



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117843779 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 09

(21) 申请号 202311774329.9

A61P 37/02 (2006.01)

(22) 申请日 2023.12.21

A61P 35/00 (2006.01)

(71) 申请人 北京贝来药业有限公司

地址 102600 北京市大兴区中关村科技园
区大兴生物医药产业基地宝参南街16
号院5号楼

(72) 发明人 刘拥军 刘广洋 徐利强 周敬文
王道辉 龙浩淼

(74) 专利代理机构 北京精金石知识产权代理有
限公司 11470

专利代理师 刘广南

(51) Int. Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

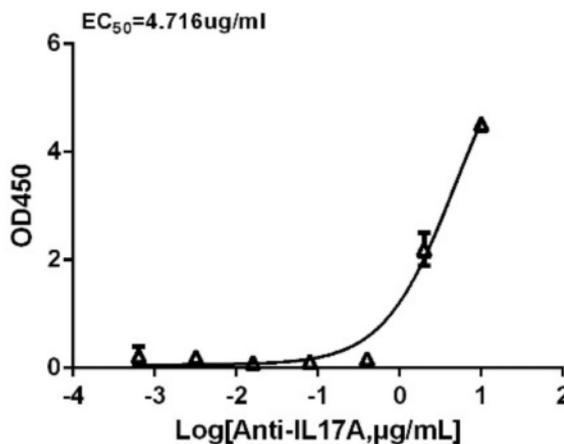
权利要求书4页 说明书29页
序列表(电子公布) 附图12页

(54) 发明名称

抗体、核酸、药物制剂和炎性疾病治疗方法

(57) 摘要

本发明属于生物医药技术领域,涉及抗体、核酸、药物制剂和炎性疾病治疗方法,具体涉及一种抗IL-17A抗体及其重组蛋白与应用。本发明提供了一种抗体,所述的抗体的氨基酸序列包含:氨基酸序列如SEQ ID NO:1-3所示的HCDR1、HCDR2、HCDR3;和/或;与SEQ ID NO:1-3所示的氨基酸序列具有至少80%序列一致性的氨基酸序列。该抗IL-17A单域抗体与IL-17A蛋白结合活性较强,稳定性、亲和力均优于阳性对照抗体。



1. 一种抗体,其特征在于,所述的抗体的氨基酸序列包含:
 - (i) 氨基酸序列如SEQ ID NO:1-3所示的HCDR1、HCDR2、HCDR3;或;
 - (ii) 与SEQ ID NO:1-3所示的氨基酸序列具有至少80%序列一致性的氨基酸序列。
2. 根据权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述抗体的氨基酸序列包含:通过在SEQ ID NO:1-3所示的氨基酸序列上进行添加、缺失、修饰和/或取代中的至少一种方式所得到的氨基酸序列。
3. 根据权利要求2所述的抗体,其特征在于,所述抗体的氨基酸序列包含:与SEQ ID NO:1-3所示的氨基酸序列相比具有1、2、3、4或5个氨基酸差异的氨基酸序列。
4. 一种抗体,其特征在于,所述的抗体的氨基酸序列包含:
 - i) 氨基酸序列如SEQ ID NO:4-7所示的FR1、FR2、FR3、FR4;或;
 - ii) 与SEQ ID NO:4-7所示的氨基酸序列具有至少80%序列一致性的氨基酸序列。
5. 根据权利要求4所述的抗体,其特征在于,所述抗体的氨基酸序列包含:通过在SEQ ID NO:4-7所示的氨基酸序列上进行添加、缺失、修饰和/或取代中的至少一种方式所得到的氨基酸序列。
6. 根据权利要求4或5所述的抗体,其特征在于,所述抗体的氨基酸序列包含:与SEQ ID NO:4-7所示的氨基酸序列相比具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸差异的氨基酸序列。
7. 一种抗体,其特征在于,所述的抗体的氨基酸序列包含:
 - (1) 权利要求1-3中任意一项所述的抗体的氨基酸序列;和
 - (2) 权利要求4-7中任意一项所述的抗体的氨基酸序列。
8. 一种抗体,其特征在于,所述的抗体的氨基酸序列包含:
FR1-HCDR1-FR2-HCDR2-FR3-HCDR3-FR4;
其中HCDR1、HCDR2、HCDR3选自以下:
 - 1) 如SEQ ID NO:1-3所示的氨基酸序列;或
 - 2) 与1) 相比具有1、2、3、4、5个的氨基酸差异的氨基酸序列的功能活性变体;FR1、FR2、FR3、FR4选自以下:
 - (a) 如SEQ ID NO:4-7所示的氨基酸序列;或
 - (b) 与(a) 具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的功能活性变体。
9. 根据权利要求8所述的抗体,其特征在于,所述HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,所述HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,所述HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。
10. 根据权利要求8或9所述的抗体,其特征在于,所述FR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,所述FR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,所述FR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,所述FR4的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。
11. 根据权利要求10所述的抗体,其特征在于,所述的抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。
12. 根据权利要求1-11中任意一项所述的抗体,其特征在于,所述的抗体为单域抗体。
13. 根据权利要求1-12中任意一项所述的抗体,其特征在于,所述的抗体为抗IL-17A抗体。

14. 根据权利要求1-13中任意一项所述的抗体,其特征在于,包含部分或全部选自人源、鼠源、灵长目动物源或骆驼科动物源的抗体重链框架区或其变体;

优选地,包含部分或全部选自骆驼科动物源的抗体重链框架区或其变体;

更优选地,包含部分或全部选自羊驼源的抗体重链框架区或其变体。

15. 一种多克隆抗体,其特征在于,包含权利要求1-14中任意一项所述的抗体。

16. 一种重组蛋白,其特征在于,包含权利要求1-14中任意一项所述的抗体。

17. 根据权利要求16所述的重组蛋白,其特征在于,还包含协助其表达和/或分泌,或延长其在体内半衰期的生物活性蛋白或其功能片段;

优选地,所述生物活性蛋白或其功能片段选自免疫球蛋白Fc结构域、血清白蛋白、白蛋白结合多肽、前白蛋白、羧基末端肽、弹性蛋白样多肽、His标签、GST标签、MBP标签、FLAG标签和SUMO标签中的至少一种。

18. 根据权利要求17所述的重组蛋白,其特征在于,所述生物活性蛋白或其功能片段为人免疫球蛋白Fc结构域,优选人IgG的Fc结构域,例如人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4的Fc结构域,更优选人IgG1的Fc结构域。

19. 一种抗体制剂,其特征在于,所述抗体制剂包括:

a) 包含权利要求1-14中任意一项所述的抗体;和

b) 药学上可接受的载剂。

20. 一种试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:

权利要求1-14中任意一项所述的抗体、权利要求15所述的多克隆抗体、权利要求16-18中任意一项所述的重组蛋白或权利要求19所述的抗体制剂;

任选地,还包括装载所述抗体制剂的容器。

21. 一种抗体药物偶联物,其特征在于,其包括:

(I) 权利要求1-14中任意一项所述的抗体、权利要求15所述的多克隆抗体或权利要求16-18中任意一项所述的重组蛋白;和

(II) 与(I)结合的偶联部分。

22. 一种分离的核酸分子,其特征在于,所述核酸分子编码权利要求1-14中任意一项所述的抗体、权利要求15所述的多克隆抗体或权利要求16-18中任意一项所述的重组蛋白。

23. 一种表达载体,其特征在于,所述的表达载体包含权利要求22所述的核酸分子。

24. 一种宿主细胞,其特征在于,所述的宿主细胞的基因组整合有权利要求22所述的核酸分子、或包含权利要求23所述的表达载体。

25. 一种药物组合物,其特征在于,所述的药物组合包含:

权利要求1-14中任意一项所述的抗体、权利要求15所述的多克隆抗体、权利要求16-18中任意一项所述的重组蛋白、权利要求19所述的抗体制剂、权利要求21所述的抗体药物偶联物、权利要求22所述的核酸分子、权利要求23所述的表达载体或权利要求24所述的宿主细胞;

任选地,所述药物组合物还包括至少一种药学上可接受的辅料。

26. 权利要求1-14中任意一项所述的抗体、权利要求15所述的多克隆抗体、权利要求16-18中任意一项所述的重组蛋白、权利要求19所述的抗体制剂、权利要求20所述的试剂盒、权利要求21所述的抗体药物偶联物、权利要求22所述的核酸分子、权利要求23所述的表

达载体或权利要求24所述的宿主细胞的用途,所述用途选自以下至少一种:

- I) 制备检测试剂或试剂盒;
- II) 制备预防和/或治疗自身免疫性疾病的药物;
- III) 制备预防和/或治疗癌症的药物。

27. 根据权利要求26所述的用途,其特征在于,所述自身免疫性疾病包括白塞氏病、系统性红斑狼疮、慢性盘状红斑狼疮、多发性硬化症、系统性硬皮病、进行性系统性硬化症、硬皮病、多发性肌炎、皮炎、结节性动脉周围炎、主动脉炎综合征、恶性类风湿关节炎、类风湿关节炎、幼年特发性关节炎、脊椎关节炎、混合性结缔组织病、卡斯尔曼病、干燥综合征、成人斯蒂尔病、血管炎、过敏性肉芽肿性血管炎、过敏性血管炎、类风湿性血管炎、大血管血管炎、ANCA相关性血管炎、Cogan综合征、RS3PE综合征、颞动脉炎、风湿性多肌痛、纤维肌痛、抗磷脂抗体综合征、嗜酸性筋膜炎、IgG4相关疾病、格林巴利综合征、重症肌无力、慢性萎缩性胃炎、自身免疫性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、Good-pasture综合征、急进性肾小球肾炎、狼疮性肾炎、巨幼红细胞性贫血、自身免疫性溶血性贫血、恶性贫血、自身免疫性中性粒细胞减少症、特发性血小板减少性紫癜、巴塞杜病、桥本病、自身免疫性肾上腺皮质功能减退症、原发性甲状腺功能减退症、艾迪生病、特发性艾迪生病、I型糖尿病、缓慢进展型I型糖尿病、局灶性硬皮病、银屑病、银屑病关节炎、大疱性类天疱疮、天疱疮、类天疱疮、妊娠疱疹、线性IgA大疱性皮肤病、获得性大疱性表皮松解症、斑秃、白斑病、寻常型白斑病、视神经脊髓炎、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、多灶性运动神经病、结节病、巨细胞动脉炎、肌萎缩侧索硬化、原田病、自身免疫性视神经病、特发性无精子症、习惯性流产、炎症性肠病、乳糜泻、强直性脊柱炎、严重哮喘、慢性荨麻疹移植免疫、家族性地中海热、嗜酸性粒细胞慢性鼻窦炎、扩张型心肌病、系统性肥大细胞增多症或包涵体肌炎。

28. 根据权利要求26或27所述的用途,其特征在于,所述癌症包括基底细胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、乳腺癌、腹膜癌、宫颈癌、胆管癌、绒毛膜癌、结直肠癌、结缔组织癌、消化系统癌症、子宫内膜癌、食道癌、眼癌、头颈癌、胃癌、胶质母细胞瘤、肝癌、肾癌、喉癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、直肠癌、呼吸系统癌、唾液腺癌、肉瘤、皮肤癌、鳞状细胞癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、泌尿系统癌症、B细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、毛细胞白血病、慢性成髓细胞性白血病。

29. 一种用于非诊断目的的体外检测样品中的IL-17A的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(A) 将权利要求1-14中任意一项所述的抗体、权利要求15所述的多克隆抗体、权利要求16-18中任意一项所述的重组蛋白、权利要求19所述的抗体制剂或权利要求21所述的抗体药物偶联物与待测样品相接触;

(B) 检测抗原-抗体复合物;

(C) 判读结果。

30. 一种预防和/或治疗自身免疫性疾病的方法,其特征在于,所述方法包括:

向有需要的受试者施用治疗有效量的权利要求1-14中任意一项所述的抗体、权利要求15所述的多克隆抗体、权利要求16-18中任意一项所述的重组蛋白、权利要求19所述的抗体制剂、权利要求21所述的抗体药物偶联物、权利要求22所述的核酸分子、权利要求23所述的

表达载体、权利要求24所述的宿主细胞或权利要求25所述的药物组合物。

31. 一种预防和/或治疗癌症的方法,其特征在于,所述方法包括:

向有需要的受试者施用治疗有效量的权利要求1-14中任意一项所述的抗体、权利要求15所述的多克隆抗体、权利要求16-18中任意一项所述的重组蛋白、权利要求19所述的抗体制剂、权利要求21所述的抗体药物偶联物、权利要求22所述的核酸分子、权利要求23所述的表达载体、权利要求24所述的宿主细胞或权利要求25所述的药物组合物。

抗体、核酸、药物制剂和炎性疾病治疗方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种抗IL-17A抗体及其重组蛋白与应用;尤其涉及一种抗IL-17A单域抗体及其下游产品和应用。

背景技术

[0002] 自近30年前被发现以来,IL-17已成为宿主保护粘膜感染的关键细胞因子,也是多种自身免疫和炎症性疾病的主要致病细胞因子和药物靶标(Yao,Z.et al.Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine,IL-17,which binds to a novel cytokine receptor.Immunity 3,811-821(1995).)。IL-17家族包括六个成员:IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F,各成员皆通过IL-17受体(IL-17RA至IL-17RE)介导其生物学功能。其中研究最多的IL-17家族成员是IL-17A,其通过与IL-17RA和IL-17RC结合来促进其生物活性。

[0003] 现在人们认识到,IL-17A的进化是为了调节缺乏适应性免疫系统的无脊椎动物的先天免疫。然而,IL-17A的炎症功能最初是在自身免疫性疾病小鼠模型中描述的,其中研究重点在于分泌IL-17A的CD4⁺T细胞-T辅助17(T_H17)细胞-作为这种细胞因子的关键生产者。现在得知CD8⁺T细胞, γ δ T细胞,先天淋巴细胞(ILCs),自然杀伤(NK)细胞,恒定NK T细胞(Invariant NK T cells),粘膜相关的恒定T细胞(Invariant T cells),肥大细胞(Mast cells)和Paneth细胞也可以是IL-17A的来源。虽然T细胞受体(TCR)活化是CD4⁺和CD8⁺T细胞产生IL-17A的关键,但先天免疫细胞产生IL-17A主要由炎性细胞因子驱动,特别是IL-1 β 和IL-23。

[0004] 实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的研究表明,IL-17A是T细胞介导的自身免疫性疾病病理学中的关键致病细胞因子(Langrish,C.L.et al.IL-23drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation.J.Exp.Med.201,233-240(2005).;Sutton,C.,Brereton,C.,Keogh,B.,Mills,K.H.&Lavelle,E.C.A crucial role for interleukin(IL)-1in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis.J.Exp.Med.203,1685-1691(2006).)。随后的研究表明,在EAE中,IL-17A由TH17细胞和分泌IL-17A的 γ δ T(γ δ T17)细胞分泌(Sutton,C.E.et al.Interleukin-1and IL-23induce innate IL-17production from gammadelta T cells,amplifying Th17 responses and autoimmunity.Immunity 31,331-341(2009).)。

[0005] 这些研究和其他详细阐述了IL-17A在人类疾病中的病理作用的研究最终导致了针对IL-17A(IL-17A和IL-17F、IL-17RA或IL-23)的单克隆抗体(mAb)的开发。这些单克隆抗体已被许可用于治疗某些自身免疫性疾病,特别是牛皮癣,其疗效已超过传统的非甾体类抗炎药和肿瘤坏死因子(TNF)阻断药物(Langley,R.G.et al.Secukinumab in plaque psoriasis-results of two phase 3trials.N.Engl.J.Med.371,326-338(2014).;Reich,K.et al.Bimekizumab versus Secukinumab in plaque psoriasis.N.Engl.J.Med.385,142-152(2021).;Warren,R.B.etal.Bimekizumab versus Adalimumab in plaque

psoriasis.N.Engl.J.Med.385,130-141(2021).).

[0006] 近几十年来,越来越多的研究发现IL-17A在多种癌症的发展中起着重要作用。IL-17A在前列腺癌、结直肠癌(CRC)、胃癌、乳腺癌、肺癌和肝细胞癌(HCC)组织中高表达,其表达水平与肿瘤进展呈正相关(Kryczek I,Banerjee M,Cheng P,et al.PhenoType,distribution,generation,and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments.Blood.2009;114(6):1141-1149.)。目前的研究表明,IL-17A的高表达分别通过促进肿瘤细胞增殖、胆固醇合成、上皮到间充质细胞转化(EMT)、MMPs表达、炎症细胞募集到肿瘤组织以及抑制细胞自噬和凋亡来促进肿瘤进展(Liao R,Sun J,Wu H,et al.High expression of IL-17and IL-17RE associate with poor prognosis of hepatocellular carcinoma.J Exp Clin Cancer Res.2013;32(1):3.;Sun C,Kono H,Furuya S,et al.Interleukin-17A Plays a Pivotal Role in Chemically Induced Hepatocellular Carcinoma in Mice.Dig Dis Sci.2016;61(2):474-488.)。

[0007] 中国专利申请202310019497.0公开了一种抗人IL-17A蛋白的单克隆抗体、包含该抗体的试剂盒及其在检测人IL-17A中的应用。包含所述抗人IL-17A蛋白的单克隆抗体检测试剂盒可用于检测人血清中的IL-17A。

[0008] 中国专利申请202180041325.2公开了一种稳定的抗IL-17A抗体的药物组合物及其在医药上的应用。该药物组合物含有抗IL-17A抗体或其抗原结合片段、缓冲液,还可以含有至少一种稳定剂,任选的还可以含有表面活性剂。

[0009] 目前全球范围内已上市多款阻断IL-17的抗体药物,其中包括中和IL-17A(Secukinumab和Ixekizumab)或IL-17RA(Brodalumab)的单抗药物,而国内在研的围绕IL-17靶点并用于自身免疫疾病治疗的抗体药物或小分子已经超过50个。尽管与化疗药物相比抗体药通常在人体具有良好的疗效和耐受性,然而在临床使用中仍然存在很多治疗相关副作用,例如:鼻咽炎、头痛、恶心和腹泻或者更严重的如感染、心脏毒性和严重的免疫反应等;另外单抗药物结构复杂、稳定性相对较差也导致其需要反复大剂量注射从而达到最佳效果。

[0010] 因此本领域需要更多的高特异性、高稳定性和长效的抗IL-17A抗体或IL-17A抑制剂用于预防和/或治疗自身免疫性疾病和癌症。

[0011] 本发明系发明人针对自主开发的抗IL-17A抗体所提出的专利申请。

[0012] 除本发明请求保护的抗体外,发明人同时开发出另外8个抗体,基于专利法单一性的相关规定,对9个不同抗体分别请求保护。

[0013] 发明人还根据这9个抗体开发了12个串联抗体,基于专利法单一性的相关规定,对12个不同的串联抗体分别请求保护。

[0014] 发明人还根据这12个串联抗体,开发了基因修饰干细胞技术,基于专利法单一性的相关规定,对3个不同的基因修饰干细胞以及3项不同的应用分别请求保护。

[0015] 为便于理解本发明,可选地参阅本项目其他系列申请文本。

发明内容

[0016] 单域抗体(single domain antibody,sdAb),也称纳米抗体(nanobody,Nb),最早是从骆驼血液中发现的新型抗体,因其只有两条重链,没有轻链,因此也被称为重链单域抗体

VHH(variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody)。纳米抗体晶体直径2.5nm,长4nm,只包含一个重链可变区(VHH)和CH2、CH3区,相比于普通的抗体,纳米抗体轻链天然缺失,是自然存在的可以和抗原结合的最小片段。纳米抗体能像其他抗体一样与抗原等靶标紧紧结合,但不像单链抗体那样相互黏连聚集成块。以该“重链抗体”为基础的纳米抗体不仅分子量只是普通抗体的1/10,临床使用更加安全,而且化学性质也更加灵活、稳定性好、可溶性高、表达容易且容易偶联其他分子,因此研发IL17A纳米抗体可能克服传统抗体的缺陷,具有广阔的前景。

[0017] 为了实现上述技术目的,本发明特此提出了以下技术方案:

[0018] 第一方面,本发明提供了一种抗体,所述的抗体的氨基酸序列包含:

[0019] (i) 氨基酸序列如SEQ ID NO:1-3所示的HCDR1、HCDR2、HCDR3;或;

[0020] (ii) 与SEQ ID NO:1-3所示的氨基酸序列具有至少80%序列一致性的氨基酸序列。

[0021] 在一些实施方案中,所述的氨基酸差异通过在SEQ ID NO:1-3所示的氨基酸序列上进行添加、缺失、修饰和/或取代中的至少一种方式实现。

[0022] 优选地,一个或多个氨基酸的取代可以是一个或多个氨基酸的保守性取代。这种保守性取代优选地是以下组(a)到(e)中的一个氨基酸被同组中的另一个氨基酸残基取代的取代:(a)小的脂肪族、非极性或弱极性残基:Ala、Ser、Thr、Pro和Gly;(b)极性、带负电的残基及其(不带电的)酰胺:Asp、Asn、Glu和Gln;(c)极性、带正电的残基:His、Arg和Lys;(d)大的脂肪族、非极性残基:Met、Leu、He、Val和Cys;以及(e)芳香族残基:Phe、Tyr和Trp。

[0023] 特别优选地,保守性取代如下:Ala到Gly或到Ser;Arg到Lys;Asn到Gln或到His;Asp到Glu;Cys到Ser;Gln到Asn;Glu到Asp;Gly到Ala或到Pro;His到Asn或到Gln;Ile到Leu或到Val;Leu到Ile或到Val;Lys到Arg、到Gln或到Glu;Met到Leu、到Tyr或到Ile;Phe到Met、到Leu或到Tyr;Ser到Thr;Thr到Ser;Trp到Tyr;Tyr到Trp;和/或Phe到Val、到Ile或到Leu。

[0024] 第二方面,本发明提供了一种抗体,所述的抗体的氨基酸序列包含:

[0025] i) 氨基酸序列如SEQ ID NO:4-7所示的FR1、FR2、FR3、FR4;或;

[0026] ii) 与SEQ ID NO:4-7所示的氨基酸序列具有至少80%序列一致性的氨基酸序列。

[0027] 在一些实施方案中,所述抗体的氨基酸序列包含:通过在SEQ ID NO:4-7所示的氨基酸序列上进行添加、缺失、修饰和/或取代中的至少一种方式所得到的氨基酸序列。

[0028] 在一些实施方案中,所述抗体的氨基酸序列包含:与SEQ ID NO:4-7所示的氨基酸序列相比具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0029] 第三方面,本发明提供了一种抗体,所述的抗体的氨基酸序列包含:

[0030] (1) 第一方面所述的抗体的氨基酸序列;和

[0031] (2) 第二方面所述的抗体的氨基酸序列。

[0032] 第四方面,本发明提供了一种抗体,所述的抗体的氨基酸序列包含:

[0033] FR1-HCDR1-FR2-HCDR2-FR3-HCDR3-FR4;

[0034] 其中HCDR1、HCDR2、HCDR3选自以下:

[0035] 1) 如SEQ ID NO:1-3所示的氨基酸序列;或

[0036] 2) 与1)相比具有1、2、3、4、5个的氨基酸差异的氨基酸序列的功能活性变体;

[0037] FR1、FR2、FR3、FR4选自以下:

- [0038] (a) 如SEQ ID NO:4-7所示的氨基酸序列;或
- [0039] (b) 与(a)具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的功能活性变体。
- [0040] 在一些实施方案中,所述功能活性变体为与其来源的母体抗体具有相同或相近的亲和力或功能的单域抗体变体(突变体),例如可以特异性结合IL-17A并阻断IL-17A与其受体结合的变体(突变体)。
- [0041] 在一些实施方案中,所述HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,所述HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,所述HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。
- [0042] 在一些实施方案中,所述FR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,所述FR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,所述FR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,所述FR4的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。
- [0043] 在一些实施方案中,所述的抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。
- [0044] 在一些实施方案中,所述的抗体为单域抗体。
- [0045] 在一些实施方案中,所述的抗体为抗IL-17A抗体。
- [0046] 在一些实施方案中,所述的抗体包含部分或全部选自人源、鼠源、灵长目动物源或骆驼科动物源的抗体重链框架区或其变体。
- [0047] 在一些优选的实施方案中,所述的抗体包含部分或全部选自骆驼科动物源的抗体重链框架区或其变体。
- [0048] 在一些更优选的实施方案中,所述的抗体包含部分或全部选自羊驼源的抗体重链框架区或其变体。
- [0049] 其中SEQ ID NO:1为GFSFSIYS;
- [0050] SEQ ID NO:2为ITKGGLK;
- [0051] SEQ ID NO:3为NAGRENGY;
- [0052] SEQ ID NO:4为EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAW;
- [0053] SEQ ID NO:5为VNWYRQAPGKERELVAG;
- [0054] SEQ ID NO:6为DYADSVKGRFTISRDNKNAVYLRMNMLKPEDTAVYYC;
- [0055] SEQ ID NO:7为WGQGTQVAVST;
- [0056] SEQ ID NO:8:
- [0057] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAWGFSGFSIYSVNWYRQAPGKERELVAGITKGGLK DYADSVKGRF TISRDNKNAVYLRMNMLKPEDTAVYYCNAGRENGYWGQGTQVAVST编码SEQ ID NO:8的核苷酸序列如SEQ ID NO:9所示:
- [0058] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGT AGCCTGGGGATTTAGCTTCAGTATCTATTCCGTGAACTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGTTGGTC GCAGGTATTACGAAAGGTGGTCTAAAAGACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACG CCAAGAACGCGGTGTATCTGCGAATGAACATGTTGAAACCTGAAGACACGGCCGTCTACTACTGTAATGCAGGCCG GGAGAATGGTTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCGCCGTCTCTACC。
- [0059] 第五方面,本发明提供了一种多克隆抗体,其包含前述任一抗体。
- [0060] 第六方面,本发明提供一种重组蛋白,其包含前述任一抗体。
- [0061] 在一些实施方案中,所述重组蛋白可以为融合蛋白。

[0062] 在一些实施方案中,所述重组蛋白还包含协助其表达和/或分泌,或延长其在体内半衰期的生物活性蛋白或其功能片段。

[0063] 在一些实施方案中,所述生物活性蛋白(也可包括多肽)或其功能片段选自免疫球蛋白Fc结构域、血清白蛋白(例如,人血清白蛋白(HSA))、白蛋白结合多肽(例如HAS结合多肽)、前白蛋白(也称为转甲状腺素)、羧基末端肽(例如,人绒毛膜促性腺激素 β 亚基(CTP))、弹性蛋白样多肽(ELP)、His标签(优选 $6 \times \text{His}$)、GST(谷胱甘肽巯基转移酶)标签、MBP(麦芽糖结合蛋白)标签、FLAG标签、SUMO(泛素样修饰蛋白)标签等中的至少一种。

[0064] 优选地,所述生物活性蛋白或其功能片段可以为免疫球蛋白Fc结构域,优选人IgG的Fc结构域,例如人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4的Fc结构域,更优选人IgG1的Fc结构域。

[0065] 在一些实施方案中,所述人IgG1 Fc的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示。

[0066] SEQ ID NO:10:

[0067] DKTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

[0068] 编码SEQ ID NO:10的核苷酸序列如SEQ ID NO:11所示:

[0069] GACAAAACACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACAAGTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA。

[0070] 在一些实施方案中,可在本文中所提供抗体的Fc区中引入一个或多个氨基酸修饰,以此产生Fc区变体。Fc区变体可包含在一或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如置换、缺失和插入)的人Fc区序列(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区)。

[0071] 在一些实施方案中,所述重组蛋白可以为单聚体、二聚体或多聚体。

[0072] 第七方面,本发明提供了一种抗体制剂,其包括:

[0073] a) 前述任一抗体;和

[0074] b) 药学上可接受的载剂,例如缓冲液、无菌水或表面活性剂。

[0075] 在一些实施方案中,所述表面活性剂可以为离子活性剂或非离子型活性剂。

[0076] 第八方面,本发明提供一种试剂盒,其包括前述任一抗体、前述任一多克隆抗体、前述任一重组蛋白和/或前述任一抗体制剂;

[0077] 任选地,还包括装载所述抗体制剂的容器。

[0078] 第九方面,本发明提供了一种抗体药物偶联物,其包括:

[0079] (I) 前述任一抗体、多克隆抗体或重组蛋白;和

[0080] (II)与(I)偶联的偶联部分。

[0081] 在一些实施方案中,所述偶联部分包括可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素和/或酶。

[0082] 第十方面,本发明提供了一种分离的核酸分子,所述核酸分子编码前述任一抗体、多克隆抗体或重组蛋白。

[0083] 第十一方面,本发明提供了一种表达载体,所述的表达载体包含前述任一核酸分子。

[0084] 在一些实施方案中,所述表达载体可以为真核表达载体或原核表达载体,优选真核表达载体。

[0085] 优选地,所述真核表达载体选自酵母表达载体、昆虫表达载体或哺乳动物表达载体;

[0086] 更优选地,所述哺乳动物表达载体选自逆转录病毒表达载体、慢病毒表达载体、腺病毒表达载体、腺相关病毒表达载体。

[0087] 第十二方面,本发明提供了一种宿主细胞,所述的宿主细胞的基因组整合有前述任一核酸分子、或包含前述任一表达载体。

[0088] 第十三方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含如前述任一抗体、多克隆抗体、重组蛋白、抗体制剂、抗体偶联物、核酸分子、表达载体和/或宿主细胞;

[0089] 任选地,所述药物组合物还包括至少一种药学上可接受的辅料。

[0090] 在一个实施方案中,所述辅料选自溶剂、稀释剂、崩解剂、沉淀抑制剂、表面活性剂、助流剂、粘合剂、润滑剂、分散剂、助悬剂、等渗剂、增稠剂、乳化剂、防腐剂、稳定剂、水合剂、乳化加速剂、缓冲剂、吸收剂、着色剂、香味剂、甜味剂、离子交换剂、脱模剂、涂布剂、矫味剂或抗氧化剂。

[0091] 第十四方面,本发明提供了一种前述任一抗体、多克隆抗体、重组蛋白、抗体制剂、抗体药物偶联物和/或药物组合物的用途,所述用途选自以下的至少一种:

[0092] I) 制备检测试剂或试剂盒;

[0093] II) 制备预防和/或治疗自身免疫性疾病的药物;

[0094] III) 制备预防和/或治疗癌症的药物。

[0095] 在一些实施方案中,所述自身免疫性疾病包括,但不限于白塞氏病、系统性红斑狼疮、慢性盘状红斑狼疮、多发性硬化症、系统性硬皮病、进行性系统性硬化症、硬皮病、多发性肌炎、皮肌炎、结节性动脉周围炎(结节性多动脉炎、显微镜下多血管炎)、主动脉炎综合征(高安动脉炎)、恶性类风湿关节炎、类风湿关节炎、幼年特发性关节炎、脊椎关节炎、混合性结缔组织病、卡斯尔曼病、干燥综合征、成人斯蒂尔病、血管炎、过敏性肉芽肿性血管炎、过敏性血管炎、类风湿性血管炎、大血管血管炎、ANCA相关性血管炎(例如,韦格纳肉芽肿和嗜酸性韦格纳肉芽肿)、Cogan综合征、RS3PE综合征、颞动脉炎、风湿性多肌痛、纤维肌痛、抗磷脂抗体综合征、嗜酸性筋膜炎、IgG4相关疾病(例如,原发性硬化性胆管炎、自身免疫性胰岛炎等)、格林巴利综合征、重症肌无力、慢性萎缩性胃炎、自身免疫性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、Good-pasture综合征、急进性肾小球肾炎、狼疮性肾炎、巨幼红细胞性贫血、自身免疫性溶血性贫血、恶性贫血、自身免疫性中性粒细胞减少症、特发性血小板减少性紫癜、巴塞杜病(格雷夫斯病(甲亢))、桥本病、自身免疫性肾上腺皮质功能减

退症、原发性甲状腺功能减退症、艾迪生病(慢性肾上腺皮质功能减退症)、特发性艾迪生病、I型糖尿病、缓慢进展型I型糖尿病(成人隐匿性自身免疫性糖尿病)、局灶性硬皮病、银屑病、银屑病关节炎、大疱性类天疱疮、天疱疮、类天疱疮、妊娠疱疹、线性IgA大疱性皮肤病、获得性大疱性表皮松解症、斑秃、白斑病、寻常型白斑病、视神经脊髓炎、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、多灶性运动神经病、结节病、巨细胞动脉炎、肌萎缩侧索硬化、原田病、自身免疫性视神经病、特发性无精子症、习惯性流产、炎症性肠病(例如溃疡性结肠炎、克罗恩病)、乳糜泻、强直性脊柱炎、严重哮喘、慢性荨麻疹移植免疫、家族性地中海热、嗜酸性粒细胞慢性鼻窦炎、扩张型心肌病、系统性肥大细胞增多症或包涵体肌炎等。

[0096] 在一些实施方案中,所述癌症包括,但不限于基底细胞癌、胆管癌;膀胱癌;骨癌;乳腺癌;腹膜癌;宫颈癌;胆管癌;绒毛膜癌;结直肠癌;结缔组织癌;消化系统癌症;子宫内膜癌;食道癌;眼癌;头颈癌;胃癌;胶质母细胞瘤;肝癌;肾癌;喉癌;白血病;肝癌;肺癌(例如,小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌);淋巴瘤(包括霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤);黑色素瘤;骨髓瘤;神经母细胞瘤;口腔癌;卵巢癌;胰腺癌;前列腺癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤;直肠癌;呼吸系统癌;唾液腺癌;肉瘤;皮肤癌;鳞状细胞癌;睾丸癌;甲状腺癌;子宫癌;泌尿系统癌症;B细胞淋巴瘤;慢性淋巴细胞性白血病(CLL);急性成淋巴细胞性白血病(ALL);毛细胞白血病;慢性髓细胞性白血病等。

[0097] 第十五方面,本发明提供了一种用于非诊断目的的体外检测样品中的IL-17A的方法,所述方法包括以下步骤:

[0098] I) 将前述任一抗体、多克隆抗体、重组蛋白、抗体制剂和/或抗体药物偶联物与待测样品相接触;

[0099] II) 检测抗原-抗体复合物;

[0100] III) 判读结果。

[0101] 第十六方面,本发明提供了一种预防和/或治疗自身免疫性疾病的方法,所述方法包括:

[0102] 向有需要的受试者施用治疗有效量的前述任一抗体、多克隆抗体、重组蛋白、抗体制剂、抗体药物偶联物、核酸分子、表达载体、或宿主细胞或药物组合物。

[0103] 第十七方面,本发明提供了一种预防和/或治疗癌症的方法,所述方法包括:

[0104] 向有需要的受试者施用治疗有效量的前述任一抗体、多克隆抗体、重组蛋白、抗体制剂、抗体药物偶联物、核酸分子、表达载体、或宿主细胞或药物组合物。

[0105] 与现有技术相比,本发明提供的抗IL-17A单域抗体可有效抑制IL-17A蛋白与其膜受体结合,并抑制胞内NF κ B的信号,呈现剂量效应;与IL-17A蛋白结合活性较强,EC₅₀可达4.7 μ g/mL,远高于阳性对照抗体的10.06 μ g/mL;稳定性、亲和力均优于阳性对照抗体,其中单域抗体1-G12热稳定性显著优于阳性对照抗体,其聚集温度T_{agg}相对于阳性对照抗体提高了约20 $^{\circ}$ C。

附图说明

[0106] 图1示出了Human IL-17A蛋白的纯度检测结果。

[0107] 图2-图4示出了VHH片段PCR克隆及酶切结果。

[0108] 图5-图8示出了羊驼酵母库流式检测结果。

- [0109] 图9示出了酵母库FACS检测结果。
- [0110] 图10示出了酵母库测序分析结果。
- [0111] 图11示出了单域抗体1-G12的SDS PAGE检测结果。
- [0112] 图12示出了ELISA检测单域抗体1-G12亲和力的实验结果。
- [0113] 图13示出了ELISA检测阳性对照抗体亲和力的实验结果。
- [0114] 图14和图15示出了IL-17A重组蛋白激活报告基因细胞株的情况。
- [0115] 图16示出了单域抗体1-G12阻断功能检测的实验结果。
- [0116] 图17示出了阳性对照抗体阻断功能检测的实验结果。
- [0117] 图18示出了单域抗体1-G12的热稳定性检测结果。
- [0118] 图19示出了阳性对照抗体的热稳定性检测结果。

具体实施方式

[0119] 除非另有定义,否则本发明使用的所有技术术语和科技术语都具有如在本发明所属领域中通常使用的相同含义。出于解释本说明书的目的,将应用以下定义,并且在适当时,以单数形式使用的术语也将包括复数形式,反之亦然。

[0120] 除非上下文另有明确说明,否则本文所用的表述“一种”和“一个”包括复数指代。例如,提及“一个细胞”包括多个这样的细胞及本领域技术人员可知晓的等同物等等。

[0121] 本文所用的术语“包括(comprises)”或“包含(comprising)”是指“包括但不限于”。该术语旨在是开放式的,以指定任何所述特征、要素、整数、步骤或组件的存在,但不排除一个或多个其他特征、要素、整数、步骤、组件或其组的存在或添加。因此,术语“包含”包括更具限制性的术语“由……组成”和“基本上由……组成”。在一个实施方式中,在整个申请中特别是在权利要求书中使用的术语“包含”可以被术语“由……组成”代替。本文所用氨基酸三字母代码和单字母代码如本领域技术人员知晓,或J Biol.Chem,243,p3558(1968)中所述。

[0122] 本文所用的术语“任选”、“任一”、“任意”或“任一项”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生,该说明包括该事件或环境发生或不发生地场合。例如,“任选包含1个抗体重链可变区”意味着特定序列的抗体重链可变区可以但不必须存在。

[0123] 本文所用的术语“约”表示其后的数值的 $\pm 20\%$ 的范围。在一些实施方式中,术语“约”表示其后的数值的 $\pm 10\%$ 的范围。在一些实施方式中,术语“约”表示其后的数值的 $\pm 5\%$ 的范围。

[0124] 本文所用的术语“和/或”应理解为意指可选项中的任一项或可选项中的任意两项或更多项的组合。

[0125] 本文所用的术语“IL-17A”或“白介素-17A”,是指一种细胞因子,属于白细胞介素17家族,由T细胞和其他类型的免疫细胞产生,并在免疫系统中发挥重要作用。IL-17A主要由Th17细胞产生,其他细胞包括CD8+T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、NK细胞及中性粒细胞、肥大细胞和巨噬细胞也表达IL-17A。它主要作用于免疫细胞,如巨噬细胞、中性粒细胞和内皮细胞,诱导炎症反应。在一些实例中,该术语包括变体、同源物、直系同源物和旁系同源物。例如,对人IL-17A特异的抗体可以在某些情况下与另一物种例如猴的IL-17A蛋白交叉反应。在其他实施方式中,对人IL-17A蛋白特异的抗体可以完全地对人IL-17A蛋白特异而不与其他物种或

其他类型的蛋白交叉反应,或者可以与一些其他物种而非所有其他物种的IL-17A蛋白交叉反应。

[0126] 本文所用的术语“高变区”、“超变区”、“互补决定区”、“HVR”或“CDR”,是指在抗体可变结构域区域中序列上高变和/或形成结构上限定的环(“高变环”)的区域。通常,天然四链抗体包含六个HVR或CDR:三个存在于VH中(H1、H2、H3),三个存在于VL中(L1、L2、L3)。基于Chothia定义规则,示例性CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2和HCDR3)位于氨基酸残基L26-L32(L1)、L50-L52(L2)、L91-L96(L3)、H26-H32(H1)、H52-H56(H2)和H96-H101(H3)处(Chothia等人,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。基于Kabat定义规则,示例性CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2和HCDR3)位于氨基酸残基L24-L34(L1)、L50-L56(L2)、L89-L97(L3)、H31-H35(H1)、H50-H65(H2)和H95-H102(H3)处(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,the fifth edition,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991))。基于IMGT定义规则,示例性CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2和HCDR3)位于氨基酸残基L27-L32(L1)、L50-L51(L2)、L89-L97(L3)、H26-H33(H1)、H51-H56(H2)和H93-H102(H3)处(Honjo,T.和Alt,F.W.(1995) Immunoglobulin genes.Academic Press pp.3-443)。本领域人员公知,在本领域中可以通过多种方法来定义抗体的CDR,例如基于序列可变性的Kabat定义规则、基于结构环区域位置的Chothia定义规则和基于CDR移植的抗体人源化设计的参考工具(参见J Mol Biol.273:927-48,1997)。本领域技术人员应当理解的是,除非另有规定,否则术语给定抗体或其区(例如可变区)的“CDR”及“互补决定区”应理解为涵盖如通过本发明描述的上述已知方案中的任何一种界定的互补决定区。虽然本公开请求保护的范围是基于IMGT定义规则所示出的序列,但是根据其他CDR定义规则所对应的氨基酸序列也应当落在本发明的保护范围内。

[0127] 本文所用的术语“抗IL-17A(单域或纳米)抗体”或“IL-17A(单域或纳米)抗体”,是指特异性结合IL-17A,并且部分或完全地中和、抑制或削弱IL-17A活性、和/或使IL-17A失活、阻止IL-17A应答或由IL-17A介导的下游通路或其他IL-17A介导的功能的抗体。

[0128] 本文所用的术语“抗体”,是指包含由二硫键(S-S)相互连接的重链(H)和轻链(L)的糖蛋白。每条重链由重链可变区(本文中缩写为VH)和重链恒定区(本文中缩写为CH)组成。重链恒定区由3个结构域CH1、CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区(本文中缩写为VL)和轻链恒定区(本文中缩写为VH)组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。轻链分为两类分别为kappa型轻链和lambda型轻链(例如本发明中轻链恒定区C κ / λ 表示轻链恒定区为kappa型轻链或者lambda型轻链)。VH区和VL区可以进一步再划分为超变区(也称互补决定区(CDR)),其间插有较保守的构架区或框架区(FR)。每个VH和VL由三个CDR和4个FR组成,从氨基端到羧基端以如下顺序排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。抗体包含单特异性抗体、双特异性抗体和多特异性抗体,只要其表现所期望的生物活性或功能即可。

[0129] 术语“单域抗体”(sdAb)或“纳米抗体”,具有其在本领域中的一般含义,且是指具有仅12-15kDa分子量的抗体片段,其由来源于重链的单个单体可变抗体结构域组成。这种单域抗体(命名为VHH)可以在骆驼科哺乳动物中发现,且天然缺失轻链。对于(单)域抗体的一般描述,还参考上述现有技术以及EP 0368684,Ward等(Nature 1989Oct 12;341(6242):544-6),Holt et al,Trends Biotechnol,2003,21(11):484-490;和WO 06/030220,WO 06/

003388。单域抗体的氨基酸序列和结构可以被认为由四个框架区或“FRW”组成,其在本领域中分别称为“框架区1”或“FRW1”;“框架区2”或“FRW2”;“框架区3”或“FRW3”;以及“框架区4”或“FRW4”;框架区被三个互补决定区或“CDR”间隔,在本领域中分别称为“互补决定区1”或“CDR1”;“互补决定区2”或“CDR2”,以及“互补决定区3”或“CDR3”。因此,单域抗体可定义为具有以下一般结构的氨基酸序列:FRW1-CDR1-FRW2-CDR2-FRW3-CDR3-FRW4,其中FRW1-FRW4分别指框架区1-4,且其中CDR1-CDR3指互补决定区1-3。在本公开的上下文中,单域抗体的氨基酸残基根据International ImMunoGeneTics information system氨基酸编号(<http://imgt.cmes.fr/>)给出的VH结构域的通用编号方式进行编号。

[0130] 本文所用的术语“氨基酸”,是指天然存在的和合成的氨基酸,以及以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸,以及经修饰的氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即,碳结合至氢、羧基、氨基和R基团,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基硫类。这些类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽主链,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指结构不同于氨基酸的一般化学结构,但以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的化合物。

[0131] 本文所用的术语“活性”、“功能活性”或“生物活性”,或术语“生物性质”或“生物特征”此处可互换使用,包括但不限于表位/抗原亲和力和特异性、在体内或体外中和或拮抗IL-17A活性的能力、 IC_{50} 、抗体的体内稳定性和抗体的免疫原性质。本领域公知的抗体的其它可鉴定的生物学性质或特征包括,例如,交叉反应性(即通常与靶定肽的非人同源物,或与其它蛋白质或组织的交叉反应性),和保持哺乳动物细胞中蛋白质高表达水平的能力。使用本领域公知的技术观察、测定或评估前面提及的性质或特征,所述技术包括但不限于ELISA、FACS或BIAcore等离子体共振分析、不受限制的体外或体内中和测定、受体结合、细胞因子或生长因子的产生和/或分泌、信号转导和不同来源(包括人类、灵长类或任何其它来源)的组织切片的免疫组织化学。

[0132] 本文所用的术语“Fc”或“Fc区”或“Fc片段”,是指由IgA、IgD及IgG的CH2和CH3结构域,或者由IgE及IgM的CH2、CH3和CH4结构域通过铰链区的组成的多肽。尽管Fc片段的分解是可变的,但是人IgG的重链Fc片段通常指从A231到其羧基末端这一段多肽。

[0133] 本文所用的术语“表位”,是指能够特异性结合抗体的蛋白决定簇。表位通常由表面簇集分子,例如氨基酸或糖侧链组成,和通常具有特定的三维结构特征,以及特定的电荷特征。构象和非构象表位的不同之处在于与前者而非后者的结合在存在变性溶剂的情况下丢失。表位可包含直接参与结合的氨基酸残基和不直接参与结合的其他氨基酸残基,例如被特异性抗原结合肽有效封闭或覆盖的氨基酸残基(换句话说,氨基酸残基在特异性抗原结合肽的足迹内)。

[0134] 本文所用的术语“亲和力”或“结合亲和力”指反映结合对子的成员之间相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶物Y的亲和力可以通常由平衡解离常数(KD)代表,平衡解离常数是解离速率常数和结合速率常数(分别是 K_{off} 和 K_{on})的比值。亲和力可以由本领域已知的常见方法测量。用于测量亲和力的一个具体方法是本文中的ForteBio动力学结合测定法。

[0135] 本文所用的术语“高亲和性”或“高亲和力”，对于IgG抗体而言，是指对于抗原的KD为 1.0×10^{-6} M或更低，优选 5.0×10^{-8} M或更低，更优选 1.0×10^{-8} M或更低、 5.0×10^{-9} M或更低，更优选 1.0×10^{-9} M或更低。对于其他抗体亚型，“高亲和性”结合可能会变化。例如，IgM亚型的“高亲和性”结合是指KD为 10^{-6} M或更低，优选 10^{-7} M或更低，更优选 10^{-8} M或更低。

[0136] 术语“抗体药物偶联物”是指生物活性化合物片段与抗体或其抗原结合片段部分连接得到的物质。生物活性化合物片段与靶向部分可以通过连接子相连。所述连接子在特定环境(例如胞内低pH值环境)中或特定作用(例如溶酶体蛋白酶的作用)下能够断裂，从而使生物活性化合物片段与靶向部分或抗体或其抗原结合片段分离。所述连接子包含可裂解或不可裂解的单元，例如肽或二硫键。生物活性化合物片段与靶向部分或抗体或其抗原结合片段直接通过共价键相连，所述共价键在特定环境或作用下能够断裂，从而使生物活性化合物片段与抗体或其抗原结合片段部分分离。

[0137] 本文所用的术语“核酸”或“多核苷酸”是指脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其呈单链或双链形式的聚合物。除非明确地限制，否则术语包括具有与参照核酸相似的结合性质并且以与天然存在的核苷酸相似的方式被代谢的含有已知的天然核苷酸的类似物的核酸(参见，属于Kariko等人的美国专利No.8278036，其公开了尿苷被假尿苷替代的mRNA分子，合成所述mRNA分子的方法以及用于在体内递送治疗性蛋白的方法)。除非另有所指，否则特定核酸序列还隐含地包括其保守修饰的变体(例如，简并密码子取代)、等位基因、直系同源物、SNP和互补序列以及明确指出的序列。具体地，简并密码子取代可通过生成其中一个或多个选择的(或全部)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(Batzer, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994))。

[0138] 本文所用的术语“分离的核酸”是一种已被鉴定并从其自然环境的组成部分中分离出来的核酸。分离的核酸包括包含在通常包含核酸分子的细胞中的核酸分子，但该核酸分子存在于染色体外或不同于其自然染色体位置的染色体位置。

[0139] 本文所用的术语“构建体”是指任何重组多核苷酸分子(诸如质粒、粘粒、病毒、自主复制多核苷酸分子、噬菌体或线性或环状单链或双链DNA或RNA多核苷酸分子)，衍生自任何来源，能够与基因组整合或自主复制，构成如下多核苷酸分子，其中已经以功能操作的方式连接(即，可操作地连接)一或多个多核苷酸分子。重组构建体通常会包含可操作地连接至转录起始调节序列的本发明的多核苷酸，这些序列会导引多核苷酸在宿主细胞中的转录。可使用异源及非异源(即，内源)启动子两者导引本发明的核酸的表达。

[0140] 本文所用的术语“载体”是指任何重组多核苷酸构建体，该构建体可用于转化的目的(即将异源DNA引入到宿主细胞中)。一种类型的载体为“质粒”，是指环状双链DNA环，可将额外DNA区段连接至该环中。另一类型的载体为病毒载体，其中可将额外DNA区段连接至病毒基因组中。某些载体能够在被引入到的宿主细胞中自主复制(例如，具有细菌复制起点的细菌载体及游离型哺乳动物载体)。在引入到宿主细胞中后，其他载体(例如，非游离型哺乳动物载体)整合至宿主细胞的基因组中，且因此与宿主基因组一起复制。此外，某些载体能够导引被操作性连接的基因的表达。本文将此类载体称为“表达载体”。

[0141] 本文所用的术语“表达载体”是指能够在转化、转染或转导至宿主细胞中时复制及表达目的基因的核酸分子。表达载体包含一或多个表型选择标记及复制起点，以确保维护

载体及以在需要的情况下于宿主内提供扩增。

[0142] 本文所用的术语“细胞”、“细胞系”可互换使用,并且所有这类名称都包括其后代。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,如大肠杆菌等原核细胞,如酵母细胞等的真菌细胞,或者如纤维原细胞、CHO细胞、COS细胞、NSO细胞、HeLa细胞、BHK细胞、HEK293细胞或人细胞等的动物细胞。

[0143] 本文所用的术语“药物组合物”通常是指这样的制剂,其以允许活性成分的生物学活性有效的形式存在,并且不包含对将施用所述组合物的对象具有不可接受的毒性的另外的成分。所述组合物是无菌的。

[0144] 术语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断的范围内适合用于与人和动物的组织接触而没有过度毒性、刺激性、变应性应答或其它问题或并发症,与合理的益处/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。如本文中所示,术语“药学上可接受的载体、赋形剂和/或稀释剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体,是本领域公知的(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences, Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995)。药学上可接受的材料、组合物或媒介物,如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂、介质、包封材料、制造助剂或溶剂包封材料,其涉及维持本公开的抗体或其抗原结合片段的稳定性、溶解度或活性,并且包括但不限于:pH调节剂,表面活性剂,佐剂,离子强度增强剂,稀释剂,维持渗透压的试剂,延迟吸收的试剂,防腐剂。例如,pH调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液。表面活性剂包括但不限于阳离子,阴离子或者非离子型表面活性剂,例如Tween-80。离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂,例如对羟苯甲酸酯,三氯叔丁醇,苯酚,山梨酸等。维持渗透压的试剂包括但不限于糖、NaCl及其类似物。延迟吸收的试剂包括但不限于单硬脂酸盐和明胶。稀释剂包括但不限于水,水性缓冲液(如缓冲盐水),醇和多元醇(如甘油)等。防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂,例如硫柳汞,2-苯氧乙醇,对羟苯甲酸酯,三氯叔丁醇,苯酚,山梨酸等。稳定剂具有本领域技术人员通常理解的含义,其能够稳定药物中的活性成分的期望活性,包括但不限于谷氨酸钠,明胶,SPGA,糖类(如山梨醇,甘露醇,淀粉,蔗糖,乳糖,葡聚糖,或葡萄糖),氨基酸(如谷氨酸,甘氨酸),蛋白质(如干燥乳清,白蛋白或酪蛋白)或其降解产物(如乳白蛋白水解物)等。

[0145] 本文所用的术语“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,诸如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0146] 本文所用的术语“治疗有效量”、“治疗有效剂量”和“有效量”,是指本发明的抗IL-17A抗体或其抗原结合片段当单独或与其它治疗药物组合给予细胞、组织或受试者时,有效预防或改善一种或多种疾病或病况的症状或该疾病或病况的发展的量。治疗有效剂量还指足以导致症状改善的抗体或其抗原结合片段的量,例如治疗、治愈、预防或改善相关医学病况或者提高这类病况的治疗、治愈、预防或改善的速度的量。当对个体施用单独给予的活性成分时,治疗有效剂量仅是指该成分。当组合施用时,治疗有效剂量是指引起治疗效果的活性成分的综合量,不论是组合、依次给予还是同时给予。治疗剂的有效量将导致诊断标准或参数提高至少10%;通常至少20%;优选至少约30%;更优选至少40%,最优选至少50%。

[0147] 本文所用的术语“EC₅₀”是指半最大效应浓度(concentration for 50% of

maximal effect),即能引起50%最大效应的浓度。

[0148] 本文所用的术语“癌症”或“肿瘤”,是指描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调控的生理疾患。此定义中包括良性和恶性癌症以及休眠肿瘤或微转移。癌症的例子包括但不限于基底细胞癌、胆管癌;膀胱癌;骨癌;乳腺癌;腹膜癌;宫颈癌;胆管癌;绒毛膜癌;结直肠癌;结缔组织癌;消化系统癌症;子宫内膜癌;食道癌;眼癌;头颈癌;胃癌;胶质母细胞瘤;肝癌;肾癌;喉癌;白血病;肝癌;肺癌(例如,小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌);淋巴瘤,包括霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤;黑色素瘤;骨髓瘤;神经母细胞瘤;口腔癌;卵巢癌;胰腺癌;前列腺癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤;直肠癌;呼吸系统癌;唾液腺癌;肉瘤;皮肤癌;鳞状细胞癌;睾丸癌;甲状腺癌;子宫或子宫内膜癌;泌尿系统癌症;B细胞淋巴瘤;慢性淋巴细胞性白血病(CLL);急性成淋巴细胞性白血病(ALL);毛细胞白血病;慢性成髓细胞性白血病等。

[0149] 本文所用的术语“自身免疫性疾病”或“自免疫性疾病”,是指由于某些原因造成免疫系统对自身成分的免疫耐受减低、降低和/或破坏,致使自身抗体和/或致敏淋巴细胞损伤自身器官组织而引起的疾病,具体表现为相应组织器官的功能障碍。包括但不限于白塞氏病、系统性红斑狼疮、慢性盘状红斑狼疮、多发性硬化症、系统性硬皮病、进行性系统性硬化症、硬皮病、多发性肌炎、皮肌炎、结节性动脉周围炎(结节性多动脉炎、显微镜下多血管炎)、主动脉炎综合征(高安动脉炎)、恶性类风湿关节炎、类风湿关节炎、幼年特发性关节炎、脊椎关节炎、混合性结缔组织病、卡斯尔曼病、干燥综合征、成人斯蒂尔病、血管炎、过敏性肉芽肿性血管炎、过敏性血管炎、类风湿性血管炎、大血管血管炎、ANCA相关性血管炎(例如,韦格纳肉芽肿和嗜酸性韦格纳肉芽肿)、Cogan综合征、RS3PE综合征、颞动脉炎、风湿性多肌痛、纤维肌痛、抗磷脂抗体综合征、嗜酸性筋膜炎、IgG4相关疾病(例如,原发性硬化性胆管炎、自身免疫性胰岛炎等)、格林巴利综合征、重症肌无力、慢性萎缩性胃炎、自身免疫性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、Good-pasture综合征、急进性肾小球肾炎、狼疮性肾炎、巨幼红细胞性贫血、自身免疫性溶血性贫血、恶性贫血、自身免疫性中性粒细胞减少症、特发性血小板减少性紫癜、巴塞杜病(格雷夫斯病(甲亢))、桥本病、自身免疫性肾上腺皮质功能减退症、原发性甲状腺功能减退症、艾迪生病(慢性肾上腺皮质功能减退症)、特发性艾迪生病、I型糖尿病、缓慢进展型I型糖尿病(成人隐匿性自身免疫性糖尿病)、局灶性硬皮病、银屑病、银屑病关节炎、大疱性类天疱疮、天疱疮、类天疱疮、妊娠疱疹、线性IgA大疱性皮肤病、获得性大疱性表皮松解症、斑秃、白斑病、寻常型白斑病、视神经脊髓炎、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、多灶性运动神经病、结节病、巨细胞动脉炎、肌萎缩侧索硬化、原田病、自身免疫性视神经病、特发性无精子症、习惯性流产、炎症性肠病(例如溃疡性结肠炎、克罗恩病)、乳糜泻、强直性脊柱炎、严重哮喘、慢性荨麻疹移植免疫、家族性地中海热、嗜酸性粒细胞慢性鼻窦炎、扩张型心肌病、系统性肥大细胞增多症或包涵体肌炎。

[0150] 为使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步的详细说明。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所有试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购的常规产品。为了更好地说明本发明,在下文的具体实施方式中给出了众多的具体细节。此处所描述的具体实施例仅用于解释本发明,并不用于构成对本发明的任何限制。此外,在以下说明中,省略了对公知结构

和技术的描述,以避免不必要地混淆本发明的概念。这样的结构和技术在许多出版物,例如《分子克隆实验指南(第四版)》(冷泉港实验室科学出版社)、Ausubel,F.M等人,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Assoc.和Wiley-Interscience的出版中也进行了描述。

[0151] 本发明涉及的主要试剂、材料和设备如表1所示。

[0152] 表1本发明涉及的主要试剂、材料和设备

[0153]

试剂/材料/设备	供应商/品牌	货号/型号
琼脂	Sigma	A1296
蛋白胨	Sigma	93926
酵母提取物	OXOID	LP0021
氯化钠	阿拉丁	C111533
氯化钾	阿拉丁	P112133
硫酸镁	国药	10013018
氯化镁	国药	10012818
葡萄糖	生工	GT1991
SfiI	NEB	R0123L
T4 DNA ligase	TaKaRa	2011A
PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit	TaKaRa	6210B
NuHi power mix	新海生物	NH9303
3M 醋酸钠 (pH 5.2-6)	Sigma	126-96-5
DNA 片段回收试剂盒	TakaRa	9761
胶回收试剂盒	Qiagen	28706
天根质粒大抽试剂盒	天根	DP117
HRP-Anti-M13	iCarTab	-
PE-anti-Human IgG	eBioscience	12-4998-82
Rabbit anti-Llama IgG (H+L) Secondary Antibody [HRP]	Novus	NBP1-75095
SS320 感受态	iCarTab	-

[0154]

pComF 噬菌体展示载体	iCarTab	-
NHS-biotin	APExBIO	A8002
HRP-Streptavidin	Boster	BA1088
HRP-ProteinA	Boster	BA1080
Octet ® ProA Biosensors	Sartorius	18-5010
PBS	Gbico	14190-250
DMEM	Gbico	41965-062
RPMI1640	Gbico	61870044
FBS	VivaCell	C04001-500
Genomic DNA Purification Kit	Lifetech	K0512
Mouse-IL-17A-His	ACRO	CT8-M5240
50 mL Falcon 离心管	Corning	352070
0.2 cm 电击杯	Bio-Rad	-
1.5 mL RNase free EP 管	QSP	509-GRD-Q
200 µL RNase free PCR 管	Axygen	PCR-02D-C
T125 摇瓶	Corning	431143
15 mL Falcon 离心管	Corning	430052
6 孔板	Corning	3516
96 孔板	Corning	3365
96 孔黑板 (F-BOTTOM (CHIMNEY WELL) BLACK)	-	-
电转仪	Eppendorf Multiporator	
离心机	ThermoFisher	Thermo FRESCO-17
恒温培养箱	上海精宏	DNP-9052
恒温震荡培养箱	精骐	CO-O6U
超净工作台	苏净安泰	SW-CJ-1FD
PCR 仪	Applied Biosystems	ABI2720
生物安全柜	海尔	HR40-IIA2
流式细胞仪	ThermoFisher	Thermo Attune Nxt flow cytometer
CO ₂ 培养箱	ThermoFisher	Thermo 3111
ForteBio Octet 分子相互作用仪	ForteBio Octet	ForteBio OCTET R2
PE-Streptavidin	Biologend	405204
BL21 感受态	Biomed	BC201-02

[0155]

Bright-Lite Luciferase Assay System	Vazyme	DD1204-01
NHS-biotin	APExBIO	A8002

[0156] 本发明筛选、克隆VHH片段、构建纳米抗体所使用的引物均参照以下文献设计：

[0157] Maass DR, Sepulveda J, Pernthaner A, Shoemaker CB. Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J Immunol Methods*. 2007; 324(1-2): 13-25.

[0158] Lin, J, Gu, Y, Xu, Y et al. Characterization and applications of nanobodies against *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin a selected from single alpaca B cells. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2020; 34: 1028-37.

[0159] Studies on design of singledomain antibodies by Alpaca VHH phage library and high throughput sequencing to construct Fab antibody purification system (<http://hdl.handle.net/10232/00030916>).

[0160] 实施例1制备抗IL-17A单域抗体

[0161] 1.1制备IL-17A (Human及Mouse) 重组蛋白 (抗原)

[0162] 从UniProt数据库中检索Human IL-17A (Q16552-1) 序列信息 (AA Gly 24-Ala 155, 如SEQ ID NO:12所示), 在C端添加6×His标签, 按照原核密码子优化后进行基因合成并亚克隆至pET28a载体中; 经Sanger测序验证无误后, 进行质粒抽提。

[0163] 将重组质粒转化BL21感受态, 使用0.5mM IPTG诱导过夜, 收集菌液裂解; 使用镍柱纯化重组蛋白。

[0164] SDS-PAGE检测目标蛋白的纯度, 结果显示纯度>90% (图1)。

[0165] SEQ ID NO:12:

[0166] MTPGKTSLSVLLLLLSLEAIVKAGITIPRNP GCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSDYNNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA。

[0167] 1.2动物免疫

[0168] 采用制备的重组抗原对2只羊驼 (Alpaca) 进行免疫, 免疫方式为皮下多点免疫, 共免疫6次, 间隔时间21天, 最后一次免疫10天后, 采集外周血, ELISA检测免疫效价。

[0169] 1.3免疫效价检测

[0170] 实验步骤如下:

[0171] (1) 采集5mL外周血, 将收集有血液样本的离心管置于37℃培养箱内放置1小时; 然后将血液样本转移至4℃过夜。

[0172] (2) 将收集有血液样本的离心管置于离心机中, 5000rpm离心20min; 分离上层血清, 将血清转移至一个新的无菌离心管中, 收集免疫血清。

[0173] (3) 使用无菌CBS (碳酸盐缓冲液) 稀释IL-17A重组蛋白至终浓度为1μg/mL。取一块新的96孔酶标板, 加入100μL/孔4℃包被过夜。

[0174] (4) 去掉抗原包被液, 使用PBST (含0.05%的吐温20) 洗涤5次。

[0175] (5) 加入200μL/孔的3% MPBS 37℃封闭2小时。

[0176] (6) 去掉封闭缓冲液后, 使用PBST洗涤孔板5次。

[0177] (7) 加入100μL梯度稀释的血清 (100μL/孔), 室温孵育1小时, 对照孔为PBS。

[0178] (8) 去掉孔内的液体, 并使用PBST洗涤5次。

[0179] (9) 加入100μL HRP anti-Llama IgG (H+L) 抗体 (1:50000稀释), 室温孵育1小时。

[0180] (10) 去掉孔内的液体后, 使用PBST洗涤孔板5次。

- [0181] (11) 加入100 μ L/孔TMB显色液。
 [0182] (12) 室温避光孵育10-15分钟。
 [0183] (13) 加入50 μ L/孔终止液。
 [0184] (14) 使用酶标仪读取孔内的OD450值。
 [0185] 如表2所示,经6轮免疫,羊驼的免疫效价均达到要求。
 [0186] 表2免疫效价检测结果

血清稀释梯度	2#羊驼					
	阴血		五免		六免	
1:1K	0.264	0.230	3.712	3.469	4.484	4.492
1:2K	0.157	0.154	2.752	2.699	4.172	4.132
1:4K	0.124	0.110	1.986	1.806	3.500	3.477
1:8K	0.091	0.091	1.319	1.225	2.727	2.745
1:16K	0.084	0.077	0.791	0.751	1.901	1.884
1:32K	0.085	0.076	0.459	0.447	1.277	1.286
1:64K	0.072	0.056	0.272	0.249	0.748	0.957
PBS	0.078	0.062	0.060	0.064	0.070	0.069

血清稀释梯度	3#羊驼					
	阴血		五免		六免	
1:1K	0.558	0.518	3.294	3.427	3.012	2.981
1:2K	0.338	0.322	2.623	2.753	2.192	2.216
1:4K	0.205	0.190	1.901	2.011	1.579	1.580
1:8K	0.131	0.124	1.429	1.447	1.120	1.110
1:16K	0.089	0.084	0.931	0.983	0.738	0.761
1:32K	0.082	0.081	0.714	0.747	0.507	0.509
1:64K	0.067	0.064	0.393	0.489	0.302	0.295
PBS	0.069	0.062	0.066	0.066	0.070	0.088

[0187] [0188] 1.4 抗体酵母文库构建过程

[0190] 1.4.1 PBMC分离及VHH抗体片段克隆

[0191] 采集100mL外周血抗凝样品,使用淋巴细胞分离液分离PBMC细胞。

[0192] 提取RNA,使用PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit进行反转录,制备cDNA,其包括以下步骤:

[0193] (1) 在200 μ L PCR中配制下列反应混合液Mix1(表3):

[0194] 表3

试剂	用量
Oligo dT Primer (50 μ M)	8 μ L
dNTP Mixture (10 mM each)	8 μ L
总 RNA 样品	20 μ g
无 RNA 酶水	补至 80 μ L

[0195] [0196] (2) 65 $^{\circ}$ C 保温5min后,冰上迅速冷却。

[0197] (3) 在上述PCR管中配制下列反应液(表4):

[0198] 表4

	试剂	用量
	上述变性后的反应液	80 μ L
[0199]	5 \times PrimeScript II Buffer	32 μ L
	RNA 酶抑制剂 (40 M/ μ L)	4 μ L
	PrimeScript II RTase (200 M/ μ L)	8 μ L
	无 RNA 酶水	36 μ L

[0200] (4) 吹打混匀后,分装80 μ L/管,置于PCR仪中42 $^{\circ}$ C、1小时,70 $^{\circ}$ C热失活15分钟,最后将cDNA样品置于冰上或-20 $^{\circ}$ C长期保存。

[0201] PCR扩增VHH片段:

[0202] 1) 配置第一轮PCR反应体系(50 μ L/管),见表5:

[0203] 表5

	成分	用量
[0204]	上游引物 (5 μ M)	2 μ L
	下游引物 (10 μ M)	1 μ L
[0205]	NuHi Power mix (2 \times)	25 μ L
	cDNA 模板	2 μ L
	无菌水	20 μ L

[0206] 配置好PCR反应体系后,按照如下程序设置PCR仪,见表6:

[0207] 表6

	程序	温度	时间	循环数
	预变性	95 $^{\circ}$ C	10 min	
[0208]	变性	95 $^{\circ}$ C	15 s	15 \times
	退火	55 $^{\circ}$ C	30 s	
	延伸	68 $^{\circ}$ C	1 min	
	最后延伸	68 $^{\circ}$ C	10 min	

[0209] 2) PCR产物的琼脂糖电泳

[0210] 使用1%的琼脂糖进行电泳分析PCR产物,分离分子量大小为750bp左右的片段。使用胶回收试剂盒回收PCR产物,并用NanoDrop测定浓度。

[0211] 3) 配置二轮PCR反应体系(50 μ L/管),见表7:

[0212] 表7

	成分	用量
[0213]	2 nd F引物	2 μ L
	2 nd R引物	2 μ L
	NuHi Power mix (2 \times)	25 μ L
	一轮PCR回收产物	200 ng
	无菌水	补足至50 μ L

[0214] 配置好PCR反应体系后,按照如下程序设置PCR仪,见表8:

[0215] 表8

	程序	温度	时间	循环数
[0216]	预变性	95 $^{\circ}$ C	10 min	
	变性	95 $^{\circ}$ C	15 s	25 \times
	退火	55 $^{\circ}$ C	30 s	
	延伸	68 $^{\circ}$ C	1 min	
	最后延伸	68 $^{\circ}$ C	10 min	

[0217] 4) 二轮PCR产物的琼脂糖电泳分析

[0218] 使用1%的琼脂糖进行电泳分析PCR产物,分离分子量大小为400bp左右的VHH片段。使用胶回收试剂盒回收VHH PCR产物,并用NanoDrop测定浓度。

[0219] 结果显示,第一轮PCR分别获得1000bp和750bp左右的PCR条带,胶回收750bp的片段作为二轮PCR的模板(图2)。第二轮PCR获得400bp左右的条带,为VHH片段,柱回收作为三轮PCR的模板(图3)。第三轮PCR获得500bp左右的条带,添加同源臂,后续同源重组入酵母展示载体pDisplay中(图4)。

[0220] 1.4.2单域抗体酵母展示库的构建

[0221] (a) 酵母展示载体pDisplay线性化,酶切体系见表9:

[0222] 表9

	成分	用量
[0223]	pDisplay	140 μ g
	10 \times CutSmart [®] Buffer	200 μ L
	SfiI	1200 U(60 μ L)
	无菌水	补足至 2000 μ L

[0224] 使用SfiI酶切pDisplay载体,100 μ L/管分装,50 $^{\circ}$ C酶切过夜;

[0225] 使用1%的琼脂糖凝胶分离pDisplay载体片段,切取5000bp的载体片段进行胶回收,并用NanoDrop测定浓度;

[0226] 将回收的pDisplay酶切产物每个1.5mL离心管分装200 μ L,加入1/10体积(20 μ L) 3M醋酸钠,1 μ g/ μ L糖原(Glycogen),吹吸混匀,加入880 μ L无水乙醇,颠倒混匀,-80 $^{\circ}$ C。

[0227] (b) 电转化构建酵母展示库

[0228] 将-80 $^{\circ}$ C冻存的酵母感受态菌株划线到YPD固体培养基平皿上,30 $^{\circ}$ C活化3-5天;

[0229] 接种单菌落酵母感受态到50mL YPD培养基,250rpm、30 $^{\circ}$ C摇培1-2天;

[0230] 制备酵母感受态菌株。将线性化载体片段和PCR产物混合后,加到电击杯中,电击;电击后的酵母感受态转染培养瓶中,220rpm,30℃摇培1h;

[0231] 取20 μ L重悬液,用SDCAA稀释5000倍,吸取100 μ L,涂SDCAA平板,培养2-3天,计算库容,其余菌液继续培养24;

[0232] 保菌。将剩余菌液收集到50mL离心管中,3000g,离心5min,弃去上清,加入10mL SDCAA重悬,用50%甘油:重悬液=1:1混合,-80℃冻存。

[0233] 1.5酵母展示库淘选和筛选过程

[0234] 使用制备的IL-17A抗原,与链霉亲和素磁珠孵育,将酵母菌液加到结合了抗原的磁珠中,4℃旋转孵育60分钟对构建的酵母展示库使用链霉亲和素磁珠进行2轮磁分选。分选后酵母菌液涂SDCAA平板,挑取单克隆培养,诱导表达48h后进行流式分析。与Biotin-IL-17A-His孵育1h,二抗使用PE Streptavidin,孵育完成后进行流式检测。

[0235] 根据流式检测结果(图5-图8),第二次磁分选后,酵母阳性克隆显著富集,将分选产物直接涂SDCAA平板,挑选单克隆进行流式检测。

[0236] 1.6FACS筛选过程

[0237] 分选后酵母菌液涂SDCAA平板,挑取单克隆培养,诱导表达48h后,与Biotin-抗原孵育,二抗使用PE-Streptavidin,孵育完成后进行流式检测。

[0238] 结果如图9所示FACS检测IL-17A靶点单克隆与靶点结合情况;对测序获得的候选单域抗体氨基酸序列进行比对,挑选CDR区域氨基酸序列不同的候选抗体构建真核表达载体。

[0239] 1.7抗体序列鉴定

[0240] 富集阳性克隆;挑选富集后的单克隆,进行Phage ELISA鉴定,并对克隆进行测序分析,获取候选单域抗体的核酸及氨基酸序列信息。随机挑取20个单克隆,进行测序分析,序列差异大,库多样性较好(图10)。针对候选的单域抗体CDR区域氨基酸序列信息,采用In silico方法对可能的翻译后修饰位点进行分析。

[0241] 根据酵母单克隆流式检测结果,选择与IL-17A-His结合的阳性克隆提取基因组DNA,PCR获得抗体序列。根据PCR产物测序结果,挑选差异克隆进行overlap PCR扩增,具体步骤如下:

[0242] 第一轮PCR:扩增CMV、VHH及Fc:

[0243] a) 配置PCR反应体系(50 μ L体系/反应)见表10,

[0244] 表10

	成分	用量
[0245]	上游引物(5 μ M)	2 μ L
	下游引物(5 μ M)	2 μ L
	NuHi Power mix (2 \times)	25 μ L
	模板(菌液)	1 μ L
	无菌水	补足至50 μ L

[0246] PCR反应程序见表11:

[0247] 表11

[0248]	程序	温度	时间	循环数
	预变性	95°C	10 min	
	变性	95°C	15 s	25×
[0249]	退火	56°C	30 s	
	延伸	68°C	1 min	
	最后延伸	68°C	10 min	

[0250] b) 取50 μ L PCR产物,加入1/10体积10 \times loading buffer,使用1%的琼脂糖进行电泳分析,CMV的条带大小为750bp左右,Fc的条带大小为1400bp左右,VHH的条带大小为500bp左右。

[0251] c) 从胶上切除目的条带,并纯化PCR产物,并用NanoDrop测定浓度(如浓度过高,可稀释进行后续反应)。

[0252] 第二轮PCR:Overlap Extension PCR连接CMV、VHH及FC。

[0253] d) 配置PCR反应体系见表12:

[0254] 表12

	成分	用量
[0255]	CMV 1st产物	50 ng
	VHH 1st产物	50 ng
	Fc 1st产物	50 ng
	NuHi Power mix (2 \times)	25 μ L
	无菌水	补足至46 μ L

[0256] PCR反应程序见表13:

[0257] 表13

	程序	温度	时间	循环数
	预变性	95°C	10 min	
[0258]	变性	95°C	15 s	
	退火	56°C	30 s	15×
	延伸	68°C	2 min	

[0259] 加入引物CMV-F及PGK-R各2 μ L。

[0260] PCR反应程序见表14:

[0261] 表14

	程序	温度	时间	循环数
[0262]	预变性	95°C	10 min	-
	变性	95°C	15 s	20×

	退火	56°C	30 s	
[0263]	延伸	68°C	2 min	
	最后延伸	68°C	10 min	-

[0264] e) 使用TakaRa的DNA片段回收试剂盒纯化Overlap PCR产物,并用NanoDrop测定浓度,至少需要10 μ g PCR产物。用于后续细胞转染验证。

[0265] f) 转染步骤同真核表达载体的转染。

[0266] 在VHH的N端加上信号肽,C端加上IgG1-Fc,PCR产物瞬时转染HEK293细胞;取表达的抗体上清进行ELISA检测:100 μ L转染上清加入IL-17A重组抗体预包被的96孔板中孵育,采用HRP-Protein A作为二抗进行ELISA检测,结果如表15所示:

[0267] 表15

	克隆号	IL-17A-His (OD450)	
	1-C3	1.537	1.487
	1-F8	0.871	0.944
	1-F12	0.854	0.887
	1-B11	0.097	0.123
	1-F11	0.281	0.288
	1-H9	0.489	0.494
	1-C11	0.241	0.267
[0268]	1-F2	1.538	1.605
	1-G12	0.835	0.859
	1-G5	0.42	0.422
	1-C3	0.567	0.567
	2-B4	0.535	0.558
	3-F1	0.241	0.248
	3-H11	0.198	0.208
	3-H10	1.832	1.818
	NC	0.07	0.091

[0269] 1.8抗体表达纯化过程

[0270] S1:根据候选抗体的ELISA检测结果,挑选阳性克隆,将获得的VHH抗体序列分别进行基因合成,与human IgG1 Fc (SEQ ID NO:10) 串联亚克隆至表达载体pcDNA3.4-hIgG1Fc中。载体经测序验证无误后,使用Qiagen质粒大抽试剂盒制备去内毒素质粒备用。

[0271] S2:从冰箱中取出LVTransm转染试剂及单链抗体表达载体,室温解冻后,用移液枪上下吹打完全混匀。取出PBS缓冲液,温热至室温。取2mL PBS至6孔板的一个孔,分别加入130 μ g抗体表达载体,移液枪上下吹打充分混匀后,加入400 μ L LVTransm,立即用移液器上下吹打混匀,室温下静置10分钟。

[0272] S3:将上述DNA/LVTransm复合物加入到30mL 293F细胞中,轻轻晃动充分混匀。将细胞置于37°C、5% CO₂培养箱,130rpm培养6-8小时后,加入50mL新鲜的293细胞培养基,将细胞重新放回培养箱中继续培养。

[0273] S4:连续培养7天后,离心收集培养基上清,用0.45 μ m的滤膜过滤,滤液转至无菌离心管中,使用Protein A柱子纯化抗体。

[0274] Protein A柱子纯化抗体的步骤如下所示:

[0275] 1) 将含有目标抗体的样品加入EP管中,轻轻倒置试管混合。

[0276] 2) 将EP管在室温下混合或在旋转器上孵育,(1-4小时或过夜),可添加100mM PMSF以防止蛋白质降解。

[0277] 3) 使用磁分离架收集磁珠并弃去上清液。如有必要,保留上清液进行分析。

[0278] 4) 向EP管中加入1mL结合/洗涤缓冲液并充分混匀,使用磁力架收集磁珠并弃去上清液,重复洗涤步骤三遍。

[0279] 5) 向EP管中加入500 μ L洗脱缓冲液,用移液器吹打或者涡旋震荡下迅速重悬,然后在室温下(约25 $^{\circ}$ C)置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转EP管孵育5分钟。

[0280] 6) 使用磁分离架收集磁珠,将含有洗脱抗体的上清液转移到干净的EP管中。

[0281] 7) 重复步骤1)和2)两次。

[0282] 8) 向每500 μ L洗脱液中加入1/10的中和缓冲液以中和pH,以利于维持抗体的生物活性,避免抗体失活。如果需要,可以通过透析或脱盐进行缓冲液交换。

[0283] 9) 结合/洗涤缓冲液:1 \times PBS,pH 7.0。

[0284] 洗脱缓冲液:0.1M甘氨酸,pH 2-3;0.1M NaAc-HAc,pH 3.6。

[0285] 中和缓冲液:1M Tris,pH 8.5。

[0286] 磁珠再生缓冲液:0.1M NaOH。

[0287] 1-G12抗体的SDS PAGE检测结果如图11。

[0288] 实施例2ELISA检测重组抗体与靶蛋白的亲合力

[0289] 2.1制备阳性对照抗体Ixekezumab

[0290] 基因合成Ixekezumab重链及轻链可变区(轻链序列如SEQ ID NO:13所示;重链序列如SEQ ID NO:14所示),将重链可变区亚克隆至pcDNA3.4-hIgG4(IgG4 Fc的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示)载体中,轻链可变区亚克隆至pcDNA3.4-hIgG1 Kc(IgG1 Kc的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示)载体中;经Sanger测序验证无误后使用质粒大抽试剂盒制备去内毒素质粒备用。

[0291] 从冰箱中取出LVTransm转染试剂及重链与轻链表达载体,室温解冻后,用移液枪上下吹打完全混匀。取出PBS缓冲液,温热至室温。取2mL PBS至6孔板的一个孔,分别加入50 μ g重链和轻链表达载体,移液枪上下吹打充分混匀后,加入300 μ L LVTransm,立即用移液器上下吹打混匀,室温下静置10分钟。

[0292] 将上述DNA/LVTransm复合物加入到100mL 293F细胞中,轻轻晃动充分混匀,将细胞置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱,130RPM继续培养。

[0293] 连续培养5-7天后,离心收集培养基上清,用0.45 μ m的滤膜过滤,滤液转至无菌离心管中,使用Protein A柱子纯化抗体。

[0294] SDS-PAGE检测目标抗体蛋白的纯度,结果显示蛋白纯度>95%。

[0295] SEQ ID NO:13:

[0296] DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRLVHSRGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNR FIGVPDFR
SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHLPFTFGQGTKLEIK。

[0297] SEQ ID NO:14:

[0298] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYSFTDYHIHWVRQAPGQGLEWMGVINPMYG TTDYNQRFKGR

VTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYDYFTGTGVYWGQGLVT VSS。

[0299] SEQ ID NO:15:

[0300] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGKTYTTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR
WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGK。

[0301] SEQ ID NO:16:

[0302] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC。

[0303] 2.2检测Human IL-17A重组蛋白与对照抗体ELISA结合活性

[0304] 使用无菌CBS稀释IL-17A重组蛋白至终浓度为2 μ g/mL。取一块新的96孔板,加入
100 μ L/孔4 $^{\circ}$ C包被过夜;

[0305] 去掉抗原包被液,使用PBST(含0.5%的吐温)洗涤3次;

[0306] 加入200 μ L/孔的3%MPBS 37 $^{\circ}$ C封闭2小时;

[0307] 去掉封闭缓冲液后,使用PBST洗涤孔板3次;

[0308] 阳性对照抗体Ixekezumab使用PBS稀释至10 μ g/mL,5倍稀释7个点,按100 μ L/孔加
入酶标板中,室温孵育1小时,对照孔为PBS;

[0309] 去掉孔内的液体,并使用PBST洗涤3次;

[0310] 加入二抗HRP-ProteinA (Boster,BA1080) 1:10000稀释,按100 μ L/孔加入酶标板
中,室温孵育1小时;

[0311] 去掉孔内的液体后,使用PBST洗涤孔板3次;

[0312] 加入100 μ L/孔TMB显色液;

[0313] 室温避光孵育15分钟;

[0314] 加入50 μ L/孔终止液(2M HCL);

[0315] 使用酶标仪读取孔内的OD450值。结果如表16所示,阳性抗体与IL-17A抗原蛋白结
合良好,可以用于免疫。

[0316] 表16Human IL17A与阳性抗体结合活性检测

	Ixekizumab	IL-17A (精纯前)		IL-17A (精纯后)	
	($\mu\text{g/mL}$)	OD450		OD450	
[0317]	10.000	4.596	4.606	4.589	4.553
	5.000	4.526	4.507	4.495	4.550
	2.500	4.632	4.511	4.606	4.590
	1.250	4.551	4.493	4.525	4.486
	0.625	4.512	4.491	4.486	4.569
	0.313	4.534	4.528	4.491	4.480
	0.156	4.467	4.393	4.449	4.434
	PBS	0.108	0.109	0.227	0.225

[0318] 2.3ELISA检测重组抗体与靶蛋白的结合

[0319] 使用无菌CBS稀释重组蛋白至终浓度为 $2\mu\text{g/mL}$ 。取一块新的96孔酶标板,加入 $100\mu\text{L}$ /孔 4°C 包被过夜。

[0320] 去掉抗原包被液,使用PBST(含0.05%的吐温20)洗涤5次。

[0321] 加入 $200\mu\text{L}$ /孔的3% MPBS 37°C 封闭2小时;

[0322] 去掉封闭缓冲液后,使用PBST洗涤孔板5次;

[0323] 加入纯化后的单域抗体,起始浓度为 $10\mu\text{g/mL}$,5倍梯度稀释7个点($100\mu\text{L}$ /孔),室温孵育1小时,对照孔为PBS;

[0324] 去掉孔内的液体,并使用PBST洗涤5次;

[0325] 加入 $100\mu\text{L}$ /孔HRP-Protein A抗体(1:50000稀释),室温孵育1小时;

[0326] 去掉孔内的液体后,使用PBST洗涤孔板5次;

[0327] 加入 $100\mu\text{L}$ /孔TMB显色液;

[0328] 室温避光孵育10-15分钟;

[0329] 加入 $50\mu\text{L}$ /孔终止液;

[0330] 使用酶标仪读取孔内的OD450值。

[0331] 结果如表17所示,全部克隆除1-B11与IL-17A-His抗原不结合外,其余14个克隆均结合,将14个差异克隆进行构建真核表达载体。

[0332] 表17ELISA检测重组抗体与靶蛋白的结合

克隆号	IL-17A-His (OD450)	
1-G4	1.537	1.487
1-F8	0.871	0.944
1-F12	0.854	0.887
1-B11	0.097	0.123
1-F11	0.281	0.288
1-H9	0.489	0.494
1-C11	0.241	0.267
[0333] 1-F2	1.538	1.605
1-G12	0.835	0.859
1-G5	0.42	0.422
1-C3	0.567	0.567
2-B4	0.535	0.558
3-F1	0.241	0.248
3-H11	0.198	0.208
3-H10	1.832	1.818
NC	0.07	0.091

[0334] 实施例3抗IL17A单域抗体ELISA检测

[0335] 采用纯化后的单域抗体 (2 μ g/mL) 包被酶标板, 加入Biotin-IL-17A-His, 起始浓度为10 μ g/mL, 5倍梯度稀释7个点, 采用HRP-Streptavidin进行ELISA检测。

[0336] 结果显示, 抗体1-G12与Human IL-17A蛋白具有较好的结合活性。抗体1-G12的EC₅₀为4.716 μ g/mL, 结合活性远高于阳性对照抗体的10.06 μ g/mL (图12和图13)。

[0337] 实施例4抗IL17A单域抗体阻断功能实验

[0338] 4.1 IL-17A报告基因细胞株构建

[0339] 根据IL-17RA (UniProtKB:Q96F46) 及IL-17RC (UniProtKB:Q8NAC3) 的氨基酸序列信息, 构建慢病毒表达载体并包装慢病毒, 共同感染293细胞, 筛选同时过表达这两个受体的重组293细胞, 进一步稳转NFKB-Luciferase (氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示, 编码其的核苷酸序列如SEQ ID NO:18所示) 和ACT1基因 (核苷酸序列如SEQ ID NO:19所示), 构建IL-17A报告基因细胞株293F-IL-17RA-IL-17Rc-ACT1-NF κ B-Luc。

[0340] SEQ ID NO:17:

[0341] MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVDITYAEYFEMSVRLAEAMK
RYGLNTNHRIVVCSENSLQFFMPVLGALFIGVAVAPANDIYNERELLSMGSISQPTVVFVSKKGLQKILNVQKKLP
IIQKIIIMDSKTDYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMSSGSTGLPKGVALPHRTACVRF
HARDPIFGNQIIPDTAILSVPFHHGFGMFTTLGYLICGFRVVLMYRFEEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFA
KSTLIDKYDLSNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAILITPEGDDKPGAVGKVVPPFEAK
VVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSGYVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFIVDRLKSLIKYKGYQ

VAPAELESILLQHPNIFDAGVAGLPDDDAGELPAAVVVLEHGKTMTEKEIVDYVASQVTTAKKLRGGVVFVDEVPK
GLTGKLDARKIREILIKAKKGGKIAV。

[0342] SEQ ID NO:18:

[0343] ATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCCCAGCGCCATTCTACCCACTCGAAGACGGGACCGCCGG
CGAGCAGCTGCACAAAGCCATGAAGCGCTACGCCCTGGTGCCCGCACCATCGCCTTTACCGACGCACATATCGAG
GTGGACATTACCTACGCCGAGTACTTCGAGATGAGCGTTTCGGCTGGCAGAAGCTATGAAGCGCTATGGGCTGAATA
CAAACCATCGGATCGTGGTGTGCAGCGAGAATAGCTTGCAGTTCTTCATGCCCGTGTGGGTGCCCTGTTTCATCGG
TGTGGCTGTGGCCCCAGCTAACGACATCTACAACGAGCGCGAGCTGCTGAACAGCATGGGCATCAGCCAGCCCACC
GTCGTATTCGTGAGCAAGAAAAGGGCTGCAAAAGATCCTCAACGTGCAAAAAGAAGCTACCGATCATAAAAAGATCA
TCATCATGGATAGCAAGACCGACTACCAGGGCTTCCAAAGCATGTACACCTTCGTGACTTCCCATTTGCCACCCGG
CTTCAACGAGTACGACTTCGTGCCGAGAGCTTCGACCGGGACAAAACCATCGCCTGATCATGAACAGTAGTGCC
AGTACCGGATTGCCCAAGGGCGTAGCCCTACCGCACCGCACCGCTTGTGTCCGATTCAGTCATGCCCGCGACCCCA
TCTTCGGCAACCAGATCATCCCCGACCCGCTATCCTCAGCGTGGTGCCATTTACCACGGCTTCGGCATGTTTAC
CACGCTGGGCTACTTGATCTGCGGCTTTCGGGTCGTGCTCATGTACCGCTTCGAGGAGGAGCTATTCTTGCGCAGC
TTGCAAGACTATAAGATTCAATCTGCCCTGCTGGTGCCACACTATTTAGCTTCTTCGCTAAGAGCACTCTCATCG
ACAAGTACGACCTAAGCAACTTGCACGAGATCGCCAGCGGGCGGGCGCCGCTCAGCAAGGAGGTAGGTGAGGCCGT
GGCCAAACGCTTCCACCTACCAGGCATCCGCCAGGGCTACGGCCTGACAGAAAACAACCAGCGCCATTCTGATCACC
CCCGAAGGGGACGACAAGCCTGGCGCAGTAGGCAAGGTGGTGCCCTTCTTCGAGGCTAAGGTGGTGGACTTGGACA
CCGTAAGACACTGGGTGTGAACCAGCGCGGCGAGCTGTGCGTCCGTGGCCCCATGATCATGAGCGGCTACGTTAA
CAACCCCGAGGCTACAAACGCTCTCATCGACAAGGACGGCTGGCTGCACAGCGGCGACATCGCCTACTGGGACGAG
GACGAGCACTTCTTCATCGTGGACCGGCTGAAGAGCCTGATCAAATACAAGGGCTACCAGGTAGCCCCAGCCGAAC
TGGAGAGCATCCTGCTGCAACACCCCAACATCTTCGACGCCGGGGTCGCCGGCCTGCCGACGACGATGCCGGCGA
GCTGCCCGCCGAGTCGTGCTGGAACACGGTAAAACCATGACCGAGAAGGAGATCGTGGACTATGTGGCCAGC
CAGGTTACAACCGCCAAGAAGCTGCGCGGTGGTGTGTTGTTTCGTGGACGAGGTGCCTAAAGGACTGACCGGCAAGT
TGGACGCCCGCAAGATCCGCGAGATTCTCATTAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGATCGCCGTG。

[0344] SEQ ID NO:19:

[0345] ATGCCACCTCAGTTGCAGGAACTCGGATGAATAGAAGCATCCCCGTGGAAGTGGACGAGAGCGAGCC
GTACCCTAGTCAGCTGCTGAAGCCGATCCCTGAGTACTCCCCGGAAGAGGAATCCGAACCACCAGCCCCAACATT
CGCAATATGGCCCCAATAGCTTGTCCGCACCAACAATGCTGCACAACTCTTCTGGCGACTTCTCTCAGGCCCACT
CCACCCTGAAACTGGCGAATCACCAGCGCCTGTATCCCGCAGGTGACCTGTCTGAGAACTCAGGTGCTTGAAGA
CTCCGAGGACTCTTTCTGTAGGCGCATCCAGGTTTGGGCAAGGCGTTTCCGTCCGGCTGTCCGCGTTTCAGAG
CCCCTTCCGAAAGTGTGCTGGGCGCCCTGCCAGCCGAGCACCAGTTCTCCTTCATGAAAAGCGGAACCAGTGGC
TGGTCAGTCAGCTGAGCGCCGCTCACCTGATACAGGTCACGATTCGACAAGTCTGACCAGTCTCTGCCAATGC
GTCAGCCGATAGTCTCGGGGCTCCCAGGAGATGGTGCAGAGACCACAGCCGCACAGAAAACCGGGCCGGCTTGAT
CTGCCACCATTGATACAGGCTACGATTCACAGCCCCAGGACGTCTTGGCATTCCGACAGCTGGAAGGCCTCTGC
CCTTGACCTCCGTGTGTTACCCCCAGGACCTGCCCGCCCTTTGAGAAGCCGGGAGTTTCCCCAGTTTGAGCCCCA
ACGATAACCTGCCTGTGCTCAGATGCTGCCTCCGAACCTGAGCCCACACGCTCCCTGGAACCTACCACTATCACTGT
CCCAGCAGCCCCGATCACCAGGTGCCTTATGGACACGACTACCCGCGGGCTGCATACCAGCAGGTCATACAGCCTG
CCTTGCCGGGTCAGCCGCTGCCCGAGCTTCTGTGCGCGGCTGCACCCCGTTCAGAAAAGTATCCTGAACTATCC

AAGCCCATGGGACCATGAAGAGAGACCAGCCCAAAGAGATTGCTCTTTTCCTGGGTTGCCTAGACACCAAGACCAG
CCTCACCACCAGCCTCCCAATCGGGCAGGCGCCCCAGGCGAAAGTCTCGAGTGCCCCGCCGAACCTCAGACCACAGG
TCCCTCAGCCCCCTTCCCCCGCGGCAGTACCCAGACCCCCCTCTAACCCACCCGCCCGGGGAACGCTCAAGACTTC
AAATCTCCCAGAAGAGCTGCGCAAAGTGTTACATAACCTACAGCATGGACACCGCTATGGAGGTGGTTAAGTTTCGTC
AACTTCCTGCTGGTCAATGGGTTCCAGACTGCAATCGACATTTTTGAGGATAGAATTCGGGGAATCGACATCATCA
AGTGGATGGAGAGATACCTGCGGGATAAGACAGTGATGATTATCGTGGCCATTAGTCCCAAGTACAAGCAAGATGT
GGAGGGCGCAGAATCACAGTTGGACGAAGACGAGCAGGACTCCATACAAAATATATCCACAGGATGATGCAGATC
GAGTTCATTAAACAAGGCTCCATGAATTTCCGCTTCATACCGGTCTGTTCCAAACGCAAAAAAAGAGCATGTAC
CCACTTGGCTCCAGAATACCCATGTCTACTCTGGCCCAAGAACAAGAAGATATCCTGCTGCGCTTGCTCAGAGA
AGAAGAGTATGTGCCCCCTCCAAGGGGGCCCCCTCCCCACACTCCAAGTAGTGCCACTT。

[0346] 4.2 IL-17A重组蛋白与报告基因细胞株的结合

[0347] 从液氮中复苏293F-IL-17RA-IL-17Rc-ACT1-NFκB-Luc细胞株,调整细胞状态至对数生长期;

[0348] 将细胞分别分为若干份,每份细胞的数量为 2×10^5 个细胞;

[0349] 将IL-17A-His蛋白与靶细胞孵育,充分混匀后,室温孵育1小时;

[0350] $800 \times g$ 室温离心3分钟,去掉含有抗体的上清,使用PBS洗涤细胞3次;

[0351] 加入二抗APC-His(1:500稀释),充分混匀后,室温避光孵育30分钟;

[0352] $800 \times g$ 室温离心3分钟,去掉含有二抗的上清,使用PBS洗涤细胞3次;

[0353] 使用 $500 \mu\text{L}$ PBS重悬细胞,进行流式分析。

[0354] FACS结果显示:构建的IL-17A受体过表达细胞株可以和IL-17A结合,阳性率大于90%(图14)。

[0355] 采用IL-17A重组蛋白激活293F-IL-17RA-IL-17Rc-ACT1-NFκB-Luc。结果显示,IL-17A重组蛋白可有效激活293F-IL17Ra/IL17Rc-NFκB-Luc报告基因细胞株中荧光素酶表达(图15)。

[0356] 4.3 Ixekizumab阻断IL-17A重组蛋白与报告基因细胞株结合的功能实验

[0357] 在96孔板中加入梯度稀释的检测抗体(阳性抗体:Ixekizumab;待检测抗体),按照10倍梯度稀释抗体,连续稀释10个梯度,终浓度依次为 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$, $10 \mu\text{g}/\text{mL}$, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$, $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$, $0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$, $0.001 \mu\text{g}/\text{mL}$, $0.0001 \mu\text{g}/\text{mL}$, $0.00001 \mu\text{g}/\text{mL}$, $0.000001 \mu\text{g}/\text{mL}$, $0.0000001 \mu\text{g}/\text{mL}$, $0 \mu\text{g}/\text{mL}$,将稀释好的梯度浓度抗体取 $50 \mu\text{L}$ 加入96孔板中,每个梯度2个复孔。然后再向对应孔中,每孔加入 $50 \mu\text{L}$ $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的IL-17A蛋白(终浓度为 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$)。混匀后,放置 37°C 培养箱中,孵育1小时。吸取培养至对数生长期的293F-IL-17RA-IL-17Rc-ACT1-NFκB-Luc细胞于96孔板中,每孔接种 2×10^4 个细胞。共培养18h后,每孔加入 $20 \mu\text{L}$ Bright-Glo™检测试剂,使用Tecan M1000pro酶标仪检测孔内的荧光素酶活性数值。

[0358] 结果显示,阳性对照抗体Ixekizumab可抑制IL17A蛋白与其膜受体结合,并抑制胞内NFκB的信号,呈现剂量效应。

[0359] 4.4 单域抗体阻断功能

[0360] 使用293F-IL-17RA-IL-17Rc-ACT1-NFκB-Luc报告基因细胞株进行单域抗体1-G12阻断活性检测。结果显示,1-G12的 IC_{50} 为 $6.923 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{mL}$,阳性对照抗体的 IC_{50} 为 $1.356 \mu\text{g}/\text{mL}$ (图16和图17)。因此,1-G12和阳性对照抗体均可阻断Human IL-17A蛋白激活293F-

IL-17RA-IL-17Rc-ACT1-NFκB-Luc,但1-G12阻断效果显著优于阳性对照抗体。

[0361] 实施例5抗IL-17A单域抗体稳定性检测

[0362] 通过微量差示扫描荧光技术(nanoDSF)技术检测荧光变化,可在天然条件下检测蛋白热变性和化学变性,精确地确定蛋白50%处于去折叠状态时的温度(T_m)、开始去折叠的温度(T_{onset})以及开始出现聚集时的温度(T_{agg});热变性 T_m 值、 T_{onset} 和 T_{agg} 越高说明抗体蛋白越稳定。

[0363] 取100 μ L前期项目制备的候选抗体以及Lxekizumab(样本浓度大于200 μ g/mL),4 $^{\circ}$ C,12000 \times g,离心10min后,用毛细管吸取样品,每个样品准备两根毛细管,作为平行对照,按顺序放入对应的卡槽中,确保毛细管吸满样品,无气泡,进行检测分析。

[0364] 结果显示,1-G12的 T_{m1} 为61.32 $^{\circ}$ C, T_{m3} 为81.49 $^{\circ}$ C, T_{onset} 为54.70 $^{\circ}$ C, T_{agg} 为81.92 $^{\circ}$ C(图18);阳性对照抗体的 T_{m1} 为56.10 $^{\circ}$ C, T_{m2} 为79.84 $^{\circ}$ C, T_{onset} 为47.50 $^{\circ}$ C, T_{agg} 为61.86 $^{\circ}$ C(图19)。以上结果表明单域抗体1-G12热稳定性优于阳性对照抗体,其中聚集温度 T_{agg} 相对于阳性对照抗体提高了约20 $^{\circ}$ C。

[0365] 最后应当说明的是,以上内容仅用以说明本发明的技术方案,而非对本发明保护范围的限制,本领域的普通技术人员对本发明的技术方案进行的简单修改或者等同替换,均不脱离本发明技术方案的实质和范围。

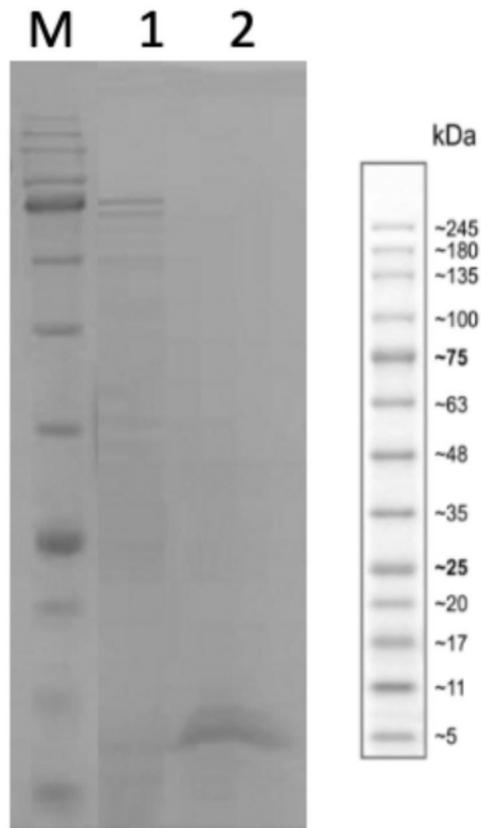


图1

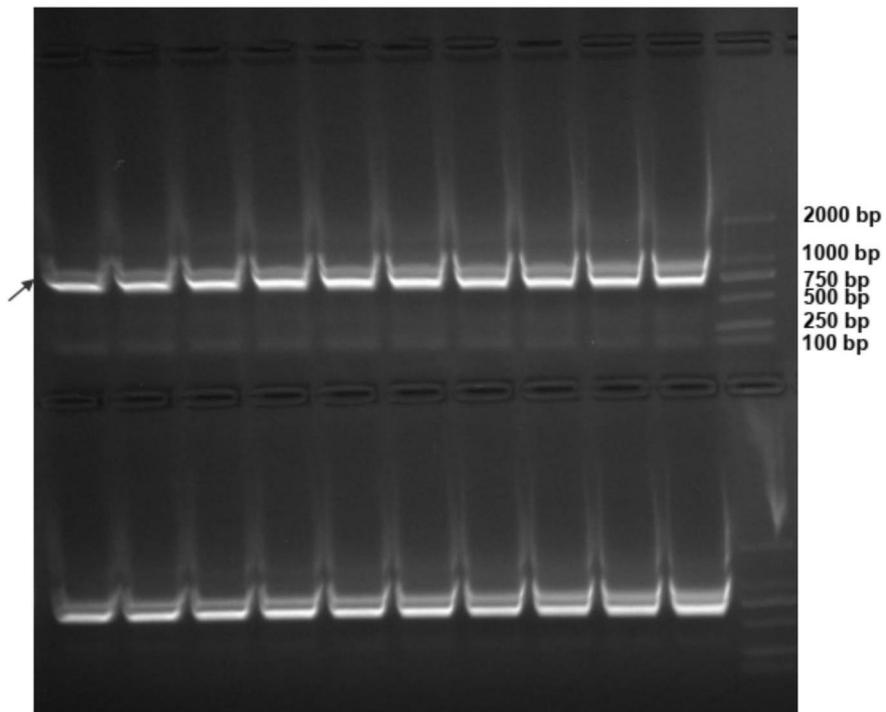


图2

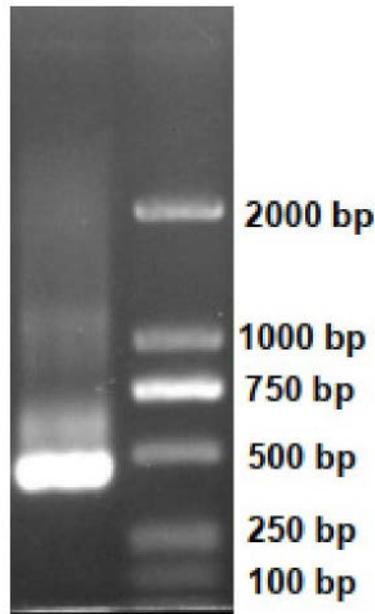


图3

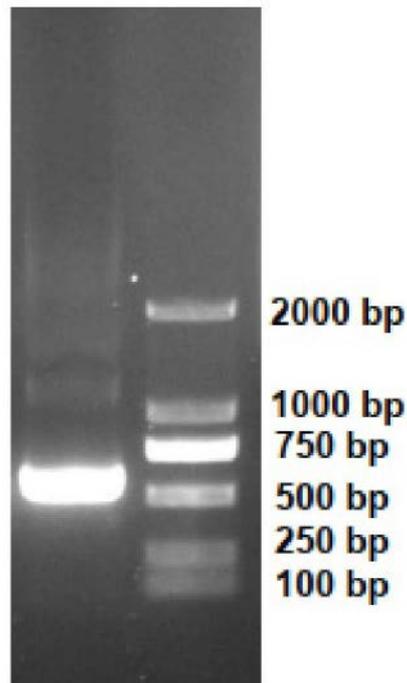


图4

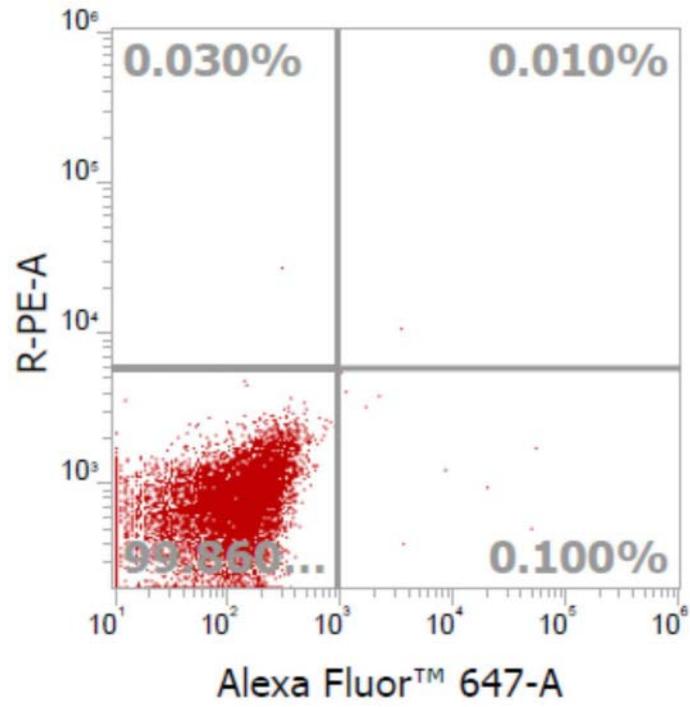


图5

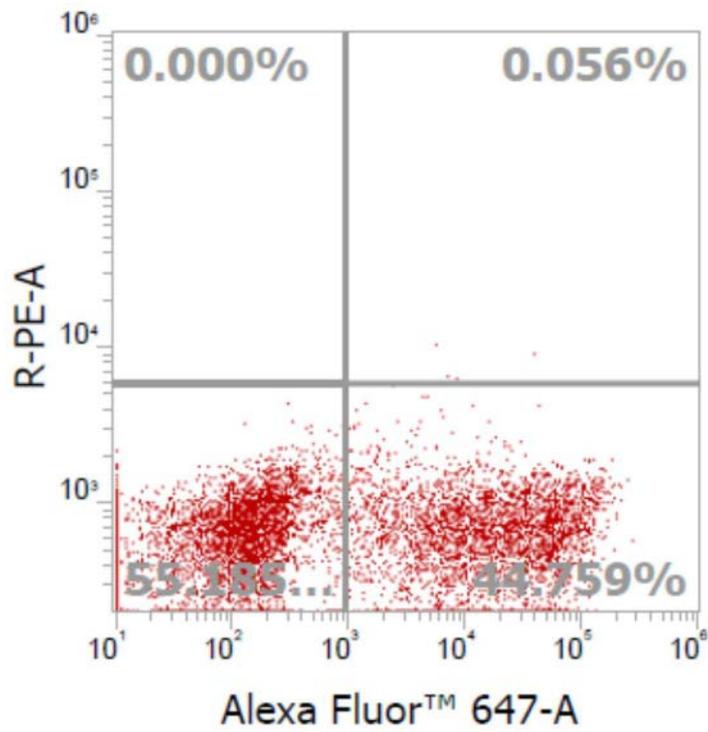


图6

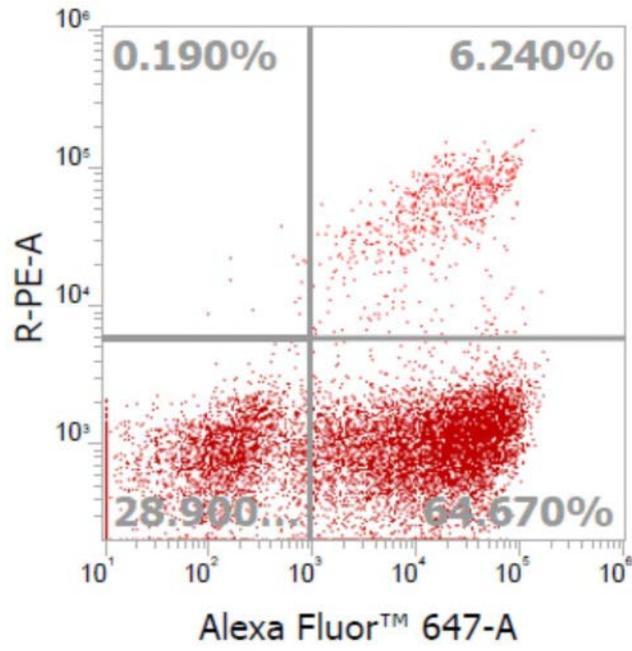


图7

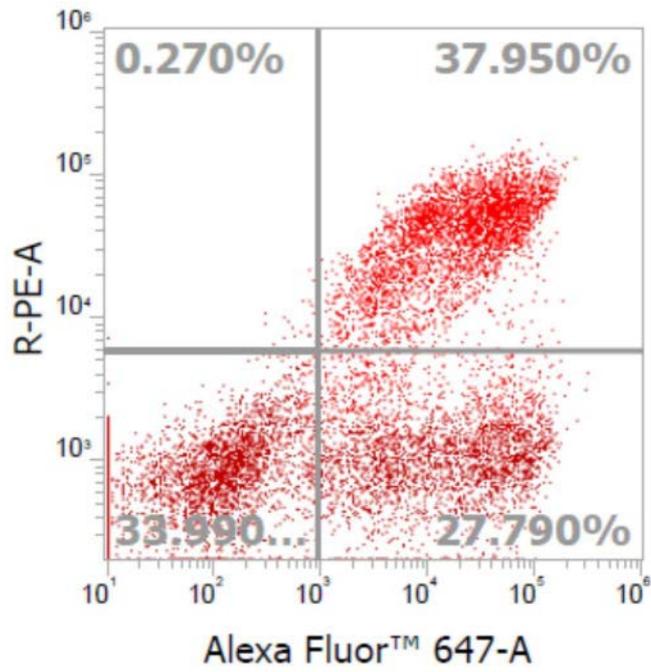


图8

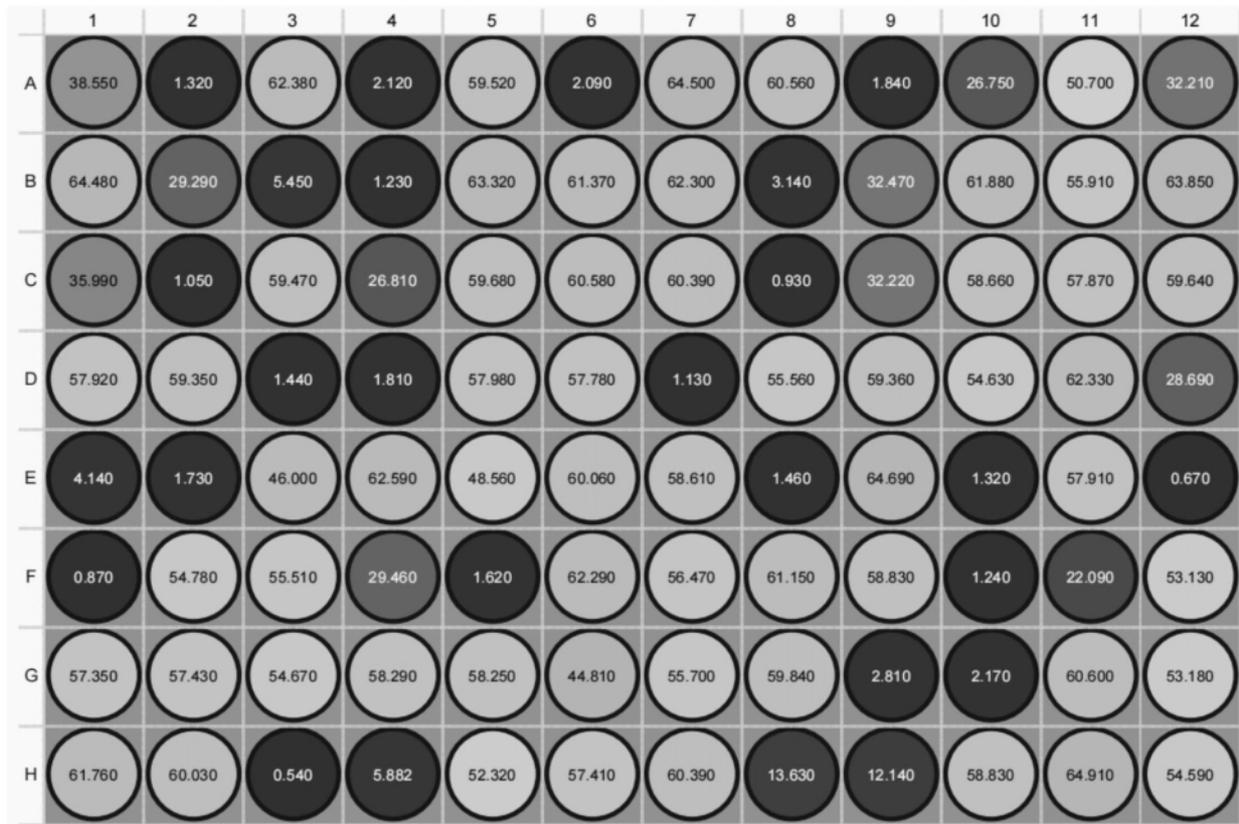


图9

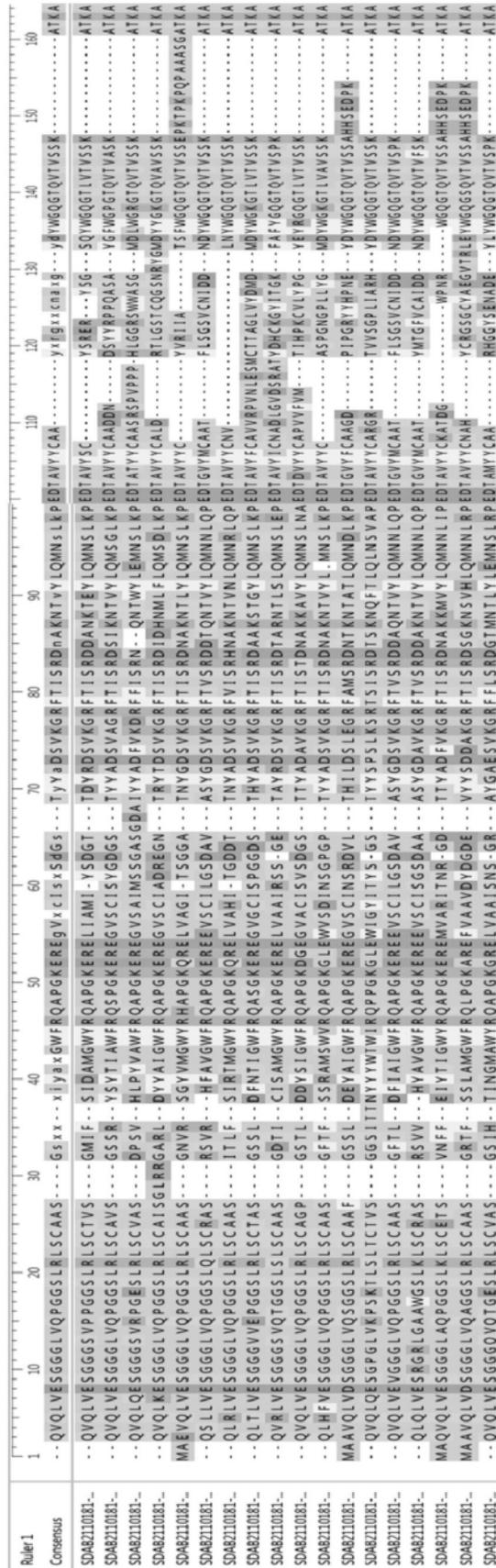


图10

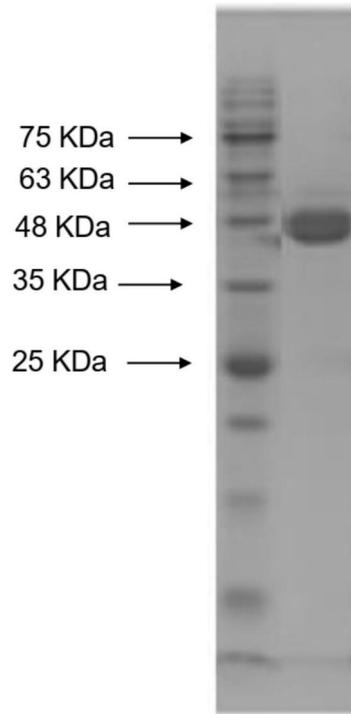


图11

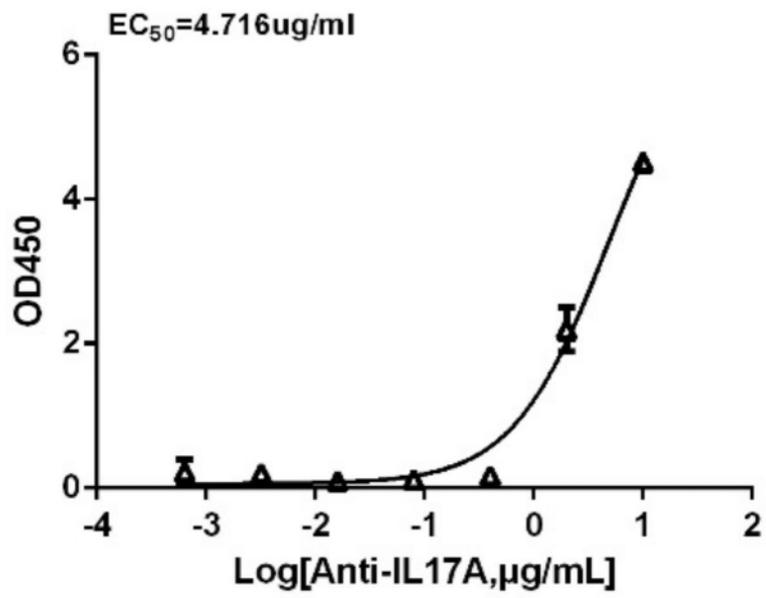


图12

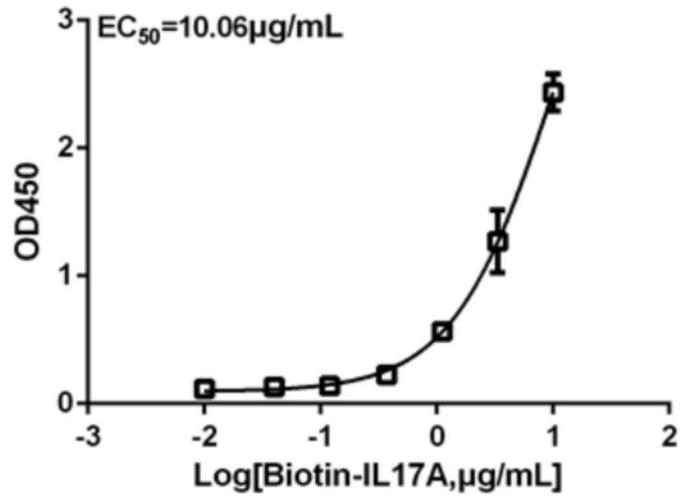


图13

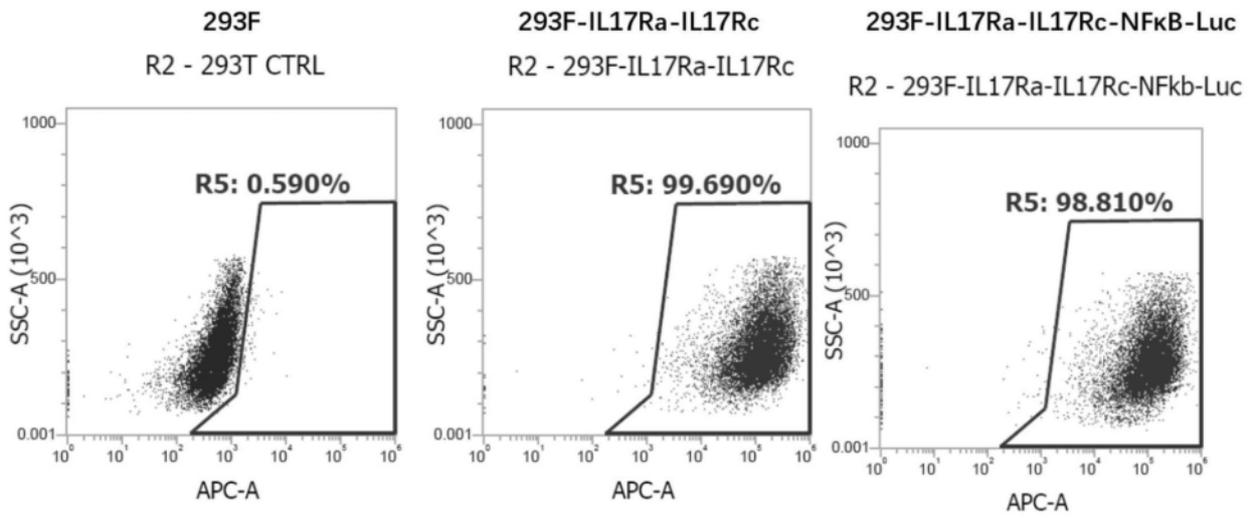


图14

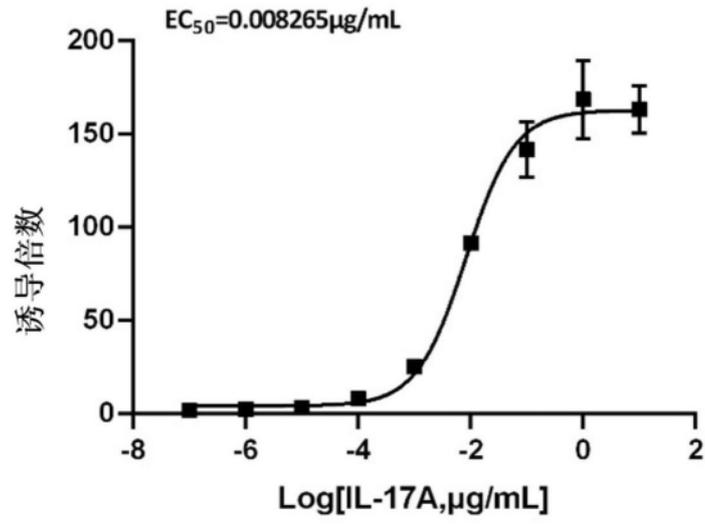


图15

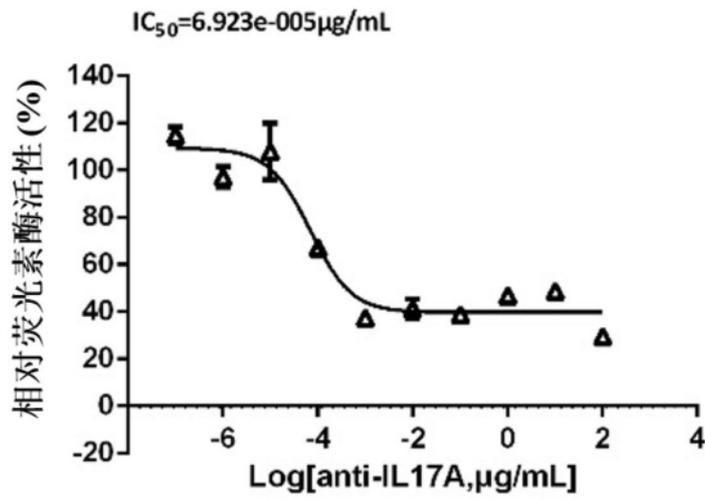


图16

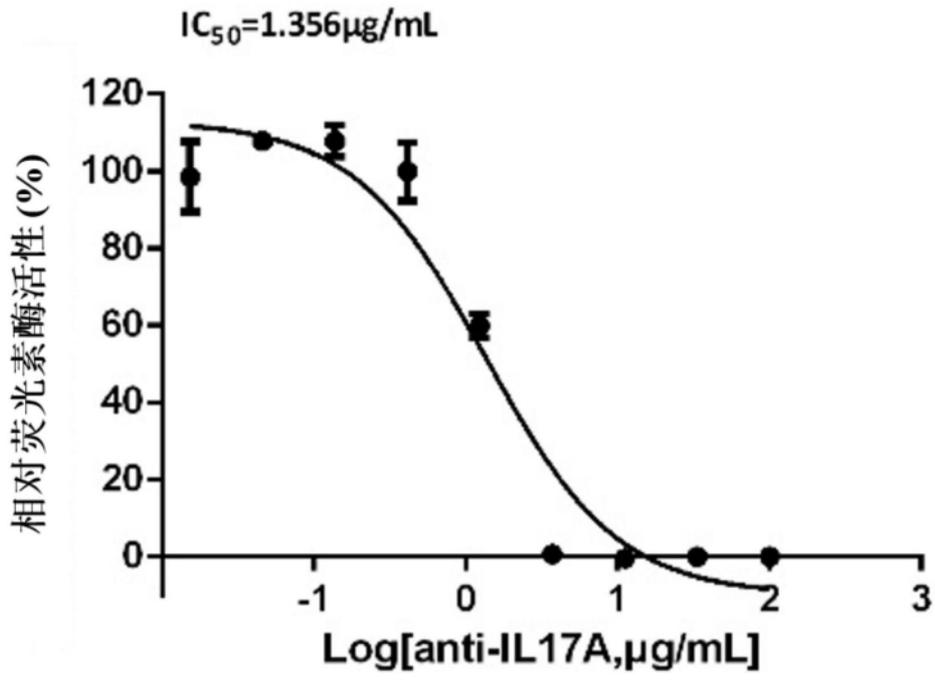


图17

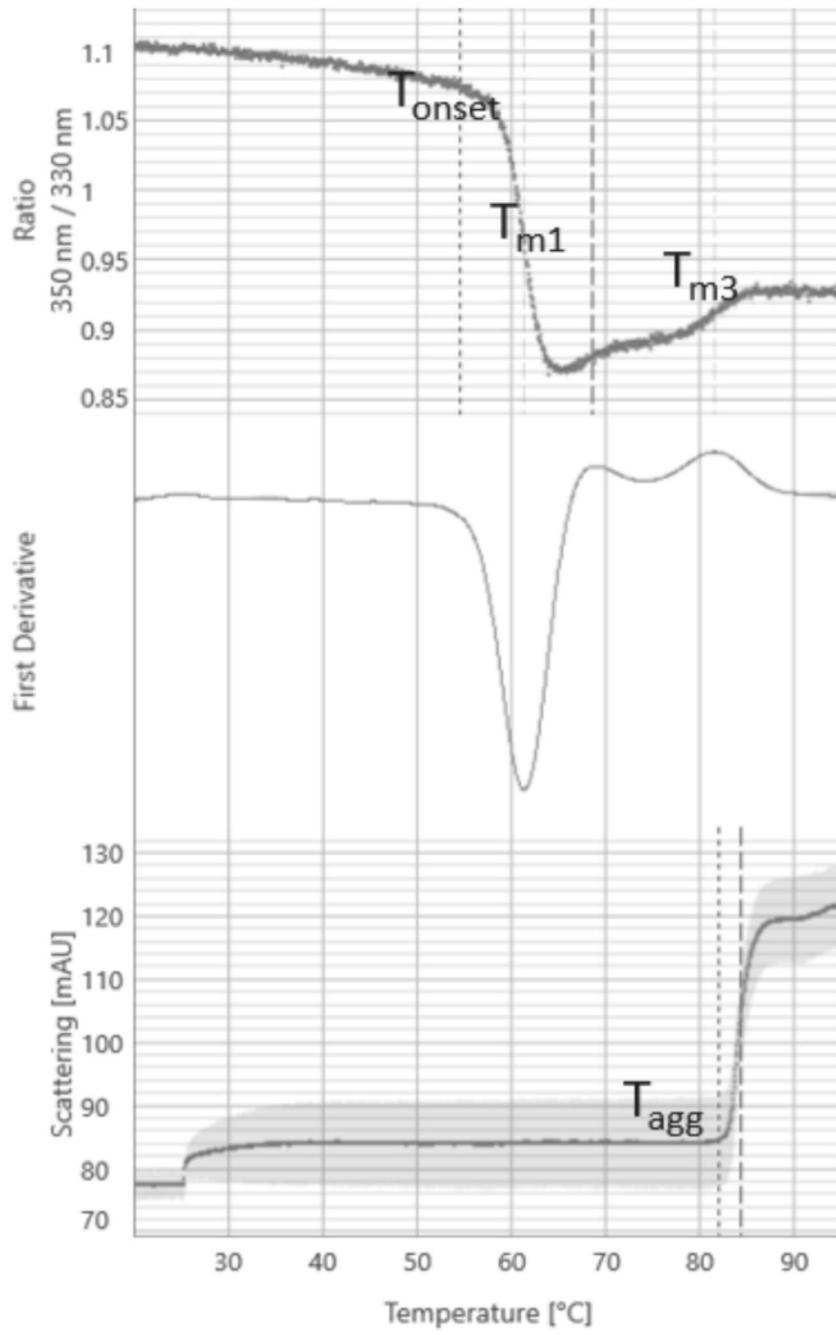


图18

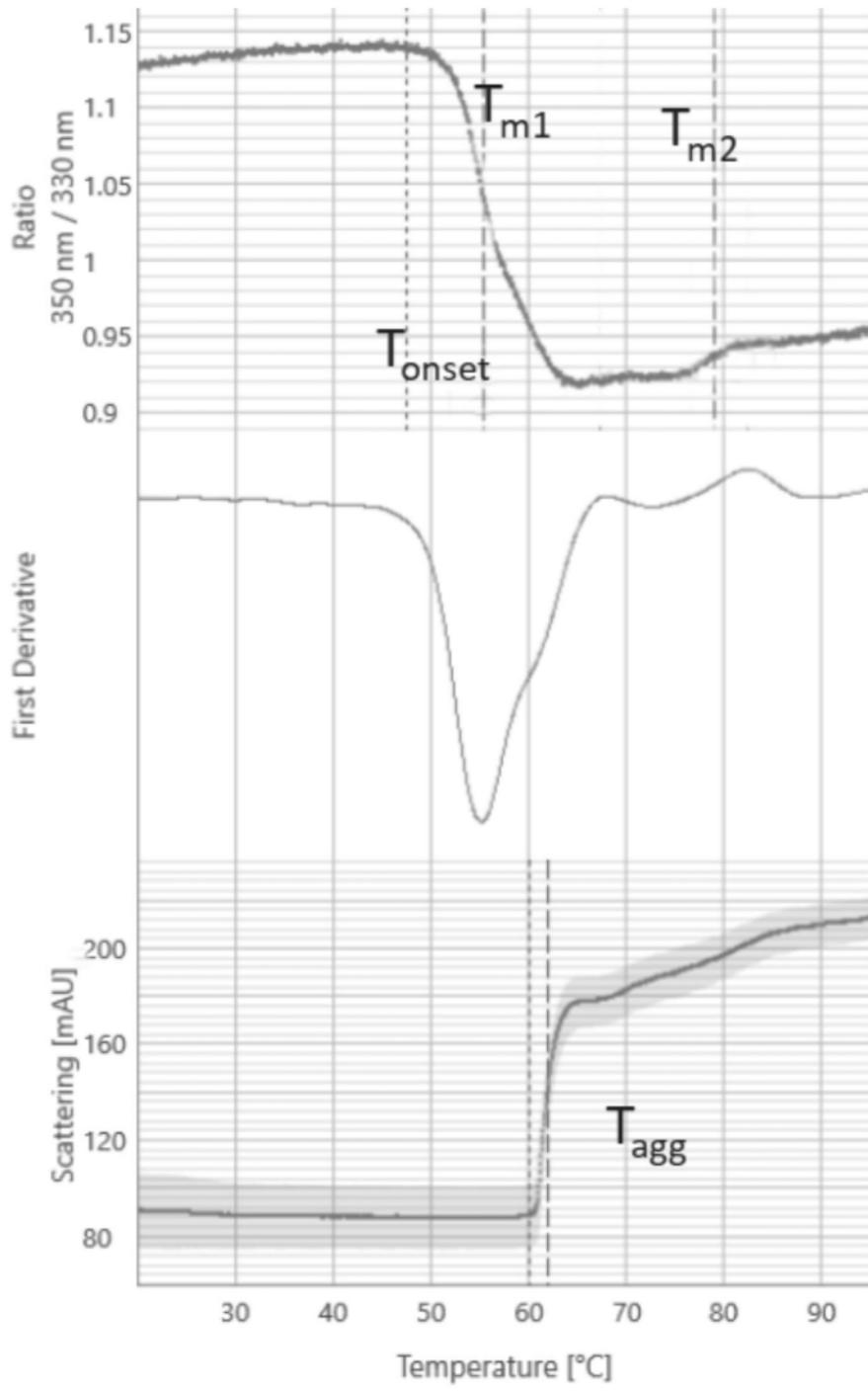


图19