抗 TNFα 的人源化抗体及其抗原结合片段 Fab 和用途

技术领域

本发明涉及一种抗人肿瘤坏死因子α的人源化抗体及其抗原结合片段Fab和用途。

背景技术

自身免疫性疫病的发生发展是一个由许多有活性的细胞因子调控失衡的复杂过程。在众多因子中，TNFα 被证实在免疫调节中发挥重要作用，但其过量表达被证实是导致自身免疫性等疾病主要因素之一。因此，抑制 TNFα 活性的生物药成为治疗该类疾病中最为成功的疗法之一，已被批准治疗的适应症，主要包括类风湿性关节炎（Rheumatoid Arthritis）、克隆病（Crohn's Disease）、斑片性银屑病（Plaque Psoriasis）、银屑病关节炎（Psoriatic Arthritis）、强直性脊柱炎（Ankylosing Spondylitis）、溃疡性结肠炎（Ulcerative Colitis）和幼年特发性关节炎（Juvenile Idiopathic Arthritis），同时还有许多其他相关疾病正在开展临床试验。

欧美市场上已经有针对 TNFα 的抗体药物和类似抗体的 Fc 融合蛋白药物，如 Remicade。Remicade 在体内的半衰期较短，大约为 9 天。此外，Remicade 虽有良好的结合亲和性、生物活性和临床疗效，但作为一个包含 1/3 鼠源序列和 2/3 人源序列的嵌合性抗体，约有 10% - 47%的患者在使用 Remicade 后发生了免疫反应，通常产生人抗小鼠抗体（HAMA），影响该抗体的疗效和长期应用。因此，十分需要寻求一种人源化程度高的抗 TNFα 抗体，最大程度减少其中鼠源序列比例，以降低鼠源性并能安全用于治疗人体疾病。 一种常见的抗体人源化方法是将鼠源抗体可变区（VH、VK）的互补决定区（CDR）部分移植到事先选择的人抗体框架之中，所得抗体将具有大部分人源的序列，同时又能够保留起始鼠源抗体对相同抗原的选择性，但这个过程通常导致抗体亲和力的损失。

发明公开

本发明的一个目的是提供抗人肿瘤坏死因子 α 人源化抗体或抗原结合片段 Fab，该抗体或 Fab 与人肿瘤坏死因子 α 的亲和力与人鼠嵌合抗体 Remicade 相似，甚至更高。

本发明所提供的抗人肿瘤坏死因子 α 的人源化抗体或 Fab，含有重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区的氨基酸序列为序列表中序列 1 或序列 3，所述轻链可变区的氨基酸序列为序列表中序列 15、序列 9、序列 11、序列 7、序列 13 和序列 5 中的任一种；其中序列 1 的第一位氨基酸残基为 Glu 或 Gln。

所述抗体具体为下述 a-l 中任一种：

a. KS10，其重链可变区为 SH01，氨基酸序列为序列 1，轻链可变区为 SH08，氨基酸序列为序列 15；

b. KS03，其重链可变区为 SH01，氨基酸序列为序列 1，轻链可变区为

SH05，氨基酸序列为序列 9；

c. KS06，其重链可变区为 SH01，氨基酸序列为序列 1，轻链可变区为 SH06，氨基酸序列为序列 11；

d. KS12，其重链可变区为 SH02，氨基酸序列为序列 3，轻链可变区为 SH08，氨基酸序列为为序列 15；

e. KS04，其重链可变区为 SH02，氨基酸序列为序列 3，轻链可变区为 SH05，氨基酸序列为序列 9；

f. KS07，其重链可变区为 SH02，氨基酸序列为序列 3，轻链可变区为 SH06，氨基酸序列为序列 11；

g. KS02，其重链可变区为 SH02，氨基酸序列为序列 3，轻链可变区为 SH03，氨基酸序列为序列 5；

h. KS08，其重链可变区为 SH02，氨基酸序列为序列 3，轻链可变区为 SH04，氨基酸序列为序列 7；

i. KS11，其重链可变区为 SH02，氨基酸序列为序列 3，轻链可变区为 SH07，氨基酸序列为序列 13；

j. KS01，其重链可变区为 SH01，氨基酸序列为序列 1，轻链可变区为 SH03，氨基酸序列为序列 5；

k. KS05，其重链可变区为 SH01，氨基酸序列为序列 1，轻链可变区为 SH04，氨基酸序列为序列 7；

l. KS09，其重链可变区为 SH01，氨基酸序列为序列 1，轻链可变区为 SH07，氨基酸序列为序列 13；

所述序列 1 的第一位氨基酸残基为 Glu 或 Gln。

本发明的再一个目的是提供另外的抗人肿瘤坏死因子 α 人源化抗原结合片段 Fab。所述 Fab 含有重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区的氨基酸序列为序列表中序列 27 的第 1-120 位或序列 25 的第 1-120 位，所述轻链可变区的氨基酸序列为序列表中序列 31 的的第 1-109 位或序列 29 的第 1-109 位。

本发明所提供的抗体由重链和轻链组成，所述重链的恒定区氨基酸序列与人抗体重链恒定区氨基酸序列相同，所述轻链的恒定区氨基酸序列与人抗体轻链恒定区氨基酸序列相同。

所述抗体的重链恒定区可以是任意类型（IgG、IgA、IgM、IgE、IgD）或亚类（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，IgM1、IgM2，IgA1、IgA2，）的人源恒定区；所述抗体的轻链恒定区可为任意类型（κ 型或 λ 型）、亚型（λ1、λ2、λ3、λ4）、或同种异性（κm（1）、κm（2）、κm（3））轻链的人源恒定区。

所述抗体的重链恒定区氨基酸序列具体如序列表中序列 17 所示；所述抗体的轻链恒定区氨基酸序列具体如序列表中序列 19 所示。

所述重链的氨基酸序列为序列表中序列 21；所述轻链的氨基酸序列为序列表中序列 23。其中序列 21 的第 1-120 位氨基酸残基为所述重链的可变区，第

121-450 位氨基酸残基为所述重链的恒定区；序列 23 的第 1-109 位氨基酸残基为所述轻链的可变区，第 110-214 位氨基酸残基为所述轻链的恒定区。序列 21 的第一位氨基酸为 Glu 或 Gln。

本发明所提供的 Fab 由重链 Fd 片段和轻链组成；所述重链 Fd 片段由 V_H 和 CH1 组成，所述轻链由 V_K 和轻链恒定区组成；所述 CH1 氨基酸序列与人抗体重链恒定区的 CH1 氨基酸序列相同，所述轻链恒定区氨基酸序列与人抗体轻链恒定区氨基酸序列相同。

所述 Fab 的 Fd 片段的 CH1可以是任意类型（IgG、IgA、IgM、IgE、IgD）或亚类（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，IgM1、IgM2，IgA1、IgA2，）的人源恒定区的 CH1；所述 Fab 的轻链恒定区可为任意类型（κ 型或 λ 型）、亚型（λ1、λ2、λ3、λ4）、或同种异性（κm（1）、κm（2）、κm（3））轻链的人源恒定区。

所述 CH1 氨基酸序列如序列表中序列 33 所示；所述轻链恒定区氨基酸序列如序列表中序列 19 所示。

在本发明的具体实施例中，所述 Fab 为下述 b1）-b3）中任一种：

b1）KS-7F：所述重链片段的氨基酸序列为序列表中序列 27，且所述轻链的氨基酸序列为序列表中序列 31；

b2）KS-7A：所述重链片段的氨基酸序列为序列表中序列 25，且所述轻链的氨基酸序列为序列表中序列 31；

b3）KS-2E：所述重链片段的氨基酸序列为序列表中序列 25，且所述轻链的氨基酸序列为序列表中序列 29。

本发明的再一个目的是提供抗原结合片段 A 或抗原结合片段 B，其特征在于：所述抗原结合片段 A 为由所述抗体衍生的 Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv（抗体可变区片段）、重链可变区、轻链可变区、选自重链可变区的多肽片段或选自轻链可变区的多肽片段；所述抗原结合片段 B 为由所述 Fab 衍生的 Fab'、$F(ab')_2$、Fv、重链可变区、轻链可变区、选自重链可变区的多肽片段或选自轻链可变区的多肽片段。

上述 $F(ab')_2$ 由一对轻链和一对略大于 Fd 的重链（称为 Fd'）组成，胃蛋白酶水解 IgG 分子产生此片段，它包含两个 Fab，可结合 2 个抗原表位。 Fd'约含有 235 个氨基酸残基，包括 V_H、CH1 和绞链区。Fv 由轻链可变区（V_L）和重链可变区（V_H）组成，二者以非共价键结合在一起，分子量约为完整抗体分子的 1 / 6，具有单一抗原结合位点。Fv 包括 ScFv（单链抗体）、DsFv（二硫键稳定抗体）等。ScFv 是将 V_H 和 V_L 用一段适当的寡聚核苷酸（接头，linker）连起来，使之表达为单一的肽链。DsFv 是在轻链可变区和重链可变区适当部位各引入一个半胱氨酸，形成一个二硫键固定的 Fv 段，经证实其结合能力及稳定性均优于 ScFv。

编码如下 A）-C）中任一种蛋白的基因也属于本发明的保护范围：

A）所述抗体； B）所述 Fab；C）所述抗原结合片段 A 或所述抗原结合片段 B。

所述抗体和所述抗原结合片段 A 的重链可变区的编码序列均如序列表中序列 2 或序列 4 所示；所述抗体和所述抗原结合片段 A 的轻链可变区编码序列均如序列表中序列 16、序列 10、序列 12、序列 8、序列 14 和序列 6 中的任一种所示；所述 Fab 和所述抗原结合片段 B 的重链可变区的编码序列均为序列表中序列 2、序列 4、序列 28 的第 1-360 位和序列 26 的第 1-360 位中的任一种；所述 Fab 和所述抗原结合片段 B 的轻链可变区的编码序列均为序列表中序列 16、序列 10、、序列 12、序列 8、序列 14、序列 6、序列 32 的第 1-327 位和序列 30 的第 1-327 位中的任一种。

其中，序列 2 和序列 4 均共有 360 个核苷酸；序列 6、序列 8、序列 14、序列 10、序列 12 和序列 16 均共有 327 个核苷酸。

所述抗体的重链恒定区的编码序列如序列表中序列 18 所示；所述抗体的轻链恒定区的编码序列如序列表中序列 20 所示。

所述 Fab 的 CH1 的编码序列如序列表中序列 34 所示；所述 Fab 的轻链恒定区编码序列如序列表中序列 20 所示。

在本发明的实施例中，所述抗体的重链编码序列具体为序列表中序列 22；所述抗体的轻链编码序列具体为序列表中序列 24；

所述 Fab 的编码序列为下述 c1）-c3）中任一种：

c1）KS-7F：所述 Fab 的重链片段的编码序列为序列表中序列 28，且所述 Fab 的轻链编码序列为序列表中序列 32；

c2）KS-7A：所述 Fab 的重链片段的编码序列为序列表中序列 26，且所述 Fab 的轻链编码序列为序列表中序列 32；

c3）KS-2E：所述 Fab 的重链片段的编码序列为序列表中序列 26，且所述 Fab 的轻链编码序列为序列表中序列 30。

其中序列 22 的第 1-360 位核苷酸为所述重链的可变区核苷酸，第 360-1350 位核苷酸为所述重链的恒定区核苷酸；其中序列 24 的第 1-327 位核苷酸为所述轻链的可变区核苷酸，第 328-642 位核苷酸为所述轻链的恒定区核苷酸。

本发明的又一个目的是提供下述遗传材料：含有所述基因的重组载体、重组菌、重组细胞系、重组病毒或表达盒。

所述重组载体为表达所述抗体或 Fab 或抗原结合片段的原核表达载体或真核表达载体。所述重组菌为携带有所述基因的大肠杆菌。所述重组细胞系可为转基因细胞系或融合细胞系，其中转基因细胞系可为转入本发明的抗人肿瘤坏死因子 α 人源化抗体或 Fab 或抗原结合片段编码基因的哺乳动物细胞系，优选 CHO 细胞系，或 293 细胞及其亚系；融合细胞系可为分泌本发明的抗人肿瘤坏死因子 α 人源化抗体的杂交瘤细胞。所述重组病毒为携带有所述基因的重组腺病毒或重组腺相关病毒等。所述表达盒是一个 DNA 分子，从上游至下游依次为

如下三个片段：启动子、由所述启动子启动转录的所述抗体或 Fab，或所述抗原结合片段的编码基因和终止子。

将含所述抗体，或所述 Fab，或所述抗原结合片段编码基因的重组载体转染或转化宿主细胞，即可表达相应的蛋白，获得所述抗体或 Fab，或所述抗原结合片段。所述宿主细胞可以是真核细胞，也可以是原核细胞，它们包含但不限于哺乳动物细胞、细菌、酵母、昆虫细胞等。可用于蛋白质大规模表达的哺乳动物细胞有多种，如 293 细胞、CHO 细胞、SP20 细胞、NS0 细胞、COS 细胞、BHK 细胞或 PerC6 细胞等。转染细胞的方法有多种，其中包括但不限于：电穿孔，脂质体介导法，钙介导法等。

一种较佳的所述抗体或 Fab，或所述抗原结合片段的表达方式是在已经稳定转染的宿主细胞中对重组载体进行基因扩增，以提高相应重组蛋白的表达量，例如用含有二氢叶酸还原酶（DHFR）的重组载体稳定转染缺乏 DHFR 的宿主细胞后，可在细胞培养液中添加氨甲喋啶(MTX)的浓度以扩增重组载体在宿主细胞中的拷贝数量。

含有所述编码基因序列组合的 Fab 或 IgG 表达后，可用酶联免疫吸附法（ELISA）或其他方法测定培养液中的蛋白浓度。对于 Fab 片段，可用 Protein G 亲和层析法提纯；IgG 蛋白可用 Protein A 亲和层析法提纯。

所述抗体，或所述 Fab，或所述抗原结合片段，或所述基因，或所述遗传材料的用途也属于本发明的保护范围：

d1）在制备预防和/或治疗人抗肿瘤坏死因子 α 相关疾病药物中的用途，或

d2）在制备中和人抗肿瘤坏死因子 α 产品中的用途，或

d3）在制备定性或定量检测人抗肿瘤坏死因子 α 的试剂盒中的用途。

所述人肿瘤坏死因子 α 相关疾病为由人肿瘤坏死因子 α 升高引起的疾病；优选为类风湿性关节炎、自身免疫性葡萄膜炎、克隆病、斑片性银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎或幼年特发性关节炎。

本发明的又一个目的是提供药物组合物，该药物组合物含有辅料和活性成分，所述活性成分含有下述物质中的至少一种：所述抗体，所述 Fab，所述抗原结合片段，所述基因，和所述遗传材料；所述辅料为药学上可接受的载体或赋形剂。该药物组合物的活性成分也可只为上述任一 Fab 或抗体，或上述任一所述抗原结合片段，或上述任一所述基因，或上述遗传材料中的任一种。

下述物质中的任一种在治疗人肿瘤坏死因子 α 相关疾病中的应用也属于本发明的保护范围：所述抗体，所述 Fab，所述抗原结合片段，所述基因，所述遗传材料，和所述药物组合物。

所述与人肿瘤坏死因子 α 相关疾病为由人肿瘤坏死因子 α 升高引起的疾病，优选为自身免疫性葡萄膜炎、类风湿性关节炎、克隆病、斑片性银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎或幼年特发性关节炎。

附图说明

图1为Elisa检测人源化Fab抑制 TNFα的生物活性。

图2为L929细胞毒性实验检测人源化Fab中和TNFα的生物活性。

图3为KS10与不同种属抗原TNFα的结合情况。

图4为KS10对实验性类风湿性关节炎大鼠的治疗评分结果。由左至右依次为正常组、阴性组、模型组、KS10 5mg/kg组、KS10 10mg/kg组、KS10 20mg/kg组。

图5为KS10对实验性类风湿性关节炎大鼠关节滑液/组织IL-1β水平的影响。由左至右依次为正常组、阴性组、模型组、KS10 5mg/kg组、KS10 10mg/kg组、KS10 20mg/kg组。

图6为 KS10对实验性类风湿性关节炎大鼠关节滑液/组织IL-6水平的影响。由左至右依次为正常组、阴性组、模型组、KS10 5mg/kg组、KS10 10mg/kg组、KS10 20mg/kg组。

实施发明的最佳方式

以下的实施例便于更好地理解本发明，但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料，如无特殊说明，均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验，均设置三次重复实验，结果取平均值。

本发明描述的人源化 TNFα 抗体重轻链的 CDR 移植，PCR 引入位点突变及突变文库的筛选是通过常规基因重组技术及基于抗原抗体相互作用的免疫学技术所完成，具体实验方法步骤如<<分子克隆>>第三版(Joseph Sambrook，科学出版社)及类似实验手册所记载。实施例中涉及到的 EC50 是将测得的 OD 值（OD450）输入 graphpad prism 5 软件获得的，同时获得相关结果图。

实施例 1、人源化 TNFα 抗体 Fab 的表达及活性检测

本实施例涉及三种人源化 TNFα 抗体 Fab（Fab 由抗体的重链 Fd 片段和抗体的轻链组成），分别是 KS-2E、KS-7A、KS-7F。

一、KS-2E、KS-7A、KS-7F 表达载体的构建

（一）轻链、重链的获得

以人 TNF-α（R&D 公司，货号：210-TA-050）免疫鼠获得的杂交瘤细胞，经过单克隆筛选后，提取总 RNA 为模板，利用通用引物 P1：5-GCGAATTCAGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG-3，P2：5-TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAG-3 引导进行 PCR 扩增重链可变区序列，通用引物 P3：5-GACATTCTGMTSACMCAGMCTCC-3，P4：5-GTTAGATCTCGAGCTTGGTCCC-3 引导进行 PCR 扩增轻链可变区序列，切胶回收目的条带，将扩增获得的抗体轻链和重链的产物分别插入到 pMD18-T 载体（TaKaRa 公司 货号：D101C）中，分别挑取单菌落，经过测序鉴定获得抗体重链和轻链可变区序列。

（二）人源化 Fab 的构建

将轻链可变区与人源化抗体的轻链可变区进行氨基酸序列相似性比对，将重链可变区与人源化抗体的重链可变区进行氨基酸序列相似性比对，通过IgBLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/)和 IMGT（免疫基因数据库 IMGT：http://www.imgt.org）中分别进行序列相似性搜索，在搜索的结果中，选择与轻、重链均有较高序列相似性的抗体作为人源化抗体模板，将获得的重链可变区 VH 移植到序列相似度较高的人抗体 IGHV3-15*07（Accession number: M99406）的框架之中，对获得轻链可变区 VK 移植到相似度较高的人抗体 IGKV6-21*01（Accession number: X63399）的框架之中。

在经过对重链片段（Fd）和轻链人源序列经过多轮的突变后，将不同的轻链和重链片段（Fd）组合插入到 pTLR 载体（经过改造的 pET22b(+)载体）中。具体操作为，制备两端分别含有酶切位点 *BamH*I 和 *EcoR*I 的各轻链 DNA，以及两端分别含有酶切位点 *Not*I 和 *Xho*I 的各重链片段（Fd）DNA，将这两个 DNA 分别克隆入 pTLR 载体（经过改造的 pET22b(+)载体）中的相应限制性内切酶位点之间，即各轻链 DNA 分别插入到限制性内切酶 *BamH*I 和 *EcoR*I 位点之间，各重链片段（Fd）DNA 分别插入到限制性内切酶 *Not*I 和 *Xho*I 位点之间，构建数个 Fab 表达载体（包括分别表达 KS-2E、KS-7A 和 KS-7F 的三个 Fab 表达载体）。

其中，上述不同的轻链和重链片段（Fd）组合中包括 KS-2E、KS-7F、KS-7A 这三个 Fab。KS-2E 的重链片段氨基酸序列为序列表中序列 25，核苷酸序列为序列 26，轻链氨基酸序列为序列表中序列 29，核苷酸序列为序列 30；KS-7A 的重链片段氨基酸序列为序列表中序列 25，核苷酸序列为序列 26，轻链氨基酸序列为序列表中序列 31，核苷酸序列为 32；KS-7F 的重链片段氨基酸序列为序列表中序列 27，核苷酸序列为序列 28，轻链氨基酸序列为序列表中序列 31，核苷酸序列为序列 32。

对 pET22b(+)载体进行改造获得上述 pTLR 载体的具体方法如下：首先通过人工合成一段含有 T7 启动子（T7 promoter）、乳糖操纵子（lac operator）、核糖体结合位点（RBS）序列以及两端包含有 *Sal*I 和 *Not*I 酶切位点的 DNA 片段（简称，T-L-R DNA 序列，如序列表中序列 35 所示），pET22b(+)载体（美国 Novage 公司产品）和 T-L-R DNA 序列分别用 *Sal* I 和 *Not* I 双酶切后，T_4 连接酶连接后转化，常规方法挑单克隆测序筛选出正确改造的载体。

二、KS-2E、KS-7A、KS-7F 的原核表达

将上述构建的 Fab 表达载体（包括分别表达 KS-2E、KS-7A 和 KS-7F 的三个 Fab 表达载体）分别转化大肠杆菌 Top10，涂氯霉素抗性 2-YT 平板（蛋白胨 1.6%，酵母提取物 1%，NaCl 0.5%，琼脂粉 1.5%）。第二天选择合适菌落密度的板挑取单克隆菌落，每个阳性克隆挑 8 个单克隆到 96 孔深孔板里 IPTG 诱导表达，每个单克隆菌落加入到 6ml 含氯霉素的 2-YT 液体培养基（蛋白胨 1.6%，酵母提取物 1%，NaCl 0.5%）中，于 37℃ 250rpm 摇 12 小时，每管中取 0.2μl

菌液在氯霉素抗性的 2-YT 平板上保菌。将 5ml 菌液接种到 500ml 氯霉素抗性 2-YT 液体培养基，33℃，300rmp 培养至 OD_{600} 为 0.6。在培养基中加入 IPTG 至终浓度为 50μM，诱导不同 Fab 蛋白表达，诱导时间为 3h。将诱导表达结束后的培养液在 5100 rpm，10℃条件下，离心 15min，弃上清，沉淀用 40ml 预冷的 TES 溶液充分重悬菌体沉淀；重悬后再加入 66ml 预冷的 1/5 TES 溶液到重悬后的菌液中，冰上孵育 40min；冰浴结束后，13000rpm，4℃，离心 10 min；离心后收集上清，上清即为含有 Fab 蛋白（KS-2E、KS-7A 或 KS-7F 蛋白）的细胞周质提取液。周质提取液过 G-25 (GE 公司，17-0034-01) 柱脱盐处理后，准备 Protein G（GE 公司 17-0618-04）预装柱，平衡液（20mM 磷酸缓冲液 pH 6.5）平衡后蛋白上样，上样结束后继续用平衡液清洗柱子，然后用洗脱液（0.1M Gly-HCl，pH2.5）直接洗脱，收集洗脱样品，并预先在收集样品前按照 Tris 缓冲液与样品体积比 1：9 加入 1.0M Tris-HCl（pH9.0）于样品收集管里，快速调 pH7.0，收集到的液体即为目的蛋白，蛋白经过 SDS-PAGE 分析纯度后，对蛋白样品进行浓度测定，最后分装后保存于-80℃，得到纯度较高的 Fab 蛋白（包括 KS-2E、KS-7A 和 KS-7F 这三个蛋白）。

三、KS-2E、KS-7A、KS-7F 的活性检测

1、ELISA 法检测人源化 Fab 与 TNFα 的结合能力

以每孔 100 ng 的人源 TNFα（R&D 公司，商品目录号为 210-TA-050）为底物包被酶标板，然后分别加入一系列 2 倍稀释的 40 nM 抗体 Fab（步骤二制备的 Fab 蛋白, 包括 KS-2E、KS-7A 和 KS-7F 这三个蛋白）温育后，再加辣根过氧化酶标记的羊抗人 C-Kappa 二抗（Sigma 公司，产品目录号为 K3502），最后加 TMB 显色，加入 2M 硫酸终止反应，从而检测结合 TNFα 的 Fab 蛋白，经过这样的筛选方法获得了 3 个活性较高的 Fab：KS-2E、KS-7F、KS-7A，共包含了 2 个不同的 VH（VH01 和 VH02，VH01 的氨基酸序列如序列 25；核苷酸序列如序列 26；VH02 的氨基酸序列如序列 27；核苷酸序列如序列 28）和 2 个不同的 VK(VK03 和 VK05，VK03 的氨基酸序列如序列 29；核苷酸序列如序列 30；VK05 的氨基酸序列如序列 31；核苷酸序列如序列 32)（表 1）。

ELISA 法检测人源化 Fab 与 TNFα 的结合能力的实验结果在图 1 中显示。结果表明上述获得的 3 个人源化 Fab 和人鼠嵌合抗体 Remicade 的 Fab 片段具有相似的抗原亲和力，其中 KS-7A 和 KS-7F 结合 TNFα 的 EC_{50} 优于人鼠嵌合抗体 Remicade Fab（表 2）。

表 1 人源化 TNF-α 抗体的 Fab

Fab 片段	VH	VK
KS-2E	VH01	VK03
N/A	VH02	VK03
KS-7F	VH01	VK05

KS-7A	VH02	VK05

注：N/A 表示 Fab 片段活性较差，未命名。

表 2 人源化 TNFα 抗体的 Fab 在 Elisa 实验中结合 TNFα 的 EC_{50}

样品	EC_{50}（nM）
Remicade Fab	3.324
KS-2E	6.659
KS-7A	3.027
KS-7F	2.740

注：表 2 中的数据为三次重复实验的平均值。

2、L929 细胞毒性实验检测人源化 Fab 抑制 TNFα 的生物活性

进一步通过细胞生物学实验，即 L929 细胞毒性实验验证了上述三种人源化 Fab（KS-2E、KS-7F 和 KS-7A）中和 TNFα 的生物活性。实验中，取 1×10^4 个对数生长期 L929 细胞在 DMEM（10%FBS，Gibco）培养液中接种于 96 孔板，24 小时后加入 0.5ng/ml 人源 TNFα（R&D 公司，商品目录号为 210-TA-050）和 0.5μg/ml 放线菌素 D（Fluka），同时分四组分别加入上述三种人源化 Fab 以及对照抗体 Remicade 的 Fab 片段，继续培养 24 小时，然后利用 CCK8 试剂盒（同仁化学研究所）检测细胞存活情况。结果如图 2 所示，上述三种人源化 Fab 可有效地中和 TNFα 的生物活性，其中 KS-7A 中和 TNFα 的生物活性优于人鼠嵌合抗体 Remicade 的 Fab 片段。图 2 中数据为 3 次重复实验的平均值±标准差。

实施例 2、人源化 TNFα 抗体 Fab CDR3 亲和力成熟文库的构建

为了进一步提高上述人源化 TNF-α 抗体 Fab 片段对抗原的亲和力，分别在人源化 TNF-α 抗体 Fab 表达载体中对重链 VH02 CDR3 和轻链 VK05 CDR3 构建了亲和力成熟文库。抗体与抗原结合最重要的区域是重、轻链的 CDR3 区域，对 CDR3 进行饱和点突变筛选可能得到亲和力更高的抗体。为了构建重链、轻链 CDR3 的饱和点突变文库，设计一系列点突变引物，PCR 反应后，然后把这些 PCR 产物按照引物系列的简并度相同的比例混合起来再克隆到人源化 TNF-α 抗体的 Fab 表达质粒中。轻链 CDR3 的点突变文库的构建以系列引物 5 和轻链下游引物 6(5’-CGGAATTCCGTACGTTTCACTTCCAGATTGG-3’)以轻链 DNA 为模版进行 PCR 得到 DNA 产物，然后将 DNA 产物克隆到 Fab 表达质粒，经过电转铺板，即可得到轻链 CDR3 的点突变文库。其中引物 5 系列包含了 CDR3 的突变位点，共有 19 条引物列于表 3；重链 CDR3 的点突变文库的构建以系列突变引物 7 和重链下游引物 8(5’-CCGCTCGAGGCGCTCACGGTCAGGGTGGTGCCCTG-3’)以重链 DNA 为模版进行 PCR 得到 DNA 产物，然后将 DNA 产物克隆到 Fab 表达质粒，经过电转铺板，既可得到轻链 CDR3 的点突变文库。其中引物 7 系列包含了 CDR3 的

突变位点，共有 22 条引物列于表 4，最终建立的轻链和重链突变文库，ELISA 结果挑选与抗原 TNF-α（R&D 公司）结合力高的 TNF-α 抗体 Fab，重链突变筛选获得两个活性更高重链可变区，分别命名为 SH01 和 SH02；轻链突变筛选获得 4 个活性更好的轻链可变区，分别命名为 SH03、SH04、SH05 、SH06、SH07 和 SH08。

表 3 轻链 CDR3 的点突变引物 5 系列

名称	序列
引物 5-1Q1	GCAACCTACTACTGC**NBK**CAGAGCCATAGCTGG
引物 5-1Q2	GCAACCTACTACTGC**DAK**CAGAGCCATAGCTGG
引物 5-1Q3	GCAACCTACTACTGC**CAT**CAGAGCCATAGCTGG
引物 5-2Q1	GCAACCTACTACTGCCAG**NBK**AGCCATAGCTGGCCG
引物 5-2Q2	GCAACCTACTACTGCCAG**DAK**AGCCATAGCTGGCCG
引物 5-2Q3	GCAACCTACTACTGCCAG**CAT**AGCCATAGCTGGCCG
引物 5-3S1	GCAACCTACTACTGCCAGCAG**BDK**CATAGCTGGCCGTTC
引物 5-3S2	GCAACCTACTACTGCCAGCAG**VCT**CATAGCTGGCCGTTC
引物 5-3S3	GCAACCTACTACTGCCAGCAG**AWK**CATAGCTGGCCGTT C
引物 5-4H1	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGC**NBK**AGCTGGCCGTTC ACC
引物 5-4H2	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGC**DAK**AGCTGGCCGTTC ACC
引物 5-4H3	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGC**CAG**AGCTGGCCGTTC ACC
引物 5-5S1	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCCAT**BDK**TGGCCGTTC ACCTTC
引物 5-5S2	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCCAT**VCT**TGGCCGTTC ACCTTC
引物 5-5S3	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCCAT**AWK**TGGCCGTT CACCTTC
引物 5-6W1	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCCATAGC**HNK**CCGTTC ACCTTCGGC
引物 5-6W2	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCCATAGC**NGT**CCGTTC ACCTTCGGC
引物 5-6P1	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCCATAGCTGG**NDK**TTC ACCTTCGGCAGC
引物 5-6P2	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCCATAGCTGG**DCT**TTC ACCTTCGGCAGC

表 4 重链 CDR3 的点突变引物 7 系列

名称	序列
引物 7-1N1	GTATTACTGCAGCCGT**NBK**TACTACGGCAGCACC
引物 7-1N2	GTATTACTGCAGCCGT**BAK**TACTACGGCAGCACC
引物 7-1N3	GTATTACTGCAGCCGT**AAA**TACTACGGCAGCACC
引物 7-2Y1	GTATTACTGCAGCCGTAAT**NBK**TACGGCAGCACCTACG
引物 7-2Y2	GTATTACTGCAGCCGTAAT**VAK**TACGGCAGCACCTACG
引物 7-3Y1	GTATTACTGCAGCCGTAATTAC**NBK**GGCAGCACCTACGATTAC
引物 7-3Y2	GTATTACTGCAGCCGTAATTAC**VAK**GGCAGCACCTACGATTAC
引物 7-4G1	GTATTACTGCAGCCGTAATTACTAC**NHK**AGCACCTACGATTACTG
引物 7-4G2	GTATTACTGCAGCCGTAATTACTAC**HGK**AGCACCTACGATTACTG
引物 7-5S1	GTATTACTGCAGCCGTAATTACTACGGC**BDK**ACCTACGATTACTGGGC
引物 7-5S2	GTATTACTGCAGCCGTAATTACTACGGC**VCT**ACCTACGATTACTGGGC
引物 7-5S3	GTATTACTGCAGCCGTAATTACTACGGC**AWK**ACCTACGATTACTGGGC
引物 7-6T1	GTATTACTGCAGCCGTAATTACTACGGCAGC**NDK**TACGATTACTGGGCCC
引物 7-6T2	GTATTACTGCAGCCGTAATTACTACGGCAGC**BCT**TACGATTACTGGGCCC
引物 7-7Y1	GTATTACTGCAGCCGTAATTACTACGGCAGCACC**NBK**GATTACTGGGGCCAGG
引物 7-7Y2	GTATTACTGCAGCCGTAATTACTACGGCAGCACC**VAK**GATTACTGGGGCCAGG
引物 7-8D1	GTATTACTGCAGCCGTAATTACTACGGCAGCACCTAC**NBK**TACTGGGGCCAGGGC
引物 7-8D2	GTATTACTGCAGCCGTAATTACTACGGCAGCACCTAC**HAK**TACTGGGGCCAGGGC
引物 7-8D3	GTATTACTGCAGCCGTAATTACTACGGCAGCACCTAC**GA**ATACTGGGGCCAGGGC
引物 7-9Y1	GTATTACTGCAGCCGTAATTACTACGGCAGCACCTACGA

引物 7-9Y2	TNBKTGGGGCCAGGGCACC GTATTACTGCAGCCGTAATTACTACGGCAGCACCTACGA TVAKTGGGGCCAGGGCACC

实施例 3、高亲和力的人源化 TNFα 抗体 Fab 的表达及活性检测

本实施例涉及两个人源化 TNFα 抗体 Fab，名称分别是 FA01、FA02。其中，FA01 的轻链可变区的氨基酸序列为序列表中序列 15（核苷酸序列如序列表中的序列 16 所示），轻链恒定区的氨基酸序列为序列表中序列 19（核苷酸序列如序列表中的序列 20 所示），重链 Fd 片段的重链可变区氨基酸序列为序列表中序列 1（核苷酸序列如序列表中的序列 2 所示），重链恒定区 CH1 氨基酸序列为序列表中序列 33（核苷酸序列如序列表中的序列 34 所示）；FA02 的轻链可变区的氨基酸序列为序列表中序列 9（核苷酸序列如序列表中的序列 10 所示），轻链恒定区的氨基酸序列为序列表中序列 19（核苷酸序列如序列表中的序列 20 所示），重链 Fd 片段的重链可变区氨基酸序列为序列表中序列 1（核苷酸序列如序列表中的序列 2 所示），重链恒定区 CH1 氨基酸序列为序列表中序列 33（核苷酸序列如序列表中的序列 34 所示）。

一、高亲和力的人源化 TNFα 抗体 Fab 的构建和表达

这两个人源化 TNFα 抗体 Fab 的构建方法同实施例 1 所述，将上述两个人源化 TNFα 抗体 Fab 的重链编码 DNA 和轻链编码 DNA 插入 pTLR 载体的相应位点，分别得到 FA01 的表达载体 pFA01 Fab，以及 FA02 的表达载体 pFA02 Fab。再通过实施例 1 所述方法，得到纯度较高的 FA01 和 FA02 蛋白。

二、高亲和力的人源化 TNFα 抗体 Fab 的生物活性检测

通过 L929 细胞毒性实验对上述两个人源化 TNFα 抗体 Fab（FA01 和 FA02）进行生物活性检测，具体方法同实施例 1，将得到的 OD450 值输入 graphpad prism 5 软件获得 EC50。结果如表 5 所示， FA01 和 FA02 的活性均比 Remicade 抗体 Fab 片段生物活性强。

表 5 人源化 Fab 片段中和 TNFα 的生物活性

组别	EC50（nM）
Remicade Fab	3.184
FA01	2.582
FA02	2.870

注：表 5 中的数据为三次重复实验的平均值。

实施例 4、人源化 TNFα 抗体 IgG 的表达及活性检测

一、人源化 TNFα 抗体 IgG 重组表达载体的构建

将实施例 1 和实施例 2 所获得的 2 种重链 Fd 片段（分别含有 SH01 和 SH02）和 6 种轻链（分别含有 SH03、SH05、SH04、SH06、SH07 和 SH08）如表 6 所

示分别组合，以重叠延伸 PCR 和 IgG1 Fc 恒定区拼接在一起，再重组至表达质粒 pcDNA3.1(+)中，将构建好的重组表达质粒转染 CHO 细胞，表达全长人源化抗体。

具体操作如下所述：（1）轻链直接重组在真核表达载体 pcDNA3.1(+)中。设计引物如下：5' -TGAAAGCTTATGGAAATTGTGCTGACTCAGTCTC-3'（划线处为 HindIII 酶切位点）；5' AATCTCGAGTCAACACTCTCCCCTGTTGAAGCT-3'（划线处为 Xho Ⅰ酶切位点），进行 PCR 扩增，扩增产物以 HindIII酶（R0104L，NEB 公司产品）和 Xho Ⅰ酶（R0146L，NEB 公司产品）双酶切后，以 T_4 连接酶与同样双酶切的 pcDNA3.1(+)大片段相连接。（2）重链需以重叠延伸 PCR 和 IgG1 Fc 恒定区拼接在一起，再重组至 pcDNA3.1(+)。5'-ACTGGTACCATGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGG-3'（划线处为 Kpn Ⅰ酶切位点）；5'-GATGGGCCCTTGGTGCTAGCGGAGCTCACGGTCAGGGTGGTGCCC-3' ；5'-GATGGGCCCTTGGTGCTAGCGGAGCTCACGGTCAGGGTGGTGCCC-3' ；5'-AATCTCGAGTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGG-3'（划线处为 Xho Ⅰ酶切位点）。将拼接 PCR 产物以 Kpn Ⅰ酶（R0142L，NEB 公司产品）和 Xho Ⅰ酶（R0146L，NEB 公司产品）酶切后再重组至同样双酶切的表达质粒 pcDNA3.1(+)中，并经鉴酶切与测序鉴定正确。

表 7 中 18 个抗体按照上述方法制备表达载体。其中，KS01（Glu）、KS03（Glu）、KS05（Glu）、KS06（Glu）、KS09（Glu）、KS10（Glu）的重链可变区编码 DNA 均为序列表中序列 2 所示（第 1-3 位核苷酸序列为 GAG），均编码序列 1 所示的重链可变区（第 1 为氨基酸为 Glu），KS01（Gln）、KS03（Gln）、KS05（Gln）、KS06（Gln）、KS09（Gln）、KS10（Gln）的重链可变区编码 DNA 均为序列表中序列 2 的第 1-3 位核苷酸序列替换为 CAG，均编码序列 1 所示的重链可变区（第 1 为氨基酸为 Gln）；KS02、KS04、KS07、KS08、KS11、KS12 的重链可变区编码 DNA 均为序列表中序列 4 所示，均编码序列 3 所示的重链可变区；KS01（Glu）、KS01（Gln）和 KS02 的轻链可变区的编码 DNA 均为序列表中序列 6，均编码序列 5 所示的轻链可变区；KS03（Glu）、KS03（Gln）和 KS04 的轻链可变区的编码 DNA 均为序列表中序列 10，均编码序列 9 所示的轻链可变区；KS05（Glu）、KS05（Gln）和 KS08 的轻链可变区的编码 DNA 均为序列表中序列 8，均编码序列 7 所示的轻链可变区；KS06（Glu）、KS06（Gln）和 KS07 的轻链可变区的编码 DNA 均为序列表中序列 12，均编码序列 11 所示的轻链可变区；KS09（Glu）、KS09（Gln）和 KS11 的轻链可变区的编码 DNA 均为序列表中序列 14，均编码序列 13 所示的轻链可变区；KS10（Glu）、KS10（Gln）和 KS12 的轻链可变区的编码 DNA 均为序列表中序列 16，均编码序列 15 所示的轻链可变区。所述 18 种抗体的重链恒定区的 DNA 编码序列为序列表

中序列 18，编码序列 17 所示重链恒定区；所述 18 种抗体的轻链恒定区的 DNA 编码序列为序列表中序列 20，编码序列 19 所示轻链恒定区。

二、人源化 TNFα 抗体 IgG 全长抗体的表达及纯化

将步骤一所得的轻链重组质粒和重链重组质粒共转染至 CHO 细胞中表达全长人源化抗体。常规方法，将如表 6 所示组合的相应质粒分别共稳定转染 CHO 细胞后，所对应的 12 种重组全长抗体分泌至细胞培养上清中，以上清纯化获得相应的全长 IgG 抗体。具体纯化步骤如下：

1)层析填料

Mabselect Sure(GE 公司产品)、Superdex 200(GE 公司产品 GE)

2)缓冲液

亲和平衡缓冲液(PBS): 0.2M 磷酸氢二钠: 82.5mL/L；0.2M 磷酸二氢钠: 17.5mL/L；2M 氯化钠：75mL/L；加入超纯水，充分搅拌混匀，用 1M 氢氧化钠或 1M 盐酸调节 pH 至 7.1-7.3。

亲和洗脱缓冲液: NaCl 2.922g/L，无水乙酸钠 0.49 g/L，加入 2.9mL/L 无水醋酸，pH3.4-3.6。

亲和再生缓冲液：5.8mL/L 无水醋酸 pH3.0。

亲和 CIP 缓冲液: 1M 氢氧化钠 100mL/L。

凝胶过滤层析溶液(PBS): 0.2M 磷酸氢二钠: 82.5mL/L；0.2M 磷酸二氢钠: 17.5mL/L；2M 氯化钠：75mL/L；加入超纯水，充分搅拌混匀，用 1M 氢氧化钠或 1M 盐酸调节 pH 至 6.8。

3)样品准备(澄清过滤)

离心：5000－6000rpm，10－15 分钟，离心样品。

过滤：离心后样品上清液采用 H7（0.45＋0.2um）滤器过滤。

4)亲和层析

安装好 AKTA 纯化系统及亲和层析柱（Mabselect 或 Mabselect Sure）。用超纯水冲洗 2 倍柱体积。 用亲和平衡缓冲液冲洗 5 柱体积，直至基线稳定，上样。上样结束后，用亲和平衡缓冲液冲洗 5～10 柱体积。用亲和洗脱缓冲液洗柱，收集 280nm 处的主吸收峰，继续流洗 1 柱体积。用亲和再生缓冲液流洗 3 柱体积。用亲和平衡缓冲液冲洗至 pH 中性。用 Mabselect CIP 缓冲液或 Mabselect Sure CIP 缓冲液在位清洗 5 柱体积。用亲和平衡缓冲液冲洗 3 柱体积，直至基线稳定。用超纯水冲洗 3 柱体积，直至基线稳定。用 20%乙醇冲洗 3 柱体积，保存亲和层析柱。

5)凝胶过滤层析

安装好 AKTA explorer 纯化系统及 Superdex 200 凝胶过滤层析柱。调节流速 5ml/min，用超纯水冲洗 1 柱体积，用 Superdex200 柱层析平衡液冲洗 2 柱体积。调节流速 2.5 ml/min，取调节 pH 后亲和收集峰直接上样。上样结束后，用 Superdex200 柱层析平衡液洗脱，收集 280nm 处目的峰。继续冲洗 1 柱体积。用

0.01M NaOH 保存层析柱。

三、人源化 TNFα 抗体 IgG 的活性检测

将步骤二所得的 12 种人源化 TNFα 抗体 IgG 进行 L929 细胞毒性实验检测其中和 TNFα 的生物活性，（具体操作如实施例 1 所述），得到 OD450 的值，将 OD450 值输入 graphpad prism 5 软件获得 EC50。表 7 显示了 12 种人源化 TNFα 抗体 IgG 抑制 TNFα 生物活性的 EC50，结果表明大大提高了人源化 TNFα 抗体的生物活性，其中，KS10 活性最高，后期对抗体活性的深入研究主要是针对 KS10 进行的。

表 6 高亲和力人源化 TNFα 抗体

IgG 抗体	VH	VK
KS01	SH01	SH03
KS02	SH02	SH03
KS03	SH01	SH05
KS04	SH02	SH05
KS05	SH01	SH04
KS06	SH01	SH06
KS07	SH02	SH06
KS08	SH02	SH04
KS09	SH01	SH07
KS10	SH01	SH08
KS11	SH02	SH07
KS12	SH02	SH08

表 7 人源化全长 TNFα 抗体中和 TNFα 的生物活性

组别	EC50（nM）
KS01（Glu）	0.081
KS01（Gln）	0.087
KS02	0.109
KS03（Glu）	0.087
KS03（Gln）	0.093
KS04	0.126
KS05（Glu）	0.051
KS05（Gln）	0.064

KS06（Glu）	0.059
KS06（Gln）	0.068
KS07	0.100
KS08	0.113
KS09（Glu）	0.036
KS09（Gln）	0.032
KS10（Glu）	0.028
KS10（Gln）	0.025
KS11	0.059
KS12	0.136
Remicade	0.174

实施例 5、KS10（Glu）与 hTNFα 结合动力学检测

将 hTNF-α（R&D 公司，210-TA-050）与 NHS-LCLC-biotin（货号：21338，购自 Thermo-fisher 公司）以摩尔比 1:3 混匀，于室温放置 1h，然后通过 PD-10 脱盐柱(17-0851-01,购自 GE 公司)将剩余的 NHS-LCLC-biotin 去除，得到最终的藕联产物为 50μg/ml 生物素-hTNF-α。

以 Octet 技术平台中的 Octet RED96 系统(ForteBio 公司) Kinetics Assays 检测 KS10 与 hTNFα 结合动力学参数检测，其试验步骤设置按照仪器操作说明进行，通过 Loading 将 50μg/ml 生物素-hTNFα 结合于 SA（Streptavidin biosensor）上；通过预试验确定抗体的适宜浓度范围，分别为 6000 nM、2000 nM、666.7 nM、222.2 nM、74.1 nM 和 24.7nM。以 Remicade 为阳性对照，PBS（pH 7.4）为空白对照。实验结果（表 8）显示：KS10 的 KD 值低于 Remicade，表明其与 hTNFα 的亲和力高于人鼠嵌合抗体 Remicade。

另外检测了 KS10 与黑猩猩 TNFα（Chimpanzee TNFα）（氨基酸序列如序列 36 所示，核苷酸序列如序列 37 所示）、猕猴 TNFα（Chimpanzee TNFα）（氨基酸序列如序列 38 所示，核苷酸序列如序列 39 所示）、小鼠 TNFα（mTNFα）（货号：CYT-252，购自 PROSPEC）人 TNFβ（human TNFβ）(货号：CYT-224，购自 PROSPEC）的结合亲和性。根据 Octet RED96 系统亲和性判定标准：抗原和抗体结合后产生的光波位移距离间接反应两者间的亲和性，光波位移距离越大，亲和性越高。结果（图 3）显示，KS10 与人 TNFα 有很强的结合，与与黑猩猩 TNFα 也有明显结合，而与猕猴 TNFα 有较弱结合，与小鼠 TNFα 和人 TNFβ 几乎不结合。由此证实了本发明所提供的抗体经人源化之后的特异结合能力。

表 8 KS10 与 hTNFα 结合动力学参数

抗体种类	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
Remicade	8.12E-12	1.95E+04	1.58E-07
KS10	2.18E-12	4.69E+04	1.02E-07

注: KD 为亲和力常数；kon 为结合常数；kdis 为解离常数。

实施例 6、KS10（Glu）对人 TNF-α 诱导的类风湿性关节炎大鼠的作用

Sprague Dawley 大鼠（动物许可号：SCXK(川)2008-24），4-6 周龄，SPF 级，72 只，雌雄各半，体重 140-180g。大鼠适应性饲养一周后，随机分为 6 个组别，每组 12 只大鼠，分别为正常组、阴性对照组，模型对照组、KS10 5mg/kg 组、KS10 10mg/kg 组、KS10 20mg/kg 组。实验开始时，除正常组以外，每组大鼠以 10%水合氯醛(350mg/kg)麻醉，造模前，三种 KS10 剂量组（5mg/kg、10mg/kg 和 20mg/kg）采用尾静脉注射给药，阴性对照组和模型对照组均经尾静脉注射等体积的生理盐水。注射后 15 分钟，以 1 毫升注射器将 0.5mg/ml hTNF-α（R&D 公司，商品目录号为 210-TA-050）（用 1% BSA 溶解，注射体积为 60μl/只）注射入三种 KS10 剂量组和模型对照组的大鼠左踝关节腔内造成急性关节炎(单脚造模)，将相同体积 1% BSA 注射到阴性对照组大鼠左踝关节腔内。以关节腔两侧凹陷逐渐鼓起表明注射成功。正常组大鼠不进行上述注射。

造模后 18 小时，将各组大鼠左踝关节肿胀程度按改进的 0-4 级分类标准进行相应评分：0 分：无红肿；1 分：仅有踝关节肿和/或红；2 分：踝关节红肿及足底肿；3 分：踝关节及足底红肿；4 分：踝关节、足底及脚面红肿[参考文献：R O Williams, M Feldmann, and R N Maini. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis.Proc Natl Acad Sci U S A.1992 October 15;89(20):9784–9788.]，于造模后 20 小时抽取关节滑液，分离关节周边软组织并匀浆，离心后一并冻存于-70℃，采用大鼠 ELISA 试剂盒（IL-1β 购于 R&D 公司，货号：RLB00; IL-6 购于 R&D 公司，批号：R6000B）测定其中 IL-1β、IL-6 的水平。

根据评分结果（图 4）显示，KS10 三个剂量均能明显减轻 hTNF-α 引起的大鼠关节红肿，明显拮抗 hTNF-α 诱导类风湿性关节炎的形成。细胞因子检测显示，KS10 三个剂量均能明显降低关节滑液/关节周边软组织中的 IL-1β（图 5）和 IL-6（图 6）水平，表明 KS10 能完全阻断 TNF-α 所致的 IL-1β 和 IL-6 水平，直接证实了 KS10 的抗人 TNF-α 作用。

实施例 7、KS10（Glu）对人 TNF-α 诱导的大鼠葡萄膜炎的治疗作用

取健康 lewis 大鼠 40 只，随机分为正常组、模型组、阴性对照组、KS10 组。大鼠腹腔注射 10%水合氯醛（剂量 0.35ml/kg），待大鼠麻醉后，模型组与阴性对照组每只由睫状肌扁平部向玻璃体注射（使用 30G1/2 针头）给予 10μl 生理盐水，KS10 组大鼠每只注射 10μl 浓度为 4mg/ml 的 KS10 溶液(KS10 用 PBS 配制)，30min 后，模型组与 KS10 组每只玻璃体注射给予 10μl hTNF-α (约 0.5 mg/ml)，阴性对照组每只玻璃体给予 10μl 1% BSA。在首次给药造模 24h、48h 将大鼠麻醉置于裂隙灯下观察，并进行评分，评分指标分级参考文献[Fleisher LN, Ferrell JB, Smith MG, McGahan MC. Lipid mediators of tumor necrosis factor-alpha-induced uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1991 Jul;32(8):2393-9.]并

稍加修订：虹膜充血 0~2 分（无充血为 0 分、轻度充血为 1 分、重度充血为 2 分），瞳孔缩小 0~1 分（瞳孔正常为 0 分、瞳孔缩小为 1 分），前房渗出 0~2 分（前房无渗出为 0 分、轻度渗出为 1 分、重度渗出为 2 分），瞳孔或虹膜后粘连 0~2 分（无粘连为 0 分、一处粘连为 1 分、二者粘连为 2 分）。

评分结果如表 9 所示，这一结果显示，KS10 能明显降低葡萄膜炎评分指标分数，主要表现为能抑制虹膜充血，纤维渗出，瞳孔或虹膜后粘连，增加眼内透明度，这表明 KS10 对 hTNF-α 诱导的葡萄膜炎有明显的拮抗作用。

表 9 KS10 对 hTNF-α 诱导的大鼠葡萄膜炎的治疗评分结果

组别	首次给药造模后时间	
	24h	48h
正常	0.88±0.834	0.38±0.518
阴性	0.90±0.737	0.38±0.744
模型	3.5±0.971	3.78±1.202
KS10	2.5±0.971*	1.55±2.422*

注：*表示与模型组相比，$^{*}P<0.05$；（$\bar{x}$ ±SD，n=10）。

工业应用

本发明通过对CDR移植后的抗体进行突变改造，有力克服了常规抗体人源化方法（将鼠源抗体可变区（VH、VK）的互补决定区（CDR）直接移植到人抗体框架中）导致抗体亲和力受损这一缺陷，最终得到与起始抗体相近的人源化抗体。本发明所提供的Fab及IgG抗体的人源化程度大大提高（达95%以上），且经实验证明具有与人鼠嵌合抗体Remicade相近，甚至更高的亲和力及生物活性，对人TNFα具有更好的中和作用，可更有效地治疗与TNFα相关的疾病，优选类风湿性关节炎、自身免疫性葡萄膜炎、克隆病、斑片性银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎或幼年特发性关节炎。

权利要求

1、抗人肿瘤坏死因子 α 的人源化抗体或抗原结合片段 Fab，含有重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区氨基酸序列为序列表中序列 1 或序列 3；所述轻链可变区氨基酸序列为序列表中序列 15、序列 9、序列 11、序列 7、序列 13 和序列 5 中的任一种；所述序列 1 的第一位氨基酸残基为 Glu 或 Gln。

2、根据权利要求 1 所述抗体，其特征在于所述抗体为下述 a-l 中任一种：

a、KS10，其重链可变区为 SH01，氨基酸序列为序列 1，轻链可变区为 SH08，氨基酸序列为序列 15；

b、KS03，其重链可变区为 SH01，氨基酸序列为序列 1，轻链可变区为 SH05，氨基酸序列为序列 9；

c、KS06，其重链可变区为 SH01，氨基酸序列为序列 1，轻链可变区为 SH06，氨基酸序列为序列 11；

d、KS12，其重链可变区为 SH02，氨基酸序列为序列 3，轻链可变区为 SH08，氨基酸序列为为序列 15；

e、KS04，其重链可变区为 SH02，氨基酸序列为序列 3，轻链可变区为 SH05，氨基酸序列为序列 9；

f、KS07，其重链可变区为 SH02，氨基酸序列为序列 3，轻链可变区为 SH06，氨基酸序列为序列 11；

g、KS02，其重链可变区为 SH02，氨基酸序列为序列 3，轻链可变区为 SH03，氨基酸序列为序列 5；

h、KS08，其重链可变区为 SH02，氨基酸序列为序列 3，轻链可变区为 SH04，氨基酸序列为序列 7；

i、KS11，其重链可变区为 SH02，氨基酸序列为序列 3，轻链可变区为 SH07，氨基酸序列为序列 13；

j、KS01，其重链可变区为 SH01，氨基酸序列为序列 1，轻链可变区为 SH03，氨基酸序列为序列 5；

k、KS05，其重链可变区为 SH01，氨基酸序列为序列 1，轻链可变区为 SH04，氨基酸序列为序列 7；

l、KS09，其重链可变区为 SH01，氨基酸序列为序列 1，轻链可变区为 SH07，氨基酸序列为序列 13；

所述序列 1 的第一位氨基酸残基为 Glu 或 Gln。

3、一种抗人肿瘤坏死因子 α 的人源化抗原结合片段 Fab，含有重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区的氨基酸序列为序列表中序列 27 的第 1-120 位或序列 25 的第 1-120 位，所述轻链可变区的氨基酸序列为序列表中序列 31 的第 1-109 位或序列 29 的第 1-109 位。

4、根据权利要求 1 或 2 所述的抗体，其特征在于：所述抗体由重链和轻链

组成，所述重链的恒定区氨基酸序列与人抗体重链恒定区氨基酸序列相同，所述轻链的恒定区氨基酸序列与人抗体轻链恒定区氨基酸序列相同；

5、根据权利要求 1 或 2 或 4 所述的抗体，其特征在于：所述重链的恒定区氨基酸序列如序列表中序列 17 所示；所述轻链的恒定区氨基酸序列如序列表中序列 19 所示。

6、根据权利要求 1、2、4 和 5 中任一所述的抗体，其特征在于：所述重链的氨基酸序列为序列表中序列 21；所述轻链的氨基酸序列为序列表中序列 23；

所述序列 21 的第一位氨基酸为 Glu 或 Gln。

7、根据权利要求 1 或 3 所述的 Fab，其特征在于：所述 Fab 由重链片段和轻链组成，所述重链片段由所述重链可变区和重链恒定区的 CH1 组成，所述轻链由所述轻链可变区和轻链恒定区组成；所述 CH1 氨基酸序列与人抗体重链恒定区的 CH1 氨基酸序列相同，所述轻链恒定区氨基酸序列与人抗体轻链恒定区氨基酸序列相同；

8、根据权利要求 1 或 3 或 7 所述的 Fab，其特征在于：所述 CH1 氨基酸序列如序列表中序列 33 所示；所述轻链恒定区氨基酸序列如序列表中序列 19 所示。

9、根据权利要求 3 或 7 或 8 所述的 Fab，其特征在于：所述 Fab 为下述 b1）-b3）中任一种：

b1）KS-7F：所述重链片段的氨基酸序列为序列表中序列 27，且所述轻链的氨基酸序列为序列表中序列 31；

b2）KS-7A：所述重链片段的氨基酸序列为序列表中序列 25，且所述轻链的氨基酸序列为序列表中序列 31；

b3）KS-2E：所述重链片段的氨基酸序列为序列表中序列 25，且所述轻链的氨基酸序列为序列表中序列 29。

10、由权利要求 1、2、4、5 和 6 中任一所述抗体衍生的抗原结合片段 A 或由权利要求 1、3、7、8 和 9 中任一所述 Fab 衍生的抗原结合片段 B，其特征在于：所述抗原结合片段 A 为 Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv、重链可变区、轻链可变区、选自重链可变区的多肽片段或选自轻链可变区的多肽片段；所述抗原结合片段 B 为 Fab'、$F(ab')_2$、Fv、重链可变区、轻链可变区、选自重链可变区的多肽片段或选自轻链可变区的多肽片段。

11、编码如下 A）-C）中任一种蛋白的基因：

A）权利要求 1、2、4、5 和 6 中任一所述的抗体；

B）权利要求 1、3、7、8 和 9 中任一所述的 Fab；

C）权利要求 10 所述的抗原结合片段。

12、根据权利要求 11 所述的基因，其特征在于：权利要求 1、2、4、5 和 6 中任一所述抗体和权利要求 10 所述抗原结合片段 A 的重链可变区的编码序列均如序列表中序列 2 或序列 4 所示；权利要求 1、2、4、5 和 6 中任一所述抗体和

权利要求 10 所述抗原结合片段 A 的轻链可变区编码序列均如序列表中序列 16、序列 10、序列 12、序列 8、序列 14 和序列 6 中的任一种所示；

权利要求 1、3、7、8 和 9 中任一所述 Fab 和权利要求 10 所述抗原结合片段 B 的重链可变区的编码序列均为序列表中序列 2、序列 4、序列 28 的第 1-360 位和序列 26 的第 1-360 位中的任一种；1、3、7、8 和 9 中任一所述 Fab 和权利要求 10 所述抗原结合片段 B 的轻链可变区的编码序列均为序列表中序列 16、序列 10、序列 12、序列 8、序列 14、序列 6、序列 32 的第 1-327 位和序列 30 的第 1-327 位中的任一种。

13、根据权利要求 11 或 12 所述的基因，其特征在于：所述抗体的重链恒定区的编码序列如序列表中序列 18 所示；所述抗体的轻链恒定区的编码序列如序列表中序列 20 所示；

所述 Fab 的 CH1 的编码序列如序列表中序列 34 所示；所述 Fab 的轻链恒定区编码序列如序列表中序列 20 所示。

14、根据权利要求 11-13 中任一所述的基因，其特征在于：所述抗体的重链编码序列为序列表中序列 22；所述抗体的轻链编码序列为序列表中序列 24；

权利要求 3、7、8 和 9 中任一所述 Fab 的编码序列为下述 c1）-c3）中任一种：

c1）KS-7F：所述 Fab 的重链片段的编码序列为序列表中序列 28，且所述 Fab 的轻链编码序列为序列表中序列 32；

c2）KS-7A：所述 Fab 的重链片段的编码序列为序列表中序列 26，且所述 Fab 的轻链编码序列为序列表中序列 32；

c3）KS-2E：所述 Fab 的重链片段的编码序列为序列表中序列 26，且所述 Fab 的轻链编码序列为序列表中序列 30。

15、下述遗传材料：含有权利要求 11-14 中任一所述基因的重组载体、重组菌、重组细胞系、重组病毒或表达盒。

16、根据权利要求 15 所述的遗传材料，其特征在于：所述重组载体为表达所述 Fab 或抗体或抗原结合片段的原核表达载体或真核表达载体；所述重组菌为携带有所述基因的大肠杆菌；所述重组细胞系为转入所述基因的哺乳动物细胞系，优选 CHO 细胞系，或 293 细胞及其亚系；所述重组病毒为携带有所述基因的重组腺病毒或重组腺相关病毒。

17、权利要求 1、2、4、5 和 6 中任一所述抗体，或权利要求 1、3、7、8 和 9 中任一所述 Fab，或权利要求 10 所述抗原结合片段，或权利要求 11-14 中任一所述基因，或权利要求 15 或 16 所述遗传材料的用途：

d1）在制备预防和/或治疗人抗肿瘤坏死因子 α 相关疾病药物中的用途，或

d2）在制备中和人抗肿瘤坏死因子 α 产品中的用途，或

d3）在制备定性或定量检测人抗肿瘤坏死因子 α 的试剂盒中的用途。

18、药物组合物，含有辅料和活性成分，所述活性成分含有下述物质中的

至少一种：权利要求 1、2、4、5 和 6 中任一所述抗体，权利要求 1、3、7、8 和 9 中任一所述 Fab，权利要求 10 所述抗原结合片段，权利要求 11-14 中任一所述的基因，和权利要求 15 或 16 所述遗传材料；所述辅料为药学上可接受的载体或赋形剂。

19、下述物质中的任一种在治疗人肿瘤坏死因子 α 相关疾病中的应用：权利要求 1、2、4、5 和 6 中任一所述抗体，权利要求 1、3、7、8 和 9 中任一所述 Fab，权利要求 10 所述抗原结合片段，权利要求 11-14 中任一所述的基因，权利要求 15 或 16 所述遗传材料，和权利要求 18 所述的药物组合物。

20、根据权利要求 17 所述用途或权利要求 19 所述应用，其特征在于：所述人肿瘤坏死因子 α 相关疾病为由人肿瘤坏死因子 α 升高引起的疾病，优选为类风湿性关节炎、自身免疫性葡萄膜炎、克隆病、斑片性银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎或幼年特发性关节炎。