IL-36R 结合蛋白及其医药用途

本公开要求 2023 年 02 月 21 日提交的中国专利申请 202310148631.7 的优先权，前述专利申请的全部内容通过引用并入本公开。

技术领域

本公开涉及生物医药领域，具体涉及 IL-36R 结合蛋白及其用于治疗癌症的方法和相关制药用途。

背景技术

白介素-36(IL-36)属于 IL-1 超家族，包括三个具有促炎功能的细胞因子：IL-36α、IL-36β 和 IL-36γ。IL-36 主要由上皮细胞和炎性的免疫细胞以失活的全长型式分泌，在炎性疾病部位被中性粒细胞来源的蛋白酶(cathepsin G，elastases 等)酶切后，释放出活性片段，进一步结合受体发挥下游功能。IL-36 受体是由 IL-36R(又被称为 interleukin-1 receptor-like 2，IL1RL2，主要表达于上皮细胞和单核细胞)和 IL-1RAcP 组成的异源二聚体，IL-36 结合 IL-36R 后招募 IL-1RAcP，通过激活 MAPK 和 NF-κB 等信号通路发挥下游功能。IL-36RA 和 IL-38 可结合 IL-36R 并抑制 IL-1RAcP 招募，进而阻断 IL-36 对下游通路的激活作用(Elias M *et al. JCI*. 2021)。

IL-36 通路的激活介导多个生物学过程：1)促进角质细胞增殖，抑制其分化；2)促进多种细胞因子释放(包括 IL-6, TNFα, IL-8, CCL20, CXCL10 等)；3)促进树突状细胞(Dendritic cell, DC)的成熟和激活(Yuan ZC *et al. Frontiers Immunol*. 2019)。IL-36 通路的紊乱与多种自身免疫性疾病相关，在许多皮肤炎性疾病患者(包括银屑病、化脓性汗腺炎、慢性单纯性苔藓、结节性痒疹、天疱疮等)的皮损处以及炎性疾病性肠炎患者(溃疡性结肠炎、克罗恩病)的肠道中，均观察到 IL-36 表达上调(Aquino TM *et al. J Cutan Pathol*. 2021)。据文献报道，抑制性配体 IL-36RA 的失活突变与泛发性脓疱银屑病(Generalized pustular psoriasis, GPP)的发生密切相关：中国 GPP 患者中携带 IL-36RA 失活突变的比例约为 46.8-60.5%(Li X *et al. J Dermatol Sci,* 2014)，日本的一项研究显示，有 9/11 仅 GPP 和 2/20 GPP 伴寻常型银屑病患者携带 IL-36RA 失活突变(Sugiura K *et al, J Invest Dermatol*, 2013)。在临床前 IMQ 诱导的银屑病模型中，阻断 IL-36 通路可显著降低疾病评分并抑制下游炎性疾病基因表达(Mahil SK *et al. Sci Trans Med*, 2017)。

白介素-23 (IL-23)属于 IL-12 家族，是由 p19 亚基和 p40 亚基组成的异源二聚体。IL-23 主要由激活的巨噬细胞和 DC 细胞分泌，结合 IL-23R/IL-12Rβ1 异源二聚体受体复合物后，通过激活 JAK-STAT 通路促进 17 型 T 细胞的分化和表型维持，并促进多种 17 型细胞因子(如 IL-17A, IL-17F 和 IL-22 等)的分泌(Elias M et al. JCI. 2021；Teng MWL *et al. Nat Med*. 2016)。IL-23/IL-17 通路在多种自免疾病中发挥着重要作用。

虽然抗 IL-23 抗体在银屑病中的疗效较好，但仍有部分患者对抗 IL-23 抗体响应不佳(Ghoreschi, K *et al, The Lancet*, 2021)。而 IL-36 通路的基因表达在这部分对

IL-23 抗体响应不佳患者的皮肤损伤处明显增加。IL-36 直接参与皮肤炎性疾病和免疫细胞招募，同时靶向 IL-36 和 IL-23 通路潜在可提高抗 IL-23 抗体的起效速率，并扩大受益人群。鉴于临床治疗过程中，存在未满足的患者需求，本公开提供了高活性的治疗性抗 IL-36R 抗体，能特异性结合 IL-36R，具有可用于干预或治疗 IL-36R 信号通路相关疾病，特别是自身免疫疾病的优异的抗原结合特异性、亲和力、及药代动力学和药效学特性。此外，本公开提供了机制新颖的治疗性人源化抗 IL-36R/IL-23 双抗，能特异性同时结合 IL-36R 和 IL-23，具有可用于干预或治疗 IL-36R/IL-23 信号通路相关疾病，特别是自身免疫疾病的优异的抗原结合特异性、亲和力、及药代动力学和药效学特性。

发明内容

本公开提供 IL-36R 结合蛋白、IL-36R/IL-23 结合蛋白，其编码核酸、载体、宿主细胞、药物组合物及其用于治疗或预防疾病的方法和相关制药用途。

IL-36R 结合蛋白

本公开提供 IL-36R 结合蛋白，其包含免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含：

SEQ ID NO: 3、12-26 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3，或

SEQ ID NO: 4、27-35 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3，

其中，所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的，例如，根据 Kabat 编号系统定义的。

一些实施方案中，提供 IL-36R 结合蛋白，包含上述 CDR1、CDR2 和 CDR3 中的任意一个或其任意组合。

一些实施方案中，提供 IL-36R 结合蛋白，其包含免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:5、6、7 所示，或如 SEQ ID NO: 8、9、10 所示。

一些实施方案中，前述 IL-36R 结合蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域为人源化的、回复突变、亲合力成熟、去除/减少 T 细胞表位(TCE)、降低抗体脱酰胺和/或降低抗体异构化改造的。

一些实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域经过去除/减少 TCE 获得的，其在一个或多个 CDR 中具有一个或多个变化，所述变化导致 IL-36R 结合蛋白的免疫原性降低。

一些实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域在 1、27、28、29、30、37、44、45、47、49、71、74、76、78、94、103 位(根据 Kabat 编号系统编号)的氨基酸残基存在中一个、多个或任意组合的突变，例如，存在选自 1D、27Y、28S、29Y、30R、37Y、44Q、45R、47A、49A、71Q、74A、76T、78V、94A、103S 中一个、多个或任意组合的突变，例如具有本公开表 3-1 中的突变组合。

一些实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域在 27、29、37、33、45、47、49、71、94 位(根据 Kabat 编号系统编号)的氨基酸残基存在中一个、多个或任意组合的突变，例如，存在选自 27N、29Y、37F、44E、45R、47G、49A、71K、

94A 中一个、多个或任意组合的突变，例如，具有本公开表 3-2 中的突变组合。

一些实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域具有选自 F27N, F29Y, V37F, G44E, L45R, W47G, S49A, R71K, R94A 中一个、多个或任意组合的突变，例如具有本公开表 3-2 中的突变组合。

一些实施方案中，前述 IL-36R 结合蛋白中所述免疫球蛋白单一可变结构域的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 3、12-26 任一所示或与 SEQ ID NO: 3、12-26 任一具有至少 80%、至少 90%序列同一性；一些实施方案中，前述 IL-36R 结合蛋白中所述免疫球蛋白单一可变结构域的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 4、27-35 任一所示或与 SEQ ID NO: 4、27-35 任一具有至少 80%、至少 90%序列同一性。

本公开中，“至少 80%(序列)同一性”涵盖至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%(序列)同一性；“至少 90%(序列)同一性”涵盖至少 90%、至少 91％、至少 92％、至少 93％、至少 94％、至少 95％、至少 96％、至少 97％、至少 98％、至少 99％或 100%(序列)同一性。

一些实施方案中，前述 IL-36R 结合蛋白中包含或为特异性结合人 IL-36R 蛋白或其片段的抗体或其抗原结合片段。一些具体实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段例如为骆驼抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或其抗原结合片段。一些具体实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段例如为重组抗体或其片段。一些具体实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段为线性抗体、单链抗体、纳米抗体、肽抗体 peptibody、结构域抗体和多特异性抗体(双特异性抗体、diabody、triabody 和 tetrabody、串联二- scFv、串联三-scFv)。

一些实施方案中，前述 IL-36R 结合蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域是单域抗体或 VHH。

一些实施方案中，本公开提供 IL-36R 结合蛋白，其包含一个或多个(例如 2、3、4、5、6、7、8 个)前述免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域可以是相同或不同的，可以形成二聚体或多聚体分子。

一些实施方案中，前述 IL-36R 结合蛋白还包含人免疫球蛋白 Fc 区；例如，所述 Fc 区是人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的 Fc 区。一些实施方案中，所述 Fc 区是具有 S228P 突变的人 IgG4 的 Fc 区，例如 SEQ ID NO:11 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性。一些实施方案中，Fc 区是稳定性增高的，或具有使得所述 Fc 区较之野生型 Fc 区稳定性增高的突变。一些实施方案中，Fc 区可以使所述结合蛋白形成二聚体分子。一些实施方案中，Fc 区可以延长所述结合蛋白的体内半衰期。

一些实施方案中，前述 IL-36R 结合蛋白中免疫球蛋白单一可变结构域与 Fc 区直接或通过连接子连接。所述连接子可以是长 1-20 个或更多个氨基酸、无二级以上结构的非功能性氨基酸序列。例如，所述连接子是柔性连接子，例如 G_4S、GS、GAP、$(G_4S)_2$、$(G_4S)_3$、$(G_4S)_4$、$(G_4S)_5$、ASGS 等，更例如是$(G_4S)_2$。

一些实施方案中，本公开的 IL-36R 结合蛋白为抗 IL-36R 抗体或其抗原结合片段，或包含所述抗体、抗原结合片段的缀合物、融合蛋白。

一些实施方案中，前述 IL-36R 结合蛋白，具有选自以下至少一项的活性：

(a) 以≤10^{-7} 的 K_D 值与人 IL-36R 或其表位结合；

(b) 具有抑制 IL-17 分泌活性；优选地，以小于 0.03nM(例如，小于 0.03 nM、小于 0.02 nM、小于 0.01 nM 或更小)的 IC_{50} 值抑制 IL-17 分泌；在一些实施方案中，所述 IC_{50} 值通过本公开实施例 5 方法检测；

(c) 具有抑制 BaF3-IL-23R 细胞增殖活性；优选地，以小于 0.5 nM(例如，小于 0.5 nM、小于 0.4 nM、小于 0.3nM、小于 0.2nM、小于 0.1nM 或更小)的 IC_{50} 值抑制 BaF3-IL-23R 细胞增殖；在一些实施方案中，所述 IC_{50} 值通过实施例 9 方法检测；

(d) 具有抑制 STAT 通路活性；优选地，以小于 10 nM(例如，小于 9nM、小于 8nM 或更小)的 IC_{50} 值抑制 STAT3 通路；在一些实施方案中，所述 IC_{50} 值通过实施例 9 方法检测；

(e) 具有抑制人 IL-36 刺激因子活性；优选地，以小于 0.5 nM(例如，小于 0.5 nM、小于 0.4 nM、小于 0.3nM、小于 0.2nM、小于 0.1nM 或更小)的 IC_{50} 值抑制 IL-8 的分泌；在一些实施方案中，所述 IC_{50} 值通过实施例 8 方法检测。

一些实施方案中，本公开的前述 IL-36R 结合蛋白结合 IL-36R 的 K_D 值可以≤1×10^{-7}M，例如≤1×10^{-8}M，或≤1×10^{-9}M，或≤1×10^{-10}M。

一些实施方案中，本公开的前述 IL-36R 结合蛋白涵盖变体，所述变体与 SEQ ID NO: 3、12-26 任一或 4、27-35 任一相比，具有一个或多个(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个)氨基酸突变；所述氨基酸突变可以是保守的替换、取代或修饰，和/或不影响功能的缺失、添加；所述氨基酸突变可以发生在 CDR 区和/或 FR 区。

一些实施方案中，提供抗 IL-36R 抗体或其抗原结合片段，其与前述本公开的 IL-36R 结合蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域结合或竞争结合相同的表位。

一些实施方案中，提供抗 IL-36R 抗体或其抗原结合片段，其阻断前述本公开的 IL-36R 结合蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域与 IL-36R(例如人 IL-36R)的结合。

一些实施方案中，提供抗 IL-36R 抗体或其抗原结合片段，其与 IL-36R(例如人 IL-36R)的结合被前述本公开的 IL-36R 结合蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域阻断。

一些实施方案中，提供蛋白或分子，其包含前述本公开任意一个或多个(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个)IL-36R 结合蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域是相同的或不同的。例如，所述蛋白或分子为缀合物，所述缀合物例如可包含任意可检测标记。

IL-36R/IL-23 结合蛋白

本公开提供 IL-36R/IL-23 结合蛋白，其特异性结合人 IL-36R 和/或人 IL-23 p19 亚基。

一些实施方案中，提供 IL-36R/IL-23 结合蛋白，包含特异性结合 IL-36R 的第

一抗原结合结构域，和特异性结合 IL-23(例如 IL-23 p19 亚基)的第二抗原结合结构域。

关于特异性结合 IL-36R 的第一抗原结合结构域：

一些实施方案中，所述 IL-36R/IL-23 结合蛋白中的第一抗原结合结构域包含或为前述本公开的 IL-36R 结合蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域。

一些具体实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含：

SEQ ID NO: 3、12-26 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3，或

SEQ ID NO: 4、27-35 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3，

其中，所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的，例如，根据 Kabat 编号系统定义的。

一些具体实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含上述 CDR1、CDR2 和 CDR3 中的任意一个或其任意组合。

一些具体实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:5、6、7 所示，或如 SEQ ID NO: 8、9、10 所示。

一些具体实施方案中，前述 IL-36R 结合蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域为人源化的、回复突变、亲合力成熟、去除/减少 T 细胞表位(TCE)、降低抗体脱酰胺和/或降低抗体异构化改造的。

一些具体实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域是经过人源化改造的。所述人源化所使用的人种系模板的重链框架区(FR)源自 IGHV3-23*04、IGHV3-74*01 和/或 IGHJ1*01。一些实施方案中，FR1、FR2、FR3 源自 IGHV3-23*04，FR4 源自 IGHJ1*01。一些实施方案中，FR1、FR2、FR3 源自 IGHV3-74*01，FR4 源自 IGHJ1*01。

一些具体实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域在 1、27、28、29、30、37、44、45、47、49、71、74、76、78、94、103 位(根据 Kabat 编号系统编号)的氨基酸残基存在中一个、多个或任意组合的突变，例如，存在选自 1D、27Y、28S、29Y、30R、37Y、44Q、45R、47A、49A、71Q、74A、76T、78V、94A、103S 中一个、多个或任意组合的突变，例如具有本公开表 3-1 中的突变组合。

一些具体实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域在 27、29、37、33、45、47、49、71、94 位(根据 Kabat 编号系统编号)的氨基酸残基存在中一个、多个或任意组合的突变，例如，存在选自 27N、29Y、37F、44E、45R、47G、49A、71K、94A 中一个、多个或任意组合的突变，例如，具有本公开表 3-2 中的突变组合。

一些具体实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 3、12-26 任一所示或与 SEQ ID NO: 3、12-26 任一具有至少 80%、至少 90%序列同一性；一些实施方案中，前述 IL-36R 结合蛋白中所述免疫球蛋白单一可变结构域的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 4、27-35 任一所示或与 SEQ ID NO: 4、27-35 任一具有至少 80%、至少 90%序列同一性。

一些具体实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域为单域抗体或 VHH。

一些具体实施方案中，所述特异性结合 IL-36R 的第一抗原结合结构域包含

BI655130 或 H4H14706P2 中的 fab 或 VH、VL，本公开全文引入 WO2013074569A1 和 WO2020018503A。一些具体实施方案中，所述特异性结合 IL-36R 的第一抗原结合结构域包含 VH 和 VL，所述 VH 包含 SEQ ID NO：36 中 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO：37 中 LCDR1、LCDR2、LCDR3；例如，所述 VH 为 SEQ ID NO：36 中 VH 或与之具有至少 80%、至少 90%同一性，所述 VL 为 SEQ ID NO：37 中 VL 或与之具有至少 80%、至少 90%同一性。一些具体实施方案中，所述 VH 包含 SEQ ID NO：38 中 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO：39 中 LCDR1、LCDR2、LCDR3；例如，所述 VH 为 SEQ ID NO：38 中 VH 或与之具有至少 80%、至少 90%同一性，所述 VL 为 SEQ ID NO：39 中 VL 或与之具有至少 80%、至少 90%同一性。

关于特异性结合 IL-23(例如 IL-23 p19 亚基)的第二抗原结合结构域：

一些实施方案中，所述第二抗原结合结构域包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。

一些具体实施方案中，所述第二抗原结合结构域中，

VH 包含 SEQ ID NO:40 中所示的氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，VL 包含 SEQ ID NO:41 所示的氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；或

VH 包含 SEQ ID NO:52-57 任一所示的氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO:58-61 任一所示的氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

其中，所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的，例如是根据 Kabat 编号系统定义的。

一些具体实施方案中，所述第二抗原结合结构域中，

VH 包含 SEQ ID NO:42-44 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，VL 包含 SEQ ID NO:45-47 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

VH 包含 SEQ ID NO:50、43、44 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，VL 包含 SEQ ID NO:45-47 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

VH 包含 SEQ ID NO:51、43、44 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，VL 包含 SEQ ID NO:45-47 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

一些具体实施方案中，所述第二抗原结合结构域为人源化的、回复突变、亲合力成熟、去除/减少 T 细胞表位(TCE)、降低抗体脱酰胺和/或降低抗体异构化改造的。

一些具体实施方案中，所述第二抗原结合结构域在 VH 的第 1、30、37、44、49、73、89 和/或 93(根据 Kabat 编号系统编号)氨基酸残基存在突变，和/或在 VL 的第 4、17、36、58、60 和/或 68 位(根据 Kabat 编号系统编号)氨基酸残基存在突变。例如，VH 存在 1E、30T、37V、44G、49G、73N、89R 和 93V 中的一个、多个或其任意组合的突变，和/或 VL 存在 4L、17Q、36F、58I、60A 和 68R 中的一个、多个或其任意组合的突变。

一些具体实施方案中，所述第二抗原结合结构域中，

VH 包含 SEQ ID NO:40 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸

序列，VL 包含 SEQ ID NO:41 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列；

VH 包含 SEQ ID NO: 52-57 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列，VL 包含 SEQ ID NO: 58-61 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列；

例如，VH 包含 SEQ ID NO: 56 所示的氨基酸序列，VL 包含 SEQ ID NO: 60 所示的氨基酸序列。

一些具体实施方案中，所述第二抗原结合结构域包含重链和轻链，所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:62 或 64 所示，或与之具有至少 80%、至少 90%同一性；所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:63 或 65 所示，或与之具有至少 80%、至少 90%同一性。

一些具体实施方案中，所述特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域包含 Risankizumab、Guselkumab 中的 fab 或 VH、VL。一些具体实施方案中，所述特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域包含 VH 和 VL，所述 VH 包含 SEQ ID NO：66 中 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO：67 中 LCDR1、LCDR2、LCDR3；例如，所述 VH 为 SEQ ID NO：66 中 VH 或与之具有至少 80%、至少 90%同一性，所述 VL 为 SEQ ID NO：67 中 VL 或与之具有至少 80%、至少 90%同一性。一些具体实施方案中，所述特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域包含 VH 和 VL，所述 VH 包含 SEQ ID NO：77 中 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO：78 中 LCDR1、LCDR2、LCDR3；例如，所述 VH 为 SEQ ID NO：77 中 VH 或与之具有至少 80%、至少 90%同一性，所述 VL 为 SEQ ID NO：78 中 VL 或与之具有至少 80%、至少 90%同一性。

关于 IL-36R/IL-23 结合蛋白：

以下示例性提供本公开的 IL-36R/IL-23 结合蛋白：

一些实施方案中，所述 IL-36R/IL-23 结合蛋白中有一个或多个(例如 2、3、4、5、6 个) 特异性结合 IL-36R 的第一抗原结合结构域，和/或，有一个或多个(例如 2、3、4 个) 特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域。一些具体实施方案中，所述 IL-36R/IL-23 结合蛋白中有 2 个特异性结合 IL-36R 的第一抗原结合结构域，并且有 2 个特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域。

一些实施方案中，所述 IL-36R/IL-23 结合蛋白中，特异性结合 IL-36R 的第一抗原结合结构域与特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域的价数比在 6:1 至 1:3(例如 4：1 至 1：2)之间，例如为 1：1，1：2，2：1，1：3，3：1。

一些实施方案中，所述 IL-36R/IL-23 结合蛋白中，特异性结合 IL-36R 的第一抗原结合结构域位于特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域的 N 端和/或 C 端。

一些实施方案中，所述 IL-36R/IL-23 结合蛋白还包含人免疫球蛋白 Fc 区。例如，所述 Fc 区是人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的 Fc 区。

一些具体实施方案中，所述 Fc 区可以使所述结合蛋白形成二聚体分子。

一些具体实施方案中，所述 Fc 区包含延长体内半衰期的突变，所述半衰期取决于 FcRn 结合亲合力。半衰期的延长可以允许减少给予患者的药物的量，和/或降

低给药频率。例如，所述 Fc 区具有 M252Y、S254T 和/或 T256E 突变

一些具体实施方案中，所述 Fc 区可以是效应器功能降低的 Fc 区，例如，所述 Fc 区可以具有突变，效应器功能降低的示例性 IgG Fc 区包括具有以下的取代：N297A 或 N297Q(IgG1)；L234A/L235A(IgG1)；V234A/G237A(IgG2)；L235A/G237A/E318A(IgG4)；H268Q/V309L/A330S/A331S(IgG2)；C220S/C226S/C229S/P238S(IgG1)；C226S/C229S/E233P/L234V/L235A(IgG1)；L234F/L235E/P331S(IgG1)；或 S267E/L328F(IgG1)。

一些实施方案中，所述 Fc 区是稳定性增高的 Fc 区，例如，具有 S228P 突变的人 IgG4 的 Fc 区。

一些实施方案中，所述 Fc 区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:11、48、76 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性。

一些实施方案中，所述 IL-36R/IL-23 结合蛋白中的 Fc 区包含能够彼此缔合的第一亚基 Fc1 与第二亚基 Fc2。

一些实施方案中，Fc1 和 Fc2 中包含氨基酸突变，使得与 Fc1 相比，Fc1 优先与 Fc2 配对或优先形成异源二聚体。一些实施方案中，所述突变位于 Fc1 和 Fc2 的 CH3 中。一些实施方案中，Fc1 和 Fc2 中的氨基酸突变产生比不含该突变的野生型更大的静电互补性。一些实施方案中，Fc1 和 Fc2 中的氨基酸突变产生比不含该突变的野生型更大的空间互补性。

一些实施方案中，在 Fc1 和 Fc2 中，例如在 CH3/CH3 界面内，用一个或多个具有更大侧链体积的氨基酸残基突变 Fc1 的 CH3 域中的一个或多个氨基酸残基，从而在 Fc1 的 CH3 域表面产生凸起(或杵，Knob)，Fc2 的 CH3 域中与 Fc1 的 CH3 域相互作用的一个或多个、优选两个或三个氨基酸残基，用具有更小侧链体积的氨基酸残基突变，从而在与 Fc1 的 CH3 域相互作用的 Fc2 的 CH3 域表面产生凹陷(或臼，Hole)。一些实施方案中，具有更大侧链体积的输入残基是苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、精氨酸(R)或色氨酸(W)。一些实施方案中，具有更小侧链体积的输入残基是丝氨酸(S)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)或苏氨酸(T)。

一些具体实施方案中，所述 Fc1 中包含选自 T366S、L368A 和 Y407V 中的至少一个或至少两个氨基酸突变(臼突变修饰)，所述 Fc2 中包含 T366W(杵突变修饰)；或者所述 Fc1 中包含 T366W(杵突变修饰)，所述 Fc2 中包含选自 T366S、L368A 和 Y407V 中的至少一个或至少两个氨基酸突变(臼突变修饰)。

一些具体实施方案中，Fc1 和 Fc2 中，例如 CH3 中可以包含天然非半胱氨酸至半胱氨酸的突变，例如在 Fc1 中包含 S354C，Fc2 中包含 Y349C；或 Fc1 中包含 Y349C，Fc2 中包含 S354C。

一些具体实施方案中，Fc1 和 Fc2 中，例如在 Fc1 CH3/Fc2 CH3 界面内，包含如下的氨基酸突变或其组合：T366Y/Y407T；T366W/Y407A；T366Y/Y407T；T394W/F405A；T366Y/F405AT394W/Y407T；T366W/F405WT394S/Y407A；F405W/T394S；D399C/K392C；T366W/T366S/L368A/Y407V；T366W/D399C/T366S/L368A/K392C/Y407V；T366W/K392C/T366S/D399C/L368A/Y407V；

S354C/T366W/Y349C/T366S/L368A/Y407V ；
Y349C/T366W/S354C/T366S/L368A/Y407V ；
E356C/T366W/Y349C/T366S/L368A/Y407V ；
Y349C/T366W/E356C/T366S/L368A/Y407V ；
E357C/T366W/Y349C/T366S/L368A/Y407V ；和
Y349C/T366W/E357C/T366S/L368A/Y407V。

一些具体实施方案中，Fc1 和 Fc2 中还包含使得 Fc1 和 Fc2(例如 CH3 和 CH3)之间形成静电相互作用界面的氨基酸突变。形成静电相互作用界面的氨基酸突变例如选自以下：K370E/D399K/K439D/D356K/E357K/K409D；K409D/D399K；K409E/D399K；K409E/D399R；K409D/D399R；D339K/E356K；D399K/E356K/K409D/K392D；D399K/E356K/K409D/K439D；D399K/E357K/K409D/K370D；D399K/E356K/E357K/K409D/K392D/K370D；D399K/E357K/K409D/K392D；K392D/K409D/D399K；和 K409D/K360D/D399K。

一些实施方案中，Fc1 和/或 Fc2 中包含来自不同抗体亚型的结构域，例如来自不同抗体亚型 CH3。

此外，本公开援引 WO96/27011、WO98/050431、EP1870459、WO2007/110205、WO2007/147901、WO2009/089004、WO2010/129304、WO2011/90754、WO2011/143545、WO2012058768、WO2013157954、WO2013096291 中修饰 Fc 区的 CH3 区以加强异二聚化的方案。

一些实施方案中，所述 IL-36R/IL-23 结合蛋白中，所述特异性结合 IL-36R 的第一抗原结合结构域、特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域直接或通过连接子连接。一些实施方案中，所述特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域与 Fc 区直接或通过连接子连接。

一些具体实施方案中，所述连接子包括但不限于如$(G_mS_n)_h$ 或(GGNGT)$_h$ 或(YGNGT)$_h$ 或(EPKSS)$_h$ 所示的氨基酸序列，其中 m，n 各自独立地选自 1-8 的整数(例如，1、2、3、4、5、6、7 或 8)，h 独立地选自 1-20 的整数(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20)。一些具体实施方案中，所述连接子可以是长 1-20 个或更多个氨基酸、无二级以上结构的非功能性氨基酸序列。一些具体实施方案中，所述连接子是柔性连接子。一些具体实施方案中，所述连接子选自 G_4S、GS、GAP、$(G_4S)_2$、$(G_4S)_3$、$(G_4S)_4$、$(G_4S)_5$、ASGS，例如为$(G_4S)_2$、$(G_4S)_3$。

一些具体实施方案中，所述 IL-36R/IL-23 结合蛋白包含第一多肽链和第二多肽链，所述第一、第二多肽链从 N 端到 C 端如下：

(1)第一多肽链：[特异性结合 IL-36R 的第一抗原结合结构域]-[连接子 1]a-[特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域的 VH]-CH1-Fc 区；第二多肽链：[特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域的 VL]-CL；

(2)第一多肽链：[特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域的 VH]-CH1-Fc 区；第二多肽链：[特异性结合 IL-36R 的第一抗原结合结构域]-[连接子 1]a-[特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域的 VL]-CL；

(3)第一多肽链：[特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域的 VH]-CH1-Fc 区-[连接子 1]a-[特异性结合 IL-36R 的第一抗原结合结构域]；第二多肽链：[特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域的 VL]-CL；

(4)第一多肽链：[特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域的 VH]-CH1-Fc 区；第二多肽链：[特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域的 VL]-[连接子 1]a-CL[特异性结合 IL-36R 的第一抗原结合结构域]；

(5)第一多肽链：[特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域的 VH]-CH1-Fc 区-[连接子 1]a-[特异性结合 IL-36R 的第一抗原结合结构域]；第二多肽链：[特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域的 VL]-CL-[连接子 2]b-[特异性结合 IL-36R 的第一抗原结合结构域]

(6)第一多肽链：[特异性结合 IL-36R 的第一抗原结合结构域]-[连接子 1]a-[特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域的 VH]-CH1-Fc 区；第二多肽链：[特异性结合 IL-36R 的第一抗原结合结构域]-[连接子 2]b-[特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域的 VL]-CL

其中，-表示肽键，连接子为能够实现连接功能的多肽，连接子 1、连接子 2、可以相同，也可以不同；a、b 可以独立的选自 1 或 0，例如 a、b 均为 1。所述连接子例如选自 G_4S、GS、GAP、$(G_4S)_2$、$(G_4S)_3$、$(G_4S)_4$、$(G_4S)_5$、ASGS，例如为 $(G_4S)_2$、$(G_4S)_3$。

一些实施方案中，提供 IL-36R/IL-23 结合蛋白，其包含第一和第二多肽链。一些具体实施方案中，所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:68、70、71、74、75 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性，所述第二多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:69、72、73 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性。

一些实施方案中，提供 IL-36R/IL-23 结合蛋白，其包含第一和第二多肽链：

(1) 第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:68、70 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性，第二多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:69 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性；

(2) 第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:71 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性，第二多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:72、73 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性；

(3) 第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:74 或 75 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性，第二多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:69 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性。

一些实施方案中，本公开的 IL-36R/IL-23 结合蛋白，具有选自以下至少一项的活性：

(a) 以≤10^{-7} 的 K_D 值与人 IL-36R 或其表位结合；

(b) 以≤10^{-7} 的 K_D 值与人 IL-23 p19 亚基或其表位结合；

(c) 具有阻断 IL-23/IL-23R 结合活性；优选地，阻断人 IL-23/IL-23R 结合的 IC50 值小于 0.6 nM(例如，小于 0.6 nM、小于 0.5 nM、小于 0.4 nM、小于 0.3 nM

或更小)，所述 IC_{50} 值通过 ELISA 方法检测；在一些实施方案中，所述 IC_{50} 值通过本公开实施例 5 方法检测；

(d)具有抑制 IL-17 分泌活性；优选地，以小于 0.03nM(例如，小于 0.03 nM、小于 0.02 nM、小于 0.01 nM 或更小)的 IC_{50} 值抑制 IL-17 分泌；在一些实施方案中，所述 IC_{50} 值通过本公开实施例 5 方法检测；

(e) 具有抑制 BaF3-IL-23R 细胞增殖活性；优选地，以小于 0.5 nM(例如，小于 0.5 nM、小于 0.4 nM、小于 0.3nM、小于 0.2nM、小于 0.1nM 或更小)的 IC_{50} 值抑制 BaF3-IL-23R 细胞增殖；在一些实施方案中，所述 IC_{50} 值通过实施例 9 方法检测；

(f) 具有抑制 STAT 通路活性；优选地，以小于 10 nM(例如，小于 9nM、小于 8nM 或更小)的 IC_{50} 值抑制 STAT3 通路；在一些实施方案中，所述 IC_{50} 值通过实施例 9 方法检测；

(g) 具有抑制人 IL-36 刺激因子活性；优选地，以小于 0.5 nM(例如，小于 0.5 nM、小于 0.4 nM、小于 0.3nM、小于 0.2nM、小于 0.1nM 或更小)的 IC_{50} 值抑制 IL-8 的分泌；在一些实施方案中，所述 IC_{50} 值通过实施例 8 方法检测；

(h) 能够缓解或治疗由过量 IL-36 和/或 IL-23 表达所导致的炎症性疾病，例如银屑病；优选地，在小鼠动物模型中，能抑制人 IL-36 和人 IL-23 诱导的小鼠耳肿胀，抑制比率例如至少约 10%，例如至少约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%或以上；在一些实施方案中，所述抑制比率通过对 IL-36α、IL-23、IL-17F、S100A8、S100A9、KRT16 的检测实现，例如实施例 10 中的检测方法。

一些实施方案中，本公开的 IL-36R/IL-23 结合蛋白涵盖变体，所述变体与前述(1)-(3)任一组合中的第一、第二多肽链相比有一个或多个(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个)氨基酸突变；所述氨基酸突变可以是保守的替换、取代或修饰，和/或不影响功能的缺失、添加。

一些实施方案中，提供 IL-36R/IL-23 结合蛋白，其与前述本公开的 IL-36R/IL-23 结合蛋白结合或竞争结合 IL-23 和/或 IL-36R，或，结合或竞争结合 IL-23 和/或 IL-36R 的相同表位。

一些实施方案中，提供 IL-36R/IL-23 结合蛋白，其阻断前述本公开的 IL-36R/IL-23 结合蛋白结合 IL-23 和/或 IL-36R。

一些实施方案中，提供蛋白或分子，其包含前述本公开任意的 IL-36R/IL-23 结合蛋白。例如，所述蛋白或分子为缀合物，所述缀合物例如可包含任意可检测标记。

IL-36R 结合蛋白与 IL-23 结合蛋白的组合物或复合物

本公开提供组合物或复合物，其包含 IL-36R 结合蛋白和 IL-23 结合蛋白，例如包含抗 IL-36R 抗体或其抗原结合片段和抗 IL-23 抗体或其抗原结合片段。

一些实施方案中，所述 IL-36R 结合蛋白为前述本公开的 IL-36R 结合蛋白，所述 IL-23 结合蛋白包含 VH 和 VL，所述 VH 包含 SEQ ID NO:40 中所示的氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO:41 所示的氨基酸

序列中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；或，所述 VH 包含 SEQ ID NO:52-57 任一所示的氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO:58-61 任一所示的氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；其中，所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的，例如是根据 Kabat 编号系统定义的。

一些具体实施方案中，所述 IL-23 结合蛋白中，

VH 包含 SEQ ID NO:42-44 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，VL 包含 SEQ ID NO:45-47 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

VH 包含 SEQ ID NO:50、43、44 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，VL 包含 SEQ ID NO:45-47 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

VH 包含 SEQ ID NO:51、43、44 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，VL 包含 SEQ ID NO:45-47 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

一些具体实施方案中，所述 IL-23 结合蛋白中，

VH 包含 SEQ ID NO:40 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列，VL 包含 SEQ ID NO:41 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列；

VH 包含 SEQ ID NO: 52-57 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列，VL 包含 SEQ ID NO: 58-61 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列。

示例性的，提供组合物或复合物，其包含 IL-36R 结合蛋白和 IL-23 结合蛋白，所述 IL-36R 结合蛋白包含或为本公开实施例 1-3 中的 VHH 213 或其人源化及回复突变序列(例如 VHH213_Hu07)，或为 VHH162 或其人源化及回复突变序列(例如 VHH162_Hu11)；所述 IL-23 结合蛋白包含或为本公开实施例 4 中的抗 IL-23 抗体(例如 Hu29-19)。

多核苷酸和载体

本公开提供编码本公开的 IL-36R 结合蛋白、IL-36R/IL-23 结合蛋白的多核苷酸。本公开的核酸可为 RNA、DNA 或 cDNA。根据本公开的一些实施方案，本公开的核酸是基本上分离的核酸。

本公开的核酸也可呈载体形式，可存在于载体中和/或可为载体的一部分，该载体例如质粒、粘端质粒、YAC 或病毒载体。载体可尤其为表达载体，即可提供 IL-36R 结合蛋白、IL-36R/IL-23 结合蛋白体外和/或体内(即在适合宿主细胞、宿主有机体和/或表达系统中)表达的载体。该表达载体通常包含至少一种本公开的核酸，其可操作地连接至一个或多个适合的表达调控元件(例如启动子、增强子、终止子等)。针对在特定宿主中的表达对所述元件及其序列进行选择为本领域技术人员的常识。对本公开的 IL-36R 结合蛋白、IL-36R/IL-23 结合蛋白表达有用或必需的调控元件及其他元件例如为启动子、增强子、终止子、整合因子、选择标记物、前导序列、报告基因。

本公开的核酸可基于本公开的多肽的氨基酸序列的信息通过已知的方式(例如

通过自动 DNA 合成和/或重组 DNA 技术)制备或获得，和/或可从适合的天然来源加以分离。

宿主细胞

本公开提供表达或能够表达一种或多种本公开的 IL-36R 结合蛋白、IL-36R/IL-23 结合蛋白和/或含有本公开的多核苷酸或载体的重组宿主细胞。一些实施方案中，宿主细胞为细菌细胞、真菌细胞或哺乳动物细胞。

细菌细胞例如包括革兰氏阴性细菌菌株(例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株、变形杆菌属(*Proteus*)菌株及假单胞菌属(*Pseudomonas*)菌株)及革兰氏阳性细菌菌株(例如芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株、链霉菌属(*Streptomyces*)菌株、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)菌株及乳球菌属(*Lactococcus*)菌株)的细胞。

真菌细胞例如包括木霉属(*Trichoderma*)、脉孢菌属(*Neurospora*)及曲菌属(*Aspergillus*)的物种的细胞；或者包括酵母属(*Saccharomyces*)(例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)(例如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*))、毕赤酵母属(*Pichia*)(例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)及嗜甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*))及汉森酵母属(*Hansenula*)的物种的细胞。

哺乳动物细胞例如包括例如 HEK293 细胞、CHO 细胞、BHK 细胞、HeLa 细胞、COS 细胞等。

然而，本公开也可使用两栖类细胞、昆虫细胞、植物细胞及本领域中用于表达异源蛋白的任何其他细胞。

制备方法

本公开提供一种用于制备 IL-36R 结合蛋白、IL-36R/IL-23 结合蛋白的方法，包括：在如前所述的宿主细胞中表达所述目的蛋白，并自该宿主细胞中分离目的蛋白。可选地，还可以包含纯化步骤，例如，用含调整过的缓冲液的 A 或 G Sepharose FF 柱进行纯化，洗去非特异性结合的组分，再用 PH 梯度法洗脱结合的抗体，用 SDS-PAGE 检测，收集。可选地，用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻，如 -70℃，或者冻干。

生产和纯化抗体的方法在现有技术中熟知和能找到，如冷泉港的抗体实验技术指南(5-8 章和 15 章)。

本公开工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如，编码重链和轻链的 cDNA 序列，可以克隆并重组至表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染 CHO 细胞。哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化，特别是在 Fc 区的高度保守 N 端。通过表达与人源抗原特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化、收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛，离子交换。

组合物

本公开提供组合物，包含前述本公开的 IL-36R 结合蛋白、IL-36R/IL-23 结合蛋白。例如，提供药物组合物，其含有对治疗、缓解或预防疾病有效量的前述 IL-36R 结合蛋白、IL-36R/IL-23 结合蛋白，和至少一种可药用的赋形剂、稀释或载体。

在一些具体实施方式中，所述药物组合物单位计量中可含有 0.01 至 99 重量%的 IL-36R 结合蛋白、IL-36R/IL-23 结合蛋白，或药物组合物单位剂量中含 IL-36R 结合蛋白、IL-36R/IL-23 结合蛋白的量为 0.1-2000mg，在一些具体实施方式中为 1-1000mg。

一些实施方案中，提供制品或产品，包含前述 IL-36R 结合蛋白、IL-36R/IL-23 结合蛋白。可选地，制品包含容器和标签。容器例如瓶、注射器和试管。容器容纳有效于治疗病症的组合物。容器上或与容器相连的标签表明所述组合物用于治疗所选病症。

一些实施方案中，前述疾病为炎性疾病、自体免疫疾病。

治疗方法和制药用途

本公开提供前述 IL-36R 结合蛋白、L-36R/IL-23 结合蛋白、多核苷酸、组合物(包括药物组合物)用于治疗、缓解、预防、诊断疾病或病症的方法。

一些实施方案中，提供改善、缓解、治疗或预防疾病的方法，包括向受试者施用改善、缓解、治疗或预防有效量的前述 IL-36R 结合蛋白、IL-36R/IL-23 结合蛋白、多核苷酸、组合物(包括药物组合物)。

一些实施方案中，提供本公开的 IL-36R 结合蛋白、IL-36R/IL-23 结合蛋白多核苷酸、组合物(包括药物组合物)用于制备改善、缓解、治疗或预防疾病的药物的用途。

一些实施方案中，前述疾病为与 IL-36 和/或 IL-23 超量表达相关的疾病或病症。

一些实施方案中，前述疾病为与 IL-36R 介导的疾病或病症。

一些实施方案中，前述疾病为炎性疾病、自体免疫疾病，例如银屑病。

检测

本公开提供 IL-36R 结合蛋白、IL-36R/IL-23 结合蛋白、多核苷酸、组合物的检测用途。本公开还提供用于体内或体外检测 IL-36R、IL-23 的方法、系统或装置，其包括用本公开的前述结合蛋白、多核苷酸、组合物处理样品。

一些实施方案中，体外检测方法、系统或装置可能例如包括：

(1) 使样品与本公开的 IL-36R 结合蛋白、IL-36R/IL-23 结合蛋白、多核苷酸、组合物接触；

(2) 检测在前述结合蛋白、多核苷酸和样品之间形成的复合物；和/或

(3) 使参比样品(例如，对照样品)与结合蛋白、核酸接触；和

(4) 通过与参比样品比较，确定复合物形成的程度。如与对照样品相比，样品

中复合物形成的变化(例如，统计学上的显著变化)表示样品中存在 IL-36R、IL-23。

一些实施方案中，还提供试剂盒，所述试剂盒包含前述 IL-36R 结合蛋白、IL-36R/IL-23 结合蛋白、多核苷酸，还可以包含诊断使用说明。试剂盒还可以含有至少一种额外的试剂，如标记物或额外的诊断剂。对于体内使用，IL-36R 结合蛋白、IL-36R/IL-23 结合蛋白可以配制为药物组合物。

术语定义

为了更容易理解本公开，以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本公开中另有明确定义，本公开使用的所有其它技术和科学术语都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem，243，p3558(1968)中所述。

“IL-23”(也称 IL23)主要由活化的树突状细胞、巨噬细胞及单核细胞等产生，是 IL-12 异源二聚体细胞因子家族中的一员，由 p19(也称 IL-23 p19 亚基)和 p40(也称 IL-23 p40 亚基)两个亚基组成，其中 p40 亚基是与 IL-12 共同含有的亚基(J Immunol. 2018 Sep 15;201(6):1605-1613.)。

“IL-36R 结合蛋白”涵盖任何能够特异性结合 IL-36R 的蛋白或包含所述蛋白的任何分子，包括但不限于针对 IL-36R 的如本公开定义的抗体、其抗原结合片段或其缀合物、融合蛋白。一些实施方案中，“IL-36R 结合蛋白”可以包含至少一个(例如 1、2、3、4、5、6 或更多个)本公开实施例中特异性结合 IL-36R 的单域抗体。一些实施方案中，本公开的“IL-36R 结合蛋白”除包含 IL-36R 的免疫球蛋白单一可变结构域外，也可包含连接子和/或具有效应器功能的部分，例如半衰期延长部分(如结合血清白蛋白的免疫球蛋白单一可变结构域)和/或融合配偶体(如血清白蛋白)和/或缀合的聚合物(如 PEG)和/或 Fc 区。一些实施方案中，“IL-36R/IL-23 结合蛋白”涵盖本公开实施例中的抗 IL-36R 和 IL-23 的双特异性抗体。

“IL-36R/IL-23 结合蛋白”涵盖任何能够特异性结合 IL-23 和 IL-36R 的蛋白或包含所述蛋白的任何分子，包括但不限于抗体、多肽、抗体和多肽的融合蛋白或其缀合物、融合蛋白。一些实施方案中，“IL-36R/IL-23 结合蛋白”涵盖本公开实施例中的抗 IL-36R 和 IL-23 的双特异性抗体。

“抗体”涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体，多克隆抗体；单特异性抗体，多特异性抗体(例如双特异性抗体)，全长抗体和抗体片段(或抗原结合片段，或抗原结合部分)，只要它们展现出期望的抗原结合活性。抗体可以指免疫球蛋白，是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将免疫球蛋白分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相应的重链分别为 μ 链、δ 链、γ 链、α 链和 ε 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中第每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。抗体重链和轻链靠近 N 端的约 110 个

氨基酸的序列变化很大，为可变区(V 区)；靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定，为恒定区(C 区)。可变区包括 3 个高变区(HVR)和 4 个序列相对保守的框架区(FR)。3 个高变区决定抗体的特异性，又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)由 3 个 CDR 区 4 个 FR 区组成，从氨基端到羧基端依次排列的顺序为：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1，LCDR2，和 LCDR3；重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3。

本公开的抗体可以是多克隆的、单克隆的、异种的、同种异体的、同基因的或其经过修饰的形式，其中单克隆抗体尤其适用于多个实施例中。一般来说，本公开的抗体是重组抗体。如本文所用的“重组”泛指例如细胞或核酸、蛋白质或载体等产品，表示所述细胞、核酸、蛋白质或载体已经通过引入异源核酸或蛋白质或改变天然核酸或蛋白质而加以修饰，或所述细胞来源于如此修饰的细胞。例如，重组细胞表达天然(非重组)细胞形式内不存在的基因或表达原本异常表达、低表达或完全不表达的天然基因。

“抗原结合片段”涵盖单链抗体(即全长重链和轻链)；Fab、修饰的 Fab、Fab’、修饰的 Fab’、F(ab’)2、Fv、Fab-Fv、Fab-dsFv、单结构域抗体(例如 VH 或 VL 或 VHH)、scFv、二价或三价或四价抗体、Bis-scFv、diabody、tribody、triabody、tetrabody 和上述任意一种的表位结合片段(参见例如 Holliger and Hudson，2005，Nature Biotech.23(9)：1126-1136；Adair and Lawson，2005，Drug Design Reviews-Online 2(3)，209-217)。产生和制备这些抗原结合片段的方法在本领域是公知的(参见例如 Verma 等人，1998，Journal ofImmunological Methods，216，165-181)。

对于 CDR 的确定或定义，能够通过分辨抗体的结构和/或分辨抗体-配体复合物的结构来完成 CDR 的确定性描绘和包含抗体的结合位点的残基的鉴定。这可通过本领域技术人员已知的各种技术中的任一种，例如 X 射线晶体学来实现。多种分析方法可用于鉴定 CDR，包括但不限于 Kabat 编号系统、Chothia 编号系统、AbM 编号系统、IMGT 编号系统、接触定义、构象定义。Kabat 编号系统是用于编号抗体中残基的标准并且通常用于鉴定 CDR 区域(参见例如 Johnson&Wu，2000，Nucleic Acids Res.，28：214-8)。Chothia 编号系统与 Kabat 编号系统类似，但 Chothia 编号系统考虑了某些结构环区域的位置。(参见例如 Chothia 等，1986，J.Mol.Biol.，196：901-17；Chothia 等人，1989，Nature，342：877-83)。AbM 编号系统使用建模抗体结构的由 Oxford Molecular Group 生产的计算机程序集成套件(参见例如 Martin 等，1989，ProcNatl Acad Sci(USA)，86：9268-9272；”AbMTM，A Computer Program for ModelingVariable Regions of Antibodies，”Oxford，UK；Oxford Molecular，Ltd)。AbM 编号系统使用知识数据库和从头开始方法的组合，从基本序列建模抗体的三级结构(参见 Samudrala 等，1999，在 PROTEINS，Structure，Function and Genetics Suppl.，3：194-198 中的”Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined HierarchicalApproach”描述的那些)。接触定义基于可用复杂晶体结构的分析(参见例如 MacCallum 等，1996，J.Mol.Biol.，5：732-45)。构象定义中，CDR 的位置可鉴定为对抗原结合做出焓贡献的残基(参见例如 Makabe 等，2008，Journal ofBiological Chemistry，283：1156-1166)。另外其它的 CDR 边界定义可能不严格遵

循上述方法之一，但仍然与 Kabat CDR 的至少一部分重叠，尽管根据特定残基或残基组不显著影响抗原结合的预测或实验结果，它们可缩短或延长。如本公开使用的，CDR 可指通过本领域已知的任何方法(包括方法的组合)定义的 CDR。各种编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的。

多肽或蛋白的“结构域”是指折叠蛋白结构，其能够独立于蛋白的其余部分维持其三级结构。一般而言，结构域负责蛋白的单个功能性质，且在许多情况下可添加、移除或转移至其它蛋白而不损失蛋白的其余部分和/或结构域的功能。

“免疫球蛋白结构域”是指抗体链(例如常规四肽链结构抗体的链或重链抗体的链)的球形区域，或是指基本上由这类球形区域组成的多肽。免疫球蛋白结构域的特征在于其维持抗体分子的免疫球蛋白折叠特征，其由排列在两个 β 折叠中任选由保守二硫键稳定的约 7 个反平行 β 折叠股的 2 层夹层组成。

“免疫球蛋白可变结构域”是指基本上由本领域及下文中分别称为“框架区 1”或“FR1”、“框架区 2”或“FR2”、“框架区 3”或“FR3”、及“框架区 4”或“FR4”的四个“框架区”组成的免疫球蛋白结构域，其中所述框架区由本领域及下文中分别称为“互补决定区 1”或“CDR1”、“互补决定区 2”或“CDR2”、及“互补决定区 3”或“CDR3”的三个“互补决定区”或“CDR”间隔开。因此，免疫球蛋白可变结构域的一般结构或序列可如下表示为：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。免疫球蛋白可变结构域因具有抗原结合位点而赋予其对抗原的特异性。

“抗体框架(FR)”，是指可变结构域的一部分，其用作该可变结构域的抗原结合环(CDR)的支架。

“免疫球蛋白单一可变结构域”通常用于指可以在不与其他可变结构域相互作用的情况下(例如在没有如常规四链单克隆抗体的 VH 和 VL 结构域之间所需要的 VH/VL 相互作用的情况下)，形成功能性抗原结合位点的免疫球蛋白可变结构域(其可以是重链或轻链结构域，包括 VH、VHH 或 VL 结构域)。“免疫球蛋白单一可变结构域”的实例包括纳米抗体(包括 VHH、人源化 VHH 和/或骆驼化 VH，例如骆驼化人 VH)、IgNAR、结构域、作为 VH 结构域或衍生自 VH 结构域的(单结构域)抗体(诸如 dAbs™)和作为 VL 结构域或衍生自 VL 结构域的(单结构域)抗体(诸如 dAbs™)。基于和/或衍生自重链可变结构域(诸如 VH 或 VHH 结构域)的免疫球蛋白单一可变结构域通常是优选的。免疫球蛋白单一可变结构域的一个具体实例为如下文定义的“VHH 结构域”(或简称为“VHH”)。

“VHH”亦称为重链单域抗体、VHH、V_HH 结构域、VHH 抗体片段、VHH 抗体、纳米抗体，是称为“重链抗体”(即“缺乏轻链的抗体”)的抗原结合免疫球蛋白的可变结构域(Hamers-Casterman C，Atarhouch T，Muyldermans S，Robinson G，Hamers C，Songa EB，Bendahman N，Hamers R.:”Naturally occurring antibodies devoid of light chains”；Nature363，446-448(1993))。使用“VHH”以将所述可变结构域与存在于常规四肽链结构抗体中的重链可变结构域(其在本公开中称为“VH 结构域”或 VH)以及轻链可变结构域(其在本公开中称为“VL 结构域”或 VL)进行区分。VHH 结构域特异性结合表位而无需其他抗原结合结构域(此与常规四肽链结构抗体中的 VH 或 VL 结构域相反，在该情况下表位由 VL 结构域与 VH 结构域一起识

别)。VHH 结构域为由单一免疫球蛋白结构域形成的小型稳定及高效的抗原识别单元。术语“重链单域抗体”、“VHH 结构域”、“VHH”、“V_HH 结构域”、“VHH 抗体片段”、“VHH 抗体”、“Nanobody®”以及“Nanobody®结构域”(“Nanobody”为 Ablynx N.V.公司，Ghent，Belgium 的商标)可互换使用。VHH 包括但不限于经骆驼科动物产生的天然抗体，也可以是骆驼科动物产生的抗体后再经人源化的，也可以是经噬菌体体展示技术筛选获得的。VHH 中的氨基酸残基的总数将通常在 110 至 120 范围内，常常介于 112 与 115 之间。然而应注意较小及较长序列也可适于本公开所述的目的。获得结合特定抗原或表位的 VHH 的方法，先前已公开于以下文献中：R.van der Linden et al.，Journal of Immunological Methods，240(2000)185-195；Li et al.，J Biol Chem.，287(2012)13713-13721；Deffar et al.，African Journal of Biotechnology Vol.8(12)，pp.2645-2652，17June，2009 和 WO94/04678。

如本领域中对于 VH 结构域及 VHH 结构域所公知的，各 CDR 中的氨基酸残基的总数可能不同，且可能不对应于由 Kabat 编号指示的氨基酸残基的总数(即根据 Kabat 编号的一个或多个位置可能在实际序列中未被占据，或实际序列可能含有多于 Kabat 编号所允许数目的氨基酸残基)。这意味着一般而言，根据 Kabat 的编号可能对应或可能不对应于实际序列中氨基酸残基的实际编号。其它的编号系统或编码规则包括 Chothia、IMGT、AbM。

“人源化抗体(humanized antibody)”，也称为 CDR 移植抗体(CDR-grafted antibody)，是指将非人 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量非人蛋白成分，从而诱导的强烈的免疫应答反应。为避免在免疫原性下降的同时引起活性的下降，可对所述的全人抗体可变区可进行最少反向突变，以保持活性。“人源化”的例子包括可将源自骆驼科的 VHH 结构域通过以人常规四肽链结构抗体 VH 结构域中相应位置处存在的一个或多个氨基酸残基置换原始 VHH 序列的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基而“人源化”(本公开中亦称为“序列优化”，除人源化外，“序列优化”也可涵盖通过提供 VHH 改良性质的一个或多个突变对序列进行的其它修饰，例如移除潜在的翻译后修饰位点)。人源化 VHH 结构域可含有一个或多个完全人框架区序列，且在一些具体实施方案中，可含 IGHV3 的人框架区序列。人源化方法例如蛋白表面氨基酸人源化(resurfacing)及抗体人源化通用框架移植法(CDR grafting to a universal framework)，即将 CDR“移植”于其它“支架”(包括但不限于人支架或非免疫球蛋白支架)上。适于所述 CDR 移植的支架及技术在本领域中是已知的。如人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在 VBase 人种系序列数据库，以及在 Kabat，E.A.等人，1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版中找到。本公开的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对 CDR 进行亲合力成熟后的人源化抗体。此外，为避免免疫原性下降的同时，引起的活性下降，可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变，以保持活性。

“亲和力成熟的”抗体指与不拥有此类改变的亲本抗体相比，在一个或多个高变区(HVR)中具有一处或多处改变的抗体，此类改变导致该抗体对抗原的亲和力改善。例如，“亲合力成熟”的 IL-36R 结合蛋白或抗 IL-36R 抗体，在一个或多个 CDR

中具有一个或多个变化，所述变化导致对抗原的亲合力相比于其亲本抗体有所增加。亲合力成熟的抗体可通过例如由以下所述的本领域中已知的方法来制备：Marks 等人，1992，Biotechnology 10：779-783 或 Barbas 等人，1994，Proc.Nat.Acad.Sci，USA 91：3809-3813.；Shier 等人，1995，Gene 169：147-155；Yelton 等人，1995，Immunol.155：1994-2004；Jackson 等人，1995，J.Immunol.154(7)：3310-9；及 Hawkins 等人，1992，J.MoI.Biol.226(3)：889896；KS Johnson 及 RE Hawkins，"Affinity maturation of antibodies using phage display"，Oxford University Press 1996。

通常，本公开的 IL-36R 结合蛋白、IL-36R/IL-23 结合蛋白将以如于 Biacore 或 KinExA 或 Fortibio 测定中测量的优选 10^{-7} 至 10^{-10} 摩尔/升(M)、更优选 10^{-8} 至 10^{-10} 摩尔/升、甚至更优选 10^{-9} 至 10^{-10} 或更低的解离常数(K_D)，和/或以至少 10^{-7}M、优选至少 10^{-8}M、更优选至少 10^{-9}M，更优选至少 10^{-10}M 的缔合常数(KA)结合所要结合的抗原或靶蛋白(即 IL-36R、IL-23、CD16A)。任何大于 10^{-4}M 的 K_D 值一般都视为指示非特异性结合。抗原结合蛋白对抗原或表位的特异性结合可以以已知的任何适合方式来测定，包括例如本公开所述的表面等离子体共振术(SPR)测定、Scatchard 测定和/或竞争性结合测定(例如放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定(EIA)及夹心式竞争性测定)。

"结合亲和力"或"亲和力"在本公开中用作两个分子(例如抗体或其部分与抗原)之间的非共价相互作用的强度量度。两个分子之间的结合亲和力可通过确定解离常数(K_D)来量化。可通过使用例如表面等离子共振(SPR)方法(Biacore)测量复合物形成和解离的动力学来确定 K_D。对应于单价复合物的结合和解离的速率常数分别被称为结合速率常数 ka(或 kon)和解离速率常数 kd(或 koff)。K_D 通过方程 K_D ＝kd/ka 与 ka 和 kd 有关。解离常数的值可通过众所周知的方法直接确定，并且甚至可通过例如 Caceci 等人(1984，Byte 9：340-362)中所述的那些方法对于复杂混合物进行计算。例如，可使用双重过滤硝化纤维素滤器结合测定如 Wong&Lohman(1993，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90：5428-5432)中公开的那种来确定 K_D。评估抗体针对靶抗原的结合能力的其它标准测定是本领域已知的，包括例如 ELISA、蛋白质印迹、RIA 和流式细胞术分析、以及本公开其它地方例举的其它测定。抗体的结合动力学和结合亲和力也可通过本领域已知的标准测定，例如表面等离子共振(SPR)，例如通过使用 Biacore™ 系统或 KinExA 来评价。可通过比较各个抗体/抗原复合物的 K_D 值来比较与不同分子相互作用相关的结合亲和力，例如，不同抗体对于给定抗原的结合亲和力的比较。类似地，相互作用的特异性可通过确定和比较目的相互作用(例如抗体和抗原之间的特异性相互作用)的 K_D 值与非目的相互作用(例如已知不结合 IL-36R、IL-23 或 CD16A 的对照抗体)的 K_D 值进行评价。

"保守性置换"指置换为具有与原始氨基酸残基相似的特性的另一个氨基酸残基。例如，赖氨酸、精氨酸和组氨酸具有相似的特性，在于它们具有碱性侧链，并且天冬氨酸和谷氨酸具有相似的特性，在于它们具有酸性侧链。此外，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸和色氨酸具有相似的特性，在于它们具有不带电荷极性侧链，并且丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸和甲硫氨酸具有相似的特性，在于它们具有非极性侧链。

另外，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和组氨酸具有相似的特性，在于它们具有芳族侧链。因此，本领域技术人员将显而易见，甚至当置换如上文所述的显示相似特性的组中的氨基酸残基时，它将不显示特性的特定变化。

“同源性”、“同一性”或“序列同一性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同核苷酸或氨基酸单体占据时，例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被相同核苷酸占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数×100%的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源，那么两个序列为 60%同源。一般而言，当比对两个序列而得到最大的同源性百分率时进行比较。

“核酸”或“多核苷酸”在本公开中可互换使用，指的是单链或双链的任何 DNA 分子或 RNA 分子以及在单链的情况下，它的互补序列的分子，优选是双链 DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时，核酸是“有效连接的”。例如，如果启动子或增强子影响编码序列的转录，那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

“宿主细胞”包括各个细胞或细胞培养物，其可为或已是用于掺入多核苷酸插入片段的载体的受体。宿主细胞包括单个宿主细胞的子代，并且由于天然、偶然或有意的突变，子代可不一定与原始亲本细胞完全相同(在形态学或基因组 DNA 互补体中)。宿主细胞包括用本公开的多核苷酸在体内转染和/或转化的细胞。“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，并且所有这类名称都包括其后代。还应当理解的是，由于故意或非有意的突变，所有后代在 DNA 含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。

“抑制”或“阻断”可互换使用，并涵盖部分和完全抑制/阻断这两者。“抑制生长”(例如涉及细胞)旨在包括细胞生长任何可测量的降低。

“给予”、“施用”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触，例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“给予”、“施用”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。当应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

“治疗”意指给予受试者内用或外用治疗剂，例如包含本公开的任一种结合蛋白或其药物组合物作为治疗剂，所述受试者已经患有、疑似患有、倾向于患有一种或多种增殖性疾病或其症状，而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗受试者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，无论是通过诱导这类症状退化还是抑制这类症状发展到任何临床能测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量(也称作“治疗有效量”)可根据多种因素变化，例如受试者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在受试者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何

临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本公开的实施方案(例如治疗方法或制品)在缓解某个受试者中目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验(H 检验)、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定，其在统计学显著数目的受试者中应当减轻目标疾病症状。

“有效量”包含足以改善或预防医学病症的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于受试者的有效量可依据以下因素而变化：如待治疗的病症、受试者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。本公开的受试者可以是动物或人类受试者。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。“和/或”应视为特定揭示两种指定特征或组分中的每一者具有或不具有另一者。因此，诸如本公开中“A 和/或 B”的词组中所用的术语“和/或”包括“A 及 B”、“A 或 B”、“A”（单独）及“B”（单独）。除非上下文另外清楚要求，否则在整个说明书和权利要求书中，应将词语“包含”、“具有”、“包括”等理解为具有包含意义，而不是排他性或穷举性意义；也即，“包括但不仅限于”的意义。在本公开中 Fc 区所包含的突变的上下文中，“/”表示“和”，例如，“L234A/L235A”表示“L234A 和 L235A”，即，Fc 中包含 L234A 和 L235A 突变；本公开 Fc 区的突变的氨基酸位置均是根据 EU 编号系统定义的。

本公开的“受试者”、“患者”意指哺乳动物，尤其灵长类动物，尤其是人。

附图说明

图 1A 和 1B 为抗 IL-36R 单域抗体 VHH162 和 VHH213 及其人源化抗体对 CHO-K1 细胞表面人 IL-36R 的结合活性。

图 2 为 VHH162_Hu09、VHH213_Hu01 之间以及与对照抗体 BI655130、H4H14706P2 竞争结合结果。

图 3A 为咪喹莫特诱导的银屑病动物的红疹严重程度评分的实验结果，图 3B 为咪喹莫特诱导的银屑病动物的皮肤脱屑严重程度评分的实验结果，图 3C 为咪喹莫特诱导的银屑病动物的红疹和皮肤脱屑的综合评分结果。

图 4A 为人 IL-23 诱导的银屑病动物的右耳厚度实验结果，图 4B 为人 IL-23 诱导的银屑病动物的曲线下面积的实验结果(附图中，与阴性对照相比，*** $P<0.001$)，图 4C 为人 IL-23 诱导的银屑病动物的右耳重量的实验结果(附图中，与阴性对照相比，** $P<0.01$，*** $P<0.001$)。

图 5 为本公开抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体结构示意图。

图 6A 为 ELISA 检测双特异性抗体 IL-36R-IL-23-01、IL-36R-IL-23-02 与人 IL-23 结合活性的结果，图 6B 为 FACS 检测双特异性抗体 IL-36R-IL-23-01、IL-36R-IL-23-02 以及抗 IL-36R 单域抗体 VHH162_Hu11、VHH213_Hu07 与细胞表面人 IL-36R 的结合活性的结果。

图 7A 至 7D 为 IL-36R-IL-23-01、IL-36R-IL-23-02 对 IL-36 诱导 A431 分泌 IL-8 的抑制作用结果。

图 8A 和 8B 为 IL-36R-IL-23-01、IL-36R-IL-23-02 对 IL-23 诱导 BaF3-mIL-23R 细胞增殖的抑制作用结果。

图 9 为 IL-36R-IL-23-01、IL-36R-IL-23-02 对 IL-23 诱导 DB-STAT3-Luc2 报告基因体系的抑制作用结果。

图 10A 为人 IL-36 和人 IL-23 诱导人 IL-36R 转基因小鼠耳肿胀模型研究流程图，图 10B 为 IL-36R-IL-23-01、VHH213_Hu07 在人 IL-36 和人 IL-23 诱导小鼠耳肿胀模型中对耳重量的影响结果，图 10C 为 IL-36R-IL-23-01、VHH213_Hu07 在人 IL-36 和人 IL-23 诱导小鼠耳肿胀模型中对下游基因表达的影响结果。

图 11 为 IL-36R-IL-23-01、VHH213_Hu07 在人 IL-36 和人 IL-23 诱导小鼠耳肿胀模型中对下游基因表达的影响结果。

具体实施方式

以下结合实施例用于进一步描述本公开，但这些实施例并非限制着本公开的范围。本公开实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，如冷泉港的抗体技术实验手册，分子克隆手册；或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

实施例 1. 抗 IL-36R 抗体的筛选

1. 免疫抗原、筛选抗原与细胞系构建

使用 C 端带有人 Fc 标签的人 IL-36R 胞外结构域(近岸，CJ62)作为免疫抗原，使用 C 端带有 his tag 和 avi tag 的人 IL-36R 胞外结构域(恺佧蛋白，IL1-HM4L2)、生物素化的人 IL-36R 胞外结构域(恺佧蛋白，IL1-HM4L2B)、或者 C 端带有 his tag 的食蟹猴 IL-36R 胞外结构域(恺佧蛋白，IL1-CM1L2)作为筛选抗原。具体免疫抗原和筛选抗原信息见表 1。

表 1.免疫和筛选用 IL-36R 抗原信息

抗原	生产商及货号	氨基酸起止	登录号
人 IL-36R 蛋白(Fc Tag)	近岸蛋白，CJ62	Asp20-Tyr337	#Q9HB29-1
人 IL-36R 蛋白(His + Avi Tag)	恺佧蛋白，IL1-HM4L2	Asp20-Arg335	
人 IL-36R 蛋白(His + Avi Tag，生物素标记)	恺佧蛋白，IL1-HM4L2B		
猴 IL-36R 蛋白(His Tag)	恺佧蛋白，IL1-CM1L2	Asp20-Arg335	#EHH61702.1

用 FlpIn 系统构建稳定表达人 IL-36R 和猴 IL-36R 全长蛋白的 CHO-K1 细胞系。将 FlpIn™-CHO-K1 细胞(Thermo，R75807)按 2E5 /孔铺入六孔板(培养基：F12+10% FBS+100 μg/mL Zeocin)，过夜培养后，用 Lipo3000(GIBCO，L3000001)转染过表达人 IL-36R 或猴 IL-36R 全长蛋白的质粒与 pOG44(Thermo，V6005)的混

合物。转染 24h 后更换新鲜培养基(培养基：F12+10% FBS)，转染 48h 后消化细胞，并加入 800 μg/mL Hygromycin B(Gibco，10687010)进行抗性筛选。待阴性细胞完全消失后，消化剩余细胞，取部分进行流式鉴定。将阳性率高于 95%的细胞进行扩增冻存，用于后续抗体的结合筛选。

人和猴 IL-36R 序列如下，其中下划线为胞外区域序列，氨基酸起止 Asp20-Arg335。

>人 IL-36R 序列(Q9HB29-1) (SEQ ID NO:1)

MWSLLLCGLSIALPLSVTADGCKDIFMKNEILSASQPFAFNCTFPPITSGEVSVTW
YKNSSKIPVSKIIQSRIHQDETWILFLPMEWGDSGVYQCVIKGRDSCHRIHVNLT
VFEKHWCDTSIGGLPNLSDEYKQILHLGKDDSLTCHLHFPKSCVLGPIKWYKDC
NEIKGERFTVLETRLLVSNVSAEDRGNYACQAILTHSGKQYEVLNGITVSITERA
GYGGSVPKIIYPKNHSIEVQLGTTLIVDCNVTDTKDNTNLRCWRVNNTLVDDYY
DESKRIREGVETHVSFREHNLYTVNITFLEVKMEDYGLPFMCHAGVSTAYIILQL
PAPDFRAYLIGGLIALVAVAVSVVYIYNIFKIDIVLWYRSAFHSTETIVDGKLYDAY
VLYPKPHKESQRHAVDALVLNILPEVLERQCGYKLFIFGRDEFPGQAVANVIDEN
VKLCRRLIVIVVPESLGFGLLKNLSEEQIAVYSALIQDGMKVILIELEKIEDYTVM
PESIQYIKQKHGAIRWHGDFTEQSQCMKTKFWKTVRYHMPPRRCRPFPPVQLL
QHTPCYRTAGPELGSRRKKCTLTTG

>猴 IL-36R(EHH61702.1) (SEQ ID NO:2)

MWSLLLCGLSIALPLSVTADGCNNIFMKNEMLSASQPFAFNCTFPPITSGEVSVT
WYKNSSKIPVSKIIQSRIHQDETWILFLPMEWGDSGVYQCVIKGRDSCHRIHVNL
TVFEKQWCDTSVKGLPNLSDEYKQILHLGKDDSLTCHLHFPKSCILGPIKWYKD
CNEITGERFTVLETRLLVSNVSAEDRGNYACQVILTHSGRQYEVLNGITVSITER
AGYGGSVPKIIYPKNNSIEVQLGTTLIVDCNITDTKDNTNLRCWRVNNTLVDDY
YNESKRIREGVETHASFREHNLYTVNITFLEVKMEDYGLPFMCHAGVSAAYIML
QLPAPDFRAYLIGGLIAFLAVAVSVVYIYNIFKIDIVLWYRSTFQSTETLEDGKLYD
AYVLYPKPRRESQRHAVDTLVLKILPEVLERQCGYKLFIFGRDEFPGQAVANVID
ENVKLCRRLIVIVVPESLGFGLLKNLSEEQIAVYNALIQDGMKVILIELEKIEDYT
AMPESIQYIRQKHGVIRWHGDFTEQSQCVKTKFWKTVRYHMPPRRCRPSPPVQ
LPQHTPCYRTTASPKLGSRRKKCTLKTG

2. 骆驼免疫、纳米抗体噬菌体展示文库构建和抗人 IL-36R 纳米抗体筛选

1) 骆驼免疫

使用带有人 Fc 标签的人 IL-36R 胞外结构域(近岸，CJ62)作为免疫抗原，对 2 只健康骆驼(camelus bactrianus)进行免疫。第 0 天初次免疫，将 200 μg 人 IL-36R 抗原与弗氏完全佐剂(CFA)混匀后皮下注射。 第 14、28、42 天，将 200 μg 人 IL-36R 抗原与弗氏不完全佐剂(IFA)混匀后皮下注射。分别在第 42、56 天采血检测血清滴度。对两只骆驼的外周淋巴细胞分别构建纳米抗体噬菌体展示文库。

2) 噬菌体库构建

分别采集 2 只骆驼第四次免疫后 50 mL 外周血，分离出 PBMC，提取 PBMC

中的 RNA，反转录，获取总 cDNA。使用骆驼抗体特征序列引物扩增抗体基因后，使用 VHH 特征序列扩增 VHH 基因片段，并将这些片段克隆至噬菌体文库载体(pSCD-2)中。将连接产物电击转化进入大肠杆菌 TG1 感受态细胞。通过梯度稀释涂板，计算得到库容为 1.1×10^9。转染后的细胞经 M13KO7 侵染并过夜培养后，释放出表达 VHH 的噬菌体颗粒。收集上清，并在 4℃过滤除菌，-80℃保存直至进一步使用。

3) 纳米抗体(VHH)筛选

对 VHH 噬菌体库采用液相亲和淘选方法进行筛选，筛选抗原使用生物素化的人 IL-36R(恺伟蛋白，IL1-HM4L2B)。将噬菌体库与抗原混合，并使用链酶亲和素偶联的琼脂糖微球捕获人 IL-36R 抗原与噬菌体的复合物。采用 PBS/0.05%吐温清洗后，通过 Glycine Elution Buffer (0.2 M Glycine-HCl, pH 2.2, 1 mg/mL BSA)洗脱微球上结合的噬菌体。洗脱获得的噬菌体经过扩增后，进行第二轮筛选。两轮筛选分别使用 10 μg/mL 和 5 μg/mL 的人 IL-36R 抗原。两轮筛选后，从滴度测定平板上挑选克隆，经 ELISA 鉴定、测序、序列分析，获得人 IL-36R 抗原结合的纳米抗体的序列 VHH162 和 VHH213 见下，下划线为 CDR，参见表 2。

> VHH162 (SEQ ID NO:3)

DVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGYSYRTQCLGWYRQAPGKQREAVATISGGGTSTYYSDSVKGRFTISQDNARTTVYLSLTSLKPEDTATYYCAAGLSVLGSWCHGGSSYEYTYSGQGTQVTVSS

> VHH213 (SEQ ID NO:4)

EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGNTYSRYCMGWFRQAPGKEREGVAAIDSDGDTSYADSVEGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCAADFTPSAPPRMGSGGYCFGDYWGQGTQVTVSS

表 2. 抗 IL-36R 纳米抗体 CDR 序列 (按 kabat 编号系统定义)

纳米抗体名称	重链 CDR		序列编号
VHH162	CDR1	TQCLG	SEQ ID NO:5
	CDR2	TISGGGTSTYYSDSVKG	SEQ ID NO:6
	CDR3	GLSVLGSWCHGGSSYEYTY	SEQ ID NO:7
VHH213	CDR1	RYCMG	SEQ ID NO:8
	CDR2	AIDSDGDTSYADSVEG	SEQ ID NO:9
	CDR3	DFTPSAPPRMGSGGYCFGDY	SEQ ID NO:10

将表 2 中纳米抗体可变区序列分别连接到人 IgG4 Fc (包含铰链区，且带有 S228P 突变，根据 EU 编号系统)片段上，构建成 VHH-Fc 抗体。构建质粒，瞬时转染 HEK293 细胞并分泌表达抗体，使用 protein A 柱对上清中的抗体进行纯化，PBS 洗柱，0.1 M 甘氨酸缓冲液(pH 2.5)洗脱。洗脱获得的蛋白透析至 PBS pH7.4 缓冲液中。其中人 IgG4 Fc 序列如下：

>hIgG4-Fc(含 S228P 突变) (SEQ ID NO:11)

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV

QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSLGK

实施例 2. 抗 IL-36R 抗体的人源化改造

抗体人源化通过 CDR-grafting 方法进行。通过 IMGT 或 NCBI 网站，将母本 IL-36R 抗体可变区与 IMGT 或 NCBI/igblast 数据库中的全人源胚系基因进行比对，选择与抗 IL-36R 抗体高度同源的人胚系基因作为人源化模板，将骆驼源抗体 CDR 与相应的人源化模板框架区重组，形成人源化序列。并对 FR 区域上影响抗体稳定性、亲和力的残基进行回复突变，对免疫原性风险位点和脱酰胺、异构化风险位点等进行突变设计。

1. VHH162 的人源化框架选择及回复突变设计

骆驼源纳米抗体 VHH162 的人源化重链模板为 IGHV3-23*04 和 IGHJ1*01。将骆驼源纳米抗体重链 CDR 与相应的人源化模板框架区重组，形成人源 FR1-骆驼源 CDR1-人源 FR2-骆驼源 CDR2-人源 FR3-骆驼源 CDR3-人源 FR4 抗体重链可变区序列，其中，FR1、FR2、FR3 源自 IGHV3-23*04，FR4 源自 IGHJ1*01。形成的人源化可变区序列(下划线为 CDR 序列，斜体为 FR 序列，按照 Kabat 编号系统定义)如下：

>VHH162-graft(人源化 VHH) (SEQ ID NO:12)

*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS*TQCLG*WVRQAPGKGLEWVS*TISGGGT
STYYSDSVKG*RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK*GLSVLGSWCHGGSS
YEYTY*WGQGTLVTVSS*

在 VHH162-graft 的基础上，进行回复突变设计。回复突变见表 3-1。

表 3-1. VHH162 回复突变设计(位点按照 Kabat 编号系统定义)

抗体编号	回复突变
VHH162-Hu00	E1D, F27Y, T28S, F29Y, S30R, V37Y, G44Q, L45R, W47A, S49A, R71Q, S74A, N76T, L78V, K94A, W103S
VHH162-Hu01	E1D, F27Y, T28S, F29Y, S30R, V37Y, G44Q, W47A, S49A, R71Q, S74A, N76T, L78V, K94A, W103S
VHH162-Hu02	E1D, F27Y, T28S, F29Y, S30R, V37Y, G44Q, L45R, W47A, S49A, R71Q, S74A, N76T, L78V, K94A
VHH162-Hu03	E1D, F27Y, T28S, F29Y, S30R, V37Y, G44Q, L45R, W47A, S49A, S74A, N76T, L78V, K94A, W103S
VHH162-Hu04	E1D, F27Y, T28S, F29Y, S30R, V37Y, G44Q, L45R, W47A, S49A, R71Q, S74A, L78V, K94A, W103S
VHH162-Hu05	E1D, F27Y, T28S, F29Y, S30R, V37Y, G44Q, L45R, W47A, S49A, R71Q, S74A, N76T, K94A, W103S

VHH162-Hu06	E1D, F27Y, T28S, F29Y, S30R, V37Y, G44Q, L45R, W47A, S49A, R71Q, S74A, N76T, L78V, W103S
VHH162-Hu07	F27Y, T28S, F29Y, S30R, V37Y, G44Q, L45R, W47A, S49A, R71Q, S74A, N76T, L78V, K94A, W103S
VHH162-Hu08	E1D, F27Y, T28S, F29Y, S30R, V37Y, G44Q, L45R, W47A, R71Q, S74A, N76T, L78V, K94A, W103S
VHH162-Hu09	E1D, F27Y, T28S, F29Y, S30R, V37Y, G44Q, L45R, W47A, S49A, R71Q, N76T, L78V, K94A, W103S
VHH162-Hu10	F27Y, T28S, F29Y, S30R, V37Y, G44Q, W47A
VHH162-Hu11	F27Y, T28S, F29Y, S30R, V37Y, G44Q, L45R, W47A, S49A, R71Q, N76T, L78V, W103S
VHH162-Hu12	F27Y, T28S, F29Y, S30R, V37Y, G44Q, L45R, W47A, S49A, L78V, W103S
VHH162-Hu13	F27Y, T28S, F29Y, S30R, V37Y, G44Q, L45R, W47A, L78V

VHH162 回复突变后的人源化序列(下划线为 CDR 序列，按照 Kabat 编号系统定义)如下：

>VHH162_Hu00 (SEQ ID NO:13)

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYRTQCLGWYRQAPGKQREAVATISG
GGTSTYYSDSVKGRFTISQDNAKTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGLSVLGSW
CHGGSSYEYTYSGQGTLVTVSS

>VHH162_Hu01 (SEQ ID NO:14)

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYRTQCLGWYRQAPGKQLEAVATISG
GGTSTYYSDSVKGRFTISQDNAKTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGLSVLGSW
CHGGSSYEYTYSGQGTLVTVSS

>VHH162_Hu02 (SEQ ID NO:15)

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYRTQCLGWYRQAPGKQREAVATISG
GGTSTYYSDSVKGRFTISQDNAKTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGLSVLGSW
CHGGSSYEYTYWGQGTLVTVSS

>VHH162_Hu03 (SEQ ID NO:16)

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYRTQCLGWYRQAPGKQREAVATISG
GGTSTYYSDSVKGRFTISRDNAKTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGLSVLGSW
CHGGSSYEYTYSGQGTLVTVSS

>VHH162_Hu04 (SEQ ID NO:17)

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYRTQCLGWYRQAPGKQREAVATISG
GGTSTYYSDSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGLSVLGS
WCHGGSSYEYTYSGQGTLVTVSS

>VHH162_Hu05 (SEQ ID NO:18)

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYRTQCLGWYRQAPGKQREAVATISG
GGTSTYYSDSVKGRFTISQDNAKTTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGLSVLGSW
CHGGSSYEYTYSGQGTLVTVSS

>VHH162_Hu06 (SEQ ID NO:19)
DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYRTQCLGWYRQAPGKQREAVATISG
GGTSTYYSDSVKGRFTISQDNAKTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLSVLGSW
CHGGSSYEYTYSGQGTLVTVSS
>VHH162_Hu07 (SEQ ID NO:20)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYRTQCLGWYRQAPGKQREAVATISG
GGTSTYYSDSVKGRFTISQDNAKTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGLSVLGSW
CHGGSSYEYTYSGQGTLVTVSS
>VHH162_Hu08 (SEQ ID NO:21)
DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYRTQCLGWYRQAPGKQREAVSTISG
GGTSTYYSDSVKGRFTISQDNAKTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGLSVLGSW
CHGGSSYEYTYSGQGTLVTVSS
>VHH162_Hu09 (SEQ ID NO:22)
DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYRTQCLGWYRQAPGKQREAVATISG
GGTSTYYSDSVKGRFTISQDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGLSVLGSW
CHGGSSYEYTYSGQGTLVTVSS
>VHH162_Hu10 (SEQ ID NO:23)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYRTQCLGWYRQAPGKQLEAVSTISG
GGTSTYYSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLSVLGSW
CHGGSSYEYTYWGQGTLVTVSS
>VHH162_Hu11 (SEQ ID NO:24)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYRTQCLGWYRQAPGKQREAVATISG
GGTSTYYSDSVKGRFTISQDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLSVLGSW
CHGGSSYEYTYSGQGTLVTVSS
>VHH162_Hu12 (SEQ ID NO:25)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYRTQCLGWYRQAPGKQREAVATISG
GGTSTYYSDSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLSVLGSW
CHGGSSYEYTYSGQGTLVTVSS
>VHH162_Hu13 (SEQ ID NO:26)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYRTQCLGWYRQAPGKQREAVSTISG
GGTSTYYSDSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLSVLGSW
CHGGSSYEYTYWGQGTLVTVSS

以上人源化及回复突变的 VHH162 的 CDR 序列与骆驼源 VHH162 的 CDR 序列相同。

2．VHH213 的人源化框架选择及回复突变设计

骆驼源纳米抗体 VHH213 的人源化重链模板为 IGHV3-74*01 和 IGHJ1*01，FR1、FR2、FR3 源自 IGHV3-74*01，FR4 源自 IGHJ1*01。获得如下序列：

>VHH213-graft(人源化 VHH) (SEQ ID NO:27)
*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS*RYCMG*WVRQAPGKGLVWVS*AIDSDG

DTSYADSVEG*RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR*DFTPSAPPRMGSGG YCFGDY*WGQGTLVTVSS*

在 VHH213-graft 的基础上，进行回复突变设计。回复突变见表 3-2。

表 3-2. VHH213 回复突变设计(位点按照 Kabat 编号系统定义)

抗体编号	回复突变
VHH213-Hu00	F27N, F29Y, V37F, G44E, L45R, W47G, S49A, R71K, R94A
VHH213-Hu01	F27N, F29Y, V37F, G44E, W47G, S49A, R71K, R94A
VHH213-Hu02	F27N, F29Y, V37F, G44E, L45R, W47G, S49A, R94A
VHH213-Hu03	F27N, F29Y, V37F, G44E, L45R, W47G, S49A, R71K
VHH213-Hu04	F27N, F29Y, V37F, G44E, L45R, W47G, R71K, R94A
VHH213-Hu05	F27N, F29Y, V37F, G44E, W47G
VHH213-Hu06	F27N, F29Y, V37F, G44E, W47G, S49A, R94A
VHH213-Hu07	F27N, V37F, G44E, W47G, S49A, R94A

VHH213 回复突变后的人源化序列(下划线为 CDR 序列，按照 Kabat 编号系统定义)如下：

>VHH213_Hu00 (SEQ ID NO:28)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYSRYCMGWFRQAPGKERVGVAAIDS
DGDTSYADSVEGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADFTPSAPPR
MGSGGYCFGDYWGQGTLVTVSS
>VHH213_Hu01 (SEQ ID NO:29)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYSRYCMGWFRQAPGKELVGVAAIDS
DGDTSYADSVEGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADFTPSAPPR
MGSGGYCFGDYWGQGTLVTVSS
>VHH213_Hu02 (SEQ ID NO:30)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYSRYCMGWFRQAPGKERVGVAAIDS
DGDTSYADSVEGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADFTPSAPPR
MGSGGYCFGDYWGQGTLVTVSS
>VHH213_Hu03 (SEQ ID NO:31)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYSRYCMGWFRQAPGKERVGVAAIDS
DGDTSYADSVEGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDFTPSAPPR
MGSGGYCFGDYWGQGTLVTVSS
>VHH213_Hu04 (SEQ ID NO:32)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYSRYCMGWFRQAPGKERVGVSAIDS
DGDTSYADSVEGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADFTPSAPPR
MGSGGYCFGDYWGQGTLVTVSS
>VHH213_Hu05 (SEQ ID NO:33)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYSRYCMGWFRQAPGKELVGVSAIDS
DGDTSYADSVEGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDFTPSAPPRM

GSGGYCFGDYWGQGTLVTVSS

>VHH213_Hu06 (SEQ ID NO:34)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYSRYCMGWFRQAPGKELVGVAAIDS
DGDTSYADSVEGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADFTPSAPPR
MGSGGYCFGDYWGQGTLVTVSS

>VHH213_Hu07 (SEQ ID NO:35)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTFSRYCMGWFRQAPGKELVGVAAIDS
DGDTSYADSVEGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADFTPSAPPR
MGSGGYCFGDYWGQGTLVTVSS

VHH213 人源化及回复突变序列的 CDR 序列与骆驼源 VHH213 的 CDR 序列相同。

将 VHH162 和 VHH213 人源化及回复突变序列连接到人 IgG4 Fc (包含铰链区，且带有 S228P 突变，根据 EU 编号系统)片段上，构建成 VHH-Fc 抗体。构建人源化抗体重组质粒后，瞬时转染 HEK293 细胞并分泌表达抗体。使用 protein A 柱对上清中的抗体进行纯化，PBS 洗柱，0.1 M 甘氨酸缓冲液(pH 2.5)洗脱。洗脱获得的蛋白透析至 PBS pH7.4 缓冲液中。经检测，获得目的抗体。

实施例 3. 人源化抗 IL-36R 抗体与 IL-36R 抗原亲和力的鉴定

1. FACS 检测人源化抗 IL-36R 抗体与细胞表面 IL-36R 的结合

为检测人源化抗 IL-36R 抗体与细胞膜上表达的人 IL-36R 的结合能力，将不同浓度的候选抗 IL-36R 抗体加入到 1E5/孔过表达人 IL-36R 的 CHO-K1 细胞中，冰上孵育 1h。FACS 缓冲液(1% FBS，DPBS)洗两次后，加入 100 μL AF488-山羊抗人 IgG(H+L)的荧光二抗(1:1000，Invitrogen，A11013)，冰上孵育 30 min。FACS 缓冲液洗两次，150 μL FACS 缓冲液重悬，使用流式细胞仪(BD，FACSCelesta)检测荧光信号，计算 EC_{50}。

使用勃林格英格翰的抗人 IL-36R 抗体 BI655130(WO2013074569A1，根据专利中序列自主表达获得)和再生元的抗人 IL-36R 抗体 H4H14706P2(WO2020018503A2，根据专利中序列自主表达获得)作为对照。序列如下：

> BI655130 重链序列 (SEQ ID NO:36)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSSWIHWVKQAPGQGLEWMGEIN
PGNVRTNYNENFRNKVTMTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCTVVFYGEPYF
PYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

> BI655130 轻链序列 (SEQ ID NO:37)
QIVLTQSPGTLSLSPGERATMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGQAPRLWIYRTSRL
ASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDAATYYCHQFHRSPLTFGAGTKLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
> H4H14706P2 重链序列 (SEQ ID NO:38)
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFDDYAIHWVRQSPGKGLEWVSVISWN
SDVIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKGYNWNFFDY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKR
VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSLGK
> H4H14706P2 轻链序列 (SEQ ID NO:39)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYNAANRA
TDIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

VHH162 人源化抗体 VHH162_Hu08，VHH162_Hu09 和 VHH162_Hu11，以及 VHH213 人源化抗体 VHH213_Hu01 和 VHH213_Hu07，与人 IL-36R 的结合结果如图 1A、1B，表 4-1 和 4-2 所示。VHH162_Hu08，VHH162_Hu09，VHH162_Hu11，VHH213_Hu01 和 VHH213_Hu07 对 CHO-K1 细胞表面人 IL-36R 有较强的结合活性，并且与 VHH213 对 CHO-K1 细胞表面人 IL-36R 的结合活性相当。

表 4-1. FACS 检测 VHH162 及 VHH213 人源化抗体与人 IL-36R 的结合 EC_{50} 值

抗体编号	结合活性	
	EC_{50} (nM)	最大 MFI
VHH213	0.57	6920
VHH213_Hu01	0.40	7069
VHH162_Hu08	0.66	6009
VHH162_Hu09	0.48	5336
BI655130	0.51	13355
H4H14706P2	0.37	10877
hIgG1	N.A.	77
hIgG4	N.A.	76

注：N.A.不适用

表 4-2. FACS 检测 VHH162 及 VHH213 人源化抗体与人 IL-36R 的结合 EC_{50} 值

抗体编号	结合活性	
	EC_{50} (nM)	最大 MFI
VHH213_Hu01	0.41	7674
VHH213_Hu07	0.53	7780
VHH162_Hu11	0.63	6947
BI655130	0.51	14233
H4H14706P2	0.51	11152
hIgG1	N.A.	47

注：N.A.不适用

2. SPR 检测人源化抗 IL-36R 抗体与 IL-36R 抗原的结合

采用表面等离子共振技术(surface plasmon resonance，SPR)检测抗 IL-36R 抗体与 IL-36R 抗原的亲和力。

仪器使用 Biacore™ 8k(GE Healthcare)。实验选用 CM5 传感器芯片(Cat. # 29149603，GE)，流动相采用 HBS-EP+缓冲溶液(10 mM HEPES，150 mM NaCl，3 mM EDTA，0.05% surfactant P20)。将抗人 IgG (Fc) 抗体用 10 mM 醋酸钠缓冲液(pH 5.0)，配制成 30 μg/mL 溶液，选择 Immobilization 程序自动进行抗人 IgG (Fc) 抗体通道氨基偶联固定。用 HBS-EP+缓冲溶液分别配制各待测抗体作为配体，用芯片通道上的抗人 IgG (Fc) 抗体进行捕获。将人 IL-36R 抗原蛋白(恺佧蛋白，IL1-HM4L2)作为分析物，用 HBS-EP+缓冲溶液进行配制，分析物进行 2 倍梯度稀释将稀释，在 30 μL/min 的流速下流过实验通道和参比通道，结合 1min，解离 15min。再生缓冲液 10 mM Glycine pH 1.5(GE Healthcare，BR-1003-54) 在 10 μl/min 的流速下运行 30s。计算结合速率 Ka 和解离速率 Kd，以及解离常数(即亲合力 K_D)。结果参见表 5。

表 5. 抗 IL-36R 抗体结合人 IL-36R 抗原的 SPR 亲和力数据

抗体编号	抗原	ka(1/Ms)	kd(1/s)	K_D(M)
VHH162_Hu11	人 IL-36R 抗原	4.70E+03	1.46E-04	3.11E-08
VHH213_Hu07	人 IL-36R 抗原	1.14E+04	9.39E-05	8.26E-09
BI655130	人 IL-36R 抗原	1.33E+04	9.54E-05	7.16E-09
H4H14706P2	人 IL-36R 抗原	5.68E+04	3.64E-04	6.40E-09

结合人 IL-36R 抗原结果显示，VHH162_Hu11, VHH213_Hu07 对人 IL-36R 具有较强的亲和力，并且与 BI655130 和 H4H14706P2 对人 IL-36R 的亲和力相似。

3. 人源化抗 IL-36R 抗体与对照抗体竞争结合结果

抗 IL-36R 抗体与人 IL-36R 蛋白的竞争性结合分析通过 Biacore™ 8k(GE Healthcare)仪器测定。实验选用 CM5 传感器芯片，流动相采用 HBS-EP+缓冲溶液(10 mM HEPES，150 mM NaCl，3 mM EDTA，0.05% surfactant P20)。按照 His 捕获试剂盒(Cat.#29234602，Cytiva)和氨基偶联试剂盒(Cat.#BR100633，GE)说明书中的方法，将抗 His 抗体共价偶联于 CM5 生物传感芯片(Cat.#29149603，GE)上，亲和捕获人 IL-36R 蛋白(恺佧蛋白，IL1-HM4L2)，随后将抗体 1 进样至饱和状态，

即信号不再增加，再将抗体 2 进样，利用 Biacore™ 8k 仪器实时检测反应信号从而获得结合曲线。在每个循环解离完成后，使用 10 mM Glycine pH 1.5(GE Healthcare，BR-1003-54)将生物芯片洗净再生。实验得到的数据用 Biacore Insight Evaluation 3.0 软件以 Tandem using dual 模型进行拟合。

结果如图 2 所示，VHH162_Hu09 与 VHH213_Hu01 的抗原表位重叠，并且与 H4H14706P2 和 BI655130 不同。

实施例 4. 抗人 IL-23 p19 单克隆抗体的制备

1．鼠源抗体的制备

使用人 IL-23 蛋白(Sino Biological，CT048-H08H)免疫 SJL 小鼠。免疫 3 次后取血测定血清中抗体的效价，选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的小鼠进行脾细胞融合，将融合好的杂交瘤细胞铺在 96 孔细胞培养板中，置于 37℃，5% CO_2 培养箱中进行培养。取细胞培养上清液通过 ELISA 进行检测。将筛选出的阳性克隆进行扩增冻存保种，亚克隆直至获得单细胞克隆。选择出的杂交瘤克隆用无血清细胞培养法进一步制备和纯化抗体。得到的杂交瘤抗体用 ELISA 检测抗体与人 IL-23 蛋白的结合和对受体的阻断情况(见本公开实施例 5)，挑选出结合活性和阻断活性好的杂交瘤细胞株。

选择单克隆杂交瘤细胞株 mAb29。过程如下：收集对数生长期杂交瘤细胞，用 Trizol(Invitrogen, Cat# 15596-018)提取 RNA，反转录为 cDNA。用 cDNA 为模板进行 PCR 扩增后送测序公司测序，得到的 DNA 序列对应的抗体的可变区氨基酸序列如下，CDR 序列见表 6。

>mAb29 重链可变区 (SEQ ID NO:40)

QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYAISWVRQPPGKGLEWLGVIWTGG
GTNYNSGIKSRLTISKDNSKSQVFLNMNSLQTEDTARYYCVREGDYGSYAGAM
DYWGQGTSVTVSS

>mAb29 轻链可变区 (SEQ ID NO:41)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDYYGISSMHWFQQKPGQPPKLLIYRAS
NLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINRVETDDVATYYCQQANKDPYTFGGGTKLEIK

表 6. mAb29 的重链、轻链 CDR 序列 (kabat 编号规则下定义)

重链可变区 CDR		轻链可变区 CDR	
HCDR1	SYAIS (SEQ ID NO:42)	LCDR1	RASESVDYYGISSMH (SEQ ID NO:45)
HCDR2	VIWTGGGTNYNSGIKS (SEQ ID NO:43)	LCDR2	RASNLES (SEQ ID NO:46)
HCDR3	EGDYGSYAGAMDY (SEQ ID NO:44)	LCDR3	QQANKDPYT (SEQ ID NO:47)

将上述 mAb29 可变区序列分别通过 PCR 扩增 VH/VK 序列，再与表达载体 pHr (带信号肽及 hIgG1/hkappa 恒定区基因(CH1-Fc/CL)片段)进行同源重组，示范性地，人重链 IgG1 恒定区序列如 SEQ ID NO：48 所示，人轻链 κ 恒定区序列如 SEQ ID NO：49 所示，构建重组嵌合抗体全长表达质粒 VH-CH1-Fc-pHr/VL-CL-

pHr，进而获得其嵌合抗体 Ch29。

>人 IgG1 重链恒定区(含 L234A/L235A 突变) (SEQ ID NO:48)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

>人轻链 κ 恒定区 (SEQ ID NO:49)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

2．人源化

通过比对 IMGT 人类抗体重轻链可变区种系基因数据库，分别挑选同源性高的重轻链可变区种系基因作为模板，将鼠源抗体的 CDR 分别嫁接(Grafted)到相应的人源模板中，形成次序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的可变区序列，然后将可变区序列与人恒定区序列融合，获得人源化抗体。以下示范性地描述 mAb29 人源化，抗体的 CDR 氨基酸残基由 Kabat 编号系统确定并注释。

挑选同源性高的重轻链可变区种系基因作为模板。鼠源抗体 mAb29 的人源化轻链模板选 IGKV4-1*01 和 IGKJ4*01，即选择人种系轻链 IGKV4-1*01 的 FR1，FR2，FR3，和 IGKJ4*01 的 JK4 区(作为 FR4)作为人源化抗体轻链框架区；人源化重链模板选 IGHV2-26*01 和 IGHJ6*01，即选择人种系重链 IGHV2-26*01 的 FR1，FR2，FR3，和 IGHJ6*01 的 JH6 区(作为 FR4)作为人源化抗体轻链框架区。首先，将鼠源抗体 mAb29 的 CDR 分别移植到选择的相应人源模板中，替换人源模板的 CDR 区；然后，对人源化抗体的轻链可变区的第 4、17、36、58、60 和/或 68 位(根据 Kabat 编号系统编号)氨基酸残基进行突变，重链可变区的第 1、30、37、44、49、73、89 和/或 93(根据 Kabat 编号系统编号)氨基酸残基进行突变，此外，还对重链可变区的 HCDR1：SYAIS (SEQ ID NO：42)的第 1 位氨基酸残基突变为 N 或 Q，获得新的 HCDR1：NYAIS(SEQ ID NO：50)或 QYAIS(SEQ ID NO：51)，mAb29 的人源化抗体可变区序列如下：

>hAb29VH1 (Graft+ Q1E、A49G、A93V) (SEQ ID NO:52)

EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSSYAISWIRQPPGKALEWLGVIWTGG
GTNYNSGIKSRLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCVREGDYGSYAGAM
DYWGQGTTVTVSS

> hAb29VH2 (Graft + Q1E、S30T、A49G、T73N、A93V) (SEQ ID NO:53)

EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLTSYAISWIRQPPGKALEWLGVIWTGG
GTNYNSGIKSRLTISKDNSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCVREGDYGSYAGAM
DYWGQGTTVTVSS

> hAb29VH3 (Graft + Q1E、S30T、I37V、A49G、T73N、T89R、A93V) (SEQ ID NO:54)

EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLTSYAISWVRQPPGKALEWLGVIWTGG

GTNYNSGIKSRLTISKDNSKSQVVLTMTNMDPVDTARYYCVREGDYGSYAGAM
DYWGQGTTVTVSS
> hAb29VH4 (Graft +S30T、I37V、A44G、A49G、T73N、T89R、A93V) (SEQ ID NO:55)
QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLTSYAISWVRQPPGKGLEWLGVIWTGG
GTNYNSGIKSRLTISKDNSKSQVVLTMTNMDPVDTARYYCVREGDYGSYAGAM
DYWGQGTTVTVSS
> hAb29VH5 (Graft + S30T、I37V、A44G、A49G、T73N、T89R、A93V+ S31N) (SEQ ID NO:56)
QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLT***N***YAISWVRQPPGKGLEWLGVIWTG
GGTNYNSGIKSRLTISKDNSKSQVVLTMTNMDPVDTARYYCVREGDYGSYAGA
MDYWGQGTTVTVSS
> hAb29VH6 (Graft + S30T、I37V、A44G、A49G、T73N、T89R、A93V+ S31Q) (SEQ ID NO:57)
QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLT***Q***YAISWVRQPPGKGLEWLGVIWTG
GGTNYNSGIKSRLTISKDNSKSQVVLTMTNMDPVDTARYYCVREGDYGSYAGA
MDYWGQGTTVTVSS
> hAb29VL1 (Graft + Y36F、G68R) (SEQ ID NO:58)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDYYGISSMHWFQQKPGQPPKLLIYRA
SNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQANKDPYTFGGGTKVEI
K
> hAb29VL2 (Graft + M4L、Y36F、V58I、G68R) (SEQ ID NO:59)
DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDYYGISSMHWFQQKPGQPPKLLIYRA
SNLESGIPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQANKDPYTFGGGTKVEI
K
> hAb29VL3 (Graft + M4L、Y36F、V58I、D60A、G68R) (SEQ ID NO:60)
DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDYYGISSMHWFQQKPGQPPKLLIYRA
SNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQANKDPYTFGGGTKVEIK
> hAb29VL4 (Graft + M4L、 E17Q、Y36F、V58I、D60A、G68R) (SEQ ID NO:61)
DIVLTQSPDSLAVSLGQRATINCRASESVDYYGISSMHWFQQKPGQPPKLLIYRA
SNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQANKDPYTFGGGTKVEIK

注：序列顺序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中下划线部分为 CDR 区(CDR 氨基酸残基由 Kabat 编号系统确定)，其余部分为 FR 区。

分别构建抗体轻链和重链的表达载体，将人源化的抗体轻/重链分别交叉配对组合，转染 293E 细胞后收集培养上清纯化即得到人源化的全长抗体。人源化抗体重链恒定区可选自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 恒定区。示例性的，将前述 mAb29 的人源化抗体重链可变区与人重链 IgG1 恒定区(序列如 SEQ ID NO：48 所示)融合形成抗体全长重链，将人源化抗体轻链可变区与人轻链 κ 恒定区(序列如 SEQ ID NO：49 所示)融合形成抗体全长轻链，得到如下表 7 所示的 mAb29 人源化抗体：

表 7. mAb29 人源化抗体

VH / VL	hAb29VH1	hAb29VH2	hAb29VH3	hAb29VH4	hAb29VH5	hAb29VH6
hAb29 VL1	Hu29-1	Hu29-5	Hu29-9	Hu29-13	Hu29-17	Hu29-21
hAb29 VL2	Hu29-2	Hu29-6	Hu29-10	Hu29-14	Hu29-18	Hu29-22

hAb29 VL3	Hu29-3	Hu29-7	Hu29-11	Hu29-15	Hu29-19	Hu29-23
hAb29 VL4	Hu29-4	Hu29-8	Hu29-12	Hu29-16	Hu29-20	Hu29-24

示例性的，人源化抗体重链、轻链全长序列如下：

> Hu29-19 重链 (SEQ ID NO:62)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLTNYAISWVRQPPGKGLEWLGVIWTG
GGTNYNSGIKSRLTISKDNSKSQVVLTMTNMDPVDTARYYCVREGDYGSYAG
AMDYWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW*
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTHTCPPCPAPE<u>AA</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

> Hu29-19 轻链 (SEQ ID NO:63)

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDYYGISSMHWFQQKPGQPPKLLIYRA
SNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQANKDPYTFGGGTKVEI
K*RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV*
TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> Hu29-24 重链 (SEQ ID NO:64)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLTQYAISWVRQPPGKGLEWLGVIWTG
GGTNYNSGIKSRLTISKDNSKSQVVLTMTNMDPVDTARYYCVREGDYGSYAGA
MDYWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN*
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPE<u>AA</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

> Hu29-24 轻链 (SEQ ID NO:65)

DIVLTQSPDSLAVSLGQRATINCRASESVDYYGISSMHWFQQKPGQPPKLLIYRA
SNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQANKDPYTFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

注：斜体为恒定区，下划线为突变。

实施例 5. 抗人 IL-23 p19 单克隆抗体的功能验证

1．亲和力测试

1) ELISA 结合实验

通过 ELISA 的方法(包被待测分子)检测待测分子对 IL-23 p19 和 BAFF 的结合活性。具体方法如下：

用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液将待测样品稀释至 2 μg/mL，以 100 μL/孔的体积加入 96 孔酶标板中，4℃过夜孵育。弃去液体后，每孔加入 300 μL 用 PBS 稀释的 5%脱脂牛奶(BD，232100)进行封闭，37℃孵育 2 小时。封闭结束后，弃去封闭液，并

用 PBST 缓冲液(pH 7.4 PBS 含 0.1% tween-20)洗板 3 次后，每孔加入 100 μL 梯度稀释的 IL-23(Sino Biological，CT048-H08H)或 BAFF(ACROBiosystems，BAF-H52D4)溶液，于 37℃孵育 1 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次。检测与 IL-23 和 BAFF 的结合时，每孔加入 100 μL Anti-His-HRP(Sino biological，105327-MM02T-H，1:2000 稀释)，37℃孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3 次后，每孔加入 100 μL TMB 显色底物(KPL，5120-0077)，室温孵育 10~15 分钟，每孔加入 50 μL 1 M H_2SO_4 终止反应，用酶标仪读取在 450 nm 处的吸收值，用软件拟合出抗体与抗原的结合曲线，计算出 EC_{50} 值。其中，RCT-18 为 telitacicept (RC18，荣昌生物)。抗 IL-23 抗体及其融合蛋白对人 IL-23 的结合实验结果见表 8-1。

表 8-1. 对 IL-23 蛋白的结合实验结果

样品	人 IL-23 结合活性 EC_{50} (nM)	人 BAFF 结合活性 EC_{50} (nM)
Ch29	1.155	-
Hu29-15	1.189	-
Hu29-19	1.107	-
Hu29-24	1.218	-
RCT-18	-	21.49

实验结果显示，本公开的抗 IL-23 抗体能与人 IL-23 蛋白特异性结合。

2) Biacore 测试

用生物传感芯片 Protein A(GE，29127556)亲和捕获一定量的待测样品，然后于芯片表面流经一系列浓度梯度的抗原，利用 Biacore(GE，8K)实时检测反应信号从而获得结合和解离曲线。在每个循环解离完成后，用 10 mM 甘氨酸-盐酸溶液 pH 1.5(GE，BR-1003-54)将生物芯片洗净再生。实验数据用 BIAevaluation version 4.1 软件以 1:1 模型进行拟合，从而得出亲和力数值。本测试中用到的相关抗原蛋白如下：人 IL-23(Sino biological，CT048-H08H)。亲和力的测试结果见表 8-2 和表 8-3。

表 8-2. 抗 IL-23 抗体结合人 IL-23 p19 的亲和力实验结果

样品	人 IL-23 p19		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D (M)
Hu29-19	2.71E+06	4.08E-05	1.51E-11
Hu29-24	4.71E+06	7.03E-05	1.49E-11
Risankizumab	7.54E+05	4.91E-05	6.51E-11

表 8-3. 其他抗 IL-23 抗体结合人 IL-23 p19 的亲和力实验结果

抗体	人 IL-23 p19		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D (M)
Hu29-1	3.39E+06	1.33E-04	3.93E-11
Hu29-2	3.51E+06	1.08E-04	3.08E-11
Hu29-5	3.40E+06	1.25E-04	3.67E-11
Hu29-6	3.86E+06	9.85E-05	2.55E-11
Hu29-9	3.48E+06	1.06E-04	3.04E-11

Hu29-10	3.65E+06	8.70E-05	2.39E-11
Hu29-15	3.15E+06	7.02E-05	2.23E-11
Hu29-16	4.36E+06	7.99E-05	1.83E-11
Hu29-23	3.79E+06	8.57E-05	2.26E-11
Ch29	4.05E+06	8.40E-05	2.07E-11

实验结果表明，本公开构建的抗 IL-23 抗体能以高亲和力与人 IL-23 p19 结合。

本公开中抗 IL-23 抗体对照分子 Risankizumab(参见 WHO Drug Information Vol. 30, No. 1, 2016)的序列如下所示：

>Risankizumab 重链 (SEQ ID NO：66)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWIGYIYP
RDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSGYAWFI
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR
VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPG

>Risankizumab 轻链 (SEQ ID NO：67)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTR
HTGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

2. 配体和受体的阻断实验

通过 ELISA 方法检测抗 IL-23 抗体对 IL-23/IL-23R 的阻断活性。具体方法如下：

用 pH 7.4 的 PBS(源培生物，B320)缓冲液将受体蛋白稀释至 2 μg/mL，以 100 μL/孔的体积加入 96 孔酶标板(Corning，3590)中，4℃过夜孵育。弃去液体后，每孔加入 200 μL 1% Casein 封闭液(Thermo，37528)进行封闭，37℃孵育 2 小时。封闭结束后，弃去封闭液，并用 PBST 缓冲液(pH7.4 PBS 含 0.1% tween-20)洗板 3 次后备用。将固定浓度的生物素(Biotin)标记的配体蛋白与梯度稀释的抗体或融合蛋白混合后 37℃预孵育 30 分钟后加入封闭好的酶标板中，37℃孵育 1.5 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次，每孔加入 100 μL streptavidin-HRP (Invitrogen，434323，1:4000 稀释)，37℃孵育 1 小时。去上清，用 PBST 洗板 3 次后每孔加入 100 μL TMB 显色底物(KPL，5120-0077)，室温孵育 10~15 分钟，每孔加入 50 μL 1 M H_2SO_4 终止反应，用酶标仪读取在 450 nm 处的吸收值，用软件拟合出抑制配体和受体结合的曲线，计算出 IC_{50} 值。本测试例中所用配体蛋白和受体蛋白的来源信息如下：IL-23(Sino Biological，CT048-H08H)，IL-23R(Sino Biological，13840-H02H)，BAFF-R(Sino biological，16079-H02H)。

抗 IL-23 抗体对 IL-23/IL-23R 的阻断实验结果见表 9-1，表 9-2。

表 9-1. 抗 IL-23 抗体及其融合蛋白对 IL-23/IL-23R 的阻断实验结果

样品	IL-23/IL-23R 阻断活性 IC_{50} (nM)
Ch29	0.3858
Hu29-19	0.4783
Hu29-24	0.4877
Risankizumab	0.6104

表 9-2. 其他抗 IL-23 抗体对 IL-23/IL-23R 的阻断实验结果

样品	IL-23/IL-23R 阻断活性 IC_{50} (nM)
Hu29-1	0.4743
Hu29-2	0.3972
Hu29-5	0.3881
Hu29-6	0.4367
Hu29-9	0.3966
Hu29-10	0.4242
Hu29-15	0.4104

实验结果显示，本公开构建的抗 IL-23 抗体能有效阻断 IL-23/IL-23R 结合。

3．BaF3-IL-23R 细胞增殖实验

通过 BaF3-IL-23R 细胞增殖实验检测抗体的体外活性。实验方法如下：

将稳定表达 IL-23R 和 IL-12Rβ1 的 BaF3 细胞(Cobioer，CBP60474)铺在 96 孔细胞板(Corning，3903)中，每孔 50 μL 体积，4000 个细胞。将梯度稀释的待测样品与固定浓度的 IL-23 蛋白(Sino Biological，CT048-H08H)混合，加入细胞培养板中，37℃培养箱中培养 72 小时。然后取出细胞培养板，每孔加入 50 μL Celltiter Glo 检测液(Promega，G755B)，置于摇床中 10 min，取出置于室温静置 10 分钟，用酶标仪(PerkinElmer，Victor3)检测生物发光信号。数据用软件拟合出抑制曲线，计算 IC_{50} 值。

抗 IL-23 抗体抑制 BaF3-IL-23R 细胞增殖的实验结果见表 10-1，表 10-2。

表 10-1. 抗 IL-23 抗体及其融合蛋白抑制 BaF3-IL-23R 细胞增殖实验结果

样品	抑制 BaF3-IL-23R 细胞增殖的活性 IC_{50} (nM)
Ch29	0.1753
Hu29-19	0.1938
Hu29-24	0.1784

表 10-2. 其他抗 IL-23 抗体抑制 BaF3-IL-23R 细胞增殖实验结果

样品	抑制 BaF3-IL-23R 细胞增殖的活性 IC_{50} (nM)
Hu29-1	0.07111
Hu29-2	0.06227
Hu29-5	0.05531
Hu29-6	0.08897

Hu29-9	0.05608
Hu29-10	0.08601
Hu29-15	0.2158
Hu29-16	0.2251
Hu29-23	0.1184

实验结果显示，本公开的抗 IL-23 抗体均具有强抑制 BaF3-IL-23R 细胞增殖活性。

4．IL-17 分泌实验

通过 IL-17 分泌实验检测抗 IL-23 抗体抑制 IL-23 诱导的 T 细胞分化情况。实验方法如下：

在 96 孔板(Corning，3599)中每孔加入 100 μL 2 μg/mL anti-mouse CD3 抗体(BioLegend，100238)和 2 μg/mL anti-mouse CD28 抗体(BioLegend，102116)，37°C 孵育 1 小时，用 PBS 洗涤 2 次后备用。取小鼠脾脏进行研磨，4°C离心 5 分钟收集下层细胞，用洗涤溶液(PBS+2% FBS+2 mM EDTA)清洗一次并离心，去上清后加入 RBC Lysis Buffer(Invitrogen，00-4333-57)，室温静置 5 分钟至红细胞完全裂解。再次离心并重悬细胞进行计数。细胞悬液用 Mouse CD4 Cells Kit(Invitrogen，11415D)进行分选，将分离的 CD4+ T 细胞用培养基 RPMI 1640 Medium(Gibco，11875119)+10% FBS (Gibco，10099-141)重悬并计数备用。将细胞悬液铺在包被好的 96 孔板中，将固定浓度的 IL-23(R&D Systems，1290-IL-010)与梯度稀释的抗体或融合蛋白混合预孵育 1 小时后加入 96 孔板中，37℃细胞培养箱中培养 48 小时。取出 96 孔板，1000 rpm 离心 3 分钟，收集上清液，用 Mouse IL-17 DuoSet ELISA Kit(R&D Systems，DY421)检测上清中 IL-17 的含量。实验结果见表 11。

表 11. 抑制 IL-17 分泌实验结果

样品	抑制 IL-17 分泌的 IC_{50} (nM)
Hu29-15	0.01954
Hu29-19	0.01775
Hu29-24	0.02890

实验结果显示，本公开的抗 IL-23 抗体均具有强的抑制 IL-17 分泌的活性。

5．咪喹莫特诱导的银屑病动物模型实验

通过咪喹莫特乳膏(IMQ)诱导的银屑病动物模型实验来评估抗 IL-23 抗体的体内药效。

SPF 级雌性 C57BL/6 hIL-23A/hIL12B 转基因小鼠(百奥赛图江苏基因生物技术有限公司)，8~9 周龄，随机分组，每组 5 只小鼠。实验开始前对小鼠的背部进行脱毛处理。从第 0 天到第 5 天，假手术组在小鼠的后背皮肤均匀涂抹 80 mg 凡士林(联合利华)；动物模型组在小鼠的后背皮肤均匀涂抹 80 mg 咪喹莫特乳膏(贝美森)，连续涂抹 6 天。分别在第 0 天和第 3 天，在涂抹咪喹莫特乳膏前 1 小时腹腔注射待测样品(Risankizumab、Hu29-19、Hu29-24 和 Hu38-4 的给药剂量都为 20 mpk)。Risankizumab 作为阳性对照，PBS 作为阴性对照，一共给药 2 次。每天对小鼠背部皮肤的红疹和脱屑严重程度进行评分，在第 6 天结束实验。

红疹严重程度的评分标准如下：无红疹，0 分；微红，1 分；红但不暗，2 分；深红，3 分；极红，4 分。脱屑的评分标准如下：无脱屑，0 分；小面积细微皮屑，1 分；适中面积较厚的皮屑，2 分；较大面积的粗糙增厚皮屑，3 分；大面积的大块皮屑，4 分。

实验结果见图 3A 至 3C，实验结果表明，相比阳性对照 Risankizumab，本公开构建的抗 IL-23 抗体的体内药效更强，红疹严重程度和皮肤脱屑严重程度的评分均低于 Risankizumab。

6．人 IL-23 诱导的银屑病动物模型实验

通过人 IL-23 诱导的银屑病动物模型评价本公开构建的抗 IL-23 抗体的体内药效。SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠(维通利华实验动物技术有限公司)，6~8 周龄，将小鼠麻醉后测量小鼠右耳厚度和体重，根据右耳厚度和体重数据进行分组，每组 6 只小鼠。分组当天记为第 0 天。从第 1 天开始，每天给小鼠右耳皮内注射 1 μg 的 人 IL-23 蛋白(R&D Systems，1290-IL-500/CF)，共注射 7 天，正常组小鼠注射 PBS。在第 0 天和第 3 天腹腔注射受试药物，分别在第 0，2，4，6，8 天测量和记录小鼠体重和右耳厚度，通过右耳厚度的变化来评价受试药物对该模型的缓解作用。第 8 天结束实验，收集直径为 8 mm 的耳片并称重。

实验结果见图 4A 至 4C，实验结果表明，本公开构建的抗 IL-23 抗体 Hu29-19 在人 IL-23 诱导的银屑病动物模型中的体内药效强于对照分子 Risankizumab，其中：在剂量都为 3 mpk 的情况下，Hu29-19 组的耳朵厚度低于对照 Risankizumab；曲线下面积的统计结果表明，在 3 mpk 的剂量下，Hu29-19 的作用效果要强于 Risankizumab；小鼠耳朵重量的统计结果表明：Hu29-19 1 mpk 组的耳朵重量与 Risankizumab 3 mpk 组相同，Hu29-19 3 mpk 组的耳朵重量要低于 Risankizumab。

实施例 6. 抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体的构建

用于构建双特异性分子的抗 IL-23 抗体的 Hu29-19(可变区序列为 hAb29VH5(SEQ ID NO:56)和 hAb29VL3(SEQ ID NO:60))，人源化抗人 IL-36R 纳米抗体为 VHH213_Hu07(SEQ ID NO:35)或 VHH162_Hu11(SEQ ID NO:24)的序列，与人 IgG1 重链恒定区和人 kappa 轻链恒定区序列，按照图 5 所示分子形式示意图，构建抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体分子。图 5 结构 A 和结构 B 所示的分子形式中，抗 IL-36R VHH 序列分别融合在抗 IL-23 抗体重链和轻链的 N 端，并通过 $(G_4S)_2$ 连接子连接。所构建的抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体的重链恒定区含有 L234A 和 L235A 突变(根据 EU 编号系统)。双抗的名称及构建方式如表 12 所示。

表 12. 抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体构建规则及命名

双特异性抗体编号	抗 IL-36R 纳米抗体序列	抗 IL-23 抗体可变区序列	构建方式
IL-36R-IL-23-01	VHH213_Hu07	Hu29-19 (hAb29VH5 和 hAb29VL3)	结构 A
IL-36R-IL-23-02	VHH162_Hu11		结构 A
IL-36R-IL-23-03	VHH213_Hu07		结构 B

IL-36R-IL-23-04	VHH162_Hu11		结构 B

以下序列中，下划线为连接子，斜体为恒定区序列。

> IL-36R-IL-23-01 重链 (SEQ ID NO：68)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTFSRYCMGWFRQAPGKELVGVAAIDS
DGDTSYADSVEGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADFTPSAPPR
MGSGGYCFGDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSQVTLKESGPVLVKPTETLTLT
CTVSGFSLTNYAISWVRQPPGKGLEWLGVIWTGGGTNYNSGIKSRLTISKDNSKS
QVVLTMTNMDPVDTARYYCVREGDYGSYAGAMDYWGQGTTVTVSS*ASTKGPS*
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> IL-36R-IL-23-01 轻链 (SEQ ID NO：69)

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDYYGISSMHWFQQKPGQPPKLLIYRA
SNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQANKDPYTFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> IL-36R-IL-23-02 重链 (SEQ ID NO：70)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYRTQCLGWYRQAPGKQREAVATISG
GGTSTYYSDSVKGRFTISQDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLSVLGSW
CHGGSSYEYTYSGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSQVTLKESGPVLVKPTETLTLTC
TVSGFSLTNYAISWVRQPPGKGLEWLGVIWTGGGTNYNSGIKSRLTISKDNSKS
QVVLTMTNMDPVDTARYYCVREGDYGSYAGAMDYWGQGTTVTVSS*ASTKGPS*
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> IL-36R-IL-23-02 轻链

为 SEQ ID NO：69。

> IL-36R-IL-23-03 重链 (SEQ ID NO：71)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLTNYAISWVRQPPGKGLEWLGVIWTG
GGTNYNSGIKSRLTISKDNSKSQVVLTMTNMDPVDTARYYCVREGDYGSYAGA
MDYWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN*
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF

NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K

> IL-36R-IL-23-03 轻链 (SEQ ID NO：72)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTFSRYCMGWFRQAPGKELVGVAAIDS DGDTSYADSVEGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADFTPSAPPR MGSGGYCFGDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATIN CRASESVDYYGISSMHWFQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTL TISSLQAEDVAVYYCQQANKDPYTFGGGTKVEIK*RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

> IL-36R-IL-23-04 重链

为 SEQ ID NO：71。

> IL-36R-IL-23-04 轻链 (SEQ ID NO：73)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYRTQCLGWYRQAPGKQREAVATISG GGTSTYYSDSVKGRFTISQDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLSVLGSW CHGGSSYEYTYSGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINC RASESVDYYGISSMHWFQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTI SSLQAEDVAVYYCQQANKDPYTFGGGTKVEIK*RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

此外，在抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体 IL-36R-IL-23-01 和 IL-36R-IL-23-02 的 Fc 中引入 YTE 突变(M252Y，S254T 和 T256E 突变，根据 EU 编号系统)，构建 IL-36R-IL-23-01-YTE 和 IL-36R-IL-23-02-YTE 分子。

>IL-36R-IL-23-01-YTE 重链 (SEQ ID NO：74)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNTFSRYCMGWFRQAPGKELVGVAAIDS DGDTSYADSVEGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADFTPSAPPR MGSGGYCFGDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSQVTLKESGPVLVKPTETLTLT CTVSGFSLTNYAISWVRQPPGKGLEWLGVIWTGGGTNYNSGIKSRLTISKDNSKS QVVLTMTNMDPVDTARYYCVREGDYGSYAGAMDYWGQGTTVTVSS*ASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

>IL-36R-IL-23-02-YTE 重链 (SEQ ID NO：75)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYRTQCLGWYRQAPGKQREAVATISG

GGTSTYYSDSVKGRFTISQDNSKTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLSVLGSW
CHGGSSYEYTYSGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSQVTLKESGPVLVKPTETLTLTC
TVSGFSLTNYAISWVRQPPGKGLEWLGVIWTGGGTNYNSGIKSRLTISKDNSKS
QVVLTMTNMDPVDTARYYCVREGDYGSYAGAMDYWGQGTTVTVSS*ASTKGPS*
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF
LFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>IL-36R-IL-23-01-YTE、IL-36R-IL-23-02-YTE 轻链

均为 SEQ ID NO：69。

>IgG1 Fc(含有 L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E 突变) (SEQ ID NO：76)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

实施例 7. 抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体的亲和力

1． 对 IL-23 的结合(ELISA)

为了评估抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体对 IL-23 抗原的结合，通过 ELISA 检测抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体对 IL-23 抗原的结合。使用 PBS 溶解人 IL-23 蛋白(百普赛斯，ILB-H52W5)至 2 μg/mL，100 μL/孔加入到 96 孔板中，4℃过夜，包被抗原。使用 PBST(PBS+0.05% tween20)溶液洗三次。加入 200μL/孔封闭液(PBST/1% BSA 溶液)，37℃孵育 1h，进行封闭。PBST 溶液洗三次后加入不同浓度的抗 IL-23 单抗或抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体(封闭液稀释)，37℃孵育 2 小时。PBST 溶液洗三次。加入 100 μL HRP 偶联的抗人 IgG Fc 的二抗(1:10000，GenScript，A01854)溶液，37℃孵育 1 小时。PBST 溶液洗三次后，加入 100 μL/孔 TMB 溶液，室温反应 5-10 min，加入 100 μL 终止液，用多功能酶标仪测量 OD450 值，计算 EC_{50}。

使用艾伯维的抗人 IL-23 抗体 Risankizumab 和强生的抗人 IL-23 抗体 Guselkumab 以及 Hu29-19 全长抗体(SEQ ID NO:62 和 63)作为对照。

> Guselkumab 重链 (SEQ ID NO：77)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSNYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDP
SNSYTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARWYYKPFDV
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS

GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG

> Guselkumab 轻链 (SEQ ID NO：78)

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGSGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSK
RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCASWTDGLSLVVFGGGTKLT
VLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG
VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

结果如图 6A 和表 13-1，IL-36R-IL-23-01、IL-36R-IL-23-02 与人 IL-23 抗原的结合亲和力与 Hu29-19 相当，高于对照抗体 Risankizumab 和 Guselkumab。

表 13-1. ELISA 检测双特异性抗体与人 IL-23 的结合 EC_{50} 值

抗体编号	结合活性
	人 EC_{50}(nM)
IL-36R-IL-23-01	1.21
IL-36R-IL-23-02	0.49
Hu29-19	0.55
Risankizumab	4.72
Guselkmab	3.16

2. 对 IL-23 的结合(SPR)

采用 SPR 检测抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体与 IL-23 抗原的亲和力。将各待测单抗或双特异性抗体作为配体，将人 IL-23 抗原蛋白(百普赛斯，ILB-H52W5)作为分析物，采用与实施例 3 相同的实验方法进行检测。结果见表 13-2。

表 13-2. 双特异性抗体与人 IL-23 抗原的 SPR 亲和力

抗体编号	抗原	ka(1/Ms)	Kd(1/s)	K_D(M)
IL-36R-IL-23-01	人 IL-23 抗原	2.60E+06	5.97E-05	2.30E-11
IL-36R-IL-23-02	人 IL-23 抗原	2.90E+06	6.83E-05	2.35E-11
IL-36R-IL-23-03	人 IL-23 抗原	9.54E+05	4.93E-05	5.17E-11
IL-36R-IL-23-04	人 IL-23 抗原	8.58E+05	6.02E-05	7.02E-11
Hu29-19	人 IL-23 抗原	5.93E+06	6.26E-05	1.06E-11

结果显示，各双抗对人 IL-23 抗原具有较强的亲和力。其中 IL-36R-IL-23-01, IL-36R-IL-23-02 与 Hu29-19 对人 IL-23 抗原的亲和力相似。

3. 对细胞表面 IL-36R 的结合(FACS)

用 FACS 检测抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体与细胞膜上表达的人 IL-36R 的结合能力，实验方法为：将不同浓度的候选待测抗体加入到 1E5/孔过表达人 IL-36R 的 CHO-K1 细胞中，冰上孵育 1h。FACS 缓冲液(1% FBS，DPBS)洗两次后，加入 100 μL AF488-山羊抗人 IgG(H+L)的荧光二抗 (1:1000，Invitrogen，A11013)，

冰上孵育 30 min。FACS 缓冲液洗两次，150 μL FACS 缓冲液重悬，使用流式细胞仪(BD，FACSCelesta)检测荧光信号，计算 EC_{50}。

结果如图 6B 和表 13-3，IL-36R-IL-23-01、IL-36R-IL-23-02 与 CHO-K1 细胞表面表达的人 IL-36R 有较强的结合活性，与 VHH213_Hu07、VHH162_Hu11 以及对照抗体 BI655130 和 H4H14706P2 的结合亲和力相似。

表 13-3. FACS 检测双特异性抗体与人 IL-36R 的结合 EC_{50} 值

抗体编号	结合活性	
	人 EC_{50}(nM)	最大 MFI
IL-36R-IL-23-01	1.28	11564
IL-36R-IL-23-02	1.13	11361
VHH213_Hu07	0.97	7401
VHH162_Hu11	0.88	6211
BI655130	0.75	12893
H4H14706P2	0.64	10627

4. 对 IL-36R 的结合(SPR)

采用 SPR 检测抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体与 IL-36R 抗原的亲和力。将各待测双特异性抗体作为配体，将人 IL-36R 抗原蛋白(恺佧蛋白，IL1-HM4L2)作为分析物，实验方法为：仪器使用 Biacore™ 8k(GE Healthcare)。实验选用 CM5 传感器芯片(Cat.#29149603，GE)，流动相采用 HBS-EP+缓冲溶液(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% surfactant P20)。将抗人 IgG (Fc) 抗体用 10 mM 醋酸钠缓冲液(pH 5.0)，配制成 30 μg/mL 溶液，选择 Immobilization 程序自动进行抗人 IgG (Fc) 抗体通道氨基偶联固定。用 HBS-EP+缓冲溶液分别配制各待测抗体作为配体，用芯片通道上的抗人 IgG (Fc) 抗体进行捕获。将人 IL-36R 抗原蛋白(恺佧蛋白，IL1-HM4L2)作为分析物，用 HBS-EP+缓冲溶液进行配制，分析物进行 2 倍梯度稀释将稀释，在 30 μL/min 的流速下流过实验通道和参比通道，结合 1min，解离 15min。再生缓冲液 10 mM Glycine pH 1.5(GE Healthcare，BR-1003-54) 在 10 μL/min 的流速下运行 30s。计算结合速率 Ka 和解离速率 Kd，以及解离常数(即亲合力 K_D)。结果参见表 13-4。

表 13-4. 双特异性抗体与 IL-23 抗原的 SPR 亲和力

抗体编号	抗原	ka(1/Ms)	kd(1/s)	K_D(M)
IL-36R-IL-23-01	人 IL-36R 抗原	1.91E+04	1.23E-04	6.47E-09
IL-36R-IL-23-02	人 IL-36R 抗原	9.21E+03	1.46E-04	1.59E-08
IL-36R-IL-23-03	人 IL-36R 抗原	2.53E+04	1.08E-04	4.28E-09
IL-36R-IL-23-04	人 IL-36R 抗原	1.22E+04	2.16E-04	1.77E-08

结果显示，各双抗均对人 IL-36R 抗原具有较强的亲和力，并且与 VHH162_Hu11 和 VHH213_Hu07 对人 IL-36R 抗原的亲和力相似。

实施例 8. 抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体对 IL-36 刺激因子激活 IL-36R 功能的抑制作用

用人皮肤鳞状细胞系 A431 评价抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体对 IL-36 诱导 IL-8 分泌的抑制活性，实验方法为：将 A431(ATCC，HRC00439)以 3E4/孔铺于 96 孔板，过夜培养。每孔加入不同浓度稀释的待测抗体以及 IL-36(IL36α(CR61)，IL36β(CR59)或 IL36γ(CM77)，NOVOProtein)。培养 24 小时后，收集上清，使用 IL-8 试剂盒(Cisbio，62HIL08PEG)和多功能酶标仪(Perkin Elmer，Envision2105)检测 IL-8 含量。

结果如图 7A、7B 和表 14-1、14-2 所示，IL-36R-IL-23-01、IL-36R-IL-23-02、IL-36R-IL-23-03 和 IL-36R-IL-23-04 能够显著阻断人 IL-36 诱导 A431 分泌 IL-8。

表 14-1. IL-36R-IL-23-01、IL-36R-IL-23-02 对人 IL-36 刺激因子功能的抑制作用

抗体编号	IL-8 分泌(A431)		
	IL-36α IC_{50} (nM)	IL-36β IC_{50} (nM)	IL-36γ IC_{50} (nM)
IL-36R-IL-23-01	0.54	0.2	0.06
IL-36R-IL-23-02	1.63	0.74	0.21
BI655130	0.26	0.1	0.04
H4H14706P2	0.64	0.26	0.06

表 14-2. IL-36R-IL-23-03，IL-36R-IL-23-04 对人 IL-36 刺激因子功能的抑制作用

抗体编号	IL-36α 诱导的 A431 IL-8 分泌 IC_{50} (nM)
IL-36R-IL-23-03	0.29
IL-36R-IL-23-04	0.34
VHH213_Hu07	0.13
VHH162_Hu11	0.14
BI655130	0.06
H4H14706P2	0.15

实施例 9. 抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体对 IL-23 刺激因子激活 IL-23R 功能的抑制作用

1. 对人 IL-23 诱导 Ba/F3-IL-23 细胞增殖的抑制作用

利用 CellTiter Glo 方法评估抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体对人 IL-23 蛋白诱导 BaF3-mIL-23R 细胞增殖的抑制作用。将 BaF3-mIL-23R 细胞(稳定表达 IL-23R 和 IL-12Rβ1 的 BaF3 细胞(Cobioer，CBP60474))以 1E4/孔(50 μL)铺于 96 孔板，将 25μL 不同浓度的抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体与 25 μL 人 IL-23(百普赛斯，ILB-H52W5，终浓度 150 ng/mL)孵育半小时后，加入细胞培养板。培育 72 h 后，每孔加入 50 μl Celltiter Glo 检测液(Promega，G7573)，用多功能酶标仪(Perkin Elmer，Envision 2105)检测生物发光信号。

结果如图 8A、8B 和表 15-1、15-2 所示。IL-36R-IL-23-01 和 IL-36R-IL-23-02 显著抑制人 IL-23 蛋白诱导的 BaF3-mIL-23R 细胞增殖。

表 15-1. IL-36R-IL-23-01 对 IL-23 诱导 BaF3-mIL-23R 细胞增殖的抑制作用

抗体编号	IC_{50}(nM)

IL-36R-IL-23-01	0.39
Hu29-19	0.36

表 15-2. IL-36R-IL-23-02 对 IL-23 诱导 BaF3-mIL-23R 细胞增殖的抑制作用

抗体编号	IC_{50}(nM)
IL-36R-IL-23-02	0.5
Hu29-19	0.43

2. 对人 IL-23 诱导 DB-STAT3-Luc2 报告基因系统 STAT3 激活信号的抑制作用

利用荧光素酶报告系统评估抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体对人 IL-23 蛋白诱导 DB-STAT3 luc2 细胞内 STAT3 激活信号的抑制作用。

将 DB-STAT3-Luc2 细胞(稳定表达 STAT3-Luc2 报告基因系统的 DB 细胞株(ATCC，CRL-2289))以 3E4/孔(50uL)铺于 96 孔板，将 25 μL 不同浓度的抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体与 25 μL 人 IL-23(百普赛斯，ILB-H52W5，终浓度 1 μg/mL)孵育半小时后，加入细胞培养板。过夜培育后，每孔加入 100 μl Bright-Glo(Promega，E2620)检测液，用多功能酶标仪(Perkin Elmer，Envision 2105)检测生物发光信号。

结果如图 9 和表 16 所示。结果表明，在 DB-STAT3-Luc2 报告基因系统中，抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体 IL-36R-IL-23-01 和 IL-36R-IL-23-02 显著抑制人 IL-23 蛋白诱导的 STAT3 信号的激活，且抑制作用与抗 IL-23 单抗 HU29-19 相当。

表 16.双特异性抗体对 IL-23 诱导 DB-STAT3-Luc2 报告基因体系的抑制作用检测

抗体编号	DB-STAT3-Luc2 报告基因体系 IC_{50} (nM)
IL-36R-IL-23-01	7
IL-36R-IL-23-02	8.8
Hu29-19	5.1

实施例 10. 双特异性抗体对人 IL-36 和人 IL-23 诱导的小鼠耳肿胀的抑制作用

该模型用于模拟人体中由过量 IL-36 或 IL-23 所导致的炎症性疾病。

雌性人 IL-36R 转基因小鼠，6-8 周龄，购自百奥赛图江苏基因生物技术有限公司。饲养环境：SPF；生产许可证：SCXK(苏)-2021-0003；人 IL-36R 转基因小鼠合格证编号：320726210100341485。

1. 双特异性抗体在小鼠急性耳肿胀模型中的抑制作用

通过向 IL-36R 人源化转基因小鼠耳部皮下注射人 IL-36 和人 IL-23，构建小鼠急性耳肿胀模型，以评价抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体的体内活性。

实验流程如图 10A 所示。动物到达后适应性饲养 7 天，随机分组。实验第 0 天和第 3 天，小鼠腹腔注射等摩尔数的抗 IL-36R 抗体、抗 IL-23 抗体或抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体。从实验第 1 天至第 6 天，每日向小鼠右耳皮下注射 PBS 或 1μg 重组人 IL-36α 蛋白和 3μg 重组人 IL-23 蛋白，左耳注射等体积 PBS。小鼠分组及给药方案见表 17。实验终点测量小鼠右耳重量，并取部分耳组织用

RNAlater(Invitrogen，AM7020)保存，用于下游基因表达检测。

表 17. 人 IL-36 和人 IL-23 诱导人 IL-36R 转基因小鼠耳肿胀给药方案

小鼠品系	分组	N	左耳	右耳	给药	剂量	给药途径
人IL-36R 转基因小鼠 C57BL/6	1	3	PBS	PBS	/	/	ip
	2	4	PBS	hIL-36α 1μg + hIL-23 3μg	IgG	10 mg/kg	ip
	3	4	PBS		Hu29-19	10 mg/kg	ip
	4	5	PBS		VHH213-Hu07	5.3 mg/kg	ip
	5	5	PBS		IL-36R-IL-23-01	12 mg/kg	ip

结果如图 10B 和 10C 所示，双特异性抗体 IL-36R-IL-23-01 显著抑制人 IL-36 和人 IL-23 诱导的小鼠右耳重量增加(图 10B)、降低炎性疾病因子和抗菌肽的表达水平(图 10C)。其中，IL-36R-IL-23-01 对耳组织下游基因表达的调控作用强于抗 IL-36R 抗体 VHH213_Hu07 和抗 IL-23 抗体 HU29-19(图 10C) (附图中，与模型组相比，* P＜0.05，** P＜0.01，*** P＜0.001，**** P＜0.0001)。

2. 双特异性抗体相比单抗联用在小鼠急性耳肿胀模型中的抑制作用

实验流程如图 10A 所示。动物到达后适应性饲养 7 天，随机分组。实验第 0 天，小鼠腹腔注射等摩尔数的抗 IL-36R 抗体、抗 IL-23 抗体、抗 IL-36R 与抗 IL-23 双特异性抗体或抗 IL-36R 抗体联用抗 IL-23 抗体。从实验第 1 天至第 6 天，每日向小鼠右耳皮下注射 PBS 或 1μg 重组人 IL-36 蛋白和 3μg 重组人 IL-23 蛋白，左耳注射等体积 PBS。小鼠分组及给药方案见表 18。实验终点测量小鼠右耳重量，并取部分耳组织用 RNAlater(Invitrogen，AM7020)保存，用于下游基因表达检测。

表 18. 人 IL-36 和人 IL-23 诱导人 IL-36R 转基因小鼠耳肿胀给药方案

小鼠品系	分组	N	左耳	右耳	给药	剂量	给药途径
人IL-36R 转基因小鼠 C57BL/6	1	5	PBS	PBS	/	/	ip
	2	5	PBS	hIL-36α 1μg + hIL-23 3μg	IgG	10 mg/kg	ip
	3	6	PBS		Hu29-19	10 mg/kg	ip
	4	6	PBS		VHH213-Hu07	5.3 mg/kg	ip
	5	6	PBS		IL-36R-IL-23-01	12 mg/kg	ip
	6	6	PBS		IL-36R-IL-23-01	24 mg/kg	ip
	7	6	PBS		Hu29-19+ VHH213-Hu07	10 mg/kg + 5.3 mg/kg	ip

结果如图 11 所示，双特异性抗体 IL-36R-IL-23-01 (12 mpk)对小鼠耳组织下游基因表达的调控作用显著强于等摩尔剂量抗 IL-23 抗体 Hu29-19 (10 mpk)和抗 IL-36R 抗体 VHH213_Hu07 (5.3 mpk)，并且与 Hu29-19 (10 mpk)和 VHH213_Hu07 (5.3 mpk)联用组相当。同时，IL-36R-IL-23-01 表现出明显的剂量效应，高剂量 IL-36R-IL-23-01 (24 mpk)对多个基因 (如 S100A8 和 S100A9，两者均为抗菌肽，在炎症反应中上调表达，参与细胞因子招募和细胞因子表达)的调控作用强于低剂量 IL-36R-IL-23-01 (12 mpk)以及 Hu29-19 (10 mpk)和 VHH213_Hu07 (5.3 mpk)联用(附图中，与模型组相比，* P＜0.05，** P＜0.01，*** P＜0.001)。

虽然以上描述了本公开的具体实施方案，但是本领域的技术人员应当理解，这些仅是举例说明，在不背离本公开的原理和实质的前提下，可以对这些实施方案做出多种变更或修改。因此，本公开的保护范围由权利要求书限定。

权利要求书：

1. IL-36R/IL-23 结合蛋白，其包含特异性结合 IL-36R 的第一抗原结合结构域和特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域；

其中，所述第一抗原结合结构域包含免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含：

SEQ ID NO: 3、12-26 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3，或

SEQ ID NO: 4、27-35 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3，

其中，所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的。

2. 如权利要求 1 所述的 IL-36R/IL-23 结合蛋白，所述免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:5、6、7 所示，或如 SEQ ID NO: 8、9、10 所示。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的 IL-36R/IL-23 结合蛋白，所述免疫球蛋白单一可变结构域为人源化、回复突变、亲合力成熟、去除 T 细胞表位、降低抗体脱酰胺和/或降低抗体异构化改造的；

优选地，人源化改造过程使用的人种系模板的重链框架区源自 IGHV3-23*04、IGHV3-74*01 和/或 IGHJ1*01。

4. 如权利要求 1-3 任一项所述的 IL-36R/IL-23 结合蛋白，所述免疫球蛋白单一可变结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3、12-26 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性，或如 SEQ ID NO: 4、27-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性；

优选地，所免疫球蛋白单一可变结构域是抗 IL-36R 纳米抗体或 VHH。

5. 如权利要求 1-4 任一项所述的 IL-36R/IL-23 结合蛋白，其中，所述特性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中，

所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 52-57 任一所示的氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 58-61 任一所示的氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，或

所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，

所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的；

优选地，

所述 VH 包含 SEQ ID NO:50、43、44 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO:45-47 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

所述 VH 包含 SEQ ID NO:51、43、44 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO:45-47 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

所述 VH 包含 SEQ ID NO:42-44 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 VL 包含 SEQ ID NO:45-47 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

6. 如权利要求 5 所述的 IL-36R/IL-23 结合蛋白，其中，

所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 52-57 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列，所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 58-61 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列，或

所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 40 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列，所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 41 所示或与之具有至少 80%、至少 90%同一性的氨基酸序列；

优选地，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 56 所示的氨基酸序列，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 60 所示的氨基酸序列。

7. IL-36R/IL-23 结合蛋白，其包含特异性结合 IL-36R 的第一抗原结合结构域和特异性结合 IL-23 的第二抗原结合结构域；优选地，所述第一抗原结合结构域、所述第二抗原结合结构域如权利要求 1-6 任一项所定义。

8．如权利要求 1-7 任一项所述的 IL-36R/IL-23 结合蛋白，其还包含免疫球蛋白的 Fc 区；

优选地，所述 Fc 区是人 IgG1、人 IgG2 或人 IgG4 的 Fc 区；

更优选地，所述 Fc 区是具有 S228P 突变的人 IgG4 的 Fc 区，或具有 L234A 和/或 L235A 突变的人 IgG1 的 Fc 区，或具有 M252Y、S254T 和/或 T256E 突变的人 IgG1 的 Fc 区。

9. 如权利要求 1-8 任一项所述的 IL-36R/IL-23 结合蛋白，所述结合蛋白中还具有连接子；

优选地，所述连接子的氨基酸序列如$(G_mS_n)_h$ 或$(GGNGT)_h$ 或$(YGNGT)_h$ 或$(EPKSS)_h$所示，其中，m、n 各自独立地选自 1-8 的整数，h 独立地选自 1-20 的整数；

更优选地，所述连接子为$(G_4S)_2$、$(G_4S)_3$所示的连接子。

10. 如权利要求 1-9 任一项所述的 IL-36R/IL-23 结合蛋白，其包含第一多肽链和第二多肽链，选自如下：

(1) 第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:68 或 70 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性，第二多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:69 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性；

(2) 第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:71 所示或与之具有至少 80%、至

少 90%序列同一性，第二多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:72、73 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性；

(3) 第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:74 或 75 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性，第二多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:69 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性。

11. IL-36R 结合蛋白，其包含免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含：

SEQ ID NO: 3、12-26 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3，或

SEQ ID NO: 4、27-35 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3，

其中，所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的。

12. 如权利要求 11 所述的 IL-36R 结合蛋白，所述免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:5、6、7 所示，或如 SEQ ID NO: 8、9、10 所示。

13. 如权利要求 11 或 12 所述的 IL-36R 结合蛋白，所述免疫球蛋白单一可变结构域为人源化、回复突变、亲合力成熟、去除 T 细胞表位、降低抗体脱酰胺和/或降低抗体异构化改造的；

优选地，人源化改造过程使用的人种系模板的重链框架区源自 IGHV3-23*04、IGHV3-74*01 和/或 IGHJ1*01。

14. 如权利要求 11-13 任一项所述的 IL-36R 结合蛋白，所述免疫球蛋白单一可变结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3、12-26 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性，或如 SEQ ID NO: 4、27-35 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性；

优选地，所述 IL-36R 结合蛋白是抗 IL-36R 纳米抗体或 VHH。

15. 如权利要求 11 至 14 任一项所述的 IL-36R 结合蛋白，其还包含免疫球蛋白 Fc 区；

优选地，所述 Fc 区是人 IgG1、人 IgG2 或人 IgG4 的 Fc 区。

16. 多核苷酸，其编码权利要求 1-10 任一项所述的 IL-36R/IL-23 结合蛋白、权利要求 11-15 任一项所述的 IL-36R 结合蛋白；

优选地，所述多核苷酸为 DNA 或 RNA。

17. 载体，其包含权利要求 16 所述的多核苷酸。

18. 宿主细胞，其含有或表达权利要求 16 所述的多核苷酸或权利要求 17 所述

的载体。

19. 制备 IL-36R/IL-23 结合蛋白、IL-36R 结合蛋白的方法，包括：

在权利要求 18 所述的宿主细胞中表达权利要求 16 所述的多核苷酸或权利要求 17 所述的载体，以及从所述宿主细胞中分离表达的 IL-36R/IL-23 结合蛋白或 IL-36R 结合蛋白；

可选地，进一步包含纯化所述 IL-36R/IL-23 结合蛋白、IL-36R 结合蛋白的步骤。

20. 药物组合物，其包含权利要求 1-10 任一项所述的 IL-36R/IL-23 结合蛋白、权利要求 11-15 任一项所述的 IL-36R 结合蛋白，以及，至少一种可药用的赋形剂、稀释剂或载体。

21. 治疗或预防疾病的方法，包括向有需要的受试者施用治疗或预防有效量的权利要求 1-10 任一项所述的 IL-36R/IL-23 结合蛋白、权利要求 11-15 任一项所述的 IL-36R 结合蛋白、权利要求 16 所述的多核苷酸、权利要求 17 所述的载体或权利要求 20 的药物组合物；

优选地，所述疾病为炎性疾病或自身免疫疾病；

更优选地，所述疾病为银屑病。

22. 权利要求 1-10 任一项所述的 IL-36R/IL-23 结合蛋白、权利要求 11-15 任一项所述的 IL-36R 结合蛋白、权利要求 16 所述的多核苷酸、权利要求 17 所述的载体或权利要求 20 的药物组合物用于制备治疗或预防疾病的药物的用途；

优选地，所述疾病为炎性疾病或自身免疫疾病；

更优选地，所述疾病为银屑病。