



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120025437 A

(43) 申请公布日 2025. 05. 23

(21) 申请号 202510171628.6	A61P 29/00 (2006.01)
(22) 申请日 2020.01.31	A61P 37/02 (2006.01)
(30) 优先权数据	A61P 35/00 (2006.01)
19154846.0 2019.01.31 EP	A61P 19/02 (2006.01)
19154850.2 2019.01.31 EP	A61P 17/06 (2006.01)
19154852.8 2019.01.31 EP	A61P 11/00 (2006.01)
(62) 分案原申请数据	A61P 13/12 (2006.01)
202080025103.7 2020.01.31	A61P 11/06 (2006.01)
(71) 申请人 努玛治疗有限公司	A61P 19/08 (2006.01)
地址 瑞士	A61P 37/08 (2006.01)
(72) 发明人 大卫·乌雷克 迪·贡德	A61P 37/06 (2006.01)
塞巴斯蒂安·迈耶	A61P 13/02 (2006.01)
克里斯蒂安·赫斯	A61P 9/00 (2006.01)
(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司	A61P 3/08 (2006.01)
11332	A61P 1/02 (2006.01)
专利代理师 刘明海 胡彬	A61P 1/16 (2006.01)
(51) Int. Cl.	A61P 31/04 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)	A61P 25/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)	A61P 3/06 (2006.01)

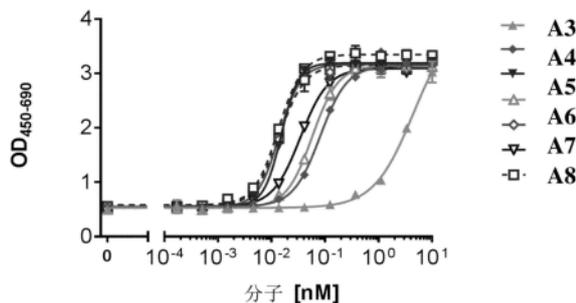
权利要求书3页 说明书136页
序列表(电子公布) 附图27页

(54) 发明名称

对TNF α 和IL-17A具有特异性的多特异性抗体、靶向IL-17A的抗体及其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及一种分离的多特异性抗体,其包含特异性结合TNF α 的第一结构域和特异性结合IL-17A的第二结构域和任意的特异性结合人血清白蛋白的第三结构域。本发明还涉及特异性结合人IL-17A的分离的抗体。此外,本发明还涉及所述抗体的使用方法、药物组合物及其使用方法,以及包含所述抗体的试剂盒。本发明还涉及包含编码所述抗体的核苷酸序列的核酸、包含所述核酸的载体、包含所述核酸或所述载体的宿主细胞以及生产所述抗体的方法。



1. 一种对人IL-17A具有结合特异性的抗体,其中所述抗体包含(i)分别为SEQ ID NO: 1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:12、13和14的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,并且其中VH包含在框架区中与氨基酸序列SEQ ID NO:10至少90%相同的氨基酸序列;并且VL包含在框架区中与氨基酸序列SEQ ID NO:21至少90%相同的氨基酸序列;或(ii)分别为SEQ ID NO:39、40和41的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO: 50、51和52的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,并且其中VH包含与氨基酸序列SEQ ID NO:48至少90%相同的氨基酸序列;并且VL包含与氨基酸序列SEQ ID NO:59至少90%相同的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中(i)所述VH包含选自由SEQ ID NO:10和11组成的组的氨基酸序列;并且所述VL包含选自由SEQ ID NO:21和22组成的组的氨基酸序列;或(ii)所述VH包含选自由SEQ ID NO:48和49组成的组的氨基酸序列;并且所述VL包含选自由SEQ ID NO:59和60组成的组的氨基酸序列。

3. 根据权利要求2所述的抗体,其包含(i)SEQ ID NO:10的VH序列和SEQ ID NO:21的VL序列;或(ii)SEQ ID NO:48的VH序列和SEQ ID NO:59的VL序列。

4. 根据权利要求2所述的抗体,其包含(i)SEQ ID NO:11的VH序列和SEQ ID NO:49的VL序列;或(ii)SEQ ID NO:11的VH序列和SEQ ID NO:60的VL序列。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的抗体,其中所述抗体对食蟹猴IL-17A具有结合特异性。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的抗体,其中通过ELISA测量,相对于人IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F,所述抗体选择性地结合人IL-17A。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的抗体,其中与IL-17A结合

(a) 抑制或阻断IL-17A与其受体(IL-17RA)之间的结合,且

(b) 降低或中和IL-17A活性。

8. 根据权利要求7所述的抗体,其中当在HT-29试验中体外评估时,所述抗体能够抑制GRO- α 分泌。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的抗体,其中所述抗体:

(h) 具有阻断IL-17A与IL-17RA之间的相互作用的能力,在ELISA试验中测定的相对于苏金单抗的效力(相对效力)大于5,优选大于10,更优选大于15,甚至更优选大于20,且其中所述相对效力是通过ELISA测量的苏金单抗的单位为ng/mL的IC₅₀值与通过ELISA测量的scFv形式的本发明抗体的单位为ng/mL的IC₅₀值的比;和/或

(i) 具有中和IL-17A的能力,在HT-29试验中通过测量GRO- α 分泌而测定的相对于苏金单抗的效力(相对效力)大于50,优选大于100,更优选大于150,且其中所述相对效力是在HT-29试验中测量的苏金单抗的单位为ng/mL的IC₅₀值与在HT-29试验中测量的scFv形式的本发明抗体的单位为ng/mL的IC₅₀值的比;和/或

(j) 能够以1ng/ml或更低,优选0.5ng/ml或更低,更优选0.2ng/ml或更低的浓度,将1ng人IL-17A的活性抑制50%,所述抑制活性通过在50pg/ml TNF α 存在下在HT-29试验中测量由人IL-17A诱导的GRO- α 分泌来测定。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的抗体,其中所述抗体:

(a) 通过表面等离子体共振测量,特别是通过表面等离子体共振以直接设置测量,与人

IL-17A结合的解离常数(K_D)小于5nM,特别是小于1nM,小于0.5nM,小于0.2nM,更特别是小于100pM,更特别是小于50pM;且

(b) 任选地,通过表面等离子体共振测量,特别是通过表面等离子体共振以捕获设置测量,与食蟹猴IL-17A结合的 K_D 小于10nM,特别是小于7nM,小于5nM,小于2nM,小于1nM,更特别是小于0.5nM。

11. 根据权利要求10所述的抗体,其中通过表面等离子体共振测量,特别是通过表面等离子体共振以直接设置测量,所述抗体与人IL-17A结合的解离常数(K_D)小于0.5nM,小于0.2nM,小于100pM,特别是小于50pM。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的抗体,其中所述抗体:

(a) 当为scFv形式时,通过差示扫描荧光法测定的熔化温度(T_m)为至少60°C,特别是至少62°C,至少65°C,更特别是至少70°C,特别地,其中所述抗体在pH 6.4、150mM NaCl的磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液中;

(b) 当为scFv形式时,当本发明的抗体的起始浓度为10mg/ml时,在5个连续的冻融循环后,单体含量损失小于5%,特别是小于3%,更特别是小于1%,特别地,其中所述抗体在pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中;

(c) 当为scFv形式时,当本发明的抗体的起始浓度为10mg/ml时,在4°C下储存至少两周,特别是至少4周后,单体含量损失为5%或更低,

特别是小于4%,小于3%,小于2%,更特别是小于1%,特别地,其中所述抗体在pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中;和/或

(d) 当本发明的抗体的起始浓度为10mg/ml时,在37°C下储存至少两周,特别是至少4周后,单体含量损失小于5%。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的抗体,其中所述抗体选自由以下组成的组:单克隆抗体、嵌合抗体、Fab、Fv、scFv、dsFv、scAb、STAB、单结构域抗体(sdAb或dAb)、单结构域重链抗体、和单结构域轻链抗体、VHH、VNAR、基于鲨鱼的VNAR结构的单结构域抗体、和基于替代支架的结合结构域包括但不限于基于锚蛋白的结构域、fynomer、avimer、anticalin、纤连蛋白、和构建在抗体恒定区中的结合位点(例如F-star的Modular Antibody Technology™),优选scFv。

14. 根据权利要求13所述的抗体,其中所述scFv具有(i)选自由SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25组成的组的氨基酸序列,优选地,其中所述scFv具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列;或所述scFv具有(ii)选自由SEQ ID NO:61和SEQ ID NO:62组成的组的氨基酸序列,优选地,其中所述scFv具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列。

15. 根据权利要求13所述的抗体,其中所述抗体是选自由IgG1、IgG2、IgG3和IgG4组成的组的IgG,优选地,其中所述抗体是IgG1或IgG4。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的抗体,其为多特异性分子。

17. 根据权利要求16所述的抗体,其中所述抗体的形式选自由以下组成的组:单链双抗体(scDb)、串联scDb(Tandab)、线性二聚体scDb(LD-scDb)、环状二聚体scDb(CD-scDb)、双特异性T细胞接合子(BiTE;串联双-scFv)、串联三-scFv、三体(Fab-(scFv)₂)或双体(Fab-(scFv)₁)、Fab、Fab-Fv₂、Morrison(IgG CH₃-scFv融合体(Morrison L)或IgG CL-scFv融合体(Morrison H))、三抗体、scDb-scFv、双特异性Fab₂、双微抗体、四抗体、scFv-Fc-scFv融

合体、scFv-HSA-scFv融合体、双-双抗体、DVD-Ig、COVD、IgG-scFab、scFab-dsscFv、Fv₂-Fc、IgG-scFv融合体如bsAb(与轻链的C-末端连接的scFv)、Bs1Ab(与轻链的N-末端连接的scFv)、Bs2Ab(与重链的N-末端连接的scFv)、Bs3Ab(与重链的C-末端连接的scFv)、Ts1Ab(与重链和轻链两者的N-末端连接的scFv)、Ts2Ab(与重链的C-末端连接的dsscFv)、基于异二聚体Fc结构域的双特异性抗体如Knob-into-Hole抗体(KiH);与异二聚体Fc结构域或任何其他异二聚体结构域的任意一条链的N-和/或C-末端融合的Fv、scFv、scDb、串联双-scFv、串联三-scFv、Fab-(scFv)₂、Fab-(scFv)₁、Fab、Fab-Fv₂、COVD、MATCH和DuoBody。

18. 一种药物组合物,其包含权利要求1至17中任一项所述的抗体和药学上可接受的载体。

19. 权利要求1至17中任一项所述的抗体,或权利要求18所述的药物组合物,其用作药物。

20. 权利要求1至17中任一项所述的抗体,或权利要求18所述的药物组合物,其用于治疗炎性病况或自身免疫疾病。

21. 权利要求1至17中任一项所述的抗体,或权利要求18所述的药物组合物,其用于治疗癌症、关节炎、类风湿关节炎、骨关节炎、反应性关节炎、银屑病、慢性阻塞性肺疾病、系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮肾炎、自身免疫性炎症性肠病、哮喘、多发性硬化症、或囊性纤维化、骨质损失、气道超敏反应、脱髓鞘病症、皮肤超敏反应、急性移植排斥、同种异体移植排斥、移植物对抗宿主病、系统性硬化症、泌尿外炎症病症、心血管疾病、血管炎、周期性发烧、葡萄糖新陈代谢障碍、肺病、牙周炎、肝脏基质角膜炎、过敏、炎症疼痛、脊椎关节病变、败血症、败血性或内毒素休克、脑膜炎、外科创伤、自身免疫血液病症、阿尔茨海默氏病、结节病、肝硬化、肝炎、肾小球肾炎或血脂紊乱。

22. 权利要求1至17中任一项所述的抗体或权利要求18所述的药物组合物在制备用于治疗炎性病况或自身免疫疾病的药物中的用途。

23. 权利要求1至17中任一项所述的抗体或权利要求18所述的药物组合物在制备用于治疗癌症、关节炎、类风湿关节炎、骨关节炎、反应性关节炎、银屑病、慢性阻塞性肺疾病、系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮肾炎、自身免疫性炎症性肠病、哮喘、多发性硬化症、囊性纤维化、骨质损失、气道超敏反应、脱髓鞘病症、皮肤超敏反应、急性移植排斥、同种异体移植排斥、移植物对抗宿主病、系统性硬化症、泌尿外炎症病症、心血管疾病、血管炎、周期性发烧、葡萄糖新陈代谢障碍、肺病、牙周炎、肝脏基质角膜炎、过敏、炎症疼痛、脊椎关节病变、败血症、败血性或内毒素休克、脑膜炎、外科创伤、自身免疫血液病症、阿尔茨海默氏病、结节病、肝硬化、肝炎、肾小球肾炎或血脂紊乱的药物中的用途。

24. 一种核酸,其编码权利要求1至17中任一项所述的抗体。

25. 一种载体,其包含权利要求24所述的核酸。

26. 一种宿主细胞,其包含权利要求24所述的核酸或权利要求25所述的载体。

27. 一种生产权利要求1至17中任一项所述的抗体的方法,所述方法包括以下步骤:培养宿主细胞,所述宿主细胞包含编码权利要求1至17中任一项所述的抗体的核酸或载体。

对TNF α 和IL-17A具有特异性的多特异性抗体、靶向IL-17A的抗体及其使用方法

[0001] 本发明是申请日为2020年1月31日,题为《对TNF α 和IL-17A具有特异性的多特异性抗体、靶向IL-17A的抗体及其使用方法》的中国发明专利申请202080025103.7的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种分离的多特异性抗体,其包含特异性结合TNF α 的第一结构域和特异性结合IL-17A的第二结构域以及任选的特异性结合人血清白蛋白的第三结构域。本发明还涉及所述抗体的使用方法、药物组合物及其使用方法、以及包含所述抗体的试剂盒。本发明还涉及包含编码所述抗体的核苷酸序列的核酸、包含所述核酸的载体、包含所述核酸或所述载体的宿主细胞、以及生产所述抗体的方法。

[0003] 本发明还涉及特异性结合人IL-17A的分离的抗体、包含本发明所述分离的抗体的多特异性分子、药物组合物及其使用方法。本发明还涉及包含所述抗体的试剂盒、包含编码所述抗体的核苷酸序列的核酸、包含所述核酸的载体、包含所述核酸或所述载体的宿主细胞、以及生产所述抗体的方法。

背景技术

[0004] TNF α 是一种同源三聚体促炎细胞因子,由免疫系统细胞释放并与之相互作用。TNF α 以可溶性蛋白和前体的形式存在,该形式被称为跨膜TNF α ,表示为细胞表面II型多肽。跨膜TNF α 被金属蛋白酶如TNF α 转化酶(TACE)在残基Ala76和Val177之间加工,从而释放出157个氨基酸残基的TNF α 可溶形式。可溶性TNF α 是一个17-kDa的裂解单体的同源三聚体。跨膜TNF α 也作为26-kDa的未裂解单体的同源三聚体存在。膜TNF α 和可溶性TNF α 都具有生物活性。TNF α 可与两种受体结合,即TNF受体1(TNFR1)和2(TNFR2),其中跨膜TNF α 主要通过TNFR2发挥作用。TNFR1在各种细胞上广泛表达,它的参与会触发促炎症反应。TNFR2的表达几乎只限于免疫细胞,它的结合促进了细胞的生存和增殖(Bazzoni F,Beutler B,N Engl J Med (1996) 334(26):1717-25;Locksley RM et al.,Cell(2001) 104(4):487-501;Caball-Hierro L,Lazo PS,Cell Signal(2012) 24(6):1297-305;Brenner D et al.,Nat Rev Immunol(2015) 15(6):362-74)。

[0005] TNF α 已被证明在许多人类疾病中上调,例如炎症和自身免疫疾病,包括慢性疾病,例如类风湿性关节炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎和多发性硬化症。已提出了针对TNF α 的抗体用于预防和治疗内毒素性休克(Beutler et al.,Science,234,470-474,1985)。Bodmer et al.(Critical Care Medicine,21,S441-S446,1993)和Wherry et al.(Critical Care Medicine,21,S436-S440,1993)讨论了抗TNF α 抗体在治疗感染性休克中的治疗潜力。Kirschenbaum et al.(Critical Care Medicine,26,1625-1626,1998)也讨论了抗TNF α 抗体在治疗感染性休克中的用途。可以使用抗TNF α 单克隆抗体有效地治疗胶原蛋白诱导的关节炎(Williams et al.(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.89,9784-9788,1992))。Feldman et al.(Transplantation Proceedings,30,4126-4127,1998)、Adorini et al.(Trends in

Immunology Today,18,209-211,1997)和Feldman et al.(Advances in Immunology,64,283-350,1997)讨论了抗TNF α 抗体在治疗类风湿性关节炎和克罗恩病中的用途。先前在这种治疗中使用的TNF α 抗体通常是嵌合抗体,例如美国专利号5,919,452中所描述的那些。

[0006] 在现有技术中已经描述了针对TNF α 的单克隆抗体。Meager et al.(Hybridoma,6,305-311,1987)描述了针对重组TNF α 的鼠单克隆抗体。Fendly et al.(Hybridoma,6,359-370,1987)描述了针对重组TNF α 的鼠单克隆抗体在定义TNF α 上的中和表位中的用途。此外,在国际专利申请WO 92/11383中,公开了TNF α 特异性重组抗体,包括CDR移植抗体。Rankin et al.(British J.Rheumatology,34,334-342,1995)描述了这种CDR移植抗体在治疗类风湿性关节炎中的用途。美国专利号5,919,452公开了抗TNF α 嵌合抗体及其在治疗与TNF α 存在相关的病理中的用途。Stephens et al.(Immunology,85,668-674,1995)、GB-A-2 246 570、GB-A-2 297 145、US 8,673,310、US2014/0193400、EP 2 390 267B1、US 8,293,235、US 8,697,074、WO 2009/155723 A2和WO 2006/131013 A2公开了其他的抗TNF α 抗体。

[0007] 目前批准的抗TNF α 生物治疗药物包括:(i) 英夫利西单抗,一种嵌合IgG抗人单克隆抗体 (**Remicade®**; Wiekowski M et al.:“Infliximab(Remicade)”,Handbook of Therapeutic Antibodies,WILEY-VCH;Weinheim,2007-01-01,p.885-904);(ii) 依那西普,一种TNFR2二聚体融合蛋白,带有IgG1Fc (**Enbrel®**);(iii) 阿达木单抗,一种全人单克隆抗体 (mAb) (**Humira®**;Kupper H et al.:“Adalimumab(Humira)”,Handbook of Therapeutic Antibodies,WILEY-VCH;Weinheim,2007-01-01,p.697-732);(iv) 赛妥珠单抗,一种PEG化的Fab片段 (**Cimzia®**;Melmed G Y et al.:“Certolizumab pegol”,Nature Reviews.Drug Discovery,Nature Publishing Group,GB,Vol.7,No.8,2008-08-01,p.641-642);(v) 戈利木单抗,一种人IgG1K单克隆抗体 (**Simponi®**;Mazumdar S et al.:“Golimumab”,mAbs,Landes Bioscience,US,Vol.1,No.5,2009-09-01,p.422-431)。

[0008] 然而,抗TNF α 治疗被证明有某些局限性。并非所有的病人都能对抗TNF α 取得足够的临床反应或长期保持临床反应,从而导致需要转用新的疗法来控制他们的疾病。例如,在对类风湿性关节炎(RA)患者进行抗TNF α 治疗时,大约40%的患者从未有反应,只有20%的患者的疾病活动性大大降低。因此,在更有效地抑制炎症和自身免疫病症等疾病的进展方面,仍然有相当大的临床需求没有得到满足。

[0009] 在抗TNF α 治疗后,患者体内补充性生物途径的激活,可能是许多患者对抗TNF α 治疗没有反应或只有部分反应的原因之一。最近出现的大量证据表明,IL-17A在炎症性和自身免疫性病症的发病机制中发挥了作用,例如在RA中。

[0010] 人类和小鼠的白细胞介素17(IL-17)家族由六个细胞因子组成,即IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E(也称为IL-25)和IL-17F,在急性和慢性炎症反应中发挥作用。白细胞介素17受体(IL-17R)家族包括五个成员,即IL-17RA、IL-17RB、IL-17RC、IL-17RD和IL-17RE。

[0011] 白细胞介素-17A(IL-17A或IL17A,与IL-17或细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-8(CTLA-8)同义)是一种同型二聚促炎细胞因子。IL-17A由记忆性CD4+T细胞(称为Th17)、CD8+T细胞(Tc17)、不变的NKT细胞、 γ δ T细胞、非T非B淋巴细胞(称为3型先天淋巴细胞)和中性粒细胞的一个亚群产生。IL-17A和IL-17F在IL-17家族中形成一个独特的亚组。它们在IL-

17家族中具有最大的序列同源性和一致性,而IL-17家族的其他成员与IL-17A的序列一致性明显较低(Starnes,T.et al.,J Immunol.167(8):4137-40(2001);Aggarwal,S.and Gurney,A.L.,J.Leukoc Biol,71(1):1-8(2002))。IL-17A和IL-17F都通过由IL-17RA和IL-17RC组成的异二聚受体复合物发出信号(Toy D.et al.,J Immunol.2006;Wright JF.et al.,J Immunol.2008;181(4):2799-2805)。IL-17A和IL-17F可以形成IL-17A/A或IL-17F/F二硫化物连接的同型二聚体和IL-17A/F二硫化物连接的异二聚体(Wright JF.et al.,J Immunol.2008;181(4):2799-2805;Liang SC.et al.,J Immunol.2007;179(11):7791-7799)。IL-17A以及IL-17F诱导促炎细胞因子和抗微生物肽的表达。

[0012] 人IL-17A(CTLA-8,Swiss Prot Q 16552,也被称为IL-17或IL17;SEQ ID NO:33)与各种炎症有关,如自身免疫疾病、代谢性病症和癌症(Ouyang W.et al.,Immunity.2008;28(4):454-467;Milner JD.,Curr Opin Immunol.2011;23(6):784-788;Kuchroo VK.et al.,Nat Med.2012;18(1):42-47;Ahmed M.and Gaffen SL.,Cytokine Growth Factor Rev.2010;21(6):449-453;Trinchieri G.,Annu Rev Immunol.2012;30:677-706;Gallimore AM,Godkin A.,N Engl J Med.2013;368(3):282-284;Ye P.et al.,J Exp Med.2001;194(4):519-527;Chung DR.et al.,J Immunol.2003;170(4):1958-1963;Huang W.et al.,J Infect Dis.2004;190(3):624-631;Ishigame H.et al.,Immunity.2009;30(1):108-119;see for review Gu C.et al.,Cytokine.2013Nov 64(2))。IL-17A在诱导其他炎症细胞因子和趋化因子以招募中性粒细胞、急性期蛋白、抗微生物肽、粘蛋白、基质金属蛋白酶和粘附分子方面起作用。IL-17A还与其他细胞因子包括TNF α 和IL-1 β 协同作用,进一步诱导趋化因子的表达(Chabaud M.et al.,J.Immunol.161(1):409-14(1998))。

[0013] IL-17A的病理性产生导致过度的炎症和组织损伤(see for review Gu et al.,Cytokine.2013November;64(2))。在多发硬化症(MS)、银屑病、哮喘、克罗恩病和类风湿性关节炎患者中发现高IL-17A水平。用IL-17A中和抗体治疗动物可降低自身免疫性脑脊髓炎的疾病发生率和严重程度(Komiyama,Y.et al.,J.Immunol.177(2006)566-573)。此外,IL-17A中和抗体可降低小鼠类风湿性关节炎模型的严重程度和发病率,在类风湿性关节炎患者发炎的关节滑液中可检测到高水平的IL-17A(Ziolkowska,M.et al.,J.Immunol.164(2000)2832-2838;Kotake,S.et al.,J.Clin.Invest.103(1999)1345-1352;Hellings P.W.et al.,Am.J.Resp.Cell Mol.Biol.28(2003)42-50)。

[0014] 大量的人类和动物模型的实验证据支持了IL-17A靶向疗法的发展。一些抗IL-17抗体被开发出来,包括AIN457(苏金单抗(secukinumab));参见美国专利号7,807,155和WO 2006/013107),LY2439821(ixekizumab;参见美国专利号7,838,638和8,110,191和WO 2007/070750),SCH900117(默克),RG4943(罗氏)等。WO 2006/013107、WO 2006/054059、WO 2007/070750、WO2007/149032、WO 2008/001063、WO 2008/021156、WO 2010/034443、WO2010/102251、WO 2012/018767、WO 2014/161570、WO 2014/001368、WO2014/122613、WO 2015/070697、WO 2015/137843、WO 2016/048188、WO2016/113557、WO 2016/138842、WO 2017/068472公开了抗IL-17A抗体的实例。

[0015] 已经进行或仍在进行各种阻断IL-17A信号的分子的若干临床试验。靶向IL-17A或其受体的生物制剂及其疗效正在炎症性或自身免疫性病症中进行评估,如类风湿性关节炎、强直性脊柱关节病、克罗恩病、银屑病、多发硬化症和臭氧引起的中性粒细胞增多症。

[0016] 例如,苏金单抗是一种全人IgG1 κ 抗IL-17A单克隆抗体(美国专利号7,807,155和WO 2006/013107),现在被批准用于治疗银屑病、银屑病关节炎和强直性脊柱炎行为(see for review Wang et al.,*Eur J Rheumatol* 2017(4)272-7)。在评估苏金单抗在银屑病关节炎受试者中的长期疗效和安全性的III期研究中(FUTURE I和FUTURE II),苏金单抗在改善银屑病关节炎的症状和体征方面明显比安慰剂有效(Mease PJ.et al.*N Engl J Med* 2015;373:1329-39;McInnes IB.et al.*The Lancet*;386:1137-46)。

[0017] Ixekizumab是一种人源化抗IL-17A单克隆抗体(美国专利号7,838,638和8,110,191和WO 2007/070750),在一项为期24周的III期试验(SPIRIT-P1)中,在没有接受过生物疗法的活动性银屑病关节炎患者中进行了研究(Mease PJ.et al.,*Ann Rheum Dis*.2017Jan;76(1):79-87)。研究表明,在没有接受过生物疗法的活动性银屑病关节炎患者中,ixekizumab治疗导致疾病活动和身体功能的改善,以及对结构性损害进展的抑制。Ixekizumab对治疗中度至重度斑块状银屑病患者也有效果(Griffiths CEM et al.,*The Lancet*;386:541-51)。

[0018] Brodalumab是一种全人IL-17受体(IL-17RA)单克隆抗体(见美国专利号7,767,206),已被证明对治疗银屑病有效(Papp KA.et al.*N Engl J Med* 2012;366:1181-9)。在一项安慰剂对照的II期研究中,它在银屑病关节炎患者中也显示出明显和持续的反应(Mease PJ.et al.,*N Engl J Med* 2014;370:2295-306)。然而,使用brodalumab治疗的同时,也出现了强烈的不良事件,如上呼吸道感染、疲劳、腹泻和报告的自杀念头和行为(see for review Wang et al.,*Eur J Rheumatol*2017(4)272-7)。

[0019] 因此,IL-17A是治疗炎症和自身免疫性病的一个有希望的目标。尽管到目前为止已经发现了一些抗IL-17A抗体,但仍然需要开发改进的治疗性抗体,能够有效地减少或消除炎症反应和自身免疫性疾病中的IL-17A活性,同时具有更好的安全性,适合开发。治疗性抗体除了具有有益的亲和力、疗效和免疫原性外,还应该具有改善的生物物理特性,导致更好的可开发性、高产率可生产性和蛋白质稳定性。一种同时阻断TNF α 和IL-17A生物途径的治疗方法,有可能显著提高反应率,并解决由TNF α 和IL-17A介导的病症的治疗中未满足的需求。到目前为止,已经提出了几种特异性结合IL-17和TNF α 的生物治疗剂。WO 2010/102251(Abbvie Inc.)披露了与TNF α 和IL-17结合的双特异性四价抗体。WO 2013/063110(Abbvie Inc.)披露了一种能够结合TNF和IL-17的多价DVD-Ig结合蛋白。WO 2014/044758(Covagen ACJ)披露了一种能够抑制糖基化IL-17A和结合TNF α 的融合构建体。另外,WO 2014/137961(Eli Lilly and Company)和WO 2017/132457(Janssen Biotech)公开了抗TNF和抗IL-17A的双特异性抗体。WO 2017/102830(UCB Biopharma)公开了一种多特异性抗体,它能够抑制TNF α 、IL-17A和IL-17F,特别是包括一个对人TNF α 特异的结合结构域和一个对人IL-17A和人IL-17F特异的结合结构域。Xu et al.,*Oncotarget*,8(2017)81860-81872生产了一种IgG样双特异性抗体(bsAb),其中该IgG样分子的两臂分别针对TNF α 和IL-17A。有趣的是,WO 2015/014979(Roche,see also Fischer et al.,*Arthritis&Rheumatology* 67(2015)51-62)披露了双特异性四价IL-17AxTNF抗体构建体,其对两种抗原中的每一种都是二价("2+2"构建体)或单价("2+2"构建体)。根据WO 2015/014979,二价构建体要优于单价替代物。

[0020] 然而,仍然需要能够有效地中和IL-17A和TNF α 的活性的改进抗炎药物,用于治疗

相当一部分患者对治疗仍无充分反应的病症,例如炎症性和自身免疫性疾病,例如类风湿性关节炎。仍然需要开发改进的治疗性抗体,有效地中和IL-17A和TNF α 的活性,具有有益的亲和力和疗效,和改善的安全性,例如较低的免疫原性。此外,治疗性抗体应具有改进的生物物理特性,从而具有更好的可开发性、高产率可生产性和卓越的抗体稳定性。

发明内容

[0021] 本发明的一个目的是提供一种改善炎症和自身免疫疾病的治疗的药物。

[0022] 本发明的抗体为医疗需求未得到满足的患者提供了一种新的治疗选择。本发明提供了一种新的多特异性抗体,其能够同时抑制IL-17A和TNF α ,并且具有进一步改善的有益于治疗的特性,例如更高的亲和力、改善的功效、选择性、安全性(例如低免疫原性)和改善的生物物理特性(例如可开发性(developability)和稳定性)。

[0023] 一方面,本公开涉及一种分离的多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域以及任意的特异性结合人血清白蛋白的第三结构域。

[0024] 一方面,本公开涉及一种药物组合物,其包含本发明的多特异性抗体和药学上可接受的载体。

[0025] 另一方面,本公开提供了本发明的多特异性抗体或本发明的药物组合物,用作药物。

[0026] 另一方面,本公开提供了用于治疗由IL-17A和/或TNF α 介导的病症或可通过抑制Gro- α 分泌来治疗的病症,特别是用于治疗炎症病况或自身免疫疾病的本发明的多特异性抗体或本发明的药物组合物。

[0027] 一方面,本公开提供了本发明的多特异性抗体或本发明的药物组合物用于治疗由IL-17A和/或TNF α 介导的病症或可通过抑制Gro- α 分泌来治疗的病症,特别是用于治疗炎症病况或自身免疫疾病的用途。

[0028] 一方面,本公开提供了本发明的多特异性抗体或本发明的药物组合物在制备用于治疗由IL-17A和/或TNF α 介导的病症或可通过抑制Gro- α 分泌来治疗的病症,特别是用于治疗炎症病况或自身免疫疾病的药物中的用途。

[0029] 又一方面,本公开提供了一种治疗由IL-17A和/或TNF α 介导的病症的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用有效量的本发明的多特异性抗体或本发明的药物组合物。

[0030] 一方面,本公开提供了一种试剂盒,其包含本发明的多特异性抗体,或本发明的药物组合物。

[0031] 另一方面,本公开提供了一种核酸,其包含编码本发明的多特异性抗体的核苷酸序列。另一方面,本公开提供了包含所述核酸的载体。另一方面,本公开提供了包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。

[0032] 又一方面,本公开提供了生产本发明的多特异性抗体或其结合结构域或其片段的方法,该方法包括以下步骤:培养宿主细胞,所述宿主细胞包含编码本发明的多特异性抗体或其结合结构域或其片段的核酸或载体。

[0033] 分别单独地或组合地在以下各项中概述的本公开的方面、有利特征和优选实施方案进一步有助于解决本发明的目的:

[0034] 1. 一种分离的多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域。

[0035] 2. 根据项1所述的多特异性抗体,其中所述抗体包含仅一个特异性结合IL-17A的结构域和/或仅一个特异性结合TNF α 的结构域。

[0036] 3. 根据项1或项2所述的多特异性抗体,其中所述抗体能够中和人TNF α 和人IL-17A的生物活性。

[0037] 4. 根据前述项中任一项所述的多特异性抗体,其中相对于人IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F,所述抗体选择性地结合人IL-17A,如通过ELISA测量的。

[0038] 5. 前述项中任一项所述的多特异性抗体,其还包含对除IL-17A或TNF α 之外的抗原具有特异性的第三结构域。

[0039] 6. 根据项5所述的多特异性抗体,其中所述抗体包含特异性结合人血清白蛋白(HSA)的第三结构域,优选地,所述抗体包含特异性结合人血清白蛋白的仅一个结构域。

[0040] 7. 根据前述项中任一项所述的多特异性抗体,其中所述结构域能够同时结合其各自的抗原或受体。

[0041] 8. 根据前述项中任一项所述的多特异性抗体,其中所述第一结构域和所述第二结构域,和,任选地所述第三结构域,独立地选自由以下组成的组:

[0042] Fab、Fv、scFv、dsFv、scAb、STAB、单结构域抗体(sdAb或dAb)、单结构域重链抗体、和单结构域轻链抗体、VHH、VNAR、基于鲨鱼的VNAR结构的单结构域抗体、和基于替代支架的结合结构域包括但不限于基于锚蛋白的结构域、fynomer、avimer、anticalin、纤连蛋白、和构建在抗体恒定区中的结合位点(例如F-star的Modular Antibody TechnologyTM),优选地,选自由以下组成的组:Fab、Fv和scFv,更优选地,其中所述第一结构域和/或所述第二结构域和/或所述第三域是Fv或scFv。

[0043] 9. 根据前述项中任一项所述的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体的形式选自由以下组成的组:单链双抗体(scDb)、串联scDb(Tandab)、线性二聚体scDb(LD-scDb)、环状二聚体scDb(CD-scDb)、双特异性T细胞接合子(BiTE;串联双-scFv)、串联三-scFv、三体(tribody)(Fab-(scFv)₂)或双体(bibody)(Fab-(scFv)₁)、Fab、Fab-Fv₂、Morrison(IgG CH3-scFv融合体(Morrison L)或IgG CL-scFv融合体(Morrison H))、三抗体、scDb-scFv、双特异性Fab₂、双微抗体、四抗体、scFv-Fc-scFv融合体、scFv-HSA-scFv融合体、双双抗体、DVD-Ig、COVD、IgG-scFab、scFab-dsscFv、Fv₂-Fc、IgG-scFv融合体例如bsAb(与轻链的C-末端连接的scFv)、Bs1Ab(与轻链的N-末端连接的scFv)、Bs2Ab(与重链的N-末端连接的scFv)、Bs3Ab(与重链的C-末端连接的scFv)、Ts1Ab(与重链和轻链的N-末端连接的scFv)、Ts2Ab(与重链的C-末端连接的dsscFv)、基于异二聚体Fc结构域的双特异性抗体例如Knob-into-Hole抗体(KiH);与异二聚体Fc结构域或任何其他异二聚体结构域的任意一条链的N-和/或C-末端融合的Fv、scFv、scDb、串联双-scFv、串联三-scFv、Fab-(scFv)₂、Fab-(scFv)₁、Fab、Fab-Fv₂、COVD、MATCH和DuoBody,优选为三体或scDb-scFv。

[0044] 10. 根据前述项中任一项所述的多特异性抗体,其中所述抗体不包含免疫球蛋白Fc区多肽,且任选地,不包含CH1和/或CL区。

[0045] 11. 前述项中任一项所述的多特异性抗体,其中所述抗体是三体。

[0046] 12. 根据项11所述的多特异性抗体,其中所述第一结构域、所述第二结构域和所述

第三结构域独立地选自自由以下组成的组:Fab和scFv,优选地,其中所述第二结构域是Fab且所述第一结构域和第三结构域是scFv。

[0047] 13.根据项9所述的多特异性抗体,其中所述抗体是scDb-scFv,优选地其中所述scFv部分与scDb在C-末端融合,更优选地其中所述第一结构域和所述第二结构域形成scDb且所述第三结构域是scFv。

[0048] 14.根据项13所述的多特异性抗体,其中所述抗体由下式表示:

[0049] VLA-L1-VHC-L2-VLC-L3-VHA-L4-VLB-L5-VHB或

[0050] VLB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VHB-L4-VLC-L5-VHC或

[0051] VLC-L1-VHB-L2-VLB-L3-VHC-L4-VLA-L5-VHA或

[0052] VLA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VHA-L4-VLC-L5-VHC,

[0053] 优选VLB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VHB-L4-VLC-L5-VHC或VLA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VHA-L4-VLC-L5-VHC,

[0054] 更优选VLB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VHB-L4-VLC-L5-VHC,

[0055] 其中VLA和VHA分别是第一结构域的轻链可变区和重链可变区;且VLB和VHB分别是第二结构域的轻链可变区和重链可变区;且VLC和VHC分别是第三结构域的轻链可变区和重链可变区,且其中L1、L2、L3、L4和L5是多肽接头。

[0056] 15.根据项14所述的多特异性抗体,其中所述L1和L3如SEQ ID NO:132所示。

[0057] 16.根据项14至15中任一项所述的多特异性抗体,其中所述L2、L4和L5如SEQ ID NO:23所示。

[0058] 17.根据前述项中任一项所述的多特异性抗体,其中所述抗体具有以下特征

[0059] (a) 具有中和IL-17A的能力,在HT-29试验中通过测量Gro- α 分泌而测定的相对于苏金单抗的效力(相对效力)大于2,例如大于5,大于10,大于15,大于20,大于25,大于30,大于35,大于40,大于45,优选大于50,且其中所述相对效力是在HT-29试验中测量的苏金单抗的单位为ng/mL的IC₅₀值与在HT-29试验中测量的所述多特异性抗体的单位为ng/mL的IC₅₀值的比;且

[0060] (b) 具有中和TNF α 的能力,在HT-29试验中通过测量Gro- α 分泌而测定的相对于根据SEQ ID NO:149的scDb(A13)的效力(相对效力)为至少1,例如,大于1,大于1.5,大于2,大于2.5,大于3,大于3.5,优选大于4,更优选大于4.5,且其中所述相对效力是在HT-29试验中测量的根据SEQ ID NO:149的所述scDb的单位为nM的IC₅₀值与在HT-29试验中测量的所述多特异性抗体的单位为nM的IC₅₀值的比;且

[0061] (c) 任选地,具有阻断IL-17A与IL-17RA之间的相互作用的能力,在ELISA试验中测定的相对于苏金单抗的效力(相对效力)大于2,例如,大于3,大于4,大于5,大于6,大于7,大于8,大于9,优选大于10,且其中所述相对效力是通过ELISA测量的苏金单抗的单位为ng/mL的IC₅₀值与通过ELISA测量的所述多特异性抗体的单位为ng/mL的IC₅₀值的比;且

[0062] (d) 任选地,具有中和TNF α 的能力,在L929试验中测定的相对于根据SEQ ID NO:149的scDb(A13)的效力(相对效力)为至少0.4,例如,至少0.5,优选至少1,且其中所述相对效力是在L929试验中测量的根据SEQ ID NO:149的所述scDb的单位为nM的IC₅₀值与在L929试验中测量的所述多特异性抗体的单位为nM的IC₅₀值的比;和/或

[0063] (e) 与人IL-17A结合,解离常数(K_D)小于5nM,例如小于4nM,小于3nM,小于2nM,小

于1nM,优选小于0.5nM,如通过表面等离子共振测量的;且任选地,与食蟹猴IL-17A结合, K_D 小于5nM,例如,小于4nM,小于3nM,小于2nM,小于1nM,优选小于0.5nM,如通过表面等离子共振测量的;

[0064] (f) 与人TNF α 结合,解离常数(K_D)小于5nM,例如,小于4nM,小于3nM,小于2nM,小于1nM,优选小于0.5nM,更优选小于0.25nM,如通过表面等离子共振测量的;且

[0065] (g) 任选地,与人血清白蛋白结合,解离常数(K_D)小于5nM,例如,小于4nM,小于3nM,优选小于2nM,如通过表面等离子共振测量的;且任选地,与食蟹猴血清白蛋白结合,解离常数(K_D)小于5nM,例如,小于4nM,小于3nM,优选小于2nM,如通过表面等离子共振测量的。

[0066] 18. 根据前述项中任一项所述的多特异性抗体,其中所述抗体具有以下特征

[0067] (a) 在pH 6.4、150mM NaCl的磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液中,通过差示扫描荧光法测定的解链温度(T_m)为至少55°C,优选至少58°C,更优选至少60°C;

[0068] (b) 当所述多特异性抗体在pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的起始浓度为10mg/ml时,在五个连续的冻融循环后,单体含量损失小于5%,

[0069] 例如,小于4%,小于3%,小于2%,优选1%或更低;

[0070] (c) 当所述多特异性抗体在pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的起始浓度为10mg/ml时,在4°C下储存至少两周,特别是至少4周后,单体含量损失小于10%,优选小于5%;和/或

[0071] (d) 当所述多特异性抗体在pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的起始浓度为10mg/ml时,在37°C下储存至少两周,特别是至少4周后,单体含量损失小于20%,优选小于15%。

[0072] 19. 前述项中任一项所述的多特异性抗体,其中每个结构域包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:

[0073] (a) 所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,且

[0074] (b) 所述VL依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0075] 20. 根据前述项中任一项所述的多特异性抗体,其中所述特异性结合IL-17A的第一结构域包括一组CDR:HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中,该组CDR相对于这样的一组CDR具有10个或更少个氨基酸取代:(i)HCDR1'如SEQ ID NO:1所示;HCDR2'如SEQ ID NO:2所示;HCDR3'如SEQ ID NO:3所示;LCDR1'如SEQ ID NO:12所示;LCDR2'如SEQ ID NO:13所示;LCDR3'如SEQ ID NO:14所示,或者(ii)HCDR1'如SEQ ID NO:39所示;HCDR2'如SEQ ID NO:40所示;HCDR3'如SEQ ID NO:41所示;LCDR1'如SEQ ID NO:50所示;LCDR2'如SEQ ID NO:51所示;LCDR3'如SEQ ID NO:52所示。

[0076] 21. 根据项20所述的多特异性抗体,其中

[0077] (i)

[0078] (a) 所述HCDR1如选自SEQ ID NO:1、4和7中的任一个的氨基酸序列所示;

[0079] (b) 所述HCDR2如选自SEQ ID NO:2、5和8中的任一个的氨基酸序列所示;

[0080] (c) 所述HCDR3如选自SEQ ID NO:3、6和9中的任一个的氨基酸序列所示;

[0081] (d) 所述LCDR1如选自SEQ ID NO:12、15和18中的任一个的氨基酸序列所示;

[0082] (e) 所述LCDR2如选自SEQ ID NO:13、16和19中的任一个的氨基酸序列所示;且

[0083] (f) 所述LCDR3如选自SEQ ID NO:14、17和20中的任一个的氨基酸序列所示;或者

[0084] (ii)

[0085] (a) 所述HCDR1如选自SEQ ID NO:39、42和45中的任一个的氨基酸序列所示;

[0086] (b) 所述HCDR2如选自SEQ ID NO:40、43和46中的任一个的氨基酸序列所示;

[0087] (c) 所述HCDR3如选自SEQ ID NO:41、44和47中的任一个的氨基酸序列所示;

[0088] (d) 所述LCDR1如选自SEQ ID NO:50、53和56中的任一个的氨基酸序列所示;

[0089] (e) 所述LCDR2如选自SEQ ID NO:51、54和57中的任一个的氨基酸序列所示;且

[0090] (f) 所述LCDR3如选自SEQ ID NO:52、55和58中的任一个的氨基酸序列所示。

[0091] 22. 根据项21所述的多特异性抗体,其包含(i)分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:12、13和14的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,或(ii) (i)分别为SEQ ID NO:39、40和41的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:50、51和52的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0092] 23. 根据前述项中任一项所述的多特异性抗体,其中所述特异性结合IL-17A的第一结构域包含重链可变区VHA且其中所述VHA是VH3或VH4,优选VH3。

[0093] 24. 根据前述项中任一项所述的多特异性抗体,其中所述特异性结合IL-17A的第一结构域包括轻链可变区VLA且其中所述VLA包括V κ 框架FR1、FR2和FR3,特别是V κ 1或V κ 3FR1至FR3,优选V κ 1FR1至FR3,以及框架FR4,所述框架FR4选自V κ FR4,特别是V κ 1FR4、V κ 3FR4,和V λ FR4,特别是包含与选自SEQ ID NO:26至SEQ ID NO:32中的任一个的氨基酸序列具有至少60、70、80、90%同一性的氨基酸序列的V λ FR4,优选如SEQ ID NO:26至SEQ ID NO:32中任一个所示的V λ FR4,优选如SEQ ID NO:26或27所示的V λ FR4,更优选如SEQ ID NO:27所示的V λ FR4。

[0094] 25. 根据项23至24中任一项所述的多特异性抗体,其中所述VHA包含(i)与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列;和/或所述VLA包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,或者所述VHA包含(ii)与SEQ ID NO:48的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列;和/或所述VLA包含与SEQ ID NO:59的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

[0095] 26. 根据项25所述的多特异性抗体,其中所述VHA包含(i)选自由SEQ ID NO:10和11组成的组的氨基酸序列;和/或所述VLA包含选自由SEQ ID NO:21和22组成的组的氨基酸序列,或者所述VHA包含(ii)选自由SEQ ID NO:48和49组成的组的氨基酸序列;和/或所述VLA包含选自由SEQ ID NO:59和60组成的组的氨基酸序列。

[0096] 27. 根据项26所述的多特异性抗体,其包含(i) SEQ ID NO:10的VHA序列和/或SEQ ID NO:21的VLA序列,或(ii) SEQ ID NO:48的VHA序列和/或SEQ ID NO:59的VLA序列。

[0097] 28. 根据前述项中任一项所述的多特异性抗体,其中所述特异性结合TNF α 的第二结构域包含一组CDR:HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中,该组CDR相对于这样的一组CDR具有10个或更少个氨基酸取代:HCDR1'如SEQ ID NO:63所示;HCDR2'如SEQ ID NO:64所示;HCDR3'如SEQ ID NO:65所示;LCDR1'如SEQ ID NO:76所示;LCDR2'如SEQ ID NO:77所示;LCDR3'如SEQ ID NO:78所示。

[0098] 29. 根据项28所述的多特异性抗体,其中

[0099] (a) 所述HCDR1如选自SEQ ID NO:63、66和69中的任一个的氨基酸序列所示;

[0100] (b) 所述HCDR2如选自SEQ ID NO:64、67和70中的任一个的氨基酸序列所示;

- [0101] (c) 所述HCDR3如选自SEQ ID NO:65、68和71中的任一个的氨基酸序列所示;
- [0102] (d) 所述LCDR1如选自SEQ ID NO:76、79和82中的任一个的氨基酸序列所示;
- [0103] (e) 所述LCDR2如选自SEQ ID NO:77、80和83中的任一个的氨基酸序列所示;且
- [0104] (f) 所述LCDR3如选自SEQ ID NO:78、81和84中的任一个的氨基酸序列所示。
- [0105] 30. 根据项29所述的多特异性抗体,其包含分别为SEQ ID NO:63、64、和65的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:76、77、和78的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。
- [0106] 31. 根据前述项中任一项所述的多特异性抗体,其中所述特异性结合TNF α 的第二结构域包含重链可变区VHB且其中所述VHB是VH3或VH4,优选VH3。
- [0107] 32. 根据前述项中任一项所述的多特异性抗体,其中所述特异性结合TNF α 的第二结构域包括轻链可变区VLB且其中所述VLB包括V κ 框架FR1、FR2和FR3,特别是V κ 1或V κ 3FR1至FR3,优选V κ 1FR1至FR3,以及框架FR4,所述框架FR4选自V κ FR4,特别是V κ 1FR4、V κ 3FR4,和V λ FR4,特别是包含与选自SEQ ID NO:26至SEQ ID NO:32中的任一个的氨基酸序列具有至少60、70、80、90%同一性的氨基酸序列的V λ FR4,优选如SEQ ID NO:26至SEQ ID NO:32中任一个所示的V λ FR4,优选如SEQ ID NO:26或27所示的V λ FR4,更优选如SEQ ID NO:27所示的V λ FR4。
- [0108] 33. 根据项31至32中任一项所述的多特异性抗体,其中所述VHB包含与选自由SEQ ID NO:72、73、74和75组成的组的氨基酸序列至少90%相同,优选与SEQ ID NO:72至少90%相同的氨基酸序列;和/或所述VLB包含与选自由SEQ ID NO:85、86、87、88和89组成的组的氨基酸序列至少90%相同,优选与SEQ ID NO:85至少90%相同的氨基酸序列。
- [0109] 34. 根据项33所述的多特异性抗体,其中所述VHB包含选自由SEQ ID NO:72、73、74和75组成的组的氨基酸序列;和/或所述VLB包含选自由SEQ ID NO:85、86、87、88和89组成的组的氨基酸序列。
- [0110] 35. 根据项34所述的多特异性抗体,其包含(i) SEQ ID NO:72的VHB序列和/或SEQ ID NO:85的VLB序列;或(ii) SEQ ID NO:75的VHB序列和/或SEQ ID NO:88的VLB序列;或(iii) SEQ ID NO:75的VHB序列和/或SEQ ID NO:89的VLB序列。
- [0111] 36. 根据项6至35中任一项所述的多特异性抗体,其中所述特异性结合HSA的第三结构域包含一组CDR:HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中,该组CDR相对于这样的一组CDR具有10个或更少个氨基酸取代:
- [0112] (a) HCDR1'如SEQ ID NO:90所示;HCDR2'如SEQ ID NO:91所示;
- [0113] HCDR3'如SEQ ID NO:92所示;LCDR1'如SEQ ID NO:100所示;
- [0114] LCDR2'如SEQ ID NO:101所示;LCDR3'如SEQ ID NO:102所示;
- [0115] 或
- [0116] (b) HCDR1'如SEQ ID NO:111所示;HCDR2'如SEQ ID NO:112所示;
- [0117] HCDR3'如SEQ ID NO:113所示;LCDR1'如SEQ ID NO:120所示;
- [0118] LCDR2'如SEQ ID NO:121所示;LCDR3'如SEQ ID NO:122所示。
- [0119] 37. 根据项36所述的多特异性抗体,其中
- [0120] (a) 所述HCDR1如选自SEQ ID NO:90、93和96中的任一个的氨基酸序列所示;所述HCDR2如选自SEQ ID NO:91、94和97中的任一个的氨基酸序列所示;所述HCDR3如选自SEQ

ID NO:92、95和98中的任一个的氨基酸序列所示;所述LCDR1如选自SEQ ID NO:100、103

[0121] 和106中的任一个的氨基酸序列所示;所述LCDR2如选自SEQ ID NO:

[0122] 101、104和107中的任一个的氨基酸序列所示;且所述LCDR3如选自SEQ ID NO:102、105和108中的任一个的氨基酸序列所示;或

[0123] (b)所述HCDR1如选自SEQ ID NO:111、114和117中的任一个的氨基酸序列所示;所述HCDR2如选自SEQ ID NO:112、115和118中的任一个的氨基酸序列所示;所述HCDR3如选自SEQ ID NO:113、116

[0124] 和119中的任一个的氨基酸序列所示;所述LCDR1如选自SEQ ID NO:

[0125] 121、124和127中的任一个的氨基酸序列所示;所述LCDR2如选自SEQ ID NO:122、125和128中的任一个的氨基酸序列所示;且所述LCDR3如选自SEQ ID NO:123、126和129中的任一个的氨基酸序列所示。

[0126] 38. 根据项37所述的多特异性抗体,其包含

[0127] (a)分别为SEQ ID NO:90、91、和92的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:100、101、和102的LCDR1、LCDR2

[0128] 和LCDR3序列;或

[0129] (b)分别为SEQ ID NO:111、112、和113的HCDR1、HCDR2和HCDR3

[0130] 序列,以及分别为SEQ ID NO:121、122、和123的LCDR1、LCDR2

[0131] 和LCDR3序列。

[0132] 39. 根据项6至38中任一项所述的多特异性抗体,其中所述特异性结合HSA的第三结构域包含重链可变区VHC且其中所述VHC是VH3或VH4,优选VH3。

[0133] 40. 项6至39中任一项的多特异性抗体,其中所述特异性结合HSA的第三结构域包括轻链可变区VLC且其中所述VLC包括V κ 框架FR1、FR2和FR3,特别是V κ 1或V κ 3FR1至FR3,优选V κ 1FR1至FR3,以及框架FR4,所述框架FR4选自V κ FR4,特别是V κ 1FR4、V κ 3FR4,和V λ FR4,特别是包含与选自SEQ ID NO:26至SEQ ID NO:32中的任一个的氨基酸序列具有至少60、70、80、90%同一性的氨基酸序列的V λ FR4,优选如SEQ ID NO:26至SEQ ID NO:32中任一个所示的V λ FR4,优选如SEQ ID NO:26或27所示的V λ FR4,更优选如SEQ ID NO:27所示的V λ FR4。

[0134] 41. 根据项39至40中任一项所述的多特异性抗体,其中所述VHC包含与SEQ ID NO:99的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列;和/或所述VLC包含与SEQ ID NO:109的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

[0135] 42. 根据项41所述的多特异性抗体,其包含SEQ ID NO:99的VHC序列和/或SEQ ID NO:109的VLC序列。

[0136] 43. 根据项39至40中任一项所述的多特异性抗体,其中所述VHC包含与SEQ ID NO:110的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列;和/或所述VLC包含与SEQ ID NO:120的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

[0137] 44. 据项43所述的多特异性抗体,其包含SEQ ID NO:110的VHC序列和/或SEQ ID NO:120的VLC序列。

[0138] 45. 根据前述项中任一项所述的多特异性抗体,其中所述抗体是人源化的。

[0139] 46. 根据前述项中任一项所述的多特异性抗体,其中所述抗体包含与选自SEQ ID NO:136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、和148,优选143的序列具有至

少80%同一性,优选至少90%同一性的氨基酸序列,其中CDR具有根据项22、30和38(a)的序列。

[0140] 47. 根据前述项中任一项所述的多特异性抗体,其中所述抗体包含选自SEQ ID NO:136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、和148中的任一个,优选143的氨基酸序列。

[0141] 48. 一种药物组合物,其包含前述项中任一项所述的多特异性抗体和药学上可接受的载体。

[0142] 49. 项1至47中任一项所述的多特异性抗体,或项48所述的药物组合物用作药物。

[0143] 50. 项1至47中任一项的多特异性抗体,或项48所述的药物组合物用于治疗由IL-17A和/或TNF α 介导的病症或可通过抑制Gro- α 分泌来治疗的病症。

[0144] 51. 项1至47中任一项的多特异性抗体,或项48所述的药物组合物用于治疗炎性病况或自身免疫疾病。

[0145] 52. 项1至47项中任一项的多特异性抗体,或项48所述的药物组合物用于治疗癌症、关节炎、类风湿关节炎、骨关节炎、反应性关节炎、银屑病、慢性阻塞性肺疾病、系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮肾炎、自身免疫性炎症性肠病、哮喘、多发性硬化症、或囊性纤维化、骨质损失、气道超敏反应、脱髓鞘病症、皮肤超敏反应、急性移植排斥、同种异体移植排斥、移植物对抗宿主病、系统性硬化症、泌尿外炎症病症、心血管疾病、血管炎、周期性发烧、葡萄糖新陈代谢障碍、肺病、牙周炎(peridontitis)、肝脏基质角膜炎、过敏、炎症疼痛、脊椎关节病变、败血症、败血性或内毒素休克、脑膜炎、外科创伤、自身免疫血液病症、阿尔茨海默氏病、结节病、肝硬化、肝炎、肾小球肾炎或血脂紊乱(dislipidemia)。

[0146] 53. 项1至47中任一项的多特异性抗体,或项48所述的药物组合物在制备用于治疗由IL-17A和/或TNF α 介导的病症或可通过抑制Gro- α 分泌来治疗的病症的药物中的用途。

[0147] 54. 项1至47中任一项的多特异性抗体,或项48所述的药物组合物在制备用于治疗炎性病况或自身免疫疾病的药物中的用途。

[0148] 55. 项1至47中任一项的多特异性抗体,或项48所述的药物组合物在制备用于治疗癌症、关节炎、类风湿关节炎、骨关节炎、反应性关节炎、银屑病、慢性阻塞性肺疾病、系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮肾炎、自身免疫性炎症性肠病、哮喘、多发性硬化症、或囊性纤维化、骨质损失、气道超敏反应、脱髓鞘病症、皮肤超敏反应、急性移植排斥、同种异体移植排斥、移植物对抗宿主病、系统性硬化症、泌尿外炎症病症、心血管疾病、血管炎、周期性发烧、葡萄糖新陈代谢障碍、肺病、牙周炎(peridontitis)、肝脏基质角膜炎、过敏、炎症疼痛、脊椎关节病变、败血症、败血性或内毒素休克、脑膜炎、外科创伤、自身免疫血液病症、阿尔茨海默氏病、结节病、肝硬化、肝炎、肾小球肾炎或血脂紊乱(dislipidemia)的药物中的用途。

[0149] 56. 一种治疗由IL-17A和/或TNF α 介导的病症的方法,所述方法包括施用有效量的项1至47中任一项所述的多特异性抗体,或项48所述的药物组合物,使得病况得到缓解。

[0150] 57. 根据项56所述的方法,其中由IL-17A和/或TNF α 介导的病症是炎性病况或自身免疫疾病。

[0151] 58. 根据项56的方法,其中由IL-17A和/或TNF α 介导的病症是癌症、关节炎、类风湿关节炎、骨关节炎、反应性关节炎、银屑病、慢性阻塞性肺疾病、系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮肾炎、自身免疫性炎症性肠病、哮喘、多发性硬化症、囊性纤维化、骨质损失、气道超敏反应、

脱髓鞘病症、皮肤超敏反应、急性移植排斥、同种异体移植排斥、移植物对抗宿主病、系统性硬化症、泌尿外炎症病症、心血管疾病、血管炎、周期性发烧、葡萄糖新陈代谢障碍、肺病、牙周炎(peridontitis)、肝脏基质角膜炎、过敏、炎症疼痛、脊椎关节病变、败血症、败血性或内毒素休克、脑膜炎、外科创伤、自身免疫血液病症、阿尔茨海默氏病、结节病、肝硬化、肝炎、肾小球肾炎或血脂紊乱(dislipidemia)。

[0152] 59.一种核酸,其编码编码项1至47中任一项所述的多特异性抗体或其片段。

[0153] 60.一种载体,其包含项59所述的核酸。

[0154] 61.一种宿主细胞,其包含项59所述的核酸或项60所述的载体。

[0155] 62.一种生产项1至47中任一项所述的多特异性抗体的方法,所述方法包括以下步骤:培养宿主细胞,所述宿主细胞包含编码项1至47中任一项所述的多特异性抗体或其片段的核酸或载体。

[0156] 63.一种试剂盒,其包含项1至47中任一项所述的多特异性抗体,或项48所述的药物组合物。

[0157] 本发明的另一个目的是提供具有改善的亲合力、功效和改善的生物物理特性例如改善的溶解性、可开发性和稳定性的抗IL-17A抗体。

[0158] 本发明的抗IL-17A抗体具有有利于用于治疗的改善特性,如更高的亲合力、改善的疗效、选择性、改善的生物物理特性如溶解性、可开发性和稳定性。

[0159] 因此,一方面,本公开提供了一种对人IL-17A具有结合特异性的分离的抗体,特别地,其包括一组CDR:HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中,该组CDR相对于这样的一组CDR具有10个或更少个,优选0个,氨基酸取代:HCDR1'是选自SEQ ID NO:1、4和7中的任一个的氨基酸序列;HCDR2'是选自SEQ ID NO:2、5和8中的任一个的氨基酸序列;HCDR3'是选自SEQ ID NO:3、6和9中的任一个的氨基酸序列;LCDR1'是选自SEQ ID NO:12、15和18中的任一个的氨基酸序列;LCDR2'是选自SEQ ID NO:13、16和19中的任一个的氨基酸序列;LCDR3'具有选自SEQ ID NO:14、17和20中的任一个的氨基酸序列。一方面,本公开涉及一种多特异性分子,其包含本公开的分离的抗体。

[0160] 另一方面,本公开提供了一种对人IL-17A具有结合特异性的分离的抗体,特别地,其包括一组CDR:HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中,该组CDR相对于这样的一组CDR具有10个或更少个,优选0个,氨基酸取代:HCDR1'是选自SEQ ID NO:39、42和45中的任一个的氨基酸序列;HCDR2'是选自SEQ ID NO:40、43和46中的任一个的氨基酸序列;HCDR3'是选自SEQ ID NO:41、44和47中的任一个的氨基酸序列;LCDR1'是选自SEQ ID NO:50、53和56中的任一个的氨基酸序列;LCDR2'是选自SEQ ID NO:51、54和57中的任一个的氨基酸序列;LCDR3'具有选自SEQ ID NO:52、55和58中的任一个的氨基酸序列。一方面,本公开涉及一种多特异性分子,其包含本公开的分离的抗体。

[0161] 一方面,本公开涉及一种药物组合物,其包含本公开的分离的抗体,或包含本公开的分离的抗体的多特异性分子,及药学上可接受的载体。

[0162] 另一方面,本公开涉及本公开的抗体或包含所述分离的抗体的多特异性分子,或本公开的药物组合物,用作药物。

[0163] 一方面,本公开涉及用于治疗由IL-17A介导的病症或可通过抑制GRO- α 分泌来治疗的病症的抗体、或包含所述分离的抗体的多特异性分子、或本公开的药物组合物。

[0164] 一方面,本公开涉及本公开的抗体、或包含所述分离的抗体的多特异性分子、或本公开的药物组合物在制备用于治疗由IL-17A介导的病症或可通过抑制GRO- α 分泌来治疗的病症的药物中的用途。

[0165] 另一方面,本公开涉及一种治疗由IL-17A介导的病症的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用有效量的本公开的抗体、或本公开的多特异性分子、或本公开的药物组合物。又一方面,本公开涉及编码本公开的抗体的核酸。另一方面,本公开涉及包含所述核酸的载体。另一方面,本公开涉及包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。

[0166] 另一方面,本公开涉及一种生产本公开的抗体的方法,该方法包括以下步骤:培养宿主细胞,所述宿主细胞包含编码本公开抗体的核酸或载体。

[0167] 分别单独地或组合地在以下各项中概述的本公开的方面、有利特征和优选实施方案进一步有助于解决本发明的目的:

[0168] 1.一种对人IL-17A具有结合特异性的分离的抗体,包括一组CDR:

[0169] HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中,该组CDR相对于这样的一组CDR具有10个或更少个氨基酸取代:

[0170] (i)HCDR1'是选自SEQ ID NO:1、4和7中的任一个的氨基酸序列;

[0171] HCDR2'是选自SEQ ID NO:2、5和8中的任一个的氨基酸序列;

[0172] HCDR3'是选自SEQ ID NO:3、6和9中的任一个的氨基酸序列;

[0173] LCDR1'是选自SEQ ID NO:12、15和18中的任一个的氨基酸序列;

[0174] LCDR2'是选自SEQ ID NO:13、16和19中的任一个的氨基酸序列;

[0175] LCDR3'具有选自SEQ ID NO:14、17和20中的任一个的氨基酸;或

[0176] (ii)HCDR1'是选自SEQ ID NO:39、42和45中的任一个的氨基酸序列;

[0177] HCDR2'是选自SEQ ID NO:40、43和46中的任一个的氨基酸序列;

[0178] HCDR3'是选自SEQ ID NO:41、44和47中的任一个的氨基酸序列;

[0179] LCDR1'是选自SEQ ID NO:50、53和56中的任一个的氨基酸序列;

[0180] LCDR2'是选自SEQ ID NO:51、54和57中的任一个的氨基酸序列;

[0181] LCDR3'具有选自SEQ ID NO:52、55和58中的任一个的氨基酸序列。

[0182] 2.根据项1所述的抗体,其包含一组CDR:HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中,该组CDR相对于这样的一组CDR具有10个或更少个氨基酸取代:

[0183] (i)HCDR1'如SEQ ID NO:1所示;

[0184] HCDR2'如SEQ ID NO:1所示;

[0185] HCDR3'如SEQ ID NO:3所示;

[0186] LCDR1'如SEQ ID NO:12所示;

[0187] LCDR2'如SEQ ID NO:13所示;

[0188] LCDR3'如SEQ ID NO:14所示;或者

[0189] (ii)HCDR1'如SEQ ID NO:39所示;

[0190] HCDR2'如SEQ ID NO:40所示;

[0191] HCDR3'如SEQ ID NO:41所示;

[0192] LCDR1'如SEQ ID NO:50所示;

[0193] LCDR2'如SEQ ID NO:51所示;

- [0194] LCDR3'如SEQ ID NO:52所示。
- [0195] 3. 根据项1或2所述的抗体,其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:
- [0196] (c) 所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,且
- [0197] (d) 所述VL依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3。
- [0198] 4. 根据项3所述的抗体,其中
- [0199] (i)
- [0200] (a) 所述HCDR1如选自SEQ ID NO:1、4和7中的任一个的氨基酸序列所示;
- [0201] (b) 所述HCDR2如选自SEQ ID NO:2、5和8中的任一个的氨基酸序列所示;
- [0202] (c) 所述HCDR3如选自SEQ ID NO:3、6和9中的任一个的氨基酸序列所示;
- [0203] (d) 所述LCDR1如选自SEQ ID NO:12、15和18中的任一个的氨基酸序列所示;
- [0204] (e) 所述LCDR2如选自SEQ ID NO:13、16和19中的任一个的氨基酸序列所示;且
- [0205] (f) 所述LCDR3如选自SEQ ID NO:14、17和20中的任一个的氨基酸序列所示;或
- (ii)
- [0206] (a) 所述HCDR1如选自SEQ ID NO:39、42和45中的任一个的氨基酸序列所示;
- [0207] (b) 所述HCDR2如选自SEQ ID NO:40、43和46中的任一个的氨基酸序列所示;
- [0208] (c) 所述HCDR3如选自SEQ ID NO:41、44和47中的任一个的氨基酸序列所示;
- [0209] (d) 所述LCDR1如选自SEQ ID NO:50、53和56中的任一个的氨基酸序列所示;
- [0210] (e) 所述LCDR2如选自SEQ ID NO:51、54和57中的任一个的氨基酸序列所示;且
- [0211] (f) 所述LCDR3如选自SEQ ID NO:52、55和58中的任一个的氨基酸序列所示。
- [0212] 5. 根据项4所述的抗体,其中所述抗体包含(i)分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:12、13和14的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;或(ii)分别为SEQ ID NO:39、40和41的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:50、51和52的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。
- [0213] 6. 项3至5中任一项所述的抗体,其中所述VH是VH3或VH4,优选VH3。
- [0214] 7. 根据项3至6中任一项所述的抗体,其中所述VL包含V κ 框架FR1、FR2和FR3,特别是V κ 1或V κ 3FR1至FR3,优选V κ 1FR1至FR3,以及框架FR4,所述框架FR4选自V κ FR4,特别是V κ 1FR4、V κ 3FR4,和V λ FR4,特别是包含与选自SEQ ID NO:26至SEQ ID NO:32中的任一个的氨基酸序列具有至少60、70、80、90%同一性的氨基酸序列的V λ FR4,优选如SEQ ID NO:26至SEQ ID NO:32中任一个所示的V λ FR4,优选如SEQ ID NO:26或27所示的V λ FR4,更优选如SEQ ID NO:27所示的V λ FR4。
- [0215] 8. 根据项3至7中任一项所述的抗体,其中(i)所述VH包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列;和/或所述VL包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列;或(ii)所述VH包含与SEQ ID NO:48的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列;和/或所述VL包含与SEQ ID NO:59的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。
- [0216] 9. 根据项8所述的抗体,其中(i)所述VH包括选自由SEQ ID NO:10和11组成的组的氨基酸序列;和/或所述VL包括选自由SEQ ID NO:21和22组成的组的氨基酸序列;或(ii)所述VH包括选自由SEQ ID NO:48和49组成的组的氨基酸序列;和/或所述VL包括选自由SEQ ID NO:59和60组成的组的氨基酸序列。
- [0217] 10. 根据项9所述的抗体,其包含(i)SEQ ID NO:10的VH序列和/或SEQ ID NO:21的

VL序列;或(ii)SEQ ID NO:48的VH序列和/或SEQ ID NO:59的VL序列。

[0218] 11. 根据项9所述的抗体,其包含(i)SEQ ID NO:11的VH序列和/或SEQ ID NO:49的VL序列;或(ii)SEQ ID NO:11的VH序列和/或SEQ ID NO:60的VL序列。

[0219] 12. 根据前述项中任一项所述的抗体,其中所述抗体对食蟹猴IL-17A具有结合特异性。

[0220] 13. 根据前述项中任一项所述的抗体,其中相对于人IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F,所述抗体选择性地结合人IL-17A,如通过ELISA测量的。

[0221] 14. 根据前述项中任一项所述的抗体,其中与IL-17A结合

[0222] (c) 抑制或阻断IL-17A与其受体(IL-17RA)之间的结合,且

[0223] (d) 降低或中和IL-17A活性。

[0224] 15. 项14的抗体,其中当在HT-29试验中体外评估时,所述抗体能够抑制GRO- α 分泌。

[0225] 16. 根据前述项中任一项所述的抗体,其中所述抗体:

[0226] (k) 具有阻断IL-17A与IL-17RA之间的相互作用的能力,在ELISA试验中测定的相对于苏金单抗的效力(相对效力)大于5,优选大于10,更优选大于15,甚至更优选大于20,且其中所述相对效力是通过ELISA测量的苏金单抗的单位为ng/mL的IC₅₀值与通过ELISA测量的scFv形式的本发明抗体的单位为ng/mL的IC₅₀值的比;和/或

[0227] (l) 具有中和IL-17A的能力,在HT-29试验中通过测量GRO- α 分泌而测定的相对于苏金单抗的效力(相对效力)大于50,优选大于100,更优选大于150,且其中所述相对效力是在HT-29试验中测量的苏金单抗的单位为ng/mL的IC₅₀值与在HT-29试验中测量的scFv形式的本发明抗体的单位为ng/mL的IC₅₀值的比;和/或

[0228] (m) 能够以1ng/ml或更低,优选0.5ng/ml或更低,更优选0.2ng/ml或更低的浓度,将1ng人IL-17A的活性抑制50%,所述抑制活性通过在50pg/ml TNF α 存在下在HT-29试验中测量由人IL-17A诱导的GRO- α 分泌来测定。

[0229] 17. 根据前述项中任一项所述的抗体,其中所述抗体:

[0230] (c) 与人IL-17A结合,解离常数(K_D)小于5nM,特别是小于1nM,小于0.5nM,小于0.2nM,更特别地小于100pM,更特别地小于50pM,如通过表面等离子体共振所测量的,特别是通过表面等离子体共振以直接设置所测量的;且

[0231] (d) 任选地,与食蟹猴IL-17A结合,K_D小于10nM,特别是小于7nM,小于5nM,小于2nM,小于1nM,更特别是小于0.5nM,如通过表面等离子体共振所测量的,特别是如通过表面等离子体共振以捕获设置所测量的。

[0232] 18. 根据项17所述的抗体,其中所述抗体与人IL-17A结合,解离常数(K_D)小于0.5nM,小于0.2nM,小于100pM,特别地小于50pM,如通过表面等离子体共振所测量的,特别是通过表面等离子体共振以直接设置所测量的。

[0233] 19. 根据前述项中任一项所述的抗体,其中所述抗体:

[0234] (e) 当为scFv形式时,通过差示扫描荧光法测定的熔化温度(T_m)为至少60°C,特别是至少62°C,至少65°C,更特别是至少70°C,特别地,其中所述抗体在pH 6.4、150mM NaCl的磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液中;

[0235] (f) 当为scFv形式时,当本发明的抗体的起始浓度为10mg/ml时,在5个连续的冻融

循环后,单体含量损失小于5%,特别是小于3%,更特别是小于1%,特别地,其中所述抗体在pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中;

[0236] (g) 当为scFv形式时,当本发明的抗体的起始浓度为10mg/ml时,在4°C

[0237] 下储存至少两周,特别是至少4周后,单体含量损失为5%或更低,特别是小于4%,小于3%,小于2%,更特别是小于1%,特别地,其中所述抗体在pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中;和/或

[0238] (h) 当本发明的抗体的起始浓度为10mg/ml时,在37°C下储存至少两周,特别是至少4周后,单体含量损失小于5%。

[0239] 20. 前述项中任一项所述的抗体,其中所述抗体选自由以下组成的组:单克隆抗体、嵌合抗体、Fab、Fv、scFv、dsFv、scAb、STAB、单结构域抗体(sdAb或dAb)、单结构域重链抗体、和单结构域轻链抗体、VHH、VNAR、基于鲨鱼的VNAR结构的单结构域抗体、和基于替代支架的结合结构域包括但不限于基于锚蛋白的结构域、fynomer、avimer、anticalin、纤连蛋白、和构建在抗体恒定区中的结合位点(例如F-star的Modular Antibody Technology™),优选scFv。

[0240] 21. 根据项20所述的抗体,其中所述scFv具有选自(i)由SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25组成的组的氨基酸序列,优选地,其中所述scFv具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列;或所述scFv具有选自(ii)由SEQ ID NO:61和SEQ ID NO:62组成的组的氨基酸序列,优选地,其中所述scFv具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列。

[0241] 22. 根据项20所述的分离的抗体,其中所述抗体是选自由IgG1、IgG2、IgG3和IgG4组成的组的IgG,优选地,其中所述抗体是IgG1或IgG4。

[0242] 23. 根据前述项中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体是人源化的。

[0243] 24. 项1至23中任一项所述的抗体,其为多特异性分子。

[0244] 25. 根据项24所述的抗体,其中所述抗体的形式选自由以下组成的组:单链双抗体(scDb)、串联scDb(Tandab)、线性二聚体scDb(LD-scDb)、环状二聚体scDb(CD-scDb)、双特异性T细胞接合子(BiTE;串联双-scFv)、串联三-scFv、三体(Fab-(scFv)₂)或双体(Fab-(scFv)₁)、Fab、Fab-Fv₂、Morrison(IgG CH₃-scFv融合体(Morrison L)或IgG CL-scFv融合体(Morrison H))、三抗体、scDb-scFv、双特异性Fab₂、双微抗体、四抗体、scFv-Fc-scFv融合体、scFv-HSA-scFv融合体、双双抗体、DVD-Ig、COVID、IgG-scFab、scFab-dsscFv、Fv₂-Fc、IgG-scFv融合体例如bsAb(与轻链的C-末端连接的scFv)、Bs1Ab(与轻链的N-末端连接的scFv)、Bs2Ab(与重链的N-末端连接的scFv)、Bs3Ab(与重链的C-末端连接的scFv)、Ts1Ab(与重链和轻链的N-末端连接的scFv)、Ts2Ab(与重链的C-末端连接的dsscFv)、基于异二聚体Fc结构域的双特异性抗体例如Knob-into-Hole抗体(KiH);与异二聚体Fc结构域或任何其他异二聚体结构域的任意一条链的N-和/或C-末端融合的Fv、scFv、scDb、串联双-scFv、串联三-scFv、Fab-(scFv)₂、Fab-(scFv)₁、Fab、Fab-Fv₂、COVID、MATCH和DuoBody。

[0245] 26. 一种药物组合物其包含项1至25中任一项所述的抗体和药学上可接受的载体。

[0246] 27. 项1至25中任一项所述的抗体,或项26所述的药物组合物,其用作药物。

[0247] 28. 用于治疗由IL-17A介导的病症或可通过抑制GRO-α分泌来治疗的病症的项1至25中任一项所述的抗体,或项26所述的药物组合物。

[0248] 29. 用于治疗炎性病况或自身免疫疾病的项1至25中任一项所述的抗体,或项26所

述的药物组合物。

[0249] 30. 用于治疗癌症、关节炎、类风湿关节炎、骨关节炎、反应性关节炎、银屑病、慢性阻塞性肺疾病、系统性红斑狼疮 (SLE)、狼疮肾炎、自身免疫性炎症性肠病、哮喘、多发性硬化症、或囊性纤维化、骨质损失、气道超敏反应、脱髓鞘病症、皮肤超敏反应、急性移植排斥、同种异体移植排斥、移植物对抗宿主病、系统性硬化症、泌尿外炎症病症、心血管疾病、血管炎、周期性发烧、葡萄糖新陈代谢障碍、肺病、牙周炎 (peridontitis)、肝脏基质角膜炎、过敏、炎症疼痛、脊椎关节病变、败血症、败血性或内毒素休克、脑膜炎、外科创伤、自身免疫血液病症、阿尔茨海默氏病、结节病、肝硬化、肝炎、肾小球肾炎或血脂紊乱 (dislipidemia) 的项1至25中任一项所述的抗体, 或项26所述的药物组合物。

[0250] 31. 项1至25中任一项所述的抗体, 或项26所述的药物组合物在制备用于治疗由 IL-17A 介导的病症或可通过抑制 GR α 分泌来治疗的病症的药物中的用途。

[0251] 32. 项1至25中任一项所述的抗体, 或项26所述的药物组合物在制备用于治疗炎性病况或自身免疫疾病的药物中的用途。

[0252] 33. 项1至25中任一项所述的抗体, 或项26所述的药物组合物在制备用于治疗癌症、关节炎、类风湿关节炎、骨关节炎、反应性关节炎、银屑病、慢性阻塞性肺疾病、系统性红斑狼疮 (SLE)、狼疮肾炎、自身免疫性炎症性肠病、哮喘、多发性硬化症、或囊性纤维化、骨质损失、气道超敏反应、脱髓鞘病症、皮肤超敏反应、急性移植排斥、同种异体移植排斥、移植物对抗宿主病、系统性硬化症、泌尿外炎症病症、心血管疾病、血管炎、周期性发烧、葡萄糖新陈代谢障碍、肺病、牙周炎 (peridontitis)、肝脏基质角膜炎、过敏、炎症疼痛、脊椎关节病变、败血症、败血性或内毒素休克、脑膜炎、外科创伤、自身免疫血液病症、阿尔茨海默氏病、结节病、肝硬化、肝炎、肾小球肾炎或血脂紊乱 (dislipidemia) 的药物中的用途。

[0253] 34. 一种治疗由 IL-17A 介导的病症的方法, 所述方法包括施用有效量的项1至25中任一项所述的抗体, 或项26所述的药物组合物, 使得病况得到缓解。

[0254] 35. 根据项34所述的方法, 其中由 IL-17A 介导的病症是炎性病况或自身免疫疾病。

[0255] 36. 根据项34的方法, 其中由 IL-17A 介导的疾病是癌症、关节炎、类风湿关节炎、骨关节炎、反应性关节炎、银屑病、慢性阻塞性肺疾病、系统性红斑狼疮 (SLE)、狼疮肾炎、自身免疫性炎症性肠病、哮喘、多发性硬化症、囊性纤维化、骨质损失、气道超敏反应、脱髓鞘病症、皮肤超敏反应、急性移植排斥、同种异体移植排斥、移植物对抗宿主病、系统性硬化症、泌尿外炎症病症、心血管疾病、血管炎、周期性发烧、葡萄糖新陈代谢障碍、肺病、牙周炎 (peridontitis)、肝脏基质角膜炎、过敏、炎症疼痛、脊椎关节病变、败血症、败血性或内毒素休克、脑膜炎、外科创伤、自身免疫血液病症、阿尔茨海默氏病、结节病、肝硬化、肝炎、肾小球肾炎或血脂紊乱 (dislipidemia)。

[0256] 37. 一种核酸, 其编码项1-25所述的抗体。

[0257] 38. 一种载体, 其包含项37所述的核酸。

[0258] 39. 一种宿主细胞, 其包含项37所述的核酸或项38所述的载体。

[0259] 40. 一种生产项1-25中任一项所述的抗体的方法, 所述方法包括以下步骤: 培养宿主细胞, 所述宿主细胞包含编码项1-25的抗体的核酸或载体。

[0260] 41. 一种试剂盒, 其包含项1至25中任一项所述的抗体, 或项26所述的药物组合物。

[0261] 本公开考虑了上述任一个或多个方面和/或实施方案的所有组合, 以及与详细描

述和实施例中提出的任一个或多个实施方案的组合。

[0262] 本文的组合物和方法的其他特征、目的和优点将从描述和附图以及权利要求中显而易见。

附图说明

[0263] 图1显示,标记的IL-17A适合用于分选过程。标记的IL-17A在HT-29试验中的生物活性。3倍连续稀释的标记的和未标记的IL-17A平行测试其在HT-29细胞中诱导GR0- α 分泌的潜力。标记的IL-17A(IL-17A-RPE)和未标记的IL-17A(IL-17A)的EC₅₀值分别为82.8ng/ml和55ng/ml。

[0264] 图2显示了27-07-G02兔IgG(A)和27-31-C04IgG(B)在HT-29试验中中和IL-17A的效力。

[0265] 图3显示了27-07-G02兔IgG(A)和27-31-C04IgG(B)抑制IL-17A和IL-17RA之间相互作用的效力。

[0266] 图4显示了人源化scFv A1和A2(A)以及PR0571和PR0592(B)在HT-29试验中中和IL-17A的效力。

[0267] 图5显示了抗-IL-17AscFv A1和A2(A)以及PR0571和PR0592(B)抑制人IL-17A和IL-17RA(ELISA)之间相互作用的效力。

[0268] 图6显示了scFv A1(A)以及scFv PR0571和PR0592(B)的靶标特异性。通过竞争ELISA分析了IL-17B至IL-17F抑制生物素化IL-17A与scFv相互作用的潜力。显示了IL-17A和IL-17B至IL-17F的剂量依赖性影响。

[0269] 图7显示了scFv A1和A2(A)以及scFv PR0571和PR0592(B)的DSF测量的热解折叠曲线。通过将数据拟合到玻尔兹曼方程以获得转变的中点,来测定所得T_m值。

[0270] 图8显示了对scFv A1(A)以及scFv PR0571和PR0592(B)的储存稳定性研究,在浓度大于10mg/mL的情况下,在三个温度(37°C、4°C和-80°C)下进行了4周。不同储存温度下的单体含量随时间的变化显示在左边;不同储存温度下(4°C(左)和37°C(右))的蛋白质浓度随时间的变化显示在右边。通过SE-HPLC峰面积的整合来确定单体含量,通过UV₂₈₀测量来计算蛋白质浓度。

[0271] 图9显示了scFv A1(A)以及scFv PR0571和PR0592(B)在5个重复的冷冻和解冻循环中的单体含量监测。

[0272] 图10显示了三特异性形式。A,设计了Fab-(scFv)₂分子的两个结构域排列方式。在三体形式的CL和CH1位置的scFv融合被认为是等价的,从而产生了该形式的三个变体。B,设计了三个scDb-scFv结构域排列方式变体。结构以特异性在底部显示。连接可变结构域的Gly-Ser连接体和结构域间的二硫键用灰色括号表示。

[0273] 图11显示了先导制造的一般过程。A,最终A3-A5(左图)和A6-A8(右图)样品的SE-HPLC痕迹的叠加。保留时间为7-8分钟的峰对应于各自分子的单体的表观分子量;保留时间>10分钟的峰是与缓冲液和盐有关的伪影。B,A3-A8在非还原(左)和还原(右)缓冲液条件下的SDS-PAGE分析。在中间泳道中加载了一个分子量参照。在非还原条件下,A3-A5和A6-A8的条带分别对应于预期的分子量~100kDa和~75kDa。正如预期的那样,对于异二聚Fab-(scFv)₂抗体形式(A3-A5),在还原条件下条带变为~50kDa,而对于A6-A8,在还原条件下也

可以观察到分子量为~75kDa的条带。

[0274] 图12显示了在L929试验中中和TNF α 的效力。使用细胞计数试剂盒-8测得的吸光度以三特异性分子A3-A8浓度(nM)的函数显示。A13(亲代双特异性,HSA结合剂和TNF α 阻断剂)被用作参照。

[0275] 图13显示了中和人和是食蟹猴TNF α 的效力的比较。在人或食蟹猴TNF- α 存在下,使用细胞计数试剂盒-8测得的吸光度以A5和A7浓度的函数表示。

[0276] 图14显示了在HSA存在的情况下,在HT-29试验中对TNF- α 和IL-17A的同时阻断情况。在1mg/ml的HSA存在下,使用基于HT-29细胞的试验分析了六种三特异性分子A3-A8对TNF α 和IL-17A的体外同时阻断作用。苏金单抗(IL-17A阻断剂)和A13(亲代双特异性,HSA结合剂和TNF α 阻断剂)被用作参照。获得的GRO- α 分泌数据以分子浓度为nM(A、C和E)和ng/ml(B、D和F)的函数表示。“无TNF”表示仅加入IL-17A时的GRO- α 分泌,相当于TNF α 阻断的最大效果。“无IL17a”表示仅加入TNF α 后的GRO- α 分泌,相当于IL-17A阻断的最大效果。“无IL17a,无TNFa”表示不添加IL-17A和TNF α 时的背景GRO- α 分泌,相当于TNF α 和IL-17A同时阻断的最大效果。

[0277] 图15显示了在竞争性ELISA中IL-17A与IL-17RA结合的中和情况。在评估IL-17A与IL-17RA结合的竞争性ELISA中测得的吸光度以六种三特异性分子(A3-A8)的增加浓度的函数表示。苏金单抗(IL-17A阻断剂)被用作参照。

[0278] 图16显示了通过SPR分析与人TNF α 、人IL-17A和HSA同时结合的情况。在MASS-1SPR装置上进行了不同分析物(人TNF α 、人IL-17A和HSA)的六种可能的注射顺序,并显示了获得的传感图。将三特异性分子固定在传感器芯片上(A3在通道1B,Ch1B,A4在通道2B,Ch2B,A5在通道3B,Ch3B,A6在通道4B,Ch4B,A7在通道5B,Ch5B,A8在通道6B,Ch6B)并依次注射抗原。

[0279] 图17显示了在37 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C和-80 $^{\circ}$ C的温度下,在蛋白质浓度为10mg/mL的情况下进行的储存稳定性研究,为期4周。在d0、d2、d7、d14、d21和d28记录了单体含量%和单体损失%随时间的变化。

[0280] 图18显示了A5(左)、A7(中)和A8(右)的d0(黑色,阴影)和d28(灰色)稳定性样品的SE-HPLC痕迹的叠加图。

[0281] 图19显示了A7在食蟹猴中静脉注射(n=3)和皮下注射(n=3)后的药代动力学曲线和ADA分析。

[0282] 图20显示了Morrison L构建体A14和A15的结构示意图。

[0283] 图21显示了通过动态光散射测定的scDb-scFvA7的可溶性复合物的平均尺寸。

[0284] 图22显示了通过动态光散射测定的A14的可溶性复合物的平均尺寸。

[0285] 图23显示了通过动态光散射测定的A15的可溶性复合物的平均尺寸。

[0286] 图24显示了scDb-scFv A7的可溶性复合物的蛋白质浓度恢复。

[0287] 图25显示了A14的可溶性复合物的蛋白质浓度恢复。

[0288] 图26显示了A15的可溶性复合物的蛋白质浓度恢复。

具体实施方式

[0289] 本公开基于特异性结合人IL-17A和TNF α 并具有改善的亲合力、功效和选择性的多特异性抗体分子的发现。此外,本公开的多特异性抗体具有更好的安全性,因为发明人已经

证明所述抗体不与TNF α 形成免疫复合物,因此具有潜在的低免疫原性。由于其他多特异性抗体(如Covagen、Abbvie等)的二价结合,很有可能形成免疫复合物,可能导致免疫原性或其他不良反应。相反,本公开的单价双特异性和三特异性构建体形成这种复合物的可能性减少,因此导致抗药性抗体和免疫相关不良反应的概率较低。此外,本公开的多特异性抗体具有更好的生物物理特性,例如,可开发性和高产率可生产性,杂质相对较少,而且稳定性优越。

[0290] 本公开还提供了与人IL-17A蛋白特异性结合的抗体,以及药物组合物、生产方法,以及使用此类抗体和药物组合物的方法。

[0291] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。

[0292] 除非另有说明,否则术语“包括”和“包含”在本文中以开放式且非限制性的含义使用。关于这些后面的实施方案,术语“包含”因此包括范围较窄的术语“由……组成”。

[0293] 除非本文另外指出或与上下文明显矛盾,否则在描述本发明的语境下(特别是在以下权利要求的语境下),术语“一”和“一个”以及“该”和类似的引用应被解释为涵盖单数和复数。例如,术语“一个细胞”包括多个细胞,包括其混合物。当化合物、盐等使用复数形式时,这也被认为是单化合物、盐等。

[0294] 本公开的多特异性抗体

[0295] 一方面,本公开提供了分离的多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域。

[0296] 术语“TNF α ”或“TNF- α ”或“肿瘤坏死因子”尤其是指人TNF α 。TNF α 以可溶性蛋白和前体的形式存在,该形式被称为跨膜TNF α ,表示为细胞表面II型多肽。跨膜TNF α 被金属蛋白酶如TNF α 转化酶(TACE)在残基Ala76和Val77之间加工,从而释放出157个氨基酸残基的TNF α 可溶形式。可溶性TNF α 是一个17-kDa的裂解单体的同源三聚体。跨膜TNF α 也作为26-kDa的未裂解单体的同源三聚体存在。如本文所用,术语“TNF α ”包括可溶形式和跨膜形式。术语“TNF α ”特别指具有UniProt ID号P01375的人跨膜TNF α ,在本文中以SEQ ID NO:134再现。术语“TNF α ”特别是指具有UniProt ID号P01375的可溶性跨膜TNF α ,在本文中以SEQ ID NO:135再现。

[0297] 适当地,本公开的抗体是分离的抗体。如本文所用,术语“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,仅特异性结合IL-17A和TNF α 的分离的抗体基本上不含特异性结合除IL-17A和TNF α 以外的抗原的抗体)。但是,特异性结合IL-17A和TNF α 的分离的抗体可能与其他抗原(例如来自其他物种的IL-17A和TNF α 分子)具有交叉反应性。此外,分离的抗体可基本不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0298] 适当地,本公开的抗体是单克隆抗体。如本文所用,术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指氨基酸序列基本相同或源自相同遗传来源的抗体。单克隆抗体组合物对某个具体表位显示结合特异性和亲和力,或对多个特定表位显示结合特异性和亲和力。

[0299] 本公开的抗体包括但不限于嵌合的和人源化的。

[0300] 术语“嵌合抗体”是一种抗体分子,其中(a)恒定区或其一部分被改变、替换或交换,以使抗原结合位点(可变区)与不同的或改变的类别、效应子功能和/或种类的恒定区相连,或与一个完全不同的分子相连,该分子赋予嵌合抗体新的特性,例如酶、毒素、激素、生

长因子、药物等；或者 (b) 可变区或其一部分被改变、替换或交换为具有不同的或改变的抗原特异性的可变区。例如，可以通过将小鼠抗体的恒定区替换为人免疫球蛋白的恒定区来对其进行修饰。由于被人恒定区替换，因此嵌合抗体可以保留其识别抗原的特异性，同时与原始小鼠抗体相比具有降低的人类抗原性。

[0301] 如本文所用，“人源化”抗体是保留了非人抗体的反应性，同时对人类的免疫原性较低的抗体。例如，这可以通过以下方法来实现：保留非人CDR，并将抗体的其余部分替换为人类对应物（即恒定区和可变区的框架部分）。可以在人框架序列以及衍生自另一哺乳动物物种的种系的CDR序列内进行另外的框架区修饰。本公开的人源化抗体可包含不是由人类序列编码的氨基酸残基（例如，通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变，或为了促进稳定性或制备的保守取代）。参见，例如，Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855, 1984; Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92, 1988; Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536, 1988; Padlan, Molec. Immun., 28:489-498, 1991; 和 Padlan, Molec. Immun., 31:169-217, 1994。人类工程技术的其他实例包括但不限于美国专利号5,766,886中公开的Xoma技术。

[0302] 如本文所用，术语“重组人源化抗体”包括所有通过重组手段制备、表达、创建或分离的本公开的人源化抗体，例如从动物（如兔）中分离的抗体；使用重组表达载体转染到宿主细胞中表达的抗体；从重组组合人源抗体库中分离的抗体；或通过任何其他涉及将人类免疫球蛋白基因序列与其他DNA序列拼接的方式制备、表达、创造或分离的抗体。这样的重组人类抗体具有来自人类种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区（如果存在）。然而，这样的抗体可以进行体外诱变（或者，当使用人类Ig序列的转基因动物时，进行体内体细胞诱变），因此，重组抗体的VH（抗体重链可变区）和VL（抗体轻链可变区）的氨基酸序列虽然来自人类种系VH和VL序列并与之相关，但可能不天然存在于人类抗体种系内。

[0303] 适当地，本公开的抗体或其结合结构域是人源化的。适当地，本公开的抗体或其结合结构域是人源化的并且包含来源于兔的CDR。

[0304] 如本文所用，术语“多特异性抗体”是指与至少两个或更多个不同靶标（例如，IL-17A和TNF α ）上的两个或更多个不同表位结合的抗体，或与同一靶标的两个或更多个不同表位结合的抗体。本公开的“多特异性抗体”具有两个或更多个结合结构域，例如两个或三个结合结构域。术语“多特异性抗体”包括双特异性、三特异性、四特异性、五特异性和六特异性。如本文所用，术语“双特异性抗体”是指与例如两个不同靶标（例如IL-17A和TNF α ）或相同靶标上的两个不同表位结合的抗体。如本文所用，术语“三特异性抗体”是指与例如三个不同靶标（例如，IL-17A、TNF α 和HSA）或相同靶标上的三个不同表位结合的抗体。

[0305] 术语“多价抗体”是指具有不止一个价（valency）的单个结合分子，其中“价”被描述为与相同靶分子上的表位结合的抗原结合部分的数目。“价（valent）”指的是一个分子中存在特定数目的对一种抗原具有特异性的结合结构域。因此，术语“单价”、“二价”、“四价”和“六价”分别指一个分子中存在一个、两个、四个和六个对一种抗原具有特异性的结合结构域。如本文所用，术语“单价抗体”是指具有单一抗原结合部分的抗体，它与靶分子上的单一表位结合，如IL-17A或TNF α 。如本文所用，术语“二价抗体”是指具有两个抗原结合部分的抗体，其中每个都与相同的表位结合。

[0306] 本公开的多特异性抗体对于结合IL-17A可以是一价或多价，例如二价、三价或四

价,优选一价。

[0307] 本公开的多特异性抗体对于结合TNF α 可以是一价或多价,例如二价、三价或四价,优选一价。由于TNF α 形成三聚体,它可能是三价,并且可以形成三维免疫复合物,其中抗体具有特异性结合TNF α 的若干结构域,例如,用于结合TNF α 的二价、三价或多价抗体。为了说明,在不同的抗原/抗体比下,在TNF和英夫利昔单抗(嵌合TNF α IgG抗体)和etanercept(具有IgG1Fc的TNFR2二聚体融合蛋白)之间形成的免疫复合物的尺寸研究显示,每种抗体产生独特尺寸特征的免疫复合物(Kim MS et al., J Mol Biol. 2007; 374: 1374-1388)。因此,潜在的高免疫原性是靶向TNF α 的治疗性抗体的担忧之一。因此,在优选的实施方案中,本公开的多特异性抗体对于结合TNF α 是一价的。

[0308] 适当地,本公开的多特异性抗体包含特异性结合IL-17A的仅一个结构域和/或特异性结合TNF α 的仅一个结构域。在一个优选的实施方案中,本公开的多特异性抗体包含特异性结合TNF α 的仅一个结构域。适当地,本公开的多特异性抗体包含特异性结合IL-17A的仅一个结构域和特异性结合TNF α 的仅一个结构域。在一个特定实施方案中,本公开的多特异性抗体由以下组成:特异性结合IL-17A的第一结构域,特异性结合TNF α 的第二结构域,和任选地,两个结构域之间的多肽接头。在一个具体实施方案中,存在任选的多肽接头并且由具有4至25个氨基酸残基的多肽组成。

[0309] 适当地,本公开的多特异性抗体有利地能够中和人TNF α 和人IL-17A的生物活性。可以理解的是,本文所用的术语“中和”是指生物信号活动的减少,这种减少可能是部分的或完全的。确定中和作用的合适方法在本领域是已知的,本文的实施例中提供了某些这样的检测方法。

[0310] 在一个实施方案中,本公开的抗体或其第一结构域相对于人IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F选择性地结合人IL-17A,特别是通过ELISA所测量的。如本文所用,术语“选择性结合”是指抗体、组合物、制剂等与IL-17B/C/D/E/F没有明显结合,但与IL-17A有结合。选择性结合的特征是高亲和力(或低 K_D)和低至中等的 IC_{50} ,区别于非特异性结合,后者通常具有低亲和力(或高 K_D)和中等至高 IC_{50} 。通常情况下,当抗体结合的 K_D 小于 10^{-7} M时,结合被认为是有选择性的。适当地,本公开的抗体或其第一结构域与人IL-17A结合比其与人IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F结合的亲和力更高或 K_D 更低,如通过SPR测量的。适当地,本公开的抗体或其第一结构域对IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F的 IC_{50} 值比对IL-17A的 IC_{50} 高至少100倍,例如高至少200倍、高至少300倍、高至少400倍,如通过ELISA测量的。在一个实施方案中,本公开的抗体或其第一结构域与人IL-17A结合,但不与人IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F结合,特别是通过SPR和/或ELISA测量。

[0311] 在另一个实施方案中,本公开的多特异性抗体还包含具有针对与IL-17A和TNF α 不同的抗原的特异性的第三结构域。适当地,本公开的多特异性抗体是三特异性抗体。如本文所用,“三特异性抗体”是指具有三种抗原结合结构域的抗体分子,例如,其中一种结合结构域结合人TNF α ,另一种结合结构域结合人IL-17A,另一种结合结构域结合能够延长抗体分子的半衰期的抗原,例如人血清白蛋白。

[0312] 特别地,本公开的多特异性抗体还包含与人血清白蛋白(HSA)特异性结合的第三结构域。

[0313] 本发明人出人意料地发现,在包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合

TNF α 的第二结构域的本公开的多特异性抗体中加入特异性结合人血清白蛋白的第三结构域,具有以下有益效果:

[0314] (i) 包含至少一个特异性结合人血清白蛋白的结构域的本公开的多特异性抗体的血清半衰期增加;和

[0315] (ii) 在本公开的多特异性抗体中加入人血清白蛋白结合结构域与其他结合结构域的功能,例如IL-17A和TNF α 结合结构域的中和活性,兼容。

[0316] 术语“HSA”特别是指具有UniProt ID号P02768的人血清白蛋白。人血清白蛋白(HSA)是人血清中66.4kDa的丰富蛋白(占总蛋白的50%),由585个氨基酸组成(Sugio, Protein Eng, Vol.12, 1999, 439-446)。多功能HSA蛋白与其结构相关联,该结构允许结合并运输许多代谢物,例如脂肪酸、金属离子、胆红素和某些药物(Fanali, Molecular Aspects of Medicine, Vol.33, 2012, 209-290)。血清中的HSA浓度约为3.5-5g/dL。白蛋白结合抗体可用于例如延长与其缀合的药物或蛋白质的体内血清半衰期。

[0317] 适当地,在一个实施方案中,本公开的多特异性抗体包括特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,和特异性结合人血清白蛋白的第三结构域。本公开的多特异性抗体对于与人血清白蛋白结合可以是一价或多价,例如二价、三价或四价,优选一价。适当地,本公开的多特异性抗体包含特异性结合IL-17A的仅一个结构域和特异性结合TNF α 的仅一个结构域,和特异性结合人血清白蛋白的仅一个结构域。在一个特定实施方案中,本公开的多特异性抗体由以下组成:特异性结合IL-17A的第一结构域,特异性结合TNF α 的第二结构域,特异性结合人血清白蛋白的第三结构域,和任选地,两个结构域之间的多肽接头。在一个具体实施方案中,存在任选的多肽接头并且由具有4至25个氨基酸残基的多肽组成。

[0318] 有利地,本公开的多特异性抗体包括特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,和任选地,特异性结合人血清白蛋白的第三结构域,其中所述结构域能够同时与其各自的抗原或受体结合。

[0319] 本公开的多特异性抗体的结构域,例如,所述第一结构域、所述第二结构域、所述第三结构域独立地选自由以下组成的组:Fab、Fv、scFv、dsFv、scAb、STAB、单结构域抗体(sdAb或dAb)、单结构域重链抗体、和单结构域轻链抗体、VHH、VNAR、基于鲨鱼的VNAR结构的单结构域抗体、和基于替代支架的结合结构域(包括但不限于基于锚蛋白的结构域、fynomer、avimer、anticalin、纤连蛋白、和构建在抗体恒定区中的结合位点(例如F-star的Modular Antibody TechnologyTM)),优选地,选自由以下组成的组:Fab、Fv和scFv,更优选地,其中所述第一结构域和/或所述第二结构域和/或所述第三域是Fv或scFv。

[0320] 本公开的多特异性抗体可以是任何合适的形式。在一个实施方案中,本公开的多特异性抗体的形式选自由以下组成的组:单链双抗体(scDb)、串联scDb(Tandab)、线性二聚体scDb(LD-scDb)、环状二聚体scDb(CD-scDb)、双特异性T细胞接合子(BiTE;串联双-scFv)、串联三-scFv、三体(Fab-(scFv)₂)或双体(Fab-(scFv)₁)、Fab、Fab-Fv₂、Morrison(IgG CH3-scFv融合体(Morrison L)或IgG CL-scFv融合体(Morrison H))、三抗体、scDb-scFv、双特异性Fab₂、双微抗体、四抗体、scFv-Fc-scFv融合体、scFv-HSA-scFv融合体、双双抗体、DVD-Ig、COVID、IgG-scFab、scFab-dsscFv、Fv₂-Fc、IgG-scFv融合体例如bsAb(与轻链的C-末端连接的scFv)、Bs1Ab(与轻链的N-末端连接的scFv)、Bs2Ab(与重链的N-末端连接

的scFv)、Bs3Ab(与重链的C-末端连接的scFv)、Ts1Ab(与重链和轻链的N-末端连接的scFv)、Ts2Ab(与重链的C-末端连接的dsscFv)、基于异二聚体Fc结构域的双特异性抗体例如Knob-into-Hole抗体(KiH);与异二聚体Fc结构域或任何其他异二聚体结构域的任意一条链的N-和/或C-末端融合的Fv、scFv、scDb、串联双-scFv、串联三-scFv、Fab-(scFv)₂、Fab-(scFv)₁、Fab、Fab-Fv₂、COVD、MATCH和DuoBody,优选为三体或scDb-scFv。

[0321] 术语“双抗体”是指具有两个抗原结合位点的抗体片段,这些片段包含与同一条多肽链中的VL连接的VH(VH-VL)。通过使用接头,该接头太短以至于不允许同一条链上的两个结构域之间配对,这些结构域被迫与另一条链的互补结构域配对,以产生两个抗原结合位点。双抗体可以是二价或双特异性的。双抗体在例如EP404097、WO 93/01161、Hudson et al.,*Nat. Med.* 9:129-134(2003)和Holliger et al.,*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-6448(1993)中更充分地描述。三抗体和四抗体也描述于Hudson et al.,*Nat. Med.* 9:129-134(2003)。双特异性scDb,特别是双特异性单体scDb,特别地包含两个可变重链结构域(VH)或其片段和两个可变轻链结构域(VL)或其片段,它们通过接头L1、L2和L3以下顺序连接VHA-L1-VLB-L2-VHB-L3-VLA、VHA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VLA、VLA-L1-VLB-L2-VHB-L3-VHA、VLA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VHA、VHB-L1-VLA-L2-VHA-L3-VLB、VHB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VLB、VLB-L1-VLA-L2-VHA-L3-VHB或VLB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VHB,其中VLA和VHA结构域共同形成第一抗原的抗原结合位点,VLB和VHB共同形成第二抗原的抗原结合位点。接头L1特别是2-10个氨基酸,更特别是3-7个氨基酸,最特别是5个氨基酸的肽,并且接头L3特别是1-10个氨基酸,更特别是2-7个氨基酸,最特别是5个氨基酸的肽。中间接头L2特别是10-40个氨基酸,更特别地15-30个氨基酸,最特别地20-25个氨基酸的肽。

[0322] 在一个实施方案中,本公开的多特异性抗体包含免疫球蛋白Fc区多肽。本文中的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C-末端区,包括天然序列Fc区和变体Fc区。合适的天然序列Fc区包括人IgG1、IgG2(IgG2A、IgG2B)、IgG3和IgG4。“Fc受体”或“FcR”描述与抗体的Fc区结合的受体。优选的FcR是天然序列人FcR。此外,优选的FcR是结合IgG抗体的FcR(γ 受体),并且包括Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类的受体,包括等位基因变体和这些受体的剪接形式,Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“活化性受体”)和Fc γ RIIB(“抑制性受体”),它们具有相似的氨基酸序列,主要区别在于其胞质结构域。激活性受体Fc γ RIIA在其胞质结构域中包含一个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。抑制性受体Fc γ RIIB在其胞质结构域中包含一个基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见M. Daeron,*Annu. Rev. Immunol.* 5:203-234(1997))。FcR的概述见Ravetch and Kinet,*Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92(1991); Capet et al.,*Immunomethods* 4:25-34(1994);及de Haas et al.,*J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41(1995)。本文中的术语“FcR”包括其他FcR,包括将来将要鉴定的FcR。术语“Fc受体”或“FcR”也包括新生儿受体FcRn,其负责将母体IgG转移至胎儿。Guyer et al.,*J. Immunol.* 117:587(1976)及Kim et al.,*J. Immunol.* 24:249(1994)。测量与FcRn的结合的方法是已知的(参见,例如,Ghetie and Ward,*Immunol. Today* 18:(12):592-8(1997); Ghetie et al.,*Nature Biotechnology* 15(7):637-40(1997); Hinton et al.,*J. Biol. Chem. TJI*(8):6213-6(2004);WO 2004/92219(Hinton et al.))。可以例如在表达人FcRn的转基因小鼠或转染的人细胞系中,或在施用具有变体Fc区的多肽的灵长类动物中测定与FcRn的体内结合以及人FcRn高亲和力结合多肽的血清半衰期。WO 2004/42072

(Presta) 描述了改善或减少与FcR结合的抗体变体。还参见,例如,Shields et al., J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001)。

[0323] 为了在相同或更低分子量下,增加特异性/功能性的数量,使用包含抗体片段的抗体是有利的,例如Fv、Fab、Fab' 和F(ab')₂片段以及其他抗体片段。这些较小的分子保留了完整抗体的抗原结合活性,并且与完整的免疫球蛋白分子相比,还表现出改善的组织渗透性和药代动力学特性。尽管相对于完整的免疫球蛋白,此类片段似乎显示出许多优势,但它们还受到血清清除率高的困扰,因为它们缺少在体内具有长半衰期的Fc结构域(Medasan et al.,1997,J.Immunol.158:2211-2217)。具有较低分子量的分子能更有效地穿透靶标组织(例如实体癌),因此有希望在相同或较低剂量下改善功效。适当地,本公开的抗体不包含免疫球蛋白Fc区多肽,且,任选地,不包括CH1和CL区,特别是当所述多特异性抗体包含特异性结合人血清白蛋白的第三结构域时。

[0324] 适当地,本公开的抗体可以是三体形式(Fab-(scFv)₂)。适当地,第一结构域和/或第二结构域和/或第三结构域是Fab或scFv结构域。特别地,本公开的多特异性抗体具有一个Fab结构域和两个scFv结构域,特别是其中scFv结构域与Fab结构域的每个链的羧基末端融合。本发明人在药效学和生物物理学特性方面测试了三特异性形式中各个结合结构域的最佳相对位置,并令人惊讶地发现,当为三体形式时,当特异性结合TNF α 的第二结构域是Fab结构域,且分别特异性结合IL-17A和HSA的第一和第三结构域是与所述Fab结构域融合的scFv结构域时,本公开的多特异性抗体具有有利的特性。

[0325] 优选地,本公开的抗体是scDb-scFv形式。术语“scDb-scFv”是指抗体形式,其中单链Fv(scFv)片段通过柔性Gly-Ser接头与单链双抗体(scDb)融合。适当地,第一结构域和/或第二结构域和/或第三结构域是Fv或scFv结构域。特别地,本公开的多特异性抗体,当为scDb-scFv形式时,具有一个scFv结构域,该结构域在C末端融合到由其他两个结构域组成的scDb。本公开的多特异性抗体,当为scDb-Fv形式时,可以由下式表示:

[0326] VLA-L1-VHC-L2-VLC-L3-VHA-L4-VLB-L5-VHB或

[0327] VLB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VHB-L4-VLC-L5-VHC或

[0328] VLC-L1-VHB-L2-VLB-L3-VHC-L4-VLA-L5-VHA或

[0329] VLA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VHA-L4-VLC-L5-VHC,

[0330] 优选VLB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VHB-L4-VLC-L5-VHC或VLA-

[0331] L1-VHB-L2-VLB-L3-VHA-L4-VLC-L5-VHC,

[0332] 更优选VLB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VHB-L4-VLC-L5-VHC,

[0333] 其中VLA和VHA分别是第一结构域(特异性结合IL-17A)的轻链可变区和重链可变区;VLB和VHB分别是第二结构域(特异性结合TNF α)的轻链可变区和重链可变区;VLC和VHC分别是第三结构域(特异性结合HSA)的轻链可变区和重链可变区,其中L1、L2、L3、L4和L5是多肽接头。

[0334] 在本公开的语境下,术语“多肽接头”是指连接两个结构域的通过肽键连接的由氨基酸残基链组成的接头,每个结构域与接头的一端连接。多肽接头的长度应足以连接两个分子,以使它们彼此之间具有正确的构象,从而保持所需的活性。在特定的实施方案中,多肽接头具有2至30个氨基酸残基(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸残基)的连续链。此外,选择包含在多肽

接头中的氨基酸残基应表现出不会显著干扰多肽活性的特性。因此,整体上接头肽不应表现出与多肽活性不一致,或干扰内部折叠,或与一种或多种单体中的氨基酸残基形成键或将严重阻碍单体结构域的结合的其他相互作用的电荷。在特定的实施方案中,多肽接头是非结构化的多肽。有用的接头包括甘氨酸-丝氨酸或GS接头。如本领域技术人员将理解的,“Gly-Ser”或“GS”接头是指串联的甘氨酸和丝氨酸的聚合物(包括例如(Gly-Ser)_n、(GSGGS)_n、(GGGGS)_n和(GGGS)_n其中n是至少一的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物以及其他柔性接头,例如用于shaker钾离子通道的系链,以及多种其他柔性肽接头。甘氨酸-丝氨酸聚合物是优选的,因为这两个氨基酸都是相对非结构化的,因此可以用作组分之间的中性系链。其次,丝氨酸是亲水的,因此能够溶解可能是球状甘氨酸链的物质。第三,已显示相似的链可有效连接重组蛋白(如单链抗体)的亚基。

[0335] 适当地,本公开的所述L1和L3如SEQ ID NO:132中所示。适当地,本公开的所述L2、L4和L5如SEQ ID NO:23中所示。

[0336] 本发明人在药效学和生物物理学特性方面测试了三特异性形式中各个结合结构域的最佳相对位置,并令人惊讶地发现,当为scDb-scFv形式时,当分别与IL-17A和TNF α 特异性结合的第一结构域和所述第二结构域形成scDb,且所述与HSA特异性结合的第三结构域为scFv时,本公开的多特异性抗体具有有利的特性。

[0337] 本公开的多特异性抗体具有以下有利的特性:

[0338] (a) 具有中和IL-17A的能力,在HT-29试验中通过测量Gro- α 分泌而测定的相对于苏金单抗的效力(相对效力)大于2,例如大于5,大于10,大于15,大于20,大于25,大于30,大于35,大于40,大于45,优选大于50,且其中所述相对效力是在HT-29试验中测量的苏金单抗的单位为ng/mL的IC₅₀值与在HT-29试验中测量的所述多特异性抗体的单位为ng/mL的IC₅₀值的比;且

[0339] (b) 具有中和TNF α 的能力,在HT-29试验中通过测量Gro- α 分泌而测定的相对于根据SEQ ID NO:149的scDb(A13)的效力(相对效力)为至少1,例如,大于1,大于1.5,大于2,大于2.5,大于3,大于3.5,优选大于4,更优选大于4.5,且其中所述相对效力是在HT-29试验中测量的根据SEQ ID NO:149的所述scDb的单位为nM的IC₅₀值与在HT-29试验中测量的所述多特异性抗体的单位为nM的IC₅₀值的比;且

[0340] (c) 任选地,具有阻断IL-17A与IL-17RA之间的相互作用的能力,在ELISA试验中测定的相对于苏金单抗的效力(相对效力)大于2,例如,大于3,大于4,大于5,大于6,大于7,大于8,大于9,优选大于10,且其中所述相对效力是通过ELISA测量的苏金单抗的单位为ng/mL的IC₅₀值与

[0341] 通过ELISA测量的所述多特异性抗体的单位为ng/mL的IC₅₀值的比;且

[0342] (d) 任选地,具有中和TNF α 的能力,在L929试验中测定的相对于根据SEQ ID NO:149的scDb(A13)的效力(相对效力)为至少0.4,例如,至少0.5,优选至少1,且其中所述相对效力是在L929试验中测量的根据SEQ ID NO:149的所述scDb的单位为nM的IC₅₀值与在L929试验中测量的所述多特异性抗体的单位为nM的IC₅₀值的比;和/或

[0343] (e) 与人IL-17A结合的解离常数(K_D)小于5nM,例如小于4nM,小于3nM,

[0344] 小于2nM,小于1nM,优选小于0.5nM,如通过表面等离子共振测量的;且任选地,与食蟹猴IL-17A结合的K_D小于5nM,例如,小于4nM,小于3nM,小于2nM,小于1nM,优选小于

0.5nM,如通过表面等离子共振测量的;

[0345] (f) 与人TNF α 结合的解离常数(K_D)小于5nM,例如,小于4nM,小于3nM,小于2nM,小于1nM,优选小于0.5nM,更优选小于0.25nM,如通过表面等离子共振测量的;且

[0346] (g) 任选地,与人血清白蛋白结合的解离常数(K_D)小于5nM,例如,小于4nM,小于3nM,优选小于2nM,如通过表面等离子共振测量的;且

[0347] 任选地,与食蟹猴血清白蛋白结合的解离常数(K_D)小于5nM,例如,小于4nM,小于3nM,优选小于2nM,如通过表面等离子共振测量的。

[0348] 如本文所用,术语“亲和力”是指在单个抗原位点上抗体和抗原之间的相互作用的强度。在每个抗原性位点内,抗体“臂”的可变区通过弱的非共价力与抗原在许多位点相互作用;相互作用越大,亲和力越强。

[0349] “结合亲和力”通常是指分子的(例如,抗体的)单个结合位点与其结合伴侣(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,否则如本文所用,“结合亲和力”或“与……结合”是指反映结合对的成员(例如抗体和抗原)之间的1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X与其伴侣Y的亲和力通常可以用解离常数(K_D)表示。亲和力可以通过本领域已知的常规方法来测量,包括本文所述的方法。低亲和力抗体通常会缓慢结合抗原并倾向于易于解离,而高亲和力抗体通常会更快地结合抗原并倾向于保持更长的结合时间。本领域已知测量结合亲和力的多种方法,其中任何一种方法均可用于本公开的目的。下面描述用于测量结合亲和力,即结合强度的具体说明性和示例性实施方案。

[0350] 本文所用的术语“ K_{assoc} ”、“ K_a ”或“ K_{on} ”是指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率,而本文所用的术语“ K_{dis} ”、“ K_d ”或“ K_{off} ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。在一个实施方案中,本文所用的术语“ K_D ”是指解离常数,其由 K_d 与 K_a 之比(即 K_d/K_a)获得,并表示为摩尔浓度(M)。在一个实施方案中,根据本公开的“ K_D ”或“ K_D 值”或“ KD ”或“ KD 值”通过使用MASS-1SPR仪器(Sierra Sensors)使用表面等离子体共振测定法来测量,如实施例所述。抗体的结合亲和力可以例如通过解离常数(K_D)确定。较低的 K_D 表示较强的亲和力,而较高的 K_D 表示较弱的亲和力。

[0351] 因此,在合适的实施方案中,本公开的抗体结合人IL-17A,解离常数(K_D)在1pM和10nM之间,在1pM和7nM之间,在1pM和5nM之间,在1pM和4nM之间,在1pM和3nM之间,在1pM和2.5nM之间,在1pM和2nM之间,在1pM和1.5nM之间,在1pM和1nM之间,优选在1pM和0.5nM,如通过表面等离子体共振所测量。在合适的实施方案中,本公开的抗体结合人IL-17A,解离常数(K_D)在1和500pM之间,如通过表面等离子体共振所测量。在合适的实施方案中,本公开的抗体结合人IL-17A,解离常数(K_D)小于5nM,小于4nM,小于3nM,小于2nM,小于1nM,优选小于0.5nM,如通过表面等离子体共振所测量。适当地,本公开的抗体以小于1nM的解离常数(K_D)结合人IL-17A。适当地,本公开的抗体以小于0.5nM的解离常数(K_D)结合人IL-17A。在另一个实施方案中,本公开的抗体结合食蟹猴IL-17A, K_D 小于10nM,例如,小于7nM,小于5nM,小于4nM,小于3nM,小于2nM,小于1nM,优选小于0.5nM,如通过表面等离子体共振(SPR)所测量。

[0352] 适当地,本公开的抗体结合人TNF α 的解离常数(K_D)在1pM和10nM之间,在1pM和7nM之间,在1pM和5nM之间,在1pM和4nM之间,在1pM和3nM之间,在1pM和2.5nM之间,在1pM和2nM之间,在1pM和1.5nM之间,在优选地1pM和1nM之间,优选在1pM和0.5nM,更优选在1pM和

0.25nM之间,如通过表面等离子体共振所测量。在合适的实施方案中,本公开的抗体结合人TNF α 的解离常数(K_D) 在1和500pM之间,优选在1和250pM之间,如通过表面等离子体共振所测量。在合适的实施方案中,本公开的抗体与人TNF α 结合的解离常数(K_D) 小于5nM,小于4nM,小于3nM,小于2nM,小于1nM,优选小于0.5nM,更优选小于0.25nM,如通过表面等离子体共振测量的。适当地,本公开的抗体以小于0.5nM的解离常数(K_D) 结合人TNF α 。适当地,本公开的抗体以小于0.25nM的解离常数(K_D) 结合人TNF α 。

[0353] 在合适的实施方案中,本公开的抗体结合人血清白蛋白的解离常数(K_D) 在1pM和10nM之间,在1pM和7nM之间,在1pM和5nM之间,在1pM和4nM之间,在1pM和3nM之间,优选在1pM和2nM之间,如通过表面等离子体共振所测量。在合适的实施方案中,本公开的抗体结合人血清白蛋白,解离常数(K_D) 在1和2000pM之间,如通过表面等离子体共振所测量。在合适的实施方案中,本公开的抗体结合人血清白蛋白的解离常数(K_D) 小于5nM,小于4nM,小于3nM,优选小于2nM,如通过表面等离子体共振测量的。适当地,本公开的抗体以小于2nM的解离常数(K_D) 结合人血清白蛋白。在另一个实施方案中,本公开的抗体结合食蟹猴血清白蛋白的 K_D 小于10nM,例如,小于7nM,小于5nM,小于4nM,小于3nM,优选小于2nM,如通过表面等离子体共振 (SPR) 所测量的。

[0354] 适当地,本公开的抗体具有有益的生物物理特征。

[0355] (a) 在pH 6.4、150mM NaCl的磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液中,通过差示扫描荧光法测定的解链温度(T_m) 为至少55 $^{\circ}$ C,优选至少58 $^{\circ}$ C,更优选至少60 $^{\circ}$ C;

[0356] (b) 当所述多特异性抗体在pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的起始浓度为10mg/ml时,在五个连续的冻融循环后,单体含量损失小于5%,例如,小于4%,小于3%,小于2%,优选1%或更低;

[0357] (c) 当所述多特异性抗体在pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的起始浓度为10mg/ml时,在4 $^{\circ}$ C下储存至少两周,特别是至少4周后,单体含量损失小于10%,优选小于5%;和/或

[0358] (d) 当所述多特异性抗体在pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的起始浓度为10mg/ml时,在37 $^{\circ}$ C下储存至少两周,特别是至少4周后,单体含量损失小于20%,优选小于15%。

[0359] 熔融(T_m) 是通过差示扫描荧光测定法(DSF)测定的,如先前所述(Egan et al., MAb, 9(1) (2017), 68-84; Niesen et al., Nature Protocols, 2(9) (2007) 2212-2221)。热解折叠的转变中点是通过差示扫描荧光法(DSF)使用荧光染料SYPRO $^{\circledR}$ Orange确定的(参见Wong&Raleigh, Protein Science 25(2016) 1834-1840)。在pH 6.4的柠檬酸磷酸盐缓冲液中的样品以50 μ g/mL的最终蛋白质浓度制备,并且含有5x SYPRO $^{\circledR}$ Orange的终浓度,总体积为100 μ l。将25微升制备的样品一式三份添加到白壁AB基因PCR板中。该分析在用作热循环仪的qPCR机中进行,并使用该软件的自定义染料校准程序检测荧光发射。将包含测试样品的PCR板以1 $^{\circ}$ C的递增量进行从25 $^{\circ}$ C到96 $^{\circ}$ C的温度变化,在每次温度递增后,暂停30秒。总测定时间为约两个小时。通过GraphPad Prism软件使用数学二阶导数方法计算曲线的拐点来计算 T_m 。报告的 T_m 是三个测量值的平均值。

[0360] 单体含量的损失由SE-HPLC测定。SE-HPLC是一种基于固体固定相和液体流动相的分离技术,如USP第621章所述。该方法利用疏水固定相和水性流动相基于分子的大小和形状来分离分子。分子的分离发生在特定柱的空隙体积(V_0) 和总渗透体积(V_T) 之间。通过SE-

HPLC测量Chromaster HPLC系统 (Hitachi High-Technologies Corporation) 上进行,该系统配备有自动样品注射和检测波长设定为280nm的UV检测器。该设备由软件EZChrom Elite (Agilent Technologies, Version 3.3.2SP2) 控制,该软件还支持对所得色谱图进行分析。在注射前通过离心清除蛋白质样品,并在将自动进样器的温度保持在6°C。对于scFv样品的分析,使用Shodex KW403-4F柱 (Showa Denko有限公司, #F6989202), 标准缓冲盐水流动相 (50mM磷酸钠pH 6.5, 300mM氯化钠), 推荐流速为0.35mL/min。每次注射的目标样品加载量为5µg。在280nm的波长下通过UV检测器检测样品,并通过合适的软件套件记录数据。在V0至VT的范围内分析所得色谱图,从而排除洗脱时间>10分钟的基质相关的峰。

[0361] 特异性结合IL-17A的示例性结构域

[0362] 本公开的多特异性抗体包含特异性结合IL-17A的第一结构域,其中所述结构域含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 且其中: (a) 所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3, 并且 (b) 所述VL依次包括三个互补确定区LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0363] 用于本公开的多特异性抗体的特异性结合IL-17A的合适结构域包括但不限于:

[0364] • 下文在“本公开的抗-IL-17a抗体”部分中介绍的人源化单克隆抗体或其结合结构域,其序列列于表1中;

[0365] • AIN457 (也称为苏金单抗;在美国专利号7,807,155和WO 2006/013107中公开,这些文件的全部内容通过引用的方式并入本文) 或其抗原结合片段;

[0366] • LY2439821 (也称为ixekizumab;在美国专利号7,838,638和8,110,191和WO 2007/070750中公开,这些文件的全部内容通过引用的方式并入本文) 或其抗原结合片段;

[0367] • SCH900117或其抗原结合片段 (Merck);

[0368] • RG4943或其抗原结合片段 (Roche);

[0369] • WO 2006/013107, WO 2006/054059, WO 2007/070750, WO 2007/149032,

[0370] WO 2008/001063, WO 2008/021156, WO 2010/034443, WO 2010/102251,

[0371] WO 2012/018767, WO 2014/161570, WO 2014/001368, WO 2014/122613, WO 2015/070697, WO 2015/137843, WO 2016/048188, WO 2016/113557, WO 2016/138842, WO 2017/068472中公开的抗IL-17A抗体或其抗原结合片段,这些文件的全部内容通过引用并入本文。

[0372] 用于本公开的多特异性抗体的特异性结合IL-17A的优选结构域包括但不限于下文呈现的人源化单克隆抗体或其结合结构域,其序列列于表1中。

[0373] 因此,在一个实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第一结构域包括一组CDR: HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3, 其中,该组CDR相对于这样的一组CDR具有10个或更少个氨基酸取代,例如,9个或更少个氨基酸取代,8个或更少个氨基酸取代,7个或更少个氨基酸取代,6个或更少个氨基酸取代,5个或更少个氨基酸取代,4个或更少个氨基酸取代,3个或更少个氨基酸取代,2个或更少个氨基酸取代,1个或0个氨基酸取代,优选0个氨基酸取代: (i) HCDR1'是选自SEQ ID NO:1、4和7中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:1; HCDR2'是选自SEQ ID NO:2、5和8中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:2; HCDR3'是选自SEQ ID NO:3、6和9中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:3; LCDR1'是选自SEQ ID NO:12、15和18中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:12; LCDR2'是选自SEQ ID

NO:13、16和19中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:13;且LCDR3'具有选自SEQ ID NO:14、17和20中的任一个的氨基酸序列,优选SEQ ID NO:14;或(ii)其中HCDR1'是选自SEQ ID NO:39、42和45中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:39;HCDR2'是选自SEQ ID NO:40、43和46中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:40;HCDR3'是选自SEQ ID NO:41、44和47中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:41;LCDR1'是选自SEQ ID NO:50、53和56中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:50;LCDR2'是选自SEQ ID NO:51、54和57中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:51;且LCDR3'具有选自SEQ ID NO:52、55和58中的任一个的氨基酸序列,优选SEQ ID NO:52。

[0374] 特别地,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第一结构域包含VH CDR,所述VH CDR具有表1中所列的任一个VH CDR的氨基酸序列。特别地,所述结构域包含(或替代地,由其组成)一个、两个、三个或更多个VH CDR,这些VH CDR具有表1中所列的任何VH CDR的氨基酸序列。

[0375] 适当地,特异性结合IL-17A的第一结构域包含重链可变区(VH),其中所述VH依次包含(i)三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1具有选自SEQ ID NO:1、4和7中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR2具有选自SEQ ID NO:2、5和8中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR3具有选自SEQ ID NO:3、6和9中的任一个的氨基酸序列。特别地,本公开提供了抗体,所述抗体对人IL-17A具有结合特异性,并且包含分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列;或(ii)三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1具有选自SEQ ID NO:39、42和45中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR2具有选自SEQ ID NO:40、43和46中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR3具有选自SEQ ID NO:41、44和47中的任一个的氨基酸序列。特别地,本公开提供了抗体,所述抗体对人IL-17A具有结合特异性,并且包含分别为SEQ ID NO:39、40和41的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列。

[0376] 本公开还提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第一结构域包含VL CDR,所述VL CDR具有表1中所列的任一个VL CDR的氨基酸序列。特别地,特异性结合IL-17A的第一结构域包含(或替代地,由其组成)一个、两个、三个或更多个VL CDR,这些VL CDR具有表1中所列的任何VL CDR的氨基酸序列。

[0377] 适当地,所述特异性结合IL-17A的第一结构域包含轻链可变区(VL),其中所述VL依次包含(i)三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述LCDR1具有选自SEQ ID NO:12、15和18中的任一个的氨基酸序列,所述LCDR2具有选自SEQ ID NO:13、16和19中的任一个的氨基酸序列,所述LCDR3具有选自SEQ ID NO:14、17和20中的任一个的氨基酸序列。特别地,本公开提供了抗体,所述抗体对人IL-17A具有结合特异性,并且包含分别为SEQ ID NO:12、13和14的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;或(ii)三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述LCDR1具有选自SEQ ID NO:50、53和56中的任一个的氨基酸序列,所述LCDR2具有选自SEQ ID NO:51、54和57中的任一个的氨基酸序列,所述LCDR3具有选自SEQ ID NO:52、55和58中的任一个的氨基酸序列。特别地,本公开提供了抗体,所述抗体对人IL-17A具有结合特异性,并且包含分别为SEQ ID NO:50、51和52的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0378] 适当地,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第一结构域包含重链可变区(VH)和轻链可变区

(VL),

[0379] (i) 其中

[0380] (a) 所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1具有选自SEQ ID NO:1、4和7中的任一个的氨基酸序列,所述

[0381] HCDR2具有选自SEQ ID NO:2、5和8中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR3具有选自SEQ ID NO:3、6和9中的任一个的氨基酸序列;且

[0382] (b) 所述VL依次包括三个互补确定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述

[0383] LCDR1具有选自SEQ ID NO:12、15和18中的任一个的氨基酸序列,所述

[0384] LCDR2具有选自SEQ ID NO:13、16和19中的任一个的氨基酸序列,所述

[0385] LCDR3具有选自SEQ ID NO:14、17和20中的任一个的氨基酸序列;或

[0386] (ii) 其中

[0387] (a) 所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1具有选自SEQ ID NO:39、42和45中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR2具有选自SEQ ID NO:40、43和46中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR3具有选自SEQ ID NO:41、44和47中的任一个的氨基酸序列;且

[0388] (b) 所述VL依次包括三个互补确定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述

[0389] LCDR1具有选自SEQ ID NO:50、53和56中的任一个的氨基酸序列,所述

[0390] LCDR2具有选自SEQ ID NO:51、54和57中的任一个的氨基酸序列,所述

[0391] LCDR3具有选自SEQ ID NO:52、55和58中的任一个的氨基酸序列。

[0392] 特别地,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第一结构域包括(i) (a) 分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及(b) 分别为SEQ ID NO:12、13和14的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;或(ii) (a) 分别为SEQ ID NO:39、40和41的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及(b) 分别为SEQ ID NO:50、51和52的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0393] 本公开的特异性结合IL-17A的其他结构域包括已突变、但仍在CDR区中与表1中描述的序列中描述的CDR区具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。适当地,本公开的特异性结合IL-17A的其他结构域包括这样的突变氨基酸序列:其中当与表1中描述的序列中描述的CDR区相比时,已经通过CDR区中的氨基酸缺失、插入或取代而突变的氨基酸不超过1、2、3、4、5或10个。突变,例如取代,可能在CDR组内的任何残基处进行,并且可能在CDR1、CDR2和/或CDR3内。

[0394] 术语“氨基酸”是指天然存在的氨基酸和合成的氨基酸,以及以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸,以及后来被修饰的氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。术语“多肽”和“蛋白质”在本文可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物,也适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。除非另有说明,否则特定的多肽序列也隐含涵盖其保守修饰的变体。

[0395] 在CDR、抗体VH或VL结构域和抗体的氨基酸序列内进行突变,例如取代,所需的技术在本领域内通常都可以得到。可以制作变体序列,其中的突变,例如取代,可以或不可以

被预测为对活性有最小或有益的影响,并测试结合和/或中和IL-17A,或者,TNF α 或人血清白蛋白的能力,和/或任何其他需要的特性。CDR内的适当的突变,例如取代,不会导致功能的丧失,所以包括一个如此突变的氨基酸序列的本公开的抗体或其结合结构域保留了结合和/或中和IL-17A,或者,TNF α 或人血清白蛋白的能力。例如,它可以保留与未作改变的本公开的结构域相同的定量结合和/或中和能力,例如,在本文所述的试验中测量。适当地,包括一个如此突变的氨基酸序列的本公开的结构域或抗原结合片段可具有改进的结合和/或中和IL-17A,或者,TNF α 或人血清白蛋白的能力。适当地,特异性结合IL-17A并包含如此突变的氨基酸序列的本公开的第一结构域具有中和IL-17A的能力,在HT-29试验中通过测量Gro- α 分泌而测定的相对于苏金单抗的效力(相对效力)大于2,例如大于5,大于10,大于15,大于20,大于25,大于30,大于35,大于40,大于45,优选大于50,且其中所述相对效力是在HT-29试验中测量的苏金单抗的单位为ng/mL的IC₅₀值与在HT-29试验中测量的所述多特异性抗体的单位为ng/mL的IC₅₀值的比。

[0396] 此外,CDR内的适当的突变,例如取代,不会导致本公开的多特异性抗体的可溶性、稳定性和高产率可生产性的损失,因此包含如此突变的氨基酸序列的本公开的多特异性抗体或其结合结构域保留了生物物理特性。例如,它可以保留与未作改变的本公开的多特异性抗体相同的高产率可生产性和/或稳定性,例如,在本文所述的试验中测量。适当地,包含如此突变的氨基酸序列的多特异性抗体或其结合结构域可具有改进的生物物理特性。

[0397] 在两个或更多个核酸或多肽序列的语境下,术语“相同”或百分比“同一性”是指相同的两个或更多个序列或子序列。关于核酸、肽、多肽或抗体序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”和“同源性”定义为在比对序列并在必要时引入缺口以实现最大百分比序列同一性后,并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分,候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以通过本领域技术范围内的各种方式来实现,例如,使用公开的计算机软件,例如BLAST、BLAST-2或ALIGN软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的合适参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0398] 为了进行序列比较,通常将一个序列用作参照序列,将其与测试序列进行比较。当使用序列比较算法时,将测试序列和参照序列输入计算机,必要时指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数,也可以指定其他参数。然后,序列比较算法根据程序参数计算测试序列相对于参照序列的序列同一性百分比。

[0399] 适用于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的两个实例是BLAST和BLAST 2.0算法,这些算法分别在Altschul et al.,Nuc Acids Res.25:3389-3402,1977;及Altschul et al.,J.Mol.Biol.215:403-410,1990中描述。可通过国家生物技术信息中心公开获得进行BLAST分析的软件。

[0400] 也可以使用E.Meyers和W.Miller(Comput.Appl.Biosci.,4:11-17,1988)的算法确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比,该算法已被纳入ALIGN程序(2.0版),其使用PAM120重量残留表,空位长度罚分为12,空位罚分为4。另外,可以使用Needleman和Wunsch(J.Mol,Biol.48:444-453,1970)算法确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比,该算法已并入GCG软件包的GAP程序中(可www.gcg.com上找到),其使用Blossom 62矩阵或PAM250矩阵,间隙权重为16、14、12、10、8、6或4,长度权重为1、2、3、4、5或6。

[0401] 适当地,本公开的多特异性抗体的特异性结合IL-17A的第一结构域包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:

[0402] (i)

[0403] (a)所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,

[0404] 所述HCDR1具有与SEQ ID NO:1、4和7中的任一个,优选SEQ ID NO:

[0405] 1,具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%

[0406] 同一性的氨基酸序列;

[0407] 所述HCDR2具有与SEQ ID NO:2、5和8中的任一个,优选SEQ ID NO:

[0408] 2,具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%

[0409] 同一性的氨基酸序列;

[0410] 所述HCDR3具有与SEQ ID NO:3、6和9中的任一个,优选SEQ ID NO:

[0411] 3,具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%

[0412] 同一性的氨基酸序列;和/或

[0413] (b)所述VL依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,

[0414] 所述LCDR1具有与SEQ ID NO:12、15和18中的任一个,优选SEQ ID NO:12,具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列;

[0415] 所述LCDR2具有与SEQ ID NO:13、16和19中的任一个,优选SEQ ID NO:13,具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列;

[0416] 所述LCDR3具有与SEQ ID NO:14、17和20中的任一个,优选SEQ ID NO:14,具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98

[0417] 或99%同一性的氨基酸序列;或(ii)

[0418] (a)所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,

[0419] 所述HCDR1具有与SEQ ID NO:39、42和45中的任一个,优选SEQ ID NO:39,具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列;

[0420] 所述HCDR2具有与SEQ ID NO:40、43和46中的任一个,优选SEQ ID NO:40,具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列;

[0421] 所述HCDR3具有与SEQ ID NO:41、44和47中的任一个,优选SEQ ID NO:41,具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98

[0422] 或99%同一性的氨基酸序列;和/或

[0423] (b)所述VL依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,

[0424] 所述LCDR1具有与SEQ ID NO:50、53和56中的任一个,优选SEQ ID NO:50,具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列;

[0425] 所述LCDR2具有与SEQ ID NO:51、54和57中的任一个,优选SEQ ID NO:51,具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列;

[0426] 所述LCDR3具有与SEQ ID NO:52、55和58中的任一个,优选SEQ ID NO:52,具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。

[0427] 适当地,特异性结合IL-17A的第一结构域包含:(i)分别与SEQ ID NO:1、2和3的序列具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的HCDR1、HCDR2和HCDR3,和/或分别与SEQ ID NO:12、13和14的序列具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、

96、97、98或99%同一性的LCDR1、LCDR2和LCDR3；或(ii)分别与SEQ ID NO:39、40和41的序列具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的HCDR1、HCDR2和HCDR3,和/或分别与SEQ ID NO:50、51和52的序列具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0428] 在另一个实施方案中,特异性结合IL-17A的第一结构域包含重链可变区VHA和轻链可变区VLA。

[0429] 在本公开的语境下,术语“VH”(可变重链或重链可变区)、“VL”(可变轻链或轻链可变区)、“V κ ”和“V λ ”指的是抗体重链和轻链序列的家族,根据序列同一性和同源性进行分组。确定序列同源性的方法,例如通过使用同源性搜索矩阵例如BLOSUM (Henikoff, S. & Henikoff, J.G., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89 (1992) 10915-10919), 以及根据同源性对序列进行分组的方法是本领域普通技术人员众所周知的。对于VH、V κ 和V λ ,可以确定不同的亚族,例如,Knappik et al., J. Mol. Biol. 296 (2000) 57-86中所示,其将VH分组为VH1A、VH1B和VH2至VH6, V κ 分组为V κ 1至V κ 4, V λ 分组为V λ 1至V λ 3。在体内,抗体V κ 链、V λ 链和VH链分别是种系 κ 链V和J片段、种系 λ 链V和J片段以及重链V、D和J片段的随机重排的结果。给定的抗体可变链属于哪个亚家族由相应的V片段,特别是由框架区FR1至FR3确定。因此,在本申请中仅以具体的一组框架区HFR1至HFR3为特征的任何VH序列可以与任何HFR4序列结合,例如从重链种系J片段之一中取得的HFR4序列,或从重新排列的VH序列取得的HFR4序列。

[0430] 适当地,本公开的多特异性抗体的特异性结合IL-17A的第一结构域包含重链可变区VHA,其中所述VHA是VH1A、VH1B、VH3或VH4。在一个实施方案中,本公开的所述特异性结合IL-17A的第一结构域包含重链可变区VHA,其中所述VHA是VH4。在一个优选实施方案中,本公开的特异性结合IL-17A的所述第一结构域包含重链可变区VHA,其中所述VHA是VH3。

[0431] 适当地,本公开的多特异性抗体的特异性结合IL-17A的第一结构域包含轻链可变区VLA,并且其中所述VLA包含V κ 框架FR1、FR2和FR3,特别是V κ 1或V κ 3FR1至FR3,优选V κ 1框架FR1至FR3,以及框架FR4,所述框架FR4选自V κ FR4,特别是V κ 1FR4、V κ 3FR4,和V λ FR4。合适的V λ FR4如SEQ ID NO:26至SEQ ID NO:32所示。在一个实施方案中,所述特异性结合IL-17A的第一结构域包含V λ FR4,所述V λ FR4包含与选自SEQ ID NO:26至SEQ ID NO:32中任一个的氨基酸序列,优选与SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27,更优选与SEQ ID NO:27,具有至少60、70、80、90%同一性的氨基酸序列。适当地,特异性结合IL-17A的所述第一结构域包含V λ FR4,所述V λ FR4包含选自SEQ ID NO:26至SEQ ID NO:32中任一个的氨基酸序列,优选地,V λ FR4如SEQ ID NO:26或27所示,更优选地,V λ FR4如SEQ ID NO:27所示。

[0432] 因此,在一个实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第一结构域包含:

[0433] (i) (a) 分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:12、13和14的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;或(i) (b) 分别为SEQ ID NO:39、40和41的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:50、51和52的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

[0434] (ii) VH3或VH4结构域,优选VH3结构域;和

[0435] (iii) VL结构域,其包含VL框架,所述VL框架包含V κ 框架FR1、FR2和FR3,特别是V κ 1或V κ 3FR1至FR3,优选V κ 1FR1至FR3,以及框架FR4,所述框架FR4选自V κ FR4,特别是V κ 1FR4、V κ 3FR4,和V λ FR4,特别是包含与选自SEQ ID NO:26至SEQ ID NO:32中任一个的氨基酸序列

具有至少60、70、80、90%同一性的氨基酸序列的V λ FR4, 优选如选自SEQ ID NO:26至SEQ ID NO:32中任一个的氨基酸序列所示的V λ FR4, 更优选如SEQ ID NO:27所示的V λ FR4。

[0436] 适当地, 本公开提供了多特异性抗体, 其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域, 其中所述第一结构域包含表1中所列的VH。适当地, 本公开还提供了多特异性抗体, 其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合HSA的第二结构域, 其中所述第一结构域包含(或替代地, 由其组成)表1中列出的VH氨基酸序列, 其中框架序列(例如, 不是CDR的序列)中已经突变(其中, 作为多个非限制性实例, 突变是添加、取代或缺失)的氨基酸不超过约20个, 优选不超过约10个。本公开的特异性结合IL-17A的其他结构域包括已突变、但仍在VH区中与表1中描述的序列中描述的VH区具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。

[0437] 适当地, 本公开提供了多特异性抗体, 其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域, 其中所述第一结构域包含表1中所列的VL结构域。适当地, 本公开还提供了多特异性抗体, 其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合HSA的第二结构域, 其中所述第一结构域包含(或替代地, 由其组成)表1中列出的VL氨基酸序列, 其中框架序列(例如, 不是CDR的序列)中已经突变(其中, 作为多个非限制性实例, 突变是添加、取代或缺失)的氨基酸不超过约20个, 优选不超过约10个。本公开的特异性结合IL-17A的其他结构域包括已突变、但仍在VL区中与表1中描述的序列中描述的VL区具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。

[0438] 在一个实施方案中, 本公开提供了多特异性抗体, 其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域, 其中所述第一结构域包含重链可变区, 所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11, 优选SEQ ID NO:10, 至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%, 优选至少90%相同的氨基酸序列, 并且特别地, 其中所述结构域包括分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列。在另一个实施方案中, 特异性结合IL-17A的第一结构域包含重链可变区, 所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:11至少90%相同的氨基酸序列, 且其中所述重链可变区包含Q14K、G16E和G56A(AHo编号)。

[0439] 在另一个实施方案中, 本公开提供了多特异性抗体, 其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域, 其中所述第一结构域包含重链可变区, 所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:49, 优选SEQ ID NO:48, 至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%, 优选至少90%相同的氨基酸序列, 并且特别地, 其中所述抗体包括分别为SEQ ID NO:39、40和41的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列。在另一个实施方案中, 本公开提供了一种特异性结合人IL-17A的分离的抗体, 其中所述抗体包含重链可变区, 所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:49至少90%相同的氨基酸序列, 且其中所述重链可变区包含R20T和Q141P(AHo编号)。

[0440] 在另一个实施方案中, 本公开提供了多特异性抗体, 其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域, 其中所述第一结构域(i)包含轻链可变区域, 所述轻链可变区域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22, 优选SEQ ID NO:21, 至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%, 优选至少90%相同的氨基酸序列, 并且特别地, 其中所述抗体包括分别为SEQ ID NO:12、13和14的LCDR1、LCDR2和LCDR3; 或(ii)

包含轻链可变区域,所述轻链可变区域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:59或SEQ ID NO:60,优选SEQ ID NO:59,至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列,并且特别地,其中所述抗体包括分别为SEQ ID NO:50、51和52的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0441] 在另一个实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第一结构域包含轻链可变区,所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:22至少90%相同的氨基酸序列,且其中所述轻链可变区包含A51P(AHo编号)。

[0442] 在另一个实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第一结构域(i)包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:10至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列;所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:21至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列;或者(ii)包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:48至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列;所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:59至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列。

[0443] 优选地,本公开的多特异性抗体的特异性结合IL-17A的所述第一结构域包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含(i)与氨基酸序列SEQ ID NO:10至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列;和轻链可变区,所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:21至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列,且其中所述抗体包含分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和/或分别为SEQ ID NO:12、13和14的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;特别地,其中所述抗体包含分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和分别为SEQ ID NO:12、13和14的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;或者所述重链可变区包含(ii)与氨基酸序列SEQ ID NO:48至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列;所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:59至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列,并且其中所述抗体包含分别为SEQ ID NO:39、40和41的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和/或分别为SEQ ID NO:50、51和52的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;特别地,其中抗体包含分别为SEQ ID NO:39、40和41的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:39、40和41的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0444] 在一个具体实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第一结构域包括(i)VH,所述VH包含选自由SEQ ID NO:10和11组成的组的氨基酸序列;和/或其VL,所述VL包含选自由SEQ ID NO:21和22组成的组的氨基酸序列,或者(ii)VH,所述VH包含选自由SEQ ID NO:48和19组成的组的氨基酸序列;和/或其VL,所述VL包含选自由SEQ ID NO:59和60组成的组的氨基酸序列。

[0445] 在一个具体实施方案中,特异性结合IL-17A的第一结构域包含(i)SEQ ID NO:10

的VH序列和SEQ ID NO:21的VL序列,或(ii)SEQ ID NO:48的VH序列和SEQ ID NO:59的VL序列。在又一个具体实施方案中,特异性结合IL-17A的第一结构域包含(i)SEQ ID NO:11的VH序列和SEQ ID NO:22的VL序列,或(ii)SEQ ID NO:49的VH序列和SEQ ID NO:60的VL序列。

[0446] 在一个实施方案中,特异性结合人IL-17A的结构域是表1中描述的结构域。在一个实施方案中,特异性结合人IL-17A的结构域包含与(i)选自由SEQ ID NO:24和25组成的组,优选SEQ ID NO:24的氨基酸序列,或(ii)选自由SEQ ID NO:61和62组成的组,优选SEQ ID NO:61的氨基酸序列,至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%的氨基酸序列。在一个实施方案中,特异性结合人IL-17A的结构域如(i)SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25,优选SEQ ID NO:24,或(ii)SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:62,优选SEQ ID NO:61所示。

[0447] 对人IL-17A具有结合特异性的本公开的其他结构域包括其中氨基酸或编码氨基酸的核酸已经突变,但与表1中所述的序列具有至少60、70、80、90或95%同一性的那些抗体。在一个实施方案中,包括这样的氨基酸序列:当与表1中描述的序列中描述的可变区相比时,可变区中已经突变的氨基酸不超过1、2、3、4或5个,同时保留了基本上相同的活性。如本文所用,术语“基本上相同的活性”是指由基本上相同的活性表示的活性为针对亲本抗体(例如本公开的多特异性抗体,特别是包含表1中描述的特异性结合人IL-17A的第一结构域和/或表1中描述的特异性结合人TNF α 的第二结构域的本公开的多特异性抗体)确定的活性的至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少90%,至少95%,至少98%或甚至至少100%或至少110%,或至少120%,或至少130%,或至少140%,或至少150%,或至少160%,或至少170%,或至少180%,或至少190%,例如高至200%。

[0448] 在又一个实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第一结构域包含与表1中描述的序列同源的氨基酸序列,并且所述第一结构域与人IL-17A结合,并保留了表1中描述的那些结构域的所需功能特性。

[0449] 在一个实施方案中,特异性结合IL-17A的本发明结构域具有重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中这些CDR序列中的一个或多个具有基于本文所述的结构域或其保守修饰的指定氨基酸序列,其中所述结构域保留了本公开的抗体的所需功能特性。

[0450] 术语“保守修饰的变体”或“保守变体”适用于氨基酸和核酸序列。关于特定的核酸序列,保守修饰的变体是指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的那些核酸,或者当核酸不编码氨基酸序列时,是指基本上相同的序列。由于遗传密码的简并性,大量功能上相同的核酸编码任何给定的蛋白质。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在其中丙氨酸由一个密码子明确规定的每个位置上,可以将该密码子改变为所描述的相应密码子中的任一个,而不改变所编码的多肽。这样的核酸变异是“沉默变异”,其是保守修饰的变异的一种。本文中编码多肽的每个核酸序列也描述了核酸的每个可能的沉默变异。本领域技术人员将认识到,可以修饰核酸中的每个密码子(除了AUG和TGG,AUG通常是蛋氨酸的唯一密码子,TGG通常是色氨酸的唯一密码子)以产生功能上相同的分子。因此,编码多肽的核酸的每个沉默变异都隐含在每个所记载的序列中。

[0451] 对于多肽序列,“保守修饰的变体”或“保守变体”包括对多肽序列的单个取代、缺失或添加,其导致氨基酸被化学上相似的氨基酸取代。提供功能上相似的氨基酸的保守取代是本领域众所周知的。这些保守修饰的变体(即具有一个或多个“保守修饰”)是以下的补充且不排除以下:本公开的多态变体、种间同系物和等位基因。以下八个组包含彼此保守取代的氨基酸:1)丙氨酸(A),甘氨酸(G);2)天冬氨酸(D),谷氨酸(E);3)天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);4)精氨酸(R),赖氨酸(K);5)异亮氨酸(I),亮氨酸(L),蛋氨酸(M),缬氨酸(V);6)苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W);7)丝氨酸(S),苏氨酸(T);和8)半胱氨酸(C),蛋氨酸(M)(参见,例如Creighton,Proteins(1984))。在一个实施方案中,术语“保守序列修饰”用于指不显著影响或改变含有该氨基酸序列的抗体的结合特性的氨基酸修饰。

[0452] 因此,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第一结构域包含(或由其组成):

[0453] (i)

[0454] 重链可变区(VH),其依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,其中所述HCDR1是氨基酸序列SEQ ID NO:1,或其保守变体;所述HCDR2是氨基酸序列SEQ ID NO:2,或其保守变体;所述HCDR3是选自SEQ ID NO:3中任一个的氨基酸序列,或其保守变体;和

[0455] 轻链可变区(VL),其依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中所述LCDR1为氨基酸序列SEQ ID NO:12,或其保守变体;所述LCDR2是氨基酸序列SEQ ID NO:13,或其保守变体;所述LCDR3具有氨基酸序列SEQ ID NO:14,或其保守变体;或者

[0456] (ii)

[0457] 重链可变区(VH),其依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,其中所述HCDR1是氨基酸序列SEQ ID NO:39,或其保守变体;所述HCDR2是氨基酸序列SEQ ID NO:40,或其保守变体;所述HCDR3是选自SEQ ID NO:41中任一个的氨基酸序列,或其保守变体;和

[0458] 轻链可变区(VL),其依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中所述LCDR1为氨基酸序列SEQ ID NO:50,或其保守变体;所述LCDR2是氨基酸序列SEQ ID NO:51,或其保守变体;所述LCDR3具有氨基酸序列SEQ ID NO:52,或其保守变体,

[0459] 其中抗体特异性结合人IL-17A和/或中和IL-17A。

[0460] 本公开的抗IL-17A抗体

[0461] 本公开基于特异性结合人IL-17A并具有改善的亲合力、功效和选择性的抗体分子的发现。此外,本公开的抗体具有改进的生物物理特性,例如改进的可溶性、可开发性和高可生产性,杂质相对较少(>98%,特别是>99%单体,如通过SE-HPLC检测),以及稳定性。

[0462] 一方面,本公开提供了一种对人IL-17A具有结合特异性的分离的抗体,包括一组CDR:HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中,该组CDR相对于这样的一组CDR具有10个或更少个氨基酸取代,例如,9个或更少个氨基酸取代,8个或更少个氨基酸取代,7个或更少个氨基酸取代,6个或更少个氨基酸取代,5个或更少个氨基酸取代,4个或更少个氨基酸取代,3个或更少个氨基酸取代,2个或更少个氨基酸取代,1个或0个氨基酸取代,优选0个氨基酸取代:(i)HCDR1'是选自SEQ ID NO:1、4和7中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:1;HCDR2'是选自SEQ ID NO:2、5和8中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:2;HCDR3'是选自SEQ ID NO:3、6和9中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:3;LCDR1'是选自SEQ ID NO:12、15和18中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:12;LCDR2'是选自

SEQ ID NO:13、16和19中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:13;且LCDR3'具有选自SEQ ID NO:14、17和20中的任一个的氨基酸序列,优选SEQ ID NO:14;或(ii)其中HCDR1'是选自SEQ ID NO:39、42和45中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:39;HCDR2'是选自SEQ ID NO:40、43和46中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:40;HCDR3'是选自SEQ ID NO:41、44和47中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:41;LCDR1'是选自SEQ ID NO:50、53和56中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:50;LCDR2'是选自SEQ ID NO:51、54和57中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:51;且LCDR3'具有选自SEQ ID NO:52、55和58中的任一个的氨基酸序列,优选SEQ ID NO:52。

[0463] 术语“IL-17A”或“IL17A”特别是指具有UniProt ID号Q16552的人IL-17A,在本文中SEQ ID NO:33再现。术语“食蟹猴IL-17A(cynomolgus IL-17A)”或“食蟹猴IL-17A(cynomolgus monkey IL-17A)”是指具有UniProt ID号G1QUS7的食蟹猴IL-17A(Macaca fascicularis IL-17A)。

[0464] 术语“IL-17B”特别是指具有UniProt ID号Q9UHF5的人IL-17B,在本文中SEQ ID NO:34再现。术语“IL-17C”特别是指具有UniProt ID号Q9POM4的人IL-17C,在本文中SEQ ID NO:35再现。术语“IL-17D”特别是指具有UniProt ID号Q8TAD2的人IL-17D,在本文中SEQ ID NO:36再现。术语“IL-17E”特别是指具有UniProt ID号Q9H293的人IL-17E,在本文中SEQ ID NO:37再现。术语“IL-17F”特别是指具有UniProt ID号Q96PD4的人IL-17F,在本文中SEQ ID NO:38再现。

[0465] 术语“表位”是指抗体可以特异性结合的抗原的局部区域。例如,表位可以是多肽的连续氨基酸,或者例如,表位可以一起来自一个多肽或多个多肽的两个或更多个非连续区域。

[0466] 如本文所用,术语“抗体”等包括:完整抗体;完整抗体的任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链;以及包含抗体CDR、VH区或VL区的分子(包括但不限于多特异性抗体)。天然存在的“完全抗体”是糖蛋白,包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链。每条重链都由重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。每条轻链都由轻链可变区(在本文缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。VH和VL区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其间散布着更为保守的区,称为框架区(FR)。每个VH和VL都由三个CDR和四个FR组成,它们从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)。

[0467] 如本文所用,术语“同种型”是指由重链恒定区基因提供的抗体类别(例如,IgM、IgE、IgD、IgA、IgY和IgG,例如IgG1或IgG4)。同种型也包括这些类别之一的修饰形式,其中修饰是为了改变Fc功能,例如,增强或降低效应子功能或与Fc受体的结合。适当地,本公开的抗体是选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4组成的组的IgG。更适当地,本公开的抗体是IgG1或IgG4。

[0468] 如本文所用,术语“抗原结合片段”、“抗原结合部分”等是指完整的完整抗体的一个或多个片段,其保留了与给定的抗原(例如IL-17A)特异性结合的能力。包含在术语抗体

的“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;F(ab)₂片段,包含两个在铰链区通过二硫键连接的Fab片段的二价片段;由VH和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;单结构域抗体(dAb)片段(Ward et al.,1989Nature 341:544-546),其由VH结构域组成;分离的互补决定区(CDR)、dsFv、scAb、STAB、单结构域抗体(sdAb或dAb)、单结构域重链抗体、和单结构域轻链抗体、VHH、VNAR、基于鲨鱼的VNAR结构的单结构域抗体、和基于替代支架的结合结构域包括但不限于基于锚蛋白的结构域、fynomer、avimer、anticalin、纤连蛋白、和构建在抗体恒定区中的结合位点(例如F-star的Modular Antibody Technology™)。

[0469] 术语“互补决定区”(“CDR”)是指使用许多著名方案中的任何一种确定边界的氨基酸序列,这些著名方案包括以下描述的那些:Kabat et al.(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(“Kabat”编号方案);Al-Lazikani et al.,(1997) JMB 273,927-948(“Chothia”编号方案);ImmunoGenTics (IMGT) 编号(Lefranc,M.-P.,The Immunologist,7,132-136(1999);Lefranc,M.-P.et al.,Dev.Comp.Immunol.,27,55-77(2003)(“IMGT”编号方案),以及Honegger&Plückthun,J.Mol.Biol.309(2001)657-670中描述的编号方案(“Aho”编号方案)。例如,对于经典形式,在Kabat下,重链可变结构域(VH)中的CDR氨基酸残基编号为31-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3);轻链可变结构域(VL)中的CDR氨基酸残基编号为24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)。在Chothia下,VH中的CDR氨基酸编号为26-32(HCDR1)、52-56(HCDR2)和95-102(HCDR3);VL中的氨基酸残基编号为24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)。通过结合Kabat和Chothia两者的CDR定义,CDR由人VH中的氨基酸残基26-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3)以及人VL中的氨基酸残基24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)组成。在IMGT下,VH中的CDR氨基酸残基编号大约为26-35(HCDR1)、51-57(HCDR2)和93-102(HCDR3),VL中的CDR氨基酸残基编号大约为27-32(LCDR1)、50-52(LCDR2)和89-97(LCDR3)(根据“Kabat”编号)。在IMGT下,可以使用程序IMGT/DomainGap Align确定抗体的CDR。

[0470] 在本公开的语境下,除非另外特别指出,否则使用由Honegger&Plückthun(“Aho”)建议的编号系统(Honegger&Plückthun,J.Mol.Biol.309(2001)657-670)。此外,根据Aho编号方案,将以下残基定义为CDR:LCDR1(也称为CDR-L1):L24-L42;LCDR2(也称为CDR-L2):L58-L72;LCDR3(也称为CDR-L3):L107-L138;HCDR1(也称为CDR-H1):H27-H42;HCDR2(也称为CDR-H2):H57-H76;HCDR3(也称为CDR-H3):H108-H138。为了清楚起见,根据Honegger&Plückthun的编号系统考虑了在天然存在的抗体中,在不同VH和VL亚家族两者中特别是在CDR中发现的长度多样性,并提供序列中的缺口。因此,在给定的抗体可变结构域中,通常并非所有位置1至149都被氨基酸残基占据。

[0471] 优选地,“抗原结合区”至少包含可变轻(VL)链的氨基酸残基4至138和可变重(VH)链的氨基酸残基5至138(在各情况下,均根据Honegger&Plückthun编号),更优选VL的氨基酸残基3至144和VH的氨基酸残基4至144,并且特别优选的是完整的VL和VH链(VL的1至149位氨基酸和VH的1至149位氨基酸)。也可以将抗原结合部分并入到单结构域抗体、大抗体(maxibody)、微抗体(minibody)、内抗体(intrabody)、双抗体(diabody)、三抗体(triabody)、四抗体(tetrabody)、v-NAR和双-scFv中(参见,例如Holliger and Hudson,

2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1 He1 1 36)。可以将抗体的抗原结合部分移植到基于多肽(例如III型纤连蛋白(Fn3))的骨架中(参见美国专利号6,703,199,其描述了纤连蛋白多肽单抗)。可以将抗原结合部分并入到包含一对串联Fv区段(VH-CH1-VH-CH1)的单链分子中,其与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区(Zapata et al., 1995 Protein Eng. 8(10):1057-1062;和美国专利号5,641,870)。

[0472] 如本文所用,术语抗体的“结构域”或“特异性结合X的结构域”或“结合结构域”、“其抗原结合片段”、“抗原结合部分”等是指完整完全抗体的一个或多个片段,其保留了与给定的抗原(例如,IL-17A、TNF α 、HSA)特异性结合的能力。抗体的抗原结合功能可以通过完整抗体的片段来执行。在一些实施方案中,本公开的多特异性抗体的结合结构域选自有以下组成的组:Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;F(ab)₂片段,包含两个在铰链区通过二硫键连接的Fab片段的二价片段;由VH和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;单结构域抗体(dAb)片段(Ward et al., 1989 Nature 341:544-546),其由VH结构域组成;分离的互补决定区(CDR)、dsFv、scAb、STAB、单结构域抗体(sdAb或dAb)、单结构域重链抗体、和单结构域轻链抗体、VHH、VNAR、基于鲨鱼的VNAR结构的单结构域抗体、和基于替代支架的结合结构域包括但不限于基于锚蛋白的结构域、fynomer、avimer、anticalin、纤连蛋白、和构建在抗体恒定区中的结合位点(例如F-star的Modular Antibody Technology™)。适当地,本公开的结合结构域是Fv片段(Fv)。适当地,本公开的结合结构域是单链Fv片段(scFv)。适当地,本公开的结合结构域是Fab片段。

[0473] 优选地,“结构域”或“特异性结合X的结构域”或“结合结构域”、“其抗原结合片段”、“抗原结合部分”至少包含可变轻(VL)链的氨基酸残基4至138和可变重(VH)链的氨基酸残基5至138(在各情况下,均根据Honegger&Plückthun编号),更优选VL的氨基酸残基3至144和VH的氨基酸残基4至144,并且特别优选的是完整的VL和VH链(VL的1至149位氨基酸和VH的1至149位氨基酸)。也可以将抗原结合部分并入到单结构域抗体、大抗体、微抗体、内抗体、双抗体、三抗体、四抗体、v-NAR和双-scFv中(参见,例如Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1 He1 1 36)。可以将抗体的抗原结合部分移植到基于多肽(例如III型纤连蛋白(Fn3))的骨架中(参见美国专利号6,703,199,其描述了纤连蛋白多肽单抗)。可以将抗原结合部分并入到包含一对串联Fv区段(VH-CH1-VH-CH1)的单链分子中,其与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区(Zapata et al., 1995 Protein Eng. 8(10):1057-1062;和美国专利号5,641,870)。

[0474] 如本文所用,术语“结合特异性”或“特异性结合”是指单个抗体或抗体结构域与一种抗原决定簇反应而不与不同的抗原决定簇反应的能力。如本文所用,术语“与……特异性结合”或“特异于”是指可测量且可再现的相互作用,例如靶标与抗体或抗体结构域之间的结合,其是在存在分子(包括生物分子)的异质群体的情况下,存在靶标的决定因素。例如,与一个靶标(可以是表位)特异性结合的抗体或抗体结构域是与该靶标结合比与其他靶标结合的亲和力更大、亲合力更大、更容易和/或持续时间更长的抗体或抗体结构域。以其最一般的形式(并且当未提及规定标准时),“特异性结合”是指抗体或抗体结构域区分目标靶标和无关分子的能力,例如根据本领域已知的特异性测定方法所确定的。此类方法包括但不限于蛋白质印迹、ELISA、RIA、ECL、IRMA、SPR(表面等离子体共振)测试和肽扫描。例如,可以进行标准ELISA测定。可以通过标准显色(例如,具有辣根过氧化物的二抗和具有过氧化

氢的四甲基联苯胺)进行评分。某些孔中的反应通过光密度(例如在450nm下)进行评分。典型背景(=阴性反应)可能约为0.10D;典型的阳性反应可能约为10D。这意味着阳性和阴性分数之间的比可以是10倍或更高。在另一个实例中,可以进行SPR测定,其中背景和信号之间有至少10倍,优选至少100倍的差异表明特异性结合。通常,使用一纽约三至五个不相关分子例如奶粉、转铁蛋白等,而非使用单一参照分子,来进行结合特异性的确定。本公开的特定抗体或抗体结构域具有对人IL-17A或人TNF α 的结合特异性。

[0475] 本公开的多特异性抗体包括特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,因此对IL-17A和TNF α 有结合特异性,特别是对人IL-17A和人TNF α 有结合特异性。在一个实施方案中,本公开的抗体对人IL-17A和食蟹猴(*Macaca fascicularis*) (也称为食蟹猴(*Cynomolgus monkey*)或“食蟹猴(*Cynomolgus*)”) IL-17A具有结合特异性。在一个实施方案中,本公开的抗体对人TNF α 和食蟹猴(*Macaca fascicularis*) (也称为食蟹猴(*Cynomolgus monkey*)或“食蟹猴(*Cynomolgus*)”) TNF α 具有结合特异性。

[0476] 另一方面,本公开涉及对人IL-17A和食蟹猴(*Macaca fascicularis*) (也称为食蟹猴(*Cynomolgus monkey*)或“食蟹猴(*Cynomolgus*)”) IL-17A具有结合特异性的抗体或抗体结构域。

[0477] 适当地,本公开的抗IL-17A抗体是分离的抗体。

[0478] 适当地,本公开的抗IL-17A抗体是单克隆抗体。

[0479] 本公开的抗IL-17A抗体包括但不限于嵌合抗体和人源化抗体。

[0480] 适当地,本公开的抗IL-17A抗体是人源化的。适当地,本公开的抗IL-17A抗体是人源化的并且包含免源CDR。

[0481] 本公开的抗体包括但不限于如本文所述(包括实施例中)分离的人源化单克隆抗体。此类抗人IL-17A抗体的实例是其序列列于表1中的抗体。实施例中提供了关于本文所述抗体的生成和表征的其他细节。

[0482] 对人IL-17A具有结合特异性的本发明的分离的抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:(a)所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,并且(b)所述VL依次包含三个互补确定区LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0483] 本公开提供了与IL-17A蛋白特异性结合的抗体,所述抗体包含VH CDR,所述VH CDR具有表1所列的VH CDR中的任一个的氨基酸序列。特别地,本公开提供了与IL-17A蛋白VH CDR的抗体,所述抗体包含一个、两个、三个或更多个VH CDR,所述VH CDR具有表1所列的VH CDR中的任一个的氨基酸序列。

[0484] 本公开提供了一种对人IL-17A具有结合特异性的抗体,其包含重链可变区(VH),其中所述VH依次包含(i)三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1具有选自SEQ ID NO:1、4和7中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR2具有选自SEQ ID NO:2、5和8中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR3具有选自SEQ ID NO:3、6和9中的任一个的氨基酸序列。特别地,本公开提供了抗体,所述抗体对人IL-17A具有结合特异性,并且包含分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列;或(ii)三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1具有选自SEQ ID NO:39、42和45中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR2具有选自SEQ ID NO:40、43和46中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR3具有选自SEQ ID NO:41、44和47中的任一个的氨基酸序列。特别地,本公开提供了抗体,所述抗体对人IL-17A具有结合特异性,并且

包含分别为SEQ ID NO:39、40和41的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列。

[0485] 本公开还提供了与IL-17A蛋白特异性结合的抗体,所述抗体包含VL CDR,所述VL CDR具有表1所列出的VL CDR中的任一个的氨基酸序列。特别地,本公开提供了与IL-17A蛋白特异性结合的抗体,所述抗体包含一个、两个、三个或更多个VL CDR,所述VL CDR具有表1所列出的VL CDR中的任一个的氨基酸序列。

[0486] 本公开提供了一种对人IL-17A具有结合特异性的抗体,其包含轻链可变区(VL),其中所述VL依次包含(i)三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述LCDR1具有选自SEQ ID NO:12、15和18中的任一个的氨基酸序列,所述LCDR2具有选自SEQ ID NO:13、16和19中的任一个的氨基酸序列,所述LCDR3具有选自SEQ ID NO:14、17和20中的任一个的氨基酸序列。特别地,本公开提供了抗体,所述抗体对人IL-17A具有结合特异性,并且包含分别为SEQ ID NO:12、13和14的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;或(ii)三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述LCDR1具有选自SEQ ID NO:50、53和56中的任一个的氨基酸序列,所述LCDR2具有选自SEQ ID NO:51、54和57中的任一个的氨基酸序列,所述LCDR3具有选自SEQ ID NO:52、55和58中的任一个的氨基酸序列。特别地,本公开提供了抗体,所述抗体对人IL-17A具有结合特异性,并且包含分别为SEQ ID NO:50、51和52的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0487] 适当地,本公开提供了一种对人IL-17A具有结合特异性的分离的抗体,其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),

[0488] (i) 其中

[0489] (a) 所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1具有选自SEQ ID NO:1、4和7中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR2具有选自SEQ ID NO:2、5和8中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR3具有选自SEQ ID NO:3、6和9中的任一个的氨基酸序列;且

[0490] (b) 所述VL依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述LCDR1具有选自SEQ ID NO:12、15和18中任一个的氨基酸序列,所述LCDR2具有氨基酸序列选自SEQ ID NO:13、16和19中任一项的序列,所述LCDR3具有选自SEQ ID NO:14、17和20中任一个的氨基酸序列;或者

[0491] (ii) 其中

[0492] (a) 所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1具有选自SEQ ID NO:39、42和45中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR2具有选自SEQ ID NO:40、43和46中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR3具有选自SEQ ID NO:41、44和47中的任一个的氨基酸序列;且

[0493] (b) 所述VL依次包括三个互补确定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,

[0494] 所述LCDR1具有选自SEQ ID NO:50、53和56中的任一个的氨基酸序列,所述LCDR2具有选自SEQ ID NO:51、54和57中的任一个的氨基酸序列,所述LCDR3具有选自SEQ ID NO:52、55和58中的任一个的氨基酸序列。

[0495] 特别地,本公开提供了抗体,所述抗体对人IL-17A具有结合特异性,并且包含(i) (a) 分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和(b) 分别为SEQ ID NO:12、13和14的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;或者(ii) (a) 分别为SEQ ID NO:39、40和41的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和(b) 分别为SEQ ID NO:50、51和52的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0496] 本公开的其他抗体包括已突变、但仍在CDR区中与表1中描述的序列中描述的CDR

区具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。适当地，本公开的其他抗体包括突变氨基酸序列，其中当与表1中描述的序列中描述的CDR区相比时，已经通过CDR区中的氨基酸缺失、插入或取代而突变的氨基酸不超过1、2、3、4、5或10个。突变，例如取代，可能在CDR组内的任何残基处进行，并且可在CDR1、CDR2和/或CDR3内。

[0497] 适当地，包含突变氨基酸序列的本公开的抗体能够在所述抗体浓度为50ng/ml，优选20ng/ml，优选10ng/ml，优选5ng/ml，更优选1ng/ml，更优选0.5ng/ml，甚至更优选0.2ng/ml或更低时，将1ng人IL-17A的活性抑制50%，所述抑制的活性是通过在50pg/ml TNF存在下，在HT-29试验中测量人IL-17A诱导的GRO- α 分泌来测定的。

[0498] 适当地，对人IL-17A具有结合特异性的本公开的分离的抗体包含：重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中：

[0499] (i)

[0500] (a) 所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3，

[0501] 所述HCDR1具有与SEQ ID NO:1、4和7中的任一个，优选SEQ ID NO:

[0502] 1，具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%

[0503] 同一性的氨基酸序列；

[0504] 所述HCDR2具有与SEQ ID NO:2、5和8中的任一个，优选SEQ ID NO:

[0505] 2，具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列；

[0506] 所述HCDR3具有与SEQ ID NO:3、6和9中的任一个，优选SEQ ID NO:

[0507] 3，具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列；和/或

[0508] (b) 所述VL依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3，

[0509] 所述LCDR1具有与SEQ ID NO:12、15和18中的任一个，优选SEQ ID NO:12，具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列；

[0510] 所述LCDR2具有与SEQ ID NO:13、16和19中的任一个，优选SEQ ID NO:13，具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列；

[0511] 所述LCDR3具有与SEQ ID NO:14、17和20中的任一个，优选SEQ ID NO:14，具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98

[0512] 或99%同一性的氨基酸序列；或(ii)

[0513] (a) 所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3，

[0514] 所述HCDR1具有与SEQ ID NO:39、42和45中的任一个，优选SEQ ID NO:39，具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列；

[0515] 所述HCDR2具有与SEQ ID NO:40、43和46中的任一个，优选SEQ ID NO:40，具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列；

[0516] 所述HCDR3具有与SEQ ID NO:41、44和47中的任一个，优选SEQ ID NO:41，具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98

[0517] 或99%同一性的氨基酸序列；和/或

[0518] (b) 所述VL依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3，

[0519] 所述LCDR1具有与SEQ ID NO:50、53和56中的任一个，优选SEQ ID NO:50，具有至

少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列；

[0520] 所述LCDR2具有与SEQ ID NO:51、54和57中的任一个,优选SEQ ID NO:51,具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列；

[0521] 所述LCDR3具有与SEQ ID NO:52、55和58中的任一个,优选SEQ ID NO:52,具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。

[0522] 适当地,对人IL-17A具有结合特异性的本发明的分离的抗体包含:(i)分别与SEQ ID NO:1、2和3的序列具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的HCDR1、HCDR2和HCDR3,和/或分别与SEQ ID NO:12、13和14的序列具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的LCDR1、LCDR2和LCDR3;或(ii)分别与SEQ ID NO:39、40和41的序列具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的HCDR1、HCDR2和HCDR3,和/或分别与SEQ ID NO:50、51和52的序列具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0523] 在进一步的实施方案中,本公开提供了特异性结合人IL-17A的抗体,其中所述抗体包含VH结构域和VL结构域。

[0524] 适当地,本公开提供了特异性结合人IL-17A的抗体,其中所述抗体包含VH1A、VH1B、VH3或VH4。在在一个实施方案中,本公开的分离的抗体包含VH4结构域。在一个优选的实施方案中,本公开的分离的抗体包含VH3结构域。

[0525] 适当地,本公开提供了一种特异性结合人IL-17A的分离的抗体,其中所述抗体包含V κ 框架FR1、FR2和FR3,特别是V κ 1或V κ 3FR1至FR3,优选V κ 1框架FR1至FR3,以及框架FR4,所述框架FR4选自V κ FR4,特别是V κ 1FR4、V κ 3FR4,和V λ FR4。合适的V λ FR4如SEQ ID NO:26至SEQ ID NO:32所示。在一个实施方案中,本公开提供了一种特异性结合人IL-17A的分离的抗体,其中所述抗体包含V λ FR4,所述V λ FR4包含与选自SEQ ID NO:26至SEQ ID NO:32中的任一个的氨基酸序列,优选与SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27,更优选与SEQ ID NO:27,具有至少60、70、80、90%同一性的氨基酸序列。适当地,本公开提供了一种特异性结合人IL-17A的分离的抗体,其中所述抗体包含V λ FR4,所述V λ FR4包含选自SEQ ID NO:26至SEQ ID NO:32中任一个的氨基酸序列,优选如SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27所示的V λ FR4,更优选如SEQ ID NO:27所示的V λ FR4。

[0526] 因此,在一个实施方案中,本公开提供了一种抗体,其包含:

[0527] (i) (a)分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:12、13和14的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;或(i) (b)分别为SEQ ID NO:39、40和41的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:50、51和52的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

[0528] (ii) VH3或VH4结构域,优选VH3结构域;和

[0529] (iii) VL结构域,其包含VL框架,所述VL框架包含V κ 框架FR1、FR2和FR3,特别是V κ 1或V κ 3的FR1至FR3,优选V κ 1FR1至FR3,以及框架FR4,所述框架FR4选自V κ FR4,特别是V κ 1FR4、V κ 3FR4,和V λ FR4,特别是包含与选自SEQ ID NO:26至SEQ ID NO:32中任一个的氨基酸序列具有至少60、70、80、90%同一性的氨基酸序列的V λ FR4,优选如选自SEQ ID NO:26至SEQ ID NO:32中任一个的氨基酸序列所示的V λ FR4,更优选如SEQ ID NO:27所示的V λ FR4。

[0530] 适当地,本公开提供了特异性结合人IL-17A的分离的抗体,其中所述抗体包含表1中所列的VH结构域。

[0531] 适当地,本公开还提供了与人IL-17A特异性结合的分离的抗体,其中所述抗体包含表1中列出的VH氨基酸序列,其中框架序列(例如,不是CDR的序列)中已经突变(其中,作为多个非限制性实例,突变是添加、取代或缺失)的氨基酸不超过约10个。

[0532] 适当地,本公开还提供了与人IL-17A特异性结合的分离的抗体,其中所述抗体包含表1中列出的VH氨基酸序列,其中框架序列(例如,不是CDR的序列)中已经突变(其中,作为多个非限制性实例,突变是添加、取代或缺失)的氨基酸不超过约20个。

[0533] 本公开的其他抗体包括已突变、但仍在VH区中与表1中描述的序列中描述的VH区具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。

[0534] 适当地,本公开提供了特异性结合人IL-17A的分离的抗体,其中所述抗体包含表1中所列的VL结构域。适当地,本公开还提供了与人IL-17A特异性结合的分离的抗体,其中所述抗体包含表1中列出的VL氨基酸序列,其中框架序列(例如,不是CDR的序列)中已经突变(其中,作为多个非限制性实例,突变是添加、取代或缺失)的氨基酸不超过约10个。

[0535] 适当地,本公开还提供了与人IL-17A特异性结合的分离的抗体,其中所述抗体包含表1中列出的VL氨基酸序列,其中框架序列(例如,不是CDR的序列)中已经突变(其中,作为多个非限制性实例,突变是添加、取代或缺失)的氨基酸不超过约20个。

[0536] 本公开的其他抗体包括已突变、但仍在VL区中与表1中描述的序列中描述的VL区具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。

[0537] 在一个实施方案中,本公开提供了一种特异性结合人IL-17A的分离的抗体,其中,所述抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11,优选SEQ ID NO:10至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列,并且特别地,其中所述抗体包括分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列。在另一个实施方案中,本公开提供了一种特异性结合人IL-17A的分离的抗体,其中所述抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:11至少90%相同的氨基酸序列,且其中所述重链可变区包含Q14K、G16E和G56A(AHo编号)。

[0538] 在一个实施方案中,本公开提供了一种特异性结合人IL-17A的分离的抗体,其中,所述抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:49,优选SEQ ID NO:48,至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列,并且特别地,其中所述抗体包括分别为SEQ ID NO:39、40和41的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列。在另一个实施方案中,本公开提供了一种特异性结合人IL-17A的分离的抗体,其中所述抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:49至少90%相同的氨基酸序列,且其中所述重链可变区包含R20T和Q141P(AHo编号)。

[0539] 在另一个实施方案中,本公开提供了一种特异性结合人IL-17A的分离的抗体,其中所述抗体(i)包含轻链可变区域,所述轻链可变区域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22,优选SEQ ID NO:21,至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列,并且特别地,其中所述抗体包括分别为SEQ ID NO:12、13和14的LCDR1、LCDR2和LCDR3;或(ii)包含轻链可变区域,所述轻链可变区域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:59或SEQ ID NO:60,优选SEQ ID NO:59,至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列,并且特别地,其中所述抗体包括分别为SEQ ID NO:50、51和52的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0540] 在又一个实施方案中,本公开提供了一种特异性结合人IL-17A的分离的抗体,其中所述抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:22至少90%相同的氨基酸序列,且其中所述轻链可变区包含A51P(AHo编号)。

[0541] 在另一个实施方案中,本公开提供了一种特异性结合人IL-17A的抗体,其中(i)所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:10至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列;所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:21至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列;或者(ii)所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:48至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列;所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:59至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列。

[0542] 因此,本公开提供了一种特异性结合人IL-17A的分离的抗体,其中(i)所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:10至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列;所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:21至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列,并且其中,该抗体包含分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和/或分别为SEQ ID NO:12、13和14的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,优选地,其中抗体包含分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:12、13和14的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;或者(ii)所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:48至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列;所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:59至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列,并且其中,该抗体包含分别为SEQ ID NO:39、40和41的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和/或分别为SEQ ID NO:50、51和52的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,优选地,其中抗体包含分别为SEQ ID NO:39、40和41的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:39、40和41的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0543] 在另一个实施方案中,本公开提供了一种特异性结合人IL-17A的分离的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:49至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列;所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:60至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列,特别地,其中所述重链可变区包含R20T和Q141P(AHo编号)。

[0544] 因此,本公开提供了一种特异性结合人IL-17A的分离的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:49至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列;所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:60至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列,特别地,其中所述重链可变区包含R20T和Q141P(AHo编号),并且其中抗体包含分别为SEQ ID NO:39、40和41的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和/或分

别为SEQ ID NO:50、51和52的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;特别地,其中抗体包含分别为SEQ ID NO:39、40和41的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:50、51和52的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0545] 在一个特定实施方案中,本公开提供了一种分离的抗体,其特异性结合人IL-17A并且包含(i)VH,所述VH包含选自由SEQ ID NO:10和11组成的组的氨基酸序列;和/或其VL,所述VL包含选自由SEQ ID NO:21和22组成的组的氨基酸序列;或者(ii)VH,所述VH包含选自由SEQ ID NO:48和49组成的组的氨基酸序列;和/或其VL,所述VL包含选自由SEQ ID NO:59和60组成的组的氨基酸序列。在具体的实施方案中,本公开的抗体包含(i)SEQ ID NO:10的VH序列和SEQ ID NO:21的VL序列;或(ii)SEQ ID NO:48的VH序列和SEQ ID NO:59的VL序列。在又一个具体实施方案中,本公开的抗体包含(i)SEQ ID NO:11的VH序列和SEQ ID NO:22的VL序列;或(ii)SEQ ID NO:49的VH序列和SEQ ID NO:60的VL序列。

[0546] 在一个实施方案中,与人IL-17A特异性结合的抗体是表1中描述的抗体。在一个实施方案中,与人IL-17A特异性结合的抗体包含与(i)选自由SEQ ID NO:24和25组成的组,优选SEQ ID NO:24的氨基酸序列,或(ii)选自由SEQ ID NO:61和62组成的组,优选SEQ ID NO:61的氨基酸序列,至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%的氨基酸序列。在一个实施方案中,与人IL-17A特异性结合的抗体如(i)SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25,优选SEQ ID NO:24;或(ii)SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:62,优选SEQ ID NO:61所示。

[0547] 对人IL-17A具有结合特异性的本公开的其他抗体包括其中氨基酸或编码氨基酸的核酸已经突变,但与表1中所述的序列具有至少60、70、80、90或95%同一性的那些抗体。在一个实施方案中,包括这样的氨基酸序列:当与表1中描述的序列中描述的可变区相比时,可变区中已经突变的氨基酸不超过1、2、3、4或5个,同时保留了基本上相同的活性。如本文所用,术语“基本上相同的活性”是指由基本上相同的活性表示的活性为针对亲本抗体(例如本发明的抗体,特别是表1中所述的本发明的抗体)确定的活性的至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少90%,至少95%,至少98%或甚至至少100%或至少110%,或至少120%,或至少130%,或至少140%,或至少150%,或至少160%,或至少170%,或至少180%,或至少190%,例如高至200%。

[0548] 在又一个实施方案中,本公开提供了一种抗体,其包含与表1中描述的序列同源的氨基酸序列,并且所述抗体与人IL-17A结合,并保留了表1中描述的那些抗体的所需功能特性。

[0549] 在一个实施方案中,本公开的抗体具有重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含CDR1、CDR2和CDR3序列,所述轻链可变区包含CDR1、CDR2和CDR3序列,其中这些CDR序列中的一个或多个具有基于本文所述的抗体或其保守修饰的指定氨基酸序列,其中所述抗体保留了本公开的抗体的所需功能特性。

[0550] 因此,本公开提供了一种单克隆抗体,其包括:

[0551] (i)

[0552] 重链可变区(VH),其依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,其中所述HCDR1是氨基酸序列SEQ ID NO:1,或其保守变体;所述HCDR2是氨基酸序列SEQ ID NO:2,或其保守变体;所述HCDR3是选自SEQ ID NO:3中任一个的氨基酸序列,或其保守变体;及

[0553] 轻链可变区 (VL), 其依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3, 其中所述LCDR1为氨基酸序列SEQ ID NO:12, 或其保守变体; 所述LCDR2是氨基酸序列SEQ ID NO:13, 或其保守变体; 所述LCDR3具有氨基酸序列SEQ ID NO:14, 或其保守变体; 或者

[0554] (ii)

[0555] 重链可变区 (VH), 其依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3, 其中所述HCDR1是氨基酸序列SEQ ID NO:39, 或其保守变体; 所述HCDR2是氨基酸序列SEQ ID NO:40, 或其保守变体; 所述HCDR3是选自SEQ ID NO:41中任一个的氨基酸序列, 或其保守变体; 及

[0556] 轻链可变区 (VL), 其依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3, 其中所述LCDR1为氨基酸序列SEQ ID NO:50, 或其保守变体; 所述LCDR2是氨基酸序列SEQ ID NO:51, 或其保守变体; 所述LCDR3具有氨基酸序列SEQ ID NO:52, 或其保守变体,

[0557] 其中抗体特异性结合人IL-17A和/或中和IL-17A。

[0558] 在一个实施方案中, 本公开的抗体对于在哺乳动物细胞中表达被优化, 其具有重链可变区和轻链可变区的, 其中这些序列中的一个或多个具有基于本文所述的抗体或其保守修饰的指定氨基酸序列, 其中所述抗体保留了本公开的抗体的所需功能特性。因此, 本发明提供了一种对于在哺乳动物细胞中表达被优化的单克隆抗体, 其包含重链可变区和轻链可变区, 其中: 重链可变区包含选自以下的氨基酸序列: (i) SEQ ID NO:10和11中的任一个, 及其保守修饰; 或 (ii) SEQ ID NO:48和49中的任一个, 及其保守修饰; 和轻链可变区包含选自以下的氨基酸序列: (i) SEQ ID NO:21和22中的任一个, 及其保守修饰; 或 (ii) SEQ ID NO:59和60中的任一个, 及其保守修饰; 其中抗体特异性结合人IL-17A和/或中和IL-17A。

[0559] 在一个实施方案中, 本公开的抗体对于在哺乳动物细胞中表达被优化, 其具有全长重链序列和全长轻链序列, 其中这些序列中的一个或多个具有基于本文所述的抗体或其保守修饰的指定氨基酸序列, 其中所述抗体保留了本公开的抗体的所需功能特性。

[0560] 如本文所用, 术语“优化的”是指将核苷酸序列改变为使用在生产细胞或生物 (通常是真核细胞, 例如毕赤酵母属细胞、中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 或人类细胞) 中优选的密码子编码氨基酸。对优化的核苷酸序列进行工程改造, 以完全或尽可能保留最初由起始核苷酸序列 (也称为“亲本”序列) 编码的氨基酸序列。本文的优化序列已经被进行了改造, 以具有在哺乳动物细胞中优选的密码子。然而, 本文中还想设想了这些序列在其他真核细胞或原核细胞中的优化表达。由优化的核苷酸序列编码的氨基酸序列也称为被优化的。

[0561] 可变区修饰的另一种类型是使VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基突变, 从而改善目标抗体的一种或多种结合特性 (例如, 亲和力), 称为“亲和力成熟”。可以进行定点诱变或PCR介导的诱变以引入突变, 并且可以如本文所述和实施例提供的体外或体内测定中评估对抗体结合或其他目的功能的影响。可以引入保守修改 (如上所述)。突变可以是氨基酸取代、添加或缺失。此外, CDR区中通常不超过1、2、3、4或5个残基被改变。

[0562] “亲和力成熟的”抗体是一种抗体, 在其一个或多个可变结构域中具有一个或多个改变, 与不具有那些改变的亲本抗体相比, 这导致抗体对抗原的亲和力得到改善。在一个实施方案中, 亲和力成熟的抗体对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲和力。通过本领域已知的方案产生亲和力成熟的抗体。例如, Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) 描述了通过VH和VL结构域改组的亲和力成熟。HVR和/或框架残基的随机诱变描述于例如: Barbas et al. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:3809-3813 (1994); Schier et

al. *Gene* 169:147-155 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154 (7) :3310-9 (1995); 及 Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)。因此,本公开提供了抗体,其中所述抗体是亲和力成熟的。

[0563] 本公开的抗体可以进一步通过如下方法制备:使用具有本文所示的一个或多个VH和/或VL序列的抗体作为起始材料来工程化修饰的抗体,该修饰的抗体可能具有与起始抗体不同的特性。可以通过修饰一个或两个可变区(即VH和/或VL)内,例如一个或多个CDR区内和/或一个或多个框架区内的一个或多个残基来工程化抗体。另外地或可替代地,可以通过修饰恒定区内的残基来工程化抗体,例如以改变抗体的效应子功能。

[0564] 可以执行的一种类型的可变区工程化是CDR移植。抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。因此,各个抗体之间CDR中的氨基酸序列比CDR之外的序列更具多样性。由于CDR序列负责大多数抗体-抗原相互作用,因此可以通过构建表达载体来表达模仿特定天然存在抗体的特性的重组抗体,该表达载体包含来自该特定天然存在抗体的CDR序列,并且该CDR序列被移植到来自具有不同特性的不同抗体的框架序列上(参见,例如,Riechmann, L. et al., 1998 *Nature* 332:323-327; Jones, P. et al., 1986 *Nature* 321:522-525; Queen, C. et al., 1989 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; Winter的美国专利号5,225,539,及Queen等人的美国专利号5,530,101; 5,585,089; 5,693,762和6,180,370)。

[0565] 这样的框架序列可以从公共DNA数据库或包括种系抗体基因序列或重排的抗体序列的公开参照文献中获得。例如,人类重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可见于“VBase”人类种系序列数据库(可以在网上在www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase获得)以及 Kabat, E.A. et al., 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I.M. et al., 1992 *J. Mol. Biol.* 227:776-798; 及 Cox, J.P.L. et al., 1994 *Eur. J Immunol.* 24:827-836; 各自的内容通过引用明确地并入本文。例如,人类重链和轻链可变区基因的种系DNA序列和重排抗体序列可以在“IMGT”数据库中找到(可以在网上在www.imgt.org获得; 参见 Lefranc, M.P. et al., 1999 *Nucleic Acids Res.* 27:209-212; 其各自的内容通过引用的方式明确地并入本文)。

[0566] 用于本公开的抗体的框架序列的实例是与本公开的所选抗体所使用的框架序列在结构上相似的那些,例如,本公开的单克隆抗体所使用的共有序列和/或框架序列。可以将VH CDR1、2和3序列以及VL CDR1、2和3序列移植到框架区上,该框架区具有与框架序列所源自的种系免疫球蛋白基因中发现的序列相同的序列,或者可以将CDR序列移植到与种系序列相比包含一个或多个突变的框架区上。例如,已经发现,在某些情况下,使框架区内的残基突变以维持或增强抗体的抗原结合能力是有益的(参见例如,美国专利号5,530,101; 5,585,089; Queen等人的5,693,762和6,180,370)。

[0567] 可以使用多种抗体/免疫球蛋白框架或骨架,只要得到的多肽包括至少一个与IL-17A. 特异性结合的结合区域即可。这样的框架或骨架包括人免疫球蛋白的五种主要的个体基因型(idiotype),其抗原结合片段,并且包括其他动物物种的免疫球蛋白,优选具有人源化特征。

[0568] 一方面,本公开涉及一种使用非免疫球蛋白骨架生产基于非免疫球蛋白的抗体的

方法,可以将本公开的CDR移植到所述非免疫球蛋白骨架上。可以使用已知的或将来的非免疫球蛋白骨架和骨架,只要它们包含对靶IL-17A蛋白具有特异性的结合区即可。已知的非免疫球蛋白骨架或骨架包括但不限于纤连蛋白(Compound Therapeutics, Inc., Waltham, Mass.)、锚蛋白(ankyrin)(Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland)、结构域抗体(Domantis, Ltd., Cambridge, Mass.和Abylynx nv, Zwijnaarde, Belgium)、脂质运载蛋白(lipopocalin)(Pieris Proteolab AG, Freising, Germany)、小型模块化免疫药物(small modular immuno-pharmaceuticals)(Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, Wash.)、maxybodies(Avidia, Inc., Mountain View, Calif)、蛋白质A(Protein A)(Affibody AG, Sweden)和affilin(γ -晶状体蛋白或泛素)(Scil Proteins GmbH, Halle, Germany)。

[0569] 根据本公开的抗体具有有价值的特性,预测其对需要人IL-17A靶向治疗的人类患者有益。根据本公开的抗体的特点是具有以下一个或多个特性(如在实施例1和2中测定的):

[0570] 该抗体与人IL-17A特异性结合,并且:

[0571] (a) 对食蟹猴IL-17A具有结合特异性;

[0572] (b) 与人IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F相比,选择性结合人IL-17A,

[0573] 如通过ELISA测量的;

[0574] (c) 抑制或阻断IL-17A与其受体(IL-17RA)之间的结合;

[0575] (d) 降低或中和IL-17A活性;

[0576] (e) 在体外HT-29测定中评估时能够抑制GRO- α 分泌;

[0577] (f) 具有阻断IL-17A与IL-17RA之间的相互作用的能力,在ELISA试验中测定的相对于苏金单抗的效力(相对效力)大于5,特别是大于10,大于15,更特别是大于20,且其中所述相对效力是通过ELISA测量的苏金单抗的单位为ng/mL的IC₅₀值与通过ELISA测量的scFv形式的本发明抗体的单位为ng/mL的IC₅₀值的比;

[0578] (g) 具有中和IL-17A的能力,在HT-29试验中通过测量GRO- α 分泌而测定的相对于苏金单抗的效力(相对效力)大于50,特别是大于100,更特别是大于150,且其中所述相对效力是在HT-29试验中测量的苏金单抗的单位为ng/mL的IC₅₀值与在HT-29试验中测量的scFv形式的本发明抗体的单位为ng/mL的IC₅₀值的比;

[0579] (h) 能够以1ng/ml或更低,特别是0.5ng/ml或更低,更特别是0.2ng/ml或更低的浓度,将1ng人IL-17A的活性抑制50%,所述抑制活性通过在50pg/ml TNF α 存在下在HT-29试验中测量由人IL-17A诱导的GRO- α 分泌来测定;(i) 与人IL-17A结合,解离常数(K_D)小于5nM,特别是小于1nM,小于0.5nM,小于0.2nM,特别是小于100pM,更特别是小于50pM,如通过表面

[0580] 等离子体共振所测量的,优选通过表面等离子体共振以直接设置所测量的;(j) 与食蟹猴IL-17A结合,K_D小于10nM,例如小于7nM,小于5nM,小于2nM,小于1nM,特别是小于0.5nM,如通过表面等离子体共振测量,特别是如通过表面等离子体共振以捕获设置所测量的;

[0581] (k) 当为scFv形式时,通过差示扫描荧光法测定的熔化温度(T_m)为至少60°C,

[0582] 特别是至少62°C,更特别是至少65°C,甚至更特别是至少70°C,特别地,其中所述抗体在pH 6.4、150mM NaCl的磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液中;

[0583] (l) 当为scFv形式时,当本发明的抗体的起始浓度为10mg/ml时,在5个连续的冻融循环后,单体含量损失小于5%,特别是小于3%,更特别是小于1%,特别地,其中所述抗体在pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中;和/或

[0584] (m) 当为scFv形式时,当本发明的抗体的起始浓度为10mg/ml时,在4°C下储存至少两周,特别是至少4周后,单体含量损失为5%或更低,特别是小于4%,小于3%,小于2%,更特别是小于1%,特别地,其中所述抗体在pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中;和/或

[0585] (n) 当本发明的抗体的起始浓度为10mg/ml时,在37°C下储存至少两周,特别是至少4周后,单体含量损失小于5%。

[0586] 在一个实施方案中,本公开的抗体相对于人IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F选择性地结合人IL-17A,如通过ELISA测量。如本文所用,术语“选择性结合”是指抗体、组合物、制剂等与IL-17B/C/D/E/F没有明显结合,但与IL-17A有结合。选择性结合的特征是高亲和力(或低 K_D)和低至中等的 IC_{50} ,区别于非特异性结合,后者通常具有低亲和力和中等至高的 IC_{50} 。通常情况下,当抗体结合的 K_D 小于 10^{-7} M时,结合被认为是有选择性的。适当地,本公开的抗体与人IL-17A结合比其与人IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F结合的亲和力更高或 K_D 更低,如通过SPR测量的。适当地,本公开的抗体对IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F的 IC_{50} 比对IL-17A的 IC_{50} 大100倍以上,特别是大200倍以上,大300倍以上,大400倍以上,如ELISA测定的。

[0587] 本公开的抗体特异性地与IL-17A结合,其中与IL-17A结合(a)抑制或阻断IL-17A与其受体(IL-17RA)之间的结合,以及(b)减少或中和IL-17A的活性。

[0588] 如本文所用,术语“中和抗体”描述的是能够中和IL-17A的生物信号活性的抗体,例如通过阻断IL-17A与其一个或多个受体的结合,特别是通过阻断IL-17A与IL-17RA的结合。本公开的抗体是IL-17A中和抗体。可以理解的是,本文所用的术语“中和”是指生物信号活动的减少,这种减少可能是部分的或完全的。IL-17A的中和作用可以通过各种检测方法来确定,实例在本文的其他地方有描述。

[0589] 因此,在HT-29试验中体外评估时,本公开的抗体能够抑制GRO- α 的分泌(在实例1和2中描述)。在一个实施方案中,本公开的抗体具有中和IL-17A的能力,在HT-29试验中通过测量GRO- α 分泌而测定的相对于苏金单抗的效力(相对效力)大于50,优选大于100,更优选大于150,且其中所述相对效力是在HT-29试验中测量的苏金单抗的单位为ng/mL的 IC_{50} 值与在HT-29试验中测量的scFv形式的本公开抗体的单位为ng/mL的 IC_{50} 值的比。在另一个实施方案中,本公开的抗体能够以1ng/ml或更低,优选0.5ng/ml或更低,更优选0.2ng/ml或更低的浓度,将1ng人IL-17A的活性抑制50%,所述抑制活性通过在50pg/ml TNF α 存在下在HT-29试验中测量由人IL-17A诱导的GRO- α 分泌来测定。

[0590] 在一个实施方案中,本公开的抗体具有阻断IL-17A与IL-17RA之间的相互作用的能力,在ELISA试验中测定的相对于苏金单抗的效力(相对效力)大于5,优选大于10,大于15,更特别是大于20,且其中所述相对效力是通过ELISA测量的苏金单抗的单位为ng/mL的 IC_{50} 值与通过ELISA测量的scFv形式的本公开抗体的单位为ng/mL的 IC_{50} 值的比。

[0591] 如本文所用,术语“亲和力”是指在单个抗原位点上抗体和抗原之间的相互作用的强度。在每个抗原性位点内,抗体“臂”的可变区通过弱的非共价力与抗原在许多位点相互作用;相互作用越大,亲和力越强。

[0592] “结合亲和力”通常是指分子的(例如,抗体的)单个结合位点与其结合伴侣(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,否则如本文所用,“结合亲和力”或“与……结合”是指反映结合对的成员(例如抗体片段和抗原)之间的1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X与其伴侣Y的亲和力通常可以用解离常数(K_D)表示。亲和力可以通过本领域已知的常规方法来测量,包括本文所述的方法。低亲和力抗体通常会缓慢结合抗原并倾向于易于解离,而高亲和力抗体通常会更快地结合抗原并倾向于保持更长的结合时间。本领域已知测量结合亲和力的多种方法,其中任何一种方法均可用于本公开的目的。下面描述用于测量结合亲和力,即结合强度的具体说明性和示例性实施方案。

[0593] 本文所用的术语“ K_{assoc} ”、“ K_a ”或“ K_{on} ”是指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率,而本文所用的术语“ K_{dis} ”、“ K_d ”或“ K_{off} ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。在一个实施方案中,本文所用的术语“ K_D ”是指解离常数,其由 K_d 与 K_a 之比(即 K_d/K_a)获得,并表示为摩尔浓度(M)。在一个实施方案中,根据本公开的“ K_D ”或“ K_D 值”或“ KD ”或“ KD 值”通过使用T200设备(Biacore, GE Healthcare)测量。为了测量人源化scFv与人IL-17A的亲和力,使用Biacore的Biotin-CAPture试剂盒捕获生物素化的人IL-17A。在每个分析物注入循环后,将CAP传感器芯片再生并捕获新抗原。使用剂量响应多循环动力学测定法将scFv作为分析物注入,其中分析物的浓度范围为0.35至90nM,稀释于运行缓冲液中。使用1:1结合模型拟合获得的传感图。另外,人源化scFv的亲和力可以用另一种SPR检测设置进行测量和分析:通过胺偶联将IL-17A固定在CM5传感器芯片(GE Healthcare)上,并在固定的IL-17A上注入0.35至90nM的scFv的连续稀释液。

[0594] 适当地,本公开的抗体对IL-17A的亲和力可以高于IL-17A对IL-17RA的亲和力。可以理解的是,与IL-17A对IL-17RA的亲和力相比,本公开的抗体的亲和力较高,可能对解离或中和预先形成的IL-17RA/IL-17A复合物特别有用。在一个实施方案中,本公开的抗体能中和IL-17RA/IL-17A的相互作用。在另一个实施方案中,本公开的抗体能抑制或阻断IL-17A和其受体(IL-17RA)之间的结合。在一个实施方案中,本公开的抗体能中和IL-17A的活性。

[0595] 适当地,本公开的抗体对IL-17A的亲和力可以与苏金单抗对IL-17A的亲和力相当或更高,优选地高于后者。在一个实施方案中,本公开的抗体中和IL-17A活性的效力等于或高于,优选高于苏金单抗。在另一个实施方案中,本公开的抗体中和IL-17RA/IL-17A相互作用的效力等于或高于,优选高于苏金单抗。

[0596] 抗体的结合亲和力可以例如通过解离常数(K_D)确定。较低的 K_D 表示较强的亲和力,而较高的 K_D 表示较弱的亲和力。

[0597] 因此,在一个合适的实施方案中,本公开的抗体的 K_D 为1至10000pM、1至7000pM、1至5000pM、1至2500pM、1至2000pM、1至1000pM、1至750pM、1至500pM、1至400pM、1至300pM、1至200pM、1至100pM、1至50pM,优选如通过表面等离子体所测量的,更优选通过表面等离子体共振以直接设置所测量的。在一个合适的实施方案中,本公开的抗体的 K_D 为1至200pM,特别是为1至100pM,通过表面等离子体共振以直接设置所测量的。在一个特定的实施方案中,本公开的抗体的 K_D 为1至50pM,通过表面等离子体共振以直接设置所测量的。在合适的实施方案中,本公开的抗体的 K_D 可以小于5nM,小于4nM,小于3nM,小于2nM,小于1nM,小于0.5nM,小于0.4nM,小于0.3nM,小于0.25nM,小于0.2nM,小于150pM,小于100pM,或小于50pM,优选

地如通过表面等离子体共振所测量的,更优选地如通过表面等离子体共振以直接设置所测量的。适当地,本公开的抗体的 K_D 小于1nM,特别是小于100pM。适当地,本公开的抗体的 K_D 小于0.5nM,特别是小于50pM。更适当地,本公开的抗体的 K_D 小于0.2nM,特别是小于50pM,如通过表面等离子体共振以直接设置所测量的。

[0598] 在另一个实施方案中,本公开的抗体与食蟹猴IL-17A结合, K_D 小于10nM,例如小于7nM,小于5nM,小于2nM,小于1nM,特别是小于0.5nM,如通过表面等离子体共振 (SPR) 以捕获设置所测量的。

[0599] 适当地,本公开的抗体与人IL-17A结合, K_{on} 速率为至少 $10^3 M^{-1} s^{-1}$ 或更高至少 $10^4 M^{-1} s^{-1}$ 或更高至少 $5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 或更高至少 $10^5 M^{-1} s^{-1}$ 或更高至少 $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 或更高至少 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 或更高,如通过表面等离子体共振 (SPR) 所测量的,优选地如通过表面等离子体共振以直接设置所测量的。优选地,本公开的抗体的 K_{on} 速率为至少至少 $10^5 M^{-1} s^{-1}$ 或更高,特别是至少 $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 或更高,特别是至少 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 或更高,如通过SPR所测量的,优选地如通过表面等离子体共振以直接设置所测量的。

[0600] 适当地,本公开的抗体与人IL-17A结合, K_{off} 速率为 $5 \times 10^{-3} s^{-1}$ 或更低 $3 \times 10^{-3} s^{-1}$ 或更低 $10^{-3} s^{-1}$ 或更低 $5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或更低 $3 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或更低 $10^{-4} s^{-1}$ 或更低 $5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 或更低,如通过表面等离子体共振 (SPR) 所测量的,优选如通过表面等离子体共振以直接设置所测量的。优选地,本公开的抗体的 K_{off} 速率为 $10^{-4} s^{-1}$ 或更低,特别是 $5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 或更低,如通过SPR测量,优选地如通过表面等离子体共振以直接设置所测量的。

[0601] 合适地,本公开的抗体具有有益的生物物理特性。

[0602] 适当地,当以scFv(单链可变片段)抗体形式表达时,本公开的抗体的熔化温度(T_m)为至少60°C,优选至少62°C,更优选至少65°C,甚至更优选至少70°C,如通过差示扫描荧光仪(DSF)测定,如前所述(Egan et al., MAb, 9(1) (2017), 68-84; Niesen et al., Nature Protocols, 2(9) (2007) 2212-2221)。scFv构建体的热解折叠的转变中点是通过差示扫描荧光法使用荧光染料SYPRO®Orange确定的(参见Wong&Raleigh, Protein Science 25(2016) 1834-1840)。在pH 6.4的柠檬酸磷酸盐缓冲液中的样品以50µg/mL的最终蛋白质浓度制备,并且含有5x SYPRO®Orange的终浓度,总体积为100µl。将25微升制备的样品一式三份添加到白壁AB基因PCR板中。该分析在用作热循环仪的qPCR机中进行,并使用该软件的自定义染料校准程序检测荧光发射。将包含测试样品的PCR板以1°C的递增量进行从25°C到96°C的温度变化,在每次温度递增后,暂停30s。总测定时间为约两个小时。通过GraphPad Prism软件使用数学二阶导数方法计算曲线的拐点来计算 T_m 。报告的 T_m 是三个测量值的平均值。

[0603] 本公开的抗体,特别是当以scFv(单链可变片段)抗体形式表达时,当本发明的抗体的起始浓度为10mg/ml时,其特点是在连续五个冻融循环后,单体含量的损失低于5%,特别是低于3%,更特别是低于1%。

[0604] 在4°C下储存至少两周,特别是至少四周后,本公开的抗体,特别是当以scFv(单链可变片段)抗体形式表达时,当本发明的抗体起始浓度为10mg/ml时,其特点是单体含量损失为5%或更少,特别是小于4%,小于3%,小于2%,最好小于1%。单体含量的损失由SE-HPLC色谱图的曲线下面积计算确定。SE-HPLC是一种基于固体固定相和液体流动相的分离技术,如USP第621章所述。该方法利用疏水固定相和水性流动相基于分子的大小和形状来

分离分子。分子的分离发生在特定柱的空隙体积 (V₀) 和总渗透体积 (V_T) 之间。通过SE-HPLC 测量Chromaster HPLC系统 (Hitachi High-Technologies Corporation) 上进行,该系统配备有自动样品注射和检测波长设定为280nm的UV检测器。该设备由软件EZChrom Elite (Agilent Technologies, Version 3.3.2SP2) 控制,该软件还支持对所得色谱图进行分析。在注射前通过离心清除蛋白质样品,并在将自动进样器的温度保持在4-6°C。对于scFv样品的分析,使用Shodex KW403-4F柱 (Showa Denko有限公司, #F6989202), 标准缓冲盐水流动相 (50mM磷酸钠pH 6.5, 300mM氯化钠), 推荐流速为0.35mL/min。每次注射的靶标样品加载量为5µg。在280nm的波长下通过UV检测器检测样品,并通过合适的软件套件记录数据。在V₀至V_T的范围内分析所得色谱图,从而排除洗脱时间>10分钟的基质相关的峰。

[0605] 适当地,本公开的分离的抗体选自以下组成的组:单克隆抗体、嵌合抗体、Fab、Fv、scFv、dsFv、scAb、STAB、单结构域抗体 (sdAb或dAb)、单结构域重链抗体、和单结构域轻链抗体、VHH、VNAR、基于鲨鱼的VNAR结构的单结构域抗体、和基于替代支架的结合结构域包括但不限于基于锚蛋白的结构域、fynomer、avimer、anticalin、纤连蛋白、和构建在抗体恒定区中的结合位点 (例如F-star的Modular Antibody Technology™), 优选scFv。

[0606] 适当地,本公开的抗体是Fv。适当地,本公开的抗体是scFv抗体片段。“单链Fv”或“scFv”或“sFv”抗体片段包含抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常,Fv多肽还包含VH和VL结构域之间多肽接头,其使得sFv能够形成所需的靶标结合结构。“单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常,scFv多肽还包含VH和VL结构域之间的多肽接头,其使得scFv能够形成所需的抗原结合结构 (参见,例如,Plückthun, The pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenburg和Moore编辑, (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315)。在特定实施方案中,所述功能片段是scFv形式,其包含根据SEQ ID NO:23的接头。在一个实施方案中,与人IL-17A特异性结合的抗体是表1中描述的抗体。在一个实施方案中,与人IL-17A特异性结合的抗体包括与选自 (i) 由SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25组成的组;或(ii) 由SEQ ID NO:61和SEQ ID NO:62组成的组的氨基酸序列至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%, 优选至少90%相同的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本公开的抗体是 (i) 如SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25所示;或(ii) 如SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:62所示的单链可变片段 (scFv)。

[0607] 适当地,本公开的抗体是IgG抗体。在一个实施方案中,本公开的抗体是选自由IgG1、IgG2、IgG3和IgG4组成的组的IgG, 优选IgG1。

[0608] 特异性结合TNF α 的示例性结构域

[0609] 本公开的多特异性抗体包含特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述结构域含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 其中: (a) 所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3, 并且 (b) 所述VL依次包括三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0610] 用于本公开的多特异性抗体的特异性结合TNF α 的合适结构域包括但不限于:

[0611] • 人源化单克隆抗体或其结合结构域,其序列列于表1中 (描述于W02017/158101中,其通过引用的方式整体并入本文);

[0612] • incixImab (**Remicade®**; 美国专利号6,277,969、6,284,471、6,790,444和6,835,823,所有这些都通过引用的方式并入本文);

[0613] • adalimumab/D2E7 (**Humira®**;描述于美国专利号6,090,382中,其通过引用的方式整体并入本文);

[0614] • certolizumab,一种PEG化的Fab片段 (**Cimzia®**;描述于U.S.7,012,135和U.S.7,186,820中,所有这些都通过引用的方式并入本文);

[0615] • golimumab (**Simponi®**;公开于美国申请2009/214528,其通过引用的方式整体并入本文)。

[0616] 用于本公开的多特异性抗体的特异性结合TNF α 的优选结构域包括但不限于人源化单克隆抗体或其结合结构域,其序列列于表1中(描述于W02017/158101中,其通过引用整体并入本文)。

[0617] 因此,在一个实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第二结构域包括一组CDR:HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,

[0618] 其中,该组CDR相对于这样的一组CDR具有10个或更少个氨基酸取代,例如,9个或更少个氨基酸取代,8个或更少个氨基酸取代,7个或更少个氨基酸取代,6个或更少个氨基酸取代,5个或更少个氨基酸取代,4个或更少个氨基酸取代,3个或更少个氨基酸取代,2个或更少个氨基酸取代,1个或0个氨基酸取代,优选0个氨基酸取代:HCDR1'是选自SEQ ID NO:25、28和31中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:25;HCDR2'是选自SEQ ID NO:26、29和32中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:26;HCDR3'是选自SEQ ID NO:27、30和33中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:27;LCDR1'是选自SEQ ID NO:38、41和44中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:38;LCDR2'是选自SEQ ID NO:39、42和45中的任一个的氨基酸序列,优选为SEQ ID NO:39;且LCDR3'具有选自SEQ ID NO:40、43和46中的任一个的氨基酸序列,优选SEQ ID NO:40。

[0619] 特别地,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第二结构域包含VH CDR,所述VH CDR具有表1中所列的任一个VH CDR的氨基酸序列。特别地,特异性结合TNF α 的第二结构域包含(或替代地,由其组成)一个、两个、三个或更多个VH CDR,这些VH CDR具有表1中所列的任何VH CDR的氨基酸序列。

[0620] 适当地,本公开提供了特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第二结构域包含重链可变区(VH),其中所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1具有选自SEQ ID NO:25、28和31中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR2具有选自SEQ ID NO:26、29和32中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR3具有选自SEQ ID NO:27、30和33中的任一个的氨基酸序列。特别地,所述第二结构域包含分别为SEQ ID NO:25、26和27的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列。

[0621] 本公开还提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第二结构域包含VL CDR,所述VL CDR具有表1中所列的任一个VL CDR的氨基酸序列。特别地,所述特异性结合TNF α 的第二结构域包含(或替代地,由其组成)一个、两个、三个或更多个VL CDR,这些VL CDR具有表1中所列出的任何VL CDR的氨基酸序列。

[0622] 适当地,所述特异性结合TNF α 的第二结构域包含轻链可变区(VL),其中所述VL依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述LCDR1具有选自SEQ ID NO:38、41和44中的任一个的氨基酸序列,所述LCDR2具有选自SEQ ID NO:39、42和45中的任一个的氨基酸序列,所述LCDR3具有选自SEQ ID NO:40、43和46中的任一个的氨基酸序列。特别地,所述第二结构域包含分别为SEQ ID NO:38、39和40的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0623] 适当地,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第二结构域包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:

[0624] (a)所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1具有选自SEQ ID NO:25、28和31中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR2具有选自SEQ ID NO:26、29和32中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR3具有选自SEQ ID NO:27、30和33中的任一个的氨基酸序列;且

[0625] (b)所述VL依次包括三个互补确定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述LCDR1具有选自SEQ ID NO:38、41和44中的任一个的氨基酸序列,所述LCDR2具有选自SEQ ID NO:39、42和45中的任一个的氨基酸序列,所述LCDR3具有选自SEQ ID NO:40、43和46中的任一个的氨基酸序列。

[0626] 特别地,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第二结构域包含(a)分别为SEQ ID NO:25、26和27的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及(b)分别为SEQ ID NO:38、39和40的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0627] 本公开的特异性结合TNF α 的其他结构域包括已突变、但仍在CDR区中与表1中描述的序列中描述的CDR区具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。适当地,本公开的特异性结合TNF α 的其他结构域包括突变氨基酸序列,其中当与表1中描述的序列中描述的CDR区相比时,已经通过CDR区中的氨基酸缺失、插入或取代而突变的氨基酸不超过1、2、3、4、5或10个。突变,例如取代,可能在CDR组内的任何残基处进行,并且可能在CDR1、CDR2和/或CDR3内。

[0628] 适当地,本公开的多特异性抗体的特异性结合TNF α 的第二结构域包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:

[0629] (a)所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1具有与SEQ ID NO:25、28和31中的任一个具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列;所述HCDR2具有与SEQ ID NO:26、29和32中的任一个具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列;所述HCDR3具有与SEQ ID NO:27、30和33中的任一个具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%

[0630] 同一性的氨基酸序列;和/或

[0631] (b)所述VL依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述LCDR1具有与SEQ ID NO:38、41和44中的任一个具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列;所述LCDR2具有与SEQ ID NO:39、42和45中的任一个具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列;所述LCDR3具有与SEQ ID NO:40、43和46中的任一个具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%

[0632] 同一性的氨基酸序列。

[0633] 适当地,特异性结合TNF α 的第二结构域包含:分别与SEQ ID NO:25、26和27的序列具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的HCDR1、HCDR2和HCDR3,和/或分别与SEQ ID NO:38、39和40的序列具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0634] 在进一步的实施方案中,所述特异性结合TNF α 的第二结构域包含重链可变区VHB和轻链可变区VLB。

[0635] 适当地,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第二结构域包括重链可变区VHB,其中所述VHB是VH1A、VH1B、VH3或VH4。在一个实施方案中,本公开的所述特异性结合TNF α 的第二结构域包含重链可变区VHB,其中所述VHB是VH4。在一个优选实施方案中,本公开的所述特异性结合TNF α 的第二结构域包含重链可变区VHB,其中所述VHB是VH3。

[0636] 适当地,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第二结构域包括轻链可变区VLB,且其中所述VLB包含V κ 框架FR1、FR2和FR3,特别是V κ 1或V κ 3的FR1至FR3,优选V κ 1框架FR1至FR3,以及框架FR4,所述框架FR4选自V κ FR4,特别是V κ 1FR4、V κ 3FR4,和V λ FR4。合适的V λ FR4如SEQ ID NO:97至SEQ ID NO:103所示。在一个实施方案中,所述特异性结合TNF α 的第二结构域包含V λ FR4,所述V λ FR4包含与选自SEQ ID NO:97至SEQ ID NO:103中任一个的氨基酸序列,优选与SEQ ID NO:97或SEQ ID NO:98,更优选与SEQ ID NO:97,具有至少60、70、80、90%同一性的氨基酸序列。适当地,特异性结合TNF α 的第二结构域包含V λ FR4,所述V λ FR4包含选自SEQ ID NO:97至SEQ ID NO:103中任一个的氨基酸序列,优选地,V λ FR4如SEQ ID NO:97或98所示,更优选地,V λ FR4如SEQ ID NO:98所示。

[0637] 因此,在一个实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第二结构域包含:

[0638] (a) 分别为SEQ ID NO:25、26和27的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:38、39和40的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

[0639] (b) VHB,其中所述VHB是VH3或VH4,优选VH3;和

[0640] (c) VLB,其包含VL框架,所述VL框架包含V κ 框架FR1、FR2和FR3,

[0641] 特别是V κ 1或V κ 3的FR1至FR3,优选V κ 1FR1至FR3,以及框架FR4,所述框架FR4选自V κ FR4,特别是V κ 1FR4、V κ 3FR4,和V λ FR4,特别是包含与选自SEQ ID NO:97至SEQ ID NO:103中任一个的氨基酸序列具有至少60、70、80、90%同一性的氨基酸序列的V λ FR4,优选如SEQ ID NO:97至SEQ ID NO:103中任一个所示的V λ FR4,优选如SEQ ID NO:97或98所示的V λ FR4,更优选如SEQ ID NO:98所示的V λ FR4。

[0642] 适当地,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第二结构域包含表1中所列的VH。适当地,本公开还提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合HSA的第二结构域,其中所述第二结构域包含(或替代地,由其组成)表1中列出的VH氨基酸序列,其中框架序列(例如,不是CDR的序列)中已经突变(其中,作为多个非限制性实例,突变是添加、取代或缺失)的氨基酸不超过约20个,优选不超过约10个。本公开的特异性结合TNF α 的其他

结构域包括已突变、但仍在VH区中与表1中描述的序列中描述的VH区具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。

[0643] 适当地,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第二结构域包含表1中所列的VL结构域。适当地,本公开还提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第二结构域包含(或替代地,由以下组成)表1中列出的VL氨基酸序列,其中框架序列(例如,不是CDR的序列)中已经突变(其中,作为多个非限制性实例,突变是添加、取代或缺失)的氨基酸不超过约20个,优选不超过约10个。本公开的特异性结合TNF α 的其他结构域包括已突变、但仍在VL区中与表1中描述的序列中描述的VL区具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。

[0644] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第二结构域包含重链可变区,所述重链可变区包含与选自SEQ ID NO:34、35、36和37组成的组,优选SEQ ID NO:34的氨基酸序列至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列,并且特别地,其中所述结构域包括分别为SEQ ID NO:25、26和27的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列。在一个优选的实施方案中,所述特异性结合TNF α 的第二结构域包含重链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:34至少90%相同的氨基酸序列,且其中所述重链可变区包含G56A、R82L、S85A、K86Q(AH α 编号),且特别地,其中所述结构域包括分别为SEQ ID NO:25、26和27的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列。适当地,所述特异性结合TNF α 的第二结构域可包括重链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:36至少90%相同的氨基酸序列,且其中所述重链可变区包括A24K、G56A、R82L(AH α 编号),特别地,其中所述结构域包括分别为SEQ ID NO:25、26和27的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列。适当地,特异性结合TNF α 的第二结构域可包含重链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:37至少90%相同的氨基酸序列,且其中所述重链可变区包含G56A、R82L、S85A、K86Q(AH α 编号),且特别地,其中所述结构域包括分别为SEQ ID NO:25、26和27的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列。

[0645] 在另一个实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第二结构域包含轻链可变区,所述轻链可变区包含与选自SEQ ID NO:47、48、49、50和51组成的组,优选SEQ ID NO:47的氨基酸序列至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列,并且特别地,其中所述结构域包括分别为SEQ ID NO:38、39和40的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0646] 在一个优选的实施方案中,所述特异性结合TNF α 的第二结构域可包括轻链可变区,所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:47至少90%相同的氨基酸序列,且其中所述轻链可变区包括T22N、A51R、F89Y(AH α 编号),特别地,其中所述结构域包括分别为SEQ ID NO:38、39和40的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。适当地,所述特异性结合TNF α 的第二结构域可包括轻链可变区,所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:49至少90%相同的氨基酸序列,且其中所述轻链可变区包括T22N、D88E、S95G、E99A(AH α 编号),特别地,其中所述结构域LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别为SEQ ID NO:38、39和40。适当地,所述特异性结合TNF α 的第二结构域可包括轻链可变区,所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:50至少

90%相同的氨基酸序列,且其中所述轻链可变区包括T22N、A51R、F89Y、S95G、G141T、L145V(AHO编号),特别地,其中所述结构域LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别为SEQ ID NO:38、39和40。适当地,所述特异性结合TNF α 的第二结构域可包括轻链可变区,所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:51至少90%相同的氨基酸序列,且其中所述轻链可变区包括T22N、K50Q、A51R、F89Y、G141T、L145V(AHO编号),特别地,其中所述结构域LCDR1、LCDR2和LCDR3序列分别为SEQ ID NO:38、39和40。

[0647] 在另一个实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第二结构域包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:34至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列;所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:47至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列。

[0648] 优选地,所述特异性结合TNF α 的第二结构域包含重链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:34至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列;和轻链可变区,所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:47至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列,并且其中所述结构域包含分别为SEQ ID NO:25、26和27的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和/或分别为SEQ ID NO:38、39和40的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,优选地,其中所述结构域包含分别为SEQ ID NO:25、26和27的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和分别为SEQ ID NO:38、39和40的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0649] 适当地,所述特异性结合TNF α 的第二结构域包含重链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:37至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列;和轻链可变区,所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:50或51至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列,且其中所述结构域包含分别为SEQ ID NO:25、26和27的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和/或分别为SEQ ID NO:38、39和40的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,优选地,其中所述结构域包含分别为SEQ ID NO:25、26和27的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和分别为SEQ ID NO:38、39和40的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0650] 在一个具体实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第二结构域包含VH,所述VH包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:34、35、36和37;和/或其VL包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:47、48、49、50和51。在特定实施方案中,特异性结合TNF α 的第二结构域包含SEQ ID NO:34的VH序列和SEQ ID NO:47的VL序列。在又一个具体实施方案中,特异性结合TNF α 的第二结构域包含SEQ ID NO:37的VH序列和SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51的VL序列。

[0651] 在一个实施方案中,特异性结合人TNF α 的结构域是表1中描述的结构域。对人TNF α 具有结合特异性的本公开的其他结构域包括其中氨基酸或编码氨基酸的核酸已经突变,但与表1中所述的序列具有至少60、70、80、90或95%同一性的那些抗体。在一个实施方案中,包括这样的氨基酸序列:当与表1中描述的序列中描述的可变区相比时,可变区中已经突变的氨基酸不超过1、2、3、4或5个,同时保留了基本上相同的活性。

[0652] 在又一个实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第二结构域包含与表1中描述的序列同源的氨基酸序列,并且所述结构域与人TNF α 结合,并保留了表1中描述的那些结构域的所需功能特性。

[0653] 在一个实施方案中,特异性结合TNF α 的本发明结构域具有重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,所述轻链可变区包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中这些CDR序列中的一个或多个具有基于本文所述的结构域或其保守修饰的指定氨基酸序列,其中所述结构域保留了本公开的抗体所需的功能特性。

[0654] 因此,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第二结构域包含(或由其组成):

[0655] 重链可变区(VH),其依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,其中所述HCDR1是氨基酸序列SEQ ID NO:25,或其保守变体;所述HCDR2是氨基酸序列SEQ ID NO:26,或其保守变体;所述HCDR3是选自SEQ ID NO:27中任一个的氨基酸序列,或其保守变体;和

[0656] 轻链可变区(VL),其依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中所述LCDR1为氨基酸序列SEQ ID NO:38,或其保守变体;所述LCDR2是氨基酸序列SEQ ID NO:39,或其保守变体;所述LCDR3具有氨基酸序列SEQ ID NO:40,或其保守变体;

[0657] 其中所述结构域特异性结合人TNF α 和/或中和TNF α 。

[0658] 与人血清白蛋白(HSA)特异性结合的示例性结构域

[0659] 本公开的多特异性抗体包含特异性结合人血清白蛋白的第三结构域,其中所述结构域含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:(a)所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,并且(b)所述VL依次包括三个互补确定区LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0660] 适当地,本公开的多特异性抗体可以包含第三结合结构域,该第三结合结构域具有不同于第一和第二结构域的特异性的第三特异性。适当地,本公开的多特异性抗体可以包含与人血清白蛋白(HSA)特异性结合的第三结构域。因此,在一个实施方案中,本公开的多特异性抗体包括特异性结合IL-17A的第一结构域、特异性结合TNF α 的第二结构域和特异性结合人血清白蛋白的第三结构域。

[0661] 用于本公开的多特异性抗体的特异性结合人血清白蛋白的合适结构域包括但不限于序列列于表1中的人源化单克隆抗体或其结合结构域。

[0662] 在一个实施方案中,特异性结合人血清白蛋白的结构域包含一组CDR:HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中,该组CDR相对于这样的一组CDR具有10个或更少个氨基酸取代,例如,9个或更少个氨基酸取代,8个或更少个氨基酸取代,7个或更少个氨基酸取代,6个或更少个氨基酸取代,5个或更少个氨基酸取代,4个或更少个氨基酸取代,3个或更少个氨基酸取代,2个或更少个氨基酸取代,1个或0个氨基酸取代,优选0个氨基酸取代:

[0663] (a)HCDR1'如SEQ ID NO:52所示;HCDR2'如SEQ ID NO:53所示;HCDR3'

[0664] 如SEQ ID NO:54所示;LCDR1'如SEQ ID NO:62所示;LCDR2'如SEQ ID NO:63所示;LCDR3'如SEQ ID NO:64所示;或

[0665] (b)HCDR1'如SEQ ID NO:73所示;HCDR2'如SEQ ID NO:74所示;HCDR3'

[0666] 如SEQ ID NO:75所示;LCDR1'如SEQ ID NO:83所示;LCDR2'如SEQ ID NO:84所示;

LCDR3'如SEQ ID NO:85所示。

[0667] 特别地,与人血清白蛋白特异性结合的结构域包含具有表1中所列的任一VH CDR的氨基酸序列的VH CDR。特别地,本公开提供了多特异性抗体,所述多特异性抗体包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述结构域包含(或由以下组成)一个、两个、三个或更多个VH CDR,所述VH CDR具有表1所列的VH CDR中任一个的氨基酸序列。

[0668] 适当地,特异性结合人血清白蛋白的结构域包含重链可变区(VH),其中所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,其中

[0669] (a)所述HCDR1如选自SEQ ID NO:52、55和58中的任一个的氨基酸序列所示;所述HCDR2如选自SEQ ID NO:53、56和59中的任一个的氨基酸序列所示;所述HCDR3如选自SEQ ID NO:54、57和60中的任一个的氨基酸序列所示;或

[0670] (b)所述HCDR1如选自SEQ ID NO:73、76和79中的任一个的氨基酸序列所示;所述HCDR2如选自SEQ ID NO:74、77和80中的任一个的氨基酸序列所示;所述HCDR3如选自SEQ ID NO:75、78和81中的任一个的氨基酸序列所示。

[0671] 在一个优选的实施方案中,与人血清白蛋白特异性结合的结构域包含分别为SEQ ID NO:52、53和54的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列。在另一个实施方案中,与人血清白蛋白特异性结合的结构域包含分别为SEQ ID NO:73、74和75的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列。

[0672] 适当地,与人血清白蛋白特异性结合的结构域包含具有表1中所列的任一VL CDR的氨基酸序列的VL CDR。特别地,本公开提供了多特异性抗体,所述多特异性抗体包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述结构域包含(或替代地,由其组成)一个、两个、三个或更多个VL CDR,这些VL CDR具有表1中所列的任何VL CDR的氨基酸序列。

[0673] 适当地,特异性结合人血清白蛋白的结构域包含轻链可变区(VL),其中所述VL依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中

[0674] (a)所述LCDR1如选自SEQ ID NO:62、65和68中的任一个的氨基酸序列所示;所述LCDR2如选自SEQ ID NO:63、66和69中的任一个的氨基酸序列所示;且所述LCDR3如选自SEQ ID NO:64、67和70中的任一个的氨基酸序列所示;或

[0675] (b)所述LCDR1如选自SEQ ID NO:83、86和89中的任一个的氨基酸序列所示;所述LCDR2如选自SEQ ID NO:84、87和90中的任一个的氨基酸序列所示;且所述LCDR3如选自SEQ ID NO:85、88和91中的任一个的氨基酸序列所示。

[0676] 在一个优选的实施方案中,与人血清白蛋白特异性结合的结构域包含分别为SEQ ID NO:62、63和64的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。在另一个实施方案中,与人血清白蛋白特异性结合的结构域包含分别为SEQ ID NO:83、84和85的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0677] 适当地,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:

[0678] (a)所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1具有选自SEQ ID NO:52、55和58中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR2具有选自SEQ ID NO:53、56和59中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR3具有选自SEQ ID NO:54、57和60中的任一个的氨基酸序列;且所述VL依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述LCDR1具有选自SEQ ID NO:62、65和68中的任一个的氨基酸序列,所述LCDR2具有选自SEQ ID NO:63、66和69中的任一个的氨基酸序列,所述LCDR3具有选自SEQ ID NO:64、67和70中的任一个的氨基酸序

列,或

[0679] (b)所述VH依次包括三个互补确定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1具有选自SEQ ID NO:73、76和79中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR2具有选自SEQ ID NO:74、77和80中的任一个的氨基酸序列,所述HCDR3具有选自SEQ ID NO:75、78和81中的任一个的氨基酸序列;且所述VL依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述LCDR1具有选自SEQ ID NO:83、86和89中的任一个的氨基酸序列,所述LCDR2具有选自SEQ ID NO:84、87和90中的任一个的氨基酸序列,所述LCDR3具有选自SEQ ID NO:85、88和91中的任一个的氨基酸序列。

[0680] 在一个优选实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包含(a)分别为SEQ ID NO:52、53和54的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及(b)分别为SEQ ID NO:62、63和64的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。在另一个实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包含(a)分别为SEQ ID NO:73、74和75的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及(b)分别为SEQ ID NO:83、84和85的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0681] 本公开的特异性结合HSA的其他结构域包括已突变、但仍在CDR区中与表1中描述的序列中描述的CDR区具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。适当地,本公开的特异性结合HSA的其他结构域包括突变氨基酸序列,其中当与表1中描述的序列中描述的CDR区相比时,已经通过CDR区中的氨基酸缺失、插入或取代而突变的氨基酸不超过1、2、3、4、5或10个。突变,例如取代,可能在CDR组内的任何残基处进行,并且可能在CDR1、CDR2和/或CDR3内。

[0682] 适当地,本公开的多特异性抗体的特异性结合HSA的第三结构域包含:重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:

[0683] (a)所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1具有与SEQ ID NO:52、55和58中的任一个具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列;所述HCDR2具有与SEQ ID NO:53、56和59中的任一个具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列;所述HCDR3具有与SEQ ID NO:54、57和60中的任一个具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列;和/或

[0684] (b)所述VL依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述LCDR1具有与SEQ ID NO:62、65和68中的任一个具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列;所述LCDR2具有与SEQ ID NO:63、66和69中的任一个具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列;所述LCDR3具有与SEQ ID NO:64、67和70中的任一个具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。

[0685] 适当地,多特异性抗体包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包含:分别与SEQ ID NO:52、53和54的序列具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的HCDR1、HCDR2和HCDR3,和/或分别与SEQ ID NO:62、63和64的序列具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0686] 适当地,本公开的多特异性抗体的特异性结合HSA的第三结构域包含:重链可变区

(VH)和轻链可变区(VL),其中:

[0687] (a)所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1具有与SEQ ID NO:73、76和79中的任一个具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列;所述HCDR2具有与SEQ ID NO:74、77和80中的任一个具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列;所述HCDR3具有与SEQ ID NO:75、78和81中的任一个具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列;和/或

[0688] (b)所述VL依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述LCDR1具有与SEQ ID NO:83、86和89中的任一个具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列;所述LCDR2具有与SEQ ID NO:84、87和90中的任一个具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列;所述LCDR3具有与SEQ ID NO:85、88和91中的任一个具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。

[0689] 适当地,多特异性抗体包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包含:分别与SEQ ID NO:73、74和75的序列具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的HCDR1、HCDR2和HCDR3,和/或分别与SEQ ID NO:83、84和85的序列具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0690] 在进一步的实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包含重链可变区VHC和轻链可变区VLC。

[0691] 适当地,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包括重链可变区VHC,其中所述VHC是VH1A、VH1B、VH3或VH4。在一个实施方案中,本公开的特异性结合HSA的第三结构域包含重链可变区VHC,其中所述VHC是VH4。在一个优选的实施方案中,本公开的特异性结合HSA的第三结构域包含重链可变区VHC,其中所述VHC是VH3。

[0692] 适当地,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包含轻链可变区VLC,且其中所述VLC包含V κ 框架FR1、FR2和FR3,特别是V κ 1或V κ 3FR1至FR3,优选V κ 1框架FR1至FR3,以及框架FR4,所述框架FR4选自V κ FR4,特别是V κ 1FR4、V κ 3FR4,和V λ FR4。合适的V λ FR4如SEQ ID NO:97至SEQ ID NO:103所示。在一个实施方案中,所述第三结构域包含V λ FR4,所述V λ FR4包含与选自SEQ ID NO:97至SEQ ID NO:103中任一个的氨基酸序列,优选与SEQ ID NO:97或SEQ ID NO:98,更优选与SEQ ID NO:97,具有至少60、70、80、90%同一性的氨基酸序列。适当地,所述第三结构域包含V λ FR4,所述V λ FR4包含选自SEQ ID NO:97至SEQ ID NO:103中任一个的氨基酸序列,优选如SEQ ID NO:97或98所示的V λ FR4,更优选如SEQ ID NO:98所示的V λ FR4。

[0693] 因此,在一个优选实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包含:

[0694] (a)分别为SEQ ID NO:52、53和54的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:62、63和64的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

[0695] (b)VHC,其中所述VHC是VH3或VH4,优选VH3;和

[0696] (c)VLC,其包含VL框架,所述VL框架包含V κ 框架FR1、FR2和FR3,

[0697] 特别是V κ 1或V κ 3FR1至FR3,优选V κ 1FR1至FR3,以及框架FR4,所述框架FR4选自V κ FR4,特别是V κ 1FR4、V κ 3FR4,和V λ FR4,特别是包含与选自SEQ ID NO:97至SEQ ID NO:103中任一个的氨基酸序列具有至少60、70、80、90%同一性的氨基酸序列的V λ FR4,优选如选自SEQ ID NO:97至SEQ ID NO:103中任一个的氨基酸序列所示的V λ FR4,优选如SEQ ID NO:97或98所示的V λ FR4,更优选如SEQ ID NO:98所示的V λ FR4。

[0698] 在进一步的实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包含:

[0699] (i) 分别为SEQ ID NO:73、74和75的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:83、84和85的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

[0700] (ii) VHC,其中所述VHC是VH3或VH4,优选VH3;和

[0701] (iii) VLC,其包含VL框架,所述VL框架包含V κ 框架FR1、FR2和FR3,特别是V κ 1或V κ 3的FR1至FR3,优选V κ 1FR1至FR3,以及框架FR4,所述框架FR4选自V κ FR4,特别是V κ 1FR4、V κ 3FR4,和V λ FR4,特别是包含与选自SEQ ID NO:97至SEQ ID NO:103中任一个的氨基酸序列具有至少60、70、80、90%同一性的氨基酸序列的V λ FR4,优选如选自SEQ ID NO:97至SEQ ID NO:103中任一个的氨基酸序列所示的V λ FR4,优选如SEQ ID NO:97或98所示的V λ FR4,更优选如SEQ ID NO:98所示的V λ FR4。

[0702] 适当地,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包含表1中所列的VH。适当地,本公开还提供了包含特异性结合HSA的第三结构域的多特异性抗体,其中所述第三结构域包含(或替代地,由其组成)表1中列出的VH氨基酸序列,其中框架序列(例如,不是CDR的序列)中已经突变(其中,作为多个非限制性实例,突变是添加、取代或缺失)的氨基酸不超过约20个,优选不超过约10个。本公开的特异性结合HSA的其他结构域包括已突变、但仍在VH区中与表1中描述的序列中描述的VH区具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。

[0703] 适当地,本公开提供多特异性抗体,所述多特异性抗体包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包含列于表1中的VL结构域。适当地,本公开还提供了包含特异性结合HSA的第三结构域的多特异性抗体,其中所述第三结构域包含(或替代地,由其组成)表1中列出的VL氨基酸序列,其中框架序列(例如,不是CDR的序列)中已经突变(其中,作为多个非限制性实例,突变是添加、取代或缺失)的氨基酸不超过约20个,优选不超过约10个。本公开的特异性结合HSA的其他结构域包括已突变、但仍在VL区中与表1中描述的序列中描述的VL区具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。

[0704] 在一个实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包含重链可变区域,所述重链可变区域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:61至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列,并且特别地,其中所述结构域包括分别为SEQ ID NO:52、53和54的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列。

[0705] 在另一个实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包含轻链可变区域,所述轻链可变区域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:71至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基

酸序列,并且特别地,其中所述结构域包括分别为SEQ ID NO:62、63和64的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0706] 在进一步的实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:61至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列;所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:71至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列。

[0707] 在一个优选实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:61至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列;所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:71至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列,并且其中所述结构域包含分别为SEQ ID NO:52、53和54的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和/或分别为SEQ ID NO:62、63和64的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,优选地,其中所述结构域包含分别为SEQ ID NO:52、53和54的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和分别为SEQ ID NO:62、63和64的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0708] 在特定实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包含VH,所述VH包括氨基酸序列SEQ ID NO:61,和/或其VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:71。在优选实施方案中,特异性结合HSA的第三结构域包含SEQ ID NO:61的VH序列和SEQ ID NO:71的VL序列。

[0709] 在另一个实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包含重链可变区域,所述重链可变区域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:82至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列,并且特别地,其中所述结构域包括分别为SEQ ID NO:73、74和75的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列。

[0710] 在另一个实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包含轻链可变区域,所述轻链可变区域包含与氨基酸序列SEQ ID NO:92至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列,并且特别地,其中所述结构域包括分别为SEQ ID NO:83、84和85的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0711] 在进一步的实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:82至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列;所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:92至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列。

[0712] 在一个优选实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:82至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列;所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:92至少60、70、80、

90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%，优选至少90%相同的氨基酸序列，并且其中所述结构域包含分别为SEQ ID NO:73、74和75的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列，和/或分别为SEQ ID NO:83、84和85的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列，优选地，其中所述结构域包含分别为SEQ ID NO:73、74和75的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列，和分别为SEQ ID NO:83、84和85的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0713] 在特定实施方案中，本公开提供了多特异性抗体，其包含特异性结合HSA的第三结构域，其中所述第三结构域包含VH，所述VH包括氨基酸序列SEQ ID NO:82，和/或其VL包含氨基酸序列SEQ ID NO:92。在优选实施方案中，特异性结合HSA的第三结构域包含SEQ ID NO:82的VH序列和SEQ ID NO:92的VL序列。

[0714] 在一个实施方案中，特异性结合人血清白蛋白的结构域是表1中描述的结构域。在一个实施方案中，特异性结合HSA的结构域包括氨基酸序列，所述氨基酸序列与选自SEQ ID NO:72和93组成的组，优选SEQ ID NO:72的氨基酸序列至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%，优选至少90%相同。在一个实施方案中，与HSA特异性结合的结构域如SEQ ID NO:72或SEQ ID NO:93，优选SEQ ID NO:72所示。

[0715] 对HSA具有结合特异性的本公开的其他结构域包括其中氨基酸或编码氨基酸的核酸已经突变，但与表1中所述的序列具有至少60、70、80、90或95%同一性的那些抗体。在一个实施方案中，包括这样的氨基酸序列：当与表1中描述的序列中描述的可变区相比时，可变区中已经突变的氨基酸不超过1、2、3、4或5个，同时保留了基本上相同的活性。

[0716] 在又一个实施方案中，本公开提供了多特异性抗体，其包含特异性结合的第三结构域，其中所述第三结构域包括与表1中描述的序列同源的氨基酸序列，并且所述结构域与人血清白蛋白结合，并保留了表1中描述的那些结构域的所需功能特性。

[0717] 在一个实施方案中，特异性结合HSA的本发明结构域具有重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含HCDR1、HCDR2和HCDR3序列，所述轻链可变区包含LCDR1、LCDR2和LCDR3序列，其中这些CDR序列中的一个或多个具有基于本文所述的结构域或其保守修饰的指定氨基酸序列，其中所述结构域保留了本公开的抗体的所需功能特性。

[0718] 因此，本公开提供了多特异性抗体，其包含特异性结合HSA的第三结构域，其中所述第三结构域包含以下(或由以下组成)：

[0719] 重链可变区(VH)，其依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3，其中所述HCDR1是氨基酸序列SEQ ID NO:52，或其保守变体；所述HCDR2是氨基酸序列SEQ ID NO:53，或其保守变体；所述HCDR3是选自SEQ ID NO:54中任一个的氨基酸序列，或其保守变体；和

[0720] 轻链可变区(VL)，其依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3，其中所述LCDR1为氨基酸序列SEQ ID NO:62，或其保守变体；所述LCDR2是氨基酸序列SEQ ID NO:63，或其保守变体；所述LCDR3具有氨基酸序列SEQ ID NO:64，或其保守变体；

[0721] 其中所述结构域特异性结合人血清白蛋白。

[0722] 本公开还提供了多特异性抗体，其包含特异性结合HSA的第三结构域，其中所述第三结构域包含(或由以下组成)：

[0723] 重链可变区(VH)，其依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3，其中所述HCDR1是氨基酸序列SEQ ID NO:73，或其保守变体；所述HCDR2是氨基酸序列SEQ ID NO:74，或其保守变体；所述HCDR3是选自SEQ ID NO:75中任一个的氨基酸序列，或其保守变体；和

[0724] 轻链可变区 (VL), 其依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3, 其中所述LCDR1为氨基酸序列SEQ ID NO:83, 或其保守变体; 所述LCDR2是氨基酸序列SEQ ID NO:84, 或其保守变体; 所述LCDR3具有氨基酸序列SEQ ID NO:85, 或其保守变体;

[0725] 其中所述结构域特异性结合人血清白蛋白。

[0726] 本公开的多特异性抗体的其他结构域

[0727] 用于本公开的多特异性抗体的合适结构域还包括, 但不限于, 其序列列于表1并被进一步修饰的抗体或其结合结构域(其修饰版本)。

[0728] 在一个实施方案中, 多特异性抗体包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域, 其中所述第一结构域对于在哺乳动物细胞中表达被优化, 并且其具有重链可变区和轻链可变区, 其中这些序列中的一个或多个具有基于本文所述的结构域或其保守修饰的指定氨基酸序列, 其中, 所述结构域保留了本公开的结构域的所需功能特性。

[0729] 在一个实施方案中, 多特异性抗体包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域, 其中所述第二结构域对于在哺乳动物细胞中表达被优化, 并且其具有重链可变区和轻链可变区, 其中这些序列中的一个或多个具有基于本文所述的结构域或其保守修饰的指定氨基酸序列, 其中, 所述结构域保留了本公开的结构域的所需功能特性。

[0730] 在一个实施方案中, 多特异性抗体包含特异性结合HSA的第三结构域, 其中所述第三结构域对于在哺乳动物细胞中表达被优化, 并且其具有重链可变区和轻链可变区, 其中这些序列中的一个或多个具有基于本文所述的结构域或其保守修饰的指定氨基酸序列, 其中, 所述结构域保留了本公开的结构域的所需功能特性。

[0731] 如本文所用, 术语“优化的”是指将核苷酸序列改变为使用在生产细胞或生物(通常是真核细胞, 例如毕赤酵母属细胞、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或人类细胞)中优选的密码子编码氨基酸。对优化的核苷酸序列进行工程改造, 以完全或尽可能保留最初由起始核苷酸序列(也称为“亲本”序列)编码的氨基酸序列。本文的优化序列已经被进行了改造, 以具有在哺乳动物细胞中优选的密码子。然而, 本文中还想设想了这些序列在其他真核细胞或原核细胞中的优化表达。由优化的核苷酸序列编码的氨基酸序列也称为被优化的。

[0732] 因此, 本公开提供了多特异性抗体, 其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域, 其中所述第一结构域对于在哺乳动物细胞中表达被优化, 其包含重链可变区和轻链可变区, 其中: 所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:10和11中的任一个的氨基酸序列, 和其保守修饰; 且所述轻链可变区包含选自SEQ ID NO:21和22中的任一个的氨基酸序列, 或其保守修饰; 其中, 所述第一结构域特异性结合人IL-17A和/或中和IL-17A。

[0733] 因此, 本公开提供了多特异性抗体, 其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域, 其中所述第二结构域对于在哺乳动物细胞中表达被优化, 其包含重链可变区和轻链可变区, 其中: 所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:34、35、36和37中的任一个的氨基酸序列, 和其保守修饰; 且所述轻链可变区包含选自SEQ ID NO:47、48、49、50和51中的任一个的氨基酸序列, 或其保守修饰; 其中, 所述结构域特异性结合人TNF α 和/或中和TNF α 。

[0734] 因此,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域对于在哺乳动物细胞中表达被优化,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:61和SEQ ID NO:82中的任一个的氨基酸序列,和其保守修饰;且所述轻链可变区包含选自SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:92中的任一个的氨基酸序列,或其保守修饰;其中,所述结构域特异性结合人血清白蛋白。

[0735] 可变区修饰的另一种类型是使VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基突变,从而改善目标抗体的一种或多种结合特性(例如,亲和力),称为“亲和力成熟”。可以进行定点诱变或PCR介导的诱变以引入突变,并且可以如本文所述和实施例中提供的体外或体内测定中评估对抗体结合或其他目的功能的影响。可以引入保守修改(如上所述)。突变可以是氨基酸取代、添加或缺失。此外,CDR区中通常不超过1、2、3、4或5个残基被改变。

[0736] “亲和力成熟的”抗体是一种抗体,在其一个或多个可变结构域中具有一个或多个改变,与不具有那些改变的亲本抗体相比,这导致抗体对抗原的亲和力得到改善。在一个实施方案中,亲和力成熟的抗体对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲和力。通过本领域已知的方案产生亲和力成熟的抗体。例如,Marks et al.,*Bio/Technology* 10:779-783 (1992)描述了通过VH和VL结构域改组的亲和力成熟。HVR和/或框架残基的随机诱变描述于例如:Barbas et al.*Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A*91:3809-3813 (1994);Schier et al.*Gene* 169:147-155 (1995);Jackson et al.,*J.Immunol.*154(7):3310-9 (1995);及Hawkins et al.,*J.Mol.Biol.*226:889-896 (1992)。因此,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域和特异性结合TNF α 的第二结构域,其中所述第一结构域是亲和力成熟的结构域和/或所述第二结构域是亲和力成熟的结构域。在进一步的实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其还包含特异性结合HSA的第三结构域,其中所述第三结构域是亲和力成熟的结构域。

[0737] 本公开的抗体可以进一步通过如下方法制备:使用具有本文所示的一个或多个VH和/或VL序列的抗体作为起始材料来工程化修饰的抗体,该修饰的抗体可能具有与起始抗体不同的特性。可以通过修饰一个或两个可变区(即VH和/或VL)内,例如一个或多个CDR区内和/或一个或多个框架区内的一个或多个残基来工程化抗体。另外地或可替代地,可以通过修饰恒定区内的残基来工程化抗体,例如以改变抗体的效应子功能。

[0738] 可以执行的一种类型的可变区工程化是CDR移植。抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。因此,各个抗体之间CDR中的氨基酸序列比CDR之外的序列更具多样性。由于CDR序列负责大多数抗体-抗原相互作用,因此可以通过构建表达载体来表达模仿特定天然存在抗体的特性的重组抗体,该表达载体包含来自该特定天然存在抗体的CDR序列,并且该CDR序列被移植到来自具有不同特性的不同抗体的框架序列上(参见,例如,Riechmann,L.et al.,1998*Nature* 332:323-327;Jones,P.et al.,1986*Nature* 321:522-525;Queen,C.et al.,1989*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*86:10029-10033;Winter的美国专利号5,225,539,及Queen等人的美国专利号5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。

[0739] 这样的框架序列可以从公共DNA数据库或包括种系抗体基因序列或重排的抗体序列的公开参照文献中获得。例如,人类重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可见于“VBase”人类种系序列数据库(可以在网上在www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase获得)以及

Kabat, E.A. et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I.M. et al., 1992 J. Mol. Biol. 227: 776-798; 及 Cox, J.P.L. et al., 1994 Eur. J. Immunol. 24: 827-836; 各自的内容通过引用明确地并入本文。例如, 人类重链和轻链可变区基因的种系DNA序列和重排抗体序列可以在“IMGT”数据库中找到(可以在网上在www.imgt.org获得; 参见Lefranc, M.P. et al., 1999 Nucleic Acids Res. 27: 209-212; 其各自的内容通过引用的方式明确地并入本文)。

[0740] 用于本公开的多特异性抗体的结合结构域的框架序列的实例是与本公开的所选结构域所使用的框架序列在结构上相似的那些, 例如, 本公开的结构域所使用的共有序列和/或框架序列。可以将VH CDR1、2和3序列以及VL CDR1、2和3序列移植到框架区上, 该框架区具有与框架序列所源自的种系免疫球蛋白基因中发现的序列相同的序列, 或者可以将CDR序列移植到与种系序列相比包含一个或多个突变的框架区上。例如, 已经发现, 在某些情况下, 使框架区内的残基突变以维持或增强抗体的抗原结合能力是有益的(参见例如, 美国专利号5,530,101; 5,585,089; Queen等人的5,693,762和6,180,370)。

[0741] 本公开的示例性多特异性抗体

[0742] 在一个具体实施方案中, 本公开提供了多特异性抗体, 其包含特异性结合IL-17A的第一结构域、特异性结合TNF α 的第二结构域和任选地特异性结合HSA的第三结构域, 其中(i) 所述第一结构域包括分别为SEQ ID NO: 1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列, 以及分别为SEQ ID NO: 12、13和14的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列, 并且(ii) 所述第二结构域包含分别为SEQ ID NO: 25、26和27的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列, 和分别为SEQ ID NO: 38、39和40的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列, 并且(iii) 任选地, 所述第三结构域包含分别为SEQ ID NO: 52、53和54的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列, 和分别为SEQ ID NO: 62、63和64的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0743] 在更具体的实施方案中, 本公开提供了多特异性抗体, 其包含特异性结合IL-17A的第一结构域、特异性结合TNF α 的第二结构域和任选的特异性结合HSA的第三结构域, 其中

[0744] (i) 本公开的多特异性抗体的特异性结合IL-17A的所述第一结构域包含重链可变区, 所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 10至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%, 优选至少90%相同的氨基酸序列; 和轻链可变区, 所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 21至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%, 优选至少90%相同的氨基酸序列, 并且其中所述结构域包含分别为SEQ ID NO: 1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列, 和分别为SEQ ID NO: 12、13和14的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列; 且

[0745] (ii) 所述特异性结合TNF α 的第二结构域包含重链可变区, 所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 34至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%, 优选至少90%相同的氨基酸序列; 和轻链可变区, 所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 47至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%, 优选至少90%相同的氨基酸序列, 并且其中所述结构域包含分别为SEQ ID NO: 25、26和27的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列, 和分别为SEQ ID NO: 38、39和40的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列; 且

[0746] (iii) 任选地, 所述第三结构域包含重链可变区, 所述重链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 61至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%, 优选至少90%相同

的氨基酸序列;和轻链可变区,所述轻链可变区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:71至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列,并且其中所述结构域包含分别为SEQ ID NO:52、53和54的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和分别为SEQ ID NO:62、63和64的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0747] 在一个具体实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域、特异性结合TNF α 的第二结构域和特异性结合HSA的第三结构域,其中所述多特异性抗体包含与选自SEQ ID NO:112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、和124组成的组,优选SEQ ID NO:119的序列具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性,优选至少80%同一性,更优选至少90%同一性的氨基酸序列,特别地,其中

[0748] (a)所述第一结合结构域包含分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和分别为SEQ ID NO:12、13和14的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

[0749] (b)所述第二结合结构域包含分别为SEQ ID NO:25、26和27的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和分别为SEQ ID NO:38、39和40的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;且

[0750] (c)所述第三结合结构域包含分别为SEQ ID NO:52、53和54的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和分别为SEQ ID NO:62、63和64的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0751] 在一个更具体的实施方案中,本公开提供了多特异性抗体,其包含特异性结合IL-17A的第一结构域、特异性结合TNF α 的第二结构域和特异性结合HSA的第三结构域,其中所述多特异性抗体包含以下(优选由以下组成):选自SEQ ID NO:112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、和124中的任一个,优选SEQ ID NO:119的氨基酸序列。

[0752] 本公开的另外的多特异性分子

[0753] 本公开还提供了一种抗体,该抗体是包含本公开的抗IL-17A抗体和至少另一种特异性的多特异性分子,例如双特异性分子、三特异性分子、四特异性、五特异性、六特异性分子。

[0754] 如本文所用,术语“多特异性分子”或“多特异性抗体”是指与至少两个或更多个不同靶标(例如,IL-17A和不同于IL-17A的另一个靶标)上的两个或更多个不同表位结合的抗体,或与同一靶标的两个或更多个不同表位结合的抗体。

[0755] 术语“多特异性分子”包括双特异性、三特异性、四特异性、五特异性和六特异性抗体。如本文所用,术语“双特异性抗体”是指与两个不同靶标或相同靶标上的两个不同表位结合的抗体。如本文所用,术语“三特异性抗体”是指与三个不同靶标或相同靶标上的三个不同表位结合的抗体。

[0756] 可以将本公开的抗体衍生化或与另一种功能分子,例如另一种肽或蛋白质(例如,另一种抗体或受体的配体)连接,以产生与至少两个结合位点和/或不同靶标分子结合的多特异性分子。实际上,本公开的抗体可被衍生化或与不止一个其他功能分子连接,以产生与不止两个不同结合位点和/或靶标分子结合的多特异性分子。为了产生本公开的多特异性分子,可以将本公开的抗体与一个或多个其他结合分子,例如另一种抗体、肽或结合模拟物功能性地连接(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或其他方式),从而产生多特异性分子。

[0757] 因此,本公开包括多特异性分子,其包含至少一个对IL-17A的第一结合特异性和

对第二靶表位的第二结合特异性。例如,第二靶表位存在于不同于IL-17A的另一种靶分子上。因此,本公开包括多特异性分子,其包含至少一个对IL-17A的第一结合特异性和对第二靶表位的第二结合特异性。例如,第二靶表位是不同于第一靶表位的IL-17A的另一表位。除了第一和第二靶表位之外,多特异性分子还可以包括第三结合特异性。

[0758] 在另一个实施方案中,本公开包括针对IL-17A特异性的单价、二价或多价的多特异性分子,优选单价。

[0759] 在本公开的另一个具体实施方案中,本公开的抗体是IL-17A特异性分子的单价或多价,例如二价、三价、四价、五价、六价。

[0760] 如本文所用,术语“单价分子”或“单价抗体”是指具有与靶分子上的单个表位(例如IL-17A)结合的单一抗原结合部分的抗体。

[0761] 术语“多价抗体”是指具有不止一个价(valency)的单个结合分子,其中“价”被描述为与相同靶分子上的表位结合的抗原结合部分的数目。这样,单个结合分子可以与不止一个靶分子结合,或者与一个靶分子(其包含多个拷贝的表位)上的不止一个结合位点结合。多价抗体的实例包括但不限于二价抗体、三价抗体、四价抗体、五价抗体等。如本文所用,术语“二价抗体”是指具有两个抗原结合部分的抗体,其中每个都与相同的表位结合。

[0762] 适当地,本公开的多特异性分子,例如,双特异性分子,和/或多价分子,例如,IL-17A特异性分子的单价,IL-17A特异性分子的二价,是选自本领域已知的任何合适的多特异性(例如双特异性)形式的抗体形式,包括但不限于基于以下的形式:单链双抗体(scDb)、串联scDb(Tandab)、线性二聚体scDb(LD-scDb)、环状二聚体scDb(CD-scDb)、双特异性T细胞接合子(BiTE;串联双-scFv)、串联三-scFv、三体(Fab-(scFv)₂)或双体(Fab-(scFv)₁)、Fab、Fab-Fv₂、Morrison(IgG-CH3-scFv融合体(Morrison L)或IgG-CL-scFv融合体(Morrison H))、三抗体、scDb-scFv、双特异性Fab₂、双微抗体、四抗体、scFv-Fc-scFv融合体、scFv-HSA-scFv融合体、双双抗体、DVD-Ig、COVD、IgG-scFab、scFab-dsscFv、Fv₂-Fc、IgG-scFv融合体例如bsAb(与轻链的C-末端连接的scFv)、Bs1Ab(与轻链的N-末端连接的scFv)、Bs2Ab(与重链的N-末端连接的scFv)、Bs3Ab(与重链的C-末端连接的scFv)、Ts1Ab(与重链和轻链的N-末端连接的scFv)、Ts2Ab(与重链的C-末端连接的dsscFv)、基于异二聚体Fc结构域的双特异性抗体例如Knob-into-Hole抗体(KiH)(通过KiH技术制备的双特异性IgG);与异二聚体Fc结构域或任何其他异二聚体结构域的任意一条链的N-和/或C-末端融合的Fv、scFv、scDb、串联双-scFv、串联三-scFv、Fab-(scFv)₂、Fab-(scFv)₁、Fab、Fab-Fv₂、COVD、MATCH(描述于WO 2016/0202457;Egan T. et al.,mAbs 9(2017)68-84)和Duobody(通过Duobody技术制备的双特异性IgG)(MAbs.2017Feb/Mar;9(2):182-212.doi:10.1080/19420862.2016.1268307)。特别适用于本文的是单链双抗体(scDb)或scDb-scFv。

[0763] 术语“双抗体”是指具有两个抗原结合位点的抗体片段,这些片段包含与同一条多肽链中的VL连接的VH(VH-VL)。通过使用接头,该接头太短以至于不允许同一条链上的两个结构域之间配对,这些结构域被迫与另一条链的互补结构域配对,以产生两个抗原结合位点。双抗体可以是二价或双特异性的。双抗体在例如EP404097、WO 93/01161、Hudson et al.,Nat.Med.9:129-134(2003)和Holliger et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:6444-6448(1993)中更充分地描述。三抗体和四抗体也描述于Hudson et al.,Nat.Med.9:129-134(2003)。术语“scDb-scFv”是指抗体形式,其中单链Fv(scFv)片段通过柔性Gly-Ser

接头与单链双抗体(scDb)融合。

[0764] 双特异性scDb,特别是双特异性单体scDb,特别地包含两个可变重链结构域(VH)或其片段和两个可变轻链结构域(VL)或其片段,它们通过接头L1、L2和L3以下顺序连接VHA-L1-VLB-L2-VHB-L3-VLA、VHA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VLA、VLA-L1-VLB-L2-VHB-L3-VHA、VLA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VHA、VHB-L1-VLA-L2-VHA-L3-VLB、VHB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VLB、VLB-L1-VLA-L2-VHA-L3-VHB或VLB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VHB,其中VLA和VHA结构域共同形成第一抗原的抗原结合位点,VLB和VHB共同形成第二抗原的抗原结合位点。

[0765] 接头L1特别是2-10个氨基酸,更特别是3-7个氨基酸,最特别是5个氨基酸的肽,并且接头L3特别是1-10个氨基酸,更特别是2-7个氨基酸,最特别是5个氨基酸的肽。中间接头L2特别是10-40个氨基酸,更特别地15-30个氨基酸,最特别地20-25个氨基酸的肽。

[0766] 在一个实施方案中,本公开的多特异性和/或多价分子为W02016/0202457;Egan T. et al.,mAbs 9(2017)68-84中描述的MATCH格。

[0767] 本公开的多特异性和/或多价分子可以使用本领域已知的任何方便的抗体制备方法来制备(关于双特异性构建体的生产,例如参见Fischer,N.&Leger,O.,Pathobiology 74(2007)3-14;关于双特异性双抗体和串联scFv的生产,例如参见Hornig,N.&Färber-Schwarz,A.,Methods Mol.Biol.907(2012)713-727和W099/57150)。用于制备本公开的双特异性构建体的合适方法的具体实例还包括Genmab技术(参见Labrijn et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.110(2013)5145-5150)和Merus技术(参见de Kruif et al.,Biotechnol.Bioeng.106(2010)741-750)技术。用于生产包含功能性抗体Fc部分的双特异性抗体的方法在本领域中也是已知的(参见,例如,Zhu et al.,Cancer Lett.86(1994)127-134);及Suresh et al.,Methods Enzymol.121(1986)210-228)。

[0768] 可以在本公开的多特异性和多价分子中使用的其他抗体是鼠、嵌合和人源化单克隆抗体。

[0769] 可以使用本领域已知的方法通过将成分结合特异性缀合来制备本公开的多特异性分子。例如,可以单独生成双特异性分子的每种结合特异性,然后将其彼此缀合。当结合特异性是蛋白质或肽时,可使用多种偶联剂或交联剂进行共价结合。交联剂的实例包括蛋白质A、碳二亚胺(carbodiimide)、N-琥珀酰亚胺基-5-乙酰基-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻苯二甲酰亚胺(oPDM)、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)和磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(磺基-SMCC)(参见例如,Karpovsky et al.,1984J.Exp.Med.160:1686;Liu,M A et al.,1985Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.82:8648)。其他方法包括Paulus,1985Behring Ins.Mitt.No.78,118-132;Brennan et al.,1985Science 229:81-83,和Glennie et al.,1987J.Immunol.139:2367-2375中描述的方法。缀合剂是SATA和磺基-SMCC,两者均可从Pierce Chemical有限公司(Rockford,111)获得。

[0770] 当结合特异性是抗体时,它们可以通过两条重链的C末端铰链区的巯基键缀合。在一个特别的实施方案中,在缀合之前,将铰链区修饰为包含奇数个巯基残基,例如一个。

[0771] 或者,可以在相同载体中编码两个或更多个结合特异性,并在相同宿主细胞中表达和装配。当双特异性分子是mAb X mAb、mAb X Fab、Fab X F(ab')₂或配体X Fab融合蛋白时,此方法是特别有用的。适当地,本公开的多特异性分子可以是包含一个单链抗体和结合

决定簇的单链分子,或者可以是包含两个结合决定簇的单链多特异性分子。多特异性分子可以包含至少两个单链分子。制备多特异性分子的方法描述于例如美国专利号5,260,203;美国专利号5,455,030;美国专利号4,881,175;美国专利号5,132,405;美国专利号5,091,513;美国专利号5,476,786;美国专利号5,013,653;美国专利号5,258,498;和美国专利号5,482,858中。

[0772] 多特异性分子与其特异性靶标的结合可以通过例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(REA)、FACS分析、生物测定(例如生长抑制)或蛋白质印迹测定来确认。这些测定中的每一种通常通过采用对目标复合物具有特异性的标记试剂(例如抗体)来检测特定目标蛋白质-抗体复合物的存在。本公开的核酸、载体、宿主细胞和生产方法

[0773] 另一方面,本公开提供了编码本公开的抗体或其片段或抗原结合片段的核酸。本公开还提供了编码与IL-17A蛋白特异性结合的CDR、VH、VL及其抗原结合片段的核酸序列。本公开还提供了编码与TNF α 蛋白特异性结合的CDR、VH、VL及其抗原结合片段的核酸序列。本公开还提供了编码与HSA蛋白特异性结合的CDR、VH、VL及其抗原结合片段的核酸序列。可以对此类核酸序列对于在哺乳动物细胞中表达进行优化。

[0774] 术语“核酸”在本文中术语“多核苷酸”互换使用,并且是指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。该术语涵盖含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或连接(linkage)的核酸,它们是合成的、天然存在的和非天然存在的,具有与参照核酸相似的结合特性,并且以类似于参照核苷酸的方式代谢。此类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、手性甲基磷酸酯、2-0-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)。除非另有说明,否则特定的核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如简并密码子取代)和互补序列,以及明确指出的序列。具体而言,如下所述,简并密码子取代可以通过生成这样的序列来实现,即在所述序列中,一个或多个选定(或全部)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷(deoxyinosine)残基取代(Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081,1991;Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608,1985;及Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98,1994)。

[0775] 本公开提供了基本上纯化的核酸分子,其编码包含上述多特异性抗体链的片段或结构域和/或上述IL-17A结合抗体链的片段或结构域的多肽。当从合适的表达载体表达时,由这些核酸分子编码的多肽能够表现出IL-17A和/或TNF α 和/或HSA抗原结合能力。

[0776] 本公开还提供了多核苷酸,其编码表1中列出的IL-17A结合抗体、表1中列出的TNF α 结合结构域、或表1中列出的HSA结合结构域的重链或轻链的至少一个CDR区和通常所有三个CDR区。其他一些多核苷酸编码表1中列出的IL-17A结合抗体、表1中列出的TNF α 结合结构域、或表1中列出的HSA结合结构域的重链和/或轻链的全部或基本全部可变区序列。由于密码子的简并性,多种核酸序列将编码所述免疫球蛋白氨基酸序列的每一个。

[0777] 多核苷酸序列可以从头通过固相DNA合成或通过PCR诱变编码表1中列出的IL-17A结合抗体、表1中列出的TNF α 结合结构域或表1中列出的HSA结合结构域的现有序列(例如,以下实施例中描述的序列)来产生。核酸的直接化学合成可以通过本领域已知的方法来完成,例如Narang et al., 1979, *Meth. Enzymol.* 68:90的磷酸三酯法;Brown et al., *Meth. Enzymol.* 68:109,1979的磷酸二酯法;Beaucage et al., *Tetra. Lett.*, 22:1859,1981的二乙基亚磷酰胺法;和美国专利号4,458,066的固体支撑法。通过PCR将突变引入多核苷

酸序列中可以通过例如如下文献中描述的方法来进行:PCR Technology:Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, N.Y., 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, Calif, 1990; Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; 及 Eckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991。

[0778] 本公开还提供了用于产生本公开抗体的表达载体和宿主细胞。

[0779] 术语“载体”旨在指能够转运已与其连接的另一种多核苷酸的多核苷酸分子。载体的一种类型是“质粒”,其是指环状双链DNA环,其中可以连接其他DNA区段。载体的另一种类型是病毒载体,其中可以将其他DNA区段连接到病毒基因组中。某些载体能够在它们导入的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和游离体(episomal)哺乳动物载体)。在导入宿主细胞后,其他载体(例如非游离型哺乳动物载体)可以被整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。

[0780] 此外,某些载体能够指导与其可操作地连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。通常,在重组DNA技术中有用的表达载体通常是质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可以互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,本公开意图包括具有等同功能的此类其他形式的表达载体,例如病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0781] 术语“可操作地连接”是指两个或更多个多核苷酸(例如,DNA)片段之间的功能关系。通常,它是指转录调节序列与转录序列的功能关系。例如,如果在合适的宿主细胞或其他表达系统中,启动子或增强子序列刺激或调节编码序列的转录,则它与该编码序列可操作地连接。通常,与转录序列可操作地连接的启动子转录调控序列与转录序列在物理上是连续的,即,它们是顺式的。但是,某些转录调控序列,例如增强子,不必在物理上连续或位于其增强转录的编码序列的附近。

[0782] 可以使用多种表达载体来表达编码本公开的抗体的多核苷酸。基于病毒的表达载体和非病毒表达载体均可用于在哺乳动物宿主细胞中生产抗体。非病毒载体和系统包括质粒、游离体载体(通常具有用于表达蛋白质或RNA的表达盒)和人工染色体(参见例如 Harrington et al., Nat Genet. 15:345, 1997)。例如,可用于在哺乳动物(例如人)细胞中表达本公开的多特异性抗体或其结构域(包括IL-17A结合多核苷酸和多肽)的非病毒载体包括pThioHis A、B和C、pcDNA3.1/His、pEBVHis A、B和C(Invitrogen, San Diego, Calif.)、MPS V载体和本领域已知的用于表达其他蛋白质的许多其他载体。有用的病毒载体包括基于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒的载体,基于SV40、乳头瘤病毒、HBP爱泼斯坦巴尔病毒(HBP Epstein Barr virus)、牛痘病毒载体和塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus, SFV)的载体。参见Brent et al., supra; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49: 807, 1995; 及Rosenfeld et al., Cell 68:143, 1992。

[0783] 表达载体的选择取决于要在其中表达所述载体的预期宿主细胞。通常,表达载体包含启动子和其他调控序列(例如,增强子),其与编码本公开的多特异性抗体或其结构域(包括IL-17A结合抗体)的多核苷酸可操作地连接。在一个实施方案中,采用诱导型启动子来防止插入序列在非诱导条件下的表达。诱导型启动子包括例如阿拉伯糖、lacZ、金属硫蛋白启动子或热激启动子。转化生物体的培养物可以在非诱导条件下扩增,而不会使群体偏

向于表达产物被宿主细胞更好地耐受的编码序列。除启动子外,有效表达本公开的抗体或其片段(包括IL-17A结合抗体)还可能需要或期望其他调控元件。这些元件通常包括ATG起始密码子和相邻的核糖体结合位点或其他序列。另外,可以通过包含适合使用中的细胞系统的增强子来增强表达的效率(参见,例如,Scharf et al.,*Results Probl.Cell Differ.* 20:125,1994;及Bittner et al.,*Meth.Enzymol.*, 153:516,1987)。例如,可以使用SV40增强子或CMV增强子来增加在哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0784] 表达载体还可以提供分泌信号序列位置,从而与由插入的多特异性抗体编码序列(包括IL-17A结合抗体编码序列)编码的多肽形成融合蛋白。更常见的是,插入的抗体序列,例如多特异性抗体编码序列或IL-17A结合抗体编码序列,在包含在载体中之前与信号序列连接。用于接收编码多特异性抗体的,或其片段或结构域的,包括IL-17A结合抗体的轻链和重链可变结构域的序列的载体,有时也编码恒定区或其部分。这种载体允许可变区表达为与恒定区的融合蛋白,从而导致产生完整的抗体。通常,这样的恒定区是人的。

[0785] 术语“重组宿主细胞”(或简称为“宿主细胞”)是指已将重组表达载体引入其中的细胞。应当理解,这些术语不仅旨在指特定的对象细胞,而且还指该细胞的后代。因为由于突变或环境影响,在后代中可能发生某些修饰,所以此类后代实际上可能与亲本细胞不同,但仍包括在本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0786] 用于包含和表达多特异性抗体的,或其片段或结构域的,包括IL-17A结合抗体的链的宿主细胞,可以是原核的或真核的。大肠杆菌是一种可用于克隆和表达本公开的多核苷酸的原核宿主。其他适用的微生物宿主包括杆菌,例如枯草芽孢杆菌,以及其他肠杆菌科,例如沙门氏菌、沙雷氏菌和各种假单胞菌。在这些原核宿主中,还可以制备表达载体,其通常包含与宿主细胞相容的表达控制序列(例如,复制起点)。另外,将存在任意数量的多种众所周知的启动子,例如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或噬菌体 λ 的启动子系统。启动子通常控制表达(任选地与操纵子序列一起),并具有核糖体结合位点序列等,用于启动和完成转录和翻译。还可以使用其他微生物,例如酵母,来表达本公开的包括IL-17A结合抗体的多特异性抗体的链,或其片段或结构域的链。还可以将昆虫细胞与杆状病毒载体结合使用。

[0787] 在一个实施方案中,使用哺乳动物宿主细胞来表达并产生本公开的多特异性抗体的,或其片段或结构域的,包括IL-17A结合抗体的链。例如,它们可以是表达内源性免疫球蛋白基因的杂交瘤细胞系,也可以是具有外源性表达载体的哺乳动物细胞系。这些包括任何正常的终将死亡的(mortal)或者正常或异常的永生的动物或人类细胞。例如,已经开发了许多能够分泌完整免疫球蛋白的合适宿主细胞系,包括CHO细胞系、各种Cos细胞系、HeLa细胞、骨髓瘤细胞系、转化的B细胞和杂交瘤。哺乳动物组织细胞培养物表达多肽的用途在Winnacker, *FROM GENES TO CLONES*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987中大体地描述。用于哺乳动物宿主细胞的表达载体可以包括表达控制序列,例如复制起点、启动子和增强子(参见,例如,Queen et al., *Immunol.Rev.* 89:49-68,1986),和必要的加工信息位点,例如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。这些表达载体通常含有来源于哺乳动物基因或哺乳动物病毒的启动子。合适的启动子可以是组成型、细胞类型特异性、阶段特异性和/或可调节的或可调控的。有用的启动子包括但不限于金属硫蛋白启动子、组成型腺病毒主要晚期启动子、地塞米松诱导型MMTV启动子、SV40启动子、MRP polIII

启动子、组成型MPS V启动子、四环素诱导型CMV启动子(例如人立即早期CMV启动子)、组成型CMV启动子和本领域已知的启动子-增强子组合。

[0788] 引入包含目的多核苷酸序列的表达载体的方法取决于细胞宿主的类型。例如,氯化钙转染通常用于原核细胞,而磷酸钙处理或电穿孔可用于其他细胞宿主(大体上参见 Sambrook et al.,同上)。其他方法包括,例如电穿孔、磷酸钙处理、脂质体介导的转化、注射和显微注射、弹道法(ballistic method)、病毒体、免疫脂质体、聚阳离子:核酸缀合物、裸DNA、人工病毒体、与疱疹病毒结构蛋白VP22的融合体(Elliot和O'Hare,Cell 88:223,1997)、试剂增强的DNA吸收和离体转导。为了长期、高产量地生产重组蛋白,通常需要稳定的表达。例如,可以使用本公开的表达载体来制备稳定表达多特异性抗体的,或其片段或结构域的,包括IL-17A结合抗体的多肽的细胞系,该载体含有病毒复制原点或内源性表达元件和可选择标记基因。引入载体后,可以使细胞在丰富的培养基中生长1-2天,然后将其转换为选择性培养基。可选择标记的目的是赋予对选择的抗性,并且其存在允许成功表达引入序列的细胞在选择培养基中生长。有抗性的、稳定转染的细胞可以使用适合细胞类型的组织培养技术使增殖。因此,本公开提供了一种生产本公开的抗体的方法,其中所述方法包括以下步骤:培养包含编码本公开抗体的核酸或载体的宿主细胞,由此表达本公开的所述抗体或其片段。

[0789] 本公开的药物组合物

[0790] 另一方面,本公开涉及一种药物组合物,其包括本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包括本公开的抗IL-17A抗体的另一种多特异性分子,以及药学上可接受的载体。药学上可接受的载体增强或稳定组合物,或促进组合物的制备。药学上可接受的载体包括生理上相容的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。

[0791] 本公开的药物组合物可以通过本领域已知的多种方法来施用。施用途径和/或方式取决于所需结果。施用可以是静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下施用,或在靶部位附近施用。药学上可接受的载体应适合于静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮施用(例如通过注射或输注)。取决于施用途径,活性化合物即抗体和多特异性分子可以用一种材料包被,以保护该化合物免受酸和可能使该化合物失活的其他自然条件的影响。

[0792] 本公开的药物组合物可以根据本领域众所周知的和常规实践的方法制备。参见,例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Mack Publishing Co.,20th ed.,2000;及Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems,J.R.Robinson,ed.,Marcel Dekker,Inc.,New York,1978。药物组合物优选在GMP条件下制造。通常,在本公开的药物组合物中采用治疗有效剂量或有效剂量的本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包括本公开的抗IL-17A抗体的另一多特异性分子。本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包括本公开的抗IL-17A抗体的另一多特异性分子,通过本领域技术人员已知的常规方法配制成药学上可接受的剂型。调整剂量方案以提供最佳的所需反应(例如治疗性反应)。例如,可以施用单次推注,可以随时间施用数个分开的剂量,或者可以根据治疗情况的紧急程度按比例减少或增加剂量。以配制易于施用和剂量均匀的剂量单位形式的肠胃外组合物是特别有利的。本文所用的剂量单位形式是指适合作为待治疗受试者的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位包含经计算可与所需的药物载体一起产生所需的治疗效果的预定量的活性化合物。

[0793] 可以改变本公开的药物组合物中活性成分的实际剂量水平,以便获得活性成分的量,所述活性成分的量可以针对特定患者、组合物和施用方式有效地实现所需治疗反应,而对病人无毒。所选择的剂量水平取决于多种药代动力学因素,包括所使用的本公开的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性、施用途径、施用时间、所使用的特定化合物的排泄速率、治疗的持续时间、与所使用的特定组合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料、所治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、一般健康状况和既往病史等因素。

[0794] 抗体通常被多次施用。单剂之间的间隔可以是每周、每月或每年。间隔也可以是不规则的,如通过测量患者中抗体的血液水平所指示的。或者,抗体可以作为缓释制剂施用,在这种情况下,需要较少的频繁施用。剂量和频率取决于抗体在患者中的半衰期。通常,人源化抗体的半衰期比嵌合抗体和非人抗体的半衰期更长。施用的剂量和频率可以根据治疗是预防性的还是治疗性的而变化。在预防性应用中,在很长一段时间内以相对不频繁的间隔施用相对较低的剂量。一些患者终生持续接受治疗。在治疗应用中,有时需要以相对较短的间隔施用相对较高的剂量,直到疾病的进展减少或终止,并且优选直到患者显示出疾病症状的部分或完全缓解。此后,可以对患者施用预防方案。

[0795] 本公开的用途和方法

[0796] 本公开的抗体具有体外和体内诊断和治疗用途。例如,可以将这些分子施用于培养的(例如体外或体内)或受试者(例如体内)的细胞中,以治疗、预防或诊断多种疾病。

[0797] 术语“受试者”包括人类和非人类动物。非人类动物包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人类灵长类动物、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。除非另有说明,否则术语“患者”或“受试者”在本文中可互换使用。

[0798] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”、“治疗(treat)”、“治疗(treated)”等是指获得期望的药理和/或生理效果。就部分或完全治愈疾病和/或归因于该疾病的不良影响或延迟疾病进展而言,该作用可能是治疗性的。如本文所用,“治疗”涵盖在哺乳动物例如在人类中对疾病的任何治疗,并且包括:(a)抑制疾病,例如阻止其发展;和(b)减轻疾病,例如使疾病消退。

[0799] 术语“预防”是指完全抑制疾病的发展或疾病的任何继发作用。如本文所用,术语“预防”包括预防疾病或病况发生在可能易患该疾病但尚未被诊断为患有该疾病的个体中。

[0800] 术语“治疗有效量”或“有效量”是指当施用于哺乳动物或其他受试者以治疗疾病时足以引起对疾病的这种治疗的剂的量。“治疗有效量”将根据剂、疾病及其严重程度以及被治疗受试者的年龄、体重等而变化。

[0801] 一方面,本公开涉及本公开的抗体、本公开的多特异性分子、或本公开的药物组合物,用作药物。

[0802] 一方面,本公开的多特异性抗体或本公开的药物组合物特别适合用于治疗、预防或诊断,特别是治疗,由IL-17A和/或介导TNF α 的病征或可通过抑制Gro- α 分泌来治疗的病征。

[0803] 另一方面,本公开的IL-17A结合抗体或本公开的药物组合物特别适合用于治疗、预防或诊断,特别是治疗,由IL-17A介导的病征或可通过抑制GRO- α 分泌来治疗的病征。

[0804] 在本公开中,术语“由IL-17A介导的疾病”包括IL-17A在疾病或医疗病况中直接或间接发挥作用的所有疾病和医疗病况,包括疾病或病况的致病、发展、进展、持续或病理。因

此,术语“由IL-17A介导的疾病”包括与异常IL-17A水平相关或以异常IL-17A水平为特征的病况,和/或可通过减少或抑制靶细胞或组织中IL-17A诱导的活性(例如,IL-6或GRO- α 的产生)来治疗的疾病或病况。在本公开中,术语“由TNF α 介导的疾病”包括TNF α 在疾病或医疗病况中直接或间接发挥作用的所有疾病和医疗病况,包括疾病或病况的致病、发展、进展、持续或病理。因此,术语“由TNF α 介导的疾病”包括与异常TNF α 水平相关或以异常TNF α 水平为特征的病况,和/或可通过减少或抑制靶细胞或组织中TNF α 诱导的活性(例如,Gro- α 的产生)来治疗的疾病或病况。由IL-17A和/或TNF α 介导的病症包括炎症性病况和自身免疫性疾病,如关节炎、类风湿关节炎或银屑病。这些疾病还包括过敏和过敏性病况、超敏反应、慢性阻塞性肺病、囊性纤维化和器官或组织移植排斥。例如,本公开的抗体可用于治疗心、肺、心肺联合、肝、肾、胰腺、皮肤或角膜移植的接受者,包括同种异体移植排斥或异种移植排斥,以及预防移植抗宿主疾病,如骨髓移植后,和器官移植相关的动脉硬化。

[0805] 在一个实施方案中,本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包含本公开的抗IL-17A抗体的另一种多特异性分子、或本公开的药物组合物特别适用于治疗、预防或诊断,特别是治疗,炎症病况或自身免疫疾病。

[0806] 本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包含本公开的抗IL-17A抗体的另一种多特异性分子、或本公开的药物组合物适用于治疗、预防或改善自身免疫性疾病和炎症性病况,特别是病因包括自身免疫成分的炎症性病况,如关节炎(例如类风湿性关节炎、慢性关节炎和畸形关节炎)和风湿病,包括涉及骨质流失的炎症性病况和风湿病、炎性疼痛、脊柱关节病包括强直性脊柱炎、Reiter综合征、反应性关节炎、银屑病关节炎、青少年特发性关节炎和肠病性关节炎、关节炎、超敏症(包括呼吸道超敏症和皮肤超敏症)和过敏。

[0807] 可以采用本公开的抗体的具体自身免疫性疾病包括自身免疫性血液病(包括如溶血性贫血、再生障碍性贫血、纯红细胞贫血和特发性血小板减少症)、系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、炎症性肌肉疾病(皮肌炎)、牙周炎、多软骨炎、硬皮病、韦格纳肉芽肿、皮肌炎、慢性活动性肝炎、重症肌无力、银屑病、Steven-Johnson综合征、特发性麸皮病、自身免疫性炎症性肠病(包括如溃疡性结肠炎、克罗恩病和肠易激综合征)、内分泌性眼病、格雷夫斯病、肉瘤病、多发性硬化症、系统性硬化症、纤维化疾病、原发性胆汁性肝硬化、青少年糖尿病(I型糖尿病,1型糖尿病)、葡萄膜炎、角膜结膜炎和春季角膜结膜炎、肺间质纤维化、假体周围骨溶解、肾小球肾炎(包括或不包括肾病综合征,如包括特发性肾病综合征或最小变化的肾病)、多发性骨髓瘤其他类型的肿瘤、皮肤和角膜炎症、肌炎、骨植入物松动、代谢紊乱(如肥胖、动脉粥样硬化和其他心血管疾病,包括扩张型心肌病、心肌炎、II型糖尿病和血脂异常)和自身免疫性甲状腺疾病(包括桥本甲状腺炎)、中小血管原发性脉管炎、大血管脉管病包括巨细胞动脉炎、化脓性皮炎、视神经炎、Sjogren综合征、白塞氏病、特应性和接触性皮炎、支气管炎、炎症性肌肉疾病、自身免疫性周围神经病、免疫性肾脏、肝脏和甲状腺疾病、炎症和动脉血栓形成、自体炎症发热综合征、免疫血液病以及皮肤和粘膜的牛痘疾病。在解剖学上,葡萄膜炎可以是前部、中部、后部或泛葡萄膜炎。它可以是慢性或急性的。葡萄膜炎的病因可以是自身免疫性或非感染性的,也可以是感染性的,与系统性疾病相关的,或者是白点综合征。

[0808] 在一个具体的实施方案中,本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包含本公开的抗IL-17A抗体的另一种多特异性分子、或本公开的药物组合物适用于治疗多发

性硬化症、牛皮癣、哮喘、系统性红斑狼疮 (SLE) 和狼疮性肾炎。在另一个具体的实施方案中,本公开的抗体适合用于治疗糖尿病,特别是I型或II型糖尿病。

[0809] 术语“由IL-17A和/或TNF α 介导的疾病”也包括炎症相关的癌症。在一个具体实施方案中,本公开的抗体适用于治疗癌症,特别是IL-17A-和/或TNF α -介导的癌症。在一个具体实施方案中,本公开的抗体适用于治疗炎症相关癌症。

[0810] 术语“癌症”是指以异常细胞的快速且不受控制的生长为特征的疾病。癌细胞可以局部扩散,也可以通过血液和淋巴系统扩散到身体的其他部位。本文描述了多种癌症的实例,其包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等。术语“肿瘤”和“癌症”在本文可互换使用,例如,两个术语均涵盖实体和液体(例如扩散或循环的)肿瘤。如本文所用,术语“癌”或“肿瘤”包括恶变前以及恶性癌症和肿瘤。

[0811] 炎症相关癌症的非限制性实例包括胃癌、结直肠癌、非小细胞肺癌、肝细胞癌和腺癌(Wu et al., 2014 *Tumour Biol.* 35 (6) :5347-56; Wu et al., 2012 *PLoS One* 7 (12) ; Zhang et al. 2012 *Asian Pac J Cancer Prev* 13 (8) :3955-60; Liu et al., 2011 *Biochem Biophys Res Commun.* 407 (2) :348-54)。

[0812] 本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包含本公开的抗IL-17A抗体的另一多特异性分子也适用于某些癌症的诊断和/或预后,如炎症相关的癌症,例如胃癌、结直肠癌、非小细胞肺癌、肝细胞癌和腺癌。例如,IL-17A与非小细胞肺癌(Chen et al., 2010 *Lung Cancer* 69 (3) :348-54)、结直肠癌和肝细胞癌(Punt et al., 2015 *Oncoimmunology*, 4 (2) :e984547) 患者的预后和生存率低有关。

[0813] 因此,在特定实施方案中,本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体或包含本公开的抗IL-17A抗体的另一种多特异性分子适用于治疗癌症、关节炎、类风湿关节炎、骨关节炎、反应性关节炎、银屑病、慢性阻塞性肺疾病、系统性红斑狼疮 (SLE)、狼疮肾炎、自身免疫性炎症性肠病、哮喘、多发性硬化症、或囊性纤维化、骨质损失、气道超敏反应、脱髓鞘病症、皮肤超敏反应、急性移植排斥、同种异体移植排斥、移植物对抗宿主病、系统性硬化症、泌尿外炎症病症、心血管疾病、血管炎、周期性发烧、葡萄糖新陈代谢障碍、肺病、牙周炎 (peridontitis)、肝脏基质角膜炎、过敏、炎症疼痛、脊椎关节病变、败血症、败血性或内毒素休克、脑膜炎、外科创伤、自身免疫血液病症、阿尔茨海默氏病、结节病、肝硬化、肝炎、肾小球肾炎或血脂紊乱 (dislipidemia)。

[0814] 一方面,本公开涉及本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包含本公开的抗IL-17A抗体的另一种多特异性分子、或本公开的药物组合物在制备药物中的用途。

[0815] 另一方面,本公开涉及本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包含本公开的抗IL-17A抗体的另一种多特异性分子、或本公开的药物组合物在制备用于治疗、预防或诊断,特别是治疗,由IL-17A和/或TNF α 介导的病症或可以通过抑制GRO- α 分泌来治疗的病症的药物中的用途。在一个实施方案中,本公开涉及本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包含本公开的抗IL-17A抗体的另一种多特异性分子、或本公开的药物组合物在制备用于治疗、预防或诊断,特别是治疗,炎症病况或自身免疫疾病的药物中的用途。在另一个实施方案中,本公开涉及本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包含本公开的抗IL-17A抗体的另一种多特异性分子、或本公开的药物组合物在制备用于治

疗、预防或诊断,特别是治疗,多发性硬化症、银屑病、哮喘、系统性红斑狼疮(SLE)和狼疮肾炎的药物中的用途。在另一个实施方案中,本公开涉及本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包含本公开的抗IL-17A抗体的另一种多特异性分子、或本公开的药物组合物在制备用于治疗、预防或诊断,特别是治疗,糖尿病,特别是I型或II型糖尿病的药物中的用途。在另一个实施方案中,本公开涉及本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包含本公开的抗IL-17A抗体的另一种多特异性分子、或本公开的药物组合物在制备用于治疗、预防或诊断,特别是治疗,癌症,特别是IL-17A和/或TNF α 介导的癌症,特别是炎症关联的癌症的药物中的用途。

[0816] 另一方面,本公开涉及用于治疗需要治疗的受试者的方法,其特征不在于,向受试者施用治疗有效量的本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包含本公开的抗IL-17A抗体的另一种多特异性分子、或本公开的药物组合物。

[0817] 另一方面,本公开涉及一种治疗由IL-17A和/或TNF α 介导的病症的方法,所述方法包括施用有效量的本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包含本公开的抗IL-17A抗体的另一种多特异性分子、或本公开的药物组合物,从而减轻病况。在一个实施方案中,本公开涉及一种治疗炎性病况或自身免疫疾病的方法,所述方法包括施用有效量的本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包含本公开的抗IL-17A抗体的另一种多特异性分子、或本公开的药物组合物,从而减轻病况。在另一个实施方案中,本公开涉及治疗多发性硬化症、牛皮癣、哮喘、系统性红斑狼疮(SLE)和狼疮性肾炎的方法,所述方法包括施用有效量的本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包含本公开的抗IL-17A抗体的另一种多特异性分子、或本公开的药物组合物,从而减轻病况。在进一步的实施方案中,本公开涉及一种治疗糖尿病的方法,特别是糖尿病型I或II型,所述方法包括施用有效量的本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包含本公开的抗IL-17A抗体的另一种多特异性分子、或本公开的药物组合物,从而减轻病况。在进一步的实施方案中,本公开涉及一种治疗癌症,特别是IL-17A和/或TNF α 介导的癌症,特别是炎症相关的癌症的方法,所述方法包括施用有效量的本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包含本公开的抗IL-17A抗体的另一种多特异性分子、或本公开的药物组合物,从而减轻病况。

[0818] 本公开还包括试剂盒,其包括本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包含本公开的抗IL-17A抗体的另一种多特异性分子、或本公开的药物组合物。试剂盒可以包括一个或多个其他元件,包括:使用说明;其他试剂,例如标记,治疗剂或可用于使抗体与标记或治疗剂螯合或以其他方式偶联的试剂,或放射防护组合物;用于制备用于施用的抗体分子的装置或其他材料;药学上可接受的载体;以及用于向受试者施用的装置或其他材料。在一个具体实施方案中,试剂盒包括药学上有效量的本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包含本公开的抗IL-17A抗体的另一多特异性分子。在另一个实施方案中,试剂盒包括冻干形式的药学有效量的本公开的多特异性抗体、本公开的抗IL-17A抗体、或包含本公开的抗IL-17A抗体的另一多特异性分子,和稀释剂,以及任选的使用说明。所述试剂盒还可以包括用于重构的过滤针和用于注射的针。

[0819] 表1序列表

[0820]

SEQ ID NO:	描述	序列
Anti-IL-17A 抗体 27-07-G02		
1	HCDR1 (H27-H42; AHo 编号)	GFSFSSDYWMC
2	HCDR2 (H57-H76; AHo 编号)	CIYAGDVDDTDYASWARG
3	HCDR3 (H108-H138; AHo 编号)	RVDGFDITYFDL
4	HCDR1 (Kabat)	SDYWMC
5	HCDR2 (Kabat)	CIYAGDVDDTDYASWARG

[0821]

6	HCDR3 (Kabat)	VDGFDITYFDL
7	HCDR1 (Chothia)	GFSFSSDY
8	HCDR2 (Chothia)	AGDVD
9	HCDR3 (Chothia)	DGFDITYFD
10	VH (VH3; CDR-移植物;来自 A1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSDYWMCWV RQAPGKGLEWIGCIYAGDVDDTDYASWARGRFTISRDN SKNTVYVYLMNSLRAEDTAVYYCARVDGFDITYFDLWG QGTLVTVSS
11	VH (VH3; STR-移植物;来自 A2) 突变 (AHo): Q14K; G16E; G56A	EVQLVESGGGLVKPEGSLRLSCAASGFSFSSDYWMCWV RQAPGKGLEWIACIYAGDVDDTDYASWARGRFTISRDN SKNTVYVYLMNSLRAEDTAVYYCARVDGFDITYFDLWG QGTLVTVSS
12	LCDR1 (L24-L42; AHo 编号)	QASQTINYWLA
13	LCDR2 (L58-L72; AHo 编号)	RASTLAS
14	LCDR3 (L107-L138; AHo 编号)	QNYYYSTSRSYG
15	LCDR1 (Kabat)	QASQTINYWLA
16	LCDR2 (Kabat)	RASTLAS
17	LCDR3 (Kabat)	QNYYYSTSRSYG
18	LCDR1 (Chothia)	SQTINYW
19	LCDR2 (Chothia)	RAS
20	LCDR3 (Chothia)	YYYSTSRSY
21	VL (Vk1-sk12; CDR-移植物;来自 A1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCASQTINYWLAWYQQ KPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISL QPEDFATYYCQNYYYSTSRSYGFGGGTKLTVLG
22	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCASQTINYWLAWYQQ

[0822]

	(Vk1-sk12; STR-移植物; 来自 A2) 突变 (AHo): A51P	KPGKPPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQNYYYSTSRSYGFGGGTKLTVLG
23	接头	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
24	A1 (scFv; VL-接头-VH)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQTINYWLAWYQQ KPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQNYYYSTSRSYGFGGGTKLTVLGGGGGS GGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFSFSSDYWMCWVRQAPGKGLEWIGCIYAGDVDDT DYASWARGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVYYC ARVDGFDITYFDLWGQGLTVTVSS
25	A2 (scFv; VL-接头-VH)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQTINYWLAWYQQ KPGKPPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQNYYYSTSRSYGFGGGTKLTVLGGGGGSG GGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPEGSLRLSCAA SGFSFSSDYWMCWVRQAPGKLEWIAICYAGDVDDTD YASWARGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCA RVDGFDITYFDLWGQGLTVTVSS
基于 Vλ 种系的 FR4		
26	基于 Vλ 种系的 FR4, Sk17	FGTGTKVTVLG
27	基于 Vλ 种系的 FR4, Sk12	FGGGTKLTVLG
28	基于 Vλ 种系的 FR4	FGGGTQLIILG
29	基于 Vλ 种系的 FR4	FGEGTELTVLG
30	基于 Vλ 种系的 FR4	FGSGTKVTVLG
31	基于 Vλ 种系的 FR4	FGGGTQLTVLG
32	基于 Vλ 种系的 FR4	FGGGTQLTALG
IL-17 家族		
33	IL-17A	MTPGKTSLSVLLLLLSLEAIVKAGIAIPQNPGPCPNSEDKN

[0823]

	UniProt ID NO: Q16552	FPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSDYYNRSTSPWNLHR NEDPERYPSVIWEAKCRHLGCVNADGKVDYHMNSVPI QQEILVLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVS
34	IL-17B UniProt ID NO: Q9UHF5	MDWPHNLLFLTISIFLGLGQPRSPKSKRKGQGRPGPLA PGPHQVPLDLVSRMKPYARMEEYERNIEEMVAQLRNSS ELAQRKCEVNLQLWMSNKRSLSPWGYSINHDPSPRPVD LPEARCLCLGCVNPFTMQEDRSMVSVPVFSQVPVRRRL CPPPRTGPCRQRAVMETIAVGCTCIF
35	IL-17C UniProt ID NO: Q9P0M4	MTLLPGLLFTWLHTCLAHHDPSLRGHPHSHGTPHCYS AEELPLGQAPPHELLARGAKWGQALPVALVSSLEAASHR GRHERPSATTQCPVLRPEEVLEADTHQRSISPWRYRVDT DEDRYPQKLAFAECLCRGCIDARTGRETAALNSVRLLOS LLVLRRRRPCSRDGSGLPTPGAFAFHTEFIHVPVGCTCVLP RSV
36	IL-17D UniProt ID NO: Q8TAD2	MLVAGFLALPPSWAAGAPRAGRPARPRGCADRPEEL LEQLYGRLAAGVLSAFHHTLQLGPREQARNASCPAGGR PADRRFRPPTNLRVSPWAYRISYDPARYPRYLPEAYCLC RGCLTGLFGEDVRFRSAPVYMPTVVLRRTPACAGGRS VYTEAYVTIPVGCTCVPEPEKDADSINSSIDKQGAKLLL GPNDAPAGP
37	IL-17E UniProt ID NO: Q9H293	MRERPRLGEDSSLISLFLQVVAFLAMVMGHTHTYSHWPS CCPSKGQDTSEELLRWSTVPVPPLEPARPNRHPESCRAS EDGPLNSRAISPWRYELDRDLNRLPQDLYHARCLCPHC VSLQTGSHMDPRGNSELLYHNQTVFYRRPCHGEKGTKH GYCLERRLYRVSACVCVRPRVMG
38	IL-17F UniProt ID NO: Q96PD4	MTVKTLHGPMVKYLLLSILGLAFLSEAAARKIPKVGH TFFQKPESCPPVPGGSMKLDIGIINENQRVSMRNIESRST SPWNYTVTWDPNRYPSEVVQAQCRNLGCINAQGGKEDIS

[0824]

		MNSVPIQQETLVVRRKHQGCVSFQLEKVLVTVGCTCV TPVIHHVQ
Anti-IL17A 抗体 27-31-C04		
39	HCDR1 (H27-H42; AHo 编号)	GFSFSGFYMC
40	HCDR2 (H57-H76; AHo 编号)	CIDTGDGTTYASWAKG
41	HCDR3 (H108-H138; AHo 编号)	RDAAYGGYAYPAHGMDL
42	HCDR1 (Kabat)	GFYYMC
43	HCDR2 (Kabat)	CIDTGDGTTYASWAKG
44	HCDR3 (Kabat)	DAAYGGYAYPAHGMDL
45	HCDR1 (Chothia)	GFSFSGFY
46	HCDR2 (Chothia)	TGDG
47	HCDR3 (Chothia)	AAAYGGYAYPAHGMD
48	VH (VH3; CDR- 移植物; 来自 PRO571)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSFSGFYMCWV RQAPGKGLEWIGCIDTGDG TTYASWAKGRFTISRDN SKNTVYLYQMNSLR AEDTAVYYCARDAA YGGYAYPAHGMDL WGWGQGT LTVSS
49	VH (VH3; STR- 移植物; 来自 PRO592) 突变 (AHo): R20T; Q141P	EVQLVESGGGLVQPGGSL TLSCAASGFSFSGFYMCWV RQAPGKGLEWIGCIDTGD GTTYASWAKGRFTISRDN SKNTVYLYQMNSLR AEDTAVYYCARDAA YGGYAYPAHGMDL WGWPGT LTVSS
50	LCDR1 (L24-L42; AHo 编号)	QASESIYRYLS
51	LCDR2 (L58-L72; AHo 编号)	LASTLS
52	LCDR3	QSNFGTASTTYNT

[0825]

	(L107-L138; AHo 编号)	
53	LCDR1 (Kabat)	QASESIYRYLS
54	LCDR2 (Kabat)	LASTLTS
55	LCDR3 (Kabat)	QSNFGTASTTYNT
56	LCDR1 (Chothia)	SESIYRY
57	LCDR2 (Chothia)	LAS
58	LCDR3 (Chothia)	NFGTASTTYN
59	VL (Vk1-sk12; CDR-移植物; 来自 PRO571)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASESIYRYLSWYQQK PGKAPKLLIYLASTLTSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQP EDFATYYCQSNFGTASTTYNTFGGGTKLTVLG
60	VL (Vk1-sk12; STR-移植物; 来自 PRO592)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASESIYRYLSWYQQK PGKAPKLLIYLASTLTSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQP EDFATYYCQSNFGTASTTYNTFGGGTKLTVLG
61	PRO571 (scFv; VL-接头-VH)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASESIYRYLSWYQQK PGKAPKLLIYLASTLTSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQP EDFATYYCQSNFGTASTTYNTFGGGTKLTVLGGGGGS GGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFSFSGFYMCWVRQAPGKGLEWIGCIDTGDGTTY ASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DAAYGGYAYPAHGMDLWGQGLTVTVSS
62	PRO592 (scFv; VL-接头-VH)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASESIYRYLSWYQQK PGKAPKLLIYLASTLTSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQP EDFATYYCQSNFGTASTTYNTFGGGTKLTVLGGGGGS GGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFSFSGFYMCWVRQAPGKGLEWIGCIDTGDGTTY ASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DAAYGGYAYPAHGMDLWGPGLTVTVSS
Anti-TNFα 结构域(16-19-B11-sc06)		

[0826]

63	HCDR1 (H27-H42; AHo 编号)	GIDFSTYGIS
64	HCDR2 (H57-H76; AHo 编号)	YIYPDYGITDYASWVNG
65	HCDR3 (H108-H138; AHo 编号)	RSGSYYSRGGWAHYFNL
66	HCDR1 (Kabat)	TYGIS
67	HCDR2 (Kabat)	YIYPDYGITDYASWVNG
68	HCDR3 (Kabat)	SGSYYSRGGWAHYFNL
69	HCDR1 (Chothia)	GIDFSTY
70	HCDR2 (Chothia)	PDYG
71	HCDR3 (Chothia)	GSYYSRGGWAHYFN
72	VH16-19-B11-sc06 (VH3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSTYGISWVRQ APGKGLEWIAIYIPDYGITDYASWVNGRFTISLDNAQNT VYLQMNSLRAEDTAVYYCARSYYSRGGWAHYFNL WGQGLVTVSS
73	VH16-19-B11-sc01 (VH3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSTYGISWVRQ APGKGLEWIGIYIPDYGITDYASWVNGRFTISRDNKNT VYLQMNSLRAEDTAVYYCARSYYSRGGWAHYFNL WGQGLVTVSS
74	VH16-19-B11-sc02 (VH3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKASGIDFSTYGISWVRQ APGKGLEWIAIYIPDYGITDYASWVNGRFTISLDNSKNT

[0827]

		VYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGSYYSRGGWAHYFNL WGQGLVTVSS
75	VH16-19-B11-sc10 or sc11 (VH3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSTYGISWVRQ APGKGLEWIAYIYPDYGITDYASWVNGRFTISLDNAQNT VYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGSYYSRGGWAHYFNL WGQGLVTVSS
76	LCDR1 (L24-L42; AHo 编号)	QASESISSWLA
77	LCDR2 (L58-L72; AHo 编号)	KASTLAS
78	LCDR3 (L107-L138; AHo 编号)	QGYILDSSVDDNV
79	LCDR1 (Kabat)	QASESISSWLA
80	LCDR2 (Kabat)	KASTLAS
81	LCDR3 (Kabat)	QGYILDSSVDDNV
82	LCDR1 (Chothia)	SESISSW
83	LCDR2 (Chothia)	KAS
84	LCDR3 (Chothia)	YYLDSSVDDN
85	VL16-19-B11-sc06 (Vk1-sk12)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCQASESISSWLAWYQQK PGKRPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDFATYYCQGYILDSSVDDNVFGGGKLTVLG
86	VL16-19-B11-sc01	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESISSWLAWYQQK

	(Vκ1-sk12)	PGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQGYLDSSVDDNVFGGGTKLTVLG
87	VL16-19-B11-sc02 (Vκ1-sk12)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCQASESISWLAWYQQK PGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISGLQP ADFATYYCQGYLDSSVDDNVFGGGTKLTVLG
88	VL16-19-B11-sc10 (Vκ1-sk12)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCQASESISWLAWYQQK PGKRPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISGLQ PEDFATYYCQGYLDSSVDDNVFGTGTKVTVLG
89	VL16-19-B11-sc11 (Vκ1-sk12)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCQASESISWLAWYQQK PGQRPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDFATYYCQGYLDSSVDDNVFGTGTKVTVLG
Anti-HSA 结构域(19-01-H04-sc03)		
90	HCDR1 (H27-H42; AHo 编号)	GFSLSSNAMG
91	HCDR2 (H57-H76; AHo 编号)	IISVGGFTYYASWAKG
92	HCDR3 (H108-H138; AHo 编号)	RDRHGGDSSGAFYL
93	HCDR1 (Kabat)	SNAMG
94	HCDR2 (Kabat)	IISVGGFTYYASWAKG
95	HCDR3 (Kabat)	DRHGGDSSGAFYL
96	HCDR1 (Chothia)	GFSLSSN
97	HCDR2 (Chothia)	VGG

[0828]

[0829]

98	HCDR3 (Chothia)	RHGGDSSGAFY
99	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFLSSNAMGWVR QAPGKGLEIYIGIISVGGFTYYASWAKGRFTISRDNKNT VYLQMNSLRAEDTATYFCARDRHGGDSSGAFYLGWGQ TLVTVSS
100	LCDR1 (L24-L42; AHo 编号)	QSSESVYSNNQLS
101	LCDR2 (L58-L72; AHo 编号)	DASDLAS
102	LCDR3 (L107-L138; AHo 编号)	AGGFSSSSDTA
103	LCDR1 (Kabat)	QSSESVYSNNQLS
104	LCDR2 (Kabat)	DASDLAS
105	LCDR3 (Kabat)	AGGFSSSSDTA
106	LCDR1 (Chothia)	SESVYSNNQ
107	LCDR2 (Chothia)	DAS
108	LCDR3 (Chothia)	GFSSSSDT
109	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSESVYSNNQLSWYQ QKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISS LQPEDFATYYCAGGFSSSDTAFGGGKLTVLG
110	scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSESVYSNNQLSWYQ

[0830]

		QKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISS LQPEDFATYYCAGGFSSSSDTAFGGGKLTVLGGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFSLSSNAMGWVRQAPGKGLEIYIGIISVGGFTYYASWA KGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYFCARDRHG GDSSGAFYLVGQGLVTVSS
Anti-HSA 结构域(23-13-A01-sc03)		
111	HCDR1 (H27-H42; AHo 编号)	GFSFSSSYWIC
112	HCDR2 (H57-H76; AHo 编号)	CVFTGDGTTYASWAKG
113	HCDR3 (H108-H138; AHo 编号)	RPVSVYYYGMDL
114	HCDR1 (Kabat)	SSYWIC
115	HCDR2 (Kabat)	CVFTGDGTTYASWAKG
116	HCDR3 (Kabat)	PVSVYYYGMDL
117	HCDR1 (Chothia)	GFSFSSSY
118	HCDR2 (Chothia)	TGDG
119	HCDR3 (Chothia)	VSVYYYGMD
120	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSSYWICWVR QAPGKGLEWVGCVFTGDGTTYASWAKGRFTISRDN KNTVYLMNSLRAEDTATYFCARPVSVYYYGMDLWGQ

[0831]

		GTLVTVSS
121	LCDR1 (L24-L42; AHo 编号)	QASQIISRSA
122	LCDR2 (L58-L72; AHo 编号)	QASKLAS
123	LCDR3 (L107-L138; AHo 编号)	QCTYIDSNFGA
124	LCDR1 (Kabat)	QASQIISRSA
125	LCDR2 (Kabat)	QASKLAS
126	LCDR3 (Kabat)	QCTYIDSNFGA
127	LCDR1 (Chothia)	SQIISR
128	LCDR2 (Chothia)	QAS
129	LCDR3 (Chothia)	TYIDSNFG
130	VL	DVVMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQIISRSAWYQK PGQPPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQP EDFATYYCQCTYIDSNFGAFGGGKLTVLG
131	scFv	DVVMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQIISRSAWYQK PGQPPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQP EDFATYYCQCTYIDSNFGAFGGGKLTVLGGGGSGGG GSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FSFSSSYWICWVRQAPGKGLEWVGCVFTGDGTTYAS WAKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYFCARPV

		SVYYYGMDLWGQGLVTVSS
其他接头		
132	接头序列单元	GGGGS
133	通用接头序列	(GmS) _n , 其中 M 选自 2、3 和 4, 且 n 选自 2、3、4、5 和 6
TNFα		
134	跨膜 TNF α	MSTESMIRDVELAEELPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLI VAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSS RTPSDKPVAVHVVANPQAEGLQWLNRRANALLANGVE LRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGCPSTHVLLTHTISR IAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPYILG GVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL
135	可溶性 TNF α	VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGLQWLNRRANALLA NGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGCPSTHVLLT HTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEP IYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL
本发明的多特异性分子的实例		
136	A3 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQSSSESVYSNNQLSWYQ QKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCAGGFSSSDTAFGGGTKLTVLGRTRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEKH KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRTINCQASESISWLAWYQQKPGK RPKLLIYKASTLASGVPSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDF ATYYCQGYILDSSVDDNVFGGGTKLTVLGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG IDFSTYGISWVRQAPGKGLEWIAYIYIPDYGITDYASWVN GRFTISLDNAQNTVYVYLMNSLRRAEDTAVYYCARGSGSY

[0832]

[0833]

		SRGWGAHYFNLWGQGLTVTVSS
137	A3 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSNAMGWVR QAPGKGLEIYIGIISVGGFTYYASWAKGRFTISRDNKNT VYLQMNSLRAEDTATYFCARDRHGGDSSGAFYLVGQG TLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQTINYWLAWYQ QKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISS LQPEDFATYYCQNYYYSTSRSYGFGGGTKLTVLGGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFSFSSDYWMCWVRQAPGKGLEWIGCIYAGDVDD TDYASWARGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYY CARVDGFDTYFDLWGQGLTVTVSS
138	A4 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQTINYWLAWYQQ KPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISL QPEDFATYYCQNYYYSTSRSYGFGGGTKLTVLGRTRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTINCQASESISSWLAWYQQKPGK RPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDF ATYYCQGYLDSSVDDNVFGGGTKLTVLGGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG IDFSTYGISWVRQAPGKLEWIAIYIPDYGITDYASWVN GRFTISLDNAQNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGSY SRGWGAHYFNLWGQGLTVTVSS
139	A4 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSDYWMCWV

[0834]

		<p>RQAPGKGLEWIGCIYAGDVDDTDYASWARGRFTISRDN SKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARVDGFDITYFDLWG QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTWSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGG SGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSSEVYSNN QLSWYQQKPGQPPELLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSSSSDTAFGGGKTLTVLG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFLSSNAMGWVRQAPGKGLEIYIGIISVGGF TYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYF CARDRHGGDSSGAFYLVWGQGLTVTVSS</p>
140	A5 LC	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCQASESISWLAWYQQK PGRPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDFATYYCQGYLDSSVDDNVFGGGKTLTVLGRTRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSSEVYSNNQLSWYQQ KPGQPPELLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCAGGFSSSSDTAFGGGKTLTVLGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFLSSNAMGWVRQAPGKGLEIYIGIISVGGFTYYASWA KGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYFCARDRHG GDSSGAFYLVWGQGLTVTVSS</p>
141	A5 HC	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSTYGISWVRQ APGKGLEWIAYIYIPDYGITDYASWVNGRFTISLDNAQNT VYLMNSLRAEDTAVYYCARSGSYYSRGWGAHYFNL</p>

[0835]

		<p>WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGG GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQTINY WLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQNYYYSTSRSYGFGGGTKLTV LGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFSFSSDYWMCWVRQAPGKGLEWIGCIY AGDVDDTDYASWARGRFTISRDNKNTVYLQMNLSRA EDTAVYYCARVDGFDITYFDLWGQGLTVTVSS</p>
142	A6	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQTINYWLAWYQQ KPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQNYYYSTSRSYGFGGGTKLTVLGGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSNAMGWVR QAPGKLEYIGIISVGGFTYYASWAKGRFTISRDNKNT VYLQMNLSRAEDTATYFCARDRHGGDSSGAFYLVGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCQSSSEVYSNNQLSWYQQKPGPPKLLI YDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC AGGFSSSDTAFGGGKTLTVLGGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFSFSSDYWMCWVRQAPGKGLEW IGCIYAGDVDDTDYASWARGRFTISRDNKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARVDGFDITYFDLWGQGLTVTVSSGG GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCQASESISS WLAWYQQKPGKRPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGT DYTLTISSLQPEDFATYYCQGYLDSSVDDNVFGGGTKL TVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGIDFSTYGISWVRQAPGKLEWIAYIY</p>

[0837]

		<p>GQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSP SSLSASVGDRTINCQASESISSWLAWYQQKPGKRPKLL IYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYY CQGYLDSSVDDNVFGGGKLTVLGGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSNAMGWVRQAPGKG LEYIGIISVGGFTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMN SLRAEDTATYFCARDRHGGDSSGAFYLVGQGLTVTVSS GGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQTI NYWLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLPEDFATYYCQNYYYSTSRSYFGGGTKL TVLGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFSFSSDYWMCWVRQAPGKGLEWIG CIYAGDVDDTDYASWARGRFTISRDNKNTVYLQMNLSL RAEDTAVYYCARVDGFDITYFDLWGQGLTVTVSS</p>
145	A9	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTINCQASESISSWLAWYQQK PGKRPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISGLQ PEDFATYYCQGYLDSSVDDNVFGTGTKTVLGGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSDYWMCWV RQAPGKGLEWIGCIYAGDVDDTDYASWARGRFTISRDN SKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARVDGFDITYFDLWG QGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRTITCQASQTINYWLAWYQQKPGKAPKLLI YRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYC QNYYYSTSRSYFGGGTKLTVLGGGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGIDFSTYGISWVRQAPGKLEWIA YIYPDYGITDYASWVNGRFTISLDNAQNTVYLQMNLSL AEDTAVYYCARSGSYYSRGWGAHYFNLWGQGLTVTVS SGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQSSES</p>

[0838]

		VYSNNQLSWYQQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSSSSDTAFGGGT KLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFLSSNAMGWVRQAPGKLEYIG IISVGGFTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAE DTATYFCARDRHGGDSSGAFYLVWGQGLTVTVSS
146	A10	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCQASESISSWLAWYQQK PGQRPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDFATYYCQGYLDSSVDDNVFGTGTKVTVLGGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSDYWMCWV RQAPGKLEWIGCIYAGDVDDTDYASWARGRFTISRDN SKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARVDGFDITYFDLWG QGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRVTITCQASQTINYWLAWYQQKPKAPKLLI YRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QNYYYSTSRSYGFGGGTKLTVLGGGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGIDFSTYGISWVRQAPGKLEWIA YIYPDYGITDYASWVNGRFTISLDNAQNTVYLMNSLR AEDTAVYYCARSGSYSRGWGAHYFNLWGQGLTVTVS SGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSS VYSNNQLSWYQQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSSSSDTAFGGGT KLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFLSSNAMGWVRQAPGKLEYIG IISVGGFTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAE DTATYFCARDRHGGDSSGAFYLVWGQGLTVTVSS
147	A11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCQASESISSWLAWYQQK PGKRPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISGLQ

[0839]

		<p>PEDFATYYCQGYLDSSVDDNVFGTGTKVTVLGGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSDYWMCWV RQAPGKGLEWIGCIYAGDVDDTDYASWARGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARVDGFDITYFDLWG QGTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSIQMTQSPSS LSASVGDRVITTCASQTINYWLAWYQQKPGKAPKLLI YRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC QNYYYSTSRSYGFGGGTKLTVLGGGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGIDFSTYGISWVRQAPGKGLEWIA YIYPDYGITDYASWVNGRFTISLDNAQNTVYLQMNSLR AEDTAVYYCARSGSYYSRGWGAHYFNLWGQGTLTVSS SGGGGSGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQSSSEV YSNNQLSWYQQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSGS GSGTDFLTISLQPEDFATYYCAGGFSSSDTAFGGGTK LTVLGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFSLSNAMGWVRQAPGKLEYIGII SVGGFTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAED TATYFCARDRHGGDSSGAFYLVWGQGTLTVSS</p>
<p>148</p>	<p>A12</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITNCQASESISWVWLAWYQQK PGQRPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQ PEDFATYYCQGYLDSSVDDNVFGTGTKVTVLGGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSDYWMCWV RQAPGKGLEWIGCIYAGDVDDTDYASWARGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARVDGFDITYFDLWG QGTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSIQMTQSPSS LSASVGDRVITTCASQTINYWLAWYQQKPGKAPKLLI YRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC QNYYYSTSRSYGFGGGTKLTVLGGGGGSEVQLVESGGG</p>

		LVQPGGSLRLSCAASGIDFSTYGISWVRQAPGKGLEWIA YIYPDYGITDYASWVNGRFTISLDNAQNTVYLQMNSLR AEDTAVYYCARSGSYYSRGGWAHYFNLWGQGLTVTVS SGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSSEV YSNNQLSWYQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFSSSDTAFGGGTK LTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGLSLRLSCAASGFLSSNAMGWVRQAPGKGLEIYIGII SVGGFTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAED TATYFCARDRHGGDSSGAFYLVWGQGLTVTVSS
[0840]	149 A13	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCQASESISWVLAWYQQK PGKRPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDTYTLTISSLQ PEDFATYYCQGYLDSSVDDNVFGGGTKLTVLGGGGGS EVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFLSSNAMGWVR QAPGKGLEIYIGIISVGGFTYYASWAKGRFTISRDNKNT VYLQMNSLRAEDTATYFCARDRHGGDSSGAFYLVWQGG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCQSSSEVYSNNQLSWYQKPGQPPKLLI YDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC AGGFSSSDTAFGGGTKLTVLGGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGIDFSTYGISWVRQAPGKGLEWIA IYYPDYGITDYASWVNGRFTISLDNAQNTVYLQMNSLRA EDTAVYYCARSGSYYSRGGWAHYFNLWGQGLTVTVSS

[0841] 应当理解,为清楚起见在单独的实施方案的语境下描述的本发明的某些特征也可以在单个实施方式中组合提供。相反,为简洁起见在单个实施方案的语境下描述的本发明的各种特征也可以单独地或以任何合适的子组合的形式提供。与本发明有关的实施方案的所有组合都被本发明特别地涵盖,并且在本文中公开,就好像每个组合都被单独地明确公开了一样。另外,各种实施方案及其元素的所有子组合也被本发明特别地涵盖,并且在本文中公开,就好像每个这样的子组合都在本文中被单独地明确地公开了一样。

[0842] 本发明不限于本文所述的具体实施方案的范围。实际上,除了本文描述的那些之外,根据前面的描述,本发明的各种修改对于本领域技术人员将变得显而易见。这样的修改旨在落入所附权利要求的范围内。

[0843] 在各自的专利法允许的范围内,本文引用的所有专利、申请、出版物、测试方法、文献和其他材料均通过引用的方式并入本文。

[0844] 下列实施例举例说明了上述发明,但并不意图以任何方式限制本发明的范围。相关领域技术人员已知的其他测试模型也可以确定所要求保护的发明的有益效果。

[0845] 实施例

[0846] 实施例1:针对人IL-17A的兔抗体的生成

[0847] 1.1免疫

[0848] 用以重组方式生产和纯化的IL-17A(Peprotech,Cat.No.200-17)免疫了兔。在免疫过程中,通过确定多克隆血清抗体依旧能够与抗原产生可检测的结合的每只兔的血清的最大稀释度(滴度),来定性评估针对抗原的体液免疫应答的强度。使用酶联免疫吸附测定(ELISA)评估针对固定化抗原(重组人IL-17A)的血清抗体滴度。

[0849] 使用基于细胞的试验,用在IL-17A刺激下会分泌GRO- α 的HT-29细胞,来评估兔血清抑制IL-17A生物活性的能力。在96孔板中接种50'000个HT-29细胞/孔,用50ng/ml IL-17A刺激。对IL-17A免疫的兔的最后出血的5倍连续稀释液进行了中和IL-17A生物功能的效力测试。所有五个血清都抑制了HT-29细胞的GRO- α 分泌。从免疫动物的脾脏中分离出淋巴细胞,并作为后续Hit鉴定程序的对象。

[0850] 1.2抗IL-17A抗体的鉴定

[0851] 1.2.1表达抗IL-17A抗体的B细胞的分离

[0852] 为了鉴定IL-17A结合的B细胞,用R-Phycoerythrin(RPE)对IL-17A进行标记。由于标记的IL-17A上的IL-17受体A结合位点有可能被庞大的RPE标签阻断,因此通过两种方法确认了该表位的可及性。在第一种试验中,使用流式细胞仪分析了RPE标记的IL-17A与苏金单抗和IL-17受体A的结合。将苏金单抗和融合至人IgG1的Fc部分的IL-17受体A胞外结构域捕获在蛋白G珠上,通过流式细胞仪确认了RPE标记的IL-17A的结合。IL-17A与苏金单抗和IL-17受体AFc嵌合体的结合由此得到证实,而没有检测到与无关IgG或细胞因子受体的结合。在第二种方法中,标记的IL-17A的生物活性在HT-29试验中被证实。如图1所示,与未标记的IL-17A(诱导IL-17A依赖性GRO- α 分泌的EC₅₀高出1.5倍)相比,RPE标记的IL-17A只显示出轻微的生物活性降低。因此,证实标记的IL-17A适合用于分选过程。

[0853] 1.2.2筛选IL-17A结合上清液

[0854] 筛选阶段获得的结果是基于用来自抗体分泌细胞(ASC)培养上清的非纯化抗体进行的检测。在高通量ELISA中筛选ASC上清液与重组人IL-17A的结合。在基于细胞的HT-29试验和竞争性ELISA中,对IL-17A结合上清液的结合动力学和中和IL-17A生物活性的潜力作了进一步的鉴定。通过ELISA进一步鉴定了IL-17A结合上清液与食蟹猴IL-17A的结合情况。

[0855] 1.2.2.1通过ELISA检测IL-17A结合

[0856] 为了确定产生结合人IL-17A的抗体的B细胞克隆,通过ELISA分析了B细胞克隆的细胞培养上清液中是否存在人IL-17A的抗体。所用的ELISA方法评估与重组人IL-17A结合的IgG亚型的抗体的“数量”,但不提供关于抗体的亲和力或浓度的信息。

[0857] 1.2.2.2对人IL-17A的亲和力

[0858] 使用MASS-1SPR设备(Sierra Sensors),通过表面等离子体共振(SPR)测定初筛时合格的培养上清液中单克隆兔抗体与人IL-17A的结合亲和力。对于亲和力筛选,使用标准胺偶联程序将对兔IgG的Fc区特异性的抗体固定在传感器芯片(SPR-2Affinity Sensor, High Capacity Amine, Sierra Sensors)上。B-细胞上清液中的兔单克隆抗体被固定的抗

兔IgG抗体捕获。B细胞上清液中的IgG最低浓度要求足以进行捕获。捕获单克隆抗体后,将人IL-17A以90nM的浓度注入流动池中3分钟,然后使蛋白质从传感器芯片上捕获的IgG中解离5分钟。使用一对一的Langmuir结合,用MASS-1分析软件(Analyzer, Sierra Sensors)计算表观解离常数(kd)和缔合速率常数(ka)以及表观解离平衡常数(K_D)。

[0859] 1.2.2.3通过HT-29试验和竞争ELISA检测IL-17A的中和

[0860] 为了评估效力,开发了一种基于细胞的试验(HT-29试验),以及一种受体配体竞争ELISA。

[0861] 使用基于细胞的试验,用在IL-17A刺激下会分泌GRO- α 的HT-29细胞,评估了B细胞上清液中的抗体抑制IL-17A生物活性的能力。在96孔板中接种50'000个HT-29细胞/孔,用5ng/ml IL-17A刺激。分析最终浓度为50%的B细胞上清液对IL-17A的生物功能的中和效力。

[0862] 通过竞争性ELISA评估了hIL-17A与hIL-17RA结合的抑制作用。将hIL-17RA以4 μ g/ml的浓度涂在ELISA板上。将生物素化的hIL-17A(20ng/ml)与B细胞上清液(95%)预孵育1小时,然后将混合物加入到ELISA板,使其与hIL-17RA结合1.5小时。然后,用Streptavidin-HRP检测生物素化的IL-17A。

[0863] 1.2.2.4物种交叉反应性(通过SPR分析与食蟹猴IL-17A的结合)

[0864] 通过SPR分析所选hit与食蟹猴IL-17A的物种交叉反应性。使用MASS-1SPR装置(Sierra Sensors)通过表面等离子体共振(SPR)确定结合亲和力,与1.2.2.2节中描述的人IL-17A的结合亲和力相似,不同的是使用90nM的食蟹猴IL-17A而不是人IL-17A。

[0865] 1.2.2.5通过ELISA检测IL-17F结合

[0866] 为了确认抗IL-17AscFv的特异性,评估了与所有IL-17家族成员(IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17F和IL-17E)的结合,以寻求最佳性能的人源化scFv。在ELISA中筛选了分选上清液与IL-17F的结合,因为IL-17F与IL-17A的一致性最高(47%,见表2)。相对于用2 μ g/ml的苏金单抗获得的信号对结合进行量化。

[0867] 表2. IL-17A和IL-17家族其他成员之间的一致性。数据是通过使用EMBOSS NEEDLE(标准设置)将IL-17A序列(UniProtKB/Swiss-Prot:Q16552.1)与IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17F和IL-17E进行比对而得到的。

IL-17 家族成员	与 IL-17A 的一致性	与 IL-17A 的相似性
IL-17B	26.6	36.4
[0868] IL-17C	23.4	31.8
IL-17D	21.8	27.5
IL-17E	21.3	31.7
IL-17F	47.2	62

[0869] 1.3功能表征

[0870] 根据B细胞上清液中单克隆抗体的药理特性,选择了一些克隆用于命中物确认分析。表3列出了B细胞上清液中所选克隆的单克隆抗体的药理特性。

[0871] 1.3.1 IL-17A结合动力学(通过SPR)

[0872] 通过SPR (Mass-1) 测量测定了一些人IL-17A的纯化单克隆兔抗体的结合动力学。各IgG经由与羧基甲基化葡聚糖表面 (SPR-2Affinity Sensor, High Capacity Amine, Sierra Sensors) 偶联的抗兔IgG (Bethyl Laboratories, Cat.No. A120-111A) 进行捕获, 并测量IL-17A剂量反应, 以便准确拟合动力学参数。在捕获单克隆抗体后, 将人IL-17A (Peprotech, 货号200-17) 注入流动池中3分钟, 并使蛋白质与传感器芯片上捕获的IgG解离5分钟。每个注射循环后, 两次注射10mM甘氨酸-HCl使表面再生。使用MASS-1分析软件 (Analyzer, Sierra Sensors) 使用一对一Langmuir结合模型计算表观解离速率常数(kd) 和缔合速率常数(ka) 以及表观解离平衡常数(K_D), 并根据相对Chi2 (将Chi2标准化为分析物的外推最大结合水平) 监控拟合质量, 其中相对Chi2是对曲线拟合质量的度量。

[0873] 所有抗体都证实了与人IL-17A的高亲和力结合, K_D 值低至亚皮摩尔亲和力(2.87×10^{-10} 至低于 1.51×10^{-13} M)。所选克隆27-07-G02的单克隆抗体的解离常数(K_D) 为1.88pM, 结合速率ka为 $2.44 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, 解离速率kd为 $4.58 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$, 如通过SPR测量的(见表3)。所选克隆27-31-C04的单克隆抗体的解离常数(K_D) 小于0.5pM, 结合速率ka为 $1.99 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, 解离速率kd小于 $1 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$, 如通过SPR测量的(见表3)。

[0874] 1.3.2与食蟹猴IL-17A的交叉反应(通过SPR)

[0875] 与上文类似, 通过SPR (Mass-1) 测量, 对所选的纯化的单克隆兔抗体确定了与食蟹猴IL-17A的物种交叉反应性。使用Trenzyme公司定制生产的食蟹猴IL-17A进行试验。所选克隆27-07-G02的单克隆抗体的解离常数(K_D) 为0.6pM, 结合速率ka为 $1.24 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, 解离速率kd为 $7.72 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$, 如通过SPR测量的(见表3)。通过SPR测量的 $K_{D\text{食蟹猴IL-17A}}/K_{D\text{人IL-17A}}$ 的比率被测定为0.3(见表3)。所选克隆27-31-C04的单克隆抗体的解离常数(K_D) 小于25pM, 结合速率ka为 $1.69 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, 解离速率 $4.22 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$, 如通过SPR测量的(见表3)。通过SPR测量的 $K_{D\text{食蟹猴IL-17A}}/K_{D\text{人IL-17A}}$ 的比率被测定为大于5(见表3)。

[0876] 1.3.3人IL-17A的中和(通过HT-29试验)

[0877] 研究了纯化的兔单克隆抗体对IL-17A诱导的人结肠癌细胞系HT-29的GRO- α 分泌的影响。对所有抗体的连续稀释液分析了中和IL-17A诱导的GRO- α 分泌(由商业ELISA量化)的效力(IC_{50}), 并与苏金单抗的效力进行比较。使用四参数逻辑曲线拟合分析数据, 并从抑制曲线得出将GRO- α 分泌减少到50%所需的IL-17A抑制剂的摩尔浓度(IC_{50})。为了使不同试验板的 IC_{50} 值可以直接相互比较, 将每个板上的单个 IC_{50} 值相对于每个板上一起进行的参考分子苏金单抗的 IC_{50} 进行校准(相对 $IC_{50}: IC_{50, \text{苏金单抗}}/IC_{50, \text{测试抗体}}$)。以苏金单抗和scFv的质量单位(ng/ml) 计算相对 IC_{50} 值。

[0878] 只有当靶标阻断抗体与其靶标结合的平衡结合常数(K_D) 高于效力试验中使用的靶标浓度时($K_D >$ 目标浓度), 中和试验才可以区分靶标阻断抗体的效力。对于HT-29试验, 使用的IL-17A浓度为20ng/ml (=645pM)。因此, 理论上, HT-29试验可以区分 $K_D > 645 \text{pM}$ 的IgG之间的效力。由于所有被分析的IgG的 K_D 值都低于645pM, 因此不能以此来区分具有不同亲和力(但作用机制相似)的IgG之间的效力。因此, 进一步开发了HT-29试验, 包括50pg/ml TNF α , 以便更好地解决效力问题。这种细胞因子与IL-17A协同作用, 诱导GRO- α 分泌, 因此在TNF α 存在的情况下, IL-17A的浓度可以降低到1ng/ml (=32pM)。

[0879] 所选择的克隆27-07-G02显示出超过50倍的效力(见表3, 图2)。更具体地说, 在HT-

29试验中测定,克隆27-07-G02相对于苏金单抗的中和IL-17A的效力(相对效力)对于 IC_{50} 为75,对于 IC_{90} 为48,且其中,所述相对效力是在HT-29试验中苏金单抗的 IC_{50} 或 IC_{90} 值(ng/ml)与在HT-29试验中克隆27-07-G02单克隆抗体的 IC_{50} 或 IC_{90} 值(ng/ml)的比率(见表3,图2)。

[0880] 所选择的克隆27-31-C04显示出高于苏金单抗的100倍的效力(见表3,图2)。更具体地说,在HT-29试验中测定,克隆27-31-C04相对于苏金单抗的中和IL-17A的效力(相对效力)对于 IC_{50} 为287,对于 IC_{90} 为704,且其中,所述相对效力是在HT-29试验中苏金单抗的 IC_{50} 或 IC_{90} 值(ng/ml)与在HT-29试验中克隆27-31-C04单克隆抗体的 IC_{50} 或 IC_{90} 值(ng/ml)的比率(见表3,图2)。

[0881] 1.3.4阻断人IL-17A/IL-17RA相互作用(通过竞争性ELISA)

[0882] 通过竞争性ELISA评估hIL-17A与hIL-17RA结合的抑制作用。通过在4°C下加入50 μ l含有4 μ g/ml IL-17A(Sino Biological Cat.No.10895-H08H)ON的PBS,将hIL-17A涂覆在ELISA板上。将生物素化的hIL-17A与兔单克隆抗体预孵育1小时,然后将混合物加到ELISA板上,使其与hIL-17A结合1.5小时,然后添加50 μ l的10ng/ml streptavidin-polyHRP40(SDT货号SP40C),用于检测生物素化的IL-17A,并将平板孵育1小时。最后,加入四甲基苯丁溶液(KPL,货号53-00-00)显影5至10分钟,用1M HCl停止反应。使用微孔板阅读器(Infinity reader M200Pro,Tecan)在450nm和570nm(参考波长)的波长下读板。

[0883] 图3表示了所选兔IgG的剂量-反应曲线。与参照物苏金单抗相比的 IC_{50} 值和 IC_{90} 值总结于表3。如前一节所述,只有当靶标阻断抗体与其靶标结合的平衡结合常数(K_D)高于效力试验中使用的靶标浓度($K_D >$ 目标浓度)时,中和试验才可以区分靶标阻断抗体的效力。对于HT-29试验,使用的IL-17A浓度为32pM,而在IL-17A/IL-17RA抑制ELISA中,使用的IL-17A浓度为193pM。因此,理论上,HT-29试验可以区分 $K_D >$ 32pM的IgG之间的效力,而抑制ELISA只能区分 $K_D >$ 193pM的IgG之间的效力。与HT-29试验一样,克隆27-07-G02和克隆27-31-C04显示出比苏金单抗更高的效力。

[0884] 在ELISA试验中测定,克隆27-07-G02相对于苏金单抗的阻断IL-17A/IL-17RA相互作用的效力(相对效力)对于 IC_{50} 为5,对于 IC_{90} 为14,且其中,所述相对效力是在ELISA试验中苏金单抗的 IC_{50} 或 IC_{90} 值(ng/ml)与在ELISA试验中克隆27-07-G02单克隆抗体的 IC_{50} 或 IC_{90} 值(ng/ml)的比率。类似地,在ELISA试验中测定,克隆27-31-C04相对于苏金单抗的阻断IL-17A/IL-17RA相互作用的效力(相对效力)对于 IC_{50} 为8,对于 IC_{90} 为90(见表3)。

[0885] 1.3.5与食蟹猴IL-17A的交叉反应(通过HT-29试验)

[0886] 在96孔板的每个孔中接种50'000个HT-29细胞。除了兔单克隆抗体和内部参考苏金单抗的系列稀释液之外,分别向HT-29细胞中添加人TNF α (50pg/ml)和人或食蟹猴IL-17A(1ng/ml)的预稀释液。在37°C和5%CO₂孵育24小时后,收集上清液,通过ELISA定量GRO- α (CXCL1趋化因子)分泌。为了使用食蟹猴IL-17A获得的 IC_{50} 值可以直接相互比较,将每个板上的单个 IC_{50} 值相对于每个板上一起进行的用人IL-17A获得的 IC_{50} 进行校准(相对 IC_{50} : $IC_{50,食蟹猴IL-17A}/IC_{50,人IL-17A}$)。所选克隆的效力在表3中示出。对于克隆27-07-G02,中和食蟹猴IL-17A诱导的GRO- α 分泌的效力(IC_{50})被确定为0.64ng/ml,对于克隆27-31-C04,对食蟹猴IL-17A诱导的GRO- α 分泌的效力(IC_{50})被确定为0.49ng/ml(见表3)。

[0887] 表3. 选自免疫的克隆27-07-G02和27-31-C04单克隆兔抗IL-17AIgG的药效学特性。

IgG	对人IL-17A的亲合力 (SPR)			对食蟹猴IL-17A的亲合力 (SPR)			比例IL-17A 结合SPR ($\frac{KD_{食蟹猴IL-17A}}{KD_{人IL-17A}}$)	
	克隆ID	$k_a [M^{-1} s^{-1}]$	$k_d [s^{-1}]$	$K_D [M]$	$k_a [M^{-1} s^{-1}]$	$k_d [s^{-1}]$		$K_D [M]$
	27-07-G02	2.44E+06	4.58E-06	1.88E-12	1.24E+06	7.72E-07	6.22E-13	0.3

*: IC_{50} : 苏金单抗 / IC_{50} : 测试样品
 **: IC_{50} : 食蟹猴IL17A / IC_{50} : 人IL17A

[0888]

IgG	在HT-29试验中的效力		在IL17A-IL17RA试验中的效力		人和食蟹猴IL17A的HT-29试验			对IL-17F的相对结合 (ELISA)	
	相对 IC_{50} *	相对 IC_{90} *	相对 IC_{50} *	相对 IC_{90} *	IC_{50} [ng/ml] 人IL17A	IC_{50} [ng/ml] 食蟹猴IL17A	相对 IC_{50} **		
	27-07-G02	74.88	47.95	4.94	13.64	0.32	0.64	1.98	1%

IgG	对人IL-17A的亲合力 (SPR)			对食蟹猴IL-17A的亲合力 (SPR)			比例IL-17A 结合SPR ($\frac{KD_{食蟹猴IL-17A}}{KD_{人IL-17A}}$)	
	克隆ID	$k_a [M^{-1} s^{-1}]$	$k_d [s^{-1}]$	$K_D [M]$	$k_a [M^{-1} s^{-1}]$	$k_d [s^{-1}]$		$K_D [M]$
	27-31-C04	1.99E+06	<1E-06	<5.03E-13	1.69E+06	4.22E-05	2.50E-11	> 5.0

*: IC_{50} : 苏金单抗 / IC_{50} : 测试样品
 **: IC_{50} : 食蟹猴IL17A / IC_{50} : 人IL17A

IgG	在HT-29试验中的效力		在IL17A-IL17RA试验中的效力		人和食蟹猴IL17A的HT-29试验			对IL-17F的相对结合 (ELISA)	
	相对 IC_{50} *	相对 IC_{90} *	相对 IC_{50} *	相对 IC_{90} *	IC_{50} [ng/ml] 人IL17A	IC_{50} [ng/ml] 食蟹猴IL17A	相对 IC_{50} **		
	27-31-C04	286.79	703.62	7.93	21.31	0.41	0.49	1.19	19%

[0889] 表4. 兔单克隆抗体与IL-17F的结合。相对于a) 苏金单抗结合的OD (450-690nm) 和 b) IL-17A结合的OD (450-690nm) 来计算IgG (10 μ g/ml) 结合IL-17F的OD (450-690nm)。

[0890]

IgG	相对结合 IL-17F, 与 10 μ g/ml 的苏金单抗 相比	相对结合 IL-17F, 与 10 μ g/ml 的 IL-17A 相 比
	克隆 ID	结合 IL-17F, 相对于 10 μ g/ml 苏金单抗 (%)
27-31-C04	19.7%	19.1%

[0891] 1.3.6对IL-17A与IL-17F的选择性

[0892] 测定了IgG与IL-17A结合比与其他IL-17家族成员结合的选择性, 以确保靶标特异

性结合。为了测定抗IL-17AIgG与IL-17F的结合,开发了一种直接ELISA,其中用IL-17A或IL-17F(Peprotech货号200-25)涂布平板,用10 μ g/ml的重组抗IL-17AIgG(包括苏金单抗作为对照)孵育。相对于a) IL-17A结合的OD(450-690nm)和b) 苏金单抗结合的OD(450-690nm)来计算IL-17F结合的OD(450-690nm)。数据汇总于表4。

[0893] 实施例2:scFv的人源化和生成

[0894] 2.1人源化scFv抗体的生成

[0895] 根据命中物确认过程中获得的数据,选择克隆27-07-G02和27-31-C04进行人源化。所选克隆的人源化包括将兔CDR转移到V κ 1- λ cap/VH3类型的scFv受体框架上,如W02014/206561中所述。在该过程中,在供体序列(兔mAb)上确定了六个CDR区的氨基酸序列,并将其移植到受体支架序列中,产生称为“CDR移植”的构建体(分别参见SEQ ID NO:24, A1;和SEQ ID NO:61, PR0571)。此外,针对两个克隆27-07-G02和27-31-C04设计了第二种移植体(分别为SEQ ID NO:25, A2;和SEQ ID NO:62, PR0592),在某些框架位置上包含来自兔供体的另外的氨基酸修饰,这可能会影响CDR定位并因此影响抗原结合和/或稳定性(Borras et al., 2010; J. Biol. Chem., 285:9054-9066)。这些人源化构建体被称为“结构化(STR)移植”。此外,在克隆27-07-G02的情况下,为了提高亲和力,在基于结构的移植体(SEQ ID NO:25, A2)中引入了四个突变,即可变轻链上的A51P,以及可变重链上的Q14K、G16E和G56A(根据AHo编号)。在克隆27-31-C04的情况下,为了提高亲和力,在基于结构的移植体SEQ ID NO:62, PR0592的可变重链上引入了两个突变,即R20T和Q141P(根据AHo编号)。

[0896] 在比较这些构建体的表征数据显示STR构建体具有显著优点的情况下,可以设计另外的变体,将CDR移植的VL与STR移植的VH组合。已经证明这种组合通常足以保留STR移植物的活性(Borras et al. JBC. 2010; 285:9054-9066)并且通常是优选的,因为人受体支架中的非人改变较少,降低了稳定性受损的风险以及免疫原性的可能性。

[0897] 2.2人源化scFv的制造

[0898] 完成计算机模拟构建体设计后,则合成相应的基因并构建细菌表达载体。在DNA水平上确认表达构建体的序列,并根据通用表达和纯化方案制备构建体。

[0899] 通过小规模(55mL)诱导过夜表达,以不溶性包涵体的形式在大肠杆菌中进行蛋白质的异源表达。通过离心方案从均质化的细胞沉淀中分离包涵体,该离心方案包括几个洗涤步骤,以去除细胞碎片和其他宿主细胞杂质。将纯化的包涵体溶解于变性缓冲液(100mM Tris/HCl pH 8.0, 6M Gdn-HCl, 2mM EDTA)中,并通过可扩展的重折叠方案使scFv重折叠,产生毫克量的天然折叠的单体scFv。在这一点上,采用标准化方案纯化scFv。通过亲和层析捕获重折叠后的产物,得到纯化的scFv。此外,通过差示扫描荧光法(DSF)测量来测定scFv的熔化温度,以支持在完成以下段落所述的药效学特征后选择分子进入更宽泛的稳定性评估。2.4.2段中详细介绍了所选分子的DSF测量。

[0900] 2.3人源化scFvs的功能表征

[0901] 在下文中,使用与针对命中物确认阶段所描述的不同测定系统(但进行了某些修改,以适应于scFv分子的不同形式)对人源化的scFv进行了主要药效学特性表征。

[0902] 2.3.1对人IL-17A和食蟹猴IL-17A的亲和力

[0903] 通过SPR分析在T200设备(Biacore, GE Healthcare)上测定人源化scFv与人体IL-17A以及食蟹猴(Macaca Fascularis) IL-17A的亲和力。在该实验中,使用Biacore的

Biotin-CAPture试剂盒(“捕获设置”)捕获生物素化的人IL-17A。在每个分析物注入循环后,将CAP传感器芯片再生并捕获新抗原。使用剂量响应多循环动力学测定法将scFv作为分析物注入,其中分析物的浓度范围为0.35至90nM,稀释于运行缓冲液中。使用1:1结合模型拟合获得的传感图。此外,在另一种SPR检测设置(“直接设置”)中分析了这些scFv。将IL-17A通过胺偶联固定在CM5传感器芯片(GE Healthcare)上。在固定的IL-17A上注入0.35至90nM的scFv的连续稀释液。当使用直接设置时,与捕获设置相比,所测试的scFv的亲合力高出2倍至高于50倍。使用捕获设置亲合力较低,可能是由于生物素对scFv结合的干扰。

[0904] 在一个类似于测量与人类IL-17A结合的试验中,用Trenzyme生产的IL-17A测量了与食蟹猴IL-17A的交叉反应性。

[0905] scFv A1 (CDR) 和A2 (STR) 与人IL-17A结合的亲合力分别为 2.5×10^{-10} 和 3×10^{-9} M (表5),如在SPR捕获设置中测量的。在直接SPR设置中,scFv A1 (CDR) 和A2 (STR) 与人IL-17A结合的亲合力分别为 1.4×10^{-10} 和 5.5×10^{-11} M (表5)。scFv A1 (CDR) 和A2 (STR) 与食蟹猴IL-17A结合的亲合力分别为 9×10^{-10} 和 5×10^{-9} M (表5)。

[0906] scFvs PR0571 (CDR) 和PR0592 (STR) 与人IL-17A结合的亲合力分别为 1.2×10^{-10} 和 3.7×10^{-10} M (表5),如在SPR捕获设置中测量的。在直接SPR设置中,scFv PR0571 (CDR) 和PR0592 (STR) 与人IL-17A结合的亲合力分别为 4×10^{-11} 和 3.8×10^{-11} M (表5)。scFv PR0571 (CDR) 和PR0592 (STR) 与食蟹猴IL-17A结合的亲合力分别为 3.3×10^{-11} 和 1.6×10^{-10} M (表5)。

[0907] 2.3.2HT-29试验(人IL-17A的中和)

[0908] HT29试验测试了人源化scFvs抑制IL-17A诱导的人结肠癌细胞系HT-29的GRO- α 分泌的能力。如上文1.3.3和1.3.5节所述,除IL-17A外,还加入了TNF α 以提高检测的灵敏度。在96孔板的每个孔中接种50'000个HT-29细胞。除了连续稀释的scFv以及内部参考苏金单抗之外,向HT-29细胞中添加人TNF α (50pg/ml) 和人IL-17A (1ng/ml) 的预稀释液。在37°C和5%CO₂孵育24小时后,收集上清液,通过ELISA定量GRO- α (CXCL1趋化因子) 分泌。

[0909] 人源化scFv A1、PR0571和PR0592的抑制曲线见图4。表5和表6中总结了所有效力数据。报告的每个分子的相对IC₅₀值与参考抗体苏金单抗进行了校准,以便于直接比较不同检测板的IC₅₀值。以苏金单抗和scFv的质量单位 (ng/ml) 计算相对IC₅₀值。

[0910] 来自克隆27-07-G02的人源化scFv A1和A2,以及来自克隆27-31-C04的人源化scFv PR0571和PR0592,抑制IL-17A诱导的GRO- α 分泌,IC₅₀低于苏金单抗(见表5和表6),并且与苏金单抗相比显示出100倍以上的更高效力(见表5和表6)。

[0911] 表5. 人源化scFv的药效学特性。

蛋白质编号	scFv		对人IL-17A的亲和力 (捕获设置)			对人IL-17A的亲和力 (直接设置)		
	克隆ID		ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D (M)	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D (M)
A1	27-07-G02-sc01		4,55E+05	1,12E-04	2,47E-10	7,37E+05	1,02E-04	1,39E-10
A2	27-07-G02-sc02		2,27E+05	6,97E-04	3,07E-09	1,08E+06	5,92E-05	5,51E-11

蛋白质编号	scFv		对食蟹猴IL-17A的亲和力			K _{D, 食蟹猴} /K _{D, 人}	HT-29试验中 IL-17A的中和	阻断 IL-17A/ IL-17RA 相互作用
	克隆ID		ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D (M)			
A1	27-07-G02-sc01		2,88E+05	2,61E-04	9,05E-10	3,66	173,3	19,3
A2	27-07-G02-sc02		1,67E+05	8,68E-04	5,19E-09	1,69	375,4	24,0

[0912]

*: IC₅₀, 苏金单抗/IC₅₀, 测试样品

蛋白质编号	scFv		对人IL-17A的亲和力 (捕获设置)			对人IL-17A的亲和力 (直接设置)		
	克隆ID		ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D (M)	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D (M)
PRO571	27-31-C04-sc01		1.21E+06	1.44E-04	1.19E-10	1.13E+06	4.55E-05	4.03E-11
PRO592	27-31-C04-sc02		3.87E+05	1.42E-04	3.67E-10	1.08E+06	4.07E-05	3.76E-11

蛋白质编号	scFv		对食蟹猴IL-17A的亲和力			K _{D, 食蟹猴} /K _{D, 人}	HT-29试验中 IL-17A的中和	阻断IL-17A/ IL-17RA相互作用
	克隆ID		ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D (M)			
PRO571	27-31-C04-sc01		1.17E+06	3.88E-05	3.31E-11	0.28	190.8	22.9
PRO592	27-31-C04-sc02		3.36E+05	5.38E-05	1.6E-10	0.44	196.0	40.9

*: IC₅₀, 苏金单抗/IC₅₀, 测试样品

[0913]

表6. 抗IL-17A scFv抑制IL-17A诱导的人类结肠癌细胞系HT-29的GRO-α分泌的效力。

蛋白质 ID	scFv		在 HT-29 试验中的效力	
	克隆 ID	IC ₅₀ [ng/mL]	相对 IC ₅₀ *	
A1	27-07-G02-sc01	0.2	173.3	
A2	27-07-G02-sc02	0.1	375.4	

[0914] *: IC₅₀, 苏金单抗/IC₅₀, 测试
样品

蛋白质 ID	scFv		在 HT-29 试验中的效力	
	克隆 ID	IC ₅₀ [ng/mL]	相对 IC ₅₀ *	
PRO571	27-31-C04-sc01	0.1	190.8	
PRO592	27-31-C04-sc02	0.13	196.0	

mea

[0915] 2.3.3 竞争性ELISA (抑制hIL-17A与hIL-17-RA的结合)

[0916] 除了HT-29试验,通过ELISA评估每个人源化scFv抑制人IL-17A和人IL-17RA之间相互作用的效力,程序与1.3.4节所述相同。与HT-29试验类似,将每个板上的单个IC₅₀值相对于每个板上一起进行的参考分子苏金单抗的IC₅₀进行校准且相对IC₅₀ (相对IC₅₀: IC_{50,苏金单抗}/IC_{50,测试抗体}) (表5和表7)。在这个试验中,6ng/ml IL-17A被实施,这意味着该试验只能解决K_D>193pM的IgG之间的效力。图5显示了A1、A2、PRO571和PRO592的抑制曲线,表5和表7中总结了效力。

[0917] 表7. 抗IL-17A scFv阻断人IL-17A/IL-17RA相互作用的能力 (ELISA)。

蛋白质 ID	scFv	在 IL-17A/IL-17RA ELISA 中的效力	
	克隆 ID	IC ₅₀ [ng/mL]	相对 IC ₅₀ *
A1	27-07-G02-sc01	2.0	19.3
A2	27-07-G02-sc02	1.6	24.0

[0918]

*: IC_{50, 苏金单抗}/IC_{50, 测试样品}

蛋白质 ID	scFv	在 IL-17A/IL-17RA ELISA 中的效力	
	克隆 ID	IC ₅₀ [ng/mL]	相对 IC ₅₀ *
PRO571	27-31-C04-sc01	1.8	22.9
PRO592	27-31-C04-sc02	0.9	40.9

[0919] *: IC_{50, 苏金单抗}/IC_{50, 测试样品}

[0920] 2.3.4对IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F的选择性(竞争ELISA)

[0921] 通过竞争ELISA评估了与IL-17A相比,IL-17B至F半数最大抑制IL-17A与各scFv的结合的相对潜力。通过竞争ELISA分析了未标记的IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F抑制生物素化的IL-17A与scFv相互作用的潜力。为此目的,将scFv涂覆在96孔ELISA板上。在连续稀释的IL-17A或IL-17B至IL-17F存在的情况下,使用与HRP缀合的生物素结合streptavidin检测生物素化的IL-17A与包被的scFv的结合。对于IL-17A的剂量反应曲线,使用四参数逻辑曲线拟合分析数据,并计算出将生物素化的IL-17A与包被的scFv的相互作用阻断50%所需的IL-17A浓度(EC₅₀)。IL-17B至IL-17F对生物素化的TNF与scFv之间的相互作用没有显示出任何明显的抑制作用(见图6)。为了量化这些IL-17家族成员与IL-17A相比抑制IL-17A与各scFv结合的相对潜力,计算了IL-17家族成员相对于IL-17A抑制相互作用的EC₅₀。由于在使用比IL-17A的EC₅₀高约100至40'000倍的浓度的IL-17成员时,没有观察到明显的抑制作用,所以确定与IL-17A结合的选择性比IL-17家族成员明显更高约100至40000倍。

[0922] 如图6所示和表8对A1、PRO571和PRO592的总结,scFv A1、PRO571和PRO592与生物素化的IL-17A之间的相互作用被未标记的IL-17A阻断,而IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F即使在测试的细胞因子的最高浓度(20至500μg/ml)也没有显示任何明显效果。因此,A1、PRO571和PRO592特异性地与IL-17A结合,而不是与其最接近的同源物IL-17B至IL-17F结合。因此,本文描述的scFv的脱靶结合似乎是非常不可能的。

[0923] 2.4人源化scFv的生物物理表征

[0924] 2.4.1稳定性材料的制造

[0925] 采用与上述相同的制造工艺(见第2.2节),以更高的规模(1.2L-2.4L表达量)再次生产scFv。此外,蛋白质样品在纯化后使用离心浓缩管浓缩到>10mg/mL。表9汇编了用于稳定性评估的材料的高规模制造情况。所有分子都能以足够的数量和纯度(>95%的单体)生产。

[0926] 通过不同的报告点来表征了scFv构建体的可生产性(表9)。生产性标准应确保所选择的scFv实体能够以足够支持后续先导分子开发的量表达、重折叠和纯化。定义的标准是如通过SDS-PAGE评估的,每升发酵液中scFv的表达产率,以及如通过UV光谱法测量纯化蛋白质的量评估的,计算回1升重折叠溶液的在通用实验室规模的过程中实现的纯化产率。

[0927] 在离心收获细胞后,在粗大肠杆菌裂解物的水平上测定表达效价。在收获期间,预期损失少量细胞,然而,计算表达产率时忽略该因子,有利于更保守地估计生产。为了定量裂解物中的scFv产物,选择考马斯染色的还原SDS-PAGE,因为该方法的高特异性允许将产物与样品中的宿主细胞蛋白区分开。

[0928] 评估生产性的第二个标准是每升重折叠溶液所计算的scFv的纯化产率。该参数解决了包括蛋白质重折叠步骤的预期制造过程中的潜在瓶颈。由于重折叠方案的效率已经证明在可比较的制造过程中是有限的,因此可以将不同构建体的性能与标准化为限定重折叠体积的生产性进行比较。为了计算产率,通过UV吸光度定量来自各批次的最终蛋白质样品,并除以相应纯化物的实际重折叠体积。

[0929] 表8.人源化scFv的靶标选择性。

蛋白质 ID	scFv 克隆 ID	选择性 IL-17B		选择性 IL-17C		选择性 IL-17D	
		相对 IC50 [IC50, IL-17B/IC50, IL-17A]	测试的最高浓度 (ng/ml)	相对 IC50 [IC50, IL-17C/IC50, IL-17A]	测试的最高浓度 (ng/ml)	相对 IC50 [IC50, IL-17D/IC50, IL-17A]	测试的最高浓度 (ng/ml)
A1	27-07-G02-sc01	>> 1307	100000	>> 1307	100000	>> 11871	500000
PRO571	27-31-C04-sc01	>> 8636	100000	>> 8636	100000	>> 42808	500000
PRO592	27-31-C04-sc02	>> 1102	100000	>> 1102	100000	>> 7716	500000

[0930]

蛋白质 ID	scFv 克隆 ID	选择性 IL-17E		选择性 IL-17F	
		相对 IC50 [IC50, IL-17E/IC50, IL-17A]	测试的最高浓度 (ng/ml)	相对 IC50 [IC50, IL-17F/IC50, IL-17A]	测试的最高浓度 (ng/ml)
A1	27-07-G02-sc01	>> 475	20000	>> 475	20000
PRO571	27-31-C04-sc01	>> 1712	20000	>> 1712	20000
PRO592	27-31-C04-sc02	>> 309	20000	>> 309	20000

[0931] 表8.用于稳定性评估的材料制造。

蛋白质 ID	构建体 ID	表达体积 [mL]	Capto L 之后的产量 [mg]	终产量 [mg]	每L解折叠的产量 [mg/L]	每L表达的产量 [mg/L]	纯度 SE-HPLC [%单体]
A1	27-07-G02-sc01	1200	126.8	26.5	13.3	22.1	99.9
PRO592	27-31-C04-sc02	1200	74.0	51.7	25.8	43.1	97.6
PRO571	27-31-C04-sc01	2400	124.0	88.5	22.1	36.9	98.9

[0933] 2.4.2热解折叠

[0934] 从scFv构建体A1、PRO571和PRO592的DSF测量中得到的热解折叠曲线见图7。对于

DSF测量,使用了小规模表达中产生的材料。在pH6.4的50mM磷酸盐缓冲液中制备样品,最终蛋白浓度为50 μ g/mL,最终浓度为5x SYPRO®Orange,总体积为100 μ l。将25微升制备的样品一式三份添加到白壁AB基因PCR板中。该测定在用作热循环仪的qPCR机中进行,并使用软件的自定义染料校准程序检测荧光发射。将包含测试样品的PCR板以1 $^{\circ}$ C的递增量进行从25 $^{\circ}$ C到96 $^{\circ}$ C的温度变化,在每次温度递增后,暂停30s。总测定时间为约两个小时。通过GraphPad Prism软件使用数学二阶导数方法计算曲线的拐点来计算T_m。测量分别进行一式两份或一式三份,如误差条所示。通过将数据拟合到玻耳兹曼方程式,可以确定所得的T_m值。

[0935] 图7显示了所选结构域的熔化曲线,通过将数据与波尔兹曼方程进行拟合来计算T_m。表10总结了A1、PRO571和PRO592的计算熔化温度和通过SE-HPLC测量的纯度。

[0936] 表9. 所选结构域的单体含量和T_m。

	蛋白质 ID	纯度 SE-HPLC [%单体]	T _m [$^{\circ}$ C]
[0937]	A1	95.1	74.3
	PRO592	99.7	66.1
	PRO571	98.9	68.8

[0938] 2.4.3 储存稳定性研究

[0939] 对scFv A1、PRO571和PRO592进行了进一步的稳定性研究,如四周稳定性研究,其中将scFv以10mg/ml配制在水性缓冲液中,在<-65 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C储存四周。在每项研究的一周、两周和结束时,通过整合SE-HPLC的峰面积来评估制剂中的单体和低聚物的分数。表11比较了在研究的第28天获得的终点测量值。在28天的时间过程中,单体含量(%)和蛋白质浓度(mg/mL)随时间的变化见图8。本发明的scFv在4 $^{\circ}$ C的温度和>10mg/ml的浓度下储存时,单体损失为5%或更少,尤其是A1的单体损失小于1%。此外,本发明的scFv A1在37 $^{\circ}$ C的温度和>10mg/ml的浓度下储存时,单体损失<5%。

[0940] 表10. 在10mg/ml和储存温度为37 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C和-80 $^{\circ}$ C时的4w稳定性研究。

蛋白质 ID	温度 [°C]	浓度 [mg/mL]	[%单体含量]		%单体损失	%含量损失
			d0	d28	d28	d28
A1	37			97.2	2.72	-3.51
	4	>10	99.9	99.6	0.3	-1.76
	-80			99.8	0.09	4.16
[0941]	37			71.9	26.3	4.2
PRO592	4	>10	97.6	93.4	4.26	5.03
	-80			95.1	2.53	2.38
PRO571	37			74.4	24.76	1.71
	4	>10	98.9	95.1	3.84	2.52
	-80			96.8	2.09	0.49

[0942] 2.4.4 冷冻-解冻稳定性研究

[0943] 除了上述的储存稳定性研究外,还评估了scFv A1、PR0571和PR0592在冻融(F/T)循环方面的兼容性(胶体稳定性)。

[0944] 为了进行F/T稳定性评估,采用与存储稳定性研究(SE-HPLC, SDS-PAGE)相同的分析方法和参数(单体含量%和单体损失%)来监测分子在五个F/T循环后的质量。在研究开始之前,将样品配制在PBS中,并使用Vivaspin浓度装置浓缩至10mg/ml。小样本量(<20 μ L)允许快速的冷冻和解冻时间间隔。对样品进行五次重复的冻解循环。使它们在-80°C的温度下冷冻并在室温下解冻。为了评估A1、PR0571和PR0592的稳定性,在每个循环之后,通过SE-HPLC和UV280测量,在不同的时间点记录分析读数,例如蛋白质含量和纯度。数据列于表12。图9说明了在五个重复的F/T循环中单体含量的变化过程(%)。

[0945] 2.4.5 pH稳定性研究

[0946] 对scFv A1、PR0571和PR0592进行了短期压力稳定性研究,其中将scFv分子以20mg/ml配制在一组pH值介于3.5和7.5之间的水(磷酸盐-柠檬酸盐)缓冲体系中。在4°C储存48小时和25°C储存8小时后,分析单体含量(%)和单体损失(%) (表13表12)。A1、PR0571和PR0592在任何测试的缓冲体系中,在测量的任何时间点都表现出<5%的单体损失(表13和表14)。

[0947] 值得注意的是,在本评估范围内提出的不同研究涉及蛋白质稳定性的不同机制方面。虽然两种方法都旨在估计可能的产品保质期和稳定性,但所解决的机制却截然不同。通过热解折叠评估的转变中点(T_m)是蛋白质结构域稳定性的定性测量(不能够热力学测定 ΔG)。高度稳定的蛋白质结构域(高 T_m)在环境温度下不太可能自发地解折叠,因此不易于发生由未折叠的结构域相互作用驱动的不可逆聚集/沉淀。结构域稳定性高表明氨基酸残基的包装紧密,这也与蛋白酶切割的耐受相关。另一方面,SE-HPLC评估定量地确定单体级分以及可溶性低聚物/聚集体的含量。这种可溶性寡聚体通常是可逆的,并且由正确折叠的蛋白质之间的静电或疏水相互作用驱动而相对松散的缔合。通过热解折叠评估的 T_m 与通过

SE-HPLC评估的低聚物/聚集体形成的倾向之间存在着一些相关性,特别是对于具有“边界线”稳定性的蛋白质。超过约60°C的特定阈值 T_m ,抗体可变结构域通常足够稳定以抵抗在环境温度下由于部分结构域解折叠而产生的聚集/沉淀和蛋白水解降解。然而,仍然会发生由表面残基的疏水和/或静电相互作用驱动的低聚反应。重要的是,在温度升高(例如37°C)的加速(应力)稳定性研究中,各种机制的低聚物形成和沉淀的可同时发生。

[0948] 表11. 所选克隆的冻融稳定性评估。

蛋白质ID	冻/融 循环	浓度 [mg/mL]	[%单体含量]					
			FT0	FT1	FT2	FT3	FT4	FT5
A1	5	10	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9
PRO592	5	10	97.6	96.1	95.6	95.4	95.2	95.2
PRO571	5	10	98.9	98.8	98.8	98.6	98.5	98.5

蛋白质ID	冻/融 循环	浓度 [mg/mL]	%单体损失				
			FT1	FT2	FT3	FT4	FT5
A1	5	10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PRO592	5	10	1.5	2.0	2.2	2.4	2.4
PRO571	5	10	0.1	0.1	0.3	0.4	0.4

[0950] 表12. 在短期pH应力稳定性期间,在两个确定的时间点(t_8, t_{48})和温度(4°C, 25°C)对单体含量和单体损失的监测。

蛋白质 ID	pH	[%单体含量]			%单体损失	
		t_0	t_8	t_{48}	t_8	t_{48}
A1	3.5	99.7	99.6	99.6	0.2	0.2
	4.5	99.6	99.6	99.5	0.0	0.1
	5.5	99.5	99.5	99.4	0.0	0.1
	6.5	99.7	99.5	99.5	0.1	0.2
	7.5	99.6	99.5	99.4	0.1	0.2
PRO571	3.5	98.0	95.6	95.7	2.5	2.3
	4.5	97.9	97.1	97.0	0.8	0.9
	5.5	96.5	95.8	95.4	0.8	1.1
	6.5	97.4	95.6	95.0	1.9	2.5
	7.5	96.2	95.2	95.0	1.0	1.3
PRO592	3.5	99.5	98.3	98.4	1.2	1.1
	4.5	99.5	99.0	99.1	0.5	0.5
	5.5	99.5	98.8	98.8	0.7	0.7
	6.5	99.5	98.7	98.7	0.8	0.8
	7.5	99.5	98.8	98.8	0.7	0.7

[0952] 表13.在短期pH应力稳定期间,在两个确定的时间点(t8,t48)和温度(4°C,25°C)对蛋白质浓度的监测

蛋白质 ID	pH	蛋白质浓度[mg/mL]			%含量损失	
		t0	t8	t48	t8	t48
A1	3.5	99.7	99.6	99.6	0.2	0.2
	4.5	99.6	99.6	99.5	0.0	0.1
	5.5	99.5	99.5	99.4	0.0	0.1
	6.5	99.7	99.5	99.5	0.1	0.2
	7.5	99.6	99.5	99.4	0.1	0.2
PRO571	3.5	27.7	26.4	26.3	4.8	5.0
	4.5	26.5	27.1	26.2	-2.3	1.1
	5.5	29.3	27.9	28.4	4.8	3.1
	6.5	29.5	27.4	29.2	7.4	1.1
	7.5	29.3	29.3	29.2	0.1	0.2
PRO592	3.5	28.3	27.8	28.0	1.8	1.1
	4.5	26.2	25.1	26.4	4.5	-0.7
	5.5	25.3	25.8	25.3	-2.0	0.1
	6.5	28.4	27.7	28.1	2.5	1.1
	7.5	28.7	28.4	28.5	1.0	0.9

[0953]

[0954] 表14.生物物理特性数据的总结。

蛋白质 ID	克隆 ID	Tm [°C]	%单体	%单体	%单体	%单体	%单体损	%单体损
			损失, 10 mg/mL, 5xFT	损失, 28d, 10 mg/mL, 37°C	损失, 28d, 10 mg/mL, 4°C	损失, 28d, 10 mg/mL, -80°C	失, pH3.5-7.5, 20 mg/mL, RT, t8	失, pH3.5-7.5, 20 mg/mL, 4°C, t48
A1	27_07_G02_sc01	71.2	0.0	2.72	0.3	0.09	0.0-0.2	0.1-0.2
PRO592	27_31_C04_sc02	68.4	2.4	26.3	4.26	2.53	0.5-1.2	0.5-1.1
PRO571	27_31_C04_sc01	68.8	0.4	24.76	3.84	2.09	0.8-2.5	0.9-2.3

[0955]

[0956] 2.4.6方法

[0957] 2.4.6.1还原SDS-PAGE

[0958] 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 是一种用于定性表征并控制蛋

白质纯度的分析技术。根据美国药典(USP) (USP第1056章),分析凝胶电泳是鉴定和评估药物中蛋白质的同质性的合适且常规的方法。

[0959] 使用该方法来量化来自大肠杆菌裂解物的scFv产物的量,以得到发酵后的表达产率。该方法的另一个应用是基于其相对于理论值的分子量来验证测试物质的身份。出于支持性目的,该方法用于量化测试样品相对于过程相关杂质(宿主细胞蛋白质)和产物相关杂质(降解产物或加合物)的纯度。

[0960] 用购自Bio-Rad Laboratories有限公司的市售预制凝胶系统“Mini Protean”进行SDS-PAGE分析。在“Any kD”拆分凝胶(#456-9036)上分析人源化scFv。在两种情况下,均使用制造商推荐的Tris/甘氨酸缓冲体系。使用SimplyBlue™染色液(Life Technologies Corp., #LC6060)进行蛋白质条带的检测,采用了Coomassie染色。染色程序按照供应商的协议进行。

[0961] 使用文档系统ChemiDoc XRS System(Bio-Rad Laboratories有限公司,#170-8265)和软件Image Lab,版本4.0.1(Bio-Rad Laboratories有限公司,#170-9690)进行染色的蛋白质凝胶的记录和分析。

[0962] 2.4.6.2在280nm处的UV吸收度

[0963] 该280nm处的UV吸光度法是如USP第1057章中概述的总蛋白质测定法。由于芳族氨基酸的存在,蛋白质溶液吸收280nm波长的UV光。UV吸光度是蛋白质中酪氨酸和色氨酸残基含量的函数,并且与蛋白质浓度成比例。可以通过应用比尔定律: $A = \epsilon * l * c$,根据USP第851章关于光谱学的内容来确定未知蛋白质溶液的吸光度,其中吸光度(A)等于摩尔吸光系数(ϵ)、吸收路径长度和物质的浓度的乘积。用软件VectorNTI®(Life Technologies Corporation)计算scFv的摩尔吸光系数。

[0964] 使用配备有Nanoquant板(Tecan Group有限公司)的Infinity读数器M200Pro进行UV吸光度的测量。在280nm和310nm处测量蛋白质样品的吸光度,其中后一波长用作从280nm信号中减去的参照信号。为了解释样品基质的潜在干扰,对每次测量均进行扣空白(blank subtraction)处理。获得的蛋白质样品的最终吸光度信号用于使用Lambert-Beer定律计算蛋白质浓度。

[0965] 所有测量均在仪器规格给出的范围内进行,测量范围为0-40D,制造商规定的重现性<1%,均匀度<3%。

[0966] 2.4.6.3SE-HPLC(尺寸排阻高压液相色谱法)

[0967] SE-HPLC是一种基于固体固定相和液体流动相的分离技术,如USP第621章所述。该方法利用疏水固定相和水性流动相基于分子的大小和形状来分离分子。分子的分离发生在特定柱的空隙体积(V_0)和总渗透体积(V_T)之间。通过SE-HPLC测量Chromaster HPLC系统(Hitachi High-Technologies Corporation)上进行,该系统配备有自动样品注射和检测波长设定为280nm的UV检测器。该设备由软件EZChrom Elite(Agilent Technologies, Version 3.3.2SP2)控制,该软件还支持对所得色谱图进行分析。在注射前通过离心清除蛋白质样品,并在将自动进样器的温度保持在4-6°C。对于scFv样品的分析,使用Shodex KW402.5-4F柱(Showa Denko有限公司,#F6989201),标准缓冲盐水流动相(50mM乙酸钠pH 6.0,250mM氯化钠),推荐流速为0.35mL/min。每次注射的目标样品加载量为5 μ g。在280nm的波长下通过UV检测器检测样品,并通过合适的软件套件记录数据。在 V_0 至 V_T 的范围内分析

所得色谱图,从而排除洗脱时间>10分钟的基质相关的峰。

[0968] 为了确保该方法的中间精确度,在每个HPLC序列的开始和结束时常规测量参照标准品。用于该系统适用性测试的参照标准品是一个批次生产并等分以用于每个测量时间点的scFv。

[0969] 2.4.6.4DSF(差示扫描荧光法)

[0970] 基本上如Niesen(Niesen et al., Nat Protoc. 2(2007) 2212-21)所述,通过差示扫描荧光法(DSF)测定所测试的scFv构建体的热诱导去折叠的转变中值。DSF法是测量温度依赖性蛋白质去折叠的非药典方法。由DSF测量热解折叠温度使用MX3005P qPCR仪(Agilent Technologies)进行,该MX3005P qPCR仪由MX Pro软件包(Agilent Technologies)控制,并配备有设定在492/610nm处的激发/发射滤光片。反应设置在Thermo快速96白色PCR板(Abgene; #AB-0600/W)中。为了检测蛋白质去折叠,使用市售的染料SYPRO橙的储备溶液(Molecular Probes; #S6650),最终稀释度为1:1'000。为了解折叠测量,将蛋白质样品在标准化缓冲盐水溶液中稀释至终浓度为50µg/mL。热解折叠通过如下温度程序进行:以25°C开始,以1°C的步长升温至96°C,每步持续时间为30秒。在该温度程序期间,记录每个样品的荧光发射。使用Microsoft Excel模板包(Niesen, Nature Protocols 2007, Vol. 2 No. 9)处理并评估记录的原始数据,并使用GraphPad Prism(GraphPad Software有限公司)程序使用玻尔兹曼方程拟合荧光数据以获得过渡中点(T_m)。

[0971] 为了产生解折叠中点的可靠且稳定的测量,进行至少两次测量。为了评估中间精度,每次测量都包括参照标准品(特征已知的scFv),以允许比较不同日期的测定性能。

[0972] 2.4.6.5稳定性研究

[0973] 为了评估不同scFv构建体的稳定性作为这些分子可行性的读数,可以设计一项短期稳定性研究方案。将蛋白质构建体在简单的缓冲盐水制剂(参见上文)中浓缩至目标浓度为10mg/mL。通过SE-HPLC测定单体含量以确认纯度超过>95%的成功标准。随后将蛋白质样品在<-80°C、4°C和37°C下储存4°C周,并在不同时间点分析等分试样。主要读数是通过SE-HPLC的分析,其允许对可溶性较高分子量的低聚物和聚集体定量。作为支持性测量,通过280nm处的UV吸光度确定蛋白质含量,这表明在储存期间是否通过沉淀损失了大量蛋白质。另外,通过SDS-PAGE测定本研究终点时的纯度,其表明构建体在降解或共价多聚化方面的稳定性。

[0974] 实施例3:多特异性构建体生成

[0975] 将抗IL-17(27-07-G02-sc01,见表1)、抗TNFα(16-19-B11-sc06,见表1,在WO 2017/158101中描述)和抗HSA结合结构域(19-01-H04-sc03,见表1)组合成两种不同的三特异性抗体形式:三体和scDb-scFv形式(表1Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.)。三体形式是一个Fab片段与融合到Fab的每条链的羧基末端的一个scFv分子的融合体,从而形成一个三特异性分子(Fab-(scFv)₂)。该形式采用了Fab片段的异二聚组装,该片段由一条蛋白链上融合了恒定轻结构域(CL)的可变轻结构域(VL),以及第二条蛋白链上融合了恒定重结构域(CH1)的可变重结构域(VH)组成。在羧基末端,恒定结构域分别通过一个灵活的Gly-Ser连接体与scFv片段相连。scDb-scFv是一种形式,其中scFv片段通过一个灵活的Gly-Ser连接体与高度稳定的单链二抗体(scDb)形式融合。Fab-scFv₂(三体)和scDb-scFv两种形式都可以在CHO-S宿主细胞中重组表达。

[0976] 在药效学和生物物理参数方面,测试了三特异性形式中各个结合结构域的最佳相对位置。由于每种形式允许不同的配置,即结构域之间的相对位置。

[0977] 在三体片段的CL和CH1位置的scFv融合被认为是等价的,导致这种形式有三种变体(图10,A)。因为scFv部分与分子的单链Diabody (scDb) 核心结构域的C末端融合优于N末端融合,所以只评估了这种形式的C末端融合变体。分析了这种形式的几个变体(图10,B)。所有分子的序列列于表1。

[0978] 实施例4:先导制造通用工艺

[0979] 使用CHOgro瞬时转染试剂盒 (Mirus) 在CHO-S细胞中进行所有三特异性构建体的表达。在37°C下表达5-7天(细胞活力<70%)后,通过离心收获培养物,并通过蛋白质L亲和色谱法从澄清的培养上清液中纯化蛋白接下来通过尺寸排阻色谱法进行精炼步骤。对于所制备的材料的质量控制,使用了标准分析方法,例如SE-HPLC、SDS-PAGE和UV280。

[0980] 表16列出了三特异性形式变体的生产和特征总结。图11列出了A3-A8的生产和纯化。使用在磷酸盐缓冲盐水(PBS)结合缓冲液中预平衡的包装蛋白L柱,直接从CHO细胞培养上清液中捕获抗体片段。样品应用后,用结合缓冲液清洗柱子,用一步式pH梯度洗脱蛋白质。通过尺寸排除法高效液相色谱法(SE-HPLC)测定蛋白质馏分的单体含量,馏分汇集并通过透析将缓冲液交换为pH6.4的柠檬酸磷酸盐缓冲液(最终缓冲液)。馏分池用离心浓缩器浓缩,以减少总样品量,用于随后的制备性尺寸排除色谱(SEC),使用在PBS中预平衡的GE Superdex 200 10/300柱,对蛋白质样品进行精制。样品用最终缓冲液等压洗脱,并通过SE-HPLC、SDS-PAGE和UV₂₈₀进一步表征。

[0981] 表16.三特异性形式变体的生产和表征总结。

蛋白质 ID	形式	ProteinL 之后的	SEC 之后的纯度
		产量 [mg/L 培养基]*	SE-HPLC [%单体]
[0982] A3	三体	65.9	98.4
A4	三体	17.5**	99.2
A5	三体	41.1	100.0
A6	scDb-scFv	36.3	98.9
A7	scDb-scFv	22.5	100.0
A8	scDb-scFv	29.6	98.9

[0983] *UV280

**由于实验误差~50%损失

[0984] 实施例5:药理学表征

[0985] 5.1在pH5.5和pH7.4时对HSA和CSA的亲合力

[0986] 通过在MASS-1设备 (Sierra Sensors) 上运行SPR光谱,评估了纯化的三特异性分子与人血清白蛋白 (HSA) 和食蟹猴血清白蛋白 (CSA) 的结合。将HSA直接固定在高容量胺传感器芯片 (Sierra Sensors) 上,三特异性分子作为分析物注入,使用剂量响应多循环动力

学分析,分析物的浓度范围从0.35到90nM,在pH5.5或pH7.5的运行缓冲液中稀释。使用1:1的结合模型对获得的传感器图进行拟合。使用CSA固定化的传感器芯片,以类似的方法评估对CSA的亲合力。仅在pH5.5和pH7.5时测量A5和A7与CSA的结合。下表(表17)总结了获得的对HSA和CSA的亲合力。

[0987] 表17. 在pH5.5和pH7.4时对HSA和CSA的亲合力

蛋白 质编 号	在 PH5.5 时对 HSA 的亲合力				在 PH7.4 时对 HSA 的亲合力			
	ka (M-1 s-1)	kd (s-1)	KD (M)	结 合 (%)#	ka (M-1 s-1)	kd (s-1)	KD (M)	结 合 (%)#
	[0988] A3	6.23E+05	5.90E-04	9.47E-10	70.2%	4.06E+05	5.57E-04	1.372E-09
A4	1.85E+05	3.08E-04	1.67E-09	51.5%	8.72E+04	4.17E-04	4.788E-09	43.3%
A5	1.80E+05	2.99E-04	1.66E-09	54.0%	1.10E+05	2.95E-04	2.686E-09	42.8%
A6	4.75E+05	3.65E-04	7.7E-10	62.3%	2.66E+05	3.32E-04	1.248E-09	57.5%
A7	2.84E+05	3.73E-04	1.32E-09	58.7%	1.93E+05	3.69E-04	1.913E-09	55.0%
A8	4.69E+05	3.75E-04	7.99E-10	62.2%	3.10E+05	4.40E-04	1.421E-09	56.3%

#: 达到的最大结合水平, 归一化至理论 Rmax

蛋白质 编号	在 PH5.5 时对 CSA 的亲合力				在 PH7.4 时对 CSA 的亲合力			
	ka (M-1 s-1)	kd (s-1)	KD (M)	结 合 (%)#	ka (M-1 s-1)	kd (s-1)	KD (M)	结 合 (%)#
	[0989] A3			未测量				未测量
A4			未测量				未测量	
A5	1.81E+05	1.44E-04	7.952E-10	37.1%	7.78E+04	1.93E-04	2.474E-09	19.4%
A6			未测量				未测量	
A7	3.18E+05	1.47E-04	4.63E-10	44.1%	1.64E+05	2.15E-04	1.311E-09	31.6%
A8			未测量				未测量	

#: 达到的最大结合水平, 归一化至理论 Rmax

[0990] 5.2对人TNF α 以及人和食蟹猴IL-17A的亲合力

[0991] 在T200设备(Biacore,GE Healthcare)上用SPR分析来测量对人TNF α 以及人和食

蟹猴IL-17A的亲合力。在这个实验中,使用Biacore的Biotin-CAPture试剂盒捕获生物素化的抗原。在每个分析物注入循环后,将CAP传感器芯片再生并捕获新抗原。三特异性分子作为分析物注入,使用剂量响应多循环动力学分析,分析物的浓度范围从0.35到90nM,在运行缓冲液中稀释。使用1:1结合模型拟合获得的传感图。仅对A5和A7测量了与食蟹猴IL-17A的结合。下表(表18)总结了对人TNF α 以及人和食蟹猴IL-17A的亲合力。如该表所示,有些分子与TNF α 或IL-17A的结合低于10%。这一发现可以通过这些结构域对其各自靶标的可及性降低来解释。尽管这些低结合剂的测量亲合力在类似的范围内,有时甚至明显高于达到较高结合水平的分子,但这些分子抑制TNF α 和IL-17A的生物活性的潜力明显降低(见表19和表21)。

[0992] 使用小鼠L929成纤维细胞测定纯化的三特异性分子对TNF诱导的生物反应的影响。首先,用放线菌素D抑制L929细胞的生长。然后,每孔铺60'000个细胞,然后用人(5pM)或食蟹猴(5pM) TNF α 以及3倍连续稀释的三特异性分子和内部参考A13处理,A13是一种含有与三特异性分子相同的抗TNF结构域的scDb (SEQ ID NO:125)。孵育20小时后,使用Sigma-Aldrich公司的细胞计数试剂盒-8评估细胞活力。图12中描述了六种三特异性分子中和TNF α 的数据。此外,图13显示了A5和A7比较其中和人和食蟹猴TNF α 能力的结果。表19中总结了对人TNF α 确定的相对于参考A13的相对IC₅₀值,以及对人和食蟹猴TNF α 获得的IC₅₀值之间的比。

[0993] 表18. 对人TNF α 以及人和食蟹猴IL-17A的亲合力

蛋白质 编号	对人 TNF α 的亲合力				对人 IL-17A 的亲合力				对食蟹猴 IL-17A 的亲合力			
	ka (M-1 s-1)	kd (s-1)	KD (M)	结合(%)#	ka (M-1 s-1)	kd (s-1)	KD (M)	结合(%)#	ka (M-1 s-1)	kd (s-1)	KD (M)	结合(%)#
A3	4.31E+04	<1.00E-6	<2.32E-11	1.0%	5.91E+04	9.04E-05	1.53E-09	5.8%				未测量
A4	9.08E+04	2.33E-05	2.57E-10	4.4%	2.15E+05	7.23E-05	3.37E-10	29.6%				未测量
A5	2.91E+05	2.92E-05	1.00E-10	11.7%	1.39E+05	7.99E-05	5.75E-10	19.3%	7.39E+04	3.86E-05	5.23E-10	23.3%
A6	1.12E+05	2.66E-06	2.37E-11	6.0%	2.16E+05	8.96E-05	4.14E-10	30.2%				未测量
A7	2.96E+05	3.59E-05	1.22E-10	14.0%	2.29E+05	7.83E-05	3.41E-10	31.6%	2.64E+05	5.89E-05	2.23E-10	51.5%
A8	2.19E+05	4.06E-05	1.85E-10	9.3%	1.73E+05	8.36E-05	4.83E-10	25.6%				未测量

#: 达到的最大结合水平, 归一化至理论 Rmax

[0995] 表19. 在L929试验中获得的三特异性分子的相对效力数据汇总表。

L929 试验中 TNF 的中和			
蛋白质 ID	人		
	IC50 [nM]	相对 IC50 & A13	IC50, 食蟹猴/IC50, 人
A3	4.5	0.003	n.a.
A4	0.08	0.2	n.a.

	A5	0.02	0.9	3.3
[0997]	A6	0.06	0.2	n.a.
	A7	0.01	1	2.5
	A8	0.03	0.4	n.a.

&: IC₅₀, A13/IC₅₀, 测试样品 (nM)

[0998] 5.3HT-29试验(同时阻断人TNF和人IL-17A)。

[0999] IL-17A与TNF协同作用,上调结直肠腺癌细胞系HT-29中Gro- α /CXCL1等趋化因子和细胞因子子集的表达。因此,通过分析HT-29细胞的Gro- α /CXCL1分泌,评估了人TNF α 和人IL-17A的同时阻断。为了测试HSA结合对效力的影响,还在有HSA的情况下,评估了抑制IL-17A和TNF α 诱导的Gro- α /CXCL1分泌的IC₅₀。实验是在没有和有1mg/ml HSA的情况下进行的。在96孔板的每个孔中接种50'000个HT-29细胞。除了滴定的测试的三特异性分子以及内部参照A13(SEQ ID NO:125)和苏金单抗之外,向HT-29细胞中添加人TNF α (0.2ng/ml)和人IL-17A(2ng/ml)的预稀释液。在37°C和5%CO₂孵育24小时后,收集上清液,通过ELISA定量GRO- α (CXCL1趋化因子)分泌。图14显示了六种三特异性分子在1mg/ml人血清白蛋白(HSA)存在下产生的滴定曲线。表20总结了相对于参照苏金单抗和A13的相对IC₅₀值,以及在存在或不存在HSA时观察到的抑制百分比。相对于苏金单抗的相对IC₅₀是通过用苏金单抗的IC₅₀(ng/ml)除以被测三特异性分子的IC₅₀(ng/ml)来计算的。相对于A13的相对IC₅₀是通过将A13的IC₅₀(nM)除以被测三特异性分子的IC₅₀(nM)来计算的。

[1000] 观察到A5、A7和A8的效力最好。三特异性分子的效力比苏金单抗高50至90倍,比A13高2至5倍。与单一阻断TNF α 或IL-17A相比,同时阻断TNF α 和IL-17A的效果急剧增加。要达到与苏金单抗和A13的最大效果相同的效果,需要的浓度大约低200倍和60倍。

[1001] 表20. 在HT-29试验中获得的三特异性分子的相对效力数据汇总。

HT-29 试验中 IL-17A TNF 的中和 (-/+ HSA)

蛋白质 ID	相对 IC50* 苏金单 抗 (ng/ml)		相对 IC50& A13 (nM)		% 抑制	
	-HSA	+HSA	-HSA	+HSA	-HSA	+HSA
A3	2.4	11.8	0.2	0.5	80.2	52.2
A4	7.1	6	0.6	0.3	106.6	104
[1002] A5	88.9	63	2.4	1.5	104.7	101.7
A6	30	26.8	0.6	1	105.1	98.9
A7	52	64.5	4.8	1	103.7	101.2
A8	44.1	304.2	3.9	4.6	103.4	100.4

*: IC50, 苏金单抗/IC50, 测试样品 (ng/ml)

&: IC50, A13/IC50, 测试样品 (nM)

[1003] 5.4竞争性ELISA (hIL-17A与hIL-17RA结合的抑制)

[1004] 通过竞争性ELISA评估hIL-17A与hIL-17RA结合的抑制作用。将hIL-17RA涂覆在ELISA板上。将生物素化的hIL-17A与三特异性分子预孵育1.5小时,然后将混合物加入ELISA板上,使其与hIL-17RA结合1小时。然后,加入用于检测生物素化的IL-17A的链霉亲和素,并将板子孵育1小时。最后,加入四甲基联苯胺溶液,使板子显影5至10分钟,用1M HCl停止反应。在450nm和570nm(参考波长)下读板。图15中表示了六种三特异性分子的滴定曲线。表21总结了相对于参照物苏金单抗的计算的相对IC₅₀值。

[1005] 表21. 在竞争性ELISA中获得的三特异性分子的效力汇总表。

蛋白质编号	IL-17A/IL-17RA 相互作用的阻
	断
	相对 IC50 * 苏金单抗 (ng/ml)
A3	2.2
A4	6.3
[1006] A5	4.9
A6	10
A7	10.6
A8	10.2

*: IC50, 苏金单抗/IC50, 测试样品 (ng/ml)

[1007] 5.5同时与TNF、IL-17A和HSA结合

[1008] 为了证明三特异性分子与人TNF α 、人IL-17A和HSA的同时结合,采用了SPR实验。简而言之,将六个三特异性分子(A3-A8)直接固定在一个高容量胺传感器芯片(Sierra Sensors)上,并以2500nM(HSA)、180nM(TNF α)和90nM(IL-17A)的浓度依次注入抗原作为分析物,确保每种结合达到饱和。对所有可能的抗原注射顺序进行了测试,产生了六种可能的顺序。对于所有的三特异性分子,都观察到与所有三种抗原同时结合。图16显示了与三特异性分子同时结合的传感器图。

[1009] 为了评估每种抗原与三特异性分子的同时结合,使用各自的配体和分析物分子量以及三特异性分子的固定化水平,计算每次注射时相对于理论R_{max}的结合水平。通过对两次注射获得的相对于理论R_{max}的单个最大结合取平均,得到每种抗原相对于理论R_{max}的最大结合的平均值,其中注射各自的抗原作为第一分析物(在没有其他结合抗原的情况下)。接下来,将每个分析物注射液相对于理论R_{max}的结合与它的平均最大结合进行比较,以计算在有其他结合的抗原存在的情况下获得的结合分数。表12显示了每种抗原相对于其平均最大结合的结合水平,该表显示了与平均最大结合相比,每种抗原的结合水平。计算了每种抗原的相对于理论R_{max}的结合水平和平均最大结合(没有其他抗原时的结合水平)。为了评估每个抗原在其他结合抗原存在下的结合,相对于每个分析物注射的理论R_{max}的结合被归一化为其平均最大结合,得到一个结合值,该值显示在其他抗原存在下的结合程度。

[1010] 表22. 每个抗原的相对结合水平与平均最大结合量的比较。

[1011]

相对于理论R _{max} 的抗原结合水平				相对于理论R _{max} 的最大结合水平的平均值				获得的抗原结合水平,与相对于理论R _{max} 的平均最大结合水平相比							
		第一抗原的结合	第二抗原	第三抗原的结合			HSA	TNF α	IL-17A			第一抗原的结合	第二抗原的结合	第三抗原的结合	
1. 循环															
	HSA	TNF α	IL-17A												
A3	21%	34%	52%	A3	21%	37%	48%	A3	98.8%	92.8%	108.9%	A3	101.2%	89.3%	126.6%
A4	18%	37%	59%	A4	19%	39%	58%	A4	97.8%	94.2%	101.8%	A4	102.2%	91.9%	100.6%
A5	33%	43%	56%	A5	33%	44%	54%	A5	99.6%	97.8%	104.6%	A5	100.4%	92.9%	108.2%
A6	16%	21%	34%	A6	16%	22%	32%	A6	99.6%	94.1%	104.6%	A6	100.4%	91.3%	107.6%
A7	30%	23%	38%	A7	31%	25%	32%	A7	99.4%	92.6%	118.7%	A7	100.6%	85.4%	122.0%
A8	24%	24%	37%	A8	24%	26%	35%	A8	99.6%	93.7%	105.8%	A8	100.4%	88.9%	111.6%
2. 循环															
	HSA	IL-17A	TNF α												
A3	21%	43%	47%	A3	21%	43%	47%	A3	101.2%	89.3%	126.6%	A3	101.2%	89.3%	126.6%
A4	19%	53%	39%	A4	19%	53%	39%	A4	102.2%	91.9%	100.6%	A4	102.2%	91.9%	100.6%
A5	33%	50%	48%	A5	33%	50%	48%	A5	100.4%	92.9%	108.2%	A5	100.4%	92.9%	108.2%
A6	16%	29%	24%	A6	16%	29%	24%	A6	100.4%	91.3%	107.6%	A6	100.4%	91.3%	107.6%
A7	31%	28%	30%	A7	31%	28%	30%	A7	100.6%	85.4%	122.0%	A7	100.6%	85.4%	122.0%
A8	24%	31%	29%	A8	24%	31%	29%	A8	100.4%	88.9%	111.6%	A8	100.4%	88.9%	111.6%
3. 循环															
	TNF α	HSA	IL-17A												
A3	37%	21%	52%	A3	37%	21%	52%	A3	99.3%	98.7%	107.5%	A3	99.3%	98.7%	107.5%
A4	39%	14%	56%	A4	39%	14%	56%	A4	99.7%	77.7%	97.6%	A4	99.7%	77.7%	97.6%
A5	44%	30%	54%	A5	44%	30%	54%	A5	99.7%	92.7%	101.5%	A5	99.7%	92.7%	101.5%
A6	22%	14%	33%	A6	22%	14%	33%	A6	99.6%	84.5%	103.5%	A6	99.6%	84.5%	103.5%
A7	25%	26%	37%	A7	25%	26%	37%	A7	99.7%	86.1%	114.3%	A7	99.7%	86.1%	114.3%
A8	26%	21%	36%	A8	26%	21%	36%	A8	99.8%	84.9%	102.2%	A8	99.8%	84.9%	102.2%
4. 循环															
	TNF α	IL-17A	HSA												
A3	37%	53%	21%	A3	37%	53%	21%	A3	100.7%	110.8%	97.6%	A3	100.7%	110.8%	97.6%
A4	39%	58%	13%	A4	39%	58%	13%	A4	100.3%	100.5%	71.8%	A4	100.3%	100.5%	71.8%
A5	44%	56%	26%	A5	44%	56%	26%	A5	100.3%	105.5%	78.3%	A5	100.3%	105.5%	78.3%
A6	22%	35%	11%	A6	22%	35%	11%	A6	100.4%	107.8%	71.3%	A6	100.4%	107.8%	71.3%
A7	25%	39%	24%	A7	25%	39%	24%	A7	100.3%	122.5%	77.3%	A7	100.3%	122.5%	77.3%
A8	26%	39%	18%	A8	26%	39%	18%	A8	100.2%	110.1%	72.7%	A8	100.2%	110.1%	72.7%
5. 循环															
	IL-17A	HSA	TNF α												
A3	48%	21%	47%	A3	48%	21%	47%	A3	99.5%	100.8%	128.3%	A3	99.5%	100.8%	128.3%
A4	57%	17%	39%	A4	57%	17%	39%	A4	99.3%	91.5%	99.5%	A4	99.3%	91.5%	99.5%
A5	53%	28%	48%	A5	53%	28%	48%	A5	99.2%	85.0%	108.6%	A5	99.2%	85.0%	108.6%
A6	32%	13%	24%	A6	32%	13%	24%	A6	99.3%	83.1%	108.2%	A6	99.3%	83.1%	108.2%
A7	32%	28%	30%	A7	32%	28%	30%	A7	98.5%	90.5%	120.9%	A7	98.5%	90.5%	120.9%
A8	35%	21%	28%	A8	35%	21%	28%	A8	98.6%	88.2%	109.3%	A8	98.6%	88.2%	109.3%
6. 循环															
	IL-17A	TNF α	HSA												
A3	48%	47%	21%	A3	48%	47%	21%	A3	100.5%	128.8%	100.2%	A3	100.5%	128.8%	100.2%
A4	58%	39%	14%	A4	58%	39%	14%	A4	100.7%	99.6%	73.5%	A4	100.7%	99.6%	73.5%
A5	54%	48%	25%	A5	54%	48%	25%	A5	100.8%	108.2%	77.6%	A5	100.8%	108.2%	77.6%
A6	32%	24%	11%	A6	32%	24%	11%	A6	100.7%	110.3%	70.7%	A6	100.7%	110.3%	70.7%
A7	33%	30%	24%	A7	33%	30%	24%	A7	101.5%	122.1%	79.5%	A7	101.5%	122.1%	79.5%
A8	36%	29%	18%	A8	36%	29%	18%	A8	101.4%	113.6%	73.0%	A8	101.4%	113.6%	73.0%

[1012] 对于所有的组合,相对于理论R_{max},抗原结合至少是平均最大结合的70% (例如,当TNF α 作为第二或第三分析物注入固定化的A3上时,与没有其他抗原时的结合水平相比,获得的相对结合水平或者略微下降,达到92.8%,或者略微上升,达到126.6%)。值得注意的是,当HSA作为最后一个分析物被注入时,除A3外,所有三特异性分子的相对结合水平下降到约70%。总之,所有三特异性分子均观察到同时结合,在测试分子之间没有实质性的差异。

[1013] 5.6基本可开发性评估的药代动力学表征和分子选择总结

[1014] 表23概述了六个三特异性分子的药理学表征,并为选择分子进行可开发性评估提供了依据。三个分子,即A5、A7和A8,被选为可开发性评估的依据是它们在L929试验中中和TNF以及HT29试验中同时中和TNF α 和IL-17A方面的总体性能优于A3、A4和A6。所有三个分子对三个靶点中的每一个都表现出类似的亲和力。A7对IL-17A和TNF α 都显示出最高的中和效力,而A5对IL-17A的中和效力降低了约2倍,A8对TNF α 的中和效力比A7低约2倍。

[1015] 表23. 药理学表征的总结。

[1016]

蛋白质 编号	对人 TNF 的亲合力		对人 IL-17A 的亲合力 (捕获设置)		在 PH5.5 时对 HSA 的 亲合力		HT-29 试验中 IL-17A 和 TNF 的中和						IL-17A/I L-17RA 相互作用 的阻断	L929 试 验中 TNF 的 中和
	KD (M)	结合 (%)#	KD (M)	结合 (%)#	KD (M)	结合 (%)#	相对 IC50* 苏 金单抗		相对 IC50& A13		% 抑制		相对 IC50*	相对 IC50&
							-HSA	+HSA	-HSA	+HSA	-HSA	+HSA		
A3	<2.32E-11	1.0%	1.53E-09	5.8%	9.467E-10	70.2%	2.4	11.8	0.2	0.5	80.2	52.2	2.2	0.003
A4	2.57E-10	4.4%	3.37E-10	29.6%	1.67E-09	51.5%	7.1	6.0	0.6	0.3	106.6	104.0	6.3	0.2
A5	1.00E-10	11.7%	5.75E-10	19.3%	1.659E-09	54.0%	88.9	63.0	2.4	1.5	104.7	101.7	4.9	0.9
A6	2.37E-11	6.0%	4.14E-10	30.2%	7.697E-10	62.3%	30.0	26.8	0.6	1.0	105.1	98.9	10.0	0.2
A7	1.22E-10	14.0%	3.41E-10	31.6%	1.316E-09	58.7%	52.0	64.5	4.8	1.0	103.7	101.2	10.6	1.0
A8	1.85E-10	9.3%	4.83E-10	25.6%	7.991E-10	62.2%	44.1	304.2	3.9	4.6	103.4	100.4	10.2	0.4

*: IC50, 苏金单抗/IC50, 测试样品 (ng/ml)
 &: IC50, A13/IC50, 测试样品 (nM)
 #: 达到的最大结合水平, 归一化至理论 Rmax

[1017] 实施例6:可开发性评估

[1018] 由于A3、A4和A6显示抗TNF结构域的结合和效力明显降低,因此只选择A5、A7和A8进行可开发性评估。

[1019] 6.1探索性的pH兼容性

[1020] 将选择的纯化的三特异性候选物 (A5、A7和A8) 浓缩到>20g/L,随后在覆盖制剂过程潜在pH范围的缓冲液中进行配制。在这些pH值为3.5至7.5的条件下,将分子在20°C下孵育8小时或在4°C下孵育48小时,然后采用通用的稳定性指示方法SE-HPLC和SDS-PAGE,以建立分子与潜在工艺条件的初步兼容性概况,并确定分子储存稳定性评估的缓冲液条件。

[1021] 探索性的pH值实验是用A5和A7在多个50mM的磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液中进行的,范围从pH3.5到7.5 (表24)。此外,用A5、A7和A8在pH7.4的PBS缓冲液中进行了实验 (表25)。所有这三种分子在任何所评估的缓冲液中都没有损失>5%的单体含量。

[1022] 表24. 在通用磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液中的探索性pH兼容性研究。

蛋白质 ID	pH	[%单体含量]			[%单体损失]		蛋白质浓度 [mg/mL]			[%含量损失]	
		t0	t8	t48	t8	t48	t0	t8	t48	t8	t48
[1023] A5	pH 3.5	94.6	89.5	89.2	5.3	5.7	9.4	8.3	8.1	11.0	13.8
	pH 4.5	95.5	93.8	94.5	1.8	1.1	10.4	7.3	9.0	29.6	13.3
	pH 5.5	93.1	91.5	90.8	1.7	2.5	17.2	21.7	18.7	-25.9	-8.3
	pH 6.5	91.6	89.9	89.1	1.9	2.8	27.6	33.9	23.4	-22.7	15.5
	pH 7.5	90.8	87.7	88.2	3.4	2.9	43.9	22.8	53.3	48.1	-21.3
A7	pH 3.5	NA*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	pH 4.5	98.6	98.0	97.8	0.6	0.8	0.8	-0.6	0.4	171.3	46.3
	pH 5.5	98.2	97.3	97.6	0.9	0.6	3.3	1.2	2.2	63.8	34.9
	pH 6.5	98.2	97.2	97.5	1.0	0.7	4.0	1.9	3.9	52.7	1.2
	pH 7.5	97.8	96.2	96.3	1.6	1.5	6.1	3.7	5.6	40.3	8.4

[1024] 表25. 在PBS中探索性的pH兼容性研究。

蛋白质 ID	[%单体含量]			[%单体损失]	
	t0	t8	t48	t8	t48
[1025] A5	98.91	98.18	98.6	0.74	0.31
[1026] A7	97.67	94.62	92.81	3.12	4.98
A8	98.35	97.54	94.43	0.82	3.99

[1027] 6.2热解折叠

[1028] 差示扫描荧光法 (DSF) 是一种测量随温度变化的蛋白质解折叠的非规范性方法，其测量方法如下。

[1029] 在pH6.4的50mM磷酸盐缓冲液中制备样品，最终蛋白浓度为50 μ g/mL，最终浓度为5x SYPRO® Orange，总体积为100 μ l。将25微升制备的样品一式三份添加到白壁AB基因PCR板中。该测定在用作热循环仪的qPCR机中进行，并使用软件的自定义染料校准程序检测荧光发射。将包含测试样品的PCR板以1 $^{\circ}$ C的递增量进行从25 $^{\circ}$ C到96 $^{\circ}$ C的温度变化，在每次温度递增后，暂停30s。总测定时间为约两个小时。通过GraphPad Prism软件使用数学二阶导数方法计算曲线的拐点来计算T_m。报告的T_m是三个测量值的平均值。

[1030] 表26显示了在通用缓冲液 (pH 6.4的柠檬酸磷酸盐缓冲液, 150mM NaCl) 中配制的三特异性分子的解链温度。

[1031] 表26.通用缓冲液中三特异性分子的DSF测量。

蛋白质 ID	抗体形式	DSF, 在通用缓冲液中, T _m [°C]
A5	三体	64.3
A7	scDb-scFv	60.5
A8	scDb-scFv	59.0

[1033] 6.3储存稳定性

[1034] 作为选定的三特异性分子的稳定性和最终可开发性的指示,对选定的分子(A5、A7和A8)在不同温度和蛋白质浓度的通用非优化配方缓冲液(PBS, pH7.4)中进行了短期稳定性研究。

[1035] 在研究开始之前,将样品配制在PBS中,并使用Vivaspin浓度装置浓缩至10mg/ml。本研究采用的孵育条件是温度为-80°C、4°C和37°C,蛋白质浓度为10mg/ml,持续4周。为了评估分子的稳定性,通过SE-HPLC、UV₂₈₀测量和SDS-PAGE(图17和表27),在不同的时间点记录了蛋白质含量和纯度等分析性读出。

[1036] 表27.在37°C、4°C和-80°C的温度下,在蛋白质浓度为10mg/mL的情况下进行了4周的储存稳定性研究。

蛋白 质 ID	温度 [°C]	浓度 [mg/mL]	[%单体含量]						%单体损失				
			d0	d2	d7	d14	d21	d28	d2	d7	d14	d21	d28
A5	-80.0	10.0	98.9	98.9	98.9	98.8	98.8	98.8	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1
	4.0		98.9	98.9	98.7	98.2	98.0	97.8	0.0	0.2	0.7	0.9	1.1
	37.0		98.9	93.2	88.3	79.3	63.9	65.4	5.8	10.7	19.8	35.4	33.9
A7	-80.0	10.0	98.1	97.4	97.6	97.0	97.4	97.1	0.7	0.5	1.1	0.7	1.0
	4.0		98.1	96.2	95.2	94.6	94.6	94.1	1.9	3.0	3.6	3.6	4.1
	37.0		98.1	92.3	90.5	88.1	80.8	83.7	5.9	7.7	10.2	17.6	14.6
A8	-80.0	10.0	98.3	98.2	98.2	98.2	98.2	98.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.2
	4.0		98.3	98.0	97.2	95.9	95.3	95.0	0.3	1.1	2.4	3.0	3.3
	37.0		98.3	79.9	67.7	66.2	45.7	42.4	18.7	31.1	32.6	53.5	56.8

[1038] 如图18中d0和d28稳定性样品的SE-HPLC痕迹叠加所示,37°C下单体含量百分比随时间的记录显示了分子之间的实质性差异。A8与A5和A7相比,稳定性明显较差,表现出相当

多的高分子量种类,这是出乎意料的,因为后者分子与A7有相同的抗体形式,并且由相同的结构域组成,尽管结构域的方向有所改变。

[1039] 6.4冻/融稳定性

[1040] 除了上述储存稳定性研究外,还针对五次重复冻融(F/T)循环评估了分子的兼容性(表28)。对于F/T稳定性的评估,使用了与储存稳定性研究相同的分析方法来监测分子在五个F/T循环后的质量。所有分子的单体含量损失都低于1%(表28)。

[1041] 在研究开始之前,将样品配制在PBS中,并使用Vivaspin浓度装置浓缩至10mg/ml。小样本量(<20 μ L)允许快速的冷冻和解冻时间间隔。对样品进行五次重复的冻解循环。使它们在-80 $^{\circ}$ C的温度下冷冻并在室温下解冻。为了评估分子的稳定性,在每个循环之后,通过SE-HPLC和UV₂₈₀测量,在不同的时间点记录分析读数,例如蛋白质含量和纯度。

[1042] 表28.F/T稳定性评估。三特异性分子被反复冷冻和解冻,每个循环后测量单体含量。

蛋白质 ID	温度[$^{\circ}$ C]	浓度 [mg/mL]	[%单体含量]					%单体损失						
			FT1	FT2	FT3	FT4	FT5	FT1	FT2	FT3	FT4	FT5		
[1043]														
A5	-80 / RT	10.0	98.9	98.9	98.8	98.8	98.8	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1		
A7	-80 / RT	10.0	97.4	97.6	97.0	97.4	97.1	0.7	0.5	1.1	0.7	1.0		
A8	-80 / RT	10.0	98.2	98.2	98.2	98.2	98.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.2		

[1044] 6.5基本可开发性评估总结

[1045] 可开发性评估总结在表29中。

[1046] 表29.可开发性评估。

蛋白质 编号	Tm	4w, 10 mg/mL @ 4 °C 的单体损 失	5 个 F/T 循环后的 单体损失	在 pH 范围 3.5-7.5 的 任何缓冲体系中, 8 h, ≥ 20 mg/mL @ 20 °C 的单体损失	在 pH 范围 3.5-7.5 的任何缓冲体系 中, 48 h, ≥ 20 mg/mL @ 4 °C 的 单体损失
[1047]					
A5	64.0°C	1.10%	0.10%	0.70%	0.30%
A7	60.5°C	4.10%	1.00%	3.10%	5.00%
A8	59.0°C	3.30%	0.20%	0.82%	3.99%
	> 60 °C	≤ 5%	≤ 5%	≤ 5%	≤ 5%

[1048] 实施例7:在食蟹猴中的药代动力学(PK)表征

[1049] 为了证实使用包括抗HSA结构域的三特异性形式延长半衰期,在食蟹猴中进行了非GLP药代动力学研究。根据下文简述的研究计划,将A7施用于食蟹猴(另见表30)。在对雄性食蟹猴进行静脉注射和皮下注射后,测定A7的药代动力学。总共有六只 non-naïve 动物(每组三只)以3mg/kg的目标剂量水平接受A7的单次给药。该蛋白被预先配制在无菌的1x磷酸盐缓冲盐水中,150mM L-精氨酸,500mM蔗糖,pH值为7.5(表30)。

[1050] 表30. 剂量方案概述。

分组	动物 ID	测试项目	途径	剂量水平 (mg/kg)	剂量体 积 (mL/kg)	剂量浓 度 (mg/mL)
[1051]						
1	001M-003M	A7	IV	3	1.003	2.99
2	004M-006M	A7	SC	3	1.003	2.99

[1052] 在以下时间点收集血液样本,制备血清:用药前、用药后10和30min以及1、2、4、6、8、12、24、36、48、72、96、144、192、240、288、336、384、432和504h。

[1053] 测量的血清浓度显示在图19中。从192小时开始观察到A7浓度的强烈下降。时间点288到504h的所有样品都低于定量限(BLQ)。这种信号的减少表明猴出现了抗药性抗体(ADA)。针对人类可变结构域的ADA的形成是可以预期的,并且之前已经用抗TNF α HSA临时抗体观察到了。因此,进行了一项试验,将A7涂在ELISA板上并与血清样品一起孵育。使用抗猴IgG抗体检测与A7结合的食蟹猴IgG。ADA的存在得到确认,结果显示在图19中。由于动物从192h开始出现了ADA,为了不低估A7的半衰期,在估算PD参数时省略了后面的时间点。

[1054] 随后用PK-ELISA法对猴血清样本进行了分析。将所有治疗动物的血清样本稀释。将ELISA板用人TNF α 涂覆过夜,并将A7在5%猴血清中的连续稀释液加入板中,得到校准曲线。用生物素化的人IL-17A,然后用streptavidin聚-HRP检测TNF α 结合的A7。如果需要,将未知浓度的血清样品稀释20倍或更多,并从校准曲线中插值A7的浓度。为了鉴定检测结果,设定了定量的下限和上限和质量对照,以确定分析范围为50-600ng/ml。该检测方法进行了稀释线性、钩子效应和选择性的测试。此外,在定量之前显示了经过1-3次冻融循环的食蟹

猴血清中A7的稳定性。

[1055] 然后利用PK分析的数据进行PK参数的计算。使用WinNonlin药代动力学软件(Phoenix 1.4版),采用非室方法估算药代动力学参数。

[1056] 准确评估不同的动力学参数需要从时间零到无限的AUC。通过对 t_{last} 到无穷大的曲线的数学积分来完成从最后一次测量浓度的时间(t_{last})开始的外推。从最后一个样品到无穷大的外推面积应小于总AUC的20%,以确认得出的动力学参数的准确性。对于A7的IV和SC给药,AUC到无穷大的外推值占总面积的20%以上。因此,计算出的数据(表31)需要慎重解释。最有可能的是,这种影响是由于抗药性抗体的产生,它干扰了检测方法。这种干扰有可能通过提高剂量来避免。

[1057] 表31.以3mg/kg的目标剂量水平静脉内和皮下注射后A7的药代动力学参数。

途径	动物编	C0	Tmax	Cmax	AUC(0-t)	AUC(0-inf)	CLA//CL	VdA/	T1/2
(靶标 剂量)	号	(ng/mL)	(h)	(ng/mL)	(h*ng/mL)	A (h*ng/mL)	FA (mL/h/kg)	Vd FA (mL/kg)	A (h)
IV (3 mg/kg)	001M	47000	4	63900	4920000	10000000	0.345	76.1	153
	002M	57400	0.5	76800	3570000	7740000	0.423	108	178
	003M	48300	2	53200	3750000	7230000	0.472	87.2	128
	平均*	50900	2	64600	4080000	8330000	0.413	90.6	153
	SD	5680	-	11800	732000	1490000	0.0638	16.3	24.7
SC (3 mg/kg)	004M	-	36	43500	4390000	11100000	0.301	73.3	169
	005M	-	48	27800	3110000	5490000	0.603	93.6	108
	006M	-	24	33100	3420000	19100000	0.170	107	436
	Mean*	-	36	34800	3640000	11900000	0.358	91.2	237
	SD	-	-	8000	666000	6830000	0.222	16.9	175

[1060] *报告的Tmax中位数。

[1061] A AUC至无穷大的外推值占总面积的20%以上。对于002M和006M,消除阶段的决定系数 <0.800 。被认为是有代表性的数值,详见上文。

[1062] NA不适用。

[1063] 观察到包含抗HSA结构域的scDb-scFv的半衰期明显延长。A7的半衰期($t_{1/2}$)超过了5天。这与给药方式无关,如表31所示。由于消除阶段的最后几个点(在信号下降之前)有较强的变化,为动物006M计算的436小时的半衰期可能不如为其余动物确定的半衰期准确。SC注射后的平均半衰期高于IV给药后,平均半衰期分别为237小时(9.9天)和153小时(6.4天)。

[1064] 实施例8:复合物形成分析

[1065] 在这项研究中,将不同比例的scDb-scFv A7和Morrison L A14和A15(见图20)与

目标结合分子人IL-17A和人TNF α 共同孵化,并对生成的复合物进行了表征。

[1066] A14是Morrison L形式,其中,抗TNF α 结合结构域置于Fab臂上,抗IL-17A结合结构域以scFv形式在C末端连接到轻链上。

[1067] A15是Morrison L型,其中,抗IL-17A结合结构域置于Fab臂上,抗TNF α 结合结构域以scFv形式在C末端连接到轻链上。

[1068] 使用瞬时CHOgro表达系统(Mirus)在FreeStyle CHO-S细胞中进行A7、A14和A15表达。对目的基因进行了哺乳动物表达优化,合成并克隆到标准pcDNA3.1载体中。信号序列源自小鼠重链IgG。将表达培养物在37°C下分批培养6至7天(细胞活力<70%),或在37°C下培养一天,然后将温度转为32°C持续5至6天。通过离心,然后进行0.45 μ m的过滤,分离培养上清液。通过Protein L亲和层析法,然后进行精制尺寸排除层析法,从澄清的培养上清液中捕获A7。

[1069] 重组人IL-17A购自Peprotech(Rocky Hill,NJ,USA),为大肠杆菌中表达的二硫连接的同源物,通过SDS-PAGE和HPLC纯化,纯度 \geq 98%(目录号200-17,批号061184)。

[1070] 重组人TNF α 购自Peprotech(Rocky Hill,NJ,USA),为大肠杆菌中表达的同源三聚体,通过SDS-PAGE和HPLC纯化,纯度 \geq 98%(目录号300-01A,批号0906CY25)。

[1071] 在离心后对形成的复合物进行表征,通过动态光散射(DLS)测定流体力学半径,并通过280nm波长的吸收测量恢复蛋白质浓度。

[1072] 动态光散射是一种快速且灵敏的方法,通过记录散射光强度随时间的波动来确定溶液中颗粒的粒径分布。将数据在数学上转化为其自相关函数,得到平移扩散系数(D_t)。随后从斯托克斯-爱因斯坦方程中得出流体力学半径(R_h)。

$$[1073] \quad R_h = \frac{k_b T}{6\pi\eta D_t}$$

[1074] 其中 k_b 是玻尔兹曼常数,T是温度(开尔文), η 是溶剂的粘度。

[1075] 使用DynaPro[®] Plate Reader[™] II和Dynamics软件包(Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA, USA)测定流体力学半径。在384孔光学透明底微孔板(如Corning[®] 384孔微孔板,Merck,CLS3540-50EA)上涂抹25 μ L,并通过离心(1000g,4min)去除剩余的气泡。在25°C下测量样品,5至10秒进行10次采集。粘度设置为PBS。

[1076] 在复合物形成实验中,将A7与它的每个可溶性靶标,人IL-17A和人TNF α ,以表32中给出的相对摩尔比(A7上的结合位点(互补位)和各自靶标上的表位的相对数量),以及高于 K_D 至少1000倍的浓度(表32)进行孵育。每个表位/结合位点和A7的浓度范围在0.5和5 μ M之间。

[1077] 表32:溶液中互补位和表位的相对数量(A7上每个靶标表位和互补位的摩尔比)

实验	互补位和表位的摩尔比		
	抗体	人 IL-17A	人 TNF α
A	1	1	0
B	1	1	0.2
C	1	1	1
[1078] D	0.2	0.2	1
E	1	0	1
F	1	0.2	1
G	0.2	1	0.2
H	1	0.2	0.2
I	1	0	0

[1079] 图21、图22和图23总结了在每个测试的结合伴侣比例下形成的可溶性复合物的流体力学半径。图24、图25和图26中总结了回收的可溶性蛋白浓度的百分比。

[1080] 1. 在大多数条件下,观察到蛋白质浓度的完全恢复,这表明A7没有或仅有有限的不溶性复合物的形成。

[1081] 2. A7在形成复合物的过程中,流体力学半径的增加有限,最大为5倍。

[1082] 3. 由于A7的可溶性复合物的形成和微小的尺寸增加,免疫原性风险有限。

[1083] 4. A7对每个靶标的单价结合只促进了可溶性复合物的形成,复合物形成时体积增加不大。

[1084] 结论:

[1085] 抗体介导的免疫复合物形成与免疫原性和免疫相关的不良事件有关。例如,如果二价抗体与多聚体形式(如二聚体、三聚体、四聚体等)的靶标分子交联,就会形成这种免疫复合物。在三聚体靶标(如TNF)的情况下,一个抗体可以用它的两个Fab臂与两个不同的TNF三聚体结合,形成一个小的可溶性复合物。复合物中两个参与的TNF三聚体中的两个未结合的单元可以反过来被其他抗体结合。在被多个抗体同时结合时,这导致了更高阶复合物和免疫沉淀物的形成。这种大型免疫复合物增强了治疗性抗体的免疫原性,并可能引发抗药性抗体的形成以及免疫相关的不良事件。在一个分子可以同时与一个以上的靶标类型各自通过二价相互作用接触的情况下,免疫复合物形成的风险变得更加明显。这方面的实例是双特异性抗TNF/IL-17阻断剂ABT122和COVA322,它们以二价结合模式与各自的靶标相互作用。据报道,ABT122引发抗药性抗体形成的发生率很高,而COVA322甚至导致免疫相关的不良反应(皮疹),可能是由免疫复合物形成引发的。

[1086] 在这里,我们表明,以A7为例的双特异性单价scDb-scFv,与以二价方式与其靶标相互作用的双特异性形式(如A14和A15,包括与A7相同的结合结构域)相比,其介导免疫复合物形成的能力明显降低。因此,我们得出结论,单价双特异性形式优于双特异性双价形

式,因为它减少了ADA形成的风险,而且其风险-效益状况良好。

[1087] 通常情况下,选择双价形式是为了弥补对靶标的相对低亲和力(例如COVA322与IL-17结合)。因此,为了在多特异性方法中启用单价形式,需要对各自的靶标有非常高的亲和力。A7(及其变体)中的Fv结构域的高亲和力使其能够使用单价形式,从而获得高度有效的双特异性治疗。

[1088] 此外,单价双特异性scDb-scFv形式中没有Fc区域,避免了与免疫细胞上的Fc受体结合,这也可能有助于产生免疫相关的不良事件。

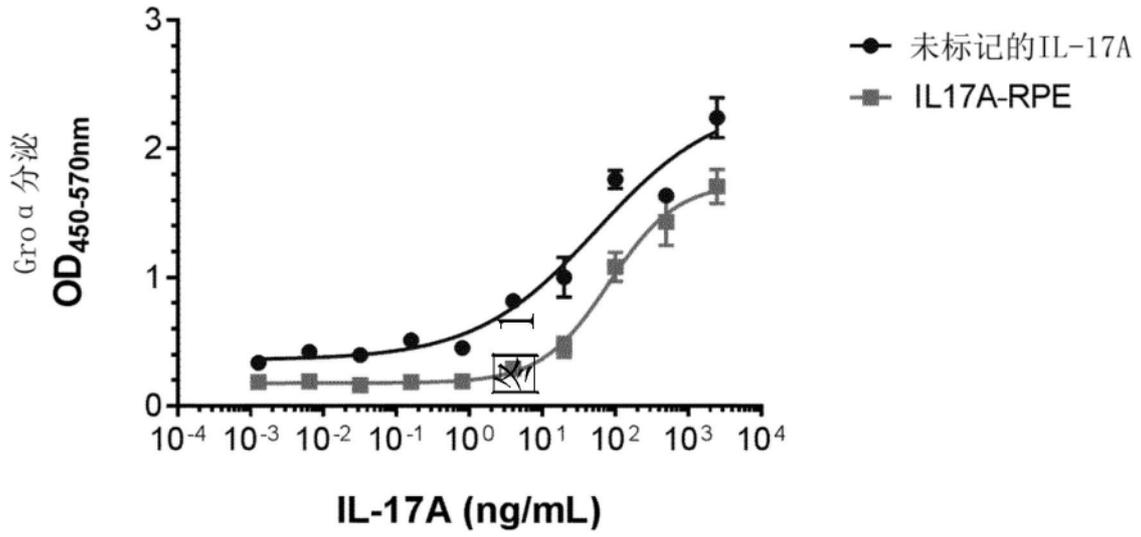
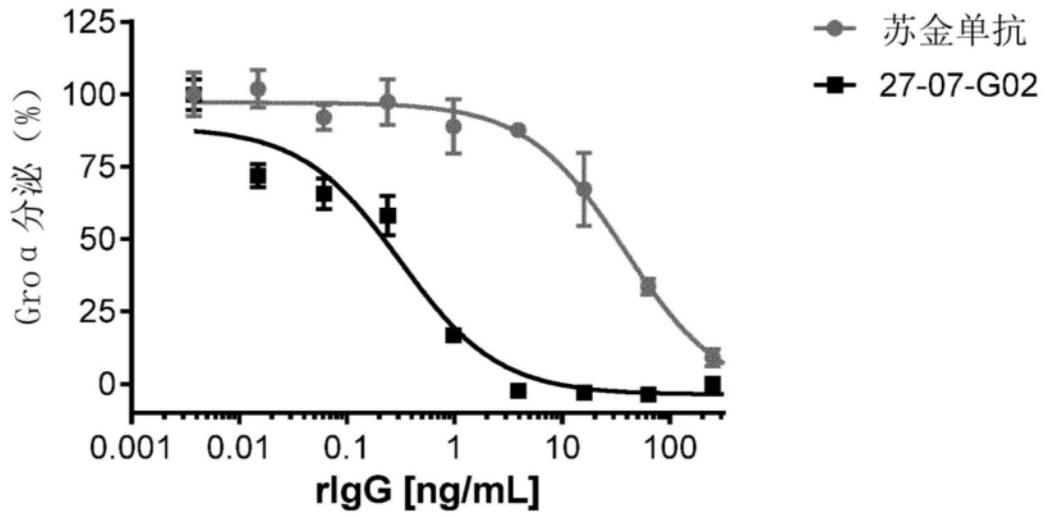


图1

(A)



(B)

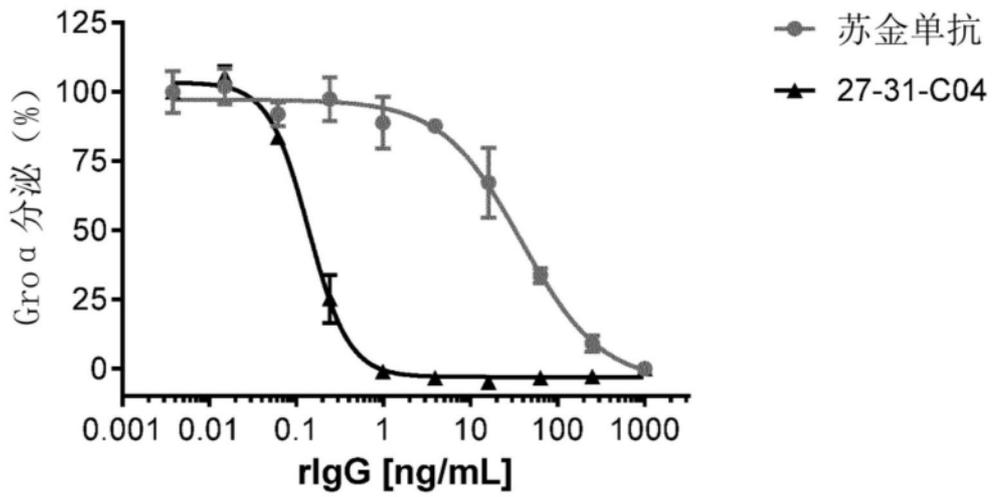
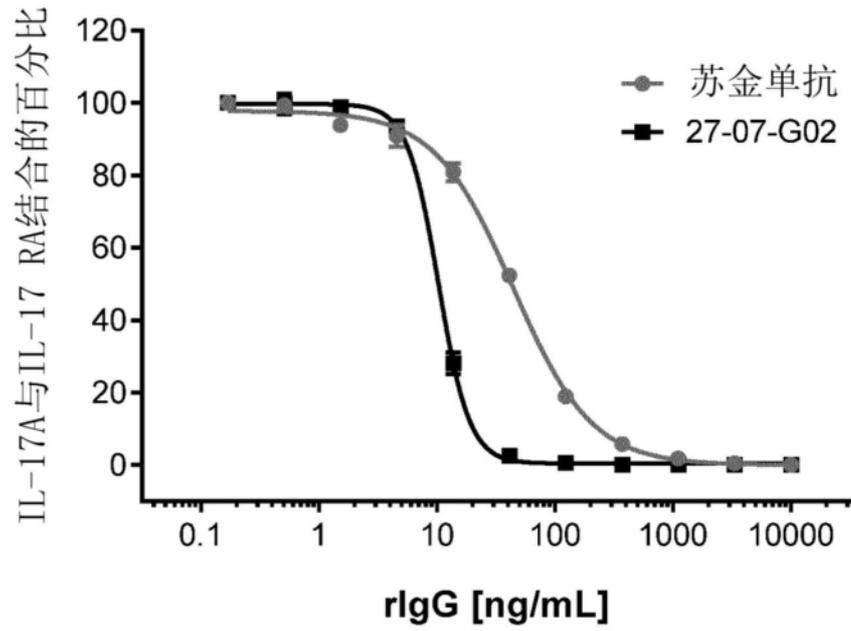


图2

(A)



(B)

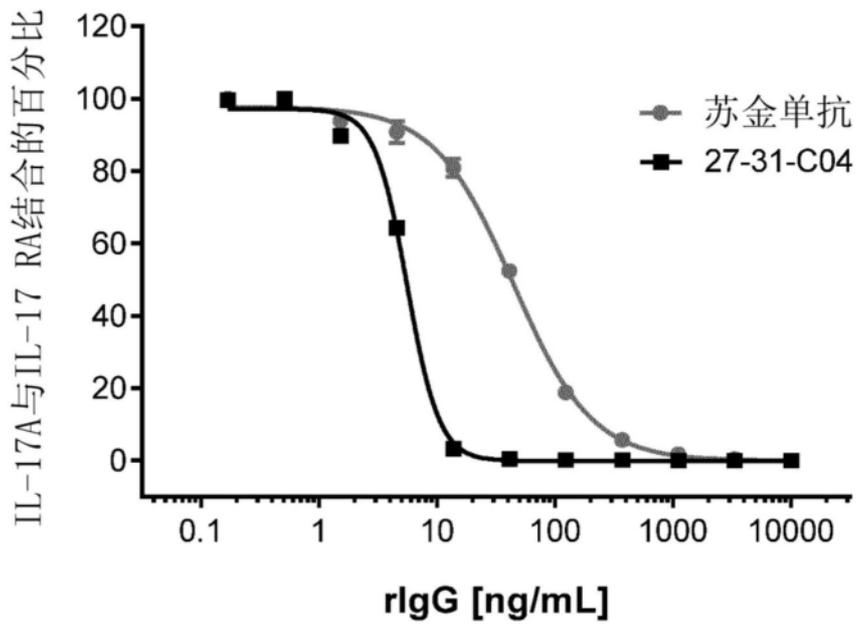
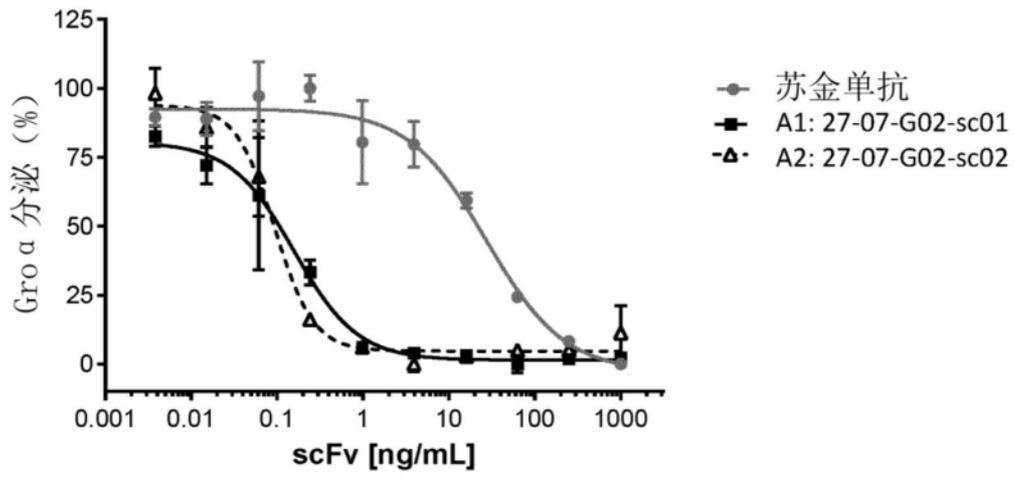


图3

(A)



(B)

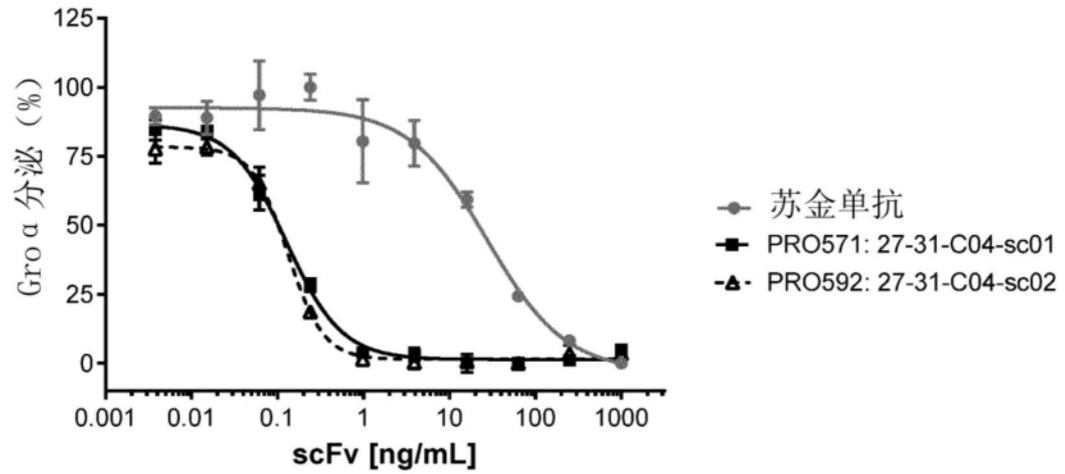
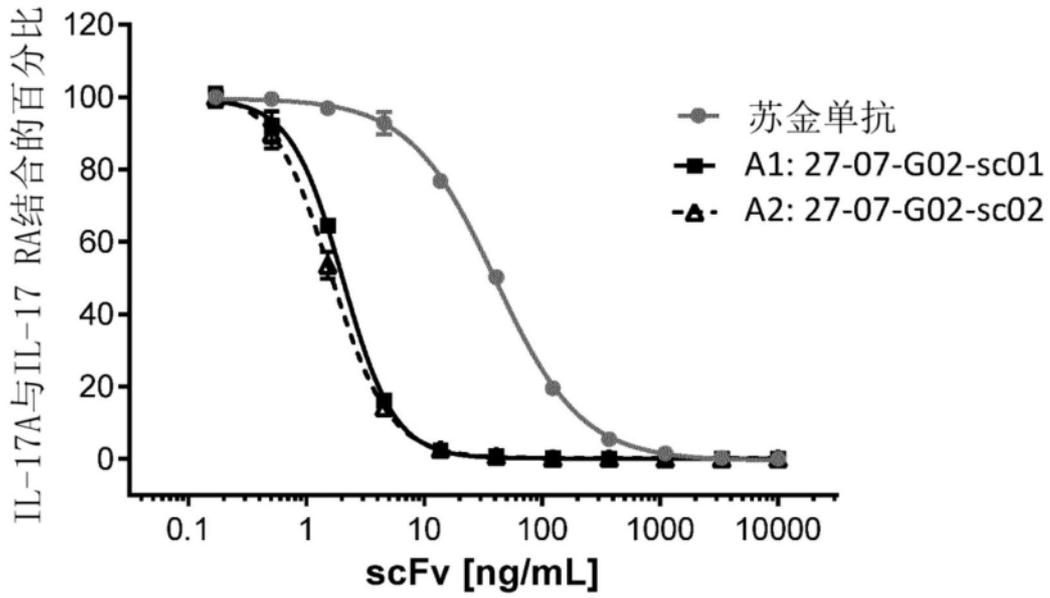


图4

(A)



(B)

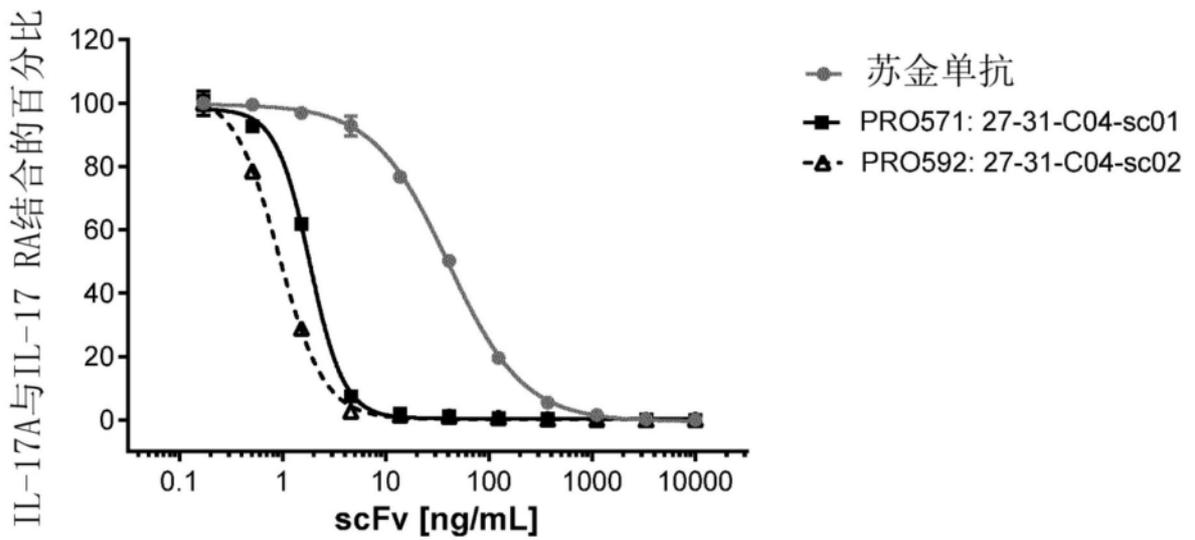
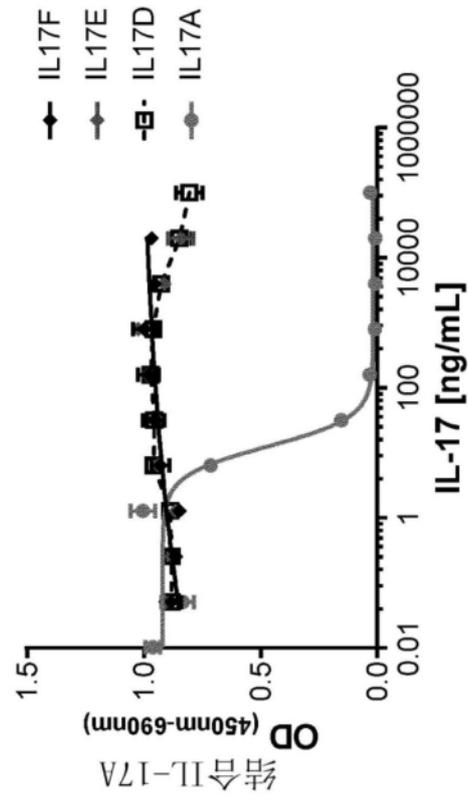


图5

(I)

A



B

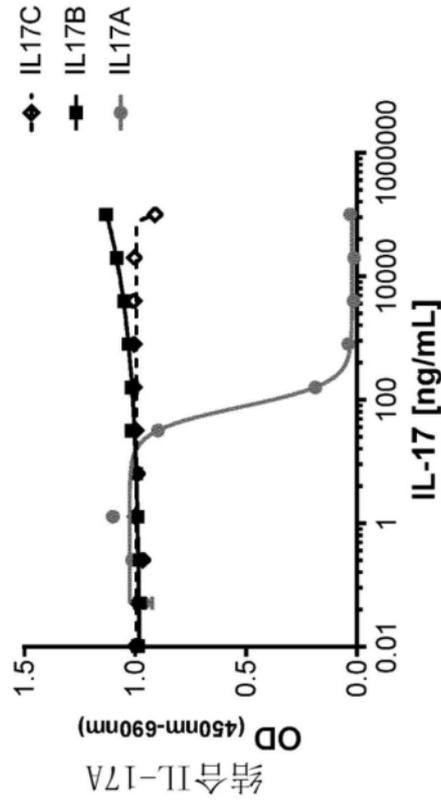


图6

(III)

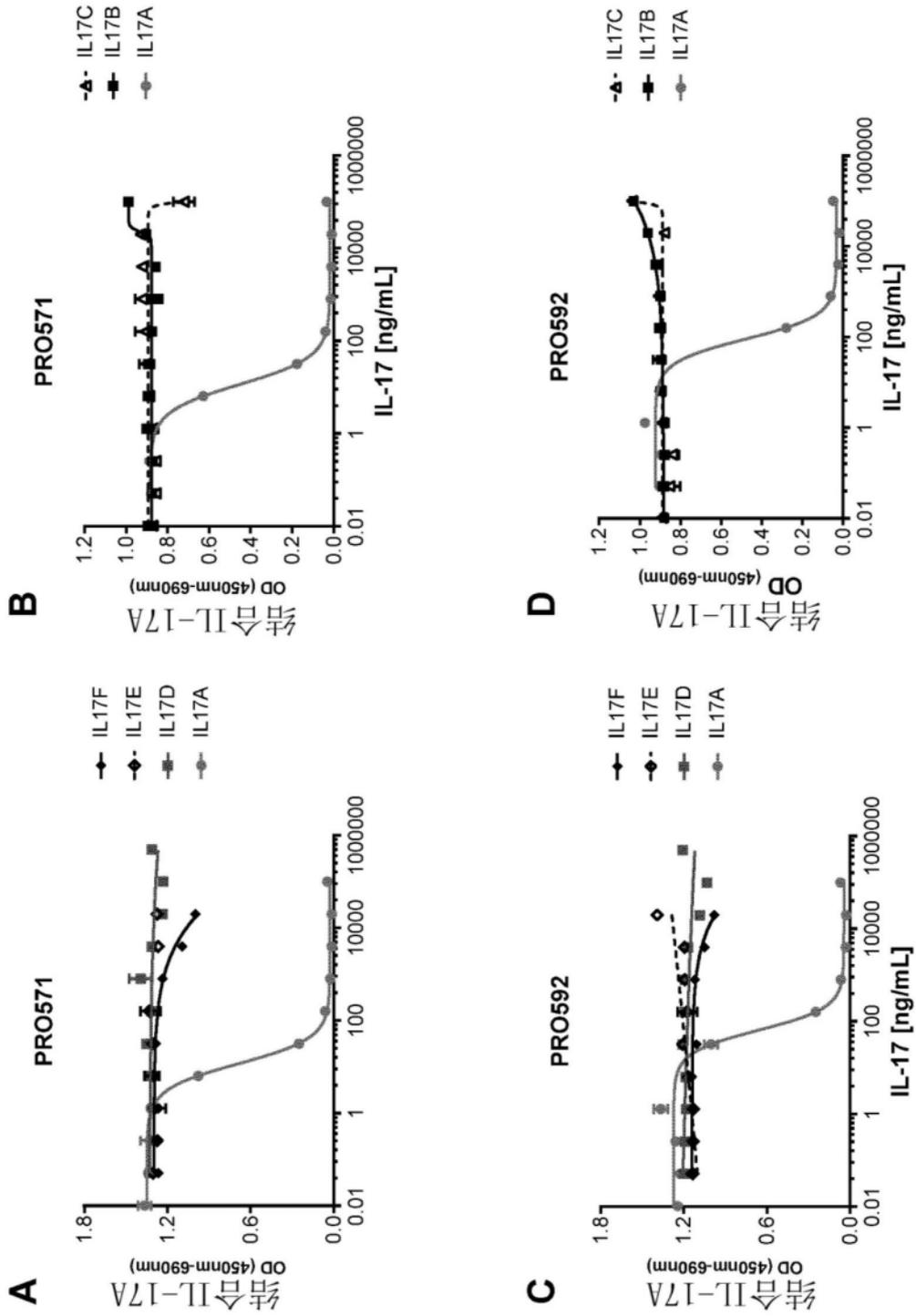
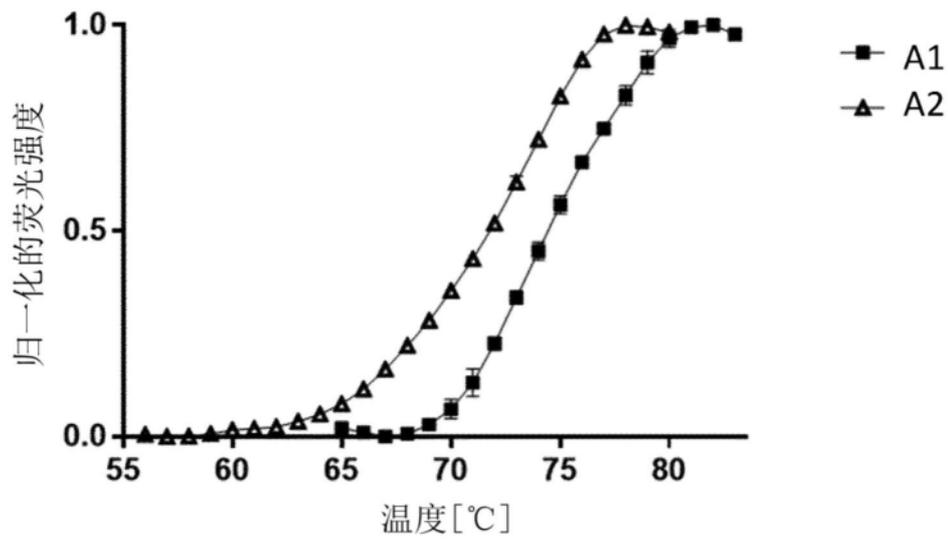


图6(续)

(A)



(B)

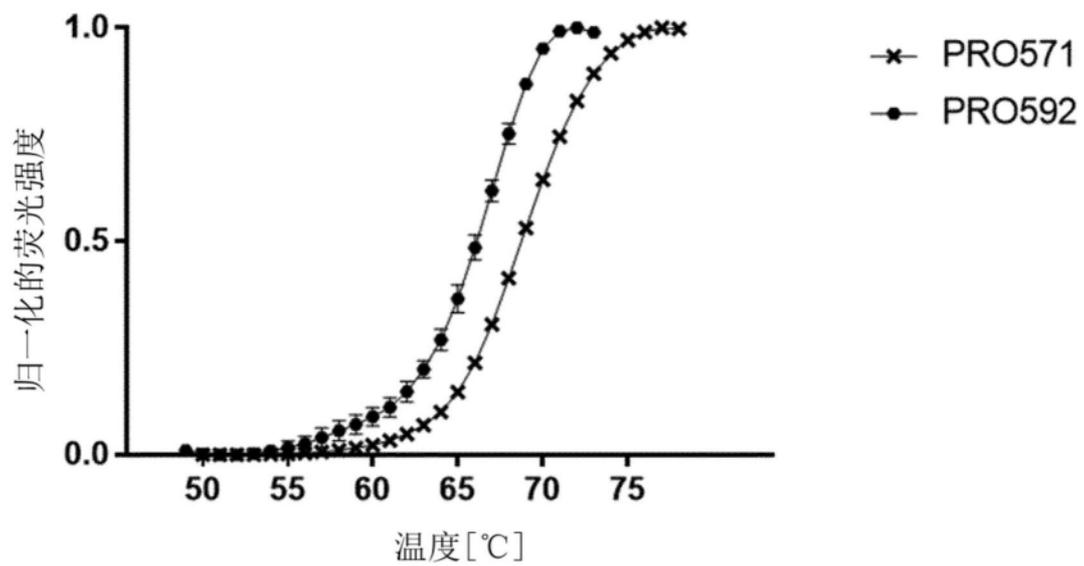


图7

(A)

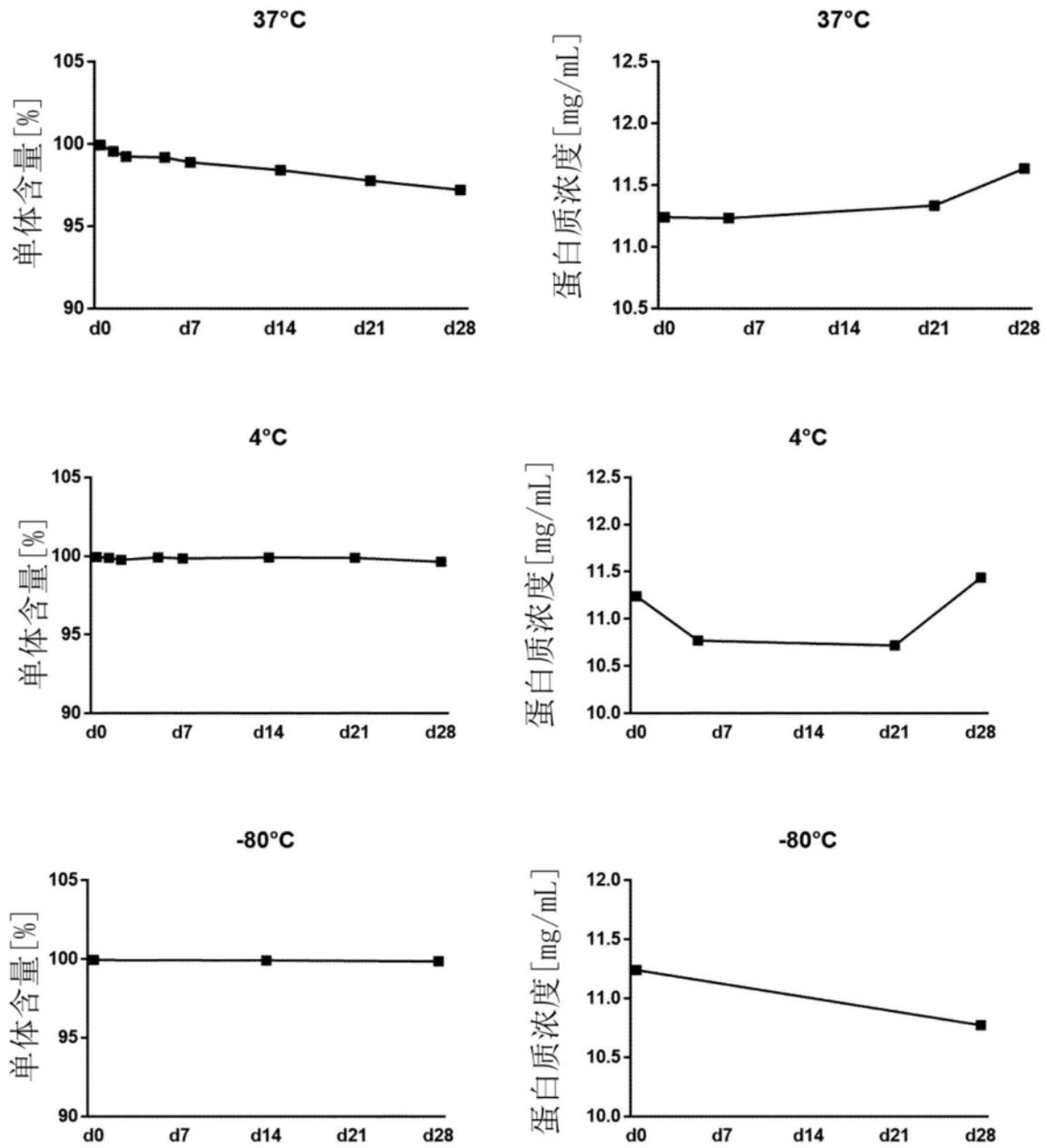


图8

(B)

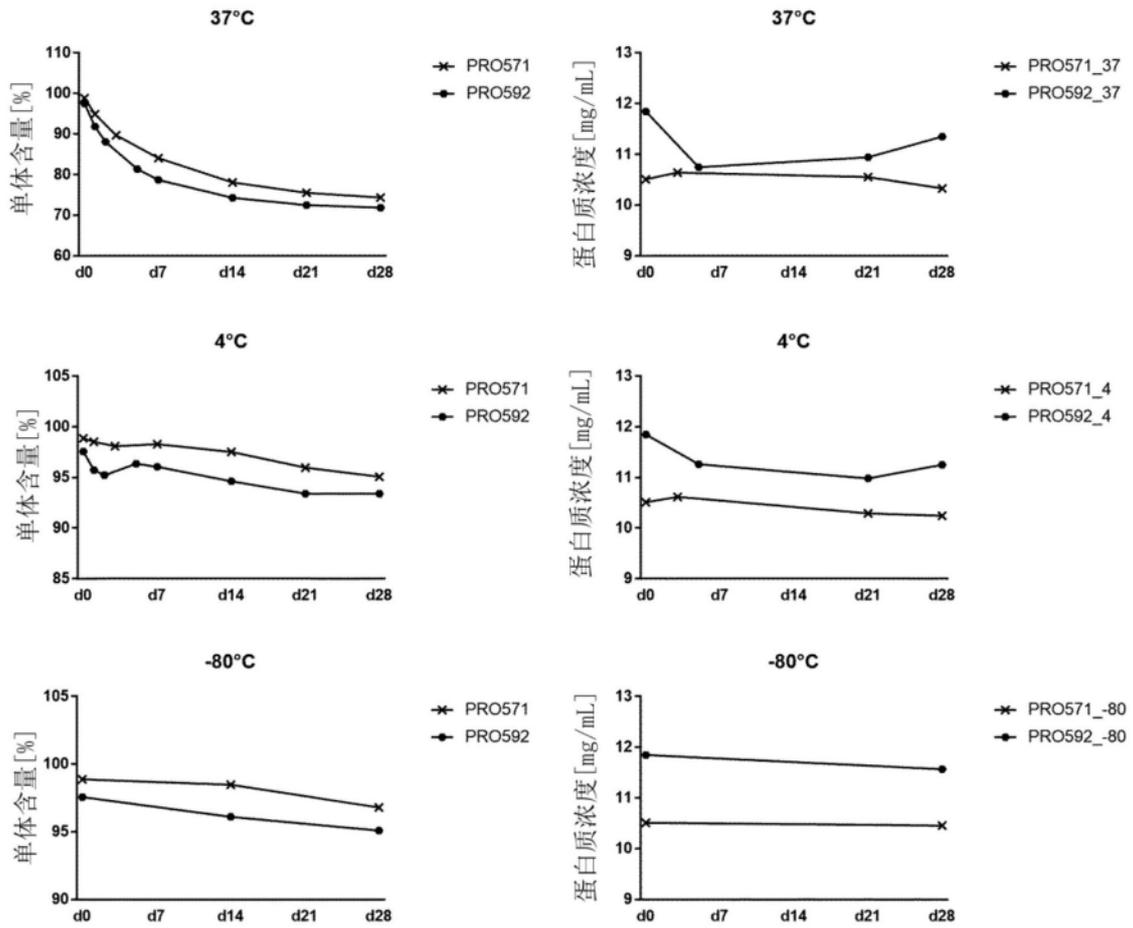
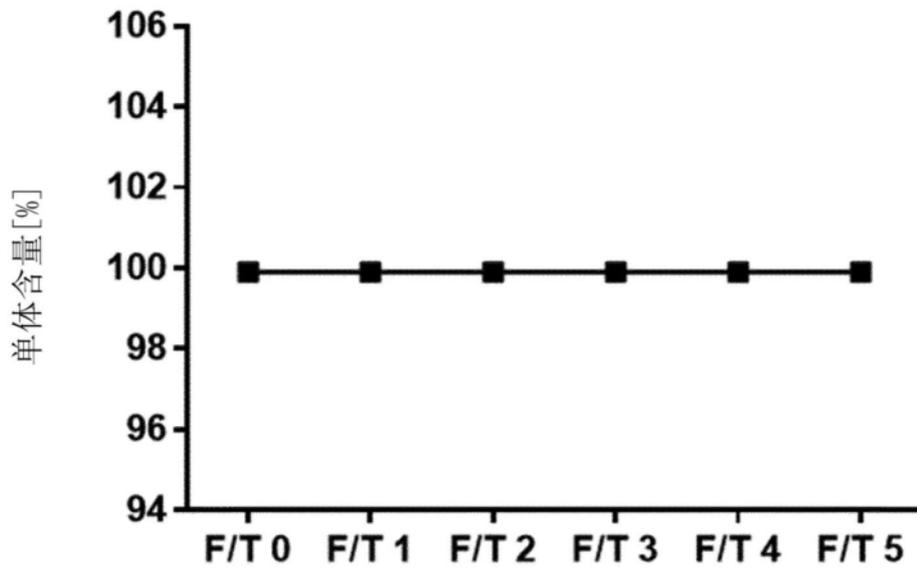


图8 (续)

(A)



(B)

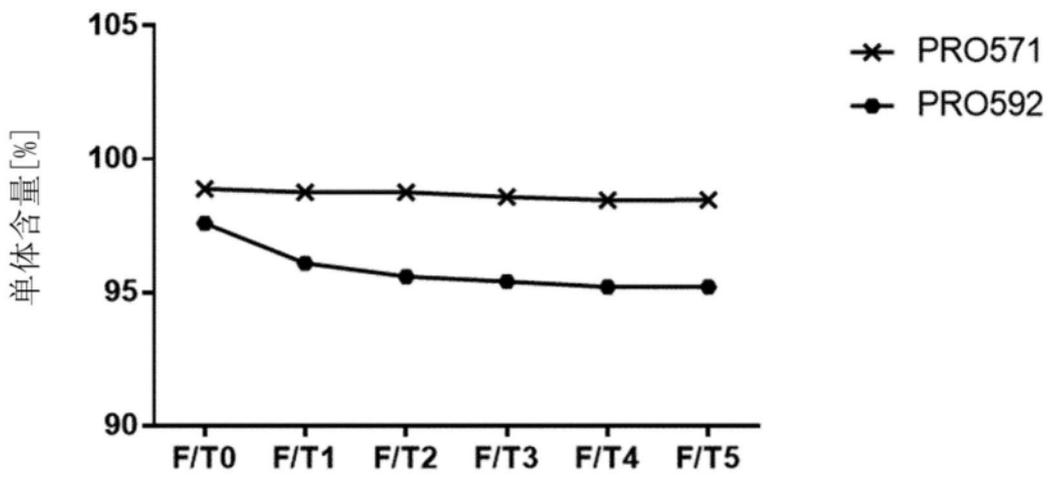


图9

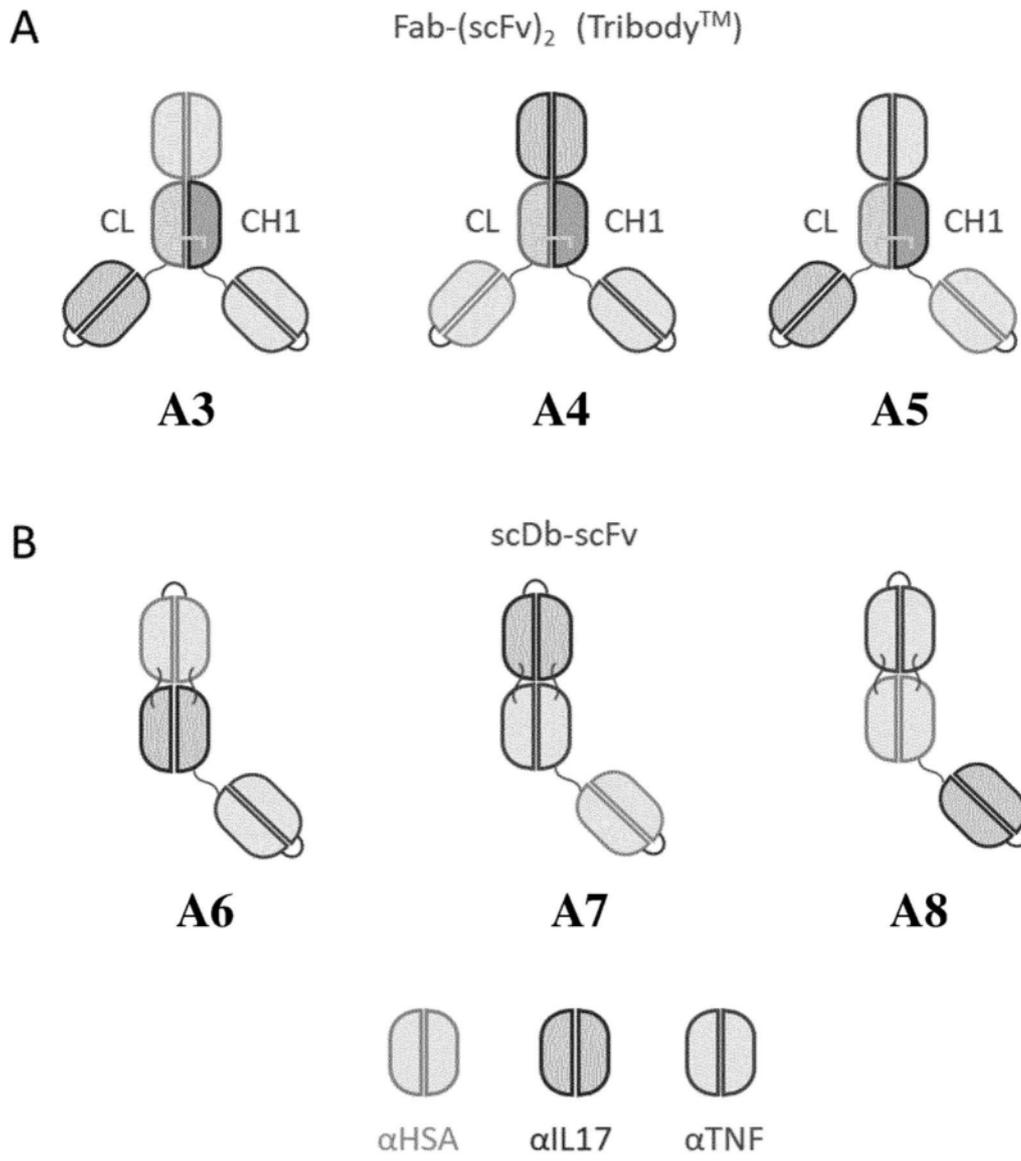
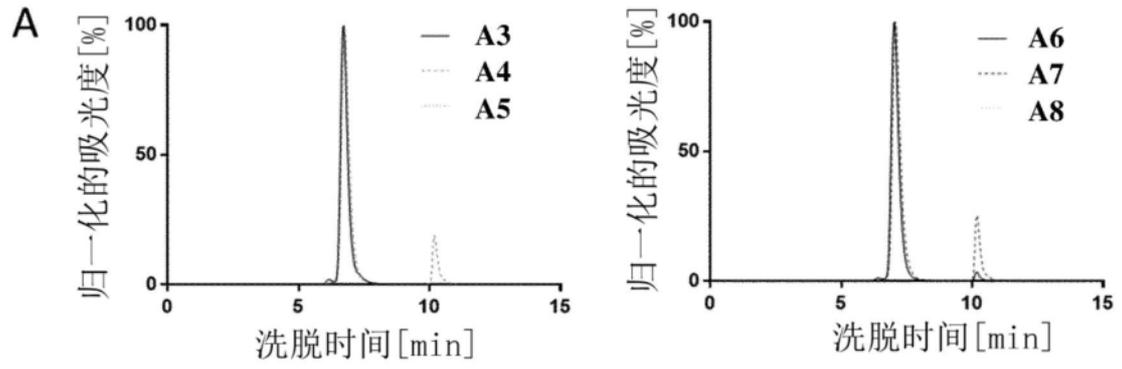


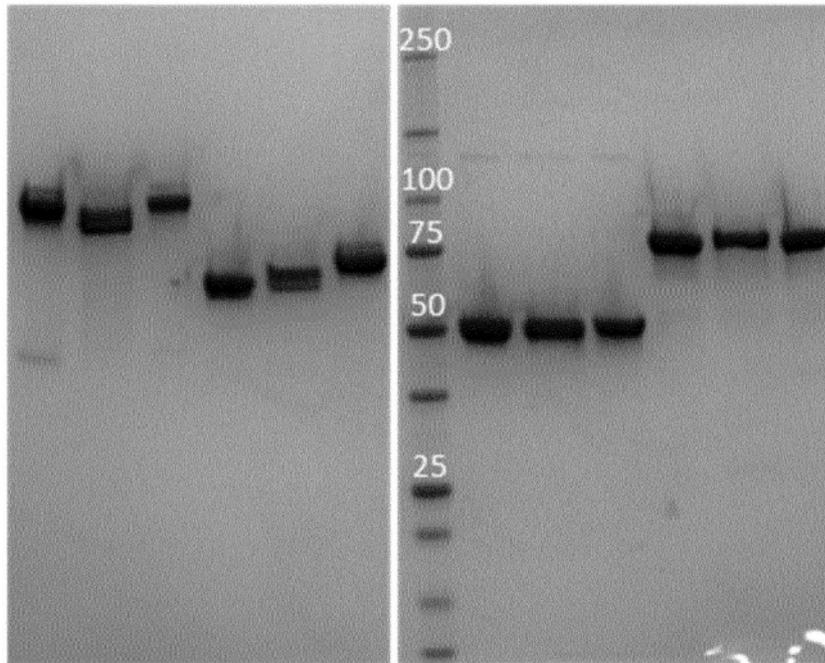
图10



B

M = 标记物 , kDa

A3 A4 A5 A6 A7 A8 M A3 A4 A5 A6 A7 A8



非还原 (NR)

还原 (NR)

图11

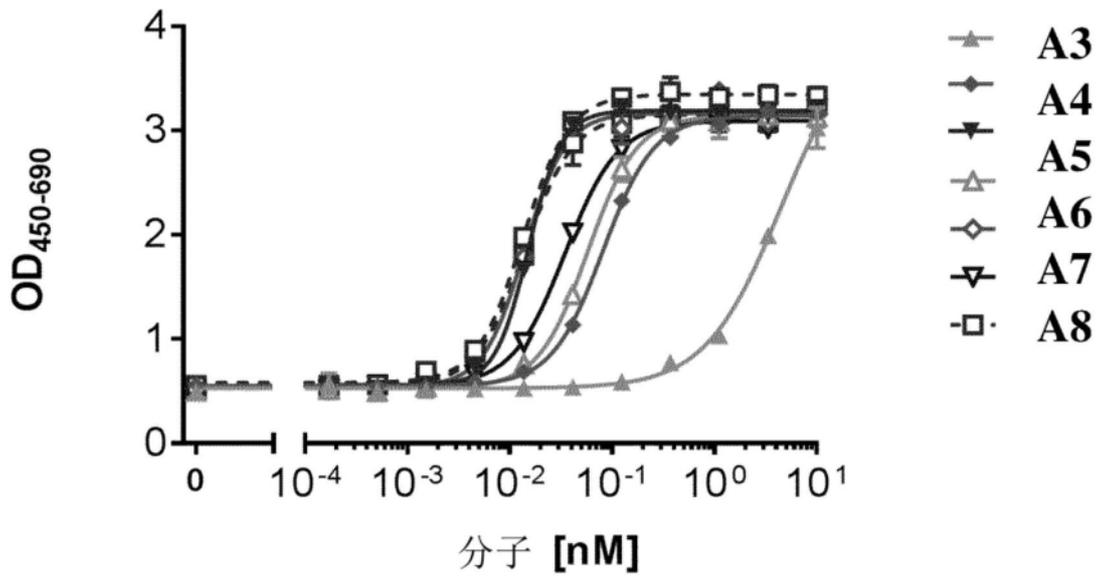


图12

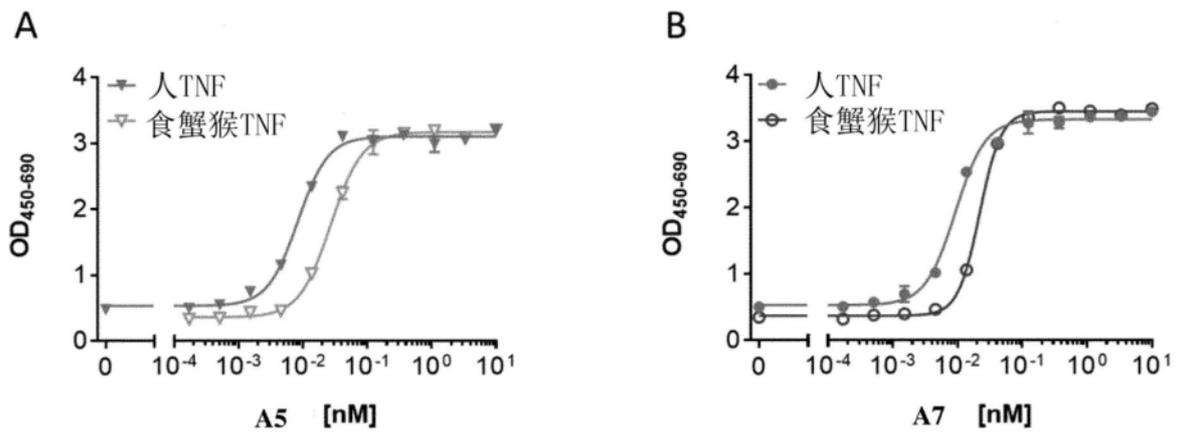


图13

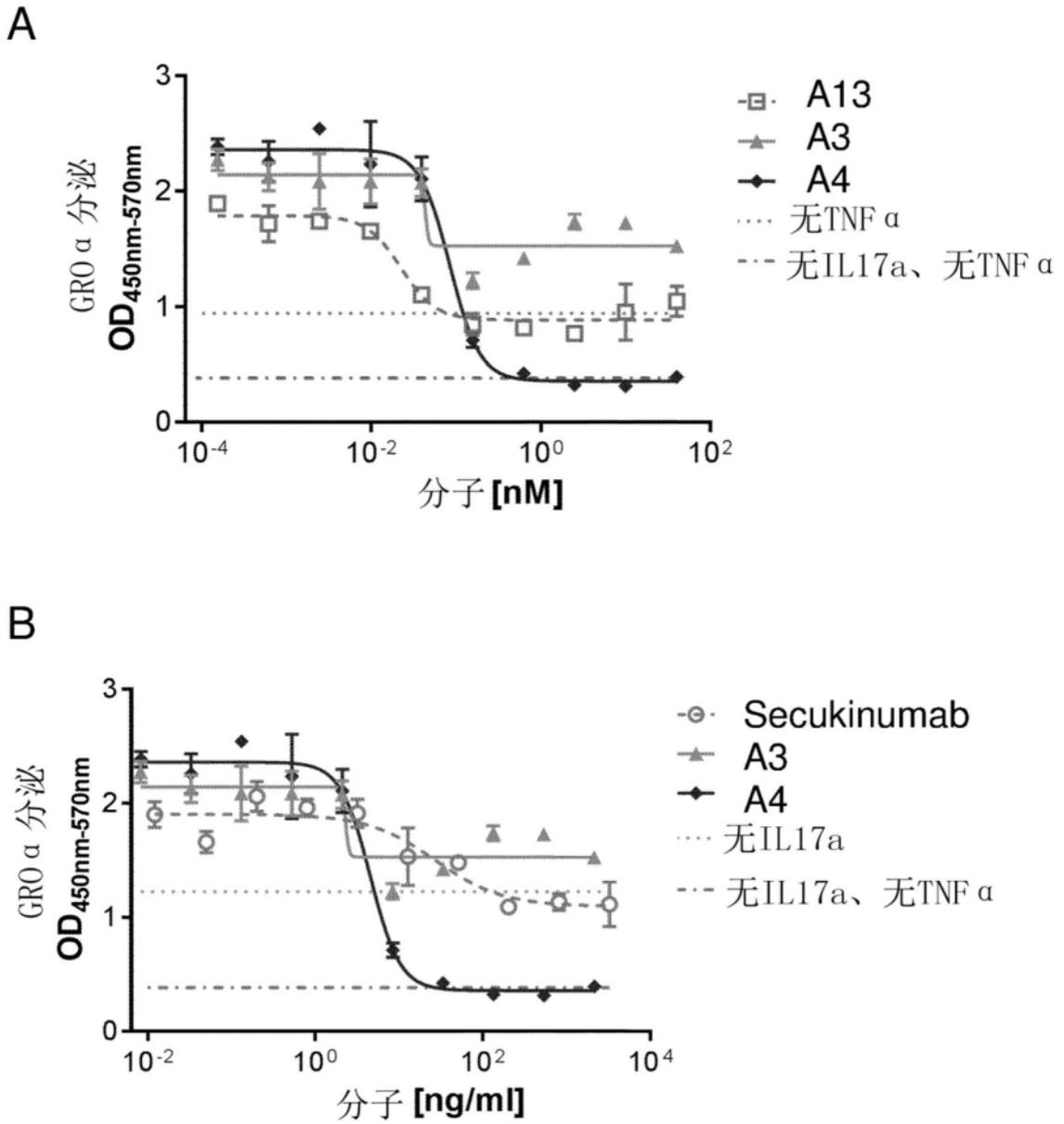


图14

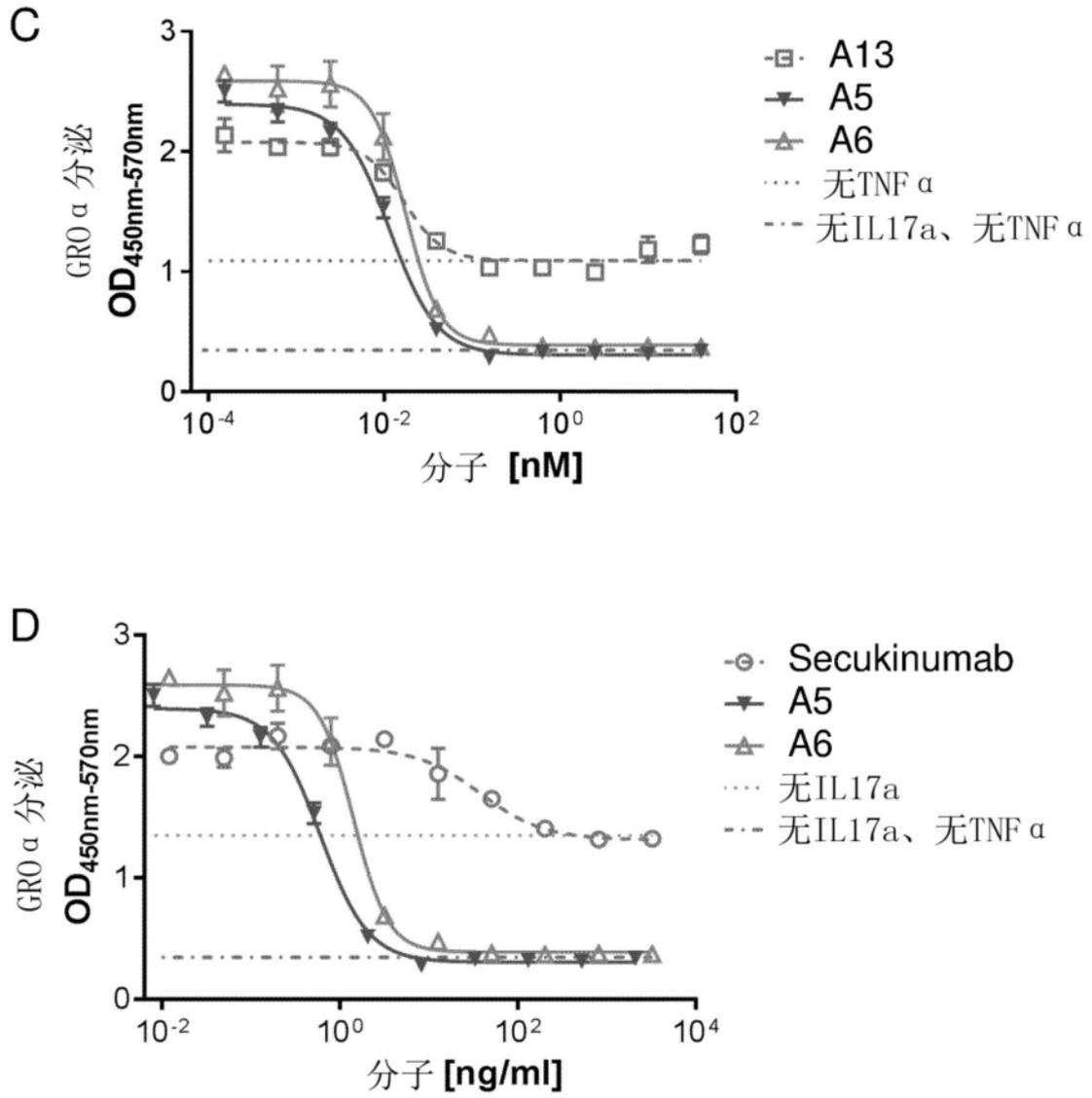


图14(续)

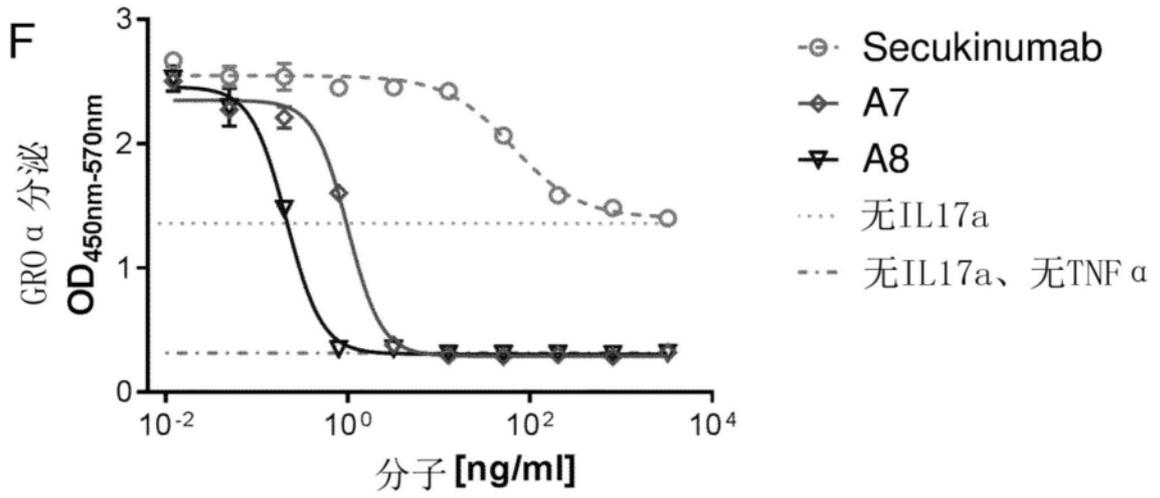
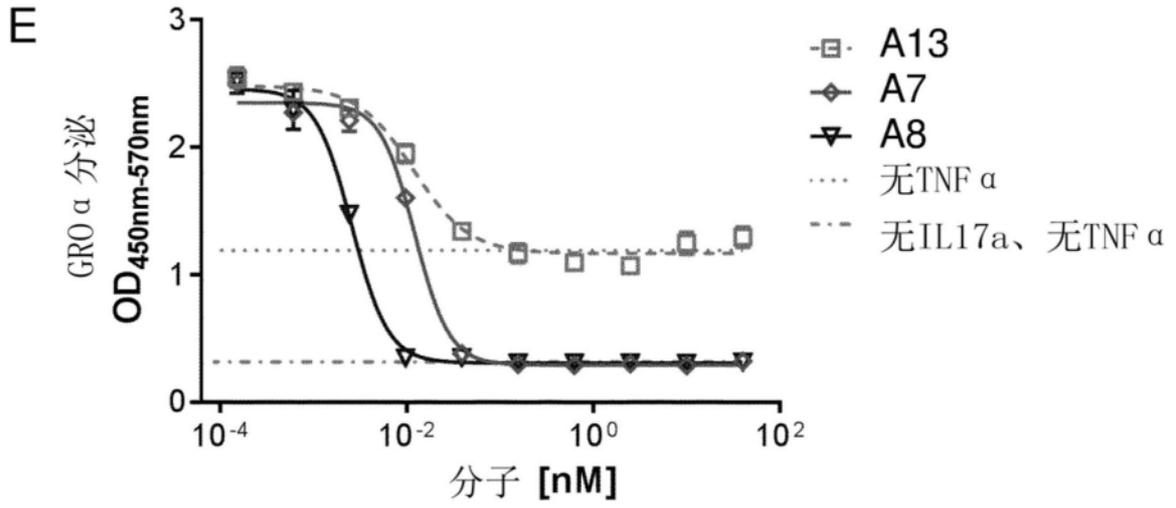


图14(续)

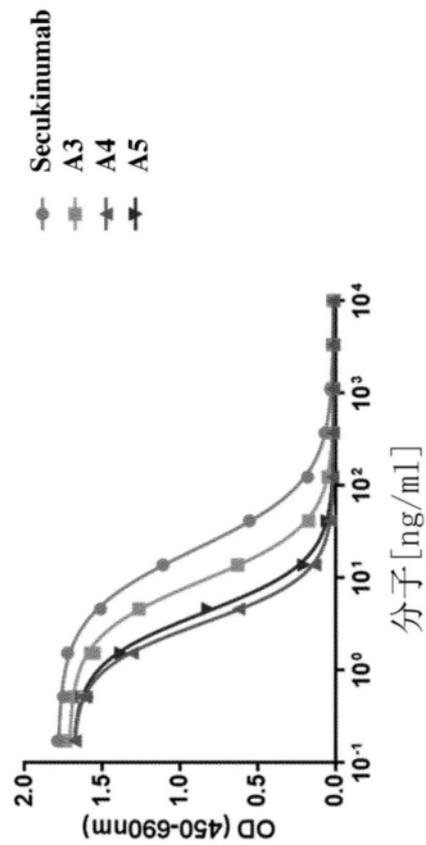
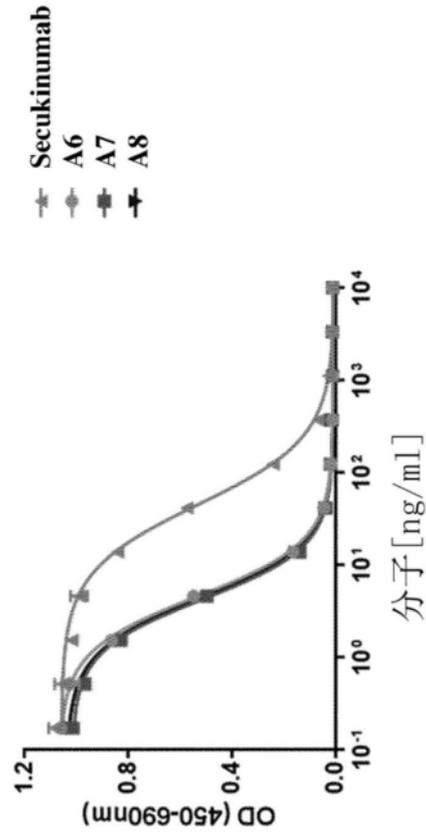


图15

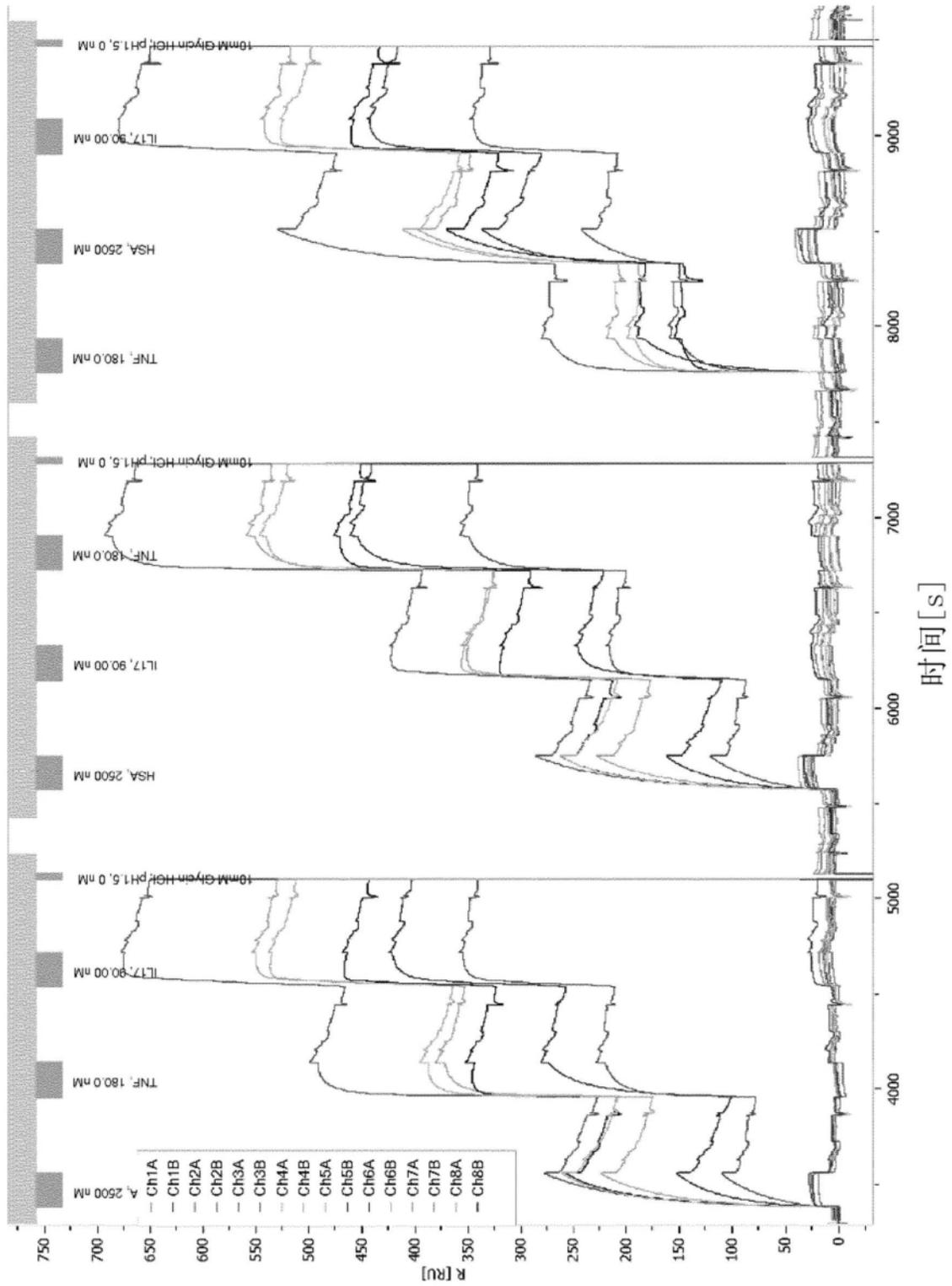


图16

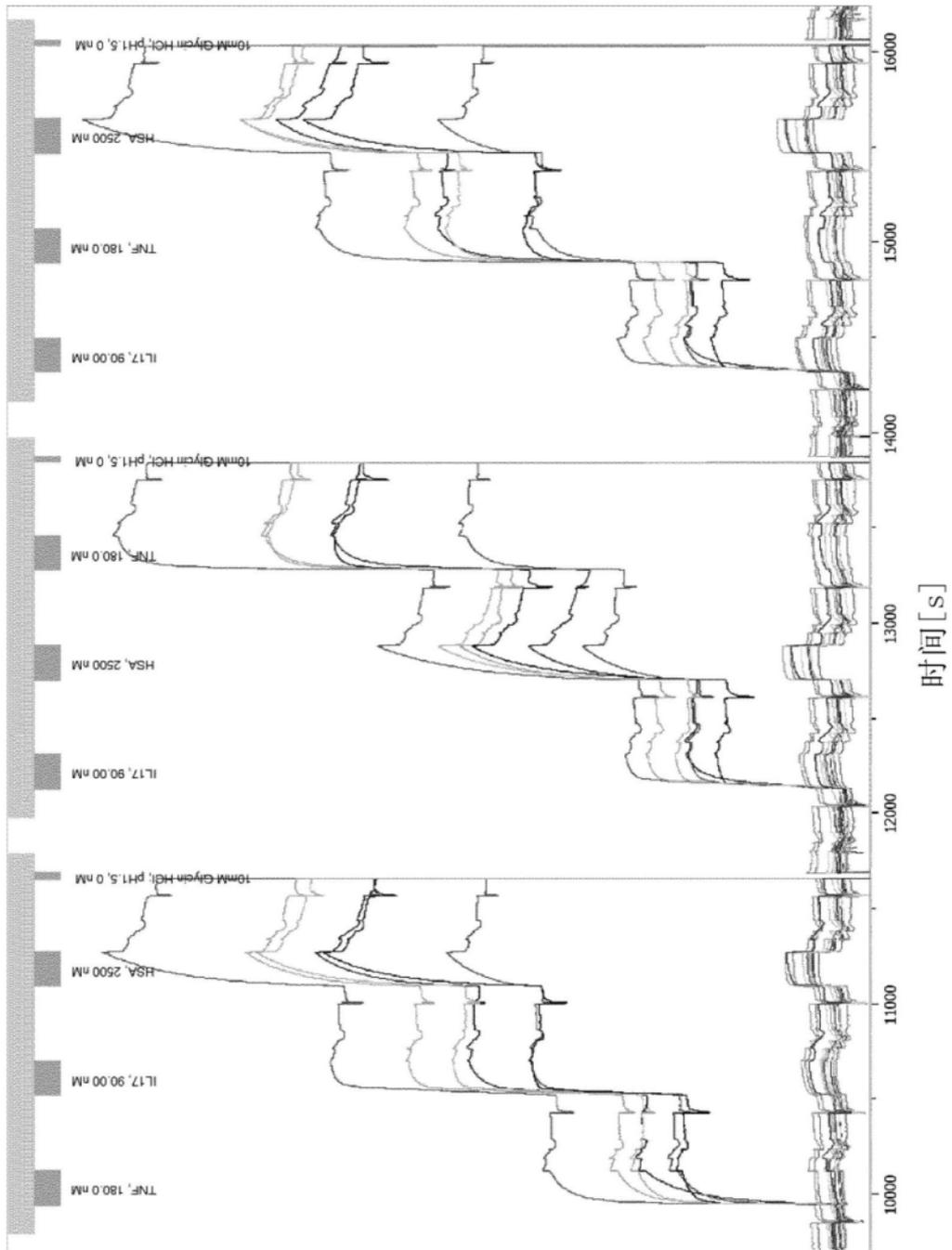


图16(续)

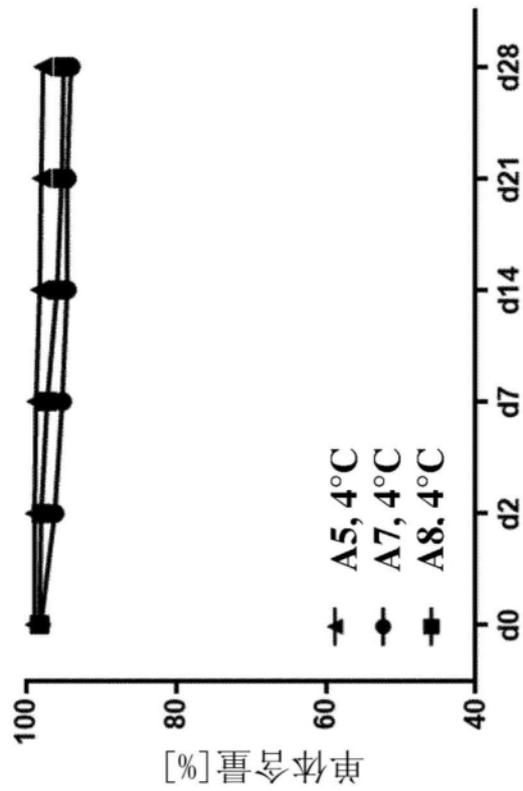
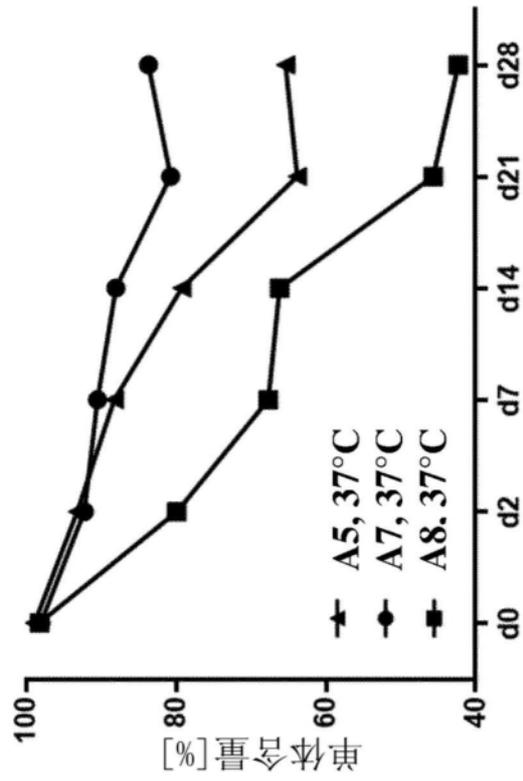


图17

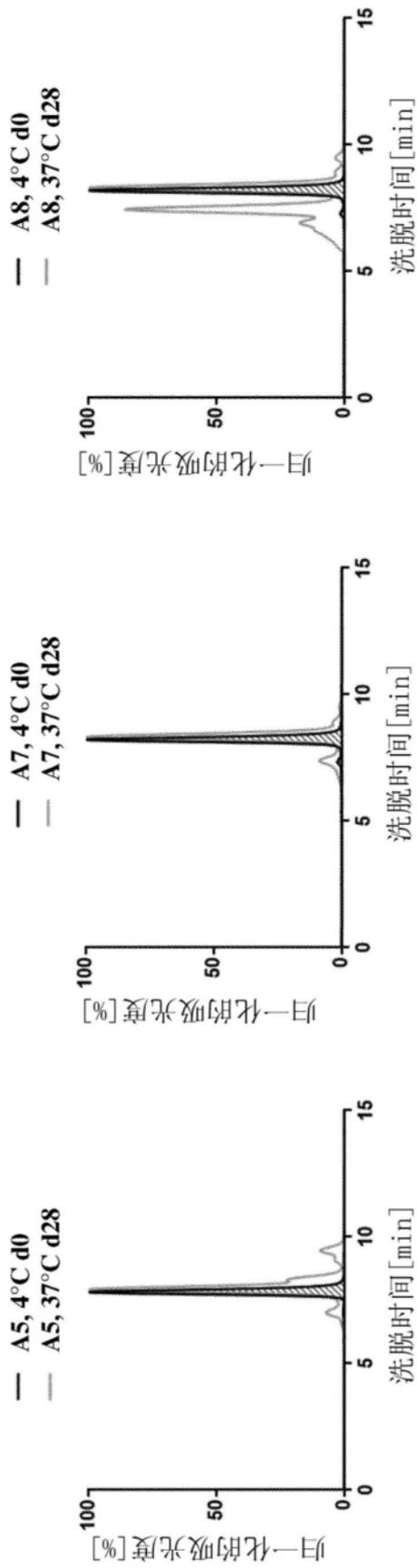


图18

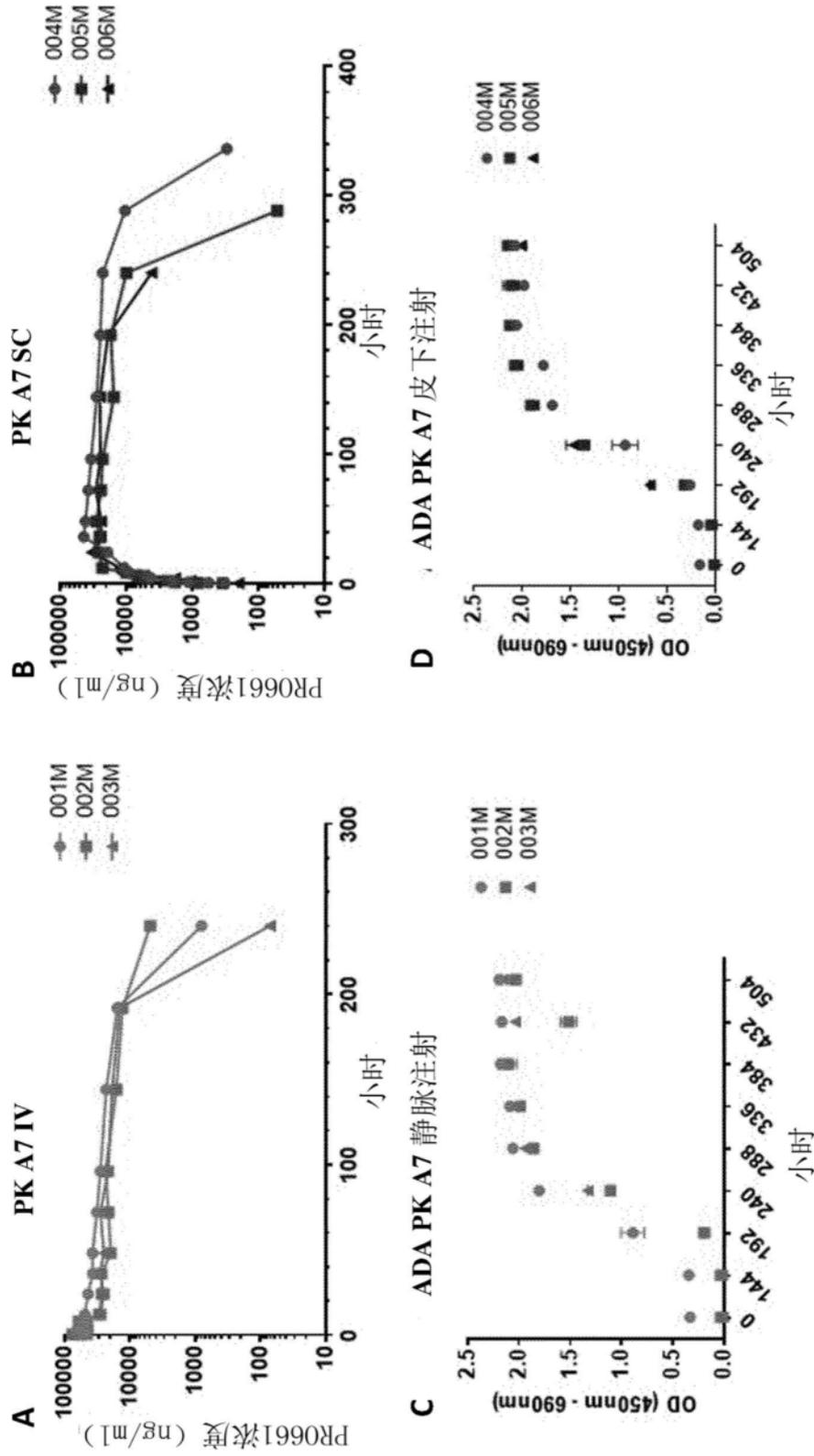
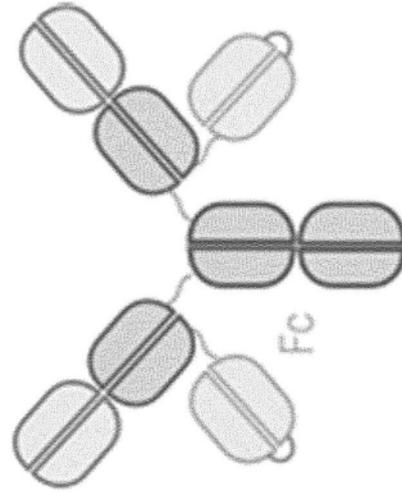


图19

A15

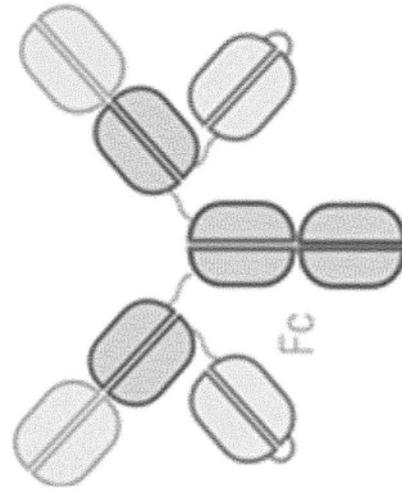
Anti-IL-17



Anti-TNF α

A14

Anti-TNF α



Anti-IL-17

图20

可溶性复合物的平均尺寸

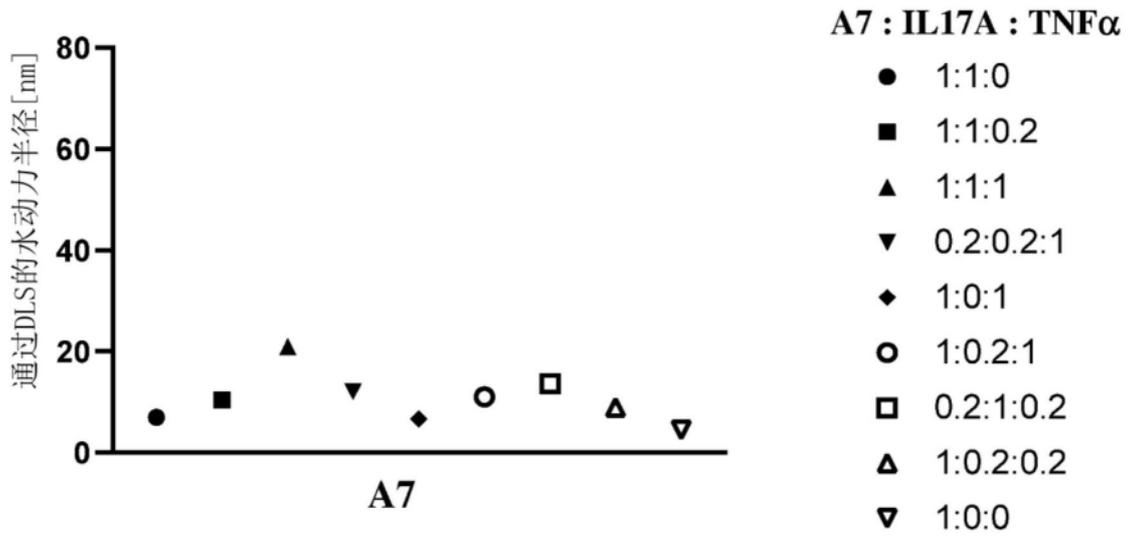


图21

可溶性复合物的平均尺寸

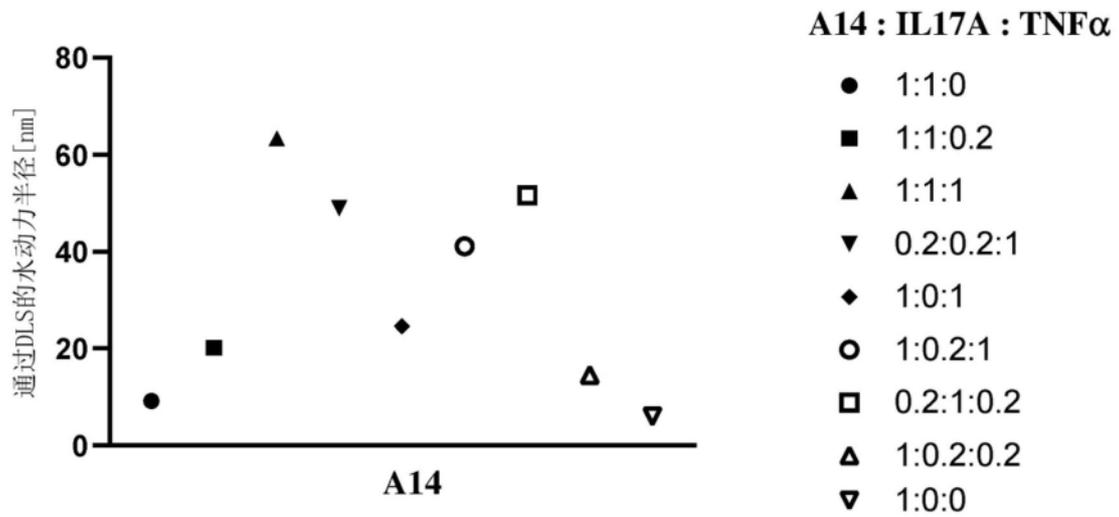


图22

可溶性复合物的平均尺寸

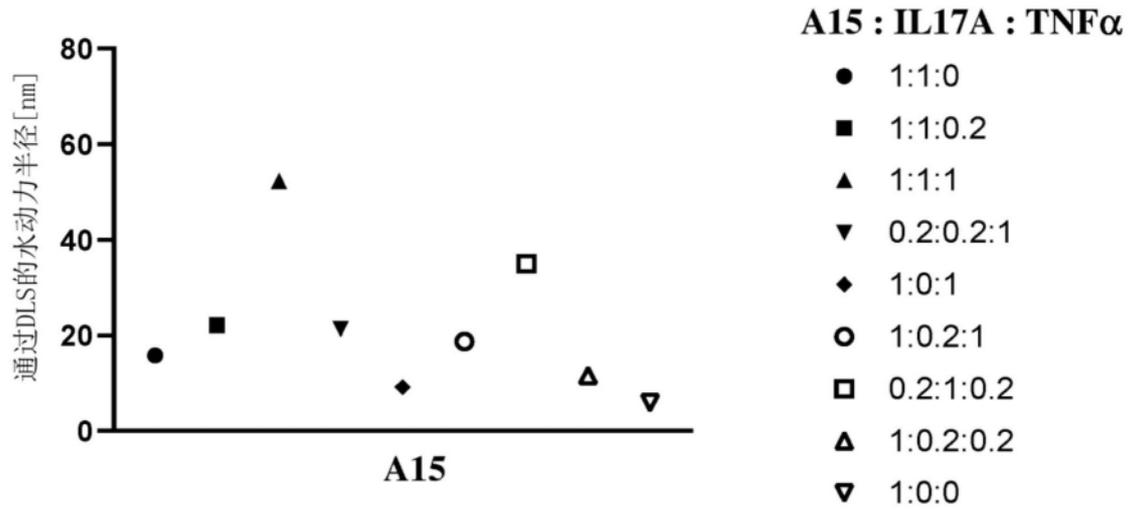


图23

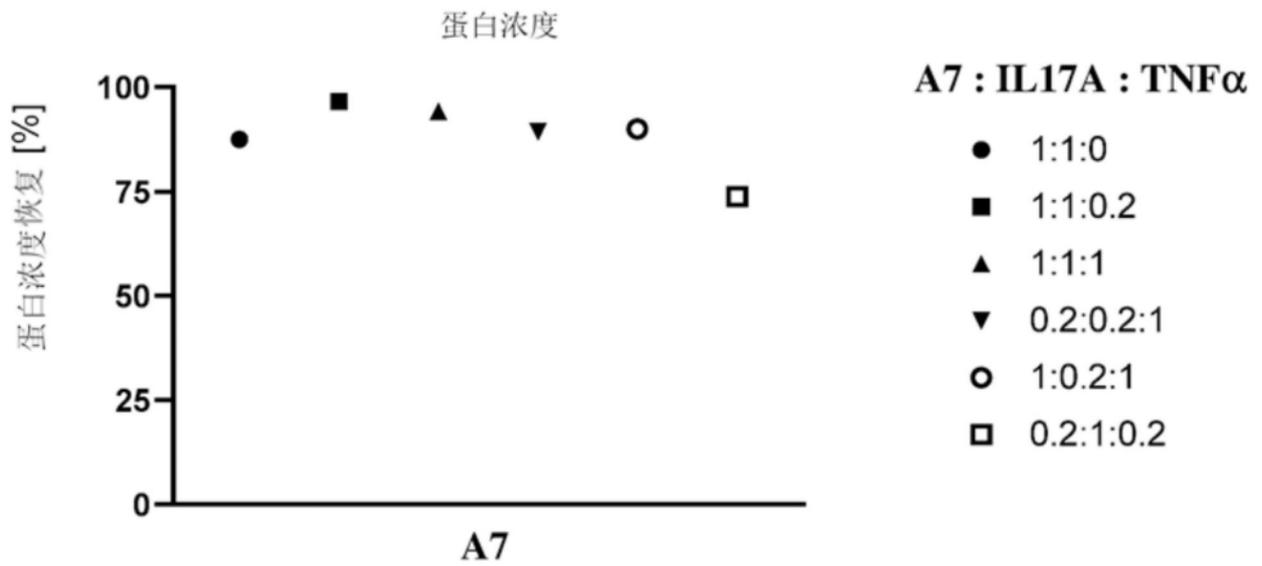


图24

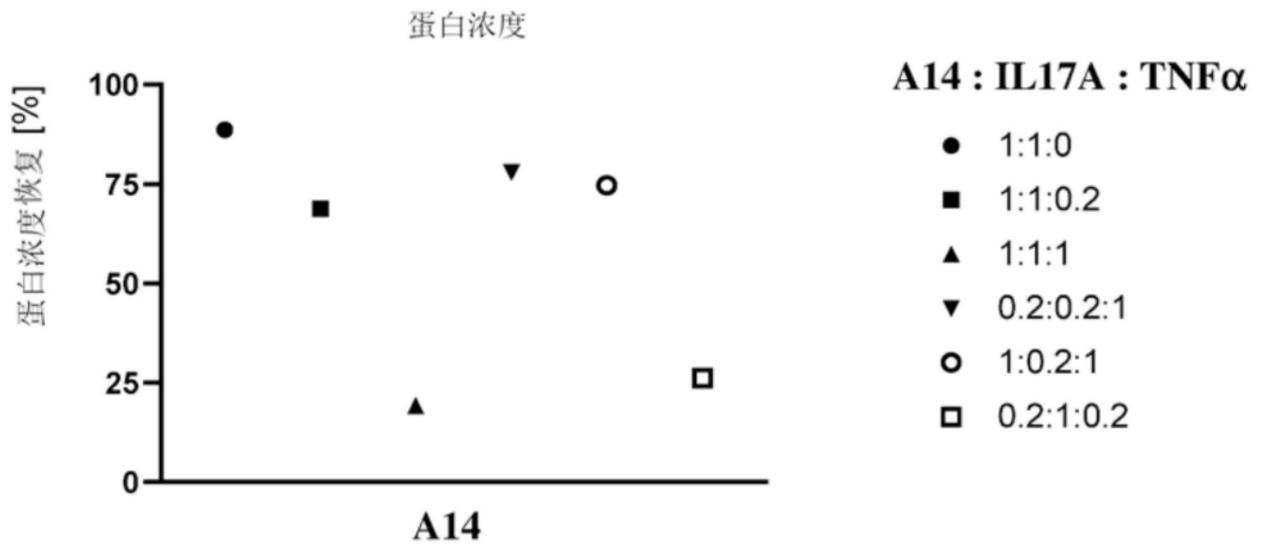


图25

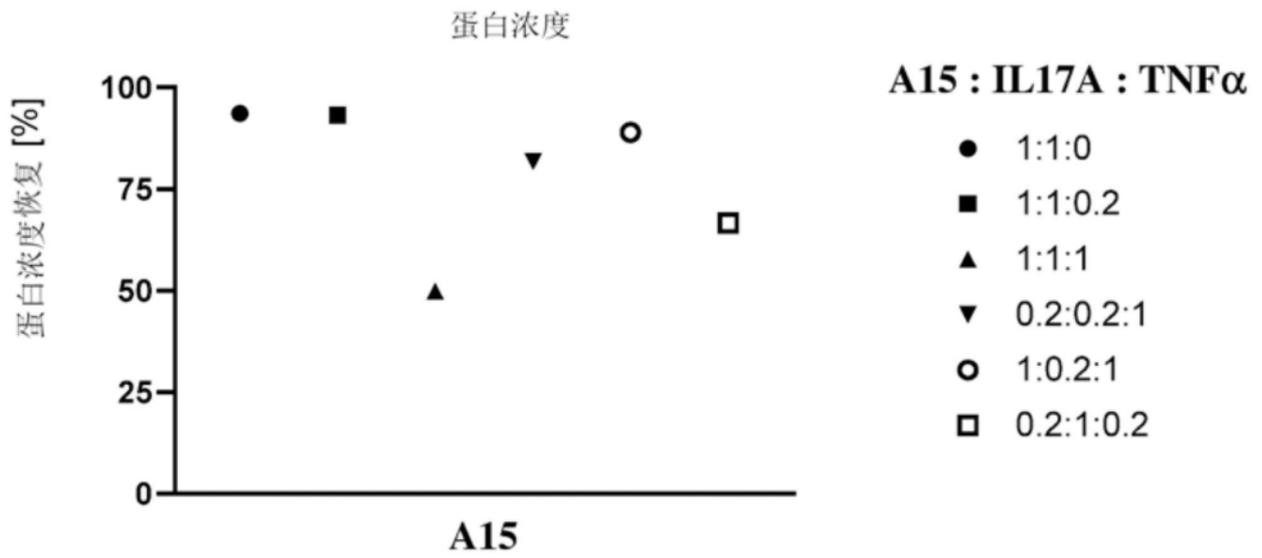


图26