

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **048249**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | | |
|---------------------------------------|---------------|------------------------------|
| (45) Дата публикации и выдачи патента | (51) Int. Cl. | <i>C07K 16/24</i> (2006.01) |
| 2024.11.12 | | <i>C07K 16/46</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки | | <i>C07K 19/00</i> (2006.01) |
| 202290414 | | <i>C12N 15/13</i> (2006.01) |
| (22) Дата подачи заявки | | <i>C12N 15/62</i> (2006.01) |
| 2020.07.28 | | <i>C12N 15/63</i> (2006.01) |
| | | <i>A61K 39/395</i> (2006.01) |
| | | <i>G01N 33/50</i> (2006.01) |
| | | <i>A61P 1/04</i> (2006.01) |
| | | <i>A61P 37/00</i> (2006.01) |

(54) **АНТИЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К ДОМЕНУ БЕЛКА Р40 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

- | | |
|--|---------------------|
| (31) 201910706137.1; 201911040745.X;
201911171754.2 | (56) CN-A-103275222 |
| (32) 2019.07.30; 2019.10.29; 2019.11.25 | CN-A-109400709 |
| (33) CN | CN-A-102177178 |
| (43) 2022.05.13 | CN-A-101379085 |
| (86) PCT/CN2020/105039 | |
| (87) WO 2021/018114 2021.02.04 | |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АКЕСО БАЙОФАРМА, ИНК (CN) | |
| (72) Изобретатель:
Ся Юй, Ван Чжунминь Максвелл,
Чжан Пэн, Ли Байюн (CN) | |
| (74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU) | |

-
- (57) Настоящее изобретение относится к антителу для лечения или профилактики аутоиммунных заболеваний. Антитело по настоящему изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 24, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO : 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 25.

B1

048249

048249

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к области медицины и, в частности, относится к моноклонально-му антителу для блокирования функции домена белка р40 интерлейкина IL-12/IL-23 и его применению.

Уровень техники

Интерлейкин 12 (IL-12), также известный как фактор созревания цитотоксических лимфоцитов (CLMF) или фактор стимуляции естественных киллеров (NKSF), является членом семейства интерлейкинов. IL-12 имеет уникальную гетеродимерную структуру и представляет собой гликозилированную пептидную цепь (с относительной молекулярной массой 75000 Дальтон), образованную путем ковалентного связывания двух белковых доменов, р40 и р35, через дисульфидную связь. Он имеет тяжелую цепь (р40), состоящую из 306 аминокислот и включающую 10 цистеиновых остатков и 4 потенциальных сайта гликозилирования, и легкую цепь (р35), состоящую из 197 аминокислот и включающую 7 цистеиновых остатков и 3 потенциальных сайта гликозилирования.

Интерлейкин 23 (IL-23), новый член семейства цитокинов интерлейкина-12 (IL-12), открытый в 2000 г. Orpmann et al., представляет собой биологически активный сложный цитокин, образованный ковалентным связыванием домена белка р 19 и домена белка р40 IL-12 через дисульфидную связь. IL-23 может секретироваться активированными антигенпрезентирующими клетками и дендритными клетками. IL-23 связывается со своими рецепторами IL-23R и IL-12Rβ1, но не с IL-12Rβ2 (Orpmann B et al., *Immunity*, 2000, 13(5): 715-725).

IL-23 и IL-12 имеют одни и те же сигнальные пути, такие как Янус-киназы Тук2, Jak2 и STAT, но каждый из них влияет на разные Т-клетки. IL-23 индуцирует острую пролиферацию Т-клеток памяти CD4⁺, тогда как IL-12 стимулирует пролиферацию "девственных" CD4⁺ Т-клеток. Подобно IL-12, IL-23 человека стимулирует выработку и пролиферацию IFN-γ в РНА-активированных Т-клетках и CD45RO⁺ Т-клетках. Противодействуя общей субъединице р40 IL-12 и IL-23, можно одновременно эффективно противодействовать путям IL-12 и IL-23.

Интерлейкин 12 в основном продуцируется дендритными клетками, макрофагами, В-лимфоцитами и некоторыми другими антигенпрезентирующими клетками (APC), и он может усиливать цитотоксичность естественных киллеров (NK клеток) и цитотоксических Т-клеток (Тс клеток), стимулировать покоящиеся или активированные Т-клетки и NK клетки на продуцирование интерферона-γ (IFN-γ), и способствовать дифференциации Th0 в Th1. Он также способствует секреции IFN-γ и IL2 Th1-клетками для опосредования клеточных иммунных ответов, индуцирует Т-клетки и NK-клетки на продуцирование IFN-γ и обеспечивает функцию экстрамедуллярного кроветворения. IL-12 играет чрезвычайно важную роль как в раннем неспецифическом иммунитете, так и в последующих антиген-специфических адаптивных иммунных процессах в организме и является многофункциональным иммунным регулятором (Manetti R et al., *Journal of Experimental Medicine*, 1993, 177(4): 1199-1204). Роль IL-12 в аутоиммунной индукции заключается в следующем: (1) способствует дифференциации и пролиферации антигенспецифических клеток Th1 с образованием множества цитокинов, и усилению иммунного ответа типа Th1 и (2) стимулирует мононуклеарные макрофаги с образованием различных активных сред, усиливает цитотоксичность иммунокомпетентных клеток и вызывает самоповреждение тканей; IL-12 также участвует в опосредованном антителами аутоиммунитете.

IL-23 играет важную роль в различных иммунологических заболеваниях и, как полагают, участвует в возникновении псориаза. Накопление аномальных IL-2 и TNF-α в очаге поражения кожи при псориазе ускоряет возникновение и развитие псориаза, и считается, что лимфоциты в очаге поражения кожи секретируют множество цитокинов и, таким образом, образуется огромная клеточная сеть, в основном состоящая из Th1 цитокинов, что является важной патологической основой заболевания. Th1 цитокины, секретируемые DC, по-видимому, являются иницирующими факторами начала псориаза, и зрелые DC могут повышать экспрессию IFN-α и IL-12. Конкретный механизм действия психических, генетических и инфекционных факторов в начале заболевания неизвестен. Saint-Mezard et al. обнаружили, что психический стресс способствует агрегации кожных DC, усиливая отсроченный аллергический ответ кожи на гаптены. Экспериментально подтверждено, что IL-23 также действует на воспалительные реакции, индуцированные DC, но неясно, является ли он прямым воспалительным фактором. IL-12 индуцирует начало псориаза, опосредуя Т-клетки на поверхности кожи через антигены кожных лимфоцитов, и Rosmarin et al. проанализировали структуру, рецептор и функцию IL-12 и предположили, что псориаз можно лечить путем изменения уровней IL-12 (Rosmarin D et al., *Journal of Drugs in Dermatology*, 2005, 4(3): 318-325).

Системная красная волчанка (SLE) является сложным системным аутоиммунным заболеванием. В настоящее время в Китае нет эффективных средств лечения для клинического лечения, и обычное лечение в основном включает гормоны и иммунодепрессанты. STELARA® (устекинумаб), продукт известной фармацевтической компании Johnson&Johnson, является полностью антагонистом IL-12 и IL-23 человека, который был одобрен U.S. FDA для лечения SLE, демонстрируя эффективность анти-IL-12 р40 антител при лечении SLE (Janssen R&D's STELARA (ustekinumab) Shows Positive Results in Treatment of Systemic Lupus Erythematosus in Phase II Trial).

Таким образом, IL-12 и IL-23 чрезвычайно важны для аутоиммунной индукции и поддержания им-

мунного ответа, поэтому любая часть блокирования продуцирования или передачи сигналов IL-12 и IL-23 может предотвратить или сдержать возникновение и развитие аутоиммунного заболевания.

Структурно и IL-12 и IL-23 имеют домен белка p40, и моноклональное антитело, специфически связывающееся с доменом белка p40, может быть использовано в качестве блокатора путей IL-12 и IL-23, таким образом, являясь новым лекарственным средством для лечения аутоиммунных заболеваний (таких как бляшечный псориаз и системная красная волчанка).

Язвенный колит является заболеванием IBD и в основном характеризуется иммунной дисфункцией. Он характеризуется сложными клиническими патологическими изменениями, длительным течением заболевания и повторяющимися приступами, и является иммунным заболеванием со сложным болезненным состоянием. Более половины пациентов получали обычную или биологическую терапию и не почувствовали облегчения. Язвенный колит является результатом комбинированного действия экзогенных факторов и факторов хозяина в определенном генетическом контексте. Поражения обычно локализируются в сигмовидной и прямой кишках и могут распространяться на нисходящую толстую кишку или даже на всю толстую кишку. Течение заболевания длительное, часто повторные приступы. Заболевание встречается в любом возрасте, но чаще всего в возрасте 20-30 лет. Ввиду особенностей язвенного колита существует потребность в поиске более эффективных лекарственных средств на основе антител для лечения пациентов с язвенным колитом.

Сущность изобретения

Авторы изобретения разработали, на основе кристаллических структур IL-12/IL-23 p40 и с использованием искусственного интеллекта, технологию моноклонального антитела для разработки последовательности антитела, провели предварительный скрининг антитела с помощью таких способов, как ELISA, и, наконец, отобрали антитело с наилучшей эффективностью в качестве кандидатного антитела для последующего фармакодинамического исследования.

Кроме того, авторы изобретения получили гуманизированные антитела против домена белка IL-12/IL-23 p40 человека (например, гуманизированные антитела, называемые H5L9, H5L10, H5L11, H5L12, H5L14 и H8L15).

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что антитела могут специфически связываться с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека и проявлять хорошую связывающую активность.

Кроме того, изобретатели неожиданно обнаружили, что описанные в настоящем документе антитела могут эффективно блокировать связывание домена белка IL-12/IL-23 p40 человека с рецепторами клеточной поверхности IL-12R β 1 и IL-23R и ингибировать IL-23-индуцированную секрецию IL-17A мононуклеарными лимфоцитами периферической крови человека.

Авторы изобретения также неожиданно обнаружили, что описанные в настоящем документе антитела могут эффективно связываться с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека, блокировать связывание домена белка IL-12/IL-23 p40 человека с лигандами IL-12R β 1 и IL-23R и ингибировать активацию сигнальных путей ниже IL-12/IL-23. Их можно использовать для получения лекарственных средств для профилактики и лечения аутоиммунных заболеваний (например, бляшечного псориаза или системной красной волчанки) и язвенного колита (например, рефрактерного или рецидивирующего).

Аминокислотные последовательности областей CDR указанных выше антител анализируют техническими средствами, хорошо известными специалистам в данной области техники, например, с помощью базы данных VBASE2.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что области CDR антитела ответственны за специфичность связывания антитела с антигеном. Учитывая известные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей антитела, существует несколько способов определения областей CDR антитела, включая системы нумерации Kabat, IMGT, Chothia и AbM.

В частности, система нумерации AbM: способ AbM для определения CDR был получен из родственного исследования Martin (Martin ACR, Cheatham JC, Rees AR (1989) Modelling antibody hypervariable loops: A combined algorithm. Proc Natl Acad Sci USA 86: 9268-9272), и этот способ объединяет частичные определения способов Kabat и Chothia.

Система нумерации Kabat: см., например, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991.

Система нумерации Chothia: см., например, Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; Chothia et al. (1989), Nature 342: 878-883.

Система нумерации IMGT: см., например, Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27: 55-77, 2003.

Однако применение всех определений CDR для антитела или его варианта должно подпадать под действие терминов, определенных и используемых в настоящем документе. Если аминокислотная последовательность переменной области антитела известна, специалисты в данной области техники обычно могут определить, какие остатки составляют конкретный CDR, не полагаясь на какие-либо экспериментальные данные, помимо самой последовательности. Подходящие аминокислотные остатки CDR, определенные системами нумерации CDR Kabat и Chothia, перечислены ниже для сравнения. Точное количество остатков, составляющих конкретную CDR, будет варьироваться в зависимости от последовательно-

сти и размера этой CDR.

Предпочтительно, антитела H5L9, H5L10, H5L11, H5L12 и H5L14, описанные в настоящем документе, имеют одинаковую HCDR1-3:

Аминокислотные последовательности 3 областей HCDR варибельной области тяжелой цепи следующие:

HCDR1: GYSFTTYW (SEQ ID NO: 3)

HCDR2: MSPVDSI (SEQ ID NO: 4)

HCDR3: ARRRPGQGYDFD (SEQ ID NO: 5)

Антитело H5L9, описанное в настоящем документе, имеет LCDR1-3: Аминокислотные последовательности 3 областей CDR варибельной области легкой цепи следующие:

LCDR1: QNVGSW (SEQ ID NO: 8)

LCDR2: ASS (SEQ ID NO: 9)

LCDR3: QQYDIYPFT (SEQ ID NO: 10)

Антитело H5L10, описанное в настоящем документе, имеет LCDR1-3: Аминокислотные последовательности 3 областей CDR варибельной области легкой цепи следующие:

LCDR1: QSVGSW (SEQ ID NO: 19)

LCDR2: ASN (SEQ ID NO: 21)

LCDR3: QQYNIYPYT (SEQ ID NO: 22)

Антитела H5L11 и H5L12, описанные в настоящем документе, имеют один и тот же LCDR1-3:

Аминокислотные последовательности 3 областей CDR варибельной области легкой цепи следующие:

LCDR1: QSVSSW (SEQ ID NO: 20)

LCDR2: ASN (SEQ ID NO: 21)

LCDR3: QQYNIYPYT (SEQ ID NO: 22)

Описанное в настоящем документе антитело H5L14 имеет LCDR1-3: Аминокислотные последовательности 3 областей CDR варибельной области легкой цепи следующие:

LCDR1: QSVSSW (SEQ ID NO: 20)

LCDR2: ASN (SEQ ID NO: 21)

LCDR3: QQYNIYPFT (SEQ ID NO: 23)

Описанное в настоящем документе антитело H8L15 имеет HCDR1-3 и LCDR1-3: Аминокислотные последовательности 3 областей HCDR варибельной области тяжелой цепи следующие:

HCDR1: GYTFTSYW (SEQ ID NO: 26)

HCDR2: MSPVDSI (SEQ ID NO: 4)

HCDR3: ARRRPGQGYDFD (SEQ ID NO: 5)

Аминокислотные последовательности 3 областей CDR варибельной области легкой цепи следующие:

LCDR1: QSVGTW (SEQ ID NO: 27)

LCDR2: AAS (SEQ ID NO: 28)

LCDR3: QQYNIYPYT (SEQ ID NO: 22).

Настоящее изобретение подробно описано ниже.

Один аспект настоящего изобретения относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, предпочтительно, специфически связывающемуся с IL-12/IL-23 p40 человека, где

(1) антитело содержит

HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 1, где предпочтительно

HCDR1 содержит или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно, по меньшей мере, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к последовательности, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно, 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно, замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностью,

HCDR2 содержит или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно, по меньшей мере, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к последовательности, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно, 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно, замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностью, и

HCDR3 содержит или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, предпочтительно, по меньшей мере, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность

довательности, представленные в SEQ ID NO: 20, 21 и 22, где полипептид специфически связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека как часть античеловеческого антитела к домену белка IL-12/IL-23 p40, дополнительно содержащему последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3, 4 и 5.

Один аспект настоящего изобретения относится к выделенному полипептиду, содержащему последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3, 4 и 5, где полипептид специфически связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека как часть античеловеческого антитела к домену белка IL-12/IL-23 p40, дополнительно содержащему последовательности, представленные в SEQ ID NO: 20, 21 и 23.

Один аспект настоящего изобретения относится к выделенному полипептиду, содержащему последовательности, представленные в SEQ ID NO: 20, 21 и 23, где полипептид специфически связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека как часть античеловеческого антитела к домену белка IL-12/IL-23 p40, дополнительно содержащему последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3, 4 и 5.

Один аспект настоящего изобретения относится к выделенному полипептиду, содержащему последовательности, представленные в SEQ ID NO: 26, 4 и 5, где полипептид специфически связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека как часть античеловеческого антитела к домену белка IL-12/IL-23 p40, дополнительно содержащему последовательности, представленные в SEQ ID NO: 27, 28 и 22.

Один аспект настоящего изобретения относится к выделенному полипептиду, содержащему последовательности, представленные в SEQ ID NO: 27, 28 и 22, где полипептид специфически связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека как часть античеловеческого антитела к домену белка IL-12/IL-23 p40, дополнительно содержащему последовательности, представленные в SEQ ID NO: 26, 4 и 5.

Один аспект настоящего изобретения относится к выделенному полипептиду, содержащему последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или 24, последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно, по меньшей мере, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к последовательности, или аминокислотной последовательности, содержащей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно, замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностью, в которой полипептид специфично связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека как часть античеловеческого антитела к домену белка IL-12/IL-23 p40, где указанное антитело дополнительно содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, 11, 13, 15, 17 или 25, последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно, по меньшей мере, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к последовательности, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно, замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностью; или выделенному полипептиду, содержащему последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, 11, 13, 15, 17 или 25, последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно, по меньшей мере, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к последовательности, или аминокислотную последовательность, содержащую одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно, замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностью, в которой полипептид специфично связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека как часть античеловеческого антитела к домену белка IL-12/IL-23 p40, где указанное антитело дополнительно содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 или 24, последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно, по меньшей мере, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к последовательности или аминокислотной последовательности, имеющей одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно, замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностью.

В варианте осуществления настоящего изобретения, антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, Fab/c, фрагмента определяющей комплементарность области (CDR), одноцепочечного антитела (например, scFv), двухвалентного антитела и доменного антитела.

В варианте осуществления настоящего изобретения антителом является гуманизированное антитело, химерное антитело или мультиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело).

В варианте осуществления настоящего изобретения, антитело связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека с K_D менее примерно 10^{-5} М, например, менее примерно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или менее. Предпочтительно, K_D измеряют с помощью анализатора молекулярного взаимодействия ForteBio.

В варианте осуществления настоящего изобретения антитело связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека с EC_{50} менее примерно 100 нМ, например менее примерно 10 нМ, 1 нМ, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ, 0,1 нМ или менее. В частности, EC_{50} измеряют с помощью непрямого ELISA.

В варианте осуществления настоящего изобретения, антитело содержит константные области, где константные области происходят от видов, отличных от мышиных, например, от антитела человека,

предпочтительно, от IgG человека, более предпочтительно, от IgG1.

В варианте осуществления настоящего изобретения, константные области антитела гуманизованы, например, константной областью тяжелой цепи является С область цепи Ig гамма-1, предпочтительно, С-область цепи Ig гамма-1 GenBank ACCESSION No. P01857; константной областью легкой цепи является С-область каппа-цепи Ig, предпочтительно, С-область каппа-цепи Ig из GenBank ACCESSION No. P01834.

Другой аспект настоящего изобретения относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3, 4 и 5, где полипептид специфически связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека как часть античеловеческого антитела домена белка IL-12/IL-23 p40, где указанное антитело дополнительно содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8, 9 и 10.

Один аспект настоящего изобретения относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8, 9 и 10, где полипептид специфически связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека как часть античеловеческого антитела домена белка IL-12/IL-23 p40, где указанное антитело дополнительно содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO:3, 4 и 5.

Другой аспект настоящего изобретения относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3, 4 и 5, где полипептид специфически связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека как часть античеловеческого антитела домена белка IL-12/IL-23 p40, где указанное антитело дополнительно содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO: 19,21 и 22.

Один аспект настоящего изобретения относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий последовательности, представленные в SEQ ID NO: 19, 21 и 22, где полипептид специфически связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека как часть античеловеческого антитела домена белка IL-12/IL-23 p40, где указанное антитело дополнительно содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO:3, 4 и 5.

Другой аспект настоящего изобретения относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3, 4 и 5, где полипептид специфически связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека как часть античеловеческого антитела домена белка IL-12/IL-23 p40, где указанное антитело дополнительно содержит последовательности, представленные в SEQ IDNO: 20,21 и 22.

Один аспект настоящего изобретения относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий последовательности, представленные в SEQ ID NO: 20, 21 и 22, где полипептид специфически связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека как часть античеловеческого антитела домена белка IL-12/IL-23 p40, где указанное антитело дополнительно содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO:3, 4 и 5.

Другой аспект настоящего изобретения относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3, 4 и 5, где полипептид специфически связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека как часть античеловеческого антитела домена белка IL-12/IL-23 p40, где указанное антитело дополнительно содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO: 20,21 и 23.

Один аспект настоящего изобретения относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий последовательности, представленные в SEQ ID NO: 20, 21 и 23, где полипептид специфически связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека как часть античеловеческого антитела домена белка IL-12/IL-23 p40, где указанное антитело дополнительно содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO:3, 4 и 5.

Другой аспект настоящего изобретения относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий последовательности, представленные в SEQ ID NO: 26, 4 и 5, где полипептид специфически связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека как часть античеловеческого антитела домена белка IL-12/IL-23 p40, где указанное антитело дополнительно содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO:27, 28 и 22.

Один аспект настоящего изобретения относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий последовательности, представленные в SEQ ID NO: 27, 28 и 22, где полипептид специфически связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека как часть античеловеческого антитела домена белка IL-12/IL-23 p40, где указанное антитело дополнительно содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO:26, 4 и 5.

Один аспект настоящего изобретения относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 или 24, последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно, по меньшей мере, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или несколько (предпочтительно, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций

(предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностью, где указанный полипептид специфически связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека как часть античеловеческого антитела к домену белка IL-12/IL-23 p40, где указанное антитело дополнительно содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, 11, 13, 15, 17 или 25, последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно, при по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к последовательности или последовательности аминокислот, имеющей одну или несколько (предпочтительно, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностью; или выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6, 11, 13, 15, 17 или 25, последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно, по меньшей мере, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностью, где полипептид специфически связывается с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека как часть античеловеческого антитела к домену белка IL-12/IL-23 p40, где указанное антитело дополнительно содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 или 24, последовательность, имеющая по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно, по меньшей мере, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к последовательности или аминокислотной последовательности, имеющей одну или более (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативные аминокислотные мутации (предпочтительно, замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностью.

В частности, полинуклеотид содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно, по меньшей мере, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к последовательности.

В частности, полинуклеотид содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно, по меньшей мере, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к последовательности.

В частности, полинуклеотид содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12, или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно, по меньшей мере, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к последовательности.

В частности, полинуклеотид содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14, или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно, по меньшей мере, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к последовательности.

В частности, полинуклеотид содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16, или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно, по меньшей мере, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к последовательности.

В частности, полинуклеотид содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 18, или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно, по меньшей мере, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к последовательности.

В частности, полинуклеотид содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 37, или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно, по меньшей мере, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к последовательности.

В частности, полинуклеотид содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 38, или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно, по меньшей мере, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к последовательности.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к вектору, содержащему любую из описанных в настоящем документе полинуклеотидных молекул, как описано выше.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к клетке-хозяину, содержащей любую из описанных в настоящем документе полинуклеотидных молекул, как описано выше, или описанный в настоящем документе вектор.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу получения любого из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в настоящем документе, как описано выше, включающему

культивирование клетки-хозяина, описанной в настоящем документе, в подходящих условиях и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клеточных культур.

В одном аспекте настоящего изобретения дополнительно предложен конъюгат антитела, содержащий античеловеческое антитело домена белка IL-12/IL-23 p40 или его антигенсвязывающий фрагмент и конъюгированный фрагмент, связанный с ним, где конъюгированной группой является метка очистки (например, His метка), цитотоксический агент или детектируемая метка. Предпочтительно, конъюгированной группой является радиоизотоп, люминесцентное вещество, красящее вещество, фермент или полиэтиленгликоль.

В одном аспекте настоящего изобретения дополнительно предложен слитый белок, содержащий любое из античеловеческих антител к домену белка IL-12/IL-23 p40 или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано выше.

Один аспект настоящего изобретения представляет мультиспецифическое антитело, предпочтительно, биспецифическое антитело, содержащее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе.

В одном аспекте настоящего изобретения дополнительно представлен набор, содержащий любое из описанных в настоящем документе антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано выше, или конъюгат антитела, слитый белок или мультиспецифическое антитело, описанные в настоящем документе.

Предпочтительно, набор дополнительно содержит второе антитело, которое специфически идентифицирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; необязательно, второе антитело дополнительно содержит детектируемую метку, такую как радиоизотоп, люминесцентное вещество, красящее вещество, фермент или полиэтиленгликоль.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению любого из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, как описано выше, конъюгата антитела, слитого белка или мультиспецифического антитела в приготовлении набора для обнаружения присутствия или уровня IL-12/IL-23 p40 человека в образце.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей любое из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, как описано выше, конъюгат антител, мультиспецифическое антитело или слитый белок и, необязательно, фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению любого из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано выше, или конъюгата антитела, мультиспецифического антитела, слитого белка или фармацевтической композиции при получении:

лекарственного средства для блокировки связывания IL-12/IL-23 p40 человека с IL-12R β 1 человека или IL-23R человека,

лекарственного средства для блокировки активности IL-12/IL-23 p40 человека или снижения его уровня, или

лекарственного средства для блокировки клеточного ответа, опосредованного связыванием IL-12R β 1 человека или IL-23R с p40 человека;

предпочтительно лигандом IL-12/IL-23 p40 человека является IL-12R β 1 человека или IL-23R человека.

Один аспект настоящего изобретения относится к применению любого из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано выше, конъюгата антител, мультиспецифического антитела, слитого белка или фармацевтической композиции при получении лекарственного средства для лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из аутоиммунных заболеваний (например, бляшечного псориаза или системной красной волчанки) и язвенного колита (например, рефрактерного или рецидивирующего).

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу *in vivo* или *in vitro*, включающему введение клетки, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела, мультиспецифическое антитело, слитый белок или фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе, или введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества любого из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, как описано выше, конъюгата антитела, мультиспецифического антитела, слитого белка или фармацевтической композиции. Способ выбирают из группы, состоящей из

способа блокировки связывания IL-12/IL-23 p40 человека с лигандом IL-12R β 1 или IL-23R,

способа снижения активности или уровня IL-12/IL-23 p40 человека, и

способа блокировки клеточного ответа, опосредованного связыванием IL-12R β 1 человека или IL-23R человека с p40;

предпочтительно лигандом IL-12/IL-23 p40 является IL-12R β 1 или IL-23R.

В варианте осуществления настоящего изобретения, способ *in vitro* предназначен для не терапевтических и/или не диагностических целей.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению любого из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, как описано выше, конъюгата антите-

ла, мультиспецифического антитела, слитого белка или фармацевтической композиции при получении лекарственного средства для профилактики, лечения, адъювантного лечения и/или диагностики аутоиммунных заболеваний (например, бляшечного псориаза или системной красной волчанки) или язвенного колита (например, рефрактерного или рецидивирующего), или их применению для профилактики, лечения, адъювантного лечения и/или диагностики аутоиммунных заболеваний (например, бляшечного псориаза или системной красной волчанки) или язвенного колита (например, рефрактерного или рецидивирующего).

В варианте осуществления настоящего изобретения, лекарственное средство находится в форме, подходящей для введения путем подкожной инъекции, внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции или инъекции в очаг поражения.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу профилактики, лечения, адъювантного лечения и/или диагностики аутоиммунных заболеваний (например, бляшечного псориаза или системной красной волчанки) или язвенного колита (например, рефрактерного или рецидивирующего), который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, любого из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, как описано выше, конъюгата антитела, мультиспецифического антитела, слитого белка или фармацевтической композиции.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения пациента, страдающего язвенным колитом, который включает: (i) измерение уровня IL-12/IL-23 p40 человека в образце пациента, где пациент является положительным на p40IL-12/IL-23 человека, и (ii) введение пациенту терапевтически эффективного количества античеловеческого антитела против IL-12/IL-23 p40 или его антигенсвязывающей части.

Описанный в настоящем документе язвенный колит может быть рефрактерным и рецидивирующим. Например, у некоторых больных язвенный колит рецидивирует; у некоторых больных язвенный колит является рефрактерным.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пациент получил обычное лечение или неадекватно отвечает, не отвечает или не переносит биологические агенты. В некоторых конкретных вариантах осуществления, пациент, получивший традиционное лечение, или неадекватно отвечающий, невосприимчивый или имеющий непереносимость биологических агентов, дает неполный или частичный ответ.

В настоящем документе, H8L15H1L1 является античеловеческое моноклональное антитело против IL-12/IL-23 p40, и можно сделать ссылку на патент CN 201910706137.1 в отношении его последовательности и структуры. В моноклональном антителе H8L15H1L1 HCDR1 содержит последовательность GYTFTSYW (SEQ ID NO: 3), HCDR2 содержит последовательность MSPVDSI (SEQ ID NO: 4), HCDR3 содержит последовательность ARRRPGQGYFDF (SEQ ID NO: 5), LCDR1 содержит последовательность QSVGTW (SEQ ID NO: 6), LCDR2 содержит последовательность AAS (SEQ ID NO: 7), и LCDR3 содержит последовательность QQYNIYPYT (SEQ ID NO: 8).

В настоящем изобретении, если не указано иное, используемые в настоящем документе научные и технические термины имеют значения, обычно понятные специалистам в данной области техники. Кроме того, лабораторные операции клеточных культур, молекулярной генетики, химии нуклеиновых кислот и иммунологии, используемые в настоящем изобретении, являются рутинными операциями, широко используемыми в соответствующих областях. Между тем, чтобы лучше понять настоящее изобретение, ниже приведены определения и пояснения соответствующих терминов.

Используемый в настоящем документе термин "антигенсвязывающая область" означает белок или часть белка, который специфически связывается с данным антигеном. Например, часть антитела, содержащая аминокислотные остатки, которые взаимодействуют с антигеном и придают антителу специфичность и аффинность к антигену, называется "антигенсвязывающей областью". Антигенсвязывающая область обычно содержит одну или несколько определяющих комплементарность областей (CDR). Некоторые антигенсвязывающие области дополнительно содержат одну или несколько "каркасных" областей (FR). CDR представляют собой аминокислотные последовательности, которые способствуют специфичности и аффинности связывания антигена.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" относится к интактному иммуноглобулину любого изотипа или его антигенсвязывающему фрагменту, который может конкурировать с интактным антителом за специфическое связывание с антигеном-мишенью, и включает, например, химерные, гуманизированные, полностью человеческие и биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Такие "антитела" представляют собой антигенсвязывающие белки. Интактное антитело обычно содержит, по меньшей мере, две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, но в некоторых случаях может содержать меньше цепей, например, антитело, существующее в природе у верблюдовых, которое может содержать только тяжелую цепь. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть получены только из одного источника или могут быть "химерными", т.е. разные части антитела могут быть получены из двух разных источников, как дополнительно описано ниже. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно получить в гибридомах методами рекомбинантной ДНК или ферментативным или химическим расщеплением интактных антител. Если не указано иное, термин "антитело", помимо антител, содержащих две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, также включает их производные, варианты и фрагменты.

Используемые в настоящем документе, термин "антигенсвязывающий фрагмент" (или сокращенно "фрагмент") "антитела" или "цепи иммуноглобулина" (тяжелой или легкой цепи) включает часть антитела (независимо от того, получена она или синтезирована), в которой отсутствует, по меньшей мере, некоторые из аминокислотных остатков, присутствующих во всей длине антитела, но которая способна специфически связываться с антигеном. Такие фрагменты являются биологически активными, поскольку они специфически связываются с антигеном-мишенью и могут конкурировать с другими антителами или их антигенсвязывающими фрагментами за специфическое связывание с данным эпитопом. В одном аспекте, такие фрагменты будут сохранять, по меньшей мере, одну CDR, присутствующую в полноразмерной легкой или тяжелой цепи антитела, и в некоторых вариантах осуществления, будут содержать одну тяжелую и/или легкую цепь или ее часть. Такие биологически активные фрагменты могут быть получены методами рекомбинантной ДНК или, например, ферментативным или химическим расщеплением интактных антител. Иммунологически функциональные фрагменты иммуноглобулина включают, но не ограничены ими, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, dAb, Fab/c, фрагмент определяющей комплементарности области (CDR), одноцепочечное антитело (например, scFv), двухвалентное антитело и доменное антитело, и могут быть получены от любого млекопитающего, включая, но не ограничиваясь ими, человека, мышь, крысу, верблюдовых или кролика. Также рассматривается, что функциональная часть описанного в настоящем документе антитела, такая как одна или несколько CDR, может быть ковалентно связана со вторым белком или малой молекулой для создания терапевтического агента, направленного на конкретную мишень в организме, тем самым имея бифункциональными терапевтическими свойствами или имея увеличенный период полужизни в сыворотке, например слитого белка.

Используемые в настоящем документе термины "полноразмерная цепь антитела", "полноразмерное антитело", "интактное антитело" и "полное антитело" используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего структуру, по существу аналогичную структуре природного антитела, или имеющего тяжелую цепь в Fc области, как определено в настоящем документе.

Термин "легкая цепь" включает полноразмерные легкие цепи и их фрагменты с достаточным количеством последовательностей варибельной области для придания специфичности связывания. Полноразмерная легкая цепь содержит домен V_L варибельной области и домен C_L константной области. Домен варибельной области легкой цепи находится на аминоконце полипептида. Легкая цепь включает каппа (κ) и лямбда (λ) цепи.

Термин "тяжелая цепь" включает полноразмерные тяжелые цепи и их фрагменты с достаточным количеством последовательностей варибельной области для придания специфичности связывания. Полноразмерная тяжелая цепь включает домен варибельной области V_H и 3 домена константной области C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}. Домен V_H находится на аминоконце полипептида, и домены C_H находятся на карбоксильном конце, при этом C_{H3} находится ближе всего к карбоксильному концу полипептида. Тяжелая цепь может быть любого изотипа, включая IgG (включая подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (включая подтипы IgA1 и IgA2), IgM и IgE.

Используемый в настоящем документе термин "Fab фрагмент" состоит из одной легкой цепи, C_{H1} и варибельной области одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидные связи с другой молекулой тяжелой цепи.

Используемый в настоящем документе термин "Fc область" включает два фрагмента тяжелой цепи, включающие домены C_{H1} и C_{H2} антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или более дисульфидными связями и гидрофобным взаимодействием доменов C_{H3}.

Используемый в настоящем документе термин "Fab' фрагмент" включает одну легкую цепь и часть одной тяжелой цепи (содержащую домен V_H, домен C_{H1} и часть области между доменами C_{H1} и C_{H2}), так что межцепочечные дисульфидные связи могут образовываться между двумя тяжелыми цепями двух Fab' фрагментов с получением молекулы F(ab')₂.

Используемый в настоящем документе термин "фрагмент F(ab')₂" включает две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области между доменами C_{H1} и C_{H2}, так что между двумя тяжелыми цепями образуются межцепочечные дисульфидные связи. Таким образом, фрагмент F(ab')₂ состоит из двух фрагментов Fab', удерживаемых вместе дисульфидными связями между двумя тяжелыми цепями.

Используемый в настоящем документе термин "Fv область" включает варибельные области тяжелой и легкой цепей, но не включает константные области.

Используемый в настоящем документе термин "Fd" фрагмент относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_H и C_{H1} (Ward et al., Nature, 341:544-546 (1989)).

Используемый в настоящем документе термин "dAb" фрагмент состоит из доменов V_H (Ward et al., Nature 341:544-546 (1989)).

Используемый в настоящем документе термин "Fab'-SH" является обозначением Fab', в котором один или несколько цистеиновых остатков константного домена несут свободную тиольную группу.

Используемый в настоящем документе термин "Fab'/c" фрагмент означает промежуточное соединение, образованное пепсиновым переваром иммуноглобулина, которое сочетает в себе преимущества областей Fab и Fc, т. е. сильную диффузионную способность и низкий метаболический клиренс in vivo, при

сохранении высокой аффинности (Liu Jianjun, Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 1989(4):29-29).

Используемый в настоящем документе термин "одноцепочечное антитело" является молекулой Fv, в которой переменные области тяжелой и легкой цепи соединены гибким линкером с образованием одиночной полипептидной цепи (которая образует антигенсвязывающую область) (см., например, Bird et al., Science, 242:423-426 (1988), and Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5879-5883 (1988)). Одноцепочечные антитела подробно описаны в публикации международного патента № WO88/01649 и патентах США №№ 4,946,778 и 5,260,203, описание которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

Используемый в настоящем документе термин "домен антитела" означает иммунофункциональный фрагмент иммуноглобулина, который содержит только переменную область тяжелой цепи или легкой цепи. В некоторых случаях, две или несколько V_H областей ковалентно связаны пептидным линкером с образованием антитела с поливалентным доменом (в частности, антитела с двухвалентным доменом). Две области V_H антитела с двухвалентным доменом могут таргетировать один и тот же или разные антигены.

Используемый в настоящем документе термин "двухвалентный антигенсвязывающий белок" или "двухвалентное антитело" включает два антигенсвязывающих сайта. В некоторых случаях, два сайта связывания имеют одинаковую антигенную специфичность. Двухвалентное антитело может быть биспецифическим.

Используемый в настоящем документе термин "мультиспецифический антигенсвязывающий белок" или "мультиспецифическое антитело" означает антигенсвязывающий белок или антитело, таргетирующее более одного антигена или эпитопа.

Используемый в настоящем документе термин "биспецифический", "с двойной специфичностью" или "бифункциональный" антигенсвязывающий белок или антитело является гибридным антигенсвязывающим белком или антителом, имеющим два разных антигенсвязывающих сайта соответственно. Биспецифическим антителом является мультиспецифический антигенсвязывающий белок или мультиспецифическое антитело, и оно может быть получено различными способами, включая, но не ограничиваясь ими, слияние гибридом или связывание Fab' фрагментов. См., например, Songsivilai and Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553. Два сайта связывания биспецифического антигенсвязывающего белка или антитела будут связываться с двумя разными эпитопами, присутствующими в одном и том же или разных белках-мишенях.

Используемые в настоящем документе термины "mAb" и "моноклональное антитело" относятся к антителу или фрагменту антитела, полученному из группы высоко гомологичных антител, т. е. из группы идентичных молекул антител, за исключением естественных мутаций, которые могут возникнуть спонтанно. Моноклональное антитело обладает высокой специфичностью в отношении одного эпитопа на антигене. Поликлональное антитело, по сравнению с моноклональным антителом, обычно содержит, по меньшей мере, два или несколько различных антител, которые обычно идентифицируют разные эпитопы на антигене. Моноклональные антитела, как правило, могут быть получены методом гибридом, впервые описанным Kohler et al. (Nature, 256:495, 1975), а также может быть получен методом рекомбинантной ДНК (например, см. патент США № 4,816,567).

Используемый в настоящем документе термин "гуманизованное антитело" относится к антителу или фрагменту антитела, полученному при замене всех или части областей CDR иммуноглобулина человека (рецепторного антитела) областями CDR антитела не человека (донорным антителом), где донорным антителом может быть антителом не человека (например, мыши, крысы или кролика), обладающим ожидаемой специфичностью, аффинностью или реакционной способностью. Кроме того, некоторые аминокислотные остатки в каркасных областях (FR) рецепторного антитела также могут быть заменены аминокислотными остатками соответствующих антител не человека или аминокислотными остатками других антител для дальнейшего улучшения или оптимизации эффективности антитела. Более подробно о гуманизованных антителах см., например, Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol, 2:593-596 (1992); and Clark, Immunol. Today 21:397-402 (2000).

Используемый в настоящем документе термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело. "Эпитоп" также называют в данной области "антигенной детерминантой". Эпитоп или антигенная детерминанта обычно состоит из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты, углеводы или боковые цепи Сахаров, и обычно имеет специфические трехмерные структурные характеристики и специфические характеристики заряда. Например, эпитоп обычно содержит, по меньшей мере, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 последовательных или не последовательных аминокислот в уникальной пространственной конформации, которая может быть "линейной" или "конформационной". См., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996). В линейном эпитопе все сайты взаимодействия между белком и взаимодействующей молекулой (например, антителом) расположены линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка. В конформационном эпитопе сайты взаимодействия расположены поперек аминокислотных остатков белка, которые отделены друг от друга.

Термины "полипептид" или "белок" используются в настоящем документе для обозначения полимера аминокислоты. Этот термин также используется для обозначения полимера аминокислоты, в котором один или несколько аминокислотных остатков являются аналогами или миметиками существующих в природе аминокислот, а также для существующих в природе полимеров аминокислоты. Термин может также включать, например, полимеры аминокислот, которые модифицированы добавлением остатков сахаридов с образованием гликопротеинов, или которые фосфорилированы. Полипептиды и белки могут быть продуцированы существующими в природе клетками и не рекомбинантными клетками, или они могут быть получены генно-инженерными или рекомбинантными клетками, и содержат молекулу, имеющую аминокислотную последовательность нативного белка, или молекулу, имеющую делеции, вставки и/или замены в одной или нескольких аминокислотах нативной последовательности.

В частности, термины "полипептид" и "белок" включают антитела, такие как античеловеческие антитела против р40 (также называемые антителами к р40), белки, связывающие р40, и антитела или последовательности, имеющие делеции, вставки и/или замены в одной или нескольких аминокислотах антигенсвязывающего белка.

Термин "фрагмент полипептида" относится к полипептиду, имеющему делецию на amino конце, делецию на карбоксильном конце и/или внутреннюю делецию по сравнению с полноразмерным белком. Такие фрагменты могут также содержать модифицированные аминокислоты по сравнению с полноразмерным белком. В некоторых вариантах осуществления, такие фрагменты имеют примерно от 5 до 500 аминокислот в длину. Например, фрагмент может иметь, по меньшей мере, 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 450 аминокислот в длину. Полезные полипептидные фрагменты включают иммунологически функциональные фрагменты антител, включая связывающие домены. В случае антител к р40 человека, полезные фрагменты включают, но не ограничены ими, области CDR, переменные домены тяжелых или легких цепей, части цепей антитела, переменные домены, точно содержащие 2 CDR, или подобные.

"Производным" полипептида является полипептид (например, антигенсвязывающий белок или антитело), который химически модифицирован способами, отличными от вставки, делеции или замены, например, путем конъюгации с другим химическим фрагментом, например, ПЭГ-конъюгированный полипептид.

Используемый в настоящем документе термин "выделенный" относится к полученному искусственными средствами из естественного состояния. Если какое-то "выделенное" вещество или компонент появляется в природе, это может быть случай, когда изменение происходит в его естественной среде, или когда оно выделено из естественной среды, или и то, и другое. Например, определенный не выделенный полинуклеотид или полипептид в природе существует у определенного живого животного, и такой же полинуклеотид или полипептид с высокой степенью чистоты, выделенный из такого природного состояния, называется выделенным полинуклеотидом или полипептидом.

Термин "выделенный" не исключает наличия искусственных или синтетических веществ или других примесей, не влияющих на активность вещества.

Используемый в настоящем документе термин "вектор" относится к носителю нуклеиновой кислоты, в который может быть вставлен полинуклеотид. Когда вектор обеспечивает экспрессию белка, кодируемого вставленным полинуклеотидом, такой вектор называется вектором экспрессии. Вектор может быть введен в клетку-хозяина путем трансформации, трансдукции или трансфекции, так что элементы генетического вещества, переносимые вектором, могут быть экспрессированы в клетке-хозяине. Векторы хорошо известны специалистам в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими: плазмиды; фагмиды; космиды; искусственные хромосомы, такие как искусственная хромосома дрожжей (YAC), искусственная хромосома бактерий (BAC) или искусственная хромосома, полученная из P1 (PAC); фаги, такие как фаги лямбда или фаги M13; и вирусы животных. Вирусы животных, которые можно использовать в качестве векторов, включают, но не ограничены ими, ретровирусы (включая лентивирусы), аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса (такие как вирус простого герпеса), поксвирусы, бакуловирусы, папилломавирусы и паповавирусы (такие как SV40). Вектор может содержать множество элементов, которые контролируют экспрессию, включающих, но не ограниченных ими, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, элементы селекции и репортерные гены. Кроме того, вектор может дополнительно содержать сайт инициации репликации.

Используемый в настоящем документе термин "клетка-хозяин" относится к клеткам, которые могут быть введены с векторами, включая, но не ограничиваясь ими, прокариотические клетки, такие как *E. coli* или *Bacillus subtilis*, клетки грибов, такие как клетки дрожжей или *Aspergillus*, клетки насекомых, такие как клетки дрозофилы S2 или Sf9, или клетки животных, такие как фибробласты, клетки CHO, клетки COS, клетки NSO, клетки HeLa, клетки ВНК, клетки HEK 293 или клетки человека.

Используемый в настоящем документе термин "специфически связываться" относится к реакции неслучайного связывания между двумя молекулами, такой как реакция между антителом и антигеном, который оно таргетирует. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое специфически связывается с антигеном (или антитело, которое специфично связывается с антигеном), означает, что анти-

тело связывается с антигеном с аффинностью (K_D) менее примерно 10^{-5} М, например, менее чем примерно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или менее.

Используемый в настоящем документе термин " K_D " относится к равновесной константе диссоциации для специфического взаимодействия антитело-антиген, которая используется для описания аффинности связывания между антителом и антигеном. Среди нескольких параметров, измеряемых кинетикой молекулярного связывания, значение K_D является равновесной константой диссоциации. В исследованиях лекарственных средств на основе антител это параметр, характеризующий интенсивность аффинности между представляющим интерес антителом и молекулой антигена-мишени, и рассчитывается по формуле: $K_D = k_{dis}/k_{on}$. Меньшая равновесная константа диссоциации указывает на более интенсивное связывание антитело-антиген и более высокое сродство между антителом и антигеном. k_{on} (константой скорости ассоциации) является скорость образования комплекса антиген-антитело, и меньшая k_{on} предполагает более быстрое связывание антитела с антигеном. k_{dis} (константой скорости диссоциации) является скорость, с которой антитело диссоциирует от комплекса антиген-антитело, и меньшая k_{dis} предполагает более медленную скорость диссоциации антитела от антигена и более прочное связывание между антителом и антигеном. Как правило, антитело связывается с антигеном (например, белком L1) с равновесной константой диссоциации (K_D) менее примерно 10^{-5} М, например, менее примерно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или меньше, например, как определено анализатором молекулярного взаимодействия Fortebio с использованием метода биослойной интерферометрии (BLI).

Используемый в настоящем документе термин " EC_{50} " относится к эффективной концентрации, равной 50% от максимального ответа антитела.

Используемые в настоящем документе термины "моноклональное антитело" и "McAb" имеют одинаковое значение и используются взаимозаменяемо; термины "поликлональное антитело" и "PcAb" имеют одинаковое значение и используются взаимозаменяемо. Кроме того, в настоящем документе аминокислоты обычно представлены однобуквенными и трехбуквенными аббревиатурами, известными в данной области техники. Например, аланин может быть представлен A или Ala.

Используемые в настоящем документе термины "доля идентичности последовательности" и "доля гомологии последовательности" используются взаимозаменяемо.

Используемые в настоящем документе термины "сходство", "сходство последовательностей" и "идентичность" относятся к корреляции между последовательностями двух или нескольких белковых или полипептидных молекул, определяемой путем выравнивания и сравнения последовательностей. "Доля идентичности" относится к доле идентичных аминокислотных остатков в сравниваемых молекулах и может быть рассчитана на основе размера наименьшей сравниваемой молекулы. Для таких расчетов, гэпы в выравнивании (если они есть) должны быть устранены с помощью конкретной математической модели или компьютерной программы (т. е. "алгоритма"). Термин "существенная идентичность", когда он используется для полипептидов, означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с использованием программ GAP или BESTFIT, с использованием штрафов за гэпы по умолчанию, предоставленных программами, имеют, по меньшей мере, 70%, 75% или 80% идентичности последовательности, по меньшей мере, 90% или 95% идентичности последовательности или, по меньшей мере, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности. В некоторых случаях, не идентичные положения остатков отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативной аминокислотной заменой" является такая, в которой аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком, имеющим группу R боковой цепи со сходными химическими свойствами (например, зарядом, гидрофильностью или гидрофобностью). Как правило, консервативные аминокислотные замены в значительной степени сохраняют функции и свойства белка. В случаях, когда две или несколько аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, доля идентичности последовательности может быть повышена для корректировки консервативного характера замены. Способы такой регуляции хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson, *Methods Mol. Biol.*, 243:307-31 (1994). Примеры групп аминокислот, имеющих боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают: 1) алифатическая гидроксильная боковая цепь: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин, 2) алифатическая гидроксильная боковая цепь: серин и треонин, 3) амидосодержащая боковая цепь: аспарагин и глутамин, 4) ароматическая боковая цепь: фенилаланин, тирозин и триптофан, 5) основная боковая цепь: лизин, аргинин и гистидин, 6) кислая боковая цепь: аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота и 7) серосодержащая боковая цепь: цистеин и метионин. Например, консервативными аминокислотными замещающими группами являются валин-лейцин-изолейцин-аланин-глицин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, треонин-серин, глутаминовая кислота-аспарагиновая кислота и аспарагин-глутамин.

Необязательно, консервативной заменой является любое изменение с положительным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et al., *Science*, 256:1443-45 (1992), которая включена в настоящий документ в качестве ссылки. "Умеренно консервативной" заменой является любое изменение с не отрицательным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Идентичность последовательностей полипептидов обычно измеряют с помощью программного

обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет последовательности, используя меру сходства, присвоенную различным заменам, делециям и другим модификациям (включая консервативные аминокислотные замены). Например, GCG, включая такие программы, как "Gap" и "Bestfit", которые (с использованием параметров по умолчанию, заданных программой) можно использовать для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами (например, гомологичными полипептидами из разных биологических видов) или между белком дикого типа и его мутантным белком. См., например, GCG Version 6.1 (University of Wisconsin, WI). Полипептидные последовательности также можно сравнивать с помощью FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендуемыми. См. GCG Version 6.10 FASTA (например, FASTA2 и FASTA3), которая обеспечивает выравнивание областей оптимального перекрытия между контрольными и запрашиваемыми последовательностями и долю идентичности последовательностей (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990);

Pearson, *Methods Mol. Biol.*, 132:185-219 (2000)). Другим предпочтительным алгоритмом, используемым при сравнении последовательностей с базой данных, содержащей массивные последовательности из разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности, blastp или blastn (с использованием параметров по умолчанию, предоставляемых программой). См., например, Altschul et al., *Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990); Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-402 (1997).

Термин "лечение" или "лечить" обычно относится к действиям для получения необходимого фармакологического эффекта и/или физиологического эффекта. С точки зрения полной или частичной профилактики заболевания или его симптома, эффект может быть профилактическим; и/или с точки зрения частичной или полной стабилизации или излечения заболевания и/или побочного эффекта заболевания, эффект может быть терапевтическим. Используемый в настоящем документе термин "лечение" или "лечить" охватывает любое лечение заболевания у пациента, включая (а) профилактику возникновения заболевания или симптома заболевания у пациента, который может быть предрасположен к заболеванию, но еще не был диагностирован как страдающий от него; (б) ингибирование симптома заболевания, т.е. остановку его развития; или (с) ослабление симптома заболевания, т.е. регрессию заболевания или симптома.

Используемый в настоящем документе термин "общее лечение" относится к лечению, при котором лекарственное вещество транспортируется через кровоток для достижения и воздействия на клетки всего организма.

Используемый в настоящем документе термин "системная химиотерапия" относится к общей химиотерапии, которая исключает химиотерапию местно-распространенного заболевания как часть мультимодального лечения, где химиотерапия местно-распространенного заболевания включает индукционную химиотерапию, одновременную химиотерапию и радиационную терапию и адьювантную химиотерапию.

Используемый в настоящем документе термин "субъект" (иногда также упоминаемый в настоящем документе как "пациент") относится к млекопитающим, таким как грызуны, кошки, собаки и приматы. Предпочтительно, субъектом настоящего изобретения является человек.

"Вводить", "введение" или "введение" означает физическое введение композиции, содержащей терапевтический агент, субъекту с использованием любого из множества способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Пути введения ингибитора фактора, связанного с аутоиммунным заболеванием (например, античеловеческого антитела против IL-12/IL-23 p40), включают внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный, спинальный или другие парентеральные способы введения, например, инъекцией или инфузией. Используемая в настоящем документе фраза "парентеральное введение" относится к способам введения, за исключением энтерального и местного введения, обычно инъекцией, включая, но не ограничиваясь ими, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, подбололочечную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, внутрикапсульную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интратермальную инъекцию и инфузию и электропорацию *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор фактора, связанного с аутоиммунным заболеванием (например, античеловеческое антитело против IL-12/IL-23 p40) вводят не парентеральным путем, и в некоторых вариантах осуществления, его вводят перорально. Другие не парентеральные пути включают местный, эпидермальный или слизистый пути введения, например интраназальное, вагинальное, ректальное, подъязычное или местное введение. Введение также можно осуществлять, например, один раз, несколько раз и/или в течение одного или нескольких продолжительных периодов времени.

"Субъект" включает любого человека или животное, отличное от человека. Термин "животное, отличное от человека" включает, но не ограничено ими, позвоночных, таких как приматы, отличные от человека, овцы, собаки и грызуны, такие как мыши, крысы и морские свинки. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является человек. Термины "субъект" и "пациент" используются в настоящем документе взаимозаменяемо.

Термины "примерно", "приблизительно" или "по существу содержат" относятся к значению или композиции в пределах приемлемого диапазона ошибки для конкретного значения или композиции, как это определено специалистами в данной области техники, что будет частично зависеть от того, как стои-

мость или композиция измеряется или определяется, т. е. ограничения системы измерения. Например, "примерно", "приблизительно" или "по существу включает" может относиться к нахождению в пределах 1 или более чем 1 стандартного отклонения, как это практикуется в данной области техники. Альтернативно, "примерно" или "по существу включает" может относиться к диапазону, который отличается на величину до 10% или 20% (т.е. $\pm 10\%$ или $\pm 20\%$) от измененного параметра или значения. Например, около 3 мг может включать любое число от 2,7 мг до 3,3 мг (для 10%) или от 2,4 мг до 3,6 мг (для 20%).

Способы введения

Приведенное ниже содержание не предназначено для ограничения способов введения лекарственного средства, описанного в настоящем документе.

В одном варианте осуществления, лекарственное средство, описанное в настоящем документе, может быть приготовлено в виде фармацевтической композиции, подходящей для однократной дозы или многократных доз.

Лекарственное средство, описанное в настоящем документе, вводят различными надлежащими путями, включая, но не ограничиваясь ими, пероральное введение или парентеральное введение (внутривенным, внутримышечным, местным или подкожным путями). В некоторых вариантах осуществления, лекарственное средство, описанное в настоящем документе, вводят посредством перорального введения или инъекции, например, внутривенной инъекции или внутривенной инъекции.

Подходящие дозированные формы лекарственного средства, описанного в настоящем документе, включают, но не ограничены ими, таблетку, пастилку, пилюлю, капсулу (например, твердую капсулу, мягкую капсулу, кишечнорастворимую капсулу и микрокапсулу), эликсир, гранулу, сироп, инъекцию (внутримышечную, внутривенную и внутривенную), гранулы, эмульсии, суспензии, растворы, порошки и дозированные формы составов с замедленным высвобождением для перорального или не перорального введения.

Описанное в настоящем документе лекарственное средство содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

Полезные эффекты настоящего изобретения

Гуманизированные антитела против домена белка IL-12/IL-23 p40 человека могут специфически связываться с доменом белка IL-12/IL-23 p40, могут эффективно блокировать связывание домена белка IL-12/IL-23 p40 с рецепторами клеточной поверхности IL-12R β 1 и IL-23R, ингибировать активацию сигнального пути ниже домена белка IL-12/IL-23 p40 человека и ингибировать IL-23-индуцированную секрецию IL-17A. Связывающая активность описанных в настоящем документе антител к p40 человека значительно выше, чем у контрольных антител устекинумаба и Ab123FR1. Описанные в настоящем документе антитела могут быть использованы для получения лекарственных средств для профилактики и лечения аутоиммунных заболеваний (например, бляшечного псориаза или системной красной волчанки) и язвенного колита (например, рефрактерного или рецидивирующего). Между тем, они имеют хорошие перспективы применения и рыночную стоимость.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1: результаты определения активности связывания H5L9 и Ab123FR1 с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека.

Фиг. 2: результаты определения активности связывания H5L10 и Ab123FR1 с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека.

Фиг. 3: результаты определения активности связывания H5L11, H5L12, H5L14 и Ab123FR1 с доменом белка IL-12/IL-23 p40 человека.

Фиг. 4: результаты определения активности H8L15 и Ab123FR1 к домену белка IL-12/IL-23 p40 человека.

Фиг. 5: результаты определения константы аффинности H5L9 для домена белка IL-12/IL-23 p40 человека. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ, 0,75 нМ и 0,31 нМ соответственно.

Фиг. 6: результаты определения константы аффинности H5L10 для домена белка IL-12/IL-23 p40 человека. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ, 0,75 нМ и 0,31 нМ соответственно.

Фиг. 7: результаты определения константы аффинности H5L11 для домена белка IL-12/IL-23 p40 человека. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ, 0,75 нМ и 0,31 нМ соответственно.

Фиг. 8: результаты определения константы аффинности H5L12 для домена белка IL-12/IL-23 p40 человека. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ, 0,75 нМ и 0,31 нМ соответственно.

Фиг. 9: результаты определения константы аффинности H5L14 для домена белка IL-12/IL-23 p40 человека. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ, 0,75 нМ и 0,31 нМ соответственно.

Фиг. 10: результаты определения константы аффинности Ab123FR1 для домена белка IL-12/IL-23

p40 человека. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ, 0,75 нМ и 0,31 нМ соответственно.

Фиг. 11: результаты определения константы аффинности H8L15 для домена белка IL-12/IL-23 p40 человека. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ, 0,75 нМ и 0,31 нМ соответственно.

Фиг. 12: результаты определения константы аффинности устекинумаба к домену белка IL-12/IL-23 p40 человека. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ, 0,75 нМ и 0,31 нМ соответственно.

Фиг. 13: антитела H5L9, H5L10, H5L11, H5L12, H5L14 и устекинумаб, конкурентно блокирующие связывание IL-12 человека с клетками 293T-IL-12R β 1&IL-23R (FACS).

Фиг. 14: антитела H5L9, H5L10, H5L11, H5L12, H5L14 и устекинумаб, конкурентно блокирующие связывание человеческого IL-23 с клетками 293T-IL-12R β 1&IL-23R (FACS).

Фиг. 15: H8L15 значительно ингибирует индуцированную IL-23 секрецию IL-17A клетками селезенки мышей со спонтанной системной красной волчанкой.

Фиг. 16: H8L15 значительно уменьшает повреждение кожи у мышей с моделью псориаза.

Фиг. 17: статистические результаты патологических оценок язвенного колита в каждой экспериментальной группе; H8L15 значительно облегчает патологические изменения и клинические симптомы у мышей с моделью язвенного колита.

Фиг. 18: изменение массы тела экспериментальных мышей.

Фиг. 19: демонстрация гистопатологического наблюдения кожи при лечении H8L15 колита у мышей, индуцированного DSS в комбинации с рекомбинантным IL-23 человека.

Фиг. 20: антитела Ab123FR1, H8L15 и устекинумаб, конкурентно блокирующие связывание IL-12 человека с клетками 293T-IL-12R β 1&IL-23R (FACS).

Фиг. 21: антитела Ab123FR1, H8L15 и устекинумаб, конкурентно блокирующие связывание IL-23 человека с клетками 293T-IL-12R β 1&IL-23R (FACS).

Подробное описание

Варианты осуществления настоящего изобретения будут подробно описаны ниже со ссылкой на примеры. Специалисты в данной области техники поймут, что следующие примеры используются только для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения. В тех случаях, когда методики или условия не указаны, примеры проводят в соответствии с методиками или условиями, описанными в литературе в данной области техники (см., например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, authored by J. Sambrook et al., and translated by Huang Peitang et al., Third Edition, Science Press) или в соответствии с руководством по продукту. Используемые реагенты или инструменты являются коммерчески доступными обычными продуктами, если их производители не указаны.

В следующих примерах настоящего изобретения, мышей C57BL/6 приобретают в Guangdong Medical Laboratory Animal Center.

В следующих примерах настоящего изобретения, IL-12 (Human IL12 (His Tag)) приобретают у Sino Biological (кат. №: CT-050-H08H-20, № партии: LC11MC2805).

В следующих примерах настоящего изобретения, Ab123FR1, анти-IL-12/IL-23 p40 антитело, используют в качестве контрольного антитела, и можно сделать ссылку на выданный в Китае патент CN 103275222B в отношении способа его получения. Оно произведено Akeso Biopharma, Inc, и его последовательности представлены в положениях 20-468 SEQ ID NO: 3 и положениях 20-233 SEQ ID NO: 4 в CN 103275222B.

В следующих примерах настоящего изобретения, устекинумаб (торговое название Stelara), имеющееся на рынке анти-p40 антитело для той же мишени, приобретают у Johnson & Johnson в качестве контрольного антитела.

В следующих примерах настоящего изобретения, используемая клеточная линия 293T-IL-12R β 1&IL-23R сконструирована Akeso Biopharma, Inc. Клеточную линию 293T-IL-12R β 1&IL-23R получают вирусной инфекцией клеток 293T клеток с применением лентивирусных систем 3-го поколения (см., например, *A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System*, Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L., *J Virol.* 1998. 72(11):8463-8471), где используемые векторы экспрессии лентивируса представляют собой pLenti-IL-12R β 1-BSD (IL-12R β 1, № доступа GenBank 3549; вектор pLenti-BSD, приобретен у Invitrogen, кат. №: K497000) и pCDH-IL-23R-puro (IL-23R, № доступа GenBank 149233; вектор pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro, приобретен у Youbio, продукт № VT1480).

Изотипическим контрольным антителом является IgG человека против лизоцима куриного яйца (анти-HEL, т. е. IgG человека, сокращенно hIgG1), и его последовательность была взята из *Affinity Maturation Increases the Stability and Plasticity of the Fv Domain of Anti-Protein Antibodies* (Acierno et al., *J Mol Biol.*, 2007, 374(1): 130-46, где последовательность аминокислот тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 21, и последовательность аминокислот легкой цепи представлена далее в SEQ ID NO: 22). Антитело

контроля изотипа было приготовлено в лаборатории Akeso Biopharma, Inc.

Рекомбинантный белок hIL-23 (IL-23, № доступа GeneBank 51561) получают в лаборатории Akeso Biopharma, Inc.

Следующие примеры являются дополнительной иллюстрацией настоящего изобретения и не предназначены для ограничения настоящего изобретения.

Пример 1. Дизайн, экспрессия и очистка последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи античеловеческого антитела против р40 H8L15.

1. Дизайн антител.

Чтобы получить античеловеческое антитело H8L15 против IL-12/IL-23 р40, авторы изобретения определяют аминокислотные последовательности CDR областей, в которых антитело связывается с антигеном, с помощью расчетов квантового моделирования на основе структуры домена белка IL-12/IL-23 р40 и с помощью технологии моделирования трехмерной пространственной структуры на основе структурной биологии для связывания антиген-антитело и взаимодействия между CDR областями антитела и антигена. При этом, каркасную часть антитела оптимизируют соответствующим образом, не влияя на трехмерную структуру CDR областей, и, наконец, получают антитела H5L9, H5L10, H5L11, H5L12, H5L14 и H8L15, специфически связывающиеся с IL-12/IL-23 р40 человека.

Аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи антител и кодирующие их последовательности ДНК являются следующими:

H5L9: аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 1, и кодирующая ее последовательность ДНК представлена в SEQ ID NO:2;

H5L9: аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 6, и кодирующая ее последовательность ДНК представлена в SEQ ID NO:7;

H5L10: аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 1, и кодирующая ее последовательность ДНК представлена в SEQ ID NO:2;

H5L10: аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 11, и кодирующая ее последовательность ДНК представлена в SEQ ID NO: 12;

H5L11: аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 1, и кодирующая ее последовательность ДНК представлена в SEQ ID NO: 2;

H5L11: аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 13, и кодирующая ее последовательность ДНК представлена в SEQ ID NO: 14;

H5L12: аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 1, и кодирующая ее последовательность ДНК представлена в SEQ ID NO: 2;

H5L12: аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 15, и кодирующая ее последовательность ДНК представлена в SEQ ID NO: 16;

H5L14: аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 1, и кодирующая ее последовательность ДНК представлена в SEQ ID NO: 2;

H5L14: аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 17, и кодирующая ее последовательность ДНК представлена в SEQ ID NO: 18;

H8L15: аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 24, и кодирующая ее последовательность ДНК представлена в SEQ ID NO: 37;

H8L15: аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 25, и кодирующая ее последовательность ДНК представлена в SEQ ID NO: 38.

2. Экспрессия и очистка антител.

Кодирующая нуклеотидная последовательность переменной области тяжелой цепи (представлена в SEQ ID NO: 37; константная область: С область гамма-1 цепи Ig; ACCESSION: P01857) и кодирующая нуклеотидная последовательность переменной области легкой цепи (приведена в SEQ ID NO: 38; константная область: С-область каппа-цепи Ig; ACCESSION: P01834) вышеописанных антител, таких как H8L15, клонируют в вектор pUC57simple (предоставленный Genscript) с получением pUC57simple-H8L15H, содержащего полноразмерную тяжелую цепь нуклеотида H8L15 и pUC57simple-H8L15L, содержащего полноразмерную легкую цепь нуклеотида H8L15, соответственно.

Плазмиды pUC57simple-H8L15H и pUC57simple-H8L15L расщепляют (HindIII&EcoRI), нуклеотидные последовательности тяжелой и легкой цепей, выделенные электрофорезом, субклонируют в вектор pCDNA3.1, и рекомбинантные плазмиды экстрагируют для совместной трансфекции клеток 293F. После культивирования трансфицированных клеток 293F в течение 7 дней, культуральную среду центрифугируют на высокой скорости, и полученный супернатант концентрируют и загружают на колонку HiTrap MabSelect SuRe. Белок элюируют в одну стадию с элюентом для выделения образца-мишени. Образец антитела хранят в PBS буфере.

Таким же образом готовят другие антитела. Антитела H5L9, H5L10, H5L11, H5L12, H5L14 и H8L15, полученные в этом примере, используют в следующих примерах 2-4.

Пример 2. Определение активности связывания антител H5L9, H5L10, H5L11, H5L12, H5L14, H8L15, Ab123FR1 и устекинумаба с антигеном IL-12/IL-23 р40 с применением ELISA.

Микропланшет покрывают р40-His человека (Akeso Biopharma, Inc.; ген р40: GeneBank NM002187).

После инкубации при 4°C в течение, по меньшей мере, 12 ч, планшет промывают PBST, промокают и блокируют раствором 1% BSA в PBS. После завершения блокировки, планшет промывают PBST и промокают. Антитело, разведенное раствором PBST в градиенте, добавляют в лунки планшета, градиент разведения антител подробно описан в табл. 1. Планшет, содержащий тестируемое антитело, инкубируют при 37°C в течение 30 мин, затем промывают PBST и промокают. Добавляют рабочий раствор HRP-меченного античеловеческого вторичного антитела козы против IgG (H+L) (приобретенного у Jackson ImmunoResearch Inc., кат. №: 109-035-088), разведенного в соотношении 1:5000, и полученную смесь инкубируют при 37°C в течение 30 мин. После инкубации планшет промывают PBST и промокают. Добавляют TMB (Neogen, 308177) для проявления окраски в течение 5 мин в отсутствие света, и затем добавляют стоп-реагент для прекращения хромогенной реакции. Затем планшет сразу же помещают в планшетный ридер, и значение OD каждой лунки в планшете считывают при 450 нм. Данные анализируют с помощью SoftMax Pro 6.2.1.

Результаты обнаружения связывания антител H5L9 и Ab123FR1 с антигеном p40-His человека показаны на фиг. 1. Значения OD для всех дозировок показаны в табл. 1. EC₅₀ связывания антитела рассчитывают путем подгонки кривой с использованием концентрации антител по оси абсцисс и значения абсорбции по оси ординат, и результаты показаны в табл. 1 ниже.

Результаты обнаружения связывания антител H5L10 и Ab123FR1 с антигеном p40-His человека показаны на фиг. 2. Значения OD для всех доз показаны в табл. 2. EC₅₀ связывания антитела рассчитывают путем подгонки кривой с использованием концентрации антител по оси абсцисс и значения абсорбции по оси ординат, и результаты показаны в таблице 2 ниже.

Результаты обнаружения связывания антител H5L11, H5L12, H5L14 и Ab123FR1 с антигеном p40-His человека показаны на фиг. 3. Значения OD для всех дозировок показаны в табл. 3. EC₅₀ связывания антитела рассчитывают путем подгонки кривой с использованием концентрации антител по оси абсцисс и значения абсорбции по оси ординат, и результаты показаны в таблице 3 ниже.

Результаты обнаружения связывания антител H8L15 и Ab123FR1 с антигеном p40-His человека показаны на фиг. 4. Значения OD для всех дозировок показаны в таблице 4. EC₅₀ связывания антитела рассчитывают путем подгонки кривой с использованием концентрации антител по оси абсцисс и значения абсорбции по оси ординат, и результаты показаны в таблице 4 ниже.

Результаты показывают, что эффективность связывания H5L9, H5L10, H5L11, H5L12, H5L14 и H8L15 с антигеном p40-His человека зависит от дозы.

Как показано на фиг. 1 и в таблице 1, H5L9 связывается с p40-His человека с EC₅₀ 0,079 нМ, и Ab123FR1 связывается с p40-His человека с EC₅₀ 0,063 нМ. Эффективность связывания H5L9 сравнима с эффективностью Ab123FR1.

Как показано на фиг. 2 и в табл. 2, H5L10 связывается с p40-His человека с EC₅₀ 0,057 нМ, и Ab123FR1 связывается с p40-His человека с EC₅₀ 0,051 нМ. Эффективность связывания H5L10 сравнима с эффективностью Ab123FR1.

Как показано на фиг. 3 и в табл. 3, H5L11, H5L12, H5L14 и Ab123FR1 связываются с p40-His человека со значениями EC₅₀ 0,082 нМ, 0,082 нМ, 0,107 нМ и 1,181 нМ, соответственно. Эффективность связывания H5L11, H5L12 и H5L14 явно выше, чем у Ab123FR1.

Как показано на фиг. 4 и в табл. 4, H8L15, Ab123FR1 и устекинумаб связываются с p40-His человека со значениями EC₅₀ 0,059 нМ, 0,074 нМ и 0,077 нМ, соответственно. С точки зрения эффективности связывания Ab123FR1 сравним с устекинумабом, тогда как H8L15 значительно лучше их обоих.

Таблица 1

Активность связывания H5L9 с p40-His человека

Концентрация антител (мкг/мл)	Покрытие антигена: p40-His (0,125 мкг/мл)			
	Ab123FR1		H5L9	
1,000	2,884	2,863	2,817	2,860
0,333	2,818	2,838	2,864	2,776
0,111	2,806	2,833	2,768	2,831
0,037	2,543	2,650	2,318	2,463
0,012	1,751	1,792	1,649	1,622
0,004	0,849	0,918	0,801	0,820
0,001	0,357	0,441	0,386	0,497
PBS	0,046	0,046	0,052	0,052
Второе антитело	HRP-меченый анти-человеческий IgG козы (H+L) (1:5000)			
EC ₅₀ (нМ)	0,063		0,079	

Таблица 2

Активность связывания H5L10 с p40-His человека

Концентрация антител (мкг/мл)	Антигенное покрытие: p40-His (0,125 мкг/мл)			
	Ab123FR1		H5L10	
1,000	3,070	3,071	3,052	3,094
0,333	3,074	3,081	3,066	3,030
0,111	3,085	3,043	2,977	3,022
0,037	2,853	2,788	2,794	2,784
0,012	2,164	1,894	1,981	2,104
0,004	1,229	0,935	1,058	1,030
0,001	0,532	0,438	0,490	0,464
PBS	0,062	0,059	0,059	0,057
Второе антитело	HRP-меченый анти-человеческий IgG козы (H+L) (1:5000)			
EC ₅₀ (нМ)	0,051		0,057	

Таблица 3

Активность связывания H5L11, H5L12 и H5L14 с p40 человека

Концентрация антител (мкг/мл)	Антигенное покрытие: p40-His (0,125 мкг/мл)									
	H5L11		H5L12		H5L14		Ab123FR1			
1	2,474	2,410	2,518	2,542	2,475	2,429	2,386	2,342	2,353	2,282
0,3	2,472	2,409	2,541	2,473	2,576	2,471	1,815	1,736	1,801	1,862
0,1	2,392	2,382	2,486	2,371	2,488	2,386	0,864	0,946	0,971	1,091
0,03	2,132	2,074	2,096	2,111	1,995	1,964	0,356	0,372	0,408	0,438
0,01	1,279	1,310	1,334	1,309	1,196	0,995	0,149	0,168	0,165	0,180
0,003	0,613	0,593	0,625	0,665	0,603	0,580	0,082	0,083	0,084	0,089
0,001	0,269	0,242	0,286	0,263	0,237	0,256	0,056	0,060	0,056	0,062
0	0,045	0,046	0,045	0,047	0,046	0,049	0,048	0,037	0,041	0,046
Второе антитело	HRP-меченый анти-человеческий IgG козы (H+L) (1:5000)									
EC ₅₀ (нМ)	0,082		0,082		0,107		1,181			

Таблица 4

Активность связывания H8L15 с p40-His человека

Концентрация антител (мкг/мл)	Антигенное покрытие: p40-His (0,25 мкг/мл)					
	H8L15		Ab123FR1		устекинумаб	
1,0000	2,584	2,470	2,466	2,425	2,686	2,690
0,3333	2,519	2,551	2,325	2,425	2,521	2,555
0,1111	2,520	2,490	2,241	2,301	2,473	2,334
0,0370	2,376	2,280	2,190	2,055	2,317	2,329
0,0123	1,602	1,537	1,300	1,373	1,377	1,386
0,0041	0,835	0,801	0,663	0,675	0,686	0,656
0,0014	0,370	0,351	0,312	0,340	0,310	0,284
0,0000	0,069	0,068	0,096	0,087	0,090	0,078
Второе антитело	HRP-меченый анти-человеческий IgG козы (H+L) (1:5000)					
EC ₅₀ (нМ)	0,059		0,074		0,077	

Пример 3. Определение констант аффинности H5L9, H5L10, H5L11, H5L12, H5L14, H8L15, Ab123FR1 и устекинумаба к антигену IL-12/IL-23 p40 человека с помощью Fortebio.

Буфером для разведения образцов для H5L9, H5L10, H5L11, H5L12, H5L14, H8L15, Ab123FR1 и устекинумаба является PBS (0,02% Tween-20, 0,1% BSA, pH 7,4). p40-His иммобилизуют на датчике HIS1K (производитель: Fortebio, кат. №: 18-5120) в концентрации 1 мкг/мл в течение 40 с. Сенсор уравнивают в буфере в течение 60 с, и p40-His иммобилизуют на датчике, связанном с антителом, в концентрации 5-0,31 нМ (двукратное разведение) в течение 120 с, и затем белок диссоциируют в буфере в течение 300 с. Сенсор обновляют 10 мМ раствором глицина (pH=1,5). Температура обнаружения составляет 37°C, частота обнаружения составляет 0,3 Гц, и скорость встряхивания планшета с образцами составляет 500 об/мин. Данные анализируют путем подбора модели 1:1с получением констант аффинности.

Результаты определения констант аффинности гуманизированных антител H5L9, H5L10, H5L11, H5L12, H5L14, Ab123FR1, H8L15 и устекинумаба (в качестве контрольного антитела) к p40-His человека показаны в табл. 5, и результаты обнаружения показаны на фиг. 5,6,7,8,9, 10, 11 и 12.

Результаты показывают, что: константа аффинности H5L9 для p40-His человека составляет 8,49E-10M, константа аффинности H5L10 для p40-His человека составляет 1,21E-10M, константа аффинности H5L11 для p40-His человека составляет 1,36E-10M, константа аффинности H5L12 для p40-His человека составляет 9,05E-11M, константа аффинности H5L14 для p40-His человека составляет 6,20E-11M, константа аффинности Ab123FR1 для p40-His человека составляет 7,40E-11M, константа аффинности H8L15 для p40-His человека составляет 6,09E-11M, и константа аффинности устекинумаба для p40-His человека составляет 8,64E-11M.

С точки зрения аффинности, антитела ранжируют в порядке от сильной к слабой: H8L15, H5L14, Ab123FR1, устекинумаб, H5L12, H5L10, H5L11 и H5L9 H8L15 и H5L14 демонстрируют более сильную аффинность к p40-His человека, чем Ab23FR1 и устекинумаб.

Таблица 5

Константы аффинности H5L9, H5L10, H5L11, H5L12, H5L14, H8L15, Ab23FR1 и устекинумаба к p40-His человека

Тестовые антитела	K_D (M)	kon(1/Me)	SE (kon)	kdis(1/c)	SE (kdis)	Rmax (нм)
H5L9	8,49E-10	1,08E+07	8,50E+05	9,20E-03	3,07E-04	0,11-0,13
H5L10	1,21E-10	3,58E+06	3,64E+05	4,35E-04	2,22E-04	0,14-0,18
H5L11	1,36E-10	3,15E+06	2,32E+05	4,28E-04	1,44E-04	0,16-0,19
H5L12	9,05E-11	3,84E+06	2,12E+05	3,48E-04	1,24E-04	0,17-0,21
H5L14	6,20E-11	2,94E+06	2,36E+05	1,82E-04	1,58E-04	0,11-0,15
Ab123FR1	7,40E-11	2,00E+06	2,89E+05	1,48E-04	2,15E-04	0,15-0,18
H8L15	6,09E-11	2,95E+06	2,13E+05	1,80E-04	1,37E-04	0,18-0,21
устекинумаб	8,64E-11	1,99E+06	2,51E+05	1,72E-04	1,81E-04	0,16-0,17

K_D является константой аффинности; $K_D = k_{dis}/k_{on}$.

Пример 4. Обнаружение античеловеческих антител против IL-12/IL-23 p40, конкурентно блокирующих связывание IL-12 и IL-23 человека с клетками 293T-IL-12Rβ1&IL-23R, с помощью проточной цитометрии.

1.1. Обнаружение антител H5L9, H5L10, H5L11, H5L12, H5L14 и устекинумаба, конкурентно блокирующих связывание IL-12 человека с клетками 293T-IL-12RP1&IL-23R, методом проточной цитометрии.

Клетки 293T-IL-12Rβ1&IL-23R расщепляют обычным способом и делят на несколько образцов по 300000 клеток в каждом. В каждый образец добавляют по 200 мкл 1% PBSA и смесь центрифугируют при 700 x g в течение 5 мин для удаления супернатанта. В соответствии с дизайном эксперимента, соответствующим образом разведенные антитела (максимальная конечная концентрация 30 мкг/мл, 3-кратное разведение, всего 8 концентраций) и IL-12 человека (Sino Biological, кат. №: CT-050-H08H-20) (конечная концентрация 20 нМ) смешивают в соотношении 1:1 и устанавливают холостую пробу в качестве контроля. Смесь антитела и IL12 человека инкубируют на льду в течение 30 мин, и затем добавляют к клеточному осадку в количестве 100 мкл/образец. Полученную смесь хорошо перемешивают и инкубируют на льду в течение 60 мин. Добавляют 200 мкл 1% PBSA, и смесь центрифугируют при 700 x g в течение 5 мин для удаления супернатанта, и затем дважды промывают. Alexa Fluor® 488 анти-His-метки антитело (Biolegend, кат. №: 652509) разводят в соотношении 1:400 и добавляют в каждую пробирку по 100 мкл. Смесь хорошо перемешивают и инкубируют на льду в течение 40 мин в отсутствие света. Добавляют 200 мкл 1% PBSA и смесь центрифугируют при 700 x g в течение 5 мин для удаления супернатанта, и затем дважды промывают. Добавляют 1% PBSA в количестве 200 мкл/пробирку, клетки ресуспендируют и переносят в пробирку для проточной цитометрии для тестирования. Результаты антител

H5L9, H5L10, H5L11, H5L12, H5L14 и устекинумаба, конкурентно блокирующих связывание IL-12 человека с клетками 293T-IL-12R β 1&IL-23R, обнаруженными с помощью FACS, показаны в таблице 6 и на фиг. 13.

Согласно результатам, показанным в табл. 6 и на фиг. 13, H5L9, H5L10, H5L11, H5L12, H5L14 и устекинумаб могут конкурентно блокировать связывание IL-12 с IL-12R β 1 на поверхности клеточной мембраны 293T-IL-12R β 1&IL-23R, при этом активность конкурентного связывания H5L9 незначительна, и значения EC₅₀ конкурентного связывания H5L10, H5L11, H5L12, H5L14 и устекинумаба составляют 0,3312 мкг/мл, 0,414 мкг/мл, 0,3172 мкг/мл, 0,5320 мкг/мл и 0,3770 мкг/мл, соответственно.

Что касается силы конкурентной блокировки связывания IL-12 с IL-12R β 1 на поверхности клеточной мембраны 293T-IL-12R β 1&IL-23R, антитела ранжируют следующим образом от сильной к слабой: H5L12, H5L10, устекинумаб, H5L11, H5L14 и H5L9.

Приведенные выше результаты показывают, что активность конкурентного связывания H5L12 и H5L10 для конкурентной блокировки связывания IL-12 с IL-12R β 1 на поверхности клеточной мембраны лучше, чем у устекинумаба.

Таблица 6

Результаты антител H5L9, H5L10, H5L11, H5L12, H5L14 и устекинумаба, конкурентно блокирующих связывание IL-12 человека с клетками 293T-IL-12R β 1&IL-23R, полученные с помощью FACS

Концентрация (мкг/мл)/MFI	30	10	3,33	1,11	0,37	0,12	0,04	0,01	EC ₅₀ (мкг/мл)
H5L9	117	134	146	157	159	160	158	169	\
H5L10	31,6	34,1	40,2	44,6	87,5	151	154	163	0,3312
H5L11	33	33,9	42,2	54,3	103	145	151	166	0,414
H5L12	31,8	32,4	31,8	38,5	86,6	133	149	161	0,3172
H5L14	34,9	46,3	51,9	66	113	146	155	149	0,5320
устекинумаб	28,7	31	29,7	31,9	95,7	137	150	160	0,3770

1.2. Обнаружение антител Ab123FR1, H8L15 и устекинумаба, конкурентно блокирующих связывание IL-12 человека с клетками 293T-IL-12R β 1&IL-23R, методом проточной цитометрии.

Клетки 293T-IL-12R β 1&IL-23R расщепляют обычным способом и делят на несколько образцов по 300000 клеток в каждом. В каждый образец добавляют по 200 мкл 1% PBSA и смесь центрифугируют при 1200 об/мин в течение 5 мин для удаления супернатанта. В соответствии с дизайном эксперимента, соответствующим образом разведенные антитела (максимальная конечная концентрация 60 мкг/мл, 3-кратное разведение, всего 8 концентраций) и IL12-His (Sino Biological, кат. №: CT-050-H08H-20) (40 нМ) смешивают в соотношении 1:1 и устанавливают холостую пробу в качестве контроля. Смесь антитела и IL-12 инкубируют на льду в течение 30 мин, и затем добавляют к клеточному осадку в количестве 100 мкл/образец. Полученную смесь хорошо перемешивают и инкубируют на льду в течение 60 мин. Добавляют 200 мкл 1% PBSA и смесь центрифугируют при 1200 об/мин в течение 5 мин для удаления супернатанта, и затем дважды промывают. Антитело THEM His tag (FITC) (Genscript, кат. №: A01620) разводят в соотношении 1:500 и добавляют в каждую пробирку по 100 мкл. Смесь хорошо перемешивают и инкубируют на льду в течение 40 мин в отсутствие света. Добавляют 200 мкл 1% PBSA и смесь центрифугируют при 1200 об/мин в течение 5 мин для удаления супернатанта, и затем дважды промывают. Добавляют 1% PBSA в количестве 200 мкл/пробирку, клетки ресуспендируют и переносят в пробирку для проточной цитометрии для тестирования. Результаты антител Ab123FR1, H8L15 и устекинумаба, конкурентно блокирующих связывание IL-12 человека с клетками 293T-IL-12R β 1&IL-23R, полученные с помощью FACS, показаны в табл. 7 и на фиг. 20.

Согласно результатам, показанным в табл. 7 и на фиг. 20, Ab23FR1, H8L15 и устекинумаб могут конкурентно блокировать связывание IL-12 с IL-12R β 1 на поверхности клеточной мембраны 293T-IL-12R β 1&IL-23R, и значения EC₅₀ связывания Ab123FR1, H8L15 и устекинумаба составляют 1,99 мкг/мл, 1,46 мкг/мл и 1,58 мкг/мл соответственно.

Приведенные выше результаты показывают, что активность H8L15 по конкурентному связыванию для конкурентной блокировки связывания IL-12 с IL-12R β 1 на поверхности клеточной мембраны лучше, чем у Ab123FR1 и устекинумаба.

Таблица 7

Результаты антител Ab123FR1, H8L15 и устекинумаба, конкурентно блокирующих связывание IL-12 с клетками 293T-IL-12Rβ1&IL-23R, полученные с помощью FACS

Концентрация (мкг/мл)/MFI	30	10	3,33	1,11	0,37	0,12	0,04	0,01	EC ₅₀ (мкг/мл)
H8L15	34,92	46,83	57,84	90,8	118,86	127,45	136,89	117,45	1,46
Ab123FR1	36,29	47,78	54,84	105,2	115,6	108,16	123,57	118,88	1,99
устекинумаб	40,32	40,9	46,98	99,64	120,43	123,28	114,93	114,66	1,58

2.1. Обнаружение антител H5L9, H5L10, H5L11, H5L12, H5L14 и устекинумаба, конкурентно блокирующих связывание IL-23 человека с клетками 293T-IL-12Rβ1&IL-23R, методом проточной цитометрии.

Клетки 293T-IL-12Rβ1&IL-23R расщепляют обычным способом и делят на несколько образцов по 300000 клеток в каждом. В каждый образец добавляют по 200 мкл 1% PBSA и смесь центрифугируют при 700 × g в течение 5 мин для удаления супернатанта. В соответствии с дизайном эксперимента, соответствующим образом разведенные антитела (наивысшая конечная концентрация 30 мкг/мл, 3-кратное разведение, всего 8 концентраций) и IL-23 человека (IL-23-His-Biotin, Akesobio, 20161209) (конечная концентрация 2 мкг/мл) смешивают в соотношении 1:1 и устанавливают холостую пробу в качестве контроля. Смесь антитела и IL23 человека инкубируют на льду в течение 30 мин, и затем добавляют к клеточному осадку в количестве 100 мкл/образец. Полученную смесь хорошо перемешивают и инкубируют на льду в течение 60 мин. Добавляют 200 мкл 1% PBSA, и смесь центрифугируют при 700 x g в течение 5 мин для удаления супернатанта, и затем дважды промывают. FITC Steptavidin (Biolegend, кат. №: 405202) разводят в соотношении 1:500 и добавляют в каждую пробирку по 100 мкл. Смесь хорошо перемешивают и инкубируют на льду в течение 40 мин в отсутствие света. Добавляют 200 мкл 1% PBSA и смесь центрифугируют при 700 x g в течение 5 мин для удаления супернатанта, и затем дважды промывают. Добавляют 1% PBSA в количестве 200 мкл/пробирку, клетки ресуспендируют и переносят в пробирку для проточной цитометрии для тестирования. Результаты антител H5L9, H5L10, H5L11, H5L12, H5L14 и устекинумаба, конкурентно блокирующих связывание IL-23 человека с клетками 293T-IL-12Rβ1&IL-23R, обнаруженные с помощью FACS, показаны в таблице 8 и на фиг. 14.

Согласно результатам, показанным в таблице 8 и на фиг. 14, H5L9, H5L10, H5L11, H5L12, H5L14 и устекинумаб могут конкурентно блокировать связывание IL-23 с рецепторным комплексом IL-23 на поверхности клеточной мембраны 293T-IL-12Rβ1&IL-23R, и значения EC₅₀ конкурентного связывания из этих антител составляют 4,252 мкг/мл, 0,6995 мкг/мл, 0,8643 мкг/мл, 0,7748 мкг/мл, 0,8806 мкг/мл и 1,158 мкг/мл, соответственно.

По силе конкурентной блокировки связывания IL-23 с рецепторным комплексом IL-23 на поверхности клеточной мембраны 293T-IL-12Rβ1&IL-23R антитела ранжируют следующим образом от сильной к слабой: H5L10, H5L12, H5L11, H5L14, устекинумаб и H5L9.

Приведенные выше результаты показывают, что активность конкурентного связывания H5L10, H5L12, H5L11 и H5L14 для конкурентной блокировки связывания IL-23 с рецепторным комплексом IL-23 на поверхности клеточной мембраны 293T-IL-12Rβ1&IL-23R лучше, чем у устекинумаба.

Таблица 8

Результаты антител H5L9, H5L10, H5L11, H5L12, H5L14 и устекинумаба, конкурентно блокирующих связывание IL-23 человека с клетками 293T-IL-12Rβ1&IL-23R, полученные с помощью FACS

Концентрация (мкг/мл)/MFI	30	10	3,33	1,11	0,37	0,12	0,04	0,01	EC ₅₀ (мкг/мл)
H5L9	104	136	153	184	206	217	221	222	4,252
H5L10	11,9	12,7	15,7	81,6	169	221	230	223	0,6995
H5L11	12,9	14,5	20,2	97,6	179	219	224	219	0,8643
H5L12	12,3	12,7	15,8	88,5	177	211	234	221	0,7748
H5L14	14,1	16,7	23,6	95,6	179	203	216	218	0,8806
устекинумаб	9,64	11,5	13,8	121	186	211	216	219	1,158

2.2. Обнаружение антител Ab123FR1, H8L15 и устекинумаба, конкурентно блокирующих связывание IL-23 человека с клетками 293T-IL-12Rβ1&IL-23R, методом проточной цитометрии.

Клетки 293T-IL-12Rβ1&IL-23R расщепляют обычным способом и делят на несколько образцов по 300000 клеток в каждом. В каждый образец добавляют по 200 мкл 1% PBSA и смесь центрифугируют при 1200 об/мин в течение 5 мин для удаления супернатанта. В соответствии с дизайном эксперимента,

соответствующим образом разведенные антитела (максимальная концентрация 60 мкг/мл, 3-кратное разведение, всего 8 концентраций) и IL23-His-биотин человека (Akeso Biopharma, Inc., № партии: 20161209) (4 мкг/мл) смешивают в соотношении 1:1 и устанавливают холостую пробу как контроль. Смесь антитела и IL23-His-биотина инкубируют на льду в течение 30 мин, и затем добавляют к клеточному осадку в количестве 100 мкл/образец. Полученную смесь хорошо перемешивают и инкубируют на льду в течение 60 мин. Добавляют 200 мкл 1% PBSA и смесь центрифугируют при 1200 об/мин в течение 5 мин для удаления супернатанта, и затем дважды промывают. FITC Steptavidin (Biolegend, кат. №: 405202) разводят в соотношении 1:500 и добавляют в каждую пробирку по 100 мкл. Смесь хорошо перемешивают и инкубируют на льду в течение 40 мин в отсутствие света. Добавляют 200 мкл 1% PBSA и смесь центрифугируют при 1200 об/мин в течение 5 мин для удаления над осадочной жидкости, и затем дважды промывают. Добавляют 1% PBSA в количестве 200 мкл/пробирку, клетки ресуспендируют и переносят в пробирку для проточной цитометрии для тестирования. Результаты антител Ab123FR1, H8L15 и устекинумаба, конкурентно блокирующих связывание IL-23 человека с клетками 293T-IL-12Rβ1&IL-23R, обнаруженные с помощью FACS, показаны в табл. 9 и на фиг. 21.

Согласно результатам, показанным в табл. 9 и на фиг. 21, Ab123FR1, H8L15 и устекинумаб могут конкурентно блокировать связывание IL-23 с IL-23R на поверхности клеточной мембраны 293T-IL-12Rβ1&IL-23R. Значения EC₅₀ связывания Ab123FR1, H8L15 и устекинумаба составляют 1,41 мкг/мл, 0,8942 мкг/мл и 1,434 мкг/мл, соответственно.

Приведенные выше результаты показывают, что активность конкурентного связывания H8L15 для конкурентной блокировки связывания IL-23 с IL-23R на поверхности клеточной мембраны 293T-IL-12Rβ1&IL-23R лучше, чем у Ab123FR1 и устекинумаба.

Таблица 9

Результаты антител Ab123FR1, H8L15 и устекинумаба, конкурентно блокирующих связывание IL-23 с клетками 293T-IL-12Rβ1&IL-23R, полученные с помощью FACS

Концентрация (мкг/мл)/MFI	30	10	3,33	1,11	0,37	0,12	0,04	0,01	EC ₅₀ (мкг/мл)
H8L15	15,67	17,95	20,65	67,47	140,58	151,42	155,60	155,36	0,8942
Ab123FR1	16,62	17,43	21,52	114,17	148,32	154,10	157,47	159,75	1,41
устекинумаб	17,65	18,37	22,39	124,07	160,96	164,00	156,17	162,10	1,434

Пример 5. H8L15, эффективно ингибирующий секрецию IL-17A клетками селезенки мышей со спонтанной системной красной волчанкой.

В модели спонтанной системной красной волчанки (Jeltsch-David H. Autoimmun Rev. 2014;13(9):963-973.) мышей (мыши MRL/lpr, приобретенные у Shanghai SLAC Laboratory Animal Co., Ltd.) анестезируют хлоралгидратом, замачивают в 75% этиловом спирте для дезинфекции, переносят в бокс биобезопасности, и затем препарируют, чтобы взять селезенку. Селезенку промывают в чашке, содержащей 1640 полной среды, для удаления жировой и фасциальной ткани. Промытую селезенку мыши помещают в 70 мкм клеточное сито и осторожно измельчают поршнем шприца, и суспензию клеток селезенки неоднократно промывают культуральным раствором. Фильтрат собирают и центрифугируют при 170 x g в течение 5 минут, чтобы удалить супернатант. Добавляют 7 мл лизата эритроцитов для ресуспендирования клеточного осадка. Смесь осторожно тщательно перемешивают и оставляют на льду на 8 мин, и затем добавляют равный объем полной среды для остановки лизиса. Смесь центрифугируют при 170 x g в течение 5 мин для удаления супернатанта. Осадок клеток подвергают центрифугированию и дважды промывают полной средой 1640, и затем клеточный осадок ресуспендируют в полной среде 1640, подсчитывают, корректируют по плотности клеток и высевают в 96-луночный планшет (1 × 10⁶/100 мкл). Согласно дизайну эксперимента, 50 мкл антитела предварительно инкубируют с 50 мкл IL-23 (конечная концентрация 20 нг/мл) в течение 1 ч, и затем добавляют 50 мкл IL-2 (конечная концентрация 100 Ед/мл), и смесь инкубируют в инкубаторе при 37°C/5% CO₂ в течение 6 дней. Через шесть дней супернатант клеток собирают центрифугированием и определяют концентрацию IL-17A в супернатанте с помощью ELISA.

Как показано на фиг. 15, IL-23 эффективно способствует секреции IL-17A клетками селезенки мышей с моделью спонтанной системной красной волчанки. Добавление H8L15 во время действия IL-23 значительно ингибирует секрецию IL-17A, и ингибирующая активность в значительной степени зависит от дозы, и фармакодинамическая активность заметно превосходит активность AB123FR1 (иногда также называемого Ab123FR1).

Пример 6. H8L5 эффективно уменьшает повреждение кожи у мышей с моделью псориаза.

После бритья, мышей C57BL/6 (приобретенных в Guangdong Medical Laboratory Animal Center) случайным образом делят на нормальную группу, модельную группу, группу положительного контроля и группы H8L15 по 10 мышей в группе. За один день до первой инъекции рекомбинантного IL-23 челове-

ка, модельной группе подкожно вводят антитело изотипического контроля (т. е. лизосому человека против куриного яйца), группам дозирования H8L15, вводят H8L15 в соответствующих концентрациях, и нормальной группе вводят подкожно равный объем физиологического раствора. На 1 день после введения, внутрибрюшинно вводят 3,5% хлоралгидрат в дозе 7,5 мл/кг для анестезии мышей линии C57BL/6, мышам в нормальной группе внутривожно вводят физиологический раствор в дозе 25 мкл/мышь, и остальным мышам внутривожно вводят рекомбинантный IL-23 человека в дозе 10 мкг/25 мкл/мышь. Инъекцию проводят один раз в сутки в течение 6 дней подряд. На 2 день после последней внутривожной инъекции рекомбинантного IL-23 человека, мышам в каждой группе подвергают цервикальной дислокации, вырезают небольшие кусочки кожи шеи (около 0,5 см × 0,5 см) и фиксируют в формалиновом фиксаторе тканей. Через 24 ч готовят патологические срезы кожи мышам у 6 мышам в группе. После приготовления патологических срезов, 1 типовое поле зрения выбирают под 100х микроскопом, и 6 участков исходного изображения случайным образом выбирают для измерения толщины эпидермиса кожи мыши. Данные выражают как среднее ± стандартная ошибка, и результаты оценивают с помощью однофакторного дисперсионного анализа после межгруппового сравнения, проведенного с помощью программного обеспечения GraphPad. P <0,05 предполагает значительную разницу, и P <0,01 предполагает очень значительную разницу.

Результаты показаны на фиг. 16. По сравнению с нормальной группой, толщина эпидермиса кожи мышам в модельной группе явно увеличена (P <0,01). После введения, H8L15 эффективно ингибирует утолщение эпидермиса у мышам с псориазом (P <0,01).

Пример 7. Лечение колита анти-IL-12/IL-23 p40 антителами.

Было обнаружено, что анти-IL-12/IL-23 p40 антитела, такие как H8L15, эффективны в облегчении патологических изменений и клинических симптомов у мышам с моделью язвенного колита.

Модель колита создают, индуцируя мышам C57BL/6 с помощью DSS (декстрансульфата натрия). Экспериментальных мышам разделяют на группы по 3 мышам в нормальной группе и по 6 мышам в каждой из остальных групп. Выбирают группу положительного контроля (группа DSS), группу изотипического контроля антитела (анти-HEL), группу с высокой дозой H8L15 (120 мг/кг) и группу с низкой дозой H8L15 (40 мг/кг). Препараты вводят подкожно в дни D0, D3 и D6. В нормальной группе, животные модели создают путем кормления стерильной водой из поилок; в группе DSS (MP Bio, кат. №: Q1723) животные модели создают путем кормления 1% раствором DSS (приготовленным путем добавления 2,5 г DSS к 250 мл стерильной воды) из поилок в течение 9 дней подряд; в экспериментальной группе с антителом, животные модели создают путем кормления 1% раствором DSS (приготовленным путем добавления 2,5 г DSS к 250 мл стерильной воды) из поилок и внутрибрюшинной инъекцией рекомбинантного белка hIL-23 (200 мкл/100 мкг/мышь) ежедневно (D1-D5, D7-D9).

Использование и благополучие лабораторных животных осуществляют в соответствии с положениями Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, International (AAALAC). Ежедневно отслеживают здоровье и смерть животных, и рутинные осмотры включают наблюдение за влиянием тестируемого вещества или лекарственного средства на повседневные показатели животных, такие как поведенческая активность, изменение веса и внешний вид.

Экспериментальный индекс предназначен для изучения влияния лекарственного средства на колит, и специфический индекс основан на таблице патологических оценок колита у мышам, которая показана в табл. 10.

Таблица 10

Патологические показатели колита у мышам

Состояние патологической ткани поражения толстой кишки	Оценка
Воспалительная инфильтрация:	0-нет, 1-относительно легкая, 2-легкая, 3-умеренная, 4-относительно тяжелая, 5-тяжелая
Повреждение железистой полости:	0-нет, 1-легкое, 2-умеренное, 3-тяжелое
Язва:	0-нет, 1-легкая, 2-умеренная, 3-тяжелая
Отек:	0-нет, 1-да

Дозировка и схема введения

Группа	n	Животная модель	Введение
Нормальная группа	3	Кормление стерильной водой через поилку	
Группа DSS	6	1% раствор ДСС готовят, добавляя 2,5 г ДСС к 250 мл стерильной воды, и кормят мышей через поилки в течение 9 дней подряд (D1-D9), и эксперимент заканчивают на 10 день.	
DSS+hIL-23+hIgG1 120 мг/кг	6	1% раствор ДСС готовят, добавляя 2,5 г ДСС к 250 мл	hIgG1, 120 мг/кг, SC, D0, D3, D6
DSS+hIL-23+H8L15 120 мг/кг	6	стерильной воды, и кормят мышей через поилки, ежедневно внутрибрюшинно вводят	H8L15, 120 мг/кг, SC, D0, D3, D6
DSS+hIL-23+ H8L15 40 мг/кг	6	рекомбинантный белок hIL-23 (200 мкл/100 мкг/мышь) (D1-D6, D8-D9), и эксперимент заканчивают на 10 день.	H8L15, 40 мг/кг, SC, D0, D3, D6

*Произвольно сгруппированы;
временем первого введения является D₀;
SC: подкожная инъекция

Что касается экспериментальных результатов, в табл. 10 представлен стандарт патологической оценки колита у мышей, в табл. 11 представлен способ установления мышинных моделей и схема введения антител в каждой экспериментальной группе, и результаты патологической оценки колита показаны на фиг. 17. Демонстрация гистопатологического наблюдения кожи при лечении H8L15 мышинного колита, индуцированного DSS, в сочетании с рекомбинантным IL-23 человека (HE окрашивание, ×100) (a: нормальная группа; b: группа DSS; c: группа DSS+hIL-23+hIgG1 (120 мг/кг);

d: группа DSS+hIL-23+H8L15 (120 мг/кг);

e: группа DSS+hIL-23+H8L15 (40 мг/кг) показана на фиг. 19.

Заключение: согласно массе тела мышей в экспериментальный период, представленной на фиг. 18, масса тела мышей в модельной группе постоянно снижается, в то время как масса тела мышей в лечебных группах не снижается, что явно отличается от массы тела в модельной группе. В соответствии с патологическими оценками колита, показанными на фиг. 17, модельная группа демонстрирует очевидные характеристики колита, в то время как группы лечения высокими дозами и низкими дозами демонстрируют статистически значимые отличия от модельной группы, что указывает на то, что антитело H8L15 эффективно при лечении язвенного колита.

Информация о последовательностях следующая.

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи H5L9, H5L10, H5L11, H5L12 и H5L14 представлена в SEQ ID NO: 1.

```
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQSSGYSFTTYWIGWVRQMPGQGLEWIGIMSPV
DSDIRYNPMFRGQVTMSVDKSSSTAYLQWSSLKASDTAMYYCARRRPGQGYFDWVG
GTMVTVSS (SEQ ID NO: 1)
```

Нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи H5L9, H5L10, H5L11, H5L12 и H5L14 представлена в SEQ ID NO: 2.

```
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCCGAAGTGAAGAAACCCGGGGAGAGT
CTGAAGATCTCATGCCAGAGCTCCGGCTACTCCTTACCACATATTGGATCGGGTGG
GTGAGACAGATGCCTGGCCAGGGGCTGGAATGGATCGGAATTATGAGCCCAGTGA
```

CTCCGATATTCGCTACAACCCCATGTTTCGAGGCCAGGTGACAATGAGCGTGGACAA
GTCTAGTTCAACTGCTTATCTGCAGTGGAGCTCCCTGAAAGCCAGCGATACCGCTAT
GTACTATTGTGCCCGGAGAAGGCCTGGACAGGGCTACTTCGACTTTTGGGGGCAGG
GAACTATGGTGACCGTCTCTAGT (SEQ ID NO: 2)

Для H5L9, H5L10, H5L11, H5L12 и H5L14, HCDR1 представлен в SEQ ID NO: 3, HCDR2 представ-
лен в SEQ ID NO: 4, и HCDR3 представлен в SEQ ID NO: 5.

HCDR1: GYSFTTYW (SEQ ID NO: 3)

HCDR2: MSPVDSI (SEQ ID NO: 4)

HCDR3: ARRRPGQGYFDF (SEQ ID NO: 5)

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи H5L9 представлена в
SEQ ID NO: 6.

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGSWLAWYQKPGKAPKSLIYSASSR
QSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLPEDFATYYCQYDIYPFTFGQGTKLEIK

Нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи H5L9 представлена в
SEQ ID NO: 7.

GATATTCAGATGACCCAGAGCCCTTCAAGCCTGTCCGCAAGCGTCGGGGATA
GAGTGACCATTACCTGTAAGCAAGCCAGAACGTGGGAAGCTGGCTGGCCTGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCCAAGTCTCTGATCTATAGTGCAAGCTCCCGGCA
GTCAGGAGTGCCAAGCAGATTCAGTGGCTCAGGGAGCGGAACAGACTTTACCCTGA
CAATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGACTTCGCAACTTACTATTGCCAGCAGTACGATA
TCTACCCATTACATTTGGCCAGGGGACTAAACTGGAGATCAAG

Для H5L9, LCDR1 представлен в SEQ ID NO: 8, LCDR2 представлен в SEQ ID NO: 9, а LCDR3
представлен в SEQ ID NO: 10.

LCDR1: QNVGSW (SEQ ID NO: 8)

LCDR2: ASS (SEQ ID NO: 9)

LCDR3: QYDIYPFT (SEQ ID NO: 10)

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи H5L10 представлена в
SEQ ID NO: 11.

EIVLTQSPATLSASPGERATISCRASQSVGSWLAWYQKPGQAPRSLIYAASNLQ
SGIPARFSGSGSDFTLTISSLEPEDFAVYYCQYNIYPYTFGQGRLEIK

Нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи H5L10 представлена в
SEQ ID NO: 12.

GAGATCGTCCTGACACAGAGTCCTGCTACCCTGAGCGCTTCCCCAGGAGAGA
GGGCAACCATCTCCTGCCGCGCCTCTCAGaGCgTTAGCTCCTGGCTGGCTTGGTACCA
GCAGAAGCCAGGCCAGGCACCCCGAAGCCTGATCTATGCCGCTTCTAaTCTGCAGAG
CGGGATTCCCGCTAGATTCTCTGGCAGTGGGTCAGGAACAGACTTTACCCTGACAAT
CTCAAGCCTGGAGCCTGAAGATTCGCCGTGTACTATTGCCAGCAGTACAACATCTA
CCCATATACATTTGGCCAGGGGACTCGGCTGGAGATCAAG

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи H5L11 представлена в
SEQ ID NO: 13.

EIVLTQSPATLSASPGERATISCRASQSVSSWLAWYQKPGQAPRSLIYSASNLS
GIPARFSGSGSDFTLTISSLEPEDFAVYYCQYNIYPYTFGQGRLEIK

Нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи H5L11 представлена в
SEQ ID NO: 14.

GAGATCGTCCTGACACAGAGTCCTGCTACCCTGAGCGCTTCCCCAGGAGAGA
GGGCAACCATCTCCTGCCGCGCCTCTCAGaGCgTTAGCTCCTGGCTGGCTTGGTACCA
GCAGAAGCCAGGCCAGGCACCCCGAAGCCTGATCTATCCGCTTCTAaTCTGCAGAG
CGGGATTCCCGCTAGATTCTCTGGCAGTGGGTCAGGAACAGACTTTACCCTGACAAT
CTCAAGCCTGGAGCCTGAAGATTCGCCGTGTACTATTGCCAGCAGTACAACATCTA
CCCATATACATTTGGCCAGGGGACTCGGCTGGAGATCAAG

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи H5L12 представлена в
SEQ ID NO: 15.

EIVLTQSPATLSASPGERATISCRASQSVSSWLAWYQKPGQAPRSLIYAASNRQ
SGIPARFSGSGSDFTLTISSLEPEDFAVYYCQYNIYPYTFGQGRLEIK

Нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи H5L12 представлена в
SEQ ID NO: 16.

GAGATCGTCCTGACACAGAGTCCTGCTACCCTGAGCGCTTCCCCAGGAGAGA
 GGGCAACCATCTCCTGCCGCGCTCTCAGaGcGTTAGCTCCTGGCTGGCTTGGTACCA
 GCAGAAGCCAGGCCAGGCACCCCGAAGCCTGATCTATGCCGCTTCTAaTCGGCAGAG
 CGGGATTCCCGCTAGATTCTCTGGCAGTGGGTCAGGAACAGACTTTACCCTGACAAT
 CTCAAGCCTGGAGCCTGAAGATTTCCGCCGTGTACTATTGCCAGCAGTACAACATCTA
 CCCATATACATTTGGCCAGGGGACTCGGCTGGAGATCAAG

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи H5L14 представлена в SEQ ID NO: 17.

EIVLTQSPATLSASPGERATISCRASQSVSSWLAWYQQKPGQAPRSLIYAASNLS
 GIPARFSGSGSGTDFLTITISLEPEDFAVYYCQQYNIYPFTFGQGTRLEIK

Нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи H5L14 представлена в SEQ ID NO: 18.

GAGATCGTCCTGACACAGAGTCCTGCTACCCTGAGCGCTTCCCCAGGAGAGA
 GGGCAACCATCTCCTGCCGCGCTCTCAGaGcGTTAGCTCCTGGCTGGCTTGGTACCA
 GCAGAAGCCAGGCCAGGCACCCCGAAGCCTGATCTATGCCGCTTCTAaTCTGCAGAG
 CGGGATTCCCGCTAGATTCTCTGGCAGTGGGTCAGGAACAGACTTTACCCTGACAAT
 CTCAAGCCTGGAGCCTGAAGATTTCCGCCGTGTACTATTGCCAGCAGTACAACATCTA
 CCCATTTACATTTGGCCAGGGGACTCGGCTGGAGATCAAG

LCDR1 из L10 представлена в SEQ ID NO: 19.

QSVGSW

LCDR1 из L11, L12 и L14 представлена в SEQ ID NO: 20.

QSVSSW

LCDR2 L10, L11, L12 и L14 представлена в SEQ ID NO: 21.

ASN

LCDR3 L10, L11 и L12 представлена в SEQ ID NO: 22.

QQYNIYPYT

LCDR3 из L14 представлена в SEQ ID NO: 23.

QQYNIYPFT

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи H8L15 представлена в SEQ ID NO: 24.

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCSQSSGYTFTSYWIGWVRQMPGQGLEWIGIMSPV
 DSDIRYNPMFRGQVTMSVDKSSSTAYLQWSSLKASDTAMYYCARRRPGQGYFDWVWGQ
 GTMVTVSS

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи H8L15 представлена в SEQ ID NO: 25.

EIVLTQSPATLSASPGERATISCRASQSVGTWVAWYQQKPGQAPRSLIYAASNLS

SGIPARFSGSGSGTDFLTITISLEPEDFAVYYCQQYNIYPYTFGQGTRLEIK

Для H8L15, HCDR1 представлена в SEQ ID NO: 26, HCDR2 представлена в SEQ ID NO: 4, HCDR3 представлена в SEQ ID NO: 5, LCDR1 представлена в SEQ ID NO: 27, LCDR2 представлена в SEQ ID NO: 28, LCDR3 представлена в SEQ ID NO: 22, FR-H1 представлена в SEQ ID NO: 29, FR-H2 представлена в SEQ ID NO: 30, FR-H3 представлена в SEQ ID NO: 31, FR-H4 представлена в SEQ ID NO: 32, FR-L1 представлена в SEQ ID NO: 33, FR-L2 представлена в SEQ ID NO: 34, FR-L3 представлена в SEQ ID NO: 35, и FR-L4 представлена в SEQ ID NO: 36.

HCDR1: GYTFTSYW (SEQ ID NO: 26)
 HCDR2: MSPVDSI (SEQ ID NO: 4)
 HCDR3: ARRRPGQGYFDF (SEQ ID NO: 5)
 LCDR1: QSVGTW (SEQ ID NO: 27)
 LCDR2: AAS (SEQ ID NO: 28)
 LCDR3: QQYNIYPYT (SEQ ID NO: 22)
 FR-H1: EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQSS (SEQ ID NO: 29)
 FR-H2: IGWVRQMPGQGLEWIGI (SEQ ID NO: 30)
 FR-H3: RYNPMFRGQVTMSVDKSSSTAYLQWSSLKASDTAMYYC (SEQ ID NO:

31)

FR-H4: WGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 32)
 FR-L1: EIVLTQSPATLSASPGERATISCRAS (SEQ ID NO: 33)
 FR-L2: VAWYQQKPGQAPRSLIY (SEQ ID NO: 34)
 FR-L3: NLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 35)
 FR-L4: FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 36)

Нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи H8L15 представлена в SEQ ID NO: 37.

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCCGAAGTGAAGAAACCCGGGGAGAGT
 CTGAAGATCTCATGCCAGAGCTCCGGCTACACCTCACCTCATATTGGATCGGGTGG
 GTGAGACAGATGCCTGGCCAGGGGCTGGAATGGATCGGAATTATGAGCCAGTGGAA
 CTCCGATATTCGCTACAACCCCATGTTTCGAGGCCAGGTGACAATGAGCGTGGACAA
 GTCTAGTTCAACTGCTTATCTGCAGTGGAGCTCCCTGAAAGCCAGCGATAACCGCTAT
 GTACTATTGTGCCCGGAGAAGGCCTGGACAGGGCTACTTCGACTTTTGGGGGCAGG
 GAACTATGGTGACCGTCTCTAGT

Нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи H8L15 представлена в SEQ ID NO: 38.

GAGATCGTCCTGACACAGAGTCCTGCTACCCTGAGCGCTTCCCAGGAGAGA
 GGGCAACCATCTCCTGCCGCGCTCTCAGAGCGTTGGCACCTGGGTGGCTTGGTACC
 AGCAGAAGCCAGGCCAGGCACCCCGAAGCCTGATCTATGCCGCTTCAATCTGCAG
 AGCGGGATTCCCGCTAGATTCTCTGGCAGTGGGTCAGGAACAGACTTTACCCTGACA
 ATCTCAAGCCTGGAGCCTGAAGATTTCGCCGTGTACTATTGCCAGCAGTACAACATC
 TACCCATATACATTTGGCCAGGGGACTCGGCTGGAGATCAAG

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи H8L15 представлена в SEQ ID NO: 39.

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQSSGYTFTSYWIGWVRQMPGQGLEWIGIMSPV
DSDIRYNPMFRGQVTMSVDKSSSTAYLQWSSLKASDTAMYYCARRRRPGQGYDFWVWQ
GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH
TFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPP
CPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLL
YSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность легкой цепи H8L15 представлена в SEQ ID NO: 40.

EIVLTQSPATLSASPGERATISCRASQSVGTWVAWYQQKPGQAPRSLIYAASNLQ
SGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQYNIYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLS
STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPPVTKSFRGEC

Для H5L9, последовательности FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4 такие же, как и у H8L15, последовательность FR-L1 представлена в SEQ ID NO: 41, последовательность FR-L2 представлена в SEQ ID NO: 42, FR-L3 представлена в SEQ ID NO: 43, и FR-L4 представлена в SEQ ID NO: 44.

FR-L1: DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKAS (SEQ ID NO: 41)
 FR-L2: LAWYQQKPGKAPKSLIYS (SEQ ID NO: 42)
 FR-L3: RQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 43)
 FR-L4: FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 44)

Для H5L10, последовательности FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4 такие же, как и у H8L15, последова-

тельность FR-L1 представлена в SEQ ID NO: 33, последовательность FR-L2 представлена в SEQ ID NO: 45, FR-L3 представлена в SEQ ID NO: 46, и FR-L4 представлена в SEQ ID NO: 36.

FR-L1: EIVLTQSPATLSASPGERATISCRAS (SEQ ID NO: 33)

FR-L2: LAWYQQKPGQAPRSLIYA (SEQ ID NO: 45)

FR-L3: LQSGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 46)

FR-L4: FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 36)

Для H5L11, последовательности FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4 такие же, как и у H8L15, последовательность FR-L1 представлена в SEQ ID NO: 33, последовательность FR-L2 представлена в SEQ ID NO: 47, FR-L3 представлена в SEQ ID NO: 46, и FR-L4 представлена в SEQ ID NO: 36.

FR-L1: EIVLTQSPATLSASPGERATISCRAS (SEQ ID NO: 33)

FR-L2: LAWYQQKPGQAPRSLIYS (SEQ ID NO: 47)

FR-L3: LQSGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 46)

FR-L4: FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 36)

Для H5L12, последовательности FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4 такие же, как и для H8L15, последовательность FR-L1 представлена в SEQ ID NO: 33, последовательность FR-L2 представлена в SEQ ID NO: 45, FR-L3 представлена в SEQ ID NO: 48, и FR-L4 представлена в SEQ ID NO: 36.

FR-L1: EIVLTQSPATLSASPGERATISCRAS (SEQ ID NO: 33)

FR-L2: LAWYQQKPGQAPRSLIYA (SEQ ID NO: 45)

FR-L3: RQSGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 48)

FR-L4: FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 36)

Для H5L14, последовательности FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4 такие же, как и у H8L15, последовательность FR-L1 представлена в SEQ ID NO: 33, последовательность FR-L2 представлена в SEQ ID NO: 45, FR-L3 представлена в SEQ ID NO: 46, и FR-L4 представлена в SEQ ID NO: 36.

FR-L1: EIVLTQSPATLSASPGERATISCRAS (SEQ ID NO: 33)

FR-L2: LAWYQQKPGQAPRSLIYA (SEQ ID NO: 45)

FR-L3: LQSGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 46)

FR-L4: FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 36)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи H5L9, H5L10, H5L11, H5L12 и H5L14 представлена в SEQ ID NO: 49.

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQSSGYSFTTYWIGWVRQMPGGLEWIGIMSPV
DSDIRYNPMFRGQVTMSVDKSSSTAYLQWSSLKASDTAMYYCARRRPGQGYDFWGG
GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

Аминокислотная последовательность легкой цепи H5L9 представлена в SEQ ID NO: 50.

DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKASQNVGSWLAWYQQKPGKAPKSLIYSASSR
QSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFATYYCQYDIYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь аминокислотной последовательности H5L10 представлена в SEQ ID NO: 51.

EIVLTQSPATLSASPGERATISCRASQSVGSWLAWYQQKPGQAPRSLIYAASNLR
SGIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQYNIYPYTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Аминокислотная последовательность легкой цепи H5L11 представлена в SEQ ID NO: 52.

EIVLTQSPATLSASPGERATISCRASQSVSSWLAWYQQKPGQAPRSLIYSASNLR
GIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQYNIYPYTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFI
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Аминокислотная последовательность легкой цепи H5L12 представлена в SEQ ID NO: 53.

EIVLTQSPATLSASPGERATISCRASQSVSSWLAWYQQKPGQAPRSLIYAASN**RQ**
SGIPARFSGSGSGTDFLTITISLEPEDFAVYYCQQYNIYPYTFGGQTRLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Аминокислотная последовательность легкой цепи H5L14 представлена в SEQ ID NO: 54.

EIVLTQSPATLSASPGERATISCRASQSVSSWLAWYQQKPGQAPRSLIYAASN**LQS**
GIPARFSGSGSGTDFLTITISLEPEDFAVYYCQQYNIYPYTFGGQTRLEIKRTVAAPSVFI
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающееся с IL-12/IL-23 р40 человека, где антитело содержит

(1) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, последовательности, по меньшей мере на 98% идентичной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, где вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 3, HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 4, и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 5; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6, последовательности, по меньшей мере на 80% идентичной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6, где вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, представленную SEQ ID NO: 8, LCDR2, представленную SEQ ID NO: 9, и LCDR3, представленную SEQ ID NO: 10;

(2) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, последовательности, по меньшей мере на 98% идентичной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, где вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, представленную SEQ ID NO: 3, HCDR2, представленную SEQ ID NO: 4, и HCDR3, представленную SEQ ID NO: 5; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11, последовательности, по меньшей мере на 98% идентичной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11, где вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, представленную SEQ ID NO: 19, LCDR2, представленную SEQ ID NO: 21, и LCDR3, представленную SEQ ID NO: 22;

(3) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1; и вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13;

(4) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, последовательности, по меньшей мере на 98% идентичной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, где вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, представленную SEQ ID NO: 3, HCDR2, представленную SEQ ID NO: 4, и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 5; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15, последовательности, по меньшей мере на 96% идентичной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15, где вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 20, LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 21, и LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 22;

(5) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, последовательности, по меньшей мере на 98% идентичной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, где вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, представленную SEQ ID NO: 3, HCDR2, представленную SEQ ID NO: 4, и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 5; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17, последовательности, по меньшей мере на 96% идентичной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17, где вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 20, LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 21, и LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 23;

(6) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24,

последовательности, по меньшей мере на 98% идентичной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24, где переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, представленную SEQ ID NO: 26, HCDR2, представленную SEQ ID NO: 4, и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 5; и

переменную область легкой цепи, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 25,

последовательности, по меньшей мере на 80% идентичной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 25, где переменная область легкой цепи содержит LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 27, LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 28, и LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 22.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, отличающееся тем, что антитело дополнительно содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, и константной областью тяжелой цепи является С-участок гамма-1 цепи Ig в GenBank ACCESSION No. P01857; константной областью легкой цепи является С-область каппа-цепи Ig в GenBank ACCESSION No. P01834.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1, 2, отличающееся тем, что антитело содержит или состоит из тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 19, и легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 20.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, Fab/c, фрагмента определяющей комплементарность области (CDR), одноцепочечного антитела, бивалентного антитела и доменного антитела.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что антителом является гуманизованное антитело, химерное антитело или мультиспецифическое антитело.

6. Выделенный полипептид, специфически связывающийся с IL-12/IL-23 p40 человека, выбранный из группы, состоящей из

(1) выделенного полипептида, содержащего переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 3, 4 и 5 соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, указанные в SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно;

(2) выделенного полипептида, содержащего переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 3, 4 и 5 соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 19, 21 и 22 соответственно;

(3) выделенного полипептида, содержащего переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO:1, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO:13;

(4) выделенного полипептида, содержащего переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO:1, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO:15;

(5) выделенного полипептида, содержащего переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 3, 4 и 5 соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 20, 21 и 23 соответственно;

(6) выделенного полипептида, содержащего переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 26, 4 и 5 соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 27, 28 и 22 соответственно.

7. Выделенный полинуклеотид, кодирующий выделенный полипептид по п.6.

8. Конъюгат антитела, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5 и конъюгированную группу, связанную с ним, где конъюгированной группой является метка очистки, цитотоксический агент или детектируемая метка.

9. Конъюгат антитела по п.8, где конъюгированной группой является радиоизотоп, люминесцентное вещество, красящее вещество, фермент или полиэтиленгликоль.

10. Слитый белок, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5.

11. Мультиспецифическое антитело, содержащее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5.

12. Набор для обнаружения присутствия или уровня домена белка IL-12/IL-23 p40 человека в образце, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, конъюгат антитела по п.8 или 9, слитый белок по п.10 или мультиспецифическое антитело по п.11.

13. Набор по п.12, где набор дополнительно содержит второе антитело, специфически идентифицирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

14. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5, конъюгата

антитела по п.8 или 9, слитого белка по п.10 или мультиспецифического антитела по п.11 для получения набора для обнаружения присутствия или уровня домена белка IL-12/IL-23 p40 человека в образце.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, конъюгат антитела по п.8 или 9, слитый белок по п.10 или мультиспецифическое антитело по п.11.

16. Фармацевтическая композиция по п.15, где фармацевтическая композиция находится в форме, подходящей для введения путем подкожной инъекции, внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции или инъекции в очаг поражения.

17. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5, конъюгата антитела по п.8 или 9, слитого белка по п.10, или мультиспецифического антитела по п.11, или фармацевтической композиции по п.15 или 16 для получения лекарственного средства для лечения заболевания, ассоциированного с активностью IL12/IL23.

18. Способ блокировки связывания домена белка IL-12/IL-23 p40 человека с лигандом IL-12R β 1 или IL-23R, включающий введение клетки, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, конъюгат антитела по п.8 или 9, слитый белок по п.10, или мультиспецифическое антитело по п.11, или фармацевтическую композицию по п.15 или 16, или введение нуждающемуся субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5, конъюгата антитела по любому из пп. по п.8 или 9, слитого белка по п.10, мультиспецифического антитела по п.11 или фармацевтической композиции по п.15 или 16.

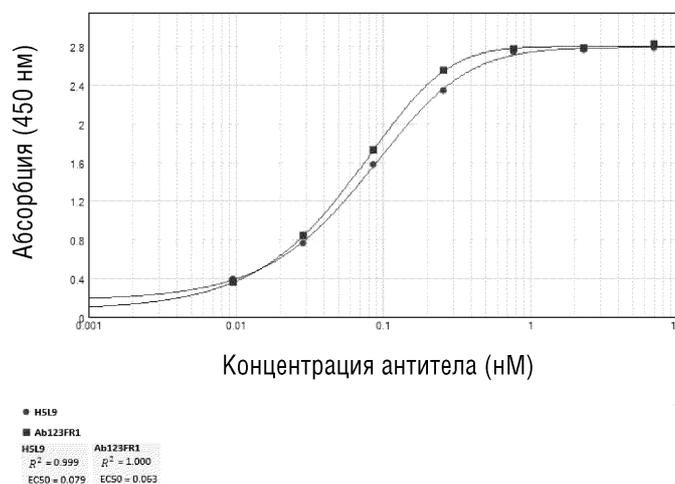
19. Способ лечения заболевания, ассоциированного с активностью IL-12/IL-23, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5, конъюгата антитела по п.8 или 9, слитого белка по п.10, мультиспецифического антитела по п.11 или фармацевтической композиции по п.15 или 16.

20. Способ по п.19, где

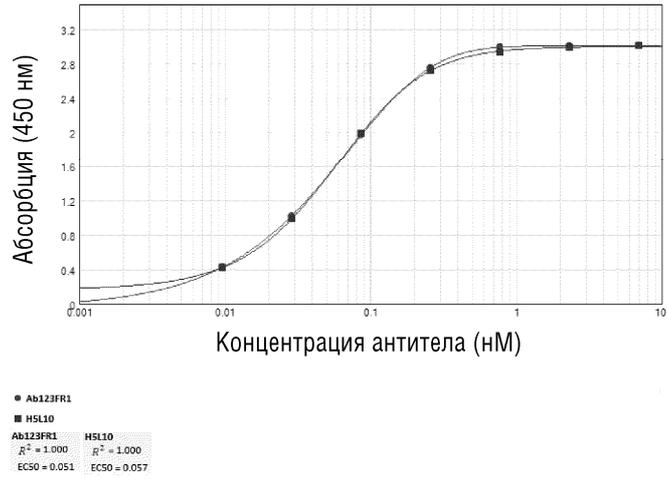
субъект получил обычное лечение или неадекватно отвечает, не отвечает или не переносит биологические агенты и, таким образом, не может достичь полного ответа или частичного ответа;

заболевание, связанное с активностью IL12/IL23, представляют собой аутоиммунное заболевание или язвенный колит; и/или

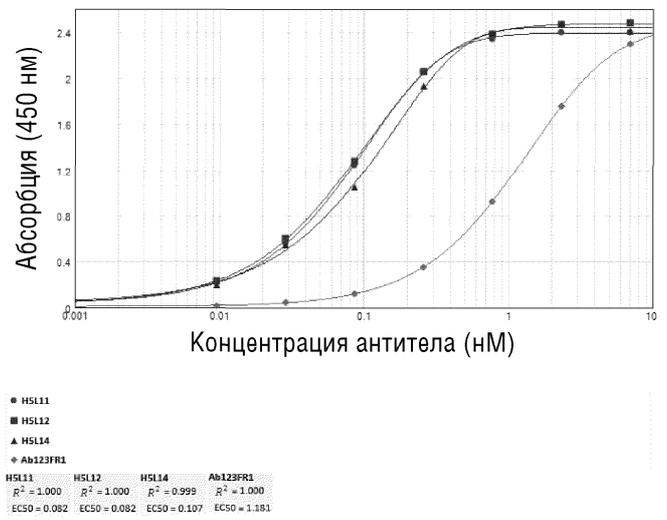
аутоиммунное заболевание представляет собой бляшечный псориаз или системную красную волчанку, или рефрактерный или рецидивирующий язвенный колит.



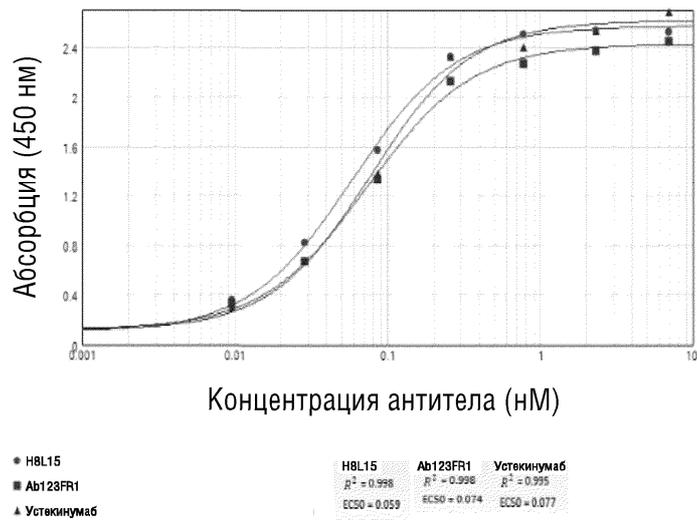
Фиг. 1



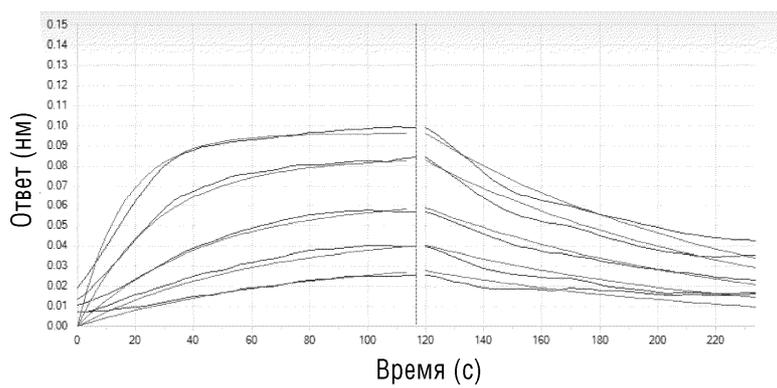
Фиг. 2



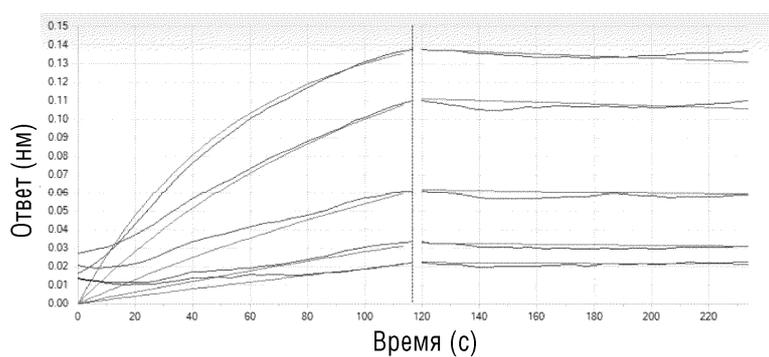
Фиг. 3



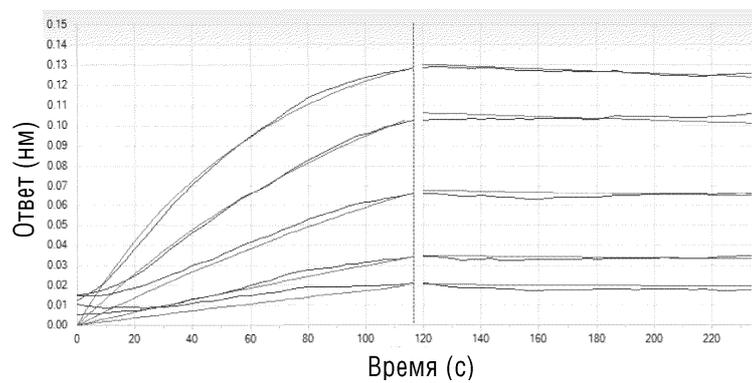
Фиг. 4



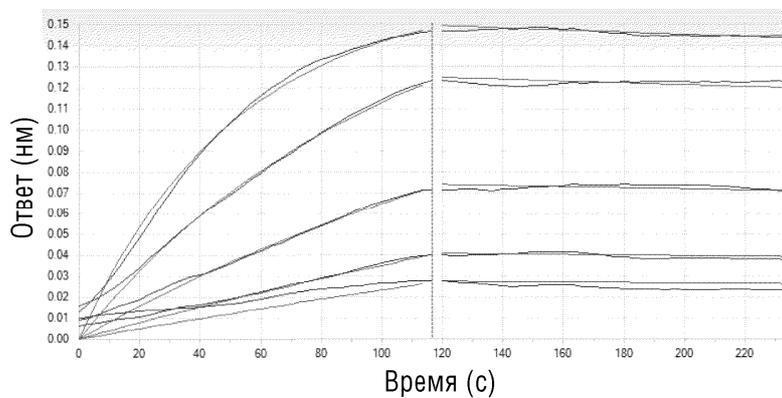
Фиг. 5



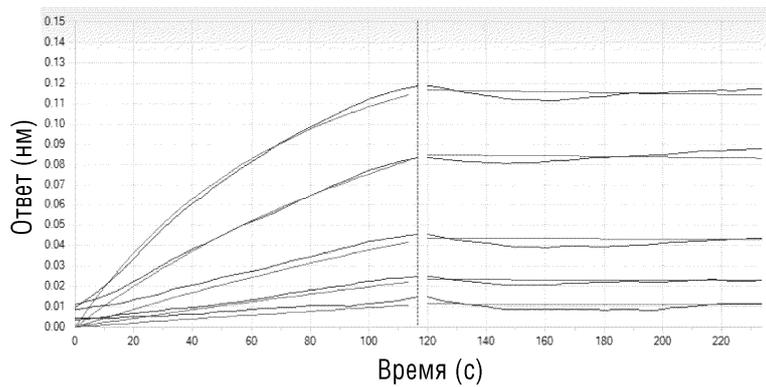
Фиг. 6



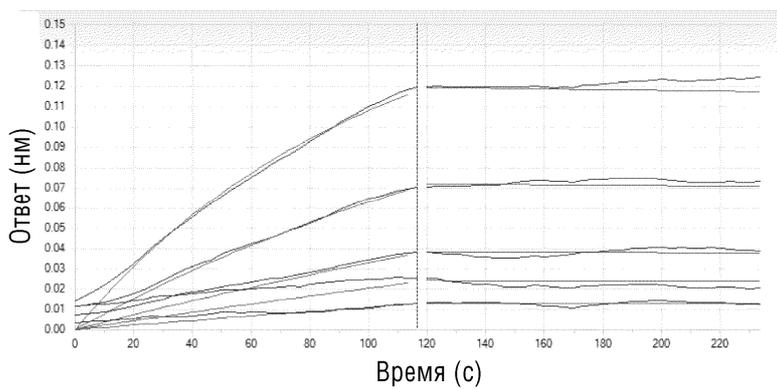
Фиг. 7



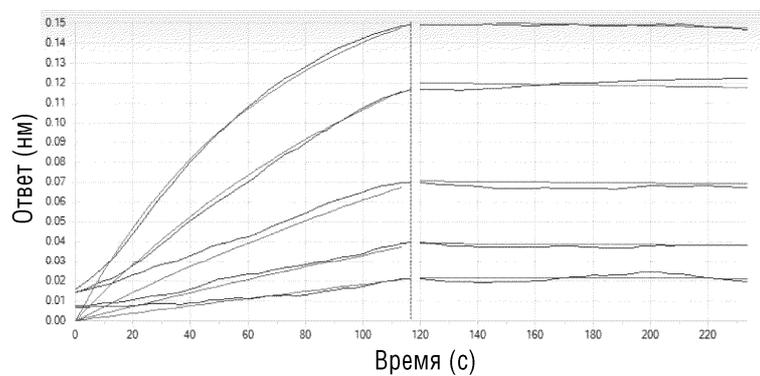
Фиг. 8



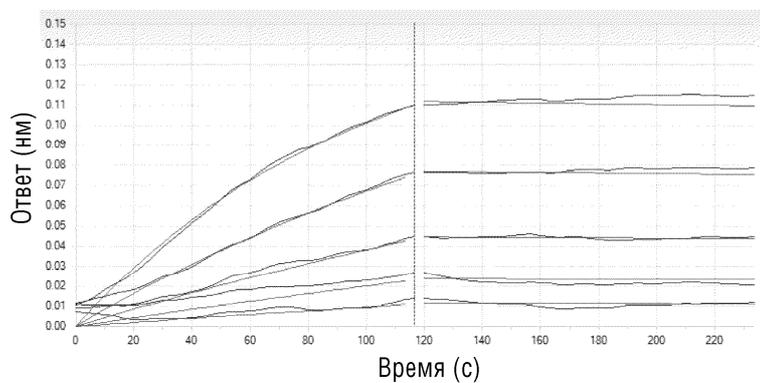
Фиг. 9



Фиг. 10

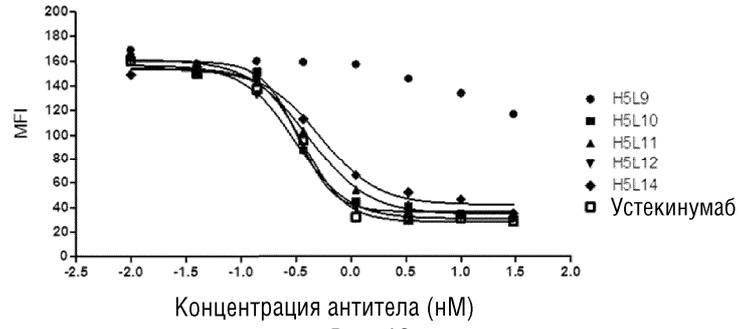


Фиг. 11

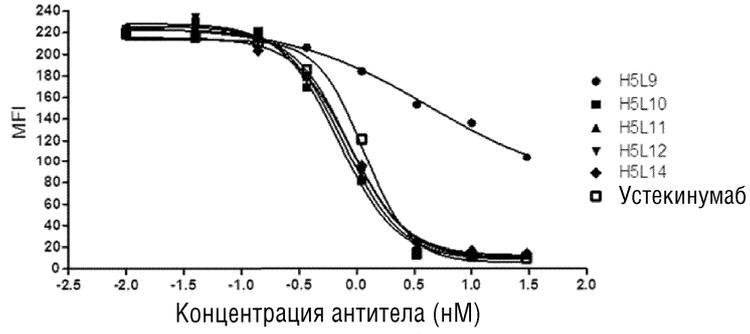


Фиг. 12

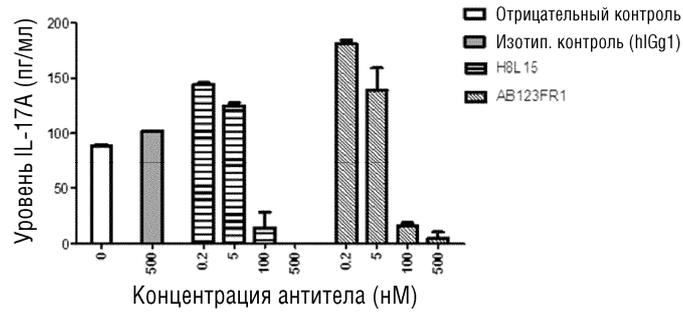
048249



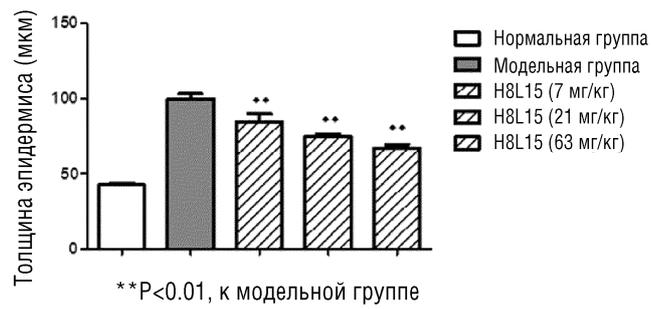
Фиг. 13



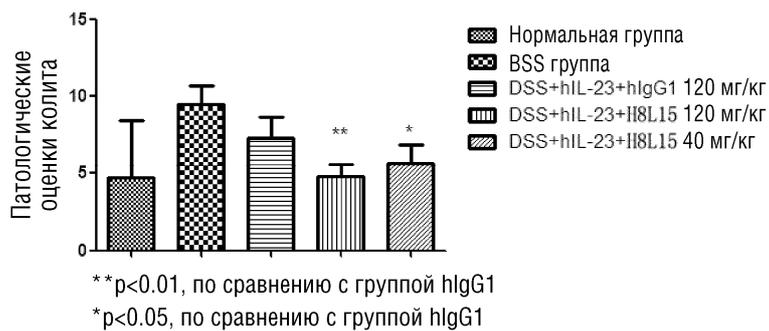
Фиг. 14



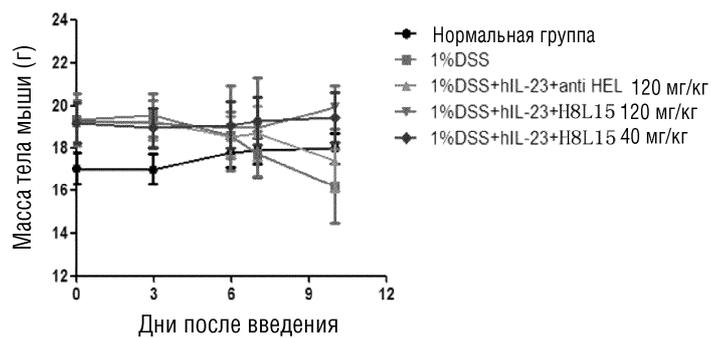
Фиг. 15



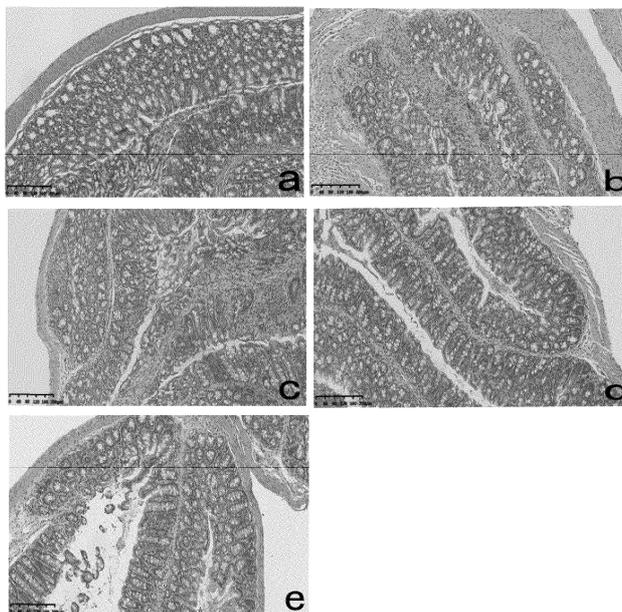
Фиг. 16



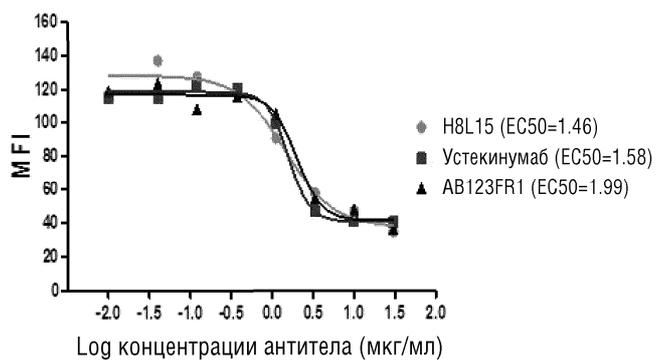
Фиг. 17



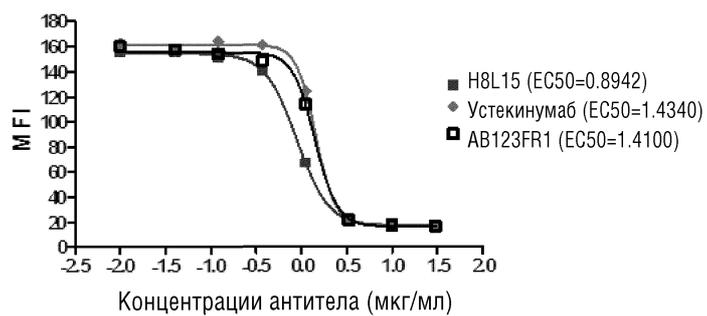
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21

