



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101370525 B

(45) 授权公告日 2013.09.18

(21) 申请号 200680039052.3

C12Q 1/68(2006.01)

(22) 申请日 2006.08.18

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/709,998 2005.08.19 US

US 20020136719 A1, 2002.09.26, 全文.

CN 1464908 A, 2003.12.31, 全文.

CN 1152877 A, 1997.06.25, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008.04.21

审查员 陈红霞

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/032398 2006.08.18

(87) PCT申请的公布数据

W02007/024715 EN 2007.03.01

(73) 专利权人 ABBVIE 公司

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 C·吴 T·加于尔 R·W·迪克松

J·G·萨尔费尔德

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 王景朝 梁谋

(51) Int. Cl.

A61K 51/00(2006.01)

A61M 36/14(2006.01)

权利要求书8页 说明书116页

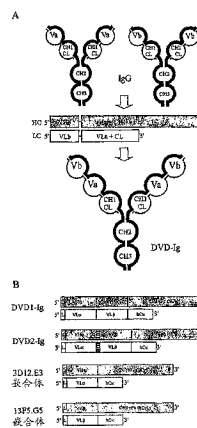
序列表85页 附图1页

(54) 发明名称

双重可变结构域免疫球蛋白及其用途

(57) 摘要

本发明涉及工程改造的多价和多特异性结合蛋白、制备方法、和具体而言涉及其在急性和慢性炎症及其他疾病预防和/或治疗中的用途。



1. 一种包含第一条和第二条多肽链的结合蛋白,其中所述第一条多肽链包含 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>,其中 VD1 是第一个重链可变结构域,VD2 是第二个重链可变结构域,C 是恒定结构域,X1 是接头,它是单个氨基酸或具有 2 个或更多氨基酸但不包含 CH1 或 CL 结构域的所有残基的多肽,X2 是 Fc 区,且 n 是 0 或 1;且所述第二条多肽链包含 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C,其中 VD1 是第一个轻链可变结构域,VD2 是第二个轻链可变结构域,C 是恒定结构域,X1 是接头,它是单个氨基酸或具有 2 个或更多氨基酸但不包含 CH1 或 CL 结构域的所有残基的多肽,且 n 是 0 或 1,其中所述第一条和第二条多肽链形成 2 个功能性抗原结合部位。

2. 根据权利要求 1 的结合蛋白,其包含 4 条多肽链,其中所述第一条多肽链和第三条多肽链各包含 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>,其中 VD1 是第一个重链可变结构域,VD2 是第二个重链可变结构域,C 是恒定结构域,X1 是接头,它是单个氨基酸或具有 2 个或更多氨基酸但不包含 CH1 或 CL 结构域的所有残基的多肽,X2 是 Fc 区,且 n 是 0 或 1;且所述第二条多肽链和第四条多肽链各包含 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C,其中 VD1 是第一个轻链可变结构域,VD2 是第二个轻链可变结构域,C 是恒定结构域,X1 是接头,它是单个氨基酸或具有 2 个或更多氨基酸但不包含 CH1 或 CL 结构域的所有残基的多肽,且 n 是 0 或 1,其中所述第一条和第二条多肽链形成 2 个功能性抗原结合部位,且所述第三条和第四条多肽链形成 2 个功能性抗原结合部位。

3. 根据权利要求 1 的结合蛋白,其中所述结合蛋白能够结合一种或多种靶。

4. 根据权利要求 3 的结合蛋白,其中所述靶选自 ABCF1 ;ACVR1 ;ACVR1B ;ACVR2 ;ACVR2B ;ACVRL1 ;ADORA2A ;聚集蛋白聚糖 ;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) ;B1yS ;BMP1 ;BMP2 ;BMP3B (GDF10) ;BMP4 ;BMP6 ;BMP8 ;BMPR1A ;BMPR1B ;BMPR2 ;BPAG1 ( 网 蛋 白 ) ;BRCA1 ;C19orf10 (IL27w) ;C3 ;C4A ; C5 ;C5R1 ;CANT1 ;CASP1 ;CASP4 ;CAV1 ;CCBP2 (D6/JAB61) ;CCL1 (I-309) ;CCL11 (嗜伊红粒细胞趋化蛋白) ;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 ;exodus-2 ;CCL22 (MDC/STC-1) ;CCL23 (MPIF-1) ;CCL24 (MPIF-2/嗜伊红粒细胞趋化蛋白-2) ;CCL25 (TECK) ;CCL26 (嗜伊红粒细胞趋化蛋白-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 ;CD52 ;CD69 ;CD72 ;CD74 ;CD79A ;CD79B ;CD8 ;CD80 ;CD81 ;CD83 ;CD86 ;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 (密蛋白-7) ;CLN3 ;CLU (簇蛋白) ;CMKLR1 ;CMKOR1 (RDC1) ;CNR1 ;COL18A1 ;COL1A1 ;COL4A3 ;COL6A1 ;CR2 ;CRP ;CSF1 (M-CSF) ;

CSF2(GM-CSF) ;CSF3(GCSF) ;CTLA4 ;CTNNB1(b- 连环蛋白) ;CTSB(组织蛋白酶 B) ;CX3CL1(SCYD1) ;CX3CR1(V28) ;CXCL1(GRO1) ;CXCL10(IP-10) ;CXCL11(I-TAC/IP-9) ;CXCL12(SDF1) ;CXCL13 ;CXCL14 ;CXCL16 ;CXCL2(GRO2) ;CXCL3(GRO3) ;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 ;ENO1 ;ENO2 ;ENO3 ;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-a ;IFNA1 ;IFNA2 ;IFNA4 ;IFNA5 ;IFNA6 ;IFNA7 ;IFNB1 ;IFN $\gamma$  ;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 ;IL1RL2 ;IL1RN ;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 整联蛋白) ;ITGAV ;ITGB3 ;ITGB4(b4 整联蛋白) ;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(瘦蛋白) ;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 ;神经蛋白聚糖 ;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 ;P2RX7 ;PAP ;PART1 ;PATE ;PAWR ;PCA3 ;PCNA ;PDGFA ;PDGFB ;PECAM1 ;PF4(CXCL4) ;PGF ;PGR ;磷酸聚糖 ;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(亲脂素 B) ;SCGB2A1(乳腺珠蛋白 2) ;SCGB2A2(乳腺珠蛋白 1) ;SCYE1(内皮单核细胞活化

细胞因子);SDF2;SERPINA1;SERPINA3;SERPINB5(乳腺丝抑蛋白);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;TGFB1;TGFB1;TGFB2;TGFB3;TH1L;THBS1(血小板反应蛋白-1);THBS2;THBS4;THP0;TIE(Tie-1);TIMP3;组织因子;TLR10;TLR2;TLR3;TLR4;TLR5;TLR6;TLR7;TLR8;TLR9;TNF;TNF- $\alpha$ ;TNFAIP2(B94);TNFAIP3;TNFRSF11A;TNFRSF1A;TNFRSF1B;TNFRSF21;TNFRSF5;TNFRSF6(Fas);TNFRSF7;TNFRSF8;TNFRSF9;TNFSF10(TRAIL);TNFSF11(TRANCE);TNFSF12(APO3L);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;VHL C5;VLA-4;XCL1(淋巴细胞趋化蛋白);XCL2(SCM-1b);XCR1(GPR5/CCXCR1);YY1;和ZFPM2。

5. 根据权利要求1的结合蛋白,其中所述结合蛋白能够结合2种靶,其中所述2种靶选自CD138和CD20;CD138和CD40;CD20和CD3;CD38和CD138;CD38和CD20;CD38和CD40;CD40和CD20;CD19和CD20;CD-8和IL-6;PDL-1和CTLA-4;CTLA-4和BTN02;CSPGs和RGM A;IGF1和IGF2;IGF1/2和Erb2B;IL-12和IL-18;IL-12和TWEAK;IL-13和ADAM8;IL-13和CL25;IL-13和IL-1 $\beta$ ;IL-13和IL-25;IL-13和IL-4;IL-13和IL-5;IL-13和IL-9;IL-13和LHR激动剂;IL-13和MDC;IL-13和MIF;IL-13和PED2;IL-13和SPRR2a;IL-13和SPRR2b;IL-13和TARC;IL-13和TGF- $\beta$ ;IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ ;MAG和RGM A;NgR和RGM A;NogoA和RGM A;OMGp和RGM A;RGM A和RGM B;Te38和TNF $\alpha$ ;TNF $\alpha$ 和IL-12;TNF $\alpha$ 和IL-12p40;TNF $\alpha$ 和IL-13;TNF $\alpha$ 和IL-15;TNF $\alpha$ 和IL-17;TNF $\alpha$ 和IL-18;TNF $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ ;TNF $\alpha$ 和IL-23;TNF $\alpha$ 和MIF;TNF $\alpha$ 和PEG2;TNF $\alpha$ 和PGE4;TNF $\alpha$ 和VEGF;和VEGFR和EGFR;TNF $\alpha$ 和RANK配体;TNF $\alpha$ 和Blys;TNF $\alpha$ 和GP130;TNF $\alpha$ 和CD-22;以及TNF $\alpha$ 和CTLA-4。

6. 根据权利要求3的结合蛋白,其中所述结合蛋白能够调节一种或多种靶的生物学功能。

7. 根据权利要求3的结合蛋白,其中所述结合蛋白能够中和一种或多种靶。

8. 根据权利要求3-5中任何一项的结合蛋白,其中所述靶选自细胞因子、趋化因子、细胞表面蛋白、酶和受体。

9. 根据权利要求8的结合蛋白,其中所述细胞因子选自淋巴因子、单核因子和多肽激素。

10. 根据权利要求9的结合蛋白,其中所述细胞因子是IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 。

11. 根据权利要求10的结合蛋白,其中所述结合蛋白包含选自SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 37、SEQ ID NO. 41、SEQ ID NO. 45、SEQ ID NO. 47、SEQ ID NO. 51、SEQ ID NO. 53、SEQ ID NO. 55、SEQ ID NO. 57、和SEQ ID NO. 59的DVD重链氨基酸序列;和选自SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 39、SEQ ID NO. 43、SEQ ID NO. 46、SEQ ID NO. 49、SEQ ID NO. 52、SEQ ID NO. 54、SEQ ID NO. 56、SEQ ID NO. 58、和SEQ ID NO. 60的DVD轻链氨基酸序列。

12. 根据权利要求9的结合蛋白,其中所述细胞因子是TNF- $\alpha$ 和IL-13。

13. 根据权利要求 9 的结合蛋白,其中所述细胞因子是 IL-12 和 IL-18。
14. 根据权利要求 13 的结合蛋白,其中所述结合蛋白包含选自 SEQ ID NO. 83、SEQ ID NO. 90、SEQ ID NO. 93、SEQ ID NO. 95、和 SEQ ID NO. 114 的 DVD 重链氨基酸序列;和选自 SEQ ID NO. 86、SEQ ID NO. 91、SEQ ID NO. 94、SEQ ID NO. 96、和 SEQ ID NO. 116 的 DVD 轻链氨基酸序列。
15. 根据权利要求 8 的结合蛋白,其中所述趋化因子选自 CCR2、CCR5 和 CXCL-13。
16. 根据权利要求 8 的结合蛋白,其中所述细胞表面蛋白是整联蛋白。
17. 根据权利要求 8 的结合蛋白,其中所述细胞表面蛋白是 CD-20 和 CD3。
18. 根据权利要求 17 的结合蛋白,其中所述结合蛋白包含 SEQ ID NO. 97 的 DVD 重链氨基酸序列,和 SEQ ID NO. 101 的 DVD 轻链。
19. 根据权利要求 8 的结合蛋白,其中所述酶选自激酶和蛋白酶。
20. 根据权利要求 8 的结合蛋白,其中所述受体选自淋巴因子受体、单核因子受体、和多肽激素受体。
21. 根据权利要求 8 的结合蛋白,其中如通过表面等离子体共振测量的,所述结合蛋白对于所述一种或多种靶具有的结合速率常数 ( $K_{on}$ ) 选自:至少  $10^2 M^{-1} s^{-1}$ ;至少  $10^3 M^{-1} s^{-1}$ ;至少  $10^4 M^{-1} s^{-1}$ ;至少  $10^5 M^{-1} s^{-1}$ ;和至少  $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 。
22. 根据权利要求 8 的结合蛋白,其中如通过表面等离子体共振测量的,所述结合蛋白对于所述一种或多种靶具有的解离速率常数 ( $K_{off}$ ) 选自:至多  $10^{-3} s^{-1}$ ;至多  $10^{-4} s^{-1}$ ;至多  $10^{-5} s^{-1}$ ;和至多  $10^{-6} s^{-1}$ 。
23. 根据权利要求 8 的结合蛋白,其中所述结合蛋白对于所述一种或多种靶具有的解离常数 ( $K_D$ ) 选自:至多  $10^{-7} M$ ;至多  $10^{-8} M$ ;至多  $10^{-9} M$ ;至多  $10^{-10} M$ ;至多  $10^{-11} M$ ;至多  $10^{-12} M$ ;和至多  $10^{-13} M$ 。
24. 根据权利要求 1-23 任一项的结合蛋白,其中所述接头 X1 选自 AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO:118)、AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO:119)、AKTTPKLGG (SEQ ID NO:120)、SAKTPKLGG (SEQ ID NO:121)、SAKTP (SEQ ID NO:122)、RADAAP (SEQ ID NO:123)、RADAAPTVS (SEQ ID NO:124)、RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO:125)、RADAAAA(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> (SEQ ID NO:126)、SAKTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO:127)、ADAAP (SEQ ID NO:40)、ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO:103)、TVAAP (SEQ ID NO:44)、TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO:50)、QPKAAP (SEQ ID NO:88)、QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO:92)、AKTTP (SEQ ID NO:38)、AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO:128)、AKTTAP (SEQ ID NO:129)、AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO:99)、ASTKGP (SEQ ID NO:42)、ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:48)、GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:130)、GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO:131)、GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO:132) 和 GHEAAAVMQVQPAS (SEQ ID NO:133)。
25. 一种结合蛋白缀合物,其包含权利要求 1-23 中任何一项中所述的结合蛋白,所述结合蛋白缀合物进一步包含选自下述的试剂:免疫粘附分子、显像剂、治疗剂和细胞毒性剂。
26. 根据权利要求 25 的结合蛋白缀合物,其中所述试剂是选自下述的显像剂:放射性标记、酶、荧光标记、发光标记、生物发光标记、磁性标记、和生物素。
27. 根据权利要求 26 的结合蛋白缀合物,其中所述显像剂是选自下述的放射性标记:

$^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、和  $^{153}\text{Sm}$ 。

28. 根据权利要求 25 的结合蛋白缀合物,其中所述试剂是选自下述的治疗或细胞毒性剂: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、葱环类、毒素、和细胞凋亡剂。

29. 根据权利要求 1 的结合蛋白,其中所述结合蛋白是结晶结合蛋白。

30. 根据权利要求 29 的结晶结合蛋白,其中所述晶体是无载体的药学控释晶体。

31. 根据权利要求 29 的结晶结合蛋白,其中所述结合蛋白具有比所述结合蛋白的所述可溶性配对物更长的体内半衰期。

32. 根据权利要求 29 的结晶结合蛋白,其中所述结合蛋白保留生物学活性。

33. 一种分离的核酸,其编码权利要求 1-23 中任何一项的结合蛋白氨基酸序列。

34. 一种载体,其包含根据权利要求 33 的分离的核酸。

35. 权利要求 34 的载体,其中所述载体选自 pcDNA、pTT、pTT3、pEFBOS、pBV、pJV、pcDNA3.1 TOPO、pEF6 TOPO、和 pBJ。

36. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求 34 的载体。

37. 根据权利要求 36 的宿主细胞,其中所述宿主细胞是原核细胞。

38. 根据权利要求 37 的宿主细胞,其中所述宿主细胞是大肠杆菌。

39. 根据权利要求 36 的宿主细胞,其中所述宿主细胞是真核细胞。

40. 根据权利要求 39 的宿主细胞,其中所述真核细胞选自原生生物细胞、动物细胞、植物细胞和真菌细胞。

41. 根据权利要求 39 的宿主细胞,其中所述真核细胞是选自下述的动物细胞:哺乳动物细胞、禽类细胞、和昆虫细胞。

42. 根据权利要求 39 的宿主细胞,其中所述宿主细胞是 CHO 细胞。

43. 根据权利要求 39 的宿主细胞,其中所述宿主细胞是 COS。

44. 根据权利要求 39 的宿主细胞,其中所述宿主细胞是酵母细胞。

45. 根据权利要求 44 的宿主细胞,其中所述酵母细胞是啤酒糖酵母。

46. 根据权利要求 39 的宿主细胞,其中所述宿主细胞是昆虫 Sf9 细胞。

47. 一种生产结合蛋白的方法,其包括在足以生产所述结合蛋白的条件下,在培养基中培养权利要求 36-46 中任何一项的宿主细胞。

48. 权利要求 47 的方法,其中生产的 50% -75% 的所述结合蛋白是双重特异性四价结合蛋白。

49. 权利要求 47 的方法,其中生产的 75% -90% 的所述结合蛋白是双重特异性四价结合蛋白。

50. 权利要求 47 的方法,其中生产的 90% -95% 的所述结合蛋白是双重特异性四价结合蛋白。

51. 一种蛋白质,其根据权利要求 47 的方法生产。

52. 一种药物组合物,其包含权利要求 1-23、29-32 和 51 中任何一项中描述的结合蛋白,和药学可接受的载体。

53. 权利要求 52 的药物组合物,其进一步包含至少一种另外的试剂。

54. 权利要求 53 的药物组合物,其中所述另外的试剂选自:治疗剂,显像剂,细胞毒性

剂,血管发生抑制剂;激酶抑制剂;共刺激分子阻断剂;粘附分子阻断剂;抗细胞因子抗体或其功能片段;氨甲蝶呤;环孢菌素;雷帕霉素;FK506;可检测标记或报道分子;TNF拮抗剂;抗风湿剂;肌肉弛缓剂,麻醉药,非类固醇消炎药(NSAID),止痛剂,麻醉剂,镇静剂,神经肌肉阻断剂;抗微生物剂,抗牛皮癣剂,皮质类固醇,促蛋白合成类固醇,促红细胞生成素,免疫接种,免疫球蛋白,免疫抑制剂,生长激素,激素替代药物,放射性药物,抗抑郁药,抗精神病药,刺激剂,哮喘药物治疗, $\beta$ 激动剂,吸入类固醇,肾上腺素,细胞因子,和细胞因子拮抗剂。

55. 权利要求 54 的药物组合物,其中所述麻醉剂是局部麻醉剂。

56. 根据权利要求 1-23 任一项的结合蛋白在制备用于治疗受试者的疾病或病症的药物中的用途。

57. 权利要求 56 的用途,其中所述病症选自类风湿性关节炎、骨关节炎、青少年慢性关节炎、脓毒性关节炎、莱姆关节炎、牛皮癣性关节炎、反应性关节炎、脊椎关节病、全身性红斑狼疮、Crohn 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、变应性疾病、牛皮癣、皮炎、硬皮病、移植物抗宿主病、器官移植排斥、与器官移植相关的急性免疫性疾病、与器官移植相关的慢性免疫性疾病、肉状瘤病、动脉粥样硬化、弥散性血管内凝血、Kawasaki 氏病、Grave 氏病、肾病综合征、慢性疲乏综合征、韦格纳氏肉芽肿病、过敏性紫癜、肾显微血管炎、慢性活动性肝炎、葡萄膜炎、脓毒性休克、中毒性休克综合征、脓毒症综合征、恶病质、传染病、寄生虫病、急性横贯性脊髓炎、亨廷顿氏舞蹈病、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、中风、原发性胆汁性肝硬变、溶血性贫血、恶性肿瘤、心力衰竭、心肌梗死、Addison 氏病、散发性多腺性 I 型缺乏、多腺性 II 型缺乏 (Schmidt 氏综合征)、成人 (急性) 呼吸窘迫综合征、秃头、斑秃、血清反应阴性关节病、关节病、Reiter 氏病、牛皮癣性关节炎、溃疡性结肠炎性关节炎、肠病性滑膜炎、衣原体、耶尔森氏菌和沙门氏菌相关性关节病、脊椎关节病、动脉粥样化疾病 / 动脉硬化、特应性变态反应、自身免疫性大疱性疾病、寻常天疱疮、落叶状天疱疮、类天疱疮、线性 IgA 疾病、自身免疫性溶血性贫血、Coombs 阳性溶血性贫血、获得性恶性贫血、青少年性恶性贫血、肌痛脑炎 / Royal Free 疾病、慢性粘膜皮肤念珠菌病、巨细胞性动脉炎、原发性硬化性肝炎、隐原性自身免疫性肝炎、获得性免疫缺陷综合征、获得性免疫缺陷相关病、乙型肝炎、丙型肝炎、常见的各种免疫缺陷 (常见的可变低丙种球蛋白血症)、扩张型心肌病、女性不育、卵巢衰竭、过早卵巢衰竭、纤维化肺疾病、隐原性纤维化肺泡炎、炎症后间质性肺病、间质性肺炎、结缔组织病相关性间质性肺病、混合性结缔组织病相关性肺病、全身性硬皮病相关性间质性肺病、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 / 多肌炎相关性肺病、Sjögren 氏病相关性肺病、强直性脊柱炎相关性肺病、脉管炎性弥散性肺病、含铁血黄素沉着病相关性肺病、药物诱导的间质性肺病、纤维化、放射性纤维化、闭塞性细支气管炎、慢性嗜酸性肺炎、淋巴细胞性浸润性肺病、传染后间质性肺病、痛风性关节炎、自身免疫性肝炎、1 型自身免疫性肝炎 (传统自身免疫性或狼疮样肝炎)、2 型自身免疫性肝炎 (抗 LKM 抗体肝炎)、自身免疫介导的低血糖、具有黑棘皮症的 B 型胰岛素耐受性、甲状旁腺机能减退、骨关节炎、原发性硬化性胆管炎、1 型牛皮癣、2 型牛皮癣、特发性白细胞减少、自身免疫性嗜中性白细胞减少症、肾脏病 NOS、肾小球肾炎、莱姆病、盘状红斑狼疮、特发性男性不育症或 NOS、精子自身免疫性、多发性硬化 (所有亚型)、交感性眼炎、结缔组织病继发的肺动脉高压、Goodpasture

氏综合征、结节性多动脉炎的肺表现、急性风湿热、类风湿性脊椎炎、Still 氏病、全身性硬皮病、Sjörgren 氏综合征、Takayasu 氏病 / 动脉炎、自身免疫性血小板减少症、特发性血小板减少症、自身免疫性甲状腺病、甲状腺机能亢进、甲状腺肿性自身免疫性甲状腺功能减退 (Hashimoto 氏病)、萎缩性自身免疫性甲状腺功能减退、原发性粘液性水肿、晶状体性葡萄膜炎、原发性血管炎、白癜风、急性肝病、慢性肝病、酒精性肝硬变、酒精诱导的肝损伤、胆汁淤积、特应性肝病、药物诱导的肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、变态反应、B 群链球菌 (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、急性和慢性痛 (不同形式的疼痛)、癌症例如肺、乳腺、胃、膀胱、结肠、胰、卵巢、前列腺和直肠癌、造血恶性肿瘤 (白血病和淋巴瘤)、无  $\beta$  脂蛋白血症、手足发绀、急性和慢性寄生或感染过程、急性白血病、急性成淋巴细胞性白血病 (ALL)、急性髓细胞样白血病 (AML)、急性或慢性细菌感染、急性胰腺炎、急性肾功能衰竭、腺癌、心房异位搏动、AIDS 痴呆复征、酒精诱导的肝炎、变应性结膜炎、过敏性接触性皮炎、变应性鼻炎、同种异体移植物排斥、 $\alpha$ -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 治疗、抗磷脂综合征、抗受体超敏反应、主和周围性动脉瘤、主动脉壁夹层形成、高动脉压、动脉硬化、动静脉瘘、共济失调、心房纤维颤动 (持续性或阵发性)、心房扑动、房室传导阻滞、B 细胞淋巴瘤、骨移植物排斥、骨髓移植 (BMT) 排斥、束支传导阻滞、Burkitt 氏淋巴瘤、烧伤、心律失常、心脏震荡综合征、心脏肿瘤、心肌病、心肺分流术炎症应答、软骨移植排斥、小脑皮质变性、小脑病症、紊乱性或多源性房性心动过速、化学疗法相关病症、慢性髓细胞性白血病 (CML)、慢性酒精中毒、慢性炎性病理学、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、慢性阻塞性肺部疾病 (COPD)、慢性水杨酸盐中毒、结肠直肠癌、充血性心力衰竭、结膜炎、接触性皮炎、肺源性心脏病、冠状动脉疾病、Creutzfeldt-Jakob 病、培养物阴性脓毒症、囊性纤维化、细胞因子疗法相关病症、拳击员痴呆、脱髓鞘病、登革出血热、皮肤病学状况、多尿症、糖尿病、糖尿病性动脉硬化性疾病、弥漫性 Lewy 小体病、扩张性充血性心肌病、基底神经节病症、中年唐氏综合征、由阻断 CNS 多巴胺受体的药物诱导的运动障碍、药物敏感性、湿疹、脑脊髓炎、心内膜炎、内分泌病、会厌炎、EB 病毒感染、红斑性肢痛病、锥体外束和小脑病症、家族性嗜血性淋巴组织细胞增多症、胎儿胸腺移植排斥、Friedreich 氏共济失调、功能性外周性动脉病症、真菌性脓毒症、气性坏疽病、胃溃疡、肾小球肾炎、任何器官或组织的移植物排斥、革兰氏阴性脓毒症、革兰氏阳性脓毒症、由于细胞内生物的肉芽肿、毛细胞性白血病、Hallervorden-Spatz 病、Hashimoto 氏甲状腺炎、枯草热、心脏移植排斥、血色素沉着症、血液透析、溶血性尿毒症综合征 / 血栓溶解性血小板减少性紫癜、出血、甲型肝炎、希氏束心律失常、HIV 感染 / HIV 神经病、何杰金氏病、运动过度性运动障碍、超敏反应、超敏感性肺炎、高血压、运动机能减退性运动障碍、下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴评价、特发性 Addison 氏病、特发性肺纤维化、抗体介导的细胞毒性、虚弱、婴儿型脊髓性肌萎缩、主动脉炎症、流行性感冒 A、电离辐射照射、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、青少年脊髓性肌萎缩、卡波西氏肉瘤、肾移植排斥、军团杆菌、利什曼病、麻风病、皮层脊髓系统损伤、脂肪水肿、肝移植排斥、淋巴水肿、疟疾、恶性淋巴瘤、恶性组织细胞增多症、恶性黑色素瘤、脑膜炎、脑膜炎球菌血症、代谢性偏头痛、特发性偏头痛、线粒体多系统病症、混合型结缔组织病、单克隆丙种球蛋白病、多发性骨髓瘤、多系统变性 (Menzel, Dejerine-Thomas, Shy-Drager 和 Machado-Joseph)、重症肌无力、鸟胞内分支杆菌、结核分支杆菌、骨髓异常

增生综合征、心肌缺血性疾病、鼻咽癌、新生儿慢性肺病、肾炎、肾变病、神经变性疾病、神经原性肌萎缩、嗜中性粒细胞减少性发烧、非何杰金淋巴瘤、腹主动脉及其分支闭塞、闭塞性动脉病症、OKT3 治疗、睾丸炎 / 附睾炎、睾丸炎 / 输精管切除术逆转操作、器官巨大症、骨质疏松症、胰移植排斥、胰癌、恶性肿瘤的肿瘤相关综合征 / 高钙血症、甲状旁腺移植排斥、盆腔炎症性疾病、常年性鼻炎、心包疾病、外周性动脉粥样硬化疾病、外周血管病症、腹膜炎、恶性贫血、卡氏肺囊虫性肺炎、肺炎、POEMS 综合征（多发性神经病、器官巨大症、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病、和皮肤变化综合征）、灌注后综合征、泵后综合征、MI 心切开后综合征、先兆子痫、进行性核上麻痹、原发性肺动脉高压、放射治疗、Raynaud 氏现象、Raynaud 氏病、Refsum 氏病、常规狭窄 QRS 心动过速、肾血管性高血压、再灌注损伤、限制性心肌病、肉瘤、老年性舞蹈病、Lewy 小体型老年性痴呆、血清阴性关节病、中风、镰状细胞贫血、皮肤同种异体移植排斥、皮肤变化综合征、小肠移植排斥、实体瘤、特殊心律失常、脊髓性共济失调、脊髓小脑变性、链球菌肌炎、小脑结构损伤、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、全身炎症反应综合征、全身发作性青少年类风湿性关节炎、T 细胞或 FABALL、毛细血管扩张、血栓闭塞性脉管炎、血小板减少症、毒性、移植、创伤 / 出血、III 型超敏反应、IV 型超敏反应、不稳定心绞痛、尿毒症、尿脓毒病、荨麻疹、心脏瓣膜疾病、静脉曲张、血管炎、静脉疾病、静脉血栓形成、心室纤维性颤动、病毒和真菌感染、病毒性脑炎 / 无菌性脑膜炎、病毒相关性噬红细胞综合征、Wernicke-Korsakoff 综合征、Wilson 氏病、任何器官或组织的异种移植排斥。

58. 根据权利要求 56 的用途，其中所述药物配制为用于经由选自下述的至少一种模式给所述受试者施用：肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、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、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、快速灌注、阴道、口腔含化、舌下、鼻内、和经皮。

59. 一种药物组合物，其包含权利要求 25 中描述的结合蛋白缀合物，和药学可接受的载体。

60. 权利要求 59 的药物组合物，其进一步包含至少一种另外的试剂。

61. 权利要求 60 的药物组合物，其中所述另外的试剂选自：治疗剂，显像剂，细胞毒性剂，血管发生抑制剂；激酶抑制剂；共刺激分子阻断剂；粘附分子阻断剂；抗细胞因子抗体或其功能片段；氨甲蝶呤；环孢菌素；雷帕霉素；FK506；可检测标记或报道分子；TNF 拮抗剂；抗风湿剂；肌肉弛缓剂，麻醉药，非类固醇消炎药（NSAID），止痛剂，麻醉剂，镇静剂，神经肌肉阻断剂；抗微生物剂，抗牛皮癣剂，皮质类固醇，促蛋白合成类固醇，促红细胞生成素，免疫接种，免疫球蛋白，免疫抑制剂，生长激素，激素替代药物，放射性药物，抗抑郁药，抗精神病药，刺激剂，哮喘药物治疗， $\beta$  激动剂，吸入类固醇，肾上腺素，细胞因子，和细胞因子拮抗剂。

62. 权利要求 61 的药物组合物，其中所述麻醉剂是局部麻醉剂。

## 双重可变结构域免疫球蛋白及其用途

### [0001] 与相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求于 2005 年 8 月 19 日提交的美国临时申请号 60/709,911、和于 2005 年 11 月 2 日提交的美国临时申请号 60/732,892 的优先权利益。

### [0003] 发明领域

[0004] 本发明涉及多价和多特异性结合蛋白、制备方法、和具体而言涉及其在预防和/或治疗急性和慢性炎症、癌症及其他疾病中的用途。

### [0005] 发明背景

[0006] 工程改造的蛋白质,例如能够结合 2 种或更多抗原的多特异性抗体是本领域已知的。此种多特异性结合蛋白可以使用细胞融合、化学缀合、或重组 DNA 技术来产生。

[0007] 基于 2 种不同杂交瘤细胞系的体细胞融合,已使用四源杂交瘤 (quadroma) 技术 (参见 Milstein, C. 和 A. C. Cuello, Nature, 1983. 305 (5934) :第 537-40 页) 生产了双特异性抗体,所述杂交瘤细胞系表达具有双特异性抗体的所需特异性的鼠单克隆抗体。因为 2 种不同 Ig 重和轻链在所得到的杂种 - 杂交瘤 (或四源杂交瘤) 细胞系内随机配对,所以产生最高达 10 种不同免疫球蛋白种类,其中只有一种是功能性双特异性抗体。错配对副产品的存在和显著减少的产物得率意味着需要复杂的纯化操作。

[0008] 双特异性抗体可以通过 2 种不同 mAbs 的化学缀合来生产 (参见, Staerz, U. D., 等人, Nature, 1985. 314 (6012) :第 628-31 页)。这种方法不产生均质制剂。其他方法已使用 2 种不同单克隆抗体或较小抗体片段的化学缀合 (参见 Brennan, M., 等人, Science, 1985. 229 (4708) :第 81-3 页)。另一种方法是用异双功能交联剂偶联 2 种亲本抗体,但所得到的双特异性抗体制剂经受显著的分子异质性,因为交联剂与亲本抗体的反应不是定点的。为了获得更均质的双特异性抗体制剂,2 种不同 Fab 片段已以定点方式在其铰链半胱氨酸残基上进行化学交联 (参见 Glennie, M. J., 等人, J Immunol, 1987. 139 (7) :第 2367-75 页)。但这种方法产生 Fab' 2 片段,而不是全 IgG 分子。

[0009] 近来已开发了广泛多样的其他重组双特异性抗体形式 (参见 Kriangkum, J., 等人, Biomol Eng, 2001. 18 (2) :第 31-40 页)。在它们当中,串联单链 Fv 分子和双抗体 (diabody)、及其各种衍生物是用于构建重组双特异性抗体的最广泛使用的形式。常规地,这些分子的构建从识别不同抗原的 2 个单链 Fv (scFv) 片段开始 (参见 Economides, A. N., 等人, Nat Med, 2003. 9 (1) :第 47-52 页)。串联 scFv 分子 (taFv) 代表用另外的肽接头简单连接 2 个 scFv 分子的简单形式。这些串联 scFv 分子中存在的 2 个 scFv 片段形成分开的折叠实体。各种接头可以用于连接 2 个 scFv 片段和接头具有最高达 63 个残基的长度 (参见 Nakanishi, K., 等人, Annu Rev Immunol, 2001. 19 :第 423-74 页)。尽管亲本 scFv 片段可以以可溶形式在细菌中正常表达,然而,常常观察到串联 scFv 分子在细菌中形成不溶性聚集物。因此,重折叠规程或哺乳动物表达系统的使用常规应用于生产可溶性串联 scFv 分子。在近期研究中,报道了通过转基因兔和牛体内表达针对 CD28 的串联 scFv 和黑素瘤相关蛋白聚糖 (参见 Gracie, J. A., 等人, J Clin Invest, 1999. 104 (10) :第 1393-401 页)。在这个构建体中,2 个 scFv 分子通过 CH1 接头进行连接,且得到最高达 100mg/L 的双特异

性抗体血清浓度。使用各种策略包括结构域顺序变化或使用具有变化长度或柔性的中间接头,以允许在细菌中可溶性表达。少数研究现在已报道了使用非常短的 Ala3 接头或长的富甘氨酸 / 丝氨酸接头,在细菌中表达可溶性串联 scFv 分子 (参见 Leung, B. P., 等人, *J Immunol*, 2000. 164(12) :第 6495-502 页 ;Ito, A., 等人, *J Immunol*, 2003. 170(9) :第 4802-9 页 ;Karni, A., 等人, *J Neuroimmunol*, 2002. 125(1-2) :第 134-40 页)。在近期研究中,包含长度为 3 或 6 个残基的随机化中间接头的串联 scFv 谱 (repertoire) 噬菌体展示,用于富集以可溶和活性形式在细菌中生产的那些分子。这种方法导致分离具有 6 个氨基酸残基接头的优选串联 scFv 分子 (参见 Arndt, M. 和 J. Krauss, *Methods Mol Biol*, 2003. 207 :第 305-21 页)。这种接头序列是否代表串联 scFv 分子可溶性表达的一般解决方案仍不清楚。然而,这项研究证明串联 scFv 分子的噬菌体展示与定向诱变组合是富集这些分子的有力工具,所述分子可以以活性形式在细菌中表达。

[0010] 双特异性双抗体 (Db) 利用双抗体形式用于进行表达。通过使连接 VH 和 VL 结构域的接头长度减少至约 5 个残基,由 scFv 片段生产双抗体 (参见 Peipp, M. 和 T. Valerius, *Biochem Soc Trans*, 2002. 30(4) :第 507-11 页)。接头尺寸的这种减少通过使 VH 和 VL 结构域交叉配对促进 2 条多肽链的二聚化。双特异性双抗体通过在相同细胞内表达 2 条多肽链来生产,所述 2 条多肽链具有结构 VHA-VLB 和 VHB-VLA (VH-VL 构型)、或 VLA-VHB 和 VLB-VHA (VL-VH 构型)。在过去已生产了大量品种繁多的不同双特异性双抗体,并且它们中的大多数可以以可溶形式在细菌中表达。然而,近期的比较研究证明可变结构域的方向可以影响活性结合位点的表达和形成 (参见 Mack, M., G. Riethmuller, 和 P. Kufer, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(15) :第 7021-5 页)。然而,在细菌中的可溶性表达代表关于串联 scFv 分子的重要优点。然而,因为 2 条不同多肽链在单个细胞内表达,所以可以生产无活性同二聚体连同活性异二聚体。这使另外纯化步骤的执行成为必需,以获得双特异性双抗体的均质制剂。促使双特异性双抗体产生的一种方法是结进孔 (knob-into-hole) 双抗体的生产 (参见 Holliger, P., T. Prospero 和 G. Winter, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(14) :第 6444-8. 18 页)。这对于针对 HER2 和 CD3 的双特异性双抗体进行了证明。通过用 Phe 交换 Val37 和用 Trp 交换 Leu45 将大结引入 VH 结构域内,且在抗 HER2 或抗 CD3 可变结构域中,通过使 Phe98 突变为 Met 和使 Tyr87 突变为 Ala 在 VL 结构域中产生互补孔。通过使用这种方法,双特异性双抗体的生产可以从经由亲本双抗体的 72% 增至经由结进孔双抗体的超过 90%。重要的是,作为这些突变的结果生产得率只有轻微减少。然而,对于几种分析的构建体观察到抗原结合活性的减少。因此,这种相当精细的方法需要分析各种构建体,以鉴定产生具有不变结合活性的异二聚分子的那些突变。此外,此类方法需要免疫球蛋白序列在恒定区的突变修饰,因此生成非天然和非自然形式的抗体序列,这可以导致免疫原性增加、体内稳定性差、以及不希望有的药物代谢动力学。

[0011] 单链双抗体 (scDb) 代表改善双特异性双抗体样分子形成的可替代策略 (参见 Holliger, P. 和 G. Winter, *Cancer Immunol Immunother*, 1997. 45(3-4) :第 128-30 页 ;Wu, A. M., 等人, *Immunotechnology*, 1996. 2(1) :第 21-36 页)。双特异性单链双抗体通过用另外的中间接头连接 2 条双抗体形成多肽链来产生,所述另外的中间接头长度为约 15 个氨基酸残基。因此,分子量对应于单体单链双抗体 (50-60kDa) 的所有分子都是双特异性的。几项研究已证明双特异性单链双抗体在细菌中以可溶和活性形式表达,其中大多数纯化的分子

呈现为单体（参见 Holliger, P. 和 G. Winter, *Cancer Immunol Immunother*, 1997. 45(3-4) : 第 128-30 页 ; Wu, A. M., 等人, *Immunotechnology*, 1996. 2(1) : 第 21-36 页 ; Pluckthun, A. 和 P. Pack, *Immunotechnology*, 1997. 3(2) : 第 83-105 页 ; Ridgway, J. B., 等人, *Protein Eng*, 1996. 9(7) : 第 617-21 页）。因此, 单链双抗体组合了串联 scFvs(所有单体都是双特异性的) 和双抗体(在细菌中可溶性表达) 的优点。

[0012] 更近地, 双抗体已与 Fc 融合以产生更 Ig 样的分子, 称为双-双抗体 (di-diabody) (参见 Lu, D., 等人, *J Biol Chem*, 2004. 279(4) : 第 2856-65 页)。此外, 已描述了在 IgG 重链中包含 2 个 Fab 重复且能够结合 4 个抗原分子的多价抗体构建体 (参见 WO 0177342A1, 和 Miller, K., 等人, *J Immunol*, 2003. 170(9) : 第 4854-61 页)。

[0013] 本领域需要能够结合 2 种或更多抗原的改良的多价结合蛋白。本发明提供了能够以高亲和力结合 2 种或更多抗原的结合蛋白新家族。

#### [0014] 发明概述

[0015] 本发明涉及能够结合 2 种或更多抗原的多价结合蛋白。本发明提供了能够以高亲和力结合 2 种或更多抗原的结合蛋白新家族。

[0016] 在一个实施方案中, 本发明提供了包含多肽链的结合蛋白, 其中所述多肽链包含 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>, 其中 VD1 是第一个可变结构域, VD2 是第二个可变结构域, C 是恒定结构域, X1 代表氨基酸或多肽, X2 代表 Fc 区和 n 是 0 或 1。在优选实施方案中, 结合蛋白中的 VD1 和 VD2 是重链可变结构域。更优选地, 重链可变结构域选自鼠重链可变结构域、人重链可变结构域、CDR 嫁接的重链可变结构域、和人源化重链可变结构域。在优选实施方案中, VD1 和 VD2 能够结合相同抗原。在另一个实施方案中, VD1 和 VD2 能够结合不同抗原。优选地 C 是重链恒定结构域。更优选地 X1 是接头, 条件是 X1 不是 CH1。最优选地 X1 是选择下述的接头: AKTTPKLEEGEFSEAR; AKTTPKLEEGEFSEARV; AKTTPKLGG; SAKTTPKLGG; AKTTPKLEEGEFSEARV; SAKTTP; SAKTTPKLGG; RADAAP; RADAAPTVS; RADAAAAGGPGS; RADAAAA(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>; SAKTTP; SAKTTPKLGG; SAKTTPKLEEGEFSEARV; ADAAP; ADAAPTVSIFPP; TVAAP; TVAAPSVFIFPP; QPKAAP; QPKAAPSVTLFPP; AKTTPP; AKTTPPSVTPLAP; AKTTAP; AKTTAPSVYPLAP; ASTKGP; ASTKGPSVFPLAP, GGGGSGGGGSGGGGS; GENKVEYAPALMALS; GPAKELTPLKEAKVS; 和 GHEAAAVMQVQYPAS。优选地 X2 是 Fc 区。更优选地 X2 是变体 Fc 区。

[0017] 在优选实施方案中, 上文公开的结合蛋白包含多肽链, 其中所述多肽链包含 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>, 其中 VD1 是第一个重链可变结构域, VD2 是第二个重链可变结构域, C 是重链恒定结构域, X1 是接头, 条件是它不是 CH1, 且 X2 是 Fc 区。

[0018] 在另一个实施方案中, 结合蛋白中的 VD1 和 VD2 是轻链可变结构域。优选地轻链可变结构域选自鼠轻链可变结构域、人轻链可变结构域、CDR 嫁接的轻链可变结构域、和人源化轻链可变结构域。在一个实施方案中, VD1 和 VD2 能够结合相同抗原。在另一个实施方案中, VD1 和 VD2 能够结合不同抗原。优选地 C 是轻链恒定结构域。更优选地 X1 是接头, 条件是 X1 不是 CL1。优选地 X1 是选择下述的接头: AKTTPKLEEGEFSEAR; AKTTPKLEEGEFSEARV; AKTTPKLGG; SAKTTPKLGG; AKTTPKLEEGEFSEARV; SAKTTP; SAKTTPKLGG; RADAAP; RADAAPTVS; RADAAAAGGPGS; RADAAAA(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>; SAKTTP; SAKTTPKLGG; SAKTTPKLEEGEFSEARV; ADAAP; ADAAPTVSIFPP; TVAAP; TVAAPSVFIFPP; QPKAAP; QPKAAPSVTLFPP; AKTTPP; AKTTPPSVTPLAP; AKTTAP; AKTTAPSVYPLAP; ASTKGP; 和 ASTKGPSVFPLAP。优选地结合蛋白不包含 X2。

[0019] 在优选实施方案中,上文公开的结合蛋白包含多肽链,其中所述多肽链包含 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>,其中 VD1 是第一个轻链可变结构域,VD2 是第二个轻链可变结构域,C 是轻链恒定结构域,X1 是接头,条件是它不是 CH1,且 X2 不包含 Fc 区。

[0020] 在另一个优选实施方案中,本发明提供了包含 2 条多肽链的结合蛋白,其中所述第一条多肽链包含 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>,其中 VD1 是第一个重链可变结构域,VD2 是第二个重链可变结构域,C 是重链恒定结构域,X1 是接头,条件是它不是 CH1,且 X2 是 Fc 区;且所述第二条多肽链包含 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>,其中 VD1 是第一个轻链可变结构域,VD2 是第二个轻链可变结构域,C 是轻链恒定结构域,X1 是接头,条件是它不是 CH1,且 X2 不包含 Fc 区。最优选地双重可变结构域 (DVD) 结合蛋白包含 4 条多肽链,其中首先 2 条多肽链分别包含 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>,其中 VD1 是第一个重链可变结构域,VD2 是第二个重链可变结构域,C 是重链恒定结构域,X1 是接头,条件是它不是 CH1,且 X2 是 Fc 区;且其次 2 条多肽链分别包含 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>,其中 VD1 是第一个轻链可变结构域,VD2 是第二个轻链可变结构域,C 是轻链恒定结构域,X1 是接头,条件是它不是 CH1,且 X2 不包含 Fc 区。此种双重可变结构域 (DVD) 蛋白具有 4 个抗原结合部位。

[0021] 在另一个优选实施方案中,上文公开的结合蛋白能够结合一种或多种靶。优选地靶选自细胞因子、细胞表面蛋白、酶和受体。优选地结合蛋白能够调节一种或多种靶的生物学功能。更优选地结合蛋白能够中和一种或多种靶。本发明的结合蛋白能够结合选自淋巴因子、单核因子和多肽激素的细胞因子。在具体实施方案中,结合蛋白能够结合选自下述的细胞因子对:IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ ;IL-12 和 IL-18,TNF $\alpha$  和 IL-23,TNF $\alpha$  和 IL-13;TNF 和 IL-18;TNF 和 IL-12;TNF 和 IL-1 $\beta$ ;TNF 和 MIF;TNF 和 IL-17;和 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- $\beta$ ;IL-13 和 LHR 激动剂;IL-13 和 CL25;IL-13 和 SPRR2a;IL-13 和 SPRR2b;IL-13 和 ADAM8;和 TNF $\alpha$  和 PGE4,IL-13 和 PED2,TNF 和 PEG2。在另一个实施方案中,本发明的结合蛋白能够结合选自下述的靶对:CD138 和 CD20;CD138 和 CD40;CD19 和 CD20;CD20 和 CD3;CD38 和 CD138;CD38 和 CD20;CD38 和 CD40;CD40 和 CD20;CD-8 和 IL-6;CSPGs 和 RGM A;CTLA-4 和 BTNO2;IGF1 和 IGF2;IGF1/2 和 Erb2B;IL-12 和 TWEAK;IL-13 和 IL-1 $\beta$ ;MAG 和 RGM A;NgR 和 RGM A;NogoA 和 RGM A;OMGp 和 RGM A;PDL-1 和 CTLA-4;RGM A 和 RGM B;Te38 和 TNF $\alpha$ ;TNF $\alpha$  和 B1ys;TNF $\alpha$  和 CD-22;TNF $\alpha$  和 CTLA-4;TNF $\alpha$  和 GP130;TNF $\alpha$  和 IL-12p40;和 TNF $\alpha$  和 RANK 配体。

[0022] 在一个实施方案中,能够结合人 IL-1 $\alpha$  和人 IL-1 $\beta$  的结合蛋白包含选自 SEQ ID NO. 33、SEQ ID NO. 37、SEQ ID NO. 41、SEQ ID NO. 45、SEQ ID NO. 47、SEQ ID NO. 51、SEQ ID NO. 53、SEQ ID NO. 55、SEQ ID NO. 57、和 SEQ ID NO. 59 的 DVD 重链氨基酸序列;和选自 SEQ ID NO. 35、SEQ ID NO. 39、SEQ ID NO. 43、SEQ ID NO. 46、SEQ ID NO. 49、SEQ ID NO. 52、SEQ ID NO. 54、SEQ ID NO. 56、SEQ ID NO. 58、和 SEQ ID NO. 60 的 DVD 轻链氨基酸序列。在另一个实施方案中,能够结合鼠 IL-1 $\alpha$  和鼠 IL-1 $\beta$  的结合蛋白包含 DVD 重链氨基酸序列 SEQ ID NO. 105 和 DVD 轻链氨基酸序列 SEQ ID NO. 109。

[0023] 在一个实施方案中,能够结合 IL-12 和 IL-18 的结合蛋白包含选自 SEQ ID NO. 83、SEQ ID NO. 90、SEQ ID NO. 93、SEQ ID NO. 95、和 SEQ ID NO. 114 的 DVD 重链氨基酸序列;和选自 SEQ ID NO. 86、SEQ ID NO. 91、SEQ ID NO. 94、SEQ ID NO. 96、和 SEQ

IDNO. 116 的 DVD 轻链氨基酸序列。

[0024] 在一个实施方案中,能够结合 CD20 和 CD3 的结合蛋白包含 DVD 重链氨基酸序列 SEQ ID NO. 97 和 DVD 轻链 SEQ ID NO. 101。

[0025] 在另一个实施方案中,本发明的结合蛋白能够结合选自下述的 1 种、2 种或更多细胞因子、细胞因子相关蛋白、和细胞因子受体: 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、PDGFB、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFB3、LTA (TNF- $\beta$ )、LTB、TNF (TNF- $\alpha$ )、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 (APO3L)、TNFSF13 (April)、TNFSF13B、TNFSF 14 (HVEM-L)、TNFSF 15 (VEG1)、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 (瘦蛋白)、PTN、和 THPO。

[0026] 本发明的结合蛋白能够结合选自下述的一种或多种趋化因子、趋化因子受体、和趋化因子相关蛋白: CCL1 (I-309)、CCL2 (MCP-1/MCAF)、CCL3 (MIP-1a)、CCL4 (MIP-1b)、CCL5 (RANTES)、CCL7 (MCP-3)、CCL8 (mcp-2)、CCL11 (嗜伊红粒细胞趋化蛋白)、CCL13 (MCP-4)、CCL15 (MIP-1d)、CCL16 (HCC-4)、CCL17 (TARC)、CCL18 (PARC)、CCL19 (MIP-3b)、CCL20 (MIP-3a)、CCL21 (SLC/exodus-2)、CCL22 (MDC/STC-1)、CCL23 (MPIF-1)、CCL24 (MPIF-2/嗜伊红粒细胞趋化蛋白-2)、CCL25 (TECK)、CCL26 (嗜伊红粒细胞趋化蛋白-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 (淋巴细胞趋化蛋白)、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、和 VHL。本发明的结合蛋白能够结合选自整联蛋白的细胞表面蛋白。本发明的结合蛋白能够结合选自激酶和蛋白酶的酶。本发明的结合蛋白能够结合选自淋巴因子受体、单核因子受体、和多肽激素受体的受体。

[0027] 在优选实施方案中,结合蛋白是多价的。更优选地结合蛋白是多特异性的。上文所述的多价和或多特异性结合蛋白具有特别从治疗观点来看需要的特性。例如,多价和或多特异性结合蛋白可以(1)经由细胞比二价抗体更快速内在化(和/或发生分解代谢),所述细胞表达抗体与之结合的抗原;(2)是激动剂抗体;和/或(3)诱导表达多价抗体能够与之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,经由表达抗体与之结合的抗原的细胞内在化(和/或发生分解代谢)的抗体;和/或可以是激动剂、细胞死亡诱导、和/或细胞凋亡诱导性抗体,且如本文所述的多价和或多特异性结合蛋白可以展示这些特性中的一种或多种中的改善。此外,亲本抗体可以缺乏这些特性中的一种或多种,但如本文所述构建为多价结合蛋白时可以赋予这些特性。

[0028] 在另一个实施方案中,如通过表面等离子体共振测量的,本发明的结合蛋白具有的对于一种或多种靶的结合速率(on rate)常数( $K_{on}$ )选自: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 $10^5 M^{-1} s^{-1}$ ;和至少约 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 。优选地,如通过表面等离子体共振测量的,本发明的结合蛋白对于一种或多种靶具有的结合速率常数( $K_{on}$ )为 $10^2 M^{-1} s^{-1}$ - $10^3 M^{-1} s^{-1}$ ;  $10^3 M^{-1} s^{-1}$ - $10^4 M^{-1} s^{-1}$ ;  $10^4 M^{-1} s^{-1}$ - $10^5 M^{-1} s^{-1}$ ; 或 $10^5 M^{-1} s^{-1}$ - $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 。

[0029] 在另一个实施方案中,如通过表面等离子体共振测量的,结合蛋白具有的对于一种或多种靶的解离速率(off rate)常数( $K_{off}$ )选自:至多约 $10^{-3} s^{-1}$ ;至多约 $10^{-4} s^{-1}$ ;至多约 $10^{-5} s^{-1}$ ;和至多约 $10^{-6} s^{-1}$ 。优选地,如通过表面等离子体共振测量的,本发明的结合蛋白具有的对于一种或多种靶的解离速率常数( $K_{off}$ )为 $10^{-3} s^{-1}$ - $10^{-4} s^{-1}$ ;  $10^{-4} s^{-1}$ - $10^{-5} s^{-1}$ ; 或 $10^{-5} s^{-1}$ - $10^{-6} s^{-1}$ 。

[0030] 在另一个实施方案中,结合蛋白具有的对于一种或多种靶的解离常数( $K_D$ )选自:至多约 $10^{-7} M$ ;至多约 $10^{-8} M$ ;至多约 $10^{-9} M$ ;至多约 $10^{-10} M$ ;至多约 $10^{-11} M$ ;至多约 $10^{-12} M$ ;和至多 $10^{-13} M$ 。优选地,本发明的结合蛋白具有的对于 IL-12 或 IL-23 的解离常数( $K_D$ )为 $10^{-7} M$ - $10^{-8} M$ ;  $10^{-8} M$ - $10^{-9} M$ ;  $10^{-9} M$ - $10^{-10} M$ ;  $10^{-10}$ - $10^{-11} M$ ;  $10^{-11} M$ - $10^{-12} M$ ; 或 $10^{-12}$ - $10^{-13} M$ 。

[0031] 在另一个实施方案中,上文所述的结合蛋白是进一步包含选自下述的试剂的缀合物:免疫粘附分子、显像剂、治疗剂和细胞毒性剂。优选地显像剂选自放射性标记、酶、荧光标记、发光标记、生物发光标记、磁性标记、和生物素。更优选地显像剂是选自下述的放射性标记: $^3H$ 、 $^{14}C$ 、 $^{35}S$ 、 $^{90}Y$ 、 $^{99}Tc$ 、 $^{111}In$ 、 $^{125}I$ 、 $^{131}I$ 、 $^{177}Lu$ 、 $^{166}Ho$ 、和 $^{153}Sm$ 。优选地,治疗或细胞毒性剂选自抗代谢物、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、葱环类、毒素、和细胞凋亡剂。

[0032] 在另一个实施方案中,上文所述的结合蛋白是结晶结合蛋白且作为晶体存在。优选地,晶体是无载体的药学控释晶体。更优选地,结晶结合蛋白具有比所述结合蛋白的可溶性配对物更长的体内半衰期。最优选地,结晶结合蛋白保留生物活性。

[0033] 在另一个实施方案中,上文所述的结合蛋白是糖基化的。优选地糖基化是人糖基化模式。

[0034] 本发明的一个方面涉及编码上文公开的任何一种结合蛋白的分离的核酸。进一步的实施方案提供包含上文公开的分离的核酸的载体,其中所述载体选自 pcDNA; pTT(Durocher 等人, *Nucleic Acids Research* 2002, 第 30 卷, No. 2); pTT3(具有另外的多克隆位点的 pTT); pEFBOS(Mizushima, S. 和 Nagata, S., (1990) *Nucleic acids Research* 第

18 卷, No. 17) ;pBV ;pJV ;pcDNA3.1 TOPO, pEF6 TOPO 和 pBJ。

[0035] 在另一个方面, 宿主细胞用上文公开的载体转化。优选地宿主细胞是原核细胞。更优选地宿主细胞是大肠杆菌 (*E. coli*)。在相关实施方案中, 宿主细胞是真核细胞。优选地真核细胞选自原生生物细胞、动物细胞、植物细胞和真菌细胞。更优选地宿主细胞是哺乳动物细胞, 包括但不限于, CHO 和 COS ;或真菌细胞例如啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) ;或昆虫细胞例如 Sf9。

[0036] 本发明的另一个方面提供了生产上文公开的结合蛋白的方法, 所述方法包括在足以生产结合蛋白的条件下, 在培养基中培养同样在上文公开的任何一种宿主细胞。优选地通过这种方法生产的 50% -75% 的结合蛋白是双重特异性四价结合蛋白。更优选地通过这种方法生产的 75% -90% 的结合蛋白是双重特异性四价结合蛋白。最优选地生产的 90% -95% 的结合蛋白是双重特异性四价结合蛋白。

[0037] 另一个实施方案提供了根据上文公开的方法生产的结合蛋白。

[0038] 一个实施方案提供了用于释放结合蛋白的组合物, 其中所述组合物包含制剂, 所述制剂依次包含如上文公开的结晶结合蛋白和成分 ;以及至少一种聚合载体。优选地聚合载体是选自下述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、聚酞、聚酯肽、聚酯、聚乳酸、乳酸 - 乙醇酸共聚物或 PLGA、聚  $\beta$ - 羟基丁酸酯、聚己内酯、聚二氧杂环己酮 (poly(dioxanone))、聚乙二醇、聚 (羟丙基) 甲基丙烯酰胺、聚有机磷氰、聚原酸酯、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、马来酞 - 烷基乙烯基醚共聚物、pluronic 多元醇、清蛋白、藻酸盐、纤维素和纤维素衍生物、胶原、血纤蛋白、明胶、透明质酸、寡糖、糖胺聚糖 (glycaminoglycans)、硫酸化多糖 (polysaccharides)、掺合物及其共聚物。优选地, 成分选自清蛋白、蔗糖、海藻糖、乳糖醇 (lactitol)、明胶、羟丙基 -  $\beta$  - 环糊精、甲氧基聚乙二醇和聚乙二醇。另一个实施方案提供了用于治疗哺乳动物的方法, 所述方法包括给哺乳动物施用有效量的上文公开的组合物的步骤。

[0039] 本发明还提供了药物组合物, 所述药物组合物包含如上文公开的结合蛋白和药学可接受的载体。在进一步的实施方案中, 药物组合物包含用于治疗病症的至少一种另外的治疗剂。优选地另外的试剂选自 :治疗剂, 显像剂, 细胞毒性剂, 血管发生抑制剂 (包括但不限于抗 VEGF 抗体或 VEGF-trap) ;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 CD20) ;粘附分子阻断剂 (包括但不限于抗 LFA-1Abs、抗 E/L 选择蛋白 Abs、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、抗 IL-6/ 细胞因子受体抗体) ;氨甲蝶呤 ;环孢菌素 ;雷帕霉素 ;FK506 ;可检测标记或报道分子 ;TNF 拮抗剂 ;抗风湿剂 ;肌肉弛缓剂, 麻醉药, 非类固醇消炎药 (NSAID), 止痛剂, 麻醉剂, 镇静剂, 局部麻醉剂, 神经肌肉阻断剂 ;抗微生物剂, 抗牛皮癣剂, 皮质类固醇, 促蛋白合成类固醇, 促红细胞生成素, 免疫接种, 免疫球蛋白, 免疫抑制剂, 生长激素, 激素替代药物, 放射性药物, 抗抑郁药, 抗精神病药, 刺激剂, 哮喘药物治疗,  $\beta$  激动剂, 吸入类固醇, 肾上腺素或类似物, 细胞因子, 和细胞因子拮抗剂。

[0040] 在另一个方面, 本发明提供了用于治疗患有病症的人受试者的方法, 在所述病症中能够由上文公开的结合蛋白结合的一种或多种靶是有害的, 所述方法包括给人受试者施用上文公开的结合蛋白, 从而使得人受试者中的一种或多种靶的活性被抑制且达到治疗。优选地病症选自关节炎、骨关节炎、青少年慢性关节炎、脓毒性关节炎、莱姆关节炎、牛皮癣

性关节炎、反应性关节炎、脊椎关节病、全身性红斑狼疮、Crohn 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、变应性疾病、牛皮癣、皮炎硬皮病、移植物抗宿主病、器官移植排斥、与器官移植相关的急性或慢性免疫性疾病、肉状瘤病、动脉粥样硬化、弥散性血管内凝血、Kawasaki 氏病、Grave 氏病、肾病综合征、慢性疲乏综合征、韦格纳氏肉芽肿病、过敏性紫癜 (Henoch-Schoenleinpurpura)、肾显微血管炎、慢性活动性肝炎、葡萄膜炎、脓毒性休克、中毒性休克综合征、脓毒症综合征、恶病质、传染病、寄生虫病、获得性免疫缺陷综合征、急性横贯性脊髓炎、亨廷顿氏舞蹈病、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、中风、原发性胆汁性肝硬化、溶血性贫血、恶性肿瘤、心力衰竭、心肌梗死、Addison 氏病、散发性多腺性 I 型缺乏和多腺性 II 型缺乏、Schmidt 氏综合征、成人 (急性) 呼吸窘迫综合征、秃头、斑秃 (alopecia areata)、血清反应阴性关节病 (arthopathy)、关节病、Reiter 氏病、牛皮癣性关节炎、溃疡性结肠炎性关节炎、肠病性滑膜炎、衣原体、耶尔森氏菌和沙门氏菌相关性关节病、脊椎关节病 (spondyloarthopathy)、动脉粥样化疾病 / 动脉硬化、特应性变态反应、自身免疫性大疱性疾病、寻常天疱疮、落叶状天疱疮、类天疱疮、线性 IgA 疾病、自身免疫性溶血性贫血、Coombs 阳性溶血性贫血、获得性恶性贫血、青少年性恶性贫血、肌痛脑炎 / Royal Free 疾病、慢性粘膜皮肤念珠菌病、巨细胞性动脉炎、原发性硬化性肝炎、隐源性自身免疫性肝炎、获得性免疫缺陷病综合征、获得性免疫缺陷相关病、乙型肝炎、丙型肝炎、常见的各种免疫缺陷 (常见的可变低丙种球蛋白血症)、扩张型心肌病、女性不育、卵巢衰竭、过早卵巢衰竭、纤维化肺疾病、隐源性纤维化肺泡炎、炎症后间质性肺病、间质性肺炎、结缔组织病相关性间质性肺病、混合性结缔组织病相关性肺病、全身性硬皮病相关性间质性肺病、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、皮炎 / 多肌炎相关性肺病、Sjögren 氏病相关性肺病、强直性脊柱炎相关性肺病、脉管炎性弥散性肺病、含铁血黄素沉着病相关性肺病、药物诱导的间质性肺病、纤维化、放射性纤维化、闭塞性细支气管炎、慢性嗜酸性肺炎、淋巴细胞性浸润性肺病、传染后间质性肺病、痛风性关节炎、自身免疫性肝炎、1 型自身免疫性肝炎 (传统自身免疫性或狼疮样肝炎)、2 型自身免疫性肝炎 (抗 LKM 抗体肝炎)、自身免疫介导的低血糖、具有黑棘皮症的 B 型胰岛素耐受性、甲状旁腺机能减退、与器官移植相关的急性免疫性疾病、与器官移植相关的慢性免疫性疾病、骨关节炎、原发性硬化性胆管炎、1 型牛皮癣、2 型牛皮癣、特发性白细胞减少 (leucopaenia)、自身免疫性嗜中性白细胞减少症、肾脏病 NOS、肾小球肾炎 (glomerulonephritides)、肾显微血管炎 (vasculitis)、莱姆病、盘状红斑狼疮、特发性男性不育症或 NOS、精子自身免疫性、多发性硬化 (所有亚型)、交感性眼炎、结缔组织病继发的肺动脉高压、Goodpasture 氏综合征、结节性多动脉炎的肺表现、急性风湿热、类风湿性脊椎炎、Still 氏病、全身性硬皮病、Sjörgren 氏综合征、Takayasu 氏病 / 动脉炎、自身免疫性血小板减少症、特发性血小板减少症、自身免疫性甲状腺病、甲状腺机能亢进、甲状腺肿性 (goitrous) 自身免疫性甲状腺功能减退 (Hashimoto 氏病)、萎缩性自身免疫性甲状腺功能减退、原发性粘液性水肿、晶状体性 (phacogenic) 葡萄膜炎、原发性血管炎、白癜风急性肝病、慢性肝病、酒精性肝硬化、酒精诱导的肝损伤、choleostatis、特应性肝病、药物诱导的肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、变态反应和哮喘、B 群链球菌 (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、急性和慢性痛 (不同形式的疼痛)、以及癌症例如肺、乳腺、胃、膀胱、结肠、胰、卵巢、前列腺和直肠癌以及造血恶性肿瘤 (白血病和淋巴瘤)、无  $\beta$  脂蛋白

血症 (Abetalipoproteinemia)、手足发绀、急性和慢性寄生或感染过程、急性白血病、急性成淋巴细胞性白血病 (ALL)、急性髓细胞样白血病 (AML)、急性或慢性细菌感染、急性胰腺炎、急性肾功能衰竭、腺癌、心房 (aerial) 异位搏动、AIDS 痴呆复征、酒精诱导的肝炎、变应性结膜炎、过敏性接触性皮炎、变应性鼻炎、同种异体移植物排斥、 $\alpha$ -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 (horn cell) 变性、抗 cd3 治疗、抗磷脂综合征、抗受体超敏反应、主 (aortic) 和周围性动脉瘤 (aneurysms)、主动脉壁夹层形成、高血压、动脉硬化、动静脉瘘、共济失调、心房纤维颤动 (持续性或阵发性)、心房扑动、房室传导阻滞、B 细胞淋巴瘤、骨移植物排斥、骨髓移植 (BMT) 排斥、束支传导阻滞、Burkitt 氏淋巴瘤、烧伤、心律失常、心脏震晕综合征、心脏肿瘤、心肌病、心肺分流术炎症应答、软骨移植排斥、小脑皮质变性、小脑病症、紊乱性或多源性房性心动过速、化学疗法相关病症、慢性髓细胞性白血病 (CML)、慢性酒精中毒、慢性炎性病理学、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、慢性阻塞性肺部疾病 (COPD)、慢性水杨酸盐中毒、结肠直肠癌、充血性心力衰竭、结膜炎、接触性皮炎、肺源性心脏病、冠状动脉疾病、Creutzfeldt-Jakob 病、培养物阴性脓毒症、囊性纤维化、细胞因子疗法相关病症、拳击员痴呆 (Dementia pugilistica)、脱髓鞘病、登革出血热、皮炎、皮肤病学状况、多尿症、糖尿病、糖尿病性动脉硬化性 (arteriosclerotic) 疾病、弥漫性 Lewy 小体病、扩张性充血性心肌病、基底神经节病症、中年唐氏综合征、由阻断 CNS 多巴胺受体的药物诱导的运动障碍、药物敏感性、湿疹、脑脊髓炎、心内膜炎、内分泌病、会厌炎、EB 病毒感染、红斑性肢痛病、锥体外束和小脑病症、家族性嗜血性 (hematophagocytic) 淋巴组织细胞增多症、胎儿胸腺移植排斥、Friedreich 氏共济失调、功能性外周性动脉病症、真菌性脓毒症、气性坏疽病、胃溃疡、肾小球肾炎、任何器官或组织的移植物排斥、革兰氏阴性脓毒症、革兰氏阳性脓毒症、由于细胞内生物的肉芽肿、毛细胞性白血病、Hallerrordeh-Spatz 病、hashimoto 氏甲状腺炎、枯草热、心脏移植排斥、血色素沉着症、血液透析、溶血性尿毒症综合征 / 血栓溶解性血小板减少性紫癜、出血、肝炎 (A)、希氏束心律失常 (arrhythmias)、HIV 感染 / HIV 神经病、何杰金氏病、运动过度性运动障碍、超敏反应、超敏感性肺炎、高血压、运动机能减退性运动障碍、下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴评价、特发性 Addison 氏病、特发性肺纤维化、抗体介导的细胞毒性、虚弱、婴儿型脊髓性肌萎缩、主动脉炎症、流行性感 a、电离辐射照射、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、青少年脊髓性肌萎缩、卡波西氏肉瘤、肾移植排斥、军团杆菌、利什曼病、麻风病、皮层脊髓系统损伤、脂肪水肿、肝移植排斥、淋巴水肿 (lymphedema)、疟疾、恶性淋巴瘤、恶性组织细胞增多症、恶性黑素瘤、脑膜炎、脑膜炎球菌血症、代谢性 / 特发性、偏头痛、线粒体多系统病症、混合型结缔组织病、单克隆丙种球蛋白病、多发性骨髓瘤、多系统变性 (MencelDejerine-Thomas Shi-Drager 和 Machado-Joseph)、重症肌无力、鸟胞内分支杆菌、结核分支杆菌、骨髓异常增生综合征、心肌梗死、心肌缺血性病症、鼻咽癌、新生儿慢性肺病、肾炎、肾变病、神经变性疾病、神经原性 I 肌萎缩、嗜中性粒细胞减少性发烧、非何杰金淋巴瘤、腹主动脉及其分支闭塞、闭塞性 (occlusive) 动脉病症、okt3 治疗、睾丸炎 / 附睾炎 (epididymitis)、睾丸炎 / 输精管切除术逆转操作、器官巨大症、骨质疏松症、胰移植排斥、胰癌、恶性肿瘤的肿瘤相关综合征 / 高钙血症、甲状旁腺移植排斥、盆腔炎症性疾病、常年性鼻炎、心包疾病、外周性动脉粥样硬化 (atherosclerotic) 疾病、外周血管病症、腹膜炎、恶性贫血、卡氏肺囊虫性肺

炎、肺炎、POEMS 综合征（多发性神经病、器官巨大症、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病、和皮肤变化综合征）、灌注后综合征、泵后综合征、MI 心切开后综合征、先兆子痫、进行性核上（supranucleo）麻痹、原发性肺动脉高压、放射治疗、Raynaud 氏现象和疾病、Raynoud 氏病、Refsum 氏病、常规狭窄 QRS 心动过速、肾血管性高血压、再灌注损伤、限制性心脏病、肉瘤、硬皮病、老年性舞蹈病、Lewy 小体型老年性痴呆、血清阴性关节病、中风、镰状细胞贫血、皮肤同种异体移植物排斥、皮肤变化综合征、小肠移植排斥、实体瘤、特殊心律失常（arrythmias）、脊髓性共济失调、脊髓小脑变性、链球菌肌炎、小脑结构损伤、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（anaphalaxis）、全身炎症反应综合征、全身发作性青少年类风湿性关节炎、T 细胞或 FAB ALL、毛细血管扩张、血栓闭塞性脉管炎、血小板减少症、毒性、移植物、创伤 / 出血、III 型超敏反应、IV 型超敏反应、不稳定心绞痛、尿毒症、尿脓毒病、荨麻疹、心脏瓣膜疾病、静脉曲张、血管炎、静脉疾病、静脉血栓形成、心室纤维性颤动、病毒和真菌感染、病毒性脑炎 / 无菌性脑膜炎、病毒相关性噬红细胞（hemaphagocytic）综合征、Wernicke-Korsakoff 综合征、Wilson 氏病、任何器官或组织的异种移植排斥。

[0041] 在另一个方面，本发明提供了治疗患有病症的患者的方法，所述方法包括在如上文讨论的第二种试剂施用之前、同时或之后，施用上文公开的任何一种结合蛋白的步骤。在优选实施方案中，第二种试剂选自布地萘德，表皮生长因子，皮质类固醇，环孢菌素，柳氮磺吡啶，氨基水杨酸盐，6- 巯基嘌呤，硫唑嘌呤，甲硝唑，脂肪加氧酶抑制剂，美沙拉秦，奥沙拉嗪，巴柳氮，抗氧化剂，血栓烷抑制剂，IL-1 受体拮抗剂，抗 IL-1 $\beta$  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 和 PDGF 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，氨甲蝶呤，环孢菌素，FK506，雷帕霉素，霉酚酸酯，来氟洛米，NSAIDs，布洛芬，皮质类固醇，强的松龙，磷酸二酯酶抑制剂，腺苷激动剂，抗凝剂，补体抑制剂，肾上腺素能药，IRAK，NIK，IKK，p38，MAP 激酶抑制剂，IL-1 $\beta$  转换酶抑制剂，TNF $\alpha$  转换酶抑制剂，T 细胞信号传导抑制剂，金属蛋白酶抑制剂，柳氮磺吡啶，硫唑嘌呤，6- 巯基嘌呤，血管紧张素转换酶抑制剂，可溶性细胞因子受体，可溶性 p55 TNF 受体，可溶性 p75 TNF 受体，sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R，抗炎细胞因子，IL-4、IL-10、IL-11、IL-13 和 TGF $\beta$ 。

[0042] 在优选实施方案中，上文公开的药物组合物经由选自下述的至少一种模式给受试者施用：肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内（intrarticular）、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、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、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、快速灌注（bolus）、阴道、直肠、口腔含化、舌下、鼻内、和经皮。

[0043] 本发明的一个方面提供针对本发明的至少一种结合蛋白的至少一种抗独特型抗体。抗独特型抗体包括包含分子的任何蛋白质或肽，所述分子包含至少部分免疫球蛋白分子，例如但不限于，重或轻链的至少一个互补性决定区（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，构架区，或；其可以掺入本发明的结合蛋白内的任何部分。

[0044] 在另一个实施方案中，本发明的结合蛋白能够结合选自下述的一种或多种靶：ABCF1；ACVR1；ACVR1B；ACVR2；ACVR2B；ACVRL1；ADORA2A；聚集蛋白聚糖；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 蛋 白 ) ;BRCA1 ;C19orf10 (IL27w) ;C3 ;C4A ;  
C5 ;C5R1 ;CANT1 ;CASP1 ;CASP4 ;CAV1 ;CCBP2 (D6/JAB61) ;CCL1 (I-309) ;CCL11 ( 嗜 伊  
红 粒 细 胞 趋 化 蛋 白 ) ;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 ;  
exodus-2 ;CCL22 (MDC/STC-1) ;CCL23 (MPIF-1) ;CCL24 (MPIF-2/ 嗜 伊 红 粒 细 胞 趋 化 蛋  
白 -2) ;CCL25 (TECK) ;CCL26 ( 嗜 伊 红 粒 细 胞 趋 化 蛋 白 -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 ;CD52 ;CD69 ;CD72 ;CD74 ;CD79A ;CD79B ;CD8 ;CD80 ;CD81 ;  
CD83 ;CD86 ;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 ( 密 蛋 白 -7) ;CLN3 ;CLU ( 簇 蛋 白 ) ;CMKLR1 ;CMKOR1 (RDC1) ;CNR1 ;  
COL18A1 ;COL1A1 ;COL4A3 ;COL6A1 ;CR2 ;CRP ;CSF1 (M-CSF) ;CSF2 (GM-CSF) ;CSF3 (GCSF) ;  
CTLA4 ;CTNNB1 (b- 连 环 蛋 白 ) ;CTSB ( 组 织 蛋 白 酶 B) ;CX3CL1 (SCYD1) ;CX3CR1 (V28) ;  
CXCL1 (GRO1) ;CXCL10 (IP-10) ;CXCL11 (I-TAC/IP-9) ;CXCL12 (SDF1) ;CXCL13 ;CXCL14 ;  
CXCL16 ;CXCL2 (GRO2) ;CXCL3 (GRO3) ;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 ;ENO1 ;ENO2 ;ENO3 ;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 ;GF11 ;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-a ;IFNA1 ;IFNA2 ;IFNA4 ;IFNA5 ;IFNA6 ;IFNA7 ;  
IFNB1 ;IFN $\gamma$  ;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 ; IL1RL2 ; IL1RN ; 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 整联蛋白) ; ITGAV ; ITGB3 ; ITGB4(b4 整联蛋白) ; 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(瘦蛋白) ; Lingo-p75 ; Lingo-Troy ; LPS ; LTA(TNF-b) ; LTB ; LTBR(GPR16) ; LTBR2 ; 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(metallothionectin)-III) ; MTSS1 ; MUC1(粘蛋白) ; MYC ; MYD88 ; NCK2 ; 神经蛋白聚糖 ; NFKB1 ; NFKB2 ; NGFB(NGF) ; NGFR ; NgR-Lingo ; NgR-Nogo66(Nogo) ; NgR-p75 ; NgR-Troy ; NME1(NM23A) ; NOX5 ; NPPB ; NROB1 ; NROB2 ; 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 ; P2RX7 ; PAP ; PART1 ; PATE ; PAWR ; PCA3 ; PCNA ; PDGFA ; PDGFB ; PECAM1 ; PF4(CXCL4) ; PGF ; PGR ; 磷酸聚糖(phosphacan) ; 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) ; ROB2 ; S100A2 ; SCGB1D2(亲脂素 B) ; SCGB2A1(乳腺珠蛋白(mammaglobin)2) ; SCGB2A2(乳腺珠蛋白1) ; SCYE1(内皮单核细胞活化细胞因子) ; SDF2 ; SERPINA1 ; SERPINA3 ; SERPINB5(乳腺丝抑蛋白) ; 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 ; TGFB1 ; TGFB1R1 ; TGFB1R2 ; TGFB1R3 ; TH1L ; THBS1(血小板反应蛋白-1) ; THBS2 ; THBS4 ; THPO ; TIE(Tie-1) ; TIMP3 ; 组织因子 ; TLR10 ; TLR2 ; TLR3 ; TLR4 ; TLR5 ; TLR6 ; TLR7 ; TLR8 ; TLR9 ; TNF ; TNF-a ; TNFAIP2(B94) ; TNFAIP3 ; TNFRSF11A ; TNFRSF1A ; TNFRSF1B ; TNFRSF21 ; TNFRSF5 ; TNFRSF6(Fas) ; TNFRSF7 ; TNFRSF8 ; TNFRSF9 ; TNFSF10(TRAIL) ; TNFSF11(TRANCE) ; TNFSF12(APO3L) ; 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 ; Toll 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 ; VHL C5 ; VLA-4 ; XCL1(淋巴细胞趋化蛋白) ; XCL2(SCM-1b) ; XCR1(GPR5/CCXCR1) ; YY1 ; 和 ZFPM2。

#### [0045] 附图简述

[0046] 图 1A 是双重可变结构域(DVD)-Ig 构建体的示意图示,且显示了从 2 种亲本抗体产生 DVD-Ig 的策略;图 1B 是构建体 DVD1-Ig、DVD2-Ig,以及来自杂交瘤克隆 2D13.E3(抗-IL-1 $\alpha$ )和 13F5.G5(抗-IL-1 $\beta$ )的 2 种嵌合单特异性抗体的示意图示。

#### [0047] 发明详述

[0048] 本发明涉及能够 2 种或更多抗原的多价和 / 或多特异性结合蛋白。具体而言, 本发明涉及双重可变结构域免疫球蛋白 (DVD-Ig)、及其药物组合物、以及用于制备此类 DVD-Igs 的核酸、重组表达载体和宿主细胞。本发明还包含了使用本发明的 DVD-Igs 在体外或体内检测特异性抗原的方法。

[0049] 除非本文另有定义, 连同本发明使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。术语的含义和范围应当清晰, 然而, 在任何潜在不明确性的情况下, 本文提供的定义优先于任何字典或外来定义。此外, 除非上下文另有要求, 单数术语应包括复数, 且复数术语应包括单数。在本申请中, 除非另有说明, “或” 的使用意味着“和 / 或”。此外, 术语“包括” 及其他形式的使用是非限制性的。同样, 除非另有具体说明, 术语例如“元件” 或“组分” 涵盖包含一个单位的元件和组分以及包含超过一个亚单位的元件和组分。

[0050] 一般地, 连同本文描述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学和杂交使用的命名法和其技术是本领域众所周知和通常使用的那些。除非另有说明, 本发明的方法和技术一般根据本领域众所周知, 且如各种一般和更具体的参考文献中所述的常规方法来进行, 所述参考文献在本说明书自始至终引用和讨论。酶促反应和纯化技术根据制造商的说明书、如本领域通常实现的或如本文所述来进行。连同本文描述的分析化学、合成有机化学以及医学和药物化学使用的命名法、以及其实验室程序和技术是本领域众所周知和通常使用的那些。使用标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配制、和递送、以及患者治疗。

[0051] 本发明可以更容易地理解, 选择的术语在下文定义。

[0052] 如本文使用的, 术语“多肽” 指氨基酸的任何聚合链。术语“肽” 和“蛋白质” 可与术语多肽互换使用, 且同样指氨基酸的聚合链。术语“多肽” 包含天然或人工蛋白质、蛋白质片段和蛋白质序列的多肽类似物。多肽可以是单体或聚合的。

[0053] 术语“分离的蛋白质” 或“分离的多肽” 是由于其衍生起源或来源不与天然结合的组分结合, 所述天然结合的组分在其天然状态下与其伴随; 基本上不含来自相同物种的其他蛋白质; 由来自不同物种的细胞表达; 或在自然界中不存在的蛋白质或多肽。因此, 化学合成或在不同于其天然起源的细胞的细胞系统中合成的多肽将是与其天然结合的组分“分离的”。蛋白质还可以通过分离, 使用本领域众所周知的蛋白质纯化技术, 使得基本上不含天然结合的组分。

[0054] 如本文使用的, 术语“回收” 指通过分离, 例如使用本领域众所周知的蛋白质纯化技术, 使得化学种类例如多肽基本上不含天然结合的组分的过程。

[0055] 如本文使用的, “生物学活性” 指抗原的所有固有生物学特性。生物学特性包括但不限于结合受体; 诱导细胞增殖, 抑制细胞生长, 诱导其他细胞因子, 诱导细胞凋亡, 和酶促活性。

[0056] 如本文使用的, 关于抗体、蛋白质、或肽与第二种化学种类相互作用的术语“特异性结合” 或“特异地结合”, 意指相互作用取决于化学种类上特定结构 (例如, 抗原决定簇或表位) 的存在; 例如, 抗体识别且与特定蛋白质结构结合而不是一般地与蛋白质结合。如果抗体对表位“A” 特异, 那么在包含标记的“A” 和抗体的反应中, 包含表位 A 的分子 (或游离的, 未标记的 A) 的存在将减少与抗体结合的标记的 A 的量。

[0057] 如本文使用的, 术语“抗体” 广泛地指包含 4 条多肽链 -2 条重 (H) 链和 2 条轻 (L)

链的任何免疫球蛋白 (Ig) 分子,或其保留 Ig 分子的基本表位结合特征的任何功能片段、突变体、变体或衍生。此类突变体、变体或衍生抗体形式是本领域已知的。其非限制性实施方案在下文讨论。

[0058] 在全长抗体中,每条重链包含重链可变区(在本文中缩写为 HCVR 或 VH)和重链恒定区。重链恒定区包含 3 个结构域 CH1、CH2 和 CH3。每条轻链包含轻链可变区(在本文中缩写为 LCVR 或 VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含 1 个结构域 CL。VH 和 VL 区可以进一步细分成称为互补性决定区(CDR)的高变区,用称为构架区(FR)的较保守区域点缀。每个 VH 和 VL 由 3 个 CDRs 和 4 个 FRs 组成,以下列顺序从氨基末端到羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)、种类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)或亚类。

[0059] 术语“Fc 区”用于定义免疫球蛋白重链的 C 末端区域,它可以通过完整抗体的木瓜蛋白酶消化来产生。Fc 区可以是天然序列 Fc 区或变体 Fc 区。免疫球蛋白的 Fc 区一般包含 2 个恒定结构域-CH2 结构域和 CH3 结构域,且任选包含 CH4 结构域。Fc 区中改变抗体效应子作用的氨基酸残基替换是本领域已知的(Winter 等人,美国专利号 5,648,260 ;5624821)。抗体的 Fc 部分介导几种重要的效应子作用,例如细胞因子诱导、ADCC、吞噬作用、依赖补体的细胞毒性(CDC)以及抗体和抗原-抗体复合物的半衰期/清除率。取决于治疗目的,在一些情况下这些效应子作用对于治疗抗体是所需的,但在其他情况下可能是不必要的或甚至有害的。某些人 IgG 同种型,特别是 IgG1 和 IgG3,经由分别与 Fc  $\gamma$  Rs 和补体 C1q 结合介导 ADCC 和 CDC。新生 Fc 受体(FcRn)是决定抗体循环半衰期的关键组分。在另外一个实施方案中,至少一个氨基酸残基在抗体恒定区例如抗体 Fc 区中进行替换,从而使得抗体的效应子作用被改变。免疫球蛋白的 2 条相同重链的二聚化由 CH3 结构域的二聚化来介导,且通过铰链区内的二硫键来稳定(Huber 等人,Nature ;264 :415-20 ;Thies 等人,1999 J Mol Biol ;293 :67-79.)。铰链区内的半胱氨酸残基突变以阻止重链-重链二硫键将使 CH3 结构域的二聚化不稳定。负责 CH3 二聚化的残基已得到鉴定(Dall'Acqua 1998 Biochemistry 37 :9266-73.)。因此,可能产生单价半-Ig。有趣的是,已在自然界中发现关于 IgG 和 IgA 亚类的这些单价半 Ig 分子(Seligman 1978 Ann Immunol129 :855-70. ;Biewenga 等人,1983 Clin Exp Immunol 51 :395-400)。FcRn:Ig Fc 区的化学计量已测定为 2 : 1(West 等人,2000 Biochemistry39 :9698-708),且半 Fc 足以介导 FcRn 结合(Kim 等人,1994 Eur JImmunol ;24 :542-548.)。破坏 CH3 结构域二聚化的突变可能对其 FcRn 结合没有更大的不利作用,因为对于 CH3 二聚化重要的残基位于 CH3 b 折叠结构的内界面上,而负责 FcRn 结合的区域位于 CH2-CH3 结构域的外界面上。然而,由于其比常规抗体的那种更小的尺寸,半 Ig 分子可以在组织穿透中具有某些优点。在一个实施方案中,至少一个氨基酸残基在本发明的结合蛋白的恒定区例如 Fc 区中进行替换,从而使得重链的二聚化被破坏,从而产生半 DVD Ig 分子。

[0060] 如本文使用的,术语抗体的“抗原结合部分”(或简单地“抗体部分”),指保留与抗原特异性结合的能力的一种或多种抗体片段。已显示抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段来执行。此种抗体实施方案也可以是双特异性、双重特异性、或多特异性形式;与 2 种或更多抗原特异性结合。包含在术语抗体的“抗原结合部分”内的结合片段的例子包括 (i) Fab 片段,由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub> 片段,包含

由铰链区的二硫键连接的 2 个 Fab 片段的二价片段；(iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；(iv) 由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段，(v) dAb 片段 (Ward 等人, (1989) Nature 341 :544-546, Winter 等人, PCT 公开 WO 90/05144A1, 引入本文作为参考), 它包含单个可变结构域；和 (vi) 分离的互补性决定区 (CDR)。此外, 尽管 Fv 片段的 2 个结构域 VL 和 VH 由分开的基因编码, 但它们可以使用重组方法通过合成接头来连接, 所述合成接头使得它们能够作为单条蛋白质链制备, 在所述单条蛋白质链中 VL 和 VH 区配对以形成单价分子 (称为单链 Fv (scFv) ; 参见, 例如, Bird 等人, (1988) Science 242 :423-426 ; 和 Huston 等人, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :5879-5883)。此种单链抗体也预期包含在术语抗体的“抗原结合部分”内。也包含其他形式的单链抗体例如双抗体。双抗体是二价、双特异性抗体, 其中 VH 和 VL 结构域在单条多肽链上表达, 但使用的接头太短而不允许相同链上的 2 个结构域之间的配对, 从而促使结构域与另一条链的互补结构域配对且产生 2 个抗原结合部位 (参见例如, Holliger, P. 等人, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6444-6448 ; Poljak, R. J. 等人, (1994) Structure 2 :1121-1123)。此种抗体结合部分是本领域已知的 (Kontermann 和 Dubel eds. Antibody Engineering. (2001) Springer-Verlag. New York. 第 790 页 (ISBN 3-540-41354-5)。此外单链抗体还包括包含一对串联 Fv 区段 (VH-CH1-VH-CH1) 的“线性抗体”, 所述串联 Fv 区段连同互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区域 (Zapata 等人, Protein Eng. 8(10) :1057-1062 (1995) ; 和美国专利号 5, 641, 870)。

[0061] 术语“多价结合蛋白”在本说明书自始至终用于指包含 2 种或更多抗原结合部位的结合蛋白。多价结合蛋白优选工程改造为具有 3 个或更多抗原结合部位, 且一般不是天然存在的抗体。术语“多特异性结合蛋白”指能够结合 2 种或更多相关或无关靶的结合蛋白。本发明的双重可变结构域 (DVD) 结合蛋白包含 2 个或更多抗原结合部位, 且是四价或多价结合蛋白。DVDs 可以是单特异性的, 即能够结合一种抗原, 或多特异性的, 即能够结合 2 种或更多抗原。包含 2 条重链 DVD 多肽和 2 条轻链 DVD 多肽的 DVD 结合蛋白称为 DVD Ig。每一半 DVD Ig 包含重链 DVD 多肽, 和轻链 DVD 多肽, 和 2 个抗原结合部位。每个结合部位包含重链可变结构域和轻链可变结构域, 其中每个抗原结合部位总共 6 个涉及抗原结合的 CDRs。

[0062] 如本文使用的, 术语“双特异性抗体”指通过下述产生的全长抗体, 四源杂交瘤技术 (参见 Milstein, C. 和 A. C. Cuello, Nature, 1983. 305 (5934) :第 537-40 页), 2 种不同 mAbs 的化学缀合 (参见 Staerz, UD. 等人, Nature, 1985. 314 (6012) :第 628-31 页), 或结进孔或在 Fc 区中引入突变的类似方法 (参见 Holliger, P., T. Prospero 和 G. Winter, Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90 (14) :第 6444-8. 18 页), 从而导致其中只有一种是功能性双特异性抗体的多种不同免疫球蛋白种类。通过分子功能, 双特异性抗体结合其 2 个结合臂之一 (1 对 HC/LC) 上的一种抗原 (或表位), 且结合其第二个臂 (不同对的 HC/LC) 上的不同抗原 (或表位)。通过这个定义, 双特异性抗体具有 2 个不同的抗原结合臂 (在特异性和 CDR 序列中), 且对于其结合的每种抗原是单价的。

[0063] 如本文使用的, 术语“双重特异性抗体”指可以在其 2 个结合臂的每一个中 (一对 HC/LC) 结合 2 种不同抗原 (或表位) 的全长抗体 (参见 PCT 公开 WO 02/02773)。因此双重特异性结合蛋白具有 2 个相同的抗原结合臂, 具有相同的特异性和相同的 CDR 序列, 且对于其结合的每种抗原是二价的。

[0064] 结合蛋白的“功能性抗原结合部位”是能够结合靶抗原的结合部位。抗原结合部位的抗原结合亲和力不必与抗原结合部位由其衍生的亲本抗体一样强,但结合抗原的能力必须是可使用已知用于评估与抗原结合的抗体的多种方法中的任何一种测量的。此外,本文的多价抗体的每个抗原结合部位的抗原结合亲和力无需在量上相同。

[0065] 术语“细胞因子”是由一种细胞群体释放的蛋白质的一般术语,所述蛋白质作为细胞间介质作用于另一种细胞群体。此类细胞因子的例子是淋巴因子、单核因子、和常规的多肽激素。在细胞因子中包括的是生长激素例如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素、和牛生长激素;甲状旁腺激素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原;糖蛋白激素例如促卵泡激素(FSH),促甲状腺激素(TSH),和黄体生成素(LH);肝生长因子;成纤维细胞生长因子;催乳素;胎盘催乳素;肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和 $\beta$ ;米勒抑制物质;小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;活化素;血管内皮生长因子;整联蛋白;血小板生成素(TPO);神经生长因子例如NGF- $\alpha$ ;血小板生长因子;转化生长因子(TGFs)例如TGF- $\alpha$ 和TGF- $\beta$ ;胰岛素样生长因子-1和-11;促红细胞生成素(EPO);骨诱导因子;干扰素例如干扰素- $\alpha$ 、- $\beta$ 和- $\gamma$ 集落刺激因子(CSFs)例如巨噬细胞-CSF(M-CSF);粒细胞巨噬细胞-CSF(GM-CSF);和粒细胞-CSF(G-CSF);白细胞介素(ILs)例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23;肿瘤坏死因子例如TNF- $\alpha$ 或TNF- $\beta$ ;及其他多肽因子包括LIF和kit配体(KL)。如本文使用的,术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养的蛋白质,以及天然序列细胞因子的生物学活性等价物。

[0066] 术语“接头”用于指包含通过肽键连接的2个或更多氨基酸残基的多肽,且用于连接一个或多个抗原结合部分。此种接头多肽是本领域众所周知的(参见例如,Holliger, P. 等人,(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA $90$ :6444-6448; Poljak, R. J. 等人,(1994)Structure  $2$ :1121-1123)。优选的接头包括但不限于,AKTTPKLEEGEFSEAR;AKTTPKLEEGEFSEARV;AKTTPKLGG;SAKTPKLGG;AKTTPKLEEGEFSEARV;SAKTP;SAKTPKLGG;RADAAP;RADAAPTVS;RADAAAAGGPGS;RADAAA(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>;SAKTP;SAKTPKLGG;SAKTPKLEEGEFSEARV;ADAAP;ADAAPTVSIFPP;TVAAP;TVAAPSVFIFPP;QPKAAP;QPKAAPSVTLFPP;AKTTPP;AKTTPPSVTPLAP;AKTTAP;AKTTAPSVYPLAP;ASTKGP;ASTKGPSVFPLAP。

[0067] 免疫球蛋白恒定结构域指重或轻链恒定结构域。人IgG重链和轻链恒定结构域氨基酸序列是本领域已知的。

[0068] 如本文使用的,术语“单克隆抗体”指从基本上均质抗体群体中获得的抗体,即构成群体的个别抗体是相同的,除了可以少量存在的可能天然存在的突变。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一抗原。此外,与一般包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂形成对照,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。修饰语“单克隆”不应解释为需要通过任何具体方法生产抗体。

[0069] 如本文使用的,术语“人抗体”预期包括具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包括例如在CDRs且特别是CDR3中,不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,在体外通过随机或定点诱变或在体内通过体细胞突变引入的突变)。然而,如本文使用的,术语“人抗体”不预期包括其中来源于另一种哺乳动物物种例如小鼠种系的CDR序列已嫁接到人构架序列上的抗体。

[0070] 如本文使用的,术语“重组人抗体”预期包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的所有人抗体,例如使用转染到宿主细胞内的重组表达载体表达的抗体(在下文部分 II C 中进一步描述),从重组、组合人抗体文库中分离的抗体(Hoogenboom H. R., (1997) *TIB Tech.* 15 :62-70;Azzazy H. 和 Highsmith W. E., (2002) *Clin. Biochem.* 35 :425-445;Gavilondo J. V. 和 Larrick J. W. (2002) *BioTechniques* 29 :128-145;Hoogenboom H. 和 Chames P. (2000) *Immunology Today* 21 :371-378),从对于人免疫球蛋白基因是转基因的动物(例如小鼠)中分离的抗体(参见例如, Taylor, L. D. 等人, (1992) *Nucl. Acids Res.* 20 :6287-6295;Kellermann S-A. 和 Green L. L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13 :593-597;Little M. 等人, (2000) *Immunology Today* 21 :364-370),或通过包括使人免疫球蛋白基因序列与其他 DNA 序列剪接的任何其他方法制备、表达、产生或分离的抗体。此种重组人抗体具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区。然而,在某些实施方案中,对此种重组人抗体实施体外诱变(或,当使用对于人 Ig 序列转基因的动物时,体内体细胞诱变),且因此重组抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列是,尽管来源于人种系 VH 和 VL 序列且与人种系 VH 和 VL 序列相关,但可能在体内的人抗体种系谱内非天然存在的序列。

[0071] “亲和力成熟的”抗体是在其一个或多个 CDRs 中具有一种或多种改变的抗体,与没有这些改变的亲本抗体相比较,所述改变导致抗体对抗原的亲和力改善。优选的亲和力成熟的抗体将对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲和力。亲和力成熟的抗体通过本领域已知的程序来产生。Marks 等人, *Bidl Technology* 10 :779-783 (1992) 描述了通过 VH 和 VL 结构域改组的亲和力成熟。CDR 和 / 或构架残基的随机诱变由下述描述:Barbas 等人, *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91 :3809-3813 (1994);Schier 等人, *Gene* 169 :147-155 (1995);Yelton 等人, *J. Immunol.* 155 :1994-2004 (1995);Jackson 等人, *J. Immunol.* 154 (7) :3310-9 (1995);和 Hawkins 等人, *J. Mol. Biol.* 226 :889-896 (1992)。

[0072] 术语“嵌合抗体”指包含来自一个物种的重和轻链可变区序列以及来自另一个物种的恒定区序列的抗体,例如具有与人恒定区连接的鼠重和轻链可变区的抗体。

[0073] 术语“CDR 嫁接的抗体”指包含来自一个物种的重和轻链可变区序列的抗体,但其中 VH 和 / 或 VL 的一个或多个 CDR 区域的序列用另一个物种的 CDR 序列替换,例如具有鼠重和轻链可变区的抗体,其中一个或多个鼠 CDRs (例如, CDR3) 已用人 CDR 序列替换。

[0074] 术语“人源化抗体”指包含来自非人物种(例如,小鼠)的重和轻链可变区序列的抗体,但其中至少部分 VH 和 / 或 VL 序列已改变成更“人样”,即更类似于人种系可变序列。一种类型的人源化抗体是 CDR 嫁接的抗体,其中将人 CDR 序列引入非人 VH 和 VL 序列以替换相应的非人 CDR 序列。

[0075] 术语“Kabat 编号”、“Kabat 定义”和“Kabat 标记”在本文中可互换使用。本领域公认的这些术语指氨基酸残基编号系统,所述氨基酸残基比抗体的重和轻链可变区,或其抗原结合部分中的其他氨基酸残基更可变(即高变)(Kabat 等人, (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190 :382-391 和 Kabat, E. A. 等人, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U. S. Department of Health and Human Services, NIH 公开号 91-3242)。对于重链可变区,高变区对于 CDR1 为氨基酸位置 31-35,对于 CDR2 为氨基酸位置 50-65,且对于 CDR3 为氨基酸位置 95-102。对于轻链可变区,高变区对于 CDR1 为氨基酸

位置 24-34, 对于 CDR2 为氨基酸位置 50-56, 且对于 CDR3 为氨基酸位置 89-97。

[0076] 如本文使用的, 术语“CDR”指在抗体可变序列内的互补性决定区。在重链和轻链的每个可变区中存在 3 个 CDRs, 所述 CDRs 对于每个可变区命名为 CDR1、CDR2 和 CDR3。如本文使用的, 术语“CDR 组”指在能够结合抗原的单个可变区中出现的 3 个 CDRs 的组。这些 CDRs 的确切边界已根据不同系统不同地限定。由 Kabat (Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) 和 (1991)) 描述的系统, 不仅提供了可应用于抗体的任何可变区的明确残基编号系统, 还提供了限定 3 个 CDRs 的精确残基边界。这些 CDRs 可以被称为 Kabat CDRs。Chothia 和同事 (Chothia 和 Lesk, *J. Mol. Biol.* 196 :901-917 (1987) 以及 Chothia 等人, *Nature* 342 : 877-883 (1989)) 发现 Kabat CDRs 内的某些亚部分采取几乎相同的肽主链构象, 尽管在氨基酸序列水平上具有大的多样性。这些亚部分命名为 L1、L2 和 L3 或 H1、H2 和 H3, 其中“L”和“H”分别指轻链和重链区域。这些区域可以被称为 Chothia CDRs, 所述 Chothia CDRs 具有与 Kabat CDRs 重叠的边界。与 Kabat CDRs 重叠的限定 CDRs 的其他边界已由 Padlan (FASEB *J.* 9 :133-139 (1995)) 和 MacCallum (*J Mol Biol* 262(5) :732-45 (1996)) 描述。再其他的 CDR 边界定义可能不严格地遵循上述系统之一, 但仍将与 Kabat CDRs 重叠, 尽管按照特定残基或残基组或甚至整个 CDRs 并不显著影响抗原结合的预测或实验发现, 它们可以缩短或加长。本文使用的方法可以利用根据这些系统中的任何一种限定的 CDRs, 尽管优选的实施方式使用 Kabat 或 Chothia 限定的 CDRs。

[0077] 如本文使用的, 术语“构架”或“构架序列”指减去 CDRs 的可变区的剩余序列。因为 CDR 序列的确切定义可以由不同系统来决定, 所以对构架序列的含义进行相应不同的解释。6 个 CDRs (轻链的 CDR-L1、-L2 和 -L3, 以及重链的 CDR-H1、-H2 和 -H3) 也将轻链和重链上的构架区分成在每条链上的 4 个亚区 (FR1、FR2、FR3 和 FR4), 其中 CDR1 位于 FR1 和 FR2 之间, CDR2 位于 FR2 和 FR3 之间, 且 CDR3 位于 FR3 和 FR4 之间。不将特定亚区指定为 FR1、FR2、FR3 或 FR4, 如其他人提及的, 构架区代表单条天然存在的免疫球蛋白链可变区内的组合 FR' s。如本文使用的, FR 代表 4 个亚区之一, 且 FRs 代表构成构架区的 4 个亚区中的 2 个或更多。

[0078] 如本文使用的, 术语“种系抗体基因”或“基因片段”指由非淋巴样细胞编码的免疫球蛋白序列, 所述非淋巴样细胞尚未经历成熟过程, 所述成熟过程导致用于表达特定免疫球蛋白的遗传重排和突变 (参见, 例如, Shapiro 等人, *Crit. Rev. Immunol.* 22(3) : 183-200 (2002) ; Marchalonis 等人, *Adv Exp Med Biol.* 484 :13-30 (2001))。由本发明的各种实施方案提供的优点之一源于下述认识: 种系抗体基因比成熟抗体基因更可能保存物种中个体的基本氨基酸序列结构特征, 因此当在那个物种中治疗上使用, 更不可能被识别为来自外来来源。

[0079] 如本文使用的, 术语“人源化抗体”是抗体或其变体、衍生物、类似物或片段, 其与目的抗原免疫特异性结合, 且包含基本上具有人抗体的氨基酸序列的构架 (FR) 区、和基本上具有非人抗体的氨基酸序列的互补决定区 (CDR)。如本文使用的, 在 CDR 上下文中的术语“基本上”指具有的氨基酸序列至少 80%、优选至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 等同于非人抗体 CDR 的氨基酸序列的 CDR。人源化抗体包含基本上所有至少一个、且一般为 2 个可变结构域 (Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、FabC、Fv), 其中所有或基本上所有

CDR 区对应非人免疫球蛋白（即，供体抗体）的那些，且所有或基本上所有构架区是人免疫球蛋白共有序列的那些。优选地，人源化抗体也包含至少部分免疫球蛋白恒定区 (Fc)，一般为人免疫球蛋白的那种。在一些实施方案中，人源化抗体包含轻链以及重链的至少可变结构域。抗体还可以包括重链的 CH1、铰链、CH2、CH3、和 CH4 区。在一些实施方案中，人源化抗体只包含人源化轻链。在一些实施方案中，人源化抗体只包含人源化重链。在具体实施方案中，人源化抗体只包含轻链的人源化可变结构域和 / 或人源化重链。

[0080] 如本文使用的，术语“中和”指结合蛋白特异性结合细胞因子时，中和细胞因子的生物学活性。优选地中和结合蛋白结合细胞因子且使其生物学活性减少至少约 20%、40%、60%、80%、85% 或更多。

[0081] 术语“活性”包括活性例如 DVD-Ig 对于 2 种或更多抗原的结合特异性 / 亲和力。

[0082] 术语“表位”包括能够与免疫球蛋白或 T 细胞受体特异性结合的任何多肽决定簇。在某些实施方案中，表位决定簇包括分子例如氨基酸、糖侧链、磷酸基、或磺酰基的化学活性表面定组 (grouping)，且在某些实施方案中，可以具有具体三维结构特征、和 / 或具体电荷特征。表位是由抗体结合的抗原区域。在某些实施方案中，当抗体在蛋白质和 / 或大分子复杂混合物中优先识别其靶抗原时，它被说成特异性结合抗原。

[0083] 如本文使用的，术语“表面等离子体共振”指通过检测生物传感器矩阵内的蛋白质浓度改变，例如使用 BIAcore 系统 (Pharmacia BiosensorAB, Uppsala, Sweden 和 Piscataway, NJ)，允许分析实时生物特异性相互作用的光学现象。关于进一步的描述，参见 Jönsson, U., 等人, (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26 ; Jönsson, U., 等人, (1991) *Biotechniques* 11:620-627 ; Johnson, B., 等人, (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131 ; 和 Johnson, B., 等人, (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277。

[0084] 如本领域已知的，如本文使用的术语“ $K_{on}$ ”意指抗体与抗原结合以形成抗体 / 抗原复合物的结合速率常数。

[0085] 如本领域已知的，如本文使用的术语“ $K_{off}$ ”意指抗体从抗体 / 抗原复合物中解离的解离速率常数。

[0086] 如本领域已知的，如本文使用的术语“ $K_d$ ”意指特定抗体 - 抗原相互作用的解离常数。

[0087] 如本文使用的，术语“标记的结合蛋白”指具有标记掺入的蛋白质，所述标记为结合蛋白的鉴定作准备。优选地，标记是可检测标记，例如，掺入放射标记的氨基酸或使生物素化部分与多肽附着，所述生物素化 (biotinyl) 部分可以通过标记的抗生物素蛋白（例如包含可以通过光学或比色法检测的荧光标记或酶促活性的链霉抗生物素蛋白）进行检测。关于多肽的标记例子包括但不限于下述：放射性同位素或放射性核素（例如， $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、或  $^{153}\text{Sm}$ ）；荧光标记（例如，FITC、罗丹明、镧系磷光体），酶促标记（例如，辣根过氧化物酶、萤光素酶、碱性磷酸酶）；化学发光标记；生物素化部分；由次级报道分子识别的预定多肽表位（例如，亮氨酸拉链对序列、关于第二抗体的结合位点、金属结合结构域、附加表位）；和磁性试剂，例如钆螯合物。

[0088] 术语“缀合物”指与第二化学部分，例如治疗或细胞毒性剂化学连接的结合蛋白例如抗体。术语“试剂”在本文中用于指化合物、化合物混合物、生物大分子、或由生物学材料制备的提取物。优选地，治疗或细胞毒性剂包括但不限于，百日咳毒素、紫杉醇、细胞松弛素

B、短杆菌肽 D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷 (tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、阿霉素、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素 D、1- 去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、心得安、和嘌呤霉素及其类似物或同源物。

[0089] 如本文使用的,术语“晶体”和“结晶的”指以晶体形式存在的抗体或其抗原结合部分。晶体是物质固态的一种形式,它不同于其他形式例如无定形固态或液体晶态。晶体由常规、重复、三维排列的原子、离子、分子(例如,蛋白质例如抗体)、或分子部件(例如,抗原/抗体复合物)组成。这些三维排列根据本领域众所周知的特异性数学关系排列。晶体中重复的基本单位或构件被称为不对称单位。符合给定、明确的晶体学对称性的排列中的不对称单位重复提供了晶体的“晶胞”。通过在所有 3 个维度中规则平移的晶胞重复提供了晶体。参见 Giege, R. 和 Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 第 2 版, 第 201-16 页, Oxford University Press, New York, New York, (1999)。”

[0090] 如本文提及的,术语“多核苷酸”意指 2 个或更多核苷酸的聚合形式,所述核苷酸为核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸,或任一类型核苷酸的修饰形式。该术语包括单和双链形式的 DNA,但优选是双链 DNA。

[0091] 如本文使用的,术语“分离的多核苷酸”应意指下述多核苷酸(例如,基因组的、cDNA、或合成来源的,或其某一组合),由于其来源,“分离的多核苷酸”:不与在自然界中发现“分离的多核苷酸”与之结合的全部或部分多核苷酸结合;与在自然界中它不与之连接的多核苷酸可操作地连接;或在自然界中不作为较大序列的部分存在。

[0092] 如本文使用的,术语“载体”意指能够运输它已与之连接的另一种核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,它指另外的 DNA 区段可以连接到其内的环状双链 DNA 环。另一种类型的载体是病毒载体,其中另外的 DNA 区段可以连接到病毒基因组内。某些载体能够在它们已引入其内的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。其他载体(例如非游离型哺乳动物载体)在引入宿主细胞内后可以整合到宿主细胞基因组内,且因此连同宿主基因组一起进行复制。此外,某些载体能够指导它们与之可操作地连接的基因表达。此种载体在本文中被称作“重组表达载体”(或简单地,“表达载体”)。一般而言,在重组 DNA 技术中使用的表达载体通常为质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可以互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,本发明预期包括此种其他形式的表达载体,例如提供等价功能的病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。

[0093] 术语“可操作地连接的”指其中所述组分处于允许它们以其预期方式起作用的关系中的并列。与编码序列“可操作地连接的”控制序列以这样的方式连接,从而使得编码序列的表达在与控制序列相容的条件下完成。“可操作地连接的”序列包括与目的基因邻接的表达控制序列,和反式或在远处起作用以控制目的基因的表达控制序列。如本文使用的,术语“表达控制序列”指实现它们与之连接的编码序列表达和加工所需的多核苷酸序列。表达控制序列包括合适的转录起始、终止、启动子和增强子序列;有效的 RNA 加工信号例如剪接和多腺苷酸化信号;稳定细胞质 mRNA 的序列;增强翻译效率的序列(即, Kozak 共有序列);增强蛋白质稳定性的序列;和需要时,增强蛋白质分泌的序列。此种控制序列的性质

依赖于宿主生物而不同；在原核生物中，此种控制序列一般包括启动子，核糖体结合位点，和转录终止序列；在真核生物中，此种控制序列一般包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”预期包括其存在是表达和加工必需的组分，且还可以包括其存在是有利的另外组分，例如前导序列和融合配偶体序列。

[0094] 如本文定义的，“转化”指外源 DNA 通过其进入宿主细胞的任何方法。转化可以使用本领域众所周知的各种方法在天然或人工条件下发生。转化可以依赖于用于将外来核酸序列插入原核或真核宿主细胞内的任何已知方法。该方法基于待转化的宿主细胞进行选择，且可以包括但不限于，病毒感染、电穿孔、脂质转染、和粒子轰击。此种“转化的”细胞包括其中插入的 DNA 能够作为自主复制质粒或作为宿主染色体部分复制的稳定转化的细胞。它们还包括瞬时表达插入的 DNA 或 RNA 有限时间段的细胞。

[0095] 如本文使用的，术语“重组宿主细胞”（或简单地“宿主细胞”）意指其中已引入外源 DNA 的细胞。应当理解此种术语不仅意指特定的受试细胞，还意指此类细胞的后代。因为由于突变或环境影响可能在随后世代中出现某些修饰，所以此种后代实际上可能不等同于亲本细胞，但仍包括在如本文使用的术语“宿主细胞”的范围内。优选地宿主细胞包括选自任何生物界的原核和真核细胞。优选的真核细胞包括原生生物、真菌、植物和动物细胞。最优选地宿主细胞包括但不限于原核细胞系大肠杆菌；哺乳动物细胞系 CHO、HEK 293 和 COS；昆虫细胞系 Sf9；和真菌细胞啤酒糖酵母。

[0096] 标准技术可以用于重组 DNA、寡核苷酸合成、以及组织培养和转化（例如，电穿孔、脂质转染）。酶促反应和纯化技术可以根据制造商的说明书或如本领域通常完成的或如本文所述的来进行。前述技术和程序一般可以根据本领域众所周知以及如各种一般和更具体的参考文献中所述的常规方法来进行，所述参考文献在本说明书自始至终引用和讨论。参见例如，Sambrook 等人，*Molecular Cloning :A Laboratory Manual*（第 2 版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)），所述参考文献为了任何目的引入本文作为参考。

[0097] 如本领域已知和如本文使用的，“转基因生物”指具有包含转基因的细胞的生物，其中引入生物（或生物祖先）内的转基因表达在该生物中非天然表达的多肽。“转基因”是 DNA 构建体，所述 DNA 构建体稳定且可操作地整合到转基因生物由其发育的细胞的基因组内，从而指导编码的基因产物在转基因生物的一种或多种细胞类型或组织中表达。

[0098] 术语“调节”和“调谐”可互换使用，且如本文使用的，指目的分子活性（例如，细胞因子的生物学活性）中的变化或改变。调谐可以是目的分子的某一活性或功能量级中的增加或减少。分子的示例性活性和功能包括但不限于，结合特征、酶促活性、细胞受体激活、和信号转导。

[0099] 相应地，如本文使用的，术语“调节剂”是能够改造或改变目的分子活性或功能（例如，细胞因子的生物学活性）的化合物。例如，与在不存在调节剂的情况下观察到的活性或功能量级相比较，调节剂可以引起分子某一活性或功能量级中的增加或减少。在某些实施方案中，调节剂是减少分子至少一种活性或功能量级的抑制剂。示例性抑制剂包括但不限于，蛋白质、肽、抗体、肽体（peptibodies）、碳水化合物或小有机分子。肽体在例如 W001/83525 中描述。

[0100] 如本文使用的，术语“激动剂”指当与目的分子接触时，与在不存在激动剂的情况

下观察到的活性或功能量级相比较,引起分子某一活性或功能量级中的增加的调节剂。具体目的激动剂可以包括但不限于,多肽、核酸、碳水化合物、或与抗原结合的任何其他分子。

[0101] 如本文使用的,术语“拮抗剂”或“抑制剂”指当与目的分子接触时,与在不存在拮抗剂的情况下观察到的活性或功能量级相比较,引起分子某一活性或功能量级中的减少的调节剂。具体目的拮抗剂包括阻断或调节抗原生物学或免疫活性的那些。抗原拮抗剂和抑制剂可以包括但不限于,蛋白质、核酸、碳水化合物、或与抗原结合的任何其他分子。

[0102] 如本文使用的,术语“有效量”指疗法的量,其足以减少或改善病症或其一种或多种症状严重性和 / 或持续时间,预防病症进展,引起病症消退,预防与病症相关的一种或多种症状复发、发展、发作或进展,检测病症,或增强或改善另一种疗法(例如,预防或治疗剂)的预防或治疗作用。

[0103] 如本文使用的,术语“样品”以其最广泛的含义使用。如本文使用的,“生物学样品”包括但不限于,来自生物(living thing)或从前生物的任何量的物质。此种生物包括但不限于,人、小鼠、大鼠、猴、狗、兔和其他动物。此物质包括但不限于,血液、血清、尿、滑液、细胞、器官、组织、骨髓、淋巴结和脾。

[0104] I. DVD 结合蛋白的产生

[0105] 本发明涉及能够结合一种或多种靶的双重可变结构域结合蛋白及其制备方法。优选地结合蛋白包含多肽链,其中所述多肽链包含 VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>,其中 VD1 是第一个可变结构域,VD2 是第二个可变结构域,C 是恒定结构域,X1 代表氨基酸或多肽,X2 代表 Fc 区且 n 是 0 或 1。本发明的结合蛋白可以使用各种技术产生。本发明提供了产生结合蛋白的表达载体、宿主细胞和方法。

[0106] A. 亲本单克隆抗体的产生

[0107] DVD 结合蛋白的可变结构域可以从亲本抗体获得,包括能够结合目的抗原的多克隆和单克隆抗体。这些抗体可以是天然存在的或可以通过重组技术产生。

[0108] 单克隆抗体可以使用本领域已知的广泛多样的技术来制备,包括使用杂交瘤、重组体、和噬菌体展示技术,或其组合。例如,单克隆抗体可以使用杂交瘤技术来制备,包括本领域已知和例如 Harlow 等人, *Antibodies :A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第 2 版 1988) ;Hammerling, 等人 :*Monoclonal Antibodies and T-CellHybridomas* 563-681(Elsevier, N. Y., 1981) (所述参考文献整体引入作为参考) 中教导的那些。如本文使用的,术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”指来源于单个克隆,包括任何真核、原核、或噬菌体克隆,而不是产生其的方法的抗体。如下文实施例 1 中讨论的,杂交瘤被选择、克隆和进一步筛选所需特性,包括强杂交瘤生长、高抗体产生和所需抗体特征。杂交瘤可以在同系动物体内、在缺乏免疫系统的动物例如裸鼠、或在体外细胞培养中培养和扩张。选择、克隆和扩张杂交瘤的方法是本领域普通技术人员众所周知的。在优选实施方案中,杂交瘤是小鼠杂交瘤。在另一个优选实施方案中,杂交瘤在非人、非小鼠物种,例如大鼠、绵羊、猪、山羊、牛或马中生产。在另一个实施方案中,杂交瘤是人杂交瘤,其中人非分泌性骨髓瘤与表达能够结合特定抗原的抗体的人细胞融合。

[0109] 重组单克隆抗体也使用本领域中称为选择淋巴细胞抗体法 (SLAM) 的程序从单个、分离的淋巴细胞中产生,所述 SLAM 如美国专利号 5, 627, 052、PCT 公开 WO 92/02551 和

Babcock, J. S. 等人, (1996)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 中所述。在这种方法中, 鉴定分泌目的抗体的单细胞, 例如来源于免疫动物的淋巴细胞, 且通过逆转录酶 PCR 从细胞中拯救重和轻链可变区 cDNAs, 随后可以在合适的免疫球蛋白恒定区 (例如, 人恒定区) 背景中, 在哺乳动物宿主细胞例如 COS 或 CHO 细胞中表达这些可变区。用扩增的免疫球蛋白序列转染的、来源于体内选择的淋巴细胞的宿主细胞, 随后可以经历进一步的体外分析和选择, 例如通过淘选转染的细胞以分离表达针对目的抗原的抗体的细胞。扩增的免疫球蛋白序列进一步可以进行体外处理, 例如通过体外亲和力成熟法, 例如 PCT 公开 WO 97/29131 和 PCT 公开 WO 00/56772 中描述的那些。

[0110] 单克隆抗体也通过用目的抗原免疫非人动物来生产, 所述非人动物包含一些或全部人免疫球蛋白基因座。在优选实施方案中, 非人动物是 XENOMOUSE 转基因小鼠, 包含人免疫球蛋白基因座大片段且在小鼠抗体产生方面有缺陷的工程改造小鼠品系。参见, 例如, Green 等人, Nature Genetics 7:13-21(1994) 和美国专利 5, 916, 771、5, 939, 598、5, 985, 615、5, 998, 209、6, 075, 181、6, 091, 001、6, 114, 598 和 6, 130, 364。还参见于 1991 年 7 月 25 日公开的 WO 91/10741, 于 1994 年 2 月 3 日公开的 WO 94/02602, 均于 1996 年 10 月 31 日公开的 WO 96/34096 和 W096/33735, 于 1998 年 4 月 23 日公开的 WO 98/16654, 于 1998 年 6 月 11 日公开的 WO 98/24893, 于 1998 年 11 月 12 日公开的 98/50433, 于 1999 年 9 月 10 日公开的 WO 99/45031, 于 1999 年 10 月 21 日公开的 W099/53049, 于 2000 年 2 月 24 日公开的 WO 00 09560, 和于 2000 年 6 月 29 日公开的 WO 00/037504。XENOMOUSE 转基因小鼠生产全人抗体的成体样人谱, 且产生抗原特异性人 Mabs。通过引入兆碱基大小的、人重链基因座和 x 轻链基因座的种系构型 YAC 片段, XENOMOUSE 转基因小鼠包含约 80% 人抗体谱。参见 Mendez 等人, Nature Genetics 15:146-156(1997), Green 和 Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495(1998), 所述参考文献的公开内容在此引入作为参考。

[0111] 体外方法也可以用于制备亲本抗体, 其中筛选抗体文库以鉴定具有所需结合特异性的抗体。关于重组抗体文库的此种筛选方法是本领域已知的, 且包括在下述参考文献中描述的方法: 例如, Ladner 等人, 美国专利号 5, 223, 409; Kang 等人, PCT 公开号 WO 92/18619; Dower 等人, PCT 公开号 WO 91/17271; Winter 等人, PCT 公开号 WO 92/20791; Markland 等人, PCT 公开号 WO 92/15679; Breitling 等人, PCT 公开号 WO 93/01288; McCafferty 等人, PCT 公开号 WO 92/01047; Garrard 等人, PCT 公开号 WO 92/09690; Fuchs 等人, (1991)Bio/Technology 9:1370-1372; Hay 等人, (1992)Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse 等人, (1989)Science 246:1275-1281; McCafferty 等人, Nature(1990)348:552-554; Griffiths 等人, (1993)EMBO J 12:725-734; Hawkins 等人, (1992)J Mol Biol 226:889-896; Clackson 等人, (1991)Nature352:624-628; Gram 等人, (1992)PNAS 89:3576-3580; Garrard 等人, (1991)Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom 等人, (1991)NucAcid Res 19:4133-4137; 和 Barbas 等人, (1991)PNAS 88:7978-7982, US 专利申请公开 20030186374, 和 PCT 公开号 WO 97/29131, 所述每个参考文献的内容都引入本文作为参考。

[0112] 本发明的亲本抗体也可以使用本领域已知的各种噬菌体展示方法来产生。在噬菌体展示方法中, 功能性抗体结构域在噬菌体颗粒表面上展示, 所述噬菌体颗粒携带编码其的多核苷酸序列。特别地, 此种噬菌体可以用于展示由谱或组合抗体文库 (例如, 人或

鼠)表达的抗原结合结构域。表达结合目的抗原的抗原结合结构域的噬菌体可以用抗原进行选择或鉴定,例如使用标记的抗原或被固体表面或珠结合或捕获的抗原。这些方法中使用的噬菌体一般是包括 fd 和 M13 结合结构域的丝状噬菌体,所述结合结构域由具有 Fab、Fv 或二硫化物稳定的 Fv 抗体结构域的噬菌体表达,所述抗体结构域与噬菌体基因 III 或基因 VIII 蛋白质重组融合。可以用于制备本发明抗体的噬菌体展示方法的例子包括下述参考文献中公开的那些:Brinkman 等人, *J. Immunol. Methods* 182:41-50(1995); Ames 等人, *J. Immunol. Methods* 184:177-186(1995); Kettleborough 等人, *Eur. J. Immunol.* 24:952-958(1994); Persic 等人, *Gene* 187:9-18(1997); Burton 等人, *Advances in Immunology* 57:191-280(1994); PCT 申请号 PCT/GB91/01134; PCT 公开 W090/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; 以及美国专利号 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 和 5,969,108; 所述参考文献各自整体引入本文作为参考。

[0113] 如上文参考文献中所述,噬菌体选择后,来自噬菌体的抗体编码区可以进行分离并用于产生完整抗体,且在任何所需宿主中表达,所述完整抗体包括人抗体或任何其他所需抗原结合片段,所述宿主包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌,例如,如下文详细描述。例如,也可以采用重组生产 Fab、Fab' 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段的技术,其中使用本领域已知的方法,例如下述参考文献中公开的那些:PCT 公开 W092/22324; Mullinax 等人, *BioTechniques* 12(6):864-869(1992); 和 Sawai 等人, *AJRI* 34:26-34(1995); 以及 Better 等人, *Science* 240:1041-1043(1988) (所述参考文献整体引入作为参考)。可以用于生产单链 Fvs 和抗体的技术例子包括下述参考文献中描述的那些:美国专利 4,946,778 和 5,258,498; Huston 等人, *Methods in Enzymology* 203:46-88(1991); Shu 等人, *PNAS* 90:7995-7999(1993); 以及 Skerra 等人, *Science* 240:1038-1040(1988)。

[0114] 作为通过噬菌体展示筛选重组抗体文库的替代,本领域已知的用于筛选大组合文库的其他方法可以应用于亲本抗体的鉴定。如 Szostak 和 Roberts 的 PCT 公开号 WO 98/31700, 以及 Roberts, R. W. 和 Szostak, J. W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302 中描述的,一类可替代的表达系统是其中重组抗体文库作为 RNA-蛋白质融合物表达的表达系统。在这种系统中,通过在其 3' 末端上携带嘌呤霉素-肽基受体抗生素的合成 mRNAs 的体外翻译,在 mRNA 及其编码的肽或蛋白质之间产生共价融合。因此,基于编码的肽或蛋白质例如抗体或其部分的性质,例如抗体或其部分与双重特异性抗原的结合,特定 mRNA 可以从 mRNAs 的复杂混合物(例如,组合文库)中富集。由此类文库筛选回收的编码抗体或其部分的核酸序列,可以通过如上所述的重组方法(例如,在哺乳动物宿主细胞中)表达,且此外可以通过 mRNA-肽融合物的另外筛选循环,或通过如上所述用于重组抗体体外亲和力成熟的其他方法实施进一步的亲和力成熟,在所述 mRNA-肽融合物中已将突变引入最初选择的序列内。

[0115] 在另一种方法中,亲本抗体也可以使用本领域已知的酵母展示方法来产生。在酵母展示方法中,使用遗传方法以使抗体结构域束缚于酵母细胞壁,且将它们显示在酵母表面上。特别地,此种酵母可以用于展示由谱或组合抗体文库(例如,人或鼠)表达的抗原结合结构域。可以用于制备亲本抗体的酵母展示方法的例子包括在 Wittrup 等人,美国专利

号 6, 699, 658 中公开的那些, 所述专利引入本文作为参考。

[0116] 上述抗体可以进一步进行修饰以产生 CDR 嫁接的和人源化的亲本抗体。CDR 嫁接的亲本抗体包含来自人抗体的重和轻链可变区序列, 其中  $V_H$  和 / 或  $V_L$  的一个或多个 CDR 区替换为能够结合目的抗原的鼠抗体的 CDR 序列。来自任何人抗体的构架序列可以充当用于 CDR 嫁接的模板。然而, 在此种构架上的直接链替换通常导致与抗原的结合亲和力的一些丧失。人抗体与最初鼠抗体越同源, 使鼠 CDRs 与人构架组合将在 CDRs 中引入可减小亲和力的变形的可能性越小。因此, 选择替换除 CDRs 外的鼠可变构架的人可变构架与鼠抗体可变区构架具有至少 65% 的序列同一性是优选的。除 CDRs 外的人和鼠可变区具有至少 70% 的序列同一性是更优选的。除 CDRs 外的人和鼠可变区具有至少 75% 的序列同一性是更加优选的。除 CDRs 外的人和鼠可变区具有至少 80% 的序列同一性是最优选的。用于生产此种抗体的方法是本领域已知的 (参见 EP239, 400 ;PCT 公开 WO 91/09967 ;美国专利号 5, 225, 539 ; 5, 530, 101 ;和 5, 585, 089), 镶面 (veneering) 或表面重建 (resurfacing) (EP 592, 106 ; EP 519, 596 ;Padlan, Molecular Immunology 28(4/5) :489-498(1991) ;Studnicka 等人, Protein Engineering 7(6) :805-814(1994) ;Roguska 等人, PNAS 91 :969-973(1994)), 和链改组 (美国专利号 5, 565, 352)。

[0117] 人源化抗体是来自结合所需抗原的非人物种抗体的抗体分子, 具有来自非人物种的一个或多个互补性决定区 (CDRs) 和来自人免疫球蛋白分子的构架区。已知的人 Ig 序列在下述网站上公开, 例如,

[0118] [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-/query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-/query.fcgi) ;

[0119] [www.atcc.org/phage/hdb.html](http://www.atcc.org/phage/hdb.html) ;[www.sciquest.com/](http://www.sciquest.com/) ;[www.abcam.com/](http://www.abcam.com/) ;

[0120] [www.antibodyresource.com/onlinecomp.html](http://www.antibodyresource.com/onlinecomp.html) ;

[0121] [www.public.jastate.edu/.about.pedro/research\\_tools.html](http://www.public.jastate.edu/.about.pedro/research_tools.html) ;[www.mgen.uni-](http://www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html)

[0122] [heidelberg.de/SD/IT/IT.html](http://www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm) ;[www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm](http://www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm) ;

[0123] [www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html](http://www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html) ;

[0124] [www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/](http://www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/) ;[www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/m-ikeimages.html](http://www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/m-ikeimages.html) ;

[0125] [www.antibodyresource.com/](http://www.antibodyresource.com/) ;[mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html](http://mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html)

[0126] [www.immunologylink.com/](http://www.immunologylink.com/) ;[pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.-html](http://pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.-html) ;

[0127] [www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/](http://www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/) ;[www.pebio.com/pa/340913/340913.html](http://www.pebio.com/pa/340913/340913.html) - ;

[0128] [www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/](http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/) ;[www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito-/Elisa.html](http://www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito-/Elisa.html) ;

[0129] [www.biodesign.com/table.asp](http://www.biodesign.com/table.asp) ;[www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html](http://www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html) ;

[0130] [www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html](http://www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html) ;[www.isac-net.org/sites\\_geo.html](http://www.isac-net.org/sites_geo.html) ;[aximtl.imt.uni-](http://aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html)

[0131] [marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html](http://marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html) ;[baserv.uci.kun/.nl/.about](http://baserv.uci.kun/.nl/.about)

Jraats/links1.html ;www.recab.uni-

[0132] hd.de/immuno.bme.nwu.edu/ ;www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html ;

[0133] www.ibt.unam.mx/vir/V\_mice.html ;imgt.cnusc.fr :8104/ ;

[0134] www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html ;antibody.bath.ac.uk/ ;

[0135] abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html ;www.unizh.ch/.about.honegger/AHOsem-

[0136] inar/Slide01.html ;www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/ ;

[0137] www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm ;www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/h-

[0138] umanisation/TAHHP.html ;www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat\_aim.html ;

[0139] www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html ;www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.abo-ut.fmolina/Web-

[0140] pages/Pept/spottech.html ;www.jerini.de/fr roducts.htm ;www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat et

[0141] al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Dept. Health(1983),

[0142] 其各自整体引入本文作为参考。如本领域已知的,此种输入的序列可以用于减少免疫原性,或减少、增强或修饰结合、亲和力、结合速率、解离速率、抗体亲抗原性、特异性、半衰期、或任何其他合适的特征。

[0143] 人构架区中的构架残基可以用来自 CDR 供体抗体的相应残基取代,以改变,优选改善抗原结合。这些构架取代通过本领域众所周知的方法鉴定,例如通过对 CDR 和构架残基的相互作用建模以鉴定对抗原结合重要的构架残基,和序列比较以鉴定在特定位置上的罕见构架残基。(参见,例如,Queen 等人,美国专利号 5,585,089 ;Riechmann 等人,Nature 332 :323(1988),所述参考文献整体引入本文作为参考)。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的且是本领域技术人员熟悉的。举例说明且展示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序是可获得的。这些展示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列功能发挥中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以这种方式,可以选择 FR 残基且从共有和输入序列组合,从而使得达到所需抗体特征例如对一种或多种靶抗原的亲和力增加。一般而言,CDR 残基直接且最重要地涉及抗原结合的影响。抗体可以使用本领域已知的多种技术进行人源化,例如但不限于下述参考文献中描述的那些 :Jones 等人, Nature 321 :522(1986) ;Verhoeyen 等人, Science 239 :1534(1988)), Sims 等人, J. Immunol. 151 :2296(1993) ;Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 196 :901(1987), Carter 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89 :4285(1992) ;Presta 等人, J. Immunol. 151 :2623(1993), Padlan, Molecular Immunology 28(4/5) :489-498(1991) ;Studnicka 等人, Protein Engineering 7(6) :805-814(1994) ;Roguska. 等人, PNAS 91 :969-973(1994) ; PCT 公 开 WO 91/09967, PCT/ :US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755 ;W090/14443, W090/14424, W090/14430,

EP 229246, EP 592, 106 ;EP 519, 596, EP 239, 400, 美国专利号 5, 565, 332、5, 723, 323、5, 976, 862、5, 824, 514、5, 817, 483、5814476、5763192、5723323、5, 766886、5, 714, 352、6, 204, 023、6, 180, 370、5, 693, 762、5, 530, 101、5, 585, 089、5, 225, 539 ;4, 816, 567, 所述参考文献各自整体引入本文作为参考, 包括其中引用的参考文献。

[0144] 亲本单克隆抗体可以选自能够结合特定靶且本领域众所周知的各种单克隆抗体。这些包括但不限于, 抗 TNF 抗体 (美国专利号 6, 258, 562), 抗 IL-12 和或抗 IL-12p40 抗体 (美国专利号 6, 914, 128); 抗 IL-18 抗体 (US 2005/0147610 A1), 抗 C5, 抗 CBL, 抗 CD147, 抗 gp120, 抗 VLA-4, 抗 CD11a, 抗 CD18, 抗 VEGF, 抗 CD40L, 抗 Id, 抗 ICAM-1, 抗 CXCL13, 抗 CD2, 抗 EGFR, 抗 TGF- $\beta$  2, 抗 E- 选择蛋白, 抗 Fact VII, 抗 Her2/neu, 抗 F gp, 抗 CD11/18, 抗 CD14, 抗 ICAM-3, 抗 CD80, 抗 CD4, 抗 CD3, 抗 CD23, 抗  $\beta$  2 整联蛋白, 抗  $\alpha$  4 $\beta$  7, 抗 CD52, 抗 HLA DR, 抗 CD22, 抗 CD20, 抗 MIF, 抗 CD64 (FcR), 抗 TCR  $\alpha$   $\beta$ , 抗 CD2, 抗 Hep B, 抗 CA 125, 抗 EpCAM, 抗 gp120, 抗 CMV, 抗 gpIIbIIIa, 抗 IgE, 抗 CD25, 抗 CD33, 抗 HLA, 抗 VNR 整联蛋白, 抗 IL-1 $\alpha$  抗 IL-1 $\beta$ , 抗 IL-1 受体, 抗 IL-2 受体, 抗 IL-4, 抗 IL-4 受体, 抗 IL5, 抗 IL-5 受体, 抗 IL-6, 抗 IL-8, 抗 IL-9, 抗 IL-13, 抗 IL-13 受体, 抗 IL-17, 和抗 IL-23 (参见 Presta LG. 2005 Selection, design, and engineering of therapeutic antibodies J Allergy Clin Immunol. 116 :731-6 和 <http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/antibodies.html>)。

[0145] 亲本单克隆抗体还可以选自批准用于在临床试验, 或临床用途开发中使用的各种治疗性抗体。此类治疗性抗体包括但不限于, 利妥希玛 (**Rituxan®**, IDEC/Genentech/Roche) (参见例如美国专利号 5, 736, 137), 批准治疗非何杰金氏淋巴瘤的嵌合抗 CD20 抗体; HuMax-CD20, 目前由 Genmab 开发中的抗 CD20, 在美国专利号 5, 500, 362 中描述的抗 C20 抗体, AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumaLYM (Intracel), 和 PR070769 (PCT/US2003/040426, 名称为 "Immunoglobulin Variants and Uses Thereof"), 曲妥珠单抗 (trastuzumab) (**Herceptin®**, Genentech) (参见例如美国专利号 5, 677, 171), 批准治疗乳腺癌的人源化抗 Her2/neu 抗体; 帕妥珠单抗 (pertuzumab) (rhuMab-2C4, **Omnitarg®**), 目前由 Genentech 开发中; 在美国专利号 4, 753, 894 中描述的抗 Her2 抗体; 西妥昔单抗 (cetuximab) (**Erbitux®**, Imclone) (美国专利号 4, 943, 533; PCT WO 96/40210, 在用于多种癌症的临床试验中的嵌合抗 EGFR 抗体; ABX-EGF (美国专利号 6, 235, 883), 目前由 Abgenix-Immunex-Amgen 开发中; HuMax-EGFr (U. S. Ser. No. 10/172, 317), 目前由 Genmab 开发中; 425, EMD55900, EMD62000, 和 EMD72000 (Merck KGaA) (美国专利号 5, 558, 864; Murthy 等人, 1987, Arch Biochem Biophys. 252(2) :549-60; Rodeck 等人, 1987, J Cell Biochem. 35(4) :315-20; Kettleborough 等人, 1991, Protein Eng. 4(7) :773-83); ICR62 (Institute of Cancer Research) (PCT WO 95/20045; Modjtahedi 等人, 1993, J. Cell Biophys. 1993, 22(1-3) :129-46; Modjtahedi 等人, 1993, Br J Cancer. 1993, 67(2) :247-53; Modjtahedi 等人, 1996, Br J Cancer, 73(2) :228-35; Modjtahedi 等人, 2003, Int J Cancer, 105(2) :273-80); TheraCIMhR3 (YM Biosciences, Canada and Centro de Immunologia Molecular, Cuba) (美国专利号 5, 891, 996; 美国专利号 6, 506, 883; Mateo 等人, 1997, Immunotechnology, 3(1) :71-81); mAb-806 (Ludwig Institute for

Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering) (Jungbluth 等 人, 2003, Proc Natl Acad Sci USA. 100(2) :639-44) ;KSB-102(KSBiomedix) ;MR1-1(IVAX, National Cancer Institute) (PCT WO0162931A2) ;和 SC100(Scancell) (PCT WO 01/88138) ;阿来组单抗 (alemutuzumab) (**Campath®**, Millenium), 目前批准用于治疗 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病的人源化单克隆抗体 ;莫罗莫那 (muromonab)-CD3 (**Orthoclone OKT3®**) , 由 Ortho Biotech/Johnson 和 Johnson 开发的抗 CD3 抗体, 替伊莫单抗 (ibritumomab tiuxetan) (**Zevalin®**) , 由 IDEC/Schering AG 开发的抗 CD20 抗体, 吉妥珠单抗 奥 唑 米 星 (gemtuzumab ozogamicin) (**Mylotarg®**) , 由 Celltech/Wyeth 开发的抗 CD33(p67 蛋白质) 抗体, 阿来塞普 (alefacept) (**Amevive®**) , 由 Biogen 开发的抗 LFA-3Fc 融合物), 阿昔单抗 (**ReoPro®**) , 由 Centocor/Lilly 开发, 巴利昔单抗 (basiliximab) (**Simulect®**) , 由 Novartis 开发, 帕利珠单抗 (palivizumab) (**Synagis®**) 由 Medimmune 开发, 英夫单抗 (**Remicade®**) , 由 Centocor 开发的抗 TNF $\alpha$  抗体, 阿达木单抗 (adalimumab) (**Humira®**) , 由 Abbott 开发的抗 TNF $\alpha$  抗体, **Humicade®**, 由 Celltech 开发的抗 TNF $\alpha$  抗体, 依那西普 (etanercept) (**Enbrel®**) , 由 Immunex/Amgen 开发的抗 TNF $\alpha$  Fc 融合物, ABX-CBL, 由 Abgenix 开发中的抗 CD147 抗体, ABX-IL8, 由 Abgenix 开发中的抗 IL8 抗体, ABX-MA1, 由 Abgenix 开发中的抗 MUC18 抗体, Pentumomab(R1549, 90Y-muHMF1), 由 Antisoma 开发的抗 MUC1, Therex(R1550), 由 Antisoma 开发中的抗 MUC1 抗体, AngioMab(AS1405), 由 Antisoma 开发中, HuBC-1, 由 Antisoma 开发中, 由 Antisoma 开发中的 Thioplatin(AS1407), **Antegren®** (那他珠单抗 (natalizumab)), 由 Biogen 开发中的抗  $\alpha$ -4- $\beta$ -1(VLA-4) 和  $\alpha$ -4- $\beta$ -7 抗体, VLA-1mAb, 由 Biogen 开发中的抗 VLA-1 整联蛋白抗体, LTBR mAb, 由 Biogen 开发中的抗淋巴毒素  $\beta$  受体 (LTBR) 抗体, CAT-152, 由 Cambridge Antibody Technology 开发中的抗 TGF- $\beta$  2 抗体, J695, 由 Cambridge Antibody Technology 和 Abbott 开发中的抗 IL-12 抗体, CAT-192, 由 Cambridge AntibodyTechnology 和 Genzyme 开发中的抗 TGF $\beta$  1 抗体, CAT-213, 由 CambridgeAntibody Technology 开发中的抗嗜伊红粒细胞趋化蛋白 1 抗体, **LymphoStat-B®** 由 Cambridge Antibody Technology 和 Human GenomeSciences, Inc. 开发中的抗 Blys 抗体, TRAIL-R1mAb, 由 CambridgeAntibody Technology 和 Human Genome Sciences, Inc. 开发中的抗 TRAIL-R1 抗体, **Avastin®** 贝伐单抗 (bevacizumab), rhuMAb-VEGF), 由 Genentech 开发中的抗 VEGF 抗体, 由 Genentech 开发中的抗 HER 受体家族抗体, 抗组织因子 (ATF), 由 Genentech 开发中的抗组织因子抗体, **Xolair®** (奥马佐单抗 (omalizumab)), 由 Genentech 开发中的抗 IgE 抗体, **Raptiva®** (依法利珠单抗 (efalizumab)), 由 Genentech 和 Xoma 开发中的抗 CD11a 抗体, MLN-02 抗体 (以前为 LDP-02), 由 Genentech 和 Millenium Pharmaceuticals 开发中, HuMax CD4, 由 Genmab 开发中的抗 CD4 抗体, HuMax-IL15, 由 Genmab 和 Amgen 开发中的抗 IL15 抗体, HuMax-Inflam, 由 Genmab 和 Medarex 开发中, HuMax-Cancer, 由 Genmab 和 Medarex 和 Oxford GcoSciences 开发中的抗类肝素酶 (heparanase) I 抗体, HuMax-Lymphoma, 由 Genmab 和 Amgen 开发中, HuMax-TAC, 由 Genmab 开发中, IDEC-131, 由 IDEC Pharmaceuticals 开发中的抗 CD40L 抗体, IDEC-151(克立昔单抗 (clenoliximab)), 由 IDEC Pharmaceuticals 开发

中的抗 CD4 抗体, IDEC-114, 由 IDECPharmaceuticals 开发中的抗 CD80 抗体, IDEC-152, 由 IDECPharmaceuticals 开发中的抗 CD23, 由 IDEC Pharmaceuticals 开发中的抗巨噬细胞移动因子 (MIF) 抗体, BEC2, 由 Imclone 开发中的抗独特型抗体, IMC-1C11, 由 Imclone 开发中的抗 KDR 抗体, DC101, 由 Imclone 开发中的抗 flk-1 抗体, 由 Imclone 开发中的抗 VE 钙粘着蛋白抗体, **CEA-Cide®** (拉贝珠单抗 (labetuzumab)), 由 Immunomedics 开发中的抗癌胚抗原 (CEA) 抗体, **LymphoCide®** (依帕珠单抗 (epratuzumab)), 由 Immunomedics 开发中的抗 CD22 抗体, AFP-Cide, 由 Immunomedics 开发中, MyelomaCide, 由 Immunomedics 开发中, LkoCide, 由 Immunomedics 开发中, ProstaCide, 由 Immunomedics 开发中, MDX-010, 由 Medarex 开发中的抗 CTLA4 抗体, MDX-060, 由 Medarex 开发中的抗 CD30 抗体, 由 Medarex 开发中的 MDX-070, 由 Medarex 开发中的 MDX-018, **Osidem®** (IDM-1), 以及由 Medarex 和 Immuno-DesignedMolecules 开发中的抗 Her2 抗体, **HuMax®-CD4**, 由 Medarex 和 Genmab 开发中的抗 CD4 抗体, HuMax-IL15, 由 Medarex 和 Genmab 开发中的抗 IL15 抗体, CNTO 148, 由 Medarex 和 Centocor/J&J 开发中的抗 TNF  $\alpha$  抗体, CNTO 1275, 由 Centocor/J&J 开发中的抗细胞因子抗体, MOR101 和 MOR102, 由 MorphoSys 开发中的抗细胞间粘附分子 1 (ICAM-1) (CD54) 抗体, MOR201, 由 MorphoSys 开发中的抗成纤维细胞生长因子受体 3 (FGFR-3) 抗体, **Nuvion®** (维西珠单抗 (visilizumab)), 由 Protein Design Labs 开发中的抗 CD3 抗体, **HuZAF®**, 由 Protein DesignLabs 开发中的抗  $\gamma$  干扰素抗体, 抗  $\alpha 5 \beta 1$  整联蛋白, 由 Protein Design Labs 开发中, 抗 IL-12, 由 Protein Design Labs 开发中, ING-1, 由 Xoma 开发中的抗 Ep-CAM 抗体, **Xolair®** (奥马佐单抗), 由 Genentech 和 Novartis 开发的人源化抗 IgE 抗体, 和 MLN01, 由 Xoma 开发中的抗  $\beta 2$  整联蛋白抗体, 这个段落中所有上文引用的参考文献都特别引入本文作为参考。

[0146] B. DVD 分子的构建:

[0147] 双重可变结构域免疫球蛋白 (DVD-Ig) 分子被这样设计, 从而使得来自 2 种不同亲本 mAbs 的 2 个不同轻链可变结构域 (VL) 通过重组 DNA 技术直接或经由短接头串联连接, 随后为轻链恒定结构域。类似地, 重链包含串联连接的 2 个不同重链可变结构域 (VH), 随后为恒定结构域 CH1 和 Fc 区 (图 1A)。

[0148] 可变结构域可以使用重组 DNA 技术从亲本抗体获得, 所述亲本抗体通过上述方法中的任何一种产生。在优选实施方案中, 可变结构域是鼠重或轻链可变结构域。更优选地, 可变结构域是 CDR 嫁接的或人源化的可变重或轻链结构域。最优选地, 可变结构域是人重或轻链可变结构域。

[0149] 在一个实施方案中, 第一个和第二个可变结构域使用重组 DNA 技术直接互相连接。在另一个实施方案中, 可变结构域经由接头序列进行连接。优选地连接 2 个可变结构域。3 个或更多可变结构域也可以直接或经由接头序列进行连接。可变结构域可以结合相同抗原或可以结合不同抗原。本发明的 DVD 分子可以包括 1 个免疫球蛋白可变结构域和 1 个非免疫球蛋白可变结构域, 例如受体的配体结合结构域, 酶活性结构域。DVD 分子也可以包含 2 个或更多非 Ig 结构域。

[0150] 接头序列可以是单个氨基酸或多肽序列。优选地, 接头序列选自 AKTTPKLEEGEFSEAR ; AKTTPKLEEGEFSEARV ; AKTTPKLGG ; SAKTTPKLGG ; AKTTPKLEEGEFSEARV ; SAKTTP ; SAKTTPKLGG ; RADAAP ; RADAAPTVS ; RADAAAAGGPGS ; RADAAAA (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> ; SAKTTP ;

SAKTPPKLGG ;SAKTPKLEEGEFSEARV ;ADAAP ;ADAAPTVSIFPP ;TVAAP ;TVAAPSVFIFPP ; QPKAAP ;QPKAAPSVTLFPP ;AKTPP ;AKTPPSVTPLAP ;AKTTAP ;AKTTAPSVYPLAP ;ASTKGP ; ASTKGPSVFPLAP ;GGGGSGGGGSGGGGS ;GENKVEYAPALMALS ;GPAKELTPLKEAKVS ; 和 GHEAAVMQVQYPAS。接头序列的选择基于几种 Fab 分子的晶体结构分析。在 Fab 或抗体分子结构中的可变结构域和 CH1/CL 恒定结构域之间存在天然柔性键合。这种天然键合包含约 10-12 个氨基酸残基,由来自 V 结构域的 C 末端的 4-6 个残基和来自 CL/CH1 结构域的 N 末端的 4-6 个残基促成。本发明的 DVD Igs 使用 CL 或 CH1 的 N 末端 5-6 个氨基酸残基,或 11-12 个氨基酸残基分别作为 DVD-Igs 轻链和重链中的接头来产生。CL 或 CH1 结构域的 N 末端残基,特别是前 5-6 个氨基酸残基,采取环构象而无强二级结构,因此可以充当 2 个可变结构域之间的柔性接头。CL 或 CH1 结构域的 N 末端残基是可变结构域的天然延伸,因为它们为 Ig 序列的部分,因此使可能由接头和接点引起的任何免疫原性大程度地降到最低。

[0151] 其他接头序列可以包括任何长度的 CL/CH1 结构域的任何序列,但不是 CL/CH1 结构域的所有残基;例如 CL/CH1 结构域的前 5-12 个氨基酸残基;轻链接头可以来自 C $\kappa$  或 C $\lambda$ ;且重链接头可以来源于任何同种型的 CH1,包括 C $\gamma$ 1、C $\gamma$ 2、C $\gamma$ 3、C $\gamma$ 4、C $\alpha$ 1、C $\alpha$ 2、C $\delta$ 、C $\epsilon$  和 C $\mu$ 。接头序列还可以来源于其他蛋白质例如 Ig 样蛋白质,(例如,TCR、FcR、KIR);基于 G/S 的序列(例如,G4S 重复);铰链区衍生的序列;和来自其他蛋白质的其他天然序列。

[0152] 在优选实施方案中,使用重组 DNA 技术使恒定结构域与 2 个连接的可变结构域连接。优选地包含连接的重链可变结构域的序列与重链恒定结构域连接,且包含连接的轻链可变结构域的序列与轻链恒定结构域连接。优选地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。最优选地 DVD 重链与 Fc 区进一步连接。Fc 区可以是天然序列 Fc 区,或变体 Fc 区。最优选地 Fc 区是人 Fc 区。在优选实施方案中,Fc 区包括来自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、或 IgD 的 Fc 区。

[0153] 在最优选的实施方案中,将 2 条重链 DVD 多肽和 2 条轻链 DVD 多肽组合,以形成 DVD-Ig 分子。能够结合特定靶的特异性 DVD-Ig 分子的详细描述及其制备方法,在下文实施例部分中提供。

#### [0154] C. DVD 蛋白质的生产

[0155] 本发明的结合蛋白可以通过本领域已知的许多技术中的任何一种来生产。例如,来自宿主细胞的表达,其中编码 DVD 重和 DNA 轻链的一种或多种表达载体通过标准技术转染到宿主细胞内。术语“转染”的各种形式预期包含通常用于将外源 DNA 引入原核或真核宿主细胞内的广泛多样的技术,例如,电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE 葡聚糖转染等。尽管可能在原核或真核宿主细胞中表达本发明的 DVD 蛋白质,但在真核细胞中表达 DVD 蛋白质是优选的,且在哺乳动物宿主细胞中是最优选的,因为此种真核细胞(且特别是哺乳动物细胞)比原核细胞更可能装配和分泌正确折叠和免疫学活性的 DVD 蛋白质。

[0156] 用于表达本发明的重组抗体的优选哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO 细胞)(包括在 Urlaub 和 Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 中描述,与 DHFR 选择标记一起使用的 dhfr-CHO 细胞,例如,如 R. J. Kaufman 和 P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621 中描述的)、NS0 骨髓瘤细胞、COS 细胞和 SP2 细胞。当编码 DVD 蛋白质的重组表达载体被引入哺乳动物宿主细胞内时,DVD 蛋白质通过将宿主细胞培养足够时间

段来生产,以允许 DVD 蛋白质在宿主细胞中表达,或更优选地, DVD 蛋白质分泌到其中宿主细胞生长的培养基内。DVD 蛋白质可以使用标准蛋白质纯化法从培养基中回收。

[0157] 在用于重组表达本发明的 DVD 蛋白质的优选系统中,编码 DVD 重链和 DVD 轻链的重组表达载体通过磷酸钙介导的转染引入 dhfr-CHO 细胞内。在重组表达载体内,DVD 重和轻链基因各自与 CMV 增强子 /AdMLP 启动子调节元件可操作地连接,以驱动基因的高水平转录。重组表达载体还携带 DHFR 基因,所述 DHFR 基因允许使用氨甲蝶呤选择 / 扩增选择已用载体转染的 CHO 细胞。培养所选转化体宿主细胞以允许表达 DVD 重和轻链,且从培养基中回收完整的 DVD 蛋白质。使用标准分子生物学技术以制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化体、培养宿主细胞和从培养基中回收 DVD 蛋白质。更进一步地本发明提供了合成本发明的 DVD 蛋白质的方法,其通过在合适的培养基中培养本发明的宿主细胞直至本发明的 DVD 蛋白质被合成实现。该方法可以进一步包括从培养基中分离 DVD 蛋白质。

[0158] DVD-Ig 的重要特征是它可以以与常规抗体相似的方式生产和纯化。DVD-Ig 的生产导致具有所需双重特异性活性的均质、单一的主要产物,而无恒定区的任何序列修饰或任何种类的化学修饰。产生“双特异性”、“多特异性”和“多特异性多价”全长结合蛋白的其他先前描述方法不导致单一的主要产物,而是导致装配的无活性、单特异性、多特异性、多价、全长结合蛋白,和具有不同结合位点组合的多价全长结合蛋白的混合物的细胞内或分泌的生产。例如,基于由 Miller 和 Presta (PCT 公开 W02001/077342 (A1) 描述的设计,存在重和轻链的 16 种可能组合。因此只有 6.25% 的蛋白质可能处于所需活性形式。使用标准层析技术使完全活性形式的蛋白质与无活性和部分活性形式的蛋白质分离仍有待证实,所述标准层析技术一般在大规模制备中使用。

[0159] 令人惊讶的是,本发明的“双重特异性多价全长结合蛋白”的设计导致双重可变结构域轻链和双重可变结构域重链,所述轻链和重链主要装配成所需“双重特异性多价全长结合蛋白”。

[0160] 至少 50%、优选 75% 且更优选 90% 装配且表达的双重可变结构域免疫球蛋白分子是所需双重特异性四价蛋白质。本发明的这个方面特别增强了本发明的商业效用。因此,本发明包括在单个细胞中表达双重可变结构域轻链和双重可变结构域重链,从而导致“双重特异性四价全长结合蛋白”的单一主要产物的方法。

[0161] 本发明提供了在单个细胞中表达双重可变结构域轻链和双重可变结构域重链,从而导致“双重特异性四价全长结合蛋白”的“主要产物”的优选方法,其中“主要产物”超过所有装配蛋白质的 50%,包含双重可变结构域轻链和双重可变结构域重链。

[0162] 本发明提供了在单个细胞中表达双重可变结构域轻链和双重可变结构域重链,从而导致“双重特异性四价全长结合蛋白”的单一“主要产物”的更优选方法,其中“主要产物”超过所有装配蛋白质的 75%,包含双重可变结构域轻链和双重可变结构域重链。

[0163] 本发明提供了在单个细胞中表达双重可变结构域轻链和双重可变结构域重链,从而导致“双重特异性四价全长结合蛋白”的单一“主要产物”的最优选方法,其中“主要产物”超过所有装配蛋白质的 90%,包含双重可变结构域轻链和双重可变结构域重链。

[0164] II. 衍生化的 DVD 结合蛋白:

[0165] 一个实施方案提供了标记的结合蛋白,其中本发明的结合蛋白用另一种功能分子(例如,另一种肽或蛋白质)衍生化或连接。例如,本发明的标记的结合蛋白可以通过使本

发明的结合蛋白与一种或多种其他分子实体功能性连接（通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或其他方式）来衍生，所述其他分子实体例如另一种抗体（例如，双特异性抗体或双抗体）、可检测试剂、细胞毒性剂、药学试剂、和 / 或可以介导结合蛋白与另一种分子（例如链霉抗生物素蛋白核心区或多组氨酸标记）结合的蛋白质或肽。

[0166] 本发明的结合蛋白可以由之衍生化的有用的可检测试剂包括荧光化合物。示例性荧光可检测试剂包括荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、5-二甲胺-1-萘磺酰氯、藻红蛋白等。结合蛋白也可以用可检测酶衍生化，例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、葡糖氧化酶等。当结合蛋白用可检测酶衍生化时，它通过添加酶用于生产可检测反应产物的另外的试剂进行检测。例如，当可检测试剂辣根过氧化物酶存在时，添加过氧化氢和二氨基联苯胺导致可检测的有色反应产物。结合蛋白也可以用生物素衍生化，且通过抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白结合的间接测量进行检测。

[0167] 本发明的另一个实施方案提供了结晶结合蛋白以及包含此类晶体的制剂和组合物。在一个实施方案中，结晶结合蛋白具有比结合蛋白的可溶性配对物更长的体内半衰期。在另一个实施方案中，结合蛋白在结晶化后保留生物学活性。

[0168] 本发明的结晶结合蛋白可以根据本领域已知的和如 WO 02072636 中公开的方法来生产，所述专利引入本文作为参考。

[0169] 本发明的另一个实施方案提供了糖基化的结合蛋白，其中抗体或其抗原结合部分包含一个或多个碳水化合物残基。新生体内蛋白质生产可以经历称为翻译后修饰的进一步加工。特别地，糖（糖基）残基可以酶促添加，这个过程称为糖基化。所得到的具有共价连接的寡糖侧链的蛋白质被称为糖基化蛋白或糖蛋白。抗体是在 Fc 结构域以及可变结构域中具有一个或多个碳水化合物残基的糖蛋白。Fc 结构域中的碳水化合物残基对 Fc 结构域的效应子作用有重要作用，对抗体的抗原结合或半衰期有最低限度的作用 (R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005), 第 11-16 页)。相比之下，可变结构域的糖基化可能对抗体的抗原结合活性有作用。可变结构域中的糖基化可能对抗体结合亲和力具有负面作用，可能是由于空间位阻 (Co, M. S. 等人, *Mol. Immunol.* (1993) 30 :1361-1367), 或导致对抗原的亲和力增加 (Wallick, S. C. 等人, *Exp. Med.* (1988) 168 :1099-1109 ;Wright, A. 等人, *EMBO J.* (1991) 10 :2717-2723)。

[0170] 本发明的一个方面涉及产生糖基化位点突变体，其中结合蛋白的 O 或 N 联糖基化位点已进行突变。本领域技术人员可以使用标准的众所周知的技术来产生此类突变体。保留生物学活性但具有增加或减少的结合活性的糖基化位点突变体是本发明的另一个目的。

[0171] 在另外一个实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合部分的糖基化得到修饰。例如，可以制备无糖基化 (aglycosylated) 抗体（即该抗体缺乏糖基化）。糖基化可以进行改变，以例如增加抗体对抗原的亲和力。此种碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来完成。例如，可以制备导致一个或多个可变区糖基化位点消除的一个或多个氨基酸置换，从而消除那个位点上的糖基化。此种无糖基化可以增加抗体对抗原的亲和力。此种方法在 PCT 公开 W02003016466A2, 以及美国专利号 5, 714, 350 和 6, 350, 861 中进一步详细描述，所述专利各自整体引入本文作为参考。

[0172] 此外或可替代地，可以制备具有改变的糖基化类型的本发明修饰的结合蛋白，例如具有减少量的岩藻糖基残基的岩藻糖基化不足 (hypofucosylated) 抗体，或具有增加的

等分 GlcNAc 结构的抗体。此种改变的糖基化模式已显示增加抗体的 ADCC 能力。此种碳水化合物修饰可以通过例如在具有改变的糖基化机器的宿主细胞中表达抗体来完成。具有改变的糖基化机器的细胞已在本领域得到描述,且可以用作在其中表达本发明的重组抗体的宿主细胞,从而生产具有改变的糖基化的抗体。参见,例如, Shields, R. L. 等人 (2002) J. Biol. Chem. 277 :26733-26740 ;Umana 等人 (1999) Nat. Biotech. 17 :176-1, 以及欧洲专利号 :EP1, 176, 195 ;PCT 公开 WO 03/035835 ;WO 99/54342 80, 所述参考文献各自整体引入本文作为参考。

[0173] 蛋白质糖基化取决于目的蛋白质的氨基酸序列,以及在其中表达蛋白质的宿主细胞。不同生物可以产生不同的糖基化酶(例如,糖基转移酶和糖苷酶),且具有不同的可用底物(核苷酸糖)。由于此类因素,蛋白质糖基化模式和糖基残基组成可以依赖于在其中表达特定蛋白质的宿主系统而不同。在本发明中有用的糖基残基可以包括但不限于,葡萄糖、半乳糖、甘露糖、岩藻糖、n-乙酰葡萄糖胺和唾液酸。优选地糖基化的结合蛋白包含糖基残基,从而使得糖基化模式是人的。

[0174] 不同的蛋白质糖基化可以导致不同的蛋白质特征,这是本领域技术人员已知的。例如,与哺乳动物细胞例如 CHO 细胞系中表达的相同蛋白质的那种比较,在微生物宿主例如酵母中生产,和利用酵母内源性途径糖基化的治疗蛋白质的功效可能是减少的。此种糖蛋白在人中也可以是免疫原性的,且在施用后显示在体内减少的半衰期。人和其他动物中的特定受体可以识别特定糖基残基且促进蛋白质从血流中快速清除。其他不利效应可以包括蛋白质折叠、可溶性、对蛋白酶的易感性、运输、转运、区室化、分泌、由其他蛋白质或因子识别、抗原性、或变应原性中的变化。因此,从业者可能更喜欢具有特定糖基化组成和模式的治疗蛋白质,例如等同于或至少类似于在人细胞或预期受试动物的物种特异性细胞中生产的那种的糖基化组成和模式。

[0175] 不同于宿主细胞那种的糖基化蛋白质表达可以通过遗传修饰宿主细胞以表达异源糖基化酶来完成。使用本领域已知的技术,从业者可以产生显示人蛋白质糖基化的抗体或其抗原结合部分。例如,酵母菌株已进行遗传修饰以表达非天然存在的糖基化酶,从而使得在这些酵母菌株中生产的糖基化蛋白(糖蛋白)显示等同于动物细胞特别是人细胞那种的蛋白质糖基化(美国专利申请 20040018590 和 20020137134 以及 PCT 申请 WO2005100584A2)。

[0176] 除了结合蛋白,本发明还涉及对本发明的此种结合蛋白特异的抗独特型(抗 Id)抗体。抗 Id 抗体是识别独特决定簇的抗体,所述独特决定簇一般与另一种抗体的抗原结合部分相关。抗 Id 可以通过用结合蛋白或其含 CDR 区免疫动物来制备。免疫的动物将识别,且对免疫抗体的独特型决定簇应答且产生抗 Id 抗体。抗 Id 抗体也可以用作“免疫原”以在另外一种动物中诱导免疫应答,从而产生所谓的抗抗 Id 抗体。

[0177] 此外,本领域技术人员将理解,目的蛋白质可以使用宿主细胞文库来表达,所述宿主细胞进行基因工程改造以表达各种糖基化酶,从而使得文库的成员宿主细胞生产具有变体糖基化模式的目的蛋白质。从业者随后可以选择并分离具有特定新糖基化模式的目的蛋白质。优选地,具有特定选择的新糖基化模式的蛋白质显示改善或改变的生物学性质。

[0178] III. DVD-Ig 的用途

[0179] 已知其与 2 种或更多抗原结合的能力,本发明的结合蛋白可以用于检测抗原(例

如,在生物样品中,例如血清或血浆),其中使用常规免疫测定,例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)或组织免疫组织化学。DVD-Ig 用可检测物质直接或间接标记,以促进结合或未结合的抗体的检测。合适的可检测物质包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料和放射性材料。合适酶的例子包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适辅基复合物的例子包括链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适荧光材料的例子包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺(dichlorotriazinylamine) 荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的例子包括鲁米诺;且合适放射性材料的例子包括  $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、或  $^{153}\text{Sm}$ 。

[0180] 本发明的结合蛋白优选能够在体外和体内中和抗原活性。因此,此种 DVD-Igs 可以例如,在包含抗原的细胞培养物中、在人受试者中或在具有本发明的结合蛋白与其交叉反应的抗原的其他哺乳动物受试者中用于抑制抗原活性。在另一个实施方案中,本发明提供了用于减少受试者中的抗原活性的方法,所述受试者患有其中抗原活性是有害的疾病或病症。本发明的结合蛋白可以施用于人受试者用于治疗目的。

[0181] 如本文使用的,术语“其中抗原活性是有害的病症”预期包括疾病或其他病症,其中患有该病症的受试者中抗原的存在已显示或怀疑负责病症的病理生理学或是促进病症恶化的因素。因此,其中抗原活性是有害的病症是其中抗原活性减少预期减轻病症症状和/或进展的病症。此种病症可以例如由患有病症的受试者生物学流体中抗原浓度的增加(例如受试者血清、血浆、滑液等中抗原浓度的增加)来证实。可以用本发明的结合蛋白治疗的病症的非限制性例子包括下文以及关于本发明抗体的药物组合物部分中讨论的那些病症。

[0182] 本发明的 DVD-Igs 可以结合一种抗原或多种抗原。此种抗原包括但不限于,下述数据库中列出的靶,所述数据库引入本文作为参考。这些靶数据库包括下述列表:

[0183] 治疗靶 (<http://xin.cz3.nus.edu.sg/group/cjttd/ttd.asp>);

[0184] 细胞因子和细胞因子受体 (<http://www.cytokinewebfacts.com/>, <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>, 和

[0185] [http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgf/CGF\\_Database/cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/indexR.html](http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgf/CGF_Database/cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/indexR.html));

[0186] 趋化因子 (<http://cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/CK/Chemokine.html>);

[0187] 趋化因子受体和 GPCRs (<http://csp.medic.kumamoto-u.ac.jp/CSP/Receptor.html>, <http://www.gpcr.org/7tm/>);

[0188] 嗅感受器 (<http://senselab.med.yale.edu/senselab/ORDB/default.asp>);

[0189] 受体 (<http://www.iuphar-db.org/iuphar-rd/list/index.htm>);

[0190] 癌症靶 (<http://cged.hgc.jp/cgi-bin/input.cgi>);

[0191] 作为可能的抗体靶的分泌的蛋白 (<http://spd.cbi.pku.edu.cn/>);

[0192] 蛋白激酶 (<http://spd.cbi.pku.edu.cn/>), 和

[0193] 人 CD 标记 ([http://content.labvelocity.com/tools/6/1226/CD\\_table\\_final\\_locked.pdf](http://content.labvelocity.com/tools/6/1226/CD_table_final_locked.pdf)) 和 (ZolaH, 2005 CD molecules 2005: human cell differentiation molecules Blood, 106:3123-6)。

[0194] DVD-Igs 作为治疗剂以同时阻断 2 种不同靶以增强功效/安全性和/或增加患

者覆盖度是有用的。此种靶可包括可溶性靶 (IL-13 和 TNF) 和细胞表面受体靶 (VEGFR 和 EGFR)。它还可以用于诱导肿瘤细胞和 T 细胞 (Her2 和 CD3) 之间改变方向的细胞毒性用于癌症治疗,或自体反应细胞或效应 (effectoe) 细胞之间改变方向的细胞毒性用于自身免疫 / 移植,或任何靶细胞和效应细胞之间改变方向的细胞毒性以消除任何给定疾病中的致病细胞。

[0195] 此外,当 DVD-Ig 设计成靶向相同受体上的 2 种不同表位时,它可以用于触发受体成簇和活化。这在制备激动性和拮抗性抗 GPCR 治疗剂中可能具有益处。在这种情况下,DVD-Ig 可以用于靶向一种细胞上的 2 种不同表位用于成簇 / 信号传导 (2 种细胞表面分子) 或信号传导 (对于一种分子)。类似地,DVD-Ig 分子可以设计成通过靶向 CTLA-4 细胞外结构域的 2 种不同表位 (或相同表位的 2 个拷贝),触发 CTLA-4 连接和负信号,从而导致免疫应答下调。CTLA-4 是用于治疗性处理许多免疫学病症的临床确认的靶。CTLA-4/B7 相互作用通过减弱细胞周期进展、IL-2 生产、和活化后的 T 细胞增殖负调节 T 细胞活化,且 CTLA-4 (CD152) 衔接可以下调 T 细胞活化且促进免疫耐受性的诱导。然而,通过激动性抗体衔接 CTLA-4 减弱 T 细胞活化的策略仍是不成功的,因为 CTLA-4 活化需要连接。如通过晶体结构分析证实的 (Stamper 2001 Nature 410 :608),CTLA-4/B7 的分子相互作用为“歪斜拉链”排列。然而,目前可用的 CTLA-4 结合试剂没有一种具有连接性质,包括抗 CTLA-4 单克隆抗体。已存在解决这个问题的几种尝试。在一种情况下,细胞膜结合的单链抗体被产生,且显著抑制小鼠中的同种异体排斥 (Hwang 2002 JI 169 :633)。在分开的情况下,针对 CTLA-4 的人工 APC 表面连接的单链抗体被产生且显示减弱 T 细胞应答 (Griffin 2000 JI164 :4433)。在 2 种情况下,CTLA-4 连接通过使膜结合的抗体紧密局限在人工系统中来完成。尽管这些实验提供了通过触发 CTLA-4 负信号传导用于免疫下调的概念验证 (proof-of-concept),但这些报道中使用的试剂不适合于治疗用途。为此,CTLA-4 连接可以通过使用 DVD-Ig 分子来达到,所述 DVD-Ig 靶向 CTLA-4 细胞外结构域的 2 种不同表位 (或相同表位的 2 个拷贝)。基本原理是跨越 IgG 2 个结合位点的距离为约 150-170 Å,太大而不能有效连接 CTLA-4 (2 个 CTLA-4 同二聚体之间 30-50 Å)。然而,DVD-Ig 上 2 个结合部位 (1 个臂) 之间的距离短得多,也在 30-50 Å 范围中,从而允许 CTLA-4 适当连接。

[0196] 类似地,DVD-Ig 可以靶向细胞表面受体复合物的 2 个不同成员 (例如 IL-12R $\alpha$  和  $\beta$ )。此外,DVD-Ig 可以靶向 CR1 和可溶蛋白 / 病原体,以驱动靶可溶蛋白 / 病原体的快速清除。

[0197] 另外,本发明的 DVD-Igs 可以用于组织特异性递送 (靶向组织标记和疾病介质用于增强局部 PK,从而达到较高的功效和 / 或较低的毒性),包括细胞内递送 (靶向内在化受体和细胞内分子),递送至脑内 (靶向转铁蛋白受体和 CNS 疾病介质用于穿过血脑屏障)。DVD-Ig 也可以充当载体蛋白,以经由与那种抗原的非中和表位结合将抗原递送至特定位置,并且也增加抗原的半衰期。此外,DVD-Ig 可以设计成与植入患者内的医学装置物理连接,或靶向这些医学装置 (参见 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 drugtherapies and infection prophylaxis,Wu, Peng ;Grainger, David W., *Biomaterials*(2006),27(11),2450-2467 ;Mediation of the cytokinenetwork in the implantation of orthopedic devices.,Marques,A.P. ;Hunt, J.A. ;Reis, Rui L., *Biodegradable Systems in Tissue Engineering andRegenerative Medicine*(2005),377-397)。简言之,将合适的细胞类型导向医学植入物部位可以促进愈合和恢复正常组织功能。可替代地,也提供了通过与装置偶联或靶向装置的 DVD 对装置植入后释放的介质(包括但不限于细胞因子)的抑制。例如,支架多年来已在介入性心脏病学中使用,以清除闭塞动脉且改善至心肌的血流。然而,常规裸金属支架已知在某些患者中引起再狭窄(治疗区域中动脉的再变窄),且可以导致血凝块。近来,抗 CD34 抗体包被的支架已得到描述,它通过捕获在血液中各处循环的内皮祖细胞(EPC)来减少再狭窄且阻止血凝块发生。内皮细胞是血管衬里的细胞,允许血液平稳流动。EPCs 与支架硬表面附着形成平滑层,所述平滑层不仅促进愈合还阻止再狭窄和血凝块,所述再狭窄和血块是以前与支架使用相关的并发症(Aoji 等人,2005 *JAm Coll Cardiol.* 45(10):1574-9)。除了改善需要支架的患者的结果外,还存在需要心血管旁路手术的患者牵涉。例如,用抗 EPC 抗体包被的假体血管管道(人工动脉)将消除使用来自患者腿或臂动脉用于旁路手术移植的需要。这将减少外科手术和麻醉时间,这依次将减少冠状动脉外科手术死亡。DVD-Ig 以这样的方式设计,从而使得它与细胞表面标记(例如 CD34)以及蛋白质(或任何种类的表位,包括但不限于脂质和多糖)结合,所述细胞表面标记以及蛋白质已包被在植入的装置上以促进细胞募集。一般而言此种方法也可以应用于其他医学植入物。可替代地,DVD-Igs 可以包被在医学装置上,并且在植入且从装置中释放所有 DVDs 后(或可能需要另外的新鲜 DVD-Ig 的任何其他需要,包括已装载的 DVD-Ig 的老化和变性),装置可以通过给患者全身施用新鲜 DVD-Ig 进行再装载,其中 DVD-Ig 被设计成用一组结合位点与目的靶(细胞因子、细胞表面标记(例如 CD34)等)结合,且用另一组与包被在装置上的靶(包括蛋白质,任何种类的表位,包括但不限于脂质、多糖和聚合物)结合。这种技术具有扩展包被的植入物有用性的优点。

[0198] A. DVD-Igs 在各种疾病中的用途

[0199] 本发明的 DVD-Ig 分子也可用作治疗分子以治疗各种疾病。此类 DVD 分子可以结合涉及特定疾病的一种或多种靶。各种疾病中的此种靶的例子在下文描述。

[0200] 1. 人自身免疫和炎症应答

[0201] 许多蛋白质已普遍牵涉于自身免疫和炎症应答,包括 C5、CCL1(I-309)、CCL11(嗜伊红粒细胞趋化蛋白)、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/嗜伊红粒细胞趋化蛋白-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、CTLA4、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、GF11、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、TGFB1R1、TGFB1R2、TGFB1R3、TH1L、TNF、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF7、TNFRSF8、TNFRSF9、TNFRSF11A、TNFRSF21、TNFSF4、TNFSF5、TNFSF6、TNFSF11、VEGF、ZFPM2、和 RNF110 (ZNF144)。在一个方面,提供了能够结合上文列出的一种或多种靶的 DVD-Igs。

## [0202] 2. 哮喘

[0203] 变应性哮喘的特征在于存在嗜曙红细胞增多、杯形细胞组织转化、上皮细胞改变、气道高反应性 (AHR)、和 Th2 和 Th1 细胞因子表达、以及血清 IgE 水平升高。目前已普遍接受气道炎症是成为哮喘发病机理基础的关键因素,涉及炎症细胞及其分泌的介质包括细胞因子和趋化因子的复杂相互影响,所述炎症细胞例如 T 细胞、B 细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞和巨噬细胞。皮质类固醇是目前用于哮喘的最重要抗炎治疗,然而,它们的作用机理是非特异性的,且特别是在青少年患者群体中存在安全性关心。因此证明开发更特异性和靶向的治疗是有正当理由的。越来越多的证据表明小鼠中的 IL-13 模拟许多哮喘特征,包括 AHR、粘液分泌过多和气道纤维化、不取决于嗜酸性炎症 (Finotto 等人, *International Immunology* (2005), 17 (8), 993-1007 ; Padilla 等人, *Journal of Immunology* (2005), 174 (12), 8097-8105)。

[0204] 已暗示 IL-13 在引起与哮喘有关的病理应答中具有关键作用。开发抗 IL-13 单克隆抗体治疗以减少 IL-13 在肺中的作用是激动人心的新方法,它提供作为哮喘新治疗的相当大的希望。然而,差别免疫途径的其他介质也涉及哮喘发病机理,且除 IL-13 外,阻断这些介质可能提供另外的治疗利益。此种靶对包括但不限于,IL-13 和促炎细胞因子,例如肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )。TNF- $\alpha$  可以放大哮喘中的炎症应答且可能与疾病严重性关联 (McDonnell 等人, *Progress in Respiratory Research* (2001), 31 (New Drugs for Asthma, Allergy and COPD), 247-250.)。这暗示阻断 IL-13 和 TNF- $\alpha$  可能具有有益作用,特别是在严重气道疾病中。在优选实施方案中,本发明的 DVD-Ig 结合靶 IL-13 和 TNF  $\alpha$  且用于治疗哮喘。

[0205] 其中炎症和 AHR 两者可以被评估的动物模型例如 OVA- 诱导的哮喘小鼠模型,是本领域已知的且可以用于确定各种 DVD-Ig 分子治疗哮喘的能力。用于研究哮喘的动物

模型在下述参考文献中公开:Coffman 等人, *Journal of Experimental Medicine*(2005), 201(12),1875-1879;Lloyd 等人, *Advances in Immunology*(2001),77,263-295;Boyce 等人, *Journal of Experimental Medicine*(2005),201(12),1869-1873;和 Snibson 等人, *Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*(2005), 35(2),146-52。除了这些靶对的常规安全性评估外,关于免疫抑制程度的特异性测试在最佳靶对的选择中可以有正当理由的和有帮助的(参见,Luster 等人,*Toxicology*(1994), 92(1-3),229-43;Descotes 等人,*Developments in biological standardization*(1992), 7799-102;Hart 等人, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*(2001),108(2), 250-257)。

[0206] 基于上文公开的基本原理以及使用关于功效和安全性的相同评估模型,可以确定 DVD-Ig 分子可以结合且用于治疗哮喘的其他靶对。优选地此种靶包括但不限于, IL-13 和 IL-1 $\beta$ , 因为 IL-1 $\beta$  也涉及哮喘中的炎症应答;IL-13 和涉及炎症的细胞因子和趋化因子, 例如 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- $\beta$ ;IL-13 和 LHR 激动剂;IL-13 和 CL25;IL-13 和 SPRR2a;IL-13 和 SPRR2b;以及 IL-13 和 ADAM8。本发明还提供了能够结合选自下述的涉及哮喘的一种或多种靶的 DVD-Igs: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、和壳多糖酶。

### [0207] 3. 类风湿性关节炎

[0208] 全身性疾病类风湿性关节炎(RA)的特征在于关节滑膜中的慢性炎症反应,且伴随软骨变性和近关节骨侵蚀。包括 TNF、细胞因子和生长因子的许多促炎细胞因子在患病关节中表达。给 RA 小鼠模型全身施用抗 TNF 抗体或 sTNFR 融合蛋白显示是抗炎和关节保护的。其中用静脉内施用的英夫单抗(嵌合型抗 TNF 单克隆抗体(mAb))(Harriman G,HarperLK,SchaibleTF.1999 Summary of clinical trials in rheumatoid arthritis using infliximab, an anti-TNF $\alpha$  treatment. *Ann Rheum Dis* 58 Suppl 1:161-4.) 阻断 RA 患者的 TNF 活性的临床研究,已提供了下述证据:TNF 调节 IL-6、IL-8、MCP-1 和 VEGF 生产,免疫和炎症细胞募集到关节内,血管发生,和基质金属蛋白酶 1 和 3 的血液水平减少。类风湿性关节炎中炎症途径的更佳理解已导致涉及类风湿性关节炎的其他治疗靶的鉴定。有希望的治疗例如白细胞介素-6 拮抗剂(MRA)、CTLA4Ig(abatacept, Genovese Mc 等人,2005 Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. *N Engl J Med.* 353:1114-23.),以及抗 B 细胞治疗(利妥希玛, Okamoto H, Kamatani N.2004 Rituximab for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 351:1909),在过去的一年中已在随机对照试验中进行测试。其他细胞因子已被鉴定且已显示在动物模型中是有利的,包括白细胞介素-15、白细胞介素-17 和白细胞介素-18,

并且这些试剂的临床试验目前在进行中。组合抗 TNF 和另一种介质的双重特异性抗体疗法在增强临床功效和 / 或患者覆盖度方面具有很大的潜能。例如, 阻断 TNF 和 VEGF 两者可以潜在地根除炎症和血管发生, 所述炎症和血管发生都涉及 RA 的病理生理学。也预期了用特定 DVD Igs 阻断涉及 RA 的其他靶对, 包括但不限于, TNF 和 IL-18 ; TNF 和 IL-12 ; TNF 和 IL-23 ; TNF 和 IL-1 $\beta$  ; TNF 和 MIF ; TNF 和 IL-17 ; 以及 TNF 和 IL-15。除了这些靶对的常规安全性评估外, 关于免疫抑制程度的特异性测试在最佳靶对的选择中可以有正当理由的和有帮助的 ( 参见 Luster 等人, *Toxicology* (1994), 92(1-3), 229-43 ; Descotes 等人, *Developments in biological standardization* (1992), 77 99-102 ; Hart 等人, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2001), 108(2), 250-257)。DVD Ig 分子是否可用于治疗类风湿性关节炎可以使用临床前动物 RA 模型, 例如胶原诱导的关节炎小鼠模型进行评估。其他有用的模型也是本领域众所周知的 ( 参见 Brand DD. , *Comp Med.* (2005) 55(2) : 114-22)。

#### [0209] 4. SLE

[0210] SLE 的免疫病理学标志是多克隆 B 细胞活化, 这导致血球蛋白过多症、自身抗体产生和免疫复合物形成。基本异常似乎是由于广泛性 T 细胞调节异常, T 细胞不能抑制禁忌 B 细胞克隆。此外, B 和 T 细胞的相互作用通过几种细胞因子例如 IL-10, 以及共刺激分子例如 CD40 和 CD40L、B7 和 CD28 和 CTLA-4 得到促进, 所述细胞因子和共刺激分子起始第二信号。这些相互作用连同免疫复合物和细胞凋亡材料的受损吞噬清除, 使免疫应答与所产生的组织损害永存。下述靶可能涉及 SLE 且可以潜在地用于 DVD-Ig 方法用于治疗干预 : B 细胞靶向的治疗 : 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、INH1、INH2、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、和 NT5E. ; 共刺激信号 : CTLA4 或 B7. 1/B7. 2 ; B 细胞存活抑制 : BlyS, 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学应答是促炎或抗炎细胞因子局部水平之间平衡的结果 ( 参见 Sfiakis PP 等人, 2005 *Curr Opin Rheumatol* 17 : 550-7)。SLE 被视为具有文件证明的血清 IL-4、IL-6、IL-10 升高的 Th-2 驱动的疾病。也预期了能够结合选自下述的一种或多种靶的 DVD Igs : IL-4、IL-6、IL-10、IFN- $\alpha$ 、和 TNF- $\alpha$ 。上文讨论的靶组合将增强关于 SLE 的治疗功效, 所述治疗功效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)。

#### [0211] 5. 多发性硬化

[0212] 多发性硬化 (MS) 是具有主要未知病因的复杂人自身免疫型疾病。遍及神经系统的髓鞘碱性蛋白 (MBP) 的免疫学破坏是多发性硬化的主要病理学。MS 是具有复杂病理学的疾病, 所述病理学涉及经由 CD4+ 和 CD8+ T 细胞的浸润和中枢神经系统内的应答。细胞因子、活性氮种类和共刺激分子在 CNS 中的表达都已在 MS 中得到描述。主要考虑是促成自身免疫发展的免疫学机制。特别地, 抗原表达、细胞因子和白细胞相互作用、以及帮助平衡 / 调节其他 T 细胞例如 Th1 和 Th2 细胞的调节性 T 细胞, 是关于治疗靶鉴定的重要范围。

[0213] IL-12 是由 APC 生产且促进 Th1 效应细胞分化的促炎细胞因子。IL-12 在患有 MS 的患者的发展中的病灶中以及受 EAE 影响的动物中产生。先前显示干扰 IL-12 途径有效阻止啮齿类动物中的 EAE, 且使用抗 IL-12mAb 体内中和 IL-12p40 在普通猕猴中在髓鞘诱导的 EAE 模型中具有有利作用。

[0214] TWEAK 是 TNF 家族成员, 在中枢神经系统 (CNS) 中组成型表达, 取决于细胞类型具有促炎、增殖或细胞凋亡作用。它的受体 Fn14 由内皮细胞、反应性星形胶质细胞和神经元在 CNS 中表达。TWEAK 和 Fn14mRNA 表达在实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 期间在脊髓中增加。当小鼠在初始期 (priming phase) 后进行处理时, 在 C57BL/6 小鼠中抗 TWEAK 抗体处理髓鞘少突胶质糖蛋白 (MOG) 诱导的 EAE 导致疾病严重性减少和白细胞浸润。

[0215] 本发明的一个方面涉及能够结合选自下述的一种或多种, 优选 2 种靶的 DVD Ig 分子: IL-12、TWEAK、IL-23、CXCL13、CD40、CD40L、IL-18、VEGF、VLA-4、TNF、CD45RB、CD200、IFN  $\gamma$ 、GM-CSF、FGF、C5、CD52、和 CCR2。优选实施方案包括双重特异性抗 IL-12/TWEAK DVD Ig 作为对 MS 治疗有利的治疗剂。用于评估 DVD 分子治疗 MS 有用性的几种动物模型是本领域已知的 (参见 Steinman L 等人, (2005) Trends Immunol. 26(11):565-71; Lublin FD. 等人, (1985) Springer Semin Immunopathol. 8(3):197-208; Genain CP 等人, (1997) J Mol Med. 75(3):187-97; Tuohy VK 等人, (1999) J Exp Med. 189(7):1033-42; Owens T 等人, (1995) Neurol Clin. 13(1):51-73; 和 't Hart BA 等人, (2005) J Immunol 175(7):4761-8。除了这些靶对的常规安全性评估外, 关于免疫抑制程度的特异性测试在最佳靶对的选择中可以有正当理由的和有帮助的 (参见 Luster 等人, Toxicology (1994), 92(1-3), 229-43; Descotes 等人, Developments in biological standardization (1992), 7799-102; Jones R. 2000 Rovelizumab (ICOS Corp). IDrugs. 3(4):442-6)。

#### [0216] 6. 脓毒病

[0217] 脓毒病的病理生理学由革兰氏阴性生物 (脂多糖 [LPS]、脂质 A、内毒素) 和革兰氏阳性生物 (脂磷壁酸、肽聚糖) 的外膜组分起始。这些外膜组分能够与单核细胞表面上的 CD14 受体结合。由于近期描述的 toll 样受体, 信号随后传递给细胞, 从而导致促炎细胞因子肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素 -1 (IL-1) 的最终生产。压倒性的炎症和免疫应答是脓毒性休克的基本特征, 且在由脓毒病诱导的组织损伤、多器官衰竭和死亡发病机理中起重要作用。细胞因子, 特别是肿瘤坏死因子 (TNF) 和白细胞介素 (IL)-1, 已显示是脓毒性休克的关键介质。这些细胞因子对组织具有直接的毒性作用; 它们还激活磷脂酶 A2。这些及其他作用导致血小板活化因子浓度增加, 促进氧化氮合酶活性, 促进经由嗜中性粒细胞的组织浸润, 和促进嗜中性粒细胞的活性。

[0218] 脓毒病和脓毒性休克治疗仍是临床难题, 且使用针对炎症应答的生物学反应调节剂 (即抗 TNF、抗 MIF) 的近期预期试验仅显示适度的临床利益。近期, 兴趣已转向针对逆转伴随的免疫抑制时间段的治疗。实验动物和危急患病患者中的研究已证实淋巴器官和某些实质组织细胞凋亡增加促成这种免疫抑制、无反应性、和器官系统功能障碍。在脓毒病综合征期间, 淋巴细胞的细胞凋亡可以由 IL-2 的不存在或由糖皮质激素、粒酶或所谓的 '死亡' 细胞因子: 肿瘤坏死因子  $\alpha$  或 Fas 配体释放来触发。细胞凋亡经由胞质和 / 或线粒体胱天蛋白酶的自体活化而进展, 所述自体活化可以受 Bcl-2 家族的促或抗细胞凋亡成员的影响。在实验动物中, 使用细胞凋亡抑制剂的处理不仅可以阻止淋巴样细胞的细胞凋亡; 它还

改善结果。尽管在很大程度上由于与其施用和组织靶向相关的技术困难,使用抗细胞凋亡剂的临床试验仍然遥远,但淋巴细胞的细胞凋亡抑制代表关于脓毒性患者的吸引人的治疗靶。同样地,靶向炎症介质和细胞凋亡介质两者的双重特异性试剂可能具有附加利益。本发明的一个方面涉及能够结合选自下述的涉及脓毒病的一种或多种靶,优选 2 种靶的 DVD Ig 分子: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、和 TREM1。此种 DVD Igs 对于脓毒病的功效可以在本领域已知的临床前动物模型中进行评估(参见 Buras JA 等人,(2005) Nat Rev Drug Discov. 4(10):854-65 和 Calandra T 等人,(2000) Nat Med. 6(2):164-70)。

## [0219] 7. 神经障碍

### [0220] 7.1. 神经变性疾病

[0221] 慢性神经变性疾病通常是依赖年龄的疾病,其特征在于神经元功能的渐进性丧失(神经元细胞死亡、脱髓鞘),活动度丧失和记忆丧失。成为慢性神经变性疾病(例如,阿尔茨海默氏病)基础的机制的新出现的知识显示了复杂的病因学,且多种因素已被识别为促进其发展和进展,例如年龄、升糖(glycemic)状态,淀粉状蛋白生产和多聚化,与其受体 RAGE(关于 AGE 的受体)结合的晚期糖化终产物(AGE)积聚,脑氧化应激增加,脑血流量减少,神经炎症包括炎症细胞因子和趋化因子释放,神经元功能障碍和小胶质细胞活化。因此这些慢性神经变性疾病代表多种细胞类型和介质之间的复杂相互作用。关于此类疾病的治疗策略是有限的,且主要构成用非特异性抗炎剂(例如皮质类固醇、COX 抑制剂)或试剂阻断炎症性过程,以阻止神经元丧失和/或突触功能。这些治疗不能阻止疾病进展。近期研究暗示更加靶向的治疗,例如针对可溶性 A-b 肽(包括 A-b 寡聚形式)的抗体,不仅帮助阻止疾病进展还帮助维持记忆。这些初步观察暗示靶向超过一种疾病介质(例如 A-b 和促炎细胞因子例如 TNF)的特异疗法,可以提供比使用靶向单一疾病机制(例如单独的可溶性 A-b)观察到的甚至更好的对慢性神经变性疾病的治疗功效(参见 C. E. Shepherd 等人, Neurobiol Aging. 2005 Oct 24; Nelson RB., Curr Pharm Des. 2005; 11:3335; William L. Klein.; Neurochem Int. 2002; 41:345; Michelle C Janelins 等人, JNeuroinflammation. 2005; 2:23; Soloman B., Curr Alzheimer Res. 2004; 1:149; Igor Klyubin 等人, Nat Med. 2005; 11:556-61; Arancio O 等人, EMBO Journal (2004) 1-10; Bornemann KD 等人, AmJ Pathol. 2001; 158:63; Deane R 等人, Nat Med. 2003; 9:907-13; 和 Eliezer Masliah 等人, Neuron. 2005; 46:857)。

[0222] 本发明的 DVD-Ig 分子可以结合涉及慢性神经变性疾病例如阿尔茨海默病的一种或多种靶。此种靶包括但不限于,涉及 AD 发病机理的任何介质,可溶性或细胞表面的,例如 AGE(S100A,两性蛋白(amphoterin))、促炎细胞因子(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)、增强神经突生长的分子(神经营养蛋白)。DVD-Ig 分子的药效可以在临床前动物模型中进行验证,例如超表达淀粉状前体蛋白或 RAGE 且发展阿尔茨海默氏病样症状的转基因小鼠。此外,可以构建 DVD-Ig 分子并在动物模型中测试药效,并且可以选择最佳的治疗 DVD-Ig 用于在人患者中测试。DVD-Ig 分子也可以用于治疗其他神经变性疾病例如帕金森氏病。 $\alpha$ -突触核蛋白(Synuclein)涉及帕金森氏病理学。

能够靶向  $\alpha$ -突触核蛋白和炎症介质例如 TNF、IL-1、MCP-1 的 DVD-Ig 可以证明是对于帕金森氏病的有效治疗,且在本发明中被预期。

#### [0223] 7.2 神经元再生和脊髓损伤

[0224] 尽管病理学机制的知识增加,但脊髓损伤 (SCI) 仍是破坏性状况且代表特征在于高医学需要的医学适应症。大多数脊髓损伤是挫伤或压迫损伤,并且原发性损伤通常随后为继发性损伤机制(炎症介质例如细胞因子和趋化因子),所述继发性损伤机制使最初损伤恶化且导致损害区域显著放大,有时超过 10 倍。SCI 中的这些原发性和继发性机制非常类似于由其他方式例如中风引起的脑损伤中的那些。没有令人满意的治疗,且高剂量单次快速静脉注射甲基强的松龙 (MP) 是损伤后 8 小时窄时间窗内唯一使用的治疗。然而,这种治疗只预期阻止继发性损伤而不产生任何显著的功能恢复。它因为缺乏明确功效和严重的不利作用而受到猛烈批评,所述不利作用如具有后续感染的免疫抑制和严重组织病理学肌肉改变。没有批准刺激内源性再生潜能的其他药物、生物制剂或小分子,但近年来有希望的治疗原理和药物候选物已在 SCI 动物模型中显示功效。人 SCI 中的功能恢复缺乏在很大程度上由抑制神经突生长的因子引起,所述因子在损害部位处、在瘢痕组织中、在髓鞘质中以及损伤相关细胞上。此种因子是髓鞘相关蛋白髓鞘相关蛋白 NogoA、OMgp 和 MAG、RGM A、瘢痕相关 CSPG (硫酸软骨素蛋白聚糖) 和关于反应性星形胶质细胞的抑制因子(有时为脑信号蛋白和肝配蛋白)。然而,在损害部位处,不仅发现了生长抑制分子,还发现了神经突生长刺激因子,如神经营养蛋白、层粘连蛋白、L1 等。神经突生长抑制和生长促进分子的这种总体可能解释了,阻断单一因子如 NogoA 或 RGM A 在啮齿类动物 SCI 模型中导致显著的功能恢复,因为抑制影响的减少可以使平衡从生长抑制转移到生长促进。然而,对于阻断单个神经突长出抑制分子观察到的恢复并不完全。为了达到更快速和更显著的恢复,可能需要阻断 2 种神经突长出抑制分子例如 Nogo 和 RGM A,或阻断神经突长出抑制分子并增强神经突长出增强分子例如 Nogo 和神经营养蛋白的功能,或阻断神经突长出抑制分子例如 Nogo 和促炎分子例如 TNF (参见 McGee AW 等人, Trends Neurosci. 2003 ;26 :193 ; Marco Domeniconi 等人, J Neurol Sci. 2005 ;233 :43 ;Milan Makwanal 等人, FEBS J. 2005 ;272 :2628 ;Barry J. Dickson, Science. 2002 ;298 :1959 ;Felicia Yu Hsuan Teng 等人, J Neurosci Res. 2005 ;79 :273 ;Tara Karnezis 等人, Nature Neuroscience 2004 ;7,736 ;Gang Xu 等人, J. Neurochem. 2004 ;91 ;1018)。

[0225] 在一个方面,提供了能够结合下述靶对的 DVD-Igs,所述靶对例如 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 ;聚集蛋白聚糖、中期因子、神经蛋白聚糖、多功能蛋白聚糖、磷酸聚糖、Te38 和 TNF- $\alpha$  ;与促进树突和轴突萌发的抗体组合的 A $\beta$  globulomer- 特异性抗体。树突病理学是非常早期的 AD 病征,且已知 NOGO A 限制树突生长。人们可以将此种 ab 类型与任何 SCI 候选(髓鞘蛋白质) Ab 组合。其他 DVD-Ig 靶可以包括 NgR-p75、NgR-Troy、NgR-Nogo66 (Nogo)、NgR-Lingo、Lingo-Troy、Lingo-p75、MAG 或 Ompg 的任何组合。此外,靶还可以包括涉及神经突抑制的任何介质,可溶性或细胞表面的,例如 Nogo、Ompg、MAG、RGM A、脑信号蛋白、肝配蛋白、可溶性 A-b、促炎细胞因子(例如 IL-1)、趋化因子(例如 MIP 1a)、抑制神经再生的分子。抗 nogo/ 抗 RGM A 或类似 DVD-Ig 分子的功效可以在脊髓损伤的临床前动物模型中进行验证。此外,可以构建这些 DVD-Ig 分子并在动物模型中测试功效,并且可以选择最佳的治疗 DVD-Ig 用于在人患

者中测试。此外,可以构建靶向单个受体上的 2 个不同配体结合位点的 DVD-Ig 分子,所述受体例如结合 3 种配体 Nogo、Ompg 和 MAG 的 Nogo 受体,以及结合 A-b 和 S100A 的 RAGE。此外,神经突长出抑制剂例如 nogo 和 nogo 受体,也在免疫学疾病如多发性硬化中阻止神经再生方面起作用。nogo-nogo 受体相互作用的抑制已显示增强多发性硬化动物模型中的恢复。因此,可以阻断一种免疫介质例如细胞因子如 IL-12 和神经突长出抑制剂分子例如 nogo 或 RGM 功能的 DVD-Ig 分子,可以提供比阻断单独的免疫或神经突长出抑制剂分子更快和更大的功效。

#### [0226] 8. 肿瘤学病症

[0227] 单克隆抗体治疗已显现为关于癌症的重要治疗方式 (von Mehren M, 等人, 2003 Monoclonal antibody therapy for cancer. Annu Rev Med. ;54 :343-69)。抗体可以通过下述发挥抗肿瘤作用:诱导细胞凋亡、改变方向的细胞毒性、干扰配体-受体相互作用、或阻止对瘤表型关键的蛋白质表达。此外,抗体可以靶向肿瘤微环境组分,干扰重要结构例如肿瘤相关脉管系统的形成。抗体还可以靶向其配体是生长因子的受体,例如表皮生长因子受体。抗体因此抑制刺激细胞生长的天然配体与靶向的肿瘤细胞结合。可替代地,抗体可以诱导抗独特型网络、补体介导的细胞毒性、或抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。与单特异性治疗比较,靶向 2 种分开的肿瘤介质的双重特异性抗体的使用将可能产生附加利益。能够结合下述靶对以治疗肿瘤学疾病的 DVD Igs 也是预期的:IGF1 和 IGF2 ;IGF1/2 和 Erb2B ; VEGFR 和 EGFR ;CD20 和 CD3、CD138 和 CD20、CD38 和 CD20、CD38 和 CD138、CD40 和 CD20、CD138 和 CD40、CD38 和 CD40。其他靶组合包括 EGF/erb-2/erb-3 家族的一个或多个成员。涉及肿瘤学疾病的、DVD Igs 可以结合的其他靶(一种或多种)包括但不限于,选自下述的那些: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、ENO2、ENO3、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、TGFB1、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、CTNBN1(b-连环蛋白)、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 整联蛋白)、JUN、KLK5、KRT19、MAP2K7(c-Jun)、MKI67(Ki-67)、NGFB(NGF)、NGFR、NME1(NM23A)、PGR、PLAU(uPA)、PTEN、SERPINB5(乳腺丝抑蛋白)、SERPINE1(PAI-1)、TGFA、THBS1(血小板反应蛋白-1)、TIE(Tie-1)、TNFRSF6(Fas)、TNFSF6(FasL)、TOP2A(拓扑异构酶 Iia)、TP53、AZGP1(锌-a-糖蛋白)、BPAG1(网蛋白)、CDKN1A(p21Wap1/Cip1)、CLDN7(密蛋白-7)、CLU(簇蛋白)、ERBB2(Her-2)、FGF1、FLRT1(纤连蛋白)、GABRP(GABAa)、GNAS1、ID2、ITGA6(a6 整联蛋白)、ITGB4(b4 整联蛋白)、KLF5(GC Box 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(亲脂素 B)、SCGB2A1(乳腺珠蛋白 2)、SCGB2A2(乳腺珠蛋白 1)、SPRR1B(Spr1)、THBS1、THBS2、THBS4、和 TNFAIP2(B94)。

#### [0228] IV. 药物组合物

[0229] 本发明还提供了包含本发明的结合蛋白,和药学可接受的载体的药物组合物。包含本发明的结合蛋白的药物组合物用于在下述方面使用,但不限于下述方面,病症诊断、检测或监控,病症或其一种或多种症状的预防、治疗、管理或改善和/或研究。在具体实施方案中,组合物包含本发明的一种或多种结合蛋白。在另一个实施方案中,药物组合物包含本发明的一种或多种结合蛋白,以及除本发明结合蛋白外用于治疗病症的一种或多种预防或治疗剂。优选地,预防或治疗剂已知在病症或其一种或多种症状的预防、治疗、管理或改善中,或已在其中使用或目前正在其中使用。依照这些实施方案,组合物可以进一步包含载体、稀释剂或赋形剂。

[0230] 本发明的结合蛋白可以掺入适合于给受试者施用的药物组合物内。一般地,药物组合物包含本发明的结合蛋白和药学可接受的载体。如本文使用的,“药学可接受的载体”包括生理学相容的任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。药学可接受的载体的例子包括下述一种或多种:水、盐水、磷酸缓冲盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等,及其组合。在许多情况下,在组合物中包括等渗剂将是优选的,所述等渗剂例如糖、多元醇例如甘露糖醇、山梨糖醇、或氯化钠。药学可接受的载体可以进一步包含少量辅助物质,例如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲液,所述辅助物质增强抗体或抗体部分的保存期限或效力。

[0231] 各种递送系统是已知的,且可以用于施用本发明的一种或多种抗体或本发明的一

种或多种抗体与预防剂或治疗剂的组合,用于预防、管理、治疗或改善病症或其一种或多种症状,例如被囊化在脂质体中、微粒、微胶囊、能够表达抗体或抗体片段的重组细胞、受体介导的胞吞(参见,例如,Wu和Wu, *J. Biol. Chem.* 262 :4429-4432(1987))、作为逆转录病毒或其他载体部分的核酸构建等。施用本发明的预防或治疗剂的方法包括但不限于,肠胃外施用(例如,皮内、肌内、腹膜内、静脉内和皮下),硬膜外施用,瘤内施用和粘膜施用(例如,鼻内和经口途径)。此外,可以使用肺施用,例如利用吸入器或喷雾器,和含雾化剂的制剂。参见,例如,美国专利号 6,019,968、5,985,320、5,985,309、5,934,272、5,874,064、5,855,913、5,290,540、和 4,880,078;以及 PCT 公开号 W092/19244、W0 97/32572、W0 97/44013、W0 98/31346、和 W0 99/66903,所述专利各自整体引入本文作为参考。在一个实施方案中,本发明的结合蛋白、组合疗法、或本发明的组合物使用 **Alkermes AIR®** 肺药物递送技术(Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.) 来施用。在具体实施方案中,本发明的预防或治疗剂肌内、静脉内、瘤内、经口、鼻内、肺、或皮下施用。预防或治疗剂可以通过任何常规途径施用,例如通过输注或单次快速静脉注射,通过经由上皮或粘膜皮肤衬里(例如,口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收,且可以连同其他生物学活性剂一起施用。施用可以是全身或局部的。

[0232] 在具体实施方案中,可能需要使本发明的预防或治疗剂的局部施用在需要治疗的区域;这可以通过例如但不限于局部输注、注射、或通过植入物来完成,所述植入物为多孔或无孔材料,包括膜和基质,例如硅橡胶(sialastic)膜、聚合物、纤维基质(例如, **Tissuel®**)、或胶原基质。在一个实施方案中,有效量的本发明拮抗剂的一种或多种抗体局部施用于受试者的受累区域,以预防、治疗、管理、和/或改善病症或其症状。在另一个实施方案中,有效量的本发明的一种或多种抗体,与有效量的除本发明结合蛋白外的一种或多种疗法(例如,一种或多种预防或治疗剂)组合,局部施用于受试者的受累区域,以预防、治疗、管理、和/或改善病症或其一种或多种症状。

[0233] 在另一个实施方案中,预防或治疗剂可以在控释或持续释放系统中递送。在一个实施方案中,可以使用泵以达到控释或持续释放(参见 Langer, 同上; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14 :20; Buchwald 等人, 1980, *Surgery* 88 :507; Saudek 等人, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321 :574)。在另一个实施方案中,聚合材料可以用于达到本发明疗法的控释或持续释放(参见例如, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer 和 Wise(eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen 和 Ball(eds.), Wiley, New York(1984); Ranger 和 Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23 :61; 还参见 Levy 等人, 1985, *Science* 228 :190; During 等人, 1989, *Ann. Neurol.* 25 :351; Howard 等人, 1989, *J. Neurosurg.* 71 :105); 美国专利号 5,679,377; 美国专利号 5,916,597; 美国专利号 5,912,015; 美国专利号 5,989,463; 美国专利号 5,128,326; PCT 公开号 W0 99/15154; 和 PCT 公开号 W099/20253。在持续释放制剂中使用的聚合物的例子包括但不限于,聚甲基丙烯酸 2-羟乙酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚丙烯酸、乙烯-乙酸乙烯酯共聚物、聚甲基丙烯酸、聚乙醇酸交酯(PLG)、聚酞、聚 N-乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺、聚乙二醇、聚丙交酯(PLA)、丙交酯-乙醇酸交酯共聚物(PLGA)、和聚原酸酯。在优选实施方案中,持续释放制剂中使用的聚合物是惰性的、不含可沥滤杂质、贮藏稳定、无菌和生物可降解的。在另外一个

实施方案中,控释或持续释放系统可以接近预防或治疗靶放置,从而只需要全身剂量的部分(参见,例如,Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, 同上,第2卷,第115-138页(1984))。

[0234] 控释系统在 Langer(1990, *Science* 249 :1527-1533) 的综述中讨论。本领域技术人员已知的任何技术都可以用于生产包含本发明的一种或多种治疗剂的持续释放制剂。参见,例如,美国专利号 4,526,938, PCT 公开 W091/05548, PCT 公开 W096/20698, Ning 等人,1996, " *Intratatumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel*, " *Radiotherapy & Oncology* 39 :179-189, Song 等人,1995, " *Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions*, " *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50 :372-397, Cleek 等人,1997, " *Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application*, " *Pro. Int' l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24 :853-854, 和 Lam 等人,1997, " *Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery*, " *Proc. Int' l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24 :759-760, 所述参考文献各自整体引入本文作为参考。

[0235] 在具体实施方案中,当本发明的组合物是编码预防或治疗剂的核酸时,核酸可以体内施用以促进其编码的预防或治疗剂的表达,这通过下述实现,将其构建为合适的核酸表达载体的部分且施用,从而使得其成为细胞内的,例如利用逆转录病毒载体(参见美国专利号 4,980,286),或直接注射,或使用微粒轰击(例如,基因枪;Biolistic, Dupont),或用脂质或细胞表面受体或转染剂包被,或与已知进入核的同源异型框样肽连接施用(参见,例如, Joliot 等人,1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 :1864-1868)。可替代地,核酸可以引入细胞内且通过同源重组整合入宿主细胞 DNA 内用于表达。

[0236] 本发明的药物组合物配制为与其预期施用途径相容。施用途径的例子包括但不限于,肠胃外,例如,静脉内、皮内、皮下、经口、鼻内(例如,吸入)、经皮(例如,局部)、跨粘膜、和直肠施用。在具体实施方案中,组合物依照常规程序配制为药物组合物,所述药物组合物适合于静脉内、皮下、肌内、经口、鼻内或局部施用于人类。一般地,用于静脉内施用的组合物是在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时,组合物还可以包括增溶剂和局部麻醉剂例如利多卡因(lignocaine),以减轻注射部位处的疼痛。

[0237] 如果本发明的组合物将局部施用,那么组合物可以配制为软膏、乳膏、经皮贴剂、洗剂、凝胶、洗发剂、喷雾剂、气溶胶、溶液、乳剂形式或本领域技术人员众所周知的其他形式。参见,例如, Remington's *Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 第19版, Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)。对于不可喷雾的局部剂型,一般使用包含与局部应用相容的载体或一种或多种赋形剂,且具有优选大于水的动态粘度的粘性至半固体或固体形式。合适的制剂包括但不限于,溶液、悬浮液、乳剂、乳膏、软膏、粉末、搽剂、油膏等,必要时进行灭菌或与助剂(例如防腐剂、稳定剂、湿润剂、缓冲液或盐)混合用于影响各种性质,例如,渗透压。其他合适的局部剂型包括可喷雾的气溶胶制剂,其中活性成分,优选与固体或液体惰性载体组合,与加压挥发物(例如,气体推进剂,例如氟利昂)在混合物中包装或包装在挤压瓶中。必要时保湿剂(moisturizer)或湿润剂也可以加到药物组合物和剂型中。此种另外成分的例子是本领域众所周知的。

[0238] 如果本发明的方法包括组合物的鼻内施用,那么组合物可以配制为气溶胶形式、喷雾剂、雾或滴剂形式。特别地,用于根据本发明使用的预防或治疗剂可以以从加压包或喷雾器呈递的气溶胶喷雾剂形式常规递送,使用合适的推进剂(例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适的气体)。在加压气溶胶的情况下,剂量单位可以通过提供阀来确定,以递送计量的量。可以配制包含化合物和合适粉末基例如乳糖或淀粉的粉末混合物的胶囊和药液筒(由例如明胶组成),用于在吸入器或吹入器中使用。如果本发明的方法包括经口施用,那么组合物可以配制为片剂、胶囊、扁胶剂、粒状胶囊(gelcaps)、溶液、悬浮液等经口形式。片剂或胶囊可以通过常规方法用药学可接受的赋形剂制备,所述赋形剂例如粘合剂(例如,预凝胶玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮、或羟丙基甲基纤维素);充填剂(例如,乳糖、微晶纤维素、或磷酸氢钙);润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石或硅石);崩解剂(例如,马铃薯淀粉或羟基乙酸淀粉钠);或湿润剂(例如,十二烷基硫酸钠)。片剂可以通过本领域众所周知的方法进行包被。用于经口施用的液体制剂可以采取下述形式,但不限于下述形式,溶液、糖浆或悬浮液,或它们可以呈现为干燥产品,用于在使用前用水或其他合适的载体构建。此类液体制剂可以通过常规方法用药学可接受的添加剂制备,所述添加剂例如悬浮剂(例如,山梨糖醇糖浆、纤维素衍生物、或氢化食用脂肪);乳化剂(例如,卵磷脂或阿拉伯胶);非水载体(例如,杏仁油、油酯、乙醇、或分馏植物油);和防腐剂(例如,对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸)。适当时制剂还可以包含缓冲盐、调味剂、着色剂和甜味剂。用于经口施用的制剂可以适当地配制,用于缓慢释放、控释、或持续释放一种或多种预防或治疗剂。

[0239] 本发明的方法可以包括用气溶胶化剂(aerosolizing agent)配制的组合物的肺施用,例如利用吸入器或喷雾器。参见,例如,美国专利号6,019,968、5,985,320、5,985,309、5,934,272、5,874,064、5,855,913、5,290,540、和4,880,078;和PCT公开号WO 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346、和WO 99/66903,所述专利各自整体引入本文作为参考。在具体实施方案中,本发明的结合蛋白、组合疗法、和/或本发明的组合物使用Alkermes AIR®肺药物递送技术(Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.)来施用。

[0240] 本发明的方法可以包括配制用于通过注射(例如通过单次快速静脉注射或连续输注)肠胃外施用的组合物的施用。用于注射的制剂可以与添加的防腐剂一起以单位剂型(例如,在安瓿或多剂容器中)呈递。组合物可以采取此种形式,如在油性或水性载体中的悬浮液、溶液或乳剂,且可以包含配制试剂例如悬浮、稳定和/或分散剂。可替代地,活性成分可以为粉末形式用于在使用前用合适的载体(例如,无菌无致热原水)构建。

[0241] 本发明的方法可以另外包括配制为积存(depot)制剂的组合物的施用。此类长效制剂可以通过植入(例如皮下或肌内)或通过肌内注射来施用。因此,例如,组合物可以用合适的聚合或疏水材料(例如,作为在可接受的油中的乳剂)或离子交换树脂配制,或配制为微溶衍生物(例如,作为微溶盐)。

[0242] 本发明的方法包括配制为中性或盐形式的组合物的施用。药学可接受的盐包括由阴离子形成的那些,例如来源于盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些,以及由阳离子形成的那些,例如来源于氢氧化钠、钾、铵、钙、铁,异丙胺,三乙胺,2-乙氨基乙醇,组氨酸,普鲁卡因等的那些。

[0243] 一般地,组合物的成分分开或混合在一起以单位剂型提供,例如,作为在密封容器

中的干冷冻干燥粉末或无水浓缩剂,所述密封容器例如安瓿或囊剂,其指示活性剂的量。当施用方式是输注时,组合物可以用包含无菌药物级别的水或盐水的输注瓶分配。当施用方式是注射时,可以提供无菌注射用水或盐水安瓿,从而使得成分可以在施用前进行混合。

[0244] 特别地,本发明还提供了包装在密封容器中的本发明的一种或多种预防或治疗剂或药物组合物,所述密封容器例如安瓿或囊剂,其指示活性剂的量。在一个实施方案中,本发明的一种或多种预防或治疗剂或药物组合物,作为在密封容器中的干无菌冷冻干燥粉末或无水浓缩剂提供,且可以重建(例如,用水或盐水)至合适浓度以用于给受试者施用。优选地,本发明的一种或多种预防或治疗剂或药物组合物,作为在密封容器中的干无菌冷冻干燥粉末提供,其单位剂量为至少 5mg、更优选至少 10mg、至少 15mg、至少 25mg、至少 35mg、至少 45mg、至少 50mg、至少 75mg、或至少 100mg。冷冻干燥的本发明的预防或治疗剂或药物组合物应在其原容器中贮存于 2°C -8°C,并且本发明的预防或治疗剂或药物组合物应在重建后 1 周内施用,优选 5 天内、72 小时内、48 小时内、24 小时内、12 小时内、6 小时内、5 小时内、3 小时内、或 1 小时内。在可替代的实施方案中,本发明的一种或多种预防或治疗剂或药物组合物,以液体形式在指示试剂的量和浓度的密封容器中提供。优选地,液体形式的施用的组合物在密封容器中提供,其量为至少 0.25mg/ml,更优选至少 0.5mg/ml、至少 1mg/ml、至少 2.5mg/ml、至少 5mg/ml、至少 8mg/ml、至少 10mg/ml、至少 15mg/kg、至少 25mg/ml、至少 50mg/ml、至少 75mg/ml 或至少 100mg/ml。液体形式应在其原容器中贮存于 2°C -8°C。

[0245] 本发明的结合蛋白可以掺入适用于肠胃外施用的药物组合物内。优选地,抗体或抗体部分将制备为包含 0.1-250mg/ml 结合蛋白的可注射溶液。可注射溶液可以由在燧石或琥珀色小瓶、安瓿或预装注射器中的液体或冷冻干燥剂型组成。缓冲液可以是 L-组氨酸(1-50mM),最佳 5-10mM, pH 5.0-7.0(最佳 pH 6.0)。其他合适的缓冲液包括但不限于,琥珀酸钠、柠檬酸钠、磷酸钠或磷酸钾。氯化钠可以用于修饰浓度 0-300mM(对于液体剂型最佳 150mM)的溶液的毒性。对于冷冻干燥剂型可以包括冷冻保护剂,主要为 0-10%蔗糖(最佳 0.5-1.0%)。其他合适的冷冻保护剂包括海藻糖和乳糖。对于冷冻干燥剂型可以包括膨胀剂,主要为 1-10%甘露糖醇(最佳 2-4%)。稳定剂可以在液体和冷冻干燥剂型中使用,主要为 1-50mM L-甲硫氨酸(最佳 5-10mM)。其他合适的膨胀剂包括甘氨酸、精氨酸,可以作为 0-0.05%聚山梨醇酯 80(最佳 0.005-0.01%)包括。另外的表面活性剂包括但不限于,聚山梨醇酯 20 和 BRIJ 表面活性剂。制备为可注射溶液用于肠胃外施用、包含本发明的结合蛋白的药物组合物可以进一步包含用作佐剂的试剂,例如用于增加治疗蛋白质(例如,抗体)吸收、或分散的那些。特别有用的佐剂是透明质酸酶,例如 **Hylenex®**(重组人透明质酸酶)。在可注射溶液中添加透明质酸酶改善肠胃外施用,特别是皮下施用后的人生物药效率。它还允许具有较少疼痛和不适的更大注射部位体积(即大于 1ml),和最低限度的注射部位反应发生率。(参见引入本文作为参考的 W02004078140 和 US2006104968)

[0246] 本发明的组合物可以为多种形式。这些包括例如,液体、半固体和固体剂型,例如液体溶液(例如,可注射和可输注溶液)、分散体或悬浮液、片剂、丸剂、粉末、脂质体和栓剂。优选形式取决于预期施用方式和治疗应用。一般的优选组合物为可注射和可输注溶液形式,例如类似于由其他抗体被动免疫接种人使用的那些的组合物。优选施用方式是肠胃外的(例如,静脉内、皮下、腹膜内、肌内)。在优选实施方案中,抗体通过静脉内输注或注射来施用。在另一个优选实施方案中,抗体通过肌内或皮下注射来施用。

[0247] 治疗组合物一般必须是无菌且在制备和贮存条件下是稳定的。组合物可以配制为溶液、微乳剂、分散体、脂质体、或适合于高药物浓度的其他有序结构。无菌可注射溶液可以通过下述制备：将需要量的活性化合物（即，抗体或抗体部分）与上文列举的一种成分或成分组合一起掺入合适的溶剂中，必要时随后进行过滤灭菌。一般地，分散体通过将活性化合物掺入无菌载体内来制备，所述无菌载体包含基本分散介质和来自上文列举那些的必需的其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌、冷冻干燥粉末的情况下，优选制备方法是由其先前无菌过滤的溶液产生活性成分加任何另外所需成分的粉末的真空干燥和喷雾干燥。溶液的正确流动性可以通过下述来维持，例如利用涂层例如卵磷脂，在分散体的情况下维持所需颗粒大小和利用表面活性剂。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中包括延迟吸收的试剂来引起，所述试剂例如单硬脂酸盐和明胶。

[0248] 本发明的结合蛋白可以通过本领域已知的多种方法来施用，尽管对于许多治疗应用，优选施用途径/模式是皮下注射、静脉内注射或输注。如技术人员应当理解的，施用途径和/或模式将依所需结果而变。在某些实施方案中，活性化合物可以与载体一起制备，所述载体将保护化合物免于快速释放，例如控释制剂，包括植入物、经皮贴剂、和微囊化递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物，例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此种制剂的许多方法是获得专利保护的或是本领域技术人员一般已知的。参见，例如，Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0249] 在某些实施方案中，本发明的结合蛋白可以例如，与惰性稀释剂或可同化食用载体一起经口施用。化合物（和若需要，其他成分）也可以装入硬或软壳明胶胶囊中，压缩成片剂，或直接掺入受试者的饮食内。对于经口部治疗施用，化合物可以与赋形剂掺合，且以可摄食片剂、口腔含化片剂、锭剂、胶囊、酞剂、悬浮液、糖浆、薄片（wafel）等的形式使用。为了通过除肠胃外施用外施用本发明的化合物，可能必须用材料包被化合物、或将化合物与材料共施用，以防止其失活。

[0250] 补充性活性化合物也可以掺入组合物内。在某些实施方案中，本发明的结合蛋白与一种或多种另外的治疗剂共配制和/或共施用，所述治疗剂对治疗其中 IL-12 活性是有害的病症是有用的。例如，本发明的结合蛋白可以与结合其他靶的一种或多种另外的抗体（例如，结合其他细胞因子或结合细胞表面分子的抗体）共配制和/或共施用。此外，本发明的一种或多种抗体可以与 2 种或更多前述治疗剂组合使用。此类组合疗法可以有利地利用较低剂量的施用的治疗剂，从而避免与各种单一疗法相关的可能毒性或并发症。

[0251] 在某些实施方案中，结合蛋白与本领域已知的半衰期延长载体连接。此类载体包括但不限于，Fc 结构域、聚乙二醇、和葡聚糖。此类载体在例如美国申请系列号 09/428,082 和公开的 PCT 申请号 WO 99/25044 中描述，所述专利为了任何目的在此引入作为参考。

[0252] 在具体实施方案中，施用编码本发明的结合蛋白或本发明的另一种预防或治疗剂的核酸序列，以经由基因疗法治疗、预防、管理、或改善病症或其一种或多种症状。基因疗法指通过给受试者施用表达的或可表达核酸来进行的疗法。在本发明的这个实施方案中，核酸生产其编码的抗体或介导预防或治疗作用的本发明预防或治疗剂。

[0253] 本领域可用的任何关于基因治疗的方法可以根据本发明使用。关于基因治疗方法的一般综述，参见 Goldspiel 等人，1993, Clinical Pharmacy 12:488-505；Wu 和

Wu, 1991, *Biotherapy* 3 :87-95 ;Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32 : 573-596 ;Mulligan, *Science* 260 :926-932(1993) ;以及 Morgan 和 Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62 :191-217 ;May, 1993, *TIBTECH* 11(5) :155-215。可使用的重组 DNA 技术领域通常已知的方法描述于 Ausubel 等人 (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY(1993) ;和 Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY(1990)。各种基因治疗方法的详细描述在引入本文作为参考的 US20050042664A1 中公开。

[0254] 本发明的结合蛋白可用于治疗其中由结合蛋白识别的靶是有害的各种疾病。此种疾病包括但不限于, 类风湿性关节炎、骨关节炎、青少年慢性关节炎、脓毒性关节炎、莱姆关节炎、牛皮癣性关节炎、反应性关节炎、脊椎关节病、全身性红斑狼疮、Crohn 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、变应性疾病、牛皮癣、皮炎硬皮病、移植物抗宿主病、器官移植排斥、与器官移植相关的急性或慢性免疫性疾病、肉状瘤病、动脉粥样硬化、弥散性血管内凝血、Kawasaki 氏病、Grave 氏病、肾病综合征、慢性疲乏综合征、韦格纳氏肉芽肿病、过敏性紫癜、肾显微血管炎、慢性活动性肝炎、葡萄膜炎、脓毒性休克、中毒性休克综合征、脓毒症综合征、恶病质、传染病、寄生虫病、获得性免疫缺陷综合征、急性横贯性脊髓炎、亨廷顿氏舞蹈病、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、中风、原发性胆汁性肝硬化、溶血性贫血、恶性肿瘤、心力衰竭、心肌梗死、Addison 氏病、散发性多腺性 I 型缺乏和多腺性 II 型缺乏、Schmidt 氏综合征、成人（急性）呼吸窘迫综合征、秃头、斑秃、血清反应阴性关节病、关节病、Reiter 氏病、牛皮癣性关节炎、溃疡性结肠炎性关节炎、肠病性滑膜炎、衣原体、耶尔森氏菌和沙门氏菌相关性关节病、脊椎关节病、动脉粥样化疾病 / 动脉硬化、特应性变态反应、自身免疫性大疱性疾病、寻常天疱疮、落叶状天疱疮、类天疱疮、线性 IgA 疾病、自身免疫性溶血性贫血、Coombs 阳性溶血性贫血、获得性恶性贫血、青少年恶性贫血、肌痛脑炎 / Royal Free 疾病、慢性粘膜皮肤念珠菌病、巨细胞性动脉炎、原发性硬化性肝炎、隐源性自身免疫性肝炎、获得性免疫缺陷病综合征、获得性免疫缺陷相关病、乙型肝炎、丙型肝炎、常见的各种免疫缺陷（常见的可变低丙种球蛋白血症）、扩张型心肌病、女性不育、卵巢衰竭、过早卵巢衰竭、纤维化肺疾病、隐源性纤维化肺泡炎、炎症后间质性肺病、间质性肺炎、结缔组织病相关性间质性肺病、混合性结缔组织病相关性肺病、全身性硬皮病相关性间质性肺病、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、皮炎 / 多肌炎相关性肺病、Sjögren 氏病相关性肺病、强直性脊柱炎相关性肺病、脉管炎性弥散性肺病、含铁血黄素沉着病相关性肺病、药物诱导的间质性肺病、纤维化、放射性纤维化、闭塞性细支气管炎、慢性嗜酸性肺炎、淋巴细胞性浸润性肺病、传染后间质性肺病、痛风性关节炎、自身免疫性肝炎、1 型自身免疫性肝炎（传统自身免疫性或狼疮样肝炎）、2 型自身免疫性肝炎（抗 LKM 抗体肝炎）、自身免疫介导的低血糖、具有黑棘皮症的 B 型胰岛素耐受性、甲状旁腺机能减退、与器官移植相关的急性免疫性疾病、与器官移植相关的慢性免疫性疾病、骨关节炎、原发性硬化性胆管炎、1 型牛皮癣、2 型牛皮癣、特发性白细胞减少、自身免疫性嗜中性白细胞减少症、肾脏病 NOS、肾小球肾炎、肾显微血管炎、莱姆病、盘状红斑狼疮、特发性男性不育症或 NOS、精子自身免疫性、多发性硬化（所有亚型）、交感性眼炎、结缔组织病继发的肺动脉高压、Goodpasture 氏综合征、结节性多动脉炎的肺表现、急性风湿热、类风湿性脊椎炎、Still 氏病、全身性硬皮病、Sjögren 氏综合征、Takayasu 氏病 / 动

脉炎、自身免疫性血小板减少症、特发性血小板减少症、自身免疫性甲状腺病、甲状腺机能亢进、甲状腺肿性自身免疫性甲状腺功能减退 (Hashimoto 氏病)、萎缩性自身免疫性甲状腺功能减退、原发性粘液性水肿、晶状体性葡萄膜炎、原发性血管炎、白癜风急性肝病、慢性肝病、酒精性肝硬变、酒精诱导的肝损伤、choleostatis、特应性肝病、药物诱导的肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、变态反应和哮喘、B 群链球菌 (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、急性和慢性痛 (不同形式的疼痛)、以及癌症例如肺、乳腺、胃、膀胱、结肠、胰、卵巢、前列腺和直肠癌以及造血恶性肿瘤 (白血病和淋巴瘤)、无  $\beta$  脂蛋白血症、手足发绀、急性和慢性寄生或感染过程、急性白血病、急性成淋巴细胞性白血病 (ALL)、急性髓细胞样白血病 (AML)、急性或慢性细菌感染、急性胰腺炎、急性肾功能衰竭、腺癌、心房异位搏动、AIDS 痴呆复征、酒精诱导的肝炎、变应性结膜炎、过敏性接触性皮炎、变应性鼻炎、同种异体移植物排斥、 $\alpha$ -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 治疗、抗磷脂综合征、抗受体超敏反应、主和周围性动脉瘤、主动脉壁夹层形成、高动脉压、动脉硬化、动静脉瘘、共济失调、心房纤维颤动 (持续性或阵发性)、心房扑动、房室传导阻滞、B 细胞淋巴瘤、骨移植物排斥、骨髓移植 (BMT) 排斥、束支传导阻滞、Burkitt 氏淋巴瘤、烧伤、心律失常、心脏震晕综合征、心脏肿瘤、心肌病、心肺分流术炎症应答、软骨移植排斥、小脑皮质变性、小脑病症、紊乱性或多源性房性心动过速、化学疗法相关病症、慢性髓细胞性白血病 (CML)、慢性酒精中毒、慢性炎性病理学、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、慢性阻塞性肺部疾病 (COPD)、慢性水杨酸盐中毒、结肠直肠癌、充血性心力衰竭、结膜炎、接触性皮炎、肺源性心脏病、冠状动脉疾病、Creutzfeldt-Jakob 病、培养物阴性脓毒病、囊性纤维化、细胞因子疗法相关病症、拳击员痴呆、脱髓鞘病、登革出血热、皮炎、皮肤病学状况、多尿症、糖尿病、糖尿病性动脉硬化性疾病、弥漫性 Lewy 小体病、扩张性充血性心肌病、基底神经节病症、中年唐氏综合征、由阻断 CNS 多巴胺受体的药物诱导的药物诱导的运动障碍、药物敏感性、湿疹、脑脊髓炎、心内膜炎、内分泌病、会厌炎、EB 病毒感染、红斑性肢痛病、锥体外束和小脑病症、家族性嗜血性淋巴组织细胞增多症、胎儿胸腺移植排斥、Friedreich 氏共济失调、功能性外周性动脉病症、真菌性脓毒病、气性坏疽病、胃溃疡、肾小球肾炎、任何器官或组织的移植物排斥、革兰氏阴性脓毒病、革兰氏阳性脓毒病、由于细胞内生物的肉芽肿、毛细胞性白血病、Hallerrorden-Spatz 病、hashimoto 氏甲状腺炎、枯草热、心脏移植排斥、血色素沉着症、血液透析、溶血性尿毒性综合征 / 血栓溶解性血小板减少性紫癜、出血、肝炎 (A)、希氏束心律失常、HIV 感染 / HIV 神经病、何杰金氏病、运动过度性运动障碍、超敏反应、超敏感性肺炎、高血压、运动机能减退性运动障碍、下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴评价、特发性 Addison 氏病、特发性肺纤维化、抗体介导的细胞毒性、虚弱、婴儿型脊髓性肌萎缩、主动脉炎症、流行性感冒 a、电离辐射照射、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、青少年脊髓性肌萎缩、卡波西氏肉瘤、肾移植排斥、军团杆菌、利什曼病、麻风病、皮层脊髓系统损伤、脂肪水肿、肝移植排斥、淋巴水肿、疟疾、恶性淋巴瘤、恶性组织细胞增多症、恶性黑素瘤、脑膜炎、脑膜炎球菌血症、代谢性 / 特发性、偏头痛、线粒体多系统病症、混合型结缔组织病、单克隆丙种球蛋白病、多发性骨髓瘤、多系统变性 (Mencel Dejerine-ThomasShi-Drager 和 Machado-Joseph)、重症肌无力、鸟胞内分支杆菌、结核分支杆菌、骨髓异常增生综合征、心肌梗死、心肌缺血性病症、鼻咽癌、新生儿慢性肺病、肾炎、肾变病、神经变性疾病、神经

原发性 I 肌萎缩、嗜中性粒细胞减少性发烧、非何杰金淋巴瘤、腹主动脉及其分支闭塞、闭塞性动脉病症、okt3 治疗、睾丸炎 / 附睾炎、睾丸炎 / 输精管切除术逆转操作、器官巨大症、骨质疏松症、胰移植排斥、胰癌、恶性肿瘤的肿瘤相关综合征 / 高钙血症、甲状旁腺移植排斥、盆腔炎症性疾病、常年性鼻炎、心包疾病、外周性动脉粥样硬化疾病、外周血管病症、腹膜炎、恶性贫血、卡氏肺囊虫性肺炎、肺炎、POEMS 综合征（多发性神经病、器官巨大症、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病、和皮肤变化综合征）、灌注后综合征、泵后综合征、MI 心切开后综合征、先兆子痫、进行性核上麻痹、原发性肺动脉高压、放射治疗、Raynaud 氏现象和疾病、Raynaud 氏病、Refsum 氏病、常规狭窄 QRS 心动过速、肾血管性高血压、再灌注损伤、限制性心肌病、肉瘤、硬皮病、老年性舞蹈病、Lewy 小体型老年性痴呆、血清阴性关节病、中风、镰状细胞贫血、皮肤同种异体移植排斥、皮肤变化综合征、小肠移植排斥、实体瘤、特殊心律失常、脊髓性共济失调、脊髓小脑变性、链球菌肌炎、小脑结构损伤、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、全身炎症反应综合征、全身发作性青少年类风湿性关节炎、T 细胞或 FABALL、毛细血管扩张、血栓闭塞性脉管炎、血小板减少症、毒性、移植物、创伤 / 出血、III 型超敏反应、IV 型超敏反应、不稳定心绞痛、尿毒症、尿脓毒病、荨麻疹、心脏瓣膜疾病、静脉曲张、血管炎、静脉疾病、静脉血栓形成、心室纤维性颤动、病毒和真菌感染、病毒性脑炎 / 无菌性脑膜炎、病毒相关性噬红细胞综合征、Wernicke-Korsakoff 综合征、Wilson 氏病、任何器官或组织的异种移植排斥。（参见 Peritt 等人 PCT 公开号 W02002097048A2, Leonard 等人, PCT 公开号 W09524918A1 和 Salfeld 等人, PCT 公开号 W000/56772A1）。

[0255] 本发明的结合蛋白可以用于治疗患有自身免疫性疾病的人，所述自身免疫性疾病特别是与炎症相关的那些，包括类风湿性关节炎、脊椎炎、变态反应、自身免疫性糖尿病、自身免疫性葡萄膜炎。

[0256] 优选地，本发明的结合蛋白或其抗原结合部分用于治疗类风湿性关节炎、Crohn 氏病、多发性硬化、胰岛素依赖性糖尿病和牛皮癣。

[0257] 本发明的结合蛋白也可以与各种疾病治疗中有一种或多种另外治疗剂一起施用。

[0258] 本发明的结合蛋白可以单独或组合使用以治疗此种疾病。应当理解结合蛋白可以单独或与另外的试剂例如治疗剂组合使用，所述另外的试剂由技术人员根据其预期目的进行选择。例如，另外的试剂可以是领域公认为治疗由本发明的抗体治疗的疾病或状况有用的治疗剂。另外的试剂也可以是赋予治疗组合物有利属性的试剂，例如影响组合物粘度的试剂。

[0259] 应进一步理解将包括在本发明内的组合是对其预期目的有用的那些组合。下文所述试剂是举例说明性目的的且不希望是限制性的。作为本发明部分的组合可以是本发明的抗体和选自下列的至少一种另外的试剂。组合还可以包括超过一种另外的试剂，例如，2 种或 3 种另外的试剂，如果组合是这样的，从而使得形成的组合物可以执行其预期功能的话。

[0260] 治疗自身免疫和炎性疾病的优选组合是非类固醇消炎药，也称为 NSAIDS，它包括药物如布洛芬。其他优选组合是皮质类固醇，包括强的松龙；当与本发明的 DVD Igs 组合治疗患者时，通过逐渐减少所需的类固醇剂量，可以减少或甚至消除类固醇使用的众所周知的副作用。本发明的抗体或抗体部分可以与之组合用于类风湿性关节炎的治疗剂的非限制

性例子包括下述：细胞因子抑制性消炎药 (CSAIDs)；针对其他人细胞因子或生长因子的抗体或拮抗剂，例如，TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、IL-21、IL-23、干扰素、EMAP-II、GM-CSF、FGF、和 PDGF。本发明的结合蛋白或其抗原结合部分可以与针对细胞表面分子或其配体包括 CD154 (gp39 或 CD40L) 的抗体组合，所述细胞表面分子例如 CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80 (B7. 1)、CD86 (B7. 2)、CD90、CTLA。

[0261] 治疗剂的优选组合可以在自身免疫和后续炎症级联中的不同点上进行干扰；优选例子包括 TNF 拮抗剂，如嵌合、人源化或人 TNF 抗体，D2E7、(PCT 公开号 WO 97/29131)、CA2 (Remicade™)、CDP 571、和可溶性 p55 或 p75TNF 受体，其衍生物 (p75TNFR1gG (Enbrel™) 或 p55TNFR1gG (Lenercept))，以及 TNF  $\alpha$  转换酶 (TACE) 抑制剂；类似地由于相同原因 IL-1 抑制剂 (白细胞介素 -1 转换酶抑制剂，IL-1RA 等) 可以是有效的。其他优选组合包括白细胞介素 11。另外一种优选组合包括自身免疫应答的关键参与物 (player)，所述关键参与物与 IL-12 功能平行作用，依赖于 IL-12 功能或与 IL-12 功能一致；特别优选的是 IL-18 拮抗剂，包括 IL-18 抗体或可溶性 IL-18 受体，或 IL-18 结合蛋白。已显示 IL-12 和 IL-18 具有重叠但不同的功能，且针对二者的拮抗剂组合可能是最有效的。另外一种优选组合是非耗尽性抗 CD4 抑制剂。另外一种优选组合包括共刺激途径 CD80 (B7. 1) 或 CD86 (B7. 2) 拮抗剂，包括抗体、可溶性受体或拮抗性配体。

[0262] 本发明的结合蛋白还可以与试剂组合，所述试剂例如氨甲蝶呤、6-MP、硫唑嘌呤、柳氮磺吡啶、美沙拉秦、奥沙拉嗪氯喹 (chloroquinine) / 羟氯喹、青霉素、硫化苹果酸金 (肌肉和经口)、硫唑嘌呤、秋水仙碱、皮质类固醇 (经口、吸入和局部注射)、 $\beta$  2 肾上腺素受体激动剂 (沙丁胺醇、特布他林、沙美特罗)、黄嘌呤 (茶碱、氨茶碱)、色甘酸盐、萘多罗米、酮替芬、异丙托铵和乙东碱、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸酯、来氟洛米、NSAIDs 例如布洛芬、皮质类固醇例如强的松龙、磷酸二酯酶抑制剂、腺苷激动剂、抗凝剂、补体抑制剂、肾上腺素能药、干扰经由促炎细胞因子例如 TNF  $\alpha$  或 IL-1 的信号传导的试剂 (例如 IRAK、NIK、IKK、p38 或 MAP 激酶抑制剂)、IL-1  $\beta$  转换酶抑制剂、TNF  $\alpha$  转换酶 (TACE) 抑制剂、T 细胞信号传导抑制剂例如激酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂、柳氮磺吡啶、硫唑嘌呤、6- 巯基嘌呤、血管紧张素转换酶抑制剂、可溶性细胞因子受体及其衍生物 (例如，可溶性 p55 或 p75TNF 受体和衍生物 p75TNFR1gG (Enbrel™ 和 p55TNFR1gG (Lenercept))、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R)、抗炎细胞因子 (例如，IL-4、IL-10、IL-11、IL-13 和 TGF  $\beta$ )、塞来昔布、叶酸、硫酸羟氯喹、洛芬昔布、依那西普、英夫单抗、萘普生、伐地考昔、柳氮磺吡啶、甲基强的松龙、美洛昔康、乙酸甲基强的松龙、硫代苹果酸金钠、阿司匹林、曲安缩松、萘磺酸右丙氧芬 / 扑热息痛、叶酸盐、萘普酮、扶他林、吡罗昔康、依托度酸、双氯酚酸钠、奥沙普嗪、盐酸羟可酮、重酒石酸二氢可待因酮 / 扑热息痛、双氯酚酸钠 / 米索前列醇、芬太尼、阿那白滞素 (anakinra)、人重组体、盐酸曲马多、双水杨酸酯、舒林酸、氰钴胺素 / fa / 吡哆醇、扑热息痛、阿仑膦酸钠、强的松龙、硫酸吗啡、盐酸利多卡因、吲哚美辛、硫酸葡萄糖胺 (glucosamine sulf) / 软骨素、盐酸阿米替林、磺胺嘧啶、盐酸羟可酮 / 扑热息痛、盐酸奥洛帕定、米索前列醇、甲氧萘丙酸钠、奥美拉唑、环磷酰胺、利妥希玛、IL-1TRAP、MRA、CTLA4-IG、IL-18BP、抗 IL-18、抗 IL15、BIRB-796、SC10-469、VX-702、AMG-548、VX-740、罗氟司特 (Roflumilast)、IC-485、CDC-801、和美苏帕玛 (Mesopram)。优选组合包括氨甲蝶呤或来氟洛米，并且在

等或重度类风湿性关节炎的情况下,环孢菌素。

[0263] 也可以与结合蛋白组合使用以治疗类风湿性关节炎的非限制性的另外试剂包括但不限于,下述:非类固醇消炎药(NSAIDs);细胞因子抑制性消炎药(CSAIDs);CDP-571/BAY-10-3356(人源化抗TNF $\alpha$ 抗体;Celltech/Bayer);cA2/英夫单抗(嵌合抗TNF $\alpha$ 抗体;Centocor);75kdTNFR-IgG/依那西普(75kd TNF受体-IgG融合蛋白;Immunex;参见例如,Arthritis & Rheumatism(1994)第37卷,S295;J. Invest. Med. (1996)第44卷,235A);55kdTNF-IgG(55kd TNF受体-IgG融合蛋白;Hoffmann-LaRoche);IDEC-CE9.1/SB 210396(非耗尽性灵长类动物源化(primatized)抗CD4抗体;IDEC/SmithKline;参见,例如Arthritis& Rheumatism(1995)第38卷,S185);DAB 486-IL-2和/或DAB 389-IL-2(IL-2融合蛋白;Seragen;参见例如,Arthritis & Rheumatism(1993)第36卷,1223);抗Tac(人源化抗IL-2R $\alpha$ ;Protein Design Labs/Roche);IL-4(抗炎细胞因子DNAX/Schering);IL-10(SCH 52000;重组IL-10,抗炎细胞因子;DNAX/Schering);IL-4;IL-10和/或IL-4激动剂(例如,激动性抗体);IL-1RA(IL-1受体拮抗剂;Synergen/Amgen);阿那白滞素(Kineret<sup>®</sup>/Amgen);TNF-bp/s-TNF(可溶性TNF结合蛋白;参见例如,Arthritis & Rheumatism(1996)第39卷,No. 9(增刊),S284;Amer. J. Physiol.-Heart and Circulatory Physiology(1995)第268卷,第37-42页);R973401(磷酸二酯酶IV型抑制剂;参见例如,Arthritis& Rheumatism(1996)第39卷,No. 9(增刊),S282);MK-966(COX-2抑制剂;参见例如,Arthritis & Rheumatism(1996)第39卷,No. 9(增刊),S81);伊落前列素(参见例如,Arthritis & Rheumatism(1996)第39卷,No. 9(增刊),S82);氨甲蝶呤;沙立度胺(参见例如,Arthritis& Rheumatism(1996)第39卷,No. 9(增刊),S282)和沙立度胺相关药物(例如,Celgen);来氟洛米(抗炎和细胞因子抑制剂;参见例如,Arthritis & Rheumatism(1996)第39卷,No. 9(增刊),S131;Inflammation Research(1996)第45卷,第103-107页);氨甲环酸(纤溶酶原活化抑制剂;参见例如,Arthritis & Rheumatism(1996)第39卷,No. 9(增刊),S284);T-614(细胞因子抑制剂;参见例如,Arthritis& Rheumatism(1996)第39卷,No. 9(增刊),S282);前列腺素E1(参见例如,Arthritis & Rheumatism(1996)第39卷,No. 9(增刊),S282);替尼达普(非类固醇消炎药;参见例如,Arthritis & Rheumatism(1996)第39卷,No. 9(增刊),S280);萘普生(非类固醇消炎药;参见例如,Neuro Report(1996)第7卷,第1209-1213页);美洛昔康(非类固醇消炎药);布洛芬(非类固醇消炎药);吡罗昔康(非类固醇消炎药);扶他林(非类固醇消炎药);吡罗美辛(非类固醇消炎药);柳氮磺吡啶(参见例如,Arthritis & Rheumatism(1996)第39卷,No. 9(增刊),S281);硫唑嘌呤(参见例如,Arthritis & Rheumatism(1996)第39卷,No. 9(增刊),S281);ICE抑制剂(白细胞介素-1转换酶抑制剂);zap-70和/或lck抑制剂(酪氨酸激酶zap-70或lck抑制剂);VEGF抑制剂和/或VEGF-R抑制剂(血管内皮细胞生长因子或血管内皮细胞生长因子受体抑制剂;血管发生抑制剂);皮质类固醇消炎药(例如,SB203580);TNF-转变酶抑制剂;抗-IL-12抗体;抗-IL-18抗体;白细胞介素-11(参见例如,Arthritis & Rheumatism(1996)第39卷,No. 9(增刊),S296);白细胞介素-13(参见例如,Arthritis & Rheumatism(1996)第39卷,No. 9(增刊),S308);白细胞介素-17抑制剂(参见例如,Arthritis & Rheumatism(1996)第39卷,No. 9(增刊),S120);金;青霉胺;氯喹;苯丁酸氮芥;羟氯喹;环孢菌素;环磷酰

胺;全淋巴照射;抗-胸腺细胞球蛋白;抗-CD4 抗体;CD5-毒素;经口施用的肽和胶原;氯苯扎利二钠;细胞因子调节剂(CRAs)HP228 和 HP466(Houghten Pharmaceuticals, Inc.); ICAM-1 反义硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸(ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.);可溶性补体受体1(TP10; T Cell Sciences, Inc.);强的松;奥古蛋白;糖胺聚糖多硫酸盐;米诺环素;抗-IL2R 抗体;海生和植物脂质(鱼和植物种子脂肪酸;参见例如, DeLuca 等人(1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21:759-777);金诺芬;保泰松;甲氯灭酸;氟芬那酸;静脉内免疫球蛋白;弃白通;阿托立平;霉酚酸(RS-61443);他克莫司(FK-506);西罗莫司(雷帕霉素);氨普立糖(amiprilose)(therafectin);克拉屈滨(2-氯脱氧腺苷);氨甲蝶呤;抗病毒剂;和免疫调谐剂。

[0264] 在一个实施方案中,结合蛋白或其抗原结合部分与下述试剂之一组合施用用于治疗类风湿性关节炎:KDR 的小分子抑制剂(ABT-123), Tie-2 的小分子抑制剂;氨甲蝶呤;强的松;塞来昔布;叶酸;硫酸羟氯喹;洛芬昔布;依那西普;英夫单抗;来氟洛米;萘普生;伐地考昔;柳氮磺吡啶;甲基强的松龙;布洛芬;美洛昔康;乙酸甲基强的松龙;硫代苹果酸金钠;阿司匹林;硫唑嘌呤;曲安缩松;萘磺酸右丙氧芬/扑热息痛;叶酸盐;萘普酮;扶他林;吡罗昔康;依托度酸;双氯酚酸钠;奥沙普嗪;盐酸羟可酮;重酒石酸二氢可待因酮/扑热息痛;双氯酚酸钠/米索前列醇;芬太尼;阿那白滞素,人重组体;盐酸曲马多;双水杨酸酯;舒林酸;氰钴胺素/fa/吡哆醇;扑热息痛;阿仑膦酸钠;强的松龙;硫酸吗啡;盐酸利多卡因;吲哚美辛;硫酸葡糖胺/软骨素;环孢菌素;盐酸阿米替林;磺胺嘧啶;盐酸羟可酮/扑热息痛;盐酸奥洛帕定;米索前列醇;甲氧萘丙酸钠;奥美拉唑;霉酚酸酯;环磷酰胺;利妥希玛;IL-1TRAP;MRA;CTLA4-IG;IL-18BP;ABT-874;ABT-325(抗 IL 18);抗 IL 15;BIRB-796;SC10-469;VX-702;AMG-548;VX-740;罗氟司特;IC-485;CDC-801;和美苏帕玛。

[0265] 本发明的结合蛋白可以与之组合用于炎性肠病的治疗剂的非限制性例子包括下述:布地奈德;表皮生长因子;皮质类固醇;环孢菌素、柳氮磺吡啶;氨基水杨酸盐;6-巯基嘌呤;硫唑嘌呤;甲硝唑;脂肪加氧酶抑制剂;美沙拉秦;奥沙拉嗪;巴柳氮;抗氧化剂;血栓烷抑制剂;IL-1 受体拮抗剂;抗-IL-1 $\beta$  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;针对其他人细胞因子或生长因子的抗体或其拮抗剂,所述细胞因子或生长因子例如 TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF、和 PDGF。本发明的抗体或其抗原结合部分可以与针对细胞表面分子或其配体的抗体组合,所述细胞表面分子例如 CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90。本发明的抗体或其抗原结合部分还可以与试剂组合,所述试剂例如氨甲蝶呤、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸酯、来氟洛米、NSAIDs 例如布洛芬、皮质类固醇例如强的松龙、磷酸二酯酶抑制剂、腺苷激动剂、抗凝剂、补体抑制物、肾上腺素能药、干扰经由促炎细胞因子例如 TNF $\alpha$  或 IL-1 的信号传导的试剂(例如 IRAK、NIK、IKK、p38 或 MAP 激酶抑制剂)、IL-1 $\beta$  转换酶抑制剂、TNF $\alpha$  转换酶抑制剂、T 细胞信号传导抑制剂例如激酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂、柳氮磺吡啶、硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤、血管紧张素转换酶抑制剂、可溶性细胞因子受体及其衍生物(例如可溶性 p55 或 p75TNF 受体, sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R) 和抗炎细胞因子(例如, IL-4、IL-10、IL-11、IL-13 和 TGF $\beta$ )。

[0266] 其中结合蛋白可以组合用于 Crohn 氏病的治疗剂的优选例子包括下述:TNF 拮抗剂,例如抗 TNF 抗体, D2E7(PCT 公开号 WO 97/29131; HUMIRA), CA2(REMICADE), CDP 571,

TNFR-Ig 构建体, (p75TNFR IgG (ENBRELE) 和 p55TNFR IgG (LENERCEPT)) 抑制剂和 PDE4 抑制剂。本发明的抗体或其抗原结合部分可以与皮质类固醇组合, 例如布地奈德和地塞米松。本发明的结合蛋白或其抗原结合部分还可以与试剂组合, 所述试剂例如柳氮磺吡啶、5-氨基水杨酸和奥沙拉嗪, 以及干扰促炎细胞因子例如 IL-1 合成或作用的试剂, 例如 IL-1 $\beta$  转换酶抑制剂和 IL-1ra。本发明的抗体或其抗原结合部分还可以与 T 细胞信号传导抑制剂一起使用, 例如, 酪氨酸激酶抑制剂 6- 巯基嘌呤。本发明的结合蛋白或其抗原结合部分可以与 IL-11 组合。本发明的结合蛋白或其抗原结合部分可以与下述试剂组合: 美沙拉秦、强的松、硫唑嘌呤、巯基嘌呤、英夫单抗、甲基强的松龙琥珀酸钠、地芬诺酯 / 硫酸阿托品、盐酸洛哌丁胺、氨甲蝶呤、奥美拉唑、叶酸盐、环丙沙星 / 葡萄糖 - 水、重酒石酸二氢可待因酮 / 扑热息痛、盐酸四环素、氟轻松、甲硝唑、硫柳汞 / 硼酸、消胆胺 / 蔗糖、盐酸环丙沙星、硫酸萘苄碱、盐酸哌替啶、盐酸咪达唑、盐酸羟可酮 / 扑热息痛、盐酸异丙嗪、磷酸钠、磺胺甲异噁唑 / 甲氧苄啶、塞来昔布、聚卡波非、萘磺酸右丙氧芬、氢化可的松、多种维生素、巴柳氮二钠、磷酸可待因 / 扑热息痛、盐酸考来维仑 (colesevelamhcl)、氰钴胺素、叶酸、左氟沙星、甲基强的松龙、那他珠单抗和干扰素  $\gamma$ 。

[0267] 本发明的结合蛋白可以与之组合用于多发性硬化的治疗剂的非限制性例子包括下述: 皮质类固醇; 强的松龙; 甲基强的松龙; 硫唑嘌呤; 环磷酰胺; 环孢菌素; 氨甲蝶呤; 4- 氨基吡啶; 替扎尼定; 干扰素 - $\beta$  1a (AVONEX; Biogen); 干扰素 - $\beta$  1b (BETASERON; Chiron/Berlex); 干扰素  $\alpha$ -n3 (Interferon Sciences/Fujimoto), 干扰素 - $\alpha$  (AlfaWassermann/J&J), 干扰素  $\beta$  1A-IF (Serono/Inhale Therapeutics), 聚乙二醇化干扰素 (Peginterferon)  $\alpha$  2b (Enzon/Schering-Plough), 共聚物 1 (Cop-1; COPAXONE; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); 高压氧; 静脉内免疫球蛋白; 克拉屈滨 (clabribine); 针对其他人细胞因子或生长因子及其受体的抗体或其拮抗剂, 例如, TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-23、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF、和 PDGF。本发明的结合蛋白可以与针对细胞表面分子或其配体的抗体组合, 所述细胞表面分子例如 CD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90。本发明的结合蛋白还可以与试剂组合, 所述试剂例如氨甲蝶呤、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸酯、来氟洛米、NSAIDs 例如布洛芬、皮质类固醇例如强的松龙、磷酸二酯酶抑制剂、腺苷激动剂、抗凝剂、补体抑制剂、肾上腺素能药、干扰经由促炎细胞因子例如 TNF  $\alpha$  或 IL-1 的信号传导的试剂 (例如 IRAK、NIK、IKK、p38 或 MAP 激酶抑制剂)、IL-1 $\beta$  转换酶抑制剂、TACE 抑制剂、T 细胞信号传导抑制剂例如激酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂、柳氮磺吡啶、硫唑嘌呤、6- 巯基嘌呤、血管紧张素转换酶抑制剂、可溶性细胞因子受体及其衍生物 (例如可溶性 p55 或 p75TNF 受体, sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R) 和抗炎细胞因子 (例如, IL-4、IL-10、IL-11、IL-13 和 TGF  $\beta$ )。

[0268] 其中本发明的结合蛋白可以组合用于多发性硬化的治疗剂的优选例子包括干扰素 - $\beta$ , 例如 IFN  $\beta$  1a 和 IFN  $\beta$  1b; 考帕松, 皮质类固醇, 胱天蛋白酶抑制剂, 例如胱天蛋白酶 -1 抑制剂, IL-1 抑制剂, TNF 抑制剂, 以及针对 CD40 配体和 CD80 的抗体。

[0269] 本发明的结合蛋白还可以与试剂组合, 所述试剂例如阿来组单抗、屈大麻酚、尤迈 (Unimed)、达克珠单抗 (daclizumab)、米托蒽醌、盐酸扎利罗登 (xaliproden hydrochloride)、4- 氨基吡啶、乙酸格拉太咪尔、那他珠单抗、辛纳必醇 (sinnabidol)、

$\alpha$ -免疫因子 ( $\alpha$ -immunokine)NNS03、ABR-215062、AnergiX、MS、趋化因子受体拮抗剂、BBR-2778、卡拉古林 (calagualine)、CPI-1189、LEM(脂质体被囊化的米托蒽醌)、THC、CBD(大麻素激动剂)、MBP-8298、美苏帕玛 (PDE4 抑制剂)、MNA-715、抗 IL-6 受体抗体、神经素 (neurovax)、哌非尼酮 allotrap 1258 (RDP-1258)、sTNF-R1、他仑帕奈 (talampanel)、特立氟胺 (teriflunomide)、TGF- $\beta$  2、替利莫肽 (tiplimotide)、VLA-4 拮抗剂 (例如, TR-14035、VLA4 Ultrahaler、Antegran-ELAN/Biogen)、干扰素  $\gamma$  拮抗剂和 IL-4 拮抗剂。

[0270] 本发明的结合蛋白可以与之组合用于心绞痛的治疗剂的非限制性例子包括下述: 阿司匹林、硝酸甘油、单硝酸异山梨酯、琥珀酸美托洛尔、阿替洛尔、酒石酸美托洛尔、阿罗地平磺酸盐、盐酸地尔草、硝酸异山梨酯、重硫酸氯吡格雷、硝苯地平、阿托伐他汀钙、氯化钾、呋塞米、斯伐他汀、盐酸维拉帕米、地高辛、盐酸普萘洛尔、卡维地洛、赖诺普利、螺内酯、氢氯噻嗪、马来酸依那普利、纳多洛尔、雷米普利、依诺肝素钠、肝素钠、缬沙坦、盐酸索他洛尔、非诺贝特、依泽替米贝 (ezetimibe)、布美他尼、氯沙坦钾、赖诺普利 / 氢氯噻嗪、非洛地平、卡托普利、富马酸比索洛尔。

[0271] 本发明的结合蛋白可以与之组合用于强直性脊柱炎的治疗剂的非限制性例子包括下述: 布洛芬、扶他林和米索前列醇、萘普生、美洛昔康、吲哚美辛、扶他林、塞来昔布、洛芬昔布、柳氮磺吡啶、氨甲蝶呤、硫唑嘌呤、米诺环素、强的松、依那西普、英夫单抗。

[0272] 本发明的结合蛋白可以与之组合用于哮喘的治疗剂的非限制性例子包括下述: 沙丁胺醇、沙美特罗 / 氟替卡松、孟鲁司特钠、丙酸氟替卡松、布地奈德、强的松、沙美特罗羟萘甲酸盐 (salmeterol xinafoate)、盐酸左旋沙丁胺醇、硫酸沙丁胺醇 / 异丙托铵、强的松龙磷酸钠、曲安缩松、倍氯美松双丙酸酯、异丙托溴铵、阿奇霉素、醋酸吡布特罗、强的松龙、无水茶碱、甲基强的松龙琥珀酸钠、克拉霉素、扎鲁司特、富马酸福莫特罗、流感病毒疫苗、甲基强的松龙、阿莫西林三水合物、氟尼缩松、变态反应注射、色甘酸钠、盐酸非索那丁、氟尼缩松 / 薄荷醇、阿莫西林 / 克拉维酸钾、左氟沙星、吸入器辅助装置、愈创木酚甘油醚、地塞米松磷酸钠、盐酸莫西沙星、盐酸多西环素、愈创木酚甘油醚 / d- 甲吗喃、p- 麻黄素 / cod/ 氯苯那敏 (chlorphenir)、加替沙星、盐酸西替立嗪、糠酸莫米他松、沙美特罗羟萘甲酸盐、苯佐那酯、头孢氨苄、pe/ 二氢可待因酮 / 氯苯那敏、盐酸西替立嗪 / 伪麻黄碱 (pseudoephed)、苯福林 / cod/ 异丙嗪、可待因 / 异丙嗪、头孢罗齐、地塞米松、愈创木酚甘油醚 / 伪麻黄碱、氯苯那敏 / 二氢可待因酮、奈多罗米钠、硫酸特布他林、肾上腺素、甲基强的松龙、硫酸间羟异丙肾上腺素。

[0273] 本发明的结合蛋白可以与之组合用于 COPD 的治疗剂的非限制性例子包括下述: 硫酸沙丁胺醇 / 异丙托铵、异丙托溴铵、沙美特罗 / 氟替卡松、沙丁胺醇、沙美特罗羟萘甲酸盐、丙酸氟替卡松、强的松、无水茶碱、甲基强的松龙琥珀酸钠、孟鲁司特钠、布地奈德、富马酸福莫特罗、曲安缩松、左氟沙星、愈创木酚甘油醚、阿奇霉素、倍氯美松双丙酸酯、盐酸左旋沙丁胺醇、氟尼缩松、头孢曲松钠、阿莫西林三水合物、加替沙星、扎鲁司特、阿莫西林 / 克拉维酸钾、氟尼缩松 / 薄荷醇、氯苯那敏 / 二氢可待因酮、硫酸间羟异丙肾上腺素、甲基强的松龙、糠酸莫米他松、p- 麻黄素 / cod/ 氯苯那敏、醋酸吡布特罗、p- 麻黄素 / 氯雷他定、硫酸特布他林、噻托溴铵 (tiotropium bromide)、(R, R)- 福莫特罗、TgAAT、西洛司特 (Cilomilast)、罗氟司特。

[0274] 本发明的结合蛋白可以与之组合用于 HCV 的治疗剂的非限制性例子包括下述: 干

扰素- $\alpha$ -2a、干扰素- $\alpha$ -2b、干扰素- $\alpha$  con1、干扰素- $\alpha$ -n1、聚乙二醇化干扰素- $\alpha$ -2a、聚乙二醇化干扰素- $\alpha$ -2b、三氮唑核苷、聚乙二醇干扰素- $\alpha$ -2b+三氮唑核苷、熊脱氧胆酸、甘草酸、胸腺法新、马克胺 (Maxamine)、VX-497 以及通过干扰下述靶用于治疗 HCV 的任何化合物: HCV 聚合酶、HCV 蛋白酶、HCV 解旋酶、HCV IRES (内部核糖体进入位点)。

[0275] 本发明的结合蛋白可以与之组合用于特发性肺纤维化的治疗剂的非限制性例子包括下述: 强的松、硫唑嘌呤、沙丁胺醇、秋水仙碱、硫酸沙丁胺醇、地高辛、 $\gamma$  干扰素、甲基强的松龙琥珀酸钠 (sod succ)、劳拉西泮、呋塞米、赖诺普利、硝酸甘油、螺内酯、环磷酰胺、异丙托溴铵、放线菌素 d、阿替普酶、丙酸氟替卡松、左氟沙星、硫酸间羟异丙肾上腺素、硫酸吗啡、盐酸羟可酮、氯化钾、曲安缩松、无水他克莫司、钙、干扰素- $\alpha$ 、氨甲蝶呤、霉酚酸酯、干扰素- $\gamma$ -1 $\beta$ 。

[0276] 本发明的结合蛋白可以与之组合用于心肌梗死的治疗剂的非限制性例子包括下述: 阿司匹林、硝酸甘油、酒石酸美托洛尔、依诺肝素钠、肝素钠、重硫酸氯吡格雷、卡维地洛、阿替洛尔、硫酸吗啡、琥珀酸美托洛尔、华法林钠、赖诺普利、单硝酸异山梨酯、地高辛、呋塞米、斯伐他汀、雷米普利、替尼普酶、马来酸依那普利、托拉塞米 (torsemide)、瑞替普酶、氯沙坦钾、盐酸喹那普利 / mag carb、布美他尼、阿替普酶、依那普利拉、盐酸胺碘酮、盐酸替罗非班一水合物、盐酸地尔~~草~~、卡托普利、依贝沙坦、缬沙坦、盐酸普萘洛尔、福辛普利钠、盐酸利多卡因、表非替得、头孢唑啉钠、硫酸阿托品、氨基己酸、螺内酯、干扰素、盐酸索他洛尔、氯化钾、多库酯钠、盐酸多巴酚丁胺、阿普唑仑、普伐他汀钠、阿托伐他汀钙、盐酸咪达唑啉、盐酸哌替啶、单硝酸异山梨酯、肾上腺素、盐酸多巴胺、比伐卢定、罗苏伐他汀 (rosuvastatin)、依泽替米贝 / 斯伐他汀、阿伐麦布 (avasimibe)、卡立泊来德 (cariporide)。

[0277] 本发明的结合蛋白可以与之组合用于牛皮癣的治疗剂的非限制性例子包括下述: KDR (ABT-123) 的小分子抑制剂、Tie-2 的小分子抑制剂、卡泊三醇 (calcipotriene)、丙酸氯倍他索、曲安缩松、丙酸卤倍他索、他佐罗汀、氨甲蝶呤、氟轻松、增强型二丙酸倍他米松、醋酸氟轻松、阿昔曲丁、焦油 (tar) 洗发剂、戊酸倍他米松、糠酸莫米他松、酮康唑、丙吗卡因 / 氟轻松、戊酸氢化可的松、氟羟可舒松、尿素、倍他米松、丙酸氯倍他索 / 润滑药 (emollient)、丙酸氟替卡松、阿奇霉素、氢化可的松、湿润配方、叶酸、丙缩羟强龙、吡美莫司 (pimecrolimus)、煤焦油、双醋二氟松、叶酸依那西普、乳酸、8- 甲氧基补骨脂素、hc / 次五倍子酸铋 (bismuth subgal) / znox/resor、乙酸甲基强的松龙、强的松、遮光剂、氯氟舒松、水杨酸、蒽地酚、氯可托龙、煤提取物、煤焦油 / 水杨酸、煤焦油 / 水杨酸 / 硫、去羟米松、地西洋、润滑药、氟轻松 / 润滑药、矿物油 / 蓖麻油 / na lact、矿物油 / 花生油、石油 / 肉豆蔻酸异丙酯、补骨脂素、水杨酸、皂 / 三溴沙仑、硫柳汞 / 硼酸、塞来昔布、英夫单抗、环孢菌素、阿来塞普、依法利珠单抗、他克莫司、吡美莫司、PUVA、UVB、柳氮磺吡啶。

[0278] 本发明的结合蛋白可以与之组合用于牛皮癣性关节炎的治疗剂的非限制性例子包括下述: 氨甲蝶呤、依那西普、洛芬昔布、塞来昔布、叶酸、柳氮磺吡啶、萘普生、来氟洛米、乙酸甲基强的松龙、吲哚美辛、硫酸羟氯喹、强的松、舒林酸、增强型二丙酸倍他米松、英夫单抗、氨甲蝶呤、叶酸盐、曲安缩松、扶他林、二甲基亚砷、吡罗昔康、双氯酚酸钠、酮基布洛芬、美洛昔康、甲基强的松龙、萘普酮、托美汀钠、卡泊三醇、环孢菌素、双氯酚酸钠 / 米索前列醇、氟轻松、硫酸葡糖胺、硫代苹果酸金钠、重酒石酸二氢可待因酮 / 扑热息痛、布洛芬、

利塞膦酸钠、磺胺嘧啶、硫鸟嘌呤、伐地考昔、阿来塞普、依法利珠单抗。

[0279] 本发明的结合蛋白可以与之组合用于再狭窄的治疗剂的非限制性例子包括下述：西罗莫司、紫杉醇、依维莫司 (everolimus)、他克莫司、ABT-578、扑热息痛。

[0280] 本发明的结合蛋白可以与之组合用于坐骨神经痛的治疗剂的非限制性例子包括下述：重酒石酸二氢可待因酮 / 扑热息痛、洛芬昔布、盐酸环苯扎林、甲基强的松龙、萘普生、布洛芬、盐酸羟可酮 +/- 扑热息痛、塞来昔布、伐地考昔、乙酸甲基强的松龙、强的松、磷酸可待因 / 扑热息痛、盐酸曲马多 / 扑热息痛、美他沙酮、美洛昔康、美索巴莫、盐酸利多卡因、双氯酚酸钠、加巴喷丁、地塞米松、卡立普多、酮咯酸氨基丁三酸醇盐、吲哚美辛、扑热息痛、地西洋、萘普酮、盐酸羟可酮、盐酸替扎尼定、双氯酚酸钠 / 米索前列醇、萘磺酸右丙氧芬 / 扑热息痛、asa/oxycod/ 羟可酮 ter、布洛芬 / 二氢可待因酮 bit、盐酸曲马多、依托度酸、盐酸丙氧芬、盐酸阿米替林、卡立普多 / 磷酸可待因 / asa、硫酸吗啡、多种维生素、甲氧萘丙烯酸钠、柠檬酸奥芬那君、替马西洋。

[0281] 其中本发明的结合蛋白可以组合用于 SLE (狼疮) 的治疗剂的优选例子包括下述：NSAIDS, 例如, 扶他林、萘普生、布洛芬、吡罗昔康、吲哚美辛；COX2 抑制剂, 例如, 塞来昔布、洛芬昔布、伐地考昔；抗疟药, 例如, 羟氯喹；类固醇, 例如, 强的松、强的松龙、布地奈德、地塞米松；细胞毒素, 例如, 硫唑嘌呤、环磷酰胺、霉酚酸酯、氨甲蝶呤；PDE4 抑制剂或嘌呤合成抑制剂, 例如 Cellcept。本发明的结合蛋白还可以与试剂组合, 所述试剂例如柳氮磺吡啶、5-氨基水杨酸、奥沙拉嗪、依木兰, 以及干扰促炎细胞因子例如 IL-1 合成、生产或作用的试剂, 例如胱天蛋白酶抑制剂, 如 IL-1 $\beta$  转换酶抑制剂和 IL-1ra。本发明的结合蛋白还可以与 T 细胞信号传导抑制剂一起使用, 例如酪氨酸激酶抑制剂；或靶向 T 细胞活化分子的分子, 例如 CTLA-4-IgG 或抗 B7 家族抗体, 抗 PD-1 家族抗体。本发明的结合蛋白可以与 IL-11 或抗细胞因子抗体组合, 例如芬突利珠单抗 (fonotolizumab) (抗 IFN $\gamma$  抗体), 或抗受体抗体, 例如抗 IL-6 受体抗体和针对 B 细胞表面分子的抗体。本发明的抗体或其抗原结合部分还可以与下述试剂一起使用：LJP 394 (阿贝莫司 (abetimus)), 耗尽或灭活 B 细胞的试剂, 例如利妥希玛 (抗 CD20 抗体), 淋弗斯特 (lymphostat)-B (抗 BlyS 抗体), TNF 拮抗剂, 例如, 抗 TNF 抗体, D2E7 (PCT 公开号 WO 97/29131; HUMIRA), CA2 (REMICADE), CDP 571, TNFR-Ig 构建体 (p75TNFR IgG (ENBREX) 和 p55TNFR IgG (LENERCEPT))。

[0282] 本发明的药物组合物可以包括“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明的结合蛋白。“治疗有效量”指在所需剂量和时间段有效达到所需治疗结果的量。结合蛋白的治疗有效量可以由本领域技术人员来确定, 且可以根据下述因素而变：个体疾病状态、年龄、性别、和重量, 以及结合蛋白在个体中引起所需应答的能力。治疗有效量也是其中治疗有利作用大于抗体或抗体部分的任何毒性或有害作用的量。“预防有效量”指在所需剂量和时间段有效达到所需预防结果的量。一般地, 因为预防剂量在疾病前或疾病早期时在受试者中使用, 所以预防有效量将小于治疗有效量。

[0283] 剂量方案可以进行调整以提供最佳所需应答 (例如, 治疗或预防应答)。例如, 可以施用快速灌注方式, 几个分份剂量可以随着时间过去而施用, 或剂量可以如治疗情形的紧急状态所指示的按比例减少或增加。为了易于施用和剂量一致, 以单位剂型配制肠胃外组合物是特别有利的。如本文使用的, 单位剂型指适合作为单一剂量用于待治疗的哺乳动物受试者的物理上不连续单位；每个单位包含计算的预定量的活性化合物以产生与所需药

学载体相关的所需疗效。关于本发明的单位剂型的详细说明由下述指示且直接取决于下述：(a) 活性化合物的独特特征和待达到的具体治疗或预防作用，和 (b) 配合这种用于治疗个体中敏感性的活性化合物的领域固有的局限性。

[0284] 关于本发明的结合蛋白的治疗或预防有效量的示例性、非限制性范围是 0.1-20mg/kg，更优选 1-10mg/kg。应当指出剂量值可以依待减轻的状况类型和严重性而变。应进一步理解对于任何特定受试者，根据个体需要和施用或监督组合物施用的人的专业判断，具体剂量方案应当随着时间过去进行调整，并且本文所述的剂量范围仅是示例性的，且不希望限制要求保护的组合物的范围或实践。

[0285] 对于本领域技术人员将显而易见的是，本文描述的本发明方法的其他合适修改和适应是明显的，且无需背离本发明或本文公开的实施方案的范围使用合适的等价方案即可进行。尽管本发明目前已得到详细描述，但通过参考下述实施例将更清楚地理解本发明，所述实施例被包括仅用于举例说明性目的且不希望限制本发明。

#### [0286] 实施例

[0287] 实施例 1：双重可变结构域免疫球蛋白 (DVD-Ig) 的产生

[0288] 双重可变结构域免疫球蛋白 (DVD-Ig) 分子被这样设计，从而使得来自 2 种不同亲本 mAbs 的 2 个不同轻链可变结构域 (VL) 直接地，或通过重组 DNA 技术经由短接头串联连接，随后为轻链恒定结构域。类似地，重链包含串联连接的 2 个不同重链可变结构域 (VH)，随后为恒定结构域 CH1 和 Fc 区 (图 1A)。

[0289] 实施例 1.1：针对 IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的鼠单克隆抗体的产生

[0290] 针对 IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的单克隆抗体使用本领域众所周知的杂交瘤技术如下产生。

[0291] 实施例 1.1.A：小鼠的免疫接种

[0292] 纯化的重组人 IL-1 $\alpha$  和鼠 IL-1 $\beta$  (R&D Systems) 用作免疫原以及效价测定和筛选 ELISA 中的包被抗原。对于所有抗原对于初次免疫接种和加强免疫接种，免疫剂量为 5.0-20.0  $\mu$ g / 小鼠 / 注射。ImmunEasy 佐剂购自 Qiagen (Waltham, MA)，且以 20ml ImmunEasy 佐剂 / 10.0  $\mu$ g 抗原的佐剂 / 抗原比使用。待免疫的每组动物包含从 Dr. Yoichiro Iwakura (University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo, 日本) 获得的 5IL-1 $\alpha$   $\beta$  KO 小鼠。小鼠根据下述给药方案进行免疫。MRC-5 细胞购自 ATCC (Manassas, VA) 且用于 IL-1 生物测定。人 IL-8ELISA 试剂盒和对照小鼠抗 hIL-1 $\alpha$  和  $\beta$  抗体 (MAB200 和 MAB201) 购自 R&D Systems (Minneapolis, MN)。

[0293] 简言之，佐剂-抗原混合物通过首先使用旋涡在小瓶中轻轻混合佐剂来制备。所需量的佐剂从小瓶中取出且放入高压灭菌的 1.5mL 微量离心管内。抗原在浓度为 0.5-1.0mg/ml 的 PBS 或盐水中制备。随后向含有佐剂的微量离心管中加入计算量的抗原，且通过上下轻轻移液 5 次使溶液混合。佐剂-抗原混合物在室温下温育 15 分钟，随后通过再次上下轻轻移液 5 次进行混合。将佐剂-抗原溶液吸到正确的注射器内用于动物注射。总共 5-20  $\mu$ g 抗原在 50-100  $\mu$ l 的体积中进行注射。对每只动物进行免疫，随后取决于效价加强 2-3 次。具有良好效价的动物在融合和产生杂交瘤之前给予最终静脉内加强。

[0294] 实施例 1.1.B：筛选杂交瘤：

[0295] 如上所述产生的杂交瘤进行筛选且使用 ELISA 测定抗体效价：将蛋白质抗原直接

包被在 ELISA 板上,用于使用标准 ELISA 程序检测特异性抗体。简言之,ELISA 板用 100  $\mu$  l rhIL-1  $\alpha$  或 rhIL-1  $\beta$  (溶于 PBS 中的 1.0  $\mu$  g/ml) 于 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。板用 250  $\mu$  l PBS/0.5% Tween<sub>20</sub> 洗涤 3 次,且用 200  $\mu$  l 封闭缓冲液(溶于含 0.5% Tween<sub>20</sub> 的 PBS 中的 2% BSA) 进行封闭。向每个孔中加入稀释的血清或杂交瘤上清液(100  $\mu$  l),且在室温下温育 2 小时。板随后用 PBS/0.5% Tween<sub>20</sub> 洗涤 3 次,使用 HRP-山羊抗鼠 IgG 用于检测,且在 450nm 处观察结合 ODs。产生在 ELISA 中显示高特异性结合活性的抗体的杂交瘤细胞进行亚克隆和纯化,且如下所述表征抗体的亲和力(Biacore)和效力(MRC-5 生物测定)。

[0296] 实施例 1.1.C:针对 IL-1  $\alpha$  和 IL-1  $\beta$  的鼠单克隆抗体的表征:

[0297] 使用下述测定以表征由实施例 1.1.B 中所述杂交瘤产生的抗体。

[0298] 实施例 1.1.C.1:表面等离子体共振:

[0299] 捕获的抗体(经由山羊抗小鼠 IgG 捕获在生物传感器基质上的小鼠抗 rmIL1 抗体)和 rmIL-1 之间的实时结合相互作用,通过表面等离子体共振(SPR)使用 BIAcore 系统(Biacore AB,Uppsala,瑞典),根据制造商的说明书和标准程序来测量。简言之,rmIL-1 在 HBS 运行缓冲液(Biacore AB)中进行稀释,且 50  $\mu$  l 等分试样以 5ml/分钟的流速注射通过固定化蛋白质基质。使用的 rhIL1 浓度为 62.5、125、187.5、250、375、500、750、1000、1500 和 2000nM。为了测定解离常数(解离速率),结合常数(结合速率),使用 BIAcore 动力学评估软件(版本 3.1)。

[0300] 实施例 1.1.C.2:抗 IL-1 生物测定:

[0301] MRC-5 细胞系是以剂量依赖性方式响应人 IL-1  $\alpha$  和 IL-1  $\beta$  生产 IL-8 的人肺成纤维细胞细胞系(参见 Dinarello, C. A., K. Muegge 和 S. K. Durum. 2000. Current Protocols in Immunology 6:1)。MRC-5 细胞在 10% FBS 完全 MEM 中培养,且在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中于 37 $^{\circ}$ C 生长。为了测定针对重组人 IL-1  $\alpha$  或 IL-1  $\beta$  的 mAbs 的中和效力,向 96 孔板中加入不同浓度(0-10  $\mu$  g/ml)的 mAb(50  $\mu$  l),且于 37 $^{\circ}$ C 与 50  $\mu$  l rhIL-1a 或 rhIL-1b(10-50pg/ml) 预温育 1 小时。收获上清液,进行稀释,且通过 ELISA 使用标准 IL-8ELISA 试剂盒(R&D Systems) 测量 IL-8 浓度。抗体效力通过其抑制经由 MRC-5 细胞的 IL-8 生产的能力来测定。

[0302] 如下表 1 中所示,基于 Biacore 和 MRC-5 生物测定,鉴定了许多具有高亲和力和效力的鼠抗 hIL-1a 和抗 hIL-1b 抗体:

[0303] 表 1. 鼠抗 hIL-1a/b mAbs 的产生和表征。

mAb 克隆#	特异性	K <sub>D</sub> (M)	IC <sub>50</sub> (M)
3D12.E3	hIL-1 $\alpha$	1.11E-09	6.70E-10
18F4.2C8	hIL-1 $\alpha$	5.78E-10	8.90E-11
6H3.1A4.3E11	hIL-1 $\alpha$	3.54E-10	2.40E-10
13F5.G5	hIL-1 $\beta$	2.91E-10	6.00E-10
1B12.4H4	hIL-1 $\beta$	2.13E-10	5.30E-10
6B12.4F6	hIL-1 $\beta$	5.54E-10	3.20E-10

[0305] 实施例 1.1.D:针对 IL-1  $\alpha$  和 IL-1  $\beta$  的鼠单克隆抗体的克隆和测序:

[0306] 使用 Trizol 试剂(Invitrogen) 根据制造商的说明书,从每个杂交瘤细胞系中分离和纯化总 RNA 后,对表 1 中所述所有抗 IL-1a/b mAbs 和另外抗体的可变重(VH)和轻(VL) 基因进行克隆和测序。使用来自 Mouse Ig-Primer Set(Novagen, Madison, WI) 的 IgGVH

和 Ig  $\kappa$  VL 寡核苷酸与 One-tube RT-PCR 试剂盒 (Qiagen), 如制造商所建议的进行 VH 和 VL 基因的扩增。根据制造商的说明书, 将由生产性扩增产生的 DNA 片段克隆到 pCR-TOPO 载体 (Invitrogen) 内。随后通过双脱氧链终止法使用 ABI 3000 测序仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 对多个 VH 和 VL 克隆进行测序。所有 mAb VL 和 VH 基因的序列显示于下表 2 中。

[0307] 表 2 : 能够结合人 IL-1  $\alpha$  或 IL-1  $\beta$  的鼠单克隆抗体

[0308]

蛋白质	序列标识符	序列
		12345678901234567890
VH 3D12. E3	SEQ ID NO. :1	QIQLVQSGPELKKPGETVKI SCKASGYTFRNYGMNWVKQA PGKDLKRMWINTYTGESTY ADDFKGRFAFSLETSASTAY LQINNKNEDTATYFCARGI YYYGSSYAMDYWGQGTSTV SS
VL 3D12. E3	SEQ ID NO. :2	NIQMTQTTSSLSASLGDRVT ISCRASQDISNCLNWIYQQK DGTVKLLIYYTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLEQ EDIATYFCQQGKTLPIYAFGG GTKLEINR
VH 18F4. 2C8	SEQ ID NO. :3	EVQLQQSGAELVKPGASVKL SCTASGLNIKDTYMHWLKQR PEQGLEWIGRIDPANGNAKY DPRFLGKATITADTSSNTAY LQLSSLTSEDTAIVYYCARGD GNFHFYWGQGTTLTVSS
VL 18F4. 2C8	SEQ ID NO. :4	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQK GQSPRALIYSASYRYSQVDP RFTGSGSGTDFTLTISNVQS  VDLAEYFCQQYTRYPLTFGG GTKLEIKR

VH 6H3. 1A4. 3E11	SEQ ID NO. :5	QVQLQQPGAELVRPGASVKL SCKASGYTFTTYWMNWVKQR PEQGLEWIGRIDPYDSETLY SQKFKDTAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYG FDYWGQGTTLTVSS
VL 6H3. 1A4. 3E11	SEQ ID NO. :6	QIVLTQSPALMSASPGEKVT MTCASASSVNYMYWYQQKPR SSPKPWIYLTSLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTISSEAE DAATYYCQQWNSNPYTFGGG TKLEMKR
VH 13F5. G5	SEQ ID NO. :7	QVQLQQSGAELVRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMNWVKQR PGQGLEWIGQIYPGDGTNY NGKFKGKATLTADKSSSTSY  MQLSGLTSEDSAMYFCVRFPP TGNDYYAMDYWGQGTSVTVS S
VL 13F5. G5	SEQ ID NO. :8	NIVLTQSPASLAVSLGQRAT ISCRASESVDSYGNSYMHWY QQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRTDFTLTID PVEADDAATYYCQQNEDPF TFGSGTKLEIKR
VH 1B12. 4H4	SEQ ID NO. :9	QVHLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTDYGVSWIRQP PGKLEWLGLIWGGDITYN SPLKSRLSIRKDNSKQVFL KMNSLQTDATAVYYCAKQRT LWGYDLYGMDYWGQGTSVTV SS

VL 1B12.4H4	SEQ ID NO. :10	ETTVTQSPASLSMAIGKVT IRCITSTDIDVDMNWyQQKP GEPPKLLISQGNLTPGVPS RFSSSGSGTDFVFIENMLS  EDVADYYCLQSDNLPLTFGA GTKLELKR
VH 6B12.4F6	SEQ ID NO. :11	EVQLQQSGPELVKTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHWRQS HGKSLEWIGYISCYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YYGTNDYWGGTTLTVSS
VL 6B12.4F6	SEQ ID NO. :12	QIVLTQSPA IMSASPGEKVT ITCSASSSVSYMHWFQQKPG ASPKLWIYSTSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTVSRMEAE DAATYYCQQRSTYPYTFGGG TKLEIKR

[0309] 实施例 1.2 :鼠 - 人嵌合抗体的产生和表征

[0310] 将所有上述 mAbs 转变成嵌合的 (具有恒定区) 且进行表达、纯化和表征以证实活性, 且将用作后续 DVD-Ig 分析的对照。为了将 3D12. E3 转变成嵌合形式, 使用引物 P1 和 P2 PCR 扩增 3D12. E3-VL ;同时使用引物 P3 和 P4 扩增人 Ck 基因 (在 ABC 内部产生的 pBOS 载体中)。2 种 PCR 反应都根据标准 PCR 技术和程序来进行。将 2 种 PCR 产物进行凝胶纯化, 且一起用作重叠模板用于后续重叠 PCR 反应, 其中使用引物 P1 和 P4 使用标准 PCR 条件。通过 TOPO 克隆根据制造商的说明书, 将最终的 PCR 产物 - 嵌合轻链 3D12. E3-VL-hCk 亚克隆到 pEF6TOPO 哺乳动物表达载体 (Invitrogen) 内。表 3 显示了 PCR 引物的序列:

[0311] 表 3 :

[0312]

P1 :5' ATG GTG TCC ACA GCT CAG TTC C 3'	SEQ ID NO. 13
P2 :5' GC AGC CAC CGT ACG CCG GTT TAT TTC CAG 3'	SEQ ID NO. 14
P3 :5' CGT ACG GTG GCT GCA CCA TCT GTC 3'	SEQ ID NO. 15
P4 :5' TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GC 3'	SEQ ID NO. 16

[0313] 为了将 3D12. E3 重链转变成嵌合形式, 使用引物 P5 和 P6 PCR 扩增 3D12. E3-VH ;同时使用引物 P7 和 P8 扩增人 C $\gamma$ 1 基因 (在 ABC 内部产生的 pBOS 载体中)。2 种 PCR 反应都根据标准 PCR 技术和程序来进行。将 2 种 PCR 产物进行凝胶纯化, 且一起用作重叠模板用于后续重叠 PCR 反应, 其中使用引物 P5 和 P8 使用标准 PCR 条件。根据制造商的说明书,

将最终的 PCR 产物 - 嵌合轻链 3D12.E3-VH-hC $\gamma$ 1 亚克隆到 pcDNA3.1 TOPO 哺乳动物表达载体 (Invitrogen) 内。表 4 显示了 PCR 引物的序列：

[0314] 表 4：

[0315]

P5 :5' ATG GCT TGG GTG TGG ACC TTG C 3'	SEQ ID NO. 17
P6 :5' GGG CCC TTG GTC GAC GCT GAG GAG ACG GTG ACT GAG G 3'	SEQ ID NO. 18
P7 :5' GCG TCG ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC C 3'	SEQ ID NO. 19
P8 :5' TC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA GGC 3'	SEQ ID NO. 20

[0316] 类似地, 使用引物 P21/P22 (对于 VH) 和 P7/P8 (对于 hC $\gamma$ 1) 产生嵌合 13F5.G5-VH-C $\gamma$ 1, 且克隆到 pcDNA3.1 TOPO 载体内, 且使用引物 P23/P24 (对于 VL) 和 P3/P4 (对于 hC $\kappa$ ) 产生嵌合 13F5.G5-VL-C $\kappa$ , 且克隆到 pEF6 TOPO 载体内。表 5 显示了 PCR 引物的序列：

[0317] 表 5：

[0318]

P21 :5' ATA GAA TGG AGC TGG GTT TTC CTC 3'	SEQ ID NO. 21
P22 :5' GGG CCC TTG GTC GAC GC TGA GGA GAC GGT GAC TGA 3'	SEQ ID NO. 22
P23 :5' ATG GTC CTC ATG TCC TTG CTG TTC 3'	SEQ ID NO. 23
P24 :5' GC AGC CAC CGT ACG CCG TTT TAT TTC CAG CTT TG 3'	SEQ ID NO. 24

[0319] 为了表达嵌合 Abs, 使用 Lipofectamin (Invitrogen) 使 13F5.G5-VL-C $\kappa$  和 13F5.G5-VH-C $\gamma$ 1 在 COS 中共表达 72 小时, 且收集培养基并通过 A 蛋白层析进行 IgG 纯化。类似地, 使用 Lipofectamin (Invitrogen) 使 13F5.G5-VL-C $\kappa$  和 13F5.G5-VH-C $\gamma$ 1 在 COS 中共表达 72 小时, 且收集培养基并通过 A 蛋白层析进行 IgG 纯化。2 种纯化的嵌合 Abs 通过 Biacore 和 MRC-5 生物测定进行表征以证实活性。结果显示这些嵌合 Abs 显示与原始鼠 mAbs 那种类似的亲和力和效力。

[0320] 实施例 1.3 :IL-1 $\alpha$  /  $\beta$  双重可变结构域免疫球蛋白 (DVD-Ig) 的构建、表达、和纯化

[0321] 图 1B 中举例说明了用于产生能够结合 hIL-1 $\alpha$  和 hIL-1 $\beta$  的 DVD-Ig 的构建体。简言之, 通过分别用重组 IL-1 $\alpha$  蛋白质 (rhIL-1 $\alpha$ ) 和重组 IL-1 $\beta$  蛋白质 (rhIL-1 $\beta$ ) 免疫 Balb/c 小鼠, 获得包括 2 种高亲和力鼠 Abs - 抗 hIL-1 $\alpha$  (克隆 3D12.E3) 和抗 hIL-1 $\beta$  (克隆 13F5.G5) 的亲本 mAbs。通过 RT-PCR 使用小鼠 Ig Primer Kit (Novagen, Madison, WI) 来分离这 2 种杂交瘤克隆的 VL/VH 基因。首先将 VL/VH 基因转变成嵌合抗体 (具有人恒定区) 以证实活性和效力。为了产生 DVD1-Ig, 将 13F5.G5 的 VH 和 VL 分别与 3D12.E3 的 VH 和 VL 的 N 末端直接融合 (如图 1B 中所示)。类似地构建 DVD2-Ig, 除了它在轻链 (接头序

列为 ADAAP) 和重链 (接头序列为 AKTTPP) 中的 2 个可变结构域之间具有接头。这些序列选自鼠 Ck 和 CH1 序列的 N 末端。选自鼠 Ck 和 CH1 的 N 末端的这些接头序列是可变结构域的天然延伸,且基于几种 Fab 晶体结构分析显示柔性构象而无显著的二级结构。PCR 克隆的详细程序在下文描述:

[0322] 实施例 1.3.A :hIL-1a/bDVD1-Ig 的分子克隆:

[0323] 使用引物 P21 和 P25 PCR 扩增 13F5. G5-VH ;同时使用引物 P14 和 P8 扩增 3D12. E3-VH-hC $\gamma$ 1。2 种 PCR 反应都根据标准 PCR 技术和程序来进行。将 2 种 PCR 产物进行凝胶纯化,且一起用作重叠模板用于后续重叠 PCR 反应,其中使用引物 P21 和 P8 使用标准 PCR 条件。根据制造商的说明书,将最终的 PCR 产物 -DVD1-Ig 重链 hIL-1a/bDVD1-VH-hC $\gamma$ 1 亚克隆到 pcDNA3.1 TOPO 哺乳动物表达载体 (Invitrogen) 内。表 6 显示了 PCR 引物的序列:

[0324] 表 6

[0325]

P14 :5' CAG ATC CAG TTG GTG CAG TCT GG3'	SEQ ID NO. 25
P25 :5' CAC CAA CTG GAT CTG TGA GGA GAC GGT GAC TGA GG 3'	SEQ ID NO. 26

[0326] 为了产生 hIL-1a/bDVD1-Ig 轻链,使用引物 P23 和 P26 PCR 扩增 13F5. G5-VL ;同时使用引物 P16 和 P4 扩增 3D12. E3-VL-hC $\kappa$ 。2 种 PCR 反应都根据标准 PCR 技术和程序来进行。将 2 种 PCR 产物进行凝胶纯化,且一起用作重叠模板用于后续重叠 PCR 反应,其中使用引物 P23 和 P4 使用标准 PCR 条件。根据制造商的说明书,将最终的 PCR 产物 -hIL-1a/bDVD1-Ig 轻链 hIL-1a/bDVD1-VL-hC $\kappa$  亚克隆到 pEF6 TOPO 哺乳动物表达载体 (Invitrogen) 内。表 7 显示了 PCR 引物的序列:

[0327] 表 7

[0328]

P16 :5' AAT ATC CAG ATG ACA CAG ACT ACA TCC 3'	SEQ ID NO. 27
P26 :5' GTGT CAT CTG GAT ATT CCG TTT TAT TTC CAG CTT TG 3'	SEQ ID NO. 28

[0329] 实施例 13. B :hIL-1a/bDVD2-Ig 的分子克隆:

[0330] 使用引物 P21 和 P17 PCR 扩增 13F5. G5-VH ;同时使用引物 P18 和 P8 扩增 3D12. E3-VH-hC $\gamma$ 1。2 种 PCR 反应都根据标准 PCR 技术和程序来进行。将 2 种 PCR 产物进行凝胶纯化,且一起用作重叠模板用于后续重叠 PCR 反应,其中使用引物 P21 和 P8 使用标准 PCR 条件。根据制造商的说明书,将最终的 PCR 产物 -DVD2-Ig 重链 hIL-1a/bDVD2-VH-hC $\gamma$ 1 亚克隆到 pcDNA3.1 TOPO 哺乳动物表达载体 (Invitrogen) 内。表 8 显示了 PCR 引物的序列:

[0331] 表 8

[0332]

P17 :5' TGG GGG TGT CGT TTT GGC TGA GG 3'	SEQ ID NO. 29
P18 :5' GCC AAA ACG ACA CCC CCA CAG ATC CAG TTG GTG CAG 3'	SEQ ID NO. 30

[0333] 为了产生 hIL-2a/bDVD2-Ig 轻链, 使用引物 P23 和 P19 PCR 扩增 13F5.G5-VL; 同时使用引物 P20 和 P4 扩增 3D12.E3-VL-hC $\kappa$ 。2 种 PCR 反应都根据标准 PCR 技术和程序来进行。将 2 种 PCR 产物进行凝胶纯化, 且一起用作重叠模板用于后续重叠 PCR 反应, 其中使用引物 P23 和 P4 使用标准 PCR 条件。根据制造商的说明书, 将最终的 PCR 产物 -hIL-1a/bDVD2-Ig 轻链 hIL-1a/bDVD2-VL-hC $\kappa$  亚克隆到 pEF6 TOPO 哺乳动物表达载体 (Invitrogen) 内。表 9 显示了 PCR 引物的序列:

[0334] 表 9

[0335]

P19 :5' TGG TGC AGC ATC AGC CCG TTT TAT TTC 3'	SEQ ID NO. 31
P20 :5' GCT GAT GCT GCA CCA AAT ATC CAG ATG ACA CAG 3'	SEQ ID NO. 32

[0336] hIL-1a/bDVD1-Ig 和 hIL-1a/bDVD2-Ig 的最终序列在表 10 中描述:

[0337] 表 10 :hIL-1 $\alpha$  /  $\beta$  DVD1-Ig 和 hIL-1 $\alpha$  /  $\beta$  DVD2-Ig 的氨基酸序列

[0338]

蛋白质	序列标识符	序列
蛋白质区域		12345678901234567890
DVD重可变 hIL-1a/bDVD1-Ig	SEQ ID NO.:33	QVQLQQSGAELVLRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMNWVKQR PGQGLEWIGQIYPGDGDTNY NGKFKGKATLTADKSSSTSY MQLSGLTSEDSAMYFCVRF TGNDYYAMDYWGQGTSVTVS SQTQLVQSGPELKKPGETVK ISCKASGYTFRNYGMNWVKQ APGKDLKRMWINTYTGEST YADDFKGRFAFSLETSASTA YLQINNLKNETATYFCARG IYYGSSYAMDYWGQGTSVT VSS
VH 13F5.G5	SEQ ID NO.:7	QVQLQQSGAELVLRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMNW VKQRPQGLEWIGQIYPGDG DTNYNGKFKGKATLTADKSS STSYMQLSGLTSEDSA MYFCVRFPTGNDYYAMDYWG QGTSVTVSS
接头		无

[0339]

蛋白质	序列标识符	序列
蛋白质区域		12345678901234567890
3D12.E3 VH	SEQ ID NO.:1	QIQLVQSGPELKKPGETVKI SCKASGYTFRNYGMNWVKQA FGKDLKRMWINTYTGESTY ADDFKGRFAFSLETSASTAY LQINNLIKNETATYFCARGI YYYGSSYAMDYWGQGTSVTV SS
CH	SEQ ID NO.:34	A. STKGPSVFLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSQVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKQVEP KSCDKTHTCPPCPAPELGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
DVD轻可变 hIL-1a/bDVD1-Ig	SEQ ID NO.:35	NIVLTQSPASLAVSLGQRAT ISCRASEVDSYGNMHWY QQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRTDFTLTID PVEADDAATYYCQQNEDPF TFGSGTKLEIKRNIQMTQTT SSLSASLGDRVTISCRASQD ISNCLNHWYQQKPDGTVKLLI YYTSRLHSGVPSRFSGSGSG TDYSLTISNLEQEDIATYFC QQGKTLPYAFGGGKLEINR R
13F5.G5 VL	SEQ ID NO.:8	NIVLTQSPASLAVSLGQRAT ISCRASEVDSYGNMHWY QQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRTDFTLTID PVEADDAATYYCQQNEDPF TFGSGTKLEIKR
接头		无
3D12.E3 VL	SEQ ID NO.:2	NIQMTQTTSSLSASLGDRVT ISCRASQDISNCLNHWYQQK DGTVKLLIYYTSRLHSGVPS RFSGSGGTDYSLTISNLEQ EDIATYFCQQGKTLPYAFGG GTKLEINR
CL	SEQ ID NO.:36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG

[0340]

蛋白质 蛋白质区域	序列标识符	序列 12345678901234567890
		TASVVCLLNIFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
DVD重可变 hIL-1a/bDVD2-Ig	SEQ ID NO.:37	QVQLQQSGAELVRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMNWVKQR PGQGLEWIGQIYPGDGDTNY NGKFKGKATLTADKSSSTSY MQLSGLTSEDSAMYFCVRF TGNDYYAMDYWGQGTSTVVS SAKTTPPQIQLVQSGPELKK PGETVKISCKASGYTFRNYG MNWVKQAPGKDLKRMWINT YTGESTYADDFKGRFAFSLE TSASTAYLQINNLIKNETAT YFCARGIYYGSSYAMDYWG QGTSTVSS
13F5.G5 VH	SEQ ID NO.:7	QVQLQQSGAELVRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMNWVKQR PGQGLEWIGQIYPGDGDTNY NGKFKGKATLTADKSSSTSY MQLSGLTSEDSAMYFCVRF TGNDYYAMDYWGQGTSTVVS S
接头	SEQ ID NO.:38	AKTTPP
3D12.E3 VH	SEQ ID NO.:1	QIQLVQSGPELKKPGETVKI SCKASGYTFRNYGMNWVKQA PGKDLKRMWINTYTGESTY ADDFKGRFAFSLETSASTAY LQINNLIKNETATYFCARGI YYGSSYAMDYWGQGTSTV SS
CH	SEQ ID NO.:34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHPKPSNTKVDKKEP KSCDKHTCTPPCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFPYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKLSLSLSPGK

[0341]

蛋白质	序列标识符	序列
蛋白质区域		12345678901234567890
DVD轻可变 HIL-1a/bDVD2-Ig	SEQ ID NO.:39	NIVLTQSPASLAVSLGQRAT ISCRASEVDSYGN SYMHWY QQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRDFTLTID PVEADDAATYYCQNNEDPF TFGSGTKLEIKRADAAPNIQ MTQTTSSLASLGDRVTISC RASQDISNCLN WYQQKPDGT VKLLIYYTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYSLTISNLEQEDI ATYFCQQGKTLPYAFGGGK LEINR
13F5.G5 VL	SEQ ID NO.:8	NIVLTQSPASLAVSLGQRAT ISCRASEVDSYGN SYMHWY QQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRDFTLTID PVEADDAATYYCQNNEDPF TFGSGTKLEIKR
接头	SEQ ID NO.:40	ADAAP
3D12.E3 VL	SEQ ID NO.:2	NIQMTQTTSSLASLGDRVT ISCRASQDISNCLN WYQQK DGTVKLLIYYTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLEQ EDIATYFCQQGKTLPYAFGG GTKLEINR
CL	SEQ ID NO.:36	TVAAPS VFI FPPSDEQLKSG TASV VCLLN NFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSL SSSLT LSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

[0342] 实施例 1.3.C :hIL-1a/bDVD1-Igs 的表达和纯化

[0343] 将每种构建体的重和轻链分别亚克隆到 pcDNA3.1 TOPO 和 pEF6TOPO 载体 (Invitrogen Inc.) 内,且进行测序以确保精确性。编码每种构建体的重和轻链的质粒使用 Lipofectamine 2000 和 293fectin 试剂分别在 COS 细胞以及人胚肾 293 细胞 (美国典型培养物保藏中心,Manassas,VA) 中进行瞬时表达。瞬时转染后 72 小时收获细胞培养基,且使用 A 蛋白层析 (Pierce,Rockford,IL) 根据制造商的说明书纯化抗体。Abs 通过 SDS-PAGE 进行分析,且通过 A280 和 BCA (Pierce,Rockford,IL) 进行定量。表 11 显示 hIL-1a/bDVD1-Ig 和 hIL-1a/bDVD2-Ig 的表达水平比得上嵌合 Abs 的那种,从而指出 DVD-Ig 可以在哺乳动物细胞中有效表达。

[0344] 表 11. hIL-1a/bDVD-Ig 的表达和分子量分析

	表达水平 (ng/ml)		分子量 (道尔顿)		
	COS	Freestyle 293	轻链	重链	全长
模拟品	0	0			
[0345] 3D12.E3-Ch	2788	3886	23,696	49,914	147,220
13F5.G5-Ch	3260	3562	24,084	49,518	147,204
DVD1-Ig	2988	3300	35,797 (35,790)	64,380 (64,371)	200,346 (200,521)
DVD2-Ig	2433	3486	36,222 (36,220)	64,976 (64,973)	202,354 (202,573)

[0346] 圆括号中显示的是通过质谱分析法实验上测定的 DVD1-Ig 和 DVD2-Ig 轻链、重链和全长的分子量。

[0347] 实施例 1.4 :hIL-1a/b DVD-Ig 的质谱分析法和 SEC 分析

[0348] 为了测量 DVD-Ig 的轻和重链的分子量 (MW), 通过 1.0M DTT 溶液 (5uL) 还原 10uL DVD-Ig (0.8ug/uL)。使用 PLRP-S, 8u, 4000A, 和 1×150mm 蛋白质柱 (Michrom BioResource, Auburn, MA) 以分离 DVD-Ig 的重和轻链。使用 Agilent HP1100 Capillary HPLC (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA) 与质谱仪 QSTAR (Applied Biosystems, Foster City, CA)。valco 值设定为 10 分钟以使流动从废物转到 MS 用于使样品脱盐。缓冲液 A 是 0.02% TFA, 0.08% FA, 0.1% ACN 和 99.8% HPLC-H<sub>2</sub>O。缓冲液 B 包含 0.02% TFA, 0.08% FA, 0.1% HPLC-H<sub>2</sub>O 和 99.8% ACN。HPLC 流速为 50uL 分钟, 且样品注射体积为 8.0mL。柱烘箱的温度设定为 60°C, 且分离梯度为 :5% B 5 分钟 ;5% B-65% B 35 分钟 ;65% B-95% B 另 5 分钟 ;和 95% B-5% B 5 分钟。TOFMS 扫描为 800-2500amu, 且循环为 3600。为了测定全长 DVD-Ig 的 MW, 使用 Protein MicroTrap 药液筒 (Michrom BioResource, Auburn, MA) 使样品脱盐。HPLC 梯度为 :5% B 5 分钟 ;5% B-95% B 1 分钟 ;和 95% B-5% B 另 4 分钟。QSTAR TOFMS 扫描为 2000-3500amu, 且循环为 899。所有 MS 原始数据使用 Analyst QS 软件 (Applied Biosystems) 进行分析。对于 DVD-Ig 的 SEC 分析, 将溶于 PBS 中的纯化的 DVD-Ig 和嵌合 Abs 施加到 Superose 6 10/300G2, 300×10mm 柱 (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) 上。对于 SEC 使用 HPLC 仪器, Model 10A (Shimadzu, Columbia, MD)。所有蛋白质都使用 UV 检测在 280nm 和 214nm 处进行测定。洗脱是等度的 (isocratic), 流速为 0.5mL/分钟。对于稳定性研究, 溶于 PBS 中的浓度为 0.2-0.4mg/ml 的样品经历 -80°C 至 25°C 的 3 次冷冻融化循环, 或于 4°C、25°C 或 40°C 温育 4 周和 8 周, 随后进行 SEC 分析。

[0349] DVD-Ig 和嵌合 Abs 通过 A 蛋白层析进行纯化。纯化得率 (3-5mg/L) 与每种蛋白质的表达培养基的 hIgG 定量一致。纯化的 DVD-Ig 和嵌合 Abs 的组成和纯度通过 SDS-PAGE 在还原和非还原条件下进行分析。在非还原条件下, 4 种蛋白质的每一种作为单一条带迁移。如预期的, DVD-Ig 蛋白质显示比嵌合 Abs 更大的 M.W.。在非还原条件下, 4 种蛋白质的每一种产生 2 个条带, 1 个重链和 1 个轻链。再次, DVD-Igs 的重和轻链在尺寸方面大于嵌合 Abs 的那种。SDS-PAGE 显示每种 DVD-Ig 作为单一种类表达, 且重和轻链有效配对以形成 IgG 样分子。基于氨基酸序列, 重和轻链的大小以及 2 种 DVD-Ig 分子的全长蛋白质与其计算分子量一致 (参见表 11)。

[0350] 为了测定 DVD-Ig 的精确分子量, 使用质谱分析法。如表 I 中所示, 每种 DVD-Ig, 包括轻链、重链、和全长蛋白质的实验上测定的分子量与预期值良好一致。为了进一步研

究 DVD-Ig 在溶液中的物理性质,使用大小排阻层析 (SEC) 以分析每种蛋白质。嵌合 Abs 和 DVD2-Ig 两者都显示单个峰,从而显示作为单体蛋白质的物理同质性。3D12. E3 嵌合 Ab 显示比 13F5. G5 嵌合 Ab 更小的物理大小,从而指出 3D12. E3 嵌合 Ab 采取更紧凑的球形。DVD1-Ig 揭示主峰以及在右侧的肩峰,从而暗示部分 DVD1-Ig 在目前的缓冲条件下可能为聚集形式。

[0351] 实施例 1.5 :hIL-1a/b DVD-Igs 的体外稳定性分析

[0352] DVD-Ig 的物理稳定性如下测试。溶于 PBS 中的浓度为 0.2-0.4mg/ml 的纯化的抗体经历 -80°C 至 25°C 的 3 次冷冻融化循环,或于 4°C、25°C 或 40°C 温育 4 周和 8 周,随后使用大小排阻层析 (SEC) 分析进行分析 (参见表 12)。

[0353] 表 12. hIL-1a/b DVD-Ig 经由 SEC 的体外稳定性分析

[0354]

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

[0355] 1. 聚集和片段化程度以百分比显示,而 Ab 百分比表示完整分子。

[0356] 2. Agg :聚集 ;

[0357] 3. Ab :完整抗体 ;

[0358] 4. Frgm :片段。

[0359] 2 种嵌合 Abs 都显示对于常规 IgG 分子正常的较小程度的聚集和片段化。纯化后 DVD1-Ig 显示在 SCE 上的某些聚集。在稳定性分析中,在不同条件下 DVD1-Ig 也显示在 PBS 中的聚集 ;然而,在延长贮存期间或在较高温度下,聚集形式的 DVD1-Ig 百分比没有增加。片段化形式的 DVD1-Ig 百分比在正常范围内,类似于嵌合 3D12. E3Ab 的那种。相比之下, DVD2-Ig 显示异常的稳定性。在所有测试的条件下对于 DVD2-Ig 没有检测到聚集或片段化,且 100% 的 DVD2-Ig 维持为完整单体分子。

[0360] 实施例 1.6 :hIL-1a/bDVD-Igs 的抗原结合亲和力测定

[0361] 与 rhIL1- $\alpha$  和 rhIL1- $\beta$  结合的 DVD-Ig 动力学通过基于表面等离子体共振的测量,用 Biacore 3000 仪器 (Biacore AB,Uppsala,瑞典) 使用 HBS-EP (10mM HEPES, pH 7.4, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 和 0.005% 表面活性剂 P20) 于 25°C 进行测定。所有化学药品都来自 Biacore AB (Uppsala,瑞典) 或否则来自如本文所述的不同来源。使用标准胺偶联试剂盒根据制造商的说明书和 25mg/ml 时的程序,将在 10mM 乙酸钠 (pH 4.5) 中稀释的约 5000RU 山

羊抗人 IgG Fc  $\gamma$  片段特异性多克隆抗体 (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) 直接固定化在 CM5 研究级生物传感器芯片上。生物传感器表面上未反应的部分用乙醇胺封闭。在流动室 2 和 4 中的修饰的羧甲基葡聚糖表面用作反应表面。在流动室 1 和 3 中不含山羊抗人 IgG 的未修饰的羧甲基葡聚糖用作参考表面。对于动力学分析,使用 Bioevaluation 4.0.1 软件,使来源于 1 : 1 Langmuir 结合模型的速率方程式同时对所有 10 次注射 (使用总体拟合分析) 的结合和解离相拟合。纯化的 DVD-Ig 样品在 HEPES 缓冲盐水中进行稀释,以用于在山羊抗人 IgG Fc 特异性反应表面上捕获,且以 5ml/ 分钟的流速注射在反应基质上。结合和解离速率常数,  $k_{on}(M^{-1}s^{-1})$  和  $k_{off}(s^{-1})$  在 25ml/ 分钟的连续流速下进行测定。通过在 1.25-1000nM 的 10 种不同抗原浓度下进行动力学结合测量来获得速率常数。随后通过下式由动力学速率常数来计算 DVD-Ig 和 rhIL1  $\alpha/\beta$  之间反应的平衡解离常数 (M) :  $KD = k_{off}/k_{on}$ 。同时也将等分试样的 rhIL1  $\alpha/\beta$  样品注射在空白参照和反应 CM 表面上,以记录和减去任何非特异性结合背景以消除大多数折射率变化和注射噪声。用流速为 5ml/ 分钟的 10mM 甘氨酸 (pH 1.5) 的 2 次后续 25ml 注射使表面再生。抗 Fc 抗体固定化的表面被完全再生且经过 12 个循环保持其全部捕获能力。捕获的 DVD-Ig-rhIL1  $\alpha/\beta$  复合物的表观化学计量在饱和结合条件下 (稳态平衡) 使用下式进行计算 :

[0362]

$$\text{化学计量} = \frac{\text{rhIL1}\alpha/\beta \text{ 应答 (RU)} \times \text{DVD-Ig MW}}{\text{DVD 应答 (RU)} \times \text{rhIL1}\alpha/\beta \text{ MW}}$$

[0363] Biacore 分析指出嵌合 Abs 对于 IL-1 具有的结合动力学和亲和力与原始杂交瘤 mAbs 相似,从而指出正确的 VL/VH 序列已被分离 (表 III)。2 种 DVD-Igs 对于 hIL-1  $\alpha$  的总体结合参数类似,其中 DVD-Igs 的亲和力仅为嵌合 3D12. E3Ab 的那种的 1/3-1/2。DVD2-Ig 对于 hIL-1  $\beta$  的结合亲和力略微小于嵌合 Ab 13F5. G5, 但为 DVD1-Ig 的那种的 3 倍。如通过对于 IL-1 的化学计量评估指出的,与嵌合 Abs 对于 hIL-1 的亲和力相比较,2 种 DVD-Igs 对于 hIL-1 的亲和力类似。二价单特异性的 2 种嵌合 Abs 分别以 1.6 和 1.7 的化学计量与 Biacore 上的 IL-1  $\alpha$  和 IL-1  $\beta$  结合。当抗体密集地固定化在 Biacore 传感器芯片上时,由于分子间干扰,这对于 IgG 是常见的,从而导致 1.5-2.0 的化学计量。2 种 DVD-Igs 对于 hIL-1  $\alpha$  和 hIL-1  $\beta$  的化学计量类似于 2 种嵌合 Abs 的那种,从而指出 2 种 DVD-Igs 对于每种抗原都具有二价结合能力。

[0364] 表 13. 抗 IL-1 DVD-Ig 分子的功能表征

[0365]

	抗原	$k_{on}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $s^{-1}$ )	$K_d$ (M)	化学计量	效力 $IC_{50}$ (M)
3D13. E3	hIL-1 $\alpha$	6.43E+05	7.13E-04	1.11E-09	2.0	6.70E-10
3D12. E3-Ch	hIL-1 $\alpha$	4.12E+05	5.52E-04	1.34E-09	1.6	7.00E-10
DVD1-Ig	hIL-1 $\alpha$	3.70E+04	1.05E-04	2.83E-09	1.8	2.30E-09
DVD2-Ig	hIL-1 $\alpha$	7.35E+04	2.52E-04	3.42E-09	2.0	2.90E-09

13F5. G5	hIL-1 $\beta$	2.13E+06	6.21E-04	2.91E-10	1.8	6.00E-10
13F5. G5-Ch	hIL-1 $\beta$	1.41E+06	6.54E-04	4.62E-10	1.7	5.30E-10
DVD1-Ig	hIL-1 $\beta$	6.09E+05	1.59E-03	2.60E-09	1.5	3.10E-09
DVD2-Ig	hIL-1 $\beta$	1.19E+06	9.50E-04	7.98E-10	1.8	1.60E-09

[0366] 亲和力和化学计量通过 Biacore 测量;效力 ( $IC_{50}$ ) 通过 MRC-5 生物测定测定。

[0367] 此外,还通过 Biacore 分析了 DVD-Ig 的四价双重特异性抗原结合(表 14)。DVD-Ig 首先经由 Biacore 传感器芯片上的山羊抗人 Fc 抗体捕获,且注射第一种抗原并观察到结合信号。当 DVD-Ig 由第一种抗原饱和时,随后注射第二种抗原并观察到第二种信号。这通过首先注射 IL-1  $\beta$  随后为 IL-1  $\alpha$ ,或对于 DVD2-Ig 首先注射 IL-1  $\alpha$  随后为 IL-1  $\beta$  来进行。在任一顺序中,检测到双重结合活性。对于 DVD1-Ig 获得类似结果。因此与双重特异性四价分子一样,每种 DVD-Ig 能够同时结合 2 种抗原。如表 IV 中所示,2 种 DVD-Ig 对于第一种抗原 hIL-1  $\alpha$  或 hIL-1  $\beta$  的化学计量大于 1.5,类似于非特异性二价结合的那种。在注射第二种抗原后,尽管 DVD-Ig 已由第一种抗原占据,但 2 种 DVD-Igs 对于第二种抗原(即 hIL-1  $\alpha$  或 hIL-1  $\beta$ )的化学计量为 1.0-1.3。因此 DVD-Ig 能够结合 2 个 IL-1  $\alpha$  和 2 个 IL-1  $\beta$  分子。DVD-Ig 首先经由 Biacore 传感器芯片上的山羊抗人 Fc 抗体捕获,且注射第一种抗原并观察到结合信号,随后注射第二种抗原。

[0368] 表 14. 与 IL-1  $\alpha$  /  $\beta$  四价双重特异性结合的 hIL-1 $\alpha$ /b DVD-Ig 的化学计量分析

	应答单位		化学计量		
	捕获的 Ab	第一种抗原	第二种抗原	hIL-1 $\alpha$ :DVD-Ig	hIL-1 $\beta$ :DVD-Ig
[0369]	DVD1-Ig: 932	hIL-1 $\alpha$ : 190	hIL-1 $\beta$ : 75	2.3	1.0
	DVD1-Ig: 1092	hIL-1 $\beta$ : 141	hIL-1 $\alpha$ : 107	1.1	1.5
	DVD2-Ig: 1324	hIL-1 $\alpha$ : 209	hIL-1 $\beta$ : 137	1.8	1.3
	DVD2-Ig: 1184	hIL-1 $\beta$ : 159	hIL-1 $\alpha$ : 131	1.2	1.6

[0370] 实施例 1.7 :DVD-Ig 的功能同质性测定

[0371] 因为 DVD2-Ig 通过 A 蛋白层析而不是靶特异性亲和层析进行纯化,所以任何可能错折叠和 / 或错配的 VL/VH 结构域(若存在的话)可以通过针对 2 种不同抗原的结合研究进行评估。此类结合分析通过大小排阻液相层析 (SEC) 来进行。向柱中施加单独的 DVD2-Ig,或以等摩尔比与 IL-1  $\alpha$ 、IL-1  $\beta$  或 IL-1  $\alpha$  和 IL-1  $\beta$  温育 120 分钟时间段后的 DVD2-Ig。抗原的每一种也作为对照单独运行。SEC 结果指出 DVD2-Ig 能够结合溶液中的 IL-1  $\alpha$  和 IL-1  $\beta$ ,且此种结合导致 SEC 信号变化,从而指出当其与任一抗原复合时 DVD2-Ig 的动力学大小增加。DVD2-Ig 信号的变化是 100%而不是部分的,从而暗示所有 DVD2-Ig 分子都能够结合抗原。在 IL-1  $\alpha$  和 IL-1  $\beta$  两者存在下, DVD2-Ig 信号有进一步和完全的变化,从而指出所有 DVD2-Ig 分子都能够以一致形式结合 2 种抗原。这个实验证明 DVD-Ig 作为功能均质蛋白质表达。这具有显著意义,因为它证实 DVD-Ig 可以作为均质单一的功能种类生产,这不同于所有先前描述的双特异性、多特异性、和多价免疫球蛋白样和免疫球蛋白衍生分子。

[0372] 实施例 1.8 :DVD-Ig 生物学活性的测定

[0373] DVD-Ig 的生物学活性使用 MRC-5 生物测定进行测量。MRC-5 细胞系是以剂量依赖性方式响应人 IL-1  $\alpha$  和 IL-1  $\beta$  生产 IL-8 的人肺成纤维细胞细胞系。MRC-5 细胞得自

ATCC,且在10% FBS完全MEM中于37°C在5% CO<sub>2</sub>培养箱中进行培养。为了测定DVD-Ig针对人IL-1 $\alpha$ 或IL-1 $\beta$ 的中和活性,向96孔板中加入溶于MEM/10% FBS中的50ul Ab(1E-7-1E-12M),且与50ul hIL-1 $\alpha$ 或hIL-1 $\beta$ (200pg/ml)于37°C,5% CO<sub>2</sub>预温育1小时。随后向所有孔中加入浓度为1E5/ml的MRC-5细胞(100ul),且使板在5% CO<sub>2</sub>培养箱中于37°C温育过夜。收获上清液,且通过标准ELISA(R&D Systems,Minneapolis,MN)测量人IL-8生产。DVD-Ig的中和活性通过其抑制IL-8生产的能力来测定。

[0374] 如表13中所示,2种DVD-Igs都能够中和hIL-1 $\alpha$ 和hIL-1 $\beta$ 。与对于hIL-1 $\alpha$ 的结合亲和力一致,DVD1-Ig和DVD2-Ig针对hIL-1 $\alpha$ 的中和活性也是类似的,即为嵌合Abs的那种的1/3(参见表III)。与其对于hIL-1 $\beta$ 的结合亲和力一致,DVD2-Ig对于hIL-1 $\beta$ 的中和活性略微小于嵌合Ab 13F5.G5的那种,但为DVD1-Ig的那种的3倍。总的来说,与原始mAbs相比较,DVD-Ig分子的生物学活性没有显著减少。

[0375] 为了确定在IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的存在下DVD-Ig是否能够抑制IL-8生产,在MRC-5测定的相同培养系统中加入等量的hIL-1 $\alpha$ 和hIL-1 $\beta$ 。在IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 两者存在下,DVD1-Ig和DVD2-Ig都能够抑制经由MRC-5细胞的IL-8合成,其活性类似于只存在1种细胞因子时的单一测定(表13)。在这种测定中,当存在IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 两者时,DVD2-Ig的双重抑制活性(1.2nM)高于DVD1-Ig的那种(2.2nM)。

[0376] 实施例2:DVD-Ig分子中的接头大小和可变结构域方向分析

[0377] 如表15中所示,构建具有不同亲本mAb对的另外DVD-Ig分子。对于每个mAbs对,产生4种不同的DVD-Ig构建体:2种具有短接头且2种具有长接头,各自为2种不同结构域方向:a-b-C( $\alpha$ - $\beta$ -恒定结构域)和b-a-C( $\beta$ - $\alpha$ -恒定结构域)。来源于人Ck或CH1结构域的N末端序列的接头序列如下:

[0378] 短接头:轻链:TVAAP;重链:ASTKGP

[0379] 长接头:轻链:TVAAPSVFIFPP;重链:ASTKGPSVFPLAP

[0380] 将所有重和轻链构建体亚克隆到pBOS表达载体内,且在COS细胞或freestyle 293细胞中表达。

[0381] 为了构建新DVD克隆,如对于hIL-1 $\alpha$ bDVD1-Ig和hIL-1 $\alpha$ bDVD2-Ig描述的,使用重叠PCR首先将2种mAbs的轻链和重链可变结构域串联连接。随后使用同源重组将连接的部分亚克隆到pBOS载体中。简言之,载体通过限制酶切消化进行线性化(2ug pBOS-hCk载体在0+缓冲液中用FspAI和BsiWI进行消化,且2ug pBOS-hC $\gamma$ z,non a载体在0+缓冲液用FspAI和SaII进行消化)。消化的样品在1%琼脂糖凝胶上电泳且在50ul水中纯化主链片段。对于同源重组和转化,使DH5 $\alpha$ 感受态细胞在冰上融化,且与20-50ng连接的PCR产物和20-50ng线性化载体混合(每50ul DH5 $\alpha$ 细胞)。随后将混合物轻轻混合且在冰上温育45分钟,随后于42°C热激1分钟。随后加入100ul SOC培养基且于37°C温育1小时。将转化培养物接种到包含氨苄青霉素的LB/琼脂板上,且于37°C温育18-20小时。分离细菌克隆,从其纯化DNA并实施测序分析。如先前所述,将最终序列验证的克隆共转染(匹配相同Ab对的HV和LC)到COS或293细胞中,用于Ab表达和纯化。

[0382] 纯化的DVD-Ig蛋白质的特征概括于表16中。表16的左侧部分显示用于构建新hIL-1 $\alpha$ /bDVD-Ig分子的2个mAbs对的特异性、结合亲和力和中和效力。抗体18F4.2C8和1B.12.4H4(参见实施例1.1.D)用于构建hIL-1 $\alpha$ /bDVD3a-Ig、hIL-1 $\alpha$ /bDVD4a-Ig、hIL-1 $\alpha$ /

bdDVD3b-Ig、和 hIL-1a/bDVD4b-Ig。hIL-1a/bDVD3a-Ig 和 hIL-1a/bDVD4a-Ig 为 a-b-C 方向，分别具有短和长接头。hIL-1a/bDVD3b-Ig 和 hIL-1a/bDVD4b-Ig 为 b-a-C 方向，分别具有短和长接头。抗体 6H3.1A4 和 6B12.4F6 用于构建 hIL-1a/bDVD5a-Ig、hIL-1a/bDVD6a-Ig、hIL-1a/bDVD5b-Ig、和 hIL-1a/bDVD6b-Ig。hIL-1a/bDVD5a-Ig 和 hIL-1a/bDVD6a-Ig 为 a-b-C 方向，分别具有短和长接头。hIL-1a/bDVD5b-Ig 和 hIL-1a/bDVD6b-Ig 为 b-a-C 方向，分别具有短和长接头。使用重叠 PCR 程序，使用先前对于 hIL-1a/bDVD1-Ig 描述的程序（参见实施例 1.3）来进行这些另外 hIL-1a/bDVD-Igs 的分子克隆。这些另外 hIL-1a/bDVD-Igs 的氨基酸序列公开于表 15 中。

[0383] 表 15 :能够结合 IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的 6 个 DVD Ig 的重链和轻链氨基酸序列。

[0384]

蛋白质 蛋白质区域	序列标识符	序列 12345678901234567890
DVD重可变 hIL-1a/b DVD3a-Ig	SEQ ID NO.:41	EVQLQQSGAELVKPGASVKL SCTASGLNIKDTYMHWLKQR PEQGLEWIGRIDPANGNAKY DRFLGKATITADTSSNTAY LQLSSLTSEDYAVYYCARGD GNEHFDYWGQGTTLTVSSAS TKGPQVHLKESGPGLVAPSQ SLSITCTVSGFSLTDYGVSW IRQPPGKGLEWLGLIWGGGD TYYNSPLKSRLSIRKDNSKS QVFLKMNSLQDDTAVYYCA KQRTLWGYDLYGMDYWGQGT SVTVSS
18F4.2C8 VH	SEQ ID NO.:3	EVQLQQSGAELVKPGASVKL SCTASGLNIKDTYMHWLKQR PEQGLEWIGRIDPANGNAKY DRFLGKATITADTSSNTAY LQLSSLTSEDYAVYYCARGD GNEHFDYWGQ GTTLTVSS
接头	SEQ ID NO.:42	ASTKGP
1B12.4H4 VH	SEQ ID NO.:9	QVHLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGGDYYN SPLKSRLSIRKDNSKSQVFL KMNSLQDDTAVYYCAKQRT LWGYDLYGMDYWGQGTSTVTV SS
CH	SEQ ID NO.:34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEVEP KSCDKHTCPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE EFTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

[0385]

蛋白质 蛋白质区域	序列标识符	序列
		12345678901234567890
DVD 轻可变 HIL- 1a/b DVD3a-Ig	SEQ ID NO.:43	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQKP GQSPRALIYSASYRYSVDP RFTGSGSGTDFTLTISNVQS VDLAEYFCQQYTRYPLTFGG GTKLEIKRTVAAPETTVTQS PASLSMAIGEKVTIRCITST DIDVDMNWXQQKPGEPKLL ISQGNLTPGVPSRFSSSGS GTFDFVFIENMLSEDVADYY CLOSDNLPLTFGAGTKLELKR
18F4.2C8 VL	SEQ ID NO.:4	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQKP GQSPRALIYSASYRYSVDP RFTGSGSGTDFTLTISNVQS VDLAEYFCQQYTRYPLTFGG GTKLEIKR
接头	SEQ ID NO.:44	TVAAP
1B12.4H4 VL	SEQ ID NO.:10	ETTVTQSPASLSMAIGEKVT IRCITSTDIDVDMNWXQQK GEPKLLISQGNLTPGVPS RFSSSGSGTDFVFIENMLS EDVADYYCLOSDNLPLTFGA GTKLELKR
CL	SEQ ID NO.:36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVCLLNIFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDYSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPEVTKS FNRGEC
DVD 重可变 hIL-1a/b DVD3b-Ig	SEQ ID NO.:45	QVHLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGGDTYIN SPLKSRLSIRKDNSKSQVFL KMNSLQTDATAVYYCAKQRT LWGYDLYGMDYWGQTSVTV SSASTKGPEVQLQSGAELV KPGASVKLSCTASGLNIKDT YMHWLKQRPEQGLEWIGRID PANGNAKYDPRFLGKATITA DTSSNTAYLQLSSLTSEDTA VYYCARGDGNFHFYWGQGT TLTVSS
1B12.4H4 VH	SEQ ID NO.:9	QVHLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGGDTYIN SPLKSRLSIRKDNSKSQVFL KMNSLQTDATAVYYCAKQRT LWGYDLYGMDYWGQTSVTV

[0386]

蛋白质		序列
蛋白质区域	序列标识符	12345678901234567890
		SS
接头	SEQ ID NO.:42	ASTKGP
18F4.2C8 VH	SEQ ID NO.:3	EVQLQQSGAELVKPGASVKL SCTASGLNIKDTYMHWLKQR FEQGLEWIGRIDPANGNAKY DPRFLGKATITADTSSNTAY LQLSSLTSEDVAVYYCARGD GNFHFQDYWGQGTTLTVSS
CH	SEQ ID NO.:34	ASTKGPSVFLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSQVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE EVTQCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSQSVMHREALHNYT QKSLSLSPGK
DVD 轻可变 HIL-1a/b DVD3b-Ig	SEQ ID NO.:46	ETTVTQSPASLSMAIGEKVT IRCITSTDIDVDMNWWYQQKP GEPPKLLISQGNLTPRGVPS RFSSSGSGTDFVFIENMLS EDVADYYCLOSDNLEPLTFGA GTKLELKRVAAPDIVMTQS QRFMSTSVGDRVSVTCKASQ NVGTNIAWYQQKPGQSPRAL IYSASYRYSYGVDPDRFTGSGS GTDFTLTISNVQSVDLAEYF CQQYTRYPLTFGGGTKLEIK R
1B12.4H4 VL	SEQ ID NO.:10	ETTVTQSPASLSMAIGEKVT IRCITSTDIDVDMNWWYQQKP GEPPKLLISQGNLTPRGVPS RFSSSGSGTDFVFIENMLS EDVADYYCLOSDNLEPLTFGA GTKLELKR
接头	SEQ ID NO.:44	TVAAP
18F4.2C8 VL	SEQ ID NO.:4	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQKP GQSPRALIYSASYRYSYGVDP RFTGSGSGTDFLTISNVQS VDLAEYFCQQYTRYPLTFGG GTKLEIKR

[0387]

蛋白质 蛋白质区域	序列标识符	序列 12345678901234567890
CL	SEQ ID NO.:36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
DVD 重可变 hIL-1a/b DVD4a-Ig	SEQ ID NO.:47	EVQLQQSGAELVKPGASVKL SCTASGLNIKDTYMHWLKQR PEQGLEWIGRIDPANGNAKY DPRFLGKATITADTSSNTAY LQLSSLTSEDTAVYYCARGD GNFHFDYWGQGTTLTVSSAS TKGPSVFPLAPQVHLKESGP GLVAPSQSLSTCTVSGFSL TDYGVSWIRQPPGKGLEWL LIWGGGDTYYNSPLKSRLSI RKDNSKSQVFLKMNSLQTD TAVYYCAKQRTLWGYDLYGM DYWGQGTSTVTVSS
18F4.2C8 VH	SEQ ID NO.:3	EVQLQQSGAELVKPGASVKL SCTASGLNIKDTYMHWLKQR PEQGLEWIGRIDPANGNAKY DPRFLGKATITADTSSNTAY LQLSSLTSEDTAVYYCARGD GNFHFDYWGQGTTLTVSS
接头	SEQ ID NO.:48	ASTKGPSVFPLAP
1B12.4H4 VH	SEQ ID NO.:9	QVHLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGGDTYYN SPLKSRLSIRKDNSKSQVFL KMNSLQTD TAVYYCAKQRT LWGYDLYGMDYWGQGTSTV SS
CH	SEQ ID NO.:34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMI SRT EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMHEALHNHYT QKLSLSLSPGK

[0388]

蛋白质 蛋白质区域	序列标识符	序列 12345678901234567890
DVD 轻可变 HIL- 1a/bDVD4a-Ig	SEQ ID NO.:49	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQKP GQSPRALIYSASYRYSGVPD RFTGSGSGTDFTLTISNVQS VDLAEYFCQQYTRYPLTFGG GTKLEIKRTVAAPSVFIFPP ETTVTQSPASLSMAIGEKVT IRCITSTDIDVDMNWXQQKP GEPPKLLISQGNLTPGVPS RFSSSGSGTDFVFIENMLS EDVADYYCLQSDNLPLTFGA GTKLELKR
18F4.2C8 VL	SEQ ID NO.:4	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQKP GQSPRALIYSASYRYSGVPD RFTGSGSGTDFTLTISNVQS VDLAEYFCQQYTRYPLTFGG GTKLEIKR
接头	SEQ ID NO.:50	TVAAPSVFIFPP
1B12.4H4 VL	SEQ ID NO.:10	ETTVTQSPASLSMAIGEKVT IRCITSTDIDVDMNWXQQKP GEPPKLLISQGNLTPGVPS RFSSSGSGTDFVFIENMLS EDVADYYCLQSDNLPLTFGA GTKLELKR
CL	SEQ ID NO.:36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
DVD 重可变 hIL- 1a/b DVD4b-Ig	SEQ ID NO.:51	QVHLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGGDTYYN SPLKSRLSIRKDNSKSQVFL KMNSLQTDDTAVYYCAKQRT LWGYDLYGMDYWGQTSVTV SSASTKGPSVFPLAPEVQLQ QSGAELVKPGASVKLSCTAS GLNIKDTYMHWLKQRPQQGL EWIGRIDPANGNAKYDPRFL GKATITADTSNTAYLQLSS LTSEDVAVYYCARGDNFHF DYWGQGTTLTVSS
1B12.4H4 VH	SEQ ID NO.:9	QVHLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGGDTYYN SPLKSRLSIRKDNSKSQVFL KMNSLQTDDTAVYYCAKQRT LWGYDLYGMDYWGQTSVTV

蛋白质	序列标识符	序列
蛋白质区域		12345678901234567890
接头	SEQ ID NO.:48	SS
18F4.2C8 VH	SEQ ID NO.:3	ASTKGPSVFPLAP EVQLQQSGAELVKPGASVKL SCTASGLNIKDTYMHWLKQR PEQGLEWIGRIDPANGNAKY DPRFLGKATITADTSSNTAY LQLSSLTSEDTAVYYCARGD GNFHFDYWGQGTTLTVSS
CH	SEQ ID NO.:34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELIGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
DVD 轻可变 HIL- 1a/b DVD4b-Ig	SEQ ID NO.:52	ETTIVTQSPASLSMAIGEKVT IRCITSTDIDVDMNWXQQKP GEPPKLLISQGNLTPGVPS RFSSSGSGTDFVFIENMLS EDVADYYCQSDNLPLTFGA GTKLELKR DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQKP GQSPRALIYSASYRSGVPD RFTGSGSGTDFTLTISNVQS VDLAEIFCQYTRYPLTFGG GTKLEIKR
1B12.4H4 VL	SEQ ID NO.:10	ETTIVTQSPASLSMAIGEKVT IRCITSTDIDVDMNWXQQKP GEPPKLLISQGNLTPGVPS RFSSSGSGTDFVFIENMLS EDVADYYCQSDNLPLTFGA GTKLEIKR
接头	SEQ ID NO.:50	TVAAPSVFIFPP
18F4.2C8 VL	SEQ ID NO.:4	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQKP GQSPRALIYSASYRSGVPD RFTGSGSGTDFTLTISNVQS VDLAEIFCQYTRYPLTFGG GTKLEIKR

[0389]

[0390]

蛋白质 蛋白质区域	序列标识符	序列 12345678901234567890
CL	SEQ ID NO.:36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
DVD 重可变 hIL-1a/b DVD5a-Ig	SEQ ID NO.:53	QVQLQQPGAELVRPGASVKL SCKASGYTFTTYWMNWVKQR PEQGLEWIGRIDPYDSETLY SQFKDTAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYG FDYWGQGTTLTVSSASTKGP EVQLQQSGPELVKGTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHWRQS HGKSLWIGYISCYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YGTNDYWGQGTTLTVSS
6H3.1A4.3E11 VH	SEQ ID NO.:5	QVQLQQPGAELVRPGASVKL SCKASGYTFTTYWMNWVKQR PEQGLEWIGRIDPYDSETLY SQFKDTAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYG FDYWGQGTTLTVSS
接头	SEQ ID NO.:42	ASTKGP
6B12.4F6 VH	SEQ ID NO.:11	EVQLQQSGPELVKGTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHWRQS HGKSLWIGYISCYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YGTNDYWGQGTTLTVSS
CH	SEQ ID NO.:34	ASTKGPSVFLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
		QIVLTQSPALMSASPGEKVT MTCASSSVNYMYWYQQKPR

[0391]

蛋白质 蛋白质区域	序列标识符	序列 12345678901234567890
DVD 轻可变 HIL- 1a/b DVD5a-Ig	SEQ ID NO.:54	SSPKPWIYLTSLNLAGV PARFSGSGSGTSYS SLTISSMEAE DAATYYCQQWNS NPYTFGGG TKLEMKRTVAAPQ IVLTQSP AIMSASPGEKVTIT CSASS VSYMHWFQQKPGAS PKLWIY S'TSNLAGVPARF SGSGSGT SYSLTVSRMEAED AATYYCQ QRSTYPYTFGGG TKLEIKR
6H3.1A4.3E11 VL	SEQ ID NO.:6	QIVLTQSPALMSAS PGEKVT MTCASASSVNYM YWYQQKPR SSPKPWIYLTSLN LAGVPAR FSGSGSGTSYS SLTISSMEAE DAATYYCQQWNS NPYTFGGG TKLEMKR
接头	SEQ ID NO.:44	TVAAP
6B12.4F6 VL	SEQ ID NO.:12	QIVLTQSPA IMASASPGEKVT ITCSASSSVSYM HWFQQKPG ASP KLWIYSTSNLAG VPAR FSGSGSGTSYS SLTVSRMEAE DAATYYCQQRST YPYTFGGG TKLEIKR
CL	SEQ ID NO.:36	TVAAPSVFIFPPS DEQLKSG TASV VCLLN NFYPREAKVQW KVDNALQSGNS QESVTEQDS KDS TYSLSSTLTL SKADYEK HKVYACEVTHQ GLSSPVTKS FNRGEC
DVD 重可变 hIL- 1a/b DVD5b-Ig	SEQ ID NO.:55	EVQLQQSGPELVK TGT SVKI SCKASGYSFTG YMHVWRQS HGKSLEWIGYIS CYNGFTSY NPKFKGKATFT VDTSSSTAY IQFSRLTSEDS AVYYCARSD YYGTNDYWGQGT TLTVSSAS TKGPQVQLQQP GAELVRPGA SVKLSCKASG YTFTTYWMNW VKQRPEQGLEW IGRIDPYDS ETLYSQKFKD TAILTVDKSS STAYMQLSSLT SEDSAVYYC ARYGFDYWGQ GTTLTVSS
6B12.4F6 VH	SEQ ID NO.:11	EVQLQQSGPELVK TGT SVKI SCKASGYSFTG YMHVWRQS HGKSLEWIGYIS CYNGFTSY NPKFKGKATFT VDTSSSTAY IQFSRLTSEDS AVYYCARSD YYGTNDYWGQGT TLTVSS
接头	SEQ ID NO.:42	ASTKGP
6H3.1A4.3E11 VH	SEQ ID NO.:5	QVQLQQPGAELV RPGASVKL SCKASGYTF TTYWMNW VKQR PEQGLEWIGRID PYDSETLY

[0392]

蛋白质 蛋白质区域	序列标识符	序列 12345678901234567890
CH	SEQ ID NO.:34	SQKFKDTAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYG FDYWGQGTTLTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTF EFTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
DVD 轻可变 HIL- 1a/b DVD5b-Ig	SEQ ID NO.:56	QIVLTQSPAIMASAPGEKVT ITCSASSSVSYMHWFQQKPG ASPKLWIYSTSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTVSRMEAE DAATYYCQQRSTYPYTFGGG TKLEIKRTVAAPQIVLTQSP ALMSASPGEKVTMTCSASSS VNMYWYQQKPRSSPKPWIY LTSNLAGVPARFSGSGSGT SYSLTISMEAEADAATYYCQ QWNSNPYTFGGGTKLEMKR
6B12.4F6 VL	SEQ ID NO.:12	QIVLTQSPAIMASAPGEKVT ITCSASSSVSYMHWFQQKPG ASPKLWIYSTSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTVSRMEAE DAATYYCQQRSTYPYTFGGG TKLEIKR
接头	SEQ ID NO.:44	TVAAP
6H3.1A4.3E11 VL	SEQ ID NO.:6	QIVLTQSPALMSASPGEKVT MTCSASSSVNMYWYQQKPR SSPKPWIYLTSNLAGVPAR FSGSGSGTSYSLTISMEAE DAATYYCQQWNSNPYTFGGG TKLEMKR
CL	SEQ ID NO.:36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

[0393]

蛋白质 蛋白质区域	序列标识符	序列 12345678901234567890
DVD 重可变 hIL- 1a/b DVD6a-Ig	SEQ ID NO.:57	QVQLQQPGAELVRPGASVKL SCKASGYTFTTYWMNWKQR PEQGLEWIGRIDPYDSETLY SQKFKDTAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYG FDYWGQGTTLTVSSASTKGP SVFPLAPEVQLQQSGPELVK TGTSVKISCKASGYSFTGYY MHWVRQSHGKSLEWIGYISC YNGFTSYNPKFKGKATFTVD TSSSTAYIQFSRLTSEDSAV YYCARSDYYGTNDYWGQGT LTVSS
6H3.1A4.3E11 VH	SEQ ID NO.:5	QVQLQQPGAELVRPGASVKL SCKASGYTFTTYWMNWKQR PEQGLEWIGRIDPYDSETLY SQKFKDTAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYG FDYWGQGTTLTVSS
接头	SEQ ID NO.:48	ASTKGPSVFPLAP
6B12.4F6 VH	SEQ ID NO.:11	EVQLQQSGPELVKTTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHWVRQS HGKSLEWIGYISCYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YYGTNDYWGQGTTLTVSS
CH	SEQ ID NO.:34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHNKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPELGG PSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCAVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTRKQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
DVD 轻可变 HIL-	SEQ ID NO.:58	QIVLTQSPALMSASPGEKVT MTCASASSVNYMYWYQQKPR SSPKPWIIYLTSLNLAGVPAR FSGSGGTSYSLTISSEAE DAATYYCQQWNSNPYTFGGG TKLEMKRTVAAPSVFIFPPQ IVLTQSPAISASPGEKVTI

蛋白质 蛋白质区域	序列标识符	序列 12345678901234567890
1a/b DVD 6a-Ig		TCSASSSVSYMHWFQOKPGA SPKLIWYSTSNLASGVPARF SGSGSGTSYSLTVSRMEAED AATYYCQQRSTYPYTFGGGT KLEIKRR
6H3.1A4.3E11 VL	SEQ ID NO.:6	QIVLTQSPALMSASPGEKVT MTCSASSSVNYMYWYQOKPR SSPKPWIIYLTSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTISSEAE DAATYYCQWNSNPYTFGGG TKLEMKR
接头	SEQ ID NO.:50	TVAAPSVFIFPP
6B12.4F6 VL	SEQ ID NO.:12	QIVLTQSPALMSASPGEKVT ITCSASSSVSYMHWFQOKPG ASPKLIWYSTSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTVSRMEA DAATYYCQQRSTYPYTFGGG TKLEIKR
CL	SEQ ID NO.:36	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQD SIKIDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
DVD 重可变 hIL- 1a/b DVD6b-Ig	SEQ ID NO.:59	EVQLQQSGPELVKGTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHWVRQS HGKSLEWIGYISCYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YYGTNDYWGQGTTLTVSSAS TKGPSVFPLAPQVQLQPPGA ELVLRPGASVKLSCKASGYTF TTYWMNWVKORPEQGLEWIG RIDPYDSETLYSOKFKDTAI LTVDKSSSTAYMQLSSLTSE DSAVYYCARYGFDYWGQGT LTVSS
6B12.4F6 VH	SEQ ID NO.:11	EVQLQQSGPELVKGTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHWVRQS HGKSLEWIGYISCYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YYGTNDYWGQGTTLTVSS
接头	SEQ ID NO.:48	ASTKGPSVFPLAP
6H3.1A4.3E11 VH	SEQ ID NO.:5	QVQLQQPGAELVLRPGASVKL SCKASGYTFTTYWMNWVKOR PEQGLEWIGRIDPYDSETLY SOKFKDTAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYG FDYWGQGTTLTVSS

[0394]

[0395]

蛋白质 蛋白质区域	序列标识符	序列
CH	SEQ ID NO.:34	12345678901234567890 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKLSLSLSPGK
DVD 轻可变 HIL- 1a/b DVD6b-Ig	SEQ ID NO.:60	QIVLTQSPAIMSASPGEKVT ITCSASSSVSYMHWFQQKPG ASPKLWIYSTSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTVSRMEAE DAATYYCQQRSTYPYTFGGG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPQ IVLTQSPALMSASPGEKVTM TCSASSSVNYMYWYQQKPRS SPKPWIYLTSNLASGVPARF SGSGSGTSYSLTISSMEAE AATYYCQQWNSNPYTFGGGT KLEMKRR
6B12.4F6 VL	SEQ ID NO.:12	QIVLTQSPAIMSASPGEKVT ITCSASSSVSYMHWFQQKPG ASPKLWIYSTSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTVSRMEAE DAATYYCQQRSTYPYTFGGG TKLEIKR
接头	SEQ ID NO.:50	TVAAPSVFIFPP
6H3.1A4.3E11 VL	SEQ ID NO.:6	QIVLTQSPALMSASPGEKVT MTCSASSSVNYMYWYQQKPR SSPKWIYLTSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTISSMEAE DAATYYCQQWNSNPYTFGGG TKLEMKR
CL	SEQ ID NO.:36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNFPYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

[0396] 新 DVD 构建体的特征概括于表 16 中。亲和力 (Kd) 和生物学活性 (IC50) 分别通过 Biacore 和 MRC-5 生物测定来测定。所有新 DVD 蛋白质的 SDS-PAGE 分析显示在还原和非还原条件下正常的迁移模式,类似于常规抗体和 DVD1/2-Ig。

[0397] 表 16. 来源于新 mAb 对的新 DVD-Ig 分子的表征

[0398]

mAb	特异性	K <sub>d</sub> (M)	IC <sub>50</sub> (M)	DVD	方向	接头	亲和力 (K <sub>d</sub> ) M		效力 (IC <sub>50</sub> ) M	
							IL-1α	IL-1β	IL-1α	IL-1β
18F4.2C8 1B12.4H 4	rhIL-1α	5.95E-10	3.30E-10	DVD3a	a-b-C	短	8.37E-10	6.37E-08	7.50E-10	NA
				DVD4a	a-b-C	长	7.01E-10	9.30E-10	3.50E-10	1.00E-08
	rhIL-1β	2.61E-10	6.00E-10	DVD3b	b-a-C	短	1.24E-09	1.90E-10	7.00E-10	4.00E-10
				DVD4b	b-a-C	长	5.60E-10	1.28E-10	3.50E-10	5.00E-10
6H3.1A4 6B12.4F6	rhIL-1α	3.54E-10	2.40E-10	DVD5a	a-b-C	短	5.08E-10	1.25E-08	2.60E-09	1.90E-08
				DVD6a	a-b-C	长	1.06E-09	2.09E-09	2.30E-09	7.00E-08
	rhIL-1β	5.54E-10	4.00E-10	DVD5b	b-a-C	短	1.32E-08	6.71E-10	3.30E-09	2.50E-10
				DVD6b	b-a-C	长	8.20E-10	6.97E-10	1.00E-09	7.50E-10

[0399] NA :没有检测到中和活性。

[0400] 新 DVD 分子的功能表征揭示对于任一方向,就 2 种抗原的结合和中和而言,具有长接头的 DVDs 比具有短接头的 DVDs 表现更佳。就具有长接头的 DVDs 而言,具有 b-a-C 方向的那些显示与 2 种抗原良好结合且中和 2 种抗原,而具有 a-b-C 方向的 DVDs 显示与 IL-1 α 良好结合且中和 IL-1 α,以及与 IL-1 β 减少的结合且较低中和 IL-1 β (例如, DVD4b 对 DVD4a)。DVD-Ig 分子 DVD4b 以亚 nM 结合且中和 IL-1 α 和 IL-1 β 两者,且完全保留亲本 mAbs 的结合和中和特征。

[0401] 实施例 3 :能够结合 IL-12 和 IL-18 的 DVD-Ig 的产生

[0402] 使用 2 种亲本 mAbs,一种针对人 IL-12p40 (ABT874) 且另一种针对人 IL-18 (ABT325),如上所述构建能够结合 IL-12 和 IL-18 的 DVD-Ig 分子。产生了 4 种不同的抗 IL12/18 DVD-Ig :2 种具有短接头且 2 种具有长接头,各自为 2 种不同结构域方向 :12-18-C 和 18-12-C (表 VI)。来源于人 C<sub>λ</sub>/C<sub>κ</sub> 或 CH1 结构域的 N 末端序列的接头序列如下 :

[0403] 对于 DVD1218 构建体 (ABT874 具有 V<sub>λ</sub>) :

[0404] 轻链 (λ) :短接头 :QPKAAP ;长接头 :QPKAAPSVTLFPP

[0405] 重链 (γ 1) : :短接头 :ASTKGP ;长接头 :ASTKGPSVFPLAP

[0406] 对于 DVD1812 构建体 (ABT325 具有 V<sub>κ</sub>) :

[0407] 轻链 (κ) :短接头 :TVAAP ;长接头 :TVAAPSVFIFPP

[0408] 重链 (γ 1) : :短接头 :ASTKGP ;长接头 :ASTKGPSVFPLAP

[0409] 将所有重和轻链构建体亚克隆到 pBOS 表达载体内,且在 COS 细胞或 freestyle 293 细胞中表达,随后通过 A 蛋白层析纯化。对纯化的材料实施 SDS-PAGE 和 SEC,且其特征类似于 DVD2-Ig 的那种。

[0410] 下表 17 描述了用于表达每种抗 IL12/IL18 DVD-Ig 蛋白质的重链和轻链构建体。

[0411] 表 17. 表达抗 IL12/IL18 DVD-Ig 蛋白质的构建体

[0412]

DVD-Ig 蛋白质	重链构建体	轻链构建体
DVD1218SL	DVD1218HC-SL	DVD1218LC-SL
DVD1218LL	DVD1218HC-LL	DVD1218LC-LL
DVD1812SL	DVD1812HC-SL	DVD1812LC-SL
DVD1812LL	DVD1812HC-LL	DVD1812LC-LL

[0413] 实施例 3.1.1 :关于 DVD1218SL 和 DVD1218LL 的 DVD 构建体的分子克隆 :

[0414] 为了产生重链构建体 DVD1218HC-LL 和 DVD1218HC-SL,分别使用引物 1 和引物 2L 或引物 2S PCR 扩增 ABT-874 的 VH 结构域 ;同时分别使用引物 3L 或引物 3S 和引物 4 扩增 ABT-325 的 VH 结构域。2 种 PCR 反应都根据标准 PCR 技术和程序来进行。将 2 种 PCR 产物进行凝胶纯化,且一起用作重叠模板用于后续重叠 PCR 反应,其中使用引物 1 和 4 使用标准 PCR 条件。通过使用标准同源重组方法,将重叠 PCR 产物亚克隆到 Srf I 和 Sal I 双重消化的 pBOS-hC $\gamma$ 1, z non-a 哺乳动物表达载体 (Abbott) 内。

[0415] 为了产生轻链构建体 DVD1218LC-LL 和 DVD1218LC-SL,分别使用引物 5 和引物 6L 或引物 6S PCR 扩增 ABT-874 的 VL 结构域 ;同时分别使用引物 7L 或引物 7S 和引物 8 扩增 ABT-325 的 VL 结构域。2 种 PCR 反应都根据标准 PCR 技术和程序来进行。将 2 种 PCR 产物进行凝胶纯化,且一起用作重叠模板用于后续重叠 PCR 反应,其中使用引物 5 和 8 使用标准 PCR 条件。通过使用标准同源重组方法,将重叠 PCR 产物亚克隆到 Srf I 和 Not I 双重消化的 pBOS-hC $\kappa$ 哺乳动物表达载体 (Abbott) 内。用于这些构建的引物在下表 18 中列出 :

[0416] 表 18 :

[0417]

引物 1 :TAGAGATCCCTCGACCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCA CCATGGAGTTTGGGCTGAGC	SEQ ID NO. :61
引物 2- S :CACCTCTGGGCCCTTGGTCGACGCTGAAGAGACGGTGACCATTGT	SEQ ID NO. :62
引物 2- L :GGGTGCCAGGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTCGACGCTGAAGA GACGGTGACCATTGT	SEQ ID NO. :63
引物 3- S :TCTCAGCGTCGACCAAGGGCCAGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCT	SEQ ID NO. :64
引物 3- L :GCGTCGACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCGAGGTG CAGCTGGTGCAGTCT	SEQ ID NO. :65
引物 4 :GTAGTCCTTGACCAGGCAGCC	SEQ ID NO. :66

引物 5 :TAGAGATCCCTCGACCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCA CCATGACTTGGACCCCACTC	SEQ ID NO. :67
引物 6- S :TATTTCCGGGGCAGCCTTGGGCTGACCTAGTACTGTGACCTTGGT	SEQ ID NO. :68
引物 6- L :GGGCGGGAACAGAGTGACCGAGGGGGCAGCCTTGGGCTGACCTA GTACTGTGACCTTGGT	SEQ ID NO. :69
引物 7- S :CTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCGAAATAGTGATGACGCAGTCT	SEQ ID NO. :70
引物 7-L :CAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCGAAATAG TGATGACGCAGTCT	SEQ ID NO. :71
引物 8 :GTCCCAGGTGGGACCCTCACTCTAGAGTCGCGGCCGCCTA ACACTCTCCCCTGTTGAA	SEQ ID NO. :72

[0418] 类似方法已用于如下所述产生 DVD1812SL 和 DVD1812LL :

[0419] 实施例 3. 1. 2 :关于 DVD1812SL 和 DVD1812LL 的 DNA 构建体的分子克隆 :

[0420] 为了产生重链构建体 DVD1812HC-LL 和 DVD1812HC-SL, 分别使用引物 1 和引物 9L 或引物 9S PCR 扩增 ABT-325 的 VH 结构域 ;同时分别使用引物 10L 或引物 10S 和引物 4 扩增 ABT-874 的 VH 结构域。2 种 PCR 反应都根据标准 PCR 技术和程序来进行。将 2 种 PCR 产物进行凝胶纯化, 且一起用作重叠模板用于后续重叠 PCR 反应, 其中使用引物 1 和 4 使用标准 PCR 条件。通过使用标准同源重组方法, 将重叠 PCR 产物亚克隆到 Srf I 和 Sal I 双重消化的 pBOS-hC $\gamma$  1, z non-a 哺乳动物表达载体 (Abbott) 内。下述是引物的序列 :

[0421] 为了产生轻链构建体 DVD1812LC-LL 和 DVD1812LC-SL, 分别使用引物 11 和引物 12L 或引物 12S PCR 扩增 ABT-325 的 VL 结构域 ;同时分别使用引物 13L 或引物 13S 和引物 14 扩增 ABT-874 的 VL 结构域。2 种 PCR 反应都根据标准 PCR 技术和程序来进行。将 2 种 PCR 产物进行凝胶纯化, 且一起用作重叠模板用于后续重叠 PCR 反应, 其中使用引物 11 和 14 使用标准 PCR 条件。通过使用标准同源重组方法, 将重叠 PCR 产物亚克隆到 Srf I 和 Not I 双重消化的 pBOS-hCk 哺乳动物表达载体 (Abbott) 内。用于这些构建的引物在下表 19 中列出 :

[0422] 表 19 :

[0423]

引物 9-S : CACCTGTGGGCCCTTGGTTCGACGCTGAAGAGACGGTGACCATTGT	SEQ ID NO. :73
引物 9-L : GGGTGCCAGGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTTCGACGCTGAAGAG ACGGTGACCATTGT	SEQ ID NO. :74

引物 10- S :TCTTCAGCGTCGACCAAGGGCCCACAGGTGCAGCTGGTGGAGTCT	SEQ ID NO. :75
引物 10- L :GCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCAGGTG CAGCTGGTGGAGTCT	SEQ ID NO. :76
引物 11 : TAGAGATCCCTCGACCTCGAGATCCATTGTGCCGGGGCCACCATG GAAGCCCCAGCGCAGCTT	SEQ ID NO. :77
引物 12-S : AGACTGTGGTGCAGCCACAGTTCGTTTAATCTCCAGTCGTGT	SEQ ID NO. :78
引物 12- L :TGGCGGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTAAT CTCCAGTCGTGT	SEQ ID NO. :79
引物 13-s : AAACGAACTGTGGCTGCACCACAGTCTGTGCTGACTCAGCCC	SEQ ID NO. :80
引物 13- L :ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTCCCGCCACAGTCTGTGC TGAATCAGCCC	SEQ ID NO. :81
引物 14 : GTCCCAGGTGGGGACCTCACTCTAGAGTCGGGCCGCTCATGAAC ATTCTGTAGGGGC	SEQ ID NO. :82

[0424] 关于抗 IL12/IL-18 DVD-Ig 的 8 个重和轻链构建体的最终 DNA 序列显示于表 20 中：

[0425] 表 20 :能够结合 IL-12 和 IL-18 的 DVD 结合蛋白的氨基酸序列

[0426]

蛋白质		序列
蛋白质区域	序列标识符	12345678901234567890
DVD重可变 DVD1218HC-SL	SEQ ID NO.:83	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAFIRYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCKTHG SHDNWGQGMVTVSSASTKG PEVQLVQSGTEVKKPGESLK ISCKGSGYTVTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGFYIPGDSETR YSPTFQGQVTISADKSFNTA FLQWSSLKASDTAMYICARV GSGWYPYTFDIWGQGMVTV SS
ABT-874 VH	SEQ ID NO.:84	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAFIRYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCKTHG SHDNWGQGMVTVSS
接头	SEQ ID NO.:42	ASTKGP
ABT-325 VH	SEQ ID NO.:85	EVQLVQSGTEVKKPGESLKI SCKGSGYTVTSYWIGWVRQM PGKGLEWMGFYIPGDSETRY SPTFQGQVTISADKSFNTAF LQWSSLKASDTAMYICARVG SGWYPYTFDIWGQGMVTVS S
CH	SEQ ID NO.:34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNKKPSNTKVDKKEP KSCDKHTCPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN

[0427]

蛋白质 蛋白质区域	序列标识符	序列 12345678901234567890
		STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFPYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMHEALHNHYT QKLSLSLSPGK
DVD 轻可变 DVD1218LC-SL	SEQ ID NO.:86	MTWTPLLFLTLHLHCTGSLS QSVLTQPPSVSGAPGQRVTI SCSGSRSNIGSNTVKWYQQ PGTAPKLLIYYNDQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAITGLQ AEDEADYYCQSYDRYTHPAL LFGTGTKVTVLGQPKAAPEI VMTQSPATLSVSPGERATLS CRASESISSNLAWYQQKPGQ APRLFITYASTRATDIPARF SGSGSGTEFTLTISLQSED FAVYYCQQYNNWPSITFGQG TRLEIKR
ABT-874 VL	SEQ ID NO.:87	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTI SCSGSRSNIGSNTVKWYQQ PGTAPKLLIYYNDQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAITGLQ AEDEADYYCQSYDRYTHPAL LFGTGTKVTVLG
接头	SEQ ID NO.:88	QPKAAP
ABT-325 VL	SEQ ID NO.:89	EIVMTQSPATLSVSPGERAT LSCRASESISSNLAWYQQK GQAPRLFITYASTRATDIPA RFSGSGSGTEFTLTISLQ EDFAVYYCQQYNNWPSITFG QGTRLEIKR
CL	SEQ ID NO.:36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
DVD 重可变 DVD1218HC-LL	SEQ ID NO.:90	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAFIRYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCKTHG SHDNWGQGTMTVTVSSASTKG PSVFLAPEVQLVQSGTEVK KPGESLKISCKGSGYTVTSY WIGWVRQMPGKGLEWMGFY PGDSETRYSPTEFQGVVISA

[0428]

蛋白质 蛋白质区域	序列标识符	序列 12345678901234567890
		DKSFNTAFLQWSSLKASDTA MYICARVGSWYPTFDIWG QGTMTVSS
ABT-874 VH	SEQ ID NO.:84	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAFIRYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNLSRAEDTAVYYCKTHG SHDNWGQGTMTVSS
接头	SEQ ID NO.:48	ASTKGPSVFPLAP
ABT-325 VH	SEQ ID NO.:85	EVQLVQSGTEVKKKPGESLKI SCKGSGYTVTSYWIGWVRQM PGKGLEWMGFIYPGDSETRY SPTFQGQVTISADKSFNTAF LQWSSLKASDTAMYICARVG SGWYPTFDIWGQGTMTVSS
CH	SEQ ID NO.:34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVFSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKHTCPCPPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKLSLSLSPGK
DVD 轻可变 DVD1218LC-LL	SEQ ID NO.:91	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTI SCSGRSNIGSNTVKWYQQL PGTAPKLLIYNDQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAITGLQ AEDEADYYCQSYDRYTHPAL LFGTGTKVTVLGQPKAAPSV TLFPPPEIVMTQSPATLSVSP GERATLSCRASESISNLAW YQKPGQAPRLFITYASTRA TDI PARFSGSGSTFEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNWNP SITFGQGRLEIKR
ABT-874 VL	SEQ ID NO.:87	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTI SCSGRSNIGSNTVKWYQQL PGTAPKLLIYNDQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAITGLQ

[0429]

蛋白质 蛋白质区域	序列标识符	序列 12345678901234567890
		AEDEADYYCQSYDRYTHPAL LFGTGTKVTVLG
接头	SEQ ID NO.:92	QPKAAPSVTLFPP
ABT-325 VL	SEQ ID NO.:89	EIVMTQSPATLSVSPGERAT LSCRASESISSNLAWYQQKP GQAPRLFIYTASTRATDIPA RFGSGSGTEFTLTISSLQ EDFAVYYCQYNNWPSITFG QGRLEIKR
CL	SEQ ID NO.:36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNMFYPREKQVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
DVD 重可变 DVD1812HC-SL	SEQ ID NO.:93	EVQLVQSGTEVKKPGESLKI SCKGSGYTVTSYWIGWVRQM PGKGLEWMGFYIPGDSETRY SPTFQGQVTISADKSFNTAF LQWSSLKASDTAMYCARVG SGWYPYTFDIWGQGMVTVS SASTKGPQVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASGFTFSSYG MHWVRQAPGKGLEWVAFIRY DGSNKYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCKTHGSHDNWGQGMVTV SS
ABT-325 VH	SEQ ID NO.:85	EVQLVQSGTEVKKPGESLKI SCKGSGYTVTSYWIGWVRQM PGKGLEWMGFYIPGDSETRY SPTFQGQVTISADKSFNTAF LQWSSLKASDTAMYCARVG SGWYPYTFDIWGQGMVTVS S
接头	SEQ ID NO.:42	ASTKGP
ABT-874 VH	SEQ ID NO.:84	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAFIRYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCKTHG SHDNWGQGMVTVSS
CH	SEQ ID NO.:34	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPEAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCCVVDVSHEDPEVKFNW

[0430]

蛋白质 蛋白质区域	序列标识符	序列 12345678901234567890
		YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
DVD 轻可变 DVD1812LC-SL	SEQ ID NO.:94	EIVMTQSPATLSVSPGERAT LSCRASESISSNLAWYQQKP GQAPRLFYTASTRATDIPA RFSGSGSGTEFTLTISSLQS EDFAVYYCQQYNNWPSITFG QGTRLEIKRTVAAPQSVLTQ PPSVSGAPGQRVTISCSGSR SNIGSNTVKWYQQLPGTAPK LLIYYNDQRPSGVPDRFSGS KSGTSASLAITGLQAEDEAD YYCQSYDRYTHPALLFGTGT KVTVLG
ABT-325 VL	SEQ ID NO.:89	EIVMTQSPATLSVSPGERAT LSCRASESISSNLAWYQQKP GQAPRLFYTASTRATDIPA RFSGSGSGTEFTLTISSLQS EDFAVYYCQQYNNWPSITFG QGTRLEIKR
接头	SEQ ID NO.:44	TVAAP
ABT-874 VL	SEQ ID NO.:87	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTI SCSGSRSNIGSNTVKWYQQL PGTAPKLLIYYNDQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAITGLQ AEDEADYYCQSYDRYTHPAL LFGTGTKVTVLG
CL	SEQ ID NO.:36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
DVD 重可变 DVD1812HC-LL	SEQ ID NO.:95	EVQLVQSGTEVKKPGESLKI SCKGSGYTVTSYWIGWVRQM PGKLEWGMGFYIPGDSETRY SPTFQGQVTISADKSFNTAF LQWSSLKASDTAMYCARVG SGWYPYTFDIWGQGMVTVS SASTKGPSVFPLAPQVQLVE SGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAFIRYDGSNKYYADSVKG

[0431]

蛋白质	序列标识符	序列
蛋白质区域		12345678901234567890
ABT-325 VH	SEQ ID NO.:85	RFTISRDN SKNTLYLQMN SL RAEDTAVYYCKTHGSHDNWG QGTMVTVSS EVQLVQSGTEVKKPGESLKI SCKGSGYTVTSYWIGWVRQM PGKGLEWMGF IYPGDSETRY SPTFQGQVTI SADKSFNTAF LQWSSLKASDTAMYICARVG SGWYPYTFDIWGQGMVTVS S
接头	SEQ ID NO.:48	ASTKGPSVFPLAP
ABT-875 VH	SEQ ID NO.:84	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAFIRYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMN SLRAEDTAVYYCKTHG SHDNWGQGMVTVSS
CH	SEQ ID NO.:34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNV FSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
DVD 轻可变 DVD1812LC-LL	SEQ ID NO.:96	EIVMTQSPATLSVSPGERAT LSCRASES ISSNLAWYQQK GQAPRLF IYTA STRATDIPA RFSGSGSGTEFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNWPSITFG QGTRLEIKRTVAAPSVFIFP PQSVLTQPPSVSGAPGQRT ISCSGSRSNIGSNTVKWYQQ LPGTAPKLLIYNDQRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAITGL QAEDEADYQCQSYDRYTHPA LLFGTGTKVTVLG
ABT-325 VL	SEQ ID NO.:89	EIVMTQSPATLSVSPGERAT LSCRASES ISSNLAWYQQK GQAPRLF IYTA STRATDIPA RFSGSGSGTEFTLTISLQS

[0432]

蛋白质		序列
蛋白质区域	序列标识符	12345678901234567890
		EDFAVYYCQQYNWPSITFG QGTRLEIKR
接头	SEQ ID NO.:50	TVAAPSVFIFPP
ABT-874 VL	SEQ ID NO.:87	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTI SCSGSRSNIGSNTVKWYQQL PGTAPKLLIYYNDQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAITGLQ AEDEADYYCQSYDRYTHPAL LFGTGTKVTVLG
CL	SEQ ID NO.:36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

[0433] 实施例 3.2. :IL-12/IL-18 DVD Igs 的抗原结合亲和力的测定

[0434] 抗 IL-12/18 DVD-Igs 对于 hIL-12 和 hIL-18 的结合亲和力通过 Biacore 来测定 (表 21)。针对 IL-18 的中和活性通过 KG-1 测定 (Konishi, K. 等人) 来测定。简言之, IL-18 样品 (终浓度为 2ng/ml) 与 DVD-Ig (终浓度为 0-10mg/ml) 于 37°C 预温育 1 小时, 随后加入在包含 10ng/ml hTNF 的 RPMI 培养基中的 KG-1 细胞 ( $3 \times 10^6$ /ml) 中, 随后于 37°C 温育 16-20 小时。收集培养上清液且通过 ELISA (R&D Systems) 测定每种样品中的人 IFN- $\gamma$  生产。针对 IL-18 的 DVD 分子的抑制活性呈现为 IC<sub>50</sub> 值, 显示于表 VI 中。为了测定抗 IL-12/18 DVD 分子针对 IL-12 的抑制活性, 使用来自活化的 PHA 母细胞的 IL-12 诱导的 IFN- $\gamma$  生产测定 (D' Andrea, A 等人)。对于人 IFN- $\gamma$  的生产, PHA 母细胞与人 IL-12 温育 18 小时。用 200pg/ml 的人 IL-12 浓度获得亚最大刺激 (最大值的 55-75%)。使用特异性人 IFN- $\gamma$  ELISA (Endogen, Cambridge, MA) 测定上清液的 IFN- $\gamma$ 。中和性 IL-12 DVDs 干扰 IL-12 诱导的 IFN- $\gamma$  生产。如表 21 中所示, 通过测量抑制 50% 经由人 PHA 母细胞的 IFN- $\gamma$  生产所需的 DVD 浓度来测定 DVD 的中和活性。

[0435] 表 21. 抗 IL-18/IL-12 DVD-Ig 分子的表征

[0436]

MAb	特异性	K <sub>d</sub> (M)	IC <sub>50</sub> (M)	DVD	方向	接头	亲和力 (K <sub>d</sub> , M)		效力 (IC <sub>50</sub> , M)	
							IL-12	IL-18	IL-12	IL-18
ABT87 4	hIL- 12	6.47E- 11	5.0E- 12	DVD1218- SL	12-18- C	短	3.81E- 11	6.22E- 10	6.93E- 12	1.8E- 10
				DVD1218- LL	12-18- C	长	2.38E- 11	6.64E- 10	3.04E- 12	1.8E- 10
ABT32 5	hIL- 18	1.37E- 10	3.0E- 10	DVD1812- SL	18-12- C	短	1.82E- 09	1.91E- 10	3.66E- 10	4.0E- 11
				DVD1812- LL	18-12- C	长	1.13E- 10	1.62E- 10	1.18E- 10	7.8E- 11

[0437] 亲和力 (Kd) 通过 Biacore 来测定, 且效力 (IC50) 通过 KG-1 生物测定 (IL-18) 和 PBMC 测定 (IL-12) 来测定。

[0438] 表 21 显示了用于构建抗 IL-12/IL-18 DVD 分子的 2 种全人 mAbs 的特异性、结合亲和力和中和活性。如表 VI 中所示,这些 mAbs 具有高亲和力和中和活性。抗 IL-18/IL-12 DVD 构建体的特征概括显示于表 VI 中。所有新 DVD 蛋白质的 SDS-PAGE 分析显示在还原和非还原条件下正常的迁移模式,类似于常规抗体和 DVD1/2-Ig。SEC 分析指出所有分子都是正常的,显示 200kD 区域中的峰。Biacore 结合数据与生物学测定中的中和活性一致。

[0439] 实施例 3.3: 抗 IL-12/IL-18 DVD-Ig 的体内生物学活性

[0440] IL-12 和 IL-18 两者都是响应各种刺激产生最佳 IFN  $\gamma$  所需的。抗 IL-12/IL-18 DVD-Ig 的体内生物学活性使用 huPBMC-SCID 小鼠模型来测定。在这种模型中,腹膜内或静脉内注射(各为 250mg/小鼠)抗 IL-12 抗体 (ABT-874)、抗 IL-18 抗体 (ABT-325) 或抗 IL-12/抗 IL-18 DVD-Ig,随后将新鲜纯化的人 PBMCs (huPBMC) 腹膜内转移到 SCID 小鼠内。15 分钟后,小鼠用干燥的金黄色葡萄球菌 (staphylococcus aureus) 细胞 (SAC) 进行攻击,以诱导人 IFN  $\gamma$  生产。18-20 小时后处死动物 (n = 7-8/组),且通过 ELISA 测定血清 huIFN  $\gamma$  水平。ABT 874 和 ABT-325 使 SAC 诱导的 IFN  $\gamma$  抑制约 70%,这代表每种化合物在这种模型中最大限度的 IFN  $\gamma$  抑制。然而,用 ABT-874+ABT-325 和抗 IL-12/抗 IL-18 DVD-Ig 处理小鼠使 IFN- $\gamma$  生产抑制几乎 100%。这些结果暗示抗 IL-12/抗 IL-18 DVD-Ig 分子在体内是有功能活性的。

[0441] 实施例 3.4 抗 IL-12/IL-18 DVD-Ig 的药物代谢动力学和药物动力学研究

[0442] 抗 IL-12/IL-18 DVD-Ig 的总体药物代谢动力学和药物动力学特征在小鼠中类似于亲本 mAbs,即 73%的生物药效率,比得上常规 IgG。对于其他 mAbs(例如,人,大鼠等)同样观察到类似的药物代谢动力学,即 6-8 天后快速清除,可能是由于抗人 IgG 应答。

[0443] 雄性 SD 大鼠用抗 IL-12/IL-18 DVD-Ig 以 4mg/kg 静脉内或皮下给药。PK 曲线的早期部分看起来正常且非常类似于其他人抗体的那些。因为在第 6 天时开始的 DVD-Ig 快速清除,所以无法获得 2 个组中的精确半衰期。DVD-Ig 浓度在第 6 天后的突然下降可能是由于 RAHA 应答。然而,对于在这个具体实验中用于构建这种 DVD-Ig 的亲本抗体之一 (ABT-874),以及先前研究的其他单特异性人抗体也已观察到类似特征。基于皮下和静脉内组中最高至第 6 天的 DVD-Ig 浓度,估计 DVD-Ig 的生物药效率。3 只大鼠中的 2 只显示 80-95%的生物药效率,且 3 只大鼠中的平均生物药效率为 73%。

[0444] 实施例 3.5: 抗 IL-12/抗 IL-18 DVD-Ig 的物理/化学表征

[0445] 293 细胞衍生的、A 蛋白纯化的、抗 IL-12/抗 IL-18 DVD-Ig 的物理和化学表征结果概括于表 22 中。

[0446] 表 22. 抗 IL-12/抗 IL-18 DVD-Ig 的物理/化学表征

[0447]

测试的参数	测定/方法	发现/注释
亲和力 ( <i>K<sub>d</sub></i> )		
• IL-12	Biacore	• 38 pM (对于 ABT-874 65 pM)
• IL-18	Biacore	• 622 pM (对于 ABT-325 137 pM)
效力 ( <i>IC<sub>50</sub></i> )		
• IL-12	• PHA-母细胞测定	• 7 pM (对于 ABT874 5 pM)
• IL-18	• KG-1 测定	• 180 pM (对于 ABT-325 300 pM)
<i>M.W</i>	MS	• HC: 64130 (理论 64127) • LC: 36072 (理论 36072)
氨基酸序列	测序-MS	全部匹配
二硫键	肽作图	所有 20 个二硫键都匹配
糖基化特征		类似于其他内部全人抗体- NGA2F 和 NGA1F 作为主要形式观察到
电荷异质性	阳离子交换 (WCX-10)	同质性
<i>PI</i>	cIEF	9.42 (ABT-874: 9.46)
动力学大小	DSL	7.69nM (对于 ABT-325 5.34 nM)
纯度/聚集	SDS-PGE	• 在还原 (~64Kd HC 和~ 36Kd LC 条带) 和非还原 (1 个条带) 凝胶上的同质性
	SEC	• A 蛋白纯化后通过 SEC 立即观察到 1 个峰 (~100%)
	AUC	• 2 个冷冻-融化循环后通过 AUC 观察到~ 16 - 17% 聚集
稳定性 (冷冻/融化)	SEC	2 个冷冻-融化循环后~ 5% 聚集, 另外 10 个冷冻-融化循环后增至~ 13%。关于这点的原因未解决 (过程相关, 序列特异性, 或 LC $\lambda/\kappa$ 杂交物)
<i>PK 特征</i>	大鼠静脉内和皮下	类似于亲本 mAbs (或由其限制)。
<i>生物药效率</i>	大鼠静脉内对皮下	平均 73%; 总体类似于亲本 mAbs

[0448] 实施例 3.6: 另外的抗 12/ 抗 18 DVD-Ig(1D4.1-ABT325) 的产生

[0449] 如表 23 中所示, 用不同亲本抗 IL-12mAb (克隆 #1D4.1) 构建另外的抗 IL-12/

IL-18 DVD-Ig 分子。用来源于人 Ck 和 CH1 结构域的 N 末端序列的如下短接头产生 1D4.1-ABT325 DVD-Ig 构建体：

[0450] 短接头：轻链：TVAAP；重链：ASTKGP

[0451] 将所有重和轻链构建体亚克隆到 pBOS 表达载体内，且在 COS 细胞或 freestyle 293 细胞中表达，且如上所述进行表征。1D4.1-ABT325DVD-Ig 完全保留了 2 种原始 mAbs 的活性（表 24）。

[0452] 表 23：1D4.1-ABT325 DVD-Ig 的氨基酸序列

[0453]

蛋白质 蛋白质区域	序列标识符	序列 12345678901234567890
1D4.1-ABT325 DVD-Ig 重可变	SEQ ID NO.:114	EVTLRESGPALVKPTQTLTL TCTFSGFSLSKSVMGVS WIRQPPGKALEWLAHIYWD DDKYYNPSLKSRLTISKDT SKNQVVLTMNTMNDPVD TATYYCARRGIRSAMDY WGQGTTVTVSSASTKGP EVQLVQSGTEVKKPGES LKI
1D4.1 VH	SEQ ID NO.:115	EVTLRESGPALVKPTQTLTL TCTFSGFSLSKSVMGVS WIRQPPGKALEWLAHIYWD DDKYYNPSLKSRLTISKDT SKNQVVLTMNTMNDPVD TATYYCARRGIRSAMDY WGQGTTVTVSS
接头	SEQ ID NO.:99	ASTKGP
ABT-325 VH	SEQ ID NO.:85	EVQLVQSGTEVKKPGES LKI SCKGSGYTVTSYWI GWVRQMPGKLEWMMGF IYPGDSETRY SPTFQ GQVTISADKSFNTAF LQWSSLKASDTAMY YCARVSGWYPYTFDI WGQGTMTVTVSS
CH	SEQ ID NO.:34	ASTKGPSVFPPLAPSSK STSGTAALGCLVKDYF PEPVTVSNWNGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGG PSVFL FPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAP IEKTIISKAKGQPREP QVYTLPPSREE MTK NQVSLTCLVKGFYPS DI AVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRW

[0454]

蛋白质 蛋白质区域	序列标识符	序列 12345678901234567890
		QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
<b>1D4.1-ABT325</b> DVD-Ig 轻可变	<b>SEQ ID NO.:116</b>	DIVMTQSPDSLAVSLGERAT INCKASQSVSNDAVWYQQKP GQPFKLLIYYASNRYTGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQA EDVAVYYCQQDYNSPWTFGG GTKVEIKR <u>TVAAPE</u> IIVMTQS PATLSVSPGERATLSCRASE SISSNLAWYQQKPGQAPRLF IYTASTRATDIPARFSGSGS GTEFTLTISSLQSEDFAVYY CQQYNNWPSITFGQGRLEI KR
<b>1D4.1 VL</b>	<b>SEQ ID NO.:117</b>	DIVMTQSPDSLAVSLGERAT INCKASQSVSNDAVWYQQKP GQPFKLLIYYASNRYTGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQA EDVAVYYCQQDYNSPWTFGG GTKVEIKR
<u>接头</u>	<b>SEQ ID NO.:44</b>	TVAAP
<b>ABT-325 VL</b>	<b>SEQ ID NO.:89</b>	EIVMTQSPATLSVSPGERAT LSCRASESISSNLAWYQQKP GQAPRLFYTASTRATDIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLQS EDFAVYYCQQYNNWPSITFG QGRLEIKR
<b>CL</b>	<b>SEQ ID NO.:36</b>	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVYCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

[0455] 表 24. 1D4. 1-ABT325 DVD-Ig 分子的表征

[0456]

mAb	亲和力 (K <sub>d</sub> , M)		效力 (IC <sub>50</sub> ,M)	
	IL-12	IL-18	IL-12	IL-18
1D4.1	1.20E-10	N/A	4.18E-10	N/A
ABT325	N/A	1.91E-10	N/A	6.87E-11
1D4.1-ABT325	1.33E-10	1.59E-10	2.17E-10	1.20E-10
DVD-Ig				

[0457] 亲和力 (Kd) 通过 Biacore 来测定,且效力 (IC50) 通过 KG-1 生物测定 (IL-18) 和 PBMC 测定 (IL-12) 来测定。

[0458] 实施例 4 :抗 CD20/ 抗 CD3 DVD-Ig 的产生

[0459] 抗 CD20/ 抗 CD3 DVD-Igs 使用鼠抗人 CD20(克隆 5F1) 和抗人 CD3(克隆 OKT3)

亲本抗体来产生。最初的构建体包括具有不同结构域方向的 2 种 DVD-Igs。抗 CD3/ 抗 CD20 DVD-Ig 以 V<sub>CD3</sub>- 接头 -V<sub>CD20</sub>- 恒定区的顺序构建, 且抗 CD20/ 抗 CD3 DVD-Ig 以 V<sub>CD20</sub>- 接头 -V<sub>CD3</sub>- 恒定区的顺序构建。然而, 在初步细胞表面结合研究中, 抗 CD20 结合活性在抗 CD3/ 抗 CD20 DVD-Ig 分子中减小, 尽管抗 CD3 活性在这种设计中保留。相比之下, 抗 CD3 和抗 CD20 结合活性在抗 CD20/ 抗 CD3 DVD-Ig 分子中完全保留, 从而指出这对于 DVD-Ig 形式的这 2 种 mAbs/ 靶组合是最佳结构域方向。因此选择抗 CD20/ 抗 CD3 DVD-Ig 构建体用于后续研究。

[0460] 抗 CD20/ 抗 CD3 DVD-Ig 作为嵌合 Ig 产生, 即恒定区是人恒定区。对于结合分析, 人 T 细胞系 Jurkat 和 B 细胞系 Raji 用人 IgG 封闭, 且随后用鼠抗 hCD3 mAb OKT3、鼠抗 hCD20 mAb 1F5、和抗 CD20/ 抗 CD3DVD-Ig 染色。细胞随后进行洗涤, 且用 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG (无抗 hIgG 交叉反应性) 染色。抗 CD20/CD3 DVD-Ig 结合 T 和 B 细胞两者, 而 CD3 和 CD20 mAbs 只分别结合 T 或 B 细胞。CD20/CD3 DVD-Ig 的氨基酸序列公开于表 25 中。

[0461] 表 25 :CD20CD3DVD-Ig 的氨基酸序列

[0462]

蛋白质		序列
蛋白质区域	序列标识符	12345678901234567890
DVD 重可变 CD20CD3DVD-Ig	SEQ ID NO.:97	QVQILRQPGAELVKPGASVKM SCKASGYTFTSYNMHWVKQT PGQGLEWIGAIYPGNGDTSY NQKIPK GKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARSH YGSINVDYFDYWGQGTTLTV SSAKTTAPSVYPLAPQVQLQ QSGAELARPGASVKMSCKAS GYTFTRYTMHWVKQRPGQGL EWIGVINPSRGYTNYNQKFK DKAFLTTDKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSS
5F1 VH	SEQ ID NO.:98	QVQILRQPGAELVKPGASVKM SCKASGYTFTSYNMHWVKQT PGQGLEWIGAIYPGNGDTSY

[0463]

蛋白质		序列
蛋白质区域	序列标识符	12345678901234567890
		NQKFKGKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARSH YGSNYVDYFDYWGQGTTLTV SS
接头	SEQ ID NO.:99	AKTTAPSVYPLAP
OKT3 VH	SEQ ID NO.:100	QVQLQQSGAELARPGASVKM SCKASGYTFTRYTMHWVKQR PGQGLEWIGYINPSRGYTNY NQKFKDKATLTDDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYY DDHYCLDYWGQGTTLTVSS
CH	SEQ ID NO.:34	ASTKGPSVFLAPSSKSTSG GTAAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDCVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTFPV LDSIDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSI.SLSPGK
CD20CD3DVD-Ig 轻可变	SEQ ID NO.:101	QIVLSQSPAILSASPGEKVT MTCRASSLSFMHWYQQKPG SSPKPWIYATSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTISRVEAE DAATYFCHQWSSNPLTFGAG TKLELKRADAAPT <del>VS</del> IFPPQ IVL:QSPA <del>IM</del> SASPGEKVTM TCSASSSVSYMNWYQQKSGT SPKRWIYDTSK <del>LA</del> SGVPAHF RSGSGSGTSYSLTISGMEAE AATYYCQWSSNPF <del>TF</del> GSGT KLE:INR
5F1 VL	SEQ ID NO.:102	QIVLSQSPAILSASPGEKVT MTCRASSLSFMHWYQQKPG SSPKPWIYATSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTISRVEAE DAATYFCHQWSSNPLTFGAG TKLELKR
接头	SEQ ID NO.:103	ADAAPT <del>VS</del> IFPP
OKT3 VL	SEQ ID NO.:104	QIVLTQSPA <del>IM</del> SASPGEKVT MTC <del>S</del> ASSSVSYMNWYQQKSG TSPKRWIYDTSK <del>LA</del> SGVPAH

[0464]

蛋白质 蛋白质区域	序列标识符	序列 12345678901234567890
		FRGSGSGTSSYSLTISGMEAE DAATYYCQWSSNPFTFGSG TKLEINR
CL	SEQ ID NO.:36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

[0465] 实施例 5 :mIL-1 α / β DVD-Ig 的产生

[0466] 为了研究关于 DVD-Ig 分子的药物代谢动力学、体内功效、组织穿透和免疫原性的主要问题,如下所述构建小鼠抗小鼠 IL-1 α / β DVD-Ig 分子。

[0467] 实施例 5.1 :mIL-1 α / β DVD-Ig 的构建

[0468] 使用由 IL-1 α β 双重 KO 小鼠产生的 2 种小鼠抗小鼠 IL-1 α / β mAbs (9H10 和 10G11) 构建小鼠抗小鼠 IL-1 α / β DVD-Ig 分子。小鼠抗小鼠 IL-1 α 和小鼠抗小鼠 IL-1 β 单克隆抗体通过分别用小鼠 IL-1 α 或小鼠 IL-1 β 免疫 IL-1 α / β 双重 KO 小鼠来产生。选择一种小鼠抗小鼠 IL-1 α (克隆 9H10)、和一种小鼠抗小鼠 IL-1 β mAb (克隆 10G11),且用于产生 mIL-1 α / β DVD-Ig 分子。测试各种接头大小和不同结构域方向。最终功能性 mIL-1 α / β DVD-Ig 分子以 V(抗 mIL-1 β)-接头-V(抗 mIL-1 β)-鼠恒定区(C γ 2a 和 C κ) 的方向构建。克隆、表达和纯化程序类似于 hIL-1 α / β DVD-Ig 的那种。mIL-1 α / β DVD-Ig 的克隆使用如对于 hIL-1 α / β DVD3-Ig 所述的类似重叠 PCR 和同源重组来进行。mIL-1 α / β DVD-Ig 序列显示于下表 26 中:

[0469] 表 26 :mIL-1 α / β DVD-Ig 的氨基酸序列

[0470]

蛋白质	序列标识符	序列
蛋白质区域		12345678901234567890
mIL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD-Ig 重可变	SEQ ID NO.:105	EVQLQQSGPELVKPGTSVKM SCKTSGYTFTSYVMHWKQK PGQGLEWIGYIIPYNDNTKY NEKFKGKATLTSKSSSTAY MELSSLTSEDSAVYYCARN EYYGSSFFDYWGQGTTLTVS SAKTIAPSVYPLAPQVILKE SGPGILQPSQTLSTLCSFSG FSLSTYGTAVNWIRQPSGKG LEWLAQIGSDDRKLYNPFLK SRITLSEDTNSQVFLKITS VDTEDSATYYCANGVMEYWG LGTSVTVSS
10G11 VH	SEQ ID NO.:106	EVQLQQSGPELVKPGTSVKM SCKTSGYTFTSYVMHWKQK PGQGLEWIGYIIPYNDNTKY NEKFKGKATLTSKSSSTAY MELSSLTSEDSAVYYCARN EYYGSSFFDYWGQGTTLTVS S
接头	SEQ ID NO.:99	AKTTAPSVYPLAP
9H10 VH	SEQ ID NO.:107	QVILKESGPGILQPSQTLSL TCSFSGFSLSTYGTAVNWIR QPSGKLEWLAQIGSDDRKL YNPFLKSRITLSEDTNSQV FLKITSVDTEDSATYYCANG VMEYWGLGTSVTVSS
CH	SEQ ID NO.:108	AKTTAPSVYPLAPVCGDITG SSVTLGCLVKGYFPEPVTLT WNSGSLSSGVHTFPAVLQSD LYTLSSSVTVTSSTWPSQSI TCNV AHPASSTKVDK KIEPR GPTIKPCPPCKCPAPNLLGG PSVFI FPKIKDVLMI SLSP IVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYN STLFVVSALPIQH QDWMSGK EFKCKVNNKDL PAPIERTIS KPKG SVRAPQVYVLPPEEE MTKKQVTLTCMVTDFMPEDI YVEWTNNGKTELNYKNTEPV LDSIGSYFMYSKLRVEKKNW VERNSYSCSVVHEGLHNHHT TKSF SRTPGK
	SEQ ID NO.:109	DIQMTQSPASLSASVGETVT ITCRGSGILHNYLVWYQQKQ GKSPQLLVYSAKILADGVPS RFGSGSGTQYSLKINSLQP

[0471]

蛋白质 蛋白质区域	序列标识符	序列 12345678901234567890
mIL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD-Ig 轻可变		EDFGSYQCQHFWS <del>T</del> PFTFGS GTKLEIKRADAAPT <del>V</del> SIFPP SIVMTQTPKFL <del>L</del> VSAGDRVT ITCKASQSVNHDVAWYQQMP GQSPKLLIYFASNRYTGV <del>P</del> D RFTGSGYGTDF <del>T</del> FTISTVQA EDLAVYFCQQDYSSPYTFGG GTKLEIKR
10G11 VL	SEQ ID NO.:110	DIQMTQSPASLSASVGETVT ITCRGSGILHNYLVWYQQKQ GKSPQLLVYSAKILADGVPS RFSGSGSGTQYSLKINSLQP EDFGSYQCQHFWS <del>T</del> PFTFGS GTKLEIKR
接头	SEQ ID NO.:111	ADAAPT <del>V</del> SIFPP
9H10 VL	SEQ ID NO.:112	SIVMTQTPKFL <del>L</del> VSAGDRVT ITCKASQSVNHDVAWYQQMP GQSPKLLIYFASNRYTGV <del>P</del> D RFTGSGYGTDF <del>T</del> FTISTVQA EDLAVYFCQQDYSSPYTFGG GTKLEIKR
CL	SEQ ID NO.:113	ADAAPT <del>V</del> SIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKW KIDGSE <del>R</del> QNGVLNSWTDQDS KDS <del>T</del> YSMSSTLTLTKDEYER HNSVTCEATHK <del>T</del> STSPIVKS FNR <del>V</del> EC

[0472] 鼠 mIL-1  $\alpha$  /  $\beta$  DVD-Ig 保留针对 IL-1  $\alpha$  和 IL-1  $\beta$  的亲合力 / 体外效力。表 27 显示了 mAbs 9H10 (抗 mIL-1  $\alpha$ )、10G11 (抗 mIL-1  $\beta$ )、和 mIL-1  $\alpha$  /  $\beta$  DVD-Ig 的特征。

[0473] 表 27. mDVD4-Ig 的特征

[0474]

	抗原	K <sub>d</sub> (M)	IC <sub>50</sub> (M)
9H10	mIL-1 $\alpha$	1.73E-10	2.00E-10
10G11	mIL-1 $\beta$	2.30E-10	3.70E-10
mIL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD-Ig	mIL-1 $\alpha$	7.66E-10	2.00E-09
	mIL-1 $\beta$	6.94E-10	8.00E-10

[0475] 实施例 5.2 :mIL-1  $\alpha$  /  $\beta$  DVD-Ig 在关节炎模型中的体内活性：

[0476] 在本领域众所周知的胶原诱导的关节炎小鼠模型中评估抗 IL-1  $\alpha$ 、抗 IL-1  $\beta$ 、组合抗 IL-1  $\alpha$  / 抗 IL-1  $\beta$ 、和鼠抗 IL-1  $\alpha$  /  $\beta$  DVD4-Ig 的疗效。简言之，雄性 DBA-1 小鼠用牛 II 型胶原在 CFA 中在尾基部进行免疫。小鼠在第 21 天用酵母聚糖腹膜内 (i.p) 加强。疾病在第 24-27 天时发作后，选择小鼠且分成各 10 只小鼠的分开组。对照组和抗细胞因子组的平均关节炎得分在处理开始时是可比较的。为了中和 IL-1，小鼠每隔一天用 1-3mg/kg

抗 IL-1 $\alpha$  mAb、抗 IL-1 $\beta$  mAb、抗 IL-1 $\alpha$  / 抗 IL-1 $\beta$  mAbs 组合、或鼠抗 IL-1 $\alpha$  /  $\beta$  DVD4-Ig 进行腹膜内注射。每周仔细检查 3 次小鼠在外周关节中的关节炎视觉表现,且测定关于疾病活性的得分。

[0477] 治疗模式中的 IL-1 封闭有效降低关节炎的严重性,其中抗 IL-1 $\beta$  显示比抗 IL-1 $\alpha$  (减少 10%) 更大的功效(与对照组比较,平均关节炎得分减少 24%)。在抗 IL-1 $\alpha$  和抗 IL-1 $\beta$  之间观察到加性效应,其中在用抗 IL-1 $\alpha$  和抗 IL-1 $\beta$  mAbs 处理的小鼠中,平均关节炎得分减少 40%。令人惊讶的是,在相同剂量水平上,mDVD-Ig 处理显示平均关节炎得分减少 47%,从而证实了 mDVD-Ig 的体内治疗效果。类似功效也在该动物模型的关节肿胀测量中观察到。

[0478] 本发明整体引入分子生物学和药物递送领域中众所周知的技术作为参考。这些技术包括但不限于,下述出版物中描述的技术:

[0479] Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY(1993);

[0480] Ausubel, F. M. et al. eds., Short Protocols In Molecular Biology(4th Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X).

[0481] Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball(eds.), Wiley, New York(1984);

[0482] Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 201-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999);

[0483] Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, pp. 115-138(1984);

[0484] Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681(Elsevier, N. Y., 1981);

[0485] Harlow et al., Antibodies; A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988);

[0486] Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991));

[0487] Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242;

[0488] Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering(2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

[0489] Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY(1990); Lu and Weiner eds., Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis(2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298pp. (ISBN 1-881299-21-X).

[0490] Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise(eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974);

[0491] Old, R. W. & S. B. Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V. 2: 409 pp. (ISBN 0-632-01318-4).

[0492] Sambrook, J. et al. eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6).

[0493] Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978

[0494] Winnacker, E. L. From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY (translated by Horst Ibelgaufts). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

[0495] 参考文献

[0496] 美国专利：

[0497] 4, 526, 938 ; 4, 753, 894 ; 4, 816, 567 ; 4, 880, 078 ; 4, 943, 533 ; 4, 946, 778 ; 4, 980, 286 ; 5, 500, 362 ;

[0498] 5, 916, 597 ; 5, 985, 309 ; 5, 128, 326 ; 5, 223, 409 ; 5, 225, 539 ; 5, 258, 498 ; 5, 290, 540 ; 5, 403, 484 ;

[0499] 5, 427, 908 ; 5, 516, 637 ; 5, 530, 101 ; 5, 558, 864 ; 5, 565, 332 ; 5, 571, 698 ; 5, 580, 717 ; 5, 585, 089 ;

[0500] 5, 624, 821 ; 5, 627, 052 ; 5, 641, 870 ; 5, 648, 260 ; 5, 658, 727 ; 5, 677, 171 ; 5, 679, 377 ; 5, 693, 762 ;

[0501] 5, 698, 426 ; 5, 714, 350 ; 5, 714, 352 ; 5, 723, 323 ; 5, 733, 743 ; 5, 736, 137 ; 5, 750, 753 ; 5, 763, 192 ;

[0502] 5, 766, 886 ; 5, 780, 225 ; 5, 814, 476 ; 5, 817, 483 ; 5, 821, 047 ; 5, 824, 514 ; 5, 855, 913 ; 5, 874, 064 ;

[0503] 5, 891, 996 ; 5, 912, 015 ; 5, 916, 771 ; 5, 934, 272 ; 5, 939, 598 ; 5, 969, 108 ; 5, 976, 862 ; 5, 985, 320 ;

[0504] 5, 985, 309 ; 5, 985, 615 ; 5, 989, 463 ; 5, 998, 209 ; 6, 019, 968 ; 6, 075, 181 ; 6, 091, 001 ; 6, 114, 598 ;

[0505] 6, 130, 364 ; 6, 180, 370 ; 6, 204, 023 ; 6, 235, 883 ; 6, 258, 562 ; 6, 350, 861 ; 6, 506, 883 ; 6, 699, 658 ; 6, 914, 128

[0506] 美国专利申请

[0507] 10/172, 317

[0508] 09/428, 082

[0509] 美国专利申请公开

[0510] 20020137134 ; 20030186374 ; 20040018590 ; 20050147610A1 ; 20050042664A1 ; 2006104968 ;

[0511] 外国专利文件

[0512] PCT/GB91/01134 ; PCT/US2003/040426 ; PCT/US91/05939 ; PCT/US91/09630 ; PCT/US94/01234 ; PCT/US96/18978 ; PCT/US98/16280 ; WO 00 09560 ; WO 00/037504 ; WO

00/56772 ;WO 01/58956 ;WO 01/77342 WO 01/83525 ;WO 01/88138 ;WO 0162931A2 ;WO 0177342A1 ;WO 02/2773 ;WO 02072636 ;WO 03/035835 ;WO 90/02809 ;WO 90/05144A1 ;WO 91/05548 ;WO 91/09967 ;WO 91/10737 ;WO 91/10741 ;WO 91/17271 ;WO 92/01047 ;WO 92/02551 W092/09690 ;WO 92/15679 ;WO 92/18619 ;WO 92/19244 ;WO 92/20791 ;WO 92/22324 W093/01288 ;WO 93/11236 ;WO 94/02602 ;WO 95/15982 ;WO 95/20045 WO 95/20401 ;W096/20698 ;WO 96/33735 ;WO 96/34096 ;WO 96/40210 ;WO 97/29131 ;WO 97/32572 ;W097/44013 ;WO 98/16654 ;WO 98/24893 ;WO 98/31346 ;WO 98/31700 ;WO 98/50433 ;W099/15154 ;WO 99/20253 ;WO 99/25044 ;WO 99/45031 ;WO 99/53049 ;WO 99/54342 ;W099/66903 ;W000/56772A1 ;WO2001/077342 (A1) ;WO2002097048A2 ;WO2003016466A2 ;WO2004078140 ;WO2005100584 A2 W090/14424 ;W090/14430 ;W090/14443 ;W09524918A1 ;EP 1, 176, 195 ;EP 229, 246 ;EP 239, 400 ;EP 519, 596 ;EP 519, 596 ;EP 592, 106 ;GB89/01334 ; ;GB91/01134 ; ;GB92/01755.

[0513] 其他参考文献

- [0514] Ameset al., J. Immunol. Methods 184 :177-186 (1995) ;
- [0515] Aoji et al., 2005 J Am Coll Cardiol. 45(10) :1574-9 ;
- [0516] Arancio O, et al., EMBO Journal (2004) 1-10 ;
- [0517] Arndt, M. and J. Krauss, Methods Mol Biol, 2003. 207 :p. 305-21 ;
- [0518] Azzazy H., and Highsmith W. E., (2002) Clin. Biochem. 35 :425-445 ;
- [0519] Babcock, J. S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 :7843-7848 ;
- [0520] Barbas et al. (1991) PNAS 88 :7978-7982 ;
- [0521] Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91 :3809-3813 (1994) ;
- [0522] Barry J. Dickson, Science. (2002) 298 :1959 ;
- [0523] Better et al., Science 240 :1041-1043 (1988) ;
- [0524] Biewenga et al 1983 Clin Exp Immunol 51 :395-400 ;
- [0525] Bird et al. (1988) Science 242 :423-426 ;
- [0526] Bornemann KD, et al., Am J Pathol. 2001 ;158 :63 ;
- [0527] Boyce et al., Journal of Experimental Medicine (2005), 201(12), 1869-1873 ;
- [0528] Brand DD. (2005) Comp Med. 55(2) :114-22 ;
- [0529] Brennan, M., et al. ;Science, (1985). 229(4708) :p. 81-3) ;
- [0530] Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182 :41-50 (1995) ;
- [0531] Buchwald et al., 1980, Surgery 88 :507 ;
- [0532] Buras JA, et al., (2005) Nat Rev Drug Discov. 4(10) :854-65 ;
- [0533] Burke, Sandra E., et al., Advanced Drug Delivery Reviews (2006), 58(3), 437-446 ;
- [0534] Burton et al., Advances in Immunology 57 :191-280 (1994) ;
- [0535] C. E. Shepherd, et al., Neurobiol Aging. 2005 Oct 24 ;
- [0536] Calandra T, et al., (2000) Nat Med. 6(2) :164-70 ;
- [0537] Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89 :4285 (1992) ;

- [0538] Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196 :901-917 (1987) ;
- [0539] Chothia et al., Nature 342 :877-883 (1989) ;
- [0540] Clackson et al. (1991) Nature 352 :624-628 ;
- [0541] Cleek et al., 1997, Pro. Int ' l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24 : 853-854 ;
- [0542] Co, M. S., et al., Mol. Immunol. (1993) 30 :1361-1367 ;
- [0543] Coffman, et al., Journal of Experimental Medicine (2005), 201(12), 1875-1879 ;
- [0544] Dall'Acqua 1998 Biochemistry 37 :9266-73 ;
- [0545] D' Andrea, A., et al., J Exp Med, 1992. 176 (5) :p. 1387-98 ;
- [0546] Deane R, et al., Nat Med. 2003 ;9 :907-13 ;
- [0547] Descotes J, et al., Developments in biological standardization (1992), 77 99-102 ;
- [0548] Dinarello, C. A., K. Muegge, and S. K. Durum. 2000. Current Protocols in Immunology 6 :1
- [0549] During et al., 1989, Ann. Neurol. 25 :351 ;
- [0550] Durocher et al., Nucleic Acids Research 2002, Vol 30, No. 2 ;
- [0551] Economides, A. N., et al., Nat Med, 2003. 9(1) :p. 47-52 ;
- [0552] Eliezer Masliah, et al., Neuron. 2005 ;46 :857 ;
- [0553] Felicia Yu Hsuan Teng, et al., J Neurosci Res. (2005) 79 :273 ;
- [0554] Finotto et al., International Immunology (2005), 17 (8), 993-1007 ;
- [0555] Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9 :1370-1372 ;
- [0556] Gang Xu, et al., J. Neurochem. 2004 ;91 ;1018 ;
- [0557] Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9 :1373-1377 ;
- [0558] Gavalondo J. V., and Larrick J. W. (2002) BioTechniques 29 :128-145 ;
- [0559] Genain CP, et al., (1997) J Mol Med. 75(3) :187-97 ;
- [0560] Genovese Mc et al 2005 N Engl J Med. 353 :1114-23 ;
- [0561] Glennie, M. J., et al., J Immunol, 1987. 139(7) :p. 2367-75 ;
- [0562] Goldspiel et al., 1993, Clinical Pharmacy 12 :488-505 ;
- [0563] Gracie, J. A., et al., J Clin Invest, 1999. 104(10) :p. 1393-401 ;
- [0564] Gram et al. (1992) PNAS 89 :3576-3580 ;
- [0565] Green and Jakobovits J. Exp. Med. 188 :483-495 (1998) ;
- [0566] Green et al. Nature Genetics 7 :13-21 (1994) ;
- [0567] Griffin (2000) JI 164 :4433 ;
- [0568] Griffiths et al. (1993) EMBO J 12 :725-734 ;
- [0569] Harriman G, Harper LK, Schaible TF. 1999 Ann Rheum Dis 58 Suppl 1 :I 61-4 ;
- [0570] Hart et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology (2001), 108(2), 250-257) ;
- [0571] Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226 :889-896 ;

- [0572] Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3 :81-85 ;
- [0573] Hildebrand, H.F., et al., Surface and Coatings Technology (2006), 200 (22-23), 6318-6324 ;
- [0574] Holliger, P. and G. Winter, Cancer Immunol Immunother, 1997. 45 (3-4) : p. 128-30 ;
- [0575] Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6444-6448 ;
- [0576] Holliger, P., T. Prospero, and G. Winter, Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90 (14) :p. 6444-8 ;
- [0577] Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19 :4133-4137 ;
- [0578] Hoogenboom H., and Chames P. (2000) Immunology Today 21 :371-378 ;
- [0579] Hoogenboom H. R., (1997) TIB Tech. 15 :62-70 ;
- [0580] Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 7 1 :105) ;
- [0581] Huber et al. Nature ;264 :415-20 ;Thies et al 1999 J Mol Biol ;293 :67-79 ;
- [0582] Huse et al. (1989) Science 246 :1275-1281 ;
- [0583] Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :5879-5883 ;
- [0584] Huston et al., Methods in Enzymology 203 :46-88 (1991) ;
- [0585] Hwang 2002 JI 169 :633 ;
- [0586] Igor Klyubin, et al., Nat Med. 2005, 11 :556-61 ;
- [0587] Ito, A., et al., J Immunol, 2003. 170 (9) :p. 4802-9 ;
- [0588] Jackson et al., J. Immunol. 154 (7) :3310-9 (1995) ;
- [0589] Johnson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198 :268-277 ;
- [0590] Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8 :125-131 ;
- [0591] Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 :1864-1868 ;
- [0592] Jones et al., Nature 321 :522 (1986) ;
- [0593] Jones R. 2000 IDrugs. 3 (4) :442-6 ;
- [0594] **Jönsson**, U., et al. (1991) Biotechniques 11 :620-627 ;
- [0595] **Jönsson**, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51 :19-26 ;
- [0596] Joosten, L. A., et al., Arthritis Rheum, 1996. 39 (5) :p. 797-809 ;
- [0597] Jungbluth et al. 2003, Proc Natl Acad Sci USA. 100 (2) :639-44) ;
- [0598] Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad, Sci. 190 :382-391 ;
- [0599] Karni, A., et al., J Neuroimmunol, 2002. 125 (1-2) :p. 134-40 ;
- [0600] Kellermann S-A., and Green L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13 :593-597 ;
- [0601] Kettleborough et al., 1991, Protein Eng. 4 (7) :773-83) ;
- [0602] Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24 :952-958 (1994) ;
- [0603] Kim et al 1994 Eur J Immunol ;24 :542-548 ;
- [0604] Kipriyanov, S. M., et al., Int J Cancer, 1998. 77 (5) :p. 763-72 ;
- [0605] Konishi, K., et al., J Immunol Methods, 1997. 209 (2) :p. 187-91 ;
- [0606] Kostelny, S. A., M. S. Cole, and J. Y. Tso, J Immunol, 1992. 148 (5) :p. 1547-53 ;

- [0607] Kriangkum, J., et al., *Biomol Eng*, 2001. 18(2) :p. 31-40 ;
- [0608] Lam et al., 1997, *Proc. Int' l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24 :759-760 ;
- [0609] Langer(1990), *Science* 249 :1527-1533 ;
- [0610] Le Gall, F., et al., *FEBS Lett*, 1999. 453(1-2) :p. 164-8 ;
- [0611] Le Gall, F., et al., *J Immunol Methods*, 2004. 285(1) :p. 111-27 ;
- [0612] Leung, B. P., et al., *J Immunol*, 2000. 164(12) :p. 6495-502 ;
- [0613] Levy et al., 1985, *Science* 228 :190 ;
- [0614] Little M. et al (2000) *Immunology Today* 21 :364-370 ;
- [0615] Lloyd, Clare M., et al., *Advances in Immunology* (2001), 77 263-295 ;
- [0616] Lu, D., et al., *J Biol Chem*, 2004. 279(4) :p. 2856-65 ;
- [0617] Lublin FD., et al., (1985) *Springer Semin Immunopathol.* 8(3) :197-208 ;
- [0618] Luster et al., *Toxicology* (1994), 92(1-3), 229-43 ;
- [0619] MacCallum, *J Mol Biol* 262(5) :732-45(1996) ;
- [0620] Mack, M., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(15) :p. 7021-5 ;
- [0621] Marchalonis et al., *Adv Exp Med Biol.* 484 :13-30(2001) ;
- [0622] Marco Domeniconi, et al., *J Neurol Sci.* 2005, 233 :43 ;
- [0623] Marks et al. *BioTechnology* 10 :779-783(1992) ;
- [0624] Marques, A. P., et al., *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (2005), 377-397 ;
- [0625] Mateo et al, 1997, *Immunotechnology*, 3(1) :71-81) ;
- [0626] May, 1993, *TIBTECH* 11(5) :155-215 ;
- [0627] McCafferty et al., *Nature* (1990) 348 :552-554 ;
- [0628] McDonnell, et al., *Progress in Respiratory Research* (2001), 31 (New Drugs for Asthma, Allergy and COPD), 247-250 ;
- [0629] McGee AW, et al., *Trends Neurosci.* 2003, 26 :193 ;
- [0630] McIntosh, J. K., et al., *J Immunol*, 1989. 143(1) :p. 162-7 ;
- [0631] Mendez et al., *Nature Genetics* 15 :146-156(1997) ;
- [0632] Merchant, A. M., et al., *Nat Biotechnol*, 1998. 16(7) :p. 677-81 ;
- [0633] Michelle C Janelsins, et al., *J Neuroinflammation.* 2005 ;2 :23 ;
- [0634] Milan Makwanal, et al., *FEBS J.* 2005, 272 :2628 ;
- [0635] Miller, K., et al., *J Immunol*, 2003. 170(9) :p. 4854-61 ;
- [0636] Milstein, C. and A. C. Cuello, *Nature*, 1983. 305(5934) :p. 537-40 ;
- [0637] Mizushima, S. and Nagata, S., (1990) *Nucleic acids Research* Vol 18, No. 17 ;
- [0638] Modjtahedi et al, 1996, *Br J Cancer*, 73(2) :228-35 ;
- [0639] Modjtahedi et al, 2003, *Int J Cancer*, 105(2) :273-80 ;
- [0640] Modjtahedi et al., 1993, *Br J Cancer.* 1993, 67(2) :247-53 ;
- [0641] Modjtahedi et al., 1993, *J. Cell Biophys.* 1993, 22(1-3) :129-46 ;
- [0642] Morgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62 :191-217 ;
- [0643] Mulligan, *Science* 260 :926-932(1993) ;

- [0644] Mullinax et al., *BioTechniques* 12(6) :864-869(1992) ;
- [0645] Murthy et al. 1987, *Arch Biochem Biophys.* 252(2) :549-60 ;
- [0646] Nakanishi, K., et al., *Ann Rev Immunol*, 2001. 19 :p. 423-74 ;
- [0647] Nelson RB, *Curr Pharm Des.* 2005 ;11 :3335 ;
- [0648] Ning et al., 1996, *Radiotherapy & Oncology* 39 :179-189 ;
- [0649] Okamoto H, Kamatani N. 2004. *N Engl J Med.* 351 :1909 ;
- [0650] Owens T, et al., (1995) *Neurol Clin.* 13(1) :51-73 ;
- [0651] Padilla et al., *Journal of Immunology* (2005), 174(12), 8097-8105 ;
- [0652] Padlan, *FASEB J.* 9 :133-139(1995) ;
- [0653] Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5) :489-498(1991) ;
- [0654] Peipp, M. and T. Valerius, *Biochem Soc Trans*, 2002. 30(4) :p. 507-11 ;
- [0655] Peng SL(2004) *Methods Mol Med.* ;102 :227-72 ;
- [0656] Persic et al., *Gene* 187 9-18(1997) ;
- [0657] Pluckthun, A. and P. Pack, *Immunotechnology*, 1997. 3(2) :p. 83-105 ;
- [0658] Poljak, R. J., et al. (1994) *Structure* 2 :1121-1123 ;
- [0659] Presta et al., *J. Immunol.* 151 :2623(1993),
- [0660] Presta LG. 2005 *J Allergy Clin Immunol.* 116 :731-6 ;
- [0661] R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21(2005), pp. 11-16 ;
- [0662] R. J. Kaufman and P. A. Sharp(1982) *Mol. Biol.* 159 :601-621 ;
- [0663] Ranger and Peppas, 1983, J., *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23 :61 ;
- [0664] Ridgway, J. B., et al., *Protein Eng*, 1996. 9(7) :p. 617-21 ;
- [0665] Riechmann et al., *Nature* 332 :323(1988) ;
- [0666] Roberts, R. W. and Szostak, J. W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 94 : 12297-12302 ;
- [0667] Rodeck et al., 1987, *J Cell Biochem.* 35(4) :315-20 ;
- [0668] Roguska et al., *PNAS* 91 :969-973(1994) ;
- [0669] Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321 :574 ;
- [0670] Sawai et al., *AJRI* 34 :26-34(1995) ;
- [0671] Schier et al. *Gene* 169 :147-155(1995) ;
- [0672] Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14 :20 ;
- [0673] Seligman 1978 *Ann Immunol* 129 :855-70. ;
- [0674] Sfrikakis PP et al(2005) *Curr Opin Rheumatol* 17 :550-7 ;
- [0675] Shapiro et al., *Crit. Rev. Immunol.* 22(3) :183-200(2002) ;
- [0676] Shields, R. L. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277 :26733-26740 ;
- [0677] Shu et al., *PNAS* 90 :7995-7999(1993) ;
- [0678] Sims et al., *J. Immunol.* 151 :2296(1993) ;
- [0679] Skerra et al., *Science* 240 :1038-1040(1988) ;.
- [0680] Snibson K J ;et al., *Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* (2005), 35(2), 146-52 ;

- [0681] Soloman B, Curr Alzheimer Res. 2004 ;1 :149 ;
- [0682] Song et al. ,1995,PDA Journal of Pharmaceutical Science &Technology 50 : 372-397 ;
- [0683] Staerz, U. D. , et al. , Nature,1985. 314(6012) :p. 628-31 ;
- [0684] Steinman L, et al. , (2005)Trends Immunol. 26(11) :565-71 ;
- [0685] Studnicka et al. ,Protein Engineering 7(6) :805-814(1994) ;
- [0686] ' t Hart BA, et al. , (2005)J Immunol 175(7) :4761-8 ;
- [0687] Tara Karnezis, et al. , Nature Neuroscience(2004)7, 736 ;
- [0688] Taylor, L. D. , et al. (1992)Nucl. Acids Res. 20 :6287-6295 ;
- [0689] Tolstoshev,1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32 :573-596 ;
- [0690] Tuohy VK, et al. , (1999)J Exp Med. 189(7) :1033-42 ;
- [0691] Umana et al. (1999)Nat. Biotech. 17 :176-1 ;
- [0692] Urlaub and Chasin, (1980)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :4216-4220 ;
- [0693] Verhoeyen et al. , Science 239 :1534(1988)),
- [0694] von Mehren M, et al(2003)Annu Rev Med. ;54 :343-69 ;
- [0695] Wallick, S. C. , et al. , Exp. Med. (1988)168 :1099-1109 ;
- [0696] Ward et al. , (1989)Nature 341 :544-546 ;
- [0697] West et al. 2000 Biochemistry 39 :9698-708 ;
- [0698] William L. Klein, Neurochem Int. 2002 ;41 :345 ;
- [0699] Wright, A. , et al. , EMBO J. (1991)10 :2717 2723 ;
- [0700] Wu and Wu,1991, Biotherapy 3 :87-95 ;
- [0701] Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262 :4429-4432(1987) ;
- [0702] Wu, A. M. , et al. , Immunotechnology, 1996. 2(1) :p. 21-36 ;
- [0703] Wu, A. M. , et al. , Immunotechnology, 1996. 2(1) :p. 21-36 ;
- [0704] Wu, Peng ;Grainger, David W. , Biomaterials(2006) ,27(11) ,2450-2467 ;
- [0705] Yelton et al. J. Immunol. 155 :1994-2004(1995) ;
- [0706] Zapata et al. Protein Eng. 8(10) :1057-1062(1995) ;
- [0707] 尽管上文已描述了许多实施方案和特征,但本领域技术人员将理解,在不背离如附加权利要求中限定的本公开内容或本发明的情况下,即可进行所述实施方案和特征的修改和变化。本文提及的每种出版物都引入作为参考。

## 序列表

<110>Abbott Bioresearch Center, Inc.

<120> 双重可变结构域免疫球蛋白及其用途

<130>7975. W0. 01

<140>to be assigned

<141>2006-08-15

<160>117

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>122

<212>PRT

<213> 小鼠

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (122)

<223> 结合人 II-1a(VH) 的鼠单克隆抗体 3D12

<400>1

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

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

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

<210>2

<211>108

<212>PRT

<213> 小鼠

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (108)

<223> 能结合人 IL-1a(VL) 的鼠单克隆抗体 3D12

<400>2

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

<210>3

<211>118

<212>PRT

<213> 小鼠

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (118)

<223> 能结合人 IL-1a(VH) 的鼠单克隆抗体 18F4

<400>3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr  
                   20                    25                    30  
 Tyr Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                    40                    45  
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ala Lys Tyr Asp Pro Arg Phe  
                   50                    55                    60  
 Leu Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65                    70                    75                    80  
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                    90                    95  
 Ala Arg Gly Asp Gly Asn Phe His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                   100                    105                    110  
 Thr Leu Thr Val Ser Ser  
                   115

<210>4

<211>108

<212>PRT

<213> 小鼠

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (108)

<223> 能结合人 IL-1a(VL) 的鼠单克隆抗体 18F4

<400>4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
                   20                    25                    30  
 Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Ala Leu Ile



<211>107

<212>PRT

<213> 小鼠

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (107)

<223> 能结合人 IL-1a(VL) 的鼠单克隆抗体 6H3

<400>6

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

<210>7

<211>121

<212>PRT

<213> 小鼠

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (121)

<223> 能结合人 IL-1b(VH) 的鼠单克隆抗体 13F5

<400>7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

1	5	10	15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr			
	20	25	30
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe			
	50	55	60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ser Tyr			
65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys			
	85	90	95
Val Arg Phe Pro Thr Gly Asn Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly			
	100	105	110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	

&lt;210&gt;8

&lt;211&gt;112

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 小鼠

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;PEPTIDE

&lt;222&gt;(1).. (112)

&lt;223&gt; 能结合人 IL-1b(VL) 的鼠单克隆抗体 13F5

&lt;400&gt;8

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

	85	90	95
Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg			
	100	105	110

&lt;210&gt;9

&lt;211&gt;122

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 小鼠

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;PEPTIDE

&lt;222&gt;(1).. (122)

&lt;223&gt; 能结合人 IL-1b(VH) 的鼠单克隆抗体 1B12

&lt;400&gt;9

Gln Val His Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln			
1	5	10	15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr			
	20	25	30
Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu			
	35	40	45
Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys			
	50	55	60
Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu			
65	70	75	80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
	85	90	95
Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp			
	100	105	110
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	

&lt;210&gt;10

&lt;211&gt;108

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 小鼠

&lt;220&gt;

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (108)

<223> 能结合人 IL-1b(VL) 的鼠单克隆抗体 1B12

<400>10

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

<210>11

<211>118

<212>PRT

<213> 小鼠

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (118)

<223> 能结合人 IL-1b(VH) 的鼠单克隆抗体 6B12

<400>11

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Thr	Gly	Thr
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile
		35				40						45			

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

<210>12

<211>107

<212>PRT

<213> 小鼠

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (107)

<223> 能结合人 IL-1b(VL) 的鼠单克隆抗体 6B12

<400>12

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

<210>13

<211>22

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (22)

<400>13

atggtgtcca cagctcagtt cc

22

<210>14

<211>29

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (29)

<400>14

gcagccaccg tacgccggtt tatttccag

29

<210>15

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (24)

<400>15 cgtacggtgg ctgcaccate tgte	24
<210>16 <211>23 <212>DNA <213> 人工的	
<220> <223>PCR 引物	
<220> <221> 引物 <222>(1).. (23)	
<400>16 tcaacactct cccctgttga agc	23
<210>17 <211>22 <212>DNA <213> 人工的	
<220> <223>PCR 引物	
<220> <221> 引物 <222>(1).. (22)	
<400>17 atggcttggg tgtggacctt gc	22
<210>18 <211>37 <212>DNA <213> 人工的	
<220>	

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (37)

<400>18

gggcccttgg tcgacgctga ggagacggtg actgagg

37

<210>19

<211>28

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (28)

<400>19

gcgtcgacca agggcccatc ggtettcc

28

<210>20

<211>26

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (26)

<400>20

tcatttaccg ggagacaggg agaggc

26

<210>21

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (24)

<400>21

atagaatgga gctgggtttt cctc

24

<210>22

<211>35

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (35)

<400>22

gggcccttgg tcgacgctga ggagacggtg actga

35

<210>23

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (24)

<400>23

atggctctca tgccttgct gtte

24

<210>24

<211>34

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (34)

<400>24

gcagccaccg tacgccgttt tatttccagc ttg

34

<210>25

<211>23

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物 1

<222>(1).. (23)

<400>25

cagatccagt tggcgcagtc tgg

23

<210>26

<211>35

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (35)

<400>26

caccaactgg atctgtgagg agacggtgac tgagg

35

<210>27

<211>27

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (27)

<400>27

aatatccaga tgacacagac tacatcc

27

<210>28

<211>36

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (36)

<400>28

gtgtcatctg gatattccgt tttatttcca gctttg

36

<210>29

<211>23

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (23)

<400>29

tgggggtgct gttttggctg agg

23

<210>30

<211>36

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (36)

<400>30

gccaaaacga cacccccaca gatccagttg gtgcag

36

<210>31

<211>27

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (27)

<400>31

tggtgcagca tcagcccggtt ttatttc

27

<210>32

<211>33

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (33)

<400>32

gctgatgctg caccaaataat ccagatgaca cag

33

<210>33

<211>243

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 嵌合小鼠 / 人 VH 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (243)

<223>DVD 重可变 hIL-1a/bDVD1-Ig 区

<400>33

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr

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

&lt;210&gt;34

&lt;211&gt;330

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 智人 (Homo sapiens)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;PEPTIDE

&lt;222&gt;(1)..(330)

&lt;223&gt;CH 区序列

&lt;400&gt;34

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
                   20                   25                   30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
                   35                   40                   45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
                   50                   55                   60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65                   70                   75                   80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
                   85                   90                   95  
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
                   100                   105                   110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
                   115                   120                   125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130                   135                   140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145                   150                   155                   160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
                   165                   170                   175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
                   180                   185                   190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
                   195                   200                   205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
                   210                   215                   220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225                   230                   235                   240  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
                   245                   250                   255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
                   260                   265                   270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
                   275                   280                   285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		320
	325	330

&lt;210&gt;35

&lt;211&gt;221

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;嵌合小鼠/人 VL 区

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;PEPTIDE

&lt;222&gt;(1)..(221)

&lt;223&gt;DVD 轻可变 hIL-1a/bDVD1-Ig 区

&lt;400&gt;35

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
1	5	10
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr		
	20	25
Gly Asn Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro		
	35	40
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala		
	50	55
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp		
65	70	75
Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn		
	85	90
Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
	100	105
Asn Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly		
	115	120
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Cys		
	130	140
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile		

145	150	155	160
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	165	170	175
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln			
	180	185	190
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Tyr			
	195	200	205
Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Arg			
	210	215	220

&lt;210&gt;36

&lt;211&gt;106

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 智人 (Homo sapiens)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;PEPTIDE

&lt;222&gt;(1).. (106)

&lt;223&gt;CL 区序列

&lt;400&gt;36

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

&lt;210&gt;37

&lt;211&gt;249

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 嵌合小鼠 / 人 VH 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (249)

<223>DVD 重可变 hIL-1a/bDVD2-Ig 区

<400>37

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

Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala  
 210 215 220  
 Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
 225 230 235 240  
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 245

<210>38

<211>6

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头肽

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1)..(6)

<223> 接头肽

<400>38

Ala Lys Thr Thr Pro Pro  
 1 5

<210>39

<211>225

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 嵌合小鼠 / 人 VL 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1)..(225)

<223>DVD 轻可变 hIL-1a/bDVD2-Ig 区

<400>39



<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (5)

<223> 接头肽

<400>40

Ala Asp Ala Ala Pro

1                    5

<210>41

<211>246

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 嵌合小鼠 / 人 VH 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (246)

<223>DVD 重可变 hIL-1a/b DVD3a-Ig 区

<400>41

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1                    5                    10                    15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr

20                    25                    30

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

35                    40                    45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ala Lys Tyr Asp Pro Arg Phe

50                    55                    60

Leu Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65                    70                    75                    80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85                    90                    95

Ala Arg Gly Asp Gly Asn Phe His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100                    105                    110

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

115	120	125	
Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile			
130	135	140	
Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Gly Val Ser Trp			
145	150	155	160
Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Leu Ile Trp			
	165	170	175
Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys Ser Arg Leu Ser			
	180	185	190
Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser			
	195	200	205
Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gln Arg Thr			
210	215	220	
Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
225	230	235	240
Ser Val Thr Val Ser Ser			
	245		

&lt;210&gt;42

&lt;211&gt;6

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 接头肽

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;PEPTIDE

&lt;222&gt;(1).. (6)

&lt;223&gt; 接头肽

&lt;400&gt;42

Ala Ser Thr Lys Gly Pro

1

5

&lt;210&gt;43

&lt;211&gt;222

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人工的

<220>

<223> 嵌合小鼠 / 人 VL 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (222)

<223>DVD 轻可变 hIL-1a/b DVD3a-Ig 区

<400>43

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

<210>44  
 <211>5  
 <212>PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 接头肽

<220>  
 <221>PEPTIDE  
 <222>(1)..(5)  
 <223> 接头肽

<400>44

Thr Val Ala Ala Pro  
 1                      5

<210>45  
 <211>246  
 <212>PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 嵌合小鼠 / 人 VH 区

<220>  
 <221>PEPTIDE  
 <222>(1)..(246)  
 <223>DVD 重可变 hIL-1a/b DVD3b-Ig 区

<400>45

Gln Val His Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
                     20                      25                      30  
 Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35	40	45	
Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys			
50	55	60	
Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu			
65	70	75	80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
	85	90	95
Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp			
	100	105	110
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro			
	115	120	125
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala			
	130	135	140
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr			
145	150	155	160
Tyr Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
	165	170	175
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ala Lys Tyr Asp Pro Arg Phe			
	180	185	190
Leu Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr			
	195	200	205
Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	210	215	220
Ala Arg Gly Asp Gly Asn Phe His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
225	230	235	240
Thr Leu Thr Val Ser Ser			
	245		

<210>46

<211>221

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>嵌合小鼠/人 VL 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1)..(221)

<223>DVD 轻可变 hIL-1a/b DVD3b-Ig 区

<400>46

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

<210>47

<211>253

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 嵌合小鼠 / 人 VH 区



<210>48  
 <211>13  
 <212>PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 接头肽

<220>  
 <221>PEPTIDE  
 <222>(1)..(13)  
 <223> 接头肽

<400>48

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

<210>49  
 <211>228  
 <212>PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 嵌合小鼠 / 人 VL 区

<220>  
 <221>PEPTIDE  
 <222>(1)..(228)  
 <223>DVD 轻可变 hIL-1a/bDVD4a-Ig 区

<400>49

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
                   20                    25                    30  
 Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Ala Leu Ile

35	40	45	
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser			
65	70	75	80
Val Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Thr Arg Tyr Pro Leu			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
	100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro			
	115	120	125
Ala Ser Leu Ser Met Ala Ile Gly Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile			
	130	135	140
Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro			
145	150	155	160
Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro			
	165	170	175
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val			
	180	185	190
Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu Ser Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys			
	195	200	205
Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu			
	210	215	220
Glu Leu Lys Arg			
225			

&lt;210&gt;50

&lt;211&gt;12

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;接头肽

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;PEPTIDE

&lt;222&gt;(1).. (12)

&lt;223&gt;接头肽



Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro  
 165 170 175  
 Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn  
 180 185 190  
 Ala Lys Tyr Asp Pro Arg Phe Leu Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp  
 195 200 205  
 Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu  
 210 215 220  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Gly Asn Phe His Phe  
 225 230 235 240  
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 245 250

<210>52

<211>228

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>嵌合小鼠/人 VL 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1)..(228)

<223>DVD 轻可变 hIL-1a/b DVD4b-Ig 区

<400>52

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



35	40	45	
Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Leu Tyr Ser Gln Lys Phe			
50	55	60	
Lys Asp Thr Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val			
100	105	110	
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly			
115	120	125	
Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala			
130	135	140	
Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ser			
145	150	155	160
His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly			
165	170	175	
Phe Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val			
180	185	190	
Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Ile Gln Phe Ser Arg Leu Thr Ser			
195	200	205	
Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr			
210	215	220	
Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser			
225	230	235	

<210>54

<211>219

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 嵌合小鼠 / 人 VL 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (219)

<223>DVD 轻可变 hIL-1a/b DVD5a-Ig 区

<400>54

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

<210>55

<211>238

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 嵌合小鼠 / 人 VH 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (238)

<223>DVD 重可变 hIL-1a/b DVD5b-Ig 区

<400>55

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

<210>56

<211>219

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 嵌合小鼠 / 人 VL 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (219)

<223>DVD 轻可变 hIL-1a/b DVD5b-Ig 区

<400>56

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg  
 210 215

<210>57

<211>245

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 嵌合小鼠 / 人 VH 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (245)

<223>DVD 重可变 hIL-1a/b DVD6a-Ig 区

<400>57

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Leu Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Asp Thr Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
 100 105 110  
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Glu  
 115 120 125  
 Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Thr Ser  
 130 135 140  
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr  
 145 150 155 160  
 Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly



Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
                   100                  105                  110  
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala  
                   115                  120                  125  
 Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala  
                   130                  135                  140  
 Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ala  
 145                  150                  155                  160  
 Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val  
                   165                  170                  175  
 Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr  
                   180                  185                  190  
 Val Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
                   195                  200                  205  
 Arg Ser Thr Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
                   210                  215                  220  
 Lys Arg Arg  
 225

<210>59

<211>245

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>嵌合小鼠/人 VH 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1)..(245)

<223>DVD 重可变 hIL-1a/b DVD6b-Ig 区

<400>59

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Thr  
 1                  5                  10                  15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
                   20                  25                  30  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35	40	45
Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe		
50	55	60
Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Ile Gln Phe Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg		
130	135	140
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe		
145	150	155
Thr Thr Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu		
165	170	175
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Leu Tyr Ser		
180	185	190
Gln Lys Phe Lys Asp Thr Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser		
195	200	205
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val		
210	215	220
Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr		
225	230	235
Leu Thr Val Ser Ser		240
245		

<210>60

<211>227

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223> 嵌合小鼠 / 人 VL 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1)..(227)

<223>DVD 轻可变 hIL-1a/b DVD6b-Ig 区

<400>60

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

<210>61

<211>62

<212>DNA

<213>人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (62)

<400>61

tagagatccc tcgacctega gatccattgt gcccgggcgc caccatggag tttgggctga 60  
gc 62

<210>62

<211>45

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (45)

<400>62

cacctctggg cccttggtcg acgctgaaga gacggtgacc attgt 45

<210>63

<211>60

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (60)

<400>63

- gggtgccagg gggaagaccg atgggcccctt ggtcgacgct gaagagacgg tgaccattgt 60
- <210>64  
 <211>45  
 <212>DNA  
 <213> 人工的
- <220>  
 <223>PCR 引物
- <220>  
 <221> 引物  
 <222>(1).. (45)
- <400>64  
 tcttcagcgt cgaccaaggg cccagaggtg cagctgggtgc agtct 45
- <210>65  
 <211>60  
 <212>DNA  
 <213> 人工的
- <220>  
 <223>PCR 引物
- <220>  
 <221> 引物  
 <222>(1).. (60)
- <400>65  
 gcgtcgacca agggcccata ggtcttcccc ctggcaccgg aggtgcagct ggtgcagtct 60
- <210>66  
 <211>21  
 <212>DNA  
 <213> 人工的
- <220>  
 <223>PCR 引物

<220>	
<221> 引物	
<222>(1).. (21)	
<400>66	
gtagtccttg accaggcage c	21
<210>67	
<211>62	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223>PCR 引物	
<220>	
<221> 引物	
<222>(1).. (62)	
<400>67	
tagagatccc tegacctega gatccattgt gcccgggcgc caccatgact tggacccac	60
tc	62
<210>68	
<211>45	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223>PCR 引物	
<220>	
<221> 引物	
<222>(1).. (45)	
<400>68	
tatttcgggg gcagccttgg gctgacctag tactgtgacc ttggt	45
<210>69	

- <211>60  
 <212>DNA  
 <213> 人工的
- <220>  
 <223>PCR 引物
- <220>  
 <221> 引物  
 <222>(1).. (60)
- <400>69  
 gggcgggaac agagtgaccg agggggcagc cttgggctga cctagtactg tgaccttggg 60  
 <210>70  
 <211>45  
 <212>DNA  
 <213> 人工的
- <220>  
 <223>PCR 引物
- <220>  
 <221> 引物  
 <222>(1).. (45)
- <400>70  
 ctaggtcagc ccaaggctgc ccccgaaata gtgatgacgc agtct 45
- <210>71  
 <211>60  
 <212>DNA  
 <213> 人工的
- <220>  
 <223>PCR 引物
- <220>  
 <221> 引物  
 <222>(1).. (60)

<400>71  
cagcccaagg ctgccccctc ggteactctg ttccccgccg aaatagtgat gacgcagtct 60

<210>72

<211>59

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (59)

<400>72

gtcccagggtg gggaccctca ctctagagtc ggggccgctt aacactctcc cctgttgaa 59

<210>73

<211>45

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (45)

<400>73

cacctgtggg cccttggtcg acgctgaaga gacggtgacc attgt 45

<210>74

<211>60

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (60)

<400>74

gggtgccagg gggaagaccg atgggccctt ggtcgacgct gaagagacgg tgaccattgt 60

<210>75

<211>45

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (45)

<400>75

tcttcagcgt cgaccaaggg cccacaggtg cagctggtgg agtct 45

<210>76

<211>60

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (60)

<400>76

gcgtcgacca agggcccate ggtcttcccc ctggcacccc aggtgcagct ggtggagtct 60

<210>77

<211>65

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (65)

<400>77

tagagatccc tcgacctega gatccattgt gcccgggcgc caccatggaa gccccagcgc 60  
agctt 65

<210>78

<211>42

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (42)

<400>78

agactgtggt gcagccacag ttcgtttaat ctccagtcgt gt 42

<210>79

<211>57

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (57)

<400>79

tggcgggaag atgaagacag atggtgcage cacagttcgt ttaatctcca gtcgtgt 57

<210>80

<211>42

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (42)

<400>80

aaacgaactg tggctgcacc acagtctgtg ctgactcage cc 42

<210>81

<211>57

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (57)

<400>81

actgtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccacagt ctgtgctgac tcagecc 57

<210>82

<211>59

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223>PCR 引物

<220>

<221> 引物

<222>(1).. (59)

<400>82

gtcccaggtg gggaccctca ctctagagtc ggggccgctc atgaacattc tgtaggggc 59

<210>83

<211>242

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 抗体 VH 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (242)

<223>DVD 重可变 DVD1218HC-SL 区

<400>83

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

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

35                                    40                                    45

Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser 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 Val Tyr Tyr Cys

85                                    90                                    95

Lys Thr His Gly Ser His Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr  
                   100                                  105                                  110  
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Val Gln Leu Val Gln Ser  
                   115                                  120                                  125  
 Gly Thr Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys  
                   130                                  135                                  140  
 Gly Ser Gly Tyr Thr Val Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln  
 145                                  150                                  155                                  160  
 Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Phe Ile Tyr Pro Gly Asp  
                                   165                                  170                                  175  
 Ser Glu Thr Arg Tyr Ser Pro Thr Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser  
                   180                                  185                                  190  
 Ala Asp Lys Ser Phe Asn Thr Ala Phe Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys  
                   195                                  200                                  205  
 Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Gly Ser Gly Trp  
                   210                                  215                                  220  
 Tyr Pro Tyr Thr Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val  
 225                                  230                                  235                                  240  
 Ser Ser

<210>84

<211>115

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (115)

<223>ABT-874 VH 区序列

<400>84

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  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                                  40                                  45  
 Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser 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	Val	Tyr	Tyr	Cys			
				85						90					95			
Lys	Thr	His	Gly	Ser	His	Asp	Asn	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr			
			100					105							110			
Val	Ser	Ser																
			115															

&lt;210&gt;85

&lt;211&gt;121

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 智人 (Homo sapiens)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;PEPTIDE

&lt;222&gt;(1).. (121)

&lt;223&gt;ABT-325 VH 区序列

&lt;400&gt;85

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Thr	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu			
1				5					10					15				
Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Thr	Val	Thr	Ser	Tyr			
			20						25					30				
Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met			
		35					40							45				
Gly	Phe	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Glu	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Thr	Phe			
		50					55					60						
Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Phe	Asn	Thr	Ala	Phe			
65					70							75			80			
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys			
				85						90					95			
Ala	Arg	Val	Gly	Ser	Gly	Trp	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly			
			100						105						110			
Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
			115						120									

<210>86

<211>247

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 抗体 VL 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (247)

<223>DVD 轻可变 DVD1218LC-SL 区

<400>86

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

Ala Thr Asp Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu  
 195 200 205  
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr  
 210 215 220  
 Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Ser Ile Thr Phe Gly Gln Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg  
 245

<210>87

<211>112

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (112)

<223>ABT-874 VL 区序列

<400>87

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn  
 20 25 30  
 Thr Val Lys Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
 35 40 45  
 Ile Tyr Tyr Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln  
 65 70 75 80  
 Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Arg Tyr Thr  
 85 90 95  
 His Pro Ala Leu Leu Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

<210>88

<211>6

<212>PRT



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

<210>90

<211>249

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 抗体 VH 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1)..(109)

<223>DVD 重可变 DVD1218LC-LL 区

<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 Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser 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 Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Lys Thr His Gly Ser His Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
 115 120 125  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Thr Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 130 135 140  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Val Thr Ser Tyr  
 145 150 155 160  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met



His Pro Ala Leu Leu Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
                   100                                  105                                  110  
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Glu Ile Val  
                   115                                  120                                  125  
 Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala  
                   130                                  135                                  140  
 Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Ser Ser Asn Leu Ala Trp  
 145                                  150                                  155                                  160  
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Phe Ile Tyr Thr Ala  
                                   165                                  170                                  175  
 Ser Thr Arg Ala Thr Asp Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser  
                   180                                  185                                  190  
 Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe  
                   195                                  200                                  205  
 Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Ser Ile Thr Phe  
                   210                                  215                                  220  
 Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg  
 225                                  230

<210>92

<211>13

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1)..(13)

<223> 接头肽

<400>92

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

<210>93

<211>242

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 抗体 VH 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1)..(242)

<223>DVD 重可变 DVD1812HC-SL 区

<400>93

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

210	215	220
Thr His Gly Ser His Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val		
225	230	235
Ser Ser		240

&lt;210&gt;94

&lt;211&gt;226

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;抗体 VL 区

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;PEPTIDE

&lt;222&gt;(1)..(226)

&lt;223&gt;DVD 轻可变 DVD1812LC-SL 区

&lt;400&gt;94

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly		
1	5	10
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Ser Ser Asn		
	20	25
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Phe Ile		
	35	40
Tyr Thr Ala Ser Thr Arg Ala Thr Asp Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
	50	55
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Ser		
	85	90
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala		
	100	105
Ala Pro Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro		
	115	120
Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly		
	130	135
Ser Asn Thr Val Lys Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys		



	100		105		110
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser					
	115		120		125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly					
	130		135		140
Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly					
145		150		155	160
Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly					
	165		170		175
Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys					
	180		185		190
Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn					
	195		200		205
Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp					
	210		215		220
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Thr His Gly Ser His Asp Asn Trp Gly					
225		230		235	240
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser					
	245				

&lt;210&gt;96

&lt;211&gt;233

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;抗体 VL 区

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;PEPTIDE

&lt;222&gt;(1)..(233)

&lt;223&gt;DVD 轻可变 DVD1812LC-LL 区

&lt;400&gt;96

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly					
1	5		10		15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Ser Ser Asn					
	20		25		30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Phe Ile  
 35 40 45  
 Tyr Thr Ala Ser Thr Arg Ala Thr Asp Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Ser  
 85 90 95  
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala  
 100 105 110  
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro  
 115 120 125  
 Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser  
 130 135 140  
 Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Lys Trp Tyr Gln Gln  
 145 150 155 160  
 Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Asn Asp Gln Arg  
 165 170 175  
 Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser  
 180 185 190  
 Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr  
 195 200 205  
 Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Arg Tyr Thr His Pro Ala Leu Leu Phe Gly  
 210 215 220  
 Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
 225 230

<210>97

<211>254

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 抗体 VH 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1)..(254)

<223>DVD 重可变 CD20CD3DVD-Ig 区

&lt;400&gt;97

Gln Val Gln Leu Arg Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
                   20                   25                   30  
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                   40                   45  
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
                   50                   55                   60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65                   70                   75                   80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                   90                   95  
 Ala Arg Ser His Tyr Gly Ser Asn Tyr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp  
                   100                   105                   110  
 Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro  
                   115                   120                   125  
 Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala  
                   130                   135                   140  
 Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser  
 145                   150                   155                   160  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro  
                   165                   170                   175  
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr  
                   180                   185                   190  
 Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp  
                   195                   200                   205  
 Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu  
                   210                   215                   220  
 Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys  
 225                   230                   235                   240  
 Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
                   245                   250

&lt;210&gt;98

&lt;211&gt;122

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (122)

<223>5F1 VH 区序列

<400>98

Gln	Val	Gln	Leu	Arg	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	20	25	30	
Asn	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	35	40	45	
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	50	55	60	
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Ser	His	Tyr	Gly	Ser	Asn	Tyr	Val	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	100	105	110	
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser							115	120		

<210>99

<211>13

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (13)

<223> 接头肽

<400>99



<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1)..(226)

<223>CD20CD3DVD-Ig 轻可变区序列

<400>101

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

<210>102  
 <211>107  
 <212>PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<220>  
 <221>PEPTIDE  
 <222>(1).. (107)  
 <223>5F1 VL 区序列

<400>102

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

<210>103  
 <211>12  
 <212>PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 接头区

<220>  
 <221>PEPTIDE  
 <222>(1).. (12)  
 <223> 接头肽

<400>103

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

<210>104

<211>107

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (107)

<223>OKT3 VL 区序列

<400>104

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  
                  100                   105

<210>105

<211>249

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 抗体 VH 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (243)

<223>mIL-1a/b DVD-Ig 重可变区序列

<400>105

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

Leu Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
245

<210>106

<211>121

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1)..(121)

<223>10G11 VH 区序列

<400>106

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Thr
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25						30	
Val	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35				40						45		
Gly	Tyr	Ile	Ile	Pro	Tyr	Asn	Asp	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
			50				55					60			
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95
Ala	Arg	Arg	Asn	Glu	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Phe	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
					100					105					110
Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser							
					115					120					

<210>107

<211>115

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (115)  
<223>9H10 VH 区序列

<400>107

Gln Val Ile Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln  
1                   5                   10                   15  
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr  
                  20                   25                   30  
Gly Thr Ala Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu  
                  35                   40                   45  
Trp Leu Ala Gln Ile Gly Ser Asp Asp Arg Lys Leu Tyr Asn Pro Phe  
                  50                   55                   60  
Leu Lys Ser Arg Ile Thr Leu Ser Glu Asp Thr Ser Asn Ser Gln Val  
65                   70                   75                   80  
Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr  
                  85                   90                   95  
Cys Ala Asn Gly Val Met Glu Tyr Trp Gly Leu Gly Thr Ser Val Thr  
                  100                   105                   110  
Val Ser Ser  
                  115

<210>108

<211>330

<212>PRT

<213> 小鼠

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (320)

<223>CH 区序列

<400>108

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly  
1                   5                   10                   15  
Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr  
                  20                   25                   30  
Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser

35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu		
50	55	60
Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile		
65	70	75
Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys		
85	90	95
Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys		
100	105	110
Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro		
115	120	125
Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp		
145	150	155
Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg		
165	170	175
Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln		
180	185	190
His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn		
195	200	205
Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly		
210	215	220
Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu		
225	230	235
Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met		
245	250	255
Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu		
260	265	270
Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe		
275	280	285
Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn		
290	295	300
Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr		
305	310	315
Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys		
325	330	

&lt;210&gt;109

<211>228

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>抗体 VL 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1)..(228)

<223>mIL-1a/b DVD-Ig 轻可变区序列

<400>109

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1                   5                   10                   15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Gly Ser Gly Ile Leu His Asn Tyr

20                   25                   30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

35                   40                   45

Tyr Ser Ala LysIle Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50                   55                   60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro

65                   70                   75                   80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Phe

85                   90                   95

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

100                   105                   110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro

115                   120                   125

Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys

130                   135                   140

Ala Ser Gln Ser Val Asn His Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Met Pro

145                   150                   155                   160

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

165                   170                   175

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr

180                   185                   190

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

195                   200                   205

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 210 215 220

Glu Ile Lys Arg  
 225

<210>110

<211>108

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (108)

<223>10G11 VL 区序列

<400>110

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

<210>111

<211>12

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头区



<212>PRT

<213> 小鼠

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (106)

<223>CL 区序列

<400>113

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

<210>114

<211>246

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 抗体 VH 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (246)

<223>1D4. 1-ABT325 DVD-Ig 重可变区序列

<400>114

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

<210>115

<211>119

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (119)

<223>1D4.1 VH 区序列

<400>115

Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1                   5                   10                   15  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser  
                   20                   25                   30  
 Val Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
                   35                   40                   45  
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser  
                   50                   55                   60  
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65                   70                   75                   80  
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
                   85                   90                   95  
 Cys Ala Arg Arg Gly Ile Arg Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
                   100                   105                   110  
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
                   115

<210>116

<211>222

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>抗体 VL 区

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1).. (222)

<223>1D4.1-ABT325 DVD-Ig 轻可变区序列

<400>116

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

<210>117

<211>108

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221>PEPTIDE

<222>(1)..(108)

<223>1D4.1 VL 区序列

&lt;400&gt;117

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

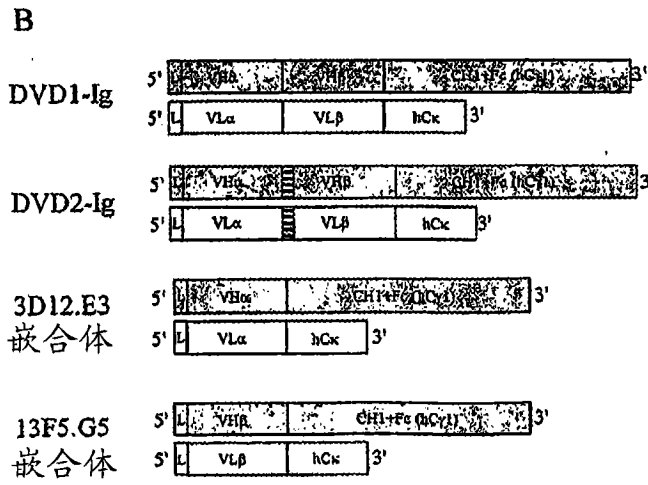
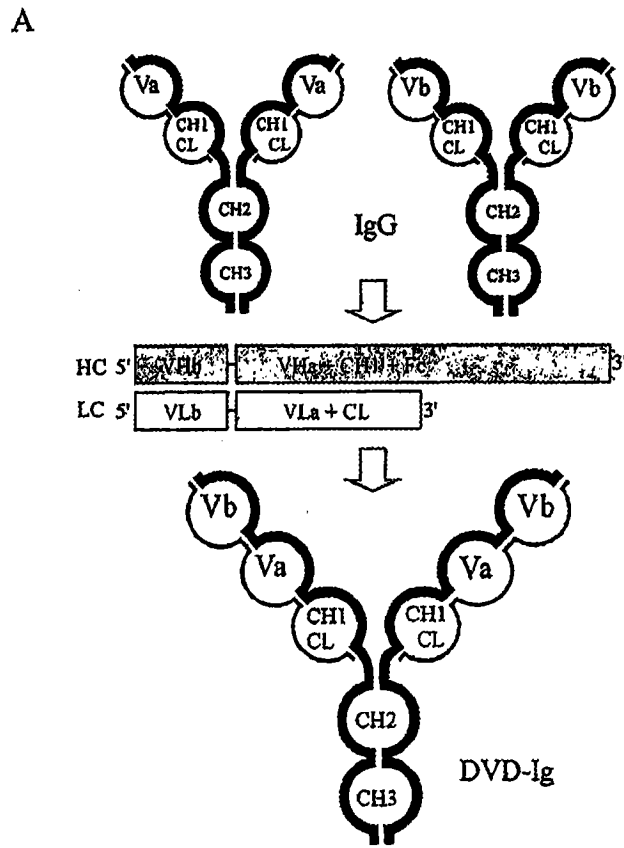


图 1