



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102448493 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 30

(21) 申请号 201080023924. 3

(22) 申请日 2010. 03. 30

(30) 优先权数据

61/165, 677 2009. 04. 01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 11. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/029280 2010. 03. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/114859 EN 2010. 10. 07

(73) 专利权人 弗·哈夫曼－拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 G·A·科卢玛姆 Y·(H)·胡

W·欧阳

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 史文静 黄革生

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

C07K 16/24 (2006. 01)

C07K 16/28 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2008067223 A2, 2008. 06. 05, 摘要.

OUYANG WENJUN et al.. Novel therapeutic targets along the Th17 pathway. 《EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY》. 2009, 第 39 卷 (第 3 期),

审查员 张起

权利要求书1页 说明书26页

序列表10页 附图12页

(54) 发明名称

胰岛素抗性疾病的治疗

(57) 摘要

本发明涉及胰岛素抗性疾病的治疗。特别地，本发明涉及通过施用 IL-17，例如 IL-17A 和 / 或 IL-17F 拮抗物，例如抗 IL-17A 和 / 或 IL-17F 和 / 或 IL-17Rc 抗体，或抗体片段治疗胰岛素抗性疾

病。

1. IL-17A 和 / 或 IL-17F 拮抗物在制备用于治疗胰岛素抗性疾病的药物中的用途。
2. 权利要求 1 的用途,其包括对需要其的哺乳动物施用有效量的 IL-17A 和 / 或 IL-17F 拮抗物。
3. 权利要求 2 的用途,其中哺乳动物是人并且施用是全身的。
4. 权利要求 1 到 3 的任一项的用途,其中疾病选自非胰岛素依赖性糖尿病、肥胖、卵巢雄激素过多症,和高血压。
5. 权利要求 4 的用途,其中疾病为非胰岛素依赖性糖尿病或肥胖。
6. 权利要求 1 到 5 的任一项的用途,其中 IL-17A 和 / 或 IL-17F 拮抗物为抗体或其片段。
7. 权利要求 6 的用途,其中抗体是选自抗 IL-17A、抗 IL-17F、抗 IL-17A/F、抗 IL-17Rc 和抗 IL-17RA 抗体的抗体。
8. 权利要求 6 或 7 的用途,其中抗体为单克隆抗体。
9. 权利要求 6 到 8 的任一项的用途,其中抗体为嵌合的、人源化的或人抗体。
10. 权利要求 6 到 9 的任一项的用途,其中抗体为双特异性、多特异性或交叉反应抗体。
11. 权利要求 1 到 10 的任一项的用途,其还包括施用有效量的胰岛素抗性治疗活性剂。
12. 权利要求 11 的用途,其中胰岛素抗性治疗活性剂为胰岛素、IGF-1,或磺酰脲。
13. 权利要求 11 或 12 的用途,其还包括有效量的能够治疗所述胰岛素抗性疾病的其他活性剂。
14. 权利要求 13 的用途,其中其他活性剂为 Dickkopf-5。

胰岛素抗性疾病的治疗

发明领域

[0001] 本发明涉及胰岛素抗性疾病的治疗。特别地,本发明涉及通过施用 IL-7(例如 IL-17A)和/或 IL-17F 拮抗物(例如抗-IL-17A 和/或 IL-17F 和/或 IL-17Rc 抗体或抗体片段)治疗胰岛素抗性疾病。

[0002] 发明背景

[0003] IL-17 家族 -

[0004] 白细胞介素-17A(IL-17A)是T细胞衍生的促炎分子,所述分子刺激上皮、内皮和成纤维细胞产生其他炎性细胞因子和趋化因子,包括 IL-6、IL-8、G-CSF、和 MCP-1(见, Yao, Z. 等, J. Immunol., 122(12):5483-5486(1995); Yao, Z. 等, Immunity, 3(6):811-821(1995); Fossiez, F., 等, J. Exp. Med., 183(6):2593-2603(1996); Kennedy, J., 等, J. Interferon Cytokine Res., 16(8):611-7(1996); Cai, X. Y., 等, Immunol. Lett., 62(1):51-8(1998); Jovanovic, D. V., 等, J. Immunol., 160(7):3513-21(1998); Laan, M., 等, J. Immunol., 162(4):2347-52(1999); Linden, A., 等, Eur Respir J, 15(5):973-7(2000); 和 Aggarwal, S. 和 Gurney, A. L., J Leukoc Biol. 71(1):1-8(2002))。IL-17 也和其他细胞因子,包括 TNF- α 和 IL-1 β 协同作用以进一步诱导趋化因子表达(Chabaud, M., 等, J. Immunol. 161(1):409-14(1998))。在多种细胞类型上 IL-17A 表现了多效性生物学活性。IL-17A 也具有诱导 ICAM-1 表面表达、T 细胞增殖、和 CD34⁺ 人祖细胞成长分化为嗜中性粒细胞的能力。IL-17A 也涉及骨代谢,并且被提出在病理学病况中起重要作用,所述病理学病况以存在活化的 T 细胞和 TNF- α 生产为特征(例如类风湿性关节炎和骨植入物疏松)(Van Bezooijen 等人, J. Bone Miner. Res., 14:1513-1521(1999))。发现来自类风湿性关节炎患者的滑膜组织的活化的 T 细胞比来自正常个体或骨关节炎患者的滑膜组织的活化的 T 细胞分泌更高量的 IL-17A(Chabaud 等, Arthritis Rheum., 42:963-970(1999))。提出在类风湿性关节炎中此促炎细胞因子主动促进滑膜炎。除了它的促炎作用之外,IL-17A 似乎通过另一机理促进类风湿性关节炎的病理学。例如,已经显示了在成骨细胞中 IL-17A 诱导破骨细胞分化因子(ODF)mRNA 的表达(Kotake 等, J. Clin. Invest., 103:1345-1352(1999))。ODF 刺激祖细胞分化为破骨细胞——在骨吸收中涉及的细胞。由于在类风湿性关节炎患者的滑液中 IL-17A 的水平显著地增加,IL-17A 诱导的破骨细胞形成在类风湿性关节炎骨吸收中似乎起了关键的作用。也相信 IL-17A 在某些其他自身免疫病【例如多发性硬化(Matusevicius 等, Mult. Scler., 5:101-104(1999); Kurasawa, K., 等, Arthritis Rheum. 43(11):2455-63(2000)) 和银屑病(Teunissen, M. B., 等, J Invest Dermatol 111(4):645-9(1998); Albanesi, C., 等, J Invest Dermatol 115(1):81-7(2000); 和 Homey, B., 等, J. Immunol. 164(12):6621-32(2000))】中起关键作用。

[0005] 通过细胞内信号传递还显示了在人巨噬细胞中 IL-17A 刺激 Ca. sup. 2⁺ 内流和 [cAMP]_i 降低(Jovanovic 等, J. Immunol., 160:3513(1998))。用 IL-17A 处理的成纤维细胞诱导 NF κ B 活化,(Yao 等, Immunity, 3:811(1995), Jovanovic 等, supra),而用它处理的巨噬细胞激活 NF- κ B 和促分裂原活化蛋白激酶(Shalom-Barek 等, J. Biol. Chem., 273:

27467(1998))。另外地, IL-17A 也与哺乳动物细胞因子样因子 7 具有序列相似性, 所述哺乳动物细胞因子样因子 7 参与骨和软骨生长。其他与 IL-17A 多肽具有序列相似性的蛋白质为人胚胎衍生的白细胞介素相关因子 (embryo-derived interleukin-related factor, EDIRF) 和白细胞介素 -20。

[0006] 与 IL-17A 的广泛作用一致, 已经发现 IL-17A 的细胞表面受体在许多组织和细胞类型中广泛表达 (Yao 等人, Cytokine, 2:794(1997))。尽管人 IL-17A 受体 (IL-R) 的氨基酸序列 (866 个氨基酸) 预测具有单一跨膜结构域和长 525 个氨基酸的细胞内结构域的蛋白质, 受体序列是独特的并且不与来自细胞因子/生长因子受体家族的任何受体 (的序列) 相似。这和 IL-17A 自身与其他已知的蛋白质缺少相似性一起表明 IL-17A 和其受体可能为信号蛋白质和受体的新家族的一部分。已经展示了通过与其独特的细胞表面受体结合介导 IL-17A 活性 (此处标明为人 IL-17R), 其中先前的研究已经显示了用可溶性形式的 IL-17A 受体多肽接触 T 细胞抑制由 PHA、伴刀豆球蛋白 A 和抗 -TCR 单克隆抗体诱导的 T 细胞增殖和 IL-2 生产 (Yao 等, J. Immunol., 155:5483-5486(1995))。如此, 有显著的兴趣鉴定和表征新多肽, 所述新多肽与已知细胞因子受体, 特别地 IL-17A 受体具有同源性。

[0007] 现在认识到白细胞介素 17A 为新出现的细胞因子家族的原型成员。人和其他脊椎动物基因组的大规模测序已经揭示了存在额外的编码与 IL-17A 明确相关的蛋白质的基因, 因而定义新的细胞因子家族。在人和小鼠中至少有 IL-17 家族的六个成员, 包括 IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E 和 IL-17F 以及新受体 IL-17RH1、IL-17RH2、IL-17RH3 和 IL-17RH4 (见 2001 年 6 月 28 日公开的 W001/46420)。已经展示了一个此 IL-17 成员 (标明为 IL-17F) 与人 IL-17 受体 (IL-17R) 结合 (Yao 等, Cytokine, 9(11):794-800(1997))。初始表征表明, 类似于 IL-17A, 若干这些新鉴定的分子具有调节免疫功能的能力。若干这些因子的已经鉴定的有效的炎性作用和与主要人类疾病新出现的关联表明这些蛋白质可在炎性过程中有重要的作用并且可提供治疗介入的机会。

[0008] 编码人 IL-17F 的基因位于 IL-17A 临近 (Hymowitz, S. G., 等, Embo J, 20(19):5332-41(2001))。IL-17A 和 IL-17F 具有约 44% 氨基酸同一性而 IL-17 家族的其他成员具有更有限的 15-27% 氨基酸同一性表明在 IL-17 家族内 IL-17A 和 IL-17F 形成明显不同的亚组 (Starnes, T., 等, J Immunol. 167(8):4137-40(2001); Aggarwal, S. 和 Gurney, A. L., J. Leukoc Biol, 71(1):1-8(2002))。IL-17F 似乎具有与 IL-17A 相似的生物学作用, 并且能够促进多种细胞生产 IL-6、IL-8、和 G-CSF。与 IL-17A 相似地, 它能够诱导软骨基质释放和抑制新软骨基质合成 (见 2002 年 11 月 28 日公布的 U. S. 2002-0177188-A1)。因此, 如 IL-17A, IL-17F 可潜在地促进炎症疾病的病理学。已经报道了 IL-17A 和 IL-17F 都在 T 细胞中通过白细胞介素 23 (IL-23) 的作用被诱导 (Aggarwal, S., 等, J. Biol Chem., 278(3):1910-4(2003))。更具体地说, 已经表明 IL-17A 和 IL-17F 都涉及人类疾病人和小鼠模型中多种炎性和自身免疫疾病的进展和病理学促进剂。事实上, 已经表明 IL-17A, 和较少程度上的 IL-17F 为效应细胞因子, 所述效应细胞因子引发炎性应答并从而促进许多自身炎性 (自身免疫) 疾病, 包括多发性硬化 (MS)、类风湿性关节炎 (RA)、和炎症肠病 (IBD)。此谱系被命名为 Th₁₇ 并且在人自身免疫疾病的小鼠模型中这些细胞的数目明确地与疾病进展和严重性相关。尽管在炎症疾病中 IL-17A 和 IL-17F 的参与看起来是明确的 (见, 例如 Kolls, J. K., A. Linden. Immunity 21:467-476(2004)), 部分地由于 IL-17F 的受体尚未被鉴定因

而尚未鉴定出这些细胞因子的靶向细胞。IL-17A 对 IL-17RA 具有亲和力。在 NCBI GenBank 登录号 NP_055154.3 下可获得人 IL-17RA 的氨基酸序列。迄今为止,基于与 IL-17RA 的序列同源性,在 IL-17R 家族中已经鉴定了至少四个另外的受体 (IL-17Rh1、IL-17Rc、IL-17RD、和 IL-17RE) 并且它们中已经显示了 IL-17Rc 与 IL-17RA 物理地相关联,表明它可为 IL-17R 复合体中的功能性成分 (Toy, D. 等, J. Immunol. 177 :36-39 (2006))。最近报道了 IL-17Rc 是 IL-17A 和 IL-17F 二者的受体 (Presnell, 等, J. Immunol. 179 (8) :5462-73 (2007))。

[0009] 炎症和肥胖

[0010] 我们对肥胖的理解的最近的重要发展是下述概念的出现,所述概念为炎症和糖尿病由慢性低级炎症的状态表征。此观点的基础为增加的若干炎症标志物的循环水平,在肥胖人中促炎细胞因子和急性期蛋白质都上升了;这些标志物包括 IL-6、TNF α 体系、C 反应蛋白 (CRP) 和触珠蛋白。然而,在表明炎症本身的位点的方面,是全身的或局部的,尚不清楚。

[0011] 胰岛素抗性,被定义为对给定剂量的胰岛素的小于预期的生物学应答,普遍与肥胖相关。实际上,认为肥胖的许多病理学后果与胰岛素抗性相关。这些包括高血压、高脂血症和最显著地、非胰岛素依赖型糖尿病 (NIDDM)。大多数 NIDDM 患者是肥胖的,并且在 NIDDM 发展中非常主要的和早期的成分是胰岛素抗性 (Moller 等, New Eng. J. Med., 325 :938 (1991))。已经表明了在此疾病初始期期间的胰岛素受体下调之外,受体后异常在胰岛素抗性进程期间出现 (Olefsky 等, in Diabetes Mellitus, Rifkin 和 Porte, Jr., 编. (Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 第 4 版, 1990), 第 121-153 页)。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明至少部分基于下述发现,所述发现为 IL-17 家族成员,并且特别地为 IL-17A 和 IL-17F,在肥胖、胰岛素抗性和与肥胖相关联的其他疾病,例如高脂血症和代谢综合征中起作用,并且 IL-17 拮抗物,特别地 IL-17A 和 IL-17F 拮抗物,能够被用来治疗这些病况。

[0014] 在一方面,本发明涉及在哺乳动物中治疗胰岛素抗性疾病的方法,所述方法包括将有效量的 IL-17A 和 / 或 IL-17F 拮抗物施用给需要其的哺乳动物。

[0015] 在另一方面,本发明涉及药物组合物,所述药物组合物包括与可药用的赋形剂混合的 IL-17A 和 / 或 IL-17F 拮抗物,用于治疗胰岛素抗性疾病。

[0016] 在另一方面,本发明涉及在治疗胰岛素抗性疾病中 IL-17A 和 / 或 IL-17F 拮抗物的用途。

[0017] 在另一方面,本发明涉及治疗胰岛素抗性疾病的试剂盒,所述试剂盒包括:(a) 包括 IL-17A 和 / 或 IL-17F 拮抗物的容器;和 (b) 施用所述抗体以治疗所述疾病的标签或说明。

[0018] 在全部方面,在一个实施方案中,疾病选自非胰岛素依赖型糖尿病 (NIDDM)、肥胖、卵巢雄激素过多症、和高血压。在另一个实施方案中,疾病是 NIDDM 或肥胖。

[0019] 在另一实施方案中,哺乳动物为人并且为全身施用。

[0020] 在另一实施方案中,IL-17A 和 / 或 IL-17F 拮抗物是抗体或其片段,例如选自抗 IL-17A、抗 IL-17F、抗 IL-17A/F、抗 IL-17Rc 和抗 IL-17RA 抗体,或其片段的抗体。

[0021] 优选地,抗体为单克隆抗体,包括嵌合的、人源化或人的抗体、双特异性、多特异性

或交叉反应抗体。

[0022] 在另一实施方案中,方法包括施用有效量的胰岛素抗性治疗活性剂,例如胰岛素、IGF-1 或磺酰脲。

[0023] 在另一实施方案中,方法包括施用有效量的另外的活性剂,所述活性剂能够治疗所述胰岛素抗性疾病,例如 Dickkopf-5 (DKK-5)。

[0024] 附图简述

[0025] 图 1 显示了天然序列的人 IL-17A cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :1)。

[0026] 图 2 显示了天然序列的人 IL-17A 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :2),所述氨基酸序列来自图 1 中显示的 SEQ ID NO :1 的编码序列。

[0027] 图 3 显示了天然序列的人 IL-17F cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :3)。

[0028] 图 4 显示了天然序列的人 IL-17F 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :4),所述氨基酸序列来自图 3 中显示的 SEQ ID NO :3 的编码序列。

[0029] 图 5 显示了编码天然序列的人 IL-17 受体 C (IL-17Rc) 多肽的核苷酸序列 (SEQ ID NO :5),所述核苷酸序列也被称为标示为“DNA164625-2890”的克隆。

[0030] 图 6 显示了天然序列的人 IL-17Rc 多肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO :6) (也被称为 IL-17RH2 受体)。

[0031] 图 7 使用 IL-17Rc KO 小鼠的高脂肪膳食 (HFD) 模型研究的实验设计。

[0032] 图 8 使用 IL-17Rc KO 小鼠的高脂肪膳食模型 (HFD) 研究的第 8 周的结果。

[0033] 图 9A 和 9B 野生型和对照组和高脂肪膳食组中的 IL-17Rc KO 小鼠中的葡萄糖水平。IL-17Rc KO 小鼠对高脂肪膳食 (HFD) 诱导的胰岛素抗性是耐受的。

[0034] 图 10 第 10 周曲线下的面积。

[0035] 图 11 体重结果。

[0036] 图 12 抗 IL-17 和抗 IL-17F mAbs 在胰岛素抗性 HF 膳食模型上的作用。

[0037] 图 13 在第 9 周给药期后的葡萄糖耐受测试 (GTT)。

[0038] 图 14 通过质粒 DNA 注射之后葡萄糖耐受测试 (GTT) 的 IL-17A 的异位表达。通过 GTT 评价的 IL-17 的过量表达对胰岛素抗性状态的效果。

[0039] 发明详述

[0040] A. 定义

[0041] 术语“IL-17”用于一般指 IL-17 家族的成员,包括 IL-17A、IL-17、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E、IL-17F、和 IL-17A/F。此处优选的 IL-17 为 IL-17A、IL-17F、和 IL-17A/F。

[0042] “天然序列的 IL-17 多肽”包括和相应的来自天然的 IL-17 多肽具有相同氨基酸序列的多肽。能够从自然分离或能够通过重组或合成方法生产此类天然序列的 IL-17 多肽。术语“天然序列的 IL-17 多肽”特别地包括特定 IL-17 多肽天然存在的截短的或分泌的形式 (例如,细胞外结构域序列)、天然存在的变体形式 (例如,可变剪接的形式) 和多肽天然存在的等位基因变体形式。在本发明的多个实施方案中,此处公开的天然序列的 IL-17 多肽为成熟的或全长的天然序列的人 IL-17A、IL-17F、和 IL-17A/F 多肽,其包括在图 2 和 4 中显示的全长氨基酸序列 (SEQ ID NO :2 和 4) 的。在附图中用粗体字下划线显示起始和终止密码子。

[0043] 术语“天然序列的 IL-17Rc 多肽”或“天然序列的 IL-17Rc”指和相应的来自天然

的 IL-17Rc 多肽具有相同氨基酸序列的多肽。能够从自然分离或能够通过重组或合成方法生产此类天然序列的 IL-17Rc 多肽。术语“天然序列的 IL-17Rc 多肽”特别地包括特定 IL-17Rc 多肽天然存在的截短的或分泌的形式、天然存在的变体形式（例如，可变剪接的形式）和多肽天然存在的等位基因变体形式。在本发明多个实施方案中，此处公开的天然序列的 IL-17Rc 多肽为包括在附图 6 中显示的全长氨基酸序列 (SEQ ID NO:6) 的全长天然序列的人 IL-17Rc。

[0044] 当使用“分离的”以描述多种本文公开的多肽时，意为已经鉴定的和分离的和/或从它的天然环境的成分中回收的多肽。它的天然环境的污染物成分为下述物质，所述物质通常干扰多肽的诊断或治疗的用途，并可包括酶、激素、和其他蛋白质的或非蛋白质的溶质。在优选的实施方案中，(1) 纯化多肽至通过使用旋转式测序仪足以获得至少 15 个 N 末端或内部氨基酸序列的残基的程度，或 (2) 通过 SDS-PAGE 在非还原或还原条件下使用 Coomassie 蓝或，优选地，银染料纯化多肽至均一性。分离的多肽包括重组细胞中的原位多肽，由于 IL-17 多肽天然环境的至少一个组分将不存在。通常地，然而，通过至少一个纯化步骤制备分离的多肽。

[0045] 如本文所用，“肥胖”指哺乳动物具有至少 25.9 的身体质量指数 (BodyMass Index, BMI) (由重量 (kg) 每高度² (米) 计算) 的情况。通常地，具有正常重量的人 BMI 为 19.9 到小于 25.9。在此定义之中特别地包括了胰岛素抗性相关联的肥胖。

[0046] “胰岛素抗性”或“胰岛素抗性疾病”或“胰岛素抗性活性”为外周组织对外源胰岛素作用的正常代谢应答失败（不敏感性）导致的病症，病况，或疾病，即，是胰岛素的存在产生的低于正常的生物学应答的病况。在临床上，当面对正常或升高的胰岛素水平时正常或升高的葡萄糖水平持续存在，此时胰岛素抗性存在。它本质上代表糖原合成抑制，通过所述合成抑制基底或胰岛素刺激的糖原合成，或二者都被降低到正常水平以下。胰岛素抗性在 2 型糖尿病中起了重要的作用，如下述事实所表明的，即有时能够通过饮食或体重减少逆转 2 型糖尿病中存在的高血糖症，所述饮食或体重减少足以明显地恢复外周组织对胰岛素的敏感性。术语包括异常的葡萄糖耐受和许多疾病，在所述疾病中胰岛素抗性起了重要的作用，例如肥胖、糖尿病、卵巢雄激素过多症和高血压。

[0047] “糖尿病”指慢性高血糖症的状态，即因相对或绝对的胰岛素作用缺乏而引起的血中过量的糖。有三种糖尿病的基本类型，I 型或胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM)、II 型或非胰岛素依赖型糖尿病 (NIDDM)、和 A 型胰岛素抗性，尽管 A 型相对罕见。患有 I 型或 II 型糖尿病的患者能够通过多种机理变为对外源胰岛素作用不敏感。A 型胰岛素抗性是由于胰岛素受体基因中的突变或对于葡萄糖代谢关键的作用的受体后位点中的缺陷。患糖尿病的受试者能够容易地被医生识别出并通过高血糖症、损伤的葡萄糖耐受性、糖基化的血红蛋白和某些情况下与创伤或疾病相关联的酮症酸中毒来表征。

[0048] “非胰岛素依赖型糖尿病”或“NIDDM”指 II 型糖尿病。当禁食和餐后或诊断测试（即所知葡萄糖耐受性测试）之后延迟的细胞葡萄糖摄入时，NIDDM 患者具有异常地高葡萄糖浓度。基于公认的标准诊断 NIDDM (American Diabetes Association, Physician's Guide to Insulin-Dependent (Type I) Diabetes, 1988; American Diabetes Association, Physician's Guide to Non-Insulin-Dependent (Type II) Diabetes, 1988)。

[0049] 如本文定义的作为疾病要被治疗的糖尿病的症状和并发症包括高血糖症，不理想

的糖血 (glycemic) 控制、酮症酸中毒、胰岛素抗性、升高的生长激素水平、升高的糖基化血红蛋白和高度糖基化终产物 (AGE) 水平、黎明现象、不理想的脂类谱、血管病 (例如, 动脉粥样硬化)、微血管病、视网膜病 (例如, 增殖性糖尿病性视网膜病变)、肾脏疾病、神经病、怀孕并发症 (例如, 早期终止 (妊娠) 和出生缺陷) 等。治疗定义中包括的结束点为, 例如, 胰岛素敏感性增加、维持糖血控制的同时胰岛素给药减少、HbA1c 降低、改善的糖血控制、减少的血管、肾脏、神经、视网膜和其他糖尿病并发症、预防或减少“黎明现象”、改善的脂类谱、减少的怀孕并发症、和减少的酮症酸中毒。

[0050] 如本文所用, 定义“治疗组合物”或“组合物”为包括 Dkk-5 和可药用的载体, 例如水、矿物质、蛋白质和本领域技术人员所知的其他赋形剂。

[0051] 为了治疗目的, 术语“哺乳动物”指任何分类为哺乳动物的动物, 包括但不限于, 人类、啮齿动物、运动动物、动物园动物、宠物动物和家畜或农场动物例如犬、猫、牛、绵羊、猪、马、和非人灵长类, 例如猴类。优选地啮齿动物为小鼠或大鼠。优选地, 哺乳动物是人, 本文也被叫做患者。

[0052] 如本文所用, “治疗”描述为了对抗任何根据本发明靶向的疾病或病况的目的管理照顾哺乳动物, 所述疾病或病况包括但不限于, 胰岛素抗性、糖尿病、高胰岛素血症、低胰岛素血症、或肥胖并且包括施用以预防症状或并发症发作, 缓和症状或并发症, 或消除所靶向的疾病或病况。

[0053] 为了本发明的目的, 有益的或期望的减少胰岛素抗性的临床“治疗”结果包括但不限于, 缓和与胰岛素抗性相关联的症状、减小胰岛素抗性症状的程度、稳定 (即不恶化) 胰岛素抗性的症状 (例如, 减少胰岛素需求)、增加胰岛素敏感性和 / 或胰岛素分泌以预防胰岛细胞衰竭、和延迟或减慢胰岛素抗性进展, 例如糖尿病进展。

[0054] 对于肥胖, “治疗”一般指减少哺乳动物的 BMI 至少于约 25.9, 并且维持该重量至少 6 个月。治疗适当地导致哺乳动物减少食物或热量摄入。此外, 如果在肥胖情况之前施用治疗, 在此背景下的治疗指预防肥胖发生。治疗包括在肥胖的哺乳动物中抑制和 / 或完全阻抑脂肪生成 (即在脂肪细胞中过量的脂类积累, 所述脂类积累为人和动物肥胖的主要特征之一) 和总体重降低。

[0055] “需要治疗的”那些包括已经患病的哺乳动物, 和那些倾向于患病的, 包括其中疾病被预防的那些哺乳动物。

[0056] “胰岛素抗性治疗活性剂”是除了 IL-17 拮抗物之外的活性剂, 所述活性剂用于治疗胰岛素抗性, 例如, Dickkopf-5 (Dkk-5) (见, 例如 U.S. Application Publication No. 2005/0170440)、和降血糖药。此类治疗活性剂的实例包括胰岛素 (一种或多种不同的胰岛素); 胰岛素模拟物例如小分子胰岛素, 例如, L-783, 281; 胰岛素类似物 (例如, **HUMALOG**[®] 胰岛素 (Eli Lilly Co.)、Lys_{B28} 胰岛素、Pro_{B29} 胰岛素、或 Asp_{B21} 胰岛素或那些描述于, 例如美国专利号 5, 149, 777 和 5, 514, 646 的), 或其生理活性的片段; 胰岛素相关的肽 (C-肽、GLP-1、胰岛素样生长因子 I (IGF-1)、或 IGF-1/IGFBP-3 复合物) 或其类似物或片段; ergoset; 普兰林肽 (pramlintide); 来普汀 (leptin); BAY-27-9955; T-1095; 胰岛素受体酪氨酸激酶抑制剂拮抗物; TNF- α 功能拮抗物; 生长激素释放剂; 胰岛淀粉样多肽或胰岛淀粉样多肽抗体; 胰岛素致敏物, 例如格列酮 (glitazone) 家族化合物, 包括那些描述于美国专利号 5, 753, 681 中的, 例如曲格列酮 (troglitazone)、吡格列

酮 (pioglitazone)、恩格列酮 (englitazone)、和相关的化合物 ;单独的里哪醇 (Linalol) 或和维生素 E 一起的里哪醇 (美国专利号 6, 187, 333) ;胰岛素分泌增强剂例如那格列奈 (nateglinide) (AY-4166)、(2s)-2- 苄基 -3-(顺 - 六氢 -2- 异二氢氮 (杂) 茛基羰基) 丙酸钙二水合物 (米格列奈 (mitiglinide), KAD-1229)、和瑞格列奈 (repaglinide) ;磺酰脲药物,例如,醋磺己脲、氯磺丙脲、妥拉磺脲、甲苯磺丁脲、格列吡脲和它的铵盐、格列本脲、格列波脲、格列齐特、1- 丁基 -3- 间氨基苯磺酰脲、氨磺丁脲、格列吡嗪、格列喹酮、格列派特、格列噻唑、格列丁唑、格列己脲、格列嘧啶、格列平脲、苯磺丁脲、甲磺环己脲,格列美脲等 ;双胍类 (例如苯乙双胍、二甲双胍、丁二胍、等) ; α - 葡萄糖苷酶抑制物 (例如阿卡波糖、伏格列波糖、米格列醇、乙格列酯、等),和此类非典型治疗例如胰移植或自身免疫试剂。

[0057] “体重减轻活性剂”指在治疗或预防肥胖中有用的分子。此类分子包括,例如激素 (儿茶酚胺、胰高血糖素、ACTH 和与 IGF-1 组合的生长激素) ;Ob 蛋白 ;氯贝丁酯 ;卤化物 ;辛可卡因 ;氯丙嗪 ;作用于去甲肾上腺素能神经递质的食欲抑制药物,例如马吲哚和苯乙胺衍生物,例如 :苯丙醇胺、安非拉酮、芬特明、苯甲曲秦、苄非他明、苯丙胺、去氧麻黄碱 (methamphetamine)、和芬美曲秦 ;作用于 5- 羟色胺神经递质的药物,例如芬氟拉明、色氨酸、5- 羟色氨酸、氟西汀、和舍曲林 ;有中枢活性的药物例如纳洛酮、神经肽 -Y、甘丙肽、促肾上腺皮质激素释放激素、和胆囊收缩素 ;胆碱能激动剂例如吡斯的明 ;鞘脂例如溶性鞘脂或其衍生物 ;产热药物例如甲状腺激素 ;麻黄碱 ; β - 肾上腺素能激动剂 ;影响胃肠道的药物例如酶抑制物,例如奥利司他 (tetrahydrolipostatin)、不能消化的食物例如蔗糖聚酯、和胃排空抑制物例如 threo-chlorocitric acid 或它的衍生物 ; β - 肾上腺素能激动剂例如异丙肾上腺素和育亨宾 ;增加育亨宾的 β - 肾上腺素能样作用的氨茶碱、 α_2 - 肾上腺素能阻断剂例如单独的或与生长激素释放肽结合的可乐定 ;干扰肠吸收的药物例如双胍类例如二甲双胍和苯乙双胍 ;大块填料例如甲基纤维素 ;代谢阻断药物例如羟基柠檬酸盐 ;黄体酮 ;胆囊收缩素激动剂 ;模拟酮酸的小分子 ;促肾上腺皮质激素释放激素激动剂 ;减少身体脂肪贮存的麦角相关的促乳素抑制化合物 (美国专利号 4, 783, 469, 发布于 1988 年 11 月 8 日) ; β -3- 激动剂 ;溴隐亭 ;阿片样肽拮抗物 ;神经肽 -Y 拮抗物 ;糖皮质激素受体拮抗物 ;生长激素激动剂 ;其组合 ;等。

[0058] 如本文所用,“胰岛素”指具有胰岛素作用的任何和全部物质,并且通过下述实施例,例如,从牛或猪胰提取的动物胰岛素、由从猪胰提取的胰岛素酶促合成的半合成的人胰岛素、和一般地使用大肠杆菌或酵母通过基因工程技术合成的人胰岛素、等。此外,胰岛素能够包括含有约 0.45 至 0.9(w/w) % 锌的胰岛素 - 锌复合体、产生自氯化锌的鱼精蛋白 - 胰岛素 - 锌、鱼精蛋白硫酸盐和胰岛素、等。胰岛素可为其片段或衍生物的形式,例如,INS-1。胰岛素也可包括胰岛素样物质例如 L83281 和胰岛素激动剂。虽然多种类型的胰岛素是可获得的,例如超级即时作用型、即时作用型、双峰作用型、中间作用型、长作用型、等,能够根据患者的病况适当地选择这些类型。

[0059] 如本文所用,定义“治疗组合物”为包括 IL-17 (包括 IL-17A 和 IL-17F 拮抗物) 拮抗物和可药用的载体,例如水、矿物质、蛋白质和本领域技术人员所知的其他赋形剂。

[0060] 在本发明范围内的表述“拮抗物”,“IL-17 (A 和 / 或 F) 的拮抗物”、“IL-17 (A 和 / 或 F) 拮抗物”等意为包括通过任何方法 (取决于被治疗的适应证) 干扰 IL-17 (例如 IL-17A 和 / 或 IL-17F) 功能,或阻断或中和 IL-17 (例如 IL-17A 和 / 或 IL-17F) 相关活性的任何分

子。它可阻止 IL-17 (包括 IL-17A 和 IL-17F) 和一个或多个它的受体之间的相互作用。此类活性剂以多种方法达成此效果。例如,“中和”IL-17 活性的拮抗物种类与 IL-17,或 IL-17 的受体结合,以如下定义的充分的亲和力和特异性干扰 IL-17。与 IL-17,或 IL-17 的受体 (例如 IL-17Rc) 结合的抗体是一个能够以充分的亲和力与抗原结合的抗体,从而使得此类抗体在靶向表达 IL-17 或 IL-17 受体的细胞中作为治疗活性剂是有用的。术语“IL-17 拮抗物”用于指任何或全部的 IL-17A、IL-17F 和 IL-17A/F 拮抗物。

[0061] 在这组拮抗物中包括,例如,针对 IL-17 或其部分的抗体,与 IL-17、或 IL-17 受体或其部分反应的抗体,特别地包括 IL-17A 和 / 或 IL-17F 和 IL-17Rc 的抗体。术语也包括干扰 IL-17A 和 / 或 IL-17F 过量生产或拮抗至少一个 IL-17 (例如 IL-17A 和 / 或 IL-17F) 受体 (例如 IL-17Rc) 的任何活性剂。此类拮抗物可为嵌合杂化物的形式,对于将活性剂功能与载体蛋白质组合以增加治疗活性剂的血清半寿期或给予跨种耐受性是有用的。因此,此类拮抗物的实例包括生物有机分子 (例如,假肽 (peptidomimetics))、抗体、蛋白质、肽、糖蛋白、糖肽、糖脂、多糖、寡糖、核酸、药理学活性剂和它们的代谢物、转轮和翻译调控序列等。在优选的实施方案中,拮抗物为具有所需的与 IL-17A 和 / 或 IL-17F 结合并且阻止它与受体 (优选地 IL-17Rc) 相互作用的性质的抗体。

[0062] 术语“抗体”以最宽泛的意义使用并且特定地包括,例如,单一抗 -IL-17A/F 或抗 -IL-17A 或抗 -IL-17F 单克隆抗体 (包括激动剂、拮抗物、和中和抗体)、具有多肽特异性的相应抗体组合物、多克隆抗体、单链抗体、和抗体片段 (见以下),只要它们表现出了需要的生物学或免疫学的活性。

[0063] 基本的 4-链抗体单元是由 2 个相同的轻链 (L) 和两个相同的重链 (H) 组成的异源四聚体糖蛋白 (IgM 抗体由 5 个基本的异源四聚体单元和一条叫做 J 链的额外的多肽组成,因此包括 10 个抗原结合位点,然而分泌的 IgA 抗体能够聚合形成包括 2-5 个基本 4-链单元和 J 链的多价装配物)。就 IgG 而言,4-链单元通常约为 150,000 道尔顿。每一 L 链通过一个共价二硫键连接于 H 链,而两个 H 链通过一个或多个二硫键互相连接,取决于 H 链同种型。每一 H 和 L 链也具有规则间隔的链内二硫桥。对于每一 α 和 γ 链,每一 H 链在 N 末端具有由 3 个 (对于 μ 和 ϵ 同种型为四个) 恒定结构域 (C_H) 跟随的可变结构域 (V_H)。每一 L 链在 N 末端具有由在其另一末端的恒定结构域 (C_L) 跟随的可变结构域 (V_L)。 V_L 与 V_H 排列而 C_L 与重链的第一个恒定结构域 (C_H) 排列。认为特定的氨基酸残基在轻链和重链可变结构域之间形成界面。 V_H 和 V_L 配对一起形成单一抗原结合位点。不同类别抗体的结构和性质参见,例如 Basic and Clinical Immunology, 第 8 版, Daniel P. Stites、Abba I. Terr 和 Tristram G. Parslow (编.), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, 第 6 章第 71 页。

[0064] 基于它们的恒定结构域的氨基酸序列,能够将来自任何脊椎动物物种的 L 链分配为两种分明的类型中的一种,称作 κ 和 λ 。取决于它们重链恒定结构域 (C_H) 的氨基酸序列,能够将免疫球蛋白分配为不同类别或同种型。有五个类别的免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG、和 IgM, 具有的重链分别指定为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、和 μ 。基于相对小的 C_H 序列和功能中的差异, γ 和 α 类别被进一步分为亚类,例如,人表达以下亚类: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、和 IgA2。

[0065] 术语“可变的”指抗体之间可变结构域的某些区段序列广泛相异的事实。V 结构域介导抗原结合并且为其特定的抗原定义了特定抗体的特异性。然而,可变性并非在可变

结构域的 110 个氨基酸的跨度上均匀分部。相反地, V 区域由下述组成: 15-30 个氨基酸的称作框架区域 (FR) 的相对不变的几段, 所述几段被称作“高变区”的极度可变的较短区域分离开, 每一所述高变区为 9-12 个氨基酸长。每一天然的重和轻链的可变结构域包括 4 个 FR, 主要采取 β -片层构型, 通过 3 个高变区连接, 所述高变区形成环状连接, 并在某些情况下形成部分 β -片层结构。通过 FR 和来自其他链的高变区, 将每一链中的高变区近距离地结合在一起, 促进抗体的抗原结合位点的形成 (见 Kabat 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。恒定结构域并不直接涉及抗体结合抗原, 但是显示了多种效应子功能, 例如抗体参与抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC)。

[0066] 在本文中使用时“高变区”指抗体负责抗原结合的氨基酸残基。高变区一般包括来自“互补决定区域”或“CDR”的氨基酸残基 (例如, 在 V_L 中约第 24-34 残基 (L1)、第 50-56 残基 (L2) 和第 89-97 残基 (L3) 左右, 和 V_H 中约第 1-35 残基 (H1)、第 50-65 残基 (H2) 和第 95-102 (H3) 残基左右; Kabat 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) 和 / 或来自“高变环”的那些残基 (例如 V_L 中第 26-32 残基 (L1)、第 50-52 残基 (L2) 和第 91-96 残基 (L3), 和 V_H 中第 26-32 残基 (H1)、第 53-55 残基 (H2) 和第 96-101 残基 (H3); Chothia 和 Lesk *J. Mol. Biol.* 196 :901-917(1987))。

[0067] 如本文所用, 术语“单克隆抗体”指从一群基本上同型的抗体中获得的抗体, 即, 除了可少量存在的可能的天然发生的突变之外, 构成群体的个体抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的, 针对单一抗原位点。此外, 与包括针对不同决定簇 (表位) 的不同抗体的多克隆抗体制品形成对照, 每一单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了它们的特异性之外, 单克隆抗体是有利的, 因为它们是不被其它抗体污染而合成的。此类单克隆抗体一般包括含有与靶结合的可变区的抗体, 其中通过下述方法获得抗体, 所述方法包括从许多抗体中选择抗体。例如, 选择方法可以是从小许多克隆中 (例如杂交瘤克隆的库、噬菌体克隆或重组 DNA 克隆) 选择独特的克隆。应当理解还能够变更选择的抗体, 例如, 以改善对靶的亲合力、以人源化抗体、以改善在细胞培养物中它的生产、以降低它的体内免疫原性、以制备多特异性的抗体等, 并且包括变更的可变区序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。除了它们的特异性之外, 单克隆抗体制品是有利的, 因为它们一般不被其他免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表明了抗体的特征为获取自基本上同型的抗体群, 并且并非被理解为需要通过任何特定的方法生产抗体。例如, 可通过多种技术制备根据本发明使用的单克隆抗体, 包括杂交瘤方法 (例如, Kohler 等, *Nature*, 256 :495(1975); Harlow 等, *Antibodies :A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第 2 版 1988); Hammerling 等, 在: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 中, (Elsevier, N. Y., 1981)、重组 DNA 方法 (见, 例如, 美国专利号 4,816,567)、噬菌体展示技术 (见, 例如, Clackson 等, *Nature*, 352 :624-628(1991); Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222 :581-597(1991); Sidhu 等, *J. Mol. Biol.* 338(2) :299-310(2004); Lee 等, *J. Mol. Biol.* 340(5) :1073-1093(2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34) :12467-12472(2004); 和 Lee 等, *J. Immunol. Methods* 284(1-2) :119-132(2004)、和从动物生产人或人样抗体的技术, 所述抗体具有部分或全部人免疫球蛋白的基因座或编码

人免疫球蛋白序列的基因（见，例如，W098/24893、W0/9634096、W0/9633735、和 W0/9110741，Jakobovits 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :2551(1993) ;Jakobovits 等，Nature, 362 :255-258(1993) ;Bruggemann 等，Year in Immuno., 7 :33(1993) ;美国专利号 5,545,806、5,569,825、5,591,669（均为 GenPharm）；5,545,807；W0 97/17852、美国专利号 5,545,807；5,545,806；5,569,825；5,625,126；5,633,425；和 5,661,016，和 Marks 等，Bio/Technology, 10 :779-783(1992) ;Lonberg 等，Nature, 368 :856-859(1994) ;Morrison, Nature, 368 :812-813(1994) ;Fishwild 等，Nature Biotechnology, 14 :845-851(1996) ;Neuberger, Nature Biotechnology, 14 :826(1996) ;和 Lonberg 和 Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13 :65-93(1995)。

[0068] 本文的单克隆抗体包括“嵌合”抗体以及此类抗体的片段（只要它们显示了所需的生物学活性），所述嵌合抗体中一部分重和 / 或轻链与来自特定的物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中对应的序列相同或同源的，而链剩余部分与来自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中对应的序列相同或同源的（见美国专利号 4,816,567；和 Morrison 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 :6851-6855(1984)）。本文感兴趣的嵌合抗体包括“灵长类源化”的抗体，所述抗体包括来自非人灵长类（例如 Old World Monkey, Ape 等）的可变结构域抗原结合序列和人恒定区序列。

[0069] “完整”的抗体包括抗原结合位点以及 C_L 和至少重链恒定结构域，CH1、CH2 和 CH3。恒定结构域可为天然序列恒定结构域（例如人天然序列恒定结构域）或其氨基酸序列变体。优选地，完整的抗体具有一个或多个效应子功能。

[0070] “抗体片段”包括完整抗体的一部分，优选完整抗体的抗原结合或可变区。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、和 Fv 片段；双抗体；线型抗体（见美国专利号 5,641,870，实施例 2；Zapata 等，Protein Eng. 8(10) :1057-1062[1995]）；单链抗体分子；和从抗体片段形成的多特异性抗体。在优选的实施方案中，片段是“功能性的，”即定性地保留对应的完整抗体结合靶 IL-17A 和 IL-17F 多肽的能力，并且如果完整抗体也抑制 IL-17A/F 生物学活性或功能，也定性地保留此类抑制性质。定性保留意为在类型上维持活性，但是结合亲和力和 / 或活性的程度可不同。

[0071] 木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段，称作“Fab”片段，和残余的“Fc”片段，名称反映出容易结晶的能力。Fab 片段由完整的 L 链和 H 链的可变区结构域 (V_H)，和一个重链的第一个恒定结构域 (C_{H1}) 组成。每一 Fab 片段在抗原结合方面是单价的，即它具有单一的抗原结合位点。胃蛋白酶处理抗体生成单一的大 F(ab')₂ 片段，所述片段大略地对应于 2 个二硫化物连接的具有二价抗原结合活性的 Fab 片段并且仍然能够交联抗原。Fab' 片段与 Fab 片段不同在于在 C_{H1} 结构域羧基末端具有额外几个残基，包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。Fab' -SH 是 Fab' 本文的名称，其中恒定结构域的一个或多个半胱氨酸残基带有游离的硫醇基。最初生产的 F(ab')₂ 抗体片段是之间具有铰链半胱氨酸的 Fab' 片段对。抗体片段的其他化学偶联剂也是已知的。

[0072] Fc 片段包括通过二硫化物保持在一起的两条 H 链的羧基端部分。抗体的效应子功能由 Fc 区中的序列决定，所述区也是在某些细胞类型上发现的 Fc 受体 (FcR) 识别的部分。

[0073] “Fv”是包括完整抗原识别和结合位点的最小的抗体片段。此片段由紧密非共价结合的一个重和一个轻链可变区结构域的二聚体组成。这 2 个结构域的折叠产生了 6 个高变

环(H和L链各自3个环),所述高变环提供了抗原结合的氨基酸残基并且给予抗体抗原结合特异性。然而,甚至单一可变结构域(或仅仅包括3个抗原特异的CDR的一半Fv)具有识别和结合抗原的能力,尽管比完整的结合位点亲和力较低。

[0074] 也缩写作“sFv”或“scFv”的“单链Fv”是包括 V_H 和 V_L 抗体结构域的抗体片段,所述 V_H 和 V_L 抗体结构域被连接成单一多肽链。优选地,sFv多肽还包括 V_H 和 V_L 结构域之间的多肽接头,所述多肽接头使sFv能够形成抗原结合所需要的结构。sFv的综述参见Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 113卷, Rosenberg和Moore编, Springer-Verlag, New York, 第269-315页(1994); Borrebaeck 1995, *infra*。

[0075] 术语“双抗体”指通过用 V_H 和 V_L 结构域之间的短接头(约5-10个残基)构建sFv片段(见前述段落)制备的小抗体片段,从而达成V结构域的链间而非链内配对,产生双价片段,即具有2个抗原结合位点的片段。双特异性双抗体是两个“交换”的sFv片段的异源二聚体,所述异源二聚体中两个抗体的 V_H 和 V_L 结构域存在于不同的多肽链上。双抗体更全面地描述于,例如,EP 404,097; WO 93/11161; 和 Hollinger等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993)中。

[0076] 非人(例如啮齿动物)抗体的“人源化的”形式为嵌合抗体,所述嵌合抗体包括来自非人抗体的最小序列。对于绝大部分,人源化的抗体为人免疫球蛋白(受体抗体),所述免疫球蛋白中来自受体的高变区的残基被来自非人物种(供体抗体)(例如具有所需的抗体特异性、亲和力、和能力的小鼠、大鼠、兔或非人灵长动物)高变区的残基替代。在一些情况下,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基被对应的非人残基替代。另外地,人源化的抗体可包括在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步精修抗体性能。一般而言,人源化的抗体将包括基本上全部的至少一个,和一般地两个可变结构域,所述可变结构域中高变环的全部或基本全部对应于非人免疫球蛋白的那些,并且FR的全部或基本全部是人免疫球蛋白序列的那些。任选地人源化的抗体也将包括免疫球蛋白恒定区(Fc)(一般地人免疫球蛋白的恒定区)的至少一部分。其他细节见 Jones等人, *Nature* 321:522-525(1986); Riechmann等, *Nature* 332:323-329(1988); 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596(1992)。

[0077] 术语“多特异性抗体”以最广泛的意义使用并且特别地覆盖包括重链可变结构域(V_H)和轻链可变结构域(V_L)的抗体,其中 V_HV_L 单元具有多表位特异性(即,能够结合在一个生物分子上的两个不同表位或不同生物分子上的每一表位)。此类多特异性抗体包括但不限于全长抗体、具有2个或更多的 V_L 和 V_H 结构域的抗体、抗体片段例如Fab、Fv、dsFv、scFv、双抗体、双特异性抗体和三抗体、已经被共价或非共价连接的抗体片段。

[0078] “多表位特异性”指特异地与在相同或不同靶上的2个或多个不同表位结合的能力。

[0079] “单特异性”指仅结合一个表位的能力。根据一个实施方案IgG1形式的多特异性抗体以亲和力 $5\mu M$ 至 $0.001pM$ 、 $3\mu M$ 至 $0.001pM$ 、 $1\mu M$ 至 $0.001pM$ 、 $0.5\mu M$ 至 $0.001pM$ 或 $0.1\mu M$ 至 $0.001pM$ 与每一表位结合。

[0080] “交叉反应抗体”是识别在多于一个抗原上的相同或相似表位的抗体。因此,本发明的交叉反应抗体识别存在于IL-17A和IL-17F上的相同的或相似的表位。在特别的实施方案中,交叉反应抗体使用相同或基本相同的互补位以和IL-17A和IL-17F结合。优选地,

本文的交叉反应抗体也阻断 IL-17A 和 IL-17F 功能（活性）。

[0081] 本文使用术语“互补位”指与靶抗原结合的抗体的一部分。

[0082] “物种依赖型抗体”例如，哺乳动物的抗 IL-17A/F 抗体，对来自第一个哺乳动物物种的抗原比对来自另一个哺乳动物物种的上述抗原的同源物具有更强的结合亲和力。通常地，物种依赖型抗体与人抗原“特异地结合”（即，结合亲和力（Kd）值不多于约 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 、优选地不多于约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 并且最优选地不多于约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ），但是对来自另一个非人哺乳动物物种的抗原的同源物的结合亲和力，比它的对人抗原的结合亲和力弱至少约 50 倍、或至少约 500 倍、或至少约 1000 倍。

[0083] 与感兴趣的抗原“结合”的抗体是以充分的亲和力与抗原结合，并且不显著地和其他蛋白质交叉反应的抗体，所述充分的亲和力使得抗体在靶向表达抗原的细胞或组织中作为诊断和 / 或治疗活性剂是有用的。在此类实施方案中，如通过荧光激活细胞分选术（FACS）分析或放射免疫沉淀法（RIA）所确定的，抗体与“非靶向”蛋白质结合的程度将少于抗体与它的特定的靶蛋白质结合的约 10%。关于抗体与靶分子的结合，术语“特异性结合”或“特异地结合”特定多肽或在特定多肽靶上的表位或针对其“特异性的”意为与非特异性相互作用可测量地不同的结合。例如，通过确定分子的结合与对照分子的结合对比，能够测量特异性结合，所述对照分子一般为不具有结合活性的相似结构的分子。例如，通过与和靶相似的对照分子（例如，过量的非标记靶）竞争能够确定特异性结合。在这个情况下，如果标记的靶与探针的结合被过量的非标记靶竞争性地抑制了，则指示了特异性结合。如此处所用，例如，能够通过对靶的 Kd 至少为约 10^{-4}M ，备选地至少约 10^{-5}M ，备选地至少约 10^{-6}M ，备选地至少约 10^{-7}M ，备选地至少约 10^{-8}M ，备选地至少约 10^{-9}M ，备选地至少约 10^{-10}M ，备选地至少约 10^{-11}M ，备选地至少约 10^{-12}M 或更大的分子表示术语“特异性结合”或“特异地结合”特定多肽或在特定多肽靶上的表位或针对其“特异性的”。在一个实施方案中，术语“特异性结合”指下述结合，所述结合中分子与特定多肽或在特定多肽上的表位结合，基本上不与任何其他多肽或多肽表位结合。在优选的实施方案中，特异性结合亲和力为至少约 10^{-10}M 。

[0084] 抗体“效应子功能”指那些由抗体 Fc 区（天然序列 Fc 区或氨基酸序列变体 Fc 区）引起的生物活性，并且随抗体同种型变化。抗体作用或功能的实例包括：C1q 结合和补体依赖性细胞毒作用；Fc 受体结合；依赖抗体的细胞毒性（ADCC）；吞噬作用；细胞表面受体（例如，B 细胞受体）的负调节；和 B 细胞活化。

[0085] “依赖抗体的细胞毒性”或“ADCC”指细胞毒性的形式，其中分泌的 Ig 结合到存在于某些细胞毒素细胞（例如，天然杀伤（NK）细胞、嗜中性粒细胞、和巨噬细胞）上的 Fc 受体上，使得这些细胞毒素的效应细胞特异地与带有抗原的靶细胞结合并且随后用细胞毒素杀死靶细胞。抗体“武装”细胞毒素细胞并且对于此类杀伤是绝对需要的。介导 ADCC、NK 细胞的初级细胞只表达 Fc γ RI，而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。在造血细胞上表达 FcR 总结于 Ravetch 和 Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9 :457-92(1991) 的第 464 页表格 3 中。可实施例如在美国专利号 5,500,362 或 5,821,337 中描述的体外 ADCC 测定法以评价感兴趣的分子的 ADCC 活性。对此类测定法有用的效应细胞包括外周血单核细胞（PMBC）和天然杀伤（NK）细胞。备选地，或额外地，可体内评价感兴趣分子的 ADCC 活性，例如，在如 Clynes 等 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95 :652-656(1998) 中公开的动物模型中。

[0086] “Fc 受体”或“FcR”描述与抗体的 Fc 区结合的受体。优选的 FcR 为天然序

列的人 FcR。此外,优选的 FcR 结合 IgG 抗体 (γ 受体) 并且包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和可变剪接形式。Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA(“活化受体”)和 Fc γ RIIB(“抑制受体”),所述 Fc γ RIIA 和 Fc γ RIIB 具有主要在其细胞质结构域不同的相似的氨基酸序列。活化受体 Fc γ RIIA 在它的细胞质结构域中包括基于免疫受体酪氨酸的活化基序 (ITAM)。抑制受体 Fc γ RIIB 在它的细胞质结构域中包括基于免疫受体酪氨酸的抑制基序 (ITIM)。(见综述 M. inDaeron, Annu. Rev. Immunol. 15 :203-234(1997))。FcR 在综述 Ravetch 和 Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9 :457-492(1991);Cape1 等, Immunomethods 4 :25-34(1994);和 de Haas 等, J. Lab. Clin. Med. 126 :330-41(1995) 中。其他 FcR,包括那些在未来将被鉴定的,包括于本文术语“FcR”之内。术语也包括新生儿受体, FcRn,所述受体负责将母体 IgG 传递到胎儿 (Guyer 等, J. Immunol. 117 :587(1976) 和 Kim 等, J. Immunol. 24 :249(1994))。

[0087] “人效应细胞”是表达一个或多个 FcR 并且实施效应功能的白细胞。优选地,细胞至少表达 Fc γ RIII 和实施 ADCC 效应子功能。介导 ADCC 的人白细胞的实例包括外周血单核细胞 (PBMC)、天然杀伤 (NK) 细胞、单核细胞、细胞毒性 T 细胞和嗜中性粒细胞;优选 PMBC 和 NK 细胞。从天然源可分离效应细胞,例如从血液。

[0088] “依赖补体的细胞毒性”或“CDC”指补体存在情况下靶细胞溶解。通过补体系统的第一个成分 (C1q) 与 (适当亚类的) 抗体结合起始经典补体途径的活化,所述抗体结合于它们的关联抗原。可实施例如在 Gazzano-Santoro 等, Immunol. Methods 202 :163(1996) 中描述的 CDC 测定法以评价补体活化。

[0089] 本文使用术语“中和”、和“中和活性”意为,例如,阻断、阻止、降低、对抗 IL-17(例如 IL-17A 和 / 或 IL-17F) 的活性或通过任何机制使 IL-17(例如 IL-17A 和 / 或 IL-17F) 失效。因此,拮抗物可阻止对 IL-17 活化必要的结合事件。

[0090] “中和抗体”意为本文定义的抗体分子能够阻断或显著地降低 IL-17(包括 IL-17A 和 / 或 IL-17F) 的效应子功能。例如,中和抗体可抑制或降低 IL-17(例如 IL-17A 和 / 或 IL-17F) 与 IL-17 受体 (例如 IL-17Rc) 相互作用的能力。备选地,中和抗体可抑制或降低 IL-17 阻断 IL-17 受体信号传导途径的能力。在 IL-17 活性的免疫测定法中,中和抗体也可免疫特异性地与 IL-17 结合。本发明的“中和抗体”的特点是它在体外和体内情况中都可以维持它的功能活性。

[0091] B. 详述

[0092] 1. 治疗用途

[0093] 胰岛素抗性是指胰岛素存在时产生低于正常的生物学应答的病况。在临床上,当面对正常或升高的胰岛素水平时正常或升高的血葡萄糖水平持续存在,此时胰岛素抗性存在。它本质上代表糖原合成抑制,通过所述合成抑制基底或胰岛素刺激的糖原合成,或二者都被降低到正常水平以下。胰岛素抗性在 2 型糖尿病中起了重要的作用,如下述事实所表明的,有时能够通过饮食或重量减少来逆转 2 型糖尿病中存在的高血糖症,其中所述饮食或重量减少足以明显地恢复外周组织对胰岛素的敏感性。

[0094] 本发明涉及通过施用 IL-17A 和 / 或 IL-17F 拮抗物来治疗胰岛素抗性或 2 型糖尿病法。如较早所讨论的,IL-17A 和 / 或 IL-17F 拮抗物可为任何分子,所述分子通过任何方法 (取决于受治疗的适应证) 干扰 IL-17A 和 / 或 IL-17F 的功能,或阻断或中和 IL-17A

和 / 或 F 的相关活性。它可阻止 IL-17A 和 / 或 IL-17F 与一个或多个它的受体 (特别是 IL-17Rc) 之间的相互作用。此类活性剂以多种方法达成此效果。例如,中和 IL-17A 和 / 或 IL-17F 活性的拮抗物类别将以充分的亲和力和特异性与 IL-17A 和 / 或 IL-17F、或 IL-17A 和 / 或 IL-17F 的受体,特别地 IL-17Rc,结合以干扰 IL-17A 和 / 或 IL-17F。

[0095] 2. 施用和配制

[0096] 可通过任何适宜的途径施用 IL-17 拮抗物,包括胃肠外途径施用例如,但不限于,静脉内的 (IV)、肌内的 (IM)、皮下的 (SC)、和腹膜内的 (IP),以及经皮肤的、口的、舌下的、直肠内的、鼻内的、和吸入剂途径。IV、IM、SC,和 IP 施用可通过推注或输注,并且对于 SC,也可通过缓释植入装置,包括但不限于泵、缓释制剂和机械装置。优选地,施用时全身的。

[0097] 一个特别优选的施用 IL-17 拮抗物的方法是通过皮下输注,特别地使用按剂量的输注装置,例如泵。此类泵能够为可重复使用的或者可处理的,并为可植入的或外型上可固定的。对此目的使用的有用的药疗法输注泵包括,例如,公开在美国专利号 5,637,095 ; 5,569,186 ;和 5,527,307 中的泵。从此类装置能够连续地,或间歇地施用组合物。

[0098] 适合贮藏的 IL-17 拮抗物的治疗制剂包括下述混合物,所述混合物为具有要求的纯度程度的拮抗物和可药用的载体的、赋形剂或稳定剂 (Remington' s Pharmaceutical Sciences 第 16 版,Osol, A. Ed. (1980)),以冻干的制剂或水溶液的形式。在使用的剂量和浓度下,可接受的载体、赋形剂、或稳定剂对受体是无毒的,并且包括缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐,和其他有机酸 ;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸 ;防腐剂 (例如氯化十八烷基二甲基苄基铵 ;氯化六烃季铵 ;苯扎氯铵、苄索氯铵 ;苯酚、丁醇或苯甲醇 ;烷基对羟基苯甲酸酯例如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯 ;儿茶酚 ;间苯二酚 ;环己醇 ;3- 戊醇 ;和间甲酚) ;低分子量 (少于约 10 个残基) 多肽 ;蛋白质,例如血清清蛋白、明胶,或免疫球蛋白 ;亲水聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮 ;氨基酸例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸,或赖氨酸 ;单糖、二糖,和其他碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖,或糊精 ;螯合剂例如 EDTA ;糖例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇 ;成盐反荷离子例如钠 ;金属复合体 (例如锌 - 蛋白质复合体) ;和 / 或非离子表面活性剂例如 TWEENTTM、PLURONICSTM 或聚乙二醇 (PEG)。优选的冻干的抗 IL-17 抗体制剂描述于 WO 97/04801 中。这些组合物包括 IL-17 拮抗物,所述拮抗物以重量计包括从约 0.1 至 90% 的活性拮抗物,优选地以可溶的形式,并且更一般地从约 10 到 30%。

[0099] 活性成分也可被包埋在微胶囊中,在胶体药物递送系统 (例如,脂质体、清蛋白微球体、微乳状液、纳米颗粒和纳米胶囊) 或粗滴乳状液中,例如通过凝聚技术或界面聚合作用制备所述微胶囊 (例如分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚 - (甲基丙烯酸甲酯) 微胶囊)。此类技术公开于 Remington' s Pharmaceutical Sciences,上文中。

[0100] IL-17A 和 / 或 IL-17F 拮抗物,例如本文公开的抗 IL-17 抗体也可配置为免疫脂质体。通过本领域已知方法制备包括抗体的脂质体,例如在 Epstein 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 :3688 (1985) ;Hwang 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 :4030 (1980) ;美国专利号 4,485,045 和 4,544,545 ;以及公开于 1997 年 10 月 23 日的 W097/38731 中描述的。具有增强的循环时间的脂质体公开于美国专利号 5,013,556 中。

[0101] 特别地,通过反相蒸发法用包括磷酸卵磷脂、胆固醇和 PEG 衍生化的磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的脂类组合物能够生成有用的脂质体。将脂质体挤压通过确定孔径的滤器以

产生具有所需直径的脂质体。能够如 Martin 等, J. Biol. Chem., 257:286-288(1982) 中描述的通过二硫互换反应将本发明抗体的 Fab' 片段与脂质体缀合。

[0102] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的适当的实例包括含有抗体的固态疏水聚合物的半渗透基质, 所述基质为成形的物品形式, 例如, 薄膜, 或微胶囊。持续释放基质的实例包括聚脂、水凝胶 (例如, 聚 (2- 羟乙基甲基丙烯酸酯), 或聚 (乙烯醇))、聚交酯 (美国专利号 3, 773, 919)、L- 谷氨酸和 γ 乙基-L- 谷氨酸盐的共聚物、不可降解乙烯醋酸乙烯酯、可降解乳酸-乙醇酸共聚物例如 LUPRON DEPOT™ (由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射的微球体), 和聚-D-(-)-3- 羟基丁酸。

[0103] 能够将任何特定的拮抗物与载体蛋白质结合以提高治疗拮抗物的血清半寿期。例如, 如美国专利号 5, 116, 964 中描述的, 能够获得针对每一特定的 IL-17 拮抗物或其拮抗部分的可溶的免疫球蛋白嵌合体 (例如本文描述的)。通过 IgG 结合蛋白质 A- 琼脂糖凝胶色谱简单地纯化免疫球蛋白嵌合体。嵌合体具有形成免疫球蛋白样二聚体的能力, 所述免疫球蛋白样二聚体具有相伴的较高的抗体亲抗原性和血清半寿期。

[0104] 用于体内施用的制剂必须是无菌的。这由通过无菌过滤膜过滤可以容易地实现。

[0105] 对于特定适应证的治疗所必需的, 本文的制剂也可包括多于一种的活性化合物, 优选地为那些彼此不会不利影响的具有互补活性的。也能够单独地对受治疗的哺乳动物施用此类活性化合物。

[0106] 例如, 可能需要进一步对那些适应证提供胰岛素抗性治疗活性剂。此外, 未能对节食和重量降低反应的 2 型糖尿病患者可对用磺酰脲连同 IL-17 拮抗物一起的治疗反应。磺酰脲药物类别包括醋酸己脲, 氯磺丙脲, 妥拉磺脲, 甲苯磺丁脲, 格列本脲, 格列波脲, 格列齐特, 格列吡嗪, 格列喹酮和格列噻啉。为此目的的其他活性剂包括自身免疫试剂、胰岛素致敏物, 例如格列酮家族的化合物, 包括那些描述于美国专利号 5, 753, 681 中的, 例如曲格列酮, 吡格列酮, 恩格列酮, 和相关的化合物、胰岛素受体酪氨酸激酶抑制剂拮抗物 (美国专利号 5, 939, 269 和 5, 939, 269)、IGF-1/IGFBP-3 复合体 (美国专利号 6, 040, 292)、TNF- α 功能拮抗物 (美国专利号 6, 015, 558)、生长激素释放剂 (美国专利号 5, 939, 387), 和胰岛淀粉样多肽抗体 (美国专利号 5, 942, 227)。其他能够使用的化合物包括胰岛素 (一种或多种不同的胰岛素)、胰岛素模拟物例如小分子胰岛素、如上注明的胰岛素类似物或其有生理学活性的片段、如上注明的胰岛素相关肽, 或其类似物或片段。在以上定义中进一步详细说明活性剂。

[0107] 为了治疗低胰岛素血症, 例如, 可与 IL-17 拮抗物一起或分开施用胰岛素。

[0108] 以对于预期目的有效的量, 通常少于如果他们被单独施用没有 IL-17 拮抗物时所施用的量, 此类额外的分子适宜地存在或被组合施用。如果将它们一起配制, 可以根据例如, 适应证类型、受试者、受试者年龄和体重、当前临床状态、施用时间、剂量形式、施用方法, 等所确定的量配制它们。例如, 优选地以约 0.0001 到 10,000 重量份相对于本文的 IL-17 拮抗物的 1 重量份的比例使用相伴药物。

[0109] IL-17 拮抗物与胰岛素组合使用使得与单独施用胰岛素时的剂量相比胰岛素剂量降低。因此, 血管并发症和诱发低血糖的危险性低, 所述血管并发症和诱发低血糖都可为大量胰岛素施用具有的问题。例如对成体糖尿病患者施用胰岛素 (体重约 50kg), 每天剂量通常为约 10 到 100U (单位), 优选地 10 到 80U, 但是由医生决定此剂量可更少。例如对相同

类型的患者施用胰岛素分泌增强剂,每天剂量优选地为约 0.1 到 1000mg,更优选地约 1 到 100mg。例如对相同类型的患者使用双胍类,每天剂量优选地为约 10 到 2500mg,更优选地约 100 到 1000mg。例如对相同类型的患者施用 α -葡萄糖苷酶抑制物,每天剂量优选地为约 0.1 到 400mg,更优选地约 0.6 到 300mg。以优选地约 0.1 到 2500mg,更优选地约 0.5 到 1000mg 的剂量,对此类患者施用 ergoset、普兰林肽、来普汀、BAY-27-9955,或 T-1095 能够有效。全部以上剂量能够为一天一次至数次施用。

[0110] 也可和胰岛素抗性的适宜的非药物治疗法(例如胰移植)一起施用 IL-17 拮抗物。

[0111] 由医生根据相关的情况,包括哺乳动物的病况、拮抗物类型、适应证类型,和选择的施用途径决定对胰岛素抗性或低胰岛素血症的哺乳动物施用的拮抗物的剂量。剂量优选地为在充分低的水平使得不引起任何显著程度的重量增加,并且医生能够确定该水平。批准的治疗人 2 型糖尿病的格列酮(罗格列酮/文迪雅和吡格列酮/艾可拓)引起一些重量增加,然而尽管该副作用仍使用它们因为由它们的治疗指数已经证明它们是有益的。本文提出的剂量范围并不意为以任何方式限制本发明的范围。通过以上因素确定针对本发明目的的对低胰岛素血症和胰岛素抗性的“治疗有效”量,但是一般地为约 0.01 到 100mg/kg 体重/天。优选的剂量为约 0.1-50mg/kg/天,更优选地约 0.1 到 25mg/kg/天。更优选地,当每天施用 IL-17 拮抗物时,人的静脉内或肌内的剂量为约 0.3 到 10mg/kg 体重每天,更优选地,约 0.5 到 5mg/kg。对于皮下的施用,优选地剂量为大于静脉内或肌内给药的治疗等价的剂量。优选地,每日人的皮下的剂量为约 0.3 至 20mg/kg,对于这两个适应证更优选地约 0.5 到 5mg/kg

[0112] 本发明预期多种给药方案。本发明包含连续的给药方案,在所述方案中定期地(每天、每周,或每月,取决于剂量和给药形式)施用 IL-17 拮抗物,没有实质性中断。优选的连续给药方案包括每天连续的输注(其中每一天输注 IL-17 拮抗物)和连续的推注施用方案,其中至少每天一次通过推注注射或吸入剂或鼻内的途径施用 IL-17 拮抗物。本发明也包含不连续的给药方案。不连续的施用方案的准确参数将根据制剂、递送方法,和受治疗的哺乳动物的临床需要变化。例如,如果由输注施用 IL-17 拮抗物,施用方案可包括第一个施用阶段,接着是第二施用阶段,在所述第二阶段中施用不多于,等于或少于第一阶段的 IL-17 拮抗物。

[0113] 在通过推注注射施用时,特别地缓释制剂的推注注射的情况下,给药方案也可连续的(其中每天施用 IL-17 拮抗物)或可为不连续的(具有上述的第一和第二阶段)。

[0114] 通过任何方法连续的和间断的施用方案也包括给药方案,在所述给药方案中贯穿第一阶段调节剂量,使得,例如,在第一阶段开始时,剂量低而直到第一阶段结束时剂量增加,剂量初始高而在第一阶段期间降低,剂量初始低,增加至峰水平,然后在第一阶段结束时降低,和其任意组合。

[0115] 能够通过多种本领域已知的测定法测量施用 IL-17 拮抗物在胰岛素抗性上的作用。最常见地,糖尿病作用减轻将导致改善的糖血控制(如通过连续的血葡萄糖测试所测量的)、维持良好糖血控制所需的胰岛素减少、糖基化的血红蛋白减少、高度糖基化终产物(AGE)血液水平的降低、减少的“黎明现象”、减少的酮症酸中毒,和改善的脂类谱。备选地,如降低的血葡萄糖水平、降低的胰岛素需求、减少的糖基化的血红蛋白和血 AGE、减少的血管、肾脏、神经和视网膜并发症、减少的怀孕并发症,和改善的脂类谱所指示的,施用 IL-17

拮抗物能够导致糖尿病症状的稳定。

[0116] 通过确定在受试者静脉血浆中葡萄糖或Hb(血红蛋白)A_{1c}在施用之前和之后的浓度,并然后对比获得的施用之前和施用之后的浓度,能够评价IL-17拮抗物的血糖降低作用。HbA_{1c}意为糖基化血红蛋白,并且响应血葡萄糖浓度逐渐地生产。因此,HbA_{1c}被认为是重要的血糖控制指数,它不轻易受糖尿病患者中迅速的血糖变化影响。

[0117] 显示了治疗低胰岛素血症的证据,例如,通过增加患者中胰岛素的循环水平。

[0118] 通常,肌肉修复和再生的用量为约0.01到100mg/kg体重,更优选地1到10mg/kg,取决于患者的病况、期望的肌肉修复的具体类型,等。给药方案与此领域医生使用的标准方案一致。通过本领域公知的多种测量测试显示了肌肉修复或再生的证据,所述测试包括肌肉细胞增殖和分化的测定法和聚合酶链反应测试(见,例如,Best等,J. Orthop. Res.,19:565-572(2001),这提供了在愈合兔骨骼肌中使用定量反转录聚合酶链反应,成肌细胞和成纤维细胞衍生的基因产物的mRNA水平变化的分析)。

[0119] 3. 制备品 (article of manufacture) 和试剂盒

[0120] 本发明也提供了治疗胰岛素抗性和低胰岛素血症,以及肌肉修复和再生的试剂盒。本发明的试剂盒包括IL-17拮抗物(优选地为抗体)的一个或多个容器,与一套说明书组合,一般地为书写的说明书,涉及IL-17拮抗物治疗胰岛素抗性或低胰岛素血症,或任何其他与胰岛素抗性相关联的靶疾病的使用和剂量。试剂盒包括的说明书一般包括治疗靶疾病(例如胰岛素抗性或低胰岛素血症疾病)的剂量、给药方案,和施用途信息。IL-17拮抗物的容器可为单位剂量、大包装(例如,多剂包装)、或亚单位剂。

[0121] 制备品包括容器和在容器上或与容器相关联的标签或药品说明书。适合的容器包括,例如,瓶、小瓶、注射器,等。可由多种材料例如玻璃或塑料构成容器。容器装有对治疗病况有效的组合物并且可具有无菌进入孔(例如容器可为静脉溶液袋或具有由皮下注射针头可刺破的塞子的小瓶)。在组合物中至少一个有活性的活性剂为本发明的IL-17拮抗物。标签或药品说明书表明组合物用于治疗特定的情况。标签或药品说明书还将包括对患者施用抗体组合物的说明书。也预期包括本文描述的包含组合疗法的制备品和试剂盒。

[0122] 药品说明书指通常地包括在治疗产品商业包装中的说明书,所述说明书包括适应证、用途、剂量、施用、禁忌证和/或涉及此类治疗产品用途的告诫事项的信息。

[0123] 额外地,制备品可还包括第二个容器,所述第二个容器包括可药用的缓冲剂,例如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸缓冲盐溶液、Ringer's溶液和葡萄糖溶液。也可还包括从商业和使用角度所需要的其他物质,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头,和注射器。

[0124] 4. 抗体制备

[0125] 单克隆抗体

[0126] 使用首先由Kohler等,Nature,256:495(1975)描述的杂交瘤方法或通过重组DNA方法(美国专利号4,816,567)可制备单克隆抗体。在杂交瘤方法中,如上文描述地使小鼠或其他适当的宿主动物(例如仓鼠或猕猴)免疫以引出淋巴细胞,所述淋巴细胞生产或能够生产与免疫接种使用的蛋白质特异性地结合的抗体。备选地,可体外免疫淋巴细胞。然后使用合适的融合剂(例如聚乙二醇)将淋巴细胞和骨髓瘤细胞融合,以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第59-103页(Academic Press, 1986))。

[0127] 在合适的培养基中接种和生长如此制备的杂交瘤细胞,所述培养基优选地包括一种或多种抑制未融合的,亲代骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如,如果亲代骨髓瘤细胞缺少次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT 或 HPRT),杂交瘤的培养基通常将包括次黄嘌呤、氨基蝶呤,和胸苷(HAT 培养基),所述物质阻止 HGPRT- 缺陷的细胞的生长。

[0128] 优选的骨髓瘤细胞是那些有效地融合、支持由选择的抗体生产细胞稳定高水平的生产抗体、并且对培养基(例如 HAT 培养基)敏感的骨髓瘤细胞。在这些之中,优选的骨髓瘤细胞系为鼠骨髓瘤系,例如那些来自 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. 美国可获得的 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的,和从 American Type Culture Collection, Rockville, Md. 美国可获得的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞的鼠骨髓瘤系。也已经描述了人骨髓瘤和小鼠-人异型骨髓瘤细胞系用于人单克隆抗体生产(Kozbor, J. Immunol., 133 :3001(1984); Brodeur 等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 第 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0129] 就生产针对抗原的单克隆抗体来测定培养基,其中杂交瘤细胞在所述培养基中生长。优选地,通过免疫沉淀或通过体外结合测定法(例如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)确定由杂交瘤细胞生产的单克隆抗体的结合特异性。

[0130] 在鉴定生产具有需要的特异性、亲和力,和/或活性的抗体的杂交瘤细胞之后,通过限制性的稀释流程亚克隆克隆并且由标准的方法生长克隆(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第 59-103 页 (Academic Press, 1986))。适合此目的的培养基包括,例如, D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。此外可在动物中体内将杂交瘤细胞生长为腹水瘤。

[0131] 通过传统的免疫球蛋白纯化方法(例如,例如蛋白质 A- 琼脂糖凝胶、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析,或亲和色谱)将由亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基、腹水流体,或血清适当地分离。

[0132] 使用传统方法(例如,通过使用寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针能够与编码单克隆抗体重和轻链的基因特异性地结合)容易地分离和测序编码单克隆抗体的 DNA。杂交瘤细胞作为此类 DNA 的优选源。一旦分离,可将 DNA 置于表达载体中,随后将所述表达载体转染进入不生产免疫球蛋白蛋白质的宿主细胞(例如大肠杆菌细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、或骨髓瘤细胞)以获取在重组宿主细胞中单克隆抗体的合成。下文将描述抗体重组生产的更多细节。

[0133] 在另一个实施方案中,能够从抗体噬菌体文库分离抗体或抗体片段,所述文库由使用 McCafferty 等, Nature, 348 :552-554(1990) 中描述的技术生成。

[0134] Clackson 等, Nature, 352 :624-628(1991) 和 Marks 等, J. Mol. Biol., 222 :581-597(1991) 描述使用噬菌体文库分别分离鼠和人抗体。随后的出版物描述通过链改组(Marks 等, Bio/Technology, 10 :779-783(1992)), 以及作为构建非常大噬菌体文库策略的组合感染和体内重组((Waterhouse 等, Nuc. Acids. Res., 21 :2265-2266(1993))) 生产高亲和力(nM 范围)人抗体。因此,这些技术是用于分离单克隆抗体的传统的单克隆抗体杂交瘤技术的可行备选。

[0135] 例如,通过以人重和轻链恒定结构域的编码序列替换同源的鼠序列(美国专利号 4,816,567; Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 :6851(1984)), 或通过与免疫球蛋

白编码序列共价结合也可修饰 DNA,所述编码序列为非免疫球蛋白多肽编码序列的全部或部分。

[0136] 通常,用此类非免疫球蛋白多肽替换抗体的恒定结构域,或用他们替换抗体的一个抗原结合位点的可变结构域,以制备嵌合的二价抗体,所述抗体包括一个对抗原具有特异性的抗原结合位点和另一个对不同的抗原具有特异性的抗原结合位点。

[0137] 人源化的和人抗体

[0138] 人源化的抗体具有从非人源引入的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入”残基,所述残基通常取自“输入”可变结构域。按照 Winter 和同事的方法 (Jones 等, *Nature*, 321 :522-525 (1986) ;Riechmann 等, *Nature*, 332 :323-327 (1988) ; Verhoeyen 等, *Science*, 239 :1534-1536 (1988)), 通过用啮齿动物 CDR 或 CDR 序列替换对应的人抗体的序列,能够基本上实施人源化。相应地,此类“人源化的”抗体为嵌合抗体 (美国专利号 4,816,567), 其中显著地少于完整的人可变结构域已经被来自非人物种的对序列替代。在实践中,通常人源化的抗体为人抗体,所述人抗体中一些 CDR 残基和可能地一些 FR 残基被来自啮齿动物抗体中类似位点的残基所替代。

[0139] 选择轻和重人可变结构域以用于制备人源化的抗体对于降低抗原性是非常重要的。根据所谓的“最适”方法,针对已知的人可变结构域序列的整个文库筛选啮齿动物抗体的可变结构域序列。随后接受最接近于啮齿动物的人序列作为人源化抗体的人框架 (FR) (Sims 等, *J. Immunol.*, 151 :2296 (1993) ;Chothia 等, *J. Mol. Biol.*, 196 :901 (1987))。另一个方法使用特定的框架,所述框架来自轻或重链的特定亚组的全部人抗体的共有序列。相同的框架可用于若干不同的人源化抗体 (Carter 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 :4285 (1992) ;Presta 等, *J. Immunol.*, 151 :2623 (1993))。

[0140] 人源化抗体时保留对抗原的高亲和力和其他有利的生物学性质也很重要。为了达到此目标,根据优选的方法,通过使用亲代和人源化序列的三维模型分析亲代序列和多种概念性的人源化产物的方法制备人源化的抗体。三维免疫球蛋白模型是常见可得的,并且为本领域技术人员熟知。计算机程序是可得的,所述程序说明并展示被选择的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构。检验这些展示物使得能够分析残基在候选免疫球蛋白序列发挥功能中可能的作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原能力的残基。用这种方法,能够选择 FR 残基并且从受体和输入序列合并 FR 残基以达到需要的抗体特征,例如对靶抗原增加的亲和力。通常而言,CDR 残基直接并且多数基本上涉及影响抗原结合。

[0141] 备选地,现在可能生产转基因动物 (例如,小鼠),所述转基因动物在免疫接种后缺乏内源免疫球蛋白生产时能够生产人抗体的全部所有组成成分。例如,已经描述了在嵌合和种系突变的小鼠中抗体重链连接区 (J. sub. H) 基因的纯合缺失导致内源抗体生产的完全抑制。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移入此类种系突变的小鼠中将导致抗原攻击时人抗体的生产。见,例如, Jakobovits 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 :2551 (1993) ;Jakobovits 等, *Nature*, 362 :255-258 (1993) ;Bruggermann 等, *Year in Immuno.*, 7 :33 (1993) ;和 Duchosal 等, *Nature* 355 :258 (1992)。人抗体也能够来自噬菌体展示文库 (Hoogenboom 等 *J. Mol. Biol.*, 227 :381 (1991) ;Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222 :581-597 (1991) ;Vaughan 等, *Nature Biotech* 14 :309 (1996))。以下还描述从抗体噬菌体展示文库生成抗体。

[0142] 抗体片段

[0143] 已经开发了生产抗体片段的多种技术。传统地,通过完整抗体的蛋白分解消化获得这些片段(见,例如,Morimoto等, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117(1992)和Brennan等, *Science*, 229:81(1985))。然而现在能够由重组宿主细胞直接生产这些片段。例如,能够从以上讨论的抗体噬菌体文库分离抗体片段。备选地,能够直接从大肠杆菌回收并且化学偶联 Fab' -SH 片段以形成 F(ab')₂ 片段(Carter等, *Bio/Technology* 10:163-167(1992))。在以下实例中描述的另一个实施方案中,通过使用亮氨酸拉链 GCN4 以促进 F(ab')₂ 分子组装,形成 F(ab')₂。根据另一个方法,从重组宿主细胞培养物能够直接分离 F(ab')₂ 片段。生产抗体片段的其他技术对技术人员将是显而易见的。在其他实施方案中,选择的抗体是单链 Fv 片段(scFv)。见 W0 93/16185。

[0144] 多特异性抗体

[0145] 多特异性抗体具有对至少两个不同表位的结合特异性,其中表位通常来自不同的抗原。尽管此类分子通常地仅与两个不同的表位结合(即双特异性抗体, BsAbs),本文使用此表达法时包括了具有额外特异性的抗体(例如三特异性抗体)。制备双特异性抗体的方法为本领域所知。全长双特异性抗体的传统生产基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两个链具有不同的特异性(Millstein等, *Nature*, 305:537-539(1983))。由于免疫球蛋白重和轻链的随机组合,这些杂交瘤(quadromas)生产潜在的10种不同抗体分子的混合物,所述混合物中只有一种具有正确的双特异性结构。正确分子的纯化相当繁琐,所述纯化通常由亲和色谱步骤完成,并且产物产量低。类似的流程公开在 W0 93/08829 和 Traunecker 等, *EMBOJ.*, 10:3655-3659(1991)中。根据不同的方法,将具有需要的结合特异性的抗体可变结构域(抗体-抗原结合位点)融合到免疫球蛋白恒定结构域序列。优选地,融合物具有免疫球蛋白重链恒定结构域,所述结构域包括至少部分的铰合部、CH2,和 CH3 区。优选使得包括轻链结合所需位点的第一重链恒定区(CH1)存在于至少一个融合物之中。将 DNA 插入分离的表达载体,并且共转染进入合适的宿主生物中,所述 DNA 编码免疫球蛋白重链融合物以及,如果是需要的,免疫球蛋白轻链。当在构建中使用的三个多肽链的不相等比例提供最佳的产量时,这为在实施方案中调整三个多肽片段的不定比例提供了巨大的灵活性。然而,当至少两个多肽链的等比例表达导致高产量或当比例没有特别的显著性时,可能在一个表达载体中插入两个或全部三个多肽链的编码序列。

[0146] 在此方法优选的实施方案中,双特异性抗体由在一个臂中的具有第一结合特异性的杂种免疫球蛋白重链,和在另一个臂中的杂种免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。发现这种不对称的结构促进从不需要的免疫球蛋白链组合中分离需要的双特异性化合物,因为免疫球蛋白轻链仅存在于双特异性分子中的一半提供了容易的分离方法。这个方法公开于 W0 94/04690 中。生成双特异性抗体的其他细节参见,例如 Suresh 等, *Methods in Enzymology*, 121:210(1986)。

[0147] 根据描述于 W096/27011 中的另一个方法,能够改造一对抗体分子之间的界面以最大化异源二聚体的百分数,从重组细胞培养物中回收所述异源二聚体。优选的界面包括至少部分抗体恒定结构域的 CH3 结构域。在此方法中,用更大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)取代来自第一个抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链。通过用较小的氨基酸(如丙氨酸或苏氨酸)取代大氨基酸侧链,在第二个抗体分子界面上制备补偿性的与大侧链具

有相同或类似尺寸的“腔”。这提供了异源二聚体产量比其他非需要终产物（例如同源二聚体）增加的机制。

[0148] 双特异性抗体包括交联的或“异源缀合物”抗体。例如，能够将异源缀合物中的一个抗体与抗生物素蛋白偶联，另一个与生物素偶联。例如，已经提出此类抗体将免疫系统细胞靶向非需要细胞（美国专利号 4,676,980），以及治疗 HIV 感染（WO 91/00360, WO 92/200373）。可使用任何合适的交联方法制备异源缀合物抗体。合适的交联剂为本领域公知，并且和一些交联技术一起公开于美国专利号 4,676,980 中。

[0149] 文献中也已经描述了从抗体片段生成双特异性抗体的技术。例如，使用化学连接能够制备双特异性抗体。Brennan 等，Science 229 :81 (1985) 描述了流程，其中完整的抗体被蛋白分解分隔生成 $F(ab')_2$ 片段。在二巯基络合剂亚砷酸钠存在的情况下还原这些片段以稳定附近的二巯基化物并且阻止分子间二硫化物形成。生成的 Fab' 片段随后被转化为硫代硝基苯甲酸酯 (TNB) 衍生物。通过用巯基乙胺还原，一个 $Fab' - TNB$ 衍生物随后被复原为 $Fab' -$ 巯基并且与等摩尔量的其他 $Fab' - TNB$ 衍生物混合以形成双特异性抗体。能够将生产的双特异性抗体用作选择性酶的固定化的活性剂。

[0150] 也能够直接从大肠杆菌回收 $Fab' - SH$ 片段，并且能够化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby 等，J. Exp. Med., 175 :217-225 (1992) 描述完全人源化的双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子的生产。每一 Fab' 片段被从大肠杆菌分离地分泌并且体外受直接化学偶联以形成双特异性抗体。

[0151] 已经描述了制备和直接从重组细胞培养物中分离双特异性抗体片段的多种技术。例如，使用亮氨酸拉链已经生产了双特异性抗体。Kostelny 等，J. Immunol., 148 (5) : 1547-1553 (1992)。通过基因融合将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽连接于两个不同抗体的 Fab' 部分。在铰链区还原抗体同源二聚体以形成单体并且随后再氧化以形成抗体异源二聚体。此方法也能够被用于抗体同源二聚体的生产。由 Hollinger 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :6444-6448 (1993) 描述的“双抗体”技术提供了制备双特异性抗体片段的备选的机制。片段包括通过接头连接于轻链可变结构域 (VL) 的重链可变结构域 (VH)，所述接头太短以至于无法容许在相同链上的两个结构域之间的配对。相应地，强迫一个片段的 VH 和 VL 结构域与另一个片段的互补的 VL 和 VH 结构域配对，因而形成两个抗原结合位点。也已经报道了通过使用单链 Fv (sFv) 二聚体制备双特异性抗体片段的另一个策略。见 Gruber 等，J. Immunol., 152 :5368 (1994)。

[0152] 预期具有多于两个效价的抗体。例如，能够制备三特异性抗体。Tuft 等 J. Immunol. 147 :60 (1991)。

[0153] 效应子功能工程

[0154] 就效应子功能修饰本发明的抗体以便增强抗体效力可能是需要的。例如可将半胱氨酸残基引入 Fc 区，从而容许链间二硫键在此区域内形成。因此生成的同源二聚体抗体可具有改善的内化能力和 / 或增加的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC)。见 Caron 等，J. Exp. Med. 176 :1191-1195 (1992) 和 Shopes, B. J. Immunol. 148 : 2918-2922 (1992)。也可使用如 Wolff 等 Cancer Research 53 :2560-2565 (1993) 中描述的异基双功能交联剂制备具有增强的抗肿瘤活性的同源二聚体抗体。备选地，能够改造具有双 Fc 区的抗体并因此可具有增强的补体溶解和 ADCC 能力。见 Stevenson 等 Anti-Cancer

Drug Design 3:219-230(1989)。

[0155] 抗体补救受体结合表位融合

[0156] 在本发明的某些实施方案中,使用抗体片段而不是完整抗体可能是需要的。在这种情况下,可能需要修饰抗体以增加其血清半寿期。这可以例如,通过将补救受体结合表位掺入抗体片段中(例如通过在抗体片段中的适当区域的突变或通过将表位掺入肽标签,所述标签随后与抗体片段末端或中间融合,例如,通过 DNA 或肽合成)来实现。

[0157] 补救受体结合表位优选地构成这样的区域,其中来自 Fc 结构域的一个或两个环的任何一个或多个氨基酸被转移到抗体片段的类似位置。甚至更优选地,来自 Fc 结构域的一个或两个环的三个或更多的残基被转移。仍然更优选地,表位取自(例如 IgG 的)Fc 区域的 CH2 结构域并且被转移到抗体的 CH1、CH3,或 V. sub. H 区,或多于一个此类区域。备选地,表位取自 Fc 区的 CH2 结构域并被转移到抗体片段的 CL 区或 / 和 VL 区。

[0158] 抗体的其他共价修饰

[0159] 抗体的共价修饰包括于本发明的范围之内。如果可行,通过化学合成或抗体的酶促或化学切割可制备它们。通过将抗体的靶向氨基酸残基与有机衍生剂反应,将抗体的其他类型的共价修饰引入分子中,所述有机衍生剂能够与选择的侧链或 N 或 C 末端残基反应。共价修饰的实例描述于美国专利号 5,534,615 中,特别地在此引入作为参考。抗体的优选类型的共价修饰包括以美国专利号 4,640,835 ;4,496,689 ;4,301,144 ;4,670,417 ;4,791,192 或 4,179,337 中描述的方式,将抗体连接于多种非蛋白质聚合物之一,例如,聚乙二醇、聚丙二醇,或聚氧烯 (polyoxyalkylene)。

[0160] 从合成的抗体噬菌体文库生成抗体

[0161] 在优选的实施方案中,本发明提供了使用独特的噬菌体展示方法生成和选择新抗体的方法。所述方法涉及基于单一框架模板生成合成的抗体噬菌体文库、设计可变结构域内充分多样性、展示具有多样性可变结构域的多肽、选择具有高亲和力的候选抗体以靶向抗原,和分离选择的抗体。

[0162] 能够在,例如公开于 2003 年 12 月 11 日的 W003/102157 中发现噬菌体展示方法的细节,所述 W003/102157 的整体公开内容在此处明确引用作为参考。

[0163] 在一个方面,能够通过突变溶剂可及的和 / 或高度多样的位置生成本发明中使用的抗体文库,所述位置在抗体可变结构域的至少一个 CDR 中。能够使用本文提供的方法突变一些或全部 CDR。在一些实施方案中,通过突变 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 中的位置以形成单文库,或通过突变 CDRL3 和 CDRH3 中的位置以形成单文库或通过突变 CDRL3 和 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 中的位置以形成单文库生成多样的抗体文库可为优选的。

[0164] 例如,能够生成抗体可变结构域文库,所述文库在 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 的溶剂可及的和 / 或高度多样的位置中具有突变。能够生成另外一个在 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3 中具有突变的文库。能够互相联合使用这些文库以生成具有需要的亲和力的结合物。例如,在针对与靶抗原结合而一轮或多轮选择重链文库之后,为了额外的选择轮次,轻链文库能够被取代进入重链结合物群以增加结合物的亲和力。

[0165] 优选地,通过用重链序列可变区的 CDRH3 区中的氨基酸变体替代原始的氨基酸制备文库。获得的文库能够包含多种抗体序列,其中序列多样性主要在重链序列的 CDRH3 区中。

[0166] 在一方面,在人源化的抗体 4D5 序列、或人源化抗体 4D5 序列的框架氨基酸序列的情况下制备文库。优选地,通过用 DVK 密码子组编码的氨基酸替代至少重链的 95-100a 残基制备文库,其中对于这些位置的每一个位置,DVK 密码子组用于编码一组氨基酸变体。对于制备这些替代有用的寡核苷酸组的实例包含序列 (DVK)₇。在一些实施方案中,通过用 DVK 和 NNK 密码子组编码的氨基酸替代 95-100a 残基生成文库。对于制备这些替代有用的寡核苷酸组的实例包含序列 (DVK)₆(NNK)。在另一个实施方案中,通过用 DVK 和 NNK 密码子组编码的氨基酸替代至少 95-100a 残基生成文库。对于制备这些替代有用的寡核苷酸组的实例包含序列 (DVK)₅(NNK)。对于制备这些替代有用的寡核苷酸组的另一个实例包含序列 (NNK)₆。本领域技术人员能够通过此处描述的标准确定合适的寡核苷酸序列的其他实例。

[0167] 在另一个实施方案中,使用不同的 CDRH3 设计以分离高亲和力结合物和分离多种表位的结合物。在此文库中生成的 CDRH3 的长度范围为 11 到 13 个氨基酸,尽管也能够生成与此不同的长度。通过使用 NNK、DVK 和 NVK 密码子组以及在 N 和 / 或 C 末端更多的受限制的多样性能够扩展 H3 多样性。

[0168] 在 CDRH1 和 CDRH2 中也能够生成多样性。CDR-H1 和 H2 多样性的设计带有修改地遵从所描述的靶向模拟的天然抗体库的策略,所述修改关注于将多样性与先前的设计相比更紧密地与天然多样性相配。

[0169] 对于 CDRH3 中的多样性,能够用不同长度的 H3 分别构建多个文库,随后将它们组合以就靶向抗原的结合物进行选择。使用如先前描述的和下文描述的固体支持选择和溶液分选法能够集中和分选多个文库。可运用多种分选策略。例如,一个变种涉及在结合于固体的靶上的分选,其后为分选标签,所述标签可存在于融合多肽上(例如抗 gD 标签)并且其后为在结合于固体的靶上的另一次分选。备选地,能够首先在结合于固体表面的靶上分选文库,随后使用与降低浓度的靶抗原液相结合分选被洗脱的结合物。使用不同分选方法的组合提供了最小化选择仅仅高表达的序列并且提供了多种不同高亲和力克隆的选择。

[0170] 从文库能够分离靶向抗原的高亲和力结合物。H1/H2 区中限制的多样性将简并性降低了约 10⁴ 到 10⁵ 倍并且允许更多的 H3 多样性提供更多高亲和力结合物。使用在 CDRH3 中具有不同类型多样性的文库(例如使用 DVK 或 NVT)提供了结合物的分离,所述结合物可与靶抗原的不同表位结合。

[0171] 在从如上述描述的集中文库中分离的结合物之中,已发现通过在轻链中提供有限的多样性还可改善亲和力。在此实施方案中如下生成轻链多样性,在 CDRL1 中:第 28 位氨基酸由 RDT 编码;第 29 位氨基酸由 RKT 编码;第 30 位氨基酸由 RVW 编码;第 31 位氨基酸由 ANW 编码;第 32 位氨基酸由 THT 编码;任选地,第 33 位氨基酸由 CTG 编码;在 CDRL2 中:第 50 位氨基酸由 KBG 编码;第 53 位氨基酸由 AVC 编码;和任选地,第 55 位氨基酸由 GMA 编码;在 CDRL3 中:第 91 位氨基酸由 TMT 或 / 和 SRT 编码;第 92 位氨基酸由 DMC 编码;第 93 位氨基酸由 RVT 编码;第 94 位氨基酸由 NHT 编码;和第 96 位氨基酸由 TWT 或 / 和 YKG 编码。

[0172] 在另一个实施方案中,生成在 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 区中具有多样性的一个或多个文库。在这个实施方案中,使用多种长度的 H3 区域和主要使用密码子组 XYZ 和 NNK 或 NNS 生成 CDRH3 中的多样性。使用单独的寡核苷酸形成文库并将所述文库集中,或者集中寡核苷酸形成文库亚组。针对结合在固体上的靶能够分选此实施方案的文库。使用 ELISA

测定法能够筛选从多种分选物分离的克隆的特异性和亲和力。对于特异性,针对需要的靶抗原和其他非靶抗原能够筛选克隆。然后在溶液结合竞争 ELISA 测定法或点竞争测定法中能够筛选那些靶抗原结合物的亲和力。使用 XYZ 密码子组能够从文库分离高亲和力的结合物,所述 XYZ 密码子组如以上描述所制备。在细胞培养物中能够容易地高产率生产作为抗体或抗原结合片段的这些结合物。

[0173] 在一些实施方案中,可能需要用更多的 CDRH3 区长度多样性以生成文库。例如,可能需要用从约 7 到 19 个氨基酸范围内的 CDRH3 区以生成文库。

[0174] 在细菌和真核细胞培养物中容易高产率地生产从这些实施方案的文库中分离的高亲和力结合物。能够设计载体来容易地移除序列(例如 gD 标签、病毒外被蛋白组分序列),和/或来添加恒定区序列以提供全长抗体或抗原结合片段的高产率生产。

[0175] 能够将在 CDRH3 中具有突变的文库和含有其他 CDR 的变体版本的水库相结合,所述 CDR 例如 CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1 和/或 CDRH2。因此,例如,在一个实施方案中,使用预先测定的密码子组将 CDRH3 文库与 CDRL3 文库组合,在人源化的 4D5 抗体序列的背景下制备所述 CDRL3 文库,所述人源化的 4D5 抗体序列在第 28、29、30、31,和/或 32 位具有变体氨基酸。在另一个实施方案中,能够将具有 CDRH3 突变的水库与包含变体 CDRH1 和/或 CDRH2 的重链可变结构域的水库组合。在一个实施方案中,用在第 28、30、31、32 和 33 位具有变体氨基酸的人源化抗体 4D5 序列制备 CDRH1 文库。使用预先测定的密码子组可用在第 50、52、53、54、56 和 58 位具有变体氨基酸的人源化抗体 4D5 序列制备 CDRH2 文库。

[0176] 认为前面书面的说明书能够足够使本领域技术人员实践此发明。仅仅为了说明的目的而提供了下述实施例,并且并不以任何方式意为限制本发明的范围。事实上,除了那些本文展示和说明以外,本发明的多种修改对于那些本领域技术人员从前述说明书中将是显而易见的,并且落在附加的权利要求范围内。

[0177] 除非另有说明,根据制造商的说明使用在实施例中提到的可商购的试剂。通过 ATCC 登录号在以下实施例,和全部说明书中鉴定的那些细胞源为 American Type Culture Collection, Manassas, VA。除非另有指示,本发明使用重组 DNA 技术的标准步骤,例如描述于以上本文和以下教科书中的那些: Sambrook 等, *supra*; Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y., 1989); Innis 等, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, Inc.: N. Y., 1990); Harlow 等, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, 1988); Gait, Oligonucleotide Synthesis (IRL Press: Oxford, 1984); Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan 等, Current Protocols in Immunology, 1991。

[0178] 在以下非限制性的实例中提供了本发明的其他细节。

[0179] 所有贯穿公开内容引用的参考文献在此以其整体明确引入作为参考。

[0180] 实施例 1

[0181] IL-17 家族成员在糖尿病和胰岛素抗性中的作用

[0182] IL-17Rc KO 小鼠和高脂肪膳食模型研究

[0183] 用常规饲料或 60% 高脂肪膳食 (HFD) 喂养 8 周龄雄性 IL-17Rc (UNQ6118. KO. lex) 敲除和同窝出生野生型 (WT) 对照小鼠。

- [0184] 第一组：高脂肪膳食 IL-17Rc 敲除 (KO) 小鼠 (5 只动物)
- [0185] 第二组：高脂肪膳食 IL-17Rc, WT 同窝出生对照 (5 只动物)
- [0186] 第三组：常规膳食 IL-17Rc KO 小鼠 (3 只动物)
- [0187] 第四组：常规膳食 IL-17Rc WT 同窝出生对照 (3 只动物)
- [0188] 附图 7 显示了实验设计。
- [0189] 对小鼠进行葡萄糖耐受测试 (GTT) 以评价它们的胰岛素抗性状态。
- [0190] 使用以下方法实施 GTT。
- [0191] 血葡萄糖和胰岛素测量：通过隐静脉放血获得血样品，并且使用血糖测计仪 (Lifescan, USA 制作的 OneTouch Glucometer) 立即分析葡萄糖浓度。使用 ELISA 方法测量血清胰岛素。
- [0192] 葡萄糖耐受测试 (GTT)：在过夜禁食 (14 小时) 后，于早晨 9:00am 测试动物。在对每一动物腹膜内注射 1.5mg/克体重的葡萄糖之前，以及在施用葡萄糖的 30、60、120 和 150 分钟之后，在从隐静脉放血获得的样品上测量血葡萄糖。将数值计算为 mg/dL 葡萄糖。
- [0193] 对基线 (在它们开始高脂肪膳食之前) 和在高脂肪膳食组之后的第 8 周、第 10 周、第 12 周和第 14 周实施 GTT。常规饲料喂养的小鼠作为对照组。敲除和野生型 (WT) 同窝对照小鼠中剩余的条件相似。
- [0194] 除了 GTT 之外每周监测动物的总体重以及禁食的血清胰岛素和葡萄糖水平
- [0195] 附图 8-11 显示了结果。
- [0196] 虽然 IL-17Rc WT 同窝出生对照小鼠显示了显著的重量增加并且发展了胰岛素抗性的表型，IL-17Rc 敲除小鼠显著地更瘦并且比它们的 WT 同窝出生对照好得多地清除了葡萄糖。甚至在用高脂肪膳食饲养多于 12 周之后，敲除小鼠没有增加重量。两组都显示了类似的禁食循环胰岛素水平。在对照膳食饲养组中未观察到 KO 和 WT 小鼠之间显著的差异。
- [0197] 除了以上描述的使用 IL-17Rc KO 小鼠的实验之外，采用了两个单独的 lineS 研究来论述促炎细胞因子 IL-17A 和 IL-17F 在糖尿病和胰岛素抗性中的作用。
- [0198] 实施例 2
- [0199] 抗 IL-17 和抗 IL-17F mAbs 对胰岛素抗性高脂肪膳食模型小鼠的作用
- [0200] 此研究的目的是研究抗 IL-17 和抗 IL-17F mAbs 在预防的和既定的胰岛素抗性模型中的效力并与 muTNFR1I-Fc 的治疗效果相比较。
- [0201] 实验设计和组：
- [0202] 第一组：100u1 盐水中 6mg/kg 豚草 ip3 次 / 周达 10 周 (n = 10)。
- [0203] 第二组：100u1 盐水中 4mg/kg MuTNFR1I-IgG2a 3 次 / 周达 10 周 (n = 10)。
- [0204] 第三组：100u1 盐水中 6mg/kg Mu 抗 IL-17 ip3 次 / 周达 10 周 (n = 10)。
- [0205] 第四组：100u1 盐水中 6mg/kg Mu 抗 IL-17+Mu 抗 IL-17F mAb ip3 次 / 周达 10 周 (n = 10)。
- [0206] 第五组：在 18 周和 24 周内，4. mg/kg MuTNFR1I-Fc = 6. mg/kg Mu 抗 IL-17+6. mg/kg Mu 抗 IL17F mAb (10 只动物)。
- [0207] 所有组受高脂肪膳食饲养。为了评价小鼠的胰岛素抗性状态，在 HFD 和抗体给药之后每两周实施葡萄糖耐受检测 (GTT)。
- [0208] 附图 12 中展示了方案。附图 13 中显示了在 9 周给药后抗 IL-17A 和抗 IL-17F

MAbs 对葡萄糖耐受的作用。

[0209] 实施例 3

[0210] IL-17 过量表达对胰岛素抗性状态的作用,所述胰岛素抗性状态通过 GTT 评价。

[0211] 本研究基于流体尾静脉 (HTV) 注射质粒 DNA,所述 DNA 用于在正常的和高脂肪膳食喂养的小鼠中表达天然的鼠 IL-17A 和 IL-17F 蛋白质,以使在小鼠中表达高水平的促炎细胞因子鼠 IL-17A 和 IL-17F,从而研究其在胰岛素抗性中的作用。

[0212] 第 1 组:无质粒

[0213] 第 2 组:单独的 pRK 载体

[0214] 第 3 组:pRK-IL-17A

[0215] 第 4 组:pRK-IL-17F

[0216] 在每组之内注射 5 个亚组的小鼠并在多个时间点 (DNA 摄取后 0 小时、2 小时、6 小时、24 小时,和 72 小时) 抽血,以测量血清中循环的细胞因子水平。一旦此确立,在高脂肪膳食 (HFD) 小鼠中过量表达 IL-17A 和 IL-17F 来评价胰岛素抗性状态的改变。

[0217] 尾静脉注射实验:

[0218] 1) 在盐水 (优选 Ringer's) 中稀释 DNA 构建体 (pRK 载体或 pRK-IL-17A 和 pRK-IL-17F) 至产生最终剂量为 50 μ g/小鼠/注射的浓度。

[0219] 2) 用约 1.6ml 溶液在尾静脉中静脉内注射每一小鼠,所述溶液含有在盐水或 Ringer's 中的 DNA。

[0220] 3) 为了达到最大 DNA 摄入,在 4-5 秒 (最大 8 秒) 的时间内以推注静脉内注射 (尾静脉) 施用剂量。

[0221] 在图 14 中显示了结果。A) 用 50 μ g 质粒 DNA (pRK-IL-17A) 或单独的 pRK 载体注射八周龄的 c57BL/6 小鼠。48 小时后从两组中都收集血清并且通过 ELISA 测量血清中 IL-17 水平。B) 三组小鼠受禁食 0/N 并且进行 ip GTT 并且在葡萄糖注射之后将结果对时间作图 (* $p > 0.05$)。

[0222] 尽管已经参考特定的实施方案描述本发明,应理解本本发明并不限于此类实施方案。相反地,本发明意为包含多种修改和等价物,所述修改和等价物包含于附加权利要求的精神和范围内。

[0001]

序列表

<110> 弗.哈夫曼.拉罗切有限公司 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG)

<120> 胰岛素抗性疾病的治疗

<130> GNE-0344.PCT

<140>

<141>

<150> 61/165,677

<151> 2009-04-01

<160> 6

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 1859

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

gcaggcaciaa actcatccat ccccagttga ttggaagaaa caacgatgac tcttggaag	60
acctcattgg tgtcactget actgetctg agcctggagg ccatagtga ggcaggaatc	120
acaatcccac gaaatccagg atgcccacat tetgaggaca agaactccc cggactgtg	180
atggteaacc tgaacatcca taaccggaat accaatacca atcccaaaag gtctcagat	240
tactacaacc gatecacctc accttggaat ctccaccga atgaggacc tgagagatat	300
ccctctgtga tctgggagge aaagtgcgc cacttgggt gcatcaacgc tgatgggaac	360
gtggactacc acatgaactc tgtcccatc cagcaagaga tcttggtct gcgcaggag	420
cctccacact gcccacactc ctccggctg gagaagatac tgggtgctgt gggctgcacc	480
tgtgtcacc cgattgtcca ccatgtggcc taagagctct ggggagccca cactcccaa	540
agcagttaga ctatggagag cggaccagc ccctcaggaa ccctcactc tcaaagacag	600

[0002]

cctcatttcg gactaaactc attagagttc ttaaggecagt ttgtccaatt aaagcttcag	660
aggtaacact tggccaagat atgagatctg aattaccttt cctcttttcc aagaaggaag	720
gtttgactga gtaccaatth gcttcttggt tactttttta agggctttta gttatttatg	780
tatttaatat gccctgagat aactttgggg tataagattc cattttaatg aattacctac	840
tttattttgt ttgtcttttt aaagaagata agattctggg cttgggaatt ttattattta	900
aaaggtaaaa cctgtattta tttagactat ttaaggatct atttatgttt aagtatttag	960
aaaaaggaga aaaagcacta ttatcagttc tgcctaggta aatgtaagat agaattaaat	1020
ggcagtga aaattctgag tctttacaac atacggatat agtatttcct cctctttgtt	1080
tttaaaagtt alaacatggc tgaagaagaa gallaaacct actttcatat gtatttaatt	1140
aaattttgca atttggtgag gttttacaag agatacagca agtetaactc tctgttccat	1200
taaacctta taataaaatc cttctgtaat aataaagttt caaaagaaaa tgtttatttg	1260
ttctcattaa atgtatttta gcaaacacag ctcttcccta ttgggaagag ttatgcaaat	1320
tctctataa gcaaaacaaa gcatgtcttt gagtaacaat gacctggaaa tacccaaaat	1380
tccaagttct cgatttcaca tgccttcaag actgaacacc gactaaggtt ttcatactat	1440
tagccaatgc ttagacaga agcattttga taggaataga gcaataaga taatggcct	1500
gaggaatggc atgicattat taaagatcat atggggaaaa tgaaccctc cccaaaatc	1560
aagaagttct gggaggagac attgtcttca gactacaatg tccagtttct cccctagact	1620
caggcttctt ttggagatta aggccctca gagatcaaca gaccaacatt tttctcttcc	1680
tcaagcaaca ctctagggc ctggcttctg tctgatcaag gcaccacaca acccagaaag	1740
gagctgatgg ggcagaacga actttaagta tgagaaaagt tcagcccaag taaaataaaa	1800
actcaatcac attcaattcc agagtagttt caagtttcac atcgtaacca ttttcgcc	1859

<210> 2

<211> 155

[0003]

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Met Thr Pro Gly Lys Thr Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Leu Ser
1 5 10 15

Leu Glu Ala Ile Val Lys Ala Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly
20 25 30

Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn
35 40 45

Leu Asn Ile His Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser
50 55 60

Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu
65 70 75 80

Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His
85 90 95

Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser
100 105 110

Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His
115 120 125

Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys
130 135 140

Thr Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala
145 150 155

<210> 3

<211> 535

<212> DNA

<213> 人

<400> 3

agccaccagc gcaacatgac agtgaagacc ctgcatggcc cagccatggc caagtacttg 60

ctgctgtcga tattggggct tgcctttctg agtgaggcgg cagctcgga aatccccaaa 120

[0004]

gtaggacata cttttttcca aaagcctgag agttgcccgc ctgtgccagg aggtaglatg	180
aagcttgaca ttggcatcat caatgaaaac cagcgcgttt ccatgtcacg taacatcgag	240
agcgcgtcca cctcccccctg gaattacact gtcacttggg accccaaccg gtaccctcg	300
gaagttgtac aggcccagtg taggaacttg ggtgcatca atgtcaagg aaaggaagac	360
atctccatga attccgttcc catccagcaa gagaccctgg tcgtccggag gaagcaccaa	420
ggtgctctg tttctttcca gttggagaag gtgctggtga ctgttggtg cacctgcgtc	480
accctgtca tccaccatgt gcagtaagag gtgcatatcc actcagctga agaag	535

<210> 4

<211> 163

<212> PRT

〈213〉 人

<400> 4

Met Thr Val Lys Thr Leu His Gly Pro Ala Met Val Lys Tyr Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ser Ile Leu Gly Leu Ala Phe Leu Ser Glu Ala Ala Ala Arg Lys
20 25 30

Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu Ser Cys Pro
35 40 45

Pro Val Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Asp Ile Gly Ile Ile Asn Glu
50 55 60

Asn Gln Arg Val Ser Met Ser Arg Asn Ile Glu Ser Arg Ser Thr Ser
65 70 75 80

Pro Trp Asn Tyr Thr Val Thr Trp Asp Pro Asn Arg Tyr Pro Ser Glu
85 90 95

Val Val Gln Ala Gln Cys Arg Asn Leu Gly Cys Ile Asn Ala Gln Gly
100 105 110

Lys Glu Asp Ile Ser Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Thr Leu
115 120 125

[0005]

Val Val Arg Arg Lys His Gln Gly Cys Ser Val Ser Phe Gln Leu Glu
130 135 140

Lys Val Leu Val Thr Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Val Ile His
145 150 155 160

His Val Gln

<210> 5

<211> 2380

<212> DNA

<213> 人

<400> 5

acactggcca acaaaaaacg aaagcactcc gtgctggaag taggaggaga gtcaggactc	60
ccaggacaga gagtgcacaa actaccacgc acagccccct ccgccccctc tggaggetga	120
agagggatcc cagccccctgc caccacacaga cacgggctga ctgggggtgc tgccccctt	180
gggggggggc agcacagggc ctcaggcctg ggtgccacct ggcacctaga agatgcctgt	240
gccctgggtc ttgtgtcctt tggcaactggg ccgaagccca gtggctcttt ctctggagag	300
gcttgtgggg cctcaggacg ctaccactg ctctccgggc ctctcctgcc gcctctggga	360
cagtacata ctctgcctgc ctggggacat cgtgcctgct ccgggccccg tgetggcgcc	420
tacgcacctg cagacagagc tgggtgtgag gtgccagaag gagaccgact gtgacctctg	480
tctgcgtgtg gctgtccact tggccgtgca tgggcactgg gaagagcctg aagatgagga	540
aaagtttggg ggagcagctg actcaggggt ggaggagcct aggaatgcct ctctccaggc	600
ccaagtcgtg ctctccttcc aggcctaccc tactgccgcg tgcgtcctgc tggaggtgca	660
agtgcctgct gcccttgtgc agtttggtea gtctgtgggc tctgtggtat atgactgctt	720
cgaggctgcc ctagggagtg aggtacgaat ctggctctat actcagccca ggtacagaaa	780
ggaactcaac cacacacagc agctgcctgc cctgccttgg ctcaacgtgt cagcagatgg	840
tgacaacgtg catctgggtc tgaatgtctc tgaggagcag cacttcggcc tctcctgtta	900

[0006]

ctggaatcag gtccagggcc ccccaaaacc ccggtggcac aaaaacctga ctggaccgca	960
gatcattacc ttgaaccaca cagacctggt tccctgcctc tgtattcagg tgtggcctct	1020
ggaacctgac tccgttagga cgaacatctg ccccttcagg gaggaccccc gcgcacacca	1080
gaacctctgg caagccgccc gactgcgact gctgacctg cagagctggc tgctggacgc	1140
accgtgctcg ctgcccgcag aagcggcact gtgctggcgg gctccgggtg gggaccctg	1200
ccagccactg gtcccaccgc tttcctggga gaacgtcact gtggacaagg ttctcgagtt	1260
cccattgctg aaaggccacc ctaacctctg tgttcagggt aacagctcgg agaagctgca	1320
gtgcaggag tgettgtggg ctgactccct ggggcctctc aaagacgatg tgctactgtt	1380
ggagacaega ggcceccagg acaacagatc cctctgtgcc ttggaacca gtggtgtac	1440
ttcactacc agcaaagcct ccacgagggc agctgcctt ggagagtact tactacaaga	1500
cctgcagtca ggccagtgtc tgcagctatg ggacgatgac ttgggagcgc tatgggcctg	1560
ccccatggac aaatacatcc acaagcgtg ggcctcgtg ttgctggcct gcctactctt	1620
tgcgctgcg ctttccctca tctccttct caaaaaggat cacgcgaaag ggtggctgag	1680
gctcttgaaa caggacgtcc gctcgggggc ggccgccagg ggccgcgcgg ctctgtcct	1740
ctactcagcc gatgactcgg gtttcgagcg cctggtgggc gccctggcgt cgccctgtg	1800
ccagctgccg ctgcgcgtgg ccgtagacct gtggagccgt cgtgaactga gcgcgcaggg	1860
gcccgtgget tggtttcacg cgcagcggcg ccagaccctg caggaggcg gcgtggtggt	1920
cttgetcttc tctccgggtg cgggtggcgt gtgcagcgag tggetacagg atggggtgtc	1980
cgggcccggg gcgcacggcc cgcacgaecg ctccgcgcgc tgcctcagct gcgtgctgcc	2040
cgacttcttg cagggccggg cgcgcggcag ctacgtgggg gcctgcttcg acaggtgct	2100
ccaccggac gccgtaccgc ccttttccg caccgtgcc gtcttcacac tgccctcca	2160
actgccagac ttctggggg cctgcagca gcctcgcgc ccgcgttcg ggcggtcca	2220

[0007]

agagagagcgg gagcaagtgt cccggggccct tcagccagccc ctggatagct acttccatcc 2280

cccgggggact cccgcgcggg gacgcgggggt gggaccaggg gcggggacctg gggcgggggga 2340

cgggacttaa ataaaggcag acgctgtttt tctaaaaaaa 2380

<210> 6
<211> 705
<212> PRT
<213> 人

<400> 6
Met Pro Val Pro Trp Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Gly Arg Ser Pro
1 5 10 15
Val Val Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Gly Pro Gln Asp Ala Thr His
20 25 30
Cys Ser Pro Gly Leu Ser Cys Arg Leu Trp Asp Ser Asp Ile Leu Cys
35 40 45
Leu Pro Gly Asp Ile Val Pro Ala Pro Gly Pro Val Leu Ala Pro Thr
50 55 60
His Leu Gln Thr Glu Leu Val Leu Arg Cys Gln Lys Glu Thr Asp Cys
65 70 75 80
Asp Leu Cys Leu Arg Val Ala Val His Leu Ala Val His Gly His Trp
85 90 95
Glu Glu Pro Glu Asp Glu Glu Lys Phe Gly Gly Ala Ala Asp Ser Gly
100 105 110
Val Glu Glu Pro Arg Asn Ala Ser Leu Gln Ala Gln Val Val Leu Ser
115 120 125
Phe Gln Ala Tyr Pro Thr Ala Arg Cys Val Leu Leu Glu Val Gln Val
130 135 140
Pro Ala Ala Leu Val Gln Phe Gly Gln Ser Val Gly Ser Val Val Tyr
145 150 155 160
Asp Cys Phe Glu Ala Ala Leu Gly Ser Glu Val Arg Ile Trp Ser Tyr

[0008]

165	170	175
Thr Gln Pro Arg Tyr Glu Lys Glu Leu Asn His Thr Gln Gln Leu Pro		
180	185	190
Ala Leu Pro Trp Leu Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Val His Leu		
195	200	205
Val Leu Asn Val Ser Glu Glu Gln His Phe Gly Leu Ser Leu Tyr Trp		
210	215	220
Asn Gln Val Gln Gly Pro Pro Lys Pro Arg Trp His Lys Asn Leu Thr		
225	230	235
Gly Pro Gln Ile Ile Thr Leu Asn His Thr Asp Leu Val Pro Cys Leu		
245	250	255
Cys Ile Gln Val Trp Pro Leu Glu Pro Asp Ser Val Arg Thr Asn Ile		
260	265	270
Cys Pro Phe Arg Glu Asp Pro Arg Ala His Gln Asn Leu Trp Gln Ala		
275	280	285
Ala Arg Leu Arg Leu Leu Thr Leu Gln Ser Trp Leu Leu Asp Ala Pro		
290	295	300
Cys Ser Leu Pro Ala Glu Ala Ala Leu Cys Trp Arg Ala Pro Gly Gly		
305	310	315
Asp Pro Cys Gln Pro Leu Val Pro Pro Leu Ser Trp Glu Asn Val Thr		
325	330	335
Val Asp Lys Val Leu Glu Phe Pro Leu Leu Lys Gly His Pro Asn Leu		
340	345	350
Cys Val Gln Val Asn Ser Ser Glu Lys Leu Gln Leu Gln Glu Cys Leu		
355	360	365
Trp Ala Asp Ser Leu Gly Pro Leu Lys Asp Asp Val Leu Leu Leu Glu		
370	375	380
Thr Arg Gly Pro Gln Asp Asn Arg Ser Leu Cys Ala Leu Glu Pro Ser		
385	390	395
		400

[0009]

Gly Cys Thr Ser Leu Pro Ser Lys Ala Ser Thr Arg Ala Ala Arg Leu			
405	410	415	
Gly Glu Tyr Leu Leu Gln Asp Leu Gln Ser Gly Gln Cys Leu Gln Leu			
420	425	430	
Trp Asp Asp Asp Leu Gly Ala Leu Trp Ala Cys Pro Met Asp Lys Tyr			
435	440	445	
Ile His Lys Arg Trp Ala Leu Val Trp Leu Ala Cys Leu Leu Phe Ala			
450	455	460	
Ala Ala Leu Ser Leu Ile Leu Leu Leu Lys Lys Asp His Ala Lys Gly			
465	470	475	480
Trp Leu Arg Leu Leu Lys Gln Asp Val Arg Ser Gly Ala Ala Ala Arg			
485	490	495	
Gly Arg Ala Ala Leu Leu Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Gly Phe Glu			
500	505	510	
Arg Leu Val Gly Ala Leu Ala Ser Ala Leu Cys Gln Leu Pro Leu Arg			
515	520	525	
Val Ala Val Asp Leu Trp Ser Arg Arg Glu Leu Ser Ala Gln Gly Pro			
530	535	540	
Val Ala Trp Phe His Ala Gln Arg Arg Gln Thr Leu Gln Glu Gly Gly			
545	550	555	560
Val Val Val Leu Leu Phe Ser Pro Gly Ala Val Ala Leu Cys Ser Glu			
565	570	575	
Trp Leu Gln Asp Gly Val Ser Gly Pro Gly Ala His Gly Pro His Asp			
580	585	590	
Ala Phe Arg Ala Ser Leu Ser Cys Val Leu Pro Asp Phe Leu Gln Gly			
595	600	605	
Arg Ala Pro Gly Ser Tyr Val Gly Ala Cys Phe Asp Arg Leu Leu His			
610	615	620	
Pro Asp Ala Val Pro Ala Leu Phe Arg Thr Val Pro Val Phe Thr Leu			
625	630	635	640

[0010]

Pro Ser Gln Leu Pro Asp Phe Leu Gly Ala Leu Gln Gln Pro Arg Ala
645 650 655

Pro Arg Ser Gly Arg Leu Gln Glu Arg Ala Glu Gln Val Ser Arg Ala
660 665 670

Leu Gln Pro Ala Leu Asp Ser Tyr Phe His Pro Pro Gly Thr Pro Ala
675 680 685

Pro Gly Arg Gly Val Gly Pro Gly Ala Gly Pro Gly Ala Gly Asp Gly
690 695 700

Thr
705

NM_002190 (GenBank)

ORIGIN

```

1  gcaggcacia actcatccat cccagttga ttggaagaaa caacgatgac tcctgggaag
61  acctcattgg tgtcactgct actgctgctg agcctggagg ccatagtga ggcaggaatc
121 acaatcccac gaaatccagg atgcccacaa tctgaggaca agaacttccc ccggactgtg
181 atggtcaacc tgaacatcca taaccggaat accaatacca atcccaaaa gtcctcagat
241 tactacaacc gatccacctc accttggaa ctccaccgca atgaggaccc tgagagatat
301 ccctctgtga tctgggaggc aaagtgcgc cacttgggct gcatcaacgc tgatgggaac
361 gtggactacc acatgaactc tgtcccatc cagcaagaga tcctggctct gcgcaggag
421 cctccacact gcccacactc cttccggctg gagaagatac tgggtgccgt gggctgcacc
481 tgtgtcacc cgttgttcca ccatgtggcc taagagctct ggggagccca cactcccaa
541 agcagttaga ctatggagag ccgaccagc ccctcaggaa cctcctcct tcaaagacag
601 cctcatttgc gactaaactc attagagttc ttaaggcagt ttgtccaatt aaagcttcag
661 aggtaacact tggccaagat atgagatctg aattaccttt ccctctttcc aagaaggaag
721 gtttgactga gtaccaattt gcttcttgtt tactttttta agggctttta gttatttatg
781 tatttaatat gccctgagat aactttgggg tataagattc cattttaatg aattacctac
841 tttattttgt ttgtcttttt aaagaagata agattctggg cttgggaatt ttattattta
901 aaaggtaaaa cctgtattta ttgagctat ttaaggatct atttatgttt aagtatttag
961 aaaaagggtga aaaagcacta ttatcagttc tgcctaggtg aatgtaagat agaattaaat
1021 ggcaagtcaa aatttctgag tctttacaac atacggatat agtatttctt cctctttgtt
1081 tttaaaagtt ataacatggc tgaaaagaaa gattaaacct actttcatat gtattaattt
1141 aaattttgca atttgttgag gttttacaag agatacagca agtctaactc tctgttccat
1201 taaaccctta taataaaatc cttctgtaat aataaagttt caaaagaaaa tgtttatttg
1261 ttctcattaa atgtatttta gcaaactcag ctcttcccta ttgggaagag ttatgcaaat
1321 tctcctataa gcaaaacaaa gcatgtcttt gagtaacaat gacctggaaa taccctaaat
1381 tccaagttct cgatttcaca tgccttcaag actgaacacc gactaagggt ttcatactat
1441 tagccaatgc tgtagacaga agcattttga taggaataga gcaaataaga taatggccct
1501 gaggaatggc atgtcattat taaagatcat atggggaaaa tgaaaccctc ccaaaaatac
1561 aagaagttct gggaggagac attgtcttca gactacaatg tccagtttct cccctagact
1621 caggcttctt ttggagatta agggccctca gagatcaaca gaccaacatt tttctcttcc
1681 tcaagcaaca ctctagggc ctggcttctg tctgatcaag gcaccacaca acccagaaaag
1741 gagctgatgg ggcagaacga actttaagta tgagaaaagt tcagcccaag taaaataaaa
1801 actcaatcac attcaattcc agagtagttt caagtttcac atcgtaacca ttttcgccc

```

图 1 (SEQ. ID NO :1)

NP_002181 (GenBank)

ORIGIN

```

1  mtpgktslvs lllllsleai vkagitiprn pgcpnsedkn fprtvmvnln ihnrtntnnp
61  krssdyynrs tspwnlhrne dperypsviw eakcrhlgi nadgnvdyhm nsvpiqqeil
121  vlrrpphpcp nsfrlekilv svgtcvtpti vhhva

```

图 2 (SEQ. ID NO :2)

leu> getseq sst.DNA166819

```

AGCCACCAGCGCAACATGACAGTGAAGACCCTGCATGGCCAGCCATGGTCAAGTACTTG
CTGCTGTCGATATTGGGGCTTGCCCTTTCTGAGTGAGGCGGCAGCTCGGAAAATCCCCAAA
GTAGGACATACTTTTTTCCAAAAGCCTGAGAGTTGCCCGCCTGTGCCAGGAGGTAGTATG
AAGCTTGACATTGGCATCATCAATGAAAACAGCGCTTCCATGTCACGTAACATCGAG
AGCCGCTCCACCTCCCCTGGAATTACACTGTCACTTGGGACCCCAACCGGTACCCCTCG
GAAGTTGTACAGGCCCAGTGTAGGAAGTTGGGCTGCATCAATGCTCAAGGAAAGGAAGAC
ATCTCCATGAATCCGTTCCCATCCAGCAAGAGACCTGGTTCGTCGGAGGAAGCACCAG
GGCTGCTCTGTTTCTTTCCAGTTGGAGAAGGTGCTGGTGACTGTTGGCTGCACCTGCGTC
ACCCCTGTATCCACCATGTGCAGTAAGAGGTGCATATCCACTCAGCTGAAGAAG

```

图 3 (SEQ. ID NO :3)

```
leu> getseq ssp.DNA166819
><Mon Dec 4 09:36:45 2000 DNA166819 [min]
></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA166819
><subunit 1 of 1, 163 aa, 1 stop
><MW: 18045, pI: 9.28, NX(S/T): 1
MTVKTLHGPMVKYLLLSILGLAFLSEAAARKIPKVGHTFFQKPESCPPVPGGSMKLDIG
IINENQVRVMSRNIESRSTSPWNYTWTWDPNRYPSEVVQAQCRNLGCINAQKEDISMNS
VPIQQETLVVRRKHQGSVSFQLEKVLTVGCTCVTPVIHHVQ
```

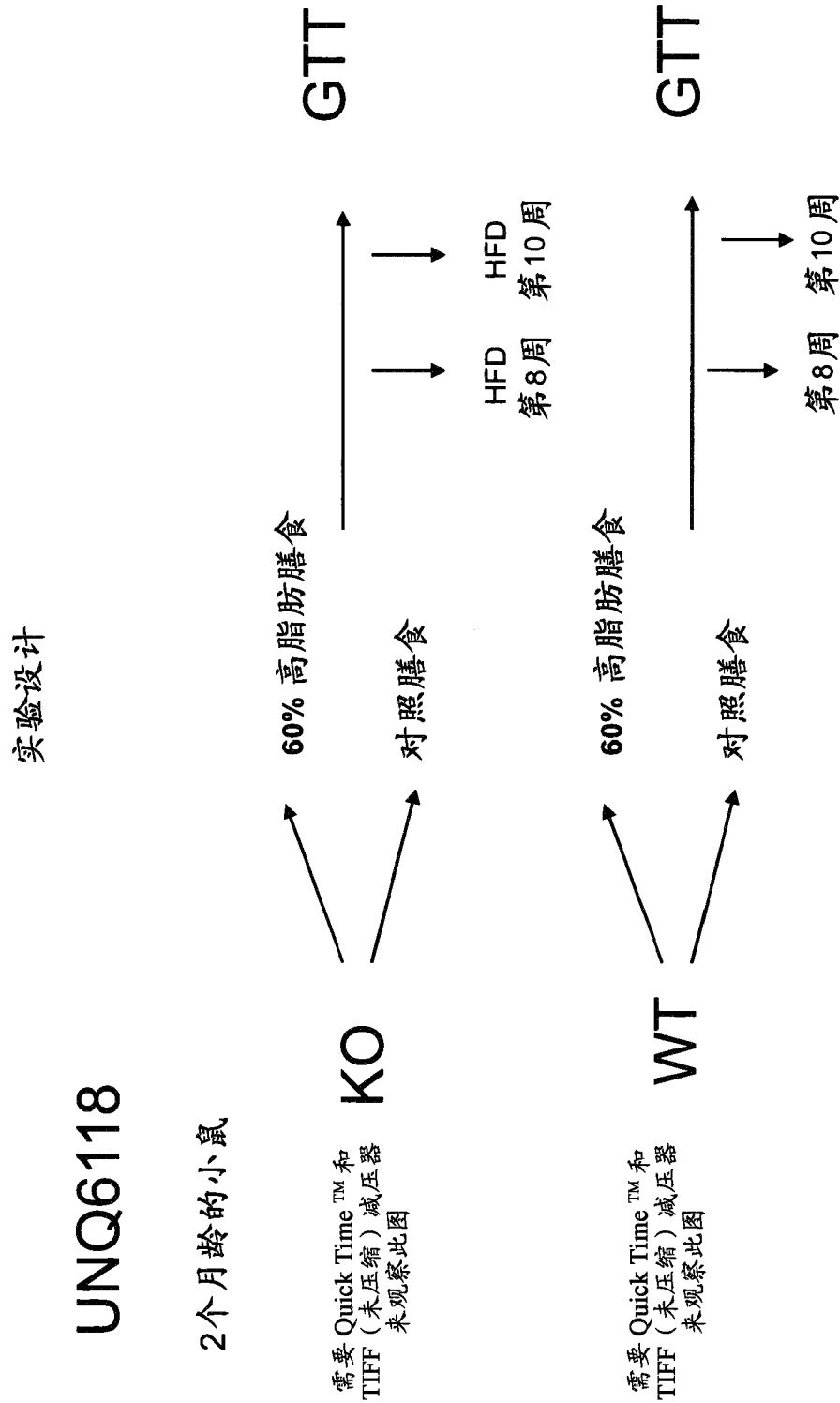
图 4 (SEQ. ID NO :4)

```
leu> getseq sst.DNA164625
ACACTGGCCAAACAAAACGAAAGCACTCCGTGCTGGAAGTAGGAGGAGAGTCAGGACTC
CCAGGACAGAGAGTGACAAACTACCCAGCACAGCCCCCTCCGCCCCCTCTGGAGGCTGA
AGAGGGATTCCAGCCCCCTGCCACCCACAGACACGGGCTGACTGGGGTGTCTGCCCCCTT
GGGGGGGGGCGACACAGGGCCTCAGGCCTGGGTGCCACCTGGCACCTAGAAGATGCCTGT
GCCCTGGTTCTTGCTGTCTTGCCACTGGGCCGAAGCCAGTGGTCTTTCTCTGGAGAG
GCTTGTGGGGCCTCAGGACGCTACCCACTGCTCTCCGGGCCTCTCCTGCCGCCTCTGGGA
CAGTGACATACTCTGCCTGCCTGGGGACATCGTGCCTGCTCCGGGCCCCGTGCTGGCGCC
TACGCACCTGCAGACAGAGCTGGTGTGAGGTGCCAGAAGGAGACCGACTGTGACCTCTG
TCTGCGTGTGGCTGTCCACTTGCCCGTGCATGGGCACTGGGAAGAGCCTGAAGATGAGGA
AAAGTTTGGAGGAGCAGCTGACTCAGGGGTGGAGGAGCCTAGGAATGCCTCTCTCCAGGC
CCAAGTCGTGCTCTCCTTCCAGGCCTACCCTACTGCCCGCTGCGTCTGCTGGAGGTGCA
AGTGCCTGCTGCCCTTGTGCAGTTTGGTCAGTCTGTGGGCTCTGTGGTATATGACTGCTT
CGAGGCTGCCCTAGGGAGTGAGGTACGAATCTGGTCTTATACTCAGCCCAGGTACGAGAA
GGAACCTCAACCACACACAGCAGCTGCCTGCCCTGCCCTGGCTCAACGTGTCAGCAGATGG
TGACAACGTGCATCTGGTCTGAATGTCTCTGAGGAGCAGCACTTCGGCCTCTCCCTGTA
CTGGAATCAGGTCCAGGGCCCCCAAAACCCCGGTGGCACAAAACCTGACTGGACCGCA
GATCATTACCTTGAACCACACAGACCTGGTTCCCTGCCTCTGTATTACAGGTGTGGCCTCT
GGAACCTGACTCCGTTAGGACGAACATCTGCCCCCTCAGGGAGGACCCCCGCGCACACCA
GAACCTCTGGCAAGCCGCCGACTGCGACTGCTGACCTGCAGAGCTGGCTGCTGGACGC
ACCGTGTCTGCTGCCCGCAGAAAGCGGCACTGTGCTGGCGGGCTCCGGGTGGGGACCCCTG
CCAGCCACTGGTCCCACCGCTTTCTTGGGAGAACGTCACTGTGGACAAGTTCTCGAGTT
CCCATTGCTGAAAGGCCACCCTAACCTCTGTGTTCAAGGTGAACAGCTCGGAGAAGCTGCA
GCTGCAGGAGTGCTTGTGGGCTGACTCCCTGGGGCCTCTCAAAGACGATGTGCTACTGTT
GGAGACACGAGGCCCCCAGGACAACAGATCCCTCTGTGCCTTGGAACCCAGTGGCTGTAC
TTCACTACCCAGCAAAGCCTCCACGAGGGCAGCTCGCCTTGGAGAGTACTTACTACAAGA
CCTGCAGTCAGGCCAGTGCTGTCAGCTATGGGACGATGACTTGGGAGCGCTATGGGCCCTG
CCCCATGGACAAATACATCCACAAGCGCTGGGCCCTCGTGTGGCTGGCCTGCCTACTCTT
TGCCGCTGCGCTTTCCCTCATCCTCTTCTCAAAAAGGATCACGCGAAAGGTTGGCTGAG
GCTCTTGAAACAGGACGTCCGCTCGGGGGCGGCCGCCAGGGGCCGCGCGGCTCTGCTCCT
CTACTCAGCCGATGACTCGGGTTTCGAGCGCCTGGTGGGCGCCCTGGCGTCGGCCCTGTG
CCAGCTGCCGCTGCGCGTGGCCGTAGACCTGTGGAGCCGTGCTGAAGTGAAGCGCGCAGGG
GCCCCGTGGCTTGGTTTACGCGCAGCGGCCAGACCCCTGCAGGAGGGCGGCGTGGTGGT
CTTGCTCTTCTCTCCCGGTGCGGTGGCGCTGTGCAGCGAGTGGCTACAGGATGGGGTGTG
CGGGCCCCGGGGCGACGGCCCCGACGACGCTTCCGCGCCTCGCTCAGCTGCGTGTGCC
CGACTTCTTGCAAGGGCCGGGCGCCGCGGACGTACGTGGGGGCTGCTTCGACAGGCTGCT
CCACCCGGACGCCGTACCCGCCCTTTTCCGCACCGTGCCCGTCTTCACTGCCCCTCCCA
ACTGCCAGACTTCTTGGGGGCCCTGCAGCAGCCTCGCGCCCCGCGTTCCGGGCGGCTCCA
AGAGAGAGCGGAGCAAGTGTCCCGGGCCCTTCCAGCCAGCCCTGGATAGCTACTTCCATCC
CCCGGGGACTCCCGCGCCGGGACGCGGGGTGGGACCAGGGGCGGGACCTGGGGCGGGGA
CGGGACTTAAATAAAGGCAGACGCTGTTTTTCTAAAAAAA
```

图 5 (SEQ. ID NO :5)

```
leu> getseq ssp.DNA164625
><Thu May 3 14:08:16 2001 DNA164625 [min]
></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA164625
><subunit 1 of 1, 705 aa, 1 stop
><MW: 76970, pI: 6.00, NX(S/T): 9
MPVPWFLLSLALGRSPVLSLERLVGPQDATHCSPGLSCRLWSDILCLPGDIVPAPGPV
LAPTHLQTELVLRCQKETDCDLCLRVAVHLAVHGHWEPEDEEKFGGAADSGVEEPRNAS
LQAQVVLSFQAYPTARCVLLEVQVPAALVQFGQSVGSVVYDCFEAALGSEVRIWSYTQPR
YEKELNHTQQLPALPWLNVSAADGNVHLVLNVSEEQHFGLSLYWNQVQGPPKPRWHKNLT
GPQIITLNHTDLVPCLCIQVWPLEPDSVRTNICPFREDPRAHQNLWQAARLRLTLQSWL
LDAPCSLPAEAALCWRAPGGDPCQPLVPPLSWENVTVDKVLEFPLLKGHPNLCVQVNSSE
KLQLQECLWADSLGPLKDDVLLLETRGPQDNRSLEPSGCTSLPSKASTRAARLGEYL
LQDLQSGQCLQLWDDDLGALWACPMDKYIHKRWALVWLACLLFAAALSLILLKKDHAKG
WLRLLKQDVRSGAAARGRAALLLYSADDSGFERLVGALASALCQLPLRVAVDLWSRRELS
AQGPVAWFHAQRRQTLQEGGVVLLFSPGAVALCSEWLQDGVSGPGAHGPHDAFRASLSC
VLPDFLQGRAPGSYVGACFDRLHLPDAVPALFRTVPVFTLPSQLPDFLGALQQPRAPRSG
RLQERAEQVSRALQPALDSYFHPPGTPAPGRGVGPGAGPGAGDGT
```

图 6 (SEQ. ID NO :6)



GTT: 在过夜禁食之后实施葡萄糖耐受测试。腹膜内注射葡萄糖并且使用葡萄糖计每 30 分钟监测血糖水平

图 7

使用 IL-17Rc KO 小鼠的高脂肪膳食模型研究的第 8 周的结果

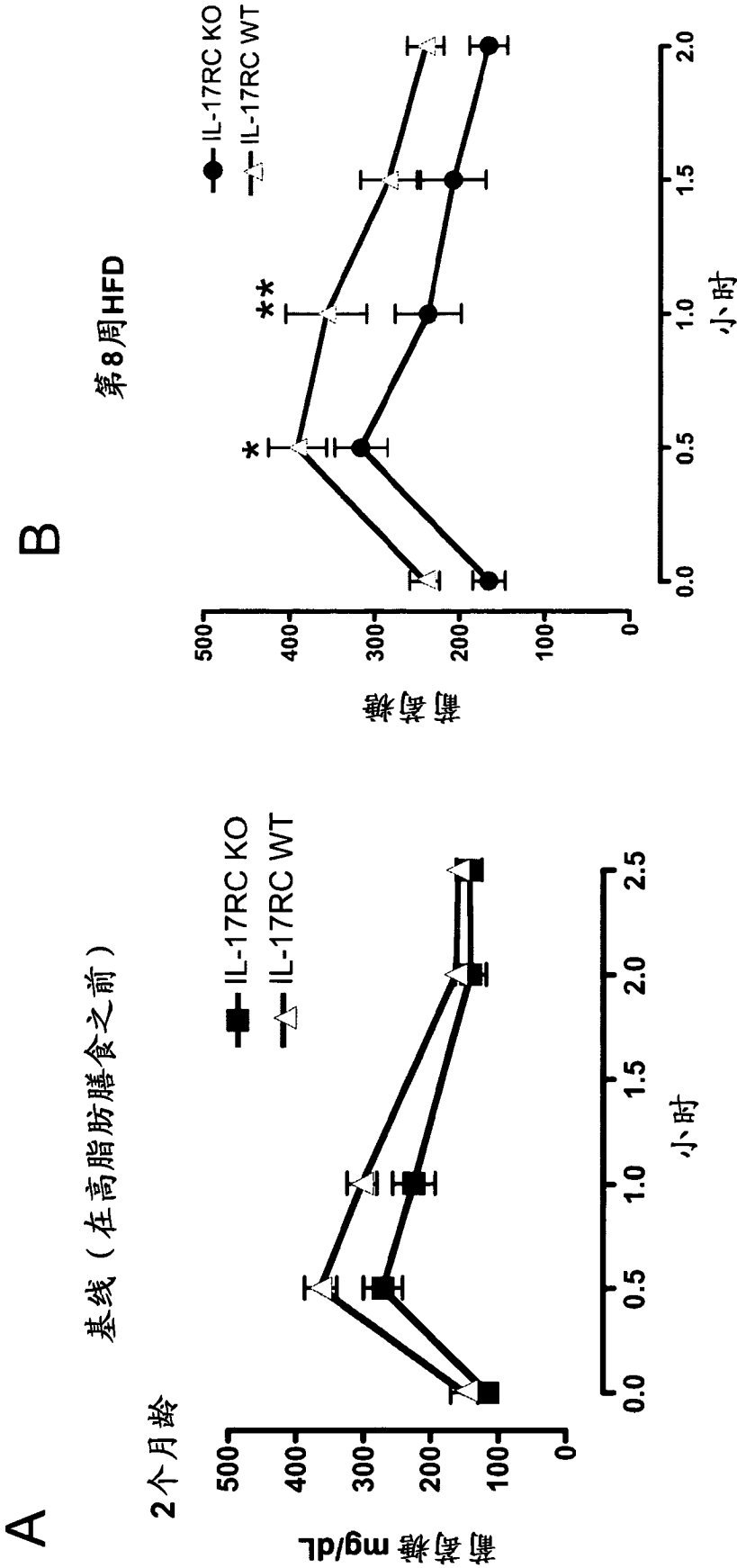


图 8

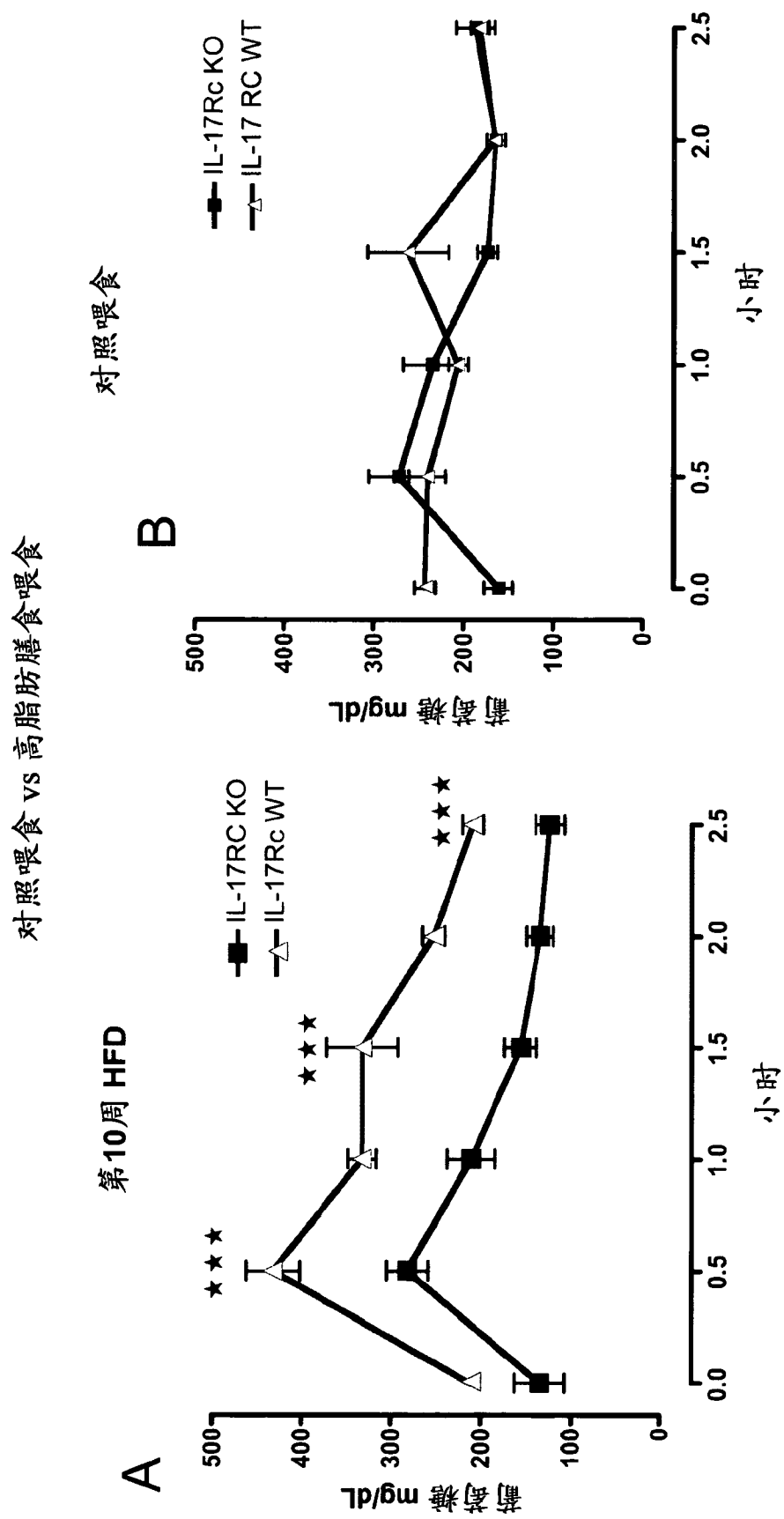


图 9A

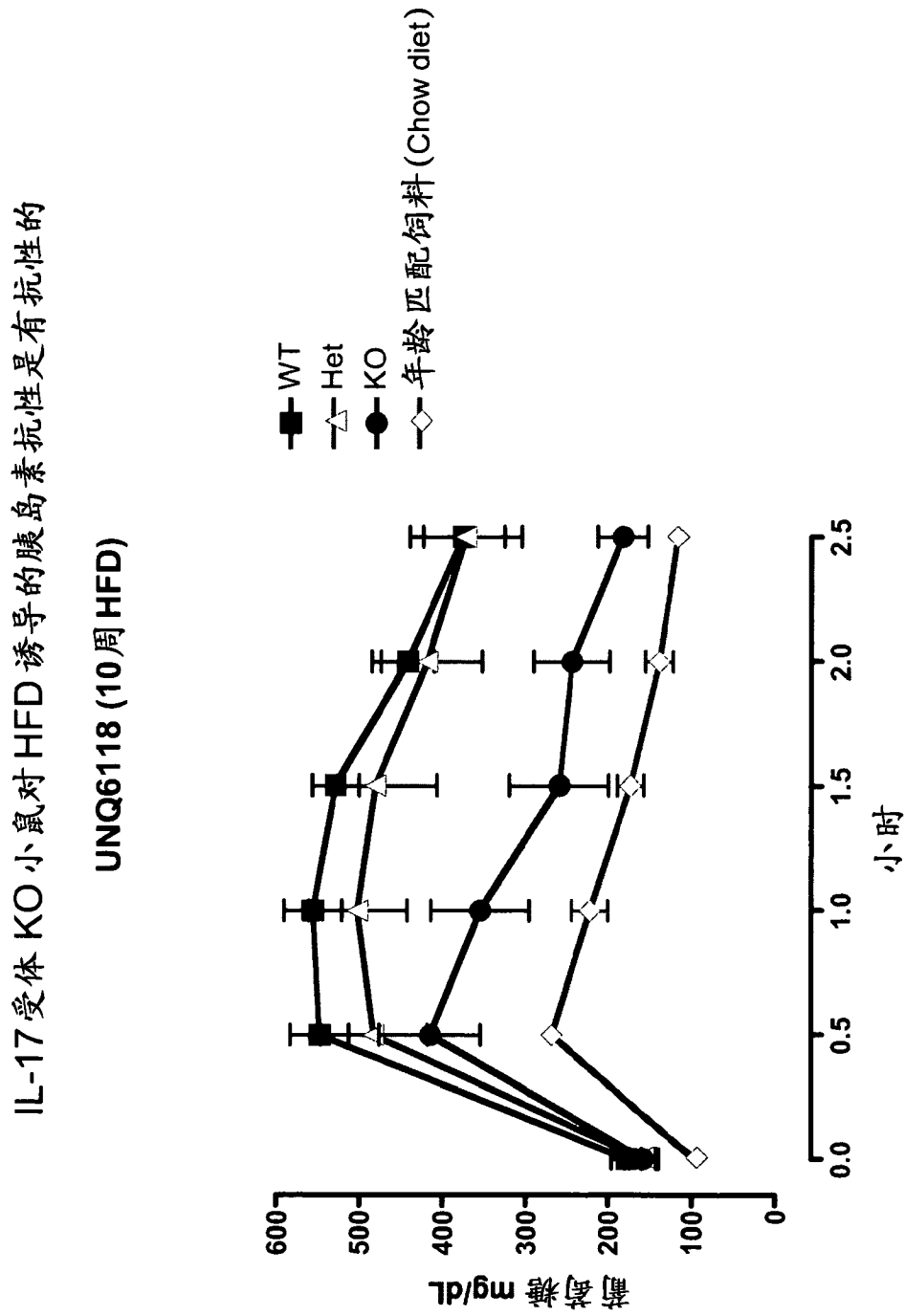


图 9B

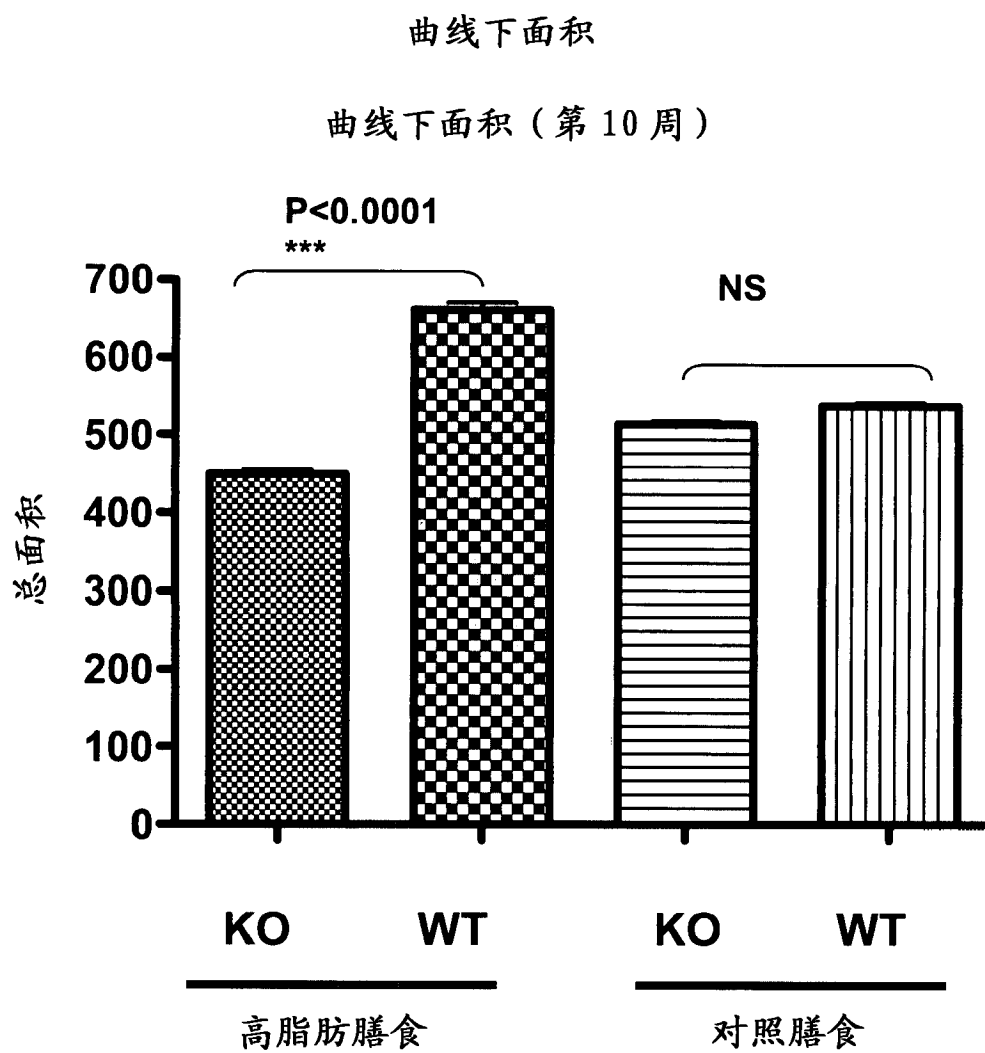


图 10

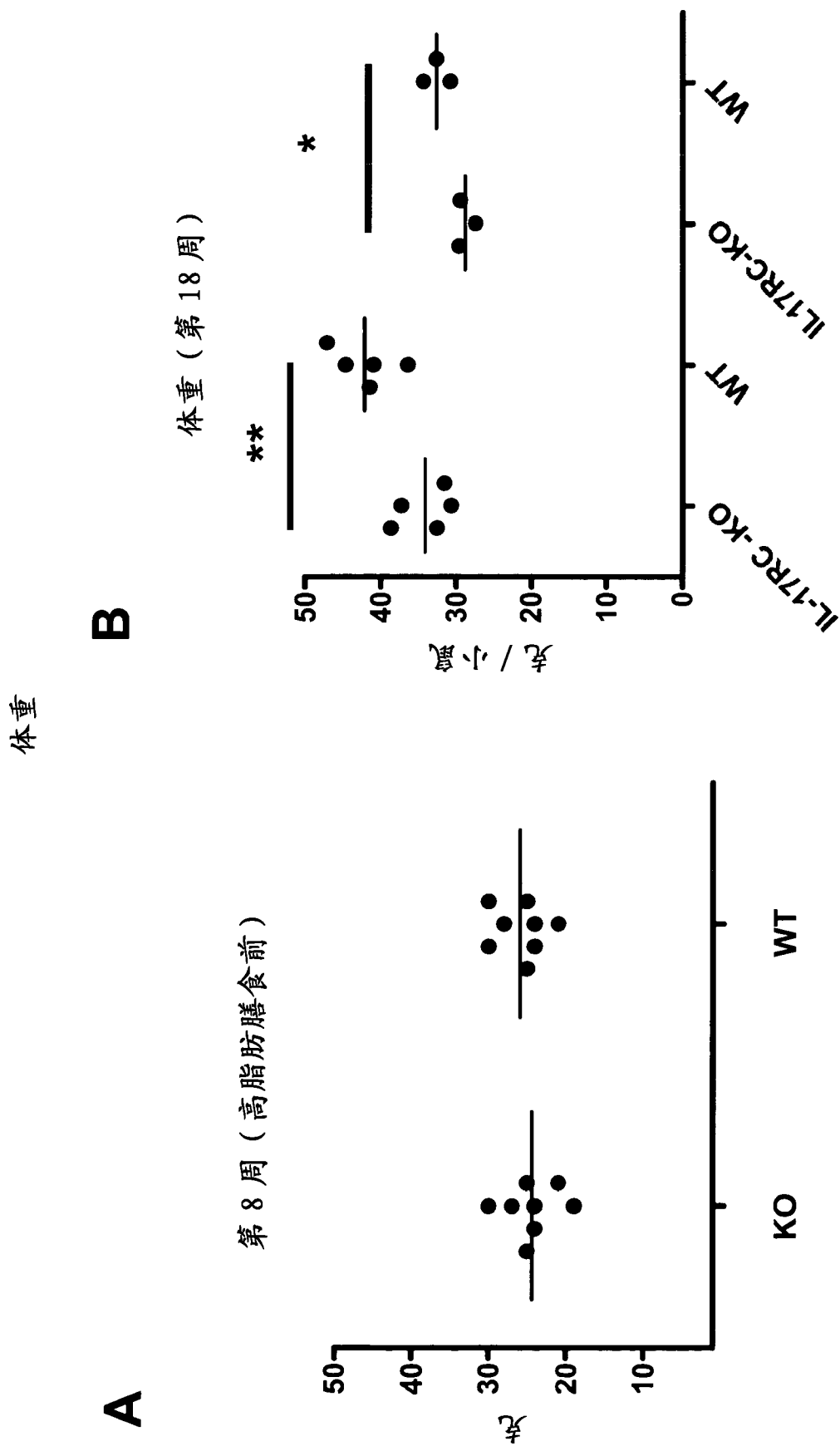


图 11

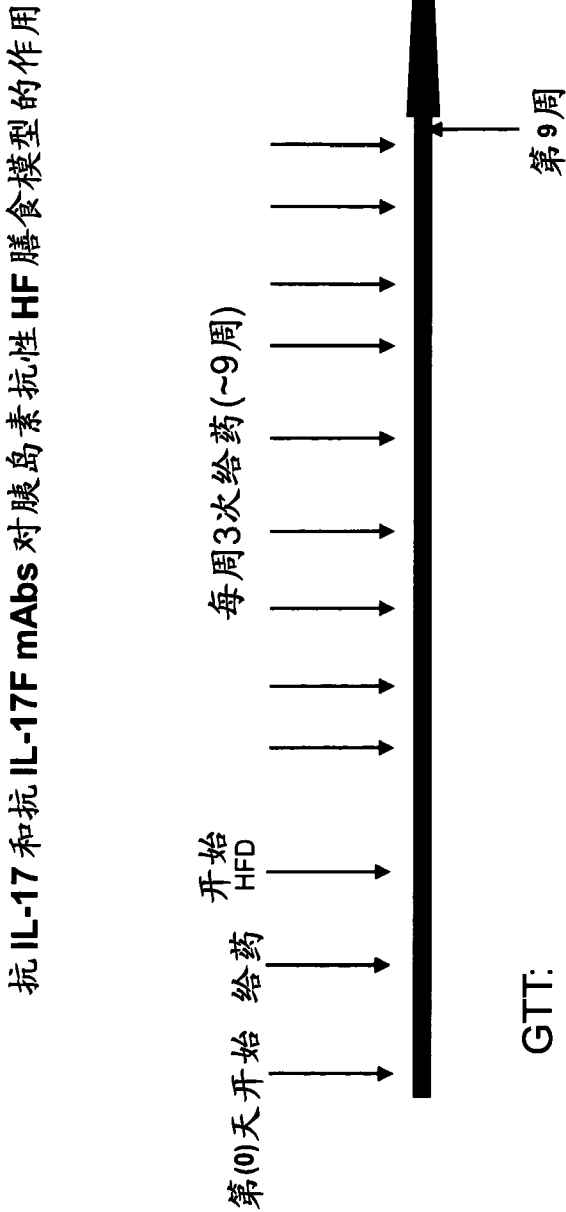


图 12

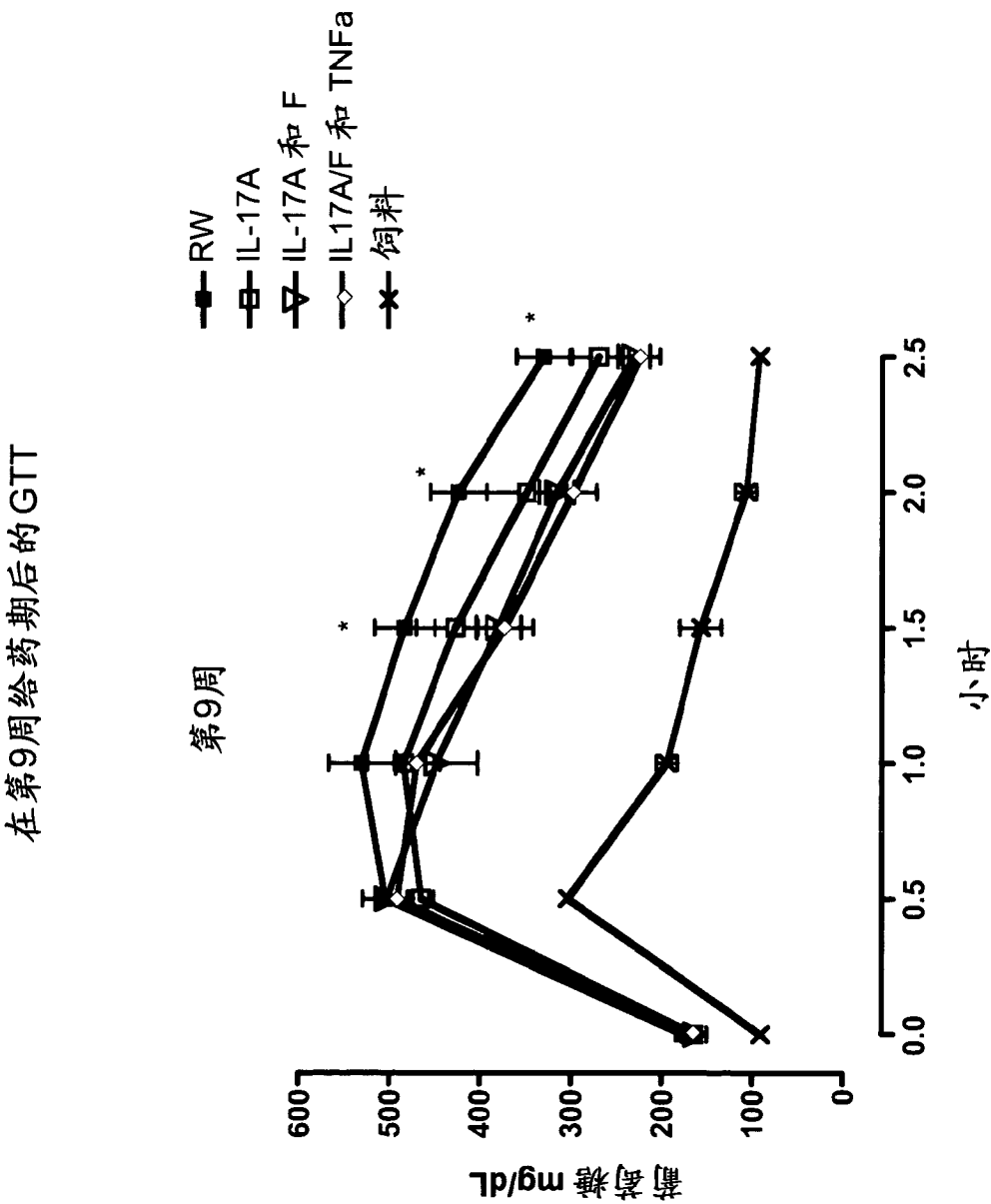
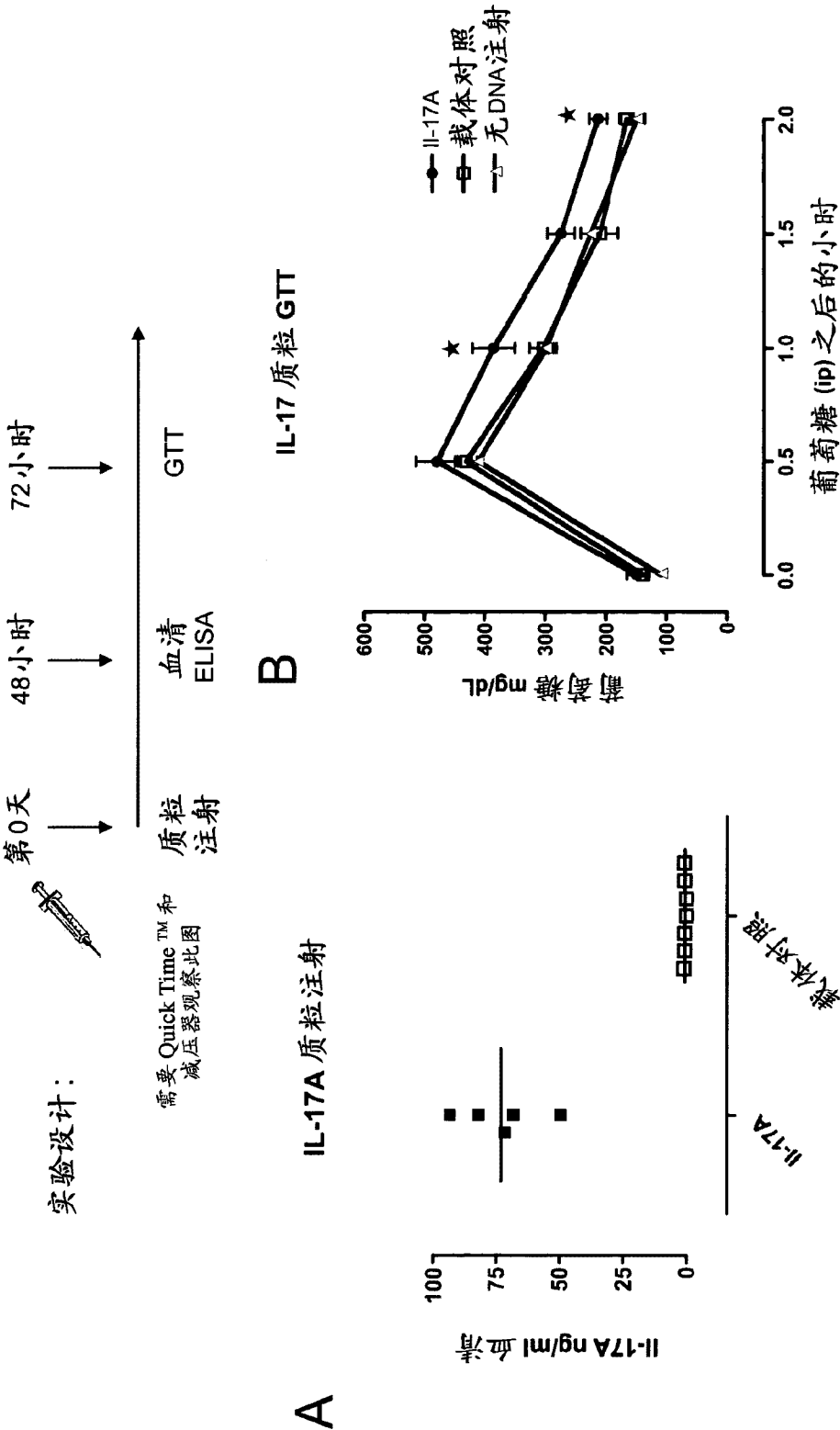


图 13

在 HFD 模型中通过 GTT 评价的抗 IL-17 ab 治疗对胰岛素抗性状态的作用

通过质粒 DNA 注射及之后的葡萄糖耐受测试的 IL-17 A 的异位表达



通过 GTT 评价的 IL-17 的过量表达对胰岛素抗性状态的作用

图 14