(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119183384 A
(43)申请公布日 2024.12.24

(21)申请号 202380035878.6
(22)申请日 2023.02.23
(30)优先权数据
63/313,483 2022.02.24 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.10.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2023/077870 2023.02.23
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/160610 EN 2023.08.31
(71)申请人 中国抗体制药有限公司
地址 中国香港
(72)发明人 宋南 林坂桁 许展维 李伟民 梁瑞安
(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
专利代理师 董志勇
(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/24(2006.01)
A61K 38/01(2006.01)
A61P 37/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书50页
序列表（电子公布） 附图14页

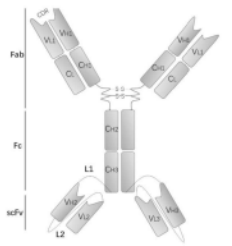
(54)发明名称

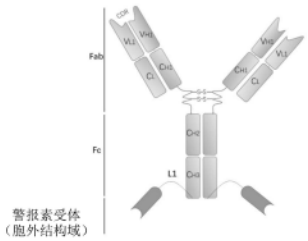
针对警报素的双特异性结合蛋白及其用途

(57)摘要

本文提供了治疗过敏性疾病(如中度至重度哮喘和特应性皮炎)的方法、减少每日口服皮质类固醇用量的方法、抑制先天性淋巴细胞增殖的方法、利用能够中和2种不同警报素的某些双特异性结合蛋白(bsBp)来调和1型和2型免疫反应的方法。本文还描述了示例性bsBp、其特征以及筛选额外治疗性bsBp的方法。

双特异性结合蛋白（双特异性抗体和抗体-受体融合蛋白）的设计





CN 119183384 A

1.一种治疗有需要的受试者中与过敏相关的疾病或紊乱的方法,所述方法包括向所述受试者的细胞或组织递送治疗有效量的针对2种不同警报素X和Y的双特异性结合蛋白的步骤,其中所述双特异性结合蛋白由(a)抗警报素X受体IgG和(b)抗警报素Y scFv和(c)多肽接头组成。

2.一种治疗有需要的受试者中与过敏相关的疾病或紊乱的方法,所述方法包括向所述受试者的细胞或组织递送治疗有效量的针对2种不同警报素X和Y的双特异性结合蛋白的步骤,其中所述双特异性结合蛋白由(a)抗警报素X受体IgG和(b)警报素Y受体和(c)多肽接头组成。

3.根据权利要求1或2所述的方法,其中所述警报素X受体是IL-17RB。

4.根据权利要求1所述的方法,其中所述警报素Y是TSLP。

5.根据权利要求1所述的方法,其中所述警报素Y是IL-33。

6.根据权利要求2所述的方法,其中所述警报素Y受体是ST2。

7.根据权利要求2所述的方法,其中所述警报素Y受体是TSLPR。

8.根据权利要求1或2所述的方法,其中所述抗警报素X受体IgG是选自IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体和IgG4抗体的抗体。

9.根据权利要求1或2所述的方法,其中所述受试者患有临床或临床前哮喘、特应性皮炎、纤维化疾病、炎性肠病(IBD)、克罗恩病、溃疡性结肠炎、慢性阻塞性肺病、慢性鼻窦炎、伴有鼻息肉的慢性鼻窦炎。

10.一种治疗有需要的受试者中与过敏相关的疾病或紊乱的方法,所述方法包括向所述受试者的细胞或组织递送治疗有效量的双特异性结合蛋白的步骤,所述双特异性结合蛋白阻断(a)IL-25和IL-33信号传导和/或(b)IL-25与TSLP信号传导。

11.根据权利要求10所述的方法,其中所述受试者患有临床或临床前哮喘、特应性皮炎、纤维化疾病、炎性肠病(IBD)、克罗恩病、溃疡性结肠炎、慢性阻塞性肺病、慢性鼻窦炎、伴有鼻息肉的慢性鼻窦炎。

12.根据权利要求10所述的方法,其中双特异性结合蛋白是抗IL-17RB/抗人TSLP双特异性抗体。

13.根据权利要求10所述的方法,其中双特异性结合蛋白是抗IL-17RB/抗人IL-33双特异性抗体。

14.根据权利要求10所述的方法,其中双特异性结合蛋白是抗IL-17RB/人ST2抗体受体融合蛋白。

15.根据权利要求10所述的方法,其中双特异性结合蛋白是抗IL-17RB/人TSLPR抗体受体融合蛋白。

16.根据权利要求10至15中任一项所述的方法,其中所述双特异性结合蛋白包含轻链可变区(VL)和重链可变区(VH),所述轻链可变区(VL)包含分别具有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;所述重链可变区(VH)包含分别具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3。

17.根据权利要求16所述的方法,其中所述抗IL-17RB抗体的VL和VH分别具有SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

18.根据权利要求10至15所述的方法,其中所述双特异性结合蛋白包含SEQ ID NO:33的轻链序列和选自SEQ ID NO:60-75的重链序列。

19.根据权利要求1至17中任一项的方法,其中所述双特异性结合蛋白通过静脉内、肌肉内、皮下、颅内、鞘内、脑室内、腹膜内、鼻内、肠胃外、局部或皮内递送至所述细胞或组织。

20.根据权利要求1至19中任一项的方法,其中所述双特异性结合蛋白与第二治疗剂联合递送。

21.根据权利要求20所述的方法,其中所述第二治疗剂选自皮质类固醇、DNA甲基转移酶(DNMT)抑制剂、抗IL17A抗体、抗IL12/IL23抗体、抗IL23抗体、抗IL17RA抗体和酪氨酸激酶抑制剂。

22.根据权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述受试者是人类受试者,并且所述受试者的细胞或组织是从所述受试者获得和分离的免疫细胞。

针对警报素的双特异性结合蛋白及其用途

1.技术领域:

[0001] 本发明涉及分子生物学和过敏性疾病,具体而言,涉及双特异性抗体的鉴定和用途,该双特异性抗体包含警报素受体结合免疫球蛋白G抗体(IgG)和警报素结合蛋白,用于治疗各种过敏性疾病,如中度至重度哮喘和特应性皮炎。

[0002] 2.优先权:

[0003] 本申请要求于2022年2月24日提交的美国临时申请号63/313,483的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0004] 3.序列表:

[0005] 本申请含有一份符合WIPO标准ST.26的序列表,其名为“SBL009PCTSL.xml”,创建于2023年2月14日,大小为93,089字节并特此通过引用以其全文并入。

4.背景技术:

[0006] 警报素是由于脱粒、细胞损伤或死亡或响应于免疫诱导而释放的内源性、组成型表达的趋化和免疫激活蛋白/肽。

[0007] 特别是,“警报素”胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)、白细胞介素-33(IL-33)和白细胞介素-25(IL-25)响应于过敏原从屏障组织(如气道上皮细胞)中释放。这些警报素通过激活2型先天性淋巴细胞(ILC2)和Th2细胞,作为负责启动Th2免疫反应的上游要素,导致事件的级联,如IL-4、IL-5、IL-13和IgE的释放,并导致多种过敏反应的出现。靶向这些警报素和细胞因子的任一种的生物制剂对诸如哮喘和特应性皮炎的过敏反应的症状评分产生不同程度的改善。虽然单一使用抗TSLP或抗IL-33抗体治疗哮喘已得到临床验证,然而缺乏完全的功效可能是因为每种疗法只靶向调节2型炎症的通路中的一些要素,而对疾病病理生理学中的其他要素未加关注。这些警报素应该潜在相互作用,导致各自的炎症反应。利用蠕虫感染和2型细胞因子驱动的肺部炎症的慢性模型证明,靶向所有三种警报素(TSLP、IL-25和IL-33)似乎比单独阻断任何一种单一警报素更有效[Vannella,Kevin M等人Science Translational Medicine vol.8,337(2016):337ra65]。此外,在屋尘螨诱导的慢性过敏性肺部炎症模型中,破坏所有三种介质产生减少的炎症、粘液产生和肺部重塑,这表明这些警报素相互作用,增强了它们在维持2型病理过程中的个体效应。因此,非常需要新型临床方法,其中抑制这些致病性警报素的两种或更多种,从而改善针对过敏性疾病的临床结果,如减少类固醇使用和维持长期疾病缓解。本公开中提供的方法满足了这一需求,并在减弱疾病进展方面提供了相关优势。

5.发明内容:

[0008] 考虑到本领域对治疗过敏性疾病和紊乱的新方法的明确需求,本发明的目的是提供针对两种不同警报素的双特异性抗体(bsBp)或抗体-受体融合蛋白,其特征是以下活性的一种或多种:i)与纯化的人IL-17RB和IL-33蛋白结合,其K_D低于10^{-8}M;ii)与纯化的人IL-17RB和TSLP蛋白结合,其K_D低于10^{-8}M;iii)与抗IL17RB单克隆抗体相比,在更大程度上抑制Th2相关细胞因子的释放;iv)与抗IL17RB单克隆抗体相比,在更大程度上抑制ILC2的增殖和激活。

[0009] 如本文所示,这种双特异性抗体(bsBp)或抗体-受体融合蛋白具有预防、抑制过敏性疾病(如哮喘和特应性皮炎(AD))或/和延缓其进展的潜力。因此,本发明的目的是提供一种治疗有需要的受试者中与过敏相关的疾病或紊乱的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的针对2种不同警报素X和Y的双特异性结合蛋白的步骤,其中双特异性结合蛋白由(a)抗警报素X受体IgG和(b)抗警报素YscFv和(c)多肽接头组成。

[0010] 在一个优选的实施方式中,受试者是患有临床或临床前哮喘、特应性皮炎、纤维化疾病、炎症性肠病(IBD)、克罗恩病、溃疡性结肠炎、慢性阻塞性肺病、慢性鼻窦炎、伴有鼻息肉的慢性鼻窦炎的人。

[0011] 在特别优选的实施方式中,警报素X受体是IL-17RB,警报素Y受体是TSLP或IL-33,和警报素受体是ST2或TSLPR。

[0012] 在其他优选的实施方式中,抗警报素X IgG选自IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体和IgG4抗体。

[0013] 本发明的另一个目的是提供一种治疗有需要的受试者中与过敏相关的疾病或紊乱的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的双特异性结合蛋白的步骤,该蛋白能够:(a)阻断IL-25和IL-33信号传导和/或(b)阻断IL-25和TSLP信号传导。

[0014] 在一个优选的实施方式中,受试者(优选人类)患有临床或临床前哮喘、特应性皮炎、纤维化疾病、炎症性肠病(IBD)、克罗恩病、溃疡性结肠炎、慢性阻塞性肺病、慢性鼻窦炎、伴有鼻息肉的慢性鼻窦炎。

[0015] 在特别优选的实施方式中,双特异性结合蛋白选自抗IL-17RB/抗人TSLP双特异性抗体、抗IL-17RB/抗人IL-33双特异性抗体、抗IL-17RB/人ST2抗体-受体融合蛋白和抗IL-17RB/人TSLPR抗体-受体融合蛋白。

[0016] 在其他优选的实施方式中,双特异性结合蛋白包括轻链可变区(VL)和重链可变区(VH),轻链可变区(VL)由分别具有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3组成,以及重链可变区(VH)由分别具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3组成。

[0017] 在特别优选的实施方式中,抗IL-17RB抗体的VL和VH分别具有SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:32的氨基酸序列,和/或SEQ ID NO:33的轻链序列和选自SEQ ID NO:60-75中任何一种的重链序列。

[0018] 在优选的实施方式中,双特异性抗体(bsBp)和/或抗体-受体融合蛋白静脉内、肌内、皮下、颅内、鞘内、脑室内、腹膜内、鼻内、肠胃外、局部或皮内、任选地与第二治疗剂联合施用,其实例包括但不限于皮质类固醇、DNA甲基转移酶(DNMT)抑制剂、抗IL17A抗体、抗IL12/IL23抗体、抗IL23抗体、抗IL17RA抗体和酪氨酸激酶抑制剂。

[0019] 当结合附图和实施例阅读下面的详细说明时,本发明的这些和其他目的和特征将变得更加明显。然而,应当理解的是,上述发明内容和以下详细描述是本发明的优选实施方式,并不限制本发明或本发明的其他可选实施方式。特别是,虽然本发明是参照许多具体的实施方式进行描述的,但应当理解的是,这些描述是对本发明的说明,而不构成对本发明的限制。在不脱离本发明的精神和范围的情况下,如所附权利要求所述的,本领域技术人员可以想到各种修改和应用。

6.附图说明:

[0020] 图1描绘了SM17与不同物种IL-17RB结合的剂量依赖性曲线。

[0021] 图2描绘了SM17与IL-17受体家族成员的结合特异性。

[0022] 图3描绘了SM17与原生人I1-17RB的结合。

[0023] 图4:描绘了SM17对人PBMC培养物中IL-5的剂量依赖性抑制作用。

[0024] 图5描绘了SM17抑制由TK-10细胞产生IL-8。

[0025] 图6描绘了SM-17在抑制OVA诱导的鼠实验性哮喘的气道高反应性的效果。

[0026] 图7描绘了SM-17在抑制OVA诱导的鼠实验性哮喘中BALF IL-5和IL-13水平的效果。

[0027] 图8描绘了SM-17在抑制OVA诱导的鼠实验性哮喘中BALF嗜酸性粒细胞计数的效果。

[0028] 图9描绘了IL25/SM17相互作用模式和可能的疾病指征。

[0029] 图10A描绘了双特异性结合蛋白(双特异性抗体和抗体-受体融合蛋白)的设计。

[0030] 图10B描绘了从ExpiCHO瞬时转染系统纯化的SM17、SM17-抗-TSLP和SM17-抗-IL-33bsBp的SDS-PAGE。

[0031] 图11描绘了抗警报素双特异性结合蛋白的抗原结合。

[0032] 图12描绘了警报素由人PBMC诱导IFNγ、CCL8、CCL17、IL-5和IL-13以及SM17对细胞因子释放的抑制效果。

[0033] 图13描绘了不同的双特异性结合蛋白对诱导人PBMC释放细胞因子和趋化因子的效力。

[0034] 图14描绘了警报素对ILC2的促增殖效果的结果。

[0035] 图15描绘了ILC2和Th2细胞对类固醇激素和bsBp响应的结果。

[0036] 图16描绘了树突状细胞效力测定的结果。

7.具体实施方式:

[0037] 在用过敏原挑战时,II型炎症性疾病涉及大量刺激性警报素和细胞因子。特应性皮炎(AD)和哮喘是这类疾病的代表。

[0038] AD是一种以严重瘙痒为特征的慢性炎症性皮肤病。它影响15-30％的儿童和2-10％的成年人,生活质量严重受损。AD发病机制的免疫因素包括Th2淋巴细胞的大量失调以及相关细胞因子(如IL-4、IL-5和IL-13)的释放。这些因素导致IgE的产生增加,这导致皮肤炎症加剧,并加重AD患者的皮肤屏障缺陷。

[0039] 白细胞介素-4(IL-4)和白细胞介素-13(IL-13)尤其值得关注:它们是由入侵寄生虫或过敏原触发的AD II型炎症反应的标志性细胞因子。IL-4和IL-13的受体享有共同的受体链,即IL-4Rα;IL-4Rα/IL-2Rγc(γc)异二聚体构成了IL-4的受体,而IL-4Rα/IL-13Rα1异二聚体构成了IL-13的受体。IL-4或IL-13与IL-4Rα受体链结合将分别允许IL-4/IL-4Rα复合物与γc受体链或IL-13/IL-4Rα复合物与IL-13Rα1受体链进一步缔合。虽然受体链IL-4Rα广泛表达,但在一些细胞类型中水平较低,而γc或IL-13Rα1受体链的表达则受细胞类型限制。例如,在非造血细胞中,尽管IL-13Rα1表现出的表达量较高,而γc的表达量较低或没有[Junttila,Ilkka S等人The Journal of Experimental Medicine,vol.205,11(2008):2595-608]。近来的研究描绘IL-4在淋巴结内T2反应中在生成和调节涉及IgE的体液免疫方面起着核心作用;而IL-13在外周组织中起着更突出的作用。IL-4和IL-13都会显

著降低如聚丝蛋白、聚丝蛋白2、兜甲蛋白、内披蛋白、角蛋白1、角蛋白10、hornerin、桥粒芯蛋白和桥粒胶蛋白1的关键结构蛋白的表达,以及对正常皮肤屏障功能重要的脂质组分的表达,导致经表皮失水(TEWL)增加,通常通过测量TEWL来反映AD的严重程度,甚至用于预测AD的发生。此外,据报道,IL-4和IL-13通过抑制角质形成细胞中AMP产生,都可导致皮肤菌群失调的发展,皮肤菌群失调的典型特征是金黄色葡萄球菌的强烈定植;近来显示这种情况的发生先于AD病变的出现。为此,针对这些途径开发并批准了两种生物制剂,用于治疗中度至重度AD。它们分别是度匹鲁单抗(Dupilumab)(抑制IL-4和IL-13反应的抗IL-4Ra抗体)和曲罗芦单抗(Tralokinumab)(抗IL-13抗体)。然而,约50%的AD患者在治疗1年后对这些抗体无响应。[Bangert,Christine等人Science Immunology,vol.6,55(2021):eabe2749;Wollenberg,A等人The British Journal of Dermatology vol.184,3(2021):437-449]。

[0040] 哮喘是一种慢性气道炎症性紊乱,以支气管高反应性和可变的气流受限为特征。哮喘影响着全世界3亿以上的人[Braman,Sidney S.Chest,vol.130,1Suppl(2006):4S-12S]。虽然大多数哮喘患者可以使用标准控制治疗实现控制疾病,但大约有5-10%的患者患有重症哮喘,尽管坚持标准治疗(高剂量吸入皮质类固醇(ICS)加长效β-激动剂(LABA)),但其仍得不到充分控制。对于标准治疗无法控制的重症哮喘,全球哮喘倡议(GINA)指南建议使用口服皮质类固醇(OCS)进行维持疗法。然而,与OCS相关的不良事件,如影响心血管、胃肠道和肌肉骨骼系统的不良事件以及感染,是常见的并且有时可以致命。因此,重症哮喘患者的特点是有最迫切的医疗需求尚未得到满足,并且可以符合附加生物疗法。

[0041] 主要有两大类哮喘:Th2高和Th2低。在Th2高哮喘中,诸如IL-4、IL-5和IL-13的2型免疫细胞因子的过度产生可导致肺嗜酸性粒细胞增多、免疫球蛋白(Ig)E水平升高、粘液产生增加以及危及生命的呼吸问题[Kuruvilla,Merin E等人Clinical Reviews in Allergy&Immunology,vol.56,2(2019):219-233]。因此,靶向IgE、IL-4、IL-5和IL-13的生物制剂近来已出现成为用于治疗Th2高表型的严重失控哮喘的有前景的附加疗法。

[0042] IL-4和IL-13还被认为在过敏和哮喘中具有一些非冗余功能。特别是,IL-4被认为通过其在调节T细胞增殖和存活以及IgE合成中作用,主要在哮喘发展的早期阶段发挥作用。相比之下,由于缺乏表面IL13Ra1的表达,人类T细胞无法对IL-13响应。与IL-4不同的是,IL-13更主要地参与过敏反应的晚期阶段,如气道重塑和杯形细胞粘液分泌过多、纤维化、平滑肌改变和气道高反应性增加[Gour,N.,&Wills-Karp,M.(2015).Cytokine,75(1),68-78]。

[0043] 然而,单独的靶向IL-4(altrakincept、帕考珠单抗(pascolizumab))或IL-13(曲罗芦单抗(tralokinumab))的抗体治疗哮喘的临床结果令人失望[Panettieri,Reynold A Jr等人The Lancet.Respiratory Medicine vol.6,7(2018):511-525;Bagnasco,Diego等人International Archives of Allergy and Immunology,vol.170,2(2016):122-31]。但当IL-4和IL-13都被靶向时,如在度匹鲁单抗的情况下,临床证明有效治疗Th2介导的哮喘[Maspero,Jorge F等人The Journal Of Allergy And Clinical Immunology.In practice,vol.8,2(2020):527-539.e9]。这一结果表明,在治疗Th2介导的哮喘时,必须对IL-4和IL-13进行双重阻断。

[0044] IL-5在嗜酸性粒细胞的分化、募集、存活和脱粒中发挥着核心致病作用[Pelaia,Corrado等人Frontiers in Physiology,vol.10 1514.2019年12月17日]。有大量患有严重

哮喘的患者,其表达出以嗜酸性粒细胞炎症为特征的Th2高表型。一半以上的哮喘对象可出现气道嗜酸性粒细胞增多,并且嗜酸性粒细胞水平高与哮喘反复加重和严重支气管阻塞相关。伴有嗜酸性粒细胞增多的Th2高哮喘通常对皮质类固醇有治疗响应,这可能是通过皮质类固醇诱导的细胞凋亡清除嗜酸性粒细胞。然而,严重的嗜酸性粒细胞性哮喘可能会对吸入性和全身性皮质类固醇产生抗药性,这是因为支气管中的IL-5量过多。支气管中的IL-5量过多可以克服皮质类固醇对嗜酸性粒细胞的促凋亡作用。因此,通过抗IL-5抗体阻断IL-5活性可有助于维持皮质类固醇治疗的治疗响应性,并且事实上,有3种阻断IL-5通路的抗体正与皮质类固醇联合使用用于治疗Th2高哮喘,包括瑞利珠单抗(Reslizumab)(抗IL-5抗体)、美泊利单抗(Mepolizumab)(抗IL-5抗体)和贝那利珠单抗(Benralizumab)(抗IL-5Ra抗体)。

[0045] 过敏性哮喘是一种Th2高哮喘亚型,其特征是存在针对一种或多种常见环境过敏原(如屋尘螨)的IgE抗体。在过敏性哮喘患者中,抗过敏原IgE与肥大细胞表面上的IgE受体(FcεRI)结合。暴露于过敏原抗原可导致肥大细胞表面FcεRI交联;当这种FcεRI交联的强度和持续时间足够时,肥大细胞会被激活,导致释放自身有效物质介质:组胺、前列腺素(PG)D2和白三烯(LT)C4,最终导致支气管收缩、粘液分泌和粘膜水肿。激活的肥大细胞也能合成和分泌大量促炎细胞因子(包括IL-4、IL-5和IL-13),其进而可以调节IgE合成和嗜酸性粒细胞炎症的发展。抗IgE抗体奥马珠单抗(Omalizumab)是第一种,也是长期以来唯一一种可用于附加治疗严重过敏性哮喘的单克隆抗体。奥马珠单抗的作用是选择性地防止人IgE与其受体结合,并且因此抑制肥大细胞激活。

[0046] 尽管已经在阐明Th2-高炎症通路和开发用于治疗Th2-高哮喘的相关生物制剂方面取得了很大进展,但仍然缺乏解决Th2-低哮喘的有效方法。Th2低哮喘患者对皮质类固醇响应较差,这进一步加剧了问题的严重性。因此,有效治疗Th2-低哮喘的治疗方法的医疗需求尚未得到满足。

[0047] 哮喘标准护理的另一个问题是过度依赖OCS。除了ICS之外,约30%的成年重症哮喘患者还依赖OCS疗法,以维持可接受的哮喘控制水平[Chung,Kian Fan等人The European Respiratory Journal,vol.43,2(2014):343-73]。全球哮喘倡议(GINA)小组致力于为维持疗法设定“可接受的”OCS剂量,并且他们建议将每天7.5mg作为可接受的水平,因为其对应于类固醇产生的生理水平。然而,近来研究表明,没有良性的OCS处方,因为不良事件的风险是累积性的,并随着每次治疗而加剧。仅在四个短期OCS疗程后,就会看到发病率增加[Sullivan,Patrick W等人The Journal of Allergy and Clinical Immunology,vol.141,1(2018):110-116.e7]。就终生累积剂量而言,大部分副作用在患者接受1-2.5g皮质类固醇治疗后出现,并且仅接受0.5g皮质类固醇的患者糖尿病发病率开始增加[Price,David B等人Journal of Asthma and Allergy,vol.11 193-204.29Aug.2018]。

[0048] 临床评估了度匹鲁单抗、美泊利单抗、瑞利珠单抗、奥马珠单抗和贝那利珠单抗的OCS节省(sparing)效果。虽然使用这些生物制剂治疗可以减少50%的每日OCS剂量,但只有5%-20%的严重哮喘患者能够停止OCS使用。开发可以消除或进一步减轻对OCS依赖的用于治疗哮喘的新治疗方法或生物制剂,仍有巨大的医疗需求尚未得到满足[Cataldo,Didier等人,The Journal of Asthma:Official Journal Of The Association For The Care Of Asthma,vol.58,4(2021):448-458]。

[0049] 目前,FDA批准用于治疗哮喘和AD的生物制剂均靶向Th2炎症的下游通路。然而,使用这些生物制剂治疗的患者仍有临床不足之处需要解决,如复发率高、对非Th2炎症的疗效有限,以及对持续使用OCS的依赖(尽管水平降低)。近来,靶向包括IL-25、TSLP和IL-33在内的警报素的新生物制剂正在开发中。它们是影响Th2炎症通路的上游要素,并且有可能潜在地导致Th2和非Th2炎症反应。因此,抗警报素生物制剂可提供额外选择——其可能解决目前AD和Th2高/低重度哮喘患者的临床不足之处。

[0050] IL-25(又称IL-17E)是IL-17细胞因子家族的成员,该细胞因子家族涵盖IL-17A至IL-17F。IL-25与由IL-17受体A(IL-17RA)和IL-17受体B(IL-17RB)组成的其受体结合,进行信号转导[Borowczyk、Julia等人,The Journal Of Allergy And Clinical Immunology,vol.148,1(2021):40-52]。IL-25是由Th2细胞产生的2型细胞因子,并且能够诱导IL-4、IL-5和IL-13基因的表达,并进一步放大肺部和消化道的过敏炎症反应。IL-25在2型免疫反应中是重要的,因为它激活多种细胞类型(包括上皮细胞、Th2细胞和ILC2)中的IL-17RA/IL-17RB复合物。据报道,IL-25抑制CD4+T细胞激活和向Th17细胞分化,并通过下调Th1和Th17细胞反应在自身免疫性疾病和炎症性疾病中发挥抗炎作用。

[0051] 胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)是IL-2细胞因子家族的成员和IL-7的远源旁系同源物。TSLP与由TSLP特异性TSLPR亚基和IL-7R信号传导链形成的异源二聚体受体结合,作用于几种免疫细胞类型,包括树突状细胞、ILC2、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和T细胞。在过敏性炎症期间,TSLP的主要产生者是上皮细胞、角质形成细胞和基质细胞。TSLP通过调节抗原呈递细胞(如树突状细胞)来放大T细胞和先天性淋巴细胞的2型细胞因子,从而在驱动Th2介导的炎症中发挥关键作用[Ito,Tomoki等人The Journal Of Experimental Medicine,vol.202,9(2005):1213-23]。

[0052] IL-33是IL-1家族的成员,并且最近被确认为IL-1受体家族成员T1/ST2(ST2)的配体。IL-33是一种双重功能蛋白质,其同时作为促炎细胞因子和具有转录调控特性的胞内核因子。细胞应激或坏死后,IL-33释放到胞外空间,并作为内源危险信号,其在创伤或感染期间警告免疫系统组织损伤。IL-33通过其对人类嗜碱性粒细胞、过敏原反应性Th2细胞、iNKT和NK细胞的活性,扩大Th1和Th2型反应。虽然IL-33规范地触发2型细胞因子反应,但这种细胞因子也能与如IL-12的1型细胞因子协同作用,激发γ干扰素(IFNγ)[Komai-Koma,Mousa等人Immunobiology,vol.221,3(2016):412-7]。因此,IL-33正在成为重要的免疫调节因子,在过敏性、纤维化、感染性和慢性炎症性疾病中发挥重要作用。

[0053] 由于IL-25、TSLP和IL-33(统称为抗警报素)展现了超越Th2免疫反应的广泛功能,除了与Th2通路下游靶标相互作用的生物制剂已获批准的适应症外,针对这些抗警报素的生物制剂被认为对额外的过敏性疾病亚型有效。抗TSLP和抗IL33抗体都已在哮喘和AD中进行了临床评估[Simpson,Eric L等人Journal of the American Academy of Dermatology,vol.80,4(2019):1013-1021;Chen,Yi-Ling等人Science Translational Medicine,vol.11,515(2019):eaax2945]。特则鲁单抗(Tezepelumab)(AMG 157/MEDI9929)是一种完全人免疫球蛋白G2-λ单克隆抗体,其与TSLP特异性结合并防止TSLP与其受体复合物相互作用。在一项II期随机、双盲、安慰剂对照研究(ALLEVIAD;NCT02525094)中,中度至重度AD患者在接受特则鲁单抗加局部使用皮质类固醇(TCS)治疗后,所有终点均表现出改善趋势,而安慰剂加TCS的改善则没有达到统计学显著性,如通过第12周的EASI50评估的。

进行两项独立的III期试验(SOURCE和NAVIGATOR)以评估特则鲁单抗治疗中度至重度哮喘的临床疗效。在NAVIGATOR研究中,中度至重度哮喘患者接受了特则鲁单抗加OCS或安慰剂加OCS治疗。与安慰剂组相比,治疗组达到了主要终点,具有统计学显著性,表明AAER(哮喘年度恶化率)的降低具有临床意义[Menzies-Gow,Andrew等人,The New England Journal of Medicine,vol.384,19(2021):1800-1809]。在NAVIGATOR研究中,特则鲁单抗(与OCS同时使用)对抑制Th2高和Th2低的严重哮喘同样有效。然而,在SOURCE研究中,特则鲁单抗未能达到主要终点,即与安慰剂相比在不失去哮喘控制的情况下减少每日OCS——具有统计学显著性。这一结果表明,特则鲁单抗用作单一疗法可能不足以治疗中度至重度哮喘。

[0054] 对Etokimab(艾托奇单抗)(ABN020),其是一种抗IL-33人源化IgG1单克隆抗体,用于治疗AD进行临床评估。在1期试验中,施用ABN020导致血液中的嗜酸性粒细胞数量大幅减少。在Iia期研究中发现,ABN020显著缓解屋尘螨诱导的皮炎症状,并减少中性粒细胞皮肤浸润(非Th2炎症的标志)[Chen,Yi-Ling等人Science Translational Medicine,vol.11,515(2019):eaax2945]。这些结果表明,ABN020能同时抑制Th2和非Th2炎症。然而,在随后的Iib期研究中,ABN020未能达到治疗中度至重度AD的主要终点。另一种抗IL-33抗体Itepekimab(依特吉单抗)(REGN3500)用于治疗哮喘被临床评估。在一项II期概念验证(POC)研究中,停止使用ICS和长效支气管舒张吸入剂(LABA)的患者接受了12周的度匹鲁单抗或依特吉单抗治疗[Wechsler,Michael E等人The New England Journal Of Medicine,vol.385,18(2021):1656-1668]。接受依特吉单抗治疗的患者哮喘失控率(22%)显著低于接受安慰剂治疗的患者(41%)。这些数据表明,不使用ICS和LABA,依特吉单抗作为单一疗法可能有效。然而,依特吉单抗的疗效略低于抗IL4Ra抗体度匹鲁单抗(19%)。因此,出于策略上而非科学上的考虑,停止了依特吉单抗针对哮喘的进一步临床开发。无论如何,后来发现依特吉单抗降低具有慢性阻塞性肺病(COPD)(一种以中性粒细胞炎症为特征的疾病)的前吸烟者的恶化率并改善肺功能[Rabe,Klaus F等人The Lancet.Respiratory Medicine,vol.9,11(2021):1288-1298]。目前正在进行两项依特吉单抗治疗前吸烟者中COPD的III期临床研究。

[0055] 迄今为止,截断IL-25/IL-17RB通路对如哮喘和AD的免疫性疾病的疗效尚未得到临床验证。最先进的抗IL25抗体是Kanovabiopharma开发的XKH001,目前正在进行I期试验评估。LNR 125.38是Lanier Biotherapeutics的另一种抗IL-25抗体,目前处于临床前阶段;LNR 125.38显著减少过敏性小鼠和鼻病毒诱导的哮喘恶化小鼠内的2型细胞因子和炎症细胞的增加。由SinoMab BioScience Limited开发的SM17是第一个进入I期临床试验的人源化抗IL17RB单克隆抗体。SM17不阻断IL-25与IL-17RB的结合,而是抑制通过IL-25/IL-17RB通路的信号转导。SM17由其亲本鼠抗体D9.2人源化,D9.2在治疗炎症性肠病、特发性肺纤维化、哮喘和鼻病毒诱导的哮喘恶化的临床前鼠研究中显示出治疗潜力。

[0056] 尽管这些抗警报素抗体(尤其是抗TSLP和抗IL33抗体)在减少Th2和非Th2炎症方面的临床前和临床疗效已得到证实,但它们作为附加疗法或单一疗法用于治疗哮喘和/或AD时的治疗反应却有些欠佳。一种可能的解释是,TSLP、IL-33以及可能的IL-25在哮喘和AD的发病机制中发挥着冗余和重叠的功能/作用。因此,阻断它们的任何单一一种都不足以实现最佳临床反应。

[0057] 在分子水平上,这三种警报素都能直接激活先天性淋巴细胞(ILC)家族成员之一

的ILC2。ILC2是组织驻留的哨兵,其通过可溶性炎症介质、神经营养因子和细胞间相互作用对环境做出快速响应。ILC2已被显示表达IL-25、IL-33和TSLP的受体,并分泌IL-5和IL-13对这些信号做出响应,从而增强过敏反应。如果ILC2失调,它们会导致Th2炎症细胞因子的过度分泌,导致过敏性哮喘、AD、过敏性鼻炎、溃疡性结肠炎和许多慢性纤维增生性紊乱的发生。ILC2还与AD疾病的快速复发和严重哮喘的OCS依赖性密切相关。

[0058] 在患有严重嗜酸性粒细胞性哮喘患者中,OCS疗程导致循环嗜酸性粒细胞、Th2细胞、Tc2细胞减少,但ILC2没有减少。这表明,与Th2细胞相比,ILC2对OCS更具抗性(Hynes,G.,等人2018)。在临床上,与Th2细胞相比,IL-13$^+$ILC2与患者哮喘控制状态呈更强的正相关,并且对糖皮质激素诱导的细胞死亡和2型细胞因子释放抑制具有更强抗性[Jia,Yi等人American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology,vol.55,5(2016):675-683]。近来研究进一步表明,三种警报素都在ILC2的皮质类固醇抗性中发挥了重要作用。在鼠模型中证实,IL-33快速增加支气管周围/血管周围区域的ILC2数量,而ILC2的肺积聚依赖于CCL8-CCR8信号转导通路。已知IL-33治疗导致CCL8的产生,其主要来自肺气道巨噬细胞。通过CCL8-CCR8通路的信号传导又对ILC2细胞因子(IL-13和IL-5)产生以及IL-13$^+$激活ILC2运动性发挥了关键作用[Puttur,Franz等人Science Immunology,vol.4,36(2019):eaav7638]。后来发现,被称为“炎症性”ILC2(iILC2)的ILC2亚群参与了皮质类固醇抗性的发展。在慢性鼻炎或哮喘患者中,确立了疾病严重程度与对皮质类固醇疗法的抗性之间的相关性,尤其是当炎症粘膜组织中的循环iILC2和驻留iILC2数量增加时。有趣的是,iILC2的发展和迁移是IL-25依赖性的[Miller,Mindy M等人Science Immunology,vol.5,43(2020):eaay3994;van der Ploeg,Esmee K等人Science Immunology,vol.6,55(2021):eabd3489]。据报道,TSLP治疗也增加ILC2的类固醇抗性。从高TSLP水平的哮喘患者采集的支气管肺泡灌洗液(BALF)ILC2是类固醇抗性的。IL-7和TSLP废除了地塞米松对血液ILC2产生2型细胞因子的抑制作用[Liu,Sucai等人The Journal Of Allergy And Clinical Immunology,vol.141,1(2018):257-268.e6]。

[0059] 在Th2记忆细胞介导的AD复发中,警报素也发挥着关键作用。在接受度匹鲁单抗治疗一年的患者中,鉴定了AD中持续存在皮肤驻留、治疗抗性的免疫Th2记忆。这些记忆Th2细胞是IL-13$^+$、IL-17RB$^+$、ST2$^+$、TSLPR$^+$,这表明它们可以对警报素做出响应。之前的研究报告,IL-33可诱导Th2记忆细胞产生IL-31,一种导致AD严重瘙痒的细胞因子[Maier,Elisabeth等人Journal of Immunology(Baltimore,Md.:1950)vol.193,2(2014):645-54;Stott,Bryony等人The Journal Of Allergy And Clinical Immunology,vol.132,2(2013):446-54.e5]。在另一份报告中,CRTH2$^+$CD4$^+$Th2记忆细胞浸润AD皮肤病变与TSLP激活的DC(TSLP-DC)相关[Wang,Yui-I等人.Immunity,vol.24,6(2006):827-838]。此外,IL-25增强TSLP-DC刺激的Th2记忆细胞的增殖[Wang,YIHsi等人.The Journal of Experimental Medicine,vol.204,8(2007):1837-47]。这些研究表明,度匹鲁单抗对IL-4和IL-13的中和作用可能不足以抑制Th2记忆细胞的活性。这可能有助于解释为什么相当一部分AD患者在接受度匹鲁单抗治疗时经历部分和非持久性反应[Bangert,Christine等人.Science Immunology,vol.6,55(2021):eabe2749][Wollenberg,A等人.The British Journal Of Dermatology,vol.184,3(2021):437-449]。与IL-4和IL-13不同,在AD中,警报素同时调节短期Th2效应器功能和长期Th2记忆。因此,中和警报素用作AD治疗的新方法。

[0060] 由于3种警报素在2型免疫中发挥着冗余和重叠的作用,因此阻断这3种警报素中的任何一种都不可能足以完全抑制Th2和ILC2活性。这可解释为什么特则鲁单抗和依特吉单抗虽然抑制了Th2和非Th2炎症反应,但对哮喘和AD表现出有限的临床疗效。

[0061] 尽管是冗余的,但这些警报素在Th2以及非Th2反应中具有不重叠的功能。IL-33与IL-12协同作用,直接诱导人类NK细胞产生γ干扰素(IFNg)——炎症性肠病(IBD)发病机制中的一个众所周知的致病因素。对患者活组织切片的研究已表明,活性IBD患者,尤其是溃疡性结肠炎(UC)患者内的IL-33水平升高[Kobori,Ayako等人Journal of Gastroenterology,vol.45,10(2010):999-1007]。此外,在肌成纤维细胞中发现了UC相关的IL-33,这些细胞往往位于UC患者炎症溃疡的底部[Sponheim,Jon等人.The American Journal Of Pathology,vol.177,6(2010):2804-15]。阻断IL-33/ST2通路显示通过增强小鼠的粘膜愈合来改善实验性结肠炎,并缓解人类的活动性疾病,这表明IL-33在IBD中的致病作用[Sedhom,Mamdouh AK等人.Gut,vol.62,12(2013):1714-23]。与之相比,TSLP诱导人类DC表达OX40配体(OX40L),但不表达IL-12,IL-12是tregI幼稚CD4+T细胞产生IL-4、IL-5和IL-13的先决条件。此外,TSLP激活的DC产生趋化因子,如CCL17/TARC和CCL22/MDC,其吸引幼稚T细胞。TSLP直接通过TSLPR或间接通过OX40配体(由DC上的TSLP诱导)与T细胞上的OX40接合来刺激幼稚CD4+T细胞,诱导专门的Th2极化。

[0062] 有趣的是,通过DC激活,人类TSLP和TLR3配体促进了具有中枢记忆T细胞表型的Th17细胞的分化。类似地,来自皮肤局部肥大细胞的IL-25刺激真皮DC产生IL-1β,从而有助于在接触性皮炎的诱导阶段激活Th17细胞,而不是Th2细胞。在银屑病皮肤中,IL-25通过激活STAT3转录因子刺激角质形成细胞增殖,并诱导炎症性细胞因子和趋化因子的产生。在角质形成细胞中的IL-25表达也有助于银屑病样炎症的扩大。此外,IL-25比IL-33更有效诱导人外周血单核细胞(PBMC)分泌IL-5和IL-13[Bartemes,Kathleen R等人The Journal Of Allergy And Clinical Immunology,vol.134,3(2014):671-678.e4]。

[0063] 尽管显得冗余,但三种警报素可在调节ILC2、Th1、Th2和Th17的活动和反应中发挥不同的作用。事实上,报道称它们靶向中枢和外周系统的不同细胞类型,包括但不限于嗜碱性粒细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、成纤维细胞和角质形成细胞。由于过敏性疾病(如接触性皮炎、AD、Th2-高/低哮喘)和自身免疫性疾病(如炎症性肠病、银屑病)的异质性,阻断单一警报素可能只对特定患者群体有效。例如,Th1和Th2混合表型在欧美AD中最常见,而Th17和Th2混合表型在亚洲和儿科AD中最常见[Renert-Yuval,Yael,and Emma Guttman-Yassky.Annals Of Allergy,Asthma&Immunology:Official Publication Of The American College Of Allergy,Asthma,&Immunology,vol.124,1(2020):28-35]。这为解决这些免疫性疾病留下了改进的余地,并对针对不同亚型免疫性疾病的新方法和疗法提出了未满足的医疗需求。

[0064] 这种替代疗法的一种方法可能包括共同施用针对两种或更多种警报素的生物制剂(如抗体)来治疗过敏性疾病的不同方面(如儿科和成人AD)。共同施用需要注射两种单独的产品,或一次注射两种不同生物制剂的共同制剂。虽然两次注射允许剂量和时间的灵活性,但对患者的依从性来说并不方便。此外,虽然共同制剂可提供剂量的一些灵活性,但由于两种或更多种抗警报素生物制剂的不同分子特性,要找到具有可接受粘度(在相对高浓度下)并促进化学和物理稳定性的制剂条件往往具有相当大的挑战性或是不可能的。此外,

共同施用和共同制剂涉及两种或更多种不同药物疗法的附加成本,这可能会增加患者和/或支付方成本。因此,仍然需要替代疗法来治疗具有疾病改变的过敏性疾病,而这种替代疗法优选包括针对不同警报素的双特异性或多特异性结合蛋白。

[0065] 为说明起见,本发明提供了一种针对2种不同警报素的双特异性结合蛋白;它可以是双特异性蛋白的形式,一端对IL-17RB具有特异性,另一端对可溶性警报素具有特异性。具体来说,双特异性蛋白可以是抗IL17RB(IL-25受体)抗体,在其C端融合有(a)靶向IL-33或TSLP警报素的单链Fv(scFv);或(b)IL-33受体(ST2)或TSLP受体(TSLPR)的胞外结构域。尽管本发明公开了针对警报素受体和不同警报素的双特异性结合蛋白的用途,但这种方法还可以扩展为靶向不同警报素受体、警报素和其他下游细胞因子的多特异性结合蛋白。

[0066] 在进一步描述本公开内容之前,应理解本公开内容不限于本文所述的特定实施方式,还应理解本文中所使用的术语是为了描述特定实施方式,并不旨在是限制性的。

[0067] 除非本文另有定义,本公开内容中使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。此外,除非上下文另有要求,单数术语应包括复数,并且复数术语应包括单数。一般而言,本文所述与细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、遗传学以及蛋白质和核酸化学和杂交结合使用的术语和这些技术均为本领域众所周知的常用术语和技术。

[0068] 术语“一个”或“一种”实体指一个实体;例如,“载体”被理解为代表一个载体。

[0069] 本文中使用的术语“和/或”应理解为具体公开了两个指定特征或部件中的每一个,无论是否包含另一个。因此,本文中“A和/或B”等短语中使用的术语“和/或”旨在包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)和“B”(单独)。同样,如在短语例如“A、B和/或C”中使用的术语“和/或”旨在包含以下方面中的每个:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0070] 范围:在本公开内容中,本发明的各个方面都可以用范围格式来表示。应当理解的是,以范围格式进行描述只是为了方便和简洁,而不应被理解为对本发明范围的僵化限制。因此,对范围的描述应被视为已具体公开了该范围内所有可能的子范围以及各个数值。例如,对1至6这样一个范围的描述应被视为已具体公开了1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等子范围,以及该范围内的单个数值,如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。无论范围的广度如何,这都适用。

[0071] 本文参考了GenBank编号、GI编号和/或SEQ ID NO描述了示例性基因和多肽。应当理解,本领域技术人员可以通过参考序列来源,包括但不限于GenBank(ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)和EMBL(embl.org/),很容易地鉴定同源序列。

[0072] 7.1IL17RB蛋白

[0073] 人IL17RB是一种47.9kDa的跨膜蛋白(462aa),其属于IL-17受体家族。IL-17RB表达于各种内分泌组织和不同器官,如肾脏和肝脏和粘膜组织的上皮细胞。在哮喘患者的肺组织和AD患者的皮肤损伤中也发现了IL-17RB的表达升高。IL-17RB在人ILC2、自然杀伤T(NKT)细胞和Th2细胞中的表达表明在免疫细胞中潜在的作用。IL-17RB由两种配体共享:IL-17B和IL-25(又称为IL-17E)。IL-25与异源二聚体IL-17RA/IL-17RB复合物结合,而据报道,IL-17B既与异源二聚体受体结合,也与IL-17RB同源二聚体受体结合[Wu,Heng-Hsiung等人.Science Translational Medicine,vol.13,583(2021):eabc2823]。IL-17B对IL-17RB的结合亲和力(K_D)比IL-25(IL-17E)的结合亲和力低约30倍,缔合速率(K_{on})相似,但解

离速率(K_{off})要快得多。关于人IL-17RB的额外信息,包括其示例性氨基酸序列,可在如GENEBANK的公共数据库(NCBI Ref.)找到。下面还提供了示例性序列。

[0074] 1MSLVLLSLAA LCRSAVPREP TVQCGSETGPSPEWMLQHDL IPGDLRDLRV EPVTTSVATG

[0075] 61DYSILMNVSW VLRADASIRL LKATKICVTG KSNFQSYSCV RCNYTEAFQT QTRPSGGKWT

[0076] 121FSYIGFPVEL NTVYFIGAHN IPNANMNEDGPSMSVNFTSP GCLDHIMKYK KKCVKAGSLW

[0077] 181DPNITACKKN EETVEVNFTT TPLGNRYMAL IQHSTIIGFS QVFEPHQKKQ TRASVVIPVT

[0078] 241GDSEGATVQL TPYFPTCGSD CIRHKGTVVL CPQTGVPFPL DNNKSKPGGW LPLLLLSLLV

[0079] 301ATWVLVAGIY LMWRHERIKK TSFSTTTLLP PIKVLVVYPS EICFHHTICY FTEFLQNHCR

[0080] 361SEVILEKWQK KKIAEMGPVQ WLATQKKAAD KVVFLLSNDV NSVCDGTCGK SEGSPSENSQ

[0081] 421DLFPLAFNLF CSDLRSQIHL HKYVVVYFRE IDTKDDYNAL SVCPKYHLMK DATAFCAELL

[0082] 481HVKQQVSAGK RSQACHDGCC SL(SEQ ID NO:88)

[0083] 7.2双特异性结合蛋白

[0084] 本公开提供了能够特异性结合两种抗原的双特异性结合蛋白。结合蛋白一般包含可变轻链和可变重链区域或结构域,这些区域或结构域与免疫球蛋白的可变轻链和可变重链区域或结构域相对应。结合蛋白的至少一个抗原结合部分是单链形式,在本领域称为scFv。在一些实施方式中,另一个抗原结合部分包含IgG。在其它实施方式中,其它抗原结合部分包含scFv。

[0085] 在一些实施方式中,本文提供了抗体或其抗原结合片段的方法和用途,这些抗体或其抗原结合片段可特异性地与警报素受体、警报素或两者结合。如本文所使用的,术语“抗体”及其语法等同物是指通过至少一个抗原结合位点(其中抗原结合位点通常位于免疫球蛋白分子的可变区内)识别并特异性结合靶标(如蛋白质、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质或上述任何物质的组合)的免疫球蛋白分子。如本文所使用的,术语包括完整的多克隆抗体、完整的单克隆抗体、单结构域抗体(sdAb;例如驼科抗体、羊驼抗体)、单链Fv(scFv)抗体、重链抗体(HCAb)、轻链抗体(LCAb)、多特异性抗体、双特异性抗体、单特异性抗体、单价抗体以及包含抗原结合位点的任何其他经修饰免疫球蛋白分子(如双可变结构域免疫球蛋白分子),只要这些抗体表现出所需的生物活性。抗体还包括但不限于小鼠抗体、兔抗体、骆驼抗体、灵长类抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人类抗体。抗体可以是五大类免疫球蛋白中的任何一类:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,或其亚类(同种型)(如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2),基于它们的重链恒定结构域的特性,分别称为α、δ、ε、γ和μ。在一些实施方式中,抗体可包含四条多肽链,两条重链(H)和两条轻链(L),其通过二硫键相互连接。每条重链由重链可变区(在本文中缩写为HCVR或VH)和重链恒定区组成。每条轻链都由轻链可变区(在本文中缩写为LCVR或VL)和轻链恒定区组成。除非另有明确说明,如本文中所使用的,术语“抗体”包括完整抗体的“抗原结合片段”。如本文中所使用的,术语“抗原结合片段”是指为完整抗体的抗原决定可变区的完整抗体的部分或片段。抗原结合片段的实例包括但不限于:Fab(由不含铰链区的VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段)、Fab’(由附接有铰链区的VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段)、F(ab’)2(二价片段,其包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段)、Fd(由VH和CH1结构域组成的片段)、Fv(由抗体单臂的VL和VH结构域组成的片段)、线性抗体、单链抗体分子(例如,scFv,其是具有通过重组方式接合的VL和VH区的单个多肽链)、重链抗体(HCAb)、轻链抗体(LCAb)、二硫键连接的scFv

(dsscFv)、二抗体(二价、双特异性抗体)、三抗体、四抗体、微抗体、双可变结构域抗体(DVD)、单可变结构域抗体(sdAb或dAb;例如:驼科抗体、羊驼抗体)、重链抗体的单可变结构域(VHH)以及由抗体片段形成的双特异性或多特异性抗体。“双特异性”抗体或结合蛋白是具有两个不同的抗原结合位点的人工杂交抗体,其识别并特异性结合两个不同的靶位点。双特异性结合抗体和蛋白质可以通过多种方法产生,其包括杂交瘤的融合或Fab'片段的连接。例如,见Kostelny,S A等人.Journal of Immunology(Baltimore,Md.:1950)vol.148,5(1992):1547-53;Songsivilai,S,and P J Lachmann.Clinical And Experimental Immunology,vol.79,3(1990):315-21。

[0086] 当用于提及抗体时,术语“重链”指的是约50-70kDa的多肽链,其中氨基末端部分包括约120-130个或更多个氨基酸的可变区(VH)和包括恒定区的羧基末端部分。在一些实施方式中,重链恒定区由CH1、CH2和CH3三个结构域组成,并且有一个短的柔性铰链区连接CH1和CH2结构域。基于重链恒定区的氨基酸序列,恒定区可以是五种不同类型之一,分别称为阿尔法(α)、德尔塔(δ)、埃普西隆(ε)、伽马(γ)和mu(μ)。不同重链的大小不同:α、δ和γ含有大约450个氨基酸,而μ和ε含有大约550个氨基酸。当与轻链结合时,这些不同类型的重链会分别产生五类众所周知的抗体,IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,包括四个亚类的IgG,即IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。重链可以是人类重链。

[0087] 当用于提及抗体时,术语“轻链”指的是约25kDa的多肽链,其中氨基末端部分包括约100至约110个或更多个氨基酸的可变区和包括恒定区的羧基末端部分。轻链恒定区由一个结构域CL组成。轻链的大致长度为211至217个氨基酸。基于恒定区的氨基酸序列,有两种不同的类型,即卡帕(κ)和拉姆达(λ)。轻链氨基酸序列是本领域众所周知的。轻链可以是人类轻链。

[0088] 术语“可变结构域”或“可变区”是指抗体轻链或重链的一部分,通常位于轻链或重链的氨基末端,并且在重链中长度约为120至130个氨基酸,在轻链中长度约为100至110个氨基酸,并且用于每种特定抗体与其特定抗原的结合和特异性。在不同抗体之间,可变结构域在序列上有很大差异。序列的可变性主要集中在CDR上,而可变结构域中可变性较低的部分被称为框架区(FR)。轻链和重链的CDR主要负责抗体与抗原的相互作用。在一些实施方式中,每条VH和VL由三个CDR和四个FR组成,从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。本文中使用的氨基酸位置编号是根据欧盟索引,如Kabat等人.(1991)Sequences of proteins of immunological interest.(美国卫生与公众服务部,华盛顿特区)第5版。

[0089] CDR是指免疫球蛋白(Ig或抗体)VHβ片层框架的非框架区内的三个超变区(H1、H2或H3)之一,或抗体VLβ片层框架的非框架区内的三个超变区(L1、L2或L3)之一。因此,CDR是穿插在框架区序列中的可变区序列。CDR区为本领域技术人员所熟知,并已通过多种方法/系统进行了定义。这些系统和/或定义已经经过多年的发展和完善,并且包括Kabat、Chothia、IMGT、ABM和Contact。例如,Kabat定义了抗体可变(V)结构域中变异性最高的区域(Kabat,E A等人.The Journal Of Biological Chemistry,vol.252,19(1977):6609-16.;Kabat,E A.Advances in protein chemistry vol.32(1978):1-75.)。Chothia的定义是基于结构环区的位置,其将CDR区序列定义为不是保守的β片层框架的一部分,并因此能够适应不同构象的那些残基[Chothia,C,and AM Lesk.Journal of Molecular Biology,

vol.196,4(1987):901-17]。这两个术语都是本领域公认的。此外,IMGT系统基于序列可变性和可变区结构中的位置。AbM定义是Kabat和Chothia之间的折衷。Contact定义基于对可获得的抗体晶体结构的分析。软件程序(如abYsis)是本领域技术人员可获得的和已知的,用于分析抗体序列和确定CDR。规范抗体可变结构域内CDR的位置已通过比较大量结构确定[Al-Lazikani,B等人.Journal Of Molecular Biology,vol.273,4(1997):927-48][Morea,V等人.Methods(San Diego,Calif.)vol.20,3(2000):267-79]。由于不同抗体中超变区内的残基数量不相同,因此在规范可变结构域编号方案中,相对于规范位置的额外残基通常在残基编号旁用a、b、c等进行编号。这种命名法同样为本领域技术人员所熟知。

[0090] 例如,下表列出了根据Kabat(超变)或Chothia(结构)名称定义的CDR。

[0091]

	Kabat[1]	Chothia[2]	环位置
VHCDR1	31-35	26-32	连接B和C链
VHCDR2	50-65	53-55	连接C'和C"链
VHCDR3	95-102	96-101	连接F和G链
VLCDR1	24-34	26-32	连接B和C链
VLCDR2	50-56	50-52	连接C'和C"链
VLCDR3	89-97	91-96	连接F和G链

[0092] [1]残基编号采用Kabat等人的命名法,同上

[0093] [2]残基编号采用Chothia等人的命名法,同上

[0094] 一个或多个CDR也可以以共价或非共价方式并入分子中,使其成为免疫粘附素。免疫粘附素可以将CDR(一个或多个)作为较大的多肽链的一部分并入,可以将CDR(一个或多个)共价连接到另一条多肽链上,或者可以非共价地将CDR(一个或多个)并入。CDR允许免疫粘附素与特定的目标抗原结合。

[0095] 术语"表位"和"抗原决定簇"在本文中可以互换使用,并且指的是抗体或抗原结合片段与靶分子表面结合的位点,如抗原表面上的局部区域。靶分子可以包括蛋白质、肽、核酸、碳水化合物或脂质。具有免疫原性活性的表位是靶分子中引起动物中免疫反应的部分。具有抗原活性的靶分子表位是靶分子中抗体与之结合的部分,可通过本领域熟知的任何方法(包括,例如通过免疫测定法)确定。抗原表位不一定具有免疫原性。表位通常由如氨基酸或糖侧链的分子的化学活性表面基团组成,并且具有特定的三维结构特征和特定的电荷特征。术语"表位"包括线性表位和构象表位。靶分子(例如多肽)中对表位起作用的区域可以是多肽的连续氨基酸,或者表位可以由靶分子的两个或更多个非连续区域组合而成。表位可以是或者可以不是靶分子的三维表面特征。由连续氨基酸形成的表位(也称为线性表位)通常会在蛋白质变性时保留下来,而由三级折叠形成的表位(也称为构象表位)通常会在蛋白质变性时丢失。表位通常包括至少3个,以及更常见的,至少5、6、7或8-10个独特空间构象的氨基酸。

[0096] 如本文中所使用的,术语"特异性结合"是指多肽或分子与表位、蛋白质或靶分子的相互作用比与替代物质(包括相关或不相关的蛋白质)的相互作用更频繁、更迅速、持续时间更长、亲和力更强,或具有上述的一些组合。特异性结合靶分子(如抗原)的结合部分(如抗体)可通过例如免疫测定、ELISA、生物层干涉测量法("BLI")、SPR(如Biacore)或本领域技术人员已知的其他技术的方法进行鉴定。通常情况下,特异性反应至少是背景信号或

噪声的两倍,并且可以是背景的10倍以上。关于抗体特异性的讨论,参见Paul编辑的1989年Fundamental Immunology Second Edition第二版,Raven出版社,纽约,第332-336页。特异性结合靶分子的结合部分可以以高于其对不同分子亲和力的亲和力结合靶分子。在一些实施方式中,特异性结合靶分子的结合部分可以以比其对不同分子亲和力至少高20倍、至少高30倍、至少高40倍、至少高50倍、至少高60倍、至少高70倍、至少高80倍、至少高90倍或至少高100倍的亲和力结合靶分子。在一些实施方式中,特异性结合特定靶分子的结合部分与不同分子以这样低的亲和力结合,以至于无法用本文所述或本领域已知的测定法检测到结合。在一些实施方式中,"特异性结合"是指,例如,结合部分以约0.1mM或更低的K_D结合靶分子。

[0097] 在一些实施方式中,"特异性结合"是指多肽或分子以约10μM或更低或约1μM或更低的K_D结合靶标。在一些实施方式中,"特异性结合"是指多肽或分子以约0.1μM或更低、约0.01μM或更低、约1nM或更低的K_D结合靶标。由于不同物种的同源蛋白质之间的序列同一性,特异性结合可包括识别超过一个物种的蛋白质或靶标的多肽或分子。同样,由于不同蛋白质的多肽序列的某些区域中的同源性,特异性结合可包括识别超过一种的蛋白质或靶标的多肽或分子。可以理解的是,在一些实施方式中,特异性结合第一靶标的结合部分(如抗体)可以或可以不特异性结合第二靶标。因此,"特异性结合"并不一定要求(尽管可以包括)排他性结合,即与单一靶标结合。因此,在一些实施方式中,结合部分(如抗体)可以特异性地结合超过一个的靶标。例如,在某些情况下,抗体可以包含两个相同的抗原结合位点,每个位点都能特异性结合两种或更多种蛋白质上的相同表位。在某些替代实施方式中,抗体可以是双特异性的并且包含至少两个具有不同特异性的抗原结合位点。

[0098] 如本文中所使用的,术语"结合亲和力"一般是指结合部分与靶分子(如抗原)之间非共价相互作用的强度总和。结合部分与靶分子的结合是一个可逆的过程,并且结合亲和力通常以平衡解离常数(K_D)来报告。K_D是解离速率(k_{off}或k_d)与缔合速率(k_{on}或k_a)之比。结合对的K_D越低,亲和力越高。K_A是平衡缔合常数,其也是平衡解离常数的倒数,即$=1/K_D$。对于抗体-抗原相互作用,K_D可计算为游离抗体和游离抗原浓度的乘积与抗体-抗原复合物浓度的比值,即[抗原]x[抗体]/[抗原-抗体]。

[0099] 本领域已知有多种测量结合亲和力的方法,其中任何一种都可用于本公开的目的。具体的说明性实施方式包括以下内容。在一些实施方式中,"K_D"或"K_D值"可以通过本领域已知的测定法来测量,例如通过结合测定法。K_D可在放射性标记抗原结合测定法(RIA)中测量(Chen,Y等人.Journal of Molecular Biology,vol.293,4(1999):865-81)。K_D或K_D值也可通过生物层干涉测量法(BLI)测量,例如使用Gator系统(Probe Life)或Octet-96系统(Sartorius,Gottingen,德国)。K_D或K_D值也可以通过使用BIAcore系统(例如,Pharmacia Biosensor AB,Uppsala,瑞典和Piscataway,新泽西州)进行表面等离子体共振测定来测量。

[0100] 如本文中所使用的,与具有特定序列特征的蛋白质或多肽("参照蛋白质"或"参照多肽")相关的术语"变体"是指与参照蛋白质或参照多肽相比具有一个或多个(例如,约1至约25个、约1至约20个、约1至约15个、约1至约10个或约1至约5个)氨基酸取代、缺失和/或添加的不同蛋白质或多肽。氨基酸序列的变化可以是氨基酸取代。氨基酸序列的变化可以是保守氨基酸取代。蛋白质或多肽的功能片段或功能变体保持参照蛋白质或多肽的基本结构

和功能特性。

[0101] 如本文中可互换使用的,术语“多肽”、“肽”、“蛋白质”及其语法等同物是指任意长度的氨基酸聚合物,其可以是线性的或支链的。它可以包括非天然的或经修饰的氨基酸,或者可以被非氨基酸中断。多肽、肽或蛋白质还可以通过例如二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任何其他操纵或修饰进行修饰。

[0102] 如本文中可互换使用的,术语“多核苷酸”、“核酸”及其语法等同物指任何长度的核苷酸聚合物,并且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的核苷酸或碱基,和/或它们的类似物,或任何可被DNA或RNA聚合酶并入到聚合物中的底物。核酸分子可以是单链的或双链的。

[0103] 如本文中所使用的,术语“编码”及其语法等同物是指多核苷酸或核酸(如基因、cDNA或mRNA)中特定核苷酸序列的固有特性,在生物过程中作为合成其他聚合物和大分子的模板,这些聚合物和大分子具有确定的核苷酸序列(即rRNA、tRNA和mRNA)或确定的氨基酸序列以及由此产生的生物特性。因此,如果与基因对应的mRNA的转录和翻译产生蛋白质,则该基因编码蛋白质。除非另有说明,“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括所有彼此简并形式并且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质和RNA的核苷酸序列可包括内含子。

[0104] “分离”的多肽、肽、蛋白质、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是指其形式不存在于自然界中的多肽、肽、蛋白质、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物。分离的多肽、肽、蛋白质、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物包括那些已经纯化到不再以自然界中存在的形式存在的多肽、肽、蛋白质、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物。在一些实施方式中,分离的多肽、肽、蛋白质、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物基本上是纯的。在一些实施方式中,分离的多肽、肽、蛋白质、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0105] 如本文中所使用的,在涉及两个或更多个多核苷酸或多肽时使用的术语“同一(相同)”、“同一性”百分比及其语法等同物,是指两个或更多个序列或子序列在进行比较和比对(如果必要,引入空位)以实现最大对应性时,不考虑作为序列同一性一部分的任何保守氨基酸取代,相同或具有特定百分比的核苷酸或氨基酸残基相同。同一性百分比可使用序列比对软件或算法或通过目测来测量。可用于获得氨基酸或核苷酸序列比对的各种算法和软件是本领域众所周知的。这些算法和软件包括但不限于BLAST、ALIGN、Megalign、BestFit、GCG Wisconsin Package及其变体。在一些实施方式中,本文提供的两个多核苷酸或多肽基本上是相同的,这意味着它们在使用序列比较算法或通过目测法进行比较和比对以实现最大对应性时,具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%,以及在一些实施方式中至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的核苷酸或氨基酸残基同一性。在一些实施方式中,同一性存在于长度为至少约10个残基、至少约20个残基、至少约40-60个残基、至少约60-80个残基或两者之间任何整数值的氨基酸序列的区域。在一些实施方式中,同一性存在于比60-80个残基更长的区域,如至少约80-100个残基,以及在一些实施方式中,序列在所比较序列的全长上(如靶蛋白或抗体的编码区)基本相同。在一些实施方式中,同一性存在于长度为至少约10个碱基、至少约20个碱基、至少约40-60个碱基、至少约60-80个碱基或两者之间任何整数值的核苷酸序列的区域。在一些实施方式中,同一

性存在于比60-80个碱基更长的区域,如至少约80-100个碱基或更多,以及在一些实施方式中,序列在所比较序列的全长上(如编码目标蛋白的核苷酸序列)基本相同。

[0106] 如本文中所使用的,“保守氨基酸取代”是指一个氨基酸残基被另一个具有相似侧链的氨基酸残基所取代。如本文中所使用的,“保守性相似”的氨基酸或残基是指具有相似侧链的非相同氨基酸残基。具有相似侧链的氨基酸残基家族已在本领域限定,包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、β-支链侧链(如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香侧链(如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0107] 如本文中所使用的,术语“载体”及其语法等同物是指用于携带遗传物质(如多核苷酸序列)的载体,该遗传物质可被引入宿主细胞,并在宿主细胞中复制和/或表达。适用的载体包括,例如表达载体、质粒、噬菌体载体、病毒载体、附加体和人工染色体,其中可包括可操作稳定整合到宿主细胞染色体中的选择序列或标记。此外,载体还可包括一个或多个可选择的标记基因和适当的表达控制序列。例如,可包括的可选择标记基因提供对抗生素或毒素的抗性,补充营养缺陷型缺陷,或供应培养基中没有的关键营养素。表达控制序列可包括组成型和诱导型启动子、转录增强子、转录终止子等,这些都是本领域中众所周知的。当将共同表达两种或更多种多核苷酸时,可以将这两种多核苷酸插入例如单个表达载体或单独的表达载体中。对于单个载体表达,编码多核苷酸可与一个共同的表达控制序列可操作地连接或与不同的表达控制序列连接,如一个诱导型启动子和一个组成型启动子。将多核苷酸引入宿主细胞可以使用本领域众所周知的方法来确认。本领域技术人员理解,多核苷酸以足够的量表达以产生所需的产物(例如,IgG组成双特异性结合蛋白),并且进一步理解,可以使用本领域众所周知的方法优化表达水平以获得足够的表达。

[0108] 如本文中所使用的,术语“宿主细胞”是指可引入或已引入遗传物质(如重组表达载体)的细胞。宿主细胞不仅包括引入外源遗传物质的受试者细胞,还包括这种细胞的后代。由于突变或环境影响,后代细胞可能会发生某些修饰,因此这些后代可能与亲本细胞不相同。

[0109] 如本文中所使用的和本领域中理解的,“EC”是指试剂(如抗体)的有效浓度,并且通常用于剂量-反应曲线。制剂的“效应”可以是正(激活)效应或者负效应。术语“EC50”是指活性剂(如抗体)产生半最大反应的浓度。也如本文中所使用的和本领域中理解的,“IC”是指具有抑制作用的试剂浓度,并且也常用于剂量-反应曲线。术语“IC50”是指试剂(如抗体)的浓度,在该浓度下,其抑制的活性降低一半。

[0110] 如上一节中所述的,双特异性结合蛋白可由包括通过二硫键连接在一起的两个多肽,其中每个多肽在其N-和C-末端分别包含第一scFv区和第二scFv区。这两个scFv区特异性地结合不同的抗原。每个多肽的第一和第二scFv区之间是包含免疫球蛋白的铰链、CH2和CH3结构域的序列。

[0111] 可选地,双特异性结合蛋白可包括IgG,其在每个CH3结构域的C-末端连接scFv区。在这种情况下,IgG的Fab区中的可变重链和轻链可特异性地结合一种抗原,而C-末端scFv区包括不同的可变重链和轻链,该可变重链和轻链特异性地结合第二抗原。

[0112] 如上所述,双特异性结合蛋白可通过两个结构域与两种不同的抗原结合,其中N-

末端的一个结构域结合抗原X以及C-末端的另一个结合抗原Y。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白结合警报素受体的第一结构域和警报素的第二结构域。在一个特定的实施方式中,双特异性结合蛋白通过经由第一结构域结合抑制IL17RB激活,并通过第二结构域结合TSLP。在另一个实施方式中,双特异性结合蛋白通过经由第一结构域结合抑制IL17RB激活,并通过第二结构域结合IL33。

[0113] 在一个实施方式中,双特异性结合蛋白包括下式的两个多肽:

[0114] $X—H—Fc—L—scFv^{Y}$

[0115] 其中X是$scFv^{X}$或Fab区,其中X与第一抗原特异性结合,并且$scFv^{Y}$与第二抗原特异性结合,H是铰链区,Fc包括免疫球蛋白的CH2和CH3区,$scFv^{X}$和$scFv^{Y}$各自独立地是单链可变片段,以及L是多肽接头。在一些实施方式中,两种抗原中的一种是免疫调节蛋白,并且另一种是警报素。在一些实施方式中,当X是Fab区时,则第一抗原是免疫调节蛋白,并且另一种是警报素。在一些实施方式中,当X是Fab区时,则第一抗原是警报素,并且另一种是免疫调节蛋白。

[0116] 在实施方式中,双特异性结合蛋白包括下式的两个多肽:

[0117] $X—H—Fc—L—ECD^{Y}$

[0118] 其中X是$scFv^{X}$或Fab区,其中X与第一抗原特异性结合,并且ECD^{Y}是警报素受体的胞外结构域,H是铰链区,Fc包括免疫球蛋白的CH2和CH3区,$scFv^{X}$是单链可变片段,以及L是多肽接头。在一些实施方式中,两种抗原中的一种是免疫调节蛋白,并且另一种是警报素受体的胞外结构域。在一些实施方式中,当X是Fab区时,则第一抗原是免疫调节蛋白,并且另一个是警报素。在一些实施方式中,ECD^{Y}是TSLP受体胞外结构域。在一些实施方式中,ECD^{Y}是IL-33受体胞外结构域。

[0119] 并入双特异性结合蛋白的VH和VL链可源于多种来源,包括先前存在的抗体、新生成的抗体以及VH和VL链库。可并入双特异性结合蛋白的VH和VL链的具体示例性实施方式,以及竞争结合免疫调节蛋白(如IL17RB或TSLPR)的双特异性结合蛋白的具体示例性实施方式,在具体实施方式部分中提供。

[0120] 本文提供了包含编码本公开多肽的核苷酸序列的核酸。还提供了产生多肽、培养宿主细胞和回收多肽的方法,并在以下的具体实施方式中作了进一步讨论。

[0121] 另一方面,本公开提供了包括本文所述的双特异性结合蛋白的组合物。组合物一般包括一种或多种本文所述的双特异性结合蛋白和/或其盐,以及一种或多种赋形剂、载体或稀释剂。

[0122] 目前的抗警报素抗体疗法对AD和中度-重度哮喘的效果有限。具体而言,特则鲁单抗(抗TSLP抗体)和艾托奇单抗(抗IL-33抗体)的II期AD临床试验未能达到各自的主要终点。然而,在治疗哮喘方面,特则鲁单抗和依特吉单抗在II期和III期试验中均达到了其主要终点,尽管它们的治疗效果有限:特则鲁单抗未能减少OCS使用的每日剂量,而依特吉单抗则相对逊色于度匹鲁单抗。本文所述的双特异性蛋白特异性地与两种抗原结合,如警报素受体和警报素,并阻断两种不同的警报素诱导的免疫反应。这种对警报素诱导的反应的抑制有可能使过敏性疾病或紊乱的给药频率减少和疾病缓解时间延长。

[0123] 在一些实施方式中,本文提供了其双特异性结合蛋白在制备用于治疗Th2-高和/或Th2-低的免疫性紊乱如哮喘的OCS每日剂量减少的药物中的用途,该双特异性结合蛋白

与警报素和/或警报素的受体特异性结合。在上述用途中,双特异性结合蛋白(a)阻断IL-25信号传导和TSLP信号传导两者和/或(b)阻断IL-25信号传导和IL-33信号传导两者。在一些实施方式中,其双特异性结合蛋白特异性结合人IL-17RB和TSLP。在一些实施方式中,其双特异性结合蛋白特异性结合人IL-17RB和IL-33。

[0124] 本文还提供了治疗有需要的受试者的过敏性疾病或紊乱的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的其双特异性结合蛋白,该双特异性结合蛋白特异性结合IL-17RB和TSLP,或IL-17RB和IL-33,其中双特异性结合蛋白(a)阻断IL-25信号传导和TSLP信号传导两者和/或(b)阻断IL-25信号传导和IL-33信号传导两者。在一些实施方式中,其双特异性结合蛋白特异性结合人IL-17RB和TSLP,或人IL-17RB和IL-33。在一些实施方式中,过敏性疾病或紊乱是AD和哮喘。在一些实施方式中,过敏性疾病或紊乱是临床前AD和哮喘。

[0125] 如本文中所使用的,术语“治疗”及其语法等同物,在涉及疾病或病症或患有疾病或病症的受试者时,是指抑制、消除、减轻和/或改善与所治疗的疾病或紊乱相关的症状、症状严重程度和/或症状频率的动作。例如,当参考AD使用时,术语“治疗”及其语法等同物指减轻疾病严重程度、延缓或减缓疾病进展的动作,其包括但不限于(a)减少给药频率以达到疾病缓解,或降低疾病复发的发生率,或(b)延迟、改善或最小化与AD相关的一种或多种症状(通过湿疹面积和严重程度指数(Eczema Area and Severity Index)(EASI)量化),(c)减少OCS使用的量和频率。

[0126] 术语“阻断”及其语法等同物指的是以包括但不限于以下方式降低警报素生物功能的动作:(a)直接竞争警报素在其相应受体上的结合位点,或(b)阻止相应受体的异源二聚化,降低警报素占位诱导的生物效应。

[0127] 如本文中所使用的,术语“施用”及其语法等同物指通过本文所述方法或本领域已知方法向受试者身体递送或使其递送治疗剂或药物组合物的行为。治疗剂可以是化合物、多肽或细胞。施用治疗剂或药物组合物包括开具将治疗剂或药物组合物递送到受试者体内的处方。示例性施用形式包括口服剂型,如片剂、胶囊、糖浆、悬浮液;可注射剂型,如静脉内的(IV)、肌内的(IM)或腹膜内的(IP);皮下的(SC)、透皮剂型,包括膏剂、啫喱、粉剂或贴剂;口腔剂型;吸入粉剂、喷雾剂、悬浮液和直肠栓剂。

[0128] 如本文中所使用的,术语“有效量”、“治疗有效量”及其语法等同物是指将试剂单独或作为药物组合物的一部分、以单剂量或作为一系列剂量的一部分施用给受试者时,其用量能对疾病、紊乱或病症的任何症状、方面或特征具有任何可检测到的积极影响。治疗有效量可通过测量相关的生理效果来确定。所需的确切量因受试者而异,取决于受试者的年龄、体重和一般状况、所治疗疾病的严重程度、临床医生的判断等。治疗有效量也是指治疗剂的毒性或有害效果被治疗有益效果超过的量。在任何单独的情况下,适当的“有效量”都可能因如个体的疾病状态、年龄、性别和体重的因素而异,并且本领域的普通技术人员可以使用常规实验来确定。“预防有效量”是指在为实现期望的预防效果(例如,延迟或预防疾病或紊乱的发生)所需的剂量下和时间段内有效的量。通常情况下,由于预防剂量在疾病之前或早期阶段用于受试者,因此预防有效量通常小于治疗有效量。

[0129] 如本文中所使用的,术语“受试者”是指将为特定治疗接受者的任何动物(如哺乳动物),包括但不限于人类、非人灵长类动物、犬科动物、猫科动物、啮齿动物等。

[0130] 在一些实施方式中,本文公开的双特异性结合蛋白(a)抑制人PBMC的IL5/CCL17/

IL13/CCL8/IFNγ分泌,/或(b)抑制ILC2迁移和增殖。因此,本文公开的双特异性结合蛋白通过直接抑制ILC2的活性显示持久的疗效。此外,本文公开的方法具有减少Th2和ILC2细胞迁移的额外治疗益处。在一些实施方式中,本文提供了使用本文公开的抗IL17RB/抗TSLP或抗IL17RB/抗IL33双特异性结合蛋白治疗OCS抗性相关疾病或紊乱的方法。

[0131] 本文提供的方法可以治疗过敏性疾病或紊乱。过敏性疾病或紊乱可以是临床或临床前过敏性哮喘、过敏性鼻炎、过敏性结膜炎或AD。

[0132] 尽管以上适应症是优选的,但对受试者施用如本文所公开的双特异性抗原结合蛋白也可治疗或预防其他疾病、紊乱或病症。这些疾病、紊乱和病症包括但不限于炎症、自身免疫性疾病、软骨炎症、纤维化疾病和/或骨质退化、关节炎、类风湿性关节炎、幼年关节炎、幼年类风湿性关节炎、少关节幼年类风湿性关节炎、多关节幼年类风湿性关节炎、全身型幼年类风湿性关节炎、幼年强直性脊柱炎、幼年肠病性关节炎、幼年反应性关节炎、幼年雷特综合征、SEA综合征(血清阴性、肌腱末端病、关节病综合征)、幼年皮肌炎(dermatomyositis)、幼年银屑病关节炎、幼年硬皮病、幼年系统性红斑狼疮、幼年血管炎、少关节类风湿性关节炎、多关节类风湿性关节炎、全身型类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、肠病性关节炎、反应性关节炎、雷特综合征、SEA综合征(血清阴性、肌腱末端病、关节病综合征)、皮肌炎、银屑病关节炎、硬皮病、系统性红斑狼疮、血管炎、肌炎、多发性肌炎、皮肤肌炎(dermatomyolitis)、骨关节炎、结节性多动脉炎、韦格纳肉芽肿病、动脉炎、风湿性多肌痛、结节病、硬皮病、硬化、原发性胆道硬化、硬化性胆管炎、舍格伦综合征、银屑病、斑块状银屑病、滴状银屑病、皮褶银屑病、脓疱性银屑病、红皮性银屑病、皮炎、AD、动脉粥样硬化、狼疮、斯蒂尔病、系统性红斑狼疮(SLE)、重症肌无力、炎症性肠病(IBD)、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、乳糜泻、多发性硬化(MS)、哮喘、COPD、格林-巴利病、I型糖尿病、格雷夫斯病、阿狄森氏病、雷诺氏现象、自身免疫性肝炎、GVHD等。在具体的实施方式中,提供了包含治疗有效量的抗IL17RB/抗TSLP双特异性结合蛋白的药物组合物。在另一个具体的实施方式中,提供了包含治疗有效量的抗IL17RB/抗IL33双特异性结合蛋白的药物组合物。

[0133] 基于本文提供的数据,使用本文所述的双特异性结合蛋白治疗过敏性疾病或紊乱的受试者预期提供治疗益处。

[0134] 7.2.1示例性抗IL17RB/抗警报素双特异性结合蛋白

[0135] 本发明提供了双特异性结合蛋白,该蛋白包含针对警报素受体具有特异性的免疫球蛋白G抗体(IgG),该抗体在免疫球蛋白链的C-末端分别与(a)对特定警报素特异性的单链可变片段(scFv)或(b)警报素受体的胞外结构域融合。

[0136] 在一些实施方式中,本发明提供了包含IgG和两个scFv的双特异性抗体,其中,(a)所述IgG包括两条重链(HC)和两条轻链(LC),每条HC包括重链可变区(HCVR1),该重链可变区包括重链CDR(HCDR)1-3,并且每条轻链包括轻链可变区(LCVR1),该轻链可变区包括轻链CDR(LCDR)1-3,其中HCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO:1,HCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO:2,HCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO:3,LCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO:4,LCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO:5,以及LCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO:6;以及(b)每个scFv包括重链可变区(HCVR2)和轻链可变区(LCVR2),该HCVR2包括HCDR 4-6,并且LCVR2包括LCDR 4-6,其中HCDR4的氨基酸序列为SEQ ID NO:7,HCDR5的氨基酸序列为SEQ ID NO:8,HCDR6的氨基酸序列为SEQ ID NO:9,LCDR4的氨基酸序列为SEQ ID NO:10,LCDR5的氨基酸序列为SEQ ID

NO:11,以及LCDR6的氨基酸序列为SEQ ID NO:12,其中每个scFv在每个scFv的HCVR2的N-末端处通过多肽接头(L1)与每个IgG HC的C-末端处的所述IgG抗体连接,并且其中每个scFv的HCVR2在HCVR2的C-末端处通过第二多肽接头(L2)与相同scFv的LCVR2的N-末端处的相同scFv的LCVR2连接。在一些实施方式中,其HCDR变体在SEQ ID NO:1-3中具有至多约3、约5、约8、约10、约12或约15个氨基酸取代、添加和/或缺失。在一些实施方式中,其LCDR变体在SEQ ID NO:4-6中具有至多约3、约5、约8、约10、约12或约15个氨基酸取代、添加和/或缺失。

[0137] 在一些实施方式中,本发明提供了包含IgG和两个scFv的双特异性抗体,其中,(a)所述IgG包括两条重链(HC)和两条轻链(LC),每条HC包括重链可变区(HCVR1),该重链可变区包括重链CDR(HCDR)1-3,并且每条轻链包括轻链可变区(LCVR1),该轻链可变区包括轻链CDR(LCDR)1-3,其中HCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO:1,HCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO:2,HCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO:3,LCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO:4,LCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO:5,以及LCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO:6;以及(b)每个scFv包括重链可变区(HCVR2)和轻链可变区(LCVR2),该HCVR2包括HCDR 4-6,并且LCVR2包括LCDR 4-6,其中HCDR4的氨基酸序列为SEQ ID NO:36,HCDR5的氨基酸序列为SEQ ID NO:37,HCDR6的氨基酸序列为SEQ ID NO:38,LCDR4的氨基酸序列为SEQ ID NO:39,LCDR5的氨基酸序列为SEQ ID NO:40,以及LCDR6的氨基酸序列为SEQ ID NO:41,其中每个scFv在每个scFv的HCVR2的N-末端处通过多肽接头(L1)与每个IgG HC的C-末端处的所述IgG抗体连接,并且其中每个scFv的HCVR2在HCVR2的C-末端处通过第二多肽接头(L2)与相同scFv的LCVR2的N-末端处的相同scFv的LCVR2连接。在一些实施方式中,其HCDR变体在SEQ ID NO:1-3中具有至多约3、约5、约8、约10、约12或约15个氨基酸取代、添加和/或缺失。在一些实施方式中,其LCDR变体在SEQ ID NO:4-6中具有至多约3、约5、约8、约10、约12或约15个氨基酸取代、添加和/或缺失。

[0138] 在一些实施方式中,本发明提供了包含IgG和两个scFv的双特异性抗体,其中,(a)所述IgG包括两条重链(HC)和两条轻链(LC),每条HC包括重链可变区(HCVR1),该重链可变区包括重链CDR(HCDR)1-3,并且每条轻链包括轻链可变区(LCVR1),该轻链可变区包括轻链CDR(LCDR)1-3,其中HCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO:1,HCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO:2,HCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO:3,LCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO:4,LCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO:5,以及LCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO:6;以及(b)每个scFv包括重链可变区(HCVR2)和轻链可变区(LCVR2),该HCVR2包括HCDR 4-6,并且LCVR2包括LCDR 4-6,其中HCDR4的氨基酸序列为SEQ ID NO:42,HCDR5的氨基酸序列为SEQ ID NO:43,HCDR6的氨基酸序列为SEQ ID NO:44,LCDR4的氨基酸序列为SEQ ID NO:45,LCDR5的氨基酸序列为SEQ ID NO:46,以及LCDR6的氨基酸序列为SEQ ID NO:47,其中每个scFv在每个scFv的HCVR2的N-末端处通过多肽接头(L1)与每个IgG HC的C-末端处的所述IgG抗体连接,并且其中每个scFv的HCVR2在HCVR2的C-末端处通过第二多肽接头(L2)与相同scFv的LCVR2的N-末端处的相同scFv的LCVR2连接。在一些实施方式中,其HCDR变体在SEQ ID NO:1-3中具有至多约3、约5、约8、约10、约12或约15个氨基酸取代、添加和/或缺失。在一些实施方式中,其LCDR变体在SEQ ID NO:4-6中具有至多约3、约5、约8、约10、约12或约15个氨基酸取代、添加和/或缺失。

[0139] 在一些实施方式中,本发明提供了包含IgG和两个scFv的双特异性抗体,其中,(a)

所述IgG包括两条重链(HC)和两条轻链(LC),每条HC包括重链可变区(HCVR1),该重链可变区包括重链CDR(HCDR)1-3,并且每条轻链包括轻链可变区(LCVR1),该轻链可变区包括轻链CDR(LCDR)1-3,其中HCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO:1,HCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO:2,HCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO:3,LCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO:4,LCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO:5,以及LCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO:6;以及(b)每个scFv包括重链可变区(HCVR2)和轻链可变区(LCVR2),该HCVR2包括HCDR 4-6,并且LCVR2包括LCDR 4-6,其中HCDR4的氨基酸序列为SEQ ID NO:13,HCDR5的氨基酸序列为SEQ ID NO:14,HCDR6的氨基酸序列为SEQ ID NO:15,LCDR4的氨基酸序列为SEQ ID NO:16,LCDR5的氨基酸序列为SEQ ID NO:17,以及LCDR6的氨基酸序列为SEQ ID NO:18,其中每个scFv在每个scFv的HCVR2的N-末端处通过多肽接头(L1)与每个IgG HC的C-末端处的所述IgG抗体连接,并且其中每个scFv的HCVR2在HCVR2的C-末端处通过第二多肽接头(L2)与相同scFv的LCVR2的N-末端处的相同scFv的LCVR2连接。在一些实施方式中,其HCDR变体在SEQ ID NO:1-3中具有至多约3、约5、约8、约10、约12或约15个氨基酸取代、添加和/或缺失。在一些实施方式中,其LCDR变体在SEQ ID NO:4-6中具有至多约3、约5、约8、约10、约12或约15个氨基酸取代、添加和/或缺失。

[0140] 在一些实施方式中,本发明提供了包含IgG和两个scFv的双特异性抗体,其中,(a)所述IgG包括两条重链(HC)和两条轻链(LC),每条HC包括重链可变区(HCVR1),该重链可变区包括重链CDR(HCDR)1-3,并且每条轻链包括轻链可变区(LCVR1),该轻链可变区包括轻链CDR(LCDR)1-3,其中HCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO:1,HCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO:2,HCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO:3,LCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO:4,LCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO:5,以及LCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO:6;以及(b)每个scFv包括重链可变区(HCVR2)和轻链可变区(LCVR2),该HCVR2包括HCDR 4-6,并且LCVR2包括LCDR 4-6,其中HCDR4的氨基酸序列为SEQ ID NO:48,HCDR5的氨基酸序列为SEQ ID NO:49,HCDR6的氨基酸序列为SEQ ID NO:50,LCDR4的氨基酸序列为SEQ ID NO:51,LCDR5的氨基酸序列为SEQ ID NO:52,以及LCDR6的氨基酸序列为SEQ ID NO:53,其中每个scFv在每个scFv的HCVR2的N-末端处通过多肽接头(L1)与每个IgG HC的C-末端处的所述IgG抗体连接,并且其中每个scFv的HCVR2在HCVR2的C-末端处通过第二多肽接头(L2)与相同scFv的LCVR2的N-末端处的相同scFv的LCVR2连接。在一些实施方式中,其HCDR变体在SEQ ID NO:1-3中具有至多约3、约5、约8、约10、约12或约15个氨基酸取代、添加和/或缺失。在一些实施方式中,其LCDR变体在SEQ ID NO:4-6中具有至多约3、约5、约8、约10、约12或约15个氨基酸取代、添加和/或缺失。

[0141] 在一些实施方式中,本发明提供了包含IgG和两个scFv的双特异性抗体,其中,(a)所述IgG包括两条重链(HC)和两条轻链(LC),每条HC包括重链可变区(HCVR1),该重链可变区包括重链CDR(HCDR)1-3,并且每条轻链包括轻链可变区(LCVR1),该轻链可变区包括轻链CDR(LCDR)1-3,其中HCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO:1,HCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO:2,HCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO:3,LCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO:4,LCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO:5,以及LCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO:6;以及(b)每个scFv包括重链可变区(HCVR2)和轻链可变区(LCVR2),该HCVR2包括HCDR 4-6,并且LCVR2包括LCDR 4-6,其中HCDR4的氨基酸序列为SEQ ID NO:54,HCDR5的氨基酸序列为SEQ ID NO:55,HCDR6的氨基

酸序列为SEQ ID NO:56,LCDR4的氨基酸序列为SEQ ID NO:57,LCDR5的氨基酸序列为SEQ ID NO:58,以及LCDR6的氨基酸序列为SEQ ID NO:59,其中每个scFv在每个scFv的HCVR2的N-末端处通过多肽接头(L1)与每个IgG HC的C-末端处的所述IgG抗体连接,并且其中每个scFv的HCVR2在HCVR2的C-末端处通过第二多肽接头(L2)与相同scFv的LCVR2的N-末端处的相同scFv的LCVR2连接。在一些实施方式中,其HCDR变体在SEQ ID NO:1-3中具有至多约3、约5、约8、约10、约12或约15个氨基酸取代、添加和/或缺失。在一些实施方式中,其LCDR变体在SEQ ID NO:4-6中具有至多约3、约5、约8、约10、约12或约15个氨基酸取代、添加和/或缺失。

[0142] 在一些实施方式中,本发明提供了包括IgG和警报素受体的胞外结构域的双特异性抗体,(a)所述IgG包括两条重链(HC)和两条轻链(LC),每条HC包括重链可变区(HCVR1),该重链可变区包括重链CDR(HCDR)1-3,并且每条轻链包括轻链可变区(LCVR1),该轻链可变区包括轻链CDR(LCDR)1-3,其中HCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO:1,HCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO:2,HCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO:3,LCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO:4,LCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO:5,以及LCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO:6;以及(b)所述警报素受体的胞外结构域,其中氨基酸序列为SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:34,其中每个警报素胞外结构域在每个结构域的氨基酸序列的C-末端处通过多肽接头(L1)与在每个IgG HC的C-末端处的所述IgG抗体连接。在一些实施方式中,其HCDR变体在SEQ ID NO:1-3中具有至多约3、约5、约8、约10、约12或约15个氨基酸取代、添加和/或缺失。

[0143] 在一些实施方式中,本发明提供了包括IgG和警报素受体的胞外结构域的双特异性抗体,(a)所述IgG包括两条重链(HC)和两条轻链(LC),每条HC包括重链可变区(HCVR1),该重链可变区包括重链CDR(HCDR)1-3,并且每条轻链包括轻链可变区(LCVR1),该轻链可变区包括轻链CDR(LCDR)1-3,其中HCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO:1,HCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO:2,HCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO:3,LCDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO:4,LCDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO:5,以及LCDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO:6;以及(b)所述警报素受体的胞外结构域,其中氨基酸序列为SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:35,其中每个警报素胞外结构域在每个结构域的氨基酸序列的C-末端处通过多肽接头(L1)与在每个IgG HC的C-末端处的所述IgG抗体连接。在一些实施方式中,其HCDR变体在SEQ ID NO:1-3中具有至多约3、约5、约8、约10、约12或约15个氨基酸取代、添加和/或缺失。

[0144] 在一些实施方式中,本公开的双特异性结合蛋白包括多肽接头(L1和/或L2),接头具有与选自下表中序列之一的序列相对应的序列:

[0145]

序列 (N→C)	标识号
VDGASSPVNVSSPSVQDI	SEQ ID NO: 21
VDGASSPVNVGSPSVQDI	SEQ ID NO: 22

[0146]

GASSPVNVSSPSV	SEQ ID NO: 23
GGGGSGGGNGTGSGGGGS	SEQ ID NO: 24
LSAGGHGGLDNDTSAFHL	SEQ ID NO: 25
SDKTHTSPPSPAPESSGG	SEQ ID NO: 26
VTTTDFQIQTEMAATMET	SEQ ID NO: 27
DFLPTTAQPTKKSTLKKR	SEQ ID NO: 28
TESRSPPAENEVSTPMQA	SEQ ID NO: 29
GGGGSGGGNGSGSGGGGS	SEQ ID NO: 30
GGGGSGGGSGGGSGGGGS	SEQ ID NO: 31

[0147] 在本发明双特异性结合蛋白的进一步实施方式中,每个HC的氨基酸序列为SEQ ID NO:32,每个LC的氨基酸序列为SEQ ID NO:33。在本发明双特异性结合蛋白的仍进一步实施方式中,多肽接头L1具有SEQ ID NO:30的序列。

[0148] 在本发明的双特异性结合蛋白的一些实施方式中,每个LC的氨基酸序列是SEQ ID NO:33。在另一个实施方式中,每个HC的氨基酸序列可以是选自SEQ ID NO:60-75中的任一个。

[0149] 在一些实施方式中,可用于本文所公开的方法的抗IL17RB IgG组成双特异性结合蛋白是IgA、IgD、IgE、IgG或IgM抗体。在一些实施方式中,抗体是IgA抗体。在一些实施方式中,抗体是IgD抗体。在一些实施方式中,抗体是IgE抗体。在一些实施方式中,抗体是IgG抗体。在一些实施方式中,抗体是IgM抗体。在一些实施方式中,本文提供的抗体可以是IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体或IgG4抗体。在一些实施方式中,抗体是IgG1抗体。在一些实施方式中,抗体是IgG2抗体。在一些实施方式中,抗体是IgG3抗体。在一些实施方式中,抗体是IgG4抗体。在某些实施方式中,抗体包括重链恒定区,如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区,或任何以上恒定区,其糖基化位点和/或糖基化位点上的糖型被修饰。

[0150] 在一些实施方式中,本文公开的方法中使用的双特异性结合蛋白的抗IL17RB结合部分是以与IgA、IgD、IgE、IgG或IgM抗体恒定区融合的单结构域抗体(sdAb)、重链抗体(HCAb)、Fv、单链可变片段(scFv)或(scFv)2形式。在一些实施方式中,抗体是IgA抗体。在一些实施方式中,抗体是IgD抗体。在一些实施方式中,抗体是IgE抗体。在一些实施方式中,抗体是IgG抗体。在一些实施方式中,抗体是IgM抗体。在一些实施方式中,本文提供的抗体可以是IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体或IgG4抗体。在一些实施方式中,抗体是IgG1抗体。在一些实施方式中,抗体是IgG2抗体。在一些实施方式中,抗体是IgG3抗体。在一些实施方式中,抗体是IgG4抗体。在某些实施方式中,抗体包括重链恒定区,如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区,或任何以上恒定区,其糖基化位点和/或糖基化位点上的糖型被修饰。

[0151] 在一些实施方式中,本文公开的方法中使用的是抗警报素抗体的抗原结合片段。在一些实施方式中,本文提供的抗原结合片段可以是单结构域抗体(sdAb)、重链抗体(HCAb)、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、单链可变片段(scFv)或(scFv)2。在一些实施方式中,抗警报素抗体的抗原结合片段是单结构域抗体(sdAb)。在一些实施方式中,抗警报素抗体的抗原结合片段是重链抗体(HCAb)。在一些实施方式中,抗警报素抗体的抗原结合片段是Fab。

在一些实施方式中,抗警报素抗体的抗原结合片段是Fab'。在一些实施方式中,抗警报素抗体的抗原结合片段是F(ab')2。在一些实施方式中,抗警报素抗体的抗原结合片段是Fv。在一些实施方式中,抗警报素抗体的抗原结合片段是scFv。在一些实施方式中,抗警报素抗体的抗原结合片段是二硫键连接的scFv[(scFv)2]。在一些实施方式中,抗警报素抗体的抗原结合片段是二抗体(dAb)。在进一步实施方式中,抗警报素抗原结合片段中和警报素的活性,包括IL-25、IL-33和TSLP。

[0152] 术语"活性"包括例如以特异性结合靶蛋白的能力、抗体或结合蛋白对蛋白的亲和力、中和靶蛋白生物活性的能力、抑制靶蛋白与其天然受体或天然配体相互作用的能力的特性。

[0153] 在一些实施方式中,本文公开的方法中使用的是重组抗IL17RB/抗TSLP双特异性抗体。在一些实施方式中,本文公开的方法中使用的是重组抗IL17RB/抗IL33双特异性抗体。在一些实施方式中,本文公开的方法中使用的是重组抗IL17RB/抗TSLP受体双特异性结合蛋白。在一些实施方式中,本文公开的方法中使用的是重组抗IL17RB/抗IL33受体双特异性结合蛋白。

[0154] 在一些实施方式中,本文提供的IgG组成双特异性结合蛋白是嵌合抗体。在一些实施方式中,本文提供的IgG组成双特异性结合蛋白是人源化抗体。在一些实施方式中,本文提供的IgG组成双特异性结合蛋白是人类抗体。在一些实施方式中,本文提供的scFv组成双特异性结合蛋白是嵌合scFv。在一些实施方式中,本文提供的scFv组成双特异性结合蛋白是人源化scFv。在一些实施方式中,本文提供的scFv组成双特异性结合蛋白是人scFv。在一些实施方式中,本文提供的方法中使用的双特异性结合蛋白是分离的。在一些实施方式中,本文所提供的方法中使用的双特异性结合蛋白基本上是纯的。

[0155] 生成人源化抗体和scFv的各种方法是本领域已知的。本领域已知实现与人源化抗体的高亲和力结合的方法。这种方法的一个非限制性实例是可变区的超突变和选择表达这种高亲和力抗体的细胞(亲和力成熟)。除了使用展示文库之外,指定抗原(如重组IL17RB或其表位)还可用于免疫非人类动物,如啮齿动物。在某些实施方式中,啮齿动物抗原结合片段(如小鼠抗原结合片段)可以使用本领域已知的方法和/或本文公开的方法生成和分离。在一些实施方式中,可以用抗原(如重组IL17RB或其表位)免疫小鼠。

[0156] 人类抗体和scFv可以使用本领域已知的各种技术制备。在一些实施方式中,人类抗体由体外免疫的永生化人B淋巴细胞生成。在一些实施方式中,人类抗体由从免疫个体中分离的淋巴细胞生成。在任何情况下,都可以生成和分离产生针对靶抗原的抗体的细胞。在一些实施方式中,人类抗体选自噬菌体文库,其中噬菌体文库表达人类抗体。可选地,也可以使用噬菌体展示技术,从未免疫的供体的免疫球蛋白可变区基因库中体外产生人类抗体和抗体片段。抗体噬菌体文库的生成和使用的技术是本领域众所周知的。一旦确定了抗体,就可以采用本领域已知的亲和力成熟策略(包括但不限于链改组和定点诱变)生成亲和力更高的人类抗体。在一些实施方式中,人类抗体在含有人类免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中产生。免疫接种后,这些小鼠能够在没有内源免疫球蛋白产生的情况下产生完整的人类抗体库。

[0157] 在一些实施方式中,本文提供的方法中使用的IgG组成双特异性结合蛋白包含单价抗原结合位点。在一些实施方式中,IgG组成双特异性结合蛋白包含单特异性结合位点。

在一些实施方式中,IgG组成双特异性结合蛋白包含双价结合位点。在一些实施方式中,本文所提供的方法中使用的scFv组成双特异性结合蛋白包含单价抗原结合位点。在一些实施方式中,scFv组成双特异性结合蛋白包含单特异性结合位点。在一些实施方式中,scFv组成双特异性结合蛋白包括双价结合位点。

[0158] 在一些实施方式中,本文提供的方法中使用的IgG组成双特异性结合蛋白是SM17。术语“SM17”是指针对人IL17RB(hIL17RB)的人源化抗体。SM17的序列特征在下表中提供。SM17结构和功能特征的额外描述可参见WO2020115319A1,其全文通过引用并入本文。SM17的HC序列是SEQ ID NO:32。SM17的LC序列是SEQ ID NO:32。SM17 HCDR1的氨基酸序列是SEQ ID NO:1,SM17 HCDR2的氨基酸序列是SEQ ID NO:2,SM17 HCDR3的氨基酸序列是SEQ ID NO:3,SM17 LCDR1的氨基酸序列是SEQ ID NO:4,SM17 LCDR2的氨基酸序列是SEQ ID NO:5,以及SM17 LCDR3的氨基酸序列是SEQ ID NO:6。

[0159] 在一些实施方式中,可用于本文所提供方法的IgG组成双特异性结合蛋白包含SM17的一个、两个、三个、四个、五个和/或六个CDR。在一些实施方式中,IgG组成双特异性结合蛋白包含VL,该VL包含SM17的一个、两个和/或三个VL CDR。在一些实施方式中,本文提供的IgG组成双特异性结合蛋白包含VH,该VH包含SM17的一个、两个和/或三个VH CDR。在一些实施方式中,本文提供的IgG组成双特异性结合蛋白包含SM17的一个、两个和/或三个VL CDR和一个、两个和/或三个VH CDR。

[0160] 本领域众所周知,VH CDR3和VL CDR3结构域在抗体与抗原的结合特异性/亲和力方面起着重要作用。因此,在一些实施方式中,可用于本文所公开方法的其IgG组成双特异性结合蛋白可与人IL17RB具有适当的缔合/解离动力学,并具有与SM17的VH CDR3和VL CDR3结构相同或相关的VH CDR3和VL CDR3。包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的SM17VL CDR3的共有基序可通过取代一个或多个氨基酸进行修饰,以在不改变其结合特异性的情况下调整抗体亲和力,或者可选地通过表现出与SM17VL CDR3足够相似性的无关人类抗体的VL CDR3进行取代,这使用如中国专利号ZL200880024788.2所述的标准,其通过引用并入本文。类似地,包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的SM17VH CDR3的共有基序可通过取代一个或多个氨基酸进行修饰,以在不改变其结合特异性的情况下调整抗体亲和力,或者可选地通过表现出与SM17VH CDR3足够相似性的无关人类抗体的VHCDR3进行取代,这使用如中国专利号ZL200880024788.2所述的标准,其通过引用并入本文。

[0161] 本领域技术人员会明白,CDR3结构域中氨基酸的某些取代不会改变抗体的表位特异性,特别是用保守氨基酸的取代。因此,在一些实施方式中,本文提供的抗体或抗原结合片段(例如SM17或)的CDR3可用来自人类或灵长类抗体的CDR3置换,其:(1)与SM17CDR3的残基数目相同,并且表现出50%或更高的序列同源性;(2)含有至少一个,优选多个,与SM17CDR3中相应位置处的残基相同或保守相似的芳香族残基;(3)含有至少一个,优选多个,与SM17CDR3中相应位置处的残基相同或保守相似的带电残基;和/或(4)含有至少一个,优选多个,与SM17CDR3中相应位置处的残基相同或保守相似的氨基酸残基,该位置已知对维持抗IL17RB抗体的结合位点结构/接触非常重要,如通过晶体结构和/或计算机数据库分析确定的。在一些实施方式中,对SM17 VL和/或VH CDR3结构域进行不超过一个至五个保守氨基酸取代,或使用含有不超过一个至五个保守相似残基的无关灵长类或人类抗体的VL和/或VH CDR3来置换SM17的VL和/或VH CDR3。在一些实施方式中,在SM17 VL和/或VH CDR3

结构域内进行不超过一个至三个保守氨基酸取代,或使用含有不超过一个至三个保守相似残基的无关灵长类或人类抗体的VL和/或VH CDR3来置换SM17的VL和/或VH CDR3。

[0162] 在一些实施方式中,本文所提供的方法中使用的IgG组成双特异性结合蛋白特异性地与IL17RB结合,该IL17RB包含与SEQ ID NO:33的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的VL。在一些实施方式中,本文提供的方法中使用的IgG组成双特异性结合蛋白与IL17RB特异性结合,该IL17RB包含与SEQ ID NO:32的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的VH。在一些实施方式中,本文提供的方法中使用的IgG组成双特异性结合蛋白特异性结合IL17RB,该IL17RB包含:(a)与SEQ ID NO:33的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的VL;和(b)与SEQ ID NO:32的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的VH。

[0163] 在一些实施方式中,本文所提供方法中使用的IgG组成双特异性结合蛋白特异性地与包含VL的IL17RB结合,其中VL与SEQ ID NO:33具有至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。在一些实施方式中,本文提供的方法中使用的IgG组成双特异性结合蛋白具有与SEQ ID NO:33具有至少85%的序列同一性的VL。在一些实施方式中,本文提供的方法中使用的IgG组成双特异性结合蛋白具有与SEQ ID NO:33具有至少90%的序列同一性的VL。在一些实施方式中,本文提供的方法中使用的IgG组成双特异性结合蛋白具有与SEQ ID NO:33具有至少95%的序列同一性的VL。在一些实施方式中,本文提供的方法中使用的IgG组成双特异性结合蛋白具有与SEQ ID NO:33具有至少98%的序列同一性的VL。在一些实施方式中,本文提供的方法中使用的IgG组成双特异性结合蛋白特异性结合IL17RB,该IL17RB包含具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VL。

[0164] 在一些实施方式中,本文所提供方法中使用的IgG组成双特异性结合蛋白与包含VH的IL17RB特异性结合,其中该VH与SEQ ID NO:32具有至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。在一些实施方式中,本文提供的方法中使用的IgG组成双特异性结合蛋白具有与SEQ ID NO:32具有至少85%序列同一性的VH。在一些实施方式中,本文提供的方法中使用的IgG组成双特异性结合蛋白具有与SEQ ID NO:32具有至少90%序列同一性的VH。在一些实施方式中,本文提供的方法中使用的IgG组成双特异性结合蛋白具有与SEQ ID NO:32具有至少95%序列同一性的VH。在一些实施方式中,本文提供的方法中使用的IgG组成双特异性结合蛋白具有与SEQ ID NO:32具有至少98%序列同一性的VH。在一些实施方式中,本文提供的方法中使用的IgG组成双特异性结合蛋白特异性结合IL17RB,该IL17RB包含具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH。

[0165] 在一些实施方式中,其IgG组成双特异性结合蛋白特异性结合包含VL和VH的IL17RB,其中VL和VH分别具有SEQ ID NO:32和33的氨基酸序列。特异性结合IL17RB的其IgG组成双特异性结合蛋白可以包含本文公开的任何VL和本文公开的任何VH的组合。

[0166] 在一些实施方式中,其IgG组成双特异性结合蛋白特异性结合IL17RB,该IL17RB包含:(a)VL,该VL包含来自具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VL的VL CDR1、2和3;和/或(b)VH,该VH包含来自具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH的VH CDR1、2和3。

[0167] 在一些实施方式中,其IgG组成双特异性结合蛋白特异性结合IL17RB,该IL17RB包含VL,其中VL包含来自具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VL的VL CDR 1、2和3。

[0168] 在一些实施方式中,其IgG组成双特异性结合蛋白特异性结合IL17RB,该IL17RB包含VH,其中VH包含来自具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH的VH CDR 1、2和3。

[0169] 在一些实施方式中,其IgG组成双特异性结合蛋白特异性结合IL17RB,该IL17RB包含VL和VH,其中VL包含来自具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VL的VL CDR1、CDR2和CDR3,并且VH包含来自具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH的VH CDR1、CDR2和CDR3。

[0170] 在一些实施方式中,本文提供的其IgG组成双特异性结合蛋白是SM17的变体。SM17变体可以具有VL,该VL是在SEQ ID NO:33中具有至多约5个氨基酸取代、添加和/或缺失的SM17的VL的变体。SM17变体可以具有VH,该VH是在SEQ ID NO:32中具有至多约5个氨基酸取代、添加和/或缺失的SM17的VH的变体。氨基酸取代、添加和/或缺失可以是在VH CDR或VL CDR中。在一些实施方式中,氨基酸取代、添加和/或缺失不在CDR中。在一些实施方式中,SM17的变体具有至多约5个保守氨基酸取代。在一些实施方式中,SM17的变体具有至多3个保守氨基酸取代。

[0171] 在一些实施方式中,可用于本文所公开方法的IgG组成双特异性结合蛋白包含具有至少一个框架(FR)区的VH或VL。在一些实施方式中,VL的FR一(FR1)区可来自VκID人类种系家族,VL的FR二(FR2)区可来自Vκ1人类种系家族,VL的FR三(FR3)区可来自Vκ1人类种系家族,VL的FR四(FR4)区可来自VκJ1人类种系家族。在一些实施方式中,VL的FR1、FR2、FR3和FR4可以分别具有SEQ ID NO:36、37、38和39的氨基酸序列(WO2020115319A1中所示的框架序列通过引用并入本文)。在一些实施方式中,VH的框架一(FR1)区可以来自V_H 3人类种系家族;VH的框架二(FR2)区可以来自V_H3人类种系家族;VH的框架三(FR3)区可以来自V_H 3人类种系家族;以及VH的框架四(FR4)区可以来自V_H J5人类种系家族。在一些实施方式中,VH的FR1、FR2、FR3和FR4可分别具有SEQ ID NO:40、41、42和43的氨基酸序列(WO2020115319A1中所示的框架序列)。

[0172] 本公开进一步考虑了与本文所述重组抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人类抗体或其抗体片段基本同源的额外变体和等效物。在一些实施方式中,期望提高抗体的结合亲和力。在一些实施方式中,期望调节抗体的生物学特性,包括但不限于特异性、恒温性、表达水平、效应功能(一种或多种)、糖基化、免疫原性和/或溶解性。本领域技术人员将明白,氨基酸改变可能会改变抗体的翻译后过程,如改变糖基化位点的数量或位置,或改变膜锚定特性。

[0173] 变异可以是编码抗体或多肽的一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入,其导致氨基酸序列与原生抗体或多肽序列相比发生变化。在一些实施方式中,氨基酸取代是用具有相似结构和/或化学性质的另一种氨基酸置换一种氨基酸的结果,例如用丝氨酸置换亮氨

酸,如保守氨基酸置换。插入或缺失可以在约1至5个氨基酸的范围内。在一些实施方式中,相对于亲本分子,取代、缺失或插入包括小于25个氨基酸取代、小于20个氨基酸取代、小于15个氨基酸取代、小于10个氨基酸取代、小于5个氨基酸取代、小于4个氨基酸取代、小于3个氨基酸取代或小于2个氨基酸取代。在一些实施方式中,可通过在序列中系统地进行插入、缺失或取代,并测试所得变体蛋白与亲本蛋白相比的活性,来确定氨基酸序列中在生物学上有用的和/或相关的变异。

[0174] 本领域中已知,抗体的恒定区介导多种效应功能,并且这些效应功能可取决于抗体的同种型而不同。例如,补体的C1组分与IgG或IgM抗体(与抗原结合)的Fc区结合激活补体系统。补体激活对细胞病原体的调理和裂解是重要的。补体的激活也刺激炎症反应,并可以参与自身免疫超敏反应。此外,抗体的Fc区可与表达Fc受体(FcR)的细胞结合。有几种Fc受体对不同类别的抗体具有特异性,包括IgG(γ受体)、IgE(ε受体)、IgA(α受体)和IgM(μ受体)。抗体与细胞表面上的Fc受体结合触发许多重要且多样的生物反应,包括抗体包被颗粒的吞噬和破坏、免疫复合物的清除、杀伤细胞对抗体包被靶细胞的裂解(称为抗体依赖性细胞毒性或ADCC)、炎症介质的释放、胎盘转移以及免疫球蛋白产生的控制。在一些实施方式中,本文所述的双特异性结合蛋白包含人IgA抗体的至少一个恒定区。在一些实施方式中,本文所述的双特异性结合蛋白包含人IgD抗体的至少一个恒定区。在一些实施方式中,本文所述的双特异性结合蛋白包含人IgE抗体的至少一个恒定区。在一些实施方式中,本文所述的双特异性结合蛋白包含人IgG抗体的至少一个恒定区。在一些实施方式中,本文所述的双特异性结合蛋白包含人IgM抗体的至少一个恒定区。在一些实施方式中,本文所述的双特异性结合蛋白包含人IgG1抗体的至少一个恒定区。在一些实施方式中,本文所述的双特异性结合蛋白包含人IgG2抗体的至少一个恒定区。在一些实施方式中,本文所述的双特异性结合蛋白包含人IgG3抗体的至少一个恒定区。在一些实施方式中,本文所述的双特异性结合蛋白包含人IgG4抗体的至少一个恒定区。

[0175] 在一些实施方式中,在本文所述的双特异性结合蛋白中,已经修饰或缺失了至少一个或多个恒定区。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白包括对三个重链恒定区(CH1、CH2或CH3)中的一个或多个和/或对轻链恒定区(CL)的修饰。在一些实施方式中,经修饰的双特异性结合蛋白的重链恒定区包括至少一个人类恒定区。在一些实施方式中,经修饰的双特异性结合蛋白的重链恒定区包括超过一个人类恒定区。在一些实施方式中,对恒定区的修饰包括一个或多个区域中一个或多个氨基酸的添加、缺失或取代。

[0176] 在一些实施方式中,从经修饰的双特异性结合蛋白的恒定区中部分或全部缺失了一个或多个区域。在一些实施方式中,整个CH2结构域已从双特异性结合蛋白(ΔCH2构建体)中移除。在一些实施方式中,缺失的恒定区被短氨基酸间隔子置换,该短氨基酸间隔子提供了通常由不存在的恒定区所赋予的一些分子灵活性。在一些实施方式中,经修饰的双特异性结合蛋白包括直接融合到双特异性结合蛋白的铰链区的CH3结构域。在一些实施方式中,经修饰的双特异性结合蛋白包括插入铰链区和经修饰的CH2和/或CH3结构域之间的肽间隔子。

[0177] 在一些实施方式中,双特异性结合蛋白包含Fc区。在一些实施方式中,Fc区通过铰链融合。铰链可以是IgG1铰链、IgG2铰链或IgG3铰链。人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的Fc区的氨基酸序列是本领域普通技术人员已知的。在一些情况下,已在原生抗体中鉴定出具有氨基

酸变异的Fc区。在一些实施方式中,经修饰的双特异性结合蛋白(如经修饰的Fc区)提供改变的效应功能,这又影响双特异性结合蛋白的生物特征谱。例如,在一些实施方式中,恒定区的缺失或失活(通过点突变或其他方法)减少经修饰的双特异性结合蛋白在其循环时的Fc受体结合。在一些实施方式中,恒定区修饰降低双特异性结合蛋白的免疫原性。在一些实施方式中,恒定区修饰增加双特异性结合蛋白的血清半衰期。在一些实施方式中,恒定区修饰减少双特异性结合蛋白的血清半衰期。在一些实施方式中,恒定区修饰降低或移除双特异性结合蛋白的ADCC和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。在一些实施方式中,用相应的IgG2或IgG4残基取代人IgG1 Fc区中的特定氨基酸降低经修饰的双特异性结合蛋白的效应功能(如ADCC和CDC)。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白不具有一种或多种效应功能(如"无效应"抗体)。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白没有ADCC活性和/或CDC活性。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白不结合Fc受体和/或补体因子。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白没有效应功能(一种或多种)。在一些实施方式中,恒定区修饰增加或增强双特异性结合蛋白的ADCC和/或CDC。在一些实施方式中,恒定区被修饰以消除二硫键或寡糖部分。在一些实施方式中,恒定区被修饰以添加/取代一个或多个氨基酸,以提供一个或多个细胞毒素、寡糖或碳水化合物附接位点。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白包含变体Fc区,与原生Fc区相比,该变体Fc区在特定氨基酸位置上被工程化取代。在一些实施方式中,本文所述的双特异性结合蛋白包含IgG1重链恒定区,该IgG1重链恒定区包含选自根据欧盟编号K214R、L234A、L235E、G237A、D356E和L358M的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方式中,IgG1重链恒定区包含选自根据欧盟编号K214R、L234A、L235E、G237A、A330S、P331S、D356E和L358M的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方式中,IgG1重链恒定区包含选自根据欧盟编号K214R、C226S、C229S和P238S的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方式中,IgG1重链恒定区包含选自根据欧盟编号K214R、D356E和L358M的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方式中,IgG1重链恒定区包含选自根据欧盟编号S131C、K133R、G137E、G138S、Q196K、I199T、N203D、K214R、C226S、C229S和P238S的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方式中,本文所述的双特异性结合蛋白包含IgG2重链恒定区,该IgG2重链恒定区包含选自V234A、G237A、P238S、H268A、V309L、A330S和P331S的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方式中,本文所述的双特异性结合蛋白包含IgG4重链恒定区,该IgG4重链恒定区包含选自S228P、L234A和L235A的一个或多个氨基酸取代。

[0178] 在一些实施方式中,变体可包括在抗体或多肽的氨基和/或羧基末端处添加氨基酸残基。额外的氨基酸残基的长度的范围可从一个残基到一百个或更多个残基。在一些实施方式中,变体包括N末端甲硫氨酰残基。在一些实施方式中,变体包括额外的多肽/蛋白质(如Fc区),以产生融合蛋白。在一些实施方式中,变体被工程化以可检测,并且可包括可检测的标记和/或蛋白质(如荧光标签或酶)。

[0179] 本文所述的变体抗体或抗原结合片段可使用本领域已知的方法产生,其包括但不限于定点诱变、丙氨酸扫描诱变和PCR诱变。

[0180] 在一些实施方式中,本文所公开的IgG组成双特异性结合蛋白的变体可保留与亲本抗体或抗原结合片段相似程度、相同程度或更高程度的与IL17RB结合的能力。在一些实施方式中,变体的氨基酸序列可与亲本抗体或抗原结合片段至少约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更高相同。在某

些实施方式中,IgG组成双特异性结合蛋白的变体包括具有一个或多个保守氨基酸取代的IgG组成双特异性结合蛋白的亲本的氨基酸序列。保守氨基酸取代在本领域是已知的,并且包括这样的氨基酸取代,其中将具有某些物理和/或化学特性的一种氨基酸更换为具有相同或相似化学或物理特性的另一种氨基酸。

[0181] 在一些实施方式中,双特异性结合蛋白的变体包括具有一个或多个非保守氨基酸取代的亲本抗体或抗原结合片段的氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白的变体包括具有一个或多个非保守氨基酸取代的亲本结合抗体或抗原结合片段的氨基酸序列,其中一个或多个非保守氨基酸取代不干扰或抑制变体的一个或多个生物活性(例如,IL17RB结合)。在某些实施方式中,一个或多个保守氨基酸取代和/或一个或多个非保守氨基酸取代可增强变体的生物活性,从而使功能变体的生物活性与亲本结合部分相比提高。

[0182] 在一些实施方式中,本文所述的双特异性结合蛋白天然或通过干预进行化学修饰。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白已通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/阻断基团的衍生化、蛋白水解裂解和/或与细胞配体或其他蛋白质的连接进行了化学修饰。众多化学修饰中的任何一种都可以通过已知技术进行。双特异性结合蛋白可包括一种或多种氨基酸类似物(包括,例如非天然氨基酸),以及本领域已知的其他修饰。

[0183] 本公开的双特异性结合蛋白可通过本领域已知的各种方法分析其物理、化学和/或生物特性。在一些实施方式中,检测双特异性结合蛋白与2种不同警报素(如人IL17RB和TSLP)结合的能力。结合测定包括但不限于表面等离子体共振(如BIAcore)、ELISA和FACS。在一些实施方式中,结合剂(如抗体)与警报素的解离常数是由表面等离子体共振(如BIAcore)确定的解离常数。此外,还可对抗体的溶解度、稳定性、热稳定性、粘度、表达水平、表达质量和/或纯化效率进行评估。

[0184] SM17与人IL17RB以约1pM的解离常数(K_D)结合。在一些实施方式中,本文公开的方法中使用的双特异性结合蛋白与IL17RB(如人IL17RB)结合的解离常数(K_D)为约100nM或更少、约40nM或更少、约20nM或更少、约10nM或更少、约1nM或更少、约0.1nM或更少、50pM或更少、10pM或更少、或1pM或更少。在一些实施方式中,K_D为约20nM或更少。在一些实施方式,K_D为约10nM或更少。在一些实施方式中,K_D为约5nM或更少。在一些实施方式中,K_D为约2nM或更少。在一些实施方式中,K_D为约1.5nM或更少。在一些实施方式中,K_D为约1nM或更少。在一些实施方式中,K_D为约0.5nM或更少。在一些实施方式中,K_D为约0.1nM或更少。在一些实施方式中,K_D为约50pM或更少。在一些实施方式中,K_D为约10pM或更少。

[0185] 在一些实施方式中,双特异性结合蛋白与IL17RB(如人IL17RB)结合的K_D在0.1-1nM、0.5-5nM、1-10nM、1-5nM、5-50nM、10-100nM或50-500nM的范围内。在一些实施方式中,K_D在0.1-1nM的范围内。在一些实施方式中,K_D在0.5-5nM的范围内。在一些实施方式中,K_D在1-10nM的范围内。在一些实施方式中,K_D在1-5nM的范围内。在一些实施方式中,K_D在5-50nM的范围内。在一些实施方式中,K_D在10-100nM的范围内。在一些实施方式中,K_D在50-500nM的范围内。

[0186] 在一些实施方式中,本文公开的方法中使用的双特异性结合蛋白与IL17RB(例如,人IL17RB)结合,其缔合常数(K_A)为约$0.8x10^9\ M^{-1}$。在一些实施方式中,本文公开的方法中使用的双特异性结合蛋白与IL17RB(例如,人IL17RB)结合,其缔合常数(K_A)为约$1\times10^6M^{-1}$

或更高、约$1\times10^{7}M^{-1}$或更高、约$1\times10^{8}M^{-1}$或更高、约$5\times10^{8}M^{-1}$或更高、约$8\times10^{8}M^{-1}$或更高、约$1\times10^{9}M^{-1}$或更高、约$5\times10^{9}M^{-1}$或更高、约$1\times10^{10}M^{-1}$或更高、约$5\times10^{10}M^{-1}$或更高、约$1\times10^{11}M^{-1}$或更高、约$5\times10^{11}M^{-1}$或更高、或约$1\times10^{12}M^{-1}$或更高。在一些实施方式中,K_A为约$1\times10^{7}M^{-1}$或更高。在一些实施方式中,K_A为约$5\times10^{7}M^{-1}$或更高。在一些实施方式中,K_A为约$1\times10^{8}M^{-1}$或更高。在一些实施方式中,K_A为约$5\times10^{8}M^{-1}$或更高。在一些实施方式中,K_A为约$8\times10^{8}M^{-1}$或更高。在一些实施方式中,K_A为约$1\times10^{9}M^{-1}$或更高。在一些实施方式中,K_A为约$5\times10^{9}M^{-1}$或更高。在一些实施方式中,K_A为约$1\times10^{10}M^{-1}$或更高。

[0187] 在一些实施方式中,本文公开的方法中使用的双特异性结合蛋白与IL17RB(如人IL17RB)结合,其K_A在约1×10^{6}-$1\times10^{7}M^{-1}$、5×10^{6}-$5\times10^{7}M^{-1}$、1×10^{7}-$1\times10^{8}M^{-1}$、5×10^{7}-$5\times10^{8}M^{-1}$、1×10^{8}-$5\times10^{8}M^{-1}$、1×10^{8}-$1\times10^{9}M^{-1}$、5×10^{8}-$1\times10^{9}M^{-1}$、5×10^{8}-$5\times10^{9}M^{-1}$、1×10^{9}-$1\times10^{10}M^{-1}$、5×10^{9}-$5\times10^{10}M^{-1}$、1×10^{10}-$1\times10^{11}M^{-1}$、5×10^{10}-$5\times10^{11}M^{-1}$、1×10^{11}-$1\times10^{12}M^{-1}$或5×10^{11}-$5\times10^{12}M^{-1}$的范围内。在一些实施方式中,K_A在约1×10^{6}-$1\times10^{7}M^{-1}$的范围内。在一些实施方式中,K_A在约1×10^{7}-$1\times10^{8}M^{-1}$的范围内。在一些实施方式中,K_A在约1×10^{8}-$1\times10^{9}M^{-1}$的范围内。在一些实施方式中,K_A在约5×10^{8}-$1\times10^{9}M^{-1}$的范围内。在一些实施方式中,K_A在约5×10^{8}-$5\times10^{9}M^{-1}$的范围内。在一些实施方式中,K_A在约1×10^{9}-$1\times10^{10}M^{-1}$的范围内。

[0188] 在一些实施方式中,本文公开的方法中使用的双特异性结合蛋白与人IL17RB解离,其kd为$1.38\times10^{-7}s^{-1}$或更少,如由Octet(如生物层干涉测量法)确定的。在一些实施方式中,本文公开的方法中使用的双特异性结合蛋白与人IL17RB解离,其kd为约$5\times10^{-4}s^{-1}$或更少、约$1\times10^{-4}s^{-1}$或更少、约$2\times10^{-5}s^{-1}$或更少、约$4\times10^{-6}s^{-1}$或更少、约$8\times10^{-7}s^{-1}$或更少、约$2\times10^{-7}s^{-1}$或更少、约$4\times10^{-8}s^{-1}$或更少。在一些实施方式中,本文公开的方法中使用的双特异性结合蛋白与人IL17RB解离,其kd为约$5\times10^{-4}s^{-1}$或更少。在一些实施方式中,kd为约$1\times10^{-4}s^{-1}$或更少。在一些实施方式中,kd为约$2\times10^{-5}s^{-1}$或更少。在一些实施方式中,kd为约$4\times10^{-6}s^{-1}$或更少。在一些实施方式中,kd为约$8\times10^{-7}s^{-1}$或更少。在一些实施方式中,kd为约$2\times10^{-7}s^{-1}$或更少。在一些实施方式中,kd为约$4\times10^{-8}s^{-1}$或更少。

[0189] 表位作图是一种鉴定双特异性结合蛋白结合的靶蛋白上的结合位点、区域或表位的方法。本领域已知有多种作图靶蛋白上表位的方法。这些方法包括但不限于鸟枪法诱变、定点诱变和丙氨酸扫描;结构域或片段扫描;肽扫描(如Pepscan技术);展示方法(如噬菌体展示、微生物展示和核糖体/mRNA展示);涉及蛋白质水解和质谱的方法;以及结构测定(如X射线晶体学和NMR)。在一些实施方式中,本文所述的双特异性结合蛋白通过包括但不限于N-末端测序、氨基酸分析、HPLC、质谱法、离子交换色谱法和木瓜蛋白酶消化的测定进行表征。

[0190] 在一些实施方式中,可用于本文所公开方法的双特异性结合蛋白可结合该构象表位,其K_A为约$0.8x10^{9}\ M^{-1}$。在一些实施方式中,本文所公开方法中使用的双特异性结合蛋白可结合该构象表位,其K_A为约$1\times10^{7}M^{-1}$或更高、约$1\times10^{8}M^{-1}$或更高、约$5\times10^{8}M^{-1}$或更高、约$1\times10^{9}M^{-1}$或更高、约$5\times10^{9}M^{-1}$或更高、约$1\times10^{10}M^{-1}$或更高、约$5\times10^{10}M^{-1}$或更高、约$1\times10^{11}M^{-1}$或更高、约$5\times10^{11}M^{-1}$或更高、或约$1\times10^{12}M^{-1}$或更高。在一些实施方式中,K_A为约$5\times10^{7}M^{-1}$或更高。在一些实施方式中,K_A为约$1\times10^{8}M^{-1}$或更高。在一些实施方式中,K_A为约$5\times10^{8}M^{-1}$或更高。在一些实施方式中,K_A为约$8\times10^{8}M^{-1}$或更高。在一些实施方式中,K_A为约$1\times10^{9}M^{-1}$或更高。在一些实施方式中,K_A为约$5\times10^{9}M^{-1}$或更高。在一些实施方式中,本文公开的方法中使

用的双特异性结合蛋白与该构象表位结合,其K_A在约1×10^6-$1\times10^7M^{-1}$、5×10^6-$5\times10^7M^{-1}$、1×10^7-$1\times10^8M^{-1}$、5×10^7-$5\times10^8M^{-1}$、1×10^8-$5\times10^8M^{-1}$、1×10^8-$1\times10^9M^{-1}$、5×10^8-$1\times10^9M^{-1}$、5×10^8-$5\times10^9M^{-1}$、1×10^9-$1\times10^{10}M^{-1}$、5×10^9-$5\times10^{10}M^{-1}$、1×10^{10}-$1\times10^{11}M^{-1}$、5×10^{10}-$5\times10^{11}M^{-1}$、1×10^{11}-$1\times10^{12}M^{-1}$或5×10^{11}-$5\times10^{12}M^{-1}$的范围内。在一些实施方式中,K_A在约1×10^6-$1\times10^7M^{-1}$的范围内。在一些实施方式中,K_A在约1×10^6-$1\times10^7M^{-1}$的范围内。在一些实施方式中,K_A在约1×10^7-$1\times10^8M^{-1}$的范围内。在一些实施方式中,K_A在约1×10^8-$1\times10^9M^{-1}$的范围内。在一些实施方式中,K_A在约5×10^8-$1\times10^9M^{-1}$的范围内。在一些实施方式中,K_A在约5×10^8-$5\times10^9M^{-1}$的范围内。在一些实施方式中,K_A在约1×10^9-$1\times10^{10}M^{-1}$的范围内。

[0191] 在一些实施方式中,本文提供的是一种双特异性结合蛋白,其可与另一种双特异性结合蛋白(如人IL17RB)竞争结合至警报素。“与另一种抗体竞争结合至靶标”的双特异性结合蛋白是指(部分或完全)抑制另一种双特异性结合蛋白与同一靶标结合的双特异性结合蛋白。是否相互竞争结合至靶标,即一种双特异性结合蛋白是否以及在多大程度上抑制另一种双特异性结合蛋白与靶标结合,可使用已知的竞争实验,如生物层干涉动力学分析来确定。在一些实施方式中,组成双特异性结合蛋白竞争,并抑制另一种双特异性结合蛋白与警报素(如人IL17RB)的结合至少50%、60%、70%、80%、90%或100%。竞争测定可按例如Ed Harlow和David Lane,Cold Spring Harb Protoc;2006;doi:10.H01/pdb.prot4277中或Ed Harlow和David Lane的“Using Antibodies”的Chapter 11,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY,USA1999中所述进行。

[0192] 在一些实施方式中,本文公开的方法中使用的双特异性结合蛋白与肾癌细胞(例如TK-10细胞)上与天然IL17RB结合的放射性标记的I^{125}-SM17竞争,EC_{50}为约0.1μg/ml或更低、约0.2μg/ml或更低、约0.5μg/ml或更低、约0.8μg/ml或更低、约1μg/ml或更低、约2μg/ml或更低、约5.0μg/ml或更低、约8μg/ml或更低、约10μg/ml或更低,或约50μg/ml或更低。在一些实施方式中,EC_{50}为约0.1μg/ml或更低。在一些实施方式中,EC_{50}为约0.2μg/ml或更低。在一些实施方式中,EC_{50}为约0.5μg/ml或更低。在一些实施方式中,EC_{50}为约1μg/ml或更低。在一些实施方式中,EC_{50}为约2μg/ml或更低。在一些实施方式中,EC_{50}为约5μg/ml或更低。在一些实施方式中,EC_{50}为约10μg/ml或更低。在一些实施方式中,本文公开的方法中使用的双特异性结合蛋白与肾癌细胞(例如TK-10细胞)上与天然IL17RB结合的放射性标记的I^{125}-SM17竞争,EC_{50}在约0.1-50μg/ml、约0.1-10μg/ml、约0.1-5μg/ml、约0.5-10μg/ml、约0.5-5μg/ml、约1-10μg/ml或约1-5μg/ml的范围内。在一些实施方式中,EC_{50}在约0.1-50μg/ml的范围内。在一些实施方式中,EC_{50}在约0.1-10μg/ml的范围内。在一些实施方式中,EC_{50}在约0.1-5μg/ml的范围内。在一些实施方式中,EC_{50}在约0.5-10μg/ml的范围内。在一些实施方式中,EC_{50}在约0.5-5μg/ml的范围内。在一些实施方式中,EC_{50}在约1-10μg/ml的范围内。在一些实施方式中,EC_{50}在约1-5μg/ml的范围内。

[0193] 在一些实施方式中,本文提供的双特异性结合蛋白可以衍生化或与另一种功能分子(如另一种肽或蛋白质)连接,并用于本文公开的方法中。因此,在一些实施方式中,本文公开的方法中使用的抗体和抗原结合片段包括本文所述的人抗IL17RB抗体的衍生化和以其他方式修饰的形式,包括免疫粘附分子。例如,抗体和抗原结合片段可以(通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或引入适用于位点特异性缀合的人工氨基酸/官能团)与一个或多个其他分子实体进行功能连接,所述其他分子实体如另一种抗体(如:双特异性抗体或二抗

体)、可检测剂、细胞毒剂、药剂和/或可介导抗体或抗原结合片段与另一种分子(如链霉亲和素核心区或聚组氨酸标签)缔合的蛋白质或肽。

[0194] 在一些实施方式中,本文所述的双特异性结合蛋白与可检测物质或分子缀合,使该试剂用于诊断和/或检测。可检测物质还可包括但不限于酶,如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、β-半乳糖苷酶和乙酰胆碱酯酶;辅基,如生物素和黄素(一种或多种);荧光材料,如伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、罗丹明、异硫氰酸四甲基罗丹明(TRITC)、二氯三嗪基胺荧光素、丹酰氯、花青(Cy3)、5-二甲胺-1-萘磺酰氯和藻红素;生物发光材料,如荧光素酶;放射性材料,如^{212}Bi、^{14}C、^{57}Co、^{51}Cr、^{67}Cu、^{18}F、^{68}Ga、^{67}Ga、^{153}Gd、^{159}Gd、^{68}Ge、^{3}H、^{166}Ho、^{131}I、^{125}I、^{123}I、^{121}I、^{115}In、^{113}In、^{112}In、^{111}In、^{140}La、^{177}Lu、^{54}Mn、^{99}Mo、^{32}P、^{103}Pd、^{149}Pm、^{142}Pr、^{186}Re、^{188}Re、^{105}Rh、^{97}Ru、^{35}S、^{47}Sc、^{75}Se、^{153}Sm、^{113}Sn、^{117}Sn、^{85}Sr、^{99m}Tc、^{201}Ti、^{133}Xe、^{90}Y、^{69}Yb、^{175}Yb、^{65}Zn;正电子发射金属;和磁性金属离子正电子发射金属;和磁性金属离子。

[0195] 本文所述的双特异性结合蛋白可附接在固体支持物上。此类固体支持物包括但不限于玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。在一些实施方式中,固定化的双特异性结合蛋白用于免疫测定。在一些实施方式中,固定化的IgG组成双特异性结合蛋白用于靶抗原(如人IL17RB)的纯化。

[0196] 产生方法

[0197] 可用于本文所公开方法的双特异性结合蛋白及其抗体包括但不限于双特异性抗体、抗体-警报素受体融合蛋白、单克隆抗体、嵌合抗体、人类抗体和人源化抗体,其可通过本文所公开或本领域另外已知的任何方法制备。抗体产生的方法在本领域是众所周知的。例如,参见Harlow等人,Antibodies:A Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,2nd ed.1988);Hammerling等人,在:Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563,681(Elsevier,N.Y.,1981),其中每篇均通过引用以其全文并入本文。

[0198] 在一些实施方式中,可用于本文所提供方法的双特异性结合蛋白是重组的,即通过重组方式制备、表达、产生或分离。在一些实施方式中,本文公开的双特异性结合蛋白可以通过以下方式制备:例如,将重组表达载体引入宿主细胞、重组体、组合人类抗体库、从转基因人免疫球蛋白基因的动物(如小鼠)中分离的抗体[Taylor,L D等人Nucleic Acids Research,vol.20,23(1992):6287-95]或通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。

[0199] 在一些实施方式中,双特异性结合蛋白可通过在宿主细胞中重组表达免疫球蛋白轻链和重链基因来制备。为了表达双特异性结合蛋白,在宿主细胞中引入一种或多种重组表达载体,这些表达载体携带编码双特异性结合蛋白的免疫球蛋白轻链和重链的DNA片段,从而使轻链和重链在宿主细胞中表达,优选地,分泌到培养宿主细胞的培养基中,可从该培养基中回收双特异性结合蛋白。标准的重组DNA方法用于获得双特异性结合蛋白重链和轻链基因,将这些基因并入重组表达载体中,并将载体引入宿主细胞,如Sambrook,Fritsch和Maniais(eds),Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版,Cold Spring Harbor,N.Y.,(1989),Ausubel等人(eds.) Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates,(1989)和美国专利号4,816,397中所述。

[0200] 要表达重组双特异性结合蛋白,如SM17相关双特异性结合蛋白,首先要获得编码

轻链和重链可变区的DNA片段。这些DNA可通过使用聚合酶链式反应(PCR)扩增和修饰鼠抗体轻链和重链可变序列的杂交瘤获得,或通过使用本领域技术人员已知的标准方法,基于设计轻链和重链可变序列的编码氨基酸序列进行寡合成获得。编码的DNA序列可进一步优化,以利于哺乳动物表达所得的抗体。

[0201] 一旦获得鼠抗体的VH和VL片段,就可以对这些序列进行突变,以编码框架修补版本,其方法已在WO2020115319A1中描述,其全文通过引用并入本文。

[0202] 一旦获得编码双特异性结合蛋白VH和VL片段的DNA片段(例如,如上所述,通过扩增和诱变原始鼠VH和VL基因),这些DNA片段可通过标准DNA重组技术进一步操纵,例如将可变区基因转化为全长抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操纵中,编码VL或VH的DNA片段与编码另一种蛋白质(如抗体恒定区或柔性接头)的另一个DNA片段进行可操作地连接。如该上下文中所使用的,术语"可操作地连接"旨在指两个DNA片段接合在一起,使两个DNA片段编码的氨基酸序列保持在框架内。

[0203] 通过将VH编码DNA与编码重链恒定区(CH1、CH2和CH3)的另一个DNA分子可操作地连接,将分离的编码VH区的DNA转化为全长重链基因。人类重链恒定区基因的序列在本领域是已知的(例如,见Kabat,E.A.,等人(1991)SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242),并且包含这些区域的DNA片段可通过标准PCR扩增获得。重链恒定区可以是IgG1、IgG2、IgG3、Ig4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区,但最优选的是IgG1或IgG4恒定区。对于Fab片段重链基因,VH编码DNA可与仅编码重链CH1恒定区的另一个DNA分子可操作地连接。

[0204] 通过将VL编码DNA与编码轻链恒定区CL的另一个DNA分子可操作地连接,将分离的编码VL区的DNA转化为全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人类轻链恒定区基因的序列在本领域是已知的(例如,见Kabat,E.A.,等人(1991)SEQUENCESOFPROTEINSOFIMMUNOLOGICALINTEREST,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242),并且包含这些区域的DNA片段可通过标准PCR扩增获得。轻链恒定区可以是κ或λ恒定区,但最优选κ恒定区。

[0205] 为了制备scFv基因,将VH和VL编码DNA片段与编码柔性接头(如编码氨基酸序列(Gly4-Ser)3)的另一个片段可操作地连接,使得VH和VL序列可作为连续的单链蛋白表达,其中VL和VH区由柔性接头接合[Bird,R E等人Science,(New York,N.Y.)vol.242,4877(1988):423-6;Huston,J S等人Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,vol.85,16(1988):5879-83;McCafferty,J等人Nature,vol.348,6301(1990):552-4]。

[0206] 为了表达可用于本文公开方法中的双特异性结合蛋白,可将如上所述获得的编码部分或全长轻链和重链的DNA插入表达载体,使基因与转录和翻译控制序列可操作地连接。在该上下文中,术语"可操作地连接"旨在指将抗体基因连接到载体中,使载体中的转录和翻译控制序列发挥其调节抗体基因的转录和翻译的预期功能。选择表达载体和表达控制序列以与所使用的表达宿主细胞相容。抗体轻链基因和双特异性结合蛋白重链基因可以分别插入单独的载体中,更典型地,将两个基因插入同一个表达载体中。抗体基因通过标准方法插入表达载体(例如,抗体基因片段和载体上互补限制性位点的连接,或在没有限制性位点的情况下进行钝端连接)。在一些实施方式中,在插入SM17相关双特异性结合蛋白轻链或重

链序列之前,表达载体已经携带双特异性结合蛋白恒定区序列。例如,将SM17相关双特异性结合蛋白VH和VL序列转化为全长双特异性结合蛋白基因的一种方法是将它们分别插入已编码重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中,使VH段与载体内的CH段(一个或多个)可操作地连接,VL段与载体内的CL段可操作地连接。另外地或可选地,重组表达载体可编码促进抗体链从宿主细胞中分泌的信号肽。抗体链基因可以克隆到载体中,使信号肽与抗体链基因的氨基末端框架内连接。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即来自非免疫球蛋白的信号肽)。

[0207] 除了双特异性结合蛋白链基因外,本文提供的重组表达载体还可携带控制双特异性结合蛋白链基因在宿主细胞中表达的调控序列。术语"调控序列"旨在包括启动子、增强子和控制双特异性结合蛋白链基因转录或翻译的其他表达控制元件(如多聚腺苷酸化信号)。例如,在Goeddel;GENEEXPRESSIONTECHNOLOGY:METHODSINENZYMOLOGY 185,Academic Press,San Diego,Calif.(1990),描述了这种调控序列。如本领域技术人员所理解的,表达载体的设计,包括调控序列的选择,取决于要转化的宿主细胞的选择、所需蛋白质的表达水平等因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调控序列包括指导在哺乳动物细胞中高水平蛋白质表达的病毒元件,如源于免疫球蛋白重链(IgH)增强子的启动子和/或增强子(Gillies,SD等人Cell,vol.33,3(1983):doi:10.1016/0092-8674(83)90014-4)金属硫蛋白(MT)、巨细胞病毒(CMV)(如CMV启动子/增强子)、猿猴病毒40(SV40)(如SV40启动子/增强子)、腺病毒(如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和多瘤病毒。关于病毒调控元件及其序列的进一步描述,参见,例如美国专利号5,665,578;5,168,062;4,510,245和4,968,615。

[0208] 除了双特异性结合蛋白链基因和调控序列外,本文提供的重组表达载体还可携带额外的序列,如调控载体在宿主细胞中复制的序列(如复制起源)和可选择标记基因。可选择标记基因有助于选择其中已经引入载体的宿主细胞(例如,见美国专利号4,399,216、4,634,665和5,179,017)。例如,可选择标记基因通常能使在已引入载体的宿主细胞上赋予对药物如G418、潮霉素或甲氨蝶呤的抗性。优选的可选择标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于甲氨蝶呤选择/扩增的dhfr-宿主细胞)、谷氨酸合成酶(GS)基因和neo基因(用于G418选择)。

[0209] 为了表达轻链和重链,可通过标准技术将编码重链和轻链的表达载体转染到宿主细胞中。术语"转染"的各种形式旨在包括通常用于将外源DNA引入原核或真核宿主细胞的各种技术,如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染、脂转染、原生质体融合等。虽然双特异性结合蛋白可以在原核或真核宿主细胞中产生,但优选在真核细胞,特别是哺乳动物宿主细胞中表达双特异性结合蛋白,因为这种宿主细胞比原核细胞更有可能组装和分泌适当折叠和免疫活性的双特异性结合蛋白。

[0210] 用于表达本文所述方法中使用的重组双特异性结合蛋白的优选哺乳动物宿主细胞包括SP2/0骨髓瘤细胞、NSO骨髓瘤细胞、COS细胞和中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括dfhr-CHO细胞,Urlaub和Chasin,(1980)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216-4200中所述,使用DHFR可选择标记,例如,如R.J.Kaufman和P.A.Sharp(1982)J.Mol.Biol.159:601-621)中所述。当重组蛋白编码表达载体被引入哺乳动物宿主细胞时,通过培养宿主细胞一段时间——足以允许在宿主细胞中表达双特异性结合蛋白,或更优选地,将双特异性结合蛋白分泌到宿主细胞生长的培养基中,产生双特异性结合蛋白。双特异性结合蛋白可以使用标

准的蛋白质纯化方法从培养基中回收。

[0211] 宿主细胞也可用于产生完整抗体的部分,如Fab片段或scFv分子。本文明确考虑了以上程序的变化。例如,用编码本文所公开方法中使用的抗体的轻链或重链(但不是两者)的DNA转染宿主细胞可以是理想的。重组DNA技术还可用于去除一些或全部编码轻链和重链之一或二者的DNA,其对与警报素结合不是必要的。由这种截短的DNA分子表达的分子也包含在本文提供的抗体中。此外,通过标准的化学交联方法将本发明的抗体与第二抗体交联,可以产生双特异性结合蛋白,其中一条重链和一条轻链是特异性结合人IL17RB的抗体,以及另一条重链和轻链对IL17RB之外的抗原具有特异性。

[0212] 在可用于本文所公开方法的其双特异性结合蛋白重组表达系统的一些实施方式中,通过电穿孔将编码重链和抗体轻链二者的重组表达载体引入SP2/0细胞。在表达系统的一些实施方式中,通过如脂转染的标准技术将编码重链和抗体轻链二者的重组表达载体引入CHO细胞。

[0213] 在重组表达载体中,重链和轻链基因各自与鼠或人类免疫球蛋白重链(IgH)、CMV增强子、金属硫蛋白或AdMLP启动子调控元件可操作地连接,以驱动基因的高水平转录。重组表达载体还携带DHFR基因,其允许使用甲氨蝶呤选择/扩增对已经转染该载体的SP2/0细胞进行选择。可选地,含有与鼠或人IgH、CMV增强子/AdMLP/金属硫蛋白启动子调控元件可操作地连接的重链和轻链基因和DHFR基因的重组表达载体可用于转染是dhfr-的SP2/0或CHO细胞。可以选择转染有载体的SP2/0或CHO细胞,并通过提高培养物中甲氨蝶呤的水平来扩大载体中的基因表达水平。培养选定的转化体宿主细胞以允许其表达重链和轻链,并从培养基中回收完整的双特异性结合蛋白。标准分子生物学技术用于制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化体、培养宿主细胞以及从培养基中回收双特异性结合蛋白。

[0214] 药物组合物

[0215] 本文还提供了药物组合物,其包含可用于本文公开方法的双特异性结合蛋白。在一些实施方式中,药物组合物包含治疗有效量的本文公开的双特异性结合蛋白和药学上可接受的载体。在一些实施方式中,药物组合物可用于治疗AD和哮喘。在一些实施方式中,药物组合物可用于抑制受试者(例如人类患者)中的AD和哮喘进展。

[0216] 在本文公开的药物组合物中,可与载体材料结合的治疗性双特异性结合蛋白的量可以变化。在一些实施方式中,药物组合物中存在的双特异性结合蛋白的量是产生治疗效果的量。一般来说,与药学上可接受的载体结合使用,在百分之百中,这个量的范围为约0.01%至约99%的活性成分、约0.1%至约70%的活性成分,或约1%至约30%的活性成分。

[0217] 本文提供的药物组合物包含本文提供的双特异性结合蛋白,如SM17相关的双特异性结合蛋白。双特异性结合蛋白可以以各种浓度存在。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物包含1-1000mg/ml的本文提供的可溶性双特异性结合蛋白。在一些实施方式中,药物组合物包含10-500mg/ml、10-400mg/ml、10-300mg/ml、10-200mg/ml、10-100mg/ml、20-100mg/ml或50-100mg/ml的本文提供的可溶性双特异性结合蛋白。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物包含约10mg/ml、约20mg/ml、约30mg/ml、约40mg/ml、约50mg/ml、约60mg/ml、约70mg/ml、约80mg/ml、约90mg/ml、约100mg/ml、约120mg/ml、约150mg/ml、约180mg/ml、约200mg/ml、约300mg/ml、约500mg/ml、约800mg/ml或约1000mg/ml的本文提供的双特异性结合蛋白。本领域技术人员可以很容易地调整剂量;例如,纯度降低需要剂量增加。

[0218] 本文提供的药物组合物可以以多种形式。这些形式包括,例如液体、半固体和固体剂型,如液体溶液(如可注射溶液和可输注溶液)、分散剂或悬浮液、片剂、丸剂、粉剂、脂质体和栓剂。优选的形式取决于预期的施用方式和治疗应用。可用于本文所述药物组合物或制剂的合适的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油(如橄榄油)和可注射的有机酯(如油酸乙酯)。

[0219] 例如,可以通过使用例如卵磷脂的包被材料、通过保持分散剂情况下所需的粒度以及通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。在一些实施方式中,本文提供的药物组合物是可注射或可输注溶液的形式。在一些实施方式中,药物组合物是水性制剂。这种制剂通常是溶液或悬浮液,但也可以包括胶体、分散剂、乳剂和多相材料。术语“水性制剂”被定义为包含至少50%w/w水的制剂。同样,术语“水性溶液”被定义为包含至少50%w/w水的溶液,以及术语“水性悬浮液”被定义为包含至少50%w/w水的悬浮液。组合物可以配制成溶液、微乳液、脂质体或其他适合高药物浓度的有序结构。

[0220] 在一些实施方式中,本文公开的药物组合物是冷冻干燥的,医生或患者在使用前会向其添加溶剂和/或稀释剂。

[0221] 本文提供的药物组合物可以包含药学上可接受的载体。药学上可接受的载体包括任何和所有生理上相容的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。实例包括水、生理盐水、磷酸盐缓冲盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等中的一种或多种,以及其组合。在一些实施方式中,药学上可接受载体包括等渗剂,例如组合物中的糖类、多元醇如甘露醇、山梨醇或氯化钠。

[0222] 在一些实施方式中,药学上可接受的载体进一步包含少量的辅助物质,如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,其提高抗体或抗原结合片段的保质期或有效性。在一些实施方式中,载体适用于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮施用(如注射或输液)。取决于施用途径,活性成分(即双特异性结合蛋白)可以包被在材料中,以保护活性成分免受可使活性成分失活的酸和其他自然条件的作用。

[0223] 本文还提供了用于制备具有本文公开的双特异性结合蛋白(如SM17相关的双特异性结合蛋白)的药物组合物的试剂盒。在一些实施方式中,试剂盒在一个或多个容器中包含本文公开的双特异性结合蛋白和药学上可接受的载体。在另一个实施方式中,试剂盒可包含本文公开的结合蛋白,用于施用至受试者。在具体的实施方式中,试剂盒包含关于制备和/或施用双特异性结合蛋白的说明书。

[0224] 在一些实施方式中,本文公开的药物组合物或制剂包括:(a)本文公开的双特异性结合蛋白;(b)缓冲剂;(c)稳定剂;(d)盐;(e)填充剂;和/或(f)表面活性剂。在一些实施方式中,药物组合物或制剂稳定至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月、至少1年、至少2年、至少3年、至少5年或更长时间。在一些实施方式中,药物组合物或制剂在4℃、25℃或40℃下储存时是稳定的。在一些实施方式中,本文还提供了提高双特异性结合蛋白的稳定性以允许其长期储存的药物组合物或制剂。本文公开的药物组合物可以进一步包含一种或多种防腐剂、张度剂、螯合剂、稳定剂和/或表面活性剂,及其各种组合。在药物组合物中使用防腐剂、等渗剂、螯合剂、稳定剂和表面活性剂是本领域技术人员众所周知的。可参考Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第19版,1995。

[0225] 可用于本文公开的药物组合物或制剂的缓冲剂可以是弱酸或弱碱,用于在加入另

一种酸或碱后将溶液的酸度(pH)保持在选定值附近。合适的缓冲剂可以通过保持制剂的pH控制,最大化药物制剂的稳定性。合适的缓冲剂还能确保生理相容性或优化溶解度。流变性、粘度和其他特性也取决于制剂的pH值。常见的缓冲剂包括但不限于组氨酸、柠檬酸盐、琥珀酸盐、醋酸盐和磷酸盐。在一些实施方式中,缓冲剂包括组氨酸(如L-组氨酸)和等渗剂,并可能用本领域已知的酸或碱调节pH。在某些实施方式中,缓冲剂为L-组氨酸。在某些实施方式中,制剂的pH保持在约2到约10之间,或约4到约8之间。

[0226] 稳定剂被添加到药物产品中,以稳定该产品。这些剂能以不同的方式稳定蛋白质。常见的稳定剂包括但不限于氨基酸(如甘氨酸、丙氨酸、赖氨酸、精氨酸或苏氨酸)、碳水化合物(如葡萄糖、蔗糖、海藻糖、棉子糖或麦芽糖)、多元醇(如甘油、甘露醇、山梨醇)、环糊精或任何种类和分子量的葡聚糖或PEG。在一些实施方式中,选择稳定剂以最大化冻干制剂中FIX多肽的稳定性。在某些实施方式中,稳定剂为蔗糖和/或精氨酸。

[0227] 填充剂可添加到药物组合物或制剂中,以增加产品的体积和质量,从而有助于其精确计量和处理。常见的填充剂包括但不限于乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、碳酸钙或硬脂酸镁。

[0228] 表面活性剂是具有亲液和疏液基团的两性物质。表面活性剂可以是阴离子、阳离子、两性离子或非离子。非离子表面活性剂的实例包括但不限于烷基乙氧基化物、壬基酚乙氧基化物、胺乙氧基化物、聚环氧乙烷、聚环氧丙烷、脂肪醇(如鲸蜡醇或油醇)、椰油酰胺MEA、椰油酰胺DEA、聚山梨醇酯或十二烷基二甲基氧化胺。在一些实施方式中,表面活性剂为聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80。

[0229] 本文公开的药物组合物还可以包括药学上可接受的抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基茴香醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、α-生育酚等;以及(3)金属螯合剂,如柠檬酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠等;(3)金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0230] 这些组合物还可以含有佐剂,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过上文所述的灭菌程序和通过包括各种抗菌剂和抗真菌剂(如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等)二者来确保防止微生物的存在。期望还能在组合物中包括等渗剂,如糖类、氯化钠等。此外,通过包括例如单硬脂酸铝和明胶的延缓吸收的试剂,可以延长可注射药物形式的吸收。

[0231] 药物组合物或制剂在制造和储存条件下通常必须是无菌的且稳定的。药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散剂以及无菌粉末,用于即刻制备无菌可注射溶液或分散剂。无菌可注射溶液可通过以下方法制备:根据需要将所需量的治疗抗体或抗原结合片段并入具有上述成分之一或组合的适当的溶剂中,然后过滤灭菌。药学活性物质使用此类介质和制剂在本领域是已知的。一般来说,分散剂通过以下方法制备:将活性化合物并入无菌载体中,该载体含有基本分散介质和所需的上述其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,有些制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),这些方法从其先前经过无菌过滤的溶液中获得活性成分粉末和任何额外所需成分。

[0232] 本文公开的药物组合物可以用保护活性成分不被快速释放的载体制备,例如控释

制剂,其包括植入物、透皮贴剂和微囊递送系统。可使用可生物降解的生物相容性聚合物,如乙烯醋酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。制备此类制剂的许多方法已获得专利,或为本领域技术人员所熟知。见,例如,SUSTAINED AND CONTROLLED RELEASE DRUG DELIVERY SYSTEMS,J.R.Robinson,ed.,Marcel Dekker,Inc.,New York,1978。

[0233] 在一些实施方式中,可以配制本文所述的双特异性结合蛋白以确保在体内适当分布。例如,血脑屏障(BBB)排斥许多高亲水性化合物。为有助于本文所述的治疗性抗体穿过BBB,可以以例如脂质体配制它们。脂质体的制造方法参见美国专利4,522,811;5,374,548;和5,399,331。脂质体可包含一个或多个部分,这些部分选择性地转运到特定细胞或器官,从而增强靶向药物递送(参见,例如,V.V.Ranade(1989)J.Clin.Pharmacol.29:685)。示例性靶向部分包括叶酸或生物素[参见Low等人的美国专利5,416,016]甘露糖苷[Umezawa,F和Y Eto.Biochemical And Biophysical Research Communications vol.153,3(1988):1038-44];抗体[Bloemen,P G等人FEBS letters vol.357,2(1995):140-4.][Owais,M等人Antimicrobial Agents And Chemotherapy vol.39,1(1995):180-4.];表面活性剂蛋白A受体[Briscoe,P等人The American Journal Of Physiology vol.268,3Pt 1(1995):L374-80];p120[Schreier,H等人The Journal Of Biological Chemistry vol.269,12(1994):9090-8][Keinänen,K和M L Laukkanen.FEBS letters vol.346,1(1994):123-6][Killion,J J和I J Fidler.ImmunoMethods vol.4,3(1994):273-9]。

[0234] 治疗方法

[0235] 如以上章节所述,本文提供了双特异性结合蛋白(如SM17相关双特异性结合蛋白)在治疗过敏性疾病或紊乱中的医学用途。本文公开的任何双特异性结合蛋白可用于本文公开的方法中。在一些实施方式中,本文公开的方法中使用的是重组抗IL17RB/抗TSLP双特异性抗体。在一些实施方式中,本文公开的方法中使用的是重组抗IL17RB/抗IL33双特异性抗体。在一些实施方式中,本文公开的方法中使用的是重组抗IL17RB/抗TSLP受体双特异性结合蛋白。在一些实施方式中,本文公开的方法中使用的是重组抗IL17RB/抗IL33受体双特异性结合蛋白。

[0236] 在一些实施方式中,本文提供了减少有需要的受试者中肺ILC2增殖的方法。在一些实施方式中,本文还提供了治疗有需要的受试者中的与过敏相关的疾病或紊乱的方法。在一些实施方式中,本文还提供了减少有需要的受试者中的嗜酸性粒细胞炎症的方法。在一些实施方式中,本文还提供了治疗有需要的受试者中的与中性粒细胞炎症相关的疾病或紊乱的方法。在一些实施方式中,本文提供的方法通过将有需要的受试者的OCS每日剂量减少至少20%、至少50%或至少超过75%来治疗疾病或紊乱。在一些实施方式中,受试者是人类。

[0237] 减少肺ILC2增殖、治疗与中性粒细胞炎症相关的疾病或紊乱、治疗与嗜酸性粒细胞炎症相关的疾病或紊乱以及通过减少OCS每日剂量治疗疾病或紊乱的方法包括向受试者施用治疗有效量的双特异性结合蛋白,该蛋白特异性结合(a)IL17RB和TSLP和/或(b)IL17RB和IL-33。

[0238] 适用于本方法的受试者包括其中希望阻断警报素活性的人类患者。在一些实施方式中,用本文公开的方法治疗的受试者被诊断患有与过敏相关的疾病或紊乱,其可以是临

床或临床前哮喘、AD、纤维化疾病、炎症性肠病(IBD)、克罗恩病、溃疡性结肠炎、慢性阻塞性肺病、慢性鼻窦炎、伴有鼻息肉的慢性鼻窦炎。在一些实施方式中,受试者可以是哺乳动物。在一些实施方式中,受试者是人类。在一些实施方式中,用本文公开的方法治疗的受试者已经患有OCS。在一些实施方式中,受试者先前未接受过治疗。

[0239] 本文提供的双特异性结合蛋白(如SM17相关双特异性结合蛋白)或药物组合物可以通过本领域已知的任何方法施用至受试者,其包括但不限于静脉内施用、皮下施用、肌内施用、颅内施用、鞘内施用、脑室内施用、腹膜内施用、脊髓施用、鼻内施用、胸腔内施用、局部施用或皮内施用。

[0240] 在一些实施方式中,本文提供的双特异性结合蛋白(如SM17相关双特异性结合蛋白)或药物组合物可使用肠胃外施用给受试者施用。如本文中所使用的,术语"肠胃外施用"是指肠内和局部施用以外的施用方式,通常通过注射,并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、包膜下、蛛网膜下腔、椎管内、硬膜外和茎内注射和输注。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白通过静脉输注或注射施用。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白通过肌内注射施用。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白通过皮下注射施用。

[0241] 本文提供的双特异性结合蛋白(如SM17相关双特异性结合蛋白)或药物组合物可以用本领域已知的医疗器械施用。例如,在一些实施方式中,可以使用无针皮下注射装置,如美国专利号5,399,163;5,383,851;5,312,335;5,064,413;4,941,880;4,790,824;或4,596,556中公开的装置。本文所述的已知植入物和模块使用的实例包括:美国专利号4,487,603,该专利公开了以受控速率分配药物的植入式微型输注泵;美国专利号4,486,194,该专利公开了用于通过皮肤施用药物的治疗装置;美国专利4,447,233号,该专利公开了以精确输注速率递送药物的药物输注泵;美国专利4,447,224号,该专利公开了连续药物递送的可变流量植入式输注器;美国专利号4,439,196,该专利公开了具有多腔室隔间的渗透药物递送系统;以及美国专利号4,475,196,该专利公开了渗透药物递送系统。这些专利通过引用并入本文。本领域技术人员已知许多其他此类植入物、递送系统和模块。

[0242] 在一些实施方式中,本文公开的双特异性结合蛋白可以口服施用,例如,与惰性稀释剂或可同化的可食用载体一起施用。治疗性双特异性结合蛋白也可以封装在硬壳或软壳明胶胶囊中,压制成片剂,或直接并入受试者的饮食中。对于口服治疗施用,可将双特异性结合蛋白与赋形剂结合,并以可摄入片剂、口腔片剂、锭剂、胶囊、酏剂、悬浮液、糖浆、糯米纸囊剂(wafer)等形式使用。

[0243] 本文提供的方法包括施用治疗有效量的本文所述的双特异性结合蛋白(如SM17相关双特异性结合蛋白)。治疗性抗体的实际剂量水平可以改变,以便获得对特定患者实现所需的治疗反应有效而不会对该患者有毒性的剂量。所选择的剂量水平将取决于各种药代动力学因素,其包括本文所述特定组合物的活性、施用途径、施用时间、排泄率、治疗持续时间、与所使用的特定组合物结合使用的其他药物、化合物和/或材料、接受治疗的患者的年龄、性别、体重、病情、一般健康状况和既往病史,以及医疗领域中众所周知的类似因素。

[0244] 一般来说,单次剂量的剂量范围可以在例如约0.1至100mg/kg的宿主体重。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白(例如,SM17相关双特异性结合蛋白)以下述量施用:约1mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约6mg/kg、约7mg/kg、约8mg/kg、约9mg/kg、约

10mg/kg、约20mg/kg、约30mg/kg、约40mg/kg、约50mg/kg、约60mg/kg、约70mg/kg、约80mg/kg、约90mg/kg。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白以约1mg/kg施用。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白以约5mg/kg施用。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白以约10mg/kg施用。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白以约20mg/kg施用。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白以约40mg/kg施用。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白以约60mg/kg施用。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白以约100mg/kg施用。

[0245] 在一些实施方式中,双特异性结合蛋白(例如,SM17相关双特异性结合蛋白)以约1至5mg/kg、约1至10mg/kg、约1至20mg/kg、约1至50mg/kg、约1至100mg/kg、约5至10mg/kg、约5至20mg/kg、约5至50mg/kg、约5至100mg/kg、约10至50mg/kg或约10至100mg/kg的范围内的剂量施用。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白以约1至5mg/kg的范围内的剂量施用。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白以约1至10mg/kg的范围内的剂量施用。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白以约1至50mg/kg的范围内的剂量施用。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白以约10至50mg/kg的范围内的剂量施用。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白以约10至100mg/kg的范围内的剂量施用。

[0246] 在一些实施方式中,本文提供的方法包括以约10-2000mg的剂量施用双特异性结合蛋白(例如,SM17相关双特异性结合蛋白)。在一些实施方式中,剂量为约10mg、约50mg、约100mg、约200mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约800mg、约900mg、约1000mg、约1100mg、约1200mg、约1300mg、约1400mg、约1500mg约1600mg、约1700mg、约1800mg、约1900mg或约2000mg。在一些实施方式中,抗体以100mg的剂量施用。在一些实施方式中,抗体以300mg的剂量施用。在一些实施方式中,抗体以600mg的剂量施用。在一些实施方式中,抗体以900mg的剂量施用。在一些实施方式中,抗体以1200mg的剂量施用。

[0247] 在一些实施方式中,本文提供的方法包括以约10-50mg、10-100mg、10-200mg、100-300mg、100-500mg、300-600mg、300-900mg、300-1200mg、600-1200mg、600-1800mg或1000-2000mg的范围内的剂量施用IgG组成双特异性结合蛋白(例如,SM17相关双特异性结合蛋白)。在一些实施方式中,抗体以100-500mg的范围内的剂量施用。在一些实施方式中,抗体以300-600mg的范围内的剂量施用。在一些实施方式中,抗体以300-900mg的范围内的剂量施用。在一些实施方式中,抗体以600-1200mg的范围内的剂量施用。

[0248] 在治疗过程中,通常以较低剂量开始,然后逐渐增加到目标剂量。为说明起见,在一些实施方式中,本文提供的方法包括以约100mg的剂量施用双特异性结合蛋白,然后逐渐增加到约600mg的目标剂量。

[0249] 受试者可以每天、每隔一天、每周、每两周、每月或根据经验分析确定的任何其他时间表以这种剂量施用。示例性治疗需要在延长的时期(例如至少六个月)内以多个剂量施用。在一些实施方式中,本文提供的方法包括每周施用双特异性结合蛋白。在一些实施方式中,方法包括每两周施用。在一些实施方式中,该方法包括每月施用。在一些实施方式中,每周、每两周或每月皮下施用双特异性结合蛋白(如SM17相关双特异性结合蛋白)。在一些实施方式中,IgG组成双特异性结合蛋白(如SM17相关双特异性结合蛋白)每周、每两周或每月静脉内施用。

[0250] 根据需要和适当情况,双特异性结合蛋白(如SM17相关双特异性结合蛋白)可以施用至多为3个月、6个月、9个月、12个月、18个月、24个月、30个月或36个月。在一些实施方式

中,治疗持续至少3个月。在一些实施方式中,治疗持续至少6个月。在一些实施方式中,治疗持续至少12个月。在一些实施方式中,治疗持续至少24个月。

[0251] 本文明确考虑了如施用轮次、剂量、治疗频率和治疗时长的各种实施方式的所有排列和组合,并可在本文公开的治疗方法中采用。

[0252] 为说明起见,在本文公开的方法中可采用以下治疗方案,其包括施用本文公开的抗IL17RB抗体或抗原结合片段(如SM17相关双特异性结合蛋白)或在本文公开的方法中鉴定的抗IL17RB抗体或抗原结合片段:

[0253] 在一些实施方式中,治疗性抗体的静脉内注射或皮下施用剂量为约10mg/kg,每4周一次,至少间隔21天。在一些实施方式中,包括以下滴注时间表:第1-2次输注:1mg/kg IV;第3-4次输注:3mg/kg IV;第5-6次输注:6mg/kg IV;第7次及以上:10mg/kg IV。

[0254] 在一些实施方式中,治疗性抗体的静脉内或皮下施用的单一剂量为10、20或40mg/kg,第二次为10mg/kg,每隔一周一次,持续24周,以及第三次为10或20mg/kg,每月一次,持续16个月。

[0255] 在一些实施方式中,治疗性抗体的静脉内或皮下施用剂量约为每周约250mg,或每两周500mg,持续至多2年。在一些实施方式中,治疗以每月注射(shot)约120mg开始。

[0256] 可对剂量方案进行调整,以提供最佳的预期反应(如治疗或预防反应)。例如,可以施用单一推注、可以随时间推移施用数个分开剂量或如治疗情况紧急性所指示的按比例减少或增加剂量。为了便于施用和剂量均匀,以剂量单位形式配制肠胃外组合物尤其有利。如本文所使用的,剂量单位形式是指物理上离散的单位,适合作为接受治疗的哺乳动物受试者的单位剂量;每个单位都含有预定量的治疗抗体,计算该量与所需的药物载体结合产生所需的治疗效果。需要注意的是,适当的剂量会随着待缓解病症的类型和严重程度而变化。应进一步理解的是,对于任何特定受试者,具体的剂量方案应根据个人需要和施用或监督施用组合物的人员的专业判断随时间推移而调整,并且本文所述剂量范围只是示例性的,并不旨在限制要求保护的组合物的范围或实践。

[0257] 在治疗与过敏相关的疾病或紊乱时,有时使用本文提供的方法可以治愈疾病或紊乱,但任何临床改善都构成益处。在一些实施方式中,本文提供的方法可将每日OCS使用减少平均约2.5mg/天、约5mg/天、约10mg/天、约20mg/天、约40mg/天、约95CL。在一些实施方式中,本文提供的方法可将OCS每日用量减少平均25%。在一些实施方式中,本文提供的方法可将OCS每日用量减少平均50%。在一些实施方式中,本文提供的方法可将OCS每日用量减少平均75%。在一些实施方式中,本文提供的方法可将OCS每日用量减少平均100%。在一些实施方式中,本文提供的方法可将OCS每日用量减少平均25-50%。在一些实施方式中,本文提供的方法可将OCS每日用量减少平均50-75%。在一些实施方式中,本文提供的方法可将OCS每日用量减少平均75-100%。

[0258] 在一些实施方式中,本文提供的方法减少肺中的ILC2增殖。在一些实施方式中,本文提供的方法减少ILC2向肺部迁移。在一些实施方式中,本文提供的方法降低支气管肺泡液中的IL-5水平。在一些实施方式中,本文提供的方法降低支气管肺泡液中的IL-13水平。在一些实施方式中,本文提供的方法减少肺嗜酸性粒细胞炎症。在一些实施方式中,本文提供的方法减少肺中性粒细胞炎症。在一些实施方式中,本文提供的方法降低哮喘年恶化率。在一些实施方式中,本文提供的方法降低呼出一氧化氮的比例。在一些实施方式中,本文提

供的方法降低血液嗜酸性粒细胞计数。在一些实施方式中,本文提供的方法减少经表皮失水。

[0259] 在一些实施方式中,本文提供的方法预防AD的发生,或延迟或阻止AD的进展。在一些实施方式中,本文提供的方法缓解AD的症状。在一些实施方式中,本文提供的方法预防哮喘的发生,或延迟或阻止哮喘的进展。在一些实施方式中,本文提供的方法缓解哮喘的症状。

[0260] 本文公开的双特异性结合蛋白可以通过本领域已知的各种方法施用。如本领域技术人员所了解的,施用途径和/或方式根据所需结果而变化。在一些实施方式中,双特异性结合蛋白可与保护其不被快速释放的载体一起制备,如控释制剂,其包括植入物、透皮贴剂和微囊递送系统。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物,如乙烯醋酸乙烯酯、聚乙二醇(PEG)、聚酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。制备此类制剂的许多方法已获得专利或为本领域技术人员所熟知。例如,见SUSTAINED AND CONTROLLED RELEASE DRUG DELIVERY SYSTEMS,J.R.Robinson ed.,Marcel Dekker,Inc.,New York,1978。在治疗应用中,有时需要在相对较短的时间间隔内相对较高的剂量,直到疾病的进展降低或终止,直到患者的疾病症状部分或完全缓解。

[0261] 使用具有不同作用机制的试剂进行联合疗法可导致附加或协同效应。联合疗法可使每种试剂的剂量与单一疗法相比降低,从而减少毒副作用和/或提高本文公开的试剂的治疗指数。联合疗法可降低发展出药物抗性的可能性。在一些实施方式中,附加疗法导致本文所述双特异性结合蛋白或药物组合物的治疗指数提高。在一些实施方式中,附加疗法导致本文所述双特异性结合蛋白或药物组合物的毒性和/或副作用减少。在一些实施方式中,本文所述的双特异性结合蛋白或药物组合物可与附加疗法联合施用。

[0262] 在一些实施方式中,第二治疗剂是皮质类固醇、DNA甲基转移酶(DNMT)抑制剂、抗IL4抗体、抗IL5抗体、抗IL4Ra抗体、抗IL13抗体和抗IgE抗体、抗IL17A抗体、抗IL12/IL23抗体、抗IL23抗体、抗IL17RA抗体、酪氨酸激酶抑制剂。在一些实施方式中,第二治疗剂可以是抑制促炎细胞因子释放的第二抗体。

[0263] 第二治疗剂可以在施用本文所述的双特异性结合蛋白或药物组合物之前、同时或之后施用。联合施用可包括以单一药物制剂或使用单独的制剂共同施用,或以任一顺序连续施用,但通常在一段时间内,使所有活性剂可同时发挥其生物活性。本领域技术人员可以基于被治疗的受试者的需要,容易地确定用于本文所述药物组合物和附加疗法联合施用的适当方案,包括联合疗法中使用的附加制剂的时机和给药。

[0264] 本说明书中引用的所有论文、出版物和专利均通过引用并入本说明书,如同每篇单独的论文、出版物或专利都具体和单独地指明通过引用并入本文,并通过引用并入本文,以公开和描述与所引用出版物相关的方法和/或材料。然而,本文引用的任何参考文献、文章、出版物、专利、专利出版物和专利申请,并不也不应被视为承认或以任何形式表明它们构成有效的现有技术或形成世界上任何国家常识的一部分。

[0265] 除非上下文另有说明,否则本文所述的各种特征可以以任何组合使用。

[0266] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语与本公开内容所属技术领域的普通技术人员通常理解的含义相同。

[0267] 实验实施例

[0268] 实施例1:SM17与外源鼠、猴和人IL-17RB蛋白结合

[0269] 使用标准酶联免疫吸附测定(ELISA)方法确定SM17对IL-17RB蛋白的物种特异性。简而言之,将来自人、小鼠、食蟹猴或恒河猴的IL-17RB蛋白(R&D systems,Minneapolis,MN)在PBS中稀释至2.5μg/ml,然后将50μl的IL-17RB蛋白加入ELISA试纸条的每个孔中。用保鲜膜密封试纸条,在4℃孵育过夜进行包被。

[0270] 第二天,用洗涤缓冲液(0.05%吐温20,在PBS中)洗涤三次,每孔100μl用阻断缓冲剂(3% BSA,在PBS中)阻断2小时(RT),然后加入连续稀释的SM17(最终浓度分别为10、2、0.4、0.08、0.016、0.0032和0.00064μg/ml)。在RT下孵育2小时后,通过在OD450 nM下按照本领域技术人员已知的标准ELISA方案,通过加入过氧化物酶缀合的山羊抗人F(ab')2特异性抗体(Jackson ImmunoResearch)和TMB底物(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO),显示结合的SM17的量。

[0271] 结果表明,SM17与鼠、人、食蟹猴和恒河猴的IL-17RB蛋白以剂量反应方式结合,其亲和力相当(见表1和图1)。

[0272] 表1:450nm下与不同物种的IL-17RB抗原结合的光密度

[0273]

SM17 (μg/mL)	OD 450nm 吸光度							
	鼠 IL17RB		人 IL17RB		恒河猴 IL17RB		食蟹猴 IL17RB	
10	2.67	2.61	1.82	1.88	1.57	1.59	1.33	1.37
2	2.46	2.44	1.74	1.61	1.40	1.45	1.13	1.12
0.4	1.68	1.61	1.10	1.14	1.12	1.17	0.89	0.97
0.08	0.78	0.64	0.58	0.44	0.51	0.58	0.72	0.74
0.016	0.25	0.31	0.17	0.13	0.27	0.17	0.34	0.35
0.0032	0.12	0.19	-0.07	-0.06	-0.09	0.01	0.04	0.13
0.00064	0.04	0.11	-0.16	-0.21	-0.10	-0.09	-0.06	0.11

[0274] 实施例2:SM17不会与其他IL17受体亚基发生交叉反应

[0275] 使用标准ELISA方法确定SM17对其他人IL17受体亚基的特异性。同样地,在包被有人IL-17受体亚基A、C、D和E(IL17RA、IL17RC、IL17RD和IL17RE)(R&D systems)的ELISA板的孔中加入不同浓度(最终浓度分别为0.4、0.08、0.016、0.0032和0.00064μg/ml)的SM17。没有检测到SM17与其他已知的人IL-17受体亚基(IL17RA、IL17RC、IL17RD和IL17RE)明显结合(见表2和图2)。

[0276] 表2:450nm下与IL-17受体家族成员抗原结合的光密度

[0277]

SM17 (μg/mL)	OD 450nm 吸光度									
	hIL17RA		hIL17RB		hIL17RC		hIL17RD		hIL17RE	
	孔 1	孔 2	孔 1	孔 2	孔 1	孔 2	孔 1	孔 2	孔 1	孔 2
0.4	0.21	0.22	1.26	1.31	0.25	0.18	0.22	0.08	0.08	0.05
0.08	0.00	0.06	0.79	0.64	0.02	-0.02	0.03	0.01	-0.04	0.00
0.016	0.01	-0.04	0.35	0.30	0.09	0.02	0.07	0.02	0.00	-0.04
0.0032	0.20	-0.03	0.16	0.07	0.03	-0.04	0.04	-0.04	-0.01	-0.02
0.00064	0.00	0.05	0.13	0.07	0.13	0.08	0.08	0.02	0.09	-0.16

[0278] 实施例3:SM17与在HEK293细胞表面上表达的人和恒河猴的原生IL-17RB结合

[0279] 按照流式细胞术的标准方案,检查转染全长人或恒河猴IL-17RB(SinoBiological,北京,中国)的HEK293细胞(ATCC,Manassas,VA)与SM17的结合。用IgG4同

种型对照(Sino Biological)染色的野生型HEK293细胞用作阴性对照并用于门控目的。简言之,将密度为3×10^{5}个细胞的HEK293细胞接种到6孔板的每个孔中。第二天,首先通过标准分子克隆技术将人或恒河猴Il-17RB全长cDNA克隆到pCMV3-不带标签表达质粒中,然后通过脂转染(Lipofectamine 3000试剂;Thermo Fisher Scientific)将人或恒河猴IL-17RB的表达质粒转染到HEK293细胞中。转染细胞胰蛋白酶化、收获并用4%多聚甲醛固定(5分钟)。将洗涤缓冲液(PBS中3% BSA)中1μg/ml的SM17或人IgG4对照加入再悬浮的细胞中,在室温下孵育30分钟,然后加入Alexa Fluor®647缀合的山羊抗人IgG特异性抗体(洗涤缓冲液中1:2000稀释)(Jackson ImmunoResearch),使用BD FACSVerse细胞分析仪(Becton Dickenson,Franklin Lakes,NJ)进行流式细胞术分析。

[0280] 与野生型HEK293(约7%)相比,SM17与转染人IL17RB(hIL17RB-HEK293:46%)和恒河猴IL17RB(RhIL17RB-HEK293:39%)的HEK293的结合增强,表明SM17与HEK293细胞上表达的原生人或恒河猴IL17RB结合(图3)。

[0281] 实施例4:SM17抑制与IL-2和IL-25共同培养的人PBMC释放IL-5

[0282] 与IL-2和IL-25(PeproTech,Cranbury,NJ)共同培养的PBMC(Ixcells,San Diego,CA)可导致IL-5的释放,IL-5是已知会加重哮喘病症的细胞因子。因此,评估了SM17对IL-2/IL-25处理的人PBMC释放IL-5的抑制作用。简而言之,将冷冻保存的人PBMC解冻并在添加了10%胎牛血清(Thermo Fisher Scientific)的RPMI-1640培养基中培养。在10单位/mL IL-2和10单位/mL IL-25的存在下,将浓度范围从0.16ng/mL到5ng/mL的连续稀释的SM17添加到4×10^{5}的人PBMC中。非特异性人IgG4(SinoBiological)用作对照抗体。处理的细胞在37℃下孵育72小时,培养上清液中的IL-5释放水平通过标准ELISA测定(R&D systems)进行测量。结果表明,SM17以剂量依赖的方式抑制IL-2和IL-25诱导的人PBMC的IL-5释放(图4)。结果以平均值±SEM表示。单因素ANOVA,Dunnett的多重比较检验,*:P<0.05;**:P<0.01。

[0283] 实施例5:在肾癌细胞系TK-10上SM17抑制IL-8释放

[0284] 用人IL-25(PeproTech公司)和TNFa(R&D systems)处理的人肾癌细胞系TK-10(NCI-60,NIH,Bethesda,MD)可导致IL-8的释放,IL-8又被称为中性粒细胞趋化因子,是先天免疫系统反应中免疫反应的重要介质。因此,评估了SM17及其鼠对应物(D9.2)对IL-25/TNFa处理的TK-10细胞释放IL-8的抑制作用。简言之,在100ng/mL的IL-25和10ng/mL的TNFa存在下,将浓度为1mg/mL的SM17(人IgG4同种型,SinoMab BioScience Limited,中国香港)、SM17-IgG1(人IgG1同种型,SinoMab BioScience Limited)及其鼠对应物(D9.2,SinoMab BioScience Limited)加入到2×10^{4}的TK-10细胞中。非特异性人IgG1(SM03,抗CD22嵌合抗体,SinoMab BioScience Limited)用作对照抗体。处理的细胞在OptiMEM(Thermo Fisher Scientific)中37℃下培养24或48小时,培养上清液中的IL-8释放水平通过标准ELISA测定使用商业试剂盒(R&D systems)进行测量。结果表明,在1mg/mL下,SM17、SM17-IgG1或D9.2都能有效抑制IL-25/TNFa诱导的TK-10细胞在两个时间点释放IL-8(图5)。

[0285] 实施例6:确定SM17的抗原(IL17RB)结合动力学

[0286] 生物层干涉仪分析(Octet ReD96系统,Sartorius)用于确定SM17与人和食蟹猴IL17RB蛋白(R&D systems)的结合亲和力。简而言之,SM17(20μg/mL)通过与抗人Fab CH1的相互作用被固定在生物传感器上;随后按照Octet ReD96系统的标准操作方案加入连续稀

释的Cyno-IL17RB和人IL17RB(浓度分别为158.7nM、79.4nM和39.7nM),以绘制出缔合和解离曲线。无关抗体(SM03,抗人CD22嵌合IgG1抗体,SinoMab BioScience Limited)用作对照参考。各自抗体的K_a、K_{dis}和K_D值汇总于下表3。值得注意的是,K_D在皮摩尔-个位数纳摩尔范围内。

[0287] 表3:SM17与人和食蟹猴IL-17RB的结合动力学

[0288]

IL17RB	试验	K_a (1/Ms)	K_{dis} (1/s)	K_D (nM)	范围 (nM)
人类	1	2.22×10^5	4.30×10^{-5}	0.194	0.194-0.546
	2	1.83×10^5	9.98×10^{-5}	0.546	
食蟹猴	1	3.21×10^4	2.73×10^{-5}	0.852	0.852-5.11
	2	4.21×10^4	2.15×10^{-4}	5.11	

[0289] 实施例7:SM17对小鼠卵清蛋白诱发的哮喘的治疗效果

[0290] 用卵清蛋白诱导雌性BALB/c小鼠以引发小鼠的类似哮喘的症状。简而言之,小鼠每只在第0天和第12天腹腔内(IP)注射10mg卵清蛋白(OVA)(在1mg氢氧化铝中乳化),总量为200毫升,进行致敏。小鼠分为6组,每组8只。致敏小鼠连续六天(第19、20、21、22、23和24天)20分钟/天暴露于无菌水中的气雾化的5% OVA。幼稚小鼠吸入雾化水,20分钟/天,连续六天。然后在气雾胶攻击前4小时给小鼠i.v.注射不同浓度的SM17、PBS(对照)或地塞米松(Dex),每天一次(第19至24天)。

[0291] 第25天(最后一次OVA攻击24小时后),用泰拉唑®(20-40mg/kg i.p)麻醉小鼠,并通过气管插管连接到计算机控制的呼吸机。呼气/吸气时间和呼吸频率分别预设为1.5:1和90/分钟。在建立稳定的基线后,记录肺阻力(RL)以评估小鼠对氯化乙酰甲基胆碱梯度(0.025和0.05mg/kg体重)的反应;氯化乙酰甲基胆碱通过细针以5分钟间隔注射入颈外静脉。用5mg/kg SM17或1mg/kg Dex治疗小鼠防止气道高反应性。在每次OVA雾化前施用1mg/kg或3mg/kg SM17,导致了乙酰甲基胆碱攻击后AHR的轻微但不显著的消除。如图6中结果表明,SM17的治疗效果是剂量依赖性的。取回第25天处死的小鼠的BALF,确定BALF中的炎性细胞数量和炎性细胞因子浓度。

[0292] 此外,以1、3和5mg/kg施用的SM17显著降低了BALF中IL-5水平。以5mg/kg施用的SM17显著降低了BALF中IL-13水平和嗜酸性粒细胞数量(图7)。发现5mg/kg的SM17和Dex显著降低了肺浸润嗜酸性粒细胞的数量。结果以平均值±SEM表示。单因素ANOVA,Dunnett的多重比较检验,*:$P<0.05$;**:$P<0.01$。Dex=地塞米松。图9显示了SM17治疗各种适应症的建议的作用机制。

[0293] 实施例8:构建和表达抗警报素双特异性结合蛋白(bsBp)

[0294] 通过TA克隆(Thermo Fisher Scientific)将SM17的轻链(SEQ ID NO:33)克隆到pcDNA3.3表达载体中。将编码SM17重链的cDNA进行基因合成(Genscript Biotech Corp.,Piscataway,NJ),并将其克隆到pEGFP-N1表达载体的NheI/NotI克隆位点(Clontech Laboratories,Mountain View,CA)(图10a),该SM17重链可操作地连接到特定的警报素结合蛋白的序列(例如,警报素蛋白结合受体或警报素特异性抗体的scFv)上。根据制造商的说明书(Thermo Fisher Scientific),将含有特定SM17-警报素结合蛋白重链的表达载体和SM17轻链的表达载体共同转染到expiCHO-S细胞中。转染后第12天收获含有与特定警报蛋白结合部分连接的SM17抗体的特定双特异性结合蛋白(bsBp),并通过蛋白A亲和层析法

纯化。图10b中显示了纯化的bsBp的还原SDS-PAGE,表明大多数双特异性抗体在自然界中是完整的。下表4总结了bsBp的重链和轻链序列。

[0295] 表4:bsBp和单克隆抗体的氨基酸序列

[0296]

构建体	HC序列ID	LC序列ID
SM17-抗TSLP 1#bsBp	60	33
SM17-抗TSLP 2#bsBp	61	33
SM17-抗TSLP 3#bsBp	62	33
SM17-抗IL-33 1#bsBp	63	33
SM17-抗IL-33 2#bsBp	64	33
SM17-抗IL-33 3#bsBp	65	33
抗-TSLP抗体1#	75	76
抗-TSLP抗体2#	77	78
抗-TSLP抗体3#	79	80
抗-IL-33抗体1#	81	82
抗-IL-33抗体2#	83	84
抗-IL-33抗体3#	85	86
SM17-hTSLPR	75	33
SM17-hST2	74	33

[0297] 实施例9:抗警报素bsBp的特异性

[0298] bsBp的结合特异性通过标准的ELISA测定进行评估。简而言之,ELISA试纸条包被有各自的靶抗原,其包括IL17RB、IL-33或TSLP(R&D systems),最终浓度为2μg/mL。在包被有所需抗原的ELISA试纸条上加入33.5nM的双特异性抗体。室温下孵育2小时后,用PBS洗涤ELISA试纸条5次。根据标准程序,通过加入山羊抗人F(ab')2特异性辣根过氧化物酶(HRP)缀合的二抗(1:5000稀释,Jackson ImmunoResearch),然后加入TMB底物溶液(Sigma-Aldrich-),显示结合(图11)。以下图11和表5总结了bsBp的抗原结合特异性。结果指示针对IL17RB和警报素的特异性,如最初设计的。没有提供SM17-人TSLPR的结果,因为产量太低而无法检测。

[0299] 表5:ELISA中bsBp的抗原结合特异性

[0300]

ELISA试纸条上包被有的抗原	SM17-抗-TSLP 1#	SM17-抗-TSLP 2#	SM17-抗-TSLP 3#	SM17-抗-IL-33 1#	SM17-抗-IL-33 2#	SM17-抗-IL-33 3#		SM-17-人ST2	SM17
TSLP	+++	++	+++	N/A	N/A	N/A		-	+
IL-17RB	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++	+++
IL-33	N/A	N/A	N/A	+++	+++	+++		+++	-

[0301] bsBp的特异性抗原结合亲和力的强度,以+/+++为半定量标准(-=无结合,+、++、+++=弱、中、强结合),N/A指无结合亲和力。

[0302] 实施例10:双特异性结合蛋白的警报素结合动力学

[0303] 使用生物层干涉分析(Octet RED96系统,Sartorius)确定bsBp与靶向警报素的结合亲和力。通过与抗人Fab CH1区结合,将bsBp或SM17(20μg/mL)固定在生物传感器上;加入连续稀释的人IL33和TSLP(158.7nM、79.4nM、39.7nM)(R&D systems),根据制造商的说明书绘制缔合和解离曲线。用无关抗体(SM03,抗人CD22嵌合IgG1抗体,SinoMabBioScience Limited,20μg/mL)固定的生物传感器用作对照参考。下表6总结了各自的双特异性结合蛋白的预期K_a、K_{dis}和KD值。

[0304] 表6:bsBp与人TSLP和IL-33的结合动力学

[0305]

TSLP	K_a(1/Ms)	K_{dis}(1/s)	K_D(nM)
SM17-抗-TSLP 1#bsBp	4.72×10	2.41×10	0.511
SM17-抗-TSLP 2#bsBp	3.74×10	<1×10	<0.001
SM17-抗-TSLP 3#bsBp	4.81×10	3.17×10	0.0658
SM17-TSLPR	N/A	N/A	N/A
SM17	1×10	1×10	100
IL33	K_a(1/Ms)	K_{dis}(1/s)	K_D(nM)
SM17-抗-IL-331#bsBp	9.81×10	2.83×10	28.9
SM17-抗-IL-332#bsBp	3.73×10	<1×10	0.0259
SM17-抗-IL-333#bsBp	2.27×10	<1×10	0.0425
SM17-ST2	5.56×10	2.26×10	0.407
SM17	2.72×10	1.79x10	659000

[0306] 由于产量太低,没有给出SM17-人TSLPR的结合亲和力。

[0307] 实施例11:警报素诱导人PBMC释放IFN γ、CCL8、CCL17、IL-5和IL-13以及SM17对细胞因子释放的抑制作用

[0308] 将人PBMC(每组4×10^5,Ixcells)与IL-2(10单位/mL,PeproTech)和各种警报素/警报素组合孵育,以模拟过敏性疾病期间的促炎细胞因子释放。对于IL-5和IL-13释放,将PBMC与IL-2和三种抗过敏素(均为10ng/ml)孵育三天。对于CCL17释放,将PBMC与TSLP(10ng/ml)孵育1天。对于CCL8和IFNγ释放,将PBMC与IL-12(10ng/ml,Sino Biological)和IL-33(10ng/ml)孵育1天。在加入细胞因子前,用SM17(5μg/ml)或IgG4同种型对照(5μg/ml)预处理细胞一小时。

[0309] 收集上清液并通过ELISA试剂盒(R&D systems)测量细胞因子的浓度。这些已建立的测定用于测试SM17和bsBp的效力。SM17能有效抑制总警报素刺激的PBMC培养物中IL-5和IL-13的分泌。然而,与IgG4同种型对照相比,在CCL17、CCL8和IFNγ释放测定中指示SM17处理没有抑制作用(见图12)。结果以pg/ml的绝对量表示。

[0310] 实施例12:不同双特异性结合蛋白抑制诱导人PBMC释放细胞因子和趋化因子的效力

[0311] 在如以上实施方式11所述的应该诱导IFNγ、CCL8、CCL17和IL-5释放的条件下,将SM17、三种不同的SM17-抗-IL33 bsBp和三种不同的SM17-抗-TSLP bsBp(浓度均为5μg/ml)添加到人PBMC培养物中。使用标准的ELISA方法对诱导的PBMC中获得的上清液中不同细胞因子和趋化因子的水平进行评估。结果表明,在抑制IFNγ、CCL8、CCL17、IL-5和IL-13的释放方面,SM17/抗-TSLP和SM17/抗-IL33 bsBp的不同对与单独使用SM17所观察到的相比,表

现出增强或/和协同作用(见图13)。具体而言,在IL-5释放测定中,与SM17处理相比,SM17-抗-IL-33 3#显示出最强的抑制作用。在CCL8释放测定中,与SM17相比,SM17-抗-IL-33 1#和SM17-抗-IL-33 3#都显示出更强的抑制作用。在IFNγ释放测定中,与SM17相比,所有三种SM17-抗-IL-33bsBp都显示出更强的抑制作用。在CCL17释放测定中,与SM17处理相比,SM17-抗-TSLP 1#和SM17-抗-TSLP 3#bsBp都显示出更强的抑制作用。图13和表7总结了bsBp在不同细胞因子释放测定中的效力。

[0312] 表7:bsBp在细胞因子释放测定中的效力

[0313]

细胞因子	SM17-抗TSLP 1# bsBp	SM17-抗TSLP 2# bsBp	SM17-抗TSLP 3# bsBp	SM17-抗IL-33 1# bsBp	SM17-抗IL-33 2# bsBp	SM17-抗IL-33 3# bsBp	SM17
IL-5	++	++	+	++	++	+++	++
IL-13	+++	++	+++	++	++	++	++
CCL-8	**Nil**	**Nil**	**Nil**	+	+	++	-
CCL-17	+	+	+	**Nil**	**Nil**	**Nil**	-
IFNγ	**Nil**	**Nil**	**Nil**	++	++	+	-

[0314] bsBp的特定细胞因子抑制强度,以+/+++为半定量标准(-=无抑制作用,+、++、+++=弱、中、强抑制作用)。Nil:未调查。

[0315] 实施例13:警报素对ILC2的促增殖作用

[0316] 分离的人ILC2细胞能响应于警报素增殖。通过EasySep™人ILC2分离试剂盒(STEMCELL Technologies Inc.Cambridge,MA)从新鲜人PMBC富集人ILC2。然后将浓缩的ILC2在含有10%人AB血清(Sigma)的RPMI1640培养基(Thermo Fisher Scientific)中培养。将IL-2(10单位/mL)连同IL-25(10ng/mL)或TSLP(10ng/mL)或IL-33(10ng/ml)或这3种警报素的组合加入ILC2培养物中持续7天后,然后使用一组针对ILC2的种系特异性抗体(CRTH2+、IL-7Ra+;BioLegend,圣地亚哥,CA)通过流式细胞术(BD FACSVerse)测量ILC2细胞群体的变化。结果表明,ILC2增殖的主要贡献者是IL-33,并且所有警报素的组合进一步增强ILC2扩增(见图14)。

[0317] 实施例14:地塞米松和bsBp抑制人PBMC中的ILC2和Th2细胞群体

[0318] 虽然已知警报素协同增强ILC2和Th2细胞功能,如增加细胞群体,但类固醇(如地塞米松(Dex))能抵消这些作用,导致减轻2型免疫反应[Jia,Yi等人American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology,vol.55,5(2016):675-683]。ILC2和Th2细胞群体可通过流式细胞仪(BD FACSVerse)按照本领域技术人员已知的标准程序进行测定。本文中,IL-2(10单位/ml)和三种警报素(10ng/ml)的组合持续5天,在实验中增强了ILC2和Th2细胞的细胞群体。结果表明,在人PBMC培养物中,Dex能显著减少Th2细胞群体(CD4+GATA3+群体,由抗CD4 PE抗体(BioLegend)和抗GATA3 APC抗体(Abcam,剑桥,英国)门控),但不能显著减少ILC2细胞群体(lin-IL-7Ra+CRTH2+,由抗IL-7Ra percp/花青5.5抗体和抗CRTH2 FITC抗体,BioLegend)门控)(见图15)。此外,添加Bsbp显著减少ILC2细胞群体,并且bsBp的效力总结在下图15和表8。

[0319] 表8:bsBp在ILC2和Th2增殖测定中的效力

[0320]

细胞类型	SM17-抗TSLP 1# bsBp	SM17-抗TSLP 2# bsBp	SM17-抗TSLP 3# bsBp	SM17-抗IL-33 1# bsBp	SM17-抗IL-33 2# bsBp	SM17-抗IL-33 3# bsBp	SM17	Dex
ILC2	+	+++	++	+++	+++	+++	++	+
Th2	++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++

[0321] bsBp的细胞增殖抑制作用,以+/+++为半定量标准(-=无抑制作用,+、++、+++=弱、中、强抑制作用)。

[0322] 实施例15:树突状细胞效力测定

[0323] 来自炎症上皮细胞的TSLP通过CCL17促进树突状细胞(DC)成熟以激发Th2反应,CCL17诱导CD4+T细胞趋化,以介导炎症(Kitajima和Ziegler.2013.“Cutting Edge: Identification Of The Thymic Stromal Lymphopoietin-Responsive Dendritic Cell Subset Critical For Initiation Of Type 2Contact Hypersensitivity”.J Immunol 191:4903-4907;Bleck等人2015.“Co-Expression Of Type 2Immune Targets In Sputum-Derived Epithelial And Dendritic Cells From Asthmatic Subjects”.J Allergy Clin Immunol 136:619-627.e5)。正常人DC获得自Lonza(Bend,OR)。DC在LGM-3培养基(Lonza)中培养。在5μg/mL SM17、IgG4同种型对照(Sino Biological)、SM17-TSLPR bsBp(SM17与TSLP受体胞外结构域融合)或SM17-抗-TSLP bsBp 2#存在下,将TSLP(10ng/mL)加入DC培养物中持续5天。收集上清液并且按照制造商的说明书(R&D systems)通过ELISA测量CCL17的水平。结果表明,双特异性SM17-TSLPR和SM17-抗-TSLP bsBp 2#有效抑制DC中TSLP诱导的CCL17的产生(图16)。SM17、IgG4和bsBp的效力总结在下表9中。

[0324] 表9:在树突状细胞上bsBp在CCL17释放测定中的效力

[0325]

构建体	SM17-抗TSLP 1# bsBp	SM17-抗TSLP 2# bsBp	SM17-抗TSLP 3# bsBp	SM17	IgG4
效力	-	+	-	-	-

[0326] bsBp、SM17和IgG4同种型的CCL17释放的抑制作用,以+/+++为半定量标准(-=无抑制作用,+、++、+++=弱、中、强抑制作用)

[0327] 虽然本发明已详细描述并参考了其具体实施方式,但本领域的技术人员显然可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下对其进行各种更改和修改。

SM17与不同物种IL-17RB结合的剂量依赖性曲线

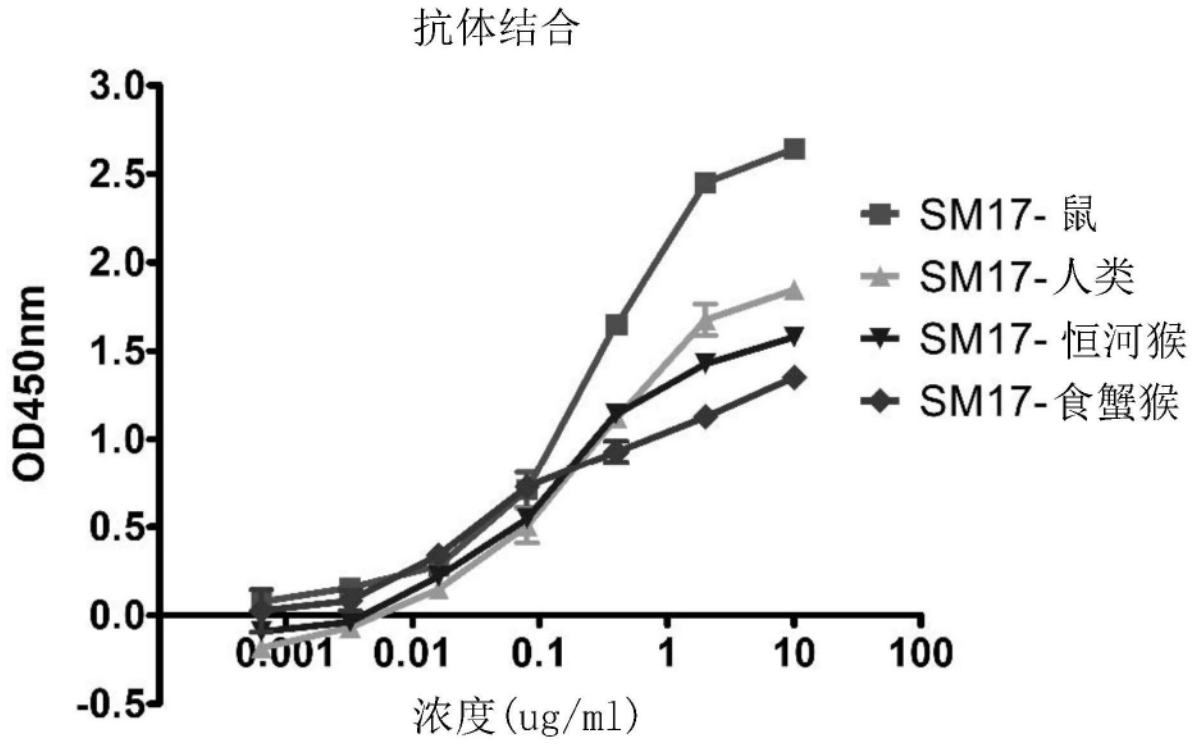


图1

SM17与IL-17受体家族成员的结合特异性

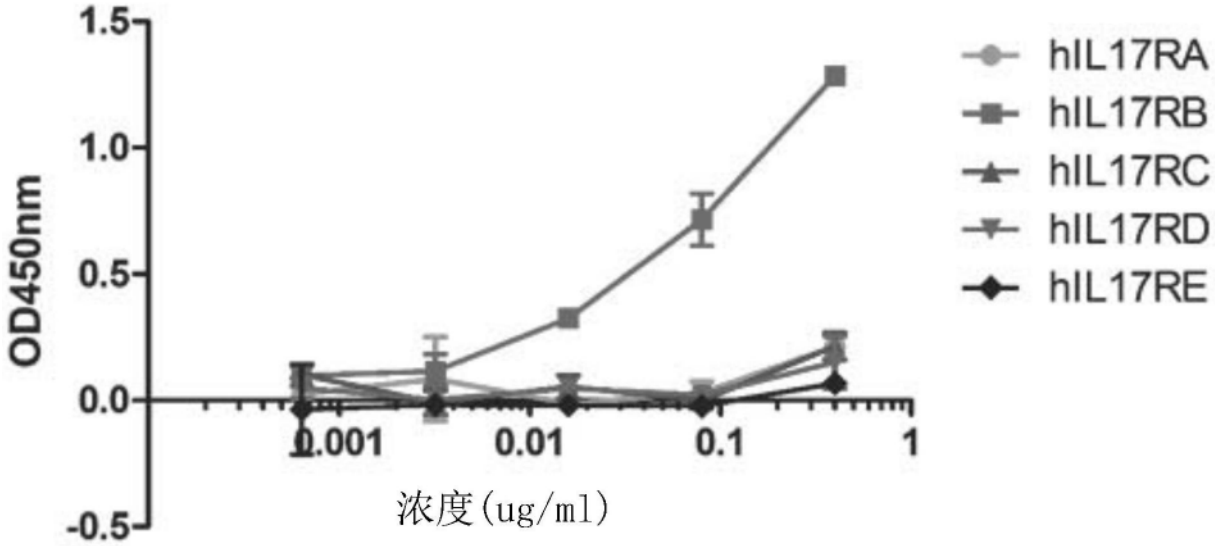


图2

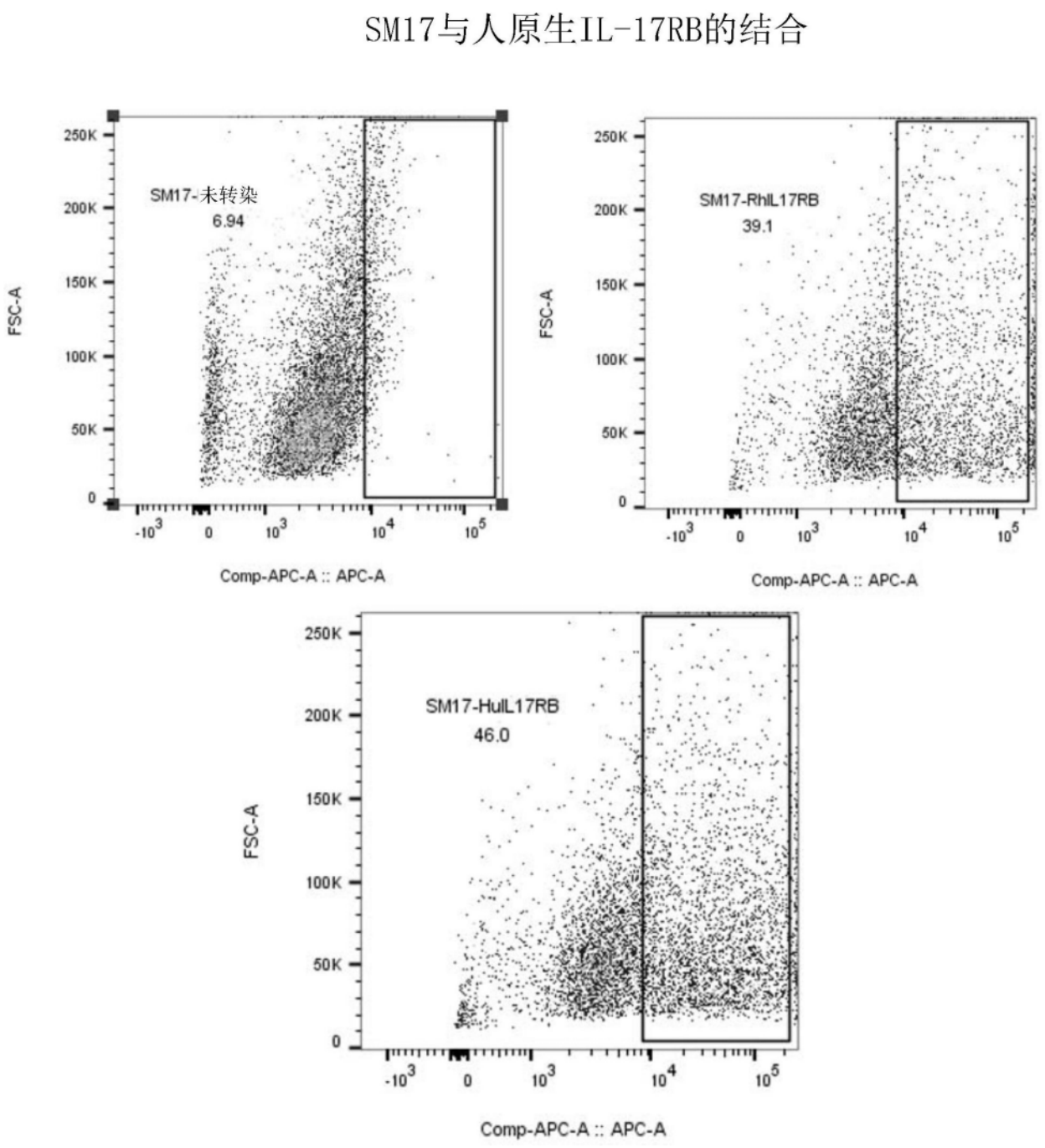

SM17与人原生IL-17RB的结合
SM17-未转染
6.94
SM17-RhlL17RB
39.1
SM17-HulL17RB
46.0
FSC-A
Comp-APC-A :: APC-A
250K
200K
150K
100K
50K
0

图3

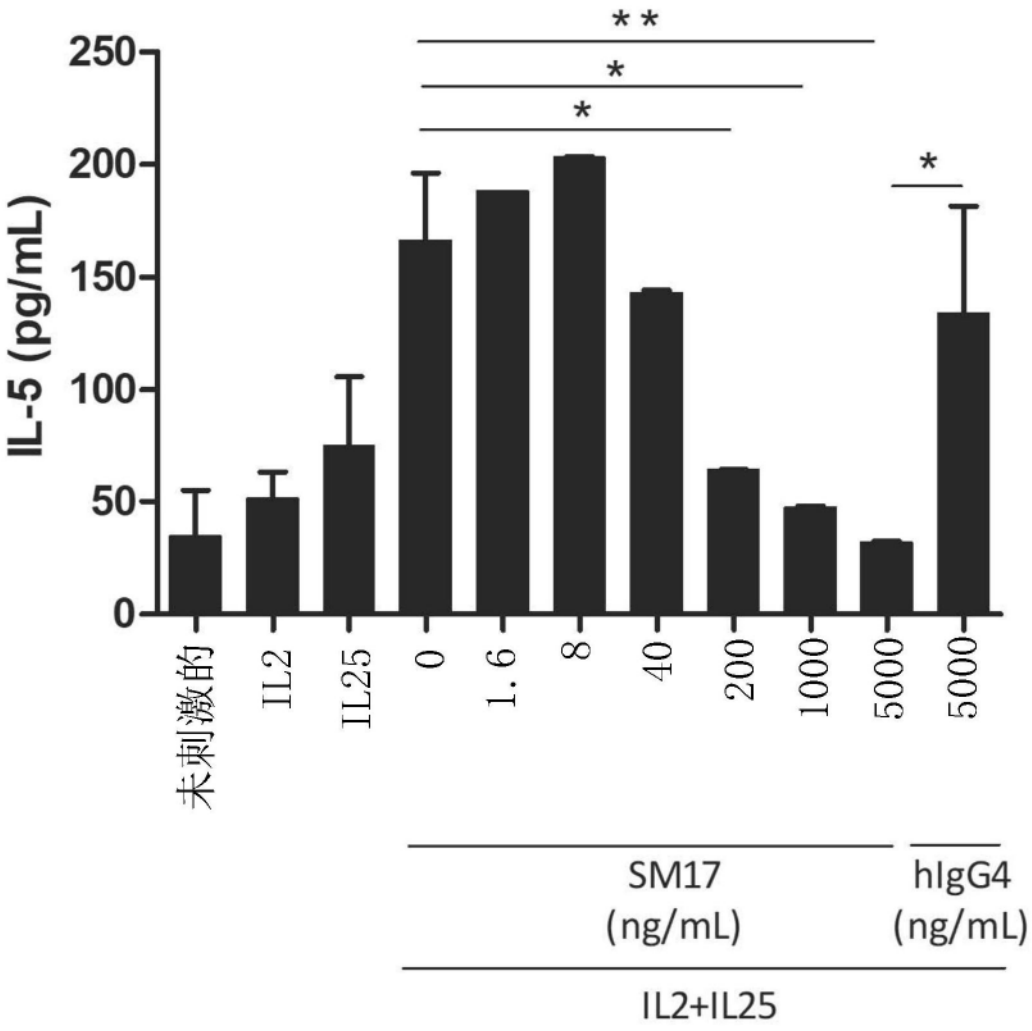

SM-17对人PBMC培养物中IL-5的剂量依赖性抑制作用
IL-5 (pg/mL)
250
200
150
100
50
0
**
*
*
*
未刺激的
IL2
IL25
0
1.6
8
40
200
1000
5000
5000
SM17
(ng/mL)
hIgG4
(ng/mL)
IL2+IL25

图4

SM17抑制由TK-10细胞产生IL-8

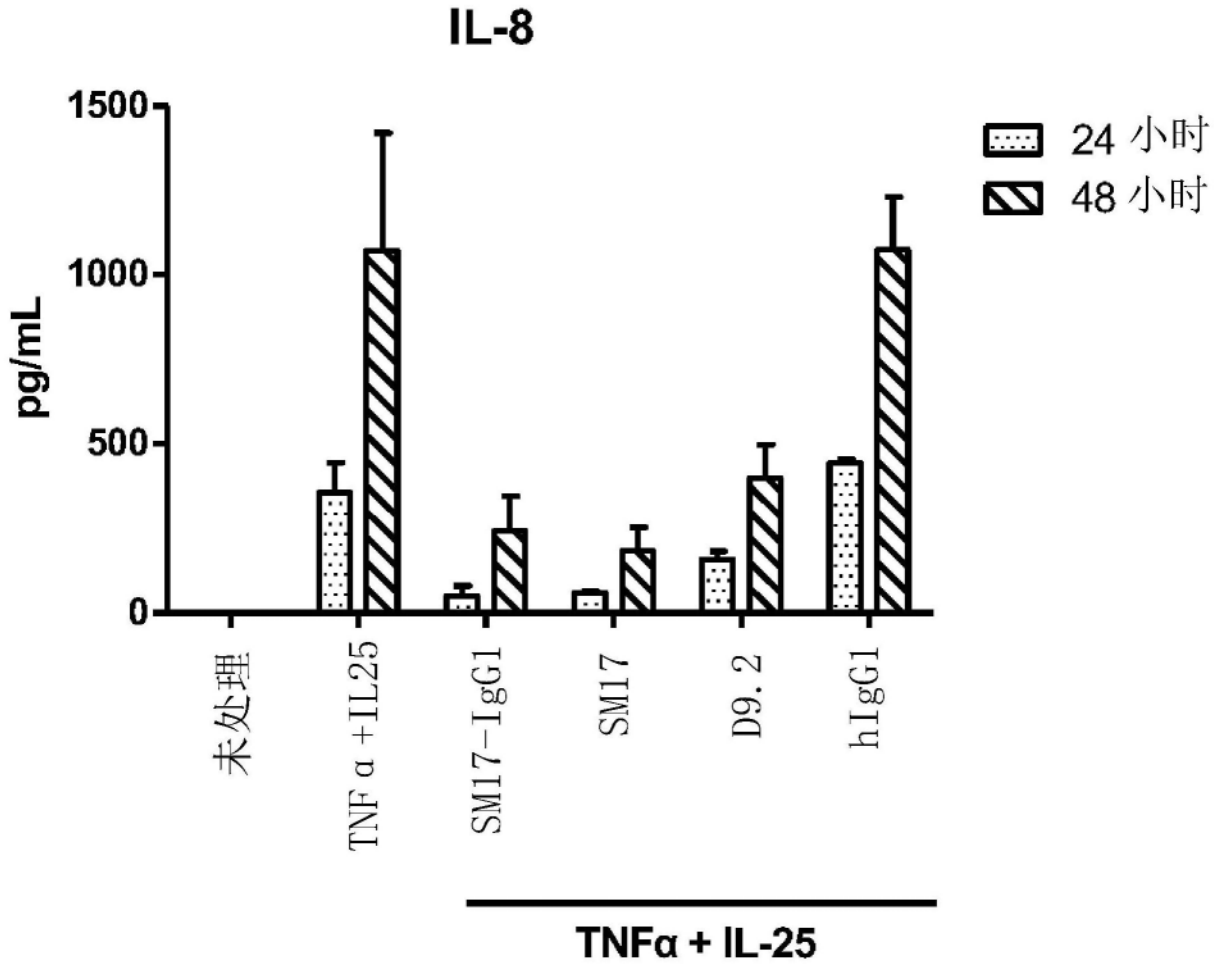


图5

SM-17在抑制OVA诱导的鼠实验性哮喘的气道高反应性的效果

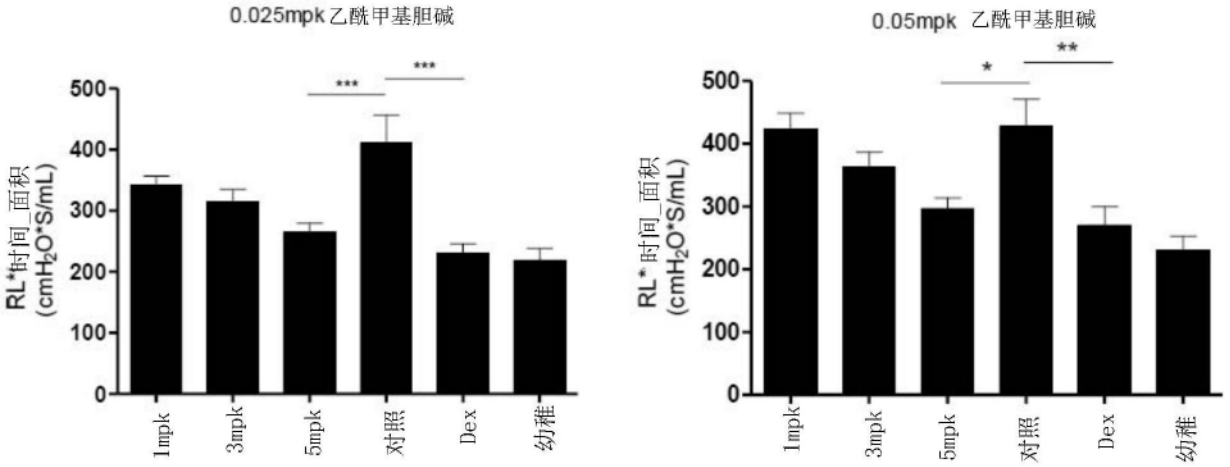


图6

SM-7在抑制OVA-诱导的鼠实验哮喘中BALF IL-5和IL-13水平的效果

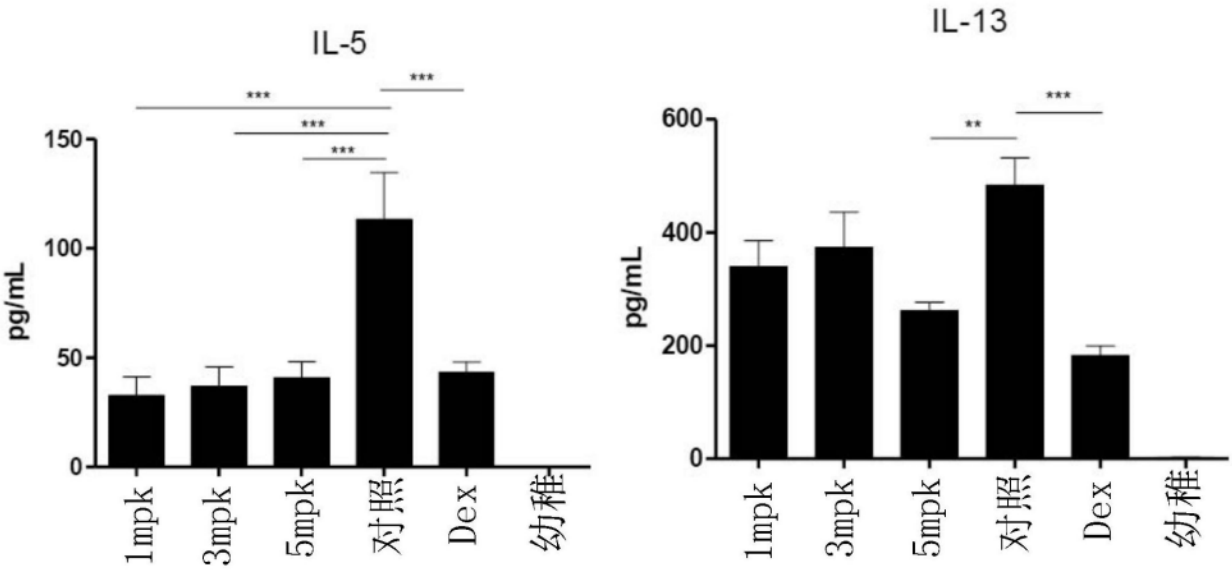


图7

SM-17在抑制OVA诱导的鼠实验性哮喘中BALF嗜酸性粒细胞计数的效果

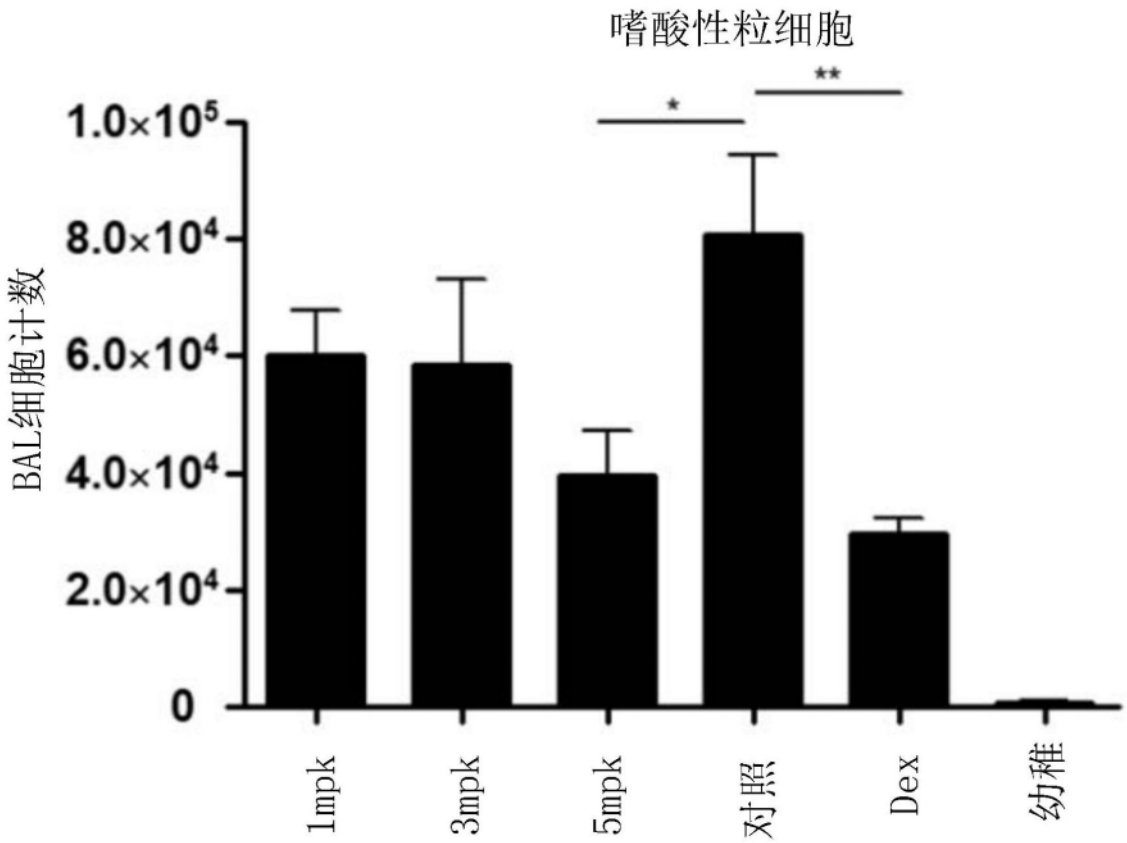


图8

IL25/SM17相互作用模式和可能的疾病指征

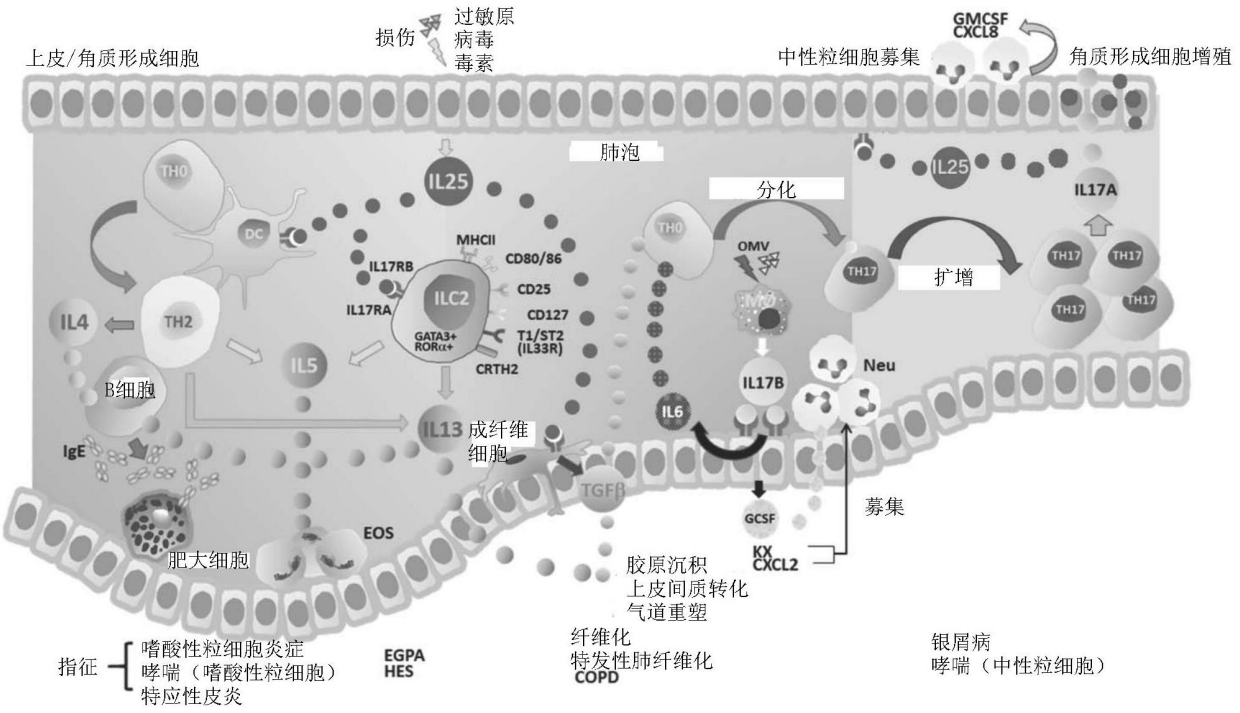


图9

双特异性结合蛋白（双特异性抗体和抗体-受体融合蛋白）的设计

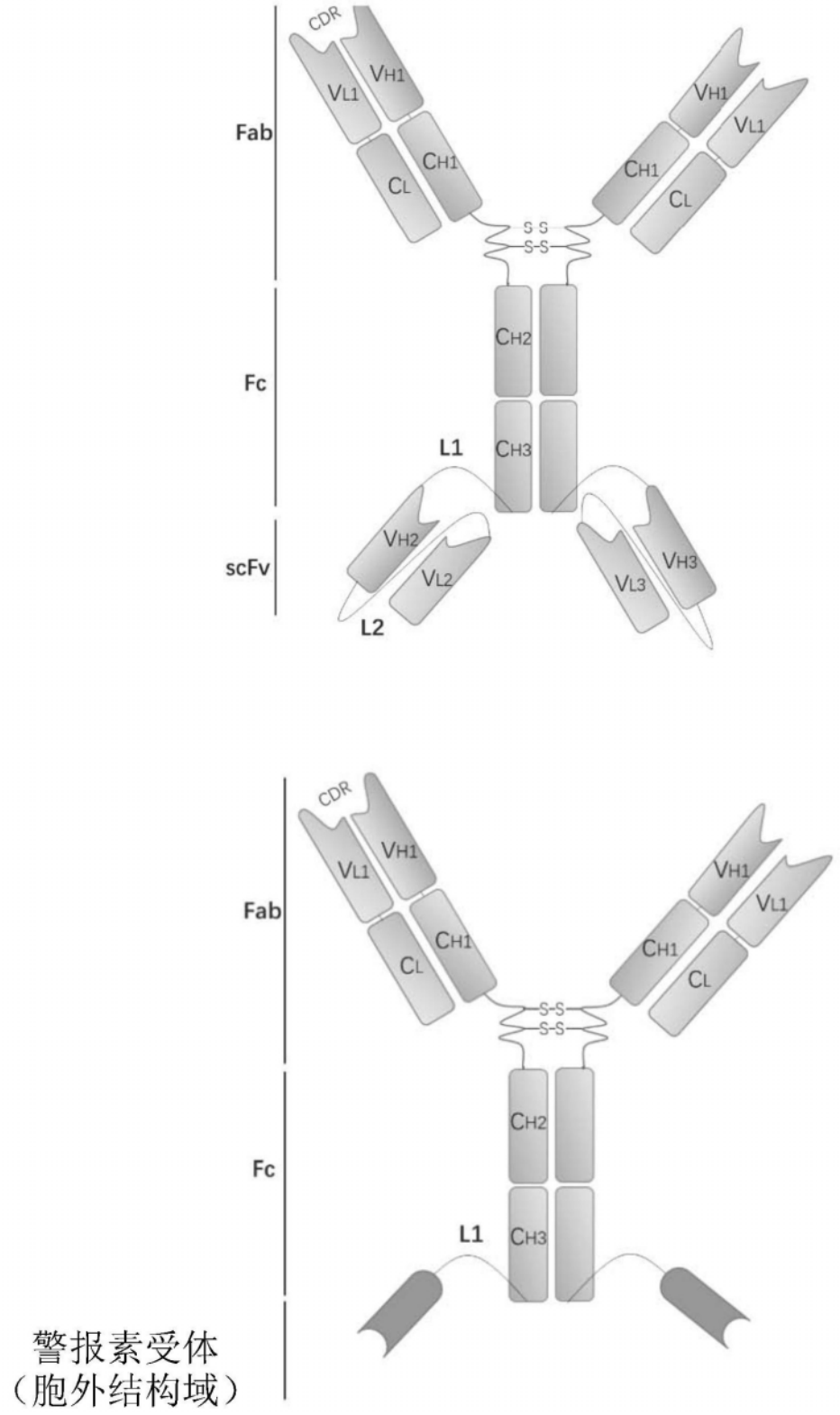


图10A

从ExpiCHO瞬时转染系统纯化的SM17、SM17-抗-TSLP和SM17-抗-IL-33 bsBp的还原性SDS-PAGE

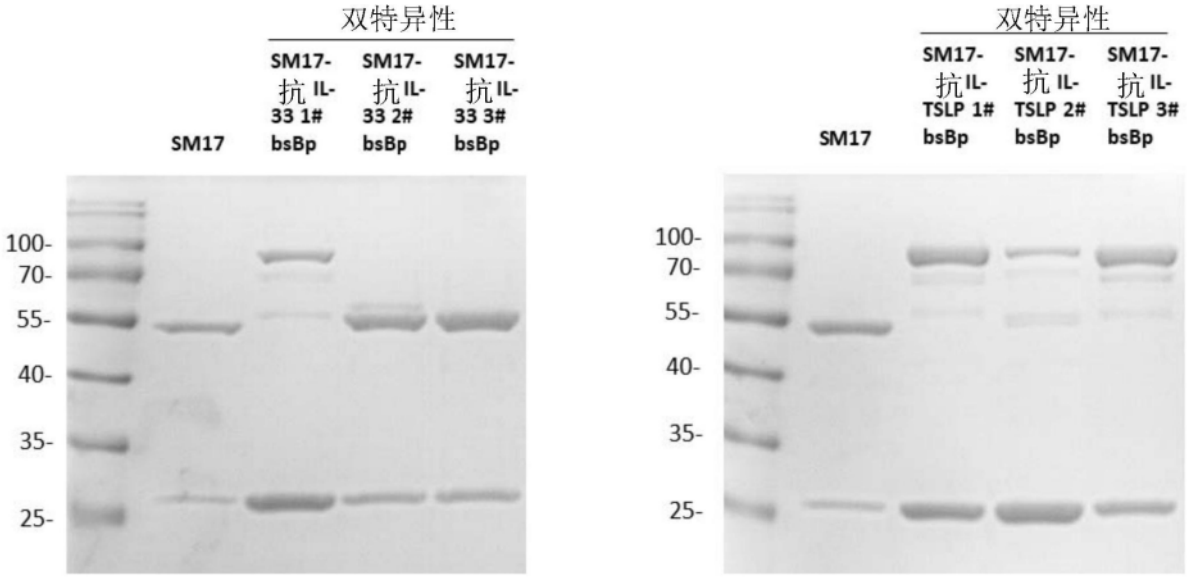
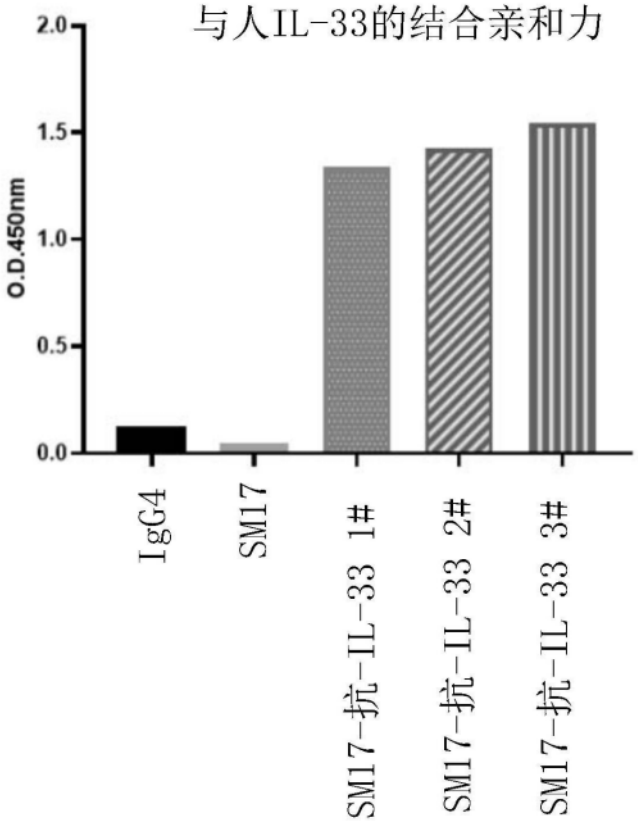


图10B

抗警报素双特异性结合蛋白的抗原结合



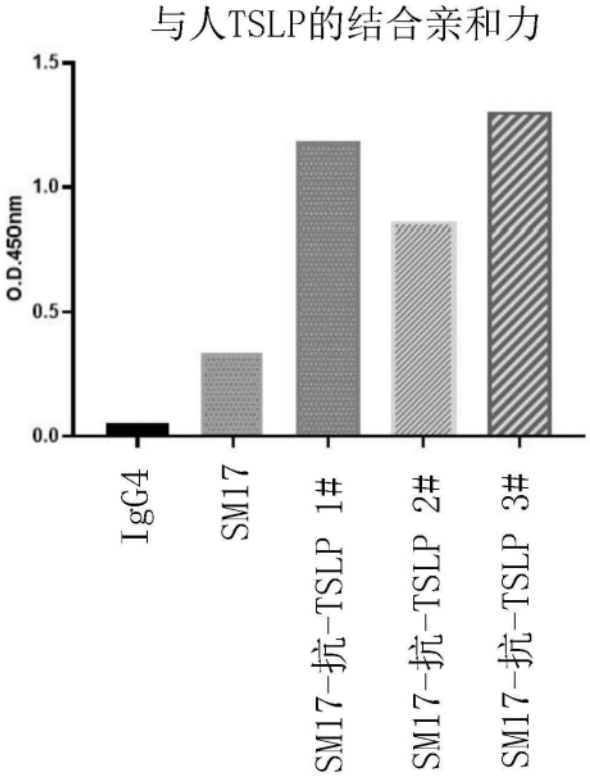


图11

警报素由人PBMC诱导IFNγ、CCL8、CCL17、IL-5和IL-13以及SM17对细胞因子释放的抑制效果

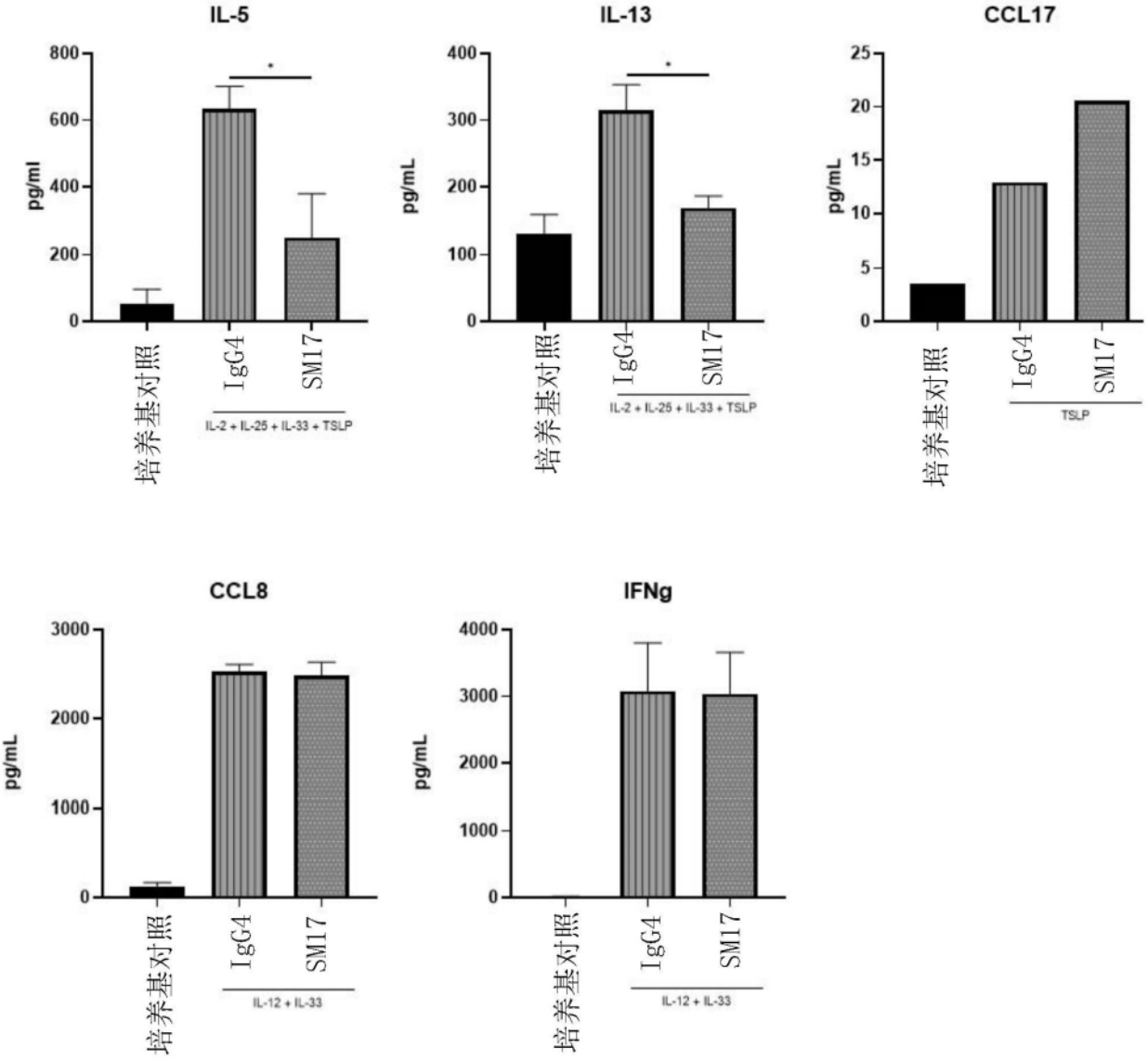


图12

不同的双特异性结合蛋白对诱导人PBMC释放细胞因子和趋化因子的效力

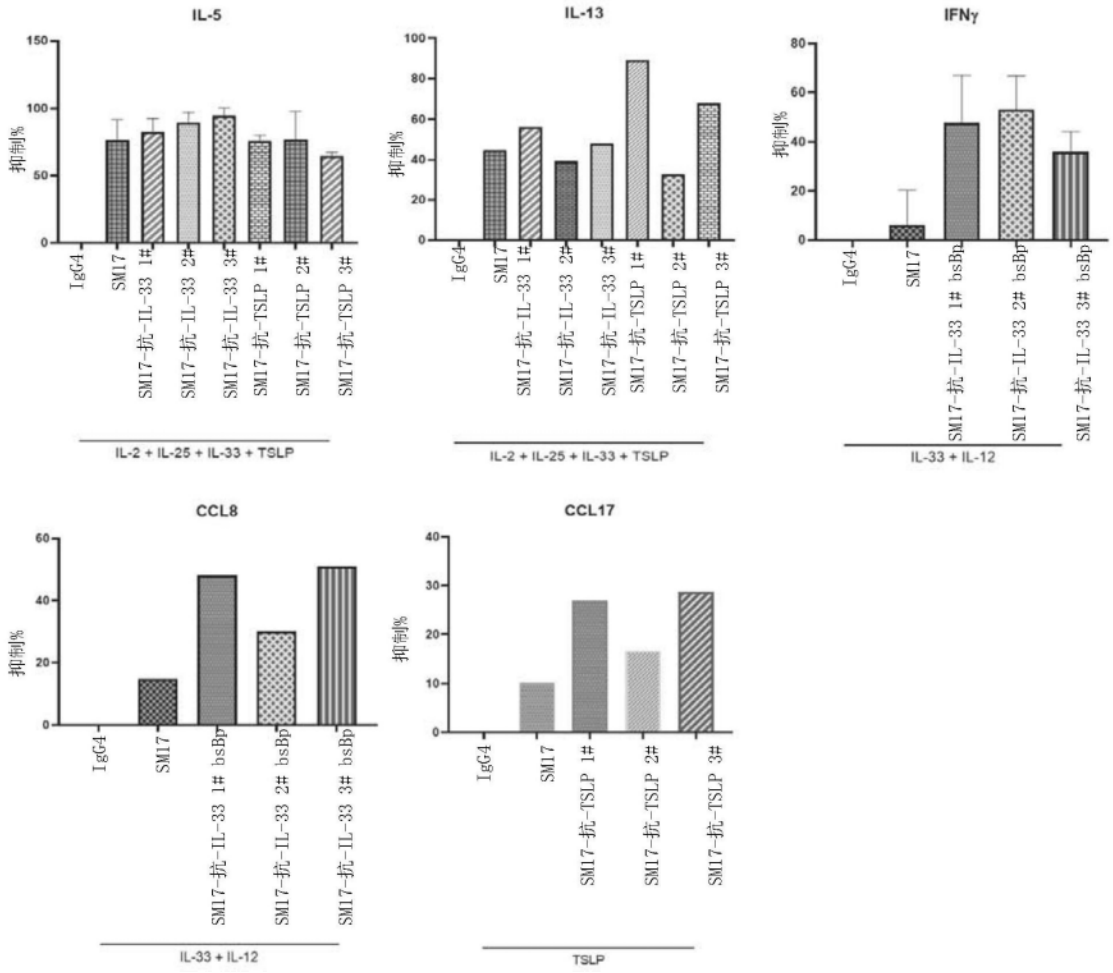


图13

警报素对ILC2的促增殖效果

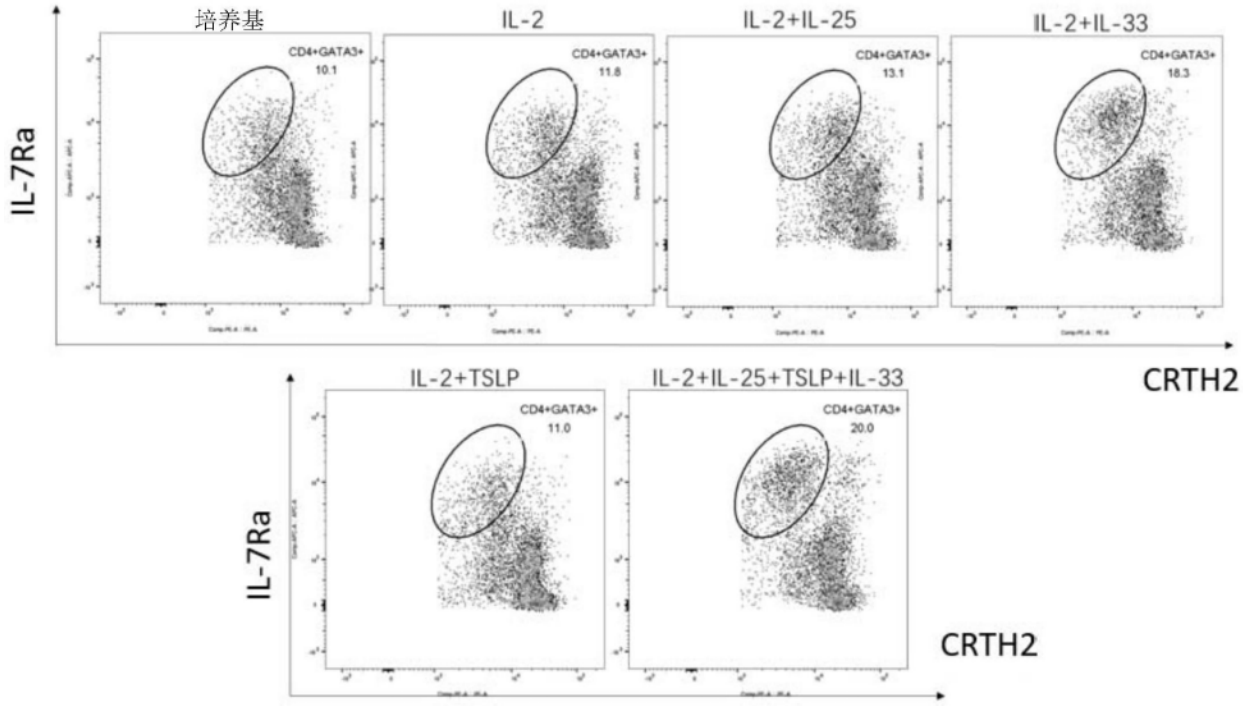


图14

ILC2和Th2细胞对类固醇激素响应的结果

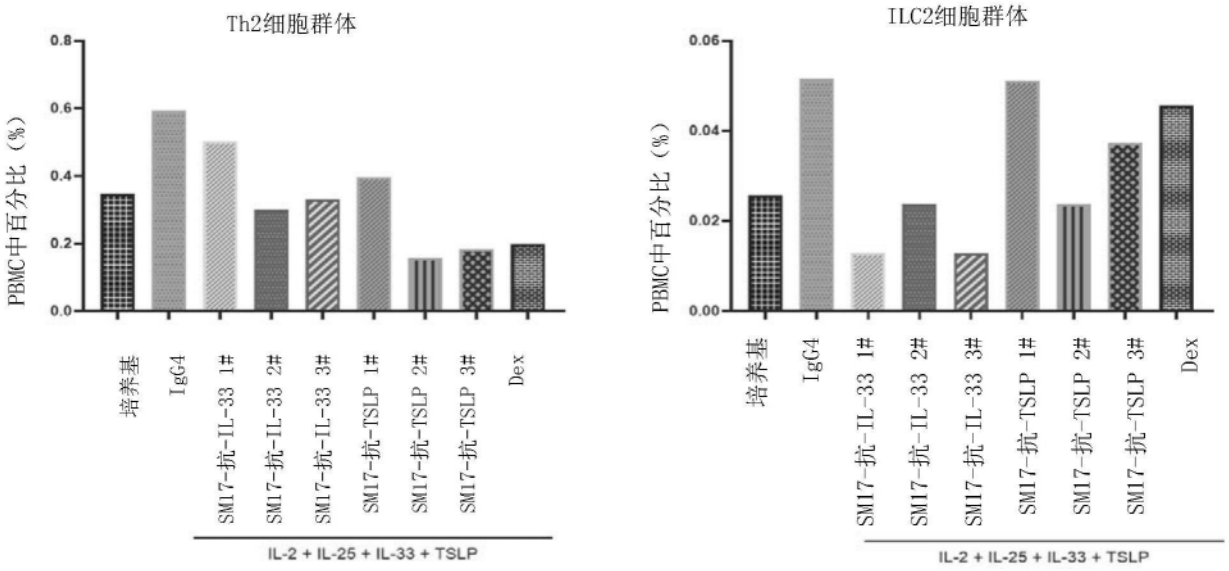


图15

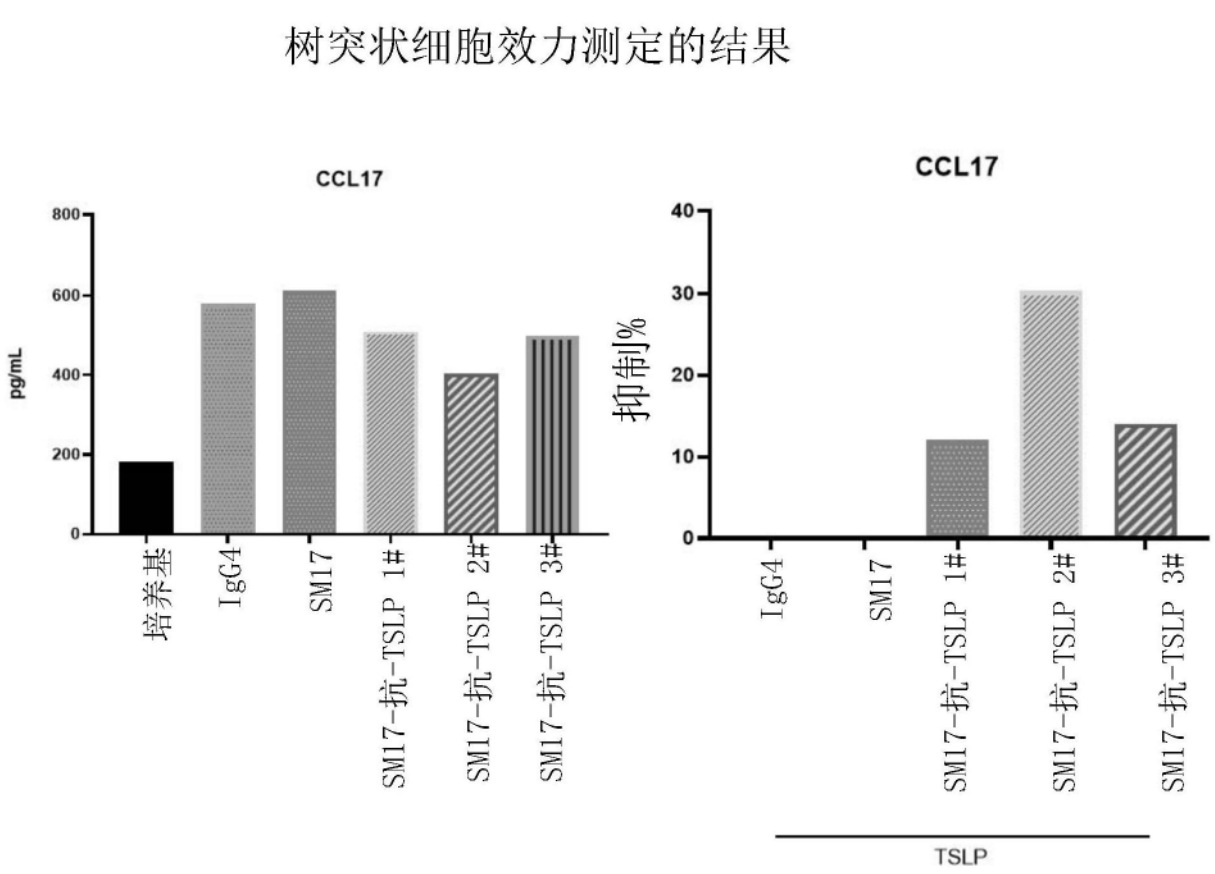

树突状细胞效力测定的结果
CCL17
pg/mL
800
600
400
200
0
培养基
IgG4
SM17
SM17-抗-TSLP 1#
SM17-抗-TSLP 2#
SM17-抗-TSLP 3#
CCL17
抑制%
40
30
20
10
0
IgG4
SM17
SM17-抗-TSLP 1#
SM17-抗-TSLP 2#
SM17-抗-TSLP 3#
TSLP

图16