

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040834**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.02

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

(21) Номер заявки
201890548

(22) Дата подачи заявки
2011.11.02

(54) **ГУМАНИЗИРОВАННОЕ АНТИТЕЛО К IL-23p19 ИЛИ ЕГО
АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ, ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ И
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ УКАЗАННОЕ АНТИТЕЛО**

(31) **61/410,158; 61/411,953; 61/412,594;
61/448,785**

(56) **WO-A2-2007027714
WO-A2-2007085955
WO-A2-2007024846**

(32) **2010.11.04; 2010.11.10; 2010.11.11;
2011.03.03**

CHAN ANDREW C. ET AL.: "Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation", NATURE REVIEWS. IMMUNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 10, no. 5, 1 May 2010 (2010-05-01), pages 301-316, XP002665072, ISSN: 1474-1733, DOI: 10.1038/NRI2761

(33) **US**

(43) **2018.07.31**

(62) **201300530; 2011.11.02**

ALEGRE M.-L. ET AL.: "A NON-ACTIVATING HUMANIZED ANTI-CD3 MONOCLONAL ANTIBODY RETAINS IMMUNOSUPPRESSIVE PROPERTIES IN VIVO", TRANSPLANTATION. WILLIAMS AND WILKINS, BALTIMORE, US, vol. 57, no. 11, 1 June 1994 (1994-06-01), pages 1537-1543, XP008036788, ISSN: 0041-1337

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

WOODLE E. STEVE ET AL.: "Phase I trial of a humanized, Fc receptor nonbinding OKT3 antibody, huOKT3gamma1 (Ala-Ala) in the treatment of acute renal allograft rejection", TRANSPLANTATION. WILLIAMS AND WILKINS, BALTIMORE, US, vol. 68, no. 5, 15 September 1999 (1999-09-15), pages 608-616, XP009134473, ISSN: 0041-1337

(72) Изобретатель:
**Баррет Рейчел Ребекка, Кэнеде Кейт,
Катрон Катрина Мэри, Коупнхейвер
Роберт, Фрего Ли Эдуард, Реймонд
Эрнст Ли, Сингх Санджая, Чжу
Сяньгян (US)**

WO-A2-2006036922

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

(57) В изобретении описаны гуманизированные антитела к IL-23p19 и применение указанного антитела для лечения воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, респираторного заболевания, метаболического нарушения или рака, а именно для лечения псориаза, воспалительного заболевания кишечника, псориатического артрита, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, болезни Крона, язвенного колита или анкилозирующего спондилита. Кроме того, предложенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть использованы для лечения астмы или хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Кроме того, в изобретении описаны фармацевтическая композиция, содержащая предложенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, и фармацевтически приемлемый носитель.

B1**040834****040834****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится в целом к антителам к IL-23p19, предназначенным для диагностического и терапевтического применения. Более конкретно, описаны гуманизированные антитела к IL-23p19 и их применения для лечения различных заболеваний или нарушений. Описаны также фармацевтические композиции, содержащие указанные соединения.

Предпосылки создания изобретения

У высших эукариотических организмов в процессе эволюции развился сложный ответ на патогены, который сначала проявляется в виде врожденного иммунного ответа, после чего запускается адаптивный иммунный ответ. В сочетании друг с другом эти два механизма не только уничтожают патогены, которые заражают организм, но и создают также долговременный иммунологический ответ против последующих воздействий. Дефицит указанных ответов может приводить к повышенной чувствительности к инфекциям и/или изменениям адаптивного иммунного ответа, что приводит к хроническому воспалению и аутоиммунитету. IL-12, гетеродимерный цитокин, состоящий из белковых субъединиц p40 и p35, в течение многих лет рассматривался как цитокин, являющийся отличительным признаком врожденного иммунного ответа, который оказывает очень большое влияние на адаптивный иммунитет. Однако данные исследований биологической роли этого цитокина привели к неоднозначным результатам. Например, в то время как мыши с дефицитом p40 обладали устойчивостью к индуцированному коллагеном артриту (CIA) и экспериментальному аутоиммунному энцефаломиелиту (ЕАЕ), мыши с дефицитом p35 обладали чувствительностью к обоим заболеваниям, и у них отмечалось даже обострение болезни. Указанные "загадки" начали разрешаться с открытием в конце 1990-х годов нового представителя семейства IL-12-цитокинов, играющего особую роль в иммунном ответе, а именно, IL-23.

IL-23 состоит из общей с IL-12 субъединицы (p40) и уникальной субъединицы p19. Несмотря на присутствие общей субъединицы p40, роли IL-23 и IL-12 являются совершенно различными. IL-12 играет важную роль для Th1-ответов посредством усиления дифференцировки, пролиферации и активации Th1-клеток. В противоположность этому, IL-23 обеспечивает развитие и поддержание недавно обнаруженной популяции CD4- Т-клеток-хелперов, обозначенных как Th17-клетки из-за их способности продуцировать IL-17 и родственные цитокины. Имеются убедительные данные о том, что IL-23 принимает участие в хроническом аутоиммунном воспалении, и модуляция активности IL-23 может представлять собой перспективный терапевтический подход к лечению аутоиммунных заболеваний.

Таким образом, существует необходимость в обладающих ценными фармакологическими свойствами молекулах-антагонистах IL-23, которые можно применять в качестве терапевтических средств для лечения заболеваний, в частности иммунологических и аутоиммунных заболеваний у людей.

Таким образом, одна из задач, положенных в основу настоящего изобретения, заключалась в том, чтобы разработать анти-IL-23 антагонистические молекулы, в частности анти-IL-23 антагонистические молекулы, которые обладают высокой аффинностью связывания с IL-23.

Следующая задача, положенная в основу настоящего изобретения, заключалась в том, чтобы разработать анти-IL-23 антагонистические молекулы, которые обладают высокой специфичностью в отношении IL-23.

Следующая задача, положенная в основу настоящего изобретения, заключалась в том, чтобы разработать анти-IL-23 антагонисты, которые обладают высокой блокирующей активностью в отношении ассоциации IL-23 с его рецептором.

Следующая задача, положенная в основу настоящего изобретения, заключалась в том, чтобы разработать анти-IL-23 антагонисты, которые обладают эффективной клеточной активностью.

Следующая задача, положенная в основу настоящего изобретения, заключалась в том, чтобы разработать анти-IL-23 антагонисты, которые обладают предпочтительной биодоступностью.

Следующая задача, положенная в основу настоящего изобретения, заключалась в том, чтобы разработать анти-IL-23 антагонисты, которые обладают предпочтительными биофизическими свойствами.

Следующими задачами, положенными в основу настоящего изобретения, являются комбинации любых из указанных выше задач.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение направлено на решение указанных выше задач и в нем предложены антитела, которые связываются с субъединицей p19 белка IL-23 с высокой аффинностью, ингибирует стимулированное IL-23 производство IL-17 в мышинных спленоцитах. Это антитело, не связывается с IL-12 и не оказывает антагонистическое действие на IL-12, который является близкородственным к IL-23 представителем семейства.

Одним из объектов настоящего изобретения является гуманизированное антитело к IL-23p19 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную 5 последовательность SEQ ID NO: 19 (CDR1-L); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 (CDR2-L) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 (CDR3-L); и

б) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 или 67 (CDR1-H); аминокислотную 10 последовательность SEQ ID NO: 64 (CDR2-H) и

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 (CDR3-H), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет величину K_D для IL-23 меньше 40 пМ.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения гуманизированное антитело к IL-23p19 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 (CDR1-L); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 (CDR2-L) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 20 (CDR3-L); и

б) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 (CDR1-H); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (CDR2-H) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 (CDR3-H).

В другом предпочтительном варианте гуманизированное антитело к IL-23p19 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 (CDR1-L); аминокислотную последовательность 30 SEQ ID NO: 20 (CDR2-L) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 (CDR3-L); и

б) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 (CDR1-H); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (CDR2-H) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 (CDR3-H).

Указанное гуманизированное антитело к IL-23p19 может представлять собой моноклональное антитело.

Другим объектом данного изобретения является применение указанного антитела для лечения воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, респираторного заболевания, метаболического нарушения или рака.

А именно, для лечения псориаза, воспалительного заболевания кишечника, псориатического артрита, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, болезни Крона, язвенного колита или анкилозирующего спондилита.

Кроме того, предложенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть использовано для лечения астмы или хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ).

Еще одним объектом данного изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая предложенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 - сравнительный анализ первичной структуры мышиной и гуманизированных вариабельных областей. На фиг. 1а - антитело к IL-23p19 6B8 со сконструированными V_κ-областями;

на фиг. 1б - антитело к IL-23p19 6B8 со сконструированными V_H-областями. Нумерация аминокислот соответствует стандартной системе нумерации Кэбота. Обычным шрифтом обозначены участки человеческой последовательности; курсивом/подчеркнутым шрифтом участки мышиной последовательности; затемненным шрифтом участки синтетической последовательности; жирным шрифтом/курсивом/подчеркнутым шрифтом обозначены CDR;

на фиг. 2 - результаты анализа связывания в конкурентных условиях человеческого IL-23 с IL-23R/Fc.

Подробное описание изобретения

Субъединица p19 IL-23 (которую обозначают также как "IL-23p19" и "субъединица p19") представляет собой состоящий из 189 аминокислот полипептид, содержащий состоящую из 21 аминокислоты (ак) лидерную последовательность (Orpmann et al., Immunity 13, 2000, p. 715, SEQ ID NO: 181). Биологическую активность молекулы можно обнаружить только после ее спаривания с субъединицей IL-12p40 с образованием IL-23. IL-23 экспрессируется главным образом активированными дендритными клетками (DC) и фагоцитарными клетками. Установлено, что рецептор IL-23 состоит из субъединицы IL-12Rβ1 IL-12-рецептора, спаренной с уникальной субъединицей, обозначенной как IL-23R (Parham et al., J. Immunol. 168, 2002, p. 5699). Экспрессия рецептора главным образом имеет место на Т-клетках памяти и NK-клетках. Таки образом, экспрессия указанной пары цитокин:рецептор, вероятно, ограничена конкретными популяциями иммунных клеток. Хотя сначала предполагалось, что IL-12 и IL-23 могут обладать общими функциями, получены данные, свидетельствующие о том, что картина является другой. В то время как IL-12 играет основную роль в производстве Th1-клеток, установлено, что IL-23 играет решающее значение в производстве и поддержании недавно обнаруженной подпопуляции Th-клеток, обозначенных как Th17 (Kikly et al., Curr. Opin. Immunol. 18, 2006, p. 670, Kastelein et al., Ann. Rev. Immunol. 25, 2007, p. 221). Эти клетки продуцируют IL-17A, IL-17F, IL-22 и другие провоспалительные цитокины, такие как IL-6 и TNF-α. Как будет описано ниже, изучение на животных моделях роли указанных Th17-клеток продемонстрировало их важность в качестве "движущей силы" при хроническом воспалении и аутоиммунитете.

Гуманизированные антитела согласно изобретению идентифицировали на основе последовательно-

стей некоторых наиболее предпочтительных ("лидерных") мышинных антител.

"Лидерные" мышинные антитела выводили из мышинных гибридом. Иммунизацию мышей осуществляли с использованием различных методик. Например, антитела, специфические в отношении человеческих белков IL-23p19 или их фрагментов, могут вырабатываться против иммуногенного антигена, такого как выделенный белок IL-23p19, выделенный белок IL-23, выделенный гибридный белок IL-23 и/или фрагмент любого из указанных выше белков (включая синтетические пептиды). Например, для иммунизации мышей используют гибридный белок IL-23, содержащий мышиную субъединицу IL-23p40 и человеческую субъединицу IL-23p19. Для получения иммуногенных антигенов и производства моноклональных антител можно применять любую приемлемую методику, известную в данной области.

"Лидерные" мышинные антитела выбирали на основе их высокой аффинности к человеческому IL-23. Отобранные мышинные антитела гуманизировали с получением гуманизированных антител. Эти гуманизированные антитела, связываются с человеческим IL-23 с высокой аффинностью. Таким образом, антитело к IL-23p19 характеризуется величиной K_D , составляющей менее чем 40 пМ. Антитело связывается с IL-23p19 с высокой аффинностью в отсутствии человеческой сыворотки или в присутствии 50% человеческой сыворотки.

Гуманизированное антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, связывается также с IL-23 обезьян циномоглус с высокой аффинностью.

Оно связывается с IL-23, но не связывается с IL-12. и не оказывает интерферирующего воздействия на биологическую активность IL-12, который является близкородственным к IL-23 представителем семейства.

Антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, ингибирует стимулированное IL-23 производство IL-17 мышинными спленоцитами и ингибирует индуцируемое IL-23 фосфорилирование STAT3 в DB-клетках.

Гуманизированное антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, антагонизирует действие IL-23 посредством связывания с субъединицей p19 IL-23, например, при оценке по ингибированию цитокинов, таких как IL-17 и IL-22, производство которых стимулируется IL-23, и что определяют по снижению уровней указанных цитокинов.

Гуманизированное антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, обладает предпочтительным фармакокинетическим (ФК) профилем, например, временем полужизни *in vivo* в организме обезьян циномоглус и обладает предпочтительными биофизическими свойствами, такими, например, как качество, стабильность или растворимость.

Антитело к IL-23p19 может представлять собой моноклональное антитело. Антитело к IL-23p19 представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, например, полноразмерное гуманизированное моноклональное антитело.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически распознает "антигенный эпитоп IL-23p19" или "эпитоп IL-23p19". В контексте настоящего описания эти понятия относятся к молекуле (например, пептиду) или фрагменту молекулы, которая/который обладает способностью к иммунологической реакции с антителом к IL-23p19, и, например, включает антигенную детерминанту IL-23p19, распознаваемую любым из антител, имеющих следующую комбинацию последовательностей легкой цепи/тяжелой цепи: SEQ ID NO: 84/121, 86/123, 88/125, 90/127, 91/128, 93/130, 95/132, 97/134, 99/136, 101/138, 103/140, 105/142, 107/144, 109/146, 111/148, 113/150, 115/152, 117/154, 119/156, 160/166, 160/168, 158/166 или 158/168. Антигенные эпитопы IL-23p19 могут быть включены в белки, белковые фрагменты, пептиды и т.п. Эпитопы в большинстве случаев представляют собой белки, короткие олигопептиды, миметики олигопептидов (например, органические соединения, которые имитируют связывающую способность антигена IL-23p19) или их комбинации. Считается, что минимальный размер пептидного или полипептидного эпитопа для антитела должен составлять примерно 4-5 аминокислот. Пептидные или полипептидные эпитопы содержат, например, по меньшей мере семь аминокислот, или, например, по меньшей мере девять аминокислот, или, например, от примерно 15 до примерно 20 аминокислот. Поскольку антитело может распознавать антигенный пептид или полипептид в его третичной форме, то не требуется, чтобы аминокислоты, входящие в эпитоп, были смежными, в некоторых случаях они могут даже не находиться на одной и той же пептидной цепи. Эпитопы можно определять с помощью различных методик, известных в данной области, таких как рентгеновская кристаллография, масс-спектрометрия дейтеро/водородного обмена (HXMS), сайтнаправленный мутагенез, аланин-сканирующий мутагенез и методы пептидного скрининга.

Общая структура антител или иммуноглобулина хорошо известна специалистам в данной области. Эти молекулы представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины, как правило с молекулярной массой примерно 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей, и, как правило, их обозначают как полноразмерные антитела. Каждая легкая цепь ковалентно связана с тяжелой цепью с помощью одной дисульфидной связи с образованием гетеродимера, и гетеротетрамерная молекула образуется посредством ковалентной дисульфидной связи между двумя идентичными тяжелыми цепями гетеродимеров. Хотя легкие и тяжелые цепи связаны с помощью одной дисульфидной связи, количество дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями варьируется в зависи-

мости от изотипа иммуноглобулина. Каждая тяжелая и легкая цепь имеет также равномерно распределенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет аминоконцевой вариабельный домен (V_H), за которым расположены три или четыре константных домена (C_H1 , C_H2 , C_H3 и C_H4), а также шарнирный участок между C_H1 и C_H2 . Каждая легкая цепь имеет два домена, аминоконцевой вариабельный домен (V_L) и карбоксиконцевой константный домен (C_L). V_L -домен нековалентно связан с V_H -доменом, а C_L -домен, как правило, ковалентно связан с C_H1 -доменом через дисульфидную связь. Считается, что определенные аминокислотные остатки образуют поверхность раздела между вариабельными областями легких и тяжелых цепей (Chothia et al., J. Mol. Biol. 186, 1985, p. 651-663). В контексте настоящего описания вариабельные домены обозначают также как вариабельные области.

Определенные участки в вариабельных доменах значительно различаются у различных антител, т.е. они являются "гипервариабельными". Эти гипервариабельные участки содержат остатки, которые непосредственно участвуют в связывании и определяют специфичность каждого конкретного антитела в отношении специфической для него антигенной детерминанты. Гипервариабельность в вариабельных доменах, как легкой цепи, так и тяжелой цепи, концентрируется в трех сегментах, которые обозначают как определяющие комплементарность участки (гипервариабельные участки) (CDR) или гипервариабельные петли (HVL). CDR определяют путем сравнения последовательностей согласно методу, описанному у Kabat et al. в: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991, а HVL (которые обозначают также как CDR) структурно определяют на основе трехмерной структуры вариабельного домена согласно методу, описанному у Chothia и Lesk, J. Mol. Biol. 196, 1987, p. 901-917. Эти два метода приводят к некоторым различиям при идентификации CDR. Согласно номенклатуре Кэбота CDR-L1 расположен примерно на остатках 24-34, CDR-L2 примерно на остатках 50-56 и CDR-L3 примерно на остатках 89-97 в вариабельном домене легкой цепи; CDR-H1 расположен примерно на остатках 31-35, CDR-H2 примерно на остатках 50-65 и CDR-H3 примерно на остатках 95-102 в вариабельном домене тяжелой цепи. Точные номера остатков, которые образуют конкретный CDR, должны варьироваться в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области могут на основе аминокислотной последовательности вариабельной области антитела с использованием общепринятых методов определять, какие остатки содержатся в конкретном CDR. Таким образом, CDR1, CDR2, CDR3 тяжелых и легких цепей определяют уникальные и функциональные свойства, специфические для данного антитела.

Три CDR в каждой из тяжелых и легких цепей разделены каркасными участками (FR), которые содержат последовательности, в меньшей степени имеющие тенденцию к вариабельности. Начиная с аминоконца по направлению к карбоксиконцу вариабельных доменов тяжелых и легких цепей FR и CDR упорядочены следующим образом: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В значительной степени β -складчатая конформация FR позволяет CDR в каждой из цепей находиться в непосредственной близости друг с другом, а также с CDR из другой цепи. Полученная конформация присуща антигенсвязывающему центру (см. Kabat et al., NIH Publ. No. 91-3242, vol. I, 1991, p. 647-669), хотя не является необходимым условием, чтобы все остатки CDR непосредственно участвовали в связывании антигена.

Остатки FR и константные домены Ig не вовлечены непосредственно в связывание антигена, но участвуют в связанной с антигеном и/или опосредуемой антигеном эффекторной функции. Некоторые остатки FR, вероятно, оказывают выраженное воздействие на связывание антигена по меньшей мере тремя путями: путем нековалентного связывания непосредственно с эпитопом, путем взаимодействия с одним или несколькими остатками CDR и путем влияния на поверхность раздела между тяжелыми и легкими цепями. Константные домены не участвуют непосредственно в связывании антигена, но опосредуют различные эффекторные функции Ig, такие как участие антитела в антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичности (ADCC), комплементзависимой цитотоксичности (CDC) и антитело-обусловленном клеточном фагоцитозе (ADCP).

Легкие цепи иммуноглобулинов позвоночных животных относят к одному из двух четко различимых классов, каппа (κ) и лямбда (λ), на основе аминокислотной последовательности константного домена. Для сравнения, тяжелые цепи иммуноглобулинов млекопитающих относят к одному из пяти основных классов с учетом последовательности константных доменов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgG и IgA дополнительно подразделяют на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелых цепей, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, обозначают как α , δ , ϵ , γ и μ соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации классов нативных иммуноглобулинов хорошо известны.

Понятия "антитело", "антитело к IL-23p19", "гуманизированное антитело к IL-23p19", "гуманизированное антитело к эпитопу IL-23p19" и "вариант гуманизированного антитела к эпитопу IL-23p19" относятся, в частности, к моноклональным антителам (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональным антителам, мультиспецифическим антителам (например, биспецифическим антителам) и фрагментам антител, таким как вариабельные домены и другие участки антител, которые обладают требуемой биологической активностью, например способностью связываться с IL-23p19. Понятие "моноклональное антитело" (MAт) относится к антителу, которое является высоко специфическим, его ми-

шенью является индивидуальная антигенная детерминанта, "эпитоп". Таким образом, прилагательное "моноклональные" указывает на отличительный признак антител, мишенью которых является идентичный эпитоп, и оно не связано с требованием к получению антител с помощью какого-либо конкретного метода. Должно быть очевидно, что моноклональные антитела можно получать с помощью любой техники или методологии, известной в данной области; включая, например, метод гибридом (Kohler et al., *Nature* 256, 1975, p. 495), или методы рекомбинантной ДНК, известные в данной области (см., например, US № 4816567), или методы выделения моноклональных полученных с помощью рекомбинантной ДНК антител с использованием фаговых библиотек антител с помощью методик, которые описаны у Clackson et al., *Nature* 352, 1991, p. 624-628 и у Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 1991, p. 581-597.

Понятие "мономер" относится к гомогенной форме антитела. Например, в случае полноразмерного антитела мономер означает мономерное антитело, которое имеет две идентичные тяжелые цепи и две идентичные легкие цепи.

Химерные антитела состоят из переменных областей тяжелых и легких цепей антител из одного вида (например, из млекопитающего кроме человека, такого как мышь) и константных областей тяжелой и легкой цепи антитела из других видов (например, человека), и их можно получать путем соединения последовательностей ДНК, кодирующих переменные области антитела из первого вида (например, мыши), с последовательностями ДНК константных областей антитела из второго вида (например, человека), и трансформации хозяина экспрессионным вектором, содержащим связанные последовательности, что позволяет хозяину продуцировать химерное антитело. В альтернативном варианте химерное антитело может также представлять собой антитело, в котором одна или несколько областей или доменов тяжелой и/или легкой цепи идентичны, гомологичны или являются вариантом соответствующей последовательности в моноклональном антителе из другого класса или изотипа иммуноглобулина или из консенсусной последовательности, или последовательности зародышей линии. Химерные антитела могут включать фрагменты указанных антител при условии, что фрагмент антитела обладает требуемой биологической активностью родительского антитела, например способностью связываться с одним и тем же эпитопом (см., например, US № 4816567; и Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1984, p. 6851-6855).

Понятия "фрагмент антитела", "фрагмент антитела к IL-23p19", "фрагмент антитела к эпитопу IL-23p19", "фрагмент гуманизированного антитела к IL-23p19", "фрагмент гуманизированного антитела к эпитопу IL-23p19", "фрагмент варианта гуманизированного антитела к эпитопу IL-23p19" относятся к части полноразмерного антитела к IL-23p19, в котором сохраняется переменная область или ее функциональная способность, например, специфичность связывания с эпитопом IL-23p19. Примерами фрагментов антител являются (но, не ограничиваясь только ими) Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, Fd-, Fv-, scFv- и scFv-Fc-фрагмент, димерное антитело (диабоди), линейное антитело, одноцепочечное антитело, мини-тело, димерное антитело, образованное из фрагментов антитела, и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Полноразмерные антитела можно обрабатывать ферментами, такими как папаин или пепсин, с получением требуемых фрагментов антител. Расщепление папаином применяют для получения двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов антител, которые называют "Fab"-фрагментами, каждый с одним антигенсвязывающим центром, при этом оставшуюся часть обозначают как "Fc"-фрагмент. Fab-фрагмент содержит также константный домен легкой цепи и C_H1-домен тяжелой цепи. После обработки пепсином получают F(ab')₂-фрагмент, который несет два антигенсвязывающих центра и все еще сохраняет способность к перекрестному сшиванию с антигеном.

Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов присутствием дополнительных остатков, включая один или несколько остатков цистеина из шарнирной области антитела на C-конце C_H1-домена. F(ab')₂-фрагменты антител представляют собой пары Fab'-фрагментов, связанных с помощью остатков цистеина в шарнирной области. Известны другие химические сочетания фрагментов антител.

"Fv"-фрагмент содержит полный антиген-распознающий и антиген-связывающий центр, состоящий из димера, включающего переменный домен одной тяжелой и одной легкой цепи, которые находятся в тесной нековалентной ассоциации. В этой конфигурации три CDR каждого переменного домена взаимодействуют с определенным антигенсвязывающим центром на поверхности димера V_H-V_L. В целом, шесть CDR обуславливают специфичность антитела в отношении связывания антигена.

"Одноцепочечный Fv" или "scFv"-фрагмент антитела представляет собой одноцепочечный Fv-вариант, содержащий V_H- и V_L-домены антитела, при этом домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Одноцепочечный Fv обладает способностью распознавать антиген и связываться с ним. Полипептид scFv необязательно может содержать также полипептидный линкер, расположенный между V_H- и V_L-доменами, для облегчения образования трехмерной структуры, требуемой для связывания scFv с антигеном (см., например, Pluckthun, в: *The Pharmacology of monoclonal Antibodies*, vol. 113, под ред. Rosenberg и Moore, изд-во Springer-Verlag, New York, 1991, p. 269-315).

Понятие "димерное антитело (диабоди)" относится к небольшим фрагментам антитела с двумя антигенсвязывающими центрами, при этом фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (V_H), сцепленный с переменным доменом легкой цепи (V_L) в одной и той же полипептидной цепи (V_H-V_L или

V_L-V_H). Димерные антитела описаны более подробно например, у Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, p. 6444-6448.

Другие обладающие способностью к распознаванию фрагменты антител включают фрагменты, которые содержат пару расположенных в виде тандема Fd-сегментов ($V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$), образующих пару антигенсвязывающих участков. Указанные "линейные антитела" могут быть биспецифическими или моноспецифическими, что описано, например, у Zapata et al., Protein Eng. 8(10), 1995, p. 1057-1062.

Гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела представляет собой специфический тип химерного антитела, которое включает вариант аминокислотной последовательности иммуноглобулина или его фрагмента, который обладает способностью связываться с предварительно определенным антигеном и который содержит один или несколько FR, который(ые) имеет(ют) аминокислотную последовательность, практически соответствующую последовательности человеческого иммуноглобулина, и один или несколько CDR, который(ые) имеет(ют) аминокислотную последовательность, которая практически соответствует аминокислотной последовательности нечеловеческого иммуноглобулина. Указанную нечеловеческую аминокислотную последовательность, которую часто обозначают как "импортная" последовательность, как правило, получают из "импортного" домена антитела, в частности, варибельного домена. В целом, гуманизированное антитело включает по меньшей мере CDR или HVL нечеловеческого антитела, встроенные между FR варибельного домена человеческой тяжелой или легкой цепи. В настоящем изобретении описаны специфические гуманизированные антитела к IL-23p19, которые содержат CDR, выведенные из мышиных моноклональных антител, или гуманизированные CDR, которые представлены в таблицах 3 и 4, встроенные между FR в последовательностях варибельных доменов тяжелой и легкой цепи человеческой зародышевой линии. Должно быть очевидно, что определенные остатки мышиного FR можно импортировать для обеспечения функции гуманизированных антител, и следовательно, определенные остатки последовательностей варибельных доменов тяжелой и легкой цепи человеческой зародышевой линии модифицируют для того, чтобы они были такими же как в соответствующей мышиной последовательности.

Гуманизированное антитело к IL-23p19 может содержать практически полностью по меньшей мере один и, как правило, два варибельных домена (таких, например, как входящие в Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, Fabc- и Fv-фрагменты), в которых все или практически все CDR соответствуют CDR нечеловеческих иммуноглобулинов, а все CDR представляют собой мышиные или гуманизированные последовательности, подробно описанные в представленных ниже в таблицах 1-4, и все или практически все FR представляют собой FR, которые имеют консенсусную последовательность или последовательность зародышевой линии человеческого иммуноглобулина. В другом объекте изобретения гуманизированное антитело к IL-23p19 включает также по меньшей мере часть Fc-области иммуноглобулина, как правило, человеческого иммуноглобулина. Как правило, антитело должно содержать как легкую цепь, так и по меньшей мере варибельный домен тяжелой цепи. Антитело может включать также при необходимости один или несколько из следующих участков: C_{H1} шарнирная область, C_{H2} , C_{H3} и/или C_{H4} тяжелой цепи.

Гуманизированное антитело к IL-23p19 можно выбирать из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Например, константный домен может представлять собой комплементфиксирующий константный домен, если требуется, чтобы гуманизированное антитело обладало цитотоксической активностью, и изотип, как правило, представляет собой IgG₁. Если указанная цитотоксическая активность не требуется, то константный домен может относиться к другому изотипу, например, IgG₂. В альтернативном варианте гуманизированное антитело к IL-23p19 может содержать последовательности более чем из одного класса или изотипа иммуноглобулинов, и выбор конкретных константных доменов для оптимизации требуемых эффекторных функций находится в компетенции обычного специалиста в данной области. Конкретно антитела могут представлять собой антитела изотипа IgG₁ и более конкретно антитела изотипа IgG₁, в которых "выключены" эффекторные функции.

FR- и CDR- или HVL-участки гуманизированного антитела к IL-23p19 не обязательно должны точно соответствовать родительским последовательностям. Например, один или несколько остатков в импортном CDR или HVL или в консенсусной последовательности или последовательности зародышевой линии FR можно изменять (например, посредством мутагенеза) путем замены, инсерции или делеции, в результате чего полученный аминокислотный остаток становится не идентичным исходному остатку в соответствующем положении любой родительской последовательности, но, тем не менее, антитело сохраняет функцию, такую как способность связываться с IL-23p19. Указанное изменение, как правило, не должно быть обширным и должно представлять собой консервативные изменения. Как правило, по меньшей мере 75% остатков, чаще по меньшей мере 90% и наиболее часто более 95% или более 98%, или более 99%, гуманизированного антитела должно соответствовать остаткам родительской консенсусной последовательности или последовательности FR зародышевой линии и импортных последовательностей CDR.

Остатки иммуноглобулина, которые влияют на поверхность раздела между варибельными областями тяжелой и легкой цепи ("поверхность раздела V_L-V_H "), представляют собой остатки, которые влияют на близость или ориентацию двух цепей относительно друг друга. Конкретными остатками, которые

могут участвовать во взаимодействиях между цепями, являются остатки V_L 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96 и 98 и остатки V_H 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100 и 103 (согласно системе нумерации, предложенной Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987)). В US № 6407213 обсуждается также, что в указанном взаимодействии могут участвовать такие остатки, как остатки V_L 43 и 85 и остатки V_H 43 и 60. Хотя эти остатки указаны только для человеческого IgG, их можно рассматривать и для других видов. Важные остатки антитела, которые, как ожидается, могут участвовать во взаимодействиях между цепями, отбирают для замены в консенсусной последовательности.

Понятия "консенсусная последовательность" и "консенсусное антитело" относятся к аминокислотной последовательности, которая содержит наиболее часто встречающийся аминокислотный остаток в каждом положении во всех иммуноглобулинах любого класса, изотипа или в любой субъединичной структуре, например вариабельном домене человеческого иммуноглобулина. Консенсусная последовательность может базироваться на иммуноглобулинах конкретных видов или множества видов. Под "консенсусной/консенсусным" последовательностью, структурой или антителом подразумевают консенсусную человеческую последовательность, указанную в конкретных вариантах осуществления изобретения, и понятие относится к аминокислотной последовательности, которая содержит наиболее часто встречающиеся остатки в каждом положении во всех человеческих иммуноглобулинах конкретного класса, изотипа или субъединичной структуры. Таким образом, консенсусная последовательность содержит аминокислотную последовательность, которая имеет в каждом положении аминокислоту, которая присутствует в одном или нескольких известных иммуноглобулинах, но которая может не представлять собой точную копию полной аминокислотной последовательности любого индивидуального иммуноглобулина. Вариабельную область консенсусной последовательности не получают из какого-либо встречающегося в естественных условиях антитела или иммуноглобулина (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991) и его вариантов. Консенсусные последовательности FR тяжелой и легкой цепи и их варианты представляют собой ценные последовательности для получения гуманизированных антител к IL-23p19 (см., например, US №№ 6037454 и 6054297).

Последовательности человеческой зародышевой линии присутствуют в естественных условиях в популяции человеческих антител. Комбинация этих генов зародышевой линии создает разнообразие антител. Последовательности зародышевой линии антитела легкой цепи антитела получают из консервативных γ -генов и $\jmath$ -генов человеческой зародышевой линии каппа или ламбда. Аналогично этому последовательности тяжелой цепи получают из ν -, d- и $\jmath$ -генов зародышевой линии (LeFranc M.-P. и LeFranc G., "The Immunoglobulin Facts Book", изд-во Academic Press, 2001).

В контексте настоящего описания каждое из понятий "вариант", "вариант антитела к IL-23p19", "гуманизированный вариант антитела к IL-23p19" или "вариант гуманизированного антитела к IL-23p19" относится к гуманизированному антителу к IL-23p19, которое имеет по меньшей мере последовательность мышиного CDR вариабельной области легкой цепи, выбранную из любых последовательностей, представленных в табл. 1, или последовательность мышиного CDR тяжелой цепи, выведенную из мышиного моноклонального антитела, представленного в табл. 2. К вариантам относятся последовательности, имеющие одну или несколько аминокислотных замен в вариабельных областях одной или обеих легких цепей или тяжелых цепей, при условии, что аминокислотная замена не оказывает существенного воздействия на связывание антитела с IL-23p19. Примерами гуманизированных антител являются антитела, обозначенные как Антитело А, Антитело В, Антитело С и Антитело D и их различные тяжелые и легкие цепи, представленные в SEQ ID NO: 174 и 180 и SEQ ID NO: 176 и 178 соответственно.

"Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое идентифицировано и отделено и/или очищено от компонента его естественного окружения. Загрязняющие компоненты естественного окружения антитела представляют собой субстанции, которые могут влиять на диагностическое или терапевтическое применение антитела и могут представлять собой ферменты, гормоны или другие белковые или небелковые растворенные вещества. Выделенное антитело должно представлять собой антитело, очищенное до степени, превышающей 95 мас. %.

Выделенное антитело представляет собой антитело *in situ* внутри рекомбинантных клеток, в которых оно продуцировано, если в нем не присутствует ни один компонент естественного окружения антитела. Однако, как правило, выделенное антитело получают с помощью по меньшей мере одной стадии очистки, во время которой удаляют рекомбинантный клеточный материал.

Понятие "характеристика антитела" относится к факторам, которые участвуют в распознавании антителом антигена или эффективности антитела *in vivo*. Изменения в аминокислотной последовательности антитела могут влиять на свойства антитела, такие как фолдинг, и могут влиять на физические факторы, такие как начальная скорость связывания антитела с антигеном (k_a), константа диссоциации антитела от антигена (k_d), константа аффинности антитела к антигену (K_d), конформация антитела, стабильность белка и время полужизни антитела.

В контексте настоящего описания понятие "эпитопное мечение" относится к антителу к IL-23p19, слитому с "эпитопной меткой". "Эпитопная метка" представляет собой полипептид, состоящий из доста-

точного количества аминокислот для создания эпитопа для производства антитела, при этом ее создают так, чтобы она не оказывала воздействия на требуемую активность гуманизированного антитела к IL-23p19. Эпитопная метка, как правило, является в значительной степени уникальной, в результате чего антитело, которое образуется против эпитопной метки, не дает выраженную перекрестную реакцию с другими эпитопами. Приемлемые полипептиды-метки, как правило, содержат по меньшей мере 6 аминокислотных остатков и, как правило, содержат примерно 8-50 аминокислотных остатков или примерно 9-30 остатков.

Примерами эпитопных меток и антител, которые связываются с эпитопом, являются полипептид-метка flu HA (HA вируса гриппа) и соответствующее ему антитело 12CA5 (Field et al., Mol. Cell. Biol. 8, 1988? 2159-2165); c-мус-метка и соответствующие ей антитела 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 и 9E10 (Evan et al., Mol. Cell. Biol. 5(12), 1985, p. 3610-3616); и метка, включающая гликопротеин D (gD) вируса герпеса простого, и соответствующее ей антитело (Paborsky et al. Protein Engineering, 3(6), 1990, p. 547-553). Эпитопная метка представляет собой "эпитоп, связывающийся с рецептором спасения". В контексте настоящего описания понятие "эпитоп, связывающийся с рецептором спасения" относится к эпитопу Fc-области молекулы IgG (такой как IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄), ответственному за удлинение времени полужизни молекулы IgG in vivo в сыворотке.

Антитела возможно конъюгировать с цитотоксическим агентом. Он может представлять собой любую субстанцию, которая ингибирует или препятствует функции клеток и/или вызывает деструкцию клеток. Под понятие подпадают радиоактивные изотопы (такие как I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰ и Re¹⁸⁶), химиотерапевтические средства и токсины, такие как обладающие ферментативной активностью токсины, полученные из бактерий, грибов, растений или животных, и их фрагменты. Указанные цитотоксические агенты можно сшивать с гуманизированными антителами с помощью стандартных процедур и применять, например, для лечения пациента, которому показана терапия на основе антитела.

"Химиотерапевтическое средство" представляет собой химическое соединение, которое можно применять для лечения рака. Известны многочисленные примеры химиотерапевтических средств, которые можно конъюгировать с терапевтическими антителами. Примерами указанных химиотерапевтических средств являются алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфат, импросульфат и пипосульфат; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилендиотфосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (прежде всего буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелесин, карзелесин и бизелесин); криптофицины (прежде всего криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин, ауристатины (включая такие аналоги, как монометил-ауристатин E и монометил-ауристатин F); дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CBI-TMI); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотные аналоги горчичного газа (иприта), такие как хлорамбуцил, хломафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид оксида мехлорметамин, мелфалан, новембихин, фенэстерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин (азотистоириповое производное урацила); нитрозмочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихеаминцин, прежде всего калихеаминцин гамма II и калихеаминцин phiII (см., например, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33, p. 183-186); динемин, включая динемин A; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также неокарзиностатиновый хромофор и родственный хромопротеин хромофоров энединовых антибиотиков), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофелин, хромомицины, дактиномицин, даунорубин, деторубин, 6-диаза-5-оксо-L-норлейцин, доксорубин (AdriamycinTM) (включая морфолино-доксорубин, цианморфолино-доксорубин, 2-пирролино-доксорубин и дезоксидоксорубин), эпирубин, эзорубин, идарубин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин C, микофенольная кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, пофиромицин, пуромицин, хеломицин, родарубин, стрептоницин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамитрин, тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуредин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксурин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолонпропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестостерон; антиадренергетики, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; заменитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеллатон; альдофосфамидгликозид; аминолевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдотраксат; дефофамин; демоколлин; диазихон; элформитин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглоид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; майтансиноиды, такие как майтансин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамед; пирарубин; лосоксантрон; подафиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарабин; PSK®; разоксан; ризоксин; сизофуран; спирогерманий; тенаузоновая ки-

слота; триазион; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (прежде всего токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндесин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например паклитаксел (TAXOL®, фирма Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, штат Нью-Джерси) и доцетаксел (TAXOTERE®, фирма Rhone-Poulenc Rorer, Энтони, Франция); хлорамбуцил; гемцитабин (Gemzar™); 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин (Navelbine™); новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS-2000; дифторметилорнитин (ДМПО); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин, и их фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше соединений. Также под объем этого определения подпадают антигормональные агенты, которые регулируют или ингибируют действие гормона на опухоли, такие как антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM), включая, например, тамоксифен (включая Nolvadex™), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Fareston™); ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, регулируют производство эстрогена надпочечниками, такие, например, как 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, мегестрола ацетат (Megace™), эксеместан, форместан, фадрозол, ворозол (Rivisor™), летрозол (Femara™) и анастрозол (Arimidex™); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, леупролид и госерелин, а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любого из указанных выше соединений. Любое одно или несколько этих средств можно конъюгировать с гуманизированными антителами с получением ценного терапевтического средства, которое можно применять для лечения различных нарушений.

Антитела можно конъюгировать также с пролекарствами. "Пролекарство" представляет собой предшественник или производное фармацевтически активной субстанции, которое является менее цитотоксичным в отношении опухолевых клеток по сравнению с исходным лекарственным средством и обладает способностью активироваться или превращаться в более активную исходную форму с помощью ферментов (см., например, Wilman в: "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", Biochemicals Society Transactions, 14, 1986, p. 375-382, 615-й симпозиум в Белфасте (1986); и Stella et al. в "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", Directed Drug Delivery, под ред. Borchardt et al., изд-во Humana Press, 1985, p. 247-267). Пригодные пролекарства включают (но, не ограничиваясь ими) фосфатсодержащие пролекарства, тиофосфатсодержащие пролекарства, сульфатсодержащие пролекарства, пептидсодержащие пролекарства, модифицированные D-аминокислотой пролекарства, гликозилированные пролекарства, β-лактамысодержащие пролекарства, пролекарства, содержащие необязательно замещенный феноксиацетамид, или пролекарства, содержащие необязательно замещенный фенилацетамид, 5-фторцитозин- и другие 5-фторуридинсодержащие пролекарства, которые могут превращаться в более активную цитотоксическую свободную лекарственную форму. Примеры цитотоксических лекарственных средств, которые могут образовывать производные в виде пролекарства, включают (но, не ограничиваясь ими) описанные выше химиотерапевтические средства.

Для диагностических целей, а также для мониторинга лечения антитела можно конъюгировать также с меткой, либо только с меткой, либо с меткой в сочетании с дополнительным вторым агентом (пролекарство, химиотерапевтическое средство и т.п.). Метка в отличие от второго дополнительно агента представляет собой субстанцию, которая является выявляемым соединением или выявляемой композицией, и ее можно конъюгировать прямо или косвенно с гуманизированным антителом. Метка сама по себе может представлять собой выявляемую субстанцию (например, радиоизотопные метки или флуоресцентные метки) или, как в случае ферментативной метки, она может катализировать химическое изменение соединения или композиции, представляющего/представляющей собой субстрат, которое можно выявлять. Меченое гуманизированное антитело к IL-23p19 можно готовить и применять для различных целей, включая диагностику *in vitro* и *in vivo*.

Антитела можно готовить таким образом, чтобы они представляли собой часть препарата в виде липосомы, для их эффективного введения *in vivo*. "Липосома" представляет собой небольшой пузырек, состоящий из различного типа липидов, фосфолипидов и/или поверхностно-активных веществ. Липосомы можно применять для введения млекопитающему соединения или композиции, например, гуманизированного антитела к IL-23p19, представленного в настоящем описании, необязательно в сочетании или в комбинации с одним или несколькими фармацевтическими действующими веществами и/или метками. Компоненты липосом обычно упорядочены в виде двухслойной структуры, аналогичной липидной структуре биологических мембран.

"Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена по меньшей мере от одной молекулы нуклеиновой кислоты-примеси, с которой она обычно связана в естественном источнике нуклеиновой кислоты антитела. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от молекулы нуклеиновой кислоты, существующей во встречающихся в естественных условиях клетках.

Для осуществления рекомбинантной экспрессии можно применять одну или несколько контролируемых последовательностей, т.е. полинуклеотидных последовательностей, необходимых для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Пригодные для прокариотических клеток контролируемые последовательности включают, например, последовательности промотора, оператора и сайта связывания рибосомы. В эукариотических клетках контролируемые последовательности включают (но, не ограничиваясь только ими) промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры. Указанные контролируемые последовательности можно применять для экспрессии и производства гуманизированного антитела к IL-23p19 в прокариотических и эукариотических клетках-хозяевах.

Нуклеиновая кислота "функционально связана", если она находится в функциональной связи с другой нуклеотидной последовательностью. Например, нуклеиновая кислота предпоследовательности или секреторного лидера функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если она экспрессируется в виде предпротеина, который принимает участие в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он оказывает воздействие на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, что может облегчать трансляцию. Как правило, "функционально связаны" обозначает, что связанные последовательности ДНК являются смежными, а в случае секреторного лидера, являются смежными и находятся в рамке считывания. Однако энхансеры не обязательно должны быть смежными. Связывание осуществляют путем встраивания лигированием в соответствующие сайты рестрикции. Если такие сайты не существуют, то можно применять синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры.

В контексте настоящего описания понятия "клетка", "линия клеток" и "культура клеток" используются взаимозаменяемо, и все такие понятия включают потомство. Так, понятия "трансформанты" и "трансформированные клетки" включают первичную представляющую интерес клетку и полученные из нее культуры, вне зависимости от количества пересевов.

Понятие "млекопитающее", подлежащее лечению, относится к любому животному, которое принадлежит к классу млекопитающих, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также живущих в зоопарке животных, предназначенных для спорта или комнатных животных, таких как собаки, лошади, кошки, коровы и т.п. Предпочтительно млекопитающее представляет собой человека.

В контексте настоящего описания понятие "нарушение" означает любое состояние, которое можно облегчать посредством лечения гуманизированным антителом к IL-23p19, представленным в настоящем описании. Оно включает хронические и острые нарушения или заболевания, том числе патологические состояния, которые приводят к предрасположенности млекопитающего к рассматриваемому нарушению. Примерами нарушений, которые можно лечить согласно изобретению, являются (но не ограничиваясь только ими) воспалительные, ангиогенные, аутоиммунные и иммунологические нарушения, респираторные нарушения, рак, гематологические злокачественные заболевания, доброкачественные и злокачественные опухоли, лейкозы и лимфоидные злокачественные заболевания.

Понятия "рак" и "раковый" относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающего, которое, как правило, отличается нерегулируемым ростом клеток. Примерами рака являются (но не ограничиваясь только ими) карцинома, лимфома, бластома, саркома и лейкоз.

В контексте настоящего описания понятие "ассоциированное с IL-23 нарушение" или "ассоциированное с IL-23 заболевание" относится к состоянию, при котором активность IL-23 принимает участие в заболевании, и, как правило, происходит аномальная экспрессия IL-23. Ассоциированное с IL-23 нарушение включает заболевания и нарушения иммунной системы, такие как аутоиммунные нарушения и воспалительные нарушения. Указанные состояния включают (но не ограничиваясь только ими) ревматоидный артрит (RA), системную красную волчанку (SLE), склеродерму, синдром Шегрена, рассеянный склероз, псориаз, псориатический артрит, воспалительное заболевание кишечника (например, неспецифический язвенный колит и болезнь Крона), воспаление легких, астму и идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ITP) и анкилозирующий спондилит.

Понятие "внутривенная инфузия" относится к интродукции агента в вену больного животного или человека в течение периода времени, превышающего примерно 15 мин, как правило, в течение примерно 30-90 мин.

Понятие "внутривенный болюс" или "внутривенный импульс" относится к введению лекарственного средства животному или человеку таким образом, чтобы лекарственное средство поступало в организм в течение примерно 15 мин или менее, как правило, 5 мин или менее.

Понятие "подкожное введение" относится к интродукции агента под кожу больного животного или человека, предпочтительно в карман между кожей и низлежащей тканью, путем относительно медленного пролонгированного введения из содержащего лекарственное средство резервуара. Путем прищипывания или оттягивания кожи вверх и в сторону от низлежащей ткани можно создавать карман.

Понятие "подкожная инфузия" относится к интродукции лекарственного средства под кожу больного животного или человека, предпочтительно в карман между кожей и низлежащей тканью, путем относительно медленного пролонгированного введения из содержащего лекарственное средство резервуара в

течение периода времени, составляющего (но, не ограничиваясь только указанным) 30 мин или менее, или 90 мин или менее. Инфузию необязательно можно осуществлять путем подкожной имплантации насоса для введения лекарственного средства, имплантированного под кожу больного животного или человека, при этом насос обеспечивает введение лекарственного средства в предварительно определенном количестве в течение предварительно определенного периода времени, составляющего 30 мин, 90 мин или периода времени, соответствующего продолжительности схемы лечения.

Понятие "подкожный болюс" относится к введению лекарственного средства под кожу больного животного или человека, при этом продолжительность введения лекарственного средства в виде болюса составляет менее примерно 15 мин; менее 5 мин, а еще в течение менее 60 р. Введение осуществляют в карман между кожей и низлежащей тканью, где карман можно создавать путем прищипывания или оттягивания кожи вверх и в сторону от низлежащей ткани.

В контексте настоящего описания понятие "терапевтически эффективное количество" относится к количеству действующего вещества, при использовании которого происходит ослабление или облегчение одного или нескольких симптомов нарушения, на которое направлено лечение. Терапевтически эффективное количество относится к концентрации в сыворотке пациента, при которой, как установлено, действующее вещество является эффективным в отношении замедления развития болезни. Эффективность можно оценивать общепринятыми путями в зависимости от подлежащего лечению состояния.

В контексте настоящего описания понятия "лечение" и "терапия" и т.п. относятся к терапевтическим, а также профилактическим или подавляющим мероприятиям в отношении заболевания или нарушения, которые приводят к любому клинически важному или благоприятному действию, включая (но, не ограничиваясь только ими) облегчение или ослабления одного или нескольких симптомов, регресс, замедление или прекращение развития заболевания или нарушения. Таким образом, например, под понятие "лечение" подпадает введение агента до или после начала проявления симптома заболевания или нарушения, что приводит к предупреждению или устранению одного или нескольких признаков заболевания или нарушения. В другом примере понятие относится к введению агента после клинического проявления болезни для борьбы с симптомами болезни. Кроме того, в контексте настоящего описания понятие "лечение" или "терапия" относятся к введению агента после возникновения и после развития клинических симптомов, где введение оказывает воздействие на клинические параметры заболевания или нарушения, такие как степень повреждения ткани или количество и распространение метастазов, вне зависимости от того, приводит или нет лечение к облегчению заболевания. Кроме того, если применение композиций, содержащих антитела, либо индивидуально, либо в сочетании с другим терапевтическим средством купирует или облегчает по меньшей мере один из симптомов подлежащего лечению нарушения по сравнению с указанным симптомом без применения содержащей гуманизированное антитело к IL-23p19 композиции, то результат следует рассматривать как эффективное лечение требуемого нарушения вне зависимости от того, происходит или нет облегчение всех симптомов нарушения.

Понятие "листовка-вкладыш в упаковке" относится к инструкциям, которые принято включать в предназначенные для продажи упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, методах применения, введения, противопоказаниях и/или мерах предосторожности при применении указанных терапевтических продуктов.

Антитела.

Гуманизированные антитела к IL-23p19 и связывающие агенты могут ингибировать производство ассоциированных с Th17 цитокинов, которые принимают участие в хронических аутоиммунных и воспалительных заболеваниях. Таким образом, гуманизированные антитела к IL-23p19 и связывающие агенты можно применять для лечения различных заболеваний или нарушений. И гуманизированное антитело к IL-23p19, и IL-23p19-связывающий агент включают по меньшей мере участок, который специфически распознает эпитоп IL-23p19 (т.е. антигенсвязывающий фрагмент).

При осуществлении первичной оценки отбирали мышинные антитела на основе их характеристик связывания IL-23p19.

Таким образом такие антитела характеризуются величиной K_D в отношении IL-23, в частности в отношении человеческого IL-23, составляющей менее чем 100 пМ, или величиной K_D , составляющей менее чем 40 пМ, или величиной K_D , составляющей менее чем 20 пМ, или величиной K_D , составляющей менее чем 10 пМ, или величиной K_D , составляющей менее чем 1 пМ.

Отобранные мышинные антитела имеют переменные области легких цепей и переменные области тяжелых цепей, которые представлены в табл. 1 и .:

Таблица 1

Мышиные "лидерные" антитела к IL-23p19 -последовательности VK

2D1vk	GACATTGTGCTGACCAATCTCCAGGTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGG GCCACCATATCCTGCAGAACCAAGTGAAAGTGTTATAGTTATGGCCAAAATTTT ATACACTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATCG TGCATCCAACTGGAATCTGGGATCCCTGCCAGGTTCTAGTGGCAGTGGGTCTA GGACAGACTTCACCTCACCATGAATCCTGTGGAGGCTGATGATGTTGCAACC TATTACTGTGAGCAAACTAATGAGGATCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAA GCTGGAAATAAGA (SEQ ID NO: 83)
	DIVLTQSPGSLAVSLGQRATISCRSTSESVYSYGQNFHWHYQKPGQPPKLLIY RASNLGIPARFSGSGSRDFTLTMPVEADDVATYYCQQTNEPYPYTFGGG TKLEIR (SEQ ID NO: 84)
6B8Vk	GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAATCTTGTCCACATCAGTGGGAGA CAGGGTCACCATCACTTGCAAGGCCAGTCGGGATGTGGCTATTGCTGTAG CCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAACTACTTCTTTTCTGG GCATCCACCCGACACACTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATC TCGGACAGATTCTACTCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGG CAGATTATTTCTGTCACCAATATAGCAGCTATCCATTACGTTCCGGCTCGG GGACAAAGTTGGAAATAAG (SEQ ID NO: 85)
	DIVMTQSHKFLSTSVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQKPGQSPKLLLFWAS TRHTGVPDRFTGSGSRDFTLTISNVQSEDLADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEI K (SEQ ID NO: 86)
9D12-Vk	GACATTGCGCTGACCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTGGGGCAG AGGGCCACCATCTCTGCAGAGCCAGTGAAACTATTAATTTTATGGCAC TAGTTTATGCACTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGTCACCCAACTCC
	TCATCTATCGTGCATCCAACCTAGAATCTGGGATCCCTGCCAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTAGGACAGACTTCACCTCACCATTAACTCTGTGGAGGC TGATGATGTTGCAACCTATTACTGTCAGCAAACTAATGAGGATCCGTACA CGTTCCGAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 87)
	DIALTQSPASLAVSLGQRATISCRASETINFYGTSMHWYQKPGQSPKLLIYRASN LESIGIPARFSGSGSRDFTLTINPVEADDVATYYCQQTNEPYPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 88)
15C11vk	GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTTGGAGAT CAAGCCTCCATCTCTTGCAATCTAGTCAGAGCCTTGACACAGTAATGG AAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGC TCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTT AGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAACAGAGTGG AGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCG TACACGTTCCGAGGGGGGACCCAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 89)
	DVVMQTPLSLPVSLGDDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYQKPGQSPKLL IYKVSNRFGVDPDRFSGSGSGDFTLTKINRVEAEDLVGYFCSQSTHVPYTFGG GTQLEIK (SEQ ID NO: 90)
15F1vk	DIVMTQSPATLSVTPGDRVLSLRASQISDYLHWYQQRSHESPRLLIKYASQ SISGIPSRFSGSGSGDFTLTINSVEPEDVGYYVCQNGHSFPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 91)
18D3vk	GACATTGTGATGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGA TAGAGTCTCTCTTCTCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGCGACTACTTAT ACTGGTATCAACAAAAATCAGATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAAATTT GCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCCCCTCCAGGTTCACTGGCAGTGGATC AGGGTCAGATTCTACTCTCAGTATCAGACAGTGTGGAACCTGATGATGTTG GAGTCTTTTCTGTCAAAATGGTCACAGCTTTCCGTTACGTTCCGAGGGG GGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 92)
	DIVMTQSPATLSVTPGDRVLSLRASQISDYLHWYQKSHESPRLLIKFASQ SISGIPSRFTGSGSGSDFTLSIDSVEPDDVGVFQNGHSFPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 93)
18C4vk	GACATTGTGATGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGA TAGAGTCTCTCTTCTCTGCAGGGCCAGCCAGAGTATTAGCGAGTACTTAC ACTGGTATCAACAAAAATCAGATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAAATTT GCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCCCCTCCAGGTTCACTGGCAGTGGATC AGGGTCAGATTCTACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAACCTGAAGATGTTG GAGTGTATTACTGTCAAAATGGTCACAGCTTTCCATTACGTTCCGGCTCG GGGACAAAGTTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 94)
	DIVMTQSPATLSVTPGDRVLSLRASQISEYLHWYQKSHESPRLLIKYASQ SISGIPSRFSGSGSGDFTLSINSVEPEDVGYYVCQNGHSFPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 95)
18E5vk	GACATTGTGATGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGA TAGAGTCTCTCTTCTCTGCAGGGCCAGCCAGAGTATTAGCGACTACTTAT ACTGGTATCAACAAAAATCAGATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAAATTT GCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCCCCTCCAGGTTCACTGGCAGTGGATC AGGGTCAGATTCTACTCTCAGTATCAGACAGTGTGGAACCTGATGATGTTG GAGTCTTTTCTGTCAAAATGGTCACAGCTTTCCGTTACGTTCCGAGGGG GGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 96)
	DIVMTQSPATLSVTPGDRVLSLRASQISDYLHWYQKSHESPRLLIKFASQ SISGIPSRFTGSGSGSDFTLSIDSVEPDDVGVFQNGHSFPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 97)
20E8vk	GACATTGTGATGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGA TAGAGTCTCTCTTCTCTGCAGGGCCAGCCAGAGTATTAGCGAGTATTTAC ACTGGTATCAACAAAAATCAGATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAAATTT GCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCCCCTCCAGGTTCACTGGCAGTGGATC AGGGTCAGATTCTACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAACCTGAAGATGTTG GAGTTTATTACTGTCAAAATGGTCACAGCTTTCCATTACGTTCCGGCTCGG

	GGACAAAGTTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 98)
	DIVMTQSPATLSVTPGDRVLSLRASQSISEYLVHWYQKSHESPRLLIKYASQ SISGIPSRFSGSGSDFTLSINSVEPEDVGYYCQNGHSFPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 99)
22E2vk	GACATTGTGATGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGA TAGAGTCTCTCTCCTGCAGGGCCAGCCAGAGTATTAGCGTCTACTTAC ACTGGTATCAACAAAAATCACCTGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAATAT GCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCCCCCTCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGATC AGGGTCAGATTTCAGTCTCAGTATCAACAGTGTGGAACCTGAAGATGTTG GAGTTTATTACTGTCAAAATGGTCACAGCTTTCCATTACGTTCCGCTCGG GGACAAAGTTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 100)
	DIVMTQSPATLSVTPGDRVLSLRASQSISEYLVHWYQKSPESPRLLIKYASQ SISGIPSRFSGSGSDFTLSINSVEPEDVGYYCQNGHSFPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 101)
24A54vk	GACATTGTGATGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAAA TAGAGTCTCTCTTCTCCTGCAGGGCCAGCCAGAGTATTAGCGACTACTTAC ACTGGTATCAACAAAAATCATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAATAT GCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCCCCCTCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGATC AGGGTCAAATTCAGTCTCAGTATCAACAGTGTGGAACCTGAAGATGTTG GAGTGTATTATTGTCAAAATGGTCACAGCTTTCCATTACGTTCCGCTCGG GGACAAAGTTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 102)
	DIVMTQSPATLSVTPGNRVLSLRASQSIDYLVHWYQKSHESPRLLIKYASQ SISGIPSRFSGSGSNFTLSINSVEPEDVGYYCQNGHSFPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 103)
26F7vk	GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTTTCTCTGGGGCAG AGGGCCACCATCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGATTCTCTGACTA TTTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCC TCATCTACCTTGCACTCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCTCAACATCCATCCTGTGGAGGA GGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGAACAGTAGGGAGCTTCCGTACA CGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATAAAA (SEQ ID NO: 104)
	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVRFSDYFYMHWYQKPGQPPLLI YLASNLESGVPARFSGSGSDFTLNIHPVEEEDAATYYCQNSRELPTYFGG GTKLEIK (SEQ ID NO: 105)
27G8vk	GACATTGTGTTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAG AGGGCCACCATCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGTACATCTGGCTA TAGTTATATACACTGGTACCAACAGAAACCGGGACAGCCACCCAAATTC TCATCTATCTTGCACTCAACCTAGATTCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCACTG GCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAG GAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCGTACAC GTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 106)
	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYIHWYQKPGQPPLLI LASNLDSGVPARFSGSGSDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPTYFGG TKLEIK (SEQ ID NO: 107)
31H9vk	GACATTGTGATGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGA TAGAGTCTCTCTTCTCCTGCAGGGCCAGCCAGAGTATTAGCGACTACTTAC ACTGGTATCAACAAAAATCATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAATAT GCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCCCCCTCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGATC AGGGTCAGATTTCAGTCTCAGTATCAACAGTGTGGAACCTGAAGATGTTG GAGTGTATTACTGTCAAAATGGTCACAGCTTTCCGTACACGTTCCGAGGG GGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 108)
	DIVMTQSPATLSVTPGDRVLSLRASQSIDYLVHWYQKSHESPRLLIKYASQ SISGIPSRFSGSGSDFTLSINSVEPEDVGYYCQNGHSFPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 109)
34G3Vk	GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTGAGTCTTGAGAT CAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGG AAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGC

	TCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCCGACAGGTTCA GTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGA GGCTAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCGT ACACGTTCCGGAGGGGGACCAAGCTGGAATAAAT (SEQ ID NO: 110)
	DVVMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLL IYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPYTFGG GTKLEIN (SEQ ID NO: 111)
34D9Vk	GACATTATGATGACCCAGTCTCACA AATTCATGTCCACATCAGTAGGAGA CAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGTAATGCTGTGG TCTGGTATCAACAAAACAGGGCAATCTCTAACTACTGATTTACTGG GCATCCACCCGGCAGATTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGATC TGGGACAGATTTCACTCTCACCATTACCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGG CAGATTATTTCTGTGAGCAATATAGCAGCTATCTCACGTTCCGGTGCTGGG ACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO: 112)
	DIMMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGNV VVWYQKPGQSPKLLIYW ASTRHIGV PDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYFCQQYSSYLTFGAGTKL ELK (SEQ ID NO: 113)
43F5vk	GATGTTGTGATGACCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTTGGAGAT CAAGCCTCCATCTCTTGAGATCTAGTCAGAGCCTTGACACAGTAATGG AAACACCTATCTACATTGGTACCTGCTGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGC TCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTCTGGGGTCCAGACAGGTTT AGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCG TACACGTTCCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 114)
	DVVMQTSPSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLLKPGQSPKLLI YKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPYTFGG GTKLEIK (SEQ ID NO: 115)
73H10Vk	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGTTTTCCTGTCTGCATCTGTGGGAGA AACTGTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGAGAATATTGACAGTTATTTAG CATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTTTGCT GCACGAACTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATC AGGCACACAGTATTCTCTCAAGATCAACAGAATGCAGTCTGAAGATGTTG CGAGATACTACTGTCAACATTATTATAGTACTCCATTACGTTCCGCTCGG GGACAAAGTTGGAATAGAA (SEQ ID NO: 116)
	DIQMTQSPVFLSASVGETVTITCRASENIDSYLAWYQKQKSPQLLVFAARNLAD GVPSRFS GSGSGTQYSLKINRMQSEDVARYYCQHYYSTPFTFGSGTKLEIE (SEQ ID NO: 117)
74H3Vk	GACATCCAGATGACTCAGTCGCCAGCTTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGAACT GTCATCTTCACATGTCGAGCAAGTGAGAATATTGACAGTTATTTAGCATGGTAT CAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATGCTGCAACAACTT AGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTATT CTCTCAAGATCAACAGCCTGCAGTCTGAAGATGTTGCGAGATATTACTGTCTAC ATTATTATAGTACTCCATTACGTTCCGGCTCGGGGACAGAGTTGGAATAAAA (SEQ ID NO: 118)
	DIQMTQSPASLSASVGETVIFTCRASENIDSYLAWYQKQKSPQLLVYAATNLAD GVPSRFS GSGSGTQYSLKINLSQSEDVARYYCLHYYSTPFTFGSGTELEIK (SEQ ID NO: 119)

Таблица 2

Мышиные "лидерные" антитела к IL-23p19 - последовательности VH

2D1vh	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAG CCTGTCCATCACATGCACTGTCTCTGGGTTCTCATTAAACCACCTATGCTATA AGCTGGGTTCCGCACTCACCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTTGGAGTCAT ATGGACTGGTGGAGGCACAAATATAATTTCAGCTCTCAAATCCAGACTGA GCATCAGCAAAGACAACCTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGT
	CTGCAAACCTGATGACACAGCCAGGTACTACTGTGCCAGAAAGGACTATAA TTACGGGGGTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTACCCGTCTC CTCA (SEQ ID NO: 120)
	QVQLKESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLTTYAISWVRQSPGKLEWLGVIWT GGGKTYNSALKSRLSISKDNSKQVFLKMNSLQTDRTARYYCARKDYNVGG AMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 121)
6B8VH	CAGGTTTCAAGTGCACAGTCTGACGCTGAGTTGGTGAACCTGGCACTTCA GTGAAGACATCCTGCAAAATTTCTGGCAACACCTTCACTGACCAAACTATT CACTGGATGAAGCAGAGGCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATAT TTATCCTAGAGATGATAGTCTTAAGTACAATGAGAACTTCAAGGGCAAGG CCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAAC AGTCTGACATCTGAGGACTCTGAGTCTATTCTGTGCAATCCCAGACAGG TCAGGCTACGCTGGTTTATTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTC TCTTCA (SEQ ID NO: 122)
	QVQLQQSDAELVKPGTSTVTSCKISGNTFTDQTIHWMKQRPQGLEWIGYIYP RDDSPKYNNFNGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCAIPDRSGYA WFIYWGQGTSLTVTVSS (SEQ ID NO: 123)
9D12VH	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGTCTGGTGGCGCCCTCACAGAG CCTGTCCATCACATGCACTGTCTCTGGGTTCTCATTAAACAACCTTGCTATA AGTTGGGTTCTGTCAGCCACCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTTGGAGCAAT ATGGACTGGTGGAGGCACAAATTATAATTTCAGCTCTCAAATCCAGACTGA GCATCAGCAAAGACAACCTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGT CTGCAAACCTGATGACACAGCCAGGTATTATTGTGTCAGAAAGGACTATAG TTACGGGGGTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTACCCGTCTC CTCA (SEQ ID NO: 124)
	QVQLKESGPGVLVAPSQSLSTCTVSGFSLNFAISWVRQPPGKLEWLGAIWTGGGT NYSALKSRLSISKDNSKQVFLKMNSLQTDRTARYYCVRKDYSGGAMDYWGQ GTSVTVSS (SEQ ID NO: 125)
15C11vh	GAGGTCCAGCTGCACAGTCTGGACCTGTGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTC AGTGAAGATGTCCTGTAAAGCTTCTGGATACACATTCAGTACTACTATAT GAACCTGGGTGAAGCAGAGCCTGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGAGGTTA TTATTCCTTACAACGGTGGTACTAGCTACAACAGAAAGTTCAAGGGCAAG GCCACATTGACTGTTGACAAGTCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAAC AGCCTGACATCTGAGGACTCTGAGTCTATTACTGTGCACGAGATGGTCA CGCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTACCCGTCTCTCTCA (SEQ ID NO: 126)
	EVQLQQSGPVLVPGASVKMSCKASGYTFTDYYMNWVKQSHGKSLEWIGVI IPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARDGHR WYFDVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 127)
15F1vh	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTCCIMHWVKQKPGQGLEWIGYI NPYNDGTYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARRWDE AYWGQGTSLTVTVSA (SEQ ID NO: 128)
18D3vh	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTCAAGCCTGGGGCTTC AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTCTATCTTAT TCACTGGGTGAAACAGAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATA TTAATCCTTACAATGATGGTACTAAATACAATGAGAAAGTTCAAAGGCAAG GCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAG CAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACCTCTAACTGGGA CCTCGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCTCTCA (SEQ ID NO: 129)
	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTTRYLIHWVKQKPGQGLEWIGYIN PYNDGTYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCTSNWDLTY WGQGTSLTVTVSS (SEQ ID NO: 130)
18C4vh	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAAGTGGTAAAGCCTGGGGCTTC AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTCTCTGTTAT ACACTGGGTGAAGCAGAAAGCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATA

	TCAATCCCTATAATGATGGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAG GCCACACTGACTTCAGACAGATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAG CAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGACGGTTGGA CGAGGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 131)
	EVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSSVIHWVKQKAGQGLEWIGYIN PYNDGTYNEKFKGKATLTSRSTAYMELSSLTSEDSAVYYCTRRLDEAY WGQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 132)
18E5vh	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTGC AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTCGCTATCTTAT TCACTGGGTGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATA TTAATCCTTACAATGATGGTACTAAATATAATGAGAAGTTCAAAGGCAAG GCCACACTGACTTCAGACAAATCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAG CAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACCTCTAATTGGGA CCTCGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCTCA (SEQ ID NO: 133)
	EVQLQQSGPELVKPGAAVKMSCKASGYTFTTRYLIHWVKQKPGQGLEWIGYIN PYNDGTYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCTSNWDLDY WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 134)
20E8vh	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAACCTGGTAAAGCCTGGGGCTTC AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGTCTCTGTTAT GCACTGGGTGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATA TCAATCCCTATAATGATGGTACTCAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAG GCCACACTGACTTCAGACAAATTTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGC AGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGACGGTTGGAC GAGGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 135)
	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSSVMHWVKQKAGQGLEWIGYI NPYNDGTQYNEKFKGKATLTSDFSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCTRRLDEA YWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 136)
22E2vh	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTC AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTCTATTAT TCACTGGGTGAAGCAGAGGCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATA TTAATCCTTACGATGATGTTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAG GCCACACTGACTTCAGACAAATCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAG CAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACGGTGGGA CGAGTCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 137)
	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSSIIHWVKQRPQGLEWIGYINP YDDVTKYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARRWDESY WGQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 138)
24A5vh	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTC AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACTTTCACTACCTCTATTAT GCACTGGGTGAAACAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATA TTAATCCTTACGATGATGTTACTAAGTACAATGAAAAGTTCAAAGGCAAG GCCACATTGACTTCAGACAAATCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAG CAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGTAAGACGGTGGGA CGAGGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 139)
	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTTSIMHWVKQKPGQGLEWIGYIN PYDDVTKYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCVRRWDEA YWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 140)
26F7VH	GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTC AGTGAAGATATCCTGTAAAGCCTTCTGGATACACGTTTACTGACTACTACAT GAACTGGGTGAGGCAGAGCCATGGAGAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATT TTAATCATAACAATGATGTTATTACTTACAACCCGAAGTTCAAGGGCAAGG TCACATTGACTGTAGAGAAGTCTTCCACCACAGCCTACATGGAGCTCCGCA

	GCCTGTCATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGGGGGCTACGAG GCTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCT CA (SEQ ID NO: 141)
	EVQLQSSGPPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYMNWVRQSHGESLEWIGDFN HNNDVITYNPKFKGKVLTLVEKSSSTAYMELRSLSEDSAVYYCARGLRGYY AMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 142)
27G8vh	CAGGTTCAGCTGCAACAGTCTGACGCTGAGTTGGTGAACCTGGAGCTTC AGTGAAGATATCCTGCAAGGTTTCTGGCTACACCTTCACTGACCATACTAT TCACTGGATGAAGCAGAGGCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATA TTTATCCTAGAGATGGTTATCCTAAGTTCAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGG CCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTAAC AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGACGGCCCCCT TACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCGCCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 143)
	QVQLQSSDAELVKPGASVKISCKVSGYTFTDHTIHWKQRPEQGLEWIGYIY PRDGYPKFNEFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCARRPPYYA MDYWGQGTSTVAVSS (SEQ ID NO: 144)
31H9vh	GAGGTCCAAGTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTC AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTATCTTAT GCACTGGGTGAAGCAGAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGTTATA TTAATCCTTACAATGATGGTACTAATTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAG GCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAG CAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTTCCCTTAAGTGGGA CTATGCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 145)
	EVQLQSSGPPELVKPGASVKMSCKASGYTFTRYLMHWVKQKPGQGLEWIGYI NPYNDGTNYNEFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCSLNWDYA YWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 146)
34G3VH	GAGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGCGCTTC AGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTACTCATTCACTGACTACAACAT GAACCTGGGTGAAGCAGAGCAAGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGTA ATTATTCCTAAGTATGGTCTTACTAGCTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAAG GCCACTTTGACTGTAGACCAAGTCTCCAGCACAGCCACATGCAGCTCAAC AGTGTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGAAGAGATGGGGG AATACTCCTCTGTATCTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGT CTCCTCA (SEQ ID NO: 147)
	EFQLQSSGPPELVKPGASVKISCKASGYFTDYNMNWVKQSKGSLEWIGVIIP NYGFTSYNQNFKGKATLTVDQSSSTAHMQLNSVTSEDSAVYYCVRDGGILL WYLDVWGTGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 148)
34D9VH7	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTC AGTGAAGATACCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACTACAACAT GGACTGGGTGAAGAAGAGCCATGGAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATA TCAATCCTCACAATGGTGGTACTATCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAG GCCACATTGACTGTAGACAAGTCTCCAGCACAGCCACATGGAGTCCG CAGCCTGACATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAAATCTACTA CGGTAGTAGTTACGGCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGG TCACCGTCTCGTCA (SEQ ID NO: 149)
	EVQLQSSGPPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYNMDWVKKSHGKSLEWIGDIN PHNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAHMELRSLTSEDYAVYYCARNYYGSS YGWYFDVWGTGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 150)
43F5vh	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTC AGTGAAGATTTCTGCAGGGCTTCTGGTACTCATTCACTGGCTACTACAT GAACCTGGGTGAAGCAAAGTCTGAAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGAGA TTATTCCTACCACTGGTGGTACTTCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGG CCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAAG AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAGAGCGG TGGGTTCTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGT
	CTCCTCA (SEQ ID NO: 151)
	EVQLQSSGPPELVKPGASVKISCRASGYFTGYIMNHWKQSPKGSLEWIGEIP TTGGTSYNQKFKAKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARESGGFY WYFDVWGTGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 152)
73H10VH	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTC AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTATCTTAT GCACTGGGTGAAGCAGAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATA TTAATCCTTACAATGATGTTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAG GCCACATGACTTCAGACAGATCCTCCAGCACAGCCTACATGAACTCAG CAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAGAACTGGGA CGTTCCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGATCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 153)
	EVQLQSSGPPELVKPGASVKMSCKASGYTFTRYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPY NDVTKYNEFKGKATLTSDRSSSTAYMKLSSLTSEDSAVYYCARNWDVPYWGQG TLITVSA (SEQ ID NO: 154)
74H3VH	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTG AAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTATCTTATGCATGG GTGAAGCAGAGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTAC AATGATGTTACTAAGTACAATGAGAGGTTCAAAGGCAAGGCCACTGACTTC AGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTTGAGGA CTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAACTGGGACGTACCTTACTGGGGCCAAGG GACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 155)
	EVQLQSSGPPELVKPGASVKMSCKASGYTFTRYLMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYN DGTKYNERFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARNWDVPYWGQGLT VTVSA (SEQ ID NO: 156)

Последовательности человеческих каркасных участков отбирали для каждого мышиного "лидерно-го" антитела на основе гомологии каркасных участков, структуры CDR, консервативных канонических остатков, консервативных остатков, образующих поверхность раздела, и других параметров.

CDR мышиных тяжелых цепей и легких цепей различных мышиных антител представлены в табл. 3 и 4 соответственно. В табл. 4 представлены также три CDR тяжелых цепей, выведенных из мышиного

антитела 6B8 при осуществлении процесса гуманизации.

Таблица 3

Последовательности CDR легких цепей

	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
18C4	RASQSISEYLH (SEQ ID NO: 1)	YASQSI (SEQ ID NO: 2)	QNGHSFPFT (SEQ ID NO: 3)
18E5	RASQSI SDYLY (SEQ ID NO: 4)	FASQSI (SEQ ID NO: 5)	QNGHSFPFT (SEQ ID NO: 3)
18D3	RASQSI SDYLY (SEQ ID NO: 4)	FASQSI (SEQ ID NO: 5)	QNGHSFPFT (SEQ ID NO: 3)
20E8	RASQSISEYLH (SEQ ID NO: 1)	YASQSI (SEQ ID NO: 2)	QNGHSFPFT (SEQ ID NO: 3)
22E2	RASQSI SVYLH (SEQ ID NO: 6)	YASQSI (SEQ ID NO: 2)	QNGHSFPFT (SEQ ID NO: 3)
24A5	RASQSI SDYLH	YASQSI	QNGHSFPFT
	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
	(SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 3)
15C11	RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 8)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 9)	SQSTHVPYT (SEQ ID NO: 10)
43F5	RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 8)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 9)	SQSTHVPYT (SEQ ID NO: 10)
27G8	RASKSVTSGYSYIH (SEQ ID NO: 11)	LASNLD (SEQ ID NO: 12)	QHSRELPT (SEQ ID NO: 13)
31H9	RASQSI SDYLH (SEQ ID NO: 7)	YASQSI (SEQ ID NO: 2)	QNGHSFPYT (SEQ ID NO: 14)
2D1	RTSESVYSYGQNFH (SEQ ID NO: 15)	RASNLES (SEQ ID NO: 16)	QQTNEDPYT (SEQ ID NO: 17)
9D12	RASETINFYGTSMH (SEQ ID NO: 18)	RASNLES (SEQ ID NO: 16)	QQTNEDPYT (SEQ ID NO: 17)
6B8	KASRDVAIAVA (SEQ ID NO: 19)	WASTRHT (SEQ ID NO: 20)	HQYSSYPFT (SEQ ID NO: 21)
73H10	RASENIDSYLA (SEQ ID NO: 22)	AARNLAD (SEQ ID NO: 23)	QHYYSTPFT (SEQ ID NO: 24)
74H3	RASENIDSYLA (SEQ ID NO: 22)	AATNLAD (SEQ ID NO: 25)	LHYYSTPFT (SEQ ID NO: 26)
35H8	RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 8)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 9)	SQSTHVPYT (SEQ ID NO: 10)
26F7	RASKSVRFSDYFYM (SEQ ID NO: 27)	LASNLES (SEQ ID NO: 28)	QNSRELPT (SEQ ID NO: 29)
34G3	RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 8)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 9)	SQSTHVPYT (SEQ ID NO: 10)
34D9	KASQDVGNVAVV (SEQ ID NO: 30)	WASTRHI (SEQ ID NO: 31)	QQYSSYL (SEQ ID NO: 32)

Таблица 4

Последовательности CDR тяжелых цепей

	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
18C4	GYTFTSSVIH (SEQ ID NO: 33)	YINPYNDGTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 34)	RLDEAY (SEQ ID NO: 35)
18E5	GYTFTRYLIH (SEQ ID NO: 36)	YINPYNDGTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 34)	NWDLDY (SEQ ID NO: 37)
18D3	GYTFTRYLIH (SEQ ID NO: 36)	YINPYNDGTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 34)	NWDLDY (SEQ ID NO: 37)
20E8	GYTFTSSVMH (SEQ ID NO: 38)	YINPYNDGTQYNEKFKG (SEQ ID NO: 39)	RLDEAY (SEQ ID NO: 35)
22E2	GYTFTSSIIH (SEQ ID NO: 40)	YINPYDDVTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 41)	RWDESY (SEQ ID NO: 42)
24A5	GYTFTTSIMH (SEQ ID NO: 43)	YINPYDDVTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 41)	RWDEAY (SEQ ID NO: 44)
15C11	GYTFTDYMN (SEQ ID NO: 45)	VIIPYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 46)	DGHRWYFDV (SEQ ID NO: 47)
43F5	GYSFTGYMN (SEQ ID NO: 48)	EIIPTTGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 49)	ESGGFYWYFDV (SEQ ID NO: 50)
27G8	GYTFTDHTIH (SEQ ID NO: 51)	YIYPRDGYPKFNEKFKG (SEQ ID NO: 52)	RPPYYAMDY (SEQ ID NO: 53)
31H9	GYTFTTRYLMH (SEQ ID NO: 54)	YINPYNDGTNYNEKFKG (SEQ ID NO: 55)	NWDYAY (SEQ ID NO: 56)

2D1	GFSLTTYAIS (SEQ ID NO: 57)	VIWTGGGTKYNSALKS (SEQ ID NO: 58)	KDYNYGGMAMY (SEQ ID NO: 59)
9D12	GFSLNNFAIS (SEQ ID NO: 60)	AIWTGGGTNYNSALKS (SEQ ID NO: 61)	KDYSYGGAMDY (SEQ ID NO: 62)
6B8	GNTFTDQTIH (SEQ ID NO: 63)	YIYPRDDSPKYNNFKG (SEQ ID NO: 64)	PDRSGYAWFIY (SEQ ID NO: 65)
Hu_6B8-2	GYTFTDQTIH (SEQ ID NO: 66)	YIYPRDDSPKYNNFKG (SEQ ID NO: 64)	PDRSGYAWFIY (SEQ ID NO: 65)
Hu_6B8-5	GFTFTDQTIH (SEQ ID NO: 67)	YIYPRDDSPKYNNFKG (SEQ ID NO: 64)	PDRSGYAWFIY (SEQ ID NO: 65)
Hu_6B8-36/65	GGTFTDQTIH (SEQ ID NO: 68)	YIYPRDDSPKYNNFKG (SEQ ID NO: 64)	PDRSGYAWFIY (SEQ ID NO: 65)
73H10	GYTFTRYVMH (SEQ ID NO: 69)	YINPYNDVTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 70)	NWDVPY (SEQ ID NO: 71)
74H3	GYTFTRYLMH (SEQ ID NO: 54)	YINPYNDGTKYNERFKG (SEQ ID NO: 72)	NWDVPY (SEQ ID NO: 71)
35H8	GYTFTDYMN (SEQ ID NO: 45)	VIIPYNGGISYNQKFKG (SEQ ID NO: 73)	NDYDWYFDV (SEQ ID NO: 74)
26F7	GYTFTDYMN (SEQ ID NO: 45)	DFNHNNDVITYNPKFKG (SEQ ID NO: 75)	GLRGYYAMDY (SEQ ID NO: 76)
34G3	GYSFTDYNMN (SEQ ID NO: 77)	VIIPNYGFTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 78)	DGGILLWYLDV (SEQ ID NO: 79)
34D9	GYTFTDYNMD (SEQ ID NO: 80)	DINPHNGGTIYNQKFKG (SEQ ID NO: 81)	NYYGSSYGWYFDV (SEQ ID NO: 82)

CDR, представленные выше в табл.х 3 и 4, определены согласно номенклатуре Хотиа (Al-Lazikani et al., JMB 273, 1997, p. 927-948).

Fab-фрагменты, для которых обнаружено улучшенное или эквивалентное связывание по сравнению с химерным родительским Fab-фрагментом, отбирали для конверсии в формат IgG. 6B8 превращали в формат IgG1KO. IgG1KO ("выключение" (knock-out) эффекторных функций) имеет две мутации в Fc-области, а именно Leu234Ala и Leu235Ala, которые снижают эффекторную функцию, такую как связывание FcγR и комплемента. IgG-формат описан в литературе (см., например, Hezareh et al., Journal of Virology 75, 2001, p. 12161-12168). В примере 1 более подробно описан процесс гуманизации. В результате осуществления указанной гуманизации удалось создать последовательности гуманизированных антител. Репрезентативные примеры переменных областей легкой цепи и тяжелой цепи, выведенных из мышиного антитела 6B8, представлены в таблицах 5 и 6. Сравнительный анализ первичной структуры гуманизированных переменных областей легкой цепи и тяжелой цепи, выведенных из мышиного антитела 6B8, и переменных областей легкой цепи и тяжелой цепи из мышиного антитела 6B8, представлен на фиг. 1.

Отобранные комбинации гуманизированных переменных областей легкой цепи и тяжелой цепи, выведенных из мышиного антитела 6B8, позволили создать антитела A, B, C и D:

Антитело A: 6B8-IgG1KO-2 с IgK-66 (переменная область тяжелой цепи 6B8CVH-02 и переменная область легкой цепи 6B8CVK-66);

Антитело B: 6B8-IgG1KO-5 ch IgK-66 (переменная область тяжелой цепи 6B8CVH-05 и переменная область легкой цепи 6B8CVK-66);

Антитело C: 6B8-IgG1KO-2 с IgK-65 (переменная область тяжелой цепи 6B8CVH-02 и переменная область легкой цепи 6B8CVK-65);

Антитело D: 6B8-IgG1KO-5 с IgK-65 (переменная область тяжелой цепи 6B8CVH-05 и переменная область легкой цепи 6B8CVK-65).

Антитела A, B, C и D имеют последовательности тяжелых и легких цепей, которые представлены в табл. 7.

Таблица 5

Гуманизированные последовательности 6B8-VK

6B8CVK-65	Gacatccagatgaccagagcccaagcagcctgagcgccagcgtggggcaccgctgacatcacctgc aaggccagccgcgacgtggccatcgccgtggcctggtaccagcagaagccaggcaaggtgccaagctg ctgctgttctgggcccagcaccgccacaccggcgtgccagaccgcttcagcgccagcgccagccgacc gacttcacctgacatcagcagcctgcagccagaggacgtggccgactactactgccaccagtacagcag ctaccattcaccttcggcagggcaccgaagctggagatcaag (SEQ ID NO: 157)
	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLL FWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDLADYYCHQYSSYPFT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 158)
6B8CVK-66	Gacatccagatgaccagagcccaagcagcctgagcgccagcgtggggcaccgctgacatcacctgc aaggccagccgcgacgtggccatcgccgtggcctggtaccagcagaagccaggcaaggtgccaagctg ctgacttactgggcccagcaccgccacaccggcgtgccaaagccgttcagcgccagcgccagccgacc gacttcacctgacatcagcagcctgcagccagaggacgtggccgactactctgccaccagtacagcag ctaccattcaccttcggcagcgccaccaagctggagatcaag (SEQ ID NO: 159)
	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLI YWASTRHTGVPDRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFT FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 160)
6B8CVK-67	Gacatccagatgaccagagcccaagcagcctgagcgccagcgtggggcaccgctgacatcacctgc aaggccagccgcgacgtggccatcgccgtggcctggtaccagcagaagccaggcaaggtgccaagctg ctgctgtactgggcccagcaccgccacaccggcgtgccaaagccgttcagcgccagcgccagccgacc gacttcacctgacatcagcagcctgcagccagaggacgtggccacttacttgcaccagtacagcag ctaccattcaccttcggcagcgccaccaagctggagatcaag (SEQ ID NO: 161)
	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLL YWASTRHTGVPDRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVATYYCHQYSSYPFT FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 162)
6B8CVK-78	Gacatccagatgaccagagcccaagcagcctgagcgccagcgtggggcaccgctgacatcacctgc aaggccagccgcgacgtggccatcgccgtggcctggtaccagcagaagccaggcaaggtgccaagctg ctgctgttctgggcccagcaccgccacaccggcgtgccagaccgcttcagcgccagcgccagccgacc gacttcacctgacatcagcagcctgcagccagaggacgtggccgactacttgcaccagtacagcag ctaccattcaccttcggcagcgccaccaagctggagatcaag (SEQ ID NO: 163)
	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLL FWASTRHTGVPDRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDLADYYCHQYSSYPFT FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 164)

Таблица 6

Гуманизированные последовательности 6B8-VH

6B8CVH-02	Caggtgcagctggtgcagagcggcgccgaggtgaagaagccaggcagcagcgtgaaggtgagctgcaa ggccagcggtacatcacctcaccgaccagaccatccactggatgcgcccagggccagggcctgga gtgatcggtctacatctaccacgcgacgacagcccaagtaacgagaactcaaggccaaggtcacc atcaccgccgacaagagcaccagcaccgctacatggagctgagcagcctgcgcagcgaggacaccgcc gtgtactactgcgcatccagaccgcagcggtacgcctggttcatctactggggccagggcaccctggt gaccgtgagcagc (SEQ ID NO: 165)
	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLE WIGYIYPRDDSPKYENFNGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVY YCAIPDRSGYAWFIYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 166)
6B8CVH-05	Caggtgcagctggtgcagagcggcgccgaggtgaagaagccaggcagcagcgtgaaggtgagctgcaa ggccagcggttcacctcaccgaccagaccatccactgggtgcgcccagggccagggcctgga gtgatgggtctacatctaccacgcgacgacagcccaagtaacgagaactcaaggccaaggtcacc ctgaccgccgacaagagcaccagcaccgctacatggagctgagcagcctgcgcagcgaggacaccgcc gtgtactactgcgcatccagaccgcagcggtacgcctggttcatctactggggccagggcaccctggt gaccgtgagcagc (SEQ ID NO: 167)
	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDQTIHWVRQAPGQGLEW MGYIYPRDDSPKYENFNGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVY CAIPDRSGYAWFIYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 168)
6B8CVH-36	Caggtgcagctggtgcagagcggcgccgaggtgaagaagccaggcagcagcgtgaagaccagctgcaa ggccagcgcggttcacctcaccgaccagaccatccactgggtgcgcccagggccagggcctgga gtgatgggtctacatctaccacgcgacgacagcccaagtaacgagaactcaaggccaaggtcacc atcaccgccgacaagagcaccagcaccgctacatggagctgagcagcctgcgcagcgaggacaccgcc gtgtactactgcgcatccagaccgcagcggtacgcctggttcatctactggggccagggcaccctggt gaccgtgagcagc (SEQ ID NO: 169)
	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKTSCKASGGTFTDQTIHWVRQRPQGLEW MGYIYPRDDSPKYENFNGKRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVY CAIPDRSGYAWFIYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 170)
6B8CVH-65	Caggtgcagctggtgcagagcggcgccgaggtgaagaagccaggcagcagcgtgaaggtgagctgcaa ggccagcgcggttcacctcaccgaccagaccatccactgggtgcgcccagggccagggcctgga gtgatgggtctacatctaccacgcgacgacagcccaagtaacgagaactcaaggccaaggtcacc tgaccgccgacaagagcaccagcaccgctacatggagctgagcagcctgcgcagcgaggacaccgcc gtgtacttctgcgcccagaccgcagcggtacgcctggttcatctactggggccagggcaccctggt gaccgtgagcagc (SEQ ID NO: 171)
	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFTDQTIHWVRQAPGQGLEW MGYIYPRDDSPKYENFNGKRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVY CARPDRSGYAWFIYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 172)

Таблица 7

Последовательности ДНК и аминокислотные последовательности
тяжелых и легких цепей Антител А, В, С и D

Антитело А	IgK, легкая цепь, № 66	<u>Gacatccagatgaccagagcccaagcagcctgagcgccagcgtgg</u> <u>gcgaccgcgtgaccatcacctgcaagccagccgcgacgtggccatc</u> <u>gccgtggcctgtaccagcagaagccagcgaaggtgccaaagctgct</u> <u>gatctactggccagcaccgccacacccgcgtgccaaagccgttca</u> <u>gcggcagcgccagccgacccgacttcaccctgaccatcagcagcctg</u> <u>cagccagaggacgtggccgactacttctgccaccagtacagcagctac</u> <u>ccattcaccttcggcagcgccaccaagctggagatcaagcgtactgtg</u> <u>gctgcaccatctgtcttcattctcccgccatctgatgagcagttgaaatct</u>
		KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG (SEQ ID NO: 178)
Антитело С	IgK, легкая цепь, № 65	<u>Gacatccagatgaccagagcccaagcagcctgagcgccagcgtgg</u> <u>gcgaccgcgtgaccatcacctgcaagccagccgcgacgtggccatc</u> <u>gccgtggcctgtaccagcagaagccagcgaaggtgccaaagctgct</u> <u>gctgttctggccagcaccgccacacccgcgtgccagaccgcttca</u> <u>gcggcagcgccagcgccacccgacttcaccctgaccatcagcagcctg</u> <u>cagccagaggacgtggccgactacttccaccagtacagcagcta</u> <u>cccattcaccttcggccagggcaccagctggagatcaagcgtactgt</u> <u>ggctgcaccatctgtcttcattctcccgccatctgatgagcagttgaaatc</u> <u>tggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatccagagagg</u> <u>caaagtacagtggaaggtggataacgcccctccaatcggglaactccc</u> <u>aggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcct</u> <u>cagcagcaccctgacgctgagcaagcagactacgagaacacaaaa</u> <u>gtctacgcctgcgaagtcaccatcagggcctgagctgcccgtcaca</u> <u>aagagcttcaacaggggagagtgt</u> (SEQ ID NO: 179)
		<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAV</u> <u>AWYQQKPGKVPKLLLFWASTRHTGVDPDRFSG</u> <u>SGSGTDFTLTISSLQPEDLADYYCHQYSSYPFT</u> <u>FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS</u> <u>VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES</u> <u>VTEQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYAC</u> <u>EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (SEQ ID NO: 180)
	IgG1KO, тяжелая цепь, № 2	(SEQ ID NO: 175)
		(SEQ ID NO: 176)
Антитело D	IgK, легкая цепь, № 65	(SEQ ID NO: 179)
		(SEQ ID NO: 180)
	IgG1KO, тяжелая цепь, № 5	(SEQ ID NO: 177)
		(SEQ ID NO: 178)

В табл. 7 подчеркнуты вариабельные области легких цепей и тяжелых цепей Антител А, В, С и D.

Гуманизированное антитело к IL-23p19, раскрытое в описании, обладает по меньшей мере одним из указанных ниже свойств. Оно может обладать любой комбинацией по меньшей мере двух или по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 указанных ниже свойств или всеми указанными ниже свойствами.

K_D в отношении человеческого IL-23 составляет ≤ 1 пМ (отсутствует сдвиг скорости ассоциации в 50%-ной человеческой сыворотке).

Блокирует связывание IL-23 с человеческим IL-23R/Fc in vitro.

Не связывается с человеческим IL-12.

Ингибирует индуцируемое человеческим IL-23 производство IL-17 в мышинных спленоцитах, что характеризуется $IC_{50} \leq 20$ пМ.

Ингибирует индуцируемое человеческим IL-23 фосфорилирование STAT3 в человеческих DB-клетках, что характеризуется $IC_{50} \leq 40$ пМ.

Не прогнозируется наличие ADCC/CDC-активности.

$K_D \leq 1$ пМ в отношении IL-23 обезьян циномоглус.

Отсутствует перекрестная реактивность с мышинным или крысиным IL-23.

Ингибирует индуцируемое человеческим IL-23 производство IL-17 и IL-22 в мышинном ухе

($\geq 80\%$ -ное ингибирование обоих цитокинов при концентрации 1 мг/кг).

Стабильность при температуре до 83°C (температура плавления 83°C по данным измерений с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии).

Растворимость ≥ 100 мг/мл (по данным измерений с помощью УФ-спектроскопии и мониторинга мутности).

При подкожном введении в дозе 1,0 мг/кг трем обезьянам циномолгус имеет место длительная (≥ 10 нМ) экспозиция в течение примерно 28 дней при биологической доступности примерно 70%.

Под понятием "не прогнозируется наличие ADCC/CDC-активности" в контексте настоящего описания подразумевается, что гуманизованное антитело к IL-23p19 обладает пониженной аффинностью к Fc-рецептору и, следовательно, у него прогнозируется отсутствие ADCC/CDC-активности.

Антитело к IL-23p19 может обладать по меньшей мере одним из указанных ниже свойств. Оно может обладать любой комбинацией по меньшей мере двух или по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 указанных ниже свойств или же всеми указанными ниже свойствами.

K_D в отношении человеческого IL-23 составляет ≤ 1 пМ (отсутствует сдвиг скорости ассоциации в 50%-ной человеческой сыворотке).

Блокирует связывание IL-23 с человеческим IL-23R/Fc *in vitro*.

Не связывается с человеческим IL-12.

Ингибирует индуцируемое человеческим IL-23 производство IL-17 в мышиных спленоцитах, что характеризуется $IC_{50} \leq 20$ пМ.

Ингибирует индуцируемое человеческим IL-23 фосфорилирование STAT3 в человеческих DB-клетках, что характеризуется $IC_{50} \leq 40$ пМ.

Не прогнозируется наличие ADCC/CDC-активности. $K_D \leq 1$ пМ в отношении IL-23 обезьян циномолгус.

Отсутствует перекрестная реактивность с мышиным или крысиным IL-23.

Ингибирует индуцируемое человеческим IL-23 производство IL-17 и IL-22 в мышном ухе ($\geq 80\%$ -ное ингибирование обоих цитокинов при концентрации 1 мг/кг).

Стабильность при температуре до 83°C (температура плавления 83°C по данным измерений с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии).

Растворимость ≥ 100 мг/мл (по данным измерений с помощью УФ-спектроскопии и мониторинга мутности).

Гуманизованное антитело обладает по меньшей мере одной из указанных ниже особенностей связывания (свойства А). Гуманизованное антитело к IL-23p19 может обладать любой комбинацией по меньшей мере двух или по меньшей мере трех указанных ниже свойств, или всеми указанными ниже свойствами.

K_D в отношении человеческого IL-23 составляет ≤ 1 пМ (отсутствует сдвиг скорости ассоциации в 50%-ной человеческой сыворотке).

Не связывается с человеческим IL-12.

$K_D \leq 1$ пМ в отношении IL-23 обезьян циномолгус.

Отсутствует перекрестная реактивность с мышиным или крысиным IL-23. В частности, гуманизованное антитело характеризуется K_D в отношении человеческого IL-23, составляющей ≤ 1 пМ (отсутствует сдвиг скорости ассоциации в 50%-ной человеческой сыворотке), и не связывается с человеческим IL-12.

Гуманизованное антитело обладает по меньшей мере одним из указанных ниже функциональных свойств (свойства Б). Гуманизованное антитело к IL-23p19 обладает любой комбинацией по меньшей мере двух или по меньшей мере трех указанных ниже свойств или обладает всеми указанными ниже свойствами.

Блокирует связывание IL-23 с человеческим IL-23R/Fc *in vitro*.

Ингибирует индуцируемое человеческим IL-23 производство IL-17 в мышиных спленоцитах, что характеризуется $IC_{50} \leq 20$ пМ.

Ингибирует индуцируемое человеческим IL-23 фосфорилирование STAT3 в человеческих DB-клетках, что характеризуется $IC_{50} \leq 40$ пМ.

Ингибирует индуцируемое человеческим IL-23 производство IL-17 и IL-22 в мышном ухе ($\geq 80\%$ -ное ингибирование обоих цитокинов при концентрации 1 мг/кг).

Гуманизованное антитело обладает по меньшей мере одним из указанных ниже функциональных свойств (свойства В). Гуманизованное антитело к IL-23p19 обладает любой комбинацией по меньшей мере двух или по меньшей мере трех указанных ниже свойств, или, или всеми указанными ниже свойствами.

Не прогнозируется наличие ADCC/CDC-активности.

Стабильность при температуре до 83°C (температура плавления 83°C по данным измерений с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии).

Растворимость ≥ 100 мг/мл (по данным измерений с помощью УФ-спектроскопии и мониторинга мутности).

При подкожном введении в дозе 1,0 мг/кг трем обезьянам циномолгус имеет место длительная (≥ 10 нМ) экспозиция в течение примерно 28 дней при биологической доступности примерно 70%.

Гуманизированное антитело обладает по меньшей мере одним из указанных ниже функциональных свойств (свойства В). Гуманизированное антитело к IL-23p19 обладает любой комбинацией по меньшей мере двух из указанных ниже свойств или обладает всеми указанными ниже свойствами.

Не прогнозируется наличие ADCC/CDC-активности.

Стабильность при температуре до 83°C (температура плавления 83°C по данным измерений с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии).

Растворимость ≥ 100 мг/мл (по данным измерений с помощью УФ-спектроскопии и мониторинга мутности).

Гуманизированное антитело обладает по меньшей мере одним свойством А, по меньшей мере одним свойством Б и по меньшей мере одним свойством В. Гуманизированное антитело к IL-23p19 обладает любой комбинацией по меньшей мере двух или по меньшей мере трех свойств А, Б и В.

Гуманизированное антитело обладает блокирующей активностью, при этом оно снижает связывание IL-23 с рецептором IL-23 по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%. Способность антитела блокировать связывание IL-23 с рецептором IL-23 можно оценивать с помощью анализов связывания в конкурентных условиях, известных в данной области. Блокирующую активность антитела можно измерять путем оценки биологических действий IL-23, таких как производство IL-17 и IL-22, для определения того, ингибируется ли опосредуемая рецептором IL-23 передача сигналов.

Гуманизированное антитело к IL-23p19 может обладать благоприятными биофизическими свойствами. Гуманизированное антитело к IL-23p19 может присутствовать в буфере по меньшей мере на 90% в мономерной форме или по меньшей мере на 92% в мономерной форме, или по меньшей мере на 95% в мономерной форме. Гуманизированное антитело к IL-23p19 сохраняется в буфере по меньшей мере на 90% в мономерной форме или по меньшей мере на 92% в мономерной форме, или по меньшей мере на 95% в мономерной форме в течение 1 месяца или в течение 4 месяцев.

Гуманизированное антитело может представлять собой Антитело А, Антитело В, Антитело С или Антитело D. Таким образом, гуманизированное антитело может содержать последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 174 и последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 176 (Антитело А). Гуманизированное антитело может содержать последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 174 и последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 178 (Антитело В). Гуманизированное антитело может содержать последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 180 и последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 176 (Антитело С). Гуманизированное антитело может содержать последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 180 и последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 178 (Антитело D).

Гуманизированное антитело может состоять из последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 174 и последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 176 (Антитело А). Гуманизированное антитело может состоять из последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 174 и последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 178 (Антитело В). Гуманизированное антитело может состоять из последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 180 и последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 176 (Антитело С). Гуманизированное антитело может состоять из последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 180 и последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 178 (Антитело D).

Гуманизированные антитела к IL-23p19, включая их антигенсвязывающие фрагменты, такие как вариабельные области тяжелых и легких цепей, может содержать последовательность аминокислотных остатков, выведенную из Антитела А (последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 174; последовательность тяжелой цепи: SEQ ID NO: 176), Антитела В ((последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 174; последовательность тяжелой цепи: SEQ ID NO: 178), Антитела С (последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 180; последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 176) или Антитела D (последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 180; последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 178).

Антитело к IL-23p19 или его антигенсвязывающий фрагмент может связываться с человеческим IL-23p19 в эпитопе, состоящем из аминокислотных остатков 108-126 и аминокислотных остатков 137-151 SEQ ID NO: 181.

Антитело к IL-23p19 или его антигенсвязывающий фрагмент может конкурировать за связыванием с человеческой субъединицей IL-23p19 с антителом, например Антителом А, Антителом В, Антителом С или Антителом D, представленным в настоящем описании. Способность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента конкурировать за связыванием с IL-23p19 можно оценивать с помощью анализов связывания в конкурентных условиях, известных в данной области.

Гуманизированные антитела к IL-23p19 необязательно включают специфические аминокислотные замены в консенсусных каркасных участках или каркасных участках зародышевой линии. Специфиче-

ская замена аминокислотных остатков в этих каркасных положениях может улучшать различные аспекты характеристик антител, такие как аффинность связывания и/или стабильность, по сравнению с теми, которые характерны для гуманизированных антител, полученных путем "непосредственного обмена" CDR или HVL на каркасные участки человеческой зародышевой линии.

В заявке описаны другие моноклональные антитела, имеющие аминокислотную последовательность вариательной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 84, 86, 88, 90, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117 или 119, а также другие моноклональные антитела, имеющие аминокислотную последовательность вариательной области тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 121, 123, 125, 127, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154 или 156 (см. табл. 1 и 2, выше). CDR-последовательности этих мышиных антител представлены в табл. 3 и 4. Интродукция указанных CDR в FR человеческих консенсусных вариательных областей тяжелых и легких цепей может приводить к получению приемлемых гуманизированных антител.

В частности, описаны моноклональные антитела, имеющие следующую комбинацию вариательных областей легких цепей и вариательных областей тяжелых цепей: SEQ ID NO: 84/121, 86/123, 88/125, 90/127, 91/128, 93/130, 95/132, 97/134, 99/136, 101/138, 103/140, 105/142, 107/144, 109/146, 111/148, 113/150, 115/152, 117/154 или 119/156. Указанные вариательные области можно объединять с человеческими константными областями.

В заявке описаны гуманизированные антитела, последовательности вариательных областей легких цепей которых имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 158, 160, 162 или 164 и другие гуманизированные антитела, последовательности вариательных областей тяжелых цепей которых имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 166, 168, 170 или 172 (см. таблицы 5 и 6, выше). Последовательности CDR этих антител представлены в табл. 3 и 4, в частности, моноклональные антитела, имеющие следующие комбинации вариательных областей легких цепей и вариательных областей тяжелых цепей: SEQ ID NO: 160/166, 160/168, 158/166 или 158/168. Указанные вариательные области можно объединять с человеческими константными областями.

Антитело к IL-23p19 или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать вариательный домен гуманизированной легкой цепи, содержащий CDR-участки из SEQ ID NO: 160, и каркасные участки, имеющие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности каркасных участков вариательного домена легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160, и вариательный домен гуманизированной тяжелой цепи, содержащий CDR-участки из SEQ ID NO: 166, и каркасные участки, имеющие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности каркасных участков вариательного домена тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 166.

Антитело к IL-23p19 или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать вариательный домен гуманизированной легкой цепи, содержащий CDR-участки из SEQ ID NO: 160, и каркасные участки, имеющие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности каркасных участков вариательного домена легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160, и вариательный домен гуманизированной тяжелой цепи, содержащий CDR-участки из SEQ ID NO: 168, и каркасные участки, имеющие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности каркасных участков вариательного домена тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 168.

Антитело к IL-23p19 или его антигенсвязывающий фрагмент, может содержать вариательный домен гуманизированной легкой цепи, содержащий CDR-участки из SEQ ID NO: 158, и каркасные участки, имеющие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности каркасных участков вариательного домена легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158, и вариательный домен гуманизированной тяжелой цепи, содержащий CDR-участки из SEQ ID NO: 166, и каркасные участки, имеющие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности каркасных участков вариательного домена тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 166.

Антитело к IL-23p19 или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать вариательный домен гуманизированной легкой цепи, содержащий CDR-участки из SEQ ID NO: 158, и каркасные участки, имеющие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности каркасных участков вариательного домена легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158, и вариательный домен гуманизированной тяжелой цепи, содержащий CDR-участки из SEQ ID NO: 168, и каркасные участки, имеющие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности каркасных участков вариательного домена тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 168.

Гуманизированные антитела к IL-23p19 могут содержать по меньшей мере вариательный домен тя-

желой или легкой цепи, содержащий CDR или HVL мышиных моноклональных антител или гуманизированных антител, представленных выше в таблицах 1-6, и FR переменных доменов тяжелой и легкой цепи человеческой зародышевой линии.

CDR этих последовательностей представлены в табл. 3 и 4. Таким образом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать последовательность CDR1 легкой цепи (L-CDR1) SEQ ID NO: 1, 4, 6, 7, 8, 11, 15, 18, 19, 22, 27 или 30; последовательность CDR2 легкой цепи (L-CDR2) SEQ ID NO: 2, 5, 9, 12, 16, 20, 23, 25, 28 или 31; последовательность CDR3 легкой цепи (L-CDR3) SEQ ID NO: 3, 10, 13, 14, 17, 21, 24, 26, 29 или 32; последовательность CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1) SEQ ID NO: 33, 36, 38, 40, 43, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 67, 68, 69, 77 или 80; последовательность CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2) SEQ ID NO: 34, 39, 41, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 70, 72, 73, 75, 78 или 81 и последовательность CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3) SEQ ID NO: 35, 37, 42, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 71, 74, 76, 79 или 82. Антитело к IL-23p19 или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать переменную область легкой цепи, включающую указанный выше L-CDR1, указанный выше L-CDR2 и указанный выше L-CDR3, и переменную область тяжелой цепи, включающую указанный выше H-CDR1, указанный выше H-CDR2 и указанный выше H-CDR3.

Антитело к IL-23p19 или его антигенсвязывающий фрагмент может также содержать:

- а) последовательность L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 33, 34 и 35 соответственно; или
- б) последовательность L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 SEQ ID NO: 4, 5, 3, 36, 34 и 37 соответственно; или
- в) последовательность L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 38, 39 и 35 соответственно; или
- г) последовательность L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 SEQ ID NO: 6, 2, 3, 40, 41 и 42 соответственно; или
- д) последовательность L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 SEQ ID NO: 7, 2, 3, 43, 41 и 44 соответственно; или
- е) последовательность L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 SEQ ID NO: 8, 9, 10, 45, 46 и 47 соответственно; или
- ж) последовательность L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 SEQ ID NO: 8, 9, 10, 48, 49 и 50 соответственно; или
- з) последовательность L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 SEQ ID NO: 11, 12, 13, 51, 52 и 53 соответственно; или
- и) последовательность L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 SEQ ID NO: 7, 2, 14, 54, 55 и 56 соответственно; или
- к) последовательность L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 SEQ ID NO: 15, 16, 17, 57, 58 и 59 соответственно; или
- л) последовательность L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 SEQ ID NO: 18, 16, 17, 60, 61 и 62 соответственно; или
- м) последовательность L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 SEQ ID NO: 19, 20, 21, 63, 66, 67 или 68, 64 и 65 соответственно; или
- н) последовательность L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 SEQ ID NO: 22, 23, 24, 69, 70 и 71 соответственно; или
- о) последовательность L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 SEQ ID NO: 22, 25, 26, 55, 72 и 71 соответственно; или
- п) последовательность L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 SEQ ID NO: 8, 9, 10, 45, 73 и 74 соответственно; или
- р) последовательность L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 SEQ ID NO: 27, 28, 29, 45, 75 и 76 соответственно; или
- с) последовательность L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 SEQ ID NO: 8, 9, 10, 77, 78 и 79 соответственно; или
- т) последовательность L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3 SEQ ID NO: 30, 31, 32, 80, 81 и 82 соответственно.

Антитело к IL-23p19 или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать переменную область легкой цепи, включающую указанную выше комбинацию L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3, и переменную область тяжелой цепи, включающую указанную выше комбинацию H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3.

Иногда подразумевается, что на основе химерных антител с заменой ("переключением") CDR-участков (т.е., например, с заменой одного или двух CDR одного из мышиных антител или выведенных из них гуманизированных антител, на аналогичные CDR из другого мышиного антитела или выведенного из него гуманизированного антитела) между этими приведенными в качестве примера иммуноглобулинами, можно получать ценными антителами.

Гуманизированное антитело к IL-23p19 может представлять собой фрагмент антитела. Различные

фрагменты антител описаны в целом выше и разработаны методики для получения фрагментов антител. Фрагменты можно получать путем протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24, 1992, p. 107-117 и Brennan et al., *Science* 229, 1985, p. 81). В альтернативном варианте фрагменты можно получать непосредственно в рекомбинантных клетках-хозяевах. Например, Fab'-SH-фрагменты можно выделять непосредственно из *E. coli* и химически сшивать с получением F(ab')₂-фрагментов (см., например, Carter et al., *Bio/Technology*, 10, 1992, p. 163-167). Согласно другому подходу F(ab')₂-фрагменты можно выделять непосредственно из культуры рекомбинантной клетки-хозяина. Другие методики получения фрагментов антител должны быть очевидны специалисту в данной области.

Таким образом, фрагменты антител могут содержать CDR, указанные в настоящем описании, в частности одну из комбинаций L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, указанных в настоящем описании. Другими являются фрагменты антител, содержащие переменные области, указанные в настоящем описании, например, одну из комбинаций переменных областей легких цепей и переменных областей тяжелых цепей, указанных в настоящем описании.

F(ab')₂-фрагмент гуманизированного антитела к IL-23p19 может содержать любую из последовательностей легкой цепи SEQ ID NO: 174 или SEQ ID NO: 180 в сочетании с последовательностью тяжелой цепи SEQ ID NO: 176 или SEQ ID NO: 178. Причем интактное антитело, в свою очередь, может содержать указанные F(ab')₂-фрагменты.

Антитело или фрагмент антитела может включать константную область, которая опосредует эффекторную функцию. Константная область может опосредовать ответы, представляющие собой антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC), антитело-обусловленный клеточный фагоцитоз (ADCP) и/или комплементзависимую цитотоксичность (CDC), в отношении клетки-мишени, экспрессирующей IL-23. Эффекторный(ые) домен(ы) может(могут) представлять собой, например, Fc-область молекулы Ig.

Эффекторный домен антитела можно получать из организма любых приемлемых видов позвоночных животных и любых изотипов. Изотипы из организма различных видов животных отличаются по способности опосредовать эффекторные функции. Например, по способности опосредовать CDC и ADCC/ADCP человеческие иммуноглобулины, как правило, располагаются в следующем порядке IgM≈IgG₁≈IgG₃>IgG₂>IgG₄ и IgG₁≈IgG₃>IgG₂/IgM/IgG₄ соответственно. Мышиные иммуноглобулины по своей способности опосредовать CDC и ADCC/ADCP, как правило, располагаются в следующем порядке: мышиный IgM≈IgG₃>>IgG_{2b}>IgG_{2a}>>IgG₁ и IgG_{2b}>IgG_{2a}>IgG₁>>IgG₃ соответственно. В другом примере мышиный IgG_{2a} опосредует ADCC, а мышиный IgG_{2a} и IgM оба опосредуют CDC.

Модификации антител.

Гуманизированные антитела и агенты к IL-23p19 могут включать модификации гуманизированного антитела к IL-23p19 или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, может потребоваться модифицировать антитело в отношении его эффекторной функции, повышая тем самым эффективность антитела при лечении рака. Одной из таких модификаций является интродукция остатка(ов) цистеина в Fc-область, что приводит к образованию в этой области дисульфидной связи между цепями. Полученное таким образом гомодимерное антитело может обладать улучшенной способностью к интернализации и/или повышенной комплементзависимой цитотоксичностью и антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичностью (ADCC) (см., например, Caron et al., *J. Exp. Med.*, 176, 1992, p. 1191-1195 и Shopes, *J. Immunol.*, 148, 1992, p. 2918-2922). Гомодимерные антитела с повышенной противоопухолевой активностью можно получать также с использованием гетеробифункциональных перекрестносшивающих линкеров, описанных у Wolff et al., *Cancer Research*, 53, 1993, p. 2560-2565. В альтернативном варианте можно сконструировать антитело, имеющее удвоенное количество Fc-областей, благодаря чему оно может иметь повышенную способность к зависящему от комплемента лизису и ADCC (см. Stevenson et al., *Ant-Cancer Drug Design*, 3, 1989, p. 219-230).

Антитела с повышенной способностью поддерживать ADCC получали путем модификации схемы гликозилирования их Fc-области. Это представляется возможным, поскольку гликозилирование антитела на остатке аспарагина, N297, в C_H2-домене участвует во взаимодействии между IgG и Fcγ-рецепторами, которое необходимо для ADCC. Конструировали линии клеток-хозяев для экспрессии антител с измененным гликозилированием, например, с повышенным уровнем бисекционирующего N-ацетилглюкозамина или пониженным уровнем фукозы. Пониженный уровень фукозы обеспечивает более значительное повышение ADCC-активности, чем увеличение уровня бисекционирующего N-ацетилглюкозамина. Кроме того, повышенная ADCC-активность антител с низким уровнем фукозы не зависит от V/F-полиморфизма FcγRIIIa.

Модификация аминокислотной последовательности Fc-области антител является альтернативой гликозилирования в отношении повышения ADCC-активности. Сайт связывания на человеческом IgG₁ для Fcγ-рецепторов был определен с помощью расширенного анализа мутаций. Это позволило создавать гуманизированные антитела изотипа IgG₁ с мутациями в Fc-области, которые повышали аффинность связывания с FcγRIIIa и усиливали ADCC-активность *in vitro*. Кроме того, получали варианты Fc с мно-

гочисленными различными пермутациями способности к связыванию, например, с повышенной способностью к связыванию со специфическими FcγR-рецепторами, но с неизменной или пониженной способностью к связыванию с другими FcγR-рецепторами.

Иммуноконъюгаты могут содержать гуманизированное антитело или его фрагмент, конъюгированное/конъюгированный с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтическое средство, токсин (например, обладающий ферментативной активностью токсин бактериального, грибного, растительного или животного происхождения или их фрагменты) или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконъюгат).

Химиотерапевтические средства, которые можно применять для получения таких иммуноконъюгатов, описаны выше. Обладающие ферментативной активностью токсины и их фрагменты, которые можно применять, включают цепь А дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин, трикотецены и т.п. Для получения радиоконъюгатов гуманизированных антител к IL-23p19 можно применять различные радионуклиды. Их примерами являются ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y и ^{186}Re .

Конъюгаты гуманизированного антитела к IL-23p19 и цитотоксического или химиотерапевтического средства можно получать известными методами, с использованием целого ряда бифункциональных связывающих белки агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдителил)пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметиладипимидат-HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бисазидосоединения (такие как бис(пара-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис(пара-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицина можно получать согласно методу, описанному у Vitetta et al., Science, 238, 1987, p. 1098. Меченная с помощью C^{14} 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является примером хелатирующего агента для конъюгации радионуклеотида с антителом. Конъюгаты можно получать также с использованием расщепляемого линкера.

Гуманизированные антитела к IL-23p19, представленные в настоящем описании, можно готовить также в виде иммунолипосом. Липосомы, содержащие антитело, получают методами, известными в данной области, например, описанными у Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1985, p. 3688; Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1980, с 4030; и в US № 4485045 и 4544545. Липосомы с удлиненным временем жизни в кровотоке описаны, например, в US № 5013556.

Наиболее предпочтительные липосомы можно получать методом упаривания с обращенной фазой с использованием липидной композиции, включающей фосфатидилхолин, холестерин и дериватизированный с помощью ПЭГ фосфатидилэтанолламин (ПЭГ-ФЭ). Липосомы экстрадируют через фильтры с определенным размером пор, получая липосомы требуемого диаметра. Fab'-фрагменты антитела можно включать в липосомы согласно методу, описанному у Martin et al., J. Biol. Chem., 257, 1982, p. 286-288, посредством реакции образования дисульфидной связи. В липосомы необязательно можно включать химиотерапевтическое средство (такое как доксорубин) (см., например, Gabizon et al., J. National Cancer Inst., 81(19), 1989, p. 1484).

Антитела, представленные в настоящем описании, можно применять в ADEPT (процедуры на основе антитело-направленного фермента пролекарственной терапии) путем конъюгации антитела с активирующим пролекарство ферментом, который превращает пролекарство (например, пептидильный химиотерапевтический агент) в активное противораковое лекарственное средство (см., например, WO 81/01145, WO 88/07378 и US № 4975278). Компонент иммуноконъюгата, представляющий собой фермент, который можно применять в ADEPT, может представлять фермент, который обладает способностью оказывать такое воздействие на пролекарство, в результате которого оно превращается в более активную цитотоксическую форму. Конкретные ферменты, которые можно применять в ADEPT, включают (но, не ограничиваясь только ими) щелочную фосфатазу для превращения содержащих фосфат пролекарств в свободные лекарственные субстанции; арилсульфатазу для превращения содержащих сульфат пролекарств в свободные лекарственные субстанции; цитозиндеаминазу для превращения нетоксичного 5-фторцитозина в противораковую лекарственную субстанцию 5-фторурацил; протеазы, такие как протеиназа Serratia, термолизин, субтилизин, карбоксипептидазы и катепсины (такие как катепсины B и L), для превращения содержащих пептид пролекарств в свободные лекарственные субстанции; D-аланилкарбоксипептидазы для превращения пролекарств, содержащих D-аминокислотные заместители; расщепляющие углеводы ферменты, такие как β-галактозидаза и нейраминидаза, для превращения гликозилированных пролекарств в свободные лекарственные субстанции; β-лактамазу для превращения пролекарств, дериватизированных β-лактамами, в свободные лекарственные субстанции; и амидазы пенициллина, такие как амидаза пенициллина V или амидаза пенициллина G, для превращения лекарственных субстанций, дериватизированных по азотам амина феноксиацетильной или фенилацетильной групп.

пами, соответственно, в свободные лекарственные субстанции. В альтернативном варианте можно применять антитела с ферментативной активностью ("абзимы") для превращения пролекарств в свободные активные лекарственные субстанции (см., например, Massey, *Nature*, 328, 1987, p. 457-458). Конъюгаты антитело-абзим можно получать с помощью известных в данной области методов, предназначенных для введения абзима в популяцию опухолевых клеток, например, путем ковалентного связывания фермента с гуманизированным антителом к IL-23p19/гетеробифункциональными перекрестносшивающими реагентами, которые описаны выше. В альтернативном варианте слитые белки, которые содержат по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, сцепленную по меньшей мере с функционально активной областью фермента, представленного в настоящем описании, можно конструировать с использованием метода рекомбинантной ДНК (см., например, Neuberger et al., *Nature*, 312, 1984, p. 604-608).

Иногда может требоваться применение фрагмента гуманизированного антитела к IL-23p19 вместо интактного антитела, например, для повышения способности проникать в ткань, например, может потребоваться модифицировать фрагмент антитела для удлинения времени полужизни в сыворотке. Для этой цели можно, например, включать эпитоп, связывающийся с рецептором спасения, во фрагмент антитела. Согласно одному из методов соответствующую область фрагмента антитела можно изменять (например, подвергать мутации) или эпитоп можно встраивать в пептидную метку, которую затем сливают с фрагментом антитела на любом конце или в середине, например, с использованием ДНК или пептидного синтеза (см., например, WO 96/32478).

Можно также применять ковалентные модификации гуманизированного антитела к IL-23p19. Ковалентные модификации включают модификацию цистеинильных остатков, гистидильных остатков, лизинильных и аминоконцевых остатков, аргинильных остатков, тирозильных остатков, карбоксильных боковых групп (аспартил или глутамил), глутаминильных и аспарагинильных остатков, или серильных, или треонинильных остатков. Другой тип ковалентной модификации включает химическое или ферментативное сшивание гликозидов с антителом. Указанные модификации можно осуществлять с помощью химического синтеза или путем ферментативного или химического расщепления антитела, если это возможно. Для интродукции других типов ковалентных модификаций в молекулу антитела можно применять взаимодействие меченых аминокислотных остатков антитела с органическим дериватирующим агентом, который может взаимодействовать с выбранными боковыми цепями или аминоконцевыми или карбоксиконцевыми остатками.

Удаление любых углеводных фрагментов, присутствующих на антителе, можно осуществлять химическим или ферментативным путем. Химическое дегликозилирование описано у Hakimuddin et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 259, 1987, p. 52 и у Edge et al., *Anal. Biochem.*, 118, 1981, p. 131. Ферментативное отщепление углеводных фрагментов на антителах можно осуществлять с помощью различных эндо- и экзогликозидаз согласно методу, описанному у Thotakura et al., *Meth. Enzymol.*, 138, 1987, p. 350.

Другой тип пригодной ковалентной модификации предусматривает связывание антитела с одним из многочисленных небелковых полимеров, например с полиэтиленгликолем (ПЭГ), полипропиленгликолем или полиоксиалкиленами, с помощью методов, описанных в одном или нескольких из US № 4640835, US № 4496689, US № 4301144, US № 4670417, US № 4791192 и US № 4179337.

Гуманизация и варианты аминокислотной последовательности.

Варианты аминокислотной последовательности антитела к IL-23p19 можно получать путем интродукции соответствующих нуклеотидных изменений в ДНК антитела к IL-23p19 или с помощью пептидного синтеза. Указанные варианты включают, например, делеции и/или инсерции, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антител к IL-23p19, представленных в качестве примера в настоящем описании. Для получения конечной конструкции применяют любую комбинацию делеций, инсерции и замен при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками. Аминокислотные замены могут изменять также посттрансляционный процессинг гуманизированного антитела к IL-23p19 или его варианта, например изменение количества или положения сайтов гликозилирования.

Пригодным методом идентификации конкретных остатков или областей в антителе к IL-23p19, которые представляют собой предпочтительные сайты для мутагенеза, является так называемый "аланин-сканирующий мутагенез", описанный у Cunningham и Wells, *Science*, 244, 1989, p. 1081-1085. С его помощью идентифицируют остаток или группу остатков-мишеней (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) и заменяют на нейтральную или отрицательно заряженную аминокислоту (как правило, на аланин) для воздействия на взаимодействие аминокислот с антигеном IL-23p19. Те положения аминокислот, для которых продемонстрирована функциональная чувствительность к заменам, затем усовершенствуют путем интродукции дополнительных или других вариантов в сайты замены или для сайтов замены. При этом, хотя сайт для интродукции вариации аминокислотной последовательности является predetermined, природа самой мутации не является predetermined. Например, для анализа эффективности мутации в рассматриваемом сайте осуществляют сканирование аланином или неспецифический мутагенез кодона-мишени или области-мишени и полученные в результате экспрессии варианты антитела к IL-23p19 подвергают скринингу в отношении требуемой активности.

Инсерции в аминокислотную последовательность включают амино- и/или карбоксиконцевые слия-

ния различной длины от одного остатка до полипептидов, которые содержат сто или большее количество остатков, а также инсерции внутрь последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примерами концевых инсерции является антитело к IL-23p19, слитое с эпитопом-меткой. Другие инсерционные варианты молекулы антитела к IL-23p19 включают слияние с N- или C-концом антитела к IL-23p19 фермента или полипептида, который удлинит время полужизни антитела в сыворотке.

Другим типом варианта является вариант, включающий аминокислотную замену. В этих вариантах по меньшей мере один аминокислотный остаток в молекуле антитела к IL-23p19 удален, а другой остаток встроен на его место. Представляющими наибольший интерес сайтами для мутагенеза путем замен являются гипервариабельные участки, но можно осуществлять также изменения в FR. Консервативные замены представлены в табл. 8 под названием "предпочтительные замены". Если такие замены приводят к изменению биологической активности, то можно интродуцировать более существенные замены, обозначенные как "Примеры замен", или другие замены, описанные ниже при ссылке на класс аминокислот, и затем продукты можно подвергать скринингу.

Таблица 8

Исходный остаток	Примеры замен	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg; Asn; Gln; Lys	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Ile; норлейцин; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Phe; Ile	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Tyr; Leu; Val; Ile; Ala	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Phe; Trp; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Leu; Ile; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

В химии белков является общепринятым, что биологические свойства антитела можно модифицировать путем выбора замен, которые в значительной степени различаются по их воздействию на поддержание (а) структуры каркаса полипептида в области замены, например, складчатой или спиральной конформации, (б) заряда или гидрофобности молекулы в сайте-мишени или (в) размера боковой цепи. Встречающиеся в естественных условиях остатки подразделяют на группы на основе общих свойств боковых цепей:

- (1) гидрофобные: норлейцин, met, ala, val, leu, ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: cys, ser, thr;
- (3) кислые: asp, glu;
- (4) основные: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: gly, pro; и
- (6) ароматические: trp, tyr, phe.

Неконсервативные замены предусматривают замену представителя одного из этих классов на представителя другого класса.

Любой из остатков цистеина, не участвующий в поддержании соответствующей конформации гуманизированного антитела к IL-23p19 или его варианта, можно заменять также, как правило, на серин, с целью повышения устойчивости молекулы к окислению и предупреждению аномального перекрестного сшивания или для создания точек для конъюгации с цитотоксическим или цитостатическим соединением. И наоборот, можно вводить в антитело цистеиновую(ые) связь(и) для повышения его стабильности (особенно если антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как Fv-фрагмент).

Один из типов создаваемого путем замены варианта включает замену одного или нескольких остатков гипервариабельного участка родительского антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела). Как правило, полученный(ые) в результате вариант(ы), отобранный(е) для дальнейшего усовершенствования, должен(ны) обладать улучшенными биологическими свойствами относительно родительского антитела, из которого оно(они) получено(ы). Приемлемый путь получения таких вариантов на основе замены включает созревание аффинности с использованием фагового дисплея. В целом, метод состоит в следующем: несколько сайтов гипервариабельного участка (например, 6-7 сайтов) подвергают мутации, получая все возможные аминокислотные замены в каждом сайте. Полученные таким образом варианты антитела экспонируются в одновалентной форме на поверхности частиц нитчатого фага в виде слияний с продуктом гена III фага M13, который упакован в каждой частице. Варианты, ко-

которые экспонируются фагом, затем подвергают скринингу в отношении их биологической активности (например, аффинности связывания). Для того чтобы выявлять перспективные с точки зрения модификации сайты гипервариабельного участка, можно осуществлять аланин-сканирующий мутагенез с целью идентификации остатков гипервариабельного участка, которые наиболее важны для связывания антигена. В альтернативном или дополнительном варианте может оказаться целесообразным анализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело с целью выявления точек соприкосновения между антителом и человеческим IL-23p19. Такие остатки в точках соприкосновения и соседние остатки являются кандидатами для замены с помощью способов, разработанных при создании настоящего изобретения. После создания таких вариантов панель вариантов подвергают скринингу, представленному в данном описании, и антитела с улучшенными свойствами по данным одного или нескольких соответствующих анализов можно отбирать для дальнейшей разработки.

Другим типом получения аминокислотного варианта антитела является изменение исходной схемы гликозилирования антитела. Под "изменением" подразумевают делецию одного или нескольких углеводных фрагментов, присутствующих в антителе, и/или добавление одного или нескольких сайтов гликозилирования, не присутствующих в антителе.

Гликозилирование антител обычно происходит посредством либо N-связывания, либо O-связывания. N-связывание предусматривает присоединение углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X обозначает любую аминокислоту кроме пролина, представляют собой распознаваемые последовательности, предназначенные для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Так, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование предусматривает присоединение одного из Сахаров, таких как N-ацетилгалактозамин, галактоза или ксилоза, к гидроксиминокислоте, наиболее часто к серину или треонину, хотя можно применять также 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин. Таким образом, для гликозилирования данного белка, например, антитела, создают аминокислотную последовательность белка, которая содержит одну или несколько описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-гликозилирования). Изменение может также представлять собой добавление или замену одного или нескольких остатков серина или треонина в последовательности исходного антитела (для сайтов O-гликозилирования).

Молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют варианты аминокислотных последовательностей антитела к IL-23p19, получают с помощью различных методов, известных в данной области. Эти методы включают (но, не ограничиваясь только ими) выделение из природного источника (в случае встречающихся в естественных условиях вариантов аминокислотных последовательностей) или получение с помощью мутагенеза с использованием олигонуклеотидов (или сайтнаправленного мутагенеза), ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза полученного ранее варианта или невариантной версии антитела к IL-23p19.

Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева и методы рекомбинации Выделенные полинуклеотиды могут кодировать любую требуемую форму антитела к IL-23p19, включая, например, полноразмерные моноклональные антитела, Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты, димерные антитела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, полученные из фрагментов антител.

Выделенные полинуклеотиды могут содержать последовательности, кодирующие вариабельную область легкой цепи антитела или фрагмента антитела, которая имеет любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 84, 86, 88, 90, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117 или 119. Примерами полинуклеотидных последовательностей, кодирующих указанные аминокислотные последовательности, являются SEQ ID NO: 83, 85, 87, 89, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116 и 118. Выделенные полинуклеотиды могут содержать последовательности, кодирующие вариабельную область тяжелой цепи антитела или фрагмента антитела, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121, 123, 125, 127, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154 или 156. Примерами полинуклеотидных последовательностей, кодирующих указанные аминокислотные последовательности, являются SEQ ID NO: 120, 122, 124, 126, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153 или 155. Выделенные полинуклеотиды могут содержать последовательности, кодирующие вариабельную область легкой цепи антитела или фрагмента антитела, которая имеет любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 158, 160, 162 или 164. Примерами полинуклеотидных последовательностей, кодирующих указанные аминокислотные последовательности, являются SEQ ID NO: 157, 159, 161 или 163. Выделенные полинуклеотиды могут содержать последовательности, кодирующие вариабельную область тяжелой цепи антитела или фрагмента антитела, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 166, 168, 170 или 172. Примерами полинуклеотидных последовательностей, кодирующих указанные аминокислотные последовательности, являются SEQ ID NO: 165, 167, 169 или 171.

Выделенные полинуклеотиды могут содержать последовательности, кодирующие легкую цепь антитела, имеющую любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 174 или SEQ ID NO: 180. Примерами полинуклеотидных последовательностей, кодирующих указанные аминокислотные последо-

вательности, являются SEQ ID NO: 173 или SEQ ID NO: 179. Выделенные полинуклеотиды могут содержать последовательности, кодирующие тяжелую цепь антитела, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 176 или SEQ ID NO: 178. Примерами полинуклеотидных последовательностей, кодирующих указанные аминокислотные последовательности, являются SEQ ID NO: 175 или SEQ ID NO: 177.

Выделенная(ые) полинуклеотидная(ые) последовательность(и) могут кодировать антитело или фрагмент антитела, имеющего вариабельную область легкой цепи и тяжелой цепи, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 174 и SEQ ID NO: 176 соответственно; SEQ ID NO: 174 и SEQ ID NO: 178 соответственно; SEQ ID NO: 180 и SEQ ID NO: 176 соответственно; SEQ ID NO: 180 и SEQ ID NO: 178 соответственно. Примерами полинуклеотидных последовательностей, кодирующих указанные аминокислотные последовательности, являются SEQ ID NO: 173 и SEQ ID NO: 175 соответственно, SEQ ID NO: 173 и SEQ ID NO: 177 соответственно, SEQ ID NO: 179 и SEQ ID NO: 175 соответственно, SEQ ID NO: 179 и SEQ ID NO: 177 соответственно.

Полинуклеотид(ы), который(ые) содержит(ат) последовательность, кодирующую гуманизованное антитело к IL-23p19 или его фрагмент или цепь, можно сливать с одной или несколькими регуляторными или контролирующими последовательностями, известными в данной области, и можно включать в приемлемые экспрессионные векторы или клетку-хозяина, известные в данной области. Каждую из молекул полинуклеотида, кодирующего вариабельные домены тяжелой или легкой цепи, можно независимо друг от друга сливать с полинуклеотидной последовательностью, которая кодирует константный домен, например, человеческий константный домен, что позволяет получать интактные антитела. В альтернативном варианте полинуклеотиды или их участки можно сливать вместе, создавая матрицу для получения одноцепочечного антитела.

Для получения с помощью методов рекомбинации полинуклеотид, кодирующий антитело, встраивают в реплицируемый вектор для клонирования (амплификация ДНК) или для экспрессии. Известно и доступно много приемлемых векторов для экспрессии рекомбинантного антитела. Компонентами вектора, как правило, являются (но, не ограничиваясь только ими) один или несколько следующих элементов: сигнальная последовательность, сайт инициации репликации, один или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминатора транскрипции.

Гуманизованные антитела к IL-23p19 можно получать также в виде слитых полипептидов, в которых антитело слито с гетерологичным полипептидом, таким как сигнальная последовательность или другой полипептид, несущий специфический сайт расщепления на аминоконце зрелого белка или полипептида. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность, как правило, представляет собой последовательность, которая распознается и процессируется (т.е. отщепляется сигнальной пептидазой) в клетке-хозяине. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не могут распознавать и процессировать сигнальную последовательность гуманизованного антитела к IL-23p19, сигнальную последовательность можно заменять на прокариотическую сигнальную последовательность. Сигнальная последовательность может представлять собой, например, лидерные последовательности щелочной фосфатазы, пенициллиназы, липопроотеина или термостабильного энтеротоксина II и т.п. Для секреции из дрожжей нативную сигнальную последовательность можно заменять, например, на лидерную последовательность, полученную из α -фактора дрожжевой инвертазы (включая лидерные последовательности α -фактора *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*), кислой фосфатазы, глюкоамилазы *C. albicans* или сигнальную последовательность, описанную в WO 90/13646. Для экспрессии в клетках млекопитающих можно применять сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например, gD-сигнал вируса герпеса простого. ДНК, кодирующую указанную область-предшественник, лигируют в рамке считывания с ДНК, которая кодирует гуманизованное антитело к IL-23p19.

Экспрессионные и клонирующие векторы содержат нуклеотидную последовательность, которая позволяет вектору реплицироваться в одной или нескольких выбранных клетках-хозяевах. Как правило, в клонирующих векторах эта последовательность представляет собой последовательность, которая обеспечивает репликацию вируса, не зависящую от хромосомной ДНК хозяина, и она включает сайт инициации репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для различных бактерий, дрожжей и вирусов. Сайт инициации репликации из плазмиды pBR322 пригоден для большинства грамотрицательных бактерий, сайт инициации плазмиды 2 μ пригоден для дрожжей, а различные вирусные сайты инициации (SV40 (обезьяний вирус 40), вируса полиомы, аденовируса, VSV (вирус везикулярного стоматита) или BPV (вирус папилломы крупного рогатого скота)) пригодны для клонирующих векторов в клетках млекопитающих. Как правило, для экспрессионных векторов млекопитающих не требуется компонент, представляющий собой сайт инициации репликации (как правило, можно применять только сайт инициации репликации SV40, поскольку он содержит ранний промотор).

Экспрессионные и клонирующие векторы могут содержать ген, который кодирует селективируемый маркер, для облегчения идентификации или экспрессии. Как правило, гены селективируемых маркеров ко-

дируют белки, которые обуславливают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, таким как ампициллин, неомицин, метотрексат или тетрациклин, или в альтернативном варианте восполняют ауко-трофную недостаточность, или в другом альтернативном варианте пополняют имеющие решающее значение питательные вещества, которые не присутствуют в комплексных средах, например ген, кодирующий D-аланинрацемазу для *Bacilli*.

В одной из приведенных в качестве примера схем селекции применяют лекарственное средство для прекращения роста клетки-хозяина. В тех клетках, которые успешно трансформированы гетерологичным геном, образуется белок, обуславливающий устойчивость к лекарственному средству, и поэтому клетки выживают при такой схеме селекции. Примерами лекарственных средств, применяемых для такой доминантной селекции, являются неомицин, микофеноловая кислота и гиромидин. Общепринятыми селективируемыми маркерами для клеток млекопитающих являются маркеры, позволяющие идентифицировать клетки, компетентные в отношении поглощения нуклеиновой кислоты, которая кодирует гуманизированное антитело к IL-23p19, такие как DHFR (дигидрофолатредуктаза), тимидинкиназа, металлотионеин-I и -II (например, гены металлотионеина приматов), аденозиндеаминаза, орнитиндекарбоксилаза и т.п. Клетки, трансформированные применяемым для селекции геном DHFR, идентифицируют, прежде всего, путем культивирования всех трансформантов в культуральной среде, которая содержит метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. Приемлемой клеткой-хозяином, когда применяют DHFR дикого типа, является клетка яичника китайского хомячка (CHO) с дефицитом DHFR-активности (например, DG44).

В альтернативном варианте клетки-хозяева (прежде всего, хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный ген DHFR), трансформированные или совместно трансформированные последовательностями ДНК, которые кодируют антитело к IL-23p19, белок DHFR дикого типа и другой селективируемый маркер, такой как аминокликозид-3'-фосфотрансфераза (APH), можно отбирать по признаку роста клетки в среде, содержащий селективирующий агент для селективирующего маркера, такой как аминокликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин или G418 (см., например, US № 4965199).

Когда получение методом рекомбинации осуществляют с использованием дрожжевой клетки в качестве клетки-хозяина, то в качестве маркера можно применять ген TRP1, который присутствует в полученной из дрожжей плазмиде YRp7 (Stinchcomb et al., Nature, 282, 1979, p. 39). Ген TRP1 является селективирующим маркером для мутантного штамма дрожжей, лишенного способности расти в среде с добавлением триптофана, например штамм ATCC № 44076 или PEP4-1 (Jones, Genetics, 85, 1977, p. 12). Таким образом, наличие повреждения *trp1* в геноме дрожжевой клетки-хозяина обеспечивает эффективное окружение для выявления трансформации по признаку роста в отсутствие триптофана. Аналогично этому, штаммы дрожжей с дефицитом *Leu2p*, такие как ATCC 20622 и 38626, дополняют с помощью известных плазмид, несущих ген *LEU2*.

Кроме того, векторы, полученные из кольцевой плазмиды pKD1 размером 1,6 мкм, можно применять для трансформации дрожжей *Kluveromyces*. С другой стороны, известна экспрессионная система для крупномасштабного получения рекомбинантного телачьего химозина в *K. lactis* (Van den Berg, Bio/Technology 8, 1990, p. 135). Описаны также стабильные мультиметодические экспрессионные векторы для секреции зрелого рекомбинантного человеческого сывороточного альбумина с помощью промышленных штаммов *Kluveromyces* (Fleer et al., Bio/Technology 9, 1991, p. 968-975).

Экспрессионные и клонирующие векторы, как правило, содержат промотор, распознаваемый организмом-хозяином и функционально связанный с молекулой нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело к IL-23p19 или его полипептидную цепь. Промоторы, которые пригодны для применения в прокариотических хозяевах, представляют собой промотор *rhoA*, промоторные системы β -лактамазы и лактозы, промоторные системы щелочной фосфатазы, триптофана (*trp*) и гибридные промоторы, такие как промотор *tac*. Можно применять также другие промоторы бактерий. Промоторы, предназначенные для применения в бактериальных системах, содержат также последовательность Шайна-Дальгарно (S.D.), функционально связанную с ДНК, которая кодирует гуманизированное антитело к IL-23p19.

Известны многие промоторные последовательности эукариот. Фактически все гены эукариот имеют богатую АТ область, локализованную примерно на расстоянии 25-30 оснований против хода транскрипции от сайт инициации транскрипции. Другая последовательность, обнаруженная на расстоянии 70-80 оснований от сайта инициации транскрипции многих генов, представляет собой CNCAAT-область, в которой N может обозначать любой нуклеотид. На 3'-конце большинства генов эукариот находится последовательность AATAAA, которая может представлять собой сигнал для добавления поли-А-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности можно встраивать в эукариотические экспрессионные векторы.

Примеры промоторных последовательностей, которые можно применять в дрожжевых клетках-хозяевах, включают промоторы 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, таких как енолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфатизомераза, 3-фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триозофосфатизомераза, фосфоглюкозоизомераза и глюкокиназа.

Индукцибельные промоторы имеют дополнительное преимущество, связанное с транскрипцией, ко-

торая контролируется условиями роста. Они включают дрожжевые промоторные области алкогольдегидрогеназы 2, изоцитохрома C, кислой фосфатазы, расщепляющих ферментов, связанных с метаболизмом азота, металлтионеина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и ферментов, ответственных за утилизацию мальтозы и галактозы. Кроме того, приемлемые векторы и промоторы, которые можно применять при экспрессии в дрожжах, описаны в EP 73657. Энхансеры из дрожжей целесообразно применять также в сочетании с промоторами из дрожжей.

Транскрипцию гуманизированного антитела к IL-23p19 с векторов в клетках-хозяевах млекопитающих контролируют, например, с помощью промоторов, полученных из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы птиц, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и обезьяний вирус 40 (SV40), с помощью гетерологичных промоторов млекопитающих, например, промотора актина или промотора иммуноглобулина, или промоторов теплового шока при условии, что такие промоторы совместимы с системами клетки-хозяина.

Ранний и поздний промоторы вируса SV40 целесообразно получать в виде рестрикционного фрагмента SV40, который содержит также сайт инициации репликации вируса SV40. Немедленно-ранний промотор человеческого цитомегаловируса целесообразно получать в виде рестрикционного HindIII E-фрагмента. Система экспрессии ДНК в клетках-хозяевах млекопитающих, в которой применяли вирус бычьей папилломы в качестве вектора, описана в US № 4419446. Модификация указанной системы описана в US № 4601978 (см. также у Reyes et al., Nature 297, 1982, p. 598-601 описание экспрессии кДНК человеческого р-интерферона в мышинных клетках под контролем промотора тимидинкиназы из вируса герпеса простого). В альтернативном варианте в качестве промотора можно применять длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса.

Другим важным элементом, который можно применять в рекомбинантном экспрессионном векторе, является энхансерная последовательность, которую используют для повышения транскрипции ДНК, кодирующей гуманизированное антитело к IL-23p19, в высших эукариотических организмах. Известны многие энхансерные последовательности генов млекопитающих (генов глобина, эластазы, альбумина, α -фетопротейна и инсулина). Однако, как правило, применяют энхансер из вируса эукариотической клетки. Примерами являются энхансер SV40, расположенный на удаленной стороне от сайта инициации репликации (пары оснований 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы, расположенный на удаленной стороне от сайта инициации репликации, и энхансеры аденовирусов (см. также у Yaniv Nature 297, 1982, p. 17-18 описание энхансерных элементов, применяемых для активации эукариотических промоторов). Энхансер можно встраивать путем сплайсинга в вектор в 5'- или 3'-положение относительно кодирующей последовательности антитела к IL-23p19, но предпочтительно его помещают в сайт, расположенный в 5'-направлении относительно промотора.

Экспрессионные векторы, применяемые в эукариотических клетках-хозяевах (клетки дрожжей, грибов, насекомых, растений, животных, людей или содержащие ядро клетки других многоклеточных организмов), должны содержать также последовательности, необходимые для терминирования транскрипции и стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно получают из 5'- и иногда из 3'-нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибированные в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой области мРНК, которая кодирует антитело к IL-23p19. Одним из пригодных компонентов терминирования транскрипции является область полиаденилирования бычьего гормона роста (см. WO 94/11026 и представленный в указанной заявке экспрессионный вектор). Гуманизированное антитело к IL-23p19 можно экспрессировать с помощью системы CHEF (см., например, US № 5888809, описание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки).

Приемлемыми клетками-хозяевами для клонирования или экспрессии ДНК в векторах, указанных в настоящем описании, являются клетки прокариот, дрожжей или высших эукариот. Приемлемыми прокариотами являются (но, не ограничиваясь ими) эукариотические бактерии (эубактерии), такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, сем. Enterobacteriaceae, такие как E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, например, Salmonella typhimurium, Serratia, например, Serratia marcescens, и Shigella, а также Bacilli, такие как B. subtilis и B. licheniformis (например, штамм B. licheniformis 41P, который описан в DD 266710, опубликованной 12 апреля 1989 г.), Pseudomonas, такие как P. aeruginosa, и Streptomyces. Одним из предпочтительных штаммов E. coli, который применяют в качестве хозяина при клонировании, является штамм E. coli 294 (ATCC 31446), хотя можно использовать и другие штаммы E. coli B, E. coli X1776 (ATCC 31537) и E. coli W3110 (ATCC 27325). Эти примеры приведены в качестве иллюстрации и не ограничивают объем изобретения.

Помимо прокариотических организмов в качестве хозяев для клонирования или экспрессии векторов, которые кодируют гуманизированное антитело к IL-23p19, можно использовать эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи. Наиболее часто применяемым низшим эукариотическим микроорганизмом-хозяином является Saccharomyces cerevisiae, т.е. обычные пекарские дрожжи. Однако возможно применение многочисленных известных и доступных представителей других родов, видов и штаммов, таких как Schizosaccharomyces pombe; хозяев из сем. Kluyveromyces таких, на-

пример, как *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilae* (ATCC 36906), *K. thermotolerans* и *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402226); *Pichiapastoris* (EP 183070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244234); *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1979, p. 5259-5263); *Schwanniomycetes*, такие как *Schwanniomycetes occidentalis* и нитчатые грибы, такие, например, как *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* и хозяева р. *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*.

Клетки-хозяева, пригодные для экспрессии гликозилированного гуманизированного антитела к IL-23p19, получают из многоклеточных организмов. Примерами клеток беспозвоночных являются клетки растений и клетки насекомых, например, многочисленные бакуловирусные штаммы и их варианты и соответствующие пригодные для них в качестве хозяев клетки насекомых, таких как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая муха) и *Bombyx mori* (шелковичный червь). Широко известны разнообразные штаммы вирусов, которые можно использовать для трансфекции, например вариант L-1 *Autographa californica* NPV и штамм *Bombyx mori* Bm-5 NPV, и такие вирусы можно применять, прежде всего, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

В качестве хозяев можно применять также культуры клеток хлопчатника, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томатов и табака.

Экспрессию гуманизированного антитела к IL-23p19 можно осуществлять в клетках позвоночных животных. В настоящее время размножение клеток позвоночных в культуре (культура ткани) стало стандартной процедурой, и соответствующие методики являются широко распространенными. Примерами пригодных в качестве хозяев линий клеток млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CVI, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия клеток почки эмбриона человека (293 или клетки линии 293, субклонированные с целью выращивания в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen. Virol., 36, 1977, p. 59); клетки почки детеныша хомячка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка/ DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1980, p. 4216); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23, 1980, p. 243-251); клетки почки обезьяны (CV1, ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени бычьей крысы (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., Ann als N.Y. Acad. Sci., 383, 1982, ss. 44-68); клетки MRC 5; клетки FS4 и линия клеток гепатомы человека (Hep G2).

Клетки-хозяева трансформируют с помощью описанных выше экспрессионных или клонирующих векторов с целью получения гуманизированного антитела к IL-23p19 и культивируют в пригодных питательных средах, соответствующим образом модифицированных для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих требуемые последовательности.

Клетки-хозяева, которые применяют для получения гуманизированного антитела к IL-23p19, представленного в настоящем описании, можно культивировать в широком разнообразии сред. Для культивирования клеток-хозяев можно использовать имеющиеся в продаже среды, такие как среда Хэма F10 (фирма Sigma-Aldrich Co., Сент-Луис, шт. Миссури), минимальная поддерживающая среда (MEM), фирма Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (фирма Sigma-Aldrich Co.) и модифицированная по методу Дульбекко среда Игла (DMEM), фирма Sigma-Aldrich Co.). Кроме того, в качестве сред для культивирования клеток-хозяев можно использовать любые из сред, которые описаны в одной или нескольких следующих публикациях: Ham et al., Meth. Enz. 58, 1979, p. 44, Barnes et al., Anal. Biochem. 102, 1980, p. 255, US № 4767704, US № 4657866, US № 4927762, US № 4560655, US № 5122469, WO 90/103430 и WO 87/00195. Любую из этих сред при необходимости можно дополнять гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид и фосфат натрия, кальция, магния), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как гентамицин), микроэлементами (т.е. неорганическими соединениями, которые обычно присутствуют в конечных концентрациях, находящихся в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Специалистам в данной области должно быть очевидно, что можно включать также любые другие необходимые добавки в соответствующих концентрациях. Условия культивирования, такие как температура, значение pH и т.п., представляют собой условия, которые использовались ранее для клеток-хозяев, отобранных для экспрессии, и они должны быть очевидны обычному специалисту в данной области.

При использовании методов рекомбинации антитело может продуцироваться внутри клетки, в периплазматическом пространстве или непосредственно выделяться в среду. Если антитело продуцируется внутри клетки, то на первой стадии клетки можно разрушать для высвобождения белка. Состоящий из отдельных частиц дебрис, либо клеток-хозяев, либо лизированных фрагментов, можно удалять, например, с помощью центрифугирования или ультрафильтрации. У Carter et al., Bio/Technology, 10, 1992, p. 163-167 описан метод выделения антител, секретлируемых в периплазматическое пространство *E. coli*. В целом, метод состоит в следующем: клеточную массу в виде пасты подвергают оттаиванию приблизи-

тельно в течение 30 мин в присутствии ацетата натрия (рН 3,5), ЭДТК и фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ). Клеточный дебрис можно удалять центрифугированием. Если антитело секретируется в среду, то супернатанты таких экспрессионных систем, как правило, сначала концентрируют с помощью имеющегося в продаже фильтра для концентрирования белков, например устройства для ультрафильтрации типа Amicon или Millipore Pellicon. На любой из предыдущих стадий для ингибирования протеолиза можно добавлять ингибитор протеазы, такой как ФМСФ, а для предупреждения увеличения нежелательных примесей можно добавлять антибиотики. Для выделения антитела из клетки-хозяина можно применять широкое разнообразие методов.

Композицию антитела, полученную из клеток, можно очищать, например, хроматографией на гидроксипатите, гель-электрофорезом, диализом и аффинной хроматографией, при этом предпочтительным методом очистки является аффинная хроматография. Возможность применения белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изотипа Fc-области любого иммуноглобулина, присутствующей в антителе. Белок А можно использовать для очистки антител, основой которых являются человеческие тяжелые гамма 1-, гамма 2- или гамма 4-цепи (Lindmark et al., J. Immunol. Meth., 62, 1983, p. 1-13). Белок G рекомендуется для применения для всех мышиных изотипов и для человеческой гамма 3-цепи (Guss et al., EMBO J., 5, 1986, p. 1567-1575). В качестве матрицы, с которой связывается аффинный лиганд, наиболее часто применяют агарозу, однако можно использовать и другие матрицы. Устойчивые к механическим воздействиям матрицы, такие как стекло или поли(стиролдвинил)бензол с контролируемым размером пор, позволяют достигать более высоких скоростей потока и более короткого времени процесса по сравнению с характеристиками, достигаемыми при использовании агарозы. Если антитело содержит C_H3-домен, то для очистки можно использовать смолу типа Bakerbond ABX™ (фирма J.T. Baker, Филлипсбург, шт. Нью-Джерси). В зависимости от антитела, подлежащего выделению, можно применять также другие методы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, ЖХВР с обращенной фазой, хроматография на силикагеле, хроматография на гепарин-SEPHAROSE™, хроматографии на анионо- или катионообменной смоле (например на колонке с полиаспартамовой кислотой), хроматофокусирование, ДСН-ПААГ и осаждение сульфатом аммония.

После любой(ых) из предыдущей(их) стадии(й) очистки смесь, содержащую представляющее интерес антитело и примеси, можно подвергать хроматографии, основанной на гидрофобном взаимодействии, при низком значении рН с использованием буфера для элюции, который имеет значение рН приблизительно от 2,5 до 4,5, хроматографию предпочтительно осуществляют при низких концентрациях солей (например, с использованием приблизительно 0-0,25М солей).

Нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в нестрогих, умеренных или строгих условиях, указанных в настоящем описании, со всей или с частью (например, с участком, который кодирует переменную область) нуклеотидной последовательности представляют собой выделенную(ые) полинуклеотидную(ие) последовательность(и), кодирующую(ие) антитело или фрагмент антитела. Гибридирующая область гибридирующей нуклеиновой кислоты, как правило, состоит по меньшей мере из 15 (например, 20, 25, 30 или 50) нуклеотидов. Гибридирующая область гибридирующей нуклеиновой кислоты идентична по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% последовательности участка или всей нуклеиновой кислоты, которая кодирует анти-IL-23p19 полипептид (например, переменную область тяжелой цепи или легкой цепи), или ее комплементу. Гибридирующиеся нуклеиновые кислоты представленного в настоящем описании типа можно применять, например, в качестве зонда для клонирования, праймера, например ПЦР-праймера, или диагностического зонда.

Выделенные полинуклеотиды могут включать последовательности, которые кодируют антитело или фрагмент антитела, имеющее/имеющий любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 84, 86, 88, 90, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117 или 119, и которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны полинуклеотидным последовательностям SEQ ID NO: 83, 85, 87, 89, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116 или 118.

Выделенные полинуклеотиды могут включать последовательности, которые кодируют антитело или фрагмент антитела, имеющее/имеющий любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 158, 160, 162 или 164, и которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны полинуклеотидным последовательностям SEQ ID NO: 157, 159, 161 или 163.

Выделенные полинуклеотиды могут включать последовательности, которые кодируют антитело или фрагмент антитела, имеющее/имеющий любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 121, 123, 125, 127, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154 или 156, и которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны полинуклеотидным последовательностям SEQ ID NO: 120, 122, 124, 126, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153 или 155.

Выделенные полинуклеотиды могут включать последовательности, которые кодируют антитело

или фрагмент антитела, имеющее/имеющий любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 166, 168, 170 или 172, и которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны полинуклеотидным последовательностям SEQ ID NO: 165, 167, 169 или 171.

Выделенные полинуклеотиды могут включать последовательности, которые кодируют антитело или фрагмент антитела, имеющее/имеющий аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 84, 86, 88, 90, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117 или 119. Выделенные полинуклеотиды могут включать последовательности, которые кодируют антитело или фрагмент антитела, имеющее/имеющий аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 158, 160, 162 или 164. Выделенные полинуклеотиды могут включать последовательности, которые кодируют антитело или фрагмент антитела, имеющее/имеющий аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 121, 123, 125, 127, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154 или 156. Выделенные полинуклеотиды могут включать последовательности, которые кодируют антитело или фрагмент антитела, имеющее/имеющий аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 166, 168, 170 или 172. В контексте настоящего описания понятия "идентичный" или "процент идентичности" касательно двух или большего количества нуклеотидных или полипептидных последовательностей относится к двум или большему количеству последовательностей или подпоследовательностей, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент одинаковых нуклеотидов или аминокислотных остатков при сравнении и выравнивании для максимального соответствия. Для определения процента идентичности последовательности выравнивают для оптимального сравнения (например, можно интродуцировать бреши в последовательность первой аминокислотной или нуклеотидной последовательности для оптимального сравнительного анализа первичной структуры со второй аминокислотной или нуклеотидной последовательностью). Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или положениях нуклеотидов. Когда в положении в первой последовательности находится такой же аминокислотный остаток или нуклеотид, что и в соответствующем положении во второй последовательности, то молекулы являются идентичными в указанном положении. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией от количества идентичных положений в последовательностях (т.е. $\% \text{ идентичности} = \frac{\text{количество идентичных положений}}{\text{общее количество положений}} \times 100$). Две сравниваемые последовательности могут иметь одинаковую длину после интродукции при необходимости брешей в последовательности (например, исключая дополнительную последовательность, простирающуюся за последовательности, подлежащие сравнению). Например, когда сравнивают последовательности вариабельных областей, то не рассматривают лидерные и/или последовательности константных доменов. При сравнении последовательностей двух последовательностей, "соответствующий" CDR относится к CDR, расположенному в одинаковом положении в обеих последовательностях (например, CDR-H1 каждой последовательности). Определение процента идентичности или процента сходства между двумя последовательностями можно осуществлять с помощью математического алгоритма. Предпочтительным примером математического алгоритма, который можно применять для сравнения двух последовательностей, является (но, не ограничиваясь только им) алгоритм Karlin и Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1990, сс. 2264-2268, модифицированный согласно Karlin и Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 5873-5877. Указанный алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST, описанные у Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 1990, р. 403-410. Анализ нуклеотидов с помощью BLAST можно осуществлять с помощью программы NBLAST, в которой балл = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных нуклеиновой кислоте, кодирующей представляющей интерес белок. Анализ белков с помощью BLAST можно осуществлять с помощью программы XBLAST, в которой балл = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных представляющему интерес белку. Для осуществления сравнительных анализов первичной структуры, включающей бреши, можно применять программу Gapped BLAST, описанную у Altschul et al., Nucleic Acids, 25, 1997, р. 3389-3402. В другом варианте можно применять PSI-Blast для осуществления итерационного поиска, позволяющего определять отдаленные взаимосвязи между молекулами (Id.). При применении программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast можно применять задаваемые по умолчанию параметры соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Другим предпочтительным примером (но, не ограничиваясь только им) математического алгоритма, который можно применять для сравнения последовательностей, является

алгоритм, описанный у Myers и Miller, CABIOS, 1989. Указанный алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программ для сравнительного анализа первичной структуры последовательностей GCG. Когда программу ALIGN применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, то можно применять таблицу взвешенных остатков PAM120, штраф за длину бреши 12 и штраф за брешь 4. Дополнительные алгоритмы для анализа последовательностей известны в данной области и включают ADVANCE и ADAM, описанные у Torellis и Robotti, Comput. Appl. Biosci. 10, 1994, p. 3-5; и FASTA, описанный у Pearson и Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1988, p. 2444-2448. В программе FASTA параметр *ktup* обозначает контрольный параметр, который задает чувствительность и скорость поиска. Если *ktup* = 2, то сходные области в двух подлежащих сравнению последовательностях выявляют путем просмотра пар выравненных остатков; если *ktup* = 1, то оценивают индивидуальные выравненные аминокислоты. Для белковых последовательностей можно задавать значение *ktup*, равное 2 или 1, а для последовательностей ДНК значения в пределах от 1 до 6. Задаваемое по умолчанию значение *ktup*, если его не определяют специально, равно 2 в случае белков и равно 6 в случае ДНК. В альтернативном варианте сравнительный анализ первичной структуры белковых последовательностей можно осуществлять с помощью алгоритма CLUSTAL W, описанного у Higgins et al., Methods Enzymol. 266, 1996, p. 383-402.

Нетерапевтическое применение.

Антитела, представленные в настоящем описании, можно применять в качестве средств, используемых для очистки на основе аффинности. При осуществлении этого процесса антитела иммобилизуют на твердой фазе, такой как смола, содержащая белок А, с помощью методов, хорошо известных в данной области. Иммобилизованное антитело приводят в контакт с образцом, содержащим белок IL-23p19 (или его фрагмент), который подлежит очистке, и затем подложку отмывают приемлемым растворителем, который должен удалять практически весь материал в образце кроме белка IL-23p19, связанного с иммобилизованным антителом. И, наконец, подложку отмывают другим приемлемым растворителем, который должен отделять белок IL-23p19 от антитела.

Антитела к IL-23p19, например, гуманизированные антитела к IL-23p19, можно применять также в диагностических анализах для выявления и/или количественной оценки белка IL-23, например, путем определения экспрессии IL-23 в конкретных клетках, тканях или сыворотке. Антитела к IL-23p19 можно использовать с целью диагностики, например, для мониторинга развития или прогрессирования заболевания, в качестве части клинической процедуры тестирования, например, для определения эффективности данной схемы лечения и/или профилактики. Выявление можно облегчать путем связывания антитела IL-23p19. Примерами выявляемых субстанций являются различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолуминесцентные материалы, радиоактивные материалы, испускающие позитроны материалы, для выявления которых используют позитрон-эмиссионную томографию, и ионы нерадиоактивных парамагнитных металлов (см., например, US № 4741900, в котором описаны ионы металлов, которые можно конъюгировать с антителами для применения в диагностике).

Антитела к IL-23p19 можно применять в методах диагностирования ассоциированного с IL-23 нарушения (например, нарушения, характеризующегося аномальной экспрессией IL-23) или для определения того, имеет ли индивидуум повышенный риск развития ассоциированного с IL-23 нарушения. Такие методы включают приведение в контакт биологического образца из организма индивидуума с антителом к IL-23p19 и определения связывания антитела с IL-23p19. Под "биологическим образцом" подразумевается любой биологический образец, полученный из индивидуума, клеточной линии, культуры ткани или другого источника клеток, потенциально экспрессирующих IL-23. Методы получения биопсий ткани и общей воды организма млекопитающих хорошо известны в данной области.

Метод может заключаться также в сравнении уровня IL-23 в образце из организма пациента и в контрольном образце (например, из организма пациента, у которого отсутствует ассоциированное с IL-23 нарушение) для определения того, имеет ли пациент ассоциированное с IL-23 нарушение или риск развития ассоциированного с IL-23 нарушения.

Целесообразно, например, для диагностических целей, метить антитело с помощью выявляемого фрагмента. Известны и доступны многочисленные выявляемые метки, такие как радиоизотопы, флуоресцентные метки, метки, представляющие собой субстраты для ферментов, и т.п. Метку можно конъюгировать с антителом опосредованным путем с помощью различных известных методик. Например, антитело можно конъюгировать с биотином, и любую из указанных выше меток, относящихся к трем широким категориям, можно конъюгировать с авидином, или наоборот. Биотин избирательно связывается с авидином и поэтому метку можно конъюгировать с антителом опосредованным путем. В альтернативном варианте для достижения опосредованной конъюгации метки с антителом антитело можно конъюгировать с небольшим гаптеном (таким как дигоксин) и одну из различных типов указанных выше меток конъюгировать с антителом к гаптену (например, антителом к дигоксину). Таким путем можно осуществлять опосредованную конъюгацию метки с антителом.

Примерами радиоизотопных меток являются ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H и ^{131}I . Антитело можно метить радиоизотопом с помощью методик, описанных, например, в Current Protocols in Immunology, т. 1 и 2, 1991,

под ред. Coligen et al., изд-во Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1991. Радиоактивность можно измерять, например, с помощью сцинтилляционного счетчика.

Примерами флуоресцентных меток являются известные метки, полученные на основе хелатов редкоземельных металлов (хелаты европия), или метки на основе флуоресцеина и его производных, родамина и его производных, дансила, лиссамина, фикоэритрина и техасского красного. Флуоресцентные метки можно конъюгировать с антителом с помощью известных методик, например, описанных в *Current Protocols in Immunology*, выше. Флуоресценцию можно оценивать количественно с помощью флуориметра.

В данной области известны различные хорошо охарактеризованные фермент-субстратные метки (см., например, обзор, приведенный в US № 4275149). Фермент, как правило, катализирует химическое изменение хромогенного субстрата, которое можно оценивать с помощью различных методик. Например, изменение может представлять собой изменение цвета субстрата, которое можно оценивать спектрофотометрически. В другом варианте фермент может изменять флуоресценцию или хемилюминисценцию субстрата. Методики количественной оценки изменения флуоресценции описаны выше. В результате химической реакции в хемилюминесцентном субстрате возникает электронно-возбужденное состояние, вследствие чего он может испускать свет, который можно оценивать, например, с помощью хемилюминометра, или он является донором энергии для флуоресцентного акцептора.

Примерами ферментативных меток являются люциферазы, такие как люцифераза светляка и бактериальная люцифераза (US №4737456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, малатдегидрогеназа, уреаза, пероксидаза, например, пероксидаза из хрена (HRPO), щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, глюкоамилаза, лизоцим, оксидазы сахаридов (такие как оксидаза глюкозы, оксидаза галактозы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа), оксидазы гетероциклических соединений (такие как уриказа и оксидаза ксантина), лактопероксидаза, микропероксидаза и т.п. Методики конъюгации ферментов с антителами описаны, например, у O'Sullivan et al., *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, в: *Methods in Enzym.*, под ред. J. Langone и H. Van Vunakis, изд-во Academic Press, N.Y., 73, 1981, p. 147-166.

Примерами комбинаций фермент-субстрат являются, например: пероксидаза из хрена (HRPO) и гидрогенпероксидаза в качестве субстрата, при этом гидрогенпероксидаза окисляет краситель-предшественник, такой как ортофенилендиамин (OPD) или гидрохлорид 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB); щелочная фосфатаза (AP) и пара-нитрофенилфосфонат в качестве хромогенного субстрата; и β -D-галактозидаза (β -D-Gal) и хромогенный субстрат, такой, например, как пара-нитрофенил- β -D-галактозидаза, или флуорегенный субстрат, такой как 4-метилумбеллиферил- β -D-галактозидаза.

Специалистам в данной области известны многочисленные другие комбинации фермент-субстрат. Общий обзор представлен, например, в US № 4275149 и US №4318980.

Гуманизированное антитело к IL-23p19 можно применять в немеченом виде и выявляют с помощью меченого антитела, связанного с гуманизированным антителом к IL-23p19.

Антитела, представленные в настоящем описании, можно применять в любом известном методе анализа, таком как анализы связывания в условиях конкуренции, прямые и косвенные сэндвич-анализы и анализы на основе иммунопреципитации (см., например, Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, изд-во CRC Press, Inc., 1987, p. 147-158).

Антитело к IL-23p19 или его антигенсвязывающий фрагмент можно применять для ингибирования связывания IL-23 с рецептором IL-23. Указанные методы заключаются в том, что вводят антитело к IL-23p19 или его антигенсвязывающий фрагмент в клетку (например, клетку млекопитающего) или окружающую клетку среду, тем самым ингибируя передачу сигналов, опосредуемую рецептором IL-23. Эти методы можно осуществлять *in vitro* или *in vivo*. Под "окружающей клетку средой" подразумевается ткань, среда или внеклеточный матрикс, окружающий клетку. Антитело к IL-23p19 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в окружающую клетку среду таким образом, что антитело или его фрагмент обладает способностью связываться с молекулами IL-23 вне клеточного окружения или в клеточном окружении, тем самым препятствуя связыванию IL-23 с его рецептором.

Диагностические наборы.

Можно применять гуманизированное антитело к IL-23p19, входящее в состав диагностического набора, представляющего собой упаковку, которая содержит комбинацию реагентов, взятых в предварительно определенных количествах, в сочетании с инструкциями по осуществлению диагностического анализа. Если антитело мечено ферментом, то набор может включать необходимые для фермента субстраты и кофакторы, такие как субстрат-предшественник, образующий выявляемый хромофор или флуорофор. Кроме того, можно включать другие добавки, такие как стабилизаторы и буферы (например, блокирующий буфер или лизирующий буфер) и т.п. Относительные количества различных реагентов могут варьироваться в широких пределах, обеспечивая концентрации реагентов в растворе, которые в значительной степени оптимизируют чувствительность анализа. Реагенты могут представлять собой сухие порошки, как правило, лиофилизированные, включая эксципиенты, которые при растворении должны образовывать раствор реагента, имеющий соответствующую концентрацию.

Терапевтическое применение.

Гуманизированное антитело к IL-23p19, представленное в настоящем описании, можно применять для лечения различных нарушений, ассоциированных с экспрессией IL-23p19, которые указаны в настоящем описании. Методы лечения ассоциированного с IL-23 нарушения заключаются в том, что вводят в терапевтически эффективном количестве гуманизированное антитело к IL-23p19 индивидууму, который нуждается в этом.

Гуманизированное антитело или агент к IL-23p19 вводят любыми приемлемыми путями, включая парентеральный, подкожный, внутрибрюшинный, внутрилегочный и интраназальный пути введения и, если требуется местное иммуносупрессорное лечение, путем введения в пораженную область (включая перфузию или другой путь обеспечения контакта трансплантата с антителом перед трансплантацией). Гуманизированное антитело и агент к IL-23p19 можно вводить, например, с помощью инфузии или болюса. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриаортальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Кроме того, гуманизированное антитело к IL-23p19 можно вводить путем пульсирующей инфузии, прежде всего с использованием понижающих доз антитела. Дозирование можно осуществлять путем инъекций, наиболее предпочтительно внутривенных или подкожных инъекций, в том числе в зависимости от того является ли обработка кратковременной или пролонгированной.

Для предупреждения или лечения заболевания соответствующая доза антитела должна зависеть от ряда факторов, таких как тип заболевания, подлежащего лечению, серьезность и процесс течения заболевания, вводят ли антитело для профилактических или терапевтических целей, предшествующая терапия, история болезни пациента и ответ на антитело, а также от предписания лечащего врача. Антитело можно вводить пациенту однократно или путем серий обработок.

В зависимости от типа и серьезности заболевания пациенту можно сначала вводить примерно от 1 мкг/кг до 20 мг/кг (например, 0,1-15 мг/кг) антитела в виде начальной предполагаемой дозы, путем, например, посредством одного или нескольких введений или путем непрерывной инфузии. Как правило, суточная доза должна составлять от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более в зависимости от указанных выше факторов. Для повторных введений в течение нескольких дней или более продолжительного периода времени, в зависимости от состояния, лечение продолжают до требуемого подавления имеющихся симптомов заболевания. Однако можно применять другие схемы введения доз. Успех указанной терапии легко оценивать общепринятыми методами и анализами. Пример схемы введения доз представлен в WO 94/04188.

В контексте настоящего описания понятие "подавление" имеет такое же значение, что и понятия "облегчение" и "купирование", и относится к ослаблению одной или нескольких характеристик заболевания.

Композицию антитела можно включать в препаративную форму, дозировать и вводить в соответствии с надлежащей клинической практикой. Важные в этом плане факторы включают конкретное нарушение, подлежащее лечению, конкретное вскармливающее, подлежащее лечению, клиническое состояние индивидуального пациента, причину нарушения, область введения агента, метод введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим медикам. В этой связи "терапевтически эффективное количество" антитела, подлежащего введению, регулируют таким образом, чтобы оно представляло собой минимальное количество, необходимое для предупреждения, облегчения или лечения нарушения, ассоциированного с экспрессией IL-23.

Антитело необязательно, но в определенных случаях, включают в препаративную форму в сочетании с одним или несколькими средствами, применяемыми в настоящее время для предупреждения или лечения рассматриваемого нарушения. Эффективное количество указанных других средств зависит от количества гуманизированного антитела к IL-23p19, присутствующего в препаративной форме, типа нарушения или лечения и других указанных выше факторов. Их, как правило, применяют в таких же дозах и с использованием таких же путей введения, в которых их применяли ранее, или с использованием в дозе, составляющей примерно от 1 до 99% от их принятых для применения доз.

Ассоциированные с IL-23 нарушения.

Антитела или агенты к IL-23p19 можно применять для лечения или предупреждения иммунологического нарушения, характеризующегося аномальной экспрессией IL-23, например несоответствующей активацией иммунных клеток (например, лимфоцитов или дендритных клеток). Указанная аномальная экспрессия IL-23 может быть связана, например, с повышенными уровнями белка IL-23. Антитела к IL-23p19 или их антигенсвязывающие фрагменты могут найти также применение для лечения или предупреждения респираторных нарушений, метаболических нарушений, например сахарного диабета, и определенных типов рака. Лечение или предупреждение иммунологического нарушения, респираторного нарушения, метаболического нарушения или рака с использованием способов, указанных в настоящем описании, осуществляют путем введения индивидууму, который нуждается в таком лечении или предупреждении, в эффективном количестве антитела или агента к IL-23p19, при этом антитело уменьшает активность IL-23, ассоциированную с болезненным состоянием.

Иммунологические заболевания, которые отличаются несоответствующей активацией иммунных клеток и которые можно лечить или предупреждать с помощью способов, предлагаемых в настоящем описании, можно классифицировать, например, по типу(ам) реакции(ий) гиперчувствительности, кото-

рая(ые) лежит(ат) в основе нарушения. Эти реакции, как правило, разделяют на 4 типа: анафилактические реакции, цитотоксические (цитолитические) реакции, иммунные комплексные реакции или реакции клеточно-опосредованного иммунитета (СМІ) (которые обозначают также как реакции замедленной гиперчувствительности (DTH) (см., например, *Fundamental Immunology*, под ред. William E. Paul, изд-во Raven Press, N.Y., 3-е изд., 1993). Иммунологические заболевания включают воспалительные заболевания и аутоиммунные заболевания.

Конкретными примерами указанных иммунологических заболеваний являются ревматоидный артрит, аутоиммунные демиелинизирующие заболевания (например, рассеянный склероз, аллергический энцефаломиелит), эндокринная офтальмопатия, увеоретинит, системная красная волчанка, тяжелая псевдопаралитическая миастения, болезнь Грейвса, гломерулонефрит, аутоиммунное гепатологическое нарушение, воспалительное заболевание кишечника (например, болезнь Крона или неспецифический язвенный колит), анафилаксия, аллергическая реакция, синдром Шегрена, сахарный диабет типа I, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, фибромиалгия, полимиозит, дерматомиозит, воспалительный миозит, множественная эндокринная недостаточность, синдром Шмидта, аутоиммунный увеит, болезнь Аддисона, воспаление надпочечника, тиреоидит, тиреоидит Хашимото, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, пернициозная анемия, атрофия желудка, хронический гепатит, волчаночный гепатит, атеросклероз, подострая кожная красная волчанка, гипопаратиреоз, синдром Дресслера, аутоиммунная тромбоцитопения, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, гемолитическая анемия, пузырчатка обыкновенная, пузырчатка, дерматит герпетический, гнездная алопеция, пемфигоид, склеродерма, прогрессирующий системный склероз, CREST-синдром (кальциноз, болезнь Рейно, эзофагит (нарушение моторики пищевода), склеродактилия и телеангиоэктазия), мужское и женское аутоиммунное бесплодие, анкилозирующий спондилит, неспецифический язвенный колит, смешанная соединительнотканная болезнь, нодозный полиартериит, системный некротизирующий васкулит, атопический дерматит, атопический ринит, синдром Гудпасчера, болезнь Шагаса, саркоидоз, ревматическая атака, астма, привычный выкидыш, антифосфолипидный синдром, экзогенный аллергический альвеолит, полиформная эритема, посткардиотомический синдром, синдром Кушинга, аутоиммунный хронический активный гепатит, аллергия пчеловодов, токсический эпидермальный некролиз, синдром Альпорта, альвеолит, аллергический альвеолит, фиброзный альвеолит, интерстициальное заболевание легких, узловатая эритема, гангренозная пиодермия, реакция на трансфузию, артерит Такаясу, ревматическая полимиалгия, преходящий артерит, шистосомоз, гигантоклеточный артерит, аскариоз, аспергиллез, синдром Самптера, экзема, лимфоматоидный гранулематоз, болезнь Бехчета, синдром Каплана, болезнь Кавасаки, лихорадка Денге, энцефаломиелит, эндокардит, эндомиокардиальный фиброз, эндофтальмит, стойкая возвышающаяся эритема, псориаз, псориазический артрит, эритробластоз плода, эозинофильный фасцит, синдром Шульмана, синдром Фелти, филариоз, циклит, хронический циклит, гетерохронический циклит, циклит Фукаса, IgA-нефропатия, пурпура Геноха-Шенлейна, реакция "трансплантат-против-хозяина", отторжение трансплантата, кардиомиопатия, синдром Итона-Лэмберта, рецидивирующий полихондрит, криоглобулинемия, макроглобулемия Вальденстрема, синдром Эванса, острый респираторный дистресс-синдром, воспаление легких, остеоопороз, реакция замедленной гиперчувствительности и аутоиммунная гонадная дисфункция.

Иммунологическое нарушение может представлять собой опосредуемое Т-клетками иммунологическое нарушение и, таким образом, антитела или агенты к IL-23p19, представленные в настоящем описании, можно применять также для лечения или предупреждения опосредуемых Т-клетками иммунологических нарушений.

Антитела или агенты к IL-23p19 можно применять для лечения или предупреждения респираторного нарушения, при котором происходит аномальная экспрессия IL-23. Лечение или предупреждение респираторного нарушения с использованием способов, указанных в настоящем описании, осуществляют путем введения индивидууму, который нуждается в таком лечении или предупреждении, в эффективном количестве антител или агентов к IL-23p19, при этом антитело уменьшает активность IL-23, ассоциированную с болезненным состоянием. Они включают (но не ограничиваясь только ими) жалобы, связанные с респираторной функцией, обструктивные легочные заболевания различного происхождения, эмфизему легких различного происхождения, облитерирующие легочные заболевания, интерстициальные пульмональные заболевания, интерстициальную болезнь легких, муковисцидоз, бронхиты различного происхождения, бронхоэктаз, РДСВ (респираторный дистресс-синдром взрослых) и все формы легочного отека; обструктивные легочные заболевания, выбранные из ХОЗЛ (хроническое обструктивное заболевание легких), астму, бронхиальную астму, педиатрическую астму, серьезную астму, острые приступы астмы и хронический бронхит; эмфизему легких, происхождение которой связано с ХОЗЛ (хроническое обструктивное заболевание легких) или с дефицитом ингибитора α_1 -протеиназы; облитерирующие легочные заболевания, выбранные из аллергического альвеолита, облитерирующих легочных заболеваний, которые инициируются работой с вредными токсичными веществами, таких как асбестоз или силикоз, и облитерации, связанной с опухолями легких, такими как карциноматозный лимфатизм, бронхоальвеолярная карцинома и лимфомы; пневмонию, вызванную инфекциями, такими, например, как инфекция, связанная с вирусами, бактериями, грибами, простейшими, гельминтами или другими патогенами, пневмонит, вы-

зываемый различными факторами, такими, например, как аспирация и левожелудочковая сердечная недостаточность, индуцированный облучением пневмонит или фиброз, коллагеноз, такой, например, как красная волчанка, системная склеродема или саркоидоз, грануломатоз, такой, например, как болезнь Бека, идиопатическая интерстициальная пневмония или идиопатический пневмосклероз (ИПФ); муковисцидоз, бронхит, вызванный бактериальной или вирусной инфекцией, аллергический бронхит и токсический бронхит; бронхоэктаз; отек легких, например, токсический отек легких после аспирации или ингаляции токсических субстанций и чужеродных субстанций; ринит, артрит и родственные артропатии, псориаз, миелоидный лейкоз, рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера, гломерулонефрит и хронический атопический дерматит.

Антитела или агенты к IL-23p19 можно применять также для лечения различных типов рака, при которых происходит аномальная экспрессия IL-23.

Типы рака, при которых происходит экспрессия IL-23, которые можно лечить с помощью способов, предлагаемых в настоящем описании, включают, например, лейкоз, например, острый лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз (например, миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный лейкоз или эритролейкоз), хронический лейкоз, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз; истинную полицитемию; лимфому (например, болезнь Ходжкина или неходжкинскую лимфому); множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема; болезнь тяжелых цепей; плотные (солидные) опухоли, такие как саркомы и карциномы (например, фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, остеосаркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангио-эндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, карцинома ободочной кишки, колоректальная карцинома, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак предстательной железы, плоскоклеточная карцинома, базальноклеточная карцинома, аденокарцинома, карцинома потовой железы, карцинома сальной железы, папиллярная карцинома, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, почечноклеточная карцинома, гепатома, карцинома желчного протока, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак матки, рак яичка, карцинома легкого, мелкоклеточная карцинома легкого, немелкоклеточная карцинома легкого, карцинома мочевого пузыря, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимомы, пинеалома, гемангиобластома, невринома слухового нерва, олигодендроглиома, менингиома, маланома, нейробластома, ретинобластома, назофарингиальная карцинома или эзофагеальная карцинома).

Фармацевтические композиции и их введение.

Композицию, содержащую IL-23p19-связывающий агент (например, антитело к IL-23p19), можно вводить индивидууму, который страдает или имеет риск развития иммунологического нарушения, респираторного нарушения или рака. IL-23p19-связывающий агент (например, антитело к IL-23p19) можно применять для получения лекарственного средства, предназначенного для профилактики или лечения рака, респираторного нарушения или иммунологического нарушения. Понятие "индивидуум" в контексте настоящего описания означает любого млекопитающего, которому можно вводить IL-23p19-связывающий агент, включая, например, человека и млекопитающих кроме человека, таких как приматы, грызуны и собаки. С использованием способов, представленных в настоящем описании, можно лечить, в частности людей. Антитела или агенты можно вводить индивидуально или в сочетании с другими композициями для профилактики или лечения иммунологического нарушения, респираторного нарушения или рака. Такие композиции, которые можно применять в сочетании с антителами или агентами, включают метотрексат (MTX) и иммуномодуляторы, например, антитела или малые молекулы.

Примерами антител для применения в указанных фармацевтических композициях являются антитела, представляющие собой гуманизированное антитело или фрагмент антитела, которое/который имеет любую из аминокислотных последовательностей вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 84, 86, 88, 90, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117 или 119. Примерами антител для применения в указанных фармацевтических композициях являются также антитела, представляющие собой гуманизированное антитело или фрагмент антитела, которое/который имеет любую из аминокислотных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 121, 123, 125, 127, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154 или 156.

Дополнительными примерами антител для применения в указанных фармацевтических композициях являются антитела, представляющие собой гуманизированное антитело или фрагмент антитела, которое/который имеет любую из аминокислотных последовательностей вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 158, 160, 162 или 164. Предпочтительными антителами для применения в указанных фармацевтических композициях являются также антитела, которые представляют собой гуманизированное антитело или фрагмент антитела, которое/который имеет любую из аминокислотных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 166, 168, 170 или 172.

Дополнительными примерами антител для применения в указанных фармацевтических композициях являются антитела, представляющие собой гуманизированное антитело или фрагмент антитела, которое/который имеет любую из аминокислотных последовательностей вариабельной области легкой цепи и

вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 160 и 166, SEQ ID NO: 160 и 168, SEQ ID NO: 158 и 166 или SEQ ID NO: 158 и 168.

Дополнительными примерами антител для применения в указанных фармацевтических композициях являются антитела, представляющие собой гуманизированное антитело, которое имеет любую из аминокислотных последовательностей вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 174 или 180. Предпочтительными антителами для применения в указанных фармацевтических композициях являются также антитела, которые представляют собой гуманизированное антитело, которое имеет любую из аминокислотных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 176 или 178.

Дополнительными примерами антител для применения в указанных фармацевтических композициях являются антитела, представляющие собой Антитело А, Антитело В, Антитело С или Антитело D.

Известны различные системы введения и их можно использовать для введения IL-23p19-связывающего агента. Методы интродукции включают (но не ограничиваются толь ими) внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и оральный пути. IL-23p19-связывающий агент можно вводить, например, путем инфузии, в виде болюса или инъекции, и его можно вводить вместе с другими биологически активными средствами, такими как химиотерапевтические средства. Введение может быть системным или местным. Предпочтительно введение представляет собой подкожную инъекцию. Препаративные формы для таких инъекций можно приготавливать, например, в виде предварительно заполненных шприцев, и их можно применять с недельным интервалом.

IL-23p19-связывающий агент вводят с помощью инъекции, с помощью катетера, с помощью суппозитория или с помощью имплантата, где имплантат состоит из пористого, непористого или гелеобразного материала, включая мембрану, такую как мембрана из силиката, или волокно. Как правило, при введении композиции используют вещества, которые не абсорбируют антитело или агент к IL-23p19.

Антитело или агент к IL-23p19 можно вводить с помощью системы с контролируемым высвобождением, можно также использовать насос (см. например, Langer, Science, 249, 1990, p. 1527-1533; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14, 1989, с 201; Buchwald et al., Surgery, 88, 1980, p. 507; Saudek et al., N. Engl. J. Med., 321, 1989, p 574). Можно также использовать полимерные материалы (см., например, Medical Applications of Controlled Release, под ред. Langer и Wise, изд-во CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, под ред. Smolen и Ball, изд-во Wiley, New York, 1984); Ranger и Peppas, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23, 1983, p. 61; см. также Levy et al., Science 228, 1985, p. 190; During et al., Ann. Neurol. 25, 1989, p. 351; Howard et al., J. Neurosurg. 81, 1989, p. 105). У Langer, выше, обсуждены другие системы с контролируемым высвобождением.

IL-23p19-связывающий агент (например, антитело к IL-23p19) можно вводить в виде фармацевтических композиций, содержащих в терапевтически эффективном количестве связывающий агент и один или несколько фармацевтически совместимых ингредиентов.

Фармацевтическую композицию приготавливают согласно общепринятым процедурам с получением фармацевтической композиции, пригодной для внутривенного или подкожного введения человеку. Как правило, композиции для введения путем инъекции представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости фармацевтическое средство может содержать также солюбилизирующий агент и местный анестетик, такой как липокаин, для снятия боли в месте инъекции. Как правило, ингредиенты поставляются либо по отдельности, либо их смешивают с получением стандартной дозы лекарственного средства, например, в виде сухого лиофилизованного порошка или не содержащего воду концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества действующего вещества. В тех случаях, когда фармацевтическое средство предназначено для введения путем инфузии, то его можно разливать по бутылкам для инфузий, содержащим стерильную воду или физиологический раствор фармацевтической степени чистоты. В тех случаях, когда фармацевтическое средство вводят с помощью инъекции, то можно использовать ампулу со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором для того, чтобы ингредиенты можно было перемешивать перед введением.

Кроме того, фармацевтическую композицию можно включать в фармацевтический набор, который содержит (а) контейнер с IL-23p19-связывающим агентом (например, антителом к IL-23p19) в лиофилизованной форме и (б) второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый разбавитель (например, стерильную воду) для инъекций. Фармацевтически приемлемый разбавитель можно использовать для восстановления или разведения лиофилизованного антитела или агента к IL-23p19. Необязательно к указанному(ым) контейнеру(ам) может прилагаться уведомление в форме, утвержденной официальным агентством, разрешающим производство, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, где в уведомлении отражено разрешение агентства на производство, применение или продажу с целью введения людям.

Количество IL-23p19-связывающего агента (например, антитела к IL-23p19), которое является эффективным для лечения или профилактики иммунологического нарушения или рака, можно определять обычными методами клинических исследований. Кроме того, необязательно можно использовать анализы *in vitro*, результаты которых могут способствовать определению оптимальных пределов доз. Точная

доза для применения в препаративной форме должна зависеть также от пути введения и стадии развития иммунологического нарушения или рака, и она должна приниматься на основе рекомендаций лечащего врача и обстоятельств, характерных для каждого пациента. Эффективные дозы можно определять путем экстраполяции на основе кривых дозовой зависимости, полученных по результатам опытов *in vitro* или на модельных тест-системах с использованием животных.

Как правило, доза антитела к IL-23p19 или IL-23p19-связывающего агента, которую вводят пациенту с иммунологическим нарушением или с раком, для которого характерна экспрессия IL-23p19, составляет примерно от 0,1 до примерно 100 мг/кг веса тела индивидуума. Доза, вводимая индивидууму, составляет от примерно 0,1 до примерно 50 мг/кг, от примерно 1 до примерно 30 мг/кг, от примерно 1 до примерно 20 мг/кг, от примерно 1 до примерно 15 мг/кг или от примерно 1 до примерно 10 мг/кг веса тела индивидуума.

Примерами доз являются (но не ограничиваются только ими) дозы, составляющие от 1 нг/кг до 100 мг/кг. Иногда доза составляет примерно 0,5, примерно 1, примерно 2, примерно 3, примерно 4, примерно 5, примерно 6, примерно 7, примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 11, примерно 12, примерно 13, примерно 14, примерно 15 или примерно 16 мг/кг. Дозу можно вводить, например, каждый день, раз в неделю (каждую неделю), два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю, пять раз в неделю, шесть раз в неделю, раз в две недели или ежемесячно, каждые два месяца или каждые три месяца. Конкретно доза может составить примерно 0,5 мг/кг/неделю, примерно 1 мг/кг/неделю, примерно 2 мг/кг/неделю, примерно 3 мг/кг/неделю, примерно 4 мг/кг/неделю, примерно 5 мг/кг/неделю, примерно 6 мг/кг/неделю, примерно 7 мг/кг/неделю, примерно 8 мг/кг/неделю, примерно 9 мг/кг/неделю, примерно 10 мг/кг/неделю, примерно 11 мг/кг/неделю, примерно 12 мг/кг/неделю, примерно 13 мг/кг/неделю, примерно 14 мг/кг/неделю, примерно 15 мг/кг/неделю или примерно 16 мг/кг/неделю. При этом пределы доз могут составить от примерно 1 до примерно 15 мг/кг/неделю.

Фармацевтические композиции, содержащие IL-23p19-связывающий агент, могут дополнительно включать терапевтическое средство, конъюгированное или неконъюгированное со связывающим агентом. Антитело к IL-23p19 или IL-23p19-связывающий агент можно вводить совместно с одним или несколькими терапевтическими средствами, применяемыми для лечения или профилактики иммунологических нарушений или рака.

Такая комбинированная терапия может обладать аддитивным или синергетическим действием в отношении признаков заболевания (например, тяжести проявления симптома, количества симптомов или частоты рецидивов).

При применении схем лечения при комбинированном введении антитела к IL-23p19 или IL-23p19-связывающий агент вводят одновременно с терапевтическим средством или терапевтическое средство вводят до или после введения антитела к IL-23p19 или IL-23p19-связывающего агента, по меньшей мере, в течение периода времени, составляющего от 1 ч до нескольких месяцев, например, в течение по меньшей мере 1 ч, 5 ч, 12 ч, одних суток, недели, месяца или трех месяцев до или после введения антитела к IL-23p19 или IL-23p19-связывающего агента.

Изделия.

Изделие включает контейнер и этикетку. Приемлемыми контейнерами являются, например, бутылки, флаконы, шприцы и лабораторные пробирки. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая является эффективной для лечения конкретного состояния, и может иметь стерильный порт доступа. Например, контейнер может представлять собой мешок или флакон для внутривенного раствора, имеющий запирающее устройство, проницаемое для инъекционной иглы для подкожного введения. Действующее вещество в композиции представляет собой гуманизированное антитело к IL-23p19. На этикетке на контейнере или связанной с ним указывается, что композиция используется для лечения выбранного состояния. Изделие может дополнительно включать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Он может дополнительно включать другие вещества, присутствие которых желательно с коммерческой и потребительской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по применению.

Изобретение описано ниже с помощью представленных примеров, которые не направлены на ограничение объема изобретения.

Примеры

Пример 1. Получение гуманизированных антител к IL-23p19.

Мышиное "лидерное" антитело 6B8 превращали в химерное антитело, состоящее из варибельного домена мышиного 6B8 и константного домена человеческого IgG1KO. Мышиное антитело 6B8 представлено выше в табл. 1 и 2. IgG1KO (knock out, выключение) несет две заместительные мутации (трансерсии) (Leu234Ala и Leu235Ala), которые элиминируют ADCC- и CDC-активность путем снижения эффекторных функций, таких как связывание с FcγR и комплементом. Варибельные домены мышиных и химерных антител являются идентичными. Химерные антитела создавали для подтверждения функции

антитела и для гарантии того, что получена правильная последовательность. Затем варибельную область антитела гуманизировали посредством конструирования и процесса скрининга. Получали библиотеку, в которой человеческие и мышиные остатки варьировали таким образом, чтобы в любом конкретном положении мог находиться либо человеческий, либо мышиный остаток. Указанную библиотеку создавали для тех аминокислотных остатков, которые были различными у человеческой зародышевой линии и мышиного антитела. Отбирали только те клоны, у которых сохранялась функция родительского мышиного антитела. Репрезентативные гуманизированные варибельные области антитела 6B8 представлены в табл. 5 и 6.

Таким образом, Антитело А, Антитело В, Антитело С и Антитело D представляли собой гуманизированные антитела, выведенные из мышиного антитела 6B8 (клонированного в каркасе человеческого IgG1-КО (КО -сокращение knock-out)/каппа). Антитела А, В, С и D представлены в табл. 7.

Пример 2. Связывание антител с рекомбинантным белком IL-23.

А) Данные о кинетике и аффинности связывания мышиных антител к IL-23p19 с рекомбинантным человеческим IL-23 представлены ниже (табл. 9). Кинетические характеристики и аффинность связывания оценивали на основе технологии Fortebio Octet (фирма Fortebio, Менло-Парк, шт. Калифорния), используя материал, полученный из гибридомы, после одной очистки на колонке. Поскольку Octet не представляет собой технологию на основе жидкостей, то этот метод не позволяет точно определять скорость диссоциации. В некоторых случаях удавалось оценивать только аффинность

Таблица 9

Антитело	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	K_D (пМ)
18C4	3,84E+05	2,14E-06	5,57
18E 5	3,29E+05	2,61E-06	7,93
18D3	3,19E+05	2,16E-06	6,78
20 E8	4,21E+05	2,69E-04	638
22 E2	3,46E+05	3,53E-04	1024
24A5	2,02E+05	4,57E-06	22,6
15C11	4,11E+05	1,07E-05	26
43F5	1,72E+05	5,96E-06	34,6
27G8	1,57E+05	4,26E-06	27,2
31H9	2,99E+05	3,45E-06	11,5
2D1		< 1E-6	< 1
9D12		< 1E-6	< 1
6B8		< 1E-6	< 1
73H10	5,29E+04	5,24E-06	99,2
74H3	3,06E+04	2,09E-06	68,3
35H8			
26F7	4,76E+05	1,34E-05	28,1
34G3	9,18E+05	3,10E-05	32,8
34D9	3,44E+03	1,87E-06	544

Б) Оценивали аффинность гуманизированных антител, выведенных из мышиного антитела 6B8. Данные о кинетике связывания, измеренные с помощью устройства ProteON XPR36 (фирма Biorad, Геркулес, шт. Калифорния) и глобальной аппроксимации на основе модели связывания 1:1, продемонстрировали, что взаимодействия между рекомбинантным IL-23, который либо содержал состоящий из 21 аминокислот линкер, ковалентно связанный с субъединицами p19 и p40, либо не содержал указанный линкер, характеризовались высокой аффинностью в диапазоне 1-100 пМ (табл. 10). Тестировали также Антитело 6H12 (описанное в WO 2007/027714), антитело QF20 (описанное в WO 2007/024846) и антитело C1273 (описанное в WO 2007/005955).

Таблица 10

Антитело	Человеческий IL-23 с линкером			Человеческий IL-23 без линкера		
	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	K_D (пМ)	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	K_D (пМ)
Мышиное 6B8				5,57E+05	1,38E-05	24,5
Антитело А	6,27E+05	< 1E-6	< 1	5,51E+05	< 1E-6	< 1

Антитело В	3,56E+05	< 1E-6	< 1	5,17E+05	< 1E-6	< 1
Антитело С	3,74E+05	1,19E-05	31,8	4,54E+05	1,65E-05	36,3
Антитело D	3,82E+05	4,07E-05	107	3,66E+05	4,93E-05	135
C-1273				3,60E+05	5,75E-06	15,8
6H12				4,99E+05	1,07E-04	214
QF20				2,03E+05	5,89E-06	2,91

В) Аффинность и кинетические характеристики связывания антител к IL-23p19 с IL-23 обезьяны циномоглус измеряли с помощью устройства ProteON XPR36 и глобальной аппроксимации на основе модели связывания 1:1 (табл. 11). Тестировали также Антитело 6H12 (описанное в WO 2007/027714), антитело QF20 (описанное в WO 2007/024846) и антитело C1273 (описанное в WO 2007/005955).

Таблица 11

Антитело	K _D (нМ)	k _a (1/Мс)	k _d (1/с)
Антитело А	< 1	2,95E+06	< 1E-6
Антитело В	< 1	2,99E+06	< 1E-6
Антитело С	2,9	3,23E+06	9,36E-06
Антитело D	15,9	2,07E+06	3,29E-05
C-1273	>5000	n/a	n/a
6H12	157	9,91E+05	1,56E-04
QF20	1,2	3,90E+06	4,78E-06

Г) Селективность на молекулярном уровне в отношении человеческого IL-12.

Антитела к IL-23p19 инъецировали также на поверхность человеческого IL-12 в концентрации 100нМ. Сигнал связывания указанных антител, измеренный с использованием технологии Fortebio Octet, равнялся нулю, что свидетельствует о том, что эти антитела избирательность связываются с человеческим IL-23. Связывание антител к IL-23p19 с IL-23 анализировали также в присутствии 50% человеческой сыворотки и обнаруженное отсутствие существенного воздействия сыворотки на скорость ассоциации демонстрирует высокую специфичность.

Пример 3. Анализ связывания в конкурентных условиях человеческого IL-23, связывающегося с человеческим IL-23R/Fc.

Человеческий IL-23R-Fc иммобилизовали на поверхности биосенсора и инъецировали 10 нМ человеческий IL-23. Сенсограммы свидетельствовали о специфическом связывании между IL-23 и рецептором IL-23 (фиг. 2, верхний чертеж). Затем антитела совместно инъецировали с 10нМ человеческим IL-23 для решения вопроса о том, может ли связывание антитела с IL-23 ингибировать взаимодействие между IL-23 и рецептором IL-23. В этом примере было установлено, что если антитело связывается с человеческим IL-23 и обладает способностью ингибировать взаимодействие, то имеет место пониженное связывание или отсутствие связывания (фиг. 2, нижний график). В этом примере Антитело А, которое применяли в эквивалентной молярной концентрации, инъецировали совместно с 10 нМ рекомбинантным человеческим IL-23.

Пример 4. Функциональные клеточные анализы, ингибирование производства IL-17 в стимулированных IL-23 мышинных спленоцитах.

Один из функциональных клеточных анализов антител к IL-23p19 позволял измерять способность ингибировать стимулированное IL-23 производство IL-17 в мононуклеарных клетках, выделенных из селезенки мышей. Человеческий рекомбинантный белок IL-23 обладает способностью стимулировать высвобождение IL-17 из мышинных спленоцитов. Кроме того, для стимуляции производства IL-17 в мышинных мононуклеарных клетках можно применять встречающийся в естественных условиях источник человеческого IL-23, обнаруженный в супернатанте активированных человеческих моноцитарных THP-1-клеток.

Человеческий рекомбинантный IL-23 или встречающийся в естественных условиях IL-23 из активированных THP-1-клеток предварительно инкубировали с титрованными антителами к IL-23p19. Затем комбинации IL-23/антитело добавляли к свежelyделенным мышинным спленоцитам. Образец, в который входил только рекомбинантный IL-23, применяли в качестве положительного контроля. После культивирования в течение 2 дней клеточные супернатанты собирали и анализировали в отношении IL-17 с помощью ELISA (фирма R&D Systems, Миннеаполис, шт. Миннесота). Ниже приведены репрезентативные величины IC₅₀ для антител к IL-23p19. Изученные антитела представляли собой мышинные антитела, выведенные из гибридом (строки 1-19, см. табл. 1 и 2), химерные антитела (строки 20-23) и Антитела А-D. Тестировали также Антитело 6H12 (описанное в WO 2007/027714), антитело QF20 (описанное в WO 2007/024846) и антитело C1273 (описанное в WO 2007/005955).

Таблица 12

Антитело	Величины IC ₅₀ (пМ), рекомбинантный человеческий IL-23	Величины IC ₅₀ (пМ), встречающийся в естественных условиях человеческий IL-23
18C4	471	100, 413
18E5	не определяли	9, 9, 13
18D3	234	не определяли
20E8	не определяли	438, 561
22E2	61, 130	117, 35
24A5	22, 37	85, 31
15C11	126	232
43F5	250, 8000	8000
27G8	235	5000
31H9	960	2000
2D1	не определяли	2336, 1911, 1597
9D12	59	281, 138
6B8	13	8, 2
73H10	1411	не определяли
74H3	1352	не определяли
36H8	не определяли	не определяли
26F7	27	2, 8
34G3	336	27, 25
34D9	510	456
химерное 18E5	31	8, 36, 10, 9
химерное 22E2	100	9, 178
химерное 24A5	404	95, 102
химерное 6B8	26, 37, 57	5, 2, 6, 3
Антитело А	5, 5, 5, 15	1, 1
Антитело В	13, 30, 54, 42	9, 8
Антитело С	53, 71, 162, 89	16, 32
Антитело D	236, 225, 614, 458	133, 125
6H12	1600, 806, 1300	957, 4400, 1013, 439
QF20	не определяли	7, 12
C1273	не определяли	93, 44

Пример 5. Определение функциональной специфичности в отношении IL-12 с помощью анализа в человеческих активированных Т-клетках

Тестировали антитела к IL-23p19 в отношении функционального ингибирования IL-12 с помощью анализа в человеческих активированных Т-клетках. Человеческий рекомбинантный IL-12 (1 нг/мл) предварительно инкубировали с антителами к IL-23p19 в концентрации 5 мкг/мл. Затем добавляли комбинацию IL-12/антитело к полученным с использованием ФГА (фитогемагглютина) бластным Т-клеткам. Образец, содержащий только рекомбинантный IL-12, применяли в качестве положительного контроля. Антитело к IL-12p70 (фирма Bender MedSystems, Вена, Австрия) применяли в качестве контрольного ингибирующего антитела. После культивирования в течение 2 дней клеточные супернатанты собирали и анализировали в отношении IFN- γ с помощью ELISA (фирма R&D Systems). Образцы оценивали в трех повторностях и определяли средний уровень IFN- γ . Результаты (с указанием стандартных отклонений) приведены в табл. 13.

Таблица 13

Антитело	Стимуляция цитокина	Средний уровень (пг/мл) IFN- γ $\pm$ стандартное отклонение
антитело отсутствует	нет	87 $\pm$ 7
антитело отсутствует	1 нг/мл IL-12	532 $\pm$ 51
химерное 18E5	1 нг/мл IL-12	511 $\pm$ 3
химерное 6B8	1 нг/мл IL-12	523 $\pm$ 60
Антитело А	1 нг/мл IL-12	497 $\pm$ 30
Антитело В	1 нг/мл IL-12	537 $\pm$ 2
Антитело С	1 нг/мл IL-12	495 $\pm$ 25
Антитело D	1 нг/мл IL-12	539 $\pm$ 38
антитело к IL-12p70	1 нг/мл IL-12	119 $\pm$ 12

Пример 6. Ингибирование индуцируемого IL-23 фосфорилирования STAT3 на человеческой клеточной линии DB.

Человеческая клеточная линия DB (ATCC, Манасас, шт. Виргиния) отвечает на стимуляцию IL-23 с

помощью эндогенного комплекса IL-23R (IL-23R и IL-12RP1) и в ней происходит фосфорилирование STAT3 в зависимости от дозы IL-23. Осуществляли анализ для оценки ингибирования антителом к IL-23p19 индуцируемого IL-23 фосфорилирования STAT3. DB-клетки высевали из расчета 1×10E6 клеток/лунку в 96-луночный планшет. Подлежащие тестированию антитела серийно разводили и предварительно инкубировали с рекомбинантным человеческим IL-23 (10 нг/мл) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем к клеткам добавляли смесь антитело/IL-23 в течение 30 мин при 37°C. Клетки собирали центрифугированием при 4°C в течение 10 мин и затем лизировали в охлажденном на льду буфере (фирма Cell Signaling Technology, Беверли, шт. Массачусетс). Часть лизата использовали для анализа с помощью ELISA, предназначенного для оценки фосфо-STAT3 (фирма Invitrogen). Величины IC₅₀ для антител рассчитывали в виде процента ингибирования фосфорилирования STAT3 по сравнению с контрольными лунками без антитела. Репрезентативные величины IC₅₀ приведены в табл. 14.

Таблица 14

Антитело	IC ₅₀ (нМ)
Антитело А	25, 15, 38, 23, 13, 18
Антитело В	73, 84
Антитело С	132, 80
Антитело D	158
QF20	26, 26, 27
C-1273	163, 438

Пример 7. Модель *in vivo* индуцируемого IL-23 производства цитокинов в ухе мышей.

Применяли созданную на мышах модель *in vivo*. Рекомбинантный человеческий IL-23 инъецировали в кожу уха мышей в течение 4 последовательных дней, что приводило к эпидермальному утолщению и повышающей регуляции белков IL-17 и IL-22. На этой модели оценивали антитела к IL-23p19. Осуществляли одну внутрибрюшинную инъекцию антитела в дозе 1 мг/кг или 5 мг/кг за 1 ч до начала введения IL-23 в кожу. Рекомбинантный человеческий IL-23 (с линкером) инъецировали один раз в день в течение 3 дополнительных дней, и образцы ткани получали для оценки цитокинов. Продемонстрировано, что антитела ингибировали производство цитокинов. В табл. 15 представлены результаты трех экспериментов (пример 1: строки 1-7, пример 2: строки 8-10, пример 3: строки 11-14).

Таблица 15

	Ткань уха, IL-17 пг/мл среднее значение ± СКО	Ткань уха, процент ингибирования IL-17	Ткань уха, IL-22 пг/мл среднее значение ± СКО	Ткань уха, процент ингибирования IL-22
0,1% БСА + цитратный буфер i.p. (нестимулированный контроль)	3 ± 1	NA	1 ± 0	NA
0,3 мкг IL-23 + цитратный буфер i.p. (наполнитель в качестве контроля)	25 ± 3	NA	274 ± 30	NA
0,3 мкг IL-23 + 1 мг/кг Антитела 6B8	7 ± 2	81	57 ± 19	80
0,3 мкг IL-23 + 1 мг/кг Антитела А	2 ± 1	101	17 ± 3	94
0,3 мкг IL-23 + 1 мг/кг Антитела В	5 ± 1	93	30 ± 2	89
0,3 мкг IL-23 + 1 мг/кг Антитела С	11 ± 1	66	108 ± 12	61
0,3 мкг IL-23 + 1 мг/кг Антитела D	10 ± 1	67	151 ± 12	45
0,1% БСА + наполнитель (нестимулированный контроль)	14 ± 1	NA	1 ± 1	NA
0,3 мкг IL-23 + наполнитель	31 ± 4	NA	129 ± 29	NA
0,3 мкг IL-23 + 5 мг/кг 24A5	14 ± 1	102	10 ± 5	93
0,1% БСА + mIgG (нестимулированный контроль)	17 ± 1	NA	4 ± 1	NA
0,3 мкг IL-23 + mIgG (наполнитель в качестве контроля)	30 ± 2	NA	208 ± 40	NA
0,3 мкг IL-23 + 5 мг/кг 24A5	16 ± 0	109	28 ± 5	88
0,3 мкг IL-23 + 5 мг/кг 18E5	21 ± 2	70	53 ± 41	80

Пример 8. Фармакокинетические исследования на обезьянах циномогус.

Гуманизированные антитела к IL-23p19 вводили путем десятиминутной внутривенной инфузии в дозе 1,0 мг/кг трем обезьянам циномогус. Образцы сыворотки получали в течение 6-недельного периода и концентрации свободных антител оценивали с помощью специфического ELISA. Профили зависимости концентрации в сыворотке от времени для антител и соответствующие фармакокинетические параметры обобщены в табл. 16.

Таблица 16

Антитело	CL (мл/д/кг)	Объем	AUC	T _{1/2} (дни)	MRT (дни)
		(мл/кг)	(нМ•ч/мл)		
Антитело А	5,2	88	32262	12,1	17,2
Антитело В	6,0	87	27030	10,1	14,8
Антитело С	4,7	91	34642	14,1	19,6
Антитело D	3,4	67	47633	12,6	19,8

Пример 9. Экспрессия в NSO-клетках и биофизические данные.

Трансфекция NSO-клеток и получение стабильных пулов: NSO-клетки выращивали в присутствии 1% FBS перед трансфекцией. Собирали 40×10⁶ клеток и ресуспендировали в 0,8 мл в средах, содержащих 2% FBS, с 20 мкг линейаризованной ДНК (экспрессионные векторы тяжелой цепи и легкой цепи) и затем клетки инкубировали на льду в течение примерно 15 мин перед электропорацией клеток при 750 В/25 мкФ (фирма Bio-Rad, устройство Gene Pulser Xcell). Клетки выделяли с помощью 2% FBS в течение примерно 48 ч при 37°C и 5% CO₂, затем высевали из расчета 2×10⁵ клеток/мл в 96-луночные планшеты, содержащие G418 и микофеноловую кислоту, и выдерживали в течение 14-21 дня до формирования колоний.

Супернатанты из 96-луночных планшетов, содержащих колонии, подвергали скринингу с помощью ELISA. Планшеты для ELISA сенсibilizировали козьим антителом к каппа-цепи в концентрации 1 мкг/мл (фирма Southern Biotech, Бирмингем, шт. Алабама) в ЗФР и разведенный супернатант инкубировали и затем оценивали с помощью козьего антитела к человеческому IgG Fc-HRP (фирма Jackson ImmunoResearch Laboratories, Вест-Гроув, шт. Пенсильвания). Дающие положительную реакцию колонии объединяли для размножения. Титры образовавшихся антител определяли с помощью устройства фирмы ForteBio, используя покрытые белком А насадки согласно протоколу производителя. Титры Антитела А и Антитела D составляли 250-350 мг/л, при этом регенерация белка после очистки составляла более 80%, и обнаружено более 94% мономеров после очистки электродиализом и ионообменом (IEX). Белки ресуспендировали в конечном буфере, содержащем 20 мМ цитрат натрия и 115 мМ NaCl, pH 6,0, и они сохраняли стабильность при 4°C в течение по меньшей мере 4 месяцев и их растворимость в указанном буфере составляла вплоть до 100 мг/мл.

Таблица 17

	Колонка с белком А			IEX-колонка	
	Титр (мг/л)	Выход (мг/л)	Регенерация	Выход (мг/л)	Регенерация
Антитело А	345	275	80%	221	80%
Антитело D	248	225	90%	175	78%

Таблица 18

	Качество		Стабильность				Растворимость
	АУЦ, свежевыделенное (%M)	ГФХ, свежевыделенное (%M)	АУЦ 1 мес. (%M)	ГФХ 1 мес. (%M)	АУЦ 4 мес. (%M)	ГФХ 4 мес. (%M)	
Антитело А	98	99	97	99	96	99	99
Антитело D	94	100	98	100	99	99	97

АУЦ: аналитическое центрифугирование, основанное на измерении скорости осаждения при концентрациях 0,5-1 мг/мл;

ГФХ: гель-фильтрационная хроматография;

%M: процент мономеров.

Пример 10. Эпитопное картирование.

Применяли масс-спектрометрию на основе водородно/дейтериевого обмена (HXMS) для картирования эпитопа Антитела А, связывающегося с человеческой субъединицей IL-23p19. С помощью этого метода определяли чувствительность водородного амидного каркаса IL-23p19 к обмену на D₂O. Эксперимент проводили с использованием только IL-23 и IL-23 с добавлением Антитела А. Таким путем иден-

тифицировали области в последовательности IL-23p19, для которых установлена выраженная защита от обмена в результате связывания с Антителом А. Разрешение метода определяли по пептидам, образовавшимся при расщеплении пепсином или протеазой XVIII. Указанные выведенные из IL-23p19 пептиды идентифицировали с помощью дополнительных контрольных экспериментов с образцами, в которых не осуществляли обмен, применяя стандартные точные методики определения массы и ЖХВР-МС/МС.

Применяли рекомбинантный человеческий IL-23. В случае образца, содержащего белок + антитело, 50 мкл IL-23 (0,8 мг/мл) инкубировали с 10 мкл Антитела А (12,7 мг/мл) в течение 15 мин при комнатной температуре. Конечное молярное соотношение Антитела А/IL-23 составляло 1,2:1.

Для осуществления обмена 5 мкл белка IL-23 добавляли к 50 мкл дейтерированного буфера (50мМ 3ФР в D₂O) и инкубировали в течение 100 с при комнатной температуре. Добавляли 50 мкл 2 М мочевины/0,5М TCEP и инкубировали в течение 60 с при комнатной температуре. Добавляли 5 мкл пепсина или протеазы XVIII (4 мг/мл в 0,1% муравьиной кислоты) и образец немедленно охлаждали до 4°C.

Через 5 мин 50 мкл образца инъецировали в ЖХВР-систему Shimadzu (контролирующее устройство SCL10A и два LC10AD-насоса) в следующих условиях:

Подвижная фаза А: 99/1/0,1 (вода/ацетонитрил/муравьиная кислота).

Подвижная фаза Б: 95/5/0,1 (ацетонитрил/вода/муравьиная кислота).

Скорость потока: 100 мкл/мин.

Колонка: Phenomenex Jupiter C5, 5 мкм, 50×1,0 мм.

Линии подвижных фаз, колонка, петля инжектора находились в ледяных банях.

Градиент: момент времени 0 (3%Б), момент времени 2,2 (3%Б), момент времени 10,1 (90%Б), момент времени 12,0 (90%Б), момент времени 12,1 (3%Б).

Масс-спектрометрию осуществляли следующим образом:

Масс-спектрометр: Thermo Orbitrap Velos (0900865).

Методы:

А) Фрагментация (до ID-пептидов): 12 мин - время захвата (3-минутная задержка на старте), полное сканирование на основе масс-спектрометрии с Фурье-преобразованием (FTMS) при разрешении 30000, семь сканированных изображений данных в зависимости от ионного захвата (CID).

Б) МС-погоны: 12 мин - время захвата (3-минутная задержка на старте), полное сканирование на основе FTMS при разрешении 60000.

Пептиды, полученные после обработки пепсином и протеазой XVIII, идентифицировали с использованием данных о фрагментации и программы Proteome Discoverer (фирма Thermoscientific, Уолтем, шт. Массачусетс). Идентифицированные пептиды визуализировали путем сравнения (индивидуальный белок в сравнении с белком в присутствии антитела), используя программу Xcalibur (фирма Thermoscientific). При осуществлении обмена вне IL-23p19-области не обнаружено никаких существенных сдвигов при оценке IL-23 индивидуально по сравнению с IL-23 в присутствии Антитела А. Для p19-области белка данные анализировали с использованием программы PerMap (фирма Thermoscientific). Эта программа позволяет рассчитывать среднюю массу измененных пептидов. Проверяли результаты, полученные с помощью PerMap, и те пептиды, для которых не были получены подтвержденные результаты, рассчитывали с помощью Microsoft Excel.

Области последовательности IL-23, для которых установлена выраженная защита от обмена в результате связывания с Антителом А, идентифицировали как содержащие аминокислотные остатки 108-126 SEQ ID NO: 181 и аминокислотные остатки 137-151 SEQ ID NO: 181.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное антитело к IL-23p19 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 (CDR1-L); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 (CDR2-L) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 (CDR3-L); и

б) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 или 67 (CDR1-H); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (CDR2-H) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 (CDR3-H), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет величину K_D для IL-23 меньше 40 пМ.

2. Гуманизированное антитело к IL-23p19 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 (CDR1-L); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 (CDR2-L) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 (CDR3-L); и

б) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 (CDR1-H); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (CDR2-H) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 (CDR3-H).

3. Гуманизированное антитело к IL-23p19 или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а) переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 (CDR1-L); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 (CDR2-L) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 (CDR3-L); и

б) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 (CDR1-H); аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (CDR2-H) и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 (CDR3-H).

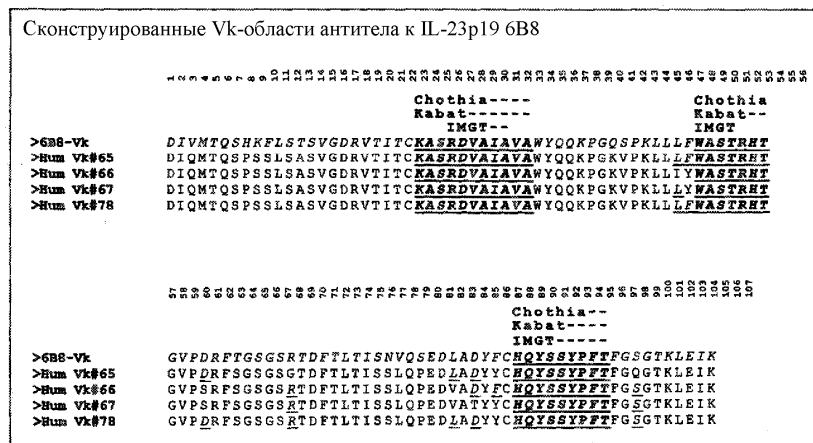
4. Гуманизированное антитело к IL-23r19 по одному из пп.1-3, где указанное антитело представляет собой моноклональное антитело.

5. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по одному из пп.1-4 для лечения воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, респираторного заболевания, метаболического нарушения или рака.

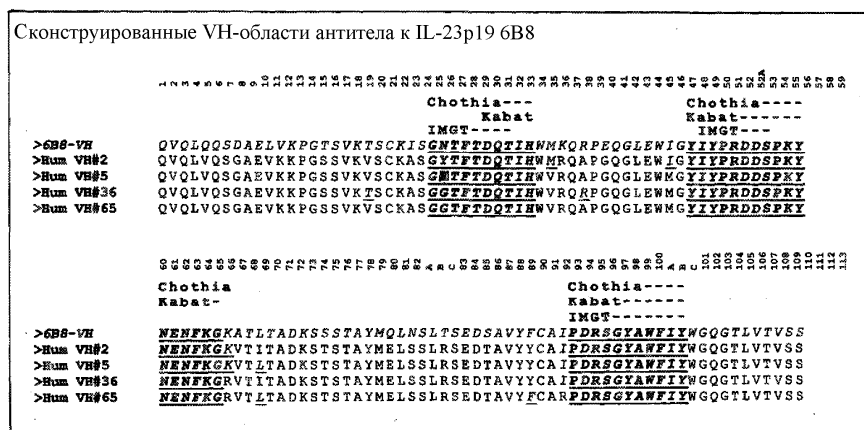
6. Применение по п.5, где заболевание представляет собой псориаз, воспалительное заболевание кишечника, псориатический артрит, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, болезнь Крона, язвенный колит или анкилозирующий спондилит.

7. Применение по п.6, где заболевание представляет собой астму или хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ).

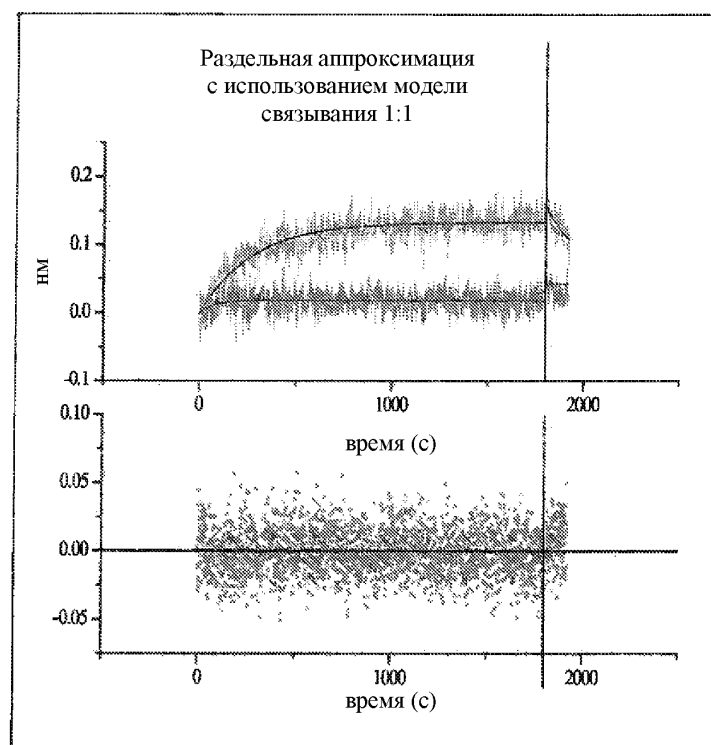
8. Фармацевтическая композиция для лечения воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, респираторного заболевания, метаболического нарушения или рака, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по одному из пп.1-3 и фармацевтически приемлемый носитель.



Фиг. 1а



ФИГ. 16



Фиг. 2

