HMW ve LMW türlerindeki artışları ve HP-SEC tarafından gözlemlenen monomer yüzdesindeki azalmayı içerir. Ek olarak, HP-IEX, bazik varyantlar ve 30 ana pikteki azalmalar ile, asidik varyantlarda ve pik sonrası türlerdeki artışları ortaya çıkarmıştır. Yükseltilmiş sıcaklıkta hum13B8-b gibi antikor ilaçların

solüsyon formülasyonlarının genişletilmiş depolanması çok uzak ihtimaldir. Örneğin hum13B8-b'nin uzun süreli depolanmasının, -45 °C'de dondurulmuş CELSIUS®-Pak torbalarında saklanması muhtemeldir, bu şartlar altında kalite özelliklerinin en az 18 ay boyunca stabil kalması beklenir. Bireysel hum13B8-b 5 dozları içeren önceden doldurulmuş şırıngaların veya otoenjektörlerin yaklaşık 5 ° C'de (± 3 °C) saklanması muhtemeldir ve aynı zamanda en az 18 ay boyunca stabil kalması da beklenir.

VI. Dozlama ve Uygulama

10

Mevcut buluşun yüksek konsantrasyonlu solüsyon formülasyonlarının, yüksek dozda deri altından uygulamaya yönelik olarak özellikle uygun olmasına rağmen, bu tür formülasyonlar başka şekillerde de uygulanabilir. Uygun uygulama yolları, örneğin, intratekal, doğrudan intraventriküler, intravenöz, intraperitoneal, 15 intranazal veya intraoküler enjeksiyonların yanı sıra oral, rektal, transmukozal veya bağırsak uygulaması; intramüsküler, intradermal, intramedüller enjeksiyonlar dahil olmak üzere parenteral doğumu içerebilir.

20

Alternatif olarak, biri, antikoru, sistemikten ziyade bir lokal yoldan, örneğin antikorun direkt olarak çoğu kez bir depoda veya sürekli salım formülasyonunda immünopatoloji tarafından karakterize edilen bir artritik eklem veya patojen indüklü lezyona enjeksiyonu vasıtasıyla uygulayabilir. Bundan başka, biri, antikoru, bir hedeflenmiş ilaç verim sisteminde, örneğin, örneğin immünopatoloji tarafından karakterize edilen artritik eklem veya patojen indüklü lezyonu 25 hedefleyen bir dokuya özgü antikor ile kaplı bir lipozomda, uygulayabilir. Lipozomlar, tutulan doku tarafından seçici olarak hedeflenecek ve alınacaktır.

30

Deri altından uygulama, bir şırınga, bir otoenjektör, bir enjektör kalemi veya bir iğnesiz enjeksiyon cihazı kullanılarak enjeksiyonla gerçekleştirilebilir.

Mevcut buluşun yüksek konsantrasyonlu solüsyon formülasyonlarının, bir yüksek konsantrasyonlu antikoru gerektiren kullanımlara yönelik olarak özellikle avantajlı olmasına rağmen, yüksek konsantrasyonların gerekli olmadığı veya istenmediği durumlardaki düşük konsantrasyonlarda formülasyonların kullanılamamasının bir nedeni yoktur. Düşük antikor konsantrasyonları, düşük dozda deri altından uygulamaya yönelik olarak veya verilebilecek hacmin büyük ölçüde 1 ml'den daha fazla olduğu diğer uygulama modlarında (intravenöz uygulama gibi) faydalı olabilir. Bu tür düşük konsantrasyonlar, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1 mg/ml veya daha azını içerebilir.

10

Bir terapötiğe yönelik olarak bir uygulama rejiminin seçilmesi, varlığın serum veya doku devir hızı, semptomların seviyesi, varlığın immünojenikliği ve biyolojik matriksteki hedef hücrelerin erişilebilirliği dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlıdır. Tercih edildiği üzere, bir uygulama rejimi, bir kabul edilebilir yan etki seviyesi ile tutarlı hastaya verilen terapötüğün miktarı maksimize eder. Buna göre verilen biyolojik miktarı kısmen özel varlığa ve tedavi edilen durumun şiddetine bağlıdır. Uygun dozlarda antikor, sitokin ve küçük moleküllerin seçilmesinde kılavuz ulaşılabilir. *Bakınız örneğin, Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, NY; Baert et al. (2003) New Engl. J. Med. 348:601-608; Milgrom et al. (1999) New Engl. J. Med. 341:1966-1973; Slamon et al. (2001) New Engl. J. Med. 344:783-792; Beniaminovitz et al. (2000) New Engl. J. Med. 342:613-619; Ghosh et al. (2003) New Engl. J. Med. 348:24-32; Lipsky et al. (2000) New Engl. J. Med. 343:1594-1602; Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57th Ed); Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002).*

30 Uygun dozun belirlenmesi, klinisyen tarafından, *örneğin*, teknikte tedaviyi etkilediği bilinen veya tedaviyi etkilediğinden şüphelenilen veya tedaviyi

etkilediği öngörülen parametreler veya faktörler kullanılarak yapılır. Proteinin uygun dozajı ("terapötik olarak etkili miktar"), örneğin, tedavi edilecek koşula, koşulun şiddetine ve seyrine, proteinin önleyici veya terapötik amaçlara yönelik olarak uygulanıp uygulanmadığına, önceki terapiye, hastanın klinik öyküsüne ve proteine yanıtına, kullanılan protein tipine ve uzman doktorun takdirine bağlı olacaktır. Bazı durumlarda, bir düşük başlangıç dozu seçilir ve dozaj, herhangi bir olumsuz yan etkiye göre istenen veya optimum terapötik fayda elde edilinceye kadar bundan sonra küçük artışlarla arttırılır. Önemli tanısal ölçümler, *örneğin*, üretilen enflamatuvar sitokinlerin enflamasyon veya seviyesinin semptomlarınıninkileri içerir. Protein hastaya uygun bir şekilde bir kerede veya tekrar tekrar uygulanır. Protein tek başına veya başka ilaçlar veya terapiler ile bağlantılı olarak uygulanabilir.

Antikorlar sürekli infüzyon tarafından veya *örneğin* bir gün, haftada 1-7 kez, bir hafta, iki hafta, aylık, iki ayda bir, üç ayda bir, yılda iki kere veya yıllık, vb. şeklinde aralıklı dozlar tarafından sağlanabilir. Tercih edilen bir doz protokolü, önemli istenmeyen yan etkileri önleyen maksimum doz veya doz frekansını kapsayan bir tanesidir. Toplam haftalık bir doz genel olarak en az 0.05 µg/kg, 0.2 µg/kg, 0.5 µg/kg, 1 µg/kg, 10 µg/kg, 100 µg/kg, 0.2 mg/kg, 1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg vücut ağırlığı veya daha fazlasıdır. *Bakınız örneğin*, Yang et al. (2003) New Engl. J. Med. 349:427-434; Herold et al. (2002) New Engl. J. Med. 346:1692-1698; Liu et al. (1999) J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67:451-456; Portielji et al. (20003) Cancer Immunol. Immunother. 52:133-144.

25 VII. Kullanımlar

Mevcut buluş, *örneğin*, otoimmün ve proliferatif rahatsızlıkların yanı sıra merkezi sinir sistemi, periferik sinir sistemi ve gastrointestinal yolun enflamatuvar rahatsızlıkların ve koşulların tedavisinde kullanıma yönelik olarak anti-insan IL-23p19 mAb hum13B8-b'nin yüksek konsantrasyonlu solüsyon formülasyonlarını sağlar.

Mevcut buluşun formülasyonları, *örneğin*, nöropatik ağrı, travma sonrası nöropatiler, Guillain-Barre sendromu (GBS), periferik polinöropati ve sinir rejenerasyonunun yanı sıra nükseden tekrarlayıcı MS ve birincil ilerleyici MS dahil olmak üzere multipl skleroz (MS), Alzheimer hastalığı, amiyotrofik lateral skleroz (aynı zamanda ALS; Lou Gehrig hastalığı olarak da bilinir), iskemik beyin hasarı, prion hastalıkları ve HIV ile ilişkili demans tedavisinde kullanılabilir.

Mevcut buluşun formülasyonları aynı zamanda, inflamatuvar bağırsak bozuklukları, *örneğin*, Crohn hastalığı, ülseratif kolit, çölyak hastalığı ve irritabl bağırsak sendromu gibi, tedavisinde de kullanılabilir. Aynı zamanda, greft versus-host hastalığı, sedef hastalığı, atopik dermatit, romatizmal artrit, osteoartrit ve psoriatik artrit dahil olmak üzere artrit, sistemik lupus eritematozus ve tip diyabet gibi otoimmün rahatsızlıklar ve kanser gibi proliferatif rahatsızlıkların tedavisinde de kullanılabilirler. *Bakınız örneğin*, PCT patent başvurusu yayınları WO 04/081190; WO 04/071517; WO 00/53631; ve WO 01/18051.

ÖRNEKLER

Örnek 1

20

Solüsyon Formülasyonu

Bir düzenlemede, mevcut buluşun hum13B8-b'nin solüsyon formülasyonu, bir önceden doldurulmuş şırıngada veya bir otoenjektörde 1.0 mL hacminde bir 100 mg/mL'lik antikor solüsyonu olarak sağlanır. 1.0 mL hacim, tam 1.0 mL dozun verilmesini garanti altına almak üzere yeterli fazla doldurmayı içerebilen doldurma hacminden ziyade çıkarılabilir hacimdir. Mevcut buluşun formülasyonunun 1.0 ml'sine yönelik bir örnekleyici tarif Tablo 2'de sağlanır. Bir düzenlemede, bir ilaç ürünü partisi 15 - 30 L ölçeğinde veya yaklaşık 15,000 – 30,000 dozda hazırlanır.

Tablo 2

1.0 mL Solüsyon Formülasyonu

Bileşen	Derece	Nicelik
hum13B8-b	Ürün spesifikasyonları	100 mg
L-Histidin	Ph.Eur./USP	0.683 mg
L-Histidin HCl	Ph.Eur.	1.17 mg
Polisorbat 80	Ph.Eur./NF/JP	0.500 mg
Sükroz	Ph.Eur./NF/JP	70.0 mg
Enjeksiyona yönelik su	USP	q.s.

- Bazı düzenlemelerde, tampon bileşenlerinin (L-histidin ve L-histidin HCl) miktarları, pH'ı yaklaşık olarak 6.0'a ayarlama ihtiyacı nedeniyle Tablo 2'de listelenen ağırlık miktarlarından biraz sapar. Spesifik olarak, bazı düzenlemelerde, pH'ı yaklaşık 6.0 olan istenen değere ayarlamak üzere, Tablo 2'deki miktarlar ile karşılaştırıldığı üzere, histidinin asidik veya bazik formlarından daha fazla veya daha azı ilave edilir. Yine başka düzenlemelerde, Tablo 2'deki değerlere yaklaşan L-histidin ve L-histidin HCl miktarları, pH'ı, biraz daha yüksek olacak şekilde 6.0'a yaklaştırmak üzere ilave edilir ve daha sonra elde edilen formülasyonun pH'ını yaklaşık 6.0'a düşürmek üzere HCl ilave edilir.

Örnek 2**15 Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)**

- Mevcut buluşun formülasyonlarındaki antikorların termal stabilitesini izlemek üzere Valerian-Plotnikov diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC) kullanılmıştır. DSC direkt olarak sıcaklıktaki kontrol edilen artış veya düşüş sırasında proteinlerde meydana gelen ısı değişikliklerini ölçer. Solüsyondaki bir protein, doğal (katlanmış) konformasyon ve bunun denatüre (katlanmamış) durumu

arasında dengededir. DSC, proteinin %50'sinin denatüre olduğu sıcaklığı belirlemek üzere kullanılır (termal geçiş orta noktası, T_m). Daha yüksek bir T_m değerine sahip olan proteinler, genel olarak, daha stabildir. Örneğin, birincisi (T_{m1}), pH'a bağlı olarak, yaklaşık 64 - 70°C'de meydana gelen ve ikinci, ana geçiş (T_{m2}) 80°C civarında meydana gelen olmak üzere, iki geçişi gösteren Şekil IE'de bir DSC eğrisi sağlanır. Ana geçiş Fc fragmanının yayılmasına atfedilebilir. Ana geçişten (*diğer bir ifadeyle*, düşük sıcaklıkta) önceki termal olayların, literatürde açıklanan IgG1 antikorlarının beklenen yapısal elemanları ile aynı ekseninde olan antikor içerisinde (*örneğin*, Fab) birkaç başka alanın yayılması nedeniyle muhtemeldir. Vermeer (2000) Biophys. J. 78: 394.

Örnek 3

Yüksek Performanslı Boyut Dışlama Kromatografisi (HP-SEC)

Mevcut buluşun hum13B8-b formülasyonlarındaki yüksek moleküler ağırlıklı (HMW) türlerin, düşük moleküler ağırlıklı (LMW) türlerin ve monomerin yüzdesi HP-SEC tarafından tespit edilmiştir. Test solüsyonu, bir boyut dışlama kolonu (YMC-pack Diol-200, 200Å gözenek boyutu, 300 x 8.0 mm, 5µm veya eşdeğeri; YMC Co. Ltd., Kyoto, Japonya) kullanılarak HPLC tarafından seyreltilmiştir ve ayrılmıştır. pik alanları, monomer, HMW türleri ve LMW türlerinin yüzdesini belirlemek üzere kullanılır.

SEC'den elüsyon pikleri, moleküler ağırlığı tahmin etmek ve agregatları izlemek üzere kullanılabilen çok açılı lazer ışık saçılımı (SEC-MALLS) kullanılarak karakterize edilmiştir. Monomer pikin SEC kolonundaki fragmanlardan ve agregatlardan ayrılmasından sonra, numune, analit konsantrasyonunun hesaplanmasına ve bunun molekül ağırlığının (MW) daha sonraki tahmin edilmesine olanak sağlayarak, ultra viyole (UV), MALLS ve kırılma indeksi (RI) detektörlerinden geçirilir. Saçılan ışığın yoğunluğu (MALLS tarafından tespit edilmiştir), protein konsantrasyonunun (RI tarafından belirlenmiştir) ürünü ve

moleküler ağırlık ile orantılıdır. SEC-MALLS, yaklaşık olarak 138 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip, bir baskın ana pik gösterir. Bu, SEC'nin kromatografik çözünürlüğünü ve ışık saçılım saptaması göz önüne alınırken, hum13B8-b monomerinin hesaplanmış teorik moleküler ağırlığına ve aynı zamanda kütle spektrometrisi kullanılarak tespit edildiği üzere hum13B8-b monomerinin 5 kütlesine fena olmayacak şekilde karşılık gelir. Yaklaşık olarak 300 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip olan yüksek moleküler ağırlıklı bir türün (HMW1), bir dimer türünü temsil etmesi muhtemeldir. Tüm partilerde gözlenmeyen bir ikinci HMW piki (HMW2), bir trimer türüne karşılık gelen yaklaşık olarak 465 kDa'lık 10 bir tahmini moleküler ağırlığa sahip türleri içerir. Bir düşük moleküler ağırlıklı tür (LMW), bir fragmentasyon ürününü, örneğin menteşe fragmentasyonu ürününü temsil edebilen 108 - 117 kDa'lık bir moleküler ağırlık ile tespit edilir.

Örnek 4

15

Dinamik Işık Saçılımı (DLS)

Dinamik ışık saçılımı (DLS), monoklonal antikorların solüsyon içinde bir 0.5 nm ila 6 µm aralığındaki boyut dağılım profilinin içyüzünü anlayabilen bir tekniktir. 20 Monoklonal antikor hum13B8-b, yoğunlukta yaklaşık 9.5 nm'lik (ve hacimde 6.5 nm) bir ortalama hidrodinamik çapı gösterir. Bu, diğer monoklonal antikorların değerleri ile tutarlıdır. Daha yüksek iyonik mukavemetli formülasyonlar, düşük iyonik mukavemetli formülasyonlardan daha düşük hidrodinamik çaplara sahip olma eğilimindedir ve tampon ve pH gibi diğer solüsyon parametreleri tarafından 25 etkilenebilir. *Bakınız ŞEKİLLER 1I ve 1J.* Mevcut buluşun formülasyonlarındaki antikorlar esasen monodispersidir. Mevcut buluşun antikorlarına yönelik hidrodinamik çap, bir antikorun daha yüksek veya daha düşük iyonik mukavemetli bir tamponda seyreltildiği deneyler tarafından kanıtlandığı üzere, geri dönüşümlüdür (veriler gösterilmemiştir). Bu sonuçlar, hidrodinamik çapın, 30 bir deneğe uygulandığında, enjeksiyon bölgesinin yerel çevrelerine eşitleneceğini önerir.

ÖRNEK 5

Yüksek Performanslı İyon Değişirme Kromatografisi (HP-IEX)

- 5 Hum13B8-b'ye yönelik yük varyantları, bir numunedeki proteinler ve bir reçine üzerindeki immobilize edilmiş yükler arasındaki elektrostatik etkileşimlere dayanan HP-IEX tarafından tespit edilmiştir. Pozitif yüklü hum13B8-b varyantları bir zayıf katyon değişim kolonunda (Dionex ProPac WCX-10, 4 x 250 mm veya eşdeğeri; Thermo Scientific, Bannockburn, Ill., USA) bir negatif yüklü reçineye
- 10 bağlanır ve HPLC tarafından ayrılır. Antikor, pH ve tuz konsantrasyonunun artırılması, antikor varyantlarının yükünün etkin bir şekilde azaltılması ve bunların eşdeğer yük iyonları ile değiştirilmesiyle ayrıştırılır. Elüente hum13B8-b ve varyantların varlığı UV tarafından ile belirlenir. pik alanları Asidik Varyantlar, Ana pik Sonrası ve Bazik Varyantların yüzdesini belirlemek üzere kullanılır.
- 15
- Ana Pikten sonra ayrıştırılanlar Bazik Varyantlar olarak refere edilirken, ana pikten önce tespit edilen, yaklaşık 23 dakikada ayrıştırılmış tüm türler Asidik Varyantlar olarak refere edilir. Ana Pik, C terminalinde tam lizin bölünmesi ve N terminalinde tam piroglutamat oluşumu sergilerken, Asidik Varyantların Pikin
- 20 analizi hiç N- veya C-terminal modifikasyonlarına sahip olmadıklarını ortaya koyar. Ana pik tam biyolojik aktiviteyi korur. Ana pik Sonrası, C-terminalinde tam lizin bölünmesi ve sınırlı prolin α -amidasyonu, N-terminalinde tam piroglutamat oluşumu, Met251 ve Met427 oksidasyonu sergiler ve ELISA'nın bağlanması tarafından ölçüldüğü üzere indirgenmiş potens sergiler. Bazik pik 1, C
- 25 terminalinde tam lizin bölünmesi ve bazı prolin α -amidasyonu ve N terminalinde tam piroglutamat oluşumu sergiler. Bazik piklerin en bol bulunan olan Bazik pik 3, C terminalinde tam lizin bölünmesi ve N terminalinde tamamlanmamış piroglutamat oluşumu sergiler. Bazik Varyantlar, C-terminalinde tam lizin bölünmesi ve değişken seviyelerde prolin α -amidasyonu ve N-terminalinde
- 30 tamamlamak üzere tamamlanmamış piroglutamat oluşumu sergiler. Yük varyantlarının çoğunluğu biyolojik aktiviteyi korur.

Örnek 6

Peptit Haritalaması

- 5 Peptit haritalaması, hum13B8-b'nin birincil yapısı hakkında bilgi sağlar ve oksidasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini değerlendirmek üzere kullanılabilir. Sekans kapsamını arttırmak üzere, hum13B8-b'yi karakterize etmek üzere iki farklı enzimatik peptid haritası kullanılmıştır. Birincisi, endoproteinaz Lys-C sindiriminden sonra peptit haritalamasıdır. Proteini denatüre etmek üzere guanidin
- 10 hidroklorür ile ve disülfid bağlarını indirgemek üzere 1,4-dithiothreitol (DTT) ile bir hum13B8-b numunesinin tedavi edilmesiyle bir peptit haritası elde edilmiştir. Daha sonra, DTT işleminden ortaya çıkan serbest tiyoller alkileştirmek üzere numuneler iyodoasetamid (IAM) ile tedavi edilmiştir. Numuneler daha sonra endoproteinaz Lys-C ile sindirilmiştir. Ortaya çıkan peptitlerin analizi,
- 15 elektrosprey kütle spektrometrisine birleştirilmiş tersine çevrilmiş fazlı sıvı kromatografisi (Xbridge C18, 5 µm, 130 Å gözenek boyutu, 2.1x150 mm veya eşdeğeri; Waters Corporation, Milford, Mass., USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. bunların kütle spektrometrisi kullanılarak tespit edilen kütlelerinin yanı sıra hafif (L) ve ağır (H) zincirlerinden kaynaklanan peptit
- 20 sekansları Tablo 3'te verilir. Tutma süreleri, kromatografi sırasında 90 dakika boyunca 214 nm'de ultraviyole Emilimi ile belirlenmiştir. IAM ile alkilenmiş sistein kalıntısı başına net 57 Da'lık bir kütlenin ilave edilmesiyle sistein kalıntılarının alkilasyonuna yönelik olarak kütleler düzeltilmiştir. Hum13B8-b'nin tamamlayıcılık belirleyici bölgesinden (CDR) kaynaklanan beş peptid özellikle
- 25 ilgi konusudur. Piroglutamate N-terminal ağır zincir peptidi, lizin-kırpılmış C-terminal ağır zincir peptidi ve birkaç metiyonin ile oksitlenmiş ve deamidatlanmış peptidler gibi yaygın post translasyonel olarak modifiye edilmiş peptitler de gözlenmiştir. Bu modifikasyonların hiçbirisi molekülün CDR'lerinde bulunmaz. Rutin peptit haritalama deneyleri kütle spektrometrisi kullanılmadan
- 30 gerçekleştirilebilir ve bir stabilite (test) numunesi ve bir kontrol (referans)

numunesi gibi numuneleri karşılaştırmak üzere gözlemlenen piklerin tutulma süreleri kullanılabilir.

- 5 Tripsin sindirimini kullanan bir ikinci peptit haritalama yöntemi, Lys-C peptit haritasında iyi temsil edilmeyen ağır zincirin 64 - 120 kalıntıları üzerine kapsama ilave etmek üzere geliştirilmiştir. Endoproteinaz C ile paylaşılan lizin kalıntılarının bölünme bölgesi C-terminaline ek olarak, tripsin aynı zamanda, bir daha küçük peptit seti ile sonuçlanarak, arginin kalıntılarının C-terminalini de böler (bir sonraki tortu P olmadığı sürece). Ağır zincirin 64 ila 120 kalıntılarında
- 10 ortaya çıkan peptitler, UV absorbans tespiti ve kütle spektrometrisi (pik notuna yönelik olarak) ile birleştirilmiş tersine çevrilmiş faz sıvı kromatografisi kullanılarak tespit edilmiştir. Hum13B8-b'nin ilgili triptik peptid fragmanları Tablo 3'te dahil edilir.

15

Tablo 3

Endoproteinaz Lys-C ve Tripsin ile Peptit Haritalama

Zincir	Peptit	Tutulma süresi (dakika)	Gözlemlenen kütle (Da)	Notlar
H	13-19	17.15	685.42	
H	334-337	8.94	447.27	
H	213-217	13.12	599.37	
H	14-19	17.15	557.32	
H	409-413	23.95	574.34	
H	439-445	35.96	659.35	C-terminal-K
H	326-333	37.23	837.50	
H	1-12	41.37	1267.68	1pE
H	340-359	43.49	2310.19	

Endoproteinaz Lys-C ve Tripsin ile Peptit Haritalama

Zincir	Peptit	Tutulma süresi (dakika)	Gözlemlenen kütle (Da)	Notlar
H	338-359	43.49	2509.32	
H	133-146	43.81	1320.68	
H	414-438	45.04	3059.36	M427 oksitlenmiş
H	360-369	47.39	1160.62	
H	121-132	47.97	1185.65	
H	274-287	50.08	1676.80	
H	414-438	52.65	3043.37	
H	370-391	56.90	2544.09	N383 isoD
H	370-391	57.27	2543.10	
H	370-391	58.13	2544.10	N383 D
H	248-273	60.30	2970.41	M251 oksitlenmiş
H	392-408	62.47	1872.92	
H	248-273	63.11	2954.42	
H	288-316	70.98	5066.36	
H	288-316	71.19	4904.28	
H	288-316	71.39	4758.17	
H	222-247	71.74	2843.43	
H	274-325	73.05	6096.43	
H	222-245	73.88	2618.29	
H	147-209	82.40	6712.66	
H	13-63	93.78	5696.78	

Zincir	Peptit	Tutulma süresi (dakika)	Gözlemlenen kütle (Da)	Notlar
H	20-63	95.45	5029.36	CDR-türevli
H	24-63	96.01	4555.12	CDR-türevli
L	184-188	9.76	624.28	
L	208-214	19.92	868.36	
L	104-107	22.96	487.30	
L	146-149	26.46	559.32	CDR-türevli
L	150-169	29.11	2134.95	
L	191-207	39.01	1874.92	
L	46-52	40.79	833.51	CDR-türevli
L	170-183	47.39	1501.76	
L	108-126	64.81	2101.11	
L	1-42	68.14	4765.28	
L	127-145	68.79	2125.05	
L	1-39	68.90	4483.13	
L	53-103	77.20	5559.57	CDR-türevli

Örnek 7

UV Spektroskopisi ile Protein Konsantrasyonu

5

Mevcut buluşun solüsyon formülasyonlarındaki hum13B8-b antikorunun protein konsantrasyonu UV spektroskopisi ile belirlenir. Belirleme, triptofan, tirozin ve sistein kalıntıları gibi amino asitler tarafından 280 nm'de UV ışığının emilimine bağlıdır. 280 nm'de emilim, 320 nm'de emilim kullanılarak ışık saçılmasına

yönelik olarak düzeltilir. Yöntem, numunenin su içinde bir gravimetrik seyreltilmesini ve 280 nm'de emiciliği ve 320 nm'de emiciliği oluşturmak üzere bir UV spektrumunun kaydedilmesini içerir. Bu absorbans değerleri ve deneysel olarak belirlenen 1.44 mL mg⁻¹ cm⁻¹'lik sönme katsayısı, hum13B8-b
5 konsantrasyonunu hesaplamak üzere kullanılır.

Örnek 8

Biyolojik Aktivite - Hücre Bazlı Fonksiyonel Analiz

10

Mevcut buluşun formülasyonlarındaki hum13B8-b'nin insan IL-23'ün biyolojik aktivitelerini bloke etme kabiliyetini değerlendirmek üzere bir fonksiyonel hücre bazlı analiz geliştirilmiştir. Bu analiz, hum13B8-b'nin, bir IL-23'e yanıt veren hücre hattında (Kit 225) IL-23 ile indüklenen STAT3 aktivasyonunu inhibe etme
15 kabiliyetini değerlendirir. Bir hum13B8-b referans materyali ve test numunesinin seri seyreltileri, Kit225 IL-23'e yanıt veren hücreler ile inkübasyon tarafından takip edilen, bir sabit insan IL-23 konsantrasyonu ile inkübe edilir. STAT3 fosforilasyonunun hum13B8-b tarafından inhibisyonu, peroksidaz ile konjüge edilmiş anti-IgG ile inkübasyon ve kemilüminesan maddenin ilavesi tarafından
20 takip edilen, STAT3 yakalama ve anti-p-STAT3 tespit etme antikor çifti kullanılarak ELISA ile hücre lisatlarında ölçülür. Bir inhibisyon yanıt eğrisi ("standart eğri"), bir doğrusal olmayan regresyon dört parametre lojistik uyumu kullanılarak üretilir, burada IC50 değeri, maksimum yanıtın 50'sini inhibe eden anti-IL-23 konsantrasyonunu temsil eder. Test numunesinin nispi potensi, test
25 numunesinin inhibisyon tepkisi eğrisinin standart eğri ile karşılaştırılması ile değerlendirilir ve referans yüzdesi olarak hesaplanır. Aynı numunenin çoklu kopyalarına yönelik nispi potens değerleri bir tek raporlanabilir değer - bağıl potensin bir geometrik ortalaması halinde birleştirilir.

Örnek 9

Biyolojik Aktivite - ELISA Bağlanması

- 5 Mevcut buluşun formülasyonlardaki hum13B8-b'nin insan IL-23'e yönelik afinitesi bir denge bağlayıcı ELISA'da değerlendirilir, burada referans materyali ve test numunelerinin seri seyreltilmeleri insan IL-23 sitokin ile kaplanmış analiz plakalarına uygulanır. Bu analiz, örneğin, çeşitli potansiyel terapötik formülasyonlarda biyolojik aktivitenin tutulmasını değerlendirmek üzere
- 10 kullanılabilir. Test numunesinin nispi potensi, test numunesinin doz yanıt eğrisinin referans materyalinin doz yanıt eğrisi ile karşılaştırılmasıyla değerlendirilir ve referans yüzdesi olarak hesaplanır.

- ELISA'lar teknikte iyi bilinen yöntemler ile gerçekleştirilir. Kısaca, mevcut
- 15 buluşun bir formülasyonundaki hum13B8-b'nin seri seyreltileri, daha önceden insan IL-23 proteini ile kaplanmış ve daha sonra bloke edilmiş olan bir mikrotitre plakasının oyuklarına ilave edilir. Bir inkübasyon periyodundan sonra, oyuklar yıkanır ve bir peroksidaz ile konjuge keçi anti-insan IgG (Fc) tespit etme antikoru reaktifi ilave edilir. Kuyucuklar tekrar yıkanır ve bir kemilüminesan peroksidaz
- 20 maddesi ilave edilir. Sinyal kemilüminesans ile okunur. Bir doğrusal olmayan regresyon dört parametrik lojistik uyumu kullanarak bir sigmoidal doz yanıt eğrisi üretilir, burada EC50 değeri maksimum IL-23 bağlanma sinyalinin %50'sini elde etmek üzere gerekli olan konsantrasyonu temsil eder. Nispi biyolojik potens, test numuneleri ile elde edilen sonuçların referans numune ile elde edilen sinyal
- 25 seviyelerine bağlı bir standart eğri ile karşılaştırılmasıyla hesaplanır. Sonuçlar, referans antikor solüsyonu ile karşılaştırıldığı üzere biyolojik potens yüzdesi olarak sunulur. Aynı numunenin çoklu kopyalarına yönelik bağıl potens değerleri bir tek raporlanabilir değer - bağıl potensin bir geometrik ortalaması halinde birleştirilir.

Örnek 10

SDS Kapiler Elektforezi (CE-SDS)

- 5 Sodyum dodesil sülfat ile kapiler elektforezi (CE-SDS), boyuta bağlı olarak proteinleri ayırır. CE-SDS, indirgeyici olmayan koşullar altında veya indirgeyici koşullar altında gerçekleştirilebilir. İndirgeyici CE-SDS ayrıştırılmış ağır ve hafif zincirleri birbirinden ve yanı zamanda numunedeki diğer potansiyel türlerinden çözerken, indirgeyici olmayan CE-SDS bozulmamış antikorları numunedeki diğer türlerden çözer. *Bakınız, örneğin, Rustandi et al. (2008) Electrophoresis 29:3612.*

İndirgeyici olmayan CE-SDS, serbest sistein kalıntılarını alkilleştirmek üzere antikor hum13B8-b numunelerinin N-etilmaleimit ve SDS varlığında ısı denatürasyonunu gerektirir. Daha sonrasında, numune, ayırmaya yönelik olarak eleme seçiciliği sağlayan bir yer değiştirebilir SDS polimer matrisi içeren bir kapiler içinde ayrılır. Test numunesindeki tüm pikler entegre edilir ve pik bölgeleri, numunedeki Ana IgG (bozulmamış antikor) yüzdesini belirlemek üzere kullanılır.

- 20 İndirgeyici CE-SDS, disülfid bağlarını indirgemek üzere antikor hum13B8-b numunelerinin 2-merkaptetanol ve SDS varlığında ısı denatürasyonunu gerektirir. Daha sonrasında, numune, ayırmaya yönelik olarak eleme seçiciliği sağlayan bir yer değiştirebilir SDS polimer matrisi içeren bir kapiler içinde ayrılır. Test numunesindeki tüm pikler entegre edilir ve pik bölgeleri hum13B8-b'deki ağır ve hafif zincirlerin yüzdesini belirlemek üzere kullanılır.

Örnek 11

Çökeltme Hızı Analitik Ultrasantrifüj (SV-AUC)

30

- Mevcut buluşun formülasyonlarındaki hum13B8-b antikorunun dört bileşenli yapısını soruşturmak üzere SV-AUC kullanılmıştır. SV-AUC, moleküllerin bir santrifüj kuvvete yanıt olarak çökelme hızı ölçer. Bu çökelme hızı, numunede mevcut olan moleküllerin moleküler ağırlığı hakkında bilgi sağlar. Hum13B8-b, 5 baskın olarak, 7.0S'lik bir çökelme katsayısına ($s_{20, w}$) sahip bir tür olarak çöker. Bu tür, monomerin beklenen moleküler ağırlığı ile aynı hızda olan yaklaşık olarak 150 kDa'lık bir tahmini moleküler ağırlığa sahiptir. Makromolekülün hidrasyonuna ve şekline bağlı olan sürtünme oranı, parçalar arasında benzerdir.

10 Örnek 12

Antikor Formülasyonlarının Genişletilmiş Stabilitesi

- Mevcut buluşun antikor formülasyonlarına yönelik ilave uzun dönemli stabilite verileri elde edilmiştir. 24 aya kadar olan örnekleyici stabilite verileri, Parçalar E ve D'ye yönelik olarak aşağıdaki Tablolar 4 - 9'da sunulur.

Tablo 4

Saklama Koşulu		5C						
Parça D		Stabilite Testi Aralığı (Aylar)						
Test	Başlangıç	1M	3M	6M	12M	18M	24M	
Analiz - UV (A280nm) mg/mL	95.1	96.1	100.4	99.4	93.6	97.7	103.8	
HP-IEX [%]								
Asidik Varyantlar	10.1	10.2	10.2	10.6	9.3	11.5	11.6	

Saklama Koşulu		5C						
Parça D		Stabilite Testi Aralığı (Aylar)						
Test		Başlangıç	1M	3M	6M	12M	18M	24M
Asidik 1 Pik		9.7	9.8	10.7	10.5	10.7	11.4	11.5
Ana pik öncesi								
Ana pik		63.2	63.3	62.3	62.0	62.2	60.3	60.4
Ana pik sonrası								
Bazık 1 pik		9.3	8.9	8.9	9.2	9.7	9.0	8.7
Bazık 2 pik		3.9	4.0	4.4	3.9	2.9	3.4	3.1
Bazık varyantlar		3.8	3.2	3.5	3.8	5.3	3.9	4.0
Diğer		ND	0.6	ND	ND	ND	0.5	0.6
HP-SEC[%]								
Yüksek Moleküler Ağırlık Türleri		0.79	0.83	0.95	0.51	0.84	1.16	1.24
Monomer		99.2	99.1	99.0	99.5	98.9	98.6	98.5
Geç Ayırılan Pik	NQ		0.11	0.07	NQ	0.25	<QL	0.27
HIAC [partiküller/mL]								
2 µM		2827	1805	1190	3701	2895	108	1879
			5			1		

5 µM	292	168	1474	712	612	201	644
10 µM	35	32	326	211	168	36	123
25 µM	0	1	13	9	6	2	4

ND - Tespit Edilmemiştir; NQ - Nicelleştirilmemiştir; QL - Nicelleştirme Sınırı;
5C: 5°C (± 3°C); QL = %0.25

Tablo 5

Saklama Koşulu	25H
Parça D	Stabilite Testi Aralığı (Aylar)
Test	Başlangıç 1 M 3M 6M 12 M
Analiz - UV (A280nm) mg/mL	95.1 96.4 98.6 102.8 96.3
HP-IEX [%]	
Asidik Varyantlar	10.1 11.5 15.3 18.5 25.4
Asidik 1 Pik	9.7 11.6 13.8 14.8 17.9
Ana pik Öncesi	
Ana pik	63.2 60.3 56.0 51.7 42.2
Ana pik Sonrası	
Bazik 1 pik	9.3 9.5 8.5 8.7 8.7
Bazik 2 pik	3.9 3.3 2.2 1.7 1.6
Bazik varyantlar	3.8 3.8 3.6 4.5 4.2
Saklama Koşulu	25H
Parça D	Stabilite Testi Aralığı (Aylar)
Test	Başlangıç 1 M 3M 6M 12 M
Diğer	ND ND 0.5 ND ND

HP-SEC [%]

Yüksek Moleküler Ağırlık Türleri	0.79	1.47	2.05	1.35	2.69
Monomer	99.2	98.4	97.7	97.9	96.2
Geç Yatışan pik	NQ	0.14	0.30	0.77	1.15

ND - Tespit Edilmemiştir; NQ - Nicelleştirilmemiştir; 25H :25°C/%60 Nispi Nemlilik

Tablo 6

Saklama Koşulu	RH4			
Parça D	Stabilite Testi Aralığı (Aylar)			
Test	Başlangıç	1 M	3M	6M
Analiz - UV (A280nm) mg/mL	95.1	95.0	103.6	102.7
HP-IEX [%]				
Asidik Varyantlar	10.1	20.4	46.3	58.4
Asidik 1 Pik	9.7	15.9	17.8	15.0
Ana Pik Öncesi				
Ana Pik	63.2	49.4	24.7	15.8
Ana Pik Sonrası				
Bazik 1 Pik	9.3	8.2	5.0	5.8
Bazik 2 Pik	3.9	1.5	1.8	ND
Bazik varyantlar	3.8	3.7	4.4	5.0
Diğer	ND	0.8	ND	ND
HP-SEC [%]				
Yüksek Moleküler Ağırlık Türleri	0.79	2.34	4.91	3.68

Monomer	99.2	97.1	93.3	93.3
Geç Ayrışan Pikler	NQ	0.56	1.74	3.00
ND - Tespit Edilmemiştir; NQ - Nicelleştirilmemiştir; RH4: 40°C/%75 Nispi Nemlilik				

Tablo 7

Saklama Koşulu	5C						
Parça E	Stabilite Testi Aralığı (Aylar)						
Test	Başlangıç	1 M	3 M	6 M	12 M	18 M	24 M
Analiz - UV (A280nm)	94.1	97.5	97.3	99.0	91.9	101.3	98.2
[mg/mL]							
HP-IEX [%]							
Asidik Varyantlar	8.1	7.7	7.8	8.0	7.9	8.5	8.6
Asidik 1Pik	8.3	8.8	8.8	8.8	9.1	9.5	9.6
Ana pik Öncesi							
Ana pik	66.0	66.0	66.0	65.8	65.6	65.2	65.2
Saklama Koşulu	5C						
Parça E	Stabilite Testi Aralığı (Aylar)						
Test	Başlangıç	1 M	3 M	6 M	12 M	18 M	24 M
Ana pik Sonrası							
Bazik 1 pik	9.5	9.5	9.7	9.8	9.9	9.4	9.4
Bazik 2 pik	4.3	4.7	4.2	4.0	3.7	3.6	3.3
Bazik varyantlar	3.3	3.3	3.4	3.5	3.6	3.4	3.4
Diğer	0.5	ND	ND	ND	ND	0.5	0.5

HP-IEX %

Asidik Varyantlar	16.9	NT	17.2	17.8	18.2	NT	19.1
Ana Pik	63.8	NT	63.5	62.7	63.1	NT	63.3
Ana Pik Sonrası	2.0	NT	2.1	2.4	2.1	NT	1.9
Bazik Varyantlar	17.3	NT	17.1	17.0	16.8	NT	15.8

ELISA Bağlama

112	NT	NT	96	NT	NT	NT
-----	----	----	----	----	----	----

Kontrole göre potens [%]**ELISA Bağlama**

NT	NT	NT	NT	98	100	103
----	----	----	----	----	-----	-----

Kontrole göre potens [%]**Hücre-bazlı fonksiyonel analiz ile biyolojik potens**

NT	NT	NT	NT	113	106	90
----	----	----	----	-----	-----	----

HP-SEC %

Yüksek Moleküler Ağırlık Türleri	0.21	0.27	0.17	0.37	0.37	0.46	0.51
Monomer	99.8	99.7	99.8	99.5	99.5	99.3	99.3
Geç Ayrışan Pikler	NQ	0.05	NO	0.13	<QL	<OL	<QL

HP-SEC [%]

Yüksek Moleküler Ağırlık Türleri	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0.47
Monomer	NT	NT	NT	NT	NT	NT	99.2
Geç Ayrışan Pikler	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0.36

HIAC [partiküller/mL]

2 µm	1646	2307	2759	2240	5752	923	4491
5 µm	199	343	524	240	1352	265	1733

10 µm	15	96	136	30	275	48	585
25 µm	0	3	4	1	15	0	11

**CE-SDS (İndirgenmiş
olmayan) [%]**

Toplam Saflık	NT	NT	NT	NT	NT	NT	96.6
---------------	----	----	----	----	----	----	------

**CE-SDS (İndirgenmiş)
%**

Toplam Saflık	NT	NT	NT	NT	NT	NT	96.6
---------------	----	----	----	----	----	----	------

ND - Tespit Edilmemiştir; NQ - Nicelleştirilmemiştir; NT - Test Edilmemiştir;
QL – Nicelleştirme Sınırı; QL = %0.25; 5C: 5°C (± 3°C)

Tablo 8

Saklama Koşulu

25H

Parça E

Stabilite Testi Aralığı (Aylar)

Test Başlangıç 1 M 3 M 6 M 12 M

Analiz - UV (A280nm) [mg/mL]	94.1	98.0	98.2	96.0	92.9
---	------	------	------	------	------

HP-IEX [%]

Asidik Varyantlar	8.1	9.1	10.9	14.5	20.0
Asidik 1 Pik	8.3	9.4	11.2	13.6	16.8
Ana pik öncesi					
Ana pik	66.0	64.3	61.8	56.8	49.5
Ana pik sonrası					

Bazik 1 pik	9.5	9.6	9.9	9.5	7.7
Bazik 2 pik	4.3	4.1	2.3	1.8	0.9
Bazik varyantlar	3.3	3.4	3.5	3.8	3.9
Diğer	0.5	ND	ND	ND	1.1
ELISA Bağlama					
Kontrole göre potens [%]	112	NT	NT	99	NT
ELISA Bağlama					
Kontrole göre potens [%]	NT	NT	NT	NT	105
Hücre-bazlı fonksiyonel analiz ile biyolojik potens	NT	NT	NT	NT	103
HP-SEC [%]					
Yüksek Moleküler Ağırlık Türleri	0.21	0.51	0.49	1.19	1.87
Monomer	99.8	99.4	99.1	98.3	97.6
Düşük Moleküler Ağırlık Türleri	NQ	0.12	0.43	0.50	0.86

ND - Tespit Edilmemiştir; NT – Test Edilmemiştir; NQ - Nicelleştirilmemiştir;
25H :25°C/%60 Nispi Nemlilik.

Tablo 9

Saklama Koşulu	RH4
Parça E	Stabilite Testi Aralığı (Aylar)
Test	Başlangıç 1 M 3 M 6 M
Analiz - UV (A280nm) [mg/mL]	94.1 94.9 98.4 95.5
HP-IEX [%]	

Asidik Varyantlar	8.1	18.5	36.3	56.7
Asidik 1 pik	8.3	15.1	19.4	16.5
Ana pik öncesi				
Ana pik	66.0	51.6	32.6	16.9
Ana pik sonrası				
Bazik 1 pik	9.5	8.8	7.3	5.5
Bazik 2 pik	4.3	1.7	0.4	ND
Bazik varyantlar	3.3	3.6	4.1	4.4
Diğer	0.5	0.7	ND	ND
ELISA Bağlanma				
Kontrole göre potens [%]	112	NT	NT	104
HP-SEC [%]				
Yüksek Moleküler Ağırlık Türleri	0.21	1.39	1.66	4.86
Monomer	99.8	98.1	96.7	92.7
Düşük Moleküler Ağırlık Türleri	NQ	0.51	1.60	2.44

ND – Tespit Edilmemiştir; NQ - Nicelleştirilmemiştir; NT – Test Edilmemiştir;
RH4: 40°C/%75 Nispi Nemlilik

Tablo 10 sekans listelemedeki sekansları listeler.

5

Tablo 10

Sekans Tanımlayıcıları

SEQ ID NO:

Açıklama

1

humI3B8-b HC

Sekans Tanımlayıcıları

SEQ ID NO:	Açıklama
2	hum13B8-b LC
3	13B8-b CDRH1
4	13B8-b CDRH2
5	13B8-b CDRH3
6	13B8-b CDRL1
7	13B8-b CDRL2
8	13B8-b CDRL3
9	insan IL-23p 19
10	hum13B8-b HC DNA
11	hum13B8-b LC DNA
12	Ağır Zincirli Sinyal Sekansı
13	Hafif Zincirli Sinyal Sekansı

DİZİ LİSTESİ

	<110> MERCK SHARP & DOHME CORP.
5	Kashi, Ramesh Badkar, Aniket
	<120> İşlenmiş Anti-IL-23p19 Antikorların Solüsyon Formülasyonları
	<130> 23364
10	<150> US 61/737,035 <151> 2012-12-13

<160> 13
<170> PatentIn versiyonu 3.5

5 <210> 1
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Yapay Dizi

10 <220>
 <223> İnsan çerçeveleri, kemirgen CDR'leri

15 <220>
 <221> DOMEN
 <222> (1)..(116)
 <223> Değişken Domen

 <400> 1

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ile	Phe	Ile	Thr	Tyr	20	25	30	
Trp	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Gln	Ile	Phe	Pro	Ala	Ser	Gly	Ser	Ala	Asp	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	50	55	60	
Glu	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	100	105	110	
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	115	120	125	

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

370	375	380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
385	390	395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
	405	410 415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
	420	425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	435	440 445

<210> 2

<211> 214

5

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> İnsan çerçeveleri, kemirgen CDR'leri

10

<220>

<221> DOMEN

<222> (1)..(108)

<223> Değişken Domen

15

<400> 2

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	1	5	10	15
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Thr	Ser	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ser	Tyr	20	25	30	
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	35	40	45	
Tyr	Asn	Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	His	Tyr	Gly	Ile	Pro	Phe	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	180	185	190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	210													

5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

5

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

<210> 4

<211> 17

10

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Bir amino asit süstitüsyonuna sahip kemirgen CDR'si

15

<400> 4

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

Gly

20

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

25

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr
1 5

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

5

<400> 6

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

10 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15 <400> 7

Asn	Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Glu
1				5		

20 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8

25

Gln	His	His	Tyr	Gly	Ile	Pro	Phe	Thr
1				5				

<210> 9
 <211> 170

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

5

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

10

<210> 10

<211> 1398

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> İnsan sabit ve çerçeve bölgeleri, kemirgen CDR'leri

<400> 10

5

atggctgtgc tggggctgct gttctgcctg gtgacattcc caagctgtgt gctgtcccag	60
gtgcagctgg tgcagctctgg cgctgagggtg aagaagcctg gcgcctccgt gaaggctctcc	120
tgcaaggctt ctggctacat cttcatcacc tactggatga cctgggtgcg gcaggccctt	180
ggccaggggc tggagtggat ggccagatc ttccctgcc aaggctctgc agactacaac	240
gagaagtctg aaggcagagt caccatgacc acagacacat ccaccagcac agcctacatg	300
gagctgagga gcctgagatc tgacgacacc gccgtgtatt actgtgccag aggcgggtggc	360
ggattcgctt actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct ccagcgctag caccaagggc	420
ccatcggtct tccccctggc accctctctc aagaqcacct ctggggggcac agcggccctg	480
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgcgtggaa ctcaggcgcc	540
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggtc gtccctacagt cctcaggact ctactccctc	600
agcagcggtg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg	660
aatcacaagc ccagcaacac caagggtggc aagaaagtgt agcccaaact ttgtgacaaa	720
actcacacat gccacccgtg cccagcacct gaactctgtg ggggaccgtc agtcttctctc	780
ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg	840
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcggtg	900
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	960
gtcagcgctc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcag	1020
gtctccaaca aagccctccc agccccctc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1080
ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccctccggg atgagctgac caagaaccag	1140
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag	1200
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1260
tccttctctc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	1320
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc	1380
ctgtctccgg gtaaatga	1398

10

<210> 11

<211> 702

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

5

<220>

<223> İnsan sabit ve çerçeve bölgeleri, kemirgen CDR'leri

<400> 11

10

atggctccag tgcagctgct ggggctgctg gtgctgttcc tgccagccat gagatgtgat	60
atccagatga cccagtctcc atccctccctg tctgctctg tgggcgacag agtgaccatc	120
acctgcagga ccagcgagaa catctacagc tacctggcct ggtatcagca gaagccaggg	180
aaagcccccta agctgctgat ctataacgcc aaqaccctgg ctgaaggggt gccatccagg	240
ttcagcggca gcggctctgg gacagacttc accctgacca tcagcagcct gcagcctgag	300
gacttcgcca cctactactg tcagcaccac tacggaattc cattcacctt cggccagggc	360
accaaaggtg agatcaagcg tacgggtggct gcaccatctg tgttcattct cctccatct	420
gatgagcagc tgaagtctgg aactgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctatccc	480
agagagggcca aggtgcagtg gaaggtggat aacgccctcc agagcggcaa ctcccaggag	540
agcgtgacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg	600
agcaaagcag actacgagaa acacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca tcagggcctg	660
agcagccccc tgacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aa	702

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

15

<213> Mus musculus

<400> 12

20

Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys

1 5 10 15

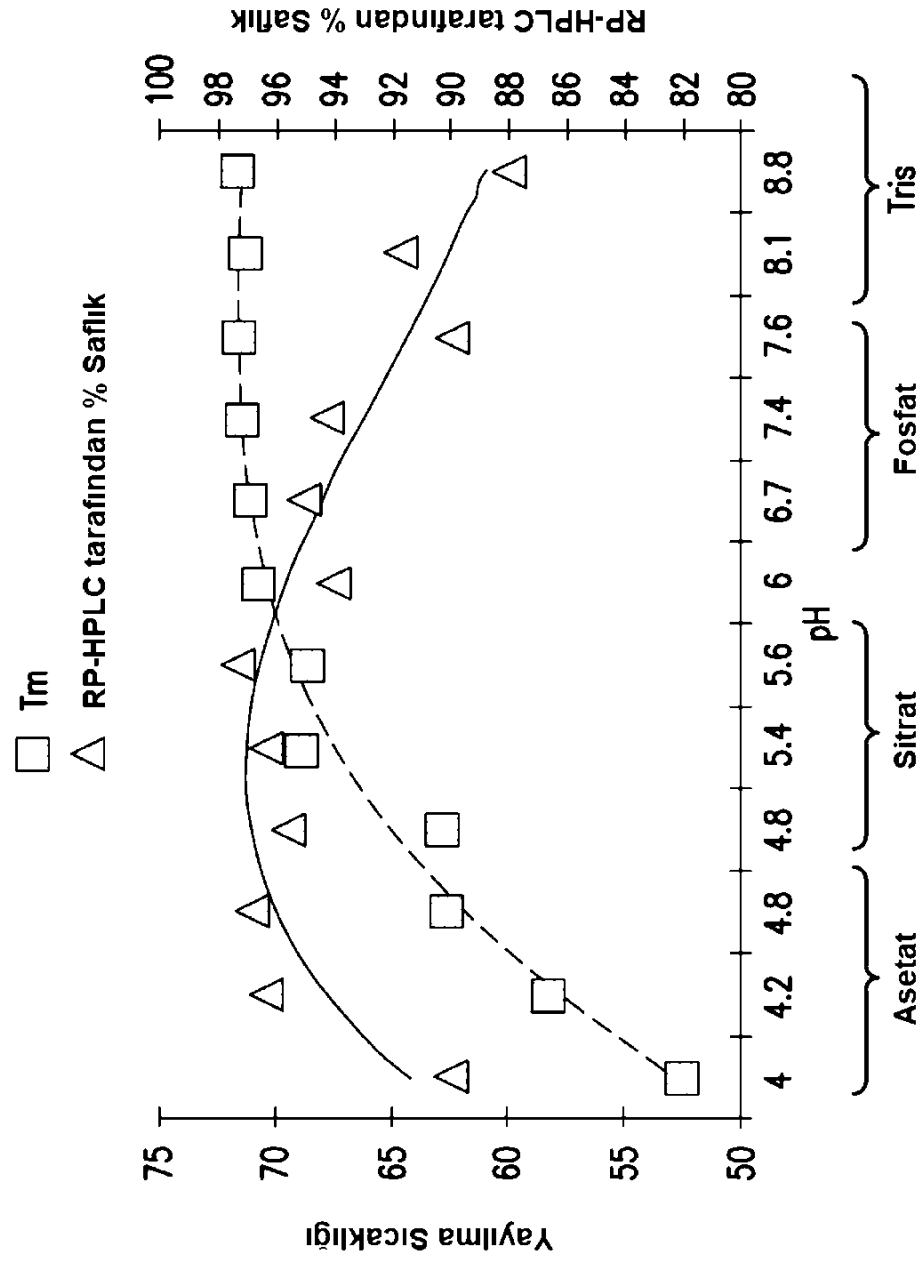
Val Leu Ser

5 <210> 13
<211> 19
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

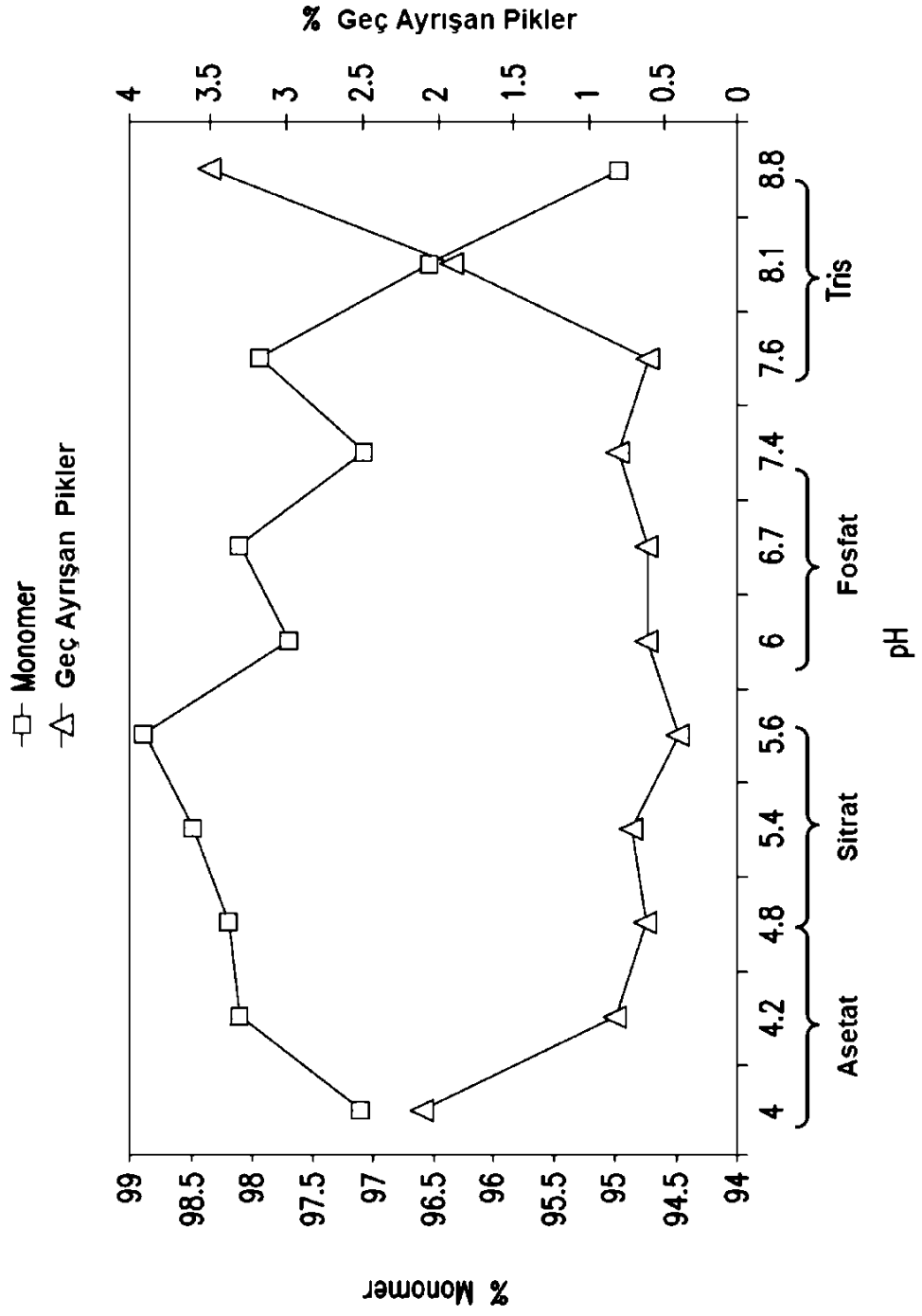
10 <400> 13

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

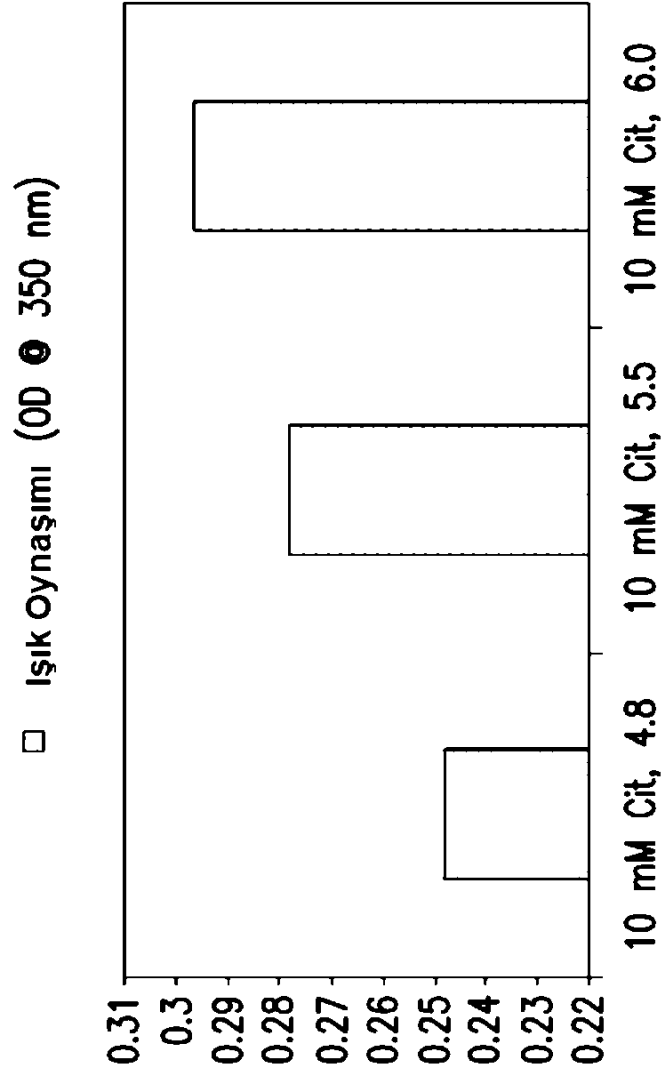
Met Arg Cys

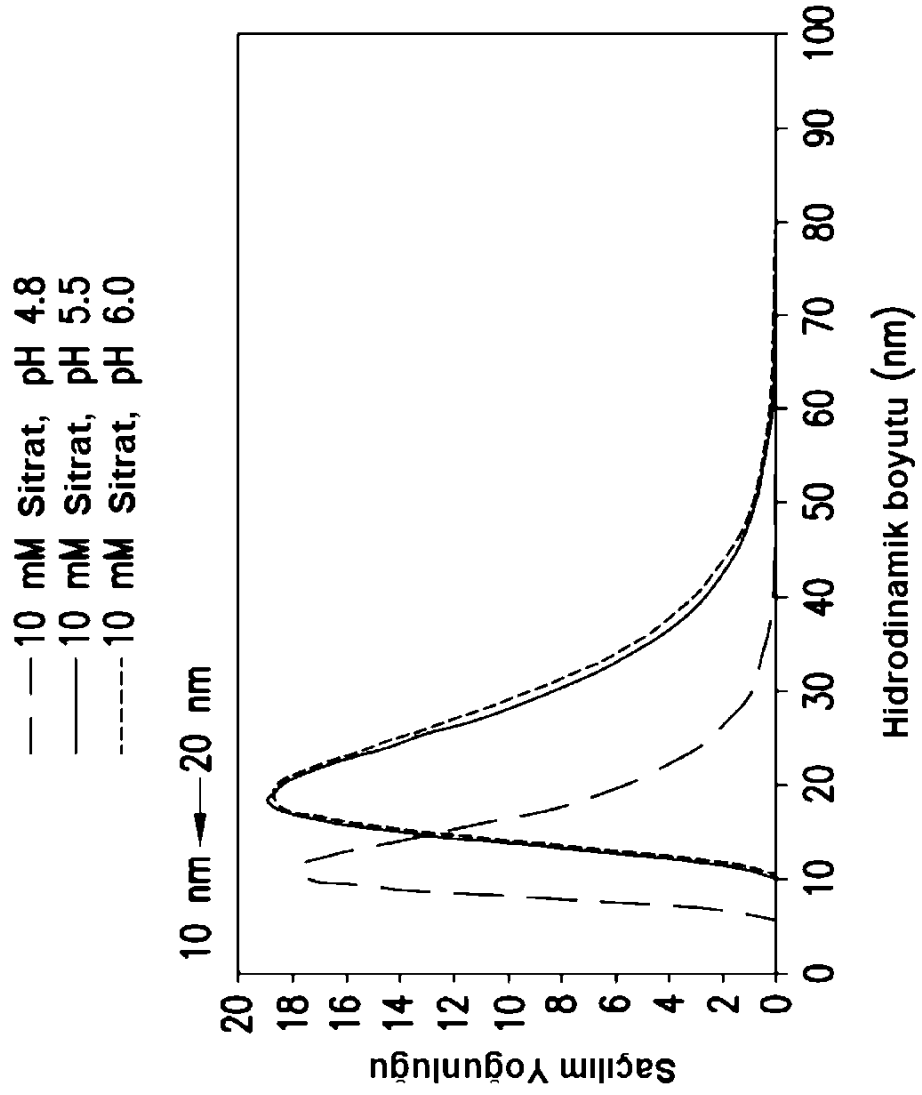


ŞEKİL 1A

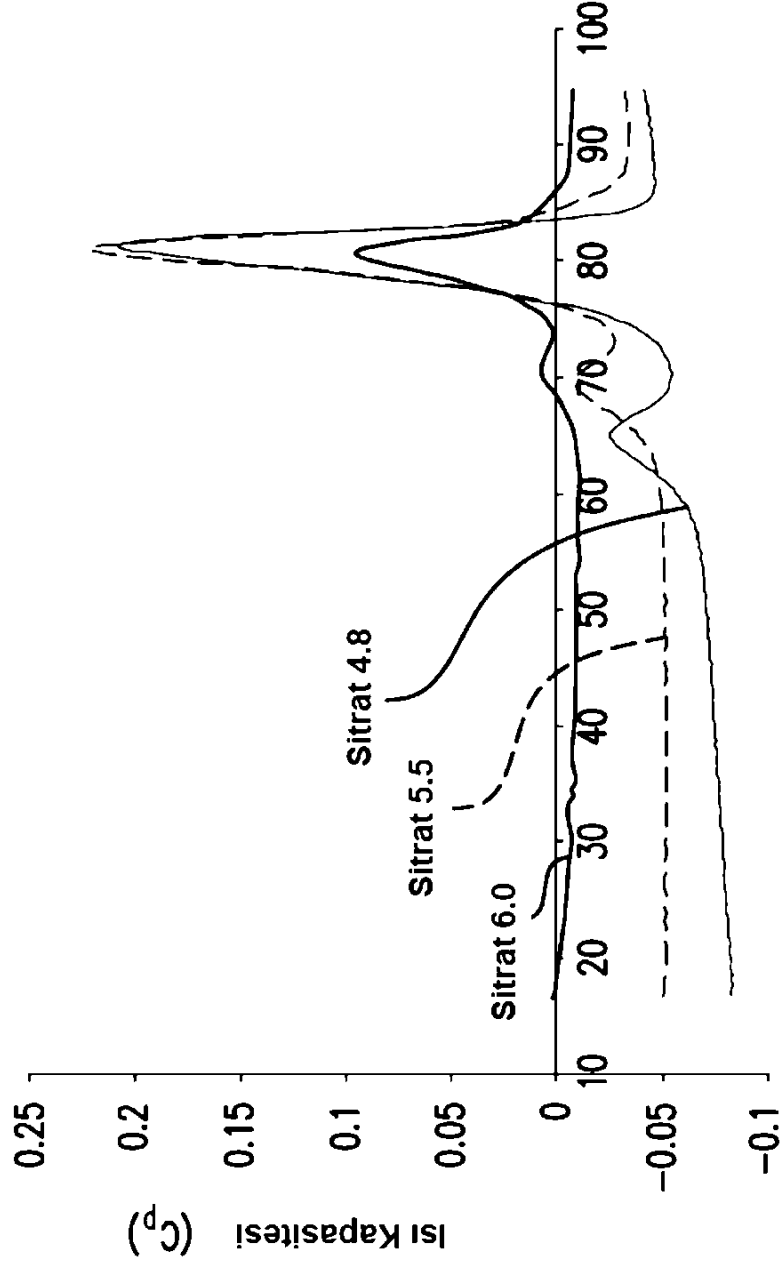


ŞEKİL 1B

**ŞEKİL 1C**

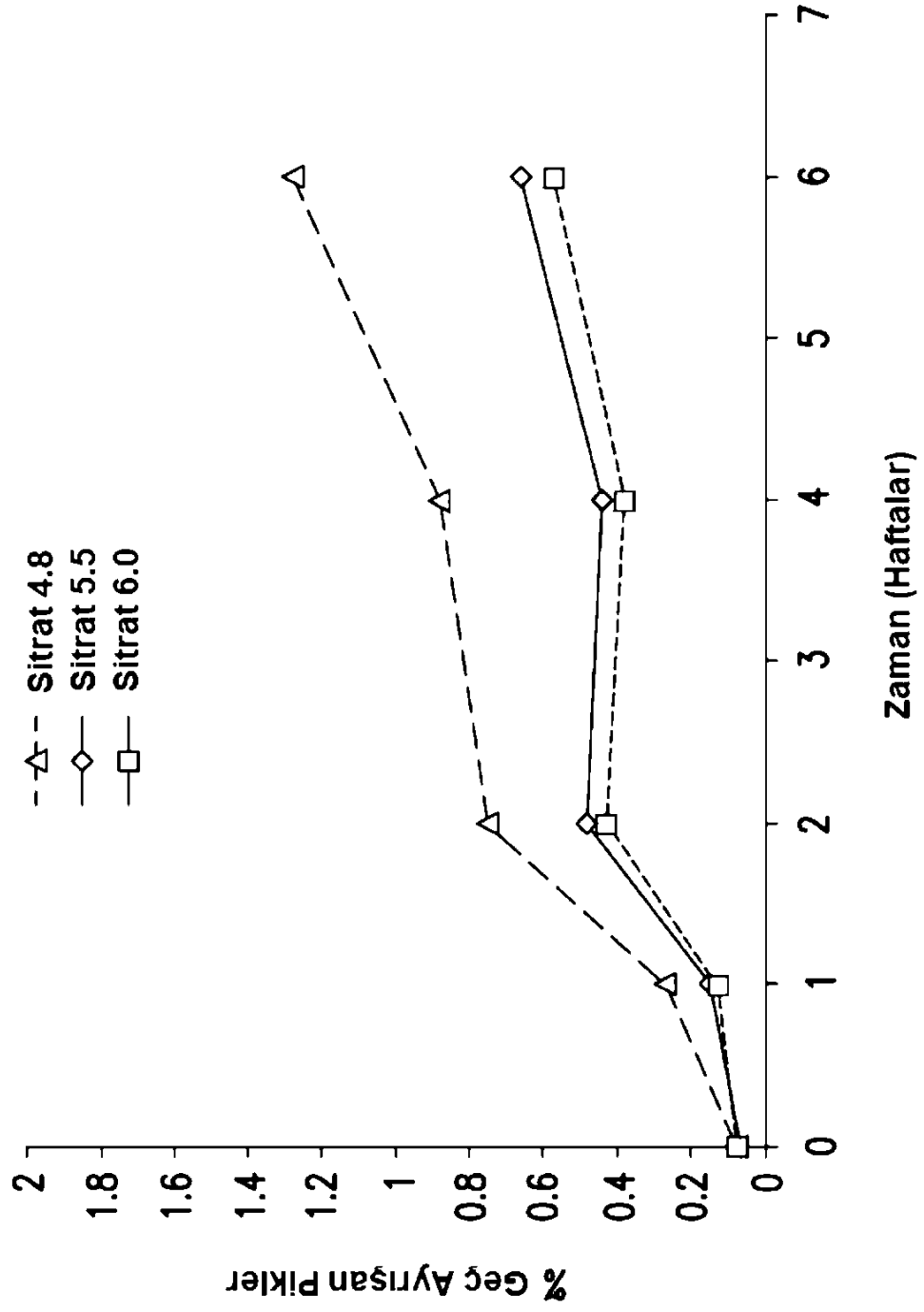


ŞEKİL 1D

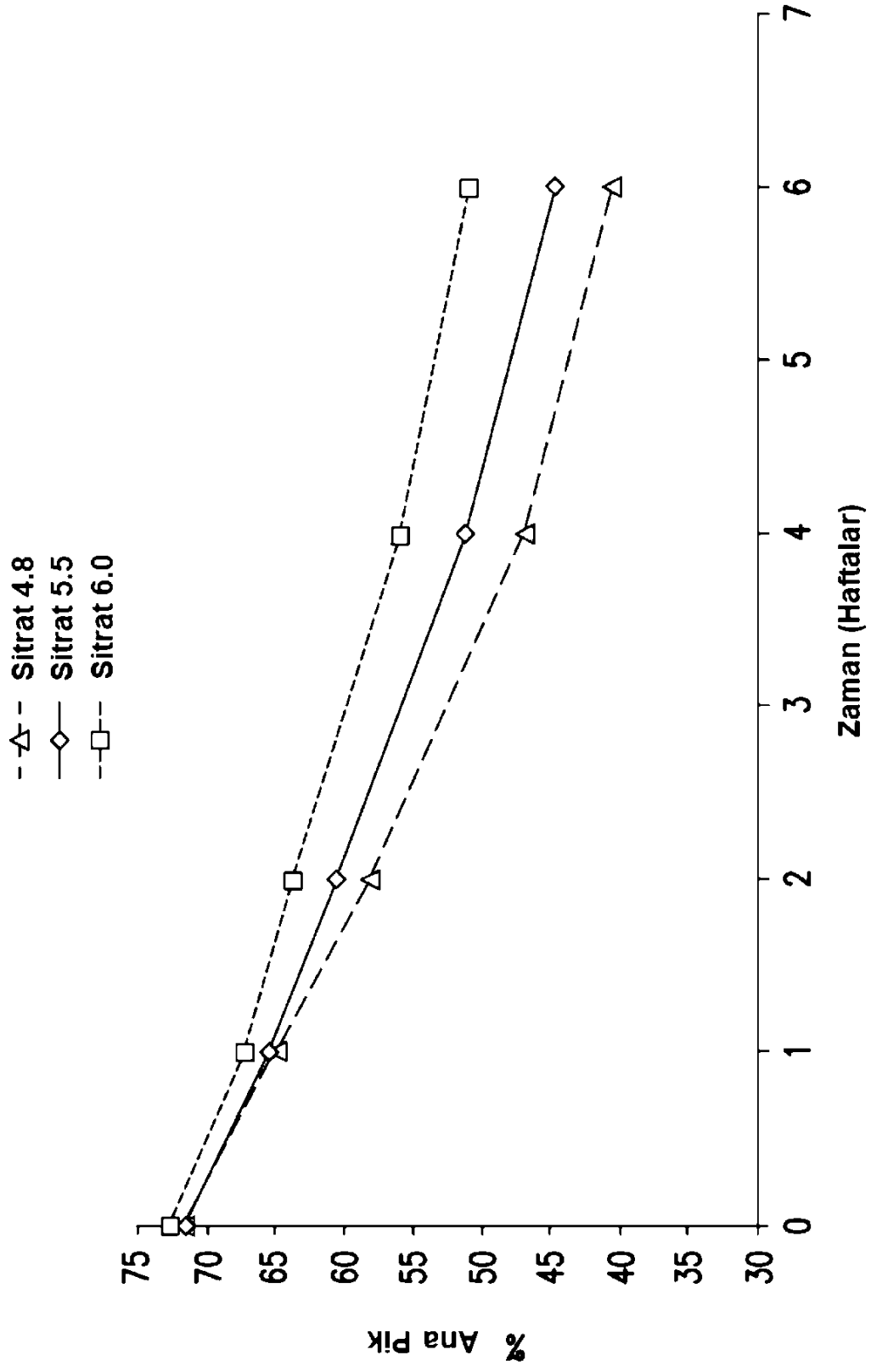


Sıcaklık (°C)

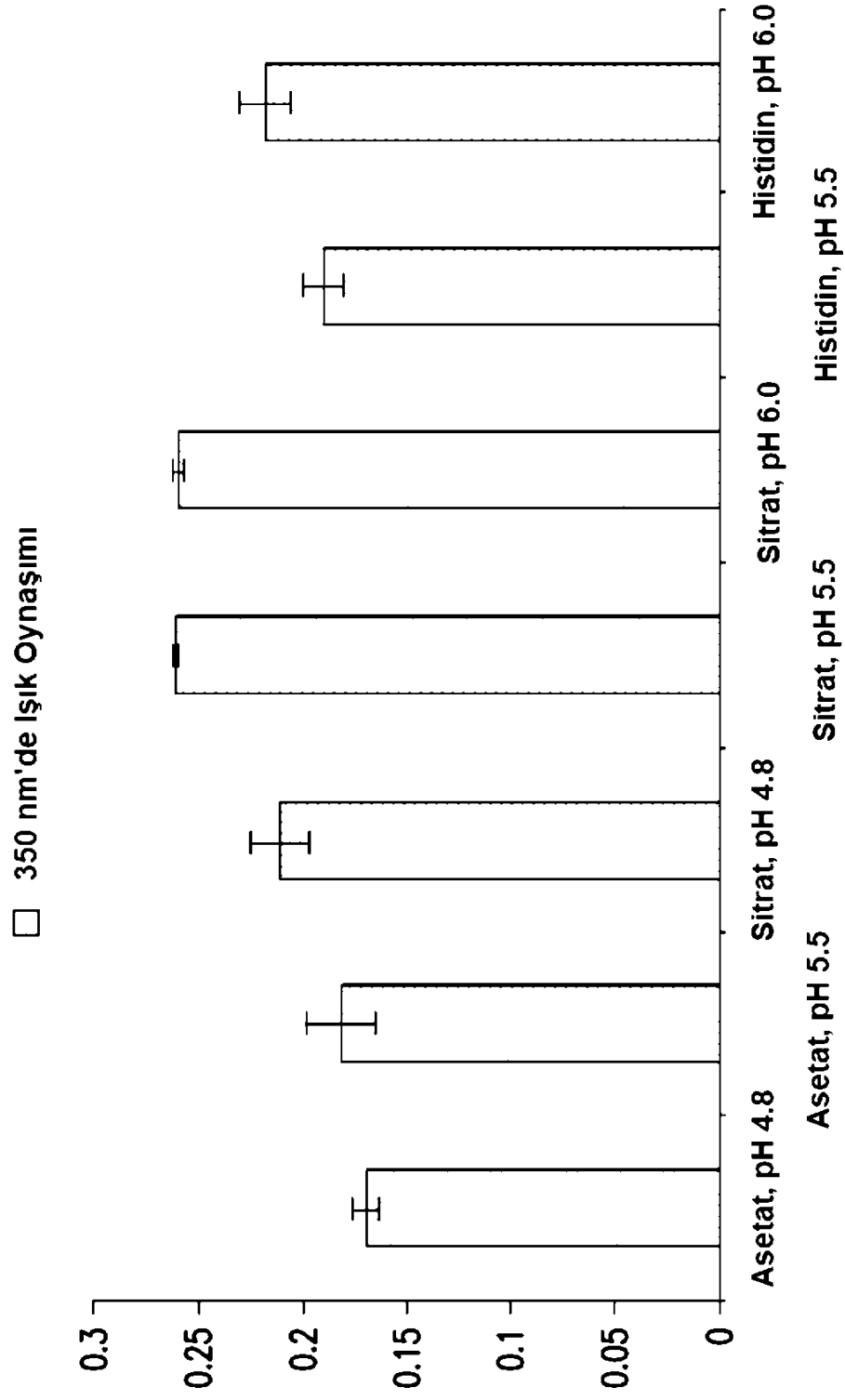
ŞEKİL 1E



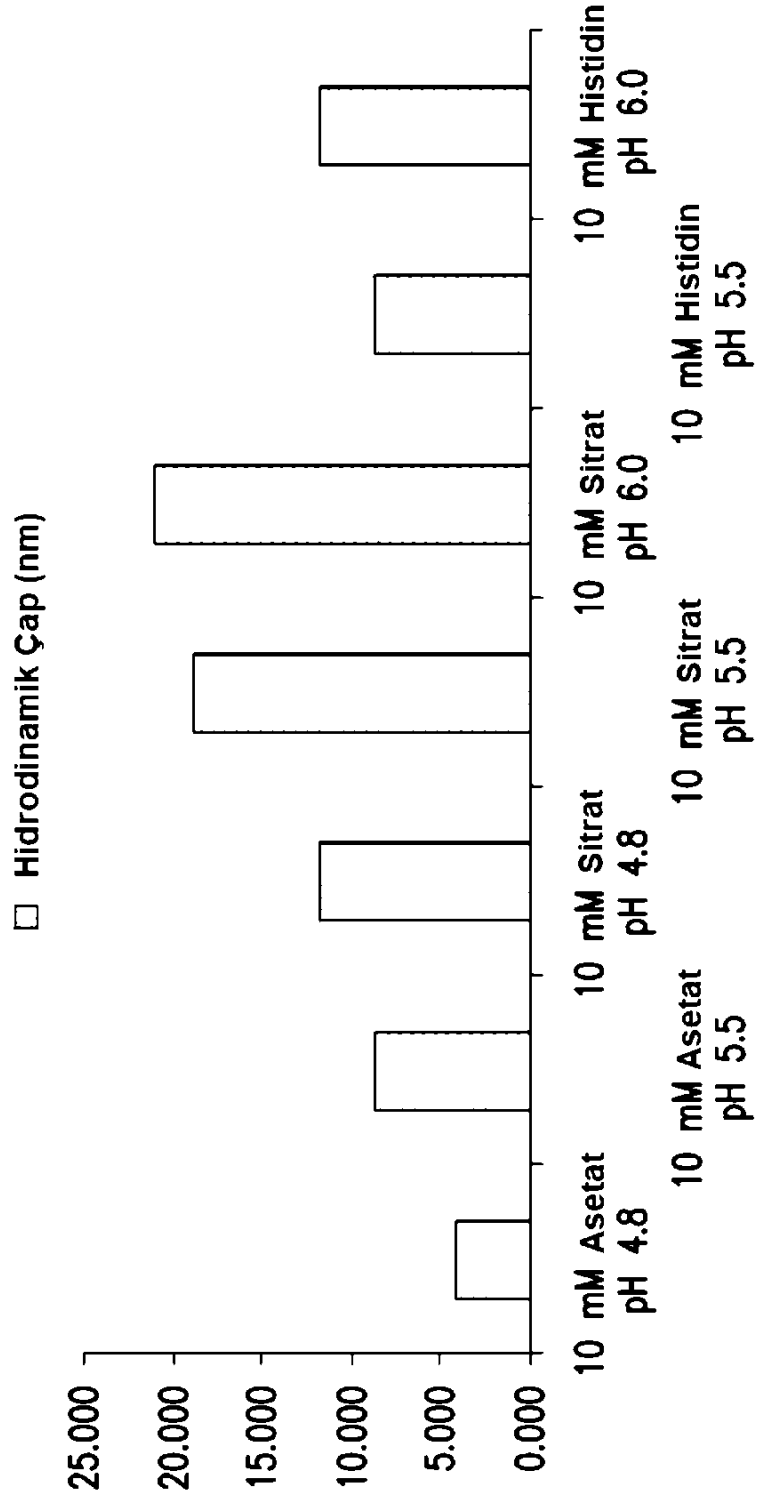
ŞEKİL 1F



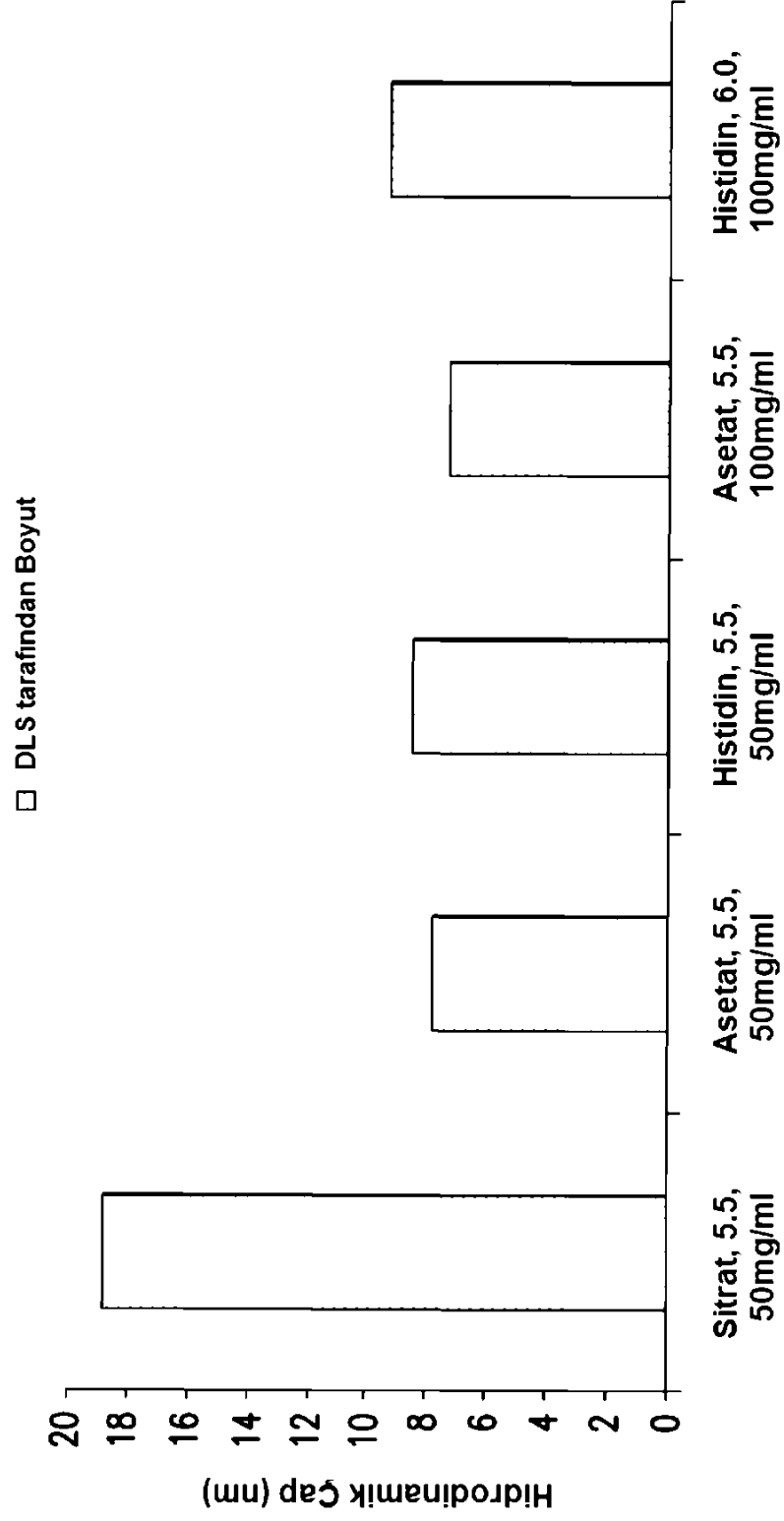
ŞEKİL 1G

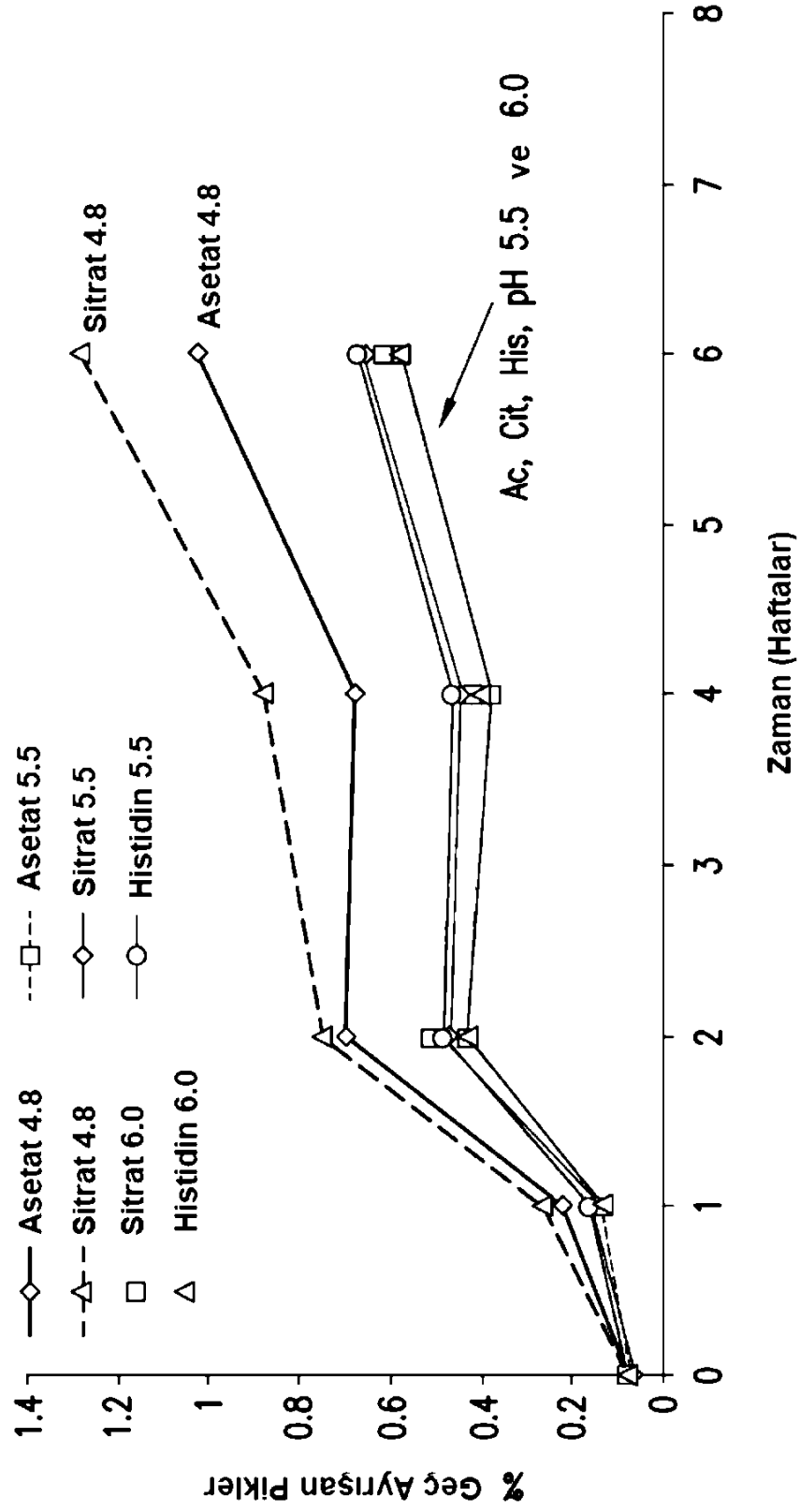


ŞEKİL 1H

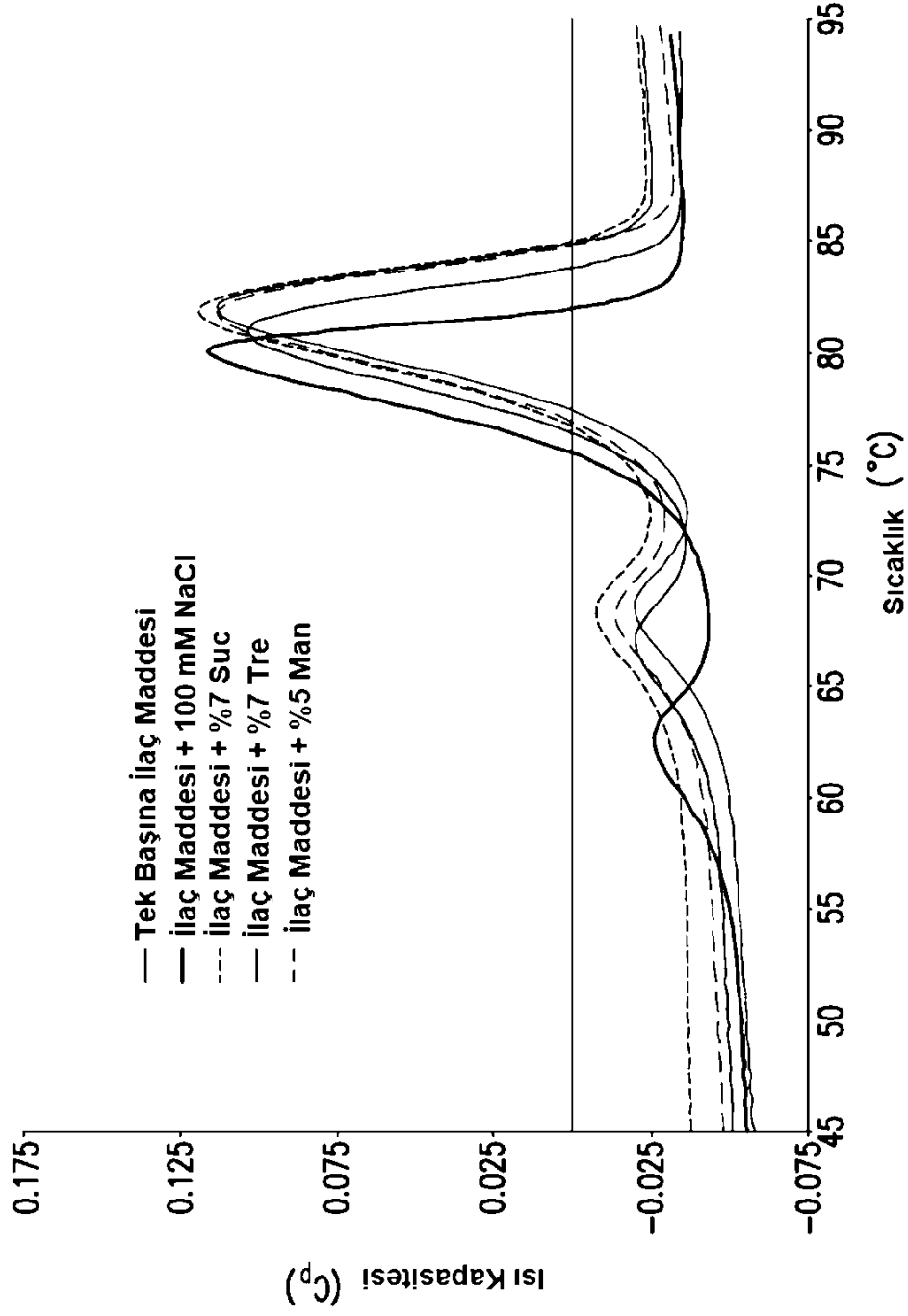


ŞEKİL 1I

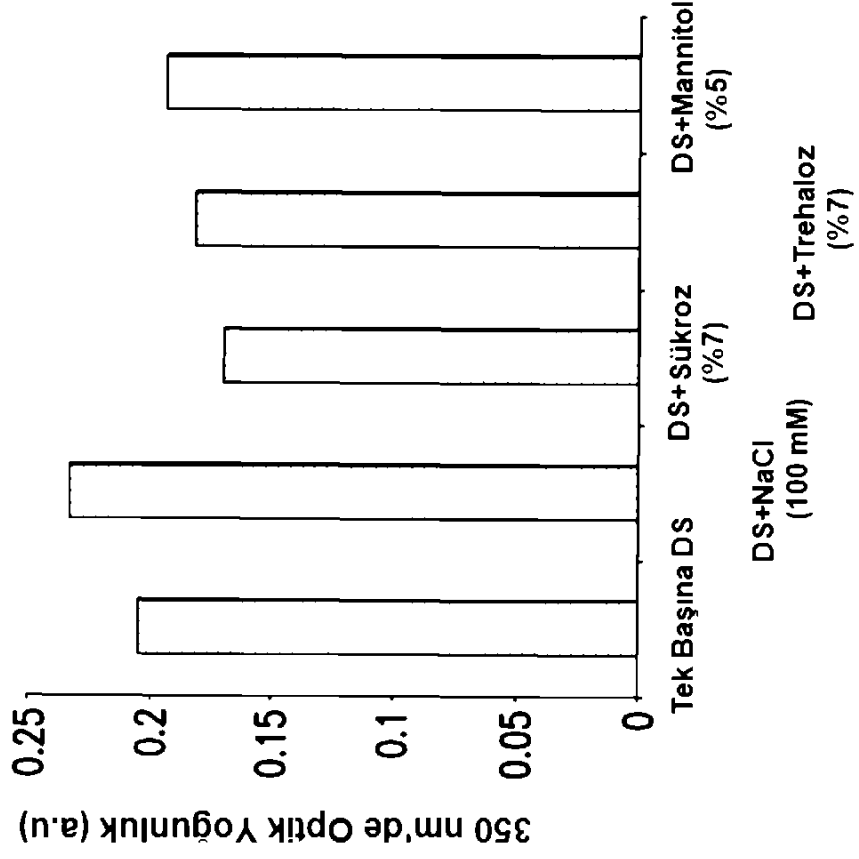
**ŞEKİL 1J**



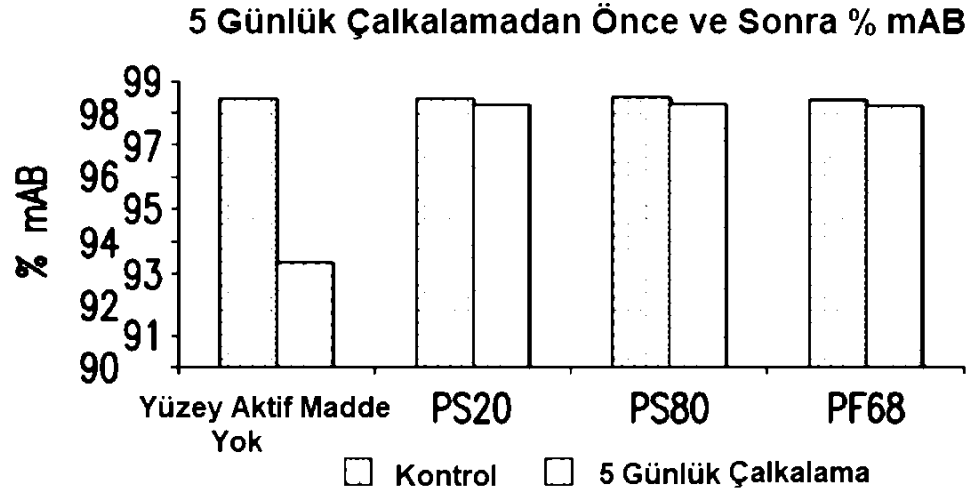
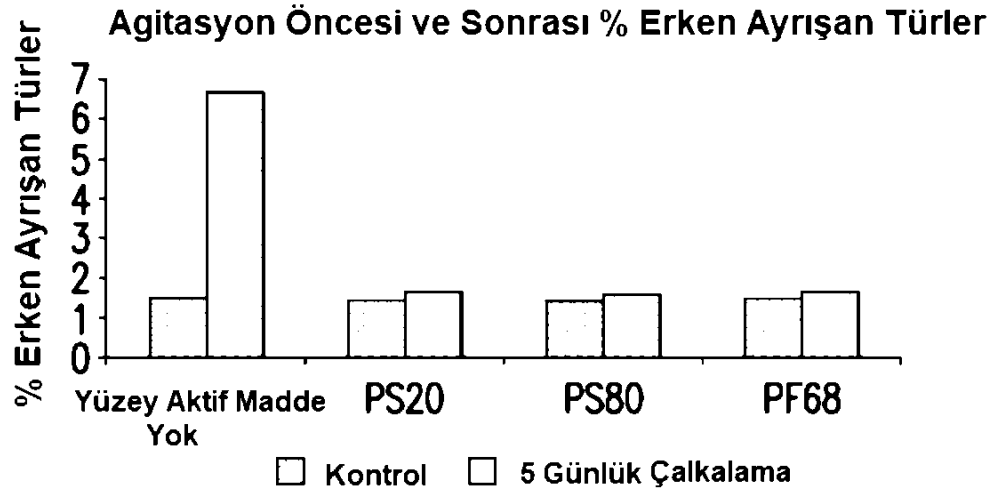
ŞEKİL 1K

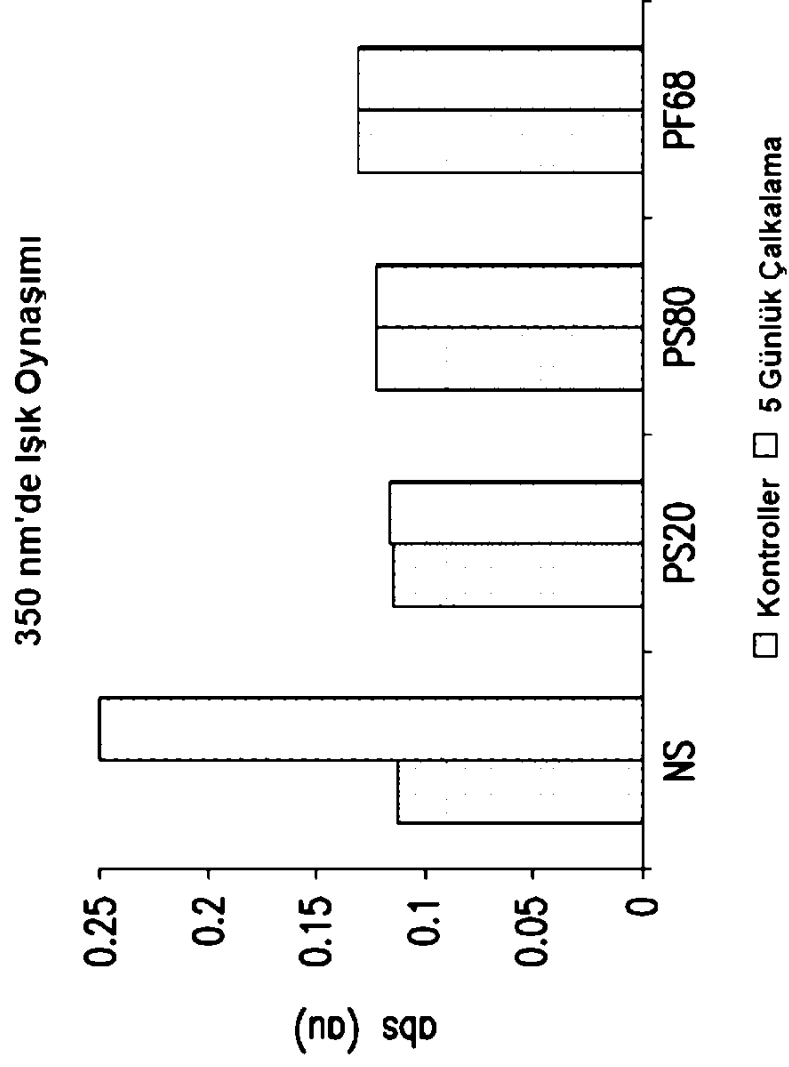


ŞEKİL 2A

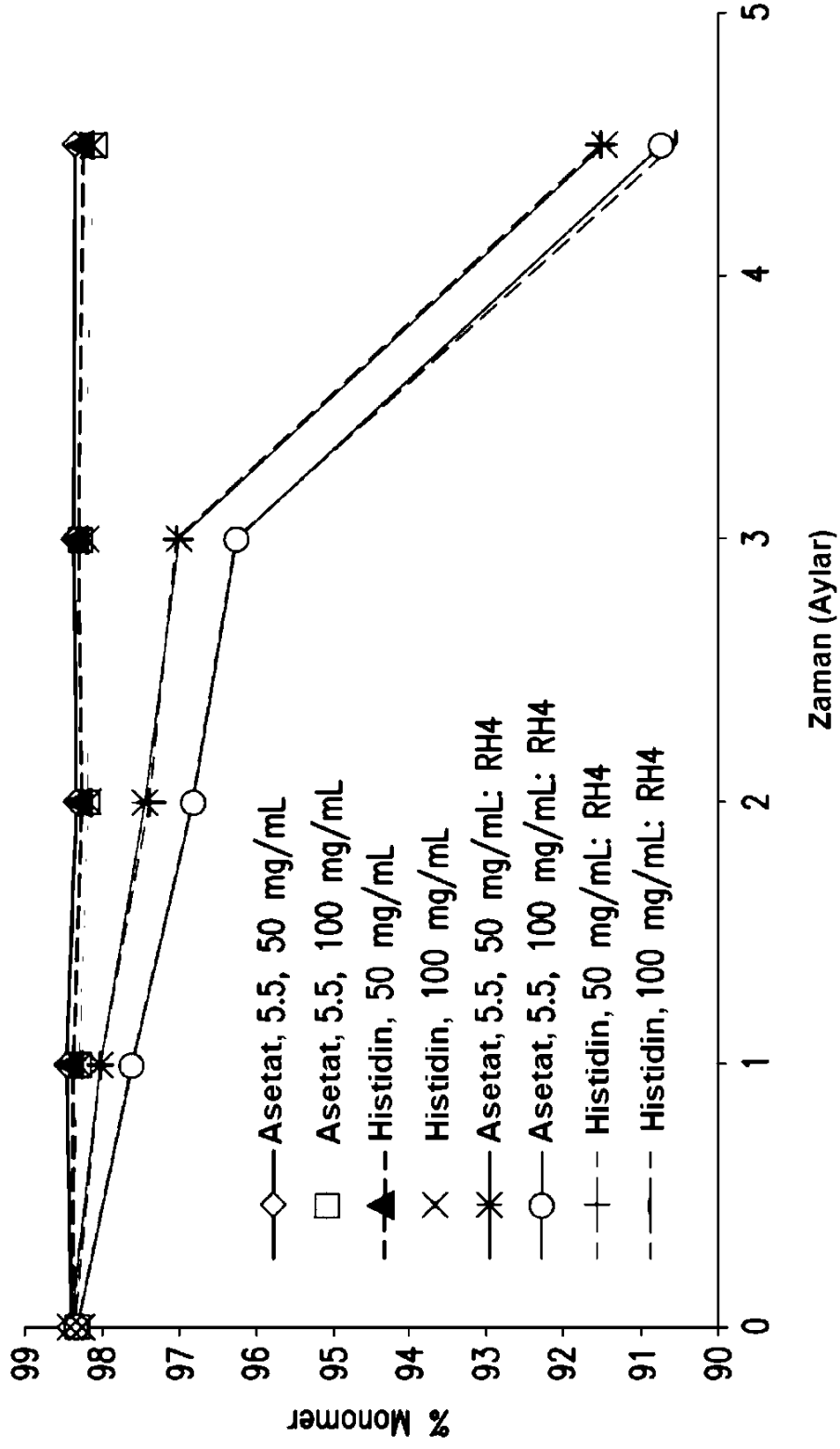


ŞEKİL 2B

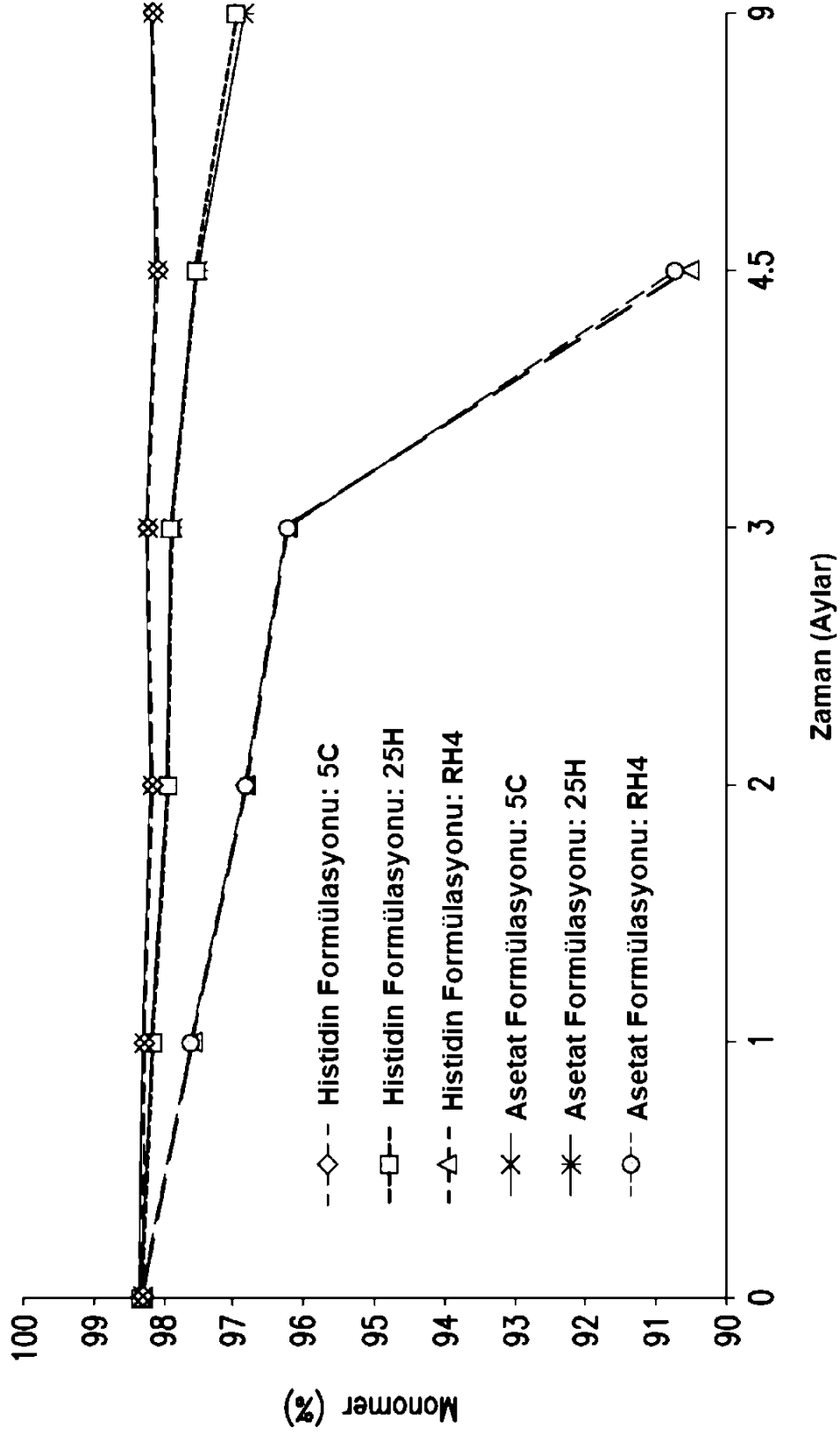
**ŞEKİL 3A****ŞEKİL 3B**



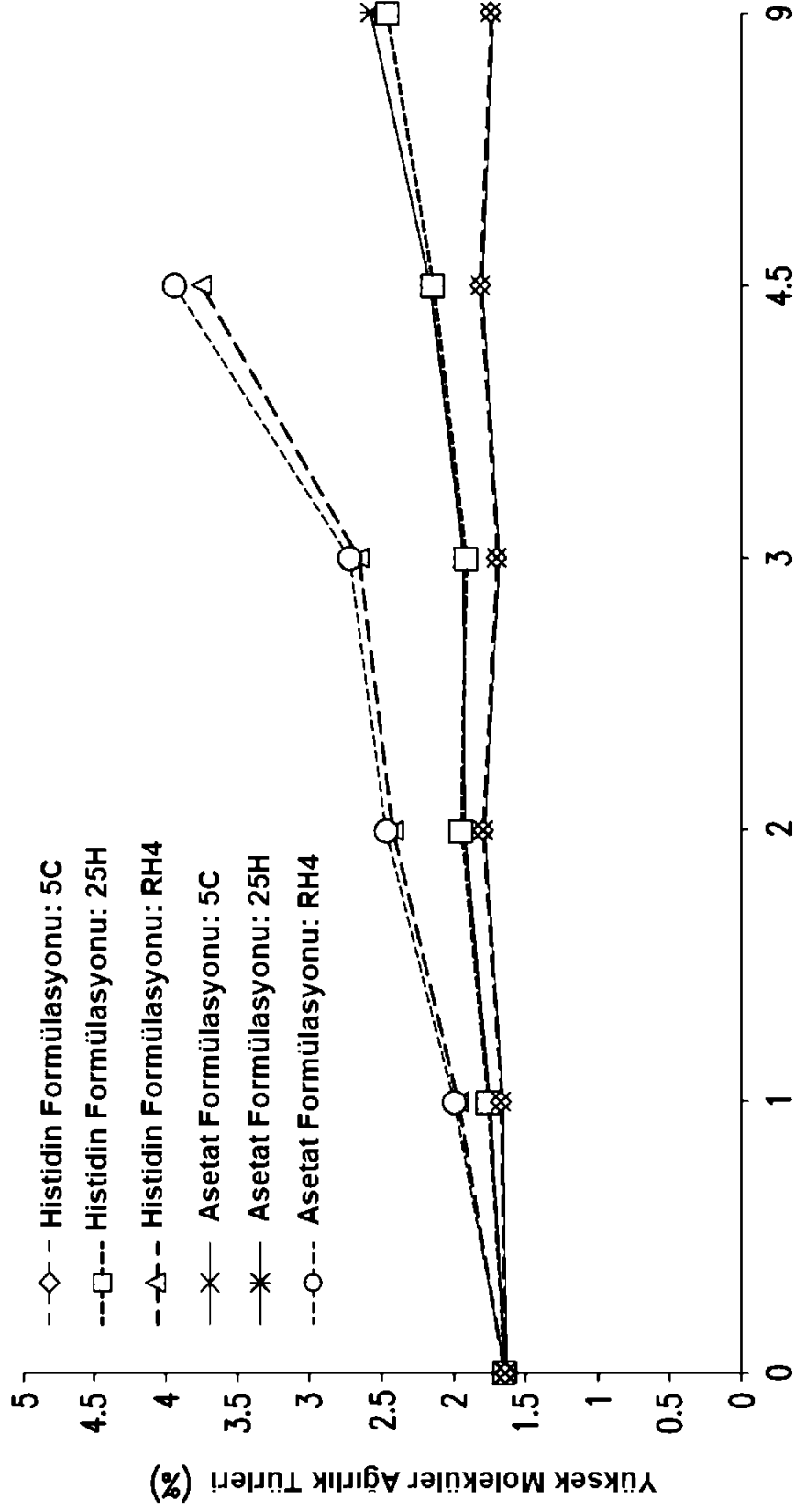
ŞEKİL 3C



ŞEKİL 4A

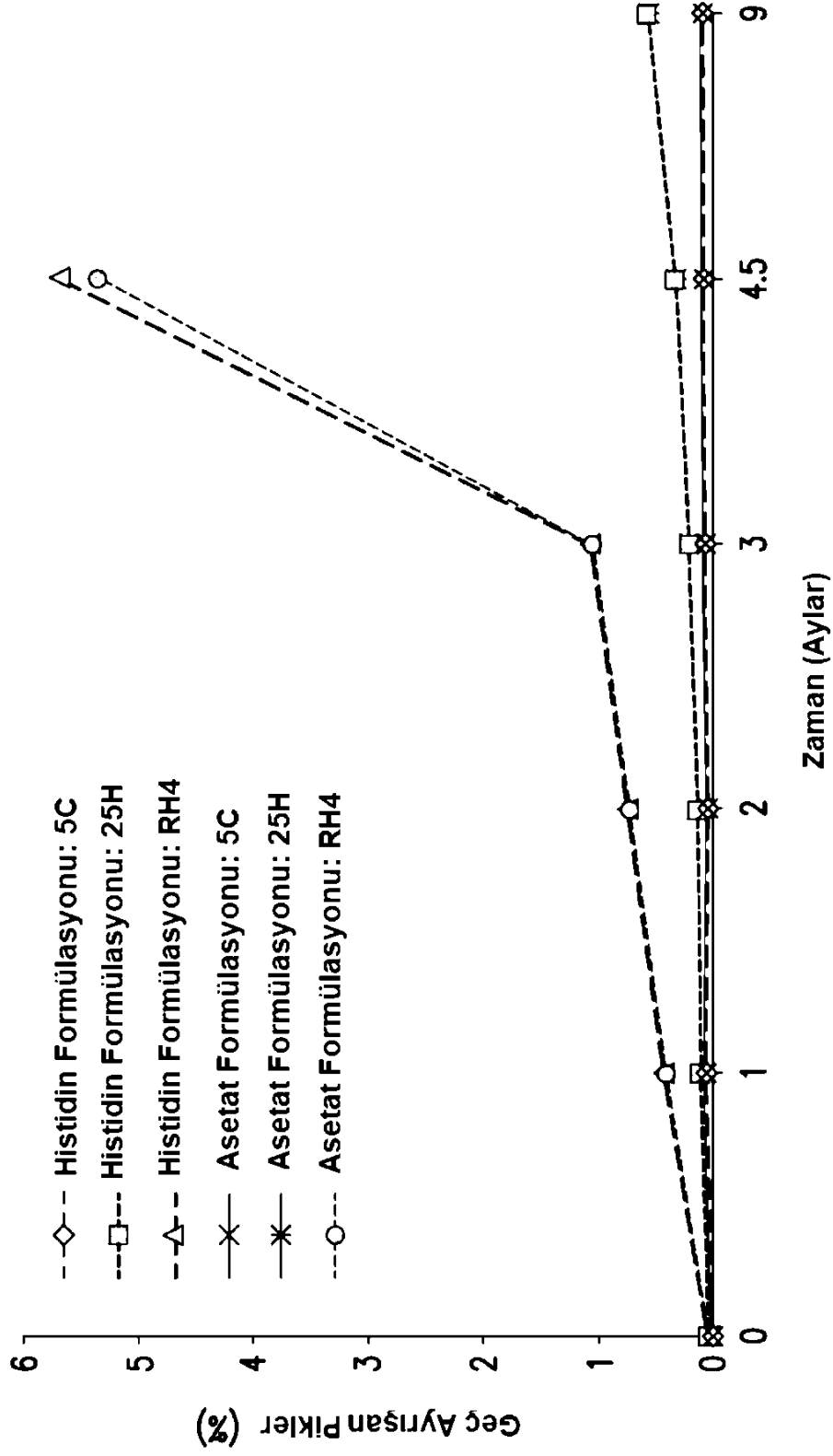


ŞEKİL 4B

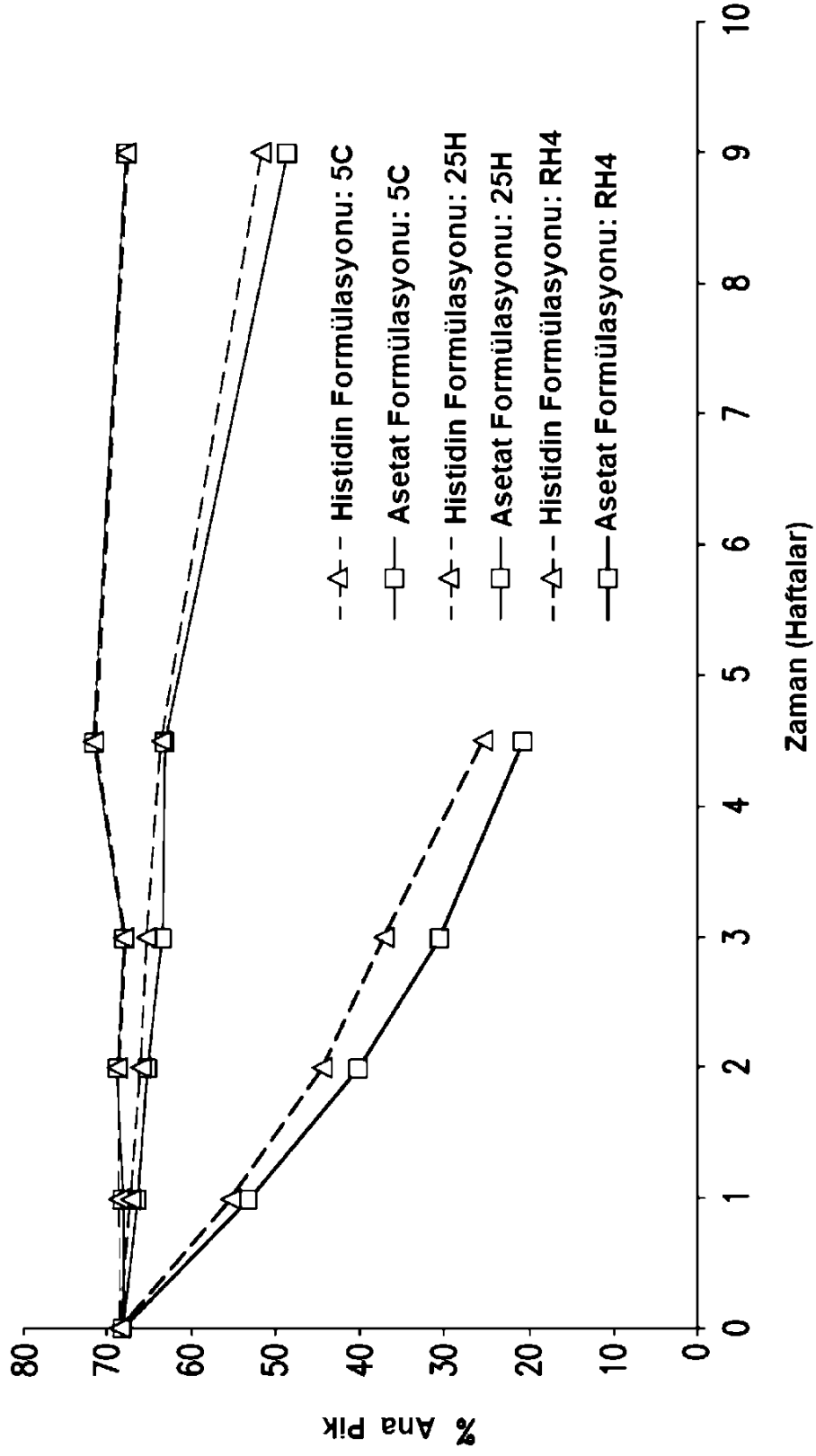


Zaman (Aylar)

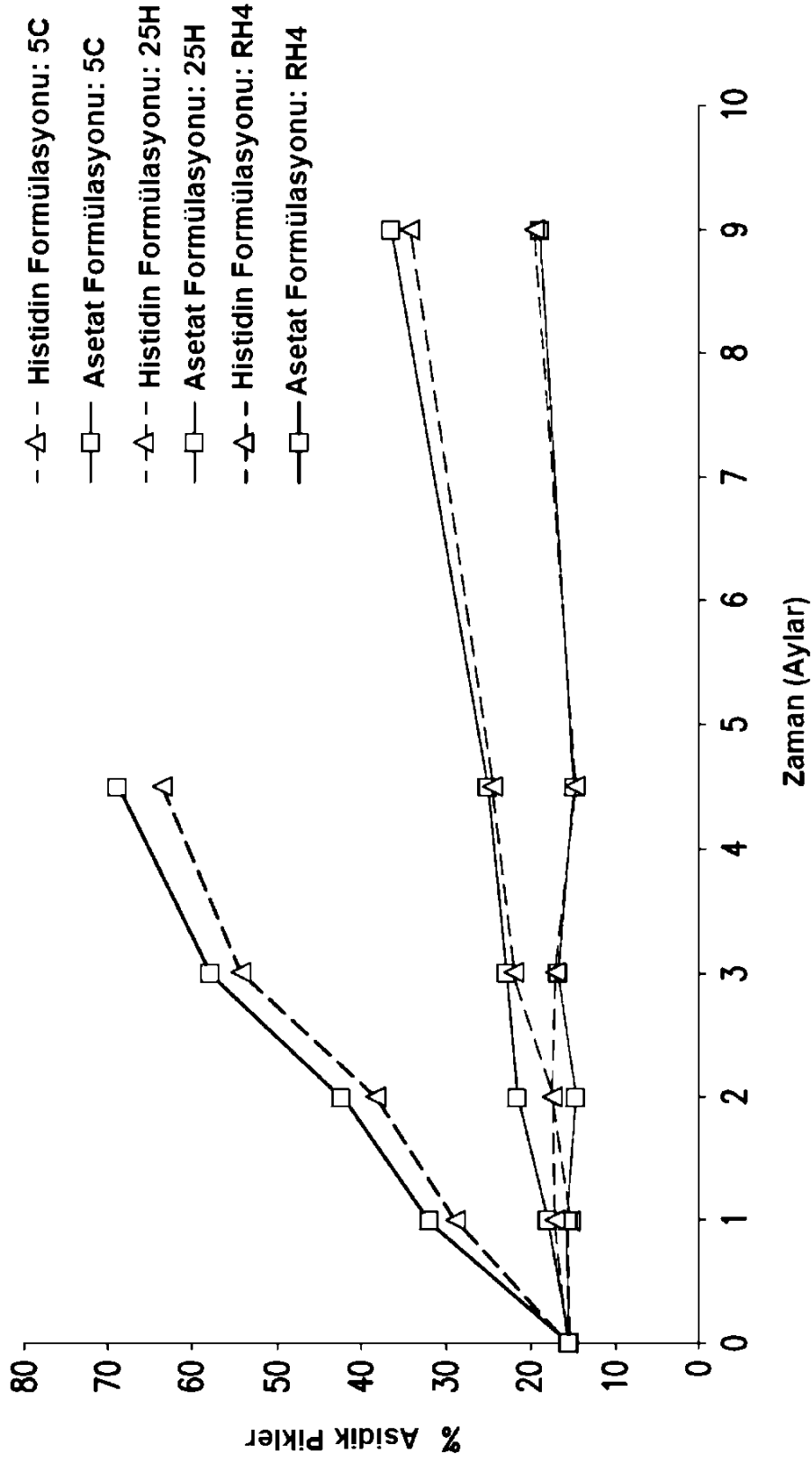
ŞEKİL 4C



ŞEKİL 4D

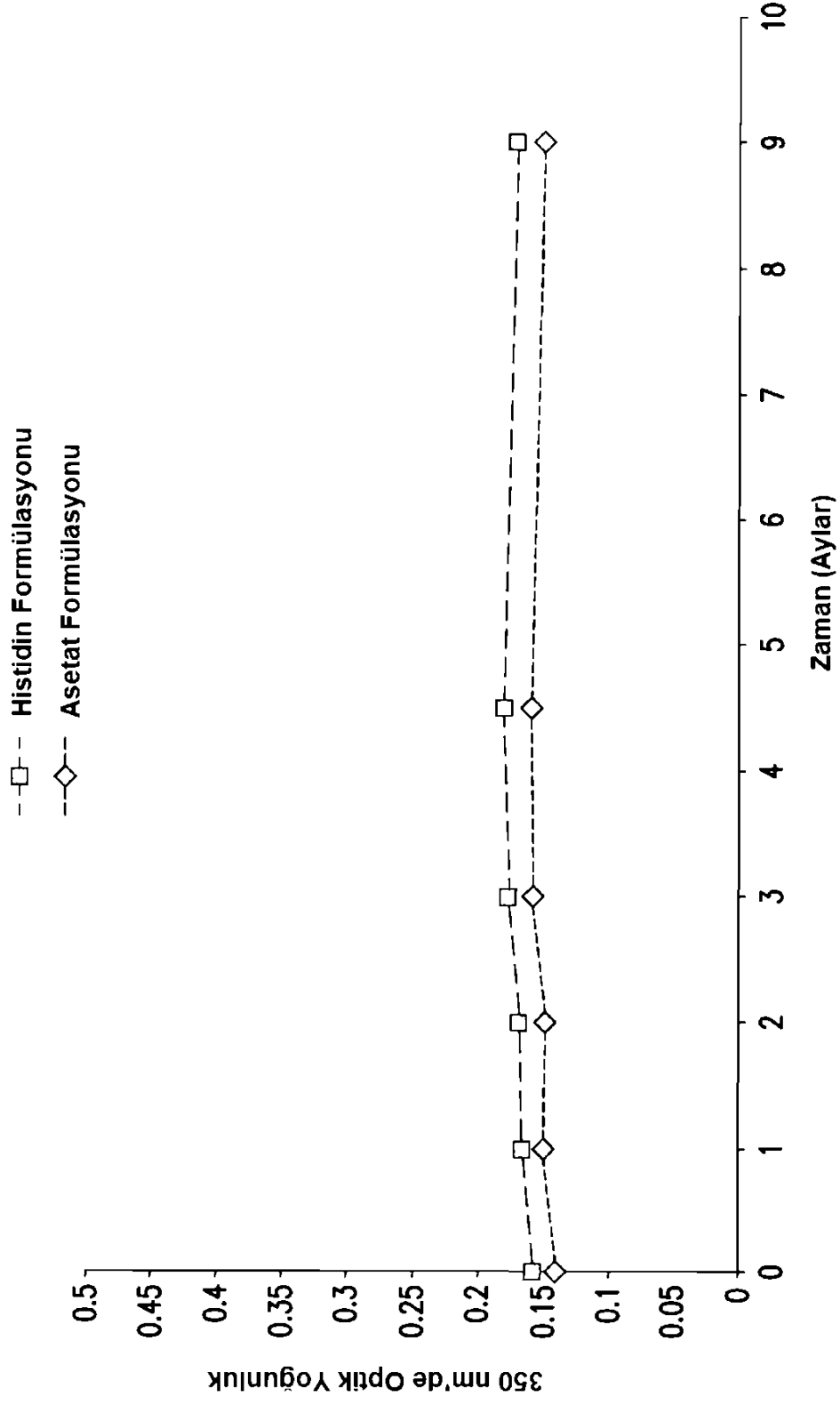


ŞEKİL 4E

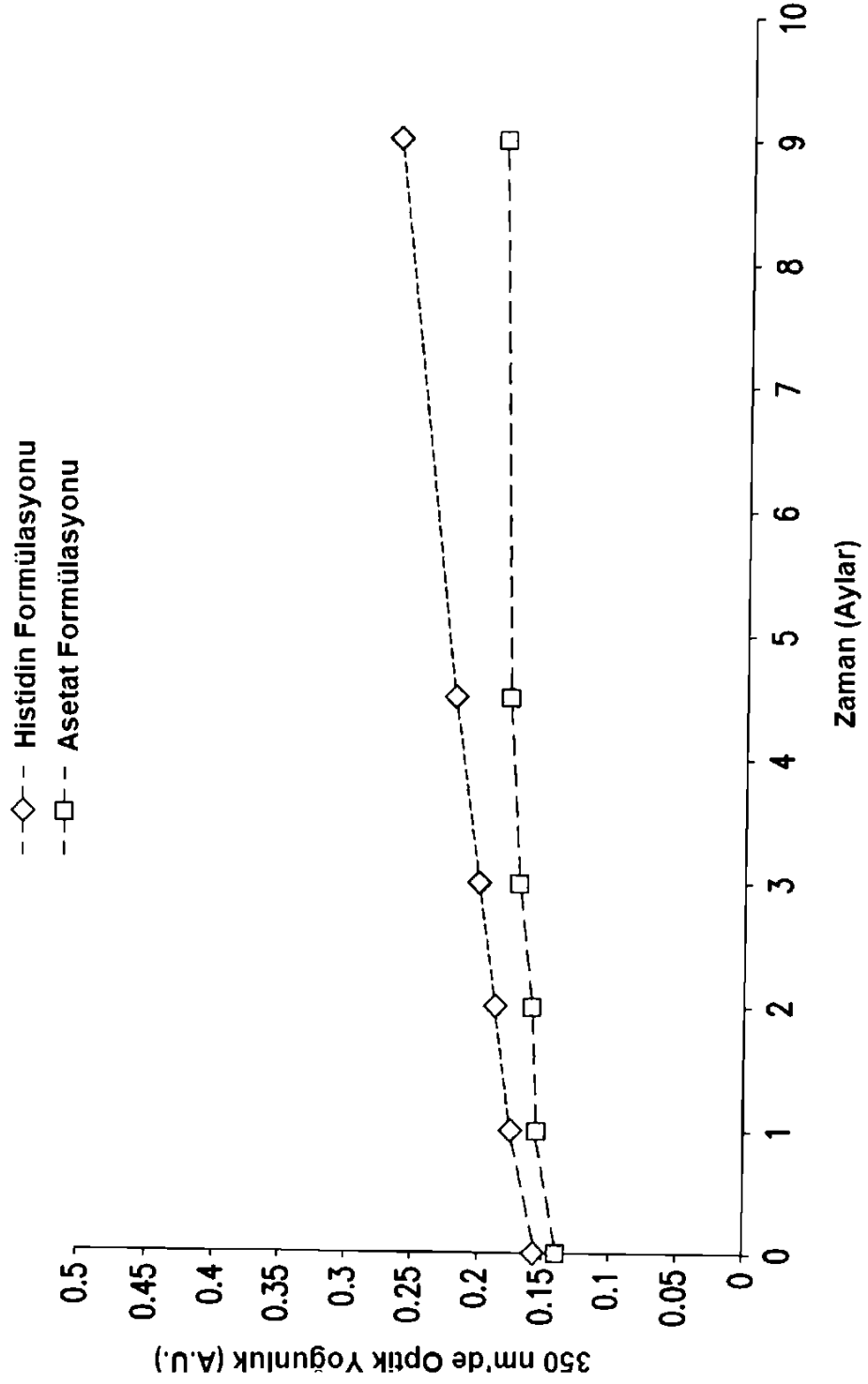


Zaman (Aylar)

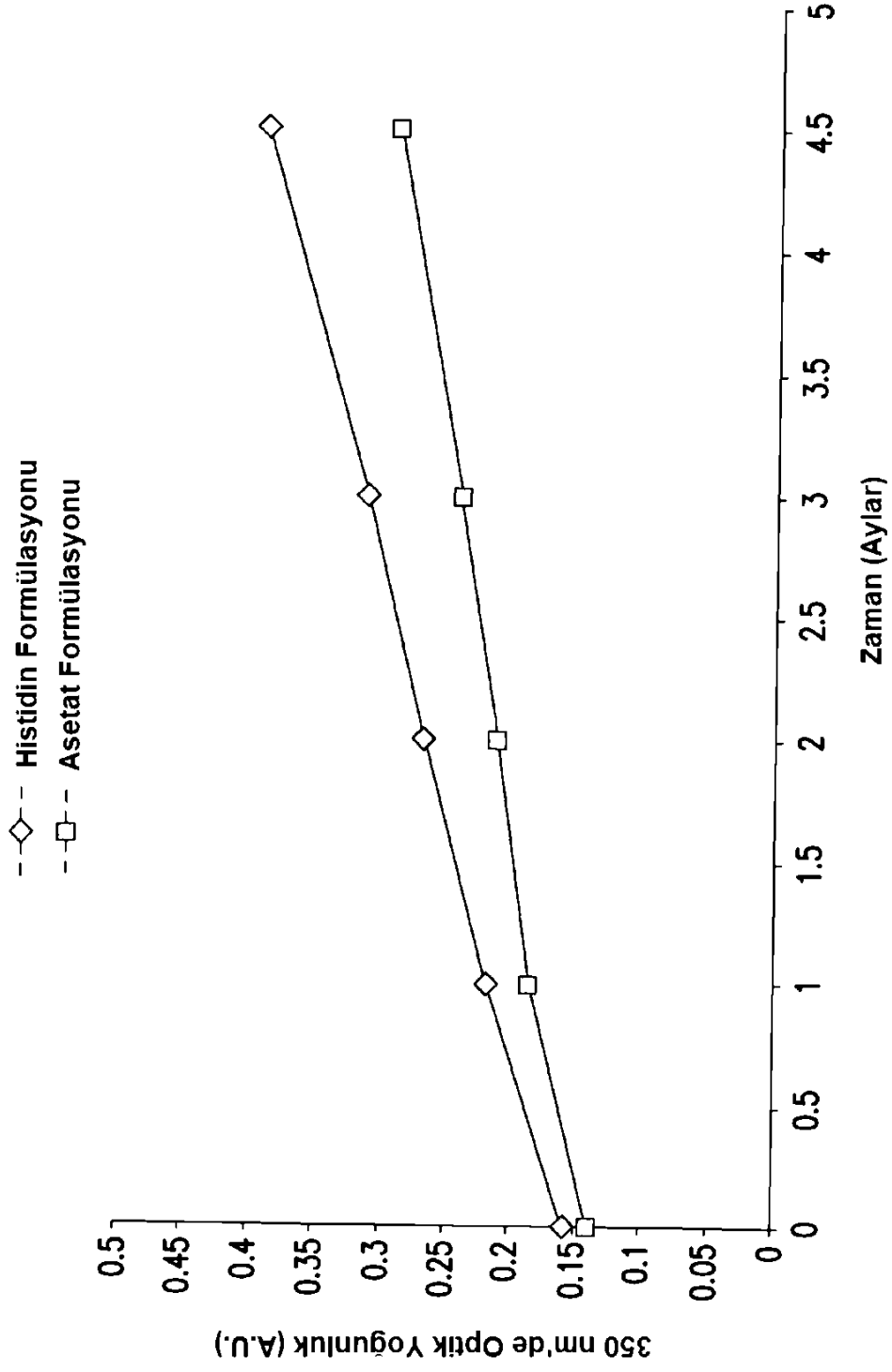
ŞEKİL 4F



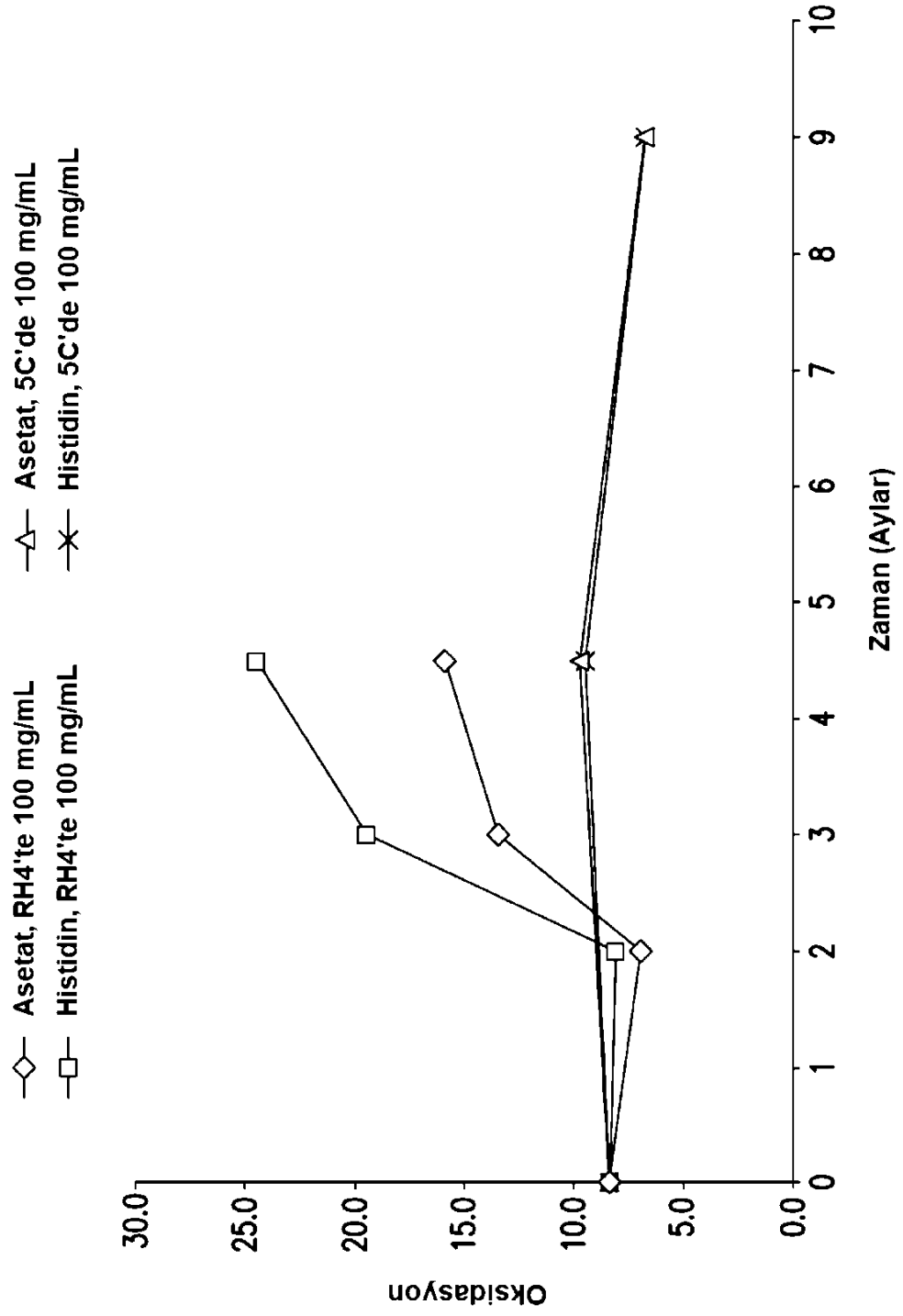
ŞEKİL 4G



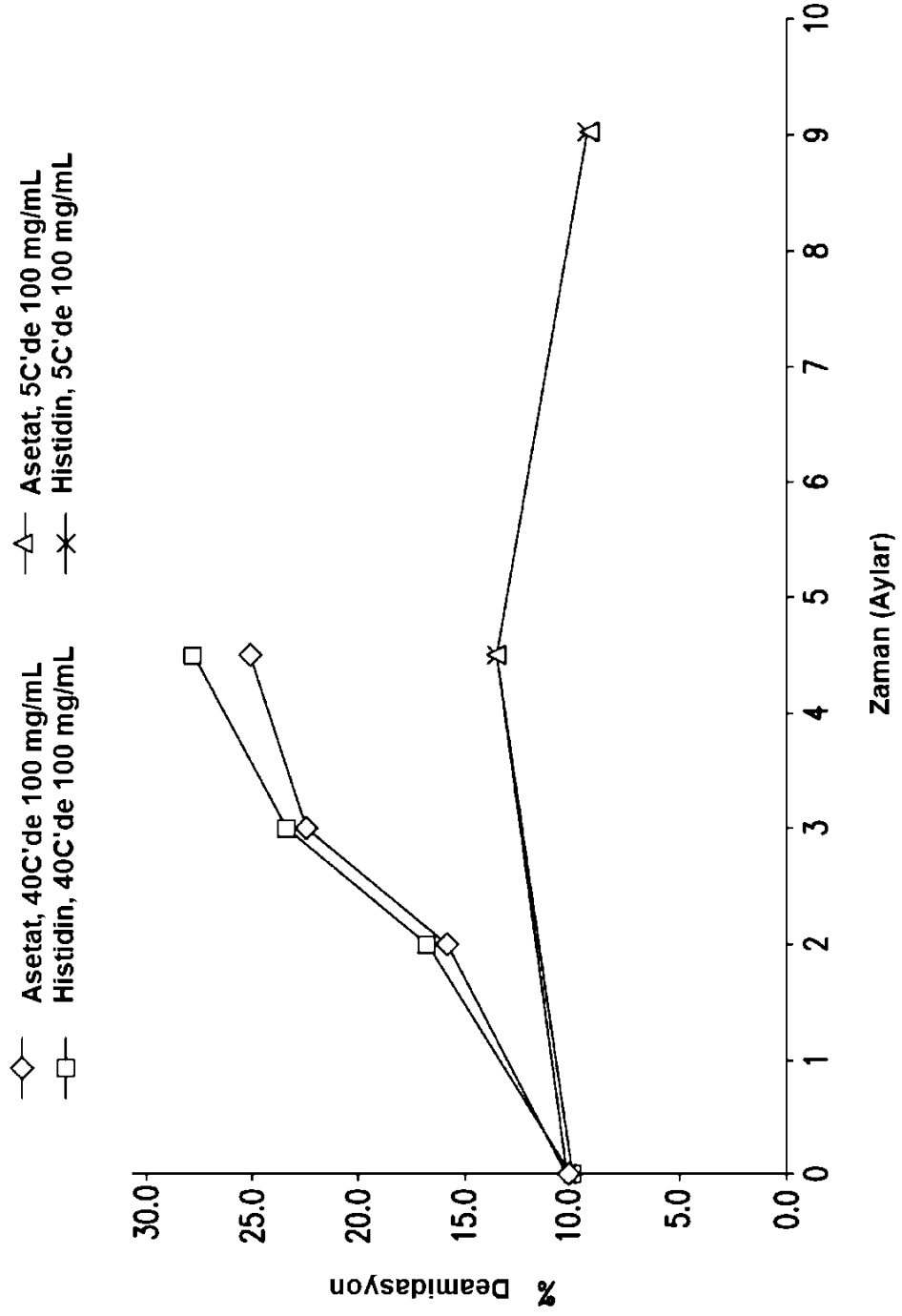
ŞEKİL 4H



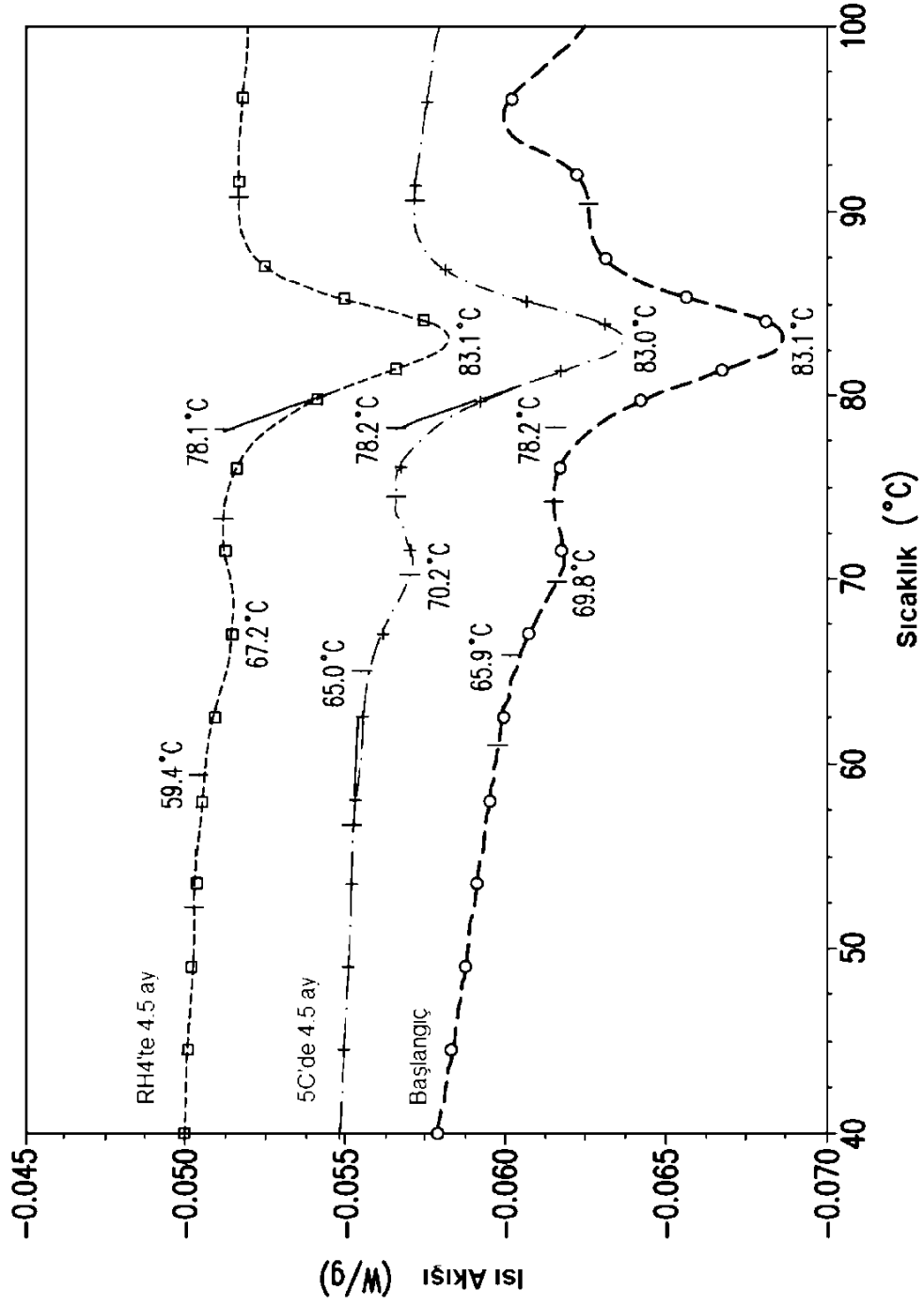
ŞEKİL 4I



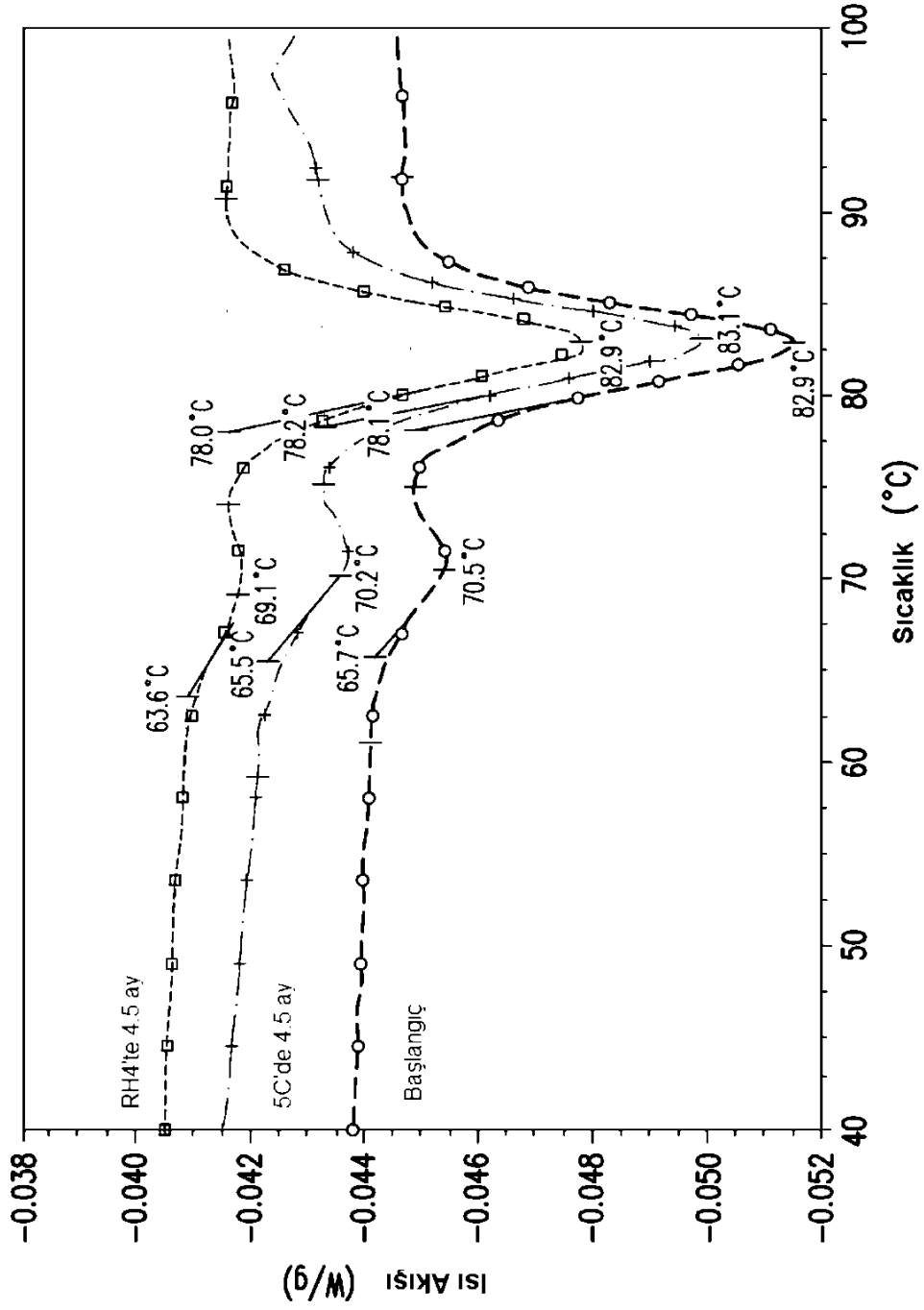
ŞEKİL 4J



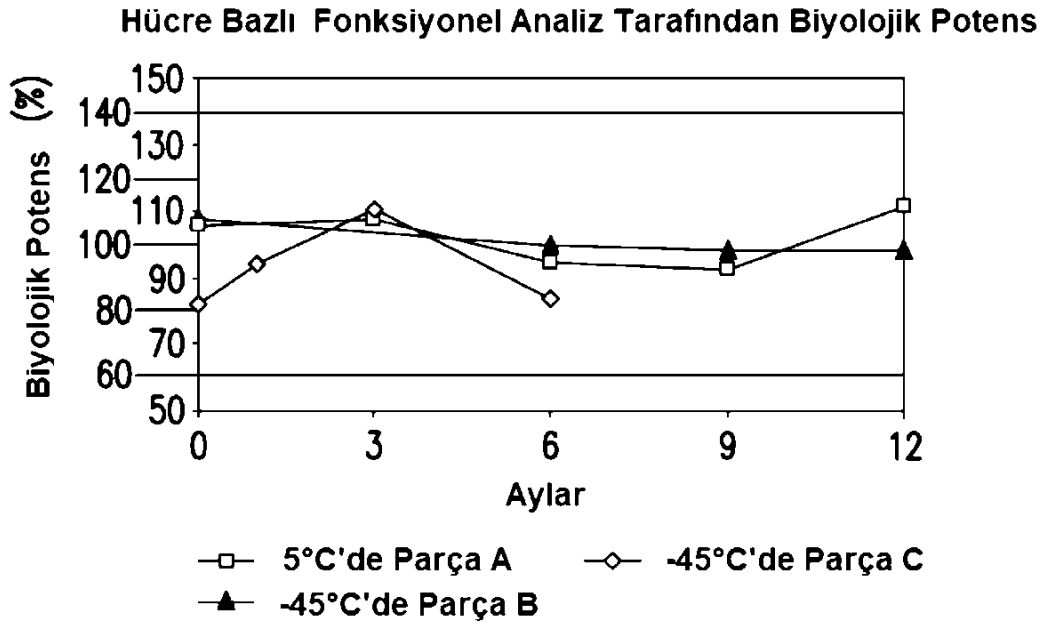
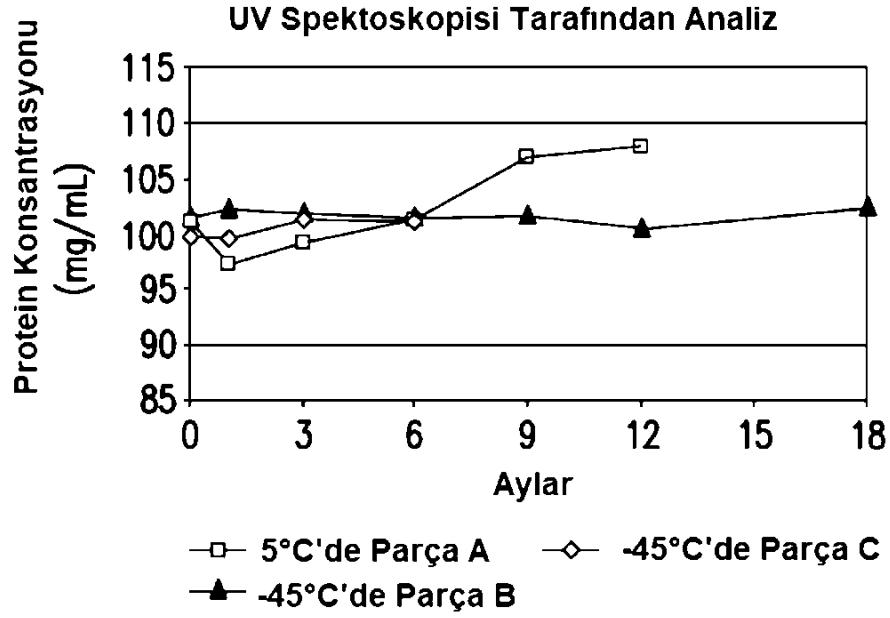
ŞEKİL 4K

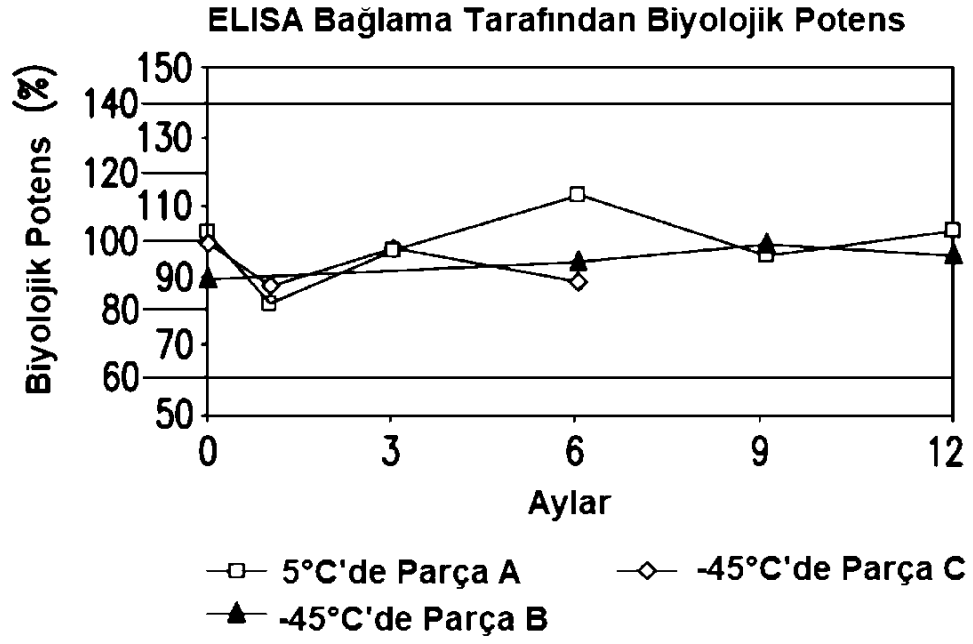


ŞEKİL 4L

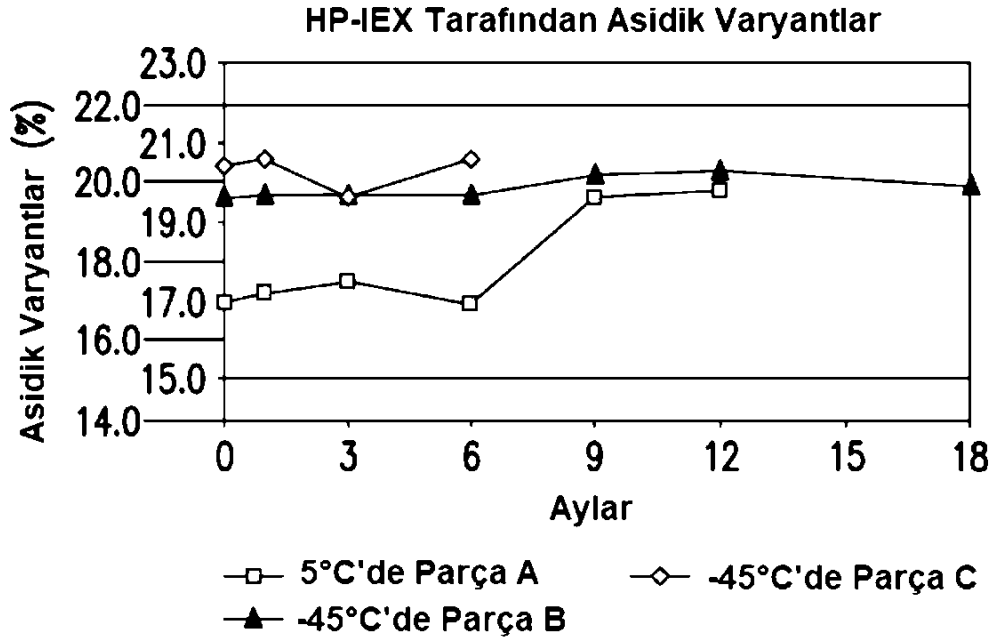


ŞEKİL 4M

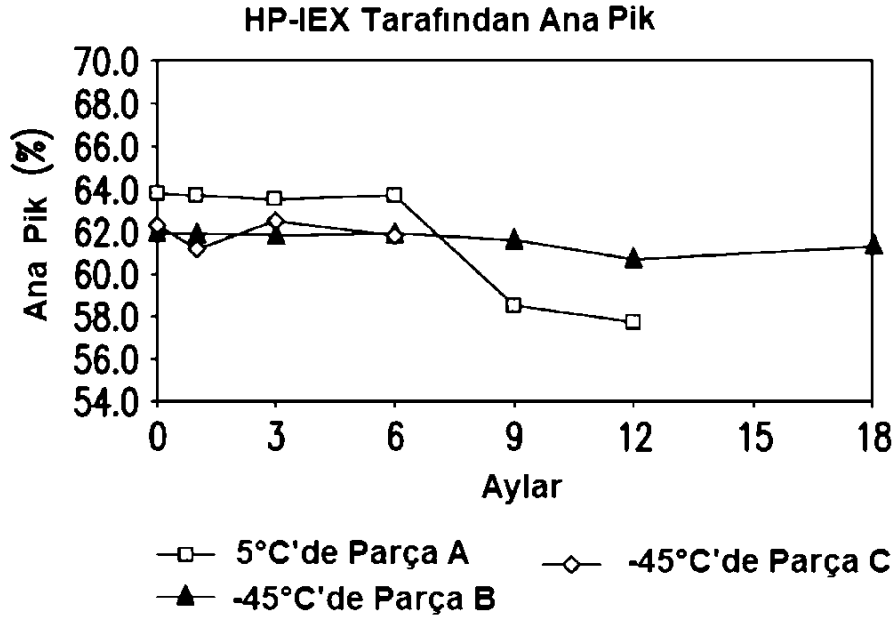
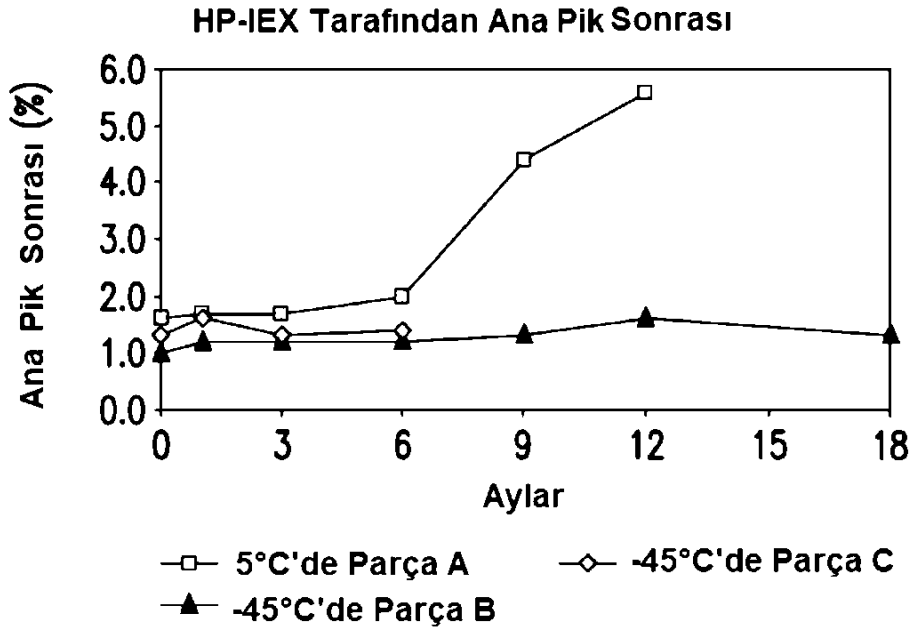


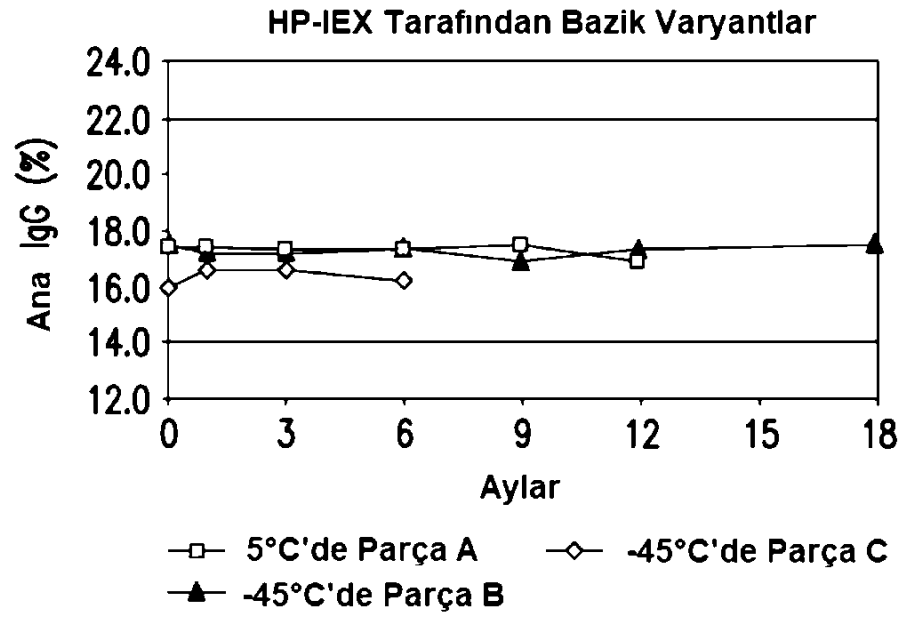


ŞEKİL 5C

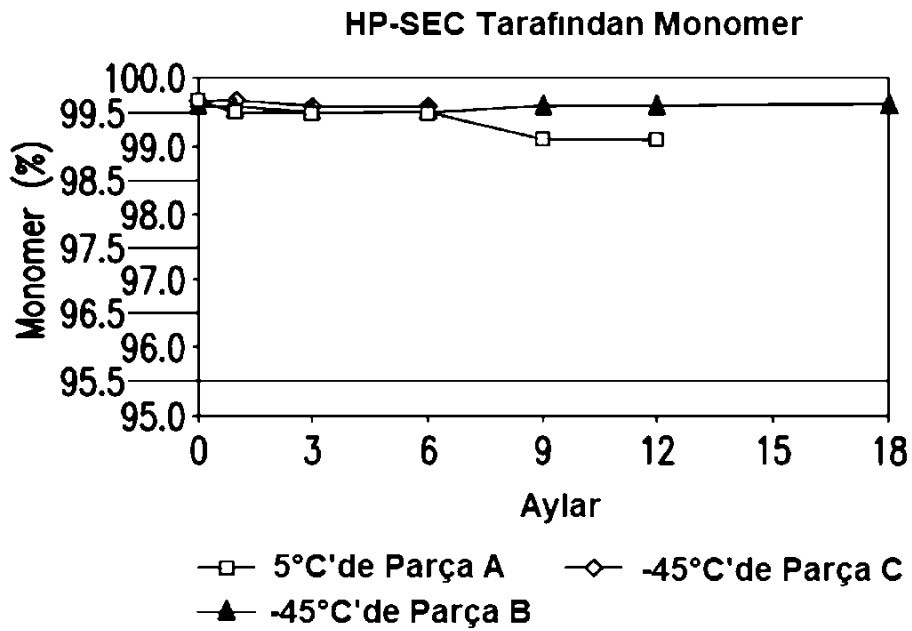


ŞEKİL 5D

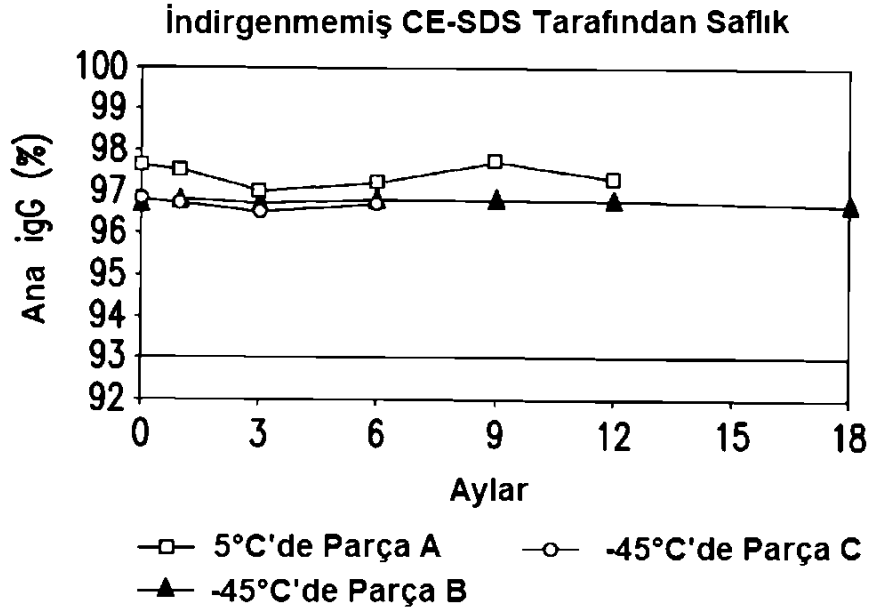
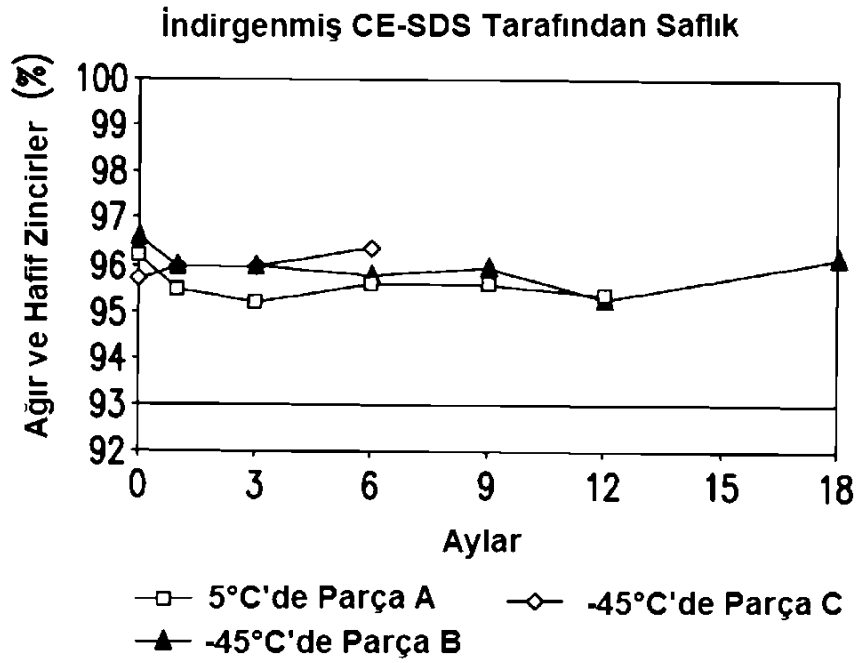
**ŞEKİL 5E****ŞEKİL 5F**

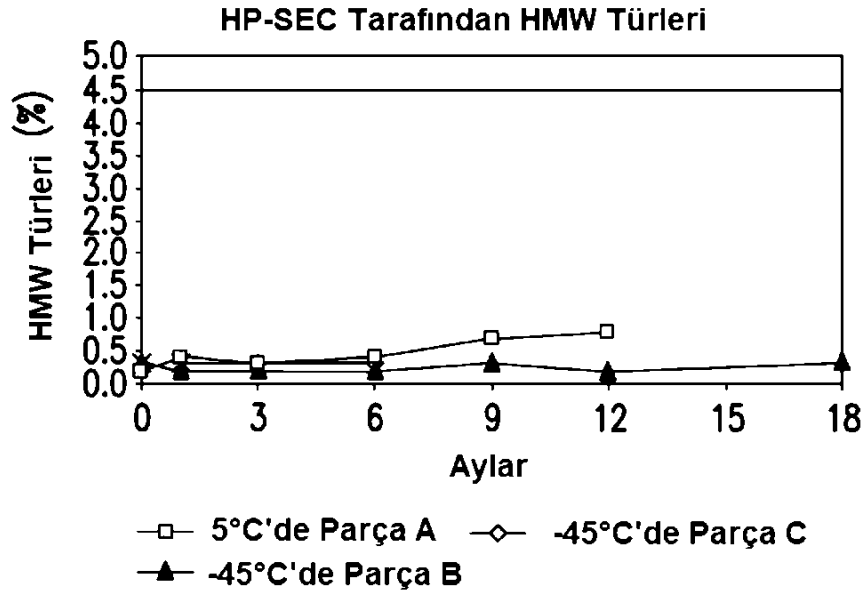
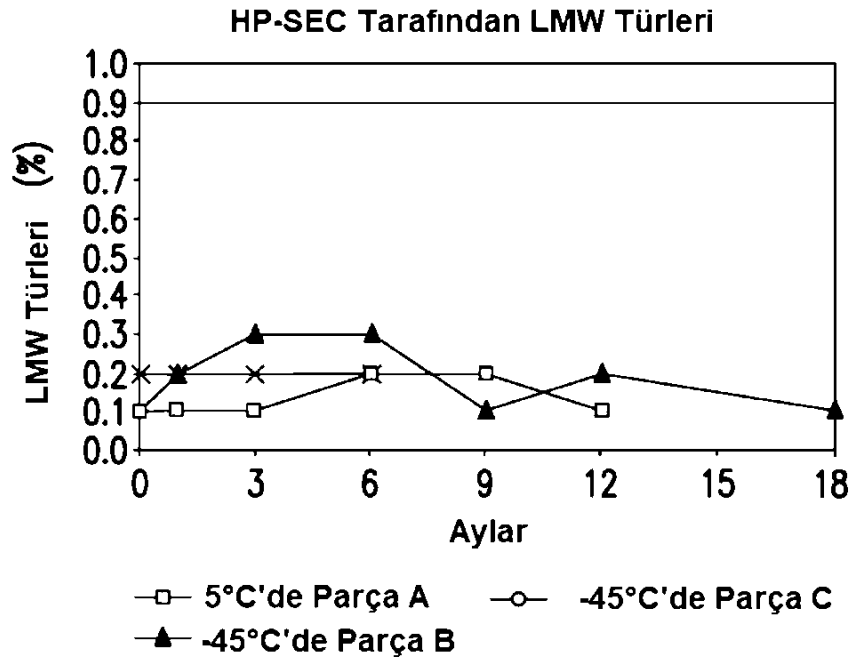


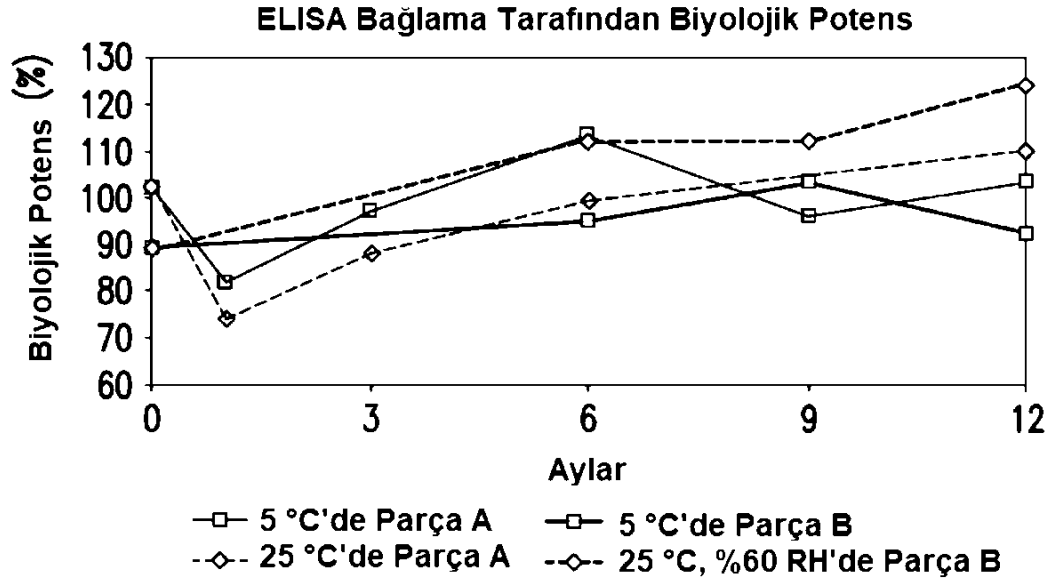
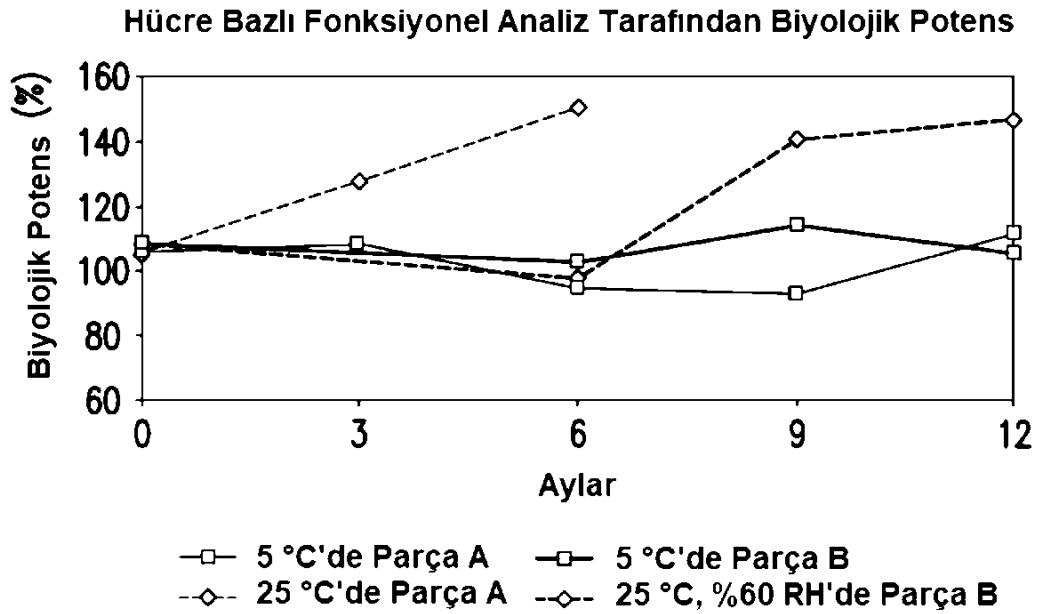
ŞEKİL 5G

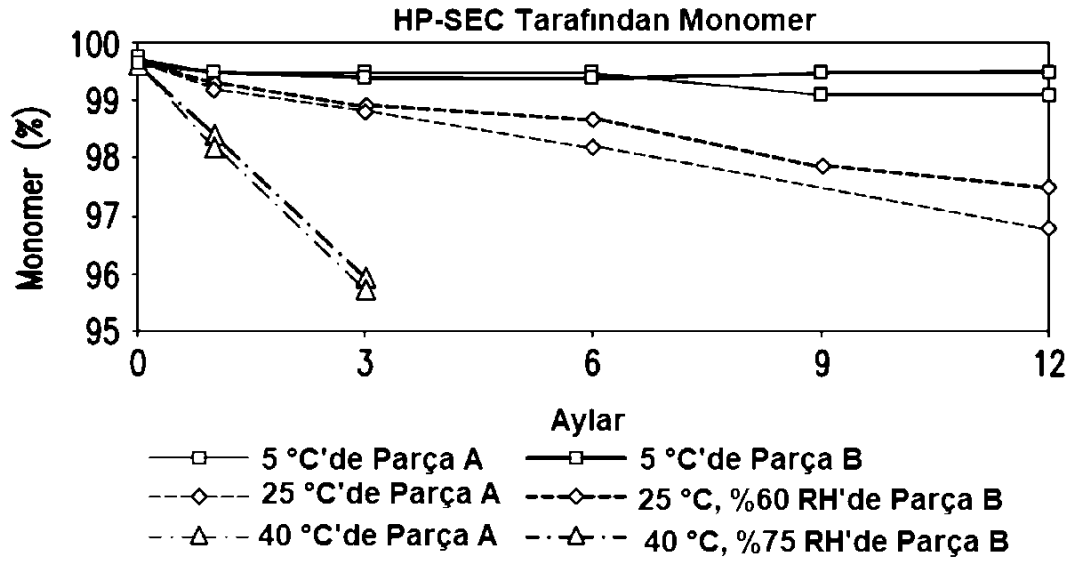
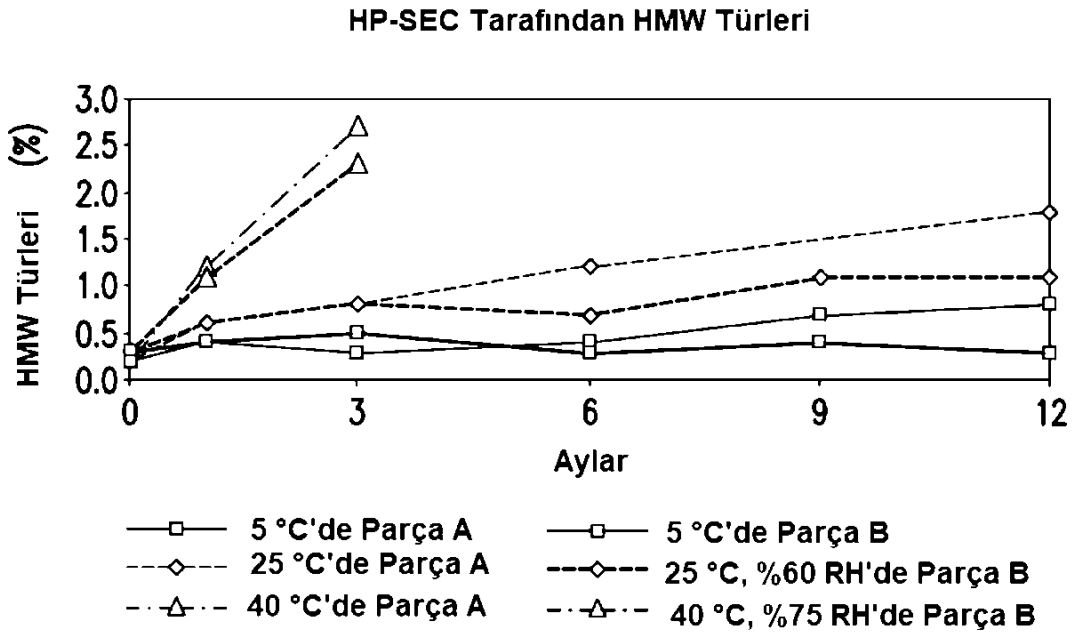


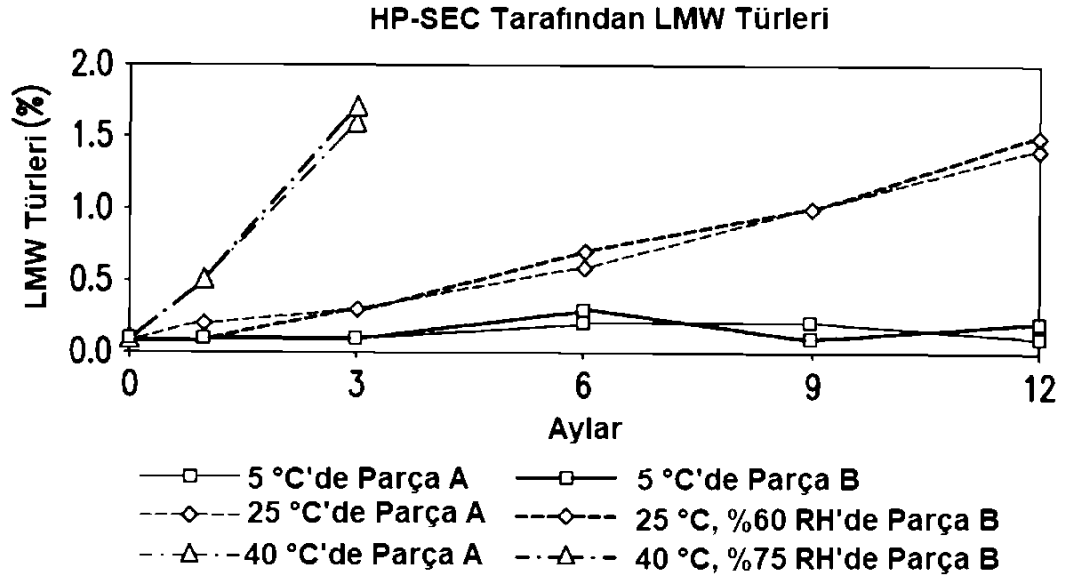
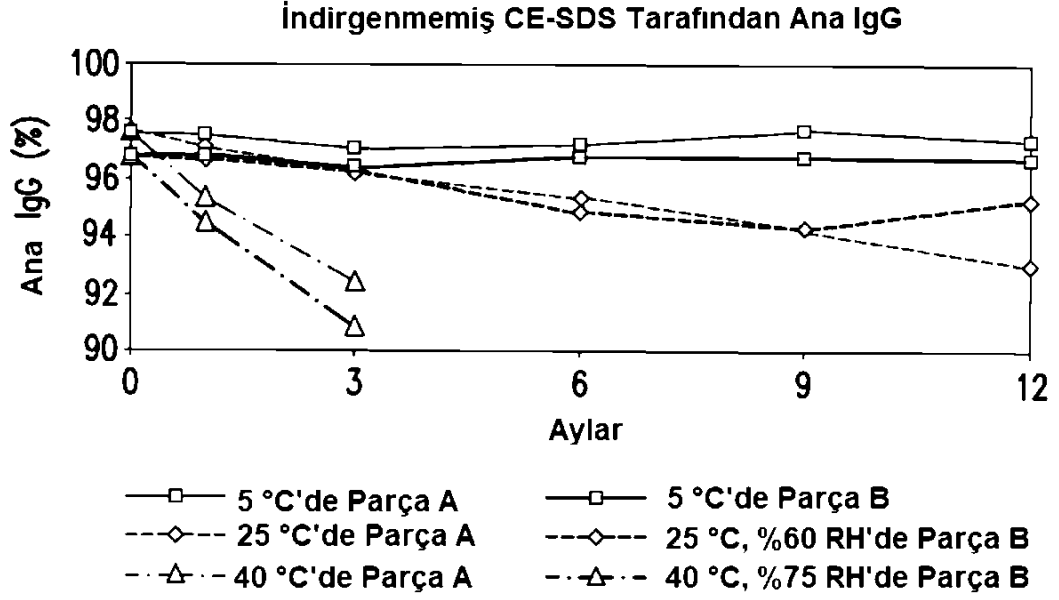
ŞEKİL 5H

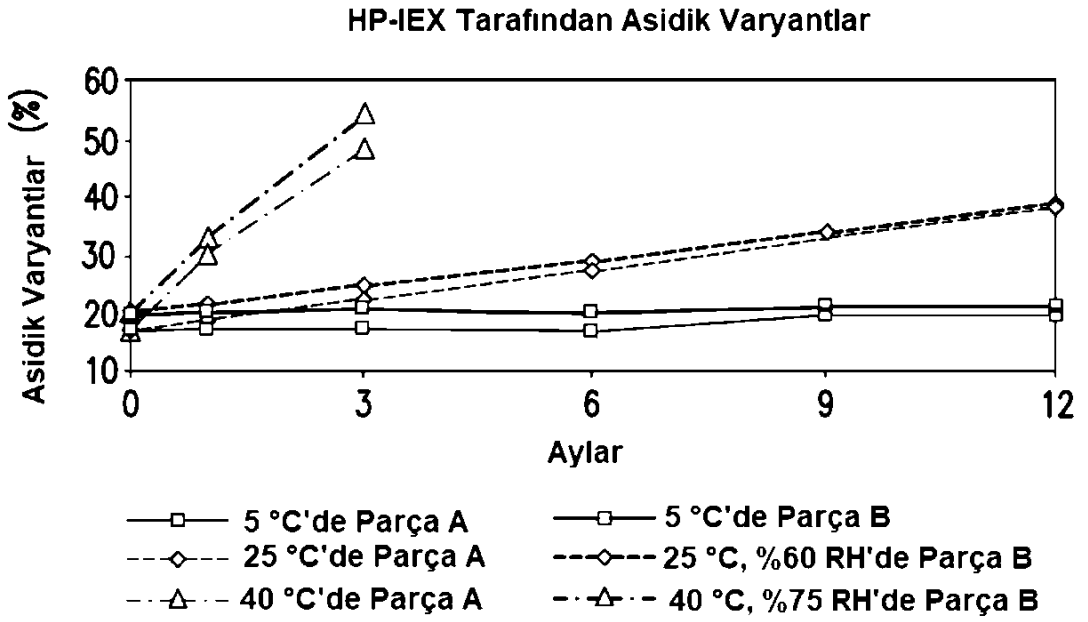
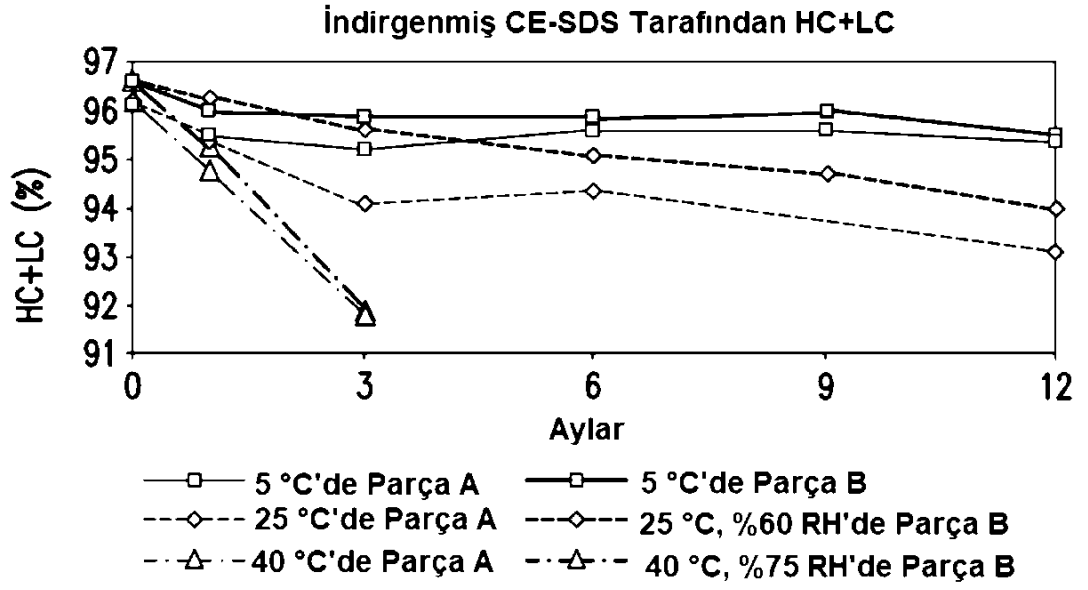
**ŞEKİL 5I****ŞEKİL 5J**

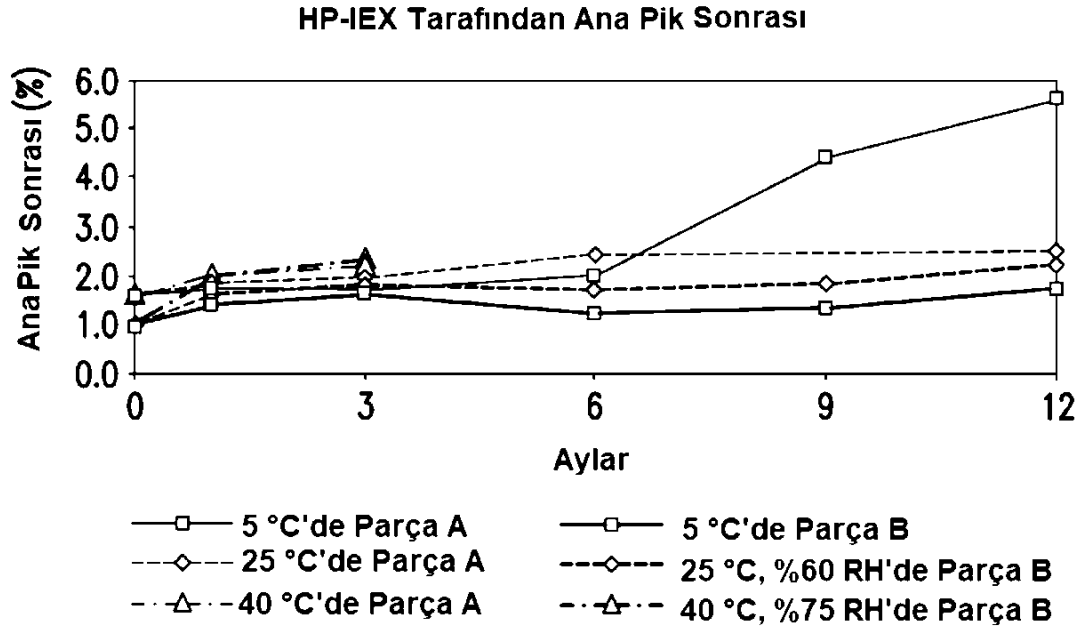
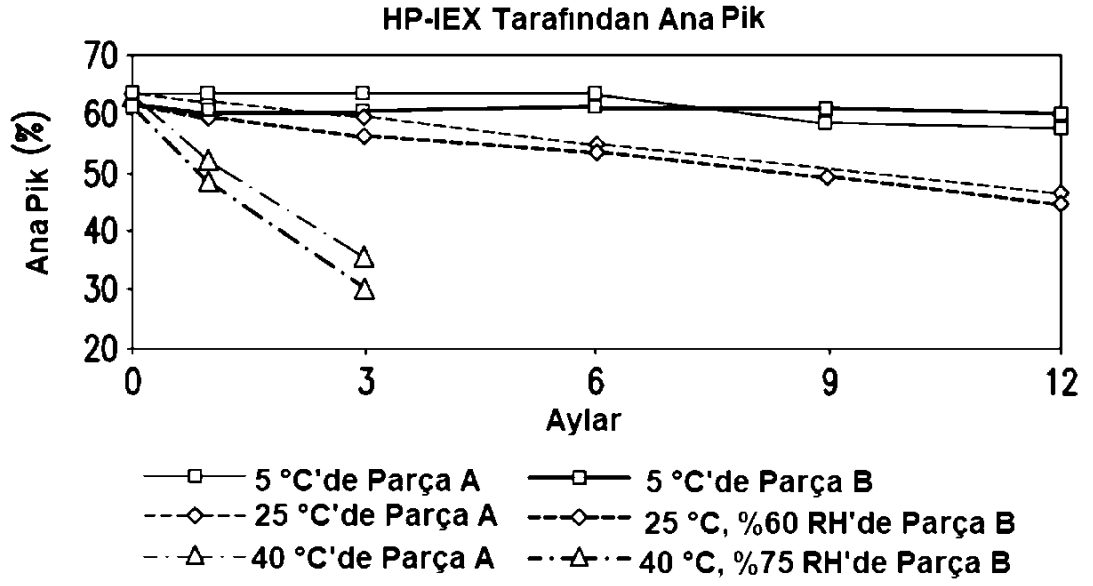
**ŞEKİL 5K****ŞEKİL 5L**

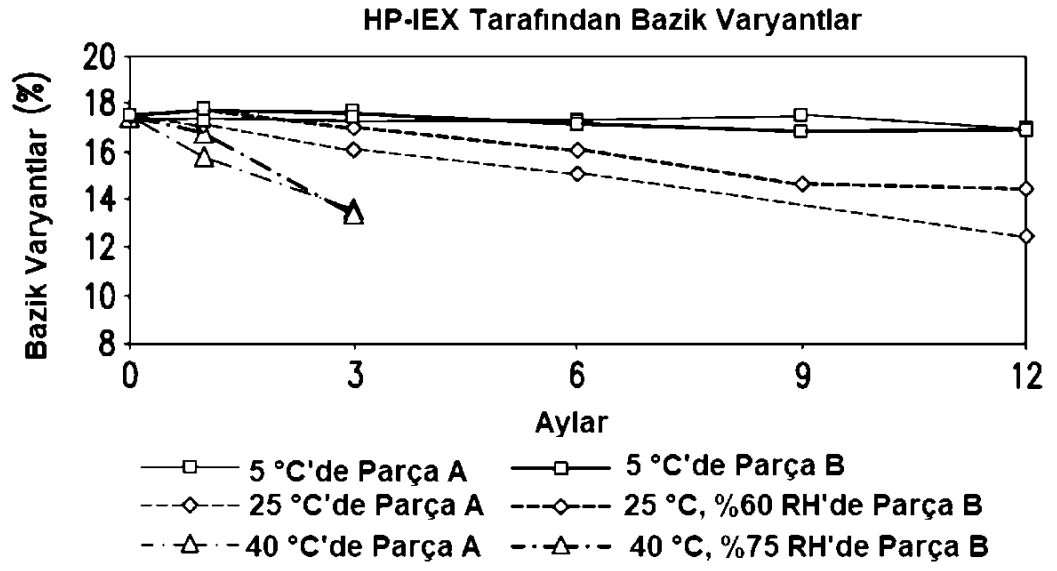
**ŞEKİL 6A****ŞEKİL 6B**

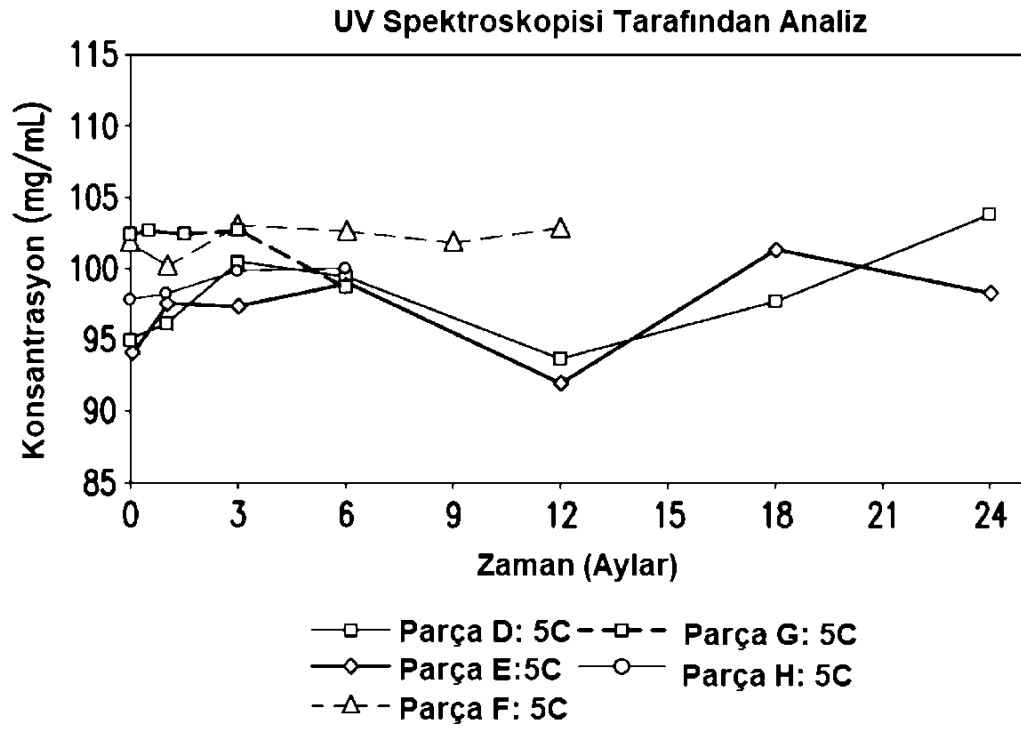
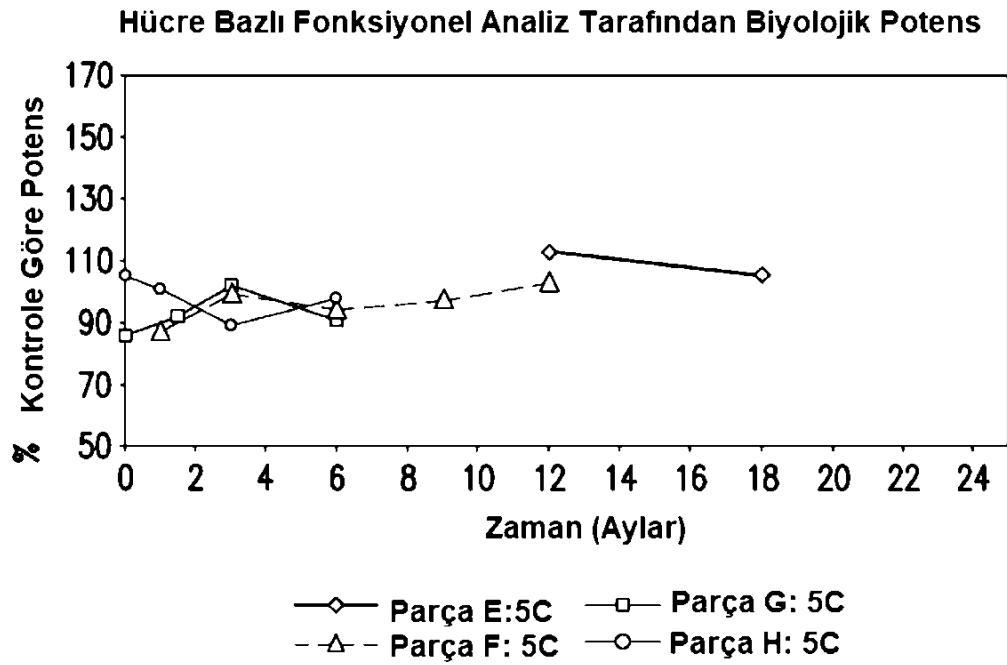
**ŞEKİL 6C****ŞEKİL 6D**

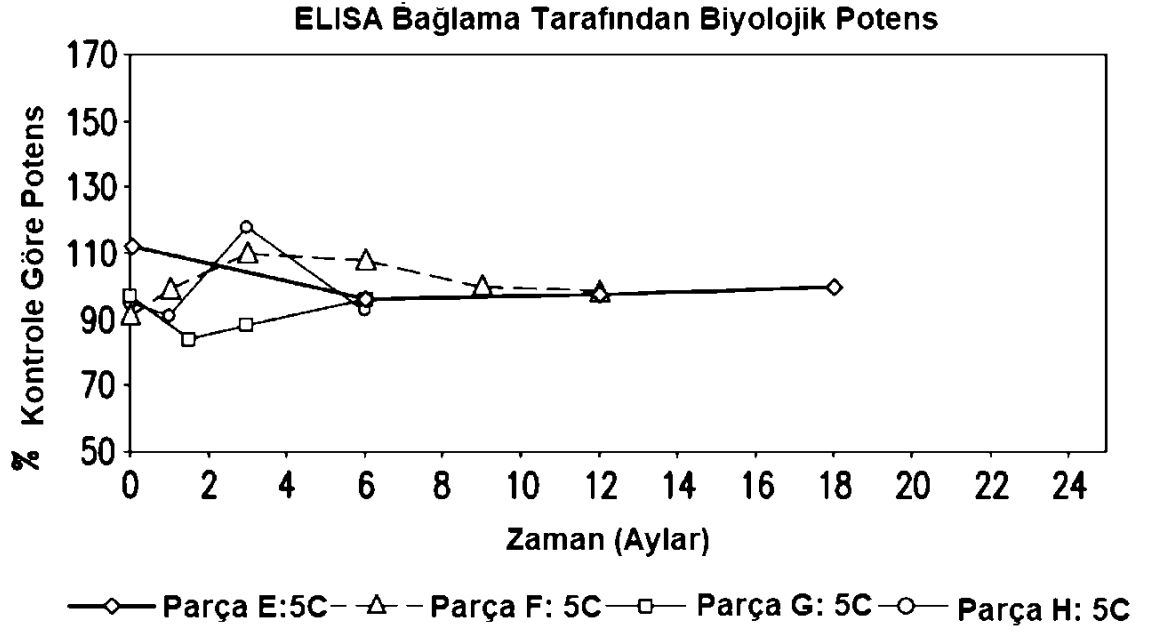
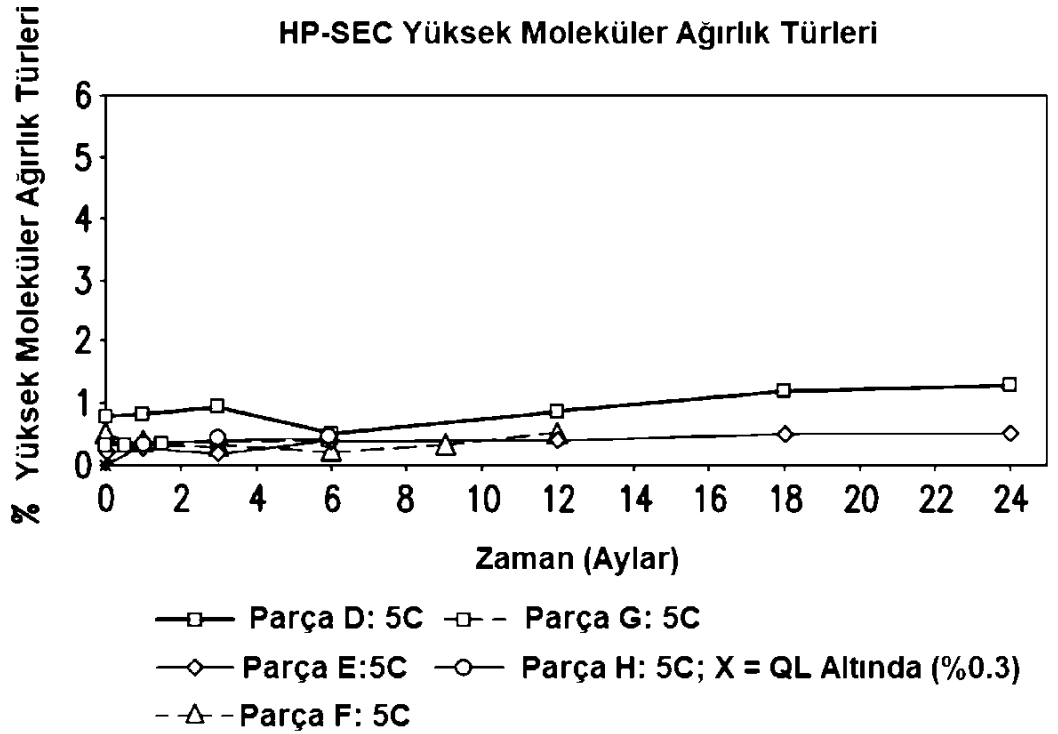
**ŞEKİL 6E****ŞEKİL 6F**

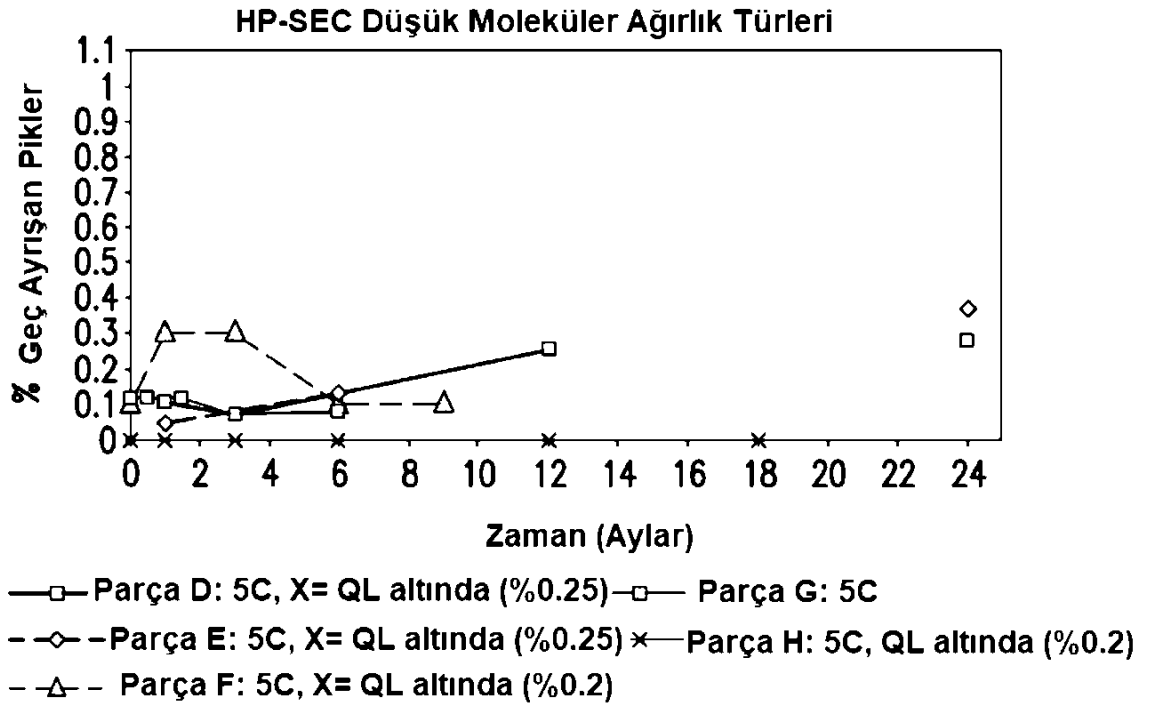
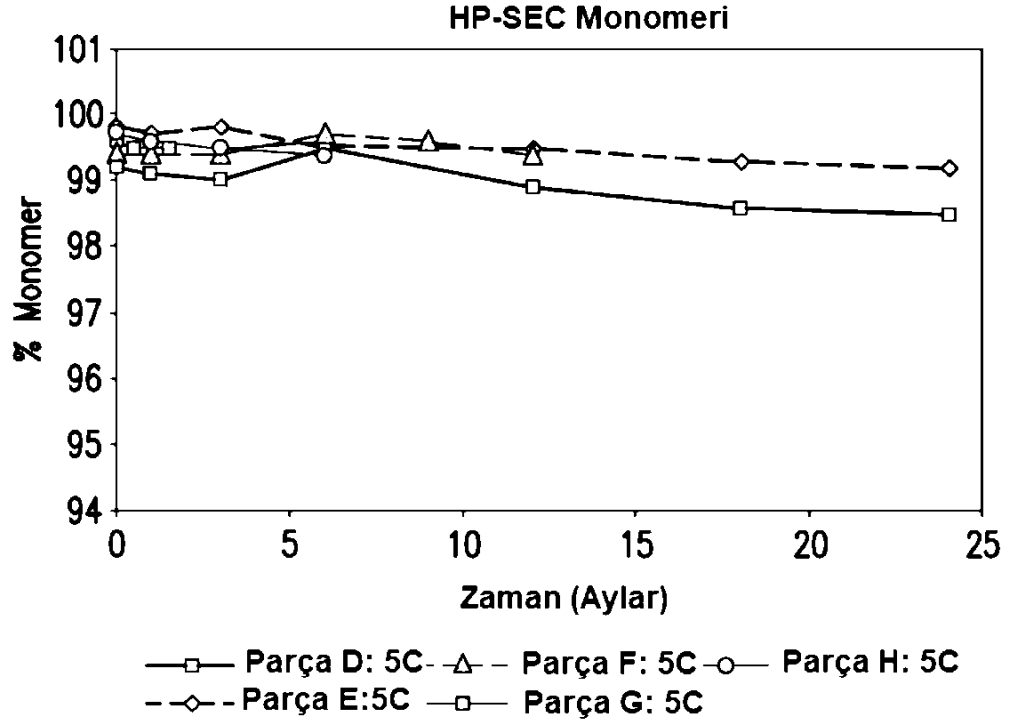


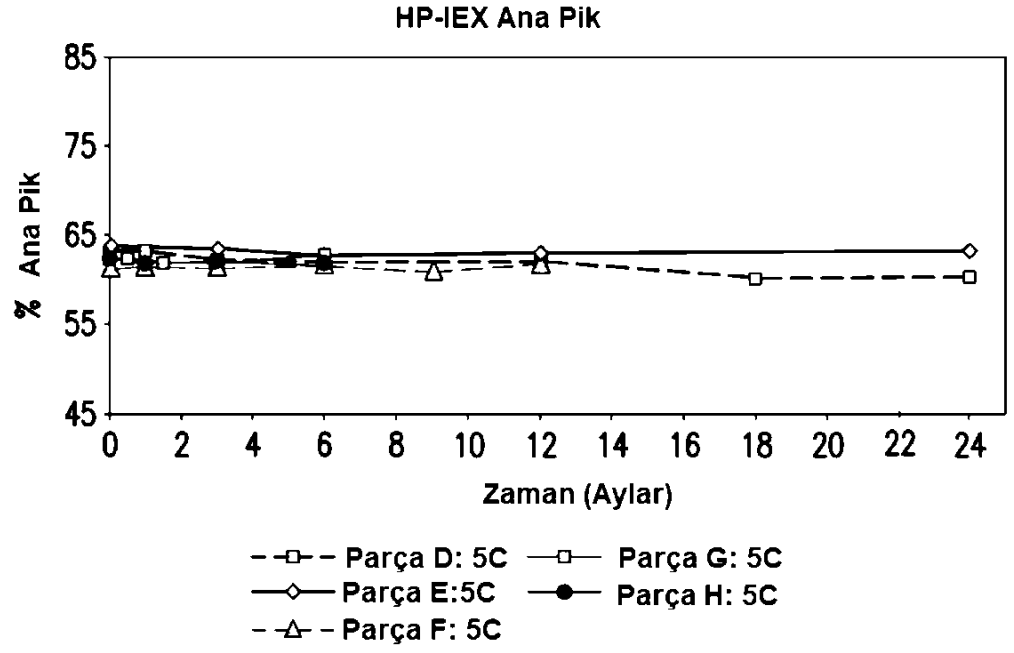
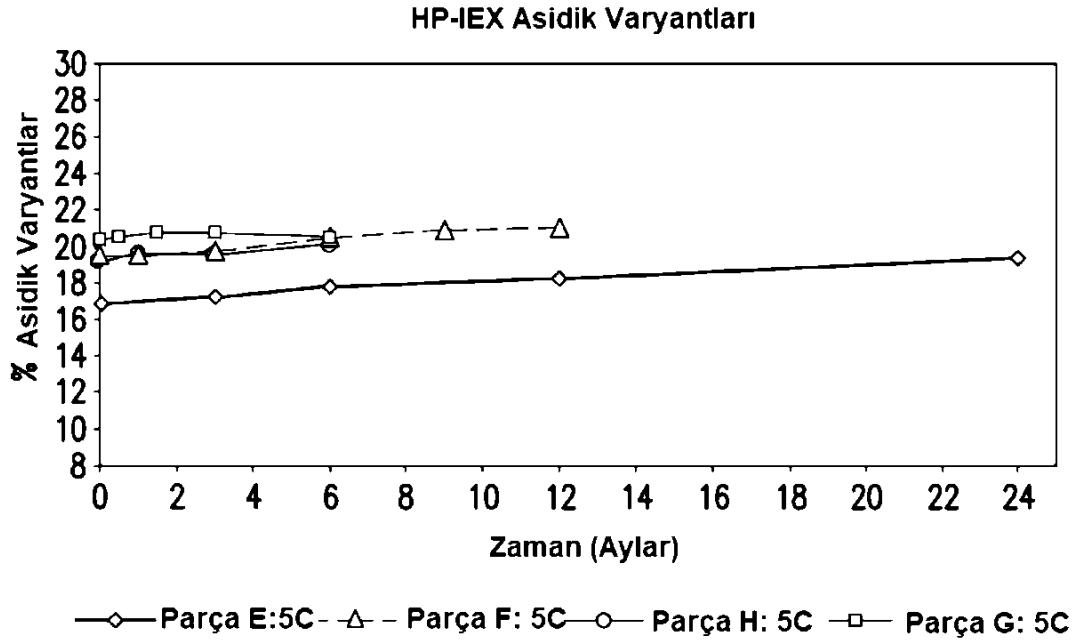


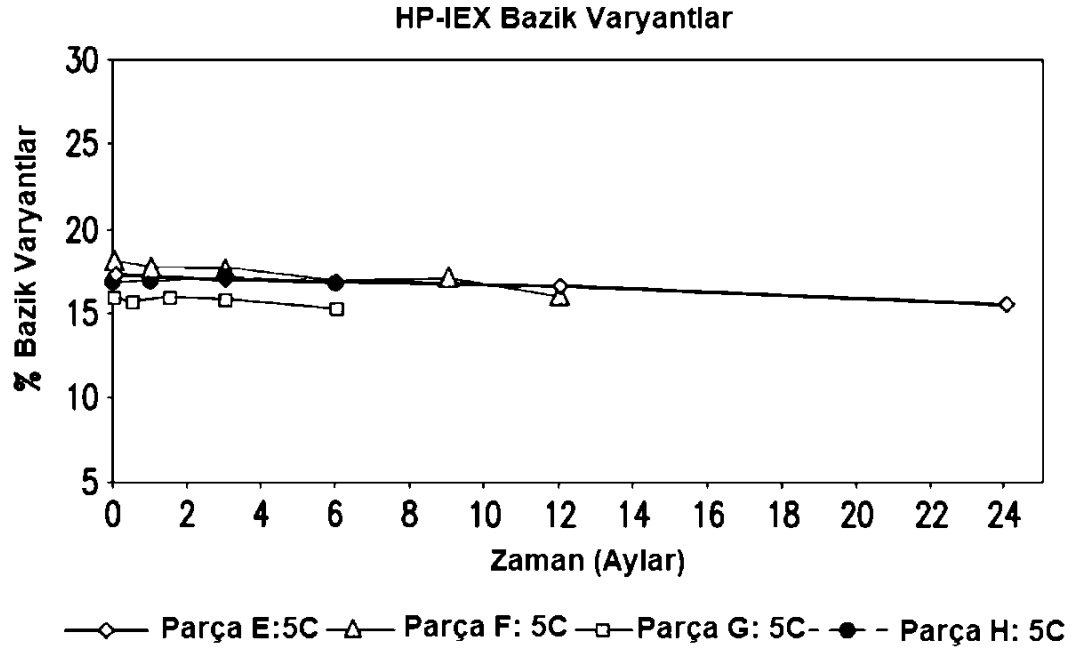
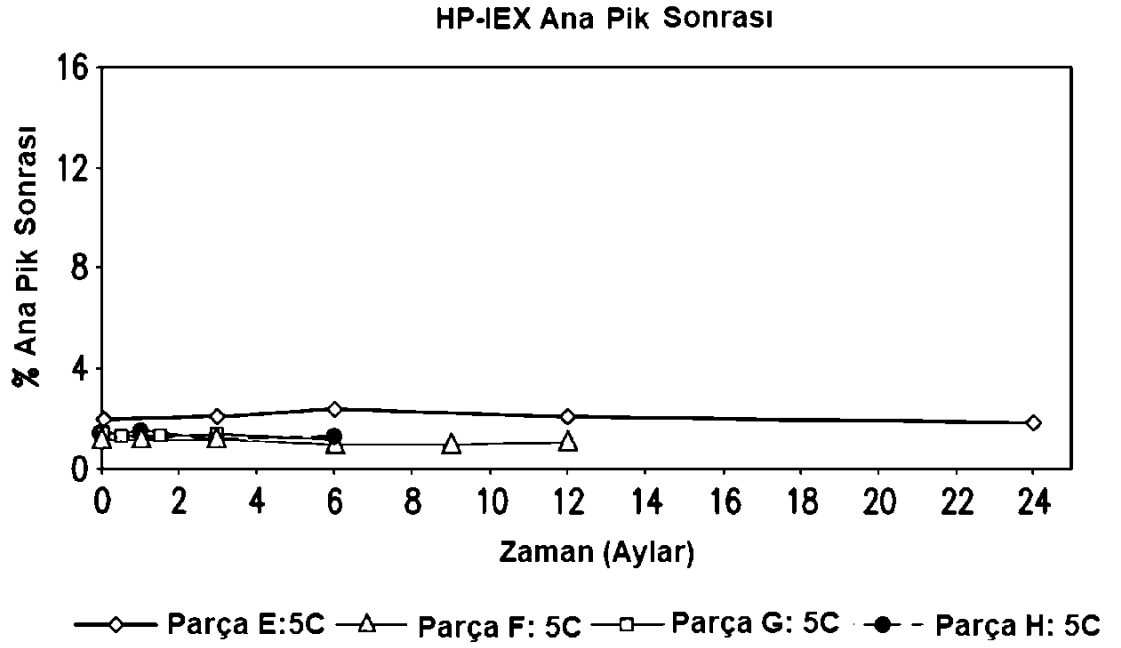
**ŞEKİL 6K**

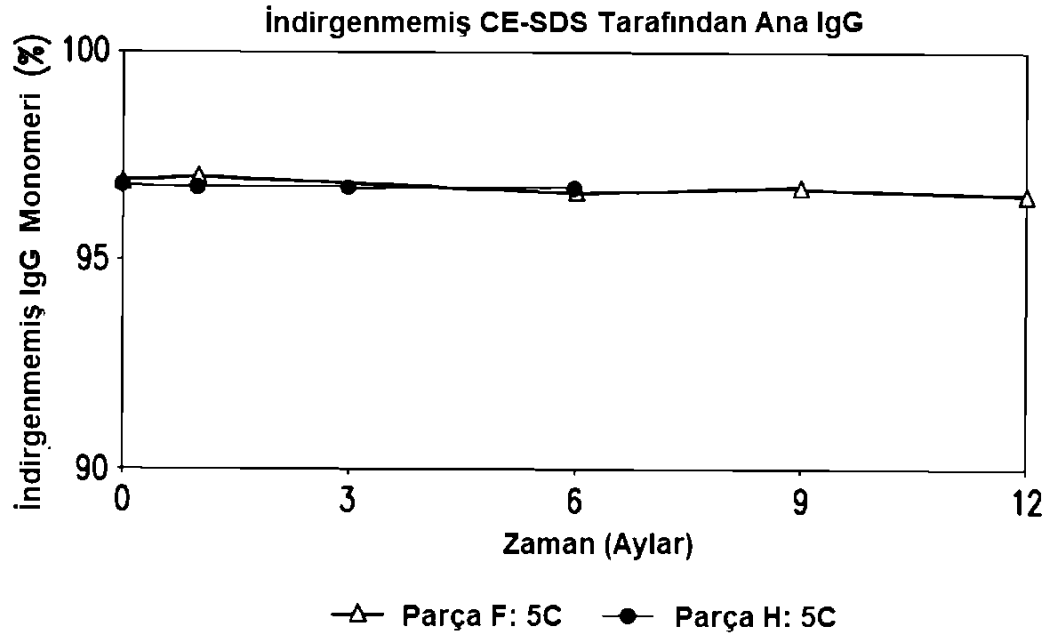
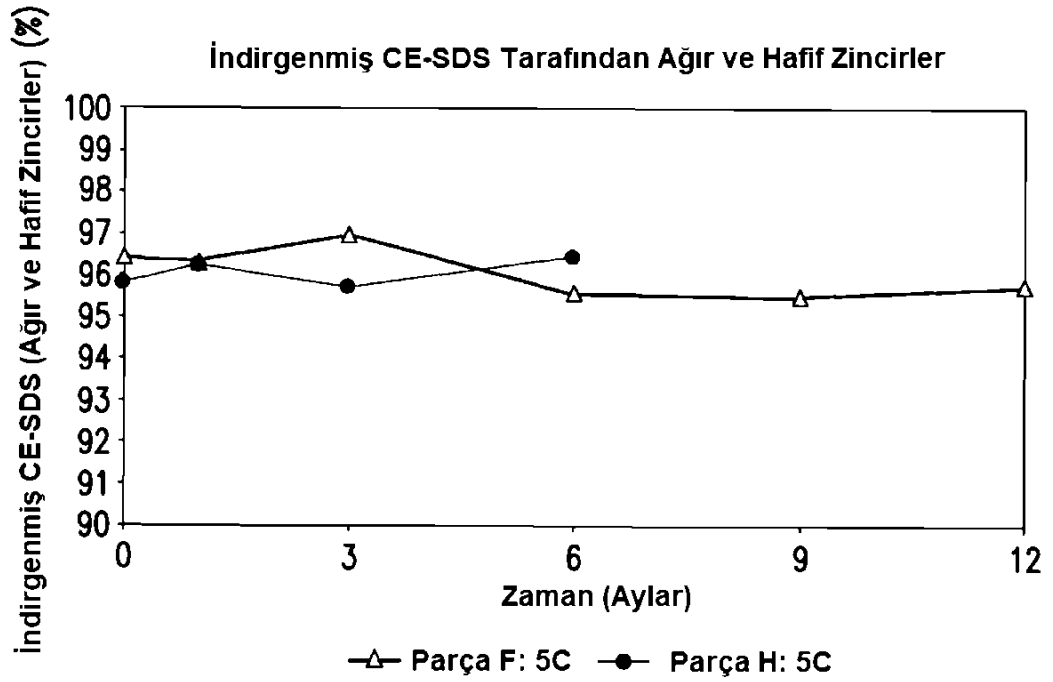
**ŞEKİL 7A****ŞEKİL 7B**

**ŞEKİL 7C****ŞEKİL 7D**



**ŞEKİL 7G****ŞEKİL 7H**

**ŞEKİL 7I****ŞEKİL 7J**

**ŞEKİL 7K****ŞEKİL 7L**