



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 105073775 B

(45)授权公告日 2019.03.19

(21)申请号 201480007944.X

(22)申请日 2014.02.07

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105073775 A

(43)申请公布日 2015.11.18

(30)优先权数据

61/762,406 2013.02.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.08.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2014/058854 2014.02.07

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2014/122613 EN 2014.08.14

(73)专利权人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 F·E·迪 帕多瓦 T·胡贝尔

J-M·R·隆多

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 陈迎春 黄革生

(51)Int.Cl.

C07K 14/54(2006.01)

C07K 16/24(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

(56)对比文件

CN 102905727 A,2013.01.30,

WO 2012093254 A1,2012.07.12,

RUDIKOFF S.等.Single amino acid

substitution altering antigen binding specificity.《PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES》.1982,第79卷(第1期),

DUMONT FJ..IL-17 cytokine/receptor

families:Emerging targets for the

modulation of inflammatory responses.

《EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS》

.2003,第13卷(第3期),

审查员 马静

权利要求书2页 说明书115页

序列表54页 附图19页

(54)发明名称

抗-IL-17A抗体及其在治疗自身免疫性和炎症病症中的用途

(57)摘要

本公开内容涉及特异性结合促炎细胞因子IL-17A的抗体和包含其抗原结合部分的蛋白质。本公开内容更具体地涉及特定抗体和蛋白质,所述抗体和蛋白质为IL-17A拮抗剂(抑制IL-17A和IL-17AF的活性)并且能够在体外测定中抑制IL-17A诱导的细胞因子产生,并且在体内在抗原诱导的关节炎模型中具有抑制作用。本公开内容还涉及使用所述抗体和蛋白治疗病理性病症的组合物和方法,所述病症可通过抑制IL-17A或IL17AF介导的活性来治疗,诸如风湿性关节炎、银屑病、系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、慢

性阻塞性肺疾病、哮喘或囊性纤维化和其它自身免疫性和炎症病症。

1. 一种分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质,其包含重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),其中:

- a) V_H依次包含三个互补决定区(CDR):SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:3,和
- b) V_L依次包含三个CDR:SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:11,

并且其中所述抗体或蛋白质特异性结合同二聚体IL-17A和异二聚体IL-17AF,但不特异性结合同二聚体IL-17F。

2. 根据权利要求1所述的分离的抗体或蛋白质,其中所述IL-17A、IL-17AF或IL-17F选自食蟹猴、恒河猴、狨猴、大鼠、小鼠或人的一种或多种。

3. 根据权利要求1或2所述的分离的抗体或蛋白质,其包含a) SEQ ID NO:12的V_H氨基酸序列,和b) SEQ ID NO:43的V_L氨基酸序列。

4. 根据权利要求1或2所述的分离的抗体或蛋白质,其包含a) SEQ ID NO:14的氨基酸序列,和b) SEQ ID NO:44的氨基酸序列。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的分离的抗体或蛋白质,其中当通过表面等离子体共振Biacore™测量时,对于人IL-17A的结合亲和力低于200pM。

6. 根据权利要求1-4中任一项所述的分离的抗体或蛋白质,其中当通过表面等离子体共振Biacore™测量时,对于人IL-17A的结合亲和力低于100pM。

7. 根据权利要求1-4中任一项所述的分离的抗体或蛋白质,当使用培养的软骨细胞或成纤维细胞在体外评估时,其能够抑制IL-6分泌或GR0-α分泌。

8. 根据权利要求1-4中任一项所述的分离的抗体或蛋白质,其能够在体内在抗原诱导的关节炎实验模型中抑制膝肿胀。

9. 根据权利要求1-4中任一项所述的分离的抗体或蛋白质,其被缀合于其它活性部分。

10. 根据权利要求1-4中任一项所述的分离的抗体或蛋白质,其为单克隆抗体或其抗原结合部分。

11. 根据权利要求10所述的分离的抗体或蛋白质,其为嵌合抗体、人源化抗体或人抗体或其部分。

12. 一种药物组合物,其包含与一种或多种可药用的赋形剂、稀释剂或载体组合的根据前述权利要求的任一项的抗体或蛋白质。

13. 根据权利要求12所述的药物组合物,其还包含一种或多种另外的活性成分。

14. 根据权利要求1至9中任一项所述的抗体或蛋白质在制造用于治疗由IL-17A介导的或可通过抑制IL-6或GR0-α分泌来治疗的病理性病症的药物中的用途。

15. 根据权利要求14所述的用途,其中所述病理性病症是炎性病症或病况。

16. 根据权利要求15所述的用途,其中所述炎性病症或病况是关节炎、银屑病、慢性阻塞性肺疾病、狼疮、狼疮性肾炎、哮喘、多发性硬化或囊性纤维化。

17. 根据权利要求16所述的用途,其中所述关节炎是类风湿性关节炎,并且其中狼疮是系统性红斑狼疮SLE或狼疮性肾炎。

18. 一种分离的核酸分子,其编码如权利要求1至4的任一项中定义的抗体或蛋白质的任一个。

19. 一种克隆性载体或表达载体,其包含一个或多个根据权利要求18的核酸序列,其中所述载体适合用于重组产生权利要求1至4的任一项定义的分离的抗体或蛋白质。

20. 一种宿主细胞,其包含一个或多个根据权利要求19的克隆性载体或表达载体。
21. 根据权利要求18所述的分离的核酸分子,其中所述核酸分子是信使RNA (mRNA)。
22. 一种方法,其用于产生根据权利要求1至4的任一项的分离的抗体或蛋白质,所述方法包括培养根据权利要求20的宿主细胞,纯化和回收所述抗体或蛋白质。

抗-IL-17A抗体及其在治疗自身免疫性和炎症病症中的用途

[0001] 相关申请

[0002] 本公开内容要求2013年2月8日提交的US 61/762406 (其通过引用整体并入本文)的优先权。

发明领域

[0003] 本公开内容涉及特异性结合IL-17A的抗体和包含其抗原结合部分的蛋白质。本公开内容更具体地涉及抑制IL-17A的作用并且能够抑制IL-17A诱导的活性的特异性抗体和蛋白质,以及使用所述抗体和蛋白质的组合物和方法,例如治疗可通过抑制IL-17A信号转导来治疗的病理性病症,所述病症例如是自身免疫性和炎症病症诸如类风湿性关节炎、银屑病、系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、多发性硬化或慢性阻塞性肺疾病、哮喘或囊性纤维化。

[0004] 发明背景

[0005] 白细胞介素-17A(IL-17A有时也称为IL-17)是由新确定的炎症T细胞的亚组Th17细胞产生的重要的淋巴因子。在几种动物模型中,这些细胞是多种自身免疫性和炎症过程的关键。升高的IL-17A水平与葡萄膜炎(Ambadi-Obi,等人2007,Nature Med;13:711-718)、类风湿性关节炎(RA)、银屑病、气道炎症、慢性阻塞性肺病(COPD)、炎症肠病(克罗恩病和溃疡性结肠炎)、同种异体移植排斥、癌症、腹腔内脓肿和粘着以及多发性硬化相关(Weaver,等人2007,Annu Rev Immunol;25:821-852;Witowski等人2004,Cell Mol Life Sci;61:567-579)。Th17细胞可快速地启动由嗜中性粒细胞主导的炎症应答(Miossec,等人2009,NEJM;361:888-98)。

[0006] IL-17A最初被鉴定为来自啮齿类T细胞淋巴瘤的转录物。其为一组称为IL-17家族的细胞因子的创始成员。在啮齿类动物中称为CTLA8,IL-17A显示与由T-亲淋巴细胞猴病毒属松鼠猴疱疹病毒的开放阅读框架编码的病毒IL-17A的高度同源性(Rouvier E,等人1993,J.Immunol.150:5445-56)。

[0007] IL-17A是类似于干扰素 γ 的细胞因子,其通过增加各种组织的趋化因子的产生以招募单核细胞和嗜中性粒细胞至炎症部位用作延迟类型反应的强效介质。IL-17家族起着响应细胞外病原体对免疫系统的侵袭并且诱导病原体的细胞基质的破坏的促炎细胞因子的作用。IL-17A与肿瘤坏死因子和白细胞介素-1协同作用(Miossec P,等人2009,N.Engl.J.Med.361:888-98)。

[0008] 为了引发其功能,IL-17A结合称为IL-17R的I型细胞表面受体,所述受体存在至少2种变体IL-17RA和IL-17RC(Pappu R,等人2012,Trends Immunol.;33:343-9)。IL-17RA结合IL-17A、IL-17AF和IL-17F并且在多个组织中表达:血管内皮细胞、周围T细胞、B细胞谱系、成纤维细胞、肺、骨髓单核细胞和骨髓基质细胞(Kolls JK,Lindén A 2004,Immunity21:467-76;Kawaguchi M,等人2004,J.Allergy Clin.Immunol.114:1265-73;Moseley TA,等人2003,Cytokine Growth Factors Rev.14:155-74)。

[0009] 除了IL-17A以外,IL-17家族的成员还包括IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E(也称

为IL-25)和IL-17F。IL-17家族的所有成员具有相似的蛋白质结构,具有对于它们的3维形状是至关重要的4个高度保守的半胱氨酸残基。系统发生分析显示在IL-17家族成员当中,IL-17F同种型1和2(ML-1)与IL-17A具有最高的同源性(分别与IL-17A具有55%和40%的氨基酸同一性),随后是IL-17B(29%)、IL-17D(25%)、IL-17C(23%),IL-17E与IL-17A(17%)的亲缘关系最远。这些细胞因子在哺乳动物中都是十分保守的,在人与小鼠同源物之间具有多至62-88%保守的氨基酸(Kolls JK,Lindén A 2004,Immunity 21:467-76)。

[0010] IL-17A是155个氨基酸的蛋白质,其为具有35kDa的分子质量的二硫键连接的同二聚体分泌型糖蛋白(Kolls JK,Lindén A 2004,Immunity21:467-76)。IL-17A的结构由信号肽和其后的具有IL-17家族的特征的氨基酸区域组成。在蛋白质的纯化在标准SDS-PAGE分析中显示2条带(一条带处于15kDa并且另一条带处于20kDa)后,首先鉴定了蛋白质上的N连接的糖基化位点。IL-17家族的不同成员的比较揭示了形成2个二硫键的4个保守半胱氨酸(Yao Z,等人1995,J.Immunol.155:5483-6)。IL-17是独特的,因为其与其它已知的白细胞介素不具有相似性。此外,IL-17不具有与任何其它已知的蛋白质或结构域结构的相似性(Kolls JK,Lindén A2004,Immunity 21:467-76)。一般地,IL-17家族的其它成员诸如IL-17F形成同二聚体(如同IL-17A)。

[0011] 还已知IL-17A在某些情况下与IL-17F形成异二聚体。异二聚体IL-17AF还在被IL-23刺激后由Th17细胞产生。

[0012] IL-17AF据认为通过IL-17RA和IL-17RC受体如IL-17A和IL-17F发送信号。IL-17AF的生物功能与IL-17A和IL-17F的生物功能相似。IL-17AF对靶细胞的刺激在适当的情况下诱导除气道中性粒细胞外的多种趋化因子的产生。IL-17AF被认为在这些活性方面不如同二聚体IL-17A强,但比同二聚体IL-17F强。例如,如果IL-17A的效力为1,则IL-17AF的相对效力约为IL-17A的1/10并且IL-17F的相对效力约为IL-17A的效力的1/100。人和小鼠IL-17AF都显示对小鼠细胞的活性。IL-17AF由总共271个氨基酸组成并且具有约30.7kDa的分子量(来自Shenandoah Biotechnology的人IL-17AF异二聚体的产品描述的数据)。

[0013] 许多相关晶体结构已被公开。这些晶体结构包括同二聚体IL-17F的晶体结构(Hymowitz等人2001,EMBO J,19:5332-5341)。

[0014] 还已公开了与受体IL-17RA复合的IL-17F的晶体结构(Ely等人,2009Nature Immunology10:1245-1251)。此外,已公开了至少一个与抗体的Fab片段复合的IL-17A的晶体结构(Gerhardt等人,2009 Journal of Molecular Biology,5:905-921)。

[0015] 几种炎症和自身免疫性疾病(包括银屑病)与恶化的Th1和/或Th17应答相关联。它们中的许多目前用一般免疫抑制剂或并非在所有患者中均有效的极具选择性的生物制剂(如抗-TNF- α 抗体)进行治疗。已发现这些制剂增加感染的风险并且在重复治疗后变得无效。因此,存在对具有增加的安全特性和同时诱导疾病的长期缓解或治愈能力的治疗的未满足的医学需要。

[0016] 已报导了细胞因子的IL-17家族的许多免疫调节功能,据推测因它们对许多免疫信号转导分子的诱导而引起。IL-17A最值得注意的作用是其参与诱导和介导促炎反应。IL-17A还与过敏反应相关。IL-17诱导来自许多细胞类型(成纤维细胞、内皮细胞、上皮细胞、角质形成细胞和巨噬细胞)的许多其它细胞因子(诸如IL-6、G-CSF、GM-CSF、IL-1 β 、TGF- β 、TNF- α)、趋化因子(包括IL-8、GRO- α 和MCP-1)和前列腺素(例如,PGE2)产生。细胞因子的释

放引起许多功能,诸如气道重塑、IL-17A应答的特征。趋化因子的增加的表达吸引其它细胞(包括嗜中性粒细胞但非嗜酸性粒细胞)。IL-17的功能对于称为T辅助17(Th17)细胞的CD4+T-细胞的一个亚组也是必需的。作为这些作用的结果,IL-17家族已与许多免疫/自身免疫性相关疾病,包括类风湿性关节炎、哮喘、狼疮、同种异体移植排斥和抗肿瘤免疫相关联(Aggarwal S, Gurney AL 2002, J. Leukoc. Biol. 71:1-8)。此外,已画出针对其它病况诸如骨关节炎、败血病、脓毒性或内毒素性休克、过敏反应、骨损失、银屑病、局部缺血、系统性硬化病、纤维化和中风的关联。

[0017] 因此,存在对拮抗IL-17A的作用并且能够抑制IL-17A诱导的活性的特异性抗体,和尤其是使用所述抗体治疗可通过抑制IL-17A信号转导来治疗的病理性病症的组合物和方法的需要。

[0018] 发明概述

[0019] 因此,在一个方面,本公开内容提供抗体或包含抗体的抗原结合部分的蛋白质,所述抗体包含与由SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:3编码的那些氨基酸序列具有至少95%同一性的CDR氨基酸序列,和与由SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:11编码的那些氨基酸序列具有至少64%同一性的CDR氨基酸序列,并且其中所述抗体或分子特异性结合同二聚体IL-17A和异二聚体IL-17AF,但不特异性结合同二聚体IL-17F。

[0020] 在一个实施方案中,IL-17A、IL-17AF或IL-17F选自食蟹猴(cynomolgus monkey)、恒河猴(rhesus macaque monkey)、狨猴(marmoset monkey)、大鼠、小鼠或人的一种或多种,诸如2种或3种或更多种。在一个具体实施方案中,IL-17A、IL-17AF或IL-17F选自人。在一个具体实施方案中,IL-17A、IL-17AF或IL-17F选自人和小鼠。在一个具体实施方案中,IL-17A、IL-17AF或IL-17F来自食蟹猴、恒河猴、狨猴、大鼠、小鼠和人。

[0021] 在一个具体实施方案中,本公开内容的分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含与SEQ ID NO:12具有至少95%同一性的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:43具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述分离的抗体包含与SEQ ID NO:14具有至少95%同一性的氨基酸序列,和与SEQ ID NO:44具有至少95%同一性的氨基酸序列。

[0022] 在一个实施方案中,所述分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含含有选自以下组成的组的CDR1、CDR2和CDR3结构域的轻链可变区:a) SEQ ID NO:73的轻链CDR1结构域,其中所述第一可变氨基酸选自Gly (G) 和Val (V) 组成的组;第二可变氨基酸选自Tyr (Y)、Asn (N) 和Ile (I) 组成的组;第三可变氨基酸选自Trp (W) 和Ser (S) 组成的组;以及第四可变氨基酸选自Glu (E) 和Ala (A) 组成的组;b) SEQ ID NO:74的轻链CDR2结构域,其中可变氨基酸选自Asn (N) 和Gln (Q) 组成的组;以及c) SEQ ID NO:75的轻链CDR3结构域,其中可变氨基酸选自Asn (N) 和Asp (D) 组成的组。

[0023] 在一个实施方案中,所述分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含重链CDR,所述重链CDR依次含有a) SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:3的重链CDR,和轻链CDR,所述轻链CDR依次含有b) SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:11、依次含有c) SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11、依次含有d) SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:11、依次含有e) SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24或依次含有f) SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11。

[0024] 在一个具体实施方案中,所述分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含依

次为SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:3的重链CDR和依次为SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:11的轻链CDR。

[0025] 在另一个具体实施方案中,所述分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含依次为SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:3的重链CDR和依次为SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11的轻链CDR。

[0026] 在另一个具体实施方案中,所述分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含依次为SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:3的重链CDR和依次为SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:11的轻链CDR。

[0027] 在另一个具体实施方案中,所述分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含依次为SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:3的重链CDR和依次地为SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的轻链CDR。

[0028] 在另一个具体实施方案中,所述分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含依次地为SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:3的重链CDR和依次地为SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11的轻链CDR。

[0029] 在一个实施方案中,所述分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含含有a) SEQ ID NO:12的免疫球蛋白重链和含有b) SEQ ID NO:43、c) SEQ ID NO:53、d) SEQ ID NO:35、e) SEQ ID NO:25或f) SEQ ID NO:13的免疫球蛋白轻链。

[0030] 在一个具体实施方案中,所述分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含根据SEQ ID NO:12的免疫球蛋白重链和根据SEQ ID NO:43的免疫球蛋白轻链。

[0031] 在一个具体实施方案中,所述分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含根据SEQ ID NO:12的免疫球蛋白重链和根据SEQ ID NO:53的免疫球蛋白轻链。

[0032] 在一个具体实施方案中,所述分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含根据SEQ ID NO:12的免疫球蛋白重链和根据SEQ ID NO:35的免疫球蛋白轻链。

[0033] 在一个具体实施方案中,所述分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含根据SEQ ID NO:12的免疫球蛋白重链和根据SEQ ID NO:25的免疫球蛋白轻链。

[0034] 在一个具体实施方案中,所述分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含根据SEQ ID NO:12的免疫球蛋白重链和根据SEQ ID NO:13的免疫球蛋白轻链。

[0035] 在一个实施方案中,所述分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含含有a) SEQ ID NO:14的免疫球蛋白重链和含有b) SEQ ID NO:44、c) SEQ ID NO:54、d) SEQ ID NO:36、e) SEQ ID NO:26或f) SEQ ID NO:15的免疫球蛋白轻链。

[0036] 在一个具体实施方案中,所述分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含根据SEQ ID NO:14的免疫球蛋白重链和根据SEQ ID NO:44的免疫球蛋白轻链。

[0037] 在一个具体实施方案中,所述分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含根据SEQ ID NO:14的免疫球蛋白重链和根据SEQ ID NO:54的免疫球蛋白轻链。

[0038] 在一个具体实施方案中,所述分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含根据SEQ ID NO:14的免疫球蛋白重链和根据SEQ ID NO:36的免疫球蛋白轻链。

[0039] 在一个具体实施方案中,所述分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含根据SEQ ID NO:14的免疫球蛋白重链和根据SEQ ID NO:26的免疫球蛋白轻链。

[0040] 在一个具体实施方案中,所述分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含根

据SEQ ID NO:14的免疫球蛋白重链和根据SEQ ID NO:15的免疫球蛋白轻链。

[0041] 在本公开内容的一个方面,提供分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质,所述抗体结合与根据本公开内容的特定实施方案的分离的抗体或分子所结合表位相同的表位。

[0042] 在一个实施方案中,所述分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质结合包含Arg78、Glu80和Trp90的IL-17A表位,诸如人IL-17A表位。

[0043] IL-17A表位还可包含Tyr85或Arg124。

[0044] 在一个实施方案中,IL-17A表位诸如人IL-17A表位还包含Pro82、Ser87或Val88的一个或多个。

[0045] 在本公开内容的一个方面,提供了分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质,其包含具有与根据特定实施方案的抗体或分子等同的表位识别特征的抗原识别表面。

[0046] 在本公开内容的一个方面,提供了分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质,其对IL-17A(诸如人IL-17A)或IL-17AF(诸如人IL-17AF)的结合被根据特定实施方案的至少一种抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质交叉阻断。

[0047] 在一个实施方案中,抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质不特异性结合a)人IL-17F同二聚体、IL-17B同二聚体、IL-17C同二聚体、IL-17D同二聚体、IL-17E同二聚体的任何一种或多种,和/或b)食蟹猴IL-17F同二聚体、小鼠IL-17F同二聚体的任何一种或多种,和/或c)选自由以下组成的组的其它人细胞因子的任何一种或多种:IL-1、IL-3、IL-4、IL-6、IL-8、gIFN、TNF α 、EGF、GMCSF、TGF β 2,和/或d)选自由以下组成的组的其它小鼠细胞因子的任何一种或多种:IL-1b、IL-2、IL-4、IL-6、IL-12、IL18、IL23、IFN或TNF。

[0048] 在一个实施方案中,抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质结合IL-17A,诸如人IL-17A,以便抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质抑制或阻断IL-17A与其受体之间的结合和降低或中和IL-17A活性。

[0049] 在一个实施方案中,人抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质对于人IL-17A的结合亲和力为100nM或更少,10nM或更少,1nM或更少,100pM或更少或10pM或更少(通过BiacoreTM测量的)。在具体实施方案中,抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质对于人IL-17A的结合亲和力低于200pM或低于100pM,如通过BiacoreTM测量的。

[0050] 在一个实施方案中,抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质当优选地使用培养的软骨细胞或成纤维细胞人在体外评估时,能够抑制IL-6分泌或GRO- α 分泌。

[0051] 在一个实施方案中,抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质能够在体内在抗原诱导的关节炎实验模型诸如大鼠AIA-模型中抑制膝关节肿胀。

[0052] 在一个实施方案中,将抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质缀合于其它活性部分。

[0053] 抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质可以是单克隆抗体或其抗原结合部分,优选嵌合抗体、人源化抗体或人抗体或其部分。

[0054] 在本公开内容的方面,提供了药物组合物,其包含与一种或多种可药用的赋形剂、稀释剂或载体组合的根据本公开内容的实施方案的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质。

[0055] 在实施方案中,所述药物组合物包含一种或多种额外的活性成分。

[0056] 在一个具体实施方案中,所述药物组合物是冻干粉剂。在另一个具体实施方案中,

所述药物组合物是包含治疗上可接受的量的本公开内容的抗体或分子的液体制剂,优选地制备为预充注射器。

[0057] 本公开内容还涉及本公开内容的所述抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质特别地XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5抗体用作药物的用途,更优选地用于治疗由IL-17A介导的或可通过抑制IL-17A信号转导或IL-6或GRO- α 分泌来治疗的病理性病症的药物的用途。

[0058] 在一个具体实施方案中,本公开内容的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质可用于治疗自身免疫性和炎症病症,诸如关节炎、类风湿性关节炎、银屑病、慢性阻塞性肺病、系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、哮喘、多发性硬化或囊性纤维化。

[0059] 在本公开内容的一个方面,提供了本公开内容的所述抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质,特别地XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5抗体在制造用于治疗由IL-17A介导的或可通过抑制IL-6或GRO- α 分泌来治疗的病理性病症的药物中的用途。

[0060] 在一个具体实施方案中,由IL-17A介导的或可通过抑制IL-6或GRO- α 分泌来治疗的病理性病症是炎症病症或病况,诸如关节炎、类风湿性关节炎、银屑病、慢性阻塞性肺病、系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、哮喘、多发性硬化或囊性纤维化。

[0061] 在本公开内容的一个方面,提供了治疗由IL-17A介导的或可通过抑制IL-6或GRO- α 分泌而得到治疗的病理性病症的方法,所述方法包括施用有效量的根据本公开内容的分离的抗体或分子,特别地XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5抗体,以便所述病况被缓解。

[0062] 在实施方案中,所述病况是炎症病症或病况,诸如关节炎、银屑病、慢性阻塞性肺病、系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、哮喘、多发性硬化或囊性纤维化。

[0063] 本公开内容还涉及用于产生本公开内容的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质的手段。此类手段包括编码本公开内容的抗体或蛋白质的至少重和/或轻可变区的分离的核酸分子,或包含此类核酸的克隆性表达载体,特别地用于在宿主细胞中重组产生根据本公开内容的抗体或蛋白质例如XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5。在具体实施方案中,此类克隆性或表达载体包含选自以下组成的组的至少一个核酸序列:SEQ ID NO:18、31、51、19、28、32、38、40、46、48、52、56和58。在另一个实施方案中,其包含有效地连接于合适的启动子序列(这对于本领域普通技术人员来说是公知的)的下列选自SEQ ID NO:16、29、49、17、27、30、37、39、45、47、50、55和57组成的组的可变重链和轻链序列的编码序列的至少一个。

[0064] 在实施方案中,所述核酸分子是信使RNA(mRNA)。

[0065] 本公开内容还涉及包含一种或多种上述克隆性载体或表达载体的宿主细胞以及用于产生本公开内容的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质,具体地XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的方法,所述方法包括培养所述宿主细胞、纯化和回收所述抗体或蛋白质。

[0066] 定义

[0067] 为了本公开内容可被更容易地理解,首先定义某些术语。另外的定义示于整个详细说明中。

[0068] 术语“免疫应答”是指例如淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞和由上述细胞或肝产生的可溶性大分子(包括抗体、细胞因子和补体)的作用,所述作用导致选择性损害、破坏侵袭病原体、感染病原体的细胞或组织、癌性细胞或在自身免疫或病理性炎症时的正常人细胞或组织或从人体选择性清除其。

[0069] “信号转导途径”或“信号转导活性”是指通常由蛋白质间相互作用诸如生长因子

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

[0070] 天然存在的“抗体”是包含通过二硫键链间连接的至少2个重(H)链和2个轻(L)链的糖蛋白。每一条重链由重链可变区(在本文中缩写为V_H)和重链恒定区组成。重链恒定区由3个结构域CH1、CH2和CH3组成。每一条轻链由轻链可变区(在本文中缩写为V_L)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域C_L组成。V_H和V_L区可被进一步细分为称为互补决定区(CDR)的具有高可变性的区域,其间隔以更保守的称为框架区(ER)的区域。每一个V_H和V_L由按下列顺序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4从氨基末端至羧基末端排列的3个CDR和4个FR组成。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白对宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q))的结合。

[0071] 如本文中所用,术语“互补决定区”和“CDR”是指抗体可变区内赋予抗原特异性和结合亲和力的氨基酸的序列。一般而言,在每一个重链可变区中存在3个CDR(HCDR1、HCDR2、HCDR3)并且在轻链可变区中存在3个CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。

[0072] 给定的CDR的精确氨基酸序列边界可使用许多公知的方案的任何方案来确定,包括由Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(“Kabat”编号方案)、Al-Lazikani等人,(1997) JMB 273,927-948(“Chothia”编号方案)描述的那些方案。例如,对于经典形式,在Kabat下,重链可变结构域(VH)中的CDR氨基酸残基被编号为31-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3);并且轻链可变结构域(VL)中的CDR氨基酸残基被编号为24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)。在Chothia下,VH中的CDR氨基酸被编号为26-32(HCDR1')、52-56(HCDR2')和95-102(HCDR3');并且VL中的氨基酸残基被编号为26-32(LCDR1')、50-52(LCDR2')和91-96(LCDR3')。通过组合Kabat和Chothia的CDR定义,CDR由人VH中的氨基酸残基26-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3)和人VL中的氨基酸残基24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)组成。

[0073] 如本文中所用,术语抗体的“抗原结合部分”(或简单地“抗原部分”)是指保留特异性结合抗原(例如,IL-17A的部分)的能力的抗体的全长或一个或多个片段,诸如蛋白质。已显示抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的片段来进行。包含在术语抗体的“抗原结合部分”中的结合片段的实例包括Fab片段、由V_L、V_H、C_L和CH1结构域组成的单价片段;F(ab)₂片段、包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个Fab片段的双价片段;由V_H和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体的单臂的V_L和V_H结构域组成的Fv片段;由V_H结构域组成的dAb片段(Ward等人1989,Nature341:544-546);和分离的互补决定区(CDR)或包含这样的抗原结合部分的任何融合蛋白。

[0074] 因此,术语“抗原结合部分”还可指对应于可被包含在替代框架或支架诸如下文中描述的骆驼抗体或‘非抗体’分子内的本公开内容的抗体的部分。

[0075] 此外,虽然Fv片段的两个结构域V_L和V_H由分开的基因编码,但它们可使用重组方法,通过合成接头来进行联接,所述接头使得它们被产生为其中V_L和V_H区域配对形成单价分

子的单链蛋白(称为单链Fv(scFv);参见,例如,Bird等人1988,Science 242:423-426;和Huston等人1988,Proc.Natl.Acad.Sci.85:5879-5883)。此类单链抗体也意欲包括在术语抗体的“抗原结合部分”内。这些抗体片段使用本领域普通技术人员已知的常规技术来获得,并且可以以与对于完整抗体使用的方式相同的方式筛选所述片段的功用。

[0076] 如本文中所用,“分离的抗体”是指大体上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体(例如,特异性结合IL-17A诸如人IL-17A的分离的抗体,大体上不含特异性结合除IL-17A外的其它抗原的抗体)。然而,特异性结合IL-17A的分离的抗体可具有与其它抗原(诸如来自其它物种IL-17A分子或IL-17A异二聚体诸如IL-17AF)的交叉反应性。此外,分离的抗体可大体上不含其它细胞材料和/或化学药品。

[0077] 如本文中所用,术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单一分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物展示对于特定表位的单一结合特异性和亲和力。

[0078] 除非另外描述,否则术语IL-17A是指如SEQ ID NO:76或SEQ ID NO:78中定义的人IL-17A。除非另外描述,否则术语IL-17F是指如SEQ ID NO:77中定义的人IL-17F。IL-17AF是IL-17A亚单位与IL-17F亚单位的异二聚体,如本领域普通技术人员所理解的。将来自不同物种的重组蛋白(利用前缀“r”来命名的)用于下文中所述的测定。例如,重组人IL-17A被命名为rhuIL-17。本领域普通技术人员知道如何使用本领域中已知的起始材料和标准方案来表达此类蛋白质。然而,为了帮助本领域普通技术人员,除非另外提出,否则可使用下列氨基酸序列:食蟹猴(cyno) IL-17A,SEQ ID NO:79;cynoIL-17F,SEQ ID NO:80;恒河猴(rhesus) IL-17A,SEQ ID NO:81;狨猴(marmoset) IL-17A,SEQ ID NO:82;小鼠(m) IL-17A,SEQ ID NO:83;mIL-17F,SEQ ID NO:84、大鼠IL-17A,SEQ ID NO:85;人IL-17受体A(huIL-17RA),SEQ ID NO:86。如对于本领域普通技术人员来说是已知的,上述序列稍有变化,即因始于不同的群组而引起的。在实例中,还使用工具抗体例如用于筛选目的。此类抗体是标准抗体并且可由本领域普通技术人员容易地获得。

[0079] 术语“表位”意指能够特异性结合抗体的蛋白质决定簇。表位通常由分子的化学活性表面分组诸如氨基酸或糖侧链组成,并且通常具有特定的三维结构特征,以及特定的电荷特征。构象和非构象表位区别在于对前者但非对后者的结合在变性溶剂存在的情况下丧失。

[0080] 术语“同种型”是指由重链恒定区基因提供的抗体种类(例如,IgM、IgE、IgG诸如IgG1或IgG4)。同种型还包括这些种类之一的修饰形式,其中修饰已被产生来改变Fc功能,例如以增强或减弱效应子功能或对Fc受体的结合。

[0081] 如本文中所用,术语“人抗体”意欲包括具有其中框架区和CDR区都来源于人来源的序列的可变区的抗体。此外,如果抗体含有恒定区,则所述恒定区也来源于这样的人序列,例如,人种系序列,或人种系序列或含有来源于人框架序列分析(例如如在Knappik,等人2000,J Mol Biol296:57-86中所描述的)的共有框架序列的抗体的突变形式。

[0082] “人源化”抗体是保留非人抗体的反应性同时在中免疫原性不太强的抗体。这可以例如通过保留非人CDR区并用它们的人对应物(即,恒定区以及可变区的框架部分)替代抗体的其余部分来实现。参见,例如,Morrison等人1984,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855;Morrison和Oi,1988,Adv.Immunol.,44:65-92;Verhoeyen等人1988,Science,239:1534-1536;Padlan 1991,Molec.Immun.,28:489-498;和Padlan 1994,Molec.Immun.,

31:169-217。人工程技术的其它实例包括,但不限于US5,766,886中公开的Xoma技术。

[0083] 本公开内容的人抗体可包括不由人序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或定点诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。然而,如本文中所用,术语“人抗体”无意包括其中来源于另一种哺乳动物物种诸如小鼠的种系的CDR序列已被移植至人框架序列上的抗体。

[0084] 术语“人单克隆抗体”是指展示单一结合特异性的抗体,其具有其中框架区和CDR区都来源于人序列的可变区。

[0085] 如本文中所用,术语“重组人抗体”包括通过重组手段制备、表达、生成或分离的所有人抗体,诸如从人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体动物(例如,小鼠)或从其制备的杂交瘤分离的抗体,从经转化表达人抗体的宿主细胞,例如从转染瘤分离的抗体,从重组组合人抗体文库分离的抗体,以及通过包括将人免疫球蛋白基因序列的全部或部分与其它DNA序列拼接的任何其它手段制备、表达、生成或分离的抗体。此类重组人抗体具有其中框架区和CDR区都来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区。然而,在某些实施方案中,可将此类重组人抗体经历体外诱变(或,当使用人Ig序列的转基因动物时,体内体细胞诱变),从而重组抗体的V_H和V_L区的氨基酸序列是虽然来源于人种系V_H和V_L序列并与所述序列相关,但在体内可以不天然存在于人抗体种系库内的序列。

[0086] 如本文中所用,“同种型”是指由重链恒定区基因提供的抗体种类(例如,IgM、IgE、IgG,诸如IgG1或IgG4)。

[0087] 短语“识别抗原的抗体”和“对于抗原是特异性的抗体”在本文中可与术语“特异性结合抗原的抗体”互换使用。

[0088] 如本文中所用,“特异性结合IL-17A多肽”的抗体或蛋白质意欲指以100nM或更低、10nM或更低、1nM或更低、100pM或更低或10pM或更低的K_D结合人IL-17A多肽的抗体或蛋白质。“与除IL-17A外的抗原交叉反应”的抗体意欲指以10nM或更低、1nM或更低或100pM或更低的K_D结合该抗原的抗体。“不与特定抗原交叉反应”的抗体意欲指以100nM或更大的K_D或1μM或更大的K_D或10μM或更大的K_D结合该抗原的抗体。在某些实施方案中,不与抗原交叉反应的此类抗体在标准结合测定中展现基本上不可检测的针对这类蛋白质的结合。

[0089] 如本文中所用,术语“K_{assoc}”或“K_a”意欲指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率,而术语“K_{dis}”或“K_d”,如本文中所用,意欲指特定抗体-抗原相互作用的离解速率。

[0090] 如本文中所用,术语“K_D”意指从K_d对K_a的比率(即K_d/K_a)获得的并且表达为摩尔浓度(M)的解离常数。抗体的K_D值可使用本领域中良好建立的方法来测定。用于测定抗体的K_D的方法是通过使用对于本领域普通技术人员来说是公知的并且如例如实施列中所述操作的表面等离子体共振或使用生物传感系统诸如Biacore™系统。

[0091] 可在各种测定,包括在本文的下文中描述的此类测定中方便地测试IL-17对其受体的结合的抑制。术语“达到相同的程度”意指参照与等同分子基于统计在本文中提及的测定之一(参见实施列)中展现基本上相同的IL-17抑制活性。例如,本公开内容的IL-17结合分子通常具有这样的对人IL-17的抑制(在由人IL-17在人皮肤成纤维细胞中诱导的IL-6产生方面)的半最大抑制浓度(IC₅₀),当例如如实施列中所述测定时,所述半最大抑制浓度在各自参照分子的IC₅₀的+/-105内,即相差低于10nM,更优选9、8、7、6、5、4、3或2nM,优选地基本上与其相同。或者,所使用的测定可以是可溶性IL-17受体和本公开内容的IL-17结合分

子对IL-17的结合的竞争性抑制的测定。

[0092] 如本文中所用,术语“亲和力”是指在单个抗原位(antigenic site)上抗体与抗原之间的相互作用的强度。在每一个抗原位内,抗体“臂”的可变区通过弱的非共价力在许多位上与抗原相互作用;相互作用越多,亲和力越强。如本文中所用,术语对于IgG抗体或其片段(例如,Fab片段)的“高亲和力”是指对于靶抗原具有 10^{-8} M或更低、 10^{-9} M或更低或 10^{-10} M或 10^{-11} M或更低或 10^{-12} M或更低或 10^{-13} M或更低的 K_D 的抗体。然而,高亲和力结合对于其它抗体同种型可变化。例如,对于IgM同种型的高亲和力结合是指具有 10^{-7} M或更低或 10^{-8} M或更低的 K_D 的抗体。

[0093] 如本文中所用,术语“抗体亲抗原性”是指抗体-抗原复合物的总体稳定性或强度的信息测度。其可受以下3个主要因素控制:抗体表位亲和力;抗原和抗体的效价;和相互作用部分的结构排列。最终,这些因素确定抗体的特异性,即,特定抗体将结合精确抗原表位的可能性。

[0094] 如本文中所用,抑制IL-17A结合IL-17R的抗体或蛋白质意欲指以10nM或更低的 IC_{50} ,优选以1nM或更低的 IC_{50} 或,更优选以100pM或更低的 IC_{50} 抑制IL-17A结合IL-17R的抗体或蛋白质,如在体外竞争性结合测定中测量的。此类测定在下面实施例中进行了更详细描述。

[0095] 如本文中所用,术语“IL-17A拮抗剂”或“IL-17A阻断分子”意欲指抑制IL-17A通过IL-17R诱导的信号转导活性,从而降低或中和IL-17A活性的抗体或蛋白质。这可在人细胞测定诸如人细胞的依赖IL-17A的IL-6或GRO- α 产生测定中得以显示。此类测定在下面实施例中进行了更详细描述。在一些实施方案中,本公开内容的抗体或蛋白质以10nM或更低,1nM或更低或100pM或更低的 IC_{50} 抑制依赖IL-17A的IL-6或GRO- α 产生,如在体外人细胞测定中测量的。此类测定在下面实施例中进行了更详细描述。在一些实施方案中,本公开内容的抗体或蛋白质在小鼠和大鼠的体内测定中抑制抗原诱导的关节炎。此类测定在下文中的实施例中进行了更详细地描述。

[0096] 如本文中所用,术语“ADCC”或“依赖抗体的细胞毒性”活性是指细胞耗尽活性。ADCC活性可通过对于本领域普通技术人员来说是公知的标准ADCC测定来测量。

[0097] 如本文中所用,术语对于本公开内容的抗体或蛋白质的“选择性”是指结合某些靶多肽,但不结合密切相关的多肽的抗体或蛋白质。短语“识别抗原的抗体”和“对于抗原是特异性的抗体”在本文中可与术语“特异性结合抗原的抗体”互换使用。

[0098] 术语“核酸”或“多核苷酸”是指脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其呈单链或双链形式的聚合物。除非明确地限制,否则术语包括具有与参照核酸相似的结合性质并且以与天然存在的核苷酸相似的方式被代谢的含有已知的天然核苷酸的类似物的核酸。(参见,属于Kariko等人的美国专利No.8,278,036,其公开了尿苷被假尿苷替代的mRNA分子,合成所述mRNA分子的方法以及用于在体内递送治疗性蛋白的方法)。可使用包装mRNA的方法,例如,属于Kariko等人的美国专利No.8,278,036和属于Moderna的专利申请W02013/090186A1中公开的那些方法。除非另有所指,否则特定核酸序列还隐含地包括其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直系同源物、SNP和互补序列以及明确指出的序列。具体地,简并密码子取代可通过生成其中一个或多个选择的(或全部)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(Batzer等人,Nucleic Acid Res.19:

5081 (1991); Ohtsuka 等人, J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); 和 Rossolini 等人, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)。

[0099] 如本文中所用, 术语“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物, 例如哺乳动物和非哺乳动物, 诸如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。如本文中所用, 术语“cyno”或“食蟹猴”是指食蟹猴 (食蟹猴 (*Macaca fascicularis*))。如本文中所用, 术语“rhesus”或“恒河猴”是指恒河猴 (恒河猴 (*Macaca mulatta*))。如本文中所用, 术语“狨猴”是指狨猴。

[0100] 如本文中所用, 术语任何疾病或病症 (即, 类风湿关节炎) 的“治疗”或“医治”在一个实施方案中是指改善疾病或病症 (即, 减缓或阻止或减少疾病的进展或其临床症状的至少一个)。在另一个实施方案中, “治疗”或“医治”是指缓解或改善至少一个身体参数, 包括可能不能被患者辨别出的那些物理参数。在另一个实施方案中, “治疗”或“医治”是指在身体上 (例如, 可辨别的症状的稳定)、生理上 (例如, 身体参数的稳定) 或在这两方面调节疾病或病症。除非在本文中明确描述, 否则用于评估疾病的治疗和/或预防的方法在本领域中通常是已知的。

[0101] 如本文中所用, 关于患者的“选择”和“选择的”用于意指因具有预定标准的特定患者而从更大的一组患者特异性选择出该特定患者。类似地, “选择性治疗患者”是指向因具有预定标准而从更大的一组患者特异性选择出的特定患者提供治疗。类似地, “选择性施用”是指向因具有预定标准而从更大的一组患者特异性选择出的特定患者施用药物。

[0102] 如本文中所用, 术语“优化的”意指核苷酸序列已被改变来使用在生产性细胞或生物体 (通常是真核细胞, 例如毕赤酵母的细胞、木霉属 (*Trichoderma*) 和中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 或人细胞) 中是优选的密码子编码氨基酸序列。优化的核苷酸序列经工程化完全或尽可能多地保留由起始核苷酸序列最初编码的氨基酸序列, 所述氨基酸序列也称为“亲代”序列。本文中优化的序列已被工程化来具有在 CHO 哺乳动物细胞中是优选的密码子, 然而, 在本文中也预想了这些序列在其它真核细胞中的优化的表达。由优化的核苷酸序列编码的氨基酸序列也被称为优选的。

[0103] 如本文中所用, 两个序列之间的百分比同一性是通过考虑需要被引用以进行两个序列的最佳比对的缺口的数目和每一个缺口的长度, 由序列共享的相同位置的数目的函数 (即, 同一性% = 相同位置的数目/位置的总数 $\times 100$)。序列的比较和两个序列之间的百分比同一性的测定可使用如下文中描述的数学算法来实现。

[0104] 两个氨基酸序列之间的百分比同一性可使用 E. Meyers 和 W. Miller 1988, Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (其已被并入 ALIGN 程序 (2.0 版) 中) 的算法, 使用 PAM120 权重残基表、为 12 的缺口长度罚分和为 4 的缺口罚分来测定。或者, 两个氨基酸序列之间的百分比同一性可使用已被并入 GCG 软件包中的 GAP 程序 (可在 <http://www.gcg.com> 上获得) 的 Needleman 和 Wunsch 1970, J. Mol. Biol. 48:444-453 算法, 使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵以及为 16、14、12、10、8、6 或 4 的缺口权重和为 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重来测定。

[0105] 两个核苷酸序列之间的百分比同一性还可使用例如算法诸如用于核酸序列的 BLASTN 程序, 使用为 11 的字长 (W)、为 10 的期望值 (E)、 $M=5$ 、 $N=4$ 以及两条链的比较作为默认值来测定。

[0106] 术语“交叉阻断”、“交叉阻断的”、“交叉阻止”在本文中可互换使用, 用于指抗体或

其它结合剂在标准竞争性结合测定中干扰其它抗体或结合剂对IL-17A的结合的能力。

[0107] 抗体或其它结合剂诸如包含抗体的抗原结合部分的蛋白质能够干扰另一种抗体或结合分子对IL-17A的结合的能力或程度,和从而其是否可被认为是根据本公开内容的交叉阻断可使用标准竞争性结合测定来测定。一个合适的测定包括使用Biacore™技术(例如通过使用Biacore™ 3000仪(Biacore™,Uppsala,Sweden)),所述技术可使用表面等离子体共振技术来测量相互作用的程度。用于测量交叉阻断的另一个测定使用基于ELISA的方法。在实施例中提供了关于这些方法的进一步细节。

[0108] 例如,本文中例举的抗体(即XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5)和包含其抗原结合部分的蛋白质将全部彼此“交叉阻断”。所有这些抗体靶向IL-17A上的相同表位。预期其它交叉阻断抗体结合相同或相关的表位。

[0109] 根据本公开内容,根据本公开内容的交叉阻断性抗体或其它结合剂,诸如包含抗体的抗原结合部分的蛋白质在描述的Biacore™交叉阻断测定中结合IL-17A,以便抗体或结合剂的组合(混合物)的记录的结合为组合中的两种抗体或结合剂的最大理论结合(如上文定义的)的80%至0.1%(例如80%至4%),特别地最大理论结合的75%至0.1%(例如75%至4%),更优选地最大理论结合的70%至0.1%(例如70%至4%),更优选地最大理论结合的65%至0.1%(例如65%至4%)。

[0110] 相较于在溶液相抗-IL-17A抗体不存在的情况下(即阳性对照孔)获得的IL-17A检测信号,如果溶液相抗IL-17抗体能够引起IL-17A检测信号(即被涂覆的抗体结合的IL-17A的量)的60%至100%,优选地70%至100%,更优选地80%至100%的减少,则抗体在如实施例中描述的ELISA测定中被定义为交叉阻断。

[0111] 发明详述

[0112] 本公开内容部分基于特异性结合同二聚体IL-17A和异二聚体IL-17AF但不特异性结合同二聚体IL-17F的抗体分子的发现。本公开内容涉及将在下文中进一步描述的全长IgG形式抗体以及包含其抗原结合部分的蛋白质。

[0113] 因此,本公开内容提供了对于几个物种(诸如选自食蟹猴、恒河猴、狨猴、大鼠、小鼠或人)具有令人惊讶地相似的结合能力的抗体以及包含其抗原结合部分的蛋白质,以及药物组合物、生产方法和使用此类抗体和组合物的方法。

[0114] 重组抗体

[0115] 本公开内容的抗体包括人重组抗体XAB1和抗体衍生物XAB2、XAB3、XAB4和XAB5,其从如下表1中描述的它们的全长重链和轻链氨基酸序列衍生、分离而来,并且在结构上由所述序列表征。

[0116] 表1. XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5的全长重链和轻链氨基酸序列

[0117]

抗 体	全长重链氨基酸序列	全长轻链氨基酸序列
XAB1	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15
XAB2	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 26
XAB3	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 36
XAB4	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 44
XAB5	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 54
序列同一性	100%	97%

[0118] 本公开内容的此类分离的抗体XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5的对应的可变区V_H和V_L的氨基酸序列示于下面的表2中。

[0119] 表2.XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5的可变重链和轻链氨基酸序列

[0120]

抗 体	可变重链氨基酸序列	可变轻链氨基酸序列
XAB1	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13
XAB2	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 25
XAB3	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 35
XAB4	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 43
XAB5	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 53
序列同一性	100%	94%

[0121] 本公开内容的其它抗体包括具有已通过氨基酸缺失、插入或取代突变的,但仍与上述抗体(特别地在上述序列中描绘的CDR区中)有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列的那些抗体。在一些实施方案中,本公开内容的抗体是XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5的任一个的突变变体,其中所述突变变异抗体包括突变氨基酸序列,在所述突变氨基酸序列中,当与上述序列中描绘的CDR区相比较时,在CDR区中已通过氨基酸缺失、插入或置换的氨基酸突变不超过1、2、3、4或5个。

[0122] XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5的全长轻链和重链核苷酸编码序列示于下面表3中。

[0123] 表3. 全长重链和轻链DNA编码序列

[0124]

抗 体	全长重链DNA编码序列	全长轻链DNA编码序列
XAB1	SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 19
XAB2	SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 31,	SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32
	SEQ ID NO: 51	
XAB3	SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40
XAB4	SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 52
XAB5	SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58

[0125] XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5的可变轻链和重链核苷酸编码序列示于下面表4中。

[0126] 表4. 可变重链和轻链氨基酸序列的DNA编码序列

[0127]

抗 体	可变重链的DNA编码序列	可变轻链的DNA编码序列
XAB1	SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 17
XAB2	SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 30
XAB3	SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39
XAB4	SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 50
XAB5	SEQ ID NO: 16,	SEQ ID NO: 55,
	SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 57

[0128] 编码本公开内容的抗体的其它核酸包括已通过核苷酸缺失、插入或取代突变的，但仍然与上文中所述的或下面表5和表6中的序列中描绘的CDR对应编码区具有至少60、70、80、90、95或100%同一性的核酸。

[0129] 在一些实施方案中，其包括变异核酸，在所述变异核酸中，相较于上文中所述的或下面表5和表6中的序列中描绘的CDR编码区，在CDR编码区中已通过核苷酸缺失、插入或取代改变的核苷酸不超过1、2、3、4或5个。

[0130] 对于结合相同表位的抗体，可将 V_H 、 V_L 、全长轻链和全长重链序列(核苷酸序列和氨基酸序列)“混合和匹配”以生成本公开内容的其它抗-IL-17A结合分子。此类“混合和匹配”的抗体的IL-17A结合可使用上述结合测定和其它常规结合测定(例如，ELISA)来进行测试。当将这些链混合和匹配时，应当用结构上相似的 V_H 序列替代来自特定 V_H/V_L 配对的 V_H 序列。同样地，应当用结构上相似的全长重链序列替代来自特定全长重链/全长轻链配对的全长重链序列。同样地，应当用结构上相似的 V_L 序列替代来自特定 V_H/V_L 配对的 V_L 序列。同样地，应当用结构上相似的全长轻链序列替代来自特定全长重链/全长轻链配对的全长轻链序列。因此，在一个方面，本公开内容提供具有如下序列的分离的重组抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质：包含选自SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变区和包含选自SEQ ID NO:13、25、35、43和53的氨基酸序列的轻链可变区；其中选择所述重链和轻链区以便抗体特异性结合IL-17A。

[0131] 本公开内容的一些抗体和包含其抗原结合部分的蛋白质的 V_H CDR1(取决于所使用的CDR界定,也称为HCDR1或HCDR1'), V_H CDR2s(取决于所使用的CDR界定,也称为HCDR2或HCDR2'), V_H CDR3(取决于所使用的CDR界定,也称为HCDR1或HCDR1'), V_L CDR1(取决于所使用的CDR界定,也称为LCDR1或LCDR1'), V_L CDR2(取决于所使用的CDR界定,也称为LCDR2或LCDR2'), V_L CDR3(取决于所使用的CDR界定,也称为HCDR3或HCDR3')的氨基酸序列的实例示于表5和表6中。

[0132] 在表5中,本公开内容的一些抗体的CDR区使用Kabat系统(Kabat,E.A.,等人1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,美国卫生和公众服务部, NIH公开号91-3242,也参见Zhao&Lu 2009, Molecular Immunology 47:694-700)来描绘。

[0133] 为了方便阅读,当按照Kabat定义描绘CDR区时,它们在下文中分别被称为HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3。

[0134] 表5. 根据Kabat定义的XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5的CDR区

[0135]

原始抗体	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
XAB1	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11
XAB2	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
XAB3	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 11
XAB4	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 11
XAB5	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11
共有序列	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 75

[0136]

序列同一性	100%	100%	100%	64%	86%	89%
-------	------	------	------	-----	-----	-----

[0137] 共有序列SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:75包含许多命名为X的可变氨基酸。基于XAB2与XAB5的序列比对,可根据以下方面有利地选择SEQ ID NO:73中的4个可变氨基酸:第一可变氨基酸(X1)可选自由Gly(G)和Val(V)组成的组;第二可变氨基酸(X2)可选自由Tyr(Y)、Asn(N)和Ile(I)组成的组;第三可变氨基酸(X3)可选自由Trp(W)和Ser(S)组成的组;以及第四可变氨基酸(X4)可选自由Glu(E)和Ala(A)组成的组。SEQ ID NO:9相较于SEQ ID NO:22具有91%的序列同一性以及相较于SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:42具有73%的序列同一性。SEQ ID NO:22相较于SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:42具有64%的序列

同一性。SEQ ID NO:34相较于SEQ ID NO:42具有91%的序列同一性。

[0138] 类似地,可按照以下方面有利地选择SEQ ID NO:74中的一个可变氨基酸:X1可选自由Asn(N)和Gln(Q)组成的组。SEQ ID NO:10相较于SEQ ID NO:23具有86%的序列同一性。

[0139] 可按照以下方面有利地选择SEQ ID NO:75中的一个可变氨基酸:X1可选自由Asn(N)和Asp(D)组成的组。SEQ ID NO:11相较于SEQ ID NO:24具有89%的序列同一性。

[0140] 在表6中,本公开内容的一些抗体的CDR区使用Chothia系统,A1-Lazikani等人1997,J.Mol.Biol.273:927-948来描绘。为方便阅读,当按照Chothia定义来描绘CDR区时,它们在下文中分别被称为HCDR1'、HCDR2'、HCDR3'、LCDR1'、LCDR2'、LCDR3'。

[0141] 表6.按照Chothia定义的XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5的CDR区

[0142]

原始抗体	HCDR1'	HCDR2'	HCDR3'	LCDR1'	LCDR2'	LCDR3'
------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

[0143]

XAB1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
XAB2	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 21
XAB3	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
XAB4	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
XAB5	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
共有序列	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 72
序列同一性	100%	100%	100%	43%	100%	83%

[0144] 共有序列SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72包含许多被命名为X的可变氨基酸。基于XAB2与XAB5的序列的序列比对,可按照以下方面有利地选择SEQ ID NO:71中的4个可变氨基酸:第一可变氨基酸(X1)可选自由Gly(G)和Val(V)组成的组,第二可变氨基酸(X2)可选自由Tyr(Y)、Asn(N)和Ile(I)组成的组,第三可变氨基酸(X3)可选自由Trp(W)和Ser(S)组成的组;以及第四可变氨基酸(X4)可选自由Glu(E)和Ala(A)组成的组。SEQ ID NO:4相较于SEQ ID NO:20具有86%的序列同一性以及相较于SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:41具有57%的序列同一性。SEQ ID NO:20相较于SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:41具有43%的序列同一性。SEQ ID NO:33相较于SEQ ID NO:41具有86%的序列同一性。

[0145] 类似地,可按照以下方面有利地选择SEQ ID NO:72中的一个可变氨基酸:X1可选

自由Asn (N) 和Asp (D) 组成的组。SEQ ID NO:6相较于SEQ ID NO:21具有86%的序列同一性。

[0146] 鉴于这些抗体的每一个可结合IL-17A以及抗原结合特异性主要由CDR1、2和3区提供,因此可将V_H CDR1、2和3序列与V_L CDR1、2和3序列“混合和匹配”(即,可将来自不同抗体的CDR混合和匹配,含有V_H CDR1、2和3以及V_L CDR1、2和3的每一个抗体生成本公开内容的其它抗-IL-17A结合分子)。可使用上文中所述的和实施例中的结合测定或其它常规测定(例如,ELISA)来测试此类“混合和匹配”抗体的IL-17A结合。当将V_H CDR序列混合和匹配时,应当用结构上相似的CDR序列替代来自特定V_H序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列。同样地,当将V_L CDR序列混合和匹配时,应当用结构上相似的CDR序列替代来自特定V_L序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列。对本领域普通技术人员来说显而易见的是,可通过用来自本文中显示的本公开内容的单克隆抗体的CDR序列的结构上相似序列取代一个或多个V_H和/或V_L CDR区序列来生成新型V_H和V_L序列。

[0147] 在一个实施方案中,分离的重组抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质具有:根据SEQ ID NO:7的重链可变区CDR1;根据SEQ ID NO:8的重链可变区CDR2;根据SEQ ID NO:3的重链可变区CDR3;包含选自由SEQ ID NO:9、22、34、42和73组成的组,优选地选自由SEQ ID NO:9、22、34、42组成的组的氨基酸序列的轻链可变区CDR1;包含选自由SEQ ID NO:10、23和74组成的组,优选地选自由SEQ ID NO:10和23组成的组的氨基酸序列的轻链可变区CDR2;和包含选自由SEQ ID NO:11、24和75组成的组,优选地选自由SEQ ID NO:11和24组成的组的氨基酸序列的轻链可变区CDR3;其中这样选择所述CDR区,以使本公开内容的抗体或蛋白质特异性结合IL-17A。

[0148] 在另一个实施方案中,分离的重组抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质具有:根据SEQ ID NO:1的重链可变区HCDR1';根据SEQ ID NO:2的重链可变区HCDR2';根据SEQ ID NO:3的重链可变区HCDR3';包含选自由SEQ ID NO:4、20、33、41和71组成的组,优选地选自由SEQ ID NO:4、20、33、41组成的组的氨基酸序列的轻链可变区LCDR1';根据SEQ ID NO:5的轻链可变区LCDR2';和包含选自由SEQ ID NO:6、21和72组成的组,优选地选自由SEQ ID NO:6和21组成的组的氨基酸序列的轻链可变区LCDR3';其中这样选择所述CDR区,以使本公开内容的抗体或蛋白质特异性结合IL-17A。

[0149] 在某些实施方案中,抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质包含SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:3;SEQ ID NO:12;或c) SEQ ID NO:14。

[0150] 如本文中所用,如果抗体的可变区链或全长链获自使用人种系免疫球蛋白基因的系统,则人抗体包含作为特定种系序列“的产物”或“从其衍生”的重链或轻链可变区或全长重链或轻链。此类系统包括用目标抗原免疫具有人免疫球蛋白基因的转基因小鼠,或用目标抗原筛选在噬菌体上展示的人免疫球蛋白基因文库。可通过将人抗体的氨基酸序列与人种系免疫球蛋白的氨基酸序列相比较和选择在序列上与人抗体的序列最接近(即,最大百分比同一性)的人种系免疫球蛋白序列,来这样鉴定作为人种系免疫球蛋白序列“的产物”或“从其衍生”的人抗体。作为特定人种系免疫球蛋白序列“的产物”或“从其衍生”的人抗体可因例如天然存在的体细胞突变或定点突变的有意引入而含有不同于种系序列的氨基酸。然而,所选择的人抗体通常在氨基酸序列上与由人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列具有至少90%同一性,并且含有当与其它物种的种系免疫球蛋白的氨基酸序列(例如,鼠类种系序列)相比较时,将人抗体鉴定为是人的氨基酸残基。在某些情况下,人抗体可在氨基

酸序列上与由种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列具有至少60%、70%、80%、90%或至少95%或甚至至少96%、97%、98%或99%的同一性。通常地,从特定人种系序列衍生的人抗体将显示与由人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列相异不超过10个氨基酸的差异。在某些情况下,人抗体可显示与由种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列相差异不超过5个或甚至不超过4、3、2或1个氨基酸的差异。

[0151] 在本公开内容中,已鉴定了特别优选地作为潜在治疗性抗体结合的靶的IL-17A上的表位。该表位被XAB1和已通过XAB1的序列修饰开发而来的变异抗体XAB2、XAB3、XAB4和XAB5结合。在IL-17A序列上于残基Arg 78与Trp 90之间发现了该表位。

[0152] 所述表位可被认为包含下列来自IL-17A内的最优选氨基酸:Arg 78、Glu 80、Trp 90。此外,下列氨基酸残基也是优选的:Tyr 85、Arg 124。其它重要的氨基酸残基是Pro 82、Ser 87、Val 88。其它贡献氨基酸残基是Val 45*、Leu 49、Asp 81、Glu 83、Pro 86、Pro 130、Phe 133、Lys 137*,其中标记有(*)的氨基酸指示由同二聚体IL-17A的第二IL-17A亚单位贡献的残基。

[0153] 已显示靶向IL-17A上的该表位的抗体阻断IL-17A对其受体的结合,以抑制IL-17A介导的体外效应,和以减轻抗原诱导的关节炎的实验性体内模型的严重度。此外,已预料之外地显示结合该表位的抗体抑制由IL-17AF异二聚体介导的体外效应,并且还保留对于来源于小鼠的IL-17A和IL-17AF以及靶分子的其它物种变体的预料之外地高的亲和力。

[0154] 因此,该表位是尤其优选的,因为其还以可及的形式预料之外地保存在IL-17AF异二聚体的结构内。因此,本公开内容的优选抗体也将结合IL-17AF异二聚体。不希望受理论束缚,预期IL-17AF异二聚体的结构与IL-17A充分相似或与本公开内容的抗体的相互作用使得其与IL-17A充分相似,结合仍然可发生。

[0155] 这是预料之外的,因为基于已通过芯片预测组合的X射线晶体学(本领域中公开的并且由本发明人进行的)获得的IL-17A、IL-17F的可获得的结构和这些分子与抗体或受体之间的相互作用的结构分析,暗示着对本公开内容的抗体的结合或所述抗体与IL-17AF的交叉反应性不一定会发生。更具体地,异二聚体的IL-17F单体亚单位的N末端区域经预测在空间上阻碍本公开内容的抗体对IL-17AF异二聚体的结合。因此预期不会存在抗体与IL-17AF的显著交叉反应性。

[0156] 然而,尽管存在这些预测,但我们已确定公开的抗体对IL-17AF的交叉结合确实存在。出于许多原因,这实际上可以是有利的。如上文中所论述的,IL-17AF也被认为是促炎细胞因子,并且可牵涉许多相同的病理性病况或不期望的生物事件(如对于IL-17A所描述的或怀疑的)。本公开内容的抗体因而在治疗上可以是尤其有价值的,因为它们可靶向IL-17A和IL-17AF或干扰两者。

[0157] 此外,本发明人已证明本公开内容的抗体与IL-17AF之间的该结合还与IL-17AF的生物活性的抑制相关,如体外测定中观察到的。因此,本公开内容的抗体不仅高效地靶向和拮抗/中和IL-17A的活性,而且还高效地靶向和拮抗/中和IL-17AF活性。

[0158] 由本发明人进行的工作的其它预料之外的结果如下。原始‘亲代’抗体XAB1的亲和力成熟还已导致一组抗体,其保留了对于来源于其它物种诸如食蟹猴、恒河猴、狨猴、大鼠或小鼠的IL-17A变体的高亲和力或提高的亲和力。

[0159] 这是预料之外的,因为在努力提高本公开内容的抗体对于人IL-17A的亲和力中,

不会预期增强所得的抗体对于IL-17A的物种变体的亲和力。事实上,通常可能预期恰好相反。增强抗体对于靶抗原的特定物种(即人)变体的亲和力的努力,通常预期将减小对于该抗原的其它物种变体的亲和力。物种变体(或同源物/旁系同源物)的概念承认给定的物种的共同祖先,但接受在整个进化史的过程中已发生趋异。因此,即使当已在不同物种中鉴定的特定分子的变体之间存在良好程度的序列保守性时,也不能假定增强的对于一个物种变体的亲和力将增强对于另一个物种变体的亲和力。事实上,不同物种的序列之间的趋异通常导致这样的预期,即对于一种变体的亲和力的增强将更可能导致对于另一种物种变体的结合亲和力的减弱(或甚至消除)。小鼠与人IL-17A之间的序列同一性仅为62%(Moseley等人2003,Cytokine&Growth Factors Reviews 14:155-174)。

[0160] 然而,在本申请中并未观察到这种现象,并且由本发明人生成的抗体变体保留对于来自其它物种的IL-17A变体的高亲和力。这是有用的,因为在开发候选抗体分子作为有用的治疗性分子所必需的工作过程中,可能需要在其它物种中或对包含其它物种(诸如食蟹猴、恒河猴、狨猴、大鼠或小鼠)的组分或来源于所述物种的组分的细胞、分子或系统进行多种测试和测定。这使本公开内容的抗体尤其适合用于进一步开发。

[0161] 因此,如本文中公开的抗体和包含其抗原结合部分的蛋白质可共有一系列期望的性质,包括对于IL-17A的高亲和力、与来自其它物种诸如小鼠、大鼠、食蟹猴和狨猴的IL-17A的交叉反应性、缺乏对于其它IL-17同种型诸如IL-17F的交叉反应性、缺乏对于其它细胞因子(诸如人或小鼠细胞因子)的交叉反应性、与异二聚体IL-17AF的交叉反应性、阻断IL-17A对其受体诸如IL-17RA的结合的能力、抑制或中和IL-17A诱导的生物效应诸如IL-6或GRO- α 分泌的刺激的能力,和/或抑制由IL-17A(和/或IL-17AF)介导的体内效应诸如在抗原诱导的关节炎模型中观察到的肿胀的能力。

[0162] 还已显示如本文中公开的抗体和包含其抗原结合部分的蛋白质提供抗体-IL17A复合物的缓慢消除、配体的缓慢周转和IL17A捕获的长持续时间。在所述实施方案中提供了这些抗体和蛋白质的其它有利特性。

[0163] 同源抗体

[0164] 在另一个实施方案中,如本文中公开的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质具有全长重链和轻链氨基酸序列;全长重链和轻链核苷酸序列、可变区重链和轻链核苷酸序列或可变区重链和轻链氨基酸序列或所有6个CDR区的氨基酸序列,或与上述,特别地表1中的抗体XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5的氨基酸或核苷酸序列同源的核苷酸编码序列,并且其中本公开内容的抗体或蛋白质保留原始XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5抗体的期望的功能性质。

[0165] 原始XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5抗体的期望的功能性质可选自由以下组成的组:

[0166] (i) 对IL-17A的结合亲和力(对IL-17A的特异性结合),例如 K_D 为1nM或更低,100pM或更低或10pM或更低,如在例如如实施例中所描述的Biacore™测定中测量的;

[0167] (ii) IL-17R对IL-17A的结合的竞争性抑制,例如 IC_{50} 为10nM或更低或1nM或更低或100pM或更低,如在例如如实施例中所描述的体外竞争性结合测定中测量的;

[0168] (iii) 依赖IL-17A的活性例如IL-6或GRO- α 的产生的抑制,例如, IC_{50} 为10nM或更低或1nM或更低或100pM或更低,如在如实施例中所描述的细胞测定中测量的;

[0169] (iv) 观察到的效应例如膝盖肿胀的抑制,如在如实施例中所所述的体内抗原诱导的关节炎测定中测量的;

[0170] (v) 与食蟹猴、恒河猴、大鼠或小鼠 IL-17A 多肽的交叉-反应性;

[0171] (vi) 与人或小鼠 IL-17AF 多肽的交叉反应性;

[0172] (vii) 对 IL-17AF 的结合亲和力(对 IL-17AF 的特异性结合),例如, K_D 为 1nM 或更低, 100pM 或更低或 10pM 或更低,如在例如如实施例中所所述的 Biacore™ 测定中测量;

[0173] (viii) IL-17AF 的抑制,例如 IC_{50} 为 200nM 或更低、150nM 或更低或 100nM 或更低,如在如实施例中所描述的体外竞争性结合测定中测量的;

[0174] (ix) 用于药物开发的合适性质,具体地,其是稳定的并且在高浓度(即高于 50mg/ml)时在制剂中不聚集。

[0175] 例如,本公开内容涉及包含可变重链 (V_H) 和可变轻链 (V_L) 序列的 XAB1、XAB2、XAB3、XAB4 和 XAB5 (或包含其抗原结合部分的蛋白质) 的同源抗体,在所述可变重链和可变轻链序列中, CDR 序列,即 6 个 CDR 区: HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3 或 HCDR1'、HCDR2'、HCDR3'、LCDR1'、LCDR2'、LCDR3' 与 XAB1、XAB2、XAB3、XAB4 和 XAB5 的至少一种抗体的对应 CDR 序列共享至少 60、70、90、95 或 100% 序列同一性,其中所述同源抗体或其抗原结合片段,诸如包含其抗原结合部分的蛋白质,特异性结合 IL-17A,并且所述抗体或蛋白质展示以下功能性质的至少一种: 其抑制 IL-17A 对其受体的结合,其在细胞测定中抑制依赖 IL-17A 的 IL-6 或 $GR\alpha$ 产生或抑制在体内抗原诱导的关节炎测定中观察到的效应。在相关特定实施方案中,同源抗体或蛋白质以 1nM 或更低的 K_D 结合 IL-17A 并且以 1nM 或更低的 IC_{50} 抑制 IL-17A 对其受体的结合(如在体外竞争性结合测定中测量的)。在上文中的表 5 和表 6 中定义了 XAB1、XAB2、XAB3、XAB4 和 XAB5 的 CDR。

[0176] 本公开内容还涉及包含重链可变区和轻链可变区的 XAB1、XAB2、XAB3、XAB4 和 XAB5 的同源抗体(或其抗原结合片段,诸如包含其抗原结合部分的蛋白质),所述重链可变区和轻链可变区与抗体 XAB1、XAB2、XAB3、XAB4 或 XAB5 的任一个的对应的重链和轻链可变区具有至少 80%、90% 或至少 95% 或 100% 同一性;所述同源抗体或蛋白质特异性结合 IL-17A,并且其展示以下功能性质的至少一个: 其抑制 IL-17A 对其受体的结合,其在细胞测定中抑制依赖 IL-17A 的 IL-6 或 $GR\alpha$ 产生或抑制在体内抗原诱导的关节炎测定中观察到的效应。在相关的特定实施方案中,同源抗体或其抗原结合片段,诸如包含其抗原结合部分的蛋白质以 1nM 或更低的 K_D 结合 IL-17A 并且以 1nM 或更低的 IC_{50} 抑制 IL-17A 对其受体的结合,如在体外竞争性结合测定中测量的。XAB1、XAB2、XAB3、XAB4 和 XAB5 的 V_H 和 V_L 氨基酸序列在上述表 2 中进行了定义。

[0177] 在另一个实例中,本公开内涉及包含全长重链和全长轻链的 XAB1、XAB2、XAB3、XAB4 和 XAB5 的同源抗体(或其抗原结合部分,诸如包含其抗原结合部分的蛋白质),其中: 可变重链由与 XAB1、XAB2、XAB3、XAB4 和 XAB5 的可变重链和轻链的对应的编码核苷酸序列具有至少 80%、至少 90%、至少 95% 或 100% 同一性的核苷酸序列编码,同源抗体或其抗原结合片段诸如包含其抗原结合部分的蛋白质特异性结合 IL-17A,并且其展示以下功能性质的至少一个: 其抑制 IL-17A 对其受体的结合,其在细胞测定中抑制依赖 IL-17A 的 IL-6 或 $GR\alpha$ 的产生或抑制在体内抗原诱导的关节炎测定中观察到的效应。在相关的特定实施方案中,同源抗体或其抗原结合片段,诸如包含其抗原结合部分的蛋白质以 1nM 或更低的 K_D 结合 IL-

17A并且以1nM或更低的IC₅₀抑制对IL-17A的结合,如在体外竞争性结合测定中测量的。XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5的可变区的编码核苷酸序列来源于显示XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5的全长编码核苷酸序列的表3和显示XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5的可变区的氨基酸序列的表2。

[0178] 在各种实施方案中,抗体或其抗原结合部分,诸如包含抗体的抗原结合部分的蛋白质可展示一个或多个、两个或更多个、三个或更多个或四个或更多个上文中论述的期望的功能性质。本公开内容的抗体或蛋白质可以是例如人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一个实施方案中,抗体或蛋白质是完全人沉默抗体,诸如完全人沉默IgG1抗体。

[0179] 沉默的效应子功能可通过抗体的Fc恒定部分的突变来获得,并且已在Art:Strohl 2009 (LALA&N297A);Baudino 2008,D265A (Baudino等人2008,J.Immunol.181:6664-69, Strohl,C0 2009,Biotechnology 20:685-91)中进行了描述。沉默IgG1抗体的实例包含在IgG1Fc氨基酸序列中含有L234A和L235A突变的所谓的LALA突变体。沉默IgG1抗体的另一个实例包含D265A突变。还可优选地将D265A突变与P329A突变(DAPA)组合。另一种沉默IgG1抗体包含N297A突变,其导致无糖基化(aglycosylated)或非糖基化抗体。

[0180] 可通过编码核酸分子的诱变(例如,定点或PCR介导的诱变),随后使用本文中描述的功能测定来测试编码的改变的抗体的保留的功能(即,上文中所示的功能)来获得具有突变的氨基酸序列的抗体。

[0181] 具有保守修饰的抗体

[0182] 在某些实施方案中,本公开内容的抗体(或包含其抗原结合部分的蛋白质)具有包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列(或HCDR1'、HCDR2'和HCDR3')的重链可变区和包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列(或LCDR1'、LCDR2'和LCDR3')的轻链可变区,其中这些CDR序列的一个或多个具有基于本文中描述的抗体XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的指定的氨基酸序列或其保守修饰,并且其中所述抗体或蛋白质保留本公开内容的抗-IL-17A抗体的期望的功能性质。

[0183] 如本文中所用,术语“保守序列修饰”意欲指其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替代的氨基酸取代。具有相似侧链的氨基酸残基的家族已在本领域中进行了定义。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、具有β-支链侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,本公开内容的抗体的CDR区内的一个或多个氨基酸残基可来自相同侧链家族的其它氨基酸残基来替代,并且可使用本文中描述的功能测定来测试改变的抗体的保留的功能。

[0184] 可通过本领域已知的标准技术诸如定点诱变和PCR介导的诱变将修饰引入本文中公开的抗体。

[0185] 工程化和修饰抗体

[0186] 可使用具有上文中显示的XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的一个或多个V_H和/或V_L序列的抗体作为起始材料工程化修饰抗体来制备其它抗体和抗原结合片段,诸如包含其抗原结合部分的蛋白质,所述修饰抗体相对于起始抗体可具有改变的性质。可通过修饰一种或

两种可变区(即, V_H 和/或 V_L)内,例如一个或多个CDR区内和/或一个或多个框架区内的一个或多个残基来工程化抗体。此外或可选择地,可通过修饰恒定区内的残基例如以改变抗体的效应子功能来工程化抗体。

[0187] 可进行的一个类型的可变区工程化是CDR移植。抗体主要通过位于6个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。为此,CDR内的氨基酸序列在个体抗体之间比CDR之外的序列更加多样。因为CDR序列负责大部分抗体-抗原相互作用,因此可能通过构建表达载体来表达模拟特定的天然存在的抗体的性质的重组抗体,所述表达载体包含移植至来自不同的具有不同性质的抗体的框架序列的来自特定天然存在的抗体的CDR序列(参见,例如,Riechmann,L.等人1998,Nature 332:323-327;Jones,P.等人1986,Nature 321:522-525;Queen,C.等人1989,Proc.Natl.Acad.参见U.S.A.86:10029-10033;属于Winter的美国专利No.5,225,539,和属于Queen等人的美国专利No.5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。

[0188] 因此,本公开内容的另一个实施方案涉及分离的重组CDR移植的抗-IL-17A抗体,其包含如表5或表6中定义的XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的任一个的6个CDR区,但含有不同的来自原始抗体的框架序列。

[0189] 此类框架序列可获自包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库或公开的参考资料。例如,人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可见于“VBase”人种系序列数据库(可在www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase于因特网上获得)以及Kabat,E.A.,等人1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,美国卫生和人类服务部,NIH公开号91-3242;Tomlinson,I.M.,等人1992,J.Mol.Biol.227:776-798;和Cox,J.P.L.等人1994,Eur.J Immunol.24:827-836中。

[0190] 框架序列的实例是在结构上与XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的任一个中使用的框架相似的那些框架序列。可将 V_H CDR1、2和3序列以及 V_L CDR1、2和3序列移植至框架区(其具有与在所述框架序列所源自的种系免疫球蛋白基因中发现的框架区相同的序列)上,或可将CDR序列移植至相较于种系序列含有一个或多个突变的框架区上。例如,已发现在某些情况下,有益地突变框架区内的残基以维持或增强抗体的抗原结合能力(参见例如,属于Queen等人的美国专利No.5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。

[0191] 可变区修饰的另一个类型是突变 V_H 和/或 V_L CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基,从而改善目标抗体的一个或多个结合性质(例如,亲和力),称为“亲和力成熟”。可进行定点诱变或PCR介导的诱变来引入突变,并且对抗体结合或其它目标功能性质的作用可在如本文中描述的和实施例中提供的体外或体内测定中进行评价。因此,在一个实施方案中,本公开内容涉及来源于XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5抗体之一的亲和力成熟抗体。可引入保守修饰(如上文中论述的)。所述突变可以是氨基酸取代、添加或缺失。此外,常见地CDR区内不超过1、2、3、4或5个残基被改变。例如,本公开内容的抗体是包含XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5之一的6个CDR的亲和力成熟的抗体,并且其中CDR内不超过1、2、3、4或5个残基被改变。

[0192] 因此,在另一个实施方案中,本公开内容提供分离的工程化抗-IL-17A抗体,其包含除所述工程化抗体的重和/或轻链氨基酸序列相较于原始序列含有1、2、3、4或5个氨基酸取代、缺失或添加外,与XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5抗体的至少一个的对应的重链和轻链

可变区相同的重链可变区和轻链可变区。

[0193] 将抗原结合结构域移植进替代框架或支架。

[0194] 可使用多种抗体/免疫球蛋白框架或支架,只要所得的多肽包括特异性结合IL-17A的XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的至少一个结合区。此类框架或支架包括人免疫球蛋白的5个主要独特型或其片段(诸如在本文中其它地方公开的那些片段),并且包括其它动物物种的免疫球蛋白(优选地具有人源化方面)。单重链抗体诸如在骆驼中鉴定的那些单重链抗体在该方面是特别有益的。新型框架、支架和片段继续被本领域普通技术人员发现和开发。

[0195] 在一个方面,本公开内容涉及使用可将本公开内容的CDR移植至其上的非免疫球蛋白支架产生基于非免疫球蛋白的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质。可使用已知的或未来的非免疫球蛋白框架和支架,只要它们包含对于SEQ ID NO:76的靶蛋白是特异性的结合区。此类化合物在本文中被称为“包含靶特异性结合区的多肽”。在以下节段(骆驼抗体和非抗体支架)中进一步描述非免疫球蛋白框架的实例。

[0196] 骆驼抗体

[0197] 从骆驼和单峰骆驼(野生双峰驼(*Camelus bactrianus*)和单峰骆驼(*Camelus dromaderius*))科的成员(包括新大陆成员诸如美洲驼物种(羊驼(*Lama paccos*)、大羊驼(*Lama glama*)和瘦驼(*Lama vicugna*)))获得的抗体蛋白已在尺寸、结构复杂性和对于人受试者的抗原性方面进行表征。如在自然界中发现的来自该科哺乳动物的某些IgG抗体缺少轻链,从而在结构上与来自其它动物的抗体的具有两条重链和两条轻链的典型四链四级结构显著不同。参见PCT公开号WO 94/04678。

[0198] 作为被鉴定为V_H的小的单可变结构域的骆驼抗体的区域可通过基因工程获得,以产生具有对于靶的高亲和力的小的蛋白质,从而导致称为“骆驼纳米抗体”的低分子量抗体衍生蛋白。参见1998年6月2日发布的美国专利No.5,759,808;也参见Stijlemans,B.等人2004,*J Biol Chem* 279:1256-1261;Dumoulin,M.等人2003,*Nature* 424:783-788;Pleschberger,M.等人2003,*Bioconjugate Chem* 14:440-448;Cortez-Retamozo,V.等人2002,*Int J Cancer* 89:456-62;和Lauwereys,M.等人1998,*EMBO J* 17:3512-3520。骆驼抗体和抗体片段的工程化文库可以例如从Ablynx,Ghent,Belgium商购获得。与非人来源的其它抗体一样,骆驼抗体的氨基酸序列可被重组改变来获得与人序列更密切相似的序列,即纳米抗体可被“人源化”。因此,骆驼抗体对人的天然低抗原性可被进一步减小。

[0199] 骆驼纳米抗体具有约为人IgG分子的分子量的1/10的分子量,并且所述蛋白质具有仅数纳米的物理直径。小尺寸的一个结果是骆驼纳米抗体结合对于更大的抗体蛋白而言在功能上是看不到的抗原位的能力,即骆驼纳米抗体用作检测否则对于使用经典免疫技术来说是隐蔽的抗原的试剂,和用作可能的治疗剂。因此小尺寸的另一个结果是骆驼抗体可因对靶蛋白沟或窄间隙中的特定位点的结合而具有抑制作用,从而与经典抗体的功能相比,更能发挥与经典低分子药物的功能更密切相似的能力。

[0200] 低分子量和紧凑尺寸还导致骆驼纳米抗体是极其热稳定的,对于极端pH和蛋白质水解消化是稳定的,并且是低抗原性的。另一个结果是骆驼纳米抗体容易地从循环系统移动至组织中,并且甚至穿过血脑屏障,从而可治疗影响神经组织的病症。纳米抗体还可促进药物运输穿过血脑屏障。参见2004年8月19日公开的美国专利公开号20040161738。与对人

的低抗原性组合的这些特征显示巨大的治疗潜力。此外,这些分子可完全在原核细胞诸如大肠杆菌(E.coli)中表达,以及在噬菌体中被表达为融合蛋白,并且是有功能的。

[0201] 工程化纳米抗体还可通过基因工程定制来在受体受试者中具有45分钟至2周的半衰期。在具体实施方案中,骆驼抗体或纳米抗体通过将本公开内容的人抗体XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5之一的重链或轻链的CDR序列移植进纳米抗体或单结构域抗体的框架序列(如例如在PCT公开号WO 94/04678中所描述的)来获得。

[0202] 非抗体支架

[0203] 已知的非免疫球蛋白框架或支架包括但不限于Adnectins(纤连蛋白)(Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA)、锚定蛋白(分子伴侣AG, Zurich, Switzerland)、结构域抗体(Domantis, Ltd (Cambridge, MA) 和Ablynx nv (Zwijnaarde, Belgium))、脂质运载蛋白(Anticalin) (Pieris Proteolab AG, Freising, Germany)、小分子免疫药物制剂(Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA)、maxybody (Avidia, Inc. (Mountain View, CA))、蛋白A (Affibody AG, Sweden) 和affilin (γ -晶状体蛋白或遍在蛋白) (Scil Proteins GmbH, Halle, Germany)、蛋白表位模拟物(Polyphor Ltd, Allschwil, Switzerland)。

[0204] (a) 纤连蛋白支架

[0205] 纤连蛋白支架优选地基于纤连蛋白III型结构域(例如,纤连蛋白III型的第10模块(10Fn3结构域))。纤连蛋白III型结构域具有7或8个分布在2个 β 折叠片之间的 β 链,其自身彼此堆叠以形成蛋白质的核心,并且还含有将 β 链彼此连接并且暴露于溶剂的环(类似于CDR)。在 β 折叠夹层的每一个边缘上存在至少3个这样的环,其中所述边缘是与 β 链的方向垂直的蛋白质的边界(美国专利No. 6,818,418)。

[0206] 这些基于纤连蛋白的支架不是免疫球蛋白,尽管总体折叠与最小的功能性抗体片段重链的可变区(其包含骆驼和美洲驼IgG中的完整抗原识别单位)的折叠密切相关。因为存在该结构,因此非免疫球蛋白抗体模拟在性质和亲和力上与抗体的抗原结合性质相似的抗原结合性质。这些支架可用于与体内抗体的亲和力成熟过程相似的体外环随机化和改组策略。这些基于纤连蛋白的分子可用作其中分子的环区域可通过使用标准克隆技术,利用XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5之一的CDR来替代的支架。

[0207] (b) 锚定蛋白-分子伴侣

[0208] 所述技术基于使用具有锚定蛋白衍生的重复模块作为用于支撑可用于结合不同靶的可变区的支架的蛋白质。锚定蛋白重复模块是由两个反向平行 α -螺旋和 β -转角组成的33个氨基酸的多肽。可变区的结合主要通过使用核糖体展示来最优化。

[0209] (c) Maxybody/Avimers-Avidia

[0210] Avimers来源于含天然A-结构域的蛋白诸如LRP-1。根据蛋白质间相互作用的性质使用这些结构域,在人中超过250种蛋白质在结构上基于A-结构域。Avimers由通过氨基酸接头连接的许多不同的“A-结构域”单体(2-10)组成。可使用例如美国专利公开号20040175756;20050053973;20050048512和20060008844中描述的方法生成可结合靶抗原的Avimers。

[0211] (d) 蛋白A-Affibody

[0212] **Affibody®**亲和配体是由基于蛋白A的IgG-结合结构域之一的支架的三螺旋束组成的小的简单蛋白。蛋白A是来自细菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的表面

蛋白。该支架结构域由58个氨基酸组成,其中的13个被随机化来产生具有大量配体变体的 **Affibody®**文库(参见例如,美国专利No.5,831,012)。**Affibody®**分子模拟抗体;相较于为150kDa的抗体的分子量,它们具有6kDa的分子量。尽管其尺寸小,但**Affibody®**分子的结合位点与抗体的结合位点相似。

[0213] (e) Anticalins-Pieris

[0214] **Anticalins®**是由Pieris ProteoLab AG公司开发的产品。它们来源于脂质运载蛋白,一组广泛的通常参与化学敏感性或不溶性化合物的生理运输或贮存的小而强健的蛋白质。几种天然脂质运载蛋白存在于人组织或体液中。

[0215] 蛋白质结构使人联想到免疫球蛋白,在刚性框架的顶部具有高变环。然而,与抗体或其重组片段相反,脂质运载蛋白由具有160至180个氨基酸残基的单个多肽链(刚好略微大于单个免疫球蛋白结构域)组成。

[0216] 组成结合口袋的4个环的组显示明显的结构可塑性并且容许多种侧链。结合位点从而可在专利方法中被重塑,以高亲力和特异性识别具有不同形状的规定的靶分子。

[0217] 脂质运载蛋白家族的一种蛋白Pieris Brassicae的后胆色素结合蛋白(BBP)已被用于通过诱变4个环的组来开发anticalin。描述“anticalin”的专利申请一个实例是PCT公开W0 199916873。

[0218] (f) Affilin-Scil蛋白

[0219] Affilin™分子是针对对于蛋白质和小分子的特异性亲和力设计的小的非免疫球蛋白蛋白。可极快地从两个文库选择新的Affilin™分子,每一个所述文库基于不同的人来源的支架蛋白。

[0220] Affilin™分子未显示与免疫球蛋白蛋白的任何结构同源性。Scil蛋白使用2个Affilin™支架,其中一个是 γ 晶状体蛋白(人结构眼晶体蛋白),另一个是“遍在蛋白”超家族蛋白。两种人支架都非常小,显示高温稳定性,并且几乎抗pH变化和变性剂。该高稳定性主要归因于蛋白质的展开的 β 折叠片。 γ 晶状体蛋白来源的蛋白的实例描述于W0200104144中,并且“遍在蛋白样”蛋白的实例描述于W02004106368中。

[0221] (g) 蛋白表位模拟物(PEM)

[0222] PEM是模拟蛋白质的 β -发夹二级结构(参与蛋白质间相互作用的主要二级结构)的中等尺寸的环状肽样分子(MW 1-2kDa),。

[0223] 框架或Fc工程

[0224] 本公开内容的工程化抗体和包含其抗原结合部分的蛋白质包括其中已对V_H和/或V_L内的框架残基进行修饰例如以改善抗体的性质的那些抗体和蛋白质。通常地,进行此类框架修饰以减小抗体的免疫原性。例如,一个方法是 将一个或多个框架残基“回复突变”成对应的种系序列。更具体地,经历体细胞突变的抗体可含有与所述抗体所源自的种系序列不同的框架残基。此类残基可通过将抗体框架序列与所述抗体所源自的种系序列相比较来鉴定。为了将框架区序列恢复成它们的种系构型,可通过例如定点诱变或PCR介导的诱变将体细胞突变“回复突变”成种系序列。此类“回复突变的”抗体也意欲被包括在本公开内容中。

[0225] 另一个类型的框架修饰包括将框架区内或甚至一个或多个CDR区内的一个或多个

残基突变,以除去T细胞-表位,从而减小抗体的潜在免疫原性。该方法也称为“去免疫化法”并且在Carr等人的美国专利公开号20030153043中进行了更详细地描述。

[0226] 除了在框架或CDR区内进行的修饰以外或作为所述修饰的另一选择,可工程化本公开内容的抗体以在Fc区内包含修饰,通常以改变抗体的一个或多个功能性质,诸如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合和/或依赖抗原的细胞毒性。此外,本公开内容的抗体可被化学修饰(例如,可将一个或多个化学部分附接于抗体)或被修饰来改变其糖基化,再次地改变抗体的一个或多个功能性质。这些实施方案的每一个在下文中进行了更详细地描述。

[0227] 如本文中所用,术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C末端区,包括天然序列Fc区和变体Fc区。人IgG重链Fc区通常被定义为包含IgG抗体的位置C226或P230至羧基末端的氨基酸残基。Fc区中的残基的编号是Kabat的EU指数的编号。可以例如在抗体的产生或纯化过程中除去Fc区的C末端赖氨酸(残基K447)。因此,本公开内容的抗体的结合物可包含所有K447残基被除去的抗体群体、K447残基未被除去的抗体群体和具有存在和不存在K447残基的抗体的混合物的抗体群体。

[0228] 在一个实施方案中,修饰CH1的铰链区,以便改变(例如增加或减少)铰链区中的半胱氨酸残基的数目。该方法在Bodmer等人的美国专利No.5,677,425中进行了进一步描述。改变CH1的铰链区中的半胱氨酸残基的数目,例如以促进轻链和重链的装配或增强或降低抗体的稳定性。

[0229] 在另一个实施方案中,将抗体的Fc铰链区突变以缩短抗体的生物半衰期。更具体地,将一个或多个氨基酸突变引入Fc铰链片段的CH2-CH3结构域的界面区,以便抗体相对于天然Fc-铰链结构域SpA结合具有减弱的葡萄球菌A蛋白(SpA)结合。该方法在Ward等人的美国专利No.6,165,745中被更详细地描述。

[0230] 在另一个实施方案中,修饰抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质以延长其生物半衰期。各种方法是可能的。例如,可引入以下突变的一个或多个:T252L、T254S、T256F,如属于Ward的美国专利No.6,277,375中所述。或者,为了延长生物半衰期,可在CH1或CL区中改变抗体以含有获自IgG的Fc区的CH2结构域的2个环的补救受体结合表位,如Presta等人的美国专利No.5,869,046和6,121,022中所描述的。

[0231] 在其它实施方案中,通过用不同氨基酸残基替代至少一个氨基酸残基来改变Fc区,以改变抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质的效应子功能。例如,可用不同氨基酸残基替代一个或多个氨基酸,以便抗体具有改变的对于效应配体的亲和力但保留亲代抗体的抗原结合能力。针对其改变亲和力的效应配体可以是例如Fc受体或补体的C1组分。该方法在Winter等人的美国专利No.5,624,821和5,648,260中进行了更详细地描述。

[0232] 在另一个实施方案中,可用不同的氨基酸残基替代选自氨基酸残基的一个或多个氨基酸,以便抗体具有改变的C1q结合和/或减小的或消除的依赖补体的细胞毒性(CDC)。该方法在Idusogie等人的美国专利No.6,194,551中进行了更详细地描述。

[0233] 在另一个实施方案中,改变一个或多个氨基酸残基,以从而改变抗体固定补体的能力。该方法在Bodmer等人的PCT公开WO 94/29351中进行了进一步描述。

[0234] 在另一个实施方案中,通过修饰一个或多个氨基酸来修饰Fc区以增强抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质介导依赖抗体的细胞毒性(ADCC)的能力和/或增强抗体对于Fc γ 受体的亲和力。该方法在Presta的PCT公开WO 00/42072中进行了进一步描述。此外,人IgG1

上的Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII和FcRn的结合位点已被定位,并且具有增强的结合的变体已进行了描述(参见Shields,R.L.等人2001,J.Biol.Chem 276:6591-6604)。

[0235] 在某些实施方案中,使用IgG1同种型的Fc结构域。在一些具体实施方案中,使用IgG1Fc片段的突变变体,例如减弱或消除融合多肽介导依赖抗体的细胞毒性(ADCC)和/或结合Fc γ 受体的能力的沉默IgG1Fc。IgG1同种型沉默突变体的实例是其中在氨基酸位置234和235上亮氨酸被丙氨酸替代的IgG1,如由Hezareh等人2001,J.Virol 75:12161-8描述的。IgG1同种型沉默突变体的另一个实例是具有D265A突变(在位置265上天冬氨酸被丙氨酸取代)的IgG1。在某些实施方案中,Fc结构域是在Fc结构域的位置297上阻止糖基化的沉默Fc突变体。例如,Fc结构域含有位置297上的天冬酰胺的氨基酸取代。此类氨基酸取代的实例是甘氨酸或丙氨酸对N297的替代。

[0236] 在另一个实施方案中,修饰抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质的糖基化。例如,可产生无糖基化抗体(即,抗体不存在糖基化)。可以改变糖基化以例如增强抗体对抗原的亲合力。此类糖修饰可通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。例如,可产生导致一个或多个可变区框架糖基化位点消除,从而消除该位点上的糖基化的一个或多个氨基酸取代。此类无糖基化可增强抗体对抗原的亲合力。此类方法在Co等人的美国专利No.5,714,350和6,350,861中进行了更详细地描述。

[0237] 此外或可选择地,可产生具有改变的类型糖基化的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质,诸如具有减少量的岩藻糖残基的低岩藻糖基化抗体或具有增加的二分GlcNac结构的抗体。已显示此类改变的糖基化模式增强抗体的ADCC能力。此类糖修饰可通过例如在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体来实现。具有改变的糖基化机制的细胞已在本领域中进行了描述,并且可用作其中表达本公开内容的重组抗体,从而产生具有改变的糖基化的抗体的宿主细胞。例如,Hang等人的EP 1 176 195描述了具有编码岩藻糖基转移酶的FUT8基因功能被破坏的细胞系,以便此类细胞中表达的抗体展示低岩藻糖基化。因此,在一个实施方案中,本公开内容的抗体通过在展示低岩藻糖基化模式的细胞系(例如具有编码岩藻糖基转移酶的FUT8基因的表达缺陷的哺乳动物细胞系)中重组表达来产生。Presta的PCT公开W0 03/035835描述了具有减弱的将岩藻糖附接于Asn(297)-连接的糖类的能力,从而也导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化的变异CHO细胞系Lec13细胞(也参见Shields,R.L.等人2002,J.Biol.Chem.277:26733-26740)。Umana等人的PCT公开W0 99/54342描述了经工程化以表达糖蛋白-修饰性糖基转移酶(例如, β (1,4)-N乙酰葡萄糖胺基转移酶III(GnTIII)),以便在该工程细胞系中表达的抗体展示增加的二分GlcNac结构(这导致增强的抗体的ADCC活性)的细胞系(也参见Umana等人1999,Nat.Biotech.17:176-180)。或者,可在针对哺乳动物样糖基化模式进行工程化的,并且能够产生缺乏岩藻糖作为糖基化模式的抗体的酵母或丝状真菌中产生本公开内容的抗体和包含其抗原结合部分的蛋白质(关于实例参见EP 1 297 172)。

[0238] 本公开内容包含的如本文中公开的抗体和包含其抗原结合部分的蛋白质的另一种修饰是PEG化。可将这些分子PEG化以例如延长它们的生物(例如,血清)半衰期。例如,为了PEG化抗体,通常在其中一个或多个PEG基团适宜附接于抗体或抗体片段的条件下,将抗体或其片段与聚乙二醇(PEG)诸如PEG的反应性酯或醛衍生物反应。可利用反应性PEG分子(或类似的反应性水溶性聚合物)通过酰化反应或烷化反应进行PEG化。如本文中所用,术语

“聚乙二醇”意欲包括已被用于衍生其它蛋白质的PEG的任何形式,诸如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施方案中,待PEG化的抗体是无糖基化抗体。用于PEG化蛋白质的方法在本领域中是已知的并且可用于本公开内容的抗体。参见,例如,Nishimura等人的EP 0 154 316和Ishikawa等人的EP 0 401 384。

[0239] 本公开内容所包括的抗体和包含其抗原结合部分的蛋白质的另一种修饰是本公开内容的抗体的至少抗原结合区至血清蛋白(诸如人血清白蛋白)或其片段的缀合或蛋白质融合,以延长所得分子的半衰期。此类方法例如在Ballance等人EP0 322094中进行了描述。

[0240] 另一种可能性是本公开内容的抗体的至少抗原结合区至能够结合血清蛋白(诸如人血清白蛋白)的融合,以延长所得分子的半衰期。此类方法例如在Nygren等人,EP 0 486 525中进行了描述。

[0241] 工程化改变的抗体的方法

[0242] 如上文中所论述的,具有本文中显示的 V_H 和 V_L 序列或全长重链和轻链序列的抗-IL-17A抗体可用于通过修饰全长重链和/或轻链序列、 V_H 和/或 V_L 序列或附着于其的恒定区来生成新的抗-IL-17A抗体。因此,在本公开内容的另一个方面,本公开内容的抗-IL-17A抗体的结构特性用于生成结构相关的抗-IL-17A抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质,所述抗体或蛋白质保留本文中公开的抗体的至少一个功能性质,诸如对人IL-17A的结合以及还有抑制IL-17A的一个或多个功能性质(例如,抑制IL-17A或IL-17AF对其受体的结合,抑制IL-17A或IL-17AF诱导的IL-6、GRO- α 的产生等)、体内测定中的抑制性活性。

[0243] 保留大体上相同的对IL-17A的结合性质的其它抗体包括XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的任一个的嵌合抗体或CDR移植抗体,所述嵌合抗体或CDR移植抗体保留XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的任一个的相同 V_H 和 V_L 区或CDR区和不同的恒定区或构架区(例如选自不同的同种型例如IgG4或IgG2的不同Fc区)。

[0244] 例如,可将XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的任一个的一个或多个CDR区或其突变与已知的构架区和/或其它CDR重组地组合,以生成本公开内容的另外的重组工程化的抗-IL-17A抗体,如上文中所论述的。其它类型的修饰包括在先前的节段中描述的那些修饰。用于工程方法的起始材料是上表中提供的XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的一个或多个 V_H 和/或 V_L 序列或其一个或多个CDR区。为了生成工程抗体,不必实际制备(即,表达为蛋白质)具有XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的一个或多个 V_H 和/或 V_L 序列或其一个或多个CDR区的抗体。相反地,将序列中包含的信息用作起始材料来生成源自原始序列的“第二代”序列,随后制备“第二代”序列并将其表达为蛋白质。

[0245] 可以例如通过改变XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的任一个的重链可变区抗体序列和/或轻链可变区抗体序列内的至少一个氨基酸残基的DNA编码序列以生成至少一个改变的抗体序列;和将所述改变的抗体序列表达为蛋白质来衍生所述第二代序列。

[0246] 因此,在另一个实施方案中,本公开内容提供了方法,所述方法用于制备针对在哺乳动物细胞中的表达优化的抗-IL-17A抗体(由XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的任一个的全长重链抗体序列和全长轻链抗体序列组成);改变核苷酸编码序列中的至少一个密码子(所述密码子编码全长重链抗体序列和/或全长轻链抗体序列内的氨基酸残基)以生成至少一个改变的抗体序列;和将所述改变的抗体序列表达为蛋白质。

[0247] 所述改变的抗体序列还可通过筛选分别具有XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的任一个的独特的重链和轻链CDR3序列或美国专利公开号20050255552中描述的最小必需结合决定簇,以及CDR1和CDR2序列的替代序列的抗体文库来制备。可按照适合用于从抗体文库筛选抗体的任何筛选技术诸如噬菌体展示技术来进行筛选。

[0248] 可使用标准分子生物学技术来制备和表达改变的抗体序列。由改变的抗体序列编码的抗体是保留本文中描述的抗-IL-17A抗体的一个、一些或全部期望的功能性质的抗体,所述功能性质包括,但不限于对人IL-17A的特异性结合;和/或其抑制IL-17A对其受体的结合;和/或其抑制IL-17A诱导的例如IL-6或GRO- α 的产生等。

[0249] 所述改变的抗体可展示1个或多个、2个或多个或3个或多个上文中论述的功能性质。

[0250] 在工程化本公开内容的抗体的方法的某些实施方案中,可沿着抗-IL-17A抗体编码序列的全部或部分随机或选择性地引入突变,并且筛选所得的经修饰的抗-IL-17A抗体的结合活性和/或如本文中描述的其它功能性质。突变方法已在本领域中进行了描述。例如,Short的PCT公开W0 02/092780描述了用于使用饱和诱变、合成连接装配或其组合生成和筛选抗体突变的方法。或者,Lazar等人的PCT公开W0 03/074679描述了使用计算机筛选法最优化抗体的生理化学性质的方法。

[0251] 编码本公开内容的抗体的核酸分子

[0252] 本公开内容的另一个方面涉及编码本公开内容的抗体或蛋白质的核酸分子。可变轻链核苷酸序列的实例是编码XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5的任一个的可变轻链氨基酸序列的那些核苷酸序列,后者的序列来源于表3(显示XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的重链和轻链的完整核苷酸编码序列)和表2(显示XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的可变区的氨基酸序列)。

[0253] 本公开内容还涉及源自后者的序列的核酸分子,所述序列已被优化以用于在哺乳动物细胞例如CHO细胞系中进行蛋白质表达。

[0254] 所述核酸可存在于完整细胞中,细胞裂解物中或可以是呈部分纯化或大体上纯的形式。当通过标准技术(包括碱性/SDS处理、CsCl分带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和本领域中公知的其它技术)从其它细胞组分或其它污染物(例如其它细胞核酸或蛋白质)纯化出来时,核酸是“分离的”或“变得大体上纯的”。参见,F.Ausubel,等人,编辑1987,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing and Wiley Interscience,New York。本公开内容的核酸可以是例如DNA或RNA并且可含有或不含有内含子序列。在实施方案中,所述核酸是cDNA分子。所述核酸可存在于载体诸如噬菌体展示载体中或重组质粒载体中。

[0255] 本公开内容的核酸可使用标准分子生物学技术来获得。一旦获得编码例如V_H和V_L区段的DNA片段,可通过标准重组DNA技术进一步操纵这些DNA片段,例如以将可变区基因转变成全长抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操纵中,V_L-或V_H-编码DNA片段被有效地连接于另一个DNA分子或编码另一种蛋白质(诸如抗体恒定区或柔性接头)的片段。术语“有效连接的”,如本说明中所用,意欲指以功能性方式联接两个DNA片段,例如以便由这两个DNA片段编码的氨基酸序列保留在框内或以便在期望的启动子控制下表达蛋白质。

[0256] 可通过将V_H-编码DNA有效地连接于编码重链恒定区(CH1、CH2和CH3)的另一个DNA

分子来将编码V_H区的分离的DNA转变成全长重链基因。人重链恒定区基因的序列在本领域是已知的(参见,例如,Kabat,E.A.,等人1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,美国卫生和人类服务部,NIH Publication No.91-3242)并且编码这些区域的DNA片段可通过标准PCR扩增来获得。重链恒定区可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区。在一些实施方案中,在IgG1同种型中选择重链恒定区。对于Fab片段的的重链基因,可将V_H-编码DNA有效地连接于仅编码重链CH1恒定区的另一个DNA分子。

[0257] 可通过将V_L-编码DNA有效地连接于编码轻链恒定区CL的另一个DNA分子来将编码V_L区的分离的DNA转变成全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列在本领域是已知的(参见,例如,Kabat,E.A.,等人1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,美国卫生和人类服务部,NIH Publication No.91-3242)并且包含这些区域的DNA片段可通过标准PCR扩增来获得。所述轻链恒定区可以是κ或λ恒定区。

[0258] 为了生成scFv基因,将V_H-和V_L-编码DNA片段有效地连接于编码柔性接头例如编码氨基酸序列(Gly4-Ser)₃的另一个片段,以便V_H和V_L序列可被表达为连续单链蛋白质,V_L与V_H区通过所述柔性接头联接(参见例如,Bird等人1988,Science 242:423-426;Huston等人1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;McCafferty等人1990,Nature348:552-554)。

[0259] 本公开内容的重组抗体的分离

[0260] 多种筛选抗体和包含其抗原结合部分的蛋白质的方法已在本领域中进行了描述。此类方法可被分成体内系统和体外系统,所述体内系统诸如能够在抗原免疫后产生全长人抗体的转基因小鼠,所述体外系统由产生抗体DNA编码文库,在适当的系统中表达DNA文库以产生推磨,选择表达以亲和力选择标准结合靶的抗体候选者的克隆,和回收所选择的克隆的对应编码序列组成)。这些体外技术被称为展示技术,包括但不限于噬菌体展示、RNA或DNA展示、核糖体展示、酵母或哺乳动物细胞展示。它们在本领域中已进行了详尽描述(关于综述,参见例如:Nelson等人2010,Nature Reviews Drug discovery,“Development trends for human monoclonal antibody therapeutics”(提前在线出版)和Hoogenboom等人2001,Method in Molecular Biology 178:1-37,0’ Brien等人,编辑,Human Press, Totowa,N.J.)。在一个具体实施方案中,使用用于筛选人重链抗体文库的文库,诸如**HuCAL®**文库的噬菌体展示方法分离本公开内容的人重组抗体。

[0261] V_H和V_L基因或相关的CDR区的库可通过聚合酶链式反应(PCR)来单独克隆或通过DNA合成仪来合成,以及在噬菌体文库中被随机重组,随后可筛选其的抗原结合克隆。此类用于分离人抗体的噬菌体展示法在本领域中已被建立或在下面的实施例进行了描述。参见例如:属于Ladner等人的美国专利No.5,223,409;5,403,484和5,571,698;属于Dower等人的美国专利No.5,427,908和5,580,717;属于McCafferty等人的美国专利No.5,969,108和6,172,197;和属于Griffiths等人的美国专利No.5,885,793;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,582,915和6,593,081。

[0262] 在某些实施方案中,可使用具有人免疫系统而非小鼠系统的部分的转基因或转染染色体小鼠鉴定针对IL-17A的人抗体。这些转基因和转染染色体小鼠包括在本文中分别被称为HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠,并且在本文中被统称为“人Ig小鼠”。

[0263] HuMAb小鼠[®] (Medarex, Inc.) 含有编码未重排的人重链(μ 和 γ)和k轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因微型基因座,加之使内源 μ 和k链基因座失活的靶向突变(参见例如,Lonberg,等人1994,Nature368:856-859)。因此,小鼠展示减少的小鼠IgM或k的表达,并且响应免疫,被引入的人重链和轻链转基因经历类型转换和体细胞突变以产生高亲和力的IgGk单克隆抗体(Lonberg,N.等人1994,同上;综述于Lonberg,N.,1994Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101;Lonberg,N.和Huszar,D.1995,Intern.Rev.Immunol.13:65-93以及Harding,F.和Lonberg,N.1995,Ann.N.Y.Acad.Sci.764:536-546中)。HuMAb小鼠的制备和使用以及由此类小鼠携带的基因组修饰在Taylor,L.等人1992,Nucleic Acids Research 20:6287-6295;Chen,J.等人1993,International Immunology 5:647-656;Tuailon等人1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA94:3720-3724;Choi等人1993,Nature Genetics 4:117-123;Chen,J.等人1993,EMBO J.12:821-830;Tuailon等人1994,J.Immunol.152:2912-2920;Taylor,L.等人1994,International Immunology 579-591;以及Fishwild,D.等人1996,Nature Biotechnology 14:845-851中进行了进一步描述。进一步参见,全部属于Lonberg和Kay的美国专利No.5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,789,650;5,877,397;5,661,016;5,814,318;5,874,299和5,770,429;属于Surani等人的美国专利No.5,545,807;全部属于Lonberg和Kay的PCT公开号WO 92103918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97113852、WO 98/24884和WO 99/45962;以及属于Korman等人的PCT公开号WO 01/14424。

[0264] 在另一个实施方案中,本公开内容的人抗体可使用在转基因和转染色体上具有人免疫球蛋白序列的小鼠(诸如具有人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠)来产生。此类小鼠(在本文中被称为“KM小鼠”)在属于Ishida等人的PCT公开WO 02/43478中进行了详细描述。

[0265] 此外,表达人免疫球蛋白基因的替代转基因动物系统在本领域中是可获得的,并且可用于产生本公开内容的抗-IL-17A抗体。例如,可使用来自Abgenix, Inc.的被称为Xeno小鼠的替代转基因系统。此类小鼠在例如属于Kucherlapati等人的美国专利No.5,939,598;6,075,181;6,114,598;6,150,584和6,162,963中进行了描述。如将被本领域普通技术人员所理解的,可使用几个其它小鼠模型,诸如来自Trianni, Inc.的Trianni[™]小鼠、来自Regeneron Pharmaceuticals, Inc.的VelocImmune[™]小鼠或来自Kymab Limited的Kymouse[™]小鼠。

[0266] 此外,表达人免疫球蛋白基因的替代转染色体动物系统在本领域中是可获得的,并且可用于产生本公开内容的抗-IL-17A抗体。例如,可使用具有人重链转染色体和人轻链转染色体的小鼠(被称为“TC小鼠”);此类小鼠在Tomizuka等人2000, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:722-727中进行了描述。

[0267] 本公开内容的人单克隆抗体还可使用SCID小鼠进行制备,该小鼠中已重新构建了人免疫细胞从而使得能在免疫作用后产生人抗体应答。在例如属于Wilson等人的美国专利5,476,996和5,698,767中描述了此类小鼠。

[0268] 从鼠系统产生本发明的单克隆抗体

[0269] 本公开内容的单克隆抗体(mAb)可以通过多种技术来产生,包括常规单克隆抗体方法,例如Kohler和Milstein 1975,Nature 256:495的标准体细胞杂交技术。可以使用用

于产生单克隆抗体的其它方法,例如B淋巴细胞的病毒转化或致癌转化。

[0270] 用于制备杂交瘤的动物系统为鼠科动物系统。在小鼠中制备杂交瘤是非常完善的方法。分离用于融合的经免疫的脾细胞的免疫方案和技术在本领域是已知的。融合配偶体(例如鼠骨髓瘤细胞)和融合方法也是已知的。

[0271] 本公开内容的嵌合或人源化抗体可基于如所述制备的鼠单克隆抗体的序列来制备。编码重链和轻链免疫球蛋白的DNA可以从目标鼠杂交瘤中获得,并且使用标准分子生物学技术进行工程改造以包含非鼠(例如人)免疫球蛋白序列。例如,为生成嵌合抗体,可使用本领域已知的方法将鼠可变区连接至人恒定区(参见例如属于Cabilly等人的美国专利No.4,816,567)。为生成人源化抗体,可以使用本领域已知的方法将鼠CDR区插入人框架。参见属于Winter的美国专利No.5,225,539及属于Queen等人的美国专利No.5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370。

[0272] 产生人单克隆抗体的杂交瘤的制备

[0273] 为了制备产生本公开内容的人单克隆抗体的杂交瘤,可以从免疫小鼠分离脾细胞和/或淋巴结细胞,并将其与合适的永生化细胞系诸如小鼠骨髓瘤细胞系融合。可筛选所得的杂交瘤的抗原特异性或表位特异性抗体的产生。例如,可用50%PEG将来自免疫小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬液与六分之一数目的P3X63-Ag8.653非分泌性小鼠骨髓瘤细胞(ATCC, CRL1580)融合。可以将细胞以约 2×145 接种至平底微量滴定板中,随后在含有20%胎克隆血清、18%“653”条件培养基、5%origen(IGEN)、4mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠、5mM HEPES、0.055mM 2-巯基乙醇、50个单位/ml青霉素、50mg/ml链霉素、50mg/ml庆大霉素和1X HAT(Sigma;在融合后24小时添加HAT)的选择培养液中孵育两周。约两周后,可将细胞在HAT被HT取代的培养液中进行培养。然后可通过ELISA筛选单个孔的人单克隆抗体IgM和IgG。一旦发生广泛的杂交瘤生长时,则通常可在10-14天后观察培养基。可以将分泌所述抗体的杂交瘤重新接种,再次进行筛选,并且如果对于人IgG仍呈阳性,则可以通过有限稀释,将单克隆抗体亚克隆一次或两次。随后可在体外培养稳定的亚克隆,以在组织培养液中产生少量抗体以供表征。

[0274] 为纯化人单克隆抗体,可将所选择的杂交瘤在两升旋转烧瓶中培养以进行单克隆抗体纯化。在用蛋白A-sepharose(Pharmacia,Piscataway,N.J.)进行亲和层析前,过滤和浓缩上清液。通过凝胶电泳和高效液相色谱检验洗脱的IgG以确保纯度。可将缓冲液替换为PBS,并使用1.43消光系数通过OD₂₈₀测定浓度。可等分单克隆抗体,并于-80℃保存。

[0275] 制备产生单克隆抗体的转染瘤

[0276] 可使用例如本领域中公知的重组DNA技术与基因转染方法的组合(例如,Morrison,S.1985,Science 229:1202)在宿主细胞转染瘤中产生本公开内容的抗体。

[0277] 例如,为了表达抗体或其抗体片段,编码部分或全长轻链和重链的DNA可利用标准分子生物学或生物化学技术(例如,DNA化学合成、PCR扩增或使用表达目标抗体的杂交瘤的cDNA克隆)来获得,并且可将所述DNA插入表达载体,以便所述基因被有效地连接于转录和翻译控制序列。在本说明书中,术语“有效连接的”意欲指将抗体基因连接进入载体,以使载体内的转录和翻译控制序列行使它们的调节抗体基因的转录和翻译的预定功能。选择可与所使用的表达宿主细胞相容的表达载体和表达调控序列。可将抗体轻链基因和抗体重链基因插入至不同的载体中,或者更通常地,将两个基因插入至同一表达载体中。通过标准方法

将抗体基因插入至表达载体中(例如,连接抗体基因片段和载体上互补的限制性位点,或者如果不存在限制性位点,则进行平端连接)。可以使用本文所述抗体的轻链和重链可变区来生成任何抗体同种型的全长抗体基因,其通过将它们插入已编码期望同种型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中,从而使得V_H区段与载体中的C_H区段有效连接,V_L区段与载体中的C_L区段有效连接。此外/或可选择地,重组表达载体可以编码信号肽(也称为前导序列),其有利于抗体链从宿主细胞分泌。可将抗体链基因克隆进载体中以使信号肽与抗体链基因的氨基末端连接于同一读码框中。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即来自非免疫球蛋白的信号肽)。此类信号肽的实例可见于表7中,并且编码信号肽的多核苷酸序列的实例可见于表8中。

[0278] 表7. 重肽链和轻肽链的信号肽

[0279]

信号肽	序列ID号	重肽链或轻肽链的使用
1	SEQ ID NO:59	重
2	SEQ ID NO:60	轻
3	SEQ ID NO:63	重
4	SEQ ID NO:64	轻
5	SEQ ID NO:67	重
6	SEQ ID NO:68	轻

[0280] 表8. 编码信号肽的多核苷酸序列

[0281]

编码信号肽 编号	序列 ID 号	编码重链或轻链的信号肽 序列
1	SEQ ID NO: 61	重
2	SEQ ID NO: 62	轻
3	SEQ ID NO: 65	重
4	SEQ ID NO: 66	轻
5	SEQ ID NO: 69	重
6	SEQ ID NO: 70	轻

[0282] 除了抗体链基因以外,本公开内容的重组表达载体还携带调控序列,其控制抗体链基因在宿主细胞中的表达。术语“调控序列”意欲包括启动子、增强子和其它表达调控元件(例如多腺苷酸化信号),其控制抗体链基因的转录或翻译。此类调控序列描述于例如 Goeddel 1990, Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA中。本领域普通技术人员应当了解,表达载体的设计,包括调控序列的选择,可取决于诸如待转化的宿主细胞的选择、期望的蛋白质表达水平等因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的调控序列包括在哺乳动物细胞中指导高水平蛋白质表达的病毒元件,诸

如源自巨细胞病毒 (CMV)、猿病毒40 (SV40)、腺病毒 (例如腺病毒主要晚期启动子 (AdMLP)) 和多瘤病毒的启动子和/或增强子。或者,可以使用非病毒调控序列,诸如遍在蛋白启动子或P-球蛋白启动子。此外,调控元件由来自不同来源的序列组成,诸如SRa启动子系统,其含有来自SV40早期启动子的序列和人T细胞I型白血病毒病的长末端重复序列 (Takebe, Y. 等人1988, Mol. Cell. Biol. 8:466-472)。

[0283] 除了抗体链基因和调控序列以外,本公开内容的重组表达载体还可携带另外的序列,诸如调控宿主细胞中载体复制的序列 (例如复制起始点) 和选择标志基因。选择标志基因使得已向其中引入载体的宿主细胞的选择更容易 (参见例如,全都属于Axel等人的美国专利No. 4,399,216、4,634,665和5,179,017)。例如,通常选择标志基因赋予已向其中引入载体的宿主细胞对药物 (诸如G418、潮霉素或甲氨蝶呤) 的抗性。选择标志基因包括二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因 (用于进行甲氨蝶呤选择/扩增的dhfr-宿主细胞中) 和neo基因 (用于G418选择)。

[0284] 为表达轻链和重链,应用标准技术来将编码重链和轻链的表达载体转染进宿主细胞中。各种形式的术语“转染”意欲涵盖多种通常用于将外源DNA导入原核或真核宿主细胞的技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-右旋糖苷转染等。理论上在原核或真核宿主细胞中都有可能表达本公开内容的抗体。论述抗体在真核细胞例如哺乳动物宿主细胞、酵母或丝状真菌中的表达,因为此类真核细胞 (特别是哺乳动物细胞) 比原核细胞更有可能组装和分泌正确折叠且具有免疫学活性的抗体。

[0285] 在一个具体实施方案中,根据本公开内容的克隆性载体或表达载体包含至少一个有效地连接于适当的启动子序列的来自表3的编码序列。在另一个具体实施方案中,根据本公开内容的克隆性载体或表达载体包含至少一个有效地连接于适当的启动子序列的来自表4的编码序列。

[0286] 用于表达本公开内容的重组抗体的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞 (CHO细胞) (包括Urlaub和Chasin 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220中所述的dhfr-CHO细胞,其与DHFR选择标志一起使用,例如R. J. Kaufman和P. A. Sharp 1982, Mol. Biol. 159:601-621中所述的)、CHO K1 dhfr+细胞系、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞和SP2细胞。具体地,为与NS0骨髓瘤细胞一起使用,另一表达系统为PCT公开WO 87/04462、WO 89/01036和EP 0 338 841中显示的GS基因表达系统。在一个实施方案中,用于表达本公开内容的重组抗体的哺乳动物宿主细胞包括对于FUT8基因表达是有缺陷的哺乳动物细胞系,例如如美国专利No. 6,946,292中描述的。

[0287] 当将编码抗体基因的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞时,通过培养宿主细胞一段足以使宿主细胞表达抗体或将抗体分泌至培养宿主细胞的培养基中的时间来生产抗体。可以使用标准蛋白质纯化方法 (参见例如Abhinav等人2007, Journal of Chromatography 848:28-37) 从培养基中回收抗体。

[0288] 在一个具体实施方案中,本公开内容的宿主细胞是利用具有有效地连接于适当的启动子序列的选自由以下组成的组的编码序列 (其分别适合用于表达XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5) 的表达载体转染的宿主细胞: SEQ ID NO: 18、31、51、19、28、32、38、40、46、48、52、56和58。

[0289] 随后可将后者宿主细胞在分别适合用于选自由以下组成的组的本公开内容的抗

体表达和产生的条件下进一步培养：XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5。

[0290] 免疫缀合物

[0291] 在另一方面，本公开内容表征了缀合于活性或治疗性部分诸如细胞毒素、药物(例如免疫抑制剂)或放射性毒素的本公开内容的抗-IL-17A抗体或其片段。此类缀合物在本文中称作“免疫缀合物”。如果IL-17A在Th17细胞的表面上表达，这可以是特别优选的(Brucklacher-Waldert等人2009, J Immunol. 183:5494-501)。

[0292] 包含一种或多种细胞毒素的免疫缀合物被称为“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒剂包括对细胞有害(例如杀伤细胞)的任何试剂。实例包括taxon、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙啶、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙素、多柔比星、柔红霉素、二羟基蒽蒽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素类、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素，及其类似物或同系物。治疗剂还包括例如抗代谢物类(例如，甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪)、烧化剂类(ablating agents)(例如，氮芥、塞替哌(thioepa)、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素C和顺-二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环类(例如，柔红霉素(以前称为道诺霉素)和多柔比星)、抗生素类(例如，放线菌素D(以前称为放线菌素)、博来霉素、光神霉素和氨基霉素(AMC))以及抗有丝分裂剂(例如长春新碱和长春碱)。

[0293] 可被缀合于本公开内容的抗体的治疗性细胞毒素的其它实例包括多卡米星、加利车霉素、美登素和auristatin及其衍生物。加利车霉素抗体缀合物的实例是商购可得的(MylotargTM; Wyeth-Ayerst)。

[0294] 可利用本领域现有的接头技术将细胞毒素缀合于本公开内容的抗体。已经用于将细胞毒素缀合于抗体的接头类型的实例包括但不限于脰、硫醚、酯、二硫化物和含肽接头。可选择例如易于在溶酶体区室内被低PH切割或易于被蛋白酶诸如优先在肿瘤组织中表达的蛋白酶诸如组织蛋白酶(例如，组织蛋白酶B、C、D)切割的接头。

[0295] 关于细胞毒素的类型、接头及将治疗剂缀合于抗体的方法的进一步讨论还可参见Saito, G.等人2003, Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail, P. A.等人2003, Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, G. 2003, Cancer Cell 3:207-212; Allen, T. M. 2002, Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan, I. 和Kreitman, R. J. 2002, Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter, P. D. 和Springer, C. J. 2001, Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264。

[0296] 还可将本公开内容的抗体缀合于放射性同位素以产生细胞毒性放射性药物，也称作放射性免疫缀合物。可被缀合于抗体以用于诊断或治疗的放射性同位素的实例包括但不限于碘¹³¹、铟¹¹¹、钇⁹⁰和镱¹⁷⁷。用于制备放射性免疫缀合物的方法在本领域已被建立。放射性免疫缀合物的实例是商购可得的，包括ZevalinTM(DEC Pharmaceuticals)和BexxarTM(Corixa Pharmaceuticals)，并且可使用类似的方法利用本公开内容的抗体来制备放射性免疫缀合物。

[0297] 本公开内容的抗体缀合物可用于改进给定的生物学应答，而且药物部分不应被解释为限于经典的化疗剂。例如，药物部分可以是具有期望生物学活性的蛋白质或多肽。此类蛋白质可以包括例如具有酶促活性的毒素或其活性片段，诸如相思豆毒素、蓖麻毒素A、假

单胞菌外毒素或白喉毒素;蛋白质,诸如肿瘤坏死因子或干扰素- γ ;或者,生物学应答修饰剂,诸如例如淋巴因子、白介素-1 (“IL1”)、白介素-2 (“IL2”)、白介素-6 (“IL-6”)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (“GM-CSF”)、粒细胞集落刺激因子 (“G-CSF”) 或其它生长因子。

[0298] 用于将此类治疗性部分缀合于抗体的技术是公知的,参见,例如,Amon等人1985,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”,于Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy,Reisfeld等人(编辑),第243-56页中;Hellstrom等人1987,“Antibodies For Drug Delivery”,于Controlled Drug Delivery (第2版),Robinson等人(编辑),第623-53页中;Thorpe 1985,“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review”,于Monoclonal Antibodies’84: Biological And Clinical Applications,Pinchera等人(编辑.),第475-506页中;Thorpe等人1982,Immunol.Rev.,62:119-58。

[0299] 双特异性分子

[0300] 在另一方面,本公开内容表征了包含本公开内容的抗-IL-17A/AF抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质的双特异性或多特异性分子。本公开内容的抗体或蛋白可被衍生化或连接至另一功能性分子,例如另一种肽或蛋白质(例如,受体的另一种抗体或配体)以产生与至少两种不同的结合位点或靶分子结合的双特异性分子。本公开内容的抗体或蛋白质事实上可以进行衍生化或连接至不止一个其它功能性分子以产生与两个以上不同结合位点和/或靶分子结合的多特异性分子;此类多特异性分子还意欲为本文中所使用的术语“双特异性分子”所涵盖。为生成本公开内容的双特异性分子,可以将本公开内容的抗体或蛋白质功能性连接(例如通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或其它方式)至一种或多种其它结合分子,诸如另一种抗体、抗体片段、肽或结合模拟物,以便产生双特异性分子。

[0301] 因此,本公开内容包括包含至少一个针对IL-17A(例如,XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的任一个的一个抗原结合部分)的第一结合特异性部分和针对第二种靶表位的第二结合特异性部分的双特异性分子。例如,第二靶表位是与第一靶表位不同的IL-17A的另一个表位。另一个实例是包含至少一个针对IL-17A的第一结合特异性部分(例如,XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的任一个的一个抗原结合部分)和针对IL-17A内的其它地方或另一个靶抗原内的表位的第二结合特异性部分的双特异性分子。

[0302] 此外,关于其中双特异性分子是多特异性的本公开内容,除了所述第一和第二靶表位以外,所述分子还可包括第三结合特异性。

[0303] 在一个实施方案中,本公开内容的双特异性分子包含至少一种抗体或其抗体片段作为结合特异性,所述抗体片段包括例如Fab、Fab’、F(ab’)₂、Fv或单链Fv。抗体还可以是轻链或重链二聚体或其任何最小片段,诸如Fv或单链构建体,如Ladner等人的美国专利No.4,946,778中所述的。

[0304] 可用于本公开内容的双特异性分子的其它抗体为鼠单克隆抗体、嵌合单克隆抗体和人源化单克隆抗体。

[0305] 可利用本领域已知的方法,通过缀合结合特异性成分来制备本公开内容的双特异性分子。例如,可以分别产生双特异性分子的每一种结合特异性部分,然后彼此缀合。当结合特异性部分是蛋白质或肽时,可使用多种偶联或交联剂来进行共价缀合。交联剂的实例包括蛋白A、碳化二亚胺、N-琥珀酰亚氨基-S-乙酰基-硫代乙酸酯(SATA)、5,5’-二硫代双

(2-硝基苯甲酸) (DTNB)、邻-苯二马来酰亚胺(oPDM)、N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)和磺基琥珀酰亚氨基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-I-羧酸酯(sulfo-SMCC) (参见例如,Karpovsky等人1984,J.Exp.Med.160:1686;Liu,MA等人1985,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:8648)。其它方法包括Paulus 1985,Behring Ins.Mitt.No.78,118-132;Brennan等人1985,Science 229:81-83)和Glennie等人1987,J.Immunol.139:2367-2375中描述的那些方法。缀合剂是SATA和sulfo-SMCC,二者都可获自Pierce Chemical Co. (Rockford,IL)。

[0306] 当结合特异性是抗体时,它们可以经由两条重链的C末端铰链区的巯基键合而缀合。在具体实施方案中,在缀合之前将铰链区修饰以包含奇数个(例如1个)巯基残基。

[0307] 或者,两种结合特异性都可以在同一载体中编码并在同一宿主细胞中表达和装配。当双特异性分子是mAb×mAb、mAb×Fab、Fab×F(ab')₂或配体×Fab融合蛋白时,这种方法特别有用。本公开内容的双特异性分子可以是包含一个单链抗体和结合决定簇的单链分子,或包含两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性分子可以包含至少两条单链分子。用于制备双特异性分子的方法描述于例如美国专利号5,260,203;美国专利号5,455,030;美国专利号4,881,175;美国专利号5,132,405;美国专利号5,091,513;美国专利号5,476,786;美国专利号5,013,653;美国专利号5,258,498和美国专利号5,482,858中。

[0308] 双特异性分子与它们的特异性靶物的结合可以通过例如酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射性免疫测定法(RIA)、FACS分析、生物测定法(例如生长抑制)或Western印迹测定法来验证。这些测定法中的每一种一般通过采用对于目标复合物是特异的经标记的试剂(例如抗体)来检测特定目标蛋白质-抗体复合物的存在。

[0309] 多价抗体

[0310] 在另一个方面,本公开内容提供多价抗体,其包含至少两个相同或不同的结合IL-17A的本公开内容的抗体的抗原结合部分(例如,选自XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的任一个的抗原结合部分)。在一个实施方案中,多价抗体提供至少2、3或4个抗体的抗原结合部分。可通过蛋白质融合或共价或非共价连接将抗原结合部分连接在一起。或者,已针对双特异性分子描述了连接方法。可以例如通过将本公开内容的抗体与结合本公开内容的抗体的恒定区例如Fc或铰链区的抗体交联来获得四价化合物。

[0311] 药物组合物

[0312] 在另一方面,本公开内容提供了一种组合物,例如药物组合物,其包含与可药用的载体配制在一起的一种或一组本公开内容的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质(选自由以下组成的组的一种抗体:XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5)。此类组合物可包含一种或一组(例如,两种或多种不同的)本公开内容的抗体或免疫缀合物或双特异性分子。例如,本公开内容的药物组合物可包含一组结合靶抗原上的不同表位或者具有互补活性的抗体或蛋白质。

[0313] 本公开内容的药物组合物还可以以联合疗法(即与其它药物组合)施用。例如,联合疗法可以包括与至少一种其它抗炎剂或另一种化疗剂(例如免疫抑制剂)组合的本公开内容的抗-IL-17A抗体或蛋白质(例如选自由以下组成的组的一种抗体:XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5)。可以用于联合疗法的治疗剂的例子在下文关于本公开内容抗体或蛋白质的用途的部分中有更加详细的描述。

[0314] 如本文中所用,“可药用的载体”包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。载体应当适于静脉内、肌内、皮下、胃肠外、脊髓或表皮施用(例如通过注射或输注)。在一个实施方案中,载体应当适合于皮下途径。取决于施用途径,活性化合物,即抗体、免疫缀合物或双特异性分子,可被包被在一种物质中,以保护该化合物不受酸和可以使该化合物失活的其它天然条件的作用。

[0315] 本公开内容的药物组合物可包含一种或多种可药用的盐。“可药用的盐”指这样一种盐,其保留亲本化合物的期望生物学活性且不产生任何不利的毒理学效果(参见例如, Berge, S.M., 等人1977, J. Pharm. Sci. 66:1-19)。此类盐的例子包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括衍生自无毒无机酸,诸如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等的盐,以及衍生自无毒有机酸,诸如脂肪族单羧酸和二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳香族酸、脂肪族和芳香族磺酸等的盐。碱加成盐包括衍生自碱土金属(诸如钠、钾、镁、钙等)的盐,以及衍生自无毒有机胺的盐,诸如N,N'-二苄乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等。

[0316] 本公开内容的药物组合物还可包含可药用的抗氧化剂。可药用的抗氧化剂的例子包括:水溶性抗氧化剂,诸如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;油溶性抗氧化剂,诸如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基茴香醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT),卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;和金属螯合剂,诸如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0317] 可以用于本公开内容的药物组合物的合适的含水和非含水载体的例子包括水、乙醇、多元醇(诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油诸如橄榄油,和可注射的有机酯诸如油酸乙酯。通过例如使用包衣材料诸如卵磷脂,通过在分散体的情况下保持期望颗粒大小,以及通过使用表面活性剂,可维持适当的流动性。

[0318] 这些组合物还可包含佐剂,诸如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。通过灭菌方法和通过包含各种抗细菌和抗真菌剂,诸如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、酚、山梨酸等,可以确保对微生物存在的预防。可能还希望向组合物中加入等渗剂,诸如糖类、氯化钠等。此外,通过加入延迟吸收的药物,诸如单硬脂酸铝和明胶,可以导致可注射药物形式的延长吸收。

[0319] 可药用的载体包括无菌水溶液或分散体和用于即时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。此类介质和试剂用于药物活性物质的用途在本领域是已知的。除了任何常规介质或药物与活性化合物不相容的情况之外,设想了其在本公开内容的药物组合物中的用途。还可以向组合物中掺入补充性的活性化合物。

[0320] 治疗性组合物在生产和贮存条件下通常必须是无菌的和稳定的。可将组合物配制成溶液、微乳液、脂质体或适于高药物浓度的其它有序结构。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、和液体聚乙二醇等)及其合适混合物的溶剂或分散介质。可以例如通过使用包衣诸如卵磷脂,在分散体的情况中通过维持期望粒度,及通过使用表面活性剂,来保持适当的流动性。在许多情况中,可在组合物中包含等渗剂,例如糖类、多元醇诸如甘露醇、山梨醇、或氯化钠。通过在组合物中包含延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸盐和明胶,可以造成可注射组合物的延长吸收。

[0321] 关于稳定的蛋白质(例如抗体)制剂的开发的综述可见于Cleland等人1993, Crit.Reviews.Ther.Drug Carrier Systems 10(4):307-377和Wei Wang 1999,

Int.J.Pharmaceutcs 185:129-88。关于抗体的另外的配制论述可见于,例如Daugherty和Mrsny 2006,Advanced Drug Delivery Reviews58:686-706;美国专利No 6,171,586、4,618,486、美国公开号20060286103、PCT公开W006/044908、W007/095337、W004/016286、Colandene等人2007,J.Pharm.Sci 96:1598-1608;Schulman 2001,Am.J.Respir.Crit.Care Med.164:S6-S11及其它已知的参考资料中。

[0322] 用于皮内或皮下施用的溶液或悬浮液通常包含以下组分的一种或多种:无菌稀释剂诸如注射用水、盐水溶液、不挥发油、聚乙二醇、丙三醇、丙二醇或其它合成溶剂、抗菌剂诸如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯,抗氧化剂诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠,螯合剂如乙二胺四乙酸,缓冲剂诸如乙酸盐,柠檬酸盐或磷酸盐,和调节张力的试剂诸如氯化钠或葡萄糖。pH可以用酸或碱,诸如盐酸或氢氧化钠来调节。可将此类制剂封装在由玻璃或塑料制造的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0323] 可通过将所需量的所述活性化合物与根据需要的一种或一组上文中列举的成分掺入合适的溶剂中,然后微量过滤灭菌,来制备无菌注射液。一般地,通过将本公开内容的抗体或蛋白质掺入含有基本分散介质和来自上文中列举的那些成分的所需其它成分的无菌媒介物中,来制备分散剂。在用于制备无菌注射液的无菌粉剂的情况下,制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),所述方法产生来自其先前过滤灭菌的溶液的活性成分加上任何另外的所需成分的粉剂。

[0324] 在一个具体实施方案中,将抗体XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5作为小瓶中的液体制剂来施用。每小瓶药物的量为150mg。所述液体含有150mg/mL抗体、4.8mM L-组氨酸、15.2mM L-组氨酸-HCl、220mM蔗糖和0.04%聚山梨醇酯20,pH 6.0±0.5。过量添加20%以允许期望的剂量的完全取出。

[0325] 可与载体材料组合以产生单剂量形式的活性成分的量将根据待治疗的受试者及具体施用模式而变化。可与载体材料组合以产生单剂量形式的活性成分的量一般是产生治疗效果的组合物量。一般地,在百分比中,这种量的范围将是约0.01%至约99%的活性成分,约0.1%至约70%,约1%至约30%的与可药用的载体组合的活性成分。

[0326] 可调整剂量方案以提供最佳的期望应答(例如治疗性应答)。例如,可以施用单次推注,可随时间施用数个分开的剂量,或者可根据治疗情况的紧急程度所指示的,按比例降低或提高剂量。以剂量单位形式配制胃肠外组合物对于易于施用和统一剂量而言是尤其有利的。如本文中所用,剂量单位形式是指在物理上离散的单位,适于作为单位剂量用于待治疗的受试者;每一个单位都含有与所需药物载体结合的经计算产生所期望的治疗效果的预定量的活性化合物。本公开内容的剂量单位形式的规格取决于且直接依赖于活性化合物的独特特性以及要实现的特定治疗效果,和配制用于治疗个体的敏感性的这样的活性化合物的固有的局限。

[0327] 对于抗体或蛋白质的施用,剂量的范围为大约0.0001至150mg/kg宿主体重,诸如5、15和50mg/kg宿主体重皮下施用,更常见地0.01-5mg/kg宿主体重。例如,剂量可以是0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重或10mg/kg体重或在1-10mg/kg的范围内。示例性治疗方案要求每周施用一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每3个月一次或每3-6个月一次。用于本公开内容的抗-IL-17A抗体或蛋白质的剂量方案包括经静脉内施用1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg或30mg/kg,其利用下

列剂量给药方案之一来给予抗体：每四周六个剂量，然后每三个月一个剂量；每三周一个剂量；给予一次3mg/kg体重，随后每三周给予1mg/kg体重。

[0328] 在有些方法中，同时施用具有不同结合特异性的两种或更多种抗体，在该情况中所施用的每种抗体的剂量落入指定的范围内。通常分多次施用本公开内容的抗体或蛋白质。单次剂量之间的间隔可以是例如一周、一个月、三个月或一年。间隔还可以是无规律的，如通过测量患者体内针对靶抗原的抗体的血液水平所指示的。在有些方法中，调整剂量以达到约1-1000 μ g/ml的血浆抗体浓度，而在有些方法中为约25-300 μ g/ml。

[0329] 或者，可以将抗体或蛋白质作为持续释放制剂来施用，在该情况中需要更低频率的施用。剂量和频率根据抗体在患者体内的半寿期而变化。一般地，人抗体显示最长的半寿期，接下来是人源化抗体、嵌合抗体、和非人抗体。施用的剂量和频率可以根据治疗是预防性的还是治疗性的而变化。在预防性应用中，在较长一段时间里以相对较不频繁的间隔施用相对较低的剂量。一些患者在其余生继续接受治疗。在治疗性应用中，有时需要以相对较短的时间间隔施用相对高的剂量直至疾病进展得以减缓或终止，或直至患者显示疾病症状的部分或完全改善。随后，可向患者施用预防性方案。

[0330] 可改变本公开内容的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平，以获得对于特定患者、组合物和施用模式有效地实现期望的治疗性应答而对患者是无毒的活性成分的量。选择的剂量水平将取决于多种药代动力学因素，包括所采用的本公开内容的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性，施用途径，施用时间，所采用的特定化合物的排泄速率，治疗的持续时间，与所采用的特定组合物组合使用的其它药物、化合物和/或材料，待治疗患者的年龄、性别、体重、状况、大体健康状态和先前病历以及医学领域公知的类似因素。

[0331] “治疗有效量”的本公开内容抗-IL-17A抗体或蛋白质可导致疾病症状严重度的降低、无疾病症状期的频率和持续时间的增加或对患病所造成的损害或残疾的预防。

[0332] 可以利用本领域中已知的多种方法中的一种或多种经一种或多种施用途径来施用本公开内容的组合物。正如本领域普通技术人员将会理解的，施用的途径和/或模式将根据期望的结果而变化。本公开内容的抗体的施用途径包括静脉内、肌内、皮内、腹膜内、皮下、脊柱或其它胃肠外施用途径，例如通过注射或输注。如本文中所用，短语“胃肠外施用”意味着除了肠和局部施用之外的施用模式，通常通过注射，包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内 (intrasternal) 注射和输注。

[0333] 或者，可以经非胃肠外途径来施用本公开内容的抗体或蛋白质，诸如局部、表皮或粘膜施用途径，例如鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部。

[0334] 可用载体制备本公开内容的抗体或蛋白质，所述载体将保护抗体以免迅速释放，诸如受控释放制剂，包括植入物、透皮贴和微囊递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容性的聚合物，诸如乙烯乙酸乙烯、聚酸酐类、聚乙醇酸、胶原、聚正酯类和聚乳酸。用于制备此类剂型的许多方法已经获得了专利或为本领域技术人员所公知。参见例如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, 编辑, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0335] 可以用本领域已知的医疗手段来施用治疗性组合物。例如，在一个实施方案中，可以用无针皮下注射手段来施用本公开内容的治疗性组合物，诸如美国专利 No. 5,399,163；

5,383,851;5,312,335;5,064,413;4,941,880;4,790,824或4,596,556中所公开的手段。可用于本公开内容的公知的植入物和模块的实例包括:美国专利No.4,487,603,其公开了可植入的微输注泵,用于以受控速率分配药物;美国专利No.4,486,194,其公开了一种治疗用装置,用于通过皮肤施用药物;美国专利No.4,447,233,其公开了一种药物输注泵,用于以精确输注速率递送药物;美国专利No.4,447,224,其显示了一种变流可植入输注装置,用于持续的递送;美国专利No.4,439,196,其公开了一种渗透性药物递送系统,它具有多室隔室;和美国专利No.4,475,196,其公开了一种渗透性药物递送系统。许多其它的此类植入物、递送系统、和模块对于本领域普通技术人员来说是已知的。

[0336] 在某些实施方案中,可配制本公开内容的抗体或蛋白质以确保在体内的适当分布。例如,血脑屏障(BBB)排除了许多高亲水性化合物。为了确保本公开内容的治疗化合物穿过BBB(如有需要),可以将它们配制在例如脂质体中。有关制造脂质体的方法,参见例如美国专利4,522,811、5,374,548和5,399,331。所述脂质体可包含被选择性地转运到特定细胞或器官、从而增强靶向药物递送的一个或多个部分(参见例如V.V.Ranade 1989,J.Cline Pharmacol.29:685)。示例性靶向部分包括叶酸或生物素(参见例如,属于Low等的美国专利5,416,016)、甘露糖苷(Umezawa等人1988,Biochem.Biophys.Res.Comm.153:1038);抗体(P.G.Bloeman等人1995,FEBS Lett.357:140;M.Owais等人1995,Antimicrob.Agents Chemoth.39:180);表面活性剂A蛋白受体(Briscoe等人1995,Am.J.Physiol.1233:134);p120(Schreier等人1994,J.Biol.Chem.269:9090);也参见Keinanen和Laukkanen 1994,FEBS Lett.346:123;Killian和Fidler 1994,Immunomethods 4:273。

[0337] 本公开内容的用途和方法

[0338] 本公开内容的抗体或蛋白质具有体外和体内诊断及治疗功用。例如,可将这些分子施用至培养中的(例如在体外或体内)或受试者中的(例如在体内)的细胞,以治疗、预防或诊断多种病症。

[0339] 所述方法特别适合用于治疗、预防或诊断IL-17A相关病症和/或自身免疫性和炎性病症,例如类风湿关节炎或银屑病。

[0340] 具体地,本公开内容提供治疗IL-17A相关病症和/或自身免疫性和炎性病症的方法。在某些实施方案中,所述方法包括向有此需要的受试者施用根据本公开内容的分离的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质的步骤。

[0341] 本公开内容还提供了方法,所述方法通过将细胞与包含治疗有效剂量的本公开内容的抗体的组合物接触,来减弱或抑制IL-17A或IL-17AF在靶细胞或组织中诱导的信号转导应答。

[0342] 本公开内容还提供用于降低细胞中的IL6、CXCL1、IL-8、GM-CSF和/或CCL2的水平的方法,所述方法包括将细胞与根据本公开内容的抗体或其抗原结合片段,诸如包含其抗原结合部分的蛋白质接触的步骤。

[0343] 在本说明书中,短语“IL-17A/AF介导的疾病”或“IL-17A/AF相关病症”包括其中IL-17A或IL-17AF在疾病或医学病况中起作用(无论是直接还是间接地)的所有疾病和医疗病况,包括疾病或病况的原因、发展、进展、持续或病理学。因此,这些术语包括与异常IL-17A/AF水平相关或以异常IL-17A/AF水平为特征的病况和/或可通过减弱或抑制IL-17A/AF在靶细胞或组织中诱导的活性(例如IL-6或GRO- α 的产生)来治疗的疾病或病况。这类疾病

或病况包括炎性病况和自身免疫性疾病,诸如关节炎、类风湿性关节炎或银屑病。这类疾病还包括过敏症和过敏性病况、超敏反应、慢性阻塞性肺疾病、囊性纤维化以及器官或组织移植排斥。

[0344] 例如,本公开内容的抗体或蛋白质可用于治疗接受者的心脏、肺、心肺联合、肝、肾、胰腺、皮肤或角膜移植物,包括同种异体移植排斥或异种移植排斥,以及用于预防移植物抗宿主病(诸如在骨髓移植后)和器官移植相关动脉粥样硬化。

[0345] 本公开内容的抗体或蛋白质可用于(然而不限于)治疗、预防或改善自身免疫性疾病或炎性病况,特别是病因学包括自身免疫组分的炎性病况,诸如关节炎(例如类风湿性关节炎、慢性进行性关节炎(arthritis chronica progrediente)和变形性关节炎)和风湿性疾病,包括牵涉骨损失、炎症性疼痛的炎性病况和风湿性疾病、脊椎关节病变(包括强直性脊柱炎)、赖特综合征、反应性关节炎、银屑病关节炎、幼年型特发性关节炎和肠病性关节炎、起止点炎、超敏反应(包括气道超敏反应和皮肤超敏反应)和过敏。可对其使用本公开内容的抗体的特定自身免疫性疾病包括自身免疫性血液学障碍(包括例如溶血性贫血、再生障碍性贫血、纯红细胞贫血和特发性血小板减少)、系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、炎性肌肉疾病(皮肌炎)、牙周炎、多软骨炎、硬皮病、韦格纳肉芽肿、皮肌炎、慢性活动性肝炎、重症肌无力、银屑病、史蒂芬约翰逊综合征、自发性口炎性腹泻、自身免疫性炎性肠病(包括例如溃疡性结肠炎、克罗恩病和肠易激综合症)、内分泌性眼病、格雷夫斯病、结节病、多发性硬化、系统性硬化病、纤维变性疾病、原发性胆汁性肝硬化、幼年型糖尿病(I型糖尿病)、葡萄膜炎、干燥性角结膜炎和春季角结膜炎、间质性肺纤维化、假体周围骨溶解、肾小球肾炎(有和无肾病综合症,例如包括特发性肾病综合症或微小病变性肾病)、多发性骨髓瘤、其他类型的肿瘤、皮肤和角膜的炎性疾病、肌炎、骨植入物的松动、代谢紊乱(诸如肥胖、动脉粥样硬化和其它心血管疾病,包括扩张型心肌病、心肌炎、II型糖尿病和血脂异常)和自身免疫性甲状腺疾病(包括桥本甲状腺炎)、中小血管原发性血管炎、大血管血管炎包括巨细胞性动脉炎、化脓性汗腺炎、视神经脊髓炎、斯耶格伦氏综合征、白塞氏病、特应性和接触性皮炎、细支气管炎、炎性肌肉疾病、自身免疫性外周神经病、免疫性肾脏、肝脏和甲状腺疾病、炎症和动脉粥样硬化、自身炎症发热综合征、免疫血液学紊乱以及皮肤和粘膜的大疱性疾病。在解剖学上,葡萄膜炎可以是前、中、后部或泛葡萄膜炎。其可以是慢性或急性的。葡萄膜炎的病因学可以是自体免疫或非感染性的、感染性的,与全身性疾病相关或白点综合征。

[0346] 本公开内容的抗体或蛋白质还可用于治疗、预防或改善哮喘、支气管炎、细支气管炎、特发性间质性肺炎、尘肺、肺气肿以及气道的其它阻塞性或炎性疾病。

[0347] 本公开内容的抗体或蛋白质还可用于骨代谢的疾病,包括骨关节炎、骨质疏松和其它炎性关节炎和一般性骨损失,包括年龄相关的骨损失,特别是牙周病。

[0348] 此外,本公开内容的抗体或蛋白质还可用于治疗慢性念珠菌病和其它慢性真菌病,以及寄生虫感染的并发症,并且还认为有希望治疗吸烟的并发症,以及病毒感染和病毒感染的并发症。

[0349] IL-17及其受体的抑制是其中最希望的用于治疗慢性炎性疾病的新的作用模式(MOA),银屑病是目前正在研究(以进行IL-17调节药物开发)的几种疾病当中进展最快的适应症(Miossec P和Kolls JK.2012,Nat Rev Drug Discov.10:763-76)。几个研究已明确地

表明,在具有中度至严重斑块状银屑病的患者中阻断IL-17A在短期内是安全的,并且诱导非常明显的改善(例如Hueber W,Patel DD,Dryja T,等人2010,Sci Transl Med.;2:52ra72)。这些发现超出预期,并且确认了IL-17A是银屑病发病机制中的至关重要的信号转导分子的假说(Garber K.2012,Nat Biotechnology30:475-477)。

[0350] 此外,在几个动物模型(包括最常见的多发性硬化(MS)模型)实验性自身免疫性脑脊髓炎中,IL-17在炎症过程中起着关键作用(Bettelli E,等人2008,Nature;453:1051-57,Wang HH,等人2011,J Clin Neurosci;18(10):1313-7,Matsushita T,等人2013,PLoS One;8(4):e64835)。IL-17的作用主要是促炎症反应,并且与其它细胞因子协同作用。IL-17的作用诸如诱导上皮细胞产生趋化因子、上调白细胞介素(IL)-1b、肿瘤坏死因子 α (TNF α)和巨噬细胞中的基质金属蛋白酶(MMP)-9,以及诱导IL-6、IL-8和前列腺素E₂的分泌,与MS病理学的许多方面十分吻合。也存在反对IL-17在神经炎症中的关键作用的数据,包括小鼠中的转基因过表达模型(Haak S等人2009,JCI;119:61-69)。

[0351] 哮喘是异质性气道炎症性疾病,其临床表现为在严重性上变化(自发地或响应治疗)的气道阻塞的症状。虽然哮喘已被认为由T辅助细胞2型(Th2)细胞及其产物驱动,但最近的数据表明Th2-高基因特征存在于仅~50%的具有哮喘的受试者的气道中(Woodruff PG等人2009,Am J Respir Crit Care Med 180:388-95)。嗜中性粒细胞性炎症在急性严重哮喘中占主导地位;一些具有哮喘的个体表现明显的痰嗜中性粒细胞增多症和对吸入的甾类的不良临床响应;并且痰嗜中性粒细胞增多症在服用大剂量的吸入和/或口服甾类的哮喘个体中非常显著(Wenzel 2012,Nature Med 18:716-25)。

[0352] 已报导在具有哮喘的个体的循环和气道中相较于健康对照存在与哮喘的严重度相关的升高的IL-17A水平。过敏性肺炎的小鼠模型中的临床前研究已暗示嗜中性粒细胞性气道炎和抗甾类气道高反应性需要IL-17A及其受体(IL-17RA)。因此,IL-17A在体外的性质、哮喘中其以增加的量存在以及疾病的临床前模型支持IL-17A在对甾类响应不佳的疾病的嗜中性粒细胞性和/或低Th2形式中的作用(Cosmi L等人2009,Am J Respir Crit Care Med 180:388-95)。

[0353] 因此,如下列表的疾病包含用于利用根据本公开内容的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质的治疗的特别优选的靶:多发性硬化、银屑病、哮喘、系统性红斑狼疮(SLE)和狼疮性肾炎。

[0354] 可将本公开内容的抗体或蛋白质作为唯一的活性成分或与其它药物例如免疫抑制剂或免疫调节剂或其它抗炎剂或其它细胞毒性剂或抗癌剂结合(例如作为其佐剂或与其组合)施用,例如以治疗或预防上述疾病。例如,可将本公开内容的抗体与如下药物组合使用:DMARD,例如金盐、柳氮磺吡啶、抗疟药、甲氨蝶呤、D-青霉胺、硫唑嘌呤、麦考酚酸、他克莫司、西罗莫司、二甲胺四环素、来氟米特、糖皮质激素;钙调神经磷酸酶抑制剂,例如环孢菌素A或FK 506;淋巴细胞再循环的调节剂,例如FTY720和FTY720类似物;mTOR抑制剂,例如雷帕霉素,40-O-(2-羟基乙基)-雷帕霉素、CCI779、ABT578、AP23573或TAFA-93;具有免疫抑制性质的子囊霉素,例如ABT-281、ASM981等;皮质类固醇;环磷酰胺;硫唑嘌呤;来氟米特;咪唑立宾;吗替麦考酚酯;15-脱氧精脒菌素或其免疫抑制同系物、类似物或衍生物;免疫抑制单克隆抗体,例如,针对白细胞受体,例如,MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD8、CD25、CD28、CD40、CD45、CD58、CD80、CD86或其配体的单克隆抗体;其它免疫调节化合物,例如具有CTLA4或其

突变体的细胞外结构域的至少一部分,例如联接于非CTLA4蛋白序列的CTLA4或其突变体的细胞外结构域的至少一部分的重组结合分子,例如CTLA4Ig (例如,指定为ATCC 68629) 或其突变体,例如LEA29Y;粘附分子抑制剂,例如LFA-1拮抗剂、ICAM-1或-3拮抗剂、VCAM-4拮抗剂或VLA-4拮抗剂;或化疗剂,例如紫杉醇、吉西他滨、顺铂、阿霉素或5-氟尿嘧啶;抗TNF药物,例如针对TNF的单克隆抗体,例如英夫利昔单抗、阿达木单抗、CDP870或针对TNF-RI或TNF-RII的受体构建体,例如依那西普、PEG-TNF-RI;促炎细胞因子的阻断剂、IL1阻断剂,例如阿那白滞素或IL1陷阱、卡那奴单抗、IL13阻断剂、IL4阻断剂、IL6阻断剂,其它IL17阻断剂(诸如secukinumab、brodalumab、ixekizumab);趋化因子阻断剂,例如蛋白酶例如金属蛋白酶的抑制剂或激活物、抗-IL15抗体、抗-IL6抗体、抗-IL4抗体、抗-IL13抗体、抗-CD20抗体、NSAID,诸如阿司匹林或抗-感染剂(列表不限于提及的试剂)。

[0355] 根据上述内容,本公开内容提供了另外的方面:

[0356] 如上定义的方法包括治疗有效量的本文中公开的抗-IL-17A抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质和至少一种第二药物的共施用,例如同时或相继施用,所述第二药物是免疫抑制剂/免疫调节剂、抗炎化疗剂或抗感染药,例如如上文中指示的。

[0357] 或者,治疗组合(例如试剂盒),其由治疗有效量的a)如本文中公开的抗体或蛋白质或包含其抗原结合部分的蛋白质,和b)至少一种选自免疫抑制剂/免疫调节剂、抗炎化疗剂或抗感染药物(如上文中指示的)的第二物质组成。该试剂盒可以包含施用其的说明书。

[0358] 当将本文中公开的抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质与其它免疫抑制剂/免疫调节剂、抗炎化疗剂或抗感染疗法结合施用时,共施用的组合化合物的剂量当然将根据使用的共药的类型(例如其是否为DMARD、抗-TNF、IL1阻断剂还是其它药物)、所使用的具体药物、待治疗的病况等而变化。

[0359] 在一个实施方案中,抗体或包含其抗原结合部分的蛋白质可用于检测IL-17A的水平或含有IL-17A的细胞的水平。这可以例如通过在允许抗体与IL-17A之间的复合物形成的条件下将样品(诸如体外样品)和对照样品与抗-IL-17A抗体(或蛋白质)接触来实现。抗体(或蛋白质)与IL-17A之间形成的任何复合物可被检测到,并且比较样品与对照中的所述复合物。例如,可使用本公开内容的组合物进行本领域中公知的标准检测法,诸如ELISA和流式细胞计数测定。

[0360] 因此,在一个方面,本公开内容还提供了用于检测IL-17A(例如,人IL-17A抗原)在样品中的存在或测量IL-17A的量的方法,所述方法包括在允许抗体或其部分与IL-17A之间的复合物形成的条件,将样品和对照样品与本公开内容的抗体或蛋白质或其抗原结合部分接触,所述抗体或蛋白质特异性结合IL-17A。随后可检测复合物的形成,其中样品与对照样品之间的复合物形成的差异表明IL-17A存在于样品中。

[0361] 也在本公开内容的范围内的是由本公开内容的组合物(例如,抗体、蛋白质、人抗体和双特异性分子)和使用说明书组成的试剂盒。所述试剂盒还可含有至少一种另外的试剂或一种或多种本公开内容的另外的抗体或蛋白质(例如,结合靶抗原上与第一抗体不同的表位的具有互补活性的抗体)。试剂盒通常包括标示试剂盒的内容物的期望的用途的标签。术语标签包括在试剂盒上或通过试剂盒提供的或否则伴随试剂盒的任何书写或记录的材料。试剂盒还可包含用于诊断患者是否属于将对(如上文中定义的)抗-IL-17A抗体治疗作出反应的组的工具。

[0362] 现通过下列实施例和权利要求进一步举例说明已被全面描述的本公开内容,所述实施例是举例说明性的并且无意进一步限制。

[0363] 附图简述

[0364] 图1提供XAB1 Fab的三维结构。图1A为空间充填描绘。图1B为卡通描绘。

[0365] 图2提供XAB1 Fv与人IL-17A的复合物的三维结构。图2A显示以空间充填描绘的2个XAB1 Fv片段,以及图2B显示以卡通描绘的2个XAB1 Fv片段。

[0366] 图3显示根据实施例的ELISA结果的图。图的编号如下对应候选者名称:1为MB440;2为MB464;3为MB468;4为MB444;5为MB435;6为MB463;7为XAB1。图3A是显示标准化的信号对比Fab浓度(M)的曲线图。图3B是显示标准化的剩余信号对比洗涤孵育时间(小时)的曲线图。图3C是显示标准化的信号对比Fab竞争剂浓度(M)的曲线图。

[0367] 图4提供XAB2 Fv与人IL-17A的复合物的三维结构。图4A显示以空间充填描绘表示的2个XAB2 Fv片段,图4B显示以卡通描绘表示的2个XAB2 Fv片段。

[0368] 图5以近视图形式提供XAB2 Fv与人IL-17A的复合物的三维结构。

[0369] 图6提供XAB5 Fv与人IL-17A的复合物的三维结构。图6A显示以空间充填描绘表示的2个XAB5 Fv片段,图6B显示以卡通描绘表示的2个XAB5 Fv片段。

[0370] 图7以抗体L-CDR1的近视图的形式提供XAB5 Fv与人IL-17A的复合物的三维结构。

[0371] 图8提供XAB4 Fv与人IL-17A的复合物的三维结构。图8A显示以空间充填描绘表示的2个XAB4 Fv片段,图8B显示以卡通描绘表示的2个XAB4 Fv片段。

[0372] 图9以抗体L-CDR1的近视图的形式提供XAB4 Fv与人IL-17A的复合物的三维结构。

[0373] 图10以抗体L-CDR2的近视图的形式提供XAB4 Fv与人IL-17A的复合物的三维结构。

[0374] 图11是显示XAB4在实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型中的治疗性评分的曲线图。

[0375] 图12是显示EAE模型中动物的治疗的体重的变化(%)的曲线图。

[0376] 图13是显示EAE模型中的累积治疗性评分的图。

[0377] 图14和15是显示EAE模型中治疗前与治疗后的治疗性评分的比較的图。

[0378] 图16是显示XAB4在EAE模型中的预防性评分的曲线图。

[0379] 图17是显示EAE模型中动物的预防的体重的变化(%)的曲线图。

[0380] 图18是显示EAE模型中的累积预防性评分的曲线图。

[0381] 图19是显示EAE模型中的最大预防性评分的曲线图。

[0382] 图20是显示EAE在EAE模型中发作的曲线图。

[0383] 图21是显示XAB4在人星形胶质细胞模型中对IL-6释放的拮抗作用的图。

[0384] 图22是显示XAB4在人星形胶质细胞模型中对CXCL1释放的拮抗作用的图。

[0385] 图23是显示XAB4在人星形胶质细胞模型中对IL-8释放的拮抗作用的图。

[0386] 图24是显示XAB4在人星形胶质细胞模型中对GM-CSF释放的拮抗作用的图。

[0387] 图25是显示XAB4在人星形胶质细胞模型中对CCL2释放的拮抗作用的图。

实施例

[0388] XAB1是人IgG1/ κ 单克隆抗体。使用标准分子生物学技术来产生其。简言之,使用

Medarex系统。用重组人IL-17A免疫小鼠。通过CO₂吸入麻醉小鼠,随后收获脾细胞,使用PEG4000将其与骨髓瘤细胞系融合。将融合细胞涂板在具有腹膜细胞饲养层的孔中。从培养细胞获自上清液,通过ELISA测定其的IL-17A反应性mAb。选择对于IL-17A mAb的产生是阳性的克隆,并将其涂板(plated out)。

[0389] 基于初始有希望的抗体/抗原结合特征(诸如对于IL-17A的结合亲和力、阻断IL-17A对其受体的结合的能力以及在体外测定中阻断IL-17A介导的生物效应的能力)鉴定负责XAB1的分泌的杂交瘤,以用于进一步表征。

[0390] XAB1的氨基酸序列是SEQ ID NO:14(重链)和SEQ ID NO:15(轻链)。XAB1被选择用于随后的亲和力成熟。

[0391] 作为朝向结构导向亲和力成熟的第一步,如下所述测定以自由状态存在的XAB1 Fab的晶体结构以及与人IL-17A的对应的Fv复合物的晶体结构。XAB1 Fv与人IL-17A的复合物的三维结构的分析允许合理的亲和力成熟过程一起进行,和作为对更加随机化过程的替代。下文中提供了进一步的细节。

[0392] 此外,X射线晶体学用于表征一些产生的亲和力成熟的变异抗体。来自亲和力成熟的变体的晶体数据的分析允许更深地理解变异抗体的结合行为,并且发现一些预料之外的性质,如在下文中进一步描述的。

[0393] 实施例1.以自由状态存在的XAB1 Fab的晶体结构

[0394] (i) 材料和方法

[0395] 使用标准分子生物学方案来获得XAB1 Fab抗体片段。简言之,克隆Fab,并将其在大肠杆菌W3110中表达为在重链上具有C末端六组氨酸标签。通过Ni-螯合层析,随后在SPX-75柱上于10mM TRIS pH 7.4, 25mM NaCl中通过尺寸排阻层析来纯化重组蛋白。随后通过超滤将XAB1 Fab浓缩至10.4mg/ml,并使其结晶。

[0396] 进行标准结晶方案。简言之,使用坐式滴蒸气扩散法在SD2 96孔板中于19℃下生长晶体。将蛋白质原液与含有40%PEG 300,0.1M磷酸钠-柠檬酸钠pH 4.2的结晶缓冲液以1:1混合。总的滴大小为0.4μl。在X射线数据采集前,将一个晶体安放在尼龙冷冻环中并直接放入液氮中快速冷却。

[0397] 使用标准方案进行X-射线数据收集和处理。简言之,使用**1.0000Å** X射线辐射,利用MAR225 CCD检测器在瑞士光源,BeamlineX10SA(Swiss Light Source,beamline X10SA)下采集达到**2.1Å**分辨率的X射线数据。在190mm的晶体至检测器的距离上总共记录了180幅每次1.0°的振荡的图像,并且利用HKL2000软件包处理所述图像。晶体属于空间群C2(具有晶胞参数**a=51.63Å, b=132.09Å, c=77.25Å, α=90.00°, β=98.88°, γ=90.00°**)并且一个XAB1 Fab分子存在于不对称单元中。达到**2.1Å**分辨率的R-sym为10.4%并且数据完整性为99.0%。

[0398] 利用程序PHASER通过分子置换法测定结构。从PDB条目1HEZ产生用于V_H/V_L和C_{H1}/C_L结构域的搜索模型。利用程序Coot(面向晶体对象的工具箱)和CNX(晶体与核磁共振探测器)2002版进行迭代模型的建立和精修,直至不能对模型作进一步的显著改进。所有数据的最终R因子和自由R因子分别为0.188和0.231。最终改进的模型显示分别来自为**0.004Å**和

0.9°的理想的键长和键角的均方根偏差(RMSD)。

[0399] (ii) 结果

[0400] XAB1 Fab的X射线精修的结果提供于表9中并且三维结构示于图1中。

[0401] 表9.利用程序CNX进行的XAB1 Fab的X射线精修

	注释 3	
	注释 3	精修.
	注释 3	程序 : CNX 2002
	注释 3	作者 : Brunger, Adams, Clore, Delano,
	注释 3	Gros, Grosse-Kunstleve, Jiang,
	注释 3	Kuszewski, Nilges, Pannu, Read,
	注释 3	Rice, Simonson, Warren
	注释 3	and
[0402]	注释 3	Accelrys Inc.,
	注释 3	Yip, Dzakula).
	注释 3	
	注释 3	用于精修的数据.
	注释 3	分辨率范围 高 (埃): 2.10
	注释 3	分辨率范围 低 (埃): 33.33
	注释 3	数据截断值 (SIGMA(F)) : 0.0
	注释 3	数据截断值 高 (ABS(F)) : 19645630.62
	注释 3	数据截断值 低 (ABS(F)) : 0.000000

注释 3 完整性 (工作 + 测试) (%): 98.2
注释 3 反射次数: 29298
注释 3
注释 3 拟合用于精修的数据。
注释 3 交叉验证法 : 自始至终
注释 3 自由 R 值测试集选择 : 随机
注释 3 R 值 (工作集): 0.188
注释 3 自由 R 值 : 0.231
注释 3 自由 R 值测试集大小 (%): 4.9
注释 3 自由 R 值测试集计数 : 1436
注释 3 自由 R 值的估计的误差 : 0.006
注释 3
注释 3 最高分辨率箱 (BIN) 中的拟合
注释 3 所使用的箱的总数 : 6
注释 3 箱分辨率范围高 (A): 2.10
注释 3 箱分辨率范围低 (A): 2.23
注释 3 箱完整性 (工作 + 测试) (%): 94.7
注释 3 箱中反射 (工作集): 4478
注释 3 箱 R 值 (工作集): 0.201
注释 3 箱自由 R 值 : 0.241
注释 3 箱自由 R 值测试集大小 (%): 4.5
注释 3 箱自由 R 值测试集计数 : 213
注释 3 估计的箱自由 R 值误差: 0.016
注释 3
注释 3 精修中使用的非氢原子的数目。
注释 3 蛋白质原子 : 3311
注释 3 核酸原子 : 0
注释 3 杂原子 : 5
注释 3 溶剂原子 : 313
注释 3
注释 3 B 值。
注释 3 来自威尔逊曲线 (A**2): 21.1
注释 3 平均 B 值 (整体, A**2): 27.4
注释 3 整体各向异性 B 值。
注释 3 B11 (A**2): -6.02
注释 3 B22 (A**2): 3.30
注释 3 B33 (A**2): 2.73
注释 3 B12 (A**2): 0.00
注释 3 B13 (A**2): 3.82
注释 3 B23 (A**2): 0.00
注释 3
注释 3 大包装溶剂建模。
注释 3 所使用的方法: 平面模型
注释 3 KSOL : 0.399279
注释 3 BSOL : 54.4727 (A**2)
注释 3
注释 3 估计的坐标值误差。
注释 3 来自 LUZZATI 曲线的 ESD (A): 0.21
注释 3 来自 SIGMAA 的 ESD (A): 0.12
注释 3 低分辨率截断值 (A): 5.00
注释 3
注释 3 交叉验证的估计的坐标值误差。
注释 3 来自 C-V LUZZATI 曲线的 ESD (A): 0.29
注释 3 来自 C-V SIGMAA 的 ESD (A): 0.14
注释 3
注释 3 理想值的均方根偏差。
注释 3 键长 (A): 0.004
注释 3 键角 (度): 0.9
注释 3 二面角 (度): 21.4
注释 3 不适当的角度 (度): 0.58

[0403]


```

注释 3
注释 3 各向同性热模型：受约束的
注释 3
注释 3 各向同性热因子约束。 RMS SIGMA
注释 3 主链键 (A**2): 1.41; 1.50
注释 3 主链角 (A**2): 2.21; 2.00
注释 3 侧链键 (A**2): 2.31; 2.00
注释 3 侧链角 (A**2): 3.44; 2.50
注释 3
注释 3 NCS 模型：无
注释 3
注释 3 NCS 约束 RMS SIGMA/WEIGHT
注释 3 组 1 位置 (A): 无 ; 无
注释 3 组 1 B- 因子 (A**2): 无 ; 无
注释 3
[0404] 注释 3 参数文件 1 : protein_rep.param
注释 3 参数文件 2 : water_rep.param
注释 3 拓扑学文件 1 : protein_no_cter.top
注释 3 拓扑学文件 2 : water.top
注释 3
注释 3 其它精修 注释: NULL
二硫键 1 CYS L 23 CYS L 88
二硫键 2 CYS L 134 CYS L 194
二硫键 3 CYS H 22 CYS H 96
二硫键 4 CYS H 143 CYS H 199
CRYST1 51.627 132.089 77.247 90.00 98.88 90.00 C 1 2 1 8
ORIGX1 1.000000 0.000000 0.000000 0.000000
ORIGX2 0.000000 1.000000 0.000000 0.000000
ORIGX3 0.000000 0.000000 1.000000 0.000000
SCALE1 0.019370 0.000000 0.003027 0.000000
SCALE2 0.000000 0.007571 0.000000 0.000000
SCALE3 0.000000 0.000000 0.013103 0.000000

```

[0405] 图1提供如在实施例1中获得的XAB1 Fab的三维结构。图1A是空间充填描绘。图1B是卡通描绘。XAB1 Fab的重链和轻链分别以深灰色和浅灰色显示。

[0406] 实施例2.XAB1 Fv与人IL-17A的复合物的晶体结构:用于结构导向亲和力成熟的互补位的分析

[0407] (i) 材料和方法

[0408] 使用标准分子生物学方案来获得XAB1 Fv抗体片段。简言之,克隆Fv,并将其在大肠杆菌W3110中表达为在重链上具有C末端六组氨酸标签和在轻链上具有C末端Strep标签。通过Ni-螯合层析纯化重组蛋白。

[0409] 随后使用标准方法制备XAB1 Fv片段与人IL-17A的复合物。简言之,将人IL-17A (1.1mg) 与过量的Fv (2.7mg) 混合,随后在S100尺寸排阻层析上于10mM TRIS pH 7.4, 25mM NaCl中运行复合物。随后通过超滤将蛋白质复合物浓缩至21.2mg/ml,并使其结晶。

[0410] 进行标准结晶方案。简言之,使用坐式滴蒸气扩散法在SD2 96孔板中于19℃下生长晶体。将蛋白质原液与含有10% PEG 20,000, 0.1M N-二甘氨酸(Bicine) pH 9.0, 2.0% (v/v) 二噁烷的结晶缓冲液以1:1混合。总的滴大小为0.4μl。在X射线数据采集前,将一个晶体迅速转移至结晶缓冲液与20% PEG 20,000, 30% 甘油的1:1混合物中,随后于液氮中快速冷冻。

[0411] 使用标准方案进行X射线数据采集和处理。简言之,使用**1.0000Å** X射线辐射,利用MAR225 CCD检测器在瑞士光源,BeamlineX10SA下采集达到**3.0Å** 分辨率的X射线数据。在300mm的晶体至检测器的距离上总共记录了110幅每次1.0°的振荡的图像,并且利用

HKL 2000 软件包处理所述图像。晶体属于空间群 $P2_12_12$ (具有晶胞参数 $a=184.31\text{\AA}$, $b=55.81\text{\AA}$, $c=70.99\text{\AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$)。达到 3.0\AA 分辨率的 R-sym 为 11.2% 并且数据完整性为 99.0%。

[0412] 利用程序 PHASER 通过分子置换法测定结构。从先前测定的 XAB1Fv 的晶体结构产生用于 XAB1 Fv 的搜索模型 (参见实施例 1)。从公开的人 IL-17F 晶体结构 (PDB 条目 1jpy) 产生用于 IL-17A 的搜索模型。利用 Coot (面向晶体对象的工具箱) 和 CNX (晶体与核磁共振探测器) 2002 版进行迭代模型的建立和精修, 直至不能对模型作进一步的显著改进。所有数据的最终 R 因子和自由 R 因子分别为 0.215 和 0.269。最终改进的模型显示分别为 0.007\AA 和 1.0° 的来自理想的键长和键角的均方根偏差 (RMSD)。

[0413] (ii) 结果

[0414] 分子置换计算显示包含一个具有 2 个结合的 XAB1 Fv 片段的 IL-17A 同二聚体的二聚体复合物。XAB1 Fv 与人 IL-17A 的复合物的 X 射线精修的结果提供于表 10 中并且该复合物的三维结构示于图 2 中。每一个 XAB1Fv 与两个 IL-17A 亚单位接触, 但绝大部分分子间接触 (约 96% 的埋置面) 仅由一个 IL-17A 亚单位贡献。

[0415] 表 10. 通过程序 CAN 获得的 XAB1 Fv 与 IL-17A 的复合物的 X 射线精修。

注释	3	
注释	3	精修.
注释	3	程序 : CNX 2002
注释	3	作者 : Brunger, Adams, Clore, Delano,
注释	3	Gros, Grosse-Kunstleve, Jiang,
注释	3	Kuszewski, Nilges, Pannu, Read,
注释	3	Rice, Simonson, Warren
注释	3	and
注释	3	Accelrys Inc.,
注释	3	(Badger, Berard, Kumar, Szalma,
注释	3	Yip, Dzakula).
注释	3	
注释	3	用于精修的数据.
注释	3	分辨率范围高 (埃): 3.01
注释	3	分辨率范围低 (埃): 47.74
注释	3	数据截断值 (SIGMA(F)): 0.0
注释	3	数据截断值高 (ABS(F)): 15276175.80
注释	3	数据截断值低 (ABS(F)): 0.000000
注释	3	完整性 (工作 + 测试) (%): 99.5
[0416]	注释	3 反射次数 : 15190
	注释	3
	注释	3 与用于精修的数据拟合。
	注释	3 交叉验证法 : 自始至终
	注释	3 自由 R 值测试集选择 : 随机
	注释	3 R 值 (工作集): 0.215
	注释	3 自由 R 值 : 0.269
	注释	3 自由 R 值测试集大小 (%): 4.9
	注释	3 自由 R 值测试集计数 : 748
	注释	3 自由 R 值的估计的误差 : 0.010
	注释	3
	注释	3 最高分辨率箱中的拟合.
	注释	3 所使用的箱的总数 : 6
	注释	3 箱分辨率范围高 (A): 3.00
	注释	3 箱分辨率范围低 (A): 3.19
	注释	3 箱完整性 (工作 + 测试) (%): 94.6
	注释	3 箱中的反射 (工作集): 2234
	注释	3 箱 R 值 (工作集): 0.301
	注释	3 箱自由 R 值 : 0.350
	注释	3 箱自由 R 值测试集大小 (%): 5.3

[0417]

```

注释 3 箱自由 R 值测试集计数      :   124
注释 3 估计的箱自由 R 值的误差 :   0.031
注释 3
注释 3 精修中使用的非氢原子的数目 .
注释 3 蛋白质原子                :  5007
注释 3 核酸原子                  :    0
注释 3 杂原子                    :    0
注释 3 溶剂原子                  :   33
注释 3
注释 3 B 值 .
注释 3 来自威尔逊曲线              (A**2): 54.9
注释 3 平均 B 值      (整体, A**2): 44.8
注释 3 整体各向异性 B 值 .
注释 3 B11 (A**2): 5.66
注释 3 B22 (A**2): 0.97
注释 3 B33 (A**2): -6.63
注释 3 B12 (A**2): 0.00
注释 3 B13 (A**2): 0.00
注释 3 B23 (A**2): 0.00
注释 3
注释 3 大包装溶剂建模 .
注释 3 所使用的方法 : 平面模型
注释 3 KSOL      : 0.313124
注释 3 BSOL      : 20.608 (A**2)
注释 3
注释 3 估计的坐标值误差 .
注释 3 来自 LUZZATI 曲线的 ESD      (A): 0.33
注释 3 来自 SIGMAA 的 ESD          (A): 0.39
注释 3 低分辨率截断值              (A): 5.00
注释 3
注释 3 交叉验证的估计的坐标值误差 .
注释 3 来自 C-V LUZZATI 曲线的 ESD  (A): 0.44
注释 3 来自 C-V SIGMAA 的 ESD      (A): 0.51
注释 3
注释 3 理想值的均方根偏差 .
注释 3 键长                      (A): 0.007
注释 3 键角                      (度): 1.0
注释 3 二面角                    (度): 22.1
注释 3 不适当的角度              (度): 0.78
注释 3
注释 3 各向同性热模型 : 受约束的
注释 3
注释 3 各向同性热因子约束.      RMS      SIGMA
注释 3 主链键                      (A**2): 1.46 ; 1.50
注释 3 主链角                      (A**2): 2.62 ; 2.00
注释 3 侧链键                      (A**2): 1.63 ; 2.00
注释 3 侧链角                      (A**2): 2.62 ; 2.50
注释 3
注释 3 NCS 模型 : 无
注释 3
注释 3 NCS 约束                      RMS SIGMA/WEIGHT
注释 3 组 1 位置                      (A): 无 ; 无
注释 3 组 1 B- 因子                    (A**2): 无 ; 无
注释 3
注释 3 参数文件 1      : protein_rep.param
注释 3 参数文件 2      : water_rep.param
注释 3 拓扑学文件 1    : protein_no_cter.top
注释 3 拓扑学文件 2    : water.top
注释 3
注释 3 OTHER 精修 注释 S: NULL

```

```

      二硫键  1 CYS L 23  CYS L 88
      二硫键  2 CYS H 22  CYS H 96
      二硫键  3 CYS A 23  CYS A 88
      二硫键  4 CYS B 22  CYS B 96
      二硫键  5 CYS C 94  CYS C 144
      二硫键  6 CYS C 99  CYS C 146
      二硫键  7 CYS D 94  CYS D 144
[0418] 二硫键  8 CYS D 99  CYS D 146
CRYST1 184.306 55.813 70.991 90.00 90.00 90.00 P 21 21 2 24
ORIGX1  1.000000 0.000000 0.000000 0.000000
ORIGX2  0.000000 1.000000 0.000000 0.000000
ORIGX3  0.000000 0.000000 1.000000 0.000000
SCALE1  0.005426 0.000000 0.000000 0.000000
SCALE2  0.000000 0.017917 0.000000 0.000000
SCALE3  0.000000 0.000000 0.014086 0.000000

```

[0419] 图2提供如实施例2中获得的XAB1 Fv与人IL-17A的复合物的三维结构。图2A显示以空间充填描绘表示的2个XAB1 Fv片段；IL-17A同二聚体以卡通描绘来显示。图2B显示以卡通描绘表示的2个XAB1 Fv片段；IL-17A同二聚体以空间充填描绘来显示。XAB1 Fv的重链和轻链分别以深灰色和浅灰色来显示。IL-17A同二聚体的一条链以浅灰色显示，另一条链以深灰色显示。

[0420] 进行复合物详细分析。利用程序Coot和Pymol进行晶体结构的仔细目视观察，并且利用CCP41软件套件的程序AREAIMOL计算包埋在抗体-抗原界面的蛋白质表面的量。使用抗体与抗原原子之间**3.9Å**的截断距离确定分子间接触。如下概括结合的概述。XAB1的结合是对称的；每一个Fv片段结合IL17A同二聚体上的等同表位。

[0421] 每一个Fv片段的结合包埋平均**1732Å²**的组合表面，并且牵涉30个抗体氨基酸残基和25个IL-17A氨基酸残基。XAB1轻链对包埋表面的贡献(约**560Å²**)大于重链的所述贡献(约**275Å²**)。此外，CDRH2不产生对IL-17A的任何直接接触，并且表现离蛋白质抗原太远以至不能为亲和力成熟提供机会。CDRH1的贡献似乎被限定于仅一个氨基酸侧链(Tyr32)；该CDR也离IL-17A太远以至不能通过氨基酸取代为亲和力成熟提供机会。XAB1CDRH3与IL-17A产生多个紧密接触。然而，该区域中的结构的仔细观察未能显示通过点突变进一步增强这些接触的任何机会；因此，CDRH3被认为不适合用作亲和力增强的靶区域。相反地，轻链CDR的观察显示多个进行亲和力成熟的机会。在3个轻链CDR当中，CDRL1被认为是最有希望的，并且基于该观察，本发明人提供出随机化轻链的位置30至32以试图增强与IL-17A残基Arg124、Phe133和Tyr85的接触。

[0422] 通过合理设计产生的亲和力成熟

[0423] 基于上述结果，可看到，XAB1与同二聚体IL-17A的界面相当小，并且特征在于主要贡献来自轻链，不涉及CDRH2，以及CDRH1主要提供间接贡献(即通过CDRH3的稳定化)。因此，XAB1的重链似乎不为亲和力成熟提供有希望的机会。

[0424] 相反地，XAB1轻链确实提供一些机会，在氨基酸残基30至32中任选地插入多达4个氨基酸残基(CDRL1)，在氨基酸51至53和56(CDRL2)以及氨基酸残基92和93中任选地插入多达4个氨基酸残基。

[0425] 同二聚体人IL-17F的公开的晶体结构以及与人受体IL-17RA形成复合物的同二聚体IL-17F的结构的可得性允许基于观察到的结晶的IL-17A和IL-17A与XAB1(及其变体)形成的复合物的结构进行预测。

[0426] 研究IL-17F与IL-17A之间预测的结构相似性(基于序列同一性和同源性)。IL-17F

和IL-17A具有结构相似性。本发明人假设IL-17A可以以与针对公开的IL-17F/IL-17RA复合物所显示的方式(Ely LK等人2009, Nat Immunol. 10:1245-51) 相同的方式结合其受体的N末端结构域。

[0427] 基于人IL-17A和IL-17F的观察到的结构和其已知序列的比较,连同源自其它物种的IL-17A的序列,本发明人做了许多另外的预测:

[0428] 预期XAB1 (和具有增强的对于被XAB1靶向的表位的亲和力的来源于其的抗体变体) 对于人IL-17A是高度特异性的。假设此类抗体可保留一定的与来自其它物种的IL-17A的交叉反应性(基于物种之间高度的保守序列的同一性或同源性)。然而,基于可获得的序列数据和结构预测,不清楚可预期与IL-17A的物种变体的何种程度的交叉反应性。鉴于不存在与其它白细胞介素的结构相似性,因此预期与此类分子(来自人或其它物种)的交叉反应性是极不可能的。

[0429] 此外,IL-17A与IL-17F的序列(具体地N末端区域)之间的差异给出预测:本公开内容的抗-IL-17A抗体不会结合IL-17F。例如,两个晶体结构的叠加表明空间位阻会阻止这些抗体与IL-17F之间的结合。此外,对IL-17AF异二聚体的结构的外推还表明此类干扰(特别是在N-末端区域中)会阻碍抗体对IL-17AF异二聚体的结合,从而导致不存在对IL-17AF的结合,即不存在这些抗体针对IL-17AF异二聚体的交叉反应性。

[0430] 实施例3. 亲和力突变的抗体变体的产生

[0431] 出于上述原因,初始抗体XAB1的实际亲和力成熟集中于轻链。在以下3个步骤中进行工作:(i) 文库的产生,(ii) 文库筛选和(iii) 候选者表征。

[0432] 以Fab片段形式进行蛋白质工程工作(即亲和力成熟)以方便操作。工程后将候选者格式化回完全IgG。

[0433] (i) 文库的产生

[0434] 将编码轻链的可变结构域的DNA序列突变以生成基因变体的文库。将2个不同的方法(A和B)用于文库产生,提供2个单独的文库。

[0435] 1) 方法A-通过易错PCR产生的随机突变:

[0436] 使用易错PCR随机地突变编码XAB1的轻链的可变结构域的DNA区域。更详细地,使用以高频率引入突变的聚合酶Mutazyme II(关于更详细内容,参见与由Stratagene# 200550提供的GeneMorph II随机诱变试剂盒一起提供的指导)扩增该区域。然而,可使用任何合适的随机突变技术或策略。

[0437] 随后通过切割和粘贴进XAB1的表达载体来克隆PCR片段变体库。基本上,将未突变的亲本序列从表达载体切出,并用原位粘贴的随机诱变的序列替代其。使用标准分子生物学技术来实现该过程。

[0438] 这导致产生包含多种随机诱变的可变结构域序列的表达载体变体的文库。

[0439] 2) 方法B-通过合理设计产生的突变:

[0440] 根据该方法,通过进行结构分析作为亲和力成熟的先驱而指导文库的产生。基于表位和源自上述晶体结构的互补位的信息靶向特定氨基酸残基(特别是在XAB1的轻链的CDR1中)。

[0441] 对基于晶体结构信息选择的3个氨基酸残进行完全随机化。标准分子生物学方法用于构建。

[0442] 首先,使用简并寡核苷酸,通过PCR扩增编码适当的CDR和轻链框架的第一部分的可变区的片段。即,编码CDR的寡核苷酸以在确定的位置上提供多种碱基的方式来合成。寡核苷酸的设计使得能够通过NNK简并密码子(其中N代表所有4种碱基A、T、C和G,K代表G和T)来随机化CDR中的被明确靶向的氨基酸位置,并且允许全部20种天然氨基酸可以存在于那些位置上。

[0443] 在该步骤后,与第一片段重叠的并且编码轻链的其余部分的第二片段也通过PCR来扩增。随后通过“装配”PCR来装配两个片段,以产生完整可变轻链,并以‘切割和粘贴’方式将其克隆回表达载体。从而亲代序列被一系列合理突变的序列替代,其中在特定氨基酸位置上可存在全部20种天然氨基酸。

[0444] (ii) 文库筛选

[0445] 在已产生包含编码XAB1变体的序列的文库后,必须筛选它们以选择具有优于亲代XAB1序列的特征(例如更高的对于IL-17A的亲合力)的那些变体。

[0446] 使用两个筛选技术。首先,通过“菌落过滤筛选”(CFS)来进行高通量筛选。该测定允许大量克隆的方便筛选。其允许在ELISA筛选之前减少阳性命中,这对于随机方法“方法A”是特别有用的,因为文库大小比“方法B”中的文库大小(仅8000个)大得多($>10^5$)。ELISA筛选对于 10^4 克隆或更少克隆是方便的,并且提供定量结果。

[0447] 1) 菌落过滤筛选(CFS):

[0448] 用于CFS的方案基于Skerra等人1991,Anal Biochem 196:151-155。进行一些改进。

[0449] 将表达Fab变体文库的大肠杆菌菌落生长在含LB琼脂和葡萄糖的培替氏培养皿上的滤纸上。平行地,用靶蛋白(IL-17A)涂覆PVDF膜。将涂覆的膜置于琼脂平板上。将具有表达Fab片段的大肠杆菌的菌落的滤纸置于膜的顶部。由细胞表达的Fab片段从菌落扩散并结合靶IL-17A。随后使用缀合有碱性磷酸酶的第二抗体进行Western染色来检测如此捕获在PVDF膜上的Fab片段。先前已使用XAB1作为参照建立了用于仅选择具有增强的结合性质的变体的条件。

[0450] 更具体地,在用文库转化大肠杆菌细胞后,将细胞涂铺在置于含LB琼脂+1%葡萄糖+目标抗生素的培替氏培养皿上的Durapore™薄膜滤纸(0.22 μ m GV, **Millipore®**, cat# GVWP09050)上。将板在30℃孵育过夜。

[0451] 将PVDF膜(Immobilon-P, **Millipore®**, cat#IPVH08100)在甲醇中预湿润,于PBS中洗涤,并用1 μ g/ml的PBS中的huIL-17A溶液包被。将膜在室温孵育过夜。涂覆后,将膜在Tris缓冲盐水(TBS)+0.05%Tween(TBST)中洗涤2次,随后在5% milk TBST中在室温下封闭2小时。随后,在TBST中洗涤膜4次,并将其在含有1mM IPTG的2xYT培养基中浸透。将该膜(称为捕获膜)置于含有1mM IPTG+目标抗生素的LB琼脂板上,随后用具有菌落的Durapore膜在顶部覆盖其。将所得的夹层在30℃下孵育4小时。

[0452] 在该孵育后,用TBST洗涤捕获膜4次,随后将其在室温下于5% milk TBST中封闭1小时。随后,用TBST洗涤膜1次,随后用第二抗体(缀合有碱性磷酸酶(AP)的抗-hu_kapp轻链抗体, Sigma#A3813,以1:5000稀释于2% milk TBST中)在室温孵育1小时。随后,将膜TBST中洗涤4次,于TBS中洗涤一次,随后将其在底物溶液(SigmaFast BCIP/NBT片剂, 10ml H₂O中1

片)中孵育。当信号达到预期强度时,用水洗涤膜,随后使其干燥。

[0453] 在捕获膜上的信号显影后,挑拣提供比亲代XAB1强的信号的菌落,并将其继续进行如下所述的第二ELISA筛选。

[0454] 2) ELISA筛选:

[0455] 在CFS后,将ELISA用于筛选通过CFS选择的候选者。简言之,对于通过易错PCR诱变鉴定的相对少的数量的变体(即文库A),在96孔格式中手工进行ELISA。相反地,对于通过合理设计构建的文库(方法B),需要在ELISA水平上筛选更大量的改良的克隆,以能够区分它们对IL-17A的结合亲和力的不同和鉴定具有最高亲和力的克隆。将ELISA机器人在384孔板格式中用于该目的。然而,在每一种情况下ELISA方案是相同的,唯一的差异是试剂的体积。

[0456] a) 细胞培养:

[0457] 首先将克隆在30℃、900rpm下于2xYT培养基+1%葡萄糖+目标抗生素中生长过夜。含有这些培养物的板被称为原始板(master plate)。第二天,将来自原始板的培养物的等分转移至含有2xYT培养基+0.1%葡萄糖+目标抗生素的表达板中。将这些板在30℃、900rpm下孵育约3小时。随后添加异丙基β-D-1-硫代半乳糖苷(IPTG)溶液直至0.5mM的终浓度。将板30℃、990rpm下孵育过夜。

[0458] 第二天,将裂解缓冲液(2x)硼酸盐缓冲盐水(BBS)(Teknova#B0205)+2.5mg/ml溶菌酶+10u/ml Benzonase)添加至培养物中。将板在室温孵育1小时,随后添加12.5% milk TBST以进行封闭。在30分钟孵育后,将细胞裂解物在2% milk TBST中以1:10稀释,随后转移至ELISA板中。

[0459] b) ELISA:

[0460] 在1小时中用1μg/ml的huIL-17A溶液包被ELISA板(Nunc Maxisorp)。用TBST洗涤板1次,随后用5% milk TBST封闭1小时。封闭后,用TBST洗涤板3次,随后在板上加载稀释的细胞裂解物,并孵育1小时。随后,用TBST洗涤板3次,并用缀合有AP的第二抗体孵育1小时。

[0461] 最后用TBST洗涤板3次,随后用底物溶液(AttoPhos substrate Set,Roche#11681 982 001)进行孵育。在室温下进行整个过程。

[0462] 除了上述“经典”ELISA以外,还可为了更好地区分对于靶蛋白具有非常高的亲和力(在皮摩尔范围内)的克隆,还进行改良ELISA。“离解率”ELISA(“off-rate”ELISA)和“竞争性”ELISA被开发来用于该目的,如下文中详述的。

[0463] c) “离解率”ELISA:

[0464] 对于该测定,相较于“经典”ELISA的修改涉及在结合步骤(在ELISA板中的细胞孵育)后的洗涤步骤。在“经典”方案中,用TBST洗涤板3次。分配洗涤溶液并立即吸出,不留任何孵育时间。对于“离解率”ELISA,在至少3小时的过程中洗涤板6次。该长洗涤增加了测定的严格度,从而允许鉴定具有低离解率的克隆。

[0465] d) “竞争性”ELISA:

[0466] 该改良ELISA方案包括在结合步骤后的额外步骤。在孵育细胞裂解物后,用TBST洗涤板3次,随后在室温下孵育亲代XAB1的溶液(200nM,于2% milk TBST中),进行过夜。该利用过量亲代Fab的长孵育允许(如在“离解率”ELISA的情况下)鉴定具有低离解率的克隆,这导致更好地区分具有皮摩尔范围内的亲和力的克隆。方案的其余部分与“经典”ELISA方案相似。该情况下使用的第二抗体为缀合有AP的抗-Flag标签抗体,因为来自文库的Fab变体

在重链的C末端上具有Flag标签,但用于竞争的亲代XAB1 Fab不具有Flag标签。

[0467] (iii) 候选者的表征

[0468] 在更大的规模上产生在筛选过程中鉴定的命中,以用于在另外的测定中进行进一步物理化学表征和确认对IL-17A的高亲和力结合,和/或其它有利的性质。这些在下文中进行了更详细地描述。

[0469] (iv) 结果:在XAB1的亲和力成熟后筛选和初步表征候选者

[0470] 1) 随机诱变法(方法A):

[0471] 发现易错PCR文库产生后的突变率在每基因2至3个突变时达到峰值。通过菌落过滤筛选,筛选了约 3×10^4 个克隆,94个克隆被鉴定为改良的,并且允许继续进行结合ELISA、离解率ELISA和竞争性ELISA。与测序结果组合的ELISA数据导致6个候选者的鉴定,所述候选者突出显示用于改良的3个替代热点:LCDR1中的位置28上的Gly至Val (G28V)、框架3中位置66上的Gly至Val (G66V) 或Ser (G66S)、LCDR3中Asn92至Asp (N92D) (数据未显示,但定位与XAB2, VL (即SEQ ID NO:25) 的相同)。

[0472] 终止密码子在所述克隆中的一个中被观察,但没有关系,因为所使用的大肠杆菌菌株是允许通读的琥珀抑制子菌株。基于获得的数据,G28V和G66V突变似乎引起最佳改良。通过标准分子生物学技术产生具有2个提及的点突变的XAB1的变体。克隆此外还具有N92D取代的其它变体,以测试潜在的翻译后脱酰胺位点 (N92, S93) 的去除是否是有益的。对这两个变体,特别是称为XAB_A2 (其最终导致XAB2) 的三重突变变体进行更详细的表征。在XAB2中,根据Kabat界定的氨基酸编号1至23构成框架1,氨基酸编号24至34 (Kabat) 构成LCDR1,氨基酸编号35至49 (Kabat) 构成框架2,氨基酸50至56 (Kabat) 构成LCDR2,氨基酸57至88 (Kabat) 构成框架3,氨基酸编号89至97 (Kabat) 构成LCDR3以及,氨基酸98至107 (Kabat) 构成框架4。还对根据本公开内容的实施方案的其它VL序列应用相同的细分。

[0473] 因此,上面提及的G66V取代存在于框架区中,所述框架区被称为外环。该框架区能够在一些情况下贡献结合。基于可获得的结构信息,有人回顾性地建议,该突变的确可能能够与不能从晶体结构解析但可靠近外环的IL-17A的区域相互作用。

[0474] 2) 合理诱变法(方法B):

[0475] 通过32个随机挑拣的成员的测序产生随机化位置上的氨基酸分布的快照。不存在显著的偏倚性,尽管不能对该少量的序列进行统计。筛选约 4×10^4 个克隆,这对8000的论文库大小进行了过取样。大量命中被鉴定,并且2630个克隆被允许继续进行ELISA筛选。通过进行结合ELISA、离解率ELISA和竞争性ELISA,对60个具有最高改良的克隆进行测序。在这60个克隆中,发现22个独特的序列,并且结果概述于表11中。

[0476] 表11. 所有选择的22个独特候选者的ELISA。将值针对亲代Fab XAB1进行标准化。

[0477] 该代表表示某一序列在60个命中内被发现的频率。在最后3栏中给出氨基酸序列的差异。

[0478] XAB1在那些位置上具有氨基酸ISA。从来自大肠杆菌的Fab表达表达产物的粗制提取物测定ELISA信号。

[0479]

候选者 名称	经典 ELISA	离解 率 ELISA	竞争性 ELISA	代表 %	30	31	32
MB491	2.1	43.0	44.2	5	F	F	W
MB483	3.1	47.1	45.2	2	F	W	T
MB447	3.0	45.5	57.0	5	F	W	W
MB457	2.7	34.7	41.0	5	I	W	S
MB464	2.7	34.9	36.9	7	I	Y	Q
MB432	2.3	44.2	37.3	12	L	F	A
MB454	2.9	34.2	36.6	2	L	W	A

[0480]

MB444	3.2	48.9	52.4	2	L	W	E
MB456	2.4	45.1	46.7	2	L	W	H
MB440	2.8	52.5	54.0	5	L	W	Q
MB450	2.9	41.5	53.3	5	M	W	W
MB435	2.7	44.7	44.6	2	N	W	E
MB438	2.7	41.5	41.1	7	P	Y	A
MB453	2.7	43.3	46.4	9	V	F	W
MB448	2.9	40.4	51.5	5	V	W	M
MB486	1.9	58.5	64.9	2	W	W	M
MB434	2.4	44.4	39.5	7	W	W	Y
MB458	2.7	33.0	42.1	5	W	Y	Q
MB463	2.7	34.2	31.6	2	Y	F	E
MB468	2.8	43.9	60.0	5	Y	W	E
MB433	2.3	39.7	29.3	2	Y	W	G
MB461	2.9	49.8	62.8	2	Y	W	T

[0481] 在22个独特的克隆中,6个被选择用于0.5L规模的标准大肠杆菌表达,并通过IMAC (Ni-NTA) 和SEC进行两步骤纯化。随后将纯化的Fab用于通过ELISA确认结合的增强。

[0482] 所选择的和纯化的Fab候选者相较于XAB1的ELISA结果示于图3中,其中图的编号如下对应于候选者名称:1为MB440;2为MB464;3为MB468;4为MB444;5为MB435;6为MB463;7为XAB1。

[0483] 图3A是显示标准化的信号对比Fab浓度(M)的曲线图。可看到,所有选择的克隆都导致比XAB1更高的信号。图3B是显示标准化的剩余信号对比洗涤孵育时间(小时)的曲线图。所有选择的克隆都导致比XAB1更高的信号。图3C是显示标准化的信号对比Fab竞争剂浓度(M)的曲线图。再次地,可看到,所有选择的克隆都导致比XAB1更高的信号。

[0484] 实施例4. 靶向潜在的翻译后脱酰胺位点

[0485] 本发明人假设后接甘氨酸的天冬酰胺的氨基酸基序 (NG) 或在更低程度上当后接丝氨酸时的氨基酸基序 (NS) 可易于进行翻译后脱酰胺。此类基序存在于抗体XAB1的L-CDR2 (位置56/57) 和L-CDR3 (92/93) 中。产生四个IgG变体以测试是否可除去NG位点而不影响结合和活性性质。通过标准分子生物学方法克隆这四个点突变变体, 并通过以100ml规模进行HEK细胞的标准瞬时转染来产生所述变体, 随后通过蛋白A柱纯化其。

[0486] 在体外中和测定 (例如如实施例12和13中描述的) 中分析纯化的IgG变体, 以将它们的活性与亲代XAB1 IgG相比较。结果显示这4个变体中有3个具有降低的活性。但候选者XAB_B12 (突变N56Q) 相较于亲代XAB1保持活性。

[0487] 表12. 对XAB1的序列修饰以及在体外中和的相应作用的概述

[0488]

Kabat CDR			L-CDR2									IC50(nM)	
残基编号	Kabat 编号		50	51	52	53	54	55	56	57		Hu IL-6 sec	Hu IL-8 sec
IgG 变体 一般名称													
XAB1	XAB1	Y	D	A	S	S	L	E	N	G		4	3
XAB_G57T	XAB_A6	Y	D	A	S	S	L	E	N	T		22	23
XAB_N56Q	XAB_B12	Y	D	A	S	S	L	E	Q	G		2	3
XAB_N56T	XAB_B13	Y	D	A	S	S	L	E	T	G		11	15
XAB_N56S	XAB_B14	Y	D	A	S	S	L	E	S	G		13	17

[0489] 从而在已鉴定最适合的取代后, 将其引入在亲和力成熟过程中鉴定的最有希望的命中, 从而导致XAB2 (XAB_A2 N56Q)、XAB3 (MB468 N56Q)、XAB4 (MB435 N56Q)。通过HEK细胞的标准瞬时转染来产生它们 (连同仍然具有NG位点的XAB5 (MB435)), 并通过蛋白A柱进行纯化。

[0490] XAB2、XAB3、XAB4的NG基序 (N56Q) 被除去, 但NG仍然存在于XAB5中。在XAB2中除去L-CDR3中的NS基序 (N92D), 如在随机亲和力成熟方法过程中发现的。因此, 最佳的一组变体可获得用于测试潜在位点的脱酰胺的易感性。

[0491] 将4个纯化的候选者稀释于缓冲液pH8中, 并在40℃孵育以迫使脱酰胺反应发生。按照本领域普通技术人员公知的原理, 在几个时间点上采集等分来利用阳离子交换层析 (CEX) 测定脱酰胺的程度, 并且通过基于细胞的测定来测定体外中和活性 (例如如实施例12和13中所描述的)。

[0492] CEX结果显示随时间推移酸性变体的百分比的增加, 如对于任何IgG所预期的, 这可能归因于抗体框架中的翻译后修饰位点, 但增加的程度对于XAB5比对于其它候选者高, 即1周后72%对比46%以及4周后94%对比83%。最后, 体外中和活性测定结果与CEX结果相关, 显示XAB5在强制脱酰胺条件过程中在4周孵育后丧失活性。将本领域普通技术人员公知

的尺寸排阻层析-多角度光散射法 (SEC-MALS) 用于监测样品中的聚集水平。

[0493] 数据概述于表13中。

[0494] 表13.通过SEC-MALS、体外中和活性和CEX进行的分析

[0495]

抗体	M ^{a)} [%]	EC ₅₀ ^{b)} [ng/ml]	CEX ^{c)} [%]	M ^{a)} [%]	EC ₅₀ ^{b)} [ng/ml]	CEX ^{c)} [%]
T= 0 周				T= 1 周		
XAB2	99	45	15	98	n.d.	45
XAB3	99	40	14	98	n.d.	44
XAB5	99	45	18	98	n.d.	72
XAB4	99	48	15	98	n.d.	48
抗体	M ^{a)} [%]	EC ₅₀ ^{b)} [ng/ml]	CEX ^{c)} [%]	NG ^{d)} 位点	NS ^{d)} 位点	
T= 4 周						
XAB2	95	47	85	0	0	
XAB3	97	40	81	0	1	
XAB5	94	61	94	1	1	
XAB4	94	47	84	0	1	

[0496] ^{a)}通过SEC-MALS分析的单体,^{b)}在利用80ng/ml IL-17的细胞刺激后

[0497] IL-6分泌的抑制,^{c)}通过交换层析分析的酸性变体,

[0498] ^{d)}CDR (未考虑框架区) 中的位点数。

[0499] 这些数据表明潜在的翻译后脱酰胺位点的成功去除,所述位点可对抗体活性具有影响。这是有利的,因为XAB2、XAB3和XAB4从而可能达到比XAB1更均一的产物,因为在生产或贮藏过程中不能发生翻译后脱酰胺来影响抗体活性。

[0500] 实施例5.通过亲和力和成熟衍生的抗体变体XAB2的X射线分析

[0501] 简言之,按照本领域普通技术人员公知的原理,克隆XAB2 Fv,并将其在大肠杆菌 TGf1-中表达为在重链上具有C末端六组氨酸标签和在轻链上具有C末端Strep标签。通过Ni-螯合层析和尺寸排阻层析 (SPX-75) 纯化重组蛋白。

[0502] 随后使用标准方法制备XAB2 Fv片段与人IL-17A的复合物。简言之,将人IL-17A (1.5mg) 与过量的XAB2 Fv (3.7mg) 混合,随后在S100尺寸排阻层析上于10mM TRIS pH 7.4, 25mM NaCl中运行复合物。随后通过超滤将蛋白质复合物浓缩至26.3mg/ml,并使其结晶。

[0503] 进行标准结晶方案。简言之,使用坐式滴蒸气扩散法在SD2 96孔板中于19℃下生长晶体。将蛋白质原液与含有0.2M醋酸钙、20%PEG 3,350的结晶缓冲液以1:1混合。总的滴大小为0.4μl。在X射线数据采集前,将一个晶体迅速转移至结晶缓冲液与30%PEG 3,350,

30%甘油的1:1混合物中,随后于液氮中快速冷冻。

[0504] 使用标准方案进行X射线数据采集和处理。简言之,使用**1.0000Å**X射线辐射,利用MAR225 CCD检测器在瑞士光源,Beamline X06DA下采集达到**2.0Å**分辨率的X射线数据。在190mm的晶体至检测器的距离上总共记录了360幅每次0.5°的振荡的图像,并且利用XDS软件包处理所述图像。晶体属于空间群P2₁2₁2 (具有晶胞参数

a=184.72Å, b=55.56Å, c=71.11Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$)。达到**2.0Å**分辨率的R_{-sym}为5.2%并且数据完整性为100.0%。

[0505] 由于XAB2 Fv复合物的晶体与XAB1 Fv复合物的晶体(实施例2)高度同晶,因此将后者的结构用作输入模型以利用程序CNX进行晶体学精修的初始运行。利用Coot(面向晶体对象的工具箱)和CNX(晶体与核磁共振探测器)2002版进行迭代模型的建立和精修,直至不能对晶体图模型作进一步的显著改进。所有数据的最终R因子和自由R因子分别为0.214和0.259。最终改进的模型显示分别为**0.005Å**和0.9°的来自理想的键长和键角的均方根偏差(RMSD)。

[0506] 结果

[0507] XAB2 Fv与人IL-17A的复合物的X射线精修的结果提供于表14中并且该复合物的三维结构示于图4中。X射线晶体学分析确认了,变异抗体XAB2保留靶特异性并且以高亲和力结合基本上与亲代XAB1抗体结合的表位相同的表位。然而,在XAB1复合物的结构中,包含Gly66的轻链环采用当该残基被突变成缬氨酸时便不再可能的构象。因此,在XAB2复合物中,Gly66至缬氨酸的突变(G66V)迫使环采用新的构象,并且缬氨酸侧链与IL-17A的Ile51疏水性接触(图5)。还有两个IL-17A残基Pro42和Arg43在该晶体结构中变得可见(有序的)。这些抗原残基与XAB2抗体产生额外的结合相互作用,特别地对Val28的疏水性接触(图5)。

[0508] 表14. 通过程序CNX获得的XAB2 Fv与IL-17A的复合物的X射线精修

	注释 3	
	注释 3	精修。
	注释 3	程序 : CNX 2002
	注释 3	作者 : Brunger, Adams, Clore, Delano,
	注释 3	Gros, Grosse-Kunstleve, Jiang,
	注释 3	Kuszewski, Nilges, Pannu, Read,
	注释 3	Rice, Simonson, Warren
	注释 3	和
	注释 3	Accelrys Inc.,
[0509]	注释 3	(Badger, Berard, Kumar, Szalma,
	注释 3	Yip, Dzakula).
	注释 3	
	注释 3	用于精修的数据。
	注释 3	分辨率范围高(埃): 2.00
	注释 3	分辨率范围低(埃): 71.11
	注释 3	数据截断值
	注释 3	数据截断值高
	注释 3	数据截断值低
	注释 3	完整性(工作+测试)(%): 99.8

注释 3 反射次数 : 50409
 注释 3
 注释 3 拟合用于精修的数据。
 注释 3 交叉验证法 : 自始至终
 注释 3 自由 R 值测试集选择 : 随机
 注释 3 R 值 (工作集): 0.214
 注释 3 自由 R 值 : 0.259
 注释 3 自由 R 值测试集大小 (%): 5.0
 注释 3 自由 R 值测试集计数 : 2521
 注释 3 自由 R 值的估计的误差 : 0.005
 注释 3
 注释 3 最高分辨率箱中的拟合。
 注释 3 所使用的箱的总数 : 6
 注释 3 箱分辨率范围高 (A): 2.00
 注释 3 箱分辨率范围低 (A): 2.13
 注释 3 箱完整性 (工作 + 测试) (%): 100.0
 注释 3 箱中的反射 (工作集): 7858
 注释 3 箱 R 值 (工作集): 0.262
 注释 3 箱自由 R 值 : 0.304
 注释 3 箱自由 R 值测试集大小 (%): 5.0
 注释 3 箱自由 R 值测试集计数 : 414
 注释 3 估计的箱自由 R 值的误差 : 0.015
 注释 3
 注释 3 精修中使用的非氢原子的数目。
 注释 3 蛋白质原子 : 5055
 注释 3 核酸原子 : 0
 注释 3 杂原子 : 0
 注释 3 溶剂原子 : 376
 注释 3
 [0510] 注释 3 B 值。
 注释 3 来自威尔逊曲线 (A**2): 27.8
 注释 3 平均 B 值 (整体, A**2): 37.3
 注释 3 整体各向异性 B 值。
 注释 3 B11 (A**2): -0.85
 注释 3 B22 (A**2): 3.93
 注释 3 B33 (A**2): -3.08
 注释 3 B12 (A**2): 0.00
 注释 3 B13 (A**2): 0.00
 注释 3 B23 (A**2): 0.00
 注释 3
 注释 3 大包装溶剂建模。
 注释 3 所使用的方法 : 平面模型
 注释 3 KSOL : 0.338594
 注释 3 BSOL : 46.0594 (A**2)
 注释 3
 注释 3 估计的坐标值误差。
 注释 3 来自 LUZZATI 曲线的 ESD (A): 0.25
 注释 3 来自 SIGMAA 的 ESD (A): 0.19
 注释 3 低分辨率截断值 (A): 5.00
 注释 3
 注释 3 交叉验证的估计的坐标值误差
 注释 3 来自 C-V LUZZATI 曲线的 ESD (A): 0.31
 注释 3 来自 C-V SIGMAA 的 ESD (A): 0.22
 注释 3
 注释 3 理想值的均方根偏差。
 注释 3 键长 (A): 0.005
 注释 3 键角 (度): 0.9
 注释 3 二面角 (度): 21.0
 注释 3 不适当的角度 (度): 0.70
 注释 3

注释 3 各向同性热模型：受约束的
 注释 3
 注释 3 各向同性热因子约束。 RMS SIGMA
 注释 3 主链键 (A**2): 1.49; 1.50
 注释 3 主链角 (A**2): 2.44; 2.00
 注释 3 侧链键 (A**2): 1.95; 2.00
 注释 3 侧链角 (A**2): 2.93; 2.50
 注释 3
 注释 3 NCS 模型：无
 注释 3
 注释 3 NCS 约束 RMS SIGMA/WEIGHT
 注释 3 组 1 位置 (A): 无 ; 无
 注释 3 组 1 B- 因子 (A**2): 无 ; 无
 注释 3
 注释 3 参数文件 1 : protein_rep.param
 注释 3 参数文件 2 : water_rep.param
 注释 3 参数文件 3 : ion.param
 注释 3 拓扑学文件 1 : protein.top
 注释 3 拓扑学文件 2 : water.top
 注释 3 拓扑学文件 4 : ion.top
 注释 3
 注释 3 其它精修注释：无
 二硫键 1 CYS L 23 CYS L 88
 二硫键 2 CYS H 22 CYS H 96
 二硫键 3 CYS A 23 CYS A 88
 二硫键 4 CYS B 22 CYS B 96
 二硫键 5 CYS C 94 CYS C 144
 二硫键 6 CYS C 99 CYS C 146
 二硫键 7 CYS D 94 CYS D 144
 二硫键 8 CYS D 99 CYS D 146
 CRYST1 184.719 55.558 71.109 90.00 90.00 90.00 P 21 21 2 24
 ORIGX1 1.000000 0.000000 0.000000 0.000000
 ORIGX2 0.000000 1.000000 0.000000 0.000000
 ORIGX3 0.000000 0.000000 1.000000 0.000000
 SCALE1 0.005414 0.000000 0.000000 0.000000
 SCALE2 0.000000 0.017999 0.000000 0.000000
 SCALE3 0.000000 0.000000 0.014063 0.000000

[0511] 图4提供XAB2 Fv与人IL-17A的复合物的三维结构。图4A显示以空间充填描绘表示的2个XAB2 Fv片段,IL-17A同二聚体以卡通描绘来显示。图4B显示以卡通描绘表示的2个XAB2 Fv片段,IL-17A同二聚体以空间充填描绘来显示。XAB2 Fv的重链和轻链分别以深灰色和浅灰色来显示。IL-17A同二聚体的一条链以浅灰色显示,另一条链以深灰色显示。

[0512] 图5以抗体L-CDR1和外环区(具有甘氨酸至缬氨酸的突变(分别为G28V和G66V))的近视图的形式提供XAB2 Fv与人IL-17A的复合物的三维结构。G66V突变导致外环构象的变化,以及导致与IL-17A残基Pro42、Arg43和Ile51的额外抗体-抗原接触。XAB2 Fv以浅灰色卡通来表示,而人IL-17A同二聚体以更深色调的灰色来表示。Ile51与Pro42和Arg43不属于相同的IL-17A亚单位。

[0513] 实施例6.通过亲和力和成熟衍生的抗体变体XAB5的X射线分析

[0514] 克隆XAB5 Fv,并将其在大肠杆菌TGf1-中表达为在重链上具有C末端六组氨酸标签和在轻链上具有C末端Strep标签。通过Ni-螯合层析,随后通过在SPX-75柱上于PBS缓冲液中进行尺寸排阻层析来纯化重组蛋白。LC-MS分析显示预期的重链的质量(13703.4Da)以及存在2种形式的轻链:全长形式(115aa;12627.3Da;ca.27%)和具有截断的Strep-标签的形式(A1至Q112;12222.8Da;ca.73%)。

[0515] 随后使用标准方法制备XAB5 Fv片段与人IL-17A的复合物。简言之,将人IL-17A(1.4mg)与过量的XAB5 Fv(3.4mg)混合,随后在S100尺寸排阻层析上于10mM TRIS pH 7.4, 25mM NaCl中运行复合物。随后通过超滤将蛋白质复合物浓缩至16.5mg/ml,并使其结晶。

[0517] 进行标准结晶方案。简言之,使用坐式滴蒸气扩散法在SD2 96孔板中于19℃下生长晶体。将蛋白质原液与含有15%PEG 5,000MME,0.1M MES pH 6.5,0.2M硫酸铵的结晶缓冲液以1:1混合。总的滴大小为0.4 μ l。在X射线数据采集前,将一个晶体迅速转移至结晶缓冲液与20%PEG5,000MME,40%甘油的1:1混合物中,随后于液氮中快速冷冻。

[0518] 使用标准方案进行X射线数据采集和处理。简言之,使用**1.0000Å**X射线辐射,利用Pilatus检测器在瑞士光源,Beamline X10SA下采集达到**3.1Å**分辨率的X射线数据。在520mm的晶体至检测器的距离上总共记录了720幅每次0.25°的振荡的图像,并且利用XDS软件包处理所述图像。晶体属于空间群C222₁(具有晶胞参数

a=55.37Å, b=84.08Å, c=156.35Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$)。达到**3.1Å**分辨率的R-sym为8.9%并且数据完整性为99.7%。

[0519] 使用从先前测定的XAB2 Fv复合物产生的搜索模型,利用程序Phaser通过分子置换法测定结构。利用Coot(面向晶体对象的工具箱)和CNX(晶体与核磁共振探测器)2002版进行迭代模型的校正和精修,直至不能对晶体模型作进一步的显著改进。所有数据的最终R因子和自由R因子分别为0.222和0.305。最终改进的模型显示分别为**0.008Å**和1.2°的来自理想的键长和键角的均方根偏差(RMSD)。

[0520] 结果

[0521] XAB5 Fv与人IL-17A的复合物的X射线精修提供于表15中并且该复合物的三维结构示于图6中。在该晶体结构中,XAB5 Fv复合物具有精确的晶体学2重对称性:晶体的不对称单元仅含有完整二聚体复合物的一半。XAB5 Fv与两个IL-17A亚单位都接触,但绝大部分的分子间接触是只针对一个亚单位(约90%的被XAB5 Fv包埋的IL-17A的表面由一个IL-17A亚单位贡献)。X射线晶体学分析确认了,变异抗体XAB5保留靶特异性并且以高亲和力结合基本上与亲代XAB1抗体结合的表位相同的表位。然而,在XAB5复合物的结构中,轻链CDRL1具有提供增强的对人IL-17A的结合的3个点突变。XAB5轻链的Trp 31参与与IL-17A的Tyr 85的强疏水/芳香相互作用以及在更低的程度上,与IL-17A的Phe 133的相互作用。XAB5轻链的Asn 30为IL-17A的Pro 130的主链羰基提供氢键,并且以范德瓦尔斯力与Leu 49(相同的IL-17A亚单位)和Val 45(另一个IL-17A亚单位)接触。XAB5轻链的Glu 32通过分子内氢键相互作用稳定CDRL1环。此外,Glu 32与IL-17A的Arg 124产生有利的静电相互作用,但不参与“头-对-头”盐桥相互作用(图7)。

[0522] 表15.通过程序CNX获得的XAB5 Fv与IL-17A的复合物的X射线精修

[0523]

注释 3
 注释 3 精修。
 注释 3 程序 : CNX 2002
 注释 3 作者 : Brunger, Adams, Clore, Delano,
 注释 3 Gros, Grosse-Kunstleve, Jiang,
 注释 3 Kuszewski, Nilges, Pannu, Read,
 注释 3 Rice, Simonson, Warren
 注释 3 and
 注释 3 Accelrys Inc.,
 注释 3 (Badger, Berard, Kumar, Szalma,
 注释 3 Yip, Dzakula).
 注释 3
 注释 3 用于精修的数据。
 注释 3 分辨率范围高 (埃): 3.11
 注释 3 分辨率范围低 (埃): 46.25
 注释 3 数据截断值 (SIGMA(F)): 0.0
 注释 3 数据截断值 高 (ABS(F)): 3778977.84
 注释 3 数据截断值 低 (ABS(F)): 0.000000
 注释 3 完整性 (工作 + 测试) (%): 99.0
 注释 3 反射次数 : 6801
 注释 3
 注释 3 拟合用于精修的数据。
 注释 3 交叉验证法 : 自始至终
 注释 3 自由 R 值测试集选择 : 随机
 注释 3 R 值 (工作集): 0.222
 注释 3 自由 R 值 : 0.305
 注释 3 自由 R 值测试集大小 (%): 5.0
 注释 3 自由 R 值测试集计数 : 340
 注释 3 自由 R 值的估计的误差 : 0.017
 注释 3
 注释 3 最高分辨率箱中的拟合。
 注释 3 所使用的箱的总数 : 6
 注释 3 箱分辨率范围高 (A): 3.10
 注释 3 箱分辨率范围低 (A): 3.29
 注释 3 箱完整性 (工作 + 测试) (%): 89.9
 注释 3 箱中的反射 (工作集): 961
 注释 3 箱 R 值 (工作集): 0.293
 注释 3 箱自由 R 值 : 0.403
 注释 3 箱自由 R 值测试集大小 (%): 4.9
 注释 3 箱自由 R 值测试集计数 : 50
 注释 3 估计的箱自由 R 值误差 : 0.057
 注释 3
 注释 3 精修中使用的非氢原子的数目。
 注释 3 蛋白质原子 : 2492
 注释 3 核酸原子 : 0
 注释 3 杂原子 : 5
 注释 3 溶剂原子 : 4
 注释 3
 注释 3 B 值。
 注释 3 来自威尔逊曲线 (A**2): 85.2
 注释 3 平均 B 值 (整体, A**2): 71.0
 注释 3 整体各向异性 B 值。
 注释 3 B11 (A**2): 23.21
 注释 3 B22 (A**2): 7.23
 注释 3 B33 (A**2): -30.44
 注释 3 B12 (A**2): 0.00
 注释 3 B13 (A**2): 0.00

注释 3 B23 (A**2): 0.00
 注释 3
 注释 3 大包装溶剂建模。
 注释 3 所使用的方法: 平面模型
 注释 3 KSOL : 0.389339
 注释 3 BSOL : 59.5295 (A**2)
 注释 3
 注释 3 估计的坐标值误差。
 注释 3 来自 LUZZATI 曲线的 ESD (A): 0.35
 注释 3 来自 SIGMAA 的 ESD (A): 0.42
 注释 3 低分辨率截断值 (A): 5.00
 注释 3
 注释 3 交叉验证的估计的坐标值误差。
 注释 3 来自 C-V LUZZATI 曲线的 ESD (A): 0.51
 注释 3 来自 C-V SIGMAA 的 ESD (A): 0.45
 注释 3
 注释 3 来自理想值的 RMS 的差异。
 注释 3 键长 (A): 0.008
 注释 3 键角 (度): 1.2
 注释 3 二面角 (度): 23.1
 注释 3 不适当的角度 (度): 0.73
 注释 3
 注释 3 各向同性热模型: 受约束的
 注释 3
 注释 3 各向同性热因子约束. RMS SIGMA
 注释 3 主链键 (A**2): 1.40; 1.50
 注释 3 主链角 (A**2): 2.49; 2.00
 注释 3 侧链键 (A**2): 1.82; 2.00
 注释 3 侧链角 (A**2): 2.93; 2.50
 注释 3
 注释 3 NCS 模型: 无
 注释 3
 注释 3 NCS 约束 RMS SIGMA/WEIGHT
 注释 3 组 1 位置 (A): 无; 无
 注释 3 组 1 B- 因子 (A**2): 无; 无
 注释 3
 注释 3 参数文件 1 : protein_rep.param
 注释 3 参数文件 2 : water_rep.param
 注释 3 参数文件 3 : ion.param
 注释 3 拓扑学文件 1 : protein_no_cter.top
 注释 3 拓扑学文件 2 : water.top
 注释 3 拓扑学文件 4 : ion.top
 注释 3
 注释 3 其它精修注释: 无
 二硫键 1 CYS S 23 CYS S 88
 二硫键 2 CYS S 22 CYS S 96
 二硫键 3 CYS S 94 CYS S 144
 二硫键 4 CYS S 99 CYS S 146
 CRYST1 55.372 84.082 156.350 90.00 90.00 90.00 C 2 2 21 24
 ORIGX1 1.000000 0.000000 0.000000 0.000000
 ORIGX2 0.000000 1.000000 0.000000 0.000000
 ORIGX3 0.000000 0.000000 1.000000 0.000000
 SCALE1 0.018060 0.000000 0.000000 0.000000
 SCALE2 0.000000 0.011893 0.000000 0.000000
 SCALE3 0.000000 0.000000 0.006396 0.000000

[0525] 图6提供XAB5 Fv与人IL-17A的复合物的三维结构。此处显示具有精确的晶体学2重对称性的完整同二聚体复合物。图6A显示以空间充填描绘表示的2个XAB5 Fv片段, IL-

17A同二聚体以卡通描绘来显示。图6B显示以卡通描绘表示的2个XAB5 Fv片段,IL-17A同二聚体以空间充填描绘来显示。XAB5 Fv的重链和轻链分别以深灰色和浅灰色来显示。IL-17A同二聚体的一条链以浅灰色显示,另一条链以深灰色显示。

[0526] 图7提供XAB5 Fv与人IL-17A的复合物的三维结构。具有通过结构导向偏库法(biased library approach)发现的3个突变:Asn 30、Trp 31和Glu 32的抗体L-CDR1的近视图。这些XAB5侧链贡献新的与抗原人IL-17A,特别地与IL-17A残基Tyr85、Phe133、Arg124、Pro 130、Leu 49(全部来自相同的IL-17A亚单位)和Val 45(来自另一个IL-17A亚单位)的结合相互作用。

[0527] 实施例7.通过亲和力成熟衍生的抗体变体XAB4的X射线分析

[0528] 克隆XAB4 Fv,并将其在大肠杆菌TG1细胞中表达为在重链上具有C末端六组氨基酸标签和在轻链上具有C末端Strep标签。通过Ni-螯合层析纯化重组蛋白。

[0529] 随后使用标准方法制备XAB4 Fv片段与人IL-17A的复合物。简言之,将人IL-17A(0.5mg)与过量的XAB4 Fv(1.2mg)混合,随后在SPX-75尺寸排阻层析上于10mM TRIS pH 7.4,25mM NaCl中运行复合物。随后通过超滤将蛋白质复合物浓缩至6.9mg/ml,并使其结晶。

[0530] 进行标准结晶方案。简言之,使用悬滴蒸气扩散法在VDX 24孔板中于19℃下生长晶体。将蛋白质原液与含有15%PEG 5,000MME,0.1M MES pH 6.5,0.2M硫酸铵的结晶缓冲液以2:1混合。总的滴大小为3.0μl。在X射线数据采集前,将一个晶体迅速转移至结晶缓冲液与25%PEG5,000MME,20%甘油的1:1混合物中,随后于液氮中快速冷冻。

[0531] 使用标准方案进行X射线数据采集和处理。简言之,使用**0.99984Å**X射线辐射,利用Pilatus检测器在瑞士光源,BeamlineX10SA下采集达到**3.15Å**分辨率的X射线数据。在500mm的晶体至检测器的距离上总共记录了720幅每次0.25°的振荡的图像,并且利用XDS软件包处理所述图像。晶体属于空间群C222₁(具有晶胞参数

a=55.76Å、b=87.11Å、c=156.31Å、 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$)。达到**3.15Å**分辨率的R-sym为5.5%并且数据完整性为99.9%。

[0532] 由于XAB4 Fv复合物的晶体与XAB5 Fv复合物的晶体(实施例6)高度同晶,因此将后者的结构用作输入模型以利用程序Phaser通过分子置换进行结构测定。利用Coot(面向晶体对象的工具箱)和Autobuster 1.11.2版(Buster 2.11.2版)进行迭代模型的建立和精修,直至不能对晶体图模型作进一步的显著改进。所有数据的最终R因子和自由R因子分别为0.197和0.253。最终精修的模型显示分别为**0.009Å**和1.0°的来自理想的键长和键角的均方根偏差(RMSD)

[0533] (i) 结果

[0534] XAB4 Fv与人IL-17A的复合物的X射线精修的结果提供于表16中并且该复合物的三维结构示于图8中。在该晶体结构中,如在XAB5复合物(实施例6)中一样,XAB4 Fv复合物具有精确的晶体学2重对称性:晶体的不对称单元仅含有完整二聚体复合物的一半。XAB4 Fv与两个IL-17A亚单位都接触,但绝大部分的分子间接触是只针对一个亚单位(约93%的被一个XAB4 Fv包埋的IL-17A的表面由一个IL-17A亚单位贡献)。X射线晶体学分析确认了,变异抗体XAB4保留靶特异性并且以高亲和力结合基本上与亲代XAB1抗体结合的表位相同

的表位。然而,在XAB4复合物的结构中,如在XAB5中复合物的结构中一样,轻链CDRL1具有提供增强的对人IL-17A的结合的3个点突变。如已针对XAB5复合物(实施例6)所描述的,XAB4轻链的Trp 31参与与IL-17A的Tyr 85的强疏水/芳香堆积相互作用以及在更低的程度上,与IL-17A的Phe 133的相互作用。XAB4轻链的Asn 30为IL-17A的Pro 130的主链羰基提供氢键,并且以范德瓦尔斯力与Leu 49(相同的IL-17A亚单位)和Val 45(另一个IL-17A亚单位)接触。XAB4轻链的Glu 32通过分子内氢键相互作用稳定CDRL1环。此外,Glu 32与IL-17A的Arg 124产生有利的静电相互作用,但不参与“头-对-头”盐桥相互作用(图9)。作为被设计来除去潜在的脱酰胺位点的Asn至Gln的突变的结果,XAB4还与XAB1相异于轻链的位置56。X射线分析显示XAB4的Gln 56与蛋白质抗原残基Leu 76和Trp 90接触,并且减小Tyr 67和Ser 64的溶剂可及性(图10)。

[0535] 表16.通过程序Autobuster获得的XAB4 Fv与IL-17A的复合物的X射线精修

```

注释 3
注释 3 精修
注释 3 程序          : BUSTER 2.11.2
注释 3 作者          : BRICOGNE,BLANC,BRANDL,FLENSBURG,KELLER,
注释 3              : PACIOREK,ROVERSI,SHARFF,SMART,VONRHEIN,WOMACK;
注释 3              : MATTHEWS,TEN EYCK,TRONRUD
注释 3
注释 3 用于精修的数据.
注释 3 分辨率范围高 (埃): 3.15
注释 3 分辨率范围低 (埃): 78.15
注释 3 数据截断值      (SIGMA(F)): 0.0
注释 3 范围的完整性      (%) : 99.85
注释 3 反射次数          : 6881
注释 3
注释 3 拟合用于精修的数据.
注释 3 交叉验证法          : 自始至终
注释 3 自由 R 值测试集选择 : 随机
注释 3 R 值      (工作 + 测试集): 0.1998
注释 3 R 值      (工作集): 0.1972
[0536] 注释 3 自由 R 值          : 0.2531
注释 3 自由 R 值测试集大小 (%) : 5.01
注释 3 自由 R 值测试集计数      : 345
注释 3 自由 R 值的估计的误差      : NULL
注释 3
注释 3 最高分辨率箱中的拟合.
注释 3 所使用的箱的总数          : 5
注释 3 箱分辨率范围高 (埃): 3.15
注释 3 箱分辨率范围低 (埃): 3.52
注释 3 箱完整性 (工作 + 测试) (%) : 99.85
注释 3 箱中的反射 (工作 + 测试集): 1916
注释 3 箱 R 值 (工作 + 测试集): 0.2376
注释 3 箱中的反映 (工作集): 1820
注释 3 箱 R 值 (工作集): 0.2326
注释 3 箱自由 R 值: 0.3295
注释 3 箱自由 R 值测试集大小 (%) : 5.01
注释 3 箱自由 R 值测试集计数      : 96
注释 3 箱自由 R 值的估计的误差      : 无
注释 3

```

[0537]

```

注释 3 精修中使用的非氢原子的数目。
注释 3 蛋白质原子      : 2499
注释 3 核酸原子      : 0
注释 3 杂原子        : 5
注释 3 溶剂原子      : 0
注释 3
注释 3 B 值。
注释 3 来自威尔逊曲线      (A**2): 102.42
注释 3 平均 B 值      (整体, A**2): 124.95
注释 3 整体各向异性 B 值。
注释 3 B11 (A**2): -11.5511
注释 3 B22 (A**2): -28.0012
注释 3 B33 (A**2): 39.5523
注释 3 B12 (A**2): 0.0000
注释 3 B13 (A**2): 0.0000
注释 3 B23 (A**2): 0.0000
注释 3
注释 3 估计的坐标值误差。
注释 3 来自 LUZZATI 曲线的 ESD      (A): 0.787
注释 3 基于自由 R 值的 DPI (BLOW EQ-9)      (A): 0.474
注释 3
注释 3 参考资料: BLOW, D. (2002) ACTA CRYST D58, 792-797
注释 3
注释 3 相关系数。
注释 3 相关系数 F0-FC      : 0.9113
注释 3 相关系数自由 F0-FC : 0.8848
注释 3
注释 3 X 射线权重 : 20.89
注释 3
注释 3 几何函数。
注释 3 约束文库。
注释 3 使用的文库的数目 : 8
注释 3 文库      1 : protgeo_eh99.dat (V1.8) 20110121 STANDARD
注释 3      AMINO ACID DICTIONARY. BONDS AND ANGLES FROM
注释 3      ENGH AND HUBER EH99. OTHER VALUES BASED ON
注释 3      PREVIOUS TNT OR TAKEN FROM CCP4. INCLUDES
注释 3      HYDROGEN ATOMS.
注释 3 文库      2 : exoticaa.dat (V1.8) 20100430 COLLECTION OF
注释 3      NON-STANDARD AMINO ACIDS, MAINLY EH91 WITHOUT
注释 3      IDEAL DISTANCE INFO
注释 3 文库      3 : nuclgeo.dat (V1.14) 20091104
注释 3 文库      4 : bcorrel.dat (V1.15) 20080423
注释 3 文库      5 : contact.dat (V1.20.2.1) 20110510
注释 3 文库      6 : idealdist_contact.dat (V1.7) 20110119
注释 3      IDEAL-DISTANCE CONTACT TERM DATA AS USED IN
注释 3      PROLSQ. VALUES USED HERE ARE BASED ON THE REFMAC
注释 3      5.5 IMPLEMENTATION.
注释 3 文库      7 : restraints for SO4 (SULFATE ION) from cif
注释 3      dictionary SO4.cif using refrmactdict2tnt revision
注释 3      1.23.2.7; buster common-compounds v 1.0 (05 May
注释 3      2011)
注释 3 文库      8 : assume.dat (V1.10) 20110113
注释 3
注释 3 定义的几何函数项的数目 : 15
注释 3 项      计数      权重      函数。
注释 3 键长      : 2566 ; 2.00 ; 调和
注释 3 键角      : 3486 ; 2.00 ; 调和
注释 3 扭角      : 860 ; 2.00 ; 正弦
注释 3 三角型碳平面      : 61 ; 2.00 ; 调和
注释 3 普通平面      : 369 ; 5.00 ; 调和

```

注释 3 各向同性热因子: 2566; 20.00; 调和
 注释 3 坏的非键接触 : 无; 无; 无
 注释 3 不当扭转 : 无; 无; 无
 注释 3 假旋转角度 : 无; 无; 无
 注释 3 手性不当扭转 : 323; 5.00; 半调和
 注释 3 占据的总和 : 无; 无; 无
 注释 3 效用距离 : 无; 无; 无
 注释 3 效用角度 : 无; 无; 无
 注释 3 效用扭转 : 无; 无; 无
 注释 3 IDEAL-DIST 接触项 : 2984; 4.00; 半调和
 注释 3
 注释 3 理想值的均方根偏差 .
 注释 3 键长 (A): 0.009
 注释 3 键角 (度): 1.00
 注释 3 肽 ω 扭转角 (度): 4.39
 注释 3 其它扭转角 (度): 18.96
 注释 3
 注释 3 相似性 .
 注释 3 NCS.
 注释 3 NCS 表示: 无
 注释 3 靶约束 .
 注释 3 靶表示: LSSR
 注释 3 靶结构: xab5_il17a_complex_final_buster.pdb
 注释 3
 注释 3 TLS 详述
 注释 3 TLS 组的数目 : 3
 注释 3
 注释 3 TLS 组: 1
 注释 3 集合 : {H}*}
 注释 3 组 (A) 的起始: 10.9676 -8.7396 -10.1379
 注释 3 T 张量
 注释 3 T11: -0.1266 T22: 0.0257
 注释 3 T33: -0.2829 T12: -0.3040
 注释 3 T13: -0.0312 T23: 0.1050
 注释 3 L 张量
 注释 3 L11: 7.4496 L22: 4.4770
 注释 3 L33: 4.2880 L12: 1.1123
 注释 3 L13: -1.8044 L23: 3.0307
 注释 3 S 张量
 注释 3 S11: 0.2013 S12: 0.3070 S13: -0.5774
 注释 3 S21: 0.4752 S22: -0.5377 S23: 0.7096
 注释 3 S31: 1.0885 S32: -1.0885 S33: 0.3364
 注释 3
 注释 3 TLS 组: 2
 注释 3 集合 : {I}*}
 注释 3 组 (A) 的起源: 22.7365 0.7101 -35.1243
 注释 3 T 张量
 注释 3 T11: -0.1883 T22: 0.1529
 注释 3 T33: -0.3560 T12: 0.0318
 注释 3 T13: -0.1985 T23: 0.0144
 注释 3 L 张量
 注释 3 L11: 2.7494 L22: 9.3427
 注释 3 L33: 3.8648 L12: 0.8073
 注释 3 L13: -0.6650 L23: -2.0544
 注释 3 S 张量
 注释 3 S11: 0.0485 S12: 0.3188 S13: 0.0579
 注释 3 S21: 0.0595 S22: 0.1433 S23: 0.7000
 注释 3 S31: 0.0050 S32: -0.6066 S33: -0.1917
 注释 3
 注释 3 TLS 组: 3

[0538]

```

注释 3 集合 :{L|*}
注释 3 组 (A) 的起源: 33.2517 -11.1794 -14.2151
注释 3 T 张量
注释 3 T11: 0.0667 T22: -0.1645
注释 3 T33: -0.2360 T12: 0.1870
注释 3 T13: -0.2270 T23: -0.1209
注释 3 L 张量
注释 3 L11: 3.3694 L22: 3.7848
注释 3 L33: 8.8916 L12: -0.6497
注释 3 L13: -2.6132 L23: 0.8234
注释 3 S 张量
注释 3 S11: -0.0839 S12: -0.2629 S13: -0.1560
注释 3 S21: 0.3804 S22: 0.7574 S23: -0.5378
注释 3 S31: 1.0885 S32: 1.0885 S33: -0.6736
注释 3
[0539] 注释 3 精修注解.
注释 3 精修注解的数目: 1
注释 3 注解 1: IDEAL-DIST 接触长期接触装置。所有原子
注释 3 具有来自文库的 CCP4 原子类型
注释 3
注释 3 其它精修注释: 无
注释 3
二硫键 1 CYS H 22 CYS H 96 1555 1555 2.03
二硫键 2 CYS I 94 CYS I 144 1555 1555 2.05
二硫键 3 CYS I 99 CYS I 146 1555 1555 2.04
二硫键 4 CYS L 23 CYS L 88 1555 1555 2.07
CISPEP 1 TYR I 85 PRO I 86 0 3.67
CISPEP 2 GLU I 125 PRO I 126 0 -9.25
CISPEP 3 PRO I 126 PRO I 127 0 5.92
CISPEP 4 SER L 7 PRO L 8 0 -6.50
CISPEP 5 TYR L 94 PRO L 95 0 -6.52
CRYST1 55.760 87.109 156.306 90.00 90.00 90.00 C 2 2 21

```

[0540] 图8提供XAB4 Fv与人IL-17A的复合物的三维结构。图8A显示以空间充填描绘表示的2个XAB2 Fv片段,IL-17A同二聚体以卡通描绘来显示。图8B显示以卡通描绘表示的2个XAB2 Fv片段,IL-17A同二聚体以空间充填描绘来显示。XAB4 Fv的重链和轻链分别以深灰色和浅灰色来显示。IL-17A同二聚体的一条链以浅灰色显示,另一条链以深灰色显示。

[0541] 图9以抗体L-CDR1(具有通过结构导向偏库法发现的3个突变:Asn30、Trp 31和Glu 32)的近视图的形式提供XAB4 Fv与人IL-17A的复合物的三维结构。这些XAB4侧链贡献新的与抗原人IL-17A,特别地与IL-17A残基Tyr85、Phe133、Arg124、Pro 130、Leu 49(全部来自相同的IL-17A亚单位)和Val 45(来自另一个IL-17A亚单位)的结合相互作用。

[0542] 图10以显示Asn 56至Gln的突变的抗体L-CDR2的近视图的形式提供XAB4 Fv与人IL-17A的复合物的三维结构。该XAB4侧链贡献与IL-17A残基Trp 90和Leu 76的结合接触,并且减小Tyr 67和Ser 64(全部来自相同的IL-17A亚单位)的溶剂可及性。

[0543] 概括而言,X射线晶体学分析确认,被选择用于进一步分析的变异抗体保留它们的靶特异性并与高亲和力结合与亲代XAB1抗体所结合的表位基本上相同的表位。作为额外的或增加的结合接触(参见下表17)的结果,观察到每一个变异抗体与IL-17A之间的更紧密结合。

[0544] 如下所述进行变异抗体的进一步表征。

[0545] 表17. 被XAB1、XAB2、XAB4和XAB5结合的IL-17A表位的X射线分析:表位残基的概述和基于结构的定性分类。(*) :由第二IL-17A亚单位贡献的残基。

[0546]

表位残基种类	XAB1	XAB2	XAB4	XAB5
非常重要的表位残基	Arg 78, Glu 80, Trp 90	Arg 78, Glu 80, Trp 90	Arg 78, Glu 80, Tyr 85, Trp 90, Arg 124	Arg 78, Glu 80, Tyr 85, Trp 90, Arg 124
其它重要的表位残基	Pro 82, Ser 87, Val 88, Arg 124	Arg 43*, Pro 82, Ser 87, Val 88, Arg 124	Pro 82, Ser 87, Val 88	Pro 82, Ser 87, Val 88
额外贡献	Val 45*, Leu 49, Ile 51, Asp 81, Glu 83, Tyr 85, Asn 131, Lys 137*	Pro 42*, Val 45*, Leu 49, Ile 51, Asp 81, Glu 83, Tyr 85, Asn 131, Lys 137*	Val 45*, Leu 49, Asp 81, Glu 83, Pro 86, Pro 130, Phe 133, Lys 137*	Val 45*, Leu 49, Asp 81, Glu 83, Pro 86, Pro 130, Phe 133, Lys 137*
几乎无贡献或无直接贡献	Thr 44*, Leu 76, His 77, Asn 79, Arg 84, Pro 86, Lys 93, Glu 118*, Pro 130, Phe 133	Leu 76, His 77, Asn 79, Arg 84, Pro 86, Lys 93, Glu 118*, Pro 130, Phe 133	Arg 43*, Asn 50, Ser 64, Tyr 67, Leu 76, His 77, Asn 79, Arg 84, Glu 118*, Leu 122, Asn 131, Leu 135*	Arg 43*, Asn 50, Leu 76, His 77, Asn 79, Arg 84, Glu 118*, Leu 122, Asn 131, Leu 135*

[0547] 实施例8. 通过Biacore™测量的亲和力和交叉反应性

[0548] 动力学结合参数的测定可使用光学生物传感器Biacore™ T200或T100 (<http://www.biacore.com>), 通过表面等离子体共振测量来实现。该技术允许无标记测定配体对受体的结合 (k_a) 和解离 (k_d) 的微观速率常数。因此其尤其适合于表征抗体-抗原相互作用。

[0549] 通过25 µg/ml的固定缓冲液 (10mM醋酸钠 pH 5.0) 中的抗-人 Ig 抗体 (GE Healthcare Bio-Sciences AB; Cat.No.BR-1008-39) 或通过20 µg/ml的固定缓冲液 (10mM醋酸钠 pH 5.0 或 pH 4.0) 中的蛋白A (RepliGen: rPA-50) 进行抗体对Biacore™芯片表面的间接结合。

[0550] 将抗体稀释入空白缓冲液以达到1.00或1.25 µg/ml的终浓度。

[0551] 使用间接偶联/结合法 (参见上文) 对以下物质进行用于XAB4或XAB1的离解常数的测定的亲和力测量: 重组huIL-17A (SEQ ID NO: 78, 例如从0.14至8.8 nM的2倍递增浓度)、重

组huIL-17A/F异二聚体(例如从0.13至8nM的2倍递增浓度)、重组huIL-17F(SEQ ID NO:77;例如从7.8至500nM的2倍递增浓度)、食蟹猴IL-17A(SEQ ID NO:79;例如从0.63至40nM的2倍递增浓度)、恒河猴IL-17A(SEQ ID NO:82;例如从1.6至100nM的2倍递增浓度)、狨猴IL-17A(SEQ ID NO:82;例如从0.63至40nM的2倍递增浓度)、重组mIL-17A(SEQ ID NO:83;例如从0.78至50nM的2倍递增浓度)、重组mIL-17A/F(R&D**Systems®**Cat#5390-IL;例如从1.25至40nM的2倍递增浓度)、大鼠IL-17A(SEQ ID NO:85;例如从0.78至50nM的2倍递增浓度),并用10mM甘氨酸pH 1.75或MgCl₂(3M)再生表面。一个芯片表面被包被和再使用而无明显的结合能力丢失。选择低于K_D的配体浓度开始并以高于K_D的10倍的浓度结束。

[0552] 将相似但不相同的条件用于测XAB2和XAB3的亲和力。

[0553] 用Biacore™T200控制软件1.0版评价动力学轨迹。将全套具有递增浓度的这些轨迹一起考虑并且称之为运行。将两个零浓度样品(空白运行)包括入每一个分析物浓度系列,以允许在数据评估中进行双参照。

[0554] 结果

[0555] 抗-IL-17抗体XAB4、XAB1、XAB2和XAB3对人、食蟹猴、狨猴、恒河猴、小鼠和大鼠IL-17A、对人和小鼠IL-17A/F异二聚体和对人IL-17F的结合可使用Biacore™技术,通过表面等离子体共振术来测定。

[0556] 计算缔合(k_a)和离解(k_d)的动力学速率常数以及离解平衡常数(K_D)。

[0557] XAB4的亲和力数据示于表18中,XAB1的亲和力数据示于表19中,XAB2的亲和力数据示于表20中,以及XAB3的亲和力数据示于表21中。XAB1、XAB2和XAB3的亲和力成熟增强对人、食蟹猴、小鼠和大鼠IL-17A的亲和力。

[0558] 表18.XAB4结合的亲和力和动力学速率常数

[0559]

抗原	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (M)
huIL-17A	4.1±0.1E+06	2.3±0.1E-05	5.7±0.0E-12
huIL-17A/F	8.9±0.2E+5	<1.0±0.0E-05*	<1.1±0.0E-11*
huIL-17F	n.d.	n.d.	n.d.
cynoIL-17A	4.1±0.5E+05	1.3±0.0E-05	3.1±0.4E-11
marmlL-17A	1.2±0.0E+06	2.2±0.0E-05	1.8±0.0E-11
rhesIL-17A	3.0±0.1E+05	1.2±0.1E-05	4.0±0.1E-11
mlL-17A	3.8±0.1E+05	6.2±0.3E-05	1.6±0.1E-10
mlL-17A/F	2.421E+05	6.305E-05	2.604E-10
ratIL-17A	5.5±0.4E+05	4.6±0.9E-05	8.4±1.0E-11

[0560] n.d.=不可测定的,使用的抗原浓度范围太低,并且在最高抗原浓度(500-50pM)上观察到抗原对参照流动池的非特异性结合。

[0561] *离解速率超出可通过仪器测量的限度(k_d<1 x 10⁻⁵1/s)

[0562] 表19.XAB1结合的亲和力和动力学速率常数

[0563]

抗原	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (M)
huIL-17A	2.33E+06	9.39E-05	4.03E-11

hulL-17A/F	9.097E+05	0.001342	1.475E-09
hulL-17F	n.d.	n.d.	n.d.
cynolL-17A	2.14E+05	1.13E-04	5.26E-10
rheslL-17A	8.87E+05	9.97E-05	1.12E-09
mIL-17A	4.05E+05	1.43E-04	3.53E-10
mIL-17A/F	1.8757E+05	9.547E-04	5.093E-09
ratIL-17A	5.44E+05	1.64E-04	3.01E-10

[0564] n.d. = 不可测定的, 使用的抗原浓度范围太低, 并且在3个最高抗原浓度(500.50pM)上观察到抗原对参照流动池的非特异性结合。

[0565] 表20.XAB2结合的亲和力和动力学速率常数

[0566]

抗原	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
hulL-17A	4.09E+06	7.12E-05	1.76E-11

[0567] 表21.XAB3结合的亲和力和动力学速率常数

[0568]

抗原	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
hulL-17A	5.48E+06	5.01E-05	9.58E-12
hulL-17A/F	3.37E+06	1.03E-04	3.29E-11
hulL-17F	n.d.	n.d.	n.d.
cynolL-17A	1.21E+06	4.23E-05	3.49E-11
mIL-17A	5.87E+05	1.01E-04	1.74E-10
ratIL-17A	9.05E+05	7.59E-05	8.26E-11

[0569] n.d. = 不可测定的

[0570] XAB2、XAB3和XAB5的亲和力和动力学速率常数可与对于XAB4观察的亲和力和动力学速率常数相当。

[0571] 实施例9.ELISA中的对IL-17A和其它家族成员的结合

[0572] 进行目标抗体对不同抗原的滴定。简言之, 用1 μ g/ml的不含Ca和Mg的磷酸盐缓冲盐水(PBS) (10x; Invitrogen Cat#14200-083) 0.02%NaN₃ (Sigma Cat#S-8032) 中的以下物质包被ELISA微量滴定板 (Nunc Immuno plates MaxiSorp; Invitrogen, Cat#4-39454A) 的孔: 重组huIL-17A (SEQ ID NO:76; 1.8mg/ml)、重组huIL-17A/F (0.59mg/ml)、重组huIL-17F (SEQ ID NO:77; 1.8mg/ml)、重组huIL-17B (R&D **Systems**® Cat#1248IB/CF)、重组huIL-17C (R&D **Systems**® Cat#1234IL/CF)、重组huIL-17D (R&D **Systems**® Cat#1504IL/CF)、重组huIL-17E (R&D **Systems**® Cat#1258-IL/CF)、重组cynoIL-17A (SEQ ID NO:79; 0.21mg/ml)、重组cynoIL-17F (SEQ ID NO:80; 1.525mg/ml)、重组mIL-17A (SEQ ID NO:83; 2.8mg/ml)、重组mIL-17A/F (R&D **Systems**® Cat#5390-IL)、重组mIL-17F (SEQ ID NO:84; 0.2mg/ml) 和重组ratIL-17A (SEQ ID NO:85; 3.8mg/ml) (100 μ l/孔), 并在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。

[0573] 第二天, 在37 $^{\circ}$ C下用300 μ l的PBS/2%BSA (级分V; Roche Cat#10 735094 001) / 0.02%NaN₃封闭微量滴定板1小时。随后用PBS/0.05%Tween20 (Sigma Cat#P7949) / 0.02%

NaN₃洗涤板4次。在室温下将XAB4或XAB1以1μg/ml添加至三重复孔(100μl/well)中,持续3h。

[0574] 为了确认抗原对板的包被,使用对照抗体,特别是小鼠mAb抗-huIL-17F (Novartis, 5μg/ml)、山羊抗-hu-IL-17B (R&D **Systems**®Cat#AF1248; 10μg/ml)、小鼠mAb抗-huIL-17C (R&D **Systems**®Cat#MAB1234; 10μg/ml)、山羊抗-huIL-17D (R&D **Systems**®Cat#AF1504; 10μg/ml)、小鼠mAb抗hu-IL-17E (R&D **Systems**®Cat#MAB1258; 10μg/ml)、小鼠抗-mIL-17A或抗-mIL-17A/F (Novartis; 1μg/ml) 和大鼠抗-mIL-17F (R&D **Systems**®Cat#MAB2057; 1μg/ml;) (100μl/孔, 于PBS, 0.02%NaN₃中, 在RT下持续3h)。

[0575] 随后用PBS/0.05%Tween 20/0.02%NaN₃洗涤板4次。然后, 在RT下将缀合有碱性磷酸酶的山羊抗-人IgG抗体 (SigmaCat#A9544) 以1/20000的稀释度(100μl/孔)添加至接受了测试抗体的孔中, 持续2小时30分钟。在RT下将缀合有碱性磷酸酶的山羊抗-小鼠IgG抗体 (Sigma Cat#A7434) 以1/10000的稀释度(100μl/孔)添加至接受了小鼠mAb的孔中, 持续2小时30分钟。在RT下, 将缀合有碱性磷酸酶的小鼠抗山羊IgG抗体 (Sigma Cat#A8062) 以1/50000的稀释度(100μl/孔)添加至山羊抗体, 持续2小时30分钟。随后洗涤板4次, 并将100μl溶解在二乙醇胺缓冲液pH 9.8中的底物(对-硝基苯磷酸盐片剂; Sigma; 5mg Cat#N9389; 20mg Cat#.N2765)添加至每一个孔, 达到1mg/ml的终浓度。

[0576] 30分钟后, 使用405和490nm的滤光片在Spectra Max M5微量板读数器 (Molecular Devices) 中读取板。值为一式三个值的平均值±SEM。

[0577] 结果

[0578] 这些研究显示, XAB4和XAB1能够结合人和小鼠IL-17A以及人和小鼠IL-17A/F。此外, 还显示XAB4能够结合食蟹猴和大鼠IL-17A。在这些实验条件下未检测到对人、食蟹猴和小鼠IL-17F的结合以及对其它人家族成员(IL-17B、IL-17C、IL-17D和IL-17E)的结合。

[0579] 表22. 通过ELISA测定的XAB4和XAB1与人、食蟹猴、小鼠和大鼠IL-17家族成员的交叉反应性

[0580]

	XAB4 (1 µg/ml) O.D 值 (平均值 ± SEM)	对照 抗体 (1 或 10 µg/ml) O.D 值 (平均值 ± SEM)	XAB1 (1 µg/ml) O.D 值 (平均值 ± SEM)	对照 抗体 (1 或 10 µg/ml) O.D 值 (平均值 ± SEM)
hu IL-17A	2.471 ± 0.0448		1.302 ±0.0554	
hu IL-17A/F	2.137 ± 0.0429		1.222 ±0.0202	
hu IL-17F	0.049 ± 0.0056		0.032 ±0.0005	1.913 ± 0.0483
hu IL-17B	0.034 ± 0.0007	0.283 ± 0.0066	0.049 ±0.0013	1.441 ± 0.0283
hu IL-17C	0.036 ± 0.0002	0.290 ± 0.0027	0.032 ±0.0002	0.558 ± 0.0169
hu IL-17D	0.034 ± 0.0005	0.292 ± 0.0048	0.031 ±0.0010	0.867 ± 0.0372
hu IL-17E	0.035 ± 0.0014	0.833 ± 0.0239	0.033 ±0.0003	2.054 ± 0.0378
cyno IL-17A	1.926 ± 0.0355			
cyno IL-17F	0.085 ± 0.0336			
小鼠 IL-17A	1.585 ± 0.0428	1.086 ± 0.0119	1.439 ±0.0354	3.697 ± 0.0602
小鼠 IL-17A/F	2.263 ± 0.0243	1.142 ± 0.0315	1.762 ±0.0097	2.084 ± 0.0223
小鼠 IL-17F	0.098 ± 0.0060	1.294 ± 0.0134	0.044 ±0.0008	1.770 ± 0.0302
大鼠 IL-17A	1.772 ± 0.1668			

[0581] 实施例10. 通过ELISA测定的与其它人、小鼠和大鼠白细胞介素的交叉反应性

[0582] 在另一组实验中, 评价本公开内容的抗体对于选择的人、小鼠或大鼠细胞因子的交叉反应性。

[0583] 除以0.5µg/ml存在于不含Ca和Mg的磷酸盐缓冲盐水(PBS) (10x; Invitrogen Cat# 14200-083) 0.02%Na₃ (Sigma Cat#S-8032) 中的重组mIL-6、重组mIL-12和重组mTNFα之

外,以1 μ g/ml的存在于不含Ca和Mg的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的以下细胞因子,用100 μ l/孔包被ELISA微量滴定板(Nunc Immuno plates MaxiSorp:Invitrogen Cat#4-39454A)的三个重复孔:重组huIL1 β (Novartis)、重组huIL-3(R&D **Systems**®Cat#203-IL/CF)、重组huIL-4(R&D **Systems**®Cat#204-IL/CF)、重组huIL-6(R&D **Systems**®Cat#206-IL-1010/CF)、重组huIL-8(R&D **Systems**®Cat#208-IL-010/CF)、重组huIL-12(R&D **Systems**®Cat#219-IL-005/CF)、重组huIL-13(Novartis)、重组huIL-17A(SEQ ID NO:76)、重组huIL-17A/F、重组huIL-17F(SEQ ID NO:77)、重组huIL-18(MBL Cat#B003-5)、重组huIL-20(Novartis)、重组huIL-23(R&D **Systems**®Cat#1290-IL-010/CF)、重组huIFN γ (Roche)、重组huTNF α (Novartis)、重组huEGF(Sigma Cat#E9644.)、重组huTGF β 2(Novartis)、重组mIL-1 β (R&D **Systems**®Cat#401-ML)、重组mIL-2(R&D **Systems**®Cat#402-ML-020/CF)、重组mIL-6(R&D **Systems**®Cat#406-ML-010/CF)、重组mIL-12(R&D **Systems**®Cat#419-ML-010/CF)、重组mIL-17A(SEQ ID NO:83)、重组mIL-17A/F(R&D **Systems**®Cat#5390-IL)、重组mIL-17F(R&D **Systems**®Cat#2057-IL/CF)、重组mIL-18(MBL Cat#B004-5)、重组mIL-23(R&D **Systems**®Cat#1887-ML)、重组mIFN- γ (R&D **Systems**®Cat#485-MT)、重组mTNF α (R&D **Systems**®Cat#410-MT)、重组大鼠IL-4(R&D **Systems**®Cat#504-RL/CF)、重组大鼠IL-6(R&D **Systems**®Cat#506-RL-010)、重组ratIL-12(R&D **Systems**®Cat#1760-RL/CF)、重组ratIL-17A(SEQ ID NO:85)、重组ratIL-23(R&D **Systems**®Cat#3136-RL-010/CF)、重组ratTNF α (R&D **Systems**®Cat#510-RT/CF),并在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。

[0584] 第2天,在37 $^{\circ}$ C用300 μ l的PBS/2%BSA(级分V;Roche Cat#10 735094 001)/0.02%NaN₃封闭微量滴定板,持续1小时。随后用PBS/0.05%Tween 20(Sigma Cat#P7949)/0.02%NaN₃洗涤板4次。

[0585] 在室温下以10 μ g/ml(100 μ l/孔)添加本公开内容的抗体,持续3小时。为了确认抗原对板的包被,使用100 μ l/孔的以下对照抗体:小鼠抗-huIL1 β (R&D **Systems**®Cat#MAB601)、小鼠抗-huIL-3(R&D **Systems**®Cat#MAB603)、小鼠抗-huIL4(R&D **Systems**®Cat#MAB604)、小鼠抗-huIL-6(R&D **Systems**®Cat#MAB206)、小鼠抗-hu-IL8(R&D **Systems**®Cat#MAB208)、小鼠抗-huIL-12(R&D **Systems**®Cat#MAB219)、小鼠抗-huIL-13(Novartis)、小鼠抗-huIL-17A(Novartis)、小鼠抗-huIL-17F(Novartis)、小鼠抗-huIL-18(MBL Cat#D043-3)、小鼠抗-huIL-20(Abcam Cat#ab57227)、山羊抗-huIL-23(R&D **Systems**®Cat#AF1716)、小鼠抗-huIFN- γ (R&D **Systems**®Cat#MAB285)、小鼠抗-huTNF- α (R&D **Systems**®Cat#MAB610)、小鼠抗-hu-EGF(R&D **Systems**®Cat#MAB236)、人

抗-huTGF β 2 (Novartis)、大鼠抗-mIL-1 β (R&D **Systems**®Cat#MAB401)、大鼠抗-mIL-2 (R&D **Systems**®Cat#MAB402)、大鼠抗-mIL-6 (R&D **Systems**®Cat#MAB406)、大鼠抗-mIL-12 (R&D **Systems**®Cat#MAB419)、小鼠抗-m/ratIL-17A (Novartis)、大鼠抗-mIL-17F (R&D **Systems**®Cat#MAB2057)、大鼠抗-mIL-18 (MBL Cat#D047-3)、大鼠抗-mIFN- γ (R&D **Systems**®Cat#MAB485)、山羊抗-mTNF α (R&D **Systems**®Cat#AF-410-NA)、小鼠抗-大鼠IL-4 (R&D **Systems**®Cat#MAB504)、山羊抗-大鼠IL-6 (R&D **Systems**®Cat#AF506)、山羊抗-大鼠IL-12 (R&D **Systems**®Cat#AF1760)、小鼠抗-大鼠IL-23 (R&D **Systems**®Cat#MAB3510)、小鼠抗-大鼠TNF α (R&D **Systems**®Cat#MAB510)。在RT下以1或5 μ g/ml (于PBS, 0.02%NaN₃中) 添加它们,持续3小时。

[0586] 随后用PBS/0.05%Tween 20/0.02%NaN₃洗涤板4次。然后,将缀合有碱性磷酸酶的山羊抗-人IgG抗体 (Sigma Cat#A9544) 以1/20000的稀释度 (100 μ l/孔) 添加至具有人抗体的孔。将缀合有碱性磷酸酶的山羊抗-小鼠IgG抗体 (Sigma Cat#A1047) 以1/10000的稀释度 (100 μ l/孔) 添加至具有小鼠抗体的孔。将缀合有碱性磷酸酶的兔抗-山羊IgG抗体 (Sigma Cat#A7650) 以1/1000的稀释度 (100 μ l/孔) 添加至具有山羊抗体的孔,以及将缀合有碱性磷酸酶的兔抗大鼠-IgG抗体 (Sigma Cat#A6066) 以1/20000的稀释度 (100 μ l/孔) 添加至具有大鼠抗体的孔。将第二抗体在RT下孵育2小时30分钟。随后洗涤板4次,并将100 μ l溶解在二乙醇胺缓冲液pH 9.8中的底物 (对-硝基苯磷酸盐片剂;Sigma;5mg Cat#N9389,或20mg Cat#.N2765) 添加至每一个孔,直至达到1mg/ml的终浓度。

[0587] 30分钟后,在RT或者在4 $^{\circ}$ C使用405和490nm的滤光片在Spectra Max M5微量板读数器 (Molecular Devices) 中读取板。值为一式三个值的平均值 \pm SEM。

[0588] 结果

[0589] 这些研究显示,XAB4和XAB1对于人、小鼠和大鼠来源的IL-17A以及对于人和小鼠来源的IL-17A/F具有高度选择性。此外,在测试的条件下,对于XAB4未观察到10 μ g/ml的XAB1对于人IL-17F的反应性 (在1 μ g/ml上未看到,参见上文)。未检测到对其他测试的细胞因子的反应性。

[0590] 表23. 通过ELISA测定的XAB4和XAB1对人细胞因子的交叉反应性

[0591]

	XAB4 (10 µg/ml) O.D 值 (平均值 ± SEM)	对照抗体 (5 µg/ml) O.D 值 (平均值 ± SEM)	XAB1 (10 µg/ml) O.D 值 (平均值 ± SEM)	对照抗体 (1 µg/ml) O.D 值 (平均值 ± SEM)
IL1β	0.015 ± 0.0075	0.867 ± 0.0107	-0.110 ± 0.0901	3.071 ± 0.0486
IL3	0.167 ± 0.1288	0.732 ± 0.0194	-0.049 ± 0.0738	2.931 ± 0.0779
IL4	0.047 ± 0.0089	0.806 ± 0.0617	0.057 ± 0.0458	2.555 ± 0.1499
IL6	-0.015 ± 0.0103	1.452 ± 0.2020	-0.044 ± 0.0838	2.976 ± 0.1025
IL8	0.018 ± 0.0078	3.130 ± 0.0109	0.058 ± 0.0431	3.153 ± 0.1228
IL12	0.009 ± 0.0058	0.853 ± 0.0496	-0.097 ± 0.1600	2.964 ± 0.1370
IL13	0.019 ± 0.0085	2.639 ± 0.0309	0.125 ± 0.0706	2.639 ± 0.0309
IL17A	3.178 ± 0.0697	3.136 ± 0.0644	2.745 ± 0.0879	2.731 ± 0.0850
IL17A/F	3.100 ± 0.0458	3.024 ± 0.0816	2.644 ± 0.2517	3.024 ± 0.0816
IL17F	0.035 ± 0.0138	3.114 ± 0.0672	0.613 ± 0.4162	3.185 ± 0.0110
IL18	-0.001 ± 0.0234	3.313 ± 0.2080	-0.086 ± 0.0170	3.313 ± 0.2080
IL20	0.039 ± 0.0117	3.039 ± 0.0671	0.335 ± 0.2442	3.118 ± 0.0252
IL23	-0.022 ± 0.0450	3.435 ± 0.0878	0.085 ± 0.0678	3.350 ± 0.0886
IFN-γ	0.048 ± 0.0676	3.419 ± 0.0404	0.059 ± 0.0511	3.236 ± 0.0312
TNF-α	0.009 ± 0.0197	3.373 ± 0.0550	0.289 ± 0.0318	3.275 ± 0.0440
EGF	0.126 ± 0.0858	3.432 ± 0.1050	0.062 ± 0.0427	3.233 ± 0.1126
TGFβ2	0.018 ± 0.0190	3.397 ± 0.0358	0.146 ± 0.0653	3.246 ± 0.0303
BSA	0.009 ± 0.0194	0.010 ± 0.0192	0.043 ± 0.0033	0.149 ± 0.0558

[0592] N.B. 负值归因于空白 (无指定抗体的孔的O.D. 值) 被扣除。

[0593] 表24. 通过ELISA测定的XAB4和XAB1对小鼠细胞因子的交叉反应性

[0594]

	XAB4 (10 µg/ml) O.D 值 (平均值 ± SEM)	对照抗体 (5 µg/ml) O.D 值 (平均值 ± SEM)	XAB1 (10 µg/ml) O.D 值 (平均值 ± SEM)	对照抗体 (5 µg/ml) O.D 值 (平均值 ± SEM)
IL-1β	0.022 ± 0.0057	0.611 ± 0.0665	0.007 ± 0.0123	0.624 ± 0.0455

[0595]

IL2	0.024 ± 0.0227	3.548 ± 0.1283	0.022 ± 0.0125	3.295 ± 0.0557
IL6	0.031 ± 0.0063	3.291 ± 0.0174	0.038 ± 0.0091	3.340 ± 0.1115
IL12	0.035 ± 0.0110	3.359 ± 0.0094	-0.005 ± 0.0121	3.295 ± 0.0331
IL17A	3.285 ± 0.0445	3.180 ± 0.0702	2.974 ± 0.0281	3.186 ± 0.0505
IL17A/F	3.342 ± 0.1047	3.407 ± 0.1102	3.169 ± 0.0340	3.214 ± 0.0145
IL17F	0.034 ± 0.0122	3.359 ± 0.0247	-0.058 ± 0.0326	3.264 ± 0.0309
IL18	0.054 ± 0.0149	2.650 ± 0.0227	0.022 ± 0.0123	2.572 ± 0.0145
IL23	0.058 ± 0.0139	0.601 ± 0.0314	0.009 ± 0.0007	0.590 ± 0.0378
IFN-γ	0.038 ± 0.0114	2.751 ± 0.0515	0.048 ± 0.0063	2.388 ± 0.2351
TNF-α	0.065 ± 0.0154	3.258 ± 0.1097	0.025 ± 0.0081	3.476 ± 0.0714
BSA	0.015 ± 0.0078	0.035 ± 0.0047	0.015 ± 0.0078	0.035 ± 0.0047

[0596] N.B. 负值归因于空白(无指定抗体的孔的O.D.值)被扣除。

[0597] 表25. 通过ELISA测定的XAB4和XAB1对大鼠细胞因子的交叉反应性。

[0598]

	XAB4 (10 µg/ml) O.D 值 (平均值 ± SEM)	对照抗体 (5 µg/ml) O.D 值 (平均值 ± SEM)	XAB1 (10 µg/ml) O.D 值 (平均值 ± SEM)	对照抗体 (5 µg/ml) O.D 值 (平均值 ± SEM)
IL4	0.026 ± 0.0082	3.168 ± 0.0297	0.017 ± 0.0092	3.324 ± 0.1092
IL6	0.021 ± 0.0028	3.116 ± 0.0318	0.000 ± 0.0141	3.253 ± 0.1078
IL12	0.009 ± 0.0113	3.185 ± 0.0921	-0.007 ± 0.0082	3.310 ± 0.0692
IL17A	3.483 ± 0.0910	3.156 ± 0.0890	1.202 ± 0.0136	3.359 ± 0.0670
IL23	0.023 ± 0.0050	3.380 ± 0.2127	0.011 ± 0.0010	3.199 ± 0.1078
TNF-α	0.020 ± 0.0104	3.346 ± 0.1376	0.003 ± 0.0029	3.159 ± 0.0854
BSA	0.015 ± 0.0078	0.035 ± 0.0047	0.015 ± 0.0078	0.035 ± 0.0047

[0599] N.B. 负值归因于空白(无指定抗体的孔的O.D.值)被扣除。

[0600] 实施例11. IL-17A-IL-17RA和IL-17A/F-IL-17RA体外竞争性结合抑制测定

[0601] 从原液(BTP22599:1.68mg/ml=46.2µM)使用人IL-17RA。用PBS/0.02%NaN₃中的人IL-17RA(100µl/孔,1µg/ml,~27.5nM)包被ELISA微量滴定板并在室温下孵育过夜。第二天,在37℃下用300µl的PBS/2%BSA/0.02%NaN₃封闭板1小时。随后用PBS/0.05%Tween20/0.02%NaN₃洗涤板4次。

[0602] 在该制备后,在室温下用人IL-17A生物素(50µl,0.94nM)或IL-17A/F(50µl,31nM)预孵育抗体变体(50µl,对于IL-17A浓度从12nM至0.12nM,以及对于IL-17A/F浓度从1200nM

至40nM,3步骤)的滴定物,持续30分钟。

[0603] 在室温下将100 μ l的混合物添加至孔,持续3小时30分钟。在用PBS/0.05% Tween20/0.02%NaN₃洗涤四次后,以1/10000的最终稀释度(100 μ l/孔)添加缀合有碱性磷酸酶的链霉抗生物素蛋白。在室温下进行45分钟后,再次用PBS/0.05%Tween20/0.02%NaN₃洗涤板4次,随后添加(100 μ l/孔)二乙醇胺缓冲液pH9.8中的底物对-硝基苯磷酸盐(1mg/ml)。

[0604] 30分钟后,利用405和490nm的滤光片在Spectra Max M5微量板读数器中读取板(一式三份)。使用四参数逻辑模型(Excel Xlfit;FIT模型205)进行不同抗体变体的抑制百分比和IC₅₀的计算。

[0605] 结果

[0606] 这些研究显示,XAB4和XAB1能够阻断人huIL-17A和huIL-17A/F对huIL-17RA的结合。XAB4对IL-17A和IL-17A/F的更高亲和力反映在更高的抑制能力。IC₅₀值报告于表中。阻断IL-17A/F-IL-17RA相互作用所需的更高浓度主要通过如下事实来解释:约30倍高的浓度的IL-17A/F被用于测定。所述抗体结合A/F的A亚单位,从而不能阻止F亚单位对IL-17RA的结合。然而,F对IL-17RA的结合相当弱,在300nM的范围内。

[0607] 表26.XAB4和XAB1抑制huIL-17A和huIL-17A/F对huIL-17RA的结合

[0608]

配体\受体相互作用	XAB4 IC ₅₀ (nM)(平均值 \pm SEM)	XAB1 IC ₅₀ (nM)(平均值 \pm SEM)	对照抗体(nM)
huIL-17A\huIL-17RA	0.321 \pm 0.037	0.830 \pm 0.112	>60
huIL-17A/F\huIL-17RA	153.9 \pm 18.9	301.3 \pm 51.9	

[0609] 实施例12.本公开内容的抗体变体对人IL-17A和IL-17A/F活性的体外中和

[0610] (i)对C20A4C16细胞(人软骨细胞系)的测定

[0611] 将C20A4C16或C-20/A4,克隆6(Goldring MB等人,1994,J Clin Invest;94:2307-16)细胞在补充有10%胎牛血清超低IgG(Gibco Cat#16250-078;批次1074403)、 β -巯基乙醇(最终5 \times 10⁻⁵M)和新霉素(0.1mg/ml;InvivoGen Cat#ant-nr-2)的RPMI(Gibco Cat#61870-010)中进行培养。

[0612] 使用Accutase溶液(PAA Cat#L11-007)将细胞从塑料脱离。将细胞在不含胎牛血清、 β -巯基乙醇(最终5 \times 10⁻⁵M)和新霉素(0.1mg/ml)的RPMI1640(Gibco Cat#61870-010)中以5 \times 10³个的密度分配至96孔微量滴定板中(100 μ l/孔)。

[0613] 使C20A4C16细胞附着于板,进行过夜。第二天早上,在人TNF α (Novartis;MW 17500)存在的情况下将不同浓度的重组huIL-17A(SEQ ID NO:76;MW 32000)、重组huIL-17A/F(MW 32800)、重组huIL-17F(SEQ ID NO:77;MW 30000)或对照培养基以50 μ l的体积添加至存在50 μ l的不同浓度的测试抗体(XAB4;XAB1)、对照抗体(Simulect®1.1%的溶液, Batch C0011;831179)或对照培养基的三个重复孔中,直至达到200 μ l/孔的终体积和0.5%

的胎牛血清终浓度。

[0614] 将HuIL-17A (30pM)、huIL-17A/F (300pM) 和huIL-17F (10nM) 与huTNF α (6pM) 一起添加。以1至0.003nM的浓度范围添加XAB4 (MW150000) 以中和huIL-17A, 以10至0.03nM的浓度范围添加XAB4 (MW150000) 以中和huIL-17A/F以及以3 μ M至30nM的浓度范围添加XAB1 (MW 150000) 以中和huIL-17F。以3至0.01nM的浓度范围添加XAB1 (MW 150000) 以中和huIL-17A, 以10至0.03nM的浓度范围添加XAB1 (MW 150000) 以中和huIL-17A/F以及以3 μ M至30nM的浓度范围添加XAB1 (MW 150000) 以中和huIL-17F。以3 μ M至100nM的浓度范围添加**Simulect®**。在24小时的孵育后收集培养上清液, 并通过ELISA测量huIL-6的产生。

[0615] (ii) 对BJ细胞(人成纤维细胞)的测定

[0616] 将BJ细胞(来自ATCC Cat#CRL 2522的人皮肤成纤维细胞)在补充有10%胎牛血清超低IgG (Gibco Cat#16250-078; lot 1074403)、 β -巯基乙醇(最终 5×10^{-5} M) 和新霉素 (0.1mg/ml; InvivoGen Cat#ant-nr-2) 的RPMI (Gibco Cat#61870-010) 中进行培养。使用Accutase溶液(PAA Cat#L11-007) 将细胞从塑料脱离。

[0617] 将细胞在不含胎牛血清、 β -巯基乙醇(最终 5×10^{-5} M) 和新霉素 (0.1mg/ml) 的RPMI 1640中以 5×10^3 的密度分配至96孔微量滴定板中(100 μ l/孔)。使BJ细胞附着于板, 进行过夜。第二天早止, 在人TNF α (Novartis; MW 17500) 存在的情况下将不同浓度的rhuIL-17A (SEQ ID NO: 76; MW32000)、rhuIL-17A/F (MW 32800) 和rhuIL-17F (SEQ ID NO: 77; MW 30000) 或对照培养基以50 μ l的体积添加至存在50 μ l的不同浓度的测试抗体(XAB4; XAB1)、对照抗体(**Simulect®** 1.1%的溶液, Batch#C0011; 831179) 或对照培养基的三重复孔, 以达到200 μ l/孔的终体积和2.5%的胎牛血清终浓度。

[0618] 将HuIL-17A (30pM)、huIL-17A/F (300pM) 和huIL-17F (10nM) 与huTNF α (6pM) 一起添加。以1至0.003nM的浓度范围添加XAB4 (MW150000) 以中和huIL-17A, 以10至0.03nM的浓度范围添加XAB4 (MW150000) 以中和huIL-17A/F以及以3 μ M至30nM的浓度范围添加XAB4 (MW 150000) 以中和huIL-17F。以3至0.01nM的浓度范围添加XAB1 (MW 150000) 以中和huIL-17A, 以10至0.03nM的浓度范围添加XAB1 (MW 150000) 以中和huIL-17A/F以及以3 μ M至30nM的浓度范围添加XAB1 (MW 150000) 以中和huIL-17F。以3 μ M至100nM的浓度范围添加**Simulect®**。在24小时的孵育后收集培养上清液, 并通过ELISA测量huIL-6和huGR α 的产生。

[0619] (iii) 检测测定

[0620] 1) 用于检测人IL-6的产生的ELISA

[0621] 用PBS 0.02%NaN₃中的抗-人IL-6小鼠Mab (R&D**Systems®** Cat#MAB206; 100 μ l/孔, 1 μ g/ml) 包被ELISA微量滴定板, 并在+4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。第二天, 在室温用300 μ l的PBS/2%BSA/0.02%NaN₃封闭微量滴定板, 进行3小时。随后用PBS/0.05%Tween20/0.02%NaN₃洗涤板4次。添加C20A4C16(对于利用huIL-17A+huTNF α 刺激的培养物, 终稀释度为1:5, 或对于利用huTNF α +huIL-17A/F或IL-17F刺激的培养物终稀释度为1:2; 100 μ l/孔) 或BJ细胞(对于利用huIL-17A+huTNF α 刺激的培养物, 终稀释度为1:10, 或对于利用huTNF α 和huIL-17A/F或IL-17F刺激的培养物, 终稀释度为1:5; 100 μ l/孔) 的培养上清液。

[0622] 为了建立滴定曲线, 以1:2的稀释级从500pg/ml至7.8pg/ml滴定rhuIL-6

(Novartis;100 μ l/孔)。在室温过夜孵育后,用PBS/0.05%Tween20/0.02%NaN₃洗涤板4次。添加缀合有生物素的山羊抗-人IL-6抗体(R&D**Systems®**Cat#BAF206;30ng/ml;100 μ l/孔)。使样品在室温下反应4小时。洗涤(4次)后,以1/10000的终稀释度(100 μ l/孔)添加缀合有碱性磷酸酶的链霉抗生物素蛋白(Jackson ImmunoResearch Cat#016-050-084)。

[0623] 在室温下进行40分钟后,再次洗涤板4次。将对-硝基苯磷酸盐底物片剂(Sigma;5mg,Cat#N9389;20mg,Cat#N2765)溶解在二乙醇胺缓冲液pH 9.8中以提供1mg/ml的终浓度。向每一个孔中添加100 μ l,1小时后使用405和490nm的滤光片在Spectra Max M5微量板读数器(Molecular Devices)中读取O.D.。

[0624] 2) 用于检测人GR α 的产生的ELISA

[0625] 用PBS 0.02%NaN₃中的抗-人GR α 小鼠mAb(R&D**Systems®Systems®** Cat#MAB275;100 μ l/孔,1.5 μ g/ml)包被ELISA微量滴定板,并在4℃下孵育过夜。第二天,在室温用300 μ l的PBS/2%BSA/0.02%NaN₃封闭微量滴定板,进行3小时。随后用PBS/0.05%Tween20/0.02%NaN₃洗涤板4次。添加BJ细胞的培养上清液(终稀释度为1:2;100 μ l/孔)。

[0626] 为了建立滴定曲线,以1:2的稀释级从2ng/ml至0.03ng/ml滴定人GR α (R&D**Systems®** Cat#275-GR/CF;100 μ l/孔)。在室温过夜孵育后,用PBS/0.05%Tween 20/0.02%NaN₃洗涤板4次。

[0627] 添加缀合有生物素的山羊抗-人GR α 抗体(R&D**Systems®**Cat#BAF275;100ng/ml;100 μ l/孔)。使样品在室温下反应4小时。洗涤(4次)后,以1/10000的终稀释度(100 μ l/孔)添加缀合有碱性磷酸酶的链霉抗生物素蛋白(Jackson ImmunoResearch Cat#016-050-084)。在室温下进行40分钟后,再次洗涤板4次。将对-硝基苯磷酸盐底物片剂(Sigma;5mg,Cat#N9389;20mg,Cat#N2765)溶解在二乙醇胺缓冲液pH 9.8中以提供1mg/ml的终浓度。向每一个孔中添加100 μ l,1小时后使用405和490nm的滤光片在Spectra Max M5微量板读数器(Molecular Devices)中读取O.D.。

[0628] 3) 计算

[0629] 数据报告为平均值 \pm SEM。将四参数曲线拟合用于ELISA计算。抗体对IL-6和GR α 分泌的抑制的IC₅₀值使用Xlfit (FIT模型205)来计算。

[0630] (iv) 结果

[0631] 1) 对C20A4C16细胞(人软骨细胞系)的测定

[0632] XAB4和XAB1能够在rhuTNF α 存在的情况下中和利用rhuIL-17A和rhuIL-17A/F刺激的C20A4C16细胞的huIL-6分泌的诱导。100nM的对照抗体(**Simulect®**)没有作用。XAB4和XAB1的IC₅₀值(平均值 \pm SEM)报告于表27中。甚至在3 μ M的Ab浓度上也未观察到对huIL-17F的抑制。

[0633] 表27. XAB4和XAB1对C20A4C16细胞的huIL-6分泌的抑制效应

[0634]

刺激物	XAB4 IC ₅₀ (nM) (平均值 ± SEM)	XAB1 IC ₅₀ (nM) (平均值 ± SEM)	对照抗体 (nM)
rhIL-17A (1 nM) ^a	0.44 ± 0.06		>100
rhIL-17A/F (3 nM) ^a	1.30 ± 0.18		>100
rhIL-17F (30 nM) ^a	>3000		>1000
rhIL-17A (30 pM) + rhuTNF-α (6 pM) ^b	0.024 ± 0.004	1.21 ± 0.09	>3000
rhIL-17A/F (300 pM) + rhuTNF-α (6 pM) ^b	0.108 ± 0.02	>10	>3000
rhIL-17F (10 nM) + rhuTNF-α (6 pM) ^b	>3000	>3000	>3000

[0635] ^a扣除在刺激不存在的情况下的hu IL-6的产生的本底 (0.13±0.003)

[0636] ^b扣除利用单独的TNF的培养中的huIL-6的产生的本底 (0.20±0.003)。

[0637] 根据这些实验,很明显的是,亲代XAB1抗体与其衍生物共有中和活性。还看到XAB4变体具有比XAB1更高的中和活性。

[0638] 在另外的实验中,与上述实验类似,比较所有抗体XAB1-XAB5,如在表28中看到的。可看到,XAB2、XAB3和XAB5的抑制特征与XAB4和XAB1,尤其是XAB4所观察到的抑制特征相当。

[0639] 表28.XAB抗体对C20A4C16细胞的huIL-6分泌的抑制效应

[0640]

刺激物	XAB1 IC ₅₀ (nM) 平均值 ± SEM	XAB2 IC ₅₀ (nM) 平均值 ± SEM	XAB3 IC ₅₀ (nM) 平均值 ± SEM	XAB4 IC ₅₀ (nM) 平均值 ± SEM	XAB5 IC ₅₀ (nM) 平均值 ± SEM
rhIL-17A (0.5 nM) ^a	0.29 ± 0.03	0.72 ± 0.08	0.63 ± 0.15	0.51 ± 0.04	0.55 ± 0.01

[0641] ^a扣除在无刺激物的情况下的HuIL-6的产生的本底 (0.04±1.13ng/ml)。

[0642] 2) 对BJ细胞(人成纤维细胞)的测定

[0643] XAB4和XAB1都在huTNFα存在的情况下中和利用rhIL-17A和rhIL-17A/F刺激的BJ细胞的huIL-6和huGR0α分泌的诱导。100nM的对照抗体(**Simulect®**)没有作用。对于IL-6和hu GR0α的抑制的IC₅₀值报告于表29和表30中。甚至在3μM的Ab浓度上也未观察到对

huIL-17F的抑制。根据这些实验,很明显的是,亲代XAB1抗体与其衍生物共有中和活性。

[0644] 还看到XAB4变体具有比XAB1高的中和活性。

[0645] 表29.XAB4和XAB1抗体对BJ细胞的huIL-6分泌的抑制效应

[0646]

刺激物	XAB4 IC50 (nM) 平均值 ± SEM	XAB1 IC50 (nM) 平均值 ± SEM	对照抗体 (nM)
rhIL-17A (1 nM) ^a	0.63 ± 0.02		>100
rhIL-17A/F (3 nM) ^a	1.68 ± 0.05		>100
rhIL-17F (30 nM) ^a	>3000		>1000
rhIL-17A (30 pM) + rhuTNF-α (6 pM) ^b	0.012 ± 0.002	0.47 ± 0.02	>3000
rhIL-17A/F (300 pM) + rhuTNF-α (6 pM) ^b	0.17 ± 0.01	3.83 ± 0.63	>3000
rhIL-17F (10 nM) + rhuTNF-α (6 pM) ^b	>3000	>3000	>3000

[0647] ^a扣除在无刺激物情况下的Hu IL-6的产生的本底 (0.32 ± 0.002ng/ml)。

[0648] ^b扣除利用单独的TNF的刺激的培养物中huIL-6产生的本底 (0.45 ± 0.02ng/ml)。

[0649] 表30.XAB4和XAB1抗体对BJ细胞的hu-GRO-α分泌的抑制效应

[0650]

刺激物	XAB4 IC50 (nM) 平均值 ± SEM	XAB1 IC50 (nM) 平均值 ± SEM	对照抗体 (nM)
IL-17A (1 nM) ^a	0.35 ± 0.01		>100
IL-17A/F (3 nM) ^a	1.11 ± 0.05		>100
IL-17F (30 nM) ^a	>3000		>1000
IL-17A (30 pM) + TNF-α (6 pM) ^b	0.007 ± 0.0004	0.72 ± 0.12	>3000
IL-17A/F (300 pM) + TNF-α (6 pM) ^b	0.1 ± 0.01	6.22 ± 0.44	>3000
IL-17F (10 nM) + TNF-α (6 pM) ^b	>3000	>3000	>3000

[0651] ^a扣除在无刺激物情况下的hu GRO α的产生的本底 (0.03 ± 0.01ng/ml)。

[0652] ^b扣除利用单独的TNF的培养物中的hu GRO α的产生的本底 (0.15 ± 0.008ng/ml)。

[0653] 在另外的实验中,与上述实验类似,比较所有抗体XAB1-XAB5,如在表31和表32中

看到的。此处可看到，XAB2、XAB3和XAB5的抑制特征与XAB4和XAB1，尤其是XAB4所观察到的抑制特征相当。

[0654] 表31.XAB抗体对BJ细胞的huIL-6分泌的抑制效应

[0655]

刺激物	XAB1 IC50 (nM) 平均值 ± SEM	XAB2 IC50 (nM) 平均值 ± SEM	XAB3 IC50 (nM) 平均值 ± SEM	XAB4 IC50 (nM) 平均值 ± SEM	XAB5 IC50 (nM) 平均值 ± SEM
rhIL-17A (0.5 nM) ^a	4.97 ± 0.59	0.64 ± 0.22	0.50 ± 0.002	0.55 ± 0.04	0.54 ± 0.02

[0656] ^a扣除在无刺激物情况下的HuIL-6的产生的本底 (0.15 ± 4.06ng/ml)。

[0657] 表32.XAB抗体对BJ细胞的huGRO α分泌的抑制效应

[0658]

刺激物	XAB1 IC50 (nM) 平均值 ± SEM	XAB2 IC50 (nM) 平均值 ± SEM	XAB3 IC50 (nM) 平均值 ± SEM	XAB4 IC50 (nM) 平均值 ± SEM	XAB5 IC50 (nM) 平均值 ± SEM
rhIL-17A (0.5 nM) ^a	1.39 ± 0.07	0.40 ± 0.06	0.42 ± 0.01	0.44 ± 0.04	0.46 ± 0.05

[0659] ^a扣除在无刺激物情况下的hu GRO α的产生的本底 (0.03 ± 0.02ng/ml)

[0660] 实施例13. 本公开内容的抗体变体对小鼠 IL-17A和IL-17A/F活性的体外中和

[0661] 将CMT-93细胞 (ATCC CCL-223) 培养在补充有10%胎牛血清超低IgG (Gibco Cat# 16250-078; 批次1074403)、β-巯基乙醇 (最终 5×10^{-5} M) 和新霉素 (0.1mg/ml; InvivoGen Cat# ant-nr-2) 的RPMI (Gibco Cat#61870-010) 中。

[0662] 使用Accutase溶液 (PAA Cat#L11-007) 将细胞从塑料脱离, 并将所述细胞在不含胎牛血清、β-巯基乙醇和新霉素的RPMI 1640中以 5×10^3 个的密度分配至96孔微量滴定板中 (100μl/孔)。

[0663] 使所述细胞附着于板, 进行过夜。第二天早上, 将1nM的rmIL-17A (SEQ ID NO:83, MW31000)、3nM的rmIL-17A/F (R&D **Systems®** Cat#5390-IL; MW 30400)、30nM的rmIL-17F (SEQ ID NO:84; MW 30000)、1nM的rratIL-17A (SEQ ID NO:85; MW 31000) 或对照培养基以50μl的体积添加至存在50μl的不同浓度的测试抗体 (XAB4或XAB1)、对照抗体 (**Simulect®** 1.1%的溶液; C0011, 831179) 或对照培养基的孔 (三个重复) 中, 以达到200μl/孔的终体积和1%的胎牛血清终浓度。

[0664] 在24小时的孵育后收集培养上清液, 并通过ELISA测量KC产量。

[0665] (i) 用于检测小鼠KC产生的ELISA

[0666] 用PBS 0.02%NaN₃中的大鼠抗-小鼠KC Mab (R&D**Systems**®Cat#MAB453;100μl/孔,1μg/ml)包被ELISA微量滴定板,并在4℃下孵育过夜。第二天,在室温用300μl的PBS/2%BSA/0.02%NaN₃封闭微量滴定板,进行3小时。随后用PBS/0.05%Tween20/0.02%NaN₃洗涤板4次。添加CMT-93细胞(终稀释度为1:5;100μl/孔)的培养上清液。

[0667] 为了建立滴定曲线,以1:2的稀释级从1ng/ml至0.016ng/ml滴定小鼠KC (R&D**Systems**®#453-KC,100μl/孔)。在室温过夜孵育后,用PBS/0.05%Tween 20/0.02%NaN₃洗涤板4次。添加0.1μg/ml的缀合有生物素的山羊抗-小鼠KC抗体 (R&D**Systems**®Cat#BAF453;100μl/孔)。使样品在室温下反应4小时。洗涤(4次)后,以1/10000的终稀释度(100μl/孔)添加缀合有碱性磷酸酶的链霉抗生物素蛋白(Jackson Immunoresearch Cat#016-050-084)。在室温下进行40分钟后,再次洗涤板4次。将对-硝基苯磷酸盐底物片剂(Sigma;5mg,Cat#N9389;20mg,Cat#N2765)溶解在二乙醇胺缓冲液pH 9.8中以提供1mg/ml的终浓度。向每一个孔中添加100μl培养上清液,1小时后使用405和490nm的滤光片在Spectra Max M5微量板读数器(Molecular Devices)中读取O.D.。

[0668] (ii) 计算

[0669] 数据报告为平均值±SEM。将四参数曲线拟合用于ELISA计算。抗体对KC分泌的抑制的IC₅₀值使用Xlfit™(FIT模型205)来计算。

[0670] (iii) 结果

[0671] XAB4和XAB1能够中和利用小鼠或大鼠IL-17A和小鼠IL-17A/F刺激的CMT-93细胞的KC分泌的诱导。对照抗体(**Simulect**®)没有作用。XAB4和XAB1的IC₅₀值(平均值±SEM)报告于表33中。甚至在10μM的Ab浓度上也未观察到对huIL-17F的抑制。

[0672] 表33.XAB4和XAB1对CMT-93细胞的小鼠KC分泌的抑制效应

[0673]

刺激物	XAB4 IC ₅₀ (nM) 平均值± SEM	XAB1 IC ₅₀ (nM) 平均值± SEM	对照抗体 (nM)
mIL-17A (1 nM) ^a	13.8 ± 0.48	539 ± 29.4	>3000
mIL-17A/F (3 nM) ^a	10.3 ± 1.06	>1000	>3000
mIL-17F (30 nM) ^a	>10000	>10000	>3000
rIL-17A (1 nM) ^a	6.7 ± 0.84	467 ± 25.1	>3000

[0674] ^a扣除在无刺激物情况下的KC产生的本底(0.07±0.001ng/ml)。

[0675] 根据这些实验,很明显的是,亲代XAB1抗体及其衍生物具有中和活性。还看到XAB4变体具有比XAB1更高的中和活性。

[0676] 在另外的实验中,与上述实验类似,比较所有抗体XAB1-XAB5,如在表34中看到的。此处可看到,XAB2、XAB3和XAB5的抑制特征可与XAB4和XAB1,尤其是XAB4观察到的抑制特征

相当。

[0677] 表34.XAB抗体对CMT-93细胞的KC分泌的抑制效应

[0678]

刺激物	XAB1 IC50 (nM) 平均值 ± SEM	XAB2 IC50 (nM) 平均值 ± SEM	XAB3 IC50 (nM) 平均值 ± SEM	XAB4 IC50 (nM) 平均值 ± SEM	XAB5 IC50 (nM) 平均值 ± SEM
mIL-17A (0.15 nM) ^a	128 ± 14.2	20.9 ± 0.96	<1	7.0 ± 0.29	7.8 ± 0.78

[0679] a扣除在无刺激物的情况下的KC的产生的本底 (0.19 ± 5.81ng/ml)。

[0680] 实施例14.大鼠抗原诱导的关节炎测定(大鼠AIA)

[0681] 在第-21和-14天,用与完全弗氏佐剂1:1混匀的甲基化牛血清白蛋白(mBSA)(0.1ml,含有5mg/ml mBSA)在背上的两个部位对雌性Lewis大鼠(120-150g)进行皮内敏化。在第0天,使用5%异氟烷/空气混合物麻醉大鼠,并使用3.5%的异氟烷经由面罩在关节内注射期间维持麻醉。右膝接受50μl的10mg/ml的5%葡萄糖溶液中的mBSA(抗原注射的膝),然而左膝接受50μl的单独的5%葡萄糖溶液(媒介物注射的膝)。随后在关节内注射后立即以及再次地在第2、4和7天使用测径器测量左膝和右膝的直径。

[0682] 在第-3天通过单次皮下注射施用治疗。以0.15、1.5、15和116mg/kg注射本公开内容的抗体。将右膝肿胀计算为左膝肿胀的比率,并且将R/L膝肿胀比率对比时间作图以提供对照和处理组的曲线图下面积(AUC)。使用Excel电子表格相对于对照组AUC(0%的抑制)计算每一个处理组的AUC中单个动物的百分比抑制。

[0683] 结果

[0684] 结果示于表35中。显示了针对XAB4的右膝肿胀的剂量相关抑制,计算的ED₅₀为1.68mg/kg s.c.。

[0685] 表35.Lewis大鼠抗原诱导的关节炎中第0天至第7天的利用XAB4的单次剂量处理对膝肿胀的效应

[0686]

抗体剂量 (mg/kg)	膝肿胀AUC的抑制百分比
0.15	18.46 ± 1.61*
1.5	65.76 ± 3.41**
15	71.59 ± 1.27**
116	77.01 ± 1.72**

[0687] 数据点代表n=5只动物的平均值 ± SEM。*p<0.05和**p<0.01

[0688] ANOVA之后进行相对于对照曲线的Dunnett's检验。

[0689] 类似地,在使用Wistar大鼠(数据未显示)的模型以及使用小鼠抗原诱导的关节炎模型(数据未显示)的模型中证明了XAB4对膝肿胀的剂量相关抑制。

[0690] 实施例15.血管生成机械模型

[0691] 含有人IL-17A(150至200ng)的小室,当被皮下置于小鼠中时,在植入物周围引起

新血管生长。血管生成的量与该区域中新形成的组织的重量相关。利用0.01、0.03、0.1、0.3、1和3mg/kg的XAB4的预防性治疗抑制人IL-17诱导的血管生成。5个更高的剂量全都导致组织室重量的强效和显著的抑制。4个更高的剂量没有显示出剂量依赖性,然而,0.03mg/kg的剂量不如0.1mg/kg和以上的剂量有效。

[0692] 本研究显示IL-17A的强效血管生成效应可用抗-IL-17A抗体来中和,并且提供XAB4在体内对于人IL-17A的功效的实验证据。

[0693] 实施例16. 实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 模型

[0694] 实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 模型是已知的多发性硬化的动物模型 (例如在Constantinescu等人, Br J Pharmacol 2011中综述的)。已显示IL-17的抑制减轻C57B1/6小鼠的EAE严重度 (Haak S等人2009, JCI; 119: 61-69)。

[0695] 用重组大鼠髓鞘少突胶质细胞糖蛋白肽 (MOG₁₋₁₂₅) (内部产生的) 和完全弗氏佐剂 (CFA, 通过向不完全弗氏佐剂 (IFA, Sigma) 中添加8mg/ml结核分枝杆菌菌株H37RA (Difco产生的) 的50/50混合物免疫雌性C57B1/6小鼠 (9周龄, Harlan, Germany)。在第0天通过在尾的基部用200μg/动物的MOG₁₋₁₂₅进行皮下注射来进行免疫。此外, 在第0和2天腹膜内注射200ng/动物百日咳毒素 (PT)。

[0696] 测试XAB4的治疗性治疗效力和预防性治疗效力。

[0697] 治疗性治疗

[0698] 对于治疗性治疗, 使用16只小鼠 (8只用于XAB4, 8只用于对照)。一旦动物具有持续3天的至少2.5 (严重的后肢无力) 的临床评分, 就开始治疗。此后, 每周用单次剂量皮下注射15mg/kg XAB4或同种型对照抗体。

[0699] 结果示于图11至15中 (d.p.i为免疫后天数)。在所有图中, XAB4以圆圈表示, 同种型对照以方块表示。治疗性评分 (平均值+SEM) 示于图11中。可清楚地看到, 利用XAB4治疗的动物具有比同种型对照更低的平均临床评分。图12显示两组小组的重量变化 (%), 以及图13显示累积治疗性评分。图14和15是治疗前与治疗后的治疗性评分的比较。可在所有图中清楚地看到, 相比较于同种型对照, XAB4具有疗效。因此, 利用XAB4的治疗性治疗显著减轻EAE的严重度。

[0700] 预防性治疗

[0701] 对于预防性治疗, 使用19只小鼠 (10只用于XAB4, 9只用于对照)。在免疫前一天通过单次皮下注射用15mg/kg XAB4或同种型对照处理每一只动物。此后, 每周用单次剂量皮下注射15mg/kg XAB4或同种型对照抗体。

[0702] 结果示于图16至20 (d.p.i为免疫后天数)。在图16至19中, XAB4以圆圈表示, 同种型对照以空心方块表示。预防性评分 (平均值+SEM) 示于图16中。可清楚地看到, 利用XAB4治疗的动物具有更低的平均临床评分。图17显示两组小鼠的重量变化 (%), 以及图18显示累积治疗性评分。在图19中看到最大预防性评分。可在所有图中清楚看到, 相比较于同种型对照, XAB4具有疗效。此外, 在图20中, 其中XAB4以实线表示并且同种型对照以点线表示, 可看到, 相较于利用同种型对照治疗的小鼠的组, 利用XAB4治疗的小鼠的组的EAE发作更迟。

[0703] 因此, 显示了利用XAB4的预防性治疗显著延迟EAE发作并且减轻最大EAE严重度。

[0704] 实施例17. 人星形胶质细胞中IL17A-诱导的IL6、CXCL1、IL-8、GM-CSF和CCL2的水平下降

[0705] 研究XAB4对从人脑的大脑皮质分离的星形胶质细胞中的IL-6、CXCL1、IL-8、GM-CSF和CCL2的水平的作用。星形胶质细胞释放许多生长因子、细胞因子和趋化因子,所述因子允许它们调节细胞通讯、迁移以及神经元、神经胶质细胞和免疫细胞的存活率。星形胶质细胞终足与内皮细胞的直接通讯还允许星形胶质细胞控制血脑屏障的功能。此外,星形胶质细胞在突触间隙释放和摄取神经递质,诸如谷氨酸盐,所述神经递质使他们能够调节突触传递和兴奋毒性。重要的是,在CNS损伤后星形胶质细胞形成瘢痕病理,从而在正常生理和病理生理中具有明显相反的作用。在疾病中,星形胶质细胞被认为在一系列精神病、神经疾病和神经退行性病变中起作用,其中它们在神经炎症中的作用可能是重要的。

[0706] 数据显示利用IL-17A和TNF α 的共刺激增加IL-6、CXCL1、IL-8、GM-CSF和CCL2的释放,并且XAB4抑制人星形胶质细胞中的IL-6、CXCL1、IL-8、GM-CSF和CCL2的水平。这些数据表明IL-17A在细胞因子从星形胶质细胞释放中的主导作用,并且支持它们作为神经炎症疾病的药物靶的用途。值得注意的是,利用XAB4预处理人星形胶质细胞抑制IL-17A-诱导的和IL-17A/TNF α -诱导的IL-6、CXCL1、IL-8、GM-CSF和CCL2的水平而不影响TNF α -诱导的IL-6、CXCL1、IL-8、GM-CSF和CCL2的水平。综上所述,所述数据表明XAB4对IL-17A信号转导的选择性抑制降低了人星形胶质细胞中的促炎细胞因子的水平。在疾病中,星形胶质细胞被认为在一系列精神病、神经疾病和神经退行性病变中起作用,其中它们在神经炎症中的作用可能是重要的。改变星形胶质细胞功能的新型药物从而具有潜在价值,其中星形胶质细胞功能的调控可证明在治疗上是有用的。因此,由于已显示XAB4对星形胶质细胞的IL-6、CXCL1、IL-8、GM-CSF和CCL2的产生有作用,因此可得出XAB4可以是有用的治疗剂,诸如用于治疗多发性硬化(MS)。

[0707] 材料和方法

[0708] 所有细胞因子购自R&D Systems。巴利昔单抗(Novartis,Basel,Switzerland)用作同种型对照。所使用的第一抗体为:抗-IL17RA Alexa Fluor 647(BG/hIL17AR,Biolegend)、抗-IL17RC Alexa Fluor 488(309822,R&D Systems,UK)、抗-p65(Santa Cruz,USA)、小鼠IgG Alexa Fluor647(MOPC-21,Biolegend,UK)、小鼠IgG Alexa Fluor 488(133303,R&D System,UK)、小鼠IgG Biotin(G155-178,BD Biosciences,Switzerland)和大鼠IgG PE(A95-1,BD Biosciences,Switzerland)。所使用的第二抗体和染料为:生物素化的山羊抗-兔IgG(BA1000,Vector,UK)、缀合有链霉抗生物素蛋白的Alexa Fluor 488和Alexa Fluor 633(S11223和S2137,Life Technology,USA)、山羊抗-小鼠Alexa Fluor 488和Alexa Fluor 633(A1101和A21050,Life Technology,USA)、链霉抗生物素BV421(405226,Biolegend,UK)、Hoechst 34580(H21486,Life Technology,USA)。

[0709] 源自大脑皮质的人星形胶质细胞购自ScienCell Research Laboratory(USA)(目录号1800)。按照提供商的说明书生长细胞。简言之,将细胞在补充有1%星形胶质细胞生长补充剂(ScienCell目录号1852)、5%胎牛血清(ScienCell目录号0010)和1%青霉素/链霉素(ScienCell目录号0503)的人星形胶质细胞培养基(ScienCell目录号1801)中生长。将细胞在5%CO₂和37℃下维持在T75培养瓶中,每3天更换一次培养基直至80%汇合。对于所有处理,将70,000个细胞/孔种植在24孔板中,生长3天,血清饥饿2-4小时,随后利用XAB4处理星形胶质细胞2小时,随后用如图例中指定的重组人细胞因子处理18-20小时。将细胞沉淀用于通过qPCR定量细胞因子的mRNA水平,并且将上清液用于通过HTRF(Cisbio,France,用

于IL-6、IL-8和CXCL1)或AlphaLISA (PerkinElmer, USA, 用于CCL2和GM-CSF) 定量细胞因子的蛋白质水平。

[0710] 通过实时聚合酶链式反应 (RT-PCR) 来进行细胞因子mRNA的测量。简言之, 在室温下通过轻轻摇动350 μ l裂解缓冲液 (含有1% β -巯基乙醇的RLT缓冲液) 来裂解星形胶质细胞, 持续5分钟, 并使用RNeasy Micro试剂盒 (74004, Qiagen, Switzerland) 提取总RNA。使用SuperScript III逆转录酶 (18080-400, Life Technology, Switzerland) 合成cDNA。每一个基因的表达水平通过在Viia7实时PCR机器 (Life Technology, Switzerland) 进行q-PCR来评估。Taqman探针购自Life Technology, Switzerland。每一个样品分析三次, 将其针对次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HPRT) 进行标准化。人星形胶质细胞上清液 (10 μ l) 中的人IL6、IL8、CXCL1蛋白 (ng/ml) 的水平通过HTRF (IL6:62IL6PEC; IL8:62IL8PEC; CXCL1:6FGROPEG, Cisbio, France) 来评估, 人星形胶质细胞上清液 (5 μ l) 中的人CCL2蛋白的水平 (ng/ml) 通过 α LISA人CCL2/MCP1 (AL244C, PerkinElmer, USA) 来评估。按照制造商的说明书进行所有测量。

[0711] 使用PBS-5mM EDTA从贴壁培养物获得人星形胶质细胞的细胞悬浮液。对于细胞外染色, 在4 $^{\circ}$ C于PBS 2%BSA中用完整小鼠IgG孵育细胞10分钟, 随后在4 $^{\circ}$ C于PBS 2%BSA中用抗体染色30分钟。对于细胞内染色, 在4 $^{\circ}$ C用Cytotfix/Cytoperm溶液 (554714, BD Biosciences, Switzerland) 透化细胞20分钟, 随后4 $^{\circ}$ C用抗体孵育30分钟。在通过70 μ m粗滤器过滤后, 在BDFortessa (BD Biosciences, Switzerland) 上获取细胞, 并使用FlowJo软件 (Tree Star Inc., USA) 分析数据。

[0712] 在化合物处理后, 在PBS (Sigma Aldrich, Germany) 中洗涤细胞, 随后在冰冷的100%甲醇中固定10分钟。将细胞在无菌PBS中洗涤3次, 每次5分钟, 随后通过在室温用0.2%的PBS中的Triton-X-100 (Sigma Aldrich, Germany) 孵育5分钟来透化细胞。在+4 $^{\circ}$ C用封闭缓冲液 (其由PBS中的10%常规山羊血清 (Life Technology, USA) 和2%牛血清白蛋白 (Sigma Aldrich, Germany) 组成) 封闭非反应位点, 进行过夜。随后在4 $^{\circ}$ C于第一抗体中孵育细胞, 进行过夜。除去第一抗体, 并用PBS洗涤细胞3次, 每次5分钟, 随后在室温下使用第二荧光抗体, 持续2小时。随后在PBS中洗涤盖玻片5次, 每次5分钟, 并用Hoescht 34580细胞核染色进行复染。最终在VectashieldR封片剂 (Vector, UK) 中将盖玻片安装在显微镜玻片上, 并用指甲油密封盖玻片的边缘。使用利用Axiovert 200M倒置显微镜 (Zeiss Ltd, Germany) 的Zeiss LSM 510META共聚焦激光扫描显微镜对细胞成像。

[0713] 结果

[0714] XAB4对TNF- α 或IL-17A刺激或IL-17A/TNF- α 共刺激的拮抗示于图21A至25A。XAB4对IL-1 β 或IL-17A/IL-1 β 共刺激的拮抗示于图21B至25B中。

[0715] 图21显示对IL-6释放的拮抗作用, 图22显示对CXCL1释放的拮抗作用, 图23显示对IL-8的拮抗作用, 图24显示对GM-CSF的拮抗作用以及图25显示对CCL2的拮抗作用。

[0716] 在使用或不使用IL-17A (50ng/ml)、TNF- α (10ng/ml)、IL-1 β 、IL-17A/TNF- α 和IL-1 β /TNF- α 的情况下, 用递增浓度的XAB4 (0.01nM、0.1nM、1nM和10nM) 处理原代人星形胶质细胞。所使用的所有浓度示于图中。所显示的数据代表XAB40.01nM的2个实验, 和XAB40.1nM、1nM和10nM的3个实验。所显示的值为平均值 \pm S.E.M。

[0717] 如在图21A中看到的, XAB4 (所有浓度) 相较于对照和同种型对IL-6从利用IL-17A

或IL-17A/TNF- α 刺激的星形胶质细胞的释放具有拮抗作用。对于每一个数据集,IL-6的浓度(ng/ml)通过y-轴表示,XAB4的浓度示于x-轴上(0,即对照,0.01nM、0.1nM、1nM和10nM),并且10nM用于同种型。左边的数据集涉及未受刺激的细胞,下一个数据集涉及用TNF- α (10ng/ml) 刺激的细胞,下一个数据集涉及用IL-17A (50ng/ml) 刺激的细胞,并且最后一个数据集涉及用TNF- α (10ng/ml) 和IL-17A (50ng/ml) 共刺激的细胞。最后一个数据集具有约10倍高的y-轴的刻度。如在图21B中看到的,XAB4(所有浓度)相较于同种型对利用IL-1 β (0.1ng/ml) 刺激的或用IL-1 β (0.1ng/ml) 和IL-17A (50ng/ml) 共刺激的细胞没有拮抗作用。

[0718] 如在图22A中看到的,XAB4(所有浓度)相较于对照和同种型对CXCL1从利用IL-17A或IL-17A/TNF- α 刺激的星形胶质细胞的释放具有拮抗作用。对于每一个数据集,CXCL1的浓度(ng/ml)通过y-轴表示,并且XAB4的浓度示于x-轴(0,即对照,0.01nM、0.1nM、1nM和10nM)上,并且10nM用于同种型。左边的数据集涉及未受刺激的细胞,下一个数据集涉及用TNF- α (10ng/ml) 刺激的细胞,下一个数据集涉及用IL-17A (50ng/ml) 刺激的细胞,并且最后一个数据集涉及用TNF- α (10ng/ml) 和IL-17A (50ng/ml) 共刺激的细胞。最后一个数据集具有约10倍高的y-轴的刻度。如在图22B中看到的,XAB4(所有浓度)相较于同种型对利用IL-1 β (0.1ng/ml) 刺激的或用IL-1 β (0.1ng/ml) 和IL-17A (50ng/ml) 共刺激的细胞没有拮抗作用。

[0719] 如在图23A中看到的,XAB4(所有浓度)相较于对照对IL-8从利用IL-17A或IL-17A/TNF- α 刺激的星形胶质细胞的释放具有拮抗作用。相较于同种型,XAB4 (0.1nM、1nM和10nM) 对IL-8的释放具有拮抗作用。对于每一个数据集,IL-8的浓度(ng/ml)通过y-轴表示,并且XAB4的浓度示于x-轴(0,即对照,0.01nM、0.1nM、1nM和10nM)上,并且10nM用于同种型。左边的数据集涉及未受刺激的细胞,下一个数据集涉及用TNF- α (10ng/ml) 刺激的细胞,下一个数据集涉及用IL-17A (50ng/ml) 刺激的细胞,并且最后一个数据集涉及用TNF- α (10ng/ml) 和IL-17A (50ng/ml) 共刺激的细胞。最后一个数据集具有约5倍高的y-轴的刻度。如在图23B中看到的,XAB4(所有浓度)相较于同种型对利用IL-1 β (0.1ng/ml) 刺激的或用IL-1 β (0.1ng/ml) 和IL-17A (50ng/ml) 共刺激的细胞没有拮抗作用。

[0720] 如在图24A中看到的,XAB4(所有浓度)相较于对照和同种型对GM-CSF从利用IL-17A/TNF- α 刺激的星形胶质细胞的释放具有拮抗作用。XAB4 (0.1nM、1nM和10nM) 相较于同种型和对照对GM-CSF从利用IL-17A刺激的星形胶质细胞的释放具有拮抗作用。对于每一个数据集,GM-CSF的浓度(ng/ml)通过y-轴表示,并且XAB4的浓度示于x-轴(0,即对照,0.01nM、0.1nM、1nM和10nM)上,并且10nM用于同种型。左边的数据集涉及未受刺激的细胞,下一个数据集涉及用TNF- α (10ng/ml) 刺激的细胞,下一个数据集涉及用IL-17A (50ng/ml) 刺激的细胞,并且最后一个数据集涉及用TNF- α (10ng/ml) 和IL-17A (50ng/ml) 共刺激的细胞。如在图24B中看到的,XAB4(所有浓度)相较于同种型对利用IL-1 β (0.1ng/ml) 刺激的或用IL-1 β (0.1ng/ml) 和IL-17A (50ng/ml) 共刺激的细胞没有拮抗作用或有低的拮抗作用。

[0721] 如在图25A中看到的,XAB4(所有浓度)相较于对照和同种型对CCL2从利用IL-17A刺激的星形胶质细胞的释放具有拮抗作用。XAB4 (0.1nM、1nM和10nM) 相较于同种型和对照对CCL2从利用IL-17A/TNF- α 刺激的星形胶质细胞的释放具有拮抗作用。对于每一个数据集,CCL2的浓度(ng/ml)通过y-轴表示,并且XAB4的浓度示于x-轴(0,即对照,0.01nM、0.1nM、1nM和10nM)上,并且10nM用于同种型。左边的数据集涉及未受刺激的细胞,下一个数据集涉及用TNF- α (10ng/ml) 刺激的细胞,下一个数据集涉及用IL-17A (50ng/ml) 刺激的细

胞,并且最后一个数据集涉及用TNF- α (10ng/ml) 和IL-17A (50ng/ml) 共刺激的细胞。如在图25B中看到的,XAB4(所有浓度)相较于同种型对利用IL-1 β (0.1ng/ml) 刺激的或用IL-1 β (0.1ng/ml) 和IL-17A (50ng/ml) 共刺激的细胞没有拮抗作用。

[0722] 综上所述,所述数据表明XAB4对IL-17A信号转导的选择性抑制降低了人星形胶质细胞中的促炎细胞因子的水平。在疾病中,星形胶质细胞被认为在一系列精神病、神经疾病和神经退行性病变中起作用,其中它们在神经炎症中的作用可能是重要的。由于已显示XAB4对星形胶质细胞的IL-6、CXCL1、IL-8、GM-CSF和CCL2的产生有作用,因此XAB4可以有用的治疗剂,诸如用于治疗多发性硬化(MS)。

[0723] 序列信息

[0724] 将涉及XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5的序列数据概述于下文中以便参考。

[0725] 表1描述实例XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5的全长重链和轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO)。

[0726] 抗体XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5可使用常规抗体重组产生方法来产生和纯化。例如,将如表3或表4中描述的编码序列克隆进生产载体以在哺乳动物生产细胞系中进行重组表达。

[0727] 表2概述XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5的可变重链(VH) 和轻链(VL) 的氨基酸序列,其可用于从XAB1、XAB2、XAB3、XAB4或XAB5产生嵌合抗体。

[0728] 表5概述产生替代CDR移植抗体的XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5的有用的CDR序列(+共有序列),其中根据Kabat定义界定来自XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5的CDR区。

[0729] 表6概述产生替代CDR移植抗体的XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5的有用的CDR序列(加共有序列),其中根据Chothia定义确定来自XAB1、XAB2、XAB3、XAB4和XAB5的CDR区。

[0730] 本说明书中提及的所有序列(SEQ ID NO) 见于表36中。

[0731] 序列表

[0732] 用于实践本发明的有用的氨基酸和核苷酸序列见于表36中。

[0733] 表36. 序列表

[0734]

抗体/片段	序列标识符 (SEQ ID NO:)	氨基酸序列或多核苷酸序列 (PN)
XAB1, CDRH1 (CHOTHIA)	1	GFTFSSY
XAB1, CDRH2 (CHOTHIA)	2	KQDGSE
XAB1, CDRH3 (CHOTHIA)	3	DRGSLYY
XAB1, CDRL1 (CHOTHIA)	4	SQGIISA
XAB1, CDRL2 (CHOTHIA)	5	DAS
XAB1, CDRL3 (CHOTHIA)	6	FNSYPL
XAB1, CDRH1 (KABAT)	7	SYWMS
XAB1, CDRH2 (KABAT)	8	NIKQDGSEKYYVDSVKG
XAB1, CDRH3 (KABAT)	3	DRGSLYY
XAB1, CDRL1 (KABAT)	9	RPSQGIISALA
XAB1, CDRL2 (KABAT)	10	DASSLEN
XAB1, CDRL3 (KABAT)	11	QQFNSYPLT
XAB1, VH	12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSLYY WGQGTLLTVSS
XAB1, VL	13	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRPSQGIISALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLENGVPSRFGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK
XAB1, HEAVY CHAIN	14	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSLYY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE

[0735]

		YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
XAB1, 轻链 CHAIN	15	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRPSQGIISALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLENGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQFNISYPLTFGGGTKEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PN 编码 ID NO: 12	SEQ 16	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGA TGTCCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCT GGTCACCGTGTCCAGC
PN 编码 ID NO: 13	SEQ 17	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT CTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGCCAAGTCAGGGCATTATCAGTGCTTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGC TCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAATGGG GTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCC TGAAGATTTTGAACCTTATTACTGTCAACAGTTTAA TAGTTACCCTCTCACTTTCCGGCGGAGGGACCAAG GTGGAGATCAAA
PN 编码 ID NO: 14	SEQ 18	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGA TGTCCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCT GGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCC CAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAG CACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGT GTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCC AGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCT GCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCCCCC AAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCAGGACCC CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCC

[0736]

		ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAAAAGA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGC CCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCT GGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGAC GGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGG ACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACCCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGG CAAG
PN 编码 ID NO: 15	SEQ 19	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT CTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGCCAAGTCAGGGCATTATCAGTGCTTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGC TCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAATGGG GTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCC TGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAA TAGTTACCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAG GTGGAGATCAAACGTACGGTGGCCGCTCCCAGC GTGTTTATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGA AGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGA ACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTG GAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAG CCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTG AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACG CCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCC CCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGGCGAGTGC
XAB2, CDRH1 (CHOTHIA)	1	GFTFSSY
XAB2, CDRH2 (CHOTHIA)	2	KQDGSE
XAB2, CDRH3 (CHOTHIA)	3	DRGSLYY
XAB2, CDRL1 (CHOTHIA)	20	SQVIISA
XAB2, CDRL2 (CHOTHIA)	5	DAS
XAB2, CDRL3 (CHOTHIA)	21	FDSYPL
XAB2, CDRH1 (KABAT)	7	SYWMS
XAB2, CDRH2 (KABAT)	8	NIKQDGSEKYYVDSVKG
XAB2, CDRH3 (KABAT)	3	DRGSLYY

[0737]

XAB2, CDRL1 (KABAT)	22	RPSQVIISALA
XAB2, CDRL2 (KABAT)	23	DASSLEQ
XAB2, CDRL3 (KABAT)	24	QQFDSYPLT
XAB2, VH	12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWWANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLEY WGQGTLVTVSS
XAB2, VL	25	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRPSQVIISALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFGSGSVSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQFDSYPLTFGGGTKEIK
XAB2, 重链	14	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWWANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLEY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
XAB2, 轻链	26	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRPSQVIISALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFGSGSVSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQFDSYPLTFGGGTKEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PN 编码 SEQ ID NO: 12	16	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGA TGTCCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCT GGTCACCGTGTCCAGC
PN 编码 SEQ ID NO: 25	27	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCGGCCAGCCAGGTCATCATCAGCGCCCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAAGGCCCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAC AGGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGTGT CCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCGACAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAATCAAG
PN 编码 SEQ	18	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG

[0738]

ID NO: 14		GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGA TGTCTTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCT GGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCC CAGCGTGTTCCTCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAG CACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGT GTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCC AGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCT GCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCC CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAAAAGA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGC CCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCT GGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGAC GGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGG ACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGG CAAG
PN 编码 ID NO: 26	SEQ 28	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCGGCCCAGCCAGGTCATCATCAGCGCCCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAC AGGGCGTGCCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGTGT CCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCGACAGCTACCCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCG CTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGA GCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAG GTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGAC

[0739]

		AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCC TGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAA GGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCT GTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGG CGAGTGC
替代 编码 NO: 12	PN SEQ ID 29	GAGGTGCAGCTGGTGGGAATCAGGAGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTCACCTTTAGTAGCTACTGGA TGAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG GTTCACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACAGTGTCTTCT
替代 编码 NO: 25	PN SEQ ID 30	GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGAATCACCTG TAGACCTAGTCAGGTGATCATTAGCGCCCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGGAACAGG GCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGTGTGAGG CACCAGCTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGT TCGATAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGGAAATCAAG
替代 编码 NO: 14	PN SEQ ID 31	GAGGTGCAGCTGGTGGGAATCAGGAGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTCACCTTTAGTAGCTACTGGA TGAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG GTTCACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACAGTGTCTTCTGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTG TCTTTCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCCACAAG CGGAGGCACTGCAGCTCTGGGTTGTCTGGTGAA GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGG AACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCC TTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTAC AGCCTGAGCAGCGTCGTGACTGTGCCTAGTTCCA GCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA GTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACC TGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGA GGACCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCCCAAGCCCA AGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGG TGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGG ACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG GGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAG AGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT GTCCGTCTGACAGTGTGACACAGGATTGGCTG AACGGCAAAGAATAACAAGTGCAAAGTCTCCAACA

[0740]

		AGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAG CAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAACGGCCAGCCCAGAACTACAAG ACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGC TTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCACTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
替代 编码 NO: 26	PN SEQ ID 32	GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTG TAGACCTAGTCAGGTGATCATTAGCGCCCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGGAACAGG GCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGTGTCAGG CACCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGT TCGATAGCTACCCCCTGACCTTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCC AGCGTGTTTCATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGC TGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGC TGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAA GGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGT ACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA GCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGT GC
XAB3, CDRH1 (CHOTHIA)	1	GFTFSSY
XAB3, CDRH2 (CHOTHIA)	2	KQDGSE
XAB3, CDRH3 (CHOTHIA)	3	DRGSLYY
XAB3, CDRL1 (CHOTHIA)	33	SQGIYWE
XAB3, CDRL2 (CHOTHIA)	5	DAS
XAB3, CDRL3 (CHOTHIA)	6	FNSYPL
XAB3, CDRH1 (KABAT)	7	SYWMS
XAB3, CDRH2 (KABAT)	8	NIKQDGSEKYYVDSVKG
XAB3, CDRH3 (KABAT)	3	DRGSLYY
XAB3, CDRL1 (KABAT)	34	RPSQGIYWELA
XAB3, CDRL2 (KABAT)	23	DASSLEQ
XAB3, CDRL3	11	QQFNSYPLT

[0741]

(KABAT)		
XAB3, VH	12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWWANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLLY WGQGTLLTVSS
XAB3, VL	35	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRPSQGIYWELAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQFNYSYPLTFGGGTKVEIK
XAB3, 重链	14	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWWANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLLY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
XAB3, 轻链	36	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRPSQGIYWELAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQFNYSYPLTFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PN 编码 SEQ ID NO: 12	16	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGA TGTCCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA GGACACCGCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCT GGTCACCGTGTCCAGC
PN 编码 SEQ ID NO: 35	37	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCGGCCAGCCAGGGCATCTACTGGGAGCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAAGGCCCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAC AGGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGAT CCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCAACAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAG
PN 编码 SEQ ID NO: 14	18	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGA TGTCCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC

[0742]

		GGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCCT GGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCC CAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAG CACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGT GTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCC AGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGCCCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCT GCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCC CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAAAAGA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGC CCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCT GGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGAC GGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGG ACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACCCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGG CAAG
PN 编码 ID NO: 36	SEQ 38	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCGGCCAGCCAGGGCATCTACTGGGAGCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAC AGGGCGTGCCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGAT CCGGCACCCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCAACAGCTACCCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCG CTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGA GCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAG GTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGAC AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCC TGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAA GGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCT GTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGG CGAGTGC

[0743]

替代 编码 NO: 12	PN SEQ ID	29	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTCACCTTTAGTAGCTACTGGA TGAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG GTTCACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACAGTGTCTTCT
替代 编码 NO: 35	PN SEQ ID	39	GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGAATCACCTG TAGACCTAGCCAGGGAATCTACTGGGAGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGGAACAGG GCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTCAGG CACCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGT TTAACTCCTACCCCTGACCTTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGGAAATCAAG
替代 编码 NO: 14	PN SEQ ID	31	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTCACCTTTAGTAGCTACTGGA TGAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG GTTCACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACAGTGTCTTCTGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTG TCTTTCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCCACAAG CGGAGGCACTGCAGCTCTGGGTTGTCTGGTGAA GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGG AACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCC TTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTAC AGCCTGAGCAGCGTCGTGACTGTGCCTAGTTCCA GCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA GTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACC TGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAAGTGTCTGGGA GGACCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCCCCAAGCCCA AGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGG TGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGG ACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG GGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAAG AGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT GTCCGTCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTG AACGGCAAAGAATAACAAGTGCAAAGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAG CAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGG

[0744]

		GAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAG ACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGC TTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
替代 PN 编码 SEQ ID NO: 36	40	GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTG TAGACCTAGCCAGGGAATCTACTGGGAGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGGAACAGG GCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTCAGG CACCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGT TTAACTCCTACCCCCTGACCTTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCC AGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGC TGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGC TGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAA GGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGT ACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA GCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGT GC
XAB4, CDRH1 (CHOTHIA)	1	GFTFSSY
XAB4, CDRH2 (CHOTHIA)	2	KQDGSE
XAB4, CDRH3 (CHOTHIA)	3	DRGSLYY
XAB4, CDRL1 (CHOTHIA)	41	SQGINWE
XAB4, CDRL2 (CHOTHIA)	5	DAS
XAB4, CDRL3 (CHOTHIA)	6	FNSYPL
XAB4, CDRH1 (KABAT)	7	SYWMS
XAB4, CDRH2 (KABAT)	8	NIKQDGSEKYYVDSVKG
XAB4, CDRH3 (KABAT)	3	DRGSLYY
XAB4, CDRL1 (KABAT)	42	RPSQGINWELA
XAB4, CDRL2 (KABAT)	23	DASSLEQ
XAB4, CDRL3 (KABAT)	11	QQFNSYPLT
XAB4, VH	12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLYY WGQGTLLTVSS

[0745]

XAB4, VL	43	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRPSQGINWELAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQFNYSYPLTFGGGTKVEIK
XAB4, 重链	14	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGRSLYY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
XAB4, 轻链	44	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRPSQGINWELAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQFNYSYPLTFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PN 编码 SEQ ID NO: 12	16	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGA TGTCCTGGGTCCGCCAGGCCCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCCCT GGTCACCGTGTCCAGC
PN 编码 SEQ ID NO: 43	45	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCGGCCCAGCCAGGGCATCAACTGGGAGCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAC AGGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGAT CCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCAACAGCTACCCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAATCAAG
PN 编码 SEQ ID NO: 14	18	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGA TGTCCTGGGTCCGCCAGGCCCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCCCT GGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCC CAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAG

[0746]

		CACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGT GTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCC AGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGCCCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCT GCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCC CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAAAAGA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGC CCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCT GGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGAC GGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGG ACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACCCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGG CAAG
PN 编码 ID NO: 44	SEQ 46	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCGGCCAGCCAGGGCATCAACTGGGAGCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAC AGGGCGTGCCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGAT CCGGCACCCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCAACAGCTACCCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCG CTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGA GCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAG GTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGAC AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCC TGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAA GGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCT GTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGG CGAGTGC
替代 编码 NO: 12	PN SEQ ID 29	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTCACCTTTAGTAGCTACTGGA TGAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG

[0747]

		GTTCACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACAGTGTCTTCT
替代 编码 NO: 43	PN SEQ ID 47	GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGAAGTATCACCTG TAGACCTAGTCAGGGGATTAAGTGGGAGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGGAACAGG GCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTCAGG CACCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGT TTAACTCCTACCCCTGACCTTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGGAAATCAAG
替代 编码 NO: 14	PN SEQ ID 31	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTCACCTTTAGTAGCTACTGGA TGAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG GTTCACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACAGTGTCTTCTGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTG TCTTTCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCCACAAG CGGAGGCACTGCAGCTCTGGGTTGTCTGTGAA GGACTACTTCCCGAGCCCGTGAAGTGTCTCTGG AACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACC TTCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTAC AGCCTGAGCAGCGTCGTGACTGTGCCTAGTTCCA GCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA GTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACC TGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAAGTGTGGGA GGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCCAAGCCCA AGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGG TGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGG ACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG GGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAG AGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT GTCCGTCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTG AACGGCAAAGAATAACAAGTGCAAAGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAG CAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAATACTACAAG ACCACCCCCCAGTGTGGACAGCGACGGCAGC TTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCACTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG

[0748]

替代 编码 NO: 44	PN SEQ ID	48	GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTG TAGACCTAGTCAGGGGATTAAGTGGGAGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGGAACAGG GCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTCAGG CACCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGT TTAACTCCTACCCCCTGACCTTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCC AGCGTGTTTATCTTCCCCCCCCAGCGACGAGCAGC TGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGC TGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAA GGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGT ACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA GCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGT GC
第二替代 编码 NO: 12	PN SEQ ID	49	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGCG CCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACTGGAT GTCCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGACT GGAATGGGTGGCCAAACATCAAGCAGGACGGCTC CGAGAAGTACTACGTGGACTCCGTGAAGGGCCG GTTACACCATCTCCCGGGACAACGCCAAGAACTCC CTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCGG GGCTCCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCTG GTGACAGTGTCTCTCC
第二替代 编码 NO: 43	PN SEQ ID	50	GCCATCCAGCTGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGT CTGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTG TCGGCCCTCCCAGGGCATCAACTGGGAAGTGGC CTGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCCAA GCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAACAG GGCGTGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCG GCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGCA GCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAG TTCAACTCCTACCCCCTGACCTTCGGCGGAGGCA CCAAGGTGGAAATCAAG
第二替代 编码 NO: 14	PN SEQ ID	51	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGCG CCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACTGGAT GTCCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGACT GGAATGGGTGGCCAAACATCAAGCAGGACGGCTC CGAGAAGTACTACGTGGACTCCGTGAAGGGCCG GTTACACCATCTCCCGGGACAACGCCAAGAACTCC CTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCGG GGCTCCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCTG GTGACAGTGTCTCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCAA GCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCA CCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGG TGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTG

[0749]

		CTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCA CACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCT GTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAG CAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAGAGTGGAGCCCCAAGAGCTGTGACAAGACCC ACACCTGCCCCCCTGCCAGCCCCCGAGCTGC TGGGCGGACCCAGCGTGTTCTGTTCCTCCCCCA GCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCC GAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAC GAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGC CCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGT GGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCC AACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACCA TCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAAGAGAGCCCC AGGTGTACACCCTGCCACCCAGCAGGGAGGAGA TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGT GAAGGGCTTCTACCCAAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAATA CAAGACCACCCCCCAGTGTCTGGACAGCGCAGG CAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGAC AAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGCT GCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA CACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCAGGCAA G
第二替代 PN 编码 SEQ ID NO: 44	52	GCCATCCAGCTGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGT CTGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTG TCGGCCCTCCCAGGGCATCAACTGGGAACTGGC CTGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCCAA GCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAACAG GGCGTGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCG GCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGCA GCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAG TTCAACTCCTACCCCCTGACCTTCGGCGGAGGCA CCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTC CCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCAAGCGACGAGCA GCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCT GCTGAACAATTCTACCCCAGGGAGGCCAAGGTG CAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGC AACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGC AAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGA CCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGG TGACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTG CAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC
XAB5, CDRH1 (CHOTHIA)	1	GFTFSSY
XAB5, CDRH2 (CHOTHIA)	2	KQDGSE
XAB5, CDRH3 (CHOTHIA)	3	DRGSLYY
XAB5, CDRL1 (CHOTHIA)	41	SQGINWE

[0750]

XAB5, CDRL2 (CHOTHIA)	5	DAS
XAB5, CDRL3 (CHOTHIA)	6	FNSYPL
XAB5, CDRH1 (KABAT)	7	SYWMS
XAB5, CDRH2 (KABAT)	8	NIKQDGSEKYYVDSVKG
XAB5, CDRH3 (KABAT)	3	DRGSLYY
XAB5, CDRL1 (KABAT)	42	RPSQGINWELA
XAB5, CDRL2 (KABAT)	10	DASLEN
XAB5, CDRL3 (KABAT)	11	QQFNSYPLT
XAB5, VH	12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWWANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLLYY WGQGTLLTVSS
XAB5, VL	53	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRPSQGINWELAWY QQKPGKAPKLLIYDASLENGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK
XAB5, 重链	14	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWWANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLLYY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
XAB5, 轻链	54	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRPSQGINWELAWY QQKPGKAPKLLIYDASLENGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
PN 编码 ID NO: 12	SEQ 16	GAGGTGCAGCTGGTCTGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGA TGTCCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA GGACACCGCGGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCT GGTCACCGTGTCCAGC
PN 编码	SEQ 55	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG

[0751]

ID NO: 53		AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCGGCCCAGCCAGGGCATCAACTGGGAGCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAA ACGGCGTGCCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGAT CCGGCACCCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCAACAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAG
PN 编码 ID NO: 14	SEQ 18	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGA TGTCCTGGGTCCGCCAGGCCCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCCCT GGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCC CAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAG CACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGT GTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCC AGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCT GCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCC CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAAAAGA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGC CCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCT GGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGAC GGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGG ACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGG CAAG
PN 编码 ID NO: 54	SEQ 56	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCGGCCCAGCCAGGGCATCAACTGGGAGCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAA

[0752]

		ACGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGAT CCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCAACAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACGGTGGCCG CTCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGA GCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGGGAGGCCAAG GTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCAACGAGCAGGAC AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCC TGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAA GGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCT GTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGG CGAGTGC
替代 编码 NO: 12	PN SEQ ID 29	GAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGAGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTCACCTTTAGTAGCTACTGGA TGAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG GTTCACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACAGTGTCTTCT
替代 编码 NO: 53	PN SEQ ID 57	GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTG TAGACCTAGTCAGGGGATTAAGTGGGAGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGAAAACG GCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTCAGG CACCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGT TTAACTCCTACCCCTGACCTTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGGAATCAAG
替代 编码 NO: 14	PN SEQ ID 31	GAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGAGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTCACCTTTAGTAGCTACTGGA TGAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG GTTCACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACAGTGTCTTCTGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTG TCTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCCACAAG CGGAGGCACTGCAGCTCTGGGTTGTCTGGTGAA GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTG AACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACC TTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTAC AGCCTGAGCAGCGTCGTGACTGTGCCTAGTTCCA GCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA

[0753]

			GTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACC TGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGA GGACCCAGCGTGTTCTGTTCCTCCCAAGCCCA AGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGG TGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGG ACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG GGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAG AGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT GTCCGTCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTG AACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAG CAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATAAG ACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGC TTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
替代 编码 NO: 54	PN SEQ ID	58	GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGAATCACCTG TAGACCTAGTCAGGGGATTAAGTGGGAGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGGAAAACG GCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTCAGG CACCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGT TTAACTCCTACCCCTGACCTTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCC AGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGC TGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGC TGAACAACCTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAA GGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGT ACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA GCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGT GC
重链的前导序列		59	MEFGLSWWFLVAILEGVHC
轻链的前导序列		60	MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC
PN编码 ID NO: 59	SEQ	61	ATGGAATTCGGCCTGAGCTGGGTGTTCTGTGCG CGATTCTGGAAGGCGTGCACTGC
PN编码 ID NO: 60	SEQ	62	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGG CTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGCGCCAGATGT
重链的替代 前导序列		63	MAVWWTLPFLMAAAQSVQA

[0754]

轻链的替代 前导序列	64	MSVLTQVLALLLLWLTGTRC
替代PN编码 SEQ ID NO: 63	65	ATGGCCTGGGTGTGGACCCTGCCCTTCCTGATGG CCGCTGCTCAGTCAGTGCAGGCC
替代PN编码 SEQ ID NO: 64	66	ATGAGCGTGCTGACTCAGGTGCTGGCCCTGCTGC TGCTGTGGCTGACCGGCACCCGCTGC
重链的第二 替代前导序列	67	MEWSWWFLFFLSVTTGVHS
轻链的第二替 代前导序列	68	MSVPTQVLGLLLLWLT DARC
第二替代PN编码 SEQ ID NO: 67	69	ATGGAATGGTCCTGGGTGTTCTTCTTCCTGTC CGTGACCACAGGCGTGCACTCC
第二替代PN编码 SEQ ID NO: 68	70	ATGTCCGTGCCCACACAGGTGCTGGGCCTGCTG CTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATGC
共有序列 CDRL1 (CHOTHIA)	71	SQX ₁ IX ₂ X ₃ X ₄
共有序列 CDRL3 (CHOTHIA)	72	FX ₁ SYPL
共有序列 CDRL1 (KABAT)	73	RPSQX ₁ IX ₂ X ₃ X ₄ LA
共有序列 CDRL2 (KABAT)	74	DASSLEX ₁
共有序列 CDRL3 (KABAT)	75	QQFX ₁ SYPLT
hulL-17A	76	GITIPRNP GCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTN PKRSSDYNNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKC RHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCP NSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVAEFRH
hulL-17F	77	MRKIPKVGHTFFQKPESCPPVPGGSMKLDIGIINEN QRVSMRNIERSRSTSPWNYTVTWDPNRYPSEVVQ AQCRNLGCINAQKEDISMNSVPIQQETLVVRRKHQ GCSVSFQLEKVLVTVGCTCVTPVIHHVQ
替代 hulL-17A	78	GPIVKAGITIPRNP GCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNR NTNTNPKRSSDYNNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVI WEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRRE PPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA
cynolL-17A	79	GIAIPRNSGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTSTN PKRSSDYNNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKC RHLGCVKADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPRHC

[0755]

		PNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA
cynolL-17F	80	MRKIPKVGHTFFQKPESCPPVPEGSMKLDGTGIINEN QRVSMsrNIESRSTSPWNYTVTWDPNRYPSEVVQ AQCKHLGCINAQGKEDISMNSVPIQQETLVLRRKHQ GCSVSFQLEKVLVTVGCTCVTPVVHHVQ
恒河猴 IL-17A	81	GIAIPRNSGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTSTS PKRSSDYNNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKC RHLGCVKADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPRHC PNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA
狨猴 IL-17A	82	SPQNPGCPNAEDKNFPRTVMVNLNIRNRNTNSKRA SDYYNRSSSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLG CVDADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPRHCTNSF RLEKMLVSVGCTCVTPIVHHVA
mlL-17A	83	MAAIPQSSACPNTAKDFLQNVKVNKVFNSLGAK VSSRRPSDYLNRSSTSPWTLHRNEDPDRYPSVIWEA QCRHQRCVNAEGKLDHHMNSVLIQQEILVLKREPES CPFTFRVEKMLVGVGCTCVASIVRQAA
mlL-17F	84	APEPEFRHRKNPKAGVPALQKAGNCPPLEDNTVRV DIRIFNQNGISVPREFQNRSSSPWDYNITRDPHRF PSEIAEAQCRHSGCINAQGQEDSTMNSVAIQEILV LRREPQGCNSFRLEKMLLKVGCTCVKPIVHQAA
ratIL-17A	85	MAVLIPQSSVCPNAEANNFLQNVKVNKVINSLSSK ASSRRPSDYLNRSSTSPWTLNRNEDPDRYPSVIWEA QCRHQRCVNAEGKLDHHMNSVLIQQEILVLKREPEK CPFTFRVEKMLVGVGCTCVSSIVRHAS
hulL-17RA	86	NCTVKNSTCLDDSWIHPRNLTPSSPKDLQIQLHFAH TQQGDLFPVAHIEWTLQTDASILYLEGAELSVLQLNT NERLCVRFEFLSKLRHHHRRWRFTFSHFVDPDQE YEVTVHHLKPIPDGDPNHQSKNFLVPDCEHARMK VTPCMSSGSLWDPNITVETLEAHQLRVSTLWNES THYQILLTSFPHMENHSCFEHMHIPAPRPEEFHQR SNVTLTLRNLKGCCRHQVQIQPFFSSCLNDCLRHS TVSCPEMPDTPPIPDYMPDWFRHDSGGGLNDIF EAQKIEWHE

序列表

<110> 诺华股份有限公司

<120> 抗-IL-17A 抗体及其在治疗自身免疫性和炎性病症中的用途

<130> PAT055329

<140> PCT/IB2014/058854

<141> 2014-02-07

<150> US 61/762406

<151> 2013-02-08

<160> 86

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

[0001]

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Lys Gln Asp Gly Ser Glu

1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 3

Asp Arg Gly Ser Leu Tyr Tyr
1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

Ser Gln Gly Ile Ile Ser Ala
1 5

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> 人

[0002]

<400> 5

Asp Ala Ser
1

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 7

Ser Tyr Trp Met Ser
1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 8

Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

[0003]

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 9

Arg Pro Ser Gln Gly Ile Ile Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 10

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Asn
1 5

<210> 11

<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 11

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 12
<211> 116
<212> PRT
<213> 人

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0004] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 13

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Gly Ile Ile Ser Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

[0005]

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 14
<211> 446
<212> PRT
<213> 人

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

[0006]

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

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

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

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

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

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

	165		170		175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu					
	180		185		190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr					
	195		200		205
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr					
	210		215		220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe					
	225		230		235
					240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro					
	245		250		255
[0007]					
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val					
	260		265		270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr					
	275		280		285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val					
	290		295		300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys					
	305		310		315
					320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser					
	325		330		335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro					

340	345	350
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
355	360	365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
370	375	380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
385	390	395
400		
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
405	410	415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
420	425	430

[0008]

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

<210> 15
<211> 214
<212> PRT
<213> 人

<400> 15

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Gly Ile Ile Ser Ala
20
25
30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35
40
45

	Tyr	Asp	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Asn	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
	50						55					60					
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
	65					70					75					80	
	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Phe	Asn	Ser	Tyr	Pro	Leu	
					85					90						95	
	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	
				100					105						110		
	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	
			115					120						125			
[0009]	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	
		130					135					140					
	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	
	145					150					155					160	
	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	
					165					170					175		
	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	
					180				185						190		
	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	
			195					200					205				
	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys											
	210																

	<210> 16	
	<211> 348	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 16	
	gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggcgac ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg	60
	agctgcgccg ccagcggett caccttcagc agctactgga tgtcctgggt ccgccaggcc	120
	cctggcaaag gcctcgaatg ggtggccaac atcaagcagg acggcagcga gaagtactac	180
	gtggacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac	240
	ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggaccgg	300
	ggcagcctgt actattgggg ccagggcacc ctggtcaccg tgtccagc	348
[0010]	<210> 17	
	<211> 321	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 17	
	gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc	60
	atcacttgcc ggccaagtca gggcattatc agtgctttag cctggtatca gcagaaacca	120
	gggaaagctc ctaagctect gatctatgat gcctccagtt tggaaaatgg ggtcccatca	180
	aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
	gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accctctcac ttccggcgga	300
	gggaccaagg tggagatcaa a	321
	<210> 18	
	<211> 1338	
	<212> DNA	
	<213> 人	

[0011]	<400> 18	
	gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggcgac ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg	60
	agctgcgccg ccagcggctt caccttcagc agctactgga tgtcctgggt ccgccaggcc	120
	cctggcaaag gcctcgaatg ggtggccaac atcaagcagg acggcagcga gaagtactac	180
	gtggacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac	240
	ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggaccgg	300
	ggcagcctgt actattgggg ccagggcacc ctggtcaccg tgtccagcgc tagcaccaag	360
	ggccccagcg tgttccccct ggcccccagc agcaagagca ccagcggcgg cacagccgcc	420
	ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gagcccgtga ccgtgtcctg gaacagcgga	480
	gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc gccgtgtgc agagcagcgg cctgtacagc	540
	ctgtccagcg tggtagacgt gcccagcagc agcctgggca ccagacctc catctgcaac	600
	gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag tggagcccaa gagctgcgac	660
	aagaccaca cctgcccccc ctgccagcc ccagagctgc tgggcggacc ctccgtgttc	720
	ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgatcagca ggacccccga ggtgacctgc	780
	gtggtgtgg acgtgagcca cgaggacca gaggtgaagt tcaactggtc cgtggacggc	840
	gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg	900
	gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggtga acggcaagga atacaagtgc	960
	aaggtctcca acaaggccct gccagcccc atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc	1020
	cagccacggg agccccaggt gtacaccctg cccccctccc gggaggagat gaccaagaac	1080
	caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccca gcgacatgc cgtggagtgg	1140
	gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc cccagtgct ggacagcgac	1200
	ggcagcttct tctgtacag caagctgacc gtggacaagt ccaggtggca gcagggaac	1260

	gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacaccca gaagagcctg	1320
	agcctgtccc ccggcaag	1338
	<210> 19	
	<211> 642	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 19	
	gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc	60
	atcacttgcc ggccaagtca gggcattatc agtgctttag cctggtatca gcagaaacca	120
	gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaaatgg ggtcccatca	180
	aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
	gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accctctcac ttctggcgga	300
[0012]	gggaccaagg tggagatcaa acgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat ctccccccc	360
	agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	420
	ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag	480
	gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc	540
	ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc	600
	ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc	642
	<210> 20	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> 人	
	<400> 20	
	Ser Gln Val Ile Ile Ser Ala	
	1 5	

<210> 21
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 21

Phe Asp Ser Tyr Pro Leu
1 5

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<400> 22

Arg Pro Ser Gln Val Ile Ile Ser Ala Leu Ala
1 5 10

[0013]

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 23

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Gln
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 24

Gln Gln Phe Asp Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 25
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 25

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Val Ile Ile Ser Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Gln Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

[0014]

Ser Val Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 26
<211> 214
<212> PRT
<213> 人

<400> 26

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Val Ile Ile Ser Ala			
20	25	30	
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Gln Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Val Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Ser Tyr Pro Leu			
85	90	95	
[0015]			
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
100	105	110	
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
115	120	125	
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
130	135	140	
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
165	170	175	
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			

	180	185	190
	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
	195	200	205
	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210		
	<210> 27		
	<211> 321		
	<212> DNA		
	<213> 人		
	<400> 27		
	gccatccagc tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc		60
	atcacctgtc ggcccagcca ggtcatcatc agcgccctgg cctggtatca gcagaagcct		120
[0016]	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaacaggg cgtgcccagc		180
	cggttcagcg gcagcgtgtc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc		240
	gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttcgacagct accccctgac cttcggcgga		300
	ggcaccaagg tggaaatcaa g		321
	<210> 28		
	<211> 642		
	<212> DNA		
	<213> 人		
	<400> 28		
	gccatccagc tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc		60
	atcacctgtc ggcccagcca ggtcatcatc agcgccctgg cctggtatca gcagaagcct		120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaacaggg cgtgcccagc		180
	cggttcagcg gcagcgtgtc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc		240

	gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttcgacagct accccctgac cttcggcgga	300
	ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc	360
	agcgacgagc agctgaagag cggcacccgc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	420
	ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag	480
	gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc	540
	ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc	600
	ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc	642
	<210> 29	
	<211> 348	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 29	
[0017]	gaggtgcagc tgggtggaatc aggaggcgac ctggtgcagc ctggcggctc actgagactg	60
	agctgcgcgc ctagtggtt cacctttagt agctactgga tgagctgggt gcgacaggcc	120
	cctggcaagg gactggagtg ggtggccaat attaagcagg acggctcaga gaagtactac	180
	gtggactcag tgaagggcgc gttcactatt agccgggata acgctaagaa tagcctgtac	240
	ctgcagatga atagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgcgc tagagataga	300
	ggctcactgt actactgggg ccagggcacc ctggtgacag tgtcttct	348
	<210> 30	
	<211> 321	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 30	
	gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtgggcga tagagtgact	60
	atcacctgta gacctagtca ggtgatcatt agcgccctgg cctggtatca gcagaagccc	120

	ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tggaacaggc cgtgccctct	180
	aggttttagcg gctcagtgct aggcaccgac ttcacctga ctattagtag cctgcagccc	240
	gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag ttcgatagct accccctgac cttcggcgga	300
	ggcactaagg tggaatcaa g	321
	<210> 31	
	<211> 1338	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 31	
	gaggtgcagc tgggtgaatc aggaggcgac ctggtgcagc ctggcggctc actgagactg	60
	agctgcgccg ctagtggctt caccttagt agctactgga tgagctgggt gcgacaggcc	120
	cctggcaagg gactggagtg ggtggccaat attaacgagg acggctcaga gaagtactac	180
[0018]	gtggactcag tgaaggccg gtctactatt agccgggata acgctaagaa tagcctgtac	240
	ctgcagatga atagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgcgc tagagataga	300
	ggctcactgt actactgggg ccagggcacc ctggtgacag tgtcttctgc tagaccaag	360
	ggcccaagtg tctttccctt gccccccagc agcaagtcca caagcggagg cactgcagct	420
	ctgggttgct tggatgaaga ctacttcccc gagcccgta cagtgtcctg gaacagcgga	480
	gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc gccgtgctgc agagcagcgg cctgtacagc	540
	ctgagcagcg tcgtgactgt gcctagtacc agcctgggca cccagaccta tatctgcaac	600
	gtgaaccaca agcccagcaa caccaagggt gacaagagag tggagcccaa gagctgcgac	660
	aagaccaca cctgcccccc ctgccagct ccagaactgc tgggaggacc cagcgtgttc	720
	ctgttcccc ccaagcccaa ggacacctg atgatcagca ggacccccga ggtgacctgc	780
	gtgggtgttg acgtgtccca cgaggaccca gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggg	840
	gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg	900

	gtggtgtccg tcctgacagt gctgcaccag gattggctga acggcaaaga atacaagtgc	960
	aaagtctcca acaaggccct gccagcccca atcgaaaaga caatcagcaa ggccaagggc	1020
	cagccacggg agccccaggt gtacaccctg cccccagcc gggaggagat gaccaagaac	1080
	caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccca gcgatatcg cgtggagtgg	1140
	gagagcaacg gccagcccg gaacaactac aagaccaccc cccagtgct ggacagcgac	1200
	ggcagcttct tcctgtacag caagctgacc gtggacaagt ccaggtggca gcagggaac	1260
	gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtcctg	1320
	agcctgagcc ccggcaag	1338
[0019]	<210> 32	
	<211> 642	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 32	
	gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtggcgga tagagtgact	60
	atcacctgta gacctagtca ggtgatcatt agcgccctgg cctggatatca gcagaagccc	120
	ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tggaacaggg cgtgccctct	180
	aggttttagcg gctcagtgtc aggcaccgac ttcacctga ctattagtag cctgcagccc	240
	gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag ttcgatagct accccctgac cttcggcgga	300
	ggcactaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc	360
	agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	420
	ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag	480
	gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc	540
	ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc	600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc

642

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 33

Ser Gln Gly Ile Tyr Trp Glu

1 5

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 34

[0020]

Arg Pro Ser Gln Gly Ile Tyr Trp Glu Leu Ala

1 5 10

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> 人

<400> 35

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Gly Ile Tyr Trp Glu

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Gln Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 36

<211> 214

<212> PRT

<213> 人

[0021]

<400> 36

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Gly Ile Tyr Trp Glu
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Gln Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

[0022]

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 37

<211> 321

<212> DNA

<213> 人

<400> 37

gccatccagc tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc ggcccagcca gggcatctac tgggagctgg cctggtatca gcagaagcct 120

	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaacaggc cgtgcccagc	180
	cggttcagcg gcagcggatc cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc	240
	gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttcaacagct accccctgac cttcggcgga	300
	ggcaccaagg tggaatatca g	321
	<210> 38	
	<211> 642	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 38	
	gccatccagc tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc	60
	atcacctgtc ggcccagcca gggcatctac tgggagctgg cctggatatca gcagaagcct	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaacaggc cgtgcccagc	180
[0023]	cggttcagcg gcagcggatc cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc	240
	gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttcaacagct accccctgac cttcggcgga	300
	ggcaccaagg tggaatatca gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc	360
	agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caatttctac	420
	ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgcc tcgagagcgg caacagccag	480
	gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc	540
	ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc	600
	ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc	642
	<210> 39	
	<211> 321	
	<212> DNA	
	<213> 人	

	<400> 39	
	gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtgggcga tagagtgact	60
	atcacctgta gacctagcca gggaatctac tgggagctgg cctggtatca gcagaagccc	120
	ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tggaacaggg cgtgccctct	180
	aggttttagcg gctcaggctc aggcaccgac ttcaccctga ctattagtag cctgcagccc	240
	gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag tttaactcct accccctgac cttcggcgga	300
	ggcactaagg tggaaatcaa g	321
	<210> 40	
	<211> 642	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 40	
	gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtgggcga tagagtgact	60
[0024]	atcacctgta gacctagcca gggaatctac tgggagctgg cctggtatca gcagaagccc	120
	ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tggaacaggg cgtgccctct	180
	aggttttagcg gctcaggctc aggcaccgac ttcaccctga ctattagtag cctgcagccc	240
	gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag tttaactcct accccctgac cttcggcgga	300
	ggcactaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc	360
	agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	420
	ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggt gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag	480
	gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc	540
	ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc	600
	ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc	642
	<210> 41	

<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 41

Ser Gln Gly Ile Asn Trp Glu
1 5

<210> 42
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<400> 42

Arg Pro Ser Gln Gly Ile Asn Trp Glu Leu Ala
1 5 10

[0025]

<210> 43
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 43

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Gly Ile Asn Trp Glu
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Gln Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 44

<211> 214

<212> PRT

<213> 人

<400> 44

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

[0026]

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Gly Ile Asn Trp Glu
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Gln Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
		160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
	165	170
		175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190

[0027]

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	
195	200
	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
210	

<210> 45	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 45	
gccatccagc tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc	60
atcacctgtc ggcccagcca gggcatcaac tgggagctgg cctggtatca gcagaagcct	120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaacaggg cgtgccagc	180
cggttcagcg gcagcggatc cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc	240

	gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttcaacagct accccctgac cttcggcgga	300
	ggcaccaagg tggaaatcaa g	321
	<210> 46	
	<211> 642	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 46	
	gccatccagc tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc	60
	atcacctgtc ggcccagcca gggcatcaac tgggagctgg cctggtatca gcagaagcct	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaacaggc cgtgcccagc	180
	cggttcagcg gcagcggatc cggcaccgac ttcacctga ccatcagctc cctgcagccc	240
	gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttcaacagct accccctgac cttcggcgga	300
[0028]	ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc	360
	agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	420
	ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag	480
	gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc	540
	ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc	600
	ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc	642
	<210> 47	
	<211> 321	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 47	
	gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtgggcga tagagtgact	60
	atcacctgta gacctagtca ggggattaac tgggagctgg cctggtatca gcagaagccc	120

	ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tggaacaggc cgtgccctct	180
	aggttttagcg gctcaggctc aggcaccgac ttcacctga ctattagtag cctgcagccc	240
	gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag tttaactcct accccctgac cttcggcgga	300
	ggcactaagg tggaatatcaa g	321
<210>	48	
<211>	642	
<212>	DNA	
<213>	人	
<400>	48	
	gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtgggcga tagagtgact	60
	atcacctgta gacctagtca ggggattaac tgggagctgg cctggatatca gcagaagccc	120
	ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tggaacaggc cgtgccctct	180
[0029]	aggttttagcg gctcaggctc aggcaccgac ttcacctga ctattagtag cctgcagccc	240
	gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag tttaactcct accccctgac cttcggcgga	300
	ggcactaagg tggaatatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc	360
	agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	420
	ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag	480
	gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc	540
	ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc	600
	ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc	642
<210>	49	
<211>	348	
<212>	DNA	
<213>	人	

	<400> 49	
	gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgac ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg	60
	tcttgccgcg cctccggett caccctctcc agctactgga tgtcctgggt gcgacaggec	120
	cctggcaagg gactggaatg ggtggccaac atcaagcagg acggctccga gaagtactac	180
	gtggactccg tgaagggcg gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac	240
	ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggaccgg	300
	ggctccctgt actattgggg ccagggcacc ctggtgacag tgtcctcc	348
	<210> 50	
	<211> 321	
	<212> DNA	
	<213> 人	
[0030]	<400> 50	
	gccatccagc tgaccagtc cccctccagc ctgtctgcct ccgtgggcca cagagtgacc	60
	atcacctgtc ggccctccca gggcatcaac tgggaactgg cctggatatca gcagaagccc	120
	ggcaaggecc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaacaggg cgtgccctcc	180
	agattctccg gctctggctc cggcaccgac ttcacctga ccattctccag cctgcagccc	240
	gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttcaactcct accccctgac cttcggcgga	300
	ggcaccaagg tggaatcaa g	321
	<210> 51	
	<211> 1338	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 51	
	gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgac ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg	60
	tcttgccgcg cctccggett caccctctcc agctactgga tgtcctgggt gcgacaggec	120
	cctggcaagg gactggaatg ggtggccaac atcaagcagg acggctccga gaagtactac	180

	gtggactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac	240
	ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggaccgg	300
	ggctccctgt actattgggg ccagggcacc ctggtgacag tgtcctccgc ctccaccaag	360
	ggcccaagcg tgttccccct ggcccccagc agcaagagca ccagcggcgg cacagccgcc	420
	ctgggctgcc tggatgaagga ctacttcccc gagcccgta ccgtgtcctg gaacagcggg	480
	gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc gccgtgctgc agagcagcgg cctgtacagc	540
	ctgagcagcg tggatgacct gccagcagc agcctgggca ccagacctc catctgtaac	600
	gtgaaccaca agcccagcaa caccaagggt gacaagagag tggagcccaa gagctgtgac	660
	aagaccaca cctgcccccc ctgccagcc cccgagctgc tgggcggacc cagcgtgttc	720
	ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgatcagca gaacccccga ggtgacctgt	780
	gtgggtgggtg acgtgtccca cgaggaccca gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggc	840
[0031]	gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg	900
	gtgggtgtccg tgctgacctg gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt	960
	aagggtgtcca acaaggccct gccagcccca atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc	1020
	cagccaagag agccccaggt gtacaccctg ccaccagca gggaggagat gaccaagaac	1080
	cagggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctacccaa gcgacatgc cgtggagtgg	1140
	gagagcaacg gccagcccgga gaacaactac aagaccaccc cccagtgct ggacagcgac	1200
	ggcagcttct tcctgtacag caagctgacc gtggacaaga gcagatggca gcagggaac	1260
	gtgttcagct gtcctgtgat gcacaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg	1320
	agcctgtccc caggcaag	1338
	<210> 52	
	<211> 642	

<212> DNA

<213> 人

<400> 52

gccatccagc tgaccacagtc cccctccagc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc ggccctccca gggcatcaac tgggaactgg cctggatatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaacaggg cgtgccctcc 180

agattctccg gctctggctc cggcaccgac ttcacctga ccattctccag cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttcaactcct accccctgac cttcggcgga 300

ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacgggtg gccgctccca gcgtgttcat cttcccccca 360

agcgacgagc agctgaagag cggcacccgc agcgtgggtg gtctgtctgaa caacttctac 420

cccaggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540

[0032]

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc 642

<210> 53

<211> 107

<212> PRT

<213> 人

<400> 53

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Gly Ile Asn Trp Glu

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 54
<211> 214
<212> PRT
<213> 人

[0033]

<400> 54

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Gly Ile Asn Trp Glu
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

[0034] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 55

<211> 321

<212> DNA

<213> 人

<400> 55

gccatccagc tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc

60

	atcacctgtc ggcccagcca gggcatcaac tgggagctgg cctggtatca gcagaagcct	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaaaacgg cgtgcccagc	180
	cggttcagcg gcagcggatc cggcacccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc	240
	gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttcaacagct accccctgac cttcggcgga	300
	ggcaccaagg tggaaatcaa g	321
	<210> 56	
	<211> 642	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 56	
	gccatccagc tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc	60
	atcacctgtc ggcccagcca gggcatcaac tgggagctgg cctggtatca gcagaagcct	120
[0035]	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagctccc tggaaaacgg cgtgcccagc	180
	cggttcagcg gcagcggatc cggcacccgac ttcaccctga ccatcagctc cctgcagccc	240
	gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ttcaacagct accccctgac cttcggcgga	300
	ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc	360
	agcgacgagc agctgaagag cggcacccgc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	420
	ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag	480
	gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc	540
	ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc	600
	ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc	642
	<210> 57	
	<211> 321	
	<212> DNA	

<213> 人

<400> 57

gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtgggcga tagagtgact	60
atcacctgta gacctagtca ggggattaac tgggagctgg cctggtatca gcagaagccc	120
ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tggaaaacgg cgtgccctct	180
aggttttagcg gctcaggctc aggcaccgac ttcacctga ctattagtag cctgcagccc	240
gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag ttttaactcct accccctgac cttcggcgga	300
ggcactaagg tggaaatcaa g	321

<210> 58

<211> 642

<212> DNA

<213> 人

[0036]

<400> 58

gctattcagc tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtgggcga tagagtgact	60
atcacctgta gacctagtca ggggattaac tgggagctgg cctggtatca gcagaagccc	120
ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gctagtagtc tggaaaacgg cgtgccctct	180
aggttttagcg gctcaggctc aggcaccgac ttcacctga ctattagtag cctgcagccc	240
gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag ttttaactcct accccctgac cttcggcgga	300
ggcactaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc	360
agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caactttctac	420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag	480
gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc	540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc	600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc	642

<210> 59
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重链前导序列

<400> 59

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val His Cys

[0037] <210> 60
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 轻链前导序列

<400> 60

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys
20

<210> 61
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 重链前导序列的编码序列

	<400> 61	
	atggaattcg gcctgagctg ggtgttcctg gtcgcgattc tggaaggcgt gcactgc	57
	<210> 62	
	<211> 66	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 轻链前导序列的编码序列	
	<400> 62	
	atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggcgcc	60
	agatgt	66
	<210> 63	
	<211> 19	
	<212> PRT	
[0038]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 替代的重链前导序列	
	<400> 63	
	Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser	
	1 5 10 15	
	Val Gln Ala	
	<210> 64	
	<211> 20	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 替代的轻链前导序列	

<400> 64

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys
20

<210> 65

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 替代的重链前导序列的编码序列

<400> 65

atggcctggg tgtggaccct gcccttcctg atggccgctg ctcagtcagt gcaggcc 57

[0039]

<210> 66

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 替代的轻链前导序列的编码序列

<400> 66

atgagcgtgc tgactcaggt gctggccctg ctgctgctgt ggctgaccgg caccgctgc 60

<210> 67

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 第二替代的重链前导序列

<400> 67

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 68

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 第二替代的轻链前导序列

<400> 68

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

[0040]

Asp Ala Arg Cys
20

<210> 69

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> for 第二替代的重链前导序列的编码序列

<400> 69

atggaatggt cctgggtggt cctgttcttc ctgtccgtga ccacaggcgt gcactcc

57

<210> 70

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

	<220>		
	<223>	第二替代的轻链前导序列的编码序列	
	<400>	70	
		atgtccgtgc ccacacaggt gctgggcctg ctgctgctgt ggctgaccga cgccagatgc	60
	<210>	71	
	<211>	7	
	<212>	PRT	
	<213>	人	
	<220>		
	<221>	Xaa	
	<222>	(3).. (3)	
	<223>	可变的	
	<220>		
[0041]	<221>	Xaa	
	<222>	(5).. (7)	
	<223>	可变的	
	<400>	71	
		Ser Gln Xaa Ile Xaa Xaa Xaa	
		1 5	
	<210>	72	
	<211>	6	
	<212>	PRT	
	<213>	人	
	<220>		
	<221>	Xaa	
	<222>	(2).. (2)	
	<223>	可变的	
	<400>	72	

Phe Xaa Ser Tyr Pro Leu
1 5

<210> 73
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> Xaa
<222> (5)..(5)
<223> 可变的

<220>
<221> Xaa
<222> (7)..(9)
<223> 可变的

<400> 73

[0042]

Arg Pro Ser Gln Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Leu Ala
1 5 10

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> Xaa
<222> (7)..(7)
<223> 可变的

<400> 74

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Xaa
1 5

<210> 75

<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> Xaa
<222> (4)..(4)
<223> 可变的

<400> 75

Gln Gln Phe Xaa Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 76
<211> 136
<212> PRT
<213> 人

[0043] <400> 76

Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys
1 5 10 15

Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn
20 25 30

Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr
35 40 45

Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser
50 55 60

Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp
65 70 75 80

Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile

85

90

95

Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu
100 105 110

Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val
115 120 125

His His Val Ala Glu Phe Arg His
130 135

<210> 77

<211> 134

<212> PRT

<213> 人

<400> 77

[0044]

Met Arg Lys Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu
1 5 10 15

Ser Cys Pro Pro Val Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Asp Ile Gly Ile
20 25 30

Ile Asn Glu Asn Gln Arg Val Ser Met Ser Arg Asn Ile Glu Ser Arg
35 40 45

Ser Thr Ser Pro Trp Asn Tyr Thr Val Thr Trp Asp Pro Asn Arg Tyr
50 55 60

Pro Ser Glu Val Val Gln Ala Gln Cys Arg Asn Leu Gly Cys Ile Asn
65 70 75 80

Ala Gln Gly Lys Glu Asp Ile Ser Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln
85 90 95

Glu Thr Leu Val Val Arg Arg Lys His Gln Gly Cys Ser Val Ser Phe
 100 105 110

Gln Leu Glu Lys Val Leu Val Thr Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro
 115 120 125

Val Ile His His Val Gln
 130

<210> 78
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 78

[0045] Gly Pro Ile Val Lys Ala Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys
 1 5 10 15

Pro Asn Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu
 20 25 30

Asn Ile His Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp
 35 40 45

Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp
 50 55 60

Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu
 65 70 75 80

Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val
 85 90 95

Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys
100 105 110

Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr
115 120 125

Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala
130 135

<210> 79

<211> 132

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 79

[0046] Gly Ile Ala Ile Pro Arg Asn Ser Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys
1 5 10 15

Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn
20 25 30

Thr Ser Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr
35 40 45

Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser
50 55 60

Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Val Lys Ala Asp
65 70 75 80

Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile
85 90 95

Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Arg His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu
100 105 110

Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val
115 120 125

His His Val Ala
130

<210> 80
<211> 134
<212> PRT
<213> 食蟹猴 (Macaca fascicularis)

<400> 80

Met Arg Lys Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu
1 5 10 15

[0047]

Ser Cys Pro Pro Val Pro Glu Gly Ser Met Lys Leu Asp Thr Gly Ile
20 25 30

Ile Asn Glu Asn Gln Arg Val Ser Met Ser Arg Asn Ile Glu Ser Arg
35 40 45

Ser Thr Ser Pro Trp Asn Tyr Thr Val Thr Trp Asp Pro Asn Arg Tyr
50 55 60

Pro Ser Glu Val Val Gln Ala Gln Cys Lys His Leu Gly Cys Ile Asn
65 70 75 80

Ala Gln Gly Lys Glu Asp Ile Ser Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln
85 90 95

Glu Thr Leu Val Leu Arg Arg Lys His Gln Gly Cys Ser Val Ser Phe

	100	105	110
	Gln Leu Glu Lys Val Leu Val Thr Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro		
	115	120	125
	Val Val His His Val Gln		
	130		
<210>	81		
<211>	132		
<212>	PRT		
<213>	恒河猴(Macaca mulatta)		
<400>	81		
	Gly Ile Ala Ile Pro Arg Asn Ser Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys		
	1	5	10
			15
[0048]	Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn		
	20	25	30
	Thr Ser Thr Ser Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr		
	35	40	45
	Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser		
	50	55	60
	Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Val Lys Ala Asp		
	65	70	75
			80
	Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile		
	85	90	95
	Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Arg His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu		
	100	105	110

Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val
 115 120 125

His His Val Ala
 130

<210> 82

<211> 127

<212> PRT

<213> 绒毛猴(Callithrix jacchus)

<400> 82

Ser Pro Gln Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ala Glu Asp Lys Asn Phe Pro
 1 5 10 15

[0049] Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile Arg Asn Arg Asn Thr Asn Ser
 20 25 30

Lys Arg Ala Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Ser Ser Pro Trp Asn Leu
 35 40 45

His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala
 50 55 60

Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Val Asp Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr
 65 70 75 80

His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg
 85 90 95

Glu Pro Arg His Cys Thr Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Met Leu Val
 100 105 110

Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala
115 120 125

<210> 83

<211> 134

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 83

Met Ala Ala Ile Ile Pro Gln Ser Ser Ala Cys Pro Asn Thr Glu Ala
1 5 10 15

Lys Asp Phe Leu Gln Asn Val Lys Val Asn Leu Lys Val Phe Asn Ser
20 25 30

[0050] Leu Gly Ala Lys Val Ser Ser Arg Arg Pro Ser Asp Tyr Leu Asn Arg
35 40 45

Ser Thr Ser Pro Trp Thr Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Asp Arg Tyr
50 55 60

Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Gln Cys Arg His Gln Arg Cys Val Asn
65 70 75 80

Ala Glu Gly Lys Leu Asp His His Met Asn Ser Val Leu Ile Gln Gln
85 90 95

Glu Ile Leu Val Leu Lys Arg Glu Pro Glu Ser Cys Pro Phe Thr Phe
100 105 110

Arg Val Glu Lys Met Leu Val Gly Val Gly Cys Thr Cys Val Ala Ser
115 120 125

Ile Val Arg Gln Ala Ala
130

<210> 84

<211> 141

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 84

Ala Pro Glu Pro Glu Phe Arg His Arg Lys Asn Pro Lys Ala Gly Val
1 5 10 15

Pro Ala Leu Gln Lys Ala Gly Asn Cys Pro Pro Leu Glu Asp Asn Thr
20 25 30

Val Arg Val Asp Ile Arg Ile Phe Asn Gln Asn Gln Gly Ile Ser Val
35 40 45

[0051]

Pro Arg Glu Phe Gln Asn Arg Ser Ser Ser Pro Trp Asp Tyr Asn Ile
50 55 60

Thr Arg Asp Pro His Arg Phe Pro Ser Glu Ile Ala Glu Ala Gln Cys
65 70 75 80

Arg His Ser Gly Cys Ile Asn Ala Gln Gly Gln Glu Asp Ser Thr Met
85 90 95

Asn Ser Val Ala Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro
100 105 110

Gln Gly Cys Ser Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Met Leu Leu Lys Val
115 120 125

Gly Cys Thr Cys Val Lys Pro Ile Val His Gln Ala Ala

130

135

140

<210> 85

<211> 134

<212> PRT

<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 85

Met Ala Val Leu Ile Pro Gln Ser Ser Val Cys Pro Asn Ala Glu Ala
1 5 10 15

Asn Asn Phe Leu Gln Asn Val Lys Val Asn Leu Lys Val Ile Asn Ser
20 25 30

Leu Ser Ser Lys Ala Ser Ser Arg Arg Pro Ser Asp Tyr Leu Asn Arg
35 40 45

[0052]

Ser Thr Ser Pro Trp Thr Leu Ser Arg Asn Glu Asp Pro Asp Arg Tyr
50 55 60

Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Gln Cys Arg His Gln Arg Cys Val Asn
65 70 75 80

Ala Glu Gly Lys Leu Asp His His Met Asn Ser Val Leu Ile Gln Gln
85 90 95

Glu Ile Leu Val Leu Lys Arg Glu Pro Glu Lys Cys Pro Phe Thr Phe
100 105 110

Arg Val Glu Lys Met Leu Val Gly Val Gly Cys Thr Cys Val Ser Ser
115 120 125

Ile Val Arg His Ala Ser
130

<210> 86

<211> 295

<212> PRT

<213> 人

<400> 86

Asn	Cys	Thr	Val	Lys	Asn	Ser	Thr	Cys	Leu	Asp	Asp	Ser	Trp	Ile	His
1				5					10					15	

Pro	Arg	Asn	Leu	Thr	Pro	Ser	Ser	Pro	Lys	Asp	Leu	Gln	Ile	Gln	Leu
			20					25					30		

His	Phe	Ala	His	Thr	Gln	Gln	Gly	Asp	Leu	Phe	Pro	Val	Ala	His	Ile
		35					40					45			

Glu	Trp	Thr	Leu	Gln	Thr	Asp	Ala	Ser	Ile	Leu	Tyr	Leu	Glu	Gly	Ala
[0053]	50					55					60				

Glu	Leu	Ser	Val	Leu	Gln	Leu	Asn	Thr	Asn	Glu	Arg	Leu	Cys	Val	Arg
65					70					75					80

Phe	Glu	Phe	Leu	Ser	Lys	Leu	Arg	His	His	His	Arg	Arg	Trp	Arg	Phe
				85					90					95	

Thr	Phe	Ser	His	Phe	Val	Val	Asp	Pro	Asp	Gln	Glu	Tyr	Glu	Val	Thr
				100				105						110	

Val	His	His	Leu	Pro	Lys	Pro	Ile	Pro	Asp	Gly	Asp	Pro	Asn	His	Gln
			115				120						125		

Ser	Lys	Asn	Phe	Leu	Val	Pro	Asp	Cys	Glu	His	Ala	Arg	Met	Lys	Val
			130				135				140				

Thr Thr Pro Cys Met Ser Ser Gly Ser Leu Trp Asp Pro Asn Ile Thr
145 150 155 160

Val Glu Thr Leu Glu Ala His Gln Leu Arg Val Ser Phe Thr Leu Trp
165 170 175

Asn Glu Ser Thr His Tyr Gln Ile Leu Leu Thr Ser Phe Pro His Met
180 185 190

Glu Asn His Ser Cys Phe Glu His Met His His Ile Pro Ala Pro Arg
195 200 205

Pro Glu Glu Phe His Gln Arg Ser Asn Val Thr Leu Thr Leu Arg Asn
210 215 220

[0054]

Leu Lys Gly Cys Cys Arg His Gln Val Gln Ile Gln Pro Phe Phe Ser
225 230 235 240

Ser Cys Leu Asn Asp Cys Leu Arg His Ser Ala Thr Val Ser Cys Pro
245 250 255

Glu Met Pro Asp Thr Pro Glu Pro Ile Pro Asp Tyr Met Pro Leu Trp
260 265 270

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala
275 280 285

Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
290 295

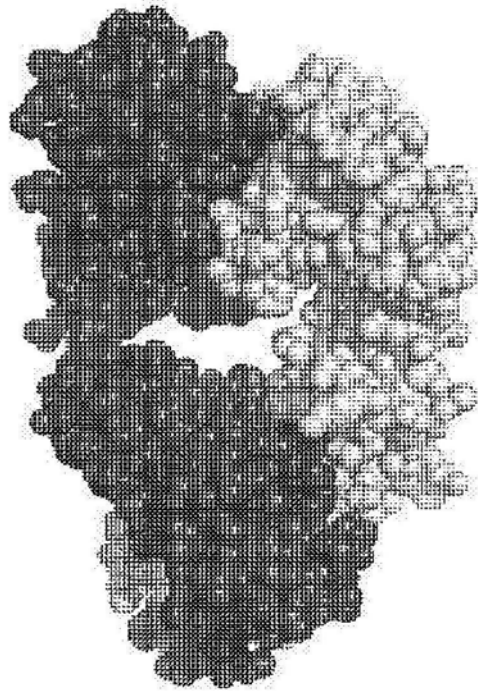


图1A

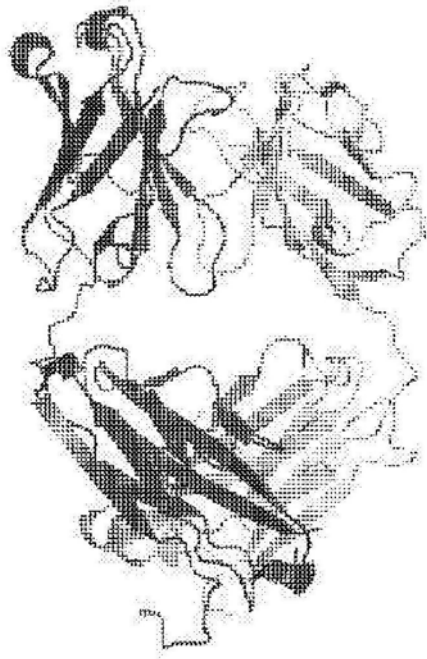


图1B

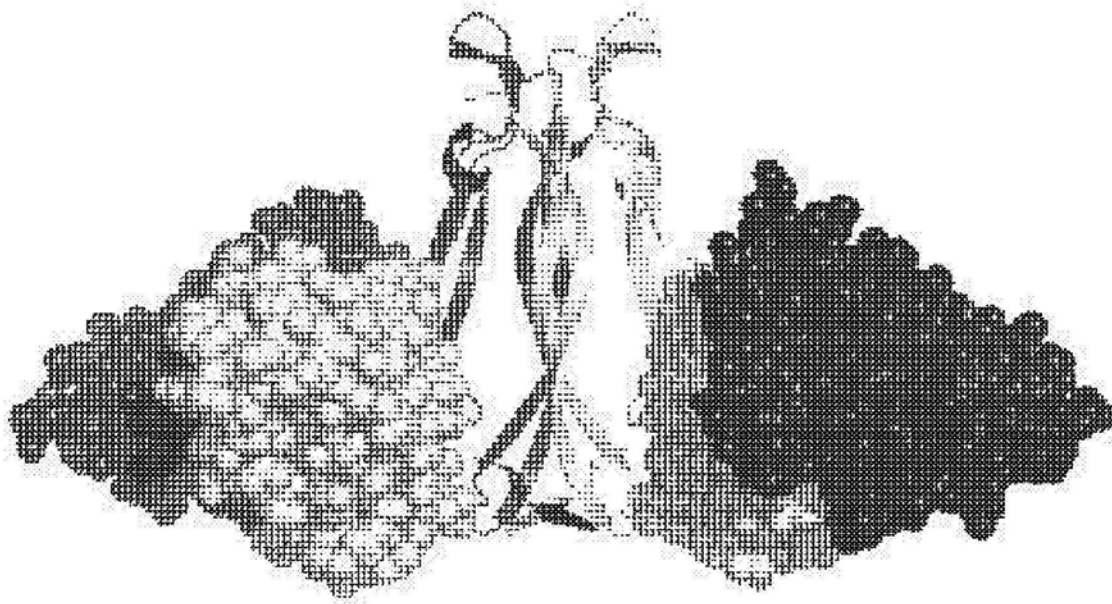


图2A

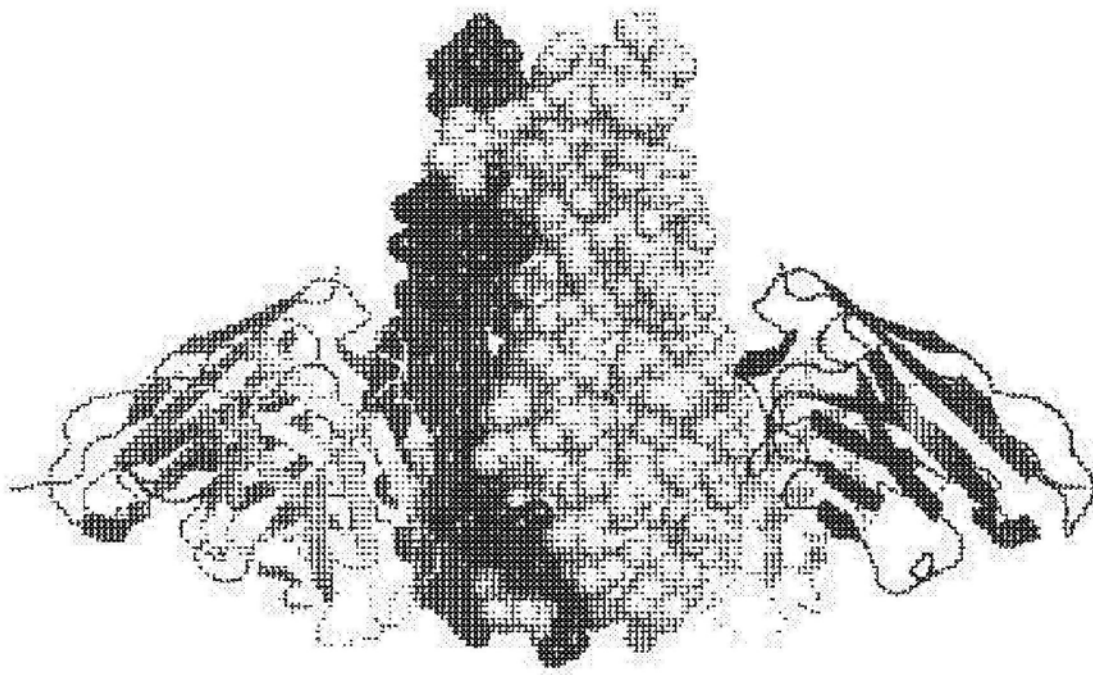


图2B

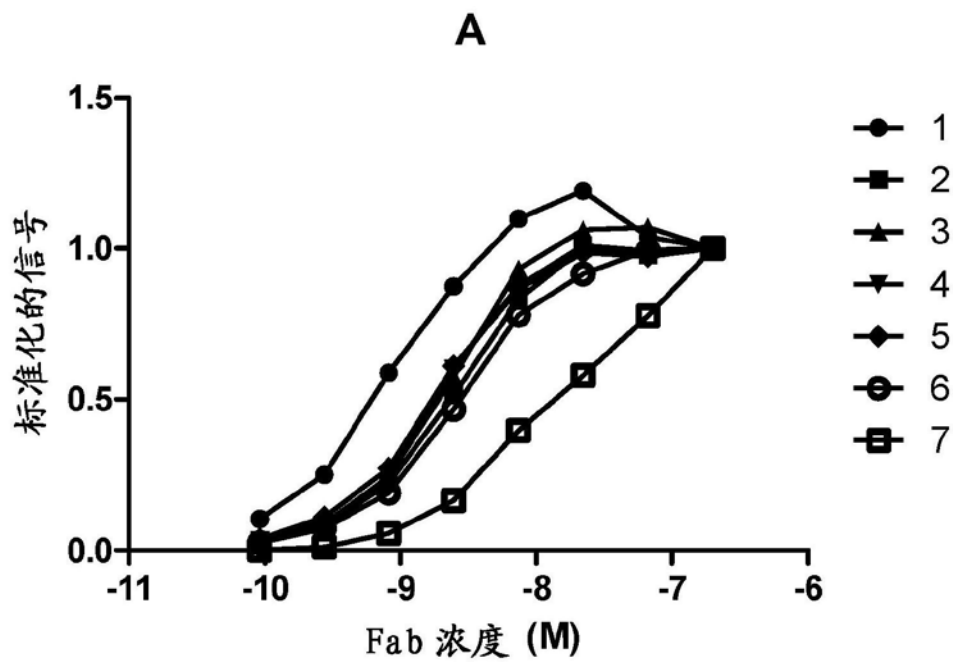


图3A

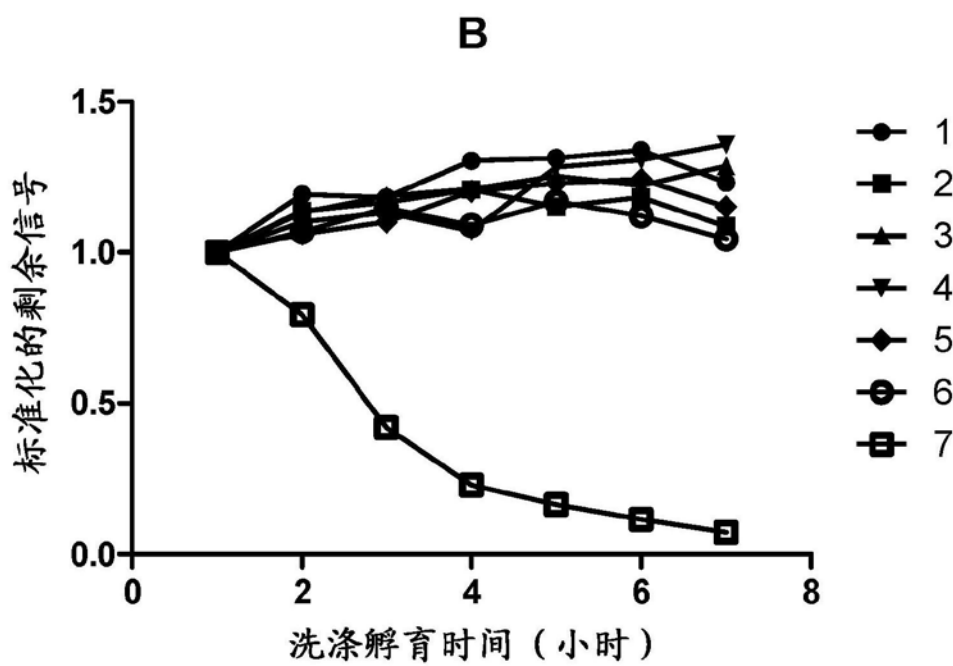


图3B

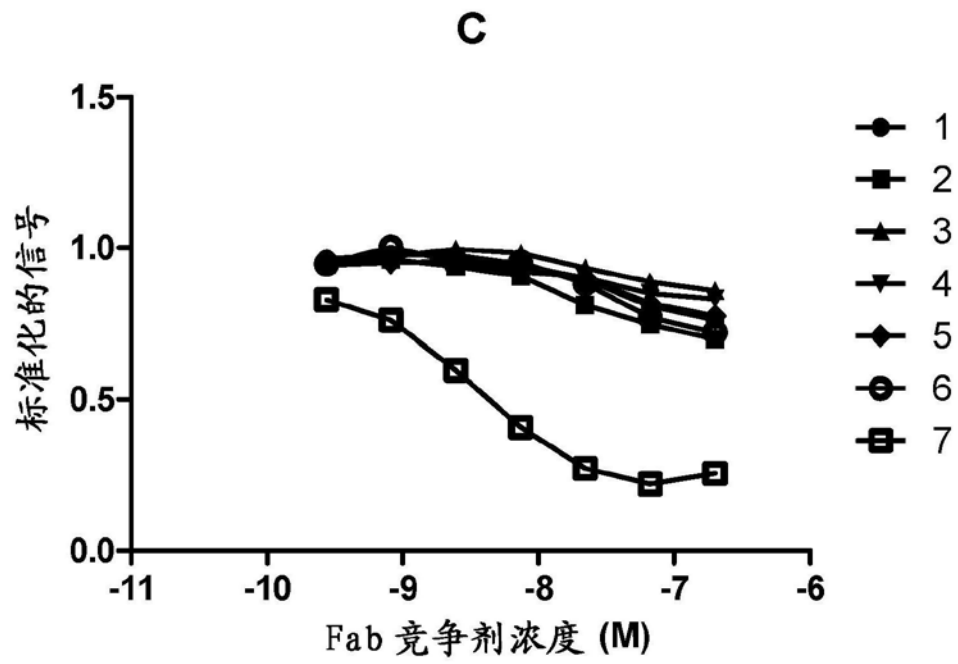


图3C

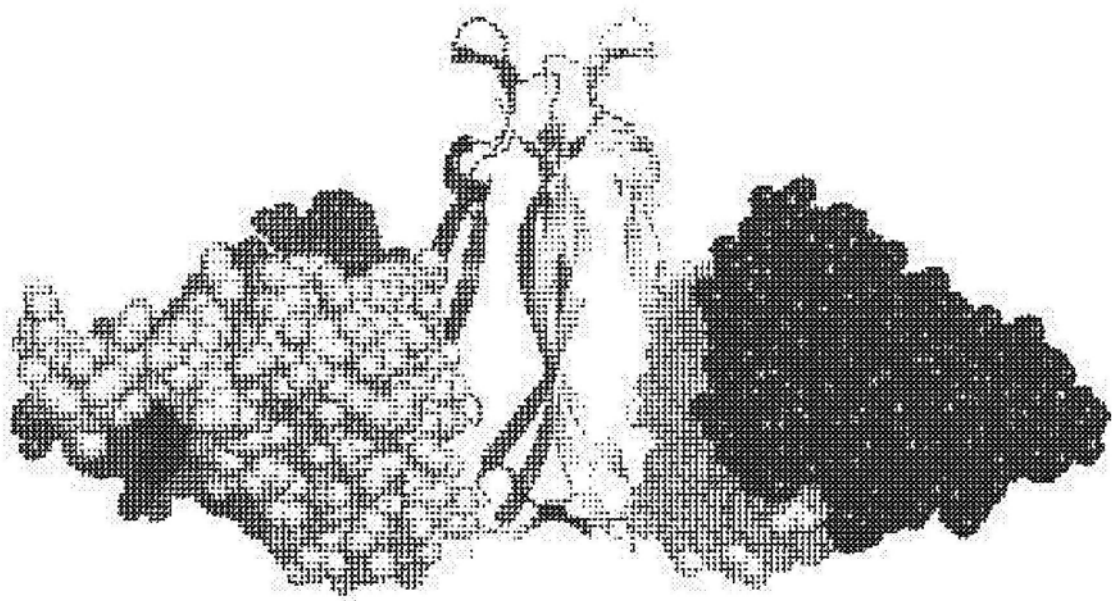


图4A

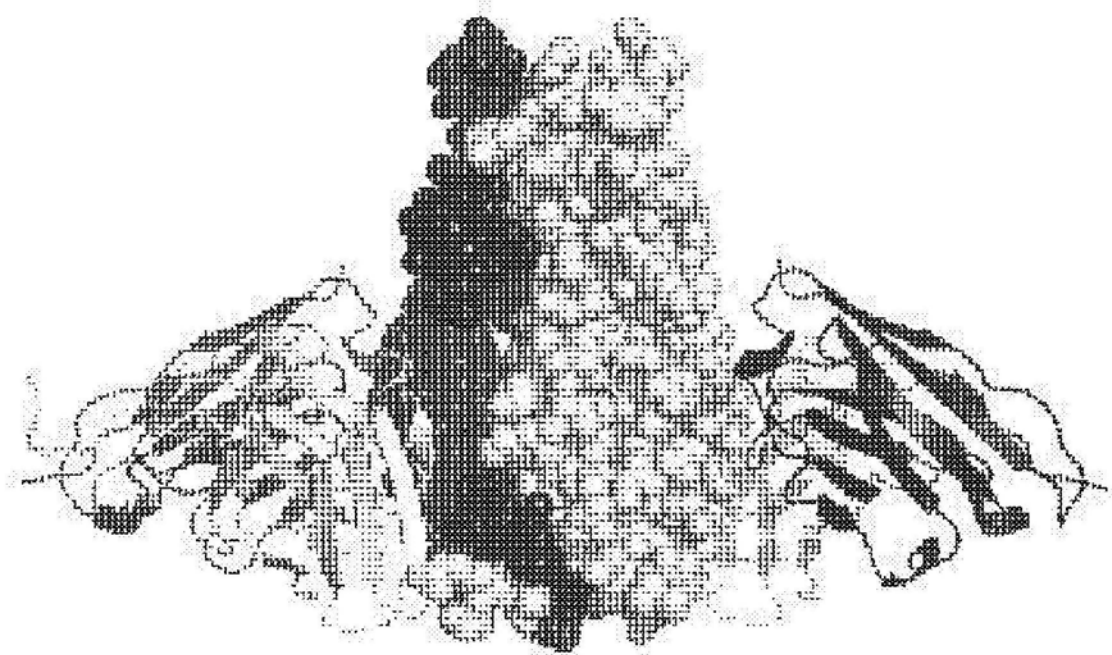


图4B

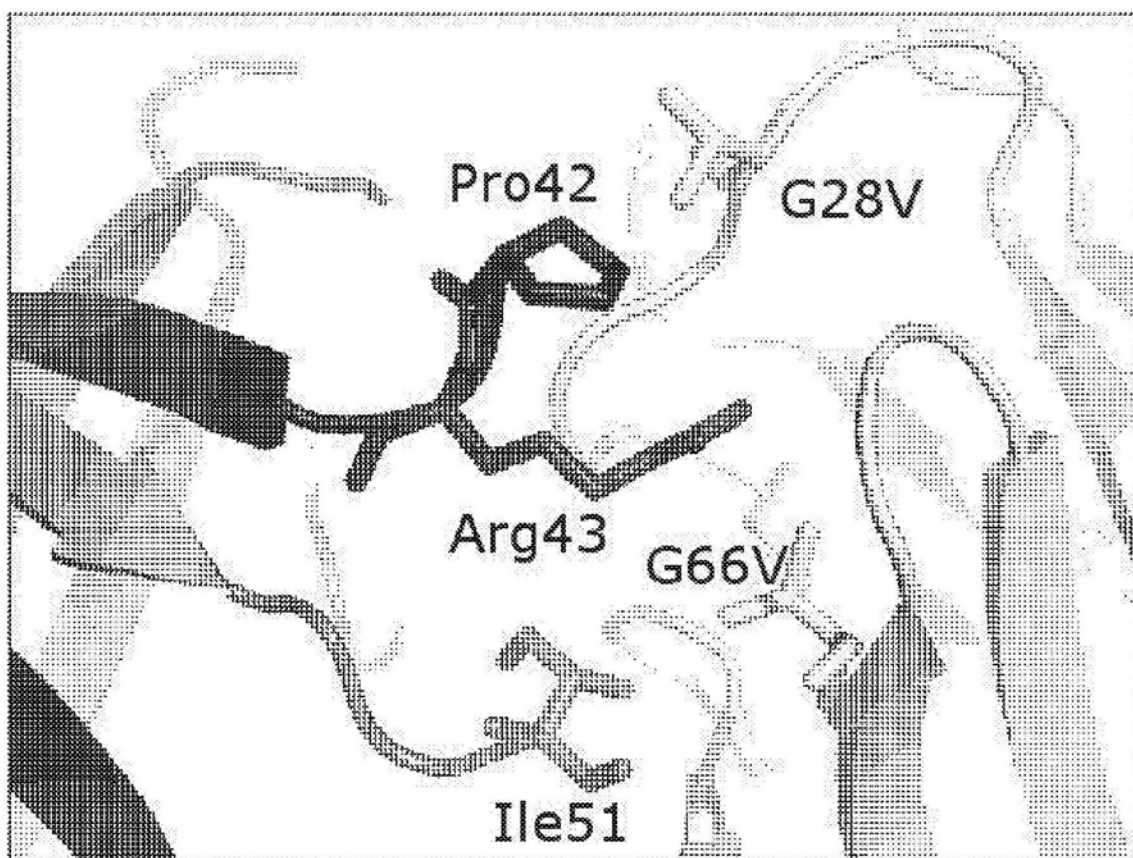


图5

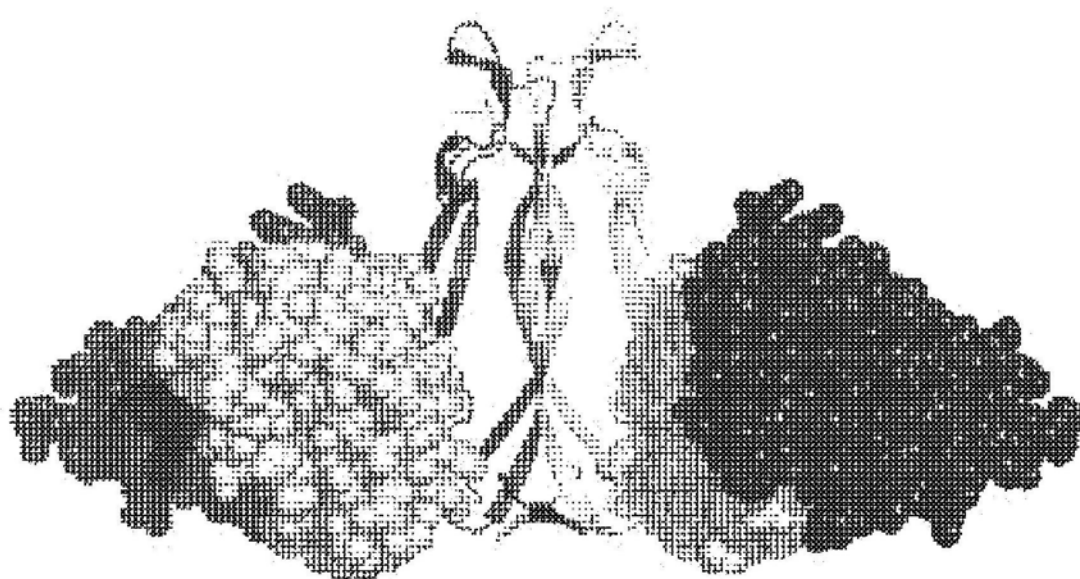


图6A

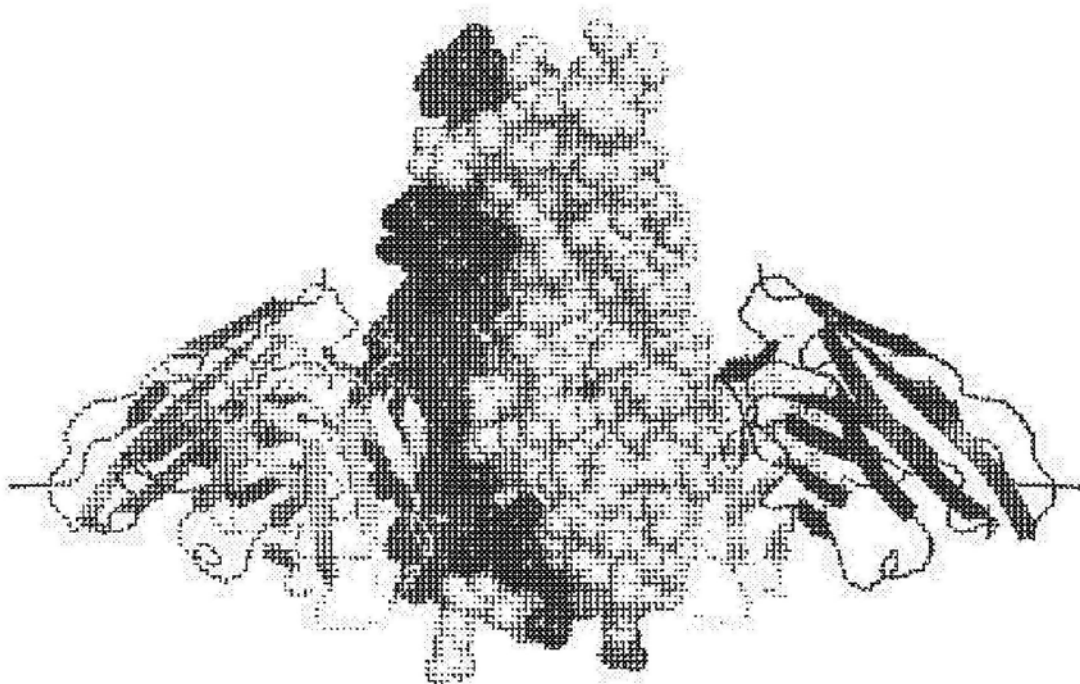


图6B

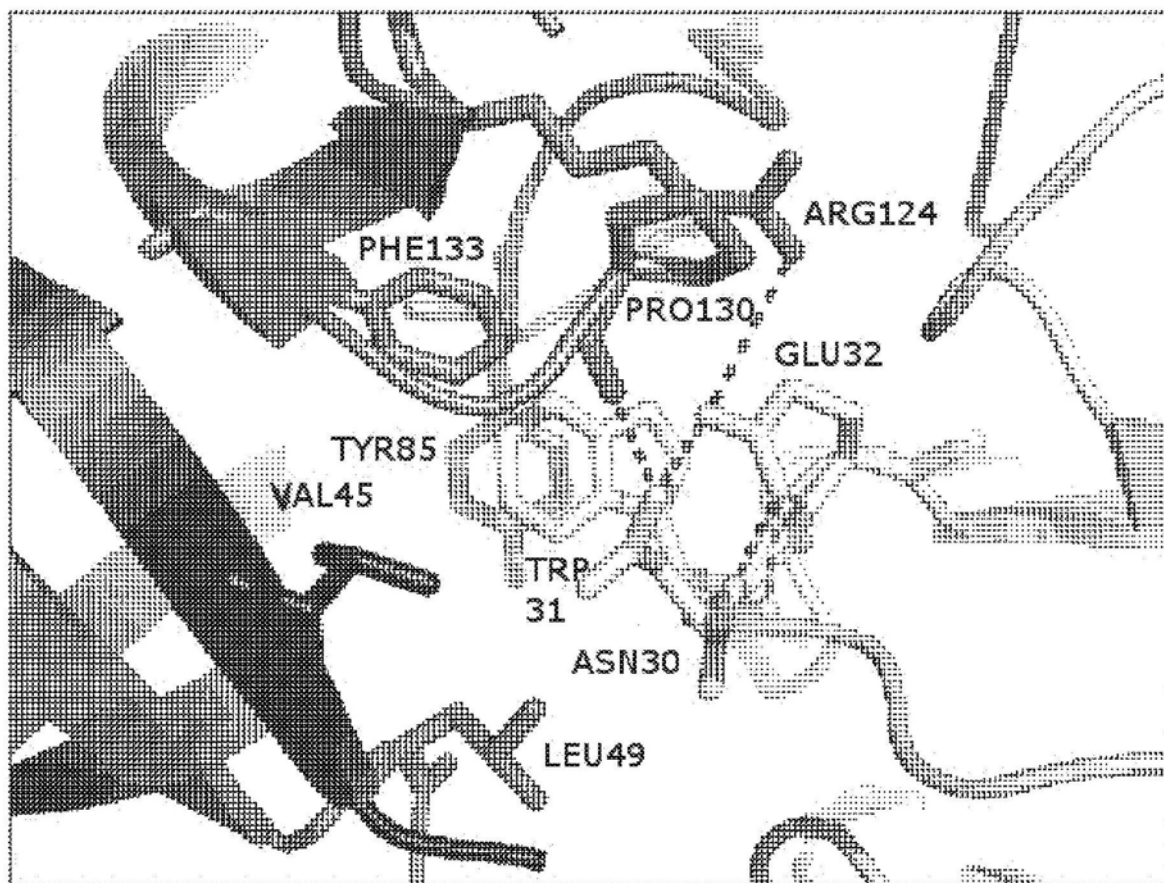


图7

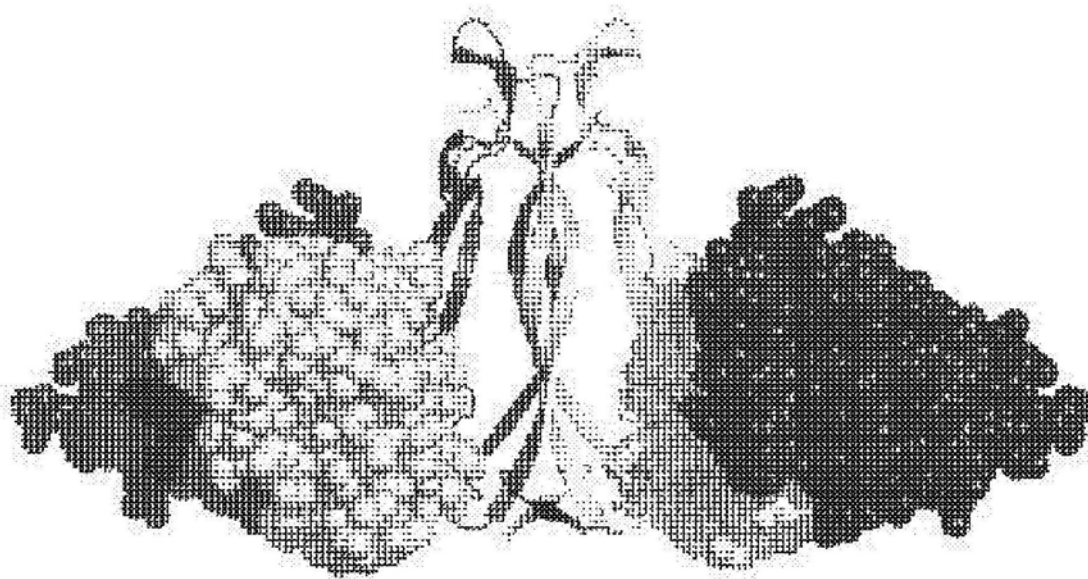


图8A

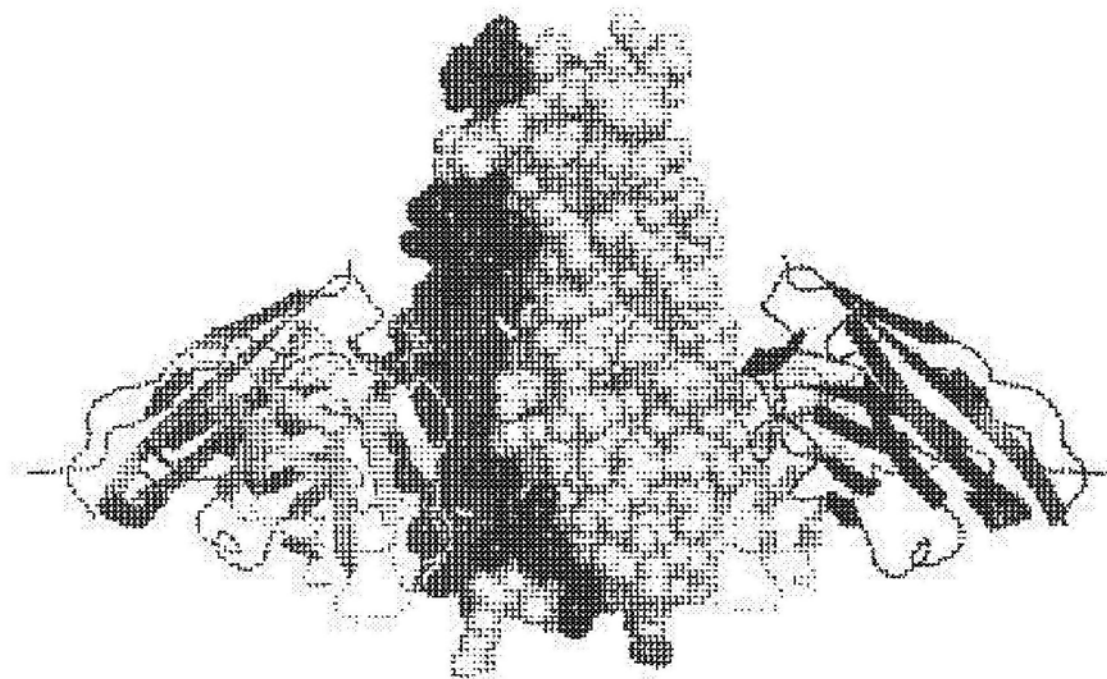


图8B

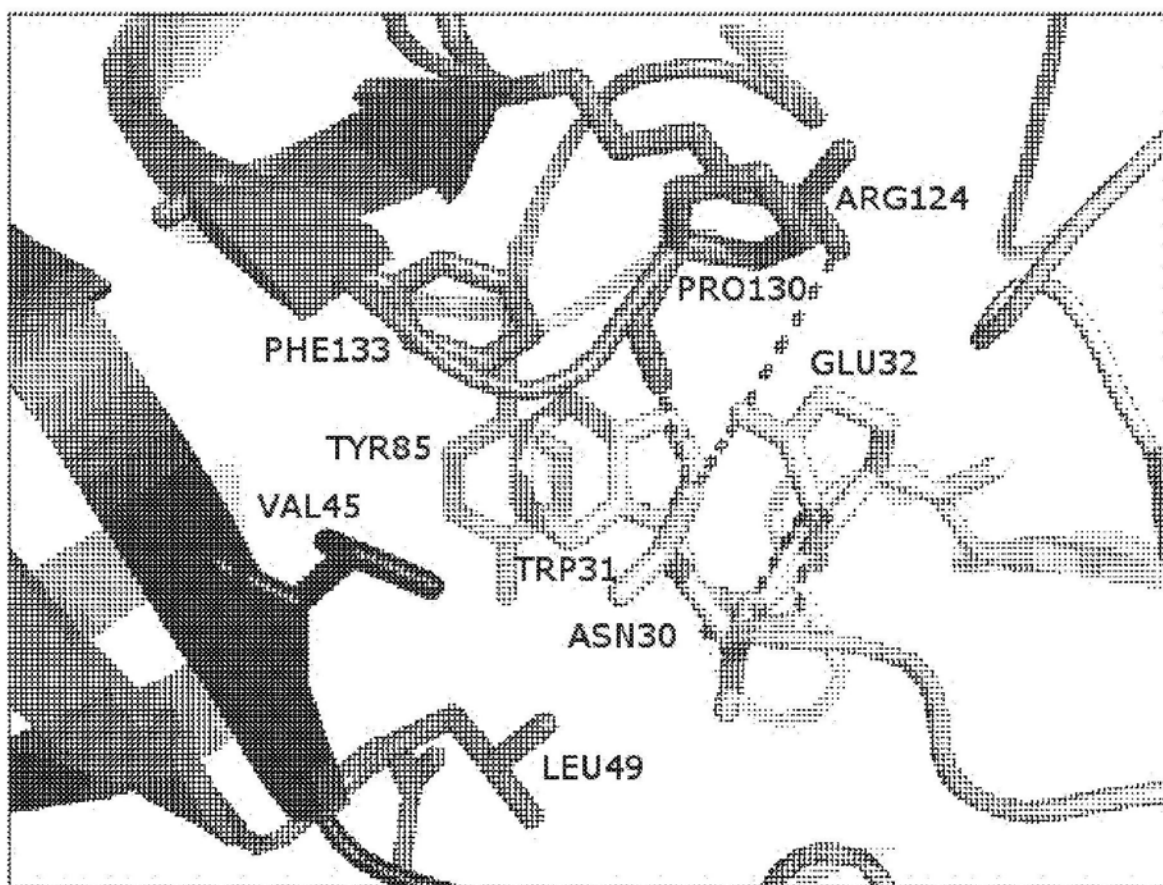


图9

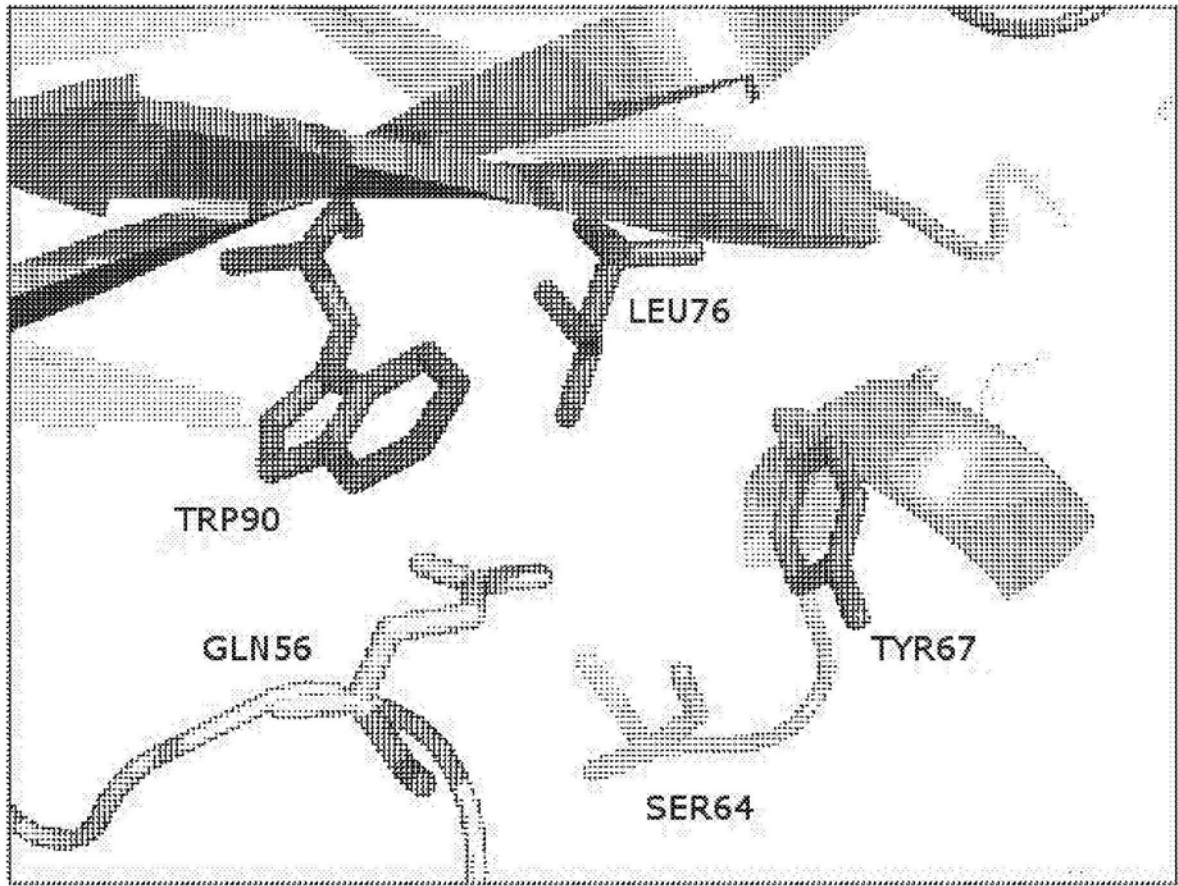


图10

治疗性治疗的评分

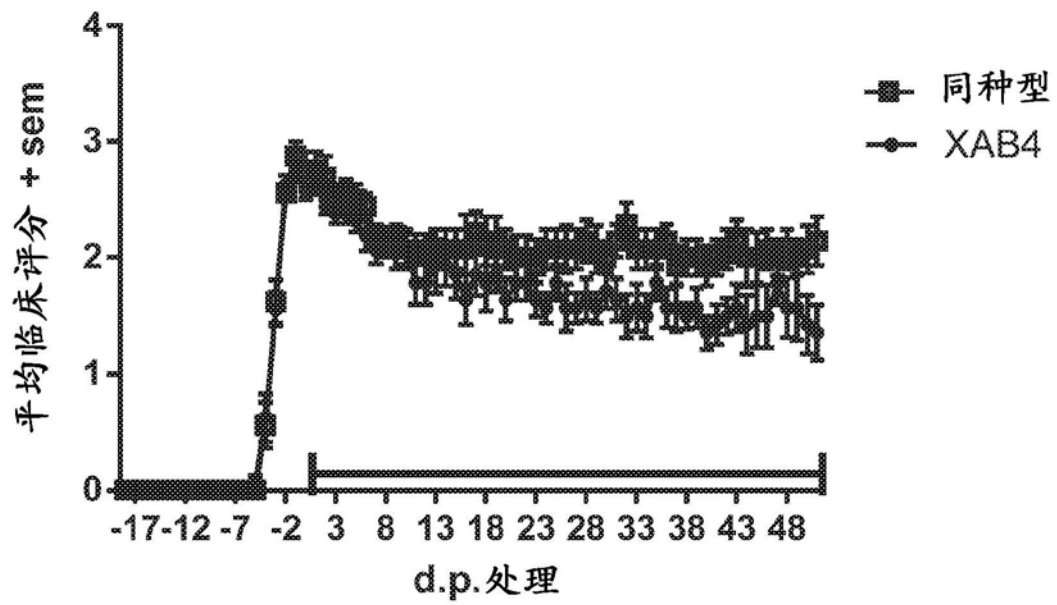


图11

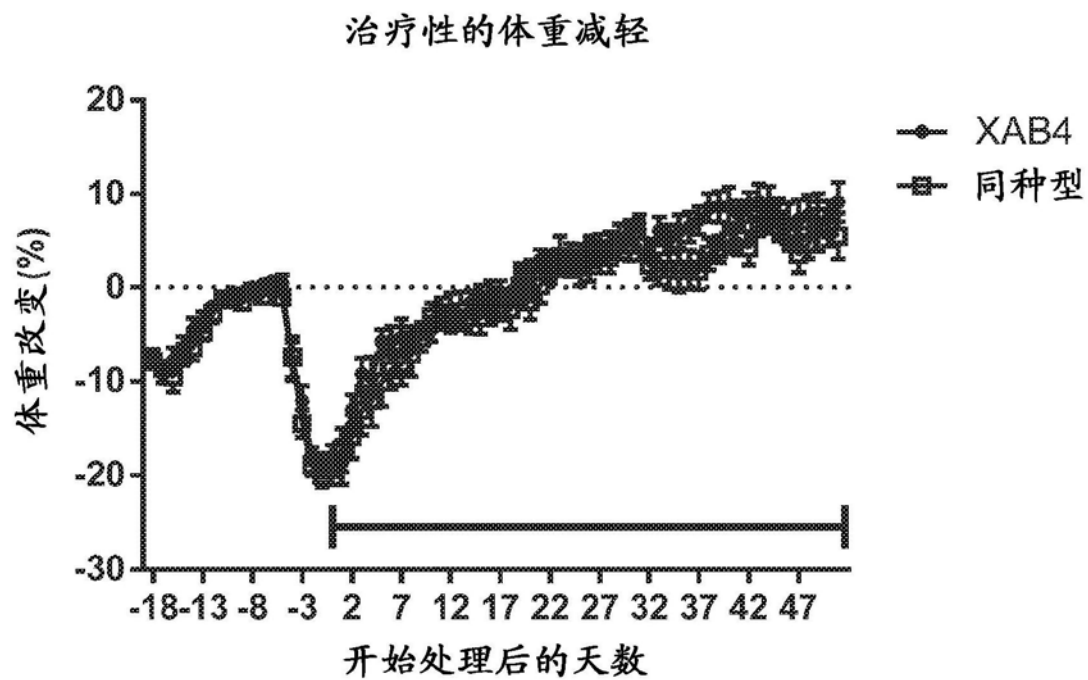


图12

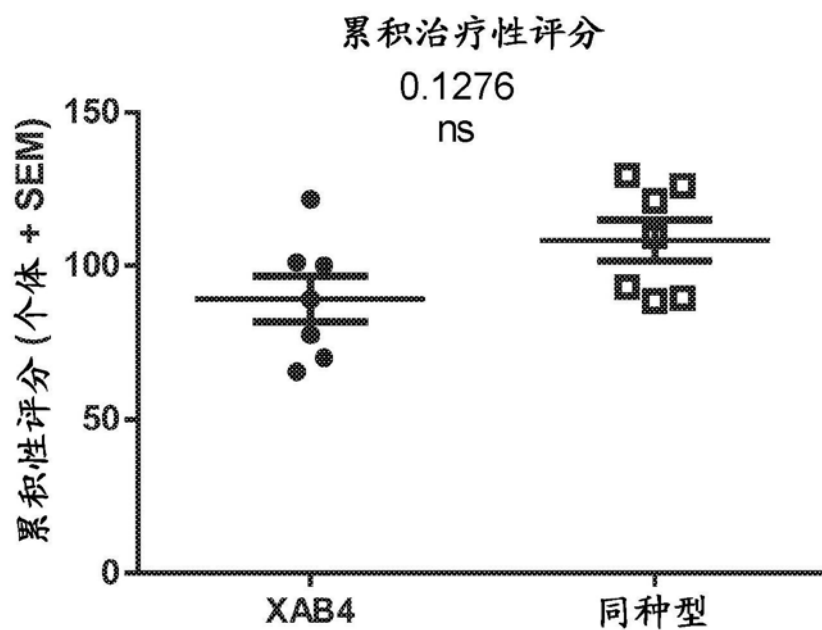


图13

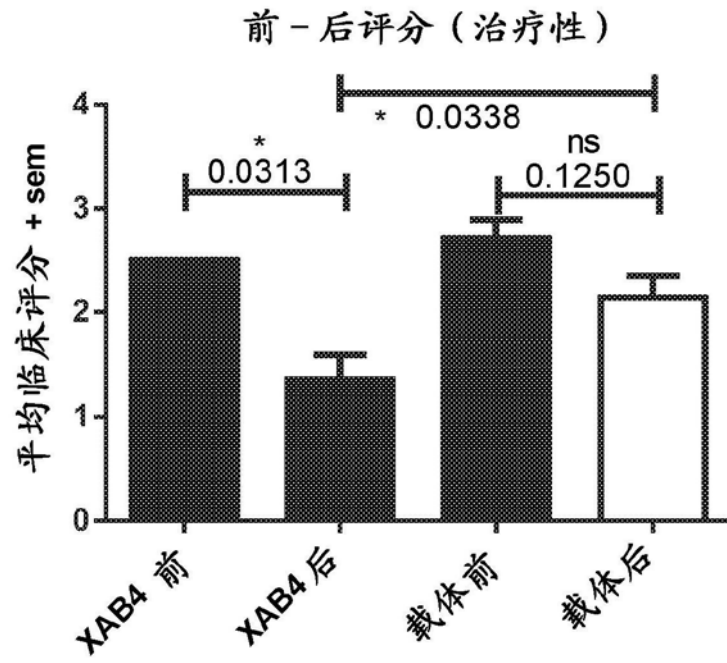


图14

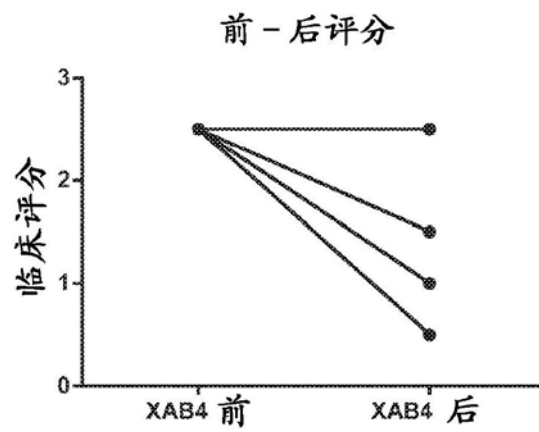


图15A

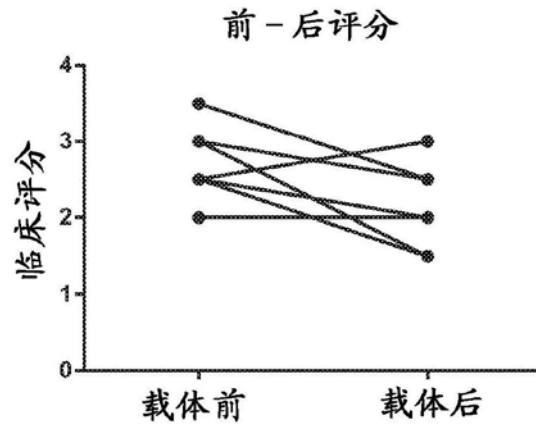


图15B

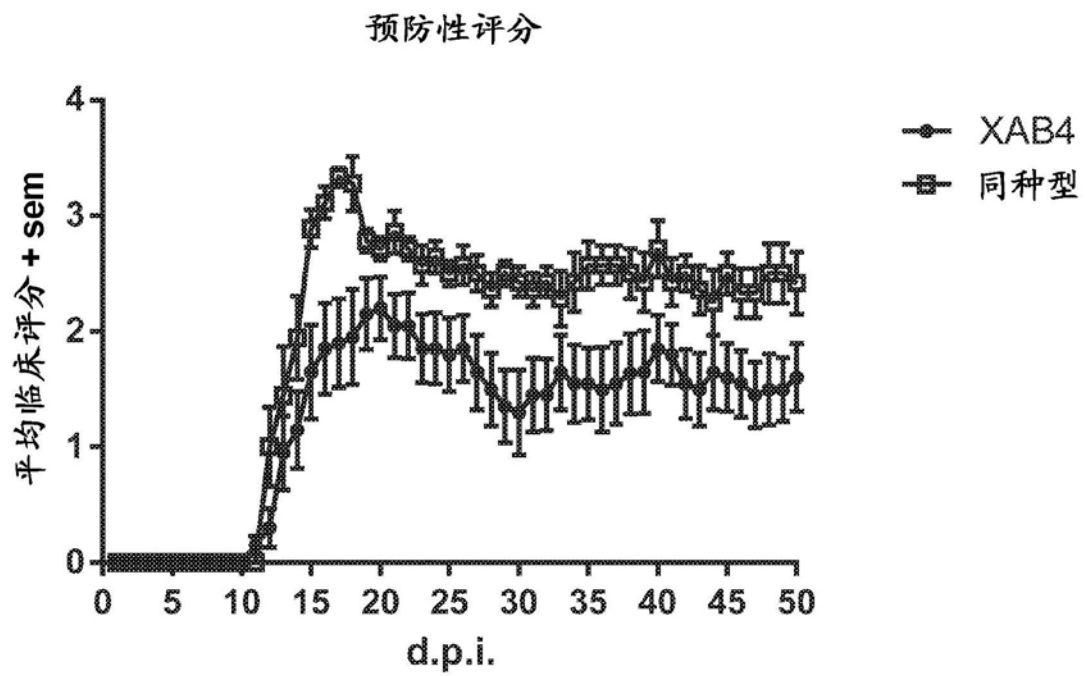


图16

预防性的体重减轻

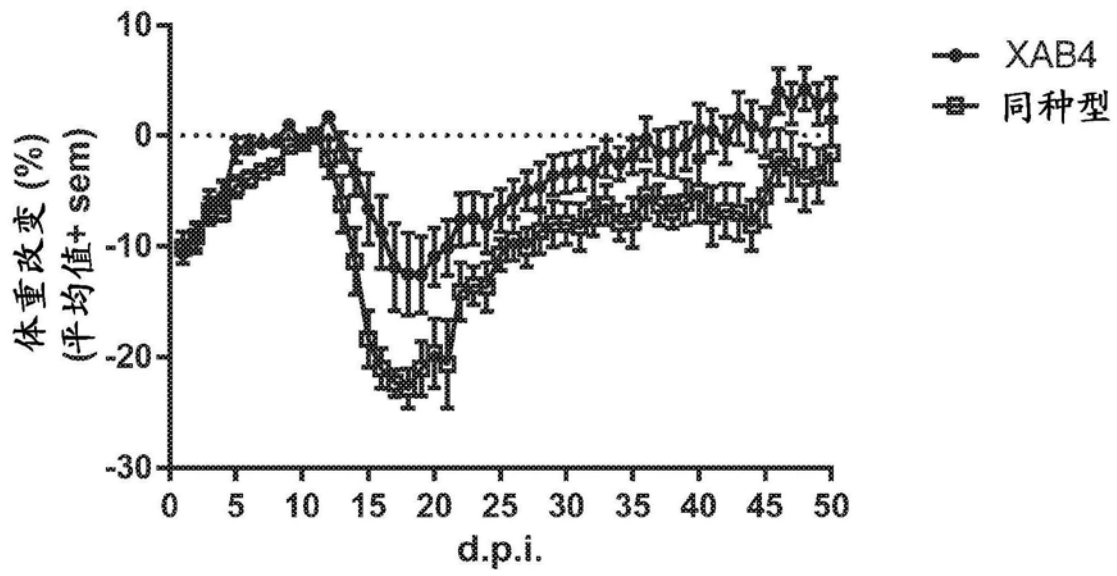


图17

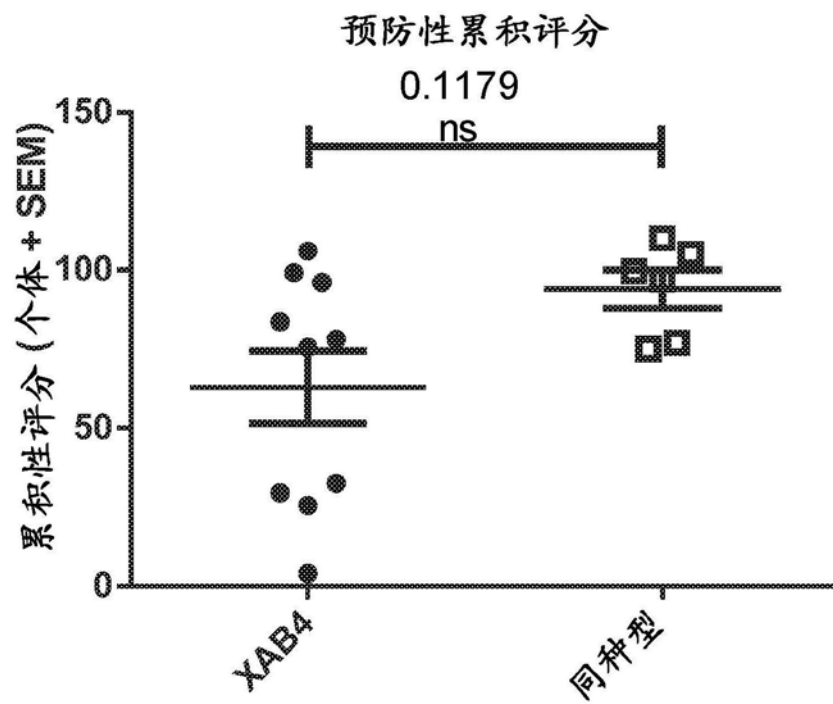


图18

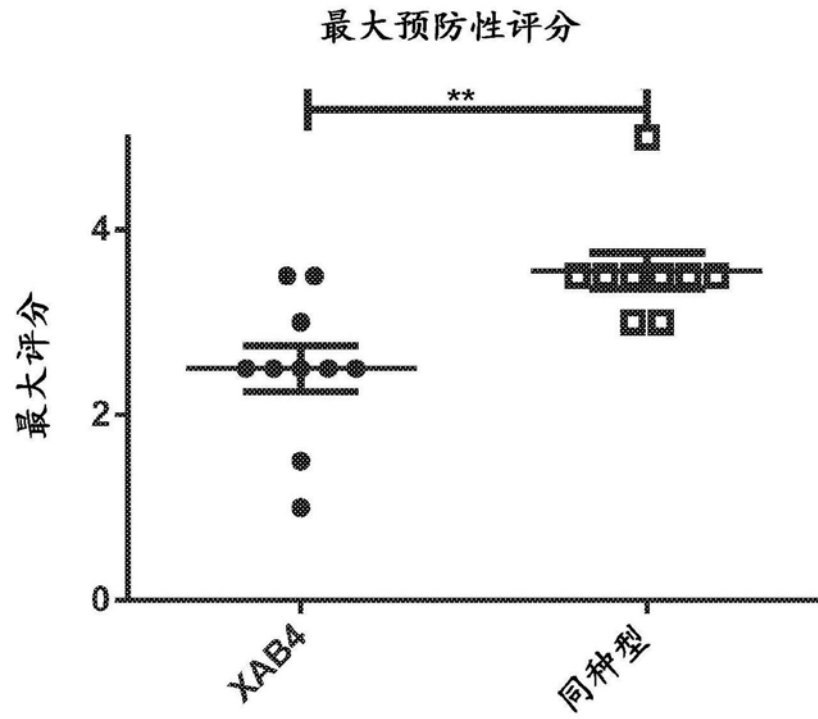


图19

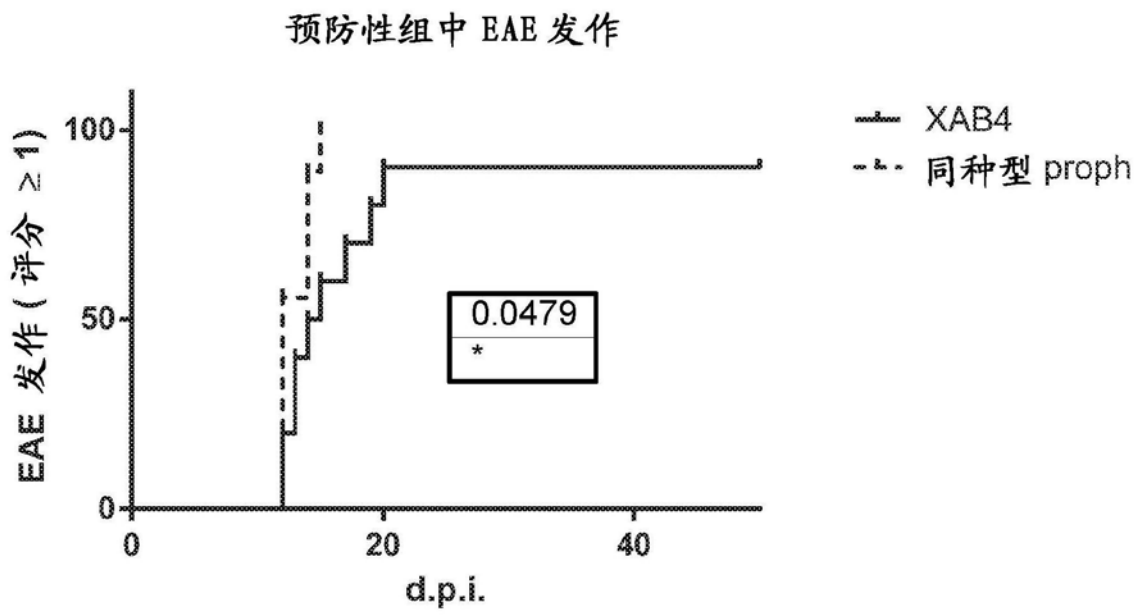


图20

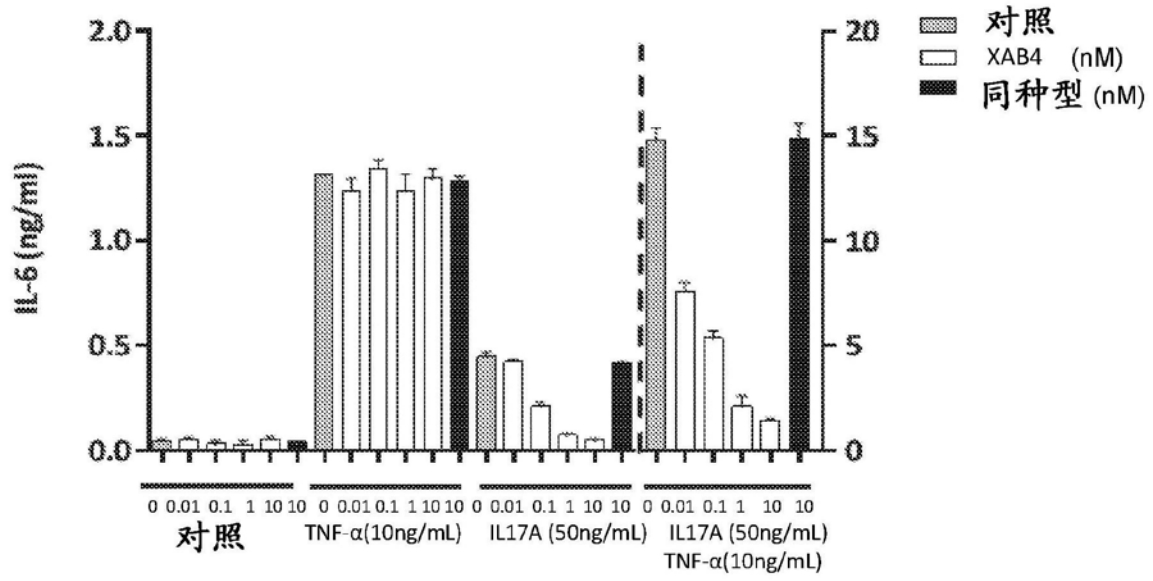


图21A

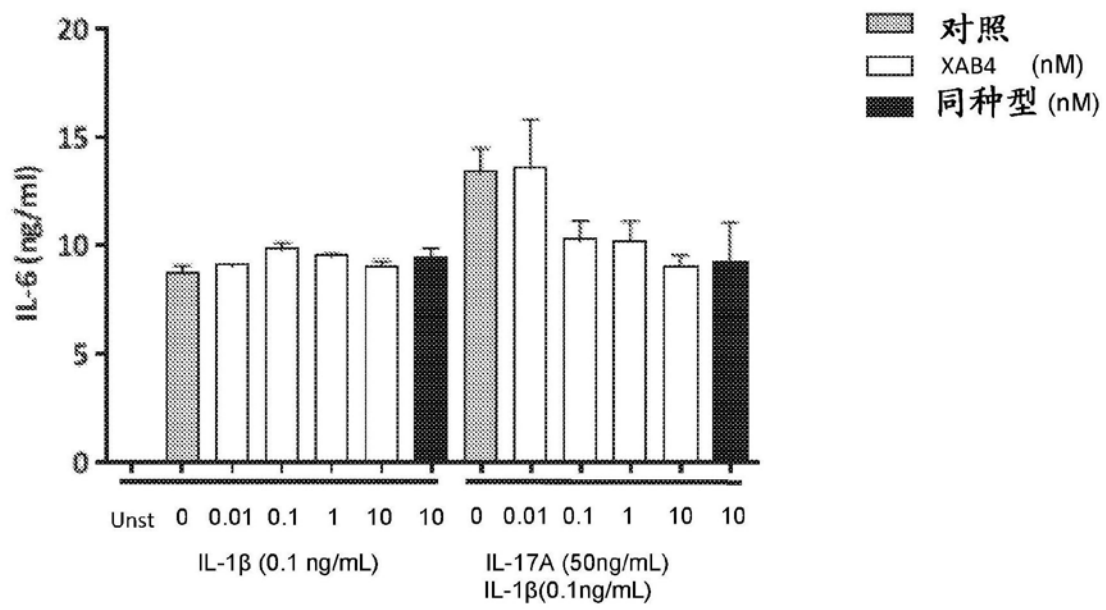


图21B

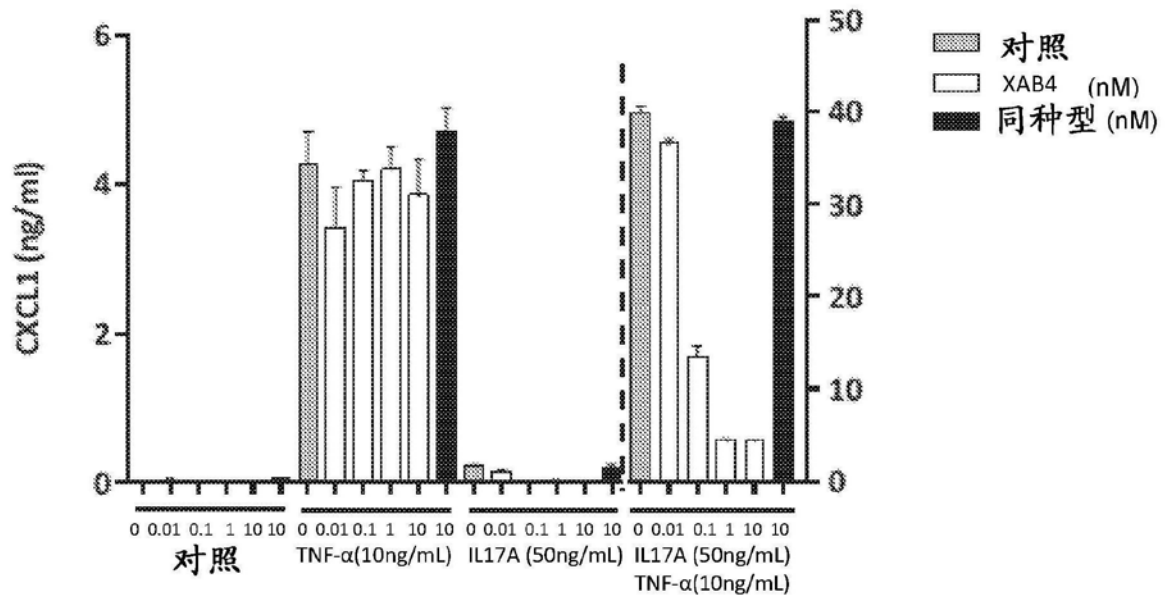


图22A

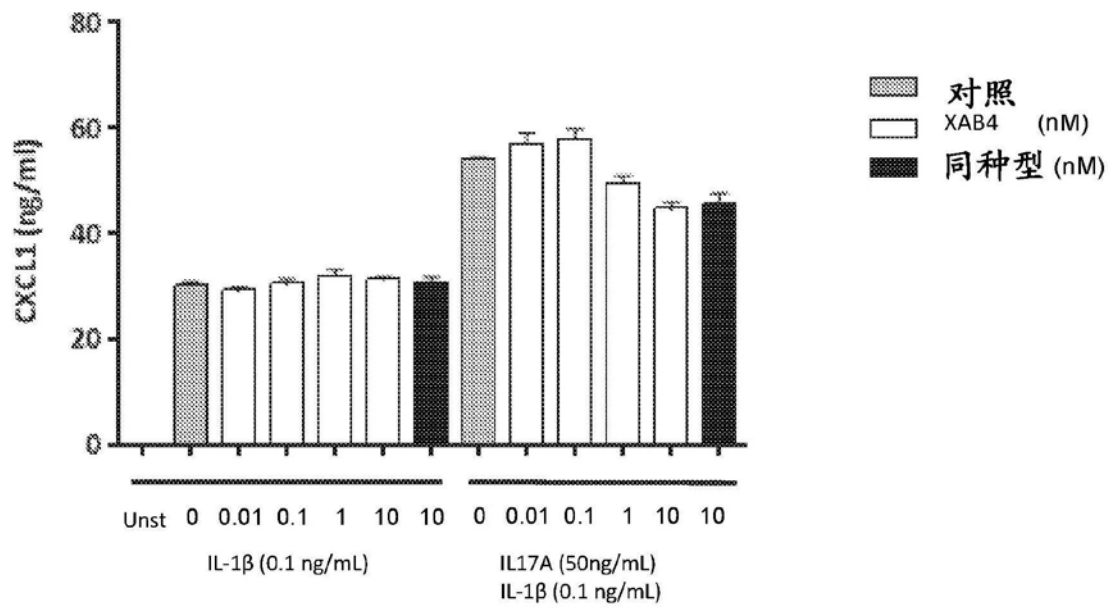


图22B

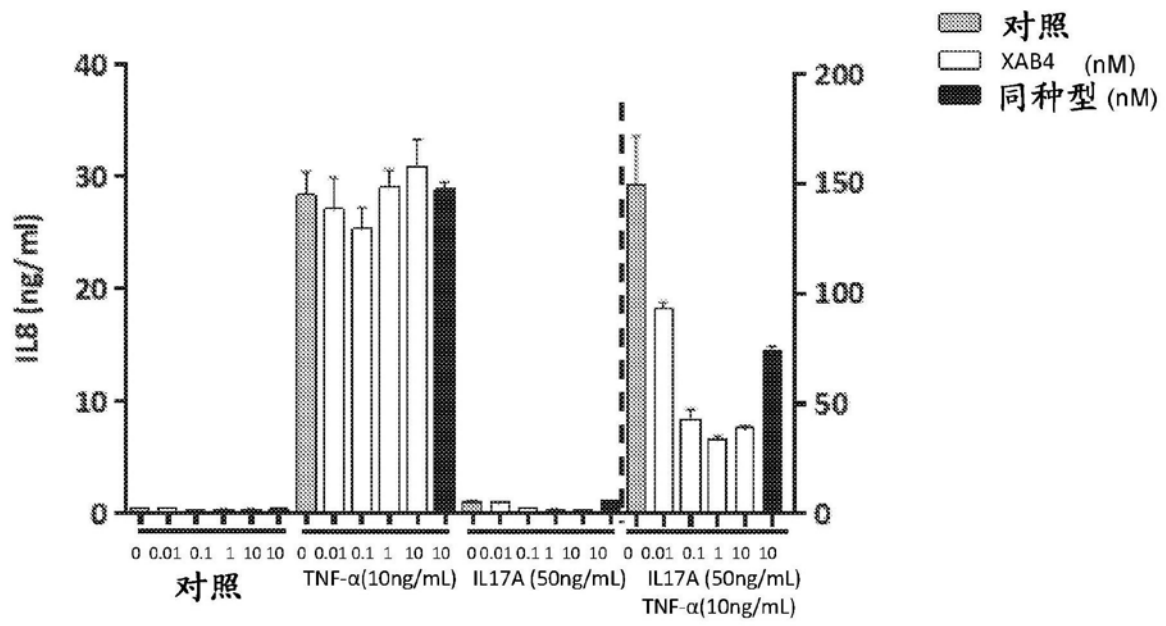


图23A

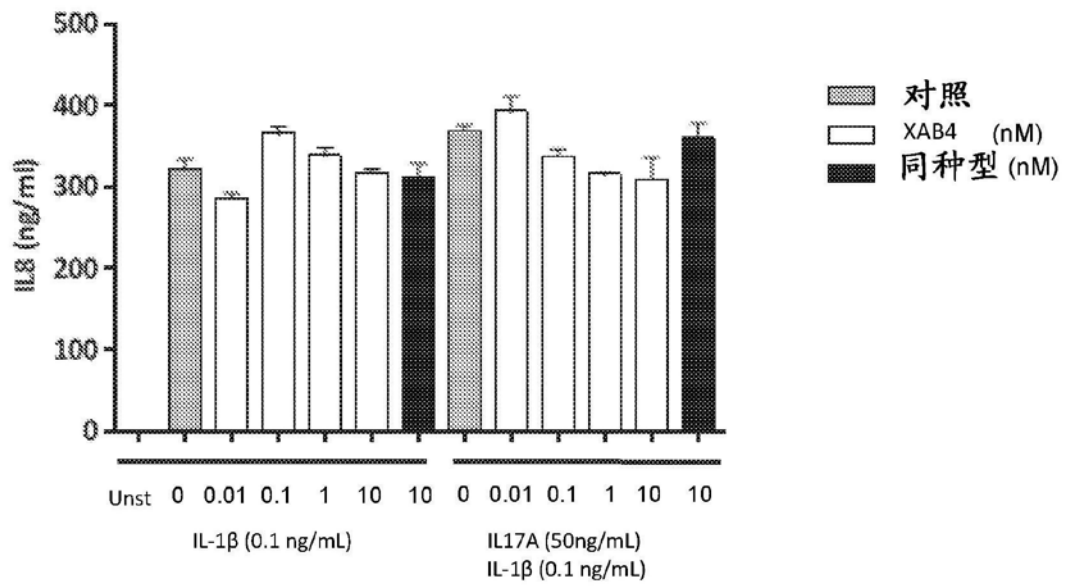


图23B

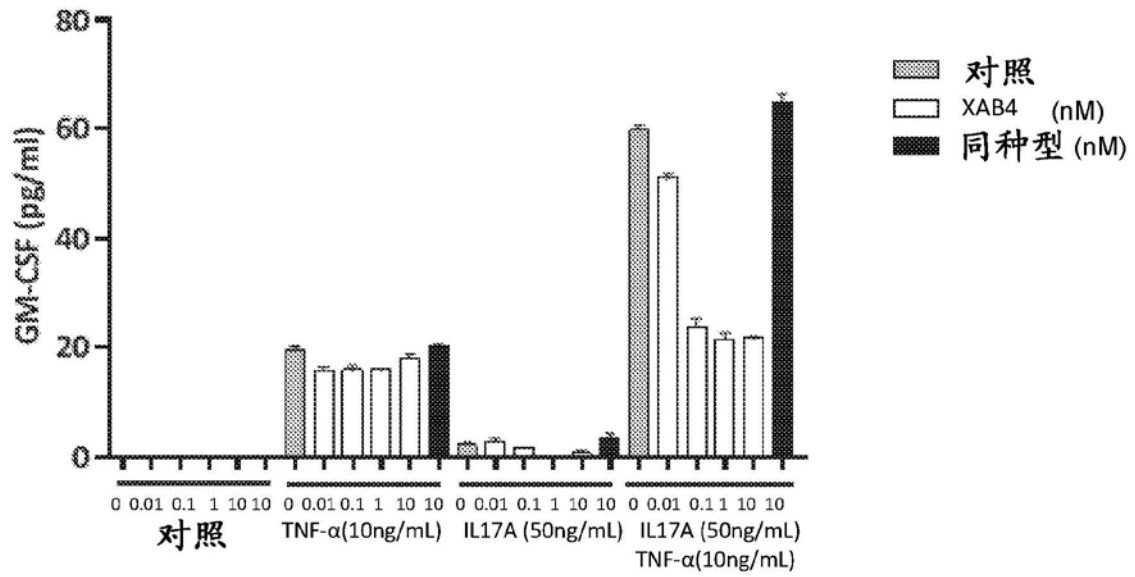


图24A

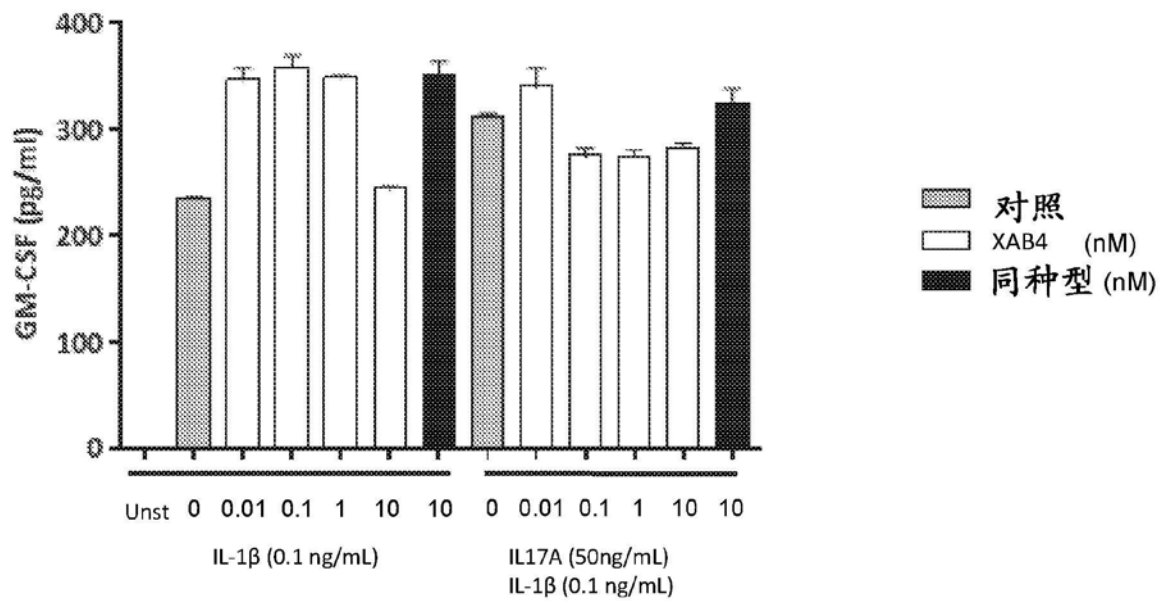


图24B

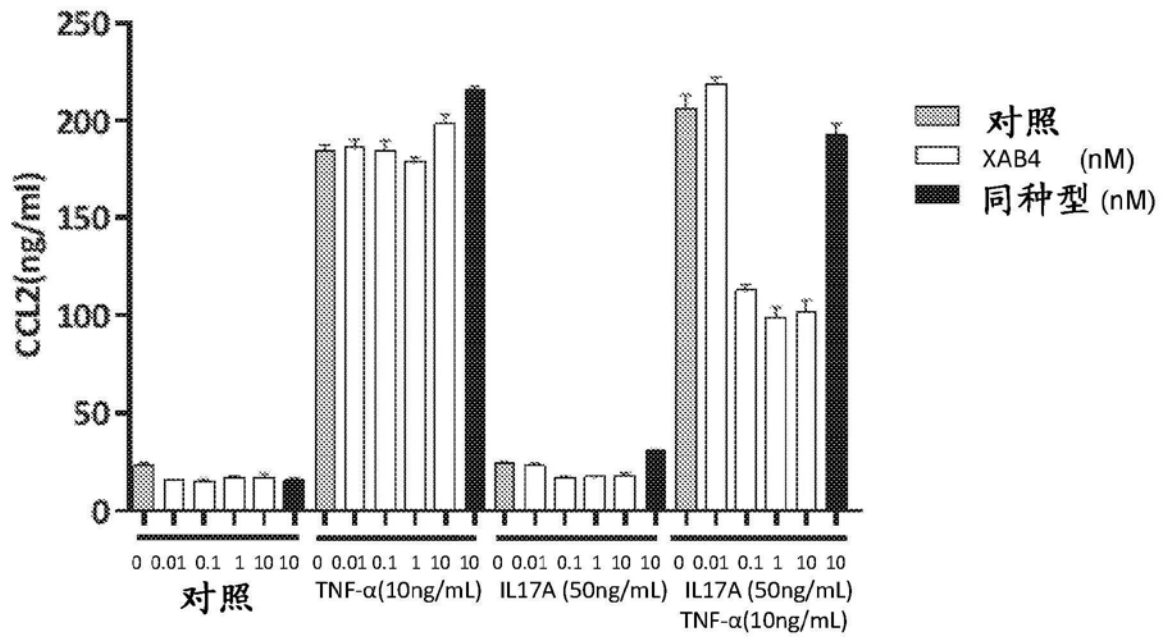


图25A

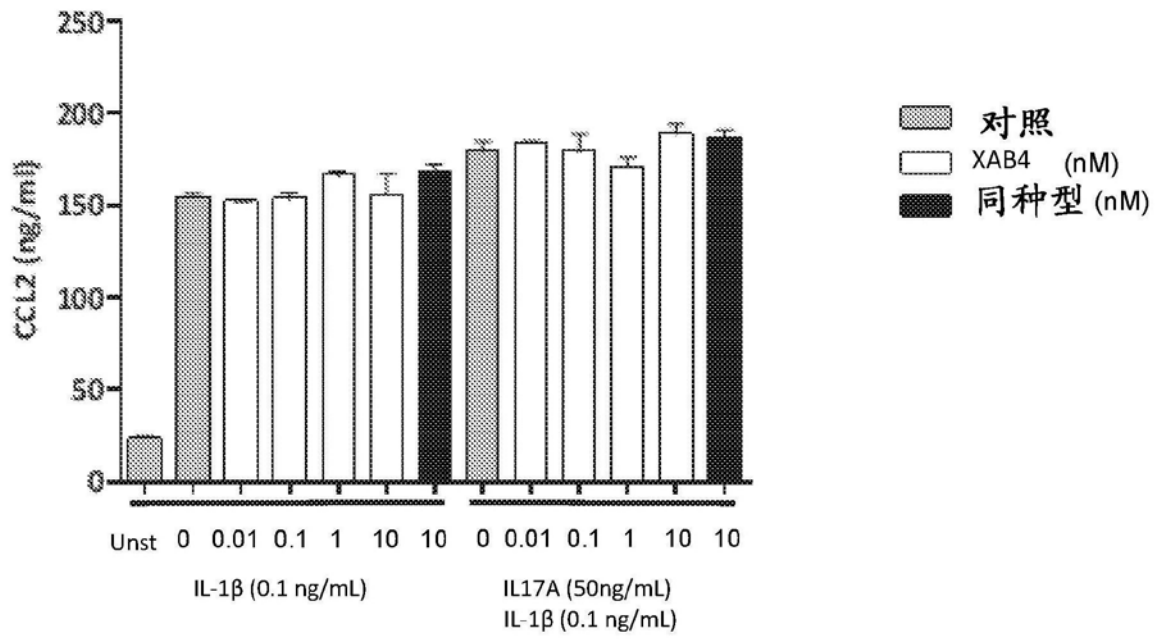


图25B