

用于生产乌司奴单抗的生物类似药的细胞株及生产方法

5 技术领域

本发明涉及抗体药物领域。具体地，本发明涉及一种可用于生产乌司奴单抗(Ustekinumab，商品名为 Stelara®)的生物类似药的中国仓鼠卵巢细胞 S(CHO-S)细胞株及利用该 CHO-S 细胞株生产乌司奴单抗的生物类似药的方法。

10

背景技术

乌司奴单抗(Ustekinumab，商品名为 Stelara®)由强生公司开发，为靶向人 IL-12、IL-23 共有的 p40 亚基的全人源单克隆抗体。IL-12 和 IL-23 是活化的抗原呈递细胞表达的异源二聚体细胞因子，IL-12 能激活 NK 细胞从而促进 CD4⁺T 细胞分化成为辅助 T 细胞 1(Th1)，IL-23 能激活辅助 T 细胞 17(Th17)途径。IL-12 和 IL-23 的调节异常与免疫相关疾病密切相关。乌司奴单抗通过阻断 IL-12 和 IL-23 共有的 p40 亚基与靶细胞表面的 IL-12Rβ1 受体蛋白的结合，抑制 IL-12 和 IL-23 介导的信号传导和细胞因子级联反应，从而在银屑病、炎症性肠炎等自身免疫性疾病患者体内发挥疗效。Stelara®于 2008 年在加拿大上市，其后分别在欧洲、美国、日本等地上市，已批准的临床适应症包括银屑病、银屑病关节炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎等。

强生公司生产的乌司奴单抗采用 SP2/0 细胞作为宿主细胞进行表达，该 SP2/0 细胞表达的抗体具有较高比例的唾液酸修饰，作为药物进入人体后有一定的免疫原性风险。理论上更换宿主细胞表达乌司奴单抗，可能降低其免疫原性风险。但一般而言，不同种类的宿主细胞表达的同一种单克隆抗体，即使氨基酸序列相同，也可能由于糖基化方式不同等原因而存在结构差别，容易造成理化性质、生物活性、体内代谢行为等方面的差异，导致生物类似药与原研药相似度低，无法通过相似性评价。这是生物类似药研发中的一大难点，也是虽然乌司奴单抗的专利保护即将到期，但关于其生物类似药却讯息

寥寥的一个重要原因。

发明内容

5 本发明的目的在于提供一种可用于生产关键理化参数、生物学功能等方面与乌司奴单抗高度相似的生物类似药的细胞株，以及生产乌司奴单抗的生物类似药的方法。

具体来说，本发明包括：

1. 一种中国仓鼠卵巢细胞 S(CHO-S)细胞株，其保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)，保藏号为 CCTCC NO: C2020232；其表达抗人 IL-12、
10 人 IL-23 共有的 p40 亚基的全人源单克隆抗体，所述全人源单克隆抗体的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，所述全人源单克隆抗体的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；其包含表达所述抗人 IL-12、人 IL-23 共有的 p40 亚基的全人源单克隆抗体的表达质粒，所述表达质粒包含如 SEQ ID NO: 2 所示的编码所述全人源单克隆抗体的重链氨基酸序列的核苷酸序列，以及
15 如 SEQ ID NO: 4 所示的编码所述全人源单克隆抗体的轻链氨基酸序列的核苷酸序列。

2. 根据项 1 所述的 CHO-S 细胞株，其表达的所述抗人 IL-12、人 IL-23 共有的 p40 亚基的全人源单克隆抗体基本不含唾液酸化组分。

3. 根据项 1 所述的 CHO-S 细胞株，其表达的所述抗人 IL-12、人 IL-23
20 共有的 p40 亚基的全人源单克隆抗体是乌司奴单抗(Ustekinumab)的生物类似药。

4. 由项 1~3 中任一项所述的 CHO-S 细胞株表达的抗人 IL-12、人 IL-23 共有的 p40 亚基的全人源单克隆抗体，其为乌司奴单抗(Ustekinumab)的生物类似药。

25 5. 根据项 5 所述的抗人 IL-12、人 IL-23 共有的 p40 亚基的全人源单克隆抗体，其基本不含唾液酸化组分。

6. 一种乌司奴单抗(Ustekinumab)的生物类似药的生产方法，其包括培养根据项 1~3 中任一项所述的 CHO-S 细胞株，从而生产项 4 或 5 所述的抗人 IL-12、人 IL-23 共有的 p40 亚基的全人源单克隆抗体。

30 7. 一种表达载体，其包含核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示的 DNA 和

核苷酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示的 DNA。

8. 一种宿主细胞，其包含项 7 所述的表达载体。

发明效果

5 将上述中国仓鼠卵巢细胞 S 细胞株命名为 CHO-S-4，并将其保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)，保藏号为 CCTCC NO: C2020232。可以通过培养该中国仓鼠卵巢细胞 S 细胞株、使其表达针对人 L-12、IL-23 共有的 p40 亚基的全人源单克隆抗体，从而产生乌司奴单抗的生物类似药，该生物类似药在关键理化参数、生物学功能等方面与原研乌司奴单抗高度相似。该

10 CHO-S 细胞株表达的乌司奴单抗生物类似药(命名为 QX001S)，不仅在临床前研究中展现了与乌司奴单抗的高度一致性，而且在临床研究中通过了药代动力学生物等效性和安全性相似性评价，成为目前为止国内首个进入临床试验、唯一一个完成了 I 期临床实验的乌司奴单抗生物类似药，据我们所知，在国际上也是新药申报进展最快的乌司奴单抗生物类似药之一。

15

附图说明

图 1 为乌司奴单抗的重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列。

图 2 为 QX001S 和乌司奴单抗单次皮下注射给药 1 mg/kg 组在食蟹猴体内的主要药代动力学参数和血药浓度-时间变化规律。

20 图 3 为 QX001S 和乌司奴单抗单次皮下注射给药在人体内的主要药代动力学参数和血药浓度-时间变化规律，即 C_{max} 、 AUC_{0-t} 及 AUC_{0-inf} 的几何均值比值的 90%置信区间(CI)。

图 4 为进行了密码子优化的 QX001S 的重链基因序列。

图 5 为进行了密码子优化的 QX001S 的轻链基因序列。

25

具体实施方式

定义

本文所使用的术语，“细胞株”是指通过选择法或克隆形成法从原代培养物或细胞系中获得的具有特殊性质或标志的培养细胞。细胞株的特殊性质或

30 标志必须在整个培养期间始终存在。细胞株的遗传物质没有发生改变。

本文所使用的术语,“DNA”是指由脱氧核苷酸组成的大分子聚合物。脱氧核苷酸由碱基、脱氧核糖和磷酸构成。其中碱基有 4 种:腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)和胞嘧啶(C)。分子结构中,两条多脱氧核苷酸链围绕一个共同的中心轴盘绕,构成双螺旋结构。脱氧核糖-磷酸链在螺旋结构的外面,碱基朝向里面。两条脱氧核苷酸链反向互补,通过碱基间的氢键形成的碱基配对相连,形成相当稳定的组合。DNA 携带有合成 RNA 和蛋白质所必需的遗传信息,是生物体发育和正常运作必不可少的生物大分子。

本文所使用的术语,“表达载体”是指在克隆载体基本骨架的基础上增加表达元件(如启动子、核糖体结合位点、终止子等),使目的基因能够表达的载体。

本文所使用的术语,“单克隆抗体”是指由单一 B 细胞克隆产生的高度均一、仅针对某一特定抗原表位的抗体。其通常采用杂交瘤技术来制备,杂交瘤(hybridoma)抗体技术是在细胞融合技术的基础上,将具有分泌特异性抗体能力的致敏 B 细胞和具有无限繁殖能力的骨髓瘤细胞融合为 B 细胞杂交瘤。用具备这种特性的单个杂交瘤细胞培养成细胞群,可制备针对一种抗原表位的特异性抗体即单克隆抗体。

本文所使用的术语,“人源化抗体(humanized antibody)”又称互补决定区移植抗体,是指抗体的可变区部分或抗体所有全部由人类抗体基因所编码。

本文所使用的术语,“人源化单克隆抗体”是指利用现有的无数已详细分析过的小鼠抗体,取其与抗原直接接触的那段抗体片段(互补决定区,CDR)与人的抗体框架嫁接,经亲和力重塑,可维持其特异性和大部分的亲和力,同时几乎去除免疫原性和毒副作用的抗体。

本文所使用的术语,“全人源化抗体是指将人体抗体基因通过转基因或转染色体技术,将人类编码抗体的基因全部转移至基因工程改造的抗体基因缺失动物中,使动物表达人类抗体,达到抗体全人源化的目的。已建立多种方法产生完全人源化抗体,主要有噬菌体展示技术、转基因小鼠技术、核糖体展示技术和 RNA-多肽技术。

本发明涉及一种中国仓鼠卵巢细胞 S(CHO-S)细胞株,其命名为 CHO-S-4,其保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏号为 CCTCC NO: C2020232,保藏日为 2020 年 12 月 03 日。

在一个具体的实施方式中，中国仓鼠卵巢细胞 S(CHO-S)细胞株表达抗人 IL-12/IL-23p40 亚基全人源单克隆抗体，所述全人源单克隆抗体的重链氨基酸序列是乌司奴单抗的重链氨基酸序列，所述全人源单克隆抗体的轻链氨基酸序列是乌司奴单抗的轻链氨基酸序列。

- 5 在一个具体的实施方式中，中国仓鼠卵巢细胞 S(CHO-S)细胞株表达抗人 IL-12/IL-23p40 亚基全人源单克隆抗体，所述全人源单克隆抗体的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，所述全人源单克隆抗体的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

SEQ ID NO: 1

10 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTTYWLGWVRQMPGKGLDWI
GIMSPVDSDIRYSPSFQGGVMTMSVDKSTTAYLQWNSLKASDTAMYCAR
RRPGQGYDFEWGQGLTVSSSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSTLTQT
YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK
15 DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDSFGLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

20 SEQ ID NO: 3

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISWLAWYQQKPEKAPKSLIYA
ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYNIYPYTFGQGT
KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
25 SPVTKSFNRGEC

- 30 在一个具体的实施方式中，中国仓鼠卵巢细胞 S(CHO-S)细胞株包含表达所述抗人 IL-12、人 IL-23 共有的 p40 亚基的全人源单克隆抗体的表达质粒，所述表达质粒包含如 SEQ ID NO: 2 所示的编码所述全人源单克隆抗体的重链氨基酸序列的核苷酸序列，以及如 SEQ ID NO: 4 所示的编码所述全人源单克隆抗体的轻链氨基酸序列的核苷酸序列。

SEQ ID NO: 2

GAAGTCCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCCGAGGTGAAGAAACCAGGTGA
AAGTCTGAAGATCAGCTGTAAAGGCTCTGGATACAGTTTCACCATAT
TGGCTGGGATGGGTGCGGCAGATGCCCGGGAAGGGTCTGGATTGGATC
35 GGTATTATGTCCCCCGTGGACAGCGACATCAGATACAGTCCTTCATTTC
AGGGCCAGGTCACTATGTCTGTGGACAAGAGTATTACTACCGCTTATCT
GCAGTGGAACTCACTGAAAGCCTCCGATACCGCTATGTACTATTGCGCA
AGGCGGAGACCCGGCCAGGGATACTTCGACTTTTGGGGGCAGGGCAC
CCTGGTCACAGTGTCCAGCTCTAGTACTAAGGGGCCTTCCGTGTTTCCA

CTGGCTCCCTCATCCAAATCCACTAGCGGAGGAACCGCAGCTCTGGGA
 TGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCAGAGCCCGTCACAGTGTGATGGAAC
 TCCGGCGCACTGACCAGCGGAGTCCATACATTTCCCTGCCGTGCTGCAG
 AGCTCTGGGCTGTACTCTCTGAGTTCAGTGGTTCACAGTGCCATCCAGC
 5 TCTCTGGGTACTCAGACCTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCTTCTA
 ATACTAAGGTTCGATAAGAGGGGTGGAACCAAAGAGTTGTGATAAAACAC
 ATACTTGCCCCCCTTGTCTGTCACCAGAGCTGCTGGGGGGTCCAAGCG
 TGTTCCTGTTTTCCACCCAAGCCCAAGATACCCTGATGATTTCCCGAAC
 ACCAGAAGTCACTTGCGTGGTCTGAGCCACGAGGACCCCG
 10 AAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTCGAGGTGCATAATGCTA
 AGACCAAACCTCGCGAGGAACAGTACAATAGCACATATCGAGTCGTGT
 CTGTCCTGACTGTGCTGCACCAAGGATTGGCTGAACGGAAAGGAGTATA
 AGTGCAAAGTGTCTAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACCA
 TTTCCAAGGCCAAAGGCCAGCCTCGTGAACCAAGGTGTACACACTG
 15 CCTCCATCAAGGGATGAGCTGACTAAGAACCAAGTCAGCCTGACCTGT
 CTGGTGAAAGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCTGTGGAGTGGGAAAGT
 AATGGACAGCCTGAAAACAATTACAAGACAACCTCCCCCTGTGCTGGAC
 AGCGATGGCTCTTTCTTTCTGTATTCCAAGCTGACCGTGGACAAAAGC
 CGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTTTCTTGTAGTGTGATGCATGAGGCC
 20 CTGCACAATCATTACACACAGAAGTCACTGTCCCTGAGCCCAGGAAAA

SEQ ID NO: 4

GACATCCAGATGACCCAGAGTCCATCCAGCCTGTCTGCTAGTGTGGGA
 GATAGGGTCACTATCACCTGTCCGGGCCTCCCAGGGGATTTCTAGTTGGC
 25 TGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCAGAGAAAGCACCCAAGTCCCTGATTT
 ATGCCGCTTCATCCCTGCAGAGTGGAGTGCCCTCACGATTCTCAGGCTC
 CGGAAGCGGGACTGACTTTACACTGACTATCAGCTCTCTGCAGCCTGA
 AGATTTTCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTACAACATTTACCCATATACTT
 TTGGTCAGGGCACCAAACTGGAGATCAAGAGAACAGTGGCAGCCCCC
 30 AGCGTCTTCATTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAATCCGGCACCG
 CAAGCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTCGCGAGGCCAAAG
 TGCAGTGGAAAGGTCGATAACGCTCTGCAGTCTGGCAATAGTCAGGAGT
 CAGTGACAGAACAGGACTCCAAAGATAGCACTTATTCTGTAGTTCAA
 CCCTGACACTGAGCAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCC
 35 TGCGAAGTCAACCATCAGGGTCTGTCCAGCCCCGTGACAAAGTCTTTT
 AATAGGGGCGAATGT

在一个具体的实施方式中，中国仓鼠卵巢细胞 S(CHO-S)细胞株表达抗人 IL-12、人 IL-23 共有的 p40 亚基的全人源单克隆抗体，所述全人源单克隆抗体基本不含唾液酸化组分。

40 本发明还涉及由上述 CHO-S 细胞株表达的抗人 IL-12、人 IL-23 共有的 p40 亚基的全人源单克隆抗体，其为乌司奴单抗(Ustekinumab)的生物类似药(命名为 QX001S)，其与作为原研药的乌司奴单抗(Ustekinumab)高度相似。

具体而言，QX001S 的一级、二级和高级结构与乌司奴单抗相似；糖基化修饰位点相似；电荷异质性的分析数据例如去糖等电点、酸性峰、碱性峰
 45 均相似；聚合体和降解产物分析的数据相似；热稳定性相似；体外生物活性的分析数据例如抗原 IL-12 结合活性、抗原 IL-12 亲和力、抗原 IL-23 结合活性、抗原 IL-23 亲和力、IL-12 受体拮抗活性、IL-23 受体拮抗活性、NK-92

MI 细胞活性、小鼠脾脏细胞活性、Fc 相关受体亲和力、种属特异性分析、抗原识别表位的一致性分析等相似。

在由 IL-23 诱导的小鼠耳部表皮增生模型中的药效学研究表明, QX001S 组与乌司奴单抗组表现出高度相似的药效作用一致性。在食蟹猴体内的药代动力学研究表明, 乌司奴单抗和 QX001S 两者在食蟹猴体内药代动力学参数和血药浓度-时间变化规律相似。在人体内药代动力学研究表明, QX001S 注射液和乌司奴单抗注射液药代动力学生物等效且安全性相似。

此外, 本发明还涉及一种乌司奴单抗(Ustekinumab)的生物类似药的生产方法, 其包括培养所述 CHO-S 细胞株, 从而生产所述抗人 IL-12、人 IL-23 共有的 p40 亚基的全人源单克隆抗体。

实施例

以下, 通过实施例对本发明进行更具体的说明。应当理解的是, 本发明不限于这些实施例。

实施例 1: 载体构建

通过公开信息查询和肽段分析确定了乌司奴单抗的重链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 1) 和轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 3)。(如图 1)

作为乌司奴单抗的生物类似药的 QX001S 的重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列与乌司奴单抗完全相同。

以乌司奴单抗的重轻链氨基酸序列为模板, 设计 QX001S 的重轻链基因序列, 并构建表达质粒。

进行了密码子优化的 QX001S 的重链基因序列为 SEQ ID NO: 2 (如图 4)。

进行了密码子优化的 QX001S 的轻链基因序列为 SEQ ID NO: 4 (如图 5)。

表达质粒系将进行了密码子优化的 QX001S 的重链基因和轻链基因通过公知的分子生物学手段分别构建到各自的空白表达载体中, 与上下游表达调控元件相连接, 再将重链及其表达调控元件酶切并连接至轻链表达载体上, 组成重、轻链连锁的质粒, 即为用于转染构建工程细胞的最终表达质粒。该

最终表达质粒还含有目前利用 CHO 细胞进行工程细胞株构建时广泛使用的筛选标记——谷氨酰胺合成酶(GS)基因筛选标记,可用于后续稳转细胞的筛选。

- 5 对上述获得的表达质粒进行瞬转表达,然后对表达的 QX001S 进行蛋白序列鉴定和活性分析,确定构建的 QX001S 表达载体基因序列及表达的蛋白无误。

实施例 2: 细胞株的筛选

- 10 确定构建的 QX001S 表达载体基因序列及表达的蛋白无误,以 CHO-S 为宿主细胞构建 QX001S 的稳定表达细胞株。CHO-S 宿主细胞购自 ThermoFisher(原 Invitrogen 公司,货号 A13696-01),复苏并培养 CHO-S™ 细胞。将线性化的表达载体电转进宿主细胞后,通过载体上的同源臂随机整合到宿主细胞的基因组中。

- 15 以谷氨酰胺合成酶作为筛选标记,通过蛋氨酸亚甲基代砒(MSX)加压筛选获得稳定、高产表达理化性质与乌司奴单抗一致的 QX001S 的 CHO-S 细胞株。

- 20 1. 通过逐级扩增、ELISA 检测等操作,对于 40 板 96 孔板中培养的细胞克隆,初步筛选获得高产细胞池(混合细胞克隆),选择出 14 个高产细胞池作为第一轮亚克隆候选池。
2. 获得的 14 个细胞池并不是单克隆,需要对这些细胞进行单克隆化以获得单一稳定的细胞株系。对 14 个高产细胞池采用有限稀释法进行亚克隆化,通过逐级扩增、ELISA 检测筛选出高表达单克隆,共扩增了 694 个细胞克隆,最后挑选 OD 值最高的 33 个克隆扩大至 T25(8ml 含 100μmol/L MSX 的 CD CHO 培养基)中悬浮培养。T25 中细胞培养 8 天后收获细胞上清, 25 Fortebio 检测 IgG 含量,用 Protein A 纯化 QX001S,进行质量分析。

3. 考虑到表达的 QX001S 的质量属性要与乌司奴单抗一致,对于上述 33 个单克隆,选择所分泌的 QX001S 在羧肽酶处理后碱性组分成分简单且含量低的克隆,选出了克隆 4、克隆 9、克隆 25、克隆 27。进一步,将 4、25、27 这 3 个克隆表达的 QX001S 同乌司奴单抗一起做肽图分析比较,4 个样品

的肽图基本一致，没有明显增加或减少的肽段，说明上述 3 个克隆分泌的 QX001S 的氨基酸序列是正确的。

4. 为了获得均一稳定高产的 QX001S 生产细胞株，对上述 4 个候选克隆进行第二轮亚克隆筛选。克隆 25 在第二轮亚克隆筛选过程中细胞状态未达到要求；克隆 27 在第二轮亚克隆后所得到的克隆的产量低；克隆 9 在初步稳定性考察中未达到要求；以上 3 个克隆均被淘汰。

即，在进入质量分析的 33 个克隆中，仅克隆 4 的一个克隆符合作为 QX001S 生产细胞株的要求。

将克隆 4 的 CHO-S 细胞株命名为中国仓鼠卵巢细胞 CHO-S-4，其保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)，保藏号为 CCTCC NO: C2020232，保藏日为 2020 年 12 月 03 日。将克隆 4 的 CHO-S 细胞株表达的抗人 IL-12/IL-23p40 亚基全人源单克隆抗体命名为 QX001S。

实施例 3：药学相似性研究

对上述克隆 4 的 CHO-S 细胞株表达的 QX001S 与乌司奴单抗的药学相似性进行了研究，我们全面比对了 QX001S 与乌司奴单抗一级结构、二级和高级结构、翻译后修饰、电荷异质性、聚合体和降解产物、体外生物学活性以及加速稳定性等方面的异同，结果表明：两者在药学研究层面是高度相似的。该 CHO-S 细胞株表达的 QX001S 在下表 1 所列的 78 个指标中的 71 个指标上均与乌司奴单抗基本一致。

两者之间存在差异的指标主要在翻译后修饰方面(5 个指标有差异)，特别是经测定，乌司奴单抗的唾液酸化组分比例在 11.87%~25.56%之间，而该 CHO-S 细胞株表达的 QX001S 基本上不含唾液酸化组分，这暗示 QX001S 可能具有低于乌司奴单抗的免疫原性。

表 1. 药学相似性研究指标汇总表

分类	质量参数	相似性评估
一级结构	氨基酸覆盖率	预设范围
	氨基酸覆盖率图谱	定性比较
	N 端序列	预设范围
	N 端序列二级图谱	定性比较

	C 端序列		预设范围	
	C 端序列二级图谱		定性比较	
	完整蛋白 MW(去糖)图谱		定性比较	
	完整蛋白分子量(去糖)		预设范围	
	还原(去糖)分子量图谱		定性比较	
	还原(去糖)分子量：LC		预设范围	
	还原(去糖)分子量：HC		预设范围	
	氨基酸组成		预设范围	
	摩尔消光系数		预设范围	
	蛋白质含量		预设范围	
二级和高级结构	二硫键配对		预设范围	
	非还原肽图谱		定性比较	
	游离巯基测定(mol/mol)		参数范围	
	圆二色谱	谱图	定性比较	
		CD: α -Helix	参数范围	
		CD: Beta	参数范围	
		CD: Turn	参数范围	
		CD: Random	参数范围	
	DSF(Tm 值)		参数范围	
晶体结构		定性比较		
翻译后修饰	糖基化位点分析		定性比较	
	N-糖修饰分析图谱		定性比较	
	总岩藻糖化组分比例		参数范围	
	高甘露糖组分比例		参数范围	
	唾液酸化组分比例		参数范围	
	氧化修饰比例分析		参数范围	
	脱酰胺修饰比例分析		参数范围	
	N 末端焦谷氨酸环化比例分析		参数范围	
	C 末端赖氨酸缺失比例分析		参数范围	
电荷异质性	等电点 cIEF	等电点图谱	定性比较	
		去糖等电点图谱	定性比较	
		去糖等电点	预设范围	
		去糖、去 末端 Lys 后	图谱	定性比较
			酸性峰	参数范围
			主峰	参数范围
			碱性峰	参数范围
	IEC-HP LC	IEC-HPLC 图谱		定性比较
		去糖、去末 端 Lys 后 IEC-HPLC	图谱	定性比较
			酸性峰	参数范围
主峰			参数范围	
		碱性峰	参数范围	
聚合体和降解产物分析	SEC-HP LC	图谱	定性比较	
		聚合体	参数范围	
		单体	参数范围	

	AUC	图谱	定性比较
		单体%	参数范围
	DLS	SEC-HPLC-LS 图谱	定性比较
		DLS	定性比较
	CE-SDS	非还原 CE-SDS 图谱	定性比较
		非还原 CE-SDS:LMW	参数范围
		还原 CE-SDS 图谱	定性比较
		还原 CE-SDS:HC&LC	参数范围
		还原 CE-SDS: NGHC	参数范围
热稳定性	40°C 高温稳定性		定性比较
	25°C 加速稳定性		定性比较
体外生物活性	抗原 IL-12 结合活性(比活)		参数范围
	抗原 IL-12 亲和力		参数范围
	抗原 IL-23 结合活性(比活)		参数范围
	抗原 IL-23 亲和力		参数范围
	IL-12 受体拮抗活性(比活)		参数范围
	IL-23 受体拮抗活性(比活)		参数范围
	细胞活性(NK-92 MI 细胞, 比活)		参数范围
	细胞活性(小鼠脾脏细胞, IC50)		参数范围
	Fc 相关受体亲和力	Clq 亲和力(比活)	参数范围
		FcγR I	参数范围
		FcγR IIa-H131	参数范围
		FcγR IIa-R131	参数范围
		FcγR IIb	参数范围
		FcγR IIIa-V158	参数范围
		FcγR IIIa-F158	参数范围
		FcRn pH6.0	参数范围
		FcRn pH7.4	参数范围
	种属特异性分析		定性比较
	抗原识别表位的一致性分析		定性比较

实施例 4：小鼠体内的药效学研究(临床前动物水平药效评价)

在本实施例中，评价了 QX001S 在由 IL-23 诱导的小鼠耳部表皮增生模型中对耳部表皮增生的影响作用，同时比较 QX001S 和原研药乌司奴单抗(该研究中的名称为 QX001S-DZY，欧盟市售产品：批号 FJS1W25)在该模型上的药效作用。研究表明，乌司奴单抗和 QX001S 均表现出了显著的抑制 rhIL-23 诱导的耳部皮肤增生的效果，表现在耳朵厚度的降低和病理综合评分的降低。QX001S 组与乌司奴单抗组表现出高度相似的药效作用一致性。

将 48 只 C57BL/6 小鼠随机分成 6 组，每组 8 只；小鼠右耳背面连续 8 天皮内注射空白媒介或 rhIL-23；rhIL-23 注射前 1h 腹腔注射给予 QX001S 或 QX001S-DZY；分别在第 0、2、4、6、8 天测量耳朵厚度和耳朵增加厚度；在第 8 天，48 只小鼠的右耳切下用于制备石蜡切片，并进行 HE 染色，对染色后的切片从角化程度、表皮厚度、真皮厚度和淋巴细胞浸润四个方面进行评分(每项 0-4 分)，将这四部分的评分相加，作为病理综合评分(0-16 分)。

实验结果表明，QX001S 10mg/kg 与 QX001S-DZY 10mg/kg 给药组比较，在右耳厚度、右耳增加厚度以及病理综合评分上无显著性差异(具体数据见表 2 和表 3)。

10

表 2. 右耳厚度以及右耳增加的厚度

给药组	剂量(mg/kg)	右耳厚度	右耳厚度	右耳增加厚度
		(mm)	(mm)	(mm)
		第 0 天	第 8 天	第 8 天
-	对照	0.23±0.01	0.39±0.02	0.16±0.02
盐水	模型	0.23±0.01	0.69±0.11 ^{##}	0.46±0.12 ^{##}
QX001S	3mg/kg	0.23±0.01	0.58±0.04 ^{*Δ}	0.35±0.04 ^{*Δ}
QX001S	10mg/kg	0.23±0.01	0.56±0.09 [*]	0.33±0.09 [*]
QX001S-DZY	3mg/kg	0.23±0.01	0.67±0.07	0.44±0.07
QX001S-DZY	10mg/kg	0.23±0.01	0.58±0.06 [*]	0.35±0.07 [*]

数据表示为平均值±SD。

[#]p<0.05, ^{##}p<0.01, 比对照; ^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, 比模型;

^Δp<0.05, ^{ΔΔ}p<0.01, QX001S 3mg/kg 比 QX001S-DZY 3mg/kg;

15 [☆]p<0.05, ^{☆☆}p<0.01, QX001S 10mg/kg 比 QX001S-DZY 10mg/kg。

表 3. HE 染色后的右耳组织切片病理评分

给药组	剂量	角化程度	表皮厚度	真皮厚度	淋巴细胞浸润	病理综合评分
	(mg/kg)					
-	对照	0.88±0.64	0.25±0.46	1.5±0.76	0.5±0.53	3.13±1.96
盐水	模型	2.75±0.46 ^{##}	3.13±0.83 ^{##}	2.75±0.71 ^{##}	3±1.07 ^{##}	11.63±1.06 ^{##}

QX001S	3	1.88±0.83 *	1.75±1.28 * [△]	2±0.93	2.13±1.36	7.75±3.92 *
QX001S	10	1.88±0.64 **	1.63±1.19 *	1.5±1.2 *	1.88±1.36	6.88±3.83 **
QX001S-DZY	3	2.5±0.53	3.13±0.83	2.5±1.07	2.63±0.92	10.75±2.71
QX001S-DZY	10	1.38±0.52 **	1.88±0.99 *	1.75±1.28	1.88±0.83 *	6.88±2.95 **

数据表示为平均值±SD。

#p<0.05, ##p<0.01, 比对照; *p<0.05, **p<0.01, 比模型;

△p<0.05, △△p<0.01, QX001S 3mg/kg 比 QX001S-DZY 3mg/kg;

☆p<0.05, ☆☆p<0.01, QX001S 10mg/kg 比 QX001S-DZY 10mg/kg。

5

实施例 5：食蟹猴体内的药代动力学研究(临床前动物水平药代动力学评价)

在本实施例中，评价了 QX001S 在食蟹猴体内的药代动力学特征，同时比较 QX001S 和原研药乌司奴单抗(该研究中的名称为 QX001S-DZY)在食蟹猴体内的药代动力学参数。研究表明，乌司奴单抗和 QX001S 两者在食蟹猴体内药代动力学参数和血药浓度-时间变化规律相似。

10

本实施例使用食蟹猴 36 只，随机分为 6 组，每组 6 只；包括 QX001S 单次皮下注射给药共 3 组(0.35、1、3 mg/kg)、QX001S 单次静脉推注给药共 1 组(1mg/kg)、QX001S-DZY 单次皮下注射给药共 1 组(1mg/kg)、QX001S 重复皮下注射给药 1 组(1mg/kg)。所有受试动物在给药前后不同时间点静脉采集血清，采用验证过的 ELISA 方法检测血清中的 QX001S 及 QX001S-DZY 浓度，并使用非房室模型计算相关药代动力学参数。

15

药物代谢动力学的结果显示，QX001S 和 QX001S-DZY 单次皮下注射给药 1 mg/kg 组主要药代参数间无显著性差异(p>0.05)，两者在食蟹猴体内药代动力学参数和血药浓度-时间变化规律相似(如图 2)。

20

免疫原性的结果显示，QX001S 和 QX001S-DZY 单次皮下注射给药 1 mg/kg 组均有 83%(5/6)的个体检测出抗药抗体，两者在食蟹猴体内的免疫原性相似。

实施例 6 人体内药代动力学研究(I 期临床研究)

QX001S 注射液为全球首个进入临床研究的乌司奴单抗注射液(Ustekinumab，商品名为 Stelara®)生物类似药，其 I 期临床研究“随机、双盲、

25

单剂量、平行比较 QX001S 注射液和乌司奴单抗注射液(欧盟市售：生产批号 GDS3IME)在中国健康男性志愿者中的药代动力学对比研究”已经顺利结束，研究结果达到预设的全部主要和次要终点(国家药物临床试验登记与信息公示平台登记号 CTR20181658)。基于 I 期临床研究的良好结果，我们正在全力准备开启 QX001S 针对银屑病适应症的 III 期临床研究。上述 I 期临床研究取得的关键试验结果包括：

1. 药代动力学生物等效

QX001S 和乌司奴单抗的 C_{max}、AUC_{0-t} 及 AUC_{0-inf} 的几何均值比值的 90%CI 分别为：100.90%~118.68%、98.71%~115.26%、98.49%~115.81%，均落在规定的等效性 80.00%~125.00% 范围内，表明 QX001S 注射液和乌司奴单抗注射液药代动力学生物等效（如图 3）。

2. 安全性相似

本研究进入安全性分析人群的 177 例受试者中，共 98 例受试者发生 228 例次 TEAE，所有受试者均未发生 SAE，也未发生因 AE 导致的退出。QX001S 组和乌司奴单抗组药物不良反应发生率分别为 42.7%和 42.0%，安全性相似。

此外，本研究进入免疫原性分析人群的 177 例受试者中，QX001S 组阳性受试者为 11 例，阳性率为 12.4%，乌司奴单抗组阳性受试者为 21 例，阳性率为 23.9%。

还需要说明的是，原研药乌司奴单抗采用 SP2/0 细胞作为宿主细胞进行重组表达，而生物类似药 QX001S 采用 CHO-S 细胞作为宿主细胞进行重组表达。一般而言，不同宿主细胞表达的同一单克隆抗体，即使氨基酸序列相同，也可能由于糖基化方式不同等原因而存在结构差别，容易造成理化性质、生物活性、体内代谢行为等方面的差异，导致生物类似物与原研药不一致，无法通过一致性评价。这是生物类似药研发中的一大难点，也是虽然乌司奴单抗的专利保护即将到期，但关于其生物类似药却讯息寥寥的一个重要原因。与此相对，本发明通过筛选得到的特定 CHO-S 细胞株表达的乌司奴单抗生物类似药 QX001S，不仅在临床前研究中展现了与乌司奴单抗的高度一致性，而且在临床研究中通过了药代动力学生物等效性和安全性相似性评价，成为目前为止国内首个进入临床试验、唯一一个完成了 I 期临床实验的

乌司奴单抗生物类似药，据我们所知，在国际上也是新药申报进展最快的乌司奴单抗生物类似药之一。

- 以上通过特定的具体实例说明本发明的实施方式，本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以
- 5 通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用，本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用，在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

PCT

打印件(原件为电子形式)

0-1	PCT/R0/134表(SAFE)有关保藏的微生物或其他生物材料的说明(PCT细则第13条之二)	
0-1-1	软件版本	CEPCT 版本 10. 25. 41 (20201201) MT/FOP 20140331/0. 20. 5. 21
0-2	国际申请号	PCT/CN2021/082333
0-3	申请人或代理人的档案号	TFE00358PCT

1	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
1-1	页码	2
1-2	行号:	8
1-3	保藏事项	
1-3-1	保藏单位名称	中国典型培养物保藏中心
1-3-2	保藏单位地址	中国湖北省武汉市武汉大学, 邮政编码: 430072, Hubei (CN)。
1-3-3	保藏日期	2020年 12月 03日 (03. 12. 2020)
1-3-4	保藏号	CCTCC NO: C2020232
1-4	补充说明	中国仓鼠卵巢细胞 CHO-S-4
1-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
1-6	单独提交的说明 这些说明将随后提交给国际局	

由受理局填写

0-4	本表格与国际申请一起收到: (是或否)	
0-4-1	授权官员	

由国际局填写

0-5	国际局收到本表格日期:	
0-5-1	授权官员	

权利要求书

1. 一种中国仓鼠卵巢细胞 S(CHO-S)细胞株, 其保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC), 保藏号为 CCTCC NO: C2020232; 其表达抗人 IL-12、
5 人 IL-23 共有的 p40 亚基的全人源单克隆抗体, 所述全人源单克隆抗体的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 所述全人源单克隆抗体的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示; 其包含表达所述抗人 IL-12、人 IL-23 共有的 p40 亚基的全人源单克隆抗体的表达质粒, 所述表达质粒包含如 SEQ ID NO: 2 所示的编码所述全人源单克隆抗体的重链氨基酸序列的核苷酸序列, 以及
10 如 SEQ ID NO: 4 所示的编码所述全人源单克隆抗体的轻链氨基酸序列的核苷酸序列。
 2. 根据权利要求 1 所述的 CHO-S 细胞株, 其表达的所述抗人 IL-12、人 IL-23 共有的 p40 亚基的全人源单克隆抗体基本不含唾液酸化组分。
 3. 根据权利要求 1 所述的 CHO-S 细胞株, 其表达的所述抗人 IL-12、
15 人 IL-23 共有的 p40 亚基的全人源单克隆抗体是乌司奴单抗(Ustekinumab)的生物类似药。
 4. 由权利要求 1~3 中任一项所述的 CHO-S 细胞株表达的抗人 IL-12、人 IL-23 共有的 p40 亚基的全人源单克隆抗体, 其为乌司奴单抗(Ustekinumab)的生物类似药。
 - 20 5. 根据权利要求 5 所述的抗人 IL-12、人 IL-23 共有的 p40 亚基的全人源单克隆抗体, 其基本不含唾液酸化组分。
 6. 一种乌司奴单抗(Ustekinumab)的生物类似药的生产方法, 其包括培养根据权利要求 1~3 中任一项所述的 CHO-S 细胞株, 从而生产权利要求 4 或 5 所述的抗人 IL-12、人 IL-23 共有的 p40 亚基的全人源单克隆抗体。
 - 25 7. 一种表达载体, 其包含核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示的 DNA 和核苷酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示的 DNA。
 8. 一种宿主细胞, 其包含权利要求 7 所述的表达载体。