

抗 IL-17A 抗体及其应用

技术领域

本发明涉及特异性结合 IL-17A 的抗体及其抗原结合片段。本发明更具体地涉及抑制 IL-17A 介导的生物活性的抗体及其抗原结合片段，以及使用所述抗体或其抗原结合片段的组合物和治疗相关疾病的方法。本发明更具体地涉及应用抗 IL-17A 抗体或其抗原结合片段来治疗免疫性病理性疾病，所述疾病包括自身免疫性和炎性疾病，诸如类风湿性关节炎、银屑病、强制性脊柱炎、多发性硬化症、系统性红斑狼疮（SLE）、狼疮性肾炎或慢性阻塞性肺病、哮喘、感染性肉芽肿、囊性纤维化或癌症。

背景技术

白细胞介素 17(Interleukin 17, IL-17)，也称为 CTLA-8 或 IL-17A，在免疫系统中扮演着关键的协调作用。IL-17 家族共六个成员，包括 IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E 和 IL-17F，都含有至关重要的 4 个高度保守的半胱氨酸残基，但成员之间生物学效应差异较大，其中，IL-17A 和 IL-17F 同源性和生物学功能最接近，目前研究也最深入。体内表达的 IL-17A 具有 23 个氨基酸的 N-末端信号肽，其经切割产生成熟的 IL-17A。成熟的 IL-17A 通过二硫键连接，一般以同源二聚体形式分泌与存在，有时也与 IL-17F 连接形成异源二聚体 IL-17AF。一般 IL-17A 或 IL-17 指 IL-17A 同源二聚体蛋白，其主要由辅助性 T 细胞 17 (T helper 17, Th17) 产生，也可以由其它免疫细胞如 $\gamma\delta$ T 细胞、LTi (Lymphoid Tissue inducer cells)、ILCs (Innate Lymphoid Cells) 和 NKT (Natural Killer T) 细胞合成分泌 (Cua DJ, Tato CM., Nature reviews. 2010, 10:479–489)。IL-17A 的表达调控非常复杂，研究发现细胞因子 IL-6、IL-1 β 和 TGF β 等诱导初始 CD4⁺T 细胞分化为 Th17，但此时 Th17 细胞稳定性弱，分泌少量 IL-17A，其组织损伤作用小；当 IL-23 存在时，其通过促进 Th17 细胞稳定性并持续分泌 IL-17A、上调促炎因子 (IL-22、CSF-2 和 IFN- γ) 和下调抑炎因子 (IL-2、IL-27 和 IL-12) 表达等途径，引起炎症爆发和组织损伤 (McGeachy MJ, et al., Nature immunology. 2009, 10:314–324)。所以，当组织中 IL-23 异常表达时，IL-17A 途径在组织损伤中发挥着关键性的作用。

IL-17 一般定点分泌，在局部组织中与靶细胞表面的 IL-17 受体 (IL-17 receptor, IL-17R)

结合发挥效应。IL-17R 家族包括 IL-17RA、IL-17RB、IL-17RC、IL-17RD 及 IL-17RE 五个成员，广泛表达于多种细胞膜上（Iwakura Y, et al., Immunity. 2011; 34:149–162）。IL-17 主要与非造血细胞来源的细胞（如上皮细胞、间质细胞）表面的 IL-17RA/IL-17RC 复合体结合发挥效应（Ishigame H, et al., Immunity. 2009; 30:108–119），促进细胞分泌细胞因子（诸如 IL-6、G-CSF、GM-CSF、IL-10、TGF-β、TNF-α）、趋化因子（包括 IL-8、CXCL1 和 MCP-1）和前列腺素（例如，PGE2），诱导中性粒细胞和巨噬细胞聚集，释放活性氧类物质（ROS）而损伤组织（Stark MA, et al., Immunity. 2005; 22:285–294）。

自身免疫性疾病严重威胁着人类的健康，如银屑病、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、克罗恩病、多发性硬化病等。研究发现，IL-17 的分泌失调与该类疾病发生发展密切相关。靶向 IL-17 的抗体通过抑制 IL-17-IL-17R 信号通路，能有效地缓解自身免疫性疾病的症状（Sarah L, et al., Nat Rev Immunol. 2014, 14(9): 585–600）。诺华公司开发的 Cosentyx（secukinumab）是全球首个 IL-17 单抗，获批的适应症包括中度至重度斑块型银屑病（plaque psoriasis），为广大银屑病群体提供一个重要的一线生物治疗选择。但是，开发结构不同、疗效更优、适应症更广等不同特性的抗 IL-17 抗体，治疗银屑病、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎等自身免疫相关病症以及 IL-17 相关的其它疾病具有迫切的需求和重要的意义。

发明概述

本发明提供一种特异性结合人 IL-17A 的抗体或其抗原结合片段，其包含至少一个选自 SEQ ID NO:1-24、60-65 的互补决定区（CDR）序列。

在一个实施方式中，本发明所述的抗体或其抗原结合片段包含至少一个选自 SEQ ID NO:1-3、4-6、7-9、10-12 或 60-62 的重链 CDR 结构域和/或至少一个选自 SEQ ID NO:13-15、16-18、19-21、22-24 或 63-65 的轻链 CDR 结构域。

在一个实施方式中，本发明所述的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区（VH），其特征为所述的重链可变区包含选自 SEQ ID NO:1、4、7、10 或 60 的 HCDR1，选自 SEQ ID NO:2、5、8、11 或 61 的 HCDR2，和选自 SEQ ID NO:3、6、9、12 或 62 的 HCDR3。

在一个实施方式中，本发明所述的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区（VH），其特征为所述的重链可变区包含的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 氨基酸序列选自以下组 A 到组 E 中的任一组：

组号	HCDR1	HCDR2	HCDR3
A	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3

B	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
C	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9
D	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
E	SEQ ID NO:60	SEQ ID NO:61	SEQ ID NO:62

在一个实施方式中，本发明所述的抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区（VL），其特征为所述的轻链可变区包含选自 SEQ ID NO:13、16、19、22 或 63 的 LCDR1，选自 SEQ ID NO:14、17、20、23 或 64 的 LCDR2，和选自 SEQ ID NO:15、18、21、24 或 65 的 LCDR3。

在一个实施方式中，本发明所述的抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区（VL），其特征为所述的轻链可变区包含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的氨基酸序列选自以下组 F 到组 J 中的任一组：

组号	LCDR1	LCDR2	LCDR3
F	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15
G	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
H	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:21
I	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24
J	SEQ ID NO:63	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:65

在一个实施方式中，本发明所述的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其特征为所述可变区包含的 6 个 CDR 的氨基酸序列选自以下组 I 到组 VI 中的任一组：

组号	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
I	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15
II	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
III	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:21
IV	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24
V	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24
VI	SEQ ID NO:60	SEQ ID NO:61	SEQ ID NO:62	SEQ ID NO:63	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:65

在一个实施方式中，本发明所述的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)，其特征为所述的重链可变区氨基酸序列选自 SEQ ID NO:25、26、27、28、33、35、38 或 40，和/或所述的轻链可变区(LV) 氨基酸序列选自 SEQ ID NO:29、30、31、32、34、36、38、39 或 41。

在一个实施方式中，本发明所述的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其特征为所述的可变区氨基酸序列选自以下组 1 到组 7 中的任一组：

组号	VH	VL
1	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:29 或 30
2	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:31
3	SEQ ID NO:27 或 28	SEQ ID NO:32
4	SEQ ID NO:33 或 35	SEQ ID NO:34
5	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:36
6	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38 或 39
7	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41

在一个实施方式中，本发明所述的抗体或其抗原结合片段包含轻链(LC)和/或重链(HC)，其特征为所述的重链(HC)氨基酸序列选自序列编号 SEQ ID NO:42、44、46 或 49，和/或所述的轻链(LC)氨基酸序列选自序列编号 SEQ ID NO:43、45、47、48 或 50。

在一个实施方式中，本发明所述的抗体或其抗原结合片段，其包含轻链(LC)和重链(HC)，其特征为所述的轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:43 所示，和重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:42 或 44 所示；或轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:45 所示，和重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:44 所示；或轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:47 或 48 所示，和重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:46 所示；或轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:50 所示，和重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:49 所示。

在一个实施方式中，本发明所述的抗体为完全抗体，优选为 IgG，更优选为 IgG4 型。

在一个具体的实施方式中，本发明所述的抗体为 1F8、2B2、2F5、ch1、ch2、ch16、hu31、hu43、hu44、hu59、hu60 或 hu250。

在一个实施方式中，本发明所述的抗体或其抗原结合片段的特征为：a)特异性结合 IL-17A 同源二聚体和 IL-17AF 异源二聚体；b)阻断 IL-17A 与其受体之间的结合；和/或 c)抑制 IL-17A 介导的生物活性。

在一个实施方式中，本发明所述的 IL-17A、IL-17AF 或 IL-17F 选自食蟹猴、小鼠

或人中的一种或多种。

在一个实施方案中，本发明所述的抗体或抗原结合片段不特异性结合 a)人 IL-17F 同二聚体、IL-17B 同二聚体、IL-17C 同二聚体、IL-17D 同二聚体、IL-17E 同二聚体的任一种或多种，和/或 b)食蟹猴 IL-17F 同二聚体、小鼠 IL-17F 同二聚体的任一种或多种。

在另一方面，本发明所述的抗体或其抗原结合片段具有抑制 IL-17A 与其受体之间的结合和/或降低由 IL-17A 介导的细胞信号转导和/或生物活性的功能。

在一个实施方式中，本发明所述的抗体或其抗原结合蛋白在体外活性评估时，能够抑制 IL-17A 诱导上皮细胞分泌 CXCL1。

在一个实施方式中，本发明所述的抗体或其抗原结合片段在体内活性评估时，能够抑制 IL-17A 诱导小鼠体内分泌 CXCL1。

在一个实施方式中，本发明所述的抗体或其抗原结合蛋白在体内活性评估时，能够在咪喹莫特诱导的银屑病实验模型中抵抗小鼠发病，小鼠银屑病发病的临床评分及耳部肿胀程度的显著降低。

在一个实施方式中，本发明所述的分离抗体或其抗原结合片段在体内评估时，能够在抗原诱导的关节炎实验模型诸如食蟹猴 AIA-模型中抑制膝关节肿胀。

本发明还提供所述抗体或其抗原结合片段，优选 hu31、hu43、hu44、hu59、hu60 或 hu250 作为药物的用途，更优选作为用于治疗由 IL-17A 介导的病理性疾病和/或通过抑制 IL-17A 信号转导来治疗的病理性疾病的药物的用途。

在一个具体实施方式中，由 IL-17A 介导的病理性疾病是炎性病症或病况，诸如关节炎、类风湿性关节炎、银屑病、强直性脊柱炎、慢性阻塞性肺病、系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、哮喘、多发性硬化或囊性纤维化等。

在本发明提供了治疗由 IL-17A 介导的病理性疾病的方法，所述方法包括施用有效量的本发明所述的分离的抗体或其抗原结合片段，优选为 hu31、hu43、hu44、hu59、hu60 或 hu250 抗体，以使所述病况被缓解。

本发明还涉及用于产生本发明的抗体或其抗原结合片段的方法。此类方法包括编码本发明的抗体或蛋白质的至少重链和/或轻链可变区的分离的核酸分子，或包含此类核酸的克隆性表达载体，特别是用于在宿主细胞中重组产生本发明所述的抗体或蛋白质例如 hu31、hu43、hu44、hu59、hu60 或 hu250。

本发明还涉及包含一种或多种上述克隆性载体或表达载体的宿主细胞以及用于产生本发明的抗体或包含其抗原结合片段的蛋白质，具体地比如产生 hu31、hu43、hu44、hu59、hu60 或 hu250 抗体的方法，所述方法包括培养所述宿主细胞、纯化和回收所述抗

体或蛋白质。

在一个实施方式中，本发明所述的分离抗体或包含其抗原结合片段的蛋白质缀合于其它活性部分。

在一个实施方式中，本发明所述的抗体或其抗原结合片段可以是单克隆抗体或其抗原结合片段，优选嵌合抗体、人源化抗体或人抗体或其部分。

在本发明的一方面，提供了药物组合物，其包含与一种或多种可药用的赋形剂、稀释剂或载体组合的本发明任一实施方式所述的抗体或包含其抗原结合片段的蛋白质。

在一个实施方式中，所述药物组合物包含一种或多种额外的活性成分。

在一个具体实施方式中，所述药物组合物是冻干粉剂。在另一个具体实施方式中，所述药物组合物是包含治疗上可接受的量的本发明所述的抗体或分子的稳定的液体制剂。

在一个实施方式中，本发明涉及所述的抗体或其抗原结合片段用于制备用于治疗任何一种由 IL-17A 介导的病理性病症的药物中的用途。

本发明提供了编码上述的抗体或其抗原结合片段的分离的核酸分子，包含上述核酸分子的表达载体或重组载体，以及转化所述载体的宿主细胞。

本发明提供了一种药物组合物，其包含如上述的抗体或其抗原结合片段、上述核酸分子、载体或宿主细胞和药学上可接受的载体或赋形剂的组合物。

本发明提供了上述的抗体或其抗原结合片段、核酸分子、载体或宿主细胞或上述的药物组合物在制备用于治疗 and/or 预防 IL-17A 介导的疾病或病症的药物中的用途。

在一些方案中，上述药物是用于治疗关节炎、类风湿性关节炎、银屑病、强制性脊柱炎、慢性阻塞性肺疾病、系统性红斑狼疮（SLE）、狼疮性肾炎、哮喘、多发性硬化或囊性纤维化的药物。

附图简述

图 1：人 IL-17A-mFc 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳图。

图 2：FACS 检测人 IL-17A-mFc 与 293F 细胞上的 IL-17RA 结合（MFI 表示平均荧光强度,实验组 v.s control:7695vs308）。

图 3：ELISA 检测杂交瘤抗体阻断 IL-17A 介导的体内生物活性作用。其中杂交瘤抗体明显抑制 IL-17A 诱导小鼠表达 CXCL1。

图 4：ELISA 检测嵌合抗体与人 IL-17A 的结合作用。其中嵌合抗体 ch1, ch2, ch4, ch7 和 ch16 与人 IL-17A 结合具有较高的特异性，其 EC₅₀ 分别为 6.62ng/ml, 5.17ng/ml, 88.48ng/ml, 39.96ng/mL 和 15.42ng/mL。

图 5: FACS 检测嵌合抗体阻断人 IL-17A 与 293F 细胞上的 IL-17RA 结合作用。其中嵌合抗体 ch1, ch2, ch7 和 ch16 具有高效的阻断作用, 其 IC₅₀ 分别为 4.46ug/ml, 3.145 ug/ml, 1.220 ug/ml 和 1.445 ug/ml。

图 6: ELISA 检测人源化抗体与人 IL-17A 的结合作用。其中抗体 hu31, hu43, hu44, hu59, hu60 和 hu250 与人 IL-17A 结合具有较高的特异性, 其 EC₅₀ 分别为 8.13ng/mL, 8.64ng/mL, 6.764ng/ml, 6.102ng/mL, 5.776ng/mL 和 6.351ng/mL。

图 7: FACS 检测人源化抗体阻断人 IL-17A 与 293F 细胞上的 IL-17RA 结合作用。其中抗体 hu31, hu43, hu44, hu59, hu60 和 hu250 均具有高效的阻断作用, 其 IC₅₀ 分别为 867.6ng/mL, 780.8ng/mL, 828.5ng/ml, 467.4ng/mL, 482.8ng/mL 和 577.8ng/mL。

图 8: ELISA 检测人源化抗体阻断 IL-17A 介导的上皮细胞分泌 CXCL1 的效应。其中抗体 hu31, hu43, hu44, hu59, hu60 和 hu250 均高效抑制 IL-17A 诱导上皮细胞表达 CXCL1, 并且比对照抗体的阻断作用更强。

图 9: ELISA 检测人源化抗体阻断 IL-17A 介导的体内生物活性作用。其中抗体 hu31, hu43, hu44, hu60 和 hu250 具有高效抑制 IL-17A 诱导小鼠表达 CXCL1, 并且比对照抗体的阻断作用更强。

图 10-1: 人源化抗体给药对咪喹莫特诱导的银屑病小鼠临床评分影响。而给予 hu31 和 hu44 可明显抑制咪喹莫特诱导的小鼠银屑病模型皮肤鳞屑、硬结、红肿等情况, 即临床评分降低(*P < 0.05 vs KLH)。

图 10-2: 人源化抗体对咪喹莫特诱导的银屑病小鼠耳肿胀程度的影响。给予 hu31 和 hu44 可明显改善耳肿胀程度。(*P < 0.05 vs KLH, **P < 0.01 vs KLH)。

图 11-1: 人源化抗体对 II 型胶原蛋白诱导的雌性食蟹猴体重的影响。hu31 和 hu59 对关节炎引起的体重下降具有一定改善作用(**P < 0.01, ****P < 0.0001, 和“G2:溶媒组”相比较; One-way ANOVA/Dunnett)。

图 11-2: 人源化抗体对 II 型胶原蛋白诱导的雌性食蟹猴关节炎评分的影响。hu31 显著抑制了食蟹猴关节炎临床评分的增加趋势(***P < 0.001, #P < 0.05, 和 G2:溶媒组相比较; One-way ANOVA/Dunnett)。

图 12: 人源化抗体对 NIH3T3-IL17 细胞诱导的小鼠关节肿胀的作用。

图 13: 人源化抗体对 NIH3T3-IL17 细胞诱导的小鼠空气囊炎症的作用。

发明详述

本发明涉及特异性结合人 IL-17A 并阻断由 IL-17A 参与介导的生物活性的抗体。本

发明涉及在下文中进一步描述的全长 IgG 形式抗体及其抗原结合片段。

定义

除非另有说明，本发明的实施将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术，这些都在本领域的技术范围内。

为了可以更容易地理解本发明，某些科技术语具体定义如下。除非本文其它部分另有明确定义，否则本文所用的科技术语都具有本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义。关于本领域的定义及术语，专业人员具体可参考 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel)。氨基酸残基的缩写是本领域中所用的指代 20 个常用 L-氨基酸之一的标准 3 字母和/或 1 字母代码。

本文(包括权利要求书)所用单数形式包括其相应的复数形式，除非文中另有明确规定。

IL-17 或 IL-17A 是白介素-17。除非另有表述，所述的 IL-17 通常指人 IL-17A。

体内表达的 IL-17A 是具有 23 个氨基酸的 N-末端信号肽,NCBI 登录号 NP_443104.1, 其经切割产生成熟的 IL-17A。在一个具体的实施方式中，本公开内容中 IL-17A 指成熟的 IL-17A, 而不包含 N-末端信号肽, 其氨基酸序列为 SEQ ID NO:66, 核苷酸序列为 SEQ ID NO:67。

体内表达的 IL-17F 是具有 30 个氨基酸的 N-末端信号肽,NCBI 登录号 NP_443104.1, 其经切割产生成熟的 IL-17F。在一个具体的实施方式中，本文中 IL-17F 指成熟的 IL-17F, 而不包含 N-末端信号肽, 其氨基酸序列为 SEQ ID NO:68。

本文中 IL-17AF 是 IL-17A 亚单位与 IL-17F 亚单位的异二聚体，如本领域普通技术人员所理解的。

“免疫应答”是指由例如淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞和由上述细胞或肝产生可溶性大分子(包括抗体、细胞因子和补体)的作用，该作用导致从人体选择性损害、破坏或清除侵入的病原体、感染病原体的细胞或组织、癌细胞或者在自体免疫或病理性炎症的情况下的正常人细胞或组织。

“信号转导途径”或“信号转导活性”是指通常由蛋白质间相互作用诸如生长因子对受体的结合启动的生化因果关系，所述关系导致信号从细胞的一部分传递至细胞的另一部分。一般地，传递包括引起信号转导的系列反应中的一种或多种蛋白质上的一个或多个酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸残基的特定磷酸化。倒数第二过程通常包括细胞核事件，从而导致基因表达的变化。

关于本发明的抗体或其抗原结合片段，术语“活性”或“生物活性”，或术语“生物性质”

或“生物特征”此处可互换使用，并包括但不限于表位/抗原亲和力和特异性、在体内或体外中和或拮抗 IL-17A 活性的能力、IC₅₀、抗体的体内稳定性和抗体的免疫原性质。本领域公知的抗体的其它可鉴定的生物学性质或特征包括，例如，交叉反应性(即通常与靶定肽的非人同源物，或与其它蛋白质或组织的交叉反应性)，和保持哺乳动物细胞中蛋白质高表达水平的能力。使用本领域公知的技术观察、测定或评估前面提及的性质或特征，所述技术包括但不限于 ELISA、FACS 或 BIACORE 等离子体共振分析、不受限制的体外或体内中和测定、受体结合、细胞因子或生长因子的产生和/或分泌、信号转导和不同来源(包括人类、灵长类或任何其它来源)的组织切片的免疫组织化学。

“抗体”是指具有所需生物活性的任何形式的抗体。因此，其以最广义使用，具体包括但不限于单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、人源化抗体、完全人抗体、嵌合抗体和骆驼源化单结构域抗体。

“分离抗体”是指结合化合物的纯化状态，且在这种情况下意指该分子基本不含其它生物分子，例如核酸、蛋白质、脂质、糖或其它物质例如细胞碎片和生长培养基。术语“分离(的)”并非意指完全不存在这类物质或不存在水、缓冲液或盐，除非它们以明显干扰本文所述结合化合物的实验或治疗应用的量存在。

“单克隆抗体”是指获自基本均质抗体群的抗体，即组成该群的各个抗体除可少量存在的可能天然存在的突变之外是相同的。单克隆抗体是高度特异性的，针对单一抗原表位。相比之下，常规(多克隆)抗体制备物通常包括大量针对不同表位(或针对不同表位有特异性)的抗体。修饰语“单克隆”表明获自基本均质抗体群的抗体的特征，且不得解释为需要通过任何特定方法产生抗体。

“全长抗体”，天然存在时包含四条肽链的免疫球蛋白分子，两条重(H)链(全长时约 50-70kDa)和两条轻(L)链(全长时约 25kDa)通过二硫键互相连接。每一条重链由重链可变区(在本文中缩写为 VH)和重链恒定区(在本文中缩写为 CH)组成。重链恒定区由 3 个结构域 CH1、CH2 和 CH3 组成。每一条轻链由轻链可变区(在本文中缩写为 VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。VH 和 VL 区可被进一步细分为具有高可变性的互补决定区(CDR)和其间隔以更保守的称为框架区(FR)的区域。每一个 VH 或 VL 区由按下列顺序：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。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白对宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。

抗体(“亲代抗体”)的“抗原结合片段”包括抗体的片段或衍生物，通常包括亲代抗

体的抗原结合区或可变区（例如一个或多个 CDR）的至少一个片段，其保持亲代抗体的至少一些结合特异性。抗体结合片段的实例包括但不限于 Fab, Fab', F(ab')₂ 和 Fv 片段；双抗体；线性抗体；单链抗体分子，例如 sc-Fv；由抗体片段形成的纳米抗体(nanobody)和多特异性抗体。当抗原的结合活性在摩尔浓度基础上表示时，结合片段或衍生物通常保持其抗原结合活性的至少 10%。优选结合片段或衍生物保持亲代抗体的抗原结合亲和力的至少 20%、50%、70%、80%、90%、95%或 100%或更高。还预期抗体的抗原结合片段可包括不明显改变其生物活性的保守或非保守氨基酸取代（称为抗体的“保守变体”或“功能保守变体”）。术语“结合化合物”是指抗体及其结合片段两者。

“单链 Fv”或“scFv”抗体是指包含抗体的 VH 和 VL 结构域的抗体片段，其中这些结构域存在于单条多肽链中。Fv 多肽一般还包含 VH 和 VL 结构域之间的多肽接头，其使 scFv 能够形成用于抗原结合的所需结构。

“结构域抗体”是只含有重链可变区或轻链可变区的免疫功能性免疫球蛋白片段。在某些情况下，两个或更多个 VH 区与肽接头共价连接形成二价结构域抗体。二价结构域抗体的 2 个 VH 区可靶向相同或不同的抗原。

“二价抗体”包含 2 个抗原结合部位。在某些情况下，2 个结合部位具有相同的抗原特异性。然而，二价抗体可以是双特异性的。

“双抗体”是指具有两个抗原结合部位的小抗体片段，所述片段包含在同一多肽链（VH-VL 或 VL-VH）中与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域（VH）。通过使用短得不允许在同一链的两个结构域之间配对的接头，迫使该结构域与另一链的互补结构域配对并产生两个抗原结合部位。

“嵌合抗体”是具有第一抗体的可变结构域和第二抗体的恒定结构域的抗体，其中第一抗体和第二抗体来自不同物种。通常可变结构域获自啮齿动物等实验动物的抗体（“亲代抗体”），而恒定结构域序列获自人抗体，使得与亲代啮齿动物抗体相比，所得嵌合抗体在人受试者中诱导不良免疫应答的可能性较低。

“人源化抗体”是指含有来自人和非人（例如鼠、大鼠）抗体的序列的抗体形式。一般而言，人源化抗体包含基本所有的至少一个、通常两个可变结构域，其中所有或基本所有的超变环相当于非人免疫球蛋白的超变环，而所有或基本所有的构架（FR）区是人免疫球蛋白序列的构架区。人源化抗体任选可包含至少一部分的人免疫球蛋白恒定区（Fc）。

“完全人抗体”是指只包含人免疫球蛋白蛋白质序列的抗体。如在小鼠中、在小鼠细胞中或在来源于小鼠细胞的杂交瘤中产生，则完全人抗体可含有鼠糖链。同样，“小鼠

抗体”是指仅包含小鼠免疫球蛋白序列的抗体。或者，如果在大鼠中、在大鼠细胞中或在来源于大鼠细胞的杂交瘤中产生，则完全人抗体可含有大鼠糖链。同样，“大鼠抗体”是指仅包含大鼠免疫球蛋白序列的抗体。

“同种型”是指由重链恒定区基因提供的抗体种类（例如，IgM、IgE、IgG 诸如 IgG1 或 IgG4）。同种型还包括这些种类之一的修饰形式，其中修饰已被产生来改变 Fc 功能，例如以增强或减弱效应子功能或对 Fc 受体的结合。

术语“核酸”或“多核苷酸”是指脱氧核糖核酸（DNA）或核糖核酸（RNA）及其呈单链或双链形式的聚合物。除非明确地限制，否则术语包括具有与参照核酸相似的结合性质并且以与天然存在的核苷酸相似的方式被代谢的含有已知的天然核苷酸的类似物的核酸。（参见，属于 Kariko 等人的美国专利 No. 8, 278, 036, 其公开了尿苷被假尿苷替代的 mRNA 分子，合成所述 mRNA 分子的方法以及用于在体内递送治疗性蛋白的方法）。可使用经修饰 mRNA 的方法，例如，属于 Kariko 等人的美国专利 No. 8, 278, 036 和属于 Moderna 公司的专利申请 W02013/090186A1 中公开的那些方法。除非另有所指，否则特定核酸序列还隐含地包括其保守修饰的变体（例如，简并密码子取代）、等位基因、直系同源物、SNP 和互补序列以及明确指出的序列。具体地，简并密码子取代可通过生成其中一个或多个选择的（或全部）密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现（Batzer 等人，Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991) ;Ohtsuka 等人，J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985);和 Rossolini 等人，Mol. Cell. Probes 8:91-98(1994)）。

“构建体”是指任何重组多核苷酸分子（诸如质粒、粘粒、病毒、自主复制多核苷酸分子、噬菌体或线性或环状单链或双链 DNA 或 RNA 多核苷酸分子），衍生自任何来源，能够与基因组整合或自主复制，构成如下多核苷酸分子，其中已经以功能操作的方式连接（即，可操作地连接）一或多个多核苷酸分子。重组构建体通常会包含可操作地连接至转录起始调节序列的本发明的多核苷酸，这些序列会导引多核苷酸在宿主细胞中的转录。可使用异源及非异源（即，内源）启动子两者导引本发明的核酸的表达。

“载体”是指任何重组多核苷酸构建体，该构建体可用于转化的目的（即将异源 DNA 引入到宿主细胞中）。一种类型的载体为“质粒”，是指环状双链 DNA 环，可将额外 DNA 区段连接至该环中。另一类型的载体为病毒载体，其中可将额外 DNA 区段连接至病毒基因组中。某些载体能够在被引入到的宿主细胞中自主复制（例如，具有细菌复制起点的细菌载体及游离型哺乳动物载体）。在引入到宿主细胞中后，其他载体（例如，非游离型哺乳动物载体）整合至宿主细胞的基因组中，且因此与宿主基因组一起复制。此外，某些载体能够导引被操作性连接的基因的表达。本文将此类载体称为“表达载体”。

本文所用术语“表达载体”是指能够在转化、转染或转导至宿主细胞中时复制及表达目的基因的核酸分子。表达载体包含一或多个表型选择标记及复制起点，以确保维护载体及以在需要的情况下于宿主内提供扩增。

如本文中所用，术语“IL-17A 拮抗剂”或“IL-17A 阻断分子”意指抑制 IL-17A 通过 IL-17R 诱导的信号转导活性，从而降低或中和 IL-17A 活性的抗体或其抗原结合蛋白。这可在人细胞测定诸如人细胞的依赖 IL-17A 的 CXCL1 产生测定中得以显示。此类测定在下面实施例中进行了更详细描述。

用于细胞或受体的“活化”、“刺激”和“处理”可具有相同含义，例如细胞或受体用配体活化、刺激或处理，除非上下文另外或明确规定。“配体”包括天然和合成配体，例如细胞因子、细胞因子变体、类似物、突变蛋白和来源于抗体的结合化合物。“配体”还包括小分子，例如细胞因子的肽模拟物和抗体的肽模拟物。“活化”可指通过内部机制以及外部或环境因素调节的细胞活化。“应答/反应”，例如细胞、组织、器官或生物体的应答，包括生化或生理行为（例如生物区室内的浓度、密度、粘附或迁移、基因表达速率或分化状态）的改变，其中改变与活化、刺激或处理有关，或者与例如遗传编程等内部机制有关。

如本文中所用，术语任何疾病或病症的“治疗”或“医治”在一个实施方案中是指改善疾病或病症（即，减缓或阻止或减少疾病的进展或其临床症状的至少一个）。在另一个实施方案中，“治疗”或“医治”是指缓解或改善至少一个身体参数，包括可能不能被患者辨别出的那些物理参数。在另一个实施方案中，“治疗”或“医治”是指在身体上（例如，可辨别的症状的稳定）、生理上（例如，身体参数的稳定）或在这两方面调节疾病或病症。除非在本文中明确描述，否则用于评估疾病的治疗和/或预防的方法在本领域中通常是已知的。

“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物，诸如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。如本文中所用，术语“cyno”或“食蟹猴”是指食蟹猴。

“治疗有效量”、“治疗有效剂量”和“有效量”是指本发明的 IL-17A 抗体或其抗原结合片段当单独或与其它治疗药物组合给予细胞、组织或受试者时，有效预防或改善一种或多种疾病或病况的症状或该疾病或病况的发展的量。治疗有效剂量还指足以导致症状改善的抗体或其抗原结合片段的量，例如治疗、治愈、预防或改善相关医学病况或者提高这类病况的治疗、治愈、预防或改善的速度的量。当对个体施用单独给予的活性成分时，治疗有效剂量仅是指该成分。当组合施用时，治疗有效剂量是指引起治疗效果的活

性成分的综合量，不论是组合、依次给予还是同时给予。治疗剂的有效量将导致诊断标准或参数提高至少 10% ;通常至少 20% ;优选至少约 30% ;更优选至少 40%，最优选至少 50%。

抗体的产生

可采用用于产生抗体的任何合适方法来产生本发明的抗体。任何合适形式的人 IL-17A 都可用作产生抗体的免疫原（抗原）。通过举例而非限制，任何人 IL-17A 同种型或其片段都可用作免疫原。实例包括但不限于本文所述的天然的成熟型人 IL-17A(氨基酸序列为 SEQ ID NO:66)。

在一个优选方案中，产生鼠源的单克隆抗人 IL-17A 抗体的杂交瘤细胞可通过本领域公知的方法产生。这些方法包括但不限于最初由 Kohler 等（1975）(Nature 256 :495-497) 研发的杂交瘤技术。优选根据标准方案，分离出小鼠脾细胞，用 PEG 或通过电融合与小鼠骨髓瘤细胞系融合。然后可筛选产生抗原特异性抗体的所得杂交瘤。例如，在 50% PEG 的情况下，可将来源于免疫小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬液与 1/6 数目的小鼠骨髓瘤细胞 SP20 (ATCC) 融合。可将细胞以约 2×10^5 个细胞/mL 接种在平底微量滴定板中，接着在含有 20% 胎牛血清的完全培养基和 1×HAT(Sigma;融合后 24 小时加入 HAT) 的选择培养基中孵育 2 周。2 周后，可将细胞在 HAT 用 HT 替换的培养基中培养。然后可通过 ELISA 针对抗人 IL-17A 单克隆 IgG 抗体筛选各孔。一旦出现大规模杂交瘤生长，通常可在 10-14 天后对培养基进行观察。分泌抗体的杂交瘤可再次接种、筛选，如果仍为人 IgG 阳性，则可通过有限稀释对抗人 IL-17A 单克隆抗体杂交瘤进行亚克隆至少两次。然后可体外培养稳定的亚克隆以在组织培养基中产生少量的抗体用于表征。

在一个优选实施方式中，本发明获得的单克隆杂交瘤细胞为 1F8、2F5 和 2B2，其分泌的抗体与 IL-17A 高特异性结合、阻断 IL-17A 与 IL-17RA 结合并抑制 IL-17A 介导的生物活性，如抑制 CXCL1 分泌。

在一个优选实施方式中，本发明利用基于简并引物 PCR 的方法，测定由候选杂交瘤细胞 1F8、2F5 和 2B2 免疫球蛋白可变区的 DNA 序列。其中杂交瘤细胞 1F8 具有两种抗体轻链基因和一种抗体重链基因，2F5 具有两种抗体重链基因和一种抗体轻链基因。所以 1F8、2F5 分泌的抗体可能均含有两种混合完全抗体，在本文中，1F8 分泌的抗体称为 1F8-1 和 1F8-2，2F5 分泌的抗体称为 2F5-1 和 2F5-2。

表 1：杂交瘤抗体可变区的氨基酸序列

杂交瘤	可变区	氨基酸序列
-----	-----	-------

1F8-1	VH	SEQ ID NO:25
	VL1	SEQ ID NO:29
1F8-2	VH	SEQ ID NO:25
	VL2	SEQ ID NO:30
2B2	VH	SEQ ID NO:26
	VL	SEQ ID NO:31
2F5-1	VH1	SEQ ID NO:27
	VL	SEQ ID NO:32
2F5-2	VH2	SEQ ID NO:28
	VL	SEQ ID NO:32

来源于啮齿动物（如小鼠）的抗体在体内用作治疗药物时可引起不需要的抗体免疫原性，重复使用导致人体产生针对治疗性抗体的免疫应答，这类免疫应答至少导致丧失治疗功效，而最高则导致潜在致死过敏反应。降低啮齿动物抗体的免疫原性的一种方法包括嵌合抗体的产生，其中将小鼠可变区与人恒定区融合（Liu等（1987）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 :3439-43）。然而，嵌合抗体中的完整啮齿动物可变区的保留仍可在患者中引起有害的免疫原性。将啮齿动物可变结构域的互补决定区（CDR）环移植到人构架上（即人源化）已被用于进一步将啮齿动物序列减至最低（Jones等（1986）*Nature* 321 :522 ;Verhoeyen 等（1988）*Science* 239:1534）。

在一些实施方案中，本发明的嵌合或人源化抗体可基于所述制备的鼠单克隆杂交瘤抗体的序列来制备。编码重链和轻链免疫球蛋白的DNA可以从目标鼠杂交瘤中获得，并且使用标准分子生物学技术进行工程改造以包含非鼠（例如人）免疫球蛋白序列。

在一些实施方案中，本发明所述的嵌合抗体，可使用本领域已知的方法将杂交瘤来源的编码免疫球蛋白重链和轻链可变区与人IgG恒定区有效连接（参见例如属于Cabilly等人的美国专利No.4,816,567），获得嵌合型重链和嵌合型轻链。其中人IgG可选自任何亚型，如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，优选IgG4。

在一个具体的实施方式中，本发明的嵌合抗体可由一种嵌合型轻链与一种嵌合型重链表达质粒“混合和匹配”转染表达细胞获得，此类“混合和匹配”的抗体的IL-17A结合可使用上述结合测定和其它常规结合测定（例如，ELISA）来进行测试，优选的ch1，ch2，ch4，ch7和ch16具有最优的结合和阻断活性，其可变区氨基酸序列如表2所示。

表 2：嵌合抗体可变区氨基酸序列

嵌合抗体	重链可变区 (VH)	轻链可变区(VL)
ch1	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:29
ch2	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:30
ch4	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:32
ch7	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:31
ch16	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:32

本发明的所述抗体的可变区 CDR 的精确氨基酸序列边界可使用许多公知的方案中的任何一种方案来确定，包括由 Kabat 等人（1991），“Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版.Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(“Kabat”编号方案)描述的 Kabat 方案和 Lefranc M.-P.等人描述的 IMGT 方案（1999 Nucleic Acids Research,27,209-212）。在一些实施方式中，本发明优选的鼠源抗体可变区的 CDR 具体定义方案和氨基酸序列如表 3 所示。

表 3：鼠源抗体可变区 CDR 定义

CDR 区定义方案	IMGT 方案	KABAT 方案				IMGT 方案
抗体来源	1F8-1	1F8-2	2B2	2F5-1	2F5-2	
HCDR1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:60
HCDR2	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:61
HCDR3	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:62
LCDR1	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:63
LCDR2	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:64
LCDR3	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:65

在一些实施方案中，本发明所述的人源化抗体，可以使用本领域已知的方法将鼠源 CDR 区插入人种系框架区。参见 Winter 等人的美国专利 No.5,225,539 及 Queen 等人的美国专利 No.5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 和 6,180,370。简言之，发明人藉由 NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)网站中的人类免疫球蛋白基因数据库搜寻与鼠源抗体可变区的cDNA序列同源的人类种系IgG基因,原则上藉由选定的CDR嫁接实现人源化。然而,CDR环交换仍不能均匀产生具有与起始抗体相同的结合性质的抗体。在人源化抗体中,常常还需要构架残基(FR)(参与CDR环支持的残基)改变以保持抗原结合亲和力。Kabat等(1991) J. Immunol. 147:1709。简言之,人源化改造过程涉及以下步骤: A、把各候选抗体的基因序列与人胚胎系抗体基因序列进行比对,找出同源性高的序列; B、分析考察HLA-DR 亲和性,选出亲和力低的人胚胎系框架序列; C、利用计算机模拟技术,应用分子对接分析可变区及其周边的框架氨基酸序列,考察其空间立体结合方式。通过计算静电力,范德华力,亲疏水性和焓值,分析各候选的抗体基因序列中可与IL-17A作用以及维护空间构架的关键氨基酸个体,将其嫁接回已经选择的人胚胎系基因框架,并在此基础上标配出必须保留的框架区氨基酸位点,合成人源化抗体。

在一些实施方式中,本发明获得的优选人源化抗体为hu31, hu43, hu44, hu59, hu60和hu250。

人源化抗体hu31, hu43, hu44, hu59, hu60和hu250可变区及其对应的CDR氨基酸序列如表4所示。

表4: 人源化抗体可变区和CDR序列

抗体	hu31	hu43	hu44	hu59	hu60	hu250
VH	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:40
VL	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:41
HCDR1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:60
HCDR2	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:61
HCDR3	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:62
LCDR1	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:63
LCDR2	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:64
LCDR3	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:65

人源化抗体 hu31, hu43, hu44, hu59, hu60 和 hu250 的轻/重链氨基酸和核苷酸序列如表 5 所示。

表 5: 人源化抗体氨基酸/核苷酸序列

人源化抗体	重链 (HC)		轻链 (LC)	
	氨基酸序列	核苷酸序列	氨基酸序列	核苷酸序列

hu31	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:51	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:52
hu43	SEQ ID NO:44	SEQ ID NO:53	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:52
hu44	SEQ ID NO:44	SEQ ID NO:53	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:54
hu59	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:55	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:56
hu60	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:55	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:57
hu250	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:50	SEQ ID NO:59

本发明的其它抗体包括具有已通过氨基酸缺失、插入或取代突变的，但仍与上述抗体（特别地在上述序列中描绘的CDR区中）有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列的那些抗体。在一些实施方案中，本发明的抗体是hu31、hu43、hu44、hu59、hu60和hu250的任一个的突变体，其中所述突变体包括突变氨基酸序列，在所述突变氨基酸序列中，当与上述序列中描绘的CDR区相比较时，在CDR区中已通过氨基酸缺失、插入或置换的氨基酸突变不超过1、2、3、4或5个。

编码本发明的抗体的其它核酸包括已通过核苷酸缺失、插入或取代突变的，但仍然与上文中所述的序列中描绘的CDR对应编码区具有至少60、70、80、90、95或100%同一性的核酸。

抗体表达

在一些实施方案中，本发明涉及包含一种或多种表达载体或表达载体的宿主细胞以及用于产生本发明的抗体或包含其抗原结合片段的方法，所述方法包括培养所述宿主细胞、纯化和回收所述抗体或抗原结合片段。

可使用例如本领域中公知的重组DNA技术与基因转染方法的组合（例如，Morrison, S. 1985, Science 229:1202）在宿主表达细胞中产生本发明的抗体。例如，为了表达抗体或其抗体片段，编码部分或全长轻链和重链的DNA可利用标准分子生物学或生物化学技术（例如，DNA化学合成、PCR扩增或使用表达目标抗体的杂交瘤的cDNA克隆）来获得，并且可将所述DNA插入表达载体，以便所述基因被有效地连接于转录和翻译控制序列。在本说明书中，术语“有效连接的”意指将抗体基因连接进入载体，以使载体内的转录和翻译控制序列行使它们的调节抗体基因的转录和翻译的预定功能。选择可与所使用的表达宿主细胞相容的表达载体和表达调控序列。可将抗体轻链基因和抗体重链基因插入至不同的载体中，或者更通常地，将两个基因插入至同一表达载体中。通过标准方法将抗

体基因插入至表达载体中（例如，连接抗体基因片段和载体上互补的限制性位点，或者如果不存在限制性位点，则进行平端连接）。可以使用本文所述抗体的轻链和重链可变区来生成任何抗体同种型的全长抗体基因，其通过将它们插入已编码期望同种型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中，从而使得VH区段与载体中的CH段有效连接，VL区段与载体中的CL区段有效连接。此外/或可选择地，重组表达载体可以编码信号肽（也称为前导序列），其有利于抗体链从宿主细胞分泌。可将抗体链基因克隆进载体中以使信号肽与抗体链基因的氨基末端连接于同一读码框中。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽（即来自非免疫球蛋白的信号肽）。

用于表达本发明的重组抗体的哺乳动物宿主细胞，包括可获自美国典型培养物保藏中心（ATCC）的许多永生化细胞系。这些尤其包括中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、NS0、SP2/0细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾（BHK）细胞、猴肾细胞（COS）、人肝细胞癌细胞、A549细胞、293T细胞和许多其它细胞系。哺乳动物宿主细胞包括人、小鼠、大鼠、狗、猴、猪、山羊、牛、马和仓鼠细胞。通过测定哪种细胞系具有高表达水平来选择特别优选的细胞系。

在将编码重链或抗原结合片段或其片段、轻链和/或其抗原结合片段的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞中时，通过将宿主细胞培养足够的一段时间，以允许抗体在宿主细胞中表达，或者更优选抗体分泌到宿主细胞生长的培养基中，来产生抗体。可采用标准蛋白质纯化方法从培养基中回收抗体。

很可能由不同细胞系表达或在转基因动物中表达的抗体彼此具有不同的糖基化。然而，由本文提供的核酸分子编码的或包含本文提供的氨基酸序列的所有抗体是本发明的组成部分，而不论抗体的糖基化如何。同样，在某些实施方式中，非岩藻糖基化抗体是有利的，因为它们通常在体外和体内具有比其岩藻糖基化对应物更强力的功效，并且不可能是免疫原性的，因为它们的结构是天然人血清IgG的正常组分。

医药用途

本发明的抗体或其抗原结合片段具有体外和体内诊断及治疗用途。优选地，人源化抗体hu31、hu43、hu44、hu59、hu60或hu250抗体可用于治疗与IL-17A相关疾病症。

一方面，本发明所述的分离抗体或其抗原结合片段在体内活性评估时，能够在咪喹莫特诱导的银屑病实验模型中抵抗小鼠发病，小鼠银屑病发病的临床评分及耳部肿胀程度显著降低。

在一个具体的实施方式中，在咪喹莫特诱导的银屑病实验模型中，人源化抗体 hu31 和 hu44 可明显抵抗小鼠的发病，小鼠银屑病发病的临床评分及耳部肿胀程度降低。

一方面，本发明所述的分离抗体或其抗原结合片段在体内评估时，能够在抗原诱导的关节炎实验模型诸如食蟹猴 AIA-模型中抑制膝关节肿胀。

在一个具体的实施方式中，在食蟹猴 AIA-模型中，人源化抗体 hu31 显著抑制食蟹猴关节炎临床评分的增加趋势。

本发明的一个方面，提供了治疗由 IL-17A 介导的病理性疾病的方法，所述方法包括施用有效量的根据本发明的分离的抗体或其抗原结合片段，特别地 hu31、hu43、hu44、hu59、hu60 或 hu250 抗体，以使所述病症被缓解。

在一个实施方式中，本发明所述的分离抗体或包含其抗原结合片段的蛋白质缀合于其它活性部分。

在一个实施方式中，本发明所述的分离抗体或包含其抗原结合片段的蛋白质可以是单克隆抗体或其抗原结合片段，优选嵌合抗体、人源化抗体或人抗体或其部分。

在本发明的方面，提供了药物组合物，其包含与一种或多种可药用的赋形剂、稀释剂或载体组合的本发明所述的实施方式的抗体或包含其抗原结合片段的蛋白质。

在实施方式中，所述药物组合物包含一种或多种额外的活性成分。

在一个具体实施方式中，所述药物组合物是冻干粉剂。在另一个具体实施方式中，所述药物组合物是包含治疗上可接受的量的本发明所述的抗体或分子的稳定的液体制剂。

具体地，本发明提供治疗与 IL-17A 相关病症和/或自身免疫性和炎性病症的方法。在某些实施方式中，所述方法包括向有此需要的受试者施用根据本发明的分离的抗体或其抗原结合片段的步骤。

本发明还提供了方法，所述方法通过将细胞与包含治疗有效剂量的本发明的抗体的组合物接触，来减弱或抑制 IL-17A 或 IL-17AF 在靶细胞或组织中诱导的信号转导应答。

在本发明中，术语“IL-17A 介导的疾病”或“IL-17A 相关病症”包括 IL-17A 或 IL-17AF 在疾病或医学病况中起作用（无论是直接还是间接地）的所有疾病和病况，包括疾病或病况的原因、发展、进展、持续或病理学。因此，这些术语包括与异常 IL-17A 或 IL-17AF 水平相关或以异常 IL-17A 或 IL-17AF 水平为特征的病况和/或可通过减弱或抑制 IL-17A/AF 在靶细胞或组织中诱导的活性（例如 CXCL1）来治疗的疾病或病况。这类疾病或病况包括炎性病况和自身免疫性疾病，诸如关节炎、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、多发性硬化症或银屑病。这类疾病还包括过敏症和过敏性病况、超敏反应、慢性阻塞性肺疾病、囊性纤维化以及器官或组织移植排斥。

本发明所用“抑制”或“治疗”或“处理”包括病症相关症状的发展延迟和/或这类病症

症状的严重程度减轻。该术语还包括改善现有的不受控制的或有害的症状，预防其它症状和改善或预防这类症状的根本起因。因此，该术语表明已为患有病症、疾病或症状的脊椎动物受试者或者可能发生这类病症、疾病或症状的脊椎动物受试者提供有益结果。

本发明所用术语“治疗有效量”、“治疗有效剂量”和“有效量”是指本发明的IL-17结合化合物当单独或与其它治疗药物组合给予细胞、组织或受试者时，有效预防或改善一种或多种疾病或病况的症状或该疾病或病况的发展的量。治疗有效剂量还指足以导致症状改善的结合化合物的量，例如治疗、治愈、预防或改善相关医学病况或者提高这类病况的治疗、治愈、预防或改善的速度的量。当对个体施用单独给予的活性成分时，治疗有效剂量仅是指该成分。当组合施用时，治疗有效剂量是指引起治疗效果的活性成分的综合量，不论是组合、依次给予还是同时给予。治疗剂的有效量将导致诊断标准或参数提高至少10%；通常至少20%；优选至少约30%；更优选至少40%；最优选至少50%。

类风湿性关节炎 (RA)

RA是以滑膜关节的炎症为特征的进行性全身性疾病，影响约0.5%的全球人口。参见Emery(2006)BMJ332:152-155。关节炎症可导致畸形、疼痛、僵硬和肿胀，最终导致关节不可逆退化。受影响关节包括膝、肘、颈和手足关节。常规治疗包括使用NSAID缓解症状，接着给予缓解疾病的抗风湿性药物 (DMRD)，例如金、青霉胺、柳氮磺吡啶和甲氨蝶呤。最近进展包括用TNF- α 抑制剂的治疗，包括英利昔单抗、阿达木单抗和戈利木单抗等单克隆抗体，以及受体融合蛋白，例如依那西普。用这些TNF- α 抑制剂治疗显著降低因疾病所致的结构损害。

本发明的抗IL-17A抗体可用来治疗需要这种治疗的受试者的RA。本发明的抗IL-17A抗体还可与RA的其它治疗组合，例如甲氨蝶呤、硫唑嘌呤、环磷酰胺、霉酚酸吗乙酯、NSAID或TNF- α 抑制剂。

银屑病

皮肤是机体内环境与外界之间的重要屏障，防止与潜在的有害抗原接触。在抗原/病原体侵入的情况下，皮肤接触部位的T细胞、多形核细胞和巨噬细胞等局部浸润并启动炎症反应以消除抗原。(参见例如Williams和Kupper, (1996) Life Sci., 58 : 1485-1507)。通常，由病原体引发的这种炎症反应处于严密严监控之下，并在病原体消除时停止。在某些情况下，这种炎症反应在没有外部刺激的和没有适当控制的情况下发生，导致皮肤炎症。本发明提供用于治疗 and 诊断皮肤炎症的方法。皮肤炎症(上述细胞浸润以及从这些细胞分泌的细胞因子的结果)包括若干炎性病症，例如疤痕性类天疱疮、硬皮病、化脓性汗腺炎、中毒性表皮坏死松解症、痤疮、骨炎、移植物抗宿主病 (GVHD)、坏疽性

脓皮症 (pyoderma gangrenosum) 和贝切特综合征 (Behcet's Syndrome) (参见例如 Williams 和 Griffiths, (2002) Clin. Exp. Dermatol., 27 :585-590)。最常见的皮肤炎症形式是银屑病。

银屑病的特征在于T细胞介导的角质形成细胞过度增殖伴发炎症浸润。该病具某些明显重叠的临床表型, 包括慢性斑块病变、皮疹和脓疱病变 (参见例如Gudjonsson等, (2004) Clin Exp. Immunol. 135:1-8)。大约10%银屑病患者发生关节炎。该疾病具有强而复杂的遗传素因, 在单卵孪生中有60% 一致性。

典型的银屑病病变是边界十分清楚的红斑, 红斑被厚的银色鳞屑覆盖。与正常皮肤相比, 银屑病组织的炎症和过度增殖与不同的组织学、抗原和细胞因子概况有关。与银屑病有关的细胞因子为: TNF- α 、IL-19、IL-18、IL-15、IL-12、IL-7、IFN- γ 、IL-17A 和 IL-23(参见 Gudjonsson 等, 同上)。

单独或与其它作用剂组合的本发明的抗IL-17A抗体, 也可用于预防、治疗、诊断和预测银屑病复发。

为了制备本发明的IL-17A抗体的药物组合物或无菌组合物, 将抗体与药学上可接受的载体或赋形剂混合。参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences and U. S. Pharmacopeia : National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA(1984)。

可通过与可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合来制备以下形式的治疗剂和诊断剂的剂型: 例如冻干粉、膏剂、水溶液剂或混悬剂。在一个实施方式中, 将本发明的IL-17A抗体在乙酸钠溶液 (pH 5-6) 中稀释到适当浓度, 加入NaCl或蔗糖以利渗透压。可加入其它物质 (例如聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80) 以提高稳定性。

给药方案取决于若干因素, 包括治疗性抗体的血清或组织周转率、症状水平、治疗性抗体的免疫原性和生物基质中靶细胞的可及性。优选给药方案递送足够的治疗性抗体以实现靶疾病状态的改善, 同时使不良副作用降到最低。因此, 递送的生物剂 (biologic) 的量部分取决于具体的治疗性抗体和待治疗病况的严重程度。可获得有关选择适当剂量的治疗性抗体方面的指引。例如利用本领域已知或推测影响治疗的参数或因素, 临床医生可确定适当剂量。总的来讲, 剂量以稍小于最佳剂量的量开始, 之后以少的增量增加直到达到相对于任何负面的副作用是所需的效果或最佳效果。重要的诊断方法包括例如炎症症状或所产生的炎性细胞因子水平的诊断方法。优选可使用的生物剂来源于与靶向治疗的动物相同的物种, 从而使对试剂的炎症、自身免疫或增殖应答降到最低。例如, 在人受试者的情况下, 优选嵌合、人源化和完全人抗体。

本发明包括所叙述特定实施方式的所有组合。本发明的进一步实施方式及可应用性

的完整范畴将自下文所提供的详细描述变得显而易见。然而，应理解，尽管详细描述及特定实施例指示本发明的优选实施方式，但仅以说明的方式提供这些描述及实施例，因为本发明的精神及范畴内的各种改变及修改将自此详细描述对熟悉此项技术者变得显而易见。出于所有目的，包括引文在内的本文所引用的所有公开物、专利及专利申请将以引用的方式全部并入本文。

实施例

实施例 1. 重组蛋白人 IL-17A-mFc

从义翘神州购买编码全长人 IL-17A 的 cDNA 序列(NCBI 登录号: NP_002181.1)的质粒 HG12047-G，通过常规 PCR 技术扩增人 IL-17A 成熟片段(NCBI 登录号 NP_002181.1 的第 24-155 位氨基酸，氨基酸序列为 SEQ ID NO:66，核苷酸序列为 SEQ ID NO:67)。扩增片段经 BSPQI 酶切后，克隆到自主构建的真核表达质粒系统 (MXT1-Fc，包含鼠源 IgG 重链的 Fc 域)，从而产生重组融合蛋白表达质粒 IL-17A-mFc。利用常规技术，将鉴定正确的质粒转染表达细胞 293F，表达并纯化获取人 IL-17A-mFc 重组蛋白。图 1 所示为人 IL-17A-mFc 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳图。

实施例 2. 构建表达人 IL-17RA 的 293F 稳转细胞株

从义翘神州购买含有编码人类全长 IL-17RA 的 cDNA 序列的质粒 HG10895-G，通过常规 PCR 扩增编码全长人 IL-17RA 的 DNA 序列(SEQ ID NO:69)。利用常规的克隆技术，将扩增片段克隆到自主构建的真核表达质粒系统 (HXP) 中，其含嘌呤霉素筛选体系。将构建成功的 IL-17RA 重组表达质粒转染至 293F (ATCC) 细胞中。转染 24 h 后，通过嘌呤霉素 (2 μ g/ml) 进行筛选，直至形成 293F IL-17RA 稳转细胞库。利用常规方法分离单个克隆，如通过有限稀释法，按每孔 0.8 个细胞，铺 96 孔板，15 天后，挑选出 IL-17RA-293F 单克隆，并进行传代，形成 293F IL-17RA 稳转细胞株，藉由 FACS 等分析筛选所有克隆，及选择顶级表达克隆用于 FACS 结合检定以筛选杂交瘤单克隆抗体，或在功能性检定中使用。

实施例 3. 重组蛋白 IL-17A-mFc 与 293F IL-17RA 稳转细胞株的结合

FACS 实验检测重组蛋白 IL-17A-mFc 与 293F 细胞上 IL-17RA 的结合特异性。简而言之，将细胞 (293F IL-17RA 稳转细胞株) 制备成 1×10^6 /ml 的细胞悬液，按每孔 20ul 加入 96 孔板中，实际每孔细胞数为 2×10^4 个，将重组蛋白 IL-17A-mFc (3 ug/ml, 20ul/

孔;实验组)或1%BSA(20ul/孔;阴性对照组)与细胞悬液混合,37 摄氏度孵育 30 分钟后, FACS 缓冲液洗脱 3 次后,加入抗小鼠 IgG (1: 200)在室温孵育 30 分钟。以 FACS 缓冲液洗脱 3 次后上细胞流式仪检测,比较各组平均荧光强度值(MFI)。如图 2 所示,重组蛋白 IL-17A-mFc 可以与 293F 细胞上的 IL-17RA 特异性的结合。

实施例 4. 杂交瘤抗体的制备与筛选

使用标准分子生物学技术产生杂交瘤抗体。简言之,将从 HumanZyme 购买的天然人 IL-17A 蛋白作为抗原与等量免疫佐剂混合,取 5 只 6 周大雌性 FVB 小鼠进行免疫。在初次免疫以后,每周进行一次加强免疫,共进行七次免疫。在最后一针加强免疫后,选择血清中具有高抗 IL-17A 抗体滴度的小鼠进行细胞融合实验。使用标准杂交瘤技术,使脾细胞分离及与鼠类骨髓瘤细胞系 SP2/0 细胞(ATCC)融合。将融合细胞重悬于含有 HAT 的 RPMI-1640 完全培养基,涂板在具有腹膜细胞饲养层的孔中。

基于初始所希望的抗体/抗原结合特征(诸如对于 IL-17A 的结合亲和力、阻断 IL-17A 对其受体的结合的能力、种属交叉反应以及在体外测定中阻断 IL-17A 介导的生物效应的能力),鉴定单克隆杂交瘤分泌上清,其中杂交瘤 1F8、2B2、2F5、2F2、2H1 和 2H5 分泌的上清抗体用于进一步表征。

实施例 5. 杂交瘤抗体体内阻断 IL-17A 生物活性的作用

大量研究表明,IL-17A 在体内促进细胞因子 CXCL1 表达与释放,所以可通过 ELISA 定量检测小鼠血清中 CXCL1 表达变化,判断杂交瘤抗体对小鼠体内 IL-17A 介导的生物活性的影响。简而言之,选择 40 只 10 周龄的雌性 Balb/c 小鼠,分为 8 组,每组 5 只。给药前 4 天,搜集血清,并检测 CXCL1 表达量作为基础值。给药当天,心内注射候选杂交瘤抗体、生理盐水(ctrlol)或参照抗体 mAb317(商业抗 IL-17A 抗体,购自 R&D)药物,剂量为 1mg/kg;给药后 1 小时,按 150ug/kg 给药量通过皮下注射天然型的人 IL-17A (HumanZyme);注射人 IL-17A 后 2 小时,搜集血清检测血液中 CXCL1 的浓度,并与基础值进行对比,计算各组在给药前后 CXCL1 的浓度变化倍数(均值±标准误(mean ± SEM))。各抗体组与对照组的比较分析使用 Student's-t test 检验, $P < 0.05$ 认为有显著差异, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。

如图 3 所示,实施例 4 获得的杂交瘤抗体同商业抗体 mAb317 都能显著抑制 IL-17A 诱导小鼠体内 CXCL1 表达。

实施例 6. 候选抗体可变区序列的获得

用基于简并引物 PCR 的方法,测定由杂交瘤 1F8、2B2 和 2F5 表达的抗体可变区的 DNA 序列。简言之,将杂交瘤细胞株 1F8、2B2 和 2F5 分别扩大培养,1000rpm 离心收集细胞,并以 Trizol 提取总 RNA。以此为模板,合成第一链 cDNA 后,以第一链 cDNA 为后续模板 PCR 扩增对应的可变区 DNA 序列,所用 PCR 引物基于 Ig-引物组。回收纯化 PCR 产物并测序分析,获得候选杂交瘤抗体重链和轻链可变区序列。其中杂交瘤细胞 1F8 具有两种抗体轻链可变区基因序列和一种抗体重链可变区基因序列,2F5 具有两种抗体重链可变区基因序列和一种抗体轻链可变区基因序列。所以 1F8、2F5 分泌的抗体可能均含有两种混合完全抗体,其中 1F8 分泌的抗体称为 1F8-1 和 1F8-2,2F5 分泌的抗体称为 2F5-1 和 2F5-2。

1F8、2F5、2B2 表达的抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列如表 1 (见说明书详细描述) 所示。

实施例 7. 构建嵌合抗体重组表达载体

从人血细胞(北京血液研究所)中克隆人 IgG4 重链恒定区 Fc 片段和轻链 κ 恒定区,联入 pCDNA3.1 质粒加以改造。上述重链和轻链可变区序列片段由 Genscript 公司合成,重链经 Bspq I 酶切,轻链经 Bspq I 酶切后,联入相对应改造的 pCDNA3.1 质粒中,经测序确定 IgG4 嵌合型的重链(ch-HC)或轻链(ch-LC)的表达质粒。将上述不同的嵌合型重链和轻链的表达质粒混合配对转染表达细胞,获得 16 种嵌合抗体,编号为 ch1 到 ch16 (见表 6)。后续的实验材料均由此系列质粒转染表达细胞后提取获得。

表 6: 嵌合抗体轻/重链来源

LC/HC	1F8-ch-HC	2B2-ch-HC	2F5-ch-HC1	2F5-ch-HC2
1F8-ch-LC1	ch1	ch5	ch9	ch13
1F8-ch-LC2	ch2	ch6	ch10	ch14
2B2-ch-LC	ch3	ch7	ch11	ch15
2F5-ch-LC	ch4	ch8	ch12	ch16

实施例 8. 嵌合抗体与人 IL-17A 的结合特异性

利用常规 ELISA 检测方法检测嵌合抗体与人 IL-17A 结合特异性。即将 0.5 μ g/ml 的人 IL-17A-mFc 包被于 96 孔酶标板,37 摄氏度恒温孵育 60-90 分钟。然后弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗 3 次,加入含有 2% BSA 的 PBS 溶液封闭 60 分钟。用洗涤缓冲液洗 3

次后加入不同浓度的嵌合抗体稀释液,37 摄氏度孵育 60 分钟后用洗涤缓冲液冲洗 3 次,然后加入 1: 10000 倍稀释的生物素-抗 IgG4, 37 摄氏度孵育 1 小时,经洗涤缓冲液冲洗三次后,加入用洗涤缓冲液以 1: 10000 倍稀释的 HPR-Strep, 室温孵育 1 小时,经洗涤缓冲液冲洗 3 次后,加入 100 μ l TMB 底物溶液显色,室温反应 30 分钟后,以 100 μ l 2 M 的盐酸溶液终止反应并在 450nm 处读出吸光度。

如图 4 所示,嵌合抗体 ch1, ch2, ch4, ch7 和 ch16 与人 IL-17A 结合具有较高的特异性,其 EC₅₀ 分别为 6.62 ng/mL, 5.17 ng/mL, 88.48 ng/ml, 39.96 ng/mL 和 15.42 ng/mL。

实施例 9. 嵌合抗体阻断人 IL-17A 与 IL-17RA 的结合作用

采用竞争性基于细胞的流式细胞(FACS)测定检测嵌合抗体阻断 IL-17A 与细胞上 IL-17RA 的结合作用。简而言之,将不同浓度的嵌合抗体稀释液(起始 10ug/ml, 3 倍滴定)与预先生物素标记的实施例 1 获得的人 IL-17A-mFC (3ug/ml) 混合,室温孵育 30 分钟。然后将混合物与细胞悬液(实施例 2 获得的 293F IL-17RA 稳转细胞株, 1.5 $\times 10^5$ 细胞/孔)在 37 摄氏度孵育 15 分钟,以 PBS 洗脱 3 次后,加入 5 μ g/ml 的抗小鼠 IgG 并室温孵育 30 分钟。以 PBS 洗脱 3 次后,通过流式细胞仪检测嵌合抗体对 IL-17A 与 293F 细胞表面的 IL-17RA 结合的抑制作用。

如图 5 所示,嵌合抗体 ch1, ch2, ch7 和 ch16 均能显具抑制人 IL-17 与 293F 细胞表面的 IL-17RA 结合。综合实验结果,选择 ch1 和 ch16 继续进行人源化改造。

实施例 10. 抗体的人源化改造

对于抗体的人源化,首先在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)网站中的人类免疫球蛋白基因数据库搜寻与鼠源抗体可变区的 cDNA 序列同源的人类种系 IgG 基因。再藉由 Kabat 编号系统或 IMGT 编号系统定义可变区 CDR 的氨基酸序列及其精确边界。原则上将与鼠源抗体可变区具有高同源性的人类 IGVH 及 IGVk 选为人源化模板,藉由 CDR 嫁接实施人源化。简言之,人源化改造过程涉及以下步骤: A、把各候选抗体的基因序列与人胚胎系抗体基因序列进行比对,找出同源性高的序列; B、分析考察 HLA-DR 亲和性,选出亲和力和低的人胚胎系框架序列; C、利用计算机模拟技术,应用分子对接分析可变区及其周边的框架氨基酸序列,考察其空间立体结合方式。通过计算静电力,范德华力,亲疏水性和熵值,分析各候选的抗体基因序列中可与 IL-17A 作用以及维护空间构架的关键氨基酸个体,将其嫁接回已经选择的人胚胎系基因框架,并在此基础上标配出必须保留的框架区氨基酸位点,合成人源化抗体。

鼠源抗体可变区 CDR 定义方案及其氨基酸序列见本公开内容详细说明部分的表 3。

基于前述实验筛选的结果,选取嵌合抗体 ch1 和 ch16 继续人源化改造。在一系列抗体/抗原结合特征(诸如对于 IL-17A 的结合亲和力、阻断 IL-17A 对其受体的结合的能力)初级筛选后,选取人源化抗体 hu31, hu43, hu44, hu59, hu60 和 hu250 继续后续验证。

人源化抗体 hu31, hu43, hu44, hu59, hu60 和 hu250 可变区及其 CDR 氨基酸序列见本公开内容详细说明部分的表 4。

实施例 11. 人源化抗体与人 IL-17A 的结合特异性

利用常规 ELISA 检测方法检测人源化抗体与人 IL-17A 结合特异性,实验方法与步骤参见实施例 8。如图 6 所示,人源化抗体 hu31, hu43, hu44, hu59, hu60 和 hu250 均与 IL-17A 特异性结合。其 EC_{50} 分别为 8.13ng/mL, 8.64ng/mL, 6.76ng/mL, 6.10ng/mL, 5.78ng/mL 和 6.35ng/mL。

实施例 12. 人源化抗体阻断人 IL-17A 与 IL-17RA 的结合作用

采用竞争性基于细胞的流式细胞测定(FACS),检测嵌合抗体阻断 IL-17A 与细胞上 IL-17RA 的结合作用,实验方法与步骤参见实施例 9。如图 7 所示,人源化抗体 hu31, hu43, hu44, hu59, hu60 和 hu250 均能显著地抑制 IL-17A 与细胞上的 IL-17RA 特异性结合。其 IC_{50} 分别为 867.6ng/mL, 780.8ng/mL, 828.5ng/mL, 467.4ng/mL, 482.8ng/mL 和 577.8ng/mL。

实施例 13. 人源化抗体拮抗 IL-17A 诱导上皮细胞表达 CXCL1

IL-17A 可以刺激多种上皮细胞和其它细胞分泌细胞因子 CXCL1 表达与释放,可通过 ELISA 定量检测细胞上清中 CXCL1 表达量变化,判断人源化抗体对 IL-17A 在细胞中介导的生物活性的影响。

使用标准技术在组织培养物处理的烧瓶中的培养/测定培养基中维持 HT-29 细胞(人结肠直肠癌上皮细胞, ATCC)。HT-29 在组织培养瓶中生长直至它们在测定当天达到 50-80%汇合。在测定当天,用 PBS 冲洗细胞并用胰蛋白酶+EDTA 从培养瓶中脱离细胞,并制成细胞悬液。取人源化抗体 hu31、hu59、hu60、hu250 或参照抗体(Secukinumab,诺华)稀释液(起始浓度为 55ug/ml, 3 倍浓度梯度稀释)与人 IL-17A (1ug/ml)混合,铺入 96 孔板中,孵育 1h。向每孔中加入 100ul(2×10^4 个) HT-29 细胞

(ATCC,人结肠直肠癌上皮细胞)悬液, 37℃, 7% CO₂ 培养 48h。500Xg, 5min 离心, 将培养上清转入新的 96 孔板中, 利用 ELISA 试剂盒检测 CXCL1 的表达。

如图 8 所示, 相比参照抗体 Secukinumab, 人源化抗体 hu31、hu59、hu60 和 hu250 对 IL-17A 刺激上皮细胞释放 CXCL1 具有更强得拮抗作用。

实施例 14. 人源化抗体拮抗 IL-17A 诱导小鼠表达 CXCL1

同实施例 5, 通过检测小鼠血清 CXCL1 水平变化, 判断人源化抗体对 IL-17A 在体内介导生物活性的影响。简言之, 选择 40 只 10 周龄的雌性 Balb/c 小鼠, 分为 8 组, 每组 5 只。给药前 4 天, 搜集血清, 并检测 CXCL1 表达量作为基础值。给药当天, 按 1mg/kg, 分别心内注射候选抗体(人源化抗体 hu31, hu43, hu44, hu60 和 hu250)和 IgG4 同种型对照(hlgG); 给药后 1 小时, 按 150ug/kg 给药量通过皮下注射人 IL-17A; 人 IL-17A 注射后 2 小时, 搜集血清检测血液中 CXCL1 的浓度, 并与基础值进行对比, 计算各组在给药前后 CXCL1 的浓度变化倍数(均值±标准误(mean±SEM))。候选抗体与 IgG4 同种型对照的比较分析使用 Student's-t test 检验, P<0.05 认为有显著差异, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。

如图 9 所示, 相较于 IgG4 同种型对照, 候选人源化抗体 hu31, hu43, hu44, hu60 和 hu250 对 IL-17A 刺激小鼠体内释放 CXCL1 具有更强的拮抗作用。

实施例 15. 人源化抗体改善咪喹莫特诱导的小鼠银屑病模型的疗效研究

在小鼠耳背皮肤涂抹咪喹莫特可诱导银屑病样病理学特征, 即角质形成细胞过度增生、炎症细胞聚集和真皮乳头血管增生等, 构建银屑病小鼠模型。以临床评分、耳部肿胀度等为指标判断药物对银屑病小鼠的治疗作用。

15.1 实验方法

取 6-8 周 C57BL/6 雌性小鼠(南京大学模式动物研究所购买, 动物合格证号为 201605578) 48 只, 背部脱毛, 除假手术组外, 二天后致敏。致敏前两天随机分成 5 组(每组 8 只): I 组为假手术组; II 组为 PBS 组, III 组为 KLH 对照组(同型 IgG), 给予 KLH; IV 组为 hu31 组; V 组为 hu43 给药组; VI 组为 hu44 给药组, 各组给药剂量均为 50 mg/kg; 上述各组于分组第 0 天及第 3 天腹腔注射药物 1 次。致敏当天(day 1), II-VI 组小鼠于右耳及背部皮肤上涂抹约 62.5 mg 咪喹莫特乳膏(艾达乐, 5%, 3M Health Care Limited), 连续 4 天。

15.2 评价方法

致敏当天起每天用螺旋测微仪测量小鼠右耳厚度,以 day 1 右耳厚度为对照,计算小鼠耳肿胀厚度数值。同时给小鼠每天称重,观察皮肤鳞屑、硬结、红斑情况,进行评分,采用 4 级评分法:0 分,不发病;1 分,轻微;2 分,中度;3 分,严重;4 分,非常严重。结果以平均值 $\pm$ 标准误 (mean $\pm$ SEM) 表示,先使用单因素方差分析(ANOVA),有差异后两组之间的比较使用 Student's-t test 检验, $P<0.05$ 认为有显著差异。

如图 10-1 所示,给予本发明人源化抗体可明显抑制咪喹莫特诱导的小鼠银屑病模型皮肤鳞屑、硬结、红肿等情况,即评分值较小。

如图 10-2 所示,自致敏当天起于小鼠右耳涂抹咪喹莫特乳膏,其右耳会发生严重肿胀,耳厚度增加,而本发明人源化抗体均可明显改善耳肿胀程度。

在咪喹莫特诱导的小鼠银屑病模型中,本发明人源化抗体可明显抵抗小鼠的发病,表型为小鼠临床评分及耳部肿胀程度的降低。

实施例 16. 人源化抗体改善 II 型胶原蛋白诱导的雌性食蟹猴关节炎的疗效研究

II 型胶原蛋白诱导的关节炎是广泛用于类风湿关节炎(RA)研究的动物模型,具有与人 RA 相同的组织病理学特征,其特征就在于小关节的炎症和软骨及骨的进行性侵蚀。人/人源化的生物大分子包括抗体常常与食蟹猴体内抗原具有更优的交叉反应,所以食蟹猴关节炎模型是检测本发明中人源化抗体 IL-17A 抗风湿作用的一种有效体系。本实验即在食蟹猴类风湿关节炎模型上评价候选抗体药效。

16.1 实验方法

将 II 型牛胶原(CII, 四川大学)溶解在醋酸(货号 10000218; 国药; 上海; 中国)中放入 4°C 冰箱搅拌过夜,然后用等体积的完全弗氏佐剂(货号:F5881, Sigma-Aldrich, 美国)乳化胶原,乳剂胶原终浓度 2 mg/ml。第 0 天,舒泰(1.5-5 mg/kg, i.m)麻醉动物,于背部及尾根部进行多点的胶原乳剂免疫注射,根据需要,免疫时用 1.5%-5%的异氟烷维持麻醉。3 个星期后(第 21 天)重新注射一次胶原,方法同第一次。本实验分为 4 组, G1 为正常动物组,不进行关节炎的诱导; G2 为溶媒对照组; G3 为抗体 hu31 给药组; G4 为抗体 hu59 给药组。当某只动物的临床评分达到临床评分最大值的 5% ($192 \times 5\% \approx 10$) 时,按顺序分别分到各实验组,先达分值的先入组,如此循环直到所有符合条件的动物都依序分入各组中。入组后开始给药,每周一次,每次 7.5mg/kg,由输液泵(infusion pump) 30 分钟持续泵入,持续 5 周。

16.2 评价方法

体重测量:免疫前一天测量动物体重,以后每周测量一次体重直到实验结束。

关节炎评分：在第 0 天和第 21 天对猴子四肢关节炎发炎程度进行评分，并在 21 天后每周评分一次直至实验结束（如果出现提早发病，则相应提前每周一评的关节炎评分），评分标准见表 2。对每个爪掌的下述 15 个关节进行评分：5 个掌指关节（MCP），4 个近端指关节（PIP），5 个远端指关节（DIP），1 个腕关节或踝关节。同时还需要评估四肢膝盖/肘关节的发病程度。各个关节评分的总和即为这只动物的关节炎评分，最大分值为 192（16×3×4）。关节炎的评分标准：0 分，正常；1 分，轻微关节炎，发病轻微但可以明确分辨出；2 分，中度肿胀；3 分严重关节炎，严重肿胀或有明显的关节变形。

实验数据表示成均值±标准误（mean ± S.E.M）。统计分析溶媒对照、参照药和测试药组各项参数的组间差异， $p < 0.05$ 被认为具有统计学差异（One-way ANOVA/Dunnett）。

如图 11-1 所示，正常的食蟹猴（G1）体重稳定；关节炎诱导后的食蟹猴，溶媒处理组（G2）的食蟹猴平均体重持续下降，与之相比，受试抗体 hu31 和 hu59 均使这种下降趋势得到控制。故在本实验条件下，hu31 和 hu59 对关节炎引起的体重下降具有一定改善作用（** $P < 0.01$ ，**** $P < 0.0001$ ，和“G2:溶媒组”相比较；One-way ANOVA/Dunnett）。

如图 11-2 所示，动物入组后，正常对照动物关节炎临床评分保持为 0；模型-溶媒组（G2）动物关节炎评分呈渐进性增加，而受试抗体 hu31 和 hu59 显著抑制了动物的关节炎临床评分的增加趋势。故受试抗体 hu31 和 hu59 有抑制关节炎病情渐进性发展的作用，受试抗体 hu31 显著抑制了食蟹猴关节炎临床评分的增加趋势（*** $P < 0.001$ ，# $P < 0.05$ ，和 G2:溶媒组相比较；One-way ANOVA/Dunnett）。

实施例 17. 人源化抗体对 NIH3T3-IL17 细胞诱导的小鼠关节肿胀的作用

1. 动物：C57BL/6，雌性，6-8 周，北京维通利华实验动物技术有限公司。
2. 细胞：NIH3T3 细胞，表达人 IL-17 的 NIH3T3 细胞。
3. 分组及给药方案：

NIH3T3 组；

NIH3T3-IL-17 + 对照 IgG 抗体组（30 mg/kg）；

NIH3T3-IL-17 + 受试抗体高剂量给药组（抗体 hu31, 3 mg/kg）；

NIH3T3-IL-17 + 受试抗体中剂量给药组（抗体 hu31, 10 mg/kg）；

NIH3T3-IL-17 + 受试抗体低剂量给药组（抗体 hu31, 30 mg/kg）；

NIH3T3-IL-17 + 阳性药给药组（cosentyx, 10 mg/kg）。

4. 造模及给药：

将 NIH3T3-IL-17 细胞及 NIH3T3 对照细胞（ 2.5×10^5 个/只，每只注射体积为 25 μ L）

分别注射入各组小鼠的右踝关节的关节腔内。

选模前 1 天开始腹腔注射给予抗体 hu31(3、10、30 mg/kg) 和 cosentyx (10 mg/kg) 干预给药, 每 3 天 1 次, 考察抗体 hu31 注射液对于小鼠关节炎模型的影响。

5. 检测:

游标卡尺测量小鼠踝关节厚度, 计算肿胀度。

6. 实验结果:

如图 12 所示, 在小鼠踝关节腔内注射稳转 hIL-17 的 NIH3T3 细胞, 第二天可观察到小鼠踝关节处严重肿胀。

依据小鼠踝关节的厚度进行肿胀抑制率的计算, 计算公式为: 抑制率 (%) = (NIH3T3-IL17 组踝关节厚度-给药组踝关节厚度) / (NIH3-IL17 组踝关节厚度-NIH3T3 组踝关节厚度) × 100。结果显示, 给药后第 2 天, 观察到各剂量药物组别对小鼠踝关节肿胀的抑制作用, 直至试验结束, 在给药后第 6 天达到最大抑制效率。第 10 天时, 抗体 hu31 (3、10、30mg/kg) 各组抑制率分别为 49.4%、65.9%和 74.1 %。cosentyx (10 mg/kg) 肿胀抑制率为 67.1%。计算各组不同天数的平均抑制率, 结果显示, 3、10 和 30mg/kg 各组的平均抑制率分别为 45.2%、57.0%和 73.9%。cosentyx(10mg/kg)肿胀抑制率为 60.4%。实验结果提示: 抗体 hu31 能剂量依赖性的抑制 IL-17 诱导的小鼠关节踝肿胀, 其 10mg/kg 的效果与阳性对照药物 cosentyx(10mg/kg) 相当。30mg/kg 的效果优于阳性对照药物 cosentyx(10 mg/kg)。

实施例 18. 人源化抗体对 NIH3T3-IL17 细胞诱导的小鼠空气囊炎症的作用

1. 动物: C57BL/6, 雄性, 6-8 周, 由北京维通利华实验动物技术有限公司购买)。

2. 细胞: NIH3T3 细胞, 表达人 IL-17 的 NIH3T3 细胞。

3. 试剂: Gr1-FITC 抗体, Biolegend 公司

4. 分组及给药方案:

NIH3T3 细胞组

NIH3T3-IL-17 细胞组 + 对照 IgG 抗体组 (30 mg/kg);

NIH3T3-IL-17 细胞组 + 受试抗体高剂量给药组 (抗体 hu31, 30 mg/kg);

NIH3T3-IL-17 细胞组 + 受试抗体中剂量给药组 (抗体 hu31, 10 mg/kg);

NIH3T3-IL-17 细胞组 + 受试抗体低剂量给药组 (抗体 hu31, 3 mg/kg);

给药途径: 腹腔注射。

5. 造模:

空气囊：分别在第 0 和 3 天在小鼠背部注射 2.5 ml 空气。第 5 天开始将细胞注入空气囊内。每只小鼠注射的细胞数量为 2×10^5 个/500 微升 PBS。每组 8 只小鼠。

6. 检测：

白细胞向空气囊的迁移，计算灌洗液的细胞总数，流式测定 Gr1⁺细胞比例，计算中性粒细胞数量。

中性粒细胞数量=细胞总数×Gr1⁺细胞比例

7. 实验结果

如图 13 所示，在小鼠背部空气囊内注射稳转 hIL-17A 的 NIH-3T3 细胞，从浸润的细胞总数来看，相比于 NIH3T3 细胞组，NIH3T3-IL-17 细胞组空气囊中浸润的白细胞数显著增加，Gr1⁺细胞比例和数量也显著增加，选模成功。造模当天腹腔注射给予抗体 hu31（剂量分别为 3、10、30mg/kg）干预给药。依据浸润的总细胞数和 Gr1⁺细胞数进行抑制率的计算，计算公式为：抑制率（%）=（NIH3T3-IL17-IgG 组细胞数-给药组细胞数）/（NIH3T3-IL17-IgG 组细胞数—NIH3T3 细胞数）×100。结果显示，抗体 hu31（3、10、30mg/kg）各组浸润细胞总数抑制率分别为 50.0%、56.7%和 78.3%。计算 Gr1⁺细胞数的抑制率，结果显示：抗体 hu31（3、10、30mg/kg）各组平均 Gr1⁺细胞抑制率分别为 59.1%、54.5%和 81.8%，抗体 hu31 能剂量依赖性的抑制 IL-17 诱导的小鼠总细胞及炎症细胞浸润。

权 利 要 求 书

1. 一种抗体或其抗原结合片段，其特异性结合 IL-17A，其中所述抗体或其抗原结合片段包含至少一个选自 SEQ ID NO:1-24、60-65 的互补决定区（CDR）。
2. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段包含至少一个选自 SEQ ID NO:1-3、4-6、7-9、10-12 或 60-62 的重链 CDR 结构域和/或至少一个选自 SEQ ID NO:13-15、16-18、19-21、22-24 或 63-65 的轻链 CDR 结构域。
3. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区（VH），且所述重链可变区的 HCDR1 选自 SEQ ID NO:1、4、7、10 和 60 中的一个，HCDR2 选自 SEQ ID NO:2、5、8、11 和 61 中的一个，和 HCDR3 选自 SEQ ID NO:3、6、9、12 和 62 中的一个。
4. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区（VH），且所述重链可变区包含的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 氨基酸序列选自以下组 A 到组 E 中的任一组：

组号	HCDR1	HCDR2	HCDR3
A	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3
B	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
C	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9
D	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
E	SEQ ID NO:60	SEQ ID NO:61	SEQ ID NO:62

5. 如权利要求 1 或 3 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区（VL），且所述轻链可变区的 LCDR1 选自 SEQ ID NO:13、16、19、22 和 63 中的一个，LCDR2 选自 SEQ ID NO:14、17、20、23 和 64 中的一个，和 LCDR3 选自 SEQ ID NO:15、18、21、24 和 65 的一个。
6. 如权利要求 1 或 4 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区（VL），且所述轻链可变区包含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的氨基酸序列选自以下组 F 到组 J 中的任一组：

组号	LCDR1	LCDR2	LCDR3
F	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15
G	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18

H	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:21
I	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24
J	SEQ ID NO:63	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:65

7. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL), 所述可变区包含的 6 个 CDR 的氨基酸序列选自以下组 I 到组 VI 中的任一组:

组号	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
I	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15
II	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
III	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:21
IV	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24
V	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24
VI	SEQ ID NO:60	SEQ ID NO:61	SEQ ID NO:62	SEQ ID NO:63	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:65

8. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL), 所述重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:25、26、27、28、33、35、37 和 40 中的一个, 和/或所述轻链可变区(VL)的氨基酸序列选自序列编号 SEQ ID NO:29、30、31、32、34、36、38、39 和 41 中的一个。
9. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL), 所述可变区氨基酸序列选自以下组 1 到组 7 中的任一组:

组号	VH	VL
1	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:29 或 30
2	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:31
3	SEQ ID NO:27 或 28	SEQ ID NO:32
4	SEQ ID NO:33 或 35	SEQ ID NO:34
5	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:36

6	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38 或 39
7	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41

10. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段为鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体或全人抗体。
11. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体为完全抗体, 所述抗原结合片段选自单链抗体、Fab 抗体、Fab' 抗体、(Fab')₂ 抗体、和双(多) 特异性抗体。
12. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段为任何 IgG 亚型, 如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。
13. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含轻链(LC)和/或重链(HC), 且所述重链(HC)的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:42、44、46 或 49, 和/或所述轻链(LC)的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:43、45、47、48 或 50。
14. 如权利要求 13 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:43 所示, 和重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:42 或 44 所示; 或轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:45 所示, 和重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:44 所示; 或轻链的氨基酸序列 SEQ ID NO:47 或 48 所示, 和重链的氨基酸序列 SEQ ID NO:46 所示; 或轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:50 所示, 和重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:49 所示。
15. 编码如权利要求 1-14 任一项所述的抗体或其抗原结合片段的分离的核酸分子, 包含所述核酸分子的表达载体或重组载体, 以及转化所述载体的宿主细胞。
16. 一种药物组合物, 其包含如权利要求 1-14 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 15 所述核酸分子、载体或宿主细胞和药学上可接受的载体或赋形剂的组合物。
17. 如权利要求 1-14 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 15 所述核酸分子、载体或宿主细胞或权利要求 16 所述的药物组合物在制备用于治疗 and/或预防 IL-17A 介导的疾病或病症的药物中的用途。
18. 如权利要求 17 所述的用途, 其中, 所述药物是用于治疗关节炎、类风湿性关节炎、银屑病、强制性脊柱炎、慢性阻塞性肺疾病、系统性红斑狼疮 (SLE)、狼疮性肾炎、哮喘、多发性硬化或囊性纤维化的药物。