

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092844 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.03.16(22) Дата подачи заявки
2019.05.24(51) Int. Cl. C07K 16/24 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(54) АНТИ-ИНТЕРЛЕЙКИН-17А АНТИТЕЛО, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 201810539405.0

(32) 2018.05.30

(33) CN

(86) PCT/CN2019/088344

(87) WO 2019/228266 2019.12.05

(71) Заявитель:

АКЕСО БАЙОФАРМА, ИНК. (CN)

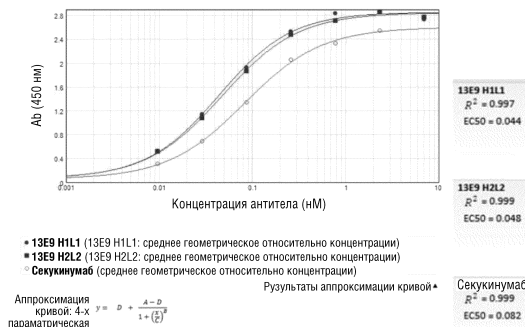
(72) Изобретатель:

Ли Байюн, Ся Юй, Ван Чжунминь
Максвелл, Чжан Пэн (CN)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к области лечения аутоиммунных заболеваний и молекулярной иммунологии, а именно к анти-IL-17А антителу, содержащей его фармацевтической композиции и их применению. Более конкретно, настоящее изобретение относится к моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, в котором переменная область тяжелой цепи моноклонального антитела содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 31-33 соответственно, или HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 37-39 соответственно, и переменная область легкой цепи моноклонального антитела содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 34-36 соответственно, или LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 40-42 соответственно. Моноклональные антитела по настоящему изобретению могут специфически связываться с IL-17А, специфически противодействовать связыванию IL-17А с его лигандом и подавлять опосредованную IL-17А активацию фибробластов.



A1

202092844

202092844

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565649EA/023

АНТИ-ИНТЕРЛЕЙКИН-17А АНТИТЕЛО, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области молекулярной иммунологии и касается антитела к интерлейкину-17А, фармацевтической композиции на основе этих антител и их применению. В частности, настоящее изобретение относится к анти-интерлейкин-17А моноклональному антителу.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Интерлейкин-17А (сокращенно IL-17А или IL 17А) является членом семейства цитокинов IL-17, которое состоит из 6 членов, т.е. IL-17А (IL-17А был обнаружен первым, он также называется IL-17), IL-17В, IL-17С, IL-17D, IL-17Е (также называемый IL-25) и IL-17F (Shi Peiqing et al., Chinese Journal of Cell Biology 33:345-357 (2011)). IL-17F имеет примерно 50% гомологию с IL-17А, кодирующие гены которых расположены в одном и том же сегменте хромосомы 6р12 (Gaffen et al., Nat Rev Immunol 9:556-67 (2009)). IL-17А и IL-17F могут существовать в форме гомодимеров, таких как IL-17А/IL-17А и IL-17F/IL-17F, а также в виде гетеродимера IL-17А/IL-17F. Биологические эффекты IL-17А и IL-17F проявляются при их связывании с рецепторами (Wright et al., J Immunol 181:2799-805 (2008)).

Семейство рецепторов IL-17 (IL-17R) состоит из 5 членов, т.е. IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD и IL-17RE. Члены семейства рецепторов IL-17 могут образовывать разные рецепторные комплексы, и среди них IL-17RA, самая крупная молекула, обнаруженная на сегодняшний день в этом семействе, является общей субъединицей, передающей сигналы для по меньшей мере четырех лигандов, и обеспечивает основные биологические эффекты (Gaffen et al., Nat Rev Immunol 9:556-67 (2009)). Комплекс IL-17RA и IL-17RC опосредует клеточные ответы на IL-17А и IL-17F (Toy et al., J Immunol 177:36-9 (2006)).

В аутоиммунном воспалительном ответе IL-17А играет более важную роль, чем IL-17F по причине того, что сродство IL17RA к IL-17А в сто раз превосходит его сродство к IL-17F (Ely et al., Nat Immunol 10 1245-51 (2009)), и клеточный ответ на IL-17А в 10 раз сильнее, чем на IL-17F (Dubin et al., Immunity 30:9-11 (2009)). Анти-IL-17А антитело или антитело к рецептору IL-17 можно использовать для блокирования связывания IL-17А с его рецептором, тем самым блокируя биологическую активность IL-17А.

IL-17А играет важную роль при некоторых аутоиммунных заболеваниях (например, псориазе, псориатическом артрите, ревматоидном артрите, анкилозирующем спондилите, системной красной волчанке и т.д.). Анти-IL-17А моноклональное антитело Секукинумаб одобрено Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) и Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA) для лечения бляшечного псориаза от умеренной до тяжелой степени,

псориатического артрита и анкилозирующего спондилита.

Псориаз, также известный как порша (чешуйка), является хроническим аутоиммунным заболеванием кожи. Гистологические характеристики кожи при псориазе включают гиперпролиферацию эпидермальных кератиноцитов, ангиогенез, а также инфильтрацию дендритных клеток, макрофагов, нейтрофилов и Т-клеток. (Nestle et al., *N Engl J. Med.*, 361:496-509 (2009)). Псориаз имеет различные проявления, среди которых наиболее распространенным типом является бляшечный псориаз, на который приходится более 90% всех пациентов, страдающих псориазом. Псориатический артрит (ПсА) является особым типом псориаза, для которого характерна псориатическая сыпь, а также боль, отек, болезненность, жесткость и дискинезия суставов и окружающих мягких тканей. У некоторых пациентов может наблюдаться сакроилеит и(или) спондилит с длительным течением, легким рецидивом и скованностью суставов на поздней стадии, приводящей к инвалидности. Наличие псориаза является важным отличием псориатического артрита от других воспалительных заболеваний суставов, где тяжесть поражения кожи не связана напрямую со степенью воспаления суставов (Tan Zhen et al., *Chinese Journal of Rheumatology* 20:354-357 (2016)).

В кожных тканях, пораженных псориазом, уровень экспрессии IL-17A существенно увеличен, и это увеличение тесно связано с активностью псориатического заболевания (Johansen et al., *Brit J Dermatol*, 160:319-24 (2009); Lowes et al. *J Invest Dermatol* 128:1207-11 (2008)). Было показано, что анти-IL-17A моноклональное антитело Секукинумаб является очень эффективным у пациентов, страдающих псориазом, и может значительно снизить активность заболевания у таких пациентов и уменьшить площадь псориатических бляшек (Langley et al., *N Engl J Med*, 371:326-38 (2014)). Секукинумаб также может существенно уменьшить симптомы артрита и улучшить функциональную активность суставов у пациентов с псориатическим артритом (Gottlieb et al., *J Drugs Dermatol*, 14821-33 (2015)). Секукинумаб одобрен FDA для лечения бляшечного псориаза от умеренной до тяжелой степени и псориатического артрита.

Ревматоидный артрит (РА) в основном характеризуется воспалительной пролиферацией в суставах синовиальных фибробластов, повреждением суставов и хрящей, инфильтрацией CD4⁺ хелперных Т-клеток и плазматических клеток, продуцирующих аутоантитела. IL-17A может вызывать как воспаление, так и повреждение костей при ревматоидном артрите. IL-17A имеет высокие уровни экспрессии в ревматоидных синовиальных моноцитах пациентов с ревматоидным артритом по сравнению со здоровыми людьми или пациентами с остеоартритом (Sarkar et al., *Clin Exp Immunol.* 177:652-61 (2014)). В цитологических исследованиях было показано, что IL-17A может стимулировать резорбцию костей и разрушение коллагена (Kitami et al., *Biochimie.* 92:398-404 (2010)). IL-17A может инициировать секрецию провоспалительных цитокинов, таких как TNF α , IL-1 β и IL-6 в хрящах, синовиальных клетках, макрофагах и остеобластах, и оказывать биологическое воздействие. Эти провоспалительные цитокины вызывают внезапное начало ревматоидного артрита и могут поддерживать количество клеток TH17

посредством IL-6, индуцированного IL-17A, тем самым формируя положительную обратную связь и действуя синергетически, усиливая их воспалительные эффекты и вызывая хроническое воспалительное состояние (Ogura et al. др., *Immunity* 29:628-36 (2008)). Антагонистическое воздействие на IL-17A может эффективно облегчить симптомы ревматоидного артрита. В модели мышей с коллаген-индуцированным артритом нейтрализация IL-17A или его рецептора позволила устранить симптомы ревматоидного артрита (Chao et al., *Autoimmunity*. 2011 May; 44(3):243-52). Дефицит IL-17 позволяет защитить мышью-хозяина от коллаген-индуцированного артрита (Nakae et al., *J Immunol*, 171:6173-7 (2003)), в то время как сверхэкспрессия IL-17A может усугублять такие состояния (Lubberts et al., *Inflamm Res* 51:102-4 (2002)).

Анкилозирующий спондилит (АС) является хроническим аутоиммунным заболеванием. Ранними патологическими признаками АС являются острые или хронические воспаления в местах прикрепления костей крестцово-подвздошных суставов, сухожилий и связок, в результате чего на более поздней стадии могут развиваться дисцит и фасеточный артрит; и у всех пациентов с АС наблюдается снижение плотности костей. Исследования показали, что как количество клеток Th17, секретирующих IL-17A, в периферической крови, так и концентрация IL-17A у пациентов с АС значительно выше, чем у здоровых людей (Gracey et al., *Arthritis Rheumatol*. 68:679-89. (2016)). IL-17A может активировать различные клетки, такие как макрофаги, дендритные клетки, эндотелиальные клетки, фибробласты, хондроциты и остеобласты, которые могут продуцировать большое количество воспалительных деструктивных факторов (Ogura et al., *Immunity* 29:628-36 (2008)). В костных тканях IL-17A индуцирует в остеобластах экспрессию активатора рецептора лиганда ядерного фактора-кВ (RANKL), активирует остеокласты, тем самым индуцируя резорбцию костей, кумулятивно усугубляя потерю костной массы и непосредственно или опосредованно вызывая разрушение костей (Gaffen, *Curr Rheumatol Rep* 11:365-370 (2009)). У пациентов с АС анти-IL-17A моноклональное антитело Секукинумаб продемонстрировало отличную эффективность, которое позволяет существенно облегчить симптомы и признаки анкилозирующего спондилита (Baeten et al., *N Engl J Med*, 373:2534-48 (2015)). На основании этих результатов Секукинумаб одобрен FDA для лечения анкилозирующего спондилита.

Системная красная волчанка (СКВ) представляет собой аутоиммунное заболевание, поражающее несколько систем. В частности, в организме пациентов появляются антитела против собственных аутоантигенов, которые непосредственно или опосредованно атакуют различные ткани или органы, при этом наиболее часто поражаются участки кожи, суставы и почки. Исследования показали, что IL-17A играет роль в СКВ. Соотношение клеток, продуцирующих IL-17A, в периферической крови пациентов с СКВ повышено, а уровень IL-17A в сыворотке пациентов является аномально высоким (Chen et al., *J Clin Immunol*, 30:221-5 (2010)). Мононуклеарные клетки периферической крови пациентов с СКВ, которая сопровождается повреждением почек, могут продуцировать более высокие уровни общего IgG, анти-дцДНК IgG и IL-6 при

культивировании с IL-17, что указывает на возможное участие IL-17 в активации В-клеток (Dong et al., Chin Med J (англ.), 116:543-8 (2003)). Также недавно было обнаружено, что IL-17A может взаимодействовать с BAFF (фактором активации В-клеток) для защиты В-клеток от апоптоза, тем самым увеличивая количество клеток, продуцирующих аутоантитела (Onishi et al., Immunology 129:311-21 (2010)).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В результате интенсивных исследований с приложением творческих усилий авторам изобретения удалось применить системы экспрессии клеток млекопитающих для экспрессии рекомбинантного IL-17A (24-155) в качестве антигена для иммунизации мышей, в результате чего было получено большое количество образцов клеток гибридом в результате слияния мышинных клеток селезенки и миеломы. В результате скрининга большого количества образцов были выделены следующие две гибридомные клеточные линии:

гибридомная клеточная линия LT006 (IL-17A-13E9), депонированная в Китайском центре коллекций типовых культур (China Center for Type Culture Collection, CCTCC) 12 сентября 2017 г. с номером доступа CCTCC: C2017102; и

гибридомная клеточная линия LT007 (IL-17A-2G2), депонированная в Китайском центре коллекций типовых культур (CCTCC) 12 сентября 2017 г. с номером доступа CCTCC: C2017165.

Неожиданно было обнаружено, что:

гибридомная клеточная линия LT006 может секретировать и продуцировать специфическое моноклональное антитело (названное 13E9), которое специфически связывается с IL-17A, и это моноклональное антитело может очень эффективно блокировать связывание IL-17A с IL-17RA;

гибридомная клеточная линия LT007 может секретировать и продуцировать специфическое моноклональное антитело (названное 2G2), которое специфически связывается с IL-17A, и это моноклональное антитело может очень эффективно блокировать связывание IL-17A с IL-17RA;

кроме того, были получены гуманизированные анти-IL-17A антитела (названные 13E9 H1L1, 13E9 H2L2, 13E9 H3L2; и 2G2 H1L1, 2G2 H2L2, 2G2 H3L3, соответственно), которые способны эффективно связываться с человеческим IL-17A, блокировать связывание IL-17A с рецепторами IL-17A и ингибировать активацию расположенных ниже сигнальных путей рецептора IL-17A;

антитело по настоящему изобретению можно использовать для изготовления лекарственного средства для профилактики и/или лечения аутоиммунных заболеваний, таких как псориаз, ревматоидный артрит, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит и системная красная волчанка.

Таким образом настоящее изобретение относится к следующему:

в одном из аспектов настоящего изобретения представлено моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором

вариабельная область тяжелой цепи (VH) моноклонального антитела содержит: HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 31-33, соответственно, или HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 37-39, соответственно; и

вариабельная область легкой цепи (VL) моноклонального антитела содержит: LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 34-36, соответственно, или LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 40-42, соответственно.

Вариабельные области легкой и тяжелой цепей отвечают за связывание антигена; вариабельная область каждой цепи содержит три гипервариабельные области, а именно определяющие комплементарность области (CDR) (CDR тяжелой (H) цепи включают HCDR1, HCDR2, HCDR3, и CDR легкой (L) цепи включают LCDR1, LCDR2, LCDR3; определенные по Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (1991), Volumes 1-3, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md).

Анализ аминокислотных последовательностей областей CDR моноклонального антитела, указанных выше в пунктах (1)-(2), выполняют техническими средствами, хорошо известными специалистам в данной области, например, с помощью базы данных VBASE2:

антитела 13E9, 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 и 13E9 H3L2 по настоящему изобретению имеют одинаковые CDR:

аминокислотные последовательности трех участков CDR вариабельной области тяжелой цепи являются следующими:

HCDR1: SYSFTSDYA (SEQ ID NO: 31),

HCDR2: ITYSGVT (SEQ ID NO: 32),

HCDR3: ARADYDSYYTMDY (SEQ ID NO: 33); и

аминокислотные последовательности трех участков CDR вариабельной области легкой цепи являются следующими:

LCDR1: QSLVHSNGNTY (SEQ ID NO: 34),

LCDR2: KVS (SEQ ID NO: 35),

LCDR3: SQSTHFWT (SEQ ID NO: 36).

Антитела 2G2, 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 и 2G2 H3L3 по настоящему изобретению имеют одинаковые CDR:

аминокислотные последовательности трех участков CDR вариабельной области тяжелой цепи являются следующими:

HCDR1: SEVFPIAD (SEQ ID NO: 37),

HCDR2: ILPSFGRT (SEQ ID NO: 38),

HCDR3: ARGNYGFAY (SEQ ID NO: 39); и

аминокислотные последовательности трех участков CDR вариабельной области легкой цепи являются следующими:

LCDR1: QLLNSDGKTY (SEQ ID NO: 40),

LCDR2: LVS (SEQ ID NO: 41),

LCDR3: WQGSHPQT (SEQ ID NO: 42).

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения представлено моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором

вариабельная область тяжелой цепи (VH) моноклонального антитела содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 31-33, соответственно, и

вариабельная область легкой цепи (VL) моноклонального антитела содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 34-36, соответственно.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения представлено моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором

вариабельная область тяжелой цепи (VH) моноклонального антитела содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 37-39, соответственно, и

вариабельная область легкой цепи (VL) моноклонального антитела содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 40-42, соответственно.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения представлено моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором

аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи выбрано из: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 28;

и

аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи выбрано из: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 30.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения представлено моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором

аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи выбрано из: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 14, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи выбрано из: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 12;

или

аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи выбрано из: SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 28, и аминокислотную

последовательность переменной области легкой цепи выбрано из: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 30.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения представлено моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи выбрано из любого из следующих пунктов (1)-(8):

(1) переменной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, и

переменной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4;

(2) переменной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, и

переменной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8;

(3) переменной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10, и

переменной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12;

(4) переменной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14, и

переменной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12;

(5) переменной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16, и

переменной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18;

(6) переменной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, и

переменной области цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22;

(7) переменной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24, и

переменной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 26; и

(8) переменной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, и

переменной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения представлено моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где

моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, фрагмента определяющей комплементарность области, одноцепочечного антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела и диатела.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения представлено моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где моноклональное антитело связывается с белком IL-17A с EC₅₀ менее примерно 100 нМ, например менее примерно 10 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2,5 нМ, 2 нМ или менее; предпочтительно EC₅₀ измеряют конкурентным ELISA.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлено моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где моноклональное антитело связывается с белком IL-17A с K_D менее примерно 10⁻⁵ М, например менее примерно 10⁻⁶ М, 10⁻⁷ М, 10⁻⁸ М, 10⁻⁹ М, 10⁻¹⁰ М или менее; предпочтительно K_D измеряют с помощью прибора для анализа молекулярных взаимодействий Fortebio.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлено моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где моноклональное антитело связывается с белком IL-17A с EC₅₀ менее примерно 100 нМ, например менее примерно 10 нМ, 1 нМ, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ, 0,1 нМ или менее; в частности, EC₅₀ измеряют методом непрямого ELISA.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения моноклональное антитело содержит области, не являющиеся CDR, где области, не являющиеся CDR, относятся к видам, отличным от мышей, например, к человеческому антителу.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения константная область иммуноглобулина является гуманизированной, например, в константных областях тяжелой цепи используют С-область цепи гамма-1 Ig, номер доступа: P01857; и в константных областях легкой цепи используют С-область каппа-цепи Ig, номер доступа: P01834.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения представлено моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где:

моноклональное антитело продуцируется гибридной клеточной линией LT006, депонированной в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) с номером доступа ССТСС: С2017102; или

моноклональное антитело продуцируется гибридной клеточной линией LT007, депонированной в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) с номером доступа ССТСС: С2017165.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент используют для профилактики и/или лечения опухолей или аутоиммунных заболеваний или для диагностики аутоиммунных заболеваний; предпочтительно аутоиммунное заболевание выбрано из псориаза, ревматоидного артрита, псориатического артрита, анкилозирующего

спондилита и системной красной волчанки; предпочтительно псориаз представляет собой бляшечный псориаз от умеренной до тяжелой степени.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент используют для:

блокирования связывания IL-17A с IL-17RA,
регуляции (например, снижения) активности или уровня IL-17A, или подавления экспрессии IL-6 в клетках.

Другой аспект настоящего изобретения относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидные последовательности, кодирующие переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи любого из моноклональных антител, представленных в настоящем изобретении.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидные последовательности, выбранные из любого из следующих (1)-(8):

- (1) SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3;
- (2) SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7;
- (3) SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11;
- (4) SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 11;
- (5) SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17;
- (6) SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21;
- (7) SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25; и
- (8) SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29.

Другой аспект настоящего изобретения относится к рекомбинантному вектору, содержащему выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Предпочтительно рекомбинантный вектор представляет собой рекомбинантный вектор экспрессии, такой как прокариотический рекомбинантный вектор экспрессии или эукариотической рекомбинантный вектор экспрессии.

Другой аспект настоящего изобретения относится к клетке-хозяину, содержащей рекомбинантный вектор по настоящему изобретению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения любого из моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, представленных в настоящем изобретении, включающему этапы культивирования клетки-хозяина в соответствии с настоящим изобретением в соответствующих условиях и выделения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клеточных культур.

Другой аспект настоящего изобретения относится к гибридной клеточной линии, выбранной из:

гибридной клеточной линии LT006, депонированной в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) с номером доступа ССТСС: С2017102; и
гибридной клеточной линии LT007, депонированной в Китайском центре

коллекции типовых культур (ССТСС) с номером доступа ССТСС: С2017165.

Другой аспект настоящего изобретения относится к конъюгату, содержащему моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и конъюгированную часть, где моноклональное антитело представляет собой любое из моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, представленных в настоящем изобретении, и конъюгированная часть представляет собой детектируемую метку; предпочтительно детектируемая метка представляет собой радиоактивный изотоп, люминесцентное вещество, такое как флуоресцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

Другой аспект настоящего изобретения относится к набору, содержащему любое из моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, представленных в настоящем изобретении, или содержащему конъюгат по настоящему изобретению;

предпочтительно, набор дополнительно содержит второе антитело, которое специфически распознает моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; второе антитело необязательно дополнительно содержит детектируемую метку; предпочтительно детектируемая метка представляет собой радиоактивный изотоп, люминесцентное вещество, такое как флуоресцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению любого из моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, представленных в настоящем изобретении, или конъюгата по настоящему изобретению при приготовлении набора для качественного или количественного определения П-17А. Качественное обнаружение относится к обнаружению в тестируемом образце наличия П-17А, а количественное обнаружение относится к определению в тестируемом образце концентрации или содержания П-17А.

Другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей любое из моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, представленных в настоящем изобретении, или конъюгату по настоящему изобретению; фармацевтическая композиция необязательно дополнительно содержит фармацевтически приемлемые носители или наполнители.

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению любого из моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, представленных в настоящем изобретении, или конъюгата по настоящему изобретению в приготовлении лекарственного средства для профилактики и/или лечения опухолей или аутоиммунных заболеваний или к применению при приготовлении лекарственного средства для диагностики аутоиммунных заболеваний; предпочтительно аутоиммунное заболевание выбрано из псориаза, ревматоидного артрита, псориатического артрита, анкилозирующего спондилита и системной красной волчанки; предпочтительно псориаз представляет собой бляшечный псориаз от умеренной до тяжелой степени.

В частности, авторы изобретения обнаружили в экспериментах на животных

(пример 11), что 13E9H3L2 может эффективно подавлять увеличение толщины эпидермиса в модели мышей C57BL/6 с псориазом, где было показано, что лекарственное средство на основе антитела 13E9H3L2 может в значительной степени ингибировать у мыши вызванное IL-17A увеличение толщины эпидермиса путем подкожной инъекции с эффективностью, эквивалентной эффективности коммерчески доступного лекарственного средства на основе моноклонального антитела Секукинумаб, используемого с той же целью.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аутоиммунные заболевания (например, псориаз, такой как бляшечный псориаз от умеренной до тяжелой степени, ревматоидный артрит, псориазический артрит, анкилозирующий спондилит или системная красная волчанка) вызваны повышенным уровнем экспрессии IL-17A. Раскрытый в настоящем описании повышенный уровень экспрессии относится к уровню экспрессии, более высокому, чем у здоровых людей, который достиг патогенного уровня.

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению любого из моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, представленных в настоящем изобретении, или к конъюгату по настоящему изобретению при приготовлении следующих лекарственных средств:

лекарственных средств, блокирующих связывание IL-17A с IL-17RA,

лекарственных средств, регулирующих (например, снижающих) активность или уровень IL-17A, или

лекарственных средств, подавляющих экспрессию IL-6 в клетках.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу *in vivo* или *in vitro*, включающему этап введения в клетку или больному эффективного количества любого из моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, представленных в настоящем изобретении, или конъюгата по настоящему изобретению, где способ выбрано из следующего:

способа блокирования связывания IL-17A с IL-17RA,

способа регуляции (например, снижения) активности или уровня IL-17A, или

способа подавления экспрессии IL-6 в фибробластах.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ *in vitro* не является терапевтическим и/или диагностическим.

Интерлейкин 6 (сокращенно IL-6 или IL6) может продуцироваться фибробластами, моноцитами/макрофагами, Т-лимфоцитами, В-лимфоцитами, эпителиальными клетками, кератиноцитами и различными опухолевыми клетками. Интерлейкин 6 является важным фактором, регулирующим иммунный ответ, и IL-6 и IL-1 могут синергетически способствовать пролиферации Т-клеток, стимулировать дифференцировку В-клеток и участвовать в воспалительных реакциях организма (Schoenborn et al. *Advances in Immunology* 96:41-101 (2007)). Эксперимент *in vitro* (пример 10) по настоящему изобретению показывает, что анти-IL-17A антитело может существенно снижать секрецию IL-6 и ингибировать опосредованный IL-6 иммунный ответ.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения и/или профилактики опухолей или аутоиммунных заболеваний, где способ включает этап введения больному эффективного количества любого из моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, представленных в настоящем изобретении, или конъюгата по настоящему изобретению; предпочтительно аутоиммунное заболевание выбрано из псориаза, ревматоидного артрита, псориатического артрита, анкилозирующего спондилита и системной красной волчанки; предпочтительно псориаз представляет собой бляшечный псориаз от умеренной до тяжелой степени.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу диагностики аутоиммунных заболеваний, где способ включает этап нанесения предназначенного для тестирования образца (такого как образец ткани, образец клеток или образец крови) или введения больному эффективного количества любого из моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, представленных в настоящем изобретении, или конъюгата по настоящему изобретению; предпочтительно аутоиммунное заболевание выбрано из псориаза, ревматоидного артрита, псориатического артрита, анкилозирующего спондилита и системной красной волчанки; предпочтительно псориаз представляет собой бляшечный псориаз от умеренной до тяжелой степени.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, учитывая, что аутоиммунные заболевания (например, псориаз, такой как бляшечный псориаз от умеренной до тяжелой степени, ревматоидный артрит, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит или системная красная волчанка) вызваны повышенным уровнем экспрессии IL-17A, диагностика может быть выполнена путем определения уровня экспрессии IL-17A с использованием любого из моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, представленных в настоящем изобретении, или конъюгата по настоящему изобретению. Если уровень экспрессии IL-17A выше, чем у здоровых людей, и достиг патогенного уровня, диагноз считается положительным; в противном случае диагноз является отрицательным.

В настоящем изобретении, если не указано иное, используемые в настоящем описании научные и технические термины имеют значения, в которых их обычно понимают специалисты в данной области. Кроме того, используемые в настоящем описании лабораторные методы культивирования клеток, молекулярной генетики, химии нуклеиновых кислот и иммунологии являются рутинными операциями, широко используемыми в соответствующих областях. Между тем, для лучшего понимания настоящего изобретения ниже приведены определения и пояснения соответствующих терминов.

В контексте настоящего описания, при упоминании аминокислотной последовательности белка IL-17A (интерлейкина-17A), эта последовательность относится к полноразмерному белку IL-17A; а также слитому белку IL-17A, такому как фрагмент, слитый с Fc-фрагментом IgG мыши или человека (mFc или hFc). Однако специалисты в данной области поймут, что аминокислотная последовательность белка IL-17A может

содержать мутации или изменения (включая, без ограничения, замены, делеции и/или добавления), полученные естественным образом или введенные искусственно, не влияющие на биологическую функцию этого белка. Следовательно, в настоящем изобретении термин «белок IL-17A» включает все такие последовательности, включая их естественные или искусственные варианты. Кроме того, при описании фрагмента последовательности белка IL-17A, белок IL-17A также включает соответствующие фрагменты последовательности его естественных или искусственных вариантов.

Полноразмерная последовательность (155aa) IL-17A является следующей (последовательность сигнального пептида (23aa) подчеркнута):

MTPGKTSLVSLLLLLSLEAIVKAGITIPRNPGCPSNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNT
NTNPKRSSDYYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVP
IQQEILVLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA (SEQ ID NO: 43)

В данном контексте, если не указано иное, IL-17R представляет собой IL-17RA; его специфическая белковая последовательность представляет собой последовательность, известную в предшествующем уровне техники, которая описана в существующем документе или которую можно найти в GenBank. Например, IL-17RA (CD217, идентификатор гена NCBI: NP_055154.3).

В контексте настоящего описания термин EC₅₀ относится к концентрации, обеспечивающей 50% максимального эффекта, т.е., к концентрации, которая может вызывать 50% от максимального эффекта.

В контексте настоящего изобретения термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, которая обычно состоит из двух пар полипептидных цепей (каждая пара с одной «легкой» (L) цепью и одной «тяжелой» (H) цепью). В общем смысле тяжелую цепь можно интерпретировать как полипептидную цепь с большей молекулярной массой в антителе, а легкая цепь относится к полипептидной цепи с меньшей молекулярной массой в антителе. Легкие цепи классифицируются как легкие цепи κ и λ . Тяжелые цепи обычно классифицируются как μ , δ , γ , α или ϵ , а изоотипы антител определяются как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. В легких цепях и тяжелых цепях переменная область и константная область связаны областью «J» из примерно 12 или более аминокислот, и тяжелая цепь также включает область «D» из примерно 3 или более аминокислот. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (V_H) и константной области тяжелой цепи (C_H). Константная область тяжелой цепи состоит из 3 доменов (C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (V_L) и константной области легкой цепи (C_L). Константная область легкой цепи состоит из одного домена C_L. Константная область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулинов с тканями или факторами хозяина, включая связывание различных клеток иммунной системы (например, эффекторных клеток) с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на сильно переменные области (называемые определяющими комплементарность областями (CDR)), между

которыми распределены консервативные области, называемые каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из 3 CDR и 4 FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области (V_H и V_L) каждой пары тяжелая цепь/легкая цепь образуют участок связывания антитела, соответственно. Отнесение аминокислот к каждой области или домену выполняют в соответствии с определением Кабат: Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 и 1991)) или Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342:878-883. В частности, тяжелая цепь также может содержать более 3 CDR, например, 6, 9 или 12. Например, в биспецифическом антителе по настоящему изобретению тяжелая цепь может представлять собой ScFv с C-концом тяжелой цепи антитела IgG, связанного с другим антителом, и в этом случае тяжелая цепь содержит 9 CDR. Термин «антитело» не ограничено каким-либо конкретным способом получения антитела. Например, антитело включает, в частности, рекомбинантное антитело, моноклональное антитело или поликлональное антитело. Антитела могут относиться к разным изотипам, таким как антитела IgG (например, подтипы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM.

В контексте настоящего описания термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к полипептиду, содержащему фрагмент полноразмерного антитела, который сохраняет способность специфически связываться с тем же антигеном, с которым связывается полноразмерное антитело, и/или конкурирует с полноразмерным антителом за специфическое связывание с антигеном, и этот фрагмент также называется «антигенсвязывающей частью». См. в общем, Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd edition, Raven Press, N.Y. (1989)), которая полностью включена в настоящее описание посредством ссылки для всех целей. Антигенсвязывающий фрагмент антитела может быть получен с помощью технологии рекомбинантной ДНК или ферментативного или химического расщепления интактных антител. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент включает Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, фрагмент определяющей комплементарности области (CDR) и одноцепочечный фрагмент антитела (например, scFv), химерное антитело, диатело и полипептид, который содержит по меньшей мере часть антитела, достаточную для придания полипептиду способности специфически связываться с антигеном.

В контексте настоящего описания термин «Fd фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_H и C_H1 ; термин «Fv фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_L и V_H одного плеча антитела; термин «фрагмент dAb» относится к фрагменту антитела, состоящему из домена V_H (Ward et al., Nature 341:544-546 (1989)); термин «Fab-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_L , V_H , C_L и C_H1 ; и термин «фрагмент F(ab')₂» относится к фрагменту антитела, содержащему из двух Fab-фрагментов, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области.

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой одноцепочечное антитело (например, scFv), в котором домены V_L и V_H спарены через линкер, который позволяет продуцировать единую полипептидную цепь, с образованием одновалентной молекулы (см., например, Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988) и Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988)). Такие молекулы scFv могут иметь общую структуру: NH_2-V_L -линкер- V_H-COOH или NH_2-V_H -линкер- V_L-COOH . Подходящий линкер предшествующего уровня техники состоит из повторяющейся аминокислотной последовательности GGGGS или ее варианта. Например, можно использовать линкер, имеющий аминокислотную последовательность (GGGGS)₄, но также можно использовать его варианты (Holliger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448). Другие линкеры, которые можно использовать в настоящем изобретении, описаны Alfthan et al. (1995), *Protein Eng.* 8:725-731, Choi et al. (2001), *Eur. J. Immunol.* 31:94-106, Hu et al. (1996), *Cancer Res.* 56:3055-3061, Kipriyanov et al. (1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56 и Roovers et al. (2001), *Cancer Immunol.*

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой диатело, т.е., двухвалентное антитело, в котором домены V_H и V_L экспрессируются в одной полипептидной цепи. Однако используемый линкер слишком короткий, чтобы позволить спаривание двух доменов в одной цепи, поэтому домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи, с образованием двух антигенсвязывающих участков (см., например, Holliger P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) и Poljak RJ et al., *Structure* 2:1121-1123 (1994)).

Антигенсвязывающие фрагменты (например, вышеупомянутые фрагменты антител) антител могут быть получены из данных антител обычными методами, известными специалистам в данной области (например, методом рекомбинантной ДНК или ферментативного или химического расщепления), затем антигенсвязывающие фрагменты антитела проверяют на специфичность так же, как интактные антитела.

В контексте настоящего описания, если иное в явном виде не следует из контекста, термин «антитело» включает не только интактные антитела, но также антигенсвязывающие фрагменты антител.

В контексте настоящего описания термины «mAb» и «моноклональное антитело» относятся к антителу или фрагменту антитела, происходящему из группы высокогомологичных антител, т.е., группы идентичных молекул антител, за исключением естественных мутаций, которые могут происходить спонтанно. Моноклональное антитело обладает высокой специфичностью в отношении одного эпитопа на антигене. Поликлональное антитело, отличие от моноклонального антитела, обычно содержит по меньшей мере два или более разных антител, которые обычно распознают разные эпитопы на антигене. Моноклональные антитела как правило можно получить с помощью гибридомной технологии, о которой впервые сообщили Kohler et al. (*Nature*, 256:495, 1975), но они также могут быть получены с помощью технологии рекомбинантной ДНК (например, см. патент США 4816567).

В контексте настоящего описания термин «химерное антитело» относится к антителу, часть легкой и/или тяжелой цепи которого происходит от некоторого антитела (которое может быть получено из конкретного вида или принадлежать к конкретному классу или подклассу антител), а другая часть легкой и/или тяжелой цепи происходит от другого антитела (которое может быть получено из того же или другого вида или принадлежать к тому же или другому классу или подклассу антител). Но в любом случае оно сохраняет активность связывания с целевым антигеном (USP 4816567, Cabilly et al.; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)).

В контексте настоящего описания термин «гуманизированное антитело» относится к антителу или фрагменту антитела, которое получается, когда все или часть областей CDR человеческого иммуноглобулина (рецепторного антитела) заменена областями CDR нечеловеческого антитела (донорного антитела), где донорное антитело может быть нечеловеческим (например, мышинным, крысиным или кроличьим) антителом с требуемой специфичностью, сродством или реактивностью. Кроме того, некоторые аминокислотные остатки в каркасных областях (FR) рецепторного антитела также могут быть заменены аминокислотными остатками соответствующих нечеловеческих антител или аминокислотными остатками других антител для дальнейшего улучшения или оптимизации работы антитела. Подробнее о гуманизированных антителах см., например, 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); и Clark, Immunol. Today 21:397-402 (2000).

В контексте настоящего описания термин «эпитоп» относится к участку антигена, с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело. «Эпитоп» также называется в данной области «антигенной детерминантой». Эпитоп или антигенная детерминанта обычно состоит из химически активных поверхностных групп молекулы, таких как аминокислоты, углеводы или боковые цепи сахара, и обычно имеет специфические трехмерные структурные характеристики и специфические характеристики заряда. Например, эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 последовательных или непоследовательных аминокислот в уникальной пространственной конформации, и может быть «линейным» или «конформационным». См., например, «Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology», Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996). В линейном эпитопе все точки взаимодействия между белком и взаимодействующей молекулой (например, антителом) расположены линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка. В конформационном эпитопе точки взаимодействия расположены между аминокислотными остатками белка, которые отделены друг от друга.

В контексте настоящего описания термин «выделенный» относится к получению с помощью искусственных средств из естественного состояния. Если в природе появляется некоторое «выделенное» вещество или компонент, это может быть связано с изменением в его естественной среде или он может быть изолирован от окружающей среды, или возможно и то, и другое. Например, некоторый невыделенный полинуклеотид или

полипептид существует в природе в определенном живом животном, и тот же самый полинуклеотид или полипептид, выделенный с высокой чистотой из своего естественного состояния, называется выделенным полинуклеотидом или полипептидом. Термин «выделенный» не исключает наличия искусственных или синтетических веществ или других примесей, которые не влияют на активность вещества.

В контексте настоящего описания термин «экспрессионная система *E. coli*» относится к экспрессионной системе, состоящей из *E. coli* (штамма) и вектора, где *E. coli* (штамм) происходит из коммерчески доступного штамма, такого как, без ограничения GI698, ER2566, BL21 (DE3), B834 (DE3) и BLR (DE3).

В контексте настоящего описания термин «вектор» относится к носителю нуклеиновой кислоты, в который может быть вставлен полинуклеотид. Когда вектор обеспечивает экспрессию белка, кодируемого вставленным полинуклеотидом, вектор называется вектором экспрессии. Вектор может быть введен в клетку-хозяина путем трансформации, трансдукции или трансфекции, обеспечивая экспрессию элементов генетического вещества, перенесенного вектором, в клетке-хозяине. Векторы хорошо известны специалистам в данной области, включая, без ограничения, плазмиды; фагемиды; космиды; искусственные хромосомы, такие как искусственные хромосомы дрожжей (YAC), бактериальные искусственные хромосомы (BAC) или искусственные хромосомы на основе P1 (PAC); фаги, такие как лямбда-фаги или фаги M13, и вирусы животных и т.д. Вирусы животных, которые могут использоваться в качестве векторов, включают, без ограничения, ретровирусы (включая лентивирусы), аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса (такие как вирус простого герпеса), поксвирусы, бакуловирусы, папилломавирусы и паповавирусы (например, SV40). Вектор может содержать несколько элементов, контролирующих экспрессию, включая, помимо прочего, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, элементы отбора и репортерные гены. Кроме того, вектор может дополнительно содержать сайт инициации репликации.

В контексте настоящего описания термин «клетка-хозяин» относится к клеткам, которые можно использовать для введения векторов, включая, без ограничения, прокариотические клетки, такие как *E. coli* или *Bacillus subtilis*, клетки грибов, такие как клетки дрожжей или аспергилл, клетки насекомых, такие как клетки дрозофилы S2 или Sf9, или клетки животных, такие как фибробласты, клетки CHO, клетки COS, клетки NSO, клетки HeLa, клетки ВНК, клетки НЕК 293 или клетки человека.

В контексте настоящего описания термин « K_D » относится к константе равновесной диссоциации, характеризующей специфическое взаимодействие антитело-антиген, которая используется для описания сродства связывания между антителом и антигеном. Чем меньше константа равновесной диссоциации, тем сильнее связывание антитело-антиген и тем выше сродство между антителом и антигеном. Обычно антитела связываются с антигенами с константой равновесной диссоциации (K_D) менее примерно 10^{-5} М, например менее примерно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М или менее, и

константа равновесной диссоциации может быть измерена, например, с помощью прибора для анализа молекулярных взаимодействий Fortebio.

В контексте настоящего описания термины «моноклональное антитело» и «mAb» имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо; термины «поликлональное антитело» и «PcAb» имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо; термины «полипептид» и «белок» имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо. И в настоящем изобретении аминокислоты обычно представлены однобуквенными и трехбуквенными сокращениями, известными в данной области. Например, аланин может быть представлен буквой A или Ala.

В контексте настоящего описания термины «гибридома» и «гибридная клеточная линия» могут использоваться взаимозаменяемо, и при упоминании терминов «гибридома» и «гибридная клеточная линия», они также включают субклоны и клетки-потомки гибридомы. Например, когда речь идет о гибридной клеточной линии LT006 или LT007, это также относится к субклонам и клеткам-потомкам гибридной клеточной линии LT006 или LT007.

В контексте настоящего описания термин «фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель» относится к носителю и/или наполнителю, фармакологически и/или физиологически совместимому с индивидом и активным ингредиентом, и этот термин хорошо известен в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, под редакцией Gennaro AR, Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995) и включает, помимо прочего, регуляторы pH, поверхностно-активные вещества, адъюванты и усилители ионной силы. Например, регуляторы pH включают, без ограничения, фосфатный буфер; поверхностно-активные вещества включают, без ограничения, катионные, анионные или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как Твин-80; и усилители ионной силы включают, без ограничения, хлорид натрия.

В контексте настоящего описания термин «адъювант» относится к неспецифическому иммунному усилителю, который может усиливать иммунный ответ организма на антигены или изменять тип иммунного ответа при доставке в организм вместе с антигенами или доставке в организм заблаговременно. Существуют различные адъюванты, включая, помимо прочего, алюминиевый адъювант (например, гидроксид алюминия), адъювант Фрейнда (например, полный адъювант Фрейнда и неполный адъювант Фрейнда), липополисахарид *Corynebacterium parvum*, цитокин и т.д. Адъювант Фрейнда является наиболее часто используемым адъювантом в экспериментах на животных. Адъювант гидроксид алюминия чаще используется в клинических испытаниях.

В контексте настоящего описания термин «эффективное количество» относится к количеству, достаточному для получения или по меньшей мере частичного получения требуемого эффекта. Например, эффективное количество для профилактики заболеваний (например, заболеваний, связанных со связыванием IL-17A с рецептором IL-17A или чрезмерной активностью IL-17A, таких как аутоиммунные заболевания), является количеством, достаточным для профилактики, купирования или отсрочки начала

заболевания (например, заболеваний, связанных со связыванием IL-17A с рецептором IL-17A или чрезмерной активностью IL-17A, таких как аутоиммунные заболевания); терапевтически эффективное количество является количеством, достаточным для излечения или по меньшей мере частичной остановки развития заболевания и его осложнений у пациентов, которые уже страдают от этого заболевания. Специалисты в данной области способны определить такое эффективное количество. Например, количество, эффективное для терапевтического применения, будет зависеть от тяжести заболевания, подлежащего лечению, общего состояния иммунной системы пациента, общего состояния пациента, такого как возраст, вес и пол, способа введения лекарственного вещества, и других видов лечения, применяемых одновременно, и т.д.

Благоприятные эффекты изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает по меньшей мере один из следующих технических эффектов:

(1) все моноклональные антитела по настоящему изобретению, такие как 13E9 H1L1, 13E9 H2L2, 13E9 H3L2 и 2G2 H1L1, 2G2 H2L2, 2G2 H3L3, способны связываться с IL-17A с высокой специфичностью и могут эффективно блокировать связывание IL-17A с лигандом IL-17A, и специфически снижают секрецию IL-6 в IL-17A-опосредованных фибробластах;

(2) моноклональные антитела по настоящему изобретению, особенно 13E9 H2L2, демонстрируют такой же эффект, как и коммерчески доступный лекарственный препарат Секукинумаб, в отношении той же мишени при ингибировании секреции IL-6;

(3) моноклональные антитела по настоящему изобретению потенциально могут применяться для лечения и/или профилактики аутоиммунных заболеваний, таких как псориаз, ревматоидный артрит, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит или системная красная волчанка.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1: Результаты детектирования моноклонального мышинового антитела 13E9 в SDS-PAGE. Образцы из четырех полос слева направо и соответствующие вводимые количества представляют собой: антитело в загрузочном буфере для электрофореза белков в нередуцирующих условиях, 1 мкг; антитело в загрузочном буфере для электрофореза белков в редуцирующих условиях, 1 мкг; маркер, 5 мкл; BSA, 1 мкг.

Фиг. 2: Результаты детектирования моноклонального мышинового антитела 2G2 в SDS-PAGE. Образцы из четырех полос слева направо и соответствующие вводимые количества представляют собой: антитело в загрузочном буфере для электрофореза белков в нередуцирующих условиях, 1 мкг; антитело в загрузочном буфере для электрофореза белков в редуцирующих условиях, 1 мкг; маркер, 5 мкл; BSA, 1 мкг.

Фиг. 3: Результаты детектирования моноклонального гуманизованного антитела 13E9 H3L2 в SDS-PAGE. Образцы трех полос слева направо и соответствующие вводимые количества: BSA, 1 мкг; маркер, 5 мкл; антитело в загрузочном буфере для электрофореза белков в нередуцирующих условиях, 1 мкг; антитело в загрузочном буфере для

электрофореза белков в редуцирующих условиях, 1 мкг.

Фиг. 4: Результаты детектирования кинетических характеристических параметров антитела 13E9 H1L1. На фигуре по оси ординат отложено значение сигнала в нм в качестве единицы измерения; по оси абсцисс отложено время в сек в качестве единицы измерения.

Фиг. 5: Результаты детектирования кинетических характеристических параметров антитела 13E9 H2L2. На фигуре по оси ординат отложено значение сигнала в нм в качестве единицы измерения; по оси абсцисс отложено время в сек в качестве единицы измерения.

Фиг. 6: Результаты детектирования кинетических характеристических параметров антитела 13E9 H3L2. На фигуре по оси ординат отложено значение сигнала в нм в качестве единицы измерения; по оси абсцисс отложено время в сек в качестве единицы измерения.

Фиг. 7: Результаты детектирования кинетических характеристических параметров антитела Секукиномаб. На фигуре по оси ординат отложено значение сигнала в нм в качестве единицы измерения; по оси абсцисс отложено время в сек в качестве единицы измерения.

Фиг. 8: Результаты детектирования кинетических характеристических параметров антитела 2G2 H1L1. На фигуре по оси ординат отложено значение сигнала в нм в качестве единицы измерения; по оси абсцисс отложено время в сек в качестве единицы измерения.

Фиг. 9: Результаты детектирования кинетических характеристических параметров антитела 2G2 H2L2. На фигуре по оси ординат отложено значение сигнала в нм в качестве единицы измерения; по оси абсцисс отложено время в сек в качестве единицы измерения.

Фиг. 10: Результаты детектирования кинетических характеристических параметров антитела 2G2 H3L3. На фигуре по оси ординат отложено значение сигнала в нм в качестве единицы измерения; по оси абсцисс отложено время в сек в качестве единицы измерения.

Фиг. 11: Результаты детектирования кинетических характеристических параметров антитела Секукиномаб. На фигуре по оси ординат отложено значение сигнала в нм в качестве единицы измерения; по оси абсцисс отложено время в сек в качестве единицы измерения.

Фиг. 12: детектирование активности связывания антител 13E9 H1L1 и 13E9 H2L2 с антигеном IL17A-His методом непрямого ELISA. Коммерчески доступный препарат Секукиномаб используется в качестве положительного контроля.

Фиг. 13: детектирование активности связывания антитела 13E9 H3L2 с антигеном IL17A-His методом непрямого ELISA. Коммерчески доступный препарат Секукиномаб используется в качестве положительного контроля.

Фиг. 14: детектирование активности антител 13E9 H1L1 и 13E9 H2L2, конкурирующих с рецептором IL17RA-His (биотин) за связывание, методом конкурентного ELISA. Коммерчески доступный препарат Секукиномаб используется в качестве положительного контроля.

Фиг. 15: детектирование активности антитела 13E9 H3L2, конкурирующего с рецептором IL17RA-His (биотин) за связывание, методом конкурентного ELISA. Коммерчески доступный на рынок лекарственный препарат Секукинумаб используется в качестве положительного контроля.

Фиг. 16: детектирование активности связывания антител 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 и 2G2 H3L3 с антигеном IL17A-His методом непрямого ELISA. Коммерчески доступный препарат Секукинумаб используется в качестве положительного контроля.

Фиг. 17: детектирование активности антител 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 и 2G2 H3L3, конкурирующих с рецептором IL17A-His (биотин) за связывание с антигеном IL17A-His, методом конкурентного ELISA. Коммерчески доступный препарат Секукинумаб используется в качестве положительного контроля.

Фиг. 18: влияние антител 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 и 13E9 H3L2, а также 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 и 2G2 H3L3 на секрецию цитокина IL-6 в реакции смешанной культуры лимфоцитов.

Фиг. 19: влияние лекарственного вещества на основе антитела 13E9 H3L2 на толщину эпидермиса в модели мышей C57BL/6 с псориазом.

Примечание относительно сохранения биологических материалов:

гибридная клеточная линия LT006 (IL17A-13E9), депонированная в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) 12 сентября 2017 г. с номером доступа CCTCC: C2017102 в Уханьском университете, Ухань, Китай, 430072.

гибридная клеточная линия LT007 (IL17A-2G2), депонированная в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) 12 сентября 2017 г. с номером доступа CCTCC: C2017165 в Уханьском университете, Ухань, Китай, 430072.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Варианты осуществления настоящего изобретения подробно описаны ниже со ссылкой на примеры. Специалисты в данной области поймут, что приведенные ниже примеры используются только для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения. Пример выполнен в соответствии со способами или условиями, описанными в данной области (например, см. Guide to Molecular Cloning Experiments, авт. J. Sambrook et al., перевод Huang Peitang et al., третье изд., Science Press) или в соответствии с руководством по продукту, если в нем не указаны конкретные способы или условия. Все используемые реагенты или инструменты являются коммерчески доступными обычными продуктами, если не указаны их производители.

В приведенных ниже примерах использованных мышей BALB/C приобретали в Центре лабораторных животных провинции Гуандун; использованных мышей C57BL/6 приобретали в Nanjing Galaxy Biopharma Co., Ltd.; использованные клетки MRC5 получали из шанхайского центра клеток IBS в Фудане; используемое моноклональное антитело Секукинумаб (Cosentyx®) приобретали в Novartis Corporation.

Пример 1: Получение анти-IL-17A антител 13E9 и 2G2

1. Получение гибридомных клеточных линий LT006 и LT007.

Антиген IL-17A (24-155)-His, используемый для создания IL-анти-17A антитела, представляет собой слитый белок зрелого пептида человеческого IL-17A (GenBank ID: Q16552) и His-метки. Выполняли слияние клеток селезенки из иммунизированных мышей BALB/C (приобретенных в Медицинском лабораторном центре животных провинции Гуандун) и клеток мышинной миеломы с получением гибридом, используя хорошо известные методы (см. например, «Monoclonal Antibody Production» in Basic Methods in Antibody Production and Characterization, Eds. G.C. Howard and D.R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000).

Слитый белок IL17A-His ферментативно расщепляли протеазой TEV и очищали на колонке с получением белка IL-17A (24-155). Скрининг, используя непрямой ELISA выполняли в микропланшетах, покрытых белком IL-17A (24-155) в качестве антигена, для получения клеток гибридомы, которые секретируют новые антитела, специфически связывающиеся с IL-17A (24-155).

Клетки гибридомы, полученные в результате скрининга непрямой ELISA подвергали скринингу, используя конкурентный ELISA для получения гибридомных клеточных линий, способных секретировать моноклональное антитело, которое конкурирует с рецептором IL-17RA (CD217, NCBI Gene ID: NP_055154.3) за связывание с IL-17A, и методом серийных разведений получали две стабильные гибридомные клеточные линии.

Гибридомную клеточную линию LT006 (IL17A-13E9) депонировали в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) в субботу, 12 сентября 2015 г., под номером доступа ССТСС: С2017102, в Уханьском университете (Ухань, Китай, 430072). Моноклональное антитело, секретируемое гибридомной клеточной линией LT006, названо 13E9.

Гибридомную клеточную линию LT007 (IL17A-2G2) депонировали в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) 12 сентября 2017 г. под номером доступа ССТСС: С2017165 в Уханьском университете (Ухань, Китай, 430072). Моноклональное антитело, секретируемое гибридомной клеточной линией LT007, названо 2G2.

2. Получение анти-IL-17A антитела 13E9.

Полученную выше клеточную линию LT006 культивировали (1×10^5 клеток на лунку) в бессывороточной среде для гибридом (дополненной 1% пенициллин-стрептомицин и 4% глутамакс, в инкубаторе для клеток при 37°C, 5% CO₂), и супернатант клеточной культуры собирали через 7 дней культивирования, когда выживаемость составила примерно 20%, и затем подвергали высокоскоростному центрифугированию, вакуумной фильтрации через микропористую мембрану и очистке на колонке HiTrap HP с белком А с получением антитела 13E9. Обнаружение очищенных образцов 13E9 выполняли с помощью SDS-PAGE электрофореза, результаты которого показаны на фиг. 1.

3. Получение анти-IL-17A антитела 2G2.

Полученную выше клеточную линию LT007 культивировали (1×10^5 клеток на лунку) в бессывороточной среде для гибридом (дополненной 1% пенициллин-стрептомицин и 4% глутамакс, в инкубаторе для клеток при 37°C, 5% CO₂), и супернатант клеточной культуры собирали через 7 дней культивирования, когда выживаемость составила примерно 20%, и затем подвергали высокоскоростному центрифугированию, вакуумной фильтрации через микропористую мембрану и очистке на колонке HiTrap HP с белком А с получением антитела 2G2. Обнаружение очищенных образцов 2G2 выполняли с помощью SDS-PAGE электрофореза, результаты которого показаны на фиг. 2.

Пример 2: Анализ последовательности антитела 13E9

Клетки LT006 культивировали в соответствии со способом, описанным на этапе 2 Примера 1.

Используя набор для экстракции клеточной/бактериальной общей РНК (Tiangen, артикул DP430), мРНК экстрагировали из культивированных клеток LT006 в соответствии с методом, описанным в руководстве к набору.

кДНК синтезировали в соответствии с руководством к набору ОТ-ПЦР системы синтеза первой цепи Invitrogen SuperScript® III и амплифицировали методом ПЦР.

Продукты, амплифицированные с помощью ПЦР, непосредственно подвергали прямому ТА-клонированию, и для выполнения конкретных операций использовали руководство по применению набора pEASY-T1 Cloning Kit (Transgen CT101).

ТА-клонированные продукты непосредственно секвенировали; результаты секвенирования были следующими:

нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи: (360 п.н.)

GAAGTAAAGCTGCAGGAGTCGGGACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTC
TGTCCCTCACCTGCACTGTCACTAGCTACTCATTCACCAGTGATTATGCCTGGAGCTG
GATCCGGCAGTTTCCAGGAATCAAAGTGGAGTGGATGGGCTACATAACCTACAGTG
GTGTCACTAGCTACAACCCCTCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACAT
CCAAGAACCAGTTCTTCTACAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACGGCCACAT
ATTACTGTGCAAGGGCAGACTATGATAGCTACTATACTATGGACTACTGGGGTCAAG
GAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 1)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (120 а.к.)

EVKLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTSYSFTSDYAWSWIRQFPGIKLEWMGYITYS
GVTSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARADYDSYYTMDYWGQGT
SVTVSS (SEQ ID NO: 2)

нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи: (333 п.н.)

GACATCCAGCTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTA
TTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAGGCTCCTGATCTACAAAGT
TTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAG
ATTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCT

CTCAAAGTACACATTTTTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 3)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (111 а.к.)

DIQLTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLVKPGQSPRLLIYKV
 SNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYFCSQSTHFWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 4)

CDR области подчеркнуты.

Пример 3: Разработка, получение и детектирование гуманизованных анти-IL-17A антител 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 и 13E9 H3L2

1. Разработка последовательностей легкой и тяжелой цепей гуманизованных анти-IL-17A антител 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 и 13E9 H3L2

На основе трехмерной кристаллической структуры белка IL-17A (EMBO J. (2001) 20 p:5332-41) и последовательности антитела 13E9, полученной в Примере 2, с помощью компьютера была смоделирована модель антитела, и вычислены мутации в соответствии с моделью с получением последовательностей варибельной области антител 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 и 13E9 H3L2 (последовательности константной области антитела взяты из базы данных NCBI, в которой константной областью тяжелой цепи является С-область цепи гамма-1 Ig, номер доступа: P01857, и константной областью легкой цепи является С-область каппа-цепи Ig, номер доступа: P01834).

Разработанные последовательности варибельных областей являются следующими:

(1) последовательности тяжелой и легкой цепей гуманизованного моноклонального антитела 13E9 H1L1

нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи: (360 п.н.)

GATGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGACCAGGACTGGTGAAGCCTAGCCAGACC
 CTGAGCCTGACTTGCACCGTGTCCAGCTACAGCTTCACCAGCGACTACGCTTGGTCT
 TGGATCAGACAGTTCCCAGGAATTGGCCTCGAGTGGATGGGCTACATCACCTACAG
 CGGCGTGACCAGCTACAACCCAGCCTGAAGAGCAGGATCACCATCAGCCGGGACA
 CCAGCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGCTGAACAGCGTGACAGCAGCCGATACCGCA
 GTGTACTATTGCGCCAGGGCCGACTACGACAGCTACTACACCATGGACTATTGGGGC
 CAGGGAACCAGCGTGACAGTGTCTAGC (SEQ ID NO: 5)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (120 а.к.)

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSSYSFSDYAWSWIRQFPGIGLEWMGYITYS
 GVTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFFLQLNSVTAADTAVYYCARADYDSYYTMDYWGQG
 TSVTVSS (SEQ ID NO: 6)

CDR области подчеркнуты.

нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи: (333 п.н.)

GATGTCGTGATGACCCAGACCCCTCTGTCTCTGCCAGTGACACTGGGACAGC
 AGGCTAGCATCTCTTGCAGAAGCAGCCAGAGCCTGGTGCACAGCAACGGCAACACC
 TACCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTAGACTGCTGATCTACAAG

GTGTCCAACCGGTTTCAGCGGCGTGCCAGATAGATTCAGCGGAAGCGGAAGCGGCAC
CGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCCGAGGATCTGGGAGTGTACTTCT
GCAGCCAGAGCACCCACTTTTGGACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAGATCAAG
(SEQ ID NO: 7)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (111 а.к.)

DVVMQTPLSLPVTLGQQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHFWTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO: 8)

CDR области подчеркнуты.

(2) последовательности тяжелой и легкой цепей гуманизированного
моноклонального антитела 13E9 H2L2

нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи: (360 п.н.)

GATGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGACCAGGACTGGTGAAGCCTAGCCAGACC
CTGAGCCTGACTTGCACCGTGTCCAGCTACAGCTTCACCAGCGACTACGCTTGGTCT
TGGATCAGACAGCCACCAGGAAAGGGACTCGAGTGGATCGGCTACATCACCTACAG
CGGCGTGACCAGCTACAACCCAGCCTGAAGAGCAGGATCACCATCAGCCGGGACA
CCAGCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGCTGTCTAGCGTGACAGCAGCCGATACCGCA
GTGTACTATTGCGCCAGGGCCGACTACGACAGCTACTACACCATGGACTATTGGGGC
CAGGGAACCAGCGTGACAGTGTCTAGC (SEQ ID NO: 9)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (120 а.к.)

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSSSYSFTSDYAWSWIRQPPGKGLEWIGYITYS
GVTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFFLQLSSVTAADTAVYYCARADYDSYYTMDYWGQG
TSVTVSS (SEQ ID NO: 10)

CDR области подчеркнуты.

нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи: (333 п.н.)

GATGTCGTGATGACCCAGACCCCTCTGTCTCTGCCAGTGACACTGGGACAGC
CAGCTAGCATCTCTTGCAGAAGCAGCCAGAGCCTGGTGCACAGCAACGGCAACACC
TACCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTAGACTGCTGATCTACAAG
GTGTCCAACCGGTTTCAGCGGCGTGCCAGATAGATTCAGCGGAAGCGGAAGCGGCAC
CGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCCGAGGATCTGGGAGTGTACTACT
GCAGCCAGAGCACCCACTTTTGGACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAGATCAAG
(SEQ ID NO: 11)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (111 а.к.)

DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPRLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCSQSTHFWTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO: 12)

CDR области подчеркнуты.

(3) последовательности тяжелой и легкой цепей гуманизированного
моноклонального антитела 13E9 H3L2

нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи: (360 п.н.)

GATGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGACCAGGACTGGTGAAGCCTAGCCAGACC
 CTGAGCCTGACTTGCACCGTGTCCAGCTACAGCTTCACCAGCGACTACGCTTGGTCT
 TGGATCAGACAGCCACCAGGAAAGGGACTCGAGTGGATCGGCTACATCACCTACAG
 CGGCGTGACCAGCTACAACCCTAGCCTGAAGAGCCGCGTGACCATTAGCGTGGACA
 CCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCCGCCGATACAGCA
 GTGTACTATTGCGCCCCGGCCGATTACGACAGCTACTACACCATGGACTATTGGGGC
 CAGGGAACCAGCGTGACAGTGTCTAGC (SEQ ID NO: 13)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (120 а.к.)

DVQLQESGPGLVKPSQTL~~SLTCTVSSYSFTSDY~~AW~~SWIRQPPGKGLEWIGYITYS~~
GVTSYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDSYYTMDYWGQG
 TSVTVSS (SEQ ID NO: 14)

CDR области подчеркнуты.

Нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи такая же, как нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи антитела 13E9 H2L2, приведенная в SEQ ID NO: 11.

Кодируемая аминокислотная последовательность антитела также совпадает с аминокислотной последовательностью варибельной области легкой цепи антитела 13E9 H2L2, приведенной в SEQ ID NO: 12.

2. Получение гуманизированных антител 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 и 13E9 H3L2.

Все константные области тяжелой цепи содержат C-область цепи гамма-1 Ig, номер доступа: P01857; константные области легкой цепи содержат C-область каппа-цепи Ig, номер доступа: P01834.

кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 13E9 H1L1, кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 13E9 H2L2 и кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 13E9 H3L2 клонировали в векторы pUC57simple (предоставленные Genscript), соответственно, с получением pUC57simple-13E9H1, pUC57simple-13E9L1, pUC57simple-13E9H2, pUC57simple-13E9L2 и pUC57simple-13E9H3, соответственно, и фрагменты, содержащие соответствующие тяжелые цепи, и фрагменты, содержащие соответствующие легкие цепи, субклонировали в векторы pcDNA3.1, соответственно, с получением рекомбинантных плазмид pcDNA3.1-13E9H1, pcDNA3.1-13E9L1, pcDNA3.1-13E9H2, pcDNA3.1-13E9L2, pcDNA3.1-13E9H3 и pcDNA3.1-13E9L2. Затем соответствующие рекомбинантные плазмиды легкой цепи и рекомбинантные плазмиды тяжелой цепи (pcDNA3.1-13E9H1 и pcDNA3.1-13E9L1; pcDNA3.1-13E9H2 и pcDNA3.1-13E9L2; pcDNA3.1-13E9H3 и pcDNA3.1-13E9L2) котрансфицировали в клетки 293F, культуру клеток собирали и очищали с получением гуманизированных антител 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 и 13E9 H3L2, соответственно. Обнаружение очищенного образца 13E9 H3L2 выполняли с помощью SDS-PAGE электрофореза, результаты которого показаны на Фиг. 3.

Пример 4: Анализ последовательности антитела 2G2

Клетки LT007 культивировали в соответствии со способом, описанным на этапе 3

Примера 1.

Используя набор для экстракции клеточной/бактериальной общей РНК (Tiangen, артикул DP430), мРНК экстрагировали из культивированных клеток LT007 в соответствии с методом, описанным в руководстве к набору.

кДНК синтезировали в соответствии с руководством к набору ОТ-ПЦР системы синтеза первой цепи Invitrogen SuperScript® III и амплифицировали методом ПЦР.

Продукты, амплифицированные с помощью ПЦР, непосредственно подвергали прямому ТА-клонированию, и для выполнения конкретных операций использовали руководство по применению набора pEASY-T1 Cloning Kit (Transgen CT101).

ТА-клонированные продукты непосредственно секвенировали; результаты секвенирования были следующими:

нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи: (351 п.н.)

GAGGTTTCAGCTGGAGCAGTCTGGTTCTGAACTGAGGAGTCCTGGATCTTCAG
TAAAGCTTTCATGCAAGGATTTTGATTCAGAAGTCTTCCCTATTGCTGATATGAGTTG
GGTTAGGCAGAAGCCTGGGCATGGATTTGAATGGATTGGAGACATACTCCCAAGTT
TTGGTAGAACAATCTATGGAGAGAAGTTTGAGGACAAAGCCAAAGTGGATGCAGAC
ACAGTGTCCAACACAGCCTACTTGGAACCAACAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCT
ATCTACTACTGTGCAAGGGGTAACCTACGGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTG
GTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 15)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (117 а.к.)

EVQLEQSGSELSPGSSVKLSCKDFDSEVFPIADMSWVRQKPGHGFEWIGDLPSF
GRTIYGEKFEDKAKVDADTVSNTAYLELNSLTSEDSAIYYCARGNYGFAYWGQGLVT
VSA (SEQ ID NO: 16)

CDR области подчеркнуты.

нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи: (336 п.н.)

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCACTTTGTCGGTTATCATTGGACAACC
AGCCTCCATCTCTTGCAAGCCAAGTCAGAGCCTCTTAAATAGTGATGGAAAGACATA
TTTGAATTGGTTGTTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGT
GTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAG
ATTTCACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCT
GGCAAGGTTACATTTTCCTCAGACGTTTCGGTGGAGGCACAAAGTTGGAAATAAAA
(SEQ ID NO: 17)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (112 а.к.)

DVLMTQTPLTLSVIIGQPASISCKPSQSLNSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLV
SKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGSHFPQTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO: 18)

CDR области подчеркнуты.

Пример 5: Разработка, получение и детектирование гуманизованных анти-IL-17A антител 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 и 2G2 H3L3

(1) последовательности тяжелой и легкой цепей гуманизованного

моноклонального антитела 2G2 H1L1:

нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи: (348 п.н.)

GTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAAGCGAACTGAGAAAGCCAGGCTCCAGCGTG
AAGCTGTCTTGCAAGGACTTCGACAGCGAGGTGTTCCCATCGCCGATATGTCTTGG
GTCCGACAGGCTCCAGGCCAGGGATTCGAGTGGATCGGTGACATTCTGCCAGCTTC
GGAAGAACCAACTACGCCCAGAAGTTCGAGGGCAAGGCCAAGGTGGACGCAGACA
AGAGCACCAACACCGCCTACCTGGAGCTGAACAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCC
ATCTACTATTGCGCCAGGGGCAACTACGGATTCGCCTATTGGGGCCAGGGAACACT
GGTGACAGTGTCCGCC (SEQ ID NO: 19)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (116 а.к.)

VQLVQSGSELRKPGSSVKLSCKDFDSEVFPIADMSWVRQAPGQGFIEWIGDILPSF
GRTNYAQKFEGKAKVDADKSTNTAYLELNSLRSEDTAIYYCARGNYGFAYWGQGLV
TVSA (SEQ ID NO: 20)

CDR области подчеркнуты.

нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи: (336 п.н.)

GATGTCGTGATGACCCAGACCCCTCTGTCTCTGAGCGTGACACTGGGACAGC
CAGCTAGCATCAGCTGCAGAAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGACGGCAAGACC
TACCTGAATTGGCTGCTGCAGAGACCAGGCCAGTCTCCTAGAAGGCTGATCTACCTG
GTGTCCAAGCTGGACAGCGGCGTGCCAGATAGATTCAGCGGAAGCGGAAGCGGCAC
CGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCCGAGGATCTGGGAGTGTACTACT
GTTGGCAGGGCAGCCACTTCCCTCAGACATTCGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATC
AAG (SEQ ID NO: 21)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (112 а.к.)

DVVMTQTPLSLSVTLGQPASISCRSSQLLNSDGKTYLNWLLQRPQSPRRLIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGSHFPQTFGGGTKLEIK
(SEQ ID NO: 22)

CDR области подчеркнуты.

(2) Последовательности тяжелой и легкой цепей гуманизированного моноклонального антитела 2G2 H2L2

нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи: (348 п.н.)

GTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAAGTGAAGAAGCCAGGCTCCAGCGTG
AAGCTGTCTTGCAAGGACTTCGACAGCGAGGTGTTCCCATCGCCGATATGTCTTGG
GTCCGACAGGCTCCAGGCCAGGGATTCGAGTGGATCGGTGACATTCTGCCAGCTTC
GGGAGAACCAATTACGCCCAGAAGTTCAGGGCAGAGTGACCGTGACCGCAGACAA
GAGCACCAACACCGCCTACCTGGAGCTGAACAGCCTGAGGAGCGAGGATACCGCCC
TGTACTATTGCGCCAGGGGCAACTACGGCTTCGCCTATTGGGGACAGGGAACACTG
GTGACAGTGTCCGCC (SEQ ID NO: 23)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (116 а.к.)

VQLVQSGAEVKKPGSSVKLSCKDFDSEVFPIADMSWVRQAPGQGFEWIGDILPSF
GRTNYAQKFQGRVTVTADKSTNTAYLELNSLRSEDTAVYYCCARGNYGFAYWGQGLV
 TVSA (SEQ ID NO: 24)

CDR области подчеркнуты.

нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи: (336 п.н.)

GATGTCGTGATGACCCAGACCCCTCTGTCTCTGAGCGTGACACTGGGACAGC
 CAGCTAGCATCAGCTGCAGAAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGACGGCAAGACC
 TACCTGAATTGGCTGCTGCAGAGACCAGGCCAGTCTCCTAGAAGGCTGATCTACCTG
 GTGTCCAACCTGGACAGCGGCGTGCCAGATAGATTCAGCGGAAGCGGAAGCGGCAC
 CGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGAGTGTACTACT
 GTTGGCAGGGCAGCCACTTCCCTCAGACATTCGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATC
 AAG (SEQ ID NO: 25)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (112 а.к.)

DVVMTQTPLSLSVTLGQPASISCRSSQSLNSDGKTYLNWLLQRPGQSPRRLIYL
VSNLDSGVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDVGVYYCWQGSHFPQTFGGGKLEIK
 (SEQ ID NO: 26)

CDR области подчеркнуты.

(3) Последовательности тяжелой и легкой цепей гуманизированного
 моноклонального антитела 2G2 H3L3

нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи: (348 п.н.)

GTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAAGTGAAGAAGCCAGGCAGCAGCGTG
 AAGGTGTCTTGCAAGGACTTCAGCAGCGAGGTGTTCCCCATCGCCGATATGTCTTGG
 GTCCGACAGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAGTGGATCGGTGACATTCTGCCCAGCTT
 CGGGAGAACCAATTACGCCAGAAGTTCCAGGGCAGAGTGACCGTGACCGCAGACA
 AGAGCACCAACACCGCCTACCTGGAGCTGTCTAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCC
 GTGTACTATTGCGCCAGGGGCAACTACGGCTTCGCCTATTGGGGACAGGGAACACT
 GGTGACAGTGTCCGCC (SEQ ID NO: 27)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (116 а.к.)

VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKDFDSEVFPIADMSWVRQAPGQGLEWIGDILPSF
GRTNYAQKFQGRVTVTADKSTNTAYLELSSLRSEDTAVYYCCARGNYGFAYWGQGLV
 TVSA (SEQ ID NO: 28)

CDR области подчеркнуты.

нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи: (336 п.н.)

GATGTCGTGATGACCCAGACCCCTCTGTCTCTGAGCGTGACACTGGGACAGC
 CAGCTAGCATCAGCTGCAGAAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGACGGCAAGACC
 TACCTGAATTGGTTCCTGCAGAGACCAGGCCAGTCTCCTAGAAGGCTGATCTACCTG
 GTGTCCAACCTGGACAGCGGCGTGCCAGATAGATTCAGCGGAAGCGGAAGCGGCAC
 CGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGAGTGTACTACT
 GTTGGCAGGGCAGCCACTTCCCTCAGACATTCGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATC
 AAG (SEQ ID NO: 29)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (116 а.к.)

DVVMTQTPLSLSVTLGQPASISCRSSQSLNSDGKTYLNWFLQRPQGSPRRLIYL
VSNLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGSHFPQTFGGGTKLEIK
 (SEQ ID NO: 30)

CDR области подчеркнуты.

2. Получение и детектирование с помощью SDS-PAGE электрофореза гуманизированных антител 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 и 2G2 H3L3.

Для константных областей тяжелой цепи использовали С-область цепи гамма-1 Ig, номер доступа: P01857; для константных областей легкой цепи использовали С-область каппа-цепи Ig, номер доступа: P01834.

кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 2G2 H1L1, кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 2G2 H2L2, и кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 2G2 H3L3 клонировали в векторы pUC57simple (предоставленные Genscript), соответственно, с получением pUC57simple-2G2H1, pUC57simple-2G2L1; pUC57simple-2G2H2, pUC57simple-2G2L2; и pUC57simple-2G2H3, pUC57simple-2G2L3, соответственно. Затем нуклеотидные фрагменты, содержащие соответствующие тяжелые цепи, и нуклеотидные фрагменты, содержащие соответствующие легкие цепи, субклонировали в векторы pcDNA3.1, соответственно, с получением рекомбинантных плазмид pcDNA3.1-2G2H1, pcDNA3.1-2G2L1, pcDNA3.1-2G2H2, pcDNA3.1-2G2L2, pcDNA3.1-2G2H3 и pcDNA3.1-2G2L3. После этого соответствующие рекомбинантные плазмиды легкой цепи и рекомбинантные плазмиды тяжелой цепи (pcDNA3.1-2G2H1 и pcDNA3.1-2G2L1; pcDNA3.1-2G2H2 и pcDNA3.1-2G2L2; pcDNA3.1-2G2H3 и pcDNA3.1-2G2L3) котрансфицировали в клетки 293F, культуру клеток собирали и очищали с получением гуманизированных антител 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 и 2G2 H3L3, соответственно. Очищенные образцы детектировали с помощью SDS-PAGE электрофореза.

Пример 6: Измерение кинетических параметров связывания 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 и 13E9 H3L2 с белком-антигеном IL-17A (24-155)

Кинетические параметры связывания гуманизированных антител 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 и 13E9 H3L2 с антигеном IL-17A (24-155) измеряли с помощью прибора для анализа молекулярных взаимодействий Fortebio.

Сенсор AR2G активировали с помощью EDC/NHS, и на активированный сенсор AR2G иммобилизовали антитело посредством аминного связывания, затем сенсор блокировали 1М этаноламином (pH 8,5). После уравнивания сенсора в PBST в течение 300 сек выполняли связывание антитела, иммобилизованного на сенсоре, с белком-антигеном IL-17A (24-155) (таким же, как антиген, использованный в Примере 1) при концентрации антигена 6,25-400 нМ (двойное градиентное разведение), время связывания составляло 420 сек, затем выполняли диссоциацию комплекса антиген-антитело в PBST в течение 600 сек.

Кинетические параметры антител 13E9 H1L1, 13E9 H2L2, 13E9 H3L2 и Секукинумаба показаны в таблице 1, а результаты определения кинетических

характеристик показаны на фиг. 4, фиг. 5, фиг. 6 и фиг. 7, соответственно.

Таблица 1: кинетические параметры гуманизированного антитела 13E9

Антитело	K_D (М)	K_{on} (1/Мс)	K_{on} ошибка	K_{dis} (1/с)	K_{dis} ошибка	R_{max} (нМ)
13E9 H1L1	9,72E-10	1,34E+05	2,60E+03	1,31E-04	9,06E-06	0,0858-0,3326
13E9 H2L2	1,03E-09	9,86E+04	1,51E+03	1,01E-04	7,57E-06	0,0546-0,3049
13E9 H3L2	5,08E-10	2,90E+05	8,22E+03	1,47E-04	1,02E-05	0,1457-0,3546
Секукинумаб	6,74E-10	9,28E+04	3,03E+03	6,26E-05	1,57E-05	0,0379-0,2064

K_D - константа сродства; K_{on} - скорость связывания антигена с антителом; K_{dis} - скорость диссоциации антигена и антитела; $K_D = K_{on}/K_{dis}$.

Результаты показывают, что все 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 и 13E9 H3L2 имеют хорошее сродство к антигену IL-17A (24-155), и это сродство эквивалентно сродству контрольного антитела Секукинумаб.

Пример 7: Измерение кинетических параметров связывания 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 и 2G2 H3L3 с антигеном IL-17A (24-155)

Кинетические параметры связывания гуманизированных антител 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 и 2G2 H3L3 с антигеном IL-17A (24-155) измеряли с помощью прибора для анализа молекулярных взаимодействий Fortebio.

Сенсор AR2G активировали с помощью EDC/NHS, и на активированный сенсор AR2G иммобилизовали антитело посредством аминового связывания, и сенсор блокировали 1М этаноламином (pH 8,5). После уравнивания сенсора в PBST в течение 300 сек выполняли связывание антитела, иммобилизованного на сенсоре, с антигеном IL-17A (24-155) при концентрации антигена 6,25-400 нМ (двойное градиентное разведение), и время связывания составляло 420 с, затем выполняли диссоциацию комплекса антиген-антитело в PBST в течение 600 сек.

Кинетические параметры антител 2G2 H1L1, 2G2 H2L2, 2G2 H3L3 и Секукинумаба показаны в таблице 2, и результаты определения кинетических характеристик показаны на фиг.8, фиг.9, фиг.10 и фиг.11, соответственно.

Таблица 2: кинетические параметры 2G2 H1L1, 2G2 H2L2, 2G2 H3L3 и секукинумаба

Антитело	K_D (М)	K_{on} (1/Мс)	K_{on} , ошибка	K_{dis} (1/с)	K_{dis} , ошибка	R_{max} (нМ)
2G2 H1L1	1,53E-09	1,46E+05	3,15E+03	2,24E-04	9,67E-06	0,0035-0,2192
2G2 H2L2	8,43E-10	1,42E+05	2,18E+03	1,20E-04	6,73E-06	0,0444-0,2732
2G2 H3L3	1,54E-09	1,98E+05	5,30E+03	3,06E-04	1,08E-05	0,011-0,2109
Секукинумаб	1,08E-09	1,33E+05	2,38E+03	1,43E-04	8,09E-06	0,0118-0,2584

K_D - константа сродства; K_{on} - скорость связывания антигена с антителом; K_{dis} -

скорость диссоциации антигена и антитела; $K_D = K_{on}/K_{dis}$.

Результаты показывают, что по сравнению с контрольным антителом Секукинумаб, 2G2 H2L2 имеет более высокое сродство к антигену IL-17A (24-155); сродство 2G2 H1L1 и 2G2 H3L3 эквивалентно сродству контрольного антитела Секукинумаб.

Пример 8: Определение активности связывания антител 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 и 13E9 H3L2 с антигеном методом ELISA.

1. Активность связывания антител 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 и 13E9 H3L2 с антигеном IL17A-His определяли с помощью непрямого ELISA и сравнивали с коммерчески доступным лекарственным средством Секукинумаб, используемым для той же цели.

IL17A-His можно получить, используя опубликованные последовательности и традиционные технические средства или с помощью следующих этапов:

Получение IL17A-His: полноразмерную последовательность белка человеческого IL-17A получали из NCBI базы данных белков и выполняли слияние с используемой для очистки меткой His*6. Синтез нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, осуществляли в компании Genscript в Нанкине и, пользуясь стандартными методами, описанными в Guide to Molecular Cloning Experiments (второе издание), и стандартными методами молекулярного клонирования, такими как ПЦР, ферментативное расщепление, извлечение с помощью геля, лигирование, ПЦР для обработки колоний или идентификация методом ферментативного расщепления, субклонировали целевой ген в векторы экспрессии в клетках млекопитающих, и затем целевой ген с рекомбинантными векторами экспрессии секвенировали и анализировали. После проверки правильности последовательности получали среднее и большое количество экспрессионных плазмид, свободных от эндотоксина, и осуществляли временную трансфекцию клеток HEK293 для экспрессии белка. Через 7 дней культуральную жидкость собирали и очищали с помощью аффинной хроматографии на колонке с Ni-сефарозой (GE), и качество полученных образцов белка определяли стандартными аналитическими методами SDS-PAGE и SEC-ВЭЖХ на соответствие стандарту.

ELISA: в микропланшет добавляли IL17A-His и инкубировали при 4°C в течение ночи; после блокирования 1% BSA в PBS при 37°C в течение 2 часов, соответственно, добавляли антитела и инкубировали при 37°C в течение 30 минут; добавляли козьи антитела к человеческому IgG(H+L)-HRP (Jackson, 109-035-088) и инкубировали при 37°C в течение 30 минут; и затем выполняли цветную реакцию с TMB (Neogen, 308177) в течение 5 минут, и на микропланшетном ридере определяли оптическую плотность при 450 нм. Полученные экспериментальные данные анализировали и обрабатывали с помощью программного обеспечения SoftMax Pro 6.2.1, затем для анализа строили кривую, аппроксимированную 4-параметрической функцией, откладывая по оси абсцисс концентрацию антител, а по оси ординат - значение поглощения.

Результаты экспериментов показаны на фиг. 12, фиг. 13, и в таблицах 3 и 4 ниже.

Таблица 3: результаты детектирования активности связывания 13E9 H1L1 и 13E9 H2L2 с антигеном IL17A-His

Концентрация/градиент антитела	Антиген покрытия: IL17A-His, 1 мкг/мл					
	13E9 H1L1		13E9 H2L2		Секукинумаб	
1 мкг/мл	2,726	2,731	2,804	2,737	2,184	2,227
1:3	2,875	2,852	2,832	2,873	2,595	2,505
1:9	2,858	2,815	2,717	2,712	2,297	2,364
1:27	2,564	2,494	2,479	2,481	2,049	2,064
1:81	1,934	1,925	1,891	1,834	1,372	1,314
1:243	1,159	1,116	1,097	1,062	0,672	0,697
1:729	0,522	0,537	0,514	0,511	0,313	0,309
0	0,047	0,048	0,048	0,048	0,046	0,046
EC ₅₀ (нМ)	0,044		0,048		0,082	

Таблица 4: результаты детектирования активности связывания 13E9 H3L2 с антигеном IL17A-His

Концентрация/градиент антитела	Антиген покрытия: IL17A-His: 1 мкг/мл			
	13E9 H3L2		Секукинумаб	
0,5 мкг/мл	3,074	3,068	2,929	2,929
1:3	3,175	3,026	2,924	2,885
1:9	2,944	2,895	2,660	2,666
1:27	2,472	2,393	1,947	1,862
1:81	1,610	1,617	1,140	1,092
1:243	0,786	0,783	0,521	0,522
1:729	0,343	0,348	0,252	0,253
0	0,091	0,084	0,087	0,087
EC ₅₀ (нМ)	0,043		0,078	

Результаты экспериментов показывают, что антитела 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 и 13E9 H3L2 могут эффективно связываться с антигеном IL17A-His, и их эффективность связывания зависит от дозы. В тех же экспериментальных условиях значение EC₅₀ связывания 13E9 H1L1 составило 0,044 нМ, значение EC₅₀ связывания 13E9 H2L2 составило 0,048 нМ, и значение EC₅₀ коммерчески доступного лекарственного средства Секукинумаб составило 0,082 нМ (фиг. 12, таблица 3); в тех же экспериментальных условиях значение EC₅₀ связывания 13E9 H3L2 составило 0,043 нМ, и значение EC₅₀ коммерчески доступного лекарственного средства Секукинумаб составило 0,078 нМ (фиг. 13, таблица 4).

Приведенные выше экспериментальные результаты показывают, что в одинаковых экспериментальных условиях значения EC₅₀ антител 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 и 13E9 H3L2 меньше, чем значение связывания с той же мишенью, наблюдаемое у препарата положительного контроля Секукинумаб, что указывает на улучшенную связывающую

активность антител 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 и 13E9 H3L2 к IL17A-His по сравнению с коммерчески доступным Секукинумабом, использованным в качестве контроля.

2. Активность антител 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 и 13E9 H3L2, блокирующих связывание IL17RA-His (биотин) с антигеном IL17A-His детектировали с помощью конкурентного ELISA.

IL17RA-His (биотин) можно получить, используя опубликованные последовательности и традиционные технические средства или путем выполнения следующих этапов:

Получение IL17RA-His (биотин): последовательность внеклеточного домена человеческого IL-17RA получали из NCBI базы данных белков и выполняли слияние с используемой для очистки меткой His*6. Синтез нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, выполняли в компании Genscript в Нанкине и, пользуясь стандартными методами, описанными в Guide to Molecular Cloning Experiments (второе издание), и стандартными методами молекулярного клонирования, такими как ПЦР, ферментативное расщепление, извлечение с помощью геля, лигирование, ПЦР для обработки колоний или идентификация методом ферментативного расщепления, субклонировали целевой ген в векторы экспрессии в клетках млекопитающих, затем целевой ген с рекомбинантными векторами экспрессии секвенировали и анализировали. После проверки правильности последовательности получали среднее и большое количество экспрессионных плазмид, свободных от эндотоксина, и выполняли временную трансфекцию клеток HEK293 для экспрессии белка. Через 7 дней культуральную жидкость собирали и очищали с помощью аффинной хроматографии на колонке с Ni-сефарозой (GE), и качество полученных образцов белка определяли стандартными аналитическими методами SDS-PAGE и SEC-ВЭЖХ на соответствие стандарту. После завершения определения качества образцы биотинилированного человеческого белка IL-17RA-His метили с помощью коммерческого набора EZ-Link®Sulfo-NHS-LC-Biotinylation от Thermo Scientific, и в соответствии с инструкциями производителя выполняли конкретный метод получения.

ELISA: в микропланшет добавляли IL17A-His и инкубировали при 4°C в течение ночи; после блокирования 1% BSA в PBST при 37°C в течение 2 часов добавляли антитела, соответственно, и обеспечивали взаимодействие антигена с антителом при комнатной температуре в течение 10 минут; затем добавляли рецептор IL17RA-His (биотин), хорошо перемешивали с антителом в объемном соотношении 1:1 и инкубировали при 37°C в течение 30 мин; добавляли SA-HRP (KPL, 14-30-00) и инкубировали при 37°C в течение 30 минут; и затем выполняли цветную реакцию с TMB (Neogen, 308177) в течение 5 минут, после этого на микропланшетном ридере определяли оптическую плотность при 450 нм. Полученные экспериментальные данные анализировали и обрабатывали с помощью программного обеспечения SoftMax Pro 6.2.1, затем для анализа строили кривую, аппроксимированную 4-параметрической функцией, откладывая по оси абсцисс концентрацию антител, а по оси ординат - значение поглощения. Результаты экспериментов показаны на фиг. 14, фиг. 15, и в таблицах 5 и 6

ниже.

Таблица 5: результаты детектирования активности 13E9 H1L1 и 13E9 H2L2, конкурирующих с рецептором IL17RA-His (биотин) за связывание с антигеном IL17A-His

Концентрация/ градиент антитела	Антиген покрытия: IL17A-His (20150213) 0,5 мкг/мл					
	13E9 H1L1		13E9 H2L2		Секукинумаб	
10 мкг/мл	0,273	0,249	0,274	0,290	0,402	0,392
1:3	0,299	0,220	0,313	0,339	0,469	0,502
1:9	0,418	0,379	0,431	0,379	0,642	0,708
1:27	0,673	0,610	0,646	0,636	0,842	0,855
1:81	0,986	1,008	1,011	1,069	1,169	1,201
1:243	1,342	1,362	1,428	1,331	1,418	1,468
1:729	1,363	1,375	1,447	1,519	1,467	1,657
0	1,495	1,406	1,429	1,561	1,610	1,495
рецептор	IL17RA-His(bio) 0,1 мкг/мл					
EC ₅₀ (нМ)	1,437		1,281		1,807	

Таблица 6: результаты детектирования активности 13E9 H3L2, конкурирующего с рецептором IL17RA-His (биотин) за связывание с антигеном IL17A-His

Концентрация/ градиент антитела	Антиген покрытия: IL17A-His 0,5 мкг/мл			
	13E9 H3L2		Секукинумаб	
10 мкг/мл	0,193	0,182	0,263	0,282
1:3	0,231	0,206	0,318	0,327
1:9	0,265	0,267	0,419	0,462
1:27	0,424	0,415	0,630	0,663
1:81	0,725	0,627	0,813	0,859
1:243	1,069	1,018	1,120	1,182
1:729	1,218	1,095	1,133	1,250
0	1,184	1,334	1,182	1,232
рецептор	IL17RA-His(bio) 0,1 мкг/мл			
EC ₅₀ (нМ)	0,805		1,580	

Результаты экспериментов показывают, что антитела 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 и 13E9 H3L2 могут эффективно блокировать связывание рецептора IL17RA-His (биотина) с антигеном IL17A-His, и эффективность блокирования зависит от дозы. В тех же экспериментальных условиях значение EC₅₀ 13E9 H1L1, конкурирующего с IL17AR-His (биотин) за связывание с IL17A-His, составило 1,437 нМ, значение EC₅₀ 13E9 H2L2, конкурирующего с IL17AR-His (биотин) за связывание с IL17A-His, составило 1,281 нМ, и значение EC₅₀ положительного контрольного препарата Секукинумаб, конкурирующего с

IL17AR-His (биотин) за связывание с той же мишенью, IL17A-His, составило 1,807 нМ (таблица 5, фиг. 14); значение EC_{50} 13E9 H3L2, конкурирующего с IL17AR-His (биотин) за связывание с IL17A-His, составило 0,805 нМ, и значение EC_{50} коммерчески доступного препарата Секукинумаб, конкурирующего с IL17AR-His (биотин) за связывание с той же мишенью, IL17A-His, составило 1,580 нМ (таблица 6, фиг. 15).

Приведенные выше экспериментальные результаты показывают, что в одинаковых экспериментальных условиях все значения EC_{50} антител 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 и 13E9 H3L2, конкурирующих с IL17AR-His (биотином) за связывание с IL17A-His, меньше, чем у коммерчески доступного препарата Секукинумаб, используемого в качестве контроля, указывая на улучшенную активность антител 13E9 H1L1, 13E9 H2L2 и 13E9 H3L2, конкурирующих с IL17AR-His (биотин) за связывание с IL17A-His, по сравнению с коммерчески доступным лекарственным средством Секукинумаб.

Пример 9: Определение методом ELISA активности связывания антител 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 и 2G2 H3L3 с антигеном.

1. Активность связывания антител 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 и 2G2 H3L3 с антигеном IL17A-His определяли непрямой ELISA.

Этапы эксперимента: в микропланшет добавляли IL17A-His и инкубировали при 4°C в течение ночи; после блокирования 1% BSA в PBS при 37°C в течение 2 часов, соответственно, добавляли антитела и инкубировали при 37°C в течение 30 минут; добавляли козы антител к человеческому IgG (H+L)-HRP (Jackson, 109-035-088) и инкубировали при 37°C в течение 30 минут; затем выполняли цветную реакцию с ТМВ (Neogen, 308177) в течение 5 минут, и с помощью микропланшетного ридера определяли оптическую плотность при 450 нм. Полученные экспериментальные данные анализировали и обрабатывали с помощью программного обеспечения SoftMax Pro 6.2.1, затем для анализа строили кривую, аппроксимированную 4-параметрической функцией, откладывая по оси абсцисс концентрацию антител, а по оси ординат - значение поглощения.

Результаты экспериментов показаны на фиг. 16 и в таблице 7 ниже. При этом значение EC_{50} связывания 2G2 H1L1 составило 0,177 нМ, значение EC_{50} связывания 2G2 H2L2 составило 0,372 нМ, и значение EC_{50} связывания 2G2 H3L3 составило 0,421 нМ.

Таблица 7: результаты детектирования связывания 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 и 2G2 H3L3 с антигеном IL17A-His

Концентрация/ градиент антитела	Антиген покрытия: IL17A-His, 1 мкг/мл							
	2G2 H1L1		2G2 H2L2		2G2 H3L3		Секукинумаб	
1 мкг/мл	3,220	3,135	3,030	2,960	2,485	2,384	3,448	3,448
1:3	3,284	3,149	2,899	2,886	2,311	2,314	3,477	3,478
1:9	2,820	2,747	2,199	2,126	1,693	1,703	3,320	3,331
1:27	2,020	1,969	1,348	1,328	0,982	1,002	2,768	2,764

1:81	1,113	1,075	0,638	0,624	0,439	0,440	1,761	1,689
1:243	0,469	0,426	0,261	0,350	0,188	0,186	0,807	0,806
1:729	0,224	0,188	0,131	0,148	0,113	0,102	0,337	0,326
0	0,061	0,057	0,058	0,068	0,063	0,060	0,062	0,060
EC ₅₀ (нМ)	0,177		0,372		0,421		0,090	

Результаты экспериментов показывают, что антитела 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 и 2G2 H3L3 могут эффективно связываться с антигеном IL17A-His, и их эффективность связывания зависит от дозы.

2. Активность антител 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 и 2G2 H3L3, конкурирующих с рецептором IL17A-His (биотин) за связывание с антигеном IL17A-His, детектировали с помощью конкурентного ELISA.

Этапы эксперимента: в микропланшет добавляли IL17A-His и инкубировали при 4°C в течение ночи; после блокирования 1% BSA в PBST при 37°C в течение 2 часов, соответственно, добавляли антитела, и обеспечивали взаимодействие антигена с антителом при комнатной температуре в течение 10 минут; затем добавляли рецептор IL17RA-His (биотин), хорошо перемешивали с антителом в объемном соотношении 1:1 и инкубировали при 37°C в течение 30 мин; добавляли SA-HRP (KPL, 14-30-00) и инкубировали при 37°C в течение 30 минут; затем выполняли цветную реакцию с ТМВ (Neogen, 308177) в течение 5 минут, и с помощью микропланшетного ридера определяли оптическую плотность при 450 нм. Полученные экспериментальные данные анализировали и обрабатывали с помощью программного обеспечения SoftMax Pro 6.2.1, затем для анализа строили кривую, аппроксимированную 4-параметрической функцией, откладывая по оси абсцисс концентрацию антител, а по оси ординат - значение поглощения.

Результаты экспериментов показаны на фиг. 17 и в таблице 8 ниже. При этом значение EC₅₀ блокирования 2G2 H1L1 составило 2,264 нМ, значение EC₅₀ блокирования 2G2 H2L2 составило 5,408 нМ, и значение EC₅₀ блокирования 2G2 H3L3 составило 5,911 нМ (фиг. 17, таблица 8).

Таблица 8: результаты детектирования активности 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 и 2G2 H3L3, конкурирующих с рецептором IL17RA-His (биотин) за связывание с антигеном IL17A-His

Концентрация / градиент антитела	Антиген покрытия: IL17A-His 0,5 мкг/мл							
	2G2 H1L1		2G2 H2L2		2G2 H3L3		Секукиnumаб	
10 мкг/мл	0,285	0,272	0,337	0,366	0,680	0,718	0,247	0,267
1:3	0,417	0,485	0,500	0,623	0,971	0,876	0,333	0,361
1:9	0,506	0,502	0,785	0,751	0,971	0,954	0,478	0,507

1:27	0,891	0,763	1,087	1,038	1,242	1,178	0,758	0,784
1:81	1,162	1,167	1,286	1,309	1,246	1,312	1,088	1,135
1:243	1,231	1,281	1,423	1,402	1,398	1,466	1,272	1,184
1:729	1,453	1,472	1,464	1,596	1,607	1,466	1,392	1,324
0	1,455	1,425	1,494	1,424	1,470	1,340	1,170	1,230
рецептор	IL17RA-His (биотин): 0,1 мкг/мл							
EC ₅₀ (нМ)	2,264		5,408		5,911		2,749	

Результаты экспериментов показывают, что антитела 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 и 2G2 H3L3 могут эффективно блокировать связывание рецептора IL17A-His (биотина) с антигеном IL17A-His, и эффективность блокирования зависит от дозы.

Пример 10: Реакция смешанной культуры эмбриональных фибробластов человека: секреция цитокина IL-6.

Клетки MRC 5 (приобретенные в Центре клеток Китайской академии наук) помещали в 96-луночный планшет в концентрации 5000 клеток/лунку и культивировали в течение ночи. Смесь IL-17 и антитела (hIgG в качестве контроля) инкубировали при 37°C в течение 20 минут, добавляли к клеткам MRC 5 и культивировали в течение 48 часов. После 48 ч культивирования супернатант клеток собирали, и количество секретируемого IL-6 определяли с помощью набора для ELISA (приобретенного у Dakewe Corporation).

Клетки MRC 5 смешивали и культивировали с 13E9 H1L1, 13E9 H2L2, 13E9 H3L2, 2G2 H1L1, 2G2 H2L2 или 2G2 H3L3 (1 нМ, 10 нМ, 100 нМ) и секукинумабом (1 нМ, 10 нМ, 100 нМ), соответственно. Результаты детектирования секретируемого IL-6 показаны на фиг. 18.

Из Фиг.18 видно, что 13E9 H1L1, 13E9 H2L2, 13E9 H3L2 и 2G2 H2L2 могут эффективно уменьшать секрецию IL-6 в клетках MRC 5, индуцированную IL-17, при этом:

влияние антитела 13E9 H1L1 на ингибирование секреции IL-6 при концентрации 100 нМ сильнее, чем у контрольного антитела Секукинумаба в той же дозе, и ингибирующий эффект на секрецию IL-6 при концентрации 10 нМ эквивалентен эффекту контрольного антитела Секукинумаб при концентрации 100 нМ;

влияние антитела 13E9 H2L2 на ингибирование секреции IL-6 при концентрациях 1 нМ, 10 нМ и 100 нМ эквивалентно влиянию контрольного антитела Секукинумаб в тех же дозах;

ингибирующие эффекты антитела 13E9 H3L2 на секрецию IL-6 в концентрациях 10 нМ и 100 нМ сильнее, чем у контрольного антитела Секукинумаб в тех же дозах, и эффект при концентрации 1 нМ эквивалентен эффекту контрольного антитела Секукинумаб;

влияние антитела 2G2 H2L2 на ингибирование секреции IL-6 при концентрациях 1 нМ и 100 нМ эквивалентно таковому у контрольного антитела Секукинумаб;

влияние антитела 2G2 H3L3 на ингибирование секреции IL-6 при концентрации 1 нМ сильнее, чем у контрольного антитела Секукинумаб в той же дозе.

Приведенные выше результаты показывают, что в реакции смешанной культуры эмбриональных фибробластов человека *in vitro* биологическая активность антител по настоящему изобретению в отношении блокирования опосредованной IL-17A секреции IL-6 выше или по меньшей мере эквивалентна активности коммерчески доступного препарата Секукинумаб.

Пример 11: Влияние лекарственного средства на основе антитела 13E9 H3L2 на толщину эпидермиса в модели псориаза у мышей C57BL/6

Мышей C57BL/6 делили на 5 групп по 8 мышей в каждой группе.

(1) Моделирование:

нормальная группа: мышам C57BL/6 внутрикожно вводили физиологический раствор в гладкий участок кожи на спине в течение 6 последовательных дней (с 1 по 6 день) по 25 мкл/мышь;

оставшимся группам мышей внутрикожно вводили рекомбинантный человеческий IL-17A с 1 по 4 день по 2 мкг/25 мкл/мышь, и внутрикожно вводили рекомбинантный человеческий IL-17A с 5 по 6 день по 5 мкг/25 мкл/мышь.

(2) Деление на группы и введение:

нормальная группа: физиологический раствор, введение дозы 0 мг/кг 3 раза в неделю, всего 3 раза;

модельная группа: отрицательный изотипический контроль, введение дозы 50 мг/кг 3 раза в неделю, всего 3 раза;

группа секукинумаба: Секукинумаб вводят в дозе 50 мг/кг 3 раза в неделю, всего 3 раза;

группа высокой дозы 13E9 H3L2: введение дозы 50 мг/кг 3 раза в неделю, всего 3 раза;

группа низкой дозы 13E9 H3L2: введение дозы 10 мг/кг 3 раза в неделю, всего 3 раза.

В каждой группе выполняли подкожное введение 3 раза, а именно за 1 день до моделирования, на 3-й день моделирования и на 6-й день моделирования, соответственно.

На 7-й день кожу в местах инъекций на спине мышей фиксировали с дальнейшим получением патологических срезов и измеряли толщину эпидермиса.

Результаты экспериментов показаны на фиг. 19.

Результаты показывают, что статистически толщина эпидермиса в группе секукинумаба (50 мг/кг), группе высокой дозы 13E9 H3L2 (50 мг/кг) и в группе низкой дозы 13E9 H3L2 (10 мг/кг) была значительно меньше, чем у модельной группы ($P < 0,01$).

Согласно полученным результатам, антитело 13E9 H3L2 (50 мг/кг) обладает статистически значимым ингибирующим действием на толщину эпидермиса в модели псориаза у мышей C57BL/6 и имеет такую же эффективность, как секукинумаб (50 мг/кг); ингибирующее влияние 13E9 H3L2 (10 мг/кг) на толщину эпидермиса также является статистически значимым.

Хотя конкретные варианты осуществления настоящего изобретения были подробно

описаны, специалисты в данной области поймут, что возможны различные модификации и замены в соответствии с раскрытием, и все эти изменения будут находиться в пределах объема защиты настоящего изобретения. Полный объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения и любыми ее эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором переменная область тяжелой цепи моноклонального антитела содержит: HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 31-33, соответственно, или HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 37-39, соответственно, и

переменная область легкой цепи моноклонального антитела содержит: LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 34-36, соответственно, или LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 40-42, соответственно.

2. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, в котором

переменная область тяжелой цепи моноклонального антитела содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 31-33, соответственно, и переменная область легкой цепи моноклонального антитела содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 34-36, соответственно;

или

переменная область тяжелой цепи моноклонального антитела содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 37-39, соответственно, и переменная область легкой цепи моноклонального антитела содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 40-42, соответственно.

3. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или п.2, в котором

аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи выбрано из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 28,

и

аминокислотную последовательность переменной области легкой цепи выбрано из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 30.

4. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, в котором

аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи выбрано из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 14, и аминокислотную последовательность переменной области легкой цепи выбрано из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 12;

или

аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи выбрано

из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 28, и аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи выбрано из SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 30.

5. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, в котором варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи выбрано из любого из (1)-(8):

(1) варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, и варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4;

(2) варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, и варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8;

(3) варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10, и варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12;

(4) варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14, и варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12;

(5) варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16, и варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18;

(6) варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, и варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22;

(7) варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24, и варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 26; и

(8) варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, и варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30.

6. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, фрагмента определяющий комплементарность области, одноцепочечного антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела и диатела.

7. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где моноклональное антитело связывается с IL-17A с EC₅₀ менее примерно 100 нМ, например, менее примерно 10 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2,5 нМ, 2 нМ или менее; предпочтительно, EC₅₀ измеряют методом конкурентного ELISA.

8. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, где моноклональное антитело содержит не являющуюся CDR область, полученную

из вида не относящегося к мышинным, а из, например, человеческого антитела.

9. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8, где:

моноклональное антитело представляет собой моноклональное антитело, продуцируемое гибридной клеточной линией LT006, депонированной в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) под номером доступа ССТСС: С2017102; или

моноклональное антитело представляет собой моноклональное антитело, продуцируемое гибридной клеточной линией LT007, депонированной в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) под номером доступа ССТСС: С2017165.

10. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи моноклонального антитела по любому из пп.1-9.

11. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.10, где нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, выбрано из любого из (1)-(8):

- (1) SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3;
- (2) SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7;
- (3) SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11;
- (4) SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 11;
- (5) SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17;
- (6) SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21;
- (7) SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25; и
- (8) SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29.

12. Рекombинантный вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п.10 или п.11, где рекombинантный вектор предпочтительно представляет собой рекombинантный вектор экспрессии, такой как рекombинантный прокариотический вектор экспрессии или рекombинантный эукариотический вектор экспрессии.

13. Клетка-хозяин, содержащая рекombинантный вектор по п.12.

14. Способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-9, включающий культивирование клетки-хозяина по п.13 в соответствующих условиях и выделение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клеточной культуры.

15. Гибридная клеточная линия, выбранная из:

гибридной клеточной линии LT006, депонированной в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) под номером доступа ССТСС: С2017102; и

гибридной клеточной линии LT007, депонированной в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) под номером доступа ССТСС: С2017165.

16. Конъюгат, содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, и конъюгированный участок, где

конъюгированный участок представляет собой детектируемую метку; предпочтительно детектируемая метка представляет собой радиоактивный изотоп, люминесцентное вещество, такое как флуоресцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

17. Набор, содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, или конъюгат по п.16, где:

предпочтительно, набор дополнительно содержит второе антитело, которое специфически распознает моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; необязательно, второе антитело дополнительно содержит детектируемую метку; предпочтительно детектируемая метка представляет собой радиоактивный изотоп, люминесцентное вещество, такое как флуоресцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

18. Применение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-9 или конъюгата по п.16 при приготовлении набора для качественного или количественного определения IL-17A.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9 или конъюгат по п.16, где, необязательно, фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемые носители или наполнители.

20. Применение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-9 или конъюгата по п.16 при приготовлении лекарственного средства для профилактики и/или лечения опухолей или аутоиммунных заболеваний, или при приготовлении лекарственного средства для диагностики аутоиммунных заболеваний, где предпочтительно аутоиммунное заболевание выбрано из псориаза, ревматоидного артрита, псориатического артрита, анкилозирующего спондилита и системной красной волчанки; предпочтительно псориаз представляет собой бляшечный псориаз от умеренной до тяжелой степени.

21. Применение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-9 или конъюгата по п.16 при получении:

лекарственного средства для блокирования связывания IL-17A с IL17RA,

лекарственного средства для регуляции (например, снижения) активности или уровня IL-17A, или

лекарственного средства для подавления экспрессии IL-6 в клетках.

22. Способ *in vivo* или *in vitro*, включающий введение в клетку или больному эффективного количества моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-9 или конъюгата по п.16, при этом способ выбрано из:

способа блокирования связывания IL-17A с IL17RA,

способа регуляции (например, снижения) активности или уровня IL-17A, или

способа подавления экспрессии IL-6 в фибробластах.

23. Способ лечения и/или профилактики опухолей или аутоиммунных заболеваний, включающий введение больному, эффективного количества моноклонального антитела

или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-9 или конъюгата по п.16, где предпочтительно аутоиммунное заболевание выбрано из псориаза, ревматоидного артрита, псориазического артрита, анкилозирующего спондилита и системной красной волчанки; предпочтительно псориаз представляет собой бляшечный псориаз от умеренной до тяжелой степени.

24. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, которое используется для профилактики и/или лечения опухолей или аутоиммунных заболеваний или для диагностики аутоиммунных заболеваний, где предпочтительно аутоиммунное заболевание выбрано из псориаза, ревматоидного артрита, псориазического артрита, анкилозирующего спондилита и системной красной волчанки; предпочтительно псориаз представляет собой бляшечный псориаз от умеренной до тяжелой степени.

25. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, которое используется для:

блокирования связывания IL-17A с IL-17RA,
регуляции (например, снижения) активности или уровня IL-17A, или
подавления экспрессии IL-6 в клетках.

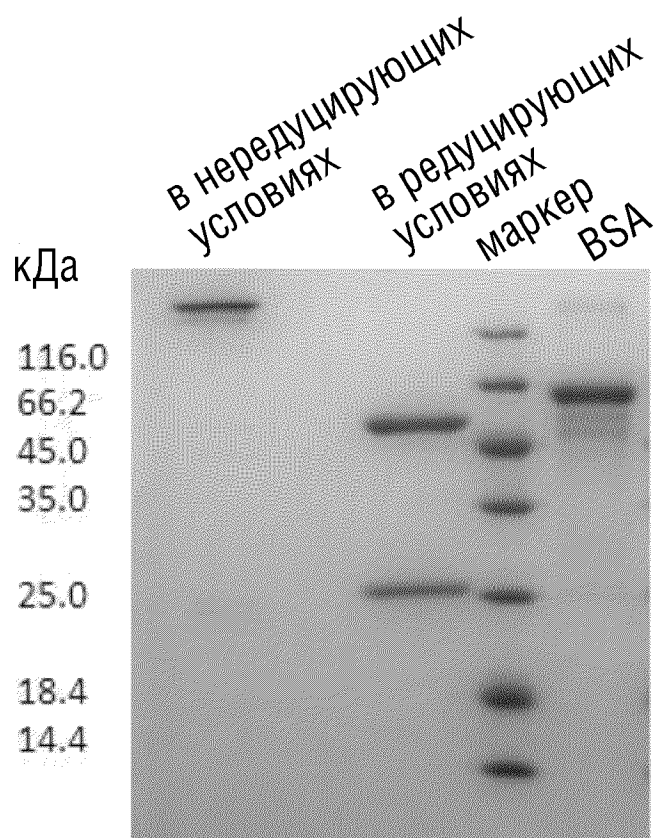
26. Способ диагностики аутоиммунных заболеваний, включающий введение в предназначенный для тестирования образец (например, образец ткани, образец клеток или образец крови) или больному, эффективного количества моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-9 или конъюгата по п.16, где предпочтительно аутоиммунное заболевание выбрано из псориаза, ревматоидного артрита, псориазического артрита, анкилозирующего спондилита и системной красной волчанки; предпочтительно псориаз представляет собой бляшечный псориаз от умеренной до тяжелой степени;

предпочтительно, если измеренный уровень экспрессии IL-17A выше, чем у здоровых индивидов и достигает патогенного уровня, то результат диагностики является положительным; в противном случае, результат диагностики является отрицательным.

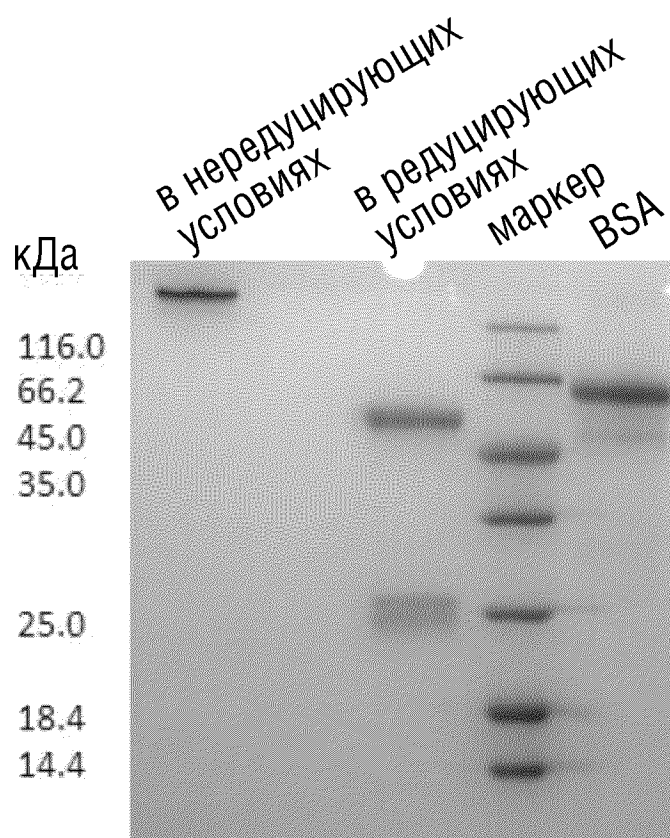
По доверенности

1/17

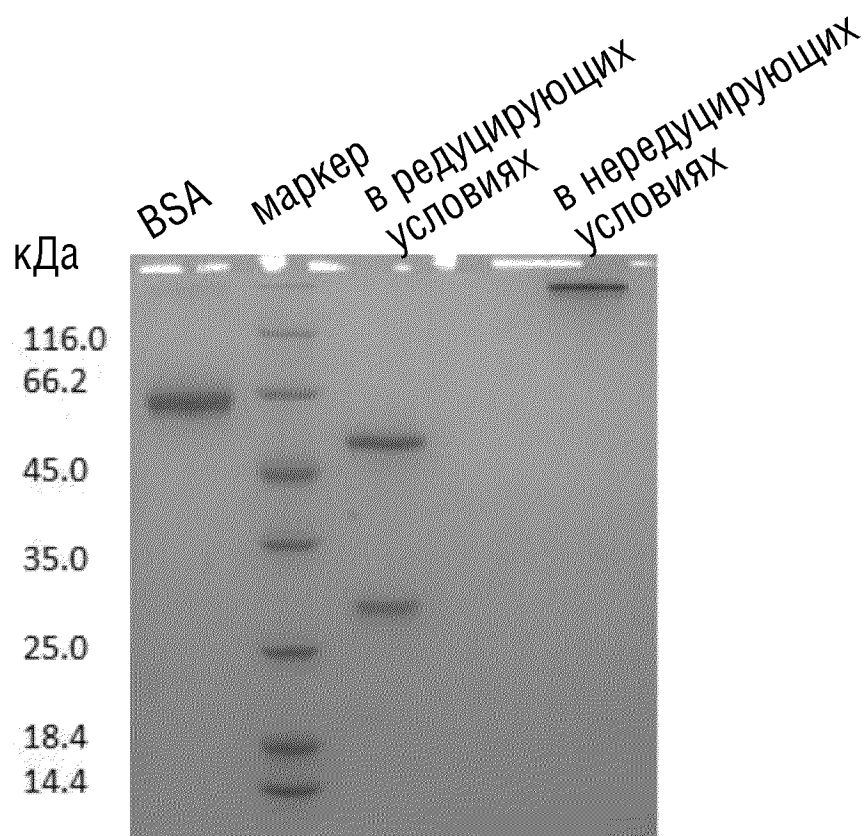
ФИГ.1



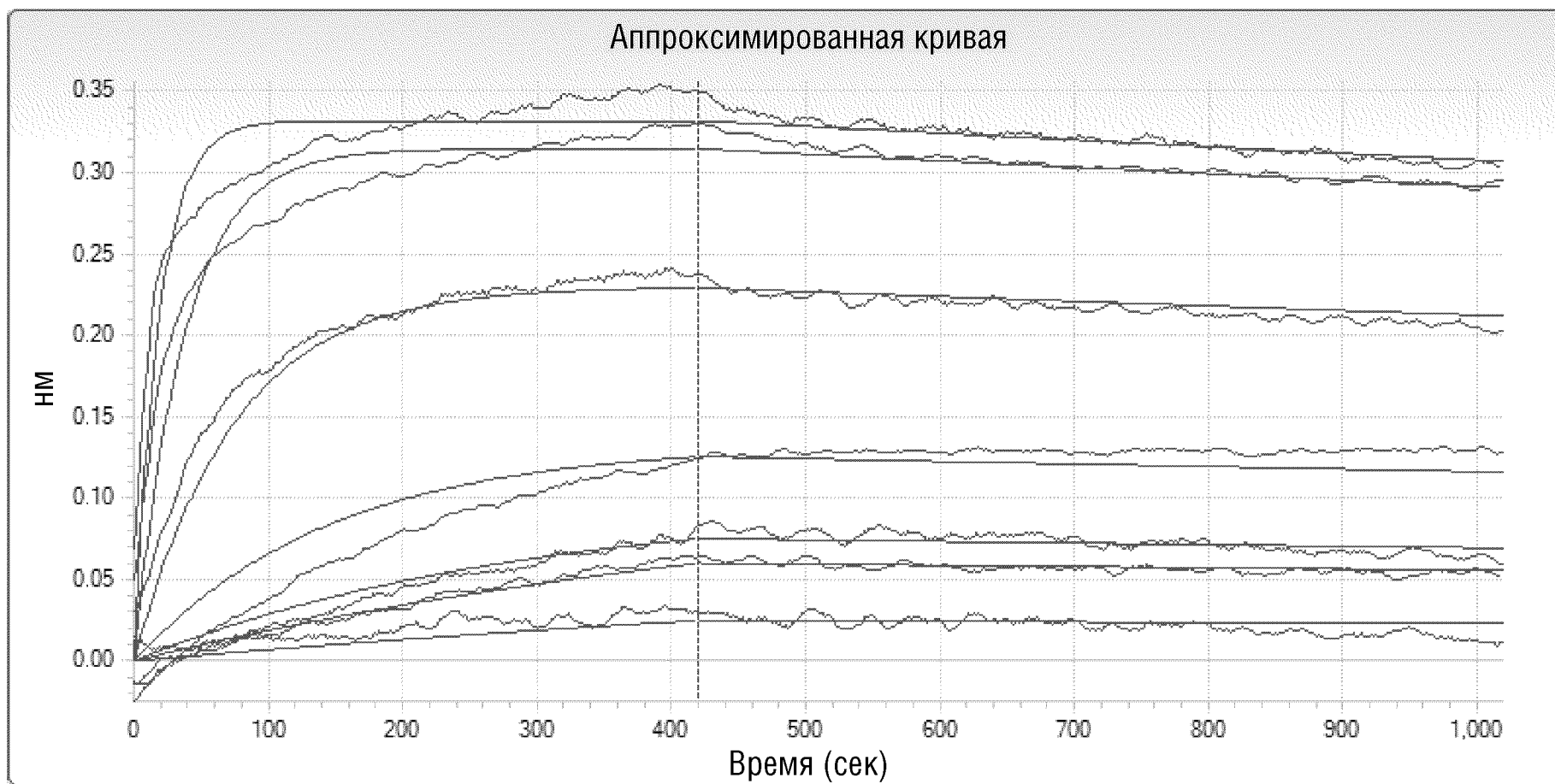
ФИГ.2



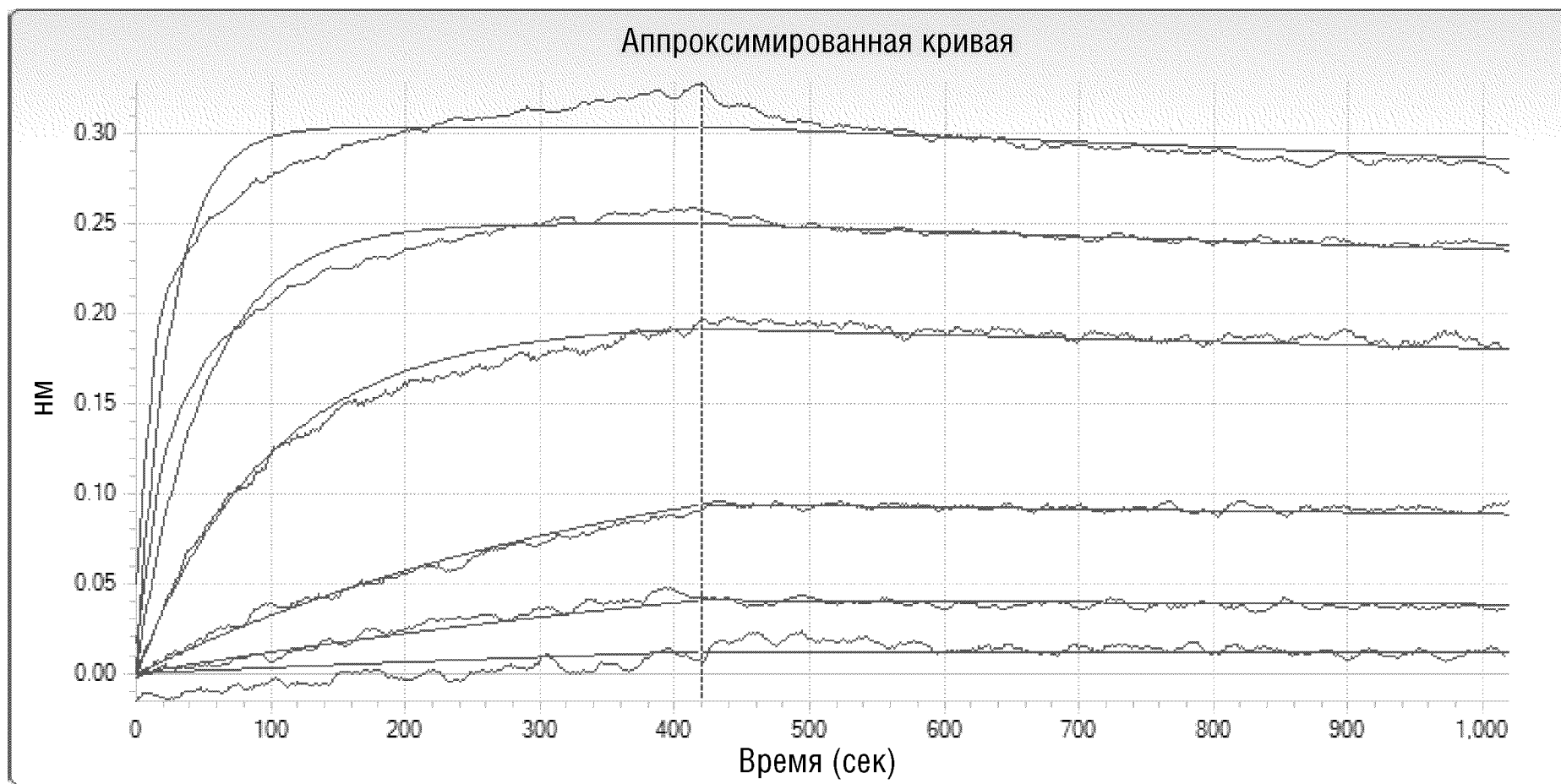
ФИГ.3



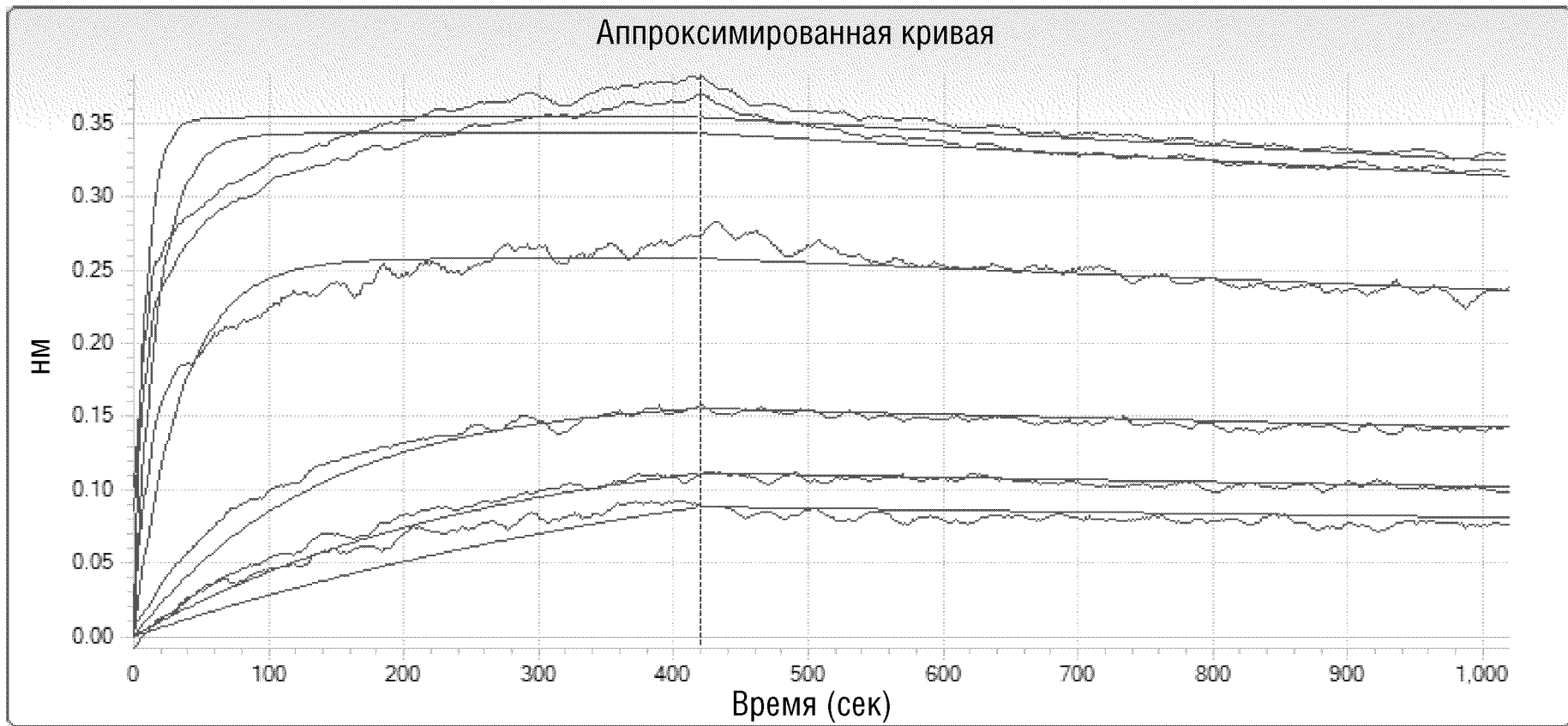
ФИГ.4



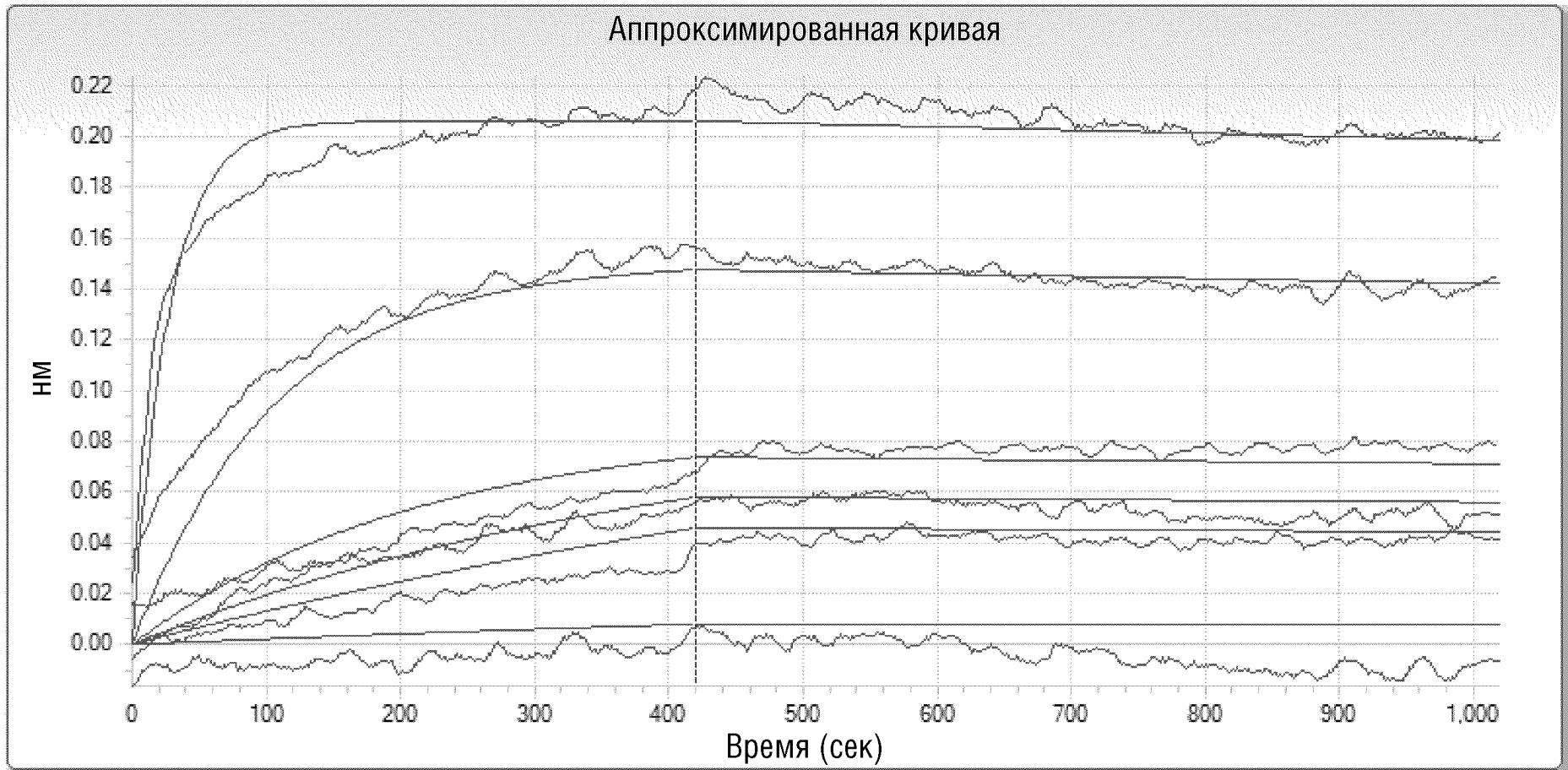
ФИГ.5



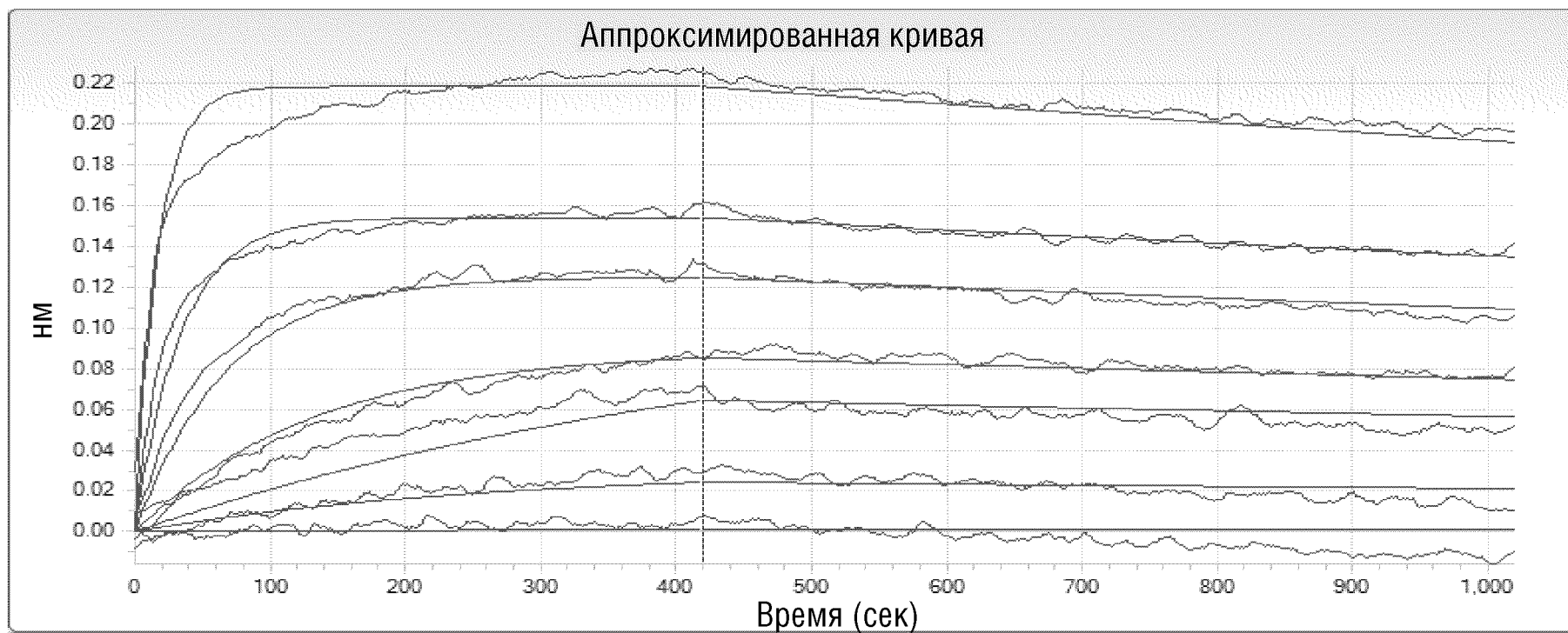
ФИГ.6



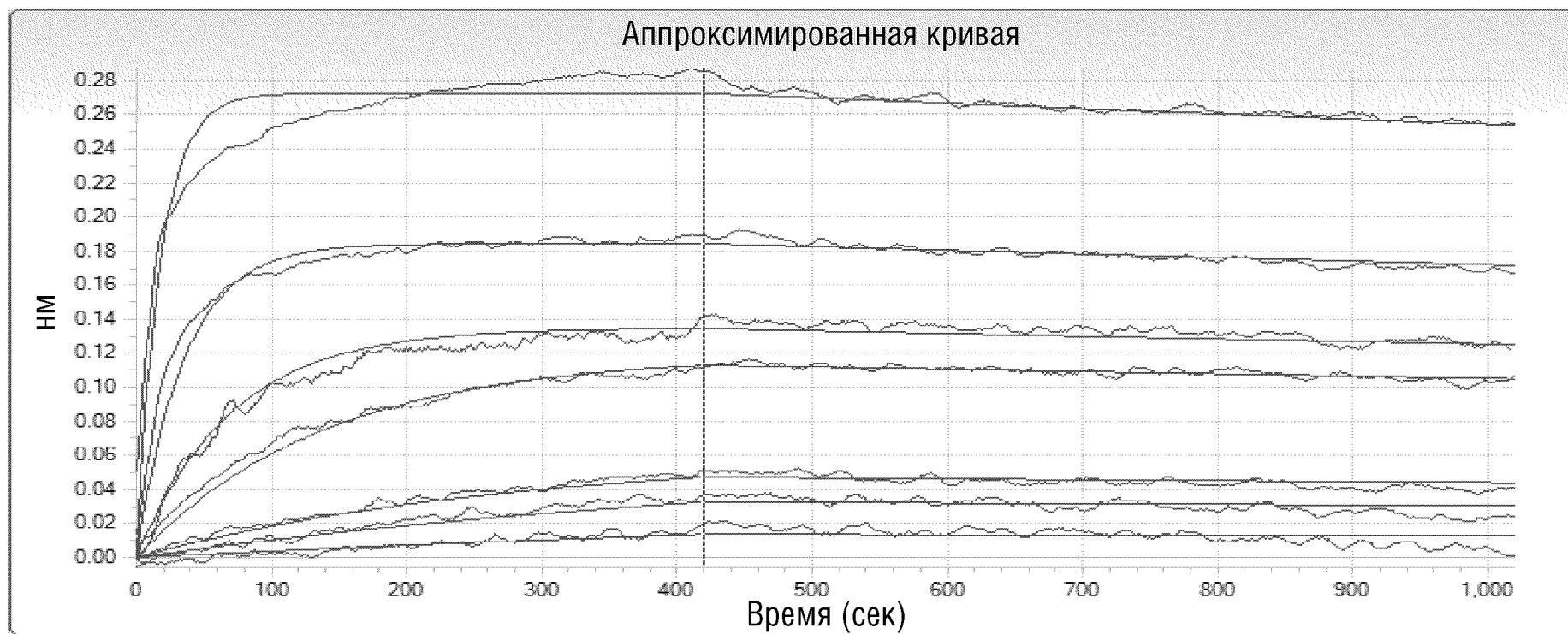
ФИГ.7



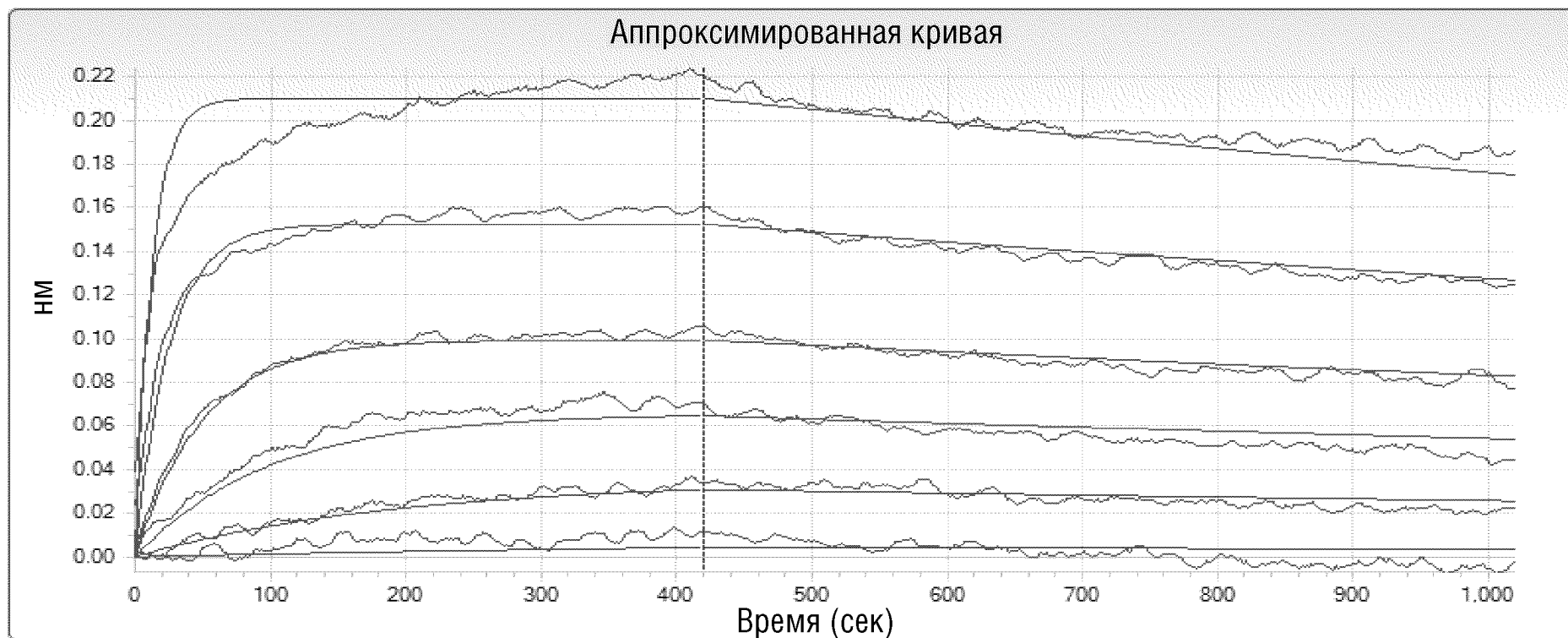
ФИГ.8



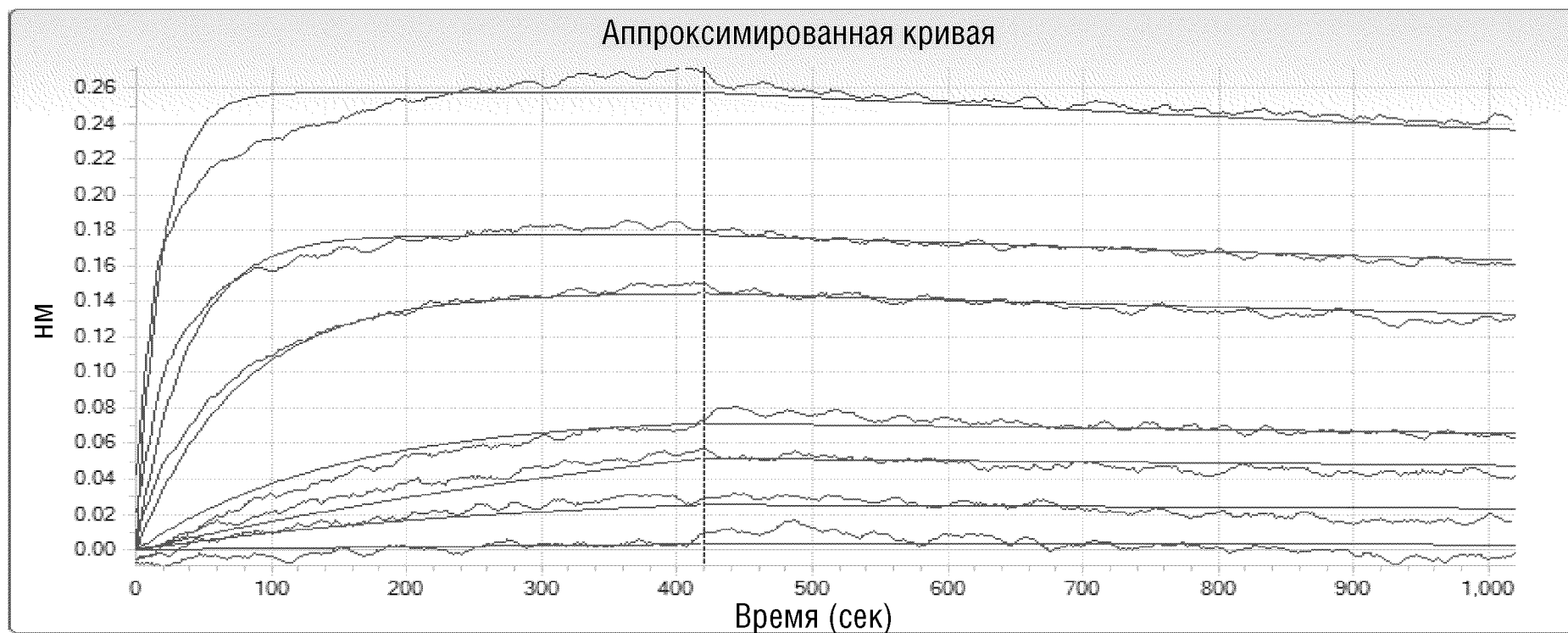
ФИГ.9



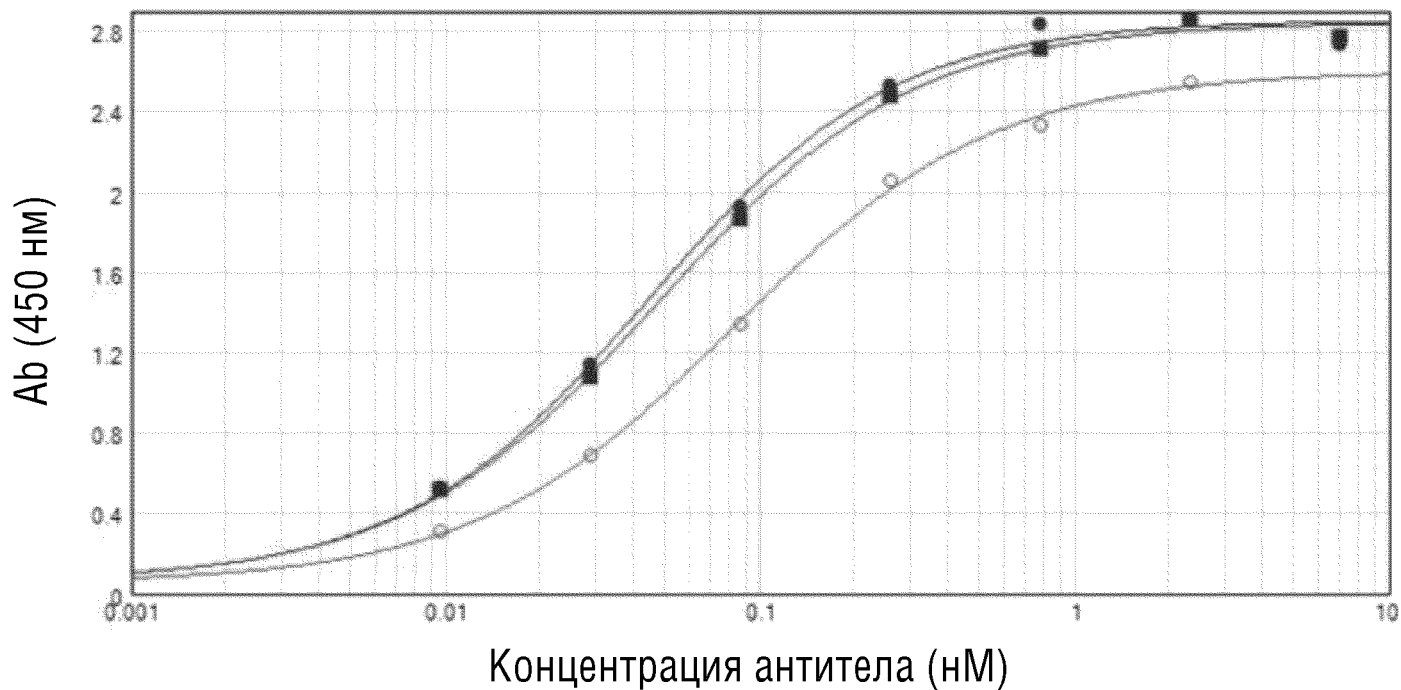
ФИГ.10



ФИГ.11



ФИГ.12



13E9 H1L1
 $R^2 = 0.997$
 $EC50 = 0.044$

13E9 H2L2
 $R^2 = 0.999$
 $EC50 = 0.048$

Секукинумаб
 $R^2 = 0.999$
 $EC50 = 0.082$

11/17

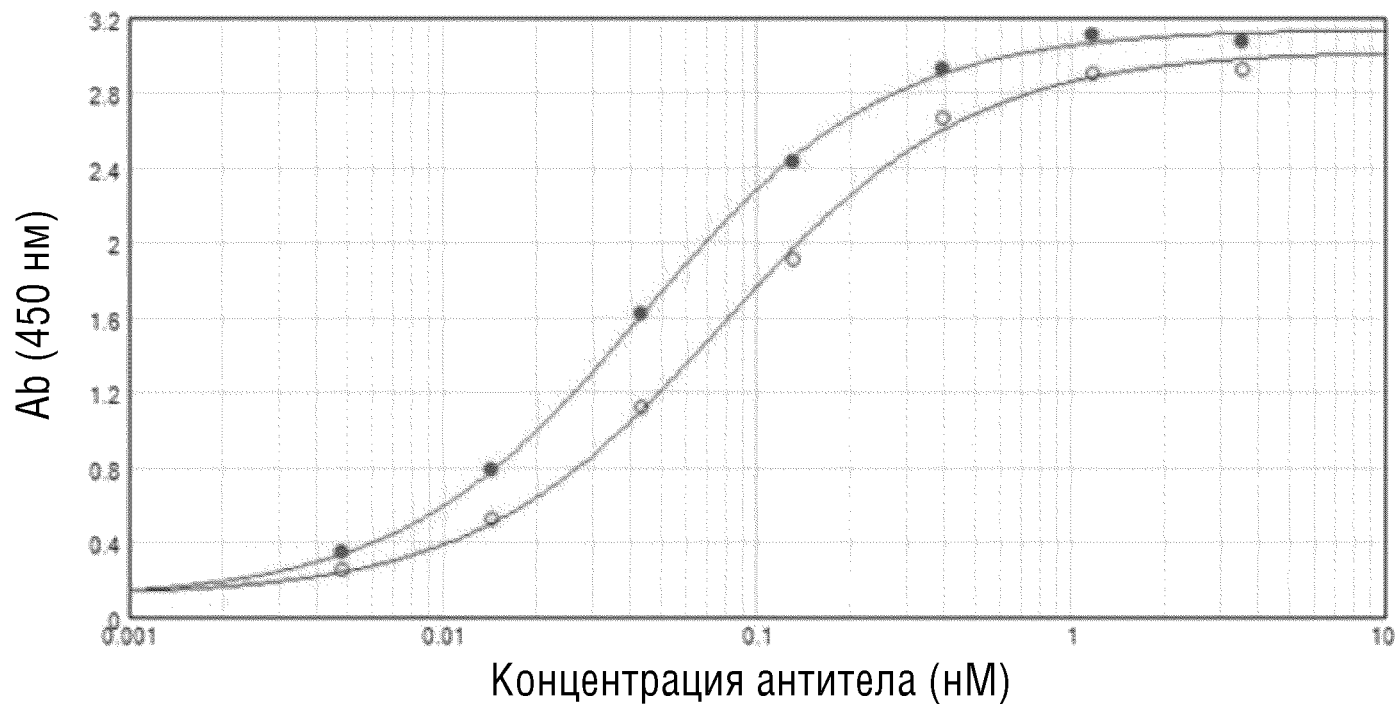
- **13E9 H1L1** (13E9 H1L1: среднее геометрическое относительно концентрации)
- **13E9 H2L2** (13E9 H2L2: среднее геометрическое относительно концентрации)
- **Секукинумаб** (среднее геометрическое относительно концентрации)

Результаты аппроксимации кривой *

Аппроксимация кривой: 4-х параметрическая

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{EC50}\right)^B}$$

ФИГ.13



13E9 H3L2
 $R^2 = 1.000$
 $EC50 = 0.043$

- **13E9 H3L2** (13E9 H3L2: среднее геометрическое относительно концентрации)
- **Секукинумаб** (Секукинумаб: среднее геометрическое относительно концентрации)

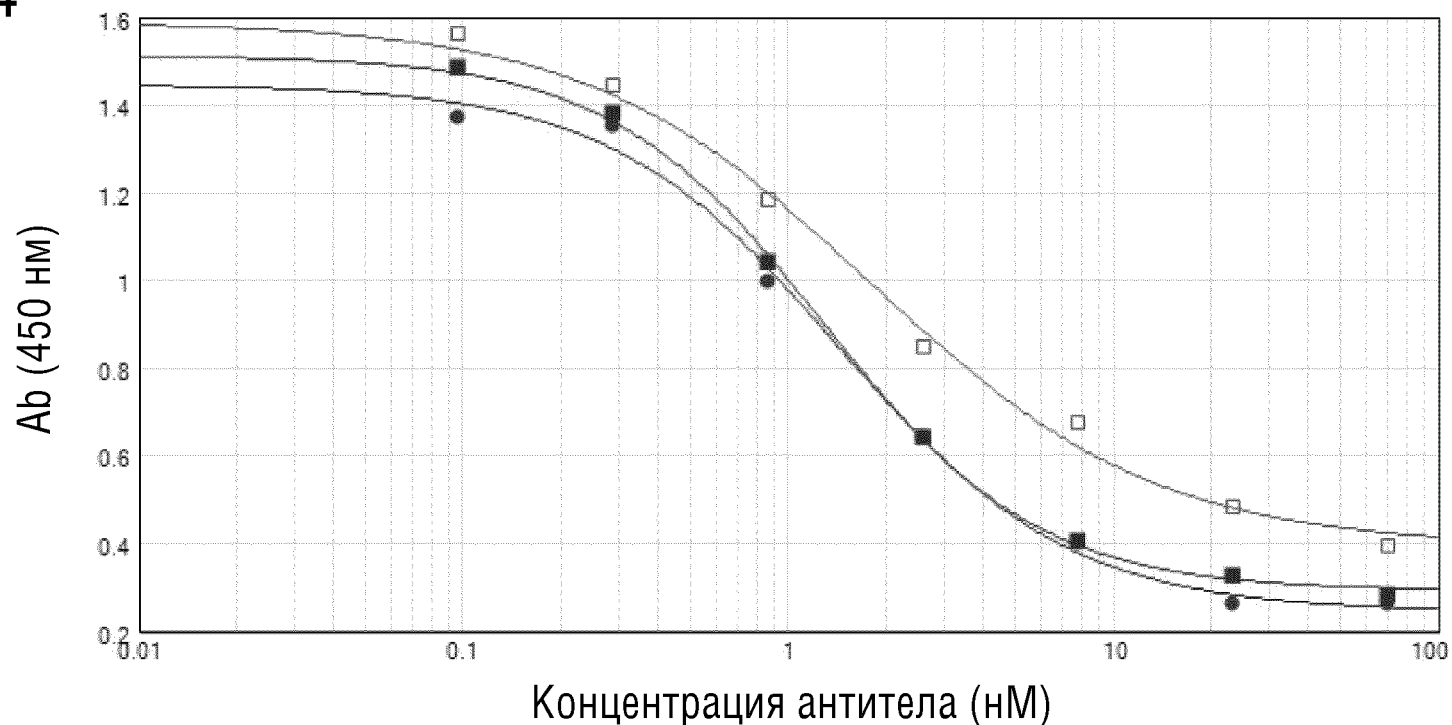
Результаты аппроксимации кривой ▲

Секукинумаб
 $R^2 = 0.999$
 $EC50 = 0.078$

Аппроксимация кривой: 4-х параметрическая

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B}$$

ФИГ.14



13E9 H1L1
 $R^2 = 0.997$
 EC50 = 1.437

13E9 H2L2
 $R^2 = 0.999$
 EC50 = 1.281

Секуинумаб
 $R^2 = 0.995$
 EC50 = 1.807

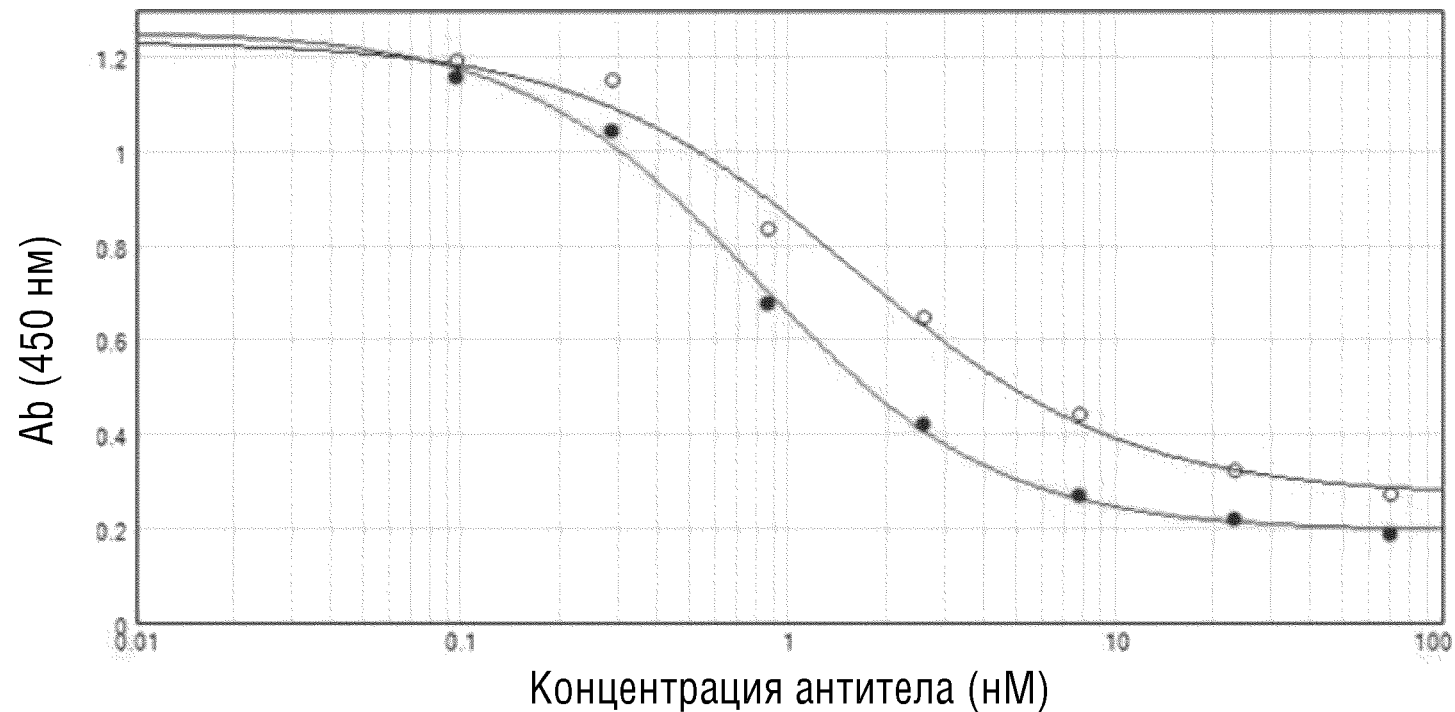
- **13E9 H1L1** (13E9 H1L1: среднее геометрическое относительно концентрации)
- **13E9 H2L2** (13E9 H2L2: среднее геометрическое относительно концентрации)
- **KF053 Секуинумаб** (Секуинумаб: среднее геометрическое относительно концентрации)

Аппроксимация кривой: 4-х параметрическая

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B}$$

Результаты аппроксимации кривой ▲

ФИГ.15



13E9 H3L2
 $R^2 = 0.998$
 EC50 = 0.805

- **13E9 H3L2** (13E9 H3L2: среднее геометрическое относительно концентрации)
- **Секукинумаб** (Секукинумаб: среднее геометрическое относительно концентрации)

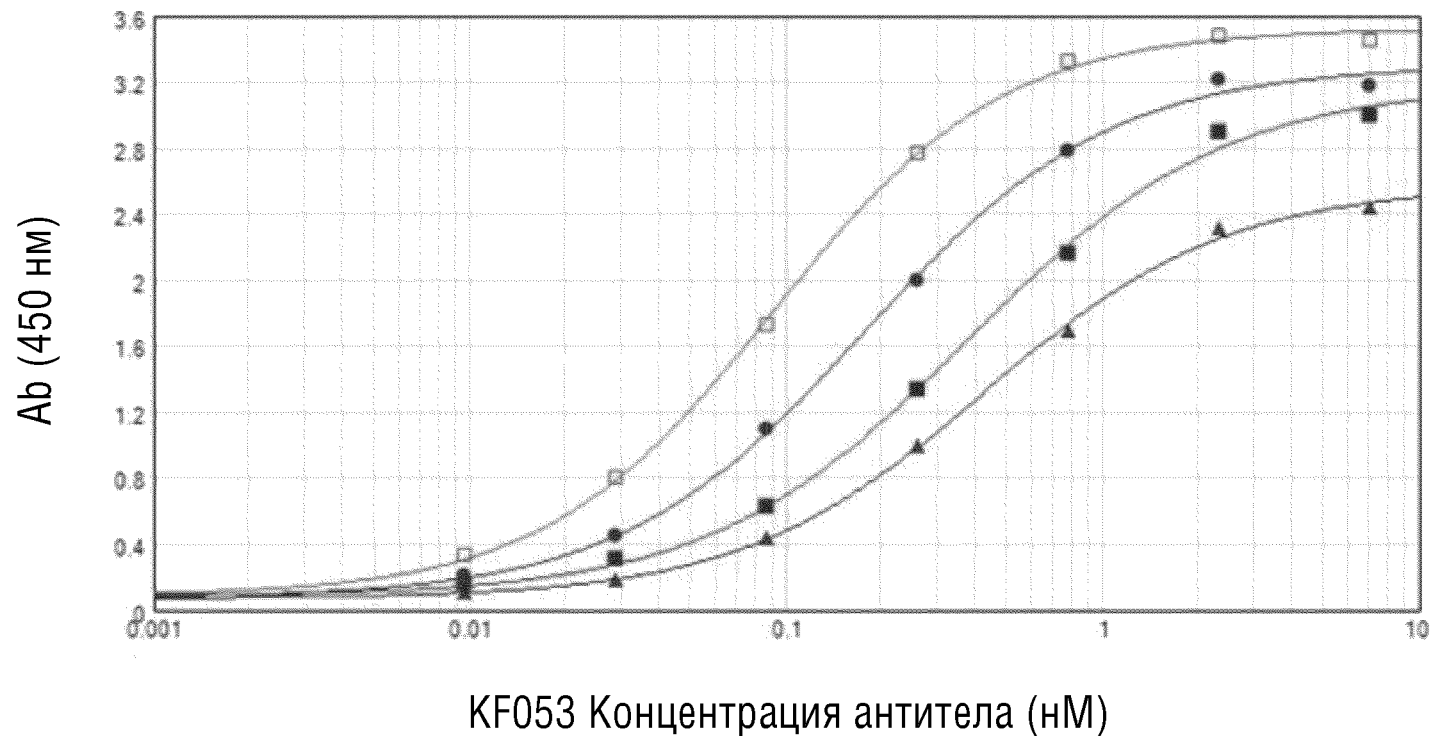
Результаты аппроксимации кривой ★

Секукинумаб
 $R^2 = 0.992$
 EC50 = 1.580

Аппроксимация кривой: 4-х параметрическая

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B}$$

ФИГ.16



2G2 H1L1
 $R^2 = 0.999$
 EC50 = 0.177

2G2 H2L2
 $R^2 = 0.998$
 EC50 = 0.372

2G2 H3L3
 $R^2 = 0.999$
 EC50 = 0.421

Секукинумаб
 $R^2 = 0.999$
 EC50 = 0.090

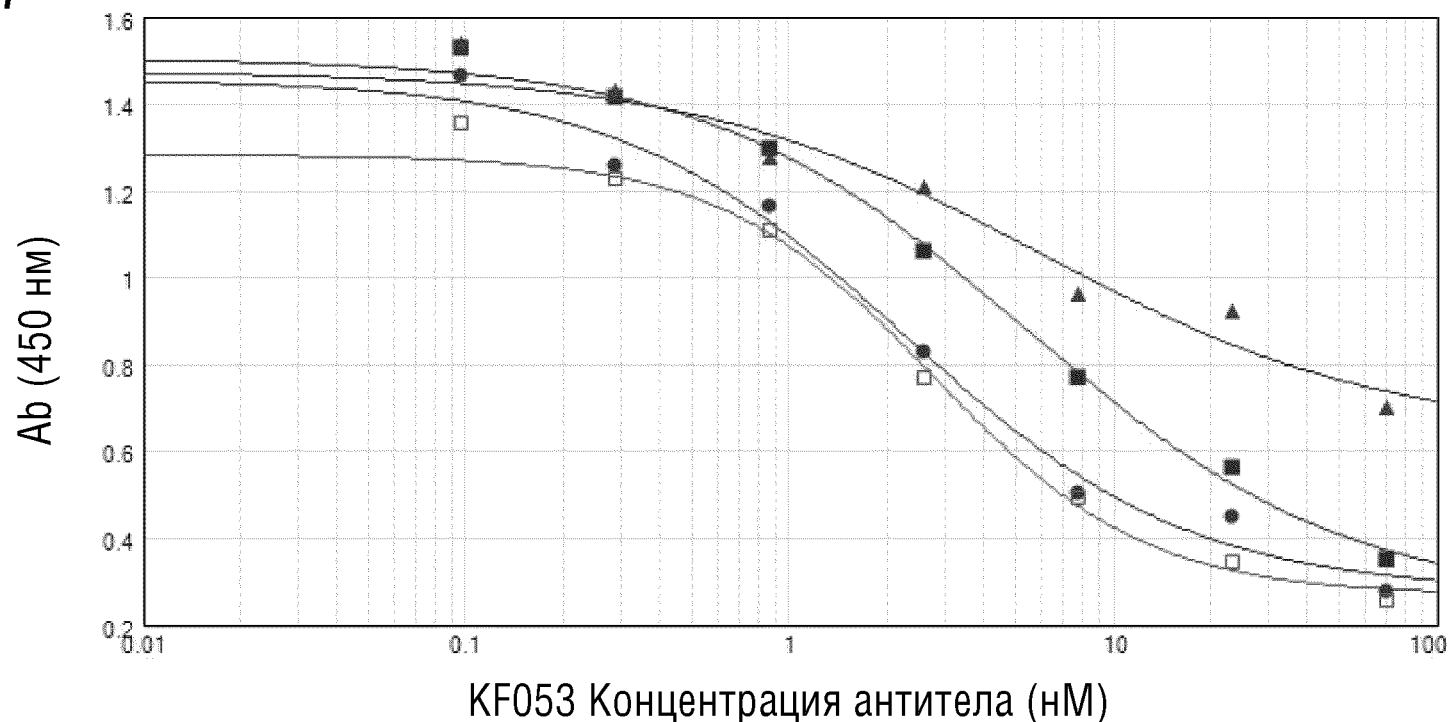
- 2G2 H1L1 (2G2 H1L1: среднее геометрическое относительно концентрации)
- 2G2 H2L2 (2G2 H2L2: среднее геометрическое относительно концентрации)
- ▲ 2G2 H3L3 (2G2 H3L3: среднее геометрическое относительно концентрации)
- Секукинумаб (Секукинумаб: среднее геометрическое относительно концентрации)

Результаты аппроксимации кривой ▲

Аппроксимация
 кривой: 4-х
 параметрическая

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{EC50}\right)^B}$$

ФИГ.17



2G2 H1L1
 $R^2 = 0.989$
 EC50 = 2.264

2G2 H2L2
 $R^2 = 0.994$
 EC50 = 5.408

2G2 H3L3
 $R^2 = 0.956$
 EC50 = 5.911

Секукинумаб
 $R^2 = 0.987$
 EC50 = 2.749

16/17

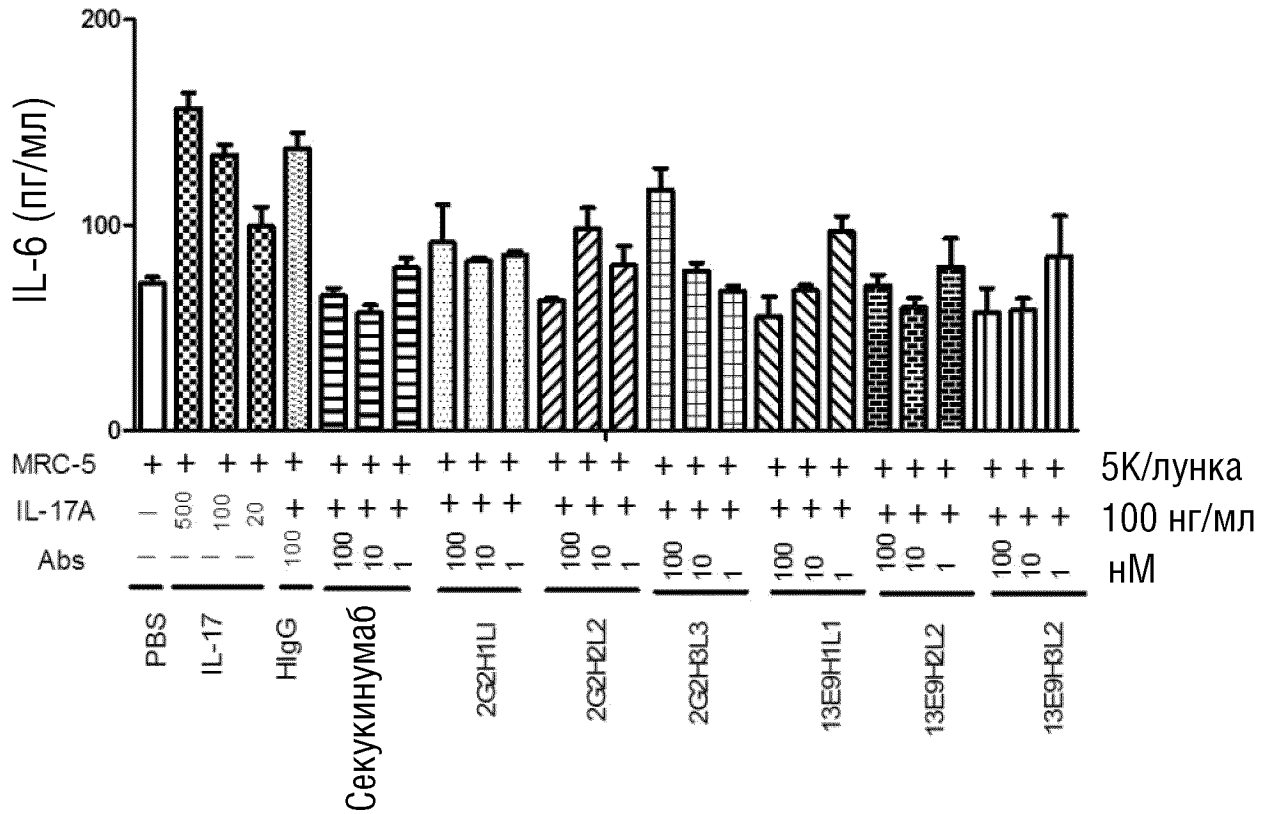
- **2G2 H1L1** (2G2 H1L1: среднее геометрическое относительно концентрации)
- **2G2 H2L2** (2G2 H2L2: среднее геометрическое относительно концентрации)
- ▲ **2G2 H3L3** (2G2 H3L3: среднее геометрическое относительно концентрации)
- **Секукинумаб** (Секукинумаб: среднее геометрическое относительно концентрации)

Результаты аппроксимации кривой▲

Аппроксимация кривой: 4-х параметрическая $y = D + \frac{A - D}{1 + (\frac{x}{C})^B}$

ФИГ.18

Секреция IL-6 в клетках MRC-5



ФИГ.19

