

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042457**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.16

(21) Номер заявки
201990673

(22) Дата подачи заявки
2017.09.08

(51) Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛО, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩЕЕСЯ С IL-17A, КОМПОЗИЦИЯ И КОНЬЮГАТ НА ЕГО ОСНОВЕ И ПРИМЕНЕНИЕ В ЛЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ, СВЯЗАННОГО СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ И/ИЛИ ИЗБЫТОЧНЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ IL-17A**

(31) **201610827097.2**

(32) **2016.09.14**

(33) **CN**

(43) **2019.08.30**

(86) **PCT/CN2017/101083**

(87) **WO 2018/050028 2018.03.22**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БЭЙЦЗИН ХАНМИ ФАРМ. КО., ЛТД.
(CN)

(72) Изобретатель:
Сун Наньмэн, Лю Цзяван, Ян Япин,
Ян Ян, Ян Дунгэ, Чжан Хунцзюань,
Цзинь Мэнсе (CN)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A1-2015070697**
CN-A-101646690
WO-A1-2015137843
CN-A-105073775
WO-A1-2016113557
CN-A-104684571
CN-A-104231080

(57) В изобретении предложены антитела или их функциональные фрагменты, специфически связывающиеся с IL-17A, композиция и конъюгат на их основе, а также применение указанных антитела или фрагмента в предотвращении или лечении заболевания, связанного со сверхэкспрессией и/или избыточным высвобождением IL-17A, и способ предотвращения или лечения указанного заболевания. Указанные антитело и его функциональный фрагмент включают химерное антитело против IL-17A и его функциональный фрагмент и гуманизированное антитело против IL-17A и его функциональный фрагмент.

B1**042457****042457****B1**

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с заявкой на выдачу патента Китая № CN 201610827097.2, поданной 14 сентября 2016 г. в государственное ведомство по интеллектуальной собственности и озаглавленной "ANTIBODY SPECIFICALLY BINDING TO IL-17A AND FUNCTIONAL FRAGMENT THEREOF", полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее раскрытие относится к области медицинской биотехнологии и исследованиям в области инженерии гуманизированных антител, и в частности к антителам, специфически связывающимся с IL-17A, и их функциональным фрагментам.

Уровень техники

Интерлейкин-17A (IL-17 или IL-17A) представляет собой провоспалительный цитокин, вырабатываемый преимущественно клетками Th17, и является наиболее типичным элементом семейства IL-17 (Miossec P, Kolls JK. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2012,11: 763-776). После связывания с рецептором IL-17A (IL-17RA), IL-17A может индуцировать экспрессию воспалительных цитокинов и хемокинов во многих клетках (таких как фибробласты, эпителиальные клетки и эндотелиальные клетки), играя важную роль в иммунологической защите организма (Lin Y, Ritchea S, Logar A. *Immunity*, 2009, 31:799-810).

Однако, сверхэкспрессированный IL-17A может вызывать многие воспалительные заболевания. Например, IL-17A оказывает воздействие на макрофаги и DC-клетки, индуцируя экспрессию на высоком уровне IL-1, IL-6, TNF и CRP, что приводит к воспалительной реакции и вовлечению в патологические процессы псориаза и отторжения трансплантата. IL-17A оказывает воздействие на эндотелиальные клетки, индуцируя экспрессию на высоком уровне IL-6, MMP и факторов коагуляции, что приводит к васкулярной активации и вовлечению в патологические процессы реперфузионного повреждения, тромбоза и атеросклероза. IL-17A оказывает воздействие на фибробласты, индуцируя экспрессию на высоком уровне IL-6, хемокинов, факторов роста и MMP, что приводит к разрушению матрицы и вовлечению в патологический процесс рассеянного склероза и болезни Крона. IL-17A оказывает воздействие на остеобласты и хондроциты, индуцируя RANKL, MMP и образование остеокластов, что приводит к эрозии костей и повреждению хрящей и вовлечению в патологический процесс ревматоидного артрита и заболевания пародонта (*N Engl J Med.* 2009 Aug 27; 361 (9) :888-98. *Nat Rev Drug Discov.* 2012 Oct; 11(10): 763-76. *Semin Arthritis Rheum.* 2013 Oct; 43(2):158-70. *Trends Mol Med.* 2016 Mar; 22 (3): 230-41).

Нейтрализующие IL-17A антитела могут ингибировать экспрессию на высоком уровне IL-17A в синовиальной ткани пациентов с ревматоидным артритом и уменьшать выработку важного воспалительного фактора IL-6 (Chabaud M, Durand JM, Buchs N, et al. *Arthritis Rheum.* 1999,42: 963-70). В экспериментах по аутоиммунным заболеваниям на многих животных моделях было показано, что применение антител для нейтрализации IL-17A может эффективно ингибировать патологическое развитие воспаления (Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, et al. *Arthritis Rheum.*, 2004, 50: 650-659).

В настоящее время, для продажи были одобрены лекарственные препараты антител, связанных с IL-17A, Секукинумаб (антитела против IL-17A) и Иксекизумаб (антитела против IL-17A), которые оба используют для лечения псориаза. Однако, результаты клинического исследования лекарственных препаратов показали, что эти лекарственные препараты не показывают ожидаемого терапевтического действия для определенных хронических воспалительных заболеваний, таких как ревматоидный артрит (Kellner H, *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2013, 5: 141-152).

Принимая это во внимание было специально предложено настоящее раскрытие.

Сущность изобретения

Настоящее раскрытие основано на полученных исходных мышиных моноклональных антителах против IL-17A человека, обладающих способностью специфически связываться с белком IL-17A человека, путем клонирования, идентификации и анализа структуры гена для определения его области CDR, конструирования соответствующих химерных антител и гуманизированных антител, создания соответствующей экспрессирующей системы эукариотических клеток и получения и очистки химерных антител и гуманизированных антител.

Для достижения упомянутых выше целей настоящего раскрытия специально приняты следующие технические решения:

антитела, способные специфически связываться с IL-17A и их функциональные фрагменты, причем антитело или его функциональный фрагмент содержат легкую цепь и тяжелую цепь;

легкая цепь содержит CDR легкой цепи, состоящую из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3;

тяжелая цепь содержит CDR тяжелой цепи, состоящую из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3;

аминокислотные последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 1, 2 и 3; аминокислотные последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 4, 5 и 6.

Предпочтительно антитело или его функциональный фрагмент включает химерное антитело против IL-17A и его функциональный фрагмент, и гуманизированное антитело против IL-17A и его функциональный фрагмент.

Предпочтительно антитело или его функциональный фрагмент включает химерное антитело против

IL-17A и его функциональный фрагмент, и гуманизированное антитело против IL-17A и его функциональный фрагмент.

То есть, антитело или его функциональный фрагмент включает химерное антитело против IL-17A и его функциональный фрагмент, или антитело или его функциональный фрагмент включает гуманизированное антитело против IL-17A и его функциональный фрагмент.

В данной области хорошо известно, что как специфичность, так и аффинность связывания антитела в основном определяются CDR, а аминокислотную последовательность области, не являющейся CDR, можно легко изменить в соответствии с хорошо известными существующими технологиями получения варианта, обладающего похожей биологической активностью. Согласно настоящему раскрытию варианты моноклональных антител имеют последовательности CDR, идентичные последовательностям CDR упомянутых выше гуманизированных антител, таким образом, они обладают похожей биологической активностью.

Предпочтительно, антитело и его функциональный фрагмент, которые описаны выше, при этом антитело содержит любую последовательность константной области, выбранную из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE и IgD человека.

Предпочтительно, антитело и его функциональный фрагмент, которые описаны выше, при этом функциональный фрагмент содержит одно или более, выбранное из группы, состоящей из F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, scFv, биспецифического антитела и минимальной распознающей единицы антитела.

"Функциональный фрагмент" настоящего раскрытия конкретно относится к фрагменту антитела, имеющему такую же специфичность к IL-17A, как специфичность исходного антитела. В дополнение к упомянутым выше функциональным фрагментам также можно включить любой фрагмент, у которого был увеличен период полувыведения.

scFv (sc=одноцепочечные), биспецифические антитела(диатела):

Эти функциональные фрагменты обычно имеют такую же специфичность связывания как у антител, из которых они получены. Рядовой специалист в данной области может узнать из изложенного в описании настоящего раскрытия об этом фрагменте антитела согласно настоящему раскрытию и получить фрагмент с упомянутой выше функцией посредством такого способа, как ферментативное расщепление (включая пепсин или папаин), и/или способа химического восстановления расщепленных дисульфидных связей.

Фрагменты антител также можно получить посредством пептидного синтеза с помощью рекомбинантных генетических методов, которые также известны рядовым специалистам в данной области, или с помощью автоматических синтезаторов пептидов, таких как автоматический синтезатор пептидов, предоставляемый, например, Applied BioSystems.

Предпочтительно антитело и его функциональный фрагмент, которые описаны выше, при этом аминокислотные последовательности вариативной области легкой цепи и вариативной области тяжелой цепи химерного антитела против IL-17A и его функционального фрагмента, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8;

Кроме того предпочтительно, антитело и его функциональный фрагмент, которые описаны выше, при этом аминокислотная последовательность константной области легкой цепи и константной области тяжелой цепи химерного антитела против IL-17A и его функционального фрагмента, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

Предпочтительно антитело и его функциональный фрагмент, которые описаны выше, при этом каркасная область легкой цепи гуманизированного антитела против IL-17A и его функционального фрагмента содержит FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4, а каркасная область тяжелой цепи гуманизированного антитела против IL-17A и его функционального фрагмента содержит FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4.

Аминокислотные последовательности FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4 показаны в SEQ ID NO: 11-14 соответственно.

Аминокислотные последовательности FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4 показаны в SEQ ID NO: 15-18 соответственно.

Обычно при трансплантации CDR мышиного антитела в каркасную область человека выбор каркасной области человека с высокой гомологией последовательностей будет иметь определенный показатель успеха. Однако исследования показали, что для восстановления определенной активности антитела многим трансплантатам CDR требуется обратная мутация. Большой проблемой является выбор правильной каркасной области у являющегося источником человека.

CDR является главным релевантным участком для связывания антигена, но в большинстве случаев FR (каркасная область) оказывает существенное влияние на конформацию участка связывания. Для того, чтобы получить гуманизированное антитело с высокой аффинностью согласно настоящему раскрытию, выбирают подходящую FR область, а релевантный остаток FR возвращают назад в исходную мышиную аминокислоту или аминокислоту, имеющуюся у человека и обладающую такой же функцией.

Предпочтительно FR-L1 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 11, и аминокислотной последовательности, имеющей следующие замещения или их комбинации:

1-я аминокислота D заменена на I;

Необходимо заметить, что в дополнение к упомянутым выше аминокислотным последовательностям согласно настоящей заявке получения химерных антител и гуманизированных антител можно добиться любым способом, известным рядовым специалистам в данной области, например путем получения рекомбинантного гуманизированного антитела на основе секвенированных CDR мышинных антител, мышинное антитело секретируется миеломными клетками иммунизированных мышей или миеломными клетками, слитыми со спленоцитами других видов, которые слиты с миеломными клетками. Иммунизированным животным может быть трансгенная мышь, имеющая локус иммуноглобулина человека, которая может непосредственно вырабатывать антитело человека. Еще один возможный вариант осуществления может включать в себя скрининг библиотеки с использованием технологии фагового дисплея.

Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, выбранная из:

А) ДНК или РНК, кодирующей антитело и его функциональный фрагмент, которые описаны выше; и

В) нуклеиновой кислоты, комплементарной нуклеиновой кислоте согласно А).

Вектор, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая описана выше.

В настоящем раскрытии, кроме того, предоставлена по меньшей мере одна ядерная конструкция, кодирующая молекулу нуклеиновой кислоты, которая описана выше, предпочтительно вектор, более предпочтительно вектор экспрессии, такой как плазида, который описан в одном варианте осуществления настоящей заявки.

Клетка-хозяин, которую трансформируют описанным выше вектором.

Клеткой-хозяином является эукариотическая клетка, например клетка млекопитающего.

Способ получения антител, способных специфически связываться с IL-17A, и их функциональных фрагментов включает следующие этапы:

культивирование описанных выше клеток-хозяев в среде и в подходящих условиях культивирования и

извлечение полученного антитела и его функциональных фрагментов из культуральной среды или из культивируемых клеток-хозяев.

Композиция, содержащая в качестве активного ингредиента антитела и/или их функциональные фрагменты, или состав из антител и/или их функциональных фрагментов вместе с другими компонентами.

Предпочтительно описанную выше композицию, антитело и его функциональный фрагмент соединяют по меньшей мере с одним диагностическим средством и/или терапевтическим средством с образованием иммуноконъюгата.

Предпочтительно диагностическим средством является одно или более, выбранное из группы, состоящей из радионуклида, радиоактивного контрастного средства, парамагнитного иона, металла, флуоресцентной метки, хемилюминесцентной метки, ультразвукового контрастного средства и фотосенсибилизатора.

Предпочтительно, радионуклидом является одно или более, выбранное из группы, состоящей из ^{110}In , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{18}F , ^{52}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{94}mTc , ^{94}Tc , ^{99}mTc , ^{120}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , $^{154-158}\text{Gd}$, ^{32}P , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{51}Mn , ^{52}mMn , ^{55}Co , ^{72}As , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{82}mRb и ^{83}Sr .

Предпочтительно парамагнитным ионом является одно или более, выбранное из группы, состоящей из хрома (III), марганца (II), железа (III), железа (II), кобальта (II), никеля (II), меди (II), неодима (III), самария (III), иттербия (III), гадолиния (III), ванадия (II), тербия (III), диспрозия (III), гольмия (III) и эрбия (III).

Предпочтительно флуоресцентной меткой является одно или более, выбранное из группы, состоящей из Alexa 350, Alexa 405, Alexa 430, Alexa 488, Alexa 555, Alexa 647, AMCA, аминокридина, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, 5-карбокси-4',5'-дихлор-2',7'-диметоксифлуоресцеина, 5-карбокси-2',4',5',7'-тетрахлорфлуоресцеина, 5-карбоксифлуоресцеина, 5-карбоксиродамина, 6-карбоксиродамина, 6-карбокситетраметилродамина, Cascade Blue, Cy2, Cy3, Cy5, Cy7, 6-FAM, дансилхлорида, флуоресцеина, HEX, 6-JOE, NBD (7-нитробензо-2-окса-1,3-диазола), Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, фталевой кислоты, терефталевой кислоты, изофталевой кислоты, крезолового прочного фиолетового, крезилового фиолетового, бриллиантового крезилового голубого, 4-аминобензойной кислоты, эритрозина, фталоцианина, азометина, цианина, ксантина, сукцинилфлуоресцеина, криптата редкоземельного металла, трибипиридилдиаминноксима, соединения криптата европия или хелата, диамина, дицианина, красителя голубой La Jolla, аллофикоцианина, аллокоцианина В, фикоцианина С, фикоцианина R, тиамин, R-фикоэритрина, С-фикоцианина, фикоэритрина R, REG, родамина зеленого, родамина изотиоцианата, родамина красного, ROX, TAMRA, TET, TRIT (тетраметилродамина изотиола), тетраметилродамина и техасского красного.

Предпочтительно терапевтическим средством является одно или более, выбранное из группы, состоящей из голого антитела, цитотоксического средства, лекарственного препарата, радионуклида, атома бора, иммуномодулятора, антиапоптического средства, фотосенсибилизирующего терапевтического средства, иммуноконъюгата и олигонуклеотида.

Предпочтительно лекарственным препаратом является одно или более, выбранное из группы, состоящей из метотрексата, фторурацила, меркаптопурина, гидроксимочевина, цитарабина, азотистого

иприта, циклофосфида, тиотепы, цисплатина, митомицина, блеомицина, камптотецина, подофиллотоксина, актиномицина D, доксорубицина, даунорубицина, винбластина, паклитаксела, алкалоидов голубчатого тиса и L-аспарагиназы.

Предпочтительно олигонуклеотидом является одно или более, выбранное из группы, состоящей из shRNA, miRNA и siRNA.

Предпочтительно иммуномодулятором является одно или более, выбранное из группы, состоящей из цитокина, хемокина, фактора роста стволовых клеток, лимфотоксина, гематопоетического фактора, колониестимулирующего фактора (CSF), интерферона, эритропоэтина, тромбопоэтина, интерлейкина (IL), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и фактора роста стволовых клеток.

При этом цитокином предпочтительно является одно или более, выбранное из группы, состоящей из гормона роста человека, гормона роста человека N-метионила, гормона роста крупного рогатого скота, паратироидного гормона, тироксина, инсулина, проинсулина, релаксина, прорелаксина, фолликулостимулирующего гормона (FSH), тиреостимулирующего гормона (TSH), лютеинизирующего гормона (LH), гепатоцитарного фактора роста, простагландина, фактора роста фибробластов, пролактина, плацентарного лактогена, белка ОВ, фактора некроза опухоли α , фактор некроза опухоли β , ингибитора Мюллера, родственного гонадотропину пептида мыши, ингибина, активина, фактора роста эндотелия сосудов, интегрина, тромбопоэтина (TPO), NGF- β , фактора роста тромбоцитов, TGF- α , TGF- β , инсулиноподобного фактора роста-I, инсулиноподобного фактора роста-11, эритропоэтина (EPO), остеиндуктивного фактора, интерферона- α , интерферона- β , интерферона- γ , макрофага-CSF (M-CSF), IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-25, LIF, FLT-3, ангиостатина, тромбоспондина, эндостатина, фактора некроза опухоли и LT.

Хемокином предпочтительно является одно или более, выбранное из группы, состоящей из RANTES, MCAF, MIP1- α , MIP1- β и IP-10.

Предпочтительно радионуклидом является одно или более, выбранное из группы, состоящей из ^{111}In , ^{111}At , ^{177}Lu , ^{211}Bi , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}I , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{111}Ag , ^{67}Ga , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{152}Dy , ^{166}Dy , ^{161}Ho , ^{166}Ho , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{211}Pb , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{99}Mo , ^{105}Rh , ^{149}Pm , ^{169}Er , ^{194}Ir , ^{58}Co , ^{80}mBr , ^{99}mTc , ^{103}mRh , ^{109}Pt , ^{119}Sb , ^{189}mOs , ^{192}Ir , ^{219}Rn , ^{215}Po , ^{221}Fr , ^{255}Fm , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{75}Br , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{224}Ac , ^{77}Br , ^{113}mIn , ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{203}Hg , ^{121}mTe , ^{122}mTe , ^{125}mTe , ^{165}Tm , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{197}Pt , ^{109}Pd , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{201}Tl , ^{76}Br и ^{169}Yb .

Применение описанной выше композиции для изготовления лекарства для предотвращения и/или лечения заболевания, связанного со сверхэкспрессией и/или избыточным высвобождением IL-17A.

Предпочтительно заболеванием является одно или более, выбранное из группы, состоящей из воспаления дыхательных путей, астмы, бронхиальной астмы, аллергической астмы, хронического обструктивного заболевания легких, идиопатического легочного фиброза, ревматоидного артрита, остеоартрита, анкилозирующего спондилоартрита, псориатического артрита, псориаза, рассеянного склероза, системного склероза, системной красной волчанки, люпус-нефрита, склеродермии, язвенного колита, воспалительного заболевания кишечника, увеита, *Helicobacter pylori*-ассоциированного гастрита, остеопороза, эрозии костей, внутрибрюшинного абсцесса и спаек, болезни Аддисона, дефицита гамма глобулина, гнездовой алопеции, целиакии, болезни Чагаса, болезни Крона, отторжения аллотрансплантата, болезни Бехчета, сепсиса, септического или эндотоксического шока и ишемии.

Применение антител, способных специфически связываться с IL-17A, и их функциональных фрагментов, которые описаны выше, для изготовления лекарства для предотвращения и/или лечения заболевания, связанного со сверхэкспрессией и/или избыточным высвобождением IL-17A.

Лекарственный препарат для предотвращения и/или лечения заболевания, связанного со сверхэкспрессией и/или избыточным высвобождением IL-17A, содержащий антитела, способные специфически связываться с IL-17A, и их функциональных фрагментов, и фармацевтически приемлемый носитель.

Альтернативно, лекарственный препарат содержит описанную выше композицию и фармацевтически приемлемый носитель.

В рамках изобретения термин "фармацевтически приемлемый" означает, что состав является физиологически приемлемым, когда состав вводят человеку, и он не вызывает аллергическую реакцию, такую как расстройство пищеварения, головокружение или другую аллергическую реакцию, или системную аллергическую реакцию, похожую на эти аллергические реакции.

Согласно настоящему раскрытию "фармацевтически приемлемый носитель" включает, но без ограничения, связующие вещества (такие как микрокристаллическая целлюлоза, альгинаты, желатин и поливинилпирролидон), наполнители (такие как крахмал, сахароза, глюкоза и безводная молочная кислота), разрыхлители (такие как поперечно-сшитый поливинилпирролидон, поперечно-сшитый натрий карбоксиметилкрахмал, кросскармеллоза натрия и низкозамещенная гидроксипропилцеллюлоза), смазывающие материалы (стеарат магния, стеарат алюминия, тальк, этиленгликоль, бензоат натрия), увлажняющее средство (такое как глицерин), поверхностно-активные вещества (такие как цетиловый спирт) и усилители поглощения, ароматизирующие средства, подсластители, разбавители, покрывающие средства и т.д.

Описанным выше заболеванием является одно или более, выбранное из группы, состоящей из воспаления дыхательных путей, астмы, бронхиальной астмы, аллергической астмы, хронического обструктивного заболевания легких, идиопатического легочного фиброза, ревматоидного артрита, остеоартрита, анкилозирующего спондилоартрита, псориатического артрита, псориаза, рассеянного склероза, системного склероза, системной красной волчанки, люпус-нефрита, склеродермии, язвенного колита, воспалительного заболевания кишечника, увеита, *Helicobacter pylori*-ассоциированного гастрита, остеопороза, эрозии костей, внутрибрюшинного абсцесса и спаек, болезни Аддисона, дефицита гамма глобулина, гнездной алопеции, целиакии, болезни Чагаса, болезни Крона, отторжения аллотрансплантата, болезни Бехчета, сепсиса, септического или эндотоксического шока и ишемии.

Способ предотвращения и/или лечения заболевания, связанного со сверхэкспрессией и/или избыточным высвобождением IL-17A, включающий введение описанного выше лекарственного препарата нуждающемуся в нем субъекту.

Предпочтительно, упомянутым выше пациентом является человек, и дополнительно, упомянутым выше пациентом является человек, нуждающийся в предотвращении и/или лечении заболевания, связанного со сверхэкспрессией и/или избыточным высвобождением IL-17A.

Описанным выше заболеванием является одно или более, выбранное из группы, состоящей из воспаления дыхательных путей, астмы, бронхиальной астмы, аллергической астмы, хронического обструктивного заболевания легких, идиопатического легочного фиброза, ревматоидного артрита, остеоартрита, анкилозирующего спондилоартрита, псориатического артрита, псориаза, рассеянного склероза, системного склероза, системной красной волчанки, люпус-нефрита, склеродермии, язвенного колита, воспалительного заболевания кишечника, увеита, *Helicobacter pylori*-ассоциированного гастрита, остеопороза, эрозии костей, внутрибрюшинного абсцесса и спаек, болезни Аддисона, дефицита гамма глобулина, гнездной алопеции, целиакии, болезни Чагаса, болезни Крона, отторжения аллотрансплантата, болезни Бехчета, сепсиса, септического или эндотоксического шока и ишемии.

Краткое описание чертежей

Для того, чтобы более ясно проиллюстрировать конкретные варианты осуществления настоящего раскрытия или технические решения предшествующего уровня техники, ниже будут кратко описаны чертежи, используемые в конкретных вариантах осуществления или в описании предшествующего уровня техники, и очевидно, что чертежи в следующем описании представляют собой некоторые варианты осуществления настоящего раскрытия и рядовой специалист в данной области на основе этих чертежей может получить другие чертежи без всякой творческой работы.

На фиг. 1 представлена активность связывания IL-17A человека моноклонального антитела, секретируемого клоном № 88 в примере 1;

На фиг. 2 представлена нейтрализующая активность моноклонального антитела, секретируемого клоном № 88 в примере 1, против стимулированной IL-17A человека секреции IL-6 клетками HFF-1;

На фиг. 3 представлена видовая специфичность химерных моноклональных антител против IL-17A человека в примере 4;

На фиг. 4 представлена специфичность связывания химерных моноклональных антител против IL-17A человека в примере 4;

На фиг. 5 представлена нейтрализующая активность *in vitro* химерных моноклональных антител против IL-17A человека в примере 5;

На фиг. 6 представлена нейтрализующая активность *in vivo* химерных моноклональных антител против IL-17A человека в примере 6;

На фиг. 7 представлена кривая концентрация-время после одной внутривенной инъекции в примере 7;

На фиг. 8 представлена активность связывания антигена гуманизированного моноклонального антитела против IL-17A человека в примере 9;

На фиг. 9 представлена нейтрализующая активность *in vitro* гуманизированного моноклонального антитела против IL-17A человека в примере 10;

На фиг. 10 представлена кривая концентрация-время после одной подкожной инъекции в примере 15.

Подробное описание

Представленные ниже варианты осуществления настоящего раскрытия будут подробно описаны со ссылкой на варианты осуществления. Однако рядовому специалисту в данной области будет понятно, что следующие варианты осуществления предназначены всего лишь для иллюстрации настоящего раскрытия и не предназначены для ограничения объема раскрытия. Для тех вариантов осуществления, в которых конкретные условия не указаны, их выполняют согласно обычным условиям или условиям, рекомендуемым производителем. Для тех используемых реагентов или инструментов, производители которых не указаны, они все являются широко доступными на рынке изделиями.

Пример 1. Получение мышиных моноклональных антител против IL-17A человека

1.1. Иммунизация животного

В качестве экспериментальных животных использовали самок мышей BALB/c 6-8 недельного воз-

раста, купленных у Beijing Huafukang Biotechnology Co. Ltd. Через неделю после акклиматизации мышей в окружающих условиях начали иммунизацию. Рекомбинантный белок IL-17A человека экспрессировали в *E.coli*, и тельца включения собирали и подвергали денатурации и обработке рефолдингом для получения растворимого белка IL-17A. Для первоначальной иммунизации 100 мкг рекомбинантного белка IL-17A-FC человека тщательно перемешивали с полным адьювантом Фрейнда (Sigma-Aldrich, номер по каталогу F5881) с образованием эмульсии, которую внутрибрюшинно инъецировали мышам. Спустя две недели проводили бустер-иммунизацию. Для бустер-иммунизации 50 мкг рекомбинантного белка IL-17A-FC человека тщательно перемешивали с неполным адьювантом Фрейнда (Sigma-Aldrich, номер по каталогу F5806) с образованием эмульсии, которую внутрибрюшинно инъецировали мышам. Иммунизацию проводили одинаково каждые 2 недели, в общей сложности 3 раза. На седьмой день после последней иммунизации брали кровь из ретроорбитального венозного сплетения мышей и центрифугировали для отделения сыворотки и титр антител определяли посредством ELISA. Мышей с высокими титрами выбирали для гибридизации для получения гибридом. За три дня до гибридизации 50 мкг рекомбинантного белка IL-17A-FC человека внутрибрюшинно инъецировали мышам без адьюванта. В день гибридизации асептически удаляли селезенку для получения суспензии отдельных клеток селезенки для использования.

1.2. Получение гибридом

Миеломные клетки SP2/0 в логарифмической фазе роста центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин, супернатант выбрасывали и клетки суспендировали в неполной среде DMEM (Gibco, cat № 11965) и подсчитывали. Брали необходимые клетки, дважды промывали неполной культуральной средой. Одновременно суспензию клеток селезенки, полученной у мыши после иммунизации, дважды промывали неполной культуральной средой. Миеломные клетки и клетки селезенки перемешивали в соотношении 1:10 или 1:5 и один раз промывали неполной культуральной средой в 50 мл пластмассовой центрифужной пробирке, а затем центрифугировали при 1200 об/мин в течение 8 мин. Супернатант выбрасывали, а для удаления остаточной жидкости использовали пипетку Пастера. Центрифужную пробирку осторожно постукивали по ладони для получения свободных и равномерных осажденных клеток, а затем пробирку помещали в водяную баню при 40°C для предварительного нагрева. 1 мл 45% PEG-4000 (pH 8,0, Sigma, cat № P7181), предварительно нагретого до 40°C, добавляли 1 мл пипеткой приблизительно 1 мин (оптимальное время составляет 45 с), осторожно взбалтывали пипеткой при добавлении (взбалтывали пипеткой), видимых частиц не должно быть видно невооруженным глазом. 20-30 мл неполной среды, предварительно нагретой до 37°C, добавляли в пробирку 10 мл пипеткой в течение 90 с для прекращения действия PEG и обеспечивали отстаивание при 20-37°C в течение 10 мин. Пробирку центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин и супернатант выбрасывали. Добавляли 5 мл среды NAT (DMEM+NAT, Sigma, cat №1 H0262-10VL) и осажденные клетки осторожно перемешивали (нужно помнить, что не надо сильно дуть, чтобы не разделить слитые клетки) для получения хорошо перемешанной суспензии. Добавляли дополнительную среду NAT до 80-100 мл (получали концентрацию клеток селезенки, составляющую $1-2 \times 10^6$ /мл). Суспензию распределяли в 96-луночный планшет для клеточных культур, 0,1 мл на лунку и в 24-луночный планшет, 1,0-1,5 мл на лунку. Планшеты инкубировали в инкубаторе при 37°C с 6% CO₂. Обычно использовали шесть 96-луночных планшетов. Спустя 5 дней 1/2 среды заменяли свежей средой NAT. Спустя 7-10 дней среду NAT заменяли средой HT (DMEM+HT, Sigma cat № H0137-10VL). Регулярно наблюдали за ростом клеток гибридомы, и собирали супернатант для обнаружения антител после того, как слияние клеток достигало 1/10 или более. Положительные колонии увеличивали в объеме и замораживали.

1.3. Скрининг и идентификация клона

ELISA использовали для скрининга антител против IL-17A человека из супернатантов культур гибридом. Рекомбинантным IL-17A человека покрывали 96-луночный высокопоглощающий планшет ELISA с карбонатным буферным раствором с pH 9,6, концентрация покрытия составляла 1 мкг/мл, величина покрытия составляла 100 мкл на лунку, и покрытие осуществляли при 4°C в течение ночи. Планшет промывали PBST пять раз, блокировали по 300 мкл/лунку PBST, содержащего 1% BSA, а затем инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. В каждую лунку добавляли 100 мкл образцов супернатанта культуры и контроля положительной сыворотки, соответственно, а затем планшет инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл меченых пероксидазой хрена антител против IgG мыши (Abeam, номер по каталогу Ab7068), разведенных 1:10000 в PBST, содержащем 1% BSA, а затем планшет инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Добавляли 100 мкл/лунку колориметрического субстрата TMB, и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Формирование цвета прекращали путем добавления 100 мкл/лунку 1 М H₂SO₄. Поглощение при 450 нм считывали на устройстве для считывания микропланшетов. Положительные клоны, способные вырабатывать антитела против IL-17A человека, выбирали на основе значения считывания при OD 450 нм.

Являются ли антитела против IL-17A человека, секретируемого положительным клоном, нейтрализующими антителами, определяли посредством клеточных анализов. Образец антител против IL-17A человека разводили в полной среде DMEM (GIBCO, номер по каталогу 11995-073), содержащей 10% FBS

(Nuclease, номер по каталогу SH30084,03). Начальная концентрация антител составляла 160 нм, а итоговая концентрация составляла 40 нм в среде. Антитела подвергали 5-кратному серийному разведению, а затем добавляли в планшеты для клеточных культур, 50 мкл на лунку. 20 нг/мл IL-17A человека (итоговая концентрация 5 нг/мл) разводили такой же полной средой и добавляли в планшеты для клеточных культур по 50 мкл на лунку. Планшеты инкубировали при 37°C в течение 1 ч в инкубаторе с 5% CO₂. Клетки HFF-1 ресуспендировали в полной среде и высевали в 96-луночный планшет для клеточных культур по 100 мкл на лунку, 5000 клеток на лунку. Клетки инкубировали при 37°C в течение 24 ч в инкубаторе с 5% CO₂. После завершения инкубации планшеты для клеточных культур центрифугировали при 250×g в течение 5 мин, и супернатант культуры удаляли, и уровень IL-6 человека определяли с использованием набора ELISA для IL-6 человека (R&D systems, номер по каталогу S6050) согласно инструкциям. Антителами, способными ингибировать стимулированную IL-17A человека секрецию IL-6 человека клетками HFF-1, были нейтрализующие антитела против IL-17A человека. Положительный клон, способный секретировать нейтрализующие антитела против IL-17A человека, выбирали на основе силы нейтрализации.

Результат показан на фиг. 1. Клон № 88 имеет сильную активность связывания IL-17A человека. Согласно показанному на фиг. 2 Клон № 88 также имеет довольно сильную активность нейтрализации IL-17A человека.

1.4. Секвенирование моноклональных антител

Клоны, имеющие как активность связывания антигена, так и активность нейтрализации антигена, полученные посредством скрининга, подвергали секвенированию последовательности ДНК антитела. Клеточную мРНК сперва экстрактировали с использованием набора для очистки RNeasy (Qiagen, DP430). Этапы были следующие: 1×10^7 клеток центрифугировали при 300×g в течение 5 мин и собирали в центрифужную пробирку, и весь супернатант осторожно отсасывали. Немедленно осуществляли этап лизиса. Щелкали по дну центрифужной пробирки для разрыхления клеточного осадка, добавляли 600 мкл лизирующего буфера RL с вихревым перемешиванием. Весь раствор переносили в фильтрующую колонку CS (фильтрующую колонку CS помещали в пробирку-сборник), центрифугировали при 12,000 об/мин (~13,400×g) в течение 2 мин и собирали фильтрат. В фильтрат добавляли однократный объем 70% этанола (обычно 350 мкл или 600 мкл), хорошо перемешивали, полученный раствор и преципитат переносили в адсорбционную колонку CR3 (адсорбционную колонку CR3 помещали в пробирку-сборник), центрифугировали при 12,000 об/мин (~13,400×g) в течение 30-60 с, жидкие отходы в пробирке-сборнике удаляли, адсорбционную колонку CR3 помещали назад в пробирку-сборник. 350 мкл безбелкового раствора RW1 добавляли в адсорбционную колонку CR3, центрифугировали при 12,000 об/мин (~13,400×g) в течение 30-60 с, жидкие отходы в пробирке-сборнике удаляли, адсорбционную колонку CR3 помещали назад в пробирку-сборник. 80 мкл рабочего раствора ДНКазы I добавляли в центр адсорбционной колонки CR3, и обеспечивали отстаивание колонки CR3 при комнатной температуре в течение 15 мин. 350 мкл безбелкового раствора RW1 добавляли в адсорбционную колонку CR3, центрифугировали при 12,000 об/мин (~13,400×g) в течение 30-60 с, жидкие отходы в пробирке-сборнике удаляли, адсорбционную колонку CR3 помещали назад в пробирку-сборник. В адсорбционную колонку CR3 добавляли 500 мкл промывающего раствора RW (проверяли, добавили ли этанол перед использованием), обеспечивали отстаивание колонки CR3 при комнатной температуре в течение 2 мин, центрифугировали при 12,000 об/мин (~13,400×g) в течение 30-60 с, жидкие отходы в пробирке-сборнике удаляли, адсорбционную колонку CR3 помещали назад в пробирку-сборник. Колонку CR3 центрифугировали при 12,000 об/мин (~13,400×g) в течение 2 мин и отходы удаляли. Адсорбционную колонку CR3 оставляли при комнатной температуре в течение нескольких минут, обеспечивая полное высыхание оставшегося промывающего раствора в адсорбирующем материале. Адсорбционную колонку CR3 переносили в новую не содержащую РНКазу центрифужную пробирку 30-100 мкл не содержащей РНКазы ddH₂O добавляли, обеспечивали отстаивание пробирки при комнатной температуре в течение 2 мин, а затем центрифугировали при 12,000 об/мин (~13,400×g) в течение 2 мин для получения раствора РНК.

Синтезировали первую цепь кДНК с использованием набора QuantScript RT (Qiagen, KR103). Этапы состоят в следующем: матричную РНК размораживали на льду; праймер, смесь 10×RT (содержащую RNasin и DTT), смесь сверхчистого dNTP, не содержащую РНКазу ddH₂O размораживали при комнатной температуре (15-25°C), и помещали на лед немедленно после размораживания. Каждый раствор хорошо перемешивали вихревой мешалкой перед использованием, пробирку недолго центрифугировали для сбора остаточной жидкости на стенке пробирки. Смесь системы обратной транскрипции (набор для синтеза первой цепи кДНК Qiagen Bio Quant, номер по каталогу KR103-04; 10× буфер для обратной транскрипции 2 мкл, dNTP высокой очистки 2 мкл, случайный праймер 2 мкл, фермент для обратной транскрипции 1 мкл) получали согласно табл. 1. Смесь тщательно перемешивали, продолжительность вихревого перемешивания не более 5 мин; а затем недолго центрифугировали и помещали на лед. В заключение, в смесь добавляли матричную РНК (от 50 нг до 2 мкг), тщательно перемешивали, продолжительность вихревого перемешивания не более чем 5 с, недолго центрифугировали для сбора остаточной жидкости на стенках пробирки, инкубировали при 37°C в течение 60 мин. Первую цепь кДНК, полученную посредством обратной транскрипции, использовали для последующей реакции ПЦР.

Праймеры, используемые в реакции ПЦР, показаны в табл. 1.

Таблица 1

ПЦР-праймеры	
VH праймер	
F1:	GAGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGACCTAGCCTGGTG
R1:	AGGT (C/G) (A/C) AACTGCAG (C/G) AGTC (A/T) GG
R2:	AGGT (C/G) (A/C) AGCTGCAG (C/G) AGTC (A/T) GG
R3:	AGGT (C/G) CAGCTGCAG (C/G) AGTC (A/T) GG
R4:	CCAGGGGCCAGTGGATAGACAAGCTTGGGTGTCGTTTT
F2:	ATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC
F3:	CTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA
F4:	AGGGGCCAGTGGATAGACTGATGG
F5:	AGGGACCAAGGGATAGACAGATGG
R5:	(G/C) A (A/G) GT (A/T/C/G) (A/C) AGCTG (G/C) AG (G/C) AGTC
R6:	(G/C) A (A/G) GT (A/T/C/G) (A/C) AGCTG (G/C) AG (G/C) AGTC (A/T) GG
VL праймер	
R1:	GGTGATATCGTGAT (A/G) AC (C/A) CA (G/A) GATGAACCTCTC
R2:	GGTGATATC (A/T) TG (A/C) TGACCCAA (A/T) CTCACCTCTC
R3:	GGTGATATCGT (G/T) CTCAC (C/T) CA (A/G) TCTCCAGCAAT
F1:	GGGAAGATGGATCCAGTTGGTGCAGCATCAGC
F2:	GGATACAGTTGGTGCAGCATC
R4:	GA (C/T) ATGTGT (A/C) T (G/C) AC (A/C) CA (A/G) (A/T) CT (A/C) CA

При использовании праймеров любой прямой праймер VH праймеров можно использовать с любым обратным праймером; таким же образом любой прямой праймер VL праймеров также можно использовать с любым обратным праймером. Целевую полосу, полученную посредством ПЦР-амплификации, клонировали в вектор pGEM-T. Для секвенирования ДНК выбрали один клон.

Пример 2. Получение химерных моноклональных антител против IL-17A человека

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей выше упомянутую легкую цепь антитела (полную длину легкой цепи составляла SEQ ID NO: 7, связанная с SEQ ID NO: 9) и тяжелую цепь (полную длину тяжелой цепи составляла SEQ ID NO: 8, связанная с SEQ ID NO: 10), клонировали в эукариотический вектор экспрессии X0GC (причем полноразмерная последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи антитела показана в SEQ ID NO: 23, полноразмерная последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи антитела показана в SEQ ID NO: 24), затем вектор экспрессии трансфецировали в клеточную линию 293F (клетки 293-F Freestyle™, номер по каталогу R79007, invitrogen). Клетки инокулировали за день перед трансфекцией. Клетки собирали посредством центрифугирования в день трансфекции. Клетки ресуспендировали в свежей экспрессионной среде FreeStyle™ 293 (Экспрессионная среда FreeStyle™ 293, номер по каталогу 12338001, Gibco), плотность клеток составляла 200×10^5 клеток/мл. Плазмиду добавляли согласно объему трансфекции, итоговая концентрация составляла 36,67 мкг/мл, осторожно перемешивали; затем добавляли линейный PEI (полиэтиленимин, линейный, молекулярная масса 25000, номер по каталогу 43896, Alfa Aesar), итоговая концентрация составляла 55 мкг/мл, осторожно перемешивали. После этого клетки помещали во встряхиватель при 120 об/мин, и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Затем добавляли 19-кратный объем трансфекции свежей среды. Продолжали инкубировать при 37°C во встряхивателе при 120 об/мин. Супернатант клеточной культуры, трансфецированной в течение 5-6 дней, собирали посредством центрифугирования.

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела, полученная посредством ПЦР-амплификации, показана в SEQ ID NO: 7, а аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела показана в SEQ ID NO: 8. Последовательность определяющей комплементарности области можно получить посредством исключения последовательности каркасной области из последовательности вариабельной области мыши; причем аминокислотные последовательности трех определяющих комплементарности областей CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 легкой цепи показаны в SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно; аминокислотные последовательности трех определяющих комплементарности областей CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 тяжелой цепи показаны в SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно. Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи антитела показана в SEQ ID NO: 9, а аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи антитела показана в SEQ ID NO: 10. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей выше упомянутую легкую цепь антитела (полную длину легкой цепи составляла SEQ ID NO: 7, связанная с SEQ ID NO: 9) и тяжелую цепь (полную длину тяжелой цепи составляла SEQ ID NO: 8, связанная с SEQ ID NO: 10), клонировали в эукариотический вектор экспрессии X0GC (причем полноразмерная последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи антитела показана в SEQ ID NO: 23, полноразмерная последовательность

нуклеиновой кислоты тяжелой цепи антитела показана в SEQ ID NO: 24), затем вектор экспрессии трансфицировали в клеточную линию 293F (Клетки 293-F Freestyle™, номер по каталогу R79007, Invitrogen). Клетки пересеивали за день перед трансфекцией. В день трансфекции клетки собирали посредством центрифугирования, а затем ресуспендировали в свежей экспрессионной среде FreeStyle™ 293 (Экспрессионная среда FreeStyle™ 293, номер по каталогу 12338001, Gibco) с плотностью 200×10^5 клеток/мл. Плазмиды добавляли на основе объема трансфекции до итоговой концентрации 36,67 мкг/мл, осторожно перемешивали; затем добавляли линейный PEI (полиэтиленмин, линейный, молекулярная масса 25000, номер по каталогу 43896, Alfa Aesar) до итоговой концентрации 55 мкг/мл, осторожно перемешивали. После этого клетки помещали во встряхиватель при 120 об/мин и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Затем добавляли 19-кратный объем трансфекции свежей среды, и клетки непрерывно культивировали при 37°C во встряхивателе при 120 об/мин. Супернатант культуры через 5-6 дней после трансфекции собирали посредством центрифугирования.

Пример 3. Кинетика связывания химерных моноклональных антител против IL-17A человека с IL-17A человека

Кинетику связывания химерных моноклональных антител против IL-17A человека с антигеном IL-17A человека определяли с использованием прибора Biacore 3000. В приборе используется технология плазмонного резонанса оптической поверхности для выявления ассоциации и диссоциации между молекулой, соединенной на сенсорном чипе, и аналитом. Использовали чипы CM5 (GE Healthcare, BR-1000-12).

Краткая методика эксперимента состоит в следующем:

IL-17A человека растворяли в натрий-ацетатном буфере (pH 5,0) и соединяли с чипом CM путем инъектирования со скоростью 10 мкл/мин. 1 М этаноламина инъектировали со скоростью 10 мкл/мин для блокирования. В фазе ассоциации разные концентрации химерных моноклональных антител против IL-17A человека и контроль, соответственно, инъектировали со скоростью 30 мкл/мин в течение 180 с, а во время фазы диссоциации, буфер PBS инъектировали со скоростью 30 мкл/мин в течение 600 с. Для восстановления использовали 10 мМ раствора глицина (pH 2,0). Константы скорости ассоциации и константы скорости диссоциации анализировали и рассчитывали с помощью программного обеспечения для управления Biacore 3000. Константу скорости ассоциации, константу скорости диссоциации и константу равновесия при диссоциации химерных антител против IL-17A человека показаны в табл. 2. По сравнению с Секукинумабом mAb против IL-17A человека имеет меньшую константу равновесия при диссоциации, большую аффинность, особенно после связывания с антигеном IL-17A, оно может сохранять состояние связывания в течение более долгого времени, и его не легко диссоциировать, что вносит вклад в его биологические функции.

Таблица 2

Кинетика связывания химерных антител против IL-17A человека с IL-17A человека

Испытываемый образец	K_{on} (1/Мс)	K_{off} (1/с)	K_D (нМ)
Секукинумаб	2,52E+05	7,96E - 05	0,32
Химерные антитела против IL-17A человека	5,41E+04	1,49E - 06	0,03

Пример 4. Видовая специфичность и специфичность связывания химерных моноклональных антител против IL-17A человека

Видовую специфичность химерных моноклональных антител против IL-17A человека определяли посредством ELISA. Рекомбинантным IL-17A человека, IL-17A обезьяны, IL-17A крысы и IL-17A мыши (все куплены у Sino Biological Inc.) покрывали 96-луночный высокопоглощающий планшет ELISA с карбонатным буферным раствором с pH 9,6, концентрация покрытия составляла 1 мкг/мл, величина покрытия составляла 100 мкл на лунку, и покрытие осуществляли при 4°C в течение ночи. Планшет промывали PBST пять раз и блокировали по 300 мкл/лунку PBST, содержащего 1% BSA, а затем инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Добавляли контроль и образец химерных моноклональных антител против IL-17A человека, серийно разведенный в PBST, содержащем 1% BSA, 100 мкл на лунку, инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Затем добавляли меченые пероксидазой хрена антитела против IgG человека (Chemicon, номер по каталогу AP309P), разведенные 1:2000 в PBST, содержащем 1% BSA, 100 мкл на лунку, инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Добавляли 100 мкл/лунку колориметрического субстрата TMB и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Формирование цвета прекращали путем добавления 100 мкл/лунку 1 М H₂SO₄. Поглощение при 450 нм считывали на устройстве для считывания микропланшетов.

Специфичность связывания химерных моноклональных антител против IL-17A человека определяли посредством ELISA. Рекombинантным IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-21, IL-22, IL-23, IFN- γ и TNF α человека (купленные у Sino Biological Inc. или R&D systems) покрывали 96-луночный высокопоглощающий планшет ELISA с карбонатным буферным раствором с pH 9,6, концентрация покрытия составляла 1 мкг/мл, величина покрытия составляла 100 мкл на лунку, и нанесение проводили при 4°C в течение ночи. Планшет промывали PBST пять раз, и блокировали по 300 мкл/лунку PBST, содержащего 1% BSA, и инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Добавляли контроль и образец химерных моноклональных антител против IL-17A человека, разведенный в PBST, содержащем 1% BSA, 100 мкл на лунку, инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Затем добавляли меченые пероксидазой хрена антитела против IgG человека (Chemicon, номер по каталогу AP309P), разведенные 1:2000 в PBST, содержащем 1% BSA, в каждую лунку добавляли 100 мкл, инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Добавляли 100 мкл/лунку колориметрического субстрата TMB и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Формирование цвета прекращали путем добавления 100 мкл/лунку 1 M H₂SO₄. Поглощение при 450 нм считывали на устройстве для считывания микропланшетов.

Специфичность связывания химерных моноклональных антител против IL-17A человека определяли посредством ELISA. Рекombинантным IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-21, IL-22, IL-23, IFN- γ и TNF α человека (купленные у Sino Biological Inc. или R&D systems) покрывали 96-луночный высокопоглощающий планшет ELISA с карбонатным буферным раствором с pH 9,6, концентрация покрытия составляла 1 мкг/мл, величина покрытия составляла 100 мкл на лунку, и нанесение проводили при 4°C в течение ночи. Промывали пять раз PBST. Блокировали по 300 мкл/лунку PBST, содержащего 1% BSA, и инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Промывали пять раз PBST. Добавляли контроль и образец химерных моноклональных антител против IL-17A человека, разведенные в PBST, содержащем 1% BSA, в каждую лунку добавляли 100 мкл, инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Промывали пять раз PBST. Затем добавляли меченые пероксидазой хрена антитела против IgG человека (Chemicon, номер по каталогу AP309P), разведенные 1:2000 в PBST, содержащем 1% BSA, в каждую лунку добавляли 100 мкл, инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Промывали пять раз PBST. Добавляли 100 мкл/лунку колориметрического субстрата TMB, выдержанного при комнатной температуре в течение 10 мин. Формирование цвета прекращали путем добавления 100 мкл/лунку 1 M H₂SO₄. Поглощение при 450 нм считывали на устройстве для считывания микропланшетов.

Результат показан на фиг. 3. Химерные моноклональные антитела против IL-17A человека связались с IL-17A человека и обезьяны, но не с IL-17A крысы или мыши, показывая, что антитела были видоспецифичными. Кроме того, как показано на фиг. 4, химерные моноклональные антитела против IL-17A человека также имеют сильную специфичность связывания, причем связываются только с IL-17A, но не с другими цитокинами семейства IL-17 или неродственными цитокинами.

Пример 5. Нейтрализующая активность химерных моноклональных антител против IL-17A человека *in vitro*

Образец антител против IL-17A человека разводили в полной среде DMEM (GIBCO, номер по каталогу 11995-073), содержащей 10% FBS (Hyclone, номер по каталогу SH30084,03). Начальная концентрация антител составляла 160 нм, а итоговая концентрация составляла 40 нм в среде. Антитела подвергали 5-кратному серийному разведению, а затем добавляли в планшет для клеточных культур, 50 мкл на лунку. 20 нг/мл IL-17A человека (итоговая концентрация 5 нг/мл) разводили такой же полной средой и добавляли в планшет для клеточных культур по 50 мкл на лунку. Планшет инкубировали при 37°C в течение 1 ч в инкубаторе с 5% CO₂. Клетки HFF-1 ресуспендировали в полной среде и высевали в 96-луночный планшет для клеточных культур по 100 мкл на лунку, 5000 клеток на лунку. Клетки инкубировали при 37°C в течение 24 ч в инкубаторе с 5% CO₂. После завершения инкубации планшет для клеточных культур центрифугировали при 250×g в течение 5 мин и супернатант культуры удаляли, и уровень IL-6 человека определяли с использованием набора ELISA для IL-6 человека (R&D systems, номер по каталогу S6050) согласно инструкциям.

Результат показан на фиг. 5. По сравнению с Секукинумабом химерные моноклональные антитела против IL-17A человека имеют большую IL-17A нейтрализующую активность *in vitro* и более хорошее действие на ингибирование стимулированной IL-17A человека секреции IL-6 человека клетками HFF-1.

Пример 6. Нейтрализующая активность химерных моноклональных антител против IL-17A человека *in vivo*

В качестве экспериментальных животных использовали самок мышей BALB/c 6-8 недельного возраста, купленных у Beijing Huafukang Biotechnology Co. Ltd. Через одну неделю после акклиматизации мышей к окружающим условиям мышей случайным образом делили на группы, по 6 в группу. Каждой группе давали химерные моноклональные антитела против IL-17A человека или контрольные моноклональные антитела, Секукинумаб, по три дозы по 0,7 нмоль/кг, 7 нмоль/кг или 70 нмоль/кг, внутривенная инъекция, одно введение. Через один час после введения подкожно инъецировали IL-17A человека, 10 мкг на мыш. Через 2 ч брали образец крови из ретроорбитального синуса без антикоагуляции и обеспе-

чивали отстаивание образца крови при комнатной температуре в течение от 30 мин до 1 ч. После коагуляции крови образец центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин для получения образца сыворотки. Концентрацию CXCL1 мыши (Хемокин С-Х-С Мотив-Лиганда, также известного как KC) в сыворотке определяли согласно инструкциям с использованием набор ELISA для CXCL1 мыши (RayBiotech, номер по каталогу ELM-KC).

Результат показан на фиг. 6. Химерные моноклональные антитела против IL-17A человека ингибировали секрецию CXCL1 у стимулированных IL-17A человека мышей, показывая большую активность, чем контрольные моноклональные антитела Секукинумаб.

Пример 7. Фармакокинетическое исследование химерных моноклональных антител против IL-17A человека у крыс

В качестве экспериментальных животных использовали самок крыс SD, 6-8 недельного возраста, купленных у Beijing Huafukang Biotechnology Co. Ltd. Через одну неделю после акклиматизации крыс к окружающим условиям крыс случайным образом делили на группы, 3 крысы в группу. Вводили химерные моноклональные антитела против IL-17A человека и контрольные моноклональные антитела Секукинумаб, соответственно, в дозе 20 нмоль/кг посредством единственной дозы внутривенной инъекции. Через 0, 5, 30 мин, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 216, 264, 312 ч после введения брали образец крови из ретроорбитального синуса без антикоагуляции и обеспечивали отстаивание образца крови при комнатной температуре в течение от 30 мин до 1 ч; после коагуляции образец крови центрифугировали при 3,000 об/мин в течение 10 мин, полученный образец сыворотки замораживали при -80°C и сохраняли для тестирования.

Концентрации химерных моноклональных антител против IL-17A человека и контрольных моноклональных антител Секукинумаб в сыворотке определяли посредством ELISA. Кратко, рекомбинантным белком IL-17A человека покрывали высокопоглощающий планшет ELISA с карбонатным буферным раствором с pH 9,6 при 4°C в течение ночи. Планшет промывали PBST. Для предотвращения неспецифического связывания планшет блокировали PBST, содержащим 5% порошок обезжиренного молока, а затем промывали PBST. Затем образец тестируемой сыворотки разводили PBST, содержащим 10% перемешанной крысиной сыворотки, добавляли 1% BSA и инкубировали при 25°C в течение 1 ч, и планшет промывали PBST. Добавляли меченые пероксидазой хрена антитела против IgG человека (Chemicon, номер по каталогу AP309P), разведенные в PBST, содержащем 5% сухое обезжиренное молоко, инкубировали при 25°C в течение 1 ч, затем планшет промывали PBST. В заключение, формирование цвета осуществляли с использованием колориметрического субстрата ТМВ при комнатной температуре в течение 10 мин. Формирование цвета прекращали путем добавления 100 мкл/лунку 1 М H₂SO₄. Поглощение при 450 нм считывали на устройстве для считывания микропланшетов.

Результат показан на фиг. 7. Единственная доза внутривенной инъекции 20 нмоль/кг химерных моноклональных антител против IL-17A человека или контрольных моноклональных антител Секукинумаб демонстрировала похожие кривые концентрация-время и фармакокинетические признаки у крыс. Фармакологические параметры химерных моноклональных антител против IL-17A человека состоят в следующем: период полувыведения $t_{1/2}$ составлял 458 ч; площадь под кривой концентрация-время AUC_{last} составляла 44,286 нМ·ч; оцениваемая первоначальная концентрация C₀ составляла 413 нМ; кажущийся объем распределения Vd составлял 115 мл/кг, скорость клиренса CL составляла 0,17 мл/ч/кг; среднее время удержания MRT_{last} составляла 140 ч.

Пример 8. Получение гуманизированных моноклональных антител против IL-17A человека

Гуманизированную форму антител против IL-17 получали по методу Leung et al. (1995, Molecule Immunol 32: 1413-27).

Гуманизированную матрицу, которая лучше всего соответствует мышинной не CDR области, выбрали из базы данных Germline. Матрицей для вариабельной области тяжелой цепи была IGVH4-59*01, и последовательность показана в SEQ ID NO: 35. Матрицей для вариабельной области легкой цепи была IGKV2-30*02, и последовательность показана в SEQ ID NO: 36. CDR область мышинного антитела трансплантировали на выбранную гуманизированную матрицу, заменяя CDR область матрицы человека. Полученная трансплантированная вариабельная область тяжелой цепи гуманизированного антитела имеет последовательность, показанную в SEQ ID NO: 37, а трансплантированная вариабельная область легкой цепи гуманизированного антитела имеет последовательность, показанную в SEQ ID NO: 38. Девять позиций, выбранных посредством выравнивания последовательностей, подвергали обратным мутациям, включая 4 позиции на тяжелых цепях: L4V, I49M, V68I, V72R, и 5 позиций на легких цепях: D1I, V2I, F41Y, R51L, Y92F. Разные гуманизированные последовательности конструировали путем уменьшения числа обратных мутаций, а в табл. 3 показаны последовательности тяжелой цепи и последовательности вариабельной области легкой цепи. Вариабельную область тяжелой цепи (SEQ ID NO: 27-34) гуманизированных моноклональных антител против IL-17A человека связывают с константной областью тяжелой цепи (SEQ ID NO: 10) антитела против IgG1 человека для получения соответствующей полноразмерной последовательности тяжелой цепи. Вариабельную область легкой цепи (SEQ ID NO: 19-26) гуманизированных моноклональных антител против IL-17A человека связывают с константной областью легкой цепи (SEQ ID NO: 9) антитела против каппа цепи человека для получения соответствующей полнораз-

мерной последовательности легкой цепи. Полноразмерную последовательность тяжелой цепи объединили с полноразмерной последовательностью легкой цепи для получения полноразмерной последовательности гуманизированных антител. Полноразмерную последовательность расщепляли с помощью EcoRI и HindIII, а затем вставляли в вектор X0GC.

Таблица 3
Последовательности вариабельной области тяжелой цепи
и вариабельной области легкой цепи гуманизированных
антител против IL-17A человека

VH	SEQ ID NO:
Трансплантировано	27
BM	28
AS15799	29
AS15802	30
AS15803	31
AS15805/ AS15815	32
AS15810	33
AS15820	34
VL	SEQ ID NO:
Трансплантировано	19
BM	20
AS15799	21
AS15802/AS15803	22
AS15805	23
AS15810	24
AS15815	25
AS15820	26

Пример 9. Активность связывания антигена гуманизированных моноклональных антител против IL-17A человека

Активность связывания антигена гуманизированных моноклональных антител против IL-17A человека определяли посредством ELISA. Рекомбинантным IL-17A человека (купленный у Sino Biological Inc.) покрывали 96-луночный высокопоглощающий планшет ELISA с карбонатным буферным раствором с pH 9,6, концентрация покрытия составляла 1 мкг/мл, величина покрытия составляла 100 мкл на лунку, и нанесение проводили при 4°C в течение ночи. Планшет промывали PBST пять раз, блокировали по 300 мкл/лунку PBST, содержащего 1% BSA, и инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Добавляли контроль и образец химерных моноклональных антител против IL-17A человека, разведенный в PBST, содержащем 1% BSA, 100 мкл на лунку, инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Затем добавляли меченые пероксидазой хрена антитела против IgG человека (Chemicon, номер по каталогу AP309P), разведенные 1:2000 в PBST, содержащем 1% BSA, в каждую лунку добавляли 100 мкл, инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Планшет промывали PBST пять раз. Добавляли 100 мкл/лунку колориметрического субстрата TMB и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Формирование цвета прекращали путем добавления 100 мкл/лунку 1 M H₂SO₄. Поглощение при 450 нм считывали на устройстве для считывания микропланшетов.

Результат показан на фиг. 8. Все гуманизированные моноклональные антитела против IL-17A человека AS15799, AS15802, AS15803, AS15805, AS15810, AS15815 и AS15820 могли связываться IL-17A человека с высокой активностью аффинности.

Пример 10. Нейтрализующая активность гуманизированных моноклональных антител против IL-17A человека *in vitro*

Образец антител против IL-17A человека разводили в полной среде DMEM (GIBCO, номер по каталогу 11995-073), содержащей 10% FBS (Hyclone, номер по каталогу SH30084,03). Начальная концентрация антител составляла 160 нм, а итоговая концентрация составляла 40 нм в среде. Антитела подвергали 5-кратному серийному разведению, а затем добавляли в планшет для клеточных культур, 50 мкл на лунку. 20 нг/мл IL-17A человека (итоговая концентрация 5 нг/мл) разводили такой же полной средой и добавляли в планшет для клеточных культур по 50 мкл на лунку. Планшет инкубировали при 37°C в течение 1 ч в инкубаторе с 5% CO₂. Клетки HFF-1 ресуспендировали в полной среде и высевали в 96-луночный планшет для клеточных культур по 100 мкл на лунку, 5000 клеток на лунку. Клетки инкубиро-

вали при 37°C в течение 24 ч в инкубаторе с 5% CO₂. После завершения инкубации планшет для клеточных культур центрифугировали при 250×g в течение 5 мин, супернатант культуры удаляли и уровень IL-6 человека определяли с использованием набора ELISA для IL-6 человека (R&D systems, номер по каталогу S6050) согласно инструкциям.

Результат показан на фиг. 9. По сравнению с Секукинумабом гуманизированные моноклональные антитела против IL-17A человека AS15799, AS15802, AS15803, AS15805, AS15810, AS15815 и AS15820 имеют большей IL-17A нейтрализующую активность и большее действие на ингибирование стимулированной IL-17A человека секреции IL-6 человека клетками HFF-1 in vitro.

Пример 11. Определение чистоты и термостабильности гуманизированных моноклональных антител против IL-17A человека посредством эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC)

Использовали колонку для хроматографии TSKgel SuperSW3000 (Номер по каталогу: 0018675). Подвижная фаза составляла 0,1 моль/л фосфатного буфера (NaH₂PO₄-Na₂HPO₄), 0,1 моль/л сульфатно-натриевого буфера, pH 6,7; скорость потока составляла 0,35 мл/мин; температура колонки составляла 25°C; температура пула образцов составляла 4°C; длина волны детектирования составляла 280 нм. Образец разводили буфером для образца до 1 мг/мл, а объем инъекции составлял 5 мкл. Результат эксперимента обрабатывали с помощью рабочей станции системы 1260 высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent, и чистоту рассчитывали по процентному значению главного пика с использованием метода нормализации площадей. Гуманизированные моноклональные антитела против IL-17A человека, полученные выше, подвергали анализу чистоты SE-HPLC. Для определения термостабильности этих моноклональных антител образцы помещали в условия высокой температуры, составляющей 40°C и образцы подвергали анализу SE-HPLC на 2 неделе и 4 неделе, соответственно, для наблюдения за термостабильностью, и результат показан в табл. 4 ниже. Все гуманизированные антитела против IL-17A человека демонстрировали хорошую и значительную стабильность.

Таблица 4

Термостабильность гуманизированных моноклональных антител против IL-17A человека при 40°C по SE-HPLC

Гуманизированные антитела против IL-17A человека	Моноклональные Чистота SE-HPLC		
	T=0	2	4
		Неделя	Неделя
AS15802	99,9%	98,5	97,3
AS15803	99,9%	98,3	96,9
AS15810	98,0%	96,9	95,9
AS15815	98,1%	97,2	96,5
AS15820	96,5%	95,7	94,5

Пример 12. Определение значения T_m гуманизированных моноклональных антител против IL-17A человека

Температуру плавления (T_m) гуманизированных моноклональных антител против IL-17A человека определяли посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF). DSF представляет собой способ обнаружения процесса термической денатурации белков в образце за счет использования изменения интенсивности флуоресценции флуоресцентного индикатора для определения температуры денатурации белка. Использовали реагент Оранжевый флуоресцентный краситель белка SYPRO (Sigma-Aldrich, USA, номер по каталогу S5692; 5000× концентрация, в DMSO). Машину для ПЦР в реальном времени AB 7500 купали у Applied BioSystems, Inc. USA. Флуоресцентный краситель белка разводили 1:50 буфером для образца и 1 мкл разведенного красителя перемешивали с 19 мкл раствора белка, так что итоговое разведение флуоресцентного красителя составляло 1:1000. Разведенный флуоресцентный краситель добавляли в 96-луночный планшет и для каждого образца определяли три параллельных лунки. Планшет герметично закрывали оптической уплотняющей пленкой, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 2 мин для удаления пузырьков воздуха. Программу RT-PCR задавали следующим образом: кривую плавления устанавливали в непрерывном режиме, диапазон температуры сканирования составлял 25-99°C, скорость нагрева составляла 1% (приблизительно 1°C/мин), а затем 25°C в течение 2 мин. Данные собирали во время нагрева, репортерную группу устанавливали как "ROX", группу гашения устанавливали как "None", а объем реакции составлял 20 мкл. Концентрация образца составляла 1 мг/мл, а эталонным раствором был буфер для образца. Кривые флуоресценции и первое производное наносили на график с использованием программного обеспечения Protein Thermal Shift™ программное обеспечение v1.3. В тесте DSF среднюю температуру первого перехода белка обычно считают температурой денатурации термостабильности белка. Значения T_m гуманизированных моноклональных антител против IL-17A человека измеряли, и результат показан в табл. 5 ниже. Все гуманизированные моноклональные антитела против IL-17A человека имеют довольно хорошее значение T_m.

Таблица 5

Значение T_m гуманизированных моноклональных антител против IL-17A человека

Гуманизированные Моноклональные антитела против IL-17A человека	T_m Значение
AS15802	67, 2°C
AS15803	68, 3°C
AS15810	67, 9°C
AS15815	69, 3°C
AS15820	67, 7°C

Пример 13. Определение заряженных изомеров гуманизированных моноклональных антител против IL-17A человека посредством катионообменной хроматографии (CEX)

Использовали катионообменную колонку для хроматографии MabPac SCX-10, 4 мм × 250 мм (Номер по каталогу: 78655). В качестве подвижной фазы А использовали 20 ммоль/л 2-(N-морфолин) этансульфоновой кислоты (MES) (pH 5,6) и 60 ммоль/л хлорида натрия; в качестве подвижной фазы В использовали 20 ммоль/л MES (pH 5,6) и 300 ммоль/л хлорида натрия. Скорость потока составляла 0,5 мл/мин; температура колонки составляла 25°C; температура пула образцов составляла 4°C; длина волны детектирования составляла 280 нМ; объем загружаемого образца составлял 50 мкл (1 мг/мл); элюирование осуществляли в линейном градиенте от 5 до 50% в течение 60 мин. Результат эксперимента обрабатывали с помощью рабочей станции системы 1260 высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent, и процентное значение площади пика рассчитывали методом нормализации площадей. Гуманизированные моноклональные антитела против IL-17A человека подвергали определению CEX. Для определения химической стабильности этих моноклональных антител указанные выше образцы помещали в условия высокой температуры, составляющей 40°C, и образцы вынимали на 2 неделе и 4 неделе, соответственно, для определения CEX, и смотрели изменения доли заряженных вариантов. Результат показан в табл. 6. Все гуманизированные антитела против IL-17A человека имеют относительно низкую долю заряженных вариантов.

Таблица 6

Изменения заряженных вариантов гуманизированных моноклональных антител против IL-17A человека при 40°C посредством CEX

	Изменения заряженных вариантов					
	T=0			2 Неделя		
AS15802	64, 9	15, 5	19, 6	53, 5	32, 7	13, 8
AS15803	61, 8	17, 5	20, 7	51, 7	37, 5	10, 8
AS15810	59, 7	14	26, 3	49, 9	36, 7	13, 5
AS15815	60, 3	14, 4	25, 3	47	40, 4	12, 6
AS15820	58, 7	16, 6	24, 7	49, 1	35, 6	15, 3

Пример 14. Стабильность гуманизированных моноклональных антител против IL-17A человека в условиях низкого pH для инактивации вирусов

200 мкг тестируемого образца регулировали до pH $3,4 \pm 0,05$ с помощью 1 моль/л маточного раствора лимонной кислоты, и итоговая концентрация образца составляла 1 мг/мл. Образец оставляли при комнатной температуре и замеряли через 0, 1, 2, 4 и 6 ч, соответственно, и pH регулировали до 7,5 с помощью 2 моль/л маточного раствора Tris-HCl pH 9,5. Образцы анализировали посредством указанного выше метода SEC, и результат показан в табл. 7. Гуманизированные антитела против IL-17A человека могли переносить условия низкого pH для инактивации вируса в течение по меньшей мере 6 ч, показывая хорошую стабильность.

Таблица 7

Стабильность гуманизированных моноклональных антител против IL-17A человека в условиях низкого pH, определенная посредством SE-HPLC

Гуманизированные Моноклональные антитела против IL-17A человека	Чистота SE-HPLC				
	T=0	1-й Час	2-й Час	4-й Час	6-й Час
AS15802	99,9%	99,8	99,9	99,9	99,8
AS15803	99,9%	99,8	99,8	99,9	99,9
AS15810	98,0%	98,1	98,1	98,0	98,2
AS15815	98,1%	98,4	98,3	98,3	98,5
AS15820	96,5%	96,4	96,4	96,5	96,7

Пример 15 Фармакокинетическое исследование гуманизированных моноклональных антител против IL-17A человека у крыс

В качестве экспериментальных животных использовали самок крыс SD 6-8 недельного возраста, купленных у Beijing Huafukang Biotechnology Co. Ltd. Через одну неделю после акклиматизации крыс к окружающим условиям крыс случайным образом делили на группы, по 3 крысы в группу. Химерные моноклональные антитела против IL-17A человека и контроль антитела вводили, соответственно, в дозе 15 нмоль/кг посредством подкожной инъекции, единственное введение. Через 0, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 216, 264, 312, 360, 408 и 480 ч после введения брали образец крови из ретроорбитального синуса без антикоагуляции и обеспечивали отстаивание образца крови при комнатной температуре в течение от 30 мин до 1 ч; после коагуляции образец крови центрифугировали при 3,000 об/мин в течение 10 мин, полученный образец сыворотки замораживали при -80°C и сохраняли для тестирования.

Концентрации химерных моноклональных антител против IL-17A человека и контроль антитела в сыворотке определяли посредством ELISA. Кратко, рекомбинантным белком IL-17A человека покрывали высокопоглощающий планшет ELISA с карбонатным буферным раствором с pH 9,6 при 4°C в течение ночи. Планшет промывали PBST. Для предотвращения неспецифического связывания планшет блокировали PBST, содержащим 5% порошок обезжиренного молока, а затем промывали PBST. Затем образец тестируемой сыворотки развели PBST, содержащим 10% перемешанную крысиную сыворотку, добавляли 1% BSA, инкубировали при 25°C в течение 1 ч и планшет промывали PBST. Добавляли меченые пероксидазой хрена антитела против IgG человека (Chemicon, номер по каталогу AP309P), разведенные в PBST, содержащем 5% сухое обезжиренное молоко, инкубировали при 25°C в течение 1 ч, затем планшет промывали PBST. В заключение, формирование цвета осуществляли с использованием колориметрического субстрата TMB при комнатной температуре в течение 10 мин. Формирование цвета прекращали путем добавления 100 мкл/лунку 1 М H₂SO₄. Поглощение при 450 нм считывали на устройстве для считывания микропланшетов.

Результат показан на фиг. 10. Единственная подкожная инъекция 15 нмоль/кг разных гуманизированных моноклональных антител против IL-17A человека, контрольных моноклональных антител Секукинумаб и контрольных моноклональных антител Иксекизумаб демонстрировали похожие кривые концентрация-время и фармакокинетические признаки *in vivo*.

В заключение, должно быть понятно, что приведенные выше варианты осуществления необходимо использовать только для представления технического решения настоящего раскрытия вместо его ограничения; хотя настоящее раскрытие было подробно описано со ссылкой на вышеизложенные варианты осуществления, рядовым специалистам в данной области должно быть понятно, что технические решения, описанные в вышеизложенных вариантах осуществления, можно модифицировать, или некоторые или все технические признаки можно равноценно заменить; и модификации или замены, однако, не будут выводить суть соответствующих технических решений за рамки технических решений вариантов осуществления настоящего раскрытия.

Промышленная применимость

Антитело и его функциональный фрагмент, предоставленные в настоящем раскрытии, могут специфически связываться с IL-17A, и их можно использовать для предотвращения и/или лечения заболевания, связанного со сверхэкспрессией и/или избыточным высвобождением IL-17A, например воспаления дыхательных путей, астмы, бронхиальной астмы, аллергической астмы, хронического обструктивного заболевания легких, идиопатического легочного фиброза, ревматоидного артрита, остеоартрита, анкилозирующего спондилоартрита, псориатического артрита, псориаза, рассеянного склероза, системного склероза, системной красной волчанки, люпус-нефрита, склеродермии, язвенного колита, воспалительного заболевания кишечника, увеита, *Helicobacter pylori*-ассоциированного гастрита, остеопороза, эрозии костей, внутрибрюшинного абсцесса и спаек, болезни Аддисона, дефицита гамма-глобулина, гнездной алопеции, целиакии, болезни Чагаса, болезни Крона, отторжения аллотрансплантата, болезни Бехчета,

сепсиса, септического или эндотоксического шока и ишемии.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его функциональный фрагмент, способные специфически связываться с IL-17A, причем антитело или его функциональный фрагмент содержат легкую цепь и тяжелую цепь;
легкая цепь содержит CDR легкой цепи, состоящую из CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3;
тяжелая цепь содержит CDR тяжелой цепи, состоящую из CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3;
аминокислотные последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 1, 2 и 3;

аминокислотные последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 4, 5 и 6.

2. Антитело или его функциональный фрагмент по п.1, которые представляют собой химерное антитело против IL-17A или его функциональный фрагмент, или гуманизированное антитело против IL-17A или его функциональный фрагмент.

3. Антитело или его функциональный фрагмент по п.1 или 2, причем антитело содержит любую последовательность константной области, выбранную из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE и IgD человека.

4. Антитело или его функциональный фрагмент по любому из пп.1-3, причем функциональный фрагмент содержит одно или более, выбранное из группы, состоящей из F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, scFv, биспецифического антитела и минимальной распознающей единицы антитела.

5. Антитело или его функциональный фрагмент по п.2, в котором аминокислотные последовательности вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи химерного антитела против IL-17A или его функционального фрагмента, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8.

6. Антитело или его функциональный фрагмент по п.5, где аминокислотная последовательность константной области легкой цепи и константной области тяжелой цепи химерного антитела против IL-17A и его функционального фрагмента, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

7. Антитело или его функциональный фрагмент по п.2, в котором каркасная область легкой цепи гуманизированного антитела против IL-17A или его функционального фрагмента включает FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4, а каркасная область тяжелой цепи гуманизированного антитела против IL-17A или его функционального фрагмента включает FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4;

FR-L1 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 11, и аминокислотной последовательности, имеющей следующие замещения или их комбинации:

1-я аминокислота D заменена на I;

2-я аминокислота V заменена на I;

FR-L2 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 12, и аминокислотной последовательности, имеющей следующие замещения или их комбинации:

4-я аминокислота F заменена на Y;

14-я аминокислота R заменена на L;

FR-L3 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 13, и аминокислотной последовательности, имеющей следующие замещения или их комбинации:

35-я аминокислота Y заменена на F;

FR-L4 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 14;

FR-H1 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 15, и аминокислотной последовательности, имеющей следующие замещения или их комбинации:

4-я аминокислота L заменена на V;

FR-H2 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 16, и аминокислотной последовательности, имеющей следующие замещения или их комбинации:

15-я аминокислота I заменена на M;

FR-H3 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 17, и аминокислотной последовательности, имеющей следующие замещения или их комбинации:

2-я аминокислота V заменена на I;

6-я аминокислота V заменена на R;

FR-H4 выбирают из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 18.

8. Антитело или его функциональный фрагмент по п.7, где последовательностью вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела против IL-17A или его функционального фрагмента является последовательность, выбранная из SEQ ID NO: 19-26.

9. Антитело или его функциональный фрагмент по п.7, где последовательностью вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела против IL-17A или его функционального фрагмента является последовательность, выбранная из SEQ ID NO: 27-34.

10. Антитело или его функциональный фрагмент по п.7, где:

(а) последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела против IL-17A или его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 19; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 27;

(b) последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела против IL-17A или его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 20; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 28;

(с) последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела против IL-17A или его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 21; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 29;

(d) последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела против IL-17A или его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 22; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 30;

(е) последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела против IL-17A или его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 22; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 31;

(f) последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела против IL-17A или его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 23; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 32;

(g) последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела против IL-17A или его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 24; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 33;

(h) последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела против IL-17A или его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 25; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 32 или

(i) последовательность вариабельной области легкой цепи гуманизированного антитела против IL-17A или его функционального фрагмента показана в SEQ ID NO: 26; соответствующая последовательность вариабельной области тяжелой цепи показана в SEQ ID NO: 34.

11. Антитело или его функциональный фрагмент по п.7, где аминокислотные последовательности константной области легкой цепи и константной области тяжелой цепи гуманизированного антитела против IL-17A или его функционального фрагмента, соответственно, показаны в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

12. Композиция для предотвращения или лечения заболевания, связанного со сверхэкспрессией и/или избыточным высвобождением IL-17A, содержащая антитело или его функциональный фрагмент по любому из пп.1-11 и фармацевтически приемлемый носитель.

13. Конъюгат, содержащий антитело или его функциональный фрагмент по любому из пп.1-11 и по меньшей мере одно терапевтическое средство, где указанное терапевтическое средство связано с указанным антителом.

14. Конъюгат по п.13, в котором терапевтическим средством является одно или более, выбранное из группы, состоящей из голого антитела, цитотоксического средства, лекарственного препарата, радионуклида, атома бора, иммуномодулятора, антиапоптотического средства, фотосенсибилизирующего терапевтического средства, иммуноконъюгата и олигонуклеотида.

15. Конъюгат по п.14, где лекарственным препаратом является одно или более, выбранное из группы, состоящей из дексаметазона, диклофенака, набуметона, мелоксикама, целекоксиба, метотрексата, циклофосамида, азатиоприна, циклоспорина А и винкристина.

16. Конъюгат по п.14, где олигонуклеотидом является одно или более, выбранное из группы, состоящей из shRNA, miRNA и siRNA.

17. Конъюгат по п.14, где иммуномодулятором является одно или более, выбранное из группы, состоящей из цитокина, хемокина, фактора роста стволовых клеток, лимфотоксина, гематопоезического фактора, колониестимулирующего фактора (CSF), интерферона, эритропоэтина, тромбопоэтина, интерлейкина (IL), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и фактора роста стволовых клеток.

18. Конъюгат по п.14, где радионуклидом является одно или более, выбранное из группы, состоящей из ¹¹¹In, ¹¹¹At, ¹⁷⁷Lu, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²¹¹At, ⁶²Cu, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹³³I, ³²P, ³³P, ⁴⁷Sc, ¹¹¹Ag, ⁶⁷Ga, ¹⁵³Sm, ¹⁶¹Tb, ¹⁵²Dy, ¹⁶⁶Dy, ¹⁶¹Ho, ¹⁶⁶Ho, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁹Re, ²¹¹Pb, ²¹²Pb, ²²³Ra, ²²⁵Ac, ⁷⁷As, ⁸⁹Sr, ⁹⁹Mo, ¹⁰⁵Rh, ¹⁴⁹Pm, ¹⁶⁹Er, ¹⁹⁴Ir, ⁵⁸Co, ⁸⁰mBr, ⁹⁹mTc, ¹⁰³mRh, ¹⁰⁹Pt, ¹¹⁹Sb, ¹⁸⁹mOs, ¹⁹²Ir, ²¹⁹Rn, ²¹⁵Po, ²²¹Fr, ²⁵⁵Fm, ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ⁷⁵Br, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au, ²²⁴Ac, ⁷⁷Br, ¹¹³mIn, ⁹⁷Ru, ¹⁰³Ru, ¹⁰⁵Ru, ¹⁰⁷Hg, ²⁰³Hg, ¹²¹mTe, ¹²²mTe, ¹²⁵mTe, ¹⁶⁵Tm, ¹⁶⁷Tm, ¹⁶⁸Tm, ¹⁹⁷Pt, ¹⁰⁹Pd, ¹⁴²Pr, ¹⁴³Pr, ¹⁶¹Tb, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵¹Cr, ⁵⁹Fe, ⁷⁵Se, ²⁰¹Tl, ⁷⁶Br и ¹⁶⁹Yb.

19. Применение композиции по п.12 для изготовления лекарства для предотвращения или лечения заболевания, связанного со сверхэкспрессией и/или избыточным высвобождением IL-17A.

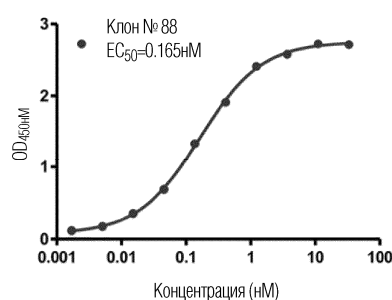
20. Применение конъюгата по любому из пп.13-18 для изготовления лекарства для предотвращения или лечения заболевания, связанного со сверхэкспрессией и/или избыточным высвобождением IL-17A.

21. Применение антитела, способного специфически связываться с IL-17A, или его функционально-

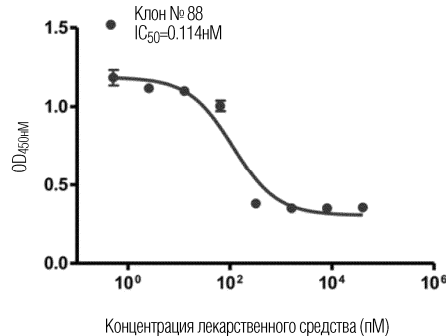
го фрагмента, способного специфически связываться с IL-17A, по любому из пп.1-11 для изготовления лекарства для предотвращения или лечения заболевания, связанного со сверхэкспрессией и/или избыточным высвобождением IL-17A.

22. Применение по п.21, где заболеванием является одно или более, выбранное из группы, состоящей из воспаления дыхательных путей, астмы, бронхиальной астмы, аллергической астмы, хронического обструктивного заболевания легких, идиопатического легочного фиброза, ревматоидного артрита, остеоартрита, анкилозирующего спондилоартрита, псориатического артрита, псориаза, рассеянного склероза, системного склероза, системной красной волчанки, люпус-нефрита, склеродермии, язвенного колита, воспалительного заболевания кишечника, увеита, *Helicobacter pylori*-ассоциированного гастрита, остеопороза, эрозии костей, внутрибрюшинного абсцесса и спаек, болезни Аддисона, дефицита гамма-глобулина, гнездной алопеции, целиакии, болезни Чагаса, болезни Крона, отторжения аллотрансплантата, болезни Бехчета, сепсиса, септического или эндотоксического шока и ишемии.

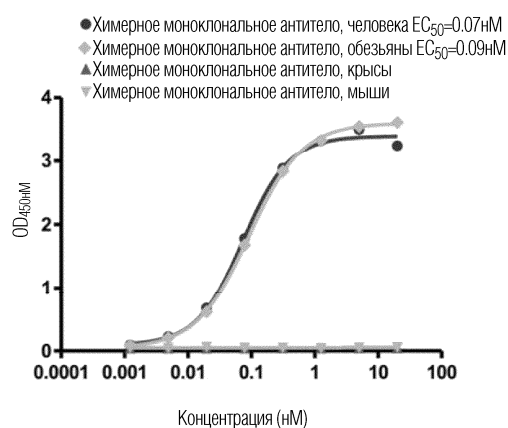
23. Способ предотвращения или лечения заболевания, связанного со сверхэкспрессией и/или избыточным высвобождением IL-17A, включающий введение антитела или его функционального фрагмента по любому из пп.1-11 нуждающемуся в нем пациенту.



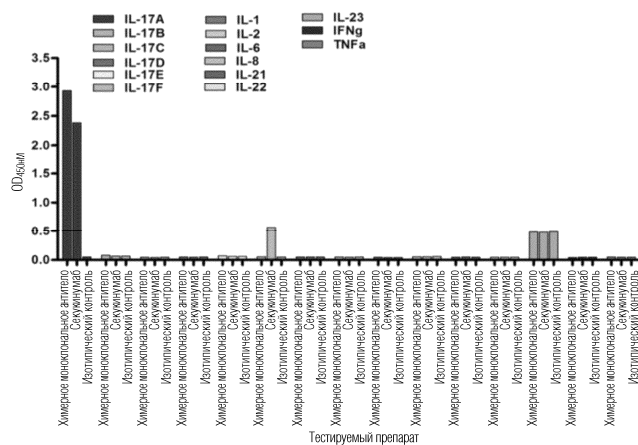
Фиг. 1



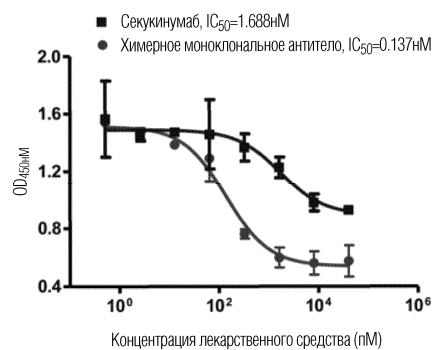
Фиг. 2



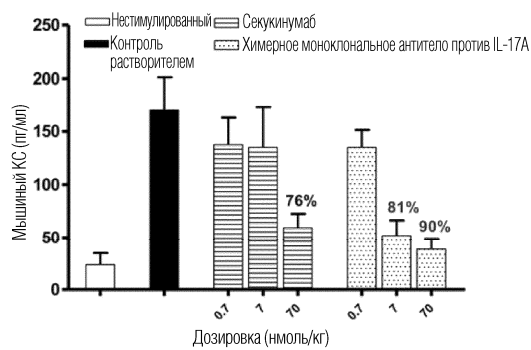
Фиг. 3



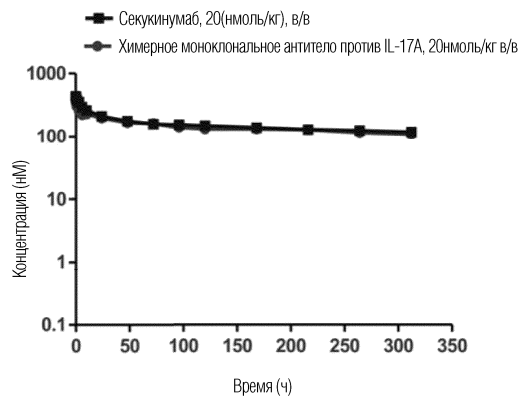
Фиг. 4



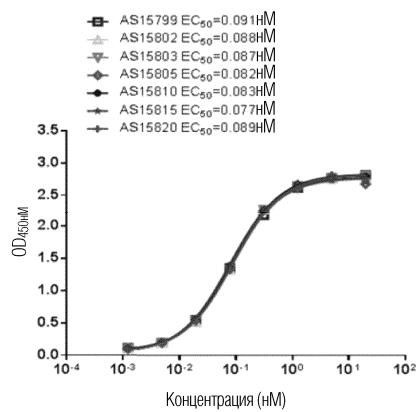
Фиг. 5



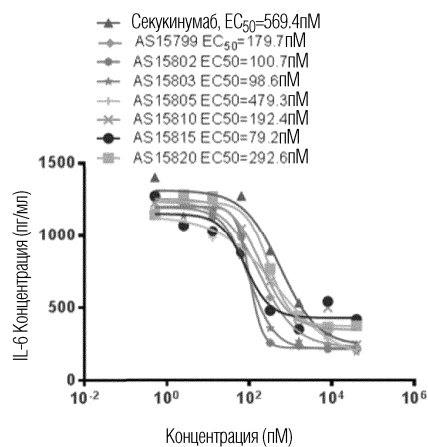
Фиг. 6



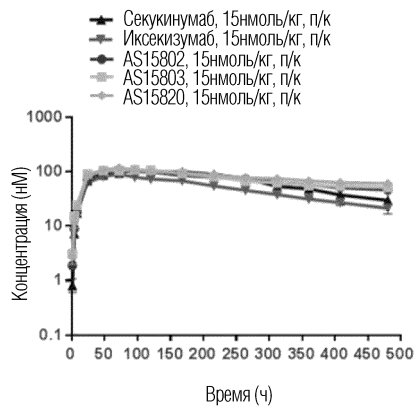
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

