(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2017 年 7 月 6 日 (06.07.2017)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2017/113181 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/46 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2015/099847

(22) 国际申请日: 2015 年 12 月 30 日 (30.12.2015)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: **深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: **赵琦 (ZHAO, Qi)**; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 **徐天殊 (XU, Tianshu)**; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: **北京三友知识产权代理有限公司 (BEIJING SANYOU INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD.)**; 中国北京市金融街 35 号国际企业大厦 A 座 16 层, Beijing 100033 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

[见续页]

(54) **Title**: IGG HYBRID BISPECIFIC ANTIBODY AGAINST TNFA AND IL-17A

(54) **发明名称** : IgG 杂合型抗 TNFα 和 IL-17A 双特异性抗体

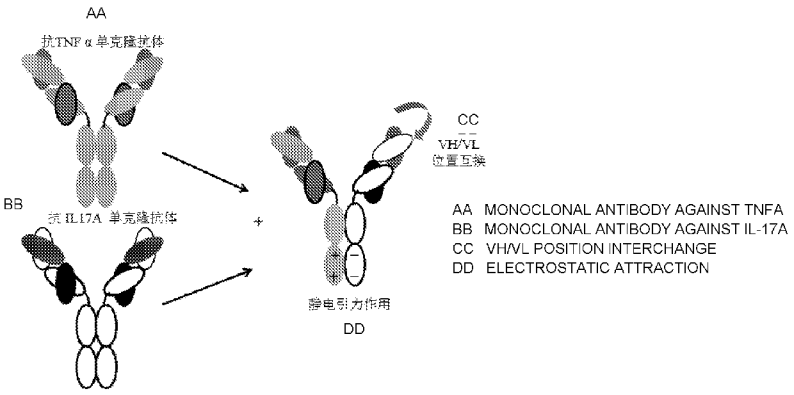


图 1

(57) **Abstract**: The present invention provides an IgG hybrid bispecific antibody against TNFα and IL-17A. The hybrid antibody comprises a first heavy chain and a first light chain from a human IgG binding specifically to TNFα, and a second heavy chain and a second light chain of a human IgG binding specifically to IL-17A. A variable region of the second heavy chain is exchanged with a variable region of the second light chain, and/or a variable region of the first heavy chain is exchanged with a variable region of the first light chain; and constant regions of the first heavy chain and the second heavy chain interact with each other via enhanced electrostatic interaction or hydrophobic interaction.

(57) **摘要**: 本发明提供 IgG 杂合型抗 TNFα 和 IL-17A 双特异性抗体，其具有人源 IgG 型特异性结合 TNFα 的第一重链及第一轻链，及人源 IgG 型特异性结合 IL-17A 的第二重链及第二轻链。所述第二重链的可变区与第二轻链的可变区交换，和/或第一重链的可变区与第一轻链的可变区交换；第一重链与第二重链的恒定区依靠增强的静电作用或疏水作用相互结合。

WO 2017/113181 A1

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体

技术领域

本发明涉及免疫学领域，具体地涉及能同时结合肿瘤坏死因子 α（TNFα）及白细胞介素17A（IL-17A）的 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体。

背景技术

目前采用基因工程技术生产的单克隆抗体在生物医学领域中发挥着重要的作用，但是由于许多重大疾病并不是由单一抗原引起的，例如肿瘤及自身免疫性疾病，往往是由多种细胞因子（包括肿瘤坏死因子α（TNF α）及白细胞介素17A（IL-17A）等驱动的，单克隆抗体用于治疗这类疾病具有一定的局限性。因此，如能够生产可以结合两种或两种以上抗原的抗体，则可大大降低单克隆抗体治疗疾病的局限性，十分有利于肿瘤及自身免疫性疾病的治疗。

双特异性抗体含有两种不同抗原结合位点，是可以结合两种不同的抗原分子的抗体，双特异性抗体在生物医学领域发展迅速，并且在生物医学领域也取得了较大的成就，如肿瘤与自身免疫性疾病的治疗。在双特异性抗体临床应用中，许多需要完整的IgG结构，所以双特异性抗体载体的构建与宿主细胞的表达对于其疗效以及临床应用起到了决定性的作用。

目前，广泛用于研究抗体表达的宿主系统是大肠杆菌和哺乳动物细胞。然而，诸多的已经报道的抗体表达系统如大肠杆菌、酵母以及昆虫细胞均存在蛋白活性低、系统无法进行连续性表达、对纯化工艺要求严格等缺点。哺乳动物细胞具有高效表达内源性重、轻链基因，将抗体糖基化、正确折叠和装配以及分泌活性抗体的能力，便于对抗体亲和力、特异性等的鉴定。其中HEK293F 表达系统具有准确的转录后修饰功能，表达的蛋白接近于天然蛋白分子；具有产物胞外分泌功能，并且很少分泌自身的内源蛋白，便于下游产物分离纯化；能以悬浮培养方式或在无血清培养基中达到高密度培养，产量较高。

虽然双特性抗体的构型与种类越来越多，但是现有双特异性抗体也存在许多相应的问题。首先构型方面，现有的双特异性抗体许多构型与天然存在的抗体构型差别较大，使得抗体的稳定性差，特异性差，容易产生同源二聚体，没有良好的药代动力学特征，甚至产生免疫原性。因此，提供一种与人体的IgG的分子量、构型接近的IgG杂合型抗TNF α和IL-17A双特异性抗体是本领域亟待解决的技术问题之一。

发明内容

本发明的目的之一在于提供一种 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体或来源于该抗体的能够特异性结合 TNF α 和 IL-17A 的生物活性片段。

本发明的另一目的在于提供编码所述 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体的核苷酸序列。

本发明的另一目的在于提供分泌本发明所述的 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体的哺乳动物细胞系。

本发明的另一目在于提供一种产生本发明所述 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体的方法。

本发明的另一目在于提供包含本发明所述 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性或其生物活性片段的药物组合物。

本发明的另一目的在于提供本发明所述的 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体或其生物活性片段或所述的药物组合物的应用。

本发明的另一目的在于提供一种检测 TNF α 或 IL-17A 水平的试剂盒。

为实现上述目的，一方面，本发明提供一种 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体或来源于该双特异性抗体的能够特异性结合 TNF α 和 IL-17A 的生物活性片段，所述双特异性抗体具有人源 IgG 型用于特异性结合 TNF α 的第一重链及第一轻链，及人源 IgG 型用于特异性结合 IL-17A 的第二重链及第二轻链；

其中，所述第一重链中的可变区为人源 IgG 型 TNF α 的抗体中的轻链的可变区；所述第一轻链中的可变区为该人源 IgG 型 TNF α 的抗体的重链中的可变区；和/或

所述第二重链中的可变区为人源 IgG 型 IL-17A 抗体的轻链中的可变区；所述第二轻链中的可变区为该人源 IgG 型 IL-17A 的抗体的重链中的可变区；

所述第一重链与第二重链中的恒定区依靠增强的静电作用和/或疏水作用相互结合。

优选地，所述增强的静电作用是通过将所述人源 IgG 型 TNF α 的抗体的重链中的恒定区进行 D360K 和/或 D403K 突变，将人源 IgG 型 IL-17A 的抗体的重链中的恒定区进行 K402D 和/或 K419D 突变得以实现的。

更优选地，所述人源 IgG 型 TNF α 的抗体的重链为 SEQ ID NO:1，在该人源 IgG 型 TNF α 的抗体的重链中的第 360、403 位氨基酸均由 Asp 替换为 Lys；所述人源 IgG 型 IL-17A 的抗体的重链为 SEQ ID NO:2，所述人源 IgG 型 IL-17A 的抗体的重链中的第 402、419 位由 Lys 替换为 Asp。

由于天然的抗体是同源二聚体，为了产生异源二聚体并使异源二聚体的表达量远远大于同源二聚体的表达量，本发明解决了重链的异源二聚体的结合以及轻链异源二聚体的结合的技术问题，具体而言，本发明通过增强的静电作用或疏水作用使得异源的所述第一重链与第二重链的结合大于同源重链之间的结合，例如将抗体的 Fc 段用定点突变的方法，改变抗体 Fc 段的作用力，使得同源二聚体相互排斥，而异源二聚体相互作用力增强；更具体地，例如将人源 IgG 型 TNF α 的抗体的重链的 Fc 段进行 D360K/D403K 的突变，将人源 IgG 型 IL-17A 的抗体的重链的 Fc 段进行 K402D/K419D 的突变，从而使得第一重链与第二重链通过静电作用结合形成异

源二聚体。为了防止轻链与重链之间的错配，本发明将重链可变区与该重链对应的轻链的可变区互换，例如将 IL-17A 抗体的轻链可变区 V_L 与该 IL-17A 抗体的重链可变区 V_H 位置互换，又由于抗体分子轻链只与重链作用，从而防止了轻链之间的错配。与现有双特异性抗体相比，本发明所述双特异性抗体在构型方面，尤其是 Fc 段的构型设计上，其稳定性及异源二聚体结合的特异性方面优于现有技术。

本发明采用ELISA检测双特异性抗体对IL-17A与TNF α的亲和力，相较于抗TNF α、抗IL-17A的单克隆抗体，本发明所述双特异性抗体与抗原亲和力与单克隆抗体相比没有显著的差异；采用用圆二色谱CD检测双特异性抗体的热稳定性，发现其热稳定性与天然的单克隆抗体几乎没有差别。

根据本发明的具体实施方案，在本发明所述的 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体或来源于该抗体的能够特异性结合 TNF α 和 IL-17A 的生物活性片段中，其中，所述第一重链具有如 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列，所述第一轻链具有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列，所述第二重链具有如 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列，所述第二轻链具有如 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列；

本发明提供的具有 SEQ ID NO:3~SEQ ID NO:6 的双特异性抗体具有较小的分子量（150kDa），相较于现有技术提供的大于 200kDa 的双特异性抗体，本发明提供双特异性抗体更接近天然的人源 IgG 抗体分子，使其有更好的生物相容性。

另一方面，本发明提供一种编码本发明所述的 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体或其生物活性片段的 DNA 分子，其包含编码具有 SEQ ID NO:3 的氨基酸的核苷酸序列，优选地，该核苷酸序列为 SEQ ID NO:7。

本发明提供一种编码本发明所述的 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体或其生物活性片段的 DNA 分子，其包含编码具有 SEQ ID NO:5 的氨基酸的核苷酸序列，优选地，该核苷酸序列为 SEQ ID NO:9。

本发明提供一种编码本发明所述的 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体或其生物活性片段的 DNA 分子，其包含编码具有 SEQ ID NO:6 的氨基酸的核苷酸序列，优选地，该核苷酸序列为 SEQ ID NO:10。

另一方面，本发明提供分泌本发明所述的 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体的 HEK293F 人肾胚细胞，其包含编码具有 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5 及 SEQ ID NO:6 的氨基酸的核苷酸序列，以及编码具有 SEQ ID NO:4 的氨基酸的核苷酸序列，优选地，该核苷酸序列为 SEQ ID NO:8；

优选地，编码具有所述SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5及SEQ ID NO:6的氨基酸的核苷酸序列被整合在质粒上；该质粒可通过电转化方法或化学转染方法转染到293F细胞株中进行表达。本发明通过SDS-PAGE及western blot检测表明抗体表达的结构功能正确。

另一方面，本发明提供一种产生 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体的方法，其包含在使得该双特异性抗体表达的条件下培养本发明所述的 HEK293F 人肾胚细胞，及回收所表达的双特异性抗体。

另一方面，本发明提供一种药物组合物，其包含本发明所述的 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体或其生物活性片段。

另一方面，本发明提供本发明所述的 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体或其生物活性片段或所述的药物组合物在制备用于治疗类风湿关节炎、克罗恩病、牛皮癣、银屑病或肿瘤的药物中的应用。

另一方面，本发明提供一种检测 TNF α 或 IL-17A 水平的试剂盒，其含有本发明所述的 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体或其生物活性片段；优选所述的试剂盒还含有第二抗体和用于检测的酶或荧光或放射标记物，以及缓冲液；优选所述第二抗体为抗本发明所述双特异性抗体的抗抗体或抗 TNF α 或 IL-17A 的多抗。

本发明开发的新型稳定人源IgG型双特异性抗体（BiAbs），是针对TNF α和IL-17A这两种抗原的分子，既保留了抗TNF α的抗体结合的功能特性，又具有和T细胞的细胞因子IL-17A结合的附加活性，因此这种分子相较于单纯针对其中一个分子的单克隆抗体对于炎症性疾病以及自身免疫性疾病都有更好的治疗效果，本发明通过体外实验证明可以阻断炎症因子对细胞的损伤，与单克隆抗体相比，有明显的优势，具有广阔的应用前景。更为重要的是，本发明所述的双特异性抗体具有较小的分子量（150kDa），相较于现有技术提供的大于200kDa的双特异性抗体，更接近天然的人源IgG抗体分子，使其有更好的生物相容性。

与现有技术相比，本发明具有如下有益效果：

（1）本发明所述双特异性抗体在构型方面，尤其是Fc段的构型设计上，其稳定性，及异源二聚体结合的特异性方面优于现有技术；

（2）与抗TNF α或抗IL-17A单克隆抗体相比，本发明所述双特异性抗体在亲和力、稳定性、纯度方法无差异；

（3）与现有技术提供的双特异性抗体比较，具有SEQ ID NO:3~ SEQ ID NO:6的的双特异性具有较小的分子量（150kDa），更接近天然的人源IgG抗体分子，使其有更好的生物相容性；

（4）与现有的原核表达载体比较，本发明的载体为真核表达系统，符合国家FDA临床审批药物的标准。

附图说明

图 1 为构建本发明双特异抗体的示意图；

图 2 为实施例 1 中所使用的 pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-CH 质粒的结构图；

图 3A~图 3D 为实施例 1 ELSA 实验结果图；

图 4 为实施例 1 SDS-PAGE 实验结果图；

图 5 为实施例 1 用 L929 细胞检测双特异性抗体对 TNF-α 的拮抗作用的实验结果图；

图 6A~6E 为实施例 1 实时 PCR 实验结果图；

图 7 为实施例 1 圆二色谱 CD 测量抗体的 T_m 值的实验结果图。

具体实施方式

为了对本发明的技术特征、目的和有益效果有更加清楚的理解，现结合具体实施例及附图对本发明的技术方案进行以下详细说明，应理解这些实例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。实施例中，各原始试剂材料均可商购获得，未注明具体条件的实验方法为所属领域熟知的常规方法和常规条件，或按照仪器制造商所建议的条件。

实施例 1

（1）质粒的构建

（1.1）抗 TNFα 抗体基因的重组载体构建

（1.1.1）含抗 TNFα V_H 基因（SEQ ID NO:11）的重组载体 pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-V_H-C_H 的构建

（1.1.1.1）全基因合成抗 TNFα 的 V_H（SEQ ID NO:11）核苷酸序列 DNA 分子，提取其质粒分别采用 BamHI 以及 NheI 限制性内切酶进行酶切，分别于 37℃酶切过夜，酶切后胶回收 450bp 酶切片段；

（1.1.1.2）提取 pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-C_H 质粒（该质粒的结构如图 2 所示，该质粒中 CH 即为 TNFα 的 C_H 基因），将步骤（1.1.1.1）回收的 V_H 基因及所述 pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-CH 质粒分别采用 BamHI 以及 NheI 内切酶进行酶切，分别于 37℃酶切过夜酶切后胶回收酶切片段，胶回收步骤参见 Genstar 货号为 D205-04 的说明书；

（1.1.1.3）抗 TNFα V_H 基因和 pcDNA3.1(+)-GS-intron -IRES-CH 质粒的连接；

取酶切后回收的 pcDNA3.1(+)-GS-intron -IRES-CH 质粒，与胶回收的 V_H 基因采用 Thermo 货号为 EL0011 的 T4 连接酶进行连接；

22℃恒温金属浴上连接 1h 后转化 DH5α，涂布 Amp^+ LB 平板，37℃恒温培养箱中倒置过夜培养；

（1.1.1.4）菌液 PCR 鉴定

涂布于含 Amp 的 LB 固体平板培养基，挑取 6 个 Amp^+ LB 平板上的单菌落接种至 4ml Amp^+ LB 培养基中，37℃ 200rpm 培养 4h 后进行菌落 PCR 鉴定是否含有阳性克隆，阳性克隆

即表示抗 TNFα V_H 基因与 pcDNA3.1(+)-GS-intron -IRES-CH 质粒成功连接。

（1.1.2）含抗 TNFα V_L-C_L 基因的重组载体 pcDNA3.1(+)-GS-intron-LC-IRES-V_H-CH 的构建

（1.1.2.1）V_L 基因(SEQ ID NO：12)的克隆

a）提供上游引物和下游引物，其中，该上游引物的碱基序列 tctGCGGCCGCGCCGCCACCATG (SEQ ID NO：13)，该下游引物的碱基序列 gaggggggcggccacggtcttgatttccaccttggt(SEQ ID NO：14)；

b）全基因合成核苷酸序列 V_L(SEQ ID NO：12)为 PCR 模板，采用 PCR 扩增 V_L 基因；

PCR 完成后，胶回收 400bp 附近的条带，胶回收步骤参见 Genstar 货号为 D205-04 的说明书；

（1.1.2.2）C_L 基因(SEQ ID NO：15)的克隆

a）提供上游引物 accaaggtggaaatcaagaccgtggccgccccctc(SEQ ID NO:16)和下游引物 agaCTCGAGCTAGCACTCG(SEQ ID NO:17)；

b）全基因合成核苷酸序列 C_L 基因(SEQ ID NO：15)的 DNA 分子作为 PCR 模板，采用 PCR 扩增 C_L 基因；

PCR 完成后，胶回收 400bp 附件的条带，胶回收步骤参见 Genstar 货号为 D205-04 的说明书。

（1.1.2.3）重叠 PCR 扩增 V_L(SEQ ID NO：12)和 C_L(SEQ ID NO：15)

配置扩增体系如下:

V_L（上述 V_L 溶液稀释 5 倍）	0.5 μl
C_L	0.5 μl
dNTP	4 μl
5×引物 STAR 缓冲液	10 μl
引物 STAR	1 μl
ddH_2O	32 μl

PCR 扩增程序为：

98℃	2min	
98℃	15s	5 循环
57℃	15s	
72℃	45s	
72℃	5min	
10℃	∞	

循环结束后加入如下引物 V_L-F 及引物 C_L-R，继续扩增；

引物 V_L-F: tctGCGGCCGCGCCGCCACCATG（SEQ ID NO:18）；

引物 C_L-R：agaCTCGAGCTAGCACTCG（SEQ IN NO:19）；

上述引物 V_L-F（20mM） 0.5 μl

上述引物 C_L-R（20mM） 0.5μl

PCR 扩增程序如下：

98℃	2min	
98℃	20s	30 循环
57℃	20s	
72℃	45s	
72℃	5min	
10℃	∞	

PCR 完成后，胶回收 700bp 附件的条带，胶回收步骤参见 Genstar 货号为 D205-04 的说明书；

（1.1.2.4）pcDNA3.1(+)-GS-intron- IRES-V_H-CH 质粒的酶切；

提取由步骤（1.1.1）获得的含抗 TNFα V_H 基因（SEQ ID NO:11）的重组载体 pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-V_H-CH 质粒，将步骤（1.1.2.3）回收的 V_L-C_L 基因及所述 pcDNA3.1(+)-GS-intron- IRES-V_H-CH 质粒分别采用 NotI 以及 XhoI 内切酶进行酶切；

37℃过夜酶切约 6h 后胶回收酶切片段；

（1.1.2.5）V_L-C_L 基因和 pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-V_H-CH 质粒的连接；

取酶切后回收的 pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-V_H-CH 质粒，与胶回收的 V_L-C_L 基因采用 Thermo 货号为 EL0011 的 T4 连接酶进行连接；

22℃恒温金属浴上连接 1h 后转化 DH5α，涂布 Amp^+ LB 平板，37℃恒温培养箱中倒置过夜培养；

（1.1.2.6）菌液 PCR 鉴定

涂布于含 Amp 的 LB 固体平板培养基，挑取 4 个 Amp^+ LB 平板上的单菌落接种至 4ml Amp^+ LB 培养基中，37℃ 200rpm 培养 4h 后进行菌落 PCR 鉴定是否含有阳性克隆，阳性克隆即表示抗 TNFα V_L-C_L 基因与 pcDNA3.1(+)-GS-intron –IRES-V_H-C_H 质粒成功连接，即构建好抗 TNFα 单克隆抗体质粒。

（1.2）抗 IL-17A 抗体基因的重组载体的构建

（1.2.1）含抗 IL-17A V_H 基因（SEQ ID NO:20）的重组载体 pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-V_H-CH 的构建

（1.2.1.1）全基因合成抗 IL-17A 的 V_H 核苷酸序列（SEQ ID NO:20）DNA 分子，提取

其质粒分别采用 BamHI 以及 NheI 限制性内切酶进行酶切，分别于 37℃酶切过夜酶切后胶回收 450bp 酶切片段；

（1.2.1.2）提取 pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-CH 质粒（该质粒的结构如图 2 所示，该质粒中 CH 即为 IL-17A 的 C_H 基因），将步骤（1.2.1.1）回收的 V_H 基因及所述 pcDNA3.1(+)-GS-intron -IRES-CH 质粒分别采用 BamHI 以及 NheI 内切酶进行酶切；分别于 37℃酶切过夜酶切后胶回收酶切片段；胶回收步骤参见 Genstar 货号为 D205-04 的说明书；

（1.2.1.3）抗 IL-17A V_H 基因和 pcDNA3.1(+)-GS-intron -IRES-CH 质粒的连接；

取酶切后回收的 pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-CH 质粒，与胶回收的 V_H 基因采用 Thermo 货号为 EL0011 的 T4 连接酶进行连接；

22℃恒温金属浴上连接 1h 后转化 DH5α，涂布 Amp^+ LB 平板，37℃恒温培养箱中倒置过夜培养；

（1.2.1.4）菌液 PCR 鉴定

涂布于含 Amp 的 LB 固体平板培养基，挑取 6 个 Amp^+ LB 平板上的单菌落接种至 4ml Amp^+ LB 培养基中，37℃ 200rpm 培养 4h 后进行菌落 PCR 鉴定是否含有阳性克隆，阳性克隆即表示抗 IL-17A V_H 基因与 pcDNA3.1(+)-GS-intron -IRES-CH 质粒成功连接。

（1.2.2）含抗 IL-17A V_L-C_L 基因的重组载体 pcDNA3.1(+)-GS-intron-LC-IRES-V_H-C_H 的构建

（1.2.2.1）V_L 基因（SEQ ID NO:21）的克隆

a）提供上游引物和下游引物，其中，该上游引物的碱基序列 tctGCGGCCGCGCCGCCACCATG（SEQ ID NO:22），该下游引物的碱基序列 gaggggcggccacggtccgcttgatttccagtcT（SEQ ID NO:23）；

b）全基因合成 V_L 核苷酸序列（SEQ ID NO:21）为 PCR 模板，采用 PCR 扩增 V_L 基因；

PCR 完成后，胶回收 400bp 附近的条带，胶回收步骤参见 Genstar 货号为 D205-04 的说明书；

（1.2.2.2）C_L 基因（SEQ ID NO:15）的克隆

a）提供上游引物 Agactggaaatcaagcggaccgtggccgccccctc（SEQ ID NO:24）和下游引物 agaCTCGAGCTAGCACTCG（SEQ ID NO:25）；

b）全基因合成 C_L 核苷酸序列（SEQ ID NO:15）的 DNA 分子作为 PCR 模板，采用 PCR 扩增 C_L 基因。

PCR 完成后，胶回收 400bp 附件的条带，胶回收步骤参见 Genstar 货号为 D205-04 的说明书。

（1.2.2.3） 重叠 PCR 扩增 V_L（SEQ ID NO:21）和 C_L（SEQ ID NO:15）

配置扩增体系如下:

V_L（上述 V_L 溶液稀释 5 倍）	0.5 μl
C_L	0.5 μl
dNTP	4 μl
5×引物 STAR 缓冲液	10μl
引物 STAR	1μl
ddH_2O	32μl

PCR 扩增程序为：

98℃	2min	
98℃	15s	5 循环
57℃	15s	
72℃	45s	
72℃	5min	
10℃	∞	

循环结束后加入如下引物 V_L-F 及引物 C_L-R，继续扩增；

该引物 V_L-F 具有序列：tctGCGGCCGCGCCGCCACCATG（SEQ ID NO:26）；

该引物 C_L-R 具有序列：agaCTCGAGCTAGCACTCG（SEQ ID NO:27）；

上述引物 V_L-F（20mM）	0.5μl
上述引物 C_L-R（20mM）	0.5μl

PCR 扩增程序如下：

98℃	2min	
98℃	20s	30 循环
57℃	20s	
72℃	45s	
72℃	5min	
10℃	∞	

PCR 完成后，胶回收 700bp 附件的条带，胶回收步骤参见 Genstar 货号为 D205-04 的说明书。

（1.2.2.4）pcDNA3.1(+)-GS-intron- IRES-V_H-CH 质粒的酶切；

提取步骤（1.2.1）制得的含抗 IL-17A V_H 基因（SEQ ID NO:20）的重组载体 pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-V_H-CH 质粒，将步骤（1.2.2.3）回收的 V_L-C_L 基因及所述 pcDNA3.1(+)-GS-intron- IRES-V_H-CH 质粒分别采用 NotI 以及 XhoI 内切酶进行酶切。

37℃过夜酶切约 6h，后胶回收酶切片段。

（1.2.2.5）V_L-C_L 和 pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-V_H-CH 质粒的连接；

取酶切后回收的 pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-V_H-CH 质粒，与胶回收的 V_L-C_L 因采用 Thermo 货号为 EL0011 的 T4 连接酶进行连接；

22℃恒温金属浴上连接 1h 后转化 DH5α，涂布 Amp^+ LB 平板，37℃恒温培养箱中倒置过夜培养。

（1.2.2.6）菌液 PCR 鉴定

涂布于含 Amp 的 LB 固体平板培养基，挑取 4 个 Amp^+ LB 平板上的单菌落接种至 4ml Amp^+ LB 培养基中，37℃ 200rpm 培养 4h 后进行菌落 PCR 鉴定是否含有阳性克隆，阳性克隆即表示抗 IL-17A V_L-C_L 基因与 pcDNA3.1(+)-GS-intron –IRES-V_H-CH 质粒成功连接，即构建好抗 IL-17A 单克隆抗体质粒。

以上构建了抗 TNF α 单克隆抗体质粒及抗 IL-17A 的单克隆抗体的质粒。

（1.3）双特异性抗体质粒的构建（构建过程如图 1 所示）：

（1.3.1）CH 基因片段定点突变

（1.3.1.1）将构建完成的如上的抗 TNFα 单克隆抗体的质粒的 CH 片段处 DNA 序列进行定点突变，第一个突变点为：

D360K

引物对 1

上游引物： 5' CTGCCCCCATCCCGGAAGGAGCTGACCAAGAAC 3'（SEQ ID NO:28）

下游引物: 5' GTTCTTGGTCAGCTCCTTCCGGGATGGGGGCAG 3'（SEQ ID NO:29）

配置扩增体系如下:

模板	1μl
dNTP	4μl
5×引物 STAR 缓冲液	10μl
引物 STAR	1μl
ddH_2O	32μl
引物对 1 中的上游引物	1μl
引物对 1 中的下游引物	1μl

PCR 扩增程序如下：

98℃	2min	
98℃	20s	16 循环
57℃	20s	16 循环

72℃ 10min

72℃ 10min

10℃ ∞

扩增 16 个循环以后将 PCR 产物用 NEB 的 Dpn1 酶进行切割，去除 PCR 模板 37℃恒温金属浴上连接 1h 后转化 DH5α；

37℃过夜培养挑取 4 个 Amp^+ LB 平板上的单菌落接种至 4ml Amp^+ LB 培养基中，37℃ 200rpm 培养 4h 送去测序公司进行测序。

（1.3.1.2）测序正确后进行第二个定点突变 D403K

引物序列如下：

引物对 2

上游引物: 5' GCCTCCCGTGCTGAAGTCCGACGGCTCC 3'（SEQ ID NO:30）；

下游引物: 5' GGAGCCGTCGGACTTCAGCACGGGAGGC 3'（SEQ ID NO:31）；

突变过程同上步骤（1.3.1.1）；

（1.3.1.3）将构建完成如上的抗 IL-17A 单克隆抗体的质粒的 CH 片段 DNA 序列进行定点突变

第一个突变点为 K402D

引物对 3

上游引物: 5' CCGGAGAACAACTACGACACCACGCCTCCCGTG 3'（SEQ ID NO:32）；

下游引物: 5' CACGGGAGGCGTGGTGTCGTAGTTGTTCTCCGG 3'（SEQ ID NO:33）；

（1.3.1.4）第二个突变点为 K419D

引物对 4

上游引物: 5' CCTTCTTCCTCTACAGCGACCTCACCGTGGACAAGAG 3'（SEQ ID NO:34）

下游引物: 5' CTCTTGTCCACGGTGAGGTCGCTGTAGAGGAAGAAGG 3'（SEQ ID NO:35）

实验过程同上步骤（1.3.1.1）；

（1.3.2）将 CH 基因序列含有抗 IL-17A 的区域突变的质粒的 V_L（SEQ ID NO:21）区域交换到 V_H（SEQ ID NO:20）区域

（1.3.2.1）将 V_L 区域进行 PCR

a）提供上游引物和下游引物，其中，该上游引物的碱基序列 tctGGATCCCCGCCACCATGGGCTG（SEQ ID NO:36），该下游引物的碱基序列

TCTGCTAGCTTGGTGGAGGCccgcttgatttccagt（SEQ ID NO:37）；

b）全基因合成 V_L 核苷酸序列为 PCR 模板，采用 PCR 扩增 V_L 基因。

PCR 完成后，胶回收 400bp 附近的条带，胶回收步骤参见 Genstar 货号为 D205-04 的说明书；

（1.3.2.2）片段与质粒进行酶切

a）将 PCR 片段分别采用 BamHI 以及 NheI 限制性内切酶进行酶切，分别于 37℃酶切过夜酶切后胶回收 400bp 酶切片段；

b）将构建好的 CH 基因序列突变的抗 IL-17A 的质粒分别采用 BamHI 以及 NheI 限制性内切酶进行酶切，分别于 37℃酶切过夜酶切后胶回收酶切片段；

（1.3.2.3）将酶切好的片段及质粒的连接，采用 Thermo 货号为 EL0011 的 T4 连接酶进行连接；

22℃恒温金属浴上连接 1h 后转化 DH5α，涂布 Amp^+ LB 平板，37℃恒温培养箱中倒置过夜培养；

（1.3.2.4）菌液 PCR 鉴定

涂布于含 Amp 的 LB 固体平板培养基，挑取 6 个 Amp^+ LB 平板上的单菌落接种至 4ml Amp^+ LB 培养基中，37℃ 200rpm 培养 4h 后进行菌落 PCR 鉴定是否含有阳性克隆，阳性克隆表示已通过 PCR 将连接进去的片段 PCR 扩增出来。

（1.3.3）将 CH 基因序列含有抗 IL-17A 的区域突变的质粒的 V_H（SEQ ID NO:20）区域交换到 V_L（SEQ ID NO:21）区域

（1.3.3.1）全基因合成 V_H 核苷酸序列为 PCR 模板，采用 PCR 扩增 V_H 基因；提供上游引物和下游引物，其中，该上游引物的碱基序列 tctGGATCCCGCCACCATGGGCTG（SEQ ID NO:38），该下游引物的碱基序列 CGGAGGGGGCGGCCACGGTAGATGACACGGTCACG（SEQ ID NO:39）；PCR 完成后，胶回收 450bp 附近的条带，胶回收步骤参见 Genstar 货号为 D205-04 的说明书；

（1.3.3.2）C_L（SEQ ID NO:15）基因的克隆

本实施例所有的 C_L 基因均是相同的，抗体的轻链恒定区都是 C_L，轻链恒定区在抗体里是恒定的，本实施例抗 TNFα 的单克隆抗体的 C_L 与抗 IL-17A 的单克隆抗体的 C_L 以及后续双特异性抗体（BsAb）的 C_L 都是一个 C_L 序列，即 SEQ ID NO：15；

a）提供上游引物 CGTGACCGTGTCATCTACCGTGGCCGCCCCCTCCG（SEQ ID NO:40）和下游引物 agaCTCGAGCTAGCACTCG（SEQ ID NO:41）；

b）全基因合成 C_L 核苷酸序列的 DNA 分子作为 PCR 模板，采用 PCR 扩增 C_L 基因；PCR 完成后，胶回收 400bp 附件的条带，胶回收步骤参见 Genstar 货号为 D205-04 的说明书；

（1.3.3.3）然后用重叠 PCR 将 V_H 区域 C_L 连接在一起

配置扩增体系如下:

V_L（上述 V_L 溶液稀释 5 倍）	0.5μl
C_L	0.5μl
dNTP	4μl
5×引物 STAR 缓冲液	10μl
引物 STAR	1μl
ddH_2O	32μl

PCR 扩增程序为：

98℃	2min	
98℃	15s	5 循环
57℃	15s	
72℃	45s	
72℃	5min	
10℃	∞	

循环结束后加入上下游引物引物，继续扩增；

引物序列：

TctGGATCCCCGCCACCATGGGCTG（SEQ ID NO:42）

AgaCTCGAGCTAGCACTCG（SEQ ID NO:43）

PCR 扩增程序如下：

98℃	2min	
98℃	20s	30 循环
57℃	20s	
72℃	45s	
72℃	5min	
10℃	∞	

PCR 完成后，胶回收 800bp 附件的条带，胶回收步骤参见 Genstar 货号为 D205-04 的说明书；

（1.3.3.4）将重叠 PCR 产物与 CH 基因序列突变的抗 IL-17A 质粒进行双酶切

分别采用 NotI 以及 XhoI 内切酶进行酶切；

37℃过夜酶切约 6h，后胶回收酶切片段；

（1.3.3.5）取酶切后回收的重叠 PCR 产物与 CH 基因序列突变的抗 IL-17A 质粒用 Thermo 货号为 EL0011 的 T4 连接酶进行连接，22℃恒温金属浴上连接 1h 后转化 DH5α，涂

布 Amp^+ LB 平板，37℃恒温培养箱中倒置过夜培养；

（1.3.3.6）菌液 PCR 鉴定以及酶切鉴定

涂布于含 Amp 的 LB 固体平板培养基，挑取 4 个 Amp^+ LB 平板上的单菌落接种至 4ml Amp^+ LB 培养基中，37℃ 200rpm 培养 4h 后进行菌落 PCR 鉴定是否含有阳性克隆，阳性克隆表示已通过 PCR 将连接进去的片段 PCR 扩增出来。

（2）将构建好的质粒转染到 HEK293F 细胞中进行表达

本实施例采用瞬时转染的方法将步骤(1)中构建好的质粒分别转染至 HEK293F 细胞株内，其中，所述质粒分别为如上构建好的抗 TNFα 单克隆抗体的质粒及抗 IL-17A 单克隆抗体的质粒，用于分别表达两个单克隆抗体，以及如上构建好的 CH 突变的抗 TNFα 质粒与 CH 突变的且 V_H 与 V_L 互换的抗 IL-17A 的质粒，其中，CH 突变的抗 TNFα 质粒与 CH 突变的且 V_H 与 V_L 互换的抗 IL17A 的质粒质量比为 1:1，即每种质粒 25μg，总量 50μg 进行转染，用来表达双特异性抗体（BsAb）；

瞬时转染所用转染试剂为 PEI25000，且质粒：PEI25000 转染的质量比例为 1:2，转染步骤包括：

（2.1）转染前 24h 细胞稀释到 5×10^5 个/ml；

（2.2）转染的时候，将 PBS 预热到 25-37℃，解冻 DNA 和 PEI25000；

（2.3）用细胞计数器确认细胞的密度和活性，细胞密度应该在 5×10^8 个/ml 到 1.2×10^6 个/ml 之间，活性应该大于 95%；

（2.4）取 45ml 细胞放到一个新的摇瓶当中；

（2.5）取 5mlPBS 放到 15ml 离心桶当中，分别取 20 μg 取步骤（1）制备好的质粒加入到 15ml 离心桶当中混匀；

（2.6）加入 40 μl 浓度为 1mg/ml 的 PEI25000 溶液，放入离心桶当中，混匀，涡旋震荡 3 次，每次 3 秒钟；

（2.7）将溶液放置室温 15 分钟；将细胞培养瓶取出，加入质粒/PEI25000 混合溶液，边震荡边加入，将细胞放入培养箱中震荡培养，培养时间为 4 天；

（2.8）4 天后，将细胞离心，收集细胞上清液。

（3）ELISA 检测

（3.1）细胞因子 TNFα 与 IL-17A 用包被液稀释后，每孔加入 50 ng 的细胞因子，4℃冰箱过夜包；

（3.2）用 PBST 洗涤 5 次；

（3.3）加 10 g/L BSA，于 37℃封闭 2h；

（3.4）用 PBST 洗涤 5 次；

（3.5）加入三种抗体上清液，每个浓度的抗体设两个复孔，抗-TNFα 、抗-IL-17A、双特异性抗体，三种抗体上清液 3 倍 3 倍用 PBS 进行稀释，最高浓度为上清原液；以未转入 HEK293F 细胞上清液为阴性对照，以 BSA 稀释液为空白对照；37℃ 1h。抗-TNFα 抗体只加入到细胞因子 TNFα 包被的孔中，抗-IL 17A 的抗体只加入到细胞因子 IL17A 包被的孔中，而 BsAb 则分别加入到这两种细胞因子包被的孔中；

（3.6）用 PBST 洗涤 5 次；

（3.7）加入 HRP 抗-人-IgG；

（3.8）用 PBST 洗涤 5 次；

（3.9）加入 TMD 底物显色；

（3.10）加入 2mol/L 硫酸终止反应；

（3.11）用酶联仪测 OD450 nm 的吸光值；

阳性孔 ELISA 的实验结果如图 3A~3D 所示，从图 3A~3D 中可以看出所构建表达的抗 TNFα 抗体与抗原 TNFα 有很强的结合作用，所构建表达的抗 IL17A 抗体与抗原 IL17A 有很强的结合作用，所构建表达的双特异性抗体与两种抗原都有很强的结合作用，而且结合作用与单克隆抗体类似。

（4）抗体的纯化：将收集的上清液，准备纯化抗体蛋白。所有表达，纯化，都是三种抗体同时进行的，抗-TNFα，抗-IL17A 及双特异性抗体（BsAb）；

用蛋白质 A（Protein A ）纯化 IgG

（4.1）纯化前将细胞上清液用 0.45 μm 的滤膜过滤一下；

（4.2）准备 0.3 ml 蛋白质 A 放入浓缩色谱柱中（BIO-RAD poly-prep chromatography columns），用 pH7.4 的 PBS 洗涤柱子一次；

（4.3）用细胞上清液过柱子两次；

（4.4）2×10 mL PBS 清洗；

（4.5）用 1 ml 浓度为的醋酸钠 （pH3）和 0.25 mL 1M Tris-HCl pH8.0 进行中和。醋酸的浓度为 50mM，氯化钠的浓度为 0.15M；

（4.6）用 10K 的超滤管对浓缩后的抗体进一步进行超滤浓缩；

（5）SDS-PAGE 鉴定：其中分离胶的质量分数为 12%

分别取适量样品加等量 2×SDS 上样缓冲液，用微量移液器加入加样槽，以 8 v/cm 电压电泳，当溴酚蓝前沿进入分离胶后，以 12 v/cm 电压电泳，溴酚蓝电泳至分离胶底部后，取出凝胶，考马斯亮蓝染色液染色，脱色液脱色至蛋白条带清晰，所得结果如图 4 所示，图 4 中左侧是变性蛋白，右侧是未变性蛋白，该未变性的蛋白是蛋白电泳中的上样缓冲液（loading Buffer）没有加巯基乙醇，蛋白电泳上样前，没有煮样，该变性蛋白是上样缓冲液（loading buffer） 里

边加了巯基乙醇，上样之前在 105℃下煮样 10min，从图 4 可以看出抗体的总大小 150KD 左右，其与天然抗体的大小相似；

本实施例所得抗 TNF α 的单克隆抗体即为阿达木单抗（Adalimumab），参见 US6090382；

本实施例所得抗 IL-17A 的单克隆抗体即为 secukinumab 单抗，参见 US20130202610；

本实施例所得双特异性抗体（BsAb）具有 SEQ ID NO:3~SEQ ID NO:6 的氨基酸序列。

（6）用 L929 细胞检测双特异性抗体对 TNF-α 的拮抗作用

L929 细胞对 TNF-α 敏感，用人重组 TNF-α 及放线菌素 D 对细胞进行联合诱导，细胞迅速死亡，加入抗体后，细胞存活率明显升高；细胞培养条件：RPMI1640+ 10%FBS，37℃培养，CO_2 浓度为 5%；当细胞处于对数生长期的时候将细胞用胰酶消化，用完全培养基将细胞的密度调整为 1×10^5 个/mL，将细胞均匀加入 96 孔板中，每孔 100 μl，过夜培养；将细胞分为空白组，双特异性抗体组（BsAb）， TNFα 抗体组及 IL 17A 抗体组，这三种抗体均为本实施例所得；空白组用人重组 TNFα 及放线菌素 D 进行联合诱导，其余四组先用人重组 TNF α 及放线菌素 D 与抗体蛋白混合，其中，放线菌素 D 终浓度为 4μg/mL，人重组 TNFα 为 25ng/mL，抗体蛋白浓度为 50 ng/mL；37℃放置 1h 后，加入 L929 细胞当中；24h 后用 MTT 方法检测细胞的存活率，所得结果如图 5 所示，从图 5 中可以看出双特异性抗体与抗原 TNF α 的结合能力与 TNFα 抗体与抗原结合能力几乎一直，都能阻碍人重组蛋白 TNFα 与 L929 细胞的结合。

（7）实时 PCR 实验

该实验用于检测本实施例所得双特异性抗体（BsAb）、TNFα 抗体及 IL-17A 抗体对 HT-29 细胞分泌趋化因子的效果；

HT-29 为人结肠癌细胞，同时具有 IL17A 及 TNFα 蛋白的受体，当与这两种蛋白结合的时候，细胞当中趋化因子的含量会显著提高，为了检测本实施例所得双特异性抗体对这两种细胞因子的拮抗作用，设计了如下实验：

HT-29 细胞培养条件：RPMI1640+10%FBS，37℃，5%CO_2；当细胞处于对数生长期时，用胰酶将细胞消化，调整细胞浓度为 1×10^6/mL，将细胞放入 6 孔板当中，每孔加入 2 mL 细胞，细胞培养 24 h 后，将细胞培养基上清去掉，换成含 0.5%血清的培养基，过夜培养后，将细胞分为五组，空白组，诱导组， TNF α 抗体组，IL 17A 抗体组，双特异性抗体（BsAb）组，加药处理；空白组不加任何药品，诱导组加入重组人 TNF α 及 IL 17A 细胞因子，TNF α 浓度为 0.5 ng/mL，IL 17A 浓度为 50 ng/mL；其余几组除加入上述浓度的重组人细胞因子外，还需要加入相应抗体，抗体的浓度均为 100ng/mL；加药处理 12h 后，提取细胞的总 RNA，用实时 PCR 检测 HT-29 细胞趋化因子表达情况，所得结果如图 6A~6E 所示，其分别代表趋化因子 CXCL1，CXCL2，CXCL6，IL8，CCL20 的结果图，从图 6A~6E 中可以看出在重组人 TNF α 及 IL 17A 细胞因子的诱导下，HT-29 细胞趋化因子 CXCL1，CXCL2，CXCL6，IL8，CCL20 的表达量

明显上调，在抗 TNFα 抗体和抗 IL17A 抗体的以及双特异性抗体的作用下，这几种趋化因子的表达量都显著下调，而且还可以看出，双特异性抗体的作用要比单克隆抗体的效果更好。

（8）圆二色谱 CD 测量抗体的 T_m 值的实验

采用圆二色谱CD测量本实施例所得抗体的T_m值，该实验采用的仪器型号为JASCO J-815，其包括如下步骤：

（8.1）样品浓度为 0.5mg/ml，将 200μl 样品加入到样品杯当中，样品杯靠近左侧放置，用后面的卡槽卡紧；

（8.2）T_m 值的测定是在 222nm 波长下进行的；

（8.3）在软件页面处选择温度/波长（temperature/wave lengthe） 界面进入 T_m 值测定；

选择手型工具进行参数设定

取样（Sampling） 1.0

目标（Target） 30 秒

效率 10 摄氏度/分钟

等待（Wait） 0 秒

温度选择从 0 度到 100 度，开始执行即可；

所测得的结果如图 7 所示，从图 7 中可以看出抗 IL-17A 抗体的 T_m 值在 82℃左右，双特异性抗体与抗 TNFα 抗体的 T_m 值相近，大约在 68℃左右，发现其热稳定性与天然的单克隆抗体几乎没有差别。

权利要求书

1. 一种IgG杂合型抗TNFα和IL-17A双特异性抗体或来源于该双特异性抗体的能够特异性结合TNFα和IL-17A的生物活性片段，所述双特异性抗体具有人源IgG型用于特异性结合TNFα的第一重链及第一轻链，及人源IgG型用于特异性结合IL-17A的第二重链及第二轻链；

其中，所述第一重链中的可变区为人源IgG型TNF α的抗体中的轻链的可变区；所述第一轻链中的可变区为该人源IgG型TNFα的抗体的重链中的可变区；和/或

所述第二重链中的可变区为人源IgG型IL-17A抗体的轻链中的可变区；所述第二轻链中的可变区为该人源IgG型IL-17A的抗体的重链中的可变区；

所述第一重链与第二重链中的恒定区依靠增强的静电作用和/或疏水作用相互结合。

2. 根据权利要求1所述的IgG杂合型抗TNF α和IL-17A双特异性抗体或来源于该抗体的能够特异性结合TNFα和IL-17A的生物活性片段，其中，所述增强的静电作用是通过将所述人源IgG型TNF α的抗体的重链中的恒定区进行D360K和/或D403K突变，将人源IgG型IL-17A的抗体的重链中的恒定区进行K402D和/或K419D突变得以实现的。

3. 根据权利要求2所述的IgG杂合型抗TNF α和IL-17A双特异性抗体或来源于该抗体的能够特异性结合TNFα和IL-17A的生物活性片段，其中，所述人源IgG型TNFα的抗体的重链为SEQ ID NO:1，在该人源IgG型TNFα的抗体的重链中的第360、403位氨基酸均由Asp替换为Lys；所述人源IgG型IL-17A的抗体的重链为SEQ ID NO:2，所述人源IgG型IL-17A的抗体的重链中的第402、419位由Lys替换为Asp。

4. 根据权利要求1所述的IgG杂合型抗TNFα和IL-17A双特异性抗体或来源于该抗体的能够特异性结合TNFα和IL-17A的生物活性片段，其中，所述第一重链具有如SEQ ID NO:3的氨基酸序列，所述第一轻链具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列，所述第二重链具有如SEQ ID NO:5的氨基酸序列，所述第二轻链具有如SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

5. 一种编码权利要求1所述的IgG杂合型抗TNFα和IL-17A双特异性抗体的DNA分子，其包含编码具有SEQ ID NO:3的氨基酸的核苷酸序列，优选地，该核苷酸序列为SEQ ID NO:7。

6. 一种编码权利要求1所述的IgG杂合型抗TNFα和IL-17A双特异性抗体的DNA分子，其包含编码具有SEQ ID NO:5的氨基酸的核苷酸序列，优选地，该核苷酸序列为SEQ ID NO:9。

7. 一种编码权利要求1所述的IgG杂合型抗TNFα和IL-17A双特异性抗体的DNA分子，其包含编码具有SEQ ID NO:6的氨基酸的核苷酸序列，优选地，该核苷酸序列为SEQ ID NO:10。

8. 分泌权利要求1所述的IgG杂合型抗TNFα和IL-17A双特异性抗体的HEK293F人肾胚细胞，其包含权利要求5所述的DNA分子、权利要求6所述的DNA分子、权利要求7所

述的 DNA 分子，以及编码具有 SEQ ID NO:4 的氨基酸的核苷酸序列，优选地，该核苷酸序列为 SEQ ID NO:8；

优选地，编码具有所述 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 及 SEQ ID NO:6 的氨基酸的核苷酸序列被整合在质粒上；该质粒可通过化学转染方法转染到 HEK293F 细胞中进行表达。

9. 一种产生 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体的方法，其包含在使得该双特异性抗体表达的条件下培养权利要求 8 所述的 HEK293F 人肾胚细胞，及回收所表达的双特异性抗体。

10. 一种药物组合物，其包含权利要求 1~4 中任一项所述的 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体或来源于该抗体的能够特异性结合 TNF α 和 IL-17A 的生物活性片段。

11. 权利要求 1~4 中任一项所述的 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体或来源于该抗体的能够特异性结合 TNF α 和 IL-17A 的生物活性片段或权利要求 10 所述的药物组合物在制备用于治疗类风湿关节炎、克罗恩病、牛皮癣、银屑病或肿瘤的药物中的应用。

12. 一种检测 TNF α 或 IL-17A 水平的试剂盒，其含有权利要求 1~4 中任一项所述的 IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体或来源于该抗体的能够特异性结合 TNF α 和 IL-17A 的生物活性片段；优选所述的试剂盒还含有第二抗体和用于检测的酶或荧光或放射标记物，以及缓冲液；优选所述第二抗体为抗权利要求 1~4 中任一项所述双特异性抗体的抗抗体或抗 TNF α 或 IL-17A 的多抗。

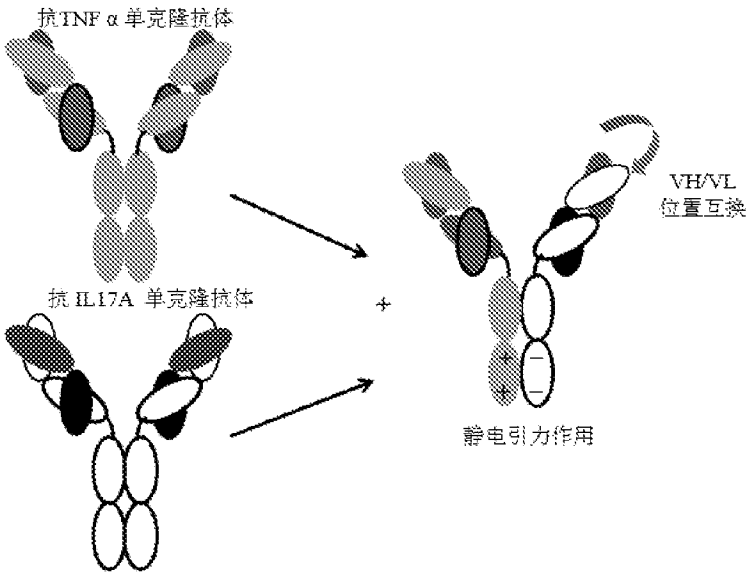

抗TNF α 单克隆抗体
抗 IL17A 单克隆抗体
VH/VL
位置互换
静电引力作用

图 1

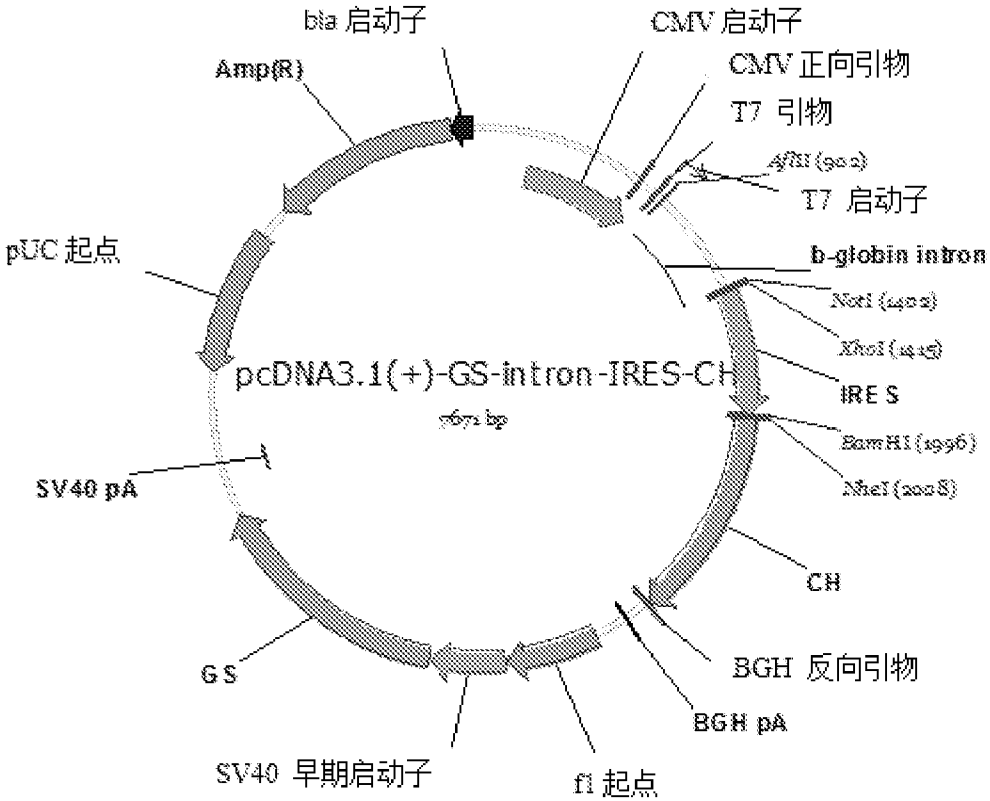

bla 启动子
CMV 启动子
Amp(R)
CMV 正向引物
T7 引物
T7 启动子
b-globin intron
pUC 起点
pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-CH
IRES
SV40 pA
CH
BGH 反向引物
BGH pA
GS
SV40 早期启动子
f1 起点

图 2

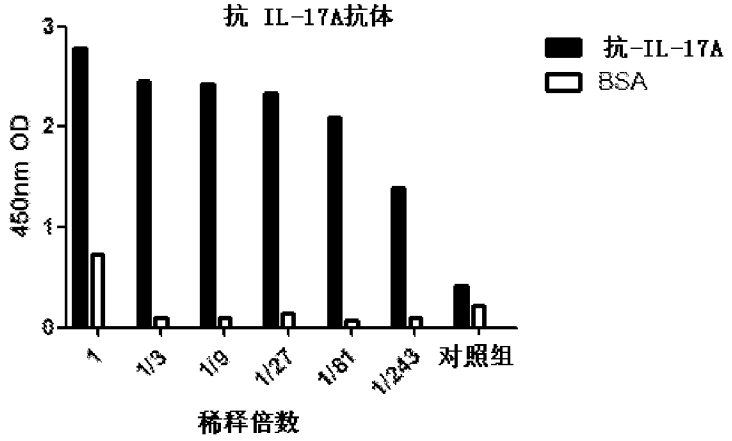

抗 IL-17A抗体
抗-IL-17A
BSA
450nm OD
0
1
2
3
1
1/3
1/9
1/27
1/81
1/243
对照组
稀释倍数

图 3A

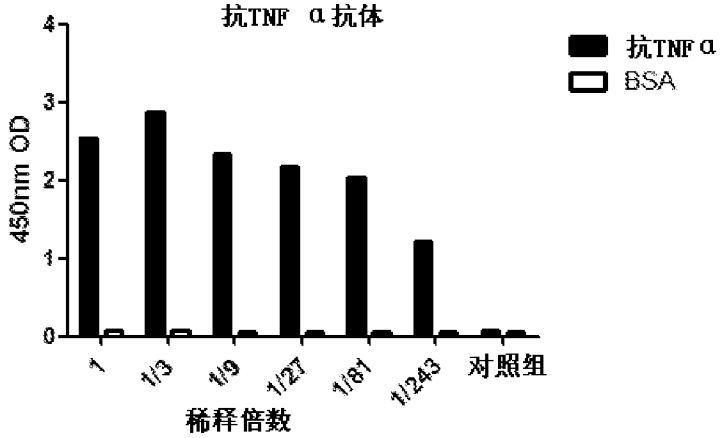

抗TNF α抗体
抗TNFα
BSA
450nm OD
0
1
2
3
4
1
1/3
1/9
1/27
1/81
1/243
对照组
稀释倍数

图 3B

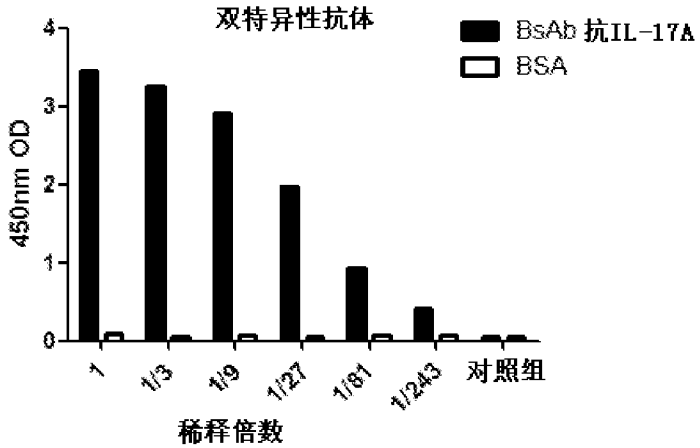

双特异性抗体
BsAb 抗IL-17A
BSA
450nm OD
0
1
2
3
4
1
1/3
1/9
1/27
1/81
1/243
对照组
稀释倍数

图 3C

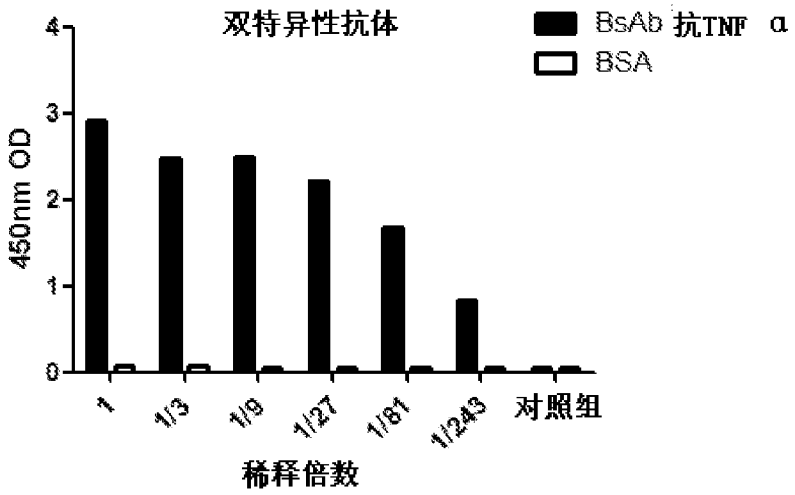

双特异性抗体
BsAb 抗TNF α
BSA
450nm OD
0
1
2
3
4
1
1/3
1/9
1/27
1/81
1/243
对照组
稀释倍数

图 3D

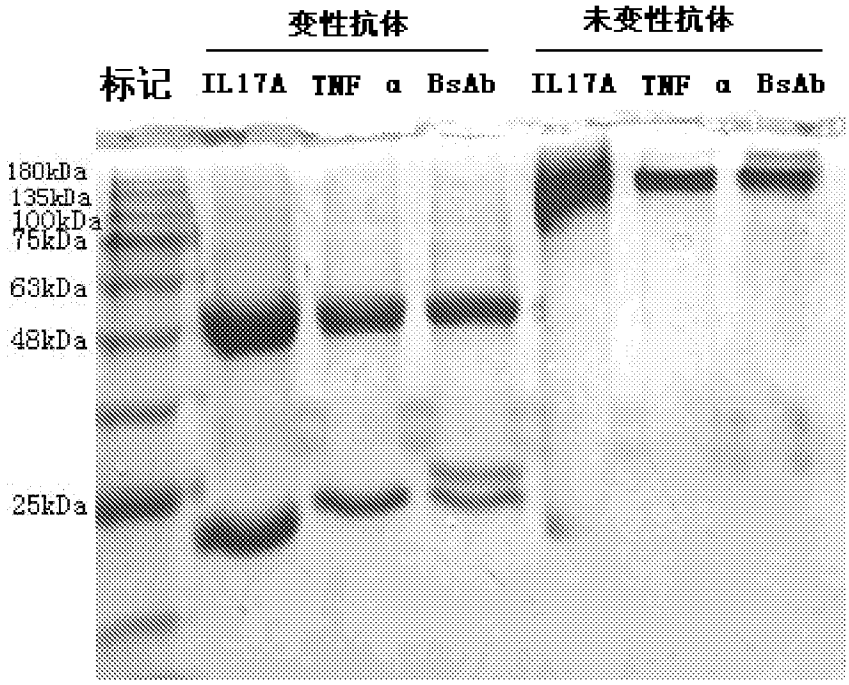

变性抗体
未变性抗体
标记
IL17A
TNF α
BsAb
IL17A
TNF α
BsAb
180kDa
135kDa
100kDa
75kDa
63kDa
48kDa
25kDa

图 4

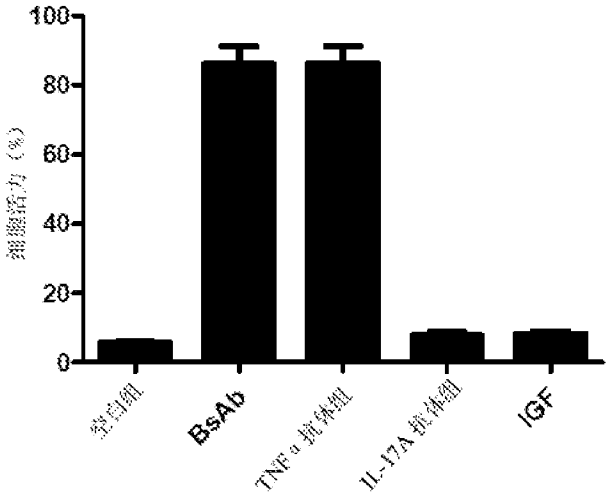

100
80
60
40
20
0
BsAb
IGF

图 5

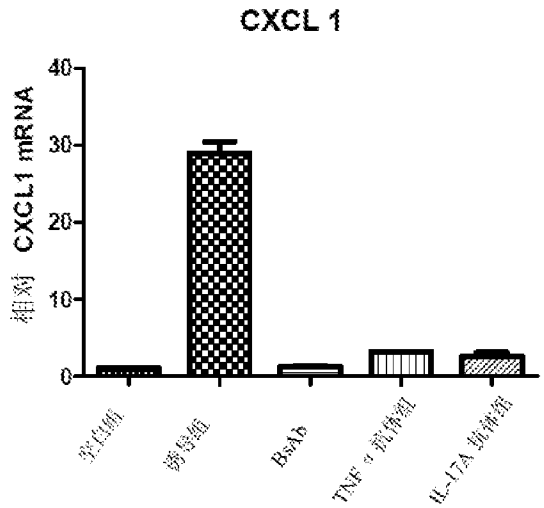

CXCL 1
40
30
20
10
0
CXCL1 mRNA
BsAb

图 6A

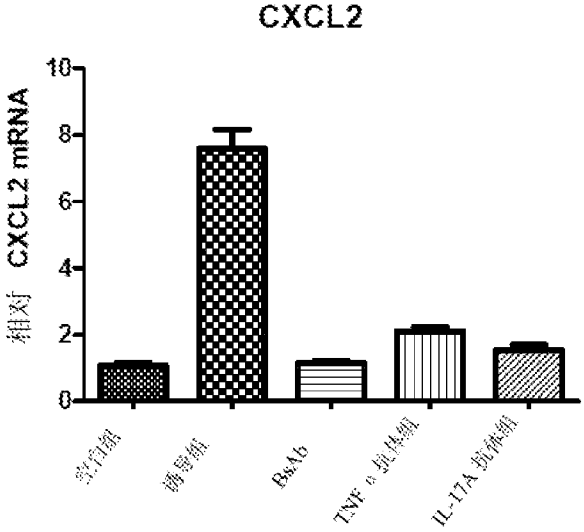

CXCL2
10
8
6
4
2
0
CXCL2 mRNA
BsAb

图 6B

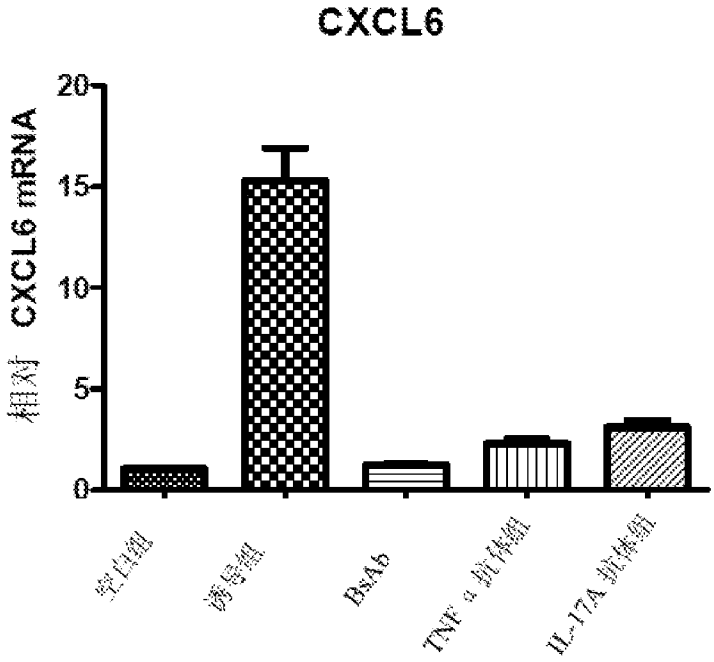

CXCL6
相对 CXCL6 mRNA
20
15
10
5
0
空白组
诱导组
BsAb
TNF α 抗体组
IL-17A 抗体组

图 6C

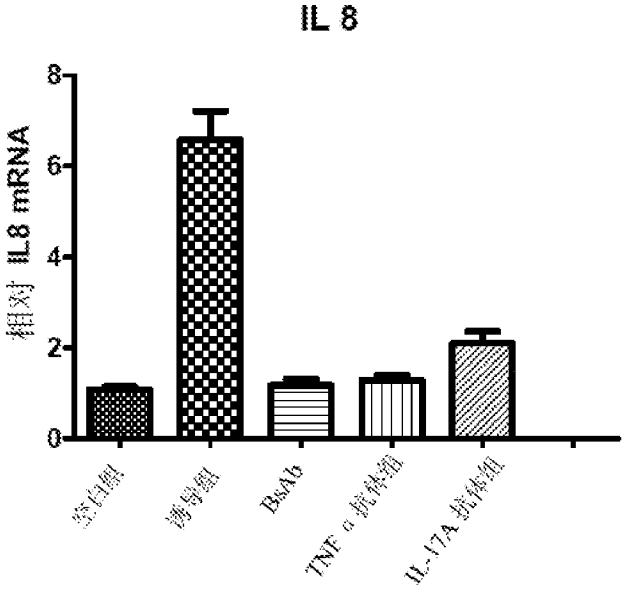

IL 8
相对 IL8 mRNA
8
6
4
2
0
空白组
诱导组
BsAb
TNF α 抗体组
IL-17A 抗体组

图 6D

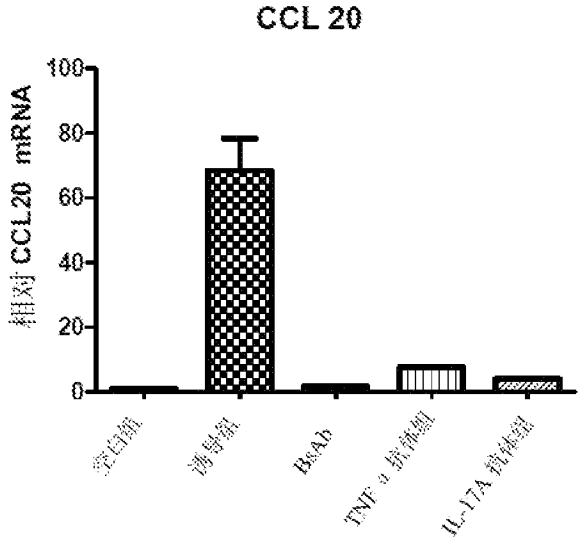

CCL 20
相对 CCL20 mRNA
100
80
60
40
20
0
空白组
诱导组
BsAb
TNF α 抗体组
IL-17A 抗体组

图 6E

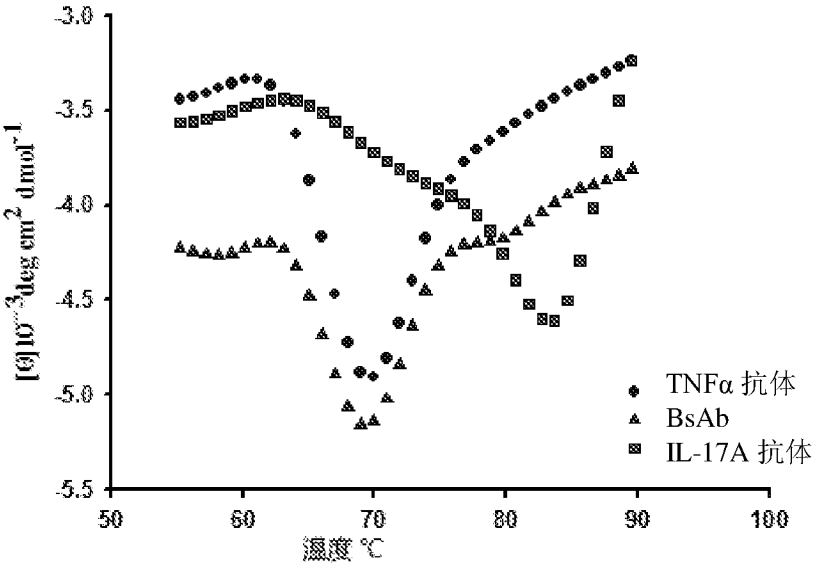

[θ]10^-3deg cm^2 dmol^-1
-3.0
-3.5
-4.0
-4.5
-5.0
-5.5
50
60
70
80
90
100
温度 ℃
TNFα 抗体
BsAb
IL-17A 抗体

图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/099847

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/46 (2006.01) i; C07K 16/24 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 37/02 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; G01N 33/53(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE AND SEARCH WORDS: TNFα, IL-17A, IgG, bispecific antibody, variable region, constant region etc.
GENBANK, EMBL, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT AND SEARCHED SEQUENCE: SEQ ID NOs: 1-10

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014137961 A1 (LILLY CO ELI), 12 September 2014 (12.09.2014), claims 1-12	1-4, 10, 11
Y	WO 2014137961 A1 (LILLY CO ELI), 12 September 2014 (12.09.2014), claims 1-12	1, 10-12
A	WO 2014137961 A1 (LILLY CO ELI), 12 September 2014 (12.09.2014), the whole document	5-9
X	US 2015147327 A1 (ABBVIE INC.), 28 May 2015 (28.05.2015), claims 76-135, and description, paragraph [0035]	1-4, 10, 11
Y	US 2015147327 A1 (ABBVIE INC.), 28 May 2015 (28.05.2015), claims 76-135, and description, paragraph [0035]	1, 10-12
A	US 2015147327 A1 (ABBVIE INC.), 28 May 2015 (28.05.2015), the whole document	5-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 September 2016 (13.09.2016)	**22 September 2016 (22.09.2016)**
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer **LI, Chen** Telephone No.: (86-10) **62411100**

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/099847

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 101198698 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 11 June 2008 (11.06.2008), claims 1-97	1, 10-12
A	CN 101198698 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 11 June 2008 (11.06.2008), the whole document	2-9
Y	CN 103889452 A (ROCHE GLYCART AG), 25 June 2014 (25.06.2014), abstract	1, 10-12
A	CN 103889452 A (ROCHE GLYCART AG), 25 June 2014 (25.06.2014), the whole document	2-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/099847

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2014137961 A1	12 September 2014	TW 201444867 A	01 December 2014
		KR 20150113199 A	07 October 2015
		CA 2896888 A1	12 September 2014
		CN 105283467 A	27 January 2016
		JP 2016510743 A	11 April 2016
		EP 2964674 A1	13 January 2016
		MX 2015011957 A	07 April 2016
		AR 094872 A1	02 September 2015
		US 2014255406 A1	11 September 2014
		AU 2014226093 A1	23 July 2015
		AP 201508709 D0	30 September 2015
US 2015147327 A1	28 May 2015	US 2010047239 A1	25 February 2010
		US 2015086554 A1	26 March 2015
		WO 2008024188 A2	28 February 2008
		WO 2008024188 A3	04 September 2008
		US 2014213768 A1	31 July 2014
		US 2015056202 A1	26 February 2015
		US 2014377805 A1	25 December 2014
		US 2013004416 A1	03 January 2013
		EP 2056869 A2	13 May 2009
		US 2014377858 A1	25 December 2014
		US 2007071675 A1	29 March 2007
		US 8258268 B2	04 September 2012
		US 7612181 B2	03 November 2009
		EP 2056869 A4	21 October 2009
		WO 2008024188 A8	03 July 2008
		US 2015004167 A1	01 January 2015
		US 2014154256 A1	05 June 2014
		US 2014100359 A1	10 April 2014
CN 101198698 A	11 June 2008	EP 1870459 A4	01 September 2010
		JP 5739387 B2	24 June 2015
		AU 2006232287 A1	12 October 2006
		JP 5620626 B2	05 November 2014
		CA 2603408 A1	12 October 2006
		EP 1870459 B1	29 June 2016
		US 2010015133 A1	21 January 2010
		KR 101374454 B1	17 March 2014
		CN 101198698 B	19 March 2014
		KR 20080013875 A	13 February 2008
		WO 2006106905 A1	12 October 2006
		AU 2006232287 A8	24 January 2008
		JP 2013009675 A	17 January 2013
		AU 2006232287 B2	06 October 2011
		EP 3050963 A1	03 August 2016
		EP 1870459 A1	26 December 2007
		HK 1114878 A1	12 September 2014
CN 103889452 A	25 June 2014	WO 2013026839 A1	28 February 2013
		US 2013058936 A1	07 March 2013
		RU 2014109551 A	27 September 2015
		US 2015274845 A1	01 October 2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/099847

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		MX 2014002097 A	28 May 2014
		KR 20140041856 A	04 April 2014
		EP 2747781 A1	02 July 2014
		CA 2844540 A1	28 February 2013
		JP 2014529600 A	13 November 2014

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2015/099847

A. 主题的分类

C07K 16/46(2006.01)i; C07K 16/24(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE和检索词：双特异抗体, TNFα, IL-17A, IgG, 可变区, 恒定区, bispecific antibody, variable region, constant region等; GENBANK, EMBL, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列：SEQ ID NO：1-10

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2014137961 A1 (LILLY CO ELI) 2014年 9月 12日 (2014-09-12) 权利要求1-12	1-4，10，11
Y	WO 2014137961 A1 (LILLY CO ELI) 2014年 9月 12日 (2014-09-12) 权利要求1-12	1，10-12
A	WO 2014137961 A1 (LILLY CO ELI) 2014年 9月 12日 (2014-09-12) 全文	5-9
X	US 2015147327 A1 (ABBVIE INC) 2015年 5月 28日 (2015-05-28) 权利要求76-135，说明书第35段	1-4，10，11
Y	US 2015147327 A1 (ABBVIE INC) 2015年 5月 28日 (2015-05-28) 权利要求76-135，说明书第35段	1，10-12
A	US 2015147327 A1 (ABBVIE INC) 2015年 5月 28日 (2015-05-28) 全文	5-9

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2016年 9月 13日	2016年 9月 22日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	李晨
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-10)62411100

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 101198698 A (中外制药株式会社) 2008年 6月 11日 (2008-06-11) 权利要求1-97	1，10-12
A	CN 101198698 A (中外制药株式会社) 2008年 6月 11日 (2008-06-11) 全文	2-9
Y	CN 103889452 A (罗切格利卡特公司) 2014年 6月 25日 (2014-06-25) 摘要	1，10-12
A	CN 103889452 A (罗切格利卡特公司) 2014年 6月 25日 (2014-06-25) 全文	2-9

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2015/099847

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2014137961	A1	2014年 9月 12日	TW	201444867	A	2014年 12月 1日
				KR	20150113199	A	2015年 10月 7日
				CA	2896888	A1	2014年 9月 12日
				CN	105283467	A	2016年 1月 27日
				JP	2016510743	A	2016年 4月 11日
				EP	2964674	A1	2016年 1月 13日
				MX	2015011957	A	2016年 4月 7日
				AR	094872	A1	2015年 9月 2日
				US	2014255406	A1	2014年 9月 11日
				AU	2014226093	A1	2015年 7月 23日
				AP	201508709	D0	2015年 9月 30日
US	2015147327	A1	2015年 5月 28日	US	2010047239	A1	2010年 2月 25日
				US	2015086554	A1	2015年 3月 26日
				WO	2008024188	A2	2008年 2月 28日
				WO	2008024188	A3	2008年 9月 4日
				US	2014213768	A1	2014年 7月 31日
				US	2015056202	A1	2015年 2月 26日
				US	2014377805	A1	2014年 12月 25日
				US	2013004416	A1	2013年 1月 3日
				EP	2056869	A2	2009年 5月 13日
				US	2014377858	A1	2014年 12月 25日
				US	2007071675	A1	2007年 3月 29日
				US	8258268	B2	2012年 9月 4日
				US	7612181	B2	2009年 11月 3日
				EP	2056869	A4	2009年 10月 21日
				WO	2008024188	A8	2008年 7月 3日
				US	2015004167	A1	2015年 1月 1日
				US	2014154256	A1	2014年 6月 5日
				US	2014100359	A1	2014年 4月 10日
CN	101198698	A	2008年 6月 11日	EP	1870459	A4	2010年 9月 1日
				JP	5739387	B2	2015年 6月 24日
				AU	2006232287	A1	2006年 10月 12日
				JP	5620626	B2	2014年 11月 5日
				CA	2603408	A1	2006年 10月 12日
				EP	1870459	B1	2016年 6月 29日
				US	2010015133	A1	2010年 1月 21日
				KR	101374454	B1	2014年 3月 17日
				CN	101198698	B	2014年 3月 19日
				KR	20080013875	A	2008年 2月 13日
				WO	2006106905	A1	2006年 10月 12日
				AU	2006232287	A8	2008年 1月 24日
				JP	2013009675	A	2013年 1月 17日
				AU	2006232287	B2	2011年 10月 6日
				EP	3050963	A1	2016年 8月 3日
				EP	1870459	A1	2007年 12月 26日
				HK	1114878	A1	2014年 9月 12日
CN	103889452	A	2014年 6月 25日	WO	2013026839	A1	2013年 2月 28日
				US	2013058936	A1	2013年 3月 7日
				RU	2014109551	A	2015年 9月 27日
				US	2015274845	A1	2015年 10月 1日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2015/099847

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
		MX	2014002097	A	2014年 5月 28日
		KR	20140041856	A	2014年 4月 4日
		EP	2747781	A1	2014年 7月 2日
		CA	2844540	A1	2013年 2月 28日
		JP	2014529600	A	2014年 11月 13日