



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 107522783 B

(45)授权公告日 2020.07.07

(21)申请号 201710916535.7

(22)申请日 2017.09.30

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107522783 A

(43)申请公布日 2017.12.29

(73)专利权人 华博生物医药技术(上海)有限公司

地址 201203 上海市浦东新区中国(上海)
自由贸易试验区蔡伦路538号1幢1楼

(72)发明人 朱向阳 贾慧峰 于海佳 俞玲

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 郑震 刘真真

(51)Int.Cl.

C07K 16/24(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

A61P 25/00(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

A61P 19/02(2006.01)

A61P 19/08(2006.01)

A61P 19/10(2006.01)

A61P 17/06(2006.01)

A61P 1/04(2006.01)

A61P 11/06(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

US 2011268707 A1,2011.11.03

CN 103215293 A,2013.07.24

CN 104936981 A,2015.09.23

CN 105073775 A,2015.11.18

审查员 邢维玲

权利要求书2页 说明书16页

序列表5页

(54)发明名称

一种抗白介素17A的抗体、其制备方法和应用

(57)摘要

本发明提供了一种抗白介素17A(IL-17A)的抗体、其制备方法和应用。具体地,本发明提供了一种新的抗IL-17A单克隆抗体。本发明的抗体能够高特异性地结合IL-17A抗原,其具有很高的亲和力和很低的免疫原性,并且用于制备预防或治疗IL-17A相关的疾病如各种炎症或自身免疫疾病的药物。

1. 一种抗体,其特征在于,所述抗体具有:
 - (1) 重链可变区,所述的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR:
SEQ ID NO:7所示的CDR1,
SEQ ID NO:8所示的CDR2,和
SEQ ID NO:9所示的CDR3;和
 - (2) 轻链可变区,所述的轻链可变区包括以下三个互补决定区CDR:
SEQ ID NO:10所示的CDR1',
氨基酸序列为GAT的CDR2',和
SEQ ID NO:11所示的CDR3'。
2. 根据权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5所示。
3. 根据权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:6所示。
4. 如权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述的抗体的重链还包括重链恒定区,所述的抗体的轻链还包括轻链恒定区。
5. 如权利要求4所述的抗体,其特征在于,所述的重链恒定区为人源、鼠源或兔源的。
6. 如权利要求4所述的抗体,其特征在于,所述的轻链恒定区为人源、鼠源或兔源的。
7. 根据权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述抗体选自:动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、或其组合。
8. 根据权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述抗体的重链可变区序列如SEQ ID NO.:1或5所示;和
所述的抗体的轻链可变区序列如SEQ ID NO.:2或6所示。
9. 根据权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述抗体的重链可变区序列如SEQ ID NO.:1所示;并且所述的抗体的轻链可变区序列如SEQ ID NO.:2所示。
10. 根据权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述抗体的重链可变区序列如SEQ ID NO.:5所示;并且所述的抗体的轻链可变区序列如SEQ ID NO.:6所示。
11. 一种重组蛋白,其特征在于,所述的重组蛋白具有:
 - (i) 如权利要求1所述的抗体;以及
 - (ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。
12. 一种CAR构建物,其特征在于,所述的CAR构建物的单克隆抗体抗原结合区域的scFV段为特异性结合于IL-17A的结合区,并且所述scFv具有重链可变区和轻链可变区,
且所述的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR:
SEQ ID NO:7所示的CDR1,
SEQ ID NO:8所示的CDR2,和
SEQ ID NO:9所示的CDR3;
且所述的轻链可变区包括以下三个互补决定区CDR:
SEQ ID NO:10所示的CDR1',
氨基酸序列为GAT的CDR2',和
SEQ ID NO:11所示的CDR3'。

13. 一种重组的免疫细胞, 其特征在于, 所述的免疫细胞表达外源的如权利要求12所述的CAR构建物。

14. 一种抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述的抗体药物偶联物含有:

(a) 抗体部分, 所述抗体部分是如权利要求1所述的抗体; 和

(b) 与所述抗体部分偶联的偶联部分, 所述偶联部分选自下组: 可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合。

15. 一种活性成分的用途, 其特征在于, 所述活性成分选自下组: 如权利要求1所述的抗体、如权利要求11所述的重组蛋白、或其组合, 其特征在于, 所述活性成分用于 (a) 制备检测试剂或试剂盒; 和/或 (b) 制备预防和/或治疗IL-17A相关疾病的药物。

16. 一种药物组合物, 其特征在于, 所述的药物组合物含有:

(i) 活性成分, 所述活性成分选自下组: 如权利要求1所述的抗体、如权利要求11所述的重组蛋白、如权利要求13所述的免疫细胞、如权利要求14所述的抗体药物偶联物、或其组合; 以及

(ii) 药学上可接受的载体。

17. 一种多核苷酸, 其特征在于, 所述的多核苷酸编码选自下组的多肽:

(1) 如权利要求1所述的抗体;

(2) 如权利要求11所述的重组蛋白; 或

(3) 如权利要求12所述的CAR构建物。

18. 一种载体, 其特征在于, 所述的载体含有如权利要求17所述的多核苷酸。

19. 一种遗传工程化的宿主细胞, 其特征在于, 所述的宿主细胞含有如权利要求18所述的载体或基因组中整合有如权利要求17所述的多核苷酸。

20. 一种体外非诊断性地检测样品中IL-17A蛋白的方法, 其特征在于, 所述方法包括步骤:

(1) 在体外, 将所述样品与如权利要求1所述的抗体接触;

(2) 检测是否形成抗原-抗体复合物, 其中形成复合物就表示样品中存在IL-17A蛋白。

21. 一种检测板, 其特征在于, 所述的检测板包括: 基片(支撑板) 和测试条, 所述的测试条含有如权利要求1所述的抗体或如权利要求14所述的抗体药物偶联物。

22. 一种试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒中包括:

(1) 第一容器, 所述第一容器中含有如权利要求1所述的抗体; 和/或

(2) 第二容器, 所述第二容器中含有抗如权利要求1所述的抗体的二抗;

或者, 所述试剂盒含有如权利要求21所述的检测板。

23. 一种重组多肽的制备方法, 其特征在于, 所述方法包括:

(a) 在适合表达的条件下, 培养如权利要求19所述的宿主细胞;

(b) 从培养物中分离出重组多肽, 所述的重组多肽是如权利要求1所述的抗体或如权利要求11所述的重组蛋白。

一种抗白介素17A的抗体、其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医药领域,具体地涉及靶向于白介素17A(也称IL-17)的抗体、其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 迄今为止,IL-17家族已有6个成员被发现:IL-17A(IL-17)、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E(IL-25)、IL-17F。这些白介素-17细胞因子可以结合到相对应的受体上,从而介导不同的炎症反应。

[0003] IL-17A最初被发现是由激活的CD4⁺T细胞分泌。这一类特征性分泌IL-17A的T细胞亚群被称为Th17细胞。除了Th17细胞以外,细胞毒性CD8⁺T细胞(Tc17)、 $\gamma\delta$ T细胞、自然杀伤T细胞(NKT-17)和B细胞也能在特定条件下表达IL-17A。先天免疫细胞,包括单核细胞、中性粒细胞、自然杀伤细胞和淋巴组织诱导样(Lti-like)细胞也可以产生IL-17A。最近,在一项关于锥虫感染的研究中发现,B细胞也可以产生IL-17A。一些非免疫细胞,比如肠道潘氏细胞和肠上皮细胞也可以在应激情况下产生IL-17A。由于Th17细胞在体内的分布最广,而且在炎症反应中有广泛作用,所以,通常认为它还是IL-17A的主要来源细胞。而产生IL-17A的先天细胞主要作为机体的早期防御细胞参与宿主的抗感染免疫反应。

[0004] IL-17A是由155个氨基酸的两条链通过二硫键连接的同源二聚体,分子量为35kDa。IL-17的结构由23个氨基酸组成的信号肽(AA)及123个氨基酸链区域构成。

[0005] IL-17结合I型细胞表面的受体称为IL-17R,其中有至少三种:IL-17RA、IL-17RB和IL-17RC。IL-17A与IL-17F以同源二聚体或异源二聚体的形式结合IL-17RA和IL-17RC受体复合物来转导信号,并参与机体自身免疫疾病、多种炎症反应以及宿主抗感染免疫反应。IL-17C结合IL-17RA和IL-17RE受体复合物激活下游信号,促进机体抗感染免疫、自身免疫疾病和炎症反应。IL-17B被发现可以结合IL-17RB,但其下游信号仍不清楚。IL-17RB也可与IL-17RA形成受体复合物介导IL-17E引起II型免疫反应。IL-17E也被报道可以促进肿瘤细胞的凋亡。IL-17D的受体及下游信号以及孤儿受体IL-17RD的配体及下游信号目前仍不清楚。

[0006] IL-17A主要诱导包括上皮细胞和基质细胞在内的非造血来源细胞的信号激活。IL-17A诱导表达的多种炎症因子和趋化因子可以促进多种免疫细胞的募集,从而对自身免疫疾病起到促进作用。研究发现,IL-17A和IL-17F,及其主要分泌T细胞亚群Th17细胞,在多种自身免疫疾病中也发挥着重要作用,这其中包括自身免疫疾病,如类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis,RA)和多发性硬化(multiple sclerosis,MS),以及炎症性大肠病(inflammatory bowel disease,IBD)、银屑病(psoriasis)、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus,SLE)和I型糖尿病(type1diabetes,T1D)。

[0007] IL-17A与IL-17F主要通过诱导靶细胞表达多种炎症因子和趋化因子来发挥其促进炎症反应的功能。IL-17A与细胞表面受体IL-17RA结合,招募IL-17RC形成异源二聚体,介导下游信号通路。IL-17与其受体结合后能激活TRAF6(TNF-receptor associated factor

6)。IL-17与IL-1及TNF共用相同的转录途径,它可以激活NF- κ B和3个MAP(丝裂原活化蛋白)酶,包括ERK1、ERK2、JNK、p38。这些通路在滑膜细胞和软骨细胞中都有发现。

[0008] 因此,鉴于IL-17A在各类相关疾病中作用和功能,本领域仍然需要开发适于治疗患者的改善的抗IL-17A特异性抗体。

发明内容

[0009] 本发明目的就是提供了一种抗IL-17A的抗体、其制备方法和用途。

[0010] 本发明的第一方面,提供了一种抗体的重链可变区,所述的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR:

[0011] SEQ ID NO:7所示的CDR1,

[0012] SEQ ID NO:8所示的CDR2,和

[0013] SEQ ID NO:9所示的CDR3。

[0014] 在另一优选例中,上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个(如1-3个,较佳地1-2个,更佳地1个)氨基酸并能够保留IL-17A结合亲和力的衍生序列。

[0015] 在另一优选例中,所述重链可变区还包括人源的FR区或鼠源的FR区。

[0016] 在另一优选例中,所述重链可变区具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。

[0017] 在另一优选例中,所述重链可变区具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。

[0018] 本发明的第二方面,提供了一种抗体的重链,所述的重链具有如本发明第一方面所述的重链可变区。

[0019] 在另一优选例中,所述的抗体的重链还包括重链恒定区。

[0020] 在另一优选例中,所述的重链恒定区为人源、鼠源或兔源的。

[0021] 本发明的第三方面,提供了一种抗体的轻链可变区,所述的轻链可变区包括以下三个互补决定区CDR:

[0022] SEQ ID NO:10所示的CDR1',

[0023] 氨基酸序列为GAT的CDR2',和

[0024] SEQ ID NO:11所示的CDR3'。

[0025] 在另一优选例中,上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个(如1-3个,较佳地1-2个,更佳地1个)氨基酸并能够保留IL-17A结合亲和力的衍生序列。

[0026] 在另一优选例中,所述轻链可变区还包括人源的FR区或鼠源的FR区。

[0027] 在另一优选例中,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

[0028] 在另一优选例中,所述轻链可变区具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。

[0029] 本发明的第四方面,提供了一种抗体的轻链,所述的轻链具有如权本发明第三方面所述的轻链可变区。

[0030] 在另一优选例中,所述的抗体的轻链还包括轻链恒定区。

[0031] 在另一优选例中,所述的轻链恒定区为人源、鼠源或兔源的。

[0032] 本发明的第五方面,提供了一种抗体,所述抗体具有:

[0033] (1) 如本发明第一方面所述的重链可变区;和/或

- [0034] (2) 如本发明第三方面所述的轻链可变区；
- [0035] 或者，所述抗体具有：如本发明第二方面所述的重链；和/或如本发明第四方面所述的轻链。
- [0036] 在另一优选例中，所述抗体对人IL-17A蛋白（优选野生型）的结合力的EC₅₀为5-50ng/ml。
- [0037] 在另一优选例中，所述抗体对人IL-17A蛋白（优选野生型）的结合力的EC₅₀为12.6ng/ml。
- [0038] 在另一优选例中，所述抗体选自：动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、或其组合。
- [0039] 在另一优选例中，所述的抗体为双链抗体、或单链抗体。
- [0040] 在另一优选例中，所述的抗体为单克隆抗体。
- [0041] 在另一优选例中，所述的抗体是部分或全人源化的单克隆抗体。
- [0042] 在另一优选例中，所述抗体的重链可变区序列如SEQ ID NO.:1或5所示；和/或
- [0043] 所述的抗体的轻链可变区序列如SEQ ID NO.:2或6所示。
- [0044] 在另一优选例中，所述抗体的重链可变区序列如SEQ ID NO.:1所示；并且所述的抗体的轻链可变区序列如SEQ ID NO.:2所示。
- [0045] 在另一优选例中，所述抗体的重链可变区序列如SEQ ID NO.:5所示；并且所述的抗体的轻链可变区序列如SEQ ID NO.:6所示。
- [0046] 在另一优选例中，所述的抗体为药物偶联物形式。
- [0047] 本发明的第六方面，提供了一种重组蛋白，所述的重组蛋白具有：
- [0048] (i) 如本发明第一方面所述的重链可变区、如本发明第二方面所述的重链、如本发明第三方面所述的轻链可变区、如本发明第四方面所述的轻链、或本发明第五方面所述的抗体；以及
- [0049] (ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。
- [0050] 在另一优选例中，所述的标签序列包括6His标签。
- [0051] 在另一优选例中，所述的重组蛋白（或多肽）包括融合蛋白。
- [0052] 在另一优选例中，所述的重组蛋白为单体、二聚体、或多聚体。
- [0053] 本发明的第七方面，提供了一种CAR构建物，所述的CAR构建物的单克隆抗体抗原结合区域的scFv段为特异性结合于IL-17A的结合区，并且所述scFv具有如本发明第一方面所述的重链可变区和如本发明第三方面所述的轻链可变区。
- [0054] 本发明的第八方面，提供了一种重组的免疫细胞，所述的免疫细胞表达外源的如本发明第七方面所述的CAR构建物。
- [0055] 在另一优选例中，所述的免疫细胞选自下组：NK细胞、T细胞。
- [0056] 在另一优选例中，所述的免疫细胞来自人或非人哺乳动物（如鼠）。
- [0057] 本发明的第九方面，提供了一种抗体药物偶联物，所述的抗体药物偶联物含有：
- [0058] (a) 抗体部分，所述抗体部分选自下组：如本发明第一方面所述的重链可变区、如本发明第二方面所述的重链、如本发明第三方面所述的轻链可变区、如本发明第四方面所述的轻链、或本发明第五方面所述的抗体、或其组合；和
- [0059] (b) 与所述抗体部分偶联的偶联部分，所述偶联部分选自下组：可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合。

[0060] 在另一优选例中,所述的抗体部分与所述的偶联部分通过化学键或接头进行偶联。

[0061] 本发明的第十方面,提供了一种活性成分的用途,所述活性成分选自下组:如本发明第一方面所述的重链可变区、如本发明第二方面所述的重链、如本发明第三方面所述的轻链可变区、如本发明第四方面所述的轻链、或本发明第五方面所述的抗体、如本发明第六方面所述的重组蛋白、如本发明第八方面所述的免疫细胞、如本发明第九方面所述的抗体药物偶联物、或其组合,所述活性成分用于(a)制备检测试剂或试剂盒;和/或(b)制备预防和/或治疗IL-17A相关疾病的药物。

[0062] 在另一优选例中,所述IL-17A相关疾病选自下组:炎症、自身免疫疾病、或其组合;优选地为自身免疫疾病。

[0063] 在另一优选例中,所述的疾病选自下组:银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、多发性硬化症、炎性关节炎、或其组合,优选地为炎性关节炎。

[0064] 在另一优选例中,所述的炎性关节炎选自下组:骨关节炎、类风湿性关节炎、风湿性关节炎、或其组合,优选地为风湿性关节炎。

[0065] 在另一优选例中,所述的抗体为药物偶联物(ADC)形式。

[0066] 在另一优选例中,所述的检测试剂或试剂盒用于诊断IL-17A相关疾病。

[0067] 在另一优选例中,所述检测试剂或试剂盒用于检测样品中IL-17A蛋白。

[0068] 在另一优选例中,所述的检测试剂为检测片。

[0069] 本发明的第十一方面,提供了一种药物组合物,所述的药物组合物含有:

[0070] (i) 活性成分,所述活性成分选自下组:如本发明第一方面所述的重链可变区、如本发明第二方面所述的重链、如本发明第三方面所述的轻链可变区、如本发明第四方面所述的轻链、或本发明第五方面所述的抗体、如本发明第六方面所述的重组蛋白、如本发明第八方面所述的免疫细胞、如本发明第九方面所述的抗体药物偶联物、或其组合;以及

[0071] (ii) 药学上可接受的载体。

[0072] 在另一优选例中,所述的药物组合物为液态制剂。

[0073] 在另一优选例中,所述的药物组合物为注射剂。

[0074] 本发明的第十二方面,提供了一种多核苷酸,所述的多核苷酸编码选自下组的多肽:

[0075] (1) 如本发明第一方面所述的重链可变区、如本发明第二方面所述的重链、如本发明第三方面所述的轻链可变区、如本发明第四方面所述的轻链、或本发明第五方面所述的抗体;或

[0076] (2) 如本发明第六方面所述的重组蛋白;

[0077] (3) 如本发明第七方面所述的CAR构建物。

[0078] 本发明的第十三方面,提供了一种载体,所述的载体含有如本发明第十二方面所述的多核苷酸。

[0079] 在另一优选例中,所述的载体包括:细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒、或其他载体。

[0080] 本发明的第十四方面,提供了一种遗传工程化的宿主细胞,所述的宿主细胞含有如本发明第十三方面所述的载体或基因组中整合有如本发明第十二方面所述的多核苷酸。

[0081] 本发明的第十五方面,提供了一种体外检测(包括诊断性或非诊断性)样品中IL-17A蛋白的方法,所述方法包括步骤:

[0082] (1) 在体外,将所述样品与如本发明第五方面所述的抗体接触;

[0083] (2) 检测是否形成抗原-抗体复合物,其中形成复合物就表示样品中存在IL-17A蛋白。

[0084] 本发明的第十六方面,提供了一种检测板,所述的检测板包括:基片(支撑板)和测试条,所述的测试条含有如本发明第五方面所述的抗体或如本发明第九方面所述的免疫偶联物。

[0085] 本发明的第十七方面,提供了一种试剂盒,所述试剂盒中包括:

[0086] (1) 第一容器,所述第一容器中含有如本发明第五方面所述的抗体;和/或

[0087] (2) 第二容器,所述第二容器中含有抗如本发明第五方面所述的抗体的二抗;

[0088] 或者,所述试剂盒含有如本发明第十六方面所述的检测板。

[0089] 本发明的第十八方面,提供了一种重组多肽的制备方法,所述方法包括:

[0090] (a) 在适合表达的条件下,培养如本发明第十四方面所述的宿主细胞;

[0091] (b) 从培养物中分离出重组多肽,所述的重组多肽是如本发明第五方面所述的抗体或如本发明第六方面所述的重组蛋白。

[0092] 本发明的第十九方面,提供了一种IL-17A相关疾病的方法,所述方法包括:给需要的对象施用如本发明第五方面所述的抗体、所述抗体的抗体-药物偶联物、或表达所述抗体的CAR-T细胞、或其组合。

[0093] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

具体实施方式

[0094] 本发明人通过广泛而深入的研究,经过大量筛选,意外地获得一种具有极其优异的亲和力和特异性的抗IL-17A单克隆抗体,基于该抗体而获得的人源化抗体。本发明抗体能够高特异性地结合IL-17A抗原,其具有很高的亲和力(ELISA测定其EC₅₀约为15.4ng/ml),并且显著抑制IL-17A与IL-17受体的结合,而对于哺乳动物本身没有可见的毒副作用。在此基础上完成了本发明。

[0095] 术语

[0096] 如本文所用,术语“结合物”是指能够与靶点结合的可溶性受体或其片段或其类似物,或抗体或其片段或其类似物。本发明所述的“IL-17A结合物”,是指能特异性识别IL-17A并与IL-17A结合的抗体或其片段或其类似物。

[0097] 如本文所用,术语“给予”和“处理”是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物应用于动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体。“给予”和“处理”可以指治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触、以及试剂与流体的接触、流体与细胞的接触。“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理。“处理”当应用于人、动物或研究受试者时,是指治疗处理、预防或预防性措施,研究和诊断;包括IL-17A结合物与人或动物、受试者、细胞、组织、生理区室或生理流

体的接触。

[0098] 如本文所用,术语“治疗”指给予患者内用或外用治疗剂,包含本发明的任何一种IL-17A结合物及其组合物,所述患者具有一种或多种疾病症状,而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常,以有效缓解一种或多种疾病症状的治疗剂的量(治疗有效量)给予患者。

[0099] 如本文所用,术语“任选”或“任选地”意味着随后所描述的事件或情况可以发生但不是必须发生。例如,“任选包含1-3个抗体重链可变区”是指特定序列的抗体重链可变区可以有但不是必须有,可以是1个、2个或3个。

[0100] 抗体

[0101] 如本文所用,术语“抗体”指免疫球蛋白,是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同,故其抗原性也不同。据此,可将免疫球蛋白分为五类,或称为免疫球蛋白的不同种型,即IgM、IgD、IgG、IgA和IgE,对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、和 μ 。IgG代表免疫球蛋白中最重要的一类,由于化学结构和生物功能差异,它又可以分为4个子类:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 或 λ 链。不同类免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是本领域人员所熟知的。

[0102] 抗体重链和轻链靠近N端的约110个氨基酸的序列变化很大,为可变区(V区);靠近C端的其余氨基酸序列相对稳定,为恒定区(C区)。可变区包括3个高变区(HVR)和4个序列相对保守的FR区(FR)。4个FR的氨基酸序列相对比较保守,不直接参与结合反应。3个高变区决定抗体的特异性,又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR)由3个CDR区和4个FR区组成,从氨基端到羧基端依次排列的顺序为FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。轻链的3个CDR区,即轻链高变区(LCDR),指LCDR1、LCDR2和LCDR3;重链的3个CDR区,即重链高变区(HCDR),指HCDR1、HCDR2和HCDR3。发明所述的抗体或抗原结合片段的LCVR和HCVR区的CDR氨基酸残基在数量和位置符合已知的Kabat编号规则(LCDR1-3,HCDR2-3),或者符合kabat和chothia的编号规则(HCDR1)。天然重链和轻链可变区中的四个FR区大致上呈 β -折叠构型,由形成连接环的三个CDR相连,在某些情况下可形成部分 β 折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位。可以通过比较同类型的抗体的氨基酸序列来确定是哪些氨基酸构成了FR或CDR区域。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

[0103] 如本文所用,术语“抗原结合片段”,指具有抗原结合活性的Fab片段,Fab'片段,F(ab')₂片段,或单一Fv片段。Fv抗体含有抗体重链可变区、轻链可变区,但没有恒定区,并具有全部抗原结合位点的最小抗体片段。一般的,Fv抗体还包含VH和VL结构域之间的多肽接头,且能够形成抗原结合所需的结构。

[0104] 如本文所用,术语“抗原决定簇”指抗原上不连续的,由本发明抗体或抗原结合片段识别的三维空间位点。

[0105] 本发明不仅包括完整的抗体,还包括具有免疫活性的抗体的片段或抗体与其他序列形成的融合蛋白。因此,本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

[0106] 在本发明中,抗体包括用本领域技术人员熟知技术所制备的鼠的、嵌合的、人源化

的或者全人的抗体。重组抗体,例如嵌合的和人源化的单克隆抗体,包括人的和非人的部分,可以采用本领域熟知的DNA重组技术制备。

[0107] 如本文所用,术语“单克隆抗体”指得自单个细胞来源的克隆分泌的抗体。单克隆抗体是高度特异性的,针对单个抗原表位。所述的细胞可能是真核的、原核的或噬菌体的克隆细胞株。

[0108] 如本文所用,术语“嵌合抗体”是由鼠源性抗体的V区基因与人抗体的C区基因拼接为嵌合基因,然后插入载体,转染宿主细胞表达的抗体分子。既保留了亲本鼠抗体的高特异性和亲和力,又使其人源Fc段能有效介导生物学效应功能。

[0109] 如本文所用,术语“人源化抗体”,是本发明鼠抗的一种可变区改造形式,具有源自(或基本上源自)非人类抗体(优选小鼠单克隆抗体)的CDR区,和基本源自人源抗体序列的FR区和恒定区;即将鼠抗的CDR区序列嫁接到不同类型的人种系抗体构架序列上。因为CDR序列负责大部分的抗体-抗原相互作用,所以可以通过构建表达载体来表达模拟特定天然存在的抗体性质的重组抗体。

[0110] 在本发明中,抗体可以是单特异性、双特异性、三特异性、或者更多的多重特异性。

[0111] 在本发明中,本发明的抗体还包括其保守性变体,指与本发明抗体的氨基酸序列相比,有至多10个,较佳地至多8个,更佳地至多5个,最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表A进行氨基酸替换而产生。

[0112] 表A

[0113]

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg (R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn (N)	Gln;His;Lys;Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro;Ala	Ala
His (H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile (I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe	Leu
Leu (L)	Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys (K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met (M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe (F)	Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe

Val (V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala	Leu
---------	---------------------	-----

[0114] 抗IL-17A抗体

[0115] 如本文所用,术语“IL-17A”一般是指天然的或重组的人IL-17A,以及人IL-17A的非人同源物。除非另有指示,否则使用IL-17A的同源二聚体的分子量(例如对于人IL-17A为30KDa)计算IL-17A的摩尔浓度。

[0116] 如本文所用,术语“人IL-17A(huIL-17A)”是指人IL-17A蛋白登陆号NP-002180和AAT22064的成熟形式(即残基24-155),及其天然变体和多态性。

[0117] 本发明提供一种针对IL-17A的高特异性和高亲和力的抗体,其包括重链和轻链,所述重链含有重链可变区(VH)氨基酸序列,所述轻链含有轻链可变区(VL)氨基酸序列。

[0118] 优选地,重链可变区(VH)氨基酸序列和轻链可变区(VL)氨基酸序列的各自CDR选自下组:

[0119] a1) SEQ ID No.:7;

[0120] a2) SEQ ID No.:8;

[0121] a3) SEQ ID No.:9;

[0122] a4) SEQ ID No.:10;

[0123] a5) GAT;

[0124] a6) SEQ ID No.:11;

[0125] a7) 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个(如1-5、1-3个,较佳地1-2个,更佳地1个)氨基酸的具有IL-17A结合亲和力的序列。

[0126] 在另一优选例中,所述经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸序列所形成的序列优选为同源性为至少80%,较佳地至少85%,更佳地至少为90%,最佳地至少95%的氨基酸序列。

[0127] 本发明的抗体可以是双链或单链抗体,并且可以是选自动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体,更优选为人源化抗体、人-动物嵌合抗体,更优选为全人源化抗体。

[0128] 本发明所述抗体衍生物可以是单链抗体、和/或抗体片段,如:Fab、Fab'、(Fab')₂或该领域内其他已知的抗体衍生物等,以及IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM抗体或其他亚型的抗体中的任意一种或几种。

[0129] 其中,所述动物优选为哺乳动物,如鼠。

[0130] 本发明抗体可以是靶向人IL-17A的鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、CDR嫁接和/或修饰的抗体。

[0131] 在本发明的一种优选实施例中,上述SEQ ID No.:7、8和9中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有IL-17A结合亲和力的序列,位于重链可变区(VH)的CDR区。

[0132] 在本发明的一种优选实施例中,上述SEQ ID No.:10、氨基酸序列:GAT和SEQ ID No.:11中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有IL-17A结合亲和力的序列,位于轻链可变区(VL)的CDR区。

[0133] 在本发明的一种更优选实施例中,VH CDR1、CDR2、CDR3分别独立地选自SEQ ID No.:7、8和9中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有IL-17A结合亲和力的序列;VL CDR1、CDR2、CDR3分别独立地选自SEQ ID No.:10、

氨基酸序列:GAT和SEQ ID No.:11中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有IL-17A结合亲和力的序列。

[0134] 本发明上述内容中,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量,优选为不超过初始氨基酸序列总氨基酸数量的40%,更优选为不超过35%,更优选为1-33%,更优选为5-30%,更优选为10-25%,更优选为15-20%。

[0135] 在本发明中,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量通常是1、2、3、4或5个,较佳地为1-3个,更佳地为1-2个,最佳地为1个。

[0136] 抗体的制备

[0137] 任何适于产生单克隆抗体的方法都可用于产生本发明的抗IL-17A抗体。例如,可以用连接或天然存在的IL-17A同源二聚体或其片段免疫动物。可以使用合适的免疫接种方法,包括佐剂、免疫刺激剂、重复加强免疫接种,可以使用一种或多种途径。

[0138] 任何合适形式的IL-17都可以作为免疫原(抗原),用于产生对IL-17A特异的非人抗体,筛选所述抗体的生物学活性。激发免疫原可以是全长的成熟人IL-17A,包括天然的同源二聚体,或含单个/多个表位的肽。免疫原可以单独使用,或与本领域已知的一种或多种免疫原性增强剂组合使用。免疫原可以由天然来源纯化,或者在遗传修饰的细胞中产生。编码免疫原的DNA在来源上可以是基因组或非基因组的(例如cDNA)。可以使用合适的遗传载体表达编码免疫原的DNA,所述载体包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、杆状病毒载体、质粒和非病毒载体。

[0139] 生产本发明的抗人IL-17A抗体的示例性方法描述于实施例1。

[0140] 人源化抗体可以选自任何种类的免疫球蛋白,包括IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在本发明中,抗体是IgG抗体,使用IgG1亚型。通过用下文实施例中描述的生物学测定筛选抗体易于实现必需恒定结构域序列的最优化,以产生所需生物学活性。

[0141] 同样,任一类轻链都可以在本文的化合物和方法中使用。具体地说, κ 、 λ 链或其变体在本发明的化合物和方法中是可以用的。

[0142] 人源化本发明的抗人IL-17A抗体的示例性方法描述于实施例5。

[0143] 本发明抗体或其片段的DNA分子的序列可以用常规技术,比如利用PCR扩增或基因组文库筛选等方法获得。此外,还可将轻链和重链的编码序列融合在一起,形成单链抗体。

[0144] 一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

[0145] 此外,还可用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。

[0146] 本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

[0147] 宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞。优选的动物细胞包括(但不限于):CHO-S、CHO-K1、HEK-293细胞。

[0148] 本发明中所述的用重组DNA转化宿主细胞的步骤可用本领域熟知的技术进行。获得的转化子可用常规方法培养,转化子表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主

细胞,用常规培养基在合适的条件下培养。

[0149] 通常,在适合本发明抗体表达的条件下,培养转化所得的宿主细胞。然后用常规的免疫球蛋白纯化步骤,如蛋白A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析、离子交换层析、疏水层析、分子筛层析或亲和层析等本领域技术人员熟知的常规分离纯化手段纯化得到本发明的抗体。

[0150] 所得单克隆抗体可用常规手段来鉴定。比如,单克隆抗体的结合特异性可用免疫沉淀或体外结合试验(如放射性免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))来测定。

[0151] 应用

[0152] 本发明提供了本发明抗体的用途,例如用于制备诊断制剂、或制备用于预防和/或治疗IL-17A相关的疾病的药物。所述IL-17A相关的疾病包括炎症疾病、自身免疫疾病等,包括但不限于银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、多发性硬化症,炎性肠病(如克罗恩氏病、溃疡性结肠炎等)、骨关节炎、类风湿性关节炎(RA)、风湿性关节炎或骨质疏松症、炎性纤维化(例如硬皮病、肺纤维化和硬化)、哮喘(包括变应性哮喘)、变态反应以及癌症。

[0153] 药物组合物

[0154] 本发明还提供了一种组合物。在优选例中,所述的组合物是药物组合物,它含有上述的抗体或其活性片段或其融合蛋白或其ADC或相应的CAR-T细胞,以及药学上可接受的载体。通常,可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中,其中pH通常约为5-8,较佳地pH约为6-8,尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但并不限于):瘤内、腹膜内、静脉内、或局部给药。

[0155] 本发明所述抗体也可以是由核苷酸序列在细胞内表达用于的细胞治疗,比如,所述抗体用于嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(CAR-T)等。

[0156] 本发明的药物组合物可直接用于结合IL-17A蛋白分子,因而可用于预防和治疗IL-17A相关的疾病。此外,还可同时使用其他治疗剂。

[0157] 本发明的药物组合物含有安全有效量(如0.001-99wt%,较佳地0.01-90wt%,更佳地0.1-80wt%)的本发明上述的单克隆抗体(或其偶联物)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量,例如每天约1微克/千克体重-约5毫克/千克体重。此外,本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

[0158] 使用药物组合物时,是将安全有效量的药物组合物施用于哺乳动物,其中该安全有效量通常至少约10微克/千克体重,而且在大多数情况下不超过约50毫克/千克体重,较佳地该剂量是约10微克/千克体重-约20毫克/千克体重。当然,具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围内的。

[0159] 检测用途和试剂盒

[0160] 本发明的抗体可用于检测应用,例如用于检测样本,从而提供诊断信息。

[0161] 本发明中,所采用的样本(样品)包括细胞、组织样本和活检标本。本发明使用的术语“活检”应包括本领域技术人员已知的所有种类的活检。因此本发明中使用的活检可以包

括例如通过内窥镜方法或器官的穿刺或针刺活检制备的组织样本。

[0162] 本发明中使用的样本包括固定的或保存的细胞或组织样本。

[0163] 本发明还提供了一种指含有本发明的抗体(或其片段)的试剂盒,在本发明的一个优选例中,所述的试剂盒还包括容器、使用说明书、缓冲剂等。在优选例中,本发明的抗体可以固定于检测板。

[0164] 本发明的主要优点

[0165] (a) 本发明抗体具有优异的生物活性和特异性,并具有很高的结合力(ELISA测定其 EC_{50} 可高达为约10-15ng/ml)。此外,对IL-17A具有良好的结合亲和力,可用做靶向IL-17A的抗体。

[0166] (b) 与鼠源抗体相比,本发明人源化抗体不仅具有与IL-17A更好的亲和力,而且具有更低的免疫原性。

[0167] (c) 本发明抗体能显著抑制IL-17A与IL-17受体的结合,而对于哺乳动物本身没有可见的毒副作用。

[0168] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0169] 实施例1抗人IL-17A的小鼠单克隆抗体——原始抗体的制备方法

[0170] 1.1制备产生鼠源单克隆抗体的杂交瘤细胞

[0171] 首先用人的IL-17A蛋白作为抗原,与佐剂乳化后对BALB/c小鼠进行多点皮下免疫,监测免疫小鼠血清效价,达到要求后取小鼠的脾细胞与骨髓瘤(Sp2/0)细胞进行融合,经过HAT筛选,获得的杂交瘤多克隆细胞。

[0172] 1.2间接ELISA——杂交瘤细胞的筛选方法

[0173] 使用ELISA检测方法筛选出高特异性结合的多克隆,进行单克隆化培养,再使用ELISA方法筛选高特异性结合的单克隆细胞株;通过HT1080细胞对IL-6释放实验,筛选具有细胞功能学效果的单克隆细胞株,然后用Biacore方法分析亲和力及半衰期,最终得到表达IL-17A的单克隆细胞。

[0174] 试验材料:

[0175] Recombinant human IL-17A,Sino Biological,12047-HNAS

[0176] 试验方法:

[0177] 将human IL-17A用CBS配制成1 μ g/ml包被液,50 μ L/孔加入酶标板,2~8 $^{\circ}$ C包被12小时以上弃去包板残液,加入3%牛奶,每孔200 μ L,室温封闭1小时。每孔加入不少于200 μ L的PBST洗1次,将杂交瘤上清稀释至100 μ g/ml,再10倍稀释10个梯度,100 μ L/孔加入酶标板。室温孵育1小时,每孔加不少于200 μ L的PBST,洗涤4次后加入3%牛奶-PBST稀释25000倍的HRP偶联的羊抗鼠IgG Fc(购自Jackson公司),100 μ L/孔加样。室温孵育1小时后,每孔加不少于200 μ L的PBST,洗涤6次,拍干。加入TMB显色液,每孔100 μ L。室温反应5分钟后加2M H_2SO_4 终止反应,50 μ L/孔。将中止反应的酶标板置酶标仪上,读取450nm波长读取吸光度OD450值。

[0178] 试验结果:

[0179] 表1. 杂交瘤对human IL-17a结合活性比较

[0180]	样品名称	EC ₅₀ (ng/mL)
	1B1/7A2	310.9
	1B1/7C8	214.6
	7D6/5G2	173
	7D6/5H8	194.4
	7D6/6B11	210.1
	7D6/6G11	226.4
	4F9/4H1	42.41
[0181]	14F10/9A1	34.42
	14F10/9F6	32.79
	1B1/8E1	268.9
	1B1/8E5	448.2

[0182] 由表1可以看出,在众多筛选出的抗体中,杂交瘤14F10/9F6产生的鼠源抗体与人IL-17a结合活性较高。

[0183] 实施例2抗IL-17A抗体V-基因序列克隆

[0184] 基于5' RACE技术,测定编码由杂交瘤14F10/9F6表达的小鼠抗体可变区的DNA序列。简言之,用SMART 5' RACE合成试剂盒(TAKARA,NO.634859)按厂商用法说明制备重链和轻链的基因特异性cDNA。由琼脂糖凝胶电泳分析PCR产物。重链和轻链二者的可变区大小约为500个碱基对。将反应所得的条带大小合适的扩增PCR产物克隆到载体pEASY-Blunt Simple质粒(北京全式金, No. CB111-02)中,并转化到Stellar大肠杆菌感受态细胞(TAKARA, No. 636763)中。通过用通用的M13正向或反向引物的菌落PCR筛选克隆,从每个反应选择2-3个克隆用于DNA测序分析。用Expasy-translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>)分析每个克隆的每个测序反应结果。测序结果显示14F10/9F6表达的抗IL17A抗体V区序列如下:

[0185] IL17-HC5SEQ ID NO:1

[0186] QVQLQQSGPEVVRPGVSVKISCKGSGYTFTDYAMHWVKQSHAKSLEWIGVIGPYNDNTNYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMEIARLTSEDSAIYYCARGERYFDYWGQGTTTLTVSS

[0187] IL17-LC5SEQ ID NO:2

[0188] DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCRASDHINNWLAWYQQKPGNAPRLLIYGATSLETGVPSRFSGSGSGKDYTLSTSLQTEDVATYYCQYWTIPLTFGAGTKLELK

[0189] 其中,下划线为CDR1'、CDR2'、CDR3' (SEQ ID NO.:10、氨基酸序列:GAT和SEQ ID NO.:11)。

[0190] 表2:鼠源抗IL-17A抗体CDR序列

[0191]

结构域		序列	SEQ ID NO
VH	CDR1	<u>GYTFTDYA</u>	7
	CDR2	<u>IGPYNDNT</u>	8
	CDR3	<u>ARGERYFDY</u>	9
VL	CDR1'	<u>DHINNW</u>	10
	CDR2'	<u>GAT</u>	-
	CDR3'	<u>QQYWTIPLT</u>	11

[0192] 实施例3构建和表达嵌合抗体

[0193] 3.1嵌合抗体的制备

[0194] 通过将PCR克隆的小鼠14F10/9F6VH和VL区cDNA分别与人IgG1和k恒定区连接,来构建嵌合重链和轻链。用PCR引物修饰小鼠cDNA序列的5'和3'端,所述引物设计成为各链增加合适的前导序列,并增加使得能克隆到现有重组抗体表达载体pHB-Fc上的限制性位点。pHB-Fc质粒载体的制法如下:以pcDNA/HA-FLAG (Accession#:FJ524378)载体为出发质粒,在内切酶EcoRI后面加上了人IgG1或k的恒定区序列,在内切酶HindIII前面加上了人类巨细胞病毒(HCMV)促进子序列(Accession#:X17403),在氨苄青霉素耐受基因后面、HCMV促进子前面加上了中国仓鼠谷氨酰胺合成酶基因(Accession#:X03495)。

[0195] 蛋白表达所用的宿主细胞是购自ATCC公司的CHO-K1细胞(Cat#CCL-61)。该细胞经过一系列驯化步骤,驯化成可在无血清培养基(EX-CELLTM302)中进行悬浮培养的CHO-K1细胞。利用该细胞,通过电转的方法,将构建好的轻链和重链重组表达质粒转入细胞。放入培养箱培养3-5天。用间接ELISA测量来自CHO-K1转染上清液的抗体浓度。这显示转染的CHO-K1细胞分泌约30mg/L的嵌合抗体。

[0196] 作为阳性对照的Novartis人源化anti-IL-17抗体(Novartis mAb)根据US 7,807,155B2(AIN 457)提供的人源化序列进行克隆,并瞬时转染进行表达。

[0197] 3.2嵌合抗体的测定

[0198] 试验材料:

[0199] Recombinant human IL-17A,Sino Biological,12047-HNAS

[0200] 试验方法:

[0201] 方法同实施例1,用嵌合抗体代替杂交瘤上清,用HRP偶联的兔抗人IgG Fc抗体(洛阳佰奥通实验材料中心)代替HRP偶联的羊抗鼠IgG Fc,测定与重组human IL-17A结合活性。

[0202] 试验结果:

[0203] 表3.嵌合抗体对human IL-17A结合活性比较

[0204]	样品	EC ₅₀ (ng/ml)
	阳性对照 (Novartis mAb)	35.11
	阴性对照 (PBS)	-
	嵌合抗体	29.98

[0205] 结果证明,与鼠源抗体和阳性对照相比,嵌合抗体与人的IL-17A有更强的结合力。

[0206] 实施例4嵌合抗体的不同种属免疫交叉反应

[0207] 在本实施例中,采用ELSIA方法测定抗IL-17A抗体与不同种属的IL-17A的抗原-抗体结合能力。

[0208] 试验材料:

[0209] Recombinant human IL-17A,Sino Biological,12047-HNAS

[0210] Recombinant mouse IL-17A,Sino Biological,PBV10159R-010

[0211] Recombinant marmoset IL-17A,Sino Biological,90287-CNAE-100

[0212] 试验方法:

[0213] 方法同实施例1,用嵌合抗体代替杂交瘤上清,用HRP偶联的兔抗人IgG Fc抗体(洛阳佰奥通实验材料中心)代替HRP偶联的羊抗鼠IgG Fc,分别测定与human IL-17A、mouse IL-17A及marmoset IL-17A结合活性。

[0214] 试验结果:

[0215] 表4.嵌合抗体与mouse IL-17A结合结果

[0216]

样品	EC ₅₀ (ng/ml)
阳性对照 (Novartis mAb)	—
阴性对照 (PBS)	—
嵌合抗体	—

[0217] 表5.嵌合抗体与human IL-17A结合结果

[0218]

样品	EC ₅₀ (ng/ml)
阳性对照 (Novartis mAb)	35.11
阴性对照 (PBS)	—
嵌合抗体	29.98

[0219] 表6.嵌合抗体与marmoset IL-17A结合结果

[0220]

样品	EC ₅₀ (ng/ml)
阳性对照 (Novartis mAb)	34.1
阴性对照 (PBS)	—
嵌合抗体	26.39

[0221] 由表4-6可以看出,本发明嵌合抗体除与人IL-17A有结合外,同时与狨猴IL-17A有结合,而与小鼠的IL-17A无结合,并且嵌合抗体与人、狨猴IL-17A的亲和力均优于阳性对照。

[0222] 实施例5人源化抗体的制备

[0223] 抗体的人源化采用以下方法。简言之,将抗体的可变链序列与NCBI蛋白质数据库中的可用序列比较,通过鉴定和分析,最终确定了合适在其上构建CDR移植重链和轻链的人构架。

[0224] 基于后续的测试和筛选,一种优选的FR区为源自hu-VH (SEQ ID NO:3),轻链为hu-VL (SEQ ID NO:4)的人源化FR区:

[0225] hu-VH SEQ ID NO:3

[0226] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQGRVT
ITRDTSASTAYMELSSLRSED^TAVYYCAR

[0227] hu-VL SEQ ID NO:4

[0228] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNSLAWYQQKPGKAPKLLLYAASRL^ESGVPSRFS^GSGSGT
DYTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTP

[0229] 改装时,根据人抗体FR区保守的氨基酸残基以及抗体FR区中重要的氨基酸残基,设计改造位点,对抗体的可变区进行人源化突变设计,利用PCR技术扩增并构建人源化点突变抗体表达质粒。将人源化点突变抗体表达质粒分别经CHO-K1(ATC C,N0.CCL-61)细胞分别表达,纯化后得到人源化抗体蛋白。利用ELISA,受体结合抑制实验,Biacore和细胞活性检测等,获得了一种性能非常优异的人源化抗体。

[0230] 人源化抗体的VH和VL序列分别如SEQ ID NO.:5和6所示:

[0231] IL17-HC5-1D4SEQ ID NO:5

[0232] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGVIGPYNDNTNYAQKFQGRVT
MTVDTSTSTVYMELSSLRSED^TAIYYCARGERYFDYWGQGT^TTVTVSS

[0233] IL17-LC5-1C5SEQ ID NO:6

[0234] DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASDHINN^LAWYQQKPGKAPKLLIYGATSLETGVPSRFS^GSGSGT
EYTLTISSLQPD^DFATYYCQQYWTIPLTFGQGTKLEIK

[0235] 实验结果表明,与鼠源抗体相比,人源化抗体具有更好的亲和力和特异性,见实施例6。

[0236] 实施例6人源化抗体的测定

[0237] 试验材料:

[0238] Recombinant human IL-17A,Sino Biological,12047-HNAS

[0239] 试验方法:

[0240] 方法同实施例1,用人源化抗体代替杂交瘤上清,用HRP偶联的兔抗人IgG Fc抗体(洛阳佰奥通实验材料中心)代替HRP偶联的羊抗鼠IgG Fc,测定与重组human IL-17A结合活性。

[0241] 试验结果:

[0242] 表7.人源化抗体对human IL-17A结合活性比较

[0243]	样品	EC ₅₀ (ng/ml)
[0244]	嵌合抗体	29.98
	阴性对照(PBS)	-
	人源化抗体	12.6

[0245] 结果表明,经过人源化改造,本发明人意外地获得了对human IL-17A结合活性不仅没有下降,反而有进一步提高的人源化抗体。鼠源抗体的EC₅₀值约为人源化抗体的3倍。同时发现,相较于阳性对照抗体Novartis mAb,本发明抗体的EC₅₀值更低,具有与人IL-17A更强的结合活性。

[0246] 实施例7人源化单克隆抗体的亲和性检测

[0247] 在本实施例中,使用BIAcore方法测定抗原-抗体结合动力学及亲和力。

[0248] 试验材料:

[0249] Recombinant human IL-17A,Sino Biological,12047-HNAS

[0250] 氨基偶联试剂盒,GE,BR-1000-50

[0251] HBS-EP (10X) ,GE,BR-1006-69

[0252] Human Antibody Captrue Kit,GE,BR-1008-39

[0253] 试验方法:

[0254] 用氨基偶联试剂盒在Sereis S Sensor Chip CM5芯片上氨基偶联固定Human Antibody Capture Antibody, Anti-Human Capture-CM5芯片。室温平衡20~30min,将芯片装入仪器。用平衡缓冲液稀释抗原,稀释抗原10nM起始稀释度5个浓度梯度,并设置2个零浓度(即平衡缓冲液)和一个重复浓度(一般为最低浓度重复)。用平衡缓冲液将抗体样品稀释至实验工作浓度,2~8℃密封备用。样品分析完成后,选用对应的分析程序对数据分析,确认无明显reference binding,选用Kinetics,1:1binding model,拟合分析,获得样品的动力学参数。

[0255] 试验结果:

[0256] 表8.人源化抗体与human IL-17a亲和力检测结果

[0257]

样品	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
阳性对照 (Novartis mAb)	1.46E+06	1.61E-04	1.11E-10
嵌合抗体	1.04E+06	1.01E-04	9.70E-11
人源化抗体	9.56E+06	1.81E-04	1.90E-11

[0258] 与人IL-17A的亲和力常数(KD(M))结果显示,本发明人源化抗体的亲和力与嵌和抗体亲和力相当,且都比阳性对照抗体高将近一个数量级,具有更强的亲和力。

[0259] 另外,本发明人还对人源化抗体细胞水平生物活性、抗原结合特异性、体内药效检测进行了测定,发现本发明的人源化抗体具有良好的生物活性和特异性,并能显著改善IL-17A相关疾病的症状。

[0260] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 华博生物医药技术(上海)有限公司
 [0003] <120> 一种抗白介素17A的抗体、其制备方法和应用
 [0004] <130> P2017-0956
 [0005] <160> 11
 [0006] <170> PatentIn version 3.5
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 116
 [0009] <212> PRT
 [0010] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0011] <400> 1
 [0012] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Arg Pro Gly Val
 [0013] 1 5 10 15
 [0014] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 [0015] 20 25 30
 [0016] Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 [0017] 35 40 45
 [0018] Gly Val Ile Gly Pro Tyr Asn Asp Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 [0019] 50 55 60
 [0020] Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [0021] 65 70 75 80
 [0022] Met Glu Ile Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
 [0023] 85 90 95
 [0024] Ala Arg Gly Glu Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 [0025] 100 105 110
 [0026] Thr Val Ser Ser
 [0027] 115
 [0028] <210> 2
 [0029] <211> 107
 [0030] <212> PRT
 [0031] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0032] <400> 2
 [0033] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Tyr Leu Ser Val Ser Leu Gly
 [0034] 1 5 10 15
 [0035] Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp
 [0036] 20 25 30
 [0037] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 [0038] 35 40 45

[0039]	Tyr Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0040]	50 55 60
[0041]	Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Thr Ser Leu Gln Thr
[0042]	65 70 75 80
[0043]	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Thr Ile Pro Leu
[0044]	85 90 95
[0045]	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[0046]	100 105
[0047]	<210> 3
[0048]	<211> 98
[0049]	<212> PRT
[0050]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0051]	<400> 3
[0052]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0053]	1 5 10 15
[0054]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[0055]	20 25 30
[0056]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
[0057]	35 40 45
[0058]	Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
[0059]	50 55 60
[0060]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
[0061]	65 70 75 80
[0062]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0063]	85 90 95
[0064]	Ala Arg
[0065]	<210> 4
[0066]	<211> 95
[0067]	<212> PRT
[0068]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0069]	<400> 4
[0070]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0071]	1 5 10 15
[0072]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Ser
[0073]	20 25 30
[0074]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu
[0075]	35 40 45
[0076]	Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0077]	50 55 60

[0078]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0079]	65 70 75 80
[0080]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro
[0081]	85 90 95
[0082]	<210> 5
[0083]	<211> 116
[0084]	<212> PRT
[0085]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0086]	<400> 5
[0087]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0088]	1 5 10 15
[0089]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
[0090]	20 25 30
[0091]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0092]	35 40 45
[0093]	Gly Val Ile Gly Pro Tyr Asn Asp Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
[0094]	50 55 60
[0095]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
[0096]	65 70 75 80
[0097]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
[0098]	85 90 95
[0099]	Ala Arg Gly Glu Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
[0100]	100 105 110
[0101]	Thr Val Ser Ser
[0102]	115
[0103]	<210> 6
[0104]	<211> 107
[0105]	<212> PRT
[0106]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0107]	<400> 6
[0108]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0109]	1 5 10 15
[0110]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp
[0111]	20 25 30
[0112]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[0113]	35 40 45
[0114]	Tyr Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0115]	50 55 60
[0116]	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[0117]	65	70	75	80
[0118]	Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Thr Ile Pro Leu			
[0119]		85	90	95
[0120]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0121]		100	105	
[0122]	<210> 7			
[0123]	<211> 8			
[0124]	<212> PRT			
[0125]	<213> 小鼠 (Mus musculus)			
[0126]	<400> 7			
[0127]	Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala			
[0128]	1	5		
[0129]	<210> 8			
[0130]	<211> 8			
[0131]	<212> PRT			
[0132]	<213> 小鼠 (Mus musculus)			
[0133]	<400> 8			
[0134]	Ile Gly Pro Tyr Asn Asp Asn Thr			
[0135]	1	5		
[0136]	<210> 9			
[0137]	<211> 9			
[0138]	<212> PRT			
[0139]	<213> 小鼠 (Mus musculus)			
[0140]	<400> 9			
[0141]	Ala Arg Gly Glu Arg Tyr Phe Asp Tyr			
[0142]	1	5		
[0143]	<210> 10			
[0144]	<211> 6			
[0145]	<212> PRT			
[0146]	<213> 小鼠 (Mus musculus)			
[0147]	<400> 10			
[0148]	Asp His Ile Asn Asn Trp			
[0149]	1	5		
[0150]	<210> 11			
[0151]	<211> 9			
[0152]	<212> PRT			
[0153]	<213> 小鼠 (Mus musculus)			
[0154]	<400> 11			
[0155]	Gln Gln Tyr Trp Thr Ile Pro Leu Thr			

[0156]	1	5
--------	---	---

专利名称(译)	一种抗白介素17A的抗体、其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN107522783B	公开(公告)日	2020-07-07
申请号	CN2017110916535.7	申请日	2017-09-30
[标]发明人	朱向阳 贾慧峰 于海佳 俞玲		
发明人	朱向阳 贾慧峰 于海佳 俞玲		
IPC分类号	C07K16/24 G01N33/53 C07K19/00 A61K39/395 A61P37/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P17/06 A61P1/04 A61P11/06 A61P35/00		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K14/7051 C07K16/244 C07K2317/21 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/92 C07K2319/00		
代理人(译)	郑震 刘真真		
其他公开文献	CN107522783A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种抗白介素17A(IL-17A)的抗体、其制备方法和应用。具体地，本发明提供了一种新的抗IL-17A单克隆抗体。本发明的抗体能够高特异性地结合IL-17A抗原，其具有很高的亲和力及很低的免疫原性，并且用于制备预防或治疗IL-17A相关的疾病如各种炎症或自身免疫疾病的药物。

样品名称	EC ₅₀ (ng/mL)
1B1/7A2	310.9
1B1/7C8	214.6
7D6/5G2	173
7D6/5H8	194.4
7D6/6B11	210.1
7D6/6G11	226.4
4F9/4H1	42.41