(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110582512 B
(45)授权公告日 2022.08.30

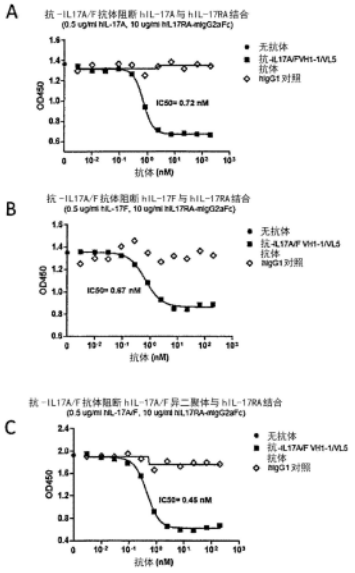
(21)申请号 201780087699.1
(22)申请日 2017.03.10
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110582512 A
(43)申请公布日 2019.12.17
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.08.29
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2017/076278 2017.03.10
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/161340 EN 2018.09.13
(73)专利权人 苏州鑫康合生物医药科技有限公司
地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号A1北座3楼H42
专利权人 北京鑫康合生物医药科技有限公司
(72)发明人 董晨 郭丽
(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
专利代理师 吴小明
(51)Int.Cl.
C07K 16/24(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61P 37/00(2006.01)
(56)对比文件
CN 106336459 A,2017.01.18
CN 105073775 A,2015.11.18
孙阳等.一株中和人IL-17免疫活性的单克隆抗体的制备.《免疫学杂志》.2011,(第07期),
审查员 陈茹
权利要求书1页 说明书10页
序列表9页 附图6页

(54)发明名称

针对IL-17A和IL-17F二者的单克隆抗体及其用途

(57)摘要

本发明提供了与IL-17A和IL-17F二者结合并且抑制IL-17A和IL-17F二者的活性的抗-IL17A/F抗体。所述抗体包含分别由SEQ ID NOs:1-3表示的重链CDRs 1-3和分别由SEQ ID NOs:4-6表示的轻链CDRs 1-3。本发明还提供所述抗体在制备用于治疗受试者中与IL-17A和/或IL-17F有关的疾病的药物中的用途,和包含所述抗体的药物组合物。



CN 110582512 B

1.一种抗-IL17A/F抗体,所述抗体与IL-17A和IL-17F二者结合并且抑制IL-17A和IL-17F二者的活性,其中所述抗体包含由SEQ ID NO:1表示的CDR1H,由SEQ ID NO:2表示的CDR2H,由SEQ ID NO:3表示的CDR3H;以及由SEQ ID NO:4表示的CDR1L,由SEQ ID NO:5表示的CDR2L和由SEQ ID NO:6表示的CDR3L。

2.根据权利要求1所述的抗-IL17A/F抗体,其中所述抗体包含由SEQ ID NO:7表示的可变重链结构域,和由SEQ ID NO:8表示的可变轻链结构域或由SEQ ID NO:9表示的可变轻链结构域。

3.根据权利要求1所述的抗-IL17A/F抗体,其中所述抗体是人IgG抗体。

4.根据权利要求1所述的抗-IL17A/F抗体,其中所述抗体是鼠、嵌合或人源化抗体。

5.根据权利要求1所述的抗-IL17A/F抗体,其中所述抗体包含由SEQ ID NO:10表示的重链和由SEQ ID NO:11表示的轻链。

6.一种核苷酸分子,其编码根据权利要求1至5中任一项所述的抗-IL17A/F抗体。

7.一种重组表达载体,其包含根据权利要求6所述的核苷酸分子。

8.一种宿主细胞,其包含根据权利要求7所述的重组表达载体。

9.根据权利要求1至5中任一项所述的抗-IL17A/F抗体在制备药物中的用途,所述药物用于治疗受试者中与IL-17A和/或IL-17F有关的疾病,其中所述疾病选自银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、类风湿性关节炎(RA)、多发性硬化(MS)、系统性红斑狼疮、骨关节炎或炎性肠病(IBD)。

10.根据权利要求9所述的用途,其中所述受试者是哺乳动物。

11.根据权利要求10所述的用途,其中所述受试者选自大鼠、小鼠、猴或人。

12.根据权利要求11所述的用途,其中所述受试者是人。

13.一种药物组合物,其用于治疗受试者中与IL-17A和/或IL-17F有关的疾病,所述药物组合物包含治疗有效量的根据权利要求1至5中任一项所述的抗-IL17A/F抗体和药用赋形剂,其中所述疾病选自银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、类风湿性关节炎(RA)、多发性硬化(MS)、系统性红斑狼疮、骨关节炎或炎性肠病(IBD)。

14.根据权利要求13所述的药物组合物,其中所述受试者是哺乳动物。

15.根据权利要求14所述的药物组合物,其中所述受试者选自大鼠、小鼠、猴或人。

16.根据权利要求15所述的药物组合物,其中所述受试者是人。

针对IL-17A和IL-17F二者的单克隆抗体及其用途

发明领域

[0001] 本发明涉及针对IL-17A和IL-17F二者的抗体及其用途。具体地，本发明提供抗-IL17A/F抗体，其结合IL-17A和IL-17F二者并且抑制IL-17A和IL-17F二者的活性，以及所述抗体的用途。

背景技术

[0002] 白细胞介素17(IL-17)细胞因子家族中有6个成员，包括IL-17A(通常称为IL-17)、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E(也称为IL-25)和IL-17F。在所有成员中，最清楚IL-17A(CTLA-8,Swiss Prot Q16552)和IL-17F(Swiss-Prot#Q96PD4SEQ ID#NP_443104)的生物学功能和调节。这两种细胞因子共有最强的序列同源性(55％同一性)。编码IL-17A和IL-17F的基因在小鼠和人二者的同一染色体上彼此接近，强调了它们共有的表达模式(Wang X.等人,Immunity 2012;36:23-31.)。在功能上，IL-17A和IL-17F二者都介导促炎反应，具有取决于炎症的类型和位点的某些差异(Ishigame H等人,Immunity 2009;30:108-119;Yang XO等人,J Exp Med2008;205:1063-1075.)。IL-25与IL-17A的序列相似性最低，仅为16％，相比之下在IL-17F的情况下为50％。相应地，IL-25在免疫中起不同的作用，主要调节针对蠕虫寄生虫和过敏性炎症的T辅助(Th)2应答(Fallon PG等人,J Exp Med 2006;203:1105-1116.)。已经显示IL-17B、IL-17C和IL-17D诱导促炎细胞因子的产生，但是它们的生物学功能在很大程度上是未知的(Yamaguchi Y等人,J Immunol 2007;179:7128-7136;Wu Q等人,Microbes Infect 2007;9:78-86;Li H等人,Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:773-778)。三个不同组的最新研究强调了IL-17C在粘膜免疫和自身免疫反应中的功能(Ramirez-Carrozzi V等人Nat Immunol 2011;12:1159-1166;Song X等人,Nat Immunol 2011;12:1151-1158;Chang SH等人,Immunity2011;35:611-621.)。IL-17家族细胞因子通过靶细胞上的表面受体介导它们的生物学功能。IL-17RA是第一个鉴定出的IL-17受体，随后主要基于它们与IL-17RA的序列相似性，鉴定出其他4种IL-17R家族成员IL-17RB、IL-17RC、IL-17RD和IL-17RE。IL-17家族细胞因子的功能性受体通常以异二聚体的形式存在，IL-17RA作为共有亚基。例如，由IL-17RA和IL-17RC组成的受体复合物识别IL-17A和IL-17F，而IL-17RA与IL-17RB配对，然后与IL-25结合(Iwakura Y等人,Immunity 2011;34:149-162;Chang SH,Dong C.Cell Signal 2011;23:1069-1075.)。

[0003] 失调的IL-17A和IL-17F的产生可以导致过度的促炎细胞因子表达和慢性炎症，其导致组织损伤和自身免疫。IL-17家族细胞因子与许多自身免疫性疾病有关，包括多发性硬化(MS)、类风湿性关节炎(RA)、炎性肠病和牛皮癣。长期以来，MS被认为是Th1依赖性疾病，直到研究揭示了Th17细胞和IL-17家族细胞因子在使用EAE发展MS(一种类似人MS的小鼠模型)中的关键作用(Langrish CL等人,J Exp Med 2005;201:233-240;Park H等人,Nat Immunol 2005;6:1133-1141.)。Th17细胞和相关细胞因子是驱动相关中枢神经系统炎症和损伤形成的主要力量(Langrish CL等人,J ExpMed 2005;201:233-240;Park H等人,Nat Immunol 2005;6:1133-1141)。在RA患者的滑液和滑膜中容易检测到IL-17A(Chabaud M等

人,J Immunol1998;161:409-414.)。使用RA小鼠模型的一些研究已证明IL-17A在疾病进展中的关键作用(Murphy CA等人,J Exp Med 2003;198:1951-1957;Nakae S等人,J Immunol 2003;171:6173-6177;Nakae S等人Proc NatlAcad Sci USA 2003;100:5986-5990;Lubberts E等人,Arthritis Rheum 2004;50:650-659;Ruddy MJ等人,J Leukoc Biol 2004;76:135-144)。在疾病发作后阻断IL-17有效地防止骨和软骨侵蚀并且降低临床症状的严重程度(Lubberts E等人,Arthritis Rheum 2004)。IL-17A在许多自身免疫性疾病中的广泛参与使得该细胞因子成为理想的药物靶标。实际上,人源化IL-17A抗体已被开发用于治疗RA、牛皮癣和葡萄膜炎,得到有利的结果(Genovesse MC等人,Arthritis Rheum 2010;62:929-939;Hueber W等人,Sci Transl Med 2010;2:52-72.)。

[0004] 总之,IL-17A和IL-17F冗余地在促进炎症方面具有相同的受体和功能。IL-17A和IL-17F可以诱导多种炎症细胞因子、趋化因子和粘附分子的产生,并且将嗜中性粒细胞和巨噬细胞募集到炎症部位。IL-17A和IL-17F二者类似地作为促进剂参与人类以及人类疾病的动物模型中的多种自身免疫性疾病和炎性疾病的进展和病理学,包括类风湿性关节炎(RA)、多发性硬化(MS)、骨关节炎和炎性肠病(IBD)。在RA患者的滑膜组织中检测到高水平的IL-17A(Chabaud M等人,J Immunol 2003;171:6173-6177)。IL-17A在MS患者的脑脊液中过表达(Hellings,P.W.等人,Am.J.Resp.Cell Mol Biol.28(2003)42-50)。

发明内容

[0005] IL-17A和IL-17F二者的证明的免疫活性说明了IL-17A和IL17F拮抗剂的临床或治疗潜力以及对其的需求。具体地,与IL-17A和IL-17F二者结合并且阻断IL-17A和IL-17F二者的活性的抗体将具有新的和/或改善的治疗性质。因此,需要针对IL-17A和IL-17F二者的拮抗剂。用单克隆抗体阻断IL-17A和IL-17F二者将具有比用于治疗牛皮癣、牛皮癣性关节炎和强直性脊柱炎的IL-17A拮抗剂更好的临床或治疗潜力。

[0006] 本发明提供了这样的抗体,所述抗体能够特异性结合人IL-17A和IL-17F二者(本文中可互换地称为“交叉反应性抗体”、“IL-17A/F抗体”等)并且能够调节IL-17A和IL-17F二者的活性,并且因此可用于治疗各种疾病和病理状况,诸如免疫相关疾病和炎症性疾病。抗体的特征在于包含由SEQ ID NO:1表示的CDR1H,由SEQ ID NO:2表示的CDR2H,由SEQ IDNO:3表示的CDR3H;以及由SEQ ID NO:4表示的CDR1L,由SEQ ID NO:5表示的CDR2L和由SEQ ID NO:6表示的CDR3L。

[0007] 在一个实施方案中,这样的抗-IL17A/F抗体是鼠、嵌合或人源化变体。抗-IL17A/F抗体是单克隆和双特异性抗体。

[0008] 在一个实施方案中,抗体的特征在于包含:

[0009] 由SEQ ID NO:7表示的可变重链结构域(VH1-1),和由SEQ ID NO:8表示的可变轻链结构域(VL5)或由SEQ ID NO:9表示的VL2-1。

[0010] 在一个实施方案中,抗体的特征在于包含:

[0011] 由SEQ ID NO:7表示的可变重链结构域(VH1-1),和由SEQ ID NO:8表示的可变轻链结构域(VL5)。

[0012] 在一个实施方案中,抗体的特征在于是人IgG类型。

[0013] 在一个实施方案中,抗体的特征在于包含:

[0014] 由SEQ ID NO:10表示的重链,和

[0015] 由SEQ ID NO:11表示的轻链。

[0016] IL-17A/F抗体尤其可以用于体外、原位或体内诊断或治疗与存在IL-17A和/或IL-17F有关的哺乳动物细胞或病理状况。在一个实施方案中,与IL-17A和/或IL-17F有关的疾病是自身免疫性疾病或炎性疾病,例如,包括但不限于牛皮癣、牛皮癣性关节炎、强直性脊柱炎、类风湿性关节炎(RA)、多发性硬化(MS)、系统性红斑狼疮、骨关节炎或炎性肠病(IBD)。

[0017] 附图描述

[0018] 图1示出了在非还原和还原条件下亲本抗体的SDS-PAGE结果。在每个泳道中加载约2μg蛋白质。(A)标记,页面标尺预染蛋白梯(page rulerpre-stained protein ladder)(Thermo Scientific,产品编号:26616);BSA-N,非还原的;QH_VH1-1+QH_VL2-1-N,非还原的;QH_VH1-1+QH_VL5-N,非还原的;QH_VH1-1+QH_VL2-1-R,还原的;QH_VH1-1+QH_VL5-R,还原的;BSA-R,还原的;(B)标记示出的分子量。

[0019] 图2示出了抗-IL17A/F抗体对HFF-1细胞中IL-17A、IL-17F和IL-17A/F诱导IL-6的抑制效果(IC50,以nM计),即本发明的抗-IL17A/F抗体的功能性测定的结果。(A)IL-17A诱导的IL-6产生被抗-IL17A/F抗体VH1-1/VL5mAb抑制,并且IC50为1.727nM;(B)IL-17F诱导的IL-6产生被抗-IL17A/F抗体VH1-1/VL5mAb抑制,并且IC50为1.77nM;(C)IL-17A/F异二聚体诱导的IL-6产生被抗-IL-17A/F抗体VH1-1/VL5mAb抑制,并且IC50为0.99nM。人IgG1(hIgG1)用作对照抗体。

[0020] 图3示出了抗-IL17A/F抗体对IL-17A、IL-17F或IL-A/F与IL-17受体之间相互作用的阻断效果。(A)抗-IL17A/F抗体,即抗-IL17A/FVH1-1/VL5抗体,阻断IL-17A和IL-17RA之间的相互作用;(B)抗-IL17A/F抗体,即抗-IL17A/F VH1-1/VL5抗体,阻断IL-17F和IL-17RA之间的相互作用;(C)抗-IL17A/F抗体,即抗-IL17A/F VH1-1/VL5抗体,阻断IL-17A/F和IL-17RA之间的相互作用。人IgG1(hIgG1)用作对照抗体。

[0021] 图4示出了hIgG VH1-1/VL5与人IL-17家族成员的结合特性。将2μg/ml的人IL-17A、B、C、D、E和F分别包被到ELISA板中,并且与一系列浓度的hIgG VH1-1/VL5抗体(A～F)一起温育。人IgG1(hIgG1)用作对照抗体。结合特性由OD450nm表示。通过GraphPad Prism计算EC50值。

[0022] 图5示出了hIgG VH1-1/VL5与食蟹猴IL-17A和F的结合特性。将2μg/ml的食蟹猴IL-17A(A)和17F(B)分别包被到ELISA板中,并且与hIgGVH1-1/VL5抗体(抗体浓度为0.3nM至66.67nM)一起温育。人IgG1(hIgG1)用作对照抗体。通过GraphPad Prism计算EC50值。

[0023] 图6抗-IL17A/F抗体在小鼠药效学模型中抑制人IL-17诱导的CXCL1分泌。在每只小鼠静脉内(i.v.)注射20μg抗-IL17A/F抗体后1小时,将人IL-17A(3μg)皮下(s.c.)施用至小鼠。在人IL-17A注射后2小时通过ELISA测定KC水平。每组n＝5只小鼠。

[0024] 发明详述

[0025] 现在将进一步描述本发明。在以下段落中,更详细地定义了本发明的不同方面。除非明确相反地指明,否则如此定义的每个方面可以与任何其他方面或多个方面组合。特别地,在不偏离由权利要求限定的本发明范围的情况下,指示为优选或有利的任何特征可以与指示为优选或有利的任何其他特征或多个特征组合。

[0026] 除非另有说明，本发明的实践将采用分子生物学、化学、生物化学和重组DNA技术、生物信息学的常规技术，这些技术在本领域的技术范围内。这样的技术在文献中得到充分说明。

[0027] 在第一方面，本发明提供抗-IL17A/F抗体，其结合IL-17A和IL-17F二者并且抑制IL-17A和IL-17F的活性。抗体包含由SEQ ID NO:1表示的CDR1H，由SEQ ID NO:2表示的CDR2H，由SEQ ID NO:3表示的CDR3H；以及由SEQ ID NO:4表示的CDR1L，由SEQ ID NO:5表示的CDR2L和由SEQ ID NO:6表示的CDR3L。

[0028] 本发明的抗-IL17A/F抗体是具有双特异性结合活性的单克隆抗体。

[0029] 抗-IL17A/F抗体可以抑制IL-17A和IL-17F与其受体的结合。

[0030] 在一个实施方案中，这样的抗-IL17A/F抗体是鼠、嵌合或人源化变体。在一个实施方案中，抗体包含由SEQ ID NO:7表示的可变重链结构域(VH1-1)，和由SEQ ID NO:8表示的可变轻链结构域(VL5)或由SEQ ID NO:9表示的VL2-1。在一个实施方案中，抗体包含由SEQ ID NO:7表示的可变重链结构域(VH1-1)，和由SEQ ID NO:8表示的可变轻链结构域(VL5)。

[0031] 在一个实施方案中，抗体的特征在于是人IgG类型。在一个实施方案中，人源化抗体包含由SEQ ID NO:10表示的重链和由SEQ ID NO:11表示的轻链。

[0032] 在第二方面，本发明提供了编码第一方面的抗-IL17A/F抗体的核苷酸序列。如本领域中公知的，核苷酸序列可以是密码子优化的，这取决于用于表达抗-IL17A/F抗体的细胞类型。

[0033] 本申请还提供了编码第一方面的抗-IL17A/F抗体的重链可变结构域和/或轻链可变结构域的核苷酸序列。

[0034] 包含编码第一方面的抗-IL17A/F抗体的核苷酸序列的重组表达载体也在本发明的范围内。重组表达载体可以在原核或真核宿主细胞中表达所述核苷酸序列。

[0035] 如本领域中已知的，包含编码第一方面的抗-IL17A/F抗体的表达载体或核苷酸序列的宿主细胞也在本发明的范围内。宿主细胞可以产生本发明的抗-IL17A/F抗体。可以通过用包含所述核苷酸序列的重组表达载体转化或转染细胞来获得所述宿主细胞。宿主细胞可以包含含有核苷酸序列的重组表达载体，或者核苷酸序列可以通过同源重组整合到宿主细胞的基因组中。宿主细胞可以是原核或真核宿主细胞，例如来源于哺乳动物物种的细胞系，诸如CHO细胞、HEK293细胞或骨髓瘤细胞等。哺乳动物物种可以选自但不限于大鼠、小鼠、猴或人。优选地，宿主细胞是人细胞。

[0036] 在这方面，本发明的抗-IL17A/F抗体可以由宿主细胞表达，所述宿主细胞包含编码第一方面的抗-IL17A/F抗体的表达载体或核苷酸序列。在表达后，可以通过常规蛋白质纯化方法从所述细胞或细胞培养上清液中回收抗-IL17A/F抗体。抗体的重组制备是本领域中公知的。在另一个方面，本发明的抗-IL17A/F抗体可以通过以下方式合成或制备：用合适的抗原免疫动物，然后从收集自免疫动物的腹水中回收抗-IL17A/F抗体。

[0037] 在一个实施方案中，本发明提供了用于制备第一方面的抗-IL17A/F抗体的方法，其中所述方法包括以下步骤：通过培养宿主细胞表达抗-IL17A/F抗体，所述宿主细胞包含编码第一方面的抗-IL17A/F抗体的表达载体或核苷酸序列，并且从宿主细胞或细胞培养上清液中回收抗-IL17A/F抗体。

[0038] 在第三方面，本发明涉及第一方面的抗-IL17A/F抗体在制备药物中的用途，所述

药物用于治疗受试者中与IL-17A和/或IL-17F有关的疾病。在一个实施方案中，与IL-17A和/或IL-17F有关的疾病是自身免疫性疾病或炎性疾病，例如，包括但不限于牛皮癣、牛皮癣性关节炎、强直性脊柱炎、类风湿性关节炎(RA)、多发性硬化(MS)、系统性红斑狼疮、骨关节炎和炎性肠病(IBD)。受试者可以是哺乳动物，诸如大鼠、小鼠、猴或人。优选地，受试者是人。

[0039] 在第四方面，本发明提供了用于治疗受试者中与IL-17A和/或IL-17F有关的疾病的药物组合物，所述药物组合物包含治疗有效量的第一方面的抗-IL17A/F抗体和药用赋形剂。本领域技术人员可以为药物组合物选择合适的赋形剂。在一个实施方案中，与IL-17A和/或IL-17F有关的疾病是自身免疫性疾病或炎性疾病，例如，包括但不限于牛皮癣、牛皮癣性关节炎、强直性脊柱炎、类风湿性关节炎(RA)、多发性硬化(MS)、系统性红斑狼疮、骨关节炎和炎性肠病(IBD)。受试者可以是哺乳动物，诸如大鼠、小鼠、猴或人。优选地，受试者是人。

[0040] 在第五方面，本发明提供了用于治疗受试者中与IL-17A和/或IL-17F有关的疾病的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本发明第四方面的药物组合物的步骤。在一个实施方案中，与IL-17A和/或IL-17F有关的疾病是自身免疫性疾病或炎性疾病，例如，包括但不限于牛皮癣、牛皮癣性关节炎、强直性脊柱炎、类风湿性关节炎(RA)、多发性硬化(MS)、系统性红斑狼疮、骨关节炎和炎性肠病(IBD)。受试者可以是哺乳动物，诸如大鼠、小鼠、猴或人。优选地，受试者是人。

[0041] 虽然前述公开内容提供了涵盖在本发明范围内的主题的一般描述，包括制备和使用本发明的方法及其最佳模式，但是提供以下实施例以进一步使得本领域技术人员能够实施本发明并且提供其完整的书面描述。然而，本领域技术人员将理解，这些实施例的细节不应理解为对本发明的限制，应当从附于本公开的权利要求及其等同物中理解本发明的范围。鉴于本发明的公开内容，本发明的各种另外的方面和实施方案对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0042] 在本文中使用的情况下，“和/或”被视为具体公开了两个特定特征或组分的每一个，其与另一个一起或不与另一个一起公开。例如，“A和/或B”将被视为具体公开了(i)A、(ii)B和(iii)A和B中的每一个，就好像每一个在本文中个别地列出。

[0043] 除非另有说明，否则上述特征的描述和定义不限于本发明的任何特定方面或实施方案，并且同样适用于所描述的所有方面和实施方案。

[0044] 上述申请和在其中引用或在其审查期间引用的所有文献和序列登记号(“申请引用文献”)以及引用文献中引用或参考的所有文献，以及本文中引用或参考的所有文献(“本文引用文献”)，以及本文引用文献中引用或参考的所有文献，连同用于本文提及的任何产品或通过引用结合于此的任何文献中的任何制造商说明书、描述、产品说明书和产品页，均通过引用结合于此，并且可以用于实施本发明。更具体地，所有参考文献通过引用并入，其程度如同每个单独的文件被具体和单独地指出通过引用并入。

实施例

[0045] 实施例1.抗-IL17A/F抗体的制备

[0046] 通过皮下注射人IL-17A(Cell Signaling#8928SF，www.cellsignal.com)和IL-

17F(Cell Signaling#8906LC,www.cellsignal.com)(每种10μg)与完全弗氏佐剂(Sigma-Aldrich,Cat#F6881),免疫BALB/c小鼠(16-18g,6周龄,购自Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co.,Ltd.)。以3天的间隔重复免疫5次。最后一次加强后3天,仔细切出靠近注射部位的淋巴结。使用PEG1500(聚乙二醇1500,Roche TM.Cat#:783641,10×4ml,在75mM Hepes中,PEG 50%W/V)将淋巴细胞与Ag8.653骨髓瘤细胞(Sigma-Aldrich,Cat#85011420)融合,并且用HAT选择(Sigma cat#:H0262)和HFCS(杂交瘤融合和克隆补充剂,50×,Roche cat#:11-363-735-001)克隆。通过ELISA和细胞因子释放测定筛选杂交瘤上清液,用以制备可以结合人IL-17A和IL-17F二者的抗体(参见实施例5)。使用CDR移植和回复突变将选择的鼠抗-IL17A/F克隆(1-15-X)人源化。

[0047] 通过CDR移植的抗体人源化:制定了精选的受体框架。使用NCBIIg-Blast(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/),在人种系数据库中搜索亲本抗体的可变结构域序列。选择每种重链和轻链的五种不同的人受体(即与亲本抗体具有高同源性的人可变结构域)。人受体的CDR用它们的小鼠对应物替换,产生人源化可变结构域序列。重链和轻链的CDR序列(SEQ ID NOs:1-6)分别如下所示。设计、合成5条人源化重链和5条人源化轻链,并且将其插入表达载体中。表达人源化抗体,然后用于亲和力排序测试。选择具有最强结合亲和力的抗体(VH1-VL5和VH1-VL2)进行回复突变。在这些变体中,选择VH1-1/VL5和VH1-1/VL2-1用于进一步表征。VH1-1/VL5显示出最佳的结合亲和力。

[0048] CDR1H氨基酸序列(SEQ ID NO:1)

[0049] DYNLN

[0050] CDR2H氨基酸序列(SEQ ID NO:2)

[0051] VIHPDYGTTSYNQKFKD

[0052] CDR3H氨基酸序列(SEQ ID NO:3)

[0053] YDYGDAMDY

[0054] CDR1L氨基酸序列(SEQ ID NO:4)

[0055] RSSQSLVHSNGNTYLH

[0056] CDR2L氨基酸序列(SEQ ID NO:5)

[0057] KVSNRFS

[0058] CDR3L氨基酸序列(SEQ ID NO:6)

[0059] SQSTHVPLT

[0060] 可变重链结构域(VH1-1)氨基酸序列(SEQ ID NO:7)

[0061] QFQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNLNWVRQAPGKGLEWMGVIHPDYGTTSYNQKFKDRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCVRYDYGDAMDYWGQGTLVTVSS

[0062] 可变轻链结构域(VL5)氨基酸序列(SEQ ID NO:8)

[0063] DIVMTQSPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQPPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPLTFGQGTKLEIK

[0064] 可变轻链结构域(VL2-1)氨基酸序列(SEQ ID NO:9)

[0065] DIVMTQTPLSSSVTLGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWLQQRPGQPPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPLTFGQGTKLEIK

[0066] 实施例2.抗-IL17A/F抗体的表达和纯化

[0067] 合成编码人源化IgG重链(SEQ ID NO:10的氨基酸序列)和轻链(SEQID NO:11的氨基酸序列)的DNA序列,并且将其插入pTGE5载体(可从Genescript商购获得)以构建全长IgG的表达质粒。亲本抗体的表达在100mlHEK293细胞培养物中进行(HEK293细胞可从ThermoFisher Scientific商购获得),并且将上清液用蛋白A亲和柱纯化。将纯化的抗体使用PD-10脱盐柱(可从Thermofisher Scientific商购获得)缓冲液交换到PBS中。纯化蛋白的浓度和纯度分别通过OD280和SDS-PAGE测定。人源化抗体在30mlHEK 293细胞培养物中表达。将细胞旋转沉淀。将上清液过滤并且进行SDS-PAGE分析(图1)。

[0068] 包含VH1-1的重链氨基酸序列(SEQ ID NO:10,全长序列)

[0069] QFQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNLNWVRQAPGKGLEWMGVIHPDYGTTSYNQKFKDRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCVRYDYGDAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0070] 包含VL5的轻链氨基酸序列(SEQ ID NO:11,全长序列)

[0071] DIVMTQSPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQPPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0072] 实施例3.SPR分析抗-IL17A/F抗体与人IL-17A和IL-17F的结合亲和力

[0073] 使用胺偶联方法将抗-人Fcγ特异性抗体(Jackson Immuno Research,批号124448,代码109-008-098)固定在传感器芯片上。注射分泌到培养基的4种抗体连同亲本抗体,并且通过Fc(捕获相)单独地由抗-人Fc抗体捕获。平衡后,注射IL-17达300秒(结合期),然后注射运行缓冲液达1200秒(解离期)。在每个循环期间从那些人源化抗体流动细胞中减去参考流动细胞(流动细胞1)的响应。在注射另一种人源化抗体之前使表面再生。重复该过程直至分析所有抗体。使用Biacore T200评价软件,通过将实验数据局部拟合至1:1相互作用模型来获得人源化抗体的解离速率。通过其解离速率常数(解离速率,K_d)对抗体进行排序。选择以与亲本抗体类似的亲和力与IL-17相互作用的结合物。

[0074] 表1.亲和力测量数据

[0075]

配体	分析物	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	Rmax (RU)	Chi² (RU²)	U-值
嵌合 IgG		2.3E+06	4.2E-04	**1.8E-10**	66.35	0.779	1
VH1-1+ VL2-1	IL-17	2.2E+06	1.8E-03	**8.4E-10**	52.3	1.65	4
VH1-1+ VL5		2.0E+06	5.9E-04	**2.9E-10**	60.19	0.741	1

[0076] 实施例4.通过ELISA测量与人IL-17A和IL-17F的结合

[0077] 将MaxiSorp 96-孔板(NUNC#449824,www.thermofisher.com)用在1xPBS(50μl/孔)中的2μg/ml人IL-17A(Cell Signaling#8928SF,www.cellsignal.com)或人IL-17F(Cell Signaling#8906LC,www.cellsignal.com)包被。将板在4℃温育过夜。移除包被溶

液，并且将板用200μl/孔的PBST(1x PBS，具有0.05％吐温-20)洗涤1次。然后加入200μl/孔的封闭缓冲液(1x PBS，具有0.05％吐温-20、3％BSA)并且在室温温育1小时。移除封闭缓冲液，并且将板用200μl/孔的PBST(1x PBS，具有0.05％吐温-20)洗涤3次。通过1x PBS将抗-IL-17A/F抗体(实施例2中制备)稀释至10、3.33、1.11、0.37、0.123、0.041、0.0137、0.0046、0.0015、0.00031、0.000102、0.000034μg/ml，并且加入板中(50μl/孔)。将板在室温温育2小时。移除孔中的抗体，并且将板用200μl/孔的PBST(1x PBS，具有0.05％吐温-20)洗涤3次。将山羊抗-人IgG(H&L)-HRP二抗(Jackson Immuno Research#109-035-088，www.jacksonimmuno.com)在1x PBS中1:5000稀释，并且加入各孔(50μl/孔)。将板在室温温育1小时。移除二抗，并且将板用200μl/孔的PBST(1x PBS，具有0.05％吐温-20)洗涤7次。加入50μl/孔的TMB(eBioscience#85-00-4201-56，www.ebioscience.com)并且将板在室温温育几分钟。然后加入50μl/孔的2N H_2SO_4以终止反应。对于人IL-17A和IL-17F结合，在450nm处测量光密度。表2示出了平衡常数EC_{50}(nM)。该结果表明抗-IL17A/F抗体可以以高亲和力与人IL-17A和IL-17F二者结合。

[0078] 表2.

[0079]

	平衡常数，EC_{50} (nM)	
	hIL-17A	hIL-17F
抗-IL-17A/F 抗体	0.039	0.042

[0080] 实施例5.抗-IL17A/F抗体阻断由IL-17A、IL17F或IL17A/F异二聚体刺激的炎症细胞因子产生。

[0081] IL-17A和IL-17F的受体分别是IL-17RA和IL-17RC。这些受体普遍表达于成纤维细胞和上皮细胞上。IL-17A和IL-17F可以与细胞上的受体结合并且诱导细胞产生和释放多种细胞因子，诸如IL-6、IL-8和TNF-α。IL-17A或IL-17F特异性抗体分别可以与可溶性IL-17A或IL-17F结合并且阻断它们与IL-17RA或IL-17RC的结合，从而抑制细胞因子的诱导，并且进一步抑制炎症的发展。

[0082] 如在用预温育抗-IL-17A/F抗体(实施例2中制备)刺激hIL-17A、hIL-17F或IL17-A/F异二聚体(R&D system Cat#5837-IL)后检测HFF-1细胞(人皮肤成纤维细胞，干细胞库，中科科学院，#SCSP-109)的hIL-6产生，进行该测定。HFF-1细胞在细胞表面表达IL-17受体。可溶性hIL-17A或hIL-17F与所述受体结合并且诱导HFF-1细胞表达并释放hIL-6细胞因子。针对hIL-17A和hIL-17F的抗-IL-17A/F抗体可以阻断细胞因子与IL-17受体的结合并且抑制IL-17A/F刺激的hIL-6表达。可以通过ELISA检测培养上清液中释放的hIL-6。hIL-6的测量可以指示抗-IL-17A/F抗体的抑制效果。

[0083] 将HFF-1细胞在具有15％FBS(可从ThermoFisher Scientific商购获得)、1％青霉素链霉素(PS，可从ThermoFisher Scientific商购获得)的0.3ml/孔DMEM培养基中以$1.5x10^5$个细胞/孔的细胞密度接种于48-孔板，并且在37℃和5％CO_2下温育12小时。然后移除孔中的培养基，并且将细胞用PBS(300μl/孔)洗涤1次。向细胞中加入300μl/孔的无血清DMEM培养基，并且将细胞在37℃饥饿6小时。饥饿6小时后，从细胞中移除孔中的无血清DMEM培养基。向细胞中加入150μl/孔的具有30％FBS、2％PS的DMEM培养基。随后，将150μl/孔的抗-IL-17A/F抗体和hIL-17A、IL17F或IL-17A/F异二聚体的混合物加入相应的孔中。将板在

37℃温育24小时。然后收获上清液用于hIL-6ELISA。通过使用人IL-6ELISAReady-SET-Go(eBioscience#88-7066-88)进行hIL-6测量。结果显示在图2中,证明了抗-IL17A/F抗体(VH1-1-VL5mAb)阻断由细胞因子IL-17A、IL-17F和IL-IL17A/F异二聚体诱导的刺激的IL-6产生(图2,A、B和C)。

[0084] 实施例6.抗-IL17A/F抗体阻断IL-17A、IL-17F或IL17A/F与IL-17受体的结合

[0085] 通过ELISA测试抗-IL17A/F抗体(实施例2中制备)对IL-17A、IL-17F或IL17A/F与IL-17受体结合的影响。将IL-17A、IL-17F或IL-17A/F用50μl/孔蛋白质溶液(蛋白质浓度为0.5μg/ml)在96孔板中在4℃包被过夜。将孔用200μl/孔的PBST中的1%BSA(吐温0.05%)在室温封闭1小时。将孔用PBST洗涤3次。将抗-IL17A/F抗体和同种型对照抗体人IgG1(Biolegend cat#403102)用PBS稀释为30μg/ml至0.0005μg/ml(30、10、3.33、1.11、0.37、0.123、0.041、0.0137、0.0046、0.0015、0.0005μg/ml)。将抗体加入相应的孔中(50μl/孔)并且在室温温育4小时。将孔用PBST洗涤3次。将hIL17RA-mIgG2aFc(10μg/ml,根据标准分子生物学技术(CarsonS,Molecular Biology Techniques,2012)内部制备)加入各孔(50μl/孔)中并且在室温温育1小时。将孔用PBST洗涤3次。将山羊抗-人IgG-HRP(1:5000,在PBS中,EASYBIO Cat#BE0102)加入各孔(50μl/孔)中,并且在室温温育30分钟。将孔用PBST洗涤6次。将TMB底物加入各孔中(50μl/孔),并且通过向各孔中加入50μl的2N H_2SO_4来终止反应。在450nm和570nm处读板。如图3所示,抗-IL17A/F抗体阻断IL17A、IL17F和甚至IL-17A/F与IL-17受体的结合。数据进一步证明了抗-IL17A/F抗体通过阻断所述细胞因子与其受体之间的相互作用来抑制IL-17A、IL-17F和IL17A/F的活性。

[0086] 实施例7.通过ELISA测量的与人IL-17A、IL-17F的结合和与其他IL-17家族成员的交叉反应性

[0087] 将MaxiSorp 96-孔板(NUNC#449824,www.thermofisher.com)分别用在1x PBS(50μl/孔)中的2μg/ml人IL-17A(Cell Signaling#8928SF,www.cellsignal.com)、人IL-17F(Cell Signaling#8906LC,www.cellsignal.com)、人IL-17B(Peprotech#200-28,www.peprotech.com)、人IL-17C(R&D systems#1234-IL-025/CF,www.rndsystems.com)、人IL-17D((Peprotech#200-27,www.peprotech.com)、人IL-17E(R&D systems#1258-IL-025/CF,www.rndsystems.com)包被。将板在4℃温育过夜。移除包被溶液,并且将板用200μl/孔的PBST(1x PBS,具有0.05%吐温-20)洗涤1次。然后加入200μl/孔的封闭缓冲液(1x PBS,具有0.05%吐温-20、3%BSA)并且在室温温育1小时。移除封闭缓冲液,并且将板用200μl/孔的PBST(1x PBS,具有0.05%吐温-20)洗涤3次。通过1x PBS将抗-IL17A/F抗体hIgG VH1-1/VL5稀释至10、3.33、1.11、0.37、0.123、0.041、0.0137、0.0046、0.0015、0.00031、0.000102、0.000034μg/ml,并且加入板中(50μl/孔)。将板在室温温育2小时。移除孔中的抗体,并且将板用200μl/孔的PBST(1x PBS,具有0.05%吐温-20)洗涤3次。将山羊抗-人IgG(H&L)-HRP二抗(Jackson Immuno Research#109-035-088,www.jacksonimmuno.com)在1x PBS中1:5000稀释,并且加入各孔(50μl/孔)。将板在室温温育1小时。移除二抗,并且将板用200μl/孔的PBST(1x PBS,具有0.05%吐温-20)洗涤7次。加入50μl/孔的TMB(eBioscience#85-00-4201-56,www.ebioscience.com)并且将板在室温温育几分钟。然后加入50μl/孔的2NH_2SO_4以终止反应。在450nm处读板。结果显示在表3中。抗-IL17A/F抗体hIgG VH1-1/VL5对人IL-17A和17F具有结合能力(图4,A和F),EC50分别为0.046和0.047nM。另外,hIgG VH1-1/

VL5不与人IL-17B、17C、17D和17E结合(图4,B、C、D和E)。因此,hIgG VH1-1/VL5抗体对人IL-17A和17F具有结合特异性,并且与其他IL-17家族成员没有交叉反应性。

[0088] 表3.与IL-17家族成员的结合能力(EC50)

[0089]

抗-IL-17A/F 抗体	结合 EC_{50} (nM)					
	IL-17A	IL-17B	IL-17C	IL-17D	IL-17E	IL-17F
hIgG VH1-1/VL5	0.046	-0	-0	-0	-0	0.047

[0090] 实施例8.与食蟹猴IL-17A和IL-17F的交叉反应性(结合测定)

[0091] 通过ELISA测定抗-IL-17A/F抗体与食蟹猴IL-17A和IL-17F的结合。除了将食蟹猴IL-17A(基因ID:XM_005552759.2,根据标准分子生物学方法(Carson S,Molecular Biology Techniques,2012)内部制备)和IL-17F(基因ID:XM_005552757.2,根据标准分子生物学方法(Carson S,Molecular Biology Techniques,2012)内部制备)分别用于替代人IL-17A和F以外,以与实施例7相同的方法进行测定。

[0092] hIgG VH1-1-VL5抗体对食蟹猴Il-17A和17F具有结合能力,EC50分别为0.06和0.18nM(表4和图5A和B)。

[0093] 表4.与食蟹猴Il-17A和F的结合能力(EC50)

[0094]

抗-IL17A/F 抗体	结合 EC50 (nM)	
	食蟹猴 IL-17A	食蟹猴 IL-17F
VH1-1-VL5	0.06	0.18

[0095] 与食蟹猴IL-17A和IL-17F的交叉反应性表明:食蟹猴有资格用于抗-IL17A/F抗体的药代动力学、药效学和毒理学研究。开发抗-IL17A/F抗体作为药物组合物是有利的。

[0096] 实施例9.抗-IL17A/F抗体效果的体内动物研究

[0097] 在皮下注射人IL-17(Cell Signaling Cat#8928SF,3μg/小鼠)之前1小时,将抗-IL-17A/F抗体(实施例2中制备的VH1-1/VL5,20μg/小鼠)静脉内施用至C57BL/6N小鼠(每组n=5,8周龄,体重:18-20g,可从BeijingVital River Laboratory Animal Technology Co.,Ltd.商购获得)。在IL-17施用后2小时,收集血液样品,并且通过ELISA(小鼠CXCL1/GROαDuoSet ELISA试剂盒,R&D system,DY345)测定血浆中的CXCL1趋化因子水平。人IgG1(BioLegend Cat#40312)用作同种型对照抗体。如图6所示,与同种型对照抗体相比,抗-IL17A/F抗体(实施例2中制备)能够降低C57BL/6小鼠血浆中人IL-17A诱导的趋化因子分泌。该结果表明抗-IL17A/F抗体可以用作抑制、阻断或中和IL-17活性的药剂。

[0098] 体内和体外研究证明了抗-IL17A/F抗体在制备用于治疗受试者中与IL-17A和/或IL-17F有关的疾病的药物中的用途。与IL-17A和/或IL-17F有关的疾病可以选自自身免疫性疾病或炎性疾病,例如,包括但不限于牛皮癣、牛皮癣性关节炎、强直性脊柱炎、类风湿性关节炎(RA)、多发性硬化(MS)、系统性红斑狼疮、骨关节炎和炎性肠病(IBD)。受试者可以是哺乳动物,诸如大鼠、小鼠、猴或人。优选地,受试者是人。

序列表

〈110〉 苏州鑫康合生物医药科技有限公司

〈120〉 针对IL-17A和IL-17F二者的单克隆抗体及其用途

〈130〉 IP160297

〈160〉 11

〈170〉 PatentIn version 3.1

[0001]

〈210〉 1

〈211〉 5

〈212〉 PRT

〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 CDR1H氨基酸序列

〈400〉 1

Asp Tyr Asn Leu Asn
1 5

〈210〉 2

〈211〉 17

〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 CDR2H氨基酸序列

〈400〉 2

Val Ile His Pro Asp Tyr Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 3

<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3H氨基酸序列

<400> 3

Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr
1 5

[0002] <210> 4

<211> 16

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1L氨基酸序列

<400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2L氨基酸序列

<400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3L氨基酸序列

<400> 6

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr
1 5

<210> 7

<211> 118

[0003]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重链可变结构域(VH1-1)氨基酸序列

<400> 7

Gln Phe Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Val Ile His Pro Asp Tyr Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8

<211> 112

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 轻链可变结构域(VL5)氨基酸序列

[0004] <400> 8

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 9

<211> 112

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 轻链可变结构域(VL2-1)氨基酸序列

<400> 9

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Ser Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[0005] 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 10

<211> 448

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 包含VH1-1的重链氨基酸序列

<400> 10

```
Gln Phe Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                  10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

Asn Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Val Ile His Pro Asp Tyr Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Val Arg Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110
```

[0006]

```
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
        115                 120                 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                165                 170                 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
            180                 185                 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
        195                 200                 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
    210                 215                 220
```

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

[0007]

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 11

<211> 219

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 包含VL5的轻链氨基酸序列

<400> 11

[0008]

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1               5                  10                  15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
            20                  25                  30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
        35                  40                  45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
                85                  90                  95

Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
        115                 120                 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
    130                 135                 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145                 150                 155                 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
```

165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

[0009]

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

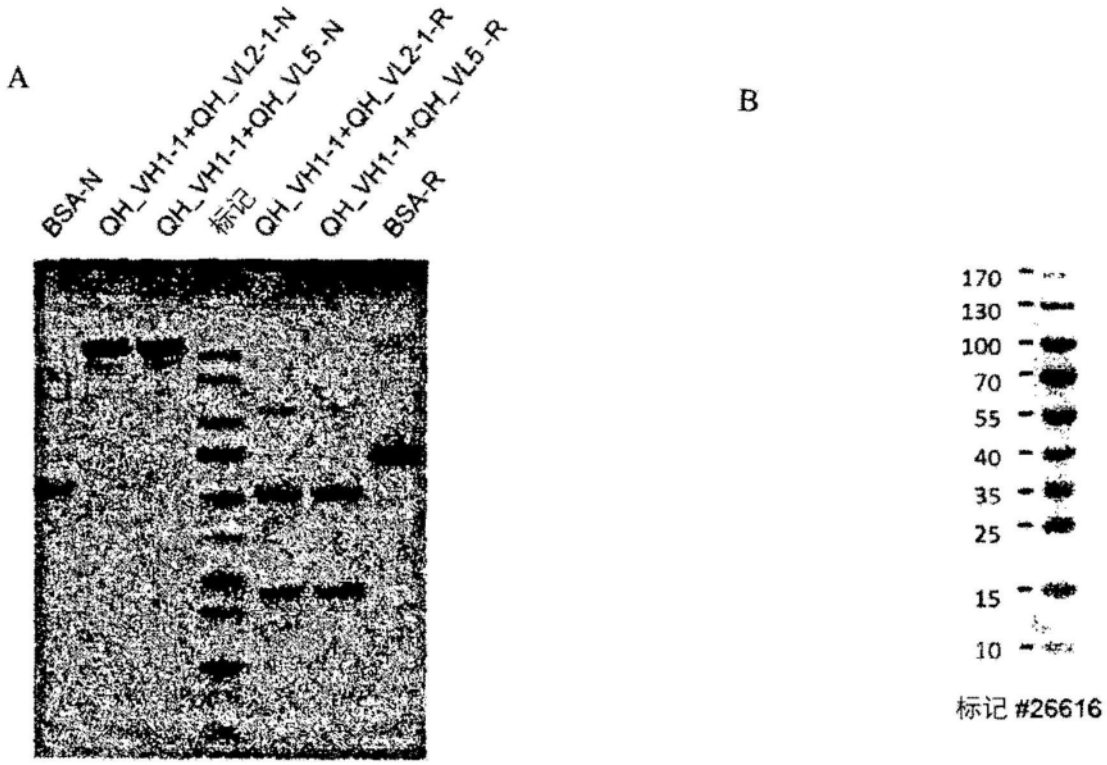

A
BSA-N
QH_VH1-1+QH_VL2-1-N
QH_VH1-1+QH_VL5-N
标记
QH_VH1-1+QH_VL2-1-R
QH_VH1-1+QH_VL5-R
BSA-R
B
170
130
100
70
55
40
35
25
15
10
标记 #26616

图1

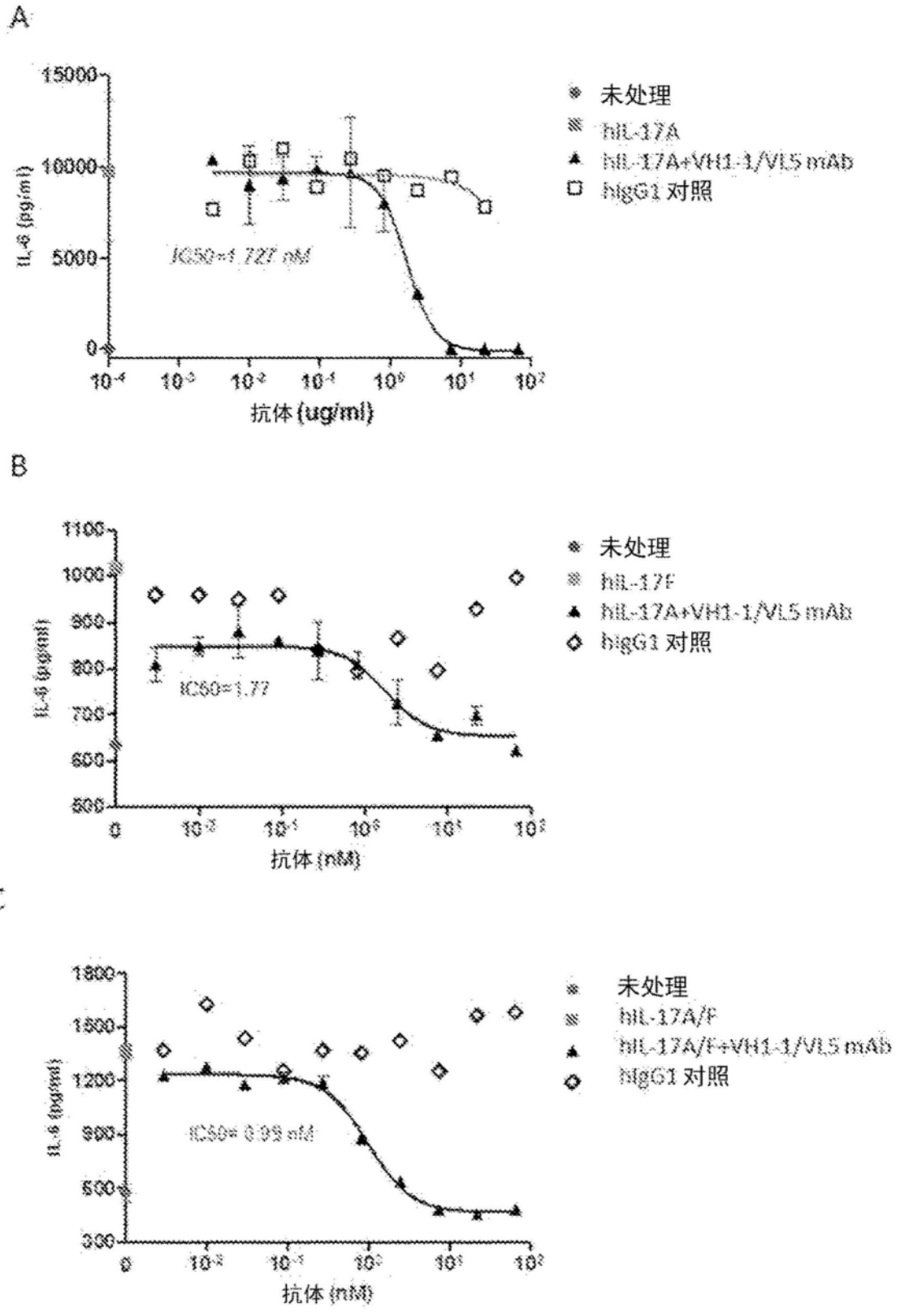

A
15000
10000
5000
0
IL-6 (pg/ml)
IC50=1.727 nM
抗体 (ug/ml)
未处理
hIL-17A
hIL-17A+VH1-1/VL5 mAb
hIgG1 对照
B
1100
1000
900
800
700
600
500
IL-6 (pg/ml)
IC50=1.77
抗体 (nM)
未处理
hIL-17F
hIL-17A+VH1-1/VL5 mAb
hIgG1 对照
C
1800
1500
1200
900
600
300
IL-6 (pg/ml)
IC50= 0.95 nM
抗体 (nM)
未处理
hIL-17A/F
hIL-17A/F+VH1-1/VL5 mAb
hIgG1 对照

图2

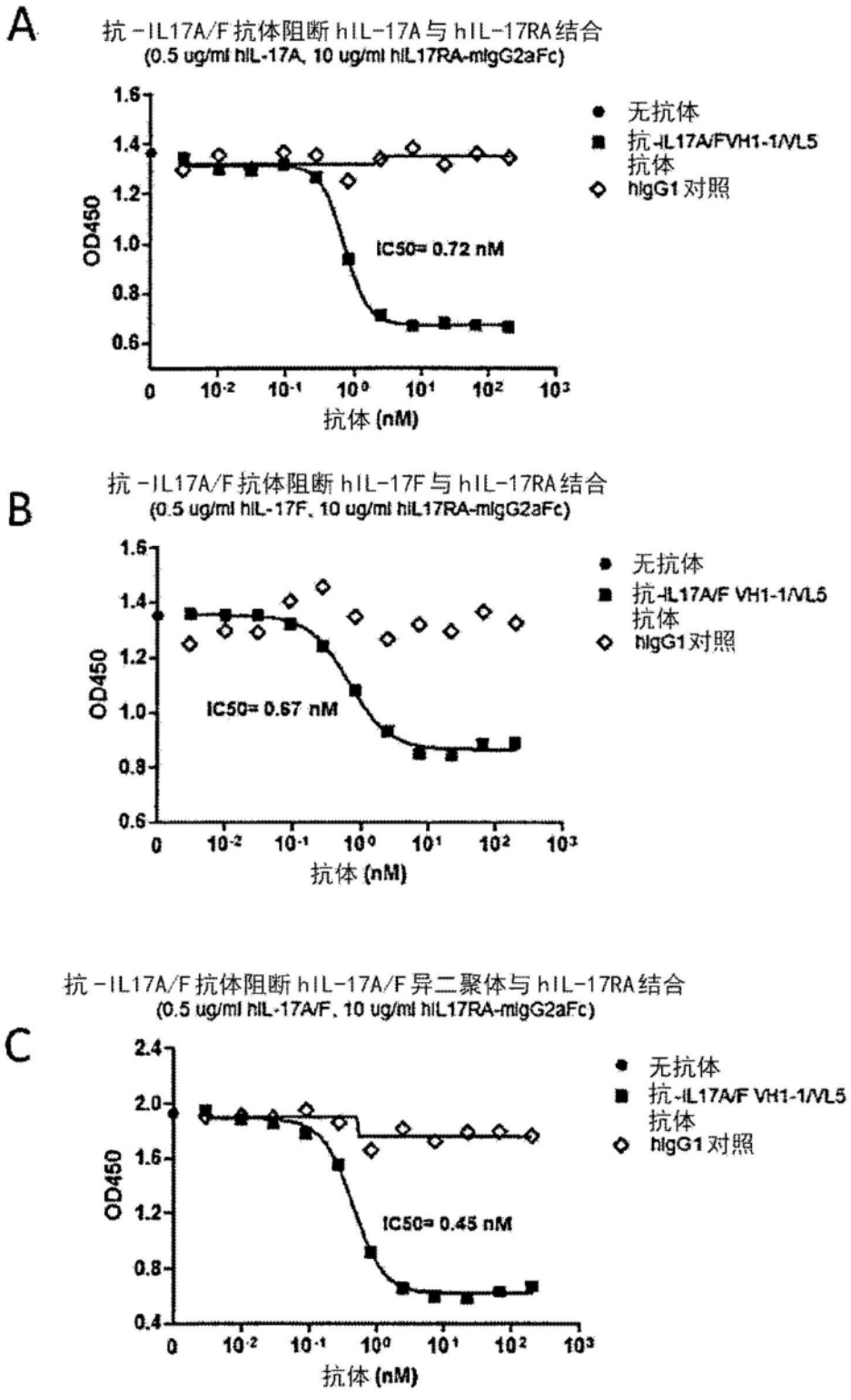

A
抗-IL17A/F抗体阻断hIL-17A与hIL-17RA结合
(0.5 ug/ml hIL-17A, 10 ug/ml hIL17RA-mIgG2aFc)
OD450
抗体 (nM)
IC50= 0.72 nM
无抗体
抗-IL17A/FVH1-1/VL5抗体
hIgG1对照
B
抗-IL17A/F抗体阻断hIL-17F与hIL-17RA结合
(0.5 ug/ml hIL-17F, 10 ug/ml hIL17RA-mIgG2aFc)
OD450
抗体 (nM)
IC50= 0.67 nM
无抗体
抗-IL17A/F VH1-1/VL5抗体
hIgG1对照
C
抗-IL17A/F抗体阻断hIL-17A/F异二聚体与hIL-17RA结合
(0.5 ug/ml hIL-17A/F, 10 ug/ml hIL17RA-mIgG2aFc)
OD450
抗体 (nM)
IC50= 0.45 nM
无抗体
抗-IL17A/F VH1-1/VL5抗体
hIgG1对照

图3

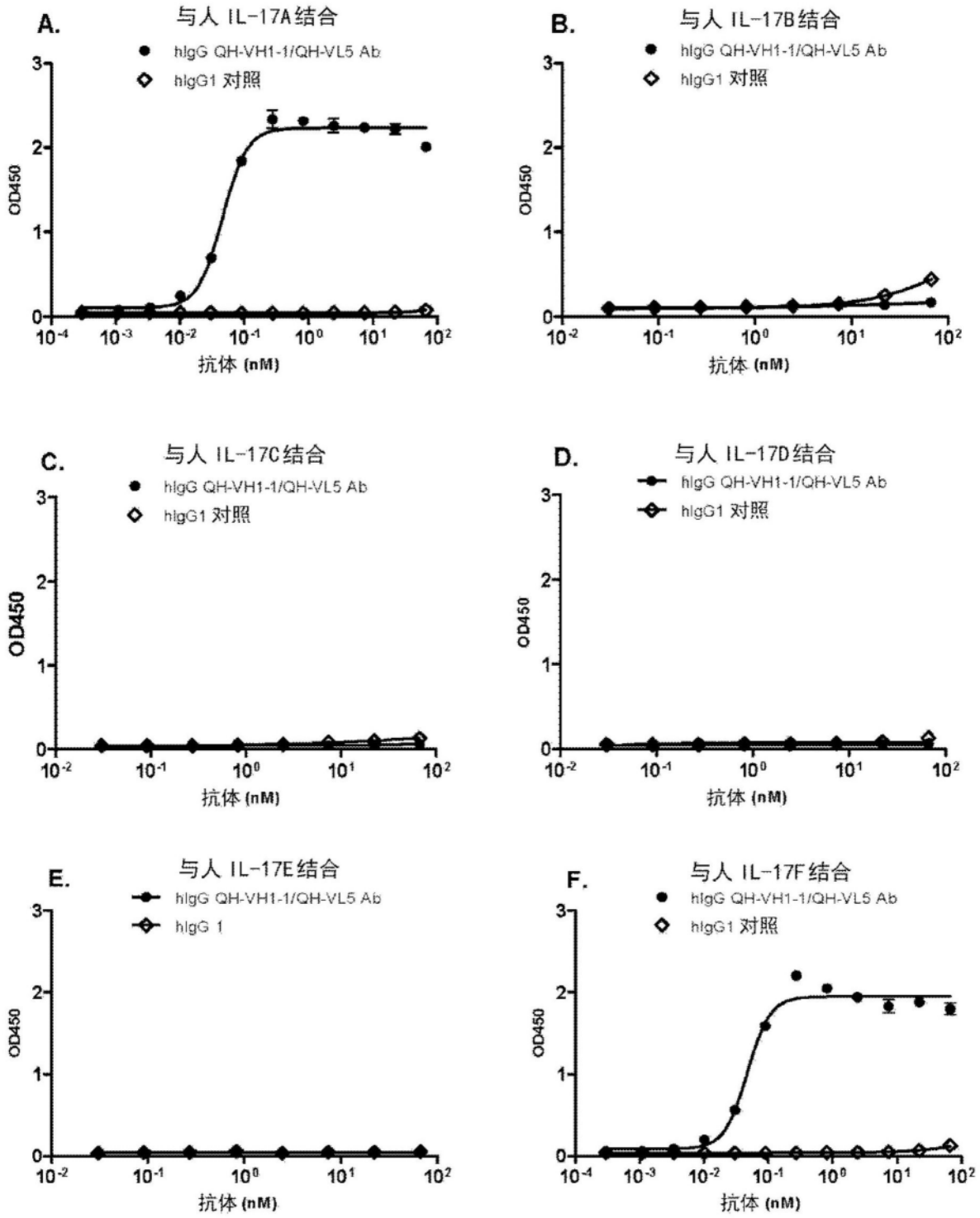

A.
与人 IL-17A结合
hIgG QH-VH1-1/QH-VL5 Ab
hIgG1 对照
OD450
抗体 (nM)
B.
与人 IL-17B结合
hIgG QH-VH1-1/QH-VL5 Ab
hIgG1 对照
OD450
抗体 (nM)
C.
与人 IL-17C结合
hIgG QH-VH1-1/QH-VL5 Ab
hIgG1 对照
OD450
抗体 (nM)
D.
与人 IL-17D结合
hIgG QH-VH1-1/QH-VL5 Ab
hIgG1 对照
OD450
抗体 (nM)
E.
与人 IL-17E结合
hIgG QH-VH1-1/QH-VL5 Ab
hIgG 1
OD450
抗体 (nM)
F.
与人 IL-17F结合
hIgG QH-VH1-1/QH-VL5 Ab
hIgG1 对照
OD450
抗体 (nM)

图4

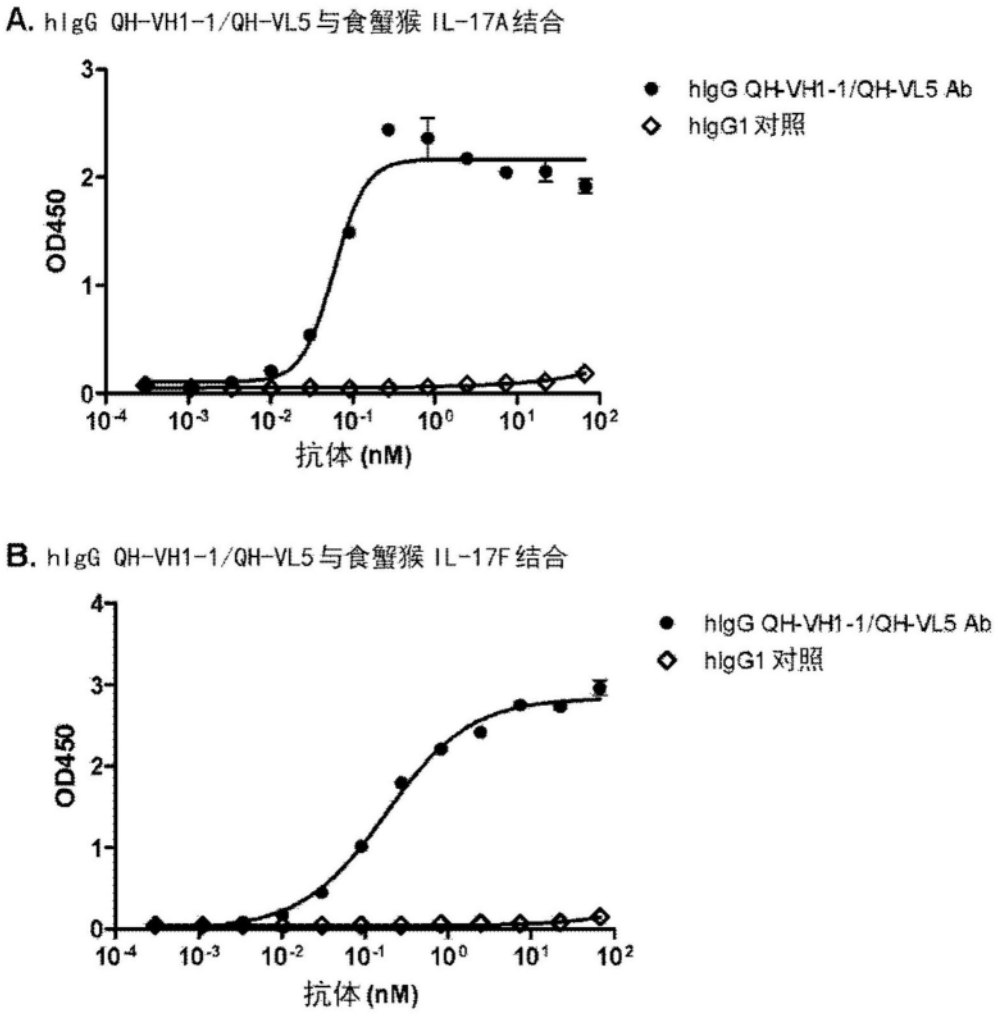

A. hIgG QH-VH1-1/QH-VL5与食蟹猴 IL-17A结合
hIgG QH-VH1-1/QH-VL5 Ab
hIgG1对照
OD450
抗体 (nM)
B. hIgG QH-VH1-1/QH-VL5与食蟹猴 IL-17F结合
hIgG QH-VH1-1/QH-VL5 Ab
hIgG1 对照
OD450
抗体 (nM)

图5

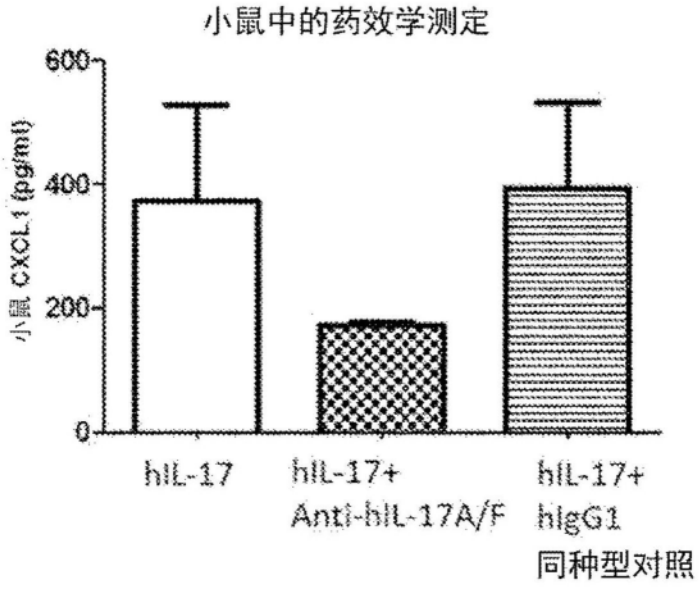

小鼠中的药效学测定
小鼠 CXCL1 (pg/ml)
600
400
200
0
hIL-17
hIL-17+
Anti-hIL-17A/F
hIL-17+
hIgG1
同种型对照

图6