

抗白细胞介素-17A 抗体、其药物组合物及其用途

技术领域

本发明属于分子免疫学领域,涉及一种抗白介素-17A 抗体、其药物组合物及其用途。

5 具体地,本发明涉及一种抗白介素-17A 的单克隆抗体。

背景技术

白细胞介素-17A (Interleukin 17A, 缩写为 IL-17A 或 IL 17A) 是 IL-17 细胞因子家族的成员,该家族共有 6 个成员即 IL-17A (IL-17A 为最先发现的,也被称为 IL-17)、
10 IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E (亦命名为 IL-25)和 IL-17F (施沛青等人, *Chinese Journal of Cell Biology* 33: 345-357 (2011))。IL-17F 与 IL-17A 有约 50% 同源性,而且其编码基因定位于染色体的同一区段 6p12 (Gaffen 等人, *Nat Rev Immunol* 9:556-67 (2009))。IL-17A 和 IL-17F 可以以 IL-17A/IL-17A 和 IL-17F/IL-17F 这样的同源二聚体形式存在,也可以以 IL-17A/IL-17F。IL-17A 及 IL-17F 通过与受体结合发挥生物学效
15 应 (Wright 等人, *J Immunol* 181: 2799-805(2008))。

IL-17 受体(IL-17R)家族由五个成员组成,即 IL-17RA、IL-17RB、IL-17RC、IL-17RD 和 IL-17RE。IL-17 受体家族成员之间可组合为不同的受体复合物,其中 IL-17RA 作为这个家族里迄今发现的最大的分子,是至少四个配体的传递信号的通用亚基,发挥了主要的生物学效应(Gaffen 等人, *Nat Rev Immunol* 9: 556-67(2009))。IL-17RA 与 IL-17RC
20 复合体介导细胞对 IL-17A 与 IL-17F 的反应 (Toy 等人, *J Immunol* 177: 36-9(2006))。

IL-17A 比 IL-17F 在自身免疫炎症反应中更为关键,关键的原因 IL-17RA 对 IL-17A 的亲和力百倍于 IL-17F (Ely 等人, *Nat Immunol* 10 1245-51(2009)), 细胞对 IL-17A 的反应强度 10 倍于其对 IL-17F 的反应 (Dubin 等人, *Immunity* 30: 9-11(2009))。运用抗 IL-17A 的抗体或者抗 IL-17 受体的抗体,阻断 IL-17A 与其受体的结合,可以阻断
25 IL-17A 的生物学效应。

IL-17A 在几种自身免疫性疾病 (例如银屑病、银屑病性关节炎、类风湿关节炎、强直性脊柱炎、系统性红斑狼疮等)中发挥着重要作用。抗 IL-17A 单克隆抗体 Secukinumab 被 FDA 及欧盟批准用于治疗中至重度斑块性银屑病、银屑病性关节炎以及强直性脊柱炎。

银屑病又称为牛皮癣,是慢性自身免疫性皮肤病,皮肤的组织学特征是表皮角质化
30 细胞过度增殖、血管增生以及树突状细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、T 细胞浸润 (Nestle

等人, *N Engl J Med*, 361: 496-509(2009))。银屑病疾病表现多样, 其中其中斑块型银屑病最为常见的类型, 约占所有银屑病发病患者的 90%以上。银屑病性关节炎(psoriatic arthritis, PsA)是银屑病的一种特殊类型, 具有银屑病皮疹并导致关节和周围软组织疼痛、肿、压痛、僵硬和运动障碍, 部分患者可有骶髂关节炎和(或)脊柱炎, 病程迁延、易
5 复发、晚期可关节强直, 导致残疾。存在银屑病是银屑病性关节炎与其他炎性关节病的重要区别, 皮肤病变严重性和关节炎炎症程度无直接关系(谭震等人, *中华风湿病学杂志* 20: :354-357 (2016))。

在银屑病的病变皮肤组织中, IL-17A 的表达显著增高, 这种增高与银屑病疾病活动密切相关(Johansen 等人, *Brit J Dermatol*, 160:319-24(2009); Lowes 等人, *J Invest*
10 *Dermatol* 128:1207-11(2008))。在银屑病患者中, 抗 IL-17A 的单克隆抗体 Secukinumab 展现出了优异的疗效, 可显著缓解银屑病患者的疾病活动, 减少银屑病斑块的面积(Langley 等人, *N Engl J Med*, 371:326-38(2014)); Secukinumab 还可以显著改善银屑病性关节炎患者的减轻关节炎症状, 显著改善关节功能(Gottlieb 等人, *J Drugs Dermatol*, 14:821-33(2015))。Secukinumab 被 FDA 批准用于治疗中至重度斑块型银屑病
15 以及银屑病性关节炎。

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的主要特征是炎症关节内滑膜成纤维细胞增生、关节和软骨损坏, CD4+辅助性 T 细胞与产生自身抗体的浆细胞浸润。IL-17A 在类风湿性关节炎中既能导致炎症又能造成骨损坏。相对于健康人或骨关节炎患者 IL-17A 在类风湿性关节炎病人的类风湿样滑膜单核细胞中高表达(Sarkar 等人, *Clin*
20 *Exp Immunol.* 177: 652-61 (2014)), 细胞学研究提示 IL-17A 可刺激骨吸收和胶原破坏(Kitami 等人 *Biochimie.* 92: 398-404 (2010))。IL-17A 可以诱导软骨、滑膜细胞、巨噬细胞和骨细胞分泌 TNF α 、IL-1 β 与 IL-6 等促炎症细胞因子并发挥, 这些促炎症因子导致类风湿性关节炎突然发作并能通过 IL-17A 诱导的 IL-6 维持 TH17 细胞数量, 从而形成正反馈发挥协同作用放大其炎症效应, 确立一种慢性炎症状态(Ogura 等人,
25 *Immunity* 29: 628-36(2008))。拮抗 IL-17A 可有效地缓解类风湿性关节炎症状。在胶原诱导的关节炎小鼠模型中, 中和 IL-17A 或其受体可消退类风湿性关节炎的症状(Chao 等人, *Autoimmunity.* 2011 May;44(3):243-52); IL-17 缺陷可保护宿主小鼠免受胶原诱导的关节炎的侵害(Nakae 等人, *J Immunol*, 171: 6173-7(2003)), 而 IL-17A 过表达可加重病情(Lubberts 等人, *Inflamm Res* 51: 102-4(2002))。

30 强直性脊柱炎(Ankylosing spondylitis, AS)是一种慢性自身免疫性疾病。AS 的早期病

理特征是骶髂关节和肌腱、韧带的骨附着点处呈急性或慢性炎症，后期则进展为椎间盘炎和椎小关节炎；且 AS 患者均存在骨密度下降的现象。研究显示，AS 患者外周血中分泌 IL-17A 的 Th17 细胞数量及 IL-17A 的浓度均较健康者显著升高（Gracey 等人，*Arthritis Rheumatol.* 68: 679-89. (2016)）。IL-17A 能激活巨噬细胞、树突状细胞、

5 内皮细胞、成纤维细胞、软骨细胞以及成骨细胞等多种细胞，这些细胞将生成数量众多的致炎破坏性因子（Ogura 等人，*Immunity* 29: 628-36(2008)）。在骨组织中，IL-17A 诱导成骨细胞表达细胞核因子 κ B 受体活化因子配体（RANKL），激活破骨细胞，从而诱发骨吸收，累积性地加剧骨丢失，直接或间接地导致骨质破坏（Gaffen, *Curr Rheumatol Rep* 11:365-370(2009)）。在 AS 患者中，抗 IL-17A 的单克隆抗体 Secukinumab 展现出

10 了优异的疗效，可显著降低强直性脊柱炎的症状和体征（Baeten 等人，*N Engl J Med*, 373:2534-48(2015)）。基于此，Secukinumab 被 FDA 批准用于治疗强直性脊柱炎。

系统性红斑狼疮 (system lupus erythematosus, SLE) 是一个影响多个系统的自身免疫性疾病，患者的体内出现针对自身抗原的抗体，直接或间接攻击身体各种组织或器官，最常影响的部位包括皮肤、关节及肾脏。研究表明 IL-17A 在 SLE 中发挥作用。在 SLE

15 病人的外周血中产生 IL-17A 的细胞比率增加，病人血清中的 IL-17A 水平也异常高（Chen 等人，*J Clin Immunol*, 30:221-5(2010)）。罹患 SLE 伴随肾损害的病人的外周血单核细胞在加入 IL-17 培养时会产生更多的总 IgG、抗 dsDNA 的 IgG 及 IL-6，这说明 IL-17 能参与 B 细胞的激活（Dong 等人，*Chin Med J (Engl)*, 116:543-8(2003)）。近来还发现，IL-17A 可以协同 BAFF(B-cell activating factor) 保护 B 细胞免于凋亡，从而增加了产生

20 自身抗体的细胞数量（Onishi 等人，*Immunology* 129: 311-21(2010)）。

发明内容

本发明人经过深入的研究和创造性的劳动，利用哺乳动物细胞表达系统分别表达出重组的 IL-17A(24-155) 作为抗原免疫小鼠，经小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合获得大量

25 杂交瘤细胞样本。发明人通过进行对大量样本的筛选，分别得到了如下的两个杂交瘤细胞株：

杂交瘤细胞株 LT006 (IL17A-13E9)，其于 2017 年 9 月 12 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC)，保藏编号为 CCTCC NO: C2017102；

以及杂交瘤细胞株 LT007 (IL17A-2G2)，其于 2017 年 9 月 12 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC)，保藏编号为 CCTCC NO: C2017165。

30

本发明人惊奇地发现：

杂交瘤细胞株 LT006 能够分泌产生与 IL-17A 特异性结合的特异性单克隆抗体（命名为 13E9），并且该单克隆抗体能够十分有效地阻断 IL-17A 与 IL-17RA 的结合；

杂交瘤细胞株 LT007 能够分泌产生与 IL-17A 特异性结合的特异性单克隆抗体（命名为 2G2），并且该单克隆抗体能够十分有效地阻断 IL-17A 与 IL-17RA 的结合；

进一步地，本发明人创造性地制得了抗 IL-17A 的人源化抗体（分别命名为 13E9 H1L1, 13E9 H2L2, 13E9 H3L2；以及 2G2 H1L1, 2G2 H2L2, 2G2 H3L3），其均能有效地结合人 IL-17A，阻断 IL-17A 与 IL-17A 受体的结合，抑制 IL-17A 受体下游信号通路的激活；

10 本发明的抗体具有用于制备防治银屑病，类风湿关节炎，银屑病性关节炎，强直性脊柱炎，系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病的药物的潜力。

由此提供了下述发明：

本发明的一个方面涉及单克隆抗体或其抗原结合片段，其中，

15 所述单克隆抗体的重链可变区（VH）包含：氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31—33 所示的 HCDR1—HCDR3 或氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37—39 所示的 HCDR1—HCDR3，和

所述单克隆抗体的轻链可变区（VL）包含：氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34—36 所示的 LCDR1—LCDR3 或氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 40—42 所示的 LCDR1—
20 LCDR3。

轻链和重链的可变区决定抗原的结合；每条链的可变区均含有三个高变区，称互补决定区（CDR）（重链（H）的 CDR 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3，轻链（L）的 CDR 包含 LCDR1、LCDR2、LCDR3；其由 Kabat 等人命名，见 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (1991), 第 1-3 卷, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md）。

通过本领域技术人员所熟知的技术手段，例如通过 VBASE2 数据库分析上面的（1）-（2）项中的单克隆抗体序列的 CDR 区的氨基酸序列：

本发明中的抗体 13E9, 13E9 H1L1, 13E9 H2L2, 13E9 H3L2 具有相同的 CDR：

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

30 HCDR1: SYSFTSDYA （SEQ ID NO: 31），

HCDR2: ITYSGVT (SEQ ID NO: 32) ,

HCDR3: ARADYDSYYTMDY (SEQ ID NO: 33) ;

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下:

LCDR1: QSLVHSNGNTY (SEQ ID NO: 34) ,

5 **LCDR2: KVS (SEQ ID NO: 35) ,**

LCDR3: SQSTHFWT (SEQ ID NO: 36) 。

本发明的抗体 2G2, 2G2 H1L1, 2G2 H2L2, 2G2 H3L3 具有相同的 CDR:

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下:

10 **HCDR1: SEVFPIAD (SEQ ID NO: 37) ,**

HCDR2: ILPSFGRT (SEQ ID NO: 38) ,

HCDR3: ARGNYGFAY (SEQ ID NO: 39) ;

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下:

LCDR1: QSLNDSGKTY (SEQ ID NO: 40) ,

15 **LCDR2: LVS (SEQ ID NO: 41) ,**

LCDR3: WQGSHPQT (SEQ ID NO: 42) 。

在本发明的一个或多个实施方案中, 所述的单克隆抗体或其抗原结合片段, 其中,

所述单克隆抗体的重链可变区 (VH) 包含: 氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31—
20 33 所示的 HCDR1—HCDR3, 和

所述单克隆抗体的轻链可变区 (VL) 包含: 氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34—36
所示的 LCDR1—LCDR3。

在本发明的一个或多个实施方案中, 所述的单克隆抗体或其抗原结合片段, 其中,

所述单克隆抗体的重链可变区 (VH) 包含: 氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37—
25 39 所示的 HCDR1—HCDR3, 和

所述单克隆抗体的轻链可变区 (VL) 包含: 氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 40—42
所示的 LCDR1—LCDR3。

在本发明的一个或多个实施方案中, 所述的单克隆抗体或其抗原结合片段, 其中,

所述重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 10、
30 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 28,

并且

所述轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 30。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中，
5 所述重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 14，并且所述轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12；

或者

所述重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 24
10 和 SEQ ID NO: 28，并且所述轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 30。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中，所述重链可变区和轻链可变区选自如下的（1）-（8）中的任一项：

- （1）重链可变区，其包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，和
15 轻链可变区，其包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列；
- （2）重链可变区，其包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列，和
轻链可变区，其包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列；
- （3）重链可变区，其包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，和
轻链可变区，其包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列；
- 20 （4）重链可变区，其包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列，和
轻链可变区，其包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列；
- （5）重链可变区，其包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，和
轻链可变区，其包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列；
- 25 （6）重链可变区，其包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列，和
轻链可变区，其包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列；
- （7）重链可变区，其包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列，和
轻链可变区，其包含 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列；以及
- （8）重链可变区，其包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列，和
轻链可变区，其包含 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列。

30 在本发明的一个或多个实施方案中，所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中，

所述单克隆抗体或其抗原结合片段选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体、人源化抗体、嵌合抗体或双抗体。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中，其中，所述的单克隆抗体以小于大约 100 nM，例如小于大约 10 nM、5 nM、4 nM、3 nM、
5 2.5 nM、2 nM 或更小的 EC₅₀ 结合 IL-17A 蛋白；优选地，所述 EC₅₀ 通过竞争 ELISA 方法测得。

在本发明的一些实施方式中，所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中，所述的单克隆抗体以小于大约 10⁻⁵ M，例如小于大约 10⁻⁶ M、10⁻⁷ M、10⁻⁸ M、10⁻⁹ M 或 10⁻¹⁰ M 或更小的 K_D 结合 IL-17A 蛋白；优选地，所述 K_D 通过 Fortebio 分子相互作用仪测得。

10 在本发明的一些实施方式中，所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中，所述的单克隆抗体以小于大约 100 nM，例如小于大约 10 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM 或更小的 EC₅₀ 结合 IL-17A 蛋白；具体地，所述 EC₅₀ 通过间接 ELISA 方法测得。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的单克隆抗体包括非-CDR 区，且所述非
15 -CDR 区来自不是鼠类的物种，例如来自人抗体。

在本发明的一些实施方案中，所述免疫球蛋白的恒定区是人源化的，例如，重链恒定区均采用 Ig gamma-1 chain C region, **ACCESSION: P01857**；轻链恒定区均采用 Ig kappa chain C region, **ACCESSION: P01834**。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中：
20 所述单克隆抗体是由杂交瘤细胞株 LT006 产生的单克隆抗体，所述杂交瘤细胞株 LT006 保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)，保藏编号为 CCTCC NO: C2017102；或者

所述单克隆抗体是由杂交瘤细胞株 LT007 产生的单克隆抗体，所述杂交瘤细胞株 LT007 保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)，保藏编号为 CCTCC NO: C2017165。

25 在本发明的一个或多个实施方案中，所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其用于预防和/或治疗肿瘤或者自身免疫性疾病，或者用于诊断自身免疫性疾病；优选地，所述自身免疫性疾病选自银屑病、类风湿关节炎、银屑病性关节炎、强直性脊柱炎、系统性红斑狼疮；优选地，所述银屑病为中度至重度斑块性银屑病。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其用于：
30 阻断 IL-17A 与 IL17RA 结合，

调节（例如下调）IL-17A 活性或水平，或者抑制细胞中 IL-6 的表达。

本发明的另一方面涉及一种分离的核酸分子，其包含编码本发明中任一项所述的单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区的核酸序列。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的分离的核酸分子，其包含选自如下的(1)-(8)中任一项的核酸序列：

- (1) SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3;
- (2) SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7;
- 10 (3) SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11;
- (4) SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 11;
- (5) SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17;
- (6) SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21;
- (7) SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25;
- 15 (8) SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29。

本发明的再一方面涉及一种重组载体，其包含本发明的分离的核酸分子；优选地，所述重组载体为重组表达载体，例如重组原核表达载体或重组真核表达载体。

本发明的再一方面涉及一种宿主细胞，其包含本发明的重组载体。

本发明的再一方面涉及一种制备本发明中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段的方法，其包括在合适的条件下培养本发明的宿主细胞，以及从细胞培养物中回收所述单克隆抗体或其抗原结合片段的步骤。

25 本发明的再一方面涉及选自如下的杂交瘤细胞株：

杂交瘤细胞株 LT006，其保藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为 CCTCC NO: C2017102；或者

杂交瘤细胞株 LT007，其保藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为 CCTCC NO: C2017165。

30

本发明的再一方面涉及一种偶联物，其包括单克隆抗体或其抗原结合片段以及偶联部分，其中，所述单克隆抗体为本发明中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，所述偶联部分为可检测的标记物；优选地，所述可检测的标记物为放射性同位素、发光物质例如荧光物质、有色物质或酶。

5

本发明的再一方面涉及一种试剂盒，其包括本发明中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，或者包括本发明的偶联物；

优选地，所述试剂盒还包括第二抗体，其特异性识别所述单克隆抗体或其抗原结合片段；任选地，所述第二抗体还包括可检测的标记物；优选地，所述可检测的标记物为放射性同位素、发光物质例如荧光物质、有色物质或酶。

10

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段或者本发明的偶联物在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于 IL-17A 的定性检测或定量检测。所述定性检测是指检测待测样本中是否存在 IL-17A，所述定量检测是指检测待测样本中的 IL-17A 的浓度或者含量。

15

本发明的再一方面涉及一种药物组合物，其包含本发明中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段或者本发明的偶联物；可选地，所述药物组合物还包括药学上可接受的载体或赋形剂。

20

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段或者本发明的偶联物在制备预防和/或治疗肿瘤或者自身免疫性疾病的药物中的用途，或者用于制备诊断自身免疫性疾病的药物中的用途；优选地，所述自身免疫性疾病选自银屑病、类风湿关节炎、银屑病性关节炎、强直性脊柱炎、系统性红斑狼疮；优选地，所述银屑病为中度至重度斑块性银屑病。

25

特别地，本发明人通过动物实验（实施例 11）发现，13E9H3L2 能够有效地抑制 C57BL/6 小鼠银屑病模型的表皮厚度的增加，表现为给予抗体药 13E9H3L2 可显著抑制 IL-17A、皮下注射所引起的小鼠表皮厚度的增加，与已上市靶点药物 Secukinumab 单抗药效相当。

在本发明的一些实施方式中，所述自身免疫性疾病（例如银屑病如中度至重度斑块

30

性银屑病、类风湿关节炎、银屑病性关节炎、强直性脊柱炎或系统性红斑狼疮）是由 IL-17A 表达水平升高所致。这里所述的表达水平升高是指表达水平高于正常人，且达到了致病的水平。

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段或者本

5 发明的偶联物在制备如下药物中的用途：

阻断 IL-17A 与 IL-17RA 结合的药物，

调节（例如下调）IL-17A 活性或水平的药物，或者

抑制细胞中 IL-6 表达的药物。

10 本发明的再一方面涉及一种在体内或在体外的方法，包括给予细胞或者有需求的受试者以有效量的本发明中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段或者本发明的偶联物的步骤，所述方法选自如下：

阻断 IL-17A 与 IL-17RA 结合的方法，

调节（例如下调）IL-17A 活性或水平的方法，或者

15 抑制成纤维细胞中 IL-6 表达的方法。

在本发明的一个具体的实施方案中，所述在体外的方法是非治疗目的的和/或非诊断目的的。

白细胞介素-6（interleukin 6，缩写为 IL-6 或 IL 6），可由纤维母细胞、单核/巨噬细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、上皮细胞、角质细胞、以及多种瘤细胞所产生。白介素 6 是调控免疫应答的重要因子，IL-6 与 IL-1 一起可协同地促进 T 细胞增殖，促使 B 20 细胞的分化，参与机体炎症反应（Schoenborn 等人，Advances in Immunology 96: 41-101(2007)）。本发明的体外实验（实施例 10）显示，抗 IL-17A 抗体能显著降低 IL-6 的分泌，抑制 IL-6 介导的免疫反应。

本发明的再一方面涉及一种治疗和/或预防肿瘤或者自身免疫性疾病的方法，包括给 25 予有需求的受试者以有效量的本发明中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段或者本发明的偶联物的步骤；优选地，所述自身免疫性疾病选自银屑病、类风湿关节炎、银屑病性关节炎、强直性脊柱炎、系统性红斑狼疮；优选地，所述银屑病为中度至重度斑块性银屑病。

本发明的再一方面涉及一种诊断自身免疫性疾病的方法，包括施加待测样品（例如 30 组织样品、细胞样品或血液样品）或者给予有需求的受试者以有效量的本发明中任一项

所述的单克隆抗体或其抗原结合片段或者本发明的偶联物的步骤；优选地，所述自身免疫性疾病选自银屑病、类风湿关节炎、银屑病性关节炎、强直性脊柱炎、系统性红斑狼疮；优选地，所述银屑病为中度至重度斑块性银屑病。

在本发明的一些实施方式中，考虑到自身免疫性疾病（例如银屑病如中度至重度斑块性银屑病、类风湿关节炎、银屑病性关节炎、强直性脊柱炎或系统性红斑狼疮）是由 IL-17A 表达水平升高所致，可以通过发明中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段或者本发明的偶联物检测 IL-17A 表达水平来进行诊断。如果 IL-17A 表达水平高于正常人，且达到了致病的水平，诊断为阳性结果；反之，诊断为阴性结果。

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

如本文中所使用的，当提及 IL-17A 蛋白（interleukin-17A）的氨基酸序列时，其包括 IL-17A 蛋白的全长；还包括 IL-17A 的融合蛋白，例如与小鼠或人 IgG 的 Fc 蛋白片段（mFc 或 hFc）进行融合的片段。然而，本领域技术人员理解，在 IL-17A 蛋白的氨基酸序列中，可天然产生或人工引入突变或变异（包括但不限于置换，缺失和/或添加），而不影响其生物学功能。因此，在本发明中，术语“IL-17A 蛋白”应包括所有此类序列，包括其天然或人工的变体。并且，当描述 IL-17A 蛋白的序列片段时，其还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

IL-17A 的全长序列（155aa）如下，其中下划线标出的为信号肽序列（23aa）。

MTPGKTSLVSLLLLLLSLEAIVKAGITIPRNPGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNR
NTNTNPKRSSDYYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYH
MNSVPIQQEILVLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA （SEQ ID NO:
43）

如本文中所使用的，如果没有特别说明，所述 IL-17R 为 IL-17RA；其具体蛋白序列为现有技术中已知序列，可以参考现有文献或者 GenBank 中公开的序列。例如，IL-17RA（CD217, NCBI Gene ID: NP_055154.3）。

如本文中所使用的，术语 EC₅₀ 是指半最大效应浓度（concentration for 50% of maximal effect），是指能引起 50% 最大效应的浓度。

如本文中所使用的, 术语“抗体”是指, 是指通常由两对多肽链(每对具有一条“轻”(L)链和一条“重”(H)链)组成的免疫球蛋白分子。从一般意义上, 重链可以理解为抗体中分子量较大的多肽链, 轻链是指抗体中分子量较小的多肽链。轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链通常可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ , 并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、
5 IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内, 可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接, 重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(V_H)和重链恒定区(C_H)组成。重链恒定区由 3 个结构域(C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3})组成。各轻链由轻链可变区(V_L)和轻链恒定区(C_L)组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子, 包括免疫系统的各种细胞(例如, 效应细胞)和经典补体系
10 统的第一组分($C1q$)的结合。 V_H 和 V_L 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR)), 其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 V_H 和 V_L 由按下列顺序: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(V_H 和 V_L)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest
15 (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883 的定义。特别地, 重链还可以包含 3 个以上 CDR, 例如 6、9、或 12 个。例如在本发明的双功能抗体中, 重链可以是 IgG 抗体的重链的 C 端连接另一个抗体的 ScFv, 这种情况下重链含有 9 个 CDR。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如, 其包括, 特别地, 重组抗体、
20 单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体, 例如, IgG (例如, IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 亚型), IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 抗体。

如本文中所使用的, 术语抗体的“抗原结合片段”是指包含全长抗体的片段的肽, 其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力, 和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合, 其也被称为“抗原结合部分”。通常参见, Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul,
25 W., ed., 第 2 版, Raven Press, N.Y. (1989)), 其以其全文通过引用合并入本文, 用于所有目的。可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。在一些情况下, 抗原结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb 和互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例如, scFv)、嵌合抗体、双抗体(diabody)和这样的多肽, 其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。

30 如本文中所使用的, 术语“Fd 片段”意指由 V_H 和 C_{H1} 结构域组成的抗体片段; 术语

“Fv 片段”意指由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的抗体片段；术语“dAb 片段”意指由 V_H 结构域组成的抗体片段(Ward 等人, *Nature* 341:544-546 (1989)); 术语“Fab 片段”意指由 V_L、V_H、C_L 和 C_{H1} 结构域组成的抗体片段；术语“F(ab')₂ 片段”意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的抗体片段。

5 在一些情况下, 抗体的抗原结合片段是单链抗体(例如, scFv), 其中 V_L 和 V_H 结构域通过使其能够产生为单个多肽链的连接体配对形成单价分子(参见, 例如, Bird 等人, *Science* 242:423-426 (1988)和 Huston 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988))。此类 scFv 分子可具有一般结构: NH₂-V_L-接头-V_H-COOH 或 NH₂-V_H-接头-V_L-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成。例如,
10 可使用具有氨基酸序列(GGGGS)₄的接头, 但也可使用其变体(Holliger 等人(1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448)。可用于本发明的其他接头由 Alfthan 等人(1995), *Protein Eng.* 8:725-731, Choi 等人(2001), *Eur. J. Immunol.* 31: 94-106, Hu 等人(1996), *Cancer Res.* 56:3055-3061, Kipriyanov 等人(1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56 和 Roovers 等人(2001), *Cancer Immunol.*描述。

15 在一些情况下, 抗体的抗原结合片段是双抗体, 即, 双价抗体, 其中 V_H 和 V_L 结构域在单个多肽链上表达, 但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对, 从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见, 例如, Holliger P.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993), 和 Poljak R. J.等人, *Structure* 2:1121-1123 (1994))。

20 可使用本领域技术人员已知的常规技术(例如, 重组 DNA 技术或酶促或化学断裂法)从给定的抗体获得抗体的抗原结合片段(例如, 上述抗体片段), 并且以与用于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

在本文中, 除非上下文明确指出, 否则当提及术语“抗体”时, 其不仅包括完整抗体, 而且包括抗体的抗原结合片段。

25 如本文中所使用的, 术语“单抗”和“单克隆抗体”是指, 来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片断, 也即除可能自发出现的自然突变外, 一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的, 其通常包含至少 2 种或更多种的不同抗体, 这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用 Kohler 等首次报道的杂交瘤技术获得 (*Nature*,
30 256:495, 1975), 但也可采用重组 DNA 技术获得(如参见 U.S.P 4,816,567)。

如本文中所使用的, 术语“嵌合抗体”是指这样的抗体, 其轻链或/和重链的一部分源自一个抗体 (其可以源自某一特定物种或属于某一特定抗体类或亚类), 且轻链或/和重链的另一部分源自另一个抗体 (其可以源自相同或不同的物种或属于相同或不同的抗体类或亚类), 但无论如何, 其仍保留对目标抗原的结合活性(U.S.P 4,816,567 to Cabilly et al.; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 6855 (1984))。

如本文中所使用的, 术语“人源化抗体”是指, 人源免疫球蛋白 (受体抗体) 的全部或部分 CDR 区被一非人源抗体 (供体抗体) 的 CDR 区替换后得到的抗体或抗体片段, 其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性的非人源 (例如, 小鼠、大鼠或兔) 抗体。此外, 受体抗体的构架区 (FR) 的一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换, 或被其他抗体的氨基酸残基替换, 以进一步完善或优化抗体的性能。关于人源化抗体的更多详细内容, 可参见例如, 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); 和 Clark, Immunol. Today 21: 397 402 (2000)。

如本文中所使用的, 术语“表位”是指, 抗原上被免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。“表位”在本领域内也称为“抗原决定簇”。表位或抗原决定簇通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链组成并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如, 表位通常以独特的空间构象包括至少 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 或 15 个连续或非连续的氨基酸, 其可以是“线性的”或“构象的”。参见, 例如, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 第 66 卷, G. E. Morris, Ed. (1996)。在线性表位中, 蛋白质与相互作用分子 (例如抗体) 之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中, 相互作用的点跨越彼此分开的蛋白质氨基酸残基而存在。

如本文中所使用的, 术语“分离的”或“被分离的”指的是, 从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分, 那么可能是其所处的天然环境发生了改变, 或从天然环境下分离出该物质, 或二者情况均有发生。例如, 某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽, 而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”或“被分离的”不排除混有人工或合成的物质, 也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

如本文中所使用的, 术语“大肠杆菌表达系统”是指由大肠杆菌 (菌株) 与载体组成的表达系统, 其中大肠杆菌 (菌株) 来源于市场上可得到的菌株, 例如但不限于: GI698, ER2566,

BL21(DE3), B834(DE3), BLR(DE3)。

如本文中所使用的，术语“载体（vector）”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞
5 中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）或 P1 来源的人工染色体（PAC）；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如 SV40）。一
10 种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。

如本文中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，如大肠杆菌或枯草菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO 细胞，COS 细胞，NSO 细胞，HeLa
15 细胞，BHK 细胞，HEK 293 细胞或人细胞等的动物细胞。

如本文中所使用的，术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小，抗体-抗原结合越紧密，抗体与抗原之间的亲和力越高。通常，抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的解离平衡常数（ K_D ）结合抗原，所述解离平衡常数可
20 以通过，例如，使用 ForteBio 分子相互作用仪测得。

如本文中所使用的，术语“单克隆抗体”和“单抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多克隆抗体”和“多抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如，丙氨酸可用 A 或 Ala 表示。

25 如本文中所使用的，术语“杂交瘤”和“杂交瘤细胞株”可互换使用，并且当提及术语“杂交瘤”和“杂交瘤细胞株”时，其还包括杂交瘤的亚克隆和后代细胞。例如，当提及杂交瘤细胞株 LT006 或 LT007 时，其还指杂交瘤细胞株 LT006 或 LT007 的亚克隆和后代细胞。

如本文中所使用的，术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理
30 学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，其是本领域公知的（参见例如

Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), 并且包括但不限于: pH 调节剂, 表面活性剂, 佐剂, 离子强度增强剂。例如, pH 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液; 表面活性剂包括但不限于阳离子, 阴离子或者非离子型表面活性剂, 例如 Tween-80; 离子强度增强剂包括

5 但不限于氯化钠。

如本文中所使用的, 术语“佐剂”是指非特异性免疫增强剂, 当其与抗原一起或预先递送入机体时, 其可增强机体对抗原的免疫应答或改变免疫应答类型。佐剂有很多种, 包括但不限于铝佐剂(例如氢氧化铝)、弗氏佐剂(例如完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂)、短小棒状杆菌、脂多糖、细胞因子等。弗氏佐剂是目前动物试验中最常用的佐剂。

10 氢氧化铝佐剂则在临床实验中使用较多。

如本文中所使用的, 术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如, 预防疾病(例如 IL-17A 与 IL-17A 受体结合或者 IL-17A 活性过高相关的疾病如自身免疫性疾病)有效量是指, 足以预防, 阻止, 或延迟疾病(例如 IL-17A 与 IL-17A 受体结合或者 IL-17A 活性过高相关的疾病如自身免疫性疾病)的发生的量; 治疗疾病有

15 效量是指, 足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如, 对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄, 体重和性别, 药物的施用方式, 以及同时施用的其他治疗等等。

20 发明的有益效果

本发明取得了下述技术效果中的至少一项:

(1)本发明的单克隆抗体例如 13E9 H1L1、13E9 H2L2、13E9 H3L2, 以及 2G2 H1L1、2G2 H2L2、2G2 H3L3 均能够很好地特异性与 IL-17A 结合, 并且能够十分有效地阻断 IL-17A 与 IL-17A 配体的结合, 特异地降低 IL-17A 介导的成纤维细胞中 IL-6 分泌;

25 (2)本发明的单克隆抗体特别是 13E9H2L2 抑制 IL-6 分泌的作用与同靶点已上市药物 Secukinumab 效果一致;

(3)本发明的单克隆抗体具有应用于治疗和/或预防抗自身免疫疾病例如抗银屑病、类风湿关节炎、银屑病性关节炎、强直性脊柱炎或系统性红斑狼疮的潜力。

30 附图说明

图 1: 单克隆鼠源抗体 13E9 的 SDS-PAGE 检测结果。从左至右的 4 个泳道的样品及其上样量依次为: 非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体, 1 μg ; 还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体, 1 μg ; Marker, 5 μl ; BSA, 1 μg 。

图 2: 单克隆鼠源抗体 2G2 的 SDS-PAGE 检测结果。从左至右的 4 个泳道的样品及其上样量依次为: 非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体, 1 μg ; 还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体, 1 μg ; Marker, 5 μl ; BSA, 1 μg 。

图 3: 单克隆人源化抗体 13E9 H3L2 的 SDS-PAGE 检测结果。从左至右的 3 个泳道的样品及其上样量依次为: BSA, 1 μg ; Marker, 5 μl ; 还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体, 1 μg ; 非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体, 1 μg 。

10 图 4: 抗体 13E9 H1L1 的动力学特征参数检测结果。图中纵坐标为信号值, 单位为 nm; 横坐标为时间, 单位为 sec。

图 5: 抗体 13E9 H2L2 的动力学特征参数检测结果。图中纵坐标为信号值, 单位为 nm; 横坐标为时间, 单位为 sec。

图 6: 抗体 13E9 H3L2 的动力学特征参数检测结果。图中纵坐标为信号值, 单位为 nm; 横坐标为时间, 单位为 sec。

图 7: 抗体 Secukinumab 的动力学特征参数检测结果。图中纵坐标为信号值, 单位为 nm; 横坐标为时间, 单位为 sec。

图 8: 抗体 2G2 H1L1 的动力学特征参数检测结果。图中纵坐标为信号值, 单位为 nm; 横坐标为时间, 单位为 sec。

20 图 9: 抗体 2G2 H2L2 的动力学特征参数检测结果。图中纵坐标为信号值, 单位为 nm; 横坐标为时间, 单位为 sec。

图 10: 抗体 2G2 H3L3 的动力学特征参数检测结果。图中纵坐标为信号值, 单位为 nm; 横坐标为时间, 单位为 sec。

图 11: 抗体 Secukinumab 的动力学特征参数检测结果。图中纵坐标为信号值, 单位为 nm; 横坐标为时间, 单位为 sec。

图 12: 采用间接 ELISA 方法检测抗体 13E9 H1L1、13E9 H2L2 与抗原 IL17A-His 的结合活性。已上市药物 Secukinumab 作为阳性对照。

图 13: 采用间接 ELISA 方法检测抗体 13E9 H3L2 与抗原 IL17A-His 的结合活性。已上市药物 Secukinumab 作为阳性对照。

30 图 14: 采用竞争 ELISA 方法检测抗体 13E9 H1L1、13E9 H2L2 与受体

IL17RA-His(biotin)竞争结合的活性。已上市药物 Secukinumab 作为阳性对照。

图 15: 采用竞争 ELISA 方法检测抗体 13E9 H3L2 与受体 IL17RA-His(biotin)竞争结合的活性。已上市药物 Secukinumab 作为阳性对照。

图 16: 采用间接 ELISA 方法检测抗体 2G2 H1L1、2G2 H2L2 和 2G2 H3L3 与抗原
5 IL17A-His 的结合活性。已上市药物 Secukinumab 作为阳性对照。

图 17: 采用竞争 ELISA 方法检测抗体 2G2 H1L1、2G2 H2L2 和 2G2 H3L3 与受体 IL17RA-His(biotin)竞争结合抗原 IL17A-His 的活性。已上市药物 Secukinumab 作为阳性对照。

图 18: 抗体 13E9 H1L1、13E9 H2L2 和 13E9 H3L2 以及 2G2 H1L1、2G2 H2L2 和
10 2G2 H3L3 对混合淋巴细胞细胞因子 IL-6 分泌的影响。

图 19: 抗体药 13E9 H3L2 对 C57BL/6 小鼠银屑病模型的表皮厚度的影响。

关于生物材料保藏の説明:

杂交瘤细胞株 LT006 (IL17A-13E9), 其于 2017 年 9 月 12 日保藏于中国典型培养
15 物保藏中心 (CCTCC), 保藏编号为 CCTCC NO: C2017102, 保藏地址为中国.武汉.
武汉大学, 邮编: 430072。

杂交瘤细胞株 LT007 (IL17A-2G2), 其于 2017 年 9 月 12 日保藏于中国典型培养
物保藏中心 (CCTCC), 保藏编号为 CCTCC NO: C2017165, 保藏地址为中国.武汉.
武汉大学, 邮编: 430072。

20

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解，
下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体
技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件（例如参考 J.萨姆布鲁克等著，
25 黄培堂等译的《分子克隆实验指南》，第三版，科学出版社）或者按照产品说明书进行。
所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市场购买获得的常规产品。

在下面的实施例中，使用的 BALB/C 小鼠购自广东省医学实验动物中心；使用的
C57BL/6 小鼠来源于南京银河生物医药有限公司；使用的 MRC5 细胞来源于上海复旦
30 IBS 细胞资源中心；使用的 Secukinumab (Cosentyx®)单抗购自诺华公司。

实施例 1: 抗 IL-17A 的抗体 13E9 和 2G2 的制备

1. 杂交瘤细胞株 LT006 和 LT007 的制备

制备抗 IL-17A 抗体所用的抗原 IL17A(24-155)-his 是人 IL-17A (GenBank ID: Q16552)成熟肽与 his 标签的融合蛋白。取免疫 BALB/C 小鼠(购自广东医学实验动物中心)的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞, 具体操作参考目前已确立的方法(例如, Stewart, S.J., "Monoclonal Antibody Production", in Basic Methods in antibody Production and Characterization, Eds. G.C. Howard and D.R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000)。

用 TEV 蛋白酶酶切融合蛋白 IL17A-his, 并过柱纯化获得 IL-17A(24-155)蛋白。用 IL-17A(24-155)蛋白作为抗原包被酶标板, 进行间接 ELISA 法筛选, 得到分泌与 IL-17A(24-155)特异性结合的新的抗体的杂交瘤细胞。

对间接 ELISA 筛选得到的杂交瘤细胞, 通过竞争 ELISA 筛选出能够分泌与受体 IL-17RA (CD217, NCBI Gene ID: NP_055154.3) 竞争结合 IL-17A 的单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 并经过有限稀释法得到两株稳定的杂交瘤细胞株。

杂交瘤细胞株 LT006 (IL17A-13E9), 其于 2015 年 9 月 12 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏编号为 CCTCC NO: C2017102, 保藏地址为中国.武汉.武汉大学, 邮编: 430072。其分泌的单克隆抗体命名为 13E9。

杂交瘤细胞株 LT007 (IL17A-2G2), 其于 2017 年 9 月 12 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏编号为 CCTCC NO: C2017165, 保藏地址为中国.武汉.武汉大学, 邮编: 430072。其分泌的单克隆抗体命名为 2G2。

2. 抗 IL-17A 的抗体 13E9 的制备

用杂交瘤无血清培养基对上面制得的 LT006 细胞株 (1×10^5 细胞每孔) 进行培养(杂交瘤无血清培养基, 内含 1%青链霉素, 4%的 Glutamax, 于 5% CO₂, 37°C 细胞培养箱中进行培养), 培养 7 天至存活率在 20%左右时收集细胞培养上清, 通过高速离心、微孔滤膜抽真空过滤以及 HiTrap protein A HP 柱进行纯化, 制得抗体 13E9。纯化后 13E9 样品进行 SDS-PAGE 电泳检测, 结果如图 1 所示。

3. 抗 IL-17A 的抗体 2G2 的制备

用杂交瘤无血清培养基对上面制得的 LT007 细胞株 (1×10^5 细胞每孔) 进行培养(杂交瘤无血清培养基, 内含 1%青链霉素, 4%的 Glutamax, 于 5% CO₂, 37°C 细胞培养箱中进行培养), 培养 7 天至存活率在 20%左右时收集细胞培养上清, 通过高速离心、

微孔滤膜抽真空过滤以及 HiTrap protein A HP 柱进行纯化，制得抗体 2G2。纯化后 2G2 样品进行 SDS-PAGE 电泳检测，结果如图 2 所示。

实施例 2：抗体 13E9 的序列分析

5 参照实施例 1 中步骤 2 中的方法培养 LT006 细胞。

使用培养细胞细菌总 RNA 提取试剂盒（Tiangen，货号 DP430），按照试剂盒说明书的方法，从培养的 LT006 细胞中提取 mRNA。

按照 Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒说明书合成 cDNA，并进行 PCR 扩增。

10 PCR 扩增产物直接进行 TA 克隆，具体操作参考 pEASY-T1 Cloning Kit（Transgen CT101）试剂盒说明书进行。

将 TA 克隆的产物直接进行测序，测序结果如下：

重链可变区的核酸序列：（360 bp）

GAAGTAAAGCTGCAGGAGTCGGGACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTC
15 TCTGTCCCTCACCTGCACTGTCACTAGCTACTCATTCACCAGTGATTATGCCTG
GAGCTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAATCAAACCTGGAGTGGATGGGCTACATA
ACCTACAGTGGTGTCACTAGCTACAACCCCTCTCTCAAAAGTCGAATCTCTAT
CACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTACAGTTGAATTCTGTGACTA
CTGAGGACACGGCCACATATTACTGTGCAAGGGCAGACTATGATAGCTACTAT
20 ACTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA （SEQ ID
NO: 1）

其编码的氨基酸序列：（120 aa）

EVKLQESGPGLVKPSQSLTCTVTSYSFTSDYAWSWIRQFPGIKLEWMGYIT
YSGVTSYNPSLKSRI SITRDT SKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARADYDSYYTMDY
25 WGQGTSVTVSS （SEQ ID NO: 2）

轻链可变区的核酸序列：（333 bp）

GACATCCAGCTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGA
TCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAA
ACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAGGCTCCTG
30 ATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAAGTGGCAG

TGGATCAGGGACAGATTTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGAT
CTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATTTTGGACGTTTCGGTGGAGG
CACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 3)

其编码的氨基酸序列: (111aa)

5 DIQLTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIY
KVSNRFSGVDPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLG VYFCSQSTHFWTFGGGTKLEI
K (SEQ ID NO: 4)

下划线标注区域为 CDR 区域。

10 实施例 3: 抗 IL-17A 的人源化抗体 13E9H1L1、13E9H2L2 和 13E9 H3L2 的设计、
制备和检测

1. 抗 IL-17A 人源化抗体 13E9H1L1、13E9H2L2 和 13E9 H3L2 的轻链和重链序列
的设计

根据 IL-17A 蛋白的三维晶体结构 (EMBO J. (2001) 20 p:5332-41) 以及实施例 2 获
15 得的抗体 13E9 的序列, 通过计算机模拟抗体模型, 根据模型设计突变, 得到抗体
13E9H1L1、13E9H2L2 和 13E9 H3L2 的可变区序列 (抗体恒定区序列, 来自 NCBI 的
数据库, 重链恒定区为 Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857, 轻链恒定区
为 Ig kappa chain C region, ACCESSION: P01834)。

设计的可变区序列如下:

20 (1) 人源化单克隆抗体 13E9H1L1 的重链和轻链序列

重链可变区的核酸序列: (360 bp)

GATGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGACCAGGACTGGTGAAGCCTAGCCAGA
CCCTGAGCCTGACTTGACCGTGTCCAGCTACAGCTTCACCAGCGACTACGCT
TGGTCTTGGATCAGACAGTTCCCAGGAATTGGCCTCGAGTGGATGGGCTACAT
25 CACCTACAGCGGCGTGACCAGCTACAACCCAGCCTGAAGAGCAGGATCACC
ATCAGCCGGGACACCAGCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGCTGAACAGCGTGA
CAGCAGCCGATACCGCAGTGTACTATTGCGCCAGGGCCGACTACGACAGCTA
CTACACCATGGACTATTGGGGCCAGGGAACCAGCGTGACAGTGTCTAGC (SEQ
ID NO: 5)

30 其编码的氨基酸序列: (120 aa)

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSSSYSETSDYAWSWIRQFPGLGLEWMGYIT
YSGVTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFFLQLNSVTAADTAVYYCCARADYDSYYTMDY
WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 6)

5 下划线标注区域为 CDR 区域。

轻链可变区的核酸序列：(333 bp)

GATGTCGTGATGACCCAGACCCCTCTGTCTCTGCCAGTGACACTGGGACA
GCAGGCTAGCATCTCTTGCAGAAGCAGCCAGAGCCTGGTGCACAGCAACGGC
10 AACACCTACCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTAGACTGCT
GATCTACAAGGTGTCCAACCGGTTTCAGCGGCGTGCCAGATAGATTCAGCGGA
AGCGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCCGAGG
ATCTGGGAGTGTACTTCTGCAGCCAGAGCACCCACTTTTGGACCTTCGGCGGA
GGCACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 7)

15 其编码的氨基酸序列：(111 aa)

DVVMTQTPLSLPVTLGQQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWY LQKPGQSPRLLI
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHFWTFGGGTKLE
IK (SEQ ID NO: 8)

下划线标注区域为 CDR 区域。

20

(2) 人源化单克隆抗体 13E9H2L2 的重链和轻链序列

重链可变区的核酸序列：(360 bp)

GATGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGACCAGGACTGGTGAAGCCTAGCCAGA
CCCTGAGCCTGACTTGCACCGTGTCCAGCTACAGCTTCACCAGCGACTACGCT
25 TGGTCTTGGATCAGACAGCCACCAGGAAAGGGACTCGAGTGGATCGGCTACA
TCACCTACAGCGGCGTGACCAGCTACAACCCAGCCTGAAGAGCAGGATCAC
CATCAGCCGGGACACCAGCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGCTGTCTAGCGTGA
CAGCAGCCGATACCGCAGTGTACTATTGCGCCAGGGCCGACTACGACAGCTA
CTACACCATGGACTATTGGGGCCAGGGAACCAGCGTGACAGTGTCTAGC (SEQ
30 ID NO: 9)

其编码的氨基酸序列：（120 aa）

**DVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSSYSFTSDYAWSWIRQPPGKGLEWIGYIT
YSGVTSYNPSLKSRLTISRDTSKNQFFLQLSSVTAADTAVYYCARADYDSYYTMDY
WGQGTSVTVSS**（SEQ ID NO: 10）

5 下划线标注区域为 CDR 区域。

轻链可变区的核酸序列：（333 bp）

**GATGTCGTGATGACCCAGACCCCTCTGTCTCTGCCAGTGACACTGGGACA
GCCAGCTAGCATCTCTTGCAGAAGCAGCCAGAGCCTGGTGCACAGCAACGGC
10 AACACCTACCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTAGACTGCT
GATCTACAAGGTGTCCAACCGGTTTCAGCGGCGTGCCAGATAGATTCAGCGGA
AGCGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCCGAGG
ATCTGGGAGTGTACTACTGCAGCCAGAGCACCCACTTTTGGACCTTCGGCGGA
GGCACCAAGCTGGAGATCAAG**（SEQ ID NO: 11）

15 其编码的氨基酸序列：（111 aa）

**DVVMQTQPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLGKPGQSPRLLI
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCSQSTHFWTFGGGTKLE
IK**（SEQ ID NO: 12）

下划线标注区域为 CDR 区域。

20

（3）人源化单克隆抗体 13E9H3L2 的重链和轻链序列

重链可变区的核酸序列：（360bp）

**GATGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGACCAGGACTGGTGAAGCCTAGCCAGA
CCCTGAGCCTGACTTGCACCGTGTCCAGCTACAGCTTCACCAGCGACTACGCT
25 TGGTCTTGGATCAGACAGCCACCAGGAAAGGGACTCGAGTGGATCGGCTACA
TCACCTACAGCGGCGTGACCAGCTACAACCCTAGCCTGAAGAGCCGCGTGAC
CATAGCGTGGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTG
ACAGCCGCCGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCCGGGCCGATTACGACAGCT
ACTACACCATGGACTATTGGGGCCAGGGAACCAGCGTGACAGTGTCTAGC
30**（SEQ ID NO: 13）

其编码的氨基酸序列：（120 aa）

DVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSSYSFTSDYAWSWIRQPPGKGLEWIGYIT
YSGVTSYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDSYYTMDY
WGQGTSVTVSS（SEQ ID NO: 14）

5 下划线标注区域为 CDR 区域。

轻链可变区的核酸序列与 13E9H2L2 的轻链可变区的核酸序列相同，如 SEQ ID NO: 11 所示。

其编码的氨基酸序列亦与 13E9H2L2 的轻链可变区的氨基酸序列相同，如 SEQ ID
10 NO: 12 所示。

2. 人源化抗体 13E9H1L1、13E9H2L2 和 13E9 H3L2 的制备

重链恒定区均采用 Ig gamma-1 chain C region，ACCESSION: P01857；轻链恒定区均采用 Ig kappa chain C region，ACCESSION: P01834。

15 将 13E9H1L1 重链 cDNA 和轻链的 cDNA、13E9H2L2 的重链 cDNA 和轻链的 cDNA、以及 13E9 H3L2 重链 cDNA 和轻链的 cDNA，分别克隆到 pUC57simple（金斯瑞公司提供）载体中，分别获得 pUC57simple-13E9H1、pUC57simple-13E9L1、pUC57simple-13E9H2、pUC57simple-13E9L2 和 pUC57simple-13E9H3，并将含有相应的重链的片段和含有相应的轻链的片段分别亚克隆到 pcDNA3.1 载体中获得
20 pcDNA3.1-13E9H1、pcDNA3.1-13E9L1、pcDNA3.1-13E9H2、pcDNA3.1-13E9L2、pcDNA3.1-13E9H3 以及 pcDNA3.1-13E9L2 重组质粒。之后将相应的轻链重组质粒与重链重组质粒一起（pcDNA3.1-13E9H1 与 pcDNA3.1-13E9L1；pcDNA3.1-13E9H2 与 pcDNA3.1-13E9L2；pcDNA3.1-13E9H3 与 pcDNA3.1-13E9L2）分别转染 293F 细胞后收集培养液进行纯化获得人源化抗体 13E9H1L1、13E9H2L2 和 13E9 H3L2。纯化后 13E9
25 H3L2 样品进行 SDS-PAGE 电泳检测，结果如图 3 所示。

实施例 4：抗体 2G2 的序列分析

参照实施例 1 中步骤 3 中的方法培养 LT007 细胞。

使用培养细胞细菌总 RNA 提取试剂盒（Tiangen，货号 DP430），按照试剂盒说明
30 书的方法，从培养的 LT007 细胞中提取 mRNA。

按照 Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒说明书合成 cDNA，并进行 PCR 扩增。

PCR 扩增产物直接进行 TA 克隆，具体操作参考 pEASY-T1 Cloning Kit (Transgen CT101) 试剂盒说明书进行。

5 将 TA 克隆的产物直接进行测序，测序结果如下：

重链可变区的核酸序列：(351 bp)

GAGGTTTCAGCTGGAGCAGTCTGGTTCTGAACTGAGGAGTCCTGGATCTTC
AGTAAAGCTTTTCATGCAAGGATTTTGATTGAGAAGTCTTCCCTATTGCTGATAT
GAGTTGGGTTAGGCAGAAGCCTGGGCATGGATTTGAATGGATTGGAGACATA
10 CTCCCAAGTTTTGGTAGAACAATCTATGGAGAGAAGTTTGAGGACAAAGCCAA
AGTGGATGCAGACACAGTGTCCAACACAGCCTACTTGGAACCTCAACAGTCTGA
CATCTGAGGACTCTGCTATCTACTACTGTGCAAGGGGTAACCTACGGGTTTGCT
TACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 15)

其编码的氨基酸序列：(117 aa)

15 EVQLEQSGSELRSPGSSVKLSCKDFDSEVFPIADMSWVRQKPGHGFEWIGDIL
PSFGRTIYGEKFEDKAKVDADTVSNTAYLELNSLTSEDSAIYYCARGNYGFAYWG
QGTLVTVSA (SEQ ID NO: 16)

下划线标注区域为 CDR 区域。

20 轻链可变区的核酸序列：(336 bp)

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCACTTTGTCTGGTTATCATTGGACAA
CCAGCCTCCATCTCTTGCAAGCCAAGTCAGAGCCTCTTAAATAGTGATGGAAA
GACATATTTGAATTGGTTGTTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAA
TCTATCTGGTGTCTAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGT
25 GGATCAGGGACAGATTTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATT
TGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTTACATTTTCCTCAGACGTTCCGGTGGA
GGCACAAAGTTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 17)

其编码的氨基酸序列：(112 aa)

DVLMTQTPLTSLVIIGQPASISCKPSQSLNSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIY
30 LVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCWQGSHEPQTFGGGTKL

EIK (SEQ ID NO: 18)

下划线标注区域为 CDR 区域。

实施例 5: 抗 IL-17A 的人源化抗体 2G2 H1L1、2G2 H2L2 和 2G2 H3L3 的设计、

5 制备和检测

(1) 人源化单克隆抗体 2G2 H1L1 的重链和轻链序列

重链可变区的核酸序列: (348 bp)

GTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAAGCGAACTGAGAAAGCCAGGCTCCAGCG
TGAAGCTGTCTTGAAGGACTTCGACAGCGAGGTGTTCCCCATCGCCGATATG
10 TCTTGGGTCCGACAGGCTCCAGGCCAGGGATTCGAGTGGATCGGTGACATTC
TGCCCAGCTTCGGAAGAACCAACTACGCCCAGAAGTTCGAGGGCAAGGCCAA
GGTGGACGCAGACAAGAGCACCAACACCGCCTACCTGGAGCTGAACAGCCTG
AGAAGCGAGGACACCGCCATCTACTATTGCGCCAGGGGCAACTACGGATTGCG
CCTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCCGCC (SEQ ID NO: 19)

15 其编码的氨基酸序列: (116 aa)

VQLVQSGSELRKPGSSVKLSCKDFDSEVFPIADMSWVRQAPGQGFEWIGDILP
SFGRTNYAQKFEGKAKVDADKSTNTAYLELNSLRSEDTAIYYCARGNYGFAYWG
QGTLVTVSA (SEQ ID NO: 20)

下划线标注区域为 CDR 区域。

20

轻链可变区的核酸序列: (336 bp)

GATGTCGTGATGACCCAGACCCCTCTGTCTCTGAGCGTGACACTGGGACA
GCCAGCTAGCATCAGCTGCAGAAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGACGGC
AAGACCTACCTGAATTGGCTGCTGCAGAGACCAGGCCAGTCTCCTAGAAGGCT
25 GATCTACCTGGTGTCCAAGCTGGACAGCGGCGTGCCAGATAGATTCAGCGGA
AGCGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCCGAGG
ATCTGGGAGTGTACTACTGTTGGCAGGGCAGCCACTTCCCTCAGACATTCGGC
GGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 21)

其编码的氨基酸序列: (112 aa)

30 DVVMTQTPLSLSVTLGQPASISCRSSQSLLNSDGKTYLNWLLQRPQGSPRRLI

YLVSKLDSGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGSHEPQTFGGGTK
LEIK (SEQ ID NO: 22)

下划线标注区域为 CDR 区域。

5 (2) 人源化单克隆抗体 2G2 H2L2 的重链和轻链序列

重链可变区的核酸序列: (348 bp)

GTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAAGTGAAGAAGCCAGGCTCCAGCG
TGAAGCTGTCTTGCAAGGACTTCGACAGCGAGGTGTTCCCCATCGCCGATATG
TCTTGGGTCCGACAGGCTCCAGGCCAGGGATTCGAGTGGATCGGTGACATTC
10 TGCCCAGCTTCGGGAGAACCAATTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAGAGTGAC
CGTGACCGCAGACAAGAGCACCAACACCGCCTACCTGGAGCTGAACAGCCTG
AGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTATTGCGCCAGGGGCAACTACGGCTTCG
CCTATTGGGGACAGGGAACACTGGTGACAGTGTCCGCC (SEQ ID NO: 23)

其编码的氨基酸序列: (116 aa)

15 VQLVQSGAEVKKPGSSVKLSCKDFDSEVFPIADMSWVRQAPGQGFEWIGDIL
PSFGRTNYAQKFQGRVTVTADKSTNTAYLELNSLRSEDTAVYYCCARGNYGFAYW
GQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 24)

下划线标注区域为 CDR 区域。

20 轻链可变区的核酸序列: (336 bp)

GATGTCGTGATGACCCAGACCCCTCTGTCTCTGAGCGTGACACTGGGACA
GCCAGCTAGCATCAGCTGCAGAAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGACGGC
AAGACCTACCTGAATTGGCTGCTGCAGAGACCAGGCCAGTCTCCTAGAAGGCT
GATCTACCTGGTGTCCAACCTGGACAGCGGCGTGCCAGATAGATTCAGCGGA
25 AGCGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAAGCCGAGG
ACGTGGGAGTGTAATACTGTTGGCAGGGCAGCCACTTCCCTCAGACATTCGGC
GGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 25)

其编码的氨基酸序列: (112 aa)

DVVMTQTPLSLSVTLGQPASISCRSSQSLLNSDGKTYLNWLLQRPQSPRRLI
30 YLVSNLDSGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGSHEPQTFGGGTK

LEIK (SEQ ID NO: 26)

下划线标注区域为 CDR 区域。

(3) 人源化单克隆抗体 2G2 H3L3 的重链和轻链序列

5 重链可变区的核酸序列: (348bp)

GTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAAGTGAAGAAGCCAGGCAGCAGCG
TGAAGGTGTCTTGCAAGGACTTCAGCAGCGAGGTGTTCCCCATCGCCGATATG
TCTTGGGTCCGACAGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAGTGGATCGGTGACATTC
TGCCCAGCTTCGGGAGAACCAATTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAGAGTGAC
10 CGTGACCGCAGACAAGAGCACCAACACCGCCTACCTGGAGCTGTCTAGCCTG
AGAAGCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGCGCCAGGGGCAACTACGGCTTCG
CCTATTGGGGACAGGGAACACTGGTGACAGTGTCCGCC (SEQ ID NO: 27)

其编码的氨基酸序列: (116 aa)

VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKDFSSSEVFPIADMSWVRQAPGQGLEWIGDIL
15 PSFGRTNYAQKFQGRVTVTADKSTNTAYLELSSLRSEDVAVYYCCARGNYGFAYW
GQGTTLVTVSA (SEQ ID NO: 28)

下划线标注区域为 CDR 区域。

轻链可变区的核酸序列: (336bp)

20 GATGTCGTGATGACCCAGACCCCTCTGTCTCTGAGCGTGACACTGGGACA
GCCAGCTAGCATCAGCTGCAGAAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGACGGC
AAGACCTACCTGAATTGGTTCCTGCAGAGACCAGGCCAGTCTCCTAGAAGGCT
GATCTACCTGGTGTCCAACCTGGACAGCGGCGTGCCAGATAGATTCAGCGGA
AGCGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAAGCCGAGG
25 ACGTGGGAGTGTAATACTGTTGGCAGGGCAGCCACTTCCCTCAGACATTCGGC
GGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 29)

其编码的氨基酸序列: (112 aa)

DVVM TQTPLSLSVTLGQPASISCRSSQSLLNSDGKTYLNWFLQRPQSPRRLI
YLVSNDLSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCCWQGSHPQTFGGGGTK
30 LEIK (SEQ ID NO: 30)

下划线标注区域为 CDR 区域。

2. 人源化抗体 2G2 H1L1, 2G2 H2L2, 2G2 H3L3 的制备和 SDS-PAGE 电泳检测
重链恒定区采用 Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857; 轻链恒定区采
5 用 Ig kappa chain C region, ACCESSION: P01834。

将 2G2 H1L1 重链 cDNA 和轻链的 cDNA、2G2 H2L2 的重链 cDNA 和轻链的 cDNA、
以及 2G2 H3L3 重链 cDNA 和轻链的 cDNA, 分别克隆到 pUC57simple (金斯瑞公司提
供)载体中, 分别获得 pUC57simple-2G2H1、pUC57simple-2G2L1; pUC57simple-2G2H2、
pUC57simple-2G2L2; 和 pUC57simple-2G2H3、pUC57simple-2G2L3。后将含有相应
10 的重链的核苷酸片段和含有相应的轻链的核苷酸片段分别亚克隆到 pcDNA3.1 载体中获
得重组质粒 pcDNA3.1-2G2H1、pcDNA3.1-2G2L1、pcDNA3.1-2G2H2、pcDNA3.1-2G2L2、
pcDNA3.1-2G2H3 和 pcDNA3.1-2G2L3。后将相应的轻链重组质粒与重链重组质粒一起
(pcDNA3.1-2G2H1 和 pcDNA3.1-2G2L1; pcDNA3.1-2G2H2 和 pcDNA3.1-2G2L2;
pcDNA3.1-2G2H3 和 pcDNA3.1-2G2L3) 分别转染 293F 细胞后收集培养液进行纯化获得
15 人源化抗体 2G2 H1L1、2G2 H2L2 和 2G2 H3L3。纯化后的样品进行 SDS-PAGE 电泳检
测。

实施例 6: 13E9 H1L1、13E9 H2L2、13E9 H3L2 与抗原 IL-17A (24-155)蛋白结合的
动力学参数的测定

20 使用 Fortebio 分子相互作用仪测定人源化抗体 13E9 H1L1、13E9 H2L2、13E9 H3L2
与抗原 IL-17A(24-155)结合的动力学参数。

使用 EDC/NHS 激活 AR2G 传感器,采用氨基偶联的方式把抗体固定到激活的 AR2G
传感器上, 使用 1 M 乙醇胺, pH8.5 封闭传感器。传感器在 PBST 中平衡 300s 后, 固定
在传感器上的抗体与抗原 IL-17A (24-155)蛋白 (与实施例 1 使用的抗原相同) 结合, 抗
25 原浓度为 6.25-400nM (两倍梯度稀释), 结合时间为 420s, 抗原抗体在 PBST 中解离,
时间 600s。

抗体 13E9 H1L1、13E9 H2L2、13E9 H3L2 和 Secukinumab 的动力学参数见表 1,
动力学特征参数检测结果分别如图 4、图 5、图 6 和图 7 所示。

表 1: 13E9 人源化抗体动力学参数

抗体名称	K _D (M)	K _{on} (1/Ms)	k _{on} 误差	k _{dis} (1/s)	k _{dis} 误差	R _{max} (nm)
------	--------------------	------------------------	--------------------	------------------------	---------------------	-----------------------

13E9 H1L1	9.72E-10	1.34E+05	2.60E+03	1.31E-04	9.06E-06	0.0858-0.3326
13E9 H2L2	1.03E-09	9.86E+04	1.51E+03	1.01E-04	7.57E-06	0.0546-0.3049
13E9 H3L2	5.08E-10	2.90E+05	8.22E+03	1.47E-04	1.02E-05	0.1457-0.3546
Secukinumab	6.74E-10	9.28E+04	3.03E+03	6.26E-05	1.57E-05	0.0379-0.2064

K_D 为亲和力常数; k_{on} 为抗原抗体结合速率; k_{dis} 为抗原抗体解离速率; $K_D=k_{dis}/k_{on}$ 。

结果表明, 13E9 H1L1、13E9 H2L2、13E9 H3L2 均与抗原 IL-17A (24-155) 有较好的亲和力, 且亲和力与对照抗体 Secukinumab 相当。

5 实施例 7: 人源化抗体 2G2 H1L1、2G2 H2L2、2G2 H3L3 与抗原 IL-17A(24-155) 结合的动力学参数的测定

使用 ForteBio 分子相互作用仪测定人源化抗体 2G2 H1L1、2G2 H2L2、2G2 H3L3 与抗原 IL-17A(24-155) 结合的动力学参数。

使用 EDC/NHS 激活 AR2G 传感器, 采用氨基偶联的方式把抗体固定到激活的 AR2G 传感器上, 使用 1 M 乙醇胺, pH8.5 封闭传感器。传感器在 PBST 中平衡 300s 后, 固定在传感器上的抗体与抗原 IL-17A(24-155) 结合, 抗原浓度为 6.25-400nM (两倍梯度稀释), 结合时间为 420s, 抗原抗体在 PBST 中解离, 时间 600s。

抗体 2G2 H1L1、2G2 H2L2、2G2 H3L3 和 Secukinumab 的动力学参数见表 2, 动力学特征参数检测结果分别如图 8、图 9、图 10 和图 11 所示。

15 表 2: 2G2 H1L1、2G2 H2L2、

2G2 H3L3 和 Secukinumab 的动力学参数

抗体名称	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{on} 误差	k_{dis} (1/s)	k_{dis} 误差	Rmax (nm)
2G2 H1L1	1.53E-09	1.46E+05	3.15E+03	2.24E-04	9.67E-06	0.0035-0.2192
2G2 H2L2	8.43E-10	1.42E+05	2.18E+03	1.20E-04	6.73E-06	0.0444-0.2732
2G2 H3L3	1.54E-09	1.98E+05	5.30E+03	3.06E-04	1.08E-05	0.011-0.2109
Secukinumab	1.08E-09	1.33E+05	2.38E+03	1.43E-04	8.09E-06	0.0118-0.2584

K_D 为亲和力常数; k_{on} 为抗原抗体结合速率; k_{dis} 为抗原抗体解离速率; $K_D=k_{dis}/k_{on}$ 。

结果表明, 与对照抗体 Secukinumab 相比, 2G2 H2L2 与抗原 IL-17A (24-155) 具有更高亲和力; 2G2 H1L1、2G2 H3L3 亲和力与对照抗体 Secukinumab 相当。

实施例 8: ELISA 方法检测抗体 13E9 H1L1、13E9 H2L2、13E9 H3L2 与抗原的结合活性

1. 采用间接 ELISA 方法检测抗体 13E9 H1L1、13E9 H2L2 和 13E9 H3L2 与抗原 5 IL17A-His 的结合活性, 并与同靶点已上市药物 Secukinmab 进行比较。

IL17A-his 可以参照公开序列和本领域常规技术手段制备, 也可以参考下面的步骤:

IL17A-his 制备: 通过 NCBI 蛋白质数据库查找人 IL-17A 的蛋白质序列, 将人 IL-17A 全长序列与 His*6 纯化标签序列进行融合设计。委托南京金斯瑞生物合成编码该融合蛋白的核酸, 参照《分子克隆实验指南(第二版)》介绍的标准技术, 采用 PCR、酶切、
10 胶回收、连接转化、菌落 PCR 或酶切鉴定等标准的分子克隆技术将目的基因亚克隆到哺乳动物细胞表达载体, 并进一步对重组表达载体的目的基因进行测序分析。测序验证正确后, 中大量制备去内毒素级别的表达质粒并将质粒瞬时转染 HEK293 细胞进行蛋白表达。培养 7 天后收集细胞培养液, 采用 Ni Sepharose 柱(GE)进行亲和纯化, 收获的蛋白样品使用 SDS-PAGE 和 SEC-HPLC 标准分析技术对其进行质量鉴定, 结果合格。

- 15 ELISA: 酶标板中加入 IL17A-His 孵育, 4℃过夜, 用 1% BSA in PBS 于 37℃封闭 2 h 后, 分别加入抗体, 37℃孵育 30 min, 加入 Goat Anti Human IgG(H+L), HRP(Jackson, 109-035-088) 于 37℃孵育 30 min, 用 TMB(Neogen, 308177)进行显色反应 5 min, 并在酶标仪中检测 450nm 波长吸光度。得到的实验数据用 SoftMax Pro 6.2.1 软件对数据进行分析处理, 以抗体浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标进行 4-parameter 拟合曲线作
20 图分析。

实验结果如图 12、图 13 以及下面的表 3 和表 4 所示。

表 3: 13E9 H1L1、13E9 H2L2
与抗原 IL17A-His 的结合活性检测结果

抗体浓度/梯度	包被抗原: IL17A-His, 1 µg/ml					
	13E9 H1L1		13E9 H2L2		Secukinumab	
1µg/ml	2.726	2.731	2.804	2.737	2.184	2.227
1:3	2.875	2.852	2.832	2.873	2.595	2.505
1:9	2.858	2.815	2.717	2.712	2.297	2.364
1:27	2.564	2.494	2.479	2.481	2.049	2.064
1:81	1.934	1.925	1.891	1.834	1.372	1.314
1:243	1.159	1.116	1.097	1.062	0.672	0.697

1:729	0.522	0.537	0.514	0.511	0.313	0.309
0	0.047	0.048	0.048	0.048	0.046	0.046
EC ₅₀ (nM)	0.044		0.048		0.082	

表 4: 13E9 H3L2 与抗原 IL17A-His 的结合活性检测结果

抗体浓度/梯度	包被抗原: IL17A-His:1μg/ml			
	13E9 H3L2		Secukinumab	
0.5μg/ml	3.074	3.068	2.929	2.929
1:3	3.175	3.026	2.924	2.885
1:9	2.944	2.895	2.660	2.666
1:27	2.472	2.393	1.947	1.862
1:81	1.610	1.617	1.140	1.092
1:243	0.786	0.783	0.521	0.522
1:729	0.343	0.348	0.252	0.253
0	0.091	0.084	0.087	0.087
EC ₅₀ (nM)	0.043		0.078	

实验结果显示, 抗体 13E9 H1L1、13E9 H2L2 和 13E9 H3L2 均能有效地结合抗原 IL17A-His, 其结合效率呈剂量依赖关系。在相同实验条件下, 13E9 H1L1 的结合 EC₅₀ 为 0.044 nM, 13E9 H2L2 的结合 EC₅₀ 为 0.048 nM, 同靶点已上市药物 Secukinumab 的 EC₅₀ 为 0.082 nM(图 12, 表 3); 在相同实验条件下, 13E9 H3L2 的结合 EC₅₀ 为 0.043nM, 同靶点已上市药物 Secukinumab 的 EC₅₀ 为 0.078 (图 13, 表 4)。

以上实验结果表明, 在相同实验条件的情况下 13E9 H1L1、13E9 H2L2 和 13E9 H3L2 的 EC₅₀ 值均小于同靶点阳性对照药物 Secukinumab, 表明 13E9 H1L1、13E9 H2L2 和 13E9 H3L2 的与 IL17A-His 的结合活性优于已上市同靶点对照药物 Secukinumab。

2. 采用竞争 ELISA 方法检测抗体 13E9 H1L1、13E9 H2L2、13E9 H3L2 阻断 IL17RA-His (biotin) 与抗原 IL17A-His 结合的活性。

IL17RA-His (biotin) 可以参照公开序列和本领域常规技术手段制备, 也可以参考下面的步骤:

IL17RA-His (biotin) 制备: 通过 NCBI 蛋白质数据库查找人 IL-17RA 的蛋白质序列, 将人 IL-17RA 胞外区序列与 His*6 纯化标签序列进行融合设计。委托南京金斯瑞生物合成编码该融合蛋白的核酸, 参照《分子克隆实验指南 (第二版)》介绍的标准技术,

采用 PCR、酶切、胶回收、连接转化、菌落 PCR 或酶切鉴定等标准的分子克隆技术将目的基因亚克隆到哺乳动物细胞表达载体，并进一步对重组表达载体的目的基因进行测序分析。测序验证正确后，中大量制备去内毒素级别的表达质粒并将质粒瞬时转染 HEK293 细胞进行蛋白表达。培养 7 天后收集细胞培养液，采用 Ni Sepharose 柱 (GE)

- 5 进行亲和纯化，收获的蛋白样品使用 SDS-PAGE 和 SEC-HPLC 标准分析技术对其进行质量鉴定，结果合格。蛋白样品质量鉴定完毕后，使用 Thermo scientific 的商业化试剂盒 EZ-Link®Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit 标记获得生物素化偶联的人 IL-17RA-His 蛋白样品，具体制备方法参照该试剂盒的说明书进行。

- ELISA：酶标板中加入 IL17A-His 孵育，4℃过夜，用 1% BSA in PBST 于 37℃封闭 2 h 后，分别加入抗体，抗原抗体室温反应 10 分钟，再加入受体 IL17RA-His (biotin)，与抗体体积 1:1 混匀后于 37℃孵育 30 min，加入 SA-HRP (KPL, 14-30-00) 于 37℃孵育 30 min，用 TMB (Neogen, 308177) 进行显色反应 5 min，并在酶标仪中检测 450nm 波长吸光度。得到的实验数据用 SoftMax Pro 6.2.1 软件对数据进行分析处理，以抗体浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标进行 4-parameter 拟合曲线作图分析。实验结果如图 14、
- 15 图 15 以及下面的表 5 和表 6 所示。

表 5：13E9 H1L1、13E9 H2L2 与受体

IL17RA-His (biotin)竞争结合抗原 IL-17A-His 的活性检测结果

抗体浓度/梯度	抗原包被： IL17A-His(20150213) 0.5 µg/ml					
	13E9 H1L1		13E9 H2L2		Secukinumab	
10µg/ml	0.273	0.249	0.274	0.290	0.402	0.392
1:3	0.299	0.220	0.313	0.339	0.469	0.502
1:9	0.418	0.379	0.431	0.379	0.642	0.708
1:27	0.673	0.610	0.646	0.636	0.842	0.855
1:81	0.986	1.008	1.011	1.069	1.169	1.201
1:243	1.342	1.362	1.428	1.331	1.418	1.468
1:729	1.363	1.375	1.447	1.519	1.467	1.657
0	1.495	1.406	1.429	1.561	1.610	1.495
Receptor	IL17RA-His(bio) 0.1 µg/ml					
EC ₅₀ (nM)	1.437		1.281		1.807	

表 6: 13E9 H3L2 与受体 IL17RA-His (biotin)

竞争结合抗原 IL17A-His 的活性检测结果

抗体浓度/梯度	抗原包被: IL17A-His 0.5 µg/ml			
	13E9 H3L2		Secukinumab	
10µg/ml	0.193	0.182	0.263	0.282
1:3	0.231	0.206	0.318	0.327
1:9	0.265	0.267	0.419	0.462
1:27	0.424	0.415	0.630	0.663
1:81	0.725	0.627	0.813	0.859
1:243	1.069	1.018	1.120	1.182
1:729	1.218	1.095	1.133	1.250
0	1.184	1.334	1.182	1.232
Receptor	IL17RA-His(bio) 0.1 µg/ml			
EC ₅₀ (nM)	0.805		1.580	

实验结果显示, 抗体 13E9 H1L1、13E9 H2L2 和 13E9 H3L2 均能有效地阻断受体

5 IL17RA-His(biotin)与抗原 IL17A-His 的结合, 阻断效率呈现剂量依赖关系。在相同实验条件下, 13E9 H1L1 与 IL17AR-His(biotin)竞争结合 IL17A-His 的 EC₅₀ 为 1.437 nM, 13E9 H2L2 与 IL17AR-His(biotin)竞争结合 IL17A-His 的 EC₅₀ 为 1.281 nM, 同靶点阳性对照药物 Secukinumab 与 IL17AR-His(biotin)竞争结合 IL17A-His 的 EC₅₀ 为 1.807 nM (表 5, 图 14); 13E9 H3L2 与 IL17AR-His(biotin)竞争结合 IL17A-His 的 EC₅₀ 为 0.805nM,

10 同靶点已上市药物 Secukinumab 与 IL17AR-His(biotin)竞争结合 IL17A-His 的 EC₅₀ 为 1.580 nM (表 6, 图 15)。

以上实验结果表明, 在相同实验条件的情况下 13E9 H1L1、13E9 H2L2 和 13E9 H3L2 与 IL17AR-His(biotin)竞争结合 IL17A-His 的 EC₅₀ 值均小于同靶点已上市对照药物 Secukinumab, 提示 13E9 H1L1、13E9 H2L2 和 13E9 H3L2 与 IL17AR-His(biotin)竞争

15 结合 IL17A-His 的活性优于同靶点已上市药物 Secukinumab。

实施例 9: ELISA 方法检测抗体 2G2 H1L1、2G2 H2L2 和 2G2 H3L3 与抗原的结合活性

1. 采用间接 ELISA 方法检测抗体 2G2 H1L1、2G2 H2L2 和 2G2 H3L3 与抗原

IL17A-His 的结合活性。

实验步骤：酶标板中加入 IL17A-His 孵育，4℃过夜，用 1% BSA in PBS 于 37℃封闭 2 h 后，分别加入抗体，37℃孵育 30 min，加入 Goat Anti Human IgG(H+L)，HRP (Jackson, 109-035-088) 于 37℃孵育 30 min，用 TMB (Neogen, 308177) 进行显色反应 5 min，并在酶标仪中检测 450nm 波长吸光度。得到的实验数据采用 SoftMax Pro 6.2.1 软件进行分析处理，以抗体浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标进行 4-parameter 拟合曲线作图分析。

实验结果如图 16 和下面的表 7 所示。其中，2G2 H1L1 的结合 EC₅₀ 为 0.177nM，2G2 H2L2 的结合 EC₅₀ 为 0.372nM，2G2 H3L3 的结合 EC₅₀ 为 0.421nM。

10 表 7：2G2 H1L1、2G2 H2L2、2G2 H3L3

与抗原 IL17A-His 的结合检测结果

抗体浓度/梯度	抗原包被： IL17A-His, 1 µg/ml							
	2G2 H1L1		2G2 H2L2		2G2 H3L3		Secukinumab	
1µg/ml	3.220	3.135	3.030	2.960	2.485	2.384	3.448	3.448
1:3	3.284	3.149	2.899	2.886	2.311	2.314	3.477	3.478
1:9	2.820	2.747	2.199	2.126	1.693	1.703	3.320	3.331
1:27	2.020	1.969	1.348	1.328	0.982	1.002	2.768	2.764
1:81	1.113	1.075	0.638	0.624	0.439	0.440	1.761	1.689
1:243	0.469	0.426	0.261	0.350	0.188	0.186	0.807	0.806
1:729	0.224	0.188	0.131	0.148	0.113	0.102	0.337	0.326
0	0.061	0.057	0.058	0.068	0.063	0.060	0.062	0.060
EC ₅₀ (nM)	0.177		0.372		0.421		0.090	

实验结果表明，抗体 2G2 H1L1、2G2 H2L2 和 2G2 H3L3 均能有效地结合抗原 IL17A-His，结合效率呈现剂量依赖关系。

15 2. 采用竞争 ELISA 方法检测抗体 2G2 H1L1、2G2 H2L2 和 2G2 H3L3 与受体 IL17RA-His (biotin)竞争结合抗原 IL17A-His 的活性。

实验步骤：酶标板中加入 IL17A-His 孵育，4℃过夜，用 1% BSA in PBST 于 37℃封闭 2 h 后，分别加入抗体，抗原抗体室温反应 10 分钟，再加入受体 IL17RA-His (biotin)，与抗体体积 1:1 混匀后于 37℃孵育 30 min，加入 SA-HRP (KPL, 14-30-00) 于 37℃孵育 30 min，用 TMB (Neogen, 308177) 进行显色反应 5 min，并在酶标仪中检测 450nm 波

长吸光度。得到的实验数据用 SoftMax Pro 6.2.1 软件对数据进行分析处理，以抗体浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标进行 4-parameter 拟合曲线作图分析。

实验结果如图 17 和下面的表 8 所示。其中，2G2 H1L1 的阻断 EC₅₀ 为 2.264nM，2G2 H2L2 的阻断 EC₅₀ 为 5.408nM，2G2 H3L3 的阻断 EC₅₀ 为 5.911nM（图 17，表 8）。

5

表 8：2G2 H1L1、2G2 H2L2、2G2 H3L3 与受体

IL17RA-His(biotin)竞争结合抗原 IL17A-His 的活性检测结果

抗体浓度/梯度	抗原包被： IL17A-His 0.5 µg/ml							
	2G2 H1L1		2G2 H2L2		2G2 H3L3		Secukinumab	
10µg/ml	0.285	0.272	0.337	0.366	0.680	0.718	0.247	0.267
1:3	0.417	0.485	0.500	0.623	0.971	0.876	0.333	0.361
1:9	0.506	0.502	0.785	0.751	0.971	0.954	0.478	0.507
1:27	0.891	0.763	1.087	1.038	1.242	1.178	0.758	0.784
1:81	1.162	1.167	1.286	1.309	1.246	1.312	1.088	1.135
1:243	1.231	1.281	1.423	1.402	1.398	1.466	1.272	1.184
1:729	1.453	1.472	1.464	1.596	1.607	1.466	1.392	1.324
0	1.455	1.425	1.494	1.424	1.470	1.340	1.170	1.230
Receptor	IL17RA-His (biotin) :0.1 µg/ml							
EC ₅₀ (nM)	2.264		5.408		5.911		2.749	

实验结果表明，抗体 2G2 H1L1、2G2 H2L2 和 2G2 H3L3 均能有效地阻断受体 IL17RA-His (biotin) 与抗原 IL17A-His 的结合，阻断效率呈现剂量依赖关系。

10

实施例 10：混合人胚胎成纤维细胞反应：细胞因子 IL-6 的分泌

MRC 5（购自中国科学院细胞中心）细胞接种到 96 孔板，5000 cell/孔，培养过夜。MRC 5 细胞中加入在 37 摄氏度下孵育 20min 的 IL-17 和抗体混合物后(hIgG 做为对照)，培养 48 小时。48 小时培养结束后后收集细胞上清液，采用 ELISA 试剂盒检测 IL-6（购自达科为公司）的分泌量。

15

MRC 5 细胞分别加入 13E9 H1L1、13E9 H2L2、13E9 H3L2、2G2 H1L1、2G2 H2L2 或 2G2 H3L3（1，10，100nM）以及 Secukinumab（1，10，100nM）混合培养后，分泌的 IL-6 检测结果如图 18 所示。

由图 18 可见，13E9 H1L1、13E9 H2L2、13E9 H3L2 和 2G2 H2L2 均能有效地降低 MRC 5 细胞在 IL-17 诱导下的 IL-6 的分泌。其中：

13E9 H1L1 抗体在浓度为 100nM 时抑制 IL-6 分泌的效果优于同剂量对照抗体 Secukinumab, 浓度为 10nM 时对 IL-6 分泌的抑制效果与对照抗体 Secukinumab 在 100nM 时相当;

13E9 H2L2 抗体在浓度为 1nM、10nM 以及 100nM 水平时均与同剂量对照抗体 Secukinumab 抑制 IL-6 分泌的效果相当;

13E9 H3L2 抗体对 IL-6 分泌的抑制效果在浓度为 10nM 和 100nM 时均优于同剂量对照抗体 Secukinumab, 在 1nM 水平与对照抗体 Secukinumab 相当;

2G2 H2L2 在浓度为 1nM、100nM 时均与对照抗体 Secukinumab 抑制 IL-6 分泌的效果相当;

2G2 H3L3 在浓度为 1nM 时抑制 IL-6 分泌的效果优于同剂量对照抗体 Secukinumab。

以上结果表明, 在体外混合人胚胎成纤维细胞反应中, 本发明的抗体阻断 IL-17A 介导的 IL-6 分泌的生活学活性优于或至少相当于同靶点已上市药物 Secukinumab。

实施例 11: 抗体药 13E9 H3L2 对 C57BL/6 小鼠银屑病模型的表皮厚度的影响

C57BL/6 小鼠, 分为 5 组, 每组 8 只。

(1) 造模:

正常组, 在 C57BL/6 小鼠光滑的背部第 1 天至第 6 天连续 6 天皮内注射生理盐水, 25 μ l/只;

其余各组小鼠第 1 天至第 4 天皮内注射重组人 IL-17A, 2 μ g/25 μ l/只, 第 5 天至第 6 天皮内注射重组人 IL-17A 5 μ g/25 μ l/只。

(2) 具体分组和给药情况:

正常组: 生理盐水, 给药剂量 0mg/kg, 一周 3 次共给药 3 次;

模型组: 阴性同型对照, 给药剂量 50mg/kg, 一周 3 次共给药 3 次;

Secukinumab 组: Secukinumab, 给药剂量 50mg/kg, 一周 3 次共给药 3 次;

13E9 H3L2 高剂量组: 给药剂量 50mg/kg, 一周 3 次共给药 3 次;

13E9 H3L2 低剂量组: 给药剂量 10mg/kg, 一周 3 次共给药 3 次。

每组均给药 3 次, 分别是在造模前 1 天、造模第 3 天、造模第 6 天, 皮下给药。

造模第 7 天固定小鼠背部注射部位皮肤制作病理切片并测量表皮厚度。

实验结果如图 19 所示。

结果显示, Secukinumab 组 (50 mg/kg) 和 13E9 H3L2 高剂量组 (50mg/kg)、13E9

H3L2 低剂量组 (10mg/kg) 的表皮厚度在统计学上均显著小于模型组 ($P<0.01$)。

结果表明, 抗体药 **13E9 H3L2** (50mg/kg) 在 C57BL/6 小鼠银屑病模型中显示有统计学显著意义的表皮厚度的抑制作用, 与 **Secukinumab** (50mg/kg) 药效一致; 抗体药 **13E9 H3L2** (10mg/kg) 的表皮厚度的抑制作用在统计学上也有显著差异。

5

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述, 本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导, 可以对那些细节进行各种修改和替换, 这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。