



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **123198** (13) **C2**

(51) МПК (2021.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00

A61P 37/02 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2015 08670	(72) Винахідник(и): Бейдлер Кетрін Бротігем (US), Брайт Стюарт Уїлліс (US), Жірдан Даніель Скотт (US), Кіклі Крістін Кей (US)
(22) Дата подання заявки: 04.03.2014	(73) Володілець (володільці): ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ, Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 04.03.2021	(74) Представник: Шляховецький Ілля Олександрович, реєстр. №190
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/774,732	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2012061448 A1, 10.05.2012 US 2007009526 A1, 11.01.2007 WO 2007024846 A2, 01.03.2007 WO 2007076524 A2, 05.07.2007 US 2007048315 A1, 01.03.2008 WO 2008103473 A1, 28.08.2008 WO 2010142534 A1, 16.12.2010 WO 2012155019 A1, 15.11.2012 WO 2006119062 A2, 09.11.2006 WO 2008103432 A1, 28.08.2008 US 7723485 B2, 25.05.2010 US 7744874 B2, 29.06.2010
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 08.03.2013	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.11.2015, Бюл.№ 22	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 03.03.2021, Бюл.№ 9	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2014/020064, 04.03.2014	

(54) АНТИТІЛО, ЯКЕ ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З СУБОДИНИЦЕЮ p19 ЛЮДСЬКОГО IL-23

(57) Реферат:

Винахід стосується антитіла, яке зв'язується з субодиноцею p19 людського IL-23. Також винахід стосується ізолюваного полінуклеотиду, що кодує дане антитіло, вектора, рекомбінантної клітини-хазяїна, способу продукування антитіла, фармацевтичної композиції, способу лікування або запобігання аутоімунному або запальному стану та способу лікування або запобігання раку.

UA 123198 C2

Цей винахід стосується антитіл, які зв'язують людський інтерлейкін-23 (IL-23), та їх використання.

Інтерлейкін-23 (IL-23) являє собою дисульфідно-зв'язаний гетеродимерний цитокін, що складається з субодиниць p19 і p40. Вказаний інтерлейкін є частиною родини інтерлейкіну-12 (IL-12) цитокінів. IL-12 являє собою гетеродимерний цитокін масою 70 кДа, що складається з ковалентно зв'язаних субодиниць p40 і p35. IL-12 відіграє важливу роль в розвитку захисних вроджених та адаптивних імунних реакцій і в контролі пухлин. Припускається причетність IL-12 до запальної реакції через його здатність активувати відповіді Т-хелперів 1-го типу (Th1). Однак функціональна роль IL-12 в запальній реакції була переглянута з відкриттям спорідненого цитокіна, IL-23. IL-23 складається з такої ж самої субодиниці p40, що і IL-12, але вона є ковалентно зв'язаною з субодиницею p19. Багато з реагентів, яких використовують для оцінки ролі IL-12, спрямовані на спільну для IL-12/IL-23 субодиницю p40, що означає, що активності, раніше приписувані IL-12, могли бути опосередковані через IL-23. Створення IL-23-дефіцитних мишей надало дослідникам можливість розрізняти активності IL-12 і IL-23 та ідентифікувати IL-23 як головного посередника аутоімунної/запальної відповіді.

Функціональний рецептор IL-23 являє собою гетеродимер субодиниці IL-12R β 1, яка є спільною з рецептором IL-12, і субодиницю IL-23R. Рецептор IL-23 є конститутивно пов'язаним з янус-кіназою 2 (Jak2), і переважно активує STAT3, з меншою активацією STAT4, ніж IL-12.

Рецептор IL-23 експресується на активованих Т-клітинах/Т-клітинах пам'яті і природних клітинах-кілерах (NK). Моноцити, макрофаги і дендритні клітини також експресують рецептор IL-23 на низькому рівні. IL-23 підтримує диференціювання і збереження наївних Т-клітин CD4⁺ в новій субпопуляції клітин, які називаються клітинами Th17 та які відрізняються від класичних клітин Th1 і Th2. Клітини Th17 продукують інтерлейкін-17A (IL-17A) та інтерлейкін-17F (IL-17F). Клітини Th17 продукують ряд інших факторів, які, як відомо, стимулюють запальні реакції, у тому числі фактори некрозу пухлин, які, як відомо, стимулюють запальні реакції, у тому числі фактор некрозу пухлин альфа (TNF- α), інтерлейкін-6 (IL-6), гранулоцитарно-макрофагальний колоніестимулювальний фактор (GM-CSF), CXCL1 і CCL20. NK-клітини і вроджені лімфоїдні клітини, такі як клітини, подібні до клітин-індукторів лімфоїдної тканини (LTi), експресують рецептор IL-23 та гамма-подібний сирітський рецептор, залежний від ретиноєвої кислоти (ROR), і продукують IL-17 у відповідь на IL-23. IL-1 β та IL-23 також коstimулюють гамма-дельта Т-клітини до індукування продукування IL-17 без залучення Т-клітинного рецептора.

Існують суттєві докази того, що клітини, які реагують на IL-23, пов'язані з аутоімунними запальними захворюваннями і раком. Зокрема, висувують припущення, що специфічний інгібітор IL-23 (тобто інгібітор, який пригнічує IL-23, але не IL-12) міг би бути особливо корисним як такий, що без впливу на IL-12 пригнічує IL-23 для максимізування терапевтичної дії, і в той самий час мінімізує ризик супресії імунного захисту хазяїна.

Антитіла, які специфічно зв'язуються з субодиницею p19 IL-23, є потенційно корисними інгібіторами, дивись, наприклад, WO 2007/024846 і WO 2007/027714. Складністю з антитілами, розкритими в WO 2007/024846, щонайменше, є можливість перехресної тканинної реактивності, зокрема, можливість зв'язування з тканиною сітківки, що становить собою питання безпеки. Крім того, розкриті в WO 2007/024846 антитіла щонайменше мають субоптимальні фізико-хімічні властивості, наприклад, надзвичайну гідрофобність, що призводить до агрегації, яка представляє собою значну перешкоду для продукування антитіл в промисловому масштабі. До того ж немає антитіла проти субодиниці p19 IL-23, схваленого для терапевтичного використання.

Отже залишається потреба в антитілах проти IL-23. Зокрема, залишається потреба в антитілах проти IL-23, які зв'язуються з високою спорідненістю з субодиницею p19 IL-23, зокрема людського IL-23, і не зв'язуються з субодиницею p40 спорідненого члена родини цитокінів, IL-12. Більш конкретно, залишається потреба в антитілах проти IL-23, які зв'язуються з високою спорідненістю з субодиницею p19 IL-23 і не демонструють помітної перехресної тканинної реактивності, зокрема, перехресної реактивності з тканиною сітківки. Існує також потреба в антитілах проти IL-23, які мають фармацевтично прийнятні фізико-хімічні властивості, що полегшують розроблення, виготовлення або приготування лікарського засобу.

За цим винаходом запропоноване антитіло, яке зв'язується з субодиницею p19 людського IL-23 і яке містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, при цьому згаданий легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), і згаданий важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), причому LCVR містить амінокислотні послідовності LCDR1, LCDR2 і LCDR3, і HCVR містить амінокислотні послідовності HCDR1, HCDR2 і HCDR3, де LCDR1 являє собою послідовність SEQ ID NO: 4, LCDR2 являє собою послідовність SEQ ID NO: 5, LCDR3 являє собою послідовність SEQ ID NO: 6, HCDR1 являє собою послідовність SEQ ID

NO: 1, HCDR2 являє собою послідовність SEQ ID NO: 2, і HCDR3 являє собою послідовність SEQ ID NO: 3.

У одному з варіантів здійснення цього винаходу антитіло містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, де згаданий легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), і згаданий важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), причому амінокислотна послідовність LCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 8, і амінокислотна послідовність HCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 7.

У ще одному варіанті здійснення цього винаходу антитіло містить дві варіабельні ділянки легкого ланцюга (LCVR) і дві варіабельні ділянки важкого ланцюга (HCVR), причому амінокислотна послідовність кожної LCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 8, і амінокислотна послідовність кожної HCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 7.

У ще одному варіанті здійснення цього винаходу антитіло містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, причому амінокислотна послідовність легкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 10, і амінокислотна послідовність важкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 9.

У ще одному варіанті здійснення цього винаходу антитіло містить два легкі ланцюги і дві важкі ланцюги, причому амінокислотна послідовність кожного легкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 10, і амінокислотна послідовність кожного важкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 9.

За цим винаходом запропоноване антитіло, яке зв'язується з субодиницею p19 людського IL-23, і яке містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, при цьому згаданий легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), і згаданий важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), причому LCVR містить гіперваріабельні ділянки LCDR1, LCDR2 та LCDR3, і HCVR містить гіперваріабельні ділянки HCDR1, HCDR2 та HCDR3, і де LCDR1 складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 4, LCDR2 складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 5, LCDR3 складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 6, HCDR1 складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 1, HCDR2 складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 2, і HCDR3 складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 3.

За цим винаходом також запропоноване антитіло, яке зв'язується з субодиницею p19 людського IL-23 і яке містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, при цьому згаданий легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), і згаданий важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), причому ланцюг LCVR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8, і ланцюг HCVR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7.

За цим винаходом також запропоноване антитіло, яке зв'язується з субодиницею p19 людського IL-23 і яке містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, при цьому згаданий легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10, і згаданий важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9.

За цим винаходом також запропоноване антитіло, яке зв'язується з субодиницею p19 людського IL-23 і яке містить два легкі ланцюги і два важкі ланцюги, причому кожен легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10, і кожен важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9.

Амінокислотні послідовності антитіл за цим винаходом наведені нижче.

SEQ ID NO

Антитіло	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг	HCVR	LCVR
I	9	10	7	8

Антитіло	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
I	1	2	3	4	5	6

За цим винаходом також запропоноване антитіло, яке зв'язується з субодиницею p19 людського IL-23 на конформаційному епітопі в положеннях амінокислот 81-99 та 115-140 послідовності SEQ ID NO: 15.

За цим винаходом також запропоноване антитіло, яке зв'язується з субодиницею p19 людського IL-23 на конформаційному епітопі в положеннях амінокислот 81-99 та 115-140 послідовності SEQ ID NO: 15, причому згадане антитіло контактує щонайменше із амінокислотними залишками 94P, 95S, 97L, 98P, 99D, 123W, 130S, 133P і 137W послідовності SEQ ID NO: 15.

У ще одному варіанті здійснення цього винаходу антитіло є селективним щодо субодиниці

p19 людського IL-23.

У разі зв'язування з субодиноцею p19 людського IL-23, антитіло за цим винаходом запобігає зв'язуванню людського IL-23 з субодиноцею IL-23 рецептора IL-23. Отже антитіло за цим винаходом пригнічує активність людського IL-23 на субодиноці людського IL-23 рецептора IL-23.

Антитіло за цим винаходом не запобігає зв'язуванню людського IL-23 з субодиноцею IL-12R β 1 рецептора IL-23, і тому не пригнічує активності людського IL-23 на субодиноці IL-12R β 1 рецептора IL-23.

Це антитіло не зв'язується з утворенням зв'язку, який може бути виявлений, з субодиноцею p40, спільною для людського IL-23 і людського IL-12.

У ще одному варіанті здійснення цього винаходу антитіло має нейтралізувальну активність щодо субодиноці p19 людського IL-23.

У ще одному варіанті здійснення цього винаходу антитіло за цим винаходом має IC₅₀ меншу ніж або таку, що дорівнює приблизно 90 пМ. За варіантом, якому віддають перевагу, антитіло за цим винаходом має IC₅₀ меншу ніж або таку, що дорівнює приблизно 74 пМ. Значення IC₅₀ визначають за допомогою *in vitro* дослідження на спленоцитах мишей, як описано в розділі, що має назву "In vitro нейтралізація IL-23 людини або макак-крабодів антитілом I в спленоцитах мишей" в Прикладі 1.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу антитіло за цим винаходом є селективним, і має нейтралізувальну активність щодо субодиноці p19 людського IL-23.

У ще одному з варіантів здійснення цього винаходу антитіло за цим винаходом має константу рівноваги дисоціації, K_D, від приблизно 10 пМ до приблизно 30 пМ для людського IL-23. За варіантом, якому віддають перевагу, антитіло за цим винаходом має K_D приблизно 21 пМ з людським IL-23. Значення K_D встановлюють за кінетикою зв'язування при температурі 37°C, як описано в розділі, який має назву "Визначення афінного зв'язування за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (BIAcore) для антитіла I" в Прикладі 1. Крім того, антитіло за цим винаходом характеризується швидкістю k_{on} з субодиноцею p19 людського IL-23 від приблизно 2,2×10⁶ M⁻¹s⁻¹ до приблизно 2,6×10⁶ M⁻¹s⁻¹. За варіантом, якому віддають перевагу, антитіло за цим винаходом має швидкість k_{on} з субодиноцею p19 людського IL-23 приблизно 2,43×10⁶ M⁻¹s⁻¹. Антитіло за цим винаходом характеризується швидкістю k_{off} з субодиноцею p19 людського IL-23 від приблизно 0,30×10⁻⁴ s⁻¹ до приблизно 0,70×10⁻⁴ s⁻¹. За варіантом, якому віддають перевагу, антитіло за цим винаходом має швидкість k_{off} з субодиноцею p19 людського IL-23 приблизно 0,52×10⁻⁴ s⁻¹.

Антитіло за цим винаходом зв'язується з субодиноцею p19 людського IL-23 з високою спорідненістю. У цьому описі термін "висока спорідненість" означає K_D щонайменше приблизно 21 пМ. Значення K_D встановлюють за кінетикою зв'язування при температурі 37°C, як описано в розділі, який має назву "Визначення афінного зв'язування за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (BIAcore) для антитіла I" в Прикладі 1.

На відміну від деяких відомих у галузі антитіл, які зв'язуються з людським IL-23, антитіло за цим винаходом не демонструє помітної перехресної тканинної реактивності. Зокрема, антитіло за цим винаходом не має помітного зв'язування з тканиною сітківки.

Антитіло за цим винаходом має фармацевтично прийнятні фізико-хімічні властивості, в тому числі фармацевтично прийнятну розчинність за фізіологічних і лабораторних умов, і фармацевтично прийнятну хімічну і фізичну стабільність, при цьому згадане антитіло залишається в мономерній формі, і за різних умов спостерігається дуже незначна кількість агрегатів високої молекулярної маси (BMM), як описано в розділі, який має назву "Фізико-хімічні властивості антитіла проти IL-23" в Прикладі 1.

За цим винаходом також запропоновані фармацевтичні композиції, які містять антитіло за цим винаходом і один або декілька фармацевтично прийнятних носіїв, розріджувачів або наповнювачів. Більш конкретно, фармацевтичні композиції за цим винаходом містять один або декілька додаткових терапевтичних засобів.

За цим винаходом запропонований спосіб лікування або запобігання певного(-ому) стану у пацієнта, який включає введення пацієнту, який цього потребує, ефективної кількості антитіла за цим винаходом, причому згаданий стан являє собою аутоімунний або запальний стан, вибраний з групи, яка складається з розсіяного склерозу, ревматоїдного артриту, псоріазу, запальної хвороби кишечника, анкілозуючого спондиліту, реакції "трансплантат-проти-хазяїна", вовчачка та метаболічного синдрому.

За цим винаходом запропонований спосіб лікування або запобігання певного(-ому) стану у пацієнта, який включає введення пацієнту, який цього потребує, ефективної кількості антитіла за цим винаходом, причому згаданий стан являє собою рак.

У одному з варіантів здійснення цього винаходу згаданим раком є меланома, рак ободової

кишки, рак яєчника, рак голови і шиї, рак легенів, рак молочної залози або рак шлунка.

Цим винаходом запропоноване антитіло за цим винаходом для застосування в терапії.

Більш конкретно, цим винаходом антитіло за цим винаходом запропоноване для застосування у лікуванні або для запобігання аутоімунного або запального стану, вибраного з групи, яка складається з розсіяного склерозу, ревматоїдного артриту, псоріазу, запальної хвороби кишечника, анкілозуючого спондиліту, реакції "трансплантат-проти-хазяїна", вовчака та метаболічного синдрому.

За цим винаходом запропоноване антитіло за цим винаходом для застосування у лікуванні або запобіганні раку.

У одному з варіантів здійснення цього винаходу згаданим раком є меланома, рак ободової кишки, рак яєчника, рак голови і шиї, рак легенів, рак молочної залози або рак шлунка.

За цим винаходом запропоноване застосування антитіла за цим винаходом у виготовленні лікарського засобу для лікування або запобігання стану, вибраного з групи, яка складається з розсіяного склерозу, ревматоїдного артриту, псоріазу, запальної хвороби кишечника, анкілозуючого спондиліту, реакції "трансплантат-проти-хазяїна", вовчака та метаболічного синдрому.

За цим винаходом запропоноване застосування антитіла за цим винаходом у виготовленні лікарського засобу для лікування або запобігання раку.

У одному з варіантів здійснення цього винаходу згаданим раком є меланома, рак ободової кишки, рак яєчника, рак голови і шиї, рак легенів, рак молочної залози або рак шлунка.

Цей винахід також стосується полінуклеотидів, що кодують описане вище антитіло за цим винаходом.

За цим винаходом запропонована молекула ДНК, що містить полінуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептид легкого ланцюга, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10.

За цим винаходом запропонована молекула ДНК, що містить полінуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептид важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9.

У одному з варіантів здійснення цим винаходом запропонований полінуклеотид, що кодує антитіло за цим винаходом, причому HCVR кодується послідовністю SEQ ID NO: 11 і LCVR кодується послідовністю SEQ ID NO: 12.

У одному з варіантів здійснення цим винаходом запропонований полінуклеотид, що кодує антитіло за цим винаходом, причому важкий ланцюг кодується послідовністю SEQ ID NO: 13, і легкий ланцюг кодується послідовністю SEQ ID NO: 14.

Полінуклеотиди за цим винаходом можуть бути у формі РНК або у формі ДНК, причому ця ДНК включає в себе кДНК і синтетичну ДНК. Згадана ДНК може бути дволанцюговою або одноланцюговою. Кодувальні послідовності, які кодують антитіло за цим винаходом, можуть змінюватись унаслідок надлишковості або вродженості генетичного коду.

Полінуклеотиди, які кодують антитіло за цим винаходом, можуть містити: лише кодувальну послідовність антитіла, кодувальну послідовність антитіла і додаткову кодувальну послідовність, таку як лідерна, або секреторна, послідовність, чи пропратейнова послідовність, кодувальну послідовність антитіла і некодувальну послідовність, таку як інтрони або некодувальна послідовність 5' та/або некодувальна послідовність 3', кодувальної послідовності білка. Отже термін "полінуклеотид, що кодує антитіло" охоплює полінуклеотид, який може містити не тільки кодувальну послідовність білка, але також полінуклеотид, який містить додаткову кодувальну і/або некодувальну послідовність.

Полінуклеотиди за цим винаходом будуть експресуватись в клітині-хазяїні після функціонального приєднання згаданих послідовностей до контрольної послідовності експресії. Вектори експресії зазвичай здатні до реплікації в організмах-хазяях або як епісоми, або як інтегральна частина хромосомної ДНК хазяїна. Зазвичай вектори експресії містять селективні маркери, наприклад, тетрациклін, неоміцин, і дигідрофолатредуктазу, для забезпечення виявлення клітин, які трансформовані необхідними послідовностями ДНК.

За цим винаходом запропонована рекомбінантна клітина-хазяїн, що містить молекулу ДНК, яка містить полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид легкого ланцюга, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10, і молекулу ДНК, яка містить полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид важкого ланцюга, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9, причому ця клітина здатна експресувати антитіло, яке містить важкий ланцюг і легкий ланцюг, де амінокислотна послідовність важкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 9, і амінокислотна послідовність легкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 10.

Антитіло за цим винаходом може легко продукуватись в клітинах ссавців, таких як клітини CHO, NS0, HEK293 або COS; в бактеріальних клітинах, таких як E. coli, Bacillus subtilis або

Pseudomonas fluorescens, чи в клітинах грибів або дріжджів. Клітини-хазяї культивують з використанням способів, добре відомих в цій галузі.

Вектори, які містять полінуклеотидні послідовності, що становлять інтерес (наприклад, полінуклеотиди, що кодують поліпептиди антитіл і контрольні послідовності експресії), можуть бути перенесені в клітину-хазяїна добре відомими методами, вибір яких залежить від типу клітини-хазяїна. Наприклад, трансформацію шляхом обробки хлоридом кальцію зазвичай використовують для клітин-прокаріотів, в той час як обробка фосфатом кальцію або електропорація можуть бути використані для інших клітин-хазяїв.

Можуть бути використані різні способи очищення білків, і такі способи відомі в цій галузі й описані, наприклад, у Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-89 (1990) and Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd Edition, Springer, NY (1994).

За цим винаходом запропонований спосіб продукування антитіла, яке зв'язується з субодиницею р19 людського IL-23 і яке містить важкий ланцюг і легкий ланцюг, де згаданий важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9, і легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10, і згаданий спосіб включає стадії:

а) культивування рекомбінантної клітини-хазяїна, як описано вище, за таких умов, що згадане антитіло експресується; і

б) виділення експресованого антитіла зі згаданої клітини-хазяїна.

Крім того, за цим винаходом запропонований спосіб продукування антитіла, яке зв'язується з субодиницею р19 людського IL-23 і яке містить важкий ланцюг і легкий ланцюг, де амінокислотна послідовність важкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 9, і амінокислотна послідовність легкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 10, і згаданий спосіб включає стадії:

а) культивування рекомбінантної клітини-хазяїна, що містить першу полінуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептидну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 9, і другу полінуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептидну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 10, за таких умов, що згадані поліпептидні послідовності експресуються; і

б) виділення зі згаданої клітини-хазяїна антитіла, що містить важкий ланцюг і легкий ланцюг, де поліпептидна послідовність згаданого важкого ланцюга представлена послідовністю SEQ ID NO: 9, і поліпептидна послідовність згаданого легкого ланцюга представлена послідовністю SEQ ID NO: 10.

У одному з варіантів здійснення описаного вище способу перша полінуклеотидна послідовність, що кодує поліпептидну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 9, і друга полінуклеотидна послідовність, що кодує поліпептидну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 10, є частинами однієї й тієї ж самої молекули нуклеїнової кислоти.

У одному з варіантів здійснення цей винахід пропонує антитіло, продуковане за згаданим вище способом.

У іншому варіанті здійснення антитіло, продуковане за згаданим вище способом, має два важкі ланцюги і два легкі ланцюги, причому поліпептидна послідовність кожного важкого ланцюга представлена послідовністю SEQ ID NO: 9, і поліпептидна послідовність кожного легкого ланцюга представлена послідовністю SEQ ID NO: 10.

Антитіло за цим винаходом являє собою тіло типу IgG, і має чотири амінокислотні ланцюги (два "важкі" ланцюги і два "легкі" ланцюги), перехресно зшиті за допомогою внутрішньо- та міжланцюгових дисульфідних зв'язків. У разі експресії в певних біологічних системах, антитіла, що мають нативні послідовності людського Fc-фрагменту, глікозилюються на Fc-фрагменті. Антитіла можуть бути глікозильовані також в інших положеннях.

Кожен важкий ланцюг складається з N-кінцевої HCVR і константної ділянки важкого ланцюга ("HCCR"). Важкі ланцюги людини, які класифікуються як гамма, мю, альфа, дельта або епсилон, визначають ізотип антитіла як IgG, IgM, IgA, IgD або IgE, відповідно. Людські антитіла IgG можуть бути додатково підрозділені на підкласи, наприклад, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄.

Переважаю антитіло за цим винаходом містить Fc-фрагмент, що походить з Fc-фрагменту людського IgG₄, оскільки він має зменшену здатність до залучення Fc-рецептор-опосередкованих запальних механізмів або активування комплементу, що призводить до зниження ефекторної функції.

За варіантом, якому віддають більшу перевагу, антитіло за цим винаходом містить Fc-фрагмент IgG₄-PAA. Fc-фрагмент IgG₄-PAA має мутацію, пов'язану із заміною серину на пролін, в положенні 223 (S223P; послідовність SEQ ID NO: 9), мутацію, пов'язану із заміною фенілаланіну на аланін, в положенні 229 (F229A; послідовність SEQ ID NO: 9) і мутацію, пов'язану із заміною лейцину на аланін, в положенні 230 (L230A; послідовність SEQ ID NO: 9).

Мутація S223P являє собою шарнірну мутацію, яка запобігає утворенню напівантитіла (явище динамічного обміну напівмолекул в антитілах IgG₄). Мутації F229A і L230A додатково знижують ефекторну функцію, яка вже є низькою у згаданого ізотипу людського IgG₄.

5 Кожен ланцюг важкого типу також характеризується певною константною ділянкою з послідовністю, добре відомою в даній галузі. Константна ділянка важкого ланцюга IgG складається з трьох доменів (CH1, CH2 і CH3).

10 Легкі ланцюги, які класифікуються як каппа або лямбда, є такими, що кожен з них характеризується певною константною ділянкою, як відомо в даній галузі. Кожен легкий ланцюг складається з LCVR і константної ділянки легкого ланцюга ("LCCR"). За варіантом, якому віддають перевагу, антитіло за цим винаходом включає легкий ланцюг каппа.

Варіабельні ділянки кожної пари легкий/важкий ланцюги утворюють антигензв'язувальний центр антитіла. HCVR і LCVR можуть бути додатково підрозділені на гіперваріабельні ділянки, які називають ділянками, що обумовлюють комплементарність ("CDR"), які чергуються з ділянками, які є більш консервативними і які називають каркасними ділянками ("FR"). Кожна 15 HCVR і LCVR складається з трьох CDR і чотирьох FR, розмішених від аміно-кінця до карбокси-кінця в такому порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. При цьому три CDR важкого ланцюга називають "HCDR1, HCDR2 і HCDR3", а три CDR легкого ланцюга називають "LCDR1, LCDR2 і LCDR3". CDR містять більшість залишків, які утворюють специфічні взаємодії з антигеном. На цей час існує три системи визначення CDR для антитіл, які використовуються 20 для трансдиференціювання послідовностей. Визначення CDR за номенклатурою Кебота (Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) ґрунтується на варіабельності послідовностей антитіла. Визначення CDR за номенклатурою Чотья (Chothia et al., "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani et al., "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 273, 25 927-948 (1997)) ґрунтується на тривимірних структурах антитіл і топологіях петель CDR. Визначення CDR за номенклатурою Чотья є ідентичним визначенням CDR за номенклатурою Кебота, за винятком HCDR1 і HCDR2. Визначення CDR за номенклатурою Норта (North et al., "A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations", Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011)) ґрунтується на поширенні спорідненості з утворенням кластерів з великою кількістю кристалічних структур.

Для цілей цього винаходу, для визначення CDR використовується консенсус трьох вказаних методів. У разі CDR легкого ланцюга, використовують визначення CDR за номенклатурою Кебота і Чотья. У разі HCDR1, використовують гібрид визначень CDR за номенклатурою Кебота і Чотья. Визначення HCDR1 за номенклатурою Кебота починається через вісім залишків після 35 першого цистеїну важкого ланцюга і складає у довжину п'ять залишків, в той час як визначення HCDR1 за номенклатурою Чотья починається через три залишки після цистеїну і складає у довжину сім залишків. HCDR1 антитіла за цим винаходом визначають за вихідним положенням за номенклатурою Чотья і кінцевим положенням за номенклатурою Кебота. У разі HCDR2, використовують визначення CDR за номенклатурою Кебота. У разі HCDR3, використовують гібрид визначень CDR за номенклатурою Норта, Кебота і Чотья. Визначення HCDR3 за 40 номенклатурою Кебота включає залишки 95-102 важкого ланцюга (послідовність SEQ ID NO: 13 для антитіла за цим винаходом) і, як правило, починається через три залишки після цистеїну. Визначення HCDR3 за номенклатурою Чотья є таким самим, як і визначення за номенклатурою Кебота. Визначення HCDR3 за номенклатурою Норта включає залишки 93-102 важкого ланцюга (послідовність SEQ ID NO: 13 для антитіла за цим винаходом) і, як правило, починається безпосередньо після залишка цистеїну. HCDR3 антитіла за цим винаходом визначається за 45 вихідним положенням за номенклатурою Норта і кінцевим положенням за номенклатурою Кебота/Чотья/Норта.

50 У Таблиці 1 наведені як приклад визначення CDR антитіла за цим винаходом.

Таблиця 1

Визначення CDR

CDR	Визначення початку	Визначення кінця
LCDR1	Кебот/Чотья/Норт	Кебот/Чотья/Норт
LCDR2	Кебот/Чотья	Кебот/Чотья/Норт
LCDR3	Кебот/Чотья/Норт	Кебот/Чотья/Норт
HCDR1	Чотья	Кебот/Норт
HCDR2	Кебот/Норт	Кебот
HCDR3	Норт	Кебот/Чотья/Норт

Антитіло за цим винаходом являє собою генно-інженерне антитіло, яке було розроблено так, щоб воно мало каркасні ділянки, шарнірні ділянки та константні ділянки людського походження, які є ідентичними або по суті ідентичними (по суті людськими), каркасним ділянкам і константним ділянкам, одержаним з геномних послідовностей людини. Повністю людськими каркасними ділянками, шарнірними ділянками і константними ділянками є послідовності людської зародкової лінії, а також послідовності з природними соматичними мутаціями і послідовності з генно-інженерними мутаціями. Антитіло за цим винаходом може містити каркасні, шарнірні або константні ділянки, одержані з повністю людської каркасної, шарнірної або константної ділянки, що містить одну або декілька амінокислотних замін, делецій або додань. Крім того, антитіло за цим винаходом за варіантом, якому віддають перевагу, є по суті неімуногенним в організмі людини.

Як основа для антитіла за цим винаходом може бути використана безліч різних каркасних послідовностей людини окремо або в комбінації. За варіантом, якому віддають перевагу, каркасні ділянки антитіла за цим винаходом мають людське походження або по суті людське (людське походження щонайменше на 95 %, 97 % або 99 %). Послідовності каркасних ділянок людського походження можна одержати з The Immunoglobulin Factsbook, by Marie-Paule Lafranc, Gerard Lefranc, Academic Press 2001, ISBN 012441351.

Каркасна послідовність для антитіла за цим винаходом відіграє роль "донорної" варіабельної каркасної ділянки, і може бути використана для створення додаткових антитіл з такими самими CDR, визначеними у цьому описі, із застосуванням методики, відомої в цій галузі. Крім того, для одержання додаткових антитіл каркасна послідовність для антитіла за цим винаходом може бути порівняна з іншими відомими людськими каркасними послідовностями. Тому ця інформація може бути використана для "зворотної мутації" іншої вибраної гомологічної каркасної ділянки до донорного амінокислотного залишку у цих положеннях. Далі, будь-які амінокислоти, що рідко зустрічаються, можуть бути виявлені в додаткових людських каркасних ділянках, так що у відповідному положенні може бути використаний консенсусний або донорний амінокислотний залишок.

Способи одержання та очищення антитіл є добре відомими в цій галузі, і можуть бути знайдені, наприклад, в Harlow and Lane (1988) Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, Chapters 5-8 and 15. Наприклад, мишей можна імунізувати людським IL-23 або його фрагментами, і потім одержані антитіла можуть бути виділені, очищені, і амінокислотні послідовності можуть бути визначені із застосуванням звичайних методів, добре відомих в цій галузі. Антитіло за цим винаходом сконструйоване так, щоб містити одну або декілька людських каркасних ділянок навколо CDR, одержаних з нелюдського антитіла. Людські каркасні послідовності зародкової лінії можна одержати з ImMunoGeneTics (IMGT) через їхній веб-сайт <http://imgt.cines.fr> або з The Immunoglobulin Facts Book by Marie-Paule Lefranc and Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN 012441351. Зокрема, каркасні ділянки легкого ланцюга зародкової лінії для використання в антитілі за цим винаходом включають 02.

Зокрема, каркасні ділянки важкого ланцюга зародкової лінії для використання в антитілі за цим винаходом включають VH1-69.

Генно-інженерні антитіла за цим винаходом можуть бути одержані і очищені з використанням відомих методів. Наприклад, послідовності кДНК, що кодує важкий ланцюг (наприклад, амінокислотна послідовність, представлена послідовністю SEQ ID NO: 9) і легкий ланцюг (наприклад, амінокислотна послідовність, представлена послідовністю SEQ ID NO: 10),

можуть бути клоновані та введені у вектор експресії на основі GS (глутамінсинтетаза). Цим сконструйованим імуноглобуліновим вектором експресії у подальшому можуть бути стабільно трансфектовані клітини CHO. Наслідком експресії антитіл ссавцями буде глікозилювання зазвичай на висококонсервативних сайтах N-глікозилювання на Fc-фрагменті. Стабільні клони

5 можуть бути перевірені на експресію антитіла шляхом специфічного зв'язування з людським IL-23. Позитивні клони можуть розмножуватись в безсироватковому культуральному середовищі для продукування антитіл в біореакторах. Середовища, у які було секретоване антитіло, можуть бути очищені за допомогою звичайних методів. Наприклад, середовище може зручно завантажуватись на колонку з протеїном A або протеїном G Sepharose FF, яка має бути

10 врівноважена сумісним буфером, наприклад, забуференим фосфатом фізіологічним розчином. Колонку промивають для видалення неспецифічних зв'язувальних компонентів. Зв'язане антитіло елюють, наприклад, із застосуванням градієнта pH, та фракції антитіл виявляють, наприклад, за допомогою SDS-PAGE (електрофорез в поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфата натрію), а потім об'єднують. Антитіло може бути сконцентровано та/або

15 відфільтровано за стерильних умов із застосуванням звичайних методів. Розчинний агрегат і мультимери можуть бути ефективно видалені із застосуванням звичайних методів, в тому числі шляхом гель-хроматографії за розміром молекул, гідрофобної хроматографії, іонообмінної хроматографії або хроматографії на гідроксилапатитній адсорбційній колонці. Продукт може бути негайно заморожений, наприклад, при температурі -70 °C, або ліофілізований.

20 Антитіла за цим винаходом є моноклональними антитілами. Термін "моноклональне антитіло" або "mAb" у значенні, вживаному у цьому описі, стосується антитіла, одержаного з однієї копії або клону, в тому числі, наприклад, будь-якого еукаріотного, прокаріотного або фагового клону, а не технології, за якою його одержують. Моноклональні антитіла можуть бути продуковані, наприклад, із застосуванням гібридомної технології, рекомбінантної технології,

25 технології фагового дисплею, синтетичної технології, наприклад, шляхом CDR-щеплення, або комбінацій таких або інших технологій, відомих в цій галузі.

За іншим варіантом здійснення цього винаходу антитіло або нуклеїнова кислота, що кодує це антитіло, запропоноване(-а) в ізольованій формі.

Антитіло за цим винаходом або фармацевтичні композиції, які містять це антитіло, можуть

30 вводиться парентеральними шляхами (наприклад, підшкірним, внутрішньовенним, внутрішньоочеревинним, внутрішньом'язовим або трансдермальним).

Фармацевтичні композиції за цим винаходом можуть бути одержані за способами, добре відомими в цій галузі (наприклад, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition (1995), (A. Gennaro et al., Mack Publishing Co.), і включати антитіло, розкриті у цьому описі, і

35 один або декілька фармацевтично прийнятних носіїв, розріджувачів або наповнювачів. Наприклад, антитіло за цим винаходом може бути введене до складу лікарського засобу разом з певними речовинами, такими як цитрат натрію, лимонна кислота, полісорбат 80, хлорид натрію і сахароза, і одержану композицію потім можна ліофілізувати, і зберігати при температурі 2-8 °C. Ліофілізована композиція у подальшому може бути відновлена стерильною водою для

40 ін'єкцій перед введенням.

Термін "зв'язуються (або "зв'язується") з субодиницею p19 людського IL-23" у значенні, вживаному у цьому описі, стосується виявлюваної взаємодії антитіла за цим винаходом з епітопом на субодиниці p19 людського IL-23, представленій амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 15. Взаємодія між антитілом за цим винаходом і субодиницею p19 людського IL-23

45 визначається за кінетикою зв'язування при температурі 37 °C, як описано в розділі, який має назву "Визначення афінного зв'язування за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (BIAcore) для антитіла I" в Прикладі 1.

Термін "епітоп" у значенні, вживаному у цьому описі, стосується амінокислотних залишків, які лежать близько один до одного на поверхні білка (антигена), і взаємодіють з антитілом. Існує

50 два основні класи епітопів: лінійні епітопи і конформаційні епітопи.

Термін "лінійний епітоп" у значенні, вживаному у цьому описі, стосується безперервної первинної амінокислотної послідовності конкретної ділянки білка.

Термін "конформаційний епітоп" у значенні, вживаному у цьому описі, стосується окремих ділянок амінокислотної послідовності антигена, з якими контактує антитіло за цим винаходом.

55 Конформаційні епітопи визначаються структурою, а також послідовністю нативного білка; ці епітопи можуть бути безперервними або переривчастими. Компоненти епітопів можуть бути розташовані на розрізнених частинах білка, які наближаються одна до іншої в структурі впорядковано укладеного нативного білка. У контексті цього винаходу, антитіло за цим винаходом зв'язується з конформаційним епітопом в межах положень амінокислот 81-99 і 115-

60 140 послідовності SEQ ID NO: 15, де згадане антитіло контактує щонайменше з

амінокислотними залишками 94P, 95S, 97L, 98P, 99D, 123W, 130S, 133P і 137W послідовності SEQ ID NO: 15. Конформаційний епітоп, однак, не обмежується цими амінокислотними залишками і може містити додаткові амінокислотні залишки в межах положень амінокислот 81-99 і 115-140 послідовності SEQ ID NO: 15.

5 Термін "не має помітного зв'язування з тканиною сітківки" у значенні, вживаному у цьому описі, стосується відсутності виявлюваної взаємодії антитіла за цим винаходом з тканиною сітківки людини і макак-крабоїдів. Взаємодію між антитілом за цим винаходом і тканиною сітківки людини і макак-крабоїдів оцінюють із застосуванням імуногістохімічного аналізу, як описано в розділі, що має назву "Перехресна реактивність з тканиною сітківки: In vitro імуногістохімічний аналіз" в Прикладі 1. Термін "помітно" у значенні, вживаному у цьому контексті, стосується візуальної оцінки тканини сітківки людини і макак-крабоїдів для визначення зв'язування антитіла за цим винаходом зі згаданою тканиною сітківки людини і макак-крабоїдів.

10 Термін "селективний" у значенні, вживаному у цьому описі відносно антитіла за цим винаходом, стосується антитіла, яке зв'язується з субодиницею p19 людського IL-23, але не зв'язується з субодиницею p40, спільною для людського IL-23 і людського IL-12.

15 Термін "нейтралізуюче" має відношення до терміну "нейтралізуюче антитіло" у значенні, вживаному у цьому описі, і означає пригнічування біологічної активності людського IL-23. Визначенням одного або декількох показників біологічної активності IL-23 із застосуванням біоаналізу на спленоцитах мишей (дивись розділ, що має назву "In vitro нейтралізація IL-23 людини або макак-крабоїдів антитілом I у спленоцитах мишей" в Прикладі 1) або аналізу нейтралізації людського IL-23 (дивись розділ, що має назву "Нейтралізація людського IL-23: різко виражена, місцева" в Прикладі 1) можна оцінити це пригнічування біологічної активності людського IL-23.

20 Термін " K_D " у значенні, вживаному у цьому описі, означає константу дисоціації конкретної взаємодії антитіло-антиген. Вона обчислюється за формулою:

$$K_{off}/K_{on} = K_D$$

Термін " K_{on} " у значенні, вживаному у цьому описі, означає константу асоціації або питому швидкість прямої або комплексотвірної реакції, що вимірюється в одиницях: $M^{-1}s^{-1}$.

30 Термін " K_{off} " у значенні, вживаному у цьому описі, означає константу дисоціації або питому швидкість реакції дисоціації антитіла з комплексу антитіло/антиген, що вимірюється в одиницях: s^{-1} .

Термін " IC_{50} " у значенні, вживаному у цьому описі, означає ефективну концентрацію антитіла за цим винаходом, необхідну для нейтралізації 50 % біологічної активності IL-23 в спленоцитах мишей у біоаналізі, описаному в розділі, що має назву "In vitro нейтралізація IL-23 людини або макак-крабоїдів антитілом I у спленоцитах мишей" в Прикладі 1.

35 Термін "полінуклеотид" у значенні, вживаному у цьому описі, охоплює молекули ДНК і молекули РНК. Молекула нуклеїнової кислоти може бути одноланцюговою або дволанцюговою.

Термін "ізолюваний" у значенні, вживаному у цьому описі, стосується білка, пептиду або нуклеїнової кислоти, що не містить або практично не містить інші різновиди макромолекул, наявних у клітинному оточенні.

40 Термін "практично не містить" у значенні, вживаному у цьому описі, означає що білок, пептид або нуклеїнова кислота, що становлять інтерес, містить більше 80 % (у перерахунку на мюлі) присутніх різновидів макромолекул, за варіантом, якому віддають перевагу, більше 90 % і, за варіантом, якому віддають більшу перевагу, більше 95 %.

45 "Пацієнтом" є ссавець, переважно людина.

Термін "лікування" (або "лікувати") стосується уповільнення, переривання, затримку, полегшення, зупинення, зменшення або обертання напрямку розвитку або тяжкості існуючого симптому, розладу, стану або захворювання.

50 Термін "ефективна кількість" у значенні, вживаному у цьому описі, стосується кількості або дози антитіла за цим винаходом, яка, при одноразовому або багаторазовому введенні пацієнту, забезпечує бажаний ефект у пацієнта при лікуванні. Ефективна кількість може бути легко визначена лікарем, який встановлює діагноз, як фахівцем в цій галузі, беручи до уваги ряд факторів, таких як вид ссавця; його розмір, вік і загальний стан здоров'я; конкретне захворювання, яким уражений пацієнт; ступінь або тяжкість захворювання; реакція окремого пацієнта; конкретне введення антитіла; спосіб введення; характеристики біодоступності введенного препарату; вибрана схема приймання лікарського засобу; і використання будь-яких супутніх лікарських засобів.

ПРИКЛАД

60 Наведений нижче Приклад ілюструє цей винахід. Однак зрозуміло, що цей Приклад наведений як ілюстрація, а не обмеження, і що різні модифікації можуть бути виготовлені

фахівцем в цій галузі.

Приклад 1

Продуктування антитіл

Антитіло I за цим прикладом містить два важкі ланцюги і два легкі ланцюги, причому кожен важкий ланцюг має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 9, і кожен легкий ланцюг має амінокислотну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 10. Антитіло I може бути виготовлено і очищено як описано далі. Придатна клітина-хазяїн, така як НЕК 293 або CHO, тимчасово або стабільно трансфекується експресійною системою для секреції антитіл з використанням оптимального заздалегідь визначеного співвідношення векторів HC:LC, або одновекторною системою, яка кодує як важкий ланцюг (послідовність SEQ ID NO: 9), так і легкий ланцюг (послідовність SEQ ID NO: 10). Просвітлене середовище, в яке було секретовано антитіло, очищають із застосуванням будь-якого з багатьох широко використовуваних методів. Наприклад, середовище може бути без утруднень завантажено на колонку з протейном А чи G, яка була урівноважена сумісним буфером, таким як забуферений фосфатом фізіологічний розчин (pH 7,4). Колонку промивають для видалення неспецифічних зв'язувальних компонентів. Зв'язане антитіло елюють, наприклад, градієнтом pH (таким як від 0,1 М натрій-фосфатного буферу (pH 6,8) до 0,1 М натрій-цитратного буферу (pH 2,5)). Фракції антитіла нейтралізують (наприклад, додаванням 1/10-ої об'єму 1 М Трис-буферу при pH 8,0), виявляють, наприклад, із застосуванням SDS-PAGE (електрофорез в поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфата натрію), після чого об'єднують. Подальше очищення є факультативним, залежно від запланованого використання. Антитіло може бути сконцентроване і/або відфільтроване за стерильних умов із застосуванням звичайних способів. Розчинний агрегат і мультимери можуть бути ефективно видалені із застосуванням звичайних методів, в тому числі шляхом гель-хроматографії за розміром молекул, гідрофобної хроматографії, іонообмінної хроматографії або хроматографії на гідроксилапатитній адсорбційній колонці. Чистота антитіла після цих хроматографічних стадій є більшою ніж 99 %. Продукт може бути негайно заморожений, наприклад, при температурі -70 °C, або ліофілізований.

Визначення афінного зв'язування за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (BIAcore)

Спорідненість антитіла (K_D) до IL-23 людини, макак-крабоїдів або кролів визначали за допомогою біосенсора BIAcore 2000 і програмного забезпечення BIAevaluation з моделлю масопереносу зі зв'язуванням 1:1. Імобілізований білок (Protein A, виробництва Calbiochem) з'єднують через вільні аміногрупи з карбоксильними групами на проточних кюветах 1 і 2 біосенсорного чіпа CM4 з використанням суміші N-етил-N-(диметиламінопропіл)карбодііміду (EDC) і N-гідрокисукциніміду (NHS). Моніторинг проточних кювет здійснюють при швидкості потоку 80 мкл/хв. з використанням буфера, що містить 0,01 М HEPES-буфера, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,005 % поверхнево-активної речовини P20. Антитіло I імобілізують на проточній кюветі 2, і одержують в цілому від 40 до 60 резонансних одиниць (RU). Потім в проточні кювети 1 і 2 здійснювали багаторазові цикли впорскування зростаючих концентрацій IL-23 (від 0,62 нМ до 30 нМ для IL-23 людини і макак-крабоїдів, і від 30 нМ до 240 нМ для IL-23 кролів) з подальшою стадією регенерації з використанням буферу гліцин-HCl (pH 1,5) між кожним циклом. Проточну кювету 1 використовують як контроль для моніторингу неспецифічного зв'язування IL-23, і ці дані відображають як дані проточної кювети 2 мінус дані проточної кювети 1. Кожен цикл включає стадію захоплення антитіла з подальшою ін'єкцією IL-23 з однією концентрацією з 30 хв періодом дисоціації й потім – регенерацією. Два цикли, з введенням буферу замість IL-23, служать контролем для базового віднімання та коригування на зміщення, пов'язане з дисоціацією антитіла I з поверхні білка А. Спорідненість визначається при температурі 37 °C. Аналіз з IL-23 людини, макак-крабоїдів або кролів проводять 2 рази. Антитіло I випробують 2 рази з кожним з IL-23 мишей з концентрацією 333 нМ, з IL-23 пацюків з концентрацією 200 нМ, з IL-12 людини з концентрацією 333 нМ, з IL-27 людини з концентрацією 500 нМ або з IL-35 з концентрацією 833 нМ.

Швидкість асоціації (k_{on}) і швидкість дисоціації (k_{off}) кожного антигену оцінюють із застосуванням моделі масопереносу зі зв'язуванням 1:1. Спорідненість (K_D) обчислюють за кінетикою зв'язування відповідно до співвідношення: $K_D = k_{off}/k_{on}$.

Таблиця 2

Параметри зв'язування для Антитіла I

Антиген	Швидкість асоціації (k_{on}) (Середнє \pm середнє квадратичне відхилення) ($M^{-1}s^{-1}$) (10^6)	Швидкість дисоціації (k_{off}) (Середнє \pm середнє квадратичне відхилення) (s^{-1}) (10^{-4})	Спорідненість (K_D) (Середнє \pm середнє квадратичне відхилення) (нМ)
IL-12 людини	Без виявлюваного зв'язування	Без виявлюваного зв'язування	Без виявлюваного зв'язування
IL-23 людини	$2,43 \pm 0,16$	$0,52 \pm 0,21$	$21 \pm 9,9$
IL-27 людини	Без виявлюваного зв'язування	Без виявлюваного зв'язування	Без виявлюваного зв'язування
IL-35 людини	Без виявлюваного зв'язування	Без виявлюваного зв'язування	Без виявлюваного зв'язування
IL-23 макак-крабодів	$1,28 \pm 0,05$	$0,7 \pm 0,11$	$55 \pm 6,4$
IL-23 кролів	$0,09 \pm 0,001$	$47,9 \pm 0,4$	$53,000 \pm 1131$
IL-23 мишей	Без виявлюваного зв'язування	Без виявлюваного зв'язування	Без виявлюваного зв'язування
IL-23 пацюків	Без виявлюваного зв'язування	Без виявлюваного зв'язування	Без виявлюваного зв'язування
^a Обчислюється як $K_D = k_{off}/k_{on}$			
n=2 для кожного антигена. IL-12 випробували з концентрацією 400× у зіставленні з концентрацією виявлюваною для IL-23. IL-27 та IL-35 випробували з концентрацією 800× у зіставленні з концентрацією виявлюваною для IL-23. IL-23 мишей і пацюків випробували з концентраціями 500× і 300× у зіставленні з концентрацією виявлюваною для людського IL-23.			

При застосуванні цього методу, антитіло I спричинює залежну від концентрації реакцію зв'язування з IL-23 людини, макак-крабодів і кролів. Насичення зв'язування IL-23 досягають при концентрації 30 нМ (людина і макаки-крабодіди) і 240 нМ (кролі), із використанням 80-100 резонансних одиниць антитіла I, іммобілізованих на поверхні чіпу. За умов випробування, спорідненість зв'язування (K_D) IL-23 людини, макак-крабодів або кролів з антитілом I дорівнює 21 нМ, 55 нМ або 53000 нМ, відповідно (Таблиця 2). За цих умов IL-23 мишей, IL-23 пацюків, IL-12 людини, IL-27 людини або IL-35 людини з антитілом I не зв'язуються.

In vitro пригнічування зв'язування IL-23 з рецептором IL-23

Рекомбінантний людський IL-23R/Fc через вільні аміногрупи з'єднують з карбоксильними групами на проточній кюветі 2 біосенсорного чіпа CM4 з використанням суміші N-етил-N-(диметиламінопропіл)карбодііміду (EDC) і N-гідроксисукциніміду (NHS). Рекомбінантний людський IgG1 Fc (виробництво R&D Systems, Inc.) з'єднують, використовуючи такий самий спосіб з проточною кюветою 1 того ж самого чіпу. Мишаче антитіло проти 6X HIS (виробництво R&D Systems, Inc.) з'єднують, використовуючи такий самий спосіб з проточною кюветою 4 того ж самого чіпу. Мишаче антитіло проти 6X HIS використовують для попереднього захоплення людського IL-12Rβ1/Fc (виробництво R&D Systems, Inc.), який містить HIS-мітку. Моніторинг проточних кювет здійснюють при швидкості потоку 30 мкл/хв. з використанням буфера, що містить 0,01 М HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,005 % поверхнево-активної речовини P20. Рекомбінантний людський IL-23 попередньо інкубують протягом 90 хв. з або без додавання 16× молярного надлишку антитіла I. Кожну комбінацію інжектують крізь проточні кювети 1, 2 і 4 в загальному об'ємі 150 мкл з наступною стадією регенерації з використанням буферу гліцин-HCl (pH 1,5) між кожним випробуванням. Проточну кювету 1 використовують як контроль для моніторингу неспецифічного зв'язування IL-23 з чіпом. Для приготування нашарувань окремих сенсограм зв'язування використовують програмне забезпечення BIAevaluation.

За допомогою *in vitro* функціональних досліджень показано, що антитіло I нейтралізує людський IL-23. Крім того, антитіло I запобігає зв'язуванню IL-23 з IL-23R/Fc. Дані в Таблиці 3 показують:

- 5 (A) IL-23 зв'язується з IL-23R/Fc;
(B) Комплекс антитіло I/IL-23 не зв'язується з IL-23R/Fc;
(C) IL-23 зв'язується з IL-12Rβ1/Fc; і
(D) Комплекс антитіло I/IL-23 зв'язується з IL-12Rβ1/Fc.

Таблиця 3

Вплив антитіла I на зв'язування IL-23 з IL-23R

Цитокін	Антитіло	Зв'язування з IL-23R	Зв'язування з IL-12Rβ1
IL-23	Немає	ТАК	ТАК
IL-23	I	НІ	ТАК

10

Отже антитіло I нейтралізує IL-23, оскільки воно пригнічує зв'язування IL-23 з субодиницею IL-23R. Окрім того, антитіло I не пригнічує зв'язування IL-23 з субодиницею IL-12Rβ1.

In vitro нейтралізація IL-23 людини або макака-крабоїдів антитілом I у спленоцитах мишей

15 Для оцінки антитіла I використовують концентрацію IL-23 людини або макака-крабоїдів, що забезпечує приблизно 50 % від максимального продукування IL-17 (16 пМ). Залежність "доза-ефект" оцінюють при дозі антитіла I від 800000 пМ до 4,4 пМ. Антитіло I або контрольне антитіло IgG₄ об'єднують з IL-23 людини або макака-крабоїдів в окремій лунці протягом 90 хв. при температурі 37 °C перед додаванням до клітин (передінкубаційна суміш).

20 Спленоцити мишей лінії C57BL/6, стимульовані IL-23 та IL-2, продукують IL-17 (Aggarwal, S. et al., "Interleukin-23 Promotes a Distinct CD4 T Cell Activation State Characterized by the Production of Interleukin-17", Journal of Biological Chemistry, 278 (3): 1910-1914 2003). Спленоцити мишей ресуспендують з розрахунку 5×10^6 WBC (лейкоцити)/мл в аналітичному середовищі (середовище RPMI 1640 з L-глутаміном, що містить 10 % FBS (ембріональна бичача сироватка), 1 % замісних амінокислот, 1 мМ пірувату натрію, 100 Од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 0,00035 % 2-меркаптоетанолу, 50 нг/мл людського IL-2), і розподіляють в об'ємі 25 100 мкл/лунку в культуральному 96-лунковому планшеті. Передінкубаційну суміш антитіло I/IL-23 розподіляють з розрахунку 100 мкл/лунку, і інкубують при температурі 37 °C в 5 % CO₂. Через сорок вісім годин культуральні супернатанти перевіряють на присутність mIL-17 із застосуванням наявного у продажу набору ELISA від компанії R&D Systems (DY421) відповідно до інструкцій в наборі з використанням сдвоєних лунок на кожне розведення. IC₅₀ визначають шляхом підгонки даних за 4-параметричною кривою.

30 Спленоцити мишей продукують IL-17 у відповідь на IL-23 людини або макака-крабоїдів. Антитіло I нейтралізує IL-23 людини або макака-крабоїдів. Обчислене значення IC₅₀ становить 82±11 пМ для людського IL-23 і 120±14 пМ для IL-23 макака-крабоїдів, n=2 для кожного (Таблиця 4). Ці результати показують, що антитіло I є здатним нейтралізувати IL-23 людини або макака-крабоїдів *in vitro*.

35

Таблиця 4

IC₅₀ в *in vitro* аналізі нейтралізації IL-23 людини і макака-крабоїдів

Вид	Аналіз №	Антитіло	IC ₅₀ (пМ)
Людина	1	I	90
Людина	2	I	74
Людина		Середнє (середнє квадратичне відхилення)	82 (11)
Макака-крабоїд	3	I	110
Макака-крабоїд	4	I	130
Макака-крабоїд		Середнє (середнє квадратичне відхилення)	120 (14)

Нейтралізація людського IL-23: різко виражена, місцева

Тварин (шість мишей-самиць лінії C57BL віком вісім тижнів від компанії Jackson Labs) розміщують в клітках (мінімум 72 год. після прибуття), і годують звичайно до експерименту і протягом усього терміну дослідження. Волосяний покрив на спині мишей видаляють за допомогою електричних ножиць, і через 3 дня миші (n=10 на групу) одержують підшкірну ін'єкцію антитіла I або контрольного антитіла ізо типу IgG₄ (0,54 мг на мишу). Протягом 2 наступних днів мишам внутрішньошкірно в одному місці на одному боці спини із застосуванням голки № 29 вводять людський IL-23 (1 мкг в 50 мкл стерильного фізіологічного розчину). Стерильний фізіологічний розчин використовують як контрольний носій на іншому боці спини. Мишей умертвлюють через 24 год. після останньої ін'єкції людського IL-23, і зразки шкіри видаляють і з місця впорскування IL-23, і з місця впорскування стерильного фізіологічного розчину, на відстані щонайменше 5 мм від межі волосяного покриву. Зразки шкіри заморожують безпосередньо в рідкому азоті для дослідження мРНК.

Тотальну РНК виділяють із замороженої тканини шкіри гомогенізацією в пробірках для качалки Lysing Matrix A (виробництво Qiagen Inc./Bio101 Systems) з подальшим очищенням з використанням набору RNeasy Mini kit (виробництво Qiagen, Inc.). Концентрації РНК визначають за спектрофотометричним поглинанням при 260 нм. РНК зворотно транскрибують в кДНК з використанням набору High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (виробництво PE Applied Biosystems). Всі реакції здійснюють з потроєнням на ABI Prism 7900HT (виробництво PE Applied Biosystems) для визначення відносного вмісту досліджуваних мРНК. Набори праймерів і зондів для мишачого IL-17A (Mm00439618_m1), мишачого IL-17F (Mm00521423_m1) і мишачого кератину-16 (Mm00492979_g1) одержують від компанії PE Applied Biosystems. Вміст і 18S, і GAPD (гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа) як ендегенних контролей визначають для нормалізації варіабельності рівнів експресії генів. Дані експресії аналізують за допомогою методу дельта-дельта (Δ-Δ) Ct. Окремі значення Ct обчислюють як середнє тричі повторених вимірювань. Експерименти проводять двічі. Там, де це доречно, застосовують непарний t-критерій. P<0,05 вважається статистично значущим.

Для вивчення того, чи здатне системне введення антитіла I нейтралізувати місцеву реакцію на людський IL-23, білок людського IL-23 вводять внутрішньошкірно мишам, призначеним для дослідження негативних наслідків піддавання шкіри дії IL-23. Шкіра мишей дикого типу, яку щоденно обробляли фізіологічним розчином, не показала виявлюваних рівнів мишачого IL-17A або мишачого IL-17F.

Однак ін'єкція людського IL-23 індукує експресію мРНК мишачого IL-17A і мишачого IL-17F (Таблиця 5). Обробка антитілом I, але не ізотиповим контрольним антитілом, нейтралізувала індуковану людським IL-23 експресію мРНК IL-17A і IL-17F.

Таблиця 5. In vivo нейтралізація індукованої людським IL-23 експресії мРНК мишачого IL-17A і мишачого IL-17F

Значення Ct

	Забуферений фосфатом фізіологічний розчин		IL-23	
	IL-17A	IL-17F	IL-17A	IL-17F
Ізотиповий контроль	≥40	≥40	35,4	31,6
Антитіло I	≥40	≥40	≥40	≥40

Крім того, ін'єкція людського IL-23 індукує потовщення епідермісу, пов'язане з підвищеною експресією кератину-16, цитокератину, пов'язаного з проліферацією. Індукція кератину-16 суттєво пригнічується введенням антитіла I (кратна індукція мишачого кератину-16 становить $5,21 \pm 2,72$ для ізотипового контрольного антитіла у зіставленні з $1,23 \pm 0,72$ для антитіла I; p = 0,0003).

Ці результати разом показують, що під час in vivo дослідження різко вираженої місцевої реакції антитіло I ефективно пригнічує індуковане людським IL-23 продукування мРНК мишачого IL-17A, IL-17F і кератину-16.

Перефресна реактивність з тканиною сітківки: In vitro імуногістохімічний аналіз

Зрізи свіжозамороженої тканини сітківки людини і макак-крабодів (5-7 мкм завтовшки) нарізають із застосуванням кріостату. Зрізи фіксують в ацетоні протягом приблизно 10 хв. при кімнатній температурі, дозволяють сохнути протягом ночі при кімнатній температурі, і

зберігають при температурі приблизно -80°C до використання. Потім фіксовані ацетоном предметні стекла виймають з холодильної камери, і дозволяють висохнути протягом ночі при кімнатній температурі. Наступні стадії виконують при кімнатній температурі. Ці предметні стекла інкубують в $1\times\text{Morphosave}^{\text{TM}}$ протягом приблизно 15 хв. для збереження морфології. Предметні
 5 стекла промивають протягом 10 хв. у $1\times\text{PBS}$, після чого інкубують в $0,3\%$ H_2O_2 в $1\times\text{PBS}$ при кімнатній температурі протягом приблизно 20 хв. для гасіння активності ендогенної пероксидази. Після інкубації предметні стекла промивають двічі протягом 5 хв в $1\times\text{PBS}$. Ендогенний біотин блокують шляхом подальшої інкубації (кожна стадія тривалістю приблизно 15 хв.) в розчинах авідину і біотину. Після інкубації в біотині зрізи тканин блокують в розчині
 10 блокувального антитіла протягом 30 хв. Антитіло I або контрольний людський IgG_4 наносять на зрізи в оптимальних концентраціях ($2,5\text{ мкг/мл}$ або 5 мкг/мл) або в концентрації, яка у п'ять разів перевищує оптимальну концентрацію (25 мкг/мл), і інкубують протягом 1 год. при кімнатній температурі. Після цього предметні скла промивають, і інкубують з біотинільованим мишачим антитілом проти людського IgG_4 ($2,5\text{ мкг/мл}$) протягом 30 хв. Зв'язані комплекси першого/другого
 15 антитіл виявляють за допомогою кон'югату стрептавідину-біотину-пероксидази хрому та діамінобензидинового хромогенного субстрату.

Клітини CHO, трансфековані людським IL-23, використовують як позитивний контрольний зразок у всіх експериментах. Батьківські клітини CHO (не трансфековані) використовують як негативний контрольний зразок, і не забарвлюють. Зв'язування не спостерігається у
 20 послідовних зрізах, забарвлених ізотиповим контрольним антитілом (людський IgG_4). Антитіло I не має помітного зв'язування з тканиною сітківки.

Картування епітопів для антитіла I: аланінове сканування

Передумови картування епітопів із застосуванням антигену, що проявляється у дріжджах

Дослідження з картування епітопів проводять для визначення конкретних амінокислот в
 25 субодиноці p19 людського IL-23 (послідовність SEQ ID NO: 15), які необхідні для зв'язування антитіла I. Картування епітопів антитіла I завершують аланіновим скануванням в поєднанні з дріжджовою дисплейною платформою.

Доступні положення амінокислот субодиноці p19 людського IL-23 ідентифікують шляхом аналізу за допомогою PyMOL (вільна система молекулярної візуалізації). Доступні або частково
 30 доступні позиції субодиноці p19 IL-23 наведені в Таблиці 6. Ті позиції, які були визначені як недоступні, до цього дослідження не включені, тобто мутації піддають лише ті позиції амінокислот субодиноці p19 людського IL-23, які є доступними або частково доступними. Відповідно, досліджуються не всі позиції.

Незважаючи на те, що картування епітопів виконується тільки на субодиноці p19 IL-23
 35 (картування епітопів на субодиноці p40 IL-23 не виконують, оскільки антитіло I з субодиноцею p40 не зв'язується з утворенням зв'язку, який може бути виявлений), в дріжджовій дисплейній платформі мають бути коекспресованими як субодиноця p19, так і субодиноця p40 людського IL-23.

Конструюють одиночні аланінові мутанти субодиноці p19 людського IL-23, що проявляються
 40 у дріжджах, та визначають зв'язування антитіла для ідентифікування епітопу. Визначенням спорідненості мутантів антитіла у зіставленні з антигеном дикого типу, який проявляється у дріжджах, надає можливість визначити енергетичний внесок бічного ланцюгу амінокислоти у зв'язування антитіла.

Конструювання бібліотеки мутантів

Ген p40 клонують в розчинній експресійній плазміді, pYKY, яка має урациловий селекційний
 45 маркер. Ген субодиноці p19 клонують в дріжджовій дисплейній плазміді, pEMD3, яка містить триптофановий селекційний маркер і V5-мітку на N-кінці і якірний білок GPDL2 на C-кінці, що дозволяє проявляти її на поверхні дріжджів за наявності триптофанового селективного маркера. Сайтами рестрикції, використовуваними для клонування, є XhoI і BamHI в плазміді pYKY, і AvrII
 50 та XmaI в плазміді pEMD3, відповідно.

Аланінові мутації вводять в кожному доступному положенні і випробують на подвійне позитивне забарвлення антитілом V5 і антитілом I. Панелі аланінових мутантів p19 конструюють в плазміді pEMD3 із застосуванням сайт-спрямованого мутагенезу (мутагенез за методом
 55 Кункеля). Стисло, ssДНК вектору pEMD3, що містить урацил, продукується після трансформації в CJ236 (виробництво New England Biolabs). Одиночну колонію трансформанта вирощують протягом ночі, ssДНК "рятують" після інфікування фагом-помічником M13K07 (виробництво New England Biolabs), і очищають із використанням набору QIAprep spin M13. Олігонуклеотиди, що кодуєть аланінові мутанти, відпалюють при молярному відношенні 20:1 до урацилової матриці денатурацією при температурі 85°C протягом 5 хв., лінійною зміною температури до рівня 55°C
 60 протягом 1 год., витримуванням при температурі 55°C протягом 5 хв., і потім охолодженням на

льоді. Потім синтез другого ланцюгу завершують із використанням полімерази T4, лігази T4 і dNTPs (дезоксинуклеозид-5'-трифосфат) (виробництво Invitrogen). Реакційну суміш шляхом електропорації вводять в Top10 E. coli (виробництво Invitrogen), окремі колонії збирають, dsДНК одержують за допомогою набору QIAprep miniprep kit (виробництво Qiagen), і мутації

підтверджують шляхом секвенування. Після цього мутанти p19 котрансформують в дріжджах лінії BJ5464 (АТСС (Американська колекція типових культур)) плазмідом p40 pYKY, і вирощують в мінімальному живильному середовищі повного складу без триптофану і урацилу.

Селекція бібліотеки мутованих антигенів на втрату зв'язування антигену

Для того, щоб ідентифікувати епітоп антитіла, бібліотеку антигенів-мутантів піддають відбору на втрату зв'язування антитіла із застосуванням проточної цитометрії. Клітини дріжджів забарвлюють двома антитілами, одне з яких картує, а інше ні. Антигени-мутанти, що проявляються у дріжджах, відбирають за втратою зв'язування з першим антитілом, але збереженням зв'язування з другим антитілом. Збереження зв'язування другого антитіла гарантує, що мутанти вибираються на основі мутацій в епітопі, і це не є вибором розгорнутих чи погано проявлених мутантів.

Для цього дослідження, першим антитілом (тобто антитілом, епітоп якого картується) є антитіло I, а друге антитіло являє собою антитіло проти V5. Для початку, дріжджі забарвлюють антитілом проти V5 (виробництво Invitrogen) і антитілом I, та потім другим козячим антитілом проти мишачого IgG_{2a} (виробництво Invitrogen, Alexa Fluor® 647) для виявлення антитіла проти V5 (експресія/проявлення) та козячим антитілом проти людського каппа RPE (базальний шар пігментованого епітелію сітківки) (виробництво Southern Biotech) для виявлення антитіла I. Дріжджі аналізують за допомогою проточної цитометрії на Becton Dickinson LSRII, де 50000 подій збирають на основі стробіювання клітин світлорозсіюванням, та забарвлювання V5/Alexa647 і антитілом I/PE (фітоеритрин R). Аналіз даних щодо зв'язування кожного з антитіла I і антитіла проти V5 проводять з використанням програмного забезпечення FACSDiva V6.1.2, яке обчислює відсоток подвійно забарвлених дріжджових клітин.

Результати

Завдяки проявленому розділенню білка, у найкращому разі 50 % дріжджів будуть проявляти субодиницю p19 IL-23. Виявлення подвійно позитивних клітин дріжджів показує, що досліджуване положення амінокислоти не є пов'язаним зі зв'язуванням антитіла I з IL-23. Виявлення лише забарвлення V5 демонструє, що білок експресується і проявляється на поверхні дріжджів і що досліджуване положення амінокислоти є важливим для зв'язування антитіла I. Встановлено, що ті залишки, які демонструють > 50 % зниження подвійного позитивного забарвлення в порівнянні з сусідніми залишками, є важливими для зв'язування. Ці залишки виділені в Таблиці 7. Деякі положення демонструють відсутність зв'язування як з V5, так і з антитілом I, що дозволяє зробити припущення про те, що амінокислотний залишок може бути необхідним для конформації білка. Систематичне дослідження кожного доступного або частково доступного положення амінокислоти в субодиниці p19 IL-23 (послідовність SEQ ID NO: 15) показує, що положення 94P, 95S, 97L, 98P, 99D, 123W, 130S, 133P і 137W є важливими для зв'язування антитіла I з людським IL-23 на основі зменшеної кількості подвійного позитивного забарвлювання для зв'язування V5 і антитіла I (Таблиця 7).

Картування епітопів також виконують з використанням заміни водень-дейтерій. Результати картування епітопів з використанням цієї заміни водень-дейтерій показують, що епітоп антитіла I є конформаційним епітопом в межах залишків 81-99 і 115-140 людського IL-23 (послідовність SEQ ID NO: 15).

Таблиця 6

Доступна або частково доступна амінокислотна
послідовність зрілої субодиниці p19 людського IL-23

Положення	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Амінокислота	R	A	V	P	G	G	S	S	P	A
Доступна/Частково доступна	x	x	x	x	x	x	x	x		x
Положення	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Амінокислота	W	T	Q	C	Q	Q	L	S	Q	K
Доступна/Частково доступна		x	x		x	x	x		x	x
Положення	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Амінокислота	L	C	T	L	A	W	S	A	H	P
Доступна/Частково доступна			x	x			x		x	x
Положення	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Амінокислота	L	V	G	H	M	D	L	R	E	E
Доступна/Частково доступна	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Положення	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Амінокислота	G	D	E	E	T	T	N	D	V	P
Доступна/Частково доступна	x	x	x	x	x	x	x	x		x
Положення	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Амінокислота	H	I	Q	C	G	D	G	C	D	P
Доступна/Частково доступна			x		x	x	x		x	
Положення	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
Амінокислота	Q	G	L	R	D	N	S	Q	F	C
Доступна/Частково доступна	x	x		x	x	x		x	x	
Положення	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Амінокислота	L	Q	R	I	H	Q	G	L	I	F
Доступна/Частково доступна		x	x			x			x	x
Положення	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
Амінокислота	Y	E	K	L	L	G	S	D	I	F

Продовження таблиці 6

Доступна/Частково доступна		x	x	x		x	x	x		
Положення	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Амінокислота	T	G	E	P	S	L	L	P	D	S
Доступна/Частково доступна	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Положення	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
Амінокислота	P	V	G	Q	L	H	A	S	L	L
Доступна/Частково доступна			x	x		x	x	x		x
Положення	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
Амінокислота	G	L	S	Q	L	L	Q	P	E	G
Доступна/Частково доступна	x			x	x		x		x	x
Положення	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
Амінокислота	H	H	W	E	T	Q	Q	I	P	S
Доступна/Частково доступна	x	x		x	x	x	x	x	x	x
Положення	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
Амінокислота	L	S	P	S	Q	P	W	Q	R	L
Доступна/Частково доступна	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Положення	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
Амінокислота	L	L	R	F	K	I	L	R	S	L
Доступна/Частково доступна	x	x	x	x	x			x		
Положення	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
Амінокислота	Q	A	F	V	A	V	A	A	R	V
Доступна/Частково доступна							x	x	x	x
Положення	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
Амінокислота	F	A	H	G	A	A	T	L	S	P
Доступна/Частково доступна	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Таблиця 7

Дані картування епітопів для антитіла I

Положення амінокислот	% подвійного позитивного забарвлення (V5 та антитіло I)
87	26
88	27
91	37
92	29
94	16
95	12
96	35
97	7
98	10
99	7
100	22
118	31
119	28
120	26
121	28
122	31
123	5
124	26
125	18
126	22
127	25
129	21
130	4
133	1
134	16
136	15
137	2
140	23

Фізико-хімічні властивості антитіла проти IL-23

5 Антитіло I має фармацевтично прийнятну розчинність, хімічну стабільність і фізичну стабільність.

А. Розчинність

Достатньо висока розчинність є бажаною для забезпечення зручного дозування. Наприклад, доза 1 мг/кг, введена шляхом 1,0 мл ін'єкції 100 кг пацієнту, буде потребувати розчинності, яка становить 100 мг/мл. Крім того, бажаним також є зберігання незмінним антитіла в мономерному стані без агрегації високомолекулярних (HMW) сполук при високій концентрації.

10 Антитіло I приготують з концентрацією приблизно 1 мг/мл у фізіологічному буфері (PBS, pH 7,4) і за двох умов виготовлення лікарського засобу (10 мМ цитрату, pH 6, плюс-мінус 150 мМ NaCl). Антитіло центрифугують при 2000× G через 30 кДа фільтр Amicon Ultra (виробництво Millipore, UFC803204) для концентрування антитіла при одночасному збереженні тих же самих

15 буферних умов. Центрифугування продовжується до досягнення межі розчинності або до досягнення мінімального об'єму, який пристрій здатний вміщувати. За всіх трьох умов досягається розчинність, більша ніж 100 мг/мл.

Гель-хроматографію за розміром молекул (SEC) застосовують для оцінки того, чи відбулось

збільшення вмісту високомолекулярного (HMW) полімеру після концентрування композицій на основі вказаного антитіла до концентрації більше ніж 100 мг/мл. Вихідний розчин антитіла і концентрований розчин антитіла вводять в колонку TSK3000 SWXL (виробництво TOSOH Bioscience) з використанням рухомої фази, що складається з 12 мМ фосфату, 500 мМ NaCl, pH 7,4. За будь-яких випробуваних умов виготовлення композиції значного підвищення вмісту розчинного полімеру не спостерігається (<0,6 % високомолекулярного полімеру за результатами SEC).

В. Хімічна стабільність

Антитіло I вводять у композицію з концентрацією 1 мг/мл у 10 мМ буфері (10 мМ цитрату для pH 4, 5, 6 і 7; 10 мМ Трис-буферу для pH 8), і інкубують протягом 4 тижнів при температурі 4 °С, 25 °С або 40 °С. Моніторинг хімічної стабільності здійснюють із застосуванням SEC (дивись спосіб, наведений вище), катіонообмінної хроматографії [CEX; Dionex, із використанням градієнта між буфером А (20 мМ фосфату натрію, pH 5,8, 0,36 % CHAPS) і буфером В (20 мМ фосфату натрію, pH 5,8, 0,36 % CHAPS, 200 мМ хлориду натрію)], CE-SDS (капілярний електрофорез у присутності додецилсульфату натрію) (біоаналізатор Agilent з білковим чіпом 230 за відновлювальних умов) і визначення LC-MS (рідинна хроматографія/мас-спектрометрія) характеристик ферментативно розщепленого матеріалу.

Антитіло I є стабільним щодо утворення полімеру (SEC) у межах pH 5-8 навіть після 4 тижнів при температурі 40 °С. При pH 4 значна кількість полімеру спостерігається при температурі 40 °С, але не при температурі 25 °С (4 тижні). Очікуваний гідроліз пептидних зв'язків або скорочення є очевидним при pH 4 (40 °С) за даними CE-SDS. Рівень деградації при pH 4,0 є типовим для антитіл IgG₄. При значеннях pH більших ніж 4 (pH 5-8) рівні деградації є низькими, та однаково з перебігом часу не змінюються і отже, швидше за все, являють собою фонові завади.

Ця гіпотеза узгоджується з LC-MS аналізом, який не виявляє скорочення при pH 6, і у той самий час визначає типовий рівень скорочення антитіла при pH 4. Моніторинг змін заряджених варіантів здійснюється із застосуванням CEX. Вихідний матеріал має три значних основних піки, які зводять до мінімального рівня роздільну здатність цього аналізу. Загалом, зразки, піддані стресу температурою 25 °С і 40 °С, є більшими ніж контроль при 4 °С, але рівні зі збільшенням часу інкубації не зростають (фактично, в багатьох випадках знижуються). У відсотках зміна при pH 6,0 (4 тижні при температурі 25 °С мінус контроль при температурі 4 °С) становить 2,5 %. LC-MS аналіз вказує на те, що більшість змін знаходиться за межами CDR і на рівні, типовому для інших антитіл IgG₄. Три ідентифіковані сайти деградації CDR змінилося менше ніж на 1 % (pH 6; 4 тижні при температурі 25 °С мінус контроль при 4 °С). Відсутність сайтів деградації в межах CDRs також узгоджується з незначною зміною спорідненості (BIACore) або стехіометрії після чотирьох тижнів інкубації при 40 °С при pH 4, 6 або 8.

С. Фізична стабільність

i) Стабільність при заморожуванні-відтаюванні

Антитіло I вводять у композицію за таких умов:

- а) 1 мг/мл у 10 мМ цитраті, pH 6,0;
- б) 1 мг/мл у 10 мМ цитраті, pH 6,0, 0,02 % Твін-80;
- с) 1 мг/мл або 50 мг/мл в 10 мМ цитраті, pH 6,0, 150 мМ NaCl; і
- д) 1 мг/мл або 50 мг/мл в 10 мМ цитраті, pH 6,0, 150 мМ NaCl, 0,02 % Твін-80.

Ці композиції поміщають в контейнер для заморожування, відрегульований на 1 °С/хв. (виробництво Nalgene, 5100-0001), і заморожують в морозильній камері при температурі -80 °С протягом щонайменше восьми годин, після чого виймають, і відтаюють при кімнатній температурі протягом щонайменше восьми годин. Цей цикл заморожування/відтаювання повторюють до трьох разів. Зразки видаляють після одного і трьох циклів заморожування/відтаювання, і аналізують на вміст високомолекулярного полімеру із застосуванням SEC (дивись метод SEC, описаний в наведеній вище частині А) і на утворення нерозчинних частинок за допомогою лічильника частинок в рідині HIAC (виробництво Pacific Scientific з пристроєм малого об'єму). Після трьох циклів заморожування/відтаювання за будь-яких умов випробування значного збільшення утворення високомолекулярного полімеру не спостерігається. Для композиції з концентрацією 1 мг/мл, значне збільшення кількості частинок в рідині (лічильник частинок в рідині HIAC) спостерігається лише в композиціях, які не містять Твін-80. При концентрації 50 мг/мл кількість частинок була такою ж, як і у інших антитіл IgG₄ з хорошими характеристиками, причому кількість частинок (≥10 мкм) становила приблизно 1500 імпульсів/мл без Твін-80 і зменшувалась до приблизно 280 з Tween-80.

ii) Утримання в статичному стані при високій концентрації

Антитіло являє собою композицію з концентрацією 50 мг/мл за таких умов:

а) 10 мМ цитрату, рН 6,0, 150 мМ NaCl; і

б) 10 мМ цитрату, рН 6,0, 150 мМ NaCl, 0,02 % Твін-80.

Ці композиції утримуються в статичному стані впродовж 4 тижнів при 4 °С і 25 °С. Зміна кількості частинок в рідині (лічильник частинок в рідині HIAC, виробництво Pacific Scientific, модель 9703, з пристроєм малого об'єму) визначають через 4 тижні при температурі 25 °С.

Кількість частинок (≥ 10 мкм) за лічильником частинок в рідині HIAC для композицій, що містять Твін, у середньому становила 290 імпульсів/мл (270 та 310), і була дещо більшою, 804 імпульси/мл (728 та 880), для композицій без Твін. Ці результати є типовими для інших антитіл IgG₄, які демонструють хорошу фізичну стабільність. Ці дві композиції також зберігались в скляних пробірках, замість стандартних пластикових еппендорфівських пробірок. Кількість частинок у зразках, що зберігались у склі, є у 4-8 разів меншою (в середньому 35 імпульсів/мл і 191 імпульс/мл для композицій з Твін і без Твін, відповідно).

Лістинг послідовностей

CDR важкого ланцюгу

SEQ ID NO: 1 GYKFTRYVMH

SEQ ID NO: 2 YINPYNDGTNYNEKFKG

SEQ ID NO: 3 ARNWDGTL

CDR легкого ланцюгу

SEQ ID NO: 4 KASDHILKFLT

SEQ ID NO: 5 GATSLET

SEQ ID NO: 6 QMYWSTPFT

Варіабельні ділянки важкого ланцюга

SEQ ID NO: 7 (Антитіло I)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYKFTRYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTNYNE
KFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNWDGTLWGQGTITVTVSS

Варіабельні ділянки легкого ланцюга

SEQ ID NO: 8 (Антитіло I)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASDHILKFLTWYQQKPKGKAPKLLIYGATSLETGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQMYWSTPFTFGGGTKVEIK

Повноскладовий важкий ланцюг

SEQ ID NO: 9 (Антитіло I)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYKFTRYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTNYNE
KFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNWDGTLWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPC
SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYYT
CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNNHYTQKSLSLSLG

Повноскладовий легкий ланцюг

SEQ ID NO: 10 (Антитіло I)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASDHILKFLTWYQQKPKGKAPKLLIYGATSLETGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQMYWSTPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC

Нуклеотидні послідовності

Варіабельна ділянка важкого ланцюгу

SEQ ID NO: 11 (Антитіло I)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCT
CCTGCAAGGCTTCTGGATATAAATTCACCTCGTTATGTTATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGA
CAAGGGCTTGAGTGGATGGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTACTAATACTACAATGAGAAGTT
CAAAGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAG
CCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAACTGGGACACAGGCCTCTGGGG
CCAAGGCACCACTGTACAGTCTCCTCA.

Нуклеотидні послідовності

Варіабельні ділянки легкого ланцюгу

SEQ ID NO: 12 (Антитіло I)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
CACTTGCAAGGCAAGTGACCACATTCTCAAATTTTAACTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAG
CCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCAACCAGTTTGGAACTGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGG
CAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCT

ACTACTGTCAAATGTATTGGAGTACTCCGTTACAGTTCGGAGGGGGGACCAAGGTGGAATAAA
A

Нуклеотидна послідовність

Повноскладовий важкий ланцюг

5 SEQ ID NO: 13 (Антитіло I)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCT
CCTGCAAGGCTTCTGGATATAAATTCACCTCGTTATGTTATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGA
CAAGGGCTTGAGTGGATGGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTACTAACTACAATGAGAAGTT
CAAAGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAG
10 CCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAACTGGGACACAGGCCTCTGGGG
CCAAGGCACCACTGTACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCG
CCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
CCCGAACCCTGAGCGGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCG
GCTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT
15 TGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAG
AGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCCTGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACC
ATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA
CGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATG
GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTG
20 TGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGG
TCTCCAACAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
AGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGGCA
GCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAC
25 AGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT

Нуклеотидна послідовність

Повноскладовий легкий ланцюг

SEQ ID NO: 14 (Антитіло I)

30 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
CACTTGCAAGGCAAGTGACCACATTCTCAAATTTTAACTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAG
CCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCAACCAGTTTGGAACTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGG
CAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTT
ACTACTGTCAAATGTATTGGAGTACTCCGTTACGTTCCGAGGGGGGACCAAGGTGGAATAAA
35 ACGAAGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGATGAGCAGATTGAAATCTGGAA
CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT
GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCT
ACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAG
40 AGTGC

Білкові послідовності

Амінокислотна послідовність зрілої субодиниці p19 людського IL-23

SEQ ID NO: 15

RAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLAWSAHPLVGHMDLREEGDEETTNDVPHIQCGDGDGPQG
45 LRDNSQFCLQRHQGLIFYEKLLGSDIFTGEPSSLPSVQGLHASLLGLSLLQPEGHHWETQQIPSL
SPSQPWQRLLLRFKILRSLQAFVAVAAARVFAHGAATLSP.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 50 1. Антитіло, яке зв'язується з субодиницею p19 людського IL-23 і яке містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, при цьому згаданий легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), і згаданий важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), причому амінокислотна послідовність LCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 8 і амінокислотна послідовність HCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 7.
- 55 2. Антитіло за п. 1, яке містить дві варіабельні ділянки легкого ланцюга (LCVR) і дві варіабельні ділянки важкого ланцюга (HCVR), причому амінокислотна послідовність кожної LCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 8 і амінокислотна послідовність кожної HCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 7.

3. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що амінокислотна послідовність легкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 10 і амінокислотна послідовність важкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 9.
4. Антитіло за п. 3, яке містить два легкі ланцюги і два важкі ланцюги, причому амінокислотна послідовність кожного легкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 10 і амінокислотна послідовність кожного важкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 9.
5. Ізольований полінуклеотид, що кодує антитіло за будь-яким з пп. 1-4.
6. Ізольований полінуклеотид за п. 5, який **відрізняється** тим, що варіабельна ділянка важкого ланцюга (HCVR) кодується послідовністю SEQ ID NO: 11 і варіабельна ділянка легкого ланцюга (LCVR) кодується послідовністю SEQ ID NO: 12.
10. 7. Ізольований полінуклеотид за п. 5 або п. 6, який **відрізняється** тим, що важкий ланцюг кодується послідовністю SEQ ID NO: 13 і легкий ланцюг кодується послідовністю SEQ ID NO: 14.
8. Полінуклеотид за будь-яким з пп. 5-7, який **відрізняється** тим, що згаданий полінуклеотид є функціонально зв'язаним з контрольною послідовністю експресії.
15. 9. Вектор, який містить полінуклеотид за п. 8.
10. Рекombінантна клітина-хазяїн, трансформована полінуклеотидом за будь-яким з пп. 5-7, яка **відрізняється** тим, що згадана клітина здатна експресувати антитіло, яке містить важкий ланцюг і легкий ланцюг, при цьому амінокислотна послідовність важкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 9 і амінокислотна послідовність легкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 10.
20. 11. Рекombінантна клітина-хазяїн за п. 10, яка **відрізняється** тим, що згадана клітина-хазяїн являє собою клітину-хазяїна ссавця, вибрану з групи, яка складається з клітин CHO, NSO, HEK293 і COS.
12. Спосіб продукування антитіла, яке зв'язується з субодиницею p19 людського IL-23 і яке містить важкий ланцюг і легкий ланцюг, при цьому згаданий важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9 і згаданий легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10, і згаданий спосіб включає стадії:
25. а) культивування рекombінантної клітини-хазяїна за п. 10 або п. 11 за таких умов, що згадане антитіло експресується; і
30. б) виділення експресованого антитіла зі згаданої клітини-хазяїна.
13. Спосіб продукування антитіла, яке зв'язується з субодиницею p19 людського IL-23 і яке містить важкий ланцюг і легкий ланцюг, при цьому амінокислотна послідовність важкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 9 і амінокислотна послідовність легкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 10, і згаданий спосіб включає стадії:
35. а) культивування рекombінантної клітини-хазяїна, що містить першу полінуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептидну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 9, і другу полінуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептидну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 10, за таких умов, що згадані поліпептидні послідовності експресуються; і
40. б) виділення зі згаданої клітини-хазяїна антитіла, що містить важкий ланцюг і легкий ланцюг, при цьому поліпептидна послідовність згаданого важкого ланцюга представлена послідовністю SEQ ID NO: 9 і поліпептидна послідовність згаданого легкого ланцюга представлена послідовністю SEQ ID NO: 10.
14. Антитіло, продуковане із застосуванням способу за п. 12 або п. 13.
45. 15. Фармацевтична композиція, що містить антитіло за будь-яким з пп. 1-4 і п. 14 та один або декілька фармацевтично прийнятних носіїв, розріджувачів або наповнювачів.
16. Спосіб лікування або запобігання аутоімунному або запальному стану у пацієнта, який включає введення пацієнту, який потребує цього, ефективної кількості антитіла за будь-яким з пп. 1-4 і п. 14, який **відрізняється** тим, що згаданий стан вибирають з групи, яка складається з розсіяного склерозу, ревматоїдного артриту, псоріазу, запальної хвороби кишечника, анкілозуючого спондиліту, реакції "трансплантат-проти-хазяїна", вовчаку та метаболічного синдрому.
50. 17. Спосіб лікування або запобігання раку у пацієнта, який включає введення пацієнту, який потребує цього, ефективної кількості антитіла за будь-яким з пп. 1-4 і п. 14.
55. 18. Спосіб лікування раку у пацієнта за п. 17, де згаданим раком є меланома, рак ободової кишки, рак яєчника, рак голови і шиї, рак легенів, рак молочної залози або рак шлунка.
19. Антитіло за будь-яким з пп. 1-4 і п. 14 для застосування в терапії.
20. Антитіло за будь-яким з пп. 1-4 і п. 14 для застосування у лікуванні аутоімунного або запального стану, при цьому згаданий стан вибирають з групи, яка складається з розсіяного

склерозу, ревматоїдного артриту, псоріазу, запальної хвороби кишечника, анкілозуючого спондиліту, реакції "трансплантат-проти-хазяїна", вовчаку та метаболічного синдрому.

21. Антитіло за будь-яким з пп. 1-4 і п. 14 для застосування у лікуванні раку.

22. Антитіло для застосування за п. 21, де згаданим раком є меланома, рак ободової кишки, рак яєчника, рак голови і шиї, рак легенів, рак молочної залози або рак шлунка.