



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 120289645 A

(43) 申请公布日 2025. 07. 11

(21) 申请号 202510531386.7

(22) 申请日 2023.04.25

(30) 优先权数据

63/334,964 2022.04.26 US

(62) 分案原申请数据

202380035364.0 2023.04.25

(71) 申请人 诺华股份有限公司

地址 瑞士

(72) 发明人 M·O·巴尔多夫 R·塞贝

J·科瓦里克 F·科宾格

M·基夫 A·里特尔 L·罗斯

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理人 张莉 黄草生

(51) Int.Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书92页

序列表(电子公布) 附图12页

(54) 发明名称

靶向IL-13和IL-18的多特异性抗体

(57) 摘要

本文描述了靶向IL-13和IL-18的多特异性抗体。所述多特异性抗体可以是靶向IL-13和IL-18的拮抗性和/或治疗性抗体。本文还描述了制备所述多特异性抗体的方法、用所述多特异性抗体同时抑制IL-13和IL-18的方法、以及通过施用本文所述的多特异性抗体治疗IL-13/IL-18介导的障碍如特应性皮炎的方法。

1. 一种多特异性抗体,其中所述抗体包含
 - a. 第一部分,所述第一部分包含特异性结合白细胞介素-18(IL-18)的第一重链和第一轻链,其中所述第一重链包含SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列,且所述第一轻链包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列,以及
 - b. 第二部分,所述第二部分包含特异性结合白细胞介素-13(IL-13)的第二重链和第二轻链,其中所述第二重链包含SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列,且所述第二轻链包含SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列。
2. 一种多特异性抗体,其中所述抗体包含
 - a. 第一部分,所述第一部分包含特异性结合白细胞介素-18(IL-18)的第一重链和第一轻链,其中所述第一重链包含SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列,且所述第一轻链包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列,以及
 - b. 第二部分,所述第二部分包含特异性结合白细胞介素-13(IL-13)的第二重链和第二轻链,其中所述第二重链包含SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列,且所述第二轻链包含SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列。
3. 权利要求1或2所述的多特异性抗体,其中所述抗体是双特异性抗体。
4. 一种药物组合物,所述药物组合物包含与一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载剂组合的根据权利要求1-3中任一项所述的多特异性抗体。
5. 根据权利要求4所述的药物组合物,所述药物组合物进一步包含一种或多种另外的活性剂。
6. 一种试剂盒,所述试剂盒包含根据权利要求1至3中任一项所述的多特异性抗体,其中所述试剂盒另外包含用于将所述多特异性抗体或所述药物组合物施用于有需要的受试者的使用说明书和药物递送设备。
7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其中用于施用的所述药物递送设备包含注射筒、自动注射器、注射笔、小瓶和注射筒、输注泵、贴片或输注袋和针。
8. 一种试剂盒,所述试剂盒包含根据权利要求4或5中任一项所述的药物组合物,其中所述试剂盒另外包含用于将所述多特异性抗体或所述药物组合物施用于有需要的受试者的使用说明书和药物递送设备。
9. 根据权利要求8所述的试剂盒,其中用于施用的所述药物递送设备包含注射筒、自动注射器、注射笔、小瓶和注射筒、输注泵、贴片或输注袋和针。

靶向IL-13和IL-18的多特异性抗体

[0001] 本申请是申请日为2023年4月25日的、发明名称为“靶向IL-13和IL-18的多特异性抗体”的中国专利申请202380035364.0 (PCT/IB2023/054248) 的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及免疫学领域。特别地,本发明涉及靶向白细胞介素13(IL-13)和白细胞介素蛋白18(IL-18)的多特异性抗体及其制备和使用方法。

背景技术

[0003] 特应性皮炎(AD)是一种慢性/复发性炎性皮肤病,其特征在于症状包括强烈瘙痒症(例如,严重瘙痒)以及鳞状和干燥湿疹样病变。由于严重的心理问题、严重的睡眠缺失和生活质量受损,严重的疾病可能导致极度残疾,从而导致高昂的社会经济成本。AD的病理生理学受到免疫球蛋白E(IgE)介导的致敏、免疫系统和环境因素之间复杂相互作用的影响。原发性皮肤缺损可能是导致IgE介导的致敏的免疫失调,伴有上皮屏障功能障碍,这是基因突变和局部炎症两者的结果。AD通常始于5岁前的儿童时期,并且可能持续到成年。

[0004] AD的典型治疗方法包括局部洗剂和保湿剂、局部皮质类固醇软膏、乳膏或注射剂。然而,大多数治疗选择仅提供暂时的、不完全的症状缓解。此外,许多患有中度至重度AD的患者对局部皮质类固醇或钙调神经磷酸酶抑制剂的治疗具有耐药性。因此,本领域需要用于治疗 and/或预防AD的新型靶向疗法。

[0005] AD的发病机制是多因素的,免疫介导的机制的特征是2型T辅助细胞(Th2)和2型固有淋巴细胞(ILC2)的不适当激活,炎性细胞因子、特别是白细胞介素IL-4和IL-13的表达增加(Moyle等人(2019)ExpDermatol.[临床与实验皮肤病学]28(7):756-768;Roediger等人(2013)NatImmunol.[自然免疫学]14(6):564-573)。IL-13通过其在炎症过程的产生和维持以及表皮屏障功能障碍中的突出作用而成为AD病理生理学中的主要细胞因子之一(Tsoi等人(2019)JInvest Dermatol.[皮肤病学研究杂志]139(7):1480-1489)。

[0006] 目前,作为抗IL4Ra抗体的度匹鲁单抗已被美国食品与药品监督管理局和欧洲药品管理局批准用于治疗中度至重度形式的AD。特异性靶向IL-13的抗体(如乐瑞吉珠单抗和曲罗芦单抗)也在开发中。

[0007] IL-18被认为参与AD的发病机制,因为IL-18诱导超级Th1细胞产生和分泌IFN- γ 和IL-13(Terada等人(2006)Proc Natl Acad Sci U S A.[美国国家科学院院刊]103:8816-8821)。IL-18由角化细胞和炎症性树突细胞释放,并且患有AD的患者中的血清IL-18水平已显示与AD病变的皮肤得分显著相关(Ikezawa等人(2010)Allergy,Asthma&Immunology Research[过敏、哮喘与免疫学研究]2(4):235-246)。IL-18的体内施用还在小鼠中引起Th2分化,并且以CD4+T细胞、IL-4和STAT6依赖性方式增加IgE产生(Yoshimoto等人(2000)Nat Immunol[自然免疫学]1:132-137;Hoshino等人(2000)Eur J Immunol[欧洲免疫学杂志]30:1998-2006)。

[0008] 由于IL-13和IL-18是影响AD相关的许多不同细胞类型的促炎性细胞因子,因此仍

然需要实现IL-13和IL-18信号传导的共阻断的有效治疗。靶向IL-13和IL-18二者的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)可以解决这种慢性炎症性疾病中未满足的医疗需求。

[0009] 在通过共表达两种不同抗体产生双特异性IgG(BsIgG)中最常见的问题之一是不希望的组分重链同二聚化以及不希望的组分轻链与不正确的重链配对。图1显示了可能的错误组装产物。为了克服重链同二聚化的问题,可以使用工程化二硫键与先前鉴定的“杵臼结构”突变的组合来重塑重链以进行异二聚化。所述变体中的一种变体S354C:T366W/Y349'C:T366'S:L368'A:Y407V可以提供接近定量(-95%)的异二聚化(Merchant等人,1998)。然而,这种接近定量的异二聚化没有解决轻链配对问题。因此,假设随机轻链配对,仅25%的所产生的抗体是所需的双特异性抗体。仍然需要进一步改善重链异二聚化和轻链配对二者,从而提高双特异性抗体的纯度、产率和质量。

发明内容

[0010] 本披露内容提供了一种用于治疗自身免疫性或炎症障碍的方法,其中所述方法包括同时或依序施用IL13抑制剂和IL18抑制剂。不希望受理论的约束,诸位发明人假设,与单独阻断IL-13或IL-18相比,对IL13和IL18的共阻断在治疗自身免疫性或炎症障碍方面提供出乎意料的优越功效。在一些情况下,所述共阻断包括施用IL13拮抗剂和IL-18拮抗剂。在一些情况下,所述共阻断包括施用抑制IL-13和IL-18二者的拮抗剂,如结合IL-18和IL-13二者的多特异性(例如,双特异性)抗体。

[0011] 本发明提供了用于治疗AD的靶向IL-13和IL-18二者的多特异性抗体或其片段,确保在合理的成本下足够的总产率、纯度和产物质量以进行临床开发和商业制造。

[0012] 在一些方面,所述多特异性抗体是双特异性抗体。一种示例性双特异性抗体,所述示例性双特异性抗体的特征在于:a)第一部分,所述第一部分包含与白细胞介素-18(IL-18)特异性结合的第一轻链可变结构域(VL1)和第一重链可变结构域(VH1);和b)第二部分,所述第二部分包含与白细胞介素-13(IL-13)特异性结合的第二轻链可变结构域(VL2)和第二重链可变结构域(VH2)。

[0013] 在一些实施例中,所述工程化多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段是人或人源化(例如,CDR移植的)IgG(例如,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)抗体。在一些情况下,所述工程化多特异性抗体(例如,双特异性抗体)是人或人源化(例如,CDR移植的)IgG1抗体。

[0014] Fc与Fc γ 受体和补体受体C1q的不利相互作用可以从与新生儿Fc受体(FcRn)的结合解耦合,所述与新生儿Fc受体(FcRn)的结合可以增加血清持久性。由FcRn赋予的体内血清持久性显示出是可调节的特性,其可以通过IgG Fc中的突变来调节。通过Fc工程化增加在核内体条件下(酸性pH下)Fc对FcRn的亲和力是延长单克隆抗体药代动力学的有效方法(Maeda,2017)。YTE突变集(根据EU编号的M252Y、S254T、T256E)或LS突变集(根据EU编号的M428L、N434S)是FcCH2结构域中此类开发的突变集的实例。

[0015] 在一个实施例中,所述工程化多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含根据EU编号的M252Y/S254T/T256E(YTE)。在一个实施例中,所述工程化多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含根据EU编号的M428L、N434S(LS)。

[0016] 链配对突变已被证明通过在双特异性或多特异性抗体的CH3-CH3界面处引入互补性而有效地驱动重链异二聚化。许多链配对突变集用于产生多特异性抗体:增加/减少侧链

体积 (T366W/S354C-T366S/L368A/Y407V/Y349C, 杵臼结构) (Ridgway, 1996)、电荷倒置 (K409D/K392D-D399K/E356K, 静电转向) (Gunasekaran, 2010) 或多种IgA取代 (SEEDbody) (Davis, 2010)。

[0017] 在一个实施例中, 所述工程化多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段包含链配对氨基酸取代, 例如与沉默和/或半衰期延长突变组合。在一些情况下, 所述链配对氨基酸取代是杵臼结构 (KiH) 突变, 例如, 其中工程化多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段包含氨基酸取代T366W的第一恒定重链和氨基酸取代T366S、L368A和Y407V的第二恒定重链, 并且所述氨基酸残基根据EU编号进行编号。

[0018] 在另一个实施例中, 所述链配对氨基酸取代是杵臼结构 (KiH) 突变, 其中包含具有氨基酸取代S354C和T366W的第一恒定重链和具有氨基酸取代Y349C、T366S、L368A和Y407V的第二恒定重链, 并且所述氨基酸残基根据EU编号进行编号。

[0019] 在其他实施例中, 所述工程化多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段包含T366W/S354C-T366S/L368A/Y407V/Y349C (KiH) 和M252Y/S254T/T256E (YTE) 二者, 并且所述氨基酸残基根据EU编号进行编号。

[0020] 不受理论束缚, 在一些实施例中, 所述多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段包含用于使例如hFc内的ADCC和/或CDC效应子功能沉默的一个或多个突变。本领域中描述了各种突变集, 例如LALA (根据EU编号的L234A、L235A) (Wines等人, 2000) 或DAPA (根据EU编号的D265A、P329A) (基因泰克公司 (Genentech), US 6,737,056)。几位研究者已采用了跨亚类的方法来降低效应子功能。在跨亚类方法的进一步完善中, IgG2变体是通过IgG4的点突变生成的 (即, 根据EU编号的H268Q、V309L、A330S、P331S) (An等人, 2009)。另一个沉默IgG1抗体包含N297A突变, 所述突变产生无糖基化/非糖基化的抗体 (Strohl等人, 2009)。一些使用的突变集结合了先前描述的技术, 从而实现更高水平的沉默, 直到完全消除部分或全部效应子功能。DANAPA是一个实例 (D265A、N297A、P329A) (Janssen的WO 2019068632)。已经报告了在Fc区域中对负责效应子功能的关键残基进行工程化或突变的其他替代方法。例如参见PCT公开WO 2009/100309 (米迪缪尼公司 (Medimmune))、WO 2006/076594 (Xencor公司)、US2006/0134709 (宏观基因公司 (Macrogenics))、US 6,737,056 (基因泰克公司)、US2010/0166740 (罗氏公司 (Roche))。

[0021] 在一个实施例中, 所述工程化多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段包含D265A/P329A (DAPA), 并且其中所述氨基酸残基根据EU编号进行编号。

[0022] 在一个实施例中, 所述工程化多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段包含L234A/L235A (LALA), 并且其中所述氨基酸残基根据EU编号进行编号。

[0023] 在另一个实施例中, 所述工程化多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段包含选自以下位置处的一个或多个半胱氨酸取代组成的组: 234、235、236、297和299, 并且其中所述氨基酸残基根据EU编号进行编号。

[0024] 在其他实施例中, 所述工程化多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段的一个或多个半胱氨酸取代选自位置234、235和236。在一个实施例中, 所述工程化多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 包含位置234处的半胱氨酸取代。在另一个实施例中, 所述工程化多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 包含位置235处的半胱氨酸取代。在另一个实施例中, 所述工程化多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 包含位置236处的半胱氨酸取代。

[0025] 在一些实施例中,所述工程化多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含降低Fc效应子功能的一个或多个氨基酸取代;和经由增强的FcRn结合增强所述工程化多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的半衰期的一个或多个氨基酸取代;和/或促进正确的链配对的一个或多个氨基酸取代。

[0026] 因此,例如在一些实施例中,根据EU编号,所述工程化多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含T366W/S354C-T366S/L368A/Y407V/Y349C (KiH) 以及选自由YTE (M252Y、S254T、T256E) 和LS (M428L、N434S) 组成的组的半衰期延长突变。在一些实施例中,根据EU编号,所述工程化多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含T366W/S354C-T366S/L368A/Y407V/Y349C (KiH) 以及选自LALA (L234A、L235A)、DAPA (D265A、P329A) 和N297组成的组的Fc沉默突变。在一些实施例中,根据EU编号,所述工程化多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含T366W/S354C-T366S/L368A/Y407V/Y349C (KiH)、选自由YTE (M252Y、S254T、T256E) 和LS (M428L、N434S) 组成的组的半衰期延长突变和选自由LALA (L234A、L235A)、DAPA (D265A、P329A) 和N297组成的组的Fc沉默突变。

[0027] 在一个实施例中,所述工程化多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含L234A/L235A (LALA) 和M252Y/S254T/T256E (YTE), 并且其中所述氨基酸残基根据EU编号进行编号。

[0028] 在一个实施例中,所述工程化多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含L234C和M252Y/S254T/T256E (YTE), 并且其中所述氨基酸残基根据EU编号进行编号。在一个实施例中,所述工程化多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含L235C和M252Y/S254T/T256E (YTE), 并且其中所述氨基酸残基根据EU编号进行编号。在另一个实施例中,所述工程化多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含G236C和M252Y/S254T/T256E (YTE), 并且其中所述氨基酸残基根据EU编号进行编号。

[0029] 在一个实施例中,所述工程化多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含L234A/L235A (LALA)、M252Y/S254T/T256E (YTE) 和T366W/S354C-T366S/L368A/Y407V/Y349C (KiH), 并且其中所述氨基酸残基根据EU编号进行编号。

[0030] 在一个实施例中,所述工程化多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含L234C、M252Y/S254T/T256E (YTE) 和T366W/S354C-T366S/L368A/Y407V/Y349C (KiH), 并且其中所述氨基酸残基根据EU编号进行编号。在一个实施例中,所述工程化多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含L235C、M252Y/S254T/T256E (YTE) 和T366W/S354C-T366S/L368A/Y407V/Y349C (KiH), 并且其中所述氨基酸残基根据EU编号进行编号。在另一个实施例中,所述工程化多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含G236C、M252Y/S254T/T256E (YTE) 和T366W/S354C-T366S/L368A/Y407V/Y349C (KiH), 并且其中所述氨基酸残基根据EU编号进行编号。

[0031] 在一些实施例中,所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的VH1和VH2结构域包含互补决定区(CDR) HCDR1、HCDR2、HCDR3; 并且所述VL1和所述VL2包含LCDR1、LCDR2、LCDR3, 其中:

[0032] a. 所述VH1结构域包含(例如依次):

[0033] i. 具有氨基酸序列SEQ ID NO:32的所述HCDR1, 具有氨基酸序列SEQ ID NO:33的所述HCDR2, 以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:34的所述HCDR3; 或

[0034] ii.具有氨基酸序列SEQ ID NO:35的所述HCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:36的所述HCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:37的所述HCDR3;或

[0035] iii.具有氨基酸序列SEQ ID NO:38的所述HCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:39的所述HCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:40的所述HCDR3;以及

[0036] b.所述VL1结构域包含(例如依次):

[0037] i.具有氨基酸序列SEQ ID NO:4的所述LCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:5的所述LCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:6的所述LCDR3;或

[0038] ii.具有氨基酸序列SEQ ID NO:7的所述LCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:8的所述LCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:9的所述LCDR3;或

[0039] iii.具有氨基酸序列SEQ ID NO:10的所述LCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:11的所述LCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:12的所述LCDR3;以及

[0040] c.所述VH2结构域包含(例如依次):

[0041] i.具有氨基酸序列SEQ ID NO:46的所述HCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:47的所述HCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:48的所述HCDR3;或

[0042] ii.具有氨基酸序列SEQ ID NO:49的所述HCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:50的所述HCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:51的所述HCDR3;或

[0043] iii.具有氨基酸序列SEQ ID NO:52的所述HCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:53的所述HCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:54的所述HCDR3;以及

[0044] d.所述VL2结构域包含(例如依次):

[0045] i.具有氨基酸序列SEQ ID NO:18的所述LCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:19的所述LCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:20的所述LCDR3;或

[0046] ii.具有氨基酸序列SEQ ID NO:21的所述LCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:22的所述LCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:23的所述LCDR3;或

[0047] iii.具有氨基酸序列SEQ ID NO:24的所述LCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:25的所述LCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:26的所述LCDR3。

[0048] 在一些实施例中,所述第一轻链是 λ 型的,并且所述第二轻链是 κ 型的。

[0049] 在一些实施例中,所述第一轻链是 $\lambda 1$ 型的,并且所述第二轻链是 $\kappa 4$ 型的。

[0050] 在一些实施例中,所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含:含有氨基酸序列SEQ ID NO:13的VL1结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:27的VL2结构域。

[0051] 在一些实施例中,所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含:含有氨基酸序列SEQ ID NO:41的VH1结构域、含有氨基酸序列SEQ ID NO:13的VL1结构域、含有氨基酸序列SEQ ID NO:55的VH2结构域、以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:27的VL2结构域。

[0052] 在一些实施例中,所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含含有如SEQ ID NO:14中所示氨基酸序列的第一轻链和含有如SEQ ID NO:28中所示氨基酸序列的第二轻链。

[0053] 在一些实施例中,所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含含有异二聚化修饰的第一重链和含有与所述第一重链的所述异二聚化修饰互补的异二聚化修饰的第二重链。

[0054] 在一些实施例中,所述第一恒定重链和所述第二恒定重链是人IgG1,其包含一个

或多个异二聚化修饰并且：

[0055] a) 所述第一免疫球蛋白重链的所述异二聚化修饰包含位置366处的丝氨酸、位置368处的丙氨酸和位置407处的缬氨酸，并且所述第二免疫球蛋白重链的所述异二聚化修饰包含位置366处的色氨酸；或

[0056] b) 所述第二免疫球蛋白重链的所述异二聚化修饰包含位置366处的丝氨酸、位置368处的丙氨酸和位置407处的缬氨酸，并且所述第一免疫球蛋白重链的所述异二聚化修饰包含位置366处的色氨酸，

[0057] 并且其中氨基酸残基根据EU编号进行编号。

[0058] 在一些实施例中，所述多特异性抗体是双特异性抗体，所述双特异性抗体包含经由增强的FcRn结合来增强所述双特异性抗体的半衰期的突变。

[0059] 在一些实施例中，增强所述双特异性抗体的半衰期的所述突变是M252Y/S254T/T256E (YTE)，并且其中所述氨基酸残基根据EU编号进行编号。

[0060] 在一些实施例中，所述第一重链包含如SEQ ID NO:42中所示的氨基酸序列，并且所述第二重链包含如SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列。

[0061] 在一些实施例中，所述第一重链包含如SEQ ID NO:57中所示的氨基酸序列，并且所述第二重链包含如SEQ ID NO:58中所示的氨基酸序列。

[0062] 在一些实施例中，所述第一重链包含如SEQ ID NO:42中所示的氨基酸序列，并且所述第一轻链包含如SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列，以及所述第二重链包含如SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列，并且所述第二轻链包含如SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列。

[0063] 在一些实施例中，所述第一重链包含如SEQ ID NO:57中所示的氨基酸序列，并且所述第一轻链包含如SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列，以及所述第二重链包含如SEQ ID NO:58中所示的氨基酸序列，并且所述第二轻链包含如SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列。

[0064] 本文还披露了一种药物组合物，所述药物组合物包含与一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载剂组合的本披露内容的多特异性抗体（例如，双特异性抗体）或其片段。

[0065] 在一些实施例中，所述药物组合物进一步包含一种或多种另外的活性剂。

[0066] 本文还披露了一种编码本披露内容的多特异性抗体的分离的核酸分子。

[0067] 本文还披露了一种包含一个或多个如上所概括的核酸序列的克隆或表达载体，其中所述载体适合于重组产生本披露内容的多特异性抗体。在一些实施例中，本文提供了一组两种克隆或表达载体，第一载体编码包含恒定结构域和可变结构域的全长重链以及包含恒定结构域和可变结构域的全长轻链，其中由所述第一载体编码的重链和轻链能够组合以形成双特异性IgG抗体的抗IL-18臂；第二载体编码包含恒定结构域和可变结构域的全长重链以及包含恒定结构域和可变结构域的全长轻链，其中由所述第二载体编码的重链和轻链能够组合以形成如本文所述的双特异性IgG抗体的抗IL-13臂。在一些实施例中，所述第一载体和所述第二载体是表达载体，并且其中所述第一载体和所述第二载体在共同宿主细胞中的共表达提供了具有高产率、纯度和活性的抗IL-18/IL-13双特异性IgG样抗体。

[0068] 本文还披露了一种包含一种或多种如上文所概括的克隆或表达载体的宿主细胞。

[0069] 本文还披露了一种用于产生本披露内容的多特异性抗体的工艺，所述工艺包括在足以表达所述多特异性抗体的条件下培养如上所概括的宿主细胞，然后从所述宿主细胞培

养物纯化和回收所述多特异性抗体。

[0070] 本文还披露了一种包含一种或多种本披露内容的克隆和/或表达载体的试剂盒,其中所述试剂盒另外包含用于产生本文披露的多特异性(例如,双特异性)抗体的说明书。

[0071] 本文还披露了一种包含本披露内容的多特异性抗体或本披露内容的药物组合物的试剂盒,其中所述试剂盒另外包含用于向有需要的受试者施用所述多特异性抗体或所述药物组合物的使用说明书和装置。

[0072] 在一些实施例中,用于施用的所述装置包含注射筒、自动注射器、注射笔、小瓶和注射筒、输注泵、贴片或输注袋和针。

[0073] 本文还披露了一种同时结合IL-13和IL-18的方法,所述方法包括使IL-13和IL-18与有效量的本披露内容的多特异性抗体接触。在一些情况下,所述接触是在体外进行的。在一些情况下,所述接触是离体进行的。在一些情况下,所述接触是在受试者(如需要IL-13和IL-18抑制的人患者)中进行的。

[0074] 本文还披露了一种同时抑制IL-13和IL-18活性的方法,所述方法包括使多个哺乳动物细胞与有效量的本披露内容的多特异性(例如,双特异性)抗体接触。在一些情况下,所述接触是在体外或离体培养物中进行的。在一些情况下,所述接触是在非人动物(如非人灵长类动物)中进行的。在一些情况下,所述接触是在需要IL-18和IL-13抑制的患者(如患有特应性皮炎的患者)中进行的。在一些情况下,IL-13和IL-18活性降低至少10%、至少25%、至少50%、至少75%或至少90%。在一些情况下,通过STAT-6信号传导的降低来测量IL-13活性的降低。在一些情况下,通过IFN γ 产生的降低(如LPS/IL-12诱导的IFN γ 产生的降低)来测量IL-18活性的降低。在一些情况下,通过分别与本文所述的多特异性抗体结合的IL-18或IL-13的水平增加或分别通过游离IL-18或IL-13水平的减少来测量IL-18和/或IL-13活性的降低。

[0075] 本文还披露了一种在受试者中同时抑制IL-13和IL-18活性的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本披露内容的多特异性(例如,双特异性)抗体。不希望受理论的约束,诸位发明人假设,与对IL-18的阻断或与对IL-13的阻断相比,对IL-13和IL-18的共阻断可以具有互补(例如,协同)作用。在一些实施例中,与对IL-18的阻断相比,对IL-13和IL-18的共阻断可以具有互补(例如,协同)作用。

[0076] 本文还披露了一种治疗受试者中IL-13和/或IL-18介导的障碍的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本披露内容的多特异性(例如,双特异性)抗体。在一些实施例中,与单特异性抗IL-13拮抗剂的治疗相比,所述方法是改善的治疗。在一些实施例中,与单特异性抗IL-18拮抗剂的治疗相比,所述方法是改善的治疗。在一些实施例中,与用抗IL-13拮抗剂或抗IL-18拮抗剂的治疗相比,所述方法是改善的治疗。在一些实施例中,治疗16、24、36或52周后,通过以下项指示所述改善:更好的湿疹面积和严重程度指数(EASI)得分、更好的研究者整体评估(IGA)得分、更好的瘙痒症数值评定量表得分和/或更好的皮肤病生活质量指数得分。在一些实施例中,与使用抗IL-13拮抗剂或抗IL-18拮抗剂的治疗相比,所述方法是改善的治疗,其中通过在治疗16、24、36或52周后更低的特应性皮炎严重程度评分(SCORAD)得分指示所述改善。

[0077] 在一些实施例中,与对IL13和IL18的共阻断(例如,用所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段治疗)之前一种或多种AD相关生物标记物(特别是选自CCL17/TARC、

IgE (例如,血清IgE)、CCL26/嗜酸性粒细胞趋化因子-3、CCL22/MDC、hsCRP、CD40、IL-13、IL-24、IL-22、IL-18 (例如,血清IL-18、血清游离IL-18 (生物活性)) 和IL-18BP (例如,血清IL-18BP) 的一种或多种AD相关生物标记物) 的表达水平相比,本披露内容的方法减少所述水平。

[0078] 本文还披露了一种用于抑制受试者的IgE抗体产生的方法,所述方法包括同时或依序抑制IL13和IL18 (例如,通过向所述受试者施用有效量的本披露内容的多特异性抗体)。

[0079] 本文还披露了一种用于抑制受试者的IFN- γ 产生的方法,所述方法包括同时或依序抑制IL13和IL18 (例如,通过向所述受试者施用有效量的本披露内容的多特异性抗体)。

[0080] 本文还披露了一种治疗和/或预防炎性或免疫病症的方法,所述方法包括同时或依序抑制IL13和IL18 (例如,通过向有需要的受试者施用治疗有效量的本披露内容的多特异性抗体)。在优选的实施例中,所述炎性或免疫病症是皮肤病症。在优选的实施例中,所述皮肤病症是特应性皮炎。在一些实施例中,所述特应性皮炎是中度至重度特应性皮炎。在一些情况下,所述特应性皮炎是中度至重度特应性皮炎。在一些情况下,所述特应性皮炎是由Rajka/Langeland标准得分确定的中度至重度,并且其中Rajka/Langeland标准得分被测定为在4.5与9之间。在一些实施例中,所述方法进一步包括施用一种或多种局部皮质类固醇。在一些实施例中,通过施用所述一种或多种局部皮质类固醇不能充分控制所述特应性皮炎。

[0081] 在其他方面,本文披露了本披露内容的多特异性抗体 (例如,双特异性抗体) 或其片段在治疗和/或预防AD中的用途。

[0082] 在其他方面,本文披露了本披露内容的多特异性抗体 (例如,双特异性抗体) 或其片段用于制造用于治疗 and/或预防AD的药物的用途。

[0083] 以下段落中提供了其他细节和实施例。

附图说明

[0084] 图1示出了当在同一宿主细胞系中表达两种KiH修饰的mAb时可能的产物。LHHL:轻链-重链-重链-轻链,并且该级分包括最终的双特异性抗体。HHL:重链-重链-轻链。HL:重链-轻链=半mAb。H:重链。L:轻链。LL:轻链异二聚体和同二聚体。

[0085] 图2是用于表达IL-13和IL-18的质粒A-D的示意图。质粒A和C编码抗IL13 κ LC和抗L13杆HC的表达;质粒B和D编码抗IL18 λ LC和抗IL18杆HC的表达。

[0086] 图3是弗林蛋白酶-2A肽 (F2A) 质粒E和F的示意图。F2A技术能够从一个启动子组合表达多于一条蛋白质链。在质粒E和F上,第一表达盒编码抗IL18 λ LC和抗IL18杆HC,并且第二表达盒编码抗IL13 κ LC和抗L13杆HC。

[0087] 图4是改编的质粒G和H的示意图。质粒G编码抗IL13 κ LC和抗L13杆HC的表达;质粒H编码抗IL18 λ LC和抗IL18杆HC的表达。

[0088] 图5是表达盒中与质粒E和F相比具有不同蛋白质链组合的弗林蛋白酶-2A肽 (F2A) 质粒I的示意图。在质粒I上,第一表达盒编码抗IL18 λ LC、抗IL18杆HC和抗IL13杆HC,并且第二表达盒编码抗IL13 κ LC。

[0089] 图6示出了IL-13/IL-18双特异性抗体的溶解曲线。图6A是bbmAb1的溶解曲线。图

6B是bbmAb2的溶解曲线。图6C是bbmAb5的溶解曲线。图6D是bbmAb4的溶解曲线。图6E是bbmAb3的溶解曲线。

[0090] 图7显示了Tg276小鼠在施用bbmAb1和bbmAb2以及Fc沉默变体bbmAb6、bbmAb7、bbmAb8和bbmAb9后的药代动力学特征的比较(按照采样时间将合并的血清样品绘图)。

[0091] 图8示出了在如下样品之间差异表达的基因的基因集变异分析(GSVA)结果:未用诱导特异性皮炎(AD)样转录组的细胞因子混合物处理的对照样品(皮肤活检物)(对照)、用诱导特异性皮炎(AD)样转录组的细胞因子混合物处理并且与同种型对照抗体(AD+同种型)共同孵育的样品(诱导的样品)。与抗IL-18抗体(AD+抗IL18)共同孵育的诱导的样品;与抗IL-13抗体(AD+抗IL13)共同孵育的诱导的样品;以及与同时抑制IL-13和IL-18活性的双特异性抗体(AD+bbmAb1)共同孵育的诱导的样品显示出不同程度的抑制。显示了来自五种不同供体样品的细胞的数据。

[0092] 图9示出了基于如实例8中所述的507个上调基因的体外疾病转录组(AD+同种型相比于对照)的t分布随机邻域嵌入(t-SNE)分析(困惑度(perplexity)为5)的结果。

[0093] 图10示出了基于如实例8中所述的1485个差异表达的基因的体外疾病转录组(AD+同种型相比于对照)的t-SNE分析结果(困惑度为5)。

具体实施方式

[0094] 为了可以更容易地理解本披露,在整个具体实施方式中具体定义了某些术语。除非另外定义,否则本文所用的全部技术术语和科学术语具有与本披露所属领域的普通技术人员通常所理解的相同意义。

[0095] 定义

[0096] 白细胞介素(IL)-18(本文简称为“IL-18”)作为前体蛋白(原IL-18)主要由巨噬细胞和T细胞产生,并且在被半胱天冬酶-1切割后作为活性蛋白分泌(Dinarello CA等人(1999)J Allergy Clin Immunol[变态反应与临床免疫学杂志];103:11-24)。在正常生理学中,与IL-12协同作用的IL-18与被微生物产物(如脂多糖(LPS))感染后诱导细胞介导的免疫相关(Sareneva T等人(2000)J Immunol[免疫学杂志];165(4):1933-8)。在经IL-18刺激后,自然杀伤(NK)细胞和T细胞释放细胞因子干扰素 γ (INF- γ),其在激活巨噬细胞和其他细胞方面发挥重要作用。除了诱导干扰素 γ 的能力之外,IL-18还具有多种功能。这些生物学特性包括NF- κ B的激活、Fas配体表达、CC和CXC两种趋化因子的诱导,以及有能力的人免疫缺陷病毒的产生增加。

[0097] 术语“IL-18”是指IL-18多肽,也称为白细胞介素-18多肽、INF- γ 诱导因子、干扰素- γ 诱导因子或INF- γ 诱导因子。在整个说明书中,术语IL-18可互换地涵盖前-IL-18(成熟的IL-18在蛋白酶切割之前的前体)和成熟的IL-18(在蛋白酶切割后),除非具体地说明意思是前-或成熟形式。

[0098] 白细胞介素(IL)-13(本文简称为“IL-13”)是一种多效性细胞因子,其主要由Th2细胞和ILC2产生,但也在较小程度上由肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、树突细胞和单核细胞产生。游离IL-13与人体所有细胞中的IL-13受体的 α 1亚基(IL-13Ra1)结合,但特别与单核细胞和B细胞结合。在级联反应中,这种结合有利于IL-4Ra的募集,从而通过二聚化诱导可激活Janus激酶1(JAK1)和酪氨酸激酶2(TYK2)的信号转

导物的形成,导致作为促进TH2分化的转录因子的信号转导及转录激活蛋白6 (STAT6) 的磷酸化,以及类别转换为IgE (Silverberg等人 (2017) *Dermatol Clin.* [皮肤病临床] 35 (3) : 327-334; Goenka等人 (2011) *Immunol Res.* [免疫学研究] 50 (1) : 87-96)。术语“IL-13”是IL-13多肽或白细胞介素-13多肽的同义词。

[0099] 在提及序列(例如,氨基酸序列)时使用术语“包含”等的所有情况下,应理解所述序列也可受术语“由……组成”等限制。如本文所用,短语“基本上由……组成 (consisting essentially of)”是指方法或组合物中所包括的活性药剂以及对这些方法或组合物的预期目的而言无活性的任何赋形剂的类属或种类。在一些方面,短语“基本上由……组成”明确不包括除本披露内容的多特异性抗体以外的一种或多种另外的活性剂。在一些方面,短语“基本上由……组成”明确不包括除本披露内容的多特异性抗体和第二共同施用的药剂以外的一种或多种另外的活性剂。

[0100] 如本文所用的术语“抗体”是指免疫球蛋白家族的多肽(或多肽的组),所述多肽(或多肽的组)能够非共价、可逆地并且特异性地结合抗原。例如,天然存在的IgG类型的“抗体”是包含由二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的四聚体。每条重链包含重链可变结构域(本文中缩写为VH)和重链恒定结构域。重链恒定结构域包含三个结构域,即CH1、CH2和CH3。每条轻链包含轻链可变结构域(本文中缩写为VL)和轻链恒定结构域(CL)。VH和VL区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其间穿插有称为框架区(FR)的较保守区。每个VH和VL由从氨基末端排到羧基末端按以下顺序排列的三个CDR和四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域,在本文中有时将其称为抗原结合结构域。这些抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)以及经典补体系统的第一组分(C1q))的结合。

[0101] 术语“抗体”包括但不限于单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、骆驼化抗体、嵌合抗体、双特异性或多特异性抗体和抗独特型(抗Id)抗体。抗体可以是任何同种型/类别(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)或亚类(例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂)的。

[0102] 将轻链和重链两者分成结构同源性区和功能同源性区。术语“恒定”和“可变”是在功能上使用。在这点上,应当理解轻链(VL)和重链(VH)部分的可变结构域均决定抗原识别和特异性。相反地,轻链(CL)和重链(CH1、CH2或CH3)的恒定结构域赋予重要生物学特性例如分泌、经胎盘移动性(transplacental mobility)、Fc受体结合、补体结合等。按照惯例,恒定区结构域离抗体的抗原结合位点或者氨基末端越远,它的编号越大。所述分子的N末端含有可变区,并且C末端含有恒定区;CH3结构域和CL结构域分别包含重链和轻链的羧基末端。

[0103] 如本文所用的短语“抗体片段”是指抗体的一个或多个部分。在一些实施例中,这些部分是抗体的一个或多个恒定结构域的一部分,例如可结晶片段(Fc)恒定的(C)结构域等。在一些其他实施例中,这一个或多个部分是保留非共价、可逆地并且特异性地结合抗原的能力的抗原结合片段,所述抗原结合片段在本文中有时称为抗原结合结构域。如本文所用的短语“抗原结合片段”是指抗体中保留与抗原的表位特异性地相互作用(例如,通过结合、空间位阻、稳定/去稳定、空间分布)的能力的一个或多个部分。结合片段的实例包括但不限于单链Fv(scFv)(具有或不具有内部半胱氨酸桥)、二硫键连接的Fv(sdFv)、F(ab)₂片段、Fab片段、F(ab')₂、片段F(ab')片段、由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;包含在

铰链区由二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;dAb片段(Ward等人,(1989)Nature[自然]341:544-546),其由V_H结构域组成;以及分离的互补决定区(CDR)、或抗体的其他表位结合片段。

[0104] 如本文所用,“Fc”或“Fc区”包含CH2和CH3,并且任选地包含抗体铰链区的任何部分。Fc区由二聚化形成Fc区的两条多肽链构成。本披露内容的每个半抗体含有一条Fc多肽链,例如,具有IL-18scFv的半抗体包含与Fc多肽链连接的IL-18scFv。该半抗体可以与另一种半抗体配对,使得两条Fc多肽链二聚化为本披露内容的多特异性抗体的Fc区。与所有多肽链一样,Fc多肽链含有N末端和C末端,所述末端各自能够与抗原结合结构域(例如,IL-18结合结构域或IL-13结合结构域)连接。

[0105] 抗体片段还可以掺入到单结构域抗体、大型抗体(maxibody)、微型抗体(minibody)、胞内抗体、双体抗体、三体抗体、四体抗体、v-NAR和双scFv中(参见,例如,Hollinger和Hudson,(2005)Nature Biotechnology[自然生物技术]23:1126-1136)。

[0106] 可以将抗体片段掺入包含一对串联Fv片段(例如,VH-CH1-VH-CH1)的单链分子中,与互补的轻链多肽(例如,VL-CL-VL-CL)一起形成一对抗原结合区(Zapata等人,(1995)Protein Eng.[蛋白工程]8:1057-1062;和US 5,641,870)。

[0107] 术语“半抗体”是指包含单一抗原结合结构域的抗体分子、抗体片段、抗体样分子或多特异性结合分子的一部分。在一个实施例中,半抗体是指例如IgG抗体的重链和轻链对。在一个实施例中,半抗体是指包含VL结构域和CL结构域的多肽,以及包含VH结构域、CH1结构域、铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域的第二多肽(即Fd和Fc),其中所述VL和VH结构域包含抗原结合结构域。在另一个实施例中,半抗体是指包含scFv结构域和Fc多肽链(包含CH2结构域和CH3结构域,并且任选地包含铰链区)的多肽。在一些多特异性结合分子中,第一半抗体、第二半抗体或第一半抗体和第二半抗体两者均可以包含额外的抗原结合结构域。在一些多特异性结合分子实施例中,第一半抗体与第二半抗体缔合,例如,异二聚化。在一些多特异性结合分子中,第一半抗体与第二半抗体共价连接。

[0108] 如本文所用的术语“单特异性分子”是指与靶抗原上的一个表位结合的含Fc的分子。在一些实施例中,本披露内容的单特异性分子是单特异性抗体样分子。在一些实施例中,本披露内容的单特异性分子是单特异性抗体。术语“双特异性分子”是指结合两种不同抗原的含Fc的多特异性分子。术语“三特异性分子”是指经由三个不同的结合部分与三种不同抗原结合的含Fc的多特异性结合分子。在一些实施例中,本披露内容的双特异性分子是双特异性抗体样分子。在一些实施例中,本披露内容的多特异性分子是多特异性抗体样分子。

[0109] 术语“多特异性抗体”是指能够识别抗原的两个或更多个表位或两个或更多个抗原的抗体。每种抗原的识别通常经由“抗原结合结构域”来完成。特别地,双特异性抗体识别相同或不同抗原上的两个不同表位。所有双特异性IgG分子(即在其组成上与天然免疫球蛋白不可区分的双特异性抗体)都是二价的,并且由于至少存在不同的Fv区域而具有不对称结构。根据制备方法和重链和轻链的来源,它们在重链或轻链的恒定区可能进一步不同(Brinkmann和Kontermann,2017)。

[0110] 双特异性抗体是“异二聚体”,这意味着一部分来自对第一靶标具有特异性的第一抗体,并且另一部分来自对第二靶标具有特异性的第二抗体。“异二聚化修饰”是对形成异

二聚体双特异性抗体的抗体的一个或两个部分的修饰,旨在促进这种形成。旨在形成双特异性抗体的两个IgG1部分的Fc结构域的异二聚化修饰的实例是在第一重链中具有大氨基酸(aa)侧链(S354C、T366W)的“杵”和在第二重链中引入了小氨基酸侧链(Y349C、T366S、L368A、Y407V)的“臼”以及在CH3区中连接两条重链的另外的二硫桥(Merchant等人, Nat.Biotechnol.[自然生物技术],16:677-681(1998),第678页,表1)。

[0111] 术语“错配”或“错误配对”或“错误组装”是指预期的蛋白质复合物的不同部分(例如双特异性抗体)未按预期复合,这意味着蛋白质复合物的外观或行为不符合预期。在双特异性抗体的情况下错配的实例如图1所示。

[0112] 如本文所用,术语“识别”或“结合”是指结合分子、抗体或其抗原结合片段发现并与其表位相互作用(例如,结合或识别),无论该表位是线性的、不连续的还是构象的。术语“表位”是指抗原上与本披露内容的抗体或抗原结合片段特异性结合的位点。表位可以从邻接氨基酸或因蛋白质的三级折叠而并置的非邻接氨基酸形成。从邻接氨基酸形成的表位典型地在暴露于变性溶剂时得到保留,而通过三级折叠形成的表位在用变性溶剂处理时典型地会丧失。表位典型地包括至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个处于独特空间构象的氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括本领域中的技术,例如,x射线结晶学和2维核磁共振(参见,例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology[分子生物学中的方法中的表位作图方案],第66卷,G.E.Morris编辑(1996))或电子显微术。“互补位”是识别抗原表位的抗体部分。

[0113] 在描述抗原(例如,蛋白质)与抗体、抗体片段或抗体衍生的结合剂之间相互作用的语境中使用时,短语“特异性结合”或“选择性结合”是指确定抗原在蛋白质异质群体和其他生物制品中例如在生物样品(例如,血液、血清、血浆或组织样品)中的存在的结合反应。因此,在某些指明的免疫测定条件下,具有特定结合特异性的抗体或结合剂与特定抗原的结合至少两倍于背景并且这些抗体或结合剂基本上不以显著的量与样品中存在的其他抗原结合。在一个方面,在指明的免疫测定条件下,具有特定结合特异性的抗体或结合剂与特定抗原的结合至少十(10)倍于背景并且这些抗体或结合剂基本上不以显著的量与样品中存在的其他抗原结合。在这样的条件下与抗体或结合剂特异性结合可能需要已经针对特定蛋白质的特异性选择抗体或试剂。如果希望或适当,可以通过扣除与来自其他物种(例如,小鼠或大鼠)或其他亚型的分子交叉反应的抗体来实现该选择。可替代地,在一些方面,选择与某些希望的分子交叉反应的抗体或抗体片段。

[0114] 术语“抗原结合位点”是指抗体的一部分,该部分包含形成与抗原或其表位结合的界面的决定簇。术语“抗原结合位点”可以与术语“抗原结合结构域”或抗体结合部分可互换地使用。关于蛋白质(或蛋白质模拟物),抗原结合位点典型地包括形成与抗原多肽结合的界面的一个或多个环(具有至少四个氨基酸或氨基酸模拟物)。典型地,抗体分子的抗原结合位点包括至少一个或两个CDR和/或高变环,或更典型地至少三个、四个、五个或六个CDR和/或高变环。

[0115] 如本文所用,术语“互补决定区”或“CDR”是指抗体可变区内的赋予抗原特异性和结合亲和力的氨基酸的序列。例如,一般来说,每个重链可变区中存在三个CDR(例如,HCDR1、HCDR2、和HCDR3),并且每个轻链可变区中存在三个CDR(LCDR1、LCDR2、和LCDR3)。CDR和框架区的位置可以使用本领域中各种已知的定义例如卡巴特(Kabat)、乔西亚

(Chothia)、IMGT、AbM以及组合的定义来确定(参见例如Kabat等人,(1991)“Sequences of Proteins of Immunological Interest[具有免疫学意义的蛋白质序列],”第5版,Public Health Service[美国公共卫生服务中心],National Institutes of Health[美国国立卫生研究院],Bethesda,MD[马里兰州贝塞斯达市];Johnson等人,(2001)Nucleic Acids Res.[核酸研究],29:205-206;Chothia和Lesk,(1987)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],196:901-917;Chothia等人,(1989)Nature[自然],342:877-883;Chothia等人,(1992)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],227:799-817;LefrancMP(2001)Nucleic Acids Res.[核酸研究],29:207-209;Al-Lazikani等人,(1997)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],273:927-748)。抗原结合位点的定义还在以下文献中描述:Ruiz等人,(2000)Nucleic Acids Res.[核酸研究],28:219-221;MacCallum等人,(1996)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],262:732-745;以及Martin等人,(1989)PNAS.USA[美国国家科学院院刊]86:9268-9272;Martin等人,(1991)Methods Enzymol.[酶学方法],203:121-153;以及Rees等人,于Sternberg M.J.E.(编辑),Protein Structure Prediction[蛋白质结构预测],Oxford University Press[牛津大学出版社],牛津,141-172(1996)中。根据Kabat编号方案,在一些实施例中,将重链可变结构域(VH)中的CDR氨基酸残基编号为31-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)、和95-102(HCDR3);并将轻链可变结构域(VL)中的CDR氨基酸残基编号为24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)。根据Chothia编号方案,在一些实施例中,将VH中的CDR氨基酸编号为26-32(HCDR1)、52-56(HCDR2)、和95-102(HCDR3);并将VL中的CDR氨基酸残基编号为26-32(LCDR1)、50-52(LCDR2)、和91-96(LCDR3)。在组合的Kabat和Chothia编号方案中,在一些实施例中,CDR对应于为Kabat CDR、Chothia CDR或两者的一部分的氨基酸残基。例如,在一些实施例中,CDR对应于人VH(例如哺乳动物VH,例如人VH)中的氨基酸残基26-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3);和人VL(例如哺乳动物VL,例如人VL)中的氨基酸残基24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)、和89-97(LCDR3)。根据IMGT,将VH中的CDR氨基酸残基编号为约26-35(CDR1)、51-57(CDR2)和93-102(CDR3),并将VL中的CDR氨基酸残基编号为约27-32(CDR1)、50-52(CDR2)和89-97(CDR3)(根据“卡巴特”编号)。根据IMGT,可以使用程序IMGT/DomainGap Align确定抗体的CDR区。

[0116] 术语非人类(例如,鼠)抗体的“人源化”形式是含有源自非人类免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。在大多数情况下,人源化抗体是人免疫球蛋白(受者抗体),其中来自受者高变区的残基被来自非人物种例如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的具有所需特异性、亲和力和能力的高变区(供者抗体)的残基替代。在一些情况下,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基由相应非人类残基替代。此外,人源化抗体可以包含在受者抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步改善抗体性能。通常,人源化抗体将包含基本上所有如下项:至少一个,典型地两个可变结构域,其中所有或基本上所有高变环对应于非人类免疫球蛋白的那些高变环,且所有或基本上所有FR是人类免疫球蛋白1 α 序列的那些FR。人源化抗体任选地还包含免疫球蛋白恒定区(Fc),典型地人免疫球蛋白恒定区的至少一部分。关于进一步的细节,参见Jones等人,Nature[自然]321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature[自然]332:323-329(1988);以及Presta,Curr.Op.Struct.Biol.[当前生物结构观点]2:593-596(1992)。还参见以下综述文章和其中引用的参考文献:Vaswani和Hamilton,Ann.Allergy,Asthma&Immunol.[过敏、哮喘和免疫学年鉴]1:105-115(1998);Harris,

Biochem.Soc.Transactions[生物化学学会学报]23:1035-1038(1995);Hurle和Gross, Curr.Op.Biotech.[当前生物技术观点]5:428-433(1994)。

[0117] 如本文所用,术语“人抗体”包括具有可变区的抗体,其中框架区和CDR区两者均衍生自人来源的序列。此外,如果抗体含有恒定区,则恒定区也衍生自此类人序列,例如人种系序列,或人种系序列的突变形式或含有衍生自人框架序列分析的共有框架序列的抗体,例如,如Knappik等人(2000.J Mol Biol[分子生物学杂志]296,57-86)所述。

[0118] 本发明的人抗体可以包括不是由人序列编码的氨基酸残基(例如,通过在体外随机诱变或位点特异性诱变、或通过在体内体细胞突变、或保守取代来引入突变以促进稳定性或生产)。然而,如本文所用的,所述术语“人抗体”不旨在包括其中衍生自另一种哺乳动物物种(例如小鼠)种系的CDR序列已被移植到人类框架序列中的抗体。

[0119] 如本文所用的氨基酸残基/位置的“修饰”或“突变”是指与起始氨基酸序列相比,一级氨基酸序列的变化,其中所述变化是由涉及所述氨基酸残基/位置的序列变化引起的。例如,典型的修饰包括用另一个氨基酸取代残基(或在所述位置处取代)(例如,保守或非保守取代)、在所述残基/位置附近插入一个或多个氨基酸、以及缺失所述残基/位置。“氨基酸取代”或其变化形式是指用不同的氨基酸残基替代预定(起始)氨基酸序列中的现有氨基酸残基。通常且优选地,与包含起始(或“野生型”)氨基酸序列的多肽相比,修饰使变体多肽的至少一种物理生物化学活性改变。例如,在抗体的情况下,改变的物理生物化学活性可以是对靶分子的结合亲和力、结合能力和/或结合作用。

[0120] 术语“保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列二者。对于特定核酸序列,保守修饰的变体是指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的那些核酸,或者在该核酸不编码氨基酸序列的情况下,是指基本上相同的序列。由于遗传密码的简并性,大量功能上相同的核酸编码任何给定的蛋白质。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在密码子指定丙氨酸的每个位置处,该密码子可以改变为任何所述的对应密码子而不改变所编码的多肽。这样的核酸变异是“沉默变异”,其是保守修饰的变异中的一个种类。本文中编码多肽的每个核酸序列也描述了核酸的每种可能性沉默变异。技术人员应认识到,核酸中的每个密码子(除了通常是甲硫氨酸的唯一密码子的AUG和通常是色氨酸的唯一密码子的TGG)均可以被修饰以产生功能上相同的分子。因此,在每个所述序列中均隐含了编码多肽的核酸的每一种沉默变异。

[0121] 对于多肽序列,“保守修饰的变体”包括对多肽序列的单独取代、缺失或添加,它们导致氨基酸取代为化学上相似的氨基酸。提供功能上类似的氨基酸的保守取代代表是本领域中已知的。此类保守修饰的变体是对本发明的多态变体、种间同源物和等位基因的补充,并且不排除这些多态变体、种间同源物和等位基因。以下八组含有互为保守取代的氨基酸:1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);

[0122] 5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和8) 半胱氨酸(C),甲硫氨酸(M)(参见,例如,Creighton,Proteins[蛋白](1984))。在一些实施例中,短语“保守序列修饰”用于指如下氨基酸修饰,其不显著影响或改变含有所述氨基酸序列的抗体或抗体样分子的结合特征。

[0123] 在两个或更多个核酸或多肽序列的情形下,术语“相同百分比”或“同一性百分比”

是指两个或更多个相同的序列或子序列。当在比较窗口或指定区域内进行比较和比对以寻求使用以下序列比较算法之一或通过手动比对和目视检查所测量的最大对应时,如果两个序列具有规定百分比的相同的氨基酸残基或核苷酸(即,在规定区域上或当没有规定时则在整个序列上,60%同一性,任选65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%同一性),则两个序列是“基本上相同的”。任选地,同一性存在于长度为至少约50个核苷酸(或10个氨基酸)的区域上,或更优选地在长度为100至500或1000或更多个核苷酸(或20、50、200或更多个氨基酸)的区域上。

[0124] 对于序列比较,典型地一个序列充当参考序列,将测试序列与该参考序列进行比较。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入到计算机中,必要时指明子序列坐标,并且指明序列算法程序参数。可以使用默认程序参数,或者可以指明可替代的参数。然后,序列比较算法基于程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0125] 如本文所用的术语“比较窗口”包括提及选自20至600、通常约50至约200、更通常约100至约150组成的组的多个邻接位置中的任一个的区段,其中可以将序列与具有相同数量邻接位置的参考序列在两个序列最佳比对后进行比较。用于比较的序列比对方法是本领域已知的。用于比较的序列的最佳比对可以通过以下来进行:例如,通过Smith和Waterman(1970) *Adv. Appl. Math.* [应用数学进展] 2:482c的局部同源性算法;通过Needleman和Wunsch(1970) *J. Mol. Biol.* [分子生物学杂志] 48:443的同源比对算法;通过搜索Pearson和Lipman,1988, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 85:2444的相似性方法;通过这些算法的计算机化实现(在威斯康星州麦迪逊市科学路575号(575 Science Dr., Madison, WI)的遗传学计算机组(Genetics Computer Group)的威斯康星遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package)中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA);或通过手动校准和目视检查(参见例如,Brent等人,(2003) *Current Protocols in Molecular Biology* [当前分子生物学实验指南])。

[0126] 适用于确定序列同一性百分比和序列相似性的算法的两个实例是BLAST和BLAST 2.0算法,它们分别描述于Altschul等人,(1977) *Nuc. Acids Res.* [核酸研究] 25:3389-3402;和Altschul等人,(1990) *J. Mol. Biol.* [分子生物学杂志] 215:403-410。用于执行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公开地获得。该算法涉及首先通过鉴定查询序列中长度为W的短字来鉴定高评分序列对(HSP),当与数据库序列中的相同长度的字比对时,该长度为W的短字匹配或满足一些正值阈值得分T。T被称为邻域词得分阈值(Altschul等人,同上)。这些最初的邻域字命中点作为种子,用于启动搜索以找到包含它们的更长的HSP。字命中点沿着每个序列在两个方向上扩展,远至可以增加累积比对得分。对于核苷酸序列,使用参数M(一对匹配残基的奖励得分;总是>0)和N(错配残基的罚分;总是<0)计算累积得分。对于氨基酸序列,使用评分矩阵来计算累积得分。当出现以下情形时,字命中点向各方向的延伸终止:累积比对得分从其最大获得值跌落数量X;由于一个或多个负评分残基比对的累积,累积得分走向零或更低;或到达任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X决定了比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(对于核苷酸序列)使用字长(W) 11、期望值(E) 10、M=5、N=-4和两条链比较作为默认值。对于氨基酸序列,BLASTP程序使用字长3和期望值(E) 10以及BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff和Henikoff(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 89:

10915) 比对 (B) 50、期望值 (E) 10、 $M=5$ 、 $N=-4$ 和两条链比较作为默认值。

[0127] 所述BLAST算法还对两个序列之间的相似度进行统计学分析(参见,例如,Karlin和Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 90:5873-5787)。由BLAST算法提供的一种相似性量度是最小总和概率($P(N)$),其提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率的指示。例如,如果在测试核酸与参考核酸的比较中最小总和概率小于约0.2、更优选地小于约0.01、以及最优选地小于约0.001,则认为核酸与参考序列相似。

[0128] 两个氨基酸序列之间的同一性百分比也可以使用已并入ALIGN程序(2.0版)中的E.Meyers和W.Miller (*Comput. Appl. Biosci.* [计算机应用生物学], 4:11-17 (1988)) 的算法,利用PAM120权重残基表、空位长度罚分12、空位罚分4来确定。另外,两个氨基酸序列之间的同一性百分比可以使用已经并入GCG软件包中的GAP程序(可从www.gcg.com获得)中的Needleman和Wunsch (*J. Mol. Biol.* [分子生物学杂志] 48:444-453 (1970)) 算法,利用Blossom 62矩阵或PAM250矩阵和空位权重16、14、12、10、8、6或4以及长度权重1、2、3、4、5或6来确定。

[0129] 除了上述序列同一性百分比之外,两个核酸序列或多肽基本上相同的另一个指示是由第一核酸编码的多肽与针对由第二核酸编码的多肽产生的抗体进行免疫交叉反应,如下所述。因此,多肽典型地与第二多肽基本上相同,例如其中两种肽仅通过保守取代而不同。两个核酸序列基本上相同的另一个指示是两个分子或它们的互补序列在严格条件下彼此杂交,如下所述。两个核酸序列基本上相同的又一个指示是可使用相同的引物来扩增序列。

[0130] 术语“核酸”或“多核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非特别限定,否则该术语涵盖含有已知的天然核苷酸类似物的核酸,该核酸具有与参考核酸相似的结合特性并且以与天然存在的核苷酸相似的方式进行代谢。除非另外指出,否则特定的核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直向同源物、SNP和互补序列以及明确指明的序列。特别地,简并密码子取代可以通过产生如下序列而获得,在这些序列中,一个或多个所选的(或全部)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代(Batzer等人, *Nucleic Acid Res.* [核酸研究] 19:5081 (1991); Ohtsuka等人, *J. Biol. Chem.* [生物化学杂志] 260:2605-2608 (1985); 和Rossolini等人, *Mol. Cell. Probes* [分子和细胞探针] 8:91-98 (1994))。

[0131] “多核苷酸”或“核酸”中的核苷酸可以包含修饰,包括碱基修饰,如溴尿苷和肌苷衍生物;核糖修饰,如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯(phosphoroselenoate)、二硒代磷酸酯(phosphorodiselenoate)、苯胺基硫代磷酸酯(phosphoroanilothioate)、酰基苯胺磷酸酯(phosphoraniladate)和氨基磷酸酯。

[0132] 术语“载体”意指适合于转化或转染宿主细胞并且含有指导和/或控制(与宿主细胞结合)一个或多个与其可操作地连接的异源编码区的表达的核酸序列的任何分子或实体(例如核酸、质粒、噬菌体或病毒)。

[0133] 如本文所用的术语“可操作地连接”或功能性连接是指两个或更多个多核苷酸(例如,DNA)区段之间的功能关系。典型地,它是指转录调节序列与转录的序列的功能性关系。例如,如果启动子或增强子序列在适当的宿主细胞或其他表达系统中刺激或调节编码序列

的转录,则所述启动子或增强子序列可操作地连接至编码序列。通常,与转录的序列可操作地连接的启动子转录调节序列与转录的序列在物理上邻接,即它们是顺式作用的。然而,一些转录调节序列(如增强子)不需要在物理上邻接或位于极为接近这些转录调节序列增强其转录的编码序列的位置。

[0134] 术语“共表达”是指在所有多肽共同的单个宿主细胞中一起表达不同的多肽。双特异性抗体的共表达意味着形成功能性双特异性抗体的不同部分在单个、共同的宿主细胞中表达。共表达可以通过在表达宿主细胞中掺入若干种表达载体(如一种表达载体用于表达双特异性抗体的各个半部分中的每一个)来实现,或者通过掺入一种编码双特异性抗体的所有部分的表达载体来实现。如本文所用,“C末端”是指具有游离羧基(-COOH)的多肽链的羧基末端氨基酸。如本文所用,“N末端”是指具有游离胺基(-NH₂)的多肽链的氨基末端氨基酸。

[0135] 术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用来指氨基酸残基的聚合物。这些短语还适用于一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,并且适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。除非另外说明,否则特定的多肽序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体。

[0136] 如本文所用的术语“体内半衰期”是指在给定哺乳动物的血液中循环的感兴趣的分子或其变体的半衰期。

[0137] 人抗体可以通过本领域技术人员已知的许多方法产生。人抗体可以通过杂交瘤方法使用人骨髓瘤或小鼠-人异骨髓瘤细胞系制备(Kozbor, J Immunol [免疫学杂志]; (1984) 133:3001; Brodeur, Monoclonal Isolated Antibody Production Techniques and Applications [单克隆分离抗体生产技术及应用], 第51-63页, Marcel Dekker Inc [马塞尔·德克尔公司], 1987)。可替代的方法包括使用噬菌体文库或转基因小鼠,两者均使用人可变区库(Winter G; (1994) Annu Rev Immunol [免疫学年度评论] 12:433-455, Green LL, (1999) J Immunol Methods [免疫学方法杂志] 231:11-23)。

[0138] 现在可获得若干个转基因小鼠品系,其中它们的小鼠免疫球蛋白基因座已被人免疫球蛋白基因区段替代(Tomizuka K, (2000) Proc Natl Acad Sci [美国国家科学院院刊], 97:722-727; Fishwild DM (1996) Nature Biotechnol [自然生物技术] 14:845-851; Mendez MJ, (1997) Nature Genetics [自然遗传学] 15:146-156)。在抗原激发后,此类小鼠能够产生人抗体库,可以从中选择目的抗体。特别值得注意的是TrimerATM系统(Eren R等人, (1988) Immunology [免疫学] 93:154-161),其中将人淋巴细胞移植到了受辐照的小鼠中;选择性淋巴细胞分离抗体系统(SLAM, Babcook等人, Proc Natl Acad Sci [美国国家科学院院刊] (1996) 93:7843-7848),其中有效地使人(或其他物种)淋巴细胞通过大量汇集的体外分离抗体生成程序,然后进行解卷积,有限稀释和选择程序以及XenomouseTM(Abgenix公司)。可从Morphotek公司使用MorphodomaTM技术获得可替代的方法。

[0139] 噬菌体展示技术可用于生产人抗体及其片段(McCafferty; (1990) Nature [自然], 348:552-553和Griffiths AD等人(1994) EMBO [欧洲分子生物学学会杂志] 13:3245-3260)。根据该技术,将分离的抗体可变结构域基因框内克隆到丝状噬菌体(如M13或fd)的蛋白基因的主要或次要外壳中,并作为功能分离的抗体片段展示(通常在辅助噬菌体的帮助下)在噬菌体颗粒的表面。基于分离的抗体的功能特性的选择导致选择编码表现出这些特性的分

离的抗体的基因。噬菌体展示技术可用于从人B细胞制备的文库中选择抗原特异性抗体,该人B细胞取自患有疾病或障碍的个体,或者可替代地取自未免疫的人供体(Marks;J MolBio[分子生物学杂志](1991)222:581-591)。当需要包含Fc结构域的完整的人分离的抗体时,必须将噬菌体展示的衍生片段重新克隆到包含所需恒定区并建立稳定表达细胞系的哺乳动物表达载体中。

[0140] 亲和力和成熟的技术(Marks;Biotechnol[生物技术](1992)10:779-783)可用于提供结合亲和力,其中通过用天然存在的变体依序替代H和L链可变区并在改善的结合亲和力的基础上进行选择来改善初级人分离抗体的亲和力。现在也提供了这种技术的变体,如“表位压印”(WO 93/06213;Waterhouse;NuclAcids Res[核酸研究](1993)21:2265-2266)。

[0141] 当在纯化的双特异性抗体的上下文中使用时,术语“纯”涉及不同的双特异性抗体组合和构建体在所选细胞中在其中细胞表达双特异性抗体的条件下共表达后和使用完整的UPLC-MS质量筛选方法的蛋白A纯化之后的纯度和同一性。纯或纯度是指形成的异二聚体和同二聚体bbmAb的相对定量。使用本发明的方法,可以观察到正确形成的异二聚体双特异性抗体,基于完整的质量信号强度,其相对纯度超过85%。

[0142] 术语“治疗上可接受的量”或“治疗有效量”或“治疗有效剂量”可互换地指足以实现所需结果(即,降低疾病活性,降低疾病进展,减少疾病病征和/或症状等)的量。在一些方面,治疗可接受量不诱导或不引起不希望的副作用。可以通过首先施用低剂量并且随后递增地增加该剂量直至实现所希望的作用来确定治疗可接受量。本发明的分子的“预防有效剂量”和“治疗有效剂量”可以分别预防疾病症状发作或使疾病症状的严重性降低,所述疾病症状包括与IL-13活性和IL-18活性相关的症状。

[0143] 术语“受试者”包括人和非人动物。非人动物包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,如非人灵长类、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。除非指出时,否则术语“患者”或“受试者”在本文中可互换地使用。

[0144] 如本文所用,诸如“需要治疗的患者”或“需要治疗的受试者”的短语包括将受益于施用例如用于检测、诊断程序和/或治疗的本披露内容的分子或药物组合物的受试者,诸如哺乳动物受试者。

[0145] 术语“治疗(treat、treating、treatment)”、“预防(prevent、preventing、prevention)”包括治疗性治疗、预防性治疗和应用,其中可降低受试者发展为障碍的风险或其他风险因素。治疗不需要完全治愈障碍,并且涵盖减轻症状或潜在的风险因素。如本文所用,人抗体或其片段包含作为特定种系序列“的产物”或“衍生自”特定种系序列的重链或轻链可变区或全长重链或轻链,如果该抗体的可变区或全长链是从使用人种系免疫球蛋白基因的系统获得的话。此类系统包括用目的抗原对携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠进行免疫或用目的抗原筛选展示在噬菌体上的人免疫球蛋白基因文库。作为人种系免疫球蛋白序列“的产物”或“衍生自”人种系免疫球蛋白序列的人抗体或其片段可以通过以下方式照此鉴定:比较人抗体的氨基酸序列与人种系免疫球蛋白的氨基酸序列,并且选择序列中与人抗体的序列最接近(即,最高同一性%)的人种系免疫球蛋白序列。作为特定人种系免疫球蛋白序列“的产物”或“衍生自”特定人种系免疫球蛋白序列的人抗体可以由于例如天然存在的体细胞突变或有意引入定点突变而含有与种系序列相比的氨基酸差异。然而,所选人抗体的氨基酸序列典型地与由人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列至少90%

相同,并且含有在与其他物种的种系免疫球蛋白氨基酸序列(例如,鼠类种系序列)相比时将该人抗体鉴定为属于人的氨基酸残基。在某些情况下,人抗体的氨基酸序列可以与由种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列至少60%、70%、80%、90%或至少95%或甚至至少96%、97%、98%或99%相同。典型地,衍生自特定人种系序列的人抗体将展示与由人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列的不超过10个氨基酸的差异。在某些情况下,人抗体可以展示与由种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列的不超过5个或甚至不超过4、3、2或1个氨基酸的差异。

[0146] 本发明的各方面在以下段落和子段落中进一步详细描述。

[0147] 结合IL-13和IL-18的多特异性抗体

[0148] I. IL-18结合结构域

[0149] 本披露内容提供了经工程化以结合人IL-18的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段。本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)对IL-18的识别通过“IL-18抗原结合结构域”发生,所述结构域可互换地称为“IL-18结合结构域”。

[0150] 在一个优选的方面,多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含一个IL-18结合结构域,使得所述多特异性结合分子对于结合IL-18是单价的。在另一个优选的方面,多特异性结合分子包含超过一个IL-18结合结构域,例如,两个IL-18结合结构域,使得所述多特异性结合分子对于结合IL-18是多价的,优选对于结合IL-18是二价的。

[0151] 在一些方面,所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的IL-18结合结构域包含IL-18scFv或IL-18Fab、优选IL-18Fab。

[0152] 在一些实施例中,所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含IL-18结合结构域,其对于IL-18具有 K_D 为 10^{-4} M至 10^{-8} M,例如 10^{-5} M至 10^{-7} M,例如 10^{-6} M或 10^{-7} M的结合亲和力。

[0153] 在优选实施例中,所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含一个IL-18Fab。在另一个优选的实施例中,所述抗IL-18结合结构域包含两个IL-18Fab。本文还考虑了包含多于两个IL-18Fab的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段。

[0154] 在一些情形下,可以根据本领域已知的方法制备Fab。木瓜蛋白酶可以用于将免疫球蛋白单体切割成两个Fab片段和一个Fc片段。胃蛋白酶在铰链区下方切割,因此形成F(ab')₂片段和pFc'片段。F(ab')₂片段可以通过温和还原而分裂成两个Fab'片段。Fab片段是高度稳定的,这是由于在重链与轻链多肽之间的巨大界面上发生的非共价相互作用所致,以及CH1与CL结构域之间存在稳定的二硫键(参见Glover和Humphreys,第2章,Antibodies[抗体],第1卷:Production and Purification[产生和纯化],Kluwer Academic/Plenum Publishers[克吕韦尔学术出版集团/普莱南出版公司],纽约2004,编辑:G Subramanian)。关于接头定向和大小的实例,参见例如,Hollinger等人(1993)PNAS U.S.A.[美国国家科学院院刊]90:6444-6448、US2005/0100543、US2005/0175606、US2007/0014794和WO 2006/020258以及WO 2007/024715,将以上文献通过引用并入本文。

[0155] 短语“结合人IL-18的Fab”和“IL-18Fab”是指与人IL-18结合的Fab。在一个方面,IL-18Fab保留等效的结合亲和力,例如以与全长抗体可比较的功效结合IL-18。在其他实施例中,与全长抗体相比,IL-18Fab具有较低的结合亲和力,例如,其以较低的结合亲和力结合IL-18,但其仍然提供本文所述的生物反应。

[0156] 用于所披露的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段中的优选IL-18Fab包含含有如SEQ ID NO:41中所示氨基酸序列的VH和含有如SEQ ID NO:13中所示氨基酸序列的VL。

[0157] 在一个方面,本披露内容提供了编码包含IL-18结合结构域(例如,IL-18Fab)的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的多核苷酸。本披露内容还提供了编码这些Fab的分离的核酸分子。

[0158] 本文披露了编码包含IL-18结合结构域的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的分离的核酸分子,所述IL-18结合结构域包含具有如SEQ ID NO:41中所示氨基酸序列的VH并且包含具有如SEQ ID NO:13中所示氨基酸序列的VL。

[0159] 在一个方面,多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的IL-18结合结构域(例如,IL-18Fab)由转基因编码,所述转基因的序列已针对在哺乳动物细胞中的表达进行密码子优化。在一个方面,本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的整个构建体由转基因编码,所述转基因的整个序列已针对在哺乳动物细胞中的表达进行密码子优化。密码子优化是指如下发现:编码DNA中的同义密码子(即编码相同氨基酸的密码子)的出现频率在不同物种中存在偏差。这种密码子简并性允许相同的多肽由各种核苷酸序列编码。各种密码子优化方法是本领域已知的,并且包括例如在至少US 5,786,464和US 6,114,148中披露的方法。

[0160] II. IL-13结合结构域

[0161] 本披露内容提供了经工程化以结合人IL-13的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段。本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)对IL-13的识别通过“IL-13抗原结合结构域”发生,所述结构域可互换地称为“IL-13结合结构域”。

[0162] 在一个优选的方面,多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含一个IL-13结合结构域,使得所述多特异性结合分子对于结合IL-13是单价的。在另一个优选的方面,多特异性结合分子包含多于一个IL-13结合结构域,例如,两个IL-18结合结构域,使得所述多特异性结合分子对于结合IL-18是多价的,优选对于结合IL-13是二价的。

[0163] 在一些方面,所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的IL-13结合结构域包含IL-13scFv或IL-13Fab、优选IL-13Fab。

[0164] 在一些实施例中,所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含IL-13结合结构域,其对于IL-13具有 K_D 为 10^{-4} M至 10^{-8} M,例如 10^{-5} M至 10^{-7} M,例如 10^{-6} M或 10^{-7} M的结合亲和力。

[0165] 在优选实施例中,所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含一个IL-13Fab。在另一个优选的实施例中,所述抗IL-13结合结构域包含两个IL-13Fab。本文还考虑了包含多于两个IL-13Fab的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段。

[0166] 短语“结合人IL-13的Fab”和“IL-13Fab”是指与人IL-13结合的Fab。在一个方面,IL-13Fab保留等效的结合亲和力,例如以与全长抗体可比较的功效结合IL-13。在其他实施例中,与全长抗体相比,IL-18Fab具有较低的结合亲和力,例如,其以较低的结合亲和力结合IL-13,但其仍然提供本文所述的生物反应。

[0167] 用于所披露的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段中的优选IL-13Fab包含含有如SEQ ID NO:55中所示氨基酸序列的VH和含有如SEQ ID NO:27中所示氨基酸序列

的VL。

[0168] 用于所披露的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段中的另一个优选IL-13Fab包含含有如SEQ ID NO:85中所示氨基酸序列的VH和含有如SEQ ID NO:71中所示氨基酸序列的VL。

[0169] 在一个方面,本披露内容提供了编码包含IL-13结合结构域(例如,IL-13Fab)的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的多核苷酸。本披露内容还提供了编码这些Fab的分离的核酸分子。

[0170] 本文披露了编码包含IL-13结合结构域的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的分离的核酸分子,所述IL-13结合结构域包含具有如SEQ ID NO:55中所示氨基酸序列的VH并且包含具有如SEQ ID NO:27中所示氨基酸序列的VL。

[0171] 本文还披露了编码包含IL-13结合结构域的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的分离的核酸分子,所述IL-13结合结构域包含具有如SEQ ID NO:85中所示氨基酸序列的VH并且包含具有如SEQ ID NO:71中所示氨基酸序列的VL。

[0172] 本披露内容还包括包含上述分离的核酸分子和多核苷酸中一种或多种的构建体(例如,克隆或表达载体)。本披露内容还包括包含一种或多种上述构建体(例如,克隆或表达载体)的宿主细胞。

[0173] 在一个方面,本披露内容包括重组核酸构建体,所述重组核酸构建体包含编码如本文所披露的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含编码IL-13结合结构域或其片段的核酸序列。

[0174] III. 多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的结构域和区域的连接和定向

[0175] 如本文所用,术语“连接的”或“连接”是指多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的一部分直接或间接地附接到分子的另一部分。直接附接是连接的一种形式,并且在本文中称为“融合”。以具有A-B-C形式的分子为例:部分A与部分B直接连接,并且与部分C间接连接(也可以将部分A描述为与部分B融合)。使用VH-内部接头-VL形式的scFv作为另一个实例,VH与VL间接连接,并且与内部接头直接连接(也可以将接头描述为与VL和VH两者融合)。

[0176] 在一些实施例中,所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的IL-18结合结构域和IL-13结合结构域是连接的。在一些实施例中,所述连接是直接连接,并且因此所述区域彼此融合。在一些实施例中,IL-18结合结构域和/或IL-13结合结构域与Fc多肽链融合。在一些实施例中,IL-13结合结构域(例如,IL-13Fab)例如通过多肽接头连接至IL-18结合结构域的N末端。在一些实施例中,IL-13结合结构域(例如,IL-13Fab)连接例如融合至IL-18结合结构域的N末端。

[0177] IV. 多特异性抗体的形式

[0178] 在一些方面,多特异性抗体是双特异性抗体。在一些方面,所述双特异性抗体对于一种抗原可以是多价的,例如二价的,并且对于另一种抗原可以是单价的。示例性双特异性抗体的特征在于对第一抗原或表位(例如,IL-18)具有结合特异性的第一抗原结合结构域(例如,包含第一VL和第一VH)和对第二抗原或表位(例如,IL-13)具有结合特异性的第二抗原结合结构域。在一些实施例中,第一和第二表位在相同抗原,例如,相同蛋白质(或多聚体蛋白质的亚单位)上。在一些实施例中,第一表位和第二表位在不同的抗原,例如两种蛋白

质(或多聚体蛋白质的亚基)上。在披露内容的实施例中,双特异性抗体包含对第一表位或抗原(例如,IL-18)具有结合特异性的重链可变结构域序列和轻链可变结构域序列,以及对第二表位或抗体(例如,IL-13)具有结合特异性的另一个结合结构域。

[0179] 用于产生双特异性或异二聚体抗体的方案在本领域中是已知的;这些方案包括但不限于:例如,“杵臼结构”途径,例如,在US 5,731,168中所述;静电转向Fc配对,如例如WO 2009/089004、WO 2006/106905和WO 2010/129304中所述;链交换工程化结构域(SEED)异二聚体形成,如例如在WO 2007/110205中所述;Fab臂交换,如例如WO2008/119353、WO 2011/131746和WO 2013/060867中所述;双抗体缀合物,例如使用具有胺反应性基团和巯基反应性基团的异双官能试剂,通过抗体交联以产生双特异性结构,如例如在US 4,433,059中所述;通过重组来自不同抗体或抗体样分子的半抗体(重链-轻链对或Fab)产生的双特异性抗体或抗体样分子决定簇,该重组通过对两条重链之间的二硫键进行还原和氧化的循环来进行,如例如US 4,444,878中所述;三功能抗体,例如通过巯基反应性基团交联的三个Fab'片段,如例如在US5,273,743中所述;生物合成结合蛋白,例如通过C-末端尾优选通过二硫键或胺反应性化学交联作用交联的scFv对,如例如在US 5,534,254中所述;双功能抗体,例如具有不同结合特异性的Fab片段,这些Fab片段通过已经替代恒定结构域的亮氨酸拉链二聚化,如例如在US 5,582,996中所述;双特异性和寡特异性单价受体和寡价受体,例如两个抗体(两个Fab片段)的VH-CH1区,这些VH-CH1区通过在一个抗体的CH1区与另一个抗体的VH区(典型地具有相关联的轻链)之间的多肽间隔区连接,如例如在US 5,591,828中所述;双特异性DNA-抗体缀合物,例如抗体或Fab片段通过DNA的双链段交联,如例如在US 5,635,602中所述;双特异性融合蛋白,例如含有两个scFv(它们之间具有亲水性螺旋肽接头)和一个完全恒定区的表达构建体,如例如在US 5,637,481中所述;多价和多特异性结合蛋白,例如具有含Ig重链可变区结合区的第一结构域和含Ig轻链可变区结合区的第二结构域的多肽二聚体,通常称为双抗体(也涵盖更高级结构,从而产生双特异性、三特异性或四特异性分子),如例如US 5,837,242中所述;具有连接的VL和VH链(它们进一步用肽间隔区连接至抗体铰链区和CH3区)的微型抗体构建体,它可以二聚化形成双特异性/多价分子,如例如在US 5,837,821中所述;用短肽接头(例如5或10个氨基酸)连接的或在任一取向上完全没有接头连接的VL和VH结构域,这些VL和VH结构域可以形成二聚体以形成双特异性双抗体;三聚体和四聚体,如例如在US 5,844,094中所述;VH结构域(或家族成员中的VL结构域)的串,其通过肽键与C末端的可交联基团连接,这些可交联基团进一步与VL结构域缔合以形成一系列Fv(或scFv),如例如在US 5,864,019中所述;VL和VH结构域、scFv或Fab,其中抗原中的一种以单价结合并且抗原中的一种以双价结合,任选地包含异二聚Fc区,如例如WO 2011/028952中所述;具有经肽接头连接的VL和VH结构域二者的单链结合多肽通过非共价或化学交联组合成多价结构,以使用scFv或双抗体类型形式形成例如同二价、异二价、三价和四价结构,如例如在US 5,869,620中所述。另外的示例性多特异性和双特异性分子及其制备方法例如在以下文献中找到:US5,910,573、US 5,932,448、US 5,959,083、US 5,989,830、US 6,005,079、US 6,239,259、US 6,294,353、US 6,333,396、US 6,476,198、US 6,511,663、US 6,670,453、US 6,743,896、US 6,809,185、US 6,833,441、US 7,129,330、US 7,183,076、US 7,521,056、US 7,527,787、US 7,534,866、US 7,612,181、US2002004587A1、US2002076406A1、US2002103345A1、US2003207346A1、US2003211078 A1、US2004219643 A1、

US2004220388A1、US2004242847 A1、US2005003403 A1、US2005004352 A1、US2005069552A1、US2005079170 A1、US2005100543 A1、US2005136049A1、US2005136051 A1、US2005163782 A1、US2005266425 A1、US2006083747A1、US2006120960 A1、US2006204493 A1、US2006263367A1、US2007004909 A1、US2007087381 A1、US2007128150 A1、US2007141049A1、US2007154901 A1、US2007274985 A1、US2008050370A1、US2008069820 A1、US2008152645 A1、US2008171855 A1、US2008241884A1、US2008254512 A1、US2008260738 A1、US2009130106A1、US2009148905 A1、US2009155275 A1、US2009162359 A1、US2009162360A1、US2009175851 A1、US2009175867 A1、US2009232811A1、US2009234105 A1、US2009263392 A1、US2009274649 A1、EP346087A2、WO 2000/06605A2、WO 2007/2635A2、WO 2004/081051 A1、WO 2006/020258A2、WO 2007/044887A2、WO 2007/095338A2、WO2007/137760A2、WO 2008/119353 A1、WO 2009/021754 A2、WO2009/068630A1、WO 1991/03493A1、WO 1993/23537A1、WO 1994/09131A1、WO 1994/12625A2、WO 1995/09917A1、WO 1996/37621A2、WO1999/64460A1。上述引用的申请的内容通过引用以其全文并入本文。因此，在一些实施例中，本披露内容的IL-13/IL-18多特异性抗体(例如，双特异性抗体)以本领域中已知和上述的多特异性或双特异性形式中的任一种包含IL-13结合结构域和IL-18结合结构域。以下更详细地描述本披露内容的多特异性抗体(例如，双特异性抗体)的优选形式。

[0180] V. 示例性抗IL-13/IL-18双特异性抗体

[0181] 表1中的氨基酸序列是IL-13/IL-18双特异性抗体以及其部分的实例。

[0182] 表1. 示例性IL-13/IL-18双特异性抗体序列。

[0183]

bbmAb1		
SEQ ID NO: 1 (组合的)	LCDR1	SGSSSNIGNHYVN
SEQ ID NO: 2 (组合的)	LCDR2	RNNHRPS
SEQ ID NO: 3 (组合的)	LCDR3	QSWDYSGFSTV
SEQ ID NO: 4 (卡巴特)	LCDR1	SGSSSNIGNHYVN
SEQ ID NO: 5 (卡巴特)	LCDR2	RNNHRPS
SEQ ID NO: 6 (卡巴特)	LCDR3	QSWDYSGFSTV
SEQ ID NO: 7 (乔西亚)	LCDR1	SSSNIGNHY
SEQ ID NO: 8 (乔西亚)	LCDR2	RNN
SEQ ID NO: 9 (乔西亚)	LCDR3	WDYSGFST
SEQ ID NO: 10 (IMGT)	LCDR1	SSNIGNHY
SEQ ID NO: 11	LCDR2	RNN

[0184]

(IMGT)		
SEQ ID NO: 12 (IMGT)	LCDR3	QSWDYSGFSTV
SEQ ID NO: 13	VL	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGNHYV NWYQQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRFSGSK SGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSWDYSGFSTV FGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 14	轻链 mAb1	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGNHYV NWYQQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRFSGSK SGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSWDYSGFSTV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT TPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 15 (组合的)	LCDR1	RASKSVDSYGNSFMH
SEQ ID NO: 16 (组合的)	LCDR2	LASNLES
SEQ ID NO: 17 (组合的)	LCDR3	QQNNEDPRT
SEQ ID NO: 18 (卡巴特)	LCDR1	RASKSVDSYGNSFMH
SEQ ID NO: 19 (卡巴特)	LCDR2	LASNLES
SEQ ID NO: 20 (卡巴特)	LCDR3	QQNNEDPRT
SEQ ID NO: 21 (乔西亚)	LCDR1	SKSVDSYGNSF

[0185]

SEQ ID NO: 22 (乔 西亚)	LCDR2	LAS
SEQ ID NO: 23 (乔 西亚)	LCDR3	NNEDPR
SEQ ID NO: 24 (IMGT)	LCDR1	KSVDSYGNSF
SEQ ID NO: 25 (IMGT)	LCDR2	LAS
SEQ ID NO: 26 (IMGT)	LCDR3	QQNNEDPRT
SEQ ID NO: 27	VL	DIVMTQSPDSL SVSLGERATINCRASKSVDSYGN SFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEDPR TFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 28	轻链 mAb2	DIVMTQSPDSL SVSLGERATINCRASKSVDSYGN SFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEDPR TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNFPYAPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 29 (组 合的)	HCDR1	GGTFKSYAIS
SEQ ID NO: 30 (组 合的)	HCDR2	NIIPMTGQTYAQAQKFQG
SEQ ID NO: 31 (组 合的)	HCDR3	AAYHPLVFDN
SEQ ID NO: 32 (卡)	HCDR1	SYAIS

[0186]

卡特)		
SEQ ID NO: 33 (卡 卡特)	HCDR2	NIIPMTGQTYYAQKFQG
SEQ ID NO: 34 (卡 卡特)	HCDR3	AAYHPLVFDN
SEQ ID NO: 35 (乔 西亚)	HCDR1	GGTFKSY
SEQ ID NO: 36 (乔 西亚)	HCDR2	IPMTGQ
SEQ ID NO: 37 (乔 西亚)	HCDR3	AAYHPLVFDN
SEQ ID NO: 38 (IMGT)	HCDR1	GGTFKSYA
SEQ ID NO: 39 (IMGT)	HCDR2	IIPMTGQT
SEQ ID NO: 40 (IMGT)	HCDR3	ARAAHYHPLVFDN
SEQ ID NO: 41	VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFKSY AISWVRQAPGQGLEWMGNIIPMTGQTYYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCA RAAYHPLVFDNWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 42	重链 mAb1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFKSY AISWVRQAPGQGLEWMGNIIPMTGQTYYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCA RAAYHPLVFDNWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP

[0187]

		CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 43 (组 合的)	HCDR1	GFSLSAYSVN
SEQ ID NO: 44 (组 合的)	HCDR2	MIWGDGKIVYNSALKS
SEQ ID NO: 45 (组 合的)	HCDR3	DGYYPYAMDN
SEQ ID NO: 46 (卡 巴特)	HCDR1	AYSVN
SEQ ID NO: 47 (卡 巴特)	HCDR2	MIWGDGKIVYNSALKS
SEQ ID NO: 48 (卡 巴特)	HCDR3	DGYYPYAMDN
SEQ ID NO: 49 (乔 西亚)	HCDR1	GFSLSAY
SEQ ID NO: 50 (乔 西亚)	HCDR2	WGDGK
SEQ ID NO: 51 (乔 西亚)	HCDR3	DGYYPYAMDN
SEQ ID NO: 52 (IMGT)	HCDR1	GFSLSAYS
SEQ ID NO: 53	HCDR2	IWGDGKI

[0188]

(IMGT)		
SEQ ID NO: 54 (IMGT)	HCDR3	AGDGYYPYAMDN
SEQ ID NO: 55	VH	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTVSGFSLAYSV NWIRQPPGKALEWLAMIWGDGKIVYNSALKSR LTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAGD GYYPYAMDNWGQGS�TVSS
SEQ ID NO: 56	重链 mAb2	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTVSGFSLAYSV NWIRQPPGKALEWLAMIWGDGKIVYNSALKSR LTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAGD GYYPYAMDNWGQGS�TVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
bbmAb2		
>抗 IL18(mAb1)/ 抗 IL13(mAb2)hIgG1_YTE_(KiH 1:1)_NEG1966		
SEQ ID NO: 1 (组合 的)	LCDR1	SGSSSNIGNHYVN
SEQ ID NO: 2 (组合 的)	LCDR2	RNNHRPS
SEQ ID NO: 3 (组合	LCDR3	QSWDYSGFSTV

[0189]

的)		
SEQ ID NO: 4 (卡巴特)	LCDR1	SGSSSNIGNHYVN
SEQ ID NO: 5 (卡巴特)	LCDR2	RNNHRPS
SEQ ID NO: 6 (卡巴特)	LCDR3	QSWDYSGFSTV
SEQ ID NO: 7 (乔西亚)	LCDR1	SSSNIGNHY
SEQ ID NO: 8 (乔西亚)	LCDR2	RNN
SEQ ID NO: 9 (乔西亚)	LCDR3	WDYSGFST
SEQ ID NO: 10 (IMGT)	LCDR1	SSNIGNHY
SEQ ID NO: 11 (IMGT)	LCDR2	RNN
SEQ ID NO: 12 (IMGT)	LCDR3	QSWDYSGFSTV
SEQ ID NO: 13	VL	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGNHYV NWKYQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRFSGSK SGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSWDYSGFSTV FGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 14	轻链 mAb1	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGNHYV NWKYQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRFSGSK SGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSWDYSGFSTV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT

[0190]

		TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 15 (组合的)	LCDR1	RASKSVDSYGNSFMH
SEQ ID NO: 16 (组合的)	LCDR2	LASNLES
SEQ ID NO: 17 (组合的)	LCDR3	QQNNEDPRT
SEQ ID NO: 18 (卡巴特)	LCDR1	RASKSVDSYGNSFMH
SEQ ID NO: 19 (卡巴特)	LCDR2	LASNLES
SEQ ID NO: 20 (卡巴特)	LCDR3	QQNNEDPRT
SEQ ID NO: 21 (乔西亚)	LCDR1	SKSVDSYGNSF
SEQ ID NO: 22 (乔西亚)	LCDR2	LAS
SEQ ID NO: 23 (乔西亚)	LCDR3	NNEDPR
SEQ ID NO: 24 (IMGT)	LCDR1	KSVDSYGNSF
SEQ ID NO: 25 (IMGT)	LCDR2	LAS
SEQ ID NO: 26 (IMGT)	LCDR3	QQNNEDPRT
SEQ ID NO: 27	VL	DIVMTQSPDSLVSLSGERATINCRASKSVDSYGN SFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFS

[0191]

		GSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQNNEDPR TFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 28	轻链 mAb2	DIVMTQSPDSLVSLSGERATINCRASKSVDSYGN SFMHWYQQKPGQPPLLIYLAASNLESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQNNEDPR TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNFPYAPREKAVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 29 (组合的)	HCDR1	GGTFKSYAIS
SEQ ID NO: 30 (组合的)	HCDR2	NIIPMTGQTYAQAQKFQG
SEQ ID NO: 31 (组合的)	HCDR3	AAYHPLVFDN
SEQ ID NO: 32 (卡巴特)	HCDR1	SYAIS
SEQ ID NO: 33 (卡巴特)	HCDR2	NIIPMTGQTYAQAQKFQG
SEQ ID NO: 34 (卡巴特)	HCDR3	AAYHPLVFDN
SEQ ID NO: 35 (乔西亚)	HCDR1	GGTFKSY
SEQ ID NO: 36 (乔西亚)	HCDR2	IPMTGQ
SEQ ID NO: 37 (乔西亚)	HCDR3	AAYHPLVFDN
SEQ ID NO: 38	HCDR1	GGTFKSYA

[0192]

(IMGT)		
SEQ ID NO: 39 (IMGT)	HCDR2	IIPMTGQT
SEQ ID NO: 40 (IMGT)	HCDR3	ARAAHYHPLVFDN
SEQ ID NO: 41	VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFKSY AISWVRQAPGQGLEWMGNIIPMTGQTYYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCA RAAYHPLVFDN WGQGT LVT VSS
SEQ ID NO: 57	重链 mAb1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFKSY AISWVRQAPGQGLEWMGNIIPMTGQTYYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCA RAAYHPLVFDN WGQGT LVT VSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 43 (组 合的)	HCDR1	GFSLSAYSVN
SEQ ID NO: 44 (组 合的)	HCDR2	MIWGDGKIVYNSALKS
SEQ ID NO: 45 (组 合的)	HCDR3	DGYYPYAMDN

[0193]

合的)		
SEQ ID NO: 46 (卡 巴特)	HCDR1	AYSVN
SEQ ID NO: 47 (卡 巴特)	HCDR2	MIWGDGKIVYNSALKS
SEQ ID NO: 48 (卡 巴特)	HCDR3	DGYYPYAMDN
SEQ ID NO: 49 (乔 西亚)	HCDR1	GFSLSAY
SEQ ID NO: 50 (乔 西亚)	HCDR2	WGDGK
SEQ ID NO: 51 (乔 西亚)	HCDR3	DGYYPYAMDN
SEQ ID NO: 52 (IMGT)	HCDR1	GFSLSAYS
SEQ ID NO: 53 (IMGT)	HCDR2	IWGDGKI
SEQ ID NO: 54 (IMGT)	HCDR3	AGDGYYPYAMDN
SEQ ID NO: 55	VH	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTVSGFSLSAYSV NWIRQPPGKALEWLAMIWGDGKIVYNSALKSR LTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAGD GYYPYAMDN WGQGS LVT VSS
SEQ ID NO: 58	重链 mAb2	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTVSGFSLSAYSV NWIRQPPGKALEWLAMIWGDGKIVYNSALKSR LTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAGD GYYPYAMDN WGQGS LVT VSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGA

[0194]

		LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTK NQVLSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
NVP-bbmAb3		
>抗 IL18(mAb1)/ 抗 IL13(mAb3)hIgG1_YTE_(KiH 1:1)		
SEQ ID NO: 1 (组合的)	LCDR1	SGSSSNIGNHYVN
SEQ ID NO: 2 (组合的)	LCDR2	RNNHRPS
SEQ ID NO: 3 (组合的)	LCDR3	QSWDYSGFSTV
SEQ ID NO: 4 (卡巴特)	LCDR1	SGSSSNIGNHYVN
SEQ ID NO: 5 (卡巴特)	LCDR2	RNNHRPS
SEQ ID NO: 6 (卡巴特)	LCDR3	QSWDYSGFSTV
SEQ ID NO: 7 (乔西亚)	LCDR1	SSSNIGNHY
SEQ ID NO: 8 (乔西亚)	LCDR2	RNN
SEQ ID NO: 9 (乔西亚)	LCDR3	WDYSGFST

[0195]

亚)		
SEQ ID NO: 10 (IMGT)	LCDR1	SSNIGNHY
SEQ ID NO: 11 (IMGT)	LCDR2	RNN
SEQ ID NO: 12 (IMGT)	LCDR3	QSWDYSGFSTV
SEQ ID NO: 13	VL	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGNHYV NWKYQQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRFSGSK SGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSWDYSGFSTV FGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 14	轻链 mAb1	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGNHYV NWKYQQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRFSGSK SGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSWDYSGFSTV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLPSPSEELQANK ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 59 (组 合的)	LCDR1	RAGQSVSSYLV
SEQ ID NO: 60 (组 合的)	LCDR2	DASNRAT
SEQ ID NO: 61 (组 合的)	LCDR3	QQRSSWPPVYT
SEQ ID NO: 62 (卡 巴特)	LCDR1	RAGQSVSSYLV
SEQ ID NO: 63 (卡 巴特)	LCDR2	DASNRAT

[0196]

SEQ ID NO: 64 (卡 巴特)	LCDR3	QQRSSWPPVYT
SEQ ID NO: 65 (乔 西亚)	LCDR1	GQSVSSY
SEQ ID NO: 66 (乔 西亚)	LCDR2	DAS
SEQ ID NO: 67 (乔 西亚)	LCDR3	RSSWPPVY
SEQ ID NO: 68 (IMGT)	LCDR1	QSVSSY
SEQ ID NO: 69 (IMGT)	LCDR2	DAS
SEQ ID NO: 70 (IMGT)	LCDR3	QQRSSWPPVYT
SEQ ID NO: 71	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERAILSCRAGQSVSSYLV WYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSWPPVYTFG QG TKLEIK
SEQ ID NO: 72	轻链 mAb3	EIVLTQSPATLSLSPGERAILSCRAGQSVSSYLV WYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSWPPVYTFG QG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSK DSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 73 (组 合的)	HCDR1	GFTFSSYGMH
SEQ ID NO: 74 (组	HCDR2	IIWYDG SNKYYADSVKG

[0197]

合的)		
SEQ ID NO: 75 (组合的)	HCDR3	LWFGDLDAFDI
SEQ ID NO: 76 (卡巴特)	HCDR1	SYGMH
SEQ ID NO: 77 (卡巴特)	HCDR2	IIWYDGSNKYYADSVKG
SEQ ID NO: 78 (卡巴特)	HCDR3	LWFGDLDAFDI
SEQ ID NO: 79 (乔西亚)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 80 (乔西亚)	HCDR2	WYDGSN
SEQ ID NO: 81 (乔西亚)	HCDR3	LWFGDLDAFDI
SEQ ID NO: 82 (IMGT)	HCDR1	GFTFSSYG
SEQ ID NO: 83 (IMGT)	HCDR2	IWYDGSNK
SEQ ID NO: 84 (IMGT)	HCDR3	ARLWFGDLDAFDI
SEQ ID NO: 85	VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG MHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGSNKYYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RLWFGDLDAFDIWGQGTMTVSS
SEQ ID NO: 86	重链 mAb3	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG MHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGSNKYYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA

[0198]

		RLWFGDLDAFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGSEFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 29 (组合的)	HCDR1	GGTFKSYAIS
SEQ ID NO: 30 (组合的)	HCDR2	NIIPMTGQTYYAQKFQG
SEQ ID NO: 31 (组合的)	HCDR3	AAYHPLVFDN
SEQ ID NO: 32 (卡巴特)	HCDR1	SYAIS
SEQ ID NO: 33 (卡巴特)	HCDR2	NIIPMTGQTYYAQKFQG
SEQ ID NO: 34 (卡巴特)	HCDR3	AAYHPLVFDN
SEQ ID NO: 35 (乔西亚)	HCDR1	GGTFKSY
SEQ ID NO: 36 (乔西亚)	HCDR2	IPMTGQ
SEQ ID NO: 37 (乔西亚)	HCDR3	AAYHPLVFDN

[0199]

西亚)		
SEQ ID NO: 38 (IMGT)	HCDR1	GGTFKSYA
SEQ ID NO: 39 (IMGT)	HCDR2	IIPMTGQT
SEQ ID NO: 40 (IMGT)	HCDR3	ARAA YHPLVFDN
SEQ ID NO: 41	VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFKSY AISWVRQAPGQGLEWMGNIIPMTGQTY YAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RAAYHPLVFDN WGQGT LVT VSS
SEQ ID NO: 87	重链 mAb1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFKSY AISWVRQAPGQGLEWMGNIIPMTGQTY YAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RAAYHPLVFDN WGQGT LVT VSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
NVP-bbmAb4		
>抗 IL18(mAb1)/ 抗 IL13(mAb2)hIgG1_LALA_YTE_(KiH 1:1)		
SEQ ID NO: 1 (组合	LCDR1	SGSSSNIGNHYVN

[0200]

的)		
SEQ ID NO: 2 (组合的)	LCDR2	RNNHRPS
SEQ ID NO: 3 (组合的)	LCDR3	QSWDYSGFSTV
SEQ ID NO: 4 (卡巴特)	LCDR1	SGSSSNIGNHYVN
SEQ ID NO: 5 (卡巴特)	LCDR2	RNNHRPS
SEQ ID NO: 6 (卡巴特)	LCDR3	QSWDYSGFSTV
SEQ ID NO: 7 (乔西亚)	LCDR1	SSSNIGNHY
SEQ ID NO: 8 (乔西亚)	LCDR2	RNN
SEQ ID NO: 9 (乔西亚)	LCDR3	WDYSGFST
SEQ ID NO: 10 (IMGT)	LCDR1	SSNIGNHY
SEQ ID NO: 11 (IMGT)	LCDR2	RNN
SEQ ID NO: 12 (IMGT)	LCDR3	QSWDYSGFSTV
SEQ ID NO: 13	VL	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGNHYV NWYQQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRFSGSK SGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSWDYSGFSTV FGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 14	轻链	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGNHYV

[0201]

	mAb1	NWYQQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRFSGSK SGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSWDYSGFSTV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 15 (组合的)	LCDR1	RASKSVDSYGNSFMH
SEQ ID NO: 16 (组合的)	LCDR2	LASNLES
SEQ ID NO: 17 (组合的)	LCDR3	QQNNEDPRT
SEQ ID NO: 18 (卡巴特)	LCDR1	RASKSVDSYGNSFMH
SEQ ID NO: 19 (卡巴特)	LCDR2	LASNLES
SEQ ID NO: 20 (卡巴特)	LCDR3	QQNNEDPRT
SEQ ID NO: 21 (乔西亚)	LCDR1	SKSVDSYGNSF
SEQ ID NO: 22 (乔西亚)	LCDR2	LAS
SEQ ID NO: 23 (乔西亚)	LCDR3	NNEDPR
SEQ ID NO: 24 (IMGT)	LCDR1	KSVDSYGNSF
SEQ ID NO: 25 (IMGT)	LCDR2	LAS

[0202]

SEQ ID NO: 26 (IMGT)	LCDR3	QQNNEDPRT
SEQ ID NO: 27	VL	DIVMTQSPDLSVSLGERATINCRASKSVDSYGN SFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEDPR TFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 28	轻链 MAb2	DIVMTQSPDLSVSLGERATINCRASKSVDSYGN SFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEDPR TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 29 (组合的)	HCDR1	GGTFKSYAIS
SEQ ID NO: 30 (组合的)	HCDR2	NIIPMTGQTYYAQKFQG
SEQ ID NO: 31 (组合的)	HCDR3	AAYHPLVFDN
SEQ ID NO: 32 (卡巴特)	HCDR1	SYAIS
SEQ ID NO: 33 (卡巴特)	HCDR2	NIIPMTGQTYYAQKFQG
SEQ ID NO: 34 (卡巴特)	HCDR3	AAYHPLVFDN
SEQ ID NO: 35 (乔西亚)	HCDR1	GGTFKSY
SEQ ID NO: 36 (乔西亚)	HCDR2	IPMTGQ

[0203]

西亚)		
SEQ ID NO: 37 (乔西亚)	HCDR3	AAYHPLVFDN
SEQ ID NO: 38 (IMGT)	HCDR1	GGTFKSYA
SEQ ID NO: 39 (IMGT)	HCDR2	IIPMTGQT
SEQ ID NO: 40 (IMGT)	HCDR3	ARAAHPLVFDN
SEQ ID NO: 41	VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFKSY AISWVRQAPGQGLEWMGNIIPMTGQTYAQQF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RAAYHPLVFDNWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 88	重链 mAb1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFKSY AISWVRQAPGQGLEWMGNIIPMTGQTYAQQF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RAAYHPLVFDNWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREMT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 43 (组	HCDR1	GFSLSAYSVN

[0204]

合的)		
SEQ ID NO: 44 (组合的)	HCDR2	MIWGDGKIVYNSALKS
SEQ ID NO: 45 (组合的)	HCDR3	DGYYPYAMDN
SEQ ID NO: 46 (卡巴特)	HCDR1	AYSVN
SEQ ID NO: 47 (卡巴特)	HCDR2	MIWGDGKIVYNSALKS
SEQ ID NO: 48 (卡巴特)	HCDR3	DGYYPYAMDN
SEQ ID NO: 49 (乔西亚)	HCDR1	GFSLSAY
SEQ ID NO: 50 (乔西亚)	HCDR2	WGDGK
SEQ ID NO: 51 (乔西亚)	HCDR3	DGYYPYAMDN
SEQ ID NO: 52 (IMGT)	HCDR1	GFSLSAYS
SEQ ID NO: 53 (IMGT)	HCDR2	IWGDGKI
SEQ ID NO: 54 (IMGT)	HCDR3	AGDGYYPYAMDN
SEQ ID NO: 55	VH	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTVSGFSLAYSV NWIRQPPGKALEWLAMIWGDGKIVYNSALKSR LTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATATYYCAGD GYYPYAMDNWGQGS LVTVSS
SEQ ID NO: 89	重链	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTVSGFSLAYSV

[0205]

	MAb2	NWIRQPPGKALEWLAMIWGDGKIVYNSALKSR LTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAGD GYYPYAMDNWGQGSLTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
NVP-bbmAb5		
>抗 IL13(MAb2) / 抗 IL18(mAb1)hIgG1_YTE_LALA_(KiH 1:1)		
SEQ ID NO: 1 (组合的)	LCDR1	SGSSSNIGNHYVN
SEQ ID NO: 2 (组合的)	LCDR2	RNNHRPS
SEQ ID NO: 3 (组合的)	LCDR3	QSWDYSGFSTV
SEQ ID NO: 4 (卡巴特)	LCDR1	SGSSSNIGNHYVN
SEQ ID NO: 5 (卡巴特)	LCDR2	RNNHRPS
SEQ ID NO: 6 (卡巴特)	LCDR3	QSWDYSGFSTV
SEQ ID NO: 7 (乔西)	LCDR1	SSSNIGNHY

[0206]

亚)		
SEQ ID NO: 8 (乔西亚)	LCDR2	RNN
SEQ ID NO: 9 (乔西亚)	LCDR3	WDYSGFST
SEQ ID NO: 10 (IMGT)	LCDR1	SSNIGNHY
SEQ ID NO: 11 (IMGT)	LCDR2	RNN
SEQ ID NO: 12 (IMGT)	LCDR3	QSWDYSGFSTV
SEQ ID NO: 13	VL	DIVLTQPPSVSGAPGQRTISCSGSSSNIGNHYV NWKYQQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRFSGSK SGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSWDYSGFSTV FGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 14	轻链 mAb1	DIVLTQPPSVSGAPGQRTISCSGSSSNIGNHYV NWKYQQLPGTAPKLLIYRNNHRPSGVPDRFSGSK SGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSWDYSGFSTV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 15 (组合的)	LCDR1	RASKSVDSYGNSFMH
SEQ ID NO: 16 (组合的)	LCDR2	LASNLES
SEQ ID NO: 17 (组合的)	LCDR3	QQNNEDPRT

[0207]

SEQ ID NO: 18 (卡 巴特)	LCDR1	RASKSVDSYGNSFMH
SEQ ID NO: 19 (卡 巴特)	LCDR2	LASNLES
SEQ ID NO: 20 (卡 巴特)	LCDR3	QQNNEDPRT
SEQ ID NO: 21 (乔 西亚)	LCDR1	SKSVDSYGNSF
SEQ ID NO: 22 (乔 西亚)	LCDR2	LAS
SEQ ID NO: 23 (乔 西亚)	LCDR3	NNEDPR
SEQ ID NO: 24 (IMGT)	LCDR1	KSVDSYGNSF
SEQ ID NO: 25 (IMGT)	LCDR2	LAS
SEQ ID NO: 26 (IMGT)	LCDR3	QQNNEDPRT
SEQ ID NO: 27	VL	DIVMTQSPDSL SVSLGERATINCRASKSVDSYGN SFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFS GSGSGTDFLTITSSLQAEDVAVYYCQQNNEDPR TFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 28	轻链 MAb2	DIVMTQSPDSL SVSLGERATINCRASKSVDSYGN SFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFS GSGSGTDFLTITSSLQAEDVAVYYCQQNNEDPR TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE

[0208]

		VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 29 (组合的)	HCDR1	GGTFKSYAIS
SEQ ID NO: 30 (组合的)	HCDR2	NIIPMTGQTYYAQKFQG
SEQ ID NO: 31 (组合的)	HCDR3	AAYHPLVFDN
SEQ ID NO: 32 (卡巴特)	HCDR1	SYAIS
SEQ ID NO: 33 (卡巴特)	HCDR2	NIIPMTGQTYYAQKFQG
SEQ ID NO: 34 (卡巴特)	HCDR3	AAYHPLVFDN
SEQ ID NO: 35 (乔西亚)	HCDR1	GGTFKSY
SEQ ID NO: 36 (乔西亚)	HCDR2	IPMTGQ
SEQ ID NO: 37 (乔西亚)	HCDR3	AAYHPLVFDN
SEQ ID NO: 38 (IMGT)	HCDR1	GGTFKSYA
SEQ ID NO: 39 (IMGT)	HCDR2	IIPMTGQT
SEQ ID NO: 40 (IMGT)	HCDR3	ARAAAYHPLVFDN
SEQ ID NO: 41	VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFKSY AISWVRQAPGQGLEWMGNIIIPMTGQTYYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA

[0209]

		RAAYHPLVFDNWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 90	重链 mAb1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFKSY AISWVRQAPGQGLEWMGNIIPMTGQTYAQQF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RAAYHPLVFDNWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 43 (组合的)	HCDR1	GFSLSAYSVN
SEQ ID NO: 44 (组合的)	HCDR2	MIWGDGKIVYNSALKS
SEQ ID NO: 45 (组合的)	HCDR3	DGYYPYAMDN
SEQ ID NO: 46 (卡巴特)	HCDR1	AYSVN
SEQ ID NO: 47 (卡巴特)	HCDR2	MIWGDGKIVYNSALKS
SEQ ID NO: 48 (卡巴特)	HCDR3	DGYYPYAMDN
SEQ ID NO: 49 (乔	HCDR1	GFSLSAY

[0210]

西亚)		
SEQ ID NO: 50 (乔西亚)	HCDR2	WGDGK
SEQ ID NO: 51 (乔西亚)	HCDR3	DGYYPYAMDN
SEQ ID NO: 52 (IMGT)	HCDR1	GFSLSAYS
SEQ ID NO: 53 (IMGT)	HCDR2	IWGDGKI
SEQ ID NO: 54 (IMGT)	HCDR3	AGDGYYPYAMDN
SEQ ID NO: 55	VH	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTVSGFSLAYSV NWIRQPPGKALEWLAMIWGDGKIVYNSALKSR LTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAGD GYYPYAMDN WGQGS LTVSS
SEQ ID NO: 91	重链 mAb2	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTVSGFSLAYSV NWIRQPPGKALEWLAMIWGDGKIVYNSALKSR LTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAGD GYYPYAMDN WGQGS LTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC

[0211]

		SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
--	--	------------------------

[0212] 在一些实施例中,本文所述的多特异性抗体是双特异性抗体,所述双特异性抗体

包含相对于表1的序列具有1、2或3个取代、缺失或插入的氨基酸序列。

[0213] 示例性IL-13/IL-18双特异性抗体的形式如表2中所示。所有bbmAb将抗IL13结合结构域和抗IL-18结合结构域组合,并基于人IgG1形式,其中所有bbmAb都含有YTE半衰期延长突变,而两种bbmAb还含有LALA沉默突变。更详细地,bbmAb2、bbmAb1和bbmAb3在Fc中含有YTE半衰期延长突变。bbmAb4和bbmAb5同时含有LALA沉默突变和YTE半衰期延长突变。bbmAb2、bbmAb1、bbmAb4和bbmAb5将mAb1和mAb2的可变结构域组合,而bbmAb3将mAb1和mAb3的可变结构域组合。

[0214] bbmAb2、bbmAb4和bbmAb3在抗IL-18重链Fc中携带KiH杵异二聚化突变,而KiH臼突变在抗IL-13重链Fc中。bbmAb2、bbmAb4和bbmAb3在抗IL-18重链Fc中携带KiH杵突变以及在抗IL-13重链Fc中携带KiH臼突变。

[0215] 表2. 示例性IL-13/IL-18双特异性抗体的形式

[0216]

候选物	沉默/HLE	抗 IL18 来源	抗 IL13 来源	KiH 异二聚化形式
bbmAb2	Wt Fc/YTE	mAb1（可变结构域）	mAb2（可变结构域）	抗 IL18 杵，抗 IL13 臼
bbmAb1				抗 IL18 臼，抗 IL13 杵
bbmAb4	抗 IL18 杵，抗 IL13 臼			
bbmAb5	抗 IL18 臼，抗 IL13 杵			
bbmAb3	Wt Fc/YTE		mAb3（可变结构域）	抗 IL18 杵，抗 IL13 臼

[0217] VI. 本披露内容的多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段的修饰

[0218] 本申请包括在结合结构域、可变结构域和/或恒定区中具有各种修饰的本文所述分子的变体和/或其片段, 以及所披露分子的融合物和缀合物。例如, 所披露的多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段的Fc区可以是野生型, 或者可以对其进行修饰以获得各种结局。Fc的优选修饰包括用于半衰期延长的“LS”突变 (M428L、N434S (EU编号)) 和“YTE”突变 (M252Y、S254T、T256E (EU编号)), 用于效应子沉默的“DAPA”突变 (D265A、P329A (EU编号)) 以及有利于正确链配对的杵臼突变 (例如, 杵S354C、T366W; 臼Y349C、T366S、L368A、Y407V (EU编号))。

[0219] A. 具有可变区修饰的多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段

[0220] 本披露内容的多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段的VH和VL结构域中的每一个包含高变区CDR1、CDR2和CDR3序列。在某些实施例中, 这些CDR序列中的一个或多个可以具有氨基酸序列的保守修饰, 并且其中与亲本抗体相比, 经修饰分子保留或具有增强的结合特性。

[0221] 此外, 已经发现在某些情况下使框架区内的残基突变以维持或增强抗体的抗原结合能力是有益的 (参见例如, Queen等人的US 5,530,101、US 5,585,089、US 5,693,762和US 6,180,370)。本披露内容的分子 (例如, 抗体或抗体样分子) 可以通过将此类突变引入其可变区框架来修饰, 以改善结合特性。

[0222] 另一种类型的可变区修饰是使VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3结构域内的氨基

酸残基突变,从而改善目的抗体的一种或多种结合特性(例如,亲和力),称为“亲和力成熟”。可以进行定点诱变或PCR介导的诱变以引入一个或多个突变,并且可以在如本文所述且在实例中提供的体外或体内测定中评价对抗体结合或其他感兴趣的功能特性的影响。可以引入保守修饰(如上所讨论的)。突变可以是氨基酸取代、添加或缺失。而且,典型地,CDR区内不超过一个、两个、三个、四个或五个残基、优选一个或两个残基被改变。

[0223] 所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的氨基酸序列变体可以通过将适当的核苷酸变化引入编码DNA中或通过合成所需的变体来制备。此类变体包括例如本发明分子的氨基酸序列内残基的缺失、插入或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以获得最终构建体,条件是最终构建体具有所需的抗原结合特征。氨基酸变化还可以改变分子的翻译后过程,诸如改变糖基化位点的数量或位置。

[0224] 本申请包括在可变区和/或恒定区中具有氨基酸保守修饰的所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的变体。

[0225] B. 具有增强的异二聚化的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段

[0226] 两个抗体重链结构域的异二聚化不足可能成为增加所需多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段产量的障碍,并代表了纯化的挑战。可以使用多种可用的方法来增强双特异性或多特异性抗体或抗体样分子的两个重链结构域的二聚化,如以下文献中所披露:EP 1870459A1;US5,582,996;US 5,731,168;US 5,910,573;US 5,932,448;US 6,833,441;US 7,183,076;US2006204493 A1;和WO 2009/089004 A1。

[0227] 本披露内容提供了增强两种相互作用的异源多肽的二聚化(异二聚化)和/或降低两种相同多肽的二聚化(同二聚化)的方法。典型地,两种相互作用的多肽中的每一种包含具有抗体的CH2和CH3结构域的Fc区。所述CH3结构域衍生自任何同种型、类型或亚类、和优选的IgG(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)类型、最优选IgG1的抗体的恒定区。

[0228] 典型地,除了CH3结构域,本披露内容的多肽还包含其他抗体片段,如本文所述的CH1结构域、CH2结构域、铰链结构域、一个或多个VH结构域、一个或多个VL结构域、一个或多个CDR和/或抗原结合片段(如scFv和/或Fab)。这些抗体片段源自本文描述的各种类型的抗体,例如,多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、双特异性或多特异性抗体、骆驼化抗体、抗独特型(抗Id)抗体和抗体缀合物。CH3结构域处两条不同的重链异二聚化产生了所需抗体或抗体样分子,而相同重链的同二聚化将降低所需抗体或分子的产量。在示例性实施例中,两条或更多条杂多肽链包含两条链,所述两条链包含CH3结构域并且形成了本披露内容以上所述的任何多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段形式的分子。在实施例中,包含CH3结构域的所述两条杂多肽链包含有利于所述多肽的异二聚体缔合的修饰(相对于未修饰的链)。下文提供了修饰策略的各种实例。

[0229] 杵臼结构(KIH)(也称为“匙孔结构”)

[0230] 本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段可以包含一个或多个(例如多个)对一个或多个恒定结构域(例如对CH3结构域)的突变。在一个实例中,本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段包含两个多肽,每个多肽包含抗体的重链Fc或恒定结构域,例如,CH2或CH3结构域。在实例中,所述两个重链恒定结构域,例如多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的CH2或CH3结构域包含一个或多个突变,所述突变允许两个链之间的异二聚体缔合。在一个方面,所述一个或多个突变设置在多特异性抗

体(例如,双特异性抗体)或其片段的两条重链的CH2结构域上。在一个方面,所述一个或多个突变设置在多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的至少两个多肽的CH3结构域上。在一个方面,对包含重链恒定结构域的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的第一多肽的一个或多个突变产生“杵”并且对包含重链恒定结构域的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的第二多肽的一个或多个突变产生“臼”,使得包含重链恒定结构域的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的多肽的异二聚化产生“杵”以与“臼”界面接合(例如,相互作用,例如,第一多肽的CH2结构域与第二多肽的CH2结构域相互作用,或第一多肽的CH3结构域与第二多肽的CH3结构域相互作用)。如本文所用的术语,“杵”是指至少一个氨基酸侧链,所述氨基酸侧链从包含重链恒定结构域的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的第一多肽的界面上突出并且因此可定位于在与包含重链恒定结构域的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的第二多肽的界面中的互补性“臼”中以稳定异多聚物,并且从而有利于异多聚物形成(例如相对于同多聚物)。杵可存在于最初的界面中或可以合成方式引入(例如,通过改变编码界面的核酸)。用于形成杵的优选输入残基通常是天然存在的氨基酸残基并且优选地选自精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)。最优选的是色氨酸和酪氨酸。在优选的实施例中,用于形成突起的最初残基具有小侧链体积,如丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸或缬氨酸。

[0231] “臼”是指至少一个氨基酸侧链,所述氨基酸侧链凹进包含重链恒定结构域的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的第二多肽的界面中并且因此容纳包含重链恒定结构域的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的第一多肽的相邻交界表面上的相应的杵。臼可存在于最初的界面中或可以合成方式引入(例如,通过改变编码界面的核酸)。用于形成臼的优选输入残基通常是天然存在的氨基酸残基并且优选地选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和缬氨酸(V)。最优选的是丝氨酸、丙氨酸或苏氨酸。在优选的实施例中,用于形成臼的最初的残基具有大的侧链体积,如酪氨酸、精氨酸、苯丙氨酸或色氨酸。

[0232] 在一个实施例中,第一CH3结构域在根据Kabat等人的EU编号方案的残基366、405或407处突变(第688-696页,在Sequences of proteins of immunological interest[具有免疫学意义的蛋白质序列],第5版,第1卷(1991;NIH[美国国立卫生研究院],贝塞斯达,马里兰州)中)以产生“杵”或“臼”(如上所述),并且与第一CH3结构域异二聚化的第二CH3结构域在以下位置处突变:残基407(如果在第一CH3结构域中的残基366突变)、残基394(如果在第一CH3结构域中的残基405突变)、或残基366(如果第一CH3结构域中的残基407突变)(EU编号),以产生与第一CH3结构域的“臼”或“杵”互补的“杵”或“臼”。

[0233] 在另一个实施例中,使第一CH3结构域在残基366(EU编号)处突变以产生“杵”或“臼”(如上所述),并且使与第一CH3结构域异二聚化的第二CH3结构域在残基366、368和/或407(EU编号)处突变以产生与第一CH3结构域的“臼”或“杵”互补的“杵”或“臼”。在一个实施例中,对第一CH3结构域的突变在位置366处引入酪氨酸(Y)残基。在实施例中,对第一CH3的突变是T366Y。在一个实施例中,对第一CH3结构域的突变在位置366处引入色氨酸(W)残基。在实施例中,对第一CH3的突变是T366W。在实施例中,与在位置366处突变(例如,具有在位置366处引入的酪氨酸(Y)或色氨酸(W),例如,包含突变T366Y或T366W)的第一CH3结构域异二聚化的第二CH3结构域的突变包含在位置366处的突变、在位置368处的突变和在位置407处的突变(EU编号)。在实施例中,在位置366处的突变引入了丝氨酸(S)残基,在位置368处

的突变引入了丙氨酸(A),并且在位置407处的突变引入了缬氨酸(V)。在实施例中,突变包含T366S、L368A和Y407V。在一个实施例中,多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的第一CH3结构域包含突变T366Y,并且与第一CH3结构域异二聚体化的第二CH3结构域包含突变T366S、L368A和Y407V,反之亦然。在一个实施例中,多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的第一CH3结构域包含突变T366W,并且与第一CH3结构域异二聚体化的第二CH3结构域包含突变T366S、L368A和Y407V,反之亦然。

[0234] 适用于本发明的任何多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的另外的杵臼结构突变对进一步描述于例如WO 1996/027011和Merchant等人,(1998)Nat.Biotechnol.[自然生物技术],16:677-681(其内容特此通过引用以其全文并入)中。

[0235] 在本文所述的任何实施例中,CH3结构域可以另外突变以引入半胱氨酸残基对。不受理论束缚,据信,引入能够形成二硫键的一对半胱氨酸残基向异二聚化抗体提供了稳定性。在实施例中,第一CH3结构域包含在位置354(EU编号)处的半胱氨酸,并且与第一CH3结构域异二聚体化的第二CH3结构域包含在位置349(EU编号)处的半胱氨酸。在实施例中,多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的第一CH3结构域包含在位置354处的半胱氨酸(例如,包含突变S354C)和在位置366处的酪氨酸(Y)(例如,包含突变T366Y),并且与第一CH3结构域异二聚体化的第二CH3结构域包含在位置349处的半胱氨酸(例如,包含突变Y349C)、在位置366处的丝氨酸(例如,包含突变T366S)、在位置368处的丙氨酸(例如,包含突变L368A)、和在位置407处的缬氨酸(例如,包含突变Y407V)。在实施例中,多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的第一CH3结构域包含在位置354处的半胱氨酸(例如,包含突变S354C)和在位置366处的色氨酸(W)(例如,包含突变T366W),并且与第一CH3结构域异二聚体化的第二CH3结构域包含在位置349处的半胱氨酸(例如,包含突变Y349C)、在位置366处的丝氨酸(例如,包含突变T366S)、在位置368处的丙氨酸(例如,包含突变L368A)、和在位置407处的缬氨酸(例如,包含突变Y407V)。

[0236] IgG异二聚化

[0237] 在一个方面,通过在衍生自IgG1抗体类别的CH3结构域中引入一个或多个突变来增加多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的多肽链的(例如,半抗体的)异二聚化。在实施例中,所述突变包含对一个CH3结构域的K409R突变,所述CH3结构域与第二CH3结构域中的F405L突变配对(EU编号)。另外的突变还可以,或可替代地,是在位置366、368、370、399、405、407、和409(EU编号)处。优选地,包含此类突变的多肽的异二聚化在还原条件下,例如,在25°C-37°C,例如,25°C或37°C下,在10-100mM 2-MEA(例如,25、50或100mM 2-MEA)中1-10小时,例如,1.5-5小时,例如,5小时实现。

[0238] 使用本领域已知的技术将本文所述的氨基酸替代引入CH3结构域中。通常,使用Mutagenesis:a Practical Approach[诱变:实用方法]中描述的技术对编码一条或多条重链的DNA进行遗传工程化。寡核苷酸介导的诱变是用于制备编码两条杂合重链的DNA的取代变体的优选方法。如Adelman等人,(1983)DNA,2:183所述,该技术是本领域中已知的。

[0239] 合适的IgG异二聚化策略描述于例如WO 2008/119353、WO2011/131746和WO 2013/060867中,其内容特此通过引用以其整体并入。

[0240] 在本文所述的任何实施例中,CH3结构域可以另外突变以引入半胱氨酸残基对。不受理论束缚,据信,引入能够形成二硫键的一对半胱氨酸残基向异二聚化的多特异性抗体

(例如,双特异性抗体)或其片段提供了稳定性。在实施例中,第一CH3结构域包含在位置354(EU编号)处的半胱氨酸,并且与第一CH3结构域异二聚体化的第二CH3结构域包含在位置349(EU编号)处的半胱氨酸。

[0241] 极性桥

[0242] 在一个方面,多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的多肽链(例如半抗体)的异二聚化通过引入基于“极性桥接”原理的突变而增加,所述基本原理是将在两条多肽链的结合界面制造残基以与异二聚体构型中具有相似(或互补性)物理特性的残基相互作用,同时与同型二聚体构型中具有不同物理特性的残基相互作用。特别地,设计这些突变使得在异二聚体形成中,极性残基与极性残基相互作用,而疏水残基与疏水残基相互作用。相比之下,在同二聚体形成中,使残基突变,使得极性残基与疏水残基相互作用。异二聚体构型中有利的相互作用和同二聚体构型中不利的相互作用一起作用使得CH3结构域形成异二聚体比形成同二聚体的可能性更大。

[0243] 在示例性实施例中,上述突变在CH3结构域的残基364、368、399、405、409、和411(EU编号)中的一个或多个位置处产生。

[0244] 在一个方面,将一个或多个选自由以下组成的组的突变:Ser364Leu、Thr366Val、Leu368Gln、Asp399Lys、Phe405Ser、Lys409Phe和Thr411Lys被引入两个CH3结构域之一。例如,Ser364Leu:位置364处的丝氨酸的最初残基被亮氨酸替代;Thr366Val:位置366处的苏氨酸的最初残基被缬氨酸替代;Leu368Gln:位置368处的亮氨酸的最初残基被谷氨酰胺替代;Asp399Lys:位置399处的最初残基天冬氨酸被赖氨酸替代;Phe405Ser:位置405处的最初残基苯丙氨酸被丝氨酸替代;Lys409Phe:位置409处的最初残基赖氨酸被苯丙氨酸替代;Thr411Lys:位置411处的苏氨酸的最初残基被赖氨酸替代。

[0245] 在另一个方面,可以将选自由以下组成的组的一个或多个突变引入另一个CH3: Tyr407Phe、Lys409Gln和Thr411Asp(例如,Tyr407Phe:位置407处的最初残基酪氨酸被苯丙氨酸替代;Lys409Glu:位置409处的最初残基赖氨酸被谷氨酸替代;Thr411Asp:位置411处的苏氨酸的最初残基被天冬氨酸替代)。

[0246] 在另一个方面,一个CH3结构域具有一个或多个选自由以下组成的组的突变: Ser364Leu、Thr366Val、Leu368Gln、Asp399Lys、Phe405Ser、Lys409Phe和Thr411Lys,而另一个CH3结构域具有一个或多个选自由以下组成的组的突变: Tyr407Phe、Lys409Gln和Thr411Asp。

[0247] 在一个示例性实施例中,一个CH3结构域的位置366处的苏氨酸的最初残基被缬氨酸替代,而另一个CH3结构域的位置407处的酪氨酸的最初残基被苯丙氨酸替代。

[0248] 在另一个示例性实施例中,一个CH3结构域的位置364处的丝氨酸的最初残基被亮氨酸替代,而在相同CH3结构域的位置368处的亮氨酸的最初残基被谷氨酰胺替代。

[0249] 在又另一个示例性实施例中,一个CH3结构域的位置405处的苯丙氨酸的最初残基被丝氨酸替代并且这一CH3结构域的位置409处的赖氨酸的最初残基被苯丙氨酸替代,而另一CH3结构域的位置409处的赖氨酸的最初残基被谷氨酰胺替代。

[0250] 在又另一个示例性实施例中,一个CH3结构域的位置399处的天冬氨酸的最初残基被赖氨酸替代,并且相同CH3结构域的位置411处的苏氨酸的最初残基被赖氨酸替代,而另一CH3结构域的位置411处的苏氨酸的最初残基被天冬氨酸替代。

[0251] 可以使用本领域已知的技术将本文所述的氨基酸替代引入CH3结构域中。通常,使用Mutagenesis:a Practical Approach[诱变:实用方法]中描述的技术对编码一条或多条重链的DNA进行遗传工程化。寡核苷酸介导的诱变是用于制备编码两条杂合重链的DNA的取代变体的优选方法。如Adelman等人,(1983)DNA,2:183所述,该技术是本领域中已知的。

[0252] 极性桥策略描述于例如,WO 2006/106905、WO 2009/089004和Gunasekaran K等人,(2010)J Biol Chem.[生物化学杂志],285:19637-19646中,其内容通过引用以其全文特此并入。

[0253] 在本文所述的任何实施例中,CH3结构域可以另外突变以引入半胱氨酸残基对。不受理论束缚,据信,引入能够形成二硫键的一对半胱氨酸残基向异二聚化的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)提供了稳定性。在实施例中,第一CH3结构域包含在位置354(EU编号)处的半胱氨酸,并且与第一CH3结构域异二聚体化的第二CH3结构域包含在位置349(EU编号)处的半胱氨酸。

[0254] C.具有延长的体内半衰期的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段。

[0255] 本发明的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段可以进一步被修饰为具有延长的体内半衰期。

[0256] 可以使用多种策略来延长本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的半衰期。例如,通过与聚乙二醇(PEG)、reCODEPEG、抗体支架、聚唾液酸(PSA)、羟乙基淀粉(HES)、白蛋白结合配体和碳水化合物屏蔽的化学连接;通过与结合血清蛋白(如白蛋白、IgG、FcRn)的蛋白质的基因融合和转移;通过与结合血清蛋白的其他结合部分(如纳米抗体、Fab、DARPin、avimer、亲合体和anticalin)偶联(遗传地或化学地);通过与rPEG、白蛋白、白蛋白的结构域、白蛋白结合蛋白和Fc的遗传融合;或通过掺入纳米载剂、缓释配制品或医疗设备中。

[0257] 还可以通过将一个或多个氨基酸修饰(即,取代、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选Fc区或其片段)中来产生具有增加的体内半衰期的本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段。参见例如,WO 1998/23289、WO 1997/34631和US6,277,375。为延长半衰期,对所披露的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的Fc的优选修饰包括“LS”突变(M428L、N434S(EU编号)) and “YTE”突变(M252Y、S254T、T256E(EU编号))。

[0258] 此外,所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段可以与一种或多种人血清白蛋白(HSA)多肽或其一部分缀合或融合。此外,使用白蛋白以使分子在体内更稳定或在体内具有更长的半衰期。所述技术是本领域中已知的,参见例如,WO 1993/15199、WO 1993/15200和WO 2001/77137;以及EP 413622。还已经提出使用HSA的N-末端片段用于与多肽融合(例如,EP 399666)。因此,将所述分子遗传地或化学地融合或缀合至白蛋白可以稳定或延长保质期,和/或保留分子在溶液中、在体外和/或在体内的活性持续延长的时间段。涉及HSA融合的其他方法可以在例如WO 2001/077137和WO 2003/06007中找到,所述专利通过引用并入本文中。在一个特定实施例中,在哺乳动物细胞系,例如,CHO细胞系中进行融合蛋白的表达。

[0259] D.Fc沉默

[0260] 在并入了一个或多个恒定结构域(例如重链恒定区)的本披露内容的实施例中,在

hFc内包括一个或多个突变以沉默例如ADCC和/或CDC效应子功能可能是有益的。免疫细胞的激活在存在与靶细胞交联的情况下优先发生。然而,人Fc可以与高亲和力和低亲和力FcR γ 受体结合。因此,在没有肿瘤靶向的情况下结合后,可能发生免疫细胞上受体(例如,CD3)的交联和随后的激动作用。另外,通过 γ 受体进行的Fc交联可以诱导体液免疫细胞毒性(ADCC)。当人Fc在细胞表面复合时,其也可以结合补体蛋白并诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)。减少或消除这些相互作用的对Fc中残基的突变可因此限制这些作用并使本文所述分子的影响集中在肿瘤靶标细胞上。

[0261] 在实施例中,多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的一个或多个(例如全部)重链恒定区结构域包含DAPA突变(例如,EU编号中的D265A和P329A)。参见例如,Shields RL等人,(2001)J BiolChem.[生物化学杂志],276(9):6591-604;US2015/0320880 A1,将其中每一篇的内容通过引用以其整体并入。

[0262] 在实施例中,所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的一个或多个(例如全部)重链恒定区结构域包含LALA突变(例如,EU编号中的L234A和L235A)。例如,Hezareh M等人,(2001)Journal of Virology[病毒学杂志],75(24):12161-12168;Shields RL等人,(2001)同上,将上述文献中的每一篇的内容通过引用以其整体并入。

[0263] 在实施例中,所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的一个或多个(例如全部)重链恒定区结构域包含N279A突变(根据EU编号)(参见例如,Tao MH和Morrison SL (1989)J Immunol.[免疫学杂志]143(8):2595-601;Shields RL等人,(2001)同上,将上述文献中的每一篇的内容通过引用以其整体并入)。

[0264] 用于提供沉默的效应子功能的另外的Fc突变描述于W02014/145806(例如,在图7中),将其通过引用以其整体并入本文。来自W0 2014/145806的沉默IgG1抗体的一个实例包含E233P、L234V、L235A和S267K突变以及G236的缺失(G236del)。来自W0 2014/145806的沉默IgG1抗体的另一实例包含E233P、L234V和L235A突变,以及G236缺失(G236del)。来自W0 2014/145806的沉默IgG1抗体的另一实例包含S267K突变。

[0265] E. 缀合物

[0266] 本披露内容包括与异源蛋白或多肽(或其片段,优选与至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个或至少100个氨基酸的多肽)重组融合或化学缀合(包括共价和非共价缀合两者)以产生融合蛋白的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段。将蛋白质、多肽或肽与抗体或抗体片段融合或缀合的方法是本领域已知的。参见例如,US 5,336,603、US5,622,929、US 5,359,046、US 5,349,053、US 5,447,851和US 5,112,946;EP 307434和EP 367166;W0 1996/04388和W0 1991/06570;Ashkenazi等人,(1991)PNAS.USA[美国国家科学院院刊]88:10535-10539;Zheng等人,(1995),J. Immunol.[免疫学杂志]154:5590-5600;以及Vi1等人,(1992)PNAS.USA[美国国家科学院院刊]89:11337-11341。

[0267] 可以通过基因改组、基序改组、外显子改组和/或密码子改组(统称为“DNA改组”)的技术生成另外的融合蛋白。DNA改组可以用于改变多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的活性。通常,参见US 5,605,793、US 5,811,238、US 5,830,721、US 5,834,252和US 5,837,458;Patten等人,(1997),Curr.Opinion Biotechnol.[当前生物技术观点]8:724-33;Harayama,(1998),Trends Biotechnol.[生物技术趋势]16(2):76-82;Hansson等人,

(1999) J. Mol. Biol. [分子生物学杂志] 287:265-76; 以及 Lorenzo 和 Blasco, 1998, Biotechniques [生物技术] 24(2):308-313 (这些专利和出版物中的每一篇均通过引用以其全文特此并入)。可以通过在重组之前借助易错 PCR、随机核苷酸插入或其他方法进行随机诱变来改变本文所述的多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段。编码本发明的分子的片段的多核苷酸可以与一个或多个异源分子的一个或多个组分、基序、区段、部分、结构域、片段等重组。

[0268] 此外, 多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段可以与标记序列 (如肽) 融合以促进纯化。在一个优选实施例中, 标记氨基酸序列是六组氨酸肽, 特别是诸如 pQE 载体中提供的标签 (加利福尼亚州查茨沃思市伊顿大街 (Eton Avenue) 9259 号凯杰公司 (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA), 91311), 其中多种可购得。如描述于 Gentz 等人, (1989) PNAS. USA [美国国家科学院院刊] 86:821-824 中, 例如, 六组氨酸为融合蛋白纯化提供方便。用于纯化的其他肽标签包括但不限于对应于源自流感血凝素蛋白的表位 (Wilson 等人, (1984) Cell 37:767) 的血凝素 (“HA”) 标记以及 “flag” 标签。

[0269] 在其他实施例中, 所述多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段与诊断剂或可检测剂缀合。此类分子可以用于监测或预后疾病或障碍的发作、发展、进展和/或严重性作为临床测试程序, 诸如确定特定疗法的功效的一部分。此种诊断和检测可以通过将分子与可检测物质偶联来完成, 这些可检测物质包括但不限于各种酶, 诸如但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶; 辅基, 诸如但不限于链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素; 荧光材料, 诸如但不限于伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明 (rhodamine)、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白; 发光材料, 诸如但不限于鲁米诺 (luminol); 生物发光材料, 诸如但不限于萤光素酶、萤光素和水母素; 放射性物质, 诸如但不限于碘 (^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 和 ^{121}I)、碳 (^{14}C)、硫 (^{35}S)、氚 (^3H)、铟 (^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 和 ^{111}In)、锝 (^{99}Tc)、钽 (^{201}Ti)、镓 (^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、钯 (^{103}Pd)、钼 (^{99}Mo)、氙 (^{133}Xe)、氟 (^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 和 ^{117}Tl ; 以及使用多种正电子发射断层摄影术的正电子发射金属和非放射性顺磁金属离子。

[0270] 本申请进一步涵盖与治疗性部分缀合的多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段的用途。本披露内容的分子或其片段可以与治疗部分诸如细胞毒素, 例如细胞抑制剂或杀细胞剂、治疗剂或放射性金属离子例如 α -发射体缀合。细胞毒素剂或细胞毒性剂包括对细胞有害的任何药剂。

[0271] 此外, 所述多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段可以与调节给定生物反应的治疗部分或药物部分缀合。治疗部分或药物部分不应解释为限于经典的化学治疗剂。例如, 药物部分可以是具有所需生物活性的蛋白质、肽或多肽。这种蛋白质可包括例如毒素, 如相思豆毒素、蓖麻毒素 A、假单胞菌外毒素、霍乱毒素或白喉毒素; 如下蛋白质, 诸如肿瘤坏死因子、 α -干扰素、 β -干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子、组织型纤溶酶原激活物、凋亡剂、抗血管生成剂; 或生物应答调节剂例如像淋巴因子。

[0272] 关于细胞毒素类型、接头和使治疗剂与所述分子缀合的方法的进一步讨论, 还请参见 Saito 等人, (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. [先进药物递送评论] 55:199-215; Trail 等人, (2003) Cancer Immunol. Immunother. [癌症免疫学和免疫治疗] 52:328-337; Payne

(2003)Cancer Cell[癌细胞]3:207-212;Allen(2002)Nat.Rev.Cancer[自然综述-癌症]2:750-763;Pastan和Kreitman(2002)Curr.Opin.Investig.Drugs[当前研究药物观点],3:1089-1091;Senter和Springer,(2001)Adv.Drug Deliv.Rev.[先进药物递送评论]53:247-264。

[0273] 所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段也可以与放射性同位素缀合以产生细胞毒性放射药物,也称作放射免疫缀合物。可以与分子缀合的用于诊断或治疗性用途的放射性同位素的实例包括但不限于碘131、铟111、钇90和镱177。本领域中建立了用于制备放射免疫缀合物的方法。参见例如,Denardo等人,(1998)Clin Cancer Res.[临床癌症研究]4(10):2483-90;Peterson等人,(1999)Bioconjug.Chem.[生物缀合化学]10(4):553-7;和Zimmerman等人,(1999)Nucl.Med.Biol.[核医学和生物学]26(8):943-50,每一篇文献均通过引用以其全文并入。

[0274] 用于将治疗部分与抗体缀合的技术是已知的,参见例如,Arnon等人,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In CancerTherapy[癌症疗法中用于药物免疫靶向的单克隆抗体]”,在MonoclonalAntibodies And Cancer Therapy[单克隆抗体和癌症疗法],Reisfeld等人,(编辑),第243-56页(Alan R.Liss,Inc.[艾伦丽思出版社公司]1985)中;Hellstrom等人,“Antibodies For Drug Delivery[用于药物递送的抗体]”,在Controlled Drug Delivery[药物控制释放](第2版)、Robinson等人(编辑),第623-53页(Marcel Dekker,Inc.[马塞尔德克尔出版社公司]1987)中;Thorpe,“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:AReview[癌症疗法中细胞毒性剂的抗体载剂:综述]”,在MonoclonalAntibodies[单克隆抗体]84:Biological And ClinicalApplications[生物和临床应用],Pinchera等人(编辑),第475-506页(1985)中;“Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody InCancer Therapy[放射标记的抗体在癌症疗法中的治疗用途的未来前景]”,在Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy[用于癌症检测和治疗的单克隆抗体],Baldwin等人(编辑),第303-16页(AcademicPress[学术出版社]1985)中以及Thorpe等人,(1982)Immunol.Rev.[免疫学综述]62:119-58。

[0275] 所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段也可以与固体支持物附接,这些支持物特别适用于免疫测定或靶抗原的纯化。此类固体支持物包括但不限于玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0276] VII.产生本发明抗体的方法

[0277] 当本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)的多肽或其片段交联时,这些功能性连接可以使用本领域已知的方法来实现。可以使用多种偶联剂或交联剂进行共价缀合。交联剂的实例包括蛋白质A、碳二亚胺、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻亚苯基二马来酰亚胺(oPDM)、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)和4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMCC)(参见例如,Karpovsky等人(1984)J.Exp.Med.[实验医学杂志]160:1686;Liu等人(1985)PNAS.USA[美国国家科学院院刊]82:8648)。其他方法包括Paulus(1985)Behring Ins.Mitt.[贝林研究所通报]第78期:118-132;Brennan等人(1985)Science[科学]229:81-83)和Glennie等人(1987)J.Immunol.[免疫学杂志]139:2367-

2375) 中描述的那些。缀合剂是SATA和磺基-SMCC,两者均可从皮尔斯化工公司(Pierce Chemical Co.) (伊利诺伊州罗克福德市(Rockford, IL)) 获得。

[0278] 可替代地,可以通过将编码所需分子的DNA构建体引入表达载体并在同一宿主细胞中表达和组装所需分子来重组产生本发明多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段。

[0279] A. 制备多肽链

[0280] 多肽和抗体以及其片段(例如半抗体)可以通过多种技术产生,所述技术包括常规的单克隆抗体方法,例如Kohler和Milstein, (1975) Nature[自然]256:495的标准体细胞杂交技术。可以使用许多用于产生单克隆抗体的技术,例如B淋巴细胞的病毒或致癌转化。

[0281] 用于制备杂交瘤的动物系统是鼠系统。小鼠中杂交瘤的产生是充分建立的程序。免疫方案和分离免疫的脾细胞用于融合的技术是本领域已知的。融合配偶体(例如鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也是已知的。

[0282] 可以基于如上述制备的鼠单克隆抗体的序列来制备本披露内容的嵌合抗体或人源化抗体。编码重链和轻链免疫球蛋白的DNA可以从感兴趣的鼠杂交瘤中获得,并使用标准分子生物学技术工程化以含有非鼠(例如人)免疫球蛋白序列。例如,为了产生嵌合抗体,可以使用本领域已知的方法将鼠可变区与人恒定区连接(参见例如,Cabilly等人的US4,816,567)。为了产生人源化抗体,可以使用本领域已知的方法将鼠CDR区插入人框架中。参见例如,Winter的US 5,225,539和US 5,530,101;US 5,585,089;Queen等人的US 5,693,762和US 6,180,370。

[0283] 在某个实施例中,本披露内容的抗体或抗体样分子是人单克隆抗体。可以使用携带部分人免疫系统而不是小鼠系统的转基因或转染色体小鼠产生此类人单克隆抗体。这些转基因和转染色体小鼠包括在本文中分别被称为HUmAb小鼠和KM小鼠的小鼠,并且在本文中统称为“人Ig小鼠”。

[0284] HUmAb小鼠(梅达瑞克斯公司(Medarex, Inc.)) 包含编码未重排的人重链(μ 和 γ) 和K轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因小基因座(miniloci),以及使内源 μ 和K链基因座失活的靶向突变(参见例如,Lonberg,等人., 1994 Nature[自然]368(6474):856-859)。因此,小鼠表现出小鼠IgM或K的表达降低,并且响应于免疫,引入的人重链和轻链转基因经历类别转换和体细胞突变以产生高亲和人IgG_K单克隆(Lonberg等人, (1994) 同上;在Lonberg, (1994) Handbook of Experimental Pharmacology[实验药理学手册]113:49-101;Lonberg和Huszar, (1995) Intern. Rev. Immunol. [国际免疫学评述]13:65-93以及Harding和Lonberg, (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. [纽约科学学术年报]764:536-546)。HUmAb小鼠的制备和用途以及由这样的小鼠进行的基因组修饰被进一步描述于以下文献中: Taylor等人, (1992) Nucleic Acids Research[核酸研究]20:6287-6295;Chen等人, (1993) International Immunology[国际免疫学]5:647-656;Tuailon等人, (1993) PNAS USA[美国国家科学院院刊]94:3720-3724;Choi等人, (1993) Nature Genetics[自然遗传学]4:117-123;Chen等人, (1993) EMBO J. [欧洲分子生物学学会杂志]12:821-830;Tuailon等人 (1994), J. Immunol. [免疫学杂志]152:2912-2920;Taylor等人, (1994) International Immunology[国际免疫学]579-591;以及Fishwild等人, (1996) Nature Biotechnology[自然生物技术]14:845-851,将所有这些文献的内容通过引用以其整体特别特此并入。另外参

见US 5,545,806;US 5,569,825;US 5,625,126;US 5,633,425;US 5,789,650;US 5,877,397;US 5,661,016;US 5,814,318;US 5,874,299;以及US 5,770,429;全部属于Lonberg和Kay;Surani等人的US 5,545,807;WO 1992/103918、WO 1993/12227、WO 1994/25585、WO 1997113852、WO 1998/24884以及WO 1999/45962,全部属于Lonberg和Kay;以及Korman等人的WO 2001/14424。

[0285] 在另一个实施例中,本披露内容中使用的人抗体可以使用在转基因和转染色体上携带人免疫球蛋白序列的小鼠,诸如携带人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠产生。此类小鼠(在本文中称为“KM小鼠”)在Ishida等人的WO 2002/43478中有详细描述。

[0286] 仍然进一步地,表达人免疫球蛋白基因的替代转基因动物系统是本领域中可获得的,并且可用于产生本披露内容中使用的人抗体。例如,可以使用被称为Xenomouse(安根尼克斯公司(Abgenix, Inc.))的可替代的转基因系统。此类小鼠描述于例如,US 5,939,598;US 6,075,181;US 6,114,598;US 6,150,584和US 6,162,963(授予Kucherlapati等人)。

[0287] 此外,表达人免疫球蛋白基因的替代转染色体动物系统是本领域中可获得的,并且可用于产生本披露内容中使用的人抗体。例如,可以使用携带人重链转染色体和人轻链染色体的被称为“TC小鼠”的小鼠;此类小鼠描述于Tomizuka等人,(2000)PNAS USA[美国国家科学院院刊]97:722-727中。此外,本领域中已经描述了携带人重链和轻链染色体的牛(Kuroiwa等人,(2002)Nature Biotechnology[自然生物技术]20:889-894),并且这些牛可以用于产生本申请中使用的人抗体。

[0288] 还可以使用针对筛选人免疫球蛋白基因文库的噬菌体展示方法来制备人单克隆抗体。用于分离人抗体的这样的噬菌体展示方法在本领域中建立或在以下实例中描述。参见例如:US 5,223,409;US 5,403,484;和US 5,571,698(授予Ladner等人);US 5,427,908和US 5,580,717(授予Dower等人);US 5,969,108和US 6,172,197(授予McCafferty等人);以及US 5,885,793;US 6,521,404;US 6,544,731;US 6,555,313;US 6,582,915和US 6,593,081(授予Griffiths等人)。

[0289] 本披露中使用的人单克隆抗体也可以使用SCID小鼠制备,已经在这些SCID小鼠中重建人免疫细胞,使得免疫后可以产生人抗体应答。此类小鼠描述于例如,US 5,476,996和US 5,698,767(授予Wilson等人)。

[0290] 制备双特异性抗体的方法是本领域中已知的,并且在本申请中进行了讨论。

[0291] B.产生重组分子的方法

[0292] 在一个实施例中,本申请提供了一种重组产生多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的一条或多条主多肽链的方法,所述方法包括:1)产生一种或多种DNA构建体,所述DNA构建体包含编码多特异性结合分子的多肽链中每一条的核酸分子;2)将所述一种或多种DNA构建体引入一种或多种表达载体中;3)将所述一种或多种表达载体共转染在一种或多种宿主细胞中;和4)在宿主细胞或溶液中表达并组装所述分子。

[0293] 在该方面,本披露内容提供了分离的核酸,例如一种或多种多核苷酸,所述核酸编码本文所述的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段,例如包括例如如本文所述的IL-13结合结构域和IL-18结合结构域的多特异性结合分子。在实施例中,所述分离的核酸布置在单个连续多核苷酸上。在其他实施例中,所述分离的多核苷酸布置在两个或更多个连续核酸序列上。

[0294] 在一些方面,分离的核酸包括编码IL-13结合结构域或其片段的序列和编码IL-18结合结构域或其片段的序列。在一些方面,编码IL-13结合结构域或其片段的序列和编码IL-18结合结构域的序列布置在单独的多核苷酸上,所述多核苷酸也称为“核酸分子组”。

[0295] 在一些方面,编码IL-13结合结构域或其片段的序列和编码IL-18结合结构域的序列布置在单个多核苷酸上。

[0296] 在示例性实施例中,编码抗体的轻链的DNA序列和编码第一-half抗体的重链的DNA序列置于分开的表达载体中。然后将表达载体以产生最佳组装的比率共转染到宿主细胞中。使所编码的重链和轻链在宿主细胞中表达并组装成功能分子。

[0297] 在另一个示例性实施例中,编码抗体的轻链的DNA序列和编码第一-half抗体的重链的DNA序列置于一个表达载体中。然后可以将表达载体转染到宿主细胞中。所编码的重链和轻链在宿主细胞中表达并组装成功能分子。

[0298] 本文提供了包含一个或多个核酸分子或一组核酸分子的克隆和表达载体,所述核酸分子编码如本文所述的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段,其中所述载体适合于重组产生多特异性结合分子。本文提供了用于产生如本文所述的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的工艺,所述工艺包括在足以表达所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的条件下培养如本文所披露的宿主细胞,然后从宿主细胞培养物纯化和回收所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段。

[0299] 如本文所述,可以在该阶段引入本文所述分子的可变区或恒定区上的所需突变,诸如用于增强异二聚化的突变。

[0300] DNA序列可以通过从头固相DNA合成或通过PCR诱变编码本发明的分子的重链或轻链的现有序列(例如,如以下实例中所述的序列)来产生。核酸的直接化学合成可以通过本领域已知的方法完成,例如Narang等人,(1979)Meth.Enzymol.[酶学方法]68:90的磷酸三酯方法;Brown等人,(1979)Meth.Enzymol.[酶学方法]68:109的磷酸二酯方法;Beaucage等人,(1981)Tetra.Lett.[四面体快报],22:1859的二乙基亚磷酰胺方法;以及US 4,458,066的固体支撑方法。通过PCR向多核苷酸序列引入突变可以如以下文献中所述进行,例如PCR Technology:Principles and Applications for DNA Amplification[PCR技术:DNA扩增的原理和应用],H.A.Erlich(编辑),Freeman Press[弗里曼出版社],纽约,纽约州,1992;PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications[PCR方案:方法和应用指南],Innis等人,(编辑),Academic Press[学术出版社],圣地亚哥,加利福尼亚州,1990;Mattila等人,(1991)Nucleic Acids Res.[核酸研究]19:967;以及Eckert等人,(1991)PCR Methods and Applications[PCR方法和应用]1:17。

[0301] 本披露内容中还提供了用于产生上述分子的表达载体和宿主细胞。术语“载体”意指适合于转化或转染宿主细胞并且含有指导和/或控制(与宿主细胞结合)一个或多个与其可操作地连接的异源编码区的表达的核酸序列的任何分子或实体(例如核酸、质粒、噬菌体或病毒)。可以使用各种表达载体来表达编码该分子的链或结合结构域的多核苷酸。基于病毒的表达载体和非病毒表达载体两者都可以用于在哺乳动物宿主细胞中产生抗体。非病毒载体和系统包括质粒、附加体载体(典型地具有用于表达蛋白质或RNA的表达盒)和人工染色体(参见例如,Harrington等人,(1997)Nat Genet[自然遗传学]15:345)。例如,可用于在哺乳动物(例如,人)细胞中表达多核苷酸和多肽的非病毒载体包括pThioHis A、

pThioHis B和pThioHis C,pcDNA3.1/His,pEBVHis A,pEBVHis B和pEBVHis C(加利福尼亚州圣地亚哥市英杰公司(Invitrogen,San Diego,CA)),MPSV载体和本领域中已知用于表达其他蛋白质的多种其他载体。有用的病毒载体包括基于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒的载体,基于SV40、乳头瘤病毒、HBP爱巴病毒(HBP Epstein Barrvirus)的载体,牛痘病毒载体和塞姆利基森林病毒(SemlikiForest virus;SFV)。参见,Brent等人,(1995)同上;Smith,Annu.Rev.Microbiol.[微生物学评论]49:807;和Rosenfeld等人,(1992)Cell[细胞]68:143。

[0302] 表达载体的选择取决于要表达该载体的预期宿主细胞。典型地,表达载体含有与编码抗体链或片段的多核苷酸可操作地连接的启动子和其他调节序列(例如,增强子)。在一些实施例中,采用诱导型启动子以防止插入的序列在诱导条件之外的条件下表达。诱导型启动子包括例如阿拉伯糖、lacZ、金属硫蛋白启动子或热激启动子。可以在非诱导条件下、而不在偏向宿主细胞更好耐受其表达产物的编码序列的群体的情况下扩大经转化的生物体的培养。除启动子外,还可能需要或期望其他调节元件以有效表达多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的重链和轻链。这些元件典型地包括ATG起始密码子和相邻的核糖体结合位点或其他序列。另外,通过包括适合于使用中的细胞系统的增强子,可以提高表达效率(参见例如,Scharf等人,(1994)Results Probl.CellDiffer.[细胞分化中的结果和问题]20:125;以及Bittner等人,(1987)Meth.Enzymol.[酶学方法],153:516)。例如,SV40增强子或CMV增强子可以用来增加哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0303] 表达载体还可以提供分泌信号序列位置,以与通过插入上述重链和/或轻链序列或其片段编码的多肽形成融合蛋白。更常见的是,所插入的抗体或抗体样分子序列在包括在载体中之前与信号序列连接。用于接受编码轻链和重链可变结构域的序列的载体有时也编码恒定区或其部分。这样的载体允许将可变区表达为具有恒定区的融合蛋白,从而导致产生完整抗体或其片段。典型地,这样的恒定区是人的。

[0304] 用于容纳和表达本发明分子的宿主细胞可以是原核或真核的。大肠杆菌(E.coli)是一种可用于克隆并表达本披露内容的多核苷酸的原核宿主。适合使用的其他微生物宿主包括杆菌(如枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis))和其他肠杆菌科(enterobacteriaceae)(如沙门氏菌属(Salmonella)、沙雷氏菌属(Serratia))以及各种假单胞菌属(Pseudomonas)物种。在这些原核宿主中,还可以制备表达运载体,其通常含有与宿主细胞相容的表达控制序列(例如,复制的起点)。此外,存在任何数量的多种已知启动子,诸如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或来自噬菌体 λ 的启动子系统。启动子典型地任选使用操纵子序列控制表达,并且具有核糖体结合位点序列等,以用于启动和完成转录和翻译。其他微生物诸如酵母也可用于表达本披露内容的抗体。也可以使用与杆状病毒载体组合的昆虫细胞。

[0305] 在一些优选的实施例中,哺乳动物宿主细胞用于表达和产生本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段。例如,它们可以是表达内源免疫球蛋白基因的杂交瘤细胞系(例如,1D6.C9骨髓瘤杂交瘤克隆)或含有外源表达运载体的哺乳动物细胞系(例如,SP2/0骨髓瘤细胞)。这些包括任何正常的非永生化或者正常或异常的永生化动物或人细胞。例如,已经开发了许多能够分泌完整的免疫球蛋白的合适的宿主细胞系,包括CHO细胞系、多种Cos细胞系、HeLa细胞、骨髓瘤细胞系、转化的B细胞和杂交瘤。利用哺乳动物组织

细胞培养表达多肽一般在例如Winnacker, FROM GENES TO CLONES[从基因到克隆], VCH出版商, 纽约州1987中讨论。哺乳动物宿主细胞的表达运载体可包括表达控制序列如复制的起点、启动子和增强子(参见例如, Queen, 等人, (1986) Immunol. Rev. [免疫学评论] 89: 49-68) 和必要的处理信息位点如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。这些表达载体通常含有衍生自哺乳动物基因或衍生自哺乳动物病毒的启动子。合适的启动子可以是组成型的、细胞类型特异性的、阶段特异性的和/或可调控的或可调节的。有用的启动子包括但不限于金属硫蛋白启动子、组成型腺病毒主要晚期启动子、地塞米松诱导型MMTV启动子、SV40启动子、MRP polIII启动子、组成型MPSV启动子、四环素诱导型CMV启动子(如人立即早期CMV启动子)、组成型CMV启动子和本领域已知的启动子-增强子组合。

[0306] 用于引入含有感兴趣的多核苷酸序列的表达载体的方法根据细胞宿主的类型而变化。例如, 氯化钙转染通常用于原核细胞, 而磷酸钙处理或电穿孔可用于其他细胞宿主。(一般参见Sambrook等人, 同上)。其他方法包括, 例如电穿孔、磷酸钙处理、脂质体介导的转化、注射和显微注射、生物轰击法、病毒体、免疫脂质体、聚阳离子: 核酸缀合物、裸DNA、人工病毒体、与疱疹病毒结构蛋白VP22融合(Elliot和O'Hare, (1997) Cell [细胞] 88: 223)、试剂增强的对DNA的吸收和离体转导。对于重组蛋白质的长期高产量产生, 通常希望稳定的表达。例如, 可以使用含有病毒复制起点或内源性表达元件和选择性标记基因的本披露内容的表达载体来制备稳定表达抗体链或结合片段的细胞系。在引入载体后, 可以使细胞在富集培养基中生长1-2天, 然后将它们转换为选择性培养基。可选择标志物的目的是赋予选择抗性, 并且它的存在允许在选择性培养基中成功地表达引入的序列的细胞的生长。可以使用适合于细胞类型的组织培养技术来增殖具有抗性的、稳定转染的细胞。

[0307] 本发明抗体或其片段典型地作为分泌的多肽从培养基中回收, 但当其直接产生而无分泌信号时也可以从宿主细胞裂解物中回收。如果所述分子是膜结合的, 则可以使用合适的去污剂溶液(例如Triton-X 100)将其从膜上释放出来。

[0308] 当所述分子在非人源细胞的重组细胞中产生时, 它完全不含人源蛋白质或多肽。然而, 需要从重组细胞蛋白或多肽纯化所述分子以获得关于异源多聚体基本上均一的制剂。作为第一步, 通常将培养基或裂解液离心以去除颗粒细胞碎片。产生的分子可以方便地通过羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、渗析或亲和色谱纯化, 其中亲和色谱是优选的纯化技术。还可以使用用于蛋白纯化的其他技术, 诸如在离子交换柱上分级分离、乙醇沉淀、反相HPLC、二氧化硅上色谱、肝素琼脂糖上色谱、阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬氨酸柱)上色谱、色谱聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀。(mRNA)。

[0309] VIII. 本发明的抗体的用途

[0310] A. 诊断和一般治疗用途

[0311] 本披露内容的抗体具有多种诊断和治疗应用。例如, 这些分子可以用于酶免疫测定, 其中臂结合酶上的特定表位, 并且分子的其他部分结合固定基质。Nolan等人讨论了使用抗体样分子的酶免疫测定(Nolan等人, (1990) Biochem. Biophys. Acta. [生物化学与生物物理学报] 1040: 1-11)。所述多特异性抗体还可用于诊断各种疾病, 例如自身免疫疾病(Songsivilai等人, (1990) Clin. Exp. Immunol. [临床和实验免疫学] 79: 315)。特别地, 所述分子的一个抗原结合结构域可以结合组织样品中的IL-13或IL-18(体外、离体、体内), 而另

一结合位点可以结合本文所述的可检测标记物,例如紧密结合放射性核素的螯合剂(Le Doussal等人,(1992) Int. J. Cancer Suppl. [国际癌症杂志增刊] 7:58-62; Le Doussal等人,(1993) J. Nucl. Med. [核医学杂志] 34:1662-1671; Stickney等人,(1995) Cancer Res. [癌症研究] 51:6650-6655)。

[0312] 本披露内容的抗体具有体外和体内诊断和治疗用途。例如,可以将这些抗体施用至培养中(例如体外或体内)或受试者中(例如体内)的细胞来治疗、预防或诊断多种障碍。

[0313] 在一个方面,本披露内容的分子可用于检测生物样品中IL-13和/或IL-18的存在。如本文所用,术语“检测”涵盖定量或定性检测。在某些方面,生物样品包含细胞或组织。在某些方面,此类组织包括正常组织和/或相对于其他组织表达较高水平IL-13和/或IL-18的癌性组织。

[0314] 在一个方面,本披露内容提供了一种检测生物样品中IL-13和/或IL-18的存在的方法。在某些方面,所述方法包括使生物样品与本披露内容的多特异性抗体在允许抗体与抗原结合的条件下接触,和检测抗体与抗原之间是否形成复合物。生物样品可以包括但不限于尿液或血液样品。

[0315] 还包括一种诊断与IL-13和/或IL-18表达相关的障碍的方法。在某些方面,所述方法包括使测试细胞与本披露内容的多特异性抗体接触;通过检测本披露内容的多特异性分子的结合来测定测试细胞中IL-13和/或IL-18的表达水平(定量或定性);和比较测试细胞中IL-13和/或IL-18的表达水平与对照细胞(例如,与测试细胞具有相同组织来源的正常细胞或非病毒感染细胞)中IL-13和/或IL-18的表达水平,其中与对照细胞相比,测试细胞中IL-13和/或IL-18的较高存在水平指示存在与IL-13和/或IL-18相关的障碍。在某些方面,测试细胞获自怀疑患有由IL-13和IL-18介导的病理性障碍的个体。

[0316] 在某些方面,诊断或检测方法诸如上述方法包括例如使用“FACS”测定检测本披露内容的多特异性分子的结合。

[0317] 可以使用某些其他方法来检测本披露内容的多特异性抗体的结合。此类方法包括但不限于本领域中已知的抗原结合测定,如诸如西方印迹(Western blot)、放射免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定、荧光免疫测定、蛋白A免疫测定和免疫组织化学(IHC)。

[0318] 在某些方面,本披露内容的多特异性抗体被标记。标记包括但不限于直接检测到的标记或部分(诸如荧光标记、发色标记、电子致密标记、化学发光标记和放射性标记),以及间接检测到(例如通过酶促反应或分子相互作用)的部分,诸如酶或配体。

[0319] B. 药物组合物和给药方面

[0320] 本文提供了包含本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的药物组合物,所述药物组合物可用于本披露内容在治疗特应性皮炎或相关病症中的用途和方法中,所述组合物进一步包含一种或多种药学上可接受的载剂和/或稀释剂。

[0321] 短语“药学上可接受的”意指由美国联邦政府或州政府的监管机构批准或者列于美国药典(U.S. Pharmacopeia)或其他普遍认可的药典中用于动物并且更特别地用于人。

[0322] 术语“药物组合物”是指至少一种活性成分(例如,本披露内容的抗体或片段)和至少一种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载剂的混合物。

[0323] 治疗剂和诊断剂的药物组合物可以通过与生理学上可接受的载剂、赋形剂或稳定

剂以例如冻干粉末、浆液、水性溶液、洗剂或悬浮液的形式混合来制备(参见例如,Hardman等人,(2001)Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics [Goodman和Gilman的治疗的药理学基础],麦格劳-希尔集团(McGraw-Hill),纽约,纽约州;Gennaro(2000)Remington: The Science and Practice of Pharmacy [雷明顿:药学科学与实践],Lippincott, Williams, and Wilkins [利平科特·威廉斯和威尔金斯出版公司],纽约,纽约州;Avis等人(编辑)(1993)Pharmaceutical Dosage Forms: Oral Medications [药物剂型:口服药物],Marcel Dekker [马塞尔德克尔公司],纽约州;Lieberman等人(编辑)(1990)Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets [药物剂型:片剂],Marcel Dekker [马塞尔德克尔公司],纽约;Lieberman等人(编辑)(1990)Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems [药物剂型:分散系统],Marcel Dekker [马塞尔德克尔公司],纽约;Weiner和Kotkoskie(2000)Excipient Toxicity and Safety [赋形剂毒性和安全性],马萨诸塞州。为治疗剂选择施用方案取决于若干种因素,包括实体的血清或组织周转速率、症状水平、实体的免疫原性、和生物基质中的靶细胞的可及性。在某些实施例中,施用方案使递送至患者的与可接受水平的副作用一致的治疗剂的量达最大。因此,递送的生物制品的量部分地取决于特定的实体和正在治疗的病症的严重性。选择适当剂量的抗体、细胞因子和小分子的指南是可获得的(参见例如,Wawrzynczak(1996)Antibody Therapy [抗体疗法],Bios Scientific Pub.Ltd [Bios科学出版社有限公司],牛津郡,英国;Kresina(编辑),(1991)Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis [单克隆抗体、细胞因子和关节炎],Marcel Dekker [马塞尔德克尔公司],纽约,纽约州;Bach(编辑),(1993)Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases [自身免疫疾病中的单克隆抗体和肽疗法],马塞尔德克尔公司,纽约,纽约州;Baert等人,(2003)New Engl.J.Med. [新英格兰医学杂志]348:601-608;Milgrom等人,(1999)New Engl.J.Med. [新英格兰医学杂志]341:1966-1973;Slamon等人,(2001)New Engl.J.Med. [新英格兰医学杂志]344:783-792;Beniaminovitz等人(2000)New Engl.J.Med. [新英格兰医学杂志]342:613-619;Ghosh等人(2003)New Engl.J.Med. [新英格兰医学杂志]348:24-32;Lipsky等人(2000)New Engl.J.Med. [新英格兰医学杂志]343:1594-1602)。rcel Dekker, Inc. [马塞尔德克尔公司],纽约,纽约州)。

[0324] 由临床医生,例如,使用本领域已知或疑似影响治疗或预计影响治疗的参数或因素确定适当的剂量。通常,剂量始于略小于最佳剂量的量并此后将其以小增量增加,直至相对于任何不利副作用,实现所希望的或最佳的效果。重要的诊断量值包括症状(例如炎症)的那些量值或产生的炎性细胞因子的水平。

[0325] 可以改变本披露内容的药物组合中活性成分的实际剂量水平,以便获得一定量的活性成分,该活性成分的量有效地实现对于特定的患者、组合物和施用方式的期望的治疗应答,而对该患者没有毒性。所选的剂量水平将取决于多种药代动力学因素,包括所用的本披露内容的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性,施用途径,施用时间,正在使用的特定化合物的排泄速率,治疗的持续时间,与所用特定组合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料,正在治疗的患者的年龄、性别、体重、病症、总体健康和既往病史,以及医学领域中已知的类似因素。

[0326] 可以通过连续输注或通过以例如1天、1周或每周1-7次的时间间隔提供包含本披

露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的组合物。可通过静脉内、皮下、局部、口、鼻、直肠、肌内、脑内、或通过吸入来提供剂量。

[0327] 以摩尔/千克体重计,本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的所需剂量与抗体或多肽的剂量大致相同。施用至受试者的剂量可以是至少1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、11次或12次或更多次。

[0328] 对于本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段,施用至患者的剂量可以是每千克患者体重约0.0001mg至约100mg,例如,每千克患者体重约1mg-约5mg、约5mg至约10mg。本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的单位剂量可以是约0.1mg至100mg,例如约1mg至5mg、约5mg-约10mg、约10mg-约25mg、约25mg-约50mg、约50mg-约100mg、约100mg-约150mg。

[0329] 在施用一系列剂量的情况下,这些剂量可以例如约每天、约每周、约每2周、约每3周、约每4周(每个月)、约每2个月、约每3个月(每季度)、约每6个月施用一次。这些剂量可以例如继续施用,直至疾病进展,出现不良事件或由医生确定的其他时间为止。例如,可以施用约两次、三次或四次至约17次或更多次固定剂量。

[0330] 特定患者的有效量可以根据诸如以下的因素改变:所治疗的病症、患者的总体健康状况、施用的方法途径和剂量和副作用的严重程度(参见例如,Maynard等人(1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice[用于良好临床实践的SOP指南], Interpharm Press[国际药物出版社],波卡拉顿,佛罗里达州;Dent(2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice[良好实验和良好临床实践],Urch Publ.[厄奇出版社],伦敦,英国)。

[0331] 必要时,可以将包含本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的治疗剂掺入包括增溶剂和局部麻醉剂诸如利多卡因(lidocaine)的组合物中以减轻注射位点的疼痛。另外,也可以采用肺部施用,例如通过使用吸入器或雾化器以及具有雾化剂的配制品。参见例如,US 6,019,968、US 5,985,320、US 5,985,309、US 5,934,272、US 5,874,064、US 5,855,913、US 5,290,540和US 4,880,078;以及WO 1992/19244、WO1997/32572、WO 1997/44013、WO 1998/31346和WO 1999/66903,每一篇文献均通过引用以其全文并入本文。

[0332] 本披露内容的多特异性抗体还可以通过一种或多种施用途径使用在本领域中已知的多种方法中的一种或多种来施用。如本领域技术人员将理解的,施用途径和/或模式将根据所希望的结果而变化。所选择的抗体的施用途径包括静脉内、肌内、真皮内、腹膜内、皮下、经脊柱或其他肠胃外施用途径,例如通过注射或输注。肠胃外施用可以代表除经肠和局部施用之外的施用模式,通常通过注射,并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、被膜下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。可替代地,本披露内容的组合物可以经由非肠胃外途径施用,如局部、表皮或粘膜施用途径,例如鼻内、口服、经阴道、经直肠、舌下或局部。

[0333] 在一个方面,通过输注施用本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段。在一个方面,皮下施用本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段。在一个方面,静脉内施用本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段。

[0334] 所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段可以使用例如注射设备、注射笔、小瓶和注射筒、预填充注射筒、自动注射器、输注泵、贴片泵、输注袋和针等,通过任何上

述途径来施用。如果在控制释放或持续释放系统中施用本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段,可以使用泵实现控制或持续释放(参见Langer,同上;Sefton,1987,CRC Crit.Ref Biomed.Eng.[CRC的生物医学工程参考评论]14:20;Buchwald等人,1980,Surgery[外科手术]88:507;Saudek等人,1989,N.Engl.J.Med.[新英格兰医学杂志]321:574)。聚合物材料可用于实现本披露治疗剂的控制释放或持续释放(参见,例如,Medical Applications of Controlled Release[控制释放药物的医学应用],Langer和Wise(编辑),CRC出版社,佛罗里达州波卡拉顿(Boca Raton,Fla.) (1974);Controlled Drug Bioavailability,Drug Product Design and Performance[受控的药物生物利用率、药物产物设计以及性能],Smolen和Ball(编辑),Wiley[威利出版公司],New York[纽约](1984);Ranger和Peppas,1983,J.,Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.[高分子科学杂志-高分子化学评论]23:61;还参见Levy等人,1985,Science[科学]228:190;During等人,1989,Ann.Neurol.[神经病学记事]25:351;Howard等人,1989,J.Neurosurg.[神经外科杂志]7 1:105);US 5,679,377;US 5,916,597;US 5,912,015;US 5,989,463;US 5,128,326;WO 1999/15154;和WO 1999/20253。用于缓释配制品中的聚合物的实例包括但不限于聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯-共-乙酸乙烯)、聚(甲基丙烯酸)、聚乙交酯(PLG)、聚酸酐、聚(N-乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯酰胺、聚(乙二醇)、聚丙交酯(PLA)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)以及聚原酸酯。在一个实施例中,用于缓释配制品的聚合物是惰性的,不含可浸出的杂质,在储存时稳定,无菌并且可生物降解。可以将控释或缓释系统置于预防或治疗靶标附近,因此仅需要全身剂量的一部分(参见例如,Goodson,在Medical Applications of Controlled Release[控释的医学应用],同上,第2卷,第115-138页(1984)中)。

[0335] 控释系统在Langer的综述中讨论(1990,Science[科学]249:1527-1533)。可以使用本领域技术人员已知的任何技术来产生包含本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的缓释配制品。参见例如,US 4,526,938,WO 1991/05548,WO 1996/20698,Ning等人,1996,“Intratatumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel,”[使用持续释放凝胶的人结肠癌异种移植物的肿瘤内放射免疫疗法]Radiotherapy&Oncology[放射治疗与肿瘤学]39:179-189,Song等人,1995,“Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions,”[抗体介导的长循环乳剂的肺靶向]PDA Journal of Pharmaceutical Science&Technology [PDA药物科学与技术杂志]50:372-397,Cleek等人,1997,“Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application,”[用于心血管应用的bFGF抗体的生物可降解聚合物载剂]Pro.Int’l.Symp.Control.Rel.Bioact.Mater.[生物活性材料的控制释放的国际研讨会会议记录]24:853-854,以及Lam等人,1997,“Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery,”[重组人源化单克隆抗体微囊化以用于局部递送]Proc.Int’l.Symp.Control Rel.Bioact.Mater.[生物活性材料的控制释放的国际研讨会会议记录]24:759-760,将其每一篇通过引用以其整体并入本文。

[0336] 如果局部施用本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段,则可以将其以油膏剂、乳膏剂、透皮贴片、洗剂、凝胶、香波、喷雾剂、气溶胶、溶液、乳液的形式或

本领域技术人员已知的其他形式配制。参见例如, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms [雷明顿制药科学和药物剂型简介], 第19版, Mack Pub. Co. [出版公司] 伊斯顿, 宾夕法尼亚州 (1995)。对于不可喷雾的局部剂型, 典型地使用粘性至半固体或固体形式, 其包含载剂或一种或多种与局部应用相容并且具有动态粘度的赋形剂, 在一些情况下, 其具有大于水的动态粘度。合适的配制品包括而不仅限于溶液、悬浮液、乳液、乳膏剂、油膏剂、粉末、搽剂、药膏剂等, 如果需要, 对它们进行灭菌或与影响各种特性诸如像渗透压的助剂 (例如, 防腐剂、稳定剂、润湿剂、缓冲剂或盐) 混合。其他合适的局部剂型包括可喷雾气溶胶制剂, 其中在一些情况下将活性成分与固体或液体惰性载剂组合包装在具有加压的挥发性物质 (例如, 气体推进剂, 诸如氟利昂 (Freon)) 的混合物中或挤瓶中。如果希望, 还可以将保湿剂或湿润剂添加到药物组合物和剂型中。此类另外的成分的实例是本领域已知的。

[0337] 如果鼻内施用包含本披露内容的多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段的组合物, 则可以将它们以气溶胶形式、喷雾剂、雾化剂或以滴剂形式配制。特别地, 用于根据本披露使用的预防剂和治疗剂可以使用合适的推进剂 (例如, 二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适的气体) 以从加压式包装或喷雾器的气溶胶喷雾展现的形式方便地进行递送。在加压的气溶胶的情况下, 可通过提供阀门来确定剂量单位, 以递送经计量的量。在吸入器或吹入器中使用的胶囊剂和药筒 (由例如明胶组成) 可以配制成含有化合物和合适散剂基料 (诸如乳糖或淀粉) 的粉末混合物。

[0338] 本披露内容的多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段也可以周期性地施用于患者。

[0339] 在某些实施例中, 可以配制本披露内容的多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段以确保适当的体内分布。例如, 血脑屏障 (BBB) 排除许多高度亲水性化合物。为确保本披露内容的治疗性化合物穿过 BBB (如果希望), 可以将它们以例如脂质体配制。对于制造脂质体的方法, 参见例如, US 4,522,811; US 5,374,548; 和 US 5,399,331。脂质体可以包含一个或多个部分, 该一个或多个部分被选择性运输至特定细胞或器官中, 因此增强靶向药物递送 (参见例如, Ranade VV (1989) J. Clin. Pharmacol. [临床药理学杂志], 29:685)。示例性的靶向部分包括叶酸或生物素 (参见例如, Low 等人的 US 5,416,016); 甘露糖苷 (Umezawa 等人, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. [生物化学与生物物理研究通讯] 153:1038); 抗体 (P.G. Bloeman 等人 (1995) FEBS Lett. [欧洲生化学会联合会快报] 357:140; M. Owais 等人 (1995) Antimicrob. Agents Chemother. [抗微生物剂化学疗法] 39:180); 表面活性剂蛋白 A 受体 (Briscoe 等人 (1995) Am. J. Physiol. [美国生理学杂志] 1233:134); p 120 (Schreier 等人 (1994) J. Biol. Chem. [生物化学杂志] 269:9090); 还参见 K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. [欧洲生化学会联合会快报] 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) Immunomethods [免疫方法] 4:273。

[0340] 本申请还提供了使用包含本披露内容的多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段和其他疗法或一种或多种治疗剂的组合的药物组合物共同施用或治疗患者的方案。与其他治疗剂, 例如, 细胞因子、类固醇、化学治疗剂、抗生素或放射共同施用或治疗的方法在本领域中是已知的 (参见例如, Hardman 等人 (编辑) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics [Goodman 和 Gilman 的治疗的药理学基础],

第10增版, McGraw-Hill [麦格劳-希尔集团], 纽约, 纽约州; Poole和Peterson (编辑) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach* [用于先进实践的药物治疗学: 实用方法], Lippincott, Williams & Wilkins [利平科特·威廉斯和威尔金斯出版公司], 费城市, 宾夕法尼亚州; Chabner和Longo (编辑) (2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* [癌症化学疗法和生物疗法], Lippincott, Williams & Wilkins [利平科特·威廉斯和威尔金斯出版公司], 费城市, 宾夕法尼亚州)。有效量的治疗剂可以将症状减少了至少10%、至少20%、至少约30%、至少40%、或至少50%。

[0341] 在一些实施例中, 本披露内容的药物组合物还包含一种或多种另外的治疗剂。

[0342] 除上述治疗方案之外, 还可以对患者进行手术和其他形式的物理疗法。

[0343] C. 针对IL-13和IL-18介导的病理性障碍的治疗应用

[0344] 本披露内容的多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段可治疗性地用于治疗各种人疾病, 例如由IL-13和IL-18介导的病理性障碍, 例如自身免疫疾病, 以及涉及IL-13和/或IL-18失调 (例如, 不适当的表达、表达水平、信号传导等) 的炎性疾病或病症。在一个实施例中, 本披露内容的多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段用于治疗特应性皮炎。

[0345] 在一个方面, 本披露内容的多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段可用于治疗、降低由IL-13和IL-18介导的病理性障碍的可能性、或改善由IL-13和IL-18介导的病理性障碍。短语“由IL-13和IL-18介导的病理性障碍”涵盖如下所有疾病和医学病症, 其中IL-13和IL-18直接或间接地引起所述疾病或医学病症, 包括疾病或病症的原因、发展、进展、持续或病理。因此, 这些术语包括与异常IL-13和IL-18水平相关或以其为特征的病症和/或可通过降低或抑制靶细胞或组织中IL-13和IL-18诱导的活性治疗的疾病或病症。由IL-13和IL-18介导的病理性障碍包括具有IL-13和IL-18组分的自身免疫性疾病和/或炎性病症和障碍。

[0346] 在一些实施例中, 所述病理性障碍与不适当的IL-13和IL-18表达相关。在一些实施例中, 病理性障碍与不适当的IL-13和IL-18信号传导相关。

[0347] 本披露内容的多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段可用于但不限于治疗、预防或改善自身免疫性疾病和/或炎性病症和障碍, 特别是病因包括自身免疫组分的炎性病症。在一个方面, 本披露内容提供了用于治疗自身免疫性疾病的方法。在一个方面, 本披露内容提供了用于治疗炎性疾病或病症的方法。在一个方面, 治疗的受试者是人。

[0348] 本文提供了本披露内容的多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段以及如本文所述的药物组合物, 所述多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段以及所述药物组合物用于在治疗和/或预防由IL-13和IL-18介导的病理性障碍中使用。本文提供了如本文所述的多特异性抗体或药物组合物在制备用于在治疗由IL-13和IL-18介导的病理性障碍中使用的药物中的用途。本文提供了治疗和/或预防由IL-13和IL-18介导的病理性障碍的方法, 所述方法包括将治疗有效量的本文所述的多特异性抗体或药物组合物施用至有需要的受试者。在一些实施例中, 由IL-13和IL-18介导的病理性障碍是自身免疫性疾病或者炎性障碍或病症。在一些实施例中, 自身免疫性疾病或炎性障碍或病症是特应性皮炎。

[0349] 本文提供了本披露内容的多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段以及如本文所述的药物组合物, 所述多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体) 或其片段以及所述药物组

合物用于在治疗和/或预防中度至重度AD中使用。

[0350] 如本文所用,术语“特应性皮炎”(AD)或“湿疹”意指一种炎性皮肤病,其特征在于强烈瘙痒症(例如,严重瘙痒)以及鳞状和干燥湿疹样病变。术语“特应性皮炎”或“湿疹”包括但不限于由表皮屏障功能障碍、过敏(例如皮肤过敏、对某些食物、花粉、霉菌、尘螨、动物等过敏)、辐射暴露和/或哮喘引起或与其相关的AD(湿疹)。本披露包括用于治疗患有轻度、中度至重度或重度AD的患者方法。如本文所用,“中度至重度AD”的特征在于剧烈瘙痒、广泛的皮肤损伤,其通常伴随有持续的细菌、病毒或真菌感染。中度至重度AD还包括患者的慢性AD。在许多情况下,慢性病变包括皮肤增厚的斑块、苔藓化和纤维性丘疹。一般来说,受中度至重度AD影响的患者还具有超过10%或超过20%的身体皮肤受到影响,或者除了眼睛、手和身体褶皱受累之外还具有10%的皮肤面积受到影响。一般来说,受中度至重度AD影响的患者还具有(i)研究者总体评估(IGA)得分为3或4,(ii)湿疹面积和严重程度指数(EASI)得分为至少10,优选至少12,以及(iii)瘙痒。中度至重度AD也被认为存在于需要频繁使用局部皮质类固醇治疗的患者中。当患者对局部皮质类固醇或钙调神经磷酸酶抑制剂或本领域已知的任何其他常用治疗剂的治疗具有耐药性或难治性时,也可以说患者患有中度至重度AD。

[0351] 适当地,本披露内容的用途和方法包括以足以达到治疗有效血清水平的剂量施用本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段。适当地,在治疗过程中维持所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的治疗有效血清水平。

[0352] 如本文所用,术语“治疗有效血清水平”是指足以降低和/或改善给定病症、障碍或疾病和/或与其相关症状的严重程度和/或持续时间的受试者中疗法(例如,双特异性抗体)的血清水平。在一些方面,如本文所用的“治疗有效血清水平”也指受试者血清中实现特定结果的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的量,例如,AD相关参数的改善,例如,研究者总体评估(IGA)得分的降低;皮肤病生活质量指数(DLQI)自基线的降低;患者对严重程度的总体印象(PGIS)自基线的降低;患者对变化的总体印象(PGIC)的改善,即自基线的降低;特应性皮炎体表面积受累(BSA)得分的降低;湿疹面积和严重程度指数(EASI)得分的降低;SCORAD得分的降低;和/或瘙痒症数值评定量表(NRS)得分的降低。

[0353] 在一些方面,如本文所用的“治疗有效血清水平”也指受试者血清中实现特定结果的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的量,例如,与用所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段治疗前的水平相比,一种或多种AD相关生物标志物,特别是选自由CCL17/TARC、IgE(例如血清IgE)、CCL26/嗜酸性粒细胞趋化因子-3、CCL22/MDC、hsCRP、CD40、IL-13、IL-24、IL-22、IL-18(例如,血清IL-18、血清游离IL-18(生物活性)、和IL-18BP(例如血清IL-18BP)组成的列表的一种或多种AD相关生物标志物表达水平的降低。

[0354] 合适地,本披露内容的用途和方法包括每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每八周一次、或每12周一次施用所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段。根据某些示例性实施例,本披露内容的用途和方法包括每4周一次施用所述多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段。

[0355] 本文还提供了一种抑制受试者中IgE抗体产生的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段。

[0356] 本文还提供了一种抑制受试者中IFN- γ 产生的方法,所述方法包括向所述受试者

施用有效量的本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段。

[0357] 在本文提供的某些实施例中的是治疗受试者中IgE介导的障碍的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段,其中所述抗体或其片段抑制IL13与其受体的结合,以及抑制和白细胞介素与所述受体的结合相关的一种或多种功能。

[0358] D. 组合疗法

[0359] 本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段可以与用于治疗各种疾病、障碍和病症的其他药剂和疗法(本文中的“其他治疗剂”)组合使用。

[0360] 对于与其他治疗剂的“组合”施用意指在受试者患有障碍的过程期间,将两种(或更多种)不同治疗递送至受试者,例如在受试者被诊断患有障碍后并且在所述障碍被治愈或消除或由于其他原因终止治疗之前递送两种或更多种治疗。在一些实施例中,第一治疗的递送在第二治疗的递送开始时仍在进行,所以就施用而言存在重叠。这在本文中有时被称为“同时递送”或“并行递送”。在其他实施例中,一种治疗的递送在另一种治疗的递送开始前结束。在每一种情况的一些实施例中,治疗因组合施用而更有效。例如,第二治疗更有效,例如,与第一治疗不存在的情况下施用第二治疗所观察到的结果相比,使用较少的第二治疗观察到等效的作用,或者第二治疗使症状减少更大的程度,或对第一治疗观察到类似的情况。在一些实施例中,与一种治疗不存在的情况下递送另一种治疗所观察到的结果相比,递送使得症状或与所述障碍相关的有他参数减少更多。两种治疗的作用可以部分累加、完全累加或大于累加。所述递送可以使得当递送第二治疗时,递送的第一治疗的作用仍然是可以检测的。

[0361] 术语“并行”不限于在完全相同的时间施用疗法(例如,预防剂或治疗剂),而是意指将包含本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段的药物组合物以一定的顺序并在一定的时间间隔内施用至受试者,以使得本披露内容的分子可以与一种或多种其他治疗剂一起发挥作用,以提供与如果以其他方式施用相比增加的益处。例如,可以将每种疗法在相同的时间或以任何顺序依序在不同的时间点向受试者施用;然而,如果不在相同的时间施用,则应当在时间上充分接近地施用所述疗法,以提供所希望的治疗或预防作用。可以将每种疗法以任何适当的形式并且通过任何合适的途径分别施用至受试者。

[0362] 可以与本申请分子组合施用的其他治疗剂(例如,其他预防剂或治疗剂)可以与本披露内容的分子或其片段相隔少于5分钟、相隔少于30分钟、相隔1小时、相隔约1小时、相隔约1小时至约2小时、相隔约2小时至约3小时、相隔约3小时至约4小时、相隔约4小时至约5小时、相隔约5小时至约6小时、相隔约6小时至约7小时、相隔约7小时至约8小时、相隔约8小时至约9小时、相隔约9小时至约10小时、相隔约10小时至约11小时、相隔约11小时至约12小时、相隔约12小时至18小时、相隔18小时至24小时、相隔24小时至36小时、相隔36小时至48小时、相隔48小时至52小时、相隔52小时至60小时、相隔60小时至72小时、相隔72小时至84小时、相隔84小时至96小时或相隔96小时至120小时进行施用。在其他实施例中,在患者的同一访视中向患者施用两种或更多种其他治疗剂。

[0363] 本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段和一种或多种另外的治疗剂可以在与所披露的同一或分开的药物组合物中同时施用或依序施用。对于依序施用,可以首先施用本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段,并且可以其

次施用另外的药剂,或者可以颠倒施用顺序。与所披露的多特异性结合分子和片段相比,可以通过相同或不同的施用途径将一种或多种其他治疗剂施用至受试者。

[0364] 本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段和/或一种或多种另外的治疗剂、程序或模式可以在活动性障碍时期的期间、或在缓解或活动性较低的疾病时期的期间施用。本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段可以在其他治疗之前、与所述治疗同时、在治疗后或在障碍缓解期间施用。

[0365] 还可以循环施用本披露内容的组合疗法的一种或多种另外的治疗剂。组合循环疗法涉及施用第一疗法(例如,第一预防剂或治疗剂)一段时间,随后施用第二疗法(例如,第二预防剂或治疗剂)一段时间,并且重复该依序施用,即,所述循环,以减少对一种疗法(例如,药剂)的耐药性产生,以避免或减少一种疗法(例如,药剂)的副作用和/或以改善疗法的功效。

[0366] 当组合施用时,本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段和另外的治疗剂(例如,第二或第三药剂)或全部以比单独使用(例如,作为单一疗法)的每种药剂的量或剂量更高、更低或相同的量或剂量施用。在某些实施例中,如本文所述的多特异性结合分子,例如双特异性分子,例如双特异性抗体样分子、其他药剂(例如,第二或第三药剂)或全部的施用量或剂量低于单独使用的每种药剂(例如,作为单一疗法)的量或剂量(例如,低至少20%、至少30%、至少40%或至少50%)。在其他实施例中,导致期望的效果(例如,治疗自身免疫性疾病或炎性疾病或病症)的本披露内容的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或其片段、另外的药剂(例如,第二或第三药剂)或全部的量或剂量比单独使用(例如作为单一疗法)的每种药剂实现相同治疗效果所需的量或剂量低(例如低至少20%、至少30%、至少40%、或至少50%)。

[0367] 优选地,所述另外的治疗剂(例如,第二药剂或第三药剂)是AD药剂,例如小分子、生物疗法,或采用AD模式的药剂,例如光线疗法,包括局部疗法、全身疗法、光线疗法、及其组合。“AD药剂”包括乳膏、软膏、洗剂、凝胶或喷雾形式的局部疗法(例如,中低效力皮质类固醇[根据WHO指南第IV-VII组,参见Bolognia JL、Jorizzo JL、Schaffer JV.Glucocorticosteroids.[糖皮质激素]Dermatology.[皮肤病学]第3版2012.第125章,2075-88;FERENCE JD,Last AR.Choosing topical corticosteroids.[选择局部糖皮质激素]Am Fam Physician.[美国家庭医生]2009年1月15日;79(2):135-40]);非处方(OTC)润肤霜,以及医疗设备或所谓的屏障乳膏(如atopiclair);和用于治疗瘙痒和/或疼痛的润滑剂,例如含有薄荷醇、普莫卡因或抗组胺剂的止痒洗剂;局部麻醉剂、全身性药剂(例如生物药剂,例如IL-4R抑制剂,如度匹鲁单抗;IL-13Ra1抑制剂,如ASLAN-004;IL-13Ra2抑制剂;IL-31抑制剂,如奈莫利珠单抗;TNF α 抑制剂,如阿达木单抗、英夫利昔单抗、赛妥珠单抗和依那西普、阿法赛特;IL-1a抑制剂,如bermekimab(MABp1);IL-23抑制剂,如布瑞吉努单抗、优特吉努单抗、谷瑟库单抗、利散吉珠单抗、替曲吉珠单抗;IL-17抑制剂,如柏达鲁单抗、艾塞吉珠单抗;CD11a抑制剂,如依法利珠单抗;IL-22抑制剂,如fezalimumab、IL-22结合蛋白;IL-5抑制剂,如美泊利单抗、本雷利珠单抗;IL-2的合成形式,如阿地白介素;靶向白细胞介素-2受体复合物的重组IL-2方法,如LY3471851;OSMR抑制剂,如KPL-716;VAP-1抑制剂;OX-40抑制剂或OX40L抑制剂,如GBR830、KY1005;IgE抑制剂,如奥马珠单抗、利格利珠单抗;TSLP抑制剂,如特折鲁单抗;IL-33抑制剂,如MEDI3506;IL-36抑制剂,如司柏索利单抗、

ANB019;B细胞调节方法,如利妥昔单抗、奥瑞利珠单抗;非生物免疫调节治疗,例如环孢菌素和其他钙调神经磷酸酶抑制剂,JAK抑制剂如托法替尼、乌帕替尼、阿布昔替尼、巴瑞克替尼;TYK2抑制剂,如deucravacitinib;甲氨蝶呤;PDE4抑制剂,如阿普斯特;Siglec抑制剂,如AK-002;S1P激动剂或拮抗剂,如依曲莫德或SCD-044;BTK抑制剂,如TAS-5315、IRAK4拮抗剂和CCR4抑制方法,如RPT-193;全身性皮质类固醇、环磷酰胺、柳氮磺胺吡啶、硫唑嘌呤、霉酚酸酯、氨苯砞、羟氯喹;类视黄醇(例如顺式视黄酸);白三烯抑制剂或抗白三烯,如孟鲁司特、普鲁司特或扎鲁司特,以及5-L0抑制剂如齐留通,和LTA4H抑制剂如阿比司他、病灶内皮质类固醇注射液;光线疗法(例如UVB和UVA高剂量)。光化学疗法(例如补骨脂素和UVA(PUVA));局部钙调神经磷酸酶抑制剂(环孢菌素、他克莫司、吡美莫司)或局部PDE4抑制剂,如克立硼罗、difamilast或罗氟司特;局部JAK抑制剂如鲁索替尼、迪高替尼,或局部维生素D类似物和局部芳烃受体(AhR)抑制剂如苯烯莫德/他匹那洛;高效-超高效的局部皮质类固醇(根据WHO的定义,为第I、II、III组);具有已知抗炎特性的抗真菌药物,例如灰黄霉素、伊曲康唑、倍他米松、地塞米松、INCB018424、曲安奈德、阿普斯特、姜黄糊剂、硫酸盐葡萄糖胺、醋酸曲安奈德、芝麻油、倍他米松二丙酸酯、丙酸氯倍他素、益生菌(例如动物双歧杆菌乳酸亚种HN019、罗伊氏乳杆菌)、 ω -3、泼尼松、泼尼松龙、富血小板血浆、orabase糊剂、番茄红素、局部洋甘菊、绿茶、CO2激光治疗、过敏原特异性免疫疗法、polybiotics、光生物调节、甲硝唑、多西环素、米诺环素、雪松蜜、马齿苋、姜黄素类、阿法赛特、六氨基乙酰丙酸酯、羟氯喹、adacortyl、依法珠单抗、氟轻松、辅酶Q10粘膜粘附片、罗马洋甘菊、西罗莫司、他克莫司、清眩汤、NSAID局部冲洗、NSAID、槲皮素、NAVS蔡、甲氯乙胺、布比卡因、燕麦片浴。合适地,局部AD疗法是特应性皮炎处方疗法,包括但不限于局部类固醇,例如皮质类固醇、他克莫司、环磷酰胺、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸酯、阿普斯特、钙调神经磷酸酶抑制剂,例如局部钙调神经磷酸酶抑制剂、磷酸二酯酶4(PDE4)抑制剂,例如局部PDE4抑制剂,例如克立硼罗、促肾上腺皮质激素类似物、度匹鲁单抗、依那西普、阿达木单抗、英夫利昔单抗、奥马珠单抗、苏金单抗。

[0368] E. 试剂盒

[0369] 本披露内容还涵盖用于治疗患有由IL-13和IL-18介导的病理性障碍,例如自身免疫疾病或者炎性障碍或病症的患者的试剂盒。此类试剂盒包含治疗有效量的本披露内容的多特异性抗体。另外,此类试剂盒可以包含用于施用本披露内容的多特异性抗体的装置(例如,自动注射器、注射筒和小瓶、预填充的注射筒、预填充笔)以及使用说明书。这些试剂盒可以含有用于治疗由IL-13和IL-18介导的病理性障碍,例如自身免疫疾病或者炎性障碍或病症的其他治疗剂(如下所述)。此类试剂盒还可以包含用于施用本披露内容的多特异性抗体以治疗患者的说明书。此类说明书可以提供用于所包装的本披露内容的多特异性抗体的剂量、施用途径、方案和总治疗持续时间。

[0370] 短语“用于施用的装置”用于指示用于向患者全身施用药物的任何可用工具,所述工具包括但不限于预填充注射筒、小瓶和注射筒、注射笔、自动注射器、静脉内滴注器和袋、输注泵、贴片、输注袋和针等。使用此类物品,患者可以自我施用药物(即,在没有医生的帮助下施用药物)或医生可以施用药物。

[0371] 实例

[0372] 提供以下实例以进一步说明本披露内容,但不限制本披露内容的范围。本披露内

容的其他变型对本领域普通技术人员而言将是清楚的,并且也由所附权利要求涵盖。

[0373] 实例1:CHO细胞系中IL-13/IL-18双特异性抗体的产生

[0374] 1. 表达载体构建

[0375] 实例中使用的载体由以下元件组成:驱动抗体构建体组装所需的各个基因的表达的hCMV启动子/增强子,多腺苷酸化信号(polyA),作为选择标记物的叶酸受体(Fo1R、FAR)、DHFR、嘌呤霉素和/或潮霉素基因,大肠杆菌复制起点,以及提供氨苄西林抗性以启动细菌中扩增的 β -内酰胺酶基因。对不同的质粒设置进行了评价,并且图中提供了更多细节。

[0376] 图2是NVS标准质粒A-D的示意图。质粒A和C编码抗IL13 κ LC和抗L13 μ HC的表达;质粒B和D编码抗IL18 λ LC和抗IL18 μ HC的表达。每个单独蛋白质链的表达由单独的CMV启动子驱动。在CHO-C8TD亲代细胞中同时共转染线性化质粒A和B或C和D。使用选择标记物DHFR和FAR在第一轮选择中选择细胞。对于第二次选择,可以使用另外的选择标记物潮霉素和嘌呤霉素。质粒携带防漏跨膜技术(LS-TM)的信息,以在FACS辅助的单细胞分选过程中对高产克隆进行染色和富集。质粒C和D被设计为具有较低的序列同源性,以通过缺失编码LC和HC的表达盒之间的重复部分噬菌体f1区来最小化同源重组的风险。质粒D携带对于IL18 μ HC的不同密码子优化和信号肽,而在质粒A和B上,IL18 μ CH和IL13 μ CH的DNA序列仅编码KiH突变的碱基不同。

[0377] 图3是NVS弗林蛋白酶-2A肽(F2A)质粒E和F的示意图。F2A技术能够从一个启动子组合表达多于一条蛋白质链。在质粒E和F上,第一表达盒编码抗IL18 λ LC和抗IL18 μ HC,并且第二表达盒编码抗IL13 κ LC和抗L13 μ HC。将线性化质粒E或F转染到CHO-C8TD亲代细胞中。使用选择标记物DHFR和FAR来选择细胞。质粒F被设计为具有较低的序列同源性,以通过使用对于IL18 μ HC和IL13 μ HC的不同密码子优化来最小化同源重组的风险,而在质粒E上,IL18 μ CH和IL13 μ CH的DNA序列仅编码KiH突变的碱基不同。

[0378] 图4是改编的NVS标准质粒G和H的示意图。质粒G和/或H用于表达质粒E或F的池的超级转染,以增加质粒的整合数量。质粒G编码抗IL13 κ LC和抗L13 μ HC的表达;质粒H编码抗IL18 λ LC和抗IL18 μ HC的表达。每个单独蛋白质链的表达由单独的CMV启动子驱动。进行不同的转染和筛选方法,即(I)在CHO-C8TD亲代细胞中同时共转染质粒G和H,并且使用选择标记物潮霉素和嘌呤霉素选择细胞,或(II)在第二轮中转染质粒G并使用潮霉素选择细胞和/或在第二轮中转染质粒H并使用嘌呤霉素选择细胞,或(III)在第一轮中转染质粒H并使用嘌呤霉素选择细胞和/或在第二轮中转染质粒G并使用潮霉素选择细胞。质粒G和H携带防漏跨膜技术(LS-TM)的信息,以在FACS辅助的单细胞分选过程中对高产克隆进行染色和富集。在质粒G和H上缺失编码LC和HC的表达盒之间的部分噬菌体f1区,并且LC和HC的密码子优化彼此不同并且不同于质粒E和F以降低序列同源性,从而最小化同源重组的风险。

[0379] 图5是表达盒中与质粒E和F相比具有不同蛋白质链组合的NVS弗林蛋白酶-2A肽(F2A)质粒I的示意图。在质粒I上,第一表达盒编码抗IL18 λ LC、抗IL18 μ HC和抗IL13 μ HC,并且第二表达盒编码抗IL13 κ LC。将线性化质粒I转染到CHO-C8TD亲代细胞中。使用选择标记物DHFR和FAR来选择细胞。使两个表达盒之间的部分噬菌体f1区域缺失,并使用CH的不同密码子优化来降低序列同源性,以最小化同源重组的风险。

[0380] 2. 细胞系、培育、转染和选择

[0381] 将亲本CHO细胞系用作宿主细胞系,以用于产生抗体构建体。宿主细胞系源自CHO-

K1细胞系。来自CHO系的单个小瓶用于制备重组细胞系。将CHO细胞系在位于150rpm转速、10%CO₂、36.5°C下的摇床柜中的摇瓶中在专有的化学成分确定的培养基中以悬浮的形式培育。通过自动化系统(ViCell, 贝克曼库尔特公司(Beckman-Coulter))监测细胞活力和生长速率。将细胞每周传代2-3次至新鲜培养基中,并保持在对数生长期。

[0382] 将编码抗体构建体的SwaI线性化表达质粒通过电穿孔(Amaxa核转染系统,德国龙沙集团(Lonza))转染。转染反应是根据制造商的说明书在化学成分确定的培养基中进行的。用于转染的亲本CHO细胞处于指数生长期,具有高于95%的细胞活力。每次转染用 5×10^6 个细胞进行转染。转染后立即将细胞转移到含有化学成分确定的培养基的摇瓶中。在开始选择过程之前,将细胞库在36.5°C和10%CO₂下孵育48小时。

[0383] 使用由单独表达载体编码的选择标记物进行选择程序。使用叶酸受体和DHFR进行第一轮转染和选择。两种蛋白质都参与相同的分子途径;FolR将叶酸以及叶酸类似物MTX运输到细胞中,DHFR将其转化为用于嘌呤和甲硫氨酸合成的重要前体。结合它们作为选择原理,可以采用特定的强选择方案来富集表达两种重组蛋白的重组细胞。

[0384] 在低叶酸条件下转染和生长后48小时,通过向化学成分确定的培养基中添加10nM MTX来施加另外的选择压力。池恢复后,将细胞冷冻在培养基中,所述培养基补充有7.5%DMSO和用于如下所述进一步分析而产生的材料。

[0385] 基于用于第一轮转染和选择的质粒设计,出现了不同的进展可能性。将池直接用于如下所述的单细胞克隆,或者在单细胞克隆之前进行第二次选择或超级转染。

[0386] 对于第二次选择,使用10nM MTX将恢复的池保持在低叶酸条件下,并通过向化学成分确定的培养基中添加0.5ug/ml嘌呤霉素和0.8mg/ml潮霉素来施加另外的选择压力。池恢复后,将细胞冷冻在培养基中,所述培养基补充有7.5%DMSO和用于如下所述进一步分析而产生的材料。

[0387] 对于超级转染,将编码抗体构建体的SwaI线性化表达质粒通过电穿孔(Amaxa核转染系统,德国龙沙集团(Lonza))转染。转染反应是根据制造商的说明书在化学成分确定的培养基中进行的。将转染后已从选择中恢复的CHO池用于第二次或第三次转染。如上所述进行转染,并在36.5°C和10%CO₂下48小时后通过向化学成分确定的培养基中添加0.5ug/ml嘌呤霉素或0.8mg/ml潮霉素或二者开始选择。池恢复后,将细胞冷冻在培养基中,所述培养基补充有7.5%DMSO和用于如下所述进一步分析而产生的材料。

[0388] 3. 单细胞克隆

[0389] 选择后,使用Cytina cell printer设备或通过流式细胞术进行单细胞克隆,以获得单克隆来源的细胞系。

[0390] Cytina cell printer含有一次性分配盒,其包含加载了细胞悬浮液的微流体芯片。从该盒中,液滴通过喷嘴喷射到96孔板中。在该过程中,喷嘴区域的图像由显微镜系统记录。自动化图像分析算法检测图像上的细胞,并根据形态学标准如大小和圆度对其进行分类。基于喷嘴出口处的液滴形成区域的图像分析,将含有单细胞的液滴引导至96孔板的单独孔中,而将不含有单细胞的液滴(空白液滴或具有多个细胞的液滴)引导至废弃物中。

[0391] 在流式细胞术之前,用FITC标记的内部产生的BD Ab针对细胞表面附接的ABC123的Fc部分对细胞进行染色,以促进高产克隆的选择。

[0392] 使用配备有96孔板支持物的Sony CellSorter仪器使用100μm一次性分选芯片进

行单细胞克隆。为了确保只对单细胞进行分选,将设置调整为单细胞模式,即3液滴分选。使用这些设置,只有在前一个和后一个液滴都为空的情况下,才对含有细胞的液滴进行分选。以牺牲产率为代价优化细胞浓度和流速,以增加每个液滴含有不多于一个单细胞的概率。设置多个门以选择具有高荧光的单个活细胞。

[0393] 在使用Cytena cell printer或Sony Cell Sorter将单细胞分选到96孔板的单独孔中后,获得每个孔的高分辨率显微镜图像以记录单克隆性并验证单细胞克隆程序。

[0394] 单细胞克隆后,将克隆扩增,并关于生产率和生物过程适用性以及转基因整合和表达进行表征。通过在补充有7.5%二甲基亚砜(DMSO)的培养基中冷冻来自表现最好的克隆的细胞来制备初级种批(PSL)小瓶,并且最终选择的克隆的PSL用于MCB制造。

[0395] 4. 上游加工

[0396] 选择后,在摇瓶补料分批培养物中产生材料。以限定的细胞接种密度接种补料分批培养物,从第3天开始添加专有的补料溶液,并在第5天将培育温度转变为33°C。在培育期间进行过程内控制以监测抗体构建体的浓度。将单独培养物培育14天的时间。在培育过程结束时,将细胞从培养上清液分离出,接着进行无菌过滤,然后进行进一步下游加工和分析表征。通过用于测定携带Fc部分的所有种类的产物和相关杂质的在细胞培养上清液中的蛋白A HPLC或通过RP-LC测定来测定所选择的池的体积生产率。

[0397] 实例2. IL-13/IL-18双特异性抗体的LC-MS筛选和纯度评估

[0398] 将100ug纯化的双特异性mAb在20mM Tris-HCl (pH 7.5) 中稀释至1mg/ml并使用2μl PNG酶F酶(新英格兰生物技术公司(New England Biolabs))在37°C下去糖基化4h。使用配备有PLRP-S RP柱(3μm, 2.1x 150mm, 300 Å, 安捷伦科技公司(Agilent))的Waters ACQUITY UPLC Class和具有双喷雾离子源(Sciex公司)的TripleTOF 6600质谱仪使去糖基化样品经受LC-MS系统。洗脱液为A:在水中的0.1% TFA和B:70%异丙醇、20%乙腈、10%水和0.09% TFA。将色谱柱设置为60°C。流速为0.2ml/min。蛋白质以40min的如下梯度洗脱:0-4min 35%B、4-28min 35%-50%B、28-29min 50%-80%B、29-34min 80%B、34-35min 80%-35%、35-40min 35%B。记录在214nm处的UV色谱图并在正ES(+)中进行MS数据采集。使用Analyst软件TF 1.7(爱博才思公司(ABSciex))获取数据,并使用BioPharmaView(3.0版,爱博才思公司)和PeakView(2.2版,爱博才思公司)软件对数据进行分析。).bbmAb种类和错误配对变体的鉴定和相对定量基于与理论预期质量的匹配和解卷积质谱的相对质量信号强度,并且结果如表3所示。

[0399] 检测到大范围的正确的重链异二聚化、重链同二聚化和半分子。所需的异二聚化程度高达>95%,并且理想情况下接近100%。为了鉴定具有>95%异二聚化的候选物,产生了bbmAb1、bbmAb2、bbmAb5、bbmAb4和bbmAb3。只有bbmAb1、bbmAb2和bbmAb5显示出>95%异二聚化,而bbmAb4和bbmAb3显示出<95%异二聚化,并且不符合治疗性开发的条件。

[0400] 表3. 通过LC-MS分析检测的错误配对

候选物	通过完整 LC-MS 分析所测的错误配对				
	具有预期质量的异构体 (%)	错误配对 HkHhLhLh (%)	错误配对 HkHhLkLk (%)	同二聚体 HkHkLkLh HkHkLkLk HkHkLhLh (%)	同二聚体 HhHhLhLh HhHhLkLk HhHhLkLh (%)
[0401] bbmAb1	>99	<1	<1	<1	<1
bbmAb2	>99	<1	<1	<1	<1
bbmAb5	>99	<1	<1	<1	<1
bbmAb4	94	<1	<1	6	<1
bbmAb3	72	<1	<1	28	<1

[0402] 实例3. IL-13/IL-18双特异性抗体的CH2和Fab结构域的热稳定性评估

[0403] 抗体的稳定性极大地影响其性能(即其特异性和亲和力)。因此,稳定性是研究人员和制造商面临的主要问题,尤其是随着抗体在治疗、诊断和快速分析平台中的使用越来越多。关键参数是CH2和Fab结构域的热稳定性和溶解温度(T_m)。蛋白质溶解温度(T_m)被定义为蛋白质变性的温度。 T_m 值和解折叠分数可以预测聚集率(Robinson等人,2018)。

[0404] 使用CFX96 Teal Time PCR检测系统(伯乐公司(BioRad))通过差示扫描荧光法测定热转变中点。将纯化的样品在20mM His/His HCl (pH 6.0)中稀释至0.3mg/mL,最终体积为43 μ L,并与7 μ L SYPRO橙色稀释液(在1mL水中稀释的1.4 μ L SYPRO橙色储备溶液)混合。热循环仪起始温度设定为20 $^{\circ}$ C,结束温度设定为95 $^{\circ}$ C,并且升温速率设定为0.5 $^{\circ}$ C。使用伯乐公司(Bio Rad)CFX Manager Software 3.1获得溶解曲线和热溶解温度。

[0405] 工程化抗体的CH2和Fab结构域的溶解温度如表4所示,并且bbmAb1、bbmAb2、bbmAb5和bbmAb4的溶解曲线如图6所示。

[0406] CH2的 T_m 反映了CH2结构域的解折叠(Johnson,2012)。如表4所示,所有候选物在Ch2结构域中展现出相似的 T_m 。

[0407] 与bbmAb3的抗13Fab结构域(64 $^{\circ}$ C)相比,在bbmAb1、bbmAb2、bbmAb5和bbmAb4的抗13Fab结构域中观察到更高的溶解温度(67 $^{\circ}$ C-68 $^{\circ}$ C)。由于bbmAb3的抗13Fab结构域中的CDR序列与其他候选物不同,因此结果表明,bbmAb1、bbmAb2、bbmAb5和bbmAb4的抗13Fab结构域的特异性CDR序列可以产生具有改善的热稳定性的更稳定的分子。

[0408] 表4.CH2和Fab结构域的溶解温度(T_m)

[0409]

候选物	CH2 的 T_m (°C, DSF)	抗 13 Fab 的 T_m (°C, DSF)	抗 18 Fab 的 T_m (°C, DSF)
bbmAb1	58	68	79
bbmAb2	58	68	79

[0410]

bbmAb5	59	67	79
bbmAb4	59	68	79
bbmAb3	58	64	79

[0411] 实例4.通过SET测量的对重组人和食蟹猴IL-13和IL-18的亲和力

[0412] 平衡解离常数(KD)的测定通过如下所述的溶液平衡滴定(SET)测量来实现。

[0413] 在样品缓冲液(含有0.5%牛血清白蛋白(BSA)和0.02%Tween-20的PBS)中制备抗原的22个连续2n稀释液(最高浓度:hsIL-18,20nM;cyIL-18,40nM;hsIL-13,20nM),并添加恒定浓度的抗体(对于hsIL-13,读数为4pM;对于hsIL-18,读数为10或4pM;以及对于cyIL-18,读数为5pM)。

[0414] 将体积为60 μ l/孔的每种抗原-抗体混合物一式两份分配到384孔聚丙烯微量滴定板(MTP)中。样品缓冲液作为阴性对照,仅包含抗体的样品作为阳性对照(无抗原的最大电化学发光信号, B_{max})。将板密封并在室温(RT)下在摇床上孵育过夜(至少16小时)。

[0415] 所使用的抗原和抗体列于表5中。

[0416] 表5:SET测量中使用的抗原和抗体

[0417]

ID	全名	来源批号或数据库 ID	缓冲液
hsIL-13	重组人 IL-13 (115aa)	派普泰克公司 (PeproTech) #200-13-10UG	磷酸钠 (pH 7.0)
hsIL-13 生物素	生物素化人 IL-13 蛋白, His,Avitag™	北京百普赛斯生物科技 股份有限公司 (AcroBiosystems) #IL3-H82E5, 25 μ g	PBS (pH 7.4)
hsIL-18	hsIL-18 (aa37-193)	内部, BTP30685 池 2	25 mM NaHepes (pH 7)、2 mM

[0418]

			DTT、1 mM EDTA, 使用前调节至 2 mM TCEP
cyIL-18	cynoIL-18 (aa37-193)	内部, BTP25839	PBS, 使用前调节至 2 mM TCEP
hsIL-18 生物素	来自上海欣百诺生物科技有限公司 (SinoBio) 的人 IL-18 蛋白, 内部生物素化	上海欣百诺生物科技有限公司 (SinoBio) #10119HNCE	PBS (pH 7.4), 2 mM TCEP
磺基- α - hsIgG	磺基标签标记的抗 hsIgG	MSD #R32AJ-5	
bbmAb1	bbmAb1-20299/20300-AFM185-UFT001-W2	内部	10 mM His/His-HCl (pH 5.0)
bbmAb2	bbmAb2-19302A-PE124-STI006-F1	内部	10 mM His/His-HCl (pH 5.0)
bbmAb5	bbmAb5-20311-iBET-DES 滤液	内部	?
bbmAb4	bbmAb4-20217A-PE133-UFT001-F1	内部	10 mM L-His (pH 5.0)

[0419] hsIL-18和cyIL-18读数:在室温 (RT) 下用50 μ l/孔阻断缓冲液 (含有5% BSA的PBS) 阻断至少1小时 (h) 或随后进行洗涤步骤 (TBST, 含有0.05% Tween 20的TBS) 后, 用30 μ l/孔生物素化人IL-18 (0.2 μ g/ml, PBS) 包被链霉亲和素Multi-**Array**®384孔板 (MSD L21SA-5), 并在摇床上在RT下孵育至少1h。

[0420] hsIL-13读数:在室温 (RT) 下用50 μ l/孔阻断缓冲液 (含有5% BSA的PBS) 阻断至少1小时 (h) 且随后进行洗涤步骤 (TBST, 含有0.05% Tween 20的TBS) 后, 用30 μ l/孔生物素化人IL-13 (0.2 μ g/ml, PBS) 包被链霉亲和素Multi-**Array**®384孔板 (MSD L21SA-5), 并在摇床上在RT下孵育至少1h。

[0421] 将体积为30 μ l/孔的平衡抗原-抗体混合物从聚丙烯MTP转移到包被的MSD板上, 并在RT下孵育20min。另外的洗涤步骤后, 将在样品缓冲液中稀释的30 μ l磺基标签标记的抗hsIgG检测抗体 (0.5 μ g/ml) 添加至每个孔中, 并在摇床上于RT下孵育30min。洗涤MSD板, 并添加35 μ l/孔的MSD读取缓冲液, 并在RT下孵育5min。电化学发光 (ECL) 信号由MSD SectorImager 6000生成并测量。

[0422] SET数据已导出到MS Excel加载项软件Xlfit。从每次测定中的重复测量来计算平均ECL信号。通过从所有数据点减去最低值对数据进行基线调整, 并针对相应的抗原浓度作图以生成滴定曲线。 K_D 值通过将图用以下拟合来确定:

[0423] 杵臼结构双特异性Ab的1:1结合模型

[0424]
$$y = B_{\max} - \left(\frac{B_{\max}}{2[Fab]} \left([Fab] + x + K_D - \sqrt{([Fab] + x + K_D)^2 - 4x[Fab]} \right) \right)$$

[0425] 其中

[0426] y:减去空白的ECL信号

[0427] $B_{\max}$:抗原浓度为零时的最大ECL信号

[0428] [Fab]:应用的双特异性抗体浓度

[0429] K_D :解离平衡常数

[0430] x:应用的抗原浓度

[0431] 获得的 K_D 值如表6所示。

[0432] 表6:通过SET测量的对重组人和食蟹猴IL-13和IL-18的亲合力(单独靶标结合测定)

抗体	K_D (pM)			
	huIL-13	cyIL-13	huIL-18	cyIL-18
bbmAb1	<1	n.d.*	1.8±0.8	57.8±15.9
bbmAb2	n.d.*	n.d.*	1.4±0.4	54.0±18.5
bbmAb5	<1	n.d.	1.4±0.3	n.d.
bbmAb4	n.d.	n.d.	1.2±0.8	n.d.

[0434] n.d.,未测定;* ,通过SPR测定(见下文); K_D ,从3或4个重复实验计算

[0435] 实例5.通过SPR测量的对重组人和食蟹猴IL-13和IL-18的亲合力

[0436] 动力学结合参数的测定是通过使用光学生物传感器Biacore™ T200的表面等离子体共振(SPR) (<http://www.cytivalifesciences.com>)实现的。

[0437] 该技术允许无标记地测定配体与受体结合(k_a , 缔合速率常数)和解离(k_d , 解离速率常数)的动力学速率常数。平衡离解常数 K_D 从动力学速率常数计算。

[0438] 通过以下方式制备C1传感器芯片(思拓凡公司(Cytiva) #BR100535)的表面以用于间接结合抗体:将固定缓冲液(10mM乙酸钠(pH 5.0))中80g/mL的NeutrAvidin™(赛默飞世尔科技公司(Thermo Scientific) #31000)经由胺偶联固定在芯片表面上,接着用HBS-EP缓冲液中5μg/mL的生物素化蛋白G(西格玛公司(Sigma) #P8045)使NeutrAvidin™饱和。

[0439] 将抗体稀释至空白缓冲液HBS-EP(0.01M HEPES(pH 7.4)、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.05% v/v表面活性剂P20;思拓凡公司(Cytiva) #BR100669)中,最终浓度为10μg/mL。对重组huIL-13(浓度从0.25至8.0nM, 2倍渐增)和重组huIL-18(浓度从0.125至32nM, 2倍渐增)进行亲合力测量以测定bbmAb2或bbmAb1的动力学常数。在循环之间用10mM甘氨酸(pH 1.5)、0.5% Tween 20使表面再生。

[0440] 所使用的抗原和抗体列于表7中。

[0441] 表7:SET测量中使用的抗原和抗体

	ID	全名	来源批号或数据库	缓冲液
			ID	
[0442]	hsIL-13	重组人 IL-13 (115aa)	派普泰克公司 (PeproTech) #200-13-10UG	磷酸钠 (pH 7.0)
	hsIL-18	hsIL-18 (aa37-193)	内部, BTP30685 池 2	25 mM NaHepes (pH 7)、2 mM DTT、1 mM EDTA
[0443]	cyIL-18	cynoIL-18 (aa37-193)	内部, BTP25839	PBS, 使用前调节至 2 mM TCEP
	bbmAb1	bbmAb1-19301A-PE124-CEN005-F1	内部	10 mM His/His-HCl (pH 5.0)
	bbmAb2	bbmAb2-19302A-PE124-STI006-F1	内部	10 mM His/His-HCl (pH 5.0)

[0444] 使用Biacore™ T200 Control Software v2.0.1评价动力学迹线。这些渐增浓度的迹线的完整集被称为跑胶。将跑胶的迹线集用通过Biacore T200 Evaluation Software v3.0提供的1:1结合模型($R_{\max}$ 集总体)进行拟合。在每次跑胶中都包括零浓度样品(空白)以允许进行双重参考。

[0445] 获得的 K_D 值如表8所示。

[0446] 表8:通过SPR测量的对重组人和食蟹猴IL-13的动力学速率常数和亲和力

	抗体	抗原	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	重复实验 (n)
[0447]	bbmAb1	huIL-13	$1.39 \pm 0.37E+6$	$4.57 \pm 0.49E-5$	35.1 ± 13.4	3
		cyIL-13	$6.49 \pm 1.15E+6$	$8.13 \pm 0.98E-5$	12.9 ± 3.8	2
	bbmAb2	huIL-13	$1.33 \pm 0.33E+6$	$2.33 \pm 0.66E-5$	19.2 ± 10.6	3
		cyIL-13	$6.34 \pm 0.59E+6$	$5.90 \pm 0.71E-5$	9.4 ± 2.0	2

[0448] 实例6.通过表面等离子体共振 (SPR) 光谱学测量的对人Fc受体的亲和力

[0449] 为了表征工程化IL-13/IL-18双特异性抗体对人Fc受体的结合,使用表面等离子体共振 (SPR) 光谱学进行直接结合测定。SPR是通常应用于蛋白质-蛋白质、蛋白质肽、蛋白质-DNA和蛋白质-小分子相互作用的亲和力和动力学分析的技术,因为它允许分析溶液中的分析物与附接在传感器芯片表面的配体之间的相互作用,从而提供复合物形成和解离的连续读数。

[0450] 1.对Fc γ 受体体外结合的测量

[0451] 在Biacore T200仪器上进行与bbmAb2的Fc片段(IL18杵YTE IL13(mAb2) 臼YTE 1+1bsAb)结合的人Fc γ 受体的亲和力测定。在Biacore 8K仪器上进行人Fc γ 受体与bbmAb5(双特异性KiH-LALA YTE)和bbmAb1(IL18臼YTE (mAb1) IL13(mAb2) 杵YTE 1+1bsAb)的Fc片段结合的亲和力测定。用10mM乙酸钠(pH 4.5)以5 μ g/ml稀释样品,并通过在Biacore T200仪器上施加标准胺偶联程序以约750个共振单位的密度将其固定在CM5传感器芯片上。在Biacore 8K仪器上,施加类似的程序,但固定的密度为约1310个共振单位。在Biacore T200上,将流动池1是空白固定的,以用作参考。在Biacore 8K上,总共有8个通道,并且每个通道的流动池1留作空白以用作参考表面。通过随后在BiacoreT200中以30 μ l/min或者在Biacore 8K中以50 μ l/min的流速并且在25 $^{\circ}$ C的温度下在所有流动池上注射1:2稀释系列的人Fc γ 受体(CD64/Fc γ RI、CD32a/Fc γ RIIA_{R131}、CD32b/Fc γ RIIB、CD16a/Fc γ RIIIA_{V176}和Fc γ RIIIA_{F176}、CD16b/Fc γ RIIB)来收集动力学结合数据。根据相互作用的强度,将Fc γ 受体在不同浓度范围的运行缓冲液(具有0.005% Tween-20的PBS (pH7.4))中稀释(在Biacore T200上,我们使用Fc γ RI:0.20至100nM;Fc γ RIIA_{R131}、Fc γ RIIB和Fc γ RIIIB:7.81至4000nM;Fc γ RIIIA_{V176}:1.95至1000nM;以及Fc γ RIIIA_{F176}:3.91至2000nM;在Biacore 8K上,施加相同的条件,但Fc γ RI从0.05至20nM进行测试)。在Biacore T200上,在Fc γ RI和Fc γ RIIIA_{V176}的每个测量周期后,使用10mM甘氨酸溶液(pH 2.0)以30 μ l/min使芯片表面再生,持续30s。在Biacore 8K上,在50 μ l/min的流速下通过注射一次10mM甘氨酸(pH 2.0)持续30s,使表面针对hFc γ R进行再生。测量零浓度样品(空白操作样)以允许在数据评价期间进行双重参考。使每个样品和缓冲液空白的重复注射液在所有表面上流动。使用Biacore T200评价软件3.0版和Biacore 8K评价软件(v.3.0.12.15655)对数据进行评价。

[0452] 对原始数据进行双重参考,即,用参考流动池的反应校正测量流动池的反应,并且在第二步骤中减去空白注射液的反应。使用稳态模型或1:1朗缪尔模型(Langmuir model)拟合所得的传感器图,以计算平衡解离常数(K_D)。

[0453] 2.对FcRn受体体外结合的测量

[0454] 在Biacore T200仪器上进行与bbmAb2的Fc片段(IL18(mAb1) 杵YTE IL13(mAb2) 臼YTE 1+1bsAb)结合的人FcRn受体的亲和力测定。在Biacore 8K仪器上进行人FcRn受体与bbmAb5(双特异性KiH-LALA YTE)和bbmAb1(IL18臼YTE (mAb1) IL13(mAb2) 杵YTE1+1bsAb)的Fc片段结合的亲和力测定。用10mM乙酸钠(pH 4.5)以5 μ g/ml稀释样品,并通过在Biacore T200仪器上施加标准胺偶联程序以约750个共振单位的密度将其固定在CM5传感器芯片上。在Biacore 8K仪器上,施加类似的程序,但固定的密度为约1310个共振单位。在BiacoreT200上,将流动池1是空白固定的,以用作参考。在Biacore 8K上,总共有8个通道,并且每个通道的流动池1留作空白以用作参考表面。通过随后在25 $^{\circ}$ C的温度下以50 μ l/min的流速在所有流动池上注射人FcRn受体的1:2稀释系列来收集动力学结合数据。将FcRn受体在两种不同的运行缓冲液中稀释,以检查pH依赖性结合:具有0.005% Tween-20的PBS (pH 5.8)和具有0.005% Tween-20的PBS (pH 7.4),从而覆盖从4.88至2500nM的浓度范围。使用具有0.005% Tween-20的PBS (pH7.4)以50 μ l/min的流速使芯片表面再生,持续120s。测量零浓度样品(空白操作样)以允许在数据评价期间进行双重参考。使每个样品和缓冲液空白的重复注射液在所有表面上流动。使用Biacore T200评价软件3.0版和Biacore 8K评价软件

(v.3.0.12.15655)对数据进行评价。

[0455] 对原始数据进行双重参考,即,用参考流动池的反应校正测量流动池的反应,并且在第二步骤中减去空白注射液的反应。使用稳态模型或1:1朗缪尔模型 (Langmuir model) 拟合所得的传感器图,以计算平衡解离常数 (K_D)。

[0456] 3.对C1q体外结合 的测量

[0457] 在Biacore T200仪器上进行人C1q与bbmAb2结合的亲和力测定。在Biacore 8K仪器上进行人C1q与bbmAb5和bbmAb1结合的亲和力测定。用10mM乙酸钠缓冲液 (pH 4.5) 以50μg/ml稀释样品,并通过在Biacore T200仪器上施加标准胺偶联程序以约8900个共振单位的密度将其固定在CM5传感器芯片上。在Biacore 8K仪器上,施加类似的程序,但固定的密度为约9400个共振单位。在Biacore T200上,将流动池1是空白固定的,以用作参考。在Biacore 8K上,总共有8个通道,并且每个通道的流动池1留作空白以用作参考表面。通过随后在25℃的温度下以30μl/min的流速在所有流动池上注射人C1q的1:2稀释系列来收集动力学结合数据。将人C1q在运行缓冲液 (HBS-EP+pH 7.4) 中稀释,浓度范围为0.49nM-250nM。使用50mM NaOH以30μl/min的流速使芯片表面再生,持续30s,包括每个测量周期后60s的稳定期。测量零浓度样品 (空白操作样) 以允许在数据评价期间进行双重参考。使每个样品和缓冲液空白的重复注射液在所有表面上流动。使用Biacore T200评价软件3.0版和Biacore 8K评价软件 (v.3.0.12.15655) 对数据进行评价。

[0458] 对原始数据进行双重参考,即,用参考流动池的反应校正测量流动池的反应,并且在第二步骤中减去空白注射液的反应。使用稳态模型拟合所得的传感器图,以计算平衡解离常数 (K_D)。

[0459] 显示Fc γ 和FcRn受体体外结合亲和力的结果

[0460] bbmAb1、bbmAb2和bbmAb5与不同Fc受体的结合亲和力总结在以下表9中。

[0461] 表9:对于bbmAb1、bbmAb2和bbmAb5的 K_D 值

[0462]

bbmAb2		bbmAb1		bbmAb5	
K_D (nM) (m ± σ)	n	K_D (nM) (m ± σ)	n	K_D (nM) (m ± σ)	n

[0463]

hFcRn (pH 5.8)	223±8	2	176±1	2	180±0.5	2
hFcRn (pH 7.4)	低水平结合	1	低水平结合	1	低水平结合	1
hFcγRI	3.12±0.08	2	0.54±0.11	2	> 20*	2
hFcγRIIA R131 (低亲和力和力)	3629±157*	2	2735±245*	2	不结合	2
hFcγRIIB	> 4000*	2	> 4000*	2	不结合	2
hFcγRIIIA V176 (高亲和力和力)	328±38	2	171±10	2	> 1000*	2
hFcγRIIIA F176 (低亲和力和力)	1287±222*	2	1280±10*	2	不结合	2
hFcγRIIIB	> 4000*	2	> 4000*	2	> 4000*	2

[0464] 注意:标有*的KD值是不可靠的,因为所确定的KD接近或大于所施加的最高浓度。

[0465] 实例7. IL-13/IL-18双特异性抗体的PK研究

[0466] 在hFcRn转基因小鼠中进行的PK研究

[0467] 在Tg276 B6.Cg-Fcgrttm1DcrTg (CAG-FCGRT) 276Dcr/DcrJ半合子小鼠中进行小鼠实验,所述半合子小鼠源自C57BL/6小鼠并购自杰克逊实验室(The Jackson Laboratory)(美国)。FcRn-/-hFcRn(系276)Tg小鼠携带小鼠基因的无效突变和在普遍存在的CAG启动子控制下表达hFcRnα链的转基因。研究开始时,所有小鼠都是在8周龄与12周龄之间的未接受处理的雄性。对于给药,在磷酸盐缓冲盐水(1x PBS(pH 7.3))中制备抗体,并以10mg/kg的单次静脉内剂量以5mL/kg的剂量体积将其施用至尾部左侧静脉中。在29天的研究持续时间内,利用连续采样方法(给药前、1h、1d、2d、3d、6d、9d、17d和29d)对于每种抗体的总共3个动物重复实验进行评价。将血液样品(30-50μL)收集到血清分离管中,并在室温下凝结20-30分钟。然后通过离心(2000g,室温,10分钟)处理样品以获得血清。将所得血清在-80℃下储存,直至分析。

[0468] 使用定量连续电化学发光免疫分析法(ECLIA)测量未知小鼠血清样品、校准标准品(Cs)和质量控制样品(QC)中的总抗体。使用两种靶标来捕获和检测抗体使得测定能够利用双特异性治疗性抗体的结合位点来检测其总量。因此,通过固定在SA包被且阻断的MSD板上的生物素化人IL-18捕获抗体。添加并结合钆(II)三联吡啶-(4-甲基磺酸)NHS酯(MSD-Sulfo-TAG™)标记的食蟹猴IL-13以用于基于电化学发光(ECL)的检测,并且在来自MSD的

ECL扇形成像器上进行读取。所获得的ECL值与初始样品中存在的药物量成比例,如通过加权因子为1/Y2的5PL回归分析所确定的,其中Y表示相应校准标准品的ECL数值。

[0469] 在人源化小鼠模型中使用上述实验方法研究bbmAb1和bbmAb2以及Fc沉默变体bbmAb6、bbmAb7、bbmAb8和bbmAb9。bbmAb7和bbmAb8是bbmAb1的Fc沉默变体,其包含L235C突变(EU编号)。bbmAb6是bbmAb1的Fc沉默变体,其包含L235C突变并且不包含YTE突变(EU编号)。bbmAb9是bbmAb1的Fc沉默变体,其包含L235C/G236C突变(EU编号)。

[0470] 所有上述抗体在静脉内施用后都显示出良好的暴露,这对于具有高 C_{max} 的半衰期延长抗体而言是典型的,以及显示出在全身循环中具有短分布期和延长的消除期的典型PK曲线形状。此处研究的抗体的半衰期非常相似,并且可以从PK曲线的末期估计,范围为大约10至16天(如图7所示)。

[0471] 实例7 IL-13/IL-18的同时抑制

[0472] 分别用IL-18或IL-13处理人外周血单个核细胞(pBMC)或人角质形成细胞,并分析基因表达的差异。观察到IL-13与IL-18诱导的基因特征之间几乎没有重叠(数据未显示),而在来自AD患者基因表达数据集的已发表的病变皮肤相比于非病变皮肤中,两者均显示为增加(He等人2020:来自5名AD(病变和非病变)和7名HV受试者的皮肤活检物;scRNA-seq数据)。

[0473] 挖掘数据集,其中已从用拮抗IL-4受体 α 的抗体(抗IL-4R α)治疗从而阻断IL-13和IL-4信号传导二者的AD患者收集病变和非病变皮肤活检样品,揭示了抗IL-4R α 治疗显著下调IL-13诱导的基因特征;然而,抗IL-4R α 治疗并未显著下调IL-18诱导的基因特征(数据未显示)。

[0474] 这些结果表明,与单独抑制IL-13或IL-18相比,对IL-13和IL-18二者的双重抑制可以改善治疗结局。

[0475] 收获来自10名特应性皮炎患者的4mm皮肤活检物。收获来自8名健康志愿者的4mm皮肤活检物作为对照样品。将每个活检物切成4块,并在100 μ l培养基中离体培养24h,所述培养基是+/- α -IL-18、 α -IL-13或二者(每种为150 μ g/mL)。以低速离心细胞培养上清液以去除细胞而不裂解它们。使用Olink测定法评价蛋白质表达的变化。病变活检样品的上清液中的蛋白质表达与对照样品相比的减少显示出抗IL-13处理的样品与对照相比的可测量的减少、抗IL-18处理的样品与对照相比的减少、以及抗IL-18/抗IL-13处理的样品与对照相比和与单独处理的样品相比的进一步减少(数据未显示)。

[0476] 实例8用双特异性抗体同时抑制IL-13/IL-18显示出对AD样转录组的协同抑制

[0477] 方法

[0478] 从来自5个单独供体的外科废弃物中获得8mm全厚皮肤活检物,并将其在12孔板的组织培养插入物中具有1%Pen/Strep和10%敲除血清替代的IMDM培养基中进行培养。在第0天,向活检物注射对照(30 μ L PBS),或将活检物用30 μ L在PBS中的抗CD28和抗CD3抗体的混合物激活,最终浓度各自为500ng。为了诱导分化为AD样转录组,将活检物(对照除外)与以下细胞因子的混合物一起在IMDM培养基中孵育培养6天,每种细胞因子的浓度为50ng/mL:IL-4、IL-13、IL-33、TSLP、IL18和IL-31,其中培养基在第2、4和5天进行更换。在6天诱导期内,用以下抗体处理诱导的活检样品:具有LALA沉默突变(AD+同种型)的1 μ M IgG1同种型对照抗体;1 μ M抗IL13抗体;1 μ M抗IL18抗体或1 μ M抗IL13/18双特异性抗体bbmAb1。第6天,收集

上清液,并且将活检物减半以用于组织学和转录组分析(Ampliseq全转录组方案)。

[0479] 将Ampliseq归一化值导入Qlucore Omics Explorer 3.8,并删除90%样品中的值小于0.5(如果为真)的变量,从而得到16719个变量。将阈值设置为0.25,并且将值进行log2转换。在供体校正的样品上,在 $q < 0.1$ 且 $FC > 2$ 的情况下将“AD同种型”样品与对照进行比较,生成了“疾病转录组”,从而得到1485个差异表达的“疾病基因”。其中507个在AD同种型样品中被上调。以单峰模式对该基因集进行基因集变异分析(GSVA)。

[0480] 结果

[0481] 如图8所示,对于所有抗IL18处理的样品,GSVA显示出无效的抑制。抗IL13抑制在5个样品中的2个样品中部分有效。相比之下,抗IL18/IL13双特异性抗体bbmAb1在5个样品中的4个样品中显示出对AD样疾病转录组的切实抑制,表明组合的细胞因子阻断的协同作用。

[0482] 如图9所示,507个上调基因的t-SNE分析(困惑度为5)显示出明显的疾病效应,其中对照与AD+同种型样品在X轴上相距最远。用抗IL13/18双特异性抗体bbmAb1处理的5个样品中有4个样品聚集在对照样品附近,这表明来自这些样品的细胞具有诱导的细胞中最少的AD样转录组。相比之下,只有两个抗IL13处理的样品显示出相似的效果,并且抗IL18处理的样品与AD+同种型样品无法区分,这表明没有治疗效果。这些结果得到了图10中所示的1485个差异表达的基因(AD+同种型相比于对照)的t-SNE分析(困惑度为5)的进一步支持。然而,图10确实表明单独阻断IL-18具有适度的治疗效果。不希望受理论的约束,诸位发明人假设图8-图10的数据表明IL-18阻断(例如,使用抗IL18抗体)可以对患者的AD展现出治疗效果,但是IL13/18共阻断(例如,通过同时或依序施用IL-13和IL-18拮抗剂)与阻断IL-13或阻断IL-18相比可以是出乎意料的优越治疗。

[0483] 实例9.用双特异性抗体同时抑制IL-13/IL-18

[0484] 在测试测定中,使多个细胞与包含本文所披露的双特异性抗体的载剂接触。测定IL-13和IL-18活性,并与其中使多个细胞仅与载剂接触的对照测定进行比较。与对照相比,IL-13活性和IL-18活性二者在测试测定中均显著降低。

[0485] 实例10.用抗IL-13/IL-18双特异性抗体治疗特应性皮炎

[0486] 向患有特应性皮炎的受试者施用本文所述的双特异性抗体。在第16周,与安慰剂处理的受试者相比,所述受试者在特应性皮炎的一个或多个体征和/或症状方面实现了更大的降低。

[0487] 本申请的一些实施方案:

[0488] 1.一种多特异性抗体,其中所述抗体包含

[0489] a.第一部分,所述第一部分包含特异性结合白细胞介素-18(IL-18)的第一轻链可变结构域(VL1)和第一重链可变结构域(VH1),以及

[0490] b.第二部分,所述第二部分包含特异性结合白细胞介素-13(IL-13)的第二轻链可变结构域(VL2)和第二重链可变结构域(VH2)。

[0491] 2.根据实施方案1所述的多特异性抗体,其中所述抗体是双特异性抗体。

[0492] 3.根据实施方案1或2所述的多特异性抗体,其中所述VH1和所述VH2包含互补决定区(CDR)HCDR1、HCDR2、HCDR3;并且所述VL1和所述VL2包含LCDR1、LCDR2、LCDR3,其中:

[0493] e.所述VH1结构域包含(例如依次):

[0494] i.具有氨基酸序列SEQ ID NO:32的所述HCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:33的

所述HCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:34的所述HCDR3;或

[0495] ii.具有氨基酸序列SEQ ID NO:35的所述HCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:36的所述HCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:37的所述HCDR3;或

[0496] iii.具有氨基酸序列SEQ ID NO:38的所述HCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:39的所述HCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:40的所述HCDR3;以及

[0497] f.所述VL1结构域包含(例如依次):

[0498] i.具有氨基酸序列SEQ ID NO:4的所述LCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:5的所述LCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:6的所述LCDR3;或

[0499] ii.具有氨基酸序列SEQ ID NO:7的所述LCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:8的所述LCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:9的所述LCDR3;或

[0500] iii.具有氨基酸序列SEQ ID NO:10的所述LCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:11的所述LCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:12的所述LCDR3;以及

[0501] g.所述VH2结构域包含(例如依次):

[0502] i.具有氨基酸序列SEQ ID NO:46的所述HCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:47的所述HCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:48的所述HCDR3;或

[0503] ii.具有氨基酸序列SEQ ID NO:49的所述HCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:50的所述HCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:51的所述HCDR3;或

[0504] iii.具有氨基酸序列SEQ ID NO:52的所述HCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:53的所述HCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:54的所述HCDR3;以及

[0505] h.所述VL2结构域包含(例如依次):

[0506] i.具有氨基酸序列SEQ ID NO:18的所述LCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:19的所述LCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:20的所述LCDR3;或

[0507] ii.具有氨基酸序列SEQ ID NO:21的所述LCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:22的所述LCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:23的所述LCDR3;或

[0508] iii.具有氨基酸序列SEQ ID NO:24的所述LCDR1,具有氨基酸序列SEQ ID NO:25的所述LCDR2,以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:26的所述LCDR3。

[0509] 4.根据实施方案1、2或3所述的多特异性抗体,所述多特异性抗体包含λ型的第一轻链和κ型的第二轻链。

[0510] 5.根据实施方案4所述的多特异性抗体,其中所述第一轻链是λ1型的,并且所述第二轻链是κ4型的。

[0511] 6.根据实施方案1-5中任一项所述的多特异性抗体,其中:

[0512] (a).所述VL1结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:13,并且

[0513] (b).所述VL2结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:27。

[0514] 7.根据实施方案1-6中任一项所述的多特异性抗体,其中:

[0515] a.所述VH1结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:41,并且

[0516] b.所述VL1结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:13,并且

[0517] c.所述VH2结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:55,并且

[0518] d.所述VL2结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:27。

[0519] 8.根据实施方案1-7中任一项所述的多特异性抗体,所述多特异性抗体包含含有

如SEQ ID NO:14中所示氨基酸序列的第一轻链和含有如SEQ ID NO:28中所示氨基酸序列的第二轻链。

[0520] 9. 根据实施方案1-8中任一项所述的多特异性抗体,所述多特异性抗体包含含有异二聚化修饰的第一重链和含有与所述第一重链的所述异二聚化修饰互补的异二聚化修饰的第二重链。

[0521] 10. 根据实施方案9所述的多特异性抗体,其中所述第一重链和所述第二重链是人IgG1,并且:

[0522] a) 所述第一重链的所述异二聚化修饰包含位置366处的丝氨酸、位置368处的丙氨酸和位置407处的缬氨酸,并且所述第二免疫球蛋白重链的所述异二聚化修饰包含位置366处的色氨酸;或

[0523] b) 所述第二重链的所述异二聚化修饰包含位置366处的丝氨酸、位置368处的丙氨酸和位置407处的缬氨酸,并且所述第一免疫球蛋白重链的所述异二聚化修饰包含位置366处的色氨酸,

[0524] 并且其中氨基酸残基根据EU编号进行编号。

[0525] 11. 根据实施方案1-10中任一项所述的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体是双特异性抗体,所述双特异性抗体包含经由增强的FcRn结合来增强所述双特异性抗体的半衰期的突变。

[0526] 12. 根据实施方案11所述的双特异性抗体,其中增强所述双特异性抗体的半衰期的所述突变是M252Y/S254T/T256E(YTE),并且其中所述氨基酸残基根据EU编号进行编号。

[0527] 13. 根据实施方案1-12中任一项所述的多特异性抗体,其中所述第一重链包含如SEQ ID NO:42中所示的氨基酸序列,并且所述第二重链包含如SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列。

[0528] 14. 根据实施方案1-12中任一项所述的多特异性抗体,其中所述第一重链包含如SEQ ID NO:57中所示的氨基酸序列,并且所述第二重链包含如SEQ ID NO:58中所示的氨基酸序列。

[0529] 15. 根据实施方案1-12中任一项所述的多特异性抗体,其中所述第一重链包含如SEQ ID NO:42中所示的氨基酸序列,并且所述第一轻链包含如SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列,以及所述第二重链包含如SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列,并且所述第二轻链包含如SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列。

[0530] 16. 根据实施方案1-12中任一项所述的多特异性抗体,其中所述第一重链包含如SEQ ID NO:57中所示的氨基酸序列,并且所述第一轻链包含如SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列,以及所述第二重链包含如SEQ ID NO:58中所示的氨基酸序列,并且所述第二轻链包含如SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列。

[0531] 17. 一种药物组合物,所述药物组合物包含与一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载剂组合的根据前述实施方案中任一项所述的多特异性抗体。

[0532] 18. 根据实施方案17所述的药物组合物,所述药物组合物进一步包含一种或多种另外的活性剂。

[0533] 19. 一种分离的核酸分子,所述核酸分子编码根据实施方案1-16中任一项所述的多特异性抗体。

[0534] 20.一种克隆或表达载体,所述克隆或表达载体包含一种或多种根据实施方案19所述的核酸序列,其中所述载体适合于重组产生根据实施方案1-16中任一项所述的多特异性抗体。

[0535] 21.一种宿主细胞,所述宿主细胞包含一种或多种根据实施方案20所述的克隆或表达载体。

[0536] 22.一种用于产生根据实施方案1至16中任一项所述的多特异性抗体的工艺,所述工艺包括在足以表达所述多特异性抗体的条件下培养根据实施方案21所述的宿主细胞,并且之后从所述宿主细胞培养物纯化并回收所述多特异性抗体。

[0537] 23.一种试剂盒,所述试剂盒包含根据实施方案1至16中任一项所述的多特异性抗体或根据实施方案17或18所述的药物组合物,其中所述试剂盒另外包含用于将所述多特异性抗体或所述药物组合物施用于有需要的受试者的使用说明书和药物递送设备。

[0538] 24.根据实施方案23所述的试剂盒,其中用于施用的所述药物递送设备包含注射筒、自动注射器、注射笔、小瓶和注射筒、输注泵、贴片或输注袋和针。

[0539] 25.一种同时抑制IL-13和IL-18活性的方法,所述方法包括使多个哺乳动物细胞与有效量的根据实施方案1至16中任一项所述的多特异性抗体接触。

[0540] 26.一种在受试者中同时抑制IL-13和IL-18活性的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据实施方案1至16中任一项所述的多特异性抗体。

[0541] 27.一种治疗受试者的IL-13和/或IL-18介导的障碍的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据实施方案1至16中任一项所述的多特异性抗体。

[0542] 28.一种预防或治疗炎性或免疫病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据实施方案1至16中任一项所述的多特异性抗体。

[0543] 29.根据实施方案1至16中任一项所述的多特异性抗体,所述多特异性抗体用于在预防或治疗有需要的受试者的炎性或免疫病症中使用。

[0544] 30.根据实施方案28或29所述的方法或用途,其中所述炎性或免疫病症是皮肤病症。

[0545] 31.根据实施方案29所述的方法或用途,其中所述皮肤病症是特应性皮炎。

[0546] 32.根据实施方案31所述的方法或用途,其中与用单特异性抗IL-13拮抗剂和/或单特异性抗IL-18拮抗剂的治疗相比,所述方法是改善的治疗。

[0547] 33.根据实施方案31或32所述的方法或用途,其中治疗16周后,所述改善由更好的湿疹面积和严重程度指数(EASI)得分指示。

[0548] 34.根据实施方案31至33中任一项所述的方法或用途,其中所述特应性皮炎是中度至重度特应性皮炎。

[0549] 35.根据实施方案31至34中任一项所述的方法或用途,其中所述特应性皮炎不能用局部皮质类固醇充分控制。

[0550] 36.一种治疗有需要的受试者的炎性或免疫病症的方法,所述方法包括向所述受试者同时或依序施用IL-13拮抗剂和IL-18拮抗剂。

[0551] 37.根据实施方案36所述的方法,其中所述方法包括施用选自IL-13拮抗剂和IL-18拮抗剂的第一拮抗剂和选自IL-13拮抗剂和IL-18拮抗剂的第二拮抗剂,其中所述第一拮抗剂和所述第二拮抗剂是结构上不同的分子。

[0552] 38. 根据实施方案36所述的方法, 其中所述方法包括施用抗IL18拮抗剂抗体和抗IL13拮抗剂抗体。

[0553] 39. 根据实施方案36所述的方法, 其中所述方法包括施用抗IL13/18双特异性抗体。

[0554] 40. 根据实施方案36所述的方法, 其中所述炎性或免疫病症是皮肤病症。

[0555] 41. 根据实施方案36所述的方法, 其中所述炎性或免疫病症是特应性皮炎, 如中度至重度特应性皮炎, 或如不能用局部皮质类固醇充分控制的特应性皮炎。

[0556] 42. 根据实施方案41所述的方法, 其中与用单特异性抗IL-13拮抗剂和/或单特异性抗IL-18拮抗剂的治疗相比, 所述方法是改善的治疗。

[0557] 43. 根据实施方案42所述的方法, 其中治疗16周后, 所述改善由更好的湿疹面积和严重程度指数 (EASI) 得分指示。

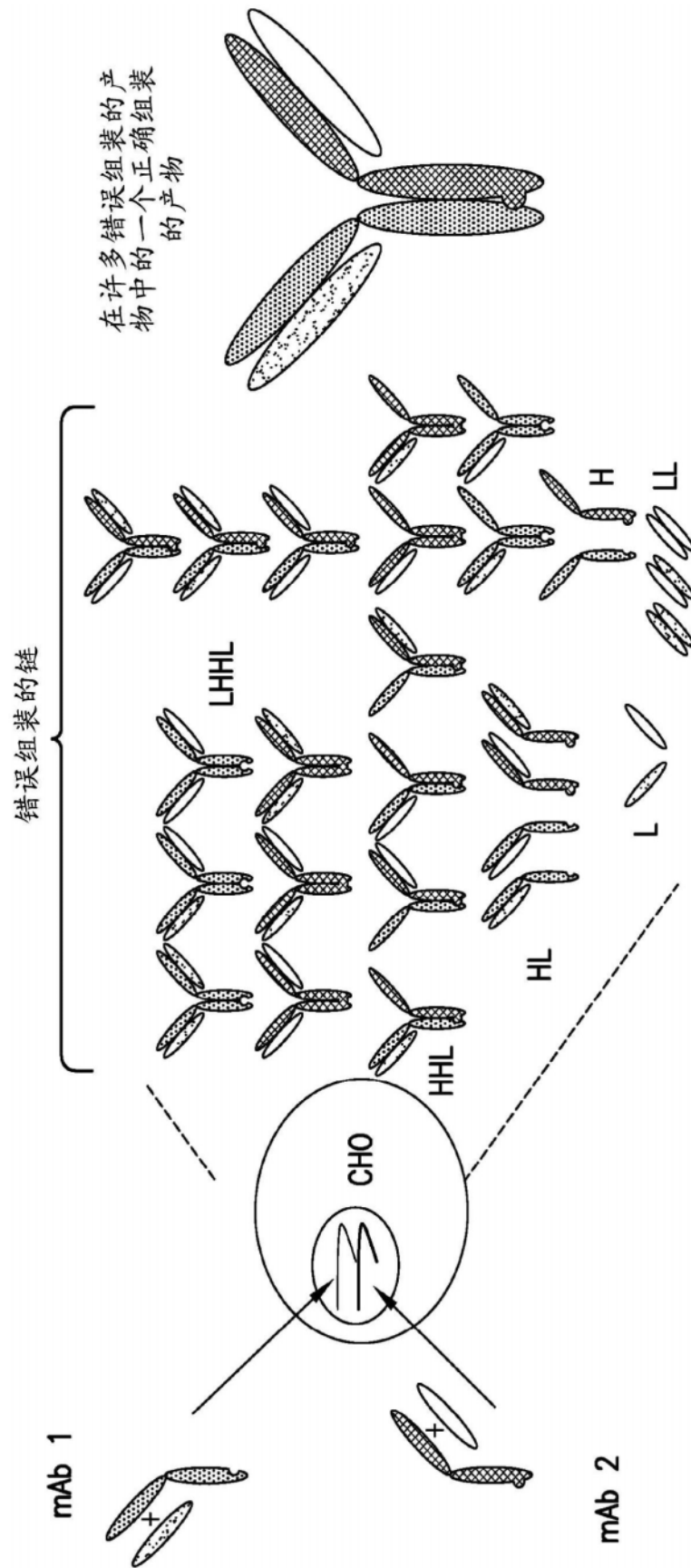


图1

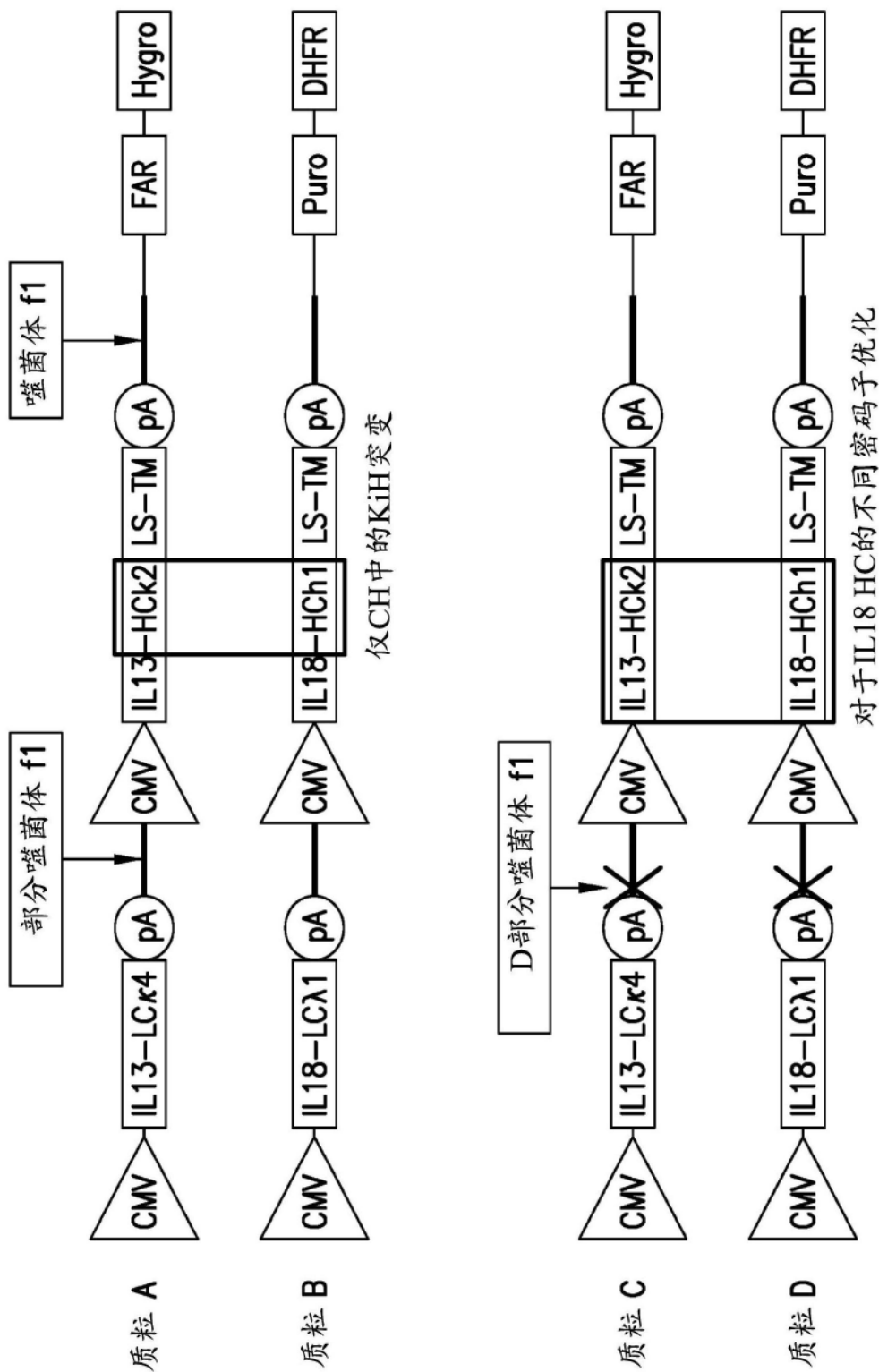


图2

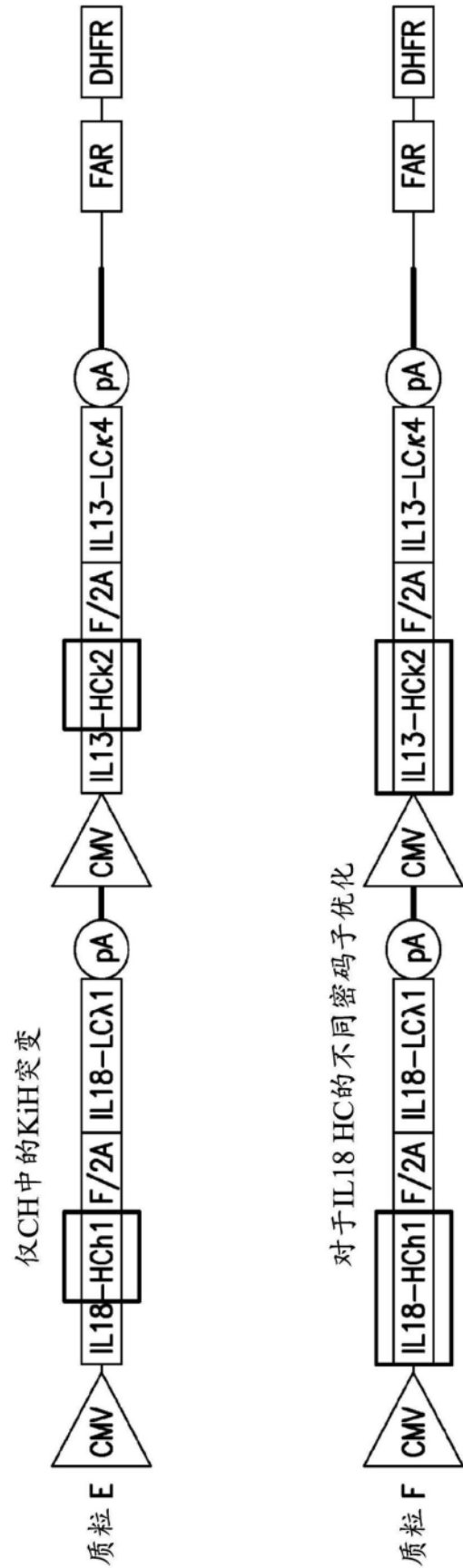


图3

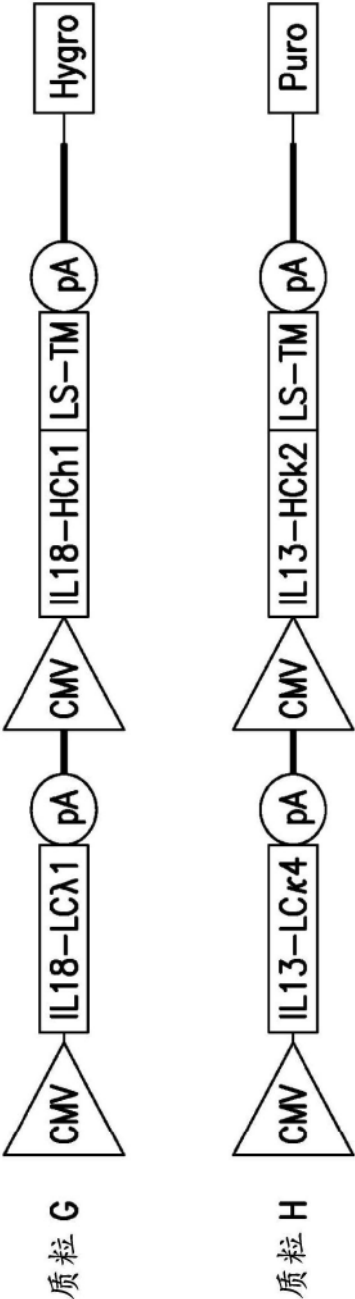


图4

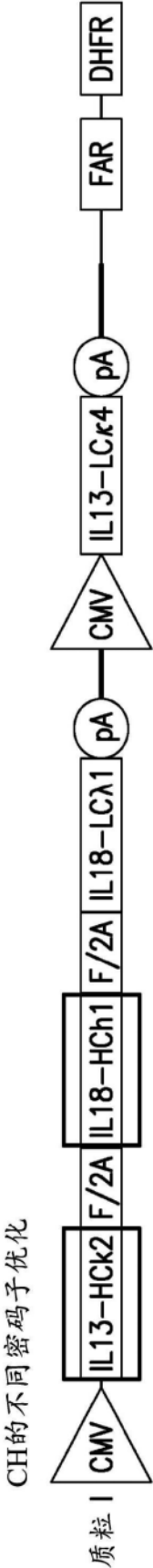


图5

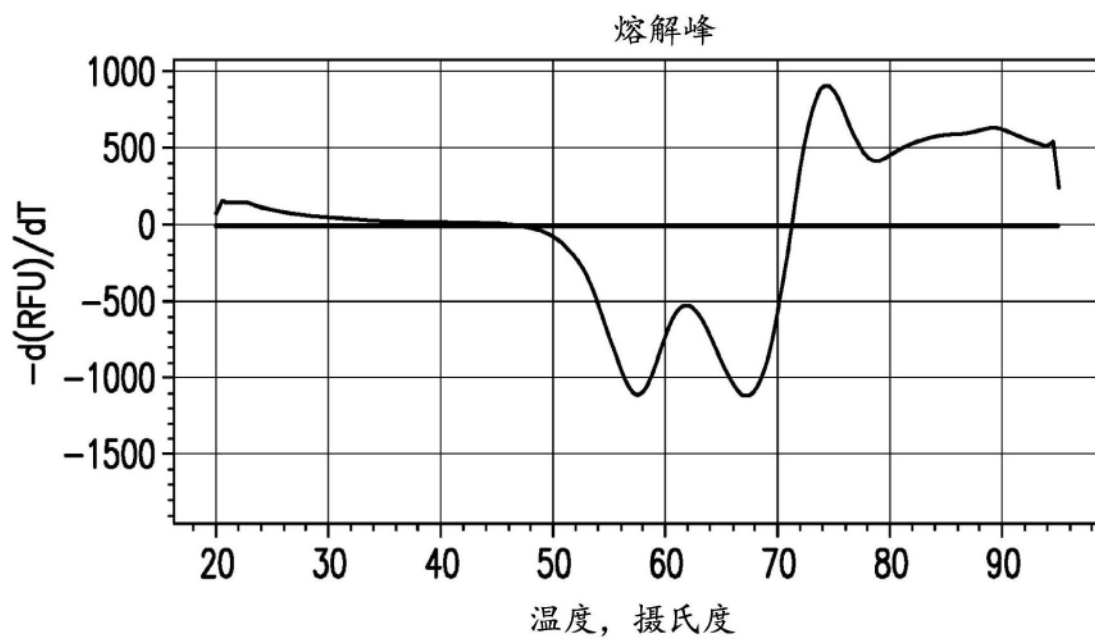


图6A

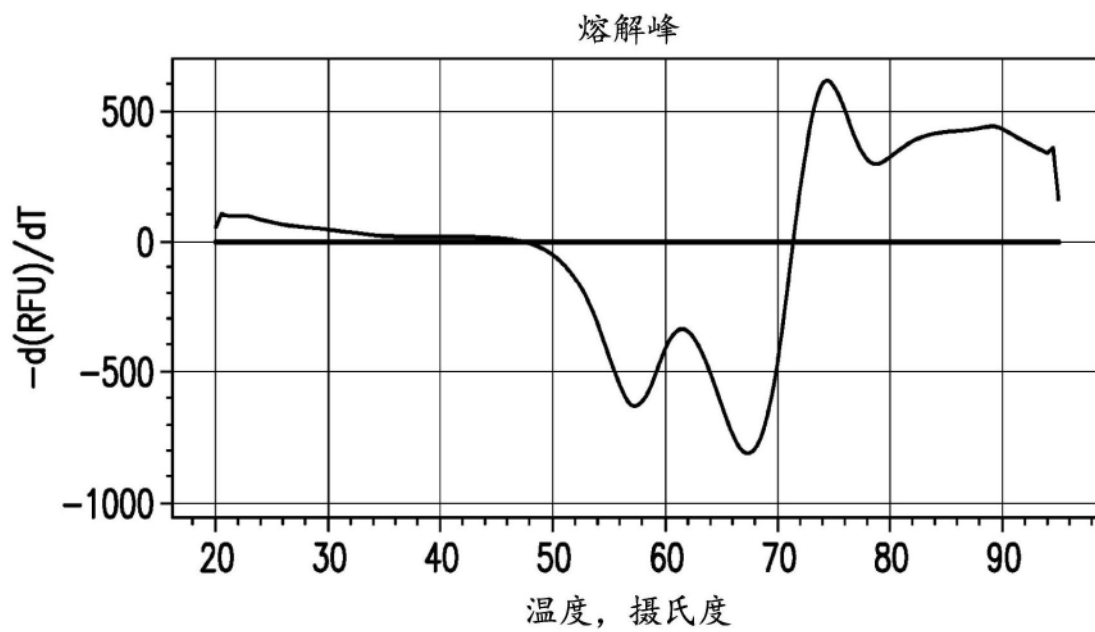


图6B

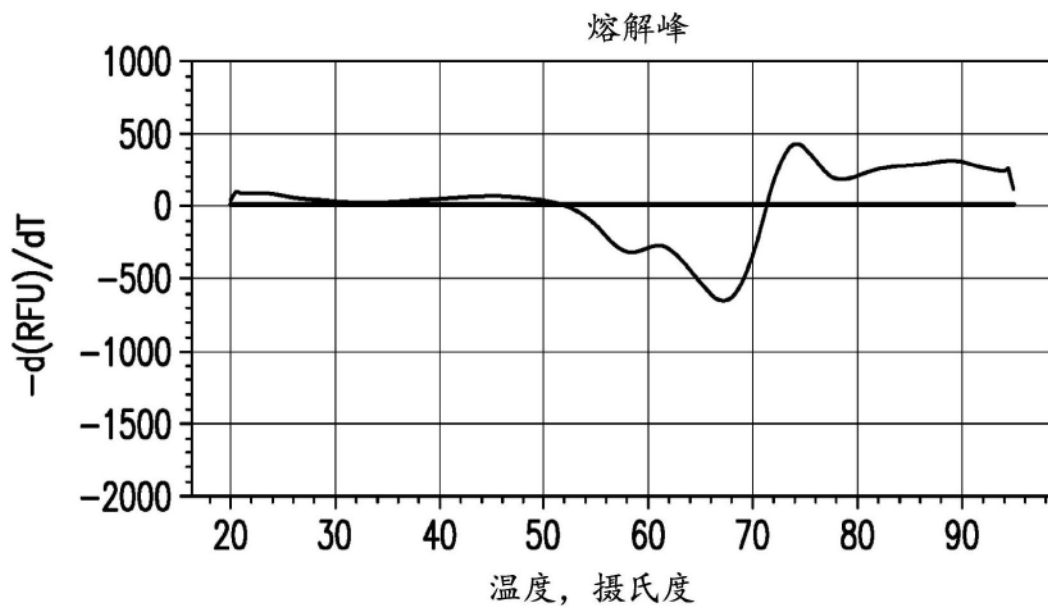


图6C

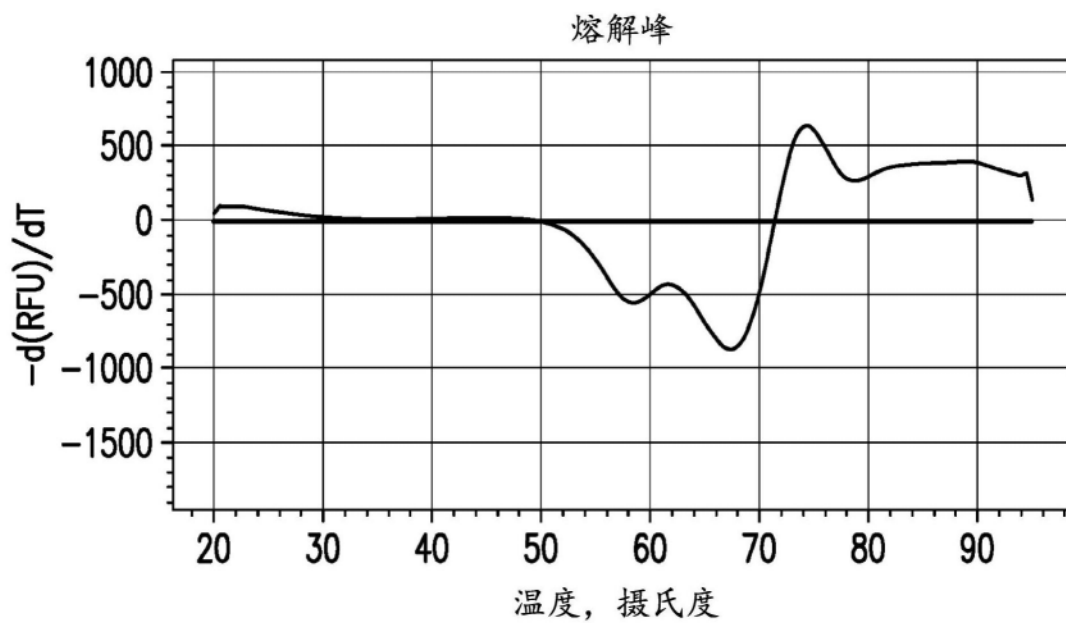


图6D

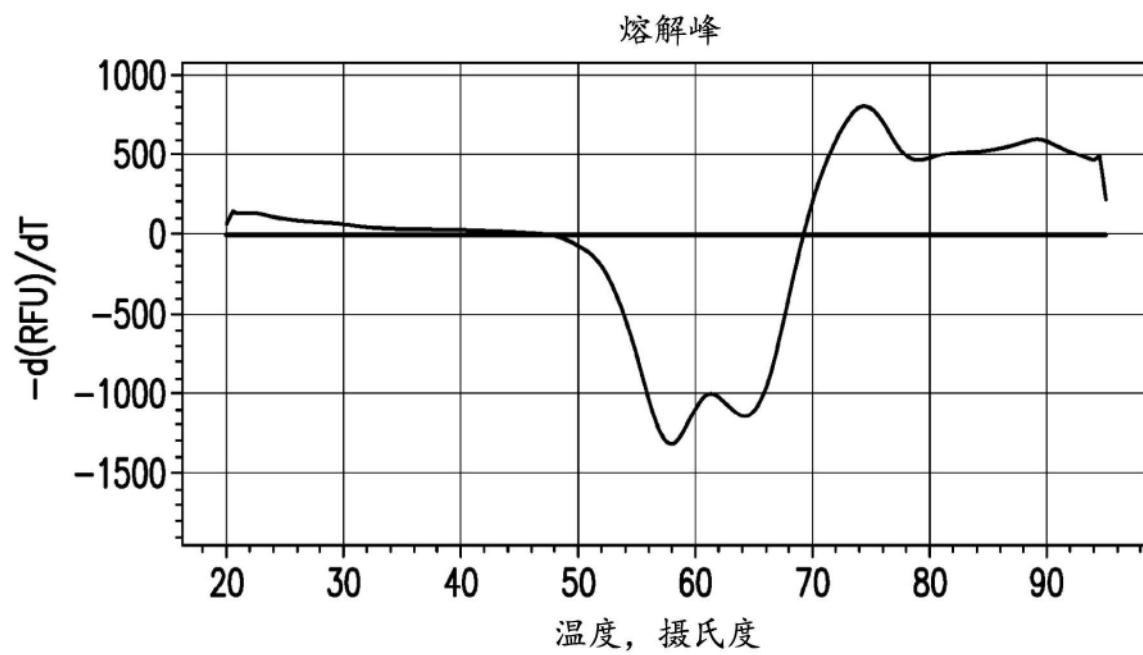


图6E

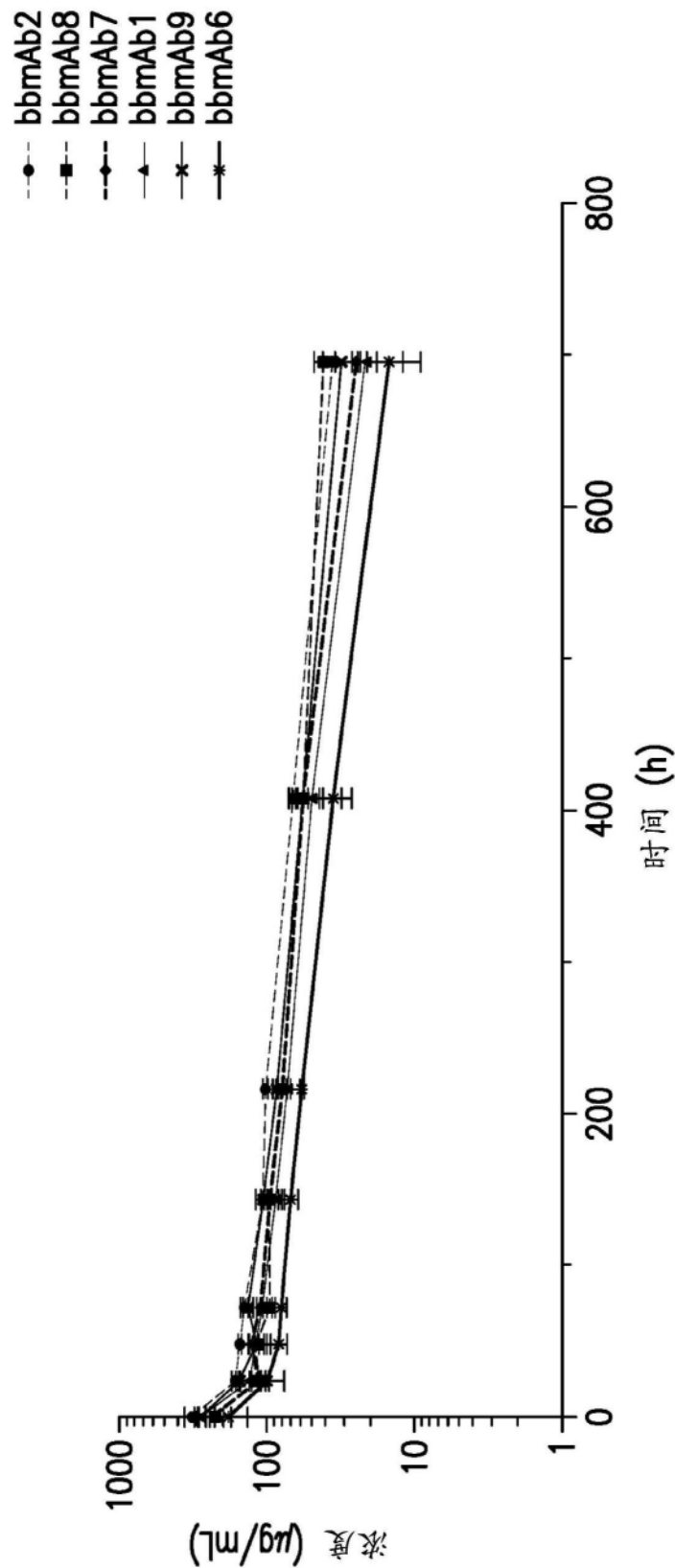


图7

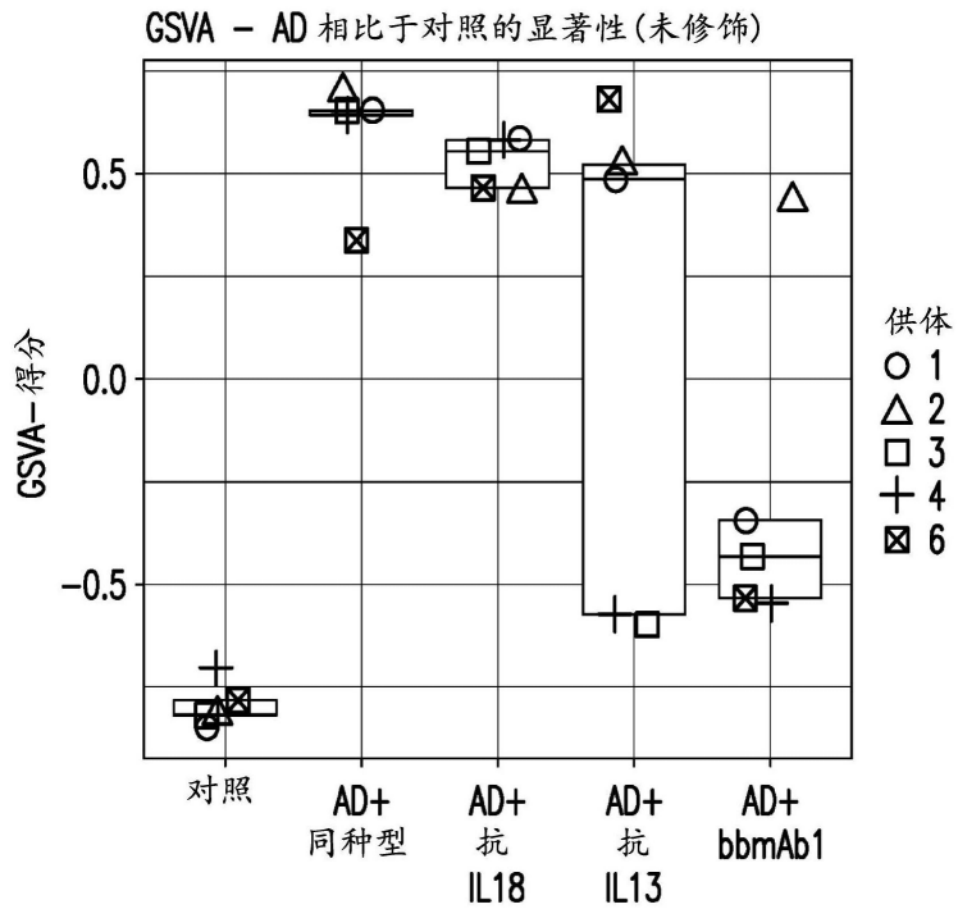


图8

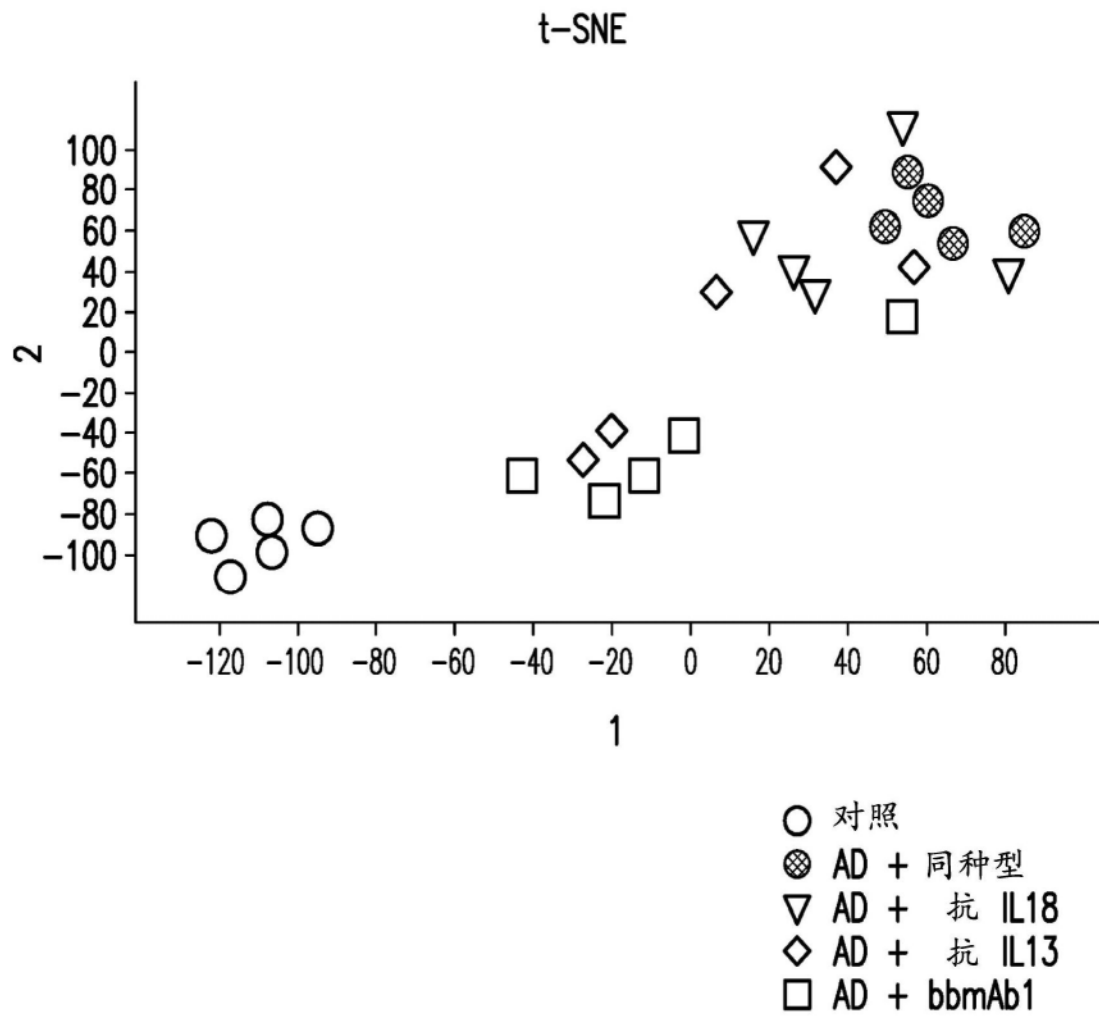


图9

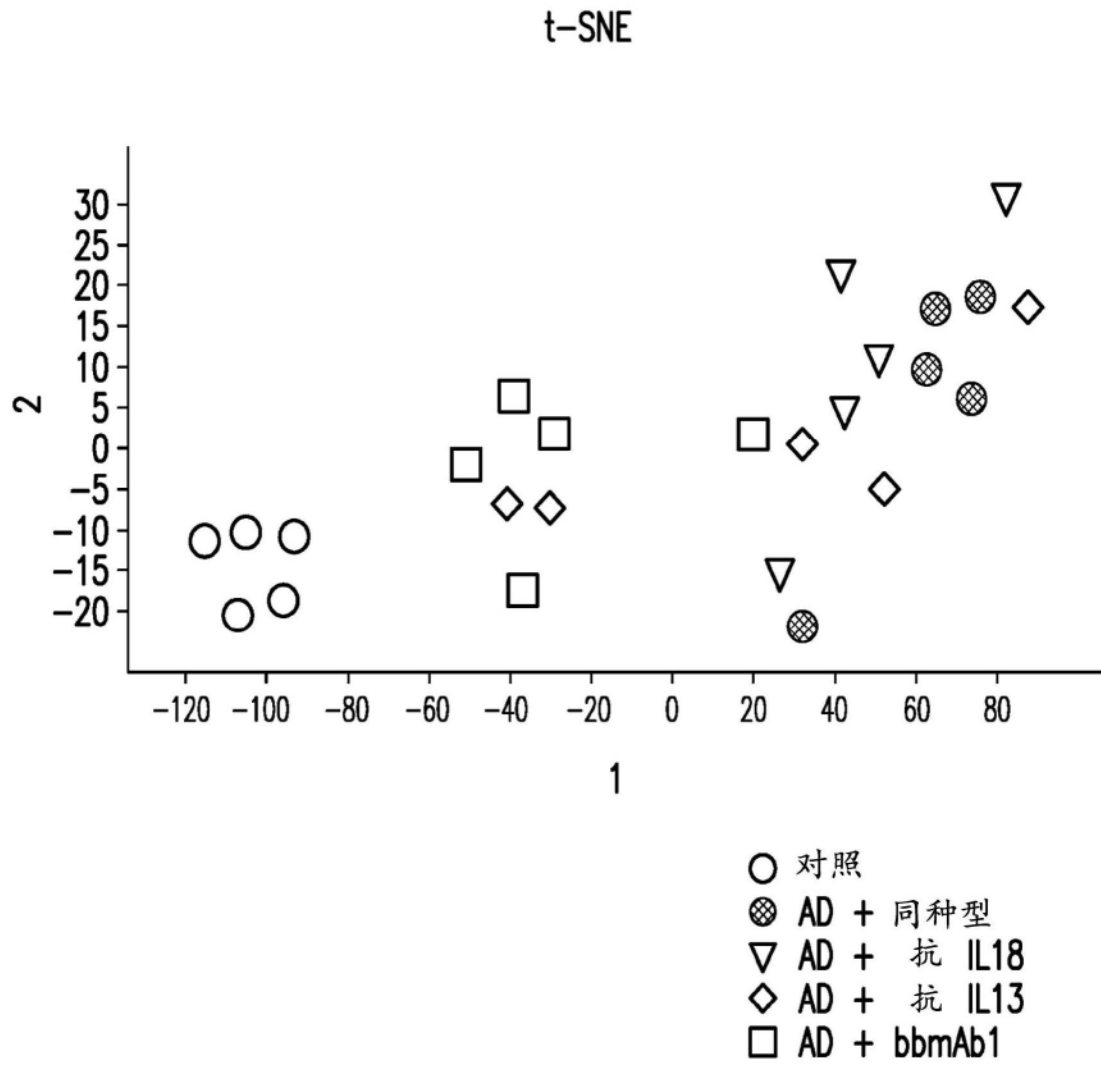


图10