



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I531377 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：101104102 (22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 02 月 08 日

(51)Int. Cl. : A61K39/395 (2006.01) A61P19/02 (2006.01)

(30)優先權：2011/02/08 美國 61/440,853

(71)申請人：艾伯維有限公司 (美國) ABBVIE INC. (US)
美國

(72)發明人：卡馬司 拉傑西 V KAMATH, RAJESH V. (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 7612181B2

NATURE BIOTECHNOLOGY, 25(11), Nov 2007, p.1290-1297

Nature Biotechnology, Mar. 2006, Vol. 8, No. 2, p. 1~14

審查人員：俞樹生

申請專利範圍項數：23 項 圖式數：19 共 259 頁

(54)名稱

骨關節炎及疼痛之治療

TREATMENT OF OSTEOARTHRITIS AND PAIN

(57)摘要

本發明係關於使用 IL-1 α 及 IL-1 β 結合蛋白(包括抗 IL-1 α 及抗 IL-1 β 抗體以及工程化多價及多特異性 IL-1 α 及 IL-1 β 結合蛋白)治療骨關節炎及疼痛。

The present invention relates to the treatment of osteoarthritis and pain using IL-1 α and IL-1 β binding proteins, including anti-IL-1 α and anti-IL-1 β antibodies and engineered multivalent and multispecific IL-1 α and IL-1 β binding proteins.

指定代表圖：

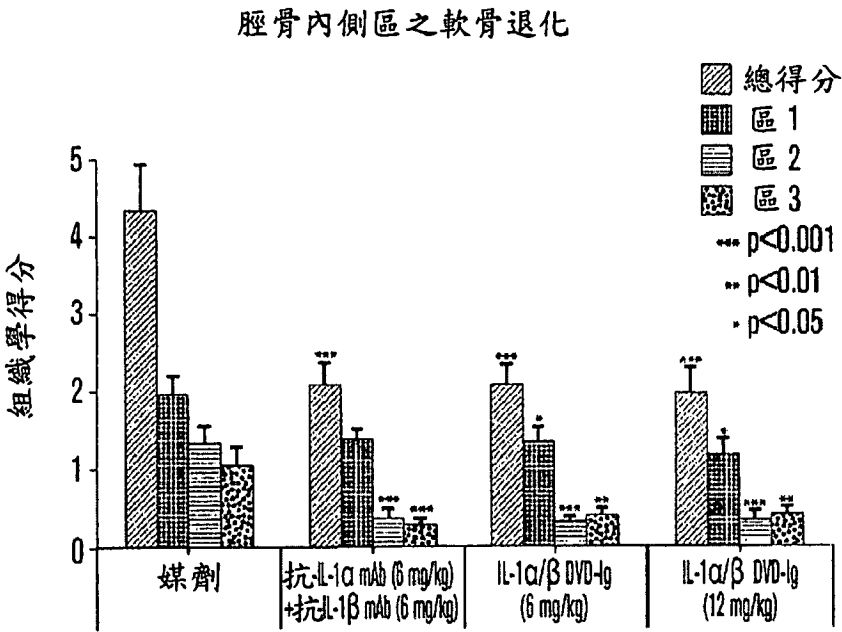


圖 3

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於骨關節炎及疼痛之治療，且更特定言之，係關於結合IL-1 α 及/或IL-1 β 之蛋白質治療骨關節炎及疼痛之用途。

相關申請案之交叉引用

本申請案主張2011年2月8日申請之美國臨時申請案第61/440,853號之優先權，該臨時申請案之全部內容係以引用的方式併入本文中。

【先前技術】

健康脊椎動物(包括人類及其他哺乳動物)之關節軟骨或「透明軟骨」為半透明的乳白色結締組織，以主要由蛋白聚糖、II型膠原蛋白及水構成之細胞外基質(ECM)中軟骨細胞之柱狀生長模式為特徵。關節軟骨提供有效重量承載緩衝墊以防止關節中對接骨之間的接觸，且因此對關節正常功能至關重要。關節軟骨不僅易受關節外傷損傷，而且易受逐步侵蝕過程損傷。最初，該侵蝕可僅為無症狀的「半層缺損(partial thickness defect)」，其中透明軟骨減少的區域並未完全穿透至軟骨下骨(subchondral bone)。該等半層缺損一般不疼且通常僅在關節鏡檢期間偵測出。然而，若不治療侵蝕過程，則半層缺損之基底可繼續磨損且缺損直徑可增加，使得該缺損最終發展為穿透下層骨之「全層缺損(full thickness defect)」。該等全層缺損可變得足夠大，使得關節對接骨表面接觸且開始彼此侵蝕，導

致炎症、疼痛及其他退行性病變，亦即骨關節炎(OA)之典型症狀。骨關節炎因此為導致關節變形、不穩定、損傷及疼痛之退行性、進行性及致殘疾病。最終，關節置換手術可為至少部分恢復個體一定活動程度的唯一切實可行之手段。

IL-1超家族由具有多種生物及生理效應之發炎過程之介體構成，該等生物及生理效應包括發熱、前列腺素合成(在例如纖維母細胞、肌細胞及內皮細胞中)、T淋巴細胞活化及介白素-2產生。IL-1超家族之原成員為IL-1 α 、IL-1 β 及IL-1受體拮抗劑(IL-1Ra、IL-1RA、IL-1ra、IL-1R α)。IL-1 α 及IL- β 為與針對感染之免疫防禦有關的促炎性細胞激素。IL-1R α 與IL-1 α 及IL-1 β 競爭結合受體，阻斷IL-1 α 及IL-1 β 在免疫活化中之作用。IL-1超家族之其他成員包括IL-18(參見Dinarello (1994) FASEB J. 8(15):1314-1325; Huising等人, (2004) Dev. Comp. Immunol. 28(5):395-413)及6個與IL-1 α 、IL-1 β 或IL-1RA具有結構同源性之附加基因，命名為IL1F5、IL1F6、IL1F7、IL1F8、IL1F9及IL1F10。為協調一致，IL-1 α 、IL-1 β 及IL-1RA已分別重命名為IL-1F1、IL-1F2及IL-1F3(參見Sims等人, (2001) Trends Immunol. 22(10):536-537; Dunn等人, (2001) Trends Immunol. 22(10):533-536)。已描述IL-1家族之另一稱為IL-33或IL-1F11之推定成員，但此名稱未被HGNC基因家族命名資料庫正式接受。

IL-1 α 及IL-1 β 兩者皆由巨噬細胞、單核細胞及樹突狀細

胞產生。其構成體內針對感染之發炎反應的重要部分。此等細胞激素增加內皮細胞上黏附因子之表現，以使白血球能夠轉移至感染部位且重設下丘腦體溫調節中樞，使體溫升高，其本身表現為發熱。因此，IL-1被稱為內源性熱原。體溫升高有助於身體免疫系統對抗感染。IL-1在調控血細胞生成方面同樣重要。外周組織中產生IL-1 β 亦與同發熱相關之痛覺過敏(疼痛敏感性增加)有關(Morgan等人, (2004) Brain Res. 1022(1-2):96-100)。IL-1上調與疼痛相關之環加氧酶-2(COX-2)的表現。在很大程度上，IL-1 α 及IL-1 β 結合於相同細胞受體。此受體由兩個相關但不相同的經由某些其他受體大部分共用的路徑傳輸胞內信號的次單位構成。其包括Toll家族之先天免疫受體及IL-18受體。IL-1 α 及IL-1 β 亦具有類似生物性質，包括誘導發熱、慢波睡眠及嗜中性白血球增多，T淋巴細胞及B淋巴細胞活化，纖維母細胞增殖，對某些細胞之細胞毒性，誘導膠原酶，合成肝臟急性期蛋白，及增加群落刺激因子及膠原蛋白之產生。

已分離並表現編碼IL-1 α 及IL-1 β 之cDNA；此等cDNA表示兩種不同基因產物，稱為IL-1 α (Lomedico等人, (1984) Nature 312:458)及IL-1 β (Auron等人, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7909)。8個介白素1家族基因在染色體2上形成細胞激素基因叢。IL-1 β 為由人類單核細胞在mRNA層面及蛋白質層面下產生的主要形式。兩種形式之人類IL-1僅享有26%之胺基酸同源性。儘管兩種形式之IL-1的

多肽序列不同，但其具有結構相似性(Auron等人, (1985) J. Mol. Cell Immunol. 2:169)，這是因為胺基酸同源性受限於IL-1分子之離散區域。

IL-1 α 及IL-1 β 以前驅肽形式產生。換言之，其係以長蛋白形式製得，隨後進行加工以釋放較短的活性分子，其被稱為成熟蛋白質。IL-1 α 以原蛋白形式產生，其由鈣蛋白酶經蛋白水解加工且以仍未充分研究的機制釋放。舉例而言，成熟IL-1 β 係由原IL-1 β 釋放，接著由稱為卡斯蛋白酶-1之卡斯蛋白酶家族蛋白質之某一成員或介白素-1轉化酶(ICE)裂解。人類IL-1超家族各成員之成熟形式之3維結構由12-14個 β 股構成，產生圓筒形蛋白質。

IL-1 α 因其在增加軟骨再吸收中之作用而最初被稱為「分解代謝產物」，且由於其對滑膜細胞中之膠原酶及前列腺素的刺激作用而亦被稱為「單核細胞細胞因子」(MCF)及因對急性期反應具有刺激作用而被稱為「白血球內源性因子」(LEM)。IL-1 α 具有許多生物學活性，這是因為IL-1 α 係由許多不同細胞合成，諸如單核細胞、巨噬細胞、纖維母細胞、內皮細胞及淋巴細胞，且許多細胞具有IL-1 α 之特異性受體。IL-1 α 藉由誘導IL-2釋放、B細胞成熟及增殖以及纖維母細胞生長因子活性來刺激胸腺細胞增殖。IL-1 α 蛋白已確定為內源性熱原且據報導刺激前列腺素及膠原酶自滑膜細胞釋放。因此，IL-1 α 亦作為各種病症及病症症狀之觸發物而佔據中心地位。此等病症通常為幾乎無或無治療方法之極嚴重病症。已提出，此等基因之

多形現象與類風濕性關節炎及阿茲海默氏病 (Alzheimer's disease) 相關。一般而言，IL-1 與許多人類疾病有關，包括關節炎、肺纖維化、中樞神經系統疾病、糖尿病及某些心血管疾病。IL-1 α 之不良作用描述於例如 Oppenheim 等人，(1986) *Immunol. Today* 7:45-56；Durum 等人，(1985) *Ann. Rev. Immunol.* 3:263-287 及 Symons 等人，(1989) *Lymphokine Res.* 8:365-372 中。

OA 之引發、維持及進展係由 IL-1 發揮關鍵作用之機械及生物化學路徑之複雜級聯所介導。IL-1 α 及 IL-1 β 不僅由單核細胞、巨噬細胞及嗜中性白血球產生，而且由關節組織中之細胞產生，諸如軟骨細胞、滑液纖維母細胞及破骨細胞 (參見例如 Dinarello 等人，(2009) *Ann. Rev. Immunol.* 27: 519-550)。活體外，IL-1 可刺激軟骨細胞及滑膜細胞產生與導致 OA 之軟骨破壞有關的蛋白酶類 (參見例如 Dayer 等人，(1977) *Science* 195: 181-183；Dayer 等人，(1984) *Biochem. Pharmacol.* 33: 2893-2899；McGuire-Goldring 等人，(1984) *Arthritis Rheum.* 27: 654-662)，以及抑制蛋白聚糖及 II 型膠原蛋白 (正常透明軟骨細胞外基質 (ECM) 之主要組分) 合成 (參見例如 Goldring 等人，(1987) *J. Biol. Chem.* 262: 16724-16729；Goldring 等人，(1988) *J. Clin. Investig.* 82: 2026-2037)。臨床前研究及臨床研究已提供 IL-1 在 OA 發病機制中之其他證據。舉例而言，將 IL-1 關節內 (ia) 注射至動物膝蓋中導致白血球浸潤及軟骨損失 (Pettiphar 等人，(1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8749-8753)。相比之

下，ia注射IL-1拮抗劑使實驗性OA之進展明顯減慢(參見例如 Pelletier 等人，(1997) *Arthritis Rheum.* 40: 1012-1019；Caron 等人，(1996) *Arthritis Rheum.* 39: 1535-1544)；Fernandes 等人，(1999) *Am. J. Pathol.* 154: 11590-11690)；Zhang 等人，(2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341: 202-208)。另外，發現IL-1基因剔除(KO)小鼠當與其野生型對應物相比時對手術誘發之軟骨損傷具有抗性(Glasson 等人，(2009) *Osteoarthritis Cartilage*, 18: 572-580)。

IL-1 α 及IL-1 β 兩者皆於人類OA患者之滑膜、軟骨及滑液中表現(參見例如 Farahat 等人，(1993) *Ann. Rheum. Dis.* 52: 870-875)。已證明IL-1拮抗劑阿那白滯素(Anakinra)(其為IL-1受體拮抗劑)及AMG-108(其為IL-1受體單株抗體)在OA試驗中關於症狀及軟骨保護的一些功效(「Results from a Randomized Controlled Trial of AMG 108 (a fully human monoclonal antibody to IL-1R type I) in Patients With Osteoarthritis of the Knee」Cohen 等人，ACR2007)。此等建議療法皆有待其他研究來證明清楚及穩固的臨床功效。

仍需要用於治療受骨關節炎困擾之個體的新穎且有效之方法及組合物。

【發明內容】

本發明提供用於治療骨關節炎(OA)及用於治療疼痛之方法。該等方法包含向個體(人類或其他哺乳動物)投與一或多種結合IL-1 α 及IL-1 β 之結合蛋白。

在本發明之一個態樣中，用於治療個體(人類或其他哺乳動物)之骨關節炎的方法包含以下步驟：向該個體投與結合IL-1 α 之結合蛋白以及(例如於混合物中、藉由連續投與或藉由同時投與)結合IL-1 β 之結合蛋白，或向該個體投與結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之結合蛋白。

在一個實施例中，用於治療個體之骨關節炎的方法包含向該個體投與結合IL-1 α 之結合蛋白，其中該結合蛋白為IL-1 α 之抗體，例如IL-1 α 之單株抗體。在另一實施例中，用於治療個體之骨關節炎的方法包含向該個體投與結合IL-1 β 之結合蛋白，其中該結合蛋白為結合IL-1 β 之抗體，例如結合IL-1 β 之單株抗體。

在本發明之另一態樣中，治療個體(人類或其他哺乳動物)之骨關節炎的方法包含以下步驟：向該個體投與結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之結合蛋白。該結合蛋白較佳為雙重可變域免疫球蛋白結合蛋白(在本文中亦稱為「DVD-IgTM」或「DVD-Ig」結合蛋白或分子)，其包含至少一個結合IL-1 α 之結合位點及至少一個結合IL-1 β 之結合位點。該DVD-Ig結合蛋白更佳包含兩個結合IL-1 α 之結合位點及兩個結合IL-1 β 之結合位點。

在另一實施例中，本發明之用於治療個體之骨關節炎的方法包含向該個體投與醫藥組合物，該醫藥組合物包含結合IL-1 α 之結合蛋白、結合IL-1 β 之結合蛋白、結合IL-1 α 之結合蛋白與結合IL-1 β 之結合蛋白的組合、或結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之結合蛋白；及醫藥學上可接受之載劑。

在本發明之一個實施例中，用於治療骨關節炎之方法包含向個體投與結合IL-1 α 之結晶結合蛋白及結合IL-1 β 之結晶結合蛋白，或結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之結晶結合蛋白。適用於本發明之該等結晶結合蛋白包括(但不限於)IL-1 α 之結晶抗體、IL-1 β 之結晶抗體及結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之結晶DVD-Ig結合蛋白。

適用於本發明之治療個體之骨關節炎之方法中的組合物包括釋放結合IL-1 α 之結晶結合蛋白、結合IL-1 β 之結晶結合蛋白、結合IL-1 α 之結晶結合蛋白與結合IL-1 β 之結晶結合蛋白的組合、或結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之結晶結合蛋白的組合物。

在一個實施例中，適用於本發明之治療骨關節炎之方法的組合物包含：

(a) 調配物，其中該調配物包含結合IL-1 α 之結晶結合蛋白、結合IL-1 β 之結晶結合蛋白、結合IL-1 α 之結晶結合蛋白與結合IL-1 β 之結晶結合蛋白兩者之組合、或結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之結晶結合蛋白；及視情況選用之成分；及

(b) 至少一種聚合載劑。

在一個實施例中，上述組合物包含結合IL-1 α 之結晶結合蛋白與結合IL-1 β 之結晶結合蛋白兩者之組合。在另一實施例中，結合IL-1 α 之結晶結合蛋白為結合IL-1 α 之結晶抗體，例如結晶單株抗體，且結合IL-1 β 之結晶結合蛋白為結合IL-1 β 之結晶抗體，例如單株抗體。

在一個實施例中，上述組合物包含結合IL-1 α 及IL-1 β 兩

者之結晶結合蛋白。在另一實施例中，該結晶結合蛋白為結合IL-1 α 及IL-1 β -Ig兩者之結晶雙重可變域(DVD-Ig)結合蛋白。

在另一實施例中，用於治療個體之骨關節炎的方法包含向該個體投與組合物，該組合物包含結合IL-1 α 之結晶結合蛋白、結合IL-1 β 之結晶結合蛋白、結合IL-1 α 之結晶結合蛋白與結合IL-1 β 之結晶結合蛋白兩者之組合、或結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之結晶結合蛋白；其中該至少一種聚合載劑為選自一或多種由以下組成之群之聚合物：聚(丙烯酸)、聚(氰基丙烯酸酯)、聚(胺基酸)、聚(酸酐)、聚(縮肽)、聚(酯)、聚(乳酸)、聚(乳酸-共-乙醇酸)或PLGA、聚(b-羥基丁酸酯)、聚(己內酯)、聚(二氧環己酮)、聚(乙二醇)、聚(羥丙基)甲基丙烯鹽胺、聚[(有機)磷腈(phosphazene)]、聚(原酸酯)、聚(乙烯醇)、聚(乙烯吡咯啉酮)、順丁烯二酸酐-烷基乙烯醚共聚物、普洛尼克多元醇(pluronic polyol)、白蛋白、海藻酸鹽、纖維素及纖維素衍生物、膠原蛋白、血纖維蛋白、明膠、玻尿酸、寡糖、糖胺基聚糖(glycaminoglycans)、硫酸化多糖、其摻合物及共聚物。

在一個實施例中，當視情況選用之成分存在於上述組合物中時，該成分係選自由白蛋白、蔗糖、海藻糖、乳糖醇、明膠、羥丙基- β -環糊精、甲氧基聚乙二醇及聚乙二醇組成之群。

在一個實施例中，上述治療骨關節炎之方法進一步包含

向該個體投與第二藥劑，其中該第二藥劑向該方法或該方法中所用之組合物提供另一所需性質。該第二藥劑可為由以下組成之群中之一或多種分子：布地奈德(budesonide)、表皮生長因子、皮質類固醇、環孢素、柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine)、胺基水楊酸鹽、6-巰基嘌呤、硫唑嘌呤、甲硝達唑(metronidazole)、脂肪加氧酶抑制劑、美沙拉嗪(mesalamine)、奧色拉嗪(olsalazine)、巴柳氮(balsalazide)、抗氧化劑、血栓素抑制劑、IL-1受體拮抗劑、抗IL-1 β 單株抗體、抗IL-6單株抗體、生長因子、彈性酶抑制劑、吡啶基-咪唑化合物；TNF、LT、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-18、IL-23、EMAP-II、GM-CSF、FGF及PDGF之抗體；CD2、CD3、CD4、CD8、CD-19、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90或其配位體之抗體；甲胺喋呤(methotrexate)、環孢素、FK506、雷帕黴素(rapamycin)、黴酚酸嗎啉乙酯(mycophenolate mofetil)、來氟米特(leflunomide)、NSAID、布洛芬(ibuprofen)、皮質類固醇、潑尼龍(prednisolone)、磷酸二酯酶抑制劑、腺苷促效劑、抗血栓劑、補體抑制劑、腎上腺素激導劑、IRAK、NIK、IKK、p38、MAP激酶抑制劑、IL-1 β 轉化酶抑制劑、TNF α 轉化酶抑制劑、T細胞信號傳導抑制劑、金屬蛋白酶抑制劑、柳氮磺胺吡啶、硫唑嘌呤、6-巰基嘌呤、血管緊張素轉化酶抑制劑、可溶性細胞激素受體、可溶性p55 TNF受體、可溶性p75 TNF受體、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R、抗發炎

細胞激素、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13及TGF β 。

在本發明之另一態樣中，本文所述之治療骨關節炎的方法包含藉由至少一種選自以下之模式向個體投與一或多種本文所述之結合蛋白或本文所述之組合物：非經腸、皮下、肌內、靜脈內、關節內、支氣管內、腹內、囊內、軟骨內、腔內、體腔內、小腦內、腦室內、結腸內、子宮頸內、胃內、肝內、心肌內、骨內、骨盆內、心包內、腹膜內、胸膜內、前列腺內、肺內、直腸內、腎內、視網膜內、脊椎內、滑膜內、胸內、子宮內、膀胱內、團式、陰道、直腸、頰內、舌下、鼻內及經皮。

在本發明之一個態樣中，用於治療個體(人類或其他哺乳動物)之疼痛的方法包含以下步驟：向該個體投與結合IL-1 α 之結合蛋白以及(例如於混合物中、藉由連續投與或藉由同時投與)結合IL-1 β 之結合蛋白，或向該個體投與結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之結合蛋白。

本發明之方法及組合物可用於治療具有任何疼痛形式之個體的疼痛，包括來自癌症之疼痛、神經病變性疼痛、肌肉疼痛、關節疼痛、骨折疼痛、創傷疼痛、來自手術之疼痛、頭痛、偏頭痛以及疼痛病狀，諸如異常疼痛(異常疼痛)、痛覺過敏及異常疼痛與痛覺過敏之組合。

在一個實施例中，用於治療個體之疼痛的方法包含向該個體投與結合IL-1 α 之結合蛋白，其中該結合蛋白為IL-1 α 之抗體，例如IL-1 α 之單株抗體。在另一實施例中，用於治療個體之疼痛的方法包含向該個體投與結合IL-1 β 之結

合蛋白，其中該結合蛋白為結合IL-1 β 之抗體，例如結合IL-1 β 之單株抗體。

在本發明之另一態樣中，治療個體之疼痛的方法包含以下步驟：向該個體投與結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之結合蛋白。該結合蛋白較佳為雙重可變域免疫球蛋白結合蛋白(在本文中亦稱為「DVD-Ig™」或「DVD-Ig」結合蛋白或分子)，其包含至少一個結合IL-1 α 之結合位點及至少一個結合IL-1 β 之結合位點。該DVD-Ig結合蛋白較佳包含兩個結合IL-1 α 之結合位點及兩個結合IL-1 β 之結合位點。

在另一實施例中，本發明之用於治療個體之疼痛的方法包含向該個體投與醫藥組合物，該醫藥組合物包含結合IL-1 α 之結合蛋白、結合IL-1 β 之結合蛋白、結合IL-1 α 之結合蛋白與結合IL-1 β 之結合蛋白的組合、或結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之結合蛋白；及醫藥學上可接受之載劑。

在本發明之一個實施例中，用於治療疼痛之方法包含向個體投與結合IL-1 α 之結晶結合蛋白及結合IL-1 β 之結晶結合蛋白，或結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之結晶結合蛋白。適用於本發明之該等結晶結合蛋白包括(但不限於)IL-1 α 之結晶抗體、IL-1 β 之結晶抗體及結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之結晶DVD-Ig結合蛋白。

適用於本發明之治療個體之疼痛之方法的組合物包括釋放結合IL-1 α 之結晶結合蛋白、結合IL-1 β 之結晶結合蛋白、結合IL-1 α 之結晶結合蛋白與結合IL-1 β 之結晶結合蛋白兩者之組合、或結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之結晶結合蛋白

的組合物。

在一個實施例中，適用於本發明之治療疼痛之方法的組合物包含：

(a) 調配物，其中該調配物包含結合IL-1 α 之結晶結合蛋白、結合IL-1 β 之結晶結合蛋白、結合IL-1 α 之結晶結合蛋白與結合IL-1 β 之結晶結合蛋白兩者之組合、或結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之結晶結合蛋白；及視情況選用之成分；及

(b) 至少一種聚合載劑。

在一個實施例中，上述組合物包含結合IL-1 α 之結晶結合蛋白與結合IL-1 β 之結晶結合蛋白兩者之組合。在另一實施例中，結合IL-1 α 之結晶結合蛋白為結合IL-1 α 之結晶抗體，例如結晶單株抗體，且結合IL-1 β 之結晶結合蛋白為結合IL-1 β 之結晶抗體，例如單株抗體。

在一個實施例中，上述組合物包含結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之結晶結合蛋白。在另一實施例中，該結晶結合蛋白為結合IL-1 α 及IL-1 β -Ig兩者之結晶雙重可變域(DVD-Ig)結合蛋白。

在另一實施例中，用於治療個體之疼痛的方法包含向該個體投與組合物，該組合物包含結合IL-1 α 之結晶結合蛋白、結合IL-1 β 之結晶結合蛋白、結合IL-1 α 之結晶結合蛋白與結合IL-1 β 之結晶結合蛋白兩者之組合、或結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之結晶結合蛋白；其中該至少一種聚合載劑為選自一或多種由以下組成之群之聚合物：聚(丙烯酸)、聚(氰基丙烯酸酯)、聚(胺基酸)、聚(酸酐)、聚(縮肽)、聚

(酯)、聚(乳酸)、聚(乳酸-共-乙醇酸)或PLGA、聚(b-羥基丁酸酯)、聚(己內酯)、聚(二氧環己酮)、聚(乙二醇)、聚(羥丙基)甲基丙烯醯胺、聚[(有機)磷腈]、聚(原酸酯)、聚(乙醇醇)、聚(乙烯吡咯啉酮)、順丁烯二酸酐-烷基乙烯醚共聚物、普洛尼克多元醇、白蛋白、海藻酸鹽、纖維素及纖維素衍生物、膠原蛋白、血纖維蛋白、明膠、玻尿酸、寡糖、糖胺基聚糖、硫酸化多糖、其摻合物及共聚物。

在一個實施例中，當視情況選用之成分存在於上述組合物中時，該成分係選自由白蛋白、蔗糖、海藻糖、乳糖醇、明膠、羥丙基- β -環糊精、甲氧基聚乙二醇及聚乙二醇組成之群。

在一個實施例中，上述治療疼痛之方法進一步包含向該個體投與第二藥劑，其中該第二藥劑向該方法或該方法中所用之組合物提供另一所需性質。該第二藥劑可為由以下組成之群中之一或多種分子：布地奈德、表皮生長因子、皮質類固醇、環孢素、柳氮磺胺吡啶、胺基水楊酸鹽、6-巯基嘌呤、硫唑嘌呤、甲硝達唑、脂肪加氧酶抑制劑、美沙拉嗪、奧色拉嗪、巴柳氮、抗氧化劑、血栓素抑制劑、IL-1受體拮抗劑、抗IL-1 β 單株抗體、抗IL-6單株抗體、生長因子、彈性酶抑制劑、吡啶基-咪唑化合物；TNF、LT、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-18、IL-23、EMAP-II、GM-CSF、FGF及PDGF之抗體；CD2、CD3、CD4、CD8、CD-19、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90或其配位體之抗體；

甲胺喋呤、環孢素、FK506、雷帕黴素、黴酚酸嗎啉乙酯、來氟米特、NSAID、布洛芬、皮質類固醇、潑尼龍、磷酸二酯酶抑制劑、腺苷促效劑、抗血栓劑、補體抑制劑、腎上腺素激導劑、IRAK、NIK、IKK、p38、MAP激酶抑制劑、IL-1 β 轉化酶抑制劑、TNF α 轉化酶抑制劑、T細胞信號傳導抑制劑、金屬蛋白酶抑制劑、柳氮磺胺吡啶、硫唑嘌呤、6-巰基嘌呤、血管緊張素轉化酶抑制劑、可溶性細胞激素受體、可溶性p55 TNF受體、可溶性p75 TNF受體、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R、抗發炎細胞激素、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13及TGF β 。

在本發明之另一態樣中，本文所述之治療疼痛的方法包含藉由至少一種選自以下之模式向個體投與一或多種本文所述之結合蛋白或本文所述之組合物：非經腸、皮下、肌肉內、靜脈內、關節內、支氣管內、腹內、囊內、軟骨內、腔內、體腔內、小腦內、腦室內、結腸內、子宮頸內、胃內、肝內、心肌內、骨內、骨盆內、心包內、腹膜內、胸膜內、前列腺內、肺內、直腸內、腎內、視網膜內、脊椎內、滑膜內、胸內、子宮內、膀胱內、團式、陰道、直腸、頰內、舌下、鼻內及經皮。

在另一實施例中，本發明提供一種治療罹患與IL-1表現相關之疾病或病症之個體之疼痛的方法。個體中之該IL-1表現可導致個體血漿及/或局部組織中IL-1含量升高。

在一個實施例中，本文所述之方法及組合物用以治療罹患選自包含以下之群之疾病或病症之個體的疼痛：骨關節

炎、類風濕性關節炎、青少年慢性關節炎、敗血性關節炎、萊姆關節炎(Lyme arthritis)、牛皮癬性關節炎、反應性關節炎、脊椎關節病、全身性紅斑狼瘡症、克羅恩氏病(Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎、發炎性腸病、胰島素依賴型糖尿病、甲狀腺炎、哮喘、過敏性疾病、牛皮癬、皮炎、硬皮病、移植物抗宿主疾病、器官移植排斥、與器官移植相關之急性或慢性免疫疾病、類肉瘤病、動脈粥樣硬化、瀰漫性血管內凝血、川崎氏病(Kawasaki's disease)、格雷氏病(Grave's disease)、腎病症候群、慢性疲勞症候群、韋格納氏肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)、亨-舒二氏紫癍(Henoch-Schoenlein purpura)、腎顯微性血管炎、慢性活動性肝炎、葡萄膜炎、敗血性休克、毒性休克症候群、敗血症候群、惡病質、傳染性疾病、寄生蟲病、急性橫貫性脊髓炎、亨廷頓氏舞蹈病(Huntington's chorea)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、阿茲海默氏病、中風、原發性膽汁性肝硬化、溶血性貧血、惡性病、心臟衰竭、心肌梗塞、阿狄森氏病(Addison's disease)、I型偶發性多腺體分泌不足症、II型多腺體分泌不足症(施密特氏症候群, Schmidt's syndrome)、成人(急性)呼吸窘迫症候群、脫髮、斑形脫髮、血清陰性關節病、關節病、萊特爾氏病(Reiter's disease)、牛皮癬性關節病、潰瘍性結腸炎性關節病、腸病性滑膜炎、衣原體相關關節病(*Chlamydia*-associated arthropathy)、耶氏桿菌相關關節病(*Yersinia*-associated arthropathy)、沙門氏菌相關關節病

(*Salmonella*-associated arthropathy)、脊椎關節病、動脈粥樣化疾病/動脈硬化、異位性過敏、自體免疫大疱病、尋常天疱瘡、葉狀天疱瘡、類天疱瘡、線狀IgA疾病、自體免疫溶血性貧血、庫姆氏陽性溶血性貧血(Coombs positive haemolytic anaemia)、後天性惡性貧血、青少年惡性貧血、肌痛腦炎/皇家自由疾病(Royal Free disease)、慢性皮膚黏膜念珠菌病、巨細胞性動脈炎、原發性硬化性肝炎、隱源性自體免疫肝炎、後天性免疫缺乏症候群、後天性免疫缺乏相關疾病、B型肝炎、C型肝炎、普通變異性免疫缺乏(普通變異性低 γ 球蛋白血症)、擴張型心肌病、女性不孕症、卵巢衰竭、卵巢早衰、纖維變性肺病、隱源性纖維化肺泡炎、發炎後間質肺病、間質肺炎、結締組織病相關間質肺病、混合性結締組織病相關肺病、全身性硬化症相關間質肺病、類風濕性關節炎相關間質肺病、全身性紅斑狼瘡症相關肺病、皮肌炎/多肌炎相關肺病、休格連氏病相關肺病(Sjögren's disease associated lung disease)、僵直性脊椎炎相關肺病、血管炎擴散性肺病、含鐵血黃素沈積症相關肺病、藥物誘發性間質肺病、纖維化、放射性纖維化、閉塞性細支氣管炎、慢性嗜伊紅血球性肺炎、淋巴球浸潤性肺病、感染後間質肺病、痛風性關節炎、自體免疫肝炎、1型自體免疫肝炎(經典自體免疫或類狼瘡肝炎)、2型自體免疫肝炎(抗LKM抗體肝炎)、自體免疫介導之低血糖症、B型胰島素抗性伴黑棘皮病、副甲狀腺低能症、與器官移植相關之急性免疫疾病、與器官移植相關之

慢性免疫疾病、骨關節炎、原發性硬化性膽管炎、1型牛皮癬、2型牛皮癬、特發性白血球減少症、自體免疫嗜中性球減少症、NOS型腎病、絲球體腎炎、腎顯微性血管炎、萊姆病(Lyme disease)、盤狀紅斑狼瘡、特發性或NOS型男性不育症、精子自體免疫性、多發性硬化症(所有亞型)、交感性眼炎、結締組織病繼發性肺高血壓、古巴士德氏症候群(Goodpasture's syndrome)、結節性多動脈炎之肺表現、急性風濕熱、類風濕性脊椎炎、斯蒂爾氏病(Still's disease)、全身性硬化症、休格連氏症候群、高安氏病(Takayasu's disease)/動脈炎、自體免疫血小板減少症、特發性血小板減少症、自體免疫性甲狀腺病、甲狀腺機能亢進、甲狀腺腫性自體免疫甲狀腺低能症(橋本氏病, Hashimoto's disease)、萎縮性自體免疫甲狀腺低能症、原發性黏液水腫、晶狀體源性葡萄膜炎、原發性脈管炎、白斑症、急性肝病、慢性肝病、酒精性肝硬化、酒精誘發性肝損傷、膽汁淤積、特應性肝病、藥物誘發性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、過敏症、B群鏈球菌(GBS)感染、精神障礙(例如抑鬱症及精神分裂症)、Th2型及Th1型介導之疾病、急性及慢性疼痛(不同疼痛形式)、癌症(諸如肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、結腸癌、胰臟癌、卵巢癌、前列腺癌及直腸癌及造血性惡性病(白血病及淋巴瘤))、無 β 脂蛋白血症、手足發紺、急性及慢性寄生或感染過程、急性白血病、急性淋巴母細胞白血病(ALL)、急性骨髓白血病(AML)、急性或慢性細菌感染、急性胰臟炎、急性腎

衰竭、腺癌、心房異位搏動、AIDS癡呆綜合症、酒精誘發性肝炎、過敏性結膜炎、過敏性接觸性皮炎、過敏性鼻炎、同種異體移植排斥、 α -1-抗胰蛋白酶缺乏、肌萎縮性側索硬化、貧血、心絞痛、前角細胞退化、抗CD3療法、抗磷脂症候群、抗受體過敏性反應、主動脈及周圍動脈動脈瘤、主動脈剝離、動脈高壓、動脈硬化、動靜脈瘻、共濟失調、心房纖維性顫動(持續性或突發性)、心房撲動、房室傳導阻滯、B細胞淋巴瘤、骨移植物排斥、骨髓移植(BMT)排斥、束支傳導阻滯、勃克氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、灼傷、心律不整、心臟頓抑症候群、心臟腫瘤、心肌病、心肺分流術發炎反應、軟骨移植排斥、小腦皮質退化、小腦病症、紊亂性或多灶性心房心動過速、化學療法相關病症、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性酒精中毒、慢性發炎性病變、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、慢性阻塞性肺病(COPD)、慢性水楊酸中毒、結腸直腸癌、充血性心臟衰竭、結膜炎、接觸性皮炎、肺心病、冠狀動脈疾病、庫賈氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)、培養物陰性敗血症、囊腫性纖維化、細胞激素療法相關病症、拳擊員癡呆、脫髓鞘病、出血性登革熱、皮炎、皮膚病、糖尿病、糖尿病性動脈硬化病、泛發性路易體疾病、擴張性充血型心肌病、基底神經節病症、中年人唐氏綜合症(Down's syndrome in middle age)、由阻斷CNS多巴胺受體之藥物誘發的藥物誘發性運動障礙、藥物過敏、濕疹、腦脊髓炎、心內膜炎、內分泌病、會厭炎、埃-巴二氏病毒

感染(Epstein-Barr virus infection)、紅斑性肢痛、錐體外
 及小腦病症、家族性噬血淋巴組織細胞瘤病、胎兒胸腺植
 入排斥、弗里德賴希氏共濟失調(Friedreich's ataxia)、功
 能性外周動脈障礙、真菌性敗血症、氣性壞疽、胃潰瘍、
 腎小球性腎炎、任何器官或組織之移植物排斥、革蘭氏陰
 性敗血症、革蘭氏陽性敗血症、胞內生物引起之肉芽腫、
 毛細胞白血病、哈勒沃登-施帕茨病(Hallervorden-Spatz
 disease)、橋本氏甲狀腺炎、花粉熱、心臟移植排斥、血
 色素沈著症、血液透析、溶血性尿毒症候群/血栓溶解性
 血小板減少性紫癜、出血、A型肝炎、希氏束心律失常
 (His bundle arrhythmias)、HIV感染/HIV神經病、霍奇金氏
 病(Hodgkin's disease)、過動性運動障礙、過敏性反應、過
 敏性肺炎、高血壓、運動機能減退性運動障礙、下丘腦-
 垂體-腎上腺軸評估、特發性阿狄森氏病、特發性肺纖維
 化、抗體介導之細胞毒性、衰弱、嬰兒脊髓性肌萎縮、主
 動脈發炎、A型流感、電離輻射暴露、虹膜睫狀體炎/葡萄
 膜炎/視神經炎、缺血-再灌注損傷、缺血性中風、青少年
 類風濕性關節炎、青少年脊髓性肌萎縮、卡波西氏肉瘤
 (Kaposi's sarcoma)、腎臟移植排斥、軍團菌病
 (legionella)、利什曼病(leishmaniasis)、麻風、皮質脊髓系
 統病變、脂性水腫、肝臟移植排斥、淋巴水腫、瘧疾、惡
 性淋巴瘤、惡性組織細胞病、惡性黑色素瘤、腦膜炎、腦
 膜炎球菌血症、代謝性偏頭痛、特發性偏頭痛、粒線體多
 系統病症、混合性結締組織病、單株 γ 球蛋白病、多發性

骨髓瘤、多系統退化(曼切、代哲因-托馬斯、史-德爾格及馬查多-約瑟夫(Menzel、Dejerine-Thomas、Shy-Drager及Machado-Joseph))、重症肌無力、細胞內鳥分枝桿菌、結核分枝桿菌、骨髓發育不良症候群、心肌梗塞、心肌缺血性病變、鼻咽癌、新生兒慢性肺病、腎炎、腎病、神經退化性疾病、神經性肌肉萎縮、中性白血球減少性發熱、非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、腹主動脈及其支脈閉塞、動脈閉塞性病變、OKT3®療法、睪丸炎/副睪炎、睪丸炎/輸精管重新接合術、器官腫大、骨質疏鬆症、胰臟移植排斥、胰臟癌、腫瘤相關症候群/惡性血鈣過多、甲狀旁腺移植排斥、盆腔炎、常年性鼻炎、心包疾病、外周動脈粥樣硬化病、外周血管性病變、腹膜炎、惡性貧血、卡氏肺囊蟲肺炎、肺炎、POEMS症候群(多發性神經病、器官腫大、內分泌病、單株 γ 球蛋白病及皮膚變化症候群)、灌注後症候群、泵後症候群、MI心切開術後症候群、子癇前症、進行性核上麻痺、原發性肺動脈高壓、放射療法、雷諾氏現象(Raynaud's phenomenon)、雷諾氏病、雷夫蘇姆氏病(Refsum's disease)、規則性窄波QRS心動過速、腎血管高血壓、再灌注損傷、限制性心肌病、肉瘤、老年性舞蹈病、路易體型老年癡呆症、血清陰性關節病、休克、鎌狀細胞貧血症、皮膚同種異體移植排斥、皮膚變化症候群、小腸移植排斥、實體腫瘤、特異性心律不整、脊髓性失調、脊髓小腦退化、鏈球菌性肌炎、小腦結構病變、亞急性硬化性全腦炎、昏厥、心血管系統

梅毒、全身過敏、全身性發炎反應症候群、全身發病型青少年類風濕性關節炎、T細胞或FAB ALL、毛細血管擴張、閉塞性血栓血管炎、血小板減少症、中毒、移植、創傷/出血、III型過敏性反應、IV型過敏症、不穩定型心絞痛、尿毒症、尿敗血病、蕁麻疹、心臟瓣膜病、靜脈曲張、脈管炎、靜脈疾病、靜脈血栓形成、心室纖維性顫動、病毒及真菌感染、病毒性腦炎/無菌性腦膜炎、病毒相關噬血細胞性症候群、韋尼克-科爾薩科夫症候群(Wernicke-Korsakoff syndrome)、威爾森氏病(Wilson's disease)、任何器官或組織之異種移植排斥、急性冠狀動脈症候群、急性特發性多發性神經炎、急性發炎性脫髓鞘多神經根神經病、急性局部缺血、成人斯蒂爾氏病、斑形脫髮、全身性過敏反應、抗磷脂抗體症候群、再生不全性貧血、動脈硬化、異位性濕疹、異位性皮炎、自體免疫性皮炎、與鏈球菌感染相關之自體免疫病症、自體免疫腸病、自體免疫聽力損失、自體免疫淋巴組織增生症候群(ALPS)、自體免疫心肌炎、自體免疫卵巢早衰、睪炎、支氣管擴張症、大皰性類天疱瘡、心血管疾病、災難性抗磷脂症候群、乳糜瀉、頸椎關節病、慢性局部缺血、瘢痕性類天疱瘡、有多發性硬化症風險之臨床單一症候群(CIS)、兒童期發病型精神障礙、慢性阻塞性肺病(COPD)、淚囊炎、皮膚炎、糖尿病性視網膜病、椎間盤突出症、椎間盤脫出症、藥物誘發型免疫性溶血性貧血、心內膜炎、子宮內膜異位、眼內炎、上鞏膜炎、多形性紅

斑、重症多形性紅斑、妊娠期類天疱瘡、格林-巴利症候群(Guillain-Barré syndrome, GBS)、花粉熱、休斯症候群(Hughes syndrome)、特發性帕金森氏病、特發性間質肺炎、IgE介導型過敏症、免疫性溶血性貧血、包涵體肌炎、感染性眼發炎症疾病、發炎症脫髓鞘病、發炎症心臟病、發炎症腎病、IPF/UIP、虹膜炎、角膜炎、乾燥性角結膜炎、庫氏病(Kussmaul disease)或庫-邁二氏病(Kussmaul-Meier disease)、蘭德里麻痺(Landry's paralysis)、朗格罕氏細胞組織細胞增生症(Langerhan's cell histiocytosis)、網狀青斑、黃斑變性、顯微性多血管炎、白赫鐵列夫症(Morbus Bechterev)、運動神經元病症、黏膜類天疱瘡、多重器官衰竭、重症肌無力、骨髓發育不良症候群、心肌炎、神經根病症、神經病、非A非B型肝炎、視神經炎、骨質溶解、卵巢癌、少關節型JRA、外周動脈閉塞性疾病(PAOD)、外周血管疾病(PVD)、外周動脈疾病(PAD)、靜脈炎、結節性多動脈炎(或結節性動脈周炎)、多軟骨炎、風濕性多肌痛、白髮症、多關節型JRA、多內分泌缺乏症候群、多肌炎、風濕性多肌痛(PMR)、泵後症候群、原發性帕金森氏病、前列腺癌及直腸癌及造血性惡性病(白血病及淋巴瘤)、前列腺炎、純紅血球發育不全、原發性腎上腺機能不全、復發性視神經脊髓炎、再狹窄、風濕性心臟病、SAPHO(滑膜炎、瘰癧、膿皰病、骨肥大及骨炎)、繼發性澱粉樣變性、休克肺、鞏膜炎、坐骨神經痛、繼發性腎上腺機能不全、聚矽氧相關結締組織

病、斯-威二氏皮膚病(Sneddon-Wilkinson dermatosis)、強直性脊柱炎、史蒂芬-瓊森症候群(Stevens-Johnson syndrome, SJS)、全身性發炎反應症候群、顱動脈炎、弓形蟲性視網膜炎、中毒性表皮壞死溶解、橫貫性脊髓炎、TRAPS(1型腫瘤壞死因子受體(TNFR)相關週期性症候群)、1型過敏反應、II型糖尿病、蕁麻疹、尋常間質肺炎(UIP)、脈管炎、春季結膜炎、病毒性視網膜炎、伏格特-小柳-原田三氏症候群(Vogt-Koyanagi-Harada syndrome, VKH症候群)、濕性黃斑變性及創傷癒合。

在一個實施例中，本文所述之方法及組合物用以治療患病個體之疼痛。如技術方案第16項之治療個體疼痛之方法，其中該個體罹患選自由以下組成之群之疾病：原發性癌、轉移性癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、肺癌、口咽癌、下咽癌、食道癌、胃癌、胰臟癌、肝癌、膽囊癌、膽管癌、小腸癌、結腸癌、泌尿道癌、腎癌、膀胱癌、尿道上皮癌、女性生殖道癌、子宮頸癌、子宮癌、卵巢癌、絨膜癌、妊娠滋養層病、男性生殖道癌、前列腺癌、精囊癌、睪丸癌、生殖細胞腫瘤、內分泌腺癌、甲狀腺癌、腎上腺癌、垂體腺癌、皮膚癌、血管瘤、黑色素瘤、肉瘤、骨癌、軟組織癌、卡波西氏肉瘤、腦腫瘤、神經癌、眼癌、腦膜癌、星形細胞瘤、神經膠質瘤、神經膠母細胞瘤、視網膜母細胞瘤、神經瘤、神經母細胞瘤、神經鞘瘤、腦膜瘤、由造血性惡性病引起之實體腫瘤、白血病、霍奇金氏淋巴瘤及非霍奇金氏淋巴瘤。

【實施方式】

本發明基於以下發現：阻斷介白素-1(IL-1)之功能可為治療個體(人類或其他哺乳動物)之骨關節炎(OA)的有效手段。根據本發明，為治療OA阻斷IL-1功能可藉由向個體投與一或多種結合IL-1 α 及IL-1 β 之蛋白質來達成。該「雙重特異性」療法可藉由向OA患者投與結合IL-1 α 之結合蛋白(例如抗體)及結合IL-1 β 之結合蛋白(例如抗體)或藉由投與結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之多價及多特異性結合蛋白來達成。適用於本發明之該多價及多特異性結合蛋白包括雙重可變域免疫球蛋白結合蛋白(在本文中亦稱為「DVD-Ig™」或「DVD-Ig」結合蛋白或分子)。參見例如PCT公開案第WO 2007/024715號及Wu等人，(2007) Nature Biotech. 25(11): 1290-1297。IL-1 α 結合蛋白與IL-1 β 結合蛋白之特定組合或結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之特異性DVD-Ig分子是否適用於治療OA可使用OA動物模型來評估，諸如OA之關節不穩定模型(JIM)或OA之內側半月板去穩定(DMM)模型(Glasson等人，(2007) Osteoarthritis. Cart. 15(9):1061-9)。

除非本文另外定義，否則與本發明關聯使用之科技術語應具有一般技術者通常所瞭解之含義。術語之含義及範疇應為明確的，然而若出現任何潛在的含義不明確，則本文所提供之定義優先於任何詞典或外來定義。另外，除非上下文另有需要，否則單數術語應包括複數且複數術語應包括單數。此外，使用術語「包括(including)」以及其他形式(諸如「包括(includes)」及「包括(included)」)並不具有

限制性。除非另外特別說明，否則諸如「元件」或「組分」之術語亦涵蓋包含一個單元之元件及組分及包含一個以上亞單元之元件及組分。

通常，與本文所述之細胞及組織培養、分子生物學、免疫學、微生物學、遺傳學、蛋白質及核酸化學及核酸雜交關聯使用之命名法及其技術為此項技術中熟知及常用之彼等命名法及技術。除非另外指示，否則本發明之方法及技術通常根據此項技術中熟知之習知方法且如各種通用及更特定參考文獻中所述執行，該等參考文獻貫穿本專利說明書中引用並討論。酶促反應及純化技術係根據製造商說明書、如此項技術中通常所完成或如本文中所述來執行。與本文中所述之分析化學、合成有機化學及醫藥與藥物化學關聯使用之命名法及其實驗室程序與技術為此項技術中熟知且常用之彼等命名法及實驗室程序與技術。對化學合成、化學分析、藥物製備、調配及傳遞以及患者之治療使用標準技術。

為了可更容易地理解本發明，選定術語定義如下。

術語「多肽」意謂胺基酸之任何聚合鏈。術語「肽」及「蛋白質」可與術語多肽互換使用且亦指胺基酸之聚合鏈。術語「多肽」涵蓋原生或人工蛋白質、蛋白質片段及蛋白質序列之多肽類似物。多肽可為單體或聚合體。

術語「分離之蛋白質」或「分離之多肽」意謂根據其衍生起源或來源而不與在其原生狀態下伴隨其之天然締合組分締合，實質上不含來自同一物種之其他蛋白質，由來自

不同物種之細胞表現，或自然界中不存在之蛋白質或多肽。因此，化學合成或在不同於其天然起源之細胞的細胞系統中合成之多肽將與其天然締合組分「分離」。亦可使用此項技術中熟知之蛋白質純化技術藉由分離使蛋白質實質上不含天然締合組分。

術語「回收」意謂藉由分離，例如使用此項技術中熟知之蛋白質純化技術使化學物質(諸如多肽)實質上不含天然締合組分之過程。

術語「人類IL-1 α 」(在本文中亦縮寫為「hIL-1 α 」或「IL-1 α 」)包括牽涉於各種免疫反應、發炎過程及血細胞生成中的多效性細胞激素。舉例而言，IL-1 α 包括由經活化之巨噬細胞所產生之人類細胞激素；其藉由誘導IL-2釋放、B細胞成熟及增殖以及纖維母細胞生長因子活性來刺激胸腺細胞增殖。術語「人類IL-1 α 」意欲包括可藉由標準重組表現方法製備之重組人類IL-1 α (「rh IL-1 α 」)。

術語「人類IL-1 β 」(在本文中亦縮寫為「hIL-1 β 」或「IL-1 β 」)包括牽涉於各種免疫反應、發炎過程及血細胞生成中的多效性細胞激素。術語「人類IL-1 β 」意欲包括可藉由標準重組表現方法製備之重組人類IL-1 β (「rh IL-1 β 」)。

人類IL-1 α 及IL-1 β 之胺基酸序列展示於表1中。

表 1：人類 IL-1 α 及 IL-1 β 之序列

蛋白質	序列識別符	序列
		123456789012345678901234567890
人類原IL-1 α	SEQ ID NO:1	MAKVPDMFEDLKNCYSENEEDSSSIDHL SLNQKSFYHVSYGPLHEGCMQSVSL SISSETS KTSKLTFKESMVV VATNGKVLKKRRLSLSQ SITDDDL EAIANDSEEEI IKPR SAPFSFLS NVKYNFMRIIKYEFILNDALNQ SIIIRANDQ YLTAAALHNL DEAVKFDMGAYKSSKDDAKI TVILRISK TQLYVTAQDEDQ PVLLKEMPEI PKTITGSET NLLFFWETHGTKNYFTSVAHP NLFIATKQDYWVCLAGGPPSI TDFQILENQ A
人類成熟IL-1 α	SEQ ID NO:1 之殘基113-271	SAPFSFLSNVKYNFMRIIKYEFILNDALNQ SIIIRANDQ YLTAAALHNLDEAVKFDMGAYK SSKDDAKITVILRISK TQLYVTAQDEDQPV LLKEMPEI PKTITGSETNLLFFWETHGTKN YFTSVAHPNLFIATKQDYWVCLAGGPPSIT DFQILENQA
人類成熟IL-1 β	SEQ ID NO:2	APVRS LNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALH LQGQDMEQQVVFMSFVQGEESNDKIPVAL GLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNY PKKKMEKR FVFNKIEINN KLEFESAQFPNW YISTSQ AENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQF VSS

術語「生物活性」係指細胞激素之所有固有生物學性質。IL-1 α 及 IL-1 β 之生物學性質包括(但不限於)結合於 IL-1 受體。

「生物活性」係指 IL-1 α 之所有固有生物學性質。IL-1 α 之生物學性質包括(但不限於)結合於 IL-1 α 受體；藉由誘導 IL-2 釋放、B 細胞成熟及增殖及纖維母細胞生長因子活性刺激胸腺細胞增殖。

關於抗體、蛋白質或肽與第二化學物質之相互作用的術語「特異性結合」意謂該相互作用視化學物質上之特定結構(例如抗原決定子或抗原決定基)的存在而定，例如抗體識別且結合於特異性蛋白質結構而非結合於一般蛋白質。若抗體對抗原決定基「A」具有特異性，則在含經標記「A」及該抗體之反應中含抗原決定基 A(或未經標記之游

離A)之分子的存在將減少結合該抗體之經標記A之量。

術語「抗體」廣泛指代包含四條多肽鏈(兩條重(H)鏈及兩條輕(L)鏈)之任何免疫球蛋白(Ig)分子，或其保留Ig分子之基本抗原決定基結合特徵之任何功能性片段、突變體、變異體或衍生物。該等突變體、變異體或衍生物抗體形式為此項技術中已知，其非限制性實施例討論如下。

在全長抗體中，每一重鏈包含重鏈可變區(本文中縮寫為HCVR或VH)及重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個結構域，即CH1、CH2及CH3。每一輕鏈包含輕鏈可變區(本文中縮寫為LCVR或VL)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個結構域CL。VH區及VL區可進一步再分為高變區(稱為互補決定區(CDR))，其間穿插有較保守區(稱為構架區(FR))。每一VH及VL係由三個CDR及四個FR構成，自胺基端至羧基端按以下順序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫球蛋白分子可為任何類型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、任何種類(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或子類。

術語抗體之「抗原結合部分」係指保留特異性結合於抗原(例如hIL-1 α)之能力之一或多個抗體片段。抗體之抗原結合功能可由全長抗體之片段進行。該等抗體實施例亦可具有雙特異性、雙重特異性或多特異性形式；特異性結合於兩種或兩種以上不同抗原。涵蓋於術語抗體之「抗原結合部分」內之結合片段之實例包括(i)Fab片段，其為由VL、VH、CL及CH1結構域組成之單價片段；(ii)F(ab')₂片

段，其為包含由在鉸鏈區之二硫橋連接之兩個Fab片段的二價片段；(iii)由VH及CH1結構域組成之Fd片段；(iv)由抗體之單臂之VL及VH結構域組成之Fv片段；(v)包含單一可變域之dAb片段(Ward等人，1989 Nature 341:544-546，PCT公開案第WO 90/05144號)；及(vi)經分離之互補決定區(CDR)。此外，儘管Fv片段之兩個結構域(VL及VH)由各別基因編碼，但其可使用重組法由合成連接子接合，該連接子能夠使其成為其中VL及VH區配對以形成單價分子之單蛋白鏈(稱為單鏈Fv(scFv)；參見例如Bird等人，(1988) Science 242:423-426；及Huston等人，(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。該等單鏈抗體(scFv)亦意欲涵蓋於術語抗體之「抗原結合部分」內。亦涵蓋單鏈抗體之其他形式，諸如雙功能抗體。雙功能抗體為二價雙特异性抗體，其中VH及VL結構域於單一多肽鏈上表現，但使用過短以致不允許同一鏈上之兩個結構域之間配對的連接子，由此迫使該等結構域與另一鏈之互補域配對且建置兩個抗原結合位點(參見例如Holliger等人，(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448；Poljak等人，(1994) Structure 2:1121-1123)。該等抗體結合部分為此項技術中已知(Kontermann及Dübel編，**Antibody Engineering** (Springer-Verlag, New York, 2001) (ISBN 3-540-41354-5))。

術語「抗體構築體」係指包含一或多個連接於連接子多肽或免疫球蛋白恆定域上之本發明之抗原結合部分的多

肽。連接子多肽包含兩個或兩個以上由肽鍵接合之胺基酸殘基且用於連接一或多個抗原結合部分。該等連接子多肽為此項技術中所熟知(參見例如 Holliger 等人, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 ; Poljak 等人, (1994) Structure 2:1121-1123)。免疫球蛋白恆定域係指重鏈或輕鏈恆定域。人類 IgG 重鏈(γ)及輕鏈(κ 及 λ)恆定域胺基酸序列為此項技術中已知及表示於表 2 中。

表 2：人類 IgG 重鏈恆定域及輕鏈恆定域之序列

蛋白質	序列識別符	序列
		123456789012345678901234567890
Ig γ -1 恆定區	SEQ ID NO:3	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVHLQDNLGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Ig γ -1 恆定區突變體	SEQ ID NO:4	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVHLQDNLGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Ig κ 恆定區	SEQ ID NO:5	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
Ig λ 恆定區	SEQ ID NO:6	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS

此外，抗體或其抗原結合部分可為藉由抗體或其抗原結合部分與一或多種其他蛋白質或肽共價或非共價締合所形成的較大免疫黏附分子之一部分。該等免疫黏附分子之實

例包括使用抗生蛋白鏈菌素核心區製備四聚scFv分子(Kipriyanov, S.等人, (1995) Human Antibod. Hybridomas 6:93-101)及使用半胱胺酸殘基、標記肽及C端聚組胺酸標籤製備生物素標記之二價scFv分子(Kipriyanov, S.等人, (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058)。抗體之抗原結合部分(諸如Fab及F(ab')₂片段)可使用全抗體之諸如相應木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化之習知技術,由全抗體製備。此外,如本文所述,可使用標準重組DNA技術獲得抗體、其抗原結合部分及免疫黏附分子。

「分離之抗體」係指實質上不含具有不同抗原特異性之其他抗體的抗體(例如特異性結合hIL-1 α 之分離之抗體實質上不含特異性結合除hIL-1 α 以外之抗原的抗體)。然而,特異性結合hIL-1 α 之分離之抗體可對其他抗原(諸如其他物種之IL-1 α 分子)具有交叉反應性。此外,分離之抗體可實質上不含其他細胞物質及/或化學物質。

術語「人類抗體」包括具有來源於人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區的抗體。本發明之人類抗體可例如在CDR中且尤其在CDR3中包括不由人類生殖系免疫球蛋白序列編碼之胺基酸殘基(例如,藉由活體外隨機或定點突變誘發或藉由活體內體細胞突變引入之突變)。然而,術語「人類抗體」不包括來源於另一哺乳動物物種(諸如小鼠)之生殖系的CDR序列已移植至人類構架序列上之抗體。

術語「重組人類抗體」包括所有經由重組方式製備、表

現、產生或分離之人類抗體，諸如使用轉染至宿主細胞中之重組表現載體所表現之抗體(進一步描述於下文章節II C中)，自重組組合型人類抗體文庫分離之抗體(Hoogenboom, H. (1997) Trends Biotechnol. 15: 62-70；Azzazy及Highsmith (2002) Clin. Biochem. 35: 425-445；Gavilondo及Larrick (2000) BioTechniques 29:128-145；Hoogenboom及Chames (2000) Immunol. Today 21: 371-378)，自人類免疫球蛋白基因之轉殖基因動物(例如小鼠)分離之抗體(參見例如Taylor等人，(1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295；Kellermann及Green (2002) Curr. Opin. Biotechnol. 13: 593-597；Little等人，(2000) Immunol. Today 21:364-370)，或藉由包含剪接人類免疫球蛋白基因序列至其他DNA序列之任何其他方式製備、表現、產生或分離之抗體。該等重組人類抗體具有來源於人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區。然而，在某些實施例中，該等重組人類抗體經受活體外突變誘發(或當使用人類Ig序列之轉殖基因動物時，經受活體內體細胞突變誘發)且因此，重組抗體之VH及VL區之胺基酸序列為雖然來源於人類生殖系VH及VL序列且與其相關但可能不天然存在於活體內人類抗體生殖系譜系中的序列。

術語「嵌合抗體」係指包含來自一個物種之重鏈及輕鏈可變區序列及來自另一物種之恆定區序列的抗體，諸如具有與人類恆定區連接之鼠類重鏈及輕鏈可變區的抗體。

術語「CDR移植抗體」係指包含來自一個物種之重鏈及

輕鏈可變區序列但其中VH及/或VL區之一或多個CDR區的序列經另一物種之CDR序列置換的抗體，諸如具有人類重鏈及輕鏈可變區且其中一或多個人類CDR(例如CDR3)已經鼠類CDR序列(例如，如自人類IL-1 α 之鼠類單株抗體獲得)置換之抗體。

如本文所用，術語「CDR」係指抗體可變序列內之互補決定區。重鏈及輕鏈可變區之每一者中存在三個CDR，對於每一可變區，該等CDR命名為CDR1、CDR2及CDR3。如本文所用之術語「CDR集合」係指存在於抗原結合位點之單個可變區(亦即VH或VL)中的一組三個CDR。該等CDR之確切邊界已根據不同系統不同地加以定義。由Kabat(Kabat等人, (1987, 1991) **Sequences of Proteins of Immunological Interest** (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland)描述之系統不僅提供適用於抗體任何可變區之明確殘基編號系統，而且提供定義三個CDR之確切殘基邊界。該等CDR可稱為Kabat CDR。Chothia及合作者(Chothia及Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917及Chothia等人, (1989) Nature 342: 877-883)發現Kabat CDR內之某些子部分儘管在胺基酸序列層面上具有巨大多樣性，但採用幾乎相同的肽骨架構形。此等子部分命名為L1、L2及L3或H1、H2及H3，其中「L」及「H」分別表示輕鏈區及重鏈區。該等區域可稱為Chothia CDR，其具有與Kabat CDR重疊之邊界。其他定義與Kabat CDR重疊之CDR之邊界已由Padlan等人, (1995) FASEB J. 9: 133-139及

MacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262(5): 732-745描述。其他CDR邊界定義可能不嚴格遵循以上系統中之一者，但仍會與Kabat CDR重疊，即使根據特定殘基或殘基群或甚至整個CDR不顯著影響抗原結合之預測或實驗研究結果其可能縮短或延長。本文中所用之方法可利用根據此等系統中之任一者所定義之CDR，但某些實施例使用Kabat或Chothia定義之CDR。

術語「Kabat編號」、「Kabat定義」及「Kabat標記」在本文中可互換使用。此等術語係指在抗體或其抗原結合部分之重鏈及輕鏈可變區中比其他胺基酸殘基更可變(亦即高變)的胺基酸殘基編號系統(Kabat等人, (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391及Kabat, E.等人, (1991) **Sequences of Proteins of Immunological Interest**, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH公開號91-3242)。對於重鏈可變區，高變區範圍為CDR1之胺基酸位置31至35、CDR2之胺基酸位置50至65及CDR3之胺基酸位置95至102。對於輕鏈可變區，高變區範圍為CDR1之胺基酸位置24至34、CDR2之胺基酸位置50至56及CDR3之胺基酸位置89至97。

在過去二十年間關於可變重鏈及輕鏈區之胺基酸序列之廣泛公共資料庫的成長及分析使得可瞭解可變區序列內構架區(FR)與CDR序列之間的典型邊界且使得熟習此項技術者能夠根據Kabat編號、Chothia編號或其他系統精確確定CDR。參見例如Martin, 「Protein Sequence and Structure

Analysis of Antibody Variable Domains,」 Kontermann及
Dübel, 編, **Antibody Engineering** (Springer-Verlag, Berlin,
2001), 第31章, 第432-433頁。測定可變重鏈區(VH)及可
變輕鏈區(VL)胺基酸序列內Kabat CDR之胺基酸序列的適
用方法提供如下：

鑑別CDR-L1胺基酸序列：

自VL區之胺基端約24個胺基酸殘基處起始；

CDR-L1序列前之殘基總為半胱胺酸(C)；

CDR-L1序列後之殘基總為色胺酸(W)殘基，通常為Trp-
Tyr-Gln(W-Y-Q)，但亦可為Trp-Leu-Gln(W-L-Q)、Trp-
Phe-Gln(W-F-Q)及Trp-Tyr-Leu(W-Y-L)；

長度通常為10至17個胺基酸殘基。

鑑別CDR-L2胺基酸序列：

總在CDR-L1末端後16個殘基處起始；

CDR-L2序列前之殘基一般為Ile-Tyr(I-Y)，但亦可為
Val-Tyr(V-Y)、Ile-Lys(I-K)及Ile-Phe(I-F)；

長度總為7個胺基酸殘基。

鑑別CDR-L3胺基酸序列：

總在CDR-L2末端後33個胺基酸處起始；

CDR-L3胺基酸序列前之殘基總為半胱胺酸(C)；

CDR-L3序列後之殘基總為Phe-Gly-X-Gly(F-G-X-
G)(SEQ ID NO: 7)，其中X為任何胺基酸；

長度通常為7至11個胺基酸殘基。

鑑別CDR-H1胺基酸序列：

自 VH 區之胺基端約 31 個胺基酸殘基處起始且半胱胺酸 (C) 後總為 9 個殘基；

CDR-H1 序列前之殘基總為 Cys-X-X-X-X-X-X-X (SEQ ID NO: 151)，其中 X 為任何胺基酸；

CDR-H1 序列後之殘基總為 Trp(W)，通常為 Trp-Val(W-V)，但亦可為 Trp-Ile(W-I) 及 Trp-Ala(W-A)；

長度通常為 5 至 7 個胺基酸殘基。

鑑別 CDR-H2 胺基酸序列：

總在 CDR-H1 末端後 15 個胺基酸殘基處起始；

CDR-H2 序列前之殘基通常為 Leu-Glu-Trp-Ile-Gly(L-E-W-I-G) (SEQ ID NO: 8)，但亦可為其他變化形式；

CDR-H2 序列後之殘基為 Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala(K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A)；

長度通常為 16 至 19 個胺基酸殘基。

鑑別 CDR-H3 胺基酸序列：

總在 CDR-H2 末端後 33 個胺基酸殘基處起始且在半胱胺酸 (C)' 後總為 3 個胺基酸殘基；

CDR-H3 序列前之殘基總為 Cys-X-X(C-X-X)，其中 X 為任何胺基酸，通常為 Cys-Ala-Arg(C-A-R)；

CDR-H3 序列後之殘基總為 Trp-Gly-X-Gly(W-G-X-G) (SEQ ID NO: 9)，其中 X 為任何胺基酸；

長度通常為 3 至 25 個胺基酸殘基。

如本文所用之術語「受體」及「受體抗體」係指提供或編碼一或多個構架區之至少 80%、至少 85%、至少 90%、

至少95%、至少98%或100%之胺基酸序列的抗體或核酸序列。在一些實施例中，術語「受體」係指提供或編碼恆定區之抗體胺基酸或核酸序列。在另一實施例中，術語「受體」係指提供或編碼一或多個構架區及恆定區之抗體胺基酸或核酸序列。在一特定實施例中，術語「受體」係指提供或編碼一或多個構架區之至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%胺基酸序列的人類抗體胺基酸或核酸序列。根據該實施例，受體可含有至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個或至少10個不出現於人類抗體之一或多個特定位置處之胺基酸殘基。受體構架區及/或受體恆定區可例如源自或獲自生殖系抗體基因、成熟抗體基因、功能抗體(例如此項技術中熟知之抗體、處於開發中之抗體或市售抗體)。

如本文所用，術語「典型」殘基係指定義如Chothia等人，(1987) J. Mol. Biol. 196:901-917及Chothia等人，(1992) J. Mol. Biol. 227:799-817所定義之特定典型CDR結構之CDR或構架中的殘基。根據Chothia等人，許多抗體之CDR之關鍵部分即使在胺基酸序列層面上具有巨大多樣性，亦具有幾乎相同的肽骨架構形。每一典型結構基本上指定一組使胺基酸殘基之鄰接區段形成環之肽骨架构扭轉角。

如本文所用，術語「供體」及「供體抗體」係指提供一或多個CDR之抗體。在一個實施例中，供體抗體為來自不同於獲得或產生構架區之抗體的物種之抗體。在人類化抗體之情況下，術語「供體抗體」係指提供一或多個CDR之

非人類抗體。

如本文所用，術語「構架」或「構架序列」係指可變區減去CDR之剩餘序列。因為CDR序列之確切定義可由不同系統確定，所以架構序列之含義遵循相應的不同解釋。六個CDR(輕鏈之CDR-L1、-L2及-L3以及重鏈之CDR-H1、-H2及-H3)亦將輕鏈及重鏈上之構架區在每一鏈上分成四個亞區(FR1、FR2、FR3及FR4)，其中CDR1位於FR1與FR2之間，CDR2位於FR2與FR3之間，且CDR3位於FR3與FR4之間。在不將特定亞區指定為FR1、FR2、FR3或FR4之情況下，構架區當以其他名稱提及時代表天然存在之單一免疫球蛋白鏈之可變區中之組合FR's。如本文所用，FR代表四個亞區中之一個，且FRs代表構成構架區之四個亞區中之兩個或兩個以上亞區。

人類重鏈及輕鏈受體序列為此項技術所知。在本發明之一個實施例中，人類重鏈及輕鏈受體序列選自表3及表4中所述之序列。

表3：重鏈受體序列

SEQ ID No.	蛋白質區	序列
		123456789012345678901234567890
10	VH2-70/JH6 FR1	EVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLS
11	VH2-70/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
12	VH2-70/JH6 FR3	RLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCAR
13	VH2-70/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
14	VH2-26/JH6 FR1	EVTLKESGPVLVKPTETLTLCTVSGFSLS
15	VH2-26/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
16	VH2-26/JH6 FR3	RLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCAR
17	VH2-26/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
18	VH3-72/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS

SEQ ID No.	蛋白質區	序列
		1234567890123456789012 34567890
19	VH3-72/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVG
20	VH3-72/JH6 FR3	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKT EDTAVYYC AR
21	VH3-72/JH6 FR4	WGQGT TVTVSS
22	VH3-21/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
23	VH3-21/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
24	VH3-21/JH6 FR3	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYC AR
25	VH3-21/JH6 FR4	WGQGT TVTVSS
26	VH1-69/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFS
27	VH1-69/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
28	VH1-69/JH6 FR3	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC AR
29	VH1-69/JH6 FR4	WGQGT TVTVSS
30	VH1-18/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFT
31	VH1-18/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
32	VH1-18/JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC AR
33	VH1-18/JH6 FR4	WGQGT TVTVSS
34	VH7-4.1/JH6 FR1	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSC KASGYTFT
35	VH7-4.1/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
36	VH7-4.1/JH6 FR3	RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAE DTAVYYC AR
37	VH7-4.1/JH6 FR4	WGQGT TVTVSS

表 4：輕鏈受體序列

SEQ ID No.	蛋白質區	序列
		1234567890123456789012 34567890
38	B3/JK4 FR1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
39	B3/JK4 FR2	WYQQKPGQP PKLLIY
40	B3/JK4 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YC
41	B3/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
42	L2/JK4 FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
43	L2/JK4 FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
44	L2/JK4 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVY YC
45	L2/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
46	L15/JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC
47	L15/JK4 FR2	WYQQKPEKAPKSLIY
48	L15/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YC
49	L15/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
50	L5/JK4 FR1	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC
51	L5/JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
52	L5/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YC
53	L5/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR

SEQ ID No.	蛋白質區	序列
		123456789012345678901234567890
54	1-33/018/JK2 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
55	1-33/018/JK2 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
56	1-33/018/JK2 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATY YC
57	1-33/018/JK2 FR4	FGQGTKLEIKR
58	1-33/018/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR

如本文所用，術語「生殖系抗體基因」或「基因片段」係指由未經受導致便於表現特定免疫球蛋白之遺傳重排及突變之成熟過程的非淋巴樣細胞編碼之免疫球蛋白序列(參見例如 Shapiro 等人, (2002) Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200; Marchalonis 等人, (2001) Adv. Exp. Med. Biol. 484:13-30)。本發明之各個實施例所提供之一個優勢係基於如下認知：生殖系抗體基因比成熟抗體基因更可能保留物種中個體之必需胺基酸序列結構特徵，因此當用於治療該物種時，不太可能識別為來自外來來源。

如本文所用，術語「關鍵」殘基係指對抗體(尤其人類化抗體)之結合特異性及/或親和力具有較大影響的可變區內之某些殘基。關鍵殘基包括(但不限於)以下一或多者：與 CDR 相鄰之殘基、潛在糖基化位點(可為 N-糖基化位點或 O-糖基化位點)、稀有殘基、能夠與抗原相互作用之殘基、能夠與 CDR 相互作用之殘基、典型殘基、介於重鏈可變區與輕鏈可變區之間的接觸殘基、游標區(Vernier zone)內之殘基及在可變重鏈 CDR1 之 Chothia 定義與第一重鏈構架之 Kabat 定義之間重疊的區域中之殘基。

術語「人類化抗體」係指包含來自非人類物種(例如小鼠)之重鏈及輕鏈可變區序列但其中 VH 及/或 VL 序列中之

至少一部分已改變為更加「人類樣」，亦即與人類生殖系可變序列更相似的抗體。一種類型之人類化抗體為CDR移植抗體，其中將非人類CDR序列引入人類VH及VL序列中以置換相應非人類架構(FR)序列。舉例而言，「人類化抗體」為免疫特異性結合於所關注之抗原且包含實質上具有人類抗體之胺基酸序列的架構(FR)區及實質上具有非人類抗體之胺基酸序列的互補決定區(CDR)之抗體或其變異體、衍生物、類似物或片段。如本文所用，在CDR情形中之術語「實質上」係指胺基酸序列與非人類抗體CDR之胺基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%一致的CDR。人類化抗體包含實質上所有至少一個且通常兩個可變域(Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv)，其中所有或實質上所有CDR區對應於非人類免疫球蛋白(亦即供體抗體)之彼等CDR區且所有或實質上所有構架區為人類免疫球蛋白共同序列之彼等構架區。在一個實施例中，人類化抗體亦包含免疫球蛋白恆定區(Fc)、通常人類免疫球蛋白之恆定區的至少一部分。在一些實施例中，人類化抗體含有輕鏈以及至少重鏈之可變域兩者。抗體亦可包括重鏈之CH1區、鉸鏈區、CH2區、CH3區及CH4區。在一些實施例中，人類化抗體僅含有人類化輕鏈。在一些實施例中，人類化抗體僅含有人類化重鏈。在特定實施例中，人類化抗體僅含有輕鏈之人類化可變域及/或人類化重鏈。

人類化抗體可選自任何種類之免疫球蛋白，包括IgM、

IgG、IgD、IgA及IgE及任何同型，包括(但不限於)IgG1、IgG2、IgG3及IgG4。人類化抗體可包含一種以上類別或同型之序列，且特定恆定域可經選擇以使用此項技術中熟知之技術優化所需效應功能。

人類化抗體之構架區及CDR區無需與親本序列精確對應，例如供體抗體CDR或共同構架可藉由取代、插入及/或缺失至少一個胺基酸殘基來誘發突變以使在該位點處之CDR或構架殘基不與供體抗體或共同構架對應。然而，在一個實施例中，該等突變將不會為大規模的。通常，人類化抗體殘基之至少80%、至少85%、至少90%及至少95%將與親本FR及CDR序列之彼等殘基對應。如本文所用，術語「共同構架」係指共同免疫球蛋白序列中之構架區。如本文所用，術語「共同免疫球蛋白序列」係指由相關免疫球蛋白序列家族中最常見之胺基酸(或核苷酸)形成之序列(參見例如 Winnaker, **From Genes to Clones** (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987))。因此，「共同免疫球蛋白序列」可包含「共同可變域」及/或「共同恆定域」。「共同可變域」又可包含一或多個「共同架構區」及/或一或多個「共同CDR」。在免疫球蛋白家族中，共同序列中之每一位置由該家族中在該位置處最常見之胺基酸佔據。若兩個胺基酸同等頻繁地出現，則共同序列中可包括任一個。

如本文所用，「游標」區係指如 Foote及 Winter (1992) J. Mol. Biol. 224:487-499所述可調整CDR結構及微調與抗原

之適合度的構架殘基子集。游標區殘基形成構成CDR之層且可影響CDR結構及抗體親和力。

術語「多價結合蛋白」在本說明書中用於表示包含兩個或兩個以上抗原結合位點之結合蛋白。多價結合蛋白經工程改造以具有三個或三個以上抗原結合位點且通常不為天然存在之抗體。術語「多特異性結合蛋白」係指能夠結合兩個或兩個以上相關或無關目標之結合蛋白。雙重可變域(DVD)結合蛋白為包含兩個或兩個以上抗原結合位點之結合蛋白且為四價或多價結合蛋白。該等DVD結合蛋白可為單特異性的，亦即能夠結合一個抗原，或為多特異性的，亦即能夠結合兩個或兩個以上抗原。包含兩個重鏈DVD多肽及兩個輕鏈DVD多肽之DVD結合蛋白稱為DVD-IgTM分子。DVD-IgTM分子之每一半包含一重鏈DVD多肽及一輕鏈DVD多肽及兩個抗原結合位點。每一結合位點包含重鏈可變域及輕鏈可變域，其中每一抗原結合位點總計有6個CDR參與抗原結合。DVD結合蛋白及製造DVD結合蛋白之方法揭示於美國專利第7,612,181號中。

本發明之一個態樣係關於包含能夠結合人類IL-1 α 之結合蛋白的DVD結合蛋白。在另一態樣中，DVD結合蛋白能夠結合IL-1 α 及第二目標。在一個實施例中，DVD結合蛋白能夠結合IL-1 α 及IL-1 β 。

術語「中和」係指當結合蛋白特異性結合細胞激素時，中和細胞激素之生物活性。在一個實施例中，中和結合蛋白為中和抗體，其結合於hIL-1 α 導致抑制hIL-1 α 之生物活

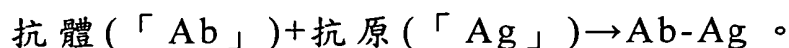
性。在一個實施例中，中和結合蛋白結合hIL-1 α 且使hIL-1 α 之生物活性降低至少約20%、至少約40%、至少約60%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%或至少約100%。藉由中和結合蛋白抑制hIL-1 α 之生物活性可藉由量測此項技術中熟知的一或多個hIL-1 α 生物活性指示劑來評估。

術語「抗原決定基」包括能夠特異性結合於免疫球蛋白或T細胞受體之任何多肽決定子。在某些實施例中，抗原決定基決定子包括分子之化學活性表面基團(諸如胺基酸、糖側鏈、磷醯基或磺醯基)，且在某些實施例中，其可具有特定三維結構特徵及/或特定電荷特徵。抗原決定基為由抗體所結合之抗原之區域。抗原決定基因此由已知結合於特異性結合搭配物上之互補位點的抗原(或其片段)區之胺基酸殘基組成。抗原性片段可含有一個以上抗原決定基。在某些實施例中，當抗體在蛋白質及/或巨分子之複雜混合物中識別其目標抗原時，則稱抗體特異性結合抗原。若抗體交叉競爭(一者阻止另一者之結合或調節效應)，則稱抗體「結合同一抗原決定基」。另外，抗原決定基之結構定義(重疊、類似、相同)為提供資訊的，但因為功能定義涵蓋結構(結合)及功能(調節、競爭)參數，所以其通常更具相關性。

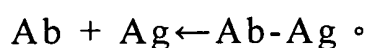
術語「表面電漿子共振」係指藉由例如使用Biacore™系統(Biacore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden and Piscataway, New Jersey)來偵測生物

感測器基質內之蛋白質濃度的變化而使得可分析即時生物特異性相互作用之光學現象。關於進一步描述，參見 Jönsson, U.等人, (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U.等人, (1991) *BioTechniques* 11: 620-627; Johnsson, B.等人, (1995) *J. Mol. Recognit.* 8: 125-131; 及 Johnsson, B.等人, (1991) *Anal. Biochem.* 198: 268-277。

術語「Kon」係指如此項技術中已知之結合蛋白(例如抗體)與抗原締合形成例如抗體/抗原複合物之締合速率常數。「Kon」亦稱為術語「締合速率常數」或「ka」，其在本文中可互換使用。此指示抗體與其目標抗原之結合速率或抗體與抗原之間的複合物形成速率之值亦由以下方程式展示：



術語「Koff」係指如此項技術中已知之結合蛋白(例如抗體)自例如抗體/抗原複合物解離之解離速率常數。「Koff」亦稱為術語「解離速率常數」或「kd」，其在本文中可互換使用。此值指示抗體自其目標抗原解離或Ab-Ag複合物隨時間而分離為游離抗體及抗原之解離速率，如由以下方程式所示：



術語「平衡解離常數」或「K_D」在本文中可互換使用，係指在滴定量測中在平衡狀態下所獲得之值，或藉由將解離速率常數(koff)除以締合速率常數(kon)所獲得之值。締合速率常數、解離速率常數及平衡解離常數係用於表示抗

體與抗原之結合親和力。測定締合及解離速率常數之方法為此項技術中所熟知。使用基於螢光之技術提供檢查在生理緩衝液中處於平衡狀態下之樣品的高靈敏性及能力。可使用其他實驗方法及儀器，諸如 BIACORE™(生物分子相互作用分析)分析法(例如可購自 Biacore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden 之儀器)。另外，亦可使用 KinExA®(動態排除分析法，Kinetic Exclusion Assay)分析法，其可購自 Sapidyne Instruments (Boise, Idaho)。

如本文所用之術語「經標記結合蛋白」係指蛋白質具有經併入以提供用於鑑別結合蛋白之標記。在一個態樣中，標記為可偵測標記物，例如併入經放射性標記之胺基酸，或連接具有生物素基部分之多肽，其可由經標記之抗生物素蛋白偵測(例如含有螢光標記物或酶活性之抗生蛋白鏈菌素，其可藉由光學或比色法偵測)。多肽之標記實例包括(但不限於)以下：放射性同位素或放射性核素(例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 及 ^{153}Sm)；螢光標記(例如 FITC、若丹明(rhodamine)及鐳系元素磷光體)、酶標記(例如辣根過氧化酶、螢光素酶、鹼性磷酸酶)；化學發光標記物；生物素基；由二級報導子識別之預定多肽抗原決定基(例如白胺酸拉鏈對序列、二級抗體之結合位點、金屬結合域及抗原決定基標籤)；及磁性劑，諸如釷螯合物。

術語「抗體結合物」係指結合蛋白(諸如抗體)以化學連

接於第二化學部分(諸如治療劑或細胞毒性劑)。術語「劑」在本文中用於表示化學化合物、化學化合物之混合物、生物巨分子，或由生物材料製成之提取物。在一個態樣中，治療劑或細胞毒性劑包括(但不限於)百日咳毒素(pertussis toxin)、紫杉醇(taxol)、細胞遲緩素B(cytochalasin B)、短桿菌肽D(gramicidin D)、溴化乙錠、吐根素(emetine)、絲裂黴素(mitomycin)、依託泊苷(etoposide)、特諾波賽(tenoposide)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、秋水仙鹼(colchicine)、阿黴素(doxorubicin)、道諾黴素(dauno-rubicin)、二羥基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、米拉黴素(mithra-mycin)、放線菌素D(actinomycin D)、1-去氫罩固酮、糖皮質激素、普魯卡因(procaine)、四卡因(tetra-caine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛爾(propranolol)及嘌呤黴素，以及其類似物或同系物。

術語「晶體」及「結晶」係指抗體或其抗原結合部分以晶體形式存在。晶體為固態物質之一種形式，其不同於諸如非晶形固態或液體晶態之其他形式。晶體係由原子、離子、分子(例如蛋白質，諸如抗體)或分子組裝體(例如抗原/抗體複合物)之規則重複三維陣列構成。該等三維陣列係根據該領域中充分瞭解之特定數學關係排列。晶體中重複之基本單元或構建基塊係稱為不對稱單元。重複之不對稱單元以符合給定之明確定義的晶體學對稱性排列提供晶體之「晶胞」。重複之晶胞在所有三維中規則平移(regular

translations)提供晶體。參見 Giegé及 Ducruix (1999) 第1章, **Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach**, 第2版, (Ducruix 及 Giegé, 編) (Oxford University Press, New York, 1999) 第1-16頁。

術語「聚核苷酸」意謂兩個或兩個以上核苷酸(核糖核苷酸或去氧核苷酸或任一類型之核苷酸的經修飾形式)之多聚形式。該術語包括單股及雙股形式之DNA或RNA, 但在一個實施例中為雙股DNA。

術語「分離之聚核苷酸」意謂如下之聚核苷酸(例如源自基因組、cDNA或合成來源或其組合): 不與在自然界中與其締合、在自然界中與其可操作地連接或在自然界中作為較大序列之一部分出現之聚核苷酸的全部或一部分締合。

術語「載體」係指能夠轉運其所連接之另一核酸的核酸分子。一種類型之載體為「質體」, 其係指可接合其他DNA區段之環狀雙股DNA環。另一種類型之載體為病毒載體, 其中可將其他DNA區段接合至病毒基因組中。某些載體能夠在引入該等載體之宿主細胞中自主複製(例如具有細菌複製起點之細菌載體及游離型哺乳動物載體)。其他載體(例如非游離型哺乳動物載體)可在引入宿主細胞中之後整合至宿主細胞基因組中, 且從而與宿主基因組一起複製。此外, 某些載體能夠指導其可操作連接之基因之表現。該等載體在本文中稱為「重組表現載體」(或簡稱為「表現載體」)。一般而言, 適用於重組DNA技術中之表

現載體通常呈質體形式。在本說明書中，因為質體為載體之最常用形式，所以「質體」與「載體」可互換使用。然而，本發明意欲包括起相等作用之該等其他表現載體形式，諸如病毒載體(例如複製缺陷型反轉錄病毒、腺病毒及腺相關病毒)。

術語「可操作地連接」係指組分之安置使得其以其預期方式起作用。控制序列「可操作地連接」於編碼序列係以使編碼序列之表現在與控制序列相容之條件下實現的方式接合。「可操作地連接」之序列包括與所關注之核酸鄰接的表現控制序列，以反式起作用(亦即位於不同於所關注之核酸的核酸分子上，但仍對所關注之核酸施加控制)之表現控制序列，及位於與所關注之核酸相同的核酸分子上但間隔一定距離之表現控制序列。如本文所用之術語「表現控制序列」係指為實現其所接合之編碼序列之表現及加工所必需之聚核苷酸序列。表現控制序列包括適當轉錄起始、終止、啟動子及強化子序列；有效RNA加工信號，諸如剪接及聚腺苷酸化信號；使細胞質mRNA穩定之序列；提高轉譯效率之序列(亦即Kozak共同序列)；增強蛋白質穩定性之序列；及必要時增加蛋白質分泌之序列。該等控制序列之性質視宿主生物體而不同；在原核生物中，該等控制序列一般包括啟動子、核糖體結合位點及轉錄終止序列；在真核生物中，該等控制序列一般包括啟動子及轉錄終止序列。術語「控制序列」意欲包括對於表現及加工而言有必要存在之組分，且亦可包括適宜存在之其他組分，

例如前導序列及融合搭配物序列。

「轉型」係指使外源DNA進入宿主細胞中之任何過程。轉型可使用此項技術中熟知用於例如將外來核酸序列插入原核或真核宿主細胞中之各種方法在天然或人工條件下進行。該方法係根據所轉型之宿主細胞進行選擇且可包括(但不限於)病毒感染、電穿孔、脂質體轉染及粒子轟擊。該等「轉型」細胞包括所插入之DNA能夠作為自主複製質體或宿主染色體之一部分複製的穩定轉型細胞。其亦包括在有限時間內短暫表現所插入之DNA或RNA的細胞。

如本文所用之術語「重組宿主細胞」(或簡稱為「宿主細胞」)意欲指代已引入外源DNA之細胞。該等術語意欲不僅指代特定個體細胞，而且指代該細胞之子代。因為某些修飾可能因突變或環境影響而在繼代中出現，所以該子代可能實際上與親本細胞不相同，但其仍包括在如本文所用之術語「宿主細胞」之範疇內。在一個態樣中，宿主細胞包括選自生物界之任一者的原核及真核細胞。真核細胞包括原生生物、真菌、植物及動物細胞。在另一態樣中，宿主細胞包括(但不限於)原核細胞株大腸桿菌(*Escherichia coli*)；哺乳動物細胞株CHO、HEK 293及COS；昆蟲細胞株Sf9；及真菌細胞釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

重組DNA、寡核苷酸合成以及組織培養與轉型(例如電穿孔及脂質體轉染)可使用標準技術。酶促反應及純化技術可根據製造商之說明書執行或如此項技術中通常所完成或如本文中所述來執行。上述技術及程序通常可根據此項

技術中熟知之習知方法且如本說明書通篇所引用及論述之各種綜合性參考文獻及更具體之參考文獻中所述來執行。參見例如 Sambrook 等人, **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 第 2 版 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989)。

術語「轉殖基因生物體」係指具有含有轉殖基因之細胞的生物體，其中引入生物體(或生物體之祖先)中之轉殖基因表現不天然表現於生物體中之多肽。「轉殖基因」為 DNA 構築體，其穩定且可操作地整合於發育成轉殖基因生物體之細胞的基因組中，從而指導所編碼之基因產物在轉殖基因生物體之一或多種細胞類型或組織中之表現。

術語「調控」及「調節」可互換使用且係指所關注之分子之活性(例如 hIL-1 α 之生物活性)的改變或變動。調節可為所關注之分子之某一活性或功能的量值之增加或減小。分子之例示性活性及功能包括(但不限於)結合特徵、酶促活性、細胞受體活化及信號傳導。

因此，術語「調節劑」為能夠改變或改動所關注之分子之活性或功能(例如 hIL-1 α 之生物活性)之化合物。舉例而言，調節劑可使得分子之某一活性或功能之量值相比在不存在調節劑之情況下所觀察到之活性或功能之量值有所增加或減小。在某些實施例中，調節劑為抑制劑，其使分子之至少一種活性或功能之量值減小。例示性抑制劑包括(但不限於)蛋白質、肽、抗體、肽體(peptibody)、碳水化合物或小有機分子。肽體描述於例如 PCT 公開案第 WO

01/83525號中。

術語「促效劑」係指當與所關注之分子接觸時引起分子的某一活性或功能之量值相較於在無促效劑存在下所觀察到之活性或功能之量值增加的調節劑。所關注之特定促效劑可包括(但不限於)多肽、核酸、碳水化合物或任何其他結合於IL-1 α 及/或IL-1 β 之分子。

術語「拮抗劑」或「抑制劑」係指當與所關注之分子接觸時引起分子的某一活性或功能之量值相較於在無拮抗劑存在下所觀察到之活性或功能之量值減小的調節劑。拮抗劑包括阻斷或調節IL-1 α 及/或IL-1 β 之生物或免疫活性之彼等拮抗劑。IL-1 α 之拮抗劑及抑制劑可包括(但不限於)多肽、核酸、碳水化合物或任何其他結合於IL-1 α 之分子。IL-1 β 之拮抗劑及抑制劑可包括(但不限於)多肽、核酸、碳水化合物或任何其他結合於IL-1 β 之分子。

術語「有效量」係指足以減少或改善病症或其一或多種症狀之嚴重程度及/或持續時間，預防病症進展，引起病症消退，預防與病症相關之一或多種症狀之復發、發展、發作或進展，偵測病症，或增強或改良另一療法(例如預防劑或治療劑)之預防或治療作用的療法之量。

術語「樣品」以其最廣泛意義使用。「生物樣品」包括(但不限於)任何數量之來自活物或原先為活物之物質。該等活物包括(但不限於)人類、小鼠、大鼠、猴、狗、兔及其他動物。該等物質包括(但不限於)血液、血清、尿、滑液、細胞、器官、組織、骨髓、淋巴結及脾。

「親和力成熟」抗體為其一或多個CDR或構架中具有一或多個變動之抗體，該(等)變動導致與不擁有該(等)變動之親本抗體相比，抗體對於抗原之親和力得以改良。較佳親和力成熟抗體將對目標抗原具有奈莫耳或甚至皮莫耳之親和力。親和力成熟抗體可由此項技術中已知之程序製備。Marks等人，(1992) BioTechnology 10: 779-783描述藉由VH及VL結構域改組之親和力成熟。Barbas等人，(1994) Proc Nat. Acad. Sci. USA 91: 3809-3813; Schier等人，(1995) Gene 169: 147-155; Yelton等人，(1995) J. Immunol. 155: 1994-2004; Jackson等人，(1995) J. Immunol. 154(7): 3310-3319；及Hawkins等人，(1992) J. Mol. Biol., 226: 889-896描述CDR及/或構架殘基之隨機突變誘發。

在疼痛初始原因已消失後在個體中持續之疼痛不再為一種症狀，而是一種以其自身原因公認的疾病。如本文所用之術語「異常疼痛」係指其中個體對通常無害刺激(通常為機械性質的刺激，諸如掠過皮膚)經受疼痛反應之病狀。異常疼痛並未涉及疼痛感受器且因此亦可稱為「非疼痛感受性」疼痛。如本文所用之術語「痛覺過敏」係指其中個體對由有害刺激(尤其是激活疼痛感受器之刺激，諸如疼痛的機械刺激、熱刺激或化學刺激)產生之疼痛敏感性增強的病狀。激活疼痛感受器之刺激引起疼痛。痛覺過敏為其中個體對通常的有害刺激具有增強之疼痛反應的病狀。個體可罹患異常疼痛、痛覺過敏或異常疼痛與痛覺過敏之組合。

I. 生成結合IL-1 α 及IL-1 β 之DVD-IgTM結合蛋白

已描述能夠結合一或多個目標抗原(或抗原決定基)之雙重可變域免疫球蛋白(DVD-IgTM)結合蛋白之設計及製造(參見例如PCT公開案第WO 2007/024715號)。適用於本文所述之用於治療骨關節炎之方法及組合物中之DVD-Ig結合蛋白結合IL-1 α 及IL-1 β 。在一個實施例中，DVD-IgTM結合蛋白包含至少兩個多肽鏈，其中該第一多肽鏈包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一重鏈可變域，VD2為第二重鏈可變域，C為重鏈恆定域，X1為連接子，其限制條件為X1不為CH1，且X2為Fc區；且其中該第二多肽鏈包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一輕鏈可變域，VD2為第二輕鏈可變域，C為輕鏈恆定域，X1為連接子，其限制條件為X1不為CH1，且X2不包含Fc區；且n為0或1。由該第一及第二多肽鏈組成之DVD-IgTM結合蛋白具有兩個抗原結合位點。

在另一實施例中，DVD-IgTM結合蛋白包含四個多肽鏈，其中該首個兩個多肽鏈各分別包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一重鏈可變域，VD2為第二重鏈可變域，C為重鏈恆定域，X1為連接子，其限制條件為X1不為CH1，且X2為Fc區；且該第二兩個多肽鏈各分別包含VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n，其中VD1為第一輕鏈可變域，VD2為第二輕鏈可變域，C為輕鏈恆定域，X1為連接子，其限制條件為X1不為CH1，且X2不包含Fc區；且n為0或1。該DVD-IgTM結合蛋白具有四個抗原結合位點。

舉例而言，適用於本文所述之用於治療個體骨關節炎之方法及組合物中之DVD-Ig結合蛋白可經工程改造以具有藉由兩個(第一及第二多肽)之VD1可變域締合所形成之IL-1 β 之結合位點及藉由兩個(第一及第二多肽)之VD2可變域締合所形成之IL-1 α 之結合位點。在一替代排列中，適用於本文所述之用於治療個體骨關節炎之方法及組合物中之DVD-Ig結合蛋白可具有藉由兩個(第一及第二多肽)之VD1可變域締合所形成之IL-1 α 之結合位點及藉由兩個(第一及第二多肽)之VD2可變域締合所形成之IL-1 β 之結合位點。

A. 生成親本單株抗體

DVD結合蛋白之可變域可自能夠結合所關注之抗原之親本抗體(包括多株及單株抗體)獲得。此等抗體可天然存在或可藉由重組技術生成。

單株抗體可使用此項技術已知之多種技術製備，包括使用融合瘤、重組及噬菌體呈現技術或其組合。舉例而言，單株抗體可使用融合瘤技術產生，包括此項技術中已知及例如Harlow等人，**Antibodies: A Laboratory Manual**，第2版，(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988)；Hammerling，等人，**Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas** (Elsevier, N.Y., 1981)，第563-581頁中所教示之融合瘤技術(該等參考文獻以全文引用的方式併入)。如本文所用之術語「單株抗體」(縮寫「mAb」)不限於經由融合瘤技術產生之抗體。術語「單株抗體」係指源自包括任何真核生物、原核生物或噬菌體純系之單一純系而非由產生其之方

法產生的抗體。使用標準方法選擇融合瘤，對其進行選殖且進一步篩選合乎需要之特徵，包括穩固的融合瘤生長、高抗體產量及合乎需要的抗體特徵。融合瘤可在活體內於同系動物、缺乏免疫系統之動物(例如裸小鼠)中或在活體外於細胞培養物中培養及擴增。選擇、選殖及擴增融合瘤之方法為一般技術者所熟知。在一較佳實施例中，融合瘤為小鼠融合瘤。在另一實施例中，融合瘤在非人類、非小鼠物種(諸如大鼠、綿羊、豬、山羊、牛或馬)中產生。在另一實施例中，融合瘤為人類融合瘤，其中人類非分泌性骨髓瘤與表現能夠結合特定所需抗原(諸如 IL-1 α 或 IL-1 β)之抗體的人類細胞融合。

如美國專利第 5,627,052 號、PCT 公開案 WO 92/02551 及 Babcook 等人(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 中所述，亦使用此項技術中稱為選擇淋巴細胞抗體法 (SLAM) 之程序自單一分離之淋巴細胞生成重組單株抗體。在此方法中，識別分泌所關注之抗體之單一細胞(例如來源於經免疫之動物之淋巴細胞)，且藉由反轉錄酶-PCR 自細胞搜出重鏈及輕鏈可變區 cDNA 且此等可變區可隨後在合適免疫球蛋白恆定區(例如人類恆定區)之情形中於哺乳動物宿主細胞(諸如 COS 或 CHO 細胞)中表現。隨後經源自活體內選擇之淋巴細胞之經擴增免疫球蛋白序列轉染的宿主細胞可於活體外進行進一步分析及選擇，例如藉由淘選該等經轉染細胞以分離出表現針對所關注抗原之抗體的細胞。可諸如由活體外親和力成熟方法(諸如 PCT 公開

案第 WO 97/29131 號及 PCT 公開案第 WO 00/56772 號中所述之方法)於活體外進一步操控經擴增之免疫球蛋白序列。

單株抗體亦藉由用所關注之抗原使包含一些或所有人類免疫球蛋白基因座之非人類動物免疫來產生。在一個實施例中，非人類動物為 XENOMOUSE 轉殖基因小鼠，其為包含人類免疫球蛋白基因座之大片段且小鼠抗體產量不足之經工程改造之小鼠品系。參見例如 Green 等人 (1994) Nature Genetics 7:13-21 及美國專利第 5,916,771 號；第 5,939,598 號；第 5,985,615 號；第 5,998,209 號；第 6,075,181 號；第 6,091,001 號；第 6,114,598 號及第 6,130,364 號。亦參見 PCT 公開案第 WO 91/10741 號；第 WO 94/02602 號；第 WO 96/34096 號；第 WO 96/33735 號；第 WO 98/16654 號；第 WO 98/24893 號；第 WO 98/50433 號；第 WO 99/45031 號；第 WO 99/53049 號；第 WO 00/09560 號；及第 WO 00/037504 號。XENOMOUSE 轉殖基因小鼠產生完全人類抗體之成人樣人類譜系，且生成抗原特異性人類單株抗體。XENOMOUSE 轉殖基因小鼠經由引入人類重鏈基因座及 x 輕鏈基因座之百萬鹼基 (megabase) 規模的生殖系組態 YAC 片段而含有約 80% 之人類抗體譜系。參見 Mendez 等人, (1997) Nature Genet. 15:146-156 以及 Green 及 Jakobovits (1998) J. Exp. Med. 188: 483-495。

亦可使用活體外方法來製備親本抗體，其中篩選抗體文庫以鑑別具有所需結合特異性之抗體。用於該重組抗體文庫篩選之方法為此項技術中所熟知且包括例如美國專利第

5,223,409 號 ; PCT 公 開 案 第 WO 92/18619 號 ; 第 WO 91/17271 號 ; 第 WO 92/20791 號 ; 第 WO 92/15679 號 ; 第 WO 93/01288 號 ; 第 WO 92/01047 號 ; 第 WO 92/09690 號 ; 第 WO 97/29131 號 ; 及 Fuchs 等 人 (1991) Bio/Technology 9: 1369-1372 ; Hay 等 人 (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3: 81-85 ; Huse 等 人 (1989) Science 246: 1275-1281 ; McCafferty 等 人 (1990) Nature 348: 552-554 ; Griffiths 等 人 (1993) EMBO J. 12: 725-734 ; Hawkins 等 人 (1992) J. Mol. Biol. 226: 889-896 ; Clackson 等 人 (1991) Nature 352: 624-628 ; Gram 等 人 (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3576-3580 ; Garrard 等 人 (1991) Bio/Technology 9: 1373-1377 ; Hoogenboom 等 人 (1991) Nucl. Acid Res. 19: 4133-4137 ; 及 Barbas 等 人 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978-7982 及 美 國 專 利 公 開 案 第 2003/0186374 號 中 所 述 之 方 法 。

適用於本發明之親本抗體亦可使用此項技術中已知之各種噬菌體呈現方法生成。在噬菌體呈現方法中，功能抗體結構域呈現於攜帶編碼其之聚核苷酸序列之噬菌體顆粒表面上。詳言之，可利用該噬菌體呈現自譜系或組合抗體文庫(例如人類或鼠類)表現之抗原結合域。可用抗原(例如使用經標記抗原或結合或捕獲於固體表面或珠粒上之抗原)來選擇或鑑別表現結合所關注之抗原之抗原結合域的噬菌體。該等方法中所用之噬菌體通常為絲狀噬菌體，包括由 Fab、Fv 或二硫化物穩定之 Fv 抗體結構域與噬菌體基因 III

或基因 VIII 蛋白重組融合之噬菌體表現之 fd 及 M13 結合域。可用於製造本發明抗體之噬菌體呈現方法之實例包括 Brinkman 等人 (1995) J. Immunol. Methods 182:41-50 ; Ames 等人 (1995) J. Immunol. Methods 184:177-186 ; Kettleborough 等人 (1994) Eur. J. Immunol. 24: 952-958 ; Persic 等人 (1997) Gene 187: 9-18 ; Burton 等人 (1994) Adv. Immunol. 57:191-280 ; PCT 申請案第 PCT/GB91/01134 號 ; PCT 公開案第 WO 90/02809 號 ; 第 WO 91/10737 號 ; 第 WO 92/01047 號 ; 第 WO 92/18619 號 ; 第 WO 93/11236 號 ; 第 WO 95/15982 號 ; 及第 WO 95/20401 號 ; 及美國專利第 5,698,426 號 ; 第 5,223,409 號 ; 第 5,403,484 號 ; 第 5,580,717 號 ; 第 5,427,908 號 ; 第 5,821,047 號 ; 第 5,571,698 號 ; 第 5,427,908 號 ; 第 5,516,637 號 ; 第 5,780,225 號 ; 第 5,658,727 號 ; 第 5,733,743 號及第 5,969,108 號中所揭示之實例。

如以上參考文獻中所述，在噬菌體選擇後，可自噬菌體分離抗體編碼區且將其用於生成包括人類抗體或任何其他所需抗原結合片段之全抗體，且使其於包括哺乳動物細胞、昆蟲細胞、植物細胞、酵母及細菌之任何所需宿主中表現，例如如下文所詳細描述。舉例而言，亦可使用此項技術中已知之方法使用重組產生 Fab、Fab' 及 F(ab')₂ 片段之技術，諸如 PCT 公開案第 WO 92/22324 號 ; Mullinax 等人 (1992) BioTechniques 12(6): 864-869 ; 及 Sawai 等人 (1995) AJRI 34: 26-34 ; 及 Better 等人 (1988) Science, 240: 1041-1043 中所揭示之彼等方法。可用於產生單鏈 Fv 及抗體之技

術的實例包括美國專利第4,946,778號及第5,258,498號；Huston等人(1991) *Methods Enzymol.* 203: 46-88；Shu等人(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7995-7999；及Skerra等人(1988) *Science* 240: 1038-1041中所述之技術。

可應用此項技術中已知之用於篩選大型組合文庫之其他方法替代用噬菌體呈現篩選重組抗體文庫來鑑別親本抗體。如Szostak及Roberts之PCT公開案第WO 98/31700號以及Roberts, R.W.及Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12297-12302中所描述，一種類型之替代表現系統為重組抗體文庫表現為RNA-蛋白融合體的系統。在此系統中，藉由在其3'端處攜帶肽基受體抗生素嘌呤黴素之合成mRNA之活體外轉譯而在mRNA與其編碼之肽或蛋白之間建置共價融合。因此，可基於所編碼之肽或蛋白質(例如抗體或其部分)之性質(諸如抗體或其部分與雙重特異性抗原之結合)，自mRNA之複雜混合物(例如組合文庫)中富集特定mRNA。可藉由如上所述之重組方式(例如於哺乳動物宿主細胞中)表現自該等文庫之篩選回收之編碼抗體或其部分之核酸序列，且此外，可藉由再進行幾輪已在最初選擇之序列中引入突變之mRNA-肽融合體之篩選或藉由如上所述活體外使重組抗體親和力成熟之其他方法使其經歷進一步親和力成熟。

在另一方法中，親本抗體亦可使用在項技術中已知之酵母呈現方法來生成。在酵母呈現方法中，遺傳方法用以將抗體結構域繫栓至酵母細胞壁上且將其呈現於酵母之表面

上。詳言之，可利用該酵母呈現由譜系或組合抗體文庫(例如人類或鼠類)表現之抗原結合域。可用於製造親本抗體之酵母呈現方法之實例包括美國專利第6,699,658號中所揭示之酵母呈現方法。

上述抗體可進一步經修飾以生成CDR移植親本抗體及人類化親本抗體。CDR移植親本抗體包含人類抗體之重鏈及輕鏈可變區序列，其中 V_H 及/或 V_L 的一或多個CDR區經能夠結合所關注抗原之鼠類抗體之CDR序列置換。來自任何人類抗體之構架序列均可充當CDR移植之模板。然而，該構架上之直鏈置換通常導致對抗原之結合親和力之部分喪失。人類抗體與原始鼠類抗體之同源性愈高，鼠類CDR與人類構架組合在CDR中引入可降低親和力之失真的可能性愈小。因此，經選擇以置換除CDR以外之鼠類可變構架之人類可變構架較佳與鼠類抗體可變區構架具有至少65%之序列一致性。人類可變區與除CDR以外之鼠類可變區更佳具有至少70%之序列一致性。人類可變區與除CDR以外之鼠類可變區甚至更佳具有至少75%之序列一致性。人類可變區與除CDR以外之鼠類可變區最佳具有至少80%之序列一致性。製造該等抗體之方法為此項技術中已知(參見EP 239,400；PCT公開案WO 91/09967；美國專利第5,225,539號；第5,530,101號；及第5,585,089號)飾面或重修表面(EP 592,106；EP 519,596；Padlan (1991) Mol. Immunol. 28(4/5): 489-498；Studnicka等人(1994) Protein Engineering 7(6): 805-814；Roguska等人(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA

91: 969-973)及鏈改組(美國專利第5,565,352號)。

人類化抗體為結合具有一或多個來自非人類物種之互補決定區(CDR)及來自人類免疫球蛋白分子之構架區之所需抗原的來自非人類物種抗體之抗體分子。已揭示已知人類Ig序列，例如 www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-/query.fcgi；
www.atcc.org/phage/hdb.html；www.sciquest.com/；www.abcam.com/；
www.antibodyresource.com/onlinecomp.html；www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html；www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html；www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm；www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html；www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/；
www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/m-ikeimages.html；www.antibodyresource.com/；mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html.www.immunologylink.com/；pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.-html；www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/；
www.pebio.com/pa/340913/340913.html-；www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/；www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito/Elisa.html；www.biodesign.com/table.asp；www.icnet.uk/axp/facs/davies/lin-ks.html；www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html；www.isac-net.org/sites_geo.html；aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html；baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/linksl.html；www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/；
www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html；www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html；imgt.cnusc.fr:8104/；

www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html ; antibody.bath.ac.uk/ ; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html ; www.unizh.ch/.about.honegger/AHOsem-inar/Slide01.html ; www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/ ; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm ; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/h-umanisation/TAHHP.html ; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html ; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html ; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.abo-ut.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html ; www.jerini.de/frroducts.htm ; www.patents.ibm.com/ibm.html ; Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), 每一者以全文引用的方式併入本文中。如此項技術中已知, 該等輸入序列可用於降低免疫原性或減小、增加或修改結合親和力、締合速率、解離速率、親合力、特異性、半衰期或任何其他合適特徵。

可用 CDR 供體抗體之相應殘基取代人類構架區中之構架殘基以改變, 較佳改良抗原結合。該等構架取代係由此項技術中熟知之方法鑑別, 例如藉由建立 CDR 與構架殘基之相互作用模型以鑑別對抗原結合重要之構架殘基以及進行序列比較以鑑別特定位置處之異常構架殘基。參見例如美國專利第 5,585,089 號; Riechmann 等人(1988) Nature 332: 323。三維免疫球蛋白模型通常可購得且為熟習此項技術者所熟知。可獲得說明且顯示所選候選免疫球蛋白序列之大概三維構形結構的電腦程式。對該等呈現之檢查允許分析殘基在候選免疫球蛋白序列起作用過程中可能的作用,

亦即分析影響候選免疫球蛋白結合其抗原之能力的殘基。以此方式，可自共同序列及輸入序列選擇並組合FR殘基以便實現所需之抗體特徵，諸如對目標抗原之親和力增大。一般而言，CDR殘基直接且最大程度上涉及影響抗原結合。抗體可使用此項技術中已知之多種技術來人類化，諸如(但不限於)以下文獻中所述之彼等技術：Jones等人(1986) Nature 321:522；Verhòeyen等人(1988) Science 239:1534；Sims等人(1993) J. Immunol. 151: 2296；Chothia及Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901；Carter等人(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285；Presta等人(1993) J. Immunol. 151:2623；Padlan (1991) Mol. Immunol. 28(4/5):489-498；Studnicka等人(1994) Protein Engineering 7(6):805-814；Roguska, 等人(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973；PCT公開案第WO 91/09967號；第WO 90/14443號；第WO 90/14424號；第WO 90/14430號；第WO 99/06834號(PCT/US98/16280)；第WO 97/20032號(PCT/US96/18978)；第WO 92/11272號(PCT/US91/09630)；第WO 92/03461號(PCT/US91/05939)；第WO 94/18219號(PCT/US94/01234)；第WO 92/01047號(PCT/GB91/01134)；及第WO 93/06213號(PCT/GB92/01755)；EP 0 592 106；EP 0 519 596；EP 0 239 400；美國專利第5,565,332號；第5,723,323號；第5,976,862號；第5,824,514號；第5,817,483號；第5,814,476號；第5,763,192號；第5,723,323號；第5,766,886號；第5,714,352號；第6,204,023號；第6,180,370

號；第 5,693,762 號；第 5,530,101 號；第 5,585,089 號；第 5,225,539 號；及第 4,816,567 號。

親本單株抗體可選自能夠結合 IL-1 α 或 IL-1 β 之各種單株抗體。

親本單株抗體亦可選自經批准用於臨床試驗或用於臨床使用開發中之各種治療性抗體。

B. 構築 DVD-Ig 分子

雙重可變域免疫球蛋白 (DVD-Ig) 分子經設計以藉由重組 DNA 技術使來自兩種不同親本單株抗體之兩個不同輕鏈可變域 (VL) 以串聯方式直接連接或經由較短連接子連接，隨後為輕鏈恆定域。類似地，重鏈包含串聯連接之兩個不同重鏈可變域 (VH)，其後為恆定域 CH1 及 Fc 區。參見 PCT 公開案第 WO 2007/024715 號。

可變域可使用重組 DNA 技術自藉由上述任一方法生成之親本抗體獲得。在一較佳實施例中，可變域為鼠類重鏈或輕鏈可變域。可變域更佳為 CDR 移植或人類化重鏈或輕鏈可變域。可變域最佳為人類重鏈或輕鏈可變域。

在一個實施例中，使用重組 DNA 技術使第一及第二可變域彼此直接連接。在另一實施例中，可變域經由連接子序列連接。兩個可變域較佳相連接。三個或三個以上可變域亦可直接連接或經由連接子序列連接。可變域可結合相同抗原或可結合不同抗原。本發明之 DVD-Ig 分子可包括一個免疫球蛋白可變域及一個非免疫球蛋白可變域，諸如受體之配位體結合域、酶之活性域。DVD-Ig 分子亦可包含 2

個或2個以上非Ig結構域。

連接子序列可為單個胺基酸或多肽序列。可用於設計及產生適用於本文所述之方法及組合物之DVD-Ig結合蛋白的連接子序列之實例包括(但不限於)：AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO:59)；AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO:60)；AKTTPKLGG (SEQ ID NO:61)；SAKTTPKLGG (SEQ ID NO:62)；SAKTTP (SEQ ID NO:63)；RADAAP (SEQ ID NO:64)；RADAAPTVS (SEQ ID NO:65)；RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO:66)；RADAAA(G₄S)₄ (SEQ ID NO:67)；SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO:68)；ADAAP (SEQ ID NO:69)；ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO:70)；TVAAP (SEQ ID NO:71)；TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO:72)；QPKAAP (SEQ ID NO:73)；QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO:74)；AKTTPP (SEQ ID NO:75)；AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO:76)；AKTTAP (SEQ ID NO:77)；AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO:78)；ASTKGP (SEQ ID NO:79)；ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:80)；GGSGGGGSG (SEQ ID NO:81)；GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:82)；GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO:83)；GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO:84)；GHEAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO:85)；TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO:86)；及ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:87)。連接子序列之選擇係基於若干Fab分子之晶體結構分析。在Fab或抗體分子結構中之可變域與CH1/CL恆

定域之間存在天然可撓性鍵聯。此天然鍵聯包含約10-12個胺基酸殘基，其由來自V結構域C端之4-6個殘基及來自CL/CH1結構域N端之4-6個殘基構成。在一個實施例中，使用CL或CH1之N端5-6個胺基酸殘基或11-12個胺基酸殘基分別作為DVD-Ig分子輕鏈及重鏈中之連接子生成適用於本發明之DVD-Ig分子。CL或CH1結構域之N端殘基，尤其是前5-6個胺基酸殘基採用不具有強二級結構之環構形，且因此可充當兩個可變域之間的可撓性連接子。因為CL或CH1結構域為免疫球蛋白序列之一部分，所以CL或CH1結構域之N端殘基為可變域之天然延伸，且因此在很大程度上使潛在地自連接子及接合出現之任何免疫原性最小化。

其他連接子序列可包括CL/CH1結構域之任何長度之任何序列，但不包括CL/CH1結構域之所有殘基；例如CL/CH1結構域之前5-12個胺基酸殘基；輕鏈連接子可來自C κ 或C λ ；且重鏈連接子可來源於任何同型之CH1，包括C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4、C α 1、C α 2、C δ 、C ϵ 及C μ 。連接子序列亦可來源於其他蛋白，諸如Ig樣蛋白(例如TCR、FcR、KIR)，基於G/S之序列(例如G4S (SEQ ID NO:88)重複序列)，來源於鉸鏈區之序列及來自其他蛋白之其他天然序列。

在一個實施例中，恆定域使用重組DNA技術與兩個經連接之可變域連接。較佳，包含經連接之重鏈可變域之序列與重鏈恆定域連接且包含經連接之輕鏈可變域之序列與輕

鏈恆定域連接。當DVD-Ig結合蛋白欲用於人類時，恆定域較佳分別為人類重鏈恆定域及人類輕鏈恆定域。DVD-Ig重鏈較佳進一步連接於Fc區。Fc區可為原生序列Fc區或變異Fc區。Fc區最佳為人類Fc區。在一較佳實施例中，Fc區包括來自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE或IgD之Fc區。

在一個實施例中，兩個重鏈DVD-Ig多肽及兩個輕鏈DVD-Ig多肽組合形成DVD-Ig分子。已描述能夠結合特定目標之特定DVD-Ig分子之實例及其製造方法之實施方式。參見例如PCT公開案第WO 2007/024715號。

C. 製造DVD-Ig結合蛋白

結合IL-1 α 及IL-1 β 且適用於本文所述之治療骨關節炎之方法及組合物中之DVD-Ig蛋白可藉由此項技術中已知的許多技術中之任一者來製造。參見例如PCT公開案第2007/024715號。舉例而言，自宿主細胞表現，其中藉由標準技術將編碼DVD-Ig重鏈及DVD-Ig輕鏈之表現載體轉染至宿主細胞中。術語「轉染」之各種形式意欲涵蓋常用於將外源DNA引入原核生物或真核生物宿主細胞中之多種技術，例如電穿孔、磷酸鈣沈澱、DEAE-葡聚糖轉染及其類似技術。雖然可能在原核或真核宿主細胞中表現DVD-Ig結合蛋白，但因為真核細胞(且尤其是哺乳動物細胞)與原核細胞相比更可能組裝且分泌經正確摺疊的免疫活性DVD-Ig蛋白，所以在該等真核細胞中表現DVD-Ig蛋白較佳，且在哺乳動物宿主細胞中表現DVD-Ig蛋白最佳。

用於表現本發明重組抗體之較佳哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢(CHO細胞)(包括 dhfr-CHO細胞，描述於 Urlaub及 Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 中，其與 DHFR 選擇性標記物一起使用，例如如 R.J. Kaufman及 P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621 中所述)、NS0 骨髓瘤細胞、COS細胞及 SP2細胞。當將編碼 DVD-Ig 蛋白之重組表現載體引入哺乳動物宿主細胞中時，DVD-Ig 蛋白藉由培養宿主細胞一段足以使 DVD-Ig 蛋白在宿主細胞中表現或更佳 DVD-Ig 蛋白分泌至宿主細胞生長之培養基中之時間來產生。DVD-Ig 蛋白可使用標準蛋白質純化方法自培養基中回收。

在重組表現適用於本發明之 DVD-Ig 蛋白的較佳系統中，將編碼 DVD-Ig 重鏈及 DVD-Ig 輕鏈兩者之重組表現載體藉由磷酸鈣介導之轉染引入 dhfr-CHO 細胞中。在重組表現載體內，將 DVD-Ig 重鏈及輕鏈基因各自可操作地連接於 CMV 強化子/AdMLP 啟動子調節元件上以驅動基因之高水準轉錄。重組表現載體亦攜有 DHFR 基因，其允許使用甲胺喋呤選擇/擴增來選擇已經載體轉染之 CHO 細胞。培養所選轉型體宿主細胞以允許表現 DVD-Ig 重鏈及輕鏈且將完整 DVD-Ig 蛋白自培養基中回收。將標準分子生物學技術用以製備重組表現載體，轉染宿主細胞，選擇轉型體，培養宿主細胞及自培養基中回收 DVD-Ig 蛋白。另外，本發明提供藉由在適合培養基中培養本發明之宿主細胞直至合成本發明之 DVD-Ig 蛋白來合成本發明之 DVD-Ig

蛋白的方法。該方法可進一步包含自培養基中分離DVD-Ig蛋白。

DVD-Ig結合蛋白之重要特徵在於，其可以與習知抗體類似的方式製造及純化。製造DVD-Ig結合蛋白產生具有所需雙重特異性活性之均質單一主要產物，而無恆定區之任何序列修飾或任何種類之化學修飾。先前描述之生成「雙特異性」、「多特異性」及「多特異性多價」全長結合蛋白之其他方法不產生單一初級產物，而實際上引起經組裝之非活性、單特異性、多特異性、多價、全長結合蛋白及具有不同結合位點之組合的多價全長結合蛋白之混合物的細胞內或分泌產生。舉例而言，基於由Miller及Presta描述之設計(PCT公開案第WO2001/077342號)，存在重鏈及輕鏈之16種可能組合。因此，僅6.25%之蛋白質可能呈所需活性形式。使用通常用於大規模製造中之標準層析技術來將完全活性形式之蛋白自非活性及部分活性形式之蛋白分離仍有待證明。

令人驚訝的是，設計DVD-Ig結合蛋白(其為「雙重特異性多價全長結合蛋白」)使雙重可變域輕鏈及雙重可變域重鏈主要組裝成所需「雙重特異性多價全長結合蛋白」，亦即功能性DVD-Ig結合蛋白。參見PCT公開案第WO2007/024715號。

II. 結晶及衍生結合蛋白

本發明包括治療骨關節炎之方法及組合物，其中結合蛋白為晶體。在一個實施例中，結晶結合蛋白具有比結合蛋

白之可溶性對應物大之活體內半衰期。在另一實施例中，結合蛋白在結晶後保留生物活性。

適用於本發明之結晶結合蛋白可根據此項技術中已知且如PCT公開案第WO 02072636號中所揭示之方法製造，該公開案係以引用的方式併入本文中。

本發明之另一實施例採用糖基化結合蛋白，其中結合蛋白或其抗原結合部分包含一或多個碳水化合物殘基。初期活體內蛋白質產生可經歷稱為轉譯後修飾之進一步加工。詳言之，可酶促添加糖(糖基)殘基，亦即一種稱為糖基化之過程。所得具有共價連接之寡醣側鏈之蛋白質係稱為糖基化蛋白質或醣蛋白。抗體為在Fc結構域以及可變域中具有一或多個碳水化合物殘基之醣蛋白。Fc結構域中之碳水化合物殘基對Fc結構域之效應功能具有重要影響，且對抗體之抗原結合或半衰期之影響最小(Jefferis (2005) *Biotechnol. Prog.*, 21: 11-16)。相比之下，可變域之糖基化可對抗體之抗原結合活性產生影響。可變域中之糖基化可能由於位阻而可對抗體結合親和力具有負面影響(Co等人(1993) *Mol. Immunol.* 30: 1361-1367)或導致對抗原之親和力增大(Wallick等人(1998) *Exp. Med.* 168:1099-1109; Wright等人(1991) *EMBO J.* 10:2717-2723)。

亦可能生成糖基化位點突變體，其中結合蛋白之O連接或N連接之糖基化位點已突變。熟習此項技術者可使用標準技術生成該等突變體。保留生物活性但結合活性增大或減小之糖基化位點突變體亦可用於本文所述之治療骨關節

炎之方法及組合物中。

可修飾適用於本發明之方法及組合物中之結合蛋白或其抗原結合部分之糖基化。舉例而言，可製備非糖基化抗體(亦即缺乏糖基化之抗體)。糖基化可經改動以例如增加抗體對抗原之親和力。可藉由例如改動抗體序列內之一或多個糖化位點實現該等碳水化合物之修飾。舉例而言，可進行一或多個胺基酸取代，導致消除一或多個可變區糖基化位點，從而消除該位點處之糖基化。該非糖基化可增加抗體對抗原之親和力。該方法進一步詳細描述於PCT公開案第 WO 2003/016466 號及美國專利第 5,714,350 號及第 6,350,861 號中。

或者或另外，可製備適用於本發明之經修飾之結合蛋白，其具有改變類型之糖基化，諸如具有減少量之岩藻糖基殘基之低岩藻糖基化抗體或具有增加之二等分 GlcNAc 結構之抗體。已證明該等改變之糖基化型態增加抗體之 ADCC 能力。該等碳水化合物修飾可藉由例如在具有改變之糖基化機構之宿主細胞中表現結合蛋白來實現。糖基化機構改變之細胞已在此項技術中得以描述且可用作表現本發明之重組抗體從而產生糖基化改變之抗體的宿主細胞。參見例如 Shields 等人(2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740; Umana 等人(1999) Nat. Biotech. 17: 176-181 以及歐洲專利第 EP 1,176,195 號；及 PCT 公開案第 WO 03/035835 號及第 WO 99/5434280 號。

蛋白質糖基化視所關注蛋白質之胺基酸序列以及表現蛋

白質之宿主細胞而定。不同生物體可產生不同糖基化酶(例如糖基轉移酶及糖苷酶)，且具有不同可用受質(核苷酸糖)。歸因於該等因素，蛋白質糖基化型態及糖基殘基之組成可視表現特定蛋白質之宿主系統而不同。適用於本發明之結合蛋白之糖基殘基可包括(但不限於)葡萄糖、半乳糖、甘露糖、岩藻糖、n-乙醯葡糖胺及唾液酸。糖基化結合蛋白較佳包含使糖基化型態為人類型態之糖基殘基。

熟習此項技術者已知不同蛋白質糖基化可產生不同蛋白質特徵。舉例而言，在諸如酵母之微生物宿主中產生且利用酵母內源性路徑糖基化之治療性蛋白的功效可比於諸如CHO細胞株之哺乳動物細胞中表現之相同蛋白質的功效低。該等醣蛋白亦可在人類體內具有免疫原性且在投藥後展示縮短之活體內半衰期。人類及其他動物中之特定受體可識別特定糖基殘基且促進蛋白質自血流中快速清除。其他副作用可包括蛋白質摺疊、溶解性、對蛋白酶之敏感度、運輸、轉運、區室化、分泌、由其他蛋白質或因子識別、抗原性或變應原性的改變。因此，醫師可能偏好具有特定糖基化組成及型態(例如與人類細胞或預定個體動物之物種特異性細胞中所產生之糖基化組成及型態相同或至少類似的糖基化組成及型態)之治療性蛋白。

表現不同於宿主細胞之糖基化蛋白的糖基化蛋白可藉由遺傳修飾宿主細胞以表現異源糖基化酶來實現。醫師可使用此項技術中已知之技術製造展現人類蛋白質糖基化之抗體或其抗原結合部分。舉例而言，已遺傳修飾酵母菌株以

表現非天然存在之糖基化酶，使得在此等酵母菌株中產生之糖基化蛋白(醣蛋白)顯示出與動物細胞(尤其人類細胞)產生之糖基化蛋白相同的蛋白質糖基化(美國專利公開案第2004/0018590號及第2002/0137134號及PCT公開案第WO 2005/100584號)。

另外，熟習此項技術者應瞭解可使用經基因工程改造以表現各種糖基化酶之宿主細胞文庫來表現所關注之蛋白質，使得該文庫之成員宿主細胞產生具有變異糖基化型態之所關注之蛋白質。醫師可隨後選擇並分離具有特定新穎糖基化型態之所關注之蛋白質。具有經特定選擇之新穎糖基化型態之蛋白質較佳展現改良或改變之生物學性質。

IV. 醫藥組合物

本發明之方法採用用於治療個體之骨關節炎或疼痛的醫藥組合物，該等醫藥組合物包含一或多種結合IL-1 α 及/或IL-1 β 之結合蛋白。該等組合物亦可包含醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及/或賦形劑、或向該組合物提供所需治療、醫藥或藥理學益處(除結合IL-1 α 及/或IL-1 β 之一或多種結合蛋白之活性以外)之任何其他化合物。在一個實施例中，本發明之適用於治療個體之骨關節炎或疼痛的組合物包含結合IL-1 α 之結合蛋白(例如抗IL-1 α 抗體)及結合IL-1 β 之結合蛋白(諸如抗IL-1 β 抗體)，或結合IL-1 α 及/或IL-1 β 兩者之結合蛋白(諸如IL-1 α / β DVD-Ig結合蛋白)。

適用於本發明方法之結合蛋白可併入適於投與個體之醫藥組合物中。醫藥組合物通常包含一或多種結合IL-1 α 及/

或 IL-1 β 之結合蛋白及醫藥學上可接受之載劑。如本文所用，「醫藥學上可接受之載劑」廣泛包括生理學可相容之任何及所有溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌劑、等張劑及吸收延遲劑以及其類似載劑。醫藥學上可接受之載劑之實例包括水、生理食鹽水、磷酸鹽緩衝之生理食鹽水、右旋糖、甘油、乙醇及其類似物中之一或多者以及其組合。在許多情況下，在組合物中較佳包括等張劑，例如糖、多元醇(例如甘露醇或山梨糖醇)或氯化鈉。醫藥學上可接受之載劑可進一步包含少量輔助物質，諸如濕潤劑或乳化劑、防腐劑或緩衝劑，其可提高抗體或抗體部分之存放期或效用。

各種傳遞系統係已知的且可用於投與一或多種適用於本發明之結合蛋白或一或多種結合蛋白與適用於預防、控制、治療或改善個體之骨關節炎或疼痛的預防劑或其他治療劑之組合，例如囊封於脂質體、微粒、微囊中、能夠表現結合蛋白或片段之重組細胞及受體介導之內飲作用(參見例如 Wu 及 Wu (1987) J. Biol. Chem., 262: 4429-4432)，構築作為反轉錄病毒或其他載體之一部分的核酸等。向個體投與結合 IL-1 α 及/或 IL-1 β 之結合蛋白的方法包括(但不限於)非經腸投藥(例如皮內、肌內、腹膜內、靜脈內及皮下)、硬膜外投藥、瘤內投藥及黏膜投藥(例如鼻內及經口途徑)。另外，可例如藉由使用吸入器或噴霧器及具有氣溶膠化劑之調配物採用肺部投藥。參見例如美國專利第 6,019,968 號；第 5,985,320 號；第 5,985,309 號；第 5,934,272

號；第 5,874,064 號；第 5,855,913 號；及第 5,290,540 號；及 PCT 公開案第 WO 92/19244 號、第 WO 97/32572 號、第 WO 97/44013 號、第 WO 98/31346 號及第 WO 99/66903 號。在一個實施例中，使用 Alkermes AIR® 肺部藥物傳遞技術 (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.) 投與適用於本發明之結合蛋白。在一特定實施例中，肌內、靜脈內、瘤內、經口、鼻內、肺部或皮下投與適用於本發明之結合蛋白。結合蛋白可藉由任何適宜途徑投與，例如藉由輸注或快速注射，藉由經由上皮或黏膜皮膚外膜 (例如口腔黏膜、直腸及腸黏膜等) 吸收且可與其他生物活性劑一起投與。投藥可為全身或局部投藥。

在一特定實施例中，可能需要將結合蛋白局部投與需要治療之區域，諸如直接投與關節區域。其可藉由例如 (但不限於) 局部輸注、藉由注射或藉助於植入物來達成，其中該植入物為多孔或無孔材料，包括膜及基質，諸如矽橡膠膜、聚合物、纖維基質 (例如 Tissuel®) 或膠原蛋白基質。在一個實施例中，將有效量之一或多種結合蛋白局部投與患病關節以治療、控制、改善及/或預防軟骨退化之進一步進展，否則該進一步進展將在骨關節炎 (包括疼痛) 中出現。在另一實施例中，將有效量之一或多種結合蛋白與有效量之除結合蛋白以外之一或多種其他療法 (例如一或多種預防劑或治療劑) 組合局部投與患病關節以預防、治療、控制及/或改善骨關節炎或其一或多種症狀 (包括疼痛)。

在另一實施例中，IL-1 α 及IL-1 β 結合蛋白可在控制釋放系統或持續釋放系統中傳遞。在一個實施例中，可使用泵以達成控制或持續釋放(參見Langer (1990) *Science* 249:1527-1533；Sefton (1987) *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.*, 14: 201-240；Buchwald等人(1980) *Surgery*, 88: 507-516；Saudek等人(1989) *N. Engl. J. Med.*, 321: 574-579)。在另一實施例中，可使用聚合材料達成適用於本發明之結合蛋白的控制或持續釋放(參見例如**Medical Applications of Controlled Release**, (Langer及Wise, 編) (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1984)；**Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance**, (Smolen及Ball, 編) (Wiley, New York, 1984)；Langer及Peppas (1983) *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys.*, C23: 61-126；亦參見Levy等人(1985) *Science* 228:190-192；During等人(1989) *Ann. Neurol.*, 25: 351-356；Howard等人(1989) *J. Neurosurg.* 71:105-112)；美國專利第5,679,377號；第5,916,597號；第5,912,015號；第5,989,463號；及第5,128,326號；及PCT公開案第WO 99/15154號及第WO 99/20253號)。用於持續釋放型調配物之聚合物之實例包括(但不限於)聚(2-羥基甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)、聚(甲基丙烯酸)、聚乙交酯(PLG)、聚酸酐、聚(N-乙烯吡咯啉酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯醯胺、聚(乙二醇)、聚乳酸交酯(PLA)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)及聚原酸酯。在一個實施例

中，用於持續釋放型調配物之聚合物為惰性的、不含可浸出雜質、儲存穩定、無菌且生物可降解。在另一實施例中，控制或持續釋放系統可鄰近於預防性或治療性目標置放，因此僅需要全身劑量之一部分(參見例如 Goodson, J.M., 第6章, **Medical Applications of Controlled Release**, 第II卷, **Applications and Evaluation**, (Langer及Wise, 編)(CRC Press, Inc., Boca Raton, 1984), 第115-138頁)。

控制釋放系統論述於 Langer, *Science*, 249: 1527-1533 (1990)之綜述中。可使用熟習此項技術者已知之任何技術製備包含一或多種本發明之治療劑之持續釋放型調配物。參見例如美國專利第4,526,938號；PCT公開案第WO 91/05548號及第WO 96/20698號；Ning等人(1996) *Radiother. Oncol.*, 39: 179-189；Song等人(1996) *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, 50: 372-377；Cleek等人(1997) *Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24: 853-854；及Lam等人(1997) *Proceed. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.*, 24: 759-760。

在一特定實施例中，當適用於本發明之組合物為編碼結合IL-1 α 及/或IL-1 β 之蛋白質的核酸時，該核酸可藉由將其構築成合適核酸表現載體之一部分且投與其以便其進入胞內而活體內投與以促進其編碼之預防劑或治療劑的表現，例如藉由使用反轉錄病毒載體(參見例如美國專利第4,980,286號)，或藉由直接注射，或藉由使用微粒轟擊(例如基因槍；Biolistic, DuPont)，或用脂質或細胞表面受體

或轉染劑塗佈，或藉由與已知進入細胞核之同源盒狀肽鍵聯而投與其(參見例如Joliot等人(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868)。或者，可將核酸引入細胞內且併入宿主細胞DNA中以藉由同源重組表現。

調配適用於本發明之治療骨關節炎或疼痛之醫藥組合物以與其預定投藥途徑相容。投藥途徑之實例包括(但不限於)非經腸，例如靜脈內、皮內、皮下、經口、鼻內(例如吸入)、經皮(例如局部)、經黏膜及直腸投藥。在一特定實施例中，組合物係根據常規程序調配成適於靜脈內、皮下、肌內、經口、鼻內或局部投與人類之醫藥組合物。用於靜脈內投與之組合物通常為於無菌等張水性緩衝液中之溶液。必要時，組合物亦可包括增溶劑及緩解注射部位之疼痛的局部麻醉劑(諸如利多卡因(lignocaine))。

若局部投與本發明中適用於治療骨關節炎或疼痛之組合物，則該等組合物可調配成軟膏、乳膏、經皮貼片、洗劑、凝膠、香波、噴霧劑、氣溶膠、溶液、乳液形式或熟習此項技術者熟知之其他形式。參見例如 **Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms**, 第19版, (Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1995)。對於非噴霧形式之局部劑型，通常採用包含與局部施用相容之載劑或一或多種賦形劑且動態黏度較佳大於水之黏性至半固體或固體形式。其他適合之調配物包括(但不限於)懸浮液、散劑、擦劑、油膏及其類似物。在一個實施例中，該等調配物經滅菌或與助劑(例

如防腐劑、穩定劑、濕潤劑、緩衝劑或鹽)混合以影響各種性質，諸如滲透壓。其他適合之局部劑型包括可噴霧之氣溶膠製劑，其中活性成分例如以及固體或液體惰性載劑與加壓揮發性物質(例如氣體推進劑，諸如FREON®)混合封裝或封裝於壓擠瓶中。必要時，亦可向醫藥組合物及劑型中添加增濕劑或保濕劑。該等其他成分之實例為此項技術中所熟知。

若本發明之治療骨關節炎或疼痛之方法包含鼻內投與組合物，則該組合物可調配成氣溶膠形式、噴霧劑、霧劑或滴劑形式。詳言之，根據本發明使用之結合蛋白宜以自加壓包裝或霧化器中之氣溶膠噴霧呈遞形式藉助於合適之推進劑(例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合適氣體)傳遞。在加壓氣溶膠之情況下，劑量單位可藉由提供閥門以傳遞定量之量來確定。可調配含有化合物與諸如乳糖或澱粉之合適粉末基劑之粉末混合物的膠囊及藥包(由例如明膠構成)用於吸入器或吹入器。

若本發明之治療骨關節炎或疼痛之方法包含口服，則組合物可以口服方式調配成錠劑、膠囊、扁膠劑、膠囊錠、溶液、懸浮液及其類似物形式。錠劑或膠囊可藉由習知方式用醫藥學上可接受之賦形劑製備，該等賦形劑係諸如黏合劑(例如預膠凝化玉米澱粉、聚乙烯吡咯啶酮或羥基丙基甲基纖維素)；填充劑(例如乳糖、微晶纖維素或磷酸氫鈣)；潤滑劑(例如硬脂酸鎂、滑石或矽石)；崩解劑(例如

馬鈴薯澱粉或乙醇酸澱粉鈉)；或濕潤劑(例如十二烷基硫酸鈉)。可藉由此項技術中熟知之方法包覆該等錠劑。口服液體製劑可採用(但不限於)溶液、糖漿或懸浮液形式，或其可呈現為在使用之前用水或其他適合媒劑復原之乾燥產品。該等液體製劑可藉由習知方式用醫藥學上可接受之添加劑製備，該等添加劑係諸如懸浮劑(例如山梨糖醇糖漿、纖維素衍生物或氫化可食用脂肪)；乳化劑(例如卵磷脂或阿拉伯膠)；非水性媒劑(例如杏仁油、油酯(oily ester)、乙醇或分餾植物油)；及防腐劑(例如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯或山梨酸)。該等製劑亦可酌情含有緩衝鹽、調味劑、著色劑及甜味劑。可適當調配口服製劑以便緩慢釋放、控制釋放或持續釋放本發明適用於治療骨關節炎或疼痛之結合蛋白。

本發明之治療骨關節炎之方法或治療疼痛之方法可包含肺部投與(例如藉由使用吸入器或霧化器)與氣溶膠化劑一起調配之組合物。參見例如美國專利第6,019,968號；第5,985,320號；第5,985,309號；第5,934,272號；第5,874,064號；第5,855,913號及第5,290,540；及PCT公開案第WO 92/19244號；第WO 97/32572號；第WO 97/44013號；第WO 98/31346號及第WO 99/66903號。在一特定實施例中，使用Alkermes AIR®肺部藥物傳遞技術(Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts)投與結合IL-1 α 及/或IL-1 β 之結合蛋白或用於治療骨關節炎之組合療法。

本發明之方法可包含投與包含結合IL-1 α 及/或IL-1 β 之結

合蛋白的組合物，該組合物經調配用於藉由注射(例如藉由快速注射或連續輸液)進行非經腸投藥。用於注射之調配物可以添加有防腐劑之單位劑型(例如於安瓿中或於多劑量容器中)存在。該等組合物可呈諸如在油性或水性媒劑中之懸浮液、溶液或乳液之形式，且可含有諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑之調配劑。或者，結合蛋白可呈在使用之前用合適之媒劑(例如無菌無熱原質水)復原之粉末形式。

本發明之方法可另外包含投與調配為儲槽式製劑形式之組合物。該等長效調配物可藉由植入(例如皮下或肌內)或藉由肌內注射投與。因此，舉例而言，組合物可用合適的聚合或疏水性物質(例如如於可接受之油中之乳液)或離子交換樹脂，或以微溶衍生物形式(例如以微溶鹽形式)調配。

本發明之方法涵蓋投與調配成中性或鹽形式之組合物。醫藥學上可接受之鹽包括與陰離子形成之鹽，諸如衍生自鹽酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等之鹽；及與陽離子形成之鹽，諸如衍生自氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣、氫氧化鐵、異丙胺、三乙胺、2-乙基胺基乙醇、組胺酸、普魯卡因(procaine)等之鹽。

組合物之成分通常單獨或混合在一起以單位劑型(例如以乾燥凍乾粉末或無水濃縮物形式)提供於指示活性劑之量之密封容器(諸如安瓿或藥囊)中。當投藥模式為輸注時，組合物可以含有無菌醫藥級水或生理食鹽水之輸液瓶

分配。當投藥模式為注射時，可提供注射用無菌水或生理食鹽水之安瓿以便成分可在投藥之前混合。

本發明亦提供一或多種結合IL-1 α 及/或IL-1 β 之結合蛋白或包含該等結合蛋白之封裝於密閉容器(諸如指示藥劑量之安瓿或藥囊)中之醫藥組合物。在一個實施例中，一或多種結合IL-1 α 及/或IL-1 β 之結合蛋白或包含該(等)結合蛋白之醫藥組合物以乾燥滅菌凍乾粉末或無水濃縮物形式於密閉容器中供應，且可復原(例如用水或生理食鹽水)至合適濃度以便投與個體來治療關節炎或疼痛。在一個實施例中，一或多種結合IL-1 α 及/或IL-1 β 之結合蛋白或包含該(等)結合蛋白之醫藥組合物以乾燥無菌凍乾粉末形式，以至少約5 mg、至少約10 mg、至少約15 mg、至少約25 mg、至少約35 mg、至少約45 mg、至少約50 mg、至少約75 mg或至少約100 mg之單位劑量於密閉容器中供應。凍乾結合蛋白或包含該(等)結合蛋白之醫藥組合物應在約2°C至約8°C下儲存於其原始容器中，且結合蛋白或包含該(等)結合蛋白之醫藥組合物應在復原後於1週內、5天內、72小時內、48小時內、24小時內、12小時內、6小時內、5小時內、3小時內或1小時內投與。在一替代實施例中，一或多種結合IL-1 α 及/或IL-1 β 之結合蛋白或包含該(等)結合蛋白之醫藥組合物以液體形式於指示藥劑數量及濃度之密閉容器中供應。在一個實施例中，所投與之組合物的液體形式以至少約0.25 mg/ml、至少約0.5 mg/ml、至少約1 mg/ml、至少約2.5 mg/ml、至少約5 mg/ml、至少約8

mg/ml、至少約 10 mg/ml、至少約 15 mg/kg、至少約 25 mg/ml、至少約 50 mg/ml、至少約 75 mg/ml或至少約 100 mg/ml於密閉容器中供應。液體形式應在約 2°C 至約 8°C 下儲存於其原始容器中。

適用於本文所述之方法及組合物之結合蛋白可併入適於非經腸投藥之醫藥組合物中。在一個態樣中，結合蛋白應製備成含有約 0.1 mg/ml至約 250 mg/ml抗體之可注射溶液。可注射溶液可由於無色或琥珀色小瓶、安瓿或預填充注射器中之液體或凍乾劑型構成。緩衝劑可為在約 pH 5.0 至約 7.0(最佳約 pH 6.0)下之 L-組胺酸(約 1 mM至約 50 mM)，最佳約 5 mM至約 10 mM。其他合適緩衝劑包括(但不限於)琥珀酸鈉、檸檬酸鈉、磷酸鈉或磷酸鉀。氯化鈉可用於改變在約 0 至約 300 mM(對於液體劑型最佳 150 mM)之濃度下的溶液之毒性。對於凍乾劑型，可包括低溫保護劑，主要為約 0%至約 10%之蔗糖(最佳約 0.5%至約 1.0%)。其他合適低溫保護劑包括海藻糖及乳糖。對於凍乾劑型，可包括增積劑，主要為約 1%至約 10%之甘露醇(最佳約 2%至約 4%)。穩定劑可用於液體劑型及凍乾劑型兩者中，主要為約 1 mM至約 50 mM之 L-甲硫胺酸(最佳約 5 mM至約 10 mM)。其他合適增積劑包括甘胺酸、精胺酸，可包括約 0%至約 0.05%之聚山梨醇酯-80(最佳約 0.005%至約 0.01%)。其他界面活性劑包括(但不限於)聚山梨酸酯 20及 BRIJ 界面活性劑。

本發明之適用於治療骨關節炎或疼痛之組合物可呈多種

形式。該等形式包括(例如)液體、半固體及固體劑型，諸如液體溶液(例如可注射溶液及可輸注溶液)、分散液或懸浮液、錠劑、丸劑、散劑、脂質體及栓劑。特定形式視預定投藥模式及治療應用而定。典型組合物呈可注射或可輸注溶液形式，諸如與用於以其他抗體使人類被動免疫之彼等組合物相似之組合物。投藥模式為非經腸(例如靜脈內、皮下、腹膜內、肌內)。在一個實施例中，藉由靜脈內輸注或注射來投與抗體。在另一實施例中，藉由肌內或皮下注射來投與抗體。

治療組合物通常必須在製造及儲存條件下無菌且穩定。組合物可調配成溶液、微乳液、分散液、脂質體或適於高藥物濃度之其他有序結構。無菌可注射溶液可藉由將所需量之活性化合物(亦即抗體或其抗原結合部分)視需要與以上列舉之成分中之一者或成分之組合一起併入適當溶劑中，接著過濾滅菌來製備。通常藉由將活性化合物併入無菌媒劑中來製備分散液，該無菌媒劑含有基礎分散介質及來自上文所列舉之成分之其他所需成分。在用於製備無菌可注射溶液之無菌凍乾粉末之情況下，例示性製備方法為真空乾燥及噴霧乾燥，該噴霧乾燥產生活性成分加來自其先前無菌過濾之溶液的任何其他所需成分的粉末。可例如藉由使用諸如卵磷脂之包衣、在分散液之情況下藉由維持所需粒度及藉由使用界面活性劑來維持溶液之適當流動性。可注射組合物之延長吸收可藉由在組合物中納入例如單硬脂酸鹽及明膠之延遲吸收劑來達成。

雖然例示性投藥途徑/模式為皮下注射、靜脈內注射或輸注，但本發明之適用於治療骨關節炎或疼痛之結合蛋白可藉由此項技術中已知的多種方法投與。如熟練技術人員應瞭解，投藥途徑及/或投藥模式將視所需結果而變化。在某些實施例中，結合蛋白可與保護結合蛋白免於快速釋放之載劑一起製備，諸如控制釋放調配物，包括植入物、經皮貼片及微囊封傳遞系統。可使用生物可降解、生物相容性聚合物，諸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原蛋白、聚原酸酯及聚乳酸。製備該等調配物之許多方法均已取得專利權或一般為熟習技術者所知。參見例如 **Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems**, J. R. Robinson編, (Marcel Dekker, Inc., New York, 1978)。

在某些實施例中，適用於本發明之結合蛋白可例如與惰性稀釋劑或可同化之食用載劑一起經口投與。結合蛋白(及其他成分，若需要)亦可封裝於硬殼或軟殼明膠膠囊中，壓縮成錠劑，或直接併入個體膳食中。對於經口治療性投藥而言，可將化合物與賦形劑合併且以可攝取錠劑、頰內錠劑、片劑、膠囊、酏劑、懸浮液、糖漿、糯米紙囊劑及其類似物之形式使用。為經由除非經腸投藥以外之形式投與本發明化合物，可能有必要用防止其不活化之材料包覆化合物或將化合物與防止其不活化之材料共投與。

亦可在組合物中併入輔助性活性化合物。在某些實施例中，將適用於本發明之結合蛋白(例如抗體)或其抗原結合部分與適用於治療骨關節炎或疼痛之一或多種其他治療劑

一起共調配及/或共投與。舉例而言，結合 hIL-1 α 及/或 hIL-1 β 之結合蛋白或其抗原結合部分可與一或多種結合其他目標之其他抗體(例如結合其他細胞激素或結合細胞表面分子之抗體)一起共調配及/或共投與。此外，一或多種結合蛋白可與一或多種其他治療劑組合使用。該等組合療法宜利用較低劑量之所投與治療劑，從而避免與各種單一療法相關之可能毒性或併發症。

在某些實施例中，將結合 IL-1 α 及/或 IL-1 β 之蛋白或其結合部分與此項技術中已知的半衰期延長媒劑連接。該等媒劑包括(但不限於)Fc結構域、聚乙二醇及葡聚糖。該等媒劑描述於例如美國專利第 6,660,843 號中。

在一特定實施例中，經由基因療法投與包含編碼結合蛋白之一或多個多肽之核苷酸序列的核酸分子以治療、預防、控制或改善骨關節炎。基因療法係指藉由向個體投與已表現或可表現之核酸所執行之療法。在本發明之該實施例中，核酸產生其所編碼之結合蛋白之結合多肽，該(等)結合蛋白結合 IL-1 α 及/或 IL-1 β 且介導關於骨關節炎或疼痛之預防或治療作用。

根據本發明可使用此項技術中可利用之用於基因療法之任何方法。關於基因療法之方法的綜述，參見 Goldspiel 等人 (1993) Clin. Pharm. 12:488-505；Wu 及 Wu (1991) Biotherapy 3: 87-95；Tolstoshev (1993) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596；Mulligan (1993) Science 260: 926-932；Morgan 及 Anderson (1993) Ann. Rev. Biochem.

62:191-217 ; 及 Robinson, C. (1993) Trends Biotechnol. 11(5):155。可使用的此項技術中通常已知之重組DNA技術之方法描述於 Ausubel 等人(編), **Current Protocols in Molecular Biology** (John Wiley & Sons, New York, 1993); 及 Kriegler, **Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual**, (Stockton Press, New York, 1990)中。基因療法之各種方法的詳細描述揭示於美國專利申請公開案第 2005/0042664 號中。

結合 IL-1 α 及 / 或 IL-1 β 之結合蛋白可單獨使用或與一或多種適用於治療骨關節炎或疼痛之其他藥劑組合使用。舉例而言，其他藥劑可為此項技術公認的適用於治療骨關節炎之一或多種症狀或影響除 IL-1 以外的與疼痛相關之目標的治療劑。其他藥劑亦可為賦予治療組合物以有利屬性之藥劑，例如影響欲投與個體之組合物之黏度的藥劑。

應進一步瞭解，將包括在本發明內之組合為適用於其預定目的之組合。以下列舉之藥劑係出於說明目的且不意欲限制。作為本發明之一部分的組合可為結合 IL-1 α 及 / 或 IL-1 β 之結合蛋白及至少一種提供所需性質的其他藥劑。組合亦可包括一種以上其他藥劑，例如兩種或三種其他藥劑，只要該組合使得所形成之組合物可執行其預定作用即可。治療骨關節炎或疼痛之較佳組合包括非類固醇消炎藥(亦稱為「NSAIDS」)，其包括如布洛芬之藥物。其他較佳組合為消炎劑，包括皮質類固醇(諸如潑尼龍)；類固醇使用之熟知副作用可藉由在治療患者時與結合 IL-1 α 及 / 或 IL-1 β

之結合蛋白組合逐漸減少所需類固醇劑量來減少或甚至消除。適用於治療罹患骨關節炎或疼痛之個體之治療劑的非限制性實例可包括(但不限於)以下一或多者：布地奈德、表皮生長因子、皮質類固醇、環孢素、柳氮磺胺吡啶、胺基水楊酸鹽、6-巰基嘌呤、硫唑嘌呤、甲硝達唑、脂肪加氧酶抑制劑、美沙拉嗪、奧色拉嗪、巴柳氮、抗氧化劑、血栓素抑制劑、IL-1受體拮抗劑、抗IL-1 β 單株抗體、抗IL-6單株抗體、生長因子、彈性酶抑制劑、吡啶基-咪唑化合物；TNF、LT、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-18、IL-23、EMAP-II、GM-CSF、FGF及PDGF之抗體；CD2、CD3、CD4、CD8、CD-19、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90或其配位體之抗體；甲胺喋呤、環孢素、FK506、雷帕黴素、黴酚酸嗎啉乙酯、來氟米特、NSAID、布洛芬、皮質類固醇、潑尼龍、磷酸二酯酶抑制劑、腺苷促效劑、抗血栓劑、補體抑制劑、腎上腺素激導劑、IRAK、NIK、IKK、p38、MAP激酶抑制劑、IL-1 β 轉化酶抑制劑、TNF α 轉化酶抑制劑、T細胞信號傳導抑制劑、金屬蛋白酶抑制劑、柳氮磺胺吡啶、硫唑嘌呤、6-巰基嘌呤、血管緊張素轉化酶抑制劑、可溶性細胞激素受體、可溶性p55 TNF受體、可溶性p75 TNF受體、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R、抗發炎細胞激素、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13及TGF β 。

本發明之醫藥組合物可包括「治療有效量」或「預防有效量」之一或多種結合IL-1 α 及/或IL-1 β 之結合蛋白。「治

療有效量」係指在必需劑量下及在必需時間內有效達成所需治療結果的量。結合蛋白之治療有效量可由熟習此項技術者確定且可根據諸如疾病狀況、個體之年齡、性別及體重以及結合蛋白在個體中引起所需反應之能力之因素而變化。治療有效量亦為結合蛋白或其部分之任何毒性或有害效應被治療有利效應超過之量。「預防有效量」係指在必需劑量下及在必需時間內有效達成所需預防結果(諸如預防骨關節炎之患病關節中關節軟骨的進一步退化或損失或預防疼痛發作或加劇)之量。通常，因為預防劑量係在疾病之前或在疾病早期階段時用於個體，所以預防有效量將小於治療有效量。

在一個實施例中，本發明提供一種治療個體疼痛之方法，其中該個體罹患與IL-1積聚相關之疾病或病症。個體中之該IL-1積聚可為IL-1表現減少或IL-1代謝減少之結果。IL-1積聚可在個體之血液(包括血漿、血清)或局部組織中出現。

在一個實施例中，本發明提供一種治療個體疼痛的方法，其中該個體罹患與IL-1積聚相關之疾病或病症。

在一個實施例中，本文所述之組合物及方法可用於治療罹患選自包含以下之群之疾病或病症之個體的疼痛：骨關節炎、類風濕性關節炎、青少年慢性關節炎、敗血性關節炎、萊姆關節炎、牛皮癬性關節炎、反應性關節炎、脊椎關節病、全身性紅斑狼瘡症、克羅恩氏病、潰瘍性結腸炎、發炎性腸病、胰島素依賴型糖尿病、甲狀腺炎、哮

喘、過敏性疾病、牛皮癬、皮炎、硬皮病、移植物抗宿主疾病、器官移植排斥、與器官移植相關之急性或慢性免疫疾病、類肉瘤病、動脈粥樣硬化、瀰漫性血管內凝血、川崎氏病、格雷氏病、腎病症候群、慢性疲勞症候群、韋格納氏肉芽腫病、亨-舒氏紫癍、腎顯微性血管炎、慢性活動性肝炎、葡萄膜炎、敗血性休克、毒性休克症候群、敗血症候群、惡病質、傳染性疾病、寄生蟲病、急性橫貫性脊髓炎、亨廷頓氏舞蹈病、帕金森氏病、阿茲海默氏病、中風、原發性膽汁性肝硬化、溶血性貧血、惡性病、心臟衰竭、心肌梗塞、阿狄森氏病、I型偶發性多腺體分泌不足症、II型多腺體分泌不足症(施密特氏症候群)、成人(急性)呼吸窘迫症候群、脫髮、斑形脫髮、血清陰性關節病、關節病、萊特爾氏病、牛皮癬性關節病、潰瘍性結腸炎性關節病、腸病性滑膜炎、衣原體相關關節病、耶氏桿菌相關關節病、沙門氏菌相關關節病、脊椎關節病、動脈粥樣化疾病/動脈硬化、異位性過敏、自體免疫大疱病、尋常天疱瘡、葉狀天疱瘡、類天疱瘡、線狀IgA疾病、自體免疫溶血性貧血、庫姆氏陽性溶血性貧血、後天性惡性貧血、青少年惡性貧血、肌痛腦炎/皇家自由疾病、慢性皮膚黏膜念珠菌病、巨細胞性動脈炎、原發性硬化性肝炎、隱源性自體免疫肝炎、後天性免疫缺乏症候群、後天性免疫缺乏相關疾病、B型肝炎、C型肝炎、普通變異性免疫缺乏(普通變異性低 γ 球蛋白血症)、擴張型心肌病、女性不孕症、卵巢衰竭、卵巢早衰、纖維變性肺病、隱源性

纖維化肺泡炎、發炎後間質肺病、間質肺炎、結締組織病相關間質肺病、混合性結締組織病相關肺病、全身性硬化症相關間質肺病、類風濕性關節炎相關間質肺病、全身性紅斑狼瘡相關肺病、皮膚炎/多肌炎相關肺病、休格連氏病相關肺病、僵直性脊椎炎相關肺病、血管炎擴散性肺病、含鐵血黃素沈積症相關肺病、藥物誘發性間質肺病、纖維化、放射性纖維化、閉塞性細支氣管炎、慢性嗜伊紅血球性肺炎、淋巴球浸潤性肺病、感染後間質肺病、痛風性關節炎、自體免疫肝炎、1型自體免疫肝炎(經典自體免疫或類狼瘡肝炎)、2型自體免疫肝炎(抗LKM抗體肝炎)、自體免疫介導之低血糖症、B型胰島素抗性伴黑棘皮病、副甲狀腺低能症、與器官移植相關之急性免疫疾病、與器官移植相關之慢性免疫疾病、骨關節炎、原發性硬化性膽管炎、1型牛皮癬、2型牛皮癬、特發性白血球減少症、自體免疫嗜中性球減少症、NOS型腎病、絲球體腎炎、腎顯微性血管炎、萊姆病、盤狀紅斑狼瘡、特發性或NOS型男性不育症、精子自體免疫性、多發性硬化症(所有亞型)、交感性眼炎、結締組織病繼發性肺高血壓、古巴士德氏症候群、結節性多動脈炎之肺表現、急性風濕熱、類風濕性脊椎炎、斯蒂爾氏病、全身性硬化症、休格連氏症候群、高安氏病/動脈炎、自體免疫血小板減少症、特發性血小板減少症、自體免疫性甲狀腺病、甲狀腺機能亢進、甲狀腺腫性自體免疫甲狀腺低能症(橋本氏病)、萎縮性自體免疫甲狀腺低能症、原發性黏液水腫、晶狀體源性葡萄膜

炎、原發性脈管炎、白斑症、急性肝病、慢性肝病、酒精性肝硬化、酒精誘發性肝損傷、膽汁淤積、特應性肝病、藥物誘發性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、過敏症、B群鏈球菌(GBS)感染、精神障礙(例如抑鬱症及精神分裂症)、Th2型及Th1型介導之疾病、急性及慢性疼痛(不同疼痛形式)、癌症(諸如肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、結腸癌、胰臟癌、卵巢癌、前列腺癌及直腸癌及造血性惡性病(白血病及淋巴瘤))、無 β 脂蛋白血症、手足發紺、急性及慢性寄生或感染過程、急性白血病、急性淋巴母細胞白血病(ALL)、急性骨髓白血病(AML)、急性或慢性細菌感染、急性胰臟炎、急性腎衰竭、腺癌、心房異位搏動、AIDS癡呆綜合症、酒精誘發性肝炎、過敏性結膜炎、過敏性接觸性皮炎、過敏性鼻炎、同種異體移植排斥、 α -1-抗胰蛋白酶缺乏、肌萎縮性側索硬化、貧血、心絞痛、前角細胞退化、抗CD3療法、抗磷脂症候群、抗受體過敏性反應、主動脈及周圍動脈動脈瘤、主動脈剝離、動脈高壓、動脈硬化、動靜脈瘤、共濟失調、心房纖維性顫動(持續性或突發性)、心房撲動、房室傳導阻滯、B細胞淋巴瘤、骨移植排斥、骨髓移植(BMT)排斥、束支傳導阻滯、勃克氏淋巴瘤、灼傷、心律不整、心臟頓抑症候群、心臟腫瘤、心肌病、心肺分流術發炎反應、軟骨移植排斥、小腦皮質退化、小腦病症、紊亂性或多灶性心房心動過速、化學療法相關病症、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性酒精中毒、慢性發炎性病變、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、慢性阻

塞性肺病(COPD)、慢性水楊酸中毒、結腸直腸癌、充血性心臟衰竭、結膜炎、接觸性皮炎、肺心病、冠狀動脈疾病、庫賈氏病、培養物陰性敗血症、囊腫性纖維化、細胞激素療法相關病症、拳擊員癡呆、脫髓鞘病、出血性登革熱、皮炎、皮膚病、糖尿病、糖尿病性動脈硬化病、泛發性路易體疾病、擴張性充血型心肌病、基底神經節病症、中年人唐氏綜合症、由阻斷CNS多巴胺受體之藥物誘發的藥物誘發性運動障礙、藥物過敏、濕疹、腦脊髓炎、心內膜炎、內分泌病、會厭炎、埃-巴二氏病毒感染、紅斑性肢痛、錐體外及小腦病症、家族性噬血淋巴組織細胞瘤病、胎兒胸腺植入排斥、弗里德賴希氏共濟失調、功能性外周動脈障礙、真菌性敗血症、氣性壞疽、胃潰瘍、腎小球性腎炎、任何器官或組織之移植物排斥、革蘭氏陰性敗血症、革蘭氏陽性敗血症、胞內生物引起之肉芽腫、毛細胞白血病、哈勒沃登-施帕茨病、橋本氏甲狀腺炎、花粉熱、心臟移植排斥、血色素沈著症、血液透析、溶血性尿毒症候群/血栓溶解性血小板減少性紫癜、出血、A型肝炎、希氏束心律失常、HIV感染/HIV神經病、霍奇金氏病、過動性運動障礙、過敏性反應、過敏性肺炎、高血壓、運動機能減退性運動障礙、下丘腦-垂體-腎上腺軸評估、特發性阿狄森氏病、特發性肺纖維化、抗體介導之細胞毒性、衰弱、嬰兒脊髓性肌萎縮、主動脈發炎、A型流感、電離輻射暴露、虹膜睫狀體炎/葡萄膜炎/視神經炎、缺血-再灌注損傷、缺血性中風、青少年類風濕性關節

炎、青少年脊髓性肌萎縮、卡波西氏肉瘤、腎臟移植排斥、軍團菌病、利什曼病、麻風、皮質脊髓系統病變、脂性水腫、肝臟移植排斥、淋巴水腫、瘧疾、惡性淋巴瘤、惡性組織細胞病、惡性黑色素瘤、腦膜炎、腦膜炎球菌血症、代謝性偏頭痛、特發性偏頭痛、粒線體多系統病症、混合性結締組織病、單株 γ 球蛋白病、多發性骨髓瘤、多系統退化(曼切、代哲因-托馬斯、史-德爾格及馬查多-約瑟夫(Menzel、Dejerine-Thomas、Shy-Drager及Machado-Joseph))、重症肌無力、細胞內鳥分枝桿菌、結核分枝桿菌、骨髓發育不良症候群、心肌梗塞、心肌缺血性病症、鼻咽癌、新生兒慢性肺病、腎炎、腎病、神經退化性疾病、神經性肌肉萎縮、中性白血球減少性發熱、非霍奇金氏淋巴瘤、腹主動脈及其支脈閉塞、動脈閉塞性病症、OKT3®療法、睪丸炎/副睪炎、睪丸炎/輸精管重新接合術、器官腫大、骨質疏鬆症、胰臟移植排斥、胰臟癌、腫瘤相關症候群/惡性血鈣過多、甲狀旁腺移植排斥、盆腔炎、常年性鼻炎、心包疾病、外周動脈粥樣硬化病、外周血管性病症、腹膜炎、惡性貧血、卡氏肺囊蟲肺炎、肺炎、POEMS症候群(多發性神經病、器官腫大、內分泌病、單株 γ 球蛋白病及皮膚變化症候群)、灌注後症候群、泵後症候群、MI心切開術後症候群、子癇前症、進行性核上麻痺、原發性肺動脈高壓、放射療法、雷諾氏現象、雷諾氏病、雷夫蘇姆氏病、規則性窄波QRS心動過速、腎血管高血壓、再灌注損傷、限制性心肌病、肉瘤、老年性舞

蹈病、路易體型老年癡呆症、血清陰性關節病、休克、鎌狀細胞貧血症、皮膚同種異體移植排斥、皮膚變化症候群、小腸移植排斥、實體腫瘤、特異性心律不整、脊髓性失調、脊髓小腦退化、鏈球菌性肌炎、小腦結構病變、亞急性硬化性全腦炎、昏厥、心血管系統梅毒、全身過敏、全身性發炎反應症候群、全身發病型青少年類風濕性關節炎、T細胞或FAB ALL、毛細血管擴張、閉塞性血栓血管炎、血小板減少症、中毒、移植、創傷/出血、III型過敏性反應、IV型過敏症、不穩定型心絞痛、尿毒症、尿敗血病、蕁麻疹、心臟瓣膜病、靜脈曲張、脈管炎、靜脈疾病、靜脈血栓形成、心室纖維性顫動、病毒及真菌感染、病毒性腦炎/無菌性腦膜炎、病毒相關噬血細胞性症候群、韋尼克-科爾薩科夫症候群、威爾森氏病、任何器官或組織之異種移植物排斥、急性冠狀動脈症候群、急性特發性多發性神經炎、急性發炎性脫髓鞘多神經根神經病、急性局部缺血、成人斯蒂爾氏病、斑形脫髮、全身性過敏反應、抗磷脂抗體症候群、再生不全性貧血、動脈硬化、異位性濕疹、異位性皮炎、自體免疫性皮炎、與鏈球菌感染相關之自體免疫病症、自體免疫腸病、自體免疫聽力損失、自體免疫淋巴組織增生症候群(ALPS)、自體免疫心肌炎、自體免疫卵巢早衰、睪炎、支氣管擴張症、大皰性類天疱瘡、心血管疾病、災難性抗磷脂症候群、乳糜瀉、頸椎關節病、慢性局部缺血、瘢痕性類天疱瘡、有多發性硬化症風險之臨床單一症候群(CIS)、兒童期發病型精神障

凝、慢性阻塞性肺病(COPD)、淚囊炎、皮膚炎、糖尿病
 性視網膜病、椎間盤突出症、椎間盤脫出症、藥物誘發型
 免疫性溶血性貧血、心內膜炎、子宮內膜異位、眼內炎、
 上鞏膜炎、多形性紅斑、重症多形性紅斑、妊娠期類天疱
 瘡、格林-巴利症候群(GBS)、花粉熱、休斯症候群、特發
 性帕金森氏病、特發性間質肺炎、IgE介導型過敏症、免
 疫性溶血性貧血、包涵體肌炎、感染性眼發炎症疾病、發
 炎性脫髓鞘病、發炎症心臟病、發炎症腎病、IPF/UIP、
 虹膜炎、角膜炎、乾燥性角結膜炎、庫氏病或庫-邁二氏
 病、蘭德里麻痺、朗格罕氏細胞組織細胞增生症、網狀青
 斑、黃斑變性、顯微性多血管炎、白赫鐵列夫症、運動神
 經元病症、黏膜類天疱瘡、多重器官衰竭、重症肌無力、
 骨髓發育不良症候群、心肌炎、神經根病症、神經病、非
 A非B型肝炎、視神經炎、骨質溶解、卵巢癌、少關節型
 JRA、外周動脈閉塞性疾病(PAOD)、外周血管疾病
 (PVD)、外周動脈疾病(PAD)、靜脈炎、結節性多動脈炎
 (或結節性動脈周炎)、多軟骨炎、風濕性多肌痛、白髮
 症、多關節型JRA、多內分泌缺乏症候群、多肌炎、風濕
 性多肌痛(PMR)、泵後症候群、原發性帕金森氏病、前列
 腺癌及直腸癌及造血性惡性病(白血病及淋巴瘤)、前列腺
 炎、純紅血球發育不全、原發性腎上腺機能不全、復發性
 視神經脊髓炎、再狹窄、風濕性心臟病、SAPHO(滑膜
 炎、痤瘡、膿皰病、骨肥大及骨炎)、繼發性澱粉樣變
 性、休克肺、鞏膜炎、坐骨神經痛、繼發性腎上腺機能不

全、聚矽氧相關結締組織病、斯-威二氏皮膚病、強直性脊柱炎、史蒂芬-瓊森症候群(SJS)、全身性發炎反應症候群、顳動脈炎、弓形蟲性視網膜炎、中毒性表皮壞死溶解、橫貫性脊髓炎、TRAPS(1型腫瘤壞死因子受體(TNFR)相關週期性症候群)、1型過敏反應、II型糖尿病、蕁麻疹、尋常間質肺炎(UIP)、脈管炎、春季結膜炎、病毒性視網膜炎、伏格特-小柳-原田三氏症候群(VKH症候群)、濕性黃斑變性及創傷癒合。

本文所述之組合物及方法可用於治療罹患選自由以下組成之群之疾病之個體的疼痛：原發性癌及轉移性癌，包括乳癌、結腸癌、直腸癌、肺癌、口咽癌、下咽癌、食道癌、胃癌、胰臟癌、肝癌、膽囊癌及膽管癌、小腸癌、泌尿道癌(包括腎癌、膀胱癌及尿道上皮癌)、女性生殖道癌(包括子宮頸癌、子宮癌、卵巢癌以及絨膜癌及妊娠滋養層病)、男性生殖道癌(包括前列腺癌、精囊癌、睪丸癌及生殖細胞腫瘤)、內分泌腺癌(包括甲狀腺癌、腎上腺癌及垂體腺癌)及皮膚癌以及血管瘤、黑色素瘤、肉瘤(包括骨及軟組織出現之肉瘤以及卡波西氏肉瘤)、腦腫瘤、神經癌、眼癌及腦膜癌(包括星形細胞瘤、神經膠質瘤、神經膠母細胞瘤、視網膜母細胞瘤、神經瘤、神經母細胞瘤、神經鞘瘤及腦膜瘤)、由諸如白血病及淋巴瘤(霍奇金氏淋巴瘤及非霍奇金氏淋巴瘤)之造血性惡性病引起之實體腫瘤。

可調整給藥方案以提供最佳所需反應(例如治療或預防

反應)。舉例而言，可投與單一大丸劑；可隨時間投與若干分次劑量；或可按治療情況之緊急需要指示按比例減少或增加劑量。出於投藥簡便性及劑量均一性之考慮，將非經腸組合物調配成單位劑型尤其有利。如本文中所使用之單位劑型係指適宜以整體劑量用於待治療之哺乳動物個體的物理個別單元；每一單元含有與所需醫藥載劑締合之經計算將產生所需治療效應之預定量的活性化合物。本發明之單位劑型的規格由以下因素規定且直接視其而定：(a)結合IL-1 α 及/或IL-1 β 之結合蛋白的獨特特徵及待達成之特定治療或預防效應，及(b)此項技術所固有之混配該(等)蛋白用於治療個體之限制。

適用於治療骨關節炎或疼痛之結合蛋白的治療或預防有效量之例示性非限制性範圍為0.1-20 mg/kg，更佳1-10 mg/kg。應注意，劑量值可隨待減輕之病狀之類型及嚴重程度而變化。應進一步瞭解，對於任何特定個體而言，特定給藥方案應根據個體需要及投與或監督組合物投與之人士的專業判斷隨著時間來加以調整，且本文中所述之劑量範圍僅為例示性的，而不意欲限制所主張之組合物的範疇或實踐。

熟習此項技術者將易於瞭解，本文所述之本發明之方法及組合物的其他合適修改及改編顯而易見且可使用不悖離本發明範疇之合適相等物或本文中所揭示之實施例進行。現已詳細描述本發明，參考下列實例將更清楚理解本發明，該等實例僅出於說明之目的包括在內且不意欲限制本

發明。

實例

實例 1. 生成雙重可變域免疫球蛋白(DVD-Ig)蛋白質

雙重可變域免疫球蛋白(DVD-Ig)分子經設計以藉由重組DNA技術使來自兩種不同親本mAb之兩個不同輕鏈可變域(VL)以串聯方式直接連接或經由短連接子連接，隨後為輕鏈恆定域。類似地，重鏈包含以串聯方式直接連接或經由短連接子連接之兩個不同重鏈可變域(VH)，隨後為恆定域CH1及Fc區。參見圖1A。已描述自親本單株抗體設計及製造DVD-Ig結合蛋白，包括由親本抗IL-1 α 單株抗體及親本抗IL-1 β 單株抗體產生結合於IL-1 α 及IL-1 β 之DVD-Ig結合蛋白的實例。參見PCT公開案第WO 2007/024715 A2號及Wu等人, *Nature Biotechnol.*, 25(11): 1290-1297 (2007)，其係以引用的方式併入本文中。所選IL-1 α 及IL-1 β 之單株抗體及其作為親本單株抗體用於製造結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之DVD-Ig分子之用途的說明於本文中提供。使用類風濕性關節炎及骨關節炎之已知動物模型，表徵DVD-Ig分子之可能的治療活性。

實例 1.1. 生成IL-1 α 及IL-1 β 之鼠類單株抗體

如下所述使用標準融合瘤技術生成IL-1 α 及IL-1 β 之單株抗體(mAb)。

實例 1.1.A. 小鼠免疫

使用經純化之重組人類IL-1 α 及鼠類IL-1 β (R&D Systems)作為效價分析及篩選ELISA中之免疫原以及塗佈抗原。對

於初次免疫及加強免疫兩者，所有抗原之免疫劑量在5.0微克/小鼠/注射至20.0微克/小鼠/注射之範圍內。ImmunEasy佐劑係購自Qiagen(Waltham, MA)且以每10.0 µg抗原20 ml ImmunEasy佐劑之佐劑/抗原比使用。各組待免疫動物含有五隻自Yoichiro Iwakura博士(University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo, Japan)獲得之IL-1αβ KO小鼠。根據如下所述之給藥時程使小鼠免疫。MRC-5細胞係購自ATCC(Manassas, VA)且用於IL-1生物分析。人類IL-8 ELISA套組及對照小鼠抗hIL-1α抗體及抗hIL-1β抗體(MAB200及MAB201)係購自R&D Systems(Minneapolis, MN)。

簡言之，藉由使用渦旋在小瓶中首先輕微混合佐劑來製備佐劑-抗原混合物。自小瓶中移取所需量之佐劑且放入熱壓處理過之1.5 mL微離心管中。在PBS或生理食鹽水中以範圍在0.5-1.0 mg/ml之濃度製備抗原。接著將計算量之抗原與佐劑一起添加至微離心管中且藉由平緩地上下吹打5次來混合溶液。在室溫下培育佐劑-抗原混合物15分鐘且隨後再藉由平緩地上下吹打5次來混合。將佐劑-抗原溶液抽取至適當注射器中用於動物注射。注射在50-100 µl之體積中之總共5-20 µg抗原。使各動物免疫，且隨後視效價而定加強2至3次。給予具有良好效價之動物最後一次靜脈內加強，隨後融合並生成融合瘤。

實例1.1.B. 篩選融合瘤

篩選如上所述生成之融合瘤且使用ELISA測定抗體效

價。將蛋白抗原直接塗佈於ELISA板上以便使用標準ELISA程序偵測特異性抗體。簡言之，在4℃下，用100 μ l rhIL-1 α 或rhIL-1 β (1.0 μ g/ml於PBS中)塗佈ELISA板隔夜。用250 μ l PBS/0.5%Tween₂₀洗滌板3次且用200 μ l阻斷緩衝液(含2%BSA之PBS及0.5%Tween₂₀)阻斷。將稀釋的血清或融合瘤上清液(100 μ l)添加至各孔中且在室溫下培育2小時。接著用PBS/0.5%Tween₂₀洗滌板3次。使用HRP-山羊抗鼠類IgG進行偵測，在450 nm下觀察結合OD。次選殖產生在ELISA中展示高特異性結合活性之抗體的融合瘤純系並純化，且抗體之親和力(Biacore)及效能(MRC-5生物分析)表徵如下。

實例 1.1.C. IL-1 α 及IL-1 β 之鼠類單株抗體之表徵

使用以下分析法表徵由實例 1.1.B中所述之融合瘤產生之抗體。

實例 1.1.C.1. 表面電漿子共振

使用BIAcore系統(Biacore AB, Uppsala, Sweden)，根據製造商說明書及標準程序，藉由表面電漿子共振(SPR)量測在生物感測器基質上經由山羊抗小鼠IgG所捕捉之抗體(小鼠抗重組mIL-1抗體)與rmIL-1之間的即時結合相互作用。簡言之，將rmIL-1於HBS操作緩衝液(Biacore AB)中稀釋，且將50 μ l等分試樣以5毫升/分鐘之流動速率注射通過經固定之蛋白質基質。所用rhIL-1之濃度為62.5 nM、125 nM、187.5 nM、250 nM、375 nM、500 nM、750 nM、1000 nM、1500 nM及2000 nM。為測定解離常數(解

離速率)、締合常數(締合速率)，使用BIAcore動力學評估軟體(版本3.1)。

實例 1.1.C.2. 抗IL-1生物分析

MRC-5細胞株為回應於人類IL-1 α 及IL-1 β 以劑量依賴性方式產生IL-8之人類肺纖維母細胞株(參見Dinarello, Muegge, and Durum (2000) Curr. Protocols Immunol. 6:1)。在10% FBS完全MEM中培養MRC-5細胞且使其在37°C下於5% CO₂培育箱中生長。為測定針對重組人類IL-1 α 或IL-1 β 之單株抗體(mAb)的中和效能，將不同濃度(0-10 μ g/ml)mAb(50 μ l)添加至96孔板中且在37°C下與50 μ l rhIL-1 α 或rhIL-1 β (10-50 pg/ml)一起預培育1小時。收集上清液，稀釋且使用標準IL-8 ELISA套組(R&D Systems)藉由ELISA量測IL-8濃度。藉由抗體抑制MRC-5細胞產生IL-8的能力測定其效能。

基於Biacore及MRC-5生物分析，鑑別許多具有高親和力及效能之鼠類抗hIL-1 α 及抗hIL-1 β 抗體，如下表1中所示：

表1.鼠類抗Hil-1 α/β mAb之生成及表徵

mAb純系編號	特異性	KD (M)	IC50 (M)
3D12.E3	hIL-1 α	1.11×10^{-9}	6.70×10^{-10}
18F4.2C8	hIL-1 α	5.78×10^{-10}	8.90×10^{-11}
6H3.1A4.3E11	hIL-1 α	3.54×10^{-10}	2.40×10^{-10}
13F5.G5	hIL-1 β	2.91×10^{-10}	6.00×10^{-10}
1B12.4H4	hIL-1 β	2.13×10^{-10}	5.30×10^{-10}
6B12.4F6	hIL-1 β	5.54×10^{-10}	3.20×10^{-10}

實例 1.1.D. IL-1 α 及IL-1 β 之鼠類單株抗體(mAb)的選殖及定序

根據製造商說明書，在自每一融合瘤細胞株分離及純化

總RNA之後，使用 Trizol 試劑 (Invitrogen) 進行表 1(上方)中所述之所有抗 IL-1 α / β mAb 及其他抗體之可變重鏈 (VH) 及輕鏈 (VL) 基因之選殖及定序。使用來自小鼠 Ig 引子集合 (Novagen, Madison, WI) 之 IgGVH 及 Ig κ VL 寡核苷酸及製造商所建議之一管式 RT-PCR 套組 (Qiagen) 進行 VH 基因及 VL 基因兩者之擴增。根據製造商說明書，將由生產性擴增產生之 DNA 片段選殖至 pCR-TOPO 載體 (Invitrogen) 中。接著使用 ABI 3000 定序器 (Applied Biosystems, Foster City, CA)，藉由雙脫氧鏈終止法為多個 VH 及 VL 純系定序。所有 mAb VL 及 VH 基因之序列展示於下表 2 中。

表 2. 能夠結合人類 IL-1 α 或 IL-1 β 之鼠類單株抗體

蛋白質	序列識別號	序列 12345678901234567890
VH 3D12.E3	SEQ ID NO:89	QIQLVQSGPELKKPGETVKI SCKASGYTFRNYGMNWVKQA PGKDLKRMWINTYTGSTY ADDFKGRFAFSLETSASTAY LQINNLKNETATYFCARGI YYYGSSYAMDYWGQGSTVT SS
VL 3D12.E3	SEQ ID NO:90	NIQMTQTTSSLSASLGDRVT ISCRASQDISNCLNWYQQKP DGTVKLLIYYTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLEQ EDIATYFCQQGKTLPYAFGG GTKLEINR
VH 18F4.2C8	SEQ ID NO:91	EVQLQQSGAELVKPGASVKL SCTASGLNIKDTYMHWLKQR PEQGLEWIGRIDPANGNAKY DPRFLGKATITADTSSNTAY LQLSSLTSEDYAVYYCARGD GNFHFYWGQGTTTLTVSS
VL 18F4.2C8	SEQ ID NO:92	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQKP GQSPRALIYSASYRYSGVPD RFTGSGSGTDFTLTISNVQS VDLAELYFCQYTRYPLTFGG GTKLEIKR

蛋白質	序列識別號	序列 12345 678901234567890
VH 6H3.1A4.3E11	SEQ ID NO:93	QVQLQQPGAELVRPGASVKL SCKASGYTFTTYWMNWVKQR PEQGLEWIGRIDPYDSETLY SQKFKDTAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYG FDYWGQGTTTLTVSS
VL 6H3.1A4.3E11	SEQ ID NO:94	QIVLTQSPALMSASPGEKVT MTCSASSSVNYMYWYQQKPR SSPKPWIIYLTSLNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTISSMEAE DAATYVCQQWNSNPYTFGGG TKLEMKR
VH 13F5.G5	SEQ ID NO:95	QVQLQQSGAELVRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMNWVKQR PGQGLEWIGQIYPGDGDTNY NGKFKGKATLTADKSSSTSY MQLSGLTSEDSAMYFCVRFP TGNDYYAMDYWGQGTSTVTS S
VL 13F5.G5	SEQ ID NO:96	NIVLTQSPASLAVSLGQRAT ISCRASESVDSYGNSYMHY QQKPGQPPKLLIYLASNL GVPARFSGSGSRTDFTLTID PVEADDAATYVCQQNNEDPF TFGSGTKLEIKR
VH 1B12.4H4	SEQ ID NO:97	QVHLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGGDTYYN SPLKSRISIRKDNSKSQVFL KMNSLQTDDTAVYYCAKQRT LWGYDLYGMDYWGQGTSTV SS
VL 1B12.4H4	SEQ ID NO:98	ETTVTQSPASLSMAIGKVT IRCITSTDIDVDMNWYQQKP GEPPKLLISQGNLTPRGVPS RFSSSGSGTDFVFIENMLS EDVADYYCLQSDNLPLTFGA GTKLELKR
VH 6B12.4F6	SEQ ID NO:99	EVQLQQSGPELVKTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHWRQS HGKSLEWIGYISYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YYGTNDYWGQGTTLTVSS
VL 6B12.4F6	SEQ ID NO:100	QIVLTQSPAISASPGEKVT ITCSASSSVSYMHWFQQKPG ASPKLWIYSTNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTVSRMEAE DAATYVCQQRSTYPYTFGGG TKLEIKR

實例 1.2. 鼠類-人類嵌合抗體之生成及表徵

將上述所有 mAb 轉化為嵌合抗體(具有人類恆定區)且表現，純化並表徵以證實活性。抗體亦用於隨後 DVD-Ig 結合蛋白分析之對照。為將 3D12.E3 轉化為嵌合形式，使用引子 P1 及 P2 PCR 擴增 3D12.E3-VL；同時使用引子 P3 及 P4 擴增人類 C κ 基因(在內部生成之 pBOS 載體中，Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA)。根據標準 PCR 技術及程序執行兩個 PCR 反應。兩個 PCR 產物經凝膠純化，且一起用作用於後續使用引子 P1 及 P4 使用標準 PCR 條件之重疊 PCR 反應的重疊模板。根據製造商說明書，藉由 TOPO 選殖將最終 PCR 產物嵌合輕鏈 3D12.E3-VL-hC κ 次選殖至 pEF6 TOPO 哺乳動物表現載體(Invitrogen)中。表 3 展示用於此程序之各 PCR 引子的序列。

表 3. PCR 引子

P1: 5' ATG GTG TCC ACA GCT CAG TTC C 3'	SEQ ID NO:101
P2: 5' GC AGC CAC CGT ACG CCG GTT TAT TTC CAG 3'	SEQ ID NO:102
P3: 5' CGT ACG GTG GCT GCA CCA TCT GTC 3'	SEQ ID NO:103
P4: 5' TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GC 3'	SEQ ID NO:104

為將 3D12.E3 重鏈轉化為嵌合形式，使用引子 P5 及 P6 PCR 擴增 3D12.E3-VH；同時使用引子 P7 及 P8 擴增人類 C γ 1 基因(在 ABC 於內部生成之 pBOS 載體中)。根據標準 PCR 技術及程序執行兩個 PCR 反應。兩個 PCR 產物經凝膠純化，且一起用作用於後續使用引子 P5 及 P8 使用標準 PCR 條件之重疊 PCR 反應的重疊模板。根據製造商說明書，將最終 PCR 產物嵌合輕鏈 3D12.E3-VH-hC γ 1 次選殖至 pcDNA3.1 TOPO 哺乳動物表現載體(Invitrogen)中。表 4 展示用於此程

序之各PCR引子的序列。

表 4. PCR 引子

P5: 5' ATG GCT TGG GTG TGG ACC TTG C 3'	SEQ ID NO:105
P6: 5' GGG CCC TTG GTC GAC GCT GAG GAG ACG GTG ACT GAG G 3'	SEQ ID NO:106
P7: 5' GCG TCG ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC C 3'	SEQ ID NO:107
P8: 5' TC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA GGC 3'	SEQ ID NO:108

類似地，使用引子 P21/P22(對於 VH)及 P7/P8(對於 hC γ 1)生成嵌合 13F5.G5-VH-C γ 1 且選殖至 pcDNA3.1 TOPO 載體中，且使用引子 P23/P24(對於 VL)及 P3/P4(對於 hC κ)生成嵌合 13F5.G5-VL-C κ 並選殖至 pEF6 TOPO 載體中。表 5 展示用於此程序之各 PCR 引子的序列。

表 5. PCR 引子

P21: 5' ATA GAA TGG AGC TGG GTT TTC CTC 3'	SEQ ID NO:109
P22: 5' GGG CCC TTG GTC GAC GC TGA GGA GAC GGT GAC TGA 3'	SEQ ID NO:110
P23: 5' ATG GTC CTC ATG TCC TTG CTG TTC 3'	SEQ ID NO:111
P24: 5' GC AGC CAC CGT ACG CCG TTT TAT TTC CAG CTT TG 3'	SEQ ID NO:112

為表現嵌合抗體，使用脂染胺 (Invitrogen) 在 COS 細胞中共表現 13F5.G5-VL-C κ 及 13F5.G5-VH-C γ 1 歷時 72 小時，且收集培養基並藉由蛋白質 A 層析純化 IgG。類似地，使用脂染胺 (Invitrogen) 在 COS 中共表現 13F5.G5-VL-C κ 及 13F5.G5-VH-C γ 1 歷時 72 小時，且收集培養基並藉由蛋白質 A 層析純化 IgG。兩種經純化之嵌合 Ab 藉由 Biacore 及 MRC-5 生物分析進行表徵以證實活性。結果展示此等嵌合 Ab 顯示與原始鼠類 mAb 之親和力及效能類似的親和力及效能。

實例 1.3. IL-1 α / β 雙重可變域免疫球蛋白 (DVD-Ig) 分子之構築、表現及純化

用於生成能夠結合 hIL-1 α 及 hIL-1 β 之 DVD-Ig 結合蛋白之構築體圖解於圖 1B 中。簡言之，藉由分別用重組 IL-1 α 蛋白 (rhIL-1 α) 及重組 IL-1 β 蛋白 (rhIL-1 β) 使 Balb/c 小鼠免疫來獲得包括兩個高親和力鼠類抗體抗 hIL-1 α (純系 3D12.E3) 及抗 hIL-1 β (純系 13F5.G5) 之親本 mAb。使用小鼠 Ig 引子套組 (Novagen, Madison, WI) 藉由 RT-PCR 分離此兩個融合瘤純系之 VL/VH 基因。將 VL/VH 基因首先轉化為嵌合抗體 (具有人類恆定區) 以證實活性及效能。為生成 DVD1-Ig 結合蛋白，將 13F5.G5 之 VH 及 VL 分別直接融合至 3D12.E3 之 VH 及 VL 的 N 端 (如圖 1B 中所示)。除 DVD2-Ig 結合蛋白在輕鏈 (連接子序列為 ADAAP) 及重鏈 (連接子序列為 AKTTPP) 兩者之兩個可變域之間具有連接子之外，以類似方式構築 DVD2-Ig 結合蛋白。此等序列係選自鼠類 Ck 及 CH1 序列之 N 端。此等選自鼠類 Ck 及 CH1 之 N 端的連接子序列為可變域之自然延伸，且基於若干 Fab 晶體結構之分析顯示出無明顯二級結構之可撓性構形。PCR 選殖之詳細程序描述如下。

實例 1.3.A. hIL-1 α / β DVD1-Ig 結合蛋白之分子選殖

使用引子 P21 及 P25 PCR 擴增 13F5.G5-VH。使用引子 P14 及 P8 擴增 3D12.E3-VH-hC γ 1。根據標準 PCR 技術及程序執行兩個 PCR 反應。兩個 PCR 產物經凝膠純化，且一起用作用於後續使用引子 P21 及 P8 使用標準 PCR 條件之重疊 PCR 反應的重疊模板。根據製造商說明書，將最終 PCR 產物 DVD1-Ig 重鏈 hIL-1 α / β DVD1-VH-hC γ 1 次選殖至 pcDNA3.1 TOPO 哺乳動物表現載體 (Invitrogen) 中。表 6 展示用於此程

序之PCR引子的序列。

表 6. PCR 引子

P14: 5' CAG ATC CAG TTG GTG CAG TCT GG3'	SEQ ID NO:113
P25: 5' CAC CAA CTG GAT CTG TGA GGA GAC GGT GAC TGA GG 3'	SEQ ID NO:114

為生成 hIL-1 α / β DVD1-Ig 輕鏈，使用引子 P23 及 P26 PCR 擴增 13F5.G5-VL；同時使用引子 P16 及 P4 擴增 3D12.E3-VL-hC κ 。根據標準 PCR 技術及程序執行兩個 PCR 反應。兩個 PCR 產物經凝膠純化，且一起用作於後續使用引子 P23 及 P4 使用標準 PCR 條件之重疊 PCR 反應的重疊模板。根據製造商說明書，將最終 PCR 產物 hIL-1 α / β DVD1-Ig 輕鏈 hIL-1 α / β DVD1-VL-hC κ 次選殖至 pEF6 TOPO 哺乳動物表現載體 (Invitrogen) 中。表 7 展示用於此程序之各 PCR 引子的序列。

表 7. PCR 引子

P16: 5' AAT ATC CAG ATG ACA CAG ACT ACA TCC 3'	SEQ ID NO:115
P26: 5' GTGT CAT CTG GAT ATT CCG TTT TAT TTC CAG CTT TG 3'	SEQ ID NO:116

實例 1.3.B. hIL-1 α / β DVD2-Ig 之分子選殖

使用引子 P21 及 P17 PCR 擴增 13F5.G5-VH。使用引子 P18 及 P8 擴增 3D12.E3-VH-hC γ 1。根據標準 PCR 技術及程序執行兩個 PCR 反應。兩個 PCR 產物經凝膠純化，且一起用作於後續使用引子 P21 及 P8 使用標準 PCR 條件之重疊 PCR 反應的重疊模板。根據製造商說明書，將最終 PCR 產物 DVD2-Ig 重鏈 hIL-1 α / β DVD2-VH-hC γ 1 次選殖至 pcDNA3.1

TOPO哺乳動物表現載體(Invitrogen)中。表8展示用於此程序之各PCR引子的序列。

表 8. PCR 引子

P17: 5' TGG GGG TGT CGT TTT GGC TGA GG 3'	SEQ ID NO:117
P18: 5' GCC AAA ACG ACA CCC CCA CAG ATC CAG TTG GTG CAG 3'	SEQ ID NO:118

為生成 hIL-1 α / β DVD2-Ig輕鏈，使用引子 P23及P19 PCR 擴增 13F5.G5-VL。使用引子 P20及P4擴增 3D12.E3-VL-hC κ 。根據標準PCR技術及程序執行兩個PCR反應。兩個PCR產物經凝膠純化，且一起用作用於後續使用引子P23及P4使用標準PCR條件之重疊PCR反應的重疊模板。根據製造商說明書，將最終PCR產物 hIL-1 α / β DVD2-Ig輕鏈 hIL-1 α / β DVD2-VL-hC κ 次選殖至 pEF6 TOPO哺乳動物表現載體(Invitrogen)中。表9展示用於此程序之各PCR引子的序列。

表 9. PCR 引子

P19: 5' TGG TGC AGC ATC AGC CCG TTT TAT TTC 3'	SEQ ID NO:119
P20: 5' GCT GAT GCT GCA CCA AAT ATC CAG ATG ACA CAG 3'	SEQ ID NO:120

hIL-1 α / β DVD1-Ig及 hIL-1 α / β DVD2-Ig之最終序列描述於表10中。

表 10. hIl-1 α / β DVD1-Ig及 hIl-1 α / β DVD2-Ig結合蛋白之胺
基 酸 序 列

蛋白質	序列識別符	序 列 123 45678901234567890
蛋白質區		
DVD-Ig重鏈可變 hIL-1 α / β DVD1-Ig	SEQ ID NO:121	QVQLQQSGAELVRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMNWVKQR PGQGLEWIGQIYPGDGDTNY NGKFKGKATLTADKSSSTSY MQLSGLTSEDSAMYFCVRF TGNDYYAMDYWGQGTSTVTS SQIQLVQSGPELKKPGETVK ISCKASGYTFRNYGMNWVKQ APGKDLKRMWINTYTGEST YADDFKGRFAFSLETSASTA YLQINNLKNEDTATYFCARG IYYYGSSYAMDYWGQGTSTV VSS
VH 13F5.G5	SEQ ID NO:95	QVQLQQSGAELVRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMNW VKQRPQGLEWIGQIYPGDG DTN YNGKFKGKATLTADKSS STS YMQLSGLTSEDSA MYFCVRFPTGNDYYAMDYWG QGTSTVTVSS
連接子		無
3D12.E3 VH	SEQ ID NO:89	QIQLVQSGPELKKPGETVKI SCKASGYTFRNYGMNWVKQA PGKDLKRMWINTYTGESTY ADDFKGRFAFSLETSASTAY LQINNLKNEDTATYFCARGI YYYGSSYAMDYWGQGTSTV SS
CH	SEQ ID NO:122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPTVTS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKHTCPCPPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTQVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVHLQDNLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

蛋白質 蛋白質區	序列識別符	序列 12345678901234567890
DVD-Ig輕鏈可變 hIL-1 α /βDVD1-Ig	SEQ ID NO:123	NIVLTQSPASLAVSLGQRAT ISCRASESVDSYGN SYMHWY QQKPGQPPKLLIY LASNLES GVPARFSGSGSRTDFTLTID PVEADDAATYYCQQNNEDPF TFGSGTKLEIKRNIQMTQTT SSLSASLGDRVTISCRASQD ISNCLN WYQQKPDGTVKLLI YYTSRLHSGVPSRFSGSGSG TDYSLTISNLEQEDIATYFC QQGKTL PYAFGGGTKLEINR R
13F5.G5 VL	SEQ ID NO:96	NIVLTQSPASLAVSLGQRAT ISCRASESVDSYGN SYMHWY QQKPGQPPKLLIY LASNLES GVPARFSGSGSRTDFTLTID PVEADDAATYYCQQNNEDPF TFGSGTKLEIKR
連接子		無
3D12.E3 VL	SEQ ID NO:90	NIQMTQTTSLSASLGDRVT ISCRASQDISNCLN WYQQK DGTVKLLIYYTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLEQ EDIATYFCQQGKTL PYAFGG GTKLEINR
CL	SEQ ID NO:124	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVC LLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
DVD-Ig重鏈可變 hIL-1 α /βDVD2-Ig	SEQ ID NO:125	QVQLQQSGAELVRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMNWVKQR PGQGLEWIGQIYPGDGDTNY NGKFKGKATLTADKSSSTSY MQLSGLTSEDSAMYFCVRFP TGNDYYAMDYWGQGTSVTVS SAKTTPPQIQLVQSGPELKK PGETVKISCKASGYTFRNYG MNWVKQAPGKDLKRMWINT YTGESTYADDFKGRFAFSLE TSASTAYLQINN LKNEDTAT YFCARGIYYYGSSYAMDYWG QGTSTVTVSS
13F5.G5 VH	SEQ ID NO:95	QVQLQQSGAELVRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMNWVKQR PGQGLEWIGQIYPGDGDTNY NGKFKGKATLTADKSSSTSY MQLSGLTSEDSAMYFCVRFP TGNDYYAMDYWGQGTSVTVS S
連接子	SEQ ID NO:75	AKTTPP

蛋白質 蛋白質區	序列識別符	序列 12345678901234567890
3D12.E3 VH	SEQ ID NO:89	QIQLVQSGPELKKPGETVKI SCKASGYTFRNYGMNWVKQA PGKDLKRMWINTYTGESTY ADDFKGRFAFSLETSASTAY LQINNLIKNEATATYFCARGI YYYGSSYAMDYWGQTSVTV SS
CH	SEQ ID NO:122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHNKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVTLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
DVD-Ig輕鏈可變 HIL-1α/βDVD2-Ig	SEQ ID NO:126	NIVLTQSPASLAVSLGQRAT ISCRASESVDSYGNSYMHY QQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRDFTLTID PVEADDAATYYCQQNNEDPF TFGSGTKLEIKRADAAPNIQ MTQTTSSLSASLGDRVTISC RASQDISNCLNWIYQQKPDGT VKLLIYYTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYSLTISNLEQEDI ATYFCQQGKTLPIYAFGGGK LEINR
13F5.G5 VL	SEQ ID NO:96	NIVLTQSPASLAVSLGQRAT ISCRASESVDSYGNSYMHY QQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRDFTLTID PVEADDAATYYCQQNNEDPF TFGSGTKLEIKR
連接子	SEQ ID NO:69	ADAAP
3D12.E3 VL	SEQ ID NO:90	NIQMTQTTSSLSASLGDRVT ISCRASQDISNCLNWIYQQK DGTVKLLIYYTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLEQ EDIATYFCQQGKTLPIYAFGG GTKLEINR

蛋白質	序列識別符	序列
蛋白質區		12345678901234567890
CL	SEQ ID NO:124	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

實例 1.3.C. hIL-1α/β DVD1-Ig結合蛋白之表現及純化

將各構築體之重鏈及輕鏈分別次選殖至pcDNA3.1 TOPO及pEF6 TOPO載體(Invitrogen Inc.)中，且定序以確保準確性。分別使用脂染胺2000及293fectin試劑在COS細胞以及人類胚腎293細胞(美國菌種保存中心，Manassas, VA)中短暫表現編碼各構築體之重鏈及輕鏈的質體。短暫轉染後72小時收集細胞培養基且根據製造商說明書，使用蛋白質A層析(Pierce, Rockford, IL)純化抗體。藉由SDS-PAGE分析抗體且藉由A280及BCA(Pierce, Rockford, IL)進行定量。表11展示hIL-1α/β DVD1-Ig及hIL-1α/β DVD2-Ig之表現量可與嵌合抗體之表現量相當，表明DVD-Ig結合蛋白可在哺乳動物細胞中有效地表現。

表 11. hIL-1α/β DVD-Ig結合蛋白之表現及分子量分析

	表現量(ng/ml)		分子量(道爾頓)		
	COS	Freestyle 293	輕鏈	重鏈	全長
模擬物	0	0			
3D12.E3-Ch	2788	3886	23,696	49,914	147,220
13F5.G5-Ch	3260	3562	24,084	49,518	147,204
DVD1-Ig	2988	3300	35,797 (35,790)	64,380 (64,371)	200,346 (200,521)
DVD2-Ig	2433	3486	36,222 (36,220)	64,976 (64,973)	202,354 (202,573)

藉由質譜分析以實驗方式測定之DVD1-Ig結合蛋白及DVD2-Ig結合蛋白之輕鏈、重鏈及全長之分子量展示於圓括號中。

實例 1.4. hIL-1α/β DVD-Ig結合蛋白之質譜分析及SEC分析

為量測DVD-Ig結合蛋白輕鏈及重鏈之分子量(MW)，用1.0 M DTT溶液(5 μ L)還原10 μ L DVD-Ig分子(0.8 μ g/ μ L)。使用PLRP-S, 8 μ , 4000A及1 $\times$ 150 mm蛋白質管柱(Michrom BioResource, Auburn, MA)分離DVD-Ig分子之重鏈及輕鏈。將Agilent HP1100毛細管HPLC(Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA)與質譜儀QSTAR(Applied Biosystems, Foster City, CA)一起使用。將valco閥設定在10分鐘以將來自廢料之物流切換至MS用於使樣品去鹽。緩衝液A為0.02% TFA、0.08% FA、0.1% ACN及99.8% HPLC-H₂O。緩衝液B含有0.02% TFA、0.08% FA、0.1% HPLC-H₂O及99.8% ACN。HPLC流動速率為50 μ L/min且樣品注射體積為8.0 mL。管柱烘箱之溫度設定在60°C，且分離梯度為：5%B歷時5分鐘；5%B至65%B歷時35分鐘；65%B至95%B再歷時5分鐘及95%B至5%B歷時5分鐘。TOFMS掃描為自800 amu至2500 amu，且週期為3600。為測定全長DVD-Ig結合蛋白之MW，使用蛋白質MicroTrap濾筒(Michrom BioResource, Auburn, MA)以使樣品去鹽。HPLC梯度為：5%B歷時5分鐘；5%B至95%B歷時1分鐘；及95%B至5%B再歷時4分鐘。QSTAR TOFMS掃描為2000 amu至3500 amu，且週期為899。使用Analyst QS軟體(Applied Biosystems)分析所有MS原始資料。對於DVD-Ig結合蛋白之SEC分析，將含經純化之DVD-Ig結合蛋白及嵌合抗體之PBS施加於Superose 6 10/300 G2, 300 $\times$ 10 mm管柱(Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)上。使用HPLC儀器

型號10A(Shimadzu, Columbia, MD)進行SEC。使用UV偵測在280 nm及214 nm下測定所有蛋白質。在0.5毫升/分鐘之流動速率下，溶離為等度的。對於穩定性研究，在4℃、25℃或40℃下培育在-80℃至25℃下經受3次凍融循環之含濃度範圍為0.2-0.4 mg/ml之樣品之PBS歷時4週及8週，隨後進行SEC分析。

藉由蛋白質A層析純化DVD-Ig結合蛋白及嵌合抗體。純化產量(3-5 mg/L)與各蛋白質表現培養基之hIgG定量一致。在還原條件及非還原條件下，藉由SDS-PAGE分析經純化之DVD-Ig結合蛋白及嵌合抗體之組成及純度。在非還原條件下，四種蛋白質各以單條帶形式遷移。如所預料，DVD-Ig蛋白展示比嵌合抗體大的分子量。在非還原條件下，四種蛋白質各產生兩個條帶，一條重鏈及一條輕鏈。此外，DVD-Ig結合蛋白之重鏈及輕鏈在尺寸上比嵌合抗體之重鏈及輕鏈大。SDS-PAGE展示各DVD-Ig結合蛋白表現為單一物質，且重鏈及輕鏈有效配對形成IgG樣分子。兩種DVD-Ig分子之重鏈及輕鏈以及全長蛋白質之尺寸與其基於胺基酸序列所計算之分子量一致(參見表11)。

為測定DVD-Ig結合蛋白之精確分子量，採用質譜分析。如表1中所示，以實驗方式測定之各DVD-Ig結合蛋白(包括輕鏈、重鏈及全長蛋白質)之分子量與預測值良好一致。為進一步研究DVD-Ig結合蛋白在溶解狀態下之物理性質，使用尺寸排阻層析(SEC)來分析各蛋白質。嵌合抗體與DVD2-Ig結合蛋白兩者展現單峰，證明作為單體蛋白

之物理均質性。3D12.E3嵌合抗體展示物理尺寸小於13F5.G5嵌合抗體，表明3D12.E3嵌合抗體採用較緊密的球形。DVD1-Ig結合蛋白顯示主峰以及在右側之肩峰，提示一部分DVD1-Ig結合蛋白可能在當前緩衝條件下呈凝集形式。

實例 1.5：hIL-1 α / β DVD-Ig結合蛋白之活體外穩定性分析

DVD-Ig之物理穩定性測試如下。在4℃、25℃或40℃下培育在-80℃至25℃下經受3次凍融循環之含濃度範圍為0.2-0.4 mg/ml之經純化之抗體之PBS歷時4週及8週，隨後使用尺寸排阻層析(SEC)分析進行分析(參見表12)。

表12.藉由SEC之hIL-1 α / β DVD-Ig之活體外穩定性分析

	3D12.E3-Ch			13F5.G5-Ch			DVD1-Ig			DVD2-Ig		
	Agg	Ab	Frgm	Agg	Ab	Frgm	Agg	Ab	Frgm	Agg	Ab	Frgm
3次凍融	1.72	98.28	0.00	13.0	87.0	0.0	46.50	53.50	0.00	0.0	100.0	0.0
在4℃下4週	0.85	99.15	0.00	4.2	95.8	0.0	42.43	56.63	0.94	0.0	100.0	0.0
在25℃下4週	1.29	98.71	0.00	0.0	100.0	0.0	45.66	54.34	0.00	0.0	100.0	0.0
在40℃下4週	1.65	98.35	0.00	20.3	78.1	1.6	36.70	59.42	3.88	0.0	100.0	0.0
在4℃下8週	5.35	90.33	4.32	2.2	97.8	0.0	38.18	56.91	4.91	0.0	100.0	0.0
在25℃下8週	1.11	60.55	38.34	1.4	97.5	1.0	24.42	67.39	8.19	0.0	100.0	0.0
在40℃下8週	4.74	81.47	13.79	34.6	65.4	0.0	20.55	67.16	12.29	0.0	100.0	0.0

凝集度及斷裂度以百分比展示，而Ab之百分比表示完整分子。

Agg：凝集物；

Ab：完整抗體；

Frgm：片段。

兩種嵌合抗體展示微小的凝集度及斷裂度，常規IgG分子正常。在純化後，DVD1-Ig結合蛋白在SEC上展示一定凝集。在穩定性分析中，DVD1-Ig結合蛋白亦在不同條件下展示於PBS中凝集；然而，DVD1-Ig結合蛋白凝集形式之百分比並未在延期儲存期間或在較高溫度下增加。與嵌

合3D12.E3抗體之斷裂形式類似，DVD1-Ig結合蛋白斷裂形式之百分比在正常範圍內。相比之下，DVD2-Ig結合蛋白展示優越的穩定性。在所有測試條件下，偵測到DVD2-Ig結合蛋白既不凝集亦不斷裂，且100%之DVD2-Ig結合蛋白以完整單體分子形式保留。

實例1.6. 測定hIL-1 α / β DVD-Ig結合蛋白之抗原結合親和力

在25℃下，使用HBS-EP(10 mM HEPES(pH 7.4)、150 mM NaCl、3 mM EDTA及0.005%界面活性劑P20)以Biacore 3000儀器(Biacore AB, Uppsala, Sweden)藉由基於表面電漿子共振之量測測定DVD-Ig分子結合於rhIL1- α 及rhIL1- β 之動力學。所有化學品自Biacore AB(Uppsala, Sweden)獲得或另外來自如本文所述之不同來源。根據製造商說明書及程序，在25 mg/ml下，使用標準胺偶合套組將稀釋於10 mM乙酸鈉(pH 4.5)中之約5000 RU山羊抗人類IgG Fc γ 片段特異性多株抗體(Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL)直接固定在CM5研究級生物感測器晶片上。用乙醇胺阻斷生物感測器表面上未反應之部分。流槽2及4中之經修飾之羧甲基葡聚糖表面用作反應表面。流槽1及3中不具有山羊抗人類IgG之未修飾之羧甲基葡聚糖用作參考表面。對於動力學分析，使用Bioevaluation 4.0.1軟體將自1:1朗繆爾結合模型(Langmuir binding model)衍生之速率方程同時擬合至所有十個注射液之締合及解離相(使用整體擬合分析)。將經純化之DVD-Ig樣品於HEPES緩衝鹽水中稀釋以便在山羊抗人類IgG Fc特異性反應表面上捕捉，

且以5毫升/分鐘之流動速率注射在反應基質上。在25毫升/分鐘之連續流動速率下測定締合速率常數及解離速率常數 $k_{on}(M^{-1}s^{-1})$ 及 $k_{off}(s^{-1})$ 。藉由在範圍在 1.25 nM至 1000 nM 內之十個不同抗原濃度下進行動力學結合量測獲得速率常數。接著藉由下式由動力學速率常數計算DVD-Ig分子與 rhIL1 α/β 之間的反應之平衡解離常數(M)： $KD=k_{off}/k_{on}$ 。rhIL1 α/β 樣品之等分試樣亦同時注射在空白參考及反應CM表面上以記錄並減去任何非特異性結合背景來消除大部分折射指數變化及注射雜訊。隨後以5毫升/分鐘之流動速率注射 25 ml 10 mM甘胺酸(pH 1.5)兩次以使表面再生。使固定抗Fc抗體之表面澈底再生且保留其超過十二個循環之完全捕捉能力。在飽和結合條件(穩態平衡)下，使用下式計算所捕捉之DVD-Ig-rhIL1 α/β 複合物之表觀化學計量：

$$\text{化學計量} = \frac{\text{rhIL1}\alpha/\beta\text{反應(RU)}}{\text{DVD反應(RU)}} \times \frac{\text{DVD-Ig (MW)}}{\text{rhIL1}\alpha/\beta \text{ (MW)}}$$

Biacore分析指示嵌合抗體具有與原始融合瘤單株抗體類似的對於IL-1之結合動力學及親和力，表明已分離正確的VL/VH序列(表13)。兩種DVD-Ig結合蛋白對hIL-1 α 之總體結合參數相似，其中DVD-Ig結合蛋白之親和力僅小於嵌合3D12.E3抗體之親和力2-3倍。DVD2-Ig結合蛋白對hIL-1 β 之結合親和力略微小於嵌合抗體13F5.G5，但比DVD1-Ig結合蛋白之結合親和力大3倍。如對IL-1之化學計量評估所指示，兩種DVD-Ig結合蛋白對hIL-1之親和力與嵌合抗

體對 hIL-1 之親和力相比係類似的。兩種嵌合抗體均為二價單特異性，分別以 1.6 及 1.7 之化學計量結合於 Biacore 上之 IL-1 α 及 IL-1 β 。對於 IgG 而言，當抗體密集地固定於 Biacore 感測器晶片上時，由於分子間干擾導致化學計量在 1.5 至 2.0 之範圍內為常見的。兩種 DVD-Ig 結合蛋白對於 hIL-1 α 及 hIL-1 β 之化學計量與兩種嵌合抗體對於 hIL-1 α 及 hIL-1 β 之化學計量類似，表明兩種 DVD-Ig 結合蛋白對各抗原具有二價結合能力。

表 13. IL-1 結合蛋白之功能特徵

IL-1 結合蛋白	抗原	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	K_d (M)	化學 計量	效能 IC ₅₀ (M)
3D13.E3	hIL-1 α	$6.43 \times 10^{+5}$	7.13×10^{-4}	1.11×10^{-9}	2.0	6.70×10^{-10}
3D12.E3-Ch	hIL-1 α	$4.12 \times 10^{+5}$	5.52×10^{-4}	1.34×10^{-9}	1.6	7.00×10^{-10}
DVD1-Ig	hIL-1 α	$3.70 \times 10^{+4}$	1.05×10^{-4}	2.83×10^{-9}	1.8	2.30×10^{-9}
DVD2-Ig	hIL-1 α	$7.35 \times 10^{+4}$	2.52×10^{-4}	3.42×10^{-9}	2.0	2.90×10^{-9}
13F5.G5	hIL-1 β	$2.13 \times 10^{+6}$	6.21×10^{-4}	2.91×10^{-10}	1.8	6.00×10^{-10}
13F5.G5-Ch	hIL-1 β	$1.41 \times 10^{+6}$	6.54×10^{-4}	4.62×10^{-10}	1.7	5.30×10^{-10}
DVD1-Ig	hIL-1 β	$6.09 \times 10^{+5}$	1.59×10^{-3}	2.60×10^{-9}	1.5	3.10×10^{-9}
DVD2-Ig	hIL-1 β	$1.19 \times 10^{+6}$	9.50×10^{-4}	7.98×10^{-10}	1.8	1.60×10^{-9}

藉由 Biacore 量測親和力及化學計量；藉由 MRC-5 生物分析測定效能 (IC₅₀)；
Ch = 嵌合

另外，亦藉由 Biacore 分析 DVD-Ig 結合蛋白之四價雙重特異性抗原結合 (表 14)。首先在 Biacore 感測器晶片上經由山羊抗人類 Fc 抗體捕捉 DVD-Ig 結合蛋白，且注射第一抗原並觀察結合信號。當由第一抗原使 DVD-Ig 結合蛋白飽和時，接著注射第二抗原並觀察第二信號。對於 DVD2-Ig 結合蛋白，藉由首先注射 IL-1 β 隨後注射 IL-1 α 或藉由首先注射 IL-1 α 接著注射 IL-1 β 均可進行。在任一順序中，偵測到雙重結合活性。對於 DVD1-Ig 結合蛋白，獲得類似結

果。因此，各DVD-Ig結合蛋白能夠以雙重特異性四價分子形式同時結合兩種抗原。如表14中所示，兩種DVD-Ig結合蛋白對第一抗原(hIL-1 α 或hIL-1 β)之化學計量均大於1.5，與單特異性二價結合之化學計量類似。在注射第二抗原後，雖然DVD-Ig結合蛋白已由第一抗原所佔據，但兩種DVD-Ig結合蛋白對第二抗原(亦即hIL-1 α 或hIL-1 β)之化學計量為1.0至1.3。因此，DVD-Ig結合蛋白能夠結合兩個IL-1 α 及兩個IL- β 分子。首先在Biacore感測器晶片上經由山羊抗人類Fc抗體捕捉DVD-Ig結合蛋白，且注射第一抗原並觀察結合信號，隨後注射第二抗原。

表14. hIL-1 α / β DVD-Ig結合蛋白在四價雙重特異性結合於IL-1 α / β 中之化學計量分析

反應單元			化學計量	
所捕捉之結合蛋白	第一抗原	第二抗原	hIL-1 α :DVD-Ig	hIL-1 β :DVD-Ig
DVD1-Ig: 932	hIL-1 α : 190	hIL-1 β : 75	2.3	1.0
DVD1-Ig: 1092	hIL-1 β : 141	hIL-1 α : 107	1.1	1.5
DVD2-Ig: 1324	hIL-1 α : 209	hIL-1 β : 137	1.8	1.3
DVD2-Ig: 1184	hIL-1 β : 159	hIL-1 α : 131	1.2	1.6

實例 1.7. 測定DVD-Ig分子之功能均勻性

因為DVD2-Ig結合蛋白藉由蛋白質A層析而非目標特異性親和性層析純化，所以可藉由針對兩個不同抗原之結合研究評估任何潛在之異常摺疊及/或錯配的VL/VH結構域(若存在)。該結合分析係藉由尺寸排阻液相層析(SEC)來進行。DVD2-Ig結合蛋白在單獨或在37 $^{\circ}$ C下以等莫耳比與IL-1 α 、IL-1 β 或IL-1 α 及IL-1 β 兩者一起培育120分鐘後，施加於管柱上。各抗原亦作為對照單獨操作。SEC結果指示

DVD2-Ig結合蛋白能夠在溶解狀態下結合IL-1 α 及IL-1 β ，且該結合導致SEC信號移位，表明當DVD2-Ig結合蛋白與任一抗原複合時，其動態尺寸增大。DVD2-Ig結合蛋白信號之位移為100%(並非部分)，提示所有DVD2-Ig分子能夠結合抗原。在IL-1 α 及IL-1 β 兩者均存在下，存在DVD2-Ig結合蛋白信號之另一完全移位，表明所有DVD2-Ig分子能夠以均勻方式結合兩種抗原。此實驗證明DVD-Ig結合蛋白表現為功能上均勻的蛋白質。此具有重要意義，因為其證明DVD-Ig結合蛋白可作為均勻的單一功能性物質產生，其不同於所有先前描述之雙特異性、多特異性及多價免疫球蛋白樣及免疫球蛋白衍生之分子。

實例1.8. 測定DVD-Ig結合蛋白之生物活性

使用MRC-5生物分析量測DVD-Ig之生物活性。MRC-5細胞株為回應於人類IL-1 α 及IL-1 β 以劑量依賴性方式產生IL-8之人類肺纖維母細胞株。MRC-5細胞獲自ATCC且在5% CO₂培育箱中，在37°C下於10% FBS完全MEM中培養。為測定DVD-Ig針對人類IL-1 α 或IL-1 β 之中和活性，將50 μ l含抗體(1×10^{-7} 至 1×10^{-12} M)之MEM/10%FBS添加至96孔板中，且在37°C、5%CO₂下，與50 μ l hIL-1 α 或hIL-1 β (200 pg/ml)一起預培育1小時。接著將在 1×10^5 /ml濃度下之MRC-5細胞添加(100 μ l)至所有孔中，且在5% CO₂培育箱中，在37°C下培育該板隔夜。收集上清液且藉由標準ELISA(R&D Systems, Minneapolis, MN)量測人類IL-8產生。藉由DVD-Ig結合蛋白抑制IL-8產生之能力測定其中和

活性。

如表 13 中所示，兩種 DVD-Ig 結合蛋白能夠中和 hIL-1 α 及 hIL-1 β 。與對於 hIL-1 α 之結合親和力一致，DVD1-Ig 結合蛋白及 DVD2-Ig 結合蛋白針對 hIL-1 α 之中和活性亦相似，亦即比嵌合抗體針對 hIL-1 α 之中和活性小 3 倍(參見表 13)。與 DVD2-Ig 結合蛋白對於 hIL-1 β 之結合親和力一致，DVD2-Ig 結合蛋白對於 hIL-1 β 之中和活性略微小於嵌合抗體 13F5.G5 對於 hIL-1 β 之中和活性，但比 DVD1-Ig 結合蛋白對於 hIL-1 β 之中和活性大 3 倍。與原始單株抗體相比，DVD-Ig 分子之生物學活性總體不存在明顯減小。

為確定 DVD-Ig 結合蛋白是否能夠在 IL-1 α 及 IL-1 β 兩者存在下抑制 IL-8 產生，在 MRC-5 分析法之同一培養系統中添加等量 hIL-1 α 及 hIL-1 β 。在 IL-1 α 及 IL-1 β 兩者均存在下，DVD1-Ig 結合蛋白及 DVD2-Ig 結合蛋白兩者均能夠抑制 MRC-5 細胞合成 IL-8，其活性與其中僅存在一種細胞激素之單分析法的活性類似(表 13)。在其中 IL-1 α 及 IL-1 β 兩者皆存在之該分析法中，DVD2-Ig 結合蛋白之雙重抑制活性(1.2 nM)高於 DVD1-Ig 結合蛋白之雙重抑制活性(2.2 nM)。

實例 2. 分析 DVD-Ig 結合蛋白中之連接子尺寸及可變域定向

構築如表 15 中所示之具有不同親本 mAb 對的其他 DVD-Ig 分子。對於各對 mAb，生成四種不同 DVD-Ig 構築體：2 種具有短連接子且 2 種具有長連接子，每一者呈兩種不同域定向：a-b-C(α - β -恆定域)及 b-a-C(β - α -恆定域)。連接子序列來源於人類 Ck 或 CH1 結構域之 N 端序列，如下：短連接

子：輕鏈：TVAAP (SEQ ID NO:71)；重鏈：ASTKGP (SEQ ID NO:79)；及長連接子：輕鏈：TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO:72)；重鏈：ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:80)。

將所有重鏈及輕鏈構築體次選殖至pBOS表現載體中，且在COS細胞或freestyle 293細胞中表現。

如關於hIL-1 α / β DVD1-Ig及hIL-1 α / β DVD2-Ig所述，為構築新DVD-Ig純系，首先使用重疊PCR串聯接合兩個mAb之可變域(輕鏈及重鏈兩者)。接著使用同源重組將接合片次選殖於pBOS載體中。簡言之，藉由限制消化使載體線性化(用含FspAI及BsiWI之O+緩衝液消化2 μ g pBOS-hCk載體，且用含FspAI及SaII之O+緩衝劑消化2 μ g pBOS-hCyz,non a載體)。使經消化之樣品在1%瓊脂糖凝膠上通過且在50 μ l水中純化骨架片段。為同源重組及轉型，在冰上融化DH5 α 勝任細胞，且與20-50 ng接合PCR產物及20-50 ng線性化載體(每50 μ l DH5 α 細胞)混合。平緩地混合混合物且在冰上培育45分鐘，接著在42°C下熱休克1分鐘。接著添加100 μ l SOC培養基且在37°C下培育1小時。將轉型培養物接種於含有胺苄西林之LB/洋菜平板上且在37°C下培育18-20小時。分離細菌純系，自其純化DNA且經受定序分析。如先前所述，將最終序列驗證之純系共轉染(匹配同一抗體對之HV及LC)於COS或293細胞中以便抗體表現及純化。

經純化之DVD-Ig蛋白的特徵概述於表16中。表16之左側部分展示用於構築新hIL-1 α / β DVD-Ig分子之2對mAb的

特異性、結合親和力及中和效能。使用抗體 18F4.2C8 及 1B12.4H4(參見實例 1.1.D)來構築 hIL-1 α / β DVD3a-Ig、hIL-1 α / β DVD4a-Ig、hIL-1 α / β DVD3b-Ig 及 hIL-1 α / β DVD4b-Ig。hIL-1 α / β DVD3a-Ig 及 hIL-1 α / β DVD4a-Ig 呈 a-b-C 定向，分別具有短連接子及長連接子。hIL-1 α / β DVD3b-Ig 及 hIL-1 α / β DVD4b-Ig 呈 b-a-C 定向，分別具有短連接子及長連接子。使用抗體 6H3.1A4 及 6B12.4F6 來構築 hIL-1 α / β DVD5a-Ig、hIL-1 α / β DVD6a-Ig、hIL-1 α / β DVD5b-Ig 及 hIL-1 α / β DVD6b-Ig。hIL-1 α / β DVD5a-Ig 及 hIL-1 α / β DVD6a-Ig 呈 a-b-C 定向，分別具有短連接子及長連接子。hIL-1 α / β DVD5b-Ig 及 hIL-1 α / β DVD6b-Ig 呈 b-a-C 定向，分別具有短連接子及長連接子。使用先前關於 hIL-1 α / β DVD1-Ig 所述之程序(參見實例 1.3)，使用重疊 PCR 程序執行該等其他 hIL-1 α / β DVD-Ig 結合蛋白之分子選殖。該等其他 hIL-1 α / β DVD-Ig 結合蛋白之胺基酸序列揭示於表 15 中。

表 15.六種能夠結合 IL-1 α 及 IL-1 β 之 DVD-Ig 蛋白之重鏈及輕鏈的胺基酸序列

蛋白質	序列識別符	序列
蛋白質區		12345678901234567890
DVD-Ig 重鏈可變 hIL-1 α / β DVD3a-Ig	SEQ ID NO:127	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGLNIKDTYMHWLKQRP EQGLEWIGRIDPANGNAKYDPRFLGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCARGDGNFHF FDYWGQGTTLTVSSASTKGPQVHLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTDYGVSWIRQPPGKGLEWLG LIWGGGD TYYNSPLKSRLSIRKDNSKSKVFLKMNSLQTD DDTAVYYCAKQRTLWGYDLYGMDYWGQGT SVTVSS

蛋白質 蛋白質區	序列識別符	序列 12345678901234567890
18F4.2C8 VH	SEQ ID NO:91	EVQLQQSGAELVKPGASVKL SCTASGLNIKDTYMHWLKQR PEQGLEWIGRIDPANGNAKY DPRFLGKATITADTSSNTAY LQLSSLTSEDVAVYYCARGD GNFHFDYWGQ GTTTLTVSS
連接子	SEQ ID NO:79	ASTKGP
1B12.4H4 VH	SEQ ID NO:97	QVHLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGGDTYYN SPLKSRLSIRKDNSKSQVFL KMNSLQTDDETAVYYCAKQRT LWGYDLYGMDYWGQGTSTVTV SS
CH	SEQ ID NO:122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHHKPSNTKVDKKVEP KSCDKHTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVHLQDNLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK
DVD-Ig輕鏈可變 HIL-1 α /β DVD3a-Ig	SEQ ID NO:128	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQKP GQSPRALIYSASYRSGVPD RFTGSGSGTDFTLTISNVQS VDLAEIFCQQYTRYPLTFGG GTKLEIKRTVAAPETTVTQS PASLSMAIGEKVTIRCITST DIDVDMNWWYQQKPGEPKLL ISQGNLTPGVPSRFSSSGS GTDVFVFIENMLSEVDADYY CLQSDNLPPLTFGAGTKLELKR
18F4.2C8 VL	SEQ ID NO:92	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQKP GQSPRALIYSASYRSGVPD RFTGSGSGTDFTLTISNVQS VDLAEIFCQQYTRYPLTFGG GTKLEIKR
連接子	SEQ ID NO:71	TVAAP
1B12.4H4 VL	SEQ ID NO:98	ETTVTQSPASLSMAIGEKVT IRCITSTDIDVDMNWWYQQKP

蛋白質 蛋白質區	序列識別符	序列 12345678901234567890
		GE PPKLLISQGNLRLPGVPS RFSSSGSGTDFVFIIENMLS EDVADYYCLQSDNLPLTFGA GTKLELKR
CL	SEQ ID NO:124	TVAAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
DVD-Ig重鏈可變hIL- 1α/β DVD3b-Ig	SEQ ID NO:129	QVHLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGGDTYYN SPLKSRLSIRKDNSKSQVFL KMNSLQTDDETAVYYCAKQRT LWGYDLYGMDYWGQGTSTVTV SSASTKGPEVQLQQSGAELV KPGASVKLSCTASGLNIKDT YMHWLKQRPEQGLEWIGRID PANGNAKYDPRFLGKATITA DTSSTNTAYLQLSSLTSEDTA VYYCARGDGNFHFYWGQGT TLTVSS
1B12.4H4 VH	SEQ ID NO:97	QVHLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGGDTYYN SPLKSRLSIRKDNSKSQVFL KMNSLQTDDETAVYYCAKQRT LWGYDLYGMDYWGQGTSTVTV SS
連接子	SEQ ID NO:79	ASTKGP
18F4.2C8 VH	SEQ ID NO:91	EVQLQQSGAELVKPGASVKL SCTASGLNIKDTYMHWLKQR PEQGLEWIGRIDPANGNAKY DPRFLGKATITADTSSTNTAY LQLSSLTSEDTA VYYCARGD GNFHFYWGQGTTLTVSS
CH	SEQ ID NO:122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKHTCPCPPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTQCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LSDSGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

蛋白質 蛋白質區	序列識別符	序列 12345678901234567890
DVD-Ig輕鏈可變 HIL-1α/β DVD3b-Ig	SEQ ID NO:130	ETTVTQSPASLSMAIGEKVT IRCITSTDI DVDMNWWYQQKP GEPPKLLISQGNLTRPGVPS RFSSSGSGTDFVFIIENMLS EDVADYYCLQSDNLPLTFGA GTKLELKRTVAAPDIVMTQS QRFMSTSVGDRVSVTCKASQ NVGTNIAWYQQKPGQSPRAL IYSASYRYSQVDRFTGSGS GTDFTLTISNVQSVDLAEYF CQQYTRYPLTFGGGTKLEIK R
1B12.4H4 VL	SEQ ID NO:98	ETTVTQSPASLSMAIGEKVT IRCITSTDI DVDMNWWYQQKP GEPPKLLISQGNLTRPGVPS RFSSSGSGTDFVFIIENMLS EDVADYYCLQSDNLPLTFGA GTKLELKR
連接子	SEQ ID NO:71	TVAAP
18F4.2C8 VL	SEQ ID NO:92	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQKP GQSPRALIYSASYRYSQVDR FTGSGSGTDFLTISNVQS VDLAEYFCQQYTRYPLTFGG GTKLEIKR
CL	SEQ ID NO:124	TVAAPSVFI FPPSDEQLKSG TASVCLLNFFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSPVTKS FNRGEC
DVD-Ig重鏈可變hIL- 1α/β DVD4a-Ig	SEQ ID NO:131	EVQLQQSGAELVKPGASVKL SCTASGLNIKDTYMHWLKQR PEQGLEWIGRIDPANGNAKY DPRFLGKATITADTSSNTAY LQLSSLTSEDVAVYYCARGD GNFHFDYWGGTTLTVSSAS TKGPSVFPLAPQVHLKESGP GLVAPSQSLITCTVSGFSL TDYGVSWIRQPPGKGLEWLG LIWGGGDTYYNSPLKSRLSI RKDNSKSQVFLKMNSLQTD TAVYYCAKQRTLWGYDLYGM DYWGQGTSTVTVSS
18F4.2C8 VH	SEQ ID NO:91	EVQLQQSGAELVKPGASVKL SCTASGLNIKDTYMHWLKQR PEQGLEWIGRIDPANGNAKY DPRFLGKATITADTSSNTAY LQLSSLTSEDVAVYYCARGD GNFHFDYWGGTTLTVSS
連接子	SEQ ID NO:80	ASTKGPSVFPLAP
1B12.4H4 VH	SEQ ID NO:97	QVHLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTDYGVSWIRQP

蛋白質 蛋白質區	序列識別符	序列 12345678901234567890
		PGKGLEWLGLIWGDDTYYN SPLKSRLSIRKDNSKSQVFL KMNSLQTDATVYYCAKQRT LWGYDL YGMDYWGQGSVTV SS
CH	SEQ ID NO:122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHNKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVTVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LSDGSGFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
DVD-Ig輕鏈可變 HIL-1α/β DVD4a-Ig	SEQ ID NO:132	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQKP GQSPRALIYSASYRSGVPD RFTGSGSGTDFTLTISNVQS VDLAHEYFCQQYTRYPLTFGG GTKLEIKRTVAAPSVFIFPP ETTVTQSPASLSMAIGEKVT IRCITSTDIDVDMNWKYQQKP GEPPKLLISQGNLTPGVPS RFSSSGSGTDFVFIIENMLS EDVADYYCLQSDNLPLTFGA GTKLELKR
18F4.2C8 VL	SEQ ID NO:92	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQKP GQSPRALIYSASYRSGVPD RFTGSGSGTDFTLTISNVQS VDLAHEYFCQQYTRYPLTFGG GTKLEIKR
連接子	SEQ ID NO:72	TVAAPSVFIFPP
1B12.4H4 VL	SEQ ID NO:98	ETTVTQSPASLSMAIGEKVT IRCITSTDIDVDMNWKYQQKP GEPPKLLISQGNLTPGVPS RFSSSGSGTDFVFIIENMLS EDVADYYCLQSDNLPLTFGA GTKLELKR
CL	SEQ ID NO:124	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

蛋白質	序列識別符	序列
蛋白質區		12345678901234567890
DVD-Ig重鏈可變hIL-1α/β DVD4b-Ig	SEQ ID NO:133	QVHLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGGDTYYN SPLKSRLSIRKDNSKSQVFL KMNSLQTDDTAVYYCAKQRT LWGYDLYGMDYWGQTSVTV SSASTKGPSVFPLAPEVQLQ QSGAELVKPGASVKLSCTAS GLNIKDTYMHWLKQRPEQGL EWIGRIDPANGNAKYDPRFL GKATITADTSSNTAYLQLSS LTSEDTAVYYCARGDGNFHF DYWGQGTTLTVSS
1B12.4H4 VH	SEQ ID NO:97	QVHLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGGDTYYN SPLKSRLSIRKDNSKSQVFL KMNSLQTDDTAVYYCAKQRT LWGYDLYGMDYWGQTSVTV SS
連接子	SEQ ID NO:80	ASTKGPSVFPLAP
18F4.2C8 VH	SEQ ID NO:91	EVQLQQSGAELVKPGASVKL SCTASGLNIKDTYMHWLKQR PEQGLEWIGRIDPANGNAKY DPRFLGKATITADTSSNTAY LQLSSLTSEDTAVYYCARGD GNFHFDYWGQGTTLTVSS
CH	SEQ ID NO:122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHNKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
DVD-Ig輕鏈可變HIL-1α/β DVD4b-Ig	SEQ ID NO:134	ETTVTQSPASLSMAIGEKVT IRCITSTDIDVDMNWAYQQK GEPPKLLISQGNLTPRGVPS RFSSSGSGTDFVFIENMLS EDVADYYCLQSDNLPLTFGA GTKLELKRTVAAPSVFIFPP DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQKP GQSPRALIYSASYRYSQVDP RFTGSGSGTDFLTITISNVQS

蛋白質	序列識別符	序列
蛋白質區		12345678901234567890
		VDLAEYFCQQYTRYPLTFGG GTKLEIKR
1B12.4H4 VL	SEQ ID NO:98	ETTVTQSPASLSMAIGKVT IRCITSTDIDVDMNWWYQQK GEPPKLLISQGNLTPGVPS RFSSSGSGTDFVFIENMLS EDVADYYCLQSDNLPLTFGA GTKLELKR
連接子	SEQ ID NO:72	TVAAPSVFIFPP
18F4.2C8 VL	SEQ ID NO:92	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIWYQQK GQSPRALIYSASYRSGVPD RFTGSGSGTDFTLTISNVQS VDLAEYFCQQYTRYPLTFGG GTKLEIKR
CL	SEQ ID NO:124	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
DVD-Ig重鏈可變hIL- 1α/β DVD5a-Ig	SEQ ID NO:135	QVQLQQPGAELVRPGASVKL SCKASGYTFTTYWMNWVKQR PEQGLEWIGRIDPYDSETLY SQKFKDTAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYG FDYWGQGTTLTVSSASTKGP EVQLQQSGPELVKTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHVWRQS HGKSLIEWIGYISCYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YYGTNDYWQGQGTTLTVSS
6H3.1A4.3E11 VH	SEQ ID NO:93	QVQLQQPGAELVRPGASVKL SCKASGYTFTTYWMNWVKQR PEQGLEWIGRIDPYDSETLY SQKFKDTAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYG FDYWGQGTTLTVSS
連接子	SEQ ID NO:79	ASTKGP
6B12.4F6 VH	SEQ ID NO:99	EVQLQQSGPELVKTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHVWRQS HGKSLIEWIGYISCYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YYGTNDYWQGQGTTLTVSS
CH	SEQ ID NO:122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPELGG PSVFLFPPKPKDTLMISRT

蛋白質 蛋白質區	序列識別符	序列 12345678901234567890
		EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
DVD-Ig輕鏈可變 HIL-1α/β DVD5a-Ig	SEQ ID NO:136	QIVLTQSPALMSASPGEKVT MTCSASSSVNYMYWYQQKPR SSPKPWIYLTSLNLSGVPAR FSGSGSGTSYSLTISSEAE DAATYYCQQWNSNPYTFGGG TKLEMKRTVAAPQIVLTQSP AIMSASPGEKVTITCSASS VSYMHWFQQKPGASPKLWIY STSLNLSGVPARFSGSGSGT SYSLTVSRMEAEDAATYYCQ QRSTYPYTFGGGTGLEIKR
6H3.1A4.3E11 VL	SEQ ID NO:94	QIVLTQSPALMSASPGEKVT MTCSASSSVNYMYWYQQKPR SSPKPWIYLTSLNLSGVPAR FSGSGSGTSYSLTISSEAE DAATYYCQQWNSNPYTFGGG TKLEMKR
連接子	SEQ ID NO:71	TVAAP
6B12.4F6 VL	SEQ ID NO:100	QIVLTQSPAISASPGEKVT ITCSASSSVSYMHWFQQKPG ASPKLWIYSTSLNLSGVPAR FSGSGSGTSYSLTVSRMEA DAATYYCQQRSTYPYTFGGG TKLEIKR
CL	SEQ ID NO:124	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
DVD-Ig重鏈可變hIL- 1α/β DVD5b-Ig	SEQ ID NO:137	EVQLQQSGPELVKTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHWRQS HGKSLEWIGYISCYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YYGTNDYWGGTTLTVSSAS TKGPQVQLQQPGAELVRPGA SVKLSCASGYTFTTYWMNW VKQRPEQGLEWIGRIDPYDS ETLYSQKFDTAILTVDKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARYGFDYWGGTTLTVSS
6B12.4F6 VH	SEQ ID NO:99	EVQLQQSGPELVKTGTSVKI

蛋白質	序列識別符	序列
蛋白質區		12345678901234567890
		SCKASGYSFTGYMHVVRQS HGKSLEWIGYISYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YYGTNDYWGGTTTLTVSS
連接子	SEQ ID NO:79	ASTKGP
6H3.1A4.3E11 VH	SEQ ID NO:93	QVQLQQPGAELVRPGASVKL SCKASGYTFTTYWMNWVKQR PEQGLEWIGRIDPYDSETLY SQKFKDTAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYG FDYWGGTTTLTVSS
CH	SEQ ID NO:122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
DVD-Ig輕鏈可變 HIL-1α/β DVD5b-Ig	SEQ ID NO:138	QIVLTQSPAIMASAPGEKVT ITCSASSSVSYMHWFQQKPG ASPKLWIYSTSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTVSRMEAE DAATYYCQQRSTYPYTFGGG TKLEIKRTVAAPQIVLTQSP ALMSASAPGEKVTMTCSASSS VNMYWYQQKPRSSPKPWIY LTSNLAGVPARFSGSGSGT SYSLTISSMEAEDAATYYCQ QWNSNPYTFGGGTKLEMKR
6B12.4F6 VL	SEQ ID NO:100	QIVLTQSPAIMASAPGEKVT ITCSASSSVSYMHWFQQKPG ASPKLWIYSTSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTVSRMEAE DAATYYCQQRSTYPYTFGGG TKLEIKR
連接子	SEQ ID NO:71	TVAAP
6H3.1A4.3E11 VL	SEQ ID NO:94	QIVLTQSPALMSASAPGEKVT MTCSASSSVNMYWYQQKPR SSPKPWIYLTSNLAGVPAR FSGSGSGTSYSLTISSMEAE DAATYYCQQWNSNPYTFGGG TKLEMKR

蛋白質 蛋白質區	序列識別符	序列 12345678901234567890
CL	SEQ ID NO:124	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
DVD-Ig重鏈可變hIL- 1α/β DVD6a-Ig	SEQ ID NO:139	QVQLQQPGAELVRPGASVKL SCKASGYTFTTYWMNWVKQR PEQGLEWIGRIDPYDSETLY SQKFKDTAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYG FDYWGQGTTTLTVSSASTKGP SVFPLAPEVQLQQSGPELVK TGTSVKISCKASGYSFTGYY MHWVRQSHGKSLEWIGYISC YNGFTSYNPKFKGKATFTVD TSSSTAYIQFSRLTSEDSAV YYCARSDYYGTNDYWQGQTT LTVSS
6H3.1A4.3E11 VH	SEQ ID NO:93	QVQLQQPGAELVRPGASVKL SCKASGYTFTTYWMNWVKQR PEQGLEWIGRIDPYDSETLY SQKFKDTAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYG FDYWGQGTTTLTVSS
連接子	SEQ ID NO:80	ASTKGPSVFPLAP
6B12.4F6 VH	SEQ ID NO:99	EVQLQQSGPELVKTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHWVRQS HGKSLEWIGYISCYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YYGTNDYWQGQTTTLTVSS
CH	SEQ ID NO:122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKHTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK
DVD-Ig輕鏈可變 HIL-1α/β DVD 6a-Ig	SEQ ID NO:140	QIVLTQSPALMSASPGEKVT MTCASSSVNYMYWYQQKPR SSPKPWIYLTSLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTISSEAE DAATYYCQQWNSNPYTFGGG

蛋白質		序列
蛋白質區	序列識別符	12345678901234567890
		TKLEMKRTVAAPSVFIFPPQ IVLTQSPAISASPGKVTI TCSASSSVSYMHWFQQKPGA SPKLWIYSTSNLASGVPARF SGSGSGTSYSLTVSRMEAED AATYYCQQRSTYPYTFGGGT KLEIKRR
6H3.1A4.3E11 VL	SEQ ID NO:94	QIVLTQSPALMSASPGKVT MTCASASSSVNYMYWYQQKPR SSPKPWIYLTSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTISSMEAE DAATYYCQWNSNPYTFGGG TKLEMKR
連接子	SEQ ID NO:72	<u>TVAAPSVFIFPP</u>
6B12.4F6 VL	SEQ ID NO:100	QIVLTQSPAISASPGKVT ITCSASSSVSYMHWFQQKPG ASPKLWIYSTSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTVSRMEAED DAATYYCQQRSTYPYTFGGG TKLEIKR
CL	SEQ ID NO:124	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
DVD-Ig重鏈可變hIL- 1α/β DVD6b-Ig	SEQ ID NO:141	EVQLQQSGPELVKTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHWVRQS HGKSLEWIGYISCYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YYGTNDYWQGQTTLTVSSAS TKGPSVFPLAPQVQLQPPGA ELVRPGASVKLSCKASGYTF TTYWMNWVKQRPEQGLEWIG RIDPYDSETLYSQKFKDTAI LTVDKSSSTAYMQLSSLTSE DSAVYYCARYGFDYWQGQTT LTVSS
6B12.4F6 VH	SEQ ID NO:99	EVQLQQSGPELVKTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHWVRQS HGKSLEWIGYISCYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YYGTNDYWQGQTTLTVSS
連接子	SEQ ID NO:80	<u>ASTKGPSVFPLAP</u>
6H3.1A4.3E11 VH	SEQ ID NO:93	QVQLQQPGAELVRPGASVKL SCKASGYTFTTYWMNWVKQR PEQGLEWIGRIDPYDSETLY SQKFKDTAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYG FDYWQGQTTTLTVSS
CH	SEQ ID NO:122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG

蛋白質	序列識別符	序列
蛋白質區		12345678901234567890
		GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
DVD-Ig輕鏈可變 HIL-1α/β DVD6b-Ig	SEQ ID NO:142	QIVLTQSPA IMSASPGEKVT ITCSASSSVSYMHW FQQKPG ASPKLWIYSTSNLASGV PAR FSGSGSGTSYSLTVSRMEAE DAATYYCQQRSTYPYTFGGG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPQ IVLTQSPALMSASPGEKVTM TCSASSSVNYMYWYQQKPRS SPKPWIYLT SNLASGV PARF SGSGSGTSYSLTIS SMEAED AATYYCQQWNSNPYTFGGGT KLEMKRR
6B12.4F6 VL	SEQ ID NO:100	QIVLTQSPA IMSASPGEKVT ITCSASSSVSYMHW FQQKPG ASPKLWIYSTSNLASGV PAR FSGSGSGTSYSLTVSRMEAE DAATYYCQQRSTYPYTFGGG TKLEIKR
連接子	SEQ ID NO:72	TVAAPSVFIFPP
6H3.1A4.3E11 VL	SEQ ID NO:94	QIVLTQSPALMSASPGEKVT MTCSASSSVNYMYWYQQKPR SSPKPWIYLT SNLASGV PAR FSGSGSGTSYSLTIS SMEAED DAATYYCQQWNSNPYTFGGG TKLEMKR
CL	SEQ ID NO:124	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSPVTKS FNRGEC

新 DVD-Ig 構 築 體 之 特 徵 概 述 於 表 16 中 。 分 別 藉 由
Biacore 及 MRC-5 生 物 分 析 測 定 親 和 力 (Kd) 及 生 物 活 性

(IC₅₀)。所有新DVD-Ig蛋白之SDS-PAGE分析在還原及非還原條件下展示與正常抗體及DVD1/2-Ig類似的常規遷移圖案。

表 16. 來源於新 mAb 對之新 DVD-Ig 分子的特徵

mAb	特異性	K _d (M)	IC ₅₀ (M)	DVD	定向	連接子	親和力 (K _d) M		效能 (IC ₅₀) M	
							IL-1α	IL-1β	IL-1α	IL-1β
18F4.2C8	rhIL-1α	5.95E-10	3.30E-10	DVD3a	a-b-C	短	8.37E-10	6.37E-08	7.50E-10	NA
				DVD4a	a-b-C	長	7.01E-10	9.30E-10	3.50E-10	1.00E-08
1B12.4H4	rhIL-1β	2.61E-10	6.00E-10	DVD3b	b-a-C	短	1.24E-09	1.90E-10	7.00E-10	4.00E-10
				DVD4b	b-a-C	長	5.60E-10	1.28E-10	3.50E-10	5.00E-10
6H3.1A4	rhIL-1α	3.54E-10	2.40E-10	DVD5a	a-b-C	短	5.08E-10	1.25E-08	2.60E-09	1.90E-08
				DVD6a	a-b-C	長	1.06E-09	2.09E-09	2.30E-09	7.00E-08
6B12.4F6	rhIL-1β	5.54E-10	4.00E-10	DVD5b	b-a-C	短	1.32E-08	6.71E-10	3.30E-09	2.50E-10
				DVD6b	b-a-C	長	8.20E-10	6.97E-10	1.00E-09	7.50E-10

mAb = 單株抗體；NA = 無所偵測之中和活性。

新 DVD-Ig 分子之功能特徵顯示，在任一定向下，就結合及中和兩種抗原而言，具有長連接子之 DVD-Ig 分子執行優於具有短連接子之 DVD-Ig 分子。相對於具有長連接子之 DVD-Ig 分子，具有 b-a-C 定向之 DVD-Ig 分子展示良好結合於兩種抗原及中和兩種抗原，而具有 a-b-C 定向之 DVD-Ig 分子展示良好的結合於 IL-1α 及中和 IL-1α 且結合於 IL-1β 及中和 IL-1β 降低 (例如 DVD4b 對比 DVD4a)。DVD-Ig 分子 DVD4b 以低於 nM 之水準結合並中和 IL-1α 及 IL-1β 兩者

且完全保留親本mAb之結合及中和特徵。

實例3. 生成mIL-1 α / β DVD-Ig分子

為研究與DVD-Ig分子之藥物動力學、活體內功效、組織穿透性及免疫原性有關的關鍵問題，如下所述構築小鼠抗小鼠IL-1 α / β DVD-Ig分子。

實例3.1. 構築mIL-1 α / β DVD-Ig分子

使用自IL-1 α β 雙重KO小鼠生成之兩種小鼠抗小鼠IL-1 α / β 單株抗體(9H10及10G11)構築小鼠抗小鼠IL-1 α / β DVD-Ig分子。藉由分別用小鼠IL-1 α 或小鼠IL-1 β 使IL-1 α / β 雙重KO小鼠免疫來生成小鼠抗小鼠IL-1 α 單株抗體(mAb)及小鼠抗小鼠IL-1 β 單株抗體。選擇一個小鼠抗小鼠IL-1 α mAb(純系9H10)及一個小鼠抗小鼠IL-1 β mAb(純系10G11)，且用以生成mIL-1 α / β DVD-Ig分子。測試各種連接子尺寸及不同域定向。以V(抗mIL-1 β)-連接子-V(抗mIL-1 α)-鼠類恆定區(C γ 2a及C κ)定向構築最終功能性mIL-1 α / β DVD-Ig分子。選殖、表現及純化程序與hIL-1 α / β DVD-Ig結合蛋白之彼等程序類似。使用與關於hIL-1 α / β DVD3-Ig所述類似的重疊PCR及同源重組進行mIL-1 α / β DVD-Ig結合蛋白之選殖。mIL-1 α / β DVD-Ig結合蛋白之序列展示於下表17中。

表 17. mIL-1 α / β DVD-Ig 結合蛋白之胺基酸序列

蛋白質 蛋白質區	序列識別符	序列 12345678901234567890
mIL-1 α / β DVD-Ig 重鏈可變區	SEQ ID NO:143	EVQLQQSGPELVKPGTSVKM SCKTSGYTFTSYVMHWVKQK PGQGLEWIGYIIPYNDNTKY NEKF'KGKATLTSDKSSSTAY MELSSLTSEDSAVYYCARRN EYYGSSFFDYWGQGTTLTVS SAKTTAPSVYPLAPQVILKE SGPGILQPSQTLSTCSFSG FSLSTYGTAVNWIRQPSGKG LEWLAQIGSDDRKLYNPFLK SRITLSEDTSNSQVFLKITS VDTEDSATYYCANGVMEYWG LGTSVTVSS
10G11 VH	SEQ ID NO:144	EVQLQQSGPELVKPGTSVKM SCKTSGYTFTSYVMHWVKQK PGQGLEWIGYIIPYNDNTKY NEKF'KGKATLTSDKSSSTAY MELSSLTSEDSAVYYCARRN EYYGSSFFDYWGQGTTLTVS S
連接子	SEQ ID NO:78	AKTTAPSVYPLAP
9H10 VH	SEQ ID NO:145	QVILKESGPGILQPSQTLSTL TCSFSGFSLSTYGTAVNWIR QPSGKGLEWLAQIGSDDRKL YNPFLKSRITLSEDTSNSQV FLKITSVDTEDSATYYCANG VMEYWGLGTSVTVSS
CH	SEQ ID NO:146	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTG SSVTLGCLVKGYFPEPVTLT WNSGSLSSGVHTFPAVLQSD LYTLSSSVTVTSSTWPSQSI TCNV AHPASSTKVDKKIEPR GPTIKPCPPCKCPAPNLLGG PSVFIFPPKIKDVLMLISLP IVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYN STLRVVSALPIQH QDWMMSGK EFKCKVNNKDLPAPIERTIS KPKGSVRAPQVYVLPPEEE MTKKQVTLTCMVTDFMPEDI YVEWTNNGKTELNYKNTEPV LDS DGSYFMYSKLRVEKKNW VERNSYSCSVVHEGLHNHHT TKSFSRTPGK
mIL-1 α / β DVD-Ig 輕鏈可變區	SEQ ID NO:147	DIQMTQSPASLSASVGETVT ITCRGSGILHNYLVWYQQKQ GKSPQLLVYSAKILADGVPS RFSGSGSGTQYSLKINSLQP EDFGSYYCQHFWSPTFTFGS GTKLEIKRADAAPTVSIFPP

蛋白質	序列識別符	序列
蛋白質區		12345678901234567890
		SIVMTQTPKFLLSAGDRV ITCKASQSVNHDVAWYQ GQSPKLLIYFASNRYTG RFTGSGYGTDFTTISTV EDLAVYFCQQDYSSPYTF GTKLEIKR
10G11 VL	SEQ ID NO:148	DIQMTQSPASLSASVGET ITCRGSGILHNYLVWYQ GKSPQLLVYSAKILADGV RFSGSGSGTQYSLKINS EDFGSYQCQHFSTPFTFG GTKLEIKR
連接子	SEQ ID NO:70	ADAAPTVSIFPP
9H10 VL	SEQ ID NO:149	SIVMTQTPKFLLSAGDRV ITCKASQSVNHDVAWYQ GQSPKLLIYFASNRYTG RFTGSGYGTDFTTISTV EDLAVYFCQQDYSSPYTF GTKLEIKR
CL	SEQ ID NO:150	ADAAPTVSIFPPSSEQLT GASVVCFLNNFYPKDINV KIDGSRQNGVLNSWTDQ KDSTYSMSSTLTTLTKDE HNSYTCEATHKTSTSPIV KSFNRNEC

鼠類 mIL-1α/β DVD-Ig 結合蛋白保留針對鼠類 IL-1α(mIL-1α)及鼠類 IL-1β(mIL-1β)兩者之親和力/活體外效能。表 18 展示 mAb 9H10(抗 mIL-1α)、10G11(抗 mIL-1β)及 mIL-1α/β DVD-Ig 結合蛋白之特徵。

表 18. mDVD4-Ig 之特徵

	抗原	K _D (M)	IC ₅₀ (M)
9H10	mIL-1α	1.73×10 ⁻¹⁰	2.00×10 ⁻¹⁰
10G11	mIL-1β	2.30×10 ⁻¹⁰	3.70×10 ⁻¹⁰
mIL-1α/βDVD-Ig	mIL-1α	7.66×10 ⁻¹⁰	2.00×10 ⁻⁹
	mIL-1β	6.94×10 ⁻¹⁰	8.00×10 ⁻¹⁰

實例 3.2. mIL-1α/β DVD-Ig 結合蛋白在類風濕性關節炎模型中之活體內活性

在此項技術中所熟知的膠原蛋白誘發之關節炎小鼠模型

中評估抗IL-1 α 、抗IL-1 β 、經組合之抗IL-1 α /抗IL-1 β 及鼠類IL-1 α / β DVD4-Ig之治療作用。簡言之，在尾巴根部用含牛類II型膠原蛋白之CFA使雄性DBA-1小鼠免疫。在第21天，小鼠腹膜內(i.p)加打以酵母聚糖。在第24-27天疾病發作後，選擇小鼠且分成各10隻小鼠的獨立組。在處理開始時，對照組及抗細胞激素組之平均關節炎得分相當。為中和IL-1，每隔一天以1-3 mg/kg向小鼠腹膜內注射抗IL-1 α mAb、抗IL-1 β mAb、抗IL-1 α mAb與抗IL-1 β mAb之組合或鼠類IL-1 α / β DVD4-Ig。一週三次仔細地檢查小鼠在外周關節之關節炎的外觀，且確定疾病活動度得分。

在治療模式中阻斷IL-1有效降低關節炎之嚴重程度，而抗IL-1 β 展示比抗IL-1 α (與對照組相比，平均關節炎得分降低10%)大的功效(降低24%)。在抗IL-1 α 與抗IL-1 β 之間觀察到累加效應，用抗IL-1 α mAb及抗IL-1 β mAb兩者處理之小鼠平均關節炎得分降低40%。令人驚訝的是，在相同劑量水準下，mDVD-Ig結合蛋白之處理顯示平均關節炎得分降低47%，證明mDVD-Ig結合蛋白之活體內治療功效。在此動物模型之關節腫脹量測中亦觀察到類似功效。

實例3.3.鼠類IL-1 α / β DVD-Ig結合蛋白在骨關節炎模型中之活體內活性

以上研究展示對於類風濕性關節炎，在小鼠膠原蛋白誘發之關節炎(CIA)模型中，用抗小鼠IL-1 α 與IL-1 β 抗體之組合以及鼠類抗小鼠IL-1 α / β DVD-Ig結合蛋白阻斷IL-1 α 及IL-1 β 兩者明顯比單獨任何單一抗體有效(亦參見Wu等人，

Nature Biotech., 25(11): 1290-1297 (2007))。在兩種OA動物模型(亦即小鼠關節不穩定模型(「JIM」)及小鼠內側半月板去穩定(「DMM」)模型)中研究抗IL-1療法對骨關節炎(OA)之功效。

實例 3.3.1. 小鼠抗鼠類IL-1 α 及抗鼠類IL-1 β 單株抗體在小鼠骨關節炎之關節不穩定模型(JIM)中之活體內活性

實例 3.3.1.A. 研究設計

在小鼠骨關節炎之關節不穩定模型(JIM)中，mIL-1 α / β DVD-Ig分子之活體內活性的研究設計展示於表19中。所有組含有25隻稱重約30公克(BW=30 g)之小鼠(n=25)。在21天後終止研究。用異氟烷麻醉劑使每籠5隻養的兩個半月大雄性Swiss Webster小鼠(25隻/組/時間點)麻醉。在第0天，對右膝及左膝施以前十字韌帶(ACL)創傷以試圖誘發OA病變。在ACL創傷當天開始用IL-1抑制性抗體IL-1 α (9H10)及IL-1 β (10G11)(單獨及組合)進行腹膜內(ip)治療，且每4天(q4d)繼續治療，持續20天。用於非處理對照之媒劑為PBS。在第21天收集右膝及左膝，且將組織病理學變化評分並表徵。僅使用具有增生性反應指示成功不穩定誘發的關節分析資料。將增生性反應/不穩定按0-3進行評分，且在最終分析中僅使用不穩定關節(1、2或3之評分)。內側及外側股骨及脛骨軟骨退化就軟骨退化嚴重程度以0-5之量度評分。在最後一次抗體給藥後4天，自各組所有動物抽取血液進行血清收集。每週記錄體重。在最後一天，向動物(組1、2、3、4中之10隻動物)投與酵母聚糖

A，且(在終止)4小時後抽血進行IL-6(IL-1/TNF依賴性)血清分析。在第21天殺死動物且將右膝關節及左膝關節收集至福馬林中。

表 19.在骨關節炎之關節不穩定動物模型中之研究設計

處理組	化合物	途徑	給藥方案
組1	媒劑1 (PBS)	ip	Q4D (每週2次)
組2	抗IL-1 α (9H10)	ip	Q4D (每週2次)
組3	抗IL-1 β (10G11)	ip	Q4D (每週2次)
組4	抗IL-1 α (9H10) 及 抗IL-1 β (10G11)	ip	Q4D (每週2次)

實例 3.3.1.B. 組織製備及分析

組織製備：在脫鈣固定劑(Surgipath Decalifier, Surgipath Medical Ind., Inc., Richmond VA)中2-3天後，修剪兩個膝關節之外部組織，包埋額狀面且切片。在額狀面之近似中點處獲取各動物(2個關節/阻斷)之一個切片。所有切片為8 μ m且用甲苯胺藍染色。由委員會認證的獸醫學病理學家在不知道研究組名稱的情況下檢查載玻片，且根據如下方法評分。統計分析係使用Microsoft Excel來執行，且包括使用95%信賴等級比較所有處理組與對照組之2尾t檢驗。

關節之組織病理學評分：使用以下系統就軟骨退化之嚴重程度對內側及外側股骨及脛骨軟骨退化進行評分：軟骨細胞及蛋白聚糖損失與纖維化之深度/程度：

1= 超過50%或50%以上之區帶表面有淺表損傷、膠原蛋

白之切線層缺失，或區帶中病灶或擴散分佈中有多達10%之蛋白聚糖及/或軟骨細胞損失

2= 50%或50%以上之區帶面積的基質損失蔓延至上部1/4，或區帶中病灶或擴散分佈中有多達25%之蛋白聚糖及/或軟骨細胞損失

3= 超過50%或50%以上之區帶的基質損失蔓延穿過軟骨厚度之1/2，或區帶中病灶或擴散分佈中有多達50%之蛋白聚糖及/或軟骨細胞損失

4= 超過50%或50%以上之區帶的基質損失蔓延穿過軟骨厚度之3/4，或區帶中病灶或擴散分佈中有多達75%之蛋白聚糖及/或軟骨細胞損失

5= 超過50%或50%以上之區帶的基質損失蔓延穿過整個軟骨厚度，或區帶中病灶或擴散分佈中有多達100%之蛋白聚糖及/或軟骨細胞損失

針對病變之分區(內部、中間及外部)分佈來指定評分，且對各三者之得分(0-5)就關節之各區域且隨後就完整關節進行求和。

使用數位軟體(NIS-Elements版本3.0)量測骨贅(對脛骨或股骨表面上的最大者進行評估)。

骨贅評估=視尺寸而定1、2或3用於表示小、中或大

小骨贅= 1(至多150 μm)

中骨贅= 2(151-300 μm)

大骨贅= 3(>301 μm)

相對於(若存在)不包括於評分中之發炎類型及程度描述

滑液反應並表徵。

測定每一動物之各不同參數的平均值 $\pm$ SE並求和以得到總關節得分。

藉由內側滑膜及側韌帶中存在增生性變化鑑別具有不穩定誘發組織學證據的關節。另外，根據以下準則記錄各關節之不穩定得分。

0=無不穩定

1=輕度不穩定(韌帶及邊緣區中之最小至輕度增生性變化)

2=中度不穩定(韌帶及邊緣區中之中度增生性變化)

3=重度不穩定(韌帶及邊緣區中之嚴重增生性變化)

結果：在最終資料分析中僅使用具有1、2或3(或2、3)之評分的不穩定關節。最後基於全患病關節而非患病動物分析資料。此研究結果表明用抗IL-1 α 單株抗體或IL-1 β 單株抗體處理之動物的關節顯示與媒劑處理之對照關節中所見類似的軟骨退化。然而，使用小鼠抗小鼠IL-1 α mAb(9H10)及小鼠抗小鼠IL-1 β mAb(10G11)兩者之組合療法顯著減小內側脛骨的軟骨退化得分。圖2展示不同處理組中之動物之關節的軟骨退化得分條形圖。

實例3.3.2. mIL-1 α / β DVD-Ig結合蛋白在小鼠骨關節炎之關節不穩定模型(JIM)中之活體內活性

如上文實例3.3.1中所述之骨關節炎之關節不穩定模型亦用於比較由小鼠抗mIL-1 α 單株抗體(9H10)與小鼠抗mIL-1 β 單株抗體(10G11)之組合所提供之抗IL-1療法與由自該兩種

單株抗體生成之mIL-1 α / β DVD-Ig結合蛋白所提供之抗IL-1療法的功效。

實例3.3.2.A. 研究設計

此研究設計與上文實例3.3.1中所述之研究設計類似。在第0天，用異氟烷麻醉劑使每籠養5隻的兩個半月大雄性Swiss Webster小鼠(25隻/組/時間點)麻醉，且鉗夾右膝及左膝區域並準備對十字韌帶進行關節內創傷手術。對動物每4天進行一次(Q4D)給藥(在第0天開始，ip)，在第21天終止(對於組2)。對動物每週進行三次給藥(在第0天開始，ip)，在第21天終止(對於組1、3及4)。在最後一次抗體給藥後四天，每組之所有動物已抽血進行血清收集。每週記錄體重。在最後一天，向動物(組1、2、3、4中之10隻動物)投與酵母聚糖A，且(在終止)4小時後抽血進行IL-6(IL-1/TNF依賴性)血清分析。在第21天使動物安樂死且將右膝關節及左膝關節收集至福馬林中。參見如下研究設計表。

表20.骨關節炎之關節不穩定動物模型的研究設計

處理組	化合物	途徑	給藥方案	劑量水準 (mg/kg)
組1	媒劑1 (PBS)	ip	每週3次	6.7 ml/kg
組2	抗IL-1 α (9H10) 及 抗IL-1 β (10G11)	ip	Q4D (每週3次)	6 mg/kg之抗IL-1 α (180微克/小鼠) 及 6 mg/kg之抗IL-1 β (180微克/小鼠)
組3	mIL-1 α / β DVD-Ig	ip	每週3次	12 mg/kg (500微克/小鼠)
組4	mIL-1 α / β DVD-Ig	ip	每週3次	6 mg/kg (250微克/小鼠)

實例 3.3.2.B. 組織製備及分析

如上文實例 3.3.1 中所述進行不同處理組中之動物關節的關節軟骨之組織製備及組織學評分。

結果：結果表明用 mIL-1 α / β 10G11-9H10 DVD-Ig 結合蛋白處理小鼠顯著抑制骨關節炎之進展(相較於媒劑， $P < 0.05$)，具有與親本 mAb 9H10 及 10G11 之組合相當的功效。圖 3 展示不同處理組中之動物關節的軟骨退化評分條形圖。如圖 3 中所示，就預防骨關節炎病變而言，用 6 mg/kg 或 12 mg/kg DVD-Ig 結合蛋白處理之結果與其功效類似。(使用 3 mg/kg DVD-Ig 結合蛋白之處理並未對軟骨退化有影響且結果與媒劑處理之關節類似。參見下文實例 3.3.3。)此研究結果表明在骨關節炎之小鼠模型中使用抗 IL-1 α 單株抗體與抗 IL-1 β 單株抗體之組合或使用 IL-1 α / β DVD-Ig 結合蛋白處理對組織病理學參數具有明顯有利的作用。

實例 3.3.3. 骨關節炎之關節不穩定模型中之追蹤研究以比較使用抗 IL-1 β 單株抗體及其他結合蛋白之處理

使用骨關節炎之關節不穩定模型執行追蹤研究以更精密地測定與其他處理相比，僅用抗 IL-1 β 單株抗體處理之動物中是否可對內側脛骨軟骨退化評分具有任何明顯作用。在 21 天研究中評估用抗 IL-1 β 單株抗體處理之效應。

實例 3.3.3.A. 研究設計

此研究設計與上文實例 3.3.1 中所述之研究設計類似。

表 21. 21天骨關節炎之關節不穩定動物模型之設計

處理組	化合物	途徑	給藥方案	劑量水準 (mg/kg)
組1	媒劑1 (PBS)	ip	Q4D	6.7 ml/kg
組2	抗IL-1 α (9H10) 及 抗IL-1 β (10G11)	ip	Q4D	6 mg/kg之抗IL-1 α (180微克/小鼠) 及 6 mg/kg之抗IL-1 β (180微克/小鼠)
組3	抗IL-1 β (10G11)	ip	Q4D	12 mg/kg (360微克/小鼠)
組4	抗IL-1 β (10G11)	ip	Q4D	6 mg/kg (180微克/小鼠)
組5	抗IL-1 β (10G11)	ip	Q4D	3 mg/kg (90微克/小鼠)

實例 3.3.3.B. 組織製備及分析

如上文實例 3.3.1 中所述進行不同處理組中之動物關節的關節軟骨之組織製備及組織學評分。

結果：如圖 4 中所示，結果證實其中指示類似正治療效應之彼等先前研究使用抗 IL-1 α 單株抗體與抗 IL-1 β 單株抗體之組合，且僅使用抗 IL-1 β 單株抗體之處理在任何測試劑量下均不有效預防軟骨退化。

實例 3.3.4. 關節不穩定模型研究中酵母聚糖誘發之介白素-6(IL-6)產生

如藥效學讀出數據以判定抗 IL-1 α 單株抗體及抗 IL-1 β 單株抗體以及 mIL-1 α/β DVD-Ig 結合蛋白是否為功能性且能夠活體內中和 IL-1 α 及 IL-1 β 一般，在 OA 之關節不穩定模型研究中量測酵母聚糖誘發 (IL-1 α 及 IL-1 β 依賴性) 之介白素 6(IL-6) 產生。

簡言之，在第21天，使酵母聚糖懸浮於PBS媒劑中且置放於沸水中半小時，接著使其冷卻，隨後用於模型中。接著將小鼠腹膜內注射以50 mg/kg酵母聚糖於0.5 ml PBS中之懸浮液(在注射前充分混合)。接著在酵母聚糖注射後4小時對小鼠放血。收集血清用於IL-6量測。

結果：如圖5中所示，與媒劑處理之對照動物相比，抗IL-1 α 單株抗體(6 mg/kg)與抗IL-1 β 單株抗體(6 mg/kg)之組合以及mIL-1 α/β DVD-Ig結合蛋白(6 mg/kg或12 mg/kg)顯著中和酵母聚糖誘發之IL-6產生。因此，抗體顯示活體內功能活性。

實例3.3.5. 細胞激素抑制性抗體處理對於SV129小鼠中由內側半月板去穩定(DMM)模型所誘發之骨關節炎的效應

亦採用替代動物模型來研究抗IL-1 α 及抗IL-1 β 活性對於減緩骨關節炎之軟骨退化進展的影響。骨關節炎之小鼠內側半月板去穩定(DMM)模型相比JIM程序(參見上文)有較小侵襲性及發炎，且主要在脛骨內側坪及股骨內側髁之中心重量承載區上引起病變。當與JIM相比時，在DMM後病變之嚴重程度及位置更一致。

實例3.3.5.A. 研究設計

在第0天，腹膜內(ip)投與氯胺酮/甲苯噻嗪混合液使每籠養5隻的重量約30公克之雄性SV129小鼠麻醉，且隨後藉由鈍器解剖暴露內側側韌帶並橫切以表現出朝向股骨之半月板。用8-0 vicryl縫合線閉合關節間隙。用傷口膠閉合皮膚。對於假手術，在膝內側造成垂直皮膚切口並打開關

節囊。用 8-0 vicryl 縫合線閉合關節囊且用傷口膠閉合皮膚。接著根據以下研究設計表，以腹膜內(ip)注射抗體或媒劑來處理動物組。兩隻性別匹配、年齡匹配且品系匹配之未實驗小鼠亦納入此項研究中。在 8 週處理後，使動物安樂死，且將膝關節收集於 10% 中性緩衝福馬林中。

表 22. 使用骨關節炎之內側半月板去穩定(DMM)模型的研究設計

處理組	化合物	動物數 (n)	劑量、途徑及方案	殺死時間點
A	假 (無)	5	無	8 週
B	媒劑(PBS)	10	ip, 3 次/週	8 週
C	抗IL-1 α mAb 及 抗IL-1 β mAb	11	各抗體180微克/小鼠, ip, 每4天一次	8 週
D	mIL-1 α/β DVD-Ig	10	250微克/小鼠, ip, 3 次/週	8 週

實例 3.3.5.B. 組織檢驗

使福馬林固定之樣品脫鈣，且將標本在額狀面上各自切成 15 層切片。每層切片約 6 μ m 厚，且各層切片相隔 70 μ m。用甲苯胺藍(T. Blue)使所有載玻片染色。由委員會認證的獸醫病理學家根據錢伯斯方法(Chambers method, Chambers 等人(2001) Arthritis Rheum 44:1455-65)就軟骨退化(參見下文)評估載玻片。根據下表中之量表，將四種軟骨表面股骨內側髌(MFC)、脛骨內側坪(MTP)、股骨外側髌(LFC)及脛骨外側坪(LTP)各以 0-6 進行評分。

表 23. 軟骨退化之錢伯斯評分系統

等級	骨關節損傷
0	無損傷
1	關節表面變粗糙及少量纖維化
2	纖維化向下至緊靠表面層以下之層(區2)及損失一些表面薄層
3	表面薄層損失且纖維化向下蔓延至鈣化軟骨
4	嚴重纖維化且軟骨侵蝕向下至軟骨下骨
5	嚴重纖維化且侵蝕多達80%之軟骨
6	超過80%之軟骨損失

使用 GraphPad Prism 軟件版本 4.03，使用 曼-惠特尼 U 檢驗 (Mann-Whitney U test) 執行統計分析。

實例 3.3.5.C. 結果

如圖 6 中所示，使用抗小鼠 IL-1 α 單株抗體 (9H10，6 mg/kg) 及抗小鼠 IL-1 β 單株抗體 (10G11，6 mg/kg) 兩者或使用 IL-1 α/β DVD-Ig 結合蛋白 (6 mg/kg) 之組合療法顯著降低骨關節炎之小鼠 DMM 模型中之軟骨退化。

實例 3.3.6. 在小鼠骨關節炎之內側半月板去穩定 (DMM) 模型中滴定抗 IL-1 α 及抗 IL-1 β 活性 (8 週研究)

針對骨關節炎之 DMM 模型中回應於不同劑量之抗 mIL-1 α 單株抗體 (9H10 mAb) 及抗 mIL-1 β 單株抗體 (10G11 mAb) (單獨或組合) 及不同劑量之 mIL-1 α/β 10G11-9H10 DVD-Ig 結合蛋白對於軟骨退化之作用進行 8 週研究。

實例 3.3.6.A. 研究設計

在第 0 天，腹膜內 (ip) 投與氯胺酮/甲苯噻嗪混合液使每籠養 5 隻的重量約 30 公克之雄性 SV129 小鼠麻醉，且隨後藉由鈍器解剖暴露內側側韌帶並橫切以表現出朝向股骨之

半月板。用8-0 vicryl縫合線閉合關節間隙。用傷口膠閉合皮膚。對於假手術，在膝內側造成垂直皮膚切口且打開關節囊。用8-0 vicryl縫合線閉合關節囊且用傷口膠閉合皮膚。接著根據以下研究設計表(表24)，以腹膜內(ip)注射抗 mIL-1 α 單株抗體、抗 mIL-1 β (單獨或組合)、mIL-1 α / β DVD-Ig結合蛋白或媒劑來處理動物組。在8週治療後，使動物安樂死，且將膝關節收集於10%中性緩衝福馬林中。

表24. 在骨關節炎之DMM模型中測試各種處理之研究設計

處理組	化合物	動物數 (n)	劑量、途徑及方案	殺死時間點
A	假(無)	5	無	8週
B	媒劑(PBS)	10(9)	ip, 3次/週	8週
C	抗IL-1 α (9H10)	10(5)	180微克/小鼠, ip, 每4天一次	8週
D	抗IL-1 β (10G11)	10(8)	180微克/小鼠, ip, 每4天一次	8週
E	抗IL-1 α (9H10) + 抗IL-1 β (10G11)	10(8)	各抗體180微克/小鼠, ip, 每4天一次	8週
F	mIL-1 α β DVD-Ig	10(9)	62.5微克/小鼠, ip, 3次/週	8週
G	mIL-1 α β DVD-Ig	10	125微克/小鼠, ip, 3次/週	8週
H	mIL-1 α β DVD-Ig	10	250微克/小鼠, ip, 3次/週	8週

上表第3行(動物數)中括號內之數字為資料集中所包括之實際動物數。排除的簡要描述如下：

組B：僅9隻動物包括於組B中。一隻動物由於在組織學檢驗下發現內側半月板完整且基本上不存在骨關節炎變化而自資料集中排除。

組C：僅5隻動物包括於組C中。五隻動物由於在組織學檢驗下發現內側半月板大部分完整且存在很少骨關節炎變化而自資料集中排除。

組D：僅8隻動物包括於組D中。一隻動物之載玻片不存在。另一隻動物由於在組織學檢驗下發現內側半月板大部分完整且存在很少骨關節炎變化而自資料集中排除。

組E：僅8隻動物包括於組E中。兩隻動物由於其被視為離群值而排除。

組F：僅9隻動物包括於組F中。一隻動物由於在組織學檢驗下發現內側半月板完整且基本上不存在骨關節炎變化而自資料集中排除。

實例3.3.6.B. 組織製備及檢驗

如上文實例3.3.5中所述製備組織並評分。

實例3.3.6.C. 結果

結果展示於圖7中。與骨關節炎之關節不穩定模型(JIM)中所獲得之結果(上文)類似，僅用抗IL-1 α 單株抗體(9H10)或抗IL-1 β 單株抗體(10G11)治療導致軟骨退化減少，其與媒劑對照關節中所觀察到的結果無統計上顯著之差異。然而，使用兩種單株抗體之組合療法或使用IL-1 α/β DVD-Ig結合蛋白(除1.5 mg/kg之IL-1 α/β DVD之外)顯著降低平均錢伯斯得分總和(表明總體軟骨退化)及平均最大錢伯斯得分(關節中最受累及之區域)。在mIL-1 α/β DVD-Ig處理組中觀察到平均錢伯斯得分總和的統計上顯著之劑量效應。因此，在此研究中，用抗mIL-1 α 單株抗體及抗mIL-1 β 單株抗

體兩者(各6 mg/kg)及用 mIL-1 α / β DVD-Ig結合蛋白(3 mg/kg及6 mg/kg)治療8週改善骨關節炎之DMM模型中所誘發之軟骨退化的進展。

實例3.3.7. 在骨關節炎之內側半月板去穩定(DMM)模型中抗IL-1 α 及抗IL-1 β 活性及小分子處理對於動物軟骨退化之效應

已展示多西環素預防骨關節炎之DMM模型中之軟骨退化(Effects of Disease-modifying Osteoarthritis Drugs in an *in-vivo* Animal Model 1Silva 等人, Univ. Mass. Med. School, Worcester, MA, USA, Trans ORS 2009-需要完整引用)且亦在人類臨床試驗中預防軟骨退化(Brandt等人(2005) Arthrit. Rheum. 52(7):2015-2025)。在此研究中，在DMM模型中，用多西環素處理動物之效應與用抗IL-1 α 單株抗體與抗IL-1 β 單株抗體之組合處理動物之效應相當。

實例3.3.7.A. 研究設計

重量約30公克之雄性SV129小鼠已藉由鈍器解剖暴露內側側韌帶，且橫切以表現出朝向股骨之半月板。用8-0 vicryl縫合線閉合關節間隙。用傷口膠閉合皮膚。對於假手術，在膝內側造成垂直皮膚切口且打開關節囊。用8-0 vicryl縫合線閉合關節囊且用傷口膠閉合皮膚。接著根據以下研究設計表，口服或經由腹膜內(ip)注射媒劑或治療劑來處理動物組。三隻性別匹配、年齡匹配且品系匹配之未實驗小鼠亦納入此項研究中。在4週處理後，使動物安樂死，且將膝關節收集於10%中性緩衝福馬林中。

表 25. 在骨關節炎之DMM模型中測試各種抗IL-1抗體及多西環素處理之研究設計

組	化合物	動物數 (n)	劑量、途徑及方案	殺死時間點
A	假(無)	3	無	4週
B	媒劑 (0.02% Tween80/ 0.5% HPMC)	10	po, BID	4週
C	多西環素	10	30 mg/kg, po, BID	4週
D	抗IL-1 α (9H10) + 抗IL-1 β (10G11)	10	各180微克/小鼠, ip, 每4天一次	4週

實例 3.3.7.B. 組織製備及檢驗

如上文實例 3.3.5 中所述製備組織並評分。

實例 3.3.7.C. 結果

結果展示於圖 8 中。在研究條件下，用各 180 微克/小鼠之劑量的抗 IL-1 α 單株抗體與抗 IL-1 β 單株抗體之組合處理 4 週導致雄性 SV129 小鼠中由內側半月板去穩定所誘發之骨關節炎變化顯著改善。與媒劑對照組相比，此組合處理顯著降低平均錢伯斯得分總和及平均最大錢伯斯得分，且尤其降低平均錢伯斯得分總和。30 mg/kg 之多西環素處理亦導致類似治療效應，但抗體組合療法更有效。

實例 4. 抗 IL-1 α / β 療法之疼痛功效

DMM 模型亦生成小鼠之可量測疼痛。最近，Malfait 等人(參見 Malfait 等人(2010) Osteoarthritis Cartilage, 18: 572-580)展示在 DMM 而非假手術後，後爪之縮爪閾值(疼痛之機械異常疼痛指示)明顯減小。在 DMM 動物模型中研究抗 IL-1 α / β 療法之功效。如此系列研究中所示，經 DMM 手術

之小鼠早在手術後第7天即出現異常疼痛且直至第35天顯示縮爪閾值減小。

在OA之DMM小鼠模型中根據機械異常疼痛測試抗IL-1療法改善疼痛之可能性。在手術當天開始IL-1 α mAb與IL-1 β mAb之組合的給藥且每週重複兩次，歷時5週。僅用PBS媒劑、用IgG同型對照或用抗IL-1 α mAb與抗IL-1 β mAb之組合(各mAb之劑量為6 mg/kg)處理動物。每週測試動物之縮爪閾值。用PBS或IgG同型對照處理之組之同側(手術)肢與對側(非手術)肢相比或與已進行假手術之動物相比異常疼痛(疼痛)。參見圖9。相比之下，在第5週(第35天)，用抗IL-1 α mAb與抗IL-1 β mAb之組合處理之組證明縮爪閾值顯著較高，表明與PBS媒劑或IgG同型治療組相比異常疼痛(疼痛)發展減慢。參見圖10。此疼痛減輕早在治療後第1週即發現(資料未展示)。

為評估IL-1療法在確定疼痛中的效應，在第35天用抗IL-1 α 單株抗體與抗IL-1 β 單株抗體之組合處理IgG對照組中患有確定OA及機械異常疼痛之動物，且在24小時後(第36天)測試縮爪閾值。資料證明使用抗IL-1 α mAb與抗IL-1 β mAb之組合療法逆轉患有確定疾病之動物的異常疼痛(減輕OA疼痛)。此等資料表明抗IL-1療法提供不依賴於潛在的疾病緩解效應之鎮痛效應。參見圖11。

實例5. 抗IL-1 α / β 組合療法之疼痛功效的進一步研究

根據機械異常疼痛進一步評估抗IL-1療法在OA之DMM小鼠模型(參見上文)中改善疼痛之可能性。在手術當天開

始IL-1 α mAb與IL-1 β mAb之組合的給藥且每週重複兩次，歷時4週。僅用PBS媒劑、用抗IL-1 α mAb(6 mg/kg)、用抗IL-1 β mAb(6 mg/kg)或用抗IL-1 α mAb(6 mg/kg)與抗IL-1 β mAb(6 mg/kg)之組合處理DMM動物，每週腹膜內(ip)投與兩次，歷時四週。在第28天測試動物之異常疼痛。用媒劑處理之組的同側(手術)肢與對側(非手術)肢相比或與已進行假手術之動物相比呈現異常疼痛(疼痛)。參見圖12。類似地，僅用抗IL-1 α mAb或抗IL-1 β mAb治療之組呈現異常疼痛(疼痛)。相比之下，用抗IL-1 α mAb與抗IL-1 β mAb之組合處理之組證明縮爪閾值顯著較高，表明與媒劑處理組相比異常疼痛(疼痛)發展減慢(圖12)。

實例6. 抗IL-1 α / β 組合療法之劑量依賴性疼痛功效

在DMM小鼠模型中，在對動物執行手術的當天開始抗IL-1 α mAb與抗IL-1 β mAb之組合的給藥，且每週重複兩次，歷時四週。僅用PBS媒劑或用抗IL-1 α mAb與抗IL-1 β mAb之組合處理動物，兩者均以1 mg/kg、3 mg/kg或6 mg/kg腹膜內(ip)投與，每四天一次，歷時四週。在第28天測試動物之縮爪閾值。用媒劑處理之組的同側(手術)肢展示縮爪閾值明顯減小，表明與對側(非手術)肢相比或與已進行假手術之動物相比呈現異常疼痛(疼痛)(圖13)。相比之下，用抗IL-1 α mAb與抗IL-1 β mAb之組合處理之組證明縮爪閾值之劑量依賴性增大，表明與媒劑處理組相比異常疼痛(疼痛)發展減慢(圖13)。

實例7. 確定疼痛中之抗IL-1 α / β 組合療法

為評估抗IL-1 α / β 組合療法在確定疼痛中之效應，在第27天用抗IL-1 α mAb與抗IL-1 β mAb之組合處理DMM小鼠模型中患有確定OA及機械異常疼痛之動物，兩者均以1 mg/kg、3 mg/kg或6 mg/kg腹膜內(ip)投與，24小時後(第28天)測試異常疼痛。結果展示於圖14中。資料證明使用抗IL-1 α mAb與抗IL-1 β mAb之組合療法以劑量相關方式逆轉患有確定疾病之動物的機械異常疼痛(減輕之OA疼痛)(圖14)。

實例8. 抗IL-1 α / β 組合療法之抗痛覺過敏效應

為評估中和IL-1 α 及IL-1 β 是否在發炎性疼痛病狀中產生抗疼痛感受性效應，評估抗IL-1 α mAb及抗IL-1 β mAb在疼痛感受性疼痛之小鼠角叉菜膠爪模型中逆轉確定疼痛之能力。

在小鼠角叉菜膠模型中評估抗IL-1 α mAb及抗IL-1 β mAb在單獨或組合投與時之功效(圖15)。在小鼠之不同組中，在足底角叉菜膠注射後30小時，投與900 μ g抗IL-1 α mAb、抗IL-1 β mAb或其組合。在角叉菜膠注射後48小時及96小時，執行熱痛覺過敏測試。如先前研究所示，900 μ g劑量組合顯著減弱熱痛覺過敏(48小時，相比PBS組 4.98 ± 0.34 s，角叉菜膠爪 8.11 ± 0.62 s， $p < 0.01$ ，圖15A；96小時，相比PBS組 4.45 ± 0.55 s，角叉菜膠爪 7.62 ± 0.45 s， $p < 0.01$)。900 μ g組合組之抗疼痛感受性效應在48小時為 $53 \pm 7\%$ ，且在96小時為 $82 \pm 11\%$ 。雙氯芬酸(非類固醇消炎鎮痛劑)陽性對照組同樣顯示顯著減弱熱痛覺過敏(在兩個

時間點下 $p < 0.01$)。相比之下，在小鼠角叉菜膠發炎性疼痛模型中，當單獨投與抗 IL-1 α mAb 及抗 IL-1 β mAb 時，在兩個時間點均未發現顯著抗疼痛感受性效應，表明同時中和 IL-1 α 及 IL-1 β 兩者為抗疼痛感受性功效所必需。

實例 9. 抗 IL-1 α / β 組合療法之劑量依賴性抗痛覺過敏效應

如圖 16 中所示，如對輻射熱刺激之縮爪等待時間減小所證明，小鼠(雌性 BALB/c)足底注射角叉菜膠產生持久的熱痛覺過敏(在角叉菜膠注射後 48 小時及 96 小時執行測試；在兩個時間點下對照未受傷爪相比 PBS 媒劑組中之角叉菜膠爪之 $p < 0.01$)。在角叉菜膠注射後 30 小時，用媒劑或抗 IL-1 α mAb 與抗 IL-1 β mAb 之組合(各 mAb 100、300 或 900 微克/小鼠)處理不同動物組。由抗 IL-1 α mAb 與抗 IL-1 β mAb 之 900 μ g 劑量組合顯著減弱熱痛覺過敏可看出劑量相關效應(48 小時，PBS 中之角叉菜膠爪 3.23 ± 0.34 s 相比 900 μ g 組中之 7.88 ± 0.93 s， $p < 0.01$ ，圖 16A；96 小時，PBS 中之角叉菜膠爪 4.45 ± 0.55 s 相比 900 μ g 組中之 7.62 ± 0.45 s， $p < 0.01$ ，圖 16B)。900 μ g 處理組之抗疼痛感受性效應在 48 小時為 $70 \pm 9\%$ ，且在 96 小時為 $62 \pm 4\%$ 。非類固醇消炎鎮痛劑雙氯芬酸(30 mg/kg)作為陽性對照納入該研究中，且當在測試前 60 分鐘經口投與時，其使受傷爪之平均縮爪等待時間增加至 48 小時之 7.01 ± 0.58 s 及 96 小時之 7.48 ± 0.34 s(在兩個時間點下， $p < 0.01$)。IgG 對照組及低劑量 100 μ g mAb 組在任一時間點下均未減弱熱痛覺過敏。mAb 及雙氯芬酸未顯著改變對照受傷爪之縮爪等待時間值。

實例 10. 抗 IL-1 α / β 組合療法在 CFA 疼痛模型中之功效

CFA(完全弗氏佐劑)發炎性疼痛模型用以測試抗 IL-1 α 與抗 IL-1 β mAb 組合是否產生針對機械終點之功效。因此，在動物(雌性 BALB/c 小鼠)足底注射以 CFA 後 48 小時，使用 von Frey 單絲評估其機械異常疼痛。如圖 17A 所示，如僅用 PBS 媒劑處理之 CFA 注射爪的縮爪閾值減小所證明，足底 CFA 產生加強的機械異常疼痛(0.052 ± 0.028 g 相較於對側未受傷爪之 0.860 ± 0.090 g, $p < 0.01$)。在 CFA 注射後 30 小時，用 IgG 同型對照或抗 IL-1 α mAb 與抗 IL-1 β mAb 之組合(各 mAb 900 微克/小鼠)處理各別動物組。mAb 處理組展示機械異常疼痛顯著減弱(0.419 ± 0.101 g, 相較於 PBS 媒劑 $p < 0.01$, 圖 17A)。功效量值(MPE%)為 $65.51 \pm 12.35\%$ (圖 17B)。消炎鎮痛陽性對照雙氯芬酸(30 mg/kg, 1 小時預處理)亦藉由增加縮爪閾值(0.359 ± 0.088 g, 相較於 PBS 媒劑 $p < 0.01$)減弱機械異常疼痛，其中 MPE% 為 $64.51 \pm 10.20\%$ 。

實例 11. 抗 IL-1 α / β 組合療法在神經痛中之功效

在小鼠(雄性 CD1)之 L5/L6 脊神經結紮(SNL)模型中檢驗抗 IL-1 α 與抗 IL-1 β mAb 組合療法是否將在神經痛病狀中產生功效。在 SNL 手術後 6 天、用 mAb 組合(各 mAb 900 微克/小鼠)處理動物後 24 小時及 72 小時執行測試。如對 von Frey 單絲刺激之縮爪閾值減小所證明，在 SNL 手術後僅用 PBS 媒劑處理之小鼠中觀察到機械異常疼痛(24 小時， 0.073 ± 0.032 g 相較於對側爪之 0.735 ± 0.109 g, 圖 18A；72 小時， 0.128 ± 0.048 g 相較於對側爪之 0.732 ± 0.132 g, 圖

18B；在兩個時間點下 $p < 0.01$)。mAb處理組展示在兩個時間點下機械異常疼痛顯著減弱(24小時， 0.477 ± 0.131 g，相較於PBS媒劑 $p < 0.01$ ，圖18A；72小時， 0.527 ± 0.111 g，相較於PBS媒劑 $p < 0.01$ ，圖18B)。功效量值(MPE%)為24小時之 $72.20 \pm 14.39\%$ 及72小時之 $80.62 \pm 12.33\%$ (圖19)。陽性對照加巴噴丁(100 mg/kg，1小時預處理)藉由顯著增加縮爪閾值在減弱機械異常疼痛中十分有效(24小時之 0.858 ± 0.077 g及72小時之 1.138 ± 0.096 g，在兩個時間點下相較於PBS媒劑 $p < 0.01$)。相比之下，IgG對照組在兩個時間點下均未對機械異常疼痛產生任何影響。

疼痛治療研究之結論

本文所述之疼痛研究之結果表明本發明之抗IL-1 α / β 組合療法有效治療任何疼痛形式且並非僅與骨關節炎相關之疼痛。該抗IL-1 α / β 組合療法可用於治療罹患任何類型疼痛病狀之個體的疼痛，其包括(但不限於)疼痛病狀異常疼痛、痛覺過敏及異常疼痛與痛覺過敏之組合。抗IL-1 α / β 組合療法可藉由向個體投與IL-1 α 結合蛋白與IL-1 β 結合蛋白之組合(例如混合物、同時投與或連續投與)，諸如抗IL-1 α 單株抗體與抗IL-1 β 單株抗體之組合；或藉由向個體投與結合IL- α 及IL-1 β 兩者之蛋白，諸如結合IL- α 及IL-1 β 兩者之雙特異性抗體或IL-1 α / β DVD-Ig結合蛋白而向該個體供應。

以引用的方式併入

本申請案通篇可引用之所有引用參考文獻(包括文獻參考案、專利、專利申請案及網站)之內容明確地以全文引

用的方式併入本文中，該等參考文獻中所引用之參考文獻亦如此併入本文中。除非另有指示，否則本發明之實踐採用此項技術中所熟知之醫藥技術、免疫學、分子生物學及細胞生物學之習知技術。

相等物

可在不悖離本發明之精神或基本特徵的情況下以其他特定形式實施本發明。因此，就各方面而言上述實施例應視作說明性的而非限制本文所述之本發明。因此本發明之範疇由隨附申請專利範圍而非前述描述指定，且因此本文意欲涵蓋申請專利範圍相等物之含義及範圍內的所有變化。

【圖式簡單說明】

圖1A為雙重可變域免疫球蛋白(DVD-Ig)構築體之示意圖且展示由兩個親本抗體生成DVD-Ig分子之策略。

圖1B展示DVD1-Ig、DVD2-Ig及兩個嵌合單特異性單株抗體2D13.E3(抗IL-1 α)及13F5.G5(抗IL-1 β)之遺傳構築體的示意圖。「VH β 」及「VL β 」分別表示結合IL- β 之13F5.G5抗體之抗原結合位點的重鏈可變域及輕鏈可變域。

「VH α 」及「VL α 」分別表示結合IL-1 α 之3D12.E3抗體的重鏈可變域及輕鏈可變域。「L」表示前導序列。在DVD2-Ig之遺傳構築體圖中，「VH β 」與「VH α 」之間及「VL β 」與「VL α 」之間的水平劃線表示存在連接子序列。

圖2展示小鼠關節軟骨在骨關節炎之關節不穩定模型(JIM)中之組織學評分條形圖。各條形圖集合提供四個處

理組中小鼠膝中之關節軟骨的評分：僅用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)媒劑處理(「PBS」)、用抗IL-1 α 單株抗體處理(「抗IL-1 α mAb」)、用抗IL-1 β 單株抗體處理(「抗IL-1 β mAb」)及用抗IL-1 α 單株抗體與抗IL-1 β 單株抗體之組合處理(「抗IL-1 α mAb +抗IL-1 β mAb」)。各集合內之個別條形圖展示組織學總得分及三個獨立區之得分，其中各區為脛骨內側軟骨區域的三分之一(區1：內部區，區2：中間區，及區3：外部區)。自左至右：脛骨內側區1、2及3總得分之條形圖；脛骨內側區1得分之條形圖；脛骨內側區2得分之條形圖；及脛骨內側區3得分之條形圖。參見實例3.3.1。

圖3展示小鼠關節軟骨在骨關節炎之關節不穩定模型(JIM)中之組織學評分條形圖。各條形圖集合提供四個處理組中小鼠膝中之關節軟骨的評分：僅用PBS媒劑處理(「媒劑」)、用抗IL-1 α 單株抗體與抗IL-1 β 單株抗體之組合處理(「抗IL-1 α mAb(6 mg/kg)+抗IL-1 β mAb(6 mg/kg)」)、用mIL-1 α/β DVD-Ig結合蛋白以6 mg/kg進行處理(「IL-1 α/β DVD-Ig(6 mg/kg)」)及用mIL-1 α/β DVD-Ig結合蛋白以12 mg/kg進行處理(「IL-1 α/β DVD-Ig(12 mg/kg)」)。各集合內之個別條形圖展示組織學總得分及三個獨立區之得分，其中各區為脛骨內側軟骨區域的三分之一(區1：內部區，區2：中間區，及區3：外部區)。自左至右：脛骨內側區1、2及3總得分之條形圖；脛骨內側區1得分之條形圖；脛骨內側區2得分之條形圖；及脛骨內側

區3得分之條形圖。參見實例3.3.2。

圖4展示小鼠關節軟骨在骨關節炎之關節不穩定模型(JIM)中之組織學評分條形圖。各條形圖集合提供四個處理組中關節軟骨在小鼠膝中之評分：僅用PBS媒劑處理(「媒劑」)、用抗IL-1 α 單株抗體(6 mg/kg)與抗IL-1 β 單株抗體(6 mg/kg)之組合處理(「抗IL-1 α mAb(6 mg/kg)+抗IL-1 β mAb(6 mg/kg)」)、用抗IL-1 β 單株抗體(12 mg/kg)處理(「抗IL-1 β mAb(12 mg/kg)」)、用抗IL-1 β 單株抗體(6 mg/kg)處理(「抗IL-1 β mAb(6 mg/kg)」)及用抗IL-1 β 單株抗體(3 mg/kg)處理(「抗IL-1 β mAb(3 mg/kg)」)。各集合內之個別條形圖展示組織學總得分及三個獨立區之得分，其中各區為脛骨內側軟骨區域的三分之一(區1：內部區，區2：中間區，及區3：外部區)。自左至右：脛骨內側區1、2及3總得分之條形圖；脛骨內側區1得分之條形圖；脛骨內側區2得分之條形圖；及脛骨內側區3得分之條形圖。參見實例3.3.3。

圖5展示在骨關節炎之關節不穩定模型中，當僅用PBS媒劑(「媒劑」)、用抗IL-1 α 單株抗體(6 mg/kg)與抗IL-1 β 單株抗體(6 mg/kg)之組合(「抗IL-1 α mAb(6 mg/kg)+抗IL-1 β mAb(6 mg/kg)」)、用6 mg/kg之mIL-1 α/β DVD-Ig結合蛋白(「IL-1 α/β DVD(6 mg/kg)」)及12 mg/kg之mIL-1 α/β DVD-Ig結合蛋白(「IL-1 α/β DVD(12 mg/kg)」)處理時，動物中酵母聚糖誘發之IL-6產生之含量(pg/ml)。參見實例3.3.4。

圖6展示在骨關節炎之內側半月板去穩定(DMM)模型中，用PBS媒劑(「媒劑」)、抗IL-1 α 單株抗體(6 mg/kg)與抗IL-1 β 單株抗體(6 mg/kg)之組合(「抗IL-1 α mAb(6 mg/kg)+抗IL-1 β mAb(6 mg/kg)」)及6 mg/kg之mIL-1 α/β DVD-Ig結合蛋白(「IL-1 α/β DVD(6 mg/kg)」)處理時，動物中軟骨退化之總得分總和。參見實例3.3.5。

圖7展示在骨關節炎之內側半月板去穩定(DMM)模型中，各種處理對於動物軟骨退化之8週研究結果。各條形圖表明僅用PBS媒劑(「媒劑」)、用抗IL-1 α 單株抗體(6 mg/kg)(「抗IL-1 α mAb 6 mg/kg」)、用抗IL-1 β 單株抗體(6 mg/kg)(「抗IL-1 β 6 mg/kg」)、用抗IL-1 α 單株抗體(6 mg/kg)與抗IL-1 β 單株抗體(6 mg/kg)之組合(「抗IL-1 α mAb(6mg/kg)+抗IL-1 β mAb(6 mg/kg)」)、用1.5 mg/kg之mIL-1 α/β DVD-Ig結合蛋白(「IL-1 α/β DVD 1.5 mg/kg」)、用3 mg/kg之mIL-1 α/β DVD-Ig結合蛋白(「IL-1 α/β DVD 3 mg/kg」)或用6 mg/kg之mIL-1 α/β DVD-Ig結合蛋白(「IL-1 α/β DVD 6 mg/kg」)處理時，動物之軟骨退化平均得分總和。參見實例3.3.6。

圖8展示在骨關節炎之內側半月板去穩定(DMM)模型中，僅用媒劑(「媒劑」)、用多西環素(30 mg/kg)(「多西環素(30 mg/kg)」)或用抗IL-1 α 單株抗體(6 mg/kg)與抗IL-1 β 單株抗體(6 mg/kg)之組合(「抗IL-1 α mAb(6 mg/kg)+抗IL-1 β mAb(6 mg/kg)」)處理動物的4週研究結果。參見實例3.3.7。

圖 9 展示經 DMM 手術之小鼠的爪在第 7、14、21、28 及 35 天之縮爪閾值(公克,「g」)條形圖。DMM 爪(「DMM」)之縮爪閾值與對側(未手術)爪(「對側」)及假手術(「假」)相比顯著減小。DMM 爪早在第 7 天即出現異常疼痛且直至第 35 天展現此疼痛行為。參見實例 4。

圖 10 展示 DMM 小鼠在僅用媒劑(「PBS 對照」)、用 IgG 同型對照(確定疾病及疼痛之陽性對照,「IgG 對照」)、或用抗 IL-1 α 單株抗體與抗 IL-1 β 單株抗體之組合(「抗 IL-1 α mAb(6 mg/kg)+抗 IL-1 β mAb(6 mg/kg)」)處理 5 週後(第 35 天)與對側(未手術)爪(「對側」)及假手術(「假」)爪相比之縮爪閾值(公克,「g」)條形圖。資料表明中和 IL-1 α 及 IL-1 β 兩者顯著預防異常疼痛之發展。所處理動物在一週後觀察到類似功效(未展示)。參見實例 4。

圖 11 展示先前用 IgG 同型對照(確定疾病及疼痛之陽性對照)處理 35 天且隨後用抗 IL-1 α 單株抗體或抗 IL-1 β 單株抗體之組合給藥並在第 36 天測試 24 小時後之縮爪閾值(「抗 IL-1 α mAb(6 mg/kg)+抗 IL-1 β (6 mg/kg)(給藥後 24 小時)」)的 DMM 小鼠之縮爪閾值(公克,「g」)條形圖。為了對比,在 5 週後(第 35 天)提供對側(未手術)爪(「對側」)、假手術爪(「假」)、僅用媒劑處理(「PBS 對照」)、用 IgG 同型處理(「IgG 對照」)及用抗 IL-1 α 單株抗體與抗 IL-1 β 單株抗體之組合處理之手術爪(「抗 IL-1 α mAb(6 mg/kg)+抗 IL-1 β mAb(6 mg/kg)」)的第 35 天之縮爪閾值。資料表明中和 IL-1 α 及 IL-1 β 兩者顯著逆轉具有確定疼痛之小鼠的異常疼

痛。參見實例4。

圖 12 展示每週兩次腹膜內 (ip) 投與僅 PBS 媒劑 (「媒劑」)、抗 IL-1 α 單株抗體 (6 mg/kg) (「抗 IL-1 α mAb (6 mg/kg)」)、抗 IL-1 β 單株抗體 (6 mg/kg) (「抗 IL-1 β mAb (6 mg/kg)」)、或抗 IL-1 α 單株抗體 (6 mg/kg) 與抗 IL-1 β 單株抗體 (6 mg/kg) 之組合 (「抗 IL-1 α mAb (6 mg/kg) + 抗 IL-1 β mAb (6 mg/kg)」) 處理持續 4 週的 DMM 小鼠之縮爪閾值 (公克, 「g」) 條形圖。在第 28 天測試動物之異常疼痛。「對側」條形圖提供代表性未手術 (對側) 肢之縮爪閾值。用媒劑處理之組中動物的同側 (手術) 肢與對側 (未手術) 肢相比或與已進行假手術之動物 (「假」) 相比呈現異常疼痛 (疼痛)。參見實例 5。

圖 13 展示僅用 PBS 媒劑 (「媒劑」) 處理或用抗 IL-1 α 單株抗體與抗 IL-1 β 單株抗體之組合處理時, 兩者皆每 4 日以 1 mg/kg (「抗 IL-1 α mAb (1 mg/kg) + 抗 IL-1 β mAb (1 mg/kg)」)、3 mg/kg (「抗 IL-1 α mAb (3 mg/kg) + 抗 IL-1 β mAb (3 mg/kg)」) 或 6 mg/kg (「抗 IL-1 α mAb (6 mg/kg) + 抗 IL-1 β mAb (6 mg/kg)」) 腹膜內 (ip) 投與 4 週的 DMM 小鼠之縮爪閾值 (公克, 「g」) 條形圖。在第 28 天測試動物。僅用 PBS 媒劑處理之組中動物的同側 (手術) 肢與對側 (未手術) 肢相比或與已進行假手術之動物 (「假」) 相比呈現異常疼痛 (疼痛)。結果展示用抗 IL-1 α 單株抗體與抗 IL-1 β 單株抗體之組合的處理以劑量相關方式預防 DMM 小鼠中之異常疼痛之發展。參見實例 6。

圖 14 展示當患有確定骨關節炎及機械性異常疼痛之 DMM 小鼠在第 27 天用抗 IL-1 α 單株抗體與抗 IL-1 β 單株抗體之組合處理時的縮爪閾值(公克, 「g」)條形圖, 兩者皆在第 28 天測試異常疼痛之前 24 小時以 1 mg/kg(「抗 IL-1 α mAb(1 mg/kg)+抗 IL-1 β mAb(1 mg/kg)」)、3 mg/kg(「抗 IL-1 α mAb(3 mg/kg)+抗 IL-1 β mAb(3 mg/kg)」)或 6 mg/kg(「抗 IL-1 α mAb(6 mg/kg)+抗 IL-1 β mAb(6 mg/kg)」)腹膜內(ip)投與。用媒劑處理之組(「媒劑」)中動物的同側(手術)肢與對側(未手術)肢相比或與已進行假手術之動物(「假」)相比呈現異常疼痛(疼痛)。結果展示用抗 IL-1 α 單株抗體與抗 IL-1 β 單株抗體之組合的處理以劑量相關方式逆轉患有確定疾病之 DMM 小鼠的確定異常疼痛。參見實例 7。

圖 15 展示在小鼠角叉菜膠誘發之發炎性疼痛(痛覺過敏)模型中, 動物之縮爪等待時間(秒, 「s」)條形圖。在角叉菜膠足底注射後 30 小時, 僅用抗 IL-1 α 單株抗體(900 μ g)(「抗 IL-1 α mAb」)、僅用抗 IL-1 β 單株抗體(900 μ g)(「抗 IL-1 β mAb」)、用抗 IL-1 α 單株抗體(900 μ g)與抗 IL-1 β 單株抗體(900 μ g)之組合(「抗 IL-1 α mAb + 抗 IL-1 β mAb」)、用 PBS 媒劑(「PBS」)或用 IgG 同型對照(「IgG」)處理小鼠。另一組在角叉菜膠足底投與後 47 及 95 小時投與一劑量(30 mg/kg)雙氯芬酸(非類固醇消炎鎮痛對照)。在足底投與角叉菜膠後 48 小時(圖 15A)及 96 小時(圖 15B)使用輻射熱刺激執行熱痛覺過敏測試。實心條形圖展

示對照爪(無角叉菜膠)之縮爪等待時間。空心條形圖展示投與角叉菜膠之爪的縮爪等待時間。參見實例8。

圖16展示在小鼠角叉菜膠誘發之發炎性疼痛(痛覺過敏)模型中,動物之縮爪等待時間(秒,「s」)條形圖。在角叉菜膠足底注射後30小時,用媒劑(「PBS」)、用IgG同型對照(「IgG」)或用抗IL-1 α 單株抗體與抗IL-1 β 單株抗體之組合的三種劑量中之一者處理小鼠,其中各單株抗體以100 μ g(「抗IL-1 α mAb(100 μ g)+抗IL-1 β mAb(100 μ g)」)、300 μ g(「抗IL-1 α mAb(300 μ g)+抗IL-1 β mAb(300 μ g)」)或900 μ g(「抗IL-1 α mAb(900 μ g)+抗IL-1 β mAb(900 μ g)」)投與。另一組在角叉菜膠足底投與後47及95小時投與一劑量(30 mg/kg)雙氯芬酸(非類固醇消炎鎮痛陽性對照)。在足底投與角叉菜膠後48小時(圖16A)及96小時(圖16B)使用輻射熱刺激執行熱痛覺過敏測試。實心條形圖展示對照爪(無角叉菜膠)之縮爪等待時間。空心條形圖展示投與角叉菜膠之爪的縮爪等待時間。參見實例9。

圖17展示在小鼠CFA(「完全弗氏佐劑」)發炎性疼痛模型中,抗IL-1 α 單株抗體與抗IL-1 β 單株抗體組合療法之測試結果。在CFA足底注射後30小時,用抗IL-1 α 單株抗體(900 μ g)與抗IL-1 β 單株抗體(900 μ g)之組合、用PBS媒劑(「PBS」)或用IgG同型對照(「IgG」)處理小鼠。另一組在CFA足底投與後47小時投與一劑量(30 mg/kg)雙氯芬酸(非類固醇消炎鎮痛陽性對照)。在CFA投與後48小時使用von Frey單絲執行動物機械性異常疼痛測試。圖17A展示

縮爪閾值(公克,「g」)條形圖。實心條形圖展示對側(無CFA)對照爪之縮爪閾值。空心條形圖展示在處理組動物中投與CFA之爪的縮爪閾值。圖17B展示處理組動物之功效量值(MPE%)條形圖。參見實例10。

圖18展示神經痛之L5/L6脊神經結紮(SNL)小鼠模型動物中的縮爪閾值(公克,「g」)條形圖。在SNL手術後第6天,用抗IL-1 α 單株抗體(900 μ g)與抗IL-1 β 單株抗體(900 μ g)之組合(「抗IL-1 α mAb+抗IL-1 β mAb」)、用PBS媒劑(「PBS」)或用IgG同型對照(「IgG」)處理動物。在SNL手術後24小時(圖18A)及72小時(圖18B)使用von Frey單絲執行動物機械性異常疼痛測試。在測試之前1小時用加巴噴丁(100 mg/kg,「加巴噴丁」)處理另一組作為陽性對照。參見實例11。

圖19展示如圖18所述之動物處理組在24及72小時之功效量值(MPE%)條形圖。「媒劑」表示用PBS媒劑處理之SNL動物。「IgG」表示用IgG同型對照處理之SNL動物。「IL-1 $\alpha\beta$ 」表示用抗IL-1 α 單株抗體(900 μ g)與抗IL-1 β 單株抗體之組合處理之動物。參見實例11。

序 列 表

<110> 美商亞培公司

<120> 骨關節炎及疼痛之治療

<130> A03763/162144

<140> 101104102

<141> 2012-02-08

<150> 61/440,853

<151> 2011-02-08

<160> 151

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 271

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Ala Lys Val Pro Asp Met Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr Ser
1 5 10 15

Glu Asn Glu Glu Asp Ser Ser Ser Ile Asp His Leu Ser Leu Asn Gln
20 25 30

Lys Ser Phe Tyr His Val Ser Tyr Gly Pro Leu His Glu Gly Cys Met
35 40 45

Asp Gln Ser Val Ser Leu Ser Ile Ser Glu Thr Ser Lys Thr Ser Lys
50 55 60

Leu Thr Phe Lys Glu Ser Met Val Val Val Ala Thr Asn Gly Lys Val
65 70 75 80

Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Ser Gln Ser Ile Thr Asp Asp Asp
85 90 95

Leu Glu Ala Ile Ala Asn Asp Ser Glu Glu Glu Ile Ile Lys Pro Arg
100 105 110

Ser Ala Pro Phe Ser Phe Leu Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe Met Arg
115 120 125

Ile Ile Lys Tyr Glu Phe Ile Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Ile
130 135 140

Ile Arg Ala Asn Asp Gln Tyr Leu Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu
145 150 155 160

Asp Glu Ala Val Lys Phe Asp Met Gly Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp
165 170 175

Asp Ala Lys Ile Thr Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr
180 185 190

Val Thr Ala Gln Asp Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro

195 200 205

Glu Ile Pro Lys Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe
210 215 220

Trp Glu Thr His Gly Thr Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Val Ala His Pro
225 230 235 240

Asn Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Asp Tyr Trp Val Cys Leu Ala Gly
245 250 255

Gly Pro Pro Ser Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ala
260 265 270

<210> 2
<211> 153
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Ala Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln Gln Lys
1 5 10 15

Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Gln
20 25 30

Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe Val Gln
35 40 45

Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu Lys Glu
50 55 60

Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met Glu
85 90 95

Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu Glu Phe
100 105 110

Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ala Glu
115 120 125

Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp Ile Thr
130 135 140

Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser
145 150

<210> 3
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Phe Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 4
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 5
<211> 106
<212> PRT
<213> 智人
<400> 5

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 6
<211> 105
<212> PRT
<213> 智人
<400> 6

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa可為任意胺基酸

<400> 7

Phe Gly Xaa Gly
1

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Leu Glu Trp Ile Gly
1 5

<210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Trp Gly Trp Gly
1

<210> 10
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser
20 25 30

<210> 11
<211> 14
<212> PRT

<213> 智人

<400> 11

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 12

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 14

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
20 25 30

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 16

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人

<400> 16

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 17

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 18
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 18

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

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

<210> 19
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 19

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 1 5 10

<210> 20
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 20

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 21

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 22
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 22

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20 25 30

<210> 23
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 23

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

<210> 24
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 26
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26

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

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

<210> 27
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 27

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 28
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 28

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 29

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 30
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 30

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

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

<210> 31
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 31

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 32
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 32

Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 33

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 34
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 34

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

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

<210> 35
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 35

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 36
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 36

Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 38
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 38

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 39
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 40
<211> 32
<212> PRT

<213> 智人

<400> 40

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 41

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 42

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人

<400> 42

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 43

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 44

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人

<400> 44

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 45

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 46
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 46

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 47
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 47

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 48
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 48

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 49

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 50
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 50

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 51
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 51

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 52
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 52

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 53

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 54
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 55
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 55

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 56
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 56

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 57

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 58

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 59

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 59

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

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 60

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

Val

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 61

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly
1 5

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 62

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly
1 5 10

<210> 63
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽連接子序列

<400> 63

Ser Ala Lys Thr Thr Pro
 1 5

<210> 64
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽連接子序列

<400> 64

Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 1 5

<210> 65
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽連接子序列

<400> 65

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
 1 5

<210> 66
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽連接子序列

<400> 66

Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ser
 1 5 10

<210> 67
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽連接子序列

<400> 67

Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25

<210> 68
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子序列

<400> 68

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala
1 5 10 15

Arg Val

<210> 69
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子序列

<400> 69

Ala Asp Ala Ala Pro
1 5

<210> 70
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子序列

<400> 70

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
1 5 10

<210> 71
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子序列

<400> 71

Thr Val Ala Ala Pro
1 5

<210> 72
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子序列

<400> 72

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
1 5 10

<210> 73
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽連接子序列

<400> 73

Gln Pro Lys Ala Ala Pro
 1 5

<210> 74
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽連接子序列

<400> 74

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
 1 5 10

<210> 75
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽連接子序列

<400> 75

Ala Lys Thr Thr Pro Pro
 1 5

<210> 76
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽連接子序列

<400> 76

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Pro Leu Ala Pro
 1 5 10

<210> 77
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽連接子序列

<400> 77

Ala Lys Thr Thr Ala Pro
 1 5

<210> 78
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子序列
<400> 78
Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
1 5 10

<210> 79
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子序列
<400> 79
Ala Ser Thr Lys Gly Pro
1 5

<210> 80
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子序列
<400> 80
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
1 5 10

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子序列
<400> 81
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 82
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子序列
<400> 82
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 83
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子序列
<400> 83

Gly Glu Asn Lys Val Glu Tyr Ala Pro Ala Leu Met Ala Leu Ser
1 5 10 15

<210> 84
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子序列

<400> 84

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

<210> 85
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子序列

<400> 85

Gly His Glu Ala Ala Ala Val Met Gln Val Gln Tyr Pro Ala Ser
1 5 10 15

<210> 86
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子序列

<400> 86

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Thr Val Ala Ala
1 5 10 15

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
20

<210> 87
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子序列

<400> 87

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Thr
1 5 10 15

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
20 25

<210> 88
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子序列

<400> 88

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 89

<211> 122

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 89

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

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

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Asp Leu Lys Arg Met
35 40 45

Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 90

<211> 108

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 90

Asn Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

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

Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
100 105

<210> 91
<211> 118
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 91

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Asp Gly Asn Phe His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 92
<211> 108
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 92

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 93
<211> 114
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 93

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Leu Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Thr Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 94
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 94

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg
100 105

<210> 95
<211> 121
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 95

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ser Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
85 90 95

Val Arg Phe Pro Thr Gly Asn Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 96
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 96

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

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

Gly Asn Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

110

<210> 97
<211> 122
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 97

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

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

Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 98
<211> 108
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 98

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

Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp
20 25 30

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

Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 99
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 99

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 100
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 100

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Val Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210>	101	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	3D12.E3之輕鏈可變域的PCR引子	
<400>	101	
	atgggtgtcca cagctcagtt cc	22
<210>	102	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	3D12.E3之輕鏈可變域的PCR引子	
<400>	102	
	gcagccaccg tacgccggtt tatttccag	29
<210>	103	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人類Cκ基因之PCR引子	
<400>	103	
	cgtacgggtgg ctgcaccatc tgc	24
<210>	104	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人類Cκ基因之PCR引子	
<400>	104	
	tcaacactct cccctgttga agc	23
<210>	105	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	3D12.E3之重鏈可變域的PCR引子	
<400>	105	
	atggcttggg tgtggacctt gc	22
<210>	106	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	3D12.E3之重鏈可變域的PCR引子	
<400>	106	
	gggcccttgg tcgacgctga ggagacggtg actgagg	37
<210>	107	
<211>	28	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人類C γ 基因之PCR引子	
<400> 107	
gcgtcgacca agggcccatc ggtcttcc	28
<210> 108	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人類C γ 基因之PCR引子	
<400> 108	
tcatittaccc ggagacaggg agaggc	26
<210> 109	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 13F5.G5之重鏈可變域的PCR引子	
<400> 109	
atagaatgga gctgggtttt cctc	24
<210> 110	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 13F5.G5之重鏈可變域的PCR引子	
<400> 110	
gggcccttgg tcgacgctga ggagacggtg actga	35
<210> 111	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 13F5.G5之輕鏈可變域的PCR引子	
<400> 111	
atggtcctca tgtccttgct gtic	24
<210> 112	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 13F5.G5之輕鏈可變域的PCR引子	
<400> 112	
gcagccaccg tacgccgttt tatttccagc ttig	34
<210> 113	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	3D12.E3之重鏈可變域的PCR引子	
<400>	113	
	cagatccagc tggcgcagc tgg	23
<210>	114	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	13F5.G5之重鏈可變域的PCR引子	
<400>	114	
	caccaactgg atctgtgagg agacgggtgac tgagg	35
<210>	115	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	3D12.E3之輕鏈可變域的PCR引子	
<400>	115	
	aataaccaga tgacacagac tacaacc	27
<210>	116	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	13F5.G5之輕鏈可變域的PCR引子	
<400>	116	
	gtgtcatcgc gatattccgt tttatttcca gctttg	36
<210>	117	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	13F5.G5之重鏈可變域的PCR引子	
<400>	117	
	tgggggtgic gttttggctg agg	23
<210>	118	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	3D12.E3之重鏈可變域的PCR引子	
<400>	118	
	gccaaaacga caccaccaca gatccagtgc gtcag	36
<210>	119	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	13F5.G5之輕鏈可變域的PCR引子	

<400> 119
tgggtgcagca tcagcccggtt ttatttc

27

<210> 120
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 3D12.E3之輕鏈可變域的PCR引子

<400> 120
gctgatgctg caccaaatat ccagatgaca cag

33

<210> 121
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-1 α / β DVD-Ig串聯重鏈可變域

<400> 121

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ser Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
85 90 95

Val Arg Phe Pro Thr Gly Asn Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser
115 120 125

Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys
130 135 140

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Arg Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln
145 150 155 160

Ala Pro Gly Lys Asp Leu Lys Arg Met Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr
165 170 175

Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser
180 185 190

Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys

	195		200		205
Asn	Glu Asp Thr Ala Thr Tyr	Phe Cys Ala Arg	Gly Ile Tyr Tyr Tyr		
210		215	220		
Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr					
225		230	235		240
Val Ser Ser					
<210> 122					
<211> 330					
<212> PRT					
<213> 智人					
<400> 122					
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys					
1	5		10		15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr					
	20		25		30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser					
	35		40		45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser					
	50		55		60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr					
	65		70		75
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys					
	85		90		95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys					
	100		105		110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro					
	115		120		125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys					
	130		135		140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp					
	145		150		155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu					
	165		170		175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu					
	180		185		190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn					
	195		200		205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly					

210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu 225 230 235 240		
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 245 250 255		
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn 260 265 270		
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe 275 280 285		
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn 290 295 300		
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr 305 310 315 320		
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 325 330		
<210> 123		
<211> 221		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> IL-1α/β DVD-Ig串聯輕鏈可變域		
<400> 123		
Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly 1 5 10 15		
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr 20 25 30		
Gly Asn Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro 35 40 45		
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala 50 55 60		
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp 65 70 75 80		
Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn 85 90 95		
Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg 100 105 110		
Asn Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly 115 120 125		
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Cys 130 135 140		

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
145 150 155 160

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
165 170 175

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
180 185 190

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Tyr
195 200 205

Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Arg
210 215 220

<210> 124

<211> 106

<212> PRT

<213> 智人

<400> 124

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 125

<211> 249

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IL-1 α / β DVD-Ig串聯重鏈可變域

<400> 125

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ser Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
85 90 95

Val Arg Phe Pro Thr Gly Asn Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Gln
115 120 125

Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr
130 135 140

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

Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Asp Leu Lys Arg Met Ala
165 170 175

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
180 185 190

Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu
195 200 205

Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
210 215 220

Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
225 230 235 240

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 126
<211> 225
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-1 α / β DVD-Ig串聯輕鏈可變域

<400> 126

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

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

Gly Asn Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Ala Asp Ala Ala Pro Asn Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
115 120 125

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
130 135 140

Asp Ile Ser Asn Cys Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
145 150 155 160

Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
165 170 175

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
180 185 190

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
195 200 205

Lys Thr Leu Pro Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn
210 215 220

Arg
225

<210> 127
<211> 246
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-1α/β DVD-Ig串聯重鏈可變域

<400> 127

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Asp Gly Asn Phe His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Gln Val His Leu
115 120 125

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

Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Gly Val Ser Trp
145 150 155 160

Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Leu Ile Trp
165 170 175

Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys Ser Arg Leu Ser
180 185 190

Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser
195 200 205

Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gln Arg Thr
210 215 220

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

Ser Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 128
<211> 222
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-1 α / β DVD-Ig串聯輕鏈可變域

<400> 128

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Pro Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Met Ala Ile
115 120 125

Gly Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val
130 135 140

Asp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu
145 150 155 160

Ile Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
165 170 175

Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu
180 185 190

Ser Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro
195 200 205

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Arg
210 215 220

<210> 129
<211> 246
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-1 α / β DVD-Ig串聯重鏈可變域

<400> 129

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

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

Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 130 135 140
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr
 145 150 155 160
 Tyr Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 165 170 175
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ala Lys Tyr Asp Pro Arg Phe
 180 185 190
 Leu Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 195 200 205
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 Ala Arg Gly Asp Gly Asn Phe His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 245
 <210> 130
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IL-1α/β DVD-Ig 串聯輕鏈可變域
 <400> 130
 Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Met Ala Ile Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp
 20 25 30
 Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala

100	105	110
Pro Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val		
115	120	125
Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr		
130	135	140
Asn Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Ala Leu		
145	150	155
Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr		
165	170	175
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln		
180	185	190
Ser Val Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Thr Arg Tyr Pro		
195	200	205
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
210	215	220

<210> 131
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> IL-1α/β DVD-Ig串聯重鏈可變域

<400> 131

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr		
20	25	30
Tyr Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
35	40	45
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ala Lys Tyr Asp Pro Arg Phe		
50	55	60
Leu Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr		
65	70	75
Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Gly Asp Gly Asn Phe His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Gln Val His Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala		
130	135	140

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
145 150 155 160

Thr Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
165 170 175

Glu Trp Leu Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser
180 185 190

Pro Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
195 200 205

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr
210 215 220

Tyr Cys Ala Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met
225 230 235 240

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 132
<211> 228
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-1α/β DVD-Ig串聯輕鏈可變域

<400> 132

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro
115 120 125

Ala Ser Leu Ser Met Ala Ile Gly Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile
130 135 140

Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
145 150 155 160

Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro
165 170 175

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val
180 185 190

Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu Ser Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys
195 200 205

Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
210 215 220

Glu Leu Lys Arg
225

<210> 133
<211> 253
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-1α/β DVD-Ig串聯重鏈可變域
<400> 133

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

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

Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

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

Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser
145 150 155 160

Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro
165 170 175

Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn
180 185 190

Ala Lys Tyr Asp Pro Arg Phe Leu Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp
195 200 205

Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
210 215 220

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Gly Asn Phe His Phe
225 230 235 240

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 134
<211> 228
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-1 α / β DVD-Ig串聯輕鏈可變域

<400> 134

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

Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp
20 25 30

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

Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln
115 120 125

Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys
130 135 140

Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
145 150 155 160

Gly Gln Ser Pro Arg Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser

	165		170		175
Gly Val Pro	Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr				
	180		185		190
Leu Thr Ile	Ser Asn Val Gln Ser Val Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys				
	195		200		205
Gln Gln Tyr Thr Arg Tyr	Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu				
	210		215		220
Glu Ile Lys Arg					
	225				
<210>	135				
<211>	238				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	IL-1α/β DVD-Ig串聯重鏈可變域				
<400>	135				
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala					
1	5		10		15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr					
	20		25		30
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile					
	35		40		45
Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Leu Tyr Ser Gln Lys Phe					
	50		55		60
Lys Asp Thr Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr					
65	70		75		80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys					
	85		90		95
Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val					
	100		105		110
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly					
	115		120		125
Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala					
	130		135		140
Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ser					
145	150		155		160
His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly					
	165		170		175
Phe Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val					
	180		185		190

Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Ile Gln Phe Ser Arg Leu Thr Ser
195 200 205

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

Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
225 230 235

<210> 136
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-1 α / β DVD-Ig串聯輕鏈可變域

<400> 136

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
115 120 125

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
130 135 140

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
145 150 155 160

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Val Ser Arg Met Glu Ala Glu
180 185 190

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Tyr Thr
195 200 205

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
210 215

<210> 137
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-1 α / β DVD-Ig 串聯重鏈可變域

<400> 137

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Gln Val Gln Leu
115 120 125

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

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met Asn Trp
145 150 155 160

Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp
165 170 175

Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Leu Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Asp Thr Ala
180 185 190

Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
195 200 205

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

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
225 230 235

<210> 138
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-1 α / β DVD-Ig串聯輕鏈可變域

<400> 138

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Val Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

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

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
115 120 125

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
130 135 140

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
145 150 155 160

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
180 185 190

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Tyr Thr
195 200 205

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg
210 215

<210> 139
<211> 245
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-1 α / β DVD-Ig串聯重鏈可變域

<400> 139

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Leu Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Thr Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Glu
115 120 125

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

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

Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
165 170 175

Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe Lys
180 185 190

Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Ile
195 200 205

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

Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
225 230 235 240

Leu Thr Val Ser Ser
245

<210> 140

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IL-1α/β DVD-Ig串聯輕鏈可變域

<400> 140

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
115 120 125

Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala
130 135 140

Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
165 170 175

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr
180 185 190

Val Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
195 200 205

Arg Ser Thr Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
210 215 220

Lys Arg Arg
225

<210> 141
<211> 245
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-1 α / β DVD-Ig串聯重鏈可變域

<400> 141

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

20	25	30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile		
35	40	45
Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe		
50	55	60
Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
65	70	80
Ile Gln Phe Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg		
130	135	140
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe		
145	150	155
Thr Thr Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu		
165	170	175
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Leu Tyr Ser		
180	185	190
Gln Lys Phe Lys Asp Thr Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser		
195	200	205
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val		
210	215	220
Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr		
225	230	235
Leu Thr Val Ser Ser		
245		

<210> 142

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IL-1α/β DVD-Ig串聯輕鏈可變域

<400> 142

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Val Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
115 120 125

Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala
130 135 140

Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser
145 150 155 160

Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
165 170 175

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr
180 185 190

Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
195 200 205

Trp Asn Ser Asn Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met
210 215 220

Lys Arg Arg
225

<210> 143
<211> 249
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mIL-1α/β DVD-Ig串聯重鏈可變域

<400> 143

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

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

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Asn Glu Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser
115 120 125

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

Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly
145 150 155 160

Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Gly Thr Ala Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro
165 170 175

Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala Gln Ile Gly Ser Asp Asp Arg
180 185 190

Lys Leu Tyr Asn Pro Phe Leu Lys Ser Arg Ile Thr Leu Ser Glu Asp
195 200 205

Thr Ser Asn Ser Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Glu
210 215 220

Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Asn Gly Val Met Glu Tyr Trp Gly
225 230 235 240

Leu Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 144
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 10G11之重鏈可變域

<400> 144

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

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

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Asn Glu Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 145
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 9H10之重鏈可變域

<400> 145

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
20 25 30

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

Trp Leu Ala Gln Ile Gly Ser Asp Asp Arg Lys Leu Tyr Asn Pro Phe
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Ile Thr Leu Ser Glu Asp Thr Ser Asn Ser Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Asn Gly Val Met Glu Tyr Trp Gly Leu Gly Thr Ser Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 146
<211> 330
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 146

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60
 Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80
 Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95
 Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
 145 150 155 160
 Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
 165 170 175
 Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
 195 200 205
 Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
 210 215 220
 Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
 245 250 255
 Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
 275 280 285
 Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
 290 295 300
 Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
 305 310 315 320
 Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

325

330

<210> 147
<211> 228
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> mIL-1 α / β DVD-Ig 串聯輕鏈可變域

<400> 147

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Gly Ser Gly Ile Leu His Asn Tyr
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Ser Ala Lys Ile Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro
115 120 125

Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys
130 135 140

Ala Ser Gln Ser Val Asn His Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Met Pro
145 150 155 160

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
165 170 175

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr
180 185 190

Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys
195 200 205

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
210 215 220

Glu Ile Lys Arg
225

<210> 148
<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 10G11之輕鏈可變域

<400> 148

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Gly Ser Gly Ile Leu His Asn Tyr
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Ser Ala Lys Ile Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 149

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 9H10之輕鏈可變域

<400> 149

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 150

<211> 106
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 150

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 1 5 10 15

Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 35 40 45

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 65 70 75 80

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 85 90 95

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 100 105

<210> 151
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(9)
 <223> Xaa可為任意胺基酸

<400> 151

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101104/02

A61K39/395 (2006.01)

※申請日：101.2.8

※IPC 分類：A61P19/02 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

骨關節炎及疼痛之治療

TREATMENT OF OSTEOARTHRITIS AND PAIN

二、中文發明摘要：

本發明係關於使用 IL-1 α 及 IL-1 β 結合蛋白(包括抗 IL-1 α 及抗 IL-1 β 抗體以及工程化多價及多特異性 IL-1 α 及 IL-1 β 結合蛋白)治療骨關節炎及疼痛。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to the treatment of osteoarthritis and pain using IL-1 α and IL-1 β binding proteins, including anti-IL-1 α and anti-IL-1 β antibodies and engineered multivalent and multispecific IL-1 α and IL-1 β binding proteins.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (3) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

七、申請專利範圍：

1. 一種結合 IL-1 α 及 IL-1 β 兩者之結合蛋白之用途，其係用於製備治療與骨關節炎相關疼痛的藥物，其中該結合蛋白為結合 IL-1 α 及 IL-1 β 兩者並治療與骨關節炎相關疼痛的雙重可變域免疫球蛋白(DVD-Ig)結合蛋白。
2. 如請求項 1 之用途，其中該個體罹患選自由異常疼痛、痛覺過敏，及異常疼痛與痛覺過敏之組合組成之群的疼痛病狀。
3. 如請求項 1 之用途，其中該結合 IL-1 α 及 IL-1 β 兩者之結合蛋白係調配於包含醫藥學上可接受之載劑之醫藥組合物中。
4. 如請求項 1 之用途，其中該結合 IL-1 α 及 IL-1 β 兩者之結合蛋白為結晶結合蛋白。
5. 如請求項 4 之用途，其中該結合 IL-1 α 及 IL-1 β 兩者之結晶結合蛋白係調配於進一步包含下列之組合物中：
視情況之成分；及
聚合載劑。
6. 如請求項 5 之用途，其中該聚合載劑為選自由以下組成之群之一或多者的聚合物：聚(丙烯酸)、聚(氰基丙烯酸酯)、聚(胺基酸)、聚(酸酐)、聚(縮肽)、聚(酯)、聚(乳酸)、聚(乳酸-共-乙醇酸)或 PLGA、聚(b-羥基丁酸酯)、聚(己內酯)、聚(二氧環己酮)；聚(乙二醇)、聚(羥丙基)甲基丙烯鹽胺、聚[(有機)磷腈]、聚(原酸酯)、聚(乙烯醇)、聚(乙烯基吡咯啉酮)、順丁烯二酸酐-烷基乙烯基

醚共聚物、普洛尼克多元醇、白蛋白、海藻酸鹽、纖維素及纖維素衍生物、膠原蛋白、血纖維蛋白、明膠、玻尿酸、寡醣、糖胺基聚糖、硫酸化多醣以及其摻合物及共聚物。

7. 如請求項5之用途，其中該成分(當存在時)係選自由白蛋白、蔗糖、海藻糖、乳糖醇、明膠、羥丙基- β -環糊精、甲氧基聚乙二醇及聚乙二醇組成之群。
8. 如請求項1之用途，其進一步提供所需性質之第二藥劑。
9. 如請求項8之用途，其中該第二藥劑為由以下組成之群中之一或多種化合物：布地奈德、表皮生長因子、皮質類固醇、環孢素、柳氮磺胺吡啶、胺基水楊酸鹽、6-巰基嘌呤、硫唑嘌呤、甲硝達唑、脂肪加氧酶抑制劑、美沙拉嗪、奧色拉嗪、巴柳氮、抗氧化劑、血栓素抑制劑、IL-1受體拮抗劑、抗IL-1 β 單株抗體、抗IL-6單株抗體、生長因子、彈性酶抑制劑、吡啶基-咪唑化合物；TNF、LT、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-18、IL-23、EMAP-II、GM-CSF、FGF及PDGF之抗體；CD2、CD3、CD4、CD8、CD-19、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90或其配位體之抗體；甲胺喋呤、環孢素、FK506、雷帕黴素、黴酚酸嗎啉乙酯、來氟米特、NSAIDs、布洛芬、皮質類固醇、潑尼龍、磷酸二酯酶抑制劑、腺苷促效劑、抗血栓劑、補體抑制劑、腎上腺素激導劑、IRAK、

NIK、IKK、p38、MAP激酶抑制劑、IL-1 β 轉化酶抑制劑、TNF α 轉化酶抑制劑、T細胞信號傳導抑制劑、金屬蛋白酶抑制劑、柳氮磺胺吡啶、硫唑嘌呤、6-巰基嘌呤、血管緊張素轉化酶抑制劑、可溶性細胞激素受體、可溶性p55 TNF受體、可溶性p75 TNF受體、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R、抗發炎細胞激素、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13及TGF β 。

10. 如請求項1至9中任一項之用途，其中該結合蛋白經調配以選自以下所組成之群之方式投與：非經腸、皮下、肌內、靜脈內、關節內、支氣管內、腹內、囊內、軟骨內、腔內、體腔內、小腦內、腦室內、結腸內、子宮頸內、胃內、肝內、心肌內、骨內、骨盆內、心包內、腹膜內、胸膜內、前列腺內、肺內、直腸內、腎內、視網膜內、脊椎內、滑膜內、胸內、子宮內、膀胱內、團式、陰道、直腸、頰內、舌下、鼻內及經皮。
11. 一種結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之結合蛋白之用途，其係用於製備治療個體之骨關節炎的藥物，其中該結合蛋白為結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者並治療骨關節炎的雙重可變域免疫球蛋白(DVD-Ig)結合蛋白。
12. 如請求項11之用途，其中該結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之結合蛋白係調配於包含醫藥學上可接受之載劑之醫藥組合物中。
13. 如請求項11之用途，其中該結合IL-1 α 及IL-1 β 兩者之結合蛋白為結晶結合蛋白。

14. 如請求項13之用途，其中該結晶結合蛋白係調配於進一步包含視情況成分及聚合載劑之組合物中。
15. 如請求項14之用途，其中該聚合載劑為選自由以下組成之群之一或多者的聚合物：聚(丙烯酸)、聚(氰基丙烯酸酯)、聚(胺基酸)、聚(酸酐)、聚(縮肽)、聚(酯)、聚(乳酸)、聚(乳酸-共-乙醇酸)或PLGA、聚(b-羥基丁酸酯)、聚(己內酯)、聚(二氧環己酮)；聚(乙二醇)、聚(羥丙基)甲基丙烯醯胺、聚[(有機)磷腈(phosphazene)]、聚(原酸酯)、聚(乙烯醇)、聚(乙烯基吡咯啉酮)、順丁烯二酸酐-烷基乙烯基醚共聚物、普洛尼克多元醇(pluronic polyols)、白蛋白、海藻酸鹽、纖維素及纖維素衍生物、膠原蛋白、血纖維蛋白、明膠、玻尿酸、寡糖、糖胺基聚糖(glycaminoglycans)、硫酸化多糖、其摻合物及共聚物。
16. 如請求項14之用途，其中該視情況成分係選自由以下組成之群：白蛋白、蔗糖、海藻糖、乳糖醇、明膠、羥丙基-β-環糊精、甲氧基聚乙二醇及聚乙二醇。
17. 如請求項11之用途，其進一步包含提供所需性質的第二藥劑。
18. 如請求項17之用途，其中該第二藥劑為由以下組成之群中之一或多種化合物：布地奈德(budesonide)、表皮生長因子、皮質類固醇、環孢素、柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine)、胺基水楊酸鹽、6-巰基嘌呤、硫唑嘌呤(azathioprine)、甲硝達唑(metronidazole)、脂肪加氧酶

抑制劑、美沙拉嗪(mesalamine)、奧色拉嗪(olsalazine)、巴柳氮(balsalazide)、抗氧化劑、血栓素(thromboxane)抑制劑、IL-1受體拮抗劑、抗IL-1 β 單株抗體、抗IL-6單株抗體、生長因子、彈性酶抑制劑、吡啶基-咪唑化合物；TNF、LT、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-18、IL-23、EMAP-II、GM-CSF、FGF及PDGF之抗體；CD2、CD3、CD4、CD8、CD-19、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90或其配位體之抗體；甲胺喋呤(methotrexate)、環孢素、FK506、雷帕黴素(rapamycin)、黴酚酸嗎啉乙酯(mycophenolate mofetil)、來氟米特(leflunomide)、NSAIDs、布洛芬(ibuprofen)、皮質類固醇、潑尼龍(prednisolone)、磷酸二酯酶抑制劑、腺苷促效劑、抗血栓劑、補體抑制劑、腎上腺素激導劑、IRAK、NIK、IKK、p38、MAP激酶抑制劑、IL-1 β 轉化酶抑制劑、TNF α 轉化酶抑制劑、T細胞信號傳導抑制劑、金屬蛋白酶抑制劑、柳氮磺胺吡啶、硫唑嘌呤、6-巰基嘌呤、血管緊張素轉化酶抑制劑、可溶性細胞激素受體、可溶性p55 TNF受體、可溶性p75 TNF受體、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R、抗發炎細胞激素、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13及TGF β 。

19. 如請求項11至18中任一項之用途，其中該結合蛋白經調配以選自以下之方式投與：非經腸、皮下、肌內、靜脈內、關節內、支氣管內、腹內、囊內、軟骨內、腔內、

體腔內、小腦內、腦室內、結腸內、子宮頸內、胃內、肝內、心肌內、骨內、骨盆內、心包內、腹膜內、胸膜內、前列腺內、肺內、直腸內、腎內、視網膜內、脊椎內、滑膜內、胸內、子宮內、膀胱內、團式(bolus)、陰道、直腸、頰內、舌下、鼻內及經皮。

20. 如請求項1至9及11至18中任一項之用途，其中該骨關節炎包含骨關節炎損傷。
21. 如請求項1至9及11至18中任一項之用途，其中該骨關節炎包含前十字韌帶損傷。
22. 如請求項1至9及11至18中任一項之用途，其中該骨關節炎包含軟骨退化及IL-6表現。
23. 如請求項22之用途，其中該軟骨退化包含股骨軟骨退化及脛骨軟骨退化。