



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106795219 B

(45) 授权公告日 2021.07.09

(21) 申请号 201480027341.6

(22) 申请日 2014.10.27

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106795219 A

(43) 申请公布日 2017.05.31

(30) 优先权数据

2014109854 2014.03.14 RU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015.11.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/RU2014/000808 2014.10.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/137843 RU 2015.09.17

(73) 专利权人 BIOCAD股份有限公司

地址 俄罗斯,圣彼得堡,彼得躲而咤伟区,
斯特列里那,34号楼,A

(72) 发明人 安德烈·鲍里索维奇·乌里京

斯坦尼斯拉夫·鲁道夫维奇·叶夫
多基莫夫

瓦列里·弗拉基米洛维奇·索洛维
耶夫

尤利娅·谢尔盖耶夫娜·切尔尼

奥尔加·弗拉基米洛夫那·宫察洛
娃

德米特里·瓦列里耶维奇·喀尔扎
维

塔季杨娜·维尼娅米诺夫娜·切尔
诺夫斯卡雅

罗曼·阿列克谢耶维奇·伊万诺夫
德米特里·瓦林基诺维奇·莫罗佐
夫

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

代理人 李唐

(51) Int.Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

审查员 李阳

权利要求书5页 说明书20页

序列表3页 附图17页

(54) 发明名称

抗IL-17抗体及其生产和使用的方法

(57) 摘要

本发明涉及医学领域,尤其是涉及抗人IL-17的单克隆抗体领域。更详细地说,本发明属于单克隆抗体IL-17 A拮抗剂,其与IL-17抗原表位高亲和力结合;本文的抗体在重链和轻链的高变区包含氨基酸取代。本发明的抗体可以是嵌合的、人源化的或人抗体或其抗原结合片段,而且可用作药物用于治疗自身免疫和炎症性紊乱或细胞增殖和发育异常。本发明还涉及所述抗体的生产方法。

1. 一种特异性结合人 IL-17A 的分离的单克隆抗体, 其包含重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L), 其中所述抗体包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,

所述HCDR1的氨基酸序列为F - T - F - S - N - Y - A - M - S (SEQ ID NO: 7);

所述HCDR2的氨基酸序列为R - I - E - G - G - I - S - S - T - Y (SEQ ID NO: 8);

所述HCDR3的氨基酸序列为C - A - V - N - Y - Y - G - M - Y - Y (SEQ ID NO: 9);

所述LCDR1的氨基酸序列为T - G - T - S - E - D - V - G - F - G - N - Y (SEQ ID NO: 10);

所述LCDR2的氨基酸序列为R - V - N - T - R - P - S (SEQ ID NO: 11); 且

所述LCDR3的氨基酸序列为C - S - S - Y - K - A - G - G - T - Y (SEQ ID NO: 12)。

2. 根据权利要求1 所述的分离的单克隆抗体, 其中:

a) 重链可变区 (V_H) 包含与SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列至少90%一致性的氨基酸序列;

b) 轻链可变区 (V_L) 包含与SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列至少90%一致性的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1 所述的分离的单克隆抗体, 其中:

a) 重链可变区 (V_H) 包含与SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列至少 95 %一致性的氨基酸序列;

b) 轻链可变区 (V_L) 包含与SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列至少 95 %一致性的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1 所述的分离的单克隆抗体, 其中:

a) 重链可变区 (V_H) 包含与SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列至少 99 %一致性的氨基酸序列;

b) 轻链可变区 (V_L) 包含与SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列至少 99 %一致性的氨基酸序列。

5. 一种特异性结合人 IL-17A 的分离的单克隆抗体, 其包含重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L), 其中所述抗体包含以下可变区:

a) 包含SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列的重链可变区 (V_H);

b) 包含SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列的轻链可变区 (V_L)。

6. 根据权利要求1-5 任一项所述的分离的抗体, 其中所述的抗体是人源化抗体。

7. 根据权利要求1-5 任一项所述的分离的抗体, 其中所述的抗体是 IgG1 或 IgG2 或 IgG3 或 IgG4 或 IgA 或 IgD 或 IgY。

8. 根据权利要求1-5 任一项所述的分离的抗体, 其中所述的抗体与人 IL - 17A 的结合亲和力为 $K_D \leq 10^{-10} M$ 。

9. 根据权利要求1-5 任一项所述的分离的抗体, 其与人 IL - 17A 的动力学的缔合常数 kon (1/Ms) 为至少 10^5 1/Msec。

10. 根据权利要求1-5 任一项所述的分离的抗体, 其与人 IL - 17A 的动力学的解离常数 dis (1/s) 为至多 10^{-5} 1/sec。

11. 根据权利要求1-5 任一项所述的分离的抗体,其中所述的抗体在 Fc 区域含有额外的 M252Y / S254T / T256E修饰(氨基酸取代)。
12. 根据权利要求1-5 任一项所述的分离的抗体,其中所述的抗体在 Fc 区域含有额外的 N434W修饰。
13. 根据权利要求1-5 任一项所述的分离的抗体,其中所述的抗体在 Fc 区域含有额外的 N434A修饰。
14. 根据权利要求1-5 任一项所述的分离的抗体,其中所述的抗体在 Fc 区域含有额外的 N434F修饰。
15. 根据权利要求1-5 任一项所述的分离的抗体,其中所述的抗体在 Fc 区域含有额外的 H433K /N434F / Y436H修饰。
16. 根据权利要求1-5 任一项所述的分离的抗体,其中所述的抗体在 Fc 区域含有额外的 H433K / N434F / Y436H + M252Y / S254T / T256E修饰。
17. 根据权利要求1-5 任一项所述的分离的抗体,其中所述的抗体在 Fc 区域含有额外的 T307A / E380A / N434A修饰。
18. 根据权利要求1-5 任一项所述的分离的抗体,其中所述的抗体在 Fc 区域含有额外的 T250Q / M428L修饰。
19. 根据权利要求1-5 任一项所述的分离的抗体,其中所述的抗体具有 SEQ ID NO: 15 所示的全长重链序列。
20. 根据权利要求1-5 任一项所述的分离的抗体,其中所述的抗体具有 SEQ ID NO: 16 所示的全长轻链序列。
21. 一种编码权利要求1-20 中任一项所述的抗体的DNA构建体。
22. 一种包含根据权利要求21的DNA构建体的表达载体。
23. 一种包含用于表达权利要求1-20 中任一项所述的抗体的权利要求 22 所述表达载体的宿主细胞。
24. 一种生产权利要求1-20 中任一项所述的单克隆抗体的方法,其特征在于:在适于获得所述抗体的条件下,在培养基中培养权利要求23 所述的宿主细胞,并进一步分离和纯化所述的抗体。
25. 一种包含权利要求1-20中任一项所述的抗体及一种或几种药学上可接受的载体的药物组合物。
26. 根据权利要求25 所述的药物组合物,进一步包含选自 TNF- α 抑制剂或任何其他抗 IL-17A 抗体的活性药物成分。
27. 根据权利要求25-26中任一项所述的药物组合物在制备用于治疗 IL-17A 介导的疾病或紊乱的药物中的用途,其中所述的 IL-17A 介导的疾病或紊乱选自类风湿性关节炎、青少年慢性关节炎、脊柱关节病、系统性红斑狼疮、哮喘、过敏性病症、移植植物抗宿主病、移植排斥、与器官移植有关的急性或慢性免疫疾病、血清反应阴性关节病、与间质性肺病相关的结缔组织病、与间质性肺病相关的类风湿性关节炎、与肺病相关的多发性肌炎、与肺病相关的干燥综合征、与肺病相关的强直性脊椎炎、急性移植相关的免疫疾病、慢性移植相关的免疫疾病、多发性硬化(所有类型)、急性风湿热、史提尔氏病、干燥综合征、Th1-或 Th2-介导的疾病、恶性肿瘤、无 β 脂蛋白血症、手足发绀、对旁路的炎性应答、囊性纤维化、细胞因

子疗法诱导的疾病、皮肤病、军团杆菌病、副肿瘤性疾病、肿瘤相关的高钙血症、成人斯蒂尔病、红斑多形物、JIA 少关节型、多关节型幼年特发性关节炎、多肌炎、SAPHO。

28. 根据权利要求27的用途,其中所述的 IL-17A 介导的疾病或紊乱选自

肺癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、直肠结肠癌、卡波济氏肉瘤、恶性黑色素瘤、鼻咽癌、心脏肿瘤;

急性淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性粒细胞性白血病(CML)、慢性淋巴白血病(CLL)、毛细胞白血病、霍奇金病、非何杰金氏淋巴瘤、恶性淋巴瘤、B-细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、恶性组织细胞病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征;

过敏性结膜炎、过敏性接触性皮炎、过敏性鼻炎、I 型变态反应;

骨移植排斥、骨髓移植(BMT)排斥、软骨移植排斥、胎儿胸腺移植排斥、心脏移植排斥、肾脏移植排斥、肝脏移植排斥、胰腺移植排斥、皮肤同种异体移植排斥、小肠移植排斥、任何器官或组织的异种移植排斥、甲状旁腺移植排斥;

湿疹、荨麻疹、牛皮癣、接触性皮炎、特应性皮炎、自身免疫皮炎、大疱性类天疱疮、疤痕性类天疱疮、系统性硬皮病、妊娠期类天疱疮;

强直性脊柱炎、牛皮癣关节炎、牛皮癣性关节病、严重红斑多形物、与肺病相关的皮肌炎、与间质性肺病相关的混合性结缔组织病、与肺病相关的系统性红斑狼疮。

29. 根据权利要求27的用途,其中所述的 IL-17A 介导的疾病或紊乱选自

肉瘤、I 型牛皮癣、II型牛皮癣、白血病、淋巴瘤、皮炎、硬皮病、皮肌炎、同种异体移植排斥。

30. 根据权利要求27的用途,其中所述的 IL-17A 介导的疾病或紊乱选自

与间质性肺病相关的系统性硬皮病、任何器官或组织的移植排斥。

31. 根据权利要求1-20中任一项所述的分离的抗体用于制备治疗 IL-17A 介导的疾病或紊乱的药物的用途,其中所述的 IL-17A 介导的疾病或紊乱选自类风湿性关节炎、青少年慢性关节炎、脊柱关节病、系统性红斑狼疮、哮喘、过敏性病症、移植物抗宿主病、移植排斥、与器官移植有关的急性或慢性免疫疾病、血清反应阴性关节病、与间质性肺病相关的结缔组织病、与间质性肺病相关的类风湿性关节炎、与肺病相关的多发性肌炎、与肺病相关的干燥综合征、与肺病相关的强直性脊椎炎、急性移植相关的免疫疾病、慢性移植相关的免疫疾病、多发性硬化(所有类型)、急性风湿热、史提尔氏病、干燥综合征、Th1-或 Th2-介导的疾病、恶性肿瘤、无β脂蛋白血症、手足发绀、对旁路的炎性应答、囊性纤维化、细胞因子疗法诱导的疾病、皮肤病、军团杆菌病、副肿瘤性疾病、肿瘤相关的高钙血症、成人斯蒂尔病、红斑多形物、JIA 少关节型、多关节型幼年特发性关节炎、多肌炎、SAPHO。

32. 根据权利要求31的用途,其中所述的 IL-17A 介导的疾病或紊乱选自

肺癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、直肠结肠癌、卡波济氏肉瘤、恶性黑色素瘤、鼻咽癌、心脏肿瘤;

急性淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性粒细胞性白血病(CML)、慢性淋巴白血病(CLL)、毛细胞白血病、霍奇金病、非何杰金氏淋巴瘤、恶性淋巴瘤、B-细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、恶性组织细胞病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征;

过敏性结膜炎、过敏性接触性皮炎、过敏性鼻炎、I 型变态反应;

骨移植排斥、骨髓移植(BMT)排斥、软骨移植排斥、胎儿胸腺移植排斥、心脏移植排斥、

肾脏移植排斥、肝脏移植排斥、胰腺移植排斥、皮肤同种异体移植排斥、小肠移植排斥、任何器官或组织的异种移植排斥、甲状旁腺移植排斥；

湿疹、荨麻疹、牛皮癣、接触性皮炎、特应性皮炎、自身免疫皮炎、大疱性类天疱疮、疤痕性类天疱疮、系统性硬皮病、妊娠期类天疱疮；

强直性脊柱炎、牛皮癣关节炎、牛皮癣性关节病、严重红斑多形物、与肺病相关的皮肌炎、与间质性肺病相关的混合性结缔组织病、与肺病相关的系统性红斑狼疮。

33. 根据权利要求31的用途,其中所述的 IL-17A 介导的疾病或紊乱选自

肉瘤、I 型牛皮癣、II型牛皮癣、白血病、淋巴瘤、皮炎、硬皮病、皮肌炎、同种异体移植排斥。

34. 根据权利要求31的用途,其中所述的 IL-17A 介导的疾病或紊乱选自

与间质性肺病相关的系统性硬皮病、任何器官或组织的移植排斥。

35. 根据权利要求1-20 中任一项所述的分离的抗体和TNF- α 抑制剂、或根据权利要求1-20中任一项所述的分离的抗体和其它的抗IL-17A抗体在制备用于治疗IL-17A介导的疾病或紊乱的药物中的用途,其中所述的 IL-17A 介导的疾病或紊乱选自类风湿性关节炎、青少年慢性关节炎、脊柱关节病、系统性红斑狼疮、哮喘、过敏性病症、移植植物抗宿主病、移植排斥、与器官移植有关的急性或慢性免疫疾病、血清反应阴性关节病、与间质性肺病相关的结缔组织病、与间质性肺病相关的类风湿性关节炎、与肺病相关的多发性肌炎、与肺病相关的干燥综合征、与肺病相关的强直性脊椎炎、急性移植相关的免疫疾病、慢性移植相关的免疫疾病、多发性硬化(所有类型)、急性风湿热、史提尔氏病、干燥综合征、Th1-或 Th2-介导的疾病、恶性肿瘤、无 β 脂蛋白血症、手足发绀、对旁路的炎性应答、囊性纤维化、细胞因子疗法诱导的疾病、皮肤病、军团杆菌病、副肿瘤性疾病、肿瘤相关的高钙血症、成人斯蒂尔病、红斑多形物、JIA 少关节型、多关节型幼年特发性关节炎、多肌炎、SAPHO。

36. 根据权利要求35的用途,其中所述的 IL-17A 介导的疾病或紊乱选自

肺癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、直肠结肠癌、卡波济氏肉瘤、恶性黑色素瘤、鼻咽癌、心脏肿瘤；

急性淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性粒细胞性白血病(CML)、慢性淋巴白血病(CLL)、毛细胞白血病、霍奇金病、非何杰金氏淋巴瘤、恶性淋巴瘤、B-细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、恶性组织细胞病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征；

过敏性结膜炎、过敏性接触性皮炎、过敏性鼻炎、I 型变态反应；

骨移植排斥、骨髓移植(BMT)排斥、软骨移植排斥、胎儿胸腺移植排斥、心脏移植排斥、肾脏移植排斥、肝脏移植排斥、胰腺移植排斥、皮肤同种异体移植排斥、小肠移植排斥、任何器官或组织的异种移植排斥、甲状旁腺移植排斥；

湿疹、荨麻疹、牛皮癣、接触性皮炎、特应性皮炎、自身免疫皮炎、大疱性类天疱疮、疤痕性类天疱疮、系统性硬皮病、妊娠期类天疱疮；

强直性脊柱炎、牛皮癣关节炎、牛皮癣性关节病、严重红斑多形物、与肺病相关的皮肌炎、与间质性肺病相关的混合性结缔组织病、与肺病相关的系统性红斑狼疮。

37. 根据权利要求35的用途,其中所述的 IL-17A 介导的疾病或紊乱选自

肉瘤、I 型牛皮癣、II型牛皮癣、白血病、淋巴瘤、皮炎、硬皮病、皮肌炎、同种异体移植排斥。

38. 根据权利要求35的用途,其中所述的 IL-17A 介导的疾病或紊乱选自与间质性肺病相关的系统性硬皮病、任何器官或组织的移植排斥。

抗IL-17抗体及其生产和使用的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医药领域,尤其涉及抗人IL-17的单克隆抗体的领域。更具体说,本发明涉及单克隆抗体-IL-17A拮抗剂,其与IL-17抗原表位高亲和力结合;本文的抗体在重链和轻链的高变区包含氨基酸取代。本发明的抗体可以是嵌合的、人源化的或人抗体或其抗原结合片段,而且可用作药物用于治疗自身免疫和炎症性紊乱或细胞增殖和发育异常。本发明还涉及所述抗体的制备方法。

背景技术

[0002] 免疫系统的主要功能是保护机体免受感染(例如,病毒或细菌)和恶性肿瘤。该系统涉及几种淋巴和骨髓细胞,如单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、嗜酸性粒细胞,T-细胞,B-细胞和中性粒细胞。这些淋巴和骨髓细胞可诱导被称为细胞因子的信号蛋白。炎症是免疫应答的一部分,其导致免疫细胞的积累,全身性的或者集中在机体中的某些部分。当对任何外源物质的感染产生应答时,免疫细胞释放细胞因子,其以它们的顺序,调节免疫细胞增殖、发育、分化和迁移。免疫应答能诱导各种病理过程,例如,如果正好发生自身免疫疾病,它引发过度炎症(ref. Abbas et al. (eds.) (2000) *Cellular and Molecular Immunology*, W.B.Saunders Co.,Philadelphia,Pa.;Oppenheim and Feldmann (eds.) (2001) *Cytokine Reference*, Academic Press, San Diego, Calif.; von Andrian and Mackay (2000) *New Engl.J. Med.* 343:1020-1034;Davidson and Diamond (2001) *New Engl.J. Med.* 345:340-350)。

[0003] 目前IL-17家族包括IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F。IL-17家族的所有成员都具有4个高度保守的半胱氨酸残基,其涉及链内二硫键的形成,和2个或多个也可能涉及的半胱氨酸残基。IL-17家族的成员与其它已知半胱氨酸的序列没有相似性。

[0004] 白细胞介素-17A(IL-17A,也称为细胞毒性T-淋巴细胞相关抗原-8(CTLA-8),IL-17),是一个20-30kDa的同型二聚体细胞因子,其由具有以下抗原识别的记忆性T-细胞产生。白细胞介素-23(IL-23)促进这些T-细胞的生长(McKenzie et al. (2006) *Trends Immunol.* 27 (1) :17-23;Langrish et al. (2005) *J. Exp. Med.* 201 (2) :233-40)。IL-17A通过两个受体(IL-17RA和IL-17RC)发挥作用,启动涉及具有嗜中性粒细胞的过程、炎症性过程和器官损伤的许多分子。该细胞因子是与肿瘤坏死因子(TNF)或白细胞介素1- β (IL-1 β)协同作用的,以获得更显著的抗炎作用。在许多炎症的治疗中,免疫和增殖疾病包括类风湿性关节炎(RA)、骨关节炎、患有RA的患者中的骨关节炎、炎症性纤维化(包括硬皮病、肺纤维化和肝硬化)、齿龈炎、牙周炎或牙周疾病、炎性肠病(例如,克罗恩氏病、溃疡性结肠炎和炎性肠病)、哮喘(包括变应性哮喘)、变态反应、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、多发性硬化症、牛皮癣、癌症,以及其他疾病,其通过阻断所述受体的抗体或结合抗原的抗体片段企图降低IL-17A的活性(例如,参见US 2003/0166862,WO 2005/108616,WO 2005/051422和WO 2006/013107)。

[0005] 目前,开发了几种抗IL-17抗体,包括AIN457(Abbott Laboratories的secukinumab)、LY2439821(Eli Lilly的Ixekizumab)、SCH900117(Merck)和RG4943(Roche),等等。

[0006] 例如,美国专利申请号US 2010/0245666描述了在重链或轻链的一个CDR区含有氨基酸取代的抗IL-17抗体(secukinumab,AIN457)。该抗体与IL-17是高亲和力的,其解离常数 K_D 为约122 μ M。该申请还公开了使用所述抗体抑制IL-17与合适的抗体结合,尤其用于治疗眼色素层炎。目前,所述抗体在进行治疗RA、强直性脊柱关节炎、克罗恩氏病、牛皮癣、多发性硬化和臭氧诱导的中性白细胞增多症的临床试验。该抗体显示是安全的,而且在患有RA的患者中显示46%的功效(Durez et al.,Communication EULAR 2009-RA)。

[0007] 现有知识也已经公开了抗IL-17的人源化抗体,如WO 2007/070750公开的国际申请中描述的(LY2439821,ixekizumab,Eli Lilly)。所述抗体含有氨基酸取代的重链和轻链可变区。于是,所述抗体与人IL-17是高亲和力的(KD低于约7.0-4.0pM),而且对人IL-17的koff指数 $<2 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ 。抗体在对患有RA的个体中进行静脉内给药的安全性、耐受力和功效的临床研究。(Genoevse et al.,Communication EULAR 2009-RA;Genoevse et al.,Arthritis & Rheumatism,62:929-39,(2010))。

[0008] 现有技术的状态有关于其它抗IL-17抗体的信息:鼠抗人中和性抗体eBio64CAP17(eBioscience)及其衍生物。专利申请US 2009/0175881A1和US 2008/0269467A1,以及国际公布WO 2008/001063 A1和WO 2007/117749 A1中公开了其它的抗IL-17抗体的实例。

[0009] 因此,考虑到它在炎症区域内的局部扩张,IL-17是一种炎症和自身免疫疾病治疗中的新的靶点,其药物安全性可能高于靶向系统循环促炎性细胞因子如TNF(肿瘤坏死因子)的药物。基于以上所述,可以得出结论,存在需要具有拮抗或中和IL-17A活性的抗体的需求,其用于治疗IL-17A的生物学活性导致或促进不利的生理学结果的疾病和状况,或者IL-17生物学活性的降低促进需要的治疗结果的疾病和状况,包括炎症性紊乱,细胞增殖和发育紊乱,自身免疫病理学如类风湿性关节炎(RA)和炎症性肠病(IBD)。

[0010] 使用这些抗体作为药剂的最大限制是由于它们的免疫原性和亲和力。由于大部分单克隆抗体是在鼠抗体的基础上获得的,这些抗体在人类中的常规应用导致对抗体治疗的免疫应答的发展(例如,过敏反应)。这些类型的免疫应答最终至少导致缺乏功效,以及最差的情况下可能的过敏性反应。

[0011] 因此,本发明提供了具有氨基酸取代的抗IL-17抗体,其中要求保护的抗体具有高亲和力,改善的溶解性和增加的 IC_{50} 。

附图说明

- [0012] 图1:获得的Phoretogram IL-17A蛋白溶液。
- [0013] 图2:获得的Phoretogram IL-17A-Fc蛋白溶液。
- [0014] 图3:还原(A)和非还原(B)条件下在12%SDS-PAGE溶液中的凝胶电泳。
- [0015] 图4:合成美洲驼组合抗体Fab文库的流程图。
- [0016] 图5:用于克隆噬菌体展示Fab文库的噬菌粒。
- [0017] 图6:合成杂合组合抗体Fab文库的流程图。
- [0018] 图7:合成杂合组合抗体Fab文库的流程图。

- [0019] 图8:可变区池的合并。
- [0020] 图9:特异性抗人IL-17Fab的ELISA筛选。
- [0021] 图10:阻断IL-17A/IL-17R相互作用的Fab候选物的竞争性ELISA筛选。
- [0022] 图11:抗IL-17A人Fab候选物的koff筛选的结果。
- [0023] 图12:BCD085溶液的电泳图。
- [0024] 图13:纯化的BCD085的HPLC图。
- [0025] 图14:相较于AIN 457,BCD085的IL-6抑制活性。
- [0026] 图15:BCD085与人IL-17的相互作用曲线。
- [0027] 图16:BCD085与猴IL-17 (Macaca mulatta) 的相互作用曲线。
- [0028] 图17:在热压后获得的BCD085抗体的色谱图。
- [0029] 图18:以40mg/kg的剂量,单次皮下给药给猕猴 (Macaca mulatta) 后的抗IL-17A BCD085 抗体的药物动力学模式。

发明内容

[0030] 术语定义

[0031] “白细胞介素17”，也称为“IL-17”或“IL-17A”，是一种20-30kD的同型二聚体糖蛋白。人IL-17的基因编码由155个氨基酸组成的蛋白，且该蛋白具有19个氨基酸信号序列和136 个氨基酸成熟片段。以它的天然状态存在时，全长抗体由4条肽链组成的免疫球蛋白(抗体)分子表示:用二硫键连接的2条重(H)链(大约50-70kD全长)和2条轻(L)链(大约25kD全长)。每条链的氨基末端区域包括大约100-110或更多个氨基酸的可变区，其主要负责抗原识别。每条链的羧基末端区域决定主要负责效应子功能的恒定区。

[0032] 抗体包括轻链和重链。重链和轻链的可变区形成抗原结合中心(位点)。抗体结构呈现如下。

[0033] 轻链分为kappa和lambda，而且具有特异性恒定区。每条轻链的特征在于包括可变的 N-末端轻链区(本文称为LCVR或VL)和由单个功能域组成的恒定的轻链区(CL)。重链区分为 γ 、 δ 、 α 、 μ 和 ϵ ，而且限定免疫球蛋白种类分别为:IgG、IgM、IgA、IgD和IgE；它们中的一些可以另外划分为亚类(同型)如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。每种重链类型的特征在于特异性的恒定区Fc。每条重链包括可变的N-末端区(本文称为 HCVR或VH)和恒定区CH。恒定的重链区由针对IgG、IgD和IgA的3个功能域(CH1、CH2和C H 3)和针对IgM和IgE的4个功能域(CH1、CH2、C H 3和C H 4)组成。HCVR和 LCVR也可以划分为所谓的高变区Rf(互补决定区,CDR)，其被多个保守框架区(FR) 打断。每个HCVR和LCVR都包括从N-末端到C-末端以下列顺序定位的3个CDR和FR: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。本申请中3条重链CDR称为CDRH1、CDRH2和CDRH3，同时3条轻链CDR称为CDRL1、CDRL2和CDRL3。CDR含有与抗原特异性相互作用的大部分氨基酸残基。根据本发明，除非另有说明，按照Kabat编码制对HCVR和LCVR中的CDR残基进行计数和定位。除非另有说明，本申请包括用于氨基酸的常用字母密码子。

[0034] 术语“抗IL-17A抗体”、“抗IL-17的抗体”、“特异性结合白细胞介素IL-17的抗体”和“抗 IL-17A的抗体”在本文中可以互换使用，而且涉及特异性结合IL-17A的抗体。

[0035] 如本文中使用的，与本发明的抗IL-17A单克隆抗体相关的术语“抗体”(或以简单

的形式：“根据本发明的单克隆抗体”），涉及单克隆抗体。除非本申请中另有说明，如本文中使用的，“单克隆抗体”涉及获自啮齿类动物、灵长类动物或骆驼科家族的抗体，优选涉及鼠、猴、骆驼或美洲驼抗体、嵌合抗体、人源化抗体或全人抗体。可以使用现有技术已知的杂交瘤技术、重组技术、噬菌体展示(phage display)技术、合成技术或这些技术的组合或者现有技术熟知的其它技术生产本发明的单克隆抗体。如本文中使用的，术语“单克隆抗体”不局限于通过杂交瘤技术的方式获得的抗体。“单克隆抗体”涉及从单个复制或克隆，包括：例如，任何真核生物、原核生物或噬菌体获得的抗体。“单克隆抗体”可以是完整的抗体(具有全部的或全长Fc区)、实际上完整的抗体、包括抗原结合区的抗体部分或片段，例如，Fab片段，Fab'片段或F(ab')2-片段。“Fab”片段包括轻链可变区和轻链恒定区以及重链可变区和第一重链恒定区(C H 1)。“F(ab')2”抗体片段包括一对Fab片段，其主要通过位于C-末端区域的铰链氨基酸共价结合。Fv是可变的抗体片段；scFv(单链Fv)是抗体的可变片段，其中重链和轻链片段通过短的接头肽连接；(scFv)2-片段包括用二硫键连接的两个scFv分子；dsFv-可变片段用另外的分子内二硫键稳定。抗体片段之间的其它化学键也是本领域状况下熟知的。

[0036] 本文中术语“抗体”和“免疫球蛋白”可以互换使用。

[0037] 每个轻链/重链对的可变区形成抗体的抗原结合位点。根据本发明，如本文中使用的，“抗原结合区”或“抗原结合位点”或“抗原结合功能域”或“抗原结合中心”可以互换使用，是指包括与抗原相互作用的氨基酸残基、并且赋予抗体对抗原的特异性和亲和力的抗体区域。抗体片段包括保持抗原结合残基的正确构象必需的框架氨基酸残基。

[0038] 优选地，根据本发明的抗原结合区或整个抗原结合位点的CDR来源于人类文库或基本上人类来源的，而且具有改变的特异性氨基酸残基，例如，用不同的氨基酸残基取代以便改善抗体的特定特性(例如，它的 K_D 、 K_{off} 和 IC_{50})。优选地，本发明的抗体框架区是人类来源的或者基本上人类来源的(至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%人类来源的)。本发明抗体的优选框架区具有相应于人抗体的框架区的氨基酸序列：

[0039] 重链可变区

[0040] FR1 QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAADG

[0041] FR2 WVRQAPGKGLEWVS

[0042] FR3 RFTISRDDAKNTLYLQMSSLKTEDTAVYYC

[0043] FR4 WGQGTLVTVSS

[0044] 轻链可变区

[0045] FR1 QSVLTQPPSVSVPAGKTVTISC

[0046] FR2 WYQHLPGTAPKLLIY

[0047] FR3 GVPDRFSGSQSGNTASLTISGLQAEDADYYC

[0048] FR4 FGGGTKLTVLGQ

[0049] 在其它的实施方案中，本发明的抗IL-17抗体的抗原结合位点可以来源于其它的非人物种，包括但不限于，兔、老鼠和仓鼠，或者来源于人类物种。

[0050] 此外，本发明的“单克隆抗体”可以由单链Fv片段表示，其可以通过连接编码LCVR-和HCVR-的DNA与接头序列获得(参见Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol.113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, p.269-

315,1994)。本发明中使用的术语“抗体”包括这样的片段或部分以及单链形式。只要蛋白保留它特异性或优选结合靶(例如,抗原表位或抗原)的能力,它都包括在术语“抗体”中。抗体可以是糖基化的或非糖基化的,都属于本发明的范围内。

[0051] 如本文中使用的,“单克隆抗体”的群体,指同源的或基本同源的抗体群体(也即,群体中抗体的至少约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%或96%,但是更优选不低于约97%或98%,或者进一步优选至少99%将在ELISA中竞争相同的抗原/抗原表位,或者考虑到它们的氨基酸序列,进一步优选抗体是相同的)。抗体可以是糖基化的或者非糖基化的,都是属于本发明的范围内。如果它们具有相同的氨基酸序列,单克隆抗体就是同源的,但是它们的翻译后修饰可以不同(例如,糖基化模式)。

[0052] 如本文使用的,抗体“变体”指一种分子,其氨基酸序列通过添加、缺失和/或取代亲本抗体序列中的一个或多个氨基酸残基而不同于亲本序列。在优选的实施方案中,抗体含有亲本抗体的CDR区中的至少一个(例如,从1到约10,优选2、3、4、5、6、7或8)氨基酸插入、缺失和/或取代。考虑到变体抗体的序列,本申请限定同一性或同源性为变体抗体序列中的氨基酸残基的百分数,其等于序列比对后亲本抗体中的残基数,而且如果需要,切断以获得最大的百分数相同序列。变体抗体保留它与亲本抗体结合的相同抗原或者优选抗原表位结合的能力,或者优选显示超过亲本抗体的至少一种特性或生物学活性。例如,相较于亲本抗体,该抗体优选具有更强的亲和力、更长的半衰期、更低的IC₅₀或增强的抑制抗原活性的能力。本申请特别感兴趣的变体抗体是,当与亲本抗体比较时,显示活性增加至少2倍,优选至少5倍、10倍或20倍的抗体。

[0053] 如本文中使用的,“亲本”抗体指用于产生变体的氨基酸序列编码的抗体。亲本抗体可以具有来源于羊驼(lama glama)的框架序列,而且优选该框架序列是完全或基本上人类来源的。亲本抗体可以来自美洲驼、嵌合的、人源化或人类。

[0054] 可以使用各种工程技术制备本发明的抗体,包括重组方法,如各种来源的DNA改组。

[0055] 如本文中使用的,术语“特异性结合”指这种情况,其中涉及特异性结合过程的一方没有显著结合除了它的特异性结合伴侣(partners)以外的分子。该术语也适用,如果,例如,本发明的抗体的抗原结合位点对特定的抗原表位是特异性的,该抗原表位由许多抗原携带;在这种情况下,具有抗原结合位点的特异性抗体将能特异性结合携带不同抗原表位的抗原。因此,本发明的单克隆抗体特异性结合人IL-17(IL-17A),但是它不特异性结合人IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F。

[0056] 如本文中使用的,术语“抗原表位”指可以通过抗体的一个或几个抗原结合位点识别并结合的分子部分。抗原表位常常包含分子的化学表面活性基团,如:氨基酸或糖侧链,并具有特异性的三维结构特性,以及特异性的电荷特性。“抑制抗原表位”和/或“中和抗原表位”指,当在完整抗原分子和结合所述抗原表位特异性的抗体的上下文中,导致体内或体外丧失或降低的分子或含有该分子的生物体的活性的抗原表位。

[0057] 如本文中使用的,术语“抗原表位”还指在动物,优选在哺乳动物,如:老鼠和人体中具有抗原性和/或免疫原性活性的多肽片段。如本文中使用的,术语“抗原性表位”是能特异性结合抗体,而且能通过现有技术熟知的任何技术(例如,通过标准的免疫测定方法)检测的多肽片段。抗原表位不是免疫原性必需的,但是它们可具有免疫原性。如本文中使

用的，“免疫原性表位”限定为在动物中引起抗体应答的多肽片段，如通过现有技术的任何方法测定的。“非线性表位”或“构象性表位”包含与抗原表位特异性抗体结合的抗原蛋白内的不相邻多肽(氨基酸)。

[0058] 如本文中使用的，涉及本发明抗体的术语“生物学特性”、“生物学特征”、“活性”和“生物学活性”是可以互换使用的，而且包括但不限于：抗原表位/抗原亲和力和特异性；体内或体外的和IL-17的能力或者是IL-17拮抗剂的IC₅₀；抗体稳定性和抗体的体内免疫原性。从现有技术鉴定的其它生物学特性或抗体特性包括：例如，交叉反应性(与靶肽的非人同源物或其它蛋白或靶的反应)和在哺乳动物细胞中保持高的蛋白表达水平的能力。可以使用现有技术中公认的方法观察、测定或评估上述特性或特征，这些方法包括但不限于：ELISA、竞争性ELISA BIACORE表面胞质基因共振或KINEXA、体外或体内非限制性的中和分析、受体结合、细胞因子或生长因子的产生和/或释放、信号转导和从各种来源包括人类、灵长类动物或任何其它来源获得的组织切片的免疫组织化学研究。

[0059] 如本文中使用的，术语“抑制”或“中和”，考虑到本发明的抗体活性时，将指显著抵抗、阻断、预防、限制、减缓、中断、破坏、终止、降低或逆转例如抑制个体的发育或严重程度的能力，包括但不限于：生物学活性(如IL-17的活性)或特性，疾病或状况。本发明的抗体与IL-17结合导致抑制或中和优选至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高的IL-17活性。

[0060] 如本文中使用的，术语“患者”指哺乳动物，包括但不限于：老鼠、猴、人、家畜哺乳动物、运动哺乳动物和宠物哺乳动物；优选地，该术语用于人。在某个实施方案中，患者优选哺乳动物、优选人，另外地特征在于IL-17A介导的疾病、紊乱或状况可以通过降低IL-17的生物学活性而改善。

[0061] 术语“载体”指能转运与它连接的其它核酸的核酸分子，包括但不限于：质粒和病毒载体。某些载体能在其被导入的宿主细胞中自主复制，而其它的载体能整合到宿主细胞基因组中病与宿主基因组一起复制。而且，一些载体能介导它们功能性结合的基因的表达。本申请中，这些载体称为“重组表达载体”(或“表达载体”)；示例性的载体是现有技术熟知的。

[0062] 如本文中使用的，术语“细胞”、“宿主细胞”、“细胞系”、“细胞培养物”和“生产细胞系”可以互换使用，指单个细胞或细胞培养物，其是本发明的任意分离的多核苷酸或含有编码本发明的HCVR、LCVR或单克隆抗体的序列的任意重组载体(多个重组载体)的受体。宿主细胞包括获自单个宿主细胞的后代；由于天然、偶然或计划的突变和/或变异，这些后代不必是与原始宿主细胞完全相同的(关于形态或完全DNA互补)。宿主细胞包括用重组载体、表达本发明的多核苷酸的单克隆抗体或它的重链或轻链转化、转导或感染的细胞。包含本发明的重组载体的宿主细胞(整合到宿主染色体中或者没有)都称为“重组宿主细胞”。用于本发明的优选宿主细胞是CHO细胞(例如，ATCC CRL-9096)、NS0细胞、COS细胞(ATCC，例如，CRL-1650、CRL-1651)和HeLa (ATCC CCL-2)。用于本发明的另外的宿主细胞包括植物细胞、酵母细胞、其它的哺乳动物细胞和原核细胞。

[0063] 术语“IL-17介导的疾病或紊乱”包括与异常的IL-17机体/组织水平相关的疾病或紊乱。这些疾病或紊乱可以感染炎症或自身免疫，可以选自风湿性关节炎、骨关节炎、青少年慢性关节炎、脓毒性关节炎、莱姆关节炎(Lyme arthritis)、牛皮癣关节炎、反应性关节

炎、脊柱关节病、系统性红斑狼疮、克罗恩氏病 (Crohn's disease)、溃疡性结肠炎、炎性肠病、胰岛素依赖型糖尿病、甲状腺炎、哮喘、过敏性病症、牛皮癣、皮炎、系统性硬化症、移植植物抗宿主病、移植排斥、与器官移植有关的急性或慢性免疫疾病、肉状瘤病、动脉粥样硬化、弥散性血管内凝血、川崎病 (Kawasaki disease)、格雷夫斯病 (Graves' disease)、肾病综合征、慢性疲劳综合征、坏死性血管炎 (Wegener's disease)、过敏性紫癜 (Henoch-Schonlein purpura)、伴有肾损害的显微镜下多血管炎、慢性活动性肝炎、葡萄膜炎、感染性休克、中毒性休克综合征、脓毒症综合征、恶病质、感染、入侵、获得性免疫缺陷综合征、急性横贯性脊髓炎、亨廷顿舞蹈病 (Huntington chorea)、帕金森病 (Parkinson disease)、阿尔茨海默病 (Alzheimer disease)、中风、原发性胆汁性肝硬化、溶血性贫血、恶性肿瘤、心力衰竭、心肌梗死、艾迪生病 (Addison disease)、多腺性自身免疫综合征I型或II型、施密特氏综合征 (Schmidt's syndrome)、急性呼吸窘迫综合征、脱发、斑形脱发、血清反应阴性关节病、关节病、莱特尔氏综合征 (Reiter's syndrome)、牛皮癣性关节病、与溃疡性结肠炎有关的关节病、肠病性滑膜炎、与衣原体有关的关节病、脊椎关节病、动脉粥样硬化病、特异反应性过敏、自身免疫性大疱病、天疱疮、落叶状天疱疮、类天疱疮、线状 IgA 疾病、自身免疫性溶血性贫血、Coombs 阳性溶血性贫血、获得性恶性贫血、青少年恶性贫血、肌痛性脑脊髓炎、慢性疲劳综合征、慢性活动性肝炎、巨细胞动脉炎、原发性硬化性肝炎、隐源性自身免疫性肝炎、爱滋病、爱滋病相关疾病、乙肝、丙肝、常见变异型免疫缺陷病、扩张型心肌病、女性不育、卵巢功能不全、过早卵巢衰竭、肺纤维化、隐源性致纤维化性肺泡炎、炎症后间质性肺病、间质性肺炎、与间质性肺病相关的结缔组织病、与间质性肺病相关的混合性结缔组织病、与间质性肺病相关的系统性硬皮病、与间质性肺病相关的类风湿性关节炎、与肺病相关的系统性红斑狼疮、与肺病相关的皮肌炎、与肺病相关的多发性肌炎、与肺病相关的干燥综合征、与肺病相关的强直性脊椎炎、弥漫性肺血管炎、与肺病相关的血铁质、药物引起的间质性肺病、纤维化、辐射诱导的纤维化、闭塞性细支气管炎、慢性嗜酸细胞性肺炎、伴有淋巴细胞浸润的肺疾病、感染后间质性肺病变、痛风性关节炎、自身免疫性肝炎、I型自身免疫肝炎、II型自身免疫性肝炎、自身免疫性低血糖症、伴有角质肥厚的B型胰岛素抵抗、甲状腺机能减退、急性移植相关的免疫疾病、慢性移植相关的免疫疾病、骨关节病、原发性硬化性胆管炎、I型牛皮癣、II型牛皮癣、特发性白细胞减少症、自身免疫性嗜中性白血球减少症、NOS-肾疾病、肾小球性肾炎、显微镜肾下多血管炎、莱姆病 (Lyme disease)、盘状红斑狼疮、先天性的NOS男性不育、抗精子免疫、多发性硬化、交感性眼炎、结缔组织病继发的肺动脉高压症、肺出血肾炎综合症、结节性多动脉炎的肺表现、急性风湿热、类风湿性脊椎炎、史提尔氏病 (Still's disease)、系统性硬皮病、干燥综合征 (Sjogren's Syndrome)、关节炎、自身免疫性血小板减少症、特发性血小板减少症、自身免疫性甲状腺病、甲状腺机能亢进、自身免疫性甲状腺机能减退、萎缩性自身免疫性甲状腺机能减退、原发性粘液水肿、晶状体抗原性葡萄膜炎、原发性血管炎、白癜风、急性肝病、慢性肝病、酒精性肝硬化、酒精诱导的肝损伤、胆汁郁积、特质性肝疾病、药物诱导的肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、过敏症、哮喘、B组链球菌感染 (group B streptococcal infection, GBS)、精神障碍、Th1-或Th2-介导的疾病、急性或慢性疼痛、恶性肿瘤 (如:肺癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌或造血系统恶性肿瘤)、无β脂蛋白血症、手足发绀、急性或慢性感染、急性或慢性侵染、急性白血病、急性淋巴细胞

白血病、急性骨髓性白血病、急性或慢性细菌感染、急性胰腺炎、急性肾衰竭、腺癌、心房异位、AIDS痴呆综合征、酒精诱导的肝炎、过敏性结膜炎、过敏性接触性皮炎、过敏性鼻炎、同种异体移植排斥、 α -I抗胰蛋白酶缺乏症、侧向肌萎缩性硬化症、贫血、心绞痛、前角细胞变性、抗-CD3治疗、抗磷脂综合征、抗受体的过敏反应、主动脉瘤、外周动脉瘤、主动脉夹层、高动脉压、冠状动脉硬化、动静脉瘘、共济失调、恒定或阵发性心房纤维性颤动、心房扑动、房室阻断、B-细胞淋巴瘤、骨移植排斥、骨髓移植排斥、束支传导阻滞、伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma)、烧伤、心律失常、心肌顿抑综合征、心脏肿瘤、心肌病、对旁路的炎性应答、软骨移植排斥、脑皮层变性、小脑病症、混乱或多灶性房性心动过速、化疗所致疾病、慢性粒细胞性白血病、慢性酒精成瘾、慢性炎性疾病、慢性淋巴白血病、慢性阻塞性肺病、慢性水杨酸盐中毒、结肠直肠癌、充血性心脏衰竭、结膜炎、接触性皮炎、肺心病、冠状动脉疾病、克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob Disease)、培养阴性的脓毒症、囊性纤维化、细胞因子疗法诱导的疾病、拳击运动员的脑病、脱髓鞘病、登革出血热(dengue hemorrhagic fever)、皮炎、皮肤病、多尿症、糖尿病、糖尿病相关的动脉粥样硬化血管疾病、弥漫性雷维小体疾病(diffuse Lewy body disease)、充血性扩张型心肌病、基底神经节疾病、中年唐氏综合征(Down's syndrome in middle age)、中枢神经系统多巴胺阻滞剂诱导的运动障碍、药物敏感性、湿疹、脑脊髓炎、心内膜炎、内分泌病、会厌炎、EB病毒感染(Epstein-Barr viral infection)、红痛病、锥体外系病症、小脑病症、家族性嗜血细胞性淋巴组织细胞增生症、胎儿胸腺移植排斥、弗里德希氏共济失调(Friedreich's ataxia)、外周动脉疾病、真菌败血症、产气性蜂窝组织炎、胃溃疡、肾小球性肾炎、任何器官或组织的移植排斥、革兰氏阴性脓毒症、革兰氏阳性脓毒症、由细胞内生物体引起的肉芽肿、毛细胞白血病、哈-施病(Hallervorden-Spatz disease)、桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、枯草热、心脏移植排斥、血色病、血液透析、溶血性尿毒综合征、血栓性血小板减少性紫癜、出血、甲型肝炎、束支心律失常、HIV感染、HIV神经病、霍奇金病(Hodgkin disease)、运动机能亢进性运动疾病、过敏反应、过敏性相关的肺炎、高血压、运动机能减退的运动障碍、下丘脑-垂体-肾上腺轴的检查、特发性艾迪生氏病(idiopathic Addison's disease)、特发性肺纤维化、抗体介导的细胞毒性、衰弱、婴儿肌肉萎缩、主动脉炎症、流感病毒A、暴露于电离辐射、虹膜睫状体炎、葡萄膜炎、视神经炎、局部缺血、再灌注诱导的疾病、缺血性中风、幼年型类风湿性关节炎、幼年型脊髓性肌萎缩、卡波济氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、肾移植排斥、军团杆菌病、利什曼病、麻风病、皮质脊髓束损伤、脂肪水肿、肝脏移植排斥、淋巴水肿、疟疾、恶性淋巴瘤、恶性组织细胞病、恶性黑色素瘤、脑膜炎、脑膜炎球菌血症、代谢疾病、特发性疾病、偏头痛、多系统线粒体疾病、混合性结缔组织病、单克隆丙种球蛋白病、多发性骨髓瘤、多系统变性症、重症肌无力、细胞内鸟结核分枝杆菌、结核分枝杆菌、骨髓增生异常综合征、心肌梗塞、心肌缺血性疾病、鼻咽癌、新生儿慢性肺疾病、肾炎、肾病、神经退行性疾病、神经源性肌萎缩、嗜中性粒细胞减少性发热、非何杰金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、腹部主动脉分支闭塞、动脉阻塞性疾病、OKT3治疗、睾丸炎、附睾炎、输精管吻合术、器官肿大、骨质疏松症、胰腺移植排斥、胰腺癌、副肿瘤性疾病、肿瘤相关的高钙血症、甲状旁腺移植排斥、盆腔炎症性疾病、常年性鼻炎、心包疾病、周边动脉粥样硬化疾病、外周血管疾病、腹膜炎、恶性贫血、卡氏肺囊虫肺炎、POEMS综合征、灌注后综合征、泵头综合征、心脏切开后梗塞后综合征、子痫前期、进行性核上性麻痹、原发性肺动脉高血压、放射

疗法、雷诺氏现象或 疾病 (Raynaud's phenomenon or disease)、雷诺氏病 (Raynaud's disease)、雷弗素姆病 (Refsum's disease)、常规窄QRS心动过速、肾血管性高血压、再灌注损伤、限制性心肌病、肉瘤、硬 皮病、老年性舞蹈症、路易体痴呆 (Dementia with Lewy bodies)、血清反应阴性关节炎、休 克、镰状细胞病、皮肤同种异体移植排斥、皮肤变化、小肠移植排斥、实体瘤、特异性心 律失常、脊髓性共济失调、脊髓小脑退化、链状球菌肌炎、小脑结构损伤、亚急性硬化性 全脑炎、晕厥、心血管梅毒、全身性过敏反应、综合全身炎症反应综合征、全身型幼年类 风湿性关节炎、毛细管扩张、血栓闭塞性脉管炎、血小板减少症、外伤、出血、III型超敏 反应、IV型超敏反应、不稳定心绞痛、尿毒症、尿脓毒病、荨麻疹、心脏瓣膜病、静脉曲 张、血管炎、静脉疾病、静脉血栓形成、心室纤维性颤动、病毒感染、真菌感染、病毒性 脑炎、无菌性脑膜炎、病毒嗜血细胞综合征、韦尼克-科尔萨科夫综合征 (Wernicke-Korsakoff syndrome)、威尔逊氏病 (Wilson's disease)、任何器官或组织的异种移植排斥、急性冠状动脉 综合征、急性特发性多神经炎、急性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、急性缺血、成人斯蒂 尔病 (adult-onset Still's disease)、斑形脱发、过敏性反应、抗磷脂抗体综合征、再生障碍性贫 血、冠状动脉硬化、特应性湿疹、特应性皮炎、自身免疫皮炎、与链球菌感染相关的自身 免疫性疾病、自身免疫性肠病、自身免疫性听力丧失、自身免疫性淋巴细胞增生综合征、自身免疫性心肌炎、自身免疫性卵巢早衰、睑炎、支气管扩张、大疱性类天疱疮、心血管 疾病、灾难性抗磷脂综合征、乳糜泻、颈椎病、慢性缺血、疤痕性类天疱疮、多发性硬化、结膜炎、儿童期发作的精神病症、慢性阻塞性肺病、泪囊炎、皮肌炎、糖尿病性视网膜病、椎间盘突出、椎间盘脱出、药物诱发的免疫性溶血性贫血、心内膜炎、子宫内膜异位症、眼内炎、巩膜外层炎、红斑多形物、严重红斑多形物、妊娠期类天疱疮、吉兰-巴雷综合征 (Guillain-Barre syndrome, GBS)、枯草热、休斯综合症 (Hughes syndrome)、特发性帕金森病、特发性间质性肺炎、IgE介导的变态反应、自身免疫性溶血性贫血、包涵体肌炎、传染性眼 部炎性疾病、炎性脱髓鞘病、炎症性心脏病、炎症性肾病、先天性肺纤维化、常见间质性 肺炎、虹膜炎、角膜炎、干燥性角结膜炎、库斯毛尔病 (Kussmaul-Meier病)、兰德里麻痹 (Landry palsy)、朗格汉斯细胞组织细胞增生症 (Langerhans' cell histiocytosis)、大理石状皮肤病、黄 斑变性、显微镜下多血管炎、Bechterew病、运动神经元疾病、粘膜类天疱疮、多发性器官 衰竭、重症肌无力、脊髓发育不良综合征、心肌炎、神经根病症、神经病、非A型肝炎、非B型肝炎、视神经炎、骨质溶解症、卵巢癌、JIA少关节型、外周动脉闭塞性疾病、周 围性血管疾病、周围动脉疾病、静脉炎、多发性结节性动脉炎、多软骨炎、风湿性多肌痛、白发病、多关节型幼年特发性关节炎、多发性内分泌缺陷、多肌炎、风湿性多肌痛、泵后 综合征、原发性帕金森氏综合征、前列腺癌、直肠癌、造血系统恶性肿瘤 (如:白血病、淋巴瘤)、前列腺炎、单纯红细胞再生障碍性贫血、原发性肾上腺机能不足、复发性视神经 脊髓炎、心瓣手术后的再狭窄、风湿性心脏病、滑膜炎、痤疮、脓疱病、股肥大、骨炎、硬皮病、继发性淀粉样变性、休克肺、巩膜炎、坐骨神经痛、继发性肾上腺机能不足、硅 相关的结缔组织病、Sneddon-Wilkison病、强直性脊柱炎、Stevens-Johnson综合征、全身炎 症反应综合征、颅动脉炎、弓形体鼻炎、中毒性表皮坏死松解症、横贯性脊髓炎、肿瘤坏 死因子受体相关的周期性综合征、I型变态反应、II型糖尿病、荨麻疹、常见间质性肺炎、血管炎、春季结膜炎、病毒性视网膜炎、Vogt-Koyanagi-Harada综合征、湿性黄斑变性、伤口愈合相关的关节病、耶尔森氏菌属相关的关节病、沙门氏菌相关的关节病。

[0064] 抗体的描述

[0065] 本发明提供了特异性结合IL-17A的抗体或其片段；重链的可变区(V_H)包括3个高变区HCDR 1、HCDR 2和HCDR 3：

[0066] 高变区HCDR 1包括SEQ ID NO:1；

[0067] 高变区HCDR 2包括SEQ ID NO:2；

[0068] 高变区HCDR 3包括SEQ ID NO:3；

[0069] 可变区(V_L)包括3个高变区LCDR 1、LCDR 2和LCDR 3：

[0070] 高变区LCDR 1包括SEQ ID NO:4；

[0071] 高变区LCDR 2包括SEQ ID NO:5；

[0072] 高变区LCDR 3包括SEQ ID NO:6。

[0073] 本发明的优选实施方案涉及含有重链(V_H)和轻链(V_L)可变区的单克隆抗体或其片段，其中所述抗体或其片段包括：

[0074] HCDR 1:F-T-F-S-N-Y-A-M-S (SEQ ID NO:7)；

[0075] HCDR 2:R-I-E-G-G-I-S-S-T-Y (SEQ ID NO:8)；

[0076] HCDR 3:C-A-V-N-Y-Y-G-M-Y-Y (SEQ ID NO:9)；

[0077] 而且轻链的可变区(V_L)包括：

[0078] LCDR 1:T-G-T-S-E-D-V-G-F-G-N-Y (SEQ ID NO:10)；

[0079] LCDR 2:R-V-N-T-R-P-S (SEQ ID NO:11)；

[0080] LCDR 3:C-S-S-Y-K-A-G-G-T-Y (SEQ ID NO:12)。

[0081] 本发明的其它优选实施方案涉及特异性结合人IL-17A的单克隆抗体或其片段，或者包含重链(V_H)或轻链(V_L)的可变区的抗体片段，其中所述抗体或它的活性片段包括至少一个下面的可变区：

[0082] a) SEQ ID NO:13的重链可变区(V_H)；

[0083] b) SEQ ID NO:14的轻链可变区。

[0084] 本发明的抗体可包括与SEQ ID NO:15相同的重链序列。本发明的另一个实施方案是包括氨基酸序列与SEQ ID NO:16相同的轻链的抗体。

[0085] 本发明的抗体包括另外的突变M252Y/S254T/T256E、N434W、N434A、N434F、H433K/N434F/Y436H、H433K/N434F/Y436H+M252Y/S254T/T256E、T307A/E380A/N434A、T250Q/M428L。所述的取代没有导致抗体与IL-17A结合的能力丧失，但是它们可能导致ADCC(抗体依赖的细胞介导的细胞毒性)降低，或者增加抗体的亲和力或其它生物学特性。

[0086] 本发明的抗体具有改善的生物学特性，尤其是关于IL-17A更好的抑制活性(IC_{50})，以及增强的聚集稳定性。

[0087] 本发明还提供了编码要求的抗体的DNA构建体和含有所述DNA构建体的表达载体，其用于生产本发明的抗体。

[0088] 而且，本发明提供了包含具有上述DNA的表达载体的细胞系。该细胞系可用于生产本发明的抗体。

[0089] 药物组合物

[0090] 本发明的抗体可以包含在适于在患者中施用的药物组合物中(请参见实施例14)。本发明的抗体可以单独施用或者与药学上可接受的载体、赋形剂和/或稀释剂联合施用，

以单剂量或者多剂量。开发用于给药的药物组合物以满足选择的给药模式；而且正确使用药学上可接受的稀释剂、载体和/或赋形剂，如：分散剂、缓冲液、表面活性剂、防腐剂、增溶剂、等渗剂、稳定剂等等（请参见实施例14）。根据例如Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 第19版, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995中说明的标准方法开发了所述组合物，其描述了用于制剂生产的常见技术。

[0091] 使用标准的给药技术包括口腔、静脉内、腹膜内、皮下、肺、经皮、肌内、鼻、颊、舌下或通过栓剂，可以将包含本发明的抗IL-17单克隆抗体的药物组合物施用患者，该患者有本文描述的病理的风险或有本文描述的病理。

[0092] 本发明的药物组合物优选包含或者是治疗有效量的本发明的抗体。“治疗有效量”指获得想要的治疗效果所需的剂量和时间周期有效的量。抗体的治疗有效量可以根据这些参数而改变，如：疾病状况、年龄、个体的性别和体重，抗体或它的片段在患者中诱导想要的反应的能力。治疗有效量也是抗体的治疗利益超过毒性或副作用的量。“预防有效量”指获得想要的预防效果所需的剂量和时间周期有效的量。由于预防剂量是在疾病之前或者疾病的早期阶段用于个体，所以预防有效量一般低于治疗有效量。

[0093] 治疗有效量或预防有效量至少是保证患者的治疗利益所需的最小剂量，但是低于活性组分的中毒剂量。同时，本发明的抗体的治疗有效量是降低哺乳动物，优选人类中IL-17的活性（例如，IL-17R结合）的量，所需哺乳动物中IL-17的存在导致或促进任何不利的病理作用，或者如果IL-17的降低导致哺乳动物优选人类的治疗利益的量。

[0094] 本发明抗体的给药途径可以是口腔、肠胃外、吸入或局部。优选地，本发明的抗体可以包含在适用于肠胃外投药的组合物中。如本文中使用的术语“肠胃外”包括：静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道或腹膜内给药。静脉内、腹膜内或皮下注射是优选的给药途径。用于这种注射的可接受的药物载体是现有技术熟知的。

[0095] 如合适的指南中描述的，药物组合物在生产和储存在容器中时应该是无菌和稳定的，其例如以密封小瓶（例如安瓿瓶）或注射器中的形式提供。因此，在制备组合物后可以对药物组合物进行过滤除菌，或者通过任何其它微生物学合适的方法制备药物组合物。用于静脉内输液的典型组合物可包括250-1000mL液体，如：无菌林格氏溶液、生理盐水、右旋糖溶液或Hank's盐溶液，和治疗有效量的（例如，1-100mg/mL或更高的）抗体浓缩物。剂量可以根据疾病类型和严重程度而改变。从医学领域的状况熟知，用于某个患者的剂量取决于多个因素包括患者的体型、体表面积、年龄、施用的具体化合物、性别、给药期限和途径、总体健康状况以及同事施用的药物。典型的剂量可以是，例如：0.001-1000 μ g的范围；但是低于和高于该示例性范围的剂量是预期的，特别是考虑到上述参数。每天的肠胃外剂量给药方式可以是从每天0.1 μ g/kg到100 μ g/kg体重，优选从0.3 μ g/kg到10 μ g/kg，更优选从1 μ g/kg到10 μ g/kg，更优选从0.5 μ g/kg到10 μ g/kg体重。可以通过患者的健康状态定期评估来监控治疗过程。对于几天或更长时间的重复给药，根据患者的状况，重复治疗直到想要的应答或疾病控制。但是，本文没有描述的其它剂量给药方式也可以应用。可以通过单丸剂或多丸剂剂量给药，或通过抗体的连续输液来施用合适的剂量，这取决于想要的药物动力学分解。

[0096] 所述的抗体假定的特性很大程度上取决于医生的决定。预期的效果是选择合适剂量和方式的关键因素。本文考虑的参数包括待治疗的某种疾病、接受的治疗的某种哺乳动

物、某个患者的临床状况、紊乱起因、给药位点、某种抗体类型、给药途径、给药模式以及医学领域熟知的其它因素。

[0097] 本发明的治疗剂可以是冷冻的或冻干的，并在给药之前在无菌载体中恢复。冻干和恢复会导致抗体活性的某些损失。可以调节剂量来补偿这种损失。通常，制剂pH从6到8是优选的。

[0098] 制品

[0099] 在另一个实施方案中，提供了含有用于治疗或预防上述紊乱的材料的制品。

[0100] 该制品包括装有包含抗体的药物组合物的容器，和标签或包装说明书。合适的容器包括：例如，小瓶、安瓿瓶、注射器和分析管。容器可以由各种材料制成，如玻璃或塑料。容器包含治疗IL-17A介导的疾病或紊乱有效的本发明的组合物，而且可具有无菌的进入孔（例如：容器可以是静脉内溶液袋或具有皮下注射针可刺穿的塞子的小瓶）。本发明的抗IL-17A抗体是组合物的活性组分。T标签或包装说明书标明组合物用于治疗想要的状况。而且，制品可包含装有药学上可接受的缓冲液如磷酸缓冲盐溶液、林格氏溶液和右旋糖溶液的第二容器。它还可包括来自商业和用户立场的需要的其它材料，包括其它的缓冲液、稀释剂、过滤器、针、注射器和包装说明书。

[0101] 提供下面实施例的目的仅仅是为了说明性的目的，而不是试图限制本发明的范围。

实施例

[0102] 实施例1

[0103] 在悬浮的哺乳动物细胞培养物中生产重组抗原和抗体

[0104] 根据公开的方案，在获自中国仓鼠卵巢细胞的已建立细胞系(CHO-K1)中生产抗体和抗原[Biotechnol Bioeng. 2005 Sep 20; 91 (6): 670-677, Liao Metal., 2004; Biotechnol Lett. 2006 Jun; 28 (11): 843-848; Biotechnol Bioeng. 2003 Nov 5; 84 (3): 332-342]。使用组成性表达EBNA1蛋白(Epstein-Barr病毒核抗原1)的基因的细胞。使用来自Life Technologies Corporation的无血清培养基，根据制造商的指南，在定轨振荡器上，在烧瓶中进行悬浮培养。为了瞬时表达，浓度为 $2*10^6$ /mL的细胞通过线性聚乙烯亚胺(PEI MAX, Polysciences)进行转染。DNA/PEI比例是1:3-1:10。转染后5-7天中，将细胞培养物在2000g离心20min，并通过0.22μm过滤器进行过滤。通过亲合HPLC从培养物液体分离靶蛋白。

[0105] 在Profinity IMAC Ni-电荷的树脂(Bio-Rad)上，从培养物液体分离并纯化重组IL-17A蛋白，其C-末端区含有6个组氨酸。纯化过程之前，添加NiCl₂到培养物液体达到浓度为1 mM。然后添加5mL Profinity IMAC Ni-电荷的树脂到培养物液体中，并在振荡器上室温下混合1h。将吸附剂转入到5mL Thermo scientific聚丙烯柱上，并用5倍柱体积的PBS洗涤，以除去非特异性结合的组分。用0.3M咪唑(pH 8)和150mM NaCL洗脱结合的抗原。然后通过蛇皮透析管技术将蛋白透析到PBS(pH 7.4)中，过滤(0.22μm)，转移到管中，并于-70°C储存。通过SDS-PAGE评估获得的蛋白的纯度(图1)。

[0106] 在用于亲和HPLC的A蛋白柱上，从细胞培养物分离并纯化重组IL-17A-Fc蛋白。澄清的培养物液体通过用PBS(pH 7.4)平衡的5mL HiTrap rProtein A琼脂糖凝胶FF柱(GE

Healthcare)。然后用5倍体积的PBS洗涤柱子,以除去未结合的组分。结合的抗原用0.1M 甘氨酸缓冲液pH 3洗脱。收集主要的蛋白洗脱峰,并用1M Tris-缓冲液(pH 8)产生中性 pH。整个阶段在11-cm/h流速下进行。然后使用蛇皮透析管技术将分离的蛋白透析到PBS (pH 7.4)中,过滤,转移到管中,并于-70°C储存。通过SDS-PAGE评估获得的蛋白的纯度(图2)。

[0107] 根据用于IL-17A-Fc的上述过程,在1mL Hi Trap rProteinA FF柱(GE Healthcare)上纯化IgG1抗体。通过SDS-PAGE评估获得的蛋白的纯度(图3)。

[0108] 实施例2

[0109] 用人IL-17A免疫接种美洲驼并产生的美洲驼抗体的Fab噬菌体文库

[0110] Lama Glama被连续免疫5次,通过皮下给予抗原材料,所述抗原材料混合有等体积的完全(第一次注射)或不完全(在余下的注射)弗氏佐剂。重组蛋白的混合物(每次注射0.2mg每种蛋白)用作抗原,其中一个是由R&D Systems的试剂盒。第二次注射(免疫接种)阶段是在第一次注射后3周进行;以2周的间隔进行3次更多的免疫接种。从第三次注射开始,每次注射后5天收集血样(50mL)。

[0111] 用含有1mM EDTA的PBS将血液稀释2倍。然后35mL稀释的血液在15mL Histopaque®-1077培养基(Sigma,密度为1.077g/mL)上分层,并在800g下离心20min。从血浆/Histopaque培养基界面区收集单核细胞(淋巴细胞和单细胞),并用包含1mM EDTA的PBS洗涤。

[0112] 使用RNasey Mini试剂盒,根据试剂盒方案(QIAGEN),分离美洲驼的单核细胞总RNA。使用Nanovue(GE Healthcare)进行RNA浓度分析;通过1.5%琼脂糖凝胶电泳检测分离的RNA的质量。

[0113] 使用MMLV RT试剂盒(Evrogen),根据推荐的方案,用MMuLV逆转录酶和随机六聚体引物进行逆转录反应。

[0114] 使用寡核苷酸试剂盒和方案[J Biol Chem. 1999 Jun 25;274 (26):18218-30; WO2010/001251],使逆转录反应产物用作二阶段聚合酶链式反应中的模板,以获得两侧为限制性位点的可变区基因。另外,通过连续的酶切、连接和扩增反应,将轻链和重链可变区的基因编码成一个限制性片段。重链基因分别与κ和λ轻链基因连接。在所有反应中的基质的分子的计算量不少于10¹¹。用NheI/Eco91I限制性内切酶处理获得DNA产物(VL-CK-VH),并连接到原始的噬菌粒pH 5。噬菌粒的构建。将连接产物转化到根据[Methods Enzymol., 2000;328:333-63]中所述方案制备的电感受态SS320细胞中。构建κ和λ的Fab全文库分别为5.1*10⁸和3.7*10⁸。根据以前描述的程序[J Mol Biol. 1991 Dec 5;222 (3):581-97]制备噬菌体文库。

[0115] 实施例3

[0116] Fab噬菌体抗体文库的筛选

[0117] 使用重组人IL-17A(来自R&D Systems的试剂盒),从噬菌体Fab展示文库分离特异性抗IL-17A噬菌体Fab抗体;如以前(J Biol Chem. 1999 Jun 25;274 (26):18218-30; Nat Biotechnol. 1996 Mar;14 (3):309-14; J Mol Biol. 1991 Dec 5;222 (3):581-97)所述的进行一系列筛选循环。为了实施采用panning方法的筛选,使50mM碳酸盐缓冲液(pH 9.5)中的人IL-17A在HighSorb管(Nunc)表面于4°C吸附过夜,并用PBS(pH 7.4)洗涤HighSorb管,然后用含有PBS(pH 7.4)-无脂牛奶(0.5%重量/体积)的溶液封闭1h。然后将PBS(pH

7.4) -无 脂牛奶(0.5%w/vol) 中的2-4mL噬菌体溶液(10^{12} 噬菌体颗粒/mL) 加到带有抗原的管中, 并搅拌孵育1h。通过用PBS (pH 7.4) -吐温20 (0.1%vol./vol.) 进行一系列洗涤循环除去未结合的噬菌体。从第一轮到第三轮的洗涤循环的次数依次按20-30-40倍增加。余下的结合的噬菌体颗粒用100mM Gly-HCl溶液 (pH 2.5) 在搅拌下洗脱15min, 然后用1M TRIS-HCl (pH 7.6) 中和, 用噬菌体感染E.coli TG1细菌, 接着分离噬菌体, 并用于下一轮的筛选循环。

[0118] 实施例4

[0119] 嵌合的Fab噬菌体抗体文库的构建

[0120] 使用RNeasy Mini试剂盒, 根据其方案 (QIAGEN), 从550个人捐献者的血淋巴细胞中 分离总RNA。使用Nanovue试剂盒 (GE Healthcare) 进行RNA浓度分析, 同时通过1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测分离的RNA的质量。使用MMLV RT试剂盒 (Evrogen), 根据推荐的 方案, 利用MMuLV逆转录酶和随机六聚体作为引物进行逆转录反应。

[0121] 使用寡核苷酸试剂盒和方案 [J Biol Chem. 1999 Jun 25; 274 (26):18218-30], 使逆转录反应产物用作二阶段聚合酶链式反应中的模板, 以获得两侧为限制性位点的可变区基因。使用国际公开W093/06213中描述的技 术, 并基于上述的原始噬菌粒pH 5, 对特异性抗IL-17A的嵌合Fab进行工程化。为了该目的, 通过连续的酶切、连接和扩增反应, 如图4 所示, 将人供体轻链可 变区基因和美洲驼A1抗体的重链可变区基因连接到一个片段中。类似地, 通过 连续的酶切、连接和扩增反应, 如图5所示, 将美洲驼A1抗体的轻链可变区基 因与人供体重链可变区基因和美洲驼抗体A1重链可变区基因结合到一个限定性 片段中。在所有反应中的人可变区基因的基质分子的计数量不少于 10^{12} 。用限制 性酶NheI/Eco91I 处理获得DNA制品 VL - CK - VH, 并连接到原始的噬菌 粒pH 5。将连接产物转化到根据 [MethodsEnzymol., 2000;328:333-63] 中所述 方案制备的电感受态SS320细胞中。基于A1 克隆的重链和混合人 κ 和 λ 链的嵌 合的Fab全文库chA1VH/hVL包括 2.8×10^9 个转化体。基于A1克隆的轻链和人 重链的嵌合的Fab全文库chA1VL/hVH包括 1.1×10^{10} 个转化体。嵌合的Fab 噬 菌体文库根据 [J Mol Biol. 1991 Dec 5;222 (3):581-97] 中描述的程序制备。

[0122] 在与上述那些相同的条件下 (看Fab噬菌体文库的筛选), 进行嵌合的Fab噬菌体文库 的筛选。

[0123] 在对IL-17A进行第二轮筛选后, 两个文库都证实显著的富集A。从富集的嵌合的Fab 文库得到的克隆池用作特异性抗IL-17A的人可变区基因VH与VK/VL相结合的来源。

[0124] 实施例5

[0125] 特异性抗人IL-17A的Fab噬菌体抗体文库的构建

[0126] 为了构建特异性抗人IL-17A的Fab噬菌体抗体, 从富集的嵌合的Fab文库得到的克 隆 池用作特异性抗IL-17A的人可变区基因VH与VK/VL相结合的来源。为了此目的, 用来自 第二轮文库chA1VH/hVL的富集物的特异性引物扩增人的轻链基因, 并用来自第二轮文 库 chA1VL/hVH的富集物的特异性引物扩增人的重链基因。通过用SfiI限制性酶切、连接 和扩 增, 如图7所示, 使人基因池的两个可变区相继结合。用NheI/Eco91I限制性酶处理 获得VL- CK - VH DNA产物, 并连接到原始的噬菌粒pH 5中。将连接产物转化到根据 [Methods Enzymol. 2000;328:333-63] 制备的电感受态SS320细胞中。基于人重链和轻链的 Fab全文库是 8.6×10^8 。嵌合的Fab噬菌体文库制品的制备是根据以前 [Mol Biol. 1991 Dec 5;222

(3) :581-97] 描述的程序。

[0127] 在与上述那些相同的条件下(看Fab噬菌体文库的筛选),进行嵌合的Fab噬菌体文库的筛选。

[0128] 在对IL-17A进行第二轮筛选后进行ELISA分析,结果显示多克隆噬菌体产物中显著富集有A.富集特异性抗IL-17A的人Fab的克隆池是源于再克隆到表达质粒中。

[0129] 实施例6A

[0130] 特异性结合人IL-17A-Fc的Fab的分析

[0131] ELISA用于检测研究的Fab片段与人IL-17A的结合。具有公开的AIN 457序列(Novartis)的Fab用作阳性对照。用50 μ L (0.5 μ g/mL, 1X包被碳酸盐缓冲液中的) IL-17A-Fc包被ELISA 平板孔(Nunc ImmunoMaxisorp),密封关闭,并于4℃孵育过夜。根据标准的ELISA方案,用高性能自动系统如GenetixQ-pix2xt (Molecular Devices) 和Tecan Freedom EVO 200 (Tecan) 进行所有后续的步骤。通过添加封闭缓冲液BB (PBS中的200 μ L 0.5%无脂牛奶) 封闭非特异性结合基团,平板在振荡器上于室温下孵育1h。用PBS-吐温洗涤后,用混有等体积 BB的50 μ L含有检测Fab的细胞上清液包被每个孔。平板在振荡器上于室温下孵育1h;每个平板孔进一步用PBS-吐温缓冲液洗涤5次。洗涤后,用PBS-吐温中的抗人Fab HRP-共轭的第二抗体(Pierce-ThermoScientific) (1:5000) 包被每个孔(50 μ L/孔)。把平板转移到旋转振荡器中(室温下50min),然后如上所述用PBS-吐温洗涤5次。通过添加TMB (100 μ L/孔) 直到饱和(平均3-5min)获得比色信号;通过添加终止溶液(100 μ L/孔,10%硫酸)阻断进一步的显色。使用合适的Tecan-Sunrise平板读数器(Tecan) 测定450nm处的吸光度。抗体结合与产生的信号成比例。

[0132] 例如,图8显示了第二轮筛选后,从具有美洲驼Fab的一个平板获得的ELISA结果。该直方图显示了具有高于或低于对照Fab (AIN457) 的信号的阳性克隆数(以红色标记),或没有与固定化抗原相互作用的克隆数(0.1-0.2相对单位)。

[0133] 实施例6B

[0134] 阻断IL-17A配体与IL-17R受体相互作用的竞争性ELISA分析

[0135] 竞争性ELISA技术用于检测前面筛选的特异性抗人IL-17A-Fc的Fab的拮抗能力。具有公开的AIN457序列(Novartis)的Fab用作阳性拮抗剂对照。用50 μ L/孔IL-17RA-Fc受体 (R&D Systems; 1X包被碳酸盐缓冲液中的1 μ g/mL溶液) 包被ELISA平板孔,并于4℃孵育过夜。根据标准的ELISA方案,用高性能自动系统如GenetixQ-pix2xt (Molecular Devices) 和Tecan Freedom EVO 200 (Tecan) 进行所有后续的步骤。通过添加封闭缓冲液BB (PBS中的200 μ L 0.5%无脂牛奶) 封闭非特异性结合基团,平板在振荡器上于室温下孵育1h。平行地,使50 μ L含有检测Fab的细胞缓冲液在96孔平板中与50 μ L IL-17A-His6-Flag (0.4 μ g/mL,用PBS-吐温稀释的1%牛奶中) 混合。平板于37℃在振荡器上以500rpm孵育1h。

[0136] 含有IL-17RA-Fc受体的平板用BB溶液洗涤后,用Fab and IL-17A-His6-Flag的反应混合物以每孔90 μ L的含量对其进行包被。平板在室温下在振荡器上孵育45min。然后用PBS-吐温缓冲液将每个孔洗涤5次。进一步添加50 μ L/孔的1 μ g/mL抗FLAG鼠M2抗体(Singma),并将平板在室温下孵育45min。孵育后,每个平板孔用PBS-吐温洗涤5次,而且每个孔用50 μ L抗鼠-IgG HRP共轭的第二抗体(Pierce-ThermoScientific) 包被,其用PBS-吐温以1:5000稀释。平板在旋转振荡器上于室温下孵育45min,并用PBS-吐温按上述洗涤 5

次。通过添加T M B (100μL/孔) 直到饱和(平均3-5min) 获得比色信号;通过添加终止溶液 (100μL/孔,10% 硫酸) 阻断进一步的显色。使用合适的Tecan-Sunrise平板读数器 (Tecan) 测定450nm处的吸光度。抗体结合度与产生的显色信号成比例。

[0137] 例如,图9显示了第二轮筛选后,具有美洲驼Fab的一个平板获得的ELISA结果。该直方图显示了具有与对照Fab (AIN457,以红色标记) 相当信号 (0.05-0.1相对单位) 的阳性克隆数,或没有阻断IL-17A/IL-17R相互作用的克隆数(信号与用配体-受体直接相互作用的对照相似,以深蓝色标记)。

[0138] 实施例7

[0139] 人抗IL-17A Fab候选物的竞争性koff-筛选

[0140] 采用Koff-筛选进行抗17A Fab候选物的筛选。使用Pall Forte Bio Octet Red 96系统进行 Koff-筛选。抗FABCH1生物传感器在含有10mM PBS (pH 7.2-7.4) 、0.1% 吐温-20和0.1% BSA的工作缓冲液中再水化30min。添加10x工作缓冲液到E.coli上清液的检测样品中达到1x终浓度。然后将抗FABCH1生物传感器浸入含有候选抗体的Fab片段E.coli上清液中,并在4℃的温度下孵育12h。将用Fab片段包被的传感器转移到具有工作缓冲液的孔中,记录基线(60秒)。然后将传感器转移到具有分析溶液 (IL-17A, 30μg/mL) 的孔中,以实现抗原-抗体结合(300秒)。然后,将传感器返回到具有工作缓冲液的孔中进行进一步解离(300秒)。每次检测后对使用的传感器进行再生:将它们置于再生缓冲液 (Gly-HCl, pH 1.7) 中3次,然后其可用于下面的实验。使用Octet Data Analysis (版本7.0),根据标准程序,利用1:1的相互作用模型分析获得曲线。

[0141] 图11显示了抗人IL-17AFab候选物的koff-筛选获得的结果。

[0142] 实施例8

[0143] 可变区CDR的扫描诱变和高亲和力候选物的筛选

[0144] 通过NNK随机技术 [Appl Environ Microbiol. 2006 Feb; 72 (2) :1141-7; MAbs. 2012 May-Jun; 4 (3) :341-8] , 使用Q5®位点直接诱变试剂盒(来自NEB) , 根据其方案, 插入突变到候选物的CDR的单个位置中。使用A1-Fab-pLL质粒作为模板。PCR产物在低熔点琼脂糖上分级, 并在合适的柱子上纯化。连接反应后, 将DNA转化到E.coli表达菌株BL21gold (Stratagene) 中。如上所述, 然后在96孔板中通过Fab表达获得单个克隆。在上述ELISA分析条件下, 使用高性能的自动系统Genetix Q-pix2xt和Tecan Freedom EV0200通过ELISA分析含有突变Fab的上清液。固定的IL-17A的浓度是0.2μg/mL。结合Fab的共轭体用1:5000的山羊抗人IgG (Fab') 2 (HRP) 共轭物 (Pierce) 稀释和TMB+H₂O₂/H₂SO₄染料进行染色; 在450nm波长处测定吸光度。

[0145] 表1中呈现了扫描诱变获得的结果。该表显示了CDR区的取代位置,与野生型序列相比较,其相当于突变的Fab/人IL-17A结合信号减少≤30%。因此,这种单个突变或其任意组合都属于本发明的主题。

[0146] 表1. 扫描诱变

突变位置	突变中积极的氨基酸	突变位置	突变中积极的氨基酸
HCDR3		LCDR3	
V99	R,N,A,I	A91	S
N100	E,L,M,S,T,V	S92	G,T

Y101	-	Y93	A, F, I
Y102	F, V	R94	K
G103	S	A95	S
M104	A, F, L, P, Y	G96	F
Y105	F, H, I, M, S, W	G97	H
Y106	A, I, N, R, S, V	T98	-
		Y99	I, L, W
HCDR2		LCDR2	
R50	G, I, L, M, S	R52	E, L, M
D52	D, E	V53	L, S
G53	M	N54	G
G54	L, R, V	T55	I, K, L, M, R, W
I55	L		
S57	L, R, T, W		
S58	T, Y		
T59	L, R, S, W		
Y60	T, L, K		
HCDR1		LCDR1	
N31	D, K, L, M, P, T	E27	N, R
Y32	F	D28	S, T
A33	G, M, N, S, T, V	V29	L, R
M34	I	G30	V
S35	G, N, T	F31	L, S, T, V, Y
		G32	L, V
		N33	P, R, S
		Y34	A, L, W

[0148] 因此,对耐受其它氨基酸取代的BCD085抗体的CDR区氨基酸位置进行筛选。证实目前的氨基酸取代对象没有显著改变抗体与人IL-17A的结合力。所述取代对象可用于改善各种候选物的特性。

[0149] 实施例9

[0150] 稳定细胞系的工程化,抗体的生产和纯化

[0151] 通过用包含最佳比例的抗体轻链和重链的载体转染亲本悬浮液CHO-S细胞系,获得生产BCD085抗体的稳定细胞系。使用ClonePix robotic平台(Molecular Devices)获得了高水平的克隆系(超过100mg/L)。通过Biomek FX robotics (Beckman Coulter)和Octet RED96 自动分析系统(Pall Life Sciences)分析所选择的克隆体的生产力。在不含动物来源蛋白的无血清培养基中培养生产系。用于临床前研究的BCD085在200L操作体积的HyClone一次性生物反应器(Thermoscientific)中积累。

[0152] 培养物液体通过装有蠕动泵的Zeta Plus Maximizer 451670160M02深度过滤器进行过滤。在MabSelect Protein A亲和基质(GE Healthcare Life Sciences) 上进行抗

体的初级纯化。通过深度过滤澄清后,将培养物液体用于吸附剂,其用 含有50mM HCl-Tris (pH7.5) 和150mM NaCL的缓冲液平衡。然后用平衡缓冲液 洗涤吸附剂,接着用低传导性的HCl-Tris洗涤。使用Gly-HCL缓冲液 (pH 3.5) 进行蛋白洗脱。为了病毒灭活的目的,将收集的洗脱物暴露于酸性pH 30m in, 然后用1M Tris碱中和到pH 6.8。当达到合适的pH时,用 MilliporeExpressPlus®0.22μm膜 (PVDF) ,在STERICUP系统上对蛋白溶液进行 过滤。通过使蛋白溶液在低的传导性下 (<2毫秒/cm²) ,流过制备的Q Sepharose FF (GE HealthCare) , pH7.0,进行最终的纯化以除去DNA、宿主细胞蛋白和释 放的亲和吸附剂的配体。纯化的蛋白然后在UltiporVF过滤器 (PALL) 上进行除去 病毒的过滤,浓缩,并对含有His/HisHCL (pH6.0-6.5) 、吐温-80和海藻糖的最终 缓冲液进行渗滤。蛋白浓度为50mg/mL或者更高。所获得的蛋白的纯度通过 SDS-PAGE评估。

[0153] 另外,产物的聚集组合物通过凝胶高效液相色谱评估。

[0154] 使用Agilent 1100系统和Tosoh TSK-Gel G3000SWXL 7.8mm×30cm柱 (Cat.No. 08541) 与Tosoh TSKgel Guard SWXL 6.0mm×4.0cm预先柱 (particles of 7μm, Cat.No. 08543) 进行色谱分析。在214nm和280nm波长处检测,在0.5mL/min流速下,用含有 50mM磷酸钠缓冲液和0.3M NaCL (pH 7.0) 的流动相进行等度洗脱。用PBS (pH 7.5) 稀释抗 体样品到 ~1mg/mL的浓度。注射体积为10μL。凝胶过滤标准混合物 (Bio-Rad, Cat.No. 151-1901) 用于在检测之前对柱子进行校准。

[0155] 图13呈现了通过凝胶高效液相色谱获得的结果。BCD085基质中的聚集量是 0.312%。

[0156] 实施例10

[0157] 阻断IL-17A诱导产生IL-6能力的细胞检测

[0158] IL-17通过人HT1080细胞 (ATCC:CCL-121) 诱导IL-6产生的能力用于分析 BCD085 关于人重组IL-17的中和能力。细胞生长于DMEM培养基上,其添加 有10%灭活的胎牛血清、庆大霉素和谷氨酰胺。5*10⁴细胞/孔的等分试样植于 96孔培养板中。允许细胞附着5h。40ng/mL重组IL-17和20ng/mL TNF-α的混 合物用BCD085稀释液在37°C下孵育1h。然后添加细胞因子/抗体混合物到细胞 中,并保持过夜。通过HT1080细胞培养物产生IL-6与添加的 IL-17的含量成比 例。通过ELISA技术,使用DuoSet ELISA Development System Human IL6 (RDSys, Cat.No.DY206) 评估细胞上清液样品中释放的IL-6的量。图14 中显示了,与 AIN 457 (Novartis的抗IL-17A抗体) 相比较,从BCD085候选物的 拮抗特性评估获得的结果。从一系列实验获得的该候选物的平均IC₅₀ 为 40±15pM。

[0159] 实施例11

[0160] 检测BCD085对来自不同生物体的IL-17A的亲和力

[0161] 在OctetRed 96 (ForteBio) 上分析BCD085结合人、猴和鼠IL-17A的亲和力。根据制 造商的手册中描述的标准方案,把BCD085非特异性固定到胺反应性第二代传感器 (AR2G) 的表面。在30°C的温度,使用具有0.1%吐温-20和0.1%BSA的PBS作为工作缓冲液进 行检 测。

[0162] 用工作缓冲液滴定人、猴和鼠 IL-17A,从126nM到2nM的浓度,以2的增量。

[0163] 使用Octet DataAnalysis软件 (版本7.0) ,根据标准程序,使用1:1相互作 用模 型,分析结合曲线 (减去参考信号后) ,如图15和16所示结果。

[0164] BCD085以皮摩尔亲和力结合人IL-17A,其比与猴IL-17A的纳摩尔亲和力强1000倍。而且,该候选物不与鼠IL-17A相互作用(没有提供曲线)。

[0165] 实施例12

[0166] 检测BCD085在热压下的聚集稳定性

[0167] PBS中的9mg/mL的BCD085制品在50°C的温度下加热6h。通过凝胶高效液相色谱评估热胁迫后的聚集。用Tosoh TSK-Gel G3000SWXL柱(7.8mm×30cm,Cat.No.08541)和Tosoh TSKgel Guard SWXL预先柱(6.0mm×4.0cm,7μm particles,Cat.No.08543),在Agilent 1100系统上进行色谱分析。在214nm和280nm波长处检测,在0.5mL/min流速下,用含有50mM磷酸钠缓冲液和0.3M NaCl(pH 7.0)的流动相进行等度洗脱。用PBS(pH 7.5)稀释抗体样品到~1mg/mL的浓度。注射体积为10μL。凝胶过滤标准混合物(Bio-Rad,Cat.No.151-1901)用于在检测之前对柱子进行校准。

[0168] 图17中显示的结果表明BCD085在热压下是稳定的:聚集量低于5%。

[0169] 实施例13

[0170] 在单剂量皮下施用给猴后,BCD085单克隆抗IL-17A抗体的药物动力学研究

[0171] 以40mg/kg的剂量,将单克隆抗IL-17A抗体BCD085单次皮下注射施给猕猴(Macaca mulatta)。以规定的时间间隔(给药0.5、1、3、6、12、24、36、48、60、72、96、120、168、264、336、432、504、672、840和1008小时后),选择动物血液样品,并通过标准程序获得血清。通过ELISA,对固定的人IL-17A(R&D Systems)评估BCD085抗体的血清水平,其中使用抗人IgG的Fc片段的多克隆山羊抗体(Pierce-ThermoScientific)检测结合的抗体。

[0172] 图18中显示了在单剂量皮下施药给猕猴后,从抗IL-17A单克隆抗体血清浓缩物分析获得的结果。这表明BCD085显示显著的长期效应,也即在血液中循环很长时间。单剂量皮下给药后,在72-168小时后观察到动物血清中抗IL-17A单克隆抗体最高浓度,同时该水平保持400小时,然后仅仅非常缓慢地降低,甚至在1000小时后,BCD085浓度显著高于基线。单剂量皮下施药给猕猴后,关于BCD085的评估的PK参数列于表2中。能够看出本发明的单克隆抗IL-17A抗体的清除(C1)是0.25±0.08mL/h/kg,其确保了它的长期血液循环(超过42天)。抗IL-17A单克隆抗体的平均滞留时间和清除半衰期分别是946±374h和632±253h。

[0173] 表2.在单剂量皮下施药40mg/kg给猕猴后,所要求的抗IL-17A单克隆抗体的主要药物动力学参数

	C _{max} (μg/mL)	T _{max} (h)	AUC ₍₀₋₁₀₀₈₎ (h* μg)/mL	CL (mL/h/kg)	MRT (h)	T _{1/2} (h)	K _{el} (h ⁻¹)
[0174]	353±164 (344-840)	144±48 (72-168)	146221±19439 (117938-162285)	0.25±0.08 (0.14-0.34)	946±374 (528-1274)	632±253 (344-840)	0.00126±0.00056 (0.0008-0.002)

[0175] 实施例14

[0176] 含有本发明抗体的药物组合物

抗-IL-17 的浓度 (BCD085)	10-50 mg/mL
[0177] 柠檬酸盐缓冲液 10mM	q.s. pH 6.0-7.0
氯化钠	50-150 mM
蔗糖、海藻糖	0.3-0.5%
注射用水	q.s. 1 mL.
[0178] 实施例15	
[0179] 含有抗体药物组合物的试剂盒	
[0180] 通过将根据实施例14获得的药物组合物无菌密封到1mL安瓿瓶或注射器中,然后贴 标签并装入到塑料或纸板箱容器中,来生产包括含有抗IL-17抗体的药物组合物的试剂盒。	
[0181] 另外,带有安瓿瓶的容器还包括包装说明书。	

序列中所涉及的氨基酸是使用常见的字母代码表示。当涉及几种可能的氨基酸替换时，假定只是一个氨基酸选自所列举的可能替换。

SEQ ID NO. 1:

F-T-F-S-X31-X32-X33-X34-X35,

X31 - N, D, K, L, P or T;

X32 - Y and F;

X33 - A, G, N, S, T or V;

X34 - M and I;

X35 - S, G, N or T.

SEQ ID NO. 2:

X50-I-X52-X52a-X52b-X53-G-X55-X56-X57-X58,

X50 - R, G, I, L, M and S;

X52 - D and E;

X52a - G and M;

[0001]

X52b - G, L, R and V;

X53 - I and L;

X55 - S, T, L, R and W;

X56 - S, T, S and Y;

X57 - S, T, L, R and W;

X58 - Y, T, L and K.

SEQ ID NO. 3:

C-A-X94-X95-Y-X97-X98-X99-X100-X100a,

X94 - R, V, A and I;

X95 - N, E, L, S, T and V;

X97 - Y, F and V;

X98 - G and S;

X99 - M, A, F, L, P and Y;

X100 - Y, F, H, I, S and W;

X100a - Y, A, I, N, R, S and V.

SEQIDNO. 4:

T-G-T-S-X28-X29-X30-X31-X32-X33-X34-X35,
X28 - E, N and R;
X29 - D, S and T;
X30 - V, L and R;
X31 - G and V;
X32 - F, Y, L, S, T and V;
X33 - G, L and V;
X34 - N, S, P and R;
X35 - Y, W, A and L.

SEQ ID NO. 5:

X50-X51-X52-X53-R-P-S,
X50 - R, E and L,
X51 - V, S and L,
[0002] X52 - N and G;
X53 - T, I, K, L, R and W.

SEQ ID NO. 6:

C-X89-X90-X91-X92-X93-X94-X95-X95a-X95b,
X89 - S and A;
X90 - S, G and T;
X91 - Y, F, A and I;
X92 - K and R;
X93 - A and S;
X94 - G and F;
X95 - G and H;
X95a - T;
X95b - Y, I, L and W.

SEQ ID NO. 7: TGTSEDVGFGNVYS

SEQ ID NO. 8: RVNTRPS

SEQ ID NO. 9: CSSYKAGGTY.

SEQ ID NO. 10: T-G-T-S-E-D-V-G-F-G-N-Y

SEQ ID NO. 11: R-V-N-T-R-P-S

SEQ ID NO. 12: C-S-S-Y-K-A-G-G-T-Y

SEQ ID NO. 13:

QVQLVQSGGLVQPGGLRLSCAADGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSRIEGGIG
SSTYAVDSVKDRFTISRDDAKNTLYLQMSSLKTEDTAVYYCAVNYYGMYYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO. 14:

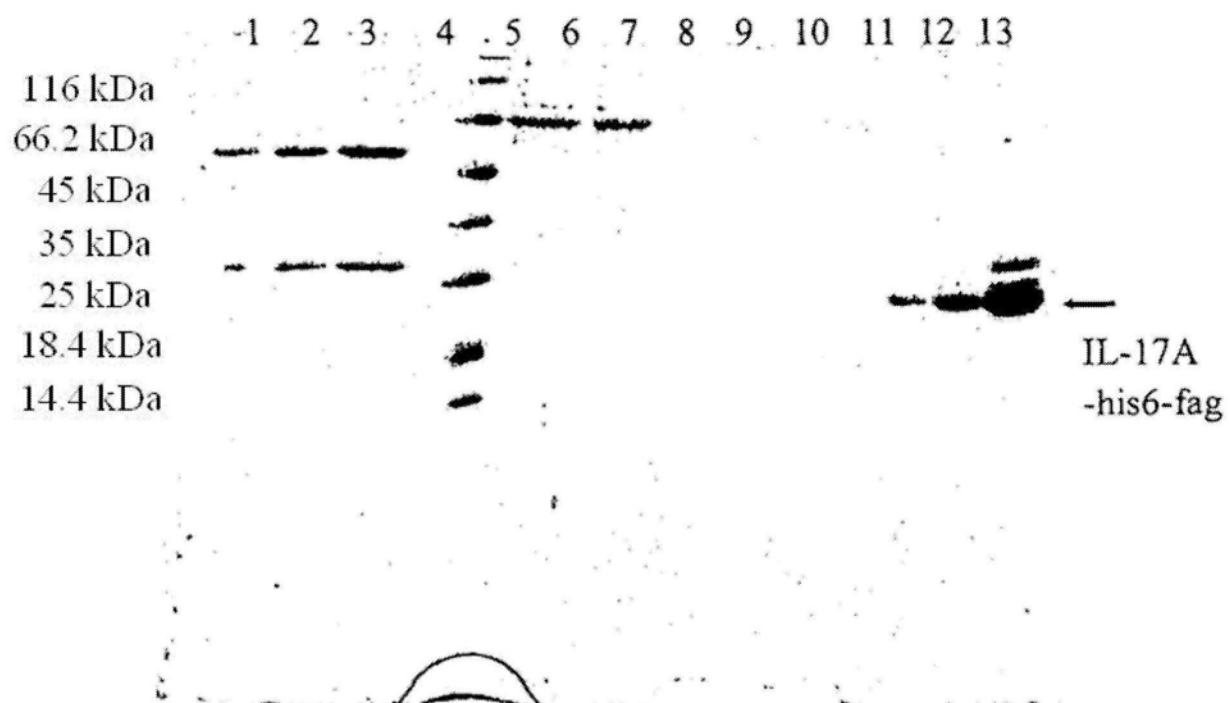
QSVLTQPPSVSVPAGKTVTISCTGTSEDVGFGNYVSWYQHLPGTAPKLLIYRVNTRPS
GVPDRFSGSQSGNTASLTISGLQAEDeadYYCSSYKAGGTYVFGGGTKLTVLGQ
[0003]

SEQ ID NO. 15:

QVQLVQSGGLVQPGGLRLSCAADGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSRIEGGIG
SSTYAVDSVKDRFTISRDDAKNTLYLQMSSLKTEDTAVYYCAVNYYGMYYWGQGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPALQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 16:

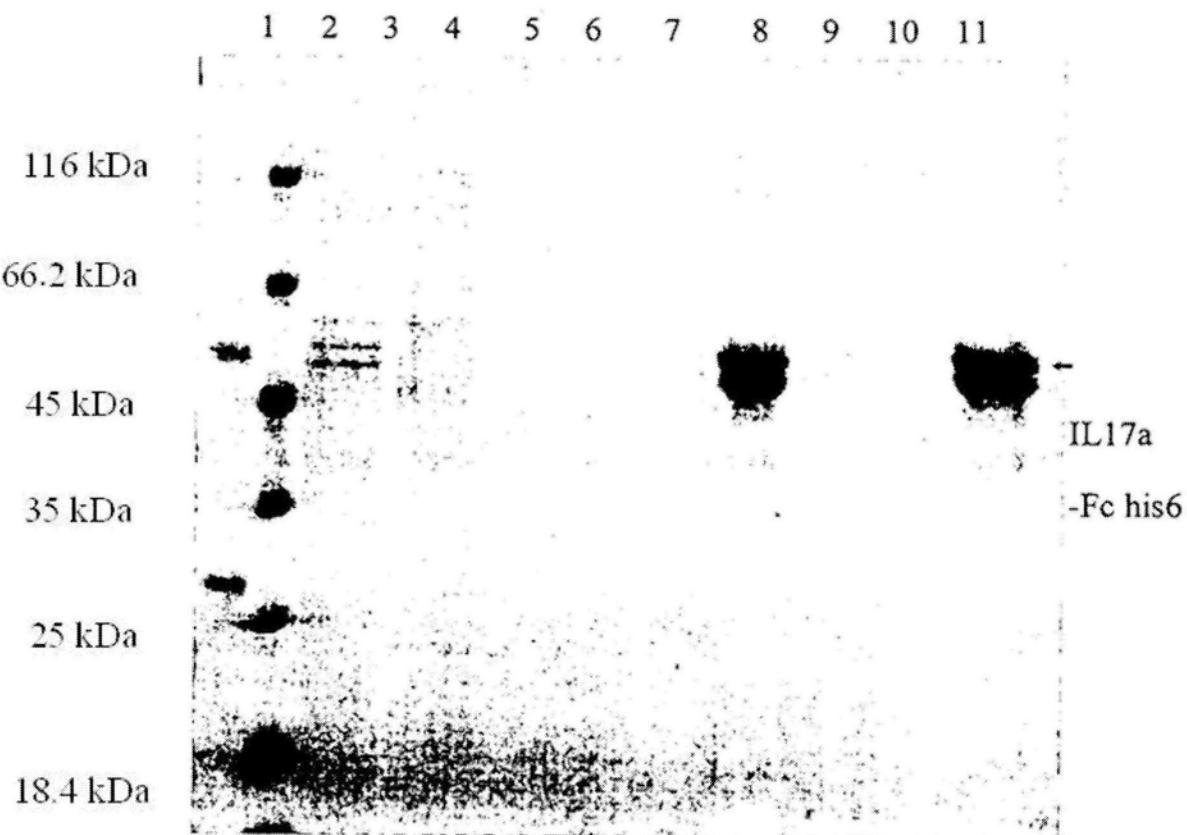
QSVLTQPPSVSVPAGKTVTISCTGTSEDVGFGNYVSWYQHLPGTAPKLLIYRVNTRPS
GVPDRFSGSQSGNTASLTISGLQAEDeadYYCSSYKAGGTYVFGGGTKLTVLGQ
KAAPS
VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAAS
SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS



1. 9^{10} 0.25 μ L + β -ME
2. 9^{10} 0.5 μ L + β -ME
3. 9^{10} 1 μ L + β -ME
4. ---
5. 酶-未染色的标记
6. 应用IMACBioRad之前的基质

7. 应用IMACBioRad之后的基质
8. 洗涤1
9. 洗涤2
10. 洗涤3
11. 洗脱2.5 μ L
12. 洗脱5 μ L
13. 洗脱10 μ L

图1



- | | |
|-----------------------------------|---------------------------|
| 1、 ⁹¹⁰ 鼠-IgG 1 μ g | 6、用PBS 10 μ L洗涤 |
| 2、酶-未染色的标记 | 7、洗脱第一次10 μ L |
| 3、应用之前的基质10 μ L | 8、洗脱12 mL 10 μ L |
| 4、应用之后的基质10 μ L | 9、洗脱12mL 10 μ L |
| 5、用PBS-吐温10 μ L洗涤 | 10、pH 2.5吸附剂10 μ L洗涤 |
| | 11、裂解后IL-17-Fc 10 μ L |

图2

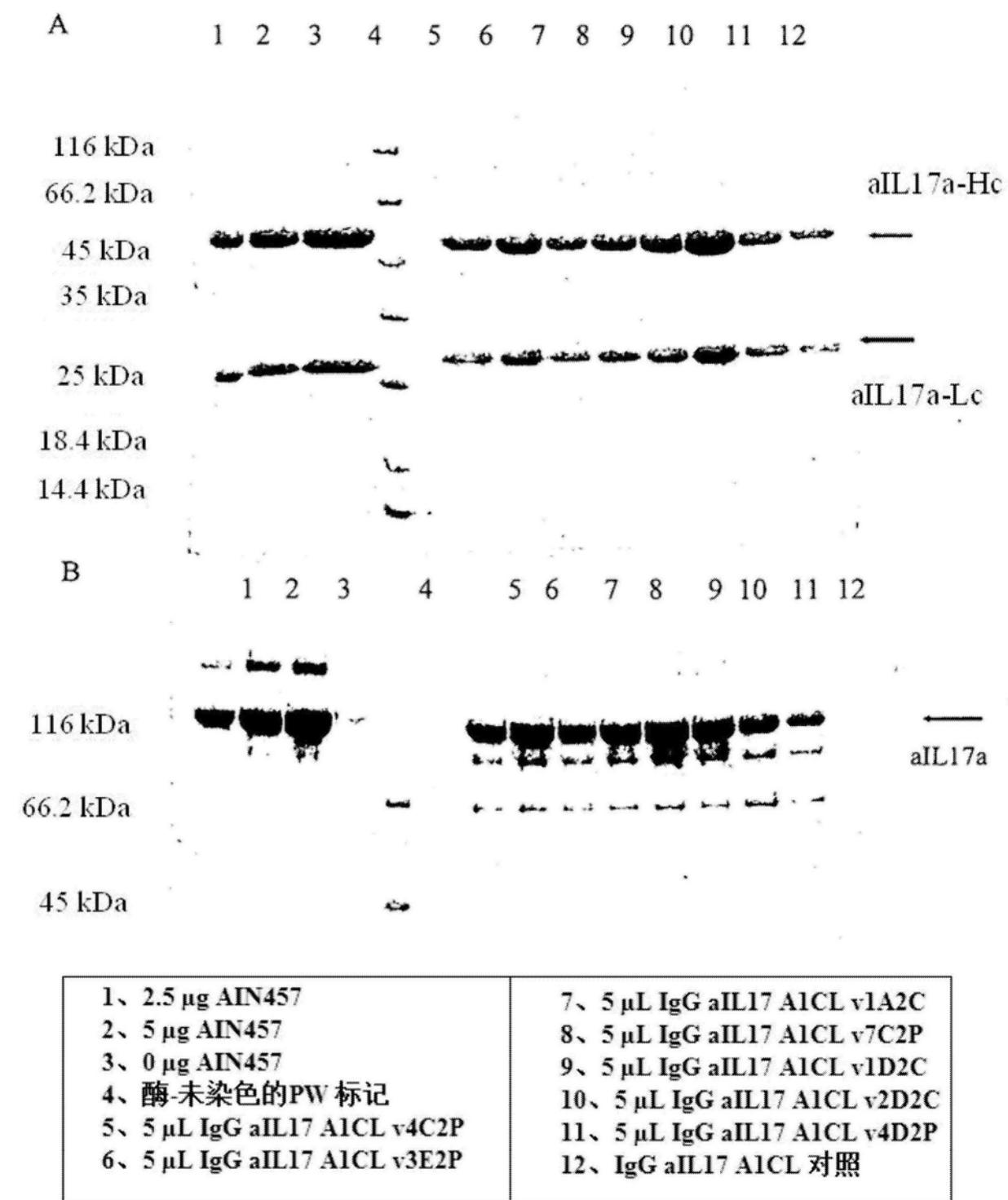


图3

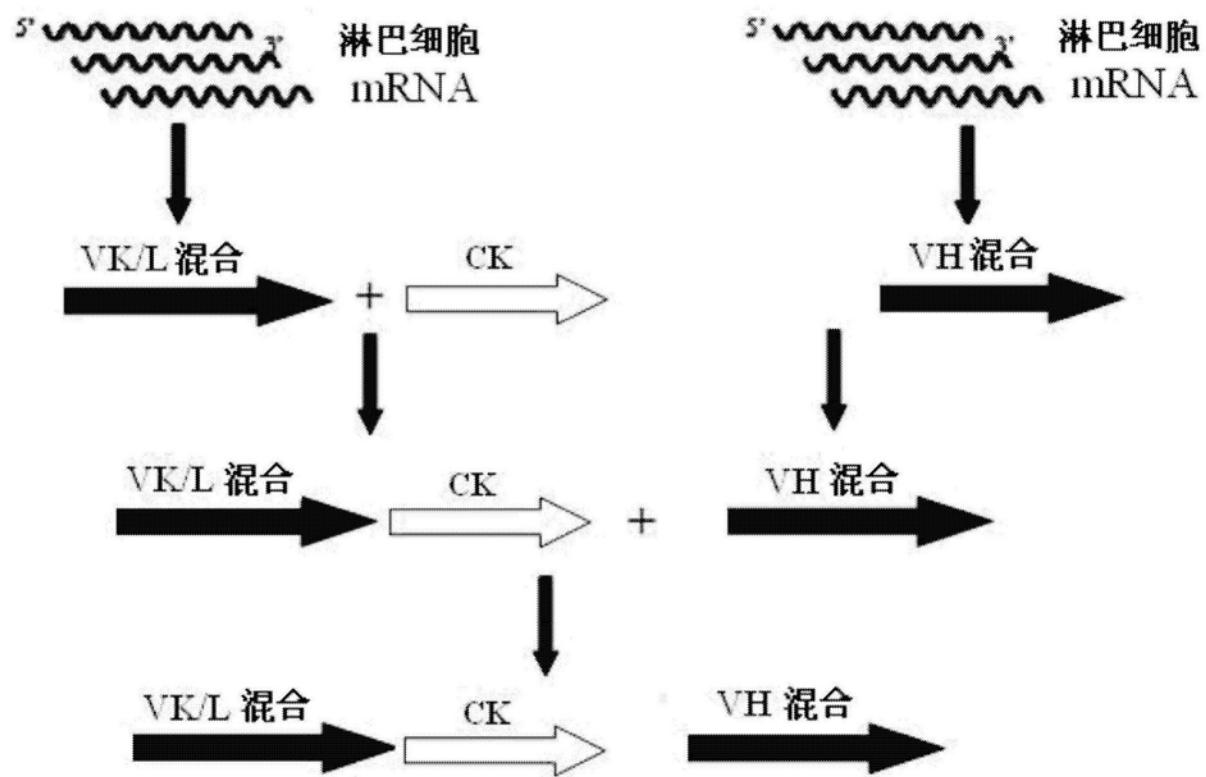


图4

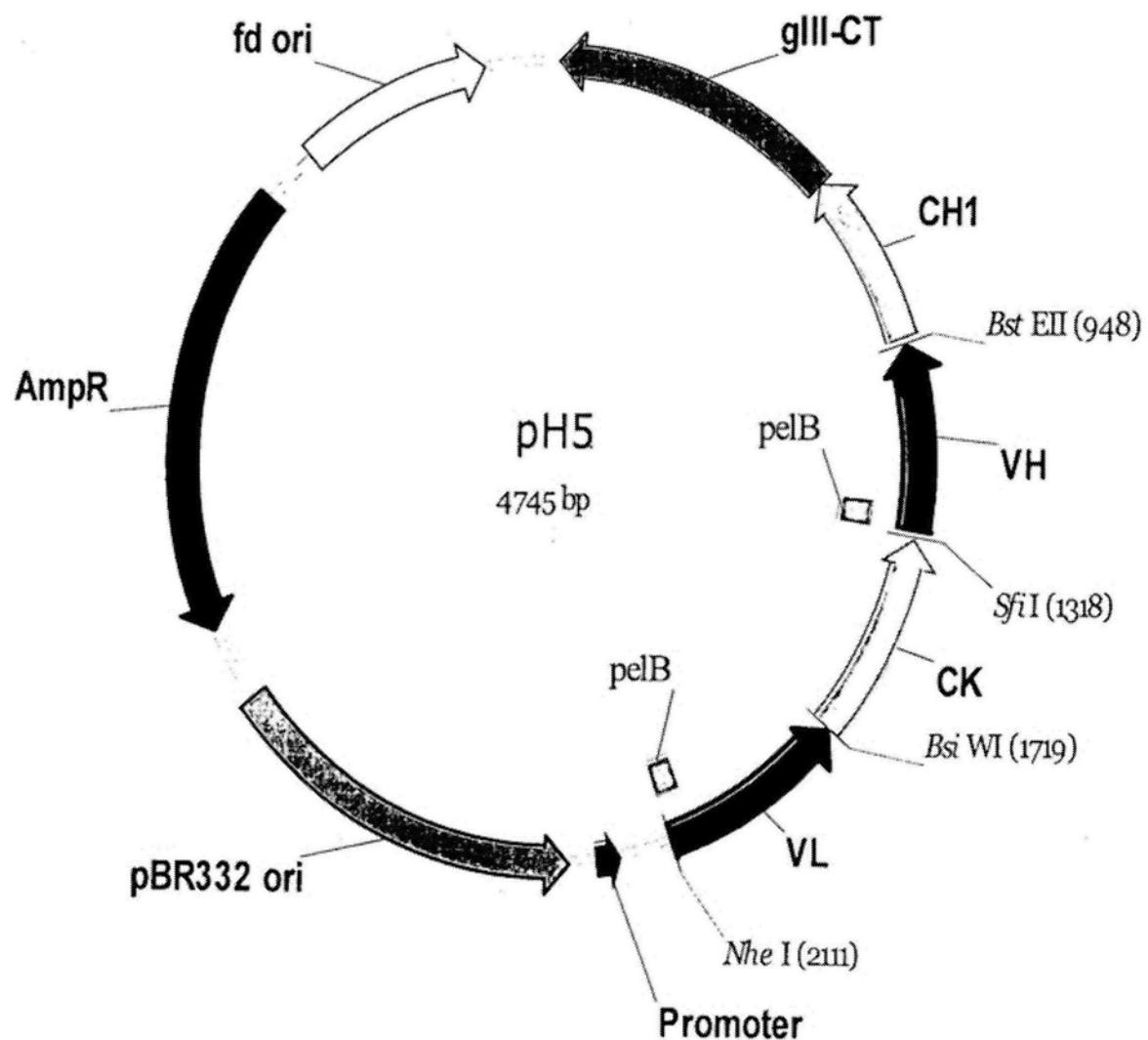


图5

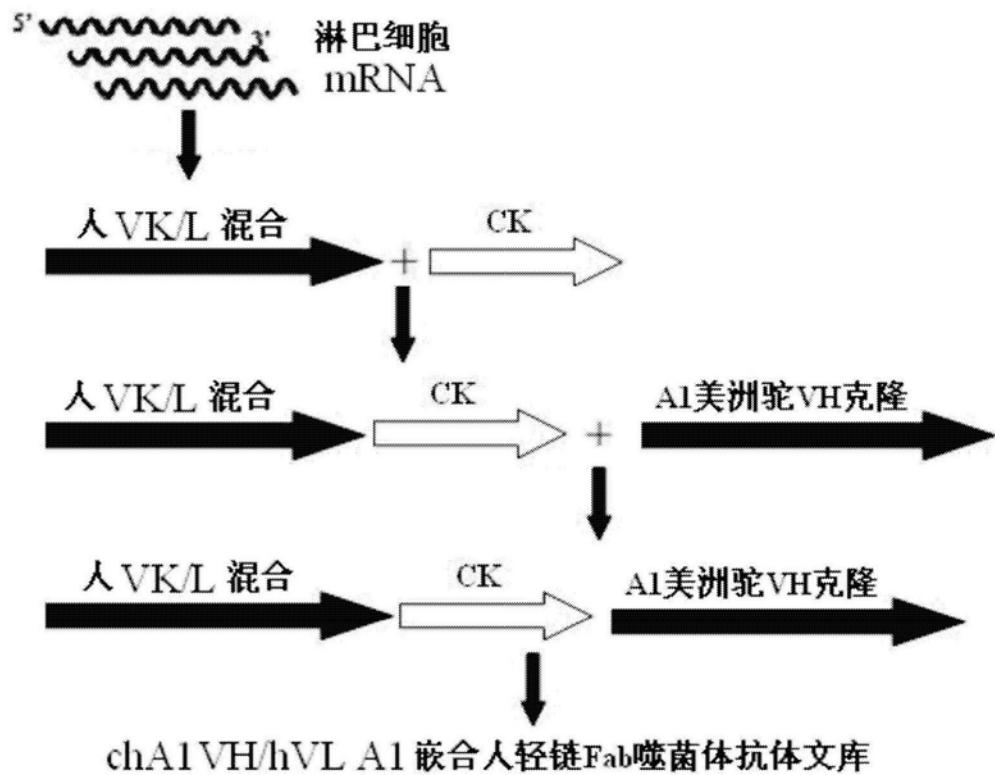


图6

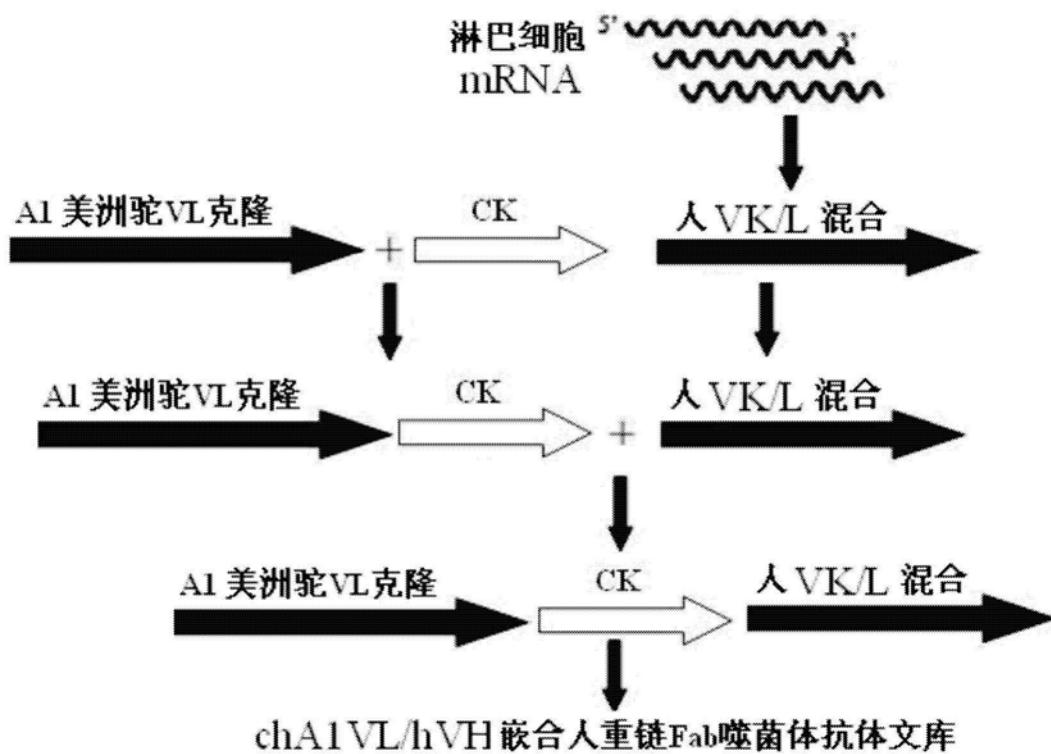


图7

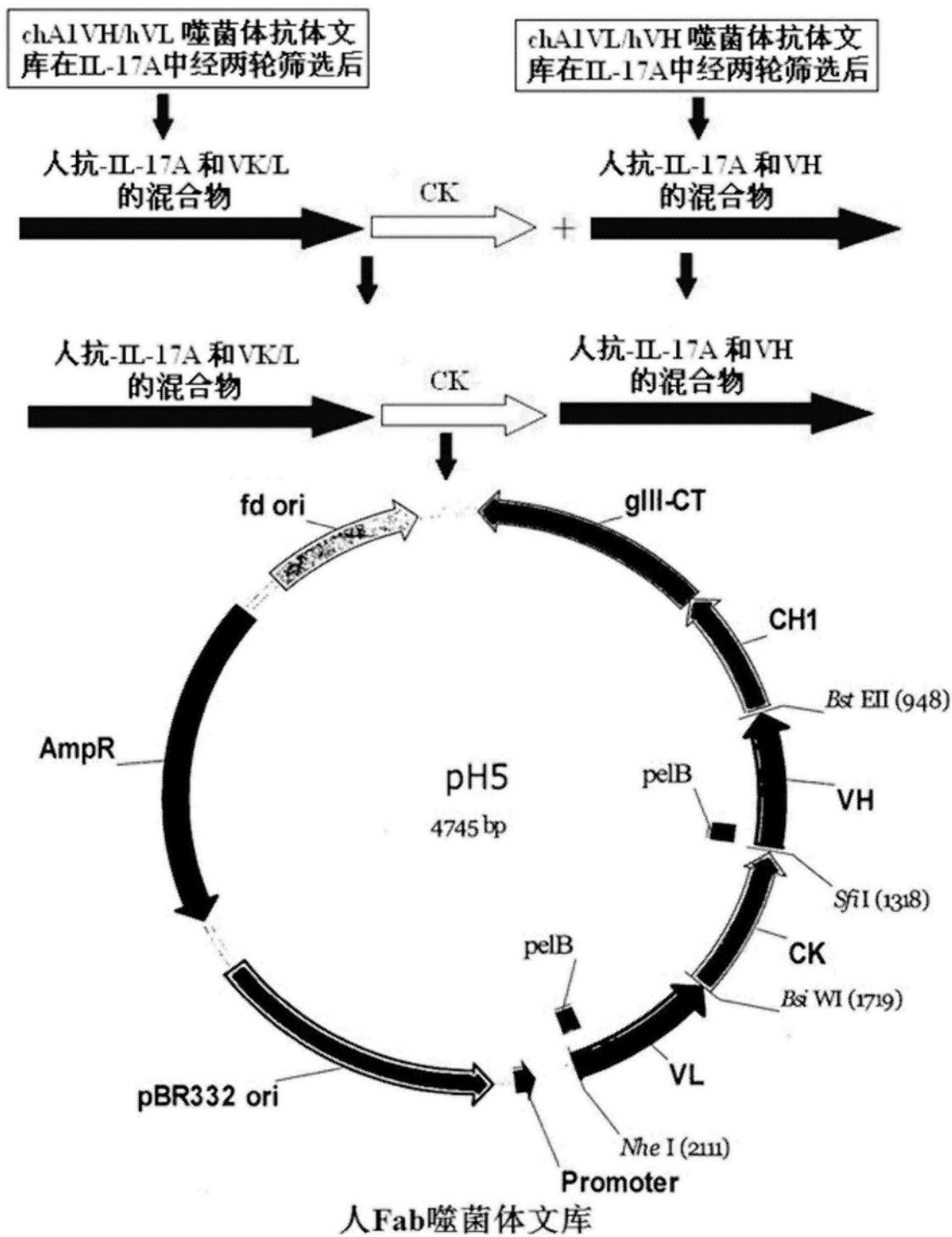


图8

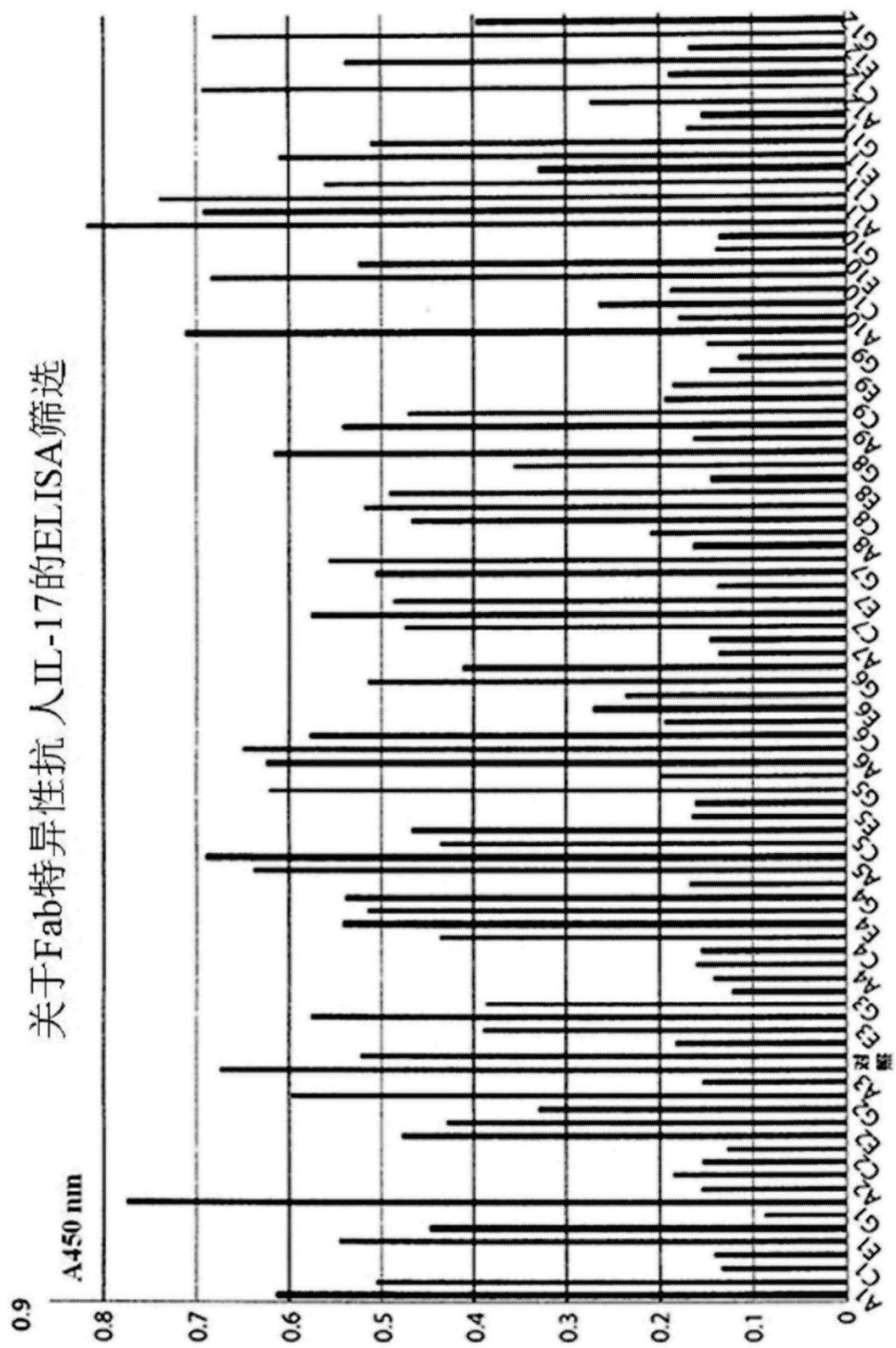


图9

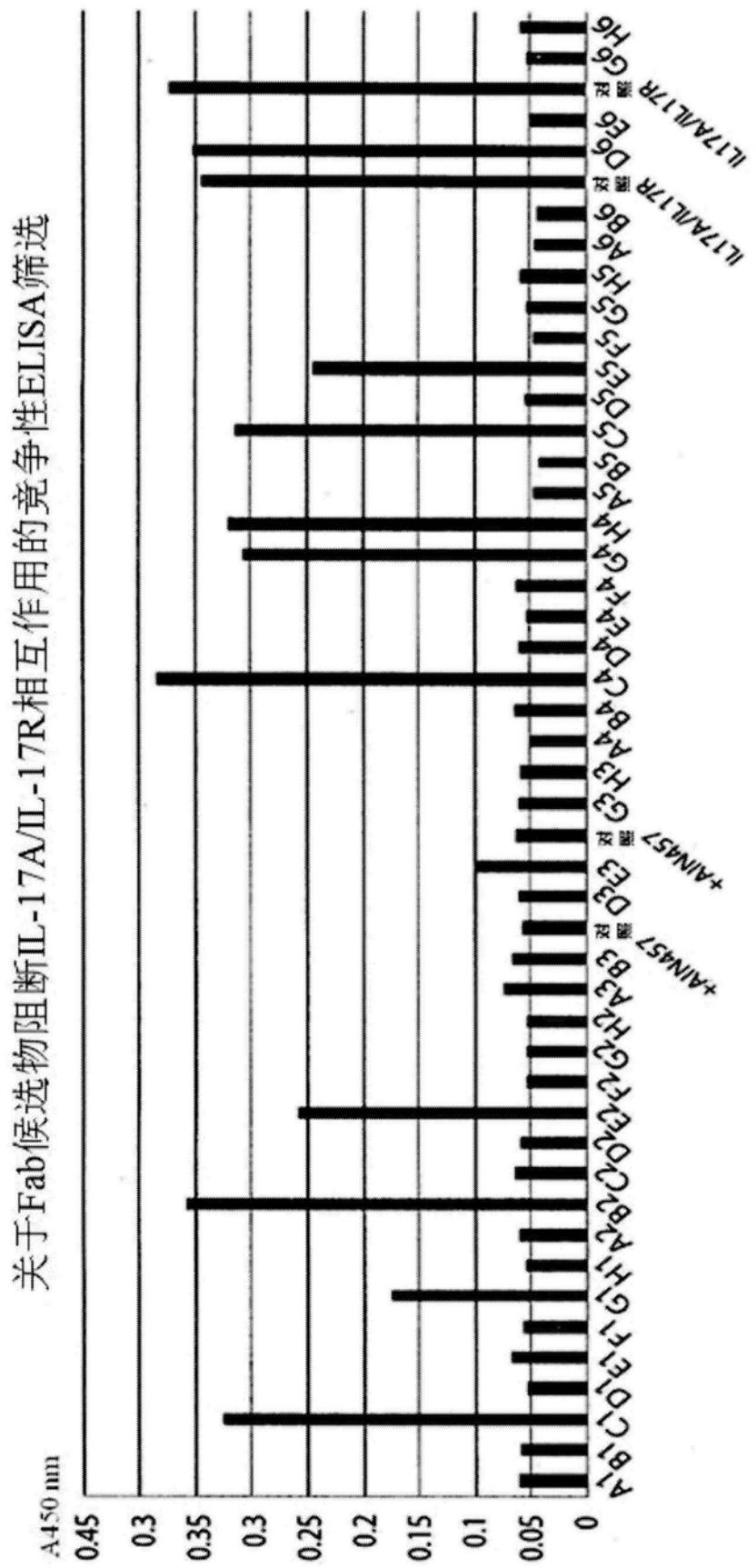


图10

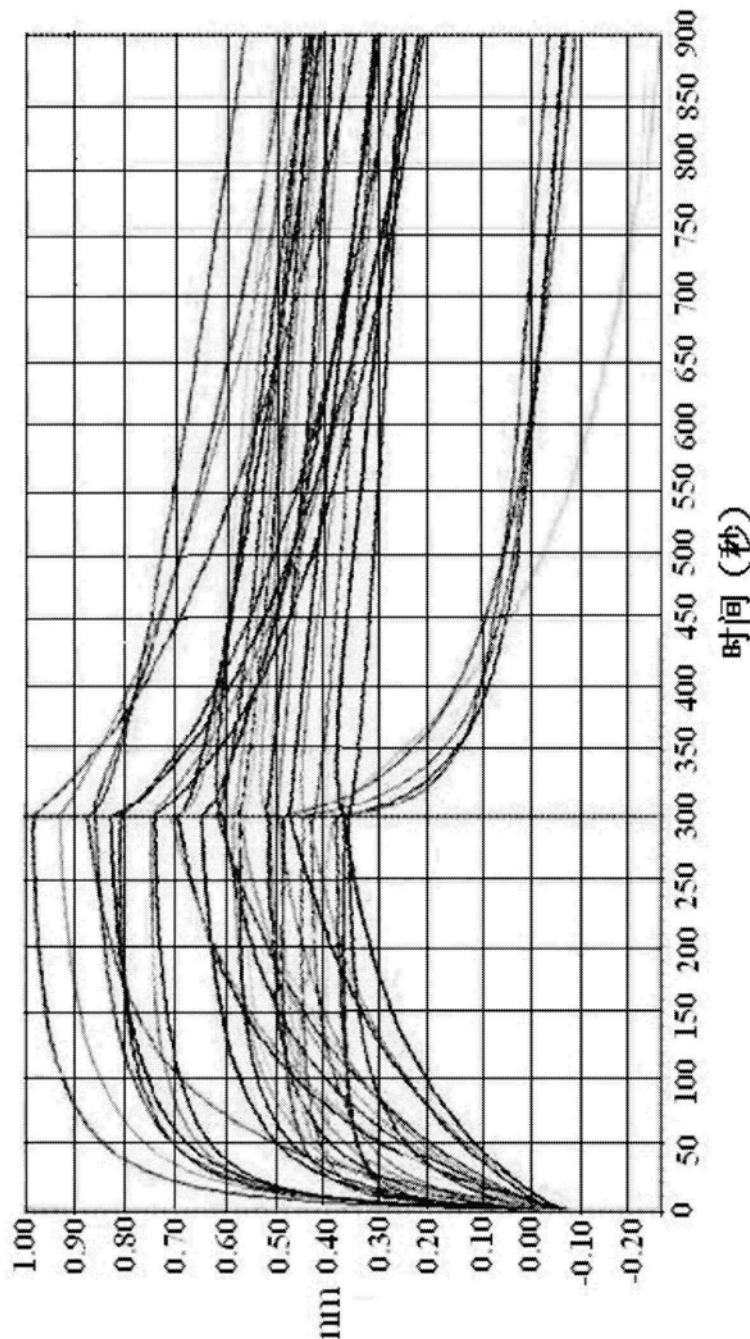
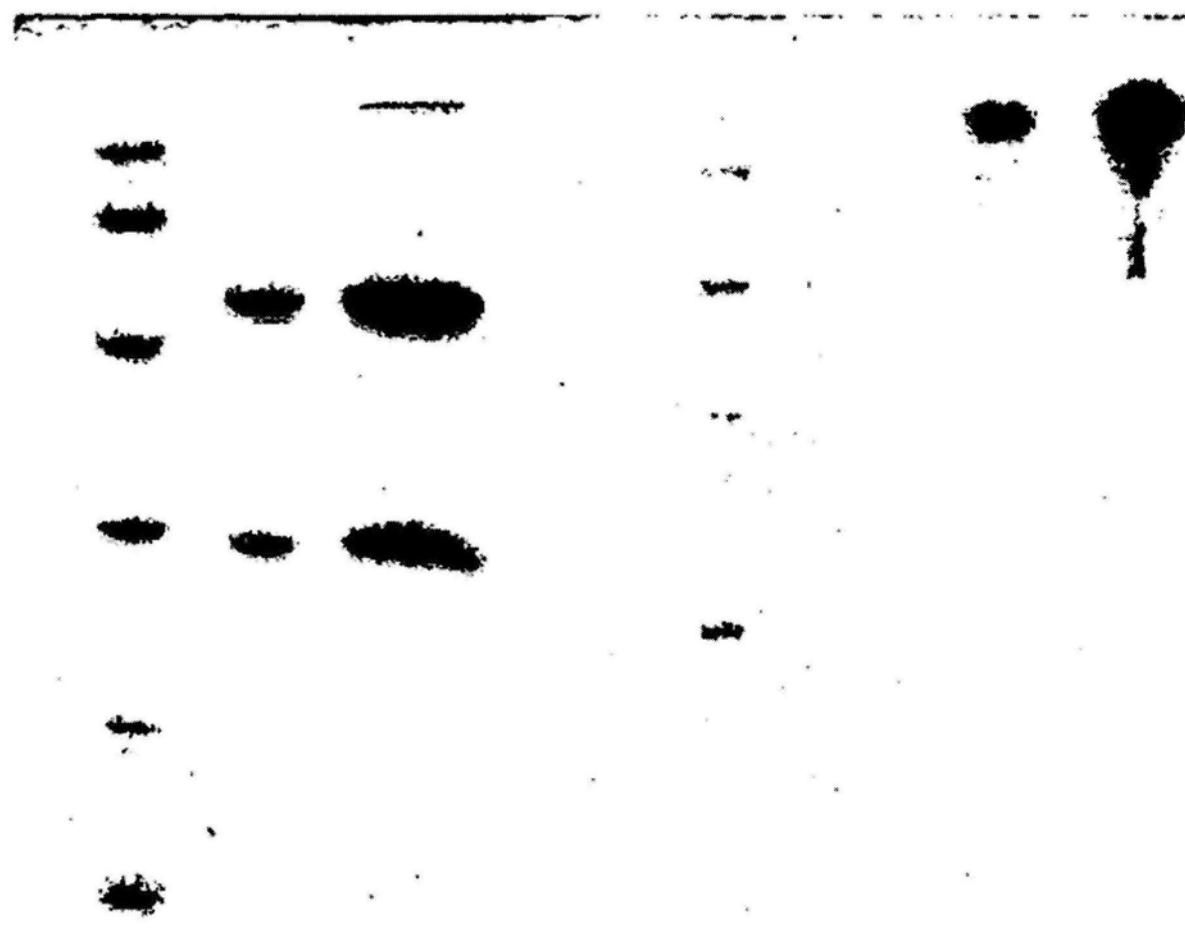


图11

1 2 3 4 5 6



1、酶未染色的标记
2、BCD085, 10 μ g + β ME
3、BCD085, 40 μ g + β ME

4、酶未染色的标记
5、BCD085, 10 μ g - β ME
6、BCD085, 40 μ g - β ME

图12

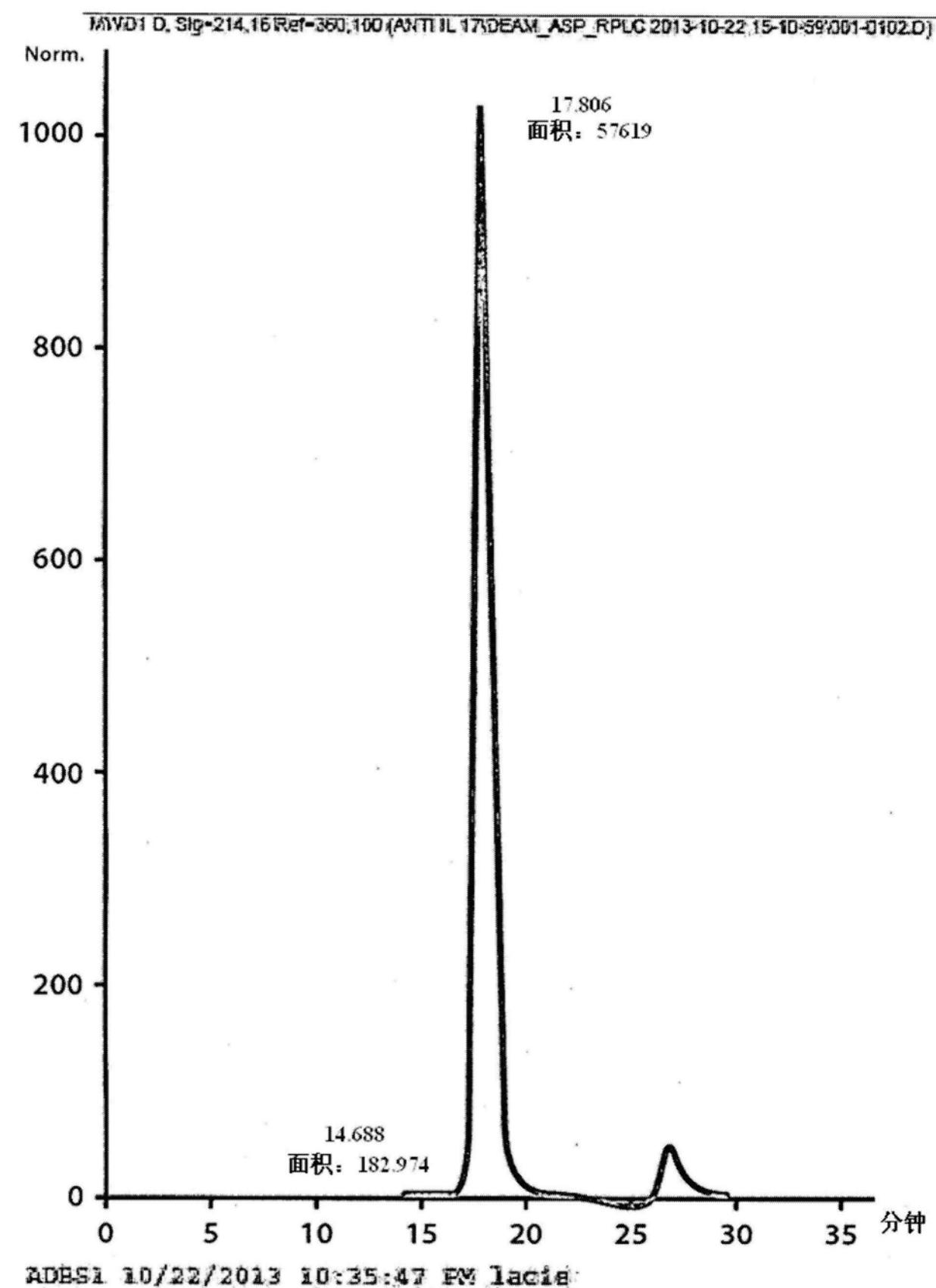


图13

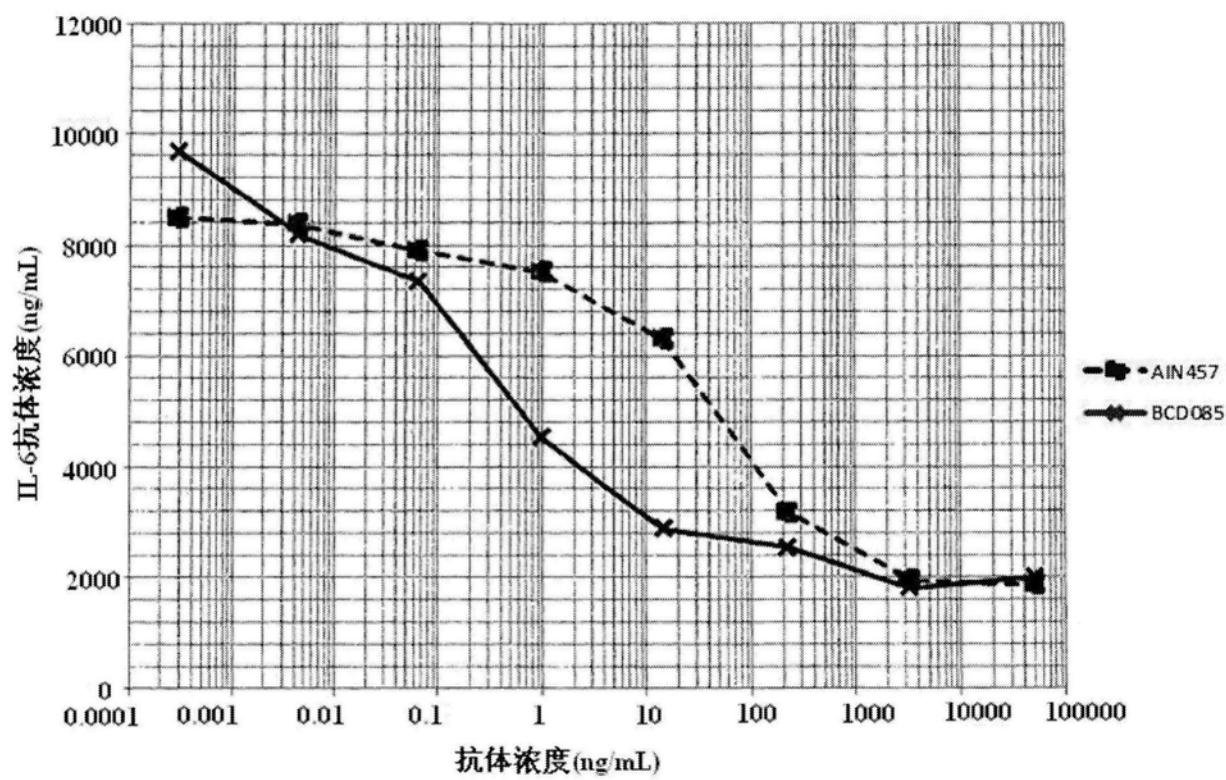
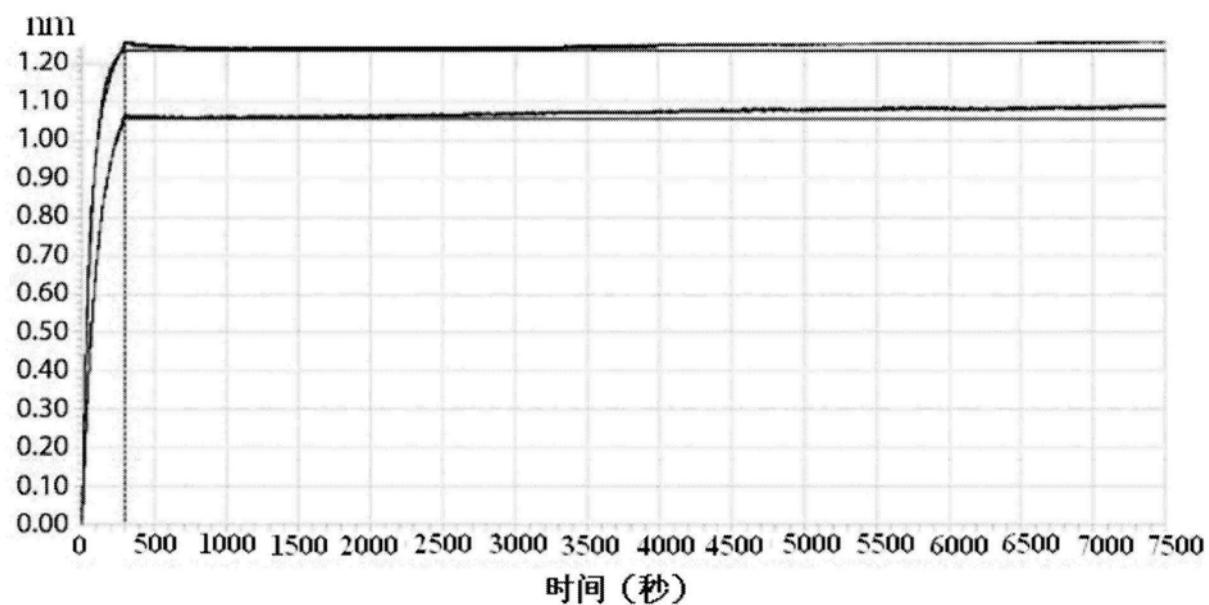
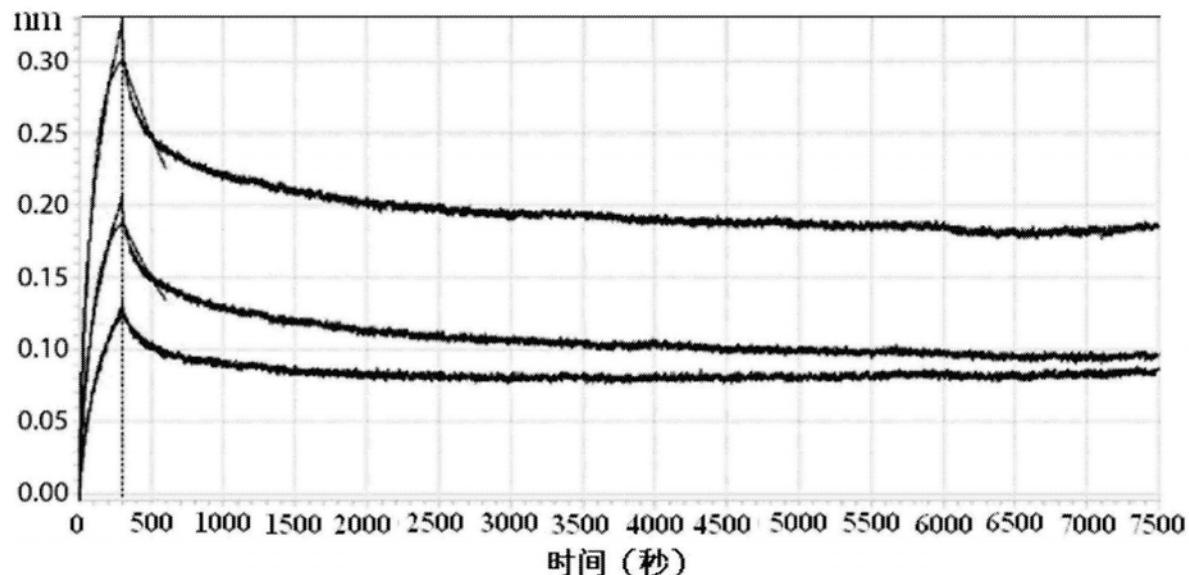


图14



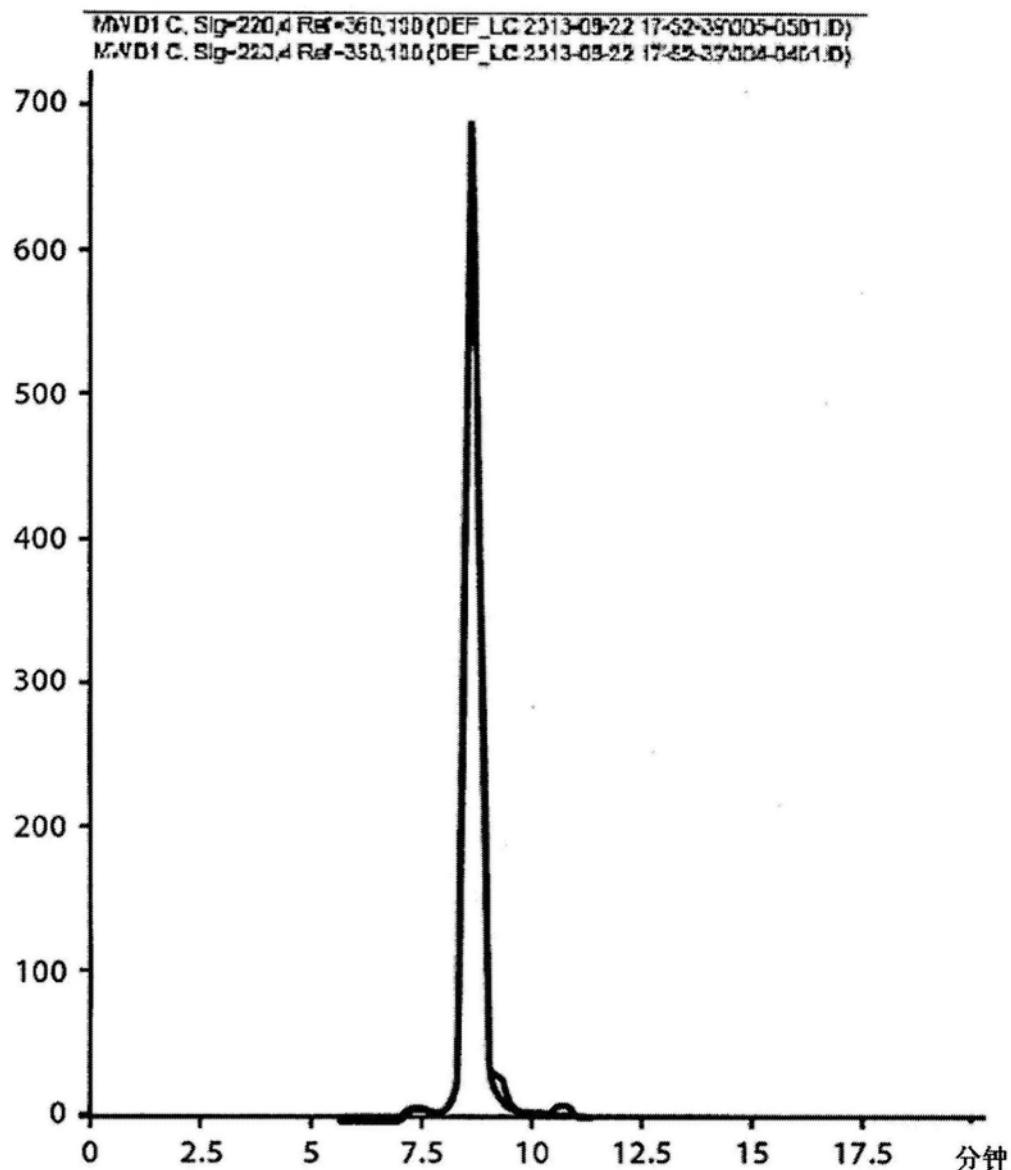
浓度 (nM)	信号	KD (M)	kon(1/Mc)	偏差 kon	kdis(1/c)	偏差 kdis	绝对平方 偏差 R^2
68.6	1.2507	<1.0E-12	2.20 E+05	6.80 E+02	<1.0E-07		0.973327
34.3	1.0595	<1.0E-12	2.64 E+05	1.77 E+03	<1.0E-07		0.937248

图15



浓度 (nM)	信号	KD (M)	kon(1/Mc)	偏差 kon	kdis(1/c)	偏差 kdis	绝对平方 偏差 R^2
68.7	0.3246	5.97E-09	1.61E+05	2.73E+03	9.60 E-04	2.35 E-05	0.956946
34.4	0.2032	4.15E-09	2.71E+05	4.78E+03	1.13 E-03	2.31 E-05	0.964905
17.2	0.127	2.22 E-09	4.06 E+05	6.23 E+03	9.01 E-04	1.71 E-05	0.983707

图16



Instrument 1 8/28/2013 11:46:06 AM SE

Page 1 of 1

序号	时间	面积	高度	宽度	%面积	对称性	样品MMt
1	7.371	147.8	4.4	0.4004	1.062	0.809	274666.2
2	8.656	13246	642.7	0.3165	95.157	0.876	149758.8
3	9.216	402.6	24.6	0.2272	2.892	0.283	52237.09
4	10.663	123.8	7	0.2528	0.889	0.867	33009.53

图17

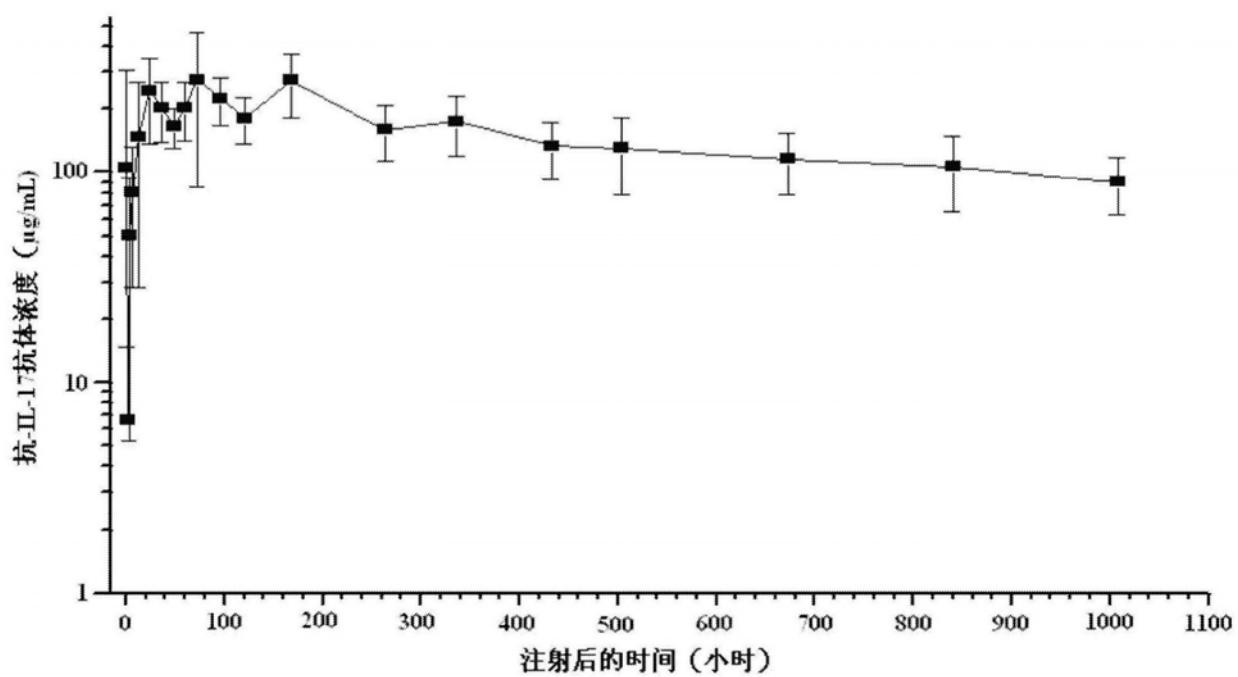


图18