



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112079922 B

(45) 授权公告日 2022.08.12

| | |
|------------------------------|--------------------------------------|
| (21) 申请号 202010740669.X | G01N 33/68 (2006.01) |
| (22) 申请日 2020.07.28 | A61K 39/395 (2006.01) |
| (65) 同一申请的已公布的文献号 | A61P 37/00 (2006.01) |
| 申请公布号 CN 112079922 A | A61P 17/06 (2006.01) |
| (43) 申请公布日 2020.12.15 | A61P 1/00 (2006.01) |
| (66) 本国优先权数据 | (56) 对比文件 |
| 201910706137.1 2019.07.30 CN | CN 103275222 A, 2013.09.04 |
| 201911040745.X 2019.10.29 CN | CN 103813804 A, 2014.05.21 |
| 201911171754.2 2019.11.25 CN | CN 102177178 A, 2011.09.07 |
| (73) 专利权人 中山康方生物医药有限公司 | US 2009181027 A1, 2009.07.16 |
| 地址 528437 广东省中山市火炬开发区神 | 李百勇等. 阻断白介素12p40功能的新型治 |
| 农路6号 | 疗性单克隆抗体的开发.《中国医药生物技术》 |
| (72) 发明人 夏瑜 王忠民 张鹏 李百勇 | .2014, 第09卷(第04期), 283-287. |
| (74) 专利代理机构 北京科穗律师事务所 11849 | 郭薇等.P40家族成员及其在自身免疫性疾 |
| 专利代理师 张国梁 | 病中的作用.《药物生物技术》.2011, 第18卷(第 |
| (51) Int.Cl. | 01期), 81-84. |
| C07K 16/24 (2006.01) | Luo J等.Structural basis for the dual |
| C12N 15/13 (2006.01) | recognition of IL-12 and IL-23 by |
| C07K 19/00 (2006.01) | ustekinumab.《Journal of Molecular |
| C07K 16/46 (2006.01) | Biology》.2010, 第402卷(第05期), 797-812. |
| | 审查员 张华 |
| | 权利要求书7页 说明书42页 附图11页 |

(54) 发明名称
 抗人p40蛋白域抗体及其用途

(57) 摘要
 本发明涉及用于治疗或预防自身免疫疾病的抗体。本发明的抗体包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:24所示的重链可变区和SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:25所示的轻链可变区。

1. 特异性结合人IL-12/IL-23 p40的抗体或其抗原结合片段,其中:所述抗体包含:

(1) SEQ ID NO:1所示的重链可变区中包含的HCDR1,HCDR2和HCDR3;和SEQ ID NO:6所示的轻链可变区中包含的LCDR1,LCDR2和LCDR3;

其中所述抗体还包括重链可变区的框架区FR和轻链可变区的框架区FR,其中

所述重链可变区的框架区FR包含FR-H1,FR-H2,FR-H3和FR-H4,其中FR-H1由SEQ ID NO:29的氨基酸序列组成;FR-H2由SEQ ID NO:30的氨基酸序列组成;FR-H3由SEQ ID NO:31的氨基酸序列组成;FR-H4由SEQ ID NO:32的氨基酸序列其组成;

所述轻链可变区的框架区FR包含FR-L1,FR-L2,FR-L3和FR-L4,其中FR-L1由SEQ ID NO: 41的氨基酸序列组成;FR-L2由SEQ ID NO:42的氨基酸序列组成;FR-L3由SEQ ID NO: 43的氨基酸序列组成;FR-L4由SEQ ID NO: 44的氨基酸序列组成;

所述抗体或其抗原结合片段包含以下重链CDR和轻链CDR:

HCDR1,其由SEQ ID NO:3所示的序列组成,

HCDR2,其由SEQ ID NO:4所示的序列组成,和

HCDR3,其由SEQ ID NO:5所示的序列组成,

并且所述抗体还包含:

LCDR1,其由SEQ ID NO:8所示的氨基酸组成,

LCDR2,其由SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列组成,和

LCDR3,其由SEQ ID NO:10所示的序列组成;或

(2) SEQ ID NO:1所示的重链可变区中包含的HCDR1,HCDR2和HCDR3;和SEQ ID NO:11所示的轻链可变区中包含的LCDR1,LCDR2和LCDR3;

其中所述抗体还包括重链可变区的框架区FR和轻链可变区的框架区FR,其中

所述重链可变区的框架区FR包含FR-H1,FR-H2,FR-H3和FR-H4,其中FR-H1由SEQ ID NO:29的氨基酸序列组成;FR-H2由SEQ ID NO:30的氨基酸序列组成;FR-H3由SEQ ID NO:31的氨基酸序列组成;FR-H4由SEQ ID NO:32的氨基酸序列其组成;

所述轻链可变区的框架区FR包含FR-L1,FR-L2,FR-L3和FR-L4,其中FR-L1由SEQ ID NO: 33的氨基酸序列组成;FR-L2由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成;FR-L3由SEQ ID NO: 46的氨基酸序列组成;FR-L4由SEQ ID NO: 36的氨基酸序列组成;

所述抗体或其抗原结合片段包含以下重链CDR和轻链CDR:

HCDR1,其由SEQ ID NO:3所示的序列组成,

HCDR2,其由SEQ ID NO:4所示的序列组成,和

HCDR3,其由SEQ ID NO:5所示的序列组成,

并且所述抗体还包含:

LCDR1,其由SEQ ID NO:19所示的氨基酸组成,

LCDR2,其由SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列组成,和

LCDR3,其由SEQ ID NO:22所示的序列组成;或

(3) SEQ ID NO:1所示的重链可变区中包含的HCDR1,HCDR2和HCDR3;和SEQ ID NO:13所示的轻链可变区中包含的LCDR1,LCDR2和LCDR3;

其中所述抗体还包括重链可变区的框架区FR和轻链可变区的框架区FR,其中

所述重链可变区的框架区FR包含FR-H1,FR-H2,FR-H3和FR-H4,其中FR-H1由SEQ ID

NO:29的氨基酸序列组成;FR-H2由SEQ ID NO:30的氨基酸序列组成;FR-H3由SEQ ID NO:31的氨基酸序列组成;FR-H4由SEQ ID NO:32的氨基酸序列其组成;

所述轻链可变区的框架区FR包含FR-L1,FR-L2,FR-L3和FR-L4,其中FR-L1由SEQ ID NO: 33的氨基酸序列组成;FR-L2由SEQ ID NO:47的氨基酸序列组成;FR-L3由SEQ ID NO: 46的氨基酸序列组成;FR-L4由SEQ ID NO: 36的氨基酸序列组成;

所述抗体或其抗原结合片段包含以下重链CDR和轻链CDR:

HCDR1,其由SEQ ID NO:3所示的序列组成,

HCDR2,其由SEQ ID NO:4所示的序列组成,和

HCDR3,其由SEQ ID NO:5所示的序列组成,

并且所述抗体还包含:

LCDR1,其由SEQ ID NO:20所示的氨基酸组成,

LCDR2,其由SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列组成,和

LCDR3,其由SEQ ID NO:22所示的序列组成;或

(4) SEQ ID NO:1所示的重链可变区中包含的HCDR1,HCDR2和HCDR3;和SEQ ID NO:15所示的轻链可变区中包含的LCDR1,LCDR2和LCDR3;

其中所述抗体还包括重链可变区的框架区FR和轻链可变区的框架区FR,其中

所述重链可变区的框架区FR包含FR-H1,FR-H2,FR-H3和FR-H4,其中FR-H1由SEQ ID NO:29的氨基酸序列组成;FR-H2由SEQ ID NO:30的氨基酸序列组成;FR-H3由SEQ ID NO:31的氨基酸序列组成;FR-H4由SEQ ID NO:32的氨基酸序列其组成;

所述轻链可变区的框架区FR包含FR-L1,FR-L2,FR-L3和FR-L4,其中FR-L1由SEQ ID NO: 33的氨基酸序列组成;FR-L2由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成;FR-L3由SEQ ID NO: 48的氨基酸序列组成;FR-L4由SEQ ID NO: 36的氨基酸序列组成;

所述抗体或其抗原结合片段包含以下重链CDR和轻链CDR:

HCDR1,其由SEQ ID NO:3所示的序列组成,

HCDR2,其由SEQ ID NO:4所示的序列组成,和

HCDR3,其由SEQ ID NO:5所示的序列组成,

并且所述抗体还包含:

LCDR1,其由SEQ ID NO:20所示的氨基酸组成,

LCDR2,其由SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列组成,和

LCDR3,其由SEQ ID NO:22所示的序列组成;或

(5) SEQ ID NO:1所示的重链可变区中包含的HCDR1,HCDR2和HCDR3;和SEQ ID NO:17所示的轻链可变区中包含的LCDR1,LCDR2和LCDR3;或

其中所述抗体还包括重链可变区的框架区FR和轻链可变区的框架区FR,其中

所述重链可变区的框架区FR包含FR-H1,FR-H2,FR-H3和FR-H4,其中FR-H1由SEQ ID NO:29的氨基酸序列组成;FR-H2由SEQ ID NO:30的氨基酸序列组成;FR-H3由SEQ ID NO:31的氨基酸序列组成;FR-H4由SEQ ID NO:32的氨基酸序列其组成;

所述轻链可变区的框架区FR包含FR-L1,FR-L2,FR-L3和FR-L4,其中FR-L1由SEQ ID NO: 33的氨基酸序列组成;FR-L2由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成;FR-L3由SEQ ID NO: 46的氨基酸序列组成;FR-L4由SEQ ID NO: 36的氨基酸序列组成;

所述抗体或其抗原结合片段包含以下重链CDR和轻链CDR:

HCDR1,其由SEQ ID NO:3所示的序列组成,

HCDR2,其由SEQ ID NO:4所示的序列组成,和

HCDR3,其由SEQ ID NO:5所示的序列组成,

并且所述抗体还包含:

LCDR1,其由SEQ ID NO:20所示的氨基酸组成,

LCDR2,其由SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列组成,和

LCDR3,其由SEQ ID NO:23所示的序列组成;或

(6) SEQ ID NO:24所示的重链可变区中包含的HCDR1,HCDR2和HCDR3;和SEQ ID NO:25的轻链可变区中包含的LCDR1,LCDR2和LCDR3,

其中所述抗体还包括重链可变区的框架区FR和轻链可变区的框架区FR,其中

所述重链可变区的框架区FR包含FR-H1,FR-H2,FR-H3和FR-H4,其中FR-H1由SEQ ID NO:29的氨基酸序列组成;FR-H2由SEQ ID NO:30的氨基酸序列组成;FR-H3由SEQ ID NO:31的氨基酸序列组成;FR-H4由SEQ ID NO:32的氨基酸序列其组成;

所述轻链可变区的框架区FR包含FR-L1,FR-L2,FR-L3和FR-L4,其中FR-L1由SEQ ID NO:33的氨基酸序列组成;FR-L2由SEQ ID NO:34的氨基酸序列组成;FR-L3由SEQ ID NO:35的氨基酸序列组成;FR-L4由SEQ ID NO:36的氨基酸序列组成,

所述抗体或其抗原结合片段包含以下重链CDR和轻链CDR:HCDR1,其由SEQ ID NO:26所示的序列组成,

HCDR2,其由SEQ ID NO:4所示的序列组成,和

HCDR3,其由SEQ ID NO:5所示的序列组成,

并且所述抗体还包含:

LCDR1,其由SEQ ID NO:27所示的氨基酸组成,

LCDR2,其由SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列组成,和

LCDR3,其由SEQ ID NO:22所示的序列组成。

2. 权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包括:

(1) 重链可变区,其由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成,和轻链可变区,其由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列组成;或

(2) 重链可变区,其由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成,和轻链可变区,其由SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列组成;或

(3) 重链可变区,其由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成,和轻链可变区,其由SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列组成;或

(4) 重链可变区,其由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成,和轻链可变区,其由SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列组成;或

(5) 重链可变区,其由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成,和轻链可变区,其由SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列组成;或

(6) 重链可变区,其由SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列组成,和轻链可变区,其由SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列组成。

3. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体还包含重链恒定

区和轻链恒定区,且所述恒定区来自不是鼠类的物种。

4. 权利要求3所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述恒定区来自人抗体。

5. 权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述恒定区来自人IgG1。

6. 权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链恒定区为Ig gamma-1 chain C region。

7. 权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链恒定区为GenBank登记号为ACCESSION:P01857的Iggamma-1链C区。

8. 权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链恒定区为Ig kappa chain C region。

9. 权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链恒定区为GenBank登记号为ACCESSION:P01834的Ig kappa链C区。

10. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体由SEQ ID NO:39所示的重链和SEQ ID NO:40所示的轻链组成;或所述抗体由SEQ ID NO:49所示的重链和SEQ ID NO:50所示的轻链组成;或所述抗体由SEQ ID NO:49所示的重链和SEQ ID NO:51所示的轻链组成;或所述抗体由SEQ ID NO:49所示的重链和SEQ ID NO:52所示的轻链组成;或所述抗体由SEQ ID NO:49所示的重链和SEQ ID NO:53所示的轻链组成;或所述抗体由SEQ ID NO:49所示的重链和SEQ ID NO:54所示的轻链组成。

11. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段选自以下各项组成的组:Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、Fab/c、互补决定区(CDR)片段、单链抗体、双价抗体、结构域抗体。

12. 权利要求11所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述单链抗体是scFv。

13. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是人源化抗体、嵌合抗体、多特异性抗体。

14. 权利要求13所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述多特异性抗体是双特异性抗体。

15. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体以小于 10^{-5} M的K_D结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域。

16. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体以小于 10^{-6} M的K_D结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域。

17. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体以小于 10^{-7} M的K_D结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域。

18. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体以小于 10^{-8} M的K_D结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域。

19. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体以小于 10^{-9} M的K_D结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域。

20. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体以小于 10^{-10} M的K_D结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域。

21. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体以小于100nM 的EC50结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域。

22. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体以小于10nM的EC50结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域。

23. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体以小于1nM的EC50结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域。

24. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体以小于0.9nM的EC50结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域。

25. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体以小于0.8nM的EC50结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域。

26. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体以小于0.7nM的EC50结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域。

27. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体以小于0.6nM的EC50结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域。

28. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体以小于0.5nM的EC50结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域。

29. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体以小于0.4nM的EC50结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域。

30. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体以小于0.3nM的EC50结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域。

31. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体以小于0.2nM的EC50结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域。

32. 分离的多肽,其选自以下各项组成的组:

- (1) 分离的多肽,其包含SEQ ID NO:1所示的序列和SEQ ID NO: 6所示的序列;
- (2) 分离的多肽,其包含SEQ ID NO:1所示的序列和SEQ ID NO:11所示的序列;
- (3) 分离的多肽,其包含SEQ ID NO:1所示的序列和SEQ ID NO: 13所示的序列;
- (4) 分离的多肽,其包含SEQ ID NO:1所示的序列和SEQ ID NO: 15所示的序列;
- (5) 分离的多肽,其包含SEQ ID NO:1所示的序列和SEQ ID NO: 17所示的序列;
- (6) 分离的多肽,其包含SEQ ID NO:24所示的序列和SEQ ID NO: 25所示的序列。

33. 编码权利要求32所述分离的多肽的分离的多核苷酸。

34. 权利要求33所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸由下述序列组成:SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:7所示的核苷酸序列;

SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:12所示的核苷酸序列;

SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:14所示的核苷酸序列;

SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:16所示的核苷酸序列;

SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:18所示的核苷酸序列;或

SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38所示的核苷酸序列。

35. 载体,其包含权利要求33-34任一项所述的多核苷酸。

36. 宿主细胞,其包含权利要求33-34任一项所述的多核苷酸或权利要求35所述的载体。

37. 制备权利要求1-31任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法,其包括在合适的

条件下培养权利要求36的宿主细胞,以及从细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段的步骤。

38. 抗体偶联物,其包括权利要求1-31任一项所述的抗体或其抗原结合片段,以及与其偶联的偶联部分,所述偶联部分为纯化标签、细胞毒性剂,或可检测的标记。

39. 权利要求38所述的抗体偶联物,其中所述纯化标签是His标签。

40. 权利要求38所述的抗体偶联物,其中所述偶联部分为放射性同位素、发光物质、有色物质、酶或聚乙二醇。

41. 融合蛋白,其包括权利要求1-31任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

42. 多特异性抗体,其包含权利要求1-31任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

43. 权利要求42所述的多特异性抗体,其是双特异性抗体。

44. 试剂盒,其包括权利要求1-31任一项所述的抗体或其抗原结合片段,权利要求38-40任一项所述的抗体偶联物,权利要求41所述的融合蛋白或权利要求42-43任一项所述的多特异性抗体。

45. 权利要求44所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包括第二抗体,其特异性识别所述抗体或其抗原结合片段。

46. 权利要求45所述的试剂盒,其中所述第二抗体还包括可检测的标记。

47. 权利要求46所述的试剂盒,其中所述可检测标记为放射性同位素、发光物质、有色物质、酶或聚乙二醇。

48. 权利要求1-31任一项所述的抗体或其抗原结合片段,权利要求38-40任一项所述的抗体偶联物,权利要求41所述的融合蛋白或权利要求42-43任一项所述的多特异性抗体在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测人IL-12/IL-23 p40蛋白域在样品中的存在或其水平。

49. 药物组合物,其包含权利要求1-31任一项所述的抗体或其抗原结合片段,权利要求38-40任一项所述的抗体偶联物,权利要求41所述的融合蛋白或权利要求42-43任一项所述的多特异性抗体。

50. 权利要求49所述的药物组合物,其还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。

51. 权利要求49所述的药物组合物,其中所述药物组合物为适于通过皮下注射、皮内注射、静脉内注射、肌肉注射或病灶内注射施用的形式。

52. 权利要求1-31任一项所述的抗体或其抗原结合片段,权利要求38-40任一项所述的抗体偶联物,权利要求41所述的融合蛋白,权利要求42-43任一项所述的多特异性抗体或权利要求49-51任一项所述的药物组合物在制备如下药物中的用途:

阻断人IL-12/IL-23 p40蛋白域与人IL-12Rβ1或人IL-23R结合的药物,

阻断人IL-12/IL-23 p40蛋白域活性或下调其水平的药物,或者

阻断人IL-12Rβ1或人IL-23R与p40蛋白域结合所介导的细胞学反应的药物。

53. 权利要求52所述的用途,其中所述人IL-12/IL-23 p40蛋白域的配体为人IL-12Rβ1或人IL-23R。

54. 权利要求1-31任一项所述的抗体或其抗原结合片段,权利要求38-40任一项所述的抗体偶联物,权利要求41所述的融合蛋白,权利要求42-43任一项所述的多特异性抗体或权利要求49-51任一项所述的药物组合物在制备治疗自身免疫性疾病或溃疡性结肠炎的药物

中的用途。

55. 权利要求54所述的用途,其中所述自身免疫性疾病为斑块性银屑病,系统性红斑狼疮。

56. 权利要求54所述的用途,其中所述溃疡性直肠炎是难治性的或复发性的。

抗人p40蛋白域抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于医药领域,具体涉及一种阻断白介素IL-12/IL-23 p40蛋白域功能的单克隆抗体及其应用。

背景技术

[0002] 白介素12(Interleukin 12,IL-12),又名细胞毒淋巴细胞成熟因子(cytotoxic lymphocyte maturation factor,CLMF),或者NK细胞刺激因子(natural killer cell stimulation factor,NKSF),是白介素家族中的一员。IL-12具有独特的异源二聚体结构,是由p40和p35两个蛋白域通过二硫键共价连接而成的糖基化肽链(相对分子质量为75000道尔顿),其重链(p40)由306个氨基酸组成,包含10个半胱氨酸残基和4个潜在的糖基化位点,轻链(p35)由197个氨基酸组成,包含7个半胱氨酸残基和3个潜在的糖基化位点。

[0003] 白介素23(Interleukin 23,IL-23),是Oppmann等于2000年发现的白介素-12(IL-12)细胞因子家族的一个新成员,白介素23是由p19蛋白域与IL-12的p40蛋白域通过二硫键共价连接而成的一种具有生物活性的复合细胞因子。IL-23可由激活的抗原递呈细胞,及树突状细胞分泌。IL-23分别与其受体IL-23R及IL-12RB1结合,而不与IL-12RB2结合(Oppmann B等人.Immunity,2000,13(5):715-725)。

[0004] IL-23与IL-12有相同的信号传导途径如Janus激酶Tyk2、Jak2和STATs,但又各自影响不同的T细胞。IL-23能诱导记忆性T细胞CD4⁺急剧增殖,而IL-12刺激处女CD4⁺T细胞增殖。与IL-12相似,人IL-23刺激PHA激活的T细胞和CD45RO⁺T细胞中的IFN- γ 产生和增殖。拮抗IL-12、IL-23的共同亚基p40可同时地有效的拮抗IL-12及IL-23通路。

[0005] 白介素12主要由树突状细胞,巨噬细胞,B淋巴细胞以及其他一些抗原提呈细胞(APC)产生,能够增强NK细胞(natural killer cell)和Tc细胞(cytotoxic T cell)的细胞毒作用;刺激静止或活化的T细胞和NK细胞产生干扰素 γ (IFN- γ);促进Th0向Th1的分化。促进Th1细胞分泌IFN- γ 和IL2,介导细胞免疫应答;诱导T细胞和NK细胞产生IFN- γ ;增加髓外造血功能。IL-12在机体早期的非特异性免疫和随后的抗原特异性的适应性免疫过程均扮演了极其重要的角色,是一个多功能的免疫调节因子(Manetti R等人.Journal of Experimental Medicine,1993,177(4):1199-1204)。IL-12在自身免疫诱导过程中的作用表现为:(1)促进抗原特异性Th1细胞分化增殖并产生多种细胞因子,增强Th1型免疫反应;(2)刺激单核巨噬细胞产生多种活性介质,增强免疫活性细胞的细胞毒作用,导致自身组织损伤;IL-12亦参与抗体介导的自身免疫。

[0006] IL-23在多种免疫性疾病中起重要作用,并认为参与银屑病的发病。银屑病皮损处聚集异常的IL-2、TNF- α ,促进了银屑病的发生与发展,并认为皮损处的淋巴细胞分泌众多的细胞因子,形成了以Th1细胞因子为主的庞大的细胞网络是发病的重要病理基础。DC分泌的Th1类细胞因子似乎是银屑病发病的始动因素,成熟的DC可以增加IFN- α 及IL-12的表达。精神、遗传和感染因素在发病中的具体作用机制不明。Saint-Mezard等发现精神紧张能促使皮肤DC的聚集,增强皮肤对半抗原的迟发型变态反应。有实验证实IL-23也作用于DC诱导

炎症反应,但是否是直接炎症因子尚不清楚。IL-12通过皮肤淋巴细胞抗原介导T细胞到皮肤表面诱导银屑病的发病,Rosmarin等分析了IL-12的结构、受体和功能,认为通过改变IL-12水平可以治疗银屑病(Rosmarin D等人.Journal of drugs in dermatology,2005,4(3):318-325)。

[0007] 系统性红斑狼疮(简称SLE)是一种复杂的系统性自身免疫病,目前我国临床治疗缺乏有效的治疗手段,常规治疗多以激素和免疫抑制剂为主。著名制药公司Johnson&Johnson旗下的产品**STELARA**®(ustekinumab)是一款完全人源的IL-12和IL-23拮抗剂,已被美国FDA批准用于SLE的治疗,证明了抗IL-12p40抗体对治疗全身性红斑狼疮(SLE)的有效性(Janssen R&D's STELARA(ustekinumab) Shows Positive Results In Treatment of Systemic Lupus Erythematosus in Phase II Trial)。

[0008] 因此,IL-12和IL-23在自身免疫的诱导及免疫反应的维持方面起着极为重要的作用,因此阻断IL-12和IL-23的产生或信号传导,任何一个环节均可预防或阻止自身免疫病的发生和发展。

[0009] IL-12和IL-23都具有p40蛋白域的结构,特异性结合p40蛋白域的单克隆抗体可作为IL-12和IL-23通路的阻断剂,从而成为自身免疫疾病(例如斑块性银屑病,系统性红斑狼疮等)治疗的一种新药物。

[0010] 溃疡性结肠炎作为IBD的一种是以机体免疫功能障碍为主的一种疾病,其临床病理变化复杂,病程漫长,多反复发作,是一种病情比较复杂的免疫性疾病,一半以上的患者都接受过常规或生物疗法且无得到缓解。溃疡性结肠炎是在一定的遗传背景下,外源性因素和宿主因素共同作用的结果。病变多位于乙状结肠和直肠,也可延伸至降结肠,甚至整个结肠。病程漫长,常反复发作。本病见于任何年龄,但20~30岁最多见。鉴于溃疡性结肠炎的特点,需要寻找更优异的抗体药物来治疗溃疡性结肠炎患者。

发明内容

[0011] 本发明人以IL-12/IL-23 p40的晶体结构为基础,利用人工智能设计单克隆抗体技术开发抗体序列,通过ELISA等方法对抗体进行初步筛选,最终选择效价较好的抗体作为候选抗体进行后续的药效学研究。

[0012] 进一步地,本发明人制得了抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的人源化抗体(例如,命名为H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14、H8L15的人源化抗体)。

[0013] 本发明人惊奇地发现,该抗体能够与人IL-12/IL-23 p40蛋白域特异性结合,并且具有良好的结合活性。

[0014] 进一步地,本发明人惊奇地发现,本发明的抗体能有效地阻断人IL-12/IL-23 p40蛋白域与细胞表面受体IL-12RB1和IL-23R的结合,抑制由IL-23诱导的人外周血单核淋巴细胞分泌IL-17A。

[0015] 本发明人还惊奇地发现,本发明抗体能有效地结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,阻断人IL-12/IL-23 p40蛋白域与其配体IL-12RB1和IL-23R的结合,抑制IL-12/IL-23下游信号通路的激活;具有用于制备预防、治疗自身免疫疾病(例如斑块性银屑病,系统性红斑狼疮等)和溃疡性结肠炎(如难治性的或复发性的)的药物的潜力。

[0016] 通过本领域技术人员所熟知的技术手段,例如通过VBASE2数据库分析上面抗体序

列的CDR区的氨基酸序列。

[0017] 本领域普通技术人员可以理解,抗体的CDR区负责抗体对抗原的结合特异性。在已知抗体重链和轻链可变区序列的情况下,目前有多种确定抗体CDR区的方法,包括Kabat,IMGT,Chothia和AbM编号系统。

[0018] 具体地,AbM编号系统:AbM CDR定义方式来源于Martin的相关研究(Martin ACR, Cheetham JC,Rees AR(1989)Modelling antibody hypervariableloops:A combined algorithm.Proc Natl Acad Sci USA 86:9268-9272),此定义方法整合了Kabat及Chothia两者的部分定义。

[0019] Kabat编号系统:参见,例如Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.,1991。

[0020] Chothia编号系统:参见,例如Chothia&Lesk(1987)J.Mol.Biol.196:901-917; Chothia等人(1989)Nature 342:878-883。

[0021] IMGT编号系统:参见例如Lefranc et al.,Dev.Comparat.Immunol.27:55-77, 2003。

[0022] 然而,每种关于抗体或其变体的CDR的定义的应用都将在本文定义和使用的术语的范围内。如果给定该抗体的可变区氨基酸序列,则本领域技术人员通常可确定哪些残基包含特定CDR,而不依赖于该序列自身之外的任何实验数据。以下列举Kabat和Chothia两种CDR编号系统定义的CDR的合适的氨基酸残基作为比较。包含特定CDR的精确残基数将随该CDR的序列和大小变化。

[0023] 优选地,本发明的抗体H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14具有相同的HCDR1-3:

[0024] 其重链可变区的3个HCDR区的氨基酸序列如下:

[0025] HCDR1: GYSFTTYW (SEQ ID NO:3)

[0026] HCDR2: IMSPVDSDI (SEQ ID NO:4)

[0027] HCDR3: ARRRPGQGYFDF (SEQ ID NO:5)

[0028] 本发明的抗体H5L9具有LCDR1-3:

[0029] 其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列如下:

[0030] LCDR1: QNVGSW (SEQ ID NO:8)

[0031] LCDR2: ASS (SEQ ID NO:9)

[0032] LCDR3: QQYDIYPFT (SEQ ID NO:10)

[0033] 本发明的抗体H5L10具有LCDR1-3:

[0034] 其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列如下:

[0035] LCDR1: QSVGSW (SEQ ID NO:19)

[0036] LCDR2: ASN (SEQ ID NO:21)

[0037] LCDR3: QQYNIYPYT (SEQ ID NO:22)

- [0038] 本发明的抗体H5L11、H5L12具有相同的LCDR1-3：
[0039] 其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列如下：
[0040] LCDR1: QSVSSW (SEQ ID NO:20)
[0041] LCDR2: ASN (SEQ ID NO:21)
[0042] LCDR3: QQYNIYPYT (SEQ ID NO:22)
[0043] 本发明的抗体H5L14具有LCDR1-3：
[0044] 其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列如下：
[0045] LCDR1: QSVSSW (SEQ ID NO:20)
[0046] LCDR2: ASN (SEQ ID NO:21)
[0047] LCDR3: QQYNIYPFT (SEQ ID NO:23)
[0048] 本发明的抗体H8L15具有HCDR1-3和LCDR1-3：
[0049] 其重链可变区的3个HCDR区的氨基酸序列如下：
[0050] HCDR1: GYTFTSYW (SEQ ID NO:26)
[0051] HCDR2: MSPVDSDI (SEQ ID NO:4)
[0052] HCDR3: ARRRPGQGYFDF (SEQ ID NO:5)
[0053] 其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列如下：
[0054] LCDR1: QSVGTW (SEQ ID NO:27)
[0055] LCDR2: AAS (SEQ ID NO:28)
[0056] LCDR3: QQYNIYPYT (SEQ ID NO:22)。
[0057] 由此提供了下述发明：
[0058] 本发明的一个方面涉及抗体或其抗原结合片段，优选特异性结合人IL-12/IL-23 p40，其中：
[0059] (1) 所述抗体包含：
[0060] SEQ ID NO:1所示的重链可变区包含的HCDR1，HCDR2和HCDR3，优选地HCDR1包含SEQ ID NO:3所示的序列，与所述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)的氨基酸序列，或由其组成，HCDR2包含SEQ ID NO:4所示的序列，与所述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)的氨基酸序列，或由其组成，和
[0061] HCDR3包含SEQ ID NO:5所示的序列，与所述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，

97%，98%或99%序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)的氨基酸序列，或由其组成，并且所述抗体还包含：

[0062] SEQ ID NO:6所示的轻链可变区包含的LCDR1，LCDR2和LCDR，优选地，LCDR1包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸，或与所述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)的氨基酸序列，或由其组成，LCDR2包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列，与所述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)的氨基酸序列，或由其组成，和

[0063] LCDR3包含SEQ ID NO:10所示的序列，与所述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)的氨基酸序列，或由其组成。

[0064] (2)所述抗体包含：

[0065] SEQ ID NO:1所示的重链可变区包含的LCDR1，LCDR2和LCDR，优选地，HCDR1包含SEQ ID NO:3所示的序列，与所述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)的氨基酸序列，或由其组成，HCDR2包含SEQ ID NO:4所示的序列，与所述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)的氨基酸序列，或由其组成，和HCDR3包含SEQ ID NO:5所示的序列，与所述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)的氨基酸序列，或由其组成，并且所述抗体还包含：

[0066] SEQ ID NO:11所示的轻链可变区包含的LCDR1，LCDR2和LCDR，优选地，LCDR1包含SEQ ID NO:19所示的氨基酸，或与所述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)的氨基酸序列，或由其组成，

[0067] LCDR2包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列，与所述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)的氨基酸序列，或由其组成，和

[0068] LCDR3包含SEQ ID NO:22所示的序列,与所述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成。

[0069] (3)所述抗体包含:

[0070] SEQ ID NO:1所示的重链可变区包含的LCDR1,LCDR2和LCDR,优选地,HCDR1包含SEQ ID NO:3所示的序列,与所述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成,HCDR2包含SEQ ID NO:4所示的序列,与所述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成,和

[0071] HCDR3包含SEQ ID NO:5所示的序列,与所述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成,并且所述抗体还包含:

[0072] SEQ ID NO:13、15所示的轻链可变区包含的LCDR1,LCDR2和LCDR,优选地,LCDR1包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸,或与所述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成,

[0073] LCDR2包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,与所述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成,和

[0074] LCDR3包含SEQ ID NO:22所示的序列,与所述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成。

[0075] (4)所述抗体包含:

[0076] SEQ ID NO:1所示的重链可变区包含的LCDR1,LCDR2和LCDR,优选地,HCDR1包含SEQ ID NO:3所示的序列,与所述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成,HCDR2包含SEQ ID NO:4所示的序列,与所述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选

至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)的氨基酸序列，或由其组成，和HCDR3包含SEQ ID NO:5所示的序列，与上述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列，或与上述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)的氨基酸序列，或由其组成，并且所述抗体还包含：

[0077] SEQ ID NO:17所示的轻链可变区包含的LCDR1，LCDR2和LCDR，优选地，LCDR1包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸，或与上述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列，或与上述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)的氨基酸序列，或由其组成，

[0078] LCDR2包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列，与上述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列，或与上述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)的氨基酸序列，或由其组成，和

[0079] LCDR3包含SEQ ID NO:23所示的序列，与上述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列，或与上述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)的氨基酸序列，或由其组成。

[0080] (5)所述抗体包含：

[0081] SEQ ID NO:24所示的重链可变区包含的LCDR1，LCDR2和LCDR，优选地，HCDR1包含SEQ ID NO:26所示的序列，与上述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列，或与上述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)的氨基酸序列，或由其组成，HCDR2包含SEQ ID NO:4所示的序列，与上述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列，或与上述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)的氨基酸序列，或由其组成，和

[0082] HCDR3包含SEQ ID NO:5所示的序列，与上述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列，或与上述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换，插入或缺失)的氨基酸序列，或由其组成，并且所述抗体还包含：

[0083] SEQ ID NO:25所示的轻链可变区包含的LCDR1，LCDR2和LCDR，优选地，LCDR1包含SEQ ID NO:27所示的氨基酸，或与上述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列，或与上述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基

酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成,

[0084] LCDR2包含SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列,与上述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与上述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成,和

[0085] LCDR3包含SEQ ID NO:22所示的序列,与上述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与上述序列相比具有一个或多个(优选1个、2个或3个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成。

[0086] 在本发明一些实施方案中,所述抗体包括:

[0087] (1) 重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0088] SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,或

[0089] 与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或

[0090] 与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,和

[0091] 轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0092] SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列,或

[0093] 与SEQ ID NO:6所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或

[0094] 与SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列。

[0095] (2) 重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0096] SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,或

[0097] 与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或

[0098] 与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,和

[0099] 轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0100] SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,或

[0101] 与SEQ ID NO:11所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或

[0102] 与SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列。

[0103] (3) 重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

- [0104] SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,或
- [0105] 与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或
- [0106] 与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,和
- [0107] 轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:
- [0108] SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列,或
- [0109] 与SEQ ID NO:13所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或
- [0110] 与SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列。
- [0111] (4)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:
- [0112] SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,或
- [0113] 与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或
- [0114] 与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,和
- [0115] 轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:
- [0116] SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列,或
- [0117] 与SEQ ID NO:15所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或
- [0118] 与SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列。
- [0119] (5)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:
- [0120] SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,或
- [0121] 与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或
- [0122] 与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,和
- [0123] 轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:
- [0124] SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列,或
- [0125] 与SEQ ID NO:17所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或

[0126] 与SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列。

[0127] (6)重链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0128] SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,或

[0129] 与SEQ ID NO:24所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或

[0130] 与SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,和

[0131] 轻链可变区,其包含下述序列或由下述序列组成:

[0132] SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,或

[0133] 与SEQ ID NO:25所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或

[0134] 与SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列。

[0135] 在本发明的实施方案中,所述抗体还包含重链可变区的框架区FR,优选地,所述框架区FR包含FR-H1,FR-H2,FR-H3和FR-H4,其中FR-H1包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:29所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其列组成;FR-H2包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列或与SEQ ID NO:30所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成;FR-H3包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列或与SEQ ID NO:31所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成;FR-H4包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:32所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列或由其组成。

[0136] 在本发明的实施方案中,所述抗体还包含轻链可变区的框架区FR,优选地,所述框架区FR包含FR-L1,FR-L2,FR-L3和FR-L4,其中FR-L1包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列或与SEQ ID NO:33所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序

列,或与SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成;FR-L2包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列或与SEQ ID NO:34所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成;FR-L3包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列或与SEQ ID NO:35所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成;FR-L4包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列或与SEQ ID NO:36所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成。

[0137] 在本发明的实施方案中,所述抗体还包含轻链可变区的框架区FR,优选地,所述框架区FR包含FR-L1,FR-L2,FR-L3和FR-L4,其中FR-L1包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列或与SEQ ID NO:41所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成;FR-L2包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列或与SEQ ID NO:42所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成;FR-L3包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列或与SEQ ID NO:43所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成;FR-L4包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列或与SEQ ID NO:44所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成。

[0138] 在本发明的实施方案中,所述抗体还包含轻链可变区的框架区FR,优选地,所述框架区FR包含FR-L1,FR-L2,FR-L3和FR-L4,其中FR-L1包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列或与SEQ ID NO:33所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或

10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成;FR-L2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列或与SEQ ID NO:45所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成;FR-L3包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列或与SEQ ID NO:46所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成;FR-L4包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列或与SEQ ID NO:36所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成。

[0139] 在本发明的实施方案中,所述抗体还包含轻链可变区的框架区FR,优选地,所述框架区FR包含FR-L1,FR-L2,FR-L3和FR-L4,其中FR-L1包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列或与SEQ ID NO:33所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成;FR-L2包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列或与SEQ ID NO:47所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成;FR-L3包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列或与SEQ ID NO:46所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成;FR-L4包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列或与SEQ ID NO:36所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成。

[0140] 在本发明的实施方案中,所述抗体还包含轻链可变区的框架区FR,优选地,所述框架区FR包含FR-L1,FR-L2,FR-L3和FR-L4,其中FR-L1包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列或与SEQ ID NO:33所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成;FR-L2包含SEQ

ID NO:45的氨基酸序列或与SEQ ID NO:45所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成;FR-L3包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列或与SEQ ID NO:48所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成;FR-L4包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列或与SEQ ID NO:36所示的序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成。

[0141] 在本发明的实施方案中,所述抗体包含SEQ ID NO:39所示的重链和SEQ ID NO:40所示的轻链,或由SEQ ID NO:39所示的重链和SEQ ID NO:40所示的轻链组成。

[0142] 在本发明的实施方案中,所述抗体包含SEQ ID NO:49所示的重链和SEQ ID NO:50所示的轻链,或由SEQ ID NO:49所示的重链和SEQ ID NO:50所示的轻链组成。

[0143] 在本发明的实施方案中,所述抗体包含SEQ ID NO:49所示的重链和SEQ ID NO:51所示的轻链,或由SEQ ID NO:49所示的重链和SEQ ID NO:51所示的轻链组成。

[0144] 在本发明的实施方案中,所述抗体包含SEQ ID NO:49所示的重链和SEQ ID NO:52所示的轻链,或由SEQ ID NO:49所示的重链和SEQ ID NO:52所示的轻链组成。

[0145] 在本发明的实施方案中,所述抗体包含SEQ ID NO:49所示的重链和SEQ ID NO:53所示的轻链,或由SEQ ID NO:49所示的重链和SEQ ID NO:53所示的轻链组成。

[0146] 在本发明的实施方案中,所述抗体包含SEQ ID NO:49所示的重链和SEQ ID NO:54所示的轻链,或由SEQ ID NO:49所示的重链和SEQ ID NO:54所示的轻链组成。

[0147] 在本发明的一个方面,涉及分离的多肽,其包含SEQ ID NO:3,4和5所示的序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:8,9和10所示的序列。

[0148] 在本发明的一个方面,涉及分离的多肽,其包含SEQ ID NO:8,9和10所示的序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:3,4和5所示的序列。

[0149] 在本发明的一个方面,涉及分离的多肽,其包含SEQ ID NO:3,4和5所示的序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:19,21和22所示的序列。

[0150] 在本发明的一个方面,涉及分离的多肽,其包含SEQ ID NO:19,21和22所示的序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:3,4和5所示的序列。

[0151] 在本发明的一个方面,涉及分离的多肽,其包含SEQ ID NO:3,4和5所示的序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23

p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:20,21和22所示的序列。

[0152] 在本发明的一个方面,涉及分离的多肽,其包含SEQ ID NO:20,21和22所示的序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:3,4和5所示的序列。

[0153] 在本发明的一个方面,涉及分离的多肽,其包含SEQ ID NO:3,4和5所示的序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:20,21和23所示的序列。

[0154] 在本发明的一个方面,涉及分离的多肽,其包含SEQ ID NO:20,21和23所示的序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:3,4和5所示的序列。

[0155] 在本发明的一个方面,涉及分离的多肽,其包含SEQ ID NO:26,4和5所示的序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:27,28和22所示的序列。

[0156] 在本发明的一个方面,涉及分离的多肽,其包含SEQ ID NO:27,28和22所示的序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:26,4和5所示的序列。

[0157] 在本发明的一个方面,涉及分离的多肽,其包含SEQ ID NO:1或24所示的序列或与所述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:6、11、13、15、17或25所示的序列或与所述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列;或者

[0158] 涉及分离的多肽,其包含SEQ ID NO:6、11、13、15、17或25所示的序列或与所述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:1或24所示的序列或与所述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列;或者

[0159] 在本发明的实施方案中,所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、Fab/c、互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例如,scFv)、双价抗体、结构域抗体。

[0160] 在本发明的实施方案中,所述抗体是人源化抗体、嵌合抗体、多特异性抗体(例如

双特异性抗体)。

[0161] 在本发明的实施方案中,所述抗体以小于大约 10^{-5} M,例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或更小的 K_D 结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域。优选地,所述 K_D 通过Fortebio分子相互作用仪测得。

[0162] 在本发明的实施方案中,所述抗体以小于大约100nM,例如小于大约10nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM、0.1nM或更小的EC50结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域。具体地,所述EC50通过间接ELISA方法测得。

[0163] 在本发明的实施方案中,所述抗体包括恒定区,且所述恒定区来自不是鼠类的物种,例如来自人抗体,优选来自人IgG,更优选IgG1。

[0164] 在本发明的实施方案中,所述抗体的恒定区是人源化的,例如,重链恒定区均采用Ig gamma-1 chain C region,更优选GenBank登记号为ACCESSION:P01857的Iggamma-1链C区;轻链恒定区均采用Ig kappa chain C region,更优选GenBank登记号为ACCESSION:P01834的Ig kappa链C区。

[0165] 本发明的另一方面涉及编码多肽的分离的多核苷酸,所述多肽包含SEQ ID NO:3,4和5所示的序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:8,9和10所示的序列。

[0166] 在本发明的一个方面,涉及编码多肽的分离的多核苷酸,所述多肽包含SEQ ID NO:8,9和10所示的序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:3,4和5所示的序列。

[0167] 本发明的另一方面涉及编码多肽的分离的多核苷酸,所述多肽包含SEQ ID NO:3,4和5所示的序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:19,21和22所示的序列。

[0168] 在本发明的一个方面,涉及编码多肽的分离的多核苷酸,所述多肽包含SEQ ID NO:19,21和22所示的序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:3,4和5所示的序列。

[0169] 本发明的另一方面涉及编码多肽的分离的多核苷酸,所述多肽包含SEQ ID NO:3,4和5所示的序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:20,21和22所示的序列。

[0170] 在本发明的一个方面,涉及编码多肽的分离的多核苷酸,所述多肽包含SEQ ID NO:20,21和22所示的序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:3,4和5所示的序列。

[0171] 本发明的另一方面涉及编码多肽的分离的多核苷酸,所述多肽包含SEQ ID NO:3,4和5所示的序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:20,21和23所示的序列。

[0172] 在本发明的一个方面,涉及编码多肽的分离的多核苷酸,所述多肽包含SEQ ID NO:20,21和23所示的序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:3,4和5所示的序

列。

[0173] 本发明的另一方面涉及编码多肽的分离的多核苷酸,所述多肽包含SEQ ID NO:26,4和5所示的序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:27,28和22所示的序列。

[0174] 在本发明的一个方面,涉及编码多肽的分离的多核苷酸,所述多肽包含SEQ ID NO:27,28和22所示的序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:26,4和5所示的序列。

[0175] 在本发明的一个方面,涉及编码多肽的分离的多核苷酸,所述多肽包含SEQ ID NO:1或24所示的序列或与所述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:6、11、13、15、17或25所示的序列或与所述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列;或

[0176] 涉及编码多肽的分离的多核苷酸,所述多肽包含SEQ ID NO:6、11、13、15、17或25所示的序列或与所述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列,其中所述多肽作为抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体的一部分,特异性结合人IL-12/IL-23 p40蛋白域,所述抗体还包含SEQ ID NO:1或24所示的序列或与所述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)保守氨基酸突变(优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列。

[0177] 具体地,所述多核苷酸包含下述序列或由下述序列组成:SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列,或与所述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列。

[0178] 具体地,所述多核苷酸包含下述序列或由下述序列组成:SEQ ID NO:7所示的核苷酸序列或与所述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列。

[0179] 具体地,所述多核苷酸包含下述序列或由下述序列组成:SEQ ID NO:12所示的核苷酸序列,或与所述序列具有至少80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,优选至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列。

[0180] 具体地,所述多核苷酸包含下述序列或由下述序列组成:SEQ ID NO:14所示的核

昔酸序列或与所述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列。

[0181] 具体地，所述多核苷酸包含下述序列或由下述序列组成：SEQ ID NO:16所示的核苷酸序列，或与所述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列。

[0182] 具体地，所述多核苷酸包含下述序列或由下述序列组成：SEQ ID NO:18所示的核苷酸序列或与所述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列。

[0183] 具体地，所述多核苷酸包含下述序列或由下述序列组成：SEQ ID NO:37所示的核苷酸序列，或与所述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列。

[0184] 具体地，所述多核苷酸包含下述序列或由下述序列组成：SEQ ID NO:38所示的核苷酸序列或与所述序列具有至少80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列。

[0185] 本发明的再一方面涉及一种载体，其包含本发明中如上所述任一个的多核苷酸。

[0186] 本发明的再一方面涉及一种宿主细胞，其包含本发明中如上所述任一个的多核苷酸，或者本发明的载体。

[0187] 本发明的再一方面涉及一种制备本发明中如上所述任一个的抗体或其抗原结合片段的方法，其包括在合适的条件下培养本发明的宿主细胞，以及从细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段的步骤。

[0188] 在本发明的一个方面，还提供了抗体偶联物，其包括所述抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体或其抗原结合片段，以及与其偶联的偶联部分，所述偶联部分为纯化标签(如His标签)、细胞毒性剂，或可检测的标记。优选地，所述偶联部分为放射性同位素、发光物质、有色物质、酶或聚乙二醇。

[0189] 在本发明的一个方面，还提供了融合蛋白，其包括如上文任一个所述的抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的抗体或其抗原结合片段。

[0190] 在本发明的一个方面，提供了多特异性抗体，优选双特异性抗体，其包含本发明所述的抗体或其抗原结合片段。

[0191] 在本发明的一个方面，还提供了试剂盒，其包括本发明中如上所述任一个的抗体或其抗原结合片段，本发明的抗体偶联物，融合蛋白或多特异性抗体。

[0192] 优选地，所述试剂盒还包括第二抗体，其特异性识别所述抗体或其抗原结合片段；任选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如放射性同位素、发光物质、有色物质、酶或聚乙二醇。

[0193] 本发明的再一方面，涉及本发明如上所述任一个的抗体或其抗原结合片段，抗体

偶联物,融合蛋白或多特异性抗体在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测人IL-12/IL-23 p40在样品中的存在或其水平。

[0194] 本发明的再一方面,涉及一种药物组合物,其包含本发明中如上所述任一个的抗体或其抗原结合片段,抗体偶联物,多特异性抗体或融合蛋白;可选地,其还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0195] 本发明的再一方面,涉及如上所述任一个的抗体或其抗原结合片段,抗体偶联物,多特异性抗体,融合蛋白或药物组合物在制备如下药物中的用途:

[0196] 阻断人IL-12/IL-23 p40与人IL-12R β 1或人IL-23R结合的药物,

[0197] 阻断人IL-12/IL-23 p40活性或下调其水平的药物,或者

[0198] 阻断人IL-12R β 1或人IL-23R与p40结合所介导的细胞学反应的药物;

[0199] 优选地,所述人IL-12/IL-23 p40的配体为人IL-12R β 1或人IL-23R。

[0200] 在本发明的一个方面,涉及如上所述任一个的抗体或其抗原结合片段,抗体偶联物,多特异性抗体,融合蛋白或药物组合物在制备治疗选自如下疾病的药物中的用途:自身免疫性疾病(如斑块性银屑病,系统性红斑狼疮)或溃疡性结肠炎(如难治性的或复发的)等。

[0201] 本发明的再一方面涉及一种在体内或体外方法,包括施加含有本发明所述的抗体或其抗原结合片段、抗体偶联物、多特异性抗体,融合蛋白或药物组合物的细胞的步骤,或给予有需求的受试者以有效量的本发明中如上所述任一个的抗体或其抗原结合片段,抗体偶联物,多特异性抗体,融合蛋白或药物组合物的步骤,所述方法选自如下各项:

[0202] 阻断人IL-12/IL-23 p40与配体IL-12R β 1或IL-23R的结合的方法,

[0203] 下调人IL-12/IL-23 p40活性或水平的方法,或者

[0204] 阻断人IL-12R β 1或人IL-23R与p40结合所介导的细胞学反应的方法;

[0205] 优选地,所述IL-12/IL-23 p40的配体为IL-12R β 1或IL-23R。

[0206] 在本发明的实施方案中,所述体外方法是非治疗目的的或诊断目的的。

[0207] 本发明的再一方面涉及本发明中如上所述任一个的抗体或其抗原结合片段,抗体偶联物,多特异性抗体,融合蛋白或药物组合物在制备预防和/或治疗和/或辅助治疗和/或诊断自身免疫性疾病(如斑块性银屑病,系统性红斑狼疮)或溃疡性结肠炎(如难治性的或复发的)的药物中的应用,或用于预防和/或治疗和/或辅助治疗和/或诊断自身免疫性疾病(如斑块性银屑病,系统性红斑狼疮)或溃疡性结肠炎(如难治性的或复发的)的应用。

[0208] 在本发明的实施方案中,所述药物为适于通过皮下注射、皮内注射、静脉内注射、肌肉注射或病灶内注射施用的形式。

[0209] 本发明的再一方面涉及预防和/或治疗和/或辅助治疗和/或诊断自身免疫性疾病(如斑块性银屑病,系统性红斑狼疮)或或溃疡性结肠炎(如难治性的或复发的)的方法,包括给需要的受试者施用本发明中如上所述任一个的抗体或其抗原结合片段,抗体偶联物,多特异性抗体,融合蛋白或药物组合物。

[0210] 本发明也提供了一种治疗患有溃疡性结肠炎的患者的方法,所述方法包括:(i)测量所述患者的样品中的人IL-12/IL-23 p40水平,其中所述患者是人IL-12/IL-23 p40阳性的,和(ii)给所述主体施用治疗有效量的抗人IL-12/IL-23 p40抗体或其抗原结合部分。

[0211] 本发明所述的溃疡性结肠炎可以是难治性的、复发性的。例如,在某些患者中,其

溃疡性结肠炎是复发性的;在某些患者中,其溃疡性结肠炎是难治性的。

[0212] 在本发明的一些实施方案中,所述患者先前已接受常规治疗或对生物制剂的反应不足、失去反应或不耐受。在一些具体实施方案中,所述已接受常规治疗或对生物制剂的反应不足、失去反应或不耐受,导致未能完全缓解或未能部分缓解。

[0213] 如本发明所用,H8L15H1L1是抗人IL-12/IL-23 p40单克隆抗体,其序列和结构可以参见专利文献(CN201910706137.1)。在所述H8L15H1L1单克隆抗体中,HCDR1包含序列GYTFTSYW (SEQ ID NO:3),HCDR2包含序列MSPVDSDI (SEQ ID NO:4),HCDR3包含序列ARRRPGQGYFDF (SEQ ID NO:5),LCDR1包含序列QSVGTW (SEQ ID NO:6),LCDR2包含序列AAS (SEQ ID NO:7),LCDR3包含序列QQYNIYPYT (SEQ ID NO:8)。

[0214] 在本发明中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且,本发明中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时,为了更好地理解本发明,下面提供相关术语的定义和解释。

[0215] 如本发明中所使用的,术语“抗原结合区”意指特异性结合指定抗原的蛋白或蛋白的部分。例如,含有与抗原相互作用并对抗体赋予其对于抗原的特异性和亲和力的氨基酸残基的抗体的该部分被称为“抗原结合区”。抗原结合区通常包括一或多个“互补决定区”(complementarity-determining region,CDR)。某些抗原结合区还包括一个或多个“框架”区(framework region,FR)。CDR是促成抗原结合特异性和亲和力的氨基酸序列。

[0216] 如本发明中所使用的,术语“抗体”是指任何同种型的完整免疫球蛋白或可与完整抗体竞争对靶抗原的特异性结合的其抗原结合片段,并且包括,例如嵌合抗体、人源化抗体、全人源化抗体和双特异性抗体或其抗原结合片段。这样的“抗体”是抗原结合蛋白的种类。完整抗体通常包含至少两个全长重链和两个全长轻链,但在一些情况下,可包括更少的链,诸如可只包含重链的天然存在于骆驼科动物中的抗体。抗体或其抗原结合片段可只来源于单个来源,或可以是“嵌合的”,即,抗体的不同部分可来源于如下文中进一步描述的两个不同来源。抗体或其抗原结合片段可通过重组DNA技术在杂交瘤中产生,或通过完整抗体的酶促或化学切割来产生。除非另外指出,否则术语“抗体”,除了包含两个全长重链和两个全长轻链的抗体外,还包括其衍生物、变体和片段。

[0217] 如本发明中所使用的,术语“抗体”或“免疫球蛋白链(重链或轻链)”的“抗原结合片段”(或简称“片段”),包含缺乏至少一些存在于抗体全长链中的氨基酸但能够特异性结合抗原的抗体的部分(无论如何获得或合成该部分)。此类片段具有生物活性,因为它们特异性结合靶抗原并且可与其它抗体或其抗原结合片段竞争对给定的表位的特异性结合。在一个方面,此类片段将保留至少一个存在于抗体全长轻链或重链中的CDR,并且在一些实施方案中将包含单个重链和/或轻链或其部分。这些生物活性片段可通过重组DNA技术产生,或可以例如通过完整抗体的酶促或化学切割产生。免疫功能性免疫球蛋白片段包括,但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fd、dAb、Fab/c、互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例如,scFv)、双价抗体和结构域抗体,并且可来源于任何哺乳动物来源,包括但不限于人、小鼠、大鼠、骆驼科动物或兔。还设想本文中公开的抗体的功能性部分例如一个或多个CDR可被共价地结合于第二蛋白或小分子以生成导向身体中的特定靶的治疗剂,从而具有双功能治疗性质或

具有延长的血清半衰期,例如融合蛋白。

[0218] 如本发明中所使用的,术语“抗体全长链”、“全长抗体”、“完整抗体(intact antibody)”和“全抗体(whole antibody)”在本文中可互换地用来指这样的抗体,所述抗体具有基本上与天然抗体结构相似的结构或具有如本文定义的Fc区的重链。

[0219] 术语“轻链”包括全长轻链和其具有充足的可变区序列来赋予结合特异性的片段。全长轻链包括可变区结构域 V_L 和恒定区结构域 C_L 。轻链的可变区结构域在多肽的氨基末端。轻链包括 κ 链和 λ 链。

[0220] 术语“重链”包括全长重链和其具有充足的可变区序列来赋予结合特异性的片段。全长重链包括可变区结构域 V_H 和3个恒定区结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 。 V_H 结构域在多肽的氨基末端,并且 C_{H1} 结构域在羧基末端, C_{H3} 最靠近多肽的羧基末端。重链可具有任何同种型,包括IgG(包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4亚型)、IgA(包括IgA1和IgA2亚型)、IgM和IgE。

[0221] 如本发明中所使用的,术语“Fab片段”由一条轻链和 C_{H1} 以及一条重链的可变区组成。Fab分子的重链不能与另一条重链分子形成二硫键。

[0222] 如本发明中所使用的,术语“Fc”区含有两个包含抗体的 C_{H1} 和 C_{H2} 结构域的重链片段。两个重链片段通过两个或更多个二硫键以及通过 C_{H3} 结构域的疏水相互作用保持在一起。

[0223] 如本发明中所使用的,术语“Fab'片段”含有一条轻链和一条重链的部分(其含有 V_H 结构域和 C_{H1} 结构域以及还有 C_{H1} 与 C_{H2} 结构域之间的区域的部分),以便可在两个Fab'片段的二条重链之间形成链间二硫键以形成 $F(ab')_2$ 分子。

[0224] 如本发明中所使用的,术语“ $F(ab')_2$ 片段”含有二条轻链和二条含有 C_{H1} 与 C_{H2} 结构域之间的恒定区的部分的重链,以便在二条重链之间形成链间二硫键。 $F(ab')_2$ 片段从而由通过二条重链之间的二硫键保持在一起的两个Fab'片段组成。

[0225] 如本发明中所使用的,术语“Fv区”包含来自重链和轻链的可变区,但缺乏恒定区。

[0226] 如本发明中所使用的,术语“Fd”片段意指由 V_H 和 C_{H1} 结构域组成的抗体片段(Ward等人,Nature 341:544-546(1989))。

[0227] 如本发明中所使用的,术语“dAb”片段(Ward等人,Nature 341:544-546(1989))由 V_H 结构域组成。

[0228] 如本发明中所使用的,术语“Fab'-SH”是本文对Fab'的命名,其中恒定结构域的一个或多个半胱氨酸残基携带游离硫醇基团。

[0229] 如本发明中所使用的,术语“Fab/c”片段是免疫球蛋白经胃蛋白酶消化形成的抗体裂解中间产物,其兼有Fab和Fc区的优点,即具有扩散能力强,体内代谢清除慢的特点,并能保持高度亲和力(刘建军,《细胞与分子免疫学杂志》,1989(4):29-29)。

[0230] 如本发明中所使用的,术语“单链抗体”是其中重链与轻链可变区通过柔性接头连接来形成单条多肽链(其形成抗原结合区)的Fv分子(参见,例如,Bird等人,Science 242:423-426(1988)和Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.90:5879-5883(1988))。单链抗体在国际专利申请公开号W088/01649和美国专利U.S.Patent 4,946,778和U.S.Patent 5,260,203(所述国际专利申请公开号和美国专利号的公开内容通过引用并入)中进行了详细描述。

[0231] 如本发明中所使用的,术语“结构域抗体”是只含有重链的可变区或轻链的可变区

的免疫功能性免疫球蛋白片段。在一些情况下,两个或更多个 V_H 区通过肽接头共价地连接,以生成多价结构域抗体(特别是双价结构域抗体)。双价结构域抗体的两个 V_H 区可靶向相同或不同的抗原。

[0232] 如本发明中所使用的,术语“双价抗原结合蛋白”或“双价抗体”包含两个抗原结合位点。在一些情况下,两个结合位点具有相同抗原特异性。双价抗体可以是双特异性的。

[0233] 如本发明中所使用的,术语“多特异性抗原结合蛋白”或“多特异性抗体”是靶向不止一种抗原或表位的抗原结合蛋白或抗体。

[0234] 如本发明中所使用的,术语“双特异性”、“双重特异性”或“双功能性”抗原结合蛋白或抗体是分别具有两个不同的抗原结合位点的杂交抗原结合蛋白或抗体。双特异性抗体是一种多特异性抗原结合蛋白或多特异性抗体,并且可通过多种方法产生,包括,但不限于杂交瘤的融合或Fab'片段的连接。参见,例如,Songsivilai和Lachmann,1990, Clin.Exp.Immunol.79:315-321;Kostelny等人,1992, J.Immunol.148:1547-1553。双特异性抗原结合蛋白或抗体的两个结合位点将结合两个不同的表位,所述表位存在于相同或不同的蛋白质靶标上。

[0235] 如本发明中所使用的,术语“单抗”和“单克隆抗体”是指,来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片段,也即除可能自发出现的自然突变外,一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的,其通常包含至少2种或更多种的不同抗体,这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用Kohler等首次报道的杂交瘤技术获得(Nature 256:495, 1975),但也可采用重组DNA技术获得(如参见U.S.Patent 4,816,567)。

[0236] 如本发明中所使用的,术语“人源化抗体”是指,人源免疫球蛋白(受体抗体)的全部或部分CDR区被一非人源抗体(供体抗体)的CDR区替换后得到的抗体或抗体片段,其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性的非人源(例如,小鼠、大鼠或兔)抗体。此外,受体抗体的框架区(FR)的一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换,或被其他抗体的氨基酸残基替换,以进一步完善或优化抗体的性能。关于人源化抗体的更多详细内容,可参见例如,Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); Presta, Curr.Op.Struct.Biol., 2:593-596 (1992); 和Clark, Immunol.Today 21:397-402 (2000)。

[0237] 如本发明中所使用的,术语“表位”是指,抗原上被免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。“表位”在本领域内也称为“抗原决定簇”。表位或抗原决定簇通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链组成并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如,表位通常以独特的空间构象包括至少3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14或15个连续或非连续的氨基酸,其可以是“线性的”或“构象的”。参见,例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,G.E.Morris,Ed.(1996)。在线性表位中,蛋白质与相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中,相互作用的点跨越彼此分开的蛋白质氨基酸残基而存在。

[0238] 术语“多肽”或“蛋白质”在本文中用于指氨基酸残基的聚合物。术语还用于其中一个或多个氨基酸残基是对应的天然存在的氨基酸的类似物或模拟物的氨基酸聚合物,以及

用于天然存在的氨基酸聚合物。术语还可包括例如通过添加糖类残基以形成糖蛋白而被修饰的或磷酸化的氨基酸聚合物。多肽和蛋白质可由天然存在的细胞和非重组细胞产生；或其由基因工程或重组细胞产生，并且包含具有天然蛋白质的氨基酸序列的分子，或具有天然序列的一个或多个氨基酸的缺失、添加和/或取代的分子。

[0239] 具体地，术语“多肽”和“蛋白质”包括抗体，例如抗人p40抗体（也称为p40抗体）、p40结合蛋白、具有抗原结合蛋白的一个或多个氨基酸的缺失、添加和/或取代的抗体或序列。

[0240] 术语“多肽片段”是指相较于全长蛋白质具有氨基末端缺失、羧基末端缺失和/或内部缺失的多肽。此类片段还可相较于全长蛋白质含有经修饰的氨基酸。在某些实施方案中，片段的长度为约5至500个氨基酸。例如，片段的长度可为至少5、6、8、10、14、20、50、70、100、110、150、200、250、300、350、400或450个氨基酸。有用的多肽片段包括抗体的免疫功能片段，包括结合结构域。在人p40抗体的情况下，有用的片段包括但不限于CDR区、重链或轻链的可变结构域、抗体链的部分或正好包括其2个CDR的可变结构域等。

[0241] 多肽的“衍生物”是以与插入、缺失或取代变体不同的方式，例如通过另一种化学部分的缀合而化学修饰的多肽（例如，抗原结合蛋白或抗体），例如缀合PEG的多肽。

[0242] 如本发明中所使用的，术语“分离的”或“被分离的”指的是，从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分，那么可能是其所处的天然环境发生了改变，或从天然环境下分离出该物质，或二者情况均有发生。例如，某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽，而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”或“被分离的”不排除混有人工或合成的物质，也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

[0243] 如本发明中所使用的，术语“载体(vector)”是指，可将多核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC)；噬菌体如 λ 噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如SV40)。一种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。

[0244] 如本发明中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，如大肠杆菌或枯草杆菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如S2果蝇细胞或Sf9等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO细胞，COS细胞，NS0细胞，HeLa细胞，BHK细胞，HEK293细胞或人细胞等的动物细胞。

[0245] 如本发明中使用的，术语“特异性结合”是指，两分子间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。在某些实施方式中，特异性结合某抗原的抗体(或对某抗原具有特异性的抗体)是指，抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或更小的亲和力(K_D)结合该抗原。

[0246] 如本发明中所使用的,术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数,其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。在分子结合动力学测定的几个参数中, K_D 值为解离平衡常数,在抗体药物研究中,是表征被测抗体与靶抗原分子亲和作用的强弱的参数,计算方法为 $K_D = k_{dis}/k_{on}$,解离平衡常数越小,抗体-抗原结合越紧密,抗体与抗原之间的亲和力越高。 k_{on} ,结合速率常数=抗原抗体复合物形成的速率, k_{on} 愈小提示抗体与抗原结合的速度愈快; k_{dis} ,解离速率常数=抗体从抗原-抗体复合物中解离的速率, k_{dis} 愈小即抗体从抗原上脱离的速度愈慢,抗体与抗原结合越稳固。通常,抗体以小于大约 $10^{-5}M$,例如小于大约 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 或 $10^{-10}M$ 或更小的解离平衡常数(K_D)结合抗原(例如,L1蛋白),例如,如使用生物膜干涉技术(BLI)在Fortebio分子相互作用仪中测定的。

[0247] 如本文所用,术语“EC50”是指有效浓度,抗体的50%最大应答。

[0248] 如本发明中所使用的,术语“单克隆抗体”和“单抗”具有相同的含义且可互换使用;术语“多克隆抗体”和“多抗”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中,氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如,丙氨酸可用A或Ala表示。

[0249] 如本文中使用的,术语“百分比序列同一性”与“百分比序列同源性”可互换使用。

[0250] 如本文中使用的,术语“相似性”或“序列相似性”、“同一性”是指两个或更多个蛋白质或多肽分子的序列之间的关系,如通过比对和比较序列测定的。“百分比同一性”意指被比较的分子中的氨基酸之间的相同残基的百分比,并且可基于待比较的最小的分子的大小来计算。为了进行这些计算,必须通过特定的数学模型或计算机程序(即,“算法”)来解决比对中的缺口(如果有的话)。当用于多肽时,术语“大体上的同一性”,是指两个肽序列,当例如使用程序GAP或BESTFIT,利用程序提供的缺省缺口权重,进行最佳对齐时,共有至少70%、75%或80%的序列同一性,至少90%或95%的序列同一性,和至少97%、98%或99%的序列同一性。在某些情况下,不相同的残基位点相异在于保守氨基酸置换。“保守氨基酸置换”是这样的置换,即其中氨基酸残基被具有拥有相似化学性质(例如,电荷或亲疏水性)的侧链R基团的另一个氨基酸残基置换。一般地,保守氨基酸置换将基本上不改变蛋白质的功能性质。在其中两个或更多个氨基酸序列彼此相异在于保守置换的情况下,可上调百分比序列同一性以就置换的保守性质进行修正。用于进行该调整的方法对于本领域技术人员来说是熟知的。参见例如Pearson,Methods Mol.Biol.243:307-31(1994)。具有拥有相似化学性质的侧链的氨基酸组的实例包括1)脂肪族羟基侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;2)脂肪族羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3)含酰胺侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;4)芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸;和7)含硫侧链:半胱氨酸和甲硫氨酸。例如,保守氨基酸置换组是缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸-丙氨酸-甘氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、苏氨酸-丝氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0251] 可选择地,保守置换是在Gonnet等人,Science 256:1443-45(1992)(通过引用合并入本文)中公开的PAM250对数似然矩阵(PAM250 log-likelihood matrix)中具有正值的任何变化。“中度保守的”置换是在PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0252] 通常使用序列分析软件测量多肽的序列同一性。蛋白质分析软件使用分配给不同置换、缺失和其他修饰(包括保守氨基酸置换)的相似性的量度来匹配序列。例如,GCG包括程序例如“Gap”和“Bestfit”,所述程序(使用由程序指定的缺省参数)可用于测定密切相关

的多肽(例如来自不同生物物种的同源多肽)之间或野生型蛋白质与其突变蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见,例如,GCG Version 6.1(University of Wisconsin,WI)。还可使用缺省或推荐的参数利用FASTA比较多肽序列,参见GCG Version 6.10 FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)提供质询序列与搜索序列之间最佳重叠的区域的比对和百分比序列同一性(Pearson,Methods Enzymol.183:63-98(1990);Pearson,Methods Mol.Biol.132:185-219(2000))。当将序列与含有大量来自不同生物的序列的数据库相比较时,另一个优选算法是计算机程序BLAST,特别地,blastp或blastn(使用程序提供的缺省参数)。参见,例如,Altschul等人,Mol.Biol.215:403-410(1990);Altschul等人,Nucleic Acids Res.25:3389-402(1997)。

[0253] 术语“治疗”一般是指获得需要的药理和/或生理效应的操作。该效应根据完全或部分地预防疾病或其症状,可以是预防性的;和/或根据部分或完全稳定或治愈疾病和/或由于疾病产生的副作用,可以是治疗性的。本文使用的“治疗”涵盖了对患者疾病的任何治疗,包括:(a)预防易感染疾病或症状但还没诊断出患病的患者所发生的疾病或症状;(b)抑制疾病的症状,即阻止其发展;或(c)缓解疾病的症状,即,导致疾病或症状退化。

[0254] 如本文所用,术语“全身治疗”是指药物物质通过血流传送,到达并影响全身细胞的治疗。

[0255] 如本文所用,术语“系统化疗”是指不包括作为多模式治疗的一个环节针对局部晚期疾病进行的化疗的全身化疗,其中,针对局部晚期疾病进行的化疗包括诱导化疗、放疗同期的化疗以及辅助化疗。

[0256] 如本文所用,术语“受试者”(在本发明中有时也表示为“患者”)表示哺乳动物,诸如啮齿动物、猫科动物、犬科动物和灵长类动物。优选地,本发明的受试者是人。

[0257] “施用”表示使用本领域技术人员已知的多种方法和递送系统中的任一种,向受试者物理引入包含治疗剂的组合物。自身免疫病相关因子抑制剂(例如,抗人IL-12/IL-23 p40抗体)的施用途径包括静脉内、肌肉内、皮下、腹膜内、脊柱或其它胃肠外施用途径,例如通过注射或输注。本文中使用的短语“胃肠外施用”是指,通常通过注射进行的除了肠内和局部施用以外的施用模式,且包括但不限于,静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、淋巴管内、病灶内、囊内、眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注、以及体内电穿孔。在某些实施方案中,所述自身免疫病相关因子抑制剂(例如,抗人IL-12/IL-23 p40抗体)通过非胃肠外途径施用,在某些实施方案中,口服施用。其它非胃肠外途径包括局部、表皮或粘膜施用途径,例如,鼻内地、阴道地、直肠地、舌下地或局部地。还可以执行施用,例如,一次、多次,和/或在一个或多个延长的时间段中。

[0258] “受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括但不限于脊椎动物诸如非人灵长类动物、绵羊、狗,和啮齿类动物诸如小鼠、大鼠和豚鼠。在某些实施方案中,所述受试者是人。术语“受试者”和“患者”在本文中可互换地使用。

[0259] 术语“约”、“大约”或“基本上包含”表示在本领域普通技术人员确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成,其将部分地取决于如何测量或测定值或组成,即,测量系统的限制。例如,“约”、“大约”或“基本上包含”可以是指按本领域中的实践,在1个或超过1个标准差内。可替换地,“约”或“基本上包含”可以是指与由其修饰的参数或数值相差至多

10%或20% (即, $\pm 10\%$ 或 $\pm 20\%$) 的范围。例如, 约3mg可以包括2.7mg至3.3mg之间 (对于10%) 或2.4mg至3.6mg (对于20%) 之间的任何数字。

[0260] 施用方式

[0261] 下述内容并非限制本申请药物的施用方式。

[0262] 在一个实施方案中, 本申请的药物可以配制成适合于单次或多次施用的药物组合物。

[0263] 本申请的药物以适合的各种途径施用, 包括但不限于, 口服或肠胃外 (通过静脉内、肌内、局部或皮下途径)。在一些实施方案中, 本申请的药物口服施用或注射施用, 例如静脉注射或腹腔注射。

[0264] 本申请的药物适合的剂型, 包括但不限于, 片剂、含片、丸剂、胶囊剂 (例如硬胶囊、软胶囊、肠溶胶囊、微囊剂)、酞剂、颗粒剂、糖浆剂、注射剂 (肌肉内、静脉内、腹腔内)、颗粒剂、乳剂、悬浮液、溶液、分散剂和用于口服或非口服给药的缓释制剂的剂型。

[0265] 本申请的药物含有药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0266] 发明的有益效果:

[0267] 本发明抗人IL-12/IL-23 p40蛋白域的人源化抗体能够与IL-12/IL-23 p40蛋白域特异性结合, 并且能有效地阻断IL-12/IL-23 p40蛋白域与细胞表面受体IL-12R β 1和IL-23R的结合, 抑制人IL-12/IL-23 p40蛋白域下游信号通路的激活, 抑制IL-23诱导的IL-17A的分泌。其中本发明的抗体与人p40结合活性明显优于对照抗体Ustekinumab及Ab123FR1。具有用于制备预防和治疗自身免疫疾病 (例如斑块性银屑病, 系统性红斑狼疮等) 和溃疡性结肠炎 (如难治性的或复发的) 的药物的潜力。同时, 具有良好的应用前景和 market 价值。

附图说明

[0268] 图1 H5L9和Ab123FR1与人IL-12/IL-23 p40蛋白域的结合活性检测结果。

[0269] 图2 H5L10和Ab123FR1与人IL-12/IL-23 p40蛋白域的结合活性检测结果。

[0270] 图3 H5L11、H5L12、H5L14和Ab123FR1与人IL-12/IL-23 p40蛋白域的结合活性检测结果。

[0271] 图4 H8L15和Ab123FR1与人IL-12/IL-23 p40蛋白域的结合活性检测结果。

[0272] 图5 H5L9与人IL-12/IL-23 p40蛋白域亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为5nM、2.5nM、1.25nM、0.75nM、0.31nM。

[0273] 图6 H5L10与人IL-12/IL-23 p40蛋白域亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为5nM、2.5nM、1.25nM、0.75nM、0.31nM。

[0274] 图7 H5L11与人IL-12/IL-23 p40蛋白域亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为5nM、2.5nM、1.25nM、0.75nM、0.31nM。

[0275] 图8 H5L12与人IL-12/IL-23 p40蛋白域亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为5nM、2.5nM、1.25nM、0.75nM、0.31nM。

[0276] 图9 H5L14与人IL-12/IL-23 p40蛋白域亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为5nM、2.5nM、1.25nM、0.75nM、0.31nM。

[0277] 图10 Ab123FR1与人IL-12/IL-23 p40蛋白域亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为5nM、2.5nM、1.25nM、0.75nM、0.31nM。

[0278] 图11 H8L15与人IL-12/IL-23 p40蛋白域亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为5nM、2.5nM、1.25nM、0.75nM、0.31nM。

[0279] 图12 Ustekinumab与人IL-12/IL-23 p40蛋白域亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为5nM、2.5nM、1.25nM、0.75nM、0.31nM。

[0280] 图13 H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14和Ustekinumab抗体竞争性阻断人IL-12与293T-IL-12Rβ1&IL-23R细胞的结合 (FACS)。

[0281] 图14 H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14和Ustekinumab抗体竞争性阻断人IL-23与293T-IL-12Rβ1&IL-23R细胞的结合 (FACS)。

[0282] 图15 H8L15显著抑制自发系统性红斑狼疮小鼠脾脏细胞对IL-23诱导的IL-17A分泌的反应

[0283] 图16 H8L15显著缓解银屑病模型小鼠皮肤损伤

[0284] 图17各实验组溃疡性结肠炎病理评分统计结果图，H8L15显著缓解溃疡性结肠炎模型小鼠病理学改变及临床症状。

[0285] 图18实验小鼠体重变化图。

[0286] 图19 H8L15治疗DSS联合重组人IL-23诱导的结肠炎小鼠皮肤组织病理学观察演示图。

[0287] 图20 Ab123FR1、H8L15和Ustekinumab抗体竞争性阻断人IL-12与293T-IL-12Rβ1&IL-23R细胞的结合 (FACS)。

[0288] 图21 Ab123FR1、H8L15和Ustekinumab抗体竞争性阻断人IL-23与293T-IL-12Rβ1&IL-23R细胞的结合 (FACS)。

具体实施方式

[0289] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考J. 萨姆布鲁克等著，黄培堂等译的《分子克隆实验指南》，第三版，科学出版社)或按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，为可以通过市场购买获得的常规产品。

[0290] 在本发明的下述实施例中，使用的C57BL/6小鼠购自广东省医学实验动物中心。

[0291] 在本发明的下述实施例中，所用的IL-12 (Human IL12 (His Tag)) 购自义翘神州(货号:CT-050-H08H-20,批号:LC11MC2805)。

[0292] 在本发明的下述实施例中，所用的抗IL-12/IL-23 p40抗体Ab123FR1作为对照抗体，其制备方法参照中国授权专利，公开号:CN103275222B，生产自中山康方生物医药有限公司，序列如CN103275222B中的SEQ ID NO:3的第20位至468位所示和SEQ ID NO:4的第20位至233位所示。

[0293] 在本发明的下述实施例中，所用的同靶点已上市药物抗p40抗体Ustekinumab(商品名Stelara)作为对照抗体，购自强生。

[0294] 在本发明的下述实施例中，所用的293T-IL-12Rβ1&IL-23R细胞系由中山康方生物医药有限公司构建。293T-IL-12Rβ1&IL-23R细胞系由293T细胞经病毒感染制得，病毒制备使用的是3rd Generation Lentiviral Systems，参见，例如A Third Generation

Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L. *J Virol*. 1998. 72 (11) : 8463-8471. 其中所使用的慢病毒表达载体为pLenti-IL-12R β 1-BSD (其中IL-12R β 1, GenBank登录号: 3549; 载体pLenti-BSD, 购自 invitrogen, Cat#K497000) 和pCDH-IL-23R-puro (其中IL-23R, GenBank登录号: 149233; 载体pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro, 购自优宝生物, 产品编号: VT1480)。

[0295] 同型对照抗体为人抗鸡蛋溶酶体 (human anti-Hen Egg Lysozyme IgG, anti-HEL, 即human IgG, 简称hIgG1), 其序列来自于Acierno等人发表的Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies (Acierno等人. *J Mol Biol*. 2007; 374 (1) : 130-46., 其中重链的氨基酸序列为SEQ ID NO: 21所示, 轻链的氨基酸序列为SEQ ID NO: 22所示), 设计为本研究的同型对照抗体, 在中山康方生物医药有限公司实验室制备而成。

[0296] hIL-23重组蛋白 (其中IL-23, GeneBank, 登录号: 51561), 在中山康方生物医药有限公司实验室制备而成。

[0297] 以下实施例是对本发明的进一步说明, 而不是对本发明的限制。实施例1. 抗人p40的抗体H8L15的重链和轻链序列的设计, 表达和纯化

[0298] 1. 抗体的设计

[0299] 为制备抗人IL-12/IL-23 p40抗体H8L15, 本发明人基于IL-12/IL-23 p40蛋白域结构, 通过基于结构生物学的抗原-抗体结合的三维空间结构模拟技术, 抗体的CDR区和抗原之间的相互作用, 进行了量子模拟计算确定了抗体与抗原结合的CDR区域氨基酸序列; 同时, 以不影响CDR区的三维结构为基准对抗体框架部分做相应的优化, 最终得到了一种与人IL-12/IL-23 p40特异性结合的抗体H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14、H8L15。

[0300] 该抗体重链/轻链可变区的氨基酸序列及其编码DNA序列分别如下所示:

[0301] H5L9: 重链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO: 1所示, 其编码DNA序列为SEQ ID NO: 2所示;

[0302] H5L9: 轻链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO: 6所示, 其编码DNA序列SEQ ID NO: 7所示;

[0303] H5L10: 重链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO: 1所示, 其编码DNA序列为SEQ ID NO: 2所示;

[0304] H5L10: 轻链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO: 11所示, 其编码DNA序列SEQ ID NO: 12所示;

[0305] H5L11: 重链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO: 1所示, 其编码DNA序列为SEQ ID NO: 2所示;

[0306] H5L11: 轻链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO: 13所示, 其编码DNA序列SEQ ID NO: 14所示;

[0307] H5L12: 重链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO: 1所示, 其编码DNA序列为SEQ ID NO: 2所示;

[0308] H5L12: 轻链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO: 15所示, 其编码DNA序列SEQ ID NO: 16所示;

[0309] H5L14: 重链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO: 1所示, 其编码DNA序列为SEQ ID NO:

2所示;

[0310] H5L14:轻链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO:17所示,其编码DNA序列SEQ ID NO:18所示;

[0311] H8L15:重链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO:24所示,其编码DNA序列为SEQ ID NO:37所示;

[0312] H8L15:轻链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO:25所示,其编码DNA序列SEQ ID NO:38所示

[0313] 2. 抗体的表达和纯化

[0314] 将上述抗体例如H8L15的重链可变区的编码核苷酸序列(如SEQ ID NO:37所示;恒定区是Ig gamma-1 chain C region,ACCESSION:P01857)和轻链可变区的编码核苷酸序列(如SEQ ID NO:38所示;恒定区为Ig kappa chain C region,ACCESSION:P01834)分别克隆到pUC57simple载体(金斯瑞公司提供)中,分别获得含有H8L15的重链全长核苷酸的pUC57simple-H8L15H和含有H8L15的轻链全长核苷酸的pUC57simple-H8L15L质粒。

[0315] 分别将质粒pUC57simple-H8L15H和pUC57simple-H8L15L进行酶切(HindIII&EcoRI),电泳回收得到的重链/轻链核苷酸序列分别亚克隆到pcDNA3.1载体中,提取重组质粒共转染293F细胞。转染后的293F细胞培养7天后,将培养液高速离心,获得的上清浓缩后上样至HiTrap MabSelect SuRe柱,用洗脱液一步洗脱蛋白,回收目标样品。抗体样品保存于PBS溶液中。

[0316] 其它抗体的制备相同。本实施例制得的抗体H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14、H8L15用于下面的实施例2~4。

[0317] 实施例2.ELISA方法检测抗体H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14、H8L15、Ab123FR1及Ustekinumab与抗原人IL-12/IL-23 p40的结合活性

[0318] 用人p40-His(中山康方生物医药有限公司,p40的基因为GeneBank NM002187)包被酶标板,4℃孵育不少于12小时后使用PBST洗板,拍干后使用1%BSA的PBS溶液对酶标板进行封闭。封闭完成后用PBST洗板、拍干。在酶标板孔内加入PBST溶液梯度稀释的抗体,抗体稀释梯度详见表1。加入待测抗体的酶标板置于37℃条件下孵育30分钟,孵育完成后用PBST洗板、拍干。然后加入1:5000比例稀释的HR标记的羊抗人IgG(H+L)(购自Jackson ImmunoResearch Inc.,货号:109-035-088)二抗工作液,置于37℃条件下孵育30分钟。孵育完成后使用PBST洗板拍干,加入TMB(Neogen,308177)避光显色5min,加入终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中,选择450nm光波长读取酶标板各孔的OD数值。用SoftMax Pro 6.2.1软件对数据进行分析处理。

[0319] 检测抗体H5L9和Ab123FR1与抗原人p40-His结合的结果如图1所示。各剂量的OD值见表1。以抗体浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标进行曲线拟合,计算抗体的结合EC50,结果如下表1所示。

[0320] 检测抗体H5L10和Ab123FR1与抗原人p40-His结合的结果如图2所示。各剂量的OD值见表2。以抗体浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标进行曲线拟合,计算抗体的结合EC50,结果如下表2所示。

[0321] 检测抗体H5L11、H5L12、H5L14和Ab123FR1与抗原人p40结合的结果如图3所示。各剂量的OD值见表3。以抗体浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标进行曲线拟合,计算抗体的结

合 EC_{50} ,结果如下表3所示。

[0322] 检测抗体H8L15和Ab123FR1与抗原人p40-His结合的结果如图4所示。各剂量的OD值见表4。以抗体浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标进行曲线拟合,计算抗体的结合 EC_{50} ,结果如下表4所示。

[0323] 结果表明H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14、H8L15与抗原人p40-His的结合效率呈现剂量依赖关系,

[0324] 如图1和表1所示,H5L9与人p40-His结合的 EC_{50} 为0.079nM,Ab123FR1与人p40-His结合的 EC_{50} 为0.063nM。H5L9与Ab123FR1结合效率相当。

[0325] 如图2和表2所示,H5L10与人p40-His结合的 EC_{50} 为0.057nM,Ab123FR1与人p40-His结合的 EC_{50} 为0.051nM。H5L10与Ab123FR1结合效率相当。

[0326] 如图3和表3所示,H5L11,H5L12,H5L14,Ab123FR1与人p40-His结合的 EC_{50} 分别为0.082nM,0.082nM,0.107nM和1.181nM。H5L11、H5L12、H5L14结合效率都显著优于Ab123FR1。

[0327] 如图4和表4所示,H8L15,Ab123FR1,Ustekinumab与人p40-His结合的 EC_{50} 分别为0.059nM,0.074nM和0.077nM。Ab123FR1与Ustekinumab的结合效率相当,而H8L15结合效率显著优于Ab123FR1与Ustekinumab。

[0328] 表1 H5L9与人p40-His的结合活性检测结果

| 抗体浓度 ($\mu\text{g/mL}$) | 抗原包被: p40-His (0.125 $\mu\text{g/mL}$) | | | |
|------------------------------|---|-------|-------|-------|
| | Ab123FR1 | | H5L9 | |
| 1.000 | 2.884 | 2.863 | 2.817 | 2.860 |
| 0.333 | 2.818 | 2.838 | 2.864 | 2.776 |
| 0.111 | 2.806 | 2.833 | 2.768 | 2.831 |
| 0.037 | 2.543 | 2.650 | 2.318 | 2.463 |
| 0.012 | 1.751 | 1.792 | 1.649 | 1.622 |
| 0.004 | 0.849 | 0.918 | 0.801 | 0.820 |
| 0.001 | 0.357 | 0.441 | 0.386 | 0.497 |
| PBS | 0.046 | 0.046 | 0.052 | 0.052 |

| 第二抗体 | HRP 标记的羊抗人 IgG(H+L) (1:5000) | |
|-----------|------------------------------|-------|
| EC50 (nM) | 0.063 | 0.079 |

[0331] 表2 H5L10与人p40-His的结合活性检测结果

| 抗体浓度 ($\mu\text{g/mL}$) | 抗原包被: p40-His (0.125 $\mu\text{g/mL}$) | | | |
|------------------------------|---|-------|-------|-------|
| | Ab123FR1 | | H5L10 | |
| 1.000 | 3.070 | 3.071 | 3.052 | 3.094 |
| 0.333 | 3.074 | 3.081 | 3.066 | 3.030 |
| 0.111 | 3.085 | 3.043 | 2.977 | 3.022 |
| 0.037 | 2.853 | 2.788 | 2.794 | 2.784 |
| 0.012 | 2.164 | 1.894 | 1.981 | 2.104 |
| 0.004 | 1.229 | 0.935 | 1.058 | 1.030 |
| 0.001 | 0.532 | 0.438 | 0.490 | 0.464 |
| PBS | 0.062 | 0.059 | 0.059 | 0.057 |
| 第二抗体 | HRP 标记的羊抗人 IgG(H+L) (1:5000) | | | |
| EC50 (nM) | 0.051 | | 0.057 | |

[0332] 表3 H5L11、H5L12、H5L14与人p40的结合活性检测结果

| 抗体浓度 ($\mu\text{g/mL}$) | 抗原包被: p40-His (0.125 $\mu\text{g/mL}$) | | | | | | | | | |
|------------------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|-------|
| | H5L11 | | H5L12 | | H5L14 | | Ab123FR1 | | | |
| 1 | 2.474 | 2.410 | 2.518 | 2.542 | 2.475 | 2.429 | 2.386 | 2.342 | 2.353 | 2.282 |
| 0.3 | 2.472 | 2.409 | 2.541 | 2.473 | 2.576 | 2.471 | 1.815 | 1.736 | 1.801 | 1.862 |
| 0.1 | 2.392 | 2.382 | 2.486 | 2.371 | 2.488 | 2.386 | 0.864 | 0.946 | 0.971 | 1.091 |
| 0.03 | 2.132 | 2.074 | 2.096 | 2.111 | 1.995 | 1.964 | 0.356 | 0.372 | 0.408 | 0.438 |
| 0.01 | 1.279 | 1.310 | 1.334 | 1.309 | 1.196 | 0.995 | 0.149 | 0.168 | 0.165 | 0.180 |
| 0.003 | 0.613 | 0.593 | 0.625 | 0.665 | 0.603 | 0.580 | 0.082 | 0.083 | 0.084 | 0.089 |
| 0.001 | 0.269 | 0.242 | 0.286 | 0.263 | 0.237 | 0.256 | 0.056 | 0.060 | 0.056 | 0.062 |
| 0 | 0.045 | 0.046 | 0.045 | 0.047 | 0.046 | 0.049 | 0.048 | 0.037 | 0.041 | 0.046 |
| 第二抗体 | HRP 标记的羊抗人 IgG(H+L) (1:5000) | | | | | | | | | |
| EC50 (nM) | 0.082 | | 0.082 | | 0.107 | | 1.181 | | | |

[0334] 表4 H8L15与人p40-His的结合活性检测结果

| 抗体浓度 ($\mu\text{g/mL}$) | 抗原包被: p40-His (0.25 $\mu\text{g/mL}$) | | | | | |
|------------------------------|--|-------|--------------|-------|--------------|-------|
| | H8L15 | | Ab123FR1 | | Ustekinumab | |
| 1.0000 | 2.584 | 2.470 | 2.466 | 2.425 | 2.686 | 2.690 |
| 0.3333 | 2.519 | 2.551 | 2.325 | 2.425 | 2.521 | 2.555 |
| 0.1111 | 2.520 | 2.490 | 2.241 | 2.301 | 2.473 | 2.334 |
| 0.0370 | 2.376 | 2.280 | 2.190 | 2.055 | 2.317 | 2.329 |
| 0.0123 | 1.602 | 1.537 | 1.300 | 1.373 | 1.377 | 1.386 |
| 0.0041 | 0.835 | 0.801 | 0.663 | 0.675 | 0.686 | 0.656 |
| 0.0014 | 0.370 | 0.351 | 0.312 | 0.340 | 0.310 | 0.284 |
| 0.0000 | 0.069 | 0.068 | 0.096 | 0.087 | 0.090 | 0.078 |
| 第二抗体 | HRP 标记的羊抗人 IgG(H+L) (1:5000) | | | | | |
| EC50 (nM) | 0.059 | | 0.074 | | 0.077 | |

[0335] 实施例3. Fortebio检测H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14、H8L15、Ab123FR1和Ustekinumab与抗原人IL-12/IL-23 p40的亲合力常数测定

[0336] H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14、H8L15、Ab123FR1和Ustekinumab样品稀释缓冲液为PBS, 0.02% Tween-20, 0.1% BSA, pH7.4。将p40-His以1 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度固定于HIS1K(厂

家:Fortebio,货号:18-5120)传感器上,时间为40s。传感器在缓冲液中平衡60s,固定在传感器上的p40-His与抗体结合,浓度为5-0.31nM(两倍稀释),时间120s,蛋白在缓冲液中解离,时间300s。传感器采用10mM甘氨酸,pH=1.5溶液再生。检测温度为37℃,检测频率为0.3Hz,样品板震动速率为500rpm。数据以1:1模型拟合分析,得到亲和力常数。

[0340] 人源化抗体H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14、Ab123FR1、H8L15、和Ustekinumab(作为对照抗体)与人p40-His的亲和力常数测定结果见表5,检测结果如图5、6、7、8、9、10、11、12所示。

[0341] 结果表明:H5L9与人p40-His的亲和力常数为8.49E-10M,H5L10与人p40-His的亲和力常数为1.21E-10M,H5L11与人p40-His的亲和力常数为1.36E-10M,H5L12与人p40-His的亲和力常数为9.05E-11M,H5L14与人p40-His的亲和力常数为6.20E-11M,Ab123FR1与人p40-His的亲和力常数为7.40E-11M,H8L15与人p40-His的亲和力常数为6.09E-11M,Ustekinumab与人p40-His的亲和力常数为8.64E-11M。

[0342] 亲和力强弱依次为H8L15、H5L14、Ab123FR1、Ustekinumab、H5L12、H5L10、H5L11、H5L9

[0343] H8L15和H5L14与人p40-His的亲和力比Ab123FR1和Ustekinumab强。

[0344] 表5.H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14、H8L15、Ab123FR1和Ustekinumab与人p40-His的亲和力常数测定结果

| 待测抗体 | K_D (M) | $k_{on}(1/Ms)$ | $S E(kon)$ | $k_{dis}(1/s)$ | $S E(kdis)$ | $Rmax(nm)$ |
|--------------------|-----------|----------------|------------|----------------|-------------|------------|
| H5L9 | 8.49E-10 | 1.08E+07 | 8.50E+05 | 9.20E-03 | 3.07E-04 | 0.11-0.13 |
| H5L10 | 1.21E-10 | 3.58E+06 | 3.64E+05 | 4.35E-04 | 2.22E-04 | 0.14-0.18 |
| H5L11 | 1.36E-10 | 3.15E+06 | 2.32E+05 | 4.28E-04 | 1.44E-04 | 0.16-0.19 |
| H5L12 | 9.05E-11 | 3.84E+06 | 2.12E+05 | 3.48E-04 | 1.24E-04 | 0.17-0.21 |
| H5L14 | 6.20E-11 | 2.94E+06 | 2.36E+05 | 1.82E-04 | 1.58E-04 | 0.11-0.15 |
| Ab123FR1 | 7.40E-11 | 2.00E+06 | 2.89E+05 | 1.48E-04 | 2.15E-04 | 0.15-0.18 |
| H8L15 | 6.09E-11 | 2.95E+06 | 2.13E+05 | 1.80E-04 | 1.37E-04 | 0.18-0.21 |
| Ustekinumab | 8.64E-11 | 1.99E+06 | 2.51E+05 | 1.72E-04 | 1.81E-04 | 0.16-0.17 |

[0345] K_D 为亲和力常数; $K_D=k_{dis}/k_{on}$ 。

[0346] 实施例4.流式细胞法检测抗人IL-12/IL-23 p40抗体竞争性阻断人IL-12、IL-23与293T-IL-12Rβ1&IL-23R细胞的结合

[0347] 1.1流式细胞法检测H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14和Ustekinumab抗体竞争性阻断人IL-12与293T-IL-12Rβ1&IL-23R细胞的结合

[0348] 取293T-IL-12Rβ1&IL-23R细胞常规消化,30w/样本加入200μL1%PBSA,700xg离心5min弃上清;按实验设计,分别将相应浓度稀释的抗体(最高终浓度为30μg/mL,3倍稀释,总

共8个浓度)和人IL-12(义翘神州,货号:CT-050-H08H-20)(最终浓度为20nM)按照1:1的比例混合,并设计空白对照,冰上孵育30min;冰浴30min后的抗体和人IL12混合液按100 μ L/样本加入到细胞沉淀中,混匀,冰上孵育60min。加入200 μ L 1%PBSA,700xg离心5min,去上清,重复洗涤两次。AlexaFluor®488anti-His Tag Antibody按1:400稀释(Biolegend,货号:652509),每管加入100 μ L,混匀后,冰上避光孵育40min。加入200 μ L 1%PBSA,700xg离心5min,去上清,重复洗涤两次。加入200 μ L 1%PBSA/管,重悬细胞,转移至流式上样管,上机检测。FACS检测H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14和Ustekinumab抗体竞争性阻断人IL-12与293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞结合的结果见表6和图13。

[0350] 结果如表6和图13所示,结果表明H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14和Ustekinumab均可竞争性的阻断IL-12与293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞膜表面的IL-12R β 1结合,其中,H5L9竞争活性不明显,H5L10、H5L11、H5L12、H5L14和Ustekinumab的竞争结合EC₅₀分别为0.3312 μ g/mL、0.414 μ g/mL、0.3172 μ g/mL、0.5320 μ g/mL和0.3770 μ g/mL。

[0351] 各抗体竞争性阻断IL-12与293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞膜表面的IL-12R β 1结合的强度依次为:H5L12,H5L10,Ustekinumab,H5L11,H5L14,H5L9。

[0352] 以上结果显示H5L12,H5L10竞争阻断IL-12与细胞膜表面IL-12R β 1结合的竞争活性优于Ustekinumab。

[0353] 表6 FACS检测H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14和Ustekinumab抗体竞争性阻断人IL-12与293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞结合的结果

| 浓度 (μ g/mL)/MFI | 30 | 10 | 3.33 | 1.11 | 0.37 | 0.12 | 0.04 | 0.01 | EC ₅₀ (μ g/mL) |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----------------------------------|
| H5L9 | 117 | 134 | 146 | 157 | 159 | 160 | 158 | 169 | \ |
| H5L10 | 31.6 | 34.1 | 40.2 | 44.6 | 87.5 | 151 | 154 | 163 | 0.3312 |
| H5L11 | 33 | 33.9 | 42.2 | 54.3 | 103 | 145 | 151 | 166 | 0.414 |
| H5L12 | 31.8 | 32.4 | 31.8 | 38.5 | 86.6 | 133 | 149 | 161 | 0.3172 |
| H5L14 | 34.9 | 46.3 | 51.9 | 66 | 113 | 146 | 155 | 149 | 0.5320 |
| Ustekinumab | 28.7 | 31 | 29.7 | 31.9 | 95.7 | 137 | 150 | 160 | 0.3770 |

[0354] 1.2流式细胞法检测Ab123FR1、H8L15和Ustekinumab抗体竞争性阻断人IL-12与293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞的结合

[0355] 取293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞常规消化,30w/样本加入200 μ L1%PBSA,1200rpm离心5min弃上清;按实验设计,分别将相应浓度稀释的抗体(最高浓度为60 μ g/mL,3倍稀释,总共8个浓度)和IL12-His(义翘神州,货号:CT-050-H08H-20)40nM按照1:1的比例混合,并设计空白对照,冰上孵育30min;冰浴30min后的抗体/IL12混合液按100 μ L/样本加入到细胞沉淀中,混匀,冰上孵育60min。加入200 μ L 1%PBSA,1200rpm离心5min,去上清,重复洗涤一次。THEM His TagAntibody (FITC)(金斯瑞,货号:A01620),按1:500稀释,每管加入100 μ L,混匀后,冰上避光孵育40min。加入200 μ L 1%PBSA,1200rpm离心5min,去上清,重复洗涤一次。加入200 μ L%PBSA/管,重悬细胞,转移至流式上样管,上机检测。FACS检测Ab123FR1、H8L15和Ustekinumab抗体竞争性阻断人IL-12与293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞结合的结果见

表7和图20。

[0356] 结果如表7和图20所示,结果表明Ab123FR1、H8L15和Ustekinumab均可竞争性的阻断IL-12与293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞膜表面的IL-12R β 1结合,Ab123FR1、H8L15和Ustekinumab其结合EC₅₀分别为1.99 μ g/ml、1.46 μ g/ml和1.58 μ g/ml。

[0357] 以上结果显示H8L15竞争阻断IL-12与细胞膜表面IL-12R β 1结合的竞争活性优于Ab123FR1和Ustekinumab。

[0358] 表7 FACS检测Ab123FR1、H8L15和Ustekinumab抗体竞争性阻断人IL-12与293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞结合的结果

| 浓度 (μ g/ml)/MFI | 30 | 10 | 3.33 | 1.11 | 0.37 | 0.12 | 0.04 | 0.01 | EC ₅₀ (μ g/ml) |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|-----------------------------------|
| H8L15 | 34.92 | 46.83 | 57.84 | 90.8 | 118.86 | 127.45 | 136.89 | 117.45 | 1.46 |
| Ab123FR1 | 36.29 | 47.78 | 54.84 | 105.2 | 115.6 | 108.16 | 123.57 | 118.88 | 1.99 |
| Ustekinumab | 40.32 | 40.9 | 46.98 | 99.64 | 120.43 | 123.28 | 114.93 | 114.66 | 1.58 |

[0359] 2.1流式细胞法检测H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14和Ustekinumab抗体竞争性阻断人IL-23与293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞的结合

[0360] 取293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞常规消化,30w/样本加入200 μ L 1%PBSA,700xg离心5min弃上清;按实验设计,分别将相应浓度稀释的抗体(最高终浓度为30 μ g/mL,3倍稀释,总共8个浓度)和人IL-23(IL-23-His-Biotin,Akesobio,20161209)(最终浓度为2 μ g/mL)按照1:1的比例混合,并设计空白对照,冰上孵育30min;冰浴30min后的抗体和人IL23混合液按100 μ L/样本加入到细胞沉淀中,混匀,冰上孵育60min。加入200 μ L 1%PBSA,700xg离心5min,去上清,重复洗涤两次。FITC Steptavidin(biolegend,货号:405202)按1:500稀释每管加入100 μ L,混匀后,冰上避光孵育40min。加入200 μ L 1%PBSA,700xg离心5min,去上清,重复洗涤两次。加入200 μ L 1%PBSA/管,重悬细胞,转移至流式上样管,上机检测。FACS检测H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14和Ustekinumab抗体竞争性阻断人IL-23与293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞结合的结果见表8和图14。

[0361] 结果如表8和图14所示,结果表明H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14和Ustekinumab均可竞争性的阻断IL-23与293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞膜表面IL-23受体复合物的结合,其竞争结合EC₅₀分别为4.252 μ g/mL、0.6995 μ g/mL、0.8643 μ g/mL、0.7748 μ g/mL、0.8806 μ g/mL和1.158 μ g/mL。

[0362] 各抗体竞争性阻断IL-23与293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞膜表面的IL-23受体复合物结合的强度依次为:H5L10,H5L12,H5L11,H5L14,Ustekinumab,H5L9。

[0363] 以上结果提示H5L10,H5L12,H5L11,H5L14竞争阻断IL-23与293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞膜表面IL-23受体复合物结合的竞争活性都优于Ustekinumab。

[0364] 表8 FACS检测H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14和Ustekinumab抗体竞争性阻断人IL-23与293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞结合结果

| 浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)/MFI | 30 | 10 | 3.33 | 1.11 | 0.37 | 0.12 | 0.04 | 0.01 | EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
|---------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|
| H5L9 | 104 | 136 | 153 | 184 | 206 | 217 | 221 | 222 | 4.252 |
| H5L10 | 11.9 | 12.7 | 15.7 | 81.6 | 169 | 221 | 230 | 223 | 0.6995 |
| H5L11 | 12.9 | 14.5 | 20.2 | 97.6 | 179 | 219 | 224 | 219 | 0.8643 |
| H5L12 | 12.3 | 12.7 | 15.8 | 88.5 | 177 | 211 | 234 | 221 | 0.7748 |
| H5L14 | 14.1 | 16.7 | 23.6 | 95.6 | 179 | 203 | 216 | 218 | 0.8806 |
| Ustekinumab | 9.64 | 11.5 | 13.8 | 121 | 186 | 211 | 216 | 219 | 1.158 |

[0365] 2.2流式细胞法检测Ab123FR1、H8L15和Ustekinumab抗体竞争性阻断人IL-23与293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞的结合

[0366] 取293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞常规消化,30w/样本加入200 μL 1%PBSA,1200rpm离心5min弃上清;按实验设计,分别将相应浓度稀释的抗体(最高浓度为60 $\mu\text{g}/\text{mL}$,3倍稀释,总共8个浓度)和人IL23-His-Biotin(中山康方生物医药有限公司,批号:20161209)(4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)按照1:1的比例混合,并设计空白对照,冰上孵育30min;冰浴30min后的抗体IL23-His-Biotin混合液按100 μL /样本加入到细胞沉淀中,混匀,冰上孵育60min。加入200 μL 1%PBSA,1200rpm离心5min,去上清,重复洗涤一次。FITC Steptavidin(biolegend,货号:405202)按1:500稀释每管加入100 μL ,混匀后,冰上避光孵育40min。加入200 μL 1%PBSA,1200rpm离心5min,去上清,重复洗涤一次。加入200 μL %PBSA/管,重悬细胞,转移至流式上样管,上机检测。FACS检测Ab123FR1、H8L15和Ustekinumab抗体竞争性阻断人IL-23与293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞结合的结果见表9和图21。

[0367] 结果如表9和图21所示,结果表明Ab123FR1、H8L15和Ustekinumab均可竞争性的阻断IL-23与293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞膜表面IL-23R的结合。Ab123FR1、H8L15和Ustekinumab其结合 EC_{50} 分别为1.41 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.8942 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和1.434 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0368] 以上结果提示H8L15竞争阻断IL-23与293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞膜表面IL-23R结合的竞争活性优于Ab123FR1和Ustekinumab。

[0369] 表9 FACS检测Ab123FR1、H8L15和Ustekinumab抗体竞争性阻断人IL-23与293T-IL-12R β 1&IL-23R细胞结合结果

| 浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)/MFI | 30 | 10 | 3.33 | 1.11 | 0.37 | 0.12 | 0.04 | 0.01 | EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| H8L15 | 15.67 | 17.95 | 20.65 | 67.47 | 140.58 | 151.42 | 155.60 | 155.36 | 0.8942 |
| Ab123FR1 | 16.62 | 17.43 | 21.52 | 114.17 | 148.32 | 154.10 | 157.47 | 159.75 | 1.41 |
| Ustekinumab | 17.65 | 18.37 | 22.39 | 124.07 | 160.96 | 164.00 | 156.17 | 162.10 | 1.434 |

[0370] 实施例5.H8L15有效抑制自发系统性红斑狼疮小鼠的脾脏细胞分泌IL-17A

[0371] 取自发系统性红斑狼疮模型(Jeltsch-David H.Autoimmun Rev.2014;13(9):963-973.)小鼠MRL/lpr小鼠(购自上海斯莱克实验动物有限公司),水合氯醛麻醉后,75%酒精浸泡消毒;转移至生物安全柜,解剖取脾脏。将脾脏置于含有1640完全培养液的平皿中润洗,去除脂肪及筋膜组织。将洗涤后的小鼠脾脏置于70 μm 细胞滤网中,用注射器活塞进行

轻柔研磨,并反复用培养液冲洗脾脏细胞悬液,收集滤液,170*g离心5分钟,弃上清。加红细胞裂解液7mL重悬细胞沉淀,轻柔混匀,于冰上静置8min;8min后加入等体积完全培养液终止裂解。170*g离心5分钟,弃上清。1640完全培养基离心洗涤2遍;用1640完全培养液重悬细胞沉淀,计数,调整细胞密度,并接种至96孔板,1*10⁶个/100μL,按实验设计将50μL抗体与50μL IL-23(终浓度为20ng/mL)预孵育1h,加入50μL IL-2(终浓度为100U/mL),置于37℃、5%CO₂培养箱培养6天。6天后,离心收集细胞上清,ELISA法检测上清中IL-17A的浓度。

[0372] 结果如图15所示,IL-23可有效促进自发系统性红斑狼疮模型小鼠脾脏细胞分泌IL-17A,在IL-23处理的同时加入H8L15可显著抑制IL-17A的分泌,且该抑制活性呈显著剂量依赖关系,药效学活性显著优于AB123FR1(有时也表示为Ab123FR1)。

[0373] 实施例6.H8L15有效改善银屑病模型小鼠的皮肤损伤

[0374] C57BL/6小鼠(购自广东省医学实验动物中心)剃毛后随机分为即正常组、模型组、阳性对照品组及H8L15组,每组10只。在第1次注射重组人IL-23前1天,模型组皮下注射同型对照抗体(即人抗鸡蛋溶酶体),H8L15各剂量组注射相应浓度H8L15,正常组皮下注射等体积生理盐水。给药后第1天,以3.5%水合氯醛7.5ml/kg腹腔注射麻醉C57BL/6小鼠,正常组小鼠皮内注射生理盐水25μl/只,其余小鼠均皮内注射重组人IL-2310μg/25μl/只,每天注射1次,连续6天。末次皮内注射重组人IL-23后第2天,将各组小鼠颈椎脱臼,剪取小块颈部皮肤(约0.5×0.5cm)放置于福尔马林组织固定剂中固定,24h后进行小鼠皮肤病理切片的制作,每组各做6只。病理切片制作完成后,在100倍显微镜下选取1个代表性视野,随机选取原始图片中的6个位点测量小鼠皮肤表皮厚度值。数据以均数±标准差表示,组间比较采用GraphPad统计学处理软件处理后,进行单因素方差分析评价结果,P<0.05有显著性差异,P<0.01有非常显著性差异。

[0375] 结果如图16所示。与正常组相比,模型组小鼠皮肤表皮厚度明显增加(P<0.01)。给药后,H8L15能够有效抑制银屑病小鼠表皮增厚(P<0.01)。

[0376] 实施例7.抗IL-12/IL-23 p40抗体治疗结肠炎

[0377] 发现抗IL-12/IL-23 p40抗体如H8L15有效缓解溃疡性结肠炎模型小鼠病理学改变和临床症状。

[0378] 采用DSS(葡聚糖硫酸钠)诱导C57BL/6小鼠建立结肠炎模型。实验小鼠正常组3只,其它组为6只。并设阳性对照组(DSS组)、同型对照抗体组(anti-HEL)、高剂量H8L15组(120mg/kg)和低剂量H8L15组(40mg/kg)。给药方式为皮下注射,且在D0、D3和D6三天给药。在正常组中,动物模型以通过饮水瓶饲喂无菌水建立;在DSS(来源于MP Bio,货号cat.no:Q1723)组中,动物模型以通过饮水瓶饲喂250ml无菌水中加入2.5g DSS配制成1%DSS溶液连续9天建立;在加抗体的实验组中,动物模型以通过饮水瓶饲喂250ml无菌水中加入2.5g DSS配制成1%DSS溶液,同时hIL-23重组蛋白(200u1/100ug/只)腹腔每天注射(D1-D5,D7-D9)建立。

[0379] 本实验动物的使用及福利遵照“国际实验动物评估和认可委员会(AAALAC)”的规定执行。每天监测动物的健康状况及死亡情况,例行检查包括观察受试物或药物对动物日常行为表现的影响如行为活动、体重变化、外观体征等。

[0380] 实验指标为考察药物对结肠炎的影响,具体指标以小鼠结肠炎病理评分的表作标准,见表10。

[0381] 表10:小鼠结肠炎病理评分

| | | |
|--------|------------|-------------------------|
| [0382] | 结肠病灶病理组织情况 | 评分 |
| | 炎症浸润: | 0-无1-较轻2-轻度3-中度4-较重5-重度 |
| | 隐窝损害: | 0-无1-轻度2-中度3-重度 |
| | 溃疡: | 0-无1-轻度2-中度3-重度 |
| | 水肿: | 0-无1-有 |

[0383] 表11:给药剂量和给药方案

| 实验组 | n | 动物模型 | 给予药物 |
|----------------------------------|---|--|---------------------------------|
| 正常组 | 3 | 无菌水通过饮水瓶饲喂 | |
| DSS 组 | 6 | 250ml 无菌水中加入 2.5g DSS 配制成 1%DSS 溶液, 通过饮水瓶饲喂连续 9 天 (D1-D9), 第 10 天结束实验 | |
| [0384] DSS+hIL-23+hIgG1 120mg/kg | 6 | 250ml 无菌水中加入 2.5g DSS 配制成 1%DSS 溶液, 通过饮水瓶饲喂, hIL-23 重组蛋白 (200ul/100ug/只) | hIgG1, 120mg/kg, SC, D0, D3, D6 |
| DSS+hIL-23+H8L15 120mg/kg | 6 | 腹腔每天注射 (D1-D6, D8-D9), 第 10 天结束实验 | H8L15, 120mg/kg, SC, D0, D3, D6 |
| DSS+hIL-23+H8L15 40mg/kg | 6 | | H8L15, 40mg/kg, SC, D0, D3, D6 |

[0385] *随机分组:第一次给药时间为D₀;SC:皮下注射。

[0386] 实验结果,表10为小鼠结肠炎病理评分标准,表11为各实验组小鼠模型的建立方法和抗体的给药方案,结肠炎病理评分结果如图17所示。H8L15治疗DSS联合重组人IL-23诱导的结肠炎小鼠皮肤组织病理学观察演示图(HE染色,×100)(a:正常组;b:DSS组;c:DSS+hIL-23+hIgG1(120mg/kg)组;d:DSS+hIL-23+H8L15(120mg/kg)组;e:DSS+hIL-23+H8L15(40mg/kg)组如图19所示。

[0387] 实验结论,如图18所示为小鼠在实验期间的体重,模型组小鼠体重不断下降,而给药组小鼠体重没有下降,与模型组有显著差异。如图17所示为结肠炎病理评分结果,模型组显示了明显的肠炎特征,而给药组高低剂量组与模型组相比显示出有统计学意义的差异,提示有药物H8L15在治疗溃疡性结肠炎上具有药效。

[0388] 序列信息如下:

[0389] H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示

- EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQSSGYSFTTYWIGWVRQMPGQGLEWIGIMSPVDSDIRYNPMF
- [0390] RGQVTMSVDKSSSTAYLQWSSLKASDTAMYICARRRPGQGYFDFWQGTMTVSS (SEQ ID NO:1)
- [0391] H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14的重链可变区核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCCGAAGTGAAGAAACCCGGGGAGAGTCTGAAGATCT
CATGCCAGAGCTCCGGCTACTCCTTACCACATATTGGATCGGGTGGGTGAGACAGATGCCT
GGCCAGGGGCTGGAATGGATCGGAATTATGAGCCCAGTGGACTCCGATATTTCGTACAACC
- [0392] CCATGTTTCGAGGCCAGGTGACAATGAGCGTGGACAAGTCTAGTTCAACTGCTTATCTGCAG
TGGAGCTCCCTGAAAGCCAGCGATACCGCTATGTACTATTGTGCCCGGAGAAGGCCTGGAC
AGGGCTACTTCGACTTTTGGGGCAGGGAAGTATGGTGACCGTCTCTAGT (SEQ ID NO:2)
- [0393] H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14的HCDR1如SEQ ID NO:3所示,HCDR2如SEQ ID NO:4所示,HCDR3如SEQ ID NO:5所示
- [0394] HCDR1: GYSFTTYW (SEQ ID NO:3)
- [0395] HCDR2: MSPVDSI (SEQ ID NO:4)
- [0396] HCDR3: ARRRPGQGYFDF (SEQ ID NO:5)
- [0397] H5L9的轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGSWLAWYQQKPKAPKSLIYSASSRQSGVPSRFSGS
- [0398] GSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQYDIYPFTFGQGTKLEIK
- [0399] H5L9轻链可变区核苷酸序列如SEQ ID NO:7所示
GATATTCAGATGACCCAGAGCCCTTCAAGCCTGTCCGCAAGCGTCGGGGATAGAGTGACCATT
ACCTGTAAAGCAAGCCAGAACGTGGGAAGCTGGCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCA
- [0400] AAGCACCCAAGTCTCTGATCTATAGTGCAAGCTCCCGGCAGTCAGGAGTGCCAAGCAGATTC
AGTGGCTCAGGGAGCGGAACAGACTTTACCCTGACAATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGACTT
CGCAACTTACTATTGCCAGCAGTACGATATCTACCCATTACATTTGGCCAGGGGACTAAACTG
- [0401] GAGATCAAG
- [0402] H5L9的LCDR1如SEQ ID NO:8所示,LCDR2如SEQ ID NO:9所示,LCDR3如SEQ ID NO:10所示
- [0403] LCDR1: QNVGSW (SEQ ID NO:8)
- [0404] LCDR2: ASS (SEQ ID NO:9)
- [0405] LCDR3: QQYDIYPFT (SEQ ID NO:10)
- [0406] H5L10的轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示
EIVLTQSPATLSASPGERATISCRASQSVGSWLAWYQQKPGQAPRSLIYAASNLSQSGIPARFSGSG
- [0407] SGTDFLTISSLEPEDFAVYYCQQYNIYPYTFGQGRLEIK
- [0408] H5L10轻链可变区核苷酸序列如SEQ ID NO:12所示

- [0409] GAGATCGTCCTGACACAGAGTCCTGCTACCCTGAGCGCTTCCCCAGGAGAGAGGGCAACCAT
CTCCTGCCGCGCCTCTCAGaGCgTTGGCTCCTGGCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCA
GGCACCCCGAAGCCTGATCTATGCCGCTTCTAaTCTGCAGAGCGGGATTCCCGCTAGATTCTCT
GGCAGTGGGTCAGGAACAGACTTTACCCTGACAATCTCAAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTCGC
CGTGTACTATTGCCAGCAGTACAACATCTACCCATATACATTTGGCCAGGGGACTCGGCTGGA
GATCAAG
- [0410] H5L11的轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示
- [0411] EIVLTQSPATLSASPGERATISCRASQSVSSWLAWYQQKPGQAPRSLIYSASNLSGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYNIYPYTFGQGTRLEIK
- [0412] H5L11轻链可变区核苷酸序列如SEQ ID NO:14所示
- [0413] GAGATCGTCCTGACACAGAGTCCTGCTACCCTGAGCGCTTCCCCAGGAGAGAGGGCAACCAT
CTCCTGCCGCGCCTCTCAGaGCgTTAGCTCCTGGCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCA
GGCACCCCGAAGCCTGATCTATTCCGCTTCTAaTCTGCAGAGCGGGATTCCCGCTAGATTCTCT
GGCAGTGGGTCAGGAACAGACTTTACCCTGACAATCTCAAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTCGC
CGTGTACTATTGCCAGCAGTACAACATCTACCCATATACATTTGGCCAGGGGACTCGGCTGGA
GATCAAG
- [0414] H5L12的轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示
- [0415] EIVLTQSPATLSASPGERATISCRASQSVSSWLAWYQQKPGQAPRSLIYAASNRSQSGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYNIYPYTFGQGTRLEIK
- [0416] H5L12轻链可变区核苷酸序列SEQ ID NO:16所示
- [0417] GAGATCGTCCTGACACAGAGTCCTGCTACCCTGAGCGCTTCCCCAGGAGAGAGGGCAACCAT
CTCCTGCCGCGCCTCTCAGaGCgTTAGCTCCTGGCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCA
GGCACCCCGAAGCCTGATCTATGCCGCTTCTAaTCGGCAGAGCGGGATTCCCGCTAGATTCTCT
GGCAGTGGGTCAGGAACAGACTTTACCCTGACAATCTCAAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTCGC
CGTGTACTATTGCCAGCAGTACAACATCTACCCATATACATTTGGCCAGGGGACTCGGCTGGA
GATCAAG
- [0418] H5L14的轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示
- [0419] EIVLTQSPATLSASPGERATISCRASQSVSSWLAWYQQKPGQAPRSLIYAASNLSGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYNIYPFTFGQGTRLEIK
- [0420] H5L14轻链可变区核苷酸序列如SEQ ID NO:18所示
- [0421]

- GAGATCGTCCTGACACAGAGTCCTGCTACCCTGAGCGCTTCCCCAGGAGAGAGGGCAACCAT
 CTCCTGCCCGCCTCTCAGaGcGTTAGCTCTGGCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCA
 GGCACCCCGAAGCCTGATCTATGCCGCTTCTAaTCTGCAGAGCGGGATTCCCGCTAGATTCTCT
 [0422] GGCAGTGGGTCAGGAACAGACTTTACCCTGACAATCTCAAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTCG
 CGTGTACTATTGCCAGCAGTACAACATCTACCCATTTACATTTGGCCAGGGGACTCGGCTGGA
 GATCAAG
- [0423] L10的LCDR1: QSVGSW 如SEQ ID NO:19所示
- [0424] L11、L12、L14的LCDR1: QSVSSW 如SEQ ID NO:20所示
- [0425] L10、L11、L12、L14的LCDR2: ASN 如SEQ ID NO:21所示
- [0426] L10、L11、L12的LCDR3: QQYNIYPYT 如SEQ ID NO:22所示
- [0427] L14的LCDR3: QQYNIYPFT 如SEQ ID NO:23所示
- [0428] H8L15的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示
- EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQSSGYTFTSYWIGWVRQMPGQGLEWIGIMSPVDSDIRYNPMF
 [0429] RGQVTMSVDKSSSTAYLQWSSLKASDTAMYICARRRPGQGYFDWVGQTMVTVSS
- [0430] H8L15的轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示
- EIVLTQSPATLSASPGERATISCRASQSVGTWVAWYQQKPGQAPRSLIYAASNLSGIPARFSGSGS
 [0431] GTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQYNIYPYTFGQGRLEIK
- [0432] H8L15的HCDR1如SEQ ID NO:26所示;HCDR2如SEQ ID NO:4所示;HCDR3如SEQ ID
 NO:5所示;LCDR1如SEQ ID NO:27所示;LCDR2如SEQ ID NO:28所示;LCDR3如SEQ ID NO:22
 所示;FR-H1如SEQ ID NO:29所示;FR-H2如SEQ ID NO:30所示;FR-H3如SEQ ID NO:31所示;
 FR-H4如SEQ ID NO:32所示;FR-L1如SEQ ID NO:33所示;FR-L2如SEQ ID NO:34所示,FR-L3
 如SEQ ID NO:35所示,FR-L4如SEQ ID NO:36所示
- [0433] HCDR1: GYTFTSYW (SEQ ID NO:26)
- [0434] HCDR2: MSPVDSI (SEQ ID NO:4)
- [0435] HCDR3: ARRRPGQGYFDF (SEQ ID NO:5)
- [0436] LCDR1: QSVGTW (SEQ ID NO:27)
- [0437] LCDR2: AAS (SEQ ID NO:28)
- [0438] LCDR3: QQYNIYPYT (SEQ ID NO:22)
- [0439] FR-H1: EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQSS (SEQ ID NO:29)
- [0440] FR-H2: IGWVRQMPGQGLEWIGI (SEQ ID NO:30)
- [0441] FR-H3: RYNPMFRGQVTMSVDKSSSTAYLQWSSLKASDTAMYIC (SEQ ID NO:31)
- [0442] FR-H4: WGQTMVTVSS (SEQ ID NO:32)
- [0443] FR-L1: EIVLTQSPATLSASPGERATISCRAS (SEQ ID NO:33)
- [0444] FR-L2: VAWYQQKPGQAPRSLIY (SEQ ID NO:34)

- [0445] FR-L3: NLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:35)
- [0446] FR-L4: FGQGRLEIK (SEQ ID NO:36)
- [0447] H8L15的重链可变区核苷酸序列如SEQ ID NO:37所示
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCCGAAGTGAAGAAACCCGGGGAGAGTCTGAAGATCT
CATGCCAGAGCTCCGGCTACACCTCACCTCATATTGGATCGGGTGGGTGAGACAGATGCCTG
GCCAGGGGCTGGAATGGATCGGAATTATGAGCCCAGTGGACTCCGATATTCGCTACAACCCCA
- [0448] TGTTTCGAGGCCAGGTGACAATGAGCGTGGACAAGTCTAGTTCAACTGCTTATCTGCAGTGG
AGCTCCCTGAAAGCCAGCGATACCGCTATGTACTATTGTGCCCGGAGAAGGCCTGGACAGGG
CTACTTCGACTTTTGGGGGCAGGGA ACTATGGTGACCGTCTCTAGT
- [0449] H8L15的轻链可变区核苷酸序列如SEQ ID NO:38所示
GAGATCGTCTGACACAGAGTCCTGCTACCCTGAGCGCTCCCCAGGAGAGAGGGCAACCAT
CTCCTGCCGCGCCTCTCAGAGCGTTGGCACCTGGGTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCC
AGGCACCCGAAGCCTGATCTATGCCGCTTCTAATCTGCAGAGCGGGATTCCCGCTAGATTCT
- [0450] CTGGCAGTGGGTGAGGAACAGACTTTACCCTGACAATCTCAAGCCTGGAGCCTGAAGATTTC
GCCGTGTACTATTGCCAGCAGTACAACATCTACCCATATACATTTGGCCAGGGGACTCGGCTG
GAGATCAAG
- [0451] H8L15的重链氨基酸序列如SEQ ID NO:39所示
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQSSGYTFTSYWIGWVRQMPGQGLEWIGIMSPVSDIRYNPMF
RGQVTMSVDKSSSTAYLQWSSLKASDTAMYICARRRPGQYDFWVQGMVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
- [0452] SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0453] H8L15的轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:40所示
EIVLTQSPATLSASGERATISCRASQSVGTWVAWYQKPGQAPRSLIYAASN LQSGIPARFSGSGS
- [0454] GTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQYNIYPYTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC
- [0455] H5L9的FR-H1,FR-H2,FR-H3,FR-H4的序列与H8L15的相同;FR-L1的序列如SEQ ID NO:41所示;FR-L2的序列如SEQ ID NO:42所示;FR-L3如SEQ ID NO:43所示;FR-L4如SEQ ID NO:44所示
- [0456] FR-L1: DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKAS (SEQ ID NO:41)
- [0457] FR-L2: LAWYQQKPGKAPKSLIYS (SEQ ID NO:42)

- [0458] FR-L3: RQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:43)
- [0459] FR-L4: FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:44)
- [0460] H5L10的FR-H1,FR-H2,FR-H3,FR-H4的序列与H8L15的相同;FR-L1的序列如SEQ ID NO:33所示;FR-L2的序列如SEQ ID NO:45所示;FR-L3如SEQ ID NO:46所示;FR-L4如SEQ ID NO:36所示
- [0461] FR-L1: EIVLTQSPATLSASPGERATISCRAS (SEQ ID NO:33)
- [0462] FR-L2: LAWYQQKPGQAPRS LIYA (SEQ ID NO:45)
- [0463] FR-L3: LQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:46)
- [0464] FR-L4: FGQGTRLEIK (SEQ ID NO:36)
- [0465] H5L11的FR-H1,FR-H2,FR-H3,FR-H4的序列与H8L15的相同;FR-L1的序列如SEQ ID NO:33所示;FR-L2的序列如SEQ ID NO:47所示;FR-L3如SEQ ID NO:46所示;FR-L4如SEQ ID NO:36所示
- [0466] FR-L1: EIVLTQSPATLSASPGERATISCRAS (SEQ ID NO:33)
- [0467] FR-L2: LAWYQQKPGQAPRS LIYS (SEQ ID NO:47)
- [0468] FR-L3: LQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:46)
- [0469] FR-L4: FGQGTRLEIK (SEQ ID NO:36)
- [0470] H5L12的FR-H1,FR-H2,FR-H3,FR-H4的序列与H8L15的相同;FR-L1的序列如SEQ ID NO:33所示;FR-L2的序列如SEQ ID NO:45所示;FR-L3如SEQ ID NO:48所示;FR-L4如SEQ ID NO:36所示
- [0471] FR-L1: EIVLTQSPATLSASPGERATISCRAS (SEQ ID NO:33)
- [0472] FR-L2: LAWYQQKPGQAPRS LIYA (SEQ ID NO:45)
- [0473] FR-L3: **R**QSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:48)
- [0474] FR-L4: FGQGTRLEIK (SEQ ID NO:36)
- [0475] H5L14的 (FR-H1,FR-H2,FR-H3,FR-H4的序列与H8L15的相同;FR-L1的序列如SEQ ID NO:33所示;FR-L2的序列如SEQ ID NO:45所示;FR-L3如SEQ ID NO:46所示;FR-L4如SEQ ID NO:36所示
- [0476] FR-L1: EIVLTQSPATLSASPGERATISCRAS (SEQ ID NO:33)
- [0477] FR-L2: LAWYQQKPGQAPRS LIYA (SEQ ID NO:45)
- [0478] FR-L3: LQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:46)
- [0479] FR-L4: FGQGTRLEIK (SEQ ID NO:36)
- [0480] H5L9、H5L10、H5L11、H5L12、H5L14的重链氨基酸序列如SEQ ID NO:49所示

- EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQSSGYSFTTYWIGWVRQMPGQGLEWIGIMSPVDSDIRYNPMF
RGQVTMSVDKSSSTAYLQWSSLKASDTAMYVCARRRPGQGYFDFWQGTMTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
[0481] SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0482] H5L9的轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:50所示
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGSWLAWYQQKPGKAPKSLIYSASSRQSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYDIYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
- [0483] CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0484] H5L10的轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:51所示
EIVLTQSPATLSASPGERATISCRASQSVGSWLAWYQQKPGQAPRSLIYAASNLSQSGIPARFSGSG
SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYNIYPYTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
- [0485] CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0486] H5L11的轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:52所示
EIVLTQSPATLSASPGERATISCRASQSVSSWLAWYQQKPGQAPRSLIYSASNLSQSGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYNIYPYTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
- [0487] TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0488] H5L12的轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:53所示
EIVLTQSPATLSASPGERATISCRASQSVSSWLAWYQQKPGQAPRSLIYAASNLSQSGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYNIYPYTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
- [0489] TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0490] H5L14的轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:54所示
EIVLTQSPATLSASPGERATISCRASQSVSSWLAWYQQKPGQAPRSLIYAASNLSQSGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYNIYPYTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
- [0491] TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

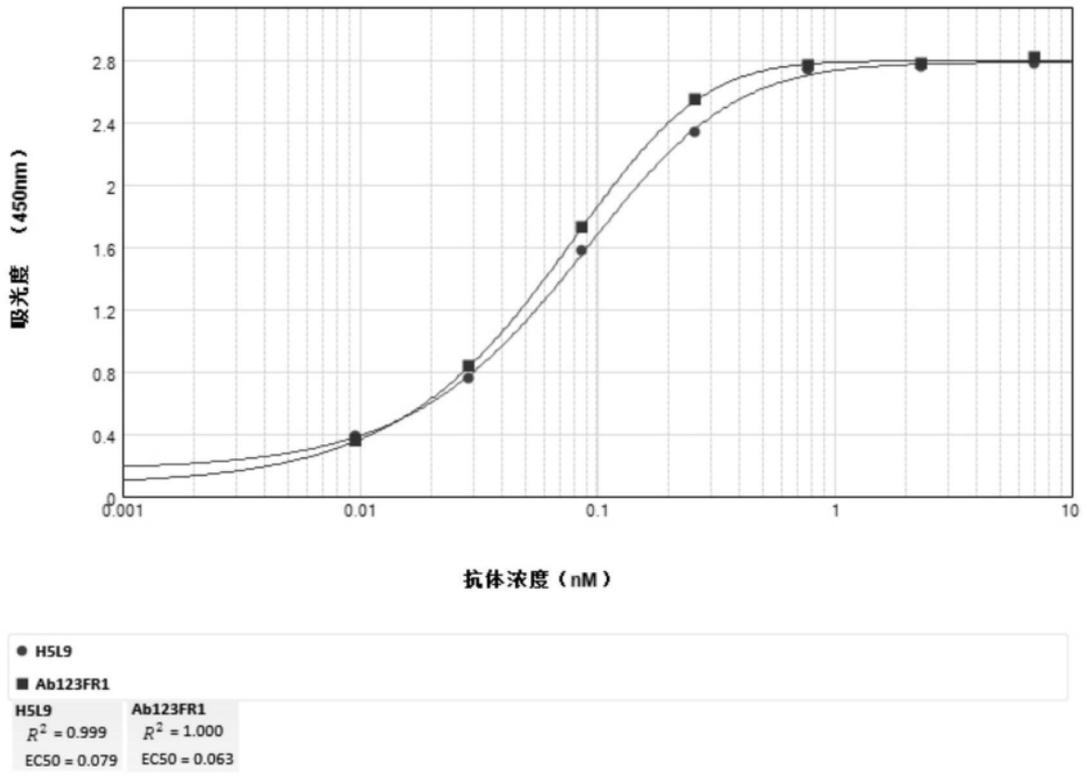


图1

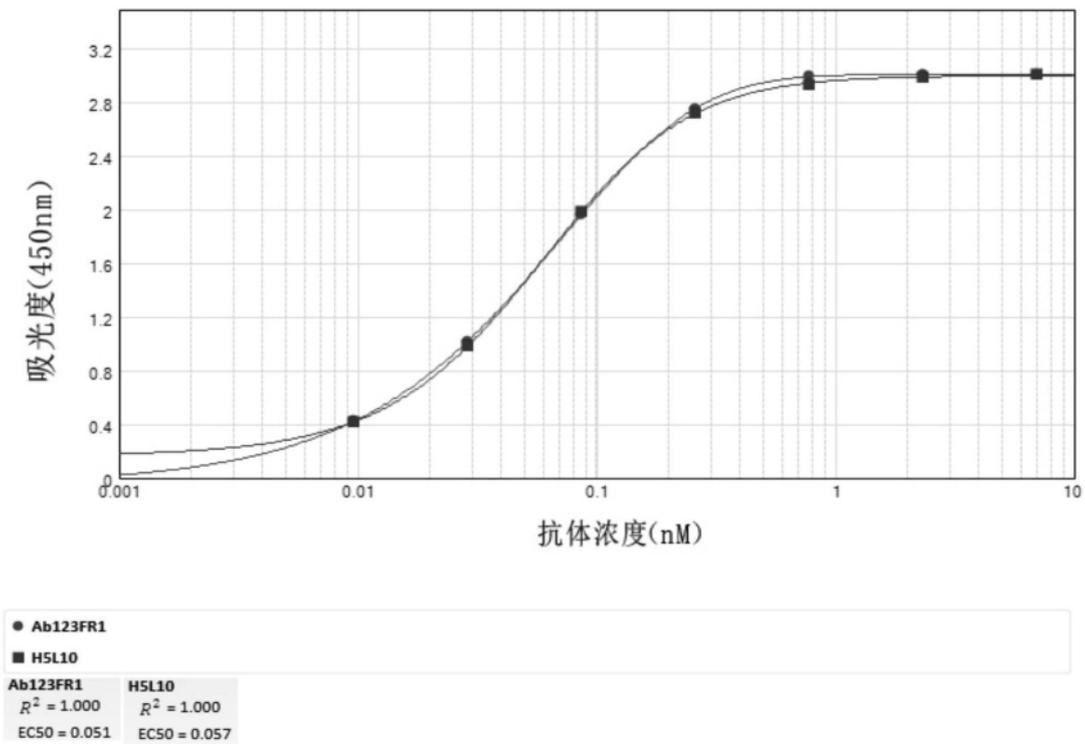


图2

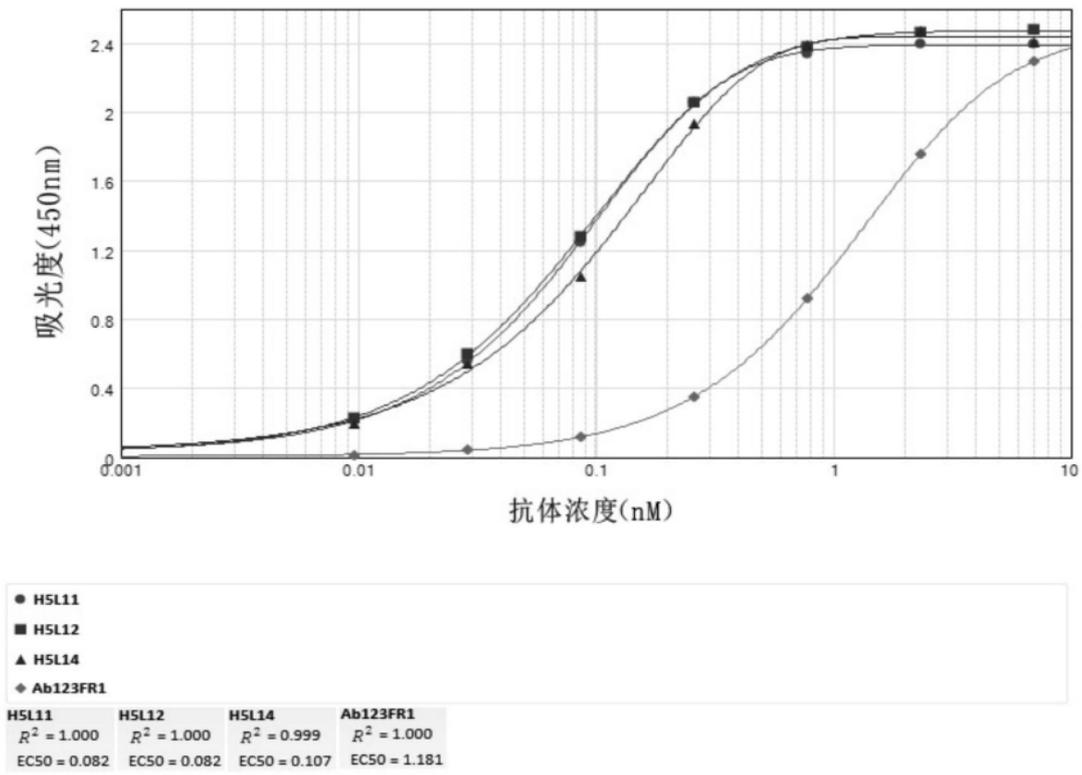


图3

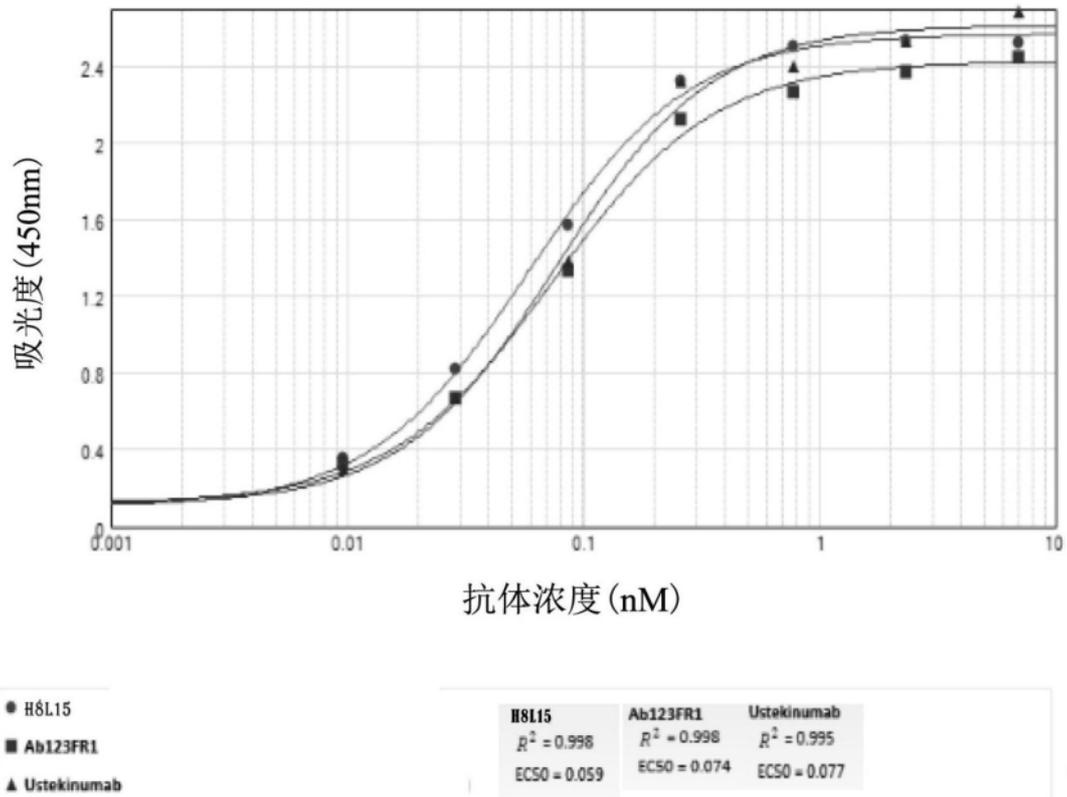


图4

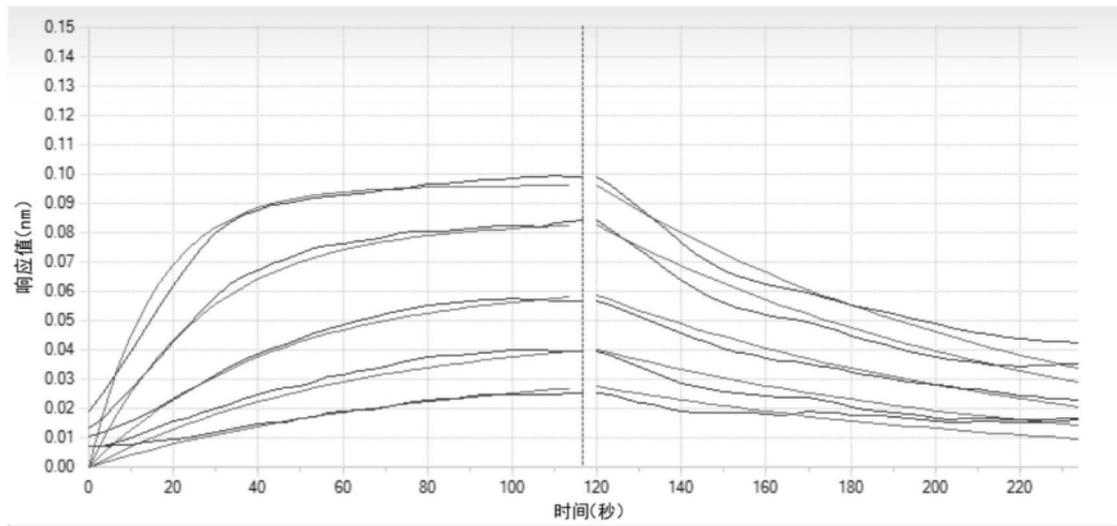


图5

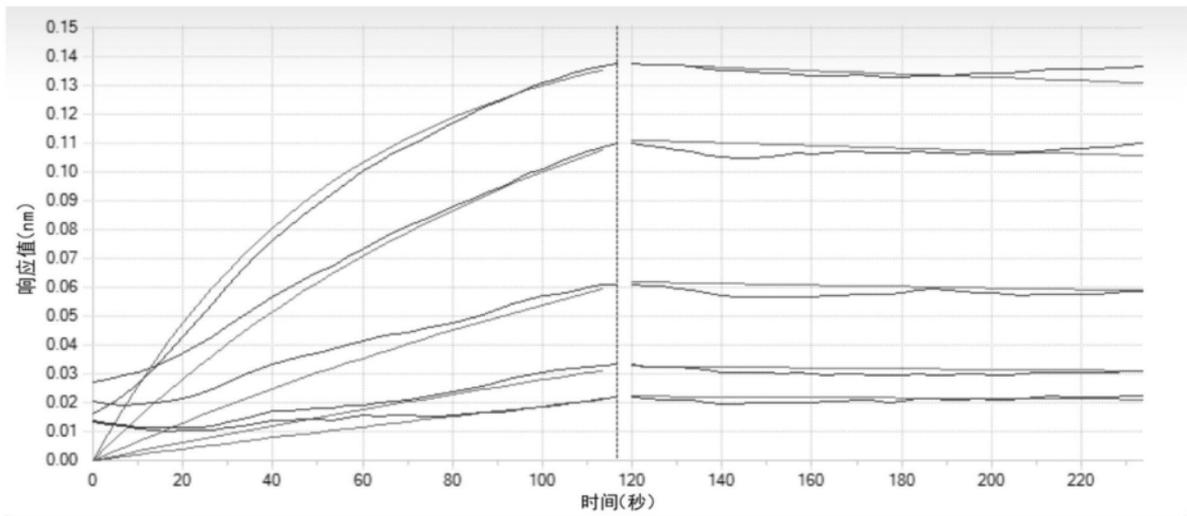


图6

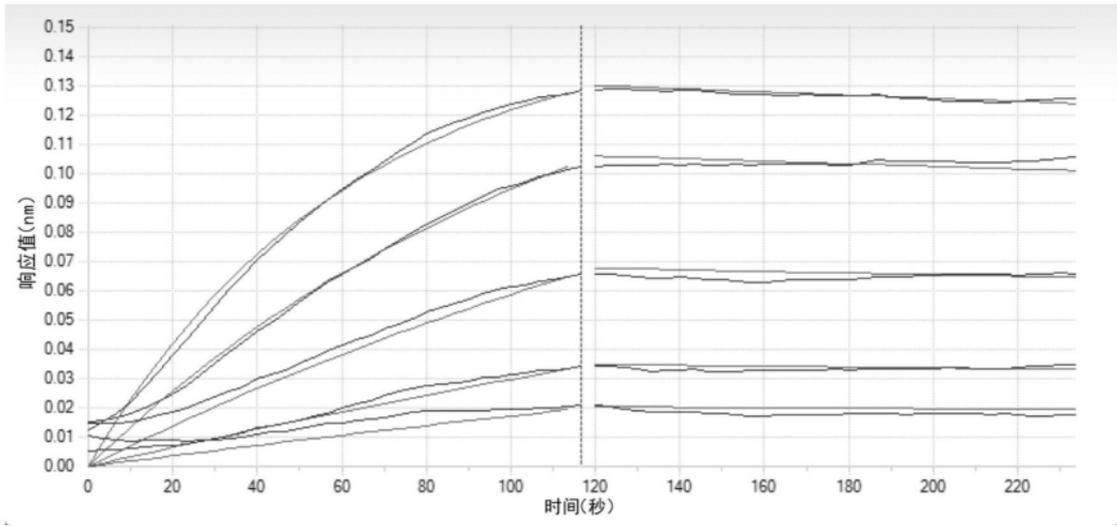


图7

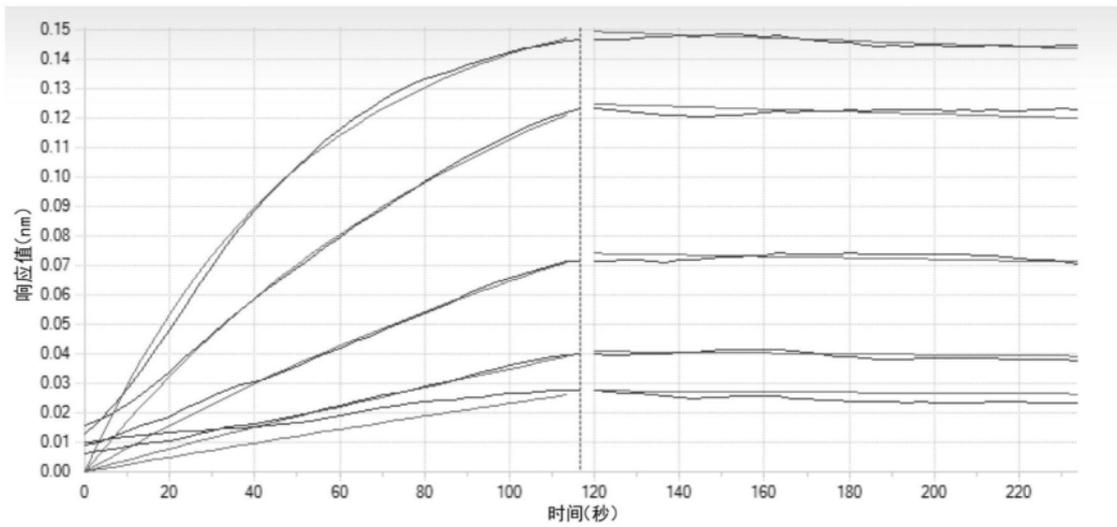


图8

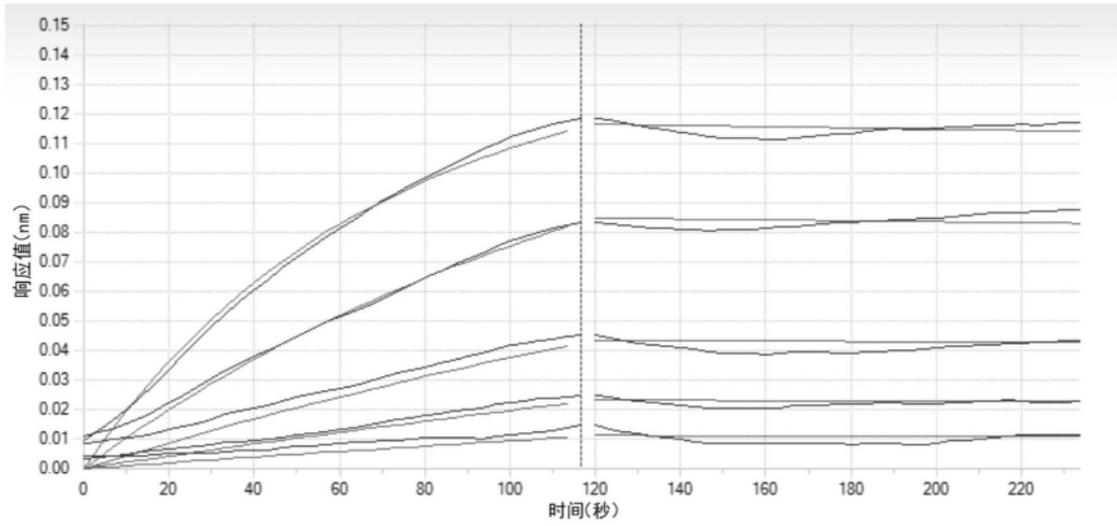


图9

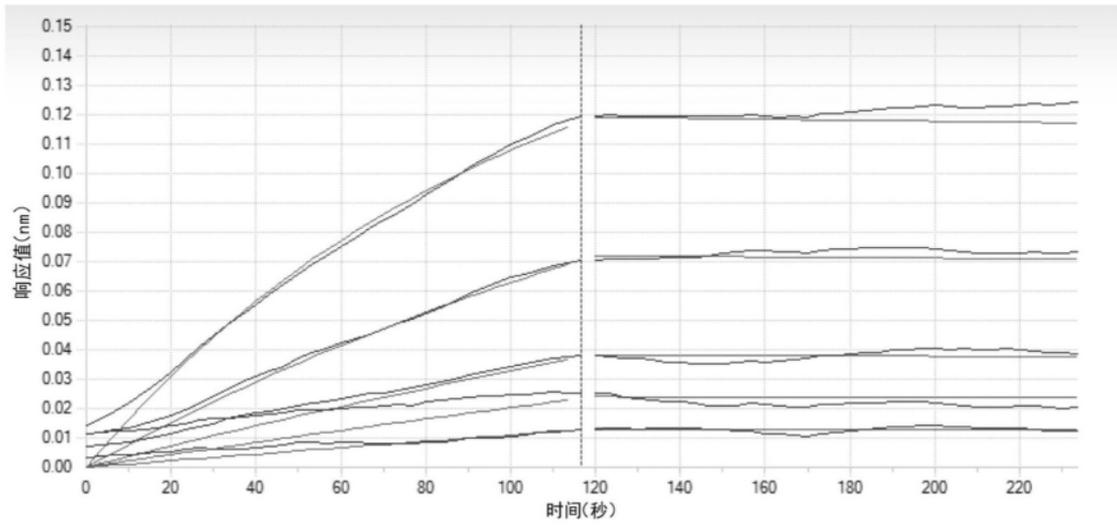


图10

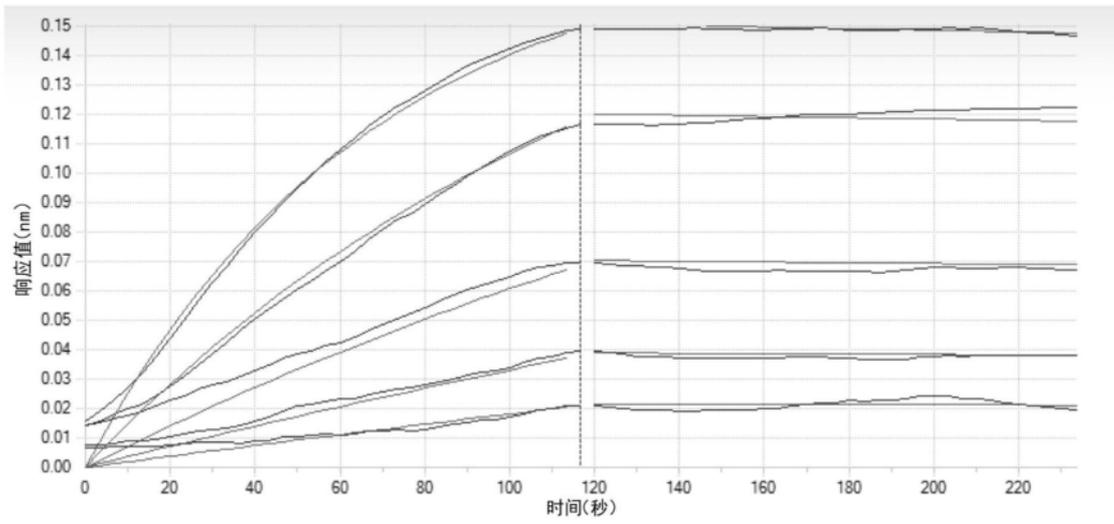


图11

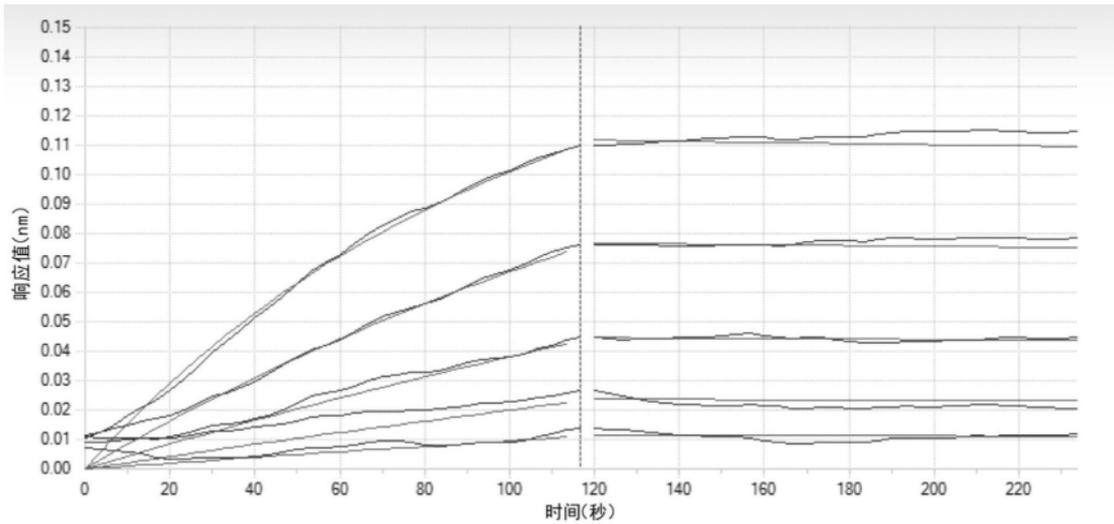


图12

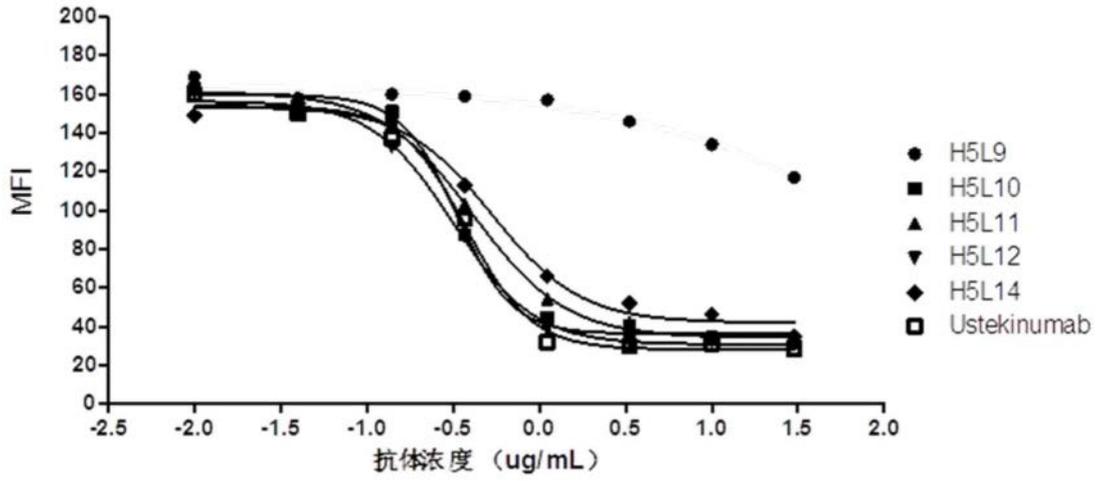


图13

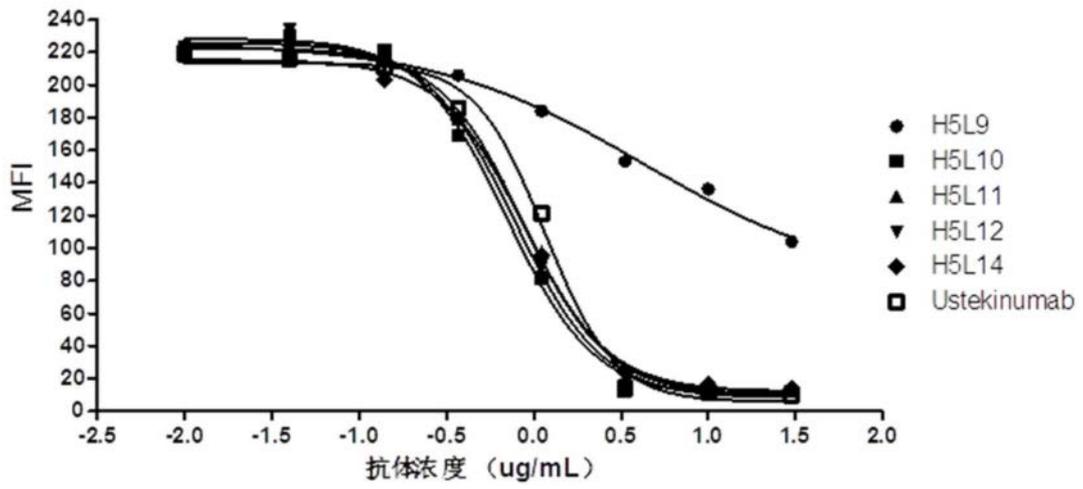


图14

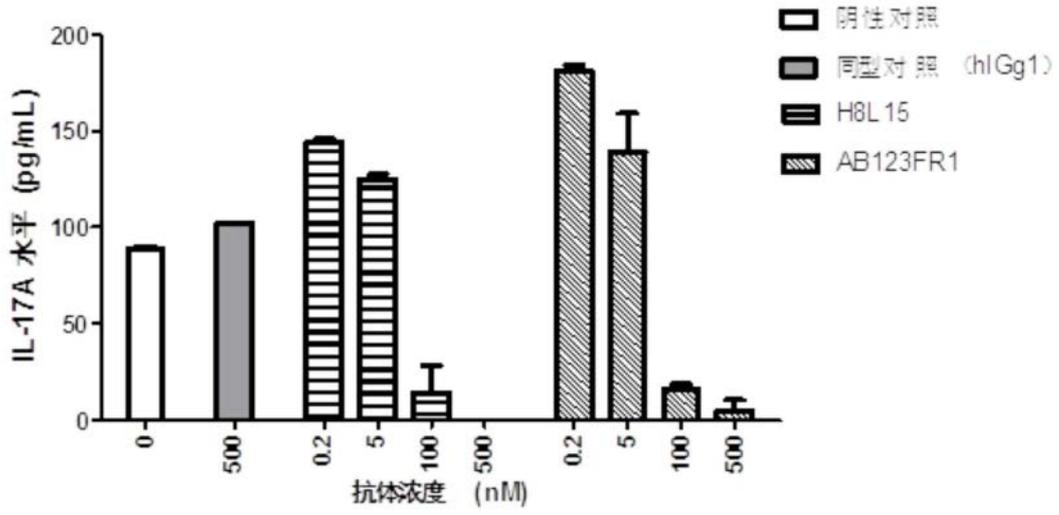


图15

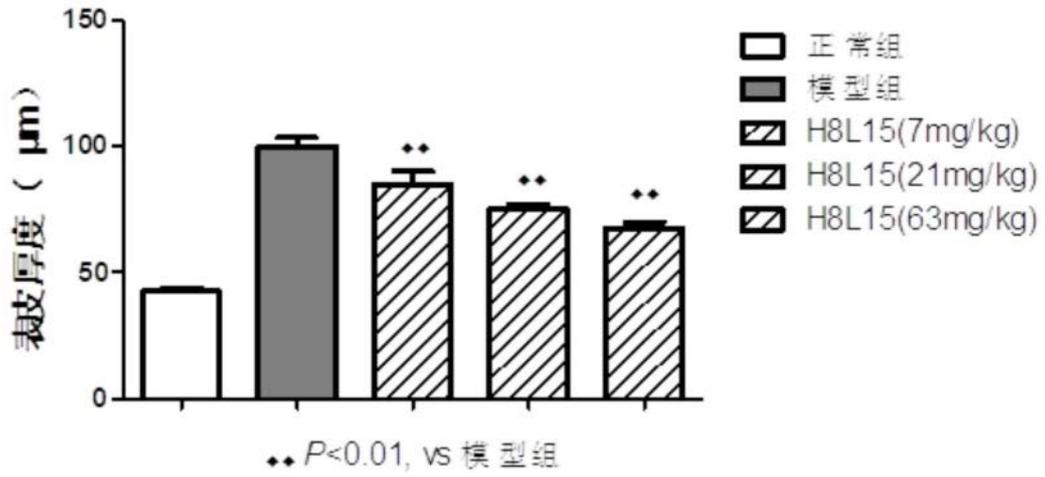


图16

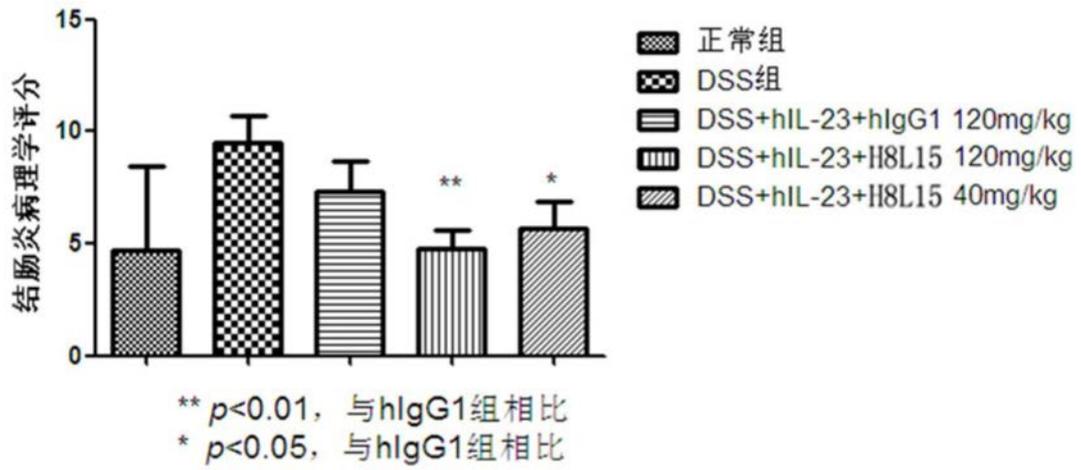


图17

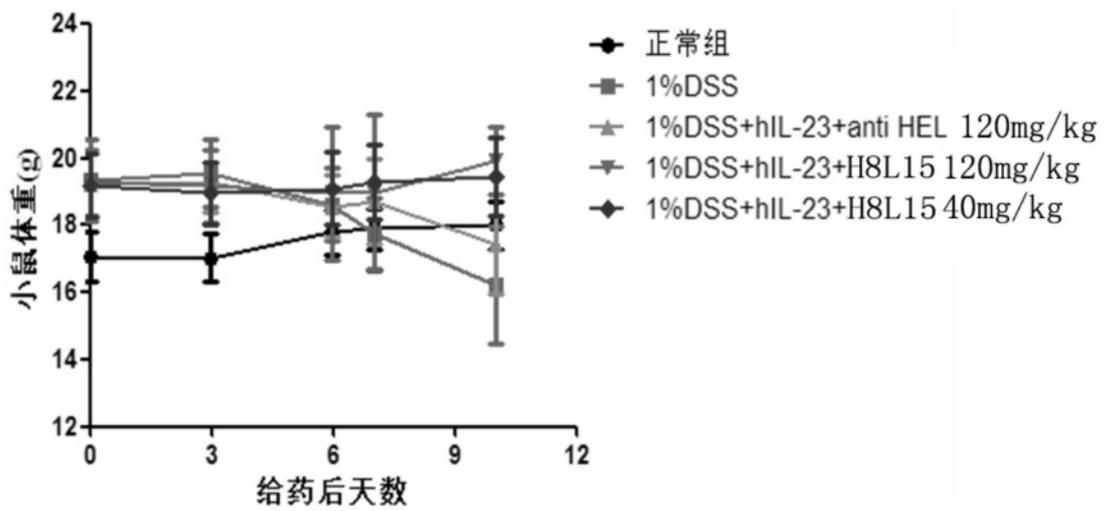


图18

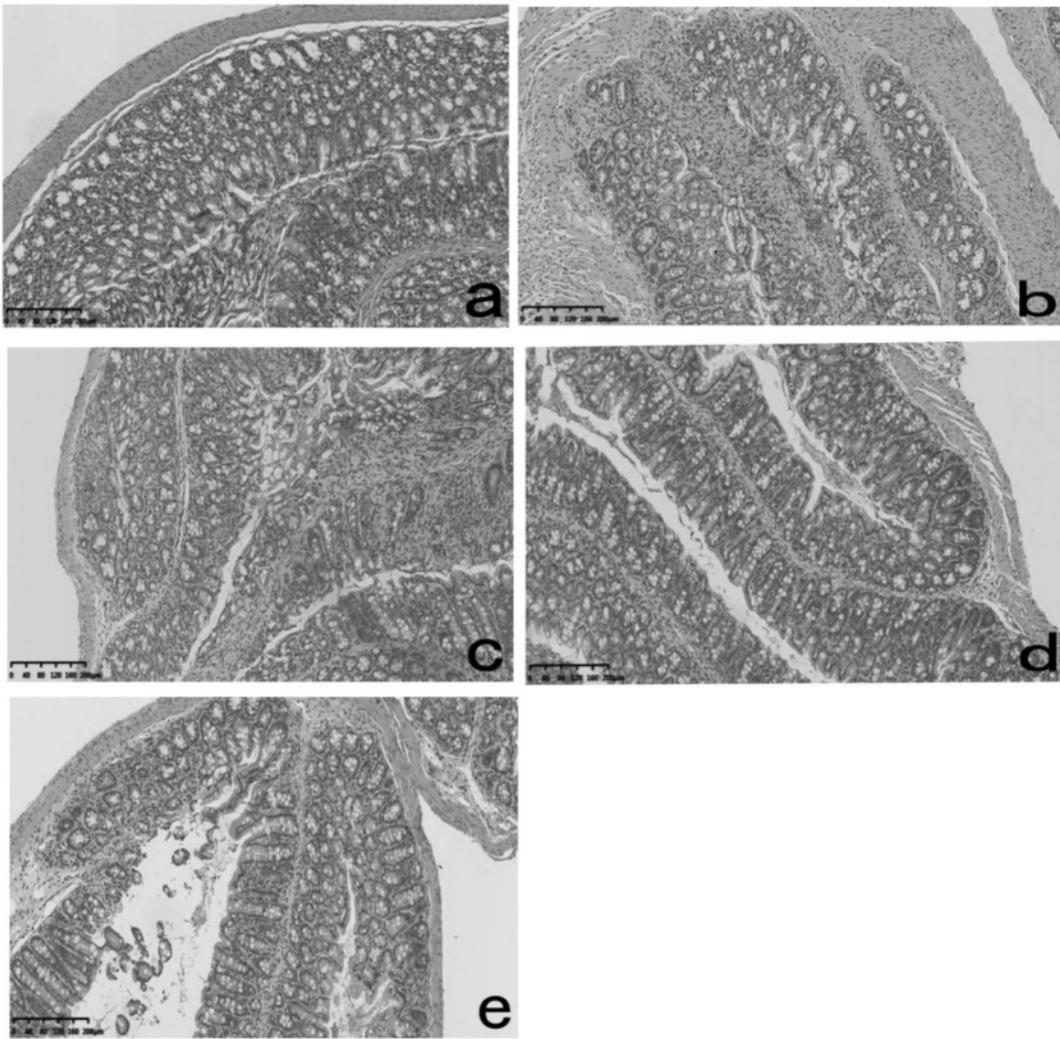


图19

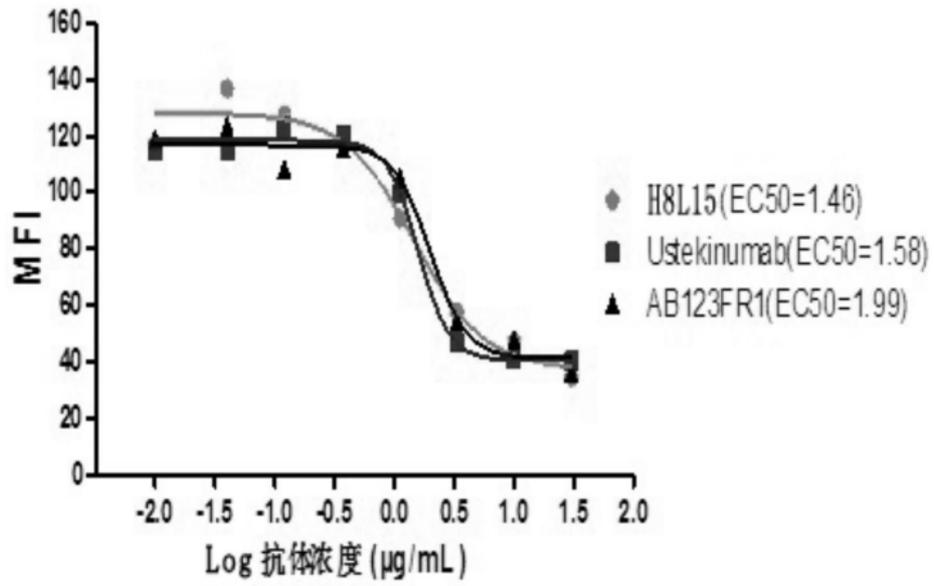


图20

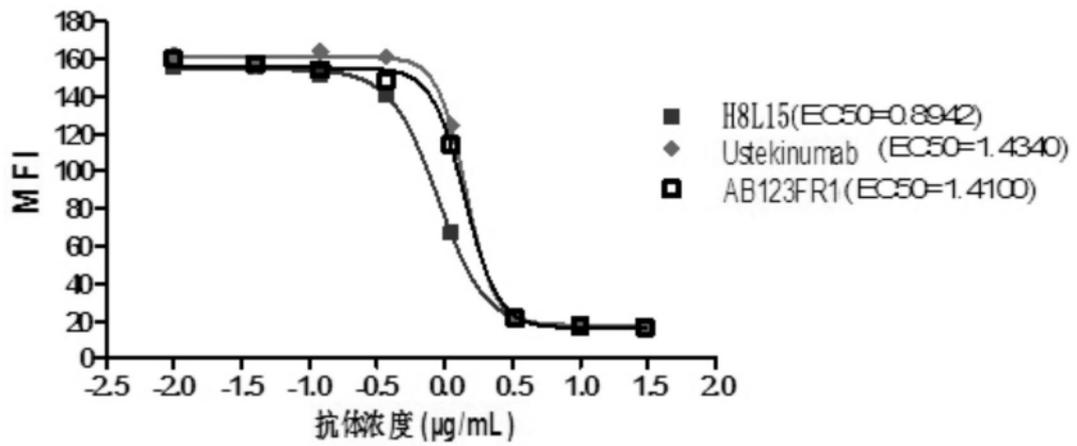


图21