



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110818793 A

(43)申请公布日 2020.02.21

(21)申请号 201810920403.6

C12N 5/20(2006.01)

(22)申请日 2018.08.14

A61K 39/395(2006.01)

(83)生物保藏信息

A61K 45/06(2006.01)

CCTCC NO:C2018133 2018.06.21

A61P 37/02(2006.01)

(71)申请人 中山康方生物医药有限公司

A61P 9/00(2006.01)

地址 528437 广东省中山市火炬开发区神农路6号

A61P 9/10(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 19/02(2006.01)

(72)发明人 李百勇 夏瑜 王忠民 张鹏

A61P 19/06(2006.01)

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 刘海罗

(51)Int.Cl.

C07K 16/24(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

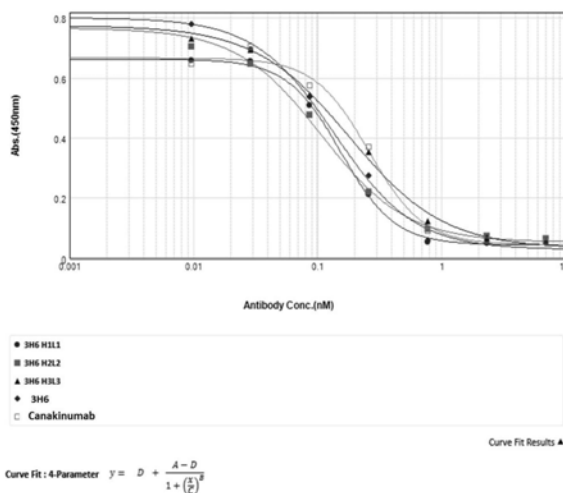
权利要求书3页 说明书26页  
序列表9页 附图8页

(54)发明名称

抗IL-1β的抗体、其药物组合物及其用途

(57)摘要

本发明属于免疫学领域,涉及一种抗IL-1β的抗体、其药物组合物及其用途。具体地,本发明涉及一种抗IL-1β的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体的重链可变区包含:氨基酸序列分别如SEQ ID NO:17—SEQ ID NO:19所示的HCDR1—HCDR3;和所述抗体的轻链可变区包含:氨基酸序列分别如SEQ ID NO:20—SEQ ID NO:22所示的LCDR1—LCDR3。本发明的抗体能够有效地结合人IL-1β,阻断IL-1β与其受体IL-1R1的结合,抑制IL-1β下游信号通路的激活;具有用于制备防治自身免疫性疾病、儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征、全身型幼年特发性关节炎、痛风性关节炎、心血管疾病或肿瘤的药物的潜力。



1. 抗IL-1 $\beta$ 的抗体或其抗原结合片段,其中,  
所述抗体的重链可变区包含:氨基酸序列分别如SEQ ID NO:17—SEQ ID NO:19所示的HCDR1—HCDR3;和  
所述抗体的轻链可变区包含:氨基酸序列分别如SEQ ID NO:20—SEQ ID NO:22所示的LCDR1—LCDR3。
2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中,  
所述抗体的重链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:14;和  
所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:16。
3. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中,  
所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示;或者  
所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示;或者  
所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示;或者  
所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示,并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示。
4. 根据权利要求1至3中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体、人源化抗体、嵌合抗体或双抗体。
5. 根据权利要求1至3中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述的抗体以小于10<sup>-5</sup>M,例如小于10<sup>-6</sup>M、小于10<sup>-7</sup>M、小于10<sup>-8</sup>M、小于10<sup>-9</sup>M或小于10<sup>-10</sup>M或更小的K<sub>D</sub>结合IL-1 $\beta$ 蛋白;优选地,所述K<sub>D</sub>通过Biacore分子相互作用仪测得。
6. 根据权利要求1至3中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中,  
所述的抗体包括非-CDR区,且所述非-CDR区来自不是鼠类的物种,例如来自人抗体。
7. 根据权利要求1至3中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中,  
所述的抗体,其恒定区来自人抗体;  
优选地,所述抗体的恒定区选自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的恒定区。
8. 根据权利要求1至3中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中,  
所述的抗体,其重链恒定区为Ig gamma-1chain C region或Ig gamma-4chain C region,并且其轻链恒定区为Ig kappa chain C region。
9. 根据权利要求1至3中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是由杂交瘤细胞株LT010产生的单克隆抗体,所述杂交瘤细胞株LT010保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏编号为CCTCC NO:C2018133。
10. 抗体药物偶联物,其包括抗体或其抗原结合片段以及小分子药物,其中,所述抗体或其抗原结合片段为权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段;优选地,所述小分子药物为小分子细胞毒药物;更优选地,所述小分子药物为肿瘤化疗药物。

11. 根据权利要求10所述的抗体药物偶联物,其中,所述抗体或其抗原结合片段通过连接子与小分子药物连接;例如,所述连接子为胺键、二硫键或肽键。

12. 根据权利要求10或11所述的抗体药物偶联物,其中,所述抗体或其抗原结合片段与小分子药物的摩尔比为1:(2-4)。

13. 一种双特异性抗体,其包括第一蛋白功能区和第二蛋白功能区,其中:

所述第一蛋白功能区靶向IL-1 $\beta$ ,

所述第二蛋白功能区靶向不同于IL-1 $\beta$ 的靶点(例如,IL-17A);

其中,所述第一蛋白功能区为权利要求1-9中任一权利要求所述的抗体或抗原结合片段;

优选地,所述双特异性抗体为IgG-scFv模式;

优选地,所述第一蛋白功能区为权利要求1-9中任一权利要求所述的抗体,并且所述第二蛋白功能区为单链抗体;或者

优选地,所述第一蛋白功能区为权利要求4所述的单链抗体,并且所述第二蛋白功能区为抗体。

14. 根据权利要求13所述的双特异性抗体,其中,所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接;

优选地,所述连接片段为(GGGGS) $m$ , $m$ 为正整数,例如1、2、3、4、5或6;

优选地,所述连接片段为SS(GGGGS) $n$ , $n$ 为正整数,例如1、2、3、4、5或6。

15. 根据权利要求13所述的双特异性抗体,其中,所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区独立地为1个、2个或者2个以上。

16. 根据权利要求13至15中任一权利要求所述的双特异性抗体,其中,所述单链抗体连接在抗体的重链的C末端。

17. 分离的核酸分子,其包含编码抗体重链可变区的核酸序列和编码抗体轻链可变区的核酸序列,其中,

所述抗体的重链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:19所示的HCDR1-HCDR3,和所述抗体的轻链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:20-SEQ ID NO:22所示的LCDR1-LCDR3;

优选地,所述抗体的重链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:14,和所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:16;

更优选地,所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示;或者所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示;或者所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示;或者所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示,并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示;

进一步优选地,所述核酸分子包含:

SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3所示的核酸序列,

SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7所示的核酸序列,

SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:11所示的核酸序列,或者  
SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:15所示的核酸序列。

18. 一种重组载体,其包含权利要求17所述的分离的核酸分子。

19. 一种宿主细胞,其包含权利要求17所述的分离的核酸分子,或者包含权利要求18所述的重组载体。

20. 制备权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段的方法,其包括在合适的条件下培养权利要求19的宿主细胞,以及从细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段的步骤。

21. 杂交瘤细胞株LT010,其保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏编号为CCTCC NO:C2018133。

22. 一种药物组合物,其包含权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求10至12中任一权利要求所述的抗体药物偶联物或者权利要求13至16中任一权利要求所述的双特异性抗体;可选地,其还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。

23. 权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求10至12中任一权利要求所述的抗体药物偶联物或者权利要求13至16中任一权利要求所述的双特异性抗体在制备治疗和/或预防自身免疫性疾病、心脑血管疾病、肿瘤、儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征、全身型幼年特发性关节炎或痛风性关节炎的药物中的用途;

优选地,所述自身免疫性疾病选自类风湿性关节炎、多发性硬化和周期性发热综合征;

优选地,所述周期性发热综合征选自肿瘤坏死因子受体相关的周期性综合征(TRAPS)、高免疫球蛋白D综合征(HIDS)/甲羟戊酸激酶缺乏症(MKD)以及家族性地中海热(FMF);

优选地,所述儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征选自家族冷自主炎症综合征、穆-韦二氏综合征、新生儿多系统炎性疾病、慢性小儿神经皮肤关节综合征以及家族性冷荨麻疹;

优选地,所述心脑血管疾病选自心肌梗死、动脉粥样硬化、动脉血栓和脑卒中;

优选地,所述肿瘤选自肺癌、肝细胞癌和急性髓性白血病;

优选地,所述痛风性关节炎为急性痛风性关节炎或慢性痛风性关节炎。

24. 权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求10至12中任一权利要求所述的抗体药物偶联物或者权利要求13至16中任一权利要求所述的双特异性抗体在制备如下药物中的用途:

阻断人IL-1 $\beta$ 与人IL-1R1和/或人IL-1R2结合的药物,

下调人IL-1 $\beta$ 活性或水平的药物,或者

抑制由人IL-1 $\beta$ 与人IL-1R1和/或人IL-1R2结合介导的下游信号转导通路激活的药物。

## 抗IL-1 $\beta$ 的抗体、其药物组合物及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫学领域,涉及一种抗IL-1 $\beta$ 的抗体、其药物组合物及其用途。具体地,本发明涉及一种抗人IL-1 $\beta$ 的抗体;更具体地,本发明涉及一种抗人IL-1 $\beta$ 的单克隆抗体;特别具体地,本发明涉及一种抗人IL-1 $\beta$ 的人源化单克隆抗体。

### 背景技术

[0002] 白介素-1 (Interleukin 1, IL-1) 家族由两种促炎因子 (IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ ) 和IL-1受体拮抗剂 (IL-1receptor antagonist, IL-1Ra) 组成, IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 可以有效激动IL-1受体 (IL-1Receptor), IL-1Ra则可以粘附在IL-1受体表面而阻断信号传导。IL-1 $\beta$ 主要由单核细胞和巨噬细胞合成, IL-1 $\beta$ 蛋白前体经半胱天冬酶-1 (caspase-1) 剪切变为活化形式。IL-1受体家族包括多个配体亚型, 包括IL-1R1、IL-1R2、IL-1R3 (又称为白介素受体协同蛋白IL-1receptor accessory protein, 简称为IL-1RAcP)、IL-1R4、IL-1R5、IL-1R6、IL-1R7、IL-1R8、IL-18BP以及2个孤儿受体即IL-1R9和IL-1R10。

[0003] 目前研究发现, IL-1 $\beta$ 可与IL-1R1、IL-1R2结合。IL-1R1 (又称为type1 IL-1Receptor, 简称为IL-1R1) 为跨膜受体, 可与IL-1 $\beta$ 结合并与IL-1RAcP结合形成受体复合物, 激活下游胞内相关信号通路, 介导IL-1 $\beta$ 相关生物学效应; IL-1R2与IL-1 $\beta$ 亲和力较IL-1R1高, 然而由于IL-1R2胞内段较短, 因此与IL-1 $\beta$ 结合后无法激活胞内相关信号通路; IL-1R1和IL-1R2均存在可溶性受体形式 (Boraschi等人. *Immunological Reviews*. 281:197-232. (2018))。

[0004] IL-1 $\beta$ 调节参与先天性免疫和适应性免疫的效应细胞的募集和激活, 也参与慢性疾病的发病机理, 包括痛风性关节炎、各种自身免疫性疾病, 如类风湿关节炎、多发性硬化、周期性发热综合征, 和自身炎症性疾病, 如全身型幼年特发性关节炎, 以及儿童和成人的冷吡琳相关的周期性综合征等疾病的发生。IL-1 $\beta$ 通路近来被证实参与肿瘤如急性髓性白血病、肝癌、肺癌以及心脑血管疾病的发生, 以IL-1 $\beta$ 为靶点的药物展现了良好的治疗和预防效果 (Cozzolino F等人. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:2369 (1989); Nakazaki H等人. *Cancer*. 70 (3) :709 (1992); (Ridker PM等人. *Lancet*. 390 (10105) :1833-1842 (2017))。

[0005] 类风湿关节炎 (Rheumatoid arthritis, RA) 是一种以关节病变为主的慢性、全身性的自身免疫疾病。IL-1 $\beta$ 在RA发病中发挥关键作用。高水平的IL-1 $\beta$ 存在于RA患者的关节腔滑液中 (van den Berg等人. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol*. 13:577-97 (1999)), IL-1 $\beta$ 介导白细胞关节浸润以及关节中基质金属蛋白酶的分泌, 诱导软骨退化并抑制新的软骨基质合成, 从而导致关节破坏 (van den Berg等人. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol*. 13:577-97 (1999).; Johnson LL等人. *Curr Opin Chem Biol*. 2:466-471 (1998).); 在RA患者中, IL-1 $\beta$ 刺激破骨细胞分化和激活, 参与RA受累关节的骨侵蚀的发生 (Gravallese EM等人. *Ann Rheum Dis*. 61:ii84-86 (2002).; Ghivizzani SC等人. *J Immunol*. 1:3604-12 (1997).; Horai R等人. *J Exp Med*. 191:313-20 (2000).; Gravallese EM等人. *Arthritis Rheum*. 43:250-8 (2000).; Takayanagi H等人. *Arthritis Rheum*. 43:

259-69 (2000) )。另外,IL-1 $\beta$ 通过调控TNF- $\alpha$ 和IL-6在内的通路,促进骨质丢失,促进滑膜中白细胞浸润和血管翳组织形成(Strand V等人.Rheumatology (Oxford) .43:iii10-iii16 (2004) )。临床研究证实,IL-1 $\beta$ 拮抗剂显著改善RA的体征和症状(Mertens M等人.J Rheumatol.36 (6) :1118-25 (2009) ) ,抗人IL-1 $\beta$ 单抗Canakinumab(**Ilaris®**)可显著降低RA患者的疾病活动(Alten R等人.Arthritis Res Ther.10:R67 (2008) ;Alten R等人.BMC Musculoskeletal Disorders.12:153 (2011) )。

[0006] 痛风是由单钠尿酸盐沉积所致的晶体相关性关节病,与嘌呤代谢紊乱和/或尿酸排泄减少所致的高尿酸血症直接相关,特指急性特征性关节炎和慢性痛风石疾病,主要包括急性发作性关节炎、痛风石形成、痛风石性慢性关节炎、尿酸盐肾病和尿酸性尿路结石;重者可出现关节残疾和肾功能不全。痛风常伴腹型肥胖、高脂血症、高血压、2型糖尿病及心血管病等表现。IL-1 $\beta$ 是痛风炎症发生的驱动因素(Cumpelik A等人.Ann Rheum Dis.pii:annrheumdis-2015-207338 (2015) )。研究表明,在痛风性关节炎患者中,外周血单个核细胞IL-1 $\beta$ mRNA及血清IL-1 $\beta$ 的表达均显著高于健康对照组,急性期组显著高于慢性期和间歇期组,患者血清IL-1 $\beta$ 的浓度与白细胞、中性粒细胞、红细胞沉降率等指标呈正相关,提示IL-1 $\beta$ 可能同时参与了急性与慢性痛风性关节炎,且与炎症程度相关,间歇期组血清IL-1 $\beta$ 浓度仍然显著高于健康对照组,提示尽管关节症状已消失但关节及组织炎症仍可能存在(李玲琴等人.中华全科医师杂志.14:29-31 (2015) )。动物实验研究表明,IL-1 $\beta$ 在急性痛风性关节炎和慢性痛风性关节炎中均起重要作用,尿酸盐晶体刺激血液及关节液中单核细胞和吞噬细胞引起IL-1 $\beta$ 大量释放(Di Giovine FS等人.J Immunol.138:3213-3218 (1987) ) ;在小鼠模型实验中发现,IL-1 $\beta$ 阻断剂可阻止腹腔内尿酸盐晶体注射引起的中性粒细胞聚集,在小鼠缺乏IL-1 $\beta$ 受体的部位不发生聚集(Martinon F等人.Nature.440:237-241 (2006) )。临床研究表明痛风急性发作期间IL-1 $\beta$ 诱导大量促炎症细胞因子产生(Amaral FA等人.Arthritis Rheum.64:474-484 (2012) ;Torres R等人.Ann Rheum Dis.68:1602-1608 (2009) )。

[0007] 抗人IL-1 $\beta$ 单克隆抗体Canakinumab在评价治疗痛风的有效性安全性临床试验中可有效缓解难治性痛风性关节炎患者的临床症状如疼痛,痛风复发率较曲安奈德组明显减低,生活质量有明显改善(So A等人.Arthritis Rhum.62:3064-3076 (2010) )。在另一项临床研究中发现,抗人IL-1 $\beta$ 单克隆抗体Canakinumab较秋水仙碱可明显减少痛风发作的次数(Schlesinger N等人.Ann Rheum Dis.70:1264-1271 (2011) )。Canakinumab单抗目前已被欧洲医药管理局(European Medicines Agency)批准用于频繁发作的但对非甾体抗炎药、秋水仙碱、糖皮质激素不能耐受或无效的痛风性关节炎患者的治疗(Lyseng-Williamson KA等人.BioDrugs.27:401-406 (2013) )。以上研究提示抗IL-1 $\beta$ 抗体相较现有治疗手段可以更为有效的治疗痛风,缓解症状,减少复发,对于痛风的发作有潜在的防治作用。

[0008] 多发性硬化是主要由Th1和Th17亚群T细胞介导的慢性脱髓鞘疾病。白介素IL-1家族因子在多发性硬化中具有重要作用。IL-1通过促进Th17亚群T细胞的发育来促进疾病发展,并且还引起脑血管中趋化因子CXCL12从实质侧的正常位置分布到内皮两侧,使其去极化分布,导致血管渗漏和T细胞在疾病进程早期进入脑实质(Chih-Chung Lin等人.J Immunol.198:4553-4560 (2017) ) ;动物研究证明,在IL-1或IL-1R1缺陷小鼠中无法诱导出

实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis,EAE),而IL-1 $\beta$ 抑制剂处理可以延迟野生型小鼠EAE发作,降低严重性并缩短疾病持续时间(Chih-Chung Lin等人.J Immunol.198:4553-4560(2017) )。

[0009] 近期临床还研究发现,抗IL-1 $\beta$ 抗体通过拮抗IL-1 $\beta$ 通路发挥抗炎效用,显著降低心血管疾病的发病风险。动脉粥样硬化和血栓形成是冠心病病理基础(Dalek os GN等人.J Lab Clin Med.129:300(1997)),在兔高胆固醇动脉粥样硬化模型中发现IL-1 $\beta$ 和IL-1 $\beta$ 的mRNA在脂质斑块中表达升高,而减少IL-1的合成可减慢动脉粥样硬化的发展(Dinarelli o CA等人.N Eng l J Med.328:106.(1993))。在心肌梗死时IL-1 $\beta$ 水平增高,在梗死后心肌重构过程中,IL-1 $\beta$ 在血浆和心梗局部表达均增加,IL-1 $\beta$ 参与心梗发生后心肌肥厚、心肌纤维化和功能不全的发生、发展(Yue P等人.Am J P hysiol.275(1Pt2):H250(1998))。心力衰竭是一种复杂综合征,研究表明,充血性心衰的患者循环血中IL-1水平增高(Blum A等人.Am Heart J.135(2Part1):181(1998)。Kapadia S等人.Cardiol Clin.16(4):645(1998))。IL-1 $\beta$ 可能参与了慢性负荷增加导致充血性心衰的发生和发展过程;在心功能III~IV级心衰患者中血清IL-1 $\beta$ 水平明显增高,促进充血性心衰的发展(Yndestad A等人.Curr Cardiol Rep.9:236-41(2007))。评估抗人IL-1 $\beta$ 抗体Canakinumab对于既往心梗合并炎症性动脉粥样硬化性心血管病的有效性、安全性和耐受性CANTOS III临床研究显示,抗IL-1 $\beta$ 抗体联合标准治疗显著降低患者的心源性死亡、非致死性心肌梗死和非致死性脑卒中发生率(Ridker PM等人.N Engl J Med.377:1119-1131(2017))。

[0010] 针对抗人IL-1 $\beta$ 抗体Canakinumab的CANTOS临床研究队列的另一项分析发现,抗IL-1 $\beta$ 抗体Canakinumab显著降低肺癌的发生和死亡风险(Ridker PM等人.Lancet.390(10105):1833-1842(2017))。在取自患者的急性髓细胞性白血病(Acute myeloid leukemia,AML)细胞体外培养发现,80%以上的原代AML患者的肿瘤细胞IL-1表达增加,IL-1 $\beta$ 可显著促进肿瘤细胞的生长,而抗IL-1 $\beta$ 或IL-1 $\alpha$ 抗体均可有效抑制肿瘤细胞的生长(Cozzolino F等人.Proc Natl Acad Soci USA.86:2369(1989))。在肝细胞癌患者中,其血清中IL-1水平较健康人对照组明显增高,(Nakazaki H等人.Cancer.70(3):709(1992))。

[0011] 儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征(Cryopyrin-associated periodic syndromes,CAPS)是一类由单一基因突变引起IL-1 $\beta$ 过度产生的罕见疾病,造成虚弱乏力、潮红、发热、头痛、关节痛和结膜炎,可出现在初生儿或婴儿,可在患者一生中每日出现,长期可造成严重疾病和可能致命,包括耳聋、骨和关节变形、中枢神经系统损伤导致失明和淀粉样变造成肾衰竭和早亡。儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征包括家族冷自主炎症综合征(Familial ColdAuto-Inflammatory Syndrome,FCAS),穆-韦二氏综合征(Muckle-Wells Syndrome,MWS),新生儿多系统炎性疾病(Neonatal-onset multisystem i n f l a m m a t o r y d i s e a s e)、慢性小儿神经皮肤关节综合征(Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome)、家族性冷荨麻疹(Familiar cold urticaria)。抗人IL-1 $\beta$ 的抗体Canakinumab可显著缓解Cryopyrin蛋白相关性周期综合征患者临床症状(Yokota S等人.Clin Exp Rheumatol.35Suppl 108(6):19-26.(2017);Kone-Paut I等人.Arthritis Care Res(Hoboken).;69:903-911.(2017))因此被美国联邦食品药品监督管理局和欧洲医药管理局批准用于治疗儿童(年龄 $\geq$ 4岁)和成人的Cryopyrin蛋白相关性周期综合征患者。

[0012] 周期性发热综合征(Periodic Fever Syndromes)是一组罕见的自身免疫性疾病,通过免疫系统的非感染性激活导致严重反复性持续性发热和致病性炎症,往往导致残疾并可能伴有关节疼痛、肿胀、肌肉疼痛、皮疹及可致命的并发症(Wurster VM等人.Pediatr Ann.40(1):48-54.(2011))。周期性发热综合征包括肿瘤坏死因子受体相关的周期性综合征(TNF receptor associated periodic syndrome,TRAPS)、高免疫球蛋白D综合征(Hyper-IgD syndrome,HIDS)/甲羟戊酸激酶缺乏症(Mevalonate kinase deficiency,MKD)、家族性地中海热(Familial mediterranean fever,FMF)。临床研究报道证实抗人IL-1 $\beta$ 单抗Canakinumab可有效治疗周期性发热综合征(De Benedetti F等人.N Engl J Med.378(20):1908-1919(2018))。因此抗人IL-1 $\beta$ 单抗Canakinumab被美国联邦食品药品监督管理局等批准用于治疗周期性发热综合征。

[0013] 全身型幼年特发性关节炎(systemic juvenile idiopathic arthritis,sJIA)是幼年特发性关节炎(juvenile idiopathic arthritis)中一种独特的亚型,多以长期高热、皮疹、贫血等关节外表现起病,常见于0-5岁幼儿,以慢性关节滑膜炎为主要特征,多伴有不同程度的器官、组织损害,主要表现为发热、皮疹和关节痛,具有长期缓解率低、功能障碍率和致残率高、死亡率较高等预后不良表现(Woerner A等人.Expert Rev Clin Immunol.11(5):575-88.(2015)),目前普遍认为sJIA是一种自身炎症性疾病,非自身免疫性疾病(孙娟等人.现代生物医学进展.8:1584-1588(2016))。临床研究证实,抗人IL-1 $\beta$ 单克隆抗体药物Canakinumab单抗可有效治疗伴发热的活动性sJIA,减少类固醇用量,显著降低sJIA复发风险(Orrrock JE等人.Expert Rev Clin Pharmacol.9:1015-24.(2016)),因此抗IL-1 $\beta$ 单抗Canakinumab被美国联邦食品药品监督管理局等批准用于治疗全身型幼年特发性关节炎。

[0014] 目前还需要开发新的抗IL-1 $\beta$ 的抗体药物。

## 发明内容

[0015] 本发明人经过深入的研究和创造性的劳动,利用哺乳动物细胞表达系统表达出重组的IL-1 $\beta$ -His作为抗原免疫小鼠,经小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合获得杂交瘤细胞。发明人通过对大量样本进行筛选,得到了如下的杂交瘤细胞株:

[0016] 杂交瘤细胞株LT010,其于2018年6月21日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏编号为CCTCC NO:C2018133。

[0017] 本发明人惊奇地发现:

[0018] 杂交瘤细胞株LT010能够分泌产生与人IL-1 $\beta$ 特异性结合的特异性单克隆抗体(命名为3H6),并且该单克隆抗体能够十分有效地阻断IL-1 $\beta$ 与IL-1R1的结合;

[0019] 进一步地,本发明人创造性地制得了抗人IL-1 $\beta$ 的人源化抗体(分别命名为3H6 H1L1,3H6 H2L2,3H6 H3L3,3H6 H4L1),能有效地结合人IL-1 $\beta$ ,阻断IL-1 $\beta$ 与其受体IL-1R1的结合,抑制IL-1 $\beta$ 下游信号通路的激活;具有用于制备降低、预防或治疗类风湿关节炎、痛风、多发性硬化、心血管事件和/或心血管疾病、肿瘤、多发性硬化、儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征、周期性发热综合征、全身型幼年特发性关节炎等疾病的药物的潜力。

[0020] 由此提供了下述发明:

[0021] 本发明的一个方面涉及一种抗IL-1 $\beta$ 的抗体或其抗原结合片段,其中,

[0022] 所述抗体的重链可变区包含:氨基酸序列分别如SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:19所

示的HCDR1-HCDR3;和

[0023] 所述抗体的轻链可变区包含:氨基酸序列分别如SEQ ID NO:20-SEQ ID NO:22所示的LCDR1-LCDR3。

[0024] 优选地,所述IL-1 $\beta$ 为人IL-1 $\beta$ 。

[0025] 重链可变区和轻链可变区决定抗原的结合;每条链的可变区均含有三个高变区,称互补决定区(CDR)(重链(H)的CDR包含HCDR1、HCDR2、HCDR3,轻链(L)的CDR包含LCDR1、LCDR2、LCDR3;其由Kabat等人命名,见Sequences of Proteins of Immunological Interest.Fifth Edition(1991),第1-3卷,NIH Publication 91-3242,Bethesda Md)。

[0026] 通过本领域技术人员所熟知的技术手段,例如通过VBASE2数据库分析本发明的抗体3H6、3H6 H1L1、3H6 H2L2、3H6 H3L21和3H6H4L1,可以发现其具有相同的HCDR1-3和LCDR1-3:

[0027] 其重链可变区的3个HCDR区的氨基酸序列如下:

[0028] HCDR1:GFSLSTSGMG(SEQ ID NO:17),

[0029] HCDR2:IYWDDDK(SEQ ID NO:18),

[0030] HCDR3:ARSAYYSFAY(SEQ ID NO:19);

[0031] 其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列如下:

[0032] LCDR1:QDVDTD(SEQ ID NO:20),

[0033] LCDR2:WAS(SEQ ID NO:21),

[0034] LCDR3:QQYSSYPT(SEQ ID NO:22)。

[0035] 在本发明的一个或多个实施方案中,所述的抗体或其抗原结合片段,其中,

[0036] 所述抗体的重链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:14;和

[0037] 所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:16。

[0038] 在本发明的一些实施方案中,所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体选自:

[0039] (1)如SEQ ID NO:2所示的VH和如SEQ ID NO:4所示的VL;

[0040] (2)如SEQ ID NO:6所示的VH和如SEQ ID NO:8所示的VL;

[0041] (3)如SEQ ID NO:10所示的VH和如SEQ ID NO:12所示的VL;和

[0042] (4)如SEQ ID NO:14所示的VH和如SEQ ID NO:16所示的VL。

[0043] 在本发明的一个或多个实施方案中,所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体(例如,scFv)、人源化抗体、嵌合抗体或双抗体。

[0044] 在本发明的一个或多个实施方案中,所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述的抗体以小于10<sup>-5</sup>M,例如小于10<sup>-6</sup>M、小于10<sup>-7</sup>M、小于10<sup>-8</sup>M、小于10<sup>-9</sup>M或小于10<sup>-10</sup>M或更小的K<sub>D</sub>结合IL-1 $\beta$ 蛋白;优选地,所述K<sub>D</sub>通过Biacore分子相互作用仪测得。

[0045] 在本发明的一些实施方式中,所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述的抗体以小于大约100nM,例如小于大约10nM、小于大约1nM、小于大约0.9nM、小于大约0.8nM、小于大约0.7nM、小于大约0.6nM、小于大约0.5nM、小于大约0.4nM、小于大约0.3nM、小于大约

0.2nM、小于大约0.1nM或更小的EC<sub>50</sub>结合IL-1 $\beta$ 蛋白。具体地,所述EC<sub>50</sub>通过间接ELISA方法测得。

[0046] 在本发明的一个或多个实施方案中,所述的抗体或其抗原结合片段,其中,

[0047] 所述的抗体包括非-CDR区,且所述非-CDR区来自不是鼠类的物种,例如来自人抗体。

[0048] 在本发明的一些实施方案中,所述抗体的恒定区是人源化的,例如,重链恒定区均采用Ig gamma-1chain C region,例如ACCESSION:P01857或Ig gamma-4chain C region,例如ACCESSION:P01861.1;轻链恒定区均采用Ig kappa chain C region,例如ACCESSION:P01834。

[0049] 在本发明的一个或多个实施方案中,所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是由杂交瘤细胞株LT010产生的单克隆抗体,所述杂交瘤细胞株LT010保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏编号为CCTCC NO:C2018133。

[0050] 在本发明的一个或多个实施方案中,所述抗体为单克隆抗体。

[0051] 本发明的另一方面涉及一种抗体药物偶联物(antibody-drug conjugate,ADC),其包括抗体或其抗原结合片段以及小分子药物,其中,所述抗体或其抗原结合片段为本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段;优选地,所述小分子药物为小分子细胞毒药物;更优选地,所述小分子药物为化疗药物。

[0052] 所述化疗药物可以是常规的肿瘤化疗药物,例如烷化剂、抗代谢药、抗肿瘤抗生素、植物类抗癌药、激素、免疫制剂等。

[0053] 在本发明的一个或多个实施方案中,所述的抗体药物偶联物,其中,所述抗体或其抗原结合片段通过连接子与小分子药物连接;所述连接子可以是本领域技术人员知悉的连接子,例如,所述连接子为胺键、二硫键或肽键。

[0054] 在本发明的一个或多个实施方案中,所述的抗体药物偶联物,其中,所述抗体或其抗原结合片段与小分子药物的摩尔比为1:(2-4),例如1:2,1:3或1:4。

[0055] 本发明的再一方面涉及一种双特异性抗体(又称为双功能抗体),其包括第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区,其中:

[0056] 所述第一蛋白功能区靶向IL-1 $\beta$ ,

[0057] 所述第二蛋白功能区靶向不同于IL-1 $\beta$ 的靶点,例如IL-17A;

[0058] 其中,所述第一蛋白功能区为本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段;

[0059] 优选地,所述双特异性抗体为IgG-scFv模式;

[0060] 优选地,

[0061] (1) 所述第一蛋白功能区为本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,并且所述第二蛋白功能区为单链抗体;

[0062] 或者,

[0063] (2) 所述第一蛋白功能区为单链抗体,其重链可变区包含氨基酸序列如SEQ ID NO:17-SEQ ID NO:19所示的HCDR1-HCDR3,其轻链可变区包含氨基酸序列如SEQ ID NO:20-SEQ ID NO:22所示的LCDR1-LCDR3,并且所述第二蛋白功能区为抗体(例如单克隆抗体)。

[0064] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,所述第一蛋白功能区和

第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接;

[0065] 优选地,所述连接片段为(GGGGS) $m$ , $m$ 为正整数,例如1、2、3、4、5或6;

[0066] 优选地,所述连接片段为SS(GGGGS) $n$ , $n$ 为正整数,例如1、2、3、4、5或6。

[0067] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,第(2)项中,

[0068] 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:14;和

[0069] 所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:16。

[0070] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,第(2)项中,

[0071] 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示;或者

[0072] 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示;或者

[0073] 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示;或者

[0074] 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示,并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示。

[0075] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区独立地为1个、2个或者2个以上。

[0076] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,(2)项中,所述单克隆抗体的恒定区选自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的恒定区。

[0077] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,所述单链抗体连接在抗体或单克隆抗体的重链的C末端。

[0078] 本发明的再一方面涉及一种分离的核酸分子,其包含编码抗体重链可变区的核酸序列和编码抗体轻链可变区的核酸序列,其中,

[0079] 所述抗体的重链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:17—SEQ ID NO:19所示的HCDR1—HCDR3,和所述抗体的轻链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:20—SEQ ID NO:22所示的LCDR1—LCDR3;

[0080] 优选地,所述抗体的重链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:14,和所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:16;

[0081] 更优选地,所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示;或者所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示;或者所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示;或者所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示,并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示;

[0082] 进一步优选地,所述分离的核酸分子包含:

[0083] SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3所示的核酸序列,

[0084] SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7所示的核酸序列,

[0085] SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:11所示的核酸序列,或者

[0086] SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:15所示的核酸序列。

[0087] 所述分离的核酸分子,可以是一个核酸分子,也可以是多个核酸分子,例如两个核酸分子。当是一个核酸分子时,抗体的重链可变区和轻链可变区可以通过同一个核酸分子表达,例如通过位于同一核酸分子上的相同或不同的表达框来表达。当是多个核酸分子例如两个核酸分子时,抗体的重链可变区和轻链可变区可以通过不同的核酸分子分别表达。

[0088] 本发明的再一方面涉及一种重组载体,其包含本发明的分离的核酸分子。所述的重组载体可以是一个或多个。当所述核酸分子是多个例如两个时,多个(例如两个)核酸分子可以通过同一重组载体表达,也可以分别通过不同的重组载体来表达。

[0089] 本发明的再一方面涉及一种宿主细胞,其包含本发明的分离的核酸分子,或者包含本发明的重组载体。

[0090] 本发明的再一方面涉及一种制备本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法,其包括在合适的条件下培养本发明的宿主细胞,以及从细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段的步骤。

[0091] 本发明的再一方面涉及一种杂交瘤细胞株LT010,其保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏编号为CCTCC NO:C2018133。

[0092] 本发明的再一方面涉及一种药物组合物,其包含本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的抗体药物偶联物或者本发明的双特异性抗体;可选地,其还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0093] 本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的抗体药物偶联物或者本发明的双特异性抗体在制备治疗和/或预防自身免疫性疾病、心脑血管疾病、肿瘤、儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征、全身型幼年特发性关节炎或痛风性关节炎的药物中的用途;

[0094] 优选地,所述自身免疫性疾病选自类风湿性关节、多发性硬化和周期性发热综合征;

[0095] 优选地,所述周期性发热综合征选自肿瘤坏死因子受体相关的周期性综合征(TRAPS)、高免疫球蛋白D综合征(HIDS)/甲羟戊酸激酶缺乏症(MKD)以及家族性地中海热(FMF);

[0096] 优选地,所述儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征选自家族冷自主炎症综合征、穆-韦二氏综合征、新生儿多系统炎性疾病、慢性小儿神经皮肤关节综合征以及家族性冷荨麻疹;

[0097] 优选地,所述心脑血管疾病选自心肌梗死、动脉粥样硬化、动脉血栓和脑卒中;

[0098] 优选地,所述肿瘤选自肺癌、肝细胞癌和急性髓性白血病;

[0099] 优选地,所述痛风性关节炎为急性痛风性关节炎或慢性痛风性关节炎。

[0100] 本发明的再一方面本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的抗体药物偶联物或者本发明的双特异性抗体在制备如下药物中的用途:

[0101] 阻断人IL-1 $\beta$ 与人IL-1R1和/或人IL-1R2结合的药物,

[0102] 下调人IL-1 $\beta$ 活性或水平的药物,或者

[0103] 抑制由人IL-1 $\beta$ 与人IL-1R1和/或人IL-1R2结合介导的下游信号转导通路激活的药物。

[0104] 在本发明的一个实施方案中,所述人IL-1R1和/或人IL-1R2是细胞表面的人IL-1R1和/或人IL-1R2。

[0105] 在本发明的一个实施方案中,所述用途是非治疗目的的和/或非诊断目的的。

[0106] 在本发明的一个或多个实施方案中,所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的抗体药物偶联物或者本发明的双特异性抗体,其用于治疗和/或预防自身免疫性疾病、心脑血管疾病、肿瘤、儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征、全身型幼年特发性关节炎或痛风性关节炎;

[0107] 优选地,所述自身免疫性疾病选自类风湿性关节、多发性硬化和周期性发热综合征;

[0108] 优选地,所述周期性发热综合征选自肿瘤坏死因子受体相关的周期性综合征(TRAPS)、高免疫球蛋白D综合征(HIDS)/甲羟戊酸激酶缺乏症(MKD)以及家族性地中海热(FMF);

[0109] 优选地,所述儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征选自家族冷自主炎症综合征、穆-韦二氏综合征、新生儿多系统炎性疾病、慢性小儿神经皮肤关节综合征以及家族性冷荨麻疹;

[0110] 优选地,所述心脑血管疾病选自心肌梗死、动脉粥样硬化、动脉血栓和脑卒中;

[0111] 优选地,所述肿瘤选自肺癌、肝细胞癌和急性髓性白血病;

[0112] 优选地,所述痛风性关节炎为急性痛风性关节炎或慢性痛风性关节炎。

[0113] 在本发明的一个或多个实施方案中,所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的抗体药物偶联物或者本发明的双特异性抗体,其用于:

[0114] 阻断人IL-1 $\beta$ 与人IL-1R1和/或人IL-1R2结合,

[0115] 下调人IL-1 $\beta$ 活性或水平,或者

[0116] 抑制由人IL-1 $\beta$ 与人IL-1R1和/或人IL-1R2结合介导的下游信号转导通路激活。

[0117] 在本发明的一个实施方案中,所述人IL-1R1和/或人IL-1R2是细胞表面的人IL-1R1和/或人IL-1R2。

[0118] 本发明的再一方面涉及一种在体内或体外方法,包括施加细胞以有效量的本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的抗体药物偶联物或者本发明的双特异性抗体的步骤,所述方法选自如下:

[0119] 阻断人IL-1 $\beta$ 与人IL-1R1和/或人IL-1R2结合的方法,

[0120] 下调人IL-1 $\beta$ 活性或水平的方法,或者

[0121] 抑制由人IL-1 $\beta$ 与人IL-1R1和/或人IL-1R2结合介导的下游信号转导通路激活的方法。

[0122] 在本发明的一个实施方案中,所述人IL-1R1和/或人IL-1R2是细胞表面的人IL-1R1和/或人IL-1R2。

[0123] 在本发明的一个实施方案中,所述体外方法是非治疗目的的和/或非诊断目的的。

[0124] 本发明的再一方面涉及一种治疗和/或预防治疗和/或预防自身免疫性疾病、心脑血管疾病、肿瘤、儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征、全身型幼年特发性关节炎或痛

风性关节炎的方法,包括给予有需求的受试者以有效量的本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的抗体药物偶联物或者本发明的双特异性抗体的步骤;

[0125] 优选地,所述自身免疫性疾病选自类风湿性关节炎、多发性硬化、周期性发热综合征;

[0126] 优选地,所述周期性发热综合征选自肿瘤坏死因子受体相关的周期性综合征(TRAPS)、高免疫球蛋白D综合征(HIDS)/甲羟戊酸激酶缺乏症(MKD)以及家族性地中海热(FMF);

[0127] 优选地,所述儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征选自家族冷自主炎症综合征、穆-韦二氏综合征、新生儿多系统炎性疾病、慢性小儿神经皮肤关节综合征以及家族性冷荨麻疹;

[0128] 优选地,所述心脑血管疾病选自心肌梗死、动脉粥样硬化、动脉血栓和脑卒中;

[0129] 优选地,所述肿瘤选自肺癌、肝细胞癌和急性髓性白血病;

[0130] 优选地,所述痛风性关节炎为急性痛风性关节炎或慢性痛风性关节炎。

[0131] 本发明人通过动物实验发现,本发明的抗体特别是3H6H4L1能够在BALB/c小鼠中有效地缓解转染人IL-1 $\beta$ 的NIH/3T3细胞诱导的类风湿性关节炎模型中的病理学改变,表现为给予抗体药3H6H4L1可有效改善类风湿性关节炎小鼠的病理行为,减少类风湿性小鼠患肢的肿胀面积。

[0132] 在本发明中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且,本发明中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时,为了更好地理解本发明,下面提供相关术语的定义和解释。

[0133] 如本文中所使用的,当提及IL-1 $\beta$ 的氨基酸序列(GenBank ID:NP\_000567.1)时,其包括IL-1 $\beta$ 蛋白的全长,还包括IL-1 $\beta$ 的融合蛋白,例如与小鼠或人IgG的Fc蛋白片段(mFc或hFc)或者多个His进行融合片段。然而,本领域技术人员理解,在IL-1 $\beta$ 的氨基酸序列中,可天然产生或人工引入突变或变异(包括但不限于置换,缺失和/或添加),而不影响其生物学功能。因此,在本发明中,术语“IL-1 $\beta$ ”应包括所有此类序列,及其天然或人工的变体。并且,当描述IL-1 $\beta$ 蛋白的序列片段时,其不仅包括序列片段,还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

[0134] 如本文中所使用的,当提及IL-1R1的氨基酸序列(GenBank ID:NP\_000868)时,其包括IL-1R1蛋白的全长,还包括IL-1R1的融合蛋白,例如与小鼠或人IgG的Fc蛋白片段(mFc或hFc)或者多个His进行融合片段。然而,本领域技术人员理解,在IL-1R1蛋白的氨基酸序列中,可天然产生或人工引入突变或变异(包括但不限于置换,缺失和/或添加),而不影响其生物学功能。因此,在本发明中,术语“IL-1R1”应包括所有此类序列以及其天然或人工的变体。并且,当描述IL-1R1蛋白的序列片段时,包括IL-1R1序列片段,还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

[0135] 如本文中所使用的,当提及IL-1R2的氨基酸序列(GenBank ID:CAA42441.1)时,其包括IL-1R2蛋白的全长,还包括IL-1R2的融合蛋白,例如与小鼠或人IgG的Fc蛋白片段(mFc或hFc)或者多个His进行融合片段。然而,本领域技术人员理解,在IL-1R2蛋白的氨基酸序列中,可天然产生或人工引入突变或变异(包括但不限于置换,缺失和/或添加),而不影

响其生物学功能。因此,在本发明中,术语“IL-1R2”应包括所有此类序列以及其天然或人工的变体。并且,当描述IL-1R2蛋白的序列片段时,包括IL-1R2序列片段,还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

[0136] 如本文中所使用的,术语EC<sub>50</sub>是指半最大效应浓度(concentration for 50% of maximal effect),是指能引起50%最大效应的浓度。

[0137] 如本文中所使用的,术语“抗体”是指,是指通常由两对多肽链(每对具有一条“轻”(L)链和一条“重”(H)链)组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为κ和λ轻链。重链可分类为μ、δ、γ、α或ε,并且分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过大约12或更多个氨基酸的“J”区连接,重链还包含大约3个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由3个结构域(CH1、CH2和CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子,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。VH和VL区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区即CDR),其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各VH和VL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。各重链/轻链对的可变区(VH和VL)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987and 1991)),或Chothia& Lesk(1987) J.Mol.Biol.196:901-917;Chothia等人(1989) Nature 342:878-883的定义。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如,其包括,特别地,重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体,例如,IgG(例如,IgG1,IgG2,IgG3或IgG4亚型),IgA1,IgA2,IgD,IgE或IgM抗体。

[0138] 如本文中所使用的,术语抗体的“抗原结合片段”是指包含全长抗体的片段的多肽,其保持特异性结合全长抗体所结合的共同抗原的能力,和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合,其也被称为“抗原结合部分”。通常参见,Fundamental Immunology,Ch.7(Paul,W.,ed.,第2版,Raven Press,N.Y.(1989),其以其全文通过引用合并入本文,用于所有目的。可通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。在一些情况下,抗原结合片段包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、dAb和互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例如,scFv)、嵌合抗体、双抗体(diabody)和这样的多肽,其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。

[0139] 在一些情况下,抗体的抗原结合片段是单链抗体(例如,scFv),其中VL和VH结构域通过使其能够产生为单个多肽链的连接体配对形成单价分子(参见,例如,Bird等人,Science 242:423-426(1988)和Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883(1988))。此类scFv分子可具有一般结构:NH<sub>2</sub>-VL-接头-VH-COOH或NH<sub>2</sub>-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的GGGGS氨基酸序列或其变体组成。例如,可使用具有氨基酸序列(GGGGS)<sub>4</sub>的接头,但也可使用其变体(Holliger等人(1993),Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448)。可用于本发明的其他接头由Alfthan等人(1995),Protein Eng.8:725-731,Choi等人(2001),Eur.J.Immunol.31:94-106,Hu等人(1996),Cancer Res.56:3055-3061,Kipriyanov等人(1999),J.Mol.Biol.293:41-56和Roovers等人(2001),Cancer

Immunol.描述。

[0140] 在一些情况下,抗体的抗原结合片段是双抗体,即,双价抗体,其中VH和VL结构域在单个多肽链上表达,但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对,从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见,例如,Holliger P.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993),和Poljak R.J.等人,Structure 2:1121-1123(1994))。

[0141] 在另一些情况下,抗体的抗原结合片段是“双功能抗体”。双功能抗体亦称为双特异性抗体(Bispecific Antibody),是同时靶向两种不同抗原的特异性药物,其可通过免疫分选纯化生产。另外,也可通过基因工程获得,基因工程在结合位点优化,合成形式的考量以及产量等方面都具有相应的灵活性,所以具有一定的优势。目前,其存在形式已被证明有超过45种(Müller D,Kontermann RE.Bispecific antibodies for cancer immunotherapy:Current perspectives.BioDrugs 2010;24:89-98)。目前已开发的多种双特异性抗体为IgG-ScFv形式即Morrison模式(1997Coloma MJ,Morrison SL.Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies.Nat Biotechnol.Nature Biotechnology,1997;15:159-163),由于这种类似于天然存在的IgG形式,其在抗体工程、表达和纯化上所具有的优势,已被证明是双功能抗体的其中一种理想存在形式(Miller BR,Demarest SJ,et al.,Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies.Protein Eng Des Sel 2010;23:549-57;Fitzgerald J,Lugovskoy A.Rational engineering of antibody therapeutics targeting multiple oncogene pathways.MAbs 2011;3:299-309)。

[0142] 可使用本领域技术人员已知的常规技术(例如,重组DNA技术或酶促或化学断裂法)从给定的抗体(例如本发明提供的单克隆抗体3H6、3H6 H1L1、3H6 H2L2、3H6 H3L21或3H6H4L1)获得抗体的抗原结合片段(例如,上述抗体片段),并且以与用于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

[0143] 如本文中所使用的,术语“单抗”和“单克隆抗体”是指,来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片断,也即除可能自发出现的自然突变外,一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的,其通常包含至少2种或更多种的不同抗体,这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用Kohler等首次报道的杂交瘤技术获得(Nature,256:495,1975),但也可采用重组DNA技术获得(如参见U.S.P 4,816,567)。

[0144] 如本文中所使用的,术语“人源化抗体”是指,人源免疫球蛋白(受体抗体)的全部或部分CDR区被一非人源抗体(供体抗体)的CDR区替换后得到的抗体或抗体片段,其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性的非人源(例如,小鼠、大鼠或兔)抗体。此外,受体抗体的构架区(FR)的一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换,或被其他抗体的氨基酸残基替换,以进一步完善或优化抗体的性能。关于人源化抗体的更多详细内容,可参见例如,Jones et al.,Nature,321:522 525(1986);Reichmann et al.,Nature,332:323 329(1988);Presta,Curr.Op.Struct.Biol.,2:593 596(1992);和Clark,Immunol.Today 21:397 402(2000)。

[0145] 如本文中所使用的,术语“分离的”或“被分离的”指的是,从天然状态下经人工手

段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分，那么可能是其所处的天然环境发生了改变，或从天然环境下分离出该物质，或二者情况均有发生。例如，某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽，而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”或“被分离的”不排除混有人工或合成的物质，也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

[0146] 如本文中所使用的，术语“载体(vector)”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC)；噬菌体如 $\lambda$ 噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如SV40)。一种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。

[0147] 如本文中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，如大肠杆菌或枯草菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如S2果蝇细胞或Sf9等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO细胞，COS细胞，NSO细胞，HeLa细胞，BHK细胞，HEK293细胞或人细胞等的动物细胞。

[0148] 如本发明中所使用的，术语“双特异性”、“双重特异性”或“双功能性”抗原结合蛋白或抗体是分别具有两个不同的抗原结合位点的杂交抗原结合蛋白或抗体。双特异性抗体是一种多特异性抗原结合蛋白或多特异性抗体，并且可通过多种方法产生，包括，但不限于杂交瘤的融合或Fab'片段的连接。参见，例如，Songsivilai和Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny等人. 1992, J. Immunol. 148:1547-1553。双特异性抗原结合蛋白或抗体的两个结合位点将结合两个不同的表位，所述表位存在于相同或不同的蛋白质靶上。

[0149] 如本文中所使用的，术语“特异性结合”是指，两分子间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。在某些实施方式中，特异性结合某抗原的抗体(或对某抗原具有特异性的抗体)是指，抗体以小于大约 $10^{-5}$ M，例如小于大约 $10^{-6}$ M、小于大约 $10^{-7}$ M、小于大约 $10^{-8}$ M、小于大约 $10^{-9}$ M或小于大约 $10^{-10}$ M或更小的亲和力( $K_D$ )结合该抗原。

[0150] 如本文中所使用的，术语“ $K_D$ ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小，抗体-抗原结合越紧密，抗体与抗原之间的亲和力越高。通常，抗体(例如，本发明的单克隆抗体3H6、3H6 H1L1、3H6 H2L2、3H6 H3L21或3H6H4L1)以小于大约 $10^{-5}$ M，例如小于大约 $10^{-6}$ M、小于大约 $10^{-7}$ M、小于大约 $10^{-8}$ M、小于大约 $10^{-9}$ M或小于大约 $10^{-10}$ M或更小的解离平衡常数( $K_D$ )结合抗原(例如，IL-1 $\beta$ 蛋白)。可以使用本领域技术人员知悉的方法测定 $K_D$ ，例如使用Biacore分子相互作用仪测定。

[0151] 如本文中所使用的，术语“单克隆抗体”和“单抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多克隆抗体”和“多抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩

写来表示。例如,丙氨酸可用A或Ala表示。

[0152] 如本文中所使用的,术语“杂交瘤”和“杂交瘤细胞株”可互换使用,并且当提及术语“杂交瘤”和“杂交瘤细胞株”时,其还包括杂交瘤的亚克隆和后代细胞。例如,当提及杂交瘤细胞株LT010时,其还指杂交瘤细胞株LT010的亚克隆和后代细胞。

[0153] 如本文中所使用的,术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂,其是本领域公知的(参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), 并且包括但不限于: pH调节剂, 表面活性剂, 佐剂, 离子强度增强剂。例如, pH调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液; 表面活性剂包括但不限于阳离子, 阴离子或者非离子型表面活性剂, 例如Tween-80; 离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。

[0154] 如本文中所使用的,术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如,预防疾病(例如RA)有效量是指,足以预防,阻止,或延迟疾病(例如RA)的发生的量;治疗疾病有效量是指,足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如,对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄,体重和性别,药物的施用方式,以及同时施用的其它治疗等。

[0155] 发明的有益效果:

[0156] 本发明的抗IL-1 $\beta$ 抗体特别是人源化的抗IL-1 $\beta$ 抗体具有如下技术效果中的一项或多项:

[0157] (1) 有效地结合人IL-1 $\beta$ , 阻断IL-1 $\beta$ 与其受体IL-1R1的结合;

[0158] (2) 抑制IL-1 $\beta$ 下游信号通路的激活;

[0159] (3) 能够特异性抑制IL-1 $\beta$ 诱导MRC-5细胞分泌IL-6的活性;

[0160] (4) 能够有效地阻断IL-1 $\beta$ 对NF- $\kappa$ B的激活;

[0161] (5) 具有用于制备抑制IL-1 $\beta$ 的药物的潜力;

[0162] (6) 具有用于制备预防和/或治疗类风湿关节炎、痛风、多发性硬化、心血管事件和/或心血管疾病、肿瘤、多发性硬化、儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征、周期性发热综合征、全身型幼年特发性关节炎等病症的药物的潜力。

## 附图说明

[0163] 图1: 13E9、13E9H1L1、13E9H2L2、13E9H3L2和与人IL-1 $\beta$ -His-Bio的结合活性检测结果。

[0164] 图2: 3H6H4L1与人IL-1 $\beta$ -His-Bio的结合活性检测结果。

[0165] 图3: 3H6、3H6H1L1、3H6H2L2和3H6H3L3与人IL-1R1 (1-332) -his竞争结合人IL-1 $\beta$ -hFc的活性检测结果。

[0166] 图4: 3H6H4L1与人IL-1R1 (1-332) -his竞争结合人IL-1 $\beta$ -hFc的活性检测结果。

[0167] 图5: 3H6H4L1与人IL-1 $\beta$ 亲和力常数检测结果。注: 曲线1~5分别表示分析物的浓度分别为25nM、12.5nM、6.25nM、3.13nM、1.56nM。

[0168] 图6: Canakinumab与人IL-1 $\beta$ 亲和力常数检测结果。注: 曲线1~5分别表示分析物

的浓度分别为25nM、12.5nM、6.25nM、3.13nM、1.56nM。

[0169] 图7:3H6H4L1对IL-1 $\beta$ 诱导MRC-5分泌IL-6的影响。

[0170] 图8:IL-1 $\beta$ 对NF- $\kappa$ B信号通路的梯度激活的影响。

[0171] 图9:3H6H4L1阻断IL-1 $\beta$ 的reporter assay图。

[0172] 图10:3H6H4L1对Lenti-IL-1 $\beta$ -NIH/3T3诱导的小鼠膝关节炎模型小鼠病理性行为的影响。

[0173] 图11:3H6H4L1对Lenti-IL-1 $\beta$ -NIH/3T3诱导的小鼠膝关节炎模型小鼠膝关节面积的影响。

[0174] 图12:3H6H4L1对Lenti-IL-1 $\beta$ -NIH/3T3诱导的小鼠膝关节炎模型小鼠体重的影响。

### 具体实施方式

[0175] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考J.萨姆布鲁克等著,黄培堂等译的《分子克隆实验指南》,第三版,科学出版社)或按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,为可以通过市场购买获得的常规产品。

[0176] 在本发明的下述实施例中,使用的BALB/c小鼠购自广东省医学实验动物中心。所用的阳性对照抗体Canakinumab来源于Novartis。

[0177] 制备例1:融合蛋白人IL-1 $\beta$ -His、IL-1R1(1-332)-His、IL-1 $\beta$ -hFc以及人IL-1 $\beta$ -His-Bio的制备

[0178] 通过NCBI GenBank蛋白数据库查找人IL-1 $\beta$ (Genbank ID:NP\_000567.1)及IL-1R1(Genbank ID:NP\_000868)的蛋白序列。将人IL-1 $\beta$ 及IL-1R1的氨基酸序列分别与His标签序列,人IgG Fc纯化标签序列进行融合设计;上述的融合蛋白分别简写命名为人IL-1 $\beta$ -His、IL-1R1(1-332)-His、IL-1 $\beta$ -hFc。

[0179] 蛋白样品质量通过SDS-PAGE鉴定合格。

[0180] 使用**EZ-Link®** Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit(Thermo scientific)制备生物素化偶联的人IL-1 $\beta$ -His蛋白样品(简称为人IL-1 $\beta$ -His-Bio);具体制备方法参考该试剂盒的说明书进行。

[0181] 制得的上述融合蛋白用于下面的实施例。

[0182] 实施例1:抗IL-1 $\beta$ 鼠源抗体3H6的制备

[0183] 1. 杂交瘤细胞株LT010的制备

[0184] 以人IL-1 $\beta$ -his作为抗原免疫BALB/C小鼠(购自广东医学实验动物中心),取免疫后小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合,制成杂交瘤细胞。以IL-1 $\beta$ -His-Bio作为抗原,对杂交瘤细胞进行ELISA法筛选,获得能够分泌和IL-1 $\beta$ -His-Bio特异性结合的抗体的杂交瘤细胞。对ELISA筛选得到的杂交瘤细胞,通过竞争ELISA筛选出能够分泌与受体IL-1R1(1-332)-His竞争结合IL-1 $\beta$ -His-Bio的单克隆抗体的杂交瘤细胞株,并经过有限稀释法得到稳定的杂交瘤细胞株。杂交瘤细胞制备的方法参考目前已确立的方法(例如,Stewart, S.J., "Monoclonal Antibody Production", in Basic Methods in antibody Production

and Characterization, Eds. G.C. Howard and D.R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000)。

[0185] 发明人将以上杂交瘤细胞株命名为杂交瘤细胞株LT010 (IL-1 $\beta$ -3H6), 其分泌的单克隆抗体命名为3H6。

[0186] 杂交瘤细胞株LT010 (IL-1 $\beta$ -3H6), 其于2018年6月21日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏编号为CCTCC NO:C2018133, 保藏地址为中国. 武汉. 武汉大学, 邮编: 430072。

[0187] 2. 抗IL-1 $\beta$ 的抗体3H6的制备

[0188] 用含10%的低IgG胎牛血清的IMDM培养基对上面制得的LT010细胞株进行培养 (IMDM培养基, 内含1%青链霉素, 于5%CO<sub>2</sub>, 37°C细胞培养箱中进行培养), 7天后收集细胞培养上清, 通过高速离心、微孔滤膜抽真空过滤以及HiTrap protein A HP柱进行纯化, 制得抗体3H6。纯化后3H6样品进行SDS-PAGE电泳检测合格。

[0189] 实施例2: 抗IL-1 $\beta$ 的抗体3H6的序列分析

[0190] 按照培养细胞细菌总RNA提取试剂盒 (Tiangen, 货号DP430) 的方法, 从实施例1中培养的LT010细胞株中提取mRNA。按照Invitrogen **SuperScript®** III First-Strand Synthesis System for RT-PCR试剂盒说明书合成cDNA, 并进行PCR扩增。PCR扩增产物直接进行TA克隆, 具体操作参考pEASY-T1Cloning Kit (Transgen CT101) 试剂盒说明书进行。

[0191] 将TA克隆的产物直接进行测序, 测序结果如下:

[0192] 编码抗体3H6的重链可变区的核酸序列: (354bp)

[0193]

CAGGTGACCCTGAAGGAGAGCGGACCAGGAATCCTGCAGCCTAGCCAGACACTGAGCCTGACTTGCAGCTTCAGCGGCTTCAGCCTGAGCACAAGCGGAATGGGCGTGTCTTGATCAGGCAGCCATCAGGAAAGGGACTCGAGTGGCTGGCTCACATCTACTGGGACGACGACAAGCGGTACAACCCCTCCCTGAAGAGCAGGCTGACCATCAGCAAGGACACCAGCAGCAACCAGGTGTTCTGAAGATCACCAGCGTGGACACCGCCGATAGCGCTACCTACTATTGCGCCAGAAGCGCCTACTACAGCTTCGCCTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGTCCGTGTCAGCC (SEQ ID NO:1)

[0194] 抗体3H6的重链可变区的氨基酸序列如下: (118aa, 其中下划线标记的氨基酸序列为CDR区域)

[0195]

QVTLKESGPGILQPSQTL~~SLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSS~~NQVFLKITSVDTADSATYYCARSAYYSFAYWGQGLVSVSA (SEQ ID NO:2)

[0196] 编码抗体3H6的轻链可变区的核酸序列: (318bp)

[0197]

GATATCGTCATGACACAGTCACATAAGTTTATGTCTACTAGTGTGGGCGGGCGGGTCAGAATTACCTGTAAGGCCTCTCAGGACGTGGATACAGACGTGGCTTGGTTCCAGCAGAAGCCCGACAGAGCCCTAACTGCTGATCTACTGGGCCTCCACAAGGCACACTGGGGTGCCAGATCGGTTCACTGGATCAGGCAGCGGGACCGACTTTACTCTGACCATTTCCAACGTCCAGTCTGAGGATCTGGCTGACTATTTCTGCCAGCAGTACAGCTCCTATCCACCTTTGGAGCAGGCACAAAGCTGGAAGTAAA (SEQ ID NO:3)

[0198] 抗体3H6的轻链可变区的氨基酸序列如下: (106aa, 其中划线标记的氨基酸序列为CDR区域)

[0199]

DIVMTQSHKFMSTSVGGRVITCKASQD~~VD~~TDVAWFQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFLTISN  
VQSEDLADYFCQ~~Q~~YSSYPTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:4)

[0200] 实施例3:抗IL-1 $\beta$ 的人源化抗体3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3和3H6H4L1的设计和制备

[0201] 1.抗IL-1 $\beta$ 人源化抗体3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3和3H6H4L1的轻链和重链序列的设计

[0202] 根据IL-1 $\beta$ 蛋白的三维晶体结构(van Oostrum J,Priestle JP,Grütter MG,Schmitz A.The structure of murine interleukin-1 beta at 2.8 A resolution.J Struct Biol.1991,107 (2):189-95.)以及实施例2获得的序列信息,设计得到人源化抗体3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3和3H6H4L1重链可变区的序列和轻链可变区的序列(3H6H1L1、3H6H2L2和3H6H3L3抗体恒定区序列,来自NCBI的数据库,重链恒定区为Ig gamma-1chain C region,ACCESSION:P01857,轻链恒定区为Ig kappa chain C region,ACCESSION:P01834;3H6H4L1抗体恒定区序列,来自NCBI的数据库,重链恒定区为Ig gamma-4chain C region,ACCESSION:P01861.1;轻链恒定区为Ig kappa chain C region,ACCESSION:P01834)。

[0203] 人源化抗体3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3和3H6H4L1的重链可变区序列和轻链可变区序列如下:

[0204] (1)人源化单克隆抗体3H6H1L1

[0205] 编码抗体3H6H1L1的重链可变区的核酸序列:(354bp)

[0206]

CAGGTGACACTGAAGGAGTCTGGCCCCGCCCTGCTGAAGCCTACCCAGACACTGACCCTGACATGTACCTTCTCCGG  
CTTTTCTCTGAGCACCTCCGGCATGGGCGTGTCTTGATCAGGCAGCCAAGCGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCAC  
ACATCTACTGGGACGATGACAAGCGGTATAACCCCTCCCTGAAGTCTAGACTGACAATCTCTAAGGATAACCAGCTCC  
AACCAGGTGTTCTGAAGATCACAAATGTGGATACCGTGGACACAGCCACCTACTATTGCGCCCGGAGCGCCTACTA  
TTCCTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGTCTGTGAGCGCC (SEQ ID NO:5)

[0207] 抗体3H6H1L1的重链可变区氨基酸序列如下:(118aa,其中下划线标记的氨基酸序列为CDR区域)

[0208]

QVTLKESGPALLKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKALEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSS  
NQVFLKITNVDTVDTATYYCARSAYYSFAYWGQGLVSVSA (SEQ ID NO:6)

[0209] 编码抗体3H6H1L1的轻链可变区的核酸序列:(318bp)

[0210]

GATATCCAGATGACCCAGTCCCACAGCTCCATGTCCACATCTGTGGCGACCGGGTGAGAATCACCTGTGGGCCTC  
CCAGGACGTGGATACAGACGTGGCCTGGTTTCAGCAGAAGCCCGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCCA  
GCACCAGGCACTCCGGAGTGCCATCTCGCTTCAGCGCTCCGGCTCTGGCACAGACTTCACCCTGACAATCAGCAAC  
GTGCAGCCAGAGATTTGCCGACTACTATTGCCAGCAGTACTCTAGCTATCCCACCTTTGGCGCCGGCACAAAGCT  
GGAGCTGAAG (SEQ ID NO:7)

[0211] 抗体3H6H1L1的轻链可变区的氨基酸序列如下:(106aa,其中划线标记的氨基酸序列为CDR区域)

[0212]

DIQMTQSHSSMSTSVGDRVITCRASQDVDTDVAWFQQKPGQAPKLLIYWASTRHSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISN  
VQPEDFADYYCQQYSSYPTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:8)

[0213] (2) 人源化单克隆抗体3H6H2L2

[0214] 编码抗体3H6H2L2的重链可变区的核酸序列: (354bp)

[0215]

CAGGTGACACTGAAGGAGTCCGGCCCCGCCCTGGTGAAGCCTACCCAGACACTGACCCTGACATGTACCTTCAGCGG  
CTTTTCTCTGAGCACCTCCGGCATGGGCGTGTCTGGATCAGGCAGCCATCTGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCC  
ACATCTACTGGGACGATGACAAGCGGTATTCTCCAGCCTGAAGTCTAGACTGACAATCAGCAAGGATAACCAGCTCC  
AACCAGGTGTTCTGACAATCACCAACGTGGACCCCGTGGACACAGCCACCTACTATTGCGCCCGGAGCGCCTACTA  
TTCCTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGTCCGTGTCTGCC (SEQ ID NO:9)

[0216] 抗体3H6H2L2的重链可变区的氨基酸序列如下: (118aa, 其中下划线标记的氨基酸  
序列为CDR区域)

[0217]

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSSTSGMGVSWIRQPSGKALEWLAHIYWDDDKRYSPSLKSRLTISKDTSS  
NQVFLTITNVPDVTATYYCARSAYYSFAYWGQGLVSVSA (SEQ ID NO:10)

[0218] 编码抗体3H6H2L2的轻链可变区的核酸序列: (318bp)

[0219]

GATATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCTCCCTGAGCGCCTCCGTGGGCGACCGGGTGAAGAATCACCTGTAGGGCCTC  
TCAGGACGTGGATACAGACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTATTGGGCCT  
CTACCCTGCAGAGCGGAGTGCCATCCCGGTTCTCTGGCAGCGGCTCCGGAACAGACTTCACCCTGACAATCTCTAGC  
CTGCAGCCAGAGACTTCGCCACCTACTATTGCCAGCAGTACTCCTTATCCCACCTTTGGCGCCGGCACAAAGCT  
GGAGCTGAAG (SEQ ID NO:11)

[0220] 抗体3H6H2L2的轻链可变区的氨基酸序列如下: (106aa, 其中划线标记的氨基酸序  
列为CDR区域)

[0221]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVDTDVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS  
LQPEDFATYYCQQYSSYPTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:12)

[0222] (3) 人源化单克隆抗体3H6H3L3

[0223] 编码抗体3H6H3L3的重链可变区的核酸序列: (354bp)

[0224]

CAGGTGACACTGAAGGAGAGCGGCCAGCCCTGGTGAAGCCAACCCAGACACTGACCCTGACATGTACCTTCTCCGG  
CTTTAGCCTGTCCACCTCTGGCATGGGCGTGTCTTGGATCAGGCAGCCACCTGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCC  
TGATCTACTGGGACGATGACAAGCGGTATAGCCCTTCCCTGAAGAGCAGACTGACAATCTCCAAGGATACTCTAAG  
AACCAGGTGGTGTGACAATCACCAACGTGGACCCCGTGGACACAGCCACCTACTATTGCGCCCGGAGCGCCTACTA  
TTCCTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGTCTGTGAGCGCC (SEQ ID NO:13)

[0225] 抗体3H6H3L3的重链可变区的氨基酸序列如下: (118aa, 其中下划线标记的氨基酸  
序列为CDR区域)

[0226]

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAL IYWDDDKRYSPSLKSRLTISKDTSK

NQVVLITITNVDPVDTATYYCARSAYYSFAYWGQGLVSVSA (SEQ ID NO:14)

[0227] 编码抗体3H6H3L3的轻链可变区的核酸序列: (318bp)

[0228]

GATATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCTCCCTGAGCGCCTCCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACATGTAGAGCCTC  
TCAGGACGTGGATAACCGACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTATTGGGCCT  
CTACCCTGCAGAGCGGAGTGCCATCCCGTTCTCTGGCAGCGGCTCCGGAACAGACTTCACCCTGACAATCTCTAGC  
CTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTATTGCCAGCAGTACTCCTTATCCCACCTTTGGCGCCGGCACAAAGCT  
GGAGCTGAAG (SEQ ID NO:15)

[0229] 抗体3H6H3L3的轻链可变区的氨基酸序列如下: (106aa, 其中划线标记的氨基酸序列为CDR区域)

[0230]

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVDTDLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISS  
LQPEDFATYYCQQYSSYPTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:16)

[0231] (4) 人源化单克隆抗体3H6H4L1

[0232] 编码抗体3H6H4L1的重链可变区的核酸序列如SEQ ID NO:5所示。

[0233] 抗体3H6H4L1的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[0234] 编码抗体3H6H4L1的轻链可变区的核酸序列如SEQ ID NO:7所示。

[0235] 抗体3H6H4L1的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。

[0236] 2. 人源化抗体3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3及3H6H4L1的制备

[0237] 3H6H1L1、3H6H2L2和3H6H3L3的重链恒定区均采用Ig gamma-1chain C region, ACCESSION:P01857;轻链恒定区均采用Ig kappa chain C region, ACCESSION:P01834;

[0238] 3H6H4L1的重链恒定区为Ig gamma-4chain C region, ACCESSION:P01861.1;轻链恒定区为Ig kappa chain C region, ACCESSION:P01834。

[0239] 将13E9H1L1重链cDNA和轻链的cDNA、13E9H2L2的重链cDNA和轻链的cDNA、13E9H3L3重链cDNA和轻链的cDNA, 以及3H6H4L1重链cDNA和轻链的cDNA分别克隆到pUC57simple载体(金斯瑞公司提供)中, 分别获得8个重组质粒即pUC57simple-13E9H1和pUC57simple-13E9L1;pUC57simple-13E9H2和pUC57simple-13E9L2;pUC57simple-13E9H3和pUC57simple-13E9L3;pUC57simple-3H6H4和pUC57simple-3H6L1。并分别亚克隆到pcDNA3.1载体中。将包含重链的质粒和包含轻链的重组质粒共转染293F细胞后收集培养液进行纯化获得人源化抗体3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3及3H6H4L1; 并经SDS-PAGE检测, 结果正确。

[0240] 实施例4: 抗体3H6、3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3及3H6H4L1与人IL-1 $\beta$ -his-bio结合的活性研究(ELISA法)

[0241] 以2 $\mu$ g/ml的SA(链霉亲和素), 每孔50 $\mu$ l 包被酶标板, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗板一次并除去残留液体, 每孔用300 $\mu$ l 1%BSA溶液(用PBS溶解)封闭, 37 $^{\circ}$ C 孵育2小时。洗板三次并除去残留液体。用PBST将人IL-1 $\beta$ -His-Bio稀释成0.2 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育30分钟, 洗板三次并除去残留液体。将抗体稀释至0.333 $\mu$ g/ml作为起始浓度, 进行1:3的梯度稀释共7个浓度, 另设空白对照, 均做2个复孔, 每孔体积100 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育30分钟。洗板三次后通过拍打将包被好的酶标板除去残余液体, 每孔加入50 $\mu$ l 辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG二抗工作

液,37℃孵育30分钟。洗板四次并除去残留液体,每孔加入50 $\mu$ l TMB显色液,室温避光显色5分钟后,每孔加入50 $\mu$ l终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中,选择450nm光波长读取酶标板各孔的OD数值。

[0242] 用SoftMax Pro 6.2.1软件对数据进行分析处理。以抗体浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标进行4-parameter拟合曲线作图,结果分别如图1及图2所示。3H6、3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3及3H6H4L1与人IL-1 $\beta$ -His-Bio的结合活性检测结果分别见表1和表2。

[0243] 表1:3H6、3H6H1L1、3H6H2L2以及3H6H3L3与人IL-1 $\beta$ -His-Bio的结合活性检测结果  
[0244]

抗体浓度 ( $\mu$ g/ml)	抗原抗体结合 OD (450nm) 值									
	3H6 H1L1		3H6 H2L2		3H6 H3L3		3H6		Canakinumab	
1	2.914	2.927	2.864	2.879	2.865	2.905	2.516	2.602	2.871	2.874
0.333	2.979	2.980	2.953	2.928	2.880	2.874	2.617	2.597	2.902	2.883
0.111	2.950	2.989	2.958	2.953	2.892	2.865	2.411	2.386	2.895	2.887
0.037	2.809	2.771	2.777	2.732	2.634	2.662	2.036	1.936	2.643	2.682
0.012	2.167	2.267	2.197	2.182	2.001	2.016	1.225	1.225	2.065	2.118
0.004	1.352	1.264	1.300	1.439	1.225	1.178	0.598	0.623	1.256	1.199
0.001	0.660	0.619	0.630	0.669	0.590	0.566	0.287	0.293	0.581	0.559
0	0.042	0.042	0.041	0.041	0.050	0.039	0.039	0.041	0.039	0.040
EC <sub>50</sub> (nM)	0.036		0.034		0.042		0.099		0.039	

[0245] 表2:3H6H4L1与人IL-1 $\beta$ -His-Bio的结合活性检测结果

[0246]

抗体稀释	抗原抗体结合 OD (450nm) 值			
	Canakinumab		3H6H4L1	
0.333 $\mu$ g/ml	2.809	2.940	2.899	2.935
1:3	2.679	2.875	2.822	2.866
1:9	2.463	2.613	2.814	2.797
1:27	1.702	1.959	2.311	2.322
1:81	0.852	1.115	1.525	1.436
1:243	0.408	0.573	0.771	0.737
1:729	0.315	0.242	0.358	0.332
0	0.075	0.071	0.071	0.075
EC <sub>50</sub> (nM)	0.057		0.029	

[0247] 结果显示:

[0248] 3H6、3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3及3H6H4L1均能够有效地结合人IL-1 $\beta$ -His-Bio, 并且结合效率呈现剂量依赖关系;

[0249] 在相同检测条件下,3H6H1L1、3H6H2L2及3H6H4L1与抗原人IL-1 $\beta$ -His-Bio的结合效率呈现剂量依赖关系,并且结合活性优于同靶点已上市药物Canakinumab;3H6H3L3、3H6结合活性与Canakinumab相当。

[0250] 实施例5:抗体3H6、3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3及3H6H4L1与人IL-1R1 (1-332) -his竞争结合人IL-1 $\beta$ -hFc的活性研究 (ELISA法)

[0251] 以4 $\mu$ g/ml的人IL-1 $\beta$ -hFc,每孔50 $\mu$ l包被酶标板,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。洗板一次并除去残留液体,每孔加入300 $\mu$ l 1%BSA溶液(用PBS溶解)封闭,37 $^{\circ}$ C孵育2小时,洗板三次并除去残留液体。抗体稀释至2 $\mu$ g/ml(终浓度1 $\mu$ g/ml)作为起始浓度,进行1:3的梯度稀释共7个浓度,另设空白对照,均做2个复孔,每孔体积50 $\mu$ l,室温孵育10分钟。将0.1 $\mu$ g/ml(终浓度0.05 $\mu$ g/ml)的人IL-1R1 (1-332) -his加入到酶标板中,每孔体积50 $\mu$ l与抗体体积1:1轻柔混匀,每孔终体积100 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。洗板三次并除去残留液体,每孔加入50 $\mu$ l抗His标签鼠单克隆抗体(HRP标记)工作液,37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。洗板四次并除去残留液体,每孔加入50 $\mu$ l的TMB显色液,室温避光显色5分钟后,每孔加入50 $\mu$ l终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中,选择450nm光波长读取酶标板各孔的OD数值。

[0252] 用SoftMax Pro 6.2.1软件对数据进行分析处理,以抗体浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标进行4-parameter拟合曲线作图,结果如图3及图4所示。3H6、3H6H1L1、3H6H2L2及3H6H3L3和3H6H4L1与人IL4-N-His竞争结合人IL4RA-hFc的活性检测结果见表3及表4。

[0253] 表3:3H6、3H6H1L1、3H6H2L2以及3H6H3L3与人IL-1R1 (1-332) -his竞争结合人IL-1 $\beta$ -hFc的活性检测结果

[0254]

抗体浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	抗体阻断抗原与受体人 IL-1R1(1-332)-his 结合 OD (450nm) 值									
	3H6 H1L1		3H6 H2L2		3H6 H3L3		3H6		Canakinumab	
1.000	0.050	0.049	0.057	0.070	0.057	0.058	0.049	0.050	0.053	0.052
0.333	0.051	0.050	0.071	0.073	0.069	0.067	0.050	0.052	0.059	0.057

[0255]

0.111	0.055	0.054	0.095	0.098	0.132	0.115	0.063	0.058	0.091	0.092
0.037	0.206	0.221	0.242	0.198	0.361	0.348	0.266	0.283	0.366	0.379
0.012	0.521	0.498	0.504	0.453	0.505	0.584	0.560	0.516	0.572	0.579
0.004	0.635	0.677	0.681	0.618	0.693	0.697	0.682	0.712	0.727	0.684
0.001	0.630	0.687	0.736	0.679	0.748	0.715	0.787	0.773	0.577	0.720
0.000	0.621	0.693	0.804	0.779	0.780	0.807	0.810	0.818	0.555	0.765
EC <sub>50</sub> (nM)	0.155		0.108		0.182		0.137		0.260	

[0256] 表4: 3H6H4L1与人IL-1R1(1-332)-his竞争结合人IL-1 $\beta$ -hFc的活性检测结果

[0257]

抗体稀释	抗体阻断抗原与受体人 IL-1R1(1-332)-his 结合 OD (450nm) 值			
	Canakinumab		3H6H4L1	
1 $\mu\text{g/ml}$	0.093	0.088	0.079	0.063
1:3	0.104	0.126	0.055	0.055
1:9	0.519	0.526	0.239	0.201
1:27	0.736	0.705	0.629	0.547
1:81	0.797	0.706	0.701	0.648
1:243	0.765	0.735	0.710	0.673
1:729	0.738	0.559	0.666	0.662
0	0.669	0.719	0.659	0.621
EC <sub>50</sub> (nM)	0.961		0.530	

[0258] 结果显示:

[0259] 33H6、3H6H1L1、3H6H2L2及3H6H3L3和3H6H4L1均能够有效地阻断抗原人IL-1 $\beta$ -hFc

与其受体人IL-1R1 (1-332)-his的结合,且阻断效率呈现剂量依赖关系,竞争结合活性优于同靶点已上市药物Canakinumab。

[0260] 实施例6:抗体3H6H4L1与人IL-1 $\beta$ 的亲合力常数测定

[0261] 采用Biacore分子相互作用仪检测抗体与人IL-1 $\beta$ -his的亲合力常数。以PBST作为缓冲液,采用氨基偶联方式将抗体固定于CM5芯片表面,固定的信号值约为1000RU。抗体与人IL-1 $\beta$ 结合,IL-1 $\beta$ 浓度为1.56-25nM(两倍梯度稀释),流速为30 $\mu$ l/min,结合的时间为120s,解离时间为600s。芯片使用3M MgCl<sub>2</sub>再生,流速为30 $\mu$ l/min,时间为30s。使用Biacore Control 2.0软件进行数据采集,Biacore T200 Evaluation 2.0软件进行数据分析。结果如表5、图5和图6所示。

[0262] 表5:3H6H4L1与人IL-1 $\beta$ 亲合力常数检测结果

[0263]

抗体名称	KD (M)	ka (1/Ms)	SE (ka)	kd (1/s)	SE (kd)	Rmax (RU)
3H6H4L1	8.79E-11	1.44E+06	3.15E+03	1.27E-04	1.75E-07	112.49-122.37
Canakinumab	9.79E-11	5.24E+05	6.84E+02	5.13E-05	1.43E-07	76.61-86.37

[0264] 结果显示:

[0265] 3H6H4L1与人IL-1 $\beta$ 的亲合力常数为8.79E-11M,Canakinumab与人IL-1 $\beta$ 的亲合力常数为9.79E-11M,表明3H6H4L1与人IL-1 $\beta$ 有较强的结合能力。

[0266] 实施例7:抗体3H6 H4L1的细胞生物学活性研究

[0267] 1. 3H6 H4L1阻断IL-1 $\beta$ 诱导MRC-5细胞分泌IL-6的细胞学活性检测

[0268] 人MRC-5细胞(购自中国科学院细胞中心)常规消化、计数,5000个/孔接种于平底96孔板中,置于细胞培养箱培养;48h后(细胞生长达到80%汇合度时),进行给药处理:抗体设4个浓度(0.37nM、1.11nM、3.33nM、10nM),IL-1 $\beta$ (购自上海欣百诺生物科技有限公司)设三个浓度(5pM、50pM、500pM),抗体组IL-1 $\beta$ 用50pM的浓度(抗体和IL-1 $\beta$ 先在37 $^{\circ}$ C孵育20min),另外同时设置空白对照组及同型对照组;加药处理后置于细胞培养箱中培养24h;收集细胞上清,用IL-6ELISA Kit(购自达科为生物技术有限公司)进行检测。检测结果如图7和表6所示。

[0269] 表6:3H6 H4L1对IL-1 $\beta$ 诱导MRC-5分泌IL-6活性的梯度抑制活性

[0270]

组别/浓度	OD (450nm)		检测浓度 (pg/mL)		稀释 倍数	原始浓度 (pg/mL) (检测浓度*稀释倍 数)	
	孔 1	孔 2	孔 1	孔 2		孔 1	孔 2
PBS	0.595	0.446	26.6	18.3	5	132.8	91.4
Human IgG/10nM	1.301	1.476	92.8	123.9	200	18552.6	24781.8
IL-1 $\beta$ /5pM	1.678	1.404	178.7	109.8	50	8936.3	5490.7
IL-1 $\beta$ /50pM	1.597	1.666	153.4	174.5	200	30681.6	34898.6
IL-1 $\beta$ /500pM	1.207	1.228	79.6	82.4	500	39817.0	41182.0
Canakinumab/0.3 7nM	0.432	0.425	17.6	17.2	100	1758.0	1720.1
Canakinumab/1.1 1nM	0.375	0.439	14.7	17.9	50	736.3	896.3
Canakinumab/3.3 3nM	0.646	0.590	29.7	26.3	20	594.3	525.0
Canakinumab-10n M	0.305	0.318	11.4	12.0	20	227.1	239.3
3H6H4L1/0.37nM	1.029	1.143	59.7	71.8	50	2984.1	3591.5
3H6H4L1/1.11nM	1.067	1.091	63.4	66.1	20	1268.8	1321.0
3H6H4L1/3.33nM	0.665	0.666	30.9	30.9	20	618.0	618.5
3H6H4L1/10nM	0.469	0.609	19.5	27.4	10	195.2	274.4

[0271] 结果显示,IL-1 $\beta$ 能够显著促进MRC-5分泌IL-6,且呈剂量依赖性;3H6 H4L1能够特异性抑制IL-1 $\beta$ 诱导MRC-5细胞分泌IL-6的活性,表现3H6 H4L1对IL-1 $\beta$ 的特异性中和活性。

[0272] 2. 3H6 H4L1阻断IL-1 $\beta$ 激活NF- $\kappa$ B信号通路

[0273] 本实验通过荧光报告基因方法检测3H6 H4L1阻断IL-1 $\beta$ 激活NF- $\kappa$ B信号通路的中和生物活性。

[0274] (1) 293T-NF- $\kappa$ B-LUC细胞构建

[0275] 胰酶消化293T细胞,传代培养;转染前2h,更换opti-DMEM培养基;在无菌EP管中,加入500 $\mu$ L opti-DMEM培养基,再加入3 $\mu$ g的质粒pNF- $\kappa$ B-Luc2P-hygro;在无菌EP管中,加入500 $\mu$ L opti-DMEM培养基,再加入8 $\mu$ L lipofectamine 2000;将稀释的lipofectamine 2000加入已稀释的质粒中,室温放置15min,均匀滴加到细胞培养皿中;转染8h后,更换新鲜培养

基;转染24h后,加入Hygromycin,终浓度100 $\mu$ g/mL筛选,设对照孔293T未转染质粒。7-10天后,对照孔细胞完全死亡为准,收获筛选完的细胞扩增培养。继续加药100 $\mu$ g/mL维持。得到293T-NF- $\kappa$ B-LUC稳转细胞株。

[0276] (2) 3H6 H4L1阻断IL-1 $\beta$ 激活NF- $\kappa$ B信号通路的中和生物活性检测

[0277] 常规消化293T-NF- $\kappa$ B-LUC细胞,按每孔2万个细胞接种于96孔板中。待细胞贴壁后,添加IL-1 $\beta$ ,使其终浓度1.65ng/mL,设置空白对照。同时添加抗体,Canakinumab,3H6 H4L1,每个抗体5个梯度,终浓度分别为:400,100,25,6.25,1.56ng/mL。共培养6小时后,去上清,加入50 $\mu$ L PBS,再加入50 $\mu$ L Bright-Glo<sup>TM</sup>底物,反应5min,上机检测。

[0278] 结果如图8、图9所示。

[0279] 结果显示:

[0280] IL-1 $\beta$ 可有效激活NF- $\kappa$ B信号通路依赖的荧光素酶报告基因的表达,且呈显著剂量依赖性;

[0281] 3H6 H4L1可特异性阻断IL-1 $\beta$ 对NF- $\kappa$ B信号通路的激活,且呈显著剂量依赖性。

[0282] 以上结果表明,在IL-1 $\beta$ 依赖的NF- $\kappa$ B信号通路报告系统中,3H6 H4L1可有效阻断IL-1 $\beta$ 对NF- $\kappa$ B的激活,表现其对IL-1 $\beta$ 特异性中和活性。

[0283] 实施例8:3H6 H4L1缓解转染人的IL-1 $\beta$ 的NIH/3T3细胞诱导的类风湿性关节炎模型小鼠治疗

[0284] 将46只BALB/c小鼠根据体重分为6组,即:

[0285] 正常组、模型组、阳性对照品组、3H6 H4L1低剂量组、3H6 H4L1中剂量组和3H6 H4L1高剂量组;除正常组6只外,其余每组均为8只。

[0286] 在细胞接种前,根据小鼠体重和给药体积,阳性对照品组皮下注射Canakinumab,模型组皮下注射Anti-HEL,3H6 H4L1各剂量组注射相应浓度3H6 H4L1,正常组皮下注射等体积生理盐水。

[0287] 在生物安全柜中收集NIH/3T3(购自美国模式菌种收集中心)细胞和Lenti-IL-1 $\beta$ -NIH/3T3细胞,Lenti-IL-1 $\beta$ -NIH/3T3细胞株是将Lenti-IL-1 $\beta$ 载体转染NIH/3T3细胞,经过筛选得到稳定分泌表达IL-1 $\beta$ 的Lenti-IL-1 $\beta$ -NIH/3T3细胞株。当NIH/3T3、Lenti-IL-1 $\beta$ -NIH/3T3细胞达到所需接种数量时,开始收集细胞。在生物安全柜内,吸掉旧的培养基,PBS清洗一次后加入适量的0.05% Trypsin-EDTA (1x) 室温消化1分钟,然后加入含有10% FBS的DMDM完全培养基终止消化,细胞悬液于1200rpm/min离心4分钟,去上清,使用无血清的DMDM培养基重悬并计数,将细胞浓度调整至200万/ml,置于冰上备用。

[0288] 以3.5%水合氯醛7.5ml/kg腹腔注射麻醉BALB/c小鼠后,正常组小鼠膝关节腔内接种NIH/3T3细胞悬液25 $\mu$ l/只(5万个细胞/只),其余小鼠膝关节腔内注射接种Lenti-IL-1 $\beta$ -NIH/3T3细胞悬液25 $\mu$ l/只(5万个细胞/只)。接种后对膝关节处创伤进行缝合,并涂拭生理盐水稀释20倍的青霉素。细胞接种后第5天,各组小鼠颈椎脱臼安乐死,解剖患肢膝关节处,用游标卡尺测量小鼠患肢膝关节滑膜的长(mm)和宽(mm)。数据以均数 $\pm$ 标准差( $\pm$ s)表示,组间比较采用GraphPad Prism 5统计学处理软件处理后,进行单因素方差分析评价结果,P<0.05有显著性差异,P<0.01有非常显著性差异。

[0289] 结果如图10、图11和图12所示。

[0290] 图10显示,与正常组相比,模型组小鼠明显出现病理行为(P<0.01)。给药后,与模

型组相比,Canakinumab与3H6 H4L1高、中剂量组均能够有效改善类风湿关节炎小鼠的病理行为( $P<0.01$ ),3H6 H4L1低剂量对改善类风湿关节炎小鼠的病理行为药效不明显( $P>0.05$ )。同时3H6 H4L1对改善小鼠病理行为程度具有一定的量效关系。与阳性对照品组相比,阳性对照品组药效优于3H6 H4L1中、低剂量组( $P<0.01$ ),3H6 H4L1高剂量与阳性对照品相当( $P>0.05$ )。

[0291] 图11显示,与正常组相比,模型组小鼠患肢膝关节面积明显增大( $P<0.01$ )。给药后,与模型组相比,阳性对照品组(Canakinumab)和3H6 H4L1中、高剂量组均能明显减少类风湿关节炎小鼠患肢的肿胀面积( $P<0.01$ ),3H6 H4L1低剂量组对减少类风湿性小鼠患肢的肿胀面积的药效不明显( $P>0.05$ )。同时3H6 H4L1对减少类风湿关节炎小鼠的患肢肿胀面积具有一定的量效关系。等剂量3H6 H4L1同靶点已上市药物Canakinumab药效相当( $P>0.05$ )。

[0292] 图12显示,与正常组相比,模型组小鼠体重明显下降( $P<0.01$ )。给药后,与模型组相比,同靶点已上市药物Canakinumab和3H6 H4L1高剂量组均能明显减少关节炎小鼠体重下降( $P<0.05$ )。与阳性对照品组相比,等剂量3H6 H4L1同靶点已上市药物Canakinumab药效相当( $P>0.05$ )。

[0293] 以上对本发明的较佳实施方式进行了具体说明,但本发明创造并不限于所述实施例,熟悉本领域的技术人员在不违背本发明精神的前提下还可做出种种的等同变型或替换,这些等同的变型或替换均包含在本申请权利要求所限定的范围内。

## SEQUENCE LISTING

- <110> 中山康方生物医药有限公司  
 <120> 抗IL-1 $\beta$ 的抗体、其药物组合物及其用途  
 <130> IDC180032  
 <160> 22  
 <170> PatentIn version 3.2  
 <210> 1  
 <211> 354  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> 编码抗体3H6的重链可变区的核酸序列  
 <400> 1

```
caggtgacc tgaaggag cggaccagga atcctgcagc ctagccagac actgagcctg 60
acttgcagct tcagcggctt cagcctgagc acaagcggaa tgggcgtgtc ttggatcagg 120
cagccatcag gaaagggact cgagtggctg gctcacatct actgggacga cgacaagcgg 180
tacaaccct ccctgaagag caggtgacc atcagcaagg acaccagcag caaccaggtg 240
ttcctgaaga tcaccagcgt ggacaccgcc gatagcgeta cctactattg cgccagaagc 300
gcctactaca gcttcgccta ttggggccag ggaacactgg tgtccgtgtc agcc 354
```

- <210> 2  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> 抗体3H6的重链可变区的氨基酸序列  
 <400> 2

```
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1           5           10           15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
           20           25           30
Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
           35           40           45
Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
           50           55           60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val
65           70           75           80
Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr
           85           90           95
```

Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Ser Val Ser Ala  
 115

<210> 3

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 编码抗体3H6的轻链可变区的核酸序列

<400> 3

gatatcgtca tgacacagtc acataagttt atgttacta gtgtgggctg gcgggtcaga 60  
 attacctgta aggcctctca ggacgtgat acagacgtgg cttggttcca gcagaagccc 120  
 ggacagagcc ctaaactgct gatctactgg gctccacaa ggcacactgg ggtgccagat 180  
 cggttcactg gatcaggcag cgggaccgac tttactctga ccatttccaa cgtccagtct 240  
 gaggatctgg ctgactatct ctgccagcag tacagctcct atcccacctt tggagcaggc 300  
 acaaagctgg aactgaaa 318

<210> 4

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 抗体3H6的轻链可变区的氨基酸序列

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Arg Val Arg Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Asp  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105

<210> 5

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 编码抗体3H6H1L1的重链可变区的核酸序列

<400> 5

caggtgacac tgaaggagtc tggccccgcc ctgctgaagc ctaccagac actgaccctg 60  
 acatgtacct tctccggctt ttctctgagc acctccggca tgggcgtgtc ttggatcagg 120  
 cagccaagcg gcaaggcctt ggagtggctg gcacacatct actgggacga tgacaagcgg 180  
 tataaccctt ccctgaagtc tagactgaca atctctaagg ataccagctc caaccaggtg 240  
 ttctgaaga tcacaaatgt ggataccgtg gacacagcca cctactattg cgccccgagc 300  
 gcctactatt cctttgctta ctggggccag ggcacactgg tgtctgtgag cgcc 354

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 抗体3H6H1L1的重链可变区氨基酸序列

<400> 6

Gln	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Leu	Lys	Pro	Thr	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser
			20						25					30	
Gly	Met	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ser	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu
			35					40					45		
Trp	Leu	Ala	His	Ile	Tyr	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg	Tyr	Asn	Pro	Ser
			50				55				60				
Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Gln	Val
65					70					75					80
Phe	Leu	Lys	Ile	Thr	Asn	Val	Asp	Thr	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
					85					90				95	
Cys	Ala	Arg	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
					100				105					110	
Leu	Val	Ser	Val	Ser	Ala										
					115										

<210> 7

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 编码抗体3H6H1L1的轻链可变区的核酸序列

<400> 7

gatatccaga tgaccagtc ccacagctcc atgtccacat ctgtgggcga ccgggtgaga 60  
 atcacctgtc gggcctccca ggacgtggat acagacgtgg cctggtttca gcagaagccc 120  
 ggccaggccc ctaagctgct gatctactgg gccagacca ggcactccgg agtgccatct 180  
 cgcttcagcg gctccggctc tggcacagac ttaccctga caatcagcaa cgtgcagcca 240  
 gaggatttcg ccgactacta ttgccagcag tactctagct atcccacctt tggcgccggc 300  
 acaaagctgg agctgaag 318

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 抗体3H6H1L1的轻链可变区的氨基酸序列

<400> 8

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	His	Ser	Ser	Met	Ser	Thr	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Arg	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asp	Thr	Asp
			20					25					30		
Val	Ala	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35				40					45			
Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50				55					60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Val	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Pro	Thr
					85					90				95	
Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys						
			100						105						

<210> 9

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 编码抗体3H6H2L2的重链可变区的核酸序列

<400> 9

caggtgacac tgaaggagtc cggccccgcc ctggtgaagc ctaccagac actgaccctg 60  
 acatgtacct tcagcggett ttctctgagc acctccggca tggcgctgtc ctggatcagg 120

cagccatctg gcaaggcctt ggagtggctg gccacatct actgggacga tgacaagcgg 180  
 tattctcca gcctgaagtc tagactgaca atcagcaagg ataccagctc caaccaggtg 240  
 ttctgacaa tcaccaacgt ggaccccggtg gacacagcca cctactattg cgcccggagc 300  
 gcctactatt cctttgccta ctggggccag ggcacactgg tgtccgtgtc tgcc 354

<210> 10

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 抗体3H6H2L2的重链可变区的氨基酸

<400> 10

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
                   20                   25                   30

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

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser  
                   50                   55                   60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val  
 65                   70                   75                   80

Phe Leu Thr Ile Thr Asn Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
                   85                   90                   95

Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                   100                   105                   110

Leu Val Ser Val Ser Ala  
 115

<210> 11

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 编码抗体3H6H2L2的轻链可变区的核酸序列

<400> 11

gatataccaga tgacacagag ccctagctcc ctgagcgctt ccgtgggcca ccgggtgaga 60  
 atcacctgta gggcctctca ggacgtgat acagacgtgg cctggtacca gcagaagccc 120  
 ggcaaggccc ctaagctget gatctattgg gcctctaccc tgcagagcgg agtgccatcc 180  
 cggttctctg gcagcggctc cggaacagac ttcacctga caatctctag cctgcagcca 240  
 gaggacttcg ccacctacta ttgccagcag tactctcttt atcccacctt tggcgccggc 300



<220>

<223> 抗体3H6H3L3的重链可变区的氨基酸序列

<400> 14

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1                   5                   10                   15  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
                   20                   25                   30  
 Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
                   35                   40                   45  
 Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser  
                   50                   55                   60  
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65                   70                   75                   80  
 Val Leu Thr Ile Thr Asn Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
                   85                   90                   95  
 Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                   100                   105                   110  
 Leu Val Ser Val Ser Ala  
                   115

<210> 15

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 编码抗体3H6H3L3的轻链可变区的核酸序列

<400> 15

gatatccaga tgacacagag ccctagctcc ctgagcgcct ccgtgggcga cagggtgacc 60  
 atcacatgta gagcctctca ggacgtggat accgacctgg cctggtacca gcagaagccc 120  
 ggcaaggccc ctaagctgct gatctattgg gcctctaccc tgcagagcgg agtgccatcc 180  
 cggttctctg gcagcggctc cggaacagac ttcacctga caatctctag cctgcagcca 240  
 gaggacttcg ccacctacta ttgccagcag tactctcttt atcccacctt tggcgccggc 300  
 acaaagctgg agctgaag 318

<210> 16

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 抗体3H6H3L3的轻链可变区的氨基酸序列

<400> 16



Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr

1                   5                   10

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> LCDR1

<400> 20

Gln Asp Val Asp Thr Asp

1                   5

<210> 21

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> LCDR2

<400> 21

Trp Ala Ser

1

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> LCDR3

<400> 22

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Thr

1                   5

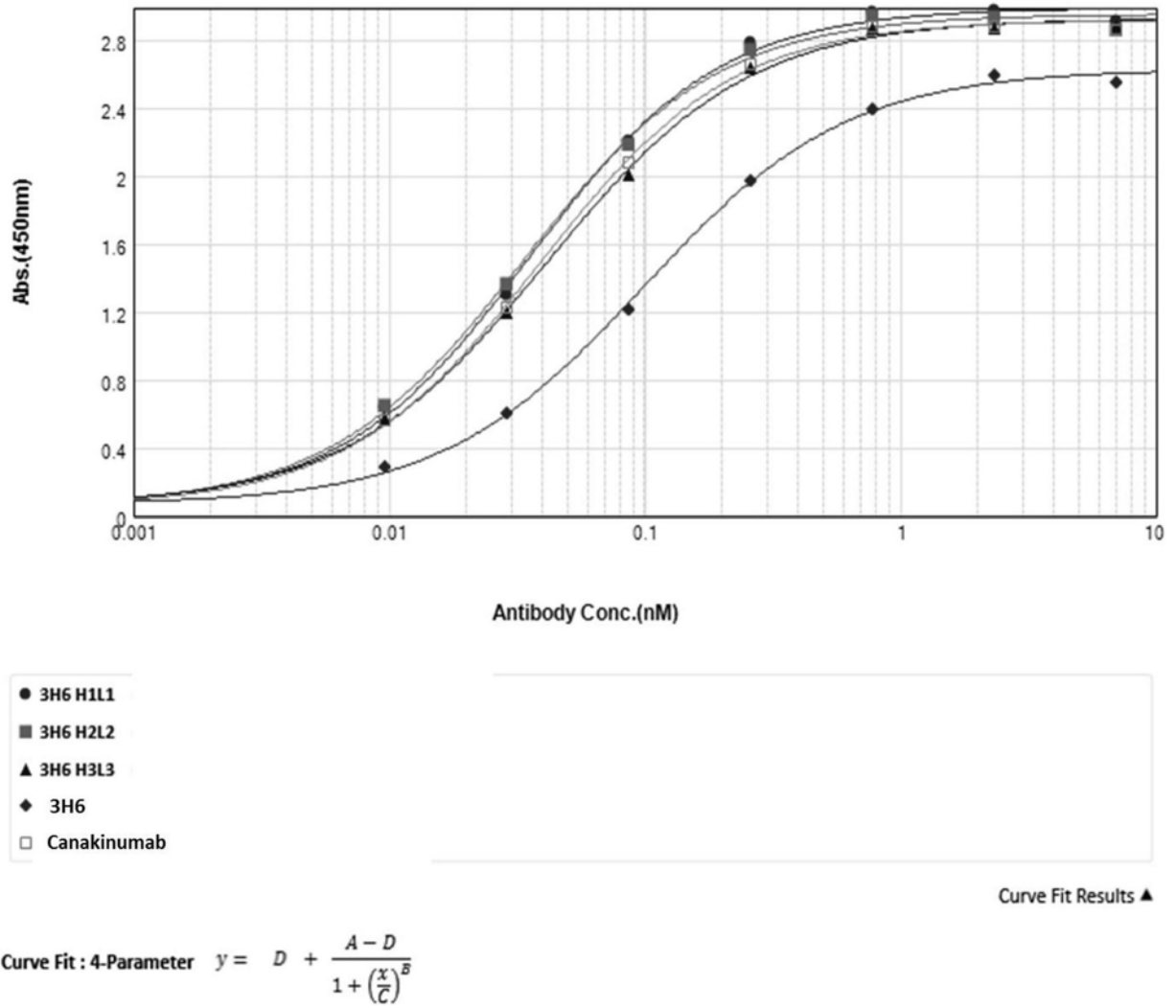


图1

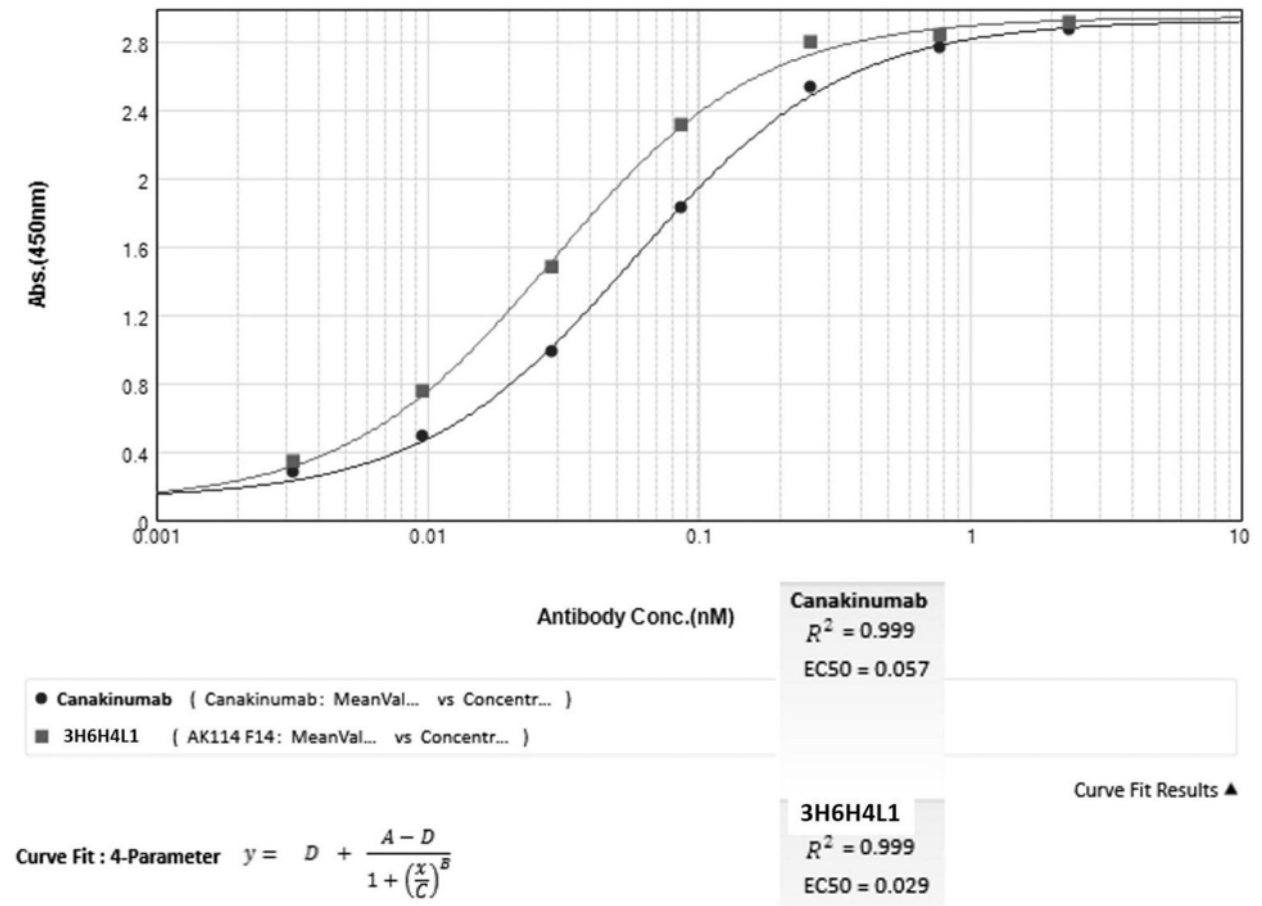
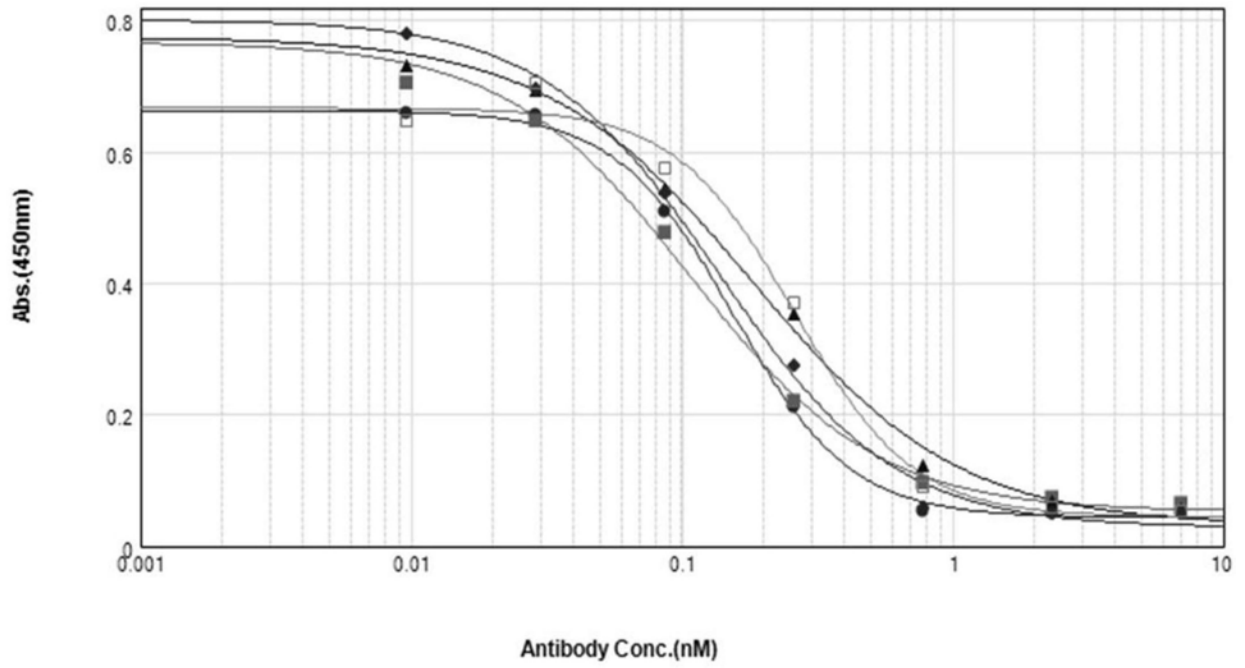


图2

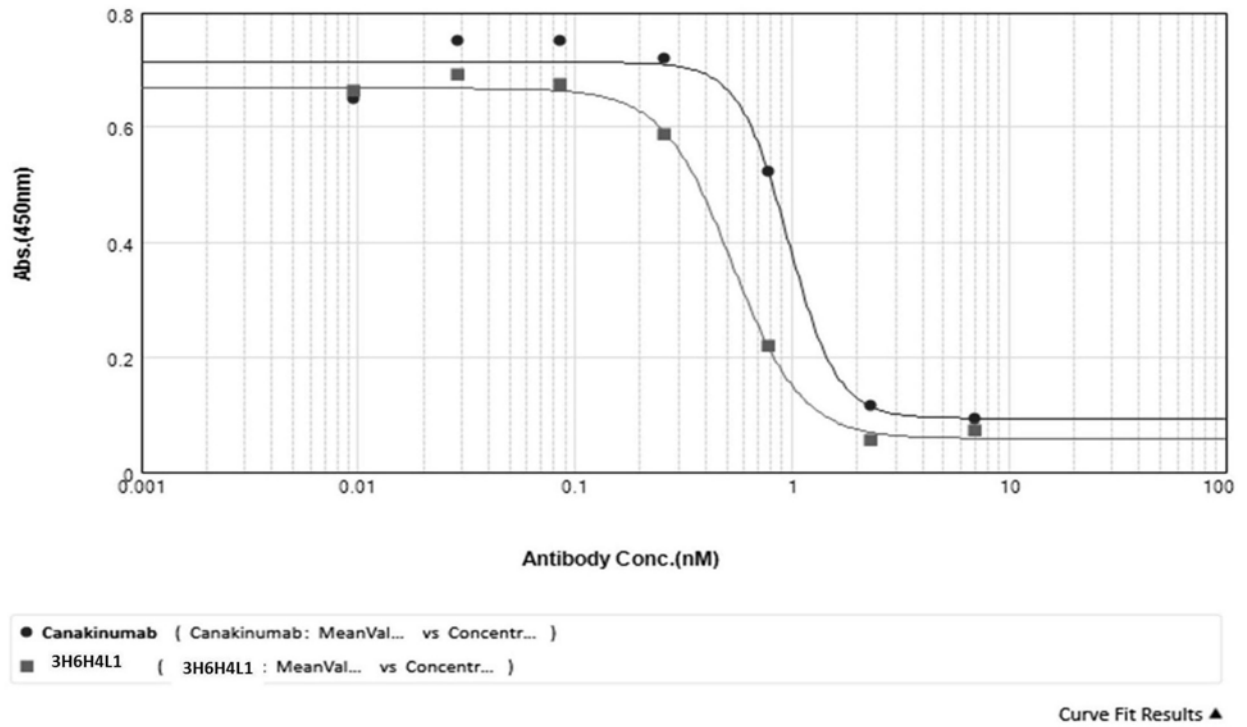


- 3H6 H1L1
- 3H6 H2L2
- ▲ 3H6 H3L3
- ◆ 3H6
- Canakinumab

Curve Fit Results ▲

Curve Fit : 4-Parameter  $y = D + \frac{A - D}{1 + (\frac{x}{C})^B}$

图3



Curve Fit : 4-Parameter  $y = D + \frac{A - D}{1 + (\frac{x}{C})^B}$

图4

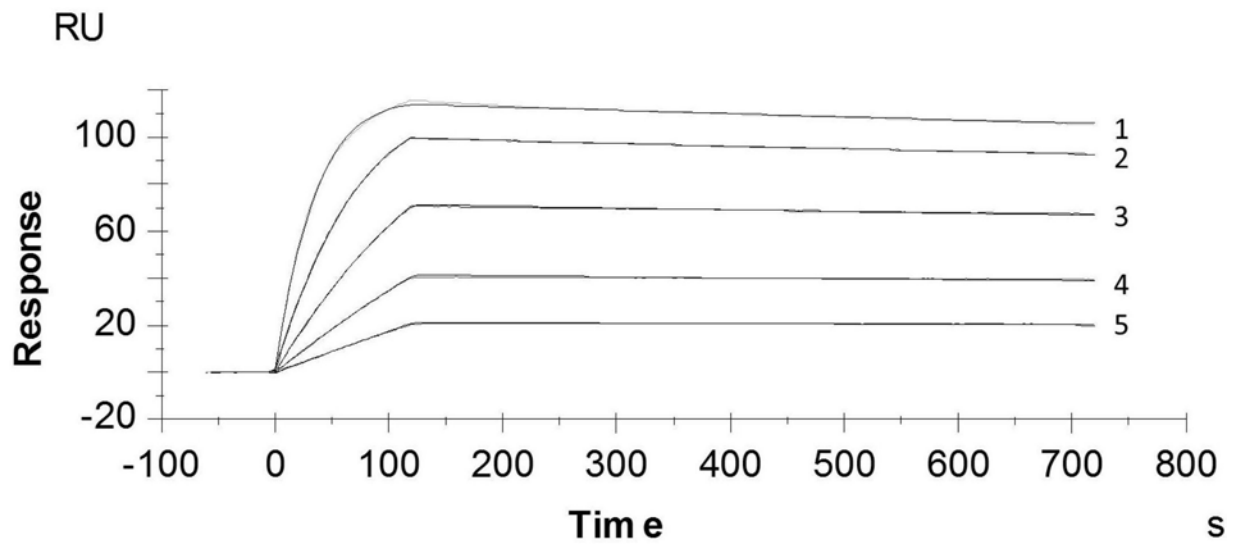


图5

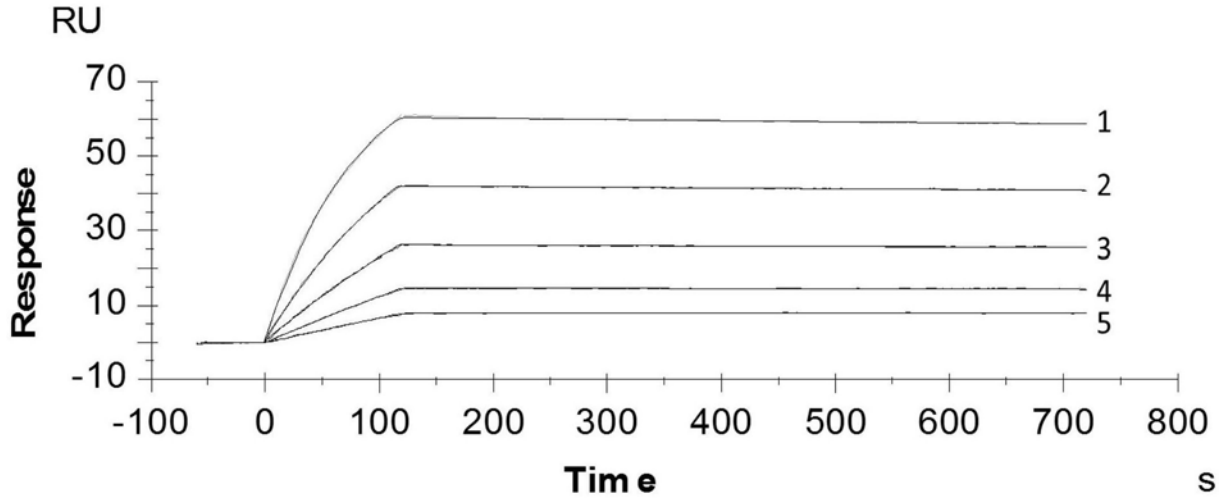


图6

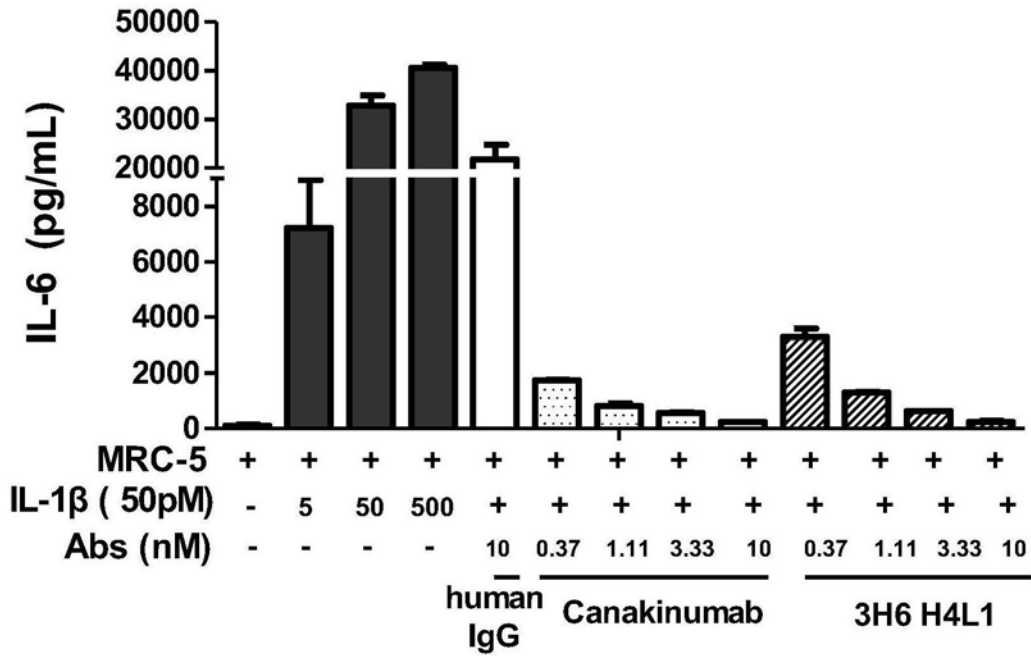


图7

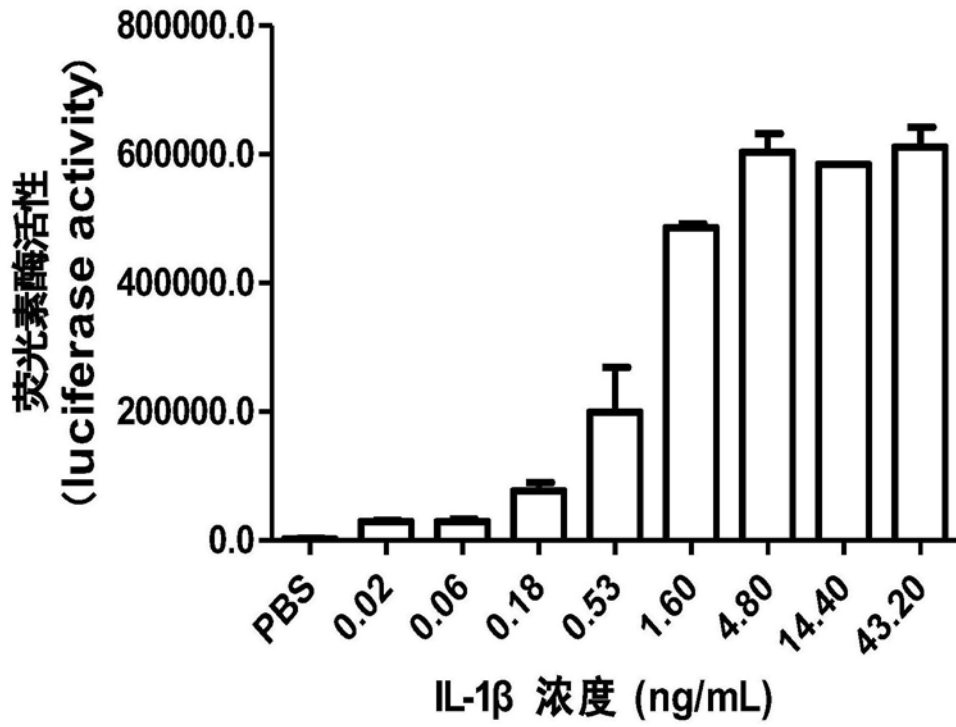


图8

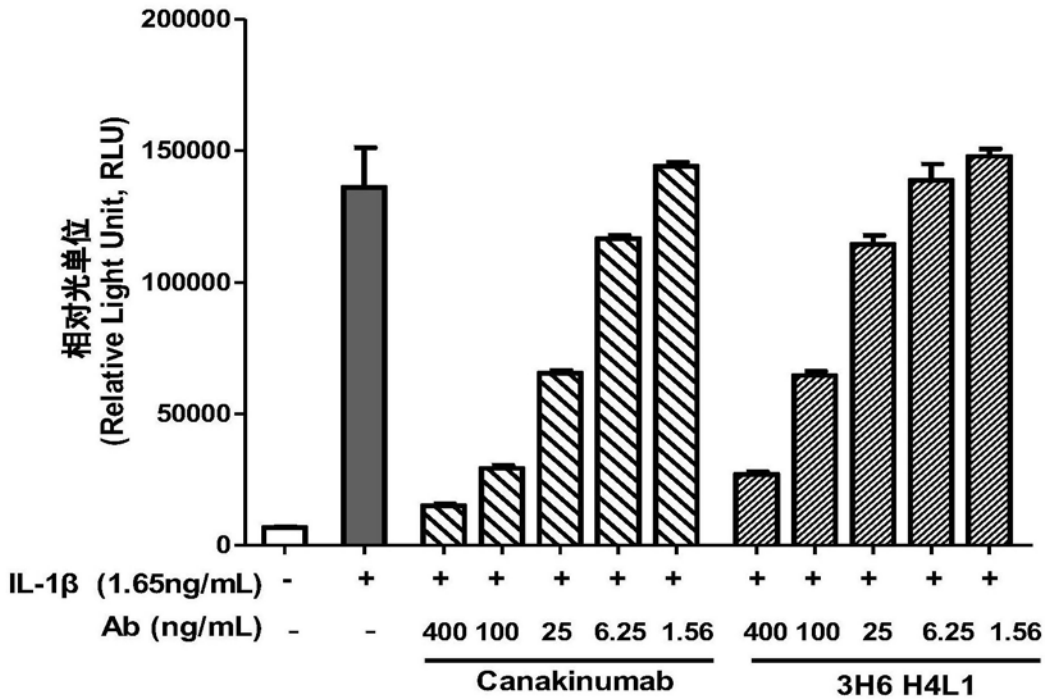


图9

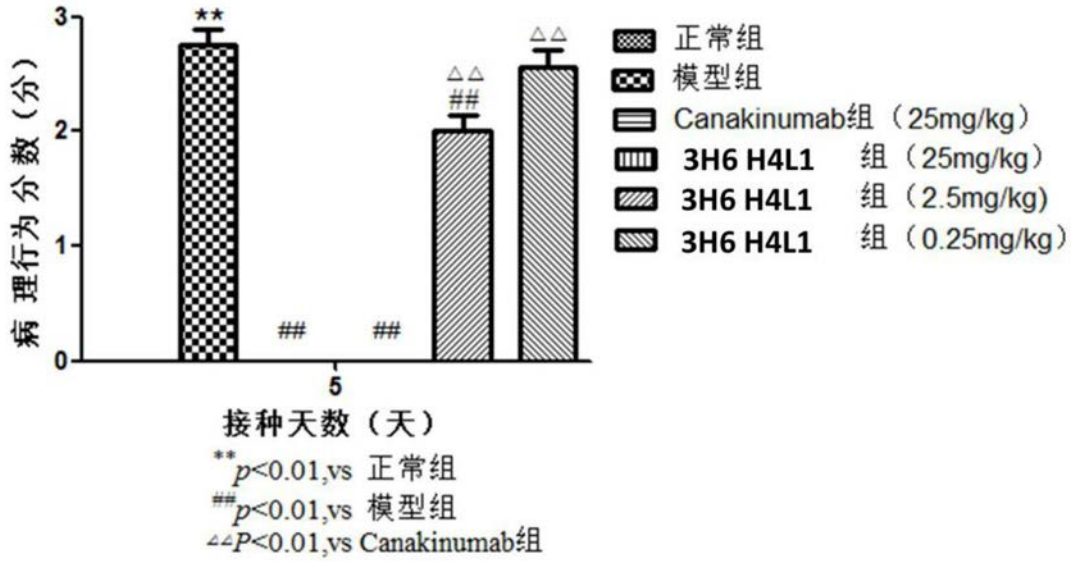


图10

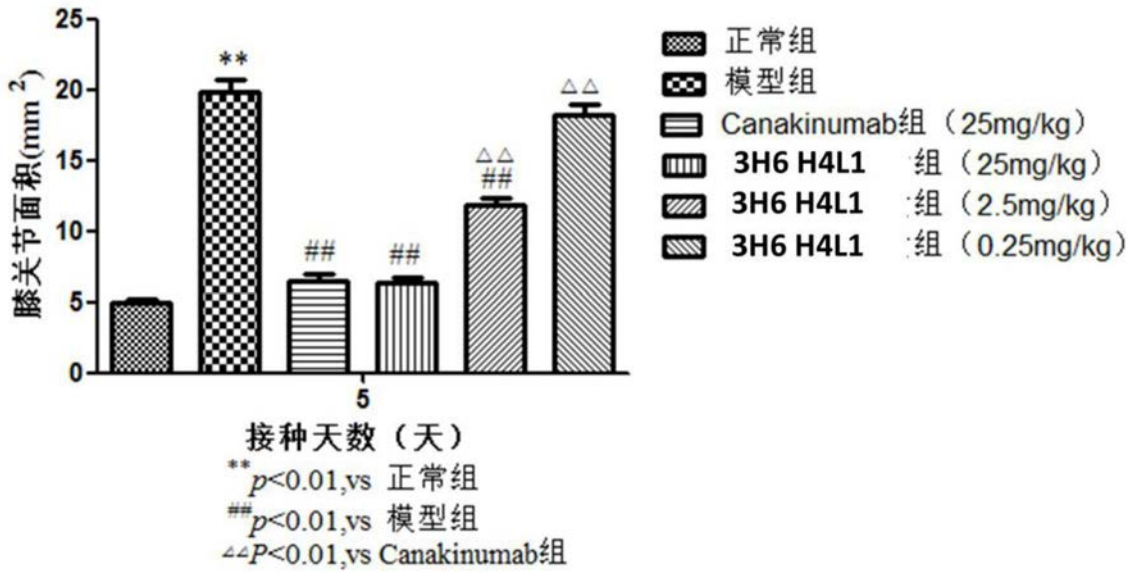


图11

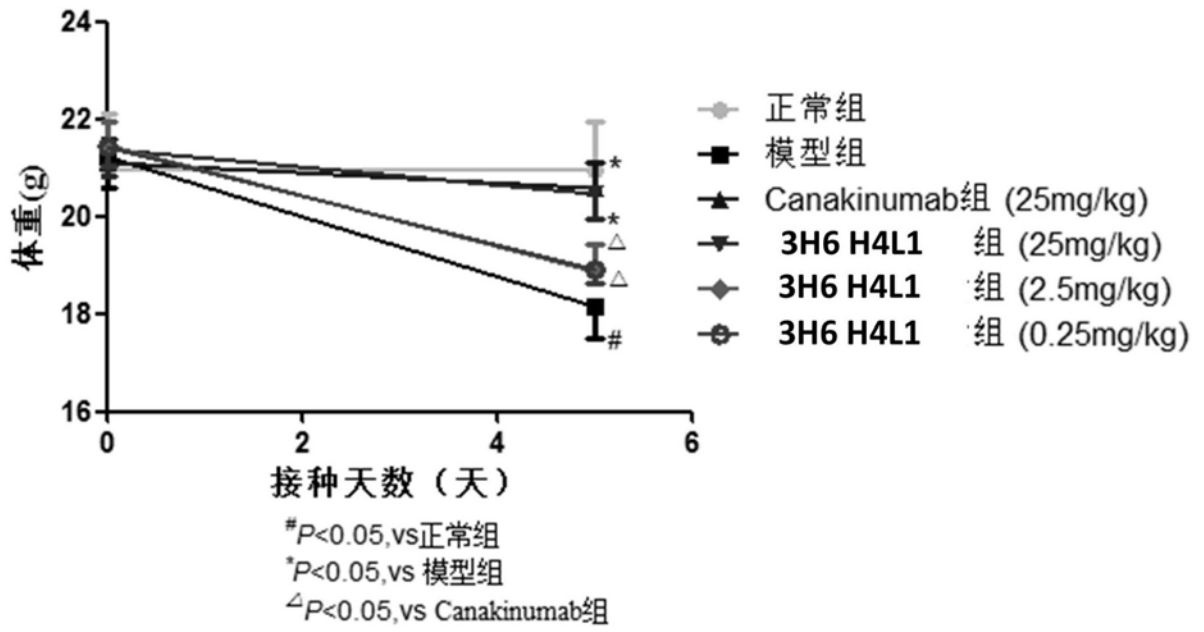


图12