



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109311964 A

(43)申请公布日 2019.02.05

(21)申请号 201780034951.2

(22)申请日 2017.06.02

(30)优先权数据

16173166.6 2016.06.06 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.12.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/063506 2017.06.02

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/211731 EN 2017.12.14

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 彼得·迈克尔·胡尔斯曼

厄哈德·科派斯基

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 张国梁 张莹

(51)Int.Cl.

*G07K 14/78*(2006.01)

*A61K 39/00*(2006.01)

*G07K 16/18*(2006.01)

权利要求书2页 说明书32页

序列表23页 附图2页

按照条约第19条修改的权利要求书2页

(54)发明名称

用于眼科的具有增加的眼保留的融合蛋白

(57)摘要

特异性结合与眼病相关的靶标的第一结合位点和特异性结合影响眼保留的靶标的第二结合位点的组合,多特异性结合剂提供与单特异性结合剂相比改善的玻璃体内保留。所述第二结合位点特异性结合玻璃体液/视网膜中细胞外基质(ECM)中发现的化合物/分子。所述细胞外基质化合物必须以允许有待结合的药物足够载量/剂量的量存在。已经发现,为此目的,胶原尤其是胶原II是玻璃体液中ECM中的合适化合物。因此,本文报道了多特异性结合剂,其包含特异性结合治疗性眼靶标的第一结合位点和特异性结合胶原II的第二结合位点。

1. 抗人胶原II抗体,其包含根据Kabat确定的以下的CDR:
  - a) SEQ ID NO:09和SEQ ID NO:10,或
  - b) SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,或
  - c) SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16。
2. 权利要求1的抗体,其包含以下的重链可变结构域和轻链可变结构域:
  - a) SEQ ID NO:09和SEQ ID NO:10,或
  - b) SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,或
  - c) SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16。
3. 权利要求1至2中任一项的抗体,其中所述抗体是scFv。
4. 药物制剂,其包含根据权利要求1至3中任一项的抗体和任选的药学上可接受的赋形剂。
  5. 权利要求4的制剂,其中所述药物制剂用于治疗眼血管疾病。
  6. 权利要求1至3中任一项的抗体,其用作药物。
  7. 权利要求6的抗体,其中所述用途是用于治疗眼血管疾病。
  8. 权利要求1至3中任一项的抗体在制备药物中的用途。
  9. 权利要求8的用途,其中所述用途是用于制备用于治疗眼血管疾病的药物。
  10. 权利要求1至3中任一项的抗体,其用于治疗眼血管疾病。
  11. 治疗患有眼血管疾病的患者的方法,所述方法是通过向需要这种治疗的患者施用权利要求1至3中任一项的抗体。
  12. 融合蛋白,其包含:
    - 特异性结合第一抗原的第一结合位点,
    - 特异性结合胶原II的第二结合位点。
  13. 权利要求12的融合蛋白,其中
    - 所述第一结合位点是特异性结合第一抗原的Fab,
    - 所述第二结合位点是特异性结合胶原II的scFv,并且其中所述Fab在其C末端之一通过肽键与肽接头的N末端缀合,并且所述scFv在其N末端通过肽键与肽接头的C末端缀合。
  14. 权利要求12-13中任一项的融合蛋白,其还包含特异性结合第二抗原的第三结合位点,其中
    - 所述第三结合位点是特异性结合胶原II的scFv,其中所述第一和第三结合位点选自由以下组成的组:F(ab')<sub>2</sub>,双抗体,BITE,tandAb和DART,并且所述第一和第三结合位点在其C末端通过肽键与肽接头的N末端缀合,并且所述scFv在其N末端通过肽键与肽接头的C末端缀合。
  15. 权利要求12-14中任一项的融合蛋白,其中所述第一抗原和/或所述第二抗原是治疗性眼靶标。
  16. 权利要求12-15中任一项的融合蛋白,其中所述第一抗原和/或所述第二抗原彼此独立地选自由以下组成的组:ANG2,VEGF,PDGF-B和IL-1 $\beta$ 。
  17. 权利要求12-15中任一项的融合蛋白,其中所述第一抗原和/或所述第二抗原是选自由以下组成的组的不同抗原:ANG2,VEGF,PDGF-B和IL-1 $\beta$ 。

18. 权利要求12-17中任一项的融合蛋白,其中特异性结合胶原II的scFv包含:
- a) 具有SEQ ID NO:09的氨基酸序列的重链可变结构域和SEQ ID NO:10的轻链可变结构域,或
  - b) 具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变结构域和SEQ ID NO:13的轻链可变结构域,或
  - c) 具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变结构域和SEQ ID NO:16的轻链可变结构域。
19. 权利要求18的融合蛋白,其中特异性结合胶原II的scFv包含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变结构域和SEQ ID NO:13的轻链可变结构域。
20. 权利要求12-19中任一项的融合蛋白,其中特异性结合胶原II的scFv具有SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17的氨基酸序列。
21. 权利要求20的融合蛋白,其中特异性结合胶原II的scFv具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列。
22. 权利要求14-21中任一项的融合蛋白,其中所述第一结合位点和所述第三结合位点是Fab。
23. 药物制剂,其包含根据权利要求12至22中任一项的融合蛋白和任选的药学上可接受的赋形剂。
24. 权利要求23的制剂,其中所述药物制剂用于治疗眼血管疾病。
25. 权利要求12-22中任一项的融合蛋白,其用作药物。
26. 权利要求25的融合蛋白,其中所述用途是用于治疗眼血管疾病。
27. 权利要求12-22中任一项的融合蛋白在制备药物中的用途。
28. 权利要求27的用途,其中所述用途是用于制备用于治疗眼血管疾病的药物。
29. 权利要求12至22中任一项的融合蛋白,其用于治疗眼血管疾病。
30. 治疗患有眼血管疾病的患者的方法,所述方法是通过向需要这种治疗的患者施用权利要求12至22中任一项的融合蛋白。

## 用于眼科的具有增加的眼保留的融合蛋白

[0001] 本发明属于眼科疾病及其治疗领域。本文报道了用于眼内/玻璃体内应用的融合蛋白,即多功能结合剂,其适用于治疗眼科疾病。由于其多功能性,所述融合蛋白可以与眼保留靶标和治疗靶标结合。

### [0002] 发明背景

[0003] 导致治疗分子从眼睛清除的因素之一是扩散。治疗分子的扩散性质主要由其最终与Fc-受体结合相组合的大小决定。从眼中清除后,可以在体循环中发现治疗分子。

[0004] Kleinberg, T.T.等 (Surv. Ophthalmol. 56 (2011) 300-323) 对玻璃质替代品进行了综述。已经尝试用胶原,透明质酸,羟丙基甲基纤维素和天然水凝胶聚合物进行永久性玻璃体替换。然而,没有一种被证明具有临床可行性。

[0005] Favara, D.M. 和 Harris, A.L. (EMBO Mol. Med. 6 (2014) 577-579) 公开了VEGF粘着陷阱作为非系统作用的血管生成抑制剂,其局部抑制血管生成而没有可检测的全身副作用。VEGF粘着陷阱是包含VEGF受体1结构域2, VEGF受体2结构域3, CH3结构域和肝素结合结构域(来自外显子6, 7和8的部分)的多肽的二聚体。

[0006] Ponsioen, T.L., 等 (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 49 (2008) 4089-4095) 公开了人玻璃体视网膜界面中的胶原分布。视网膜切除术样品表达所有测试的胶原类型的mRNA。

[0007] WO 2008/135734公开了包含针对氧化的胶原II的抗体或其片段的组合物,其中所述抗体或片段与药理学活性部分缀合。

[0008] Uysal, H. 等 (Mol. Immunol. 45 (2008) 2196-2204) 公开了致病性胶原II型特异性单克隆抗体CIIC1 Fab的晶体结构。

[0009] Nandakumar, K-S. 等 (Eur. J. Immunol. 33 (2003) 2269-2277) 公开了通过单一单克隆IgG抗胶原II型抗体诱导关节炎和在缺乏抑制性Fc $\gamma$  RIIb的小鼠中增强关节炎。

[0010] Xu, Y. 等 (Mol. Immunol. 41 (2004) 411-419) 公开了两种与II型胶原完全相同的表位的单克隆抗体通过噬菌体展示选择非交叉反应性噬菌体克隆。

[0011] WO2012/047583公开了结合人胶原II的抗体。

### [0012] 发明概述

[0013] 本发明涉及抗人胶原II抗体。

[0014] 本文公开了抗人胶原II抗体,其包含根据Kabat/如以下中确定的六个CDR

[0015] a) SEQ ID NO:09和SEQ ID NO:10,或

[0016] b) SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,或

[0017] c) SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16。

[0018] 在一个实施方案中,所述抗体包含以下重链可变结构域和轻链可变结构域:

[0019] a) SEQ ID NO:09和SEQ ID NO:10,或

[0020] b) SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,或

[0021] c) SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16。

[0022] 在一个实施方案中,抗体是scFv。

[0023] 作为一个方面,本文公开了与包含以下的重链可变结构域和轻链可变结构域的抗

体结合相同表位的抗体：

[0024] a) SEQ ID NO:09和SEQ ID NO:10,或

[0025] b) SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,或

[0026] c) SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16。

[0027] 作为一个方面,本文公开了药物制剂,其包含本文公开的抗体和任选的药学上可接受的赋形剂。

[0028] 在一个实施方案中,药物制剂用于治疗眼血管疾病。

[0029] 作为一个方面,本文公开了本文公开的抗体,其用作药物。

[0030] 在一个实施方案中,该用途是用于治疗眼血管疾病。

[0031] 作为一个方面,本文公开了本文公开的抗体在制备药物中的用途。

[0032] 在一个实施方案中,该用途是用于制备用于治疗眼血管疾病的药物。

[0033] 作为一个方面,本文公开了本文公开的抗体,其用于治疗眼血管疾病。

[0034] 作为一个方面,本文公开了治疗患有眼血管疾病的患者的方法,所述方法是通过向需要此种治疗的患者施用本文公开的抗体。

[0035] 本发明报道了具有至少两个结合位点的融合蛋白,其中一个特异性结合胶原II。

[0036] 已经发现,通过组合特异性结合与眼病相关的靶标的第一结合位点和特异性结合影响眼内保留的靶标(眼保留靶标)的第二结合位点,可以提供多特异性结合剂(binder),其与不具有对所述眼保留靶标的结合特异性的分子相比,具有改善的玻璃体内保留(retention)。第二结合位点特异性结合玻璃体液或视网膜中细胞外基质(ECM)中发现的化合物或分子。该细胞外基质化合物要以允许多特异性结合剂的足够载量并且因此足够剂量的量存在。已经发现,为此目的,胶原尤其是胶原II是玻璃体液中ECM中的合适化合物。

[0037] 这种多特异性结合剂可以作为(重组)融合蛋白重组产生。

[0038] 因此,作为一个方面,本文公开的是包含以下的融合蛋白：

[0039] -特异性结合第一抗原的第一结合位点,和

[0040] -特异性结合玻璃体液的细胞外基质中存在的化合物的第二结合位点。

[0041] 在一个实施方案中,存在于玻璃体液的细胞外基质中的化合物是胶原。在一个实施方案中,胶原是胶原II。

[0042] 在一个实施方案中,第一抗原与眼血管疾病有关。

[0043] 作为一个方面,本文还公开的是包含以下的融合蛋白：

[0044] -特异性结合第一抗原的第一结合位点,

[0045] 和

[0046] -特异性结合胶原II的第二结合位点。

[0047] 在一个实施方案中,融合蛋白包含

[0048] -特异性结合第一抗原的第一结合位点,

[0049] -特异性结合胶原II的第二结合位点,和

[0050] -特异性结合第二抗原的第三结合位点。

[0051] 在本文公开的所有方面的一个实施方案中,胶原II是人胶原II。在一个实施方案中,人胶原II具有SEQ ID NO:17或18或19的氨基酸序列。

[0052] 在本文公开的所有方面的一个实施方案中,每个结合位点彼此独立地选自以下

组成的组:抗体结合位点,抗体片段,anticalin,DARPIN,受体配体或其结合片段,受体或其结合片段,和四连接素(tetranectin)结构域。

[0053] 在本文公开的所有方面的一个实施方案中,每个结合位点彼此独立地是抗体结合位点或抗体片段。在一个实施方案中,每个结合位点是一对抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域。

[0054] 在本文公开的所有方面的一个实施方案中,第一结合位点包含在第一多肽中,第二结合位点包含在第二多肽中,其中所述第一多肽直接或通过肽接头或通过二硫键与所述第二多肽缀合或融合。

[0055] 在本文公开的所有方面的一个实施方案中,第一结合位点包含在第一多肽中,第二结合位点包含在第二多肽中,第三结合位点包含在第三多肽中,其中所述第一多肽和所述第三多肽形成抗体或抗体片段,并且所述抗体或抗体片段直接或通过肽接头或二硫键与所述第二多肽缀合。

[0056] 在本文公开的所有方面的一个实施方案中,所述第一多肽,所述第二多肽和所述第三多肽彼此独立地选自由以下组成的组:scFv,dsscFv,Fab,dsFab,CrossFab,单抗体和VHH(sc=单链,ds=二硫化物稳定的)。在一个实施方案中,多肽之一是Fab或dsFab,另一个多肽是scFv或dsscFv,并且所述多肽通过肽接头缀合。在一个实施方案中,多肽中的两个是Fab或dsFab,另一个多肽是scFv或dsscFv,并且所述多肽通过肽接头缀合。

[0057] 在本文公开的所有方面的一个实施方案中,融合蛋白包含:

[0058] -作为第一结合位点的特异性结合第一抗原的Fab,

[0059] -作为第二结合位点的特异性结合胶原II的scFv,和

[0060] -肽接头,

[0061] 其中Fab在其C末端之一通过肽键与肽接头的N末端缀合,并且scFv在其N末端通过肽键与肽接头的C末端缀合。

[0062] 在本文公开的所有方面的一个实施方案中,融合蛋白包含:

[0063] -特异性结合第一抗原的第一结合位点,

[0064] -作为第二结合位点的特异性结合胶原II的scFv,

[0065] -特异性结合第二抗原的第三结合位,和

[0066] -肽接头,

[0067] 其中组合的第一和第三结合位点在其C末端通过肽键与肽接头的N末端缀合,并且scFv在其N末端通过肽键与肽接头的C末端缀合。

[0068] 在本文公开的所有方面的一个实施方案中,组合的第一和第三结合位点是至少F(ab')<sub>2</sub>或双抗体或BITE或tandAb或DART或者在其之内。

[0069] 在本文公开的所有方面的一个实施方案中,第一抗原和/或第二抗原是治疗性眼靶标/与眼血管疾病有关。

[0070] 在本文公开的所有方面的一个实施方案中,第一抗原和/或第二抗原彼此独立地选自由以下组成的组:ANG2,VEGF,PDGF-B和IL-1 $\beta$ 。

[0071] 在本文公开的所有方面的一个实施方案中,第一抗原和/或第二抗原是选自由以下组成的组的不同抗原:ANG2,VEGF,PDGF-B和IL-1 $\beta$ 。

[0072] 在一个实施方案中,特异性结合胶原II的scFv包含:

[0073] a) 具有SEQ ID NO:09的氨基酸序列的重链可变结构域和SEQ ID NO:10的轻链可变结构域,或

[0074] b) 具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变结构域和SEQ ID NO:13的轻链可变结构域,或

[0075] c) 具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变结构域和SEQ ID NO:16的轻链可变结构域。

[0076] 在本文公开的所有方面的一个实施方案中,特异性结合胶原II的scFv包含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变结构域和SEQ ID NO:13的轻链可变结构域。

[0077] 在本文公开的所有方面的一个实施方案中,特异性结合胶原II的scFv具有SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0078] 在本文公开的所有方面的一个实施方案中,特异性结合胶原II的scFv具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0079] 在本文公开的所有方面的一个实施方案中,第一结合位点和第三结合位点是Fab。

[0080] 在本文公开的所有方面的一个实施方案中,融合蛋白包含:

[0081] -与ANG2,VEGF,PDGF-B或IL-1 $\beta$ 特异性结合的Fab,

[0082] -特异性结合胶原II的scFv,其包含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变结构域和SEQ ID NO:13的轻链可变结构域,和

[0083] -肽接头,

[0084] 其中Fab在其C末端之一通过肽键与肽接头的N末端缀合,并且scFv在其N末端通过肽键与肽接头的C末端缀合。

[0085] 在本文公开的所有方面的一个实施方案中,融合蛋白的分子量小于75kDa。

[0086] 在本文公开的所有方面的一个实施方案中,融合蛋白缺乏抗体Fc区。

[0087] 作为一个方面,本文公开了药物制剂,其包含本文公开的融合蛋白和任选的药学上可接受的赋形剂。

[0088] 在一个实施方案中,药物制剂用于治疗眼血管疾病。

[0089] 作为一个方面,本文公开了本文公开的融合蛋白,其用作药物。

[0090] 在一个实施方案中,该用途是用于治疗眼血管疾病。

[0091] 作为一个方面,本文公开了本文公开的融合蛋白在制备药物中的用途。

[0092] 在一个实施方案中,该用途是用于制备用于治疗眼血管疾病的药物。

[0093] 作为一个方面,本文公开了本文公开的融合蛋白,其用于治疗眼血管疾病。

[0094] 作为一个方面,本文公开了治疗患有眼血管疾病的患者的方法,所述方法是通过向有此需要的患者施用本文公开的融合蛋白。

[0095] 发明详述

[0096] 关于人免疫球蛋白轻链和重链的核苷酸序列的一般信息在以下文献中给出:Kabat,E.A.,等.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th ed.,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)。

[0097] 如本文所用,重链和轻链的所有恒定区和结构域的氨基酸位置根据Kabat,等.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th ed.,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)中描述的Kabat编号系统

编号并且在此称为“根据Kabat编号”。具体地,Kabat,等.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th ed.,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)(参见第647-660页)的Kabat编号系统用于 $\kappa$ 和 $\lambda$ 同种型的轻链恒定结构域CL,并且Kabat EU索引编号系统(参见第661-723页)用于恒定重链结构域(CH1, 铰链,CH2和CH3,其在本文中通过参考在这种情况下“根据Kabat EU索引编号”进一步阐明)。

[0098] 用于实施本发明的有用方法和技术描述于例如Ausubel,F.M.(ed.),Current Protocols in Molecular Biology,Volumes I to III(1997);Glover,N.D.,和Hames,B.D.,ed.,DNA Cloning:A Practical Approach,Volumes I和II(1985),Oxford University Press;Freshney,R.I.(ed.),Animal Cell Culture—a practical approach, IRL Press Limited(1986);Watson,J.D.,等.,Recombinant DNA,Second Edition,CHSL Press(1992);Winnacker,E.L.,From Genes to Clones;N.Y.,VCH Publishers(1987); Celis,J.,ed.,Cell Biology,Second Edition,Academic Press(1998);Freshney,R.I., Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique,second edition,Alan R.Liss,Inc.,N.Y.(1987)。

[0099] 重组DNA技术的使用使得能够产生核酸的衍生物。例如,这些衍生物可以通过取代,改变,交换,缺失或插入在个别或若干个核苷酸位置进行修饰。修饰或衍生化可以例如通过定点诱变进行。这些修饰可以由本领域技术人员容易地进行(参见例如Sambrook,J.,等.,Molecular Cloning:A laboratory manual(1999)Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York,USA;Hames,B.D.,和Higgins,S.G.,Nucleic acid hybridization—a practical approach(1985) IRL Press,Oxford,England)。

#### [0100] I. 定义

[0101] 在此明确指出,如本文所用的术语“包含”包括术语“由...组成”。因此,包含术语“包含”的所有方面和实施方案同样以术语“由...组成”公开。

[0102] 术语“约”表示此后的数值的 $\pm 20\%$ 的范围。在一个实施方案中,术语“约”表示此后的数值的 $\pm 10\%$ 的范围。在一个实施方案中,术语“约”表示此后的数值的 $\pm 5\%$ 的范围。

[0103] 本文中的术语“(完整)抗体”以最广泛意义上使用并且包括各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体。

[0104] 术语“(完整)抗体”是指具有不同结构的免疫球蛋白分子。完整IgG抗体是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由二硫键结合的两条相同的轻链和两条相同的重链组成。从N末端到C末端,每条重链具有可变区(VH),也称为可变重链结构域或重链可变结构域,接着是三个恒定结构域(CH1,CH2和CH3)。类似地,从N末端到C末端,每条轻链具有可变区(VL),也称为可变轻链结构域或轻链可变结构域,然后是恒定轻(CL)结构域。基于其恒定结构域的氨基酸序列,抗体的轻链可以被分配为被称为 $\kappa$ 和 $\lambda$ 的两种类型中的一种。

[0105] 术语“抗体片段”是表示完整抗体以外的分子,其包含结合完整抗体所结合的抗原的完整抗体的一部分。抗体片段的实例包括但不限于Fv,Fab,Fab',Fab'-SH,F(ab')<sub>2</sub>;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0106] 术语“抗体结合位点”表示负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。通常,这是一对抗



体重链可变结构域和轻链可变结构域。抗体的抗原结合位点包含来自“高变区”或“HVR”的氨基酸残基。“框架”或“FR”区域是除本文定义的高变区残基之外的那些可变结构域区域。因此,抗体的轻链和重链可变结构域从N末端至C末端包含区域FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3和FR4(免疫球蛋白框架)。特别地,重链的CDR3区域是对抗原结合贡献最大并且限定抗体的区域。

[0107] 术语“(与抗原)结合”是指在体外测定中抗体与其抗原的结合,在一个实施方案中,在结合测定中,抗体与表面结合,并且通过表面等离子体共振 (SPR) 测量抗原与抗体的结合。结合意指结合亲和力 ( $K_D$ ) 为约 $10^{-7}$ M或更低,在一些实施方案中为 $10^{-13}$ M至 $10^{-8}$ M。

[0108] 可以通过BIAcore测定法 (GE Healthcare Biosensor AB,Uppsala,Sweden) 研究结合。结合的亲和力由术语 $k_a$ (抗体/抗原复合物的抗体的结合速率常数), $k_d$ (解离常数)和 $K_D$ ( $k_d/k_a$ )定义。

[0109] 术语“结合位点”表示显示对靶标的结合特异性的任何蛋白质实体。

[0110] 抗体的“类别”是指其重链具有的恒定结构域或恒定区的类型。有五种主要类别的抗体: IgA, IgD, IgE, IgG和IgM,其中一些可以进一步分为亚类(同种型),例如IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>和IgA<sub>2</sub>。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ 和 $\mu$ 。

[0111] “框架”或“FR”是指除高变区 (HVR) 残基之外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由四个FR结构域组成: FR1, FR2, FR3和FR4。因此, HVR和FR序列通常以下列顺序出现在VH(或VL)中: FR1-H1 (L1) -FR2-H2 (L2) -FR3-H3 (L3) -FR4。

[0112] 术语“宿主细胞”,“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”等可互换使用,指已引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,其中包括原代转化细胞和由其衍生的后代,而不考虑传代次数。子代可能与亲本细胞的核酸含量不完全相同,而是可能含有突变。本文包括具有与在最初转化的细胞中筛选或选择的相同功能或生物活性的突变后代。

[0113] “人源化”抗体是指嵌合抗体,其包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基。在某些实施方案中,人源化抗体将包含至少一个,通常两个可变结构域中的基本上全部,其中全部或基本上全部HVR(例如,CDR)对应于非人抗体的那些,并且全部或基本上全部FR对应于人抗体的FR。人源化抗体任选地可以包含衍生自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体的“人源化形式”,例如非人抗体,是指已经历人源化的抗体。

[0114] 如本文所用,术语“高变区”或“HVR”是指抗体可变结构域的在序列方面是高变(“互补决定区”或“CDR”)并且形成结构上限定的环(“高变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触”)的每个区域。通常,抗体包含六个HVR;VH中的三个(H1,H2,H3)和VL中的三个(L1,L2,L3)。如本文所示的HVR包含:

[0115] (a) 在氨基酸残基26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) 和96-101 (H3) 处发生的高变环 (Chothia, C. 和Lesk, A.M., J.Mol.Biol. 196 (1987) 901-917);

[0116] (b) 在氨基酸残基24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) 和95-102 (H3) 处发生的CDR (Kabat, E.A.等., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.);

[0117] (c) 在氨基酸残基27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) 和 93-101 (H3) 处发生的抗原接触 (MacCallum等. *J.Mol.Biol.* 262:732-745 (1996)); 和

[0118] (d) (a), (b) 和/或 (c) 的组合, 包括HVR氨基酸残基46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) 和94-102 (H3)。

[0119] 在一个实施方案中, HVR残基包含在本说明书中其他地方鉴定为CDR残基的那些残基。

[0120] 除非另有说明, 否则可变结构域中的HVR残基和其他残基 (例如FR残基) 在本文中根据Kabat EU索引编号系统 (Kabat等, 同上) 编号。

[0121] “人抗体”是具有与人或人细胞产生的抗体或衍生自非人来源的抗体相对应的氨基酸序列的抗体, 所述氨基酸序列利用人抗体组库或其他人抗体编码序列。人抗体的这种定义具体地排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。在某些实施方案中, 人抗体衍生自非人转基因哺乳动物, 例如小鼠, 大鼠或兔。在某些实施方案中, 人抗体衍生自杂交瘤细胞系。在某些实施方案中, 人抗体衍生自 (噬菌体) 展示文库。在某些实施方案中, 人抗体衍生自人B细胞。

[0122] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养动物 (例如牛, 绵羊, 猫, 狗和马), 灵长类动物 (例如人和非人灵长类动物如猴), 兔和啮齿动物 (例如小鼠和大鼠)。在某些实施方案中, 个体或受试者是人。

[0123] “分离的”抗体是与其天然环境的组分分离的抗体。在一些实施方案中, 通过例如电泳 (例如, SDS-PAGE, 等电聚焦 (IEF), 毛细管电泳) 或色谱 (例如, 尺寸排阻色谱法或离子交换或反相HPLC) 测定, 将抗体纯化至大于95%或99%的纯度。关于评估抗体纯度的方法的综述, 参见, 例如, Flatman, S.等., *J.Chrom.B* 848 (2007) 79-87。

[0124] “分离的”核酸是指已经与其天然环境的组分分离的核酸分子。分离的核酸包括通常含有核酸分子的细胞中含有的所述核酸分子, 但所述核酸分子存在于染色体外或与其天然染色体位置不同的染色体位置。

[0125] 术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体, 即, 构成群体的各个抗体是相同的和/或结合相同的表位, 除了可能的变体抗体, 例如, 包含天然存在的突变或在单克隆抗体制剂生产期间产生, 这些变体通常以少量存在。与通常包括针对不同决定簇 (表位) 的不同抗体的多克隆抗体制剂相反, 单克隆抗体制剂的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此, 修饰语“单克隆”表示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体获得的, 并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如, 可以通过多种技术制备根据本发明使用的单克隆抗体, 包括但不限于杂交瘤方法, B细胞方法, 重组DNA方法, 噬菌体展示方法和利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法。

[0126] 术语“眼血管疾病”包括但不限于眼内新生血管综合征, 如糖尿病视网膜病, 糖尿病黄斑水肿, 早产儿视网膜病, 新生血管性青光眼, 视网膜静脉阻塞, 视网膜中央静脉阻塞, 黄斑变性, 年龄相关性黄斑变性, 色素性视网膜炎, 视网膜血管瘤增生, 黄斑性毛细血管扩张, 缺血性视网膜病变, 虹膜新生血管形成, 眼内新生血管形成, 角膜新生血管形成, 视网膜新生血管形成, 脉络膜新生血管形成和视网膜变性 (参见例如Garner, A., *Vascular diseases, In: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach*, Garner, A., and Klintworth, G.K., (eds.), 2nd edition, Marcel Dekker, New York (1994), pp.1625-

1710)。

[0127] 术语“药物制剂”是指药物制剂,其所处的形式使得其中所含的活性成分的生物活性有效,并且不含对施用制剂的受试者具有不可接受的毒性的其他成分。

[0128] “药学上可接受的载体”是指药物制剂中除活性成分外的对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂,赋形剂,稳定剂或防腐剂。

[0129] 如本文所用的术语“肽接头”表示具有氨基酸序列的肽,其在一个实施方案中具有合成来源。“肽接头”代表氨基酸残基的线性链。该氨基酸残基的线性链长度为1至30个残基。

[0130] 在一个实施方案中,肽接头富含甘氨酸,谷氨酰胺和/或丝氨酸残基。在一个实施方案中,这些残基例如以最多5个氨基酸的小重复单元排列,如GS (SEQ ID NO:21), GGS (SEQ ID NO:22), GGGs (SEQ ID NO:23) 和GGGGs (SEQ ID NO:24)。小的重复单元可以重复一到五次。在多聚体单元的氨基和/或羧基末端,可加入多达六个另外的任意的天然存在的氨基酸。

[0131] 在一个实施方案中,肽接头是具有长度为多达30个氨基酸残基(在一个实施方案中具有5至20个氨基酸残基的长度)的氨基酸序列的肽。在一个实施方案中,肽接头是(GxS)<sub>n</sub>,其中G=甘氨酸,S=丝氨酸,(x=3,n=2,3,4或5)或(x=4且n=2,3或4),在一个实施方案中,x=3,n=2,在一个实施方案中,x=4,n=2。然而,该肽接头可以在其一个或两个末端包含额外的甘氨酸和/或丝氨酸残基。

[0132] 其他合成肽接头由单一氨基酸构成,其重复10至20次,并且可以在氨基和/或羧基末端包含多达六个另外的任意的天然存在的氨基酸。

[0133] 除了合成的富含GS的肽接头外,还可以使用天然存在的肽接头,如IgG铰链,人P-糖蛋白的接头,人复制蛋白A的C末端接头,甲状旁腺激素相关蛋白的接头。

[0134] 所有肽接头可以由核酸分子编码,因此可以重组表达。由于接头本身是肽,通过接头连接的多肽经由在两个氨基酸之间形成的肽键与接头连接。

[0135] 术语“重组”或“重组产生的”表示通过重组方法制备,表达,产生或分离的多肽。这包括从宿主细胞(如NS0或CHO细胞)或转基因动物(例如小鼠)分离的多肽,或使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的多肽。

[0136] 如本文所用,“治疗”(及其语法变体,例如“进行治疗”)是指试图改变所治疗个体的自然病程的临床干预,并且可以用于预防或在临床病理期间进行。理想的治疗效果包括但不限于预防疾病的发生或复发,症状的缓解,疾病的任何直接或间接病理后果的减少,预防转移,疾病进展速度的降低,疾病状态的改善或减轻,预后的缓解或改善。在一些实施方案中,如本文报道的抗体或Fc区融合多肽用于延迟疾病的发展或减缓疾病的进展。

[0137] 本申请中使用的术语“价”表示在(抗体)分子中存在指定数量的结合位点。因此,术语“二价”,“四价”和“六价”分别表示(抗体)分子中存在两个结合位点,四个结合位点和六个结合位点。本文报道的双特异性抗体在一个优选实施方案中是“二价的”。

[0138] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的结构域,其参与抗体与其抗原的结合。抗体的重链和轻链(分别为VH和VL)的可变结构域通常具有相似的结构,其中每个结构域包含四个框架区(FR)和三个高变区(HVR)(参见例如Kindt,T.J.等.Kuby Immunology,6th ed.,W.H.Freeman and Co.,N.Y.(2007),第91页)。单个VH或VL结构域可

足以赋予抗原结合特异性。此外,结合特定抗原的抗体可以使用来自结合所述抗原的抗体的VH或VL结构域分离,以分别筛选互补VL或VH结构域的文库。参见,例如,Portolano,S.等.,*J. Immunol.* 150 (1993) 880-887;Clackson,T.等.,*Nature* 352 (1991) 624-628)。

[0139] 如本文所用,术语“载体”是指能够繁殖与其连接的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及结合到其所被引入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0140] 术语“治疗性眼靶标”表示涉及眼血管疾病的分子。

[0141] 术语“双抗体”表示单链Fv (scFv) 片段的非共价二聚体,其由通过小肽接头连接的重链可变(VH) 和轻链可变(VL) 区组成。scFv中的常见接头具有14-15个氨基酸残基,并且位于可变结构域的N末端和C末端之间。然而,使用长度为3-12个氨基酸残基的接头将导致双抗体的形成。

[0142] 术语“串联scFv (taFv)”表示其中两个scFv分子通过短接头缀合的分子。

[0143] 术语“微抗体 (miniantibody或minibody)”表示两个scFv分子通过两个经修饰的二聚化结构域缔合产生的二价(或双特异性) (scFv)<sub>2</sub>。

[0144] 术语“tandAb”表示四价双特异性抗体形式,其由针对每种抗原的两个结合位点组成。它仅由通过接头连接的可变免疫球蛋白结构域组成。

[0145] 术语“BITE”表示双特异性T细胞衔接子 (BiTE)。这是一类人工双特异性单克隆抗体,可指导宿主的免疫系统,更具体地说是T细胞对癌细胞的细胞毒活性。BiTE是由约55千道尔顿的单个肽链上的不同抗体的两个单链可变片段 (scFv) 或来自四种不同基因的氨基酸序列组成的融合蛋白。所述scFv之一经由CD3受体与T细胞结合,另一种经由肿瘤特异性分子与肿瘤细胞结合。

[0146] 术语“DART”表示由两个工程改造的Fv片段组成的分子,其自身VH与另一个交换。详细地,Fv1包含来自抗体A的VH和来自抗体B的VL,而Fv2包含来自Ab-B的VH和来自Ab-A的VL。Fv结构域的这种相互交换从短连接肽约束的构象释放变体片段。

[0147] “胶原”是动物体内各种结缔组织细胞外空间的主要结构蛋白。作为结缔组织的主要成分,它是哺乳动物中最丰富的蛋白质,占全身蛋白质含量的25%至35%。取决于矿化程度,胶原组织可以是刚性的(骨),柔性的(肌腱),或具有从刚性到柔性的梯度(软骨)。以细长纤维形式存在的胶原主要存在于纤维组织中,如肌腱,韧带和皮肤。其在角膜,软骨,骨骼,血管,肠道,椎间盘和牙齿中的牙本质中含量丰富。在肌肉组织中,它是肌内膜的主要成分。胶原占肌肉组织的1%至2%,并且占强壮肌腱肌肉重量的6%。成纤维细胞是产生胶原的最常见细胞。

[0148] “II型胶原”是关节软骨和透明软骨的基础。它占软骨中所有蛋白质的50%和关节软骨中胶原的85-90%。II型胶原确实形成原纤维。这种纤维状胶原网络允许软骨捕获蛋白多糖聚集体并为组织提供拉伸强度。II型胶原存在于软骨和眼玻璃体液中。

[0149] II. 玻璃体液/玻璃体

[0150] 填充眼中大部分空间的基质表示为玻璃体液/玻璃体。

[0151] 人体玻璃体液是一种清澈的水溶液,它填充位于晶状体和视网膜之间的眼后房。它占眼球体积的约80%,含有99%的水,但由于胶原原纤维和大分子透明质酸的网络,在出生时具有凝胶状结构。它的体积约为4-5ml (Beauthier,J.P., (2008) De Boeck Université

[Ed].Traité de médecine légale.Bruxelles:715-725)。玻璃体液含有若干种低分子量溶质,包括无机盐,糖和抗坏血酸。人玻璃体中蛋白质的总浓度约为1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,其中胶原占180 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (参见例如Aretz,S.,等.,Prot.Sci.11(2013)22;Theocharis,A.D.,等.,Biochim.84(2002)1237-1243)。Angi,M.,等(Hindawi Publishing Corporation, Mediators of Inflammation,Volume 2012,Article ID 148039)报道了健康玻璃体液的平均蛋白质浓度为0.5 $\text{mg}/\text{mL}$ ,主要由白蛋白(60-70%)组成。此外,据报道,玻璃体液的组分是球蛋白,凝血蛋白,补体因子和低分子量蛋白(Ulrich,J.N.,等.,Clin.Exp.Ophthalmol.36(2008)431-436)。睫状体通过扩散,超滤和水性流体主动输送到后段而提供恒定的流体交换(Bishop,P.N.,Eye,16(2002)454-460)。蛋白质可通过局部分泌(例如糖蛋白),血液过滤(例如白蛋白)或来自周围组织的扩散积聚在玻璃体中(Wu,C.W.,Am.J.Ophthalmol.,137(2004)655-661)。由于玻璃体和内部视网膜之间的紧密接触,视网膜的生理和病理状况影响玻璃体液的蛋白质组和生化特性。

[0152] III.用于眼科的增加眼保留的多功能结合剂

[0153] 已经发现,通过特异性结合与眼病相关的靶标的第一结合位点和特异性结合影响眼保留的靶标的第二结合位点的组合,可以提供与单特异性结合剂相比具有改善的玻璃体内保留的多特异性结合剂。第二结合位点特异性结合玻璃体液/视网膜中细胞外基质(ECM)中发现的化合物/分子。该细胞外基质化合物需要以允许有待结合的药物的足够载量/剂量的量存在。已经发现,为此目的,胶原尤其是胶原II是玻璃体液中ECM中的合适化合物。

[0154] 在玻璃体内半衰期长的情况下,需要较少的注射,在体循环中半衰期短的情况下,可以实现低系统暴露,并且在两者组合的情况下预期增加的功效和降低的副作用。

[0155] 长的玻璃体内半衰期可以通过以下方式实现:

[0156] -高分子量(IgG,添加例如PEG至较小的形式,如双抗体,Fab等),

[0157] -对保留靶标的高亲和力和亲合力(较低的有效药物浓度导致较低频率的给药),

[0158] -在37 $^{\circ}\text{C}$ 的高的热稳定性,

[0159] -减少分子跨玻璃体液和血液视网膜屏障(BRB)的扩散,

[0160] -最佳电荷或pI。

[0161] 快速全身清除可以通过以下实现:

[0162] -改造Fc区以降低FcRn结合,

[0163] -(较)低的分子量(Fab,双抗体,DARPIN),

[0164] -低施用剂量(剂量也取决于亲和力)。

[0165] 本发明的目的是提供施用进入眼的持久药物。这减少了所需的施用数量并且同样地单次施用之间的时间。这一方面可以通过增加每次施用时施用的剂量来实现,或者另一方面通过增加施用后眼中药物的半衰期和持久性来实现。

[0166] 本发明总体涉及包含以下的多特异性结合剂(即重组融合蛋白):

[0167] -特异性结合治疗性眼靶标的第一结合位点,

[0168] 和

[0169] -特异性结合胶原II的第二结合位点。

[0170] 在一个实施方案中,每个结合位点彼此独立地选自由以下组成的组:抗体结合位点,anticalin,DARPIN,受体配体或其结合片段,受体或其结合片段,和四连接素结构域。

[0171] 在一个实施方案中,每个结合位点是抗体结合位点。在一个实施方案中,每个结合位点是一(同源)对抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域。

[0172] 在一个实施方案中,第一结合位点包含在第一结构域中,第二结合位点包含在第二结构域中,并且所述第一结构域直接或通过肽接头与所述第二结构域缀合。在一个实施方案中,所述第一结构域和所述第二结构域彼此独立地选自由以下组成的组:scFv,dsscFv,Fab,dsFab,CrossFab,单抗体和VHH(sc=单链,ds=二硫化物稳定的)。在一个实施方案中,结构域之一是Fab或dsFab,另一个结构域是scFv或dsscFv,并且所述结构域通过肽接头缀合。

[0173] 在一个实施方案中,多特异性结合剂选自由以下组成的组:串联-Fv,双链体,单链双抗体,二硫键稳定的双抗体,DART,scFv<sub>2</sub>,Fab-scFv,微抗体。

[0174] 本文公开了多特异性结合剂(即重组融合蛋白),其包含

[0175] -Fab或scFv,其包含特异性结合治疗性眼靶标的第一结合位点,

[0176] -特异性结合胶原II的scFv,和

[0177] -肽接头,

[0178] 其中包含第一结合位点的Fab或scFv在其C末端之一通过肽键与肽接头的N末端缀合,并且特异性结合胶原II的scFv在其N末端通过肽键与肽接头的C末端缀合。

[0179] 在一个实施方案中,治疗性眼靶标选自由以下组成的组:ANG2,VEGF,PDGF-B,IL-1 $\beta$ 。

[0180] 在一个实施方案中,多特异性结合剂是双特异性结合剂,其包含:

[0181] -与ANG2,VEGF,PDGF-B或IL-1 $\beta$ 特异性结合的Fab,

[0182] -特异性结合胶原II的scFv,和

[0183] -肽接头,

[0184] 其中Fab在其C末端之一通过肽键与肽接头的N末端缀合,并且scFv在其N末端通过肽键与肽接头的C末端缀合。

[0185] 在一个实施方案中,多特异性结合剂是三特异性结合剂,其包含:

[0186] -特异性结合ANG2,VEGF,PDGF-B或IL-1 $\beta$ 的第一结合位点,

[0187] -特异性结合ANG2,VEGF,PDGF-B或IL-1 $\beta$ 的第二结合位点,

[0188] -特异性结合胶原II的scFv,和

[0189] -肽接头,

[0190] 其中组合的第一和第二结合位点在其C末端通过肽键与肽接头的N末端缀合,并且scFv在其N末端通过肽键与肽接头的C末端缀合。

[0191] 在一个实施方案中,特异性结合胶原II的scFv包含:

[0192] a) 具有SEQ ID NO:09的氨基酸序列的重链可变结构域和SEQ ID NO:10的轻链可变结构域,或

[0193] b) 具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变结构域和SEQ ID NO:13的轻链可变结构域,或

[0194] c) 具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变结构域和SEQ ID NO:16的轻链可变结构域。

[0195] 在一个实施方案中,特异性结合胶原II的scFv包含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序

列的重链可变结构域和SEQ ID NO:13的轻链可变结构域。

[0196] 在一个实施方案中,特异性结合胶原II的scFv具有SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0197] 在一个实施方案中,特异性结合胶原II的scFv具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0198] 在一个实施方案中,多特异性结合剂是双特异性结合剂,其包含:

[0199] -与ANG2,VEGF,PDGF-B或IL-1 $\beta$ 特异性结合的Fab,

[0200] -特异性结合胶原II的scFv,其包含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变结构域和SEQ ID NO:13的轻链可变结构域,和

[0201] -肽接头,

[0202] 其中Fab在其C末端之一通过肽键与肽接头的N末端缀合,并且scFv在其N末端通过肽键与肽接头的C末端缀合。

[0203] 药物的玻璃体内半衰期和持久性可以通过不同方式增加,如特别是例如药物的流体动力学半径的增加(从而减缓从眼的扩散),药物对其靶标的高亲和力(从而减少药物-靶标复合物的解离),眼中的高(热)降解稳定性和高注射剂量。

[0204] 影响持久性的主要因素是剂量(可施用剂量的增加对持久性有积极作用),半衰期(半衰期的增加对持久性有积极作用)和对靶标的亲和力(以 $K_D$ 表示)(亲和力的增加对持久性有积极作用)。

[0205] 在玻璃体内应用后,大量药物必须被选择用于在眼中保留药物的玻璃体液中的ECM化合物结合。与所述化合物的结合动力学必须允许药物充分保持扩散到视网膜/脉络膜中以维持最小有效剂量(目标:在玻璃体内施用后尽可能长的药物浓度高于最小有效剂量)。

[0206] “扩散速率”(取决于选择用于在眼中保留药物的ECM的化合物的 $k_{on}/k_{off}$ 和玻璃体液中贮库的容量)必须等于或略高于进入系统循环的消除率。

[0207] 选择用于在眼中保留药物的ECM的化合物的“容量”(=贮库大小)必须足够高。容量取决于选择用于在眼中保留药物的ECM化合物的量/可接近性,其结合位点的数量,及其周转率。

[0208] 结合剂-ECE化合物相互作用应当降低扩散常数,并且从而降低缀合物从眼的清除率。玻璃体液中扩散速率降低是增加/改善眼保留的先决条件。复杂溶液中经荧光标记的蛋白质的扩散常数可以通过荧光相关光谱法(FCS;即使用荧光的DLS)来确定。

[0209] 参数如浓度,扩散系数和MW可以直接从测量中确定。扩散系数的测试可以在“代表”玻璃体液的组成的人工测试溶液(包含选择用于保留药物的ECM化合物)中或直接在小型猪的玻璃体液中进行。

[0210] 荧光相关光谱法(FCS)分析经荧光标记的分子在由聚焦激光束照射的开放微观体积元件中的随机运动。FCS已成功应用于溶液中分子相互作用的研究。一个结合配偶体用荧光团标记并与指定的相互作用物一起孵育。结合后,经标记的复合物的MW和因此的扩散迁移率发生改变,其可以通过FCS定量。经标记的配体用恒定浓度的结合配偶体的滴定允许确定相互作用的亲和力。时间分辨测量将产生相应的速率常数。因此,复合物大小FCS的充分移位可用于确定解离和速率常数。

[0211] 布朗运动驱动经荧光标记的分子扩散通过照射的检测体积。在超灵敏崩塌光探测

器(APD)上记录发射通过体积元件的光子。通过用称为自相关的数学方法处理记录的光子计数并将推导的自相关函数拟合到适当的生物物理模型来分析波动。

[0212]  $J = -D \cdot dc/dx$

[0213]  $dc/dt = D \cdot (d^2c) / (dx^2)$

[0214] J: 扩散通量

[0215] D: 扩散常数

[0216] c: 浓度

[0217] x: 距离

[0218] t: 时间

[0219] 可以选择用于在眼中保留药物的ECM化合物是在玻璃体液/玻璃体内发现的潜在不溶性蛋白质,如例如胶原(II, IX, V/XI, IV型等),透明质酸(与胶原一起形成结构),硫酸软骨素和硫酸肝素。

[0220] 本发明涉及(至少)双特异性结合剂,其包含特异性结合发挥治疗效果的靶标的第一结合位点和特异性结合选择用于在眼中保留所述(至少)双特异性结合剂的ECM化合物的第二结合位点。

[0221] 根据本发明的示例性结合剂是抗地高辛配基(digoxigenin)结合剂,其与针对选择用于在眼中保留药物的ECM化合物的第二结合特异性组合。

[0222] 已经在体外和体内测试了不同的构建体:

[0223] 作为参考:

[0224] -抗地高辛配基抗体Fab(以下表示为FAB),

[0225] -与20kDa的PEG残基缀合的抗地高辛配基抗体Fab(以下表示为FAB-PEG),

[0226] 作为双特异性结合剂/融合蛋白:

[0227] -与肝素结合结构域缀合的抗地高辛配基抗体Fab(包含残基111-165的人VEGF片段;在下文中表示为FAB-HBD),

[0228] -与三种不同的抗胶原II抗体scFv缀合的抗地高辛配基抗体Fab(如下表示为FAB-COLL-I (SEQ ID NO:9 (VH), 10 (VL) 和11 (scFv)), FAB-COLL-II (SEQ ID NO:12 (VH), 13 (VL) 和14 (scFv)), FAB-COLL-III (SEQ ID NO:15 (VH), 16 (VL) 和17 (scFv), 其结合动力学不同)。

[0229] 在小型猪研究中,在玻璃体内注射(d0)相应构建体的500nM溶液后168,336和672小时,在玻璃体,视网膜和脉络膜中测定不同构建体的浓度。

[0230] 在玻璃体中,确定了以下依赖于时间的浓度:

	168 h (pmol/g)	336 h (pmol/g)	672 h (pmol/g)
FAB	82.5	53.6	6.7
FAB-PEG	128.6	93.3	32.5
[0231] FAB-HBD	45.2	10.3	2.1
FAB-COLL-I	165.6	59.2	10.4
FAB-COLL-II	171.0	58.5	19.6
FAB-COLL-III	149.3	62.0	11.1

[0232] 在视网膜中,确定了以下依赖于时间的浓度:



	168 h (pmol/g)	336 h (pmol/g)	672 h (pmol/g)
[0233] FAB	85.9	17.6	5.6
FAB-PEG	50.3	43.6	5.4
FAB-HBD	72.5	12.6	1.1
FAB-COLL-I	78.2	52.6	6.7
FAB-COLL-II	101.3	67.7	13.6
FAB-COLL-III	68.2	41.6	6.6

[0234] 在脉络膜中,确定了以下依赖于时间的浓度:

	168 h (pmol/g)	336 h (pmol/g)	672 h (pmol/g)
[0235] FAB	29.6	21.4	2.0
FAB-PEG	54.8	34.4	23.9
FAB-HBD	60.2	13.1	1.6
FAB-COLL-I	64.2	51.7	5.4
FAB-COLL-II	68.2	41.6	6.6
FAB-COLL-III	129.5	37.8	7.2

[0236] 不同的胶原scFv具有以下体外特征:

[0237] 眼的不同隔室(组织)中不同构建体的半衰期显示在图1中。

[0238] 图2中显示了眼的不同隔室(组织)相对于不同构建体的暴露。

[0239] 使用BIAcore以及在人工扩散测试溶液中在体内在小型猪中并且在体外确定构建体的特征参数。数据如下表所示。

	$K_D$ (nM) 猪/人胶原 II	扩散速率 FCS (与单独的 PBS 相比, 在等摩 尔浓度下包含 ECM 化合物的 PBS 的增加)	扩散速率 FCS (与 PBS 相 比, 玻璃体液 的增加)
[0240] FAB	n.a.	100 %	100 %
FAB-PEG	n.a.	+ 65-100 %	+ 70-100 %
FAB-HBD (40 nM)	n.a.	+ 25 %	+ 35 %
FAB-COLL-I (2 nM)	56 / 30	+ 180 %	+ 35-130 %
FAB-COLL-II (8 nM)	50 / 15	+ 260 %	+ 140-310 %
FAB-COLL-III (8 nM)	342 / 180	+ 40 %	+ 30-85 %

	浓度(nM)	扩散时间玻璃 体液(微秒)	扩散时间 PBS (微秒)
[0241] FAB	8	270	267
FAB-COLL-I	2	632	477
FAB-COLL-II	8	1113	347
FAB-COLL-III	8	497	390

[0242] 对于FAB-COLL-II,在VF中发现扩散时间增加3.2倍(即扩散减少),并且在补充有

胶原的PBS (相同的FAB-COLL-II浓度) 中扩散时间增加2.7倍。

	$t_{1/2}$ 玻璃体 (h)	C0 估计 (nM)
[0243] FAB	135	196
FAB-PEG	249	205
FAB-HBD (40 nM)	118	121
FAB-COLL-I (8 nM)	125	421
FAB-COLL-II (2 nM)	169	341

	$t_{1/2}$ 玻璃体 (h)	C0 估计 (nM)
[0244] FAB-COLL-III (8 nM)	134	355

[0245] 本文公开的多特异性结合剂/融合蛋白

[0246] -支持长的玻璃体内半衰期和短的全身半衰期,以允许不频繁给药并最小化/排除全身毒性作用,

[0247] -具有玻璃体保留,导致从眼释放更缓慢,全身 $C_{max}$ 低,全身毒性更小,

[0248] -对所选ECM化合物的亲和力增加,导致药物浓度更低,这可以导致给药频率更低,

[0249] -具有特定的玻璃体保留部分,导致长的玻璃体内半衰期,

[0250] -具有结合玻璃体保留部分的低分子量形式,以补偿跨玻璃体和血液视网膜屏障的快速扩散,

[0251] -是一种最适合用于眼装置的低分子量形式,

[0252] -通过增加第三特异性可导致更高的功效,

[0253] -当包含Fc区时是高MW形式,由于不与FcRn结合的沉默Fc部分,其具有缩短的全身半衰期。

[0254] 一方面,本发明提供了与人胶原II结合的分离的抗体。

[0255] 在某些实施方案中,抗人胶原II抗体在小型猪的玻璃体液中在8nM浓度下具有超过750微秒的扩散时间,在一个实施方案中超过1000微秒。

[0256] 在某些实施方案中,抗人胶原II抗体还特异性结合猪胶原II。

[0257] 在某些实施方案中,抗人胶原II抗体在8nM浓度下具有小于400nM的与猪胶原II结合的 $K_D$ 值。在一个实施方案中, $K_D$ 小于100nM。

[0258] 在某些实施方案中,抗人胶原II抗体对人胶原II的 $K_D$ 值小于200nM。在一个实施方案中, $K_D$ 小于50nM。

[0259] 在某些实施方案中,抗人胶原II抗体在小型猪玻璃体中具有超过150小时的半衰期。

[0260] 在某些实施方案中,抗人胶原II抗体在小型猪中的估计的C0大于200nM。在一个实施方案中,C0大于300nM。

[0261] 在一个方面,本发明提供了抗体,其包含SEQ ID NO:09的根据Kabat确定的至少一个,至少两个或全部三个VH HVR。

[0262] 在一个方面,本发明提供了抗体,其包含SEQ ID NO:12的根据Kabat确定的至少一

个,至少两个或全部三个VH HVR。

[0263] 在一个方面,本发明提供了抗体,其包含SEQ ID NO:15的根据Kabat确定的至少一个,至少两个或全部三个VH HVR。

[0264] 在一个方面,本发明提供了抗体,其包含SEQ ID NO:10的根据Kabat确定的至少一个,至少两个或全部三个VL HVR。

[0265] 在一个方面,本发明提供了抗体,其包含SEQ ID NO:13的根据Kabat确定的至少一个,至少两个或全部三个VL HVR。

[0266] 在一个方面,本发明提供了抗体,其包含SEQ ID NO:16的根据Kabat确定的至少一个,至少两个或全部三个VL HVR。

[0267] 另一方面,本发明的抗体包含(a) VH结构域,其包含SEQ ID NO:09的根据Kabat确定的至少一个,至少两个或所有三个VH HVR序列;(b) VL结构域,其包含SEQ ID NO:10的根据Kabat确定的至少一个,至少两个或所有三个VL HVR序列。

[0268] 另一方面,本发明的抗体包含(a) VH结构域,其包含SEQ ID NO:12的根据Kabat确定的至少一个,至少两个或所有三个VH HVR序列;(b) VL结构域,其包含SEQ ID NO:13的根据Kabat确定的至少一个,至少两个或所有三个VL HVR序列。

[0269] 另一方面,本发明的抗体包含(a) VH结构域,其包含SEQ ID NO:15的根据Kabat确定的至少一个,至少两个或所有三个VH HVR序列;(b) VL结构域,其包含SEQ ID NO:16的根据Kabat确定的至少一个,至少两个或所有三个VL HVR序列。

[0270] 在任何上述实施方案中,抗人胶原II抗体是人源化的。在一个实施方案中,抗人胶原II抗体包含如任何上述实施方案中的HVR,并且还包含受体人框架,例如,人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0271] 另一方面,抗人胶原II抗体包含与SEQ ID NO:09的氨基酸序列具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%的序列同一性的重链可变结构域(VH)序列。在某些实施方案中,具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%同一性的VH序列含有相对于参考序列的置换(例如,保守置换),插入或缺失,但包含该序列的抗人胶原II抗体保留与人胶原II结合的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:09中已经置换,插入和/或缺失总共1至10个氨基酸。在某些实施方案中,置换,插入或缺失发生在HVR外部的区域中(即,在FR中)。任选地,抗人胶原II抗体包含SEQ ID NO:09中的VH序列,包括该序列的翻译后修饰。

[0272] 另一方面,抗人胶原II抗体包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%的序列同一性的重链可变结构域(VH)序列。在某些实施方案中,具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%同一性的VH序列含有相对于参考序列的置换(例如,保守置换),插入或缺失,但包含该序列的抗人胶原II抗体保留与人胶原II结合的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:12中已经置换,插入和/或缺失总共1至10个氨基酸。在某些实施方案中,置换,插入或缺失发生在HVR外部的区域中(即,在FR中)。任选地,抗人胶原II抗体包含SEQ ID NO:12中的VH序列,包括该序列的翻译后修饰。

[0273] 另一方面,抗人胶原II抗体包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%的序列同一性的重链可变结构

域(VH)序列。在某些实施方案中,具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%同一性的VH序列含有相对于参考序列的置换(例如,保守置换),插入或缺失,但包含该序列的抗人胶原II抗体保留与人胶原II结合的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:15中已经置换,插入和/或缺失总共1至10个氨基酸。在某些实施方案中,置换,插入或缺失发生在HVR外部的区域中(即,在FR中)。任选地,抗人胶原II抗体包含SEQ ID NO:15中的VH序列,包括该序列的翻译后修饰。

[0274] 另一方面,提供了抗人胶原II抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%的序列同一性的轻链可变结构域(VL)。在某些实施方案中,具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%同一性的VL序列含有相对于参考序列的置换(例如,保守置换),插入或缺失,但包含该序列的抗人胶原II抗体保留与人胶原II结合的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:10中已经置换,插入和/或缺失总共1至10个氨基酸。在某些实施方案中,置换,插入或缺失发生在HVR外部的区域中(即,在FR中)。任选地,抗人胶原II抗体包含SEQ ID NO:10中的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。

[0275] 另一方面,提供了抗人胶原II抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%的序列同一性的轻链可变结构域(VL)。在某些实施方案中,具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%同一性的VL序列含有相对于参考序列的置换(例如,保守置换),插入或缺失,但包含该序列的抗人胶原II抗体保留与人胶原II结合的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:13中已经置换,插入和/或缺失总共1至10个氨基酸。在某些实施方案中,置换,插入或缺失发生在HVR外部的区域中(即,在FR中)。任选地,抗人胶原II抗体包含SEQ ID NO:13中的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。

[0276] 另一方面,提供了抗人胶原II抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%的序列同一性的轻链可变结构域(VL)。在某些实施方案中,具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%同一性的VL序列含有相对于参考序列的置换(例如,保守置换),插入或缺失,但包含该序列的抗人胶原II抗体保留与人胶原II结合的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:16中已经置换,插入和/或缺失总共1至10个氨基酸。在某些实施方案中,置换,插入或缺失发生在HVR外部的区域中(即,在FR中)。任选地,抗人胶原II抗体包含SEQ ID NO:16中的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。

[0277] 在另一方面,提供了抗人胶原II抗体,其中所述抗体包含如上文提供的任何实施方案中的VH,和如上文提供的任何实施方案中的VL。在一个实施方案中,所述抗体分别包含SEQ ID NO:09和SEQ ID NO:10中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0278] 在另一方面,提供了抗人胶原II抗体,其中所述抗体包含如上文提供的任何实施方案中的VH,和如上文提供的任何实施方案中的VL。在一个实施方案中,所述抗体分别包含SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0279] 在另一方面,提供了抗人胶原II抗体,其中所述抗体包含如上文提供的任何实施方案中的VH,和如上文提供的任何实施方案中的VL。在一个实施方案中,所述抗体分别包含SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0280] 在另一方面,本发明提供了与本文提供的抗人胶原II抗体结合相同表位的抗体。

[0281] 在本发明的另一方面,根据任何上述实施方案的抗人胶原II抗体是单克隆抗体,包括嵌合抗体,人源化抗体或人抗体。在一个实施方案中,抗人胶原II抗体是抗体片段,例如Fv,Fab,Fab',scFv,双抗体或F(ab')<sub>2</sub>片段。

[0282] 在本发明的另一方面,根据任何上述实施方案的抗人胶原II抗体是单克隆抗体scFv片段或Fab。在一个实施方案中,scFv片段具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列。在一个实施方案中,scFv片段具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在一个实施方案中,scFv片段具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0283] IV.产生

[0284] 本文公开的多特异性结合剂/融合蛋白通过重组方法产生。因此,本文报道的一个方面是编码本文报道的多特异性结合剂的核酸,另一方面是包含编码本文报道的多特异性结合剂的核酸的细胞。用于重组生产的方法在现有技术中是众所周知的,并且包括在原核和真核细胞中的蛋白质表达,随后分离多特异性结合剂并通常纯化至药学上可接受的纯度。为了在宿主细胞中表达如上所述的多特异性结合剂,通过标准方法将编码各链的核酸插入表达载体中。表达在适当的原核或真核宿主细胞如CHO细胞,NS0细胞,SP2/0细胞,HEK293细胞,COS细胞,PER.C6细胞,酵母或大肠杆菌细胞中进行,并从所述细胞(培养上清液或裂解后的细胞)中回收多特异性结合剂。用于重组产生抗体的一般方法在现有技术中是公知的,并且描述于例如Makrides,S.C.,Protein Expr.Purif.17(1999)183-202,Geisse,S.,等.,Protein Expr.Purif.8(1996)271-282,Kaufman,R.J.,Mol.Biotechnol.16(2000)151-160,和Werner,R.G.,Drug Res.48(1998)870-880的综述文章中。

[0285] 可以使用例如如US 4,816,567中所述的重组方法和制剂产生抗体。

[0286] 在一个实施方案中,提供了编码如本文所述的多特异性结合剂的分离的核酸。这种核酸可以编码包含多特异性结合剂的VL的氨基酸序列和/或包含多特异性结合剂的VH的氨基酸序列。在进一步的实施方案中,提供了包含这种核酸的一种或多种载体(例如,表达载体)。在进一步的实施方案中,提供了包含这种核酸的宿主细胞。在一个这样的实施方案中,宿主细胞包含(例如,转化有):(1)载体,其包含编码包含多特异性结合剂的VL的氨基酸序列和包含多特异性结合剂的VH的氨基酸序列的核酸。或(2)第一载体,其包含编码包含多特异性结合剂的VL的氨基酸序列的核酸和第二载体,其包含编码包含多特异性结合剂的VH的氨基酸序列的核酸。在一个实施方案中,宿主细胞是真核细胞,例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴细胞(例如,Y0,NS0,Sp20细胞)。在一个实施方案中,提供了制备如本文报道的多特异性结合剂的方法,其中所述方法包括在适于表达多特异性结合剂的条件培养如上所述包含编码多特异性结合剂的核酸的宿主细胞,并且任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)中回收多特异性结合剂。

[0287] 因此,本文报道的一个方面是制备本文报道的多特异性结合剂的方法,其包括步骤:

[0288] a) 用包含编码所述多特异性结合剂的核酸分子的载体转化宿主细胞,

[0289] b) 在允许合成所述多特异性结合剂的条件培养所述宿主细胞,和

[0290] c) 从培养物中回收所述多特异性结合剂。

[0291] 在一个实施方案中,c)的回收步骤包括使用轻链恒定结构域特异性捕获试剂(取决于双特异性抗体中是否包含 $\kappa$ 或 $\lambda$ 轻链,其例如特异于 $\kappa$ 或 $\lambda$ 恒定轻链)。在一个实施方案中,该轻链特异性捕获试剂以结合-洗脱模式使用。这种轻链恒定结构域特异性捕获试剂的实例是例如KappaSelect™和LambdaFabSelect™(可从GE Healthcare/BAC获得),其基于高度刚性的琼脂糖基质,可实现大规模的高流速和低背压。这些材料含有分别与 $\kappa$ 或 $\lambda$ 轻链的恒定区结合的配体(即缺少轻链恒定区的片段不会结合)。因此,两者都能够结合含有轻链恒定区的其他靶分子,例如IgG,IgA和IgM。配体通过长亲水间隔臂与基质连接,使其易于与靶分子结合。其是基于针对人Ig $\kappa$ 或 $\lambda$ 筛选的单链抗体片段。

[0292] 多特异性结合剂通过常规免疫球蛋白纯化方法适当地与培养基分离,所述方法如例如亲和色谱(蛋白A-琼脂糖凝胶,或KappaSelect™,LambdaFabSelect™),羟磷灰石色谱,凝胶电泳或透析。

[0293] 编码单克隆抗体的DNA和RNA易于使用常规方法分离和测序。B细胞或杂交瘤细胞可以作为这种DNA和RNA的来源。一旦分离,可将DNA插入表达载体中,然后将其转染到宿主细胞(如HEK 293细胞,CHO细胞或不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞)中,以获得宿主细胞中重组单克隆抗体的合成。

[0294] 通过标准技术,包括碱/SDS处理,CsCl条带,柱层析,琼脂糖凝胶电泳和本领域熟知的其它技术(参见例如Ausubel,F.,等.,ed.Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing and Wiley Interscience,New York(1987)),进行多特异性结合剂的纯化以消除细胞组分或其他污染物,例如其他细胞核酸或蛋白质。不同的方法已经很好地建立并广泛用于蛋白质纯化,例如亲和色谱(例如蛋白A或蛋白G亲和色谱),离子交换色谱(例如阳离子交换(羧甲基树脂),阴离子交换(氨基乙基树脂)和混合模式交换),亲疏吸附(例如用 $\beta$ -巯基乙醇和其他SH配体),疏水相互作用或芳香吸附色谱(例如用苯基琼脂糖,氮杂-嗜酸树脂或间氨基苯硼酸),金属螯合亲和色谱(例如用Ni(II)-和Cu(II)-亲和材料),尺寸排阻色谱和电泳方法(如凝胶电泳,毛细管电泳)(Vijayalakshmi,M.A.,Appl.Biochem.Biotech.75(1998)93-102)。

[0295] 用于克隆或表达编码多特异性结合剂的载体的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,多特异性结合剂可以在细菌中产生,特别是当不需要糖基化时。对于在细菌中表达多肽,参见例如US 5,648,237,US 5,789,199,和US 5,840,523(还参见Charlton,K.A.,Methods in Molecular Biology,Vol.248,Lo,B.K.C.(ed.),Humana Press,Totowa,NJ(2003),pp.245-254,描述了大肠杆菌中抗体片段的表达)。表达后,多特异性结合剂可以从可溶性级分中的细菌细胞糊中分离,并可以进一步纯化。

[0296] 除了原核生物之外,真核微生物例如丝状真菌或酵母也是编码多特异性结合剂的载体的合适克隆或表达宿主,包括糖基化途径已经“人源化”的真菌和酵母菌株(导致产生具有部分或完全人糖基化模式的多特异性结合剂)。参见Gerngross,T.U.,Nat.Biotech.22(2004)1409-1414;和Li,H.等.,Nat.Biotech.24(2006)210-215。

[0297] 用于表达糖基化多特异性结合剂的合适宿主细胞还来源于多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了许多杆状病毒株,其可以与昆虫细胞一起使用,特别是用于转染草地夜蛾(Spodoptera frugiperda)细胞。

[0298] 植物细胞培养物也可用作宿主。参见,例如,US 5,959,177,US 6,040,498,US 6,420,548,US 7,125,978和US 6,417,429(描述用于在转基因植物中产生抗体的 PLANTIBODIES™技术)。

[0299] 脊椎动物细胞也可用作宿主。例如,适于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例是由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(HEK293或293细胞,如描述于例如Graham,F.L.,等.,J.Gen Virol.36(1977)59-74中的);小仓鼠肾细胞(BHK);小鼠睾丸支持细胞(TM4细胞,如描述于Mather,J.P.,Biol.Reprod.23(1980)243-252中的);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);布法罗(buffalo)大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);TRI细胞,如描述于例如Mather,J.P.,等.,Annals N.Y.Acad.Sci.383(1982)44-68中的);MRC 5细胞;和FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,其包括DHFR-CHO细胞(Urlaub,G.,等.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77(1980)4216-4220);和骨髓瘤细胞系,如Y0,NS0和Sp2/0。关于适用于抗体产生的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见,例如,Yazaki,P.和Wu,A.M.,Methods in Molecular Biology,Vol.248,Lo,B.K.C.(ed.),Humana Press,Totowa,NJ(2004),pp.255-268。

#### [0300] V. 药物制剂

[0301] 如本文所公开的多特异性结合剂/融合蛋白可具有有价值的功效/安全性特征,并且可为需要相应治疗的患者提供益处。

[0302] 在一个方面,提供了本文报道的多特异性结合剂,其用作药物。

[0303] 在另一方面,本发明提供多特异性结合剂在制造或制备药物中的用途。根据任何实施方案的“个体”可以是人。

[0304] 在另一方面,本发明提供药物制剂,其包含本文提供的任何多特异性结合剂,例如,用于本文概述的任何治疗方法中。在一个实施方案中,药物制剂包含本文提供的任何多特异性结合剂和药学上可接受的载体。在另一个实施方案中,药物制剂包含本文提供的任何多特异性结合剂和至少一种另外的治疗剂。

[0305] 本文报道的一个方面是包含本文报道的多特异性结合剂的药物制剂。

[0306] 通过将具有所需纯度的多特异性结合剂与一种或多种任选的药学上可接受的载体混合来制备如本文所述的多特异性结合剂的药物制剂(以冻干制剂或水溶液的形式)(Remington's Pharmaceutical Sciences,16th edition,Osol,A.(ed.)(1980))。药学上可接受的载体通常在所用剂量和浓度下对接受者无毒,并且包括但不限于:缓冲剂,例如磷酸盐,柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚,丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)的多肽;蛋白质,例如血清白蛋白,明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,组氨酸,精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖,甘露糖或糊精;螯合剂例如EDTA;糖类,例如蔗糖,甘露醇,海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子例如钠;金属络合物(例如锌-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,例如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性药学上

可接受的载体还包括间质药物分散剂,例如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,例如rhuPH20(HYLENEX<sup>®</sup>,Baxter International,Inc.)。某些示例性sHASEGP(包括rhuPH20)和使用方法描述于US 2005/0260186和US 2006/0104968中。在一个方面,sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶如软骨素酶组合。

[0307] 示例性的冻干抗体制剂描述于US 6,267,958中。水性抗体制剂包括US 6,171,586和WO 2006/044908中描述的那些,后者制剂包括组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0308] 本文的制剂还可含有一种以上的活性成分,这些活性成分对于所治疗的具体适应症是必需的,优选那些具有互补活性但不会相互产生不利影响的活性成分。这种活性成分合适地以对预期目的有效的量组合存在。

[0309] 用于体内施用的制剂通常是无菌的。例如,通过无菌过滤膜过滤可以容易地实现无菌。

[0310] 本文报道的另一方面是如本文报道的多特异性结合剂在制备药物制剂中的用途。本文报道的另一方面是制备包含本文报道的多特异性结合剂的药物制剂的方法。在另一方面,提供了制剂,例如,与药物载体一起配制的含有本文报道的多特异性结合剂的药物制剂。

[0311] 可以使用许多可能的递送模式,包括但不限于眼内应用或局部应用。在一个实施方案中,所述应用是眼内的并且包括但不限于,结膜下注射,颅内注射,经由颞颥缘(termporai limbus)注射进入前房,基质内注射,角膜内注射,视网膜下注射,房水注射,眼球下注射或持续递送装置,玻璃体内注射(例如,前,中或后玻璃体注射)。在一个实施方案中,该应用是局部的并且包括但不限于滴眼剂到角膜。

[0312] 在一个实施方案中,本文报道的多特异性结合剂或药物制剂经由玻璃体内应用而施用,例如经由玻璃体内注射施用。这可以按照本领域已知的标准程序进行(参见,例如,Ritter等.,J.Clin.Invest.116(2006)3266-3276,Russelakis-Carneiro等.,Neuropathol.Appl.Neurobiol.25(1999)196-206,和Wray等.,Arch.Neurol.33(1976)183-185)。

[0313] 在一些实施方案中,提供治疗试剂盒,其含有本文所述药物制剂中存在的一个或多个剂量的多特异性结合剂,用于玻璃体内注射药物制剂的合适装置,以及详细说明用于进行注射的合适受试者和方案的说明书。在这些实施方案中,通常将制剂经由玻璃体内注射施用给需要治疗的受试者。这可以按照本领域已知的标准程序进行(参见,例如,Ritter等.,J.Clin.Invest.116(2006)3266-3276,Russelakis-Carneiro等.,Neuropathol.Appl.Neurobiol.25(1999)196-206,和Wray等.,Arch.Neurol.33(1976)183-185)。

[0314] 制剂还可含有佐剂,例如防腐剂,润湿剂,乳化剂和分散剂。通过上文的灭菌程序和通过包含各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯,氯丁醇,苯酚,山梨酸等)可以确保防止微生物的存在。还希望的是在制剂中包含等渗剂,例如糖,氯化钠等。另外,可以通过包含延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来延长可注射药物形式的吸收。

[0315] 无论选择何种施用途径,本文报道的多特异性结合剂(其可以以合适的水合形式使用)和/或如本文报道的药物制剂通过本领域技术人员已知的常规方法配制成药学上可



接受的剂型。

[0316] 可以改变本文报道的药物制剂中活性成分的实际剂量水平,以便获得以下活性成分的量,所述活性成分的量有效实现特定患者,制剂和施用方式的所需治疗应答,而不对患者有毒。选择的剂量水平取决于多个药代动力学因素,包括所用特定制剂的活性,施用途径,施用时间,所用特定化合物的排泄速率,治疗持续时间,用于与所用特定制剂组合使用的其他药物,化合物和/或材料,所治疗患者的年龄,性别,体重,状况,一般健康状况和既往病史,以及医学领域中众所周知的相似因素。

[0317] 制剂必须是无菌的和流动的,以使制剂可通过注射器递送。除水之外,载体优选是等渗缓冲盐水溶液。

[0318] 例如,通过使用表面活性剂可以保持适当的流动性。在许多情况下,优选在制剂中包含等渗剂,例如糖,多元醇例如甘露醇或山梨糖醇,和氯化钠。

[0319] 所述制剂可包含眼用贮库制剂,其包含用于结膜下施用的活性剂。眼用贮库制剂包含基本上纯的活性剂(例如本文报道的多特异性结合剂)的微粒。包含本文报道的多特异性结合剂的微粒可以包埋在生物相容的药学上可接受的聚合物或脂质包封剂中。贮库制剂可以适于在延长的时间段内释放所有或基本上所有的活性物质。如果存在,聚合物或脂质基质可以适于在释放所有或基本上所有活性剂后充分降解以从给药部位转运。贮库制剂可以是液体制剂,包含药学上可接受的聚合物和溶解的或分散的活性剂。注射后,聚合物例如通过凝胶化或沉淀在注射部位形成贮库。

[0320] 本文报道的另一一方面是本文报道的多特异性结合剂,其用于治疗眼血管疾病。

[0321] 本文报道的另一一方面是本文报道的药物制剂,其用于治疗眼血管疾病。

[0322] 本文报道的另一方面是如本文报道的多特异性结合剂在制备用于治疗眼血管疾病的药物中的用途。

[0323] 本文报道的另一方面是治疗患有眼血管疾病的患者的方法,所述方法是通过向需要此种治疗的患者施用本文报道的多特异性结合剂。

[0324] VI. 治疗方法

[0325] 本文公开的任何多特异性结合剂/融合蛋白可用于治疗方法。

[0326] 在某些实施方案中,提供了用于治疗方法的多特异性结合剂。在一个这样的实施方案中,所述方法还包括向个体施用有效量的至少一种例如如下所述的另外的治疗剂。根据任何上述实施方案的“个体”在一个优选实施方案中是人。

[0327] 在某些实施方案中,提供了用于治疗方法的多特异性结合剂。在一个这样的实施方案中,所述方法还包括向个体施用有效量的至少一种例如如下所述的另外的治疗剂。根据任何实施方案的“个体”在一个优选实施方案中是人。

[0328] 本文报道的多特异性结合剂将以符合良好医学实践的方式配制,给药和施用。在此背景下考虑的因素包括所治疗的特定疾病,所治疗的特定哺乳动物,个体患者的临床症状,疾病的原因,药剂的递送部位,施用方法,施用方案,以及医生所知的其他因素。多特异性结合剂不必是,但任选地与一种或多种目前用于预防或治疗所述疾病的药剂一起配制。这些其他药剂的有效量取决于制剂中存在的多特异性结合剂的量,疾病或治疗的类型,以及上面讨论的其他因素。这些通常以与本文所述相同的剂量和给药途径使用,或以任何剂量和通过经验/临床确定为合适的任何途径使用。

[0329] 为了预防或治疗疾病,本文报道的多特异性结合剂的适当剂量(当单独使用或与一种或多种其他治疗剂组合使用时)将取决于待治疗的疾病类型,多特异性结合剂的类型,疾病的严重程度和病程,是否施用多特异性结合剂用于预防或治疗目的,既往治疗,患者的临床病史和对多特异性结合剂的应答,以及主治医师的自由裁量权。多特异性结合剂适合一次或在一系列治疗中施用给患者。对于数天或更长时间的重复施用,取决于病症,通常持续治疗直至发生所希望的疾病症状抑制。这些剂量可以间歇施用,例如,每周或每三周(例如,使患者接受约2至约20个,或例如约6个剂量的抗体)。可施用初始较高负荷剂量,然后施用一个或多个较低剂量。通过常规技术和测定可以容易地监测该疗法的进展。

#### [0330] VII. 制品

[0331] 在本文报道的另一方面,提供了含有可用于治疗,预防和/或诊断上述疾病的材料的制品。制品包括容器和容器上或与容器相关的标签或包装说明书。合适的容器包括例如瓶子,药瓶,注射器等。容器可以由多种材料形成,例如玻璃或塑料。容器容纳制剂(其本身或与另一种有效治疗,预防和/或诊断病症的制剂组合),并且可具有无菌进入口(例如容器可以是静脉内溶液袋或具有塞子的药瓶,其可通过皮下注射针刺穿)。制剂中的至少一种活性剂是本文报道的多特异性结合剂。标签或包装说明书表明该制剂用于治疗所选择的病症。此外,制品可包括(a)其中含有制剂的第一容器,其中所述制剂包含本文报道的多特异性结合剂;(b)含有制剂的第二容器,其中所述制剂包含另外的治疗剂。如本文报道的该实施方案中的制品还可包含包装说明书,其指示制剂可用于治疗特定病症。备选地或另外地,制品还可包含第二(或第三)容器,其包含药学上可接受的缓冲液,例如抑菌性注射用水(BWFI)或磷酸盐缓冲盐水。它还可以包括从商业和用户角度所需的其他材料,包括其他缓冲剂,稀释剂,过滤器,针头和注射器。

#### [0332] VIII. 修饰

[0333] 在另一方面,根据任何上述实施方案的多特异性结合剂可以结合如以下第1-5节中所述的任何单独或组合的特征:

##### [0334] 1. 抗体亲和力

[0335] 在某些实施方案中,本文提供的多特异性结合剂对于其任何靶标具有 $\leq 100\text{nM}$ (例如 $10^{-7}\text{M}$ 或更低,例如 $10^{-7}\text{M}$ 至 $10^{-13}$ )的平衡解离常数( $K_D$ )。

[0336] 在一个实施方案中,使用BIACORE<sup>®</sup>表面等离子体共振测定法测量 $K_D$ 。例如,使用BIACORE<sup>®</sup>-2000或BIACORE<sup>®</sup>-3000(GE Healthcare Inc., Piscataway, NJ)的测定在25°C以约10个应答单位(RU)用固定化抗原CM5芯片进行。在一个实施方案中,根据供应商的说明,用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5, GE Healthcare Inc.)。将抗原用10mM乙酸钠, pH 4.8稀释至5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ( $\sim 0.2\mu\text{M}$ ),然后以5 $\mu\text{L}/\text{分钟}$ 的流速注射,以获得偶联蛋白的约10个应答单位(RU)。注射抗原后,注射1M乙醇胺以阻断未反应的基团。对于动力学测量,将Fab的两倍连续稀释液(0.78nM至500nM)在25°C以约25 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速注射到含有0.05%聚山梨醇酯20(TWEEN-20<sup>™</sup>)表面活性剂的PBS(PBST)中。通过同时拟合缔合和解离传感图,使用简单的一对一Langmuir结合模型(BIACORE<sup>®</sup>评估软件版本3.2)计算缔合速率( $k_{\text{on}}$ )和解离速率( $k_{\text{off}}$ )。平衡解离常数( $K_D$ )计算为比率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ (参见,例如,Chen, Y.等.,

J.Mol.Biol.293 (1999) 865-881)。如果上述表面等离子体共振测定的缔合速率超过 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,那么可以通过使用荧光淬灭技术测定结合速率,该技术在增加浓度的抗原存在下在25℃测量PBS (pH7.2)中的20nM抗-抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度的增加或减少(激发=295nm;发射=340nm,16nm带通),如在光谱仪中测量的,例如带有停流装置的分光光度计(Aviv Instruments)或带有搅拌比色皿的8000系列SLM-AMINCO<sup>TM</sup>分光光度计(ThermoSpectronic)。

[0337] 2.嵌合和人源化结合位点

[0338] 在某些实施方案中,本文提供的多特异性结合剂包含嵌合或人源化抗体的抗体结合位点。

[0339] 某些嵌合抗体描述于例如US 4,816,567;和Morrison,S.L.,等., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81(1984)6851-6855)。在一个实施例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如,衍生自小鼠,大鼠,仓鼠,兔或非人灵长类动物如猴的可变区)和人恒定区。在另一个实施例中,嵌合抗体是“类别转换的”抗体,其中类别或亚类已经从亲本抗体的类别或亚类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0340] 在某些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,将非人抗体人源化以降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR(例如CDR)(或其部分)衍生自非人抗体,并且FR(或其部分)衍生自人抗体序列。人源化抗体任选还包含人恒定区的至少一部分。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,HVR残基所来源于的抗体)的相应残基置换,例如,以恢复或提高抗体特异性或亲和力。

[0341] 人源化抗体及其制备方法综述于例如Almagro,J.C.和Fransson,J., Front.Biosci.13(2008)1619-1633,并且进一步描述于例如Riechmann,I.,等.,Nature 332(1988)323-329;Queen,C.,等.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86(1989)10029-10033;US 5,821,337,US 7,527,791,US 6,982,321和US 7,087,409;Kashmiri,S.V.,等.,Methods 36(2005)25-34(描述特异性决定区(SDR)移植);Padlan,E.A.,Mol.Immunol.28(1991)489-498(描述“表面再塑”);Dall'Acqua,W.F.等.,Methods 36(2005)43-60(描述“FR改组”);Osborn,J.等.,Methods 36(2005)61-68;和Klimka,A.等.,Br.J.Cancer 83(2000)252-260(描述FR改组的“引导选择”方法)。

[0342] 可用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合”方法选择的框架区域(参见,例如,Sims,M.J.,等.,J.Immunol.151(1993)2296-2308;从具有特定亚组的轻链或重链可变区的人抗体的共有序列衍生的框架区(参见,例如Carter,P.,等., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89(1992)4285-4289;以及Presta,L.G.,等.,J.Immunol.151(1993)2623-2632);人成熟(体细胞突变的)框架区或人种系框架区(参见,例如,Almagro,J.C.and Fransson,J.,Front.Biosci.13(2008)1619-1633);和来源于筛选FR文库的框架区(参见,例如,Baca,M.等.,J.Biol.Chem.272(1997)10678-10684和Rosok,M.J.等., J.Biol.Chem.271(1996)22611-22618)。

[0343] 3.人抗体结合位点

[0344] 在某些实施方案中,本文提供的多特异性结合剂包含人抗体的抗体结合位点。

[0345] 可以使用本领域已知的各种技术产生人抗体。人抗体一般描述于van Dijk,M.A.

和van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2001) 368-374和Lonberg, N., *Curr. Opin. Immunol.* 20 (2008) 450-459。

[0346] 可以通过将免疫原施用于转基因动物来制备人抗体,所述转基因动物已被修饰以响应抗原攻击产生完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。这些动物通常含有全部或部分人免疫球蛋白基因座,它们取代内源性免疫球蛋白基因座,或者在染色体外存在或随机整合到动物的染色体中。在这种转基因小鼠中,内源性免疫球蛋白基因座通常已被失活。关于从转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见Lonberg, N., *Nat. Biotech.* 23 (2005) 1117-1125。还参见例如描述XENOMOUSE™技术的US 6,075,181和US 6,150,584;描述了HuMab®技术的US 5,770,429;描述K-MMOUSE®技术的US 7,041,870和描述VELOCIMOUSE®技术的US 2007/0061900。可以进一步修饰由这些动物产生的完整抗体的人可变区,例如通过与不同的人恒定区组合。

[0347] 人抗体也可以通过基于杂交瘤的方法制备。已经描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系(参见,例如,Kozbor, D., *J. Immunol.* 133 (1984) 3001-3005; Brodeur, B.R., 等., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York (1987), pp. 51-63; 和Boerner, P., 等., *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95)。通过人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体还描述于Li, J. 等., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 3557-3562。其他方法包括例如US 7,189,826(描述从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体)和Ni, J., *Xiandai Mianyixue* 26 (2006) 265-268(描述人-人杂交瘤)中描述的那些。人杂交瘤技术(Trioma技术)描述于Vollmers, H.P. 和Brandlein, S., *Histology and Histopathology* 20 (2005) 927-937和Vollmers, H.P. 和Brandlein, S., *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27 (2005) 185-191。

[0348] 还可以通过分离选自人源噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列来产生人抗体。然后将这种可变结构域序列与期望的人恒定结构域组合。从抗体文库中选择人抗体的技术描述如下。

[0349] 4. 文库衍生的抗体结合位点

[0350] 如本文报道的多特异性结合剂可包含通过针对具有所需活性的抗体筛选组合文库而分离的抗体的抗体结合位点。

[0351] 例如,本领域已知多种方法用于产生噬菌体展示文库并筛选这些文库以获得具有期望结合特征的抗体。这些方法在例如Hoogenboom, H.R. 等., *Methods in Molecular Biology* 178 (2001) 1-37中进行了综述,并且进一步描述于例如McCafferty, J. 等., *Nature* 348 (1990) 552-554; Clackson, T. 等., *Nature* 352 (1991) 624-628; Marks, J.D. 等., *J. Mol. Biol.* 222 (1992) 581-597; Marks, J.D. 和Bradbury, A., *Methods in Molecular Biology* 248 (2003) 161-175; Sidhu, S.S. 等., *J. Mol. Biol.* 338 (2004) 299-310; Lee, C.V. 等., *J. Mol. Biol.* 340 (2004) 1073-1093; Fellouse, F.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 12467-12472; 和Lee, C.V. 等., *J. Immunol. Methods* 284 (2004) 119-132。

[0352] 在某些噬菌体展示方法中,VH和VL基因的组库通过聚合酶链反应(PCR)分别克隆,并在噬菌体文库中随机重组,然后可以如Winter, G., 等., *Ann. Rev. Immunol.* 12 (1994) 433-455中所述筛选抗原结合噬菌体。噬菌体通常展示作为单链Fv(scFv)片段或作为Fab片段的

抗体片段。来自免疫来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体,而不需要构建杂交瘤。备选地,可以克隆天然组库(例如,来自人)以提供针对广泛的非自身抗原和自身抗原的单一抗体来源,而无需任何免疫,如Griffiths,A.D.,等.,EMBO J.12(1993)725-734所述。最后,通过克隆来自干细胞的非重排V基因区段,并使用含有随机序列的PCR引物编码高度可变的CDR3区域并在体外完成重排,也可以合成地制备原始文库,如Hoogenboom,H.R.和Winter,G.,J.Mol.Biol.227(1992)381-388所述。描述人抗体噬菌体文库的专利出版物包括,例如:US 5,750,373和US 2005/0079574,US 2005/0119455,US 2005/0266000,US 2007/0117126,US 2007/0160598,US 2007/0237764,US 2007/0292936和US 2009/0002360。

[0353] 从人抗体文库分离的抗体或抗体片段在本文中被认为是人抗体或人抗体片段。

[0354] 5. 多特异性结合剂变体

[0355] 在某些实施方案中,涵盖本文提供的多特异性结合剂的氨基酸序列变体。例如,可能期望改善多特异性结合剂的结合亲和力和/或其他生物学特性。多特异性结合剂的氨基酸序列变体可以通过将适当的修饰引入编码多特异性结合剂的核苷酸序列中,或通过肽合成来制备。此类修饰包括例如多特异性结合剂的氨基酸序列内残基的缺失,和/或插入和/或置换。可以进行缺失,插入和置换的任何组合达到最终构建体,条件是最终构建体具有期望的特征例如抗原结合。

[0356] a) 置换,插入和缺失变体

[0357] 在某些实施方案中,提供了具有一个或多个氨基酸置换的多特异性结合剂变体。用于置换诱变的目标位点包括HVR和FR。保守置换显示在下表中“优选置换”的标题下。在下表中在“示例性置换”的标题下提供了更实质的变化,并且如下文参考氨基酸侧链类别进一步描述。可以将氨基酸置换引入目标多特异性结合剂中,并针对期望活性(例如保留/改善的抗原结合,降低的免疫原性,或改善的ADCC或CDC)筛选产物。

[0358] 表

原始残基	示例置换	优选置换
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0360] 氨基酸可根据常见的侧链特性分组：

[0361] (1) 疏水性：正亮氨酸, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0362] (2) 中性亲水：Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0363] (3) 酸性：Asp, Glu;

[0364] (4) 碱性：His, Lys, Arg;

[0365] (5) 影响链取向的残基：Gly, Pro;

[0366] (6) 芳香族：Trp, Tyr, Phe。

[0367] 非保守置换将需要将这些类别中的一个的成员交换为另一个类别。

[0368] 一种类型的置换变体涉及置换亲本多特异性结合剂(例如人源化或人抗体)的一

个或多个高变区残基。通常,选择用于进一步研究的所得变体将相对于亲本抗体多特异性结合剂具有某些生物学特性(例如,增加的亲和力,降低的免疫原性)的改变(例如,改善)和/或将基本上保留了亲本抗体的某些生物学特性。示例性的置换变体是亲和力成熟的多特异性结合剂,其可以方便地产生,例如,使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术,例如本文所述的那些。简而言之,突变一个或多个HVR残基并在噬菌体上展示变体多特异性结合剂并针对特定生物活性(例如结合亲和力)进行筛选。

[0369] 可以在HVR中进行改变(例如,置换),例如,以改善多特异性结合剂亲和力。这种改变可以在HVR“热点”(即由在体细胞成熟过程中经历高频突变的密码子编码的残基)(参见,例如Chowdhury,P.S.,Methods Mol. Biol. 207 (2008) 179-196)和/或接触抗原的残基中进行,测试所得变体VH或VL的结合亲和力。通过构建二级文库并从中重新选择的亲和力成熟已经描述在例如Hoogenboom,H.R.等.Methods in Molecular Biology 178 (2002) 1-37中。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法中的任何一种(例如,易错PCR,链改组或寡核苷酸定向诱变)将多样性引入选择用于成熟的可变基因中。然后创建二级文库。然后筛选文库以鉴定具有期望亲和力的任何多特异性结合剂变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR定向方法,其中若干个HVR残基(例如,每次4-6个残基)被随机化。参与抗原结合的HVR残基可以例如使用丙氨酸扫描诱变或建模特异性地被鉴定。通常CDR-H3和CDR-L3被特别地靶向。

[0370] 在某些实施方案中,置换,插入或缺失可以在一个或多个HVR内发生,只要这种改变不会显著降低多特异性结合剂结合抗原的能力。例如,可以在HVR中进行基本上不降低结合亲和力的保守改变(例如,如本文提供的保守置换)。例如,这种改变可以在HVR中的抗原接触残基之外。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,每个HVR未改变,或含有不超过一个,两个或三个氨基酸置换。

[0371] 用于鉴定可以靶向诱变的多特异性结合剂的残基或区域的有用方法称为“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham,B.C.和Wells,J.A.,Science 244 (1989) 1081-1085所述。在该方法中,鉴定残基或靶残基组(例如带电残基,例如arg,asp,his,lys和glu)并用中性或带负电荷的氨基酸(例如丙氨酸或聚丙氨酸)代替以确定多特异性结合剂与抗原的相互作用是否受到影响。可以在氨基酸位置引入另外的置换,证明对初始置换的功能敏感性。备选地或者另外地,可以使用抗原-多特异性结合剂复合物的晶体结构用于鉴定多特异性结合剂和抗原之间的接触点。可以靶向或消除这些作为置换候选物的接触残基和邻近残基。可以筛选变体以确定它们是否含有期望的性质。

[0372] 氨基酸序列插入包括长度范围从一个残基到含有一百个或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N端甲硫氨酰残基的多特异性结合剂。多特异性结合剂分子的其他插入变体包括多特异性结合剂的N末端或C末端与酶(例如对于ADEPT)或多肽的融合。

[0373] 提供以下实施例,序列和附图以帮助理解本发明,本发明的实际范围在所附权利要求中阐述。应理解,在不脱离本发明的精神的情况下,可以在所述程序中进行修改。

## 附图说明

[0374] 图1:不同构建体在眼不同隔室的半衰期;1:FAB-PEG,2:FAB-HBD,3:FAB,4:FAB-

COLL-I,5:FAB-COLL-II,6:FAB-COLL-III;上柱条:玻璃体,中间柱条:视网膜,下柱条:脉络膜。

[0375] 图2:眼的不同隔室(组织)对不同构建体的暴露;1:FAB-COLL-I,2:FAB-COLL-II,3:FAB-COLL-III,4:FAB,5:FAB-HBD,6:FAB-PEG;左柱条:玻璃体,中间柱条:视网膜,右柱条:脉络膜。

[0376] 材料和方法

[0377] 重组DNA技术

[0378] 如Sambrook,J.等.,Molecular Cloning:A laboratory manual;Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York(1989)中所述,使用标准方法操作DNA。根据制造商的说明使用分子生物学试剂。

[0379] 基因合成

[0380] 根据Geneart(Regensburg,Germany)的给定说明对所需基因区段进行订购。

[0381] DNA序列测定

[0382] 通过在MediGenomix GmbH(Martinsried,Germany)或SequiServe GmbH(Vaterstetten,Germany)进行的双链测序测定DNA序列。

[0383] DNA和蛋白质序列分析和序列数据管理

[0384] GCG(Genetics Computer Group,Madison,Wisconsin)软件包10.2版和Infomax's Vector NT1 Advance套件8.0版用于序列创建,绘图,分析,注释和说明。

[0385] 表达载体

[0386] 为了表达所述抗体,使用基于具有或不具有CMV-内含子A启动子的cDNA组织或具有CMV启动子的基因组组织的用于瞬时表达(例如在HEK293-F细胞中)的表达质粒。

[0387] 抗体基因的转录单位由以下要素构成:

[0388] -5'末端的独特限制性位点,

[0389] -来自人巨细胞病毒的即刻早期增强子和启动子,

[0390] -在cDNA组织的情况下,内含子A序列,

[0391] -人免疫球蛋白基因的5'非翻译区,

[0392] -编码免疫球蛋白重链信号序列的核酸,

[0393] -编码人抗体链(野生型或具有结构域交换)的核酸,作为cDNA或具有免疫球蛋白外显子-内含子组织的基因组组织,

[0394] -具有多腺苷酸化信号序列的3'非翻译区,和

[0395] -3'末端的独特限制性位点。

[0396] 除抗体表达盒外,质粒还包含:

[0397] -复制起点,允许质粒在大肠杆菌中复制,

[0398] -在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性的 $\beta$ -内酰胺酶基因

[0399] -来自小家鼠(Mus musculus)的二氢叶酸还原酶基因作为真核细胞中的选择标记。

[0400] 编码抗体链的核酸通过PCR和/或基因合成产生,并通过已知的重组方法和技术通过例如在相应的载体中使用独特的限制性位点连接相应的核酸区段组装。通过DNA测序验证亚克隆的核酸序列。对于瞬时转染,通过质粒制备从转化的大肠杆菌培养物(Nucleobond



AX, Macherey-Nagel) 制备更大量的质粒。

[0401] 细胞培养技术

[0402] 如Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. 和 Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc. 所述使用标准细胞培养技术。

[0403] 如下所述, 通过在悬浮培养的HEK293-F细胞中瞬时共转染各表达质粒来表达双特异性抗体。

[0404] 实施例1

[0405] 表达和纯化

[0406] HEK293-F系统中的瞬时转染

[0407] 根据制造商的说明, 使用HEK293-F系统 (Invitrogen) 通过用各质粒瞬时转染产生融合构建体。简言之, 将HEK293-F细胞 (Invitrogen) (在摇瓶中或在无血清FreeStyle™ 293表达培养基 (Invitrogen) 的搅拌发酵罐中生长) 用各表达质粒和293fectin™或fectin (Invitrogen) 的混合物转染。对于2L摇瓶 (Corning), 将HEK293-F细胞以 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL的密度接种在600mL中, 并以120rpm, 8% CO<sub>2</sub> 孵育。第二天, 将细胞以约 $1.5 \times 10^6$ 个细胞/mL的细胞密度用42mL的以下的混合物转染: A) 20mL Opti-MEM (Invitrogen), 其中600μg总质粒DNA (1μg/mL) 分别编码重链或经修饰的重链和相应的等摩尔比的轻链, 和B) 20ml Opti-MEM, 及1.2mL 293fectin或fectin (2μL/mL)。根据葡萄糖消耗, 在发酵过程中添加葡萄糖溶液。5-10天后收获含有分泌的抗体的上清液, 并从上清液中直接纯化抗体, 或将上清液冷冻并保存。

[0408] 纯化

[0409] 将含有多肽的培养上清液过滤并通过两个色谱步骤纯化。使用用PBS (1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137mM NaCl, 2.7mM KCl), pH 7.4平衡的HiTrap KappaSelect (GE Healthcare) 通过亲和和层析捕获抗体。通过用平衡缓冲液洗涤除去未结合的蛋白质, 并用100mM柠檬酸盐缓冲液 (pH 2.9) 回收融合多肽, 并在洗脱后立即用1M Tris碱 (pH 9.0) 中和至pH 6.0。使用HiLoad 26/60 Superdex 75™ (GE Healthcare) 上的尺寸排阻色谱作为第二纯化步骤。尺寸排阻色谱法在20mM组氨酸缓冲液, 0.14M NaCl, pH 6.0中进行。含有多肽的溶液用装备有Biomax-SK膜 (Millipore, Billerica, MA) 的Ultra free-CL离心过滤装置浓缩, 并储存在-80°C。

[0410] 通过使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数测量280nm处的光密度 (OD) 来确定多肽的蛋白质浓度。

[0411] 使用具有Protein Express Chip和HT Protein Express Reagents Kit的LabChip GX II (PerkinElmer) 通过CE-SDS分析多肽分子的纯度和完整性。

[0412] 使用Biosuite High Resolution SEC, 250Å, 5μm分析尺寸排阻柱 (Waters GmbH), 使用200mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250mM KCl, pH 7.0作为运行缓冲液, 通过高性能SEC测定聚集体含量。

[0413] 在通过用神经氨酸酶, O-聚糖酶和肽-N-糖苷酶F (Roche Applied Science) 的组合进行酶处理去除N-聚糖后, 通过Nano Electrospray QTOF质谱法验证还原多肽的氨基酸主链的完整性。

[0414] 实施例2

[0415] 与人和猪胶原II结合

[0416] 使用BIAcore T200仪器(GE Healthcare)通过表面等离子共振研究抗胶原抗体与人II型胶原(Millipore CC052)和猪II型胶原(USBiological C7510-31)的结合动力学。所有实验均在25℃使用HBS-P(10mM His,140mM NaCl,0.05%Tween 20pH 7.4)作为运行和稀释缓冲液进行。使用标准胺偶联化学将II型胶原固定在Series S CM5传感器芯片(GE Healthcare)上。将抗胶原抗体以浓度1.23至900nM(1:3稀释系列)注射180秒至表面(结合相)。通过用运行缓冲液洗涤,监测解离相600秒。通过注射0.85% $H_3PO_4$ 60秒再生表面。通过减去从模拟表面获得的应答来校正体积折射率差异。减去空白注射(双重参考)。使用BIAevaluation软件将得到的曲线拟合至1:1Langmuir结合模型。

[0417] 实施例3

[0418] 小型猪(minipig)药代动力学研究

[0419] 通过IVT注射,给每只7-8kg的雌性小型猪施用1.25nmol的每种药物。对于每种分子,在眼中的目标初始浓度为500nM。在施用后168,336和672小时的三个终止时间点收集玻璃体,视网膜和脉络膜样品。

[0420] 实施例4

[0421] 药代动力学参数测定

[0422] 使用ELECSYS仪器(Roche Diagnostics GmbH),用ECLIA方法分析小型猪血清,房水,玻璃体液和眼组织(视网膜,脉络膜,巩膜,虹膜,晶状体,睫状体)。

[0423] 简而言之,测试样品(校准物,质量控制或研究样品),第一检测抗体mAb<H-Fab( $\kappa$ )>M-1.7.10-IgG-Bi,第二检测抗体mAb<H-Fab(CH1)>M-1.19.31-IgG-Ru和SA-珠逐步加入检测容器中,并在每个步骤中孵育9分钟。最后,通过测量细胞检测SA-珠结合的复合物,其测量重复的SA珠的计数。计数与测试样品中的分析物浓度成比例。

[0424] Bi=生物素,Ru=钌标记,SA=链霉抗生物素蛋白

[0425] 在分析之前,使用Magana Lyser Homogenisator(Roche Diagnostics GmbH)在含有蛋白酶抑制剂的组织提取缓冲液(10mM Tris,137mM NaCl,1%Triton,10%甘油)中机械裂解玻璃体液和眼组织样品。

[0426] 三种胶原结合剂缀合物FAB-COLL-I,-II和-III的测定校准范围为4.92ng/mL至3000ng/mL(测定浓度)。

[0427] 将血清样品1:10至1:20稀释以获得有效结果。标准曲线,质量对照和样品稀释在导致10%基质浓度的测定缓冲液incl.小型猪血清中进行。低于49.2ng/mL的实验血清样品注释为“BLQ”。

[0428] 未稀释地并且稀释至1:50地测量房水,玻璃体液和眼组织样品以获得有效结果。在没有基质的测定缓冲液中完成标准曲线,质量对照和样品稀释。低于4.92ng/mL的实验房水,玻璃体液和眼组织样品注释为“BLQ”。

[0429] 实施例5

[0430] 扩散参数测定

[0431] 测试溶液-小型猪的玻璃体液-储存在-80℃。

[0432] 将Dig-3-cme-eda-Cy5溶解在DMF中,并在30%DMF/稀释缓冲液中调节至1mM Dig-

Cy5)。制备工作原液,为在PBS/0.2%BSA/1.5%DMF中的50 $\mu$ M Dig-Cy5溶液。PBS购自LONZA (#17-516F),pH 7.3-pH 7.5,并补充有0.2%BSA(级分V)。测量在384孔玻璃底测定板(MMI,#60200)中完成。

[0433] 将一个样品在冰上解冻。流体高度粘稠且透明。用裁剪的1000 $\mu$ L移液管小心地将样品上下移液十次。它温和地发泡。将100 $\mu$ l的等分试样(使用裁剪的200 $\mu$ l移液管)在干冰上冷冻并储存在-80 $^{\circ}$ C。

[0434] 其他样品类似地解冻并液化。将所有三个样品的各批量池化,等分并储存在-80 $^{\circ}$ C,样品名称为“全部”。将一些原始等分试样存储为参考样品。

[0435] 使用连接到配备有C-Apochromat 40x N.A.1.2水浸镜头(Carl Zeiss,Jena, Germany)的Axiovert 100M的ConfoCor2 FCS单元进行FCS测量。在该仪器上,Cy5用633氩氦激光器激发。用LP 650长通滤波器检测Cy5发出的红色荧光。通常在10次采集设置下进行测量10秒。荧光波动与适当的拟合形式自相关。数据分析允许确定荧光颗粒在均匀溶液中的亮度,行为和扩散时间。

## 序列表

<110> 豪夫迈-罗氏有限公司  
 <120> 用于眼科的具有增加的眼保留的融合蛋白  
 <130> P33669-W0 (ASK)  
 <150> EP16173166.6  
 <151> 2016-06-06  
 <160> 24  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 228  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> 抗地高辛配基Fab HC  
 <400> 1  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ser Ile Asn Ile Gly Ala Thr Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 [0001] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met  
 100 105 110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
 115 120 125  
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
 130 135 140  
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
 145 150 155 160  
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
 165 170 175  
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
 180 185 190  
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
 195 200 205  
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
 210 215 220  
 Pro Lys Ser Cys  
 225  
 <210> 2  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<223> 抗地高辛配基Fab LC

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Lys Asn Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Ser Ser Thr Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ile Thr Leu Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

[0002]

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 3

<211> 293

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 抗地高辛配基Fab + HBD HC

<400> 3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ser Ile Asn Ile Gly Ala Thr Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met  
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
130 135 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
210 215 220

Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Arg  
225 230 235 240

Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe  
245 250 255

Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser  
260 265 270

Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys  
275 280 285

Asp Lys Pro Arg Arg  
290

<210> 4  
<211> 488  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 抗地高辛配基Fab + 抗胶原II scFV I HC

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ser Ile Asn Ile Gly Ala Thr Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met  
100 105 110

[0003]

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
130 135 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
195 200

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
210 215 220

Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Ile  
225 230 235 240

Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg  
245 250 255

Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Asp Phe Leu Ala  
260 265 270

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly  
275 280 285

[0004] Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
290 295 300

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp  
305 310 315 320

Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Gly Ser Ala Pro Leu Thr Phe  
325 330 335

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln  
355 360 365

Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys  
370 375 380

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser  
385 390 395 400

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile  
405 410 415

Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg  
420 425 430

Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu  
435 440 445

Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp  
450 455 460

Pro Asn Gly Asn Ile Val Leu Ser Glu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln





Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp  
 305 310 315 320

Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asp Thr Ala Pro Ile Thr Phe  
 325 330 335

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln  
 355 360 365

Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys  
 370 375 380

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser  
 385 390 395 400

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile  
 405 410 415

Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg  
 420 425 430

Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu  
 435 440 445

Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn  
 450 455 460

Ile Val Gly Asp Tyr Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 465 470 475 480

[0006]

Thr Val Ser Ser

<210> 6  
 <211> 482  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 抗地高辛配基Fab + 抗胶原II scFV III HC

<400> 6

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Asn Ile Gly Ala Thr Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met  
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
 115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
 130 135 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
 145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
 165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
 180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
 195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
 210 215 220

Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Ile  
 225 230 235 240

Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg  
 245 250 255

Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ala Asp Trp Leu Ala  
 260 265 270

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp  
 275 280 285

Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 290 295 300

[0007] Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp  
 305 310 315 320

Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Gly Trp Pro Ile Thr Phe  
 325 330 335

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln  
 355 360 365

Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys  
 370 375 380

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser  
 385 390 395 400

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile  
 405 410 415

Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg  
 420 425 430

Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu  
 435 440 445

Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His  
 450 455 460

Leu Tyr Tyr Met Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 465 470 475 480

Ser Ser

<210> 7  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 肽接头

<400> 7

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10

<210> 8  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 肽接头

<400> 8

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser  
 20

<210> 9  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 抗胶原II scFV I VH

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asp Pro Asn Gly Asn Ile Val Leu Ser Glu Tyr Phe Asp Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 10  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 抗胶原II scFV I VL

<400> 10

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Asp Phe

[0008]

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Gly Ser Ala Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 11  
 <211> 250  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 抗胶原II scFV I scFv

<400> 11

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Asp Phe  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45

[0009] Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Gly Ser Ala Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser  
 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln  
 115 120 125

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser  
 130 135 140

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
 145 150 155 160

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly  
 165 170 175

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 180 185 190

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met  
 195 200 205

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 210 215 220

Arg Asp Pro Asn Gly Asn Ile Val Leu Ser Glu Tyr Phe Asp Tyr Trp  
 225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
245 250

<210> 12  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 抗胶原II scFV II VH

<400> 12

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asn Ile Val Gly Asp Tyr Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

[0010]

<210> 13  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 抗胶原II scFV II VL

<400> 13

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asp Trp  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asp Thr Ala Pro Ile  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 14  
<211> 246  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 抗胶原II scFV II scFv  
 <400> 14  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asp Trp  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asp Thr Ala Pro Ile  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser  
 100 105 110  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln  
 115 120 125  
 Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser  
 130 135 140  
 Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
 145 150 155 160  
 Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly  
 165 170 175  
 Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 180 185 190  
 Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met  
 195 200 205  
 Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 210 215 220  
 Arg Asn Ile Val Gly Asp Tyr Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 225 230 235 240  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 245

[0011]

<210> 15  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> 抗胶原II scFV III VH  
 <400> 15  
 Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val  
 1 5 10 15  
 Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile  
 20 25 30  
 Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly  
 35 40 45

Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly  
 50 55 60  
 Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
 65 70 75 80  
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 85 90 95  
 His Leu Tyr Tyr Met Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 16  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> 抗胶原II scFV III VL  
 <400> 16

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ala Asp Trp  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Gly Trp Pro Ile  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 17  
 <211> 244  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> 抗胶原II scFV III scFv  
 <400> 17

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ala Asp Trp  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Gly Trp Pro Ile  
 85 90 95

[0012]

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser  
 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln  
 115 120 125

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser  
 130 135 140

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
 145 150 155 160

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly  
 165 170 175

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 180 185 190

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met  
 195 200 205

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 210 215 220

Arg His Leu Tyr Tyr Met Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 225 230 235 240

Thr Val Ser Ser

<210> 18  
 <211> 1418  
 <212> PRT  
 <213> 智人

[0013]

<400> 18

Met Ile Arg Leu Gly Ala Pro Gln Thr Leu Val Leu Leu Thr Leu Leu  
 1 5 10 15

Val Ala Ala Val Leu Arg Cys Gln Gly Gln Asp Val Arg Gln Pro Gly  
 20 25 30

Pro Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Asp Ile Lys Asp Ile Val Gly  
 35 40 45

Pro Lys Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Ala Gly Glu Gln Gly Pro  
 50 55 60

Arg Gly Asp Arg Gly Asp Lys Gly Glu Lys Gly Ala Pro Gly Pro Arg  
 65 70 75 80

Gly Arg Asp Gly Glu Pro Gly Thr Pro Gly Asn Pro Gly Pro Pro Gly  
 85 90 95

Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Leu Gly Gly Asn Phe Ala Ala  
 100 105 110

Gln Met Ala Gly Gly Phe Asp Glu Lys Ala Gly Gly Ala Gln Leu Gly  
 115 120 125

Val Met Gln Gly Pro Met Gly Pro Met Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly  
 130 135 140

Pro Ala Gly Ala Pro Gly Pro Gln Gly Phe Gln Gly Asn Pro Gly Glu  
 145 150 155 160

Pro Gly Glu Pro Gly Val Ser Gly Pro Met Gly Pro Arg Gly Pro Pro  
 165 170 175



[0014]

Gly Pro Pro Gly Lys Pro Gly Asp Asp Gly Glu Ala Gly Lys Pro Gly  
 180 185 190

Lys Ala Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Ala Arg Gly Phe  
 195 200 205

Pro Gly Thr Pro Gly Leu Pro Gly Val Lys Gly His Arg Gly Tyr Pro  
 210 215 220

Gly Leu Asp Gly Ala Lys Gly Glu Ala Gly Ala Pro Gly Val Lys Gly  
 225 230 235 240

Glu Ser Gly Ser Pro Gly Glu Asn Gly Ser Pro Gly Pro Met Gly Pro  
 245 250 255

Arg Gly Leu Pro Gly Glu Arg Gly Arg Thr Gly Pro Ala Gly Ala Ala  
 260 265 270

Gly Ala Arg Gly Asn Asp Gly Gln Pro Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly  
 275 280 285

Pro Val Gly Pro Ala Gly Gly Pro Gly Phe Pro Gly Ala Pro Gly Ala  
 290 295 300

Lys Gly Glu Ala Gly Pro Thr Gly Ala Arg Gly Pro Glu Gly Ala Gln  
 305 310 315 320

Gly Pro Arg Gly Glu Pro Gly Thr Pro Gly Ser Pro Gly Pro Ala Gly  
 325 330 335

Ala Ser Gly Asn Pro Gly Thr Asp Gly Ile Pro Gly Ala Lys Gly Ser  
 340 345 350

Ala Gly Ala Pro Gly Ile Ala Gly Ala Pro Gly Phe Pro Gly Pro Arg  
 355 360 365

Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Ala Thr Gly Pro Leu Gly Pro Lys Gly  
 370 375 380

Gln Thr Gly Glu Pro Gly Ile Ala Gly Phe Lys Gly Glu Gln Gly Pro  
 385 390 395 400

Lys Gly Glu Pro Gly Pro Ala Gly Pro Gln Gly Ala Pro Gly Pro Ala  
 405 410 415

Gly Glu Glu Gly Lys Arg Gly Ala Arg Gly Glu Pro Gly Gly Val Gly  
 420 425 430

Pro Ile Gly Pro Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Asn Arg Gly Phe  
 435 440 445

Pro Gly Gln Asp Gly Leu Ala Gly Pro Lys Gly Ala Pro Gly Glu Arg  
 450 455 460

Gly Pro Ser Gly Leu Ala Gly Pro Lys Gly Ala Asn Gly Asp Pro Gly  
 465 470 475 480

Arg Pro Gly Glu Pro Gly Leu Pro Gly Ala Arg Gly Leu Thr Gly Arg  
 485 490 495

Pro Gly Asp Ala Gly Pro Gln Gly Lys Val Gly Pro Ser Gly Ala Pro  
 500 505 510

Gly Glu Asp Gly Arg Pro Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Ala Arg Gly  
 515 520 525

Gln Pro Gly Val Met Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Ala Asn Gly Glu  
 530 535 540

Pro Gly Lys Ala Gly Glu Lys Gly Leu Pro Gly Ala Pro Gly Leu Arg  
 545 550 555 560

Gly Leu Pro Gly Lys Asp Gly Glu Thr Gly Ala Ala Gly Pro Pro Gly  
 565 570 575

Pro Ala Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Glu Gln Gly Ala Pro Gly Pro  
 580 585 590

Ser Gly Phe Gln Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Glu Gly  
 595 600 605

Gly Lys Pro Gly Asp Gln Gly Val Pro Gly Glu Ala Gly Ala Pro Gly  
 610 615 620

Leu Val Gly Pro Arg Gly Glu Arg Gly Phe Pro Gly Glu Arg Gly Ser  
 625 630 635 640

Pro Gly Ala Gln Gly Leu Gln Gly Pro Arg Gly Leu Pro Gly Thr Pro  
 645 650 655

Gly Thr Asp Gly Pro Lys Gly Ala Ser Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly  
 660 665 670

Ala Gln Gly Pro Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Ala  
 675 680 685

Ala Gly Ile Ala Gly Pro Lys Gly Asp Arg Gly Asp Val Gly Glu Lys  
 690 695 700

Gly Pro Glu Gly Ala Pro Gly Lys Asp Gly Gly Arg Gly Leu Thr Gly  
 705 710 715 720

[0015] Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Asn Gly Glu Lys Gly Glu  
 725 730 735

Val Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ser Ala Gly Ala Arg Gly Ala Pro  
 740 745 750

Gly Glu Arg Gly Glu Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Phe Ala Gly  
 755 760 765

Pro Pro Gly Ala Asp Gly Gln Pro Gly Ala Lys Gly Glu Gln Gly Glu  
 770 775 780

Ala Gly Gln Lys Gly Asp Ala Gly Ala Pro Gly Pro Gln Gly Pro Ser  
 785 790 795 800

Gly Ala Pro Gly Pro Gln Gly Pro Thr Gly Val Thr Gly Pro Lys Gly  
 805 810 815

Ala Arg Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Ala Thr Gly Phe Pro Gly Ala  
 820 825 830

Ala Gly Arg Val Gly Pro Pro Gly Ser Asn Gly Asn Pro Gly Pro Pro  
 835 840 845

Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Lys Asp Gly Pro Lys Gly Ala Arg Gly  
 850 855 860

Asp Ser Gly Pro Pro Gly Arg Ala Gly Glu Pro Gly Leu Gln Gly Pro  
 865 870 875 880

Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser  
 885 890 895

Gly Ala Glu Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Leu Ala Gly Gln Arg Gly

	900	905	910
	Ile Val Gly Leu Pro Gly Gln Arg Gly Glu Arg Gly Phe Pro Gly Leu 915	920	925
	Pro Gly Pro Ser Gly Glu Pro Gly Lys Gln Gly Ala Pro Gly Ala Ser 930	935	940
	Gly Asp Arg Gly Pro Pro Gly Pro Val Gly Pro Pro Gly Leu Thr Gly 945	950	955
	Pro Ala Gly Glu Pro Gly Arg Glu Gly Ser Pro Gly Ala Asp Gly Pro 965	970	975
	Pro Gly Arg Asp Gly Ala Ala Gly Val Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr 980	985	990
	Gly Ala Val Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Pro Gly Ser Pro Gly 995	1000	1005
	Pro Ala Gly Pro Thr Gly Lys Gln Gly Asp Arg Gly Glu Ala Gly 1010	1015	1020
	Ala Gln Gly Pro Met Gly Pro Ser Gly Pro Ala Gly Ala Arg Gly 1025	1030	1035
	Ile Gln Gly Pro Gln Gly Pro Arg Gly Asp Lys Gly Glu Ala Gly 1040	1045	1050
	Glu Pro Gly Glu Arg Gly Leu Lys Gly His Arg Gly Phe Thr Gly 1055	1060	1065
[0016]	Leu Gln Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Asp Gln Gly 1070	1075	1080
	Ala Ser Gly Pro Ala Gly Pro Ser Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly 1085	1090	1095
	Pro Val Gly Pro Ser Gly Lys Asp Gly Ala Asn Gly Ile Pro Gly 1100	1105	1110
	Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Arg Ser Gly Glu Thr Gly 1115	1120	1125
	Pro Ala Gly Pro Pro Gly Asn Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly 1130	1135	1140
	Pro Pro Gly Pro Gly Ile Asp Met Ser Ala Phe Ala Gly Leu Gly 1145	1150	1155
	Pro Arg Glu Lys Gly Pro Asp Pro Leu Gln Tyr Met Arg Ala Asp 1160	1165	1170
	Gln Ala Ala Gly Gly Leu Arg Gln His Asp Ala Glu Val Asp Ala 1175	1180	1185
	Thr Leu Lys Ser Leu Asn Asn Gln Ile Glu Ser Ile Arg Ser Pro 1190	1195	1200
	Glu Gly Ser Arg Lys Asn Pro Ala Arg Thr Cys Arg Asp Leu Lys 1205	1210	1215
	Leu Cys His Pro Glu Trp Lys Ser Gly Asp Tyr Trp Ile Asp Pro 1220	1225	1230
	Asn Gln Gly Cys Thr Leu Asp Ala Met Lys Val Phe Cys Asn Met 1235	1240	1245

Glu Thr Gly Glu Thr Cys Val Tyr Pro Asn Pro Ala Asn Val Pro  
 1250 1255 1260

Lys Lys Asn Trp Trp Ser Ser Lys Ser Lys Glu Lys Lys His Ile  
 1265 1270 1275

Trp Phe Gly Glu Thr Ile Asn Gly Gly Phe His Phe Ser Tyr Gly  
 1280 1285 1290

Asp Asp Asn Leu Ala Pro Asn Thr Ala Asn Val Gln Met Thr Phe  
 1295 1300 1305

Leu Arg Leu Leu Ser Thr Glu Gly Ser Gln Asn Ile Thr Tyr His  
 1310 1315 1320

Cys Lys Asn Ser Ile Ala Tyr Leu Asp Glu Ala Ala Gly Asn Leu  
 1325 1330 1335

Lys Lys Ala Leu Leu Ile Gln Gly Ser Asn Asp Val Glu Ile Arg  
 1340 1345 1350

Ala Glu Gly Asn Ser Arg Phe Thr Tyr Thr Ala Leu Lys Asp Gly  
 1355 1360 1365

Cys Thr Lys His Thr Gly Lys Trp Gly Lys Thr Val Ile Glu Tyr  
 1370 1375 1380

Arg Ser Gln Lys Thr Ser Arg Leu Pro Ile Ile Asp Ile Ala Pro  
 1385 1390 1395

Met Asp Ile Gly Gly Pro Glu Gln Glu Phe Gly Val Asp Ile Gly  
 1400 1405 1410

[0017] Pro Val Cys Phe Leu  
 1415

<210> 19  
 <211> 1487  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 19

Met Ile Arg Leu Gly Ala Pro Gln Thr Leu Val Leu Leu Thr Leu Leu  
 1 5 10 15

Val Ala Ala Val Leu Arg Cys Gln Gly Gln Asp Val Gln Glu Ala Gly  
 20 25 30

Ser Cys Val Gln Asp Gly Gln Arg Tyr Asn Asp Lys Asp Val Trp Lys  
 35 40 45

Pro Glu Pro Cys Arg Ile Cys Val Cys Asp Thr Gly Thr Val Leu Cys  
 50 55 60

Asp Asp Ile Ile Cys Glu Asp Val Lys Asp Cys Leu Ser Pro Glu Ile  
 65 70 75 80

Pro Phe Gly Glu Cys Cys Pro Ile Cys Pro Thr Asp Leu Ala Thr Ala  
 85 90 95

Ser Gly Gln Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Asp Ile  
 100 105 110

Lys Asp Ile Val Gly Pro Lys Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Ala  
 115 120 125

Gly Glu Gln Gly Pro Arg Gly Asp Arg Gly Asp Lys Gly Glu Lys Gly  
 130 135 140

Ala Pro Gly Pro Arg Gly Arg Asp Gly Glu Pro Gly Thr Pro Gly Asn  
145 150 155 160

Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Leu Gly  
165 170 175

Gly Asn Phe Ala Ala Gln Met Ala Gly Gly Phe Asp Glu Lys Ala Gly  
180 185 190

Gly Ala Gln Leu Gly Val Met Gln Gly Pro Met Gly Pro Met Gly Pro  
195 200 205

Arg Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Pro Gly Pro Gln Gly Phe Gln  
210 215 220

Gly Asn Pro Gly Glu Pro Gly Glu Pro Gly Val Ser Gly Pro Met Gly  
225 230 235 240

Pro Arg Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Lys Pro Gly Asp Asp Gly Glu  
245 250 255

Ala Gly Lys Pro Gly Lys Ala Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Gln  
260 265 270

Gly Ala Arg Gly Phe Pro Gly Thr Pro Gly Leu Pro Gly Val Lys Gly  
275 280 285

His Arg Gly Tyr Pro Gly Leu Asp Gly Ala Lys Gly Glu Ala Gly Ala  
290 295 300

Pro Gly Val Lys Gly Glu Ser Gly Ser Pro Gly Glu Asn Gly Ser Pro  
305 310 315 320

[0018] Gly Pro Met Gly Pro Arg Gly Leu Pro Gly Glu Arg Gly Arg Thr Gly  
325 330 335

Pro Ala Gly Ala Ala Gly Ala Arg Gly Asn Asp Gly Gln Pro Gly Pro  
340 345 350

Ala Gly Pro Pro Gly Pro Val Gly Pro Ala Gly Gly Pro Gly Phe Pro  
355 360 365

Gly Ala Pro Gly Ala Lys Gly Glu Ala Gly Pro Thr Gly Ala Arg Gly  
370 375 380

Pro Glu Gly Ala Gln Gly Pro Arg Gly Glu Pro Gly Thr Pro Gly Ser  
385 390 395 400

Pro Gly Pro Ala Gly Ala Ser Gly Asn Pro Gly Thr Asp Gly Ile Pro  
405 410 415

Gly Ala Lys Gly Ser Ala Gly Ala Pro Gly Ile Ala Gly Ala Pro Gly  
420 425 430

Phe Pro Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Ala Thr Gly Pro  
435 440 445

Leu Gly Pro Lys Gly Gln Thr Gly Glu Pro Gly Ile Ala Gly Phe Lys  
450 455 460

Gly Glu Gln Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Pro Ala Gly Pro Gln Gly  
465 470 475 480

Ala Pro Gly Pro Ala Gly Glu Glu Gly Lys Arg Gly Ala Arg Gly Glu  
485 490 495

Pro Gly Gly Val Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro  
500 505 510

Gly Asn Arg Gly Phe Pro Gly Gln Asp Gly Leu Ala Gly Pro Lys Gly  
 515 520 525  
 Ala Pro Gly Glu Arg Gly Pro Ser Gly Leu Ala Gly Pro Lys Gly Ala  
 530 535 540  
 Asn Gly Asp Pro Gly Arg Pro Gly Glu Pro Gly Leu Pro Gly Ala Arg  
 545 550 555 560  
 Gly Leu Thr Gly Arg Pro Gly Asp Ala Gly Pro Gln Gly Lys Val Gly  
 565 570 575  
 Pro Ser Gly Ala Pro Gly Glu Asp Gly Arg Pro Gly Pro Pro Gly Pro  
 580 585 590  
 Gln Gly Ala Arg Gly Gln Pro Gly Val Met Gly Phe Pro Gly Pro Lys  
 595 600 605  
 Gly Ala Asn Gly Glu Pro Gly Lys Ala Gly Glu Lys Gly Leu Pro Gly  
 610 615 620  
 Ala Pro Gly Leu Arg Gly Leu Pro Gly Lys Asp Gly Glu Thr Gly Ala  
 625 630 635 640  
 Ala Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Glu Gln  
 645 650 655  
 Gly Ala Pro Gly Pro Ser Gly Phe Gln Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly  
 660 665 670  
 Pro Pro Gly Glu Gly Gly Lys Pro Gly Asp Gln Gly Val Pro Gly Glu  
 675 680 685  
 [0019] Ala Gly Ala Pro Gly Leu Val Gly Pro Arg Gly Glu Arg Gly Phe Pro  
 690 695 700  
 Gly Glu Arg Gly Ser Pro Gly Ala Gln Gly Leu Gln Gly Pro Arg Gly  
 705 710 715 720  
 Leu Pro Gly Thr Pro Gly Thr Asp Gly Pro Lys Gly Ala Ser Gly Pro  
 725 730 735  
 Ala Gly Pro Pro Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro  
 740 745 750  
 Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Ile Ala Gly Pro Lys Gly Asp Arg Gly  
 755 760 765  
 Asp Val Gly Glu Lys Gly Pro Glu Gly Ala Pro Gly Lys Asp Gly Gly  
 770 775 780  
 Arg Gly Leu Thr Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Asn  
 785 790 795 800  
 Gly Glu Lys Gly Glu Val Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ser Ala Gly  
 805 810 815  
 Ala Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Glu Thr Gly Pro Pro Gly Pro  
 820 825 830  
 Ala Gly Phe Ala Gly Pro Pro Gly Ala Asp Gly Gln Pro Gly Ala Lys  
 835 840 845  
 Gly Glu Gln Gly Glu Ala Gly Gln Lys Gly Asp Ala Gly Ala Pro Gly  
 850 855 860  
 Pro Gln Gly Pro Ser Gly Ala Pro Gly Pro Gln Gly Pro Thr Gly Val  
 865 870 875 880

[0020]

Thr Gly Pro Lys Gly Ala Arg Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Ala Thr  
 885 890 895  
 Gly Phe Pro Gly Ala Ala Gly Arg Val Gly Pro Pro Gly Ser Asn Gly  
 900 905 910  
 Asn Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Lys Asp Gly Pro  
 915 920 925  
 Lys Gly Ala Arg Gly Asp Ser Gly Pro Pro Gly Arg Ala Gly Glu Pro  
 930 935 940  
 Gly Leu Gln Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly  
 945 950 955 960  
 Asp Asp Gly Pro Ser Gly Ala Glu Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Leu  
 965 970 975  
 Ala Gly Gln Arg Gly Ile Val Gly Leu Pro Gly Gln Arg Gly Glu Arg  
 980 985 990  
 Gly Phe Pro Gly Leu Pro Gly Pro Ser Gly Glu Pro Gly Lys Gln Gl  
 995 1000 1005  
 Ala Pro Gly Ala Ser Gly Asp Arg Gly Pro Pro Gly Pro Val Gly  
 1010 1015 1020  
 Pro Pro Gly Leu Thr Gly Pro Ala Gly Glu Pro Gly Arg Glu Gly  
 1025 1030 1035  
 Ser Pro Gly Ala Asp Gly Pro Pro Gly Arg Asp Gly Ala Ala Gly  
 1040 1045 1050  
 Val Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Ala Val Gly Ala Pro Gly  
 1055 1060 1065  
 Ala Pro Gly Pro Pro Gly Ser Pro Gly Pro Ala Gly Pro Thr Gly  
 1070 1075 1080  
 Lys Gln Gly Asp Arg Gly Glu Ala Gly Ala Gln Gly Pro Met Gly  
 1085 1090 1095  
 Pro Ser Gly Pro Ala Gly Ala Arg Gly Ile Gln Gly Pro Gln Gly  
 1100 1105 1110  
 Pro Arg Gly Asp Lys Gly Glu Ala Gly Glu Pro Gly Glu Arg Gly  
 1115 1120 1125  
 Leu Lys Gly His Arg Gly Phe Thr Gly Leu Gln Gly Leu Pro Gly  
 1130 1135 1140  
 Pro Pro Gly Pro Ser Gly Asp Gln Gly Ala Ser Gly Pro Ala Gly  
 1145 1150 1155  
 Pro Ser Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Pro Val Gly Pro Ser Gly  
 1160 1165 1170  
 Lys Asp Gly Ala Asn Gly Ile Pro Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly  
 1175 1180 1185  
 Pro Arg Gly Arg Ser Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly  
 1190 1195 1200  
 Asn Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Gly Ile  
 1205 1210 1215  
 Asp Met Ser Ala Phe Ala Gly Leu Gly Pro Arg Glu Lys Gly Pro

[0021]

```

1220          1225          1230
Asp Pro Leu Gln Tyr Met Arg Ala Asp Gln Ala Ala Gly Gly Leu
1235          1240          1245

Arg Gln His Asp Ala Glu Val Asp Ala Thr Leu Lys Ser Leu Asn
1250          1255          1260

Asn Gln Ile Glu Ser Ile Arg Ser Pro Glu Gly Ser Arg Lys Asn
1265          1270          1275

Pro Ala Arg Thr Cys Arg Asp Leu Lys Leu Cys His Pro Glu Trp
1280          1285          1290

Lys Ser Gly Asp Tyr Trp Ile Asp Pro Asn Gln Gly Cys Thr Leu
1295          1300          1305

Asp Ala Met Lys Val Phe Cys Asn Met Glu Thr Gly Glu Thr Cys
1310          1315          1320

Val Tyr Pro Asn Pro Ala Asn Val Pro Lys Lys Asn Trp Trp Ser
1325          1330          1335

Ser Lys Ser Lys Glu Lys Lys His Ile Trp Phe Gly Glu Thr Ile
1340          1345          1350

Asn Gly Gly Phe His Phe Ser Tyr Gly Asp Asp Asn Leu Ala Pro
1355          1360          1365

Asn Thr Ala Asn Val Gln Met Thr Phe Leu Arg Leu Leu Ser Thr
1370          1375          1380

Glu Gly Ser Gln Asn Ile Thr Tyr His Cys Lys Asn Ser Ile Ala
1385          1390          1395

Tyr Leu Asp Glu Ala Ala Gly Asn Leu Lys Lys Ala Leu Leu Ile
1400          1405          1410

Gln Gly Ser Asn Asp Val Glu Ile Arg Ala Glu Gly Asn Ser Arg
1415          1420          1425

Phe Thr Tyr Thr Ala Leu Lys Asp Gly Cys Thr Lys His Thr Gly
1430          1435          1440

Lys Trp Gly Lys Thr Val Ile Glu Tyr Arg Ser Gln Lys Thr Ser
1445          1450          1455

Arg Leu Pro Ile Ile Asp Ile Ala Pro Met Asp Ile Gly Gly Pro
1460          1465          1470

Glu Gln Glu Phe Gly Val Asp Ile Gly Pro Val Cys Phe Leu
1475          1480          1485

<210> 20
<211> 268
<212> PRT
<213> 智人

<400> 20

Met Ser Ala Phe Ala Gly Leu Gly Pro Arg Glu Lys Gly Pro Asp Pro
1 5 10 15

Leu Gln Tyr Met Arg Ala Asp Gln Ala Ala Gly Gly Leu Arg Gln His
20 25 30

Asp Ala Glu Val Asp Ala Thr Leu Lys Ser Leu Asn Asn Gln Ile Glu
35 40 45

Ser Ile Arg Ser Pro Glu Gly Ser Arg Lys Asn Pro Ala Arg Thr Cys

```





<400> 23  
Gly Gly Gly Ser  
1

[0023]

<210> 24  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 接头单体

<400> 24  
Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5

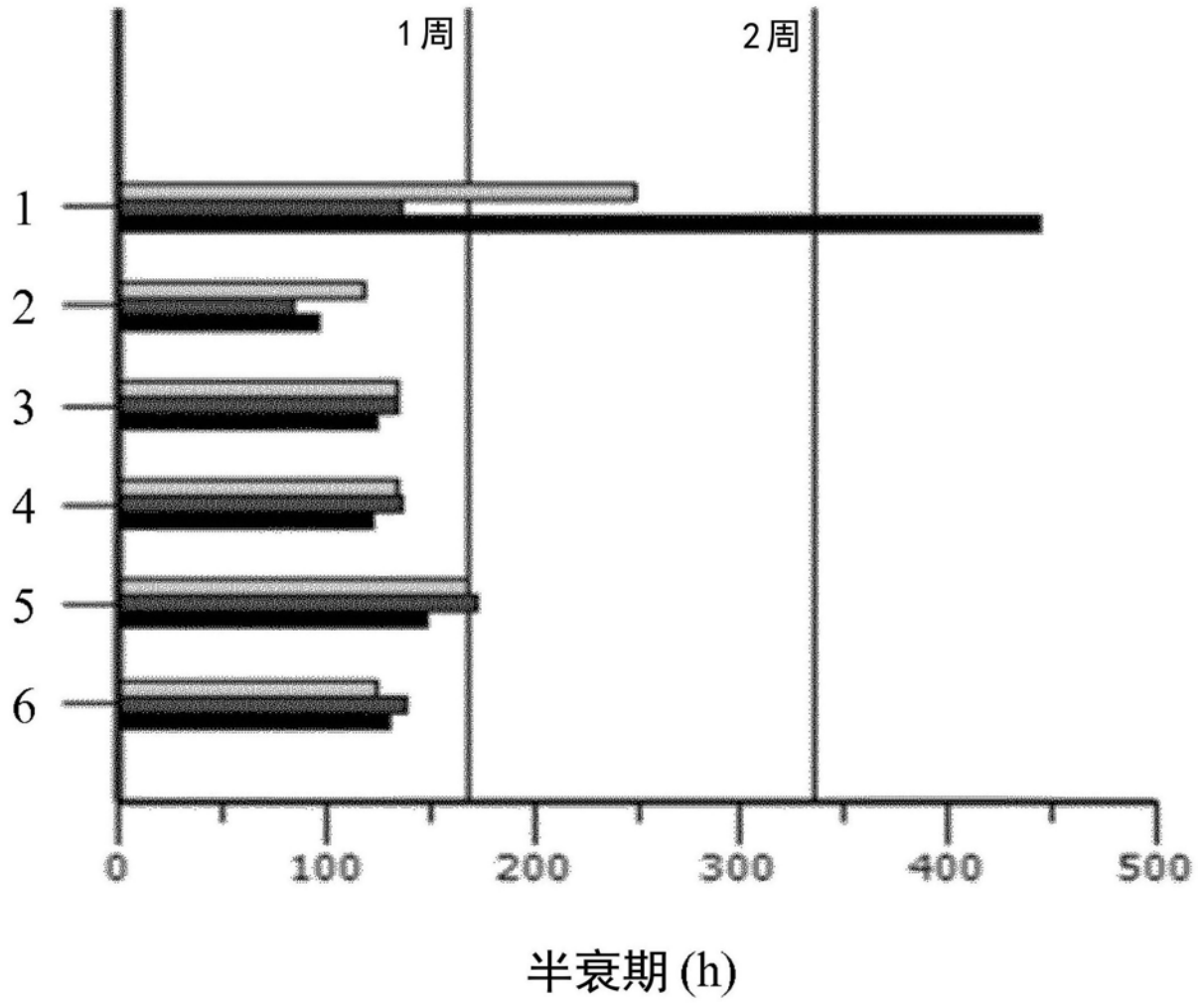


图1

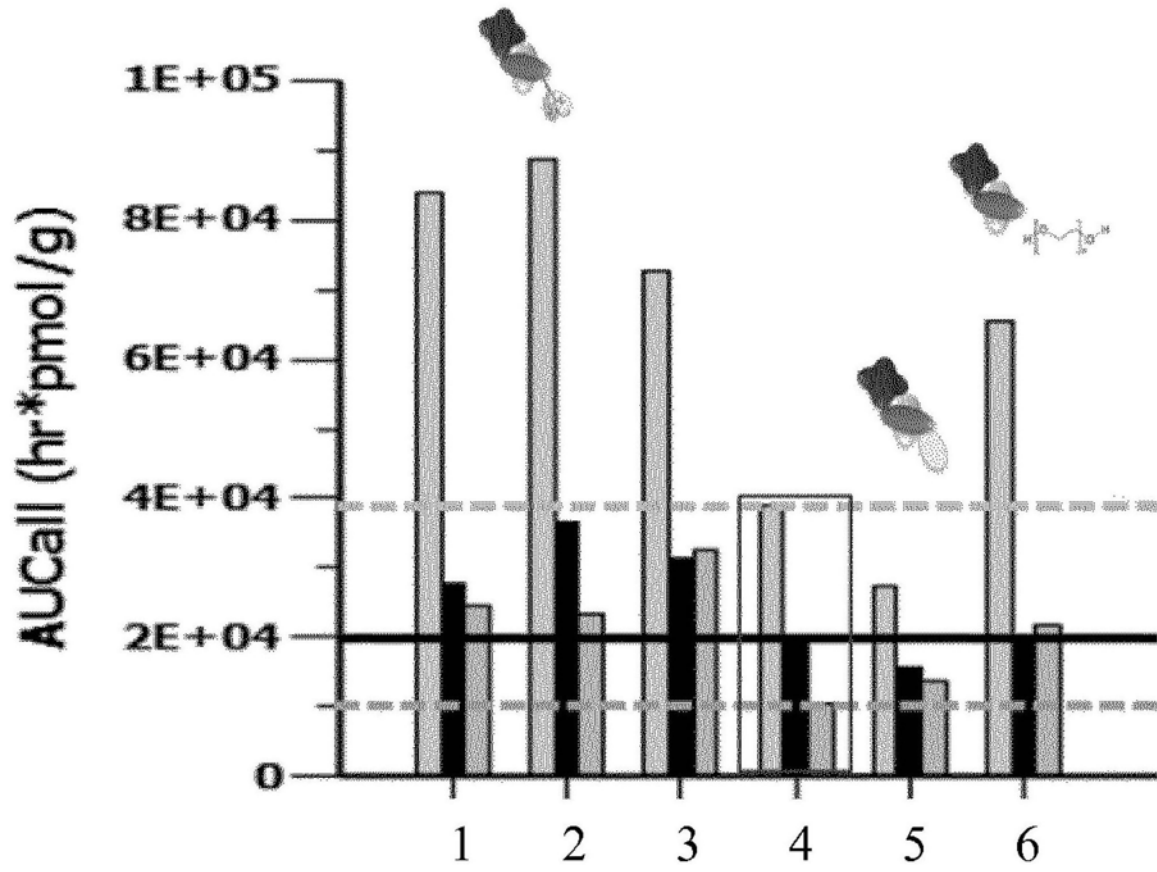


图2

1. 药物制剂,其包含抗人胶原II抗体和任选的药学上可接受的赋形剂,所述抗人胶原II抗体包含根据Kabat确定的以下的CDR:

- a) SEQ ID NO:09和SEQ ID NO:10,或
- b) SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,或
- c) SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16,

所述药物制剂用于治疗眼血管疾病。

2. 抗人胶原II抗体,其包含根据Kabat确定的以下的CDR:

- a) SEQ ID NO:09和SEQ ID NO:10,或
- b) SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,或
- c) SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16,

所述抗人胶原II抗体用作用于治疗眼血管疾病的药物。

3. 抗人胶原II抗体在制备用于治疗眼血管疾病的药物中的用途,所述抗人胶原II抗体包含根据Kabat确定的以下的CDR:

- a) SEQ ID NO:09和SEQ ID NO:10,或
- b) SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,或
- c) SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16。

4. 抗人胶原II抗体,其包含根据Kabat确定的以下的CDR:

- a) SEQ ID NO:09和SEQ ID NO:10,或
- b) SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,或
- c) SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16,

所述抗人胶原II抗体用于治疗眼血管疾病。

5. 治疗患有眼血管疾病的患者的方法,所述方法是通过向需要此种治疗的患者施用抗人胶原II抗体,所述抗人胶原II抗体包含根据Kabat确定的以下的CDR:

- a) SEQ ID NO:09和SEQ ID NO:10,或
- b) SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,或
- c) SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16。

6. 权利要求1的药物制剂,或权利要求2或权利要求4的抗体,或权利要求3的用途,或权利要求5的方法,其中所述抗体包含以下的重链可变结构域和轻链可变结构域:

- a) SEQ ID NO:09和SEQ ID NO:10,或
- b) SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,或
- c) SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16。

7. 权利要求1或权利要求6的药物制剂,或权利要求2或权利要求4或权利要求6的抗体,或权利要求3或权利要求6的用途,或权利要求5或权利要求6的方法,其中所述抗体是scFv。

8. 融合蛋白,其包含:

- 特异性结合第一抗原的Fab,
- 特异性结合胶原II的scFv,

其中所述Fab在其C末端之一通过肽键与肽接头的N末端缀合,并且所述scFv在其N末端通过肽键与肽接头的C末端缀合。

9. 权利要求8的融合蛋白,其还包含特异性结合第二抗原的第三结合位点,其中

-所述第三结合位点是特异性结合胶原II的scFv，

其中所述第一和第三结合位点选自由以下组成的组： $F(ab')_2$ ，双抗体，BITE，tandAb和DART，并且所述第一和第三结合位点在其C末端通过肽键与肽接头的N末端缀合，并且所述scFv在其N末端通过肽键与肽接头的C末端缀合。

10. 权利要求8-9中任一项的融合蛋白，其中所述第一抗原和/或所述第二抗原是治疗性眼靶标。

11. 权利要求8-10中任一项的融合蛋白，其中所述第一抗原和/或所述第二抗原彼此独立地选自由以下组成的组：ANG2，VEGF，PDGF-B和IL-1 $\beta$ 。

12. 权利要求8-10中任一项的融合蛋白，其中所述第一抗原和/或所述第二抗原是选自由以下组成的组的不同抗原：ANG2，VEGF，PDGF-B和IL-1 $\beta$ 。

13. 权利要求8-12中任一项的融合蛋白，其中特异性结合胶原II的scFv包含：

a) 具有SEQ ID NO:09的氨基酸序列的重链可变结构域和SEQ ID NO:10的轻链可变结构域，或

b) 具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变结构域和SEQ ID NO:13的轻链可变结构域，或

c) 具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变结构域和SEQ ID NO:16的轻链可变结构域。

14. 权利要求13的融合蛋白，其中特异性结合胶原II的scFv包含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链可变结构域和SEQ ID NO:13的轻链可变结构域。

15. 权利要求8-14中任一项的融合蛋白，其中特异性结合胶原II的scFv具有SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

16. 权利要求15的融合蛋白，其中特异性结合胶原II的scFv具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

17. 权利要求9-16中任一项的融合蛋白，其中所述第一结合位点和所述第三结合位点是Fab。

18. 药物制剂，其包含根据权利要求8至17中任一项的融合蛋白和任选的药学上可接受的赋形剂。

19. 权利要求18的制剂，其中所述药物制剂用于治疗眼血管疾病。

20. 权利要求8-17中任一项的融合蛋白，其用作药物。

21. 权利要求20的融合蛋白，其中所述用途是用于治疗眼血管疾病。

22. 权利要求8-17中任一项的融合蛋白在制备药物中的用途。

23. 权利要求22的用途，其中所述用途是用于制备用于治疗眼血管疾病的药物。

24. 权利要求8至17中任一项的融合蛋白，其用于治疗眼血管疾病。

25. 治疗患有眼血管疾病的患者的方法，所述方法是通过向需要此种治疗的患者施用根据权利要求8至17中任一项的融合蛋白。