



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106459182 B

(45) 授权公告日 2021.09.03

(21) 申请号 201480076500.1

(72) 发明人 吴辰冰

(22) 申请日 2014.12.24

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106459182 A

11247

(43) 申请公布日 2017.02.22

代理人 张莉 黄革生

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2013/090923 2013.12.30 CN

(51) Int.CI.

C07K 16/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016.08.26

(56) 对比文件

US 2012301400 A1, 2012.11.29

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 101952312 A, 2011.01.19

PCT/US2014/072336 2014.12.24

US 2005250185 A1, 2005.11.10

(87) PCT国际申请的公布数据

US 2005074821 A1, 2005.04.07

W02015/103072 EN 2015.07.09

US 2008269467 A1, 2008.10.30

(73) 专利权人 岸迈生物科技有限公司

US 2006235208 A1, 2006.10.19

地址 上海市闵行区浦驰路1335弄56号

CN 101952312 A, 2011.01.19

审查员 田颖

权利要求书4页 说明书76页

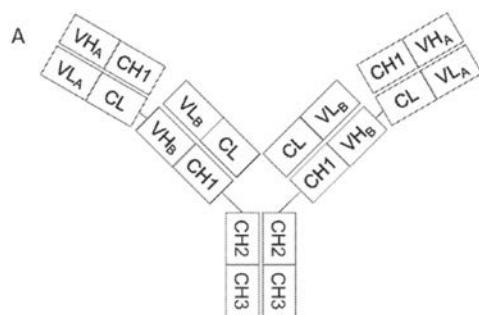
序列表57页 附图7页

(54) 发明名称

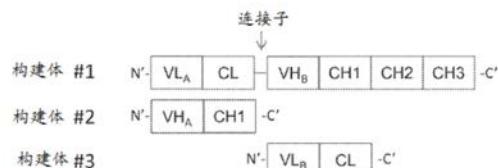
串联FAB免疫球蛋白及其用途

(57) 摘要

本发明提供了能够结合两个或更多个抗原，或者两个或更多个表位的多价和多特异性结合蛋白。本发明还提供了制备和使用此类多价和多特异性结合蛋白的方法，包括使用此类结合蛋白预防或治疗各种疾病，或在体外或体内检测特异性抗原的方法。



B



1. 一种包含三条多肽链的双特异结合蛋白,其中:

第一多肽链从氨基末端到羧基末端包含(i) VL_A-CL-VH_B-CH1-Fc,其中CL与VH_B直接融合,或(ii) VH_B-CH1-VL_A-CL-Fc,其中CH1与VL_A直接融合,且其中在可变结构域和恒定结构域之间无接头插入;

其中第二多肽链从氨基末端到羧基末端包含VH_A-CH1,其中在VH_A和CH1之间无接头插入;

其中第三多肽链从氨基末端到羧基末端包含VL_B-CL,其中在VL_B和CL之间无接头插入;

其中A是第一表位或抗原,并且B是第二表位或抗原,并且其中A和B是相同抗原上的不同表位、或者是不同抗原上的不同表位,

其中VL_A是结合A的第一亲本单克隆抗体的轻链可变结构域,CL是抗体轻链恒定结构域,VH_B是结合B的第二亲本抗体的重链可变结构域,CH1是抗体重链的第一恒定结构域,VH_A是结合A的所述第一亲本单克隆抗体的重链可变结构域,且VL_B是结合B的所述第二亲本抗体的轻链可变结构域;且

其中两个所述第一多肽链、两个所述第二多肽链、和两个所述第三多肽链能够缔合以提供双特异性四价单体结合蛋白,所述蛋白包含6个多肽链,具有4个功能性Fab结合区域,且其中所述结合蛋白能够结合A表位或抗原和B表位或抗原。

2. 如权利要求1所述的双特异性结合蛋白,其中所述Fc是人IgG1的Fc。

3. 如权利要求1所述的双特异性结合蛋白,其中所述Fc是根据SEQ ID NO:20。

4. 如权利要求1所述的双特异性结合蛋白,其中所述Fc是变体Fc。

5. 如权利要求1所述的双特异性结合蛋白,其中所述结合蛋白能够结合选自由以下组成的组的细胞因子对:IL-1 α 和IL-1 β ;IL-12和IL-18;TNF α 和IL-23;TNF α 和IL-13;TNF和IL-18;TNF和IL-12;TNF和IL-1 β ;TNF和MIF;TNF和IL-6;TNF和IL-6受体;TNF和IL-17;IL-17和IL-20;IL-17和IL-23;TNF和IL-15;TNF和VEGF;VEGFR和EGFR;IL-13和IL-9;IL-13和IL-4;IL-13和IL-5;IL-13和IL-25;IL-13和TARC;IL-13和MDC;IL-13和MIF;IL-13和TGF- β ;IL-13和LHR激动剂;IL-13和CL25;IL-13和SPRR2a;IL-13和SPRR2b;IL-13和ADAM8;TNF α 和PGE4;IL-13和PED2;以及TNF和PEG2。

6. 如权利要求5所述的双特异性结合蛋白,其中所述结合蛋白结合人IL-17和人IL-20。

7. 如权利要求6所述的双特异性结合蛋白,其中所述结合蛋白包含来源于抗IL-17抗体LY和抗IL-20抗体15D2的可变重链和可变轻链。

8. 如权利要求1所述的双特异性结合蛋白,其中所述结合蛋白包含含有选自由SEQ ID NO:15组成的组的氨基酸序列的第一多肽链;含有根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列的第二多肽链;及含有根据SEQ ID NO:23的序列的第三多肽链。

9. 如权利要求1所述的双特异性结合蛋白,其中所述结合蛋白能够结合选自由以下组成的组的靶标对:CD138和CD20;CD138和CD40;CD19和CD20;CD20和CD3;CD3和CD33;CD16和CD33;CD3和CD133;CD38和CD138;CD38和CD20;CD20和CD22;CD38和CD40;CD40和CD20;CD-8和IL-6;CSPG和RGM A;CTLA-4和BTN02;IGF1和IGF2;IGF1/2和ErbB2;IGF-1R和EGFR;EGFR和CD13;IGF-1R和ErbB3;EGFR-2和IGFR;VEGFR-2和Met;VEGF-A和血管生成素-2(Ang-2);IL-12和TWEAK;IL-13和IL-1 β ;MAG和RGM A;NgR和RGM A;NogoA和RGM A;OMGp和RGM A;PD-L1和CTLA-4;PD-1和CTLA-4;PD-1和TIM-3;CD137和CD20;CD137和EGFR;CD137和Her-2;CD137和

PD-1;CD137和PDL-1;VEGF和PD-L1;Lag-3和TIM-3;OX40和PD-1;TIM-3和PD-L1;EGFR和DLL-4;PDGFR和VEGF;EpCAM和CD3;Her2和CD3;CD19和CD3;EGFR和Her3;CD16a和CD30;CD30和PSMA;EGFR和CD3;CEA和CD3;TROP-2和HSG;TROP-2和CD3;VEGF和EGFR;HGF和VEGF;VEGF上的不同表位;EGFR和cMet;PDGF和VEGF;VEGF和DLL-4;OX40和PD-L1;ICOS和PD-1;ICOS和PD-L1;Lag-3和PD-1;Lag-3和PD-L1;Lag-3和CTLA-4;ICOS和CTLA-4;CD47和CD20;RGM A和RGM B;Te38和TNF α ;TNF α 和Blys;TNF α 和CD-22;TNF α 和CTLA-4结构域;TNF α 和GP130;TNF α 和IL-12p40;及TNF α 和RANK配体。

10. 如权利要求9所述的双特异性结合蛋白,其中所述结合蛋白能够结合人CD3和人CD20。

11. 如权利要求10所述的双特异性结合蛋白,其中所述结合蛋白包含来源于抗CD3抗体OKT3和抗CD20抗体奥法木单抗的可变重链和可变轻链。

12. 如权利要求1所述的双特异性结合蛋白,其中所述结合蛋白包含含有根据SEQ ID NO:41的氨基酸序列的第一多肽链;含有根据SEQ ID NO:44的氨基酸序列的第二多肽链;及含有根据SEQ ID NO:46的氨基酸序列的第三多肽链。

13. 如权利要求1所述的双特异性结合蛋白,其中所述结合蛋白能够结合CTLA-4上的一个或多个表位。

14. 如权利要求1所述的双特异性结合蛋白,其中所述结合蛋白能够结合PD-1上的一个或多个表位。

15. 如权利要求1所述的双特异性结合蛋白,其中所述结合蛋白能够结合T细胞上作为免疫检查点蛋白的蛋白质上的一个或多个表位。

16. 如权利要求15所述的双特异性结合蛋白,其中所述免疫检查点蛋白选自由以下组成的组:TIM-3、Lag3、ICOS、BTLA、CD160、2B4、KIR、CD137、CD27、OX40、CD40L及A2aR。

17. 如权利要求1所述的双特异性结合蛋白,其中所述结合蛋白能够结合涉及免疫检查点活性的蛋白质上的一个或多个表位。

18. 如权利要求17所述的双特异性结合蛋白,其中所述涉及免疫检查点活性的蛋白质选自由以下组成的组:PD-L1、PD-L2、半乳糖凝集素9、HVEM、CD48、B7-1、B7-2、ICOSL、B7-H3、B7-H4、CD137L、OX40L、CD70及CD40。

19. 如权利要求1至18中任一项所述的双特异性结合蛋白,其中相对于单特异性抗体或抗体片段,所述结合蛋白以类似或更高的亲和力结合至每一抗原。

20. 如权利要求1至18中任一项所述的双特异性结合蛋白,其中所述结合蛋白与选自由以下组成的组的试剂偶联:免疫粘附分子、显影剂、治疗剂及细胞毒性剂。

21. 一种药物组合物,其包含权利要求1-20中任一项所述的双特异性结合蛋白及一种或多种药学上可接受的载体。

22. 根据权利要求1-20中任一项所述的双特异性结合蛋白的用途,所述结合蛋白用于制造供治疗或预防炎性疾病、自体免疫性疾病、神经退行性疾病、癌症或脊髓损伤用的药物。

23. 如权利要求22所述的用途,其中所述炎性疾病、自体免疫性疾病或神经退行性疾病选自由以下组成的组:哮喘、类风湿性关节炎、SLE、多发性硬化、阿尔茨海默氏病或帕金森氏病。

24. 如权利要求1所述的双特异性结合蛋白,其中所述双特异性结合蛋白包含含有根据SEQ ID NO:87的氨基酸序列的第一多肽链;含有根据SEQ ID NO:89的氨基酸序列的第二多肽链;及含有根据SEQ ID NO:91的序列的第三多肽链。

25. 如权利要求5所述的双特异性结合蛋白,其中所述双特异性结合蛋白能够结合人TNF和人IL-17。

26. 如权利要求1所述的双特异性结合蛋白,其中所述双特异性结合蛋白包含含有根据SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第一多肽链;含有根据SEQ ID NO:95的氨基酸序列的第二多肽链;及含有根据SEQ ID NO:97的序列的第三多肽链。

27. 如权利要求9所述的双特异性结合蛋白,其中所述双特异性结合蛋白能够结合人CTLA-4和人PD-1。

28. 根据权利要求1的双特异性结合蛋白在制备药物中的用途,其中所述药物用于治疗选自由类风湿性关节炎、牛皮癣、骨质疏松症、中风、肝病及口腔癌组成的组的疾病,其中所述双特异性结合蛋白能够结合IL-17和IL-20。

29. 根据权利要求1的双特异性结合蛋白在制备药物中的用途,其中所述药物用于治疗B细胞癌症,其中所述双特异性结合蛋白能够结合CD3和CD20。

30. 如权利要求29所述的用途,其中所述B细胞癌症选自由以下组成的组:霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、前体B细胞淋巴母细胞性白血病/淋巴瘤、成熟B细胞赘瘤、B细胞慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞性淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、皮肤滤泡中心淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤、毛细胞白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、浆细胞瘤、浆细胞性骨髓瘤、移植后淋巴增生病症、移瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症及间变性大细胞淋巴瘤。

31. 根据权利要求1的双特异性结合蛋白在制备药物中的用途,其中所述药物用于治疗自体免疫性疾病或炎性疾病,其中所述结合蛋白能够结合TNF和IL-17。

32. 如权利要求31所述的用途,其中所述自体免疫性疾病或炎性疾病选自由以下组成的组:克罗恩氏病、牛皮癣、关节炎、多发性硬化、强直性脊椎炎、强直性关节病变、全身性红斑狼疮、葡萄膜炎、败血症、神经退行性疾病、神经元再生、脊髓损伤、原发性和转移性癌症、呼吸道病症哮喘、过敏性和非过敏性哮喘、由感染引起的哮喘、由感染呼吸道合胞病毒(RSV)引起的哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、涉及气道炎症的病状、嗜酸性粒细胞增多症、纤维化和过量粘液产生、囊性纤维化、肺纤维化、异位性病症、异位性皮炎、荨麻疹、湿疹、过敏性鼻炎、过敏性肠胃炎、炎性和/或自体免疫性皮肤病状、炎性和/或自体免疫性胃肠器官病状、炎性肠病(IBD)、溃疡性结肠炎、炎性和/或自体免疫性肝病、肝硬化、肝纤维化、硬皮病、肝细胞癌、成胶质细胞瘤、淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、HTLV-1感染、1型保护性免疫反应表达的抑制以及在疫苗接种期间1型保护性免疫反应表达的抑制。

33. 如权利要求32所述的用途,其中所述自体免疫性疾病是类风湿性关节炎、全身性红斑狼疮或多发性硬化。

34. 根据权利要求1的双特异性结合蛋白在制备药物中的用途,其中所述药物用于治疗癌症,其中所述双特异性结合蛋白能够结合CTLA-4和PD-1。

35. 如权利要求34所述的用途,其中所述癌症是黑素瘤、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、乳癌、结肠癌、肺癌、食道癌、头颈鳞状细胞癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、甲状腺癌、成胶质细胞瘤、神

经胶质瘤、白血病、淋巴瘤或其它赘生性恶性疾病。

36. 权利要求32所述的用途,其中所述牛皮癣是斑块状牛皮癣。

37. 权利要求32所述的用途,其中所述关节炎是类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎、骨关节炎或青少年特发性关节炎。

38. 权利要求31所述的用途,其中所述自体免疫性疾病或炎性疾病是病毒感染、细菌感染、寄生虫感染。

39. 权利要求32的所述的用途,其中所述肝纤维化是由乙型和/或丙型肝炎病毒引起的肝纤维化。

串联FAB免疫球蛋白及其用途

[0001] 以引用的方式并入

[0002] 本申请要求2013年12月30日提交的国际申请号PCT/CN2013/090923的优先权,所述国际申请以引用的方式整体并入本文中。

发明领域

[0003] 本发明涉及多价和多特异性结合蛋白以及制备和使用多价和多特异性结合蛋白的方法。

[0004] 有关以电子方式提交的文本文件的说明

[0005] 以电子方式与本申请一起提交的文本文件的内容以引用的方式整体并入本文中:序列表的计算机可读格式的副本(文件名:EPBI_001_01WO_SeqList_ST25.txt,记录日期:2014年12月2日,文件大小:98KB)。

[0006] 发明背景

[0007] 已经尝试产生双特异性或多特异性抗体以制备可用于治疗各种炎性疾病、癌症和其它病症的分子。

[0008] 已基于表达具有双特异性抗体所需的特异性的鼠单克隆抗体的两个不同杂交瘤细胞系的体细胞融合,使用四源杂交瘤(quadroma)技术(参见Milstein,C.和A.C.Cuello,Nature,1983.305(5934):第537-40页)制造出双特异性抗体。也可以通过化学方式偶联两种不同的mAb来制造双特异性抗体(参见Staerz,U.D.等,Nature,1985.314(6012):第628-31页)。其它方法使用了以化学方式偶联两种不同的单克隆抗体或较小的抗体片段(参见Brennan,M.等,Science,1985.229(4708):第81-3页)。

[0009] 另一种方法是用异双功能交联剂偶合两种亲本抗体。具体地,将两个不同的Fab片段在其铰链半胱氨酸残基处以定点方式通过化学方法交联(参见Glennie,M.J.等,J Immunol,1987.139(7):第2367-75页)。

[0010] 近年来,开发出来了其它重组双特异性抗体形式(参见Kriangkum,J.等,Biomol Eng,2001.18(2):第31-40页)。其中,串联单链Fv分子和双价抗体(diabody),及其各种衍生物已被用于构建重组双特异性抗体。这些分子的构建通常由识别不同抗原的两个单链Fv(scFv)片段开始(参见Economides,A.N.等,Nat Med,2003.9(1):第47-52页)。串联scFv分子(taFv)代表以另外的肽连接子简单地连接两个scFv分子的一种简单形式。这些串联scFv分子中存在的两个scFv片段形成独立的折叠实体。可以使用各种连接子来连接这两个scFv片段,其中连接子长度多达63个残基(参见Nakanishi,K.等,Annu Rev Immunol,2001.19:第423-74页)。

[0011] 在近期的研究中,报导了通过转基因兔和牛在体内表达针对CD28和黑素瘤相关蛋白聚糖的串联scFv(参见Gracie,J.A.等,J Clin Invest,1999.104(10):第1393-401页)。在这一构建体中,通过CH1连接子连接两个scFv分子,并且发现双特异性抗体的血清浓度高达100mg/L。现有少数研究报导了在细菌中使用极短的Ala3连接子或富含甘氨酸/丝氨酸的较长连接子的可溶性串联scFv分子的表达(参见Leung,B.P.等,J Immunol,2000.164(12):

第6495-502页; Ito, A. 等, J Immunol, 2003.170 (9) : 第4802-9页; Karni, A. 等, J Neuroimmunol, 2002.125 (1-2) : 第134-40页)。

[0012] 在近期的研究中, 使用了含有长度是3或6个残基的随机化中间连接子的串联scFv库的噬菌体展示来富集在细菌中以可溶性和活性形式产生的那些分子。这一方法使得分离出具有6个氨基酸残基的连接子的优选的串联scFv分子(参见Arndt, M. 和 J. Krauss, Methods Mol Biol, 2003.207: 第305-21页)。

[0013] 双特异性双价抗体(Db)利用了双价抗体形式进行表达。双价抗体是由scFv片段, 通过将连接VH和VL结构域的连接子的长度减小到约5个残基来制备(参见Peipp, M. 和 T. Valerius, Biochem Soc Trans, 2002.30 (4) : 第507-11页)。这种连接子大小的减小有利于通过VH和VL结构域的交叉配对进行两条多肽链的二聚化。双特异性双价抗体通过在同一细胞内表达具有结构VHA-VLB和VHB-VLA (VH-VL构型) 或VLA-VHB和VLB-VHA (VL-VH构型) 的两条多肽链而产生。近期的比较性研究证实, 可变结构域的取向会影响活性结合位点的表达和形成(参见Mack, M., G. Riethmuller 及 P. Kufer, Proc Natl Acad Sci U S A, 1995.92 (15) : 第7021-5页)。

[0014] 一种促使产生双特异性双价抗体的方法是产生钮入孔(knob-into-hole) 双价抗体(参见Holliger, P., T. Prospero 及 G. Winter, Proc Natl Acad Sci U S A, 1993.90 (14) : 第6444-8.18页)。针对HER2和CD3的双特异性双价抗体证实了这一点。在抗HER2可变结构域或抗CD3可变结构域中, 通过Val137与Phe交换以及Leu45与Trp交换在VH结构域中引入大钮, 并且通过使Phe98突变成Met且使Tyr87突变成Ala而在VL结构域中产生互补孔。通过使用这种方法, 双特异性双价抗体的产生可以从由亲本双价抗体得到的72%增加到由钮入孔双价抗体得到的90%以上。

[0015] 单链双价抗体(scDb)代表改善类双特异性双价抗体分子的形成的一种替代性策略(参见Holliger, P. 和 G. Winter, Cancer Immunol Immunother, 1997.45 (3-4) : 第128-30页; Wu, A. M. 等, Immunotechnol, 1996.2 (1) : 第21-36页)。双特异性单链双价抗体是通过用长度为约15个氨基酸残基的另外的中间连接子连接两个形成双价抗体的多肽链而产生。因此, 分子量对应于单价单链双价抗体(50-60kDa)的所有分子都是双特异性的。若干研究已经证实, 双特异性单链双价抗体在细菌中以可溶性和活性形式表达, 其中大多数纯化的分子以单体形式存在(参见Holliger, P. 和 G. Winter, Cancer Immunol Immunother, 1997.45 (3-4) : 第128-30页; Wu, A. M. 等, Immunotechnol, 1996.2 (1) : 第21-36页; Pluckthun, A. 和 P. Pack, Immunotechnol, 1997.3 (2) : 第83-105页; Ridgway, J. B. 等, Protein Eng, 1996.9 (7) : 第617-21页)。

[0016] 双价抗体与Fc融合产生更类似Ig的分子, 称为双双价抗体(参见Lu, D. 等, J Biol Chem, 2004.279 (4) : 第2856-65页)。此外, 也已描述了在IgG的重链中包含两个Fab重复并且能够结合四个抗原分子的多价抗体构建体(参见美国专利8,722,859B2, 及 Miller, K. 等, J Immunol, 2003.170 (9) : 第4854-61页)。

[0017] 最近的实例是四价IgG-单链可变片段(scFv)融合物(Dong J等, 2011MAbs 3:273-288; Coloma MJ, Morrison SL 1997 Nat Biotechnol 15:159-163; Lu D等, 2002 J Immunol Methods 267:213-226)、三功能大鼠/小鼠杂交双特异性表皮细胞粘附分子-CD3抗体卡妥索单抗(catumaxomab) (Lindhofer H等, 1995 J Immunol 155:219-225)、双特异性CD19-

CD3scFv抗体比那妥莫单抗 (blinatumomab) (Bargou R等, 2008Science 321:974-977)、“双效Fab” (DAF) 抗体 (Bostrom J等, 2009Science 323:1610-1614)、与催化性抗体共价连接的药效团肽 (Doppalapudi VR等, 2010Proc Natl Acad Sci USA 107:22611-22616)、在一半 IgG4分子之间使用动态交换产生双特异性抗体 (van der Neut Kolschoten M等, 2007Science 317:1554-1557; Stubenrauch K等, 2010Drug Metab Dispos 38:84-91) 或通过在一半双特异性抗体的抗原结合片段 (Fab) 内交换重链结构域与轻链结构域 (交叉Mab形式) (Schaefer W等, 2011Proc Natl Acad Sci 108:11187-92)。

[0018] 本领域中需要具有双重抗原结合功能的单分子实体,以及产生此类多价和多特异性结合蛋白的方法。本发明满足了这些和其它需求。

[0019] 发明概述

[0020] 本发明提供了多价和多特异性结合蛋白以及制备和使用此类结合蛋白的方法。在一个实施方案中,本文提供的多价和多特异性结合蛋白是串联Fab免疫球蛋白 (FIT-Ig),并且能够结合两个或更多个抗原,或同一抗原的两个或更多个表位,或同一表位的两个或更多个拷贝。本文提供的多价和多特异性结合蛋白可用于治疗和/或预防急性和慢性炎性疾病和病症、自体免疫性疾病、癌症、脊髓损伤、败血症及其它疾病、病症和病状。本文提供了包含所述多价和多特异性结合蛋白的药物组合物。此外,本文还提供了用于制备此类FIT-Ig的核酸、重组表达载体及宿主细胞。使用本发明的FIT-Ig在体内或体外检测特定抗原的方法也涵盖在本发明中。

[0021] 本发明提供了一组能够例如以高亲和力结合两个或更多个抗原的结合蛋白。在一方面,本发明提供了一种使用两种亲本单克隆抗体构建双特异性结合蛋白的方法:结合抗原A的mAb A和结合抗原B的mAb B。在一个实施方案中,本文公开的结合蛋白能够结合抗原、细胞因子、趋化因子、细胞因子受体、趋化因子受体、细胞因子或趋化因子相关分子,或细胞表面蛋白。

[0022] 因此,在一方面,提供了能够结合两个或更多个抗原的结合蛋白。在一个实施方案中,本发明提供了一种包含至少两条多肽链的结合蛋白,其中所述多肽链配对形成能够结合两个或更多个抗原的类IgG分子。在一个实施方案中,所述结合蛋白包含两条、三条、四条、五条或更多条的多肽链。在一个实施方案中,所述结合蛋白包含至少一个VL_A、至少一个VL_B、至少一个VH_A、至少一个VH_B、至少一个CL及至少一个CH1,其中VL是轻链可变结构域, VH是重链可变结构域, CL是轻链恒定结构域, CH1是重链的第一恒定结构域, A是第一抗原,并且B是第二抗原。在另一实施方案中,所述第一多肽链包含VL_A、CL、VH_B及CH1。在另一实施方案中,所述结合蛋白另外包含Fc。在另一实施方案中, Fc区是变体Fc区。在另一实施方案中, 变体Fc区展现出改进的效功能,如ADCC或CDC。在另一实施方案中, 变体Fc区展现出针对一个或多个Fc_γR的改进的亲和力或亲合力。

[0023] 在一个实施方案中,所述结合蛋白包含三条多肽链,其中第一多肽链包含VL_A、CL、VH_B及CH1,第二多肽链包含VH_A和CH1,并且第三多肽链包含VL_B和CL。在另一实施方案中,所述结合蛋白的第一多肽链另外包含Fc。在另一实施方案中,所述结合蛋白包含两条多肽链,其中第一多肽链包含VL_A、CL、VH_B及CH1,第二多肽链包含VH_A、CH1、VL_B及CL。在另一实施方案中,第一多肽链另外包含Fc。

[0024] 在一个实施方案中,所述结合蛋白包含三条多肽链,并且其相应cDNA在共转染期

间是以1:1:1、1:1.5:1、1:3:1、1:1:1.5、1:1:3、1:1.5:1.5、1:3:1.5、1:1.5:3或1:3:3的第一:第二:第三摩尔比存在。在另一实施方案中,所述结合蛋白包含两条多肽链,并且通过优化,其相应cDNA在共转染期间是以1:1、1:1.5或1:3,或任何其它比率的第一:第二摩尔比存在,以使任何给定转染中单体FIT-Ig分数最大。

[0025] 在一个实施方案中,本发明的结合蛋白不包含肽连接子。在一个实施方案中,本发明的结合蛋白包含至少一个氨基酸或多肽连接子。在另一实施方案中,所述连接子选自由以下组成的组:G、GS、SG、GGS、GSG、SGG、GGG、GGGS、SGGG、GGGGS、GGGGSGS、GGGGSGS、GGGGSGGS、GGGGSGGGS、GGGGSGGGSGGGS、AKTPKLEEGEFSEAR、AKTPKLEEGEFSEARV、AKTPKLGG、SAKTPKLGG、AKTPKLEEGEFSEARV、SAKTP、SAKTPKLGG、RADAAP、RADAAPTVS、RADAAGGPGS、RADA₄S、SAKTP、SAKTPKLGG、SAKTPKLEEGEFSEARV、ADAAP、ADAAPTVSIFPP、TVAAP、TVAAPSVFIFPP、QPKAAP、QPKAAPSVTLFPP、AKTPP、AKTPPSVTPLAP、AKTTAP、AKTTAPSVDVPLAP、ASTKGP、ASTKGPSVFPLAP、GENKVEYAPALMALS、GPAKELTPLKEAKVS及GHEAAAVMQVQYPAS。所述连接子也可以是在体内可裂解的肽连接子、蛋白酶(如MMP)敏感性连接子、如先前所描述的可以通过还原进行裂解的基于二硫键的连接子等(Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals:Applications and Challenges,由Stefan R.Schmidt编辑)或本领域中已知的任何可裂解的连接子。这些可裂解的连接子可以用于在体内释放顶部的Fab用于各种目的,以便改善组织/细胞渗透和分布,增进与靶标的结合,减少潜在副作用,以及调节2个不同的Fab区的体内功能和物理半衰期。

[0026] 在一个实施方案中,所述结合蛋白包含:第一多肽,从氨基末端到羧基末端,其包含VL_A-CL-VH_B-CH1-Fc;第二多肽链,从氨基末端到羧基末端,其包含VH_A-CH1;及第三多肽链,从氨基末端到羧基末端,其包含VL_B-CL;其中VL是轻链可变结构域,CL是轻链恒定结构域,VH是重链可变结构域,CH1是重链的第一恒定结构域,A是第一表位或抗原,并且B是第二表位或抗原。在一个实施方案中,Fc区是人IgG1。在另一实施方案中,Fc区是变体Fc区。在另一实施方案中,Fc区的氨基酸序列与SEQ ID NO:20具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性。在另一实施方案中,第一多肽链的CL与VH_B直接融合。在另一实施方案中,第一多肽链的CL经由氨基酸或寡肽连接子连接至VH_B。在另一实施方案中,所述连接子是GSG (SEQ ID NO:26) 或GGGGSGS (SEQ ID NO:28)。

[0027] 在另一实施方案中,所述结合蛋白包含:第一多肽,从氨基末端到羧基末端,其包含VH_B-CH1-VL_A-CL-Fc;第二多肽链,从氨基末端到羧基末端,其包含VH_A-CH1;及第三多肽链,从氨基末端到羧基末端,其包含VL_B-CL;其中VL是轻链可变结构域,CL是轻链恒定结构域,VH是重链可变结构域,CH1是重链的第一恒定结构域,A是第一表位或抗原,并且B是第二表位或抗原。在一个实施方案中,Fc区是人IgG1。在另一实施方案中,Fc区是变体Fc区。在另一实施方案中,Fc区的氨基酸序列与SEQ ID NO:20具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性。在一个实施方案中,第一多肽链的CH1与VL_A直接融合。在另一实施方案中,第一多肽链的CH1经由氨基酸或寡肽连接子连接至VL_A。在另一实施方案中,所述连接子是GSG (SEQ ID NO:26) 或GGGGSGS (SEQ ID NO:28)。

[0028] 在另一实施方案中,所述结合蛋白包含:第一多肽,从氨基末端到羧基末端,其包

含 VL_A -CL-VH_B-CH1-Fc；及第二多肽链，从氨基末端到羧基末端，其包含VH_A-CH1-VL_B-CL；其中VL是轻链可变结构域，CL是轻链恒定结构域，VH是重链可变结构域，CH1是重链的第一恒定结构域，A是第一表位或抗原，并且B是第二表位或抗原。在一个实施方案中，Fc区是人IgG1。在另一实施方案中，Fc区是变体Fc区。在另一实施方案中，Fc区的氨基酸序列与SEQ ID NO:20具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性。在另一实施方案中，第一多肽链的CL与VH_B直接融合。在另一实施方案中，第一多肽链的CL经由氨基酸或寡肽连接子连接至VH_B。在另一实施方案中，所述连接子是GSG (SEQ ID NO:26) 或GGGGSGS (SEQ ID NO:28)。

[0029] 在另一实施方案中，结合蛋白包含第一多肽，从氨基末端到羧基末端，其包含VH_B-CH1-VL_A-CL-Fc；及第二多肽链，从氨基末端到羧基末端，其包含VL_B-CL-VH_A-CH1；其中VL是轻链可变结构域，CL是轻链恒定结构域，VH是重链可变结构域，CH1是重链的第一恒定结构域，A是第一表位或抗原，并且B是第二表位或抗原。在一个实施方案中，Fc区是人IgG1。在另一实施方案中，Fc区是变体Fc区。在另一实施方案中，Fc区的氨基酸序列与SEQ ID NO:20具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性。在一个实施方案中，第一多肽链的CH1与VL_A直接融合。在另一实施方案中，第一多肽链的CH1经由氨基酸或寡肽连接子连接至VL_A。在另一实施方案中，所述连接子是GSG (SEQ ID NO:26) 或GGGGSGS (SEQ ID NO:28)。

[0030] 本发明的结合蛋白能够结合细胞因子对。举例来说，本发明的结合蛋白能够结合选自由以下组成的组的细胞因子对：IL-1 α 和IL-1 β ；IL-12和IL-18；TNF α 和IL-23；TNF α 和IL-13；TNF和IL-18；TNF和IL-12；TNF和IL-1 β ；TNF和MIF；TNF和IL-6；TNF和IL-6受体；TNF和IL-17；IL-17和IL-20；IL-17和IL-23；TNF和IL-15；TNF和VEGF；VEGFR和EGFR；PDGFR和VEGF；IL-13和IL-9；IL-13和IL-4；IL-13和IL-5；IL-13和IL-25；IL-13和TARC；IL-13和MDC；IL-13和MIF；IL-13和TGF- β ；IL-13和LHR激动剂；IL-13和CL25；IL-13和SPRR2a；IL-13和SPRR2b；IL-13和ADAM8；及TNF α 和PGE4；IL-13和PED2；TNF和PEG2。在一个实施方案中，本发明的结合蛋白能够结合IL-17和IL-20。在一个实施方案中，本发明的结合蛋白能够结合IL-17和IL-20并且包含来源于抗IL-17抗体LY和抗IL-20抗体15D2的可变重链和可变轻链。在一个实施方案中，本发明的结合蛋白能够结合IL-17和TNF。在一个实施方案中，本发明的结合蛋白能够结合IL-17和TNF并且包含来源于抗IL-17抗体LY和TNF抗体戈利木单抗 (golimumab) 的可变重链和可变轻链。

[0031] 在一个实施方案中，本发明的结合蛋白结合IL-17和IL-20并且包含：第一多肽，其包含选自由SEQ ID NO:15、25和27组成的组的氨基酸序列，基本上由所述序列组成或由所述序列组成；第二多肽链，其包含根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列，基本上由所述序列组成或由所述序列组成；及第三多肽链，其包含根据SEQ ID NO:23的序列，基本上由所述序列组成或由所述序列组成。在另一实施方案中，本发明的结合蛋白结合IL-27和IL-20并且包含：第一多肽链，其包含选自由SEQ ID NO:15、25和27组成的组的氨基酸序列，基本上由所述序列组成或由所述序列组成；及第二多肽链，其包含选自由SEQ ID NO:29、30和31组成的组的氨基酸序列，基本上由所述序列组成或由所述序列组成。

[0032] 在一个实施方案中，本发明的结合蛋白结合TNF和IL-17并且包含：第一多肽，其包含根据SEQ ID NO:87的氨基酸序列，基本上由所述序列组成或由所述序列组成；第二多肽

链,其包含根据SEQ ID NO:89的氨基酸序列,基本上由所述序列组成或由所述序列组成;及第三多肽链,其包含根据SEQ ID NO:91的序列,基本上由所述序列组成或由所述序列组成。

[0033] 在另一实施方案中,所述结合蛋白能够结合选自由以下组成的组的靶标对:CD137和CD20;CD137和EGFR;CD137和Her-2;CD137和PD-1;CD137和PDL-1;VEGF和PD-L1;Lag-3和TIM-3;OX40和PD-1;TIM-3和PD-1;TIM-3和PDL-1;EGFR和DLL-4;CD138和CD20;CD138和CD40;CD19和CD20;CD20和CD3;CD3和CD33;CD3和CD133;CD47和CD20;CD38和CD138;CD38和CD20;CD20和CD22;CD38和CD40;CD40和CD20;CD-8和IL-6;CSPGs和RGM A;CTLA-4和BTN02;IGF1和IGF2;IGF1/2和Erb2B;IGF-1R和EGFR;EGFR和CD13;IGF-1R和ErbB3;EGFR-2和IGFR;VEGFR-2和Met;VEGF-A和血管生成素-2(Ang-2);IL-12和TWEAK;IL-13和IL-1 β ;PDGFR和VEGF;EpCAM和CD3;Her2和CD3;CD19和CD3;EGFR和Her3;CD16a和CD30;CD30和PSMA;EGFR和CD3;CEA和CD3;TROP-2和HSG;TROP-2和CD3;MAG和RGM A;NgR和RGM A;NogoA和RGM A;OMgp和RGM A;PDL-1和CTLA-4;CTLA-4和PD-1;PD-1和TIM-3;RGM A和RGM B;Te38和TNFa;TNFa和Blys;TNFa和CD-22;TNFa和CTLA-4结构域;TNFa和GP130;TNFa和IL-12p40;及TNFa和RANK配体;因子IXa,因子X。在一个实施方案中,本发明的结合蛋白能够结合CD3和CD20。在一个实施方案中,本发明的结合蛋白能够结合CD3和CD20并且包含来源于抗CD3抗体OKT3和抗CD20抗体奥法木单抗(ofatumumab)的可变重链和可变轻链。在一个实施方案中,本发明的结合蛋白能够结合CTLA-4和PD-1。在一个实施方案中,本发明的结合蛋白能够结合CTLA-4和PD-1并且包含来源于CTLA-4抗体伊匹单抗(ipilimumab)和PD-1抗体纳武单抗(nivolumab)的可变重链和可变轻链。

[0034] 在一个实施方案中,本发明的结合蛋白结合CD3和CD20并且包含:第一多肽链,其包含选自由SEQ ID NO:41和48组成的组的氨基酸序列,基本上由所述序列组成或由所述序列组成;第二多肽链,其包含根据SEQ ID NO:44的氨基酸序列,基本上由所述序列组成或由所述序列组成;及第三多肽链,其包含根据SEQ ID NO:46的氨基酸序列,基本上由所述序列组成或由所述序列组成或由所述序列组成。

[0035] 在一个实施方案中,本发明的结合蛋白结合CTLA-4和PD-1并且包含:第一多肽链,其包含根据SEQ ID NO:92的氨基酸序列,基本上由所述序列组成或由所述序列组成;第二多肽链,其包含根据SEQ ID NO:95的氨基酸序列,基本上由所述序列组成或由所述序列组成;及第三多肽链,其包含根据SEQ ID NO:97的氨基酸序列,基本上由所述序列组成或由所述序列组成。

[0036] 在一个实施方案中,本文提供的结合蛋白能够结合CTLA-4上的一个或多个表位。在一个实施方案中,本文提供的结合蛋白能够结合PD-1上的一个或多个表位。

[0037] 在一个实施方案中,所述结合蛋白能够结合T细胞上的一种或多种免疫检查点蛋白,如例如TIM-3、Lag3、ICOS、BTLA、CD160、2B4、KIR、CD137、CD27、OX40、CD40L及A2aR上的一个或多个表位。在另一实施方案中,所述结合蛋白能够结合参与免疫检查点路径的一种或多种肿瘤细胞表面蛋白,如例如PD-L1、PD-L2、半乳糖凝集素9、HVEM、CD48、B7-1、B7-2、ICOSL、B7-H3、B7-H4、CD137L、OX40L、CD70及CD40上的一个或多个表位。

[0038] 在一方面,本发明提供药物组合物,其包含本文所述的结合蛋白。在一个实施方案中,本文提供的药物组合物包含如前述技术方案中任一项所述的结合蛋白及一种或多种药学上可接受的载体。

[0039] 在另一方面,本发明提供治疗或预防有需要的受试者的炎性疾病、自体免疫性疾病、神经退行性疾病、癌症、败血症或脊髓损伤的方法。在一个实施方案中,所述方法包括向受试者施用有效量的一种或多种本文所提供的结合蛋白,或一种或多种包含本文提供的结合蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物。本文还提供了本文所述的结合蛋白的用途,所述结合蛋白用于制造供治疗或预防炎性疾病、自体免疫性疾病、神经退行性疾病、癌症或脊髓损伤的药物。在一个实施方案中,所述炎性疾病、自体免疫性疾病或神经退行性疾病选自由以下组成的组:哮喘、类风湿性关节炎、全身性红斑狼疮、多发性硬化、阿尔茨海默氏病或帕金森氏病。

[0040] 在一个实施方案中,本公开提供了用于治疗或预防有需要的受试者的类风湿性关节炎、牛皮癣、骨质疏松症、中风、肝病或口腔癌的方法,所述方法包括向受试者施用本文所述的FIT-Ig结合蛋白,其中所述结合蛋白能够结合IL-17和IL-20。在另一实施方案中,所述FIT-Ig结合蛋白包含选自SEQ ID NO:15、25和27的氨基酸序列;和根据SEQ ID NO:21的氨基酸序列;及根据SEQ ID NO:23的氨基酸序列。在另一实施方案中,所述FIT-Ig结合蛋白包含选自SEQ ID NO:15、25和27的氨基酸序列;和选自SEQ ID NO:29、30和31的氨基酸序列。

[0041] 在一个实施方案中,本公开提供了用于治疗或预防有需要的受试者的B细胞癌症的方法,所述方法包括向受试者施用FIT-Ig结合蛋白,其中所述FIT-Ig结合蛋白能够结合一个或多个B细胞抗原。在另一实施方案中,所述FIT-Ig结合蛋白能够结合CD20。在另一实施方案中,所述FIT-Ig结合蛋白能够结合CD20和另一抗原。在另一实施方案中,所述结合蛋白能够结合CD3和CD20。在另一实施方案中,所述癌症是B细胞癌症。在又另一实施方案中,B细胞癌症选自由以下组成的组:霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、非霍奇金氏淋巴瘤[NHL]、前体B细胞淋巴母细胞性白血病/淋巴瘤、成熟B细胞赘瘤、B细胞慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞性淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、皮肤滤泡中心淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤、毛细胞白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、浆细胞瘤、浆细胞性骨髓瘤、移植后淋巴增生病症、移瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)及间变性大细胞淋巴瘤。在一个实施方案中,本公开提供了用于治疗或预防有需要的受试者的B细胞癌症的方法,所述方法包括向受试者施用FIT-Ig结合蛋白,其中所述FIT-Ig结合蛋白包含根据SEQ ID NO:41或48的氨基酸序列;和根据SEQ ID NO:44的氨基酸序列;及根据SEQ ID NO:46的氨基酸序列。

[0042] 在一个实施方案中,本公开提供了用于治疗或预防有需要的受试者的自体免疫性疾病、炎性疾病或感染的方法,所述方法包括向受试者施用本文所述的FIT-Ig结合蛋白,其中所述结合蛋白能够结合TNF和IL-17。在另一实施方案中,FIT-Ig结合蛋白包含根据SEQ ID NO:87、89和91的序列。在另一实施方案中,本公开提供了用于治疗或预防自体免疫或炎性疾病的方法,所述方法包括向受试者施用FIT-Ig结合蛋白,其中所述结合蛋白能够结合TNF和IL-17,并且其中所述自体免疫或炎性疾病选自由以下组成的组:克罗恩氏病(Crohn's disease)、牛皮癣(包括斑块状牛皮癣)、关节炎(包括类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎、骨关节炎或青少年特发性关节炎)、多发性硬化、强直性脊椎炎、强直性关节病变(spondylosing arthropathy)、全身性红斑狼疮、葡萄膜炎、败血症、神经退行性疾病、神经元再生、脊髓损伤、原发性和转移性癌症、呼吸道病症、哮喘、过敏性和非过敏性哮喘、由感

染引起的哮喘、由感染呼吸道合胞病毒 (RSV) 引起的哮喘、慢性阻塞性肺病 (COPD)、涉及气道炎症的病状、嗜酸性粒细胞增多症、纤维化和过量粘液产生、囊性纤维化、肺纤维化、异位性病症、异位性皮炎、荨麻疹、湿疹、过敏性鼻炎、过敏性肠胃炎、炎性和/或自体免疫性皮肤病状、炎性和/或自体免疫性胃肠器官病状、炎性肠病 (IBD)、溃疡性结肠炎、炎性和/或自体免疫性肝病、肝硬化、肝纤维化、由乙型和/或丙型肝炎病毒引起的肝纤维化、硬皮病。在另一实施方案中，在另一实施方案中，本公开提供了用于治疗或预防有需要的受试者的癌症的方法，所述方法包括向受试者施用本文所述的FIT-Ig结合蛋白，其中所述结合蛋白能够结合TNF和IL-17。在另一实施方案中，所述癌症是肝细胞癌；成胶质细胞瘤；淋巴瘤；或霍奇金氏淋巴瘤。在另一实施方案中，本公开提供了用于治疗或预防有需要的受试者的感染的方法，所述方法包括向受试者施用本文所述的FIT-Ig结合蛋白，其中所述感染是病毒感染、细菌感染、寄生虫感染、HTLV-1感染。在一个实施方案中，本公开提供了用于抑制1型保护性免疫反应的表达和抑制在疫苗接种期间1型保护性免疫反应的表达的方法。

[0043] 在一个实施方案中，本公开提供了用于治疗有需要的受试者的类风湿性关节炎的方法，所述方法包括向受试者施用FIT-Ig结合蛋白，其中所述结合蛋白包含根据SEQ ID NO:87、89和91的序列。

[0044] 在一个实施方案中，本公开提供了用于治疗或预防有需要的受试者的癌症的方法，所述方法包括向受试者施用本文所述的FIT-Ig结合蛋白，其中所述结合蛋白能够结合CTLA-4和PD-1。在另一实施方案中，FIT-Ig结合蛋白包含含有SEQ ID NO:92、95和97的氨基酸序列。在另一实施方案中，本公开提供了用于治疗或预防有需要的受试者的癌症的方法，其中所述结合蛋白能够结合CTLA-4和PD-1，并且其中所述癌症是典型地对免疫疗法有反应的癌症。在另一实施方案中，所述癌症是与免疫疗法无关的癌症。在另一实施方案中，所述癌症是作为难治性或复发性恶性疾病的癌症。在另一实施方案中，所述结合蛋白抑制肿瘤细胞的生长或存活。在另一实施方案中，癌症选自由以下组成的组：黑素瘤（例如，转移性恶性黑素瘤）、肾癌（例如，透明细胞癌）、前列腺癌（例如，激素难治性前列腺癌）、胰腺癌、乳癌、结肠癌、肺癌（例如，非小细胞肺癌）、食道癌、头颈鳞状细胞癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、甲状腺癌、成胶质细胞瘤、神经胶质瘤、白血病、淋巴瘤及其它赘生性恶性疾病。

[0045] 在一个实施方案中，本公开提供了用于治疗或预防有需要的受试者的黑素瘤的方法，所述方法包括向受试者施用本文所述的FIT-Ig结合蛋白，其中所述结合蛋白能够结合CTLA-4和PD-1。在另一实施方案中，本公开提供了用于治疗或预防有需要的受试者的黑素瘤的方法，其中所述方法包括向受试者施用包含根据SEQ ID NO:92、95和97的氨基酸序列的FIT-Ig结合蛋白。

[0046] 在另一实施方案中，本公开提供了用于治疗或预防有需要的受试者的感染或感染性疾病的方法，所述方法包括向受试者施用本文所述的FIT-Ig结合蛋白，其中所述结合蛋白能够结合CTLA-4和PD-1。在一个实施方案中，FIT-Ig结合蛋白是单独施用或与疫苗组合施用，以刺激针对病原体、毒素及半抗原的免疫反应。因此，在一个实施方案中，本文提供的结合蛋白可以用于刺激针对感染人的病毒（诸如但不限于人免疫缺陷病毒；甲型、乙型和丙型肝炎病毒；爱泼斯坦-巴尔病毒 (Epstein Barr virus)；人巨细胞病毒；人乳头瘤病毒；疱疹病毒）、细菌、真菌、寄生虫或其它病原体的免疫反应。

[0047] 附图简述

[0048] 图1A显示由三个构建体,如FIT1-Ig、FIT2-Ig和FIT3-Ig构成的FIT-Ig的结构。图1B显示用于制备此类FIT1-Ig的三个构建体。

[0049] 图2A显示由两个构建体构成的FIT-Ig的基本结构。图2B显示用于制备此类FIT-Ig的两个构建体。

[0050] 图3提供了通过Biacore测量的FIT1-Ig的双特异性抗原结合。图3的上图显示了其中依序利用IL-17和IL-20使FIT1-Ig饱和的Biacore结合测定的结果。图3的下图显示了其中依序利用IL-20和IL-17使FIT1-Ig饱和的Biacore测定的结果。

[0051] 图4显示了通过PEG诱导的沉淀所测量的抗IL-17/IL-20FIT Ig或单克隆抗体利妥昔单抗(rituximab)在一系列pH下的溶解度。

[0052] 图5显示了在DG44(5A和5B)和CHO-S(5C和5D)系统中稳定CHO细胞系发育的稳定性。

[0053] 图6显示了通过ELISA评估的FIT10-Ig或亲本抗体伊匹单抗和纳武单抗与CTLA-4(6A)或PD-1(图6B)的结合。

[0054] 图7显示了FIT10-Ig针对CTLA-4和PD-1的多重结合研究。图7中同时显示依序与CTLA-4和PD-1结合;及依序与PD-1和CTLA-4结合。

[0055] 详细说明

[0056] 本发明涉及多价和多特异性结合蛋白、制备所述结合蛋白的方法及其在预防和/或治疗急性和慢性炎性疾病和病症、癌症及其它疾病方面的用途。本发明涉及能够结合两个或更多个抗原的多价和/或多特异性结合蛋白。具体地,本发明涉及串联Fab免疫球蛋白(FIT-Ig)和其药物组合物,以及用于制备此类FIT-Ig的核酸、重组表达载体和宿主细胞。本发明还涵盖使用本发明的FIT-Ig在体外或体内检测特定抗原的方法。

[0057] 本文提供的新型结合蛋白家族能够例如以高亲和力结合两个或更多个抗原。具体地,本发明提供一种使用2种亲本单克隆抗体,即结合至抗原a的mAb A和结合至抗原b的mAb B构建双特异性结合蛋白的方法。

[0058] 在一方面,本发明提供了一种结合蛋白,其包含对第一抗原或表位具有特异性的可变轻链、第一轻链恒定结构域、对第二抗原或表位具有特异性的可变重链、第一重链CH1、对第一抗原或表位具有特异性的可变重链、第二重链CH1、对第二抗原或表位具有特异性的可变重链及第二轻链恒定结构域。在一个实施方案中,所述结合蛋白还包含Fc区。所述结合蛋白可以还包含连接所述结合蛋白的两种或更多种组分的一个或多个氨基酸或多肽连接子。举例来说,所述结合蛋白可以包含将轻链可变区连接至轻链恒定区的多肽连接子。

[0059] 在一个实施方案中,本公开提供了一种结合蛋白,其包含含有 $VL_A-CL-(X1)n-VH_B-CH1-(X2)n$ 的多肽链,其中VLA是mAb A的轻链可变结构域,CL是轻链恒定结构域,X1表示氨基酸或寡肽连接子,VH_B是mAb B的重链可变结构域,CH1是重链的第一恒定结构域,X2表示Fc区或不同的二聚化结构域,并且n是0或1。

[0060] 在一个实施方案中,本发明提供了一种结合蛋白,其包含三条不同的多肽链(图1),其中第一多肽链(构建体#1)包含 $VL_A-CL-(X1)n-VH_B-CH1-(X2)n$,其中VLA是mAb A的轻链可变结构域,CL是轻链恒定结构域,X1表示氨基酸或寡肽连接子,VH_B是mAb B的重链可变结构域,CH1是重链的第一恒定结构域,X2表示Fc区或不同的二聚化结构域,并且n是0或1。第二多肽链(构建体#2)包含 VH_A-CH1 ,其中VH_A是mAb A的重链可变结构域,并且CH1是重链的第

一恒定结构域。第三多肽链(构建体#3)包含 VL_B-CL ,其中 VL_B 是mAb B的轻链可变结构域,并且 CL 是轻链的恒定结构域。

[0061] 在另一实施方案中，本发明提供一种结合蛋白，其包含三条不同的多肽链，所述多肽链的总体分子设计类似于前一实施方案，例外是可变结构域的次序颠倒。在所述实施方案中，第一多肽链包含 $VH_B-CH1-(X1)n-VL_A-CL-(X2)n$ ，其中 VL_A 是 mAb A 的轻链可变结构域，CL 是轻链恒定结构域， $X1$ 表示氨基酸或寡肽连接子， VH_B 是 mAb B 的重链可变结构域， $CH1$ 是重链的第一恒定结构域， $X2$ 表示 Fc 区或不同的二聚化结构域，并且 n 是 0 或 1。第二多肽链包含 VH_A-CH1 ，其中 VH_A 是 mAb A 的重链可变结构域，并且 $CH1$ 是重链的第一恒定结构域。第三多肽链包含 VL_B-CL ，其中 VL_B 是 mAb B 的轻链可变结构域，并且 CL 是轻链的恒定结构域。

[0062] 在另一实施方案中,本发明提供一种结合蛋白,其包含两条不同的多肽链(图2),其中第一多肽链(构建体#1)包含 VL_A -CL-(X1)n-VH_B-CH1-(X2)n,其中 VL_A 是mAb A的轻链可变结构域,CL是轻链恒定结构域,X1表示氨基酸或寡肽连接子,VH_B是mAb B的重链可变结构域,CH1是重链的第一恒定结构域,X2表示Fc区或不同的二聚化结构域,并且n是0或1。第二多肽链(构建体#4)包含VH_A-CH1-(X3)n-VL_B-CL,其中VH_A是mAb A的重链可变结构域,CH1是重链的第一恒定结构域,X3表示不为恒定结构域的氨基酸或多肽,n是0或1,VL_B是mAb B的轻链可变结构域,并且CL是轻链的恒定结构域。

[0063] 在另一实施方案中,本发明提供一种结合蛋白,其包含两条多肽链,所述多肽链的总体分子设计类似于前一实施方案,例外是可变结构域的次序颠倒。在这一实施方案中,第一多肽链包含 $VH_B-CH1-(X1)n-VL_A-CL-(X2)n$,其中 VL_A 是mAb A的轻链可变结构域,CL是轻链恒定结构域,X1表示氨基酸或寡肽连接子, VH_B 是mAb B的重链可变结构域,CH1是重链的第一恒定结构域,X2表示Fc区或不同的二聚化结构域,并且n是0或1。第二多肽链包含 $VL_B-CL-(X3)n-VH_A-CH1$,其中 VH_A 是mAb A的重链可变结构域,CH1是重链的第一恒定结构域,X3表示氨基酸或寡肽连接子,n是0或1, VL_B 是mAb B的轻链可变结构域,并且CL是轻链的恒定结构域。

[0064] 在一个实施方案中,所述结合蛋白中的VH和VL结构域选自由以下组成的组:鼠重链/轻链可变结构域、完全人重链/轻链可变结构域、CDR移植的重链/轻链可变结构域、人源化重链/轻链可变结构域及其混合物。在一个优选实施方案中, VH_A/VL_A 和 VH_B/VL_B 能够结合同一抗原。在另一实施方案中, VH_A/VL_A 和 VH_B/VL_B 能够结合不同抗原。

[0065] 在一个实施方案中,第一多肽链包含 VL_A -CL-VH_B-CH1-Fc,并且第一多肽链的CL和VH_B直接融合在一起。在另一实施方案中,CL和VH_B通过氨基酸或寡肽连接子连接。在另一实施方案中,第一多肽链包含VH_B-CH1-VL_A-CL-Fc,并且CH1和VL_A直接融合在一起。在另一实施方案中,CH1和VL_A通过氨基酸或寡肽连接子连接。在另一实施方案中,寡肽或多肽连接子包含了提供柔性的任何合理序列的一个或多个氨基酸。优选地,所述连接子选自由以下组成的组:G、GS、SG、GGS、GSG、SGG、GGG、GGGS、SGGG、GGGGS、GGGGSGS、GGGGSGS、GGGGSGGS、GGGGSGGGGS、GGGGSGGGSGGGGS、AKTPKLEEGEFSEAR、AKTPKLEEGEFSEARV、AKTPKLGG、SAKTPKLGG、AKTPKLEEGEFSEARV、SAKTP、SAKTPKLGG、RADAAP、RADAAPTVS、RADAAAAGGPGS、RADAAAAA(G₄S)₄、SAKTP、SAKTPKLGG、SAKTPKLEEGEFSEARV、ADAAP、ADAAPTVSIFPP、TVAAP、TVAAPSVFIFPP、QPKAAP、QPKAAPSVTLFPP、AKTTPP、AKTTPPSVTPLAP、AKTTAP、AKTTAPSVDPLAP、ASTKGP、ASTKGPSVFPPLAP、GENKVEYAPALMALS、GPAKELTPLKEAKVS及GHEAAVMQVQYPAS。在一个

实施方案中,连接子的氨基酸序列可以选自由SEQ ID NO.26、28和49-86组成的组。在一个实施方案中,所述连接子是GSG (SEQ ID NO:26) 或GGGGSGS (SEQ ID NO:28)。所述连接子也可以是在体内可裂解的肽连接子、蛋白酶(如MMP)敏感性连接子、如先前所描述的可以通过还原进行裂解的基于二硫键的连接子等 (Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals: Applications and Challenges,由Stefan R.Schmidt编辑) 或本领域中已知的任何可裂解的连接子。这些可裂解的连接子可以用于在体内释放顶部的Fab用于各种目的,以便改善组织/细胞渗透和分布,增进与靶标的结合,减少潜在副作用,以及调节2个不同的Fab区的体内功能和物理半衰期。在一个实施方案中,所述结合蛋白包含Fc区。如本文所用,术语“Fc区”是指IgG重链的C末端区。含有人IgG1 Fc区的氨基酸序列的实例是SEQ ID NO:20。IgG的Fc区包含两个恒定结构域,即CH2和CH3。

[0066] 在一个实施方案中,Fc区是变体Fc区。在一个实施方案中,相对于亲本Fc区,变体Fc区具有一个或多个氨基酸修饰,如取代、缺失或插入。在另一实施方案中,相对于亲本Fc区活性,Fc区的氨基酸修饰改变了效应功能活性。举例来说,在一个实施方案中,变体Fc区可以具有改变的(即,增加的或降低的)抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、补体介导的细胞毒性(CDC)、吞噬作用、调理作用或细胞结合。在另一实施方案中,相对于亲本Fc区,Fc区氨基酸修饰可以改变(即,增加或降低)变体Fc区对Fc γ R的亲和力。举例来说,变体Fc区可以改变对Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII的亲和力。

[0067] 在一个优选实施方案中,本文提供的结合蛋白能够结合一个或多个靶标。在一个实施方案中,所述靶标选自由以下组成的组:细胞因子、细胞表面蛋白、酶及受体。优选地,所述结合蛋白能够调节一个或多个靶标的生物功能。更优选地,所述结合蛋白能够中和一个或多个靶标。

[0068] 在一个实施方案中,本发明的结合蛋白能够结合选自由淋巴因子、单核因子及多肽激素组成的组的细胞因子。在另一实施方案中,所述结合蛋白能够结合选自由以下组成的组的细胞因子对:IL-1 α 和IL-1 β ;IL-12和IL-18;TNF α 和IL-23;TNF α 和IL-13;TNF和IL-18;TNF和IL-12;TNF和IL-1 β ;TNF和MIF;TNF和IL-6;TNF和IL-6受体;TNF和IL-17;IL-17和IL-20;IL-17和IL-23;TNF和IL-15;TNF和VEGF;VEGFR和EGFR;IL-13和IL-9;IL-13和IL-4;IL-13和IL-5;IL-13和IL-25;IL-13和TARC;IL-13和MDC;IL-13和MIF;IL-13和TGF- β ;IL-13和LHR激动剂;IL-13和CL25;IL-13和SPRR2a;IL-13和SPRR2b;IL-13和ADAM8;及TNF α 和PGE4;IL-13和PED2;TNF和PEG2。

[0069] 在另一实施方案中,本发明的结合蛋白能够结合选自由以下组成的组的靶标对:CD137和CD20;CD137和EGFR;CD137和Her-2;CD137和PD-1;CD137和PDL-1;VEGF和PD-L1;Lag-3和TIM-3;OX40和PD-1;TIM-3和PD-1;TIM-3和PDL-1;EGFR和DLL-4;VEGF和EGFR;HGF和VEGF;VEGF和VEGF(相同或不同表位);VEGF和Ang2;EGFR和cMet;PDGF和VEGF;VEGF和DLL-4;OX40和PD-L1;ICOS和PD-1;ICOS和PD-L1;Lag-3和PD-1;Lag-3和PD-L1;Lag-3和CTLA-4;ICOS和CTLA-4;CD138和CD20;CD138和CD40;CD19和CD20;CD20和CD3;CD3和CD33;CD3和CD133;CD38和CD138;CD38和CD20;CD20和CD22;CD38和CD40;CD40和CD20;CD47和CD20;CD-8和IL-6;CSPGs和RGM A;CTLA-4和BTN02;CTLA-4和PD-1;IGF1和IGF2;IGF1/2和Erb2B;IGF-1R和EGFR;EGFR和CD13;IGF-1R和ErbB3;EGFR-2和IGFR;Her2和Her2(相同或不同表位);因子IXa、因子X、VEGFR-2和Met;VEGF-A和血管生成素-2(Ang-2);IL-12和TWEAK;IL-13和IL-1

β; MAG和RGM A; NgR和RGM A; NogoA和RGM A; OMGP和RGM A; PDL-1和CTLA-4; PD-1和TIM-3; RGM A和RGM B; Te38和TNFα; TNFα和Blys; TNFα和CD-22; TNFα和CTLA-4结构域; TNFα和GP130; TNFα和IL-12p40; 及TNFα和RANK配体。

[0070] 在一个实施方案中,所述结合蛋白能够结合人IL-17和人IL-20。在另一实施方案中,所述结合蛋白能够结合人IL-17和人IL-20并且包含:FIT-Ig多肽链#1序列,其与选自由SEQ ID NO.15、25和27组成的组的序列具有约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或100%同一性;多肽链#2序列,其与SEQ ID NO.21具有约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或100%同一性;及多肽链#3序列,其与SEQ ID NO.23具有约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或100%同一性。在另一实施方案中,所述结合蛋白能够结合人IL-17和人IL-20并且包含:FIT-Ig多肽链#1序列,其与选自由SEQ ID NO.15、25和27组成的组的序列具有约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或100%同一性;及多肽链#4,其与选自由SEQ ID NO.29、30和31组成的组的序列具有约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或100%同一性。

[0071] 在一个实施方案中,所述结合蛋白能够结合人CD3和人CD20。在另一实施方案中,所述结合蛋白包含:FIT-Ig多肽链#1序列,其与选自由SEQ ID NO.41和48组成的组的序列具有约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或100%同一性;多肽链#2序列,其与SEQ ID NO.46具有约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或100%同一性;及多肽链#3序列,其与SEQ ID NO.46具有约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或100%同一性。

[0072] 在一个实施方案中,所述结合蛋白能够结合人IL-17和人TNF。在另一实施方案中,所述结合蛋白能够结合人IL-17和人TNF并且包含:FIT-Ig多肽链#1序列,其与SEQ ID NO.87具有约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或100%同一性;多肽链#2序列,其与SEQ ID NO.89具有约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或100%同一性;及多肽链#3序列,其与SEQ ID NO.91具有约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或100%同一性。

[0073] 在一个实施方案中,所述结合蛋白能够结合人CTLA-4和人PD-1。在另一实施方案中,所述结合蛋白能够结合人CTLA-4和人PD-1并且包含:FIT-Ig多肽链#1序列,其与SEQ ID NO.92具有约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或100%同一性;多肽链#2序列,其与SEQ ID NO.95具有约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或100%同一性;及多肽链#3序列,其与SEQ ID NO.97具有约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或100%同一性。

[0074] 在另一实施方案中,本发明的结合蛋白能够结合一个或两个选自由以下组成的组的细胞因子、细胞因子相关蛋白及细胞因子受体:BMP1、BMP2、BMP3B (GDF10)、BMP4、BMP6、BMP8、CSF1 (M-CSF)、CSF2 (GM-CSF)、CSF3 (G-CSF)、EPO、FGF1 (aFGF)、FGF2 (bFGF)、FGF3 (int-2)、FGF4 (HST)、FGF5、FGF6 (HST-2)、FGF7 (KGF)、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF14、FGF16、FGF17、FGF19、FGF20、FGF21、FGF23、IGF1、IGF2、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFNB1、IFNG、IFNW1、FIL1、FIL1 (EPSILON)、FIL1 (ZETA)、IL1A、IL1B、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12A、IL12B、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL17B、

IL18、IL19、IL20、IL22、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL30、PDGFA、FGER1、FGFR2、FGFR3、EGFR、ROR1、2B4、KIR、CD137、CD27、OX40、CD40L、A2aR、CD48、B7-1、B7-2、ICOSL、B7-H3、B7-H4、CD137L、OX40L、CD70、CD40、PDGFB、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFB3、LTA (TNF-b)、LTB、TNF (TNF-a)、TNFSF4 (OX40配体)、TNFSF5 (CD40配体)、TNFSF6 (FasL)、TNFSF7 (CD27配体)、TNFSF8 (CD30配体)、TNFSF9 (4-1BB配体)、TNFSF10 (TRAIL)、TNFSF11 (TRANCE)、TNFSF12 (AP03L)、TNFSF13 (April)、TNFSF13B、TNFSF14 (HVEM-L)、TNFSF15 (VEGI)、TNFSF18、FIGF (VEGFD)、VEGF、VEGFB、VEGFC、IL1R1、IL1R2、IL1RL1、IL1RL2、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3RA、IL4R、IL5RA、IL6R、IL7R、IL8RA、IL8RB、IL9R、IL10RA、IL10RB、IL11RA、IL12RB1、IL12RB2、IL13RA1、IL13RA2、IL15RA、IL17R、IL18R1、IL20RA、IL21R、IL22R、IL1HY1、IL1RAP、IL1RAPL1、IL1RAPL2、IL1RN、IL6ST、IL18BP、IL18RAP、IL22RA2、AIF1、HGF、LEP (瘦素)、PTN及THPO。

[0075] 本发明的结合蛋白能够结合一个或多个选自由以下组成的组的趋化因子、趋化因子受体及趋化因子相关蛋白: CCL1 (I-309)、CCL2 (MCP-1/MCAF)、CCL3 (MIP-1a)、CCL4 (MIP-1b)、CCL5 (RANTES)、CCL7 (MCP-3)、CCL8 (mcp-2)、CCL11 (嗜酸性粒细胞趋化因子)、CCL13 (MCP-4)、CCL15 (MIP-1d)、CCL16 (HCC-4)、CCL17 (TARC)、CCL18 (PARC)、CCL19 (MIP-3b)、CCL20 (MIP-3a)、CCL21 (SLC/非淋巴细胞趋化因子-2)、CCL22 (MDC/STC-1)、CCL23 (MPIF-1)、CCL24 (MPIF-2/嗜酸性粒细胞趋化因子-2)、CCL25 (TECK)、CCL26 (嗜酸性粒细胞趋化因子-3)、CCL27 (CTACK/ILC)、CCL28、CXCL1 (GR01)、CXCL2 (GR02)、CXCL3 (GR03)、CXCL5 (ENA-78)、CXCL6 (GCP-2)、CXCL9 (MIG)、CXCL10 (IP 10)、CXCL11 (I-TAC)、CXCL12 (SDF1)、CXCL13、CXCL14、CXCL16、PF4 (CXCL4)、PPBP (CXCL7)、CX3CL1 (SCYD1)、SCYE1、XCL1 (淋巴细胞趋化因子)、XCL2 (SCM-1b)、BLR1 (MDR15)、CCBP2 (D6/JAB61)、CCR1 (CKR1/HM145)、CCR2 (mcp-1RB/RA)、CCR3 (CKR3/CMKBR3)、CCR4、CCR5 (CMKBR5/ChemR13)、CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6)、CCR7 (CKR7/EBI1)、CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1)、CCR9 (GPR-9-6)、CCRL1 (VSHK1)、CCRL2 (L-CCR)、XCR1 (GPR5/CCXCR1)、CMKLR1、CMKOR1 (RDC1)、CX3CR1 (V28)、CXCR4、GPR2 (CCR10)、GPR31、GPR81 (FKSG80)、CXCR3 (GPR9/CKR-L2)、CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo)、HM74、IL8RA (IL8Ra)、IL8RB (IL8Rb)、LTB4R (GPR16)、TCP10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSF8、BDNF、C5R1、CSF3、GRCC10 (C10)、EPO、FY (DARC)、GDF5、HIF1A、IL8、PRL、RGS3、RGS13、SDF2、SLIT2、TLR2、TLR4、TREM1、TREM2及VHL。

[0076] 在另一实施方案中,本发明的结合蛋白能够结合细胞表面蛋白,如例如整合素。在另一实施方案中,本发明的结合蛋白能够结合选自由激酶和蛋白酶组成的组的酶。在又另一实施方案中,本发明的结合蛋白能够结合选自由淋巴因子受体、单核因子受体及多肽激素受体组成的组的受体。

[0077] 在一个实施方案中,所述结合蛋白是多价的。在另一实施方案中,所述结合蛋白是多特异性的。上述多价和或多特异性结合蛋白具有期望的特性,特别是从治疗的观点看。举例来说,所述多价和或多特异性结合蛋白可以(1)比二价抗体更快地被表达抗体所结合的抗原的细胞内化(和/或分解代谢);(2)是激动剂抗体;和/或(3)诱导表达所述多价抗体能够结合的抗原的细胞的细胞死亡和/或细胞凋亡。提供多价和或多特异性结合蛋白的至少一种抗原结合特异性的“亲本抗体”可以是这样一种抗体,所述抗体被表达抗体所结合的抗原的细胞内化(和/或分解代谢);和/或可以是激动剂、细胞死亡诱导性抗体和/或细胞凋亡

诱导性抗体，并且如本文所述的多价和或多特异性结合蛋白可以展现这些特性中的一种或多种特性的改善。此外，亲本抗体可能缺乏这些特性中的一种或多种，但当构建为如本文所描述的多价结合蛋白形式时可以被赋予这些特性。

[0078] 在另一实施方案中，如通过表面等离子体共振所测量，本发明的结合蛋白针对一个或多个靶标的结合速率常数(K_{on})选自由以下组成的组：至少约 $10^2 M^{-1} s^{-1}$ ；至少约 $10^3 M^{-1} s^{-1}$ ；至少约 $10^4 M^{-1} s^{-1}$ ；至少约 $10^5 M^{-1} s^{-1}$ ；及至少约 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 。优选地，如通过表面等离子体共振所测量，本发明的结合蛋白针对一个或多个靶标的结合速率常数(K_{on})介于 $10^2 M^{-1} s^{-1}$ 至 $10^3 M^{-1} s^{-1}$ 之间；介于 $10^3 M^{-1} s^{-1}$ 至 $10^4 M^{-1} s^{-1}$ 之间；介于 $10^4 M^{-1} s^{-1}$ 至 $10^5 M^{-1} s^{-1}$ 之间；或介于 $10^5 M^{-1} s^{-1}$ 至 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 之间。

[0079] 在另一实施方案中，如通过表面等离子体共振所测量，所述结合蛋白针对一个或多个靶标的解离速率常数(K_{off})选自由以下组成的组：最多约 $10^{-3} s^{-1}$ ；最多约 $10^{-4} s^{-1}$ ；最多约 $10^{-5} s^{-1}$ ；及最多约 $10^{-6} s^{-1}$ 。优选地，如通过表面等离子体共振所测量，本发明的结合蛋白针对一个或多个靶标的解离速率常数(K_{off})是 $10^{-3} s^{-1}$ 至 $10^{-4} s^{-1}$ ； $10^{-4} s^{-1}$ 至 $10^{-5} s^{-1}$ ；或 $10^{-5} s^{-1}$ 至 $10^{-6} s^{-1}$ 。

[0080] 在另一实施方案中，所述结合蛋白针对一个或多个靶标的解离常数(K_D)选自由以下组成的组：最多约 $10^{-7} M$ ；最多约 $10^{-8} M$ ；最多约 $10^{-9} M$ ；最多约 $10^{-10} M$ ；最多约 $10^{-11} M$ ；最多约 $10^{-12} M$ ；及最多约 $10^{-13} M$ 。优选地，本发明的结合蛋白针对IL-12或IL-23的解离常数(K_D)是 $10^{-7} M$ 至 $10^{-8} M$ ； $10^{-8} M$ 至 $10^{-9} M$ ； $10^{-9} M$ 至 $10^{-10} M$ ； $10^{-10} M$ 至 $10^{-11} M$ ； $10^{-11} M$ 至 $10^{-12} M$ ；或 $10^{-12} M$ 至 $10^{-13} M$ 。

[0081] 在另一实施方案中，上述结合蛋白是另外包含选自由以下组成的组的试剂的偶联物：免疫粘附分子、显影剂、治疗剂及细胞毒性剂。在一个实施方案中，显影剂选自由以下组成的组：放射性标记、酶、荧光标记、发光标记、生物发光标记、磁性标记及生物素。在另一实施方案中，显影剂是选自由以下组成的组的放射性标记： 3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 及 ^{153}Sm 。在一个实施方案中，治疗剂或细胞毒性剂选自由以下组成的组：免疫抑制剂、免疫刺激剂、抗代谢物、烷化剂、抗生素、生长因子、细胞因子、抗血管生成剂、抗有丝分裂剂、蒽环霉素、毒素及细胞凋亡剂。在一个实施方案中，所述结合蛋白与所述试剂直接偶联。在另一实施方案中，所述结合蛋白经由连接子与所述试剂偶联。适合的连接子包括但不限于，本文所公开的氨基酸和多肽连接子。连接子可以是可裂解的或不可裂解的。

[0082] 在另一实施方案中，上述结合蛋白是结晶的结合蛋白并且以晶体形式存在。优选地，所述晶体是不含载体的药用控制释放晶体。更优选地，结晶的结合蛋白在体内的半衰期比所述结合蛋白的可溶性对应物长。最优选地，结晶的结合蛋白保持生物活性。

[0083] 在另一实施方案中，上述结合蛋白被糖基化。优选地，糖基化是人糖基化模式。

[0084] 本发明一方面涉及一种编码以上公开的结合蛋白中的任一种的分离的核酸。另一实施方案提供一种包含以上公开的分离的核酸的载体，其中所述载体选自由以下组成的组：pcDNA；pTT (Durocher等, Nucleic Acids Research 2002, 第30卷, 第2期)；pTT3 (具有另外的多个克隆位点的pTT)；pEFBOS (Mizushima, S. 和 Nagata, S., (1990) Nucleic acids Research第18卷, 第17期)；pBV；pJV；pcDNA3.1TOP0、pEF6TOP0及pBJ。提供了多特异性结合蛋白及其制备方法。所述结合蛋白可以使用各种技术产生。本公开提供了产生所述结合蛋白的表达载体、宿主细胞及方法。

[0085] 本公开的结合蛋白的抗原结合可变结构域可以由包括多克隆Ab、单克隆Ab和或能

够结合所关注抗原的受体在内的亲本结合蛋白获得。这些亲本结合蛋白可以天然存在的,或者可以通过重组技术产生。本领域普通技术人员熟悉用于产生抗体和/或分离的受体的许多方法,包括但不限于,使用杂交瘤技术;选择性淋巴细胞抗体法(SLAM);使用噬菌体、酵母或RNA-蛋白质融合物展示或其它文库;对包含至少一些人免疫球蛋白基因座的非人动物进行免疫接种;及制备嵌合抗体、CDR移植的抗体及人源化抗体。参见例如,US专利公布号20090311253 A1。还可以使用亲和力成熟技术来制备可变结构域。所述结合蛋白的结合可变结构域也可以由通过本领域中已知的提取工序(例如,使用溶剂、清洁剂和/或亲和纯化)获得的分离的受体分子获得,或通过本领域中已知的生物物理方法(例如,X射线结晶、NMR、干涉测量法和/或计算机建模)确定。

[0086] 提供的一个实施方案包括选择具有结合蛋白分子所需的至少一种或多种特性的亲本结合蛋白。在一个实施方案中,所需的特性是用于表征抗体参数的一种或多种特性,如例如抗原特异性、对抗原的特异性、对抗原的亲和力、效力、生物功能、表位识别、稳定性、溶解性、生产效率、免疫原性、药代动力学、生物利用率、组织交叉反应性或直系同源抗原结合。参见例如,US专利公布号20090311253。

[0087] 所述多特异性抗体还可以被设计成使得一个或多个抗原结合结构域没有功能。可变结构域可以使用重组DNA技术,由通过本文所述方法中的任一种产生的亲本结合蛋白获得。在一个实施方案中,可变结构域是鼠重链或轻链可变结构域。在另一实施方案中,可变结构域是CDR移植的或人源化可变重链或轻链结构域。在一个实施方案中,可变结构域是人重链或轻链可变结构域。

[0088] 在一个实施方案中,使用重组DNA技术将一个或多个恒定结构域连接至可变结构域。在一个实施方案中,将包含一个或多个重链可变结构域的序列连接至重链恒定结构域并且将包含一个或多个轻链可变结构域的序列连接至轻链恒定结构域。在一个实施方案中,所述恒定结构域分别是人重链恒定结构域和人轻链恒定结构域。在一个实施方案中,将重链另外连接至Fc区。Fc区可以是原生序列Fc区或变体Fc区。在另一实施方案中,Fc区是人Fc区。在另一实施方案中,Fc区包括来自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE或IgD的Fc区。

[0089] 另外地,本文提供的结合蛋白可以用于组织特异性递送(靶向组织标记物和疾病介体以增强局部PK,由此达成较高功效和/或较低毒性),包括细胞内递送(靶向内化受体和细胞内分子),递送到大脑内部(靶向转铁蛋白受体和CNS疾病介体以穿过血脑屏障)。所述结合蛋白也可充当载体蛋白,经由结合至抗原的非中和性表位而将所述抗原递送到特定位置并增加所述抗原的半衰期。此外,所述结合蛋白可以被设计成以物理方式连接至植入患者体内的医疗装置或靶向这些医疗装置(参见Burke等(2006)Advanced Drug Deliv. Rev. 58 (3) :437-446;Hildebrand等(2006)Surface and Coatings Technol. 200 (22-23) :6318-6324;Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis,Wu(2006)Biomaterials 27 (11) :2450-2467;Mediation of the cytokine network in the implantation of orthopedic devices,Marques(2005) Biodegradable Systems in Tissue Engineer. Regen. Med. 377-397)。将适当类型的细胞引导至医疗植入物的位置可以促进正常组织功能治愈和恢复。或者,也通过与装置偶合或靶向装置的受体抗体融合蛋白来抑制在装置植入后释放的介体(包括但不限于,细胞因子)。

[0090] 在一方面,用以上公开的载体转化宿主细胞。在一个实施方案中,宿主细胞是原核细胞。在另一实施方案中,宿主细胞是大肠杆菌。在另一实施方案中,宿主细胞是真核细胞。在另一实施方案中,真核细胞选自由以下组成的组:原生生物细胞、动物细胞、植物细胞及真菌细胞。在一个实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞,包括但不限于,293、COS、NS0及CHO;和或真菌细胞,如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),或昆虫细胞,如Sf9。

[0091] 本发明另一方面提供一种制备以上公开的结合蛋白的方法,所述方法包括在足以产生所述结合蛋白的条件下,在培养基中培养以上也公开的宿主细胞中的任一种。优选地,由此方法产生的结合蛋白中有50%-75%是双重特异性四价结合蛋白。更优选地,由此方法产生的结合蛋白中有75%-90%是双重特异性四价结合蛋白。最优选地,所产生的结合蛋白中有90%-95%是双重特异性四价结合蛋白。

[0092] 另一实施方案提供了根据以上公开的方法制备的结合蛋白。

[0093] 一个实施方案提供了一种用于释放结合蛋白的组合物,其中所述组合物包含制剂及至少一种聚合物载体,所述制剂又包含以上公开的结晶的结合蛋白和某一成分。优选地,聚合物载体是选自由以下组成的组的一种或多种的聚合物:聚(丙烯酸)、聚(氰基丙烯酸酯)、聚(氨基酸)、聚(酸酐)、聚(缩酚酸肽)、聚(酯)、聚(乳酸)、聚乳酸-乙醇酸共聚物或PLGA、聚(β -羟基丁酸酯)、聚(己内酯)、聚(二氧环己酮)、聚(乙二醇)、聚((羟丙基)甲基丙烯酰胺)、聚[(有机)磷氮烯]、聚(原酸酯)、聚(乙烯醇)、聚(乙烯吡咯烷酮)、顺丁烯二酸酐-烷基乙烯基醚共聚物、普洛尼克多元醇(pluronic polyol)、白蛋白、海藻酸盐、纤维素和纤维素衍生物、胶原蛋白、血纤维蛋白、明胶、透明质酸、寡糖、葡糖胺聚糖、硫酸化多糖、其掺合物和共聚物。优选地,所述成分选自由以下组成的组:白蛋白、蔗糖、海藻糖、乳糖醇、明胶、羟丙基- β -环糊精、甲氧基聚乙二醇及聚乙二醇。另一个实施方案提供一种用于治疗哺乳动物的方法,所述方法包括以下步骤:向所述哺乳动物施用有效量的以上公开的组合物。

[0094] 本发明还提供一种药物组合物,其包含如以上所公开的结合蛋白及药学上可接受的载体。药学上可接受的载体包括但不限于,磷酸盐缓冲液或生理盐水。其它常用的胃肠外媒剂包括磷酸钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏液或不挥发油。静脉内媒剂包括流体和营养补充液、电解质补充液,如基于林格氏右旋糖的那些等。也可以存在防腐剂和其它添加剂,如例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂及惰性气体等。更具体地,适合于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(水溶性的情况)或分散液和用于临时制备无菌注射溶液或分散液的无菌粉末。载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)及其适合的混合物。在一些情况下,优选在组合物中包含等渗剂,例如糖类、多元醇如甘露糖醇、山梨糖醇,或氯化钠。通过在组合物中包括例如单硬脂酸铝和明胶等延迟吸收的试剂,可以使注射组合物的吸收延长。

[0095] 在另一个实施方案中,药物组合物包含至少一种用于治疗病症的另外的治疗剂。在一个实施方案中,所述另外的药剂选自由以下组成的组:治疗剂、显影剂、细胞毒性剂、血管生成抑制剂(包括但不限于,抗VEGF抗体或VEGF捕获剂)、激酶抑制剂(包括但不限于,KDR和TIE-2抑制剂)、共刺激分子阻断剂(包括但不限于,抗B7.1、抗B7.2、CTLA4-Ig、抗PD-1、抗CD20)、粘附分子阻断剂(包括但不限于,抗LFA-1抗体、抗E/L选择素抗体、小分子抑制剂)、抗细胞因子抗体或其功能片段(包括但不限于,抗IL-18、抗TNF及抗IL-6/细胞因子受体抗体)、甲氨蝶呤(methotrexate)、环孢菌素(cyclosporin)、雷帕霉素(rapamycin)、FK506、可

检测标记或报导子、TNF拮抗剂、抗风湿药、肌肉松弛剂、麻醉药 (narcotic)、非类固醇抗炎药 (NSAID)、止痛剂、麻醉剂 (anesthetic)、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻断剂、抗微生物剂、抗牛皮癣药、皮质类固醇、合成代谢类固醇 (anabolic steroid)、红细胞生成素 (erythropoietin)、免疫接种、免疫球蛋白、免疫抑制剂、生长激素、激素替代药物、放射性药剂、抗抑郁剂、抗精神病药、兴奋剂、哮喘药物、β激动剂、吸入性类固醇、肾上腺素或类似物、细胞因子及细胞因子拮抗剂。

[0096] 在另一方面，本发明提供一种用于治疗罹患其中能够被以上公开的结合蛋白结合的一个或多个靶标是有害的病症的人受试者的方法，所述方法包括向所述人受试者施用以上公开的结合蛋白以使得所述人受试者体内的所述一个或多个靶标的活性得到抑制并且实现所述病症的预防或治疗。在一个实施方案中，所述疾病或病症是炎性病状、自体免疫性疾病或癌症。在一个实施方案中，所述疾病或病症选自包含以下的组：关节炎、骨关节炎、青少年慢性关节炎、脓毒性关节炎、莱姆氏关节炎 (Lyme arthritis)、牛皮癣性关节炎、反应性关节炎、脊柱关节病、全身性红斑狼疮、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、炎性肠病、胰岛素依赖性糖尿病、甲状腺炎、哮喘、过敏性疾病、牛皮癣、皮炎硬皮病、移植植物抗宿主疾病、器官移植排斥反应、与器官移植相关的急性或慢性免疫疾病、肉样瘤病、动脉粥样硬化、弥漫性血管内凝血、川崎氏病 (Kawasaki's disease)、格雷夫斯氏病 (Grave's disease)、肾病综合症、慢性疲劳综合症、韦格纳氏肉芽肿 (Wegener's granulomatosis)、亨-舍二氏紫癜 (Henoch-Schoenlein purpura)、肾脏显微镜下脉管炎、慢性活动性肝炎、葡萄膜炎、败血性休克、中毒休克综合征、败血症综合症、恶病质、感染性疾病、寄生虫病、获得性免疫缺陷综合症、急性横贯性脊髓炎、亨廷顿氏舞蹈症 (Huntington's chorea)、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、中风、原发性胆汁性硬化、溶血性贫血、恶性疾病、心脏衰竭、心肌梗塞、埃迪逊氏病 (Addison's disease)、散发性I型多腺体缺陷和II型多腺体缺陷、施密特氏综合症 (Schmidt's syndrome)、成人 (急性) 呼吸窘迫综合症、秃头症、斑秃、血清反应阴性关节病、关节病、瑞特氏病 (Reiter's disease)、牛皮癣性关节病、溃疡性结肠炎性关节病、肠源性滑膜炎、衣原体病、耶尔森氏菌和沙门氏菌相关性关节病、脊柱关节病、动脉粥样化病/动脉硬化、异位性过敏、自体免疫性大疱病、寻常性天疱疮、落叶状天疱疮、类天疱疮、线性IgA疾病、自体免疫性溶血性贫血、Coombs试验阳性溶血性贫血、获得性恶性贫血、青少年恶性贫血、肌痛性脑炎/皇家自由疾病 (Royal Free Disease)、慢性皮肤黏膜念珠菌病、巨细胞动脉炎、原发性硬化性肝炎、隐源性自体免疫性肝炎、获得性免疫缺陷疾病综合症、获得性免疫缺陷相关疾病、乙型肝炎、丙型肝炎、常见变异性免疫缺陷 (常见变异性低丙种球蛋白血症)、扩张性心肌病、女性不孕、卵巢衰竭、卵巢早衰、纤维性肺病、隐源性纤维性肺泡炎、发炎后间质性肺病、间质性肺炎、结缔组织疾病相关性间质性肺病、混合型结缔组织疾病相关性肺病、系统性硬化相关性间质性肺病、类风湿性关节炎相关性间质性肺病、全身性红斑狼疮相关性肺病、皮肌炎/多发性肌炎相关性肺病、修格连氏疾病 (Sjögren's disease) 相关性肺病、强直性脊椎炎相关性肺病、脉管炎性弥漫性肺病、含铁血黄素沉积病相关性肺病、药物诱发的间质性肺病、纤维化、放射性纤维化、闭塞性细支气管炎、慢性嗜酸细胞性肺炎、淋巴细胞性浸润性肺病、感染后间质性肺病、痛风性关节炎、自体免疫性肝炎、1型自体免疫性肝炎 (典型性自体免疫性或狼疮样肝炎)、2型自体免疫性肝炎 (抗LKM抗体肝炎)、自体免疫介导的低血糖、B型胰岛素抵抗伴发黑色棘皮病、甲状腺功能减退、器官移植相关性急性

免疫疾病、器官移植相关性慢性免疫疾病、骨关节病、原发性硬化性胆管炎、1型牛皮癣、2型牛皮癣、特发性白血球减少病、自体免疫性中性粒细胞减少症、肾病NOS、肾小球肾炎、肾脏显微镜下脉管炎、莱姆氏病、盘状红斑狼疮、特发性或NOS型男性不育、精子自体免疫、多发性硬化(所有亚型)、交感性眼炎、结缔组织疾病继发的肺高压、吉帕斯捷氏综合症(Goodpasture's syndrome)、结节性多动脉炎的肺表现、急性风湿热、类风湿性脊椎炎、斯蒂尔氏病(Still's disease)、系统性硬化、修格连氏综合症、高安氏病(Takayasu's disease) /动脉炎、自体免疫性血小板减少症、特发性血小板减少症、自体免疫性甲状腺疾病、甲状腺机能亢进、甲状腺肿自体免疫性甲状腺功能减退(桥本氏病(Hashimoto's disease))、衰退性自体免疫性甲状腺功能减退、原发性黏液水肿、晶状体源性葡萄膜炎、原发性脉管炎、白癜风、急性肝病、急性肝病、酒精性肝硬化、酒精诱发的肝损伤、胆汁郁积、特异质性肝病、药物诱发的肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、过敏和哮喘、B型链球菌(GBS)感染、精神障碍(例如,抑郁和精神分裂症)、Th2型和Th1型介导的疾病、急性和慢性疼痛(不同形式的疼痛),及癌症如肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌及直肠癌,及血液恶性疾病(白血病和淋巴瘤)、AB脂蛋白血症、四肢发绀、急性和慢性寄生虫或感染过程、急性白血病、急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、急性或慢性细菌感染、急性胰腺炎、急性肾衰竭、腺癌、心房异位搏动、AIDS痴呆复合征、酒精诱发的肝炎、过敏性结膜炎、过敏性接触性皮炎、过敏性鼻炎、同种异体移植植物排斥反应、 α -1抗胰蛋白酶缺乏、肌萎缩性侧索硬化、贫血、心绞痛、前角细胞变性、抗cd3疗法、抗磷脂综合症、抗受体过敏性反应、主动脉瘤和周围动脉瘤、主动脉剥离、动脉高压、动脉硬化、动静脉瘘、共济失调、心房颤动(持续性或阵发性)、心房扑动、房室传导阻滞、B细胞淋巴瘤、骨移植排斥反应、骨髓移植(BMT)排斥反应、房室束支传导阻滞、伯基特氏淋巴瘤、烧伤、心律不整、心肌顿抑综合症、心脏肿瘤、心肌病、心肺旁路炎症反应、软骨移植植物排斥反应、小脑皮质退化、小脑功能失调、紊乱性或多灶性房性心动过速、化疗相关性病症、慢性髓细胞白血病(CML)、慢性酒精中毒、慢性炎性病理过程、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性阻塞性肺病(COPD)、慢性水杨酸中毒、结直肠癌、充血性心脏衰竭、结膜炎、接触性皮炎、肺源性心脏病、冠状动脉疾病、克雅二氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)、培养阴性败血症、囊性纤维化、细胞因子疗法相关性病症、拳击手痴呆、脱髓鞘疾病、登革出血热、皮炎、皮肤病状、糖尿病(diabete)、糖尿病(diabetes mellitus)、糖尿病性动脉粥样硬化病、弥漫性莱维小体病、扩张性充血性心肌病、基底神经节病症、中年唐氏综合症(Down's Syndrome in middle age)、由阻断CNS多巴胺受体的药物诱发的药物诱发性运动障碍、药物敏感、湿疹、脑脊髓炎、心内膜炎、内分泌病、会厌炎、爱泼斯坦-巴尔病毒感染(epstein-barr virus infection)、红斑性肢痛症、锥体束外和小脑病症、家族性嗜血细胞性淋巴组织细胞增生症、胚胎胸腺移植排斥反应、弗立特里希氏共济失调(Friedreich's ataxia)、功能性周围动脉病症、真菌性败血症、气性坏疽、胃溃疡、肾小球肾炎、任何器官或组织的移植物排斥反应、革兰氏阴性败血症、革兰氏阳性败血症、由细胞内生物体引起的肉芽肿、毛细胞白血病、哈-斯二氏病(Hallerrorden-Spatz disease)、桥本氏甲状腺炎、枯草热、心脏移植排斥反应、血色素沉着病、血渗析、溶血尿毒症综合症/血栓性血小板减少性紫癜、出血、肝炎(甲型)、希氏束心律不整(Hisbundle arrhythmia)、HIV感染/HIV神经病、霍奇金氏病、高动力性运动障碍、过敏反应、过敏性肺炎、高血压、低动力性运动障碍、下丘脑-垂体-肾上腺轴评价、idiopathic

Addison's disease、特发性肺纤维化、抗体介导的细胞毒性、虚弱、婴儿型脊髓性肌肉萎缩症、主动脉炎症、a型流感、电离辐射曝露、虹膜睫状体炎/葡萄膜炎/视神经炎、缺血性再灌注损伤、缺血性中风、青少年类风湿性关节炎、青少年脊髓性肌肉萎缩症、卡波西氏肉瘤 (Kaposi's sarcoma)、肾移植排斥反应、军团杆菌病、利什曼病、麻风病、皮质脊髓系统病变、脂肪水肿、肝移植排斥反应、淋巴水肿、疟疾、恶性淋巴瘤、恶性组织细胞增多症、恶性黑色瘤、脑膜炎、脑膜炎球菌血症、代谢/特发性偏头痛、线粒体多系统病症、混合型结缔组织疾病、单克隆丙种球蛋白病、多发性骨髓瘤、多系统退化 (Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager 及 Machado-Joseph)、重症肌无力、胞内鸟型结核分枝杆菌病、结核分枝杆菌感染、骨髓增生异常综合症、心肌梗塞、心肌缺血病症、鼻咽癌、新生儿慢性肺病、肾炎、肾病、神经退行性疾病、神经源性I型肌萎缩、嗜中性白血球低下性发热、非霍奇金氏淋巴瘤、腹部主动脉及其分支阻塞、动脉阻塞性病症、okt3疗法、睾丸炎/副睾丸炎、睾丸炎/输精管切除逆转术、脏器肿大、骨质疏松症、胰脏移植排斥反应、胰腺癌、副肿瘤综合症/恶性高钙血症、甲状腺旁腺移植排斥反应、盆腔炎性疾病、常年性鼻炎、心包疾病、周围动脉硬化疾病、周围血管病症、腹膜炎、恶性贫血、卡氏肺囊虫肺炎、肺炎、POEMS综合症(多发性神经病、脏器肿大、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病及皮肤改变综合症)、灌注后综合症、泵后综合症、MI心切开术后综合症、先兆子痫、进行性核上性麻痹、原发性肺高压、放射疗法、雷诺氏现象和疾病 (Raynaud's phenomenon and disease)、雷诺氏病、雷弗素姆氏病 (Refsum's disease)、规律性窄QRS波群心动过速、肾血管性高血压、再灌注损伤、限制型心肌病、肉瘤、硬皮病、老年性舞蹈病、莱维小体型老年痴呆、血清反应阴性关节病、休克、镰刀细胞贫血、皮肤同种异体移植植物排斥反应、皮肤改变综合症、小肠移植排斥反应、实体肿瘤、特异性心律失常、脊髓性共济失调、脊髓小脑退化、链球菌肌炎、小脑结构损害、亚急性硬化性全脑炎、晕厥、心血管系统梅毒、全身性过敏反应、全身炎性反应综合症、全身发作性青少年类风湿性关节炎、T细胞或FAB ALL、毛细管扩张、血栓闭塞性脉管炎、血小板减少症、中毒、移植、外伤/出血、III型过敏反应、IV型过敏反应、不稳定型心绞痛、尿毒症、尿脓毒病、荨麻疹、心脏瓣膜病、静脉曲张、脉管炎、静脉疾病、静脉血栓、心室纤颤、病毒和真菌感染、病毒性脑炎/无菌性脑膜炎、病毒相关嗜血细胞综合症、维-柯二氏综合症 (Wernicke-Korsakoff syndrome)、威尔逊氏病 (Wilson's disease)、任何器官或组织的异种移植排斥反应。

[0097] 在另一方面,本发明提供一种治疗罹患病症的患者的方法,所述方法包括以下步骤:在施用如以上所论述的第二药剂之前、同时或之后施用以上公开的任一种结合蛋白。在一个优选实施方案中,第二药剂选自由以下组成的组:布替耐德 (budenoside) ;表皮生长因子;皮质类固醇;环孢菌素;柳氮磺胺吡啶 (sulfasalazine) ;氨基水杨酸盐;6-巯基嘌呤;硫唑嘌呤 (azathioprine) ;甲硝哒唑 (metronidazole) ;脂肪加氧酶抑制剂;美沙拉嗪 (mesalamine) ;奥沙拉嗪 (olsalazine) ;巴柳氮 (balsalazide) ;抗氧化剂;血栓素 (thromboxane) 抑制剂;IL-1受体拮抗剂;抗IL-1 β 单克隆抗体;抗IL-6单克隆抗体;生长因子;弹性蛋白酶抑制剂;吡啶基-咪唑化合物;TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-18、IL-23、EMAP-II、GM-CSF、FGF 及 PDGF 的抗体或激动剂;CD2、CD3、CD4、CD8、CD-19、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90 或其配体的抗体;甲氨蝶呤;环孢菌素;FK506;雷帕霉素;霉酚酸吗啉乙酯 (mycophenolate mofetil) ;来氟米特 (leflunomide) ;NSAID;布洛芬 (ibuprofen) ;皮质类固醇;泼尼松龙 (prednisolone) ;磷酸

二酯酶抑制剂；腺昔激动剂；抗血栓剂；补体抑制剂；肾上腺素能药剂；IRAK、NIK、IKK、p38、MAP激酶抑制剂；IL-1 β 转化酶抑制剂；TNF α 转化酶抑制剂；T细胞信号传导抑制剂；金属蛋白酶抑制剂；柳氮磺胺吡啶；硫唑嘌呤；6-巯基嘌呤；血管收缩素转化酶抑制剂；可溶性细胞因子受体；可溶性p55TNF受体；可溶性p75TNF受体；sIL-1RI；sIL-1RII；sIL-6R；抗炎细胞因子；IL-4；IL-10；IL-11；IL-13；及TGF β 。

[0098] 在一个实施方案中，以上公开的药物组合物是通过至少一种选自以下的模式施用给受试者：胃肠外、皮下、肌肉内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内(intracelial)、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊椎内、滑膜内、胸腔内、子宫内、膀胱内、快速注射、经阴道、经直肠、经颊、舌下、鼻内及透皮施用。

[0099] 本发明一方面提供针对至少一种本发明的结合蛋白的至少一种抗个体基因型抗体。抗个体基因型抗体包括任何蛋白质或肽，所述蛋白质或肽含有包含可以并入本发明的结合蛋白中的免疫球蛋白分子的至少一部分的分子，所述至少一部分如但不限于，重链或轻链的至少一个互补决定区(CDR)或其配体结合部分、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、框架区或其任何部分。

[0100] 在另一实施方案中，本发明的结合蛋白能够结合选自由以下组成的组的一个或多个靶标：ABCF1；ACVR1；ACVR1B；ACVR2；ACVR2B；ACVRL1；ADORA2A；Aggrecan；AGR2；AICDA；AIF1；AIG1；AKAP1；AKAP2；AMH；AMHR2；ANGPT1；ANGPT2；ANGPTL3；ANGPTL4；ANPEP；APC；APOC1；AR；AZGP1(锌-a-糖蛋白)；B7.1；B7.2；BAD；BAFF；BAG1；BAI1；BCL2；BCL6；BDNF；BLNK；BLR1(MDR15)；BlyS；BMP1；BMP2；BMP3B(GDF10)；BMP4；BMP6；BMP8；BMPR1A；BMPR1B；BMPR2；BPAG1(网格蛋白)；BRCA1；C19orf10(IL27w)；C3；C4A；C5；C5R1；CANT1；CASP1；CASP4；CAV1；CCBP2(D6/JAB61)；CCL1(I-309)；CCL11(嗜酸性粒细胞趋化因子)；CCL13(MCP-4)；CCL15(MIP-1d)；CCL16(HCC-4)；CCL17(TARC)；CCL18(PARC)；CCL19(MIP-3b)；CCL2(MCP-1)；MCAF；CCL20(MIP-3a)；CCL21(MIP-2)；SLC；非淋巴细胞趋化因子-2；CCL22(MDC/STC-1)；CCL23(MPIF-1)；CCL24(MPIF-2/嗜酸性粒细胞趋化因子-2)；CCL25(TECK)；CCL26(嗜酸性粒细胞趋化因子-3)；CCL27(CTACK/ILC)；CCL28；CCL3(MIP-1a)；CCL4(MIP-1b)；CCL5(RANTES)；CCL7(MCP-3)；CCL8(mcp-2)；CCNA1；CCNA2；CCND1；CCNE1；CCNE2；CCR1(CKR1/HM145)；CCR2(mcp-1RB/RA)；CCR3(CKR3/CMKBR3)；CCR4；CCR5(CMKBR5/ChemR13)；CCR6(CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6)；CCR7(CKR7/EBI1)；CCR8(CMKBR8/TER1/CKR-L1)；CCR9(GPR-9-6)；CCRL1(VSHK1)；CCRL2(L-CCR)；CD164；CD19；CD1C；CD20；CD200；CD-22；CD24；CD28；CD3；CD37；CD38；CD3E；CD3G；CD3Z；CD4；CD40；CD40L；CD44；CD45RB；CD47、CD48、CD52；CD69；CD70、CD72；CD74；CD79A；CD79B；CD8；CD80；CD81；CD83；CD86；CD137、CD138、B7-1、B7-2、ICOSL、B7-H3、B7-H4、CD137L、OX40L、CDH1(E-钙粘着蛋白)；CDH10；CDH12；CDH13；CDH18；CDH19；CDH20；CDH5；CDH7；CDH8；CDH9；CDK2；CDK3；CDK4；CDK5；CDK6；CDK7；CDK9；CDKN1A(p21Wap1/Cip1)；CDKN1B(p27Kip1)；CDKN1C；CDKN2A(p16INK4a)；CDKN2B；CDKN2C；CDKN3；CEBPB；CER1；CHGA；CHGB；壳多糖酶；CHST10；CKLFSF2；CKLFSF3；CKLFSF4；CKLFSF5；CKLFSF6；CKLFSF7；CKLFSF8；CLDN3；CLDN7(封闭素-7)；CLN3；CLU(聚集素蛋白)；CMKLR1；CMKOR1(RDC1)；CNR1；COL18A1；COL1A1；COL4A3；COL6A1；CR2；CRP；CSF1(M-CSF)；CSF2(GM-CSF)；CSF3(GCSF)；CTLA-4；CTNNB1(b-链蛋白)；CTSB(组织蛋白酶B)；CX3CL1(SCYD1)；CX3CR1(V28)；CXCL1(GR01)；

CXCL10 (IP-10) ; CXCL11 (I-TAC/IP-9) ; CXCL12 (SDF1) ; CXCL13; CXCL14; CXCL16; CXCL2 (GR02) ; CXCL3 (GR03) ; CXCL5 (ENA-78/LIX) ; CXCL6 (GCP-2) ; CXCL9 (MIG) ; CXCR3 (GPR9/CKR-L2) ; CXCR4 ; CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo) ; CYB5 ; CYC1 ; CYSLTR1 ; DAB2IP ; DES ; DKFZp451J0118; DNCL1; DPP4; E2F1; ECGF1; EDG1; EFNA1; EFNA3; EFNB2; EGF; EGFR; ELAC2; ENG; EN01; EN02; EN03; EPHB4; EPO; ERBB2 (Her-2) ; EREG; ERK8; ESR1; ESR2; F3 (TF) ; FADD; FasL; FASN; FCER1A; FCER2; FCGR3A; FGF; FGF1 (aFGF) ; FGF10; FGF11; FGF12; FGF12B; FGF13; FGF14; FGF16; FGF17; FGF18; FGF19; FGF2 (bFGF) ; FGF20; FGF21; FGF22; FGF23; FGF3 (int-2) ; FGF4 (HST) ; FGF5 ; FGF6 (HST-2) ; FGF7 (KGF) ; FGF8; FGF9; FGFR3; FIGF (VEGFD) ; FIL1 (EPSILON) ; FIL1 (ZETA) ; FLJ12584; FLJ25530; FLRT1 (纤连蛋白) ; FLT1; FOS; FOSL1 (FRA-1) ; FY (DARC) ; GABRP (GABAa) ; GAGEB1 ; GAGEC1 ; GALNAC4S-6ST ; GATA3 ; GDF5 ; GFI1 ; GGT1 ; GM-CSF ; GNAS1 ; GNRH1 ; GPR2 (CCR10) ; GPR31 ; GPR44 ; GPR81 (FKSG80) ; GRCC10 (C10) ; GRP ; GSN (凝溶胶蛋白) ; GSTP1 ; HAVCR2 ; HDAC4 ; HDAC5 ; HDAC7A ; HDAC9 ; HGF ; HIF1A ; HIP1 ; 组胺和组胺受体 ; HLA-A ; HLA-DRA ; HM74 ; HMOX1 ; HUMCYT2A ; ICEBERG ; ICOSL ; ID2 ; IFN- α ; IFNA1 ; IFNA2 ; IFNA4 ; IFNA5 ; IFNA6 ; IFNA7 ; IFNB1 ; IFN γ ; IFNW1 ; IGBP1 ; IGF1 ; IGF1R ; IGF2 ; IGFBP2 ; IGFBP3 ; IGFBP6 ; IL-1 ; IL10 ; IL10RA ; IL10RB ; IL11 ; IL11RA ; IL-12 ; IL12A ; IL12B ; IL12RB1 ; IL12RB2 ; IL13 ; IL13RA1 ; IL13RA2 ; IL14 ; IL15 ; IL15RA ; IL16 ; IL17 ; IL17B ; IL17C ; IL17R ; IL18 ; IL18BP ; IL18R1 ; IL18RAP ; IL19 ; IL1A ; IL1B ; IL1F10 ; IL1F5 ; IL1F6 ; IL1F7 ; IL1F8 ; IL1F9 ; IL1HY1 ; IL1R1 ; IL1R2 ; IL1RAP ; IL1RAPL1 ; IL1RAPL2 ; IL1RL1 ; IL1RL2IL1RN ; IL2 ; IL20 ; IL20RA ; IL21R ; IL22 ; IL22R ; IL22RA2 ; IL23 ; IL24 ; IL25 ; IL26 ; IL27 ; IL28A ; IL28B ; IL29 ; IL2RA ; IL2RB ; IL2RG ; IL3 ; IL30 ; IL3RA ; IL4 ; IL4R ; IL5 ; IL5RA ; IL6 ; IL6R ; IL6ST (糖蛋白130) ; IL7 ; IL7R ; IL8 ; IL8RA ; IL8RB ; IL8RB ; IL9 ; IL9R ; ILK ; INHA ; INHBA ; INSL3 ; INSL4 ; IRAK1 ; IRAK2 ; ITGA1 ; ITGA2 ; ITGA3 ; ITGA6 (a6整合素) ; ITGAV ; ITGB3 ; ITGB4 (b 4整合素) ; JAG1 ; JAK1 ; JAK3 ; JUN ; K6HF ; KAI1 ; KDR ; KITLG ; KLF5 (GC Box BP) ; KLF6 ; KLK10 ; KLK12 ; KLK13 ; KLK14 ; KLK15 ; KLK3 ; KLK4 ; KLK5 ; KLK6 ; KLK9 ; KRT1 ; KRT19 (角蛋白19) ; KRT2A ; KRTHB6 (毛发特异性II型角蛋白) ; LAMA5 ; LEP (瘦素) ; Lingo-p75 ; Lingo-Troy ; LPS ; LTA (TNF-b) ; LTB ; LTB4R (GPR16) ; LTB4R2 ; LTBR ; MACMARCKS ; MAG 或 Omgp ; MAP2K7 (c-Jun) ; MDK ; MIB1 ; 中期因子 ; MIF ; MIP-2 ; MKI67 (Ki-67) ; MMP2 ; MMP9 ; MS4A1 ; MSMB ; MT3 (金属硫蛋白-III) ; MTSS1 ; MUC1 (粘蛋白) ; MYC ; MYD88 ; NCK2 ; 神经粘蛋白 ; NFKB1 ; NFKB2 ; NGFB (NGF) ; NGFR ; NgR-Lingo ; NgR-Nogo66 (Nogo) ; NgR-p75 ; NgR-Troy ; NME1 (NM23A) ; NOX5 ; NPPB ; NR0B1 ; NR0B2 ; NR1D1 ; NR1D2 ; NR1H2 ; NR1H3 ; NR1H4 ; NR1I2 ; NR1I3 ; NR2C1 ; NR2C2 ; NR2E1 ; NR2E3 ; NR2F1 ; NR2F2 ; NR2F6 ; NR3C1 ; NR3C2 ; NR4A1 ; NR4A2 ; NR4A3 ; NR5A1 ; NR5A2 ; NR6A1 ; NRP1 ; NRP2 ; NT5E ; NTN4 ; ODZ1 ; OPRD1 ; PCSK9 ; P2RX7 ; PAP ; PART1 ; PATE ; PAWR ; PCA3 ; PCNA ; PD-1 ; PD-L1 ; α 4 β 7 ; OX40 ; GITR ; TIM-3 ; Lag-3 ; B7-H3 ; B7-H4 ; GDF8 ; CGRP ; Lingo-1 ; 因子IXa ; 因子X ; ICOS ; GARP ; BTLA ; CD160 ; ROR1 ; 2B4 ; KIR ; CD27 ; OX40 ; CD40L ; A2aR ; PDGFA ; PDGFB ; PECAM1 ; PF4 (CXCL4) ; PGF ; PGR ; 磷酸粘蛋白 ; PIAS2 ; PIK3CG ; PLAU (uPA) ; PLG ; PLXDC1 ; PPBP (CXCL7) ; PPID ; PR1 ; PRKCQ ; PRKD1 ; PRL ; PROC ; PROK2 ; PSAP ; PSCA ; PTAFR ; PTEN ; PTGS2 (COX-2) ; PTN ; RAC2 (p21Rac2) ; RARB ; RGS1 ; RGS13 ; RGS3 ; RNF110 (ZNF144) ; ROBO2 ; S100A2 ; SCGB1D2 (亲脂性蛋白B) ; SCGB2A1 (乳腺珠蛋白2) ; SCGB2A2 (乳腺珠蛋白1) ; SCYE1 (内皮单核细胞活化性细胞因子) ; SDF2 ; SERPINA1 ; SERPINA3 ; SERPINB5 (姜黄素) ; SERPINE1 (PAI-1) ; SERPINF1 ; SHBG ; SLA2 ; SLC2A2 ;

SLC33A1; SLC43A1; SLIT2; SPP1; SPRR1B (Spr1) ; ST6GAL1; STAB1; STAT6; STEAP; STEAP2; TB4R2; TBX21; TCP10; TDGF1; TEK; TGFA; TGFB1; TGFB1I1; TGFB2; TGFB3; TGFBI; TGFBR1; TGFBR2; TGFBR3; TH1L; THBS1 (凝血栓蛋白-1) ; THBS2; THBS4; THPO; TIE (Tie-1) ; TIMP3; 组织因子; TLR10; TLR2; TLR3; TLR4; TLR5; TLR6; TLR7; TLR8; TLR9; TNF; TNF- α ; TNFAIP2 (B94) ; TNFAIP3; TNFRSF11A; TNFRSF1A; TNFRSF1B; TNFRSF21; TNFRSF5; TNFRSF6 (Fas) ; TNFRSF7; TNFRSF8; TNFRSF9; TNFSF10 (TRAIL) ; TNFSF11 (TRANCE) ; TNFSF12 (AP03L) ; TNFSF13 (April) ; TNFSF13B; TNFSF14 (HVEM-L) ; TNFSF15 (VEGI) ; TNFSF18; TNFSF4 (OX40配体) ; TNFSF5 (CD40配体) ; TNFSF6 (FasL) ; TNFSF7 (CD27配体) ; TNFSF8 (CD30配体) ; TNFSF9 (4-1BB配体) ; TOLLIP; To11样受体; TOP2A (拓扑异构酶Iia) ; TP53; TPM1; TPM2; TRADD; TRAF1; TRAF2; TRAF3; TRAF4; TRAF5; TRAF6; TREM1; TREM2; TRPC6; TSLP; TWEAK; VEGF; VEGFB; VEGFC; 多功能蛋白聚糖; VHLC5; VLA-4; XCL1 (淋巴细胞趋化因子) ; XCL2 (SCM-1b) ; XCR1 (GPR5/CCXCR1) ; YY1; 及 ZFPM2。

[0101] 考虑到本发明的结合蛋白能够结合两个或更多个抗原,故其可以用于使用常规免疫测定法,如酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射免疫测定法(RIA)或组织免疫组织化学法来检测抗原(例如,在生物样本,如血清或血浆中)。FIT-Ig直接或间接用可检测物质标记以利于检测结合或未结合的抗体。适合的可检测物质包括各种酶、辅基、荧光物质、发光物质及放射性物质。适合的酶的实例包括辣根过氧化酶、碱性磷酸酶、*-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;适合的辅基复合物的实例包括抗生蛋白链菌素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;适合荧光物质的实例包括伞形酮(umbelliferone)、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红素;发光物质的实例包括鲁米诺(luminol);并且适合的放射性物质的实例包括 ^{3}H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 或 ^{153}Sm 。

[0102] 在一个实施方案中,本发明的结合蛋白能够在体外和体内中和抗原的活性。因此,所述FIT-Ig可以用于抑制例如含有抗原的细胞培养物中、人受试者中或具有与本发明的结合蛋白交叉反应的抗原的其它哺乳动物受试者中的抗原活性。在另一实施方案中,本发明提供一种用于降低罹患其中抗原活性是有害的疾病或病症的受试者的抗原活性的方法。本发明的结合蛋白可以被施用给人受试者用于治疗目的。

[0103] 如本文所用,术语“其中抗原活性是有害的病症”意图包括其中在罹患病症的受试者中抗原的存在已显示出或怀疑会造成病症的病理生理学或是促成病症恶化的因素的疾病和其它病症。因此,其中抗原活性是有害的病症是其中预期降低抗原活性会减轻病症的症状和/或发展的病症。此类病症可以例如通过罹患所述病症的受试者的生物流体中抗原浓度增加(例如受试者的血清、血浆、滑液等中的抗原浓度增加)来证实。可以用本发明的结合蛋白治疗的病症的非限制性实例包括以下及关于本发明的抗体的药物组合物的章节中所论述的那些病症。

[0104] 本发明的FIT-Ig可以结合一种抗原或多种抗原。这些抗原包括但不限于,以下数据库中所列的靶标,这些数据库是以引用的方式并入本文中。这些靶标数据库包括但不限于,以下清单:

[0105] ●治疗性靶标 (<http://xin.cz3.nus.edu.sg/group/cjtd/ttd.asp>) ;

[0106] ●细胞因子和细胞因子受体 (<http://www.cytokinewebfacts.com/>, <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>, 及

- [0107] ● http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgf/CGF_Database/cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/indexR.html ;
- [0108] ● 趋化因子 (<http://cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/CK/Chemokine.html>) ;
- [0109] ● 趋化因子受体和GPCR (<http://csp.medic.kumamoto-u.ac.jp/CSP/Receptor.html>/<http://www.gpcr.org/7tm/>) ;
- [0110] ● 嗅觉受体 (<http://senselab.med.yale.edu/senselab/0RDB/default.asp>) ;
- [0111] ● 受体 (<http://www.iuphar-db.org/iuphar-rd/list/index.htm>) ;
- [0112] ● 癌症靶标 (<http://cged.hgc.jp/cgi-bin/input.cgi>) ;
- [0113] ● 作为潜在抗体靶标的分泌蛋白质 (<http://spd.cbi.pku.edu.cn/>) ;
- [0114] ● 蛋白激酶 (<http://spd.cbi.pku.edu.cn/>) , 及
- [0115] ● 人CD标记物 (http://content.labvelocity.com/tools/6/1226/CD_table_final_locked.pdf) 和 (Zola H, 2005 CD molecules 2005: human cell differentiation molecules Blood, 106:3123-6) 。
- [0116] FIT-Ig可用作治疗剂以同时阻断两种不同靶标来增强功效/安全性和/或增加患者适用范围。所述靶标可以包括可溶性靶标 (IL-13和TNF) 和细胞表面受体靶标 (VEGFR和EGFR)。它也可以用于诱导针对癌症疗法的肿瘤细胞与T细胞 (Her2和CD3) 之间,或针对自体免疫/移植的自体反应性细胞与效应细胞之间,或任何靶标细胞与效应细胞之间的细胞毒性再定向,以消除任何给定疾病中的致病细胞。
- [0117] 此外,当FIT-Ig被设计用于靶向同一受体上的两个不同表位时,其还可以用于触发受体聚集和活化。这可能在制备激动性和拮抗性抗GPCR治疗剂方面具有益处。在这一情况下,可以使用FIT-Ig靶向一个细胞上的两个不同表位以进行聚集/信号传导(两个细胞表面分子)或信号传导(在一个分子上)。类似地,FIT-Ig分子可以被设计成通过靶向CTLA-4细胞外结构域的两个不同表位(或同一表位的2个拷贝)来触发CTLA-4连接和负信号,从而引起免疫反应下调。CTLA-4是在临幊上得到验证的用于治疗性治疗多种免疫病症的靶标。CTLA-4/B7相互作用通过削弱细胞周期进程、IL-2产生及活化后T细胞的增殖来负面地调控T细胞活化,并且CTLA-4 (CD152) 接合可以下调T细胞活化并促进诱导免疫耐受性。然而,通过激动性抗体接合CTLA-4来削弱T细胞活化的策略由于CTLA-4活化需要连接而不成功。如通过晶体结构分析所证实,CTLA-4/B7的分子相互作用呈“歪斜拉链 (skewed zipper)”阵列 (Stamper 2001 Nature 410:608)。然而,目前可用的CTLA-4结合试剂都不具有连接特性,包括抗CTLA-4单克隆抗体。已作出若干尝试来解决此问题。在一种情况中,产生了细胞成员结合的单链抗体,并且显著抑制小鼠中的同种异体排斥反应 (Hwang 2002 JI 169:633)。在另一情况中,产生了针对CTLA-4的人工APC表面连接的单链抗体并证实可削弱T细胞反应 (Griffin 2000 JI 164:4433)。在两种情况中,通过人工系统中紧密定位的成员结合的抗体来达成CTLA-4连接。尽管这些实验提供了通过触发CTLA-4负性信号传导来免疫下调的概念验证 (proof-of-concept),但这些报导中所用的试剂不适于治疗用途。为此,可以通过使用靶向CTLA-4细胞外结构域的两个不同表位(或同一表位的2个拷贝)的FIT-Ig分子来达成CTLA-4连接。基本原理是横跨IgG的两个结合位点的约150-170Å的距离对于CTLA-4的活性连接(2个CTLA-4均二聚体之间是30-50 Å)而言过大。不过,FIT-Ig(一个臂)上的两个结

合位点之间的距离要短得多,也在30-50 Å范围内,从而允许CTLA-4的适当连接。

[0118] 类似地,FIT-Ig可以靶向细胞表面受体复合物的两个不同成员(例如IL-12Ra和β)。此外,FIT-Ig还可以靶向CR1和可溶性蛋白/病原体以驱动靶标可溶性蛋白/病原体的快速清除。

[0119] 另外,本发明的FIT-Ig可以用于组织特异性递送(靶向组织标记物和疾病介体以增强局部PK,因此达成较高功效和/或较低毒性),包括细胞内递送(靶向内化受体和细胞内分子)、递送到大脑内部(靶向转铁蛋白受体和CNS疾病介体以穿过血脑屏障)。FIT-Ig还可以充当载体蛋白,经由结合至抗原的非中和性表位而将所述抗原递送到特定位置以及还增加所述抗原的半衰期。此外,FIT-Ig可以被设计成以物理方式连接至植入患者体内的医疗装置或靶向这些医疗装置(Burke,Sandra E.;Kuntz,Richard E.;Schwartz,Lewis B. Zotarolimus (ABT-578) eluting stents.Advanced Drug Delivery Reviews (2006),58 (3),437-446.;Surface coatings for biological activation and functionalization of medical devices.Hildebrand,H.F.;Blanchemain,N.;Mayer,G.;Chai,F.;Lefebvre, M.;Boschin,F.Surface and Coatings Technology (2006),200 (22-23),6318-6324.;Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis.Wu,Peng;Grainger,David W.Biomaterials (2006),27 (11),2450-2467.;Mediation of the cytokine network in the implantation of orthopedic devices.Marques,A.P.;Hunt,J.A.;Reis,Rui L.Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine (2005),377-397;第52页

[0120] Mediation of the cytokine network in the implantation of orthopedic devices.Marques,A.P.;Hunt,J.A.;Reis,Rui L.Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine (2005),377-397。)简单地说,将适当类型的细胞引导到医学植入物的位置可以促进正常组织功能治愈和恢复。或者,也通过与装置耦接或靶向装置的FIT-Ig来抑制在装置植入后释放的介体(包括但不限于,细胞因子)。举例来说,多年来,支架已被用于介入心脏病学中以清理阻塞的动脉以及改善血液向心肌的流动。然而,已知传统的裸金属支架在一些患者中会导致再狭窄(使治疗区域中的动脉再变窄)并且会产生血块。近来,已描述用抗CD34抗体涂布的支架,所述支架通过捕集在整个血液中循环的内皮祖细胞(EPC)来减少再狭窄并防止出现血块。内皮细胞是内衬于血管,从而允许血液平稳流动的细胞。EPC粘附于支架的硬表面,形成光滑的层,其不仅促进治愈,而且还防止先前与使用支架相关的并发症,即再狭窄和血块(Ao ji等,2005J Am Coll Cardiol.45 (10):1574-9)。除改善需要支架的患者的结果之外,对于需要心血管旁路手术的患者也具有重要意义。举例来说,用抗EPC抗体涂布的人工血管(人工动脉)将消除对于使用来自患者腿或臂的动脉进行旁路手术移植的需求。这将减少手术和麻醉时间,而时间的减少又将减少冠状动脉手术的死亡。FIT-Ig的设计方式应使得其结合至细胞表面标记物(如CD34)以及涂布于植入装置上的蛋白质(或任何种类的表位,包括但不限于脂质和多糖)以促进细胞募集。此类方法一般也可以应用于其它医学植入物。或者,可以将FIT-Ig涂布于医疗装置上并且在植入装置及从所述装置释放所有FIT(或可能需要其它新鲜FIT-Ig的任何其它需求,包括已装载的FIT-Ig的老化和变性)后,所述装置可以通过将新鲜的FIT-Ig全身性施用到患者来进行重新装载,其中FIT-Ig被设计成通过一组结合位点结合至所关注靶标(细胞因子、细

胞表面标记物(如CD34)等)并且通过另一组结合位点结合至装置上涂布的靶标(包括任何种类的蛋白质、表位,包括但不限于脂质、多糖及聚合物)。这一技术具有扩大经过涂布的植入物的有用性的优势。

[0121] 本发明的FIT-Ig分子还可用作治疗各种疾病的治疗分子。这些FIT-Ig分子可以结合特定疾病中所涉及的一个或多个靶标。各种疾病中此类靶标的实例描述于下。

[0122] 全身自体免疫和炎性反应涉及到许多蛋白质,包括C5、CCL1(I-309)、CCL11(嗜酸性粒细胞趋化因子)、CCL13(mcp-4)、CCL15(MIP-1d)、CCL16(HCC-4)、CCL17(TARC)、CCL18(PARC)、CCL19、CCL2(mcp-1)、CCL20(MIP-3a)、CCL21(MIP-2)、CCL23(MPIF-1)、CCL24(MPIF-2/嗜酸性粒细胞趋化因子-2)、CCL25(TECK)、CCL26、CCL3(MIP-1a)、CCL4(MIP-1b)、CCL5(RANTES)、CCL7(mcp-3)、CCL8(mcp-2)、CXCL1、CXCL10(IP-10)、CXCL11(I-TAC/IP-9)、CXCL12(SDF1)、CXCL13、CXCL14、CXCL2、CXCL3、CXCL5(ENA-78/LIX)、CXCL6(GCP-2)、CXCL9、IL13、IL8、CCL13(mcp-4)、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CX3CR1、IL8RA、XCR1(CCXCR1)、IFNA2、IL10、IL13、IL17C、IL1A、IL1B、IL1F10、IL1F5、IL1F6、IL1F7、IL1F8、IL1F9、IL22、IL5、IL8、IL9、LTA、LTB、MIF、SCYE1(内皮单核细胞活化性细胞因子)、SPP1、TNF、TNFSF5、IFNA2、IL10RA、IL10RB、IL13、IL13RA1、IL5RA、IL9、IL9R、ABCF1、BCL6、C3、C4A、CEBPB、CRP、ICEBERG、IL1R1、IL1RN、IL8RB、LTB4R、TOLLIP、FADD、IRAK1、IRAK2、MYD88、NCK2、TNFAIP3、TRADD、TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF4、TRAF5、TRAF6、ACVR1、ACVR1B、ACVR2、ACVR2B、ACVRL1、CD28、CD3E、CD3G、CD3Z、CD69、CD80、CD86、CNR1、CTLA-4、CYSLTR1、FCER1A、FCER2、FCGR3A、GPR44、HAVCR2、OPRD1、P2RX7、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、BLR1、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL7、CCL8、CCL11、CCL13、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CX3CL1、CX3CR1、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCR4、GPR2、SCYE1、SDF2、XCL1、XCL2、XCR1、AMH、AMHR2、BMPR1A、BMPR1B、BMPR2、C19orf10(IL27w)、CER1、CSF1、CSF2、CSF3、DKFZp451J0118、FGF2、GFI1、IFNA1、IFNB1、IFNG、IGF1、IL1A、IL1B、IL1R1、IL1R2、IL2、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3、IL4、IL4R、IL5、IL5RA、IL6、IL6R、IL6ST、IL7、IL8、IL8RA、IL8RB、IL9、IL9R、IL10、IL10RA、IL10RB、IL11、IL11RA、IL12A、IL12B、IL12RB1、IL12RB2、IL13、IL13RA1、IL13RA2、IL15、IL15RA、IL16、IL17、IL17R、IL18、IL18R1、IL19、IL20、KITLG、LEP、LTA、LTB、LTB4R、LTB4R2、LTBR、MIF、NPPB、PDGFB、TBX21、TDGF1、TGFA、TGFB1、TGFB1I1、TGFB2、TGFB3、TGFB1、TGFB2、TGFB3、TGFB1、TGFB2、TGFB3、TH1L、TNF、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF7、TNFRSF8、TNFRSF9、TNFRSF11A、TNFRSF21、TNFSF4、TNFSF5、TNFSF6、TNFSF11、VEGF、ZFPM2及RNF110(ZNF144)。同时涵盖能够结合以上所列的一个或多个靶标的FIT-Ig。

[0123] 过敏性哮喘的特征在于存在嗜酸性粒细胞增多症、杯状细胞化生、上皮细胞变化、气道过度反应(AHR)及Th2和Th1细胞因子表达,以及血清IgE水平升高。现广泛认可气道炎症是引起哮喘发病的潜在关键因素,涉及如T细胞、B细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞及巨噬细胞等炎性细胞及其分泌介质(包括细胞因子和趋化因子)的复杂相互作用。皮质类固醇是当今针对哮喘的最重要的抗炎治疗剂,不过其作用机制是非特异性的并且存在安全问题,尤其是在青少年患者群体中。因此,有必要开发更具特异性和靶向性的疗法。越来越多的证据表明,IL-13在小鼠中模拟哮喘的许多特征,包括AHR、粘液分泌亢进及气道纤维化,而与

嗜酸细胞炎症无关(Finotto等,International Immunology (2005),17 (8),993-1007; Padilla等,Journal of Immunology (2005),174 (12),8097-8105)。

[0124] IL-13在引起与哮喘相关的病理反应中起到关键作用。开发抗IL-13单克隆抗体疗法以降低IL-13在肺中的作用是一种激动人心的新方法,作为针对哮喘的新型治疗,这一方法提供了广阔前景。然而,除IL-13外,哮喘的发病机理中还涉及不同免疫路径的其它介体,而阻断这些介体可以提供另外的治疗益处。所述靶标对包括但不限于,IL-13和促炎性细胞因子,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。TNF- α 可以增大哮喘的炎性反应并且可能与疾病的严重程度有关(McDonnell等,Progress in Respiratory Research (2001),31 (New Drugs for Asthma,Allergy and COPD),247-250.)。这表明,同时阻断IL-13和TNF- α 可以具有有益作用,特别是在严重气道疾病中。在一个优选的实施方案中,本发明的FIT-Ig结合靶标IL-13和TNF α 并且用于治疗哮喘。

[0125] 其中可以同时评估炎症与AHR的动物模型(如OVA诱发哮喘的小鼠模型)在本领域中是已知的并且可以用于测定各种FIT-Ig分子治疗哮喘的能力。Coffman等,Journal of Experimental Medicine (2005),201 (12),1875-1879;Lloyd等,Advances in Immunology (2001),77,263-295;Boyce等,Journal of Experimental Medicine (2005),201 (12),1869-1873;及Snibson等,Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology (2005),35 (2),146-52中公开了用于研究哮喘的动物模型。除对这些靶标对的常规安全性评估外,还可能保证免疫抑制程度的特定测试并且这些测试有助于选择最佳靶标对(参见Luster等,Toxicology (1994),92 (1-3),229-43;Descotes等,Developments in biological standardization (1992),7799-102;Hart等,Journal of Allergy and Clinical Immunology (2001),108 (2),250-257)。

[0126] 基于以上公开的基本原理并使用相同的针对功效和安全性的评价模型,可以确定FIT-Ig分子能够结合并且可用于治疗哮喘的其它靶标对。优选地,此类靶标包括但不限于,IL-13和IL-1 β ,因为IL-1 β 也牵涉到哮喘中的炎性反应;IL-13及涉及炎症的细胞因子和趋化因子,如IL-13和IL-9;IL-13和IL-4;IL-13和IL-5;IL-13和IL-25;IL-13和TARC;IL-13和MDC;IL-13和MIF;IL-13和TGF- β ;IL-13和LHR激动剂;IL-13和CL25;IL-13和SPRR2a;IL-13和SPRR2b;及IL-13和ADAM8。本发明还涵盖能够结合哮喘中所涉及的一个或多个靶标的FIT-Ig,所述靶标选自由以下组成的组:CSF1 (MCSF)、CSF2 (GM-CSF)、CSF3 (GCSF)、FGF2、IFNA1、IFNB1、IFNG、组胺和组胺受体、IL1A、IL1B、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12A、IL12B、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL18、IL19、KITLG、PDGFB、IL2RA、IL4R、IL5RA、IL8RA、IL8RB、IL12RB1、IL12RB2、IL13RA1、IL13RA2、IL18R1、TSLP、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL7、CCL8、CCL13、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL22、CCL24、CX3CL1、CXCL1、CXCL2、CXCL3、XCL1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CX3CR1、GPR2、XCR1、FOS、GATA3、JAK1、JAK3、STAT6、TBX21、TGFB1、TNFSF6、YY1、CYSLTR1、FCER1A、FCER2、LTB4R、TB4R2、LTBR及壳多糖酶。

[0127] 类风湿性关节炎(RA)是一种全身性疾病,其以关节滑膜中的慢性炎性反应为特征并且与软骨退化和关节旁骨骼侵蚀相关。许多促炎性细胞因子,包括TNF、趋化因子及生长因子,都在患病关节中有表达。经显示,将抗TNF抗体或sTNFR融合蛋白全身性施用到RA小鼠模型具有抗炎作用并且具有关节保护作用。有关通过静脉内施用英夫利昔单抗

(infliximab;一种嵌合抗TNF单克隆抗体(mAB))阻断RA患者体内的TNF活性的临床研究(Harriman G, Harper LK, Schaible TF. 1999 Summary of clinical trials in rheumatoid arthritis using infliximab, an anti-TNFalpha treatment. Ann Rheum Dis 58增刊1:I61-4.)已证实, TNF调控IL-6、IL-8、MCP-1及VEGF的产生、免疫细胞和炎性细胞向关节的募集、血管生成以及基质金属蛋白酶-1和基质金属蛋白酶-3血液含量的降低。对于类风湿性关节炎中炎性路径的更好了解使得鉴别出类风湿性关节炎中所涉及的其它治疗性靶标。在过去的一年里,已经通过随机控制的试验测试了多种颇具前景的治疗,如白细胞介素-6拮抗剂(MRA)、CTLA4Ig(阿巴细普(abatacept), Genovese Mc等, 2005 Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. N Engl J Med. 353:1114-23)及抗B细胞疗法(利妥昔单抗, Okamoto H, Kamatani N. 2004 Rituximab for rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 351:1909)。已鉴别出其它细胞因子并且经显示,这些细胞因子在动物模型中具有益处,包括白细胞介素-15、白细胞介素-17及白细胞介素-18,而且目前正在这些药剂的临床试验。组合了抗TNF和另一介体的双重特异性抗体疗法在增强临床功效和/或患者适用范围方面具有巨大潜力。举例来说,阻断TNF与VEGF两者可以潜在根除炎症和血管生成,这两者都涉及于RA的病理生理学。也涵盖用特异性FIT-Ig Ig阻断RA中所涉及的其它靶标对,包括但不限于, TNF与IL-18; TNF与IL-12; TNF与IL-23; TNF与IL-1 β ; TNF与MIF; TNF与IL-17; 以及TNF与IL-15。除针对这些靶标对的常规安全性评估外,还可能保证针对免疫抑制程度的特定测试并且这些测试有助于选择最佳靶标对(参见Luster等, Toxicology (1994), 92 (1-3), 229-43; Descotes等, Developments in biological standardization (1992), 77 99-102; Hart等, Journal of Allergy and Clinical Immunology (2001), 108 (2), 250-257)。FIT-Ig Ig分子是否适用于治疗类风湿性关节炎可以使用临床前动物RA模型,如胶原蛋白诱发关节炎的小鼠模型进行评估。其它适用模型也是本领域中众所周知的(参见Brand DD., Comp Med. (2005) 55 (2):114-22)。

[0128] 全身性红斑狼疮(SLE)的免疫致病性特点是多克隆B细胞活化,此导致高球蛋白血症、自体抗体的产生及免疫复合物形成。主要异常看来是由于全身T细胞失调使得T细胞不能抑制被禁止的B细胞克隆。此外,若干细胞因子(如IL-10)以及共刺激分子(如CD40和CD40L、B7与CD28和CTLA-4)促进B细胞与T细胞的相互作用,由此引发第二信号。这些相互作用连同免疫复合物和细胞凋亡物质的吞噬细胞清除作用削弱一起使免疫反应得以保持并由此引起组织损伤。以下靶标可能涉及SLE并且可能用于FIT-Ig治疗干预方法中:B细胞靶向疗法:CD-20、CD-22、CD-19、CD28、CD4、CD80、HLA-DRA、IL10、IL2、IL4、TNFRSF5、TNFRSF6、TNFSF5、TNFSF6、BLR1、HDAC4、HDAC5、HDAC7A、HDAC9、ICOSL、IGBP1、MS4A1、RGS1、SLA2、CD81、IFNB1、IL10、TNFRSF5、TNFRSF7、TNFSF5、AICDA、BLNK、GALNAC4S-6ST、HDAC4、HDAC5、HDAC7A、HDAC9、IL10、IL11、IL4、INHA、INHBA、KLF6、TNFRSF7、CD28、CD38、CD69、CD80、CD83、CD86、DPP4、FCER2、IL2RA、TNFRSF8、TNFSF7、CD24、CD37、CD40、CD72、CD74、CD79A、CD79B、CR2、IL1R2、ITGA2、ITGA3、MS4A1、ST6GAL1、CD1C、CHST10、HLA-A、HLA-DRA及NT5E;共刺激信号:CTLA-4或B7.1/B7.2;B细胞存活的抑制:B1yS、BAFF;补体失活:C5;细胞因子调节:关键原理是,任何组织中的净生物反应都是促炎性细胞因子与抗炎细胞因子的局部水平之间平衡的结果(参见Sfikakis PP等, 2005 Curr Opin Rheumatol 17:550-7)。SLE被认为是血清IL-4、

IL-6、IL-10被证明升高的一种由Th-2驱动的疾病。也涵盖能够结合选自由以下组成的组的一个或多个靶标的FIT-Ig Ig: IL-4、IL-6、IL-10、IFN- α 及TNF- α 。以上论述的靶标的组合将增强针对SLE的治疗功效,这可以在许多狼疮临床前模型中进行测试(参见Peng SL (2004) *Methods Mol Med.*;102:227-72)。

[0129] 多发性硬化 (MS) 是一种病因基本上未知的复杂人自体免疫性疾病。整个神经系统中的髓磷脂碱性蛋白 (MBP) 的免疫破坏是多发性硬化的主要病理。MS是具有复杂病理的一种疾病,其涉及CD4+和CD8+T细胞的浸润及中枢神经系统内的反应。CNS中细胞因子、活性氮物质及共刺激分子的表达都在MS中得到描述。主要的考虑因素是促成自体免疫性发生的免疫机制。具体来说,抗原表达、细胞因子与白细胞相互作用以及帮助平衡/调节其它T细胞(如Th1和Th2细胞)的调控性T细胞是治疗性靶标鉴别的一个重要方面。

[0130] IL-12是由APC产生并促进Th1效应细胞分化的一种促炎性细胞因子。IL-12是在MS患者的正在发展的病变中以及受EAE影响的动物中产生的。先前已显示,干扰IL-12路径在啮齿动物中有效地防止EAE,并且使用抗IL-12mAb在体内中和IL-12p40在髓磷脂诱发的普通狨猴EAE模型中具有有益作用。

[0131] TWEAK是在中枢神经系统 (CNS) 中组成性表达的TNF家族的一员,取决于细胞类型而具有促炎性作用、增殖作用或细胞凋亡作用。其受体Fn14在CNS中是由内皮细胞、反应性星形胶质细胞和神经元表达。在实验性自体免疫性脑脊髓炎 (EAE) 期间,脊髓中TWEAK和Fn14 mRNA的表达增加。当在起始期 (priming phase) 之后治疗小鼠时,在髓磷脂寡树突神经胶质细胞糖蛋白 (MOG) 诱发的C57BL/6小鼠EAE中进行抗TWEAK抗体治疗引起疾病严重程度的降低及白细胞浸润的减少。

[0132] 本发明一方面涉及能够结合一个或多个,优选两个选自由以下组成的组的靶标的FIT-Ig Ig分子:IL-12、TWEAK、IL-23、CXCL13、CD40、CD40L、IL-18、VEGF、VLA-4、TNF、CD45RB、CD200、IFN γ 、GM-CSF、FGF、C5、CD52及CCR2。优选的实施方案包括作为对MS治疗有益的治疗剂的双重特异性抗IL-12/TWEAK FIT-Ig Ig。本领域中已知用于评估FIT-Ig分子治疗MS的适用性的若干动物模型(参见Steinman L等, (2005) *Trends Immunol.* 26 (11) : 565-71; Lublin FD.等, (1985) *Springer Semin Immunopathol.* 8 (3) : 197-208; Genain CP等, (1997) *J Mol Med.* 75 (3) : 187-97; Tuohy VK等, (1999) *J Exp Med.* 189 (7) : 1033-42; Owens T等, (1995) *Neurol Clin.* 13 (1) : 51-73; 和 't Hart BA等, (2005) *J Immunol.* 175 (7) : 4761-8)。除针对这些靶标对的常规安全性评估外,可能保证有关免疫抑制程度的特定测试并且这些测试有助于选择最佳靶标对(参见Luster等, *Toxicology* (1994) , 92 (1-3) , 229-43; Descotes等, *Developments in biological standardization* (1992) , 77 99-102; Jones R. 2000 Rovelizumab (ICOS Corp) . *IDrugs.* 3 (4) : 442-6)。

[0133] 败血症的病理生理学是由革兰氏阴性生物体(脂多糖[LPS]、脂质A、内毒素)与革兰氏阳性生物体(脂磷壁酸、肽聚糖)的外膜组分引起。这些外膜组分能够结合至单核细胞表面上的CD14受体。借助于近来描述的toll样受体,随后将信号传输给细胞,从而导致最终产生促炎性细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-1 (IL-1)。势不可挡的炎性反应和免疫反应是败血性休克的主要特征并且在由败血症诱发的组织损伤、多器官衰竭及死亡的发病机制中起主要作用。经显示,细胞因子,尤其是肿瘤坏死因子 (TNF) 和白细胞介素 (IL-1) 是败血性休克的关键介体。这些细胞因子对于组织具有直接毒性作用;它们还活化

磷脂酶A2。这些和其它作用引起血小板活化因子的浓度增加,促进氧化氮合酶活性,促进嗜中性粒细胞的组织浸润以及促进嗜中性粒细胞活性。

[0134] 败血症和败血性休克的治疗仍是临床难题,而且最近使用针对炎性反应的生物反应调节剂(即,抗TNF、抗MIF)进行的前瞻性试验仅显示适度的临床益处。近来,关注点已转向旨在逆转伴随的免疫抑制期的疗法。在实验动物和垂危患者中进行的研究证实,淋巴器官和一些实质组织中细胞凋亡增加促成此免疫抑制、无反应性及器官系统功能障碍。在败血症综合症期间,由IL-2的不存在或糖皮质激素、颗粒酶或所谓的‘死亡’细胞因子肿瘤坏死因子 α 或Fas配体的释放可以触发淋巴细胞凋亡。细胞凋亡经由胞浆和/或线粒体半胱天蛋白酶(caspase)的自活化而继续进行,这可能受到Bcl-2家族的促细胞凋亡成员和抗细胞凋亡成员影响。在实验动物中,用细胞凋亡抑制剂治疗不仅可以预防淋巴细胞的细胞凋亡;而且它还可以改善结果。尽管用抗细胞凋亡剂进行临床试验在很大程度上由于与其施用和组织靶向有关的技术难题而无法实现,但抑制淋巴细胞凋亡对于败血症患者而言是有吸引力的治疗靶标。同样地,靶向炎性介体与细胞凋亡介体两者的双重特异性药剂可以具有附加益处。本发明一方面涉及能够结合败血症所涉及的选自由以下组成的组的一个或多个靶标,优选两个靶标的FIT-Ig Ig:TNF、IL-1、MIF、IL-6、IL-8、IL-18、IL-12、IL-23、FasL、LPS、Toll样受体、TLR-4、组织因子、MIP-2、ADORA2A、CASP1、CASP4、IL10、IL1B、NFKB1、PROC、TNFRSF1A、CSF3、IL10、IL1B、IL6、ADORA2A、CCR3、IL10、IL1B、IL1RN、MIF、NFKB1、PTAFR、TLR2、TLR4、GPR44、HMOX1、中期因子、IRAK1、NFKB2、SERPINA1、SERPINE1及TREM1。此类FIT-Ig Ig对于败血症的功效可以在本领域中已知的临床前动物模型中进行评估(参见Buras JA等(2005)Nat Rev Drug Discov.4(10):854-65;及Calandra T等,(2000)Nat Med.6(2):164-70)。

[0135] 慢性神经退行性疾病通常是以神经元功能进行性丧失(神经元细胞死亡、脱髓鞘)、活动力丧失及记忆丧失为特征的年龄相关性疾病。有关慢性神经退行性疾病(例如,阿尔茨海默氏病)潜在机制的新兴认识显示出复杂的病因,而且多种因素被认为促成其发生和发展,例如年龄、血糖状态、淀粉样蛋白的产生和多聚化、结合受体其RAGE(AGE的受体)的糖基化终末产物(AGE)的积累、脑部氧化应力的增加、大脑血流的减少、神经炎症(包括炎性细胞因子和趋化因子的释放)、神经元功能障碍及小胶质细胞活化。因此,这些慢性神经退行性疾病代表着多种细胞类型与介体之间的复杂相互作用。对于此类疾病的治疗策略有限,而且主要在于用非特异性抗炎剂(例如,皮质类固醇、COX抑制剂)或防止神经元损失和/或突触功能的药剂阻断炎性过程。这些治疗无法停止疾病发展。近期的研究表明,很多靶向疗法,如针对可溶性A- β 肽(包括A- β 寡聚物形式)的抗体,不仅能帮助停止疾病发展,而且还可以帮助维持记忆。这些初步观察结果表明,靶向超过一种疾病介体(例如A- β 和促炎性细胞因子如TNF)的特定疗法可针对慢性神经退行性疾病提供的治疗功效甚至优于通过靶向单一疾病机制(例如单独可溶性A- β)所观察到的功效(参见C.E.Shepherd等,Neurobiol Aging.2005年10月24日;Nelson RB.,Curr Pharm Des.2005;11:3335;William L.Klein.;Neurochem Int.2002;41:345;Michelle C Janelsins等,J Neuroinflammation.2005;2:23;Solomon B.,Curr Alzheimer Res.2004;1:149;Igor Klyubin等,Nat Med.2005;11:556-61;Arancio O等,EMBO Journal (2004) 1-10;Bornemann KD等,Am J Pathol.2001;158:63;Deane R等,Nat Med.2003;9:907-13;及Eliezer Masliah等,Neuron.2005;46:

857)。

[0136] 本发明的FIT-Ig分子可以结合慢性神经退行性疾病(如阿尔茨海默氏病)中所涉及的一个或多个靶标。此类靶标包括但不限于,AD发病机理中所涉及的任何可溶性或细胞表面介体,例如AGE(S100A,两性蛋白)、促炎性细胞因子(例如IL-1)、趋化因子(例如MCP 1)、抑制神经再生的分子(例如Nogo、RGM A)、增进神经突生长的分子(神经营养蛋白)。FIT-Ig分子的功效可以在临床前动物模型,如过表达淀粉样前体蛋白或RAGE并且显现阿尔茨海默氏病样症状的转基因小鼠中进行验证。此外,FIT-Ig分子可以被构建并在动物模型中测试功效,而且可以选择最佳的治疗性FIT-Ig以供在人患者中进行测试。FIT-Ig分子还可以用于治疗其它神经退行性疾病,如帕金森氏病。 α -突触核蛋白涉及帕金森氏病的发病。能够靶向 α -突触核蛋白和炎性介体(如TNF、IL-1、MCP-1)的FIT-Ig可以证明是帕金森氏病的有效疗法并且涵盖于本发明中。

[0137] 尽管对病理机制的认识增加,但脊髓损伤(SCI)仍是一种破坏性病状并且代表一种以较高医学需求为特征的医学适应症。大多数的脊髓损伤是挫伤或压迫损伤,并且原发损伤之后通常是继发损伤机制(炎性介体,例如细胞因子和趋化因子),这些继发损伤机制使初始损伤恶化并导致病变区域显著扩大,有时超过10倍。SCI的这些原发和继发机制与由例如中风等其它方式引起的脑损伤中的机制极其类似。不存在令人满意的治疗并且高剂量快速注射甲基泼尼龙(methylprednisolone, MP)是在损伤后的8小时窄时窗内使用的唯一疗法。然而,这一治疗只旨在预防继发损伤,而不会引起任何显著的功能恢复。它由于明确功效的缺乏和严重不良作用(如免疫抑制,并发感染和严重组织病理学肌肉变化)而受到严厉批评。没有获得批准的刺激内源再生潜力的其它药物、生物试剂或小分子,但近年来,颇具前景的治疗原理和药物候选物在SCI动物模型中显示出功效。人SCI功能恢复的缺乏在很大程度上是由抑制病变部位、瘢痕组织、髓磷脂以及损伤相关细胞上神经突生长的因子引起。这些因子是髓磷脂相关蛋白NogoA、OMgp及MAG、RGM A、瘢痕相关CSPG(硫酸软骨素蛋白聚糖),及反应性星形细胞上的抑制因子(一些脑信号蛋白和蝶素(ephrin))。然而,在病变部位处,不仅发现了生长抑制分子,而且还发现了神经突生长刺激因子,如神经营养因子、层粘连蛋白(laminin)、L1等。神经突生长抑制和生长促进分子的组合可以解释阻断单一因子(如NogoA或RGM A)在啮齿动物SCI模型中引起显著功能恢复,因为抑制影响的减小可以使平衡从生长抑制转变成生长促进。然而,通过阻断单一神经突外生长抑制分子所观察到的恢复是不全面的。为了达成更快并且更明显的恢复,阻断两个神经突外生长抑制分子(例如Nogo和RGM A),或阻断神经突外生长抑制分子并增强神经突外生长增强分子(例如Nogo和神经营养因子)的功能,或阻断神经突外生长抑制分子(例如Nogo)和促炎性分子(例如TNF)可能是合乎需要的(参见McGee AW等,Trends Neurosci. 2003; 26:193; Marco Domeniconi等,J Neurol Sci. 2005; 233:43; Milan Makwana等,FEBS J. 2005; 272:2628; Barry J. Dickson,Science. 2002; 298:1959; Felicia Yu Hsuan Teng等,J Neurosci Res. 2005; 79:273; Tara Karnezis等,Nature Neuroscience 2004; 7, 736; Gang Xu等,J. Neurochem. 2004; 91; 1018)。

[0138] 涵盖的其它FIT-Ig是能够结合如以下靶标对的那些:NgR和RGM A;NogoA和RGM A;MAG和RGM A;OMGp和RGM A;RGM A和RGM B;CSPGs和RGM A;蛋白多糖、中期因子、神经粘蛋白、多功能蛋白聚糖、磷酸蛋白聚糖、Te38和TNF-a;A β 蛋白球聚体特异性抗体与促进树突和

轴突出芽的抗体的组合。树突病理学是AD的极早期征兆并且已知NOGO A限制树突生长。可以将所述类型的抗体与任何SCI-候选(髓磷脂-蛋白质)抗体组合。其它FIT-Ig靶标可以包括以下各物的任何组合:NgR-p75、NgR-Troy、NgR-Nogo66 (Nogo)、NgR-Lingo、Lingo-Troy、Lingo-p75、MAG或Ompg。另外,靶标还可以包括与抑制神经突有关的任何可溶性介体或细胞表面介体,例如Nogo、Ompg、MAG、RGM A、脑信号蛋白、蝶素、可溶性A-b、促炎性细胞因子(例如IL-1)、趋化因子(例如MIP1a)、抑制神经再生的分子。抗nogo/抗RGM A或类似FIT-Ig分子的功效可以在临床前脊髓损伤动物模型中得到验证。此外,这些FIT-Ig分子可以被构建并在动物模型中测试功效,并且可以选择最佳的治疗性FIT-Ig在人患者中进行测试。此外,可构建靶向单一受体上的两个不同配体结合位点的FIT-Ig分子,所述受体例如结合三个配体Nogo、OMGp及MAG的Nogo受体以及结合A-b和S100A的RAGE。另外,神经突外生长抑制剂(例如nogo和nogo受体)也在预防免疫疾病(如多发性硬化)中的神经再生中起作用。经显示,在多发性硬化的动物模型中抑制nogo-nogo受体相互作用可增进恢复。因此,可阻断一种免疫介体(例如细胞因子,如IL-12)和神经突外生长抑制剂分子(例如nogo或RGM)的功能的FIT-Ig分子可以提供比仅阻断免疫或神经突外生长抑制剂分子更快并且更强的功效。

[0139] 单克隆抗体疗法是作为癌症的重要治疗模式而出现 (von Mehren M等, 2003Monoclonal antibody therapy for cancer. Annu Rev Med.; 54:343-69)。抗体可以通过诱导细胞凋亡、再定向细胞毒性、干扰配体-受体相互作用或阻止对于赘生性表型至关重要的蛋白质的表达来发挥抗肿瘤作用。此外,抗体还可以靶向肿瘤微环境的组分,从而扰乱极为重要的结构,如肿瘤相关血管结构的形成。抗体也可以靶向配体是生长因子的受体,如表皮生长因子受体。因此,抗体抑制刺激细胞生长的天然配体结合至所靶向的肿瘤细胞。或者,抗体可以诱导抗个体基因型网络、补体介导的细胞毒性或抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。与单特异性疗法相比,使用靶向两个独立肿瘤介体的双重特异性抗体将可能产生附加益处。也涵盖能够结合以下靶标对以治疗肿瘤疾病的FIT-Ig Ig: IGF1和IGF2; IGF1/2和Erb2B; VEGFR和EGFR; CD20和CD3; CD138和CD20; CD38和CD20; CD38&CD138; CD40和CD20; CD138和CD40; CD38和CD40。其它靶标组合包括EGF/erb-2/erb-3家族的一个或多个成员。FIT-Ig Ig可以结合的涉及肿瘤疾病的其它靶标(一个或多个)包括但不限于,选自由以下组成的组的那些:CD52、CD20、CD19、CD3、CD4、CD8、BMP6、IL12A、IL1A、IL1B、IL2、IL24、INHA、TNF、TNFSF10、BMP6、EGF、FGF1、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF2、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF9、GRP、IGF1、IGF2、IL12A、IL1A、IL1B、IL2、INHA、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFB3、VEGF、CDK2、EGF、FGF10、FGF18、FGF2、FGF4、FGF7、IGF1、IGF1R、IL2、VEGF、BCL2、CD164、CDKN1A、CDKN1B、CDKN1C、CDKN2A、CDKN2B、CDKN2C、CDKN3、GNRH1、IGFBP6、IL1A、IL1B、ODZ1、PAWR、PLG、TGFB1I1、AR、BRCA1、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7、CDK9、E2F1、EGFR、EN01、ERBB2、ESR1、ESR2、IGFBP3、IGFBP6、IL2、INSL4、MYC、NOX5、NR6A1、PAP、PCNA、PRKCQ、PRKD1、PRL、TP53、FGF22、FGF23、FGF9、IGFBP3、IL2、INHA、KLK6、TP53、CHGB、GNRH1、IGF1、IGF2、INHA、INSL3、INSL4、PRL、KLK6、SHBG、NR1D1、NR1H3、NR1I3、NR2F6、NR4A3、ESR1、ESR2、NR0B1、NR0B2、NR1D2、NR1H2、NR1H4、NR1I2、NR2C1、NR2C2、NR2E1、NR2E3、NR2F1、NR2F2、NR3C1、NR3C2、NR4A1、NR4A2、NR5A1、NR5A2、NR6A1、PGR、RARB、FGF1、FGF2、FGF6、KLK3、KRT1、APOC1、BRCA1、CHGA、CHGB、CLU、COL1A1、COL6A1、EGF、ERBB2、ERK8、FGF1、FGF10、FGF11、FGF13、FGF14、

FGF16、FGF17、FGF18、FGF2、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF9、GNRH1、IGF1、IGF2、IGFBP3、IGFBP6、IL12A、IL1A、IL1B、IL2、IL24、INHA、INSL3、INSL4、KLK10、KLK12、KLK13、KLK14、KLK15、KLK3、KLK4、KLK5、KLK6、KLK9、MMP2、MMP9、MSMB、NTN4、ODZ1、PAP、PLAU、PRL、PSAP、SERPINA3、SHBG、TGFA、TIMP3、CD44、CDH1、CDH10、CDH19、CDH20、CDH7、CDH9、CDH1、CDH10、CDH13、CDH18、CDH19、CDH20、CDH7、CDH8、CDH9、ROB02、CD44、ILK、ITGA1、APC、CD164、COL6A1、MTSS1、PAP、TGFB1I1、AGR2、AIG1、AKAP1、AKAP2、CANT1、CAV1、CDH12、CLDN3、CLN3、CYB5、CYC1、DAB2IP、DES、DNCL1、ELAC2、EN02、EN03、FASN、FLJ12584、FLJ25530、GAGEB1、GAGEC1、GGT1、GSTP1、HIP1、HUMCYT2A、IL29、K6HF、KAI1、KRT2A、MIB1、PART1、PATE、PCA3、PIAS2、PIK3CG、PPID、PR1、PSCA、SLC2A2、SLC33A1、SLC43A1、STEAP、STEAP2、TPM1、TPM2、TRPC6、ANGPT1、ANGPT2、ANPEP、ECGF1、EREG、FGF1、FGF2、FIGF、FLT1、JAG1、KDR、LAMA5、NRP1、NRP2、PGF、PLXDC1、STAB1、VEGF、VEGFC、ANGPTL3、BAI1、COL4A3、IL8、LAMA5、NRP1、NRP2、STAB1、ANGPTL4、PECAM1、PF4、PROK2、SERPINF1、TNFAIP2、CCL11、CCL2、CXCL1、CXCL10、CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL9、IFNA1、IFNB1、IFNG、IL1B、IL6、MDK、EDG1、EFNA1、EFNA3、EFNB2、EGF、EPHB4、FGFR3、HGF、IGF1、ITGB3、PDGFA、TEK、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFBR1、CCL2、CDH5、COL18A1、EDG1、ENG、ITGAV、ITGB3、THBS1、THBS2、BAD、BAG1、BCL2、CCNA1、CCNA2、CCND1、CCNE1、CCNE2、CDH1 (E-钙粘着蛋白)、CDKN1B (p27Kip1)、CDKN2A (p16INK4a)、COL6A1、CTNNB1 (b-链蛋白)、CTSB (组织蛋白酶B)、ERBB2 (Her-2)、ESR1、ESR2、F3 (TF)、FOSL1 (FRA-1)、GATA3、GSN (凝溶胶蛋白)、IGFBP2、IL2RA、IL6、IL6R、IL6ST (糖蛋白130)、ITGA6 (a6整合素)、JUN、KLK5、KRT19、MAP2K7 (c-Jun)、MKI67 (Ki-67)、NGFB (NGF)、NGFR、NME1 (NM23A)、PGR、PLAU (uPA)、PTEN、CTLA-4、OX40、GITR、TIM-3、Lag-3、B7-H3、B7-H4、GDF8、CGRP、Lingo-1、ICOS、GARP、BTLA、CD160、ROR1、SERPINB5 (姜黄素)、SERPINE1 (PAI-1)、TGFA、THBS1 (凝血栓蛋白-1)、TIE (Tie-1)、TNFRSF6 (Fas)、TNFSF6 (FasL)、TOP2A (拓扑异构酶Iia)、TP53、AZGP1 (锌-a-糖蛋白)、BPAG1 (网格蛋白)、CDKN1A (p21Wap1/Cip1)、CLDN7 (封闭素-7)、CLU (聚集素蛋白)、ERBB2 (Her-2)、FGF1、FLRT1 (纤连蛋白)、GABRP (GABAa)、GNAS1、ID2、ITGA6 (a6整合素)、ITGB4 (b 4整合素)、KLF5 (GC盒BP)、KRT19 (角蛋白19)、KRTHB6 (毛发特异性II型角蛋白)、MACMARCKS、MT3 (金属硫蛋白-III)、MUC1 (粘蛋白)、PTGS2 (COX-2)、RAC2 (p21Rac2)、S100A2、SCGB1D2 (亲脂性蛋白B)、SCGB2A1 (乳腺珠蛋白2)、SCGB2A2 (乳腺珠蛋白1)、SPRR1B (Spr1)、THBS1、THBS2、THBS4及TNFAIP2 (B94)。

[0140] 在一个实施方案中,可以用本文提供的组合物和方法治疗或诊断的疾病包括但不限于,原发性和转移性癌症,包括乳癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、口咽癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、肝癌、胆囊癌和胆管癌、小肠癌、泌尿道癌(包括肾癌、膀胱癌及尿路上皮癌)、女性生殖道癌(包括宫颈癌、子宫癌和卵巢癌,以及绒毛膜癌和妊娠滋养细胞疾病)、男性生殖道癌(包括前列腺、精囊、睾丸及生殖细胞肿瘤)、内分泌腺癌(包括甲状腺癌、肾上腺癌及垂体腺癌)和皮肤癌,以及血管瘤、黑素瘤、肉瘤(包括起源于骨骼和软组织的那些,以及卡波西氏肉瘤)、脑肿瘤、神经肿瘤、眼肿瘤及脑膜瘤(包括星形细胞瘤、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、成视网膜细胞瘤、神经瘤、成神经细胞瘤、许旺氏瘤(Schwannoma)及脑膜瘤)、起源于血液科恶性的疾病的实体肿瘤(如白血病),及淋巴瘤(霍奇金氏淋巴瘤和非霍奇金氏淋巴瘤)。

[0141] 在一个实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合部分在单独或与放射疗法和/或其它化学治疗剂组合使用时用于治疗癌症或用于防止本文所述的肿瘤转移。

[0142] 根据本发明的另一实施方案,人免疫效应细胞是人淋巴细胞谱系的成员。在这一实施方案中,效应细胞可有利地为人T细胞、人B细胞或人自然杀伤(NK)细胞。有利的是,此类细胞将对靶标细胞具有细胞毒性或细胞凋亡作用。特别有利的是,人淋巴细胞是细胞毒性T细胞,当其活化时对靶标细胞发挥细胞毒性作用。根据这一实施方案,人效应细胞的募集活性则是这一细胞的细胞毒性活性。

[0143] 根据优选的实施方案,细胞毒性T细胞的活化可通过由本发明这一实施方案的双特异性抗体结合细胞毒性T细胞表面上作为效应抗原的CD3抗原而发生。人CD3抗原存在于辅助型T细胞和细胞毒性T细胞上。人CD3表示在T细胞上作为多分子T细胞复合物的一部分表达并且包含以下三条不同链的抗原:CD3- ϵ 、CD3- δ 及CD3- γ 。

[0144] T细胞的细胞毒性潜能的活化是需要多种蛋白质的相互作用的一种复杂现象。T细胞受体(“TCR”)蛋白是由两个不同糖蛋白亚基组成的膜结合、二硫键连接的异二聚体。TCR识别并且结合外来肽抗原,所述抗原自身被多个高度多样化类别的主要组织相容性复合物(“MHC”)蛋白质的成员所结合并且以结合至MHC的形式呈现于抗原呈递细胞(“APC”)的表面上。

[0145] 尽管如以上所概述,可变TCR结合外来抗原,但传导发生此结合的T细胞的信号传导取决于与TCR结合的其它无变化的信号传导蛋白的存在。这些呈结合形式的信号传导蛋白统称为CD3复合物,此处统称为CD3抗原。

[0146] T细胞细胞毒性的活化通常首先取决于TCR与MHC蛋白的结合,而MHC蛋白自身结合至位于独立细胞上的外来抗原。只有在这一初始TCR-MHC结合发生时,才能接着发生负责T细胞克隆扩增并最终引起T细胞的细胞毒性的CD3依赖性信号传导级联。

[0147] 然而,本发明的双特异性抗体的第一或第二部分与人CD3抗原的结合使T细胞活化以在不存在独立TCR-MHC结合的情况下对其它细胞发挥细胞毒性作用。这意味着,T细胞可以通过一种不依赖于克隆的方式,即以与T细胞所携带的特定TCR克隆无关的方式进行细胞毒性活化。此允许活化整个T细胞隔室而不是仅具有某一克隆身份的特定T细胞。

[0148] 根据前述论述,本发明的一个特别优选的实施方案提供一种双特异性抗体,其中效应抗原是人CD3抗原。根据本发明这一实施方案的双特异性抗体可以有总计两个或三个抗体可变结构域。

[0149] 根据本发明的其它实施方案,本发明的双特异性抗体所结合的其它淋巴细胞结合的效应抗原可以是人CD16抗原、人NKG2D抗原、人NKp46抗原、人CD2抗原、人CD28抗原或人CD25抗原。

[0150] 根据本发明另一实施方案,人效应细胞是人髓系的成员。有利的是,所述效应细胞可以是人单核细胞、人嗜中性粒细胞或人树突状细胞。有利的是,此类细胞将对靶标细胞具有细胞毒性或细胞凋亡作用。这一实施方案内可以由本发明的双特异性抗体结合的有利抗原可以是人CD64抗原或人CD89抗原。

[0151] 根据本发明的另一实施方案,靶标抗原是在疾病情况下于靶细胞或效应细胞上广泛表达,但在健康情况下不表达、以较低水平表达或不可接近的抗原。可能被本发明的双特异性抗体特异性结合的此类靶抗原的实例可有利地选自EpCAM、CCR5、CD19、HER-2neu、HER-3、HER-4、EGFR、PSMA、CEA、MUC-1(粘蛋白)、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5AC、MUC5B、MUC7、 β hCG、Lewis-Y、CD20、CD33、CD30、神经节苷脂GD3、9-O-乙酰基-GD3、GM2、G1obo H、岩藻糖基GM1、

聚SA、GD2、碳酸酐酶IX (MN/CA IX)、CD44v6、音猬因子 (Shh)、Wue-1、浆细胞抗原、(膜结合) IgE、黑素瘤硫酸软骨素蛋白聚糖 (MCSP)、CCR8、TNF- α 前体、STEAP、间皮素、A33抗原、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、Ly-6; 桥粒芯蛋白4、E-钙粘着蛋白新表位、胎儿乙酰胆碱受体、CD25、CA19-9标记物、CA-125标记物及II型苗勒抑制物质 (Muellerian Inhibitory Substance, MIS) 受体、sTn (唾液酸化Tn抗原; TAG-72)、FAP (纤维原细胞活化抗原)、内皮唾液酸蛋白、EGFRvIII、LG、SAS及CD63。

[0152] 根据一个具体实施方案,由双特异性抗体特异性结合的靶标抗原可以是癌症相关抗原,即与恶性病状相关的抗原。此类抗原在恶性细胞上表达或可接近,而所述抗原在非恶性细胞上不存在、不明显存在或无法接近。因此,根据本发明这一实施方案的双特异性抗体是募集人免疫效应细胞针对带有靶标抗原或使靶标抗原可接近的恶性靶标细胞的活性的双特异性抗体。

[0153] 基因疗法:在一个具体实施方案中,施用编码本文提供的结合蛋白或本文提供的另一预防剂或治疗剂的核酸序列以通过基因疗法治疗、预防、管理或改善病症或其一种或多种症状。基因疗法是指通过向受试者施用已表达或可表达的核酸所进行的疗法。在这个实施方案中,核酸产生其所编码的介导预防或治疗作用的本文提供的抗体或者预防剂或治疗剂。

[0154] 本领域中可用的任何基因疗法的方法都可以用于本文提供的方法中。关于基因疗法方法的一般综述,参见Goldspiel等 (1993) Clin. Pharmacy 12:488-505; Wu和Wu (1991) Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev (1993) Ann Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan (1993) Science 260:926-932; Morgan和Anderson (1993) Ann Rev. Biochem. 62: 191-217; 及May (1993) TIBTECH 11 (5) :155-215。可以使用的重组DNA技术领域中通常已知的方法描述于以下文献中: Ausubel等 (编辑), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, NY (1993); 及Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)。基因疗法的各种方法的详细描述公开于美国专利公布号US20050042664中。

[0155] 诊断法:本文的公开内容还提供了诊断应用,包括但不限于,诊断测定法、含有一种或多种结合蛋白的诊断试剂盒,及用于自动化和/或半自动化系统的方法和试剂盒的改进形式。所提供的方法、试剂盒及改进形式可以用于检测、监测和/或治疗个体的疾病或病症。这一点在下文进一步说明。

[0156] A. 测定方法:本公开还提供了使用至少一种本文所述的结合蛋白确定测试样本中分析物或其片段的存在、量或浓度的方法。本领域中已知的任何适合的测定都可以用于所述方法中。实例包括但不限于,免疫测定法和/或使用质谱法的方法。本公开提供的免疫测定法可以包括夹心免疫测定、放射免疫测定 (RIA)、酶免疫测定 (EIA)、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、竞争性抑制免疫测定、荧光偏振免疫测定 (FPIA)、酶放大免疫测定技术 (EMIT)、生物发光共振能量转移 (BRET) 及均质化学发光测定等。化学发光微粒免疫测定,特别是采用 ARCHITECT® 自动分析仪 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) 的化学发光微粒免疫测定是免疫测定的一个实例。本公开提供了采用质谱法的方法并且包括但不限于, MALDI (基质辅助激光解吸/电离) 或 SELDI (表面增强激光解吸/电离)。

[0157] 使用免疫测定和质谱法收集、处理、加工及分析生物测试样本的方法是本领域技

术人员众所周知的,被提供用于本公开的实践(US2009-0311253A1)。

[0158] B. 试剂盒:也提供一种用于测定测试样本中的分析物或其片段的存在、量或浓度的试剂盒。所述试剂盒包括至少一种用于测定测试样本中的分析物或其片段的组分和有关测定测试样本中的分析物或其片段的说明书。所述至少一种用于测定测试样本中的分析物或其片段的组分可以包括包含任选固定于固相上的如本文公开的结合蛋白和/或抗分析物结合蛋白(或其片段、变体或其变体的片段)的组合物。所述试剂盒任选地可以包含校准剂或对照物,其可以包含分离的或纯化的分析物。所述试剂盒可以包含至少一种用于通过免疫测定和/或质谱法测定测试样本中的分析物的组分。所述试剂盒组分,包括分析物、结合蛋白和/或抗分析物结合蛋白或其片段,可以任选地使用任何本领域已知的可检测标记进行标记。提供的用于实践本公开的物质及产生方法是本领域技术人员所已知的(US 2009-0311253A1)。

[0159] C. 试剂盒和方法的改进形式:通过如本文所述的免疫测定等测定来测定测试样本中分析物的存在、量或浓度的试剂盒(或其组分)以及方法可以被改进以用于如例如美国专利号5,089,424和5,006,309中所述并且如例如由Abbott Laboratories(Abbott Park, IL)以ARCHITECT®出售的多种自动化和半自动化系统(包括其中固相包括微粒的系统)中。可自Abbott Laboratories获得的其它平台包括但不限于,AxSYM®、IMx®(参见例如,美国专利号5,294,404)、PRISM®、EIA(珠粒)及Quantum™II,以及其它平台。另外,所述测定、试剂盒和试剂盒组分可以其它形式被采用,例如在电化学或其它手持型或定点照护型(point-of-care)测定系统上采用。本公开例如适用于执行夹心免疫测定的商业Abbott定点照护型(i-STAT®,Abbott Laboratories)电化学免疫测定系统。免疫传感器以及其制造和在一次性测试装置中操作的方法描述于例如美国专利号5,063,081、7,419,821和7,682,833;以及美国公布号20040018577、20060160164和US 20090311253中。对本领域技术人员易于显而易见的是,本文所述的方法的其它适合修改和改进是明显的并且可以在不脱离本文公开的实施方案的范围的情况下使用适合等效物来进行。现已详细描述某些实施方案,通过参考以下实施例将对其有更明确理解,这些实施例仅出于说明目的包括在内而不意图限制。

[0160] 尽管出于清楚理解的目的,已经通过举例说明和实施例相当详细地描述了前述发明,但是根据本发明的教义,本领域的普通技术人员将显而易见的是,在不背离所附权利要求的精神和范围情况下,可以对本发明进行某些改变和修改。以下实施例仅以说明方式提供,而并不起限制作用。本领域的技术人员将易于认识到多种非关键性参数,这些参数可以改变或修改以得到基本上类似的结果。

实施例

[0161] 实施例1.抗IL17/IL-20串联Fab免疫球蛋白(FIT-Ig)的构建、表达、纯化及分析

[0162] 为了证实FIT-Ig技术,产生一组抗IL-17/IL-20FIT-Ig分子:FIT1-Ig、FIT2-Ig及FIT3-Ig,这些分子都含有3种不同多肽,如图1中所示,其中抗原A是IL-17并且抗原B是IL-20。用于产生能够结合IL-17和IL-20的FIT-Ig的DNA构建体示于图1B中。简单地说,亲本mAb包括两种高亲和力抗体,即抗IL-17(克隆LY)(美国专利号7,838,638)和抗hIL-20(克隆15D2)(美国专利申请公布号US2014/0194599)。为了产生FIT-Ig构建体#1,将LY的VL-CL直

接(FIT1-Ig)或通过具有3个氨基酸(FIT2-Ig)或7个氨基酸(FIT3-Ig)的连接子与15D2重链的N末端融合(如表1中所示)。构建体#2是LY的VH-CH1,而第三构建体是15D2的VL-CL。每一FIT-Ig的三个构建体在293细胞中共转染,引起FIT-Ig蛋白的表达和分泌。

[0163] 另产生一组抗IL-17/IL-20FIT-Ig分子:FIT4-Ig、FIT5-Ig及FIT6-Ig,其各自含有2种不同多肽,如图2中所示。用于产生能够结合IL-17和IL-20的FIT-Ig的DNA构建体示于图2B中,其中抗原A是IL-17并且抗原B是IL-20。简单地说,亲本mAb包括两种高亲和力抗体,即抗IL-17(克隆LY)和抗hIL-20(克隆15D2)。为了产生FIT-Ig构建体#1,将LY的VL-CL直接(FIT4-Ig)或通过连接子具有3个氨基酸(FIT5-Ig)或7个氨基酸(FIT6-Ig)的连接子与15D2重链的N末端融合(如表1中所示)。为了产生FIT-Ig构建体#4,将LY的VH-CH1直接(FIT4-Ig)或通过具有3个氨基酸(FIT5-Ig)或7个氨基酸(FIT6-Ig)的连接子与15D2轻链的N末端融合。每一FIT-Ig的2个DNA构建体(构建体#1和#4)在293细胞中共转染,引起FIT-Ig蛋白的表达和分泌。PCR克隆的详细程序描述于下。

[0164] 实施例1.1:抗IL-17/IL-20FIT-Ig分子的分子克隆:

[0165] 对于构建体#1克隆,使用与轻链信号序列退火的正向引物和与轻链的C末端退火的反向引物,通过PCR扩增LY轻链。使用与15D2VH的N末端退火的正向引物和与CH的C末端退火的反向引物,通过PCR扩增15D2重链。对这两个PCR片段进行凝胶纯化并使用信号肽和CH引物对,通过重叠PCR将其合并。将合并的PCR产物克隆到已含有人Fc序列的293表达载体中。

[0166] 表1.抗IL-17/IL-20FIT-Ig分子和DNA构建体

FIT-Ig分子	构建体#1	连接子	构建体#2	构建体#3	构建体#4
FIT1-Ig	VL ₁₇ -CL-VH ₂₀ -CH1-Fc	无连接子	VH ₁₇ -CH1	VL ₂₀ -CL	
FIT2-Ig	VL ₁₇ -CL-连接子-VH ₂₀ -CH1-Fc	GSG	VH ₁₇ -CH1	VL ₂₀ -CL	
FIT3-Ig	VL ₁₇ -CL-连接子-VH ₂₀ -CH1-Fc	GGGGSGS	VH ₁₇ -CH1	VL ₂₀ -CL	
FIT4-Ig	VL ₁₇ -CL-VH ₂₀ -CH1-Fc	无连接子			VH ₁₇ -CH1-VL ₂₀ -CL
FIT5-Ig	VL ₁₇ -CL-连接子-VH ₂₀ -CH1-Fc	GSG			VH ₁₇ -CH1-连接子-VL ₂₀ -CL
FIT6-Ig	VL ₁₇ -CL-连接子-VH ₂₀ -CH1-Fc	GGGGSGS			VH ₁₇ -CH1-连接子-VL ₂₀ -CL

[0168] 对于构建体#2克隆,使用与重链信号肽退火的正向引物和与CH1的C末端退火的反向引物,通过PCR扩增LY VH-CH1。对PCR产物进行凝胶纯化,随后将其克隆到293表达载体中。

[0169] 对于构建体#3,使用与轻链信号肽N末端退火的正向引物和与CL的末端退火的反

向引物,通过PCR扩增15D2轻链。对PCR产物进行凝胶纯化,随后将其克隆到293表达载体中。

[0170] 对于构建体#4克隆,使用与重链信号肽N末端退火的正向引物和与CH1的末端退火的反向引物,通过PCR扩增LY VH-CH1。使用与15D2VL的末端退火的引物扩增15D2VL。对这两种PCR产物进行凝胶纯化并通过重叠PCR将其合并。对合并的PCR产物进行凝胶纯化并将其克隆到293表达载体中。表2显示了用于以上分子克隆中的PCR引物的序列。

[0171] 表2. 用于抗IL-17/抗CD20FIT-Ig的分子构建的PCR引物

P1: 5' CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGC GCCGAAG 3'	SEQ ID NO.1
P2: 5'GCTGGACCTGAGAGCCTGAACCGCCAC CACCACACTCTCCCTGTTGAAGC3'	SEQ ID NO.2
P3: 5' GGTGGTGGCGGTTCAAGCTCTCAGGTC CAGCTTGTGCAATCTGGCGCCGAGG3'	SEQ ID NO.3
P4: 5' GTCTGCGGCCGCTCATTACCCGGAG ACAGGGAGAG 3'	SEQ ID NO.4
P5: 5' TAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGT CTTC 3'	SEQ ID NO.5
P6: 5' CGGCGCCAGATTGCACAAGCTGGACCT GGCCTGAACCACACTCTCCCTGTTGAAGCT C3'	SEQ ID NO.6
P7: 5'GCTGGACCTGAGAGCCTGAACCGCCAC CACCACACTCTCCCTGTTGAAGC3'	SEQ ID NO.7
P8: 5' GGTGGTGGCGGTTCAAGCTCTCAGGTC CAGCTTGTGCAATCTGGCGCCGAGG3'	SEQ ID NO.8
P9: 5' TACCTCGGCCAGATTGCACAAGCT GGACCTGACACTCTCCCTGTTGAAGCTCTT G3'	SEQ ID NO.9
P10: 5' CATGACACCTAACAGAGGGCCCCAG GTCGTTTACCTCGGCCAGATTGCACAAG3 ,	SEQ ID NO.10
P11: 5' CAATAAGCTTACATGACACCTAAC AGAGGGCCCCAG3'	SEQ ID NO.11
P12: 5' TCGAGCGGCCGCTAACAGATTG GGCTCAACTTCTTG3'	SEQ ID NO.12
P13: 5'GCTGCTGCTGGTCCCCGGCTCGCG ATCGCTATACTGACACAGTC3'	SEQ ID NO.13
P14: 5' GAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCC ACCGTACGCTTGATCTACCTTTGTT 3'	SEQ ID NO.14

[0172]

[0173] hIL-17/hIL-20FIT1-Ig、FIT2-Ig、FIT3-Ig、FIT4-Ig、FIT5-Ig及FIT6-Ig的最终序列列于表3中。

[0174] 表3. 抗IL-17/IL-20FIT-Ig分子的氨基酸序列

蛋白质	序列标识符	序列	
		蛋白质区	
抗 IL-17/IL-20 FIT1-Ig 多肽#1	SEQ ID NO.:15	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASI SCRSSRSLVHSRGNTYHW YLQKPGQSPQLLIYKVSNRF IGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCSQSTHLP FTFGQGKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRG ECQVQLVQSGAEVKRPGAS VKVSCKASGYTFTNDIHW VRQAPGQRLEWMGWINAG YGNTQYSQNFQDRVSITRD TSASTAYMELISLRSEDTAV YYCAREPLWFGESSPHDYY GMDVWGQGTTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAPLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTPREEQ YNSTYRVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK*	
[0175]	LY VL	SEQ ID NO.:16	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASI SCRSSRSLVHSRGNTYHW YLQKPGQSPQLLIYKVSNRF IGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCSQSTHLP FTFGQGKLEIK
	CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSTTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSP

蛋白质	序列标识符	序列
蛋白质区		12345678901234567890
连接子		VTKSFNRGEC 无
15D2VH	SEQ ID NO.:18	QVQLVQSGAEVKRPGASVK VSCKASGYTFTNDIIHWVR QAPGQRLEWMGWINAGYG NTQYSQNFQDRVSITRDTSA STAYMELISLRSEDTAVYYC AREPLWFGESSPHDYYGMD VWGQQGTTVTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHPKPSNTKVDKKV EPKSC
Fc	SEQ ID NO.:20	DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVFKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK*
抗 IL-17/IL-20 FIT1-Ig 多肽#2	SEQ ID NO.:21	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYSFTDYHIHWVR QAPGQGLEWMGVINPMYG TTDYNQRFKGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARYDYFTGTGVYWGQQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTGGTAALGCLVKDYFP EPVTWSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHPKPSNTK VDKKVEPKSC
LYVH	SEQ ID NO.:22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYSFTDYHIHWVR QAPGQGLEWMGVINPMYG TTDYNQRFKGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARYDYFTGTGVYWGQQGTL

[0176]

蛋白质	序列标识符	序列
		蛋白质区
		VTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSC
抗 IL-17/IL-20 FIT1-Ig 多肽#3	SEQ ID NO.:23	AIQLTQSPSSLSASVGDRV TCRASQGISSALAWYQQKP GKAPKLLIYDASSLESGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQFNSYPLTFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSS LTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC*
[0177]	15D2 VL	SEQ ID NO.:24
	CL	SEQ ID NO.:17
		AIQLTQSPSSLSASVGDRV TCRASQGISSALAWYQQKP GKAPKLLIYDASSLESGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQFNSYPLTFGG TKVEIK
		RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFRGEC*
抗 IL-17/IL-20 FIT2-Ig 多肽#1	SEQ ID NO.:25	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASI SCRSSRSLVHSRGNTYLHW YLQKPGQSPQLLIYKVSNRF IGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCSQSTHLP FTFGQGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGE CGSGQVQLVQSGAEVKRPG ASVKVSCKASGYTFTNDIIH WVRQAPGQRLEWMGWINA GYGNTQYSQNFQDRVSITR

蛋白质	序列标识符	序列
		蛋白质区
[0178]		12345678901234567890
	LY VL	SEQ ID NO.:16
	CL	SEQ ID NO.:17
	连接子	SEQ ID NO.:26
	15D2VH	SEQ ID NO.:18
	CH1	SEQ ID NO.:19

蛋白质	序列标识符	序列
蛋白质区		12345678901234567890
		TYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSC
Fc	SEQ ID NO.:20	DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDEPVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK*
抗 IL-17/IL-20 FIT2-Ig 多肽#2	SEQ ID NO.:21	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYSFTDYHIHWVR QAPGQGLEWMGVINPMYG TTDYNQRFKGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARYDYFTGTGVYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSC
LYVH	SEQ ID NO.:22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYSFTDYHIHWVR QAPGQGLEWMGVINPMYG TTDYNQRFKGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARYDYFTGTGVYWGQGTL VTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSC
抗 IL-17/IL-20 FIT2-Ig 多肽#3	SEQ ID NO.:23	AIQLTQSPSSLSASVGDRV TCRASQGISSALAWYQQKP GKAPKLLIYDASSLESGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQFNSYPLTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD

[0179]

蛋白质	序列标识符	序列
		蛋白质区
		EQLKSGTASVVCLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSL TLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC*
15D2 VL	SEQ ID NO.:24	AIQLTQSPSSLSASVGDRV TCRASQGISSALAWYQQKP GKAPKLLIYDASSLESGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQFNSYPLTFGGG TKVEIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC*
抗 IL-17/IL-20 FIT3-Ig 多肽#1 [0180]	SEQ ID NO.:27	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASI SCRSSRSLVHSRGNTYHW YLQKPGQSPQLIYKVSNRF IGVPDRFSGSGSGTDFTLKS RVEAEDVGVYYCSQSTHLP FTFGQGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCL NNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGE CGGGGSGSQVQLVQSGAEV KRPGASVKVSCKASGYTFT NDIIHWVRQAPGQRLEWM GWINAGYGNQYSQNFQD RVSITRDTASTAYMELISLR SEDTAVYYCAREPLWFGESS PHDYYGMDVVGQGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPABL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVL

[0181]

蛋白质	序列标识符	序列
蛋白质区		12345678901234567890
		HQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIASKAGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK*
LY VL	SEQ ID NO.:16	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASI SCRSSRSLVHSRGNTYLHW YLQKPGQSPQLLIYKVSNRF IGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCSQSTHLP FTFGQGKLEIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTSKAD YEHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
连接子	SEQ ID NO.:28	GGGGSGS
15D2VH	SEQ ID NO.:18	QVQLVQSGAEVKRPGASVK VSCKASGYTFTNDIHWVR QAPGQRLEWMGWINAGYG NTQYSQNFQDRVSITRDTSA STAYMELISLRSEDTAVYYC AREPLWFGESSPHDYYGMD VWGQGTTVTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTW SWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSC
Fc	SEQ ID NO.:20	DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVFKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDK

蛋白质	序列标识符	序列
蛋白质区		12345678901234567890
		SRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK*
抗 IL-17/IL-20 FIT3-Ig 多肽#2	SEQ ID NO.:21	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYSFTDYHIHWVR QAPGQGLEWMGVINPMYG TTDYNQRFKGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARYDYFTGTGVYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSC
LYVH	SEQ ID NO.:22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYSFTDYHIHWVR QAPGQGLEWMGVINPMYG TTDYNQRFKGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARYDYFTGTGVYWGQGTL VTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTW SWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSC
抗 IL-17/IL-20FIT3-Ig 多肽#3	SEQ ID NO.:23	AIQLTQSPSSLSASVGDRV TCRASQGISSALAWYQQKP GKAPKLLIYDASSLESGVPS RFSGSGSGTDFLTISLQPE DFATYYCQQFNSYPLTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSS TLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC*
15D2 VL	SEQ ID NO.:24	AIQLTQSPSSLSASVGDRV TCRASQGISSALAWYQQKP GKAPKLLIYDASSLESGVPS RFSGSGSGTDFLTISLQPE DFATYYCQQFNSYPLTFGGG TKVEIK
CL	SEQ ID	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG

[0182]

蛋白质	序列标识符	序列
		蛋白质区
	NO.:17	TASVVCCLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC*
抗 IL-17/IL-20 FIT4-Ig 多肽#1	SEQ ID NO.:15	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASI SCRSSRSLVHSRGNTYHW YLQKPGQSPQLLIYKVSNRF IGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCSQSTHLP FTFGQGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGE CQVQLVQSGAEVKRPGASV KVSKCASGYTFTNDIHWV RQAPGQRLEWMGWINAGY GNTQYSQNFQDRVSITRDT ASTAYMELISLRSEDTAVYY CAREPLWFGESSPHDYYGM DVWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVTVVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNST YRVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK*
	LY VL	SEQ ID NO.:16
		DIVMTQTPLSLSVTPGQPASI SCRSSRSLVHSRGNTYHW YLQKPGQSPQLLIYKVSNRF IGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCSQSTHLP FTFGQGTKLEIK

[0184]

蛋白质	序列标识符	序列
蛋白质区		12345678901234567890
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
连接子		无
15D2VH	SEQ ID NO.:18	QVQLVQSGAEVKRPGASVK VSCKASGYTFTNDIHWVR QAPGQRLEWMGWINAGYG NTQYSQNFQDRVSITRDTSA STAYMELISLRSEDTAVYYC AREPLWFGESSPHDYYGMD VVGQGTTVTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTPSSSLGTQ TYICNVNHPKPSNTKVDKKV EPKSC
Fc	SEQ ID NO.:20	DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPPKDLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPQREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK*
抗 IL-17/IL-20 FIT4-Ig 多肽#4	SEQ ID NO.:29	QVQLVQSGAEVKPGSSVK VSCKASGYSFTDYHIHWVR QAPGQGLEWMGVINPMYG TTDYNQRFKGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARYDYFTGTGVYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAAAGCLVKDYFP EPVTWSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTPSS SLGTQTYICNVNHPKPSNTK VDKKVEPKSCAIQLTQSPSS LSASVGDRVTITCRASQGIS

蛋白质	序列标识符	序列	
		蛋白质区	
[0185]		SALAWYQQKPGKAPKLLIY DASSLESGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQQ FNSYPLTFGGGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLNNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC*	
	LYVH	SEQ ID NO.:22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYSFTDYHIHWVR QAPGQGLEWMGVINPMY TTDYNQRFKGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARYDYFTGTGVYWGQGTL VTVSS
	CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSC
	连接子		无
	15D2 VL	SEQ ID NO.:24	AIQLTQSPSSLSASVGDRV TCRASQGISSALAWYQQKP GKAPKLLIYDASSLESGVPS RFSGSGSGTDFLTISLQPE DFATYYCQQFNSYPLTFGGG TKVEIK
	CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLNNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSLTLSKAD YEHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC*
	抗 IL-17/IL-20 FIT5-Ig 多肽#1	SEQ ID NO.:25	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASI SCRSSRSLVHSRGNTYHW YLQKPGQSPQLLIYKVSNRF IGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCSQSTHLP FTFGQQGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTY

蛋白质	序列标识符	序列	
		蛋白质区	
		12345678901234567890	
[0186]		SLSSTLTL SKAD YEKHKV YA CEVTHQGLSSPVT KSFNRGE CGSGQVQLVQSGAEVKRPG ASVKVSCKASGYTFTNDIIH WVRQAPGQRLEWMGWINA GYGNTQYSQNFQDRVSITR DTSASTAYMELISLRSEDTA VYYCAREPLWFGESSPHDY YGM DVWQGQTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVT VSW NSGALTSGVHTFP AVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK*	
	LY VL	SEQ ID NO.:16	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASI SCRSSRSLVHSRGNTYIHW YLQKPGQSPQLIYKVSNRF IGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCSQSTHLP FTFGQGTKLEIK
	CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTL SKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
	连接子	SEQ ID NO.:26	GSG
	15D2VH	SEQ ID NO.:18	QVQLVQSGAEVKRPGASVK VSCKASGYTFTNDIIHWVR QAPGQRLEWMGWINAGYG NTQYSQNFQDRVSITRDTSA STAYMELISLRSEDTAVYYC

[0187]

蛋白质	序列标识符	序列	
		蛋白质区	12345678901234567890
			AREPLWFGESSPHDYYGMD VWGQGTTVTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPALQSQ SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSC
Fc	SEQ ID NO.:20		DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPPKDLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVFKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREGVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK*
抗 IL-17/IL-20 FIT5-Ig 多肽#4	SEQ ID NO.:30		QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYSFTDYHIHWVR QAPGQGLEWMGVINPMYGT TTDYNQRFKGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARYDYFTGTGVYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCGSGAIQLTQS PSSLSASVGDRVTITCRASQ GISSALAWYQQKPGKAPKL LIYDASSLESGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYC QQFNSYPLTFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFRGEC*
LYVH	SEQ ID NO.:22		QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYSFTDYHIHWVR

[0188]

蛋白质	序列标识符	序列
		蛋白质区
		12345678901234567890
		QAPGQGLEWMGVINPMYG TTDYNQRFKGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARYDYFTGTGVYWGQGTL VTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSC
连接子	SEQ ID NO.:26	GSG
15D2 VL	SEQ ID NO.:24	AIQLTQSPSSLSASVGDRV TCRASQGISSALAWYQQKP GKAPKLLIYDASSLESGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQFNSYPLTFGGG TKVEIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC*
抗 IL-17/IL-20 FIT6-Ig 多肽#1	SEQ ID NO.:27	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASI SCRSSRSLVHSRGNTYIHW YLQKPGQSPQLIYKVSNRF IGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCSQSTHLP FTFGQQTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGE CGGGGSGSQVQLVQSGAEV KRPGASVKVSCKASGYTFT NDIIHWVRQAPGQRLEWM GWINAGYGNQYSQNFQD RVSITRDTSASTAYMELISLR SEDTAVYYCAREPLWFGESS PHDYYGMDVWGQGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTV

蛋白质	序列标识符	序列	
		蛋白质区	
[0189]		VSWNSGALTSGVHTFPALV QSSGLYSLSSVVTVPSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIASKAGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK*	
	LY VL	SEQ ID NO.:16	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASI SCRSSRSLVHSRGNTYIHW YLQKPGQSPQLLIYKVSNRF IGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCSQSTHLP FTFGQGTKEIK
	CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCCLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
	连接子		GGGGSGS
	15D2VH	SEQ ID NO.:18	QVQLVQSGAEVKRPGASVK VSCKASGYTFTNDIIHWVR QAPGQRLEWMGWINAGYG NTQYSQNFQDRVSITRDTSA STAYMELISLRSEDTAVYYC AREPLWFGESSPHDYYGMD VWGQGTTVTVSS
	CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPALQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSC
	Fc	SEQ ID NO.:20	DKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYV

蛋白质	序列标识符	序列
		蛋白质区
		12345678901234567890
		DGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSPGK*
[0190]	抗 IL-17/IL-20 FIT6-Ig 多肽#4	SEQ ID NO.:31 QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYSFTDYHIHWVR QAPGQGLEWMGVINPMYG TTDYNQRFKGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARYDYFTGTGVYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTGGTAALGCLVKDYFP EPVTWSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCGGGGSGSAI QLTQSPSSLSASVGDRVITIC RASQGISSALAWYQQKPGK APKLLIYDASSLESQVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQFNSYPLTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC*
	LYVH	SEQ ID NO.:22 QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYSFTDYHIHWVR QAPGQGLEWMGVINPMYG TTDYNQRFKGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYC ARYDYFTGTGVYWGQGTL VTVSS
	CH1	SEQ ID NO.:19 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSC

蛋白质	序列标识符	序列
		12345678901234567890
连接子	SEQ ID NO.:28	GGGGSGS
15D2 VL	SEQ ID NO.:24	AIQLTQSPSSLSASVGDRV TCRASQGISSALAWYQQKP GKAPKLLIYDASSLESGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQFNSYPLTFGGG TKVEIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC*

[0191] [0192] 实施例1.2:抗IL-17/IL-20FIT-Ig蛋白的表达、纯化及分析

[0193] 将每一FIT-Ig的所有DNA构建体都亚克隆到基于pBOS的载体中,并进行测序以确保准确性。在293E细胞中,使用聚乙烯亚胺(PEI)对每一FIT-Ig(1、2及3)的构建体#1、构建体#2及构建体#3或每一FIT-Ig(4、5及6)的构建体#1和构建体#4进行短暂共表达。简单地说,将FreeStyleTM293表达培养基中的DNA与PEI以DNA与PEI的比率是1:2的最终浓度混合,在室温下孵育15分钟(不超过20分钟),接着以60 μ g DNA/120ml培养物添加到293E细胞(1.0-1.2 \times 10⁶/ml,细胞活力>95%)中。在振荡器中培养6-24小时之后,在37℃、8%CO₂下,在以125rpm/min振荡下,将蛋白胨以5%的最终浓度添加到经过转染的细胞中。在第6天-第7天,通过离心和过滤来收获上清液,并根据制造商的说明书,使用蛋白质A色谱法(Pierce, Rockford, IL)纯化FIT-Ig蛋白。通过SDS-PAGE分析这些蛋白质,并通过A280和BCA(Pierce, Rockford, IL)测定其浓度。

[0194] 为表达FIT1-Ig、FIT2-Ig及FIT3-Ig,使用了不同DNA摩尔比的3种构建体,包括构建体#1:#2:#3=1:1:1、构建体#1:#2:#3=1:1.5:1.5及构建体#1:#2:#3=1:3:3(表4)。通过蛋白质A色谱法纯化FIT-Ig蛋白。纯化产率(7-16mg/L)与每一种蛋白质的表达培养基中的hIgG定量一致。通过SDS-PAGE,在还原条件和非还原条件下分析纯化的FIT-Ig的组成和纯度。在非还原条件下,FIT-Ig以约250kDa的单一带迁移。在还原条件下,FIT-Ig蛋白各自产生两条带,高于MW带的一条是约75kDa的构建体#1,而低于MW带的一条对应于在约25kDa处重叠的构建体#2和构建体#3。SDS-PAGE显示,每一FIT-Ig表达为单一物质,并且这3条多肽链有效配对形成类IgG分子。这些链的大小以及FIT-Ig分子的全长蛋白与其基于氨基酸序列计算的分子质量一致。

[0195] 表4.hIL-17/IL-20FIT-Ig蛋白的表达和SEC分析

FIT-Ig 蛋白	DNA 比率: 构建体 1:2:3	表达水平(mg/L)	由 SEC 得到的峰单体分数%
[0196] FIT1-Ig	1:1:1	15.16	92.07
	1:1.5:1.5	14.73	95.49
	1:3:3	9.87	97.92
FIT2-Ig	1:1:1	15.59	90.92
	1:1.5:1.5	12.61	94.73
	1:3:3	7.03	97.29
FIT3-Ig	1:1:1	15.59	91.47
	1:1.5:1.5	15.16	94.08
	1:3:3	7.75	97.57

[0197] 为了进一步研究在溶液中的FIT-Ig的物理特性,使用尺寸排阻色谱法(SEC)来分析每一种蛋白质。对于FIT-Ig的SEC分析,将含有纯化的FIT-Ig的PBS施加于TSKgel SuperSW3000的300×4.6mm柱(TOSOH)上。使用U3000型HPLC仪器(DIONEX)进行SEC。所有蛋白质都使用UV检测,在280nm和214nm下测定。洗脱是以0.25mL/min流动速率进行的等度洗脱。全部3种FIT-Ig蛋白都展现单一主峰,展示作为单体蛋白质的物理均质性(表4)。对于全部3种FIT-Ig蛋白,通过SEC发现,构建体#1:#2:#3的比率=1:3:3显示较佳的单体特征(表4)。

[0198] 表4还显示,所有这些FIT-Ig蛋白的表达水平都与常规mAb的表达水平相当,表明这些FIT-Ig可以在哺乳动物细胞中高效地表达。为了表达FIT4-Ig、FIT5-Ig及FIT6-Ig,构建体#1:#4的DNA比率=1:1,并且表达水平在1-10mg/L范围内,并且由SEC测定的峰单体分数%在58-76%范围内。基于这一特定的mAb组合(LY和15D2),3-多肽FIT-Ig构建体(FIT1-Ig、FIT2-Ig及FIT3-Ig)显示出比2-多肽FIT-Ig构建体(FIT4-Ig、FIT5-Ig及FIT6-Ig)更佳的表达谱,因此再对FIT1-Ig、FIT2-Ig及FIT3-Ig的功能特性进行分析。

[0199] 实施例1.3抗IL-17/IL-20FIT-Ig的抗原结合亲和力的测定

[0200] 利用Biacore X100仪器(Biacore AB, Uppsala, Sweden),使用HBS-EP(10mM HEPES, pH 7.4, 150mM NaCl, 3mM EDTA及0.005%表面活性剂P20)通过表面等离子共振(表5)在25℃下测定FIT-Ig结合rhIL-17和rhIL-20的动力学。简单地说,根据制造商的说明书,使用标准胺偶合试剂盒将山羊抗人IgG Fc γ 片段特异性多克隆抗体(Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL)直接固定在CM5研究级生物传感器芯片上。在HEPES缓冲生理盐水中稀释纯化的FIT-Ig样本以在整个山羊抗人IgG Fc特异性反应表面上进行捕获并且在反应基质上以5 μ l/min的流动速率注射。在30 μ L/min连续流动速率下测定缔合速率常数kon(M-1s-1)和解离速率常数koff(s-1)。通过在1.25至1000nM范围内的十种不同抗原浓度下进行动力学结合测量来得到速率常数。接着,通过以下公式,由动力学速率常数计算出FIT-Ig与靶标蛋白之间的反应的平衡解离常数(M):KD=koff/kon。另外,同时在空白参照和反应CM表面上注射抗原样本的等分试样以记录并减去任何非特异性结合背景,从而消除大部分的折射率变化和注射干扰。随后,通过以10 μ L/min流动速率两次注射25ml的10mM甘氨酸(pH 1.5)使表面再生。使固定有抗Fc抗体的表面完全再生并且在十二个循环内保持其完全的捕获能力。

[0201] 表5.抗IL-17/IL-20FIT-Ig分子的功能表征

mAb 或 FIT-Ig	抗原	通过 Biacore 测定的结合动力学			中和效力 IC ₅₀ (pM)	
		k _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} (s ⁻¹)	K _d (M)		
[0202]	LY	hIL-17	8.24E+5	1.80E-5	2.18E-11	101
	FIT1-Ig	hIL-17	1.07E+7	3.88E-5	3.64E-12	102
	FIT2-Ig	hIL-17	9.24E+6	1.53E-5	1.65E-12	137
	FIT3-Ig	hIL-17	8.71E+6	9.58E-6	1.10E-12	146
	15D2	hIL-20	1.70E+6	8.30E-5	5.00E-11	50
	FIT1-Ig	hIL-20	1.40E+6	3.82E-5	2.73E-11	54
	FIT2-Ig	hIL-20	1.80E+6	3.50E-5	1.95E-11	50
	FIT3-Ig	hIL-20	1.40E+6	3.82E-5	2.73E-11	72

[0203] Biacore分析指示,三种FIT-Ig与hIL-17和hIL-20的总体结合参数类似,而且FIT-Ig的亲和力与亲本mAb LY和15D2极为接近,并且针对任一抗原结合结构域的结合亲和力不存在损失(表5)。

[0204] 此外,还通过Biacore分析FIT-Ig的四价双重特异性抗原结合。首先在Biacore传感器芯片上,经由山羊抗人Fc抗体捕获FIT1-Ig,并注射第一抗原,同时观察结合信号。当FIT1-Ig被第一抗原饱和时,则注射第二抗原并观察第二信号。对于FIT2-Ig,这是通过依序注射IL-17和IL-20或通过依序注射IL-20和IL-17进行的(图3)。以任一顺序,检测到双重结合活性,并且在25-30RU下使两种抗原结合饱和。对于FIT2-Ig和FIT3-Ig获得类似结果。由此,每一FIT-Ig能够作为双重特异性四价分子同时结合两种抗原。

[0205] FIT-Ig的表达谱和双重结合特性清楚地证实,在FIT-Ig分子内,两个VL-CL都正确地与其对应VH-CH1配对,形成2个功能性结合结构域,并且表达为单一单体、四价并且具有双特异性的全长FIT-Ig蛋白。这与呈现四价但对一个靶抗原具有单特异性结合活性的多价抗体分子类型(Miller和Presta,US专利8722859)形成对比。

[0206] 实施例1.4抗IL-17/IL-20FIT-Ig生物活性的测定

[0207] 使用GRO α 生物测定来测量FIT-Ig中和IL-17功能的生物活性。简单地说,将Hs27细胞以10000个细胞/50 μ L/孔接种到96孔板中。一式两份,将FIT-Ig或抗IL-17对照抗体(25 μ L)添加到孔中,其中起始浓度是2.5nM,随后以1:2进行连续稀释,直到5pM。接着向每个孔中添加IL-17A(25 μ L)。IL-17A的最终浓度是0.3nM。在37°C下孵育细胞17小时,随后收集细胞培养物上清液。根据制造商的方案(R&D systems),通过人CACL1/GRO α Quantikine试剂盒测量细胞培养物上清液中GRO- α 的浓度。

[0208] 使用IL-20⁺BAF3细胞增殖测定来测量FIT-Ig中和IL-20功能的生物活性。简单地说,将25 μ L 0.8nM的重组人IL-20添加到96孔板的每个孔中(IL-20的最终浓度是0.2nM)。将抗IL20抗体或FIT-Ig或另一对照抗体稀释到400nM(工作浓度是100nM),随后进行5倍连续稀释,并将其添加到96孔测定板中(每孔25 μ L)。接着,将50 μ L体积的RPMI 1640加10%FBS、浓度是800 μ g/ml的潮霉素B、浓度是800 μ g/ml的G418,用IL-20受体稳定转染的BaF3细胞以10000个细胞/孔浓度添加到每个孔中。在48小时孵育后,将100 μ L CellTiter-Glo发光缓冲液添加到每个孔中。在定轨振荡器上混合内容物2分钟以诱导细胞溶解并在室温下孵育板

10分钟以使发光信号稳定。通过SpectraMax M5记录发光。

[0209] 如表5中所示,所有FIT-Ig都能够中和hIL-20和hIL-17两者,并且亲和力类似于亲本抗体的亲和力。基于使用Biacore和基于细胞的中和测定进行的功能分析,很明显,全部3种FIT-Ig都完全保持了亲本mAb的活性。三种FIT-Ig间不存在显著功能差异,表明连接子是任选的,并且FIT-Ig构建体提供足够的柔性和特定尺寸以允许在2个Fab结合区之间不存在肽间隔子的情况下实现双重结合。这与其中2条多肽链中的每一条上的2个可变结构域之间都需要连接子以保持下部(第2)可变结构域的活性的DVD-Ig型分子形成对比。

[0210] 实施例1.5抗IL-17/IL-20FIT-Ig的稳定性研究

[0211] 将含FIT1-Ig蛋白质样本的柠檬酸盐缓冲液(pH=6.0)分别在恒定的4°C、25°C和40°C下孵育1天、3天或7天;类似地,将FIT1-Ig蛋白质样本冷冻-解冻一次、两次或三次。利用SEC-HPLC,通过将蛋白质样本各10μg以0.3mL/min流动速率注射到装备Superdex2005/150GL的Ultimate 3000HPLC中保持15分钟来检测所有样本中完整的完全单体蛋白的分数,并使用由制造商供应的Chromeleon软件记录并分析数据。表6显示在这些热激发条件下,FIT1-Ig和FIT3-Ig仍是完全完整的单体分子。

[0212] 表6.通过利用SEC测量完全单体分数%对FIT-Ig进行稳定性分析

温度(°C)	时间(天)	FIT1-Ig	FIT3-Ig
4	0(起始)	98.74	98.60
	1	98.09	97.78
	3	97.81	97.45
	7	97.63	97.65
25	1	99.00	98.26
	3	99.00	98.01
	7	98.86	98.53
40	1	98.95	98.50
	3	98.94	98.35
	7	98.82	98.37
1X 冷冻-解冻		98.89	98.21
2X 冷冻-解冻		95.37	98.21
3X 冷冻-解冻		95.24	98.35

[0213] [0214] 实施例1.6抗IL-17/IL-20FIT-Ig的溶解度研究

[0215] 通过测量在递增浓度的PEG6000(PEG6000购自Shanghai lingfeng chemical reagent co.Ltd)存在下沉淀的迹象来分析FIT1-Ig的溶解度。简单地说,所获得的在PEG6000存在下蛋白质的溶解度随PEG6000浓度(0、5%、10%、15%、20%、25%及30%)而变化。溶解度研究在25°C的温度下以pH 6.0的溶液进行。简单地说,通过混合适量的蛋白质缓冲储备液、PEG和缓冲液以达到所需的组分浓度,来使蛋白质沉淀。最终体积接近200μL并且蛋白质浓度设置在1.0mg/mL。充分混合最终溶液并平衡16小时。平衡后,以13000rpm离心溶液10分钟以分离蛋白质沉淀。使用Spectra Max Plus384(Molecular Device)在280nm下测量并从上清液的吸光度获得蛋白质溶解度,并且基于蛋白质浓度的标准曲线计算浓度(图4A)。另外,使用相同实验方法,在3种不同pH条件下分析市售抗体利妥昔单抗(Rituxan)(图4B)。很明显,蛋白质溶解度取决于pH条件,而且预测的FIT-Ig溶解度将在单克隆抗体的范围内。

[0216] 实施例1.7抗IL-17/IL-20FIT-Ig的药代动力学研究

[0217] 在雄性Sprague-Dawley (SD) 大鼠中评估FIT1-Ig的药代动力学特性。将FIT-Ig蛋白以5mg/kg单次静脉内剂量经由颈静脉导管或在背部皮肤下皮下施用给雄性SD大鼠。在28天时间内,在不同时间点收集血清样本,其中在0.5分钟、15分钟及30分钟;1小时、2小时、4小时、8小时及24小时;以及2天、4天、7天、10天、14天、21天及28天经由尾静脉连续抽血来进行取样,并通过人IL-17捕获和/或人IL-20捕获ELISA加以分析。简单地说,用山羊抗生物素抗体(5 μ g/ml, 4°C, 过夜)涂布ELISA板,用Superblock (Pierce) 阻断并在室温下与含50ng/ml生物素化人IL-17 (IL-17捕获ELISA) 或IL-20 (IL-20捕获ELISA) 的10% Superblock TTBS一起孵育2小时。对血清样本进行连续稀释(含0.5% 血清、10% Superblock的TTBS) 并在室温下,在板上孵育30分钟。用HRP标记的山羊抗人抗体进行检测并借助于标准曲线,使用四参数逻辑斯蒂拟合(four parameter logistic fit) 测定浓度。若干动物,尤其是在皮下组中,显示在第10天后FIT-Ig浓度可能因发生抗人反应而急剧下降。将这些动物从最终计算中去除。通过非房室模型,使用WinNonlin软件(Pharsight Corporation, Mountain View, Calif.) 测定药代动力学参数的值。

[0218] 在大鼠PK研究中,当通过两种不同的ELISA方法测定时,FIT1-Ig血清浓度极为相似,表明所述分子是完整的,并且能够在体内结合两种抗原。在IV给药后,FIT1-Ig展现由分配相随后消除相组成的双相药代动力学曲线,类似于常规IgG分子的PK曲线。基于这两种不同的分析方法计算的药代动力学参数极为相似并且显示于表7中。FIT-Ig的清除率较低(约12mL/天/kg) 并具有较低分配体积(Vss是约130mL/kg),由此产生较长半衰期(T1/2>10天)。在皮下施用之后,FIT-Ig缓慢吸收,并且在给药后4天达到约26.9 μ g/ml的最大血清浓度。终末半衰期是约11天并且皮下生物利用率接近100%。如由这些结果所证实,FIT1-Ig在体内的特性与常规IgG分子极为类似,表明有可能在治疗应用中使用相同的给药方案。

[0219] FIT-Ig的药代动力学研究在多特异性类Ig生物制剂开发领域展示了令人惊讶的突破。大鼠药代动力学系统在制药行业中常用于治疗性mAb的临床前评价,并且它良好地预测mAb在人体中的药代动力学特征。FIT-Ig的较长半衰期和较低清除率使其能够以较低给药频率对慢性适应症进行治疗,与治疗性mAb类似。此外,基于由PK研究得到的类IgG分布体积参数,比IgG大100-kDa的FIT-Ig看来能有效地渗透到组织中。

[0220] 表7. 在SD大鼠中进行的FIT1-Ig的药代动力学分析

PK 参数	IV				
	CL	Vss	$\beta t_{1/2}$	AUC	MRT
单位	mL/天/kg	mL/kg	天	天* $\mu\text{g}/\text{mL}$ 升	天
IL-17 ELISA	12.2	131	10.8	411	10.7
IL-20 ELISA	11.9	128	10.8	421	10.7
SC					
PK 参数	T _{max}	C _{max}	t _{1/2}	AUC _{INF}	CL/F
单位	天	$\mu\text{g}/\text{mL}$	天	天* $\mu\text{g}/\text{mL}$	mL/天 /kg
IL-17 ELISA	4.00	26.9	11.0	406	12.4
IL-20 ELISA	4.00	23.1	10.4	350	14.3
					86.4

[0222] 实施例1.8有关FIT-Ig的稳定CHO细胞系产生研究

[0223] 据观察, FIT-Ig在短暂转染的293E细胞中高效表达。为了进一步确定FIT-Ig的制造可行性, 在CHO-DG44细胞系和CHO-S细胞系中进行稳定转染, 随后进行克隆选择和生产力分析。简单地说, 通过用含 8×10^6 个细胞的400 μl 转染溶液加亚克隆到Freedom pCHO载体(Life Technologies)中的20 μg DNA(对于CHO DG44细胞)或25 μg DNA(对于CHO-S细胞)进行电穿孔来转染CHO细胞。使用常规程序进行稳定细胞系选择。简单地说, 对于CHO-DG44选择, 在转染后, 选出稳定集合(-HT/2P/400G, 其中P是 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素, G是 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418), 并通过IgG ELISA分析蛋白质的产生。选择顶部集合, 并用递增浓度的MTX(50nM、100nM、200nM及500nM)进行数轮扩增, 随后通过IgG ELISA分析蛋白质的产生。然后, 选择顶部集合进行亚克隆。对于CHO-S细胞选择, 在含有10P/400G/100M(M是nM MTX)的培养基中进行第一阶段选择, 随后分析蛋白质的产生。接着, 选择顶部集合并在30P/400G/500M或50P/400G/1000M中进行第2阶段选择, 随后通过ELISA测量蛋白质的产生。然后, 选择顶部集合进行亚克隆。对于蛋白质生产力分析, 使用30mL新鲜培养基(补充有6mM L-谷氨酰胺的CD FortiCHOTM培养基)将完全回收的细胞集合(活力>90%)以 5×10^5 个活细胞/毫升(CHO DG44)或 3×10^5 个活细胞/毫升(CHO-S)接种于125mL振荡瓶中。在37°C、80%相对湿度、8%CO₂及130rpm下, 在振荡平台上孵育细胞。每天或以规律时间间隔(例如, 在第0天、第3天、第5天、第7天、第10天、第12天及第14天)对培养物取样以测定细胞密度、活力及生产力, 直到培养物活力降到50%以下或达到第14天培养。取样后, 必要时向培养物供给葡萄糖。

[0224] FIT1-Ig CHO稳定细胞系产生的整个过程显示特征类似于单克隆抗体在CHO细胞中的产生的特征。举例来说, 在2P/400G下分析DG44集合期间, VCD持续增加, 直到第10-12天, 达到约1.3E7, 而细胞活力到第13-14天时仍高于80%, 而且生产力在第14天时达到约40mg/mL(图5A)。在5P/400G/50M下扩增后, 生产力在第14天时达到50mg/mL以上(图5B)。对于CHO-S细胞选择, 在第I阶段选择期间, 滴度达到200mg/mL以上(图5C), 并且在第2阶段选

择时超过370mg/mL(图5D)。这些生产力水平与先前在实验室关于常规人mAb产生所观察到的生产力水平类似,表明FIT-Ig对于商业应用展示出类mAb制造可行性。

[0225] 实施例2:抗CD3/CD20串联Fab免疫球蛋白(FIT-Ig)的构建、表达及纯化

[0226] 为了证实FIT-Ig是否能结合至细胞表面抗原,产生抗CD3/CD20FIT-Ig分子FIT7-Ig和FIT8-Ig,其为3-多肽构建体,如图1中所示。用于产生能够结合细胞表面CD3和CD20的FIT-Ig的构建体示于图1B中。简单地说,亲本mAb包括两种高亲和力抗体,即抗CD3(OKT3)和抗CD20(奥法木单抗)。为了产生FIT7-Ig构建体#1,将OKT3的VL-CL直接(FIT7-Ig)或通过具有7个氨基酸的连接子(FIT8-Ig)与奥法木单抗重链的N末端融合(如表8中所示)。构建体#2是OKT3的VH-CH1,并且第3构建体是奥法木单抗的VL-CL。FIT-Ig的这3种构建体在293细胞中共转染,引起FIT-Ig蛋白的表达和分泌。PCR克隆的详细程序描述于下:

[0227] 实施例2.1抗CD3/CD20FIT-Ig的分子克隆:

[0228] 分子克隆方法与有关抗hIL-17/hIL-20FIT-Ig的分子克隆方法类似。

[0229] 表8.抗CD3/CD20FIT-Ig分子和构建体

FIT-Ig分子	构建体#1	连接子	构建体#2	构建体#3
[0230] FIT7-Ig	VL _{CD3} -CL-VH _{CD20} -CH1-Fc	无连接子	VH _{CD3} -CH1	VL _{CD20} -CL
	VL _{CD3} -CL-连接子-VH _{CD20} -CH1-Fc	GGGGSGS	VH _{CD3} -CH1	VL _{CD20} -CL

[0231] 表9显示了用于以上分子构建的PCR引物的序列。

[0232] 表9.用于抗IL-17/IL-20FIT-Ig的分子构建的PCR引物

SEQ ID NO.
P4: GTCTGCGGCCGCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAG
32
P12: TCGAGCGGCCGCTAACAAAGATTGGGCTCAACTTCTGTTG
33
P20: CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTG
34
P22:GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG
35
P23: TACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACC CATCAGGGCCTGAG
36
P24: TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA GTCTACGCCCTGCGAA
37
P25:CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG
38
P28: GCTGCTGCTGTGGTCCCCGGCTCGCGATGCGAAATT GTGTTGACACAGTC
39
P29: AAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACGTTAA TCTCCAGTCGTGTCC
40

[0234] 抗CD3/CD20FIT-Ig的最终序列描述于表10中。

[0235] 表10. 抗CD3/CD20FIT-Ig的氨基酸序列

蛋白质 蛋白质区	序列标识 符	序列
OKT3/奥法木单抗 FIT7-Ig 多肽#1	SEQ ID NO.:41	12345678901234567890 QIVLTQSPAAMSASPGEKVTMTCS ASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRW IYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSY SLTISGMEAEDAATYYCQQWSSN PFTFGSGTKLEINRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECEVQLVESGGGLVQPGRSR LSCAASGFTFNDYAMHWVRQAP GKGLEWVSTISWNSGSIGYADSV

[0236]

[0237]

蛋白质	序列标识符	序列
蛋白质区		12345678901234567890
		KGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLR AEDTALYYCAKDIQYGNYYYGM DVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKD YFPEPVTVWSN GALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSL GTQTYICNVN HKPNSNTKVDKK VEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL PGK*
OKT3 VL	SEQ ID NO.:42	QIVLTQSPAAMSASPGEKVTMTCS ASSSVSYMWNWYQQKSGTSPKRW IYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSY SLTISGMEAEDAATYYCQQWSSN PFTFGSGTKLEIN
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWVVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TTLTSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
连接子		无
奥法木单抗 VH	SEQ ID NO.:43	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCA ASGFTNDYAMHWVRQAPGKGL EWVSTISWNSGSIGYADSVKGRF TISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDT ALYYCAKDIQYGNYYYGMDVW GQGTTVTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYEPEPVTVWSN GALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVN HKPNSNTK DKKVEPKSC
Fc	SEQ ID NO.:20	DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVFKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPV YTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWE

蛋白质	序列标识符	序列
蛋白质区		12345678901234567890
		SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
OKT3/奥法木单抗 FIT7-Ig 多肽#2	SEQ ID NO.:44	QVQLQQSGAELARPGASVKMCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
OKT3 VH	SEQ ID NO.:45	QVQLQQSGAELARPGASVKMCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
OKT3/奥法木单抗 FIT7-Ig 多肽#3	SEQ ID NO.:46	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYYCQQRSNWPI TFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLTLKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
奥法木单抗 VL	SEQ ID NO.:47	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYYCQQRSNWPI TFGQGTRLEIK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
OKT3/奥法木单抗 FIT8-Ig 多肽#1	SEQ ID NO.:48	QIVLTQSPAAMSASPGEKVTMTCS ASSSVSYMWNWYQQKSGTSPKRW IYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSY

[0238]

蛋白质	序列标识符	序列
蛋白质区		12345678901234567890
[0239]		SLTISGMEAEDAATYYCQQWSSN PFTFGSGTKLEINRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECCGGGSGSEVQLVESGGLV QPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMH WVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSI GYADSVKGRFTISRDNAKKSLYL QMNSLRAEDTALYYCAKDIQYG NYYYGMDVWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
OKT3 VL	SEQ ID NO.:42	QIVLTQSPAAMSASPGEKVTMTCS ASSSVSYMWNWYQQKSGTSPKRW IYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSY SLTISGMEAEDAATYYCQQWSSN PFTFGSGTKLEIN
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TTLTSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
连接子	SEQ ID NO.:28	GGGGSGS
奥法木单抗 VH		EVQLVESGGGVQPGRLRLSCA ASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGL EWVSTISWNSGSIGYADSVKGRF TISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDT ALYYCAKDIQYGNYYGMDVW GQGTTVTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT

[0240]

蛋白质	序列标识符	序列
蛋白质区		12345678901234567890
		SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
Fc	SEQ ID NO.:20	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
OKT3/奥法木单抗 FIT8-Ig 多肽#2	SEQ ID NO.:44	QVQLQQSGAELARPGASVVKMCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
OKT3 VH	SEQ ID NO.:45	QVQLQQSGAELARPGASVVKMCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
OKT3/奥法木单抗 FIT8-Ig 多肽#3	SEQ ID NO.:46	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFAVYYCQQRSNWPI TFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
奥法木单抗 VL	SEQ ID NO.:47	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFT

蛋白质	序列标识符	序列
蛋白质区		12345678901234567890
[0241] CL	SEQ ID NO.:17	LTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPI TFGQGTRLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC*

[0242] 实施例2.2抗CD3/CD20FIT-Ig的表达和纯化

[0243] 将每一FIT-Ig的所有DNA构建体都亚克隆到基于pBOS的载体中,并进行测序以确保准确性。在293E细胞中,使用聚乙烯亚胺(PEI)对每一FIT-Ig的构建体#1、构建体#2及构建体#3进行短暂共表达。简单地说,将FreeStyleTM293表达培养基中的DNA与PEI以DNA与PEI的比率是1:2的最终浓度混合,在室温下孵育15分钟(不超过20分钟),接着以60 μ g DNA/120ml培养物添加到293E细胞($1.0-1.2 \times 10^6$ /ml,细胞活力>95%)中。在振荡器中培养6-24小时之后,在37°C、8%CO₂下,在以125rpm/min振荡下,将蛋白胨以5%的最终浓度添加到经过转染的细胞中。在第6天-第7天,通过离心和过滤来收集上清液,并根据制造商的说明书,使用蛋白质A色谱法(Pierce, Rockford, IL)纯化FIT-Ig蛋白。通过SDS-PAGE分析这些蛋白质,并通过A280和BCA(Pierce, Rockford, IL)测定其浓度(表11)。

[0244] 表11.抗CD3/CD20FIT-Ig蛋白的表达和SEC分析

FIT-Ig 蛋白	DNA 比率: 构建体 1:2:3	表达水平(mg/L)	由 SEC 得到的峰单体分数%
FIT7-Ig	1:3:3	21.3	99.53
FIT8-Ig	1:3:3	25.6	99.16

[0246] 实施例2.3抗CD3/CD20FIT-Ig分子的结合活性:

[0247] 使用在细胞表面上表达CD3的Jurkat细胞,以及在细胞表面上表达CD20的Raji细胞,通过FACS分析抗CD3/CD20FIT-Ig与两种靶标的结合。简单地说,在冰冷的PBS中洗涤 5×10^5 个细胞并在冰上用2%FBS阻断,保持1小时。将细胞与抗体FIT-Ig(100nM)或同种型对照物一起在冰上孵育1小时,并用PBS洗涤3次。添加二抗(标记有Alexa Fluor 488的山羊抗人IgG, Invitrogen)并将其与细胞在冰上于暗处孵育1小时,随后用PBS洗涤三次。在FACs calibur中分析样本。细胞表面结合显示,FIT7-Ig和FIT8-Ig都以浓度依赖性方式能够结合至细胞表面抗原CD3和CD20。相较于亲本mAb的结合活性,FIT-Ig对于Jurkat细胞上的CD3显示出较低的结合强度,而对Raji细胞上的CD20显示出较强的结合强度。在所有结合研究中,FIT7-Ig和FIT8-Ig对于两种抗原显示类似的结合活性,表明连接子对于其结合FIT8-Ig的能力不造成显著影响(表12)。

[0248] 表12.抗CD3/CD20FIT-Ig蛋白的细胞表面抗原结合研究

FIT-Ig 蛋白	抗原(细胞系)	通过FACS (MFI) 测定的结合强度
OKT3	CD3 (Jurkat)	399
FIT7-Ig		159
FIT8-Ig		211
奥法木单抗	CD20 (Raji)	181
FIT7-Ig		291
FIT8-Ig		274

[0249] [0250] 实施例3:抗TNF/IL-17串联Fab免疫球蛋白 (FIT-Ig) 的构建、表达及纯化

[0251] 同样使用抗IL-17mAb克隆LY和抗TNF mAb戈利木单抗产生可结合至人IL-17和人TNF α (FIT9-Ig) 的3-多肽构建体形式的另一FIT-Ig,如图1中所示。为了产生FIT9-Ig构建体#1,将戈利木单抗的VL-CL与LY重链的N末端直接融合(如表13中所示)。构建体#2是戈利木单抗的VH-CH1并且第3构建体是LY的VL-CL。将FIT9-Ig的3种构建体共转染到293细胞中,从而引起FIT9-Ig蛋白的表达和分泌。抗TNF/IL-17FIT-Ig的最终序列描述于表14中。

[0252] [0253] 实施例3.1抗TNF/IL-17FIT-Ig的分子克隆:

[0254] 分子克隆方法与有关抗hIL-17/hIL-20FIT-Ig的分子克隆方法类似。

[0255] 表13.抗TNF/IL-17FIT-Ig分子和构建体

FIT-Ig 分子	构建体#1	连接子	构建体#2	构建体#3
FIT9-Ig	VL _{TNF} -CL-VH _{IL-17} -CH1-Fc	无连接子	VH _{TNF} -CH1	VL _{IL-17} -CL

[0256] 表14:抗TNF/IL-17FIT-Ig分子的氨基酸序列

蛋白质 蛋白质区	序列标识符	序列
抗 IL-TNF/IL-17 FIT9-Ig 多肽#1	SEQ ID NO.:87	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPPFTFGPGTKVD IKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLNNFYP REAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKS FNRGECQVQLVQSGAEV KKPGSSVKVSCKASGYS FTDYHIIHWVRQAPGQGL EWMGVINPMYGTTDYN QRFKGRVTITADESTSTA YMELSSLRSEDTAVYYC ARYDYFTGTGVYWGQQ TLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLV

[0257] 表14:抗TNF/IL-17FIT-Ig分子的氨基酸序列

蛋白质	序列标识符	序列
蛋白质区		12345678901234567890
		KGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK*
戈利木单抗 VL	SEQ ID NO.:88	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPPFTFGPGTKVD IK
CL	SEQ ID NO.:17	RTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSL STLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
连接子		无
LYVH	SEQ ID NO.:22	QVQLVQSGAEVKKPGSS VKVSKCASGYSFTDYHI HWVRQAPGQGLEWMG VINPMYGTTDYNQRFKG RVTITADESTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARYDY FTGTGVYWGQGTLTV SS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSC
Fc	SEQ ID NO.:20	DKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLmisRT PEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTIISKAK GQPREPVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGVFSCS

[0259]

[0260] 表14:抗TNF/IL-17FIT-Ig分子的氨基酸序列

蛋白质	序列标识符	序列	
蛋白质区		12345678901234567890	
		VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*	
抗 TNF/IL-17 FIT9-Ig 多肽#2	SEQ ID NO.:89	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFIFSSYAMH WVRQAPGNGLEWVAFM SYDGSNKKYADSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARDRG AAGGNNYYYYGMDVWG QGTTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDVFPEPVTWS GALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSC	
[0261]	戈利木单抗 VH	SEQ ID NO.:90	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFIFSSYAMH WVRQAPGNGLEWVAFM SYDGSNKKYADSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARDRG AAGGNNYYYYGMDVWG QGTTVTVSS
	CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSKST SGGTAALGCLVKDVFPE PVTWS GALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSV VTP VPS SSSLGTQTYICNVN H KPSNTKVDKKV E PKSC
抗 IL-TNF/IL-17 FIT9-Ig 多肽#3		SEQ ID NO.:91	DIVMTQTPLSLSVTPGQP ASISCRSSRSLVHSRGNT YLHWYLQKPGQSPQLLI YKVSNRFIGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCSQSTHLPFTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC*
	LY VL	SEQ ID NO.:16	DIVMTQTPLSLSVTPGQP ASISCRSSRSLVHSRGNT YLHWYLQKPGQSPQLLI

[0262] 表14:抗TNF/IL-17FIT-Ig分子的氨基酸序列

蛋白质 蛋白质区	序列标识符		序列
			12345678901234567890
[0263]	CL	SEQ ID NO.:17	YKVSNRFIGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCSQSTHLPFTFGQG TKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFN RGE*

[0264] 实施例3.2抗TNF/IL-17FIT-Ig蛋白的表达、纯化及分析

[0265] 将每一FIT-Ig的所有DNA构建体都亚克隆到基于pBOS的载体中，并进行测序以确保准确性。如先前所述，在293E细胞中，使用聚乙烯亚胺(PEI)对FIT9-Ig的构建体#1、构建体#2及构建体#3进行短暂共表达，并利用蛋白质A色谱法纯化FIT9-Ig蛋白。表达水平是10-23mg/L。使用基于细胞的测定针对IL-17(通过Hs27细胞产生GR0a)和TNF(通过L929细胞产生IL-8)对纯化蛋白质进行功能分析。FIT9-Ig针对人TNF的中和效力是11.6pM(与在相同实验中由戈利木单抗引起的15.9pM相比)，而针对人IL-17的中和效力是122pM(与在相同实验中由LY引起的51.5pM相比)。总体而言，FIT9-Ig保持了亲本mAb的生物活性。

[0266] 实施例4:抗CTLA-4/PD-1串联Fab免疫球蛋白(FIT-Ig)的构建、表达及纯化

[0267] 使用抗CTLA-4mAb伊匹单抗和抗PD-1mAb纳武单抗产生可结合至人CTLA-4和人PD-1的呈3-多肽构建体形式的另一FIT-Ig(FIT10-Ig)，如图1中所示。为了产生FIT10-Ig构建体#1，将伊匹单抗的VL-CL与纳武单抗重链的N末端直接融合(如表15中所示)。构建体#2是伊匹单抗的VH-CH1并且第3构建体是纳武单抗的VL-CL。将FIT10-Ig的3种构建体共转染到293细胞中，从而引起FIT10-Ig蛋白表达和分泌。

[0268] 实施例4.1抗CTLA-4/PD-1FIT-Ig的分子克隆：

[0269] 分子克隆方法与有关抗hIL-17/hIL-20FIT-Ig的分子克隆方法类似。抗CTLA-4/PD-1FIT-Ig的最终序列描述于表16中。

[0270] 表15.抗CTLA-4/PD-1FIT-Ig分子和构建体。

	FIT-Ig 分子	构建体#1	连接子	构建体#2	构建体#3
[0271]	FIT10-Ig	VL _{CTLA-4} -CL-VH _{PD-1} -CH1-Fc	无连接子	VH _{CTLA-4} -CH1	VL _{PD-1} -CL

[0272] 表16.抗CTLA-4/PD-1FIT-Ig分子的氨基酸序列

蛋白质 蛋白质区	序列标识符	序列
抗 CTLA-4/PD -1 FIT10-Ig 多肽 #1 [0273]	SEQ ID NO.:92	EIVLTQSPGTLSSLSPGER ATLSCRASQSVGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYG AFSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYQSSPWTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTTLS KADYEHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGE CQVQLVESGGVVQPG RSLRLDCKASGITFSNS GMHWVRQAPGKGLE WVAVIWYDGSKRYYA DSVKGRFTISRDNSKNT LFLQMNSLRAEDTAVY YCATNDDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVD

[0274] 表16.抗CTLA-4/PD-1FIT-Ig分子的氨基酸序列

蛋白质 蛋白质区	序列标识符	序列
[0275]		12345678901234567890 KKVEPKSCDKTHCPP CPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDEPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIKAK GQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPN NYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
	伊匹单抗 VL	SEQ ID NO.:93 EIVLTQSPGTLSSLSPGER ATLSCRASQSVGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYG AFSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGGSPWTFGQ GTKVEIK
	CL	SEQ ID NO.:17 RTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSLTLSKADYEKH KVVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
	连接子	无
	纳武单抗 VH	SEQ ID NO.:94 QVQLVESGGVVQPGR SLRLDCKASGITFSNSG MHWVRQAPGKGLEWV AVIWDGSKRYYADSV KGRFTISRDNSKNTLFL QMNSLRAEDTAVYYCA TNDDYWGQGTLTVSS
	CH1	SEQ ID NO.:19 ASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKV EPKSC
	Fc	SEQ ID NO.:20 DKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPPKDTLMIS

[0276] 表16. 抗CTLA-4/PD-1FIT-Ig分子的氨基酸序列

蛋白质 蛋白质区	序列标识符	序列
		RTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVH NAKTPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREGQVY TLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK *
抗 CTLA-4/PD -1 FIT10-Ig 多肽 #2 [0277]	SEQ ID NO.:95	QVQLVESGGVVQPGR SLRLSCAASGFTFSSYT MHWVRQAPGKGLEW VTFISYDGNNKYYADS VKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAIYYC ARTGWLGPFDYWGQG TLTVVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSC
伊匹单抗 VH	SEQ ID NO.:96	QVQLVESGGVVQPGR SLRLSCAASGFTFSSYT MHWVRQAPGKGLEW VTFISYDGNNKYYADS VKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAIYYC ARTGWLGPFDYWGQG TLTVVSS
CH1	SEQ ID NO.:19	ASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKV EPKSC
抗 CTLA-4/PD -1 FIT10-Ig 多肽	SEQ ID NO.:97	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYD ASN RATGIPARFSGSGS

[0278] 表16. 抗CTLA-4/PD-1FIT-Ig分子的氨基酸序列

蛋白质 蛋白质区	序列标识符	序列
[0279]	#3	GTDFTLTISSEPEDFAV YYCQQSSNWPRFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSSTLTSK ADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC*
	纳武单抗 VL	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYD ASN RATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSEPEDFAV YYCQQSSNWPRFGQG TKVEIK
	CL	SEQ ID NO.:17 RTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTSKADYEKH K KVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC*

[0280] 实施例4.2抗CTLA-4/PD-1FIT-Ig蛋白的表达、纯化及功能分析：

[0281] 将每一FIT-Ig的所有DNA构建体都亚克隆到基于pBOS的载体中，并进行测序以确保准确性。如先前所述，在293E细胞中，使用聚乙烯亚胺(PEI)对FIT10-Ig的构建体#1、构建体#2及构建体#3进行短暂共表达，并通过蛋白质A色谱法将FIT9-Ig蛋白纯化至98%单体完全蛋白。表达水平高达43mg/L。使用ELISA对纯化的蛋白质进行针对重组CTLA-4Ig和PD-1的结合分析。简单地说，对于结合至CTLA-4，将人CTLA-4Ig(R&D Systems)固定于96孔板上，随后进行常规洗涤和阻断程序。接着，将各种浓度的FIT-10-Ig或伊匹单抗添加到板中，随后是孵育和多次洗涤的步骤，并用抗人Fab-HRP进行检测。对于结合至PD-1，将人PD-1(带有his标签)(R&D Systems)固定于96孔板上，随后进行常规洗涤和阻断程序。接着，将各种浓度的FIT-10-Ig或纳武单抗添加到板中，随后是孵育和多次洗涤的步骤，并用抗人Fc-HRP进行检测(图6)。似乎FIT10-Ig能够分别以与亲本mAb伊匹单抗和纳武单抗类似的活性分结合CTLA-4(A)和PD-1(B)。

[0282] 此外，使用OctetRed进行多抗原结合研究以确定FIT10-Ig是否能够同时结合重组CTLA-4和PD-1。简单地说，将浓度是10 μ g/ml的FIT10-Ig固定于AR2G传感器上，随后在测定缓冲液(PBS pH 7.4, 0.1% BSA, 0.02% Tween)中依序结合CTLA-4Ig和PD-1(或先是PD-1，然后是CTLA-4Ig)，其中浓度是80nM。在实验结束时，表面用pH1.5的10mM甘氨酸再生五次(图7)。这一实验显示，FIT10-Ig当已结合至CTLA-4时能够结合PD-1，并且反之亦然，表明FIT10-Ig能够同时结合CTLA-4Ig和PD-1。

[0283] 本说明书中引用的所有出版物、专利申请及颁布的专利以引用的方式并入本文中,就如同特定地并且个别地指示将每一个别出版物、专利申请或颁布的专利以引用的方式整体并入一般。

序列表

<110> 岸迈生物科技有限公司 (Epimab BioTherapeutics)
吴辰冰 (Wu, Chengbin)

<120> 串联 FAB 免疫球蛋白及其用途

<130> EPBI-001/01W0

<150> PCT/CN2013/090923

<151> 2013-12-30

<160> 98

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 1

caggtgcagc tggcgcagag cggcgccgaa g

31

<210> 2

<211> 51

[0001] <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 2

gctggacactg agagcctgaa ccggccaccac cacactctcc cctgttgaag c

51

<210> 3

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 3

ggtgtggcg gttcaggctc tcaggtccag ctgtgtcaat ctggcgccga gg

52

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 4		
gctctgcggcc gctcattiac ccggagacag ggagag		36
<210> 5		
<211> 31		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 寡核苷酸引物		
<400> 5		
taagcgtacg gtggctgcac catctgtctt c		31
<210> 6		
<211> 59		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 寡核苷酸引物		
<400> 6		
cggcgccaga ttgcacaagc tggacctggc ctgaaccaca ctctccctg ttgaagctc		59
<210> 7		
[0002] <211> 51		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 寡核苷酸引物		
<400> 7		
gctggacactg agagcctgaa ccgccaccac cacactctcc cctgttgaag c		51
<210> 8		
<211> 52		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 寡核苷酸引物		
<400> 8		
ggtgtggcg gttcaggctc tcaggtccag cttgtgcaat ctggcgccga gg		52
<210> 9		
<211> 59		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		

<223> 寡核苷酸引物

<400> 9

tacctcggcg ccagattgca caagctggac ctgacactct cccctgttga agctctttg 59

<210> 10

<211> 56

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 10

catgacacct taacagaggc cccaggtcgt tttacctcg cgccagattg cacaag 56

<210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 11

caataagtt tacatgacac cttaacagag gccccag 37

[0003]

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 12

tcgagcggcc gctcaacaag atttgggctc aactttcttg 40

<210> 13

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 13

gctgctgctg tggttccccc gctcgcgatg cgctatacag ttgacacagt c 51

<210> 14

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 14

gaagatgaag acagatggtg cagccaccgt acgcttgatec tctacccttg ttc 53

<210> 15

<211> 676

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 IL-17/IL-20 FIT1-Ig 多肽

<400> 15

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

Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Arg	Ser	Leu	Val	His	Ser
															30
				20				25							

Arg	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
															45
				35			40								

[0004]	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ile	Gly	Val	Pro
																60
				50			55									

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

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

Thr	His	Leu	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
				100			105		110						

Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
															125
				115			120								

Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
				130			135		140						

Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
															160
				145			150		155						

Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
															175
				165			170		175						

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gln Val Gln Leu Val
 210 215 220

Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser
 225 230 235 240

Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Asp Ile Ile His Trp Val
 245 250 255

Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Ala
 260 265 270

Gly Tyr Gly Asn Thr Gln Tyr Ser Gln Asn Phe Gln Asp Arg Val Ser
 275 280 285

Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ile Ser
 290 295 300

Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Pro Leu
 305 310 315 320

Trp Phe Gly Glu Ser Ser Pro His Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 325 330 335

[0005]

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 340 345 350

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 355 360 365

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 370 375 380

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 385 390 395 400

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 405 410 415

Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 420 425 430

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 435 440 445

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 450 455 460

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 465 470 475 480

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
485	490	495	
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu			
500	505	510	
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr			
515	520	525	
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn			
530	535	540	
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro			
545	550	555	560
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln			
565	570	575	
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val			
580	585	590	
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val			
595	600	605	
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro			
[0006] 610	615	620	
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr			
625	630	635	640
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val			
645	650	655	
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			
660	665	670	
Ser Pro Gly Lys			
675			
<210> 16			
<211> 112			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 16			
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly			
1	5	10	15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Val His Ser			
20	25	30	

Arg Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ile Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Thr His Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 17

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 17

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

[0007] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 18

<211> 127

<212> PRT

<213> 小鼠属种

<400> 18

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Asp
 20 25 30
 Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Ala Gly Tyr Gly Asn Thr Gln Tyr Ser Gln Asn Phe
 50 55 60
 Gln Asp Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ile Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Pro Leu Trp Phe Gly Glu Ser Ser Pro His Asp Tyr Tyr
 100 105 110
 Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 19
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> 智人

[0008] <400> 19

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 100
 <210> 20
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 20

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
1															15

Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
															30
				20					25						

Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
															45
					35			40							

Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
															60
					50			55							

His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
															80
					65			70		75					

Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
															95
					85			90							

Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
															110
					100			105							

Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
															125
					115			120							

[0009]

Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
															140
						130			135						

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

Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
															175
					165			170							

Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
															190
						180			185						

Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
															205
					195			200			205				

His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
															220
					210			215			220				

Pro Gly Lys

225

<210> 21

<211> 222

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 IL-17/IL-20 FIT1-Ig 多肽

<400> 21

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser		
1					5					10			15				
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr																	
				20					25					30			
His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met																	
				35					40					45			
Gly Val Ile Asn Pro Met Tyr Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe																	
				50					55					60			
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr																	
				65					70					75			80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys																	
				85					90					95			
Ala Arg Tyr Asp Tyr Phe Thr Gly Thr Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly																	
				100					105					110			
[0010] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe																	
				115					120					125			
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu																	
				130					135					140			
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp																	
				145					150					155			160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu																	
				165					170					175			
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser																	
				180					185					190			
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro																	
				195					200					205			
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys																	
				210					215					220			

<210> 22

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人

<400> 22

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

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

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

 Gly Val Ile Asn Pro Met Tyr Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60

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

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

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

 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

[0011] <210> 23
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 抗 IL-17/IL-20 FIT1-Ig 多肽
 <400> 23

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

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

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

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

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

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

 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		
<210> 24		
<211> 107		
<212> PRT		
[0012] <213> 小鼠属种		
<400> 24		
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
15		
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala		
20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
80		
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu		
85	90	95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	
<210> 25		
<211> 679		

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 IL-17/IL-20 FIT2-Ig 多肽

<400> 25

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

Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Arg	Ser	Leu	Val	His	Ser
					20									30	

Arg	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
					35								40		45

Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ile	Gly	Val	Pro
					50							55		60	

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

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

[0013]

Thr	His	Leu	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
					100							105		110	

Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
					115				120			125			

Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
					130				135			140			

Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
					145				150			155		160	

Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
					165				170			175			

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

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

Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Ser	Gly	Gln	Val
					210				215			220			

Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val
					225				230			235		240	

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Asp Ile Ile
 245 250 255

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Trp
 260 265 270

Ile Asn Ala Gly Tyr Gly Asn Thr Gln Tyr Ser Gln Asn Phe Gln Asp
 275 280 285

Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 290 295 300

Leu Ile Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 305 310 315 320

Glu Pro Leu Trp Phe Gly Glu Ser Ser Pro His Asp Tyr Tyr Gly Met
 325 330 330 335

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 340 345 350

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 355 360 365

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 370 375 380

[0014]

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 385 390 395 400

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 405 410 415

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 420 425 430

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 435 440 445

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 450 455 460

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 465 470 475 480

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 485 490 495

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 500 505 510

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 515 520 525

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
530	535	540
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
545	550	555
560		
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
565	570	575
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys		
580	585	590
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
595	600	605
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
610	615	620
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
625	630	635
640		
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
645	650	655
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
660	665	670
[0015]		
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
675		
<210> 26		
<211> 3		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 肽连接子序列		
<400> 26		
Gly Ser Gly		
1		
<210> 27		
<211> 683		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 抗 IL-17/IL-20 FIT3-Ig 多肽		
<400> 27		

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Arg Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ile Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

Thr His Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

[0016]

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Ser
 210 215 220

Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro
 225 230 235 240

Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 245 250 255

Asn Asp Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu
 260 265 270

Trp Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Tyr Gly Asn Thr Gln Tyr Ser Gln

	275	280	285
	Asn Phe Gln Asp Arg Val Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr		
	290	295	300
	Ala Tyr Met Glu Leu Ile Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
	305	310	315
	Tyr Cys Ala Arg Glu Pro Leu Trp Phe Gly Glu Ser Ser Pro His Asp		
	325	330	335
	Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser		
	340	345	350
	Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser		
	355	360	365
	Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp		
	370	375	380
	Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr		
	385	390	395
	Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr		
	405	410	415
[0017]	Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln		
	420	425	430
	Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp		
	435	440	445
	Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro		
	450	455	460
	Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro		
	465	470	475
	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
	485	490	495
	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn		
	500	505	510
	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg		
	515	520	525
	Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val		
	530	535	540
	Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser		
	545	550	555
			560

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
565 570 575

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
580 585 590

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
595 600 605

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gln Pro Glu
610 615 620

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
625 630 635 640

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
645 650 655

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
660 665 670

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
675 680

<210> 28

[0018] <211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 28

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser
1 5

<210> 29

<211> 436

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 IL-17/IL-20 FIT4-Ig 多肽

<400> 29

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

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

His	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
35															
Gly	Val	Ile	Asn	Pro	Met	Tyr	Gly	Thr	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gln	Arg	Phe
50															
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65															
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
85															
Ala	Arg	Tyr	Asp	Tyr	Phe	Thr	Gly	Thr	Gly	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
100															
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
115															
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
130															
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145															
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
165															
[0019]	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
	180														
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
195															
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Ala	Ile	
210															
Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg
225															
Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Ala	Leu	Ala
245															
Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp
260															
Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly		
275															
Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp
290															
Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Phe	Asn	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe
305															

Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser
				325				330						335	
Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala
	340					345						350			
Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val
			355			360						365			
Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser
	370			375					380						
Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr
	385			390					395					400	
Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys
			405			410						415			
Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
	420				425					430					
Arg	Gly	Glu	Cys												
		435													
<210> 30															
[0020] <211> 439															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<220>															
<223> 抗 IL-17/IL-20 FIT5-Ig 多肽															
<400> 30															
Gln															
Val															
Gln															
Leu															
Val															
Gln															
Ser															
Gly															
Ala															
Glu															
Val															
Lys															
Lys															
Pro															
Gly															
Ser															
1		5		10		15									
Ser															
Val															
Lys															
Val															
Ser															
Cys															
Lys															
Ala															
Ser															
Gly															
Tyr															
Ser															
Phe															
Thr															
Asp															
Tyr															
20		25		30											
His															
Ile															
His															
Trp															
Val															
Arg															
Gln															
Ala															
Pro															
Gly															
Gln															
Gly															
Leu															
Glu															
Trp															
Met															
35		40		45											
Gly															
Val															
Ile															
Asn															
Pro															
Met															
Tyr															
Gly															
Thr															
Thr															
Asp															
Tyr															
Asn															
Gln															
Arg															
Phe															
50		55		60											
Lys															
Gly															
Arg															
Val															
Thr															
Ile															
Thr															
Ala															
Asp															
Glu															
Ser															
Thr															
Ser															
Thr															
Ala															
Tyr															
65		70		75		80									
Met															
Glu															
Leu															
Ser															
Ser															
Leu															
Arg															
Ser															
Glu															
Asp															
Thr															
Ala															
Val															
Tyr															
Tyr															
Cys															
85		90		95											

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

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

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

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

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

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

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser
 210 215 220

Gly Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 225 230 235 240

[0021]

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser
 245 250 255

Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 260 265 270

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 275 280 285

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 290 295 300

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro
 305 310 315 320

Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 325 330 335

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 340 345 350

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 355 360 365

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 370 375 380

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 385 390 395 400

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 405 410 415

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 420 425 430

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 435

<210> 31

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 IL-17/IL-20 FIT6-Ig 多肽

<400> 31

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 [0022] 20 25 30

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

Gly Val Ile Asn Pro Met Tyr Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

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

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

	165	170	175
	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
	180	185	190
	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
	195	200	205
	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly		
	210	215	220
	Gly Gly Ser Gly Ser Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu		
	225	230	235
	Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln		
	245	250	255
	Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala		
	260	265	270
	Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro		
	275	280	285
	Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile		
	290	295	300
[0023]	Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe		
	305	310	315
	Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	325	330	335
	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
	340	345	350
	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
	355	360	365
	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
	370	375	380
	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
	385	390	395
	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
	405	410	415
	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
	420	425	430
	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	435	440	

<210>	32	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸引物	
<400>	32	
gtctgcggcc	gctcatttac	ccggagacag
	ggagag	36
<210>	33	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸引物	
<400>	33	
tcgagcggcc	gctcaacaag	atttgggctc
	aactttcttg	40
<210>	34	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
[0024]		
<220>		
<223>	寡核苷酸引物	
<400>	34	
caggtccagc	tgcagcagtc	tg
		22
<210>	35	
<211>	59	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸引物	
<400>	35	
gcctgcgaag	tcacccatca	gggcctgagc
	tcgcccgtca	caaagagctt
	caacagggg	59
<210>	36	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸引物	
<400>	36	

tacgagaaac acaaagtcta cgccctgcgaa gtcacccatc agggcctgag	50
<210> 37	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸引物	
<400> 37	
tgacgctgag caaaggcagac tacgagaaac acaaagtcta cgccctgcgaa	50
<210> 38	
<211> 59	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸引物	
<400> 38	
ctcgccggtc acaaaggagct tcaacagggg agagtgtgaa gtgcagctgg tggagtcgt	59
<210> 39	
<211> 51	
[0025] <212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸引物	
<400> 39	
gctgctgctg tggttcccg gctcgcgatg cggaaattgtt ttgacacagt c	51
<210> 40	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸引物	
<400> 40	
aagatgaaga cagatggtgc agccaccgta cgttaatct ccagtcgtgt cc	52
<210> 41	
<211> 665	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> OKT3/奥法木单抗 FIT7-Ig 多肽	

<400> 41

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

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

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
 50 55 60

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

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

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

[0026] Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu
 210 215 220

Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 225 230 235 240

Thr Phe Asn Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 245 250 255

Gly Leu Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly
 260 265 270

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 275 280 285

 Lys Lys Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 290 295 300

 Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr
 305 310 315 320

 Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
 325 330 335

 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 340 345 350

 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 355 360 365

 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 370 375 380

 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 385 390 395 400

 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 405 410 415
 [0027]
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 420 425 430

 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 435 440 445

 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 450 455 460

 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 465 470 475 480

 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 485 490 495

 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 500 505 510

 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 515 520 525

 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 530 535 540

 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

545	550	555	560
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met			
565	570	575	
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
580	585	590	
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
595	600	605	
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
610	615	620	
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val			
625	630	635	640
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln			
645	650	655	
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
660	665		
<210> 42			
<211> 106			
<212> PRT			
[0028] <213> 小鼠属种			
<400> 42			
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met			
20	25	30	
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr			
35	40	45	
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser			
50	55	60	
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu			
65	70	75	80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr			
85	90	95	
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn			
100	105		
<210> 43			
<211> 122			

<212> PRT

<213> 智人

<400> 43

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

[0029] Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 44

<211> 222

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OKT3/奥法木单抗 FIT7-Ig 多肽

<400> 44

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

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

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

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

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 46
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OKT3/奥法木单抗 FIT7-Ig 多肽

<400> 46

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
[0031] 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

195

200

205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 47

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

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

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

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

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

[0032]

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
85 90 95

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

<210> 48

<211> 672

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OKT3/奥法木单抗 FIT8-Ig 多肽

<400> 48

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

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

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser

50	55	60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu		
65	70	75
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr		
85	90	95
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Thr Val Ala Ala Pro		
100	105	110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr		
115	120	125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys		
130	135	140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		
145	150	155
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser		
165	170	175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala		
180	185	190
[0033]		
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe		
195	200	205
Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Ser Gly Ser Glu Val Gln Leu		
210	215	220
Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu		
225	230	235
Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr Ala Met His Trp		
245	250	255
Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser		
260	265	270
Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe		
275	280	285
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn		
290	295	300
Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile		
305	310	315
Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr		
325	330	335

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 340 345 350
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 370 375 380
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 385 390 395 400
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 405 410 415
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 420 425 430
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 435 440 445
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 450 455 460
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 465 470 475 480
 [0034]
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 485 490 495
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 500 505 510
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 515 520 525
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr
 530 535 540
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 545 550 555 560
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 565 570 575
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 580 585 590
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 595 600 605
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 610 615 620

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 625 630 635 640

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 645 650 655

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 660 665 670

<210> 49

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 49

Gly Gly Ser

1

<210> 50

<211> 3

<212> PRT

[0035] <213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 50

Ser Gly Gly

1

<210> 51

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 51

Gly Gly Gly

1

<210> 52

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 52

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 53

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 53

Ser Gly Gly Gly

1

<210> 54

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

[0036]

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 54

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 55

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 55

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 56

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

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 57

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

<210> 58

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

[0037] <220>

<223> 肽连接子序列

<400> 58

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

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 59

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

Val

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 60

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly

1 5

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 61

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly

1 5 10

<210> 62

<211> 16

<212> PRT

[0038] <213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 62

Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val

1 5 10 15

<210> 63

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 63

Ser Ala Lys Thr Thr Pro

1 5

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 64

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

<210> 65

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 65

Arg Ala Asp Ala Ala Pro
1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

[0039]

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 66

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
1 5

<210> 67

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 67

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

<210> 68

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 68

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

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 20 25

<210> 69

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 69

Ser Ala Lys Thr Thr Pro
 1 5

<210> 70

[0040] <211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 70

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

<210> 71

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 71

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

Arg Val

<210> 72
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽连接子序列

<400> 72

Ala Asp Ala Ala Pro
1 5

<210> 73
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽连接子序列

<400> 73

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

[0041] <210> 74
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽连接子序列

<400> 74

Thr Val Ala Ala Pro
1 5

<210> 75
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽连接子序列

<400> 75

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

<210> 76

<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽连接子序列

<400> 76

Gln Pro Lys Ala Ala Pro
1 5

<210> 77
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽连接子序列

<400> 77

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

[0042] <210> 78
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽连接子序列

<400> 78

Ala Lys Thr Thr Pro Pro
1 5

<210> 79
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽连接子序列

<400> 79

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

<210> 80
<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 80

Ala Lys Thr Thr Ala Pro

1 5

<210> 81

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 81

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro

1 5 10

<210> 82

<211> 6

[0043] <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 82

Ala Ser Thr Lys Gly Pro

1 5

<210> 83

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 83

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro

1 5 10

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 84

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

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 85

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

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

[0044] <213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接子序列

<400> 86

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

<210> 87

<211> 664

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TNF/IL-17 FIT9-Ig 多肽

<400> 87

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

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

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

	35	40	45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro			
85	90	95	
Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala			
100	105	110	
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser			
115	120	125	
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu			
130	135	140	
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser			
145	150	155	160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu			
165	170	175	
[0045] Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val			
180	185	190	
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys			
195	200	205	
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala			
210	215	220	
Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser			
225	230	235	240
Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro			
245	250	255	
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Val Ile Asn Pro Met Tyr Gly Thr			
260	265	270	
Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp			
275	280	285	
Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu			
290	295	300	
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asp Tyr Phe Thr Gly Thr			
305	310	315	320

Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 325 330 335

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 340 345 350

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 355 360 365

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 370 375 380

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 385 390 395 400

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 405 410 415

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 420 425 430

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 435 440 445

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 450 455 460

[0046]

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 465 470 475 480

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 485 490 495

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 500 505 510

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 515 520 525

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 530 535 540

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 545 550 555 560

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 565 570 575

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 580 585 590

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 595 600 605

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 610 615 620

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 625 630 635 640

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 645 650 655

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 660

<210> 88

<211> 108

<212> PRT

<213> 智人

<400> 88

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

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

[0047] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 89

<211> 229

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TNF/IL-17 FIT9-Ig 多肽

<400> 89

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125

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

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 [0048] 145 150 155 160

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

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

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

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

Glu Pro Lys Ser Cys
 225

<210> 90
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 90

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

 Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110

 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

 <210> 91
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0049] <220>
 <223> TNF/IL-17 FIT9-Ig 多肽

 <400> 91

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

 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

 Arg Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ile Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

 Thr His Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115	120	125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
130	135	140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
145	150	155
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
165	170	175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
180	185	190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
195	200	205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	
<210> 92		
<211> 658		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
[0050] <223> CTLA-4/PD-1 FIT10-Ig 多肽		
<400> 92		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1	5	10
15		
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser		
20	25	30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
35	40	45
Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser		
50	55	60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu		
65	70	75
80		
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro		
85	90	95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala		
100	105	110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser		
115	120	125

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

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

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

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

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

 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 210 215 220

 Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser
 225 230 235 240

 Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 245 250 255

 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys
 260 265 270
 [0051]

 Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 275 280 285

 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 290 295 300

 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln
 305 310 315 320

 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 325 330 335

 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 340 345 350

 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 355 360 365

 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 370 375 380

 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 385 390 395 400

 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

	405	410	415
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
420	425	430	
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
435	440	445	
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
450	455	460	
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
465	470	475	480
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
485	490	495	
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
500	505	510	
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
515	520	525	
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
530	535	540	
[0052] Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
545	550	555	560
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
565	570	575	
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
580	585	590	
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
595	600	605	
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
610	615	620	
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
625	630	635	640
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
645	650	655	
Gly Lys			

<210> 93
 <211> 108
 <212> PRT

<213> 智人

<400> 93

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

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

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

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

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

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

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

[0053] <210> 94

<211> 113

<212> PRT

<213> 智人

<400> 94

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

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Ser

<210> 95
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CTLA-4/PD-1 FIT10-Ig 多肽

<400> 95

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0054] 65 70 75 80

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

210

215

220

<210> 96
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 96

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

[0055]

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 97
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CTLA-4/PD-1 FIT10-Ig 多肽

<400> 97

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		
<210> 98		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 98		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1	5	10
15		
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr		
20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
65	70	75
80		

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

[0057]

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

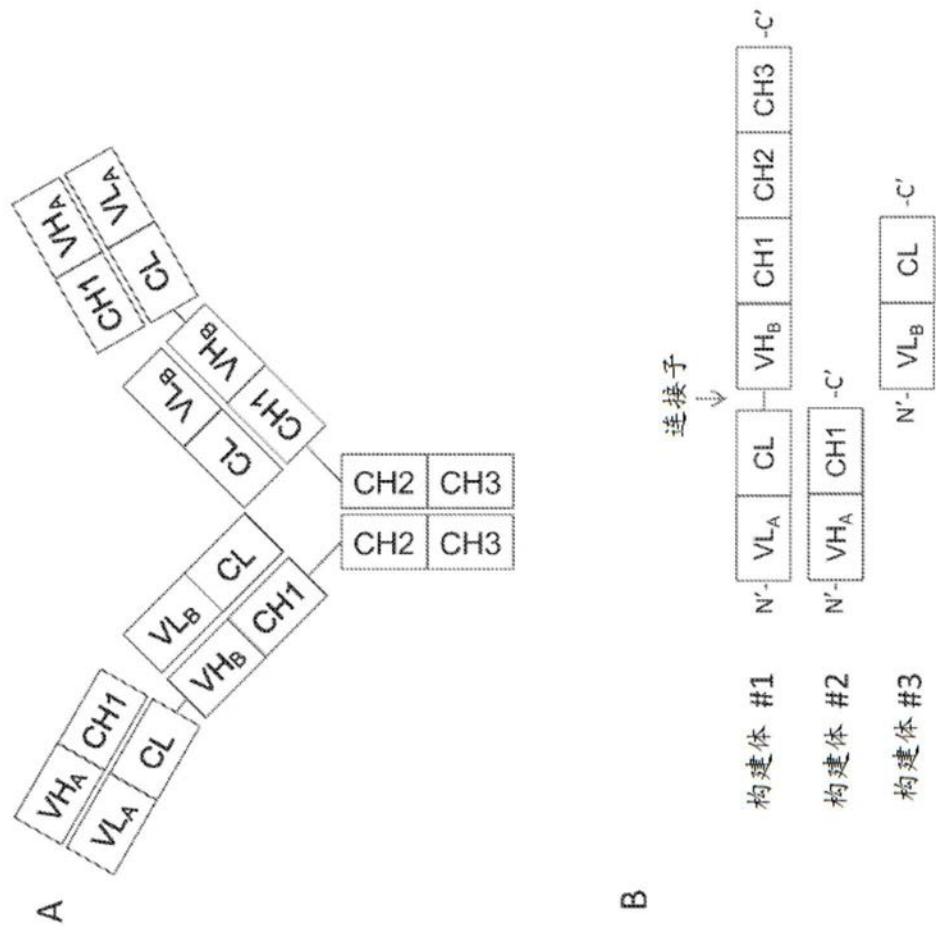


图1

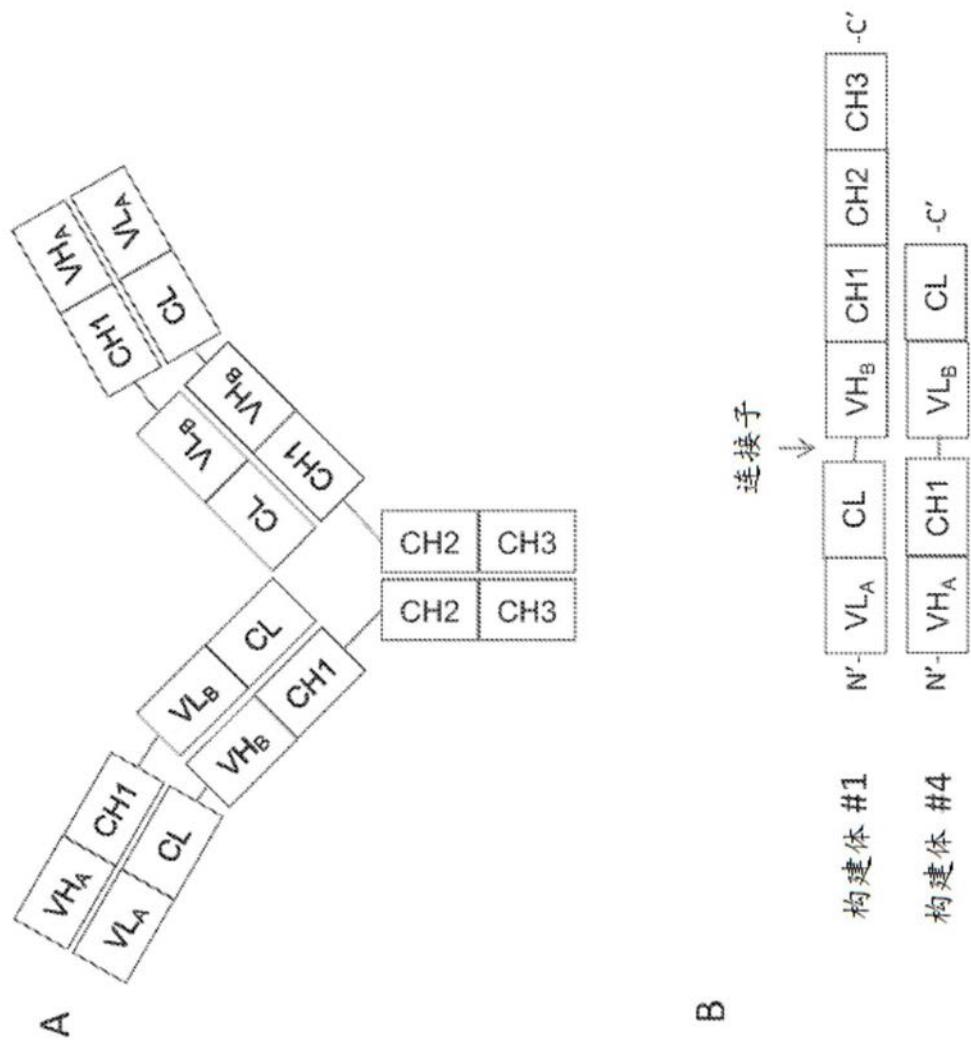


图2

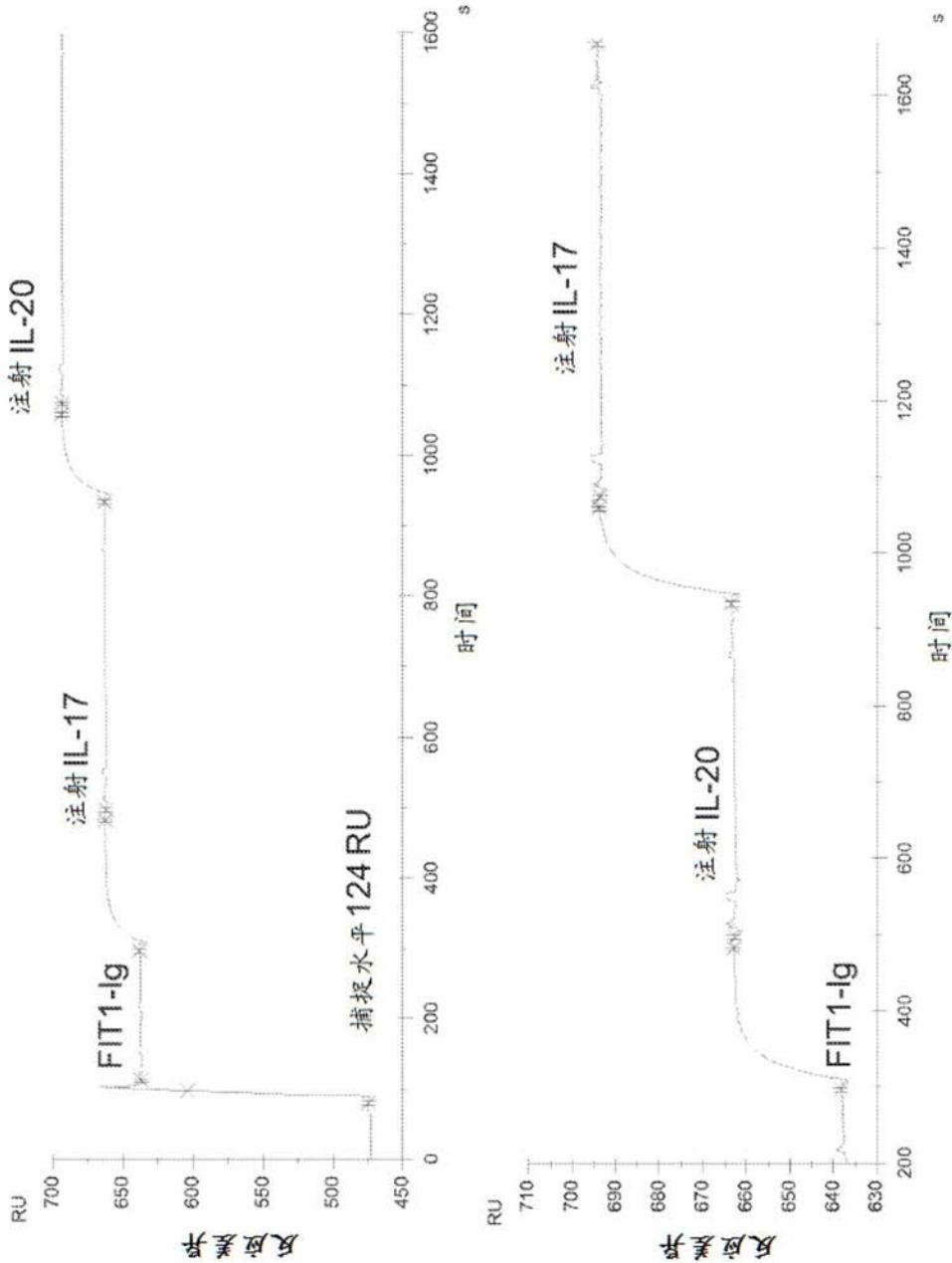
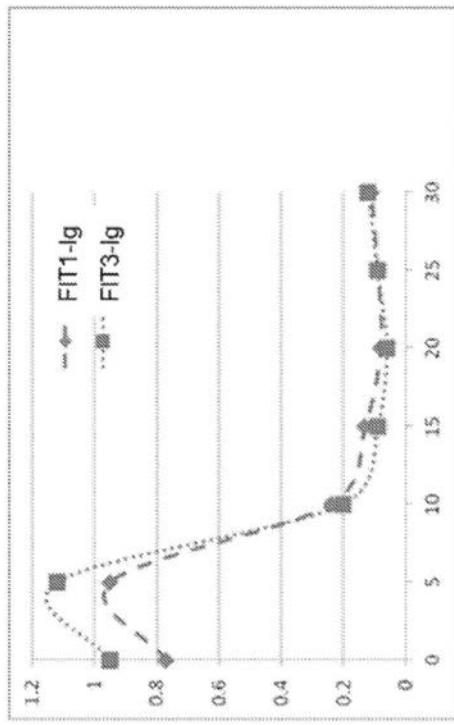


图3

A. PEG诱导的 FIT-lg 沉淀



B. PEG诱导的利妥昔单抗沉淀

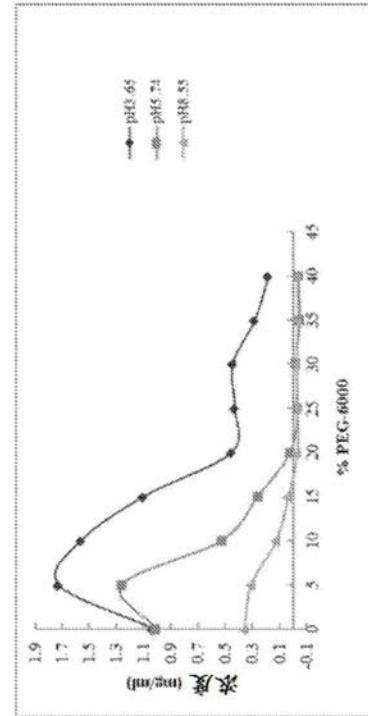
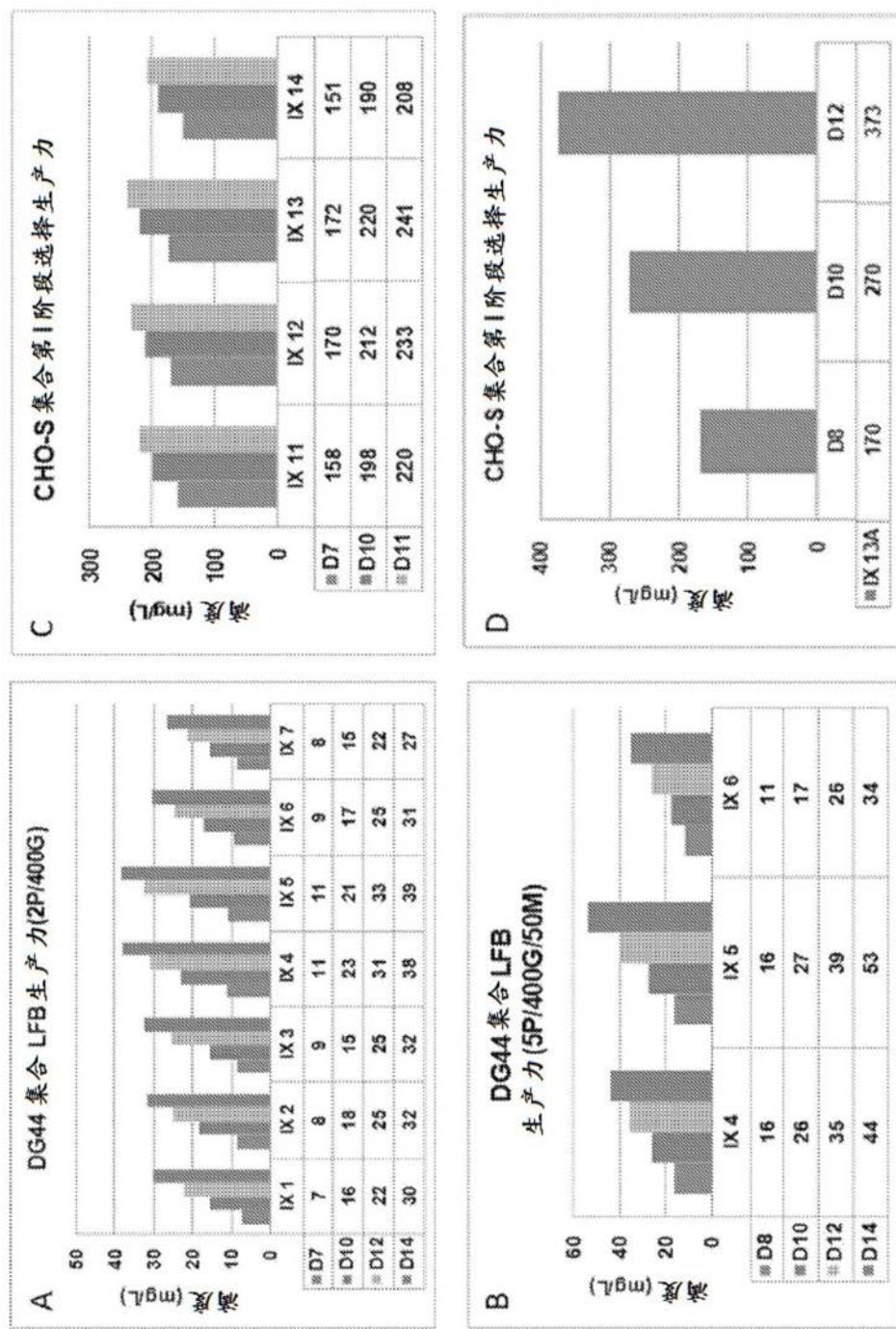


图4



D:天数。IX 1-15：克隆数。

图5

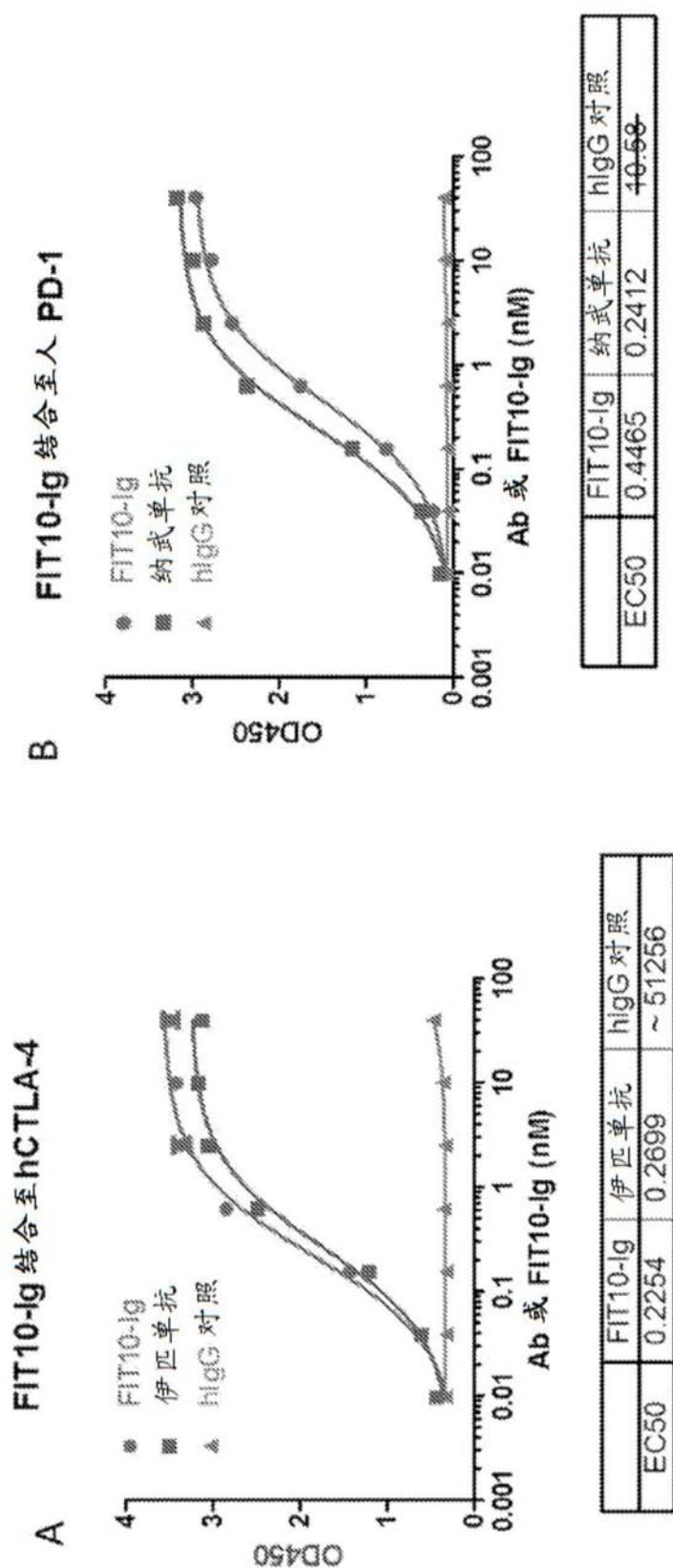


图6

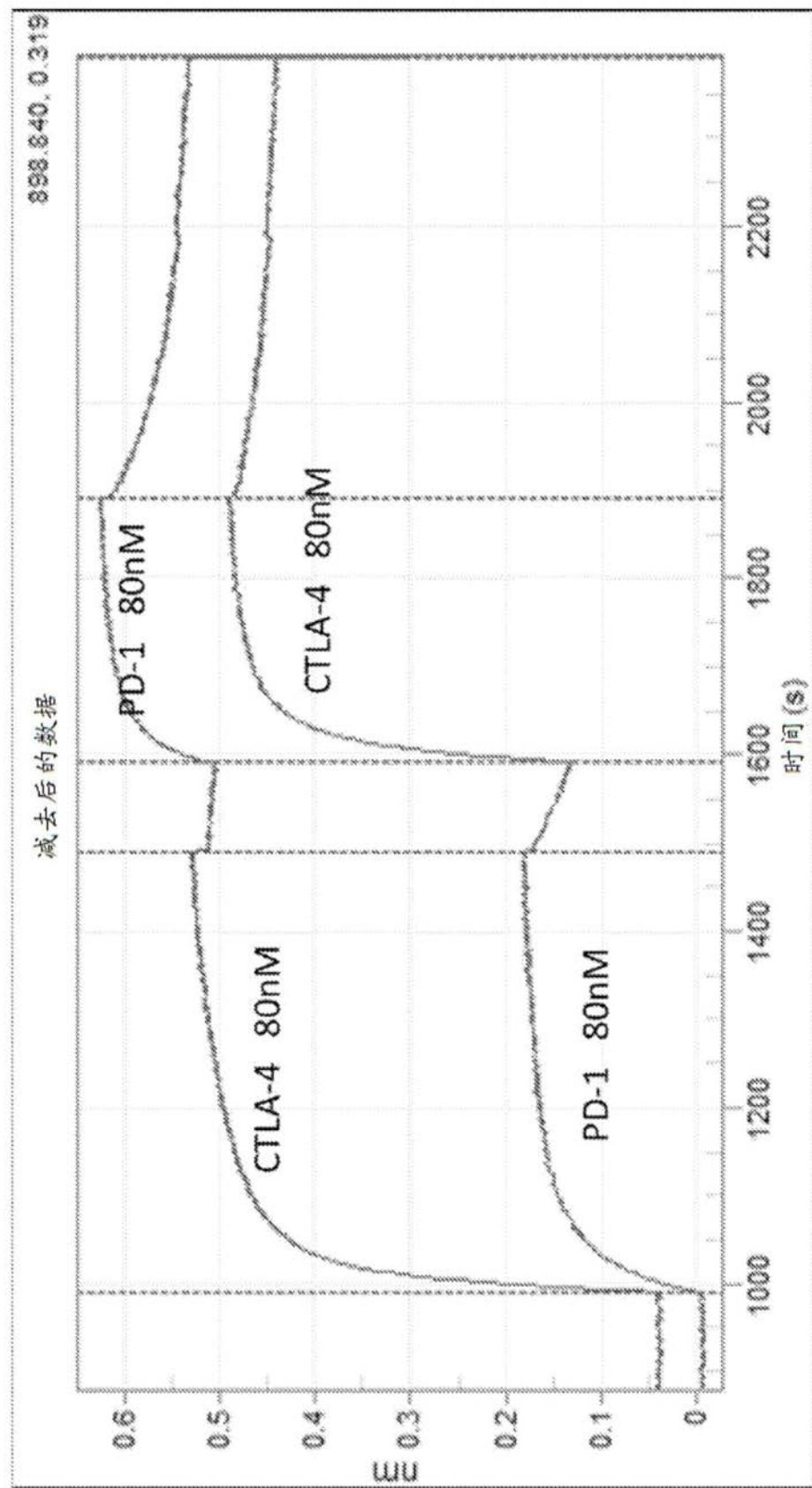


图7