(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104203278 A
(43)申请公布日 2014.12.10

(21)申请号 201280067294.9

(22)申请日 2012.11.19

(30)优先权数据
61/562,245 2011.11.21 US
61/562,728 2011.11.22 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.07.16

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/065872 2012.11.19

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/078135 EN 2013.05.30

(71)申请人 阿布维公司
地址 美国伊利诺斯州

(72)发明人 E·塔克萨

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
代理人 陈文平 徐志明

(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)

权利要求书7页 说明书168页 附图11页

(54)发明名称

IL-1结合蛋白

(57)摘要

描述了结合IL-1α和IL-1β的蛋白质以及其在用于治疗、预防和诊断IL-1相关障碍及用于检测细胞、组织、样品和组合物中的IL-1α和IL-1β的组合物和方法中的用途。

CN 104203278 A

1. 一种分离的组合物，包含抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分，其中当以约 5mg/kg 的剂量静脉内施用于受试者时，该抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分表现出：

(a) 约 15-25mgh/ml 的曲线下面积 (AUC)；

(b) 约 85-105mL/kg 的分布容积；

(c) 约 7- 约 13 天的半衰期；或

(d) 约 0.1- 约 0.4ml/h/kg 的清除率。

2. 一种分离的组合物，包含抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分，其中当以约 4mg/kg 的剂量静脉内施用于受试者时，该抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分表现出：

(a) 约 10-20mgh/ml 的曲线下面积 (AUC)；

(b) 约 75-95mL/kg 的分布容积；

(c) 约 7- 约 13 天的半衰期；或

(d) 约 0.1- 约 0.4ml/h/kg 的清除率。

3. 一种分离的组合物，包含抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分，其中当以约 5mg/kg 的剂量静脉内施用于受试者时，该抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分表现出：

(a) 约 15-30mgh/ml 的曲线下面积 (AUC)；

(b) 约 45-75mL/kg 的分布容积；

(c) 约 7- 约 13 天的半衰期；或

(d) 约 0.1- 约 0.4ml/h/kg 的清除率。

4. 一种分离的组合物，包含抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分，其中当以约 5mg/kg 的剂量皮下施用于受试者时，该抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分表现出：

(a) 约 15-30mgh/ml 的曲线下面积 (AUC)；

(b) 约 10- 约 30 天的半衰期；或

(c) 约 20- 约 40μg/ml 的峰浓度 (Cmax)。

5. 一种分离的组合物，包含抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分，其中当以约 4mg/kg 的剂量皮下施用于受试者时，该抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分表现出：

(a) 约 3- 约 12mgh/ml 的曲线下面积 (AUC)；

(b) 约 7- 约 20 天的半衰期；或

(c) 约 10- 约 30μg/ml 的峰浓度 (Cmax)。

6. 一种分离的组合物，包含抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分，其中当以约 5mg/kg 的剂量皮下施用于受试者时，该抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分表现出：

(a) 约 15- 约 30mgh/ml 的曲线下面积 (AUC)；

(b) 约 4- 约 15 天的半衰期；或

(c) 约 40- 约 65μg/ml 的峰浓度 (Cmax)。

7. 权利要求 1-7 中任一项的组合物，其中所述抗 -IL-1α / β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分是 E26.13-SS-X3 或其抗原结合部分。

8. 权利要求 7 的组合物，其中所述 E26.13-SS-X3 或其抗原结合部分包含含有 SEQ ID NO :212 中所示的氨基酸序列的重链可变结构域。

9. 权利要求 7 的组合物，其中所述 E26.13-SS-X3 或其抗原结合部分包含含有 SEQ ID NO :215 中所示的氨基酸序列的轻链可变结构域。

10. 权利要求 1-9 中任一项的组合物，其中所述组合物是药物组合物。

11. 一种用于治疗或预防受试者的骨关节炎的方法，包括对所述受试者施用权利要求 1-10 中任一项的组合物，从而治疗或预防所述受试者的骨关节炎。

12. 一种用于治疗或预防受试者的疼痛的方法，包括对所述受试者施用权利要求 1-10 中任一项的组合物，从而治疗或预防所述受试者的疼痛。

13. 一种用于治疗或预防受试者的其中 IL-1 活性有害的病症的方法，包括对所述受试者施用权利要求 1-10 中任一项的组合物，从而治疗或预防所述受试者的其中 IL-1 活性有害的所述病症。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述病症选自糖尿病、葡萄膜炎、神经性疼痛、骨关节炎性疼痛、炎性疼痛、类风湿性关节炎、骨关节炎、幼年型慢性关节炎、脓毒性关节炎、莱姆病关节炎、银屑病关节炎、反应性关节炎、脊椎关节病、系统性红斑狼疮 (SLE)、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、炎性肠病、自身免疫性糖尿病、胰岛素依赖性糖尿病、甲状腺炎、哮喘、过敏性疾病、银屑病、皮炎、硬皮病、移植物抗宿主病、器官移植排异、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、肉瘤样病、动脉粥样硬化、弥漫性血管内凝血 (DIC)、川崎病、格雷夫斯氏病、肾病综合征、慢性疲劳综合征、韦格纳肉芽肿病、过敏性紫癜 (Henoch-Schoenlein purpurea)、肾显微性血管炎、慢性活动性肝炎、自身免疫性葡萄膜炎、脓毒性休克、中毒性休克综合征、脓毒病综合征、恶病质、传染病、寄生虫病、急性横贯性脊髓炎、亨廷顿舞蹈症、帕金森病、阿尔茨海默病、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、阿狄森病、I 型散发性多腺性缺陷症、II 型多腺性缺陷症 (Schmidt 综合征)、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、脱发、斑秃、血清阴性关节病、关节病、莱特尔病、银屑病性关节病、溃疡性结肠炎关节病、肠病性滑膜炎、衣原体病、耶尔森菌和沙门氏菌相关关节病、脊椎关节病、动脉粥样硬化病 / 动脉硬化、异位性变态反应、自身免疫性大疱病、寻常天疱疮、落叶型天疱疮、类天疱疮、线状 IgA 病、自身免疫性溶血性贫血、库姆氏阳性溶血性贫血、获得性恶性贫血、青少年恶性贫血、肌痛脑脊髓炎 /Royal Free 病、慢性粘膜皮肤念珠菌病、巨细胞动脉炎 (GCA)、原发硬化性肝炎、隐源性自身免疫性肝炎、获得性免疫缺陷综合征 (AIDS)、获得性免疫缺陷相关性疾病、乙型肝炎、丙型肝炎、寻常变异型免疫缺陷 (寻常变异型低丙种球蛋白血症)、扩张型心肌病、女性不育、卵巢衰竭、早发卵巢衰竭、纤维化肺病、隐原性纤维化肺泡炎、炎症后间质性肺病、间质性肺炎、结缔组织病相关间质性肺病、混合型结缔组织病相关性肺病、系统性硬化症相关间质性肺病、类风湿性关节炎相关间质性肺病、系统性红斑狼疮相关肺病 ;皮肌炎 / 多肌炎相关肺病、舍格伦病相关肺病、强直性脊柱炎相关肺病、血管炎弥散性肺病、含铁血黄素沉着症相关肺病、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、淋巴细胞浸润性肺病、感染后间质性肺病、痛风性关节炎、自身免疫性肝炎、1 型自身免疫性肝炎

（经典自身免疫性或狼疮性肝炎）、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症、B 型胰岛素抵抗伴黑棘皮病、甲状旁腺功能减退、骨关节病、原发性硬化性胆管炎、1 型银屑病、2 型银屑病、特发性白细胞减少症、自身免疫性中性粒细胞减少症、肾病 NOS、肾小球性肾炎、肾显微性血管炎、莱姆病、盘状红斑狼疮、特发性男性不育、一氧化氮相关男性不育、精子自身免疫性、多发性硬化（全部亚型，包括原发进展型、继发进展型、复发缓解型）、交感性眼炎、继发于结缔组织病的肺性高血压、肺出血肾炎综合征、结节性多发性动脉炎的肺部表现、急性风湿热、类风湿性脊柱炎、斯蒂尔病、系统性硬化症、舍格伦综合征、塔卡亚萨病 / 动脉炎、自身免疫性血小板减少症 (AITP)、特发性血小板减少症、自身免疫性甲状腺病、甲状腺功能亢进症、甲状腺肿性自身免疫性甲状腺功能减退症（桥本氏病）、萎缩性自身免疫性甲状腺功能减退症、原发性粘液性水肿、晶状体源性葡萄膜炎、原发性血管炎、白斑症、急性肝病、慢性肝病、酒精性肝硬化、酒精诱导肝损伤、胆汁郁积、特异体质性肝病、药物诱导的肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、变态反应、B 组链球菌 (GBS) 感染、精神障碍（例如，抑郁和精神分裂症）、Th2 型和 Th1 型介导的疾病、急性和慢性疼痛（不同形式的疼痛）、癌症（如肺癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌和直肠癌）、造血系统恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤、无 β 脂蛋白血症、肢端发绀症、急性和慢性寄生性或感染性过程、急性白血病、急性成淋巴细胞性白血病 (ALL)、T- 细胞 ALL、FAB ALL、急性髓性白血病 (AML)、急性或慢性细菌性感染、急性胰腺炎、急性肾衰竭、腺癌、心房异位搏动、AIDS 痴呆综合征、酒精诱导的肝炎、变应性结膜炎、变应性接触性皮炎、过敏性鼻炎、同种异体移植排斥、α -1 抗胰蛋白酶缺乏症、肌萎缩侧索硬化、贫血、心绞痛、前角细胞变性、抗 CD3 疗法、抗磷脂综合征、抗受体超敏反应、主动脉和外周动脉瘤、主动脉壁夹层形成、动脉高血压、动脉硬化、动静脉瘘、共济失调、心房纤颤（持久性或阵发性）、心房扑动、房室传导阻滞、B 细胞淋巴瘤、骨移植排斥、骨髓移植 (BMT) 排斥、束支传导阻滞、伯基特淋巴瘤、烧伤、心律不齐、心脏眩晕综合征、心脏肿瘤、心肌病、心肺分流炎症反应、软骨移植排斥、小脑皮质变性、小脑疾病、紊乱性或多灶性房性心动过速、化疗相关病症、慢性粒细胞性白血病 (CML)、慢性酒精中毒、慢性炎性病理、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、慢性阻塞性肺病 (COPD)、慢性水杨酸盐中毒、结直肠癌、充血性心力衰竭、结膜炎、接触性皮炎、肺原性心脏病、冠状动脉病、克 - 雅氏病、培养阴性脓毒症、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、皮炎、皮肤病状况、糖尿病、糖尿病性动脉硬化病、弥漫性 Lewy 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 多巴胺受体的药物引起的药物诱导型运动障碍、药物过敏、湿疹、脑脊髓炎、心内膜炎、内分泌病、会厌炎、Epstein-Barr 病毒感染、红斑性肢痛病、锥体束外及小脑病、家族性嗜血细胞性淋巴组织细胞增多症、胎儿胸腺植入物排斥、弗里德赖希共济失调、功能性外周动脉病、真菌性败血症、气性坏疽、胃溃疡、肾小球肾炎、任何器官或组织的移植排斥、革兰氏阴性脓毒症、革兰氏阳性脓毒症、归因于胞内生物体的肉芽肿、毛细胞白血病、哈 - 斯二氏病、桥本氏甲状腺炎、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 / 溶栓性血小板减少性紫癜、出血、甲型肝炎、希氏束心率失常、HIV 感染 /HIV 神经病、霍奇金病、多动性运动障碍、超敏反应、过敏性肺炎、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、特发性阿狄森病、特发性肺纤维化 (IPF)、抗体介导的细胞毒性、无力、婴儿脊髓性肌萎缩、主动脉炎症、甲型流感、电离辐射暴露、虹膜睫状体炎 / 葡萄膜炎 / 视神经炎、

局部缺血 - 再灌注损伤、缺血性发作、幼年型类风湿关节炎、幼年期脊髓性肌萎缩、卡波西肉瘤、肾移植排斥、军团菌病、利什曼病、麻疯病、皮质脊髓系统的病变、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、代谢综合征偏头痛、特发性偏头痛、线粒体多系统障碍、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、鸟胞内分枝杆菌病、结核分枝杆菌病、骨髓增生异常综合征、心肌梗死、心肌缺血性病症、鼻咽癌、新生儿慢性肺病、肾炎、肾病、神经变性病、神经原性 I 肌萎缩、中性粒细胞减少性发热、非霍奇金淋巴瘤、腹主动脉及其分支闭塞、闭塞性动脉病、OKT3®疗法、睾丸炎 / 附睾炎、睾丸炎 / 输精管复通过程、器官巨大症、骨质疏松症、胰移植排斥、胰腺癌、副肿瘤性综合征 / 恶性肿瘤的高钙血症、甲状旁腺移植排斥、盆腔炎性疾病、常年性鼻炎、心包疾病、外周动脉粥样硬化性疾病、周围血管病、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 心切开术后综合征、先兆子痫、进行性核上麻痹、原发性肺动脉高压、放射疗法、雷诺氏现象、雷诺病、雷夫苏姆病、规则性窄 QRS 心动过速、肾血管性高血压、再灌注损伤、限制型心肌病、肉瘤、老年舞蹈症、Lewy 体型老年性痴呆、血清阴性关节病、休克、镰状细胞性贫血、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、特殊心率失常、脊髓性共济失调、脊髓小脑退行性变、链球菌性肌炎、小脑结构性损伤、亚急性硬化性全脑炎、晕厥、心血管系统梅毒、全身过敏、全身性炎性反应综合征、全身发病型幼年类风湿性关节炎、毛细血管扩张症、闭塞性血栓性脉管炎、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、不稳定型心绞痛、尿毒症、尿脓毒病、荨麻疹、心脏瓣膜病、静脉曲张、血管炎、静脉病、静脉血栓形成、心室纤颤、病毒和真菌感染、病毒性脑炎 / 无菌性脑膜炎、病毒相关噬血细胞综合征、韦 - 科二氏综合征、肝豆状核变性、任何器官或组织的异体移植排斥、急性冠状动脉综合征、急性特发性多神经炎、急性炎性脱髓鞘多发性神经根性神经病、急性局部缺血、成人斯蒂尔病、斑秃、过敏反应、抗磷脂抗体综合征、再生障碍性贫血、动脉硬化、异位性湿疹、异位性皮炎、自身免疫性皮炎、与链球菌感染相关的自身免疫病症、自身免疫性肠病、自身免疫性听力损失、自身免疫性淋巴细胞增生综合征 (ALPS)、自身免疫性心肌炎、自身免疫性早发卵巢衰竭、眼睑炎、支气管扩张症、大疱性类天疱疮、心血管疾病、灾难性抗磷脂综合征、乳糜泻、颈椎病、慢性局部缺血、瘢痕性类天疱疮、存在多发性硬化风险的临床孤立的综合征 (CIS)、结膜炎、儿童期发病精神障碍、泪囊炎、皮肌炎、糖尿病性视网膜病变、椎间盘突出、椎间盘脱出、药物诱导的免疫性溶血性贫血、心内膜炎、子宫内膜异位症、眼内炎、巩膜外层炎、多形性红斑、重型多形性红斑、妊娠性类天疱疮、格巴二氏综合征 (GBS)、枯草热、休斯氏综合征、特发性帕金森病、特发性间质性肺炎、IgE 介导的变态反应、免疫性溶血性贫血、包涵体肌炎、感染性眼部炎性疾病、炎性脱髓鞘性疾病、炎性心脏病、炎性肾疾病、虹膜炎、角膜炎、干燥性角结膜炎、库斯毛尔病或 Kussmaul-Meier 病、兰德里麻痹、郎格罕氏细胞组织细胞增多症、网状青斑、黄斑变性、显微小血管炎、白赫铁列夫症、运动神经元病、粘膜类天疱疮、多器官功能衰竭、重症肌无力、骨髓增生异常综合征、心肌炎、神经根障碍、神经病、非甲非乙肝炎、视神经炎、骨质溶解、少关节 JRA、外周动脉闭塞性疾病 (PAOD)、外周血管疾病 (PVD)、外周动脉病 (PAD)、静脉炎、结节性多发性动脉炎 (或结节性动脉周围炎)、多软

骨炎、风湿性多肌痛、白发病、多关节 JRA、多内分泌腺缺陷综合征、多肌炎、风湿性多肌痛(PMR)、泵后综合征、原发性帕金森症、继发性帕金森症、前列腺炎、单纯红细胞再生障碍、原发性肾上腺功能不足、复发型视神经脊髓炎、再狭窄、风湿性心脏病、SAPHO(滑膜炎、痤疮、脓疱病、骨肥厚和骨炎)、继发性淀粉样变性、休克肺、巩膜炎、坐骨神经痛、继发性肾上腺功能不足、硅氧烷相关结缔组织病、角质层下脓疱性皮肤病、关节强硬性脊椎炎、斯约二氏综合征 (SJS)、全身性炎性反应综合征、颞动脉炎、弓形体性视网膜炎、毒性表皮坏死松解症、横贯性脊髓炎、TRAPS(1 型肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 相关周期性综合征)、B 型胰岛素抵抗伴黑棘皮病、I 型变态反应、II 型糖尿病、荨麻疹、普通间质性肺炎 (UIP)、春季结膜炎、病毒性视网膜炎、伏格特 - 小柳 - 原田三氏综合征 (VKH 综合征)、湿性黄斑变性、伤口愈合、耶尔森菌和沙门氏菌相关关节病。

15. 权利要求 11-13 中任一项的方法,其中所述组合物施用一次。

16. 权利要求 11-13 中任一项的方法,其中所述组合物每周施用。

17. 权利要求 11-13 中任一项的方法,进一步包括施用另外的药剂。

18. 权利要求 17 的方法,其中所述另外的药剂选自治疗剂、成像剂、细胞毒性剂、血管生成抑制剂、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性片段、甲氨蝶呤、环孢菌素、雷帕霉素、FK506、可检测的标记或报道分子、TNF 拮抗剂、抗风湿药、肌肉松弛药、麻醉品、非甾体抗炎药 (NSAID)、镇痛药、麻醉药、镇静剂、局部麻醉药、神经肌肉阻滞剂、抗微生物药、抗银屑病药、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、红细胞生成素、免疫接种、免疫球蛋白、免疫抑制药、生长激素、激素替代药物、放射药物、抗抑郁药、抗精神病药、兴奋剂、哮喘药物、β 激动剂、吸入型类固醇、肾上腺素或类似物、细胞因子和细胞因子拮抗剂。

19. 一种治疗受试者的骨关节炎的方法,包括向所述受试者静脉内施用抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分,其中在向所述受试者施用所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分后实现选自下组的至少一种药代动力学特征:

(a) 约 10-30mgh/ml 的曲线下面积 (AUC);

(b) 约 45-105mL/kg 的分布容积;

(c) 约 7- 约 13 天的半衰期;或

(d) 约 0.1- 约 0.4ml/h/kg 的清除率,

从而治疗所述受试者的骨关节炎。

20. 权利要求 19 的方法,其中所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分以约 5mg/kg 的剂量施用。

21. 权利要求 19 的方法,其中所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分以约 4mg/kg 的剂量施用。

22. 一种治疗受试者的疼痛的方法,包括向所述受试者静脉内施用抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分,其中在向所述受试者施用所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分后实现选自下组的至少一种药代动力学特征:

(a) 约 10-30mgh/ml 的曲线下面积 (AUC);

(b) 约 45-105mL/kg 的分布容积；

(c) 约 7- 约 13 天的半衰期；或

(d) 约 0.1- 约 0.4ml/h/kg 的清除率，

从而治疗所述受试者的疼痛。

23. 权利要求 22 的方法，其中所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分以约 5mg/kg 的剂量施用。

24. 权利要求 22 的方法，其中所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分以约 4mg/kg 的剂量施用。

25. 一种治疗受试者的骨关节炎的方法，包括向所述受试者皮下施用抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分，其中在向所述受试者施用所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分后实现选自下组的至少一种药代动力学特征：

(a) 约 3-30mgh/ml 的曲线下面积 (AUC)；

(b) 约 4- 约 30 天的半衰期；或

(c) 约 10- 约 65μg/ml 的峰浓度 (Cmax)，

从而治疗所述受试者的骨关节炎。

26. 权利要求 25 的方法，其中所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分以约 5mg/kg 的剂量施用。

27. 权利要求 25 的方法，其中所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分以约 4mg/kg 的剂量施用。

28. 一种治疗受试者的疼痛的方法，包括向所述受试者皮下施用抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分，其中在向所述受试者施用所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分后实现选自下组的至少一种药代动力学特征：

(a) 约 3- 约 30mgh/ml 的曲线下面积 (AUC)；

(b) 约 4- 约 30 天的半衰期；或

(c) 约 10- 约 65μg/ml 的峰浓度 (Cmax)，

从而治疗所述受试者的疼痛。

29. 权利要求 28 的方法，其中所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分以约 5mg/kg 的剂量施用。

30. 权利要求 28 的方法，其中所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分以约 4mg/kg 的剂量施用。

31. 权利要求 19-30 中任一项的方法，其中所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分是 E26.13-SS-X3 或其抗原结合部分。

32. 权利要求 31 的组合物，其中所述 E26.13-SS-X3 或其抗原结合部分包含含有 SEQ ID NO：212 所示的氨基酸序列的重链可变结构域。

33. 权利要求 31 的组合物，其中所述 E26.13-SS-X3 或其抗原结合部分包含含有 SEQ ID NO：215 所示的氨基酸序列的轻链可变结构域。

34. 权利要求 19-33 中任一项的方法，其中所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球

蛋白或其抗原结合部分施用一次。

35. 权利要求 19-33 中任一项的方法，其中所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分每周施用。

36. 权利要求 19-33 中任一项的方法，进一步包括施用另外的药剂。

37. 权利要求 36 的方法，其中所述另外的药剂选自治疗剂、成像剂、细胞毒性剂、血管生成抑制剂、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性片段、甲氨蝶呤、环孢菌素、雷帕霉素、FK506、可检测的标记或报道分子、TNF 拮抗剂、抗风湿药、肌肉松弛药、麻醉品、非甾体抗炎药 (NSAID)、镇痛药、麻醉药、镇静剂、局部麻醉药、神经肌肉阻滞剂、抗微生物药、抗银屑病药、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、红细胞生成素、免疫接种、免疫球蛋白、免疫抑制药、生长激素、激素替代药物、放射药物、抗抑郁药、抗精神病药、兴奋剂、哮喘药物、β 激动剂、吸入型类固醇、肾上腺素或类似物、细胞因子和细胞因子拮抗剂。

38. 包含抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分的分离的组合物，其中当以约 4mg/kg 或 5mg/kg 的剂量静脉内施用于受试者时，所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分表现出说明书、附图或表格中示出的任何药代动力学参数。

39. 包含抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分的分离的组合物，其中当以约 4mg/kg 或 5mg/kg 的剂量皮下施用于受试者时，所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分表现出说明书、附图或表格中示出的任何药代动力学参数。

40. 一种治疗或预防受试者的骨关节炎的方法，包括以约 4mg/kg 或 5mg/kg 的剂量向所述受试者静脉内施用抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分，其中在向所述受试者施用所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分后实现说明书、附图或表格中示出的至少一种药代动力学特征。

41. 一种治疗或预防受试者的骨关节炎的方法，包括以约 4mg/kg 或 5mg/kg 的剂量向所述受试者皮下施用抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分，其中在向所述受试者施用所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分后实现说明书、附图或表格中示出的至少一种药代动力学特征。

42. 一种治疗或预防受试者的疼痛的方法，包括以约 4mg/kg 或 5mg/kg 的剂量向所述受试者静脉内施用抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分，其中在向所述受试者施用所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分后实现说明书、附图或表格中示出的至少一种药代动力学特征。

43. 一种治疗或预防受试者的疼痛的方法，包括以约 4mg/kg 或 5mg/kg 的剂量向所述受试者皮下施用抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分，其中在向所述受试者施用所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分后实现说明书、附图或表格中示出的至少一种药代动力学特征。

IL-1 结合蛋白

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2011 年 11 月 21 日提交的美国临时申请 No. 61/562,245 和 2011 年 11 月 22 日提交的美国临时申请 No. 61/562,728 的优先权。本申请与 2010 年 12 月 21 日提交的美国临时申请 No. 61/425,701 和 2011 年 5 月 13 日提交的美国申请 No. 13/107,439 相关。前述申请的全部内容通过引用并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及 IL-1 结合蛋白，且具体地涉及其用于预防和 / 或治疗急性和慢性免疫疾病如类风湿性关节炎、骨关节炎、银屑病、多发性硬化和其它自身免疫性疾病的用途。

[0004] 发明背景

[0005] 细胞因子如白介素 -1(IL-1) 和肿瘤坏死因子 (TNF) 是由多种细胞 (如单核细胞和巨噬细胞) 产生的作为炎性过程的介质的分子。白介素 -1 是具有广泛生物学和生理学效应的细胞因子，所述效应包括发热、前列腺素合成 (在例如成纤维细胞、肌细胞和内皮细胞中)、T- 淋巴细胞活化和白介素 -2 产生。

[0006] IL-1 超家族的原始成员是 IL-1α、IL-1β 和 IL-1 受体拮抗剂 (IL-1Ra、IL-1RA、IL-1ra、IL-1Rα)。IL-1α 和 IL-1β 是参与对抗感染的免疫防御的促炎性细胞因子。IL-1Rα 是与 IL-1α 和 IL-1β 竞争受体结合的分子，从而阻断它们在免疫活化中的作用。近年来，已经见到其他分子加入 IL-1 超家族，包括 IL-18(见 Dinarello 等人，FASEB J.，8(15) :1314-3225(1994) ;Huising 等人，Dev. Comp. Immunol.，28(5) :395-413(2004)) 和另外 6 种与 IL-1α、IL-1β 或 IL-1RA 具有结构同源性的基因。这后 6 个成员命名为 IL1F5、IL1F6、IL1F7、IL1F8、IL1F9 和 IL1F10。因此，IL-1α、IL-1β 和 IL-1RA 已经分别重命名为 IL-1F1、IL-1F2 和 IL-1F3(见 Sims 等人，Trends Immunol.，22(10) :536-537(2001) ;Dunn 等人，Trends Immunol.，22(10) :533-536(2001))。已经描述了 IL-1 家族的另外的推定成员，称作 IL-33 或 IL-1F11，虽然这个名称未在 HGNC 基因家族命名数据库中正式接受。

[0007] IL-1α 和 IL-1β 均由巨噬细胞、单核细胞和树突细胞产生。它们形成身体对抗感染的炎性反应的重要部分。这些细胞因子增加内皮细胞上粘附因子的表达，以使白细胞 (对抗病原体的细胞) 能够移行至感染部位并重新设定下丘脑体温调节中枢，从而导致本身表现为发热的升高的体温。IL-1 因此称作内源性热原。升高的体温帮助身体的免疫系统对抗感染。IL-1 在血细胞生成的调节中也是重要的。周围组织中的 IL-1β 产生也与发热所关联的痛觉过敏 (增加的疼痛敏感性) 相关 (Morgan 等人，Brain Res.，1022(1-2) :96-100(2004))。大多数情况下，这两种形式的 IL-1 与相同的细胞受体结合。这种受体由两个相关但是不相同的亚单位组成，所述亚单位经由大多与某些其他受体共享的途径传递细胞内信号。它们包括先天免疫受体的 Toll 家族和 IL-18 的受体。IL-1α 和 IL-1β 也具有相似的生物学特性，包括诱导发热、慢波睡眠和嗜中性细胞增多、T- 淋巴细胞和 B- 淋巴细胞活化、成纤维细胞增殖、对某些细胞的细胞毒性、诱导胶原酶、合成肝脏急性期蛋白及增加集落刺激因子和胶原蛋白的产生。

[0008] 已经分离并且表达了编码这两种不同形式的 IL-1 的 cDNA；这些 cDNA 代表两种不同的基因产物，命名为 IL-1β (Auron 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，81：7907-7911(1984)) 和 IL-1α (Lomedico 等人，Nature，312：458-462(1984))。IL-1β 是由人单核细胞产生的在 mRNA 水平和蛋白质水平上均占优势的形式。这两种形式的人 IL-1 仅共有 26％的氨基酸同源性。尽管它们的多肽序列不同，这两种形式的 IL-1 具有结构相似性 (Auron 等人，J. Mol. Cell Immunol.，2：169-177(1985))，其原因在于氨基酸同源性局限于 IL-1 分子的离散区域。

[0009] IL-1α 和 IL-1β 作为前体肽产生。换言之，它们作为长蛋白质制得，所述长蛋白质随后经加工以释放较短的活性分子，该分子称作成熟蛋白。例如，在被胱天蛋白酶蛋白质家族的某个成员（称作胱天蛋白酶 -1 或白介素 -1 转化酶 (ICE)) 切割后从前 IL-1β 释放成熟的 IL-1β。人 IL-1 超家族每个成员的成熟形式的三维结构由产生桶形蛋白质的 12-14 条 β- 链组成。

[0010] 虽然自从发现这种关键的促炎性细胞因子起，已经在近二十年的工作中描述了针对 IL-1 的多种抗体，但是仍需要可有效介导或中和 IL-1 在炎性反应和自身免疫性病症中的活性以及用于检测样品和组织中的 IL-1β 的改进抗体。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明涉及结合人 IL-1α 和 IL-1β 的蛋白质。本发明的结合蛋白包括但不限于可以结合人 IL-1α 和 IL-1β 的抗体、其抗原结合部分和多价的、多特异性的结合蛋白如 DVD-Ig™ 结合蛋白。本发明还提供了制备和使用本文所述的 IL-1α 和 IL-1β 结合蛋白的方法以及各种组合物，所述组合物可用于检测样品中的 IL-1α 和 IL-1β 的方法中或用于治疗或预防个体中与 IL-1 活性相关或疑似与 IL-1 活性相关的病症的方法中。

[0013] 在一个方面，本发明提供了包含抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分的分离的组合物，其中当以约 5mg/kg 的剂量静脉内施用于受试者时，所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分表现出约 15-25mgh/ml 的曲线下面积 (AUC)，约 85-105mL/kg 的分布容积，约 7- 约 13 天的半衰期和 / 或约 0.1- 约 0.4ml/h/kg 的清除率。

[0014] 在另一个方面，本发明提供了包含抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分的分离的组合物，其中当以约 4mg/kg 的剂量静脉内施用于受试者时，所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分表现出约 10-20mgh/ml 的曲线下面积 (AUC)，约 75-95mL/kg 的分布容积，约 7- 约 13 天的半衰期和 / 或约 0.1- 约 0.4ml/h/kg 的清除率。

[0015] 在再另一个方面，本发明提供了包含抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分的分离的组合物，其中当以约 5mg/kg 的剂量静脉内施用于受试者时，所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分表现出约 15-30mgh/ml 的曲线下面积 (AUC)，约 45-75mL/kg 的分布容积，约 7- 约 13 天的半衰期和 / 或约 0.1- 约 0.4ml/h/kg 的清除率。

[0016] 在一个方面，本发明提供了包含抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分的分离的组合物，其中当以约 5mg/kg 的剂量皮下施用于受试者时，所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分表现出约 15- 约 30mgh/ml 的

曲线下面积 (AUC)，约 10- 约 30 天的半衰期和 / 或约 20- 约 40μg/ml 的峰浓度 (Cmax)。

[0017] 在另一个方面，本发明提供了包含抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分的分离的组合物，其中当以约 4mg/kg 的剂量皮下施用于受试者时，所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分表现出约 3- 约 12mgh/ml 的曲线下面积 (AUC)，约 7- 约 20 天的半衰期和 / 或约 10- 约 30μg/ml 的峰浓度 (Cmax)。

[0018] 在再另一个方面，本发明提供了包含抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分的分离的组合物，其中当以约 5mg/kg 的剂量皮下施用于受试者时，所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分表现出约 15- 约 30mgh/ml 的曲线下面积 (AUC)，约 4- 约 15 天的半衰期和 / 或约 40- 约 65μg/ml 的峰浓度 (Cmax)。

[0019] 在一个实施方式中，所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分是 E26.13-SS-X3 或其抗原结合部分。

[0020] 在一个实施方式中，所述 E26.13-SS-X3 或其抗原结合部分包含含有 SEQ ID NO：212 中所示的氨基酸序列的重链可变结构域。在另一个实施方式中，所述 E26.13-SS-X3 或其抗原结合部分包含含有 SEQ ID NO:215 中所示的氨基酸序列的轻链可变结构域。

[0021] 在一个实施方式中，所述组合物是药物组合物。

[0022] 本发明还提供用于治疗或预防受试者的骨关节炎的方法。该方法包括对所述受试者施用本发明的组合物，从而治疗或预防骨关节炎。

[0023] 在另一个方面，本发明还提供用于治疗或预防受试者的疼痛的方法。该方法包括对所述受试者施用本发明的组合物，从而治疗或预防疼痛。

[0024] 在再另一个方面，本发明还提供用于治疗或预防受试者的其中 IL-1 活性有害的病症的方法。该方法包括对所述受试者施用本发明的组合物，从而治疗或预防其中 IL-1 活性有害的所述病症。在一个实施方式中，所述病症选自糖尿病、葡萄膜炎、神经性疼痛、骨关节炎性疼痛、炎性疼痛、类风湿性关节炎、骨关节炎、幼年型慢性关节炎、脓毒性关节炎、莱姆病关节炎、银屑病关节炎、反应性关节炎、脊椎关节病、系统性红斑狼疮 (SLE)、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、炎性肠病、自身免疫性糖尿病、胰岛素依赖性糖尿病、甲状腺炎、哮喘、过敏性疾病、银屑病、皮炎、硬皮病、移植物抗宿主病、器官移植排异、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、肉瘤样病、动脉粥样硬化、弥漫性血管内凝血 (DIC)、川崎病、格雷夫斯氏病、肾病综合征、慢性疲劳综合征、韦格纳肉芽肿病、过敏性紫癜 (Henoch-Schoenlein purpurea)、肾显微性血管炎、慢性活动性肝炎、自身免疫性葡萄膜炎、脓毒性休克、中毒性休克综合征、脓毒病综合征、恶病质、传染病、寄生虫病、急性横贯性脊髓炎、亨廷顿舞蹈症、帕金森病、阿尔茨海默病、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、阿狄森病、I 型散发性多腺性缺陷症、II 型多腺性缺陷症 (Schmidt 综合征)、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、脱发、斑秃、血清阴性关节病、关节病、莱特尔病、银屑病性关节病、溃疡性结肠炎关节病、肠病性滑膜炎、衣原体病、耶尔森菌和沙门氏菌相关关节病、脊椎关节病、动脉粥样硬化病 / 动脉硬化、异位性变态反应、自身免疫性大疱病、寻常天疱疮、落叶型天疱疮、类天疱疮、线状 IgA 病、自身免疫性溶血性贫血、库姆氏阳性溶血性贫血、获得性恶性贫血、青少年恶性贫血、肌痛脑脊髓炎 /Royal Free 病、慢性粘膜皮肤念珠菌病、巨细胞动脉炎 (GCA)、原发硬化性肝炎、隐源性自身免疫性肝炎、获得性免疫缺陷综合征 (AIDS)、获得性免疫缺陷相关性疾病、乙型肝炎、丙型肝炎、寻常

变异型免疫缺陷（寻常变异型低丙种球蛋白血症）、扩张型心肌病、女性不育、卵巢衰竭、早发卵巢衰竭、纤维化肺病、隐原性纤维化肺泡炎、炎症后间质性肺病、间质性肺炎、结缔组织病相关间质性肺病、混合型结缔组织病相关性肺病、系统性硬化症相关间质性肺病、类风湿性关节炎相关间质性肺病、系统性红斑狼疮相关肺病；皮肌炎／多肌炎相关肺病、舍格伦病相关肺病、强直性脊柱炎相关肺病、血管炎弥散性肺病、含铁血黄素沉着症相关肺病、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、淋巴细胞浸润性肺病、感染后间质性肺病、痛风性关节炎、自身免疫性肝炎、1 型自身免疫性肝炎（经典自身免疫性或狼疮性肝炎）、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症、B 型胰岛素抵抗伴黑棘皮病、甲状旁腺功能减退、骨关节病、原发性硬化性胆管炎、1 型银屑病、2 型银屑病、特发性白细胞减少症、自身免疫性中性粒细胞减少症、肾病 NOS、肾小球性肾炎、肾显微性血管炎、莱姆病、盘状红斑狼疮、特发性男性不育、一氧化氮相关男性不育、精子自身免疫性、多发性硬化（全部亚型，包括原发进展型、继发进展型、复发缓解型）、交感性眼炎、继发于结缔组织病的肺性高血压、肺出血肾炎综合征、结节性多发性动脉炎的肺部表现、急性风湿热、类风湿性脊柱炎、斯蒂尔病、系统性硬化症、舍格伦综合征、塔卡亚萨病／动脉炎、自身免疫性血小板减少症 (AITP)、特发性血小板减少症、自身免疫性甲状腺病、甲状腺功能亢进症、甲状腺肿性自身免疫性甲状腺功能减退症（桥本氏病）、萎缩性自身免疫性甲状腺功能减退症、原发性粘液性水肿、晶状体源性葡萄膜炎、原发性血管炎、白斑症、急性肝病、慢性肝病、酒精性肝硬化、酒精诱导肝损伤、胆汁郁积、特异体质性肝病、药物诱导的肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、变态反应、B 组链球菌 (GBS) 感染、精神障碍（例如，抑郁和精神分裂症）、Th2 型和 Th1 型介导的疾病、急性和慢性疼痛（不同形式的疼痛）、癌症（如肺癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌和直肠癌）、造血系统恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤、无 β 脂蛋白血症、肢端发绀症、急性和慢性寄生性或感染性过程、急性白血病、急性成淋巴细胞性白血病 (ALL)、T- 细胞 ALL、FAB ALL、急性髓性白血病 (AML)、急性或慢性细菌性感染、急性胰腺炎、急性肾衰竭、腺癌、心房异位搏动、AIDS 痴呆综合征、酒精诱导的肝炎、变应性结膜炎、变应性接触性皮炎、过敏性鼻炎、同种异体移植排斥、α -1 抗胰蛋白酶缺乏症、肌萎缩侧索硬化、贫血、心绞痛、前角细胞变性、抗 CD3 疗法、抗磷脂综合征、抗受体超敏反应、主动脉和外周动脉瘤、主动脉壁夹层形成、动脉高血压、动脉硬化、动静脉瘘、共济失调、心房纤颤（持久性或阵发性）、心房扑动、房室传导阻滞、B 细胞淋巴瘤、骨移植排斥、骨髓移植 (BMT) 排斥、束支传导阻滞、伯基特淋巴瘤、烧伤、心律不齐、心脏眩晕综合征、心脏肿瘤、心肌病、心肺分流炎症反应、软骨移植排斥、小脑皮质变性、小脑疾病、紊乱性或多灶性房性心动过速、化疗相关病症、慢性粒细胞性白血病 (CML)、慢性酒精中毒、慢性炎性病理、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、慢性阻塞性肺病 (COPD)、慢性水杨酸盐中毒、结直肠癌、充血性心力衰竭、结膜炎、接触性皮炎、肺原性心脏病、冠状动脉病、克－雅氏病、培养阴性脓毒症、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、皮炎、皮肤病状况、糖尿病、糖尿病性动脉硬化病、弥漫性 Lewy 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 多巴胺受体的药物引起的药物诱导型运动障碍、药物过敏、湿疹、脑脊髓炎、心内膜炎、内分泌病、会厌炎、Epstein-Barr 病毒感染、红斑性肢痛病、锥体束外及小脑病、家族性嗜血细胞性淋巴组织细胞增多症、胎儿胸腺植入物排斥、弗里德赖希共济失调、功能性外周动脉病、真菌性

败血症、气性坏疽、胃溃疡、肾小球肾炎、任何器官或组织的移植排斥、革兰氏阴性脓毒症、革兰氏阳性脓毒症、归因于胞内生物体的肉芽肿、毛细胞白血病、哈－斯二氏病、桥本氏甲状腺炎、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／溶栓性血小板减少性紫癜、出血、甲型肝炎、希氏束心率失常、HIV 感染 /HIV 神经病、霍奇金病、多动性运动障碍、超敏反应、过敏性肺炎、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、特发性阿狄森病、特发性肺纤维化 (IPF)、抗体介导的细胞毒性、无力、婴儿脊髓性肌萎缩、主动脉炎症、甲型流感、电离辐射暴露、虹膜睫状体炎／葡萄膜炎／视神经炎、局部缺血－再灌注损伤、缺血性发作、幼年型类风湿关节炎、幼年期脊髓性肌萎缩、卡波西肉瘤、肾移植排斥、军团菌病、利什曼病、麻疯病、皮质脊髓系统的病变、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、代谢综合征偏头痛、特发性偏头痛、线粒体多系统障碍、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、鸟胞内分枝杆菌病、结核分枝杆菌病、骨髓增生异常综合征、心肌梗死、心肌缺血性病症、鼻咽癌、新生儿慢性肺病、肾炎、肾病、神经变性病、神经原性 I 肌萎缩、中性粒细胞减少性发热、非霍奇金淋巴瘤、腹主动脉及其分支闭塞、闭塞性动脉病、OKT3®疗法、睾丸炎／附睾炎、睾丸炎／输精管复通过程、器官巨大症、骨质疏松症、胰移植排斥、胰腺癌、副肿瘤性综合征／恶性肿瘤的高钙血症、甲状旁腺移植排斥、盆腔炎性疾病、常年性鼻炎、心包疾病、外周动脉粥样硬化性疾病、周围血管病、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 心切开术后综合征、先兆子痫、进行性核上麻痹、原发性肺动脉高压、放射疗法、雷诺氏现象、雷诺病、雷夫苏姆病、规则性窄 QRS 心动过速、肾血管性高血压、再灌注损伤、限制型心肌病、肉瘤、老年舞蹈症、Lewy 体型老年性痴呆、血清阴性关节病、休克、镰状细胞性贫血、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、特殊心率失常、脊髓性共济失调、脊髓小脑退行性变、链球菌性肌炎、小脑结构性损伤、亚急性硬化性全脑炎、晕厥、心血管系统梅毒、全身过敏、全身性炎性反应综合征、全身发病型幼年类风湿性关节炎、毛细血管扩张症、闭塞性血栓性脉管炎、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、不稳定型心绞痛、尿毒症、尿脓毒病、荨麻疹、心脏瓣膜病、静脉曲张、血管炎、静脉病、静脉血栓形成、心室纤颤、病毒和真菌感染、病毒性脑炎／无菌性脑膜炎、病毒相关噬血细胞综合征、韦－科二氏综合征、肝豆状核变性、任何器官或组织的异体移植排斥、急性冠状动脉综合征、急性特发性多神经炎、急性炎性脱髓鞘多发性神经根性神经病、急性局部缺血、成人斯蒂尔病、斑秃、过敏反应、抗磷脂抗体综合征、再生障碍性贫血、动脉硬化、异位性湿疹、异位性皮炎、自身免疫性皮炎、与链球菌感染相关的自身免疫病症、自身免疫性肠病、自身免疫性听力损失、自身免疫性淋巴细胞增生综合征 (ALPS)、自身免疫性心肌炎、自身免疫性早发卵巢衰竭、眼睑炎、支气管扩张症、大疱性类天疱疮、心血管疾病、灾难性抗磷脂综合征、乳糜泻、颈椎病、慢性局部缺血、瘢痕性类天疱疮、存在多发性硬化风险的临床孤立的综合征 (CIS)、结膜炎、儿童期发病精神障碍、泪囊炎、皮肌炎、糖尿病性视网膜病变、椎间盘突出、椎间盘脱出、药物诱导的免疫性溶血性贫血、心内膜炎、子宫内膜异位症、眼内炎、巩膜外层炎、多形性红斑、重型多形性红斑、妊娠性类天疱疮、格巴二氏综合征 (GBS)、枯草热、休斯

氏综合征、特发性帕金森病、特发性间质性肺炎、IgE 介导的变态反应、免疫性溶血性贫血、包涵体肌炎、感染性眼部炎性疾病、炎性脱髓鞘性疾病、炎性心脏病、炎性肾疾病、虹膜炎、角膜炎、干燥性角结膜炎、库斯毛尔病或 Kussmaul-Meier 病、兰德里麻痹、郎格罕氏细胞组织细胞增多症、网状青斑、黄斑变性；显微小血管炎、白赫铁列夫症、运动神经元病、粘膜类天疱疮、多器官功能衰竭、重症肌无力、骨髓增生异常综合征、心肌炎、神经根障碍、神经病、非甲非乙肝炎、视神经炎、骨质溶解、少关节 JRA、外周动脉闭塞性疾病 (PAOD)、外周血管疾病 (PVD)、外周动脉病 (PAD)、静脉炎、结节性多发性动脉炎（或结节性动脉周围炎）、多软骨炎、风湿性多肌痛、白发病、多关节 JRA、多内分泌腺缺陷综合征、多肌炎、风湿性多肌痛 (PMR)、泵后综合征、原发性帕金森症、继发性帕金森症、前列腺炎、单纯红细胞再生障碍、原发性肾上腺功能不足、复发型视神经脊髓炎、再狭窄、风湿性心脏病、SAPHO（滑膜炎、痤疮、脓疱病、骨肥厚和骨炎）、继发性淀粉样变性、休克肺、巩膜炎、坐骨神经痛、继发性肾上腺功能不足、硅氧烷相关结缔组织病、角质层下脓疱性皮肤病、关节强硬性脊椎炎、斯约二氏综合征 (SJS)、全身性炎性反应综合征、颞动脉炎、弓形体性视网膜炎、毒性表皮坏死松解症、横贯性脊髓炎、TRAPS(1 型肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 相关周期性综合征）、B 型胰岛素抵抗伴黑棘皮病、I 型变态反应、II 型糖尿病、荨麻疹、普通间质性肺炎 (UIP)、春季结膜炎、病毒性视网膜炎、伏格特－小柳－原田三氏综合征 (VKH 综合征）、湿性黄斑变性、伤口愈合、耶尔森菌和沙门氏菌相关关节病。

[0025] 在本发明的方法中，所述组合物可以施用一次或每周施用。在一些实施方式中，所述方法进一步包括施用另外的药剂。在一个实施方式中，所述另外的药剂选自治疗剂、成像剂、细胞毒性剂、血管生成抑制剂、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性片段、甲氨蝶呤、环孢菌素、雷帕霉素、FK506、可检测的标记或报道分子、TNF 拮抗剂、抗风湿药、肌肉松弛药、麻醉品、非甾体抗炎药 (NSAID)、镇痛药、麻醉药、镇静剂、局部麻醉药、神经肌肉阻滞剂、抗微生物药、抗银屑病药、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、红细胞生成素、免疫接种、免疫球蛋白、免疫抑制药、生长激素、激素替代药物、放射药物、抗抑郁药、抗精神病药、兴奋剂、哮喘药物、β 激动剂、吸入型类固醇、肾上腺素或类似物、细胞因子和细胞因子拮抗剂。

[0026] 在一个方面，本发明提供治疗受试者的骨关节炎的方法。该方法包括向所述受试者静脉内施用抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分，其中在向所述受试者施用所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分后实现选自下组的至少一种药代动力学特征：约 10-30mgh/ml 的曲线下面积 (AUC)，约 45-105mL/kg 的分布容积，约 7- 约 13 天的半衰期或约 0.1- 约 0.4ml/h/kg 的清除率，从而治疗所述受试者的骨关节炎。

[0027] 所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分可以以约 5mg/kg 的剂量或约 4mg/kg 的剂量施用。

[0028] 在另一个方面，本发明提供了治疗受试者的疼痛的方法，包括向所述受试者静脉内施用抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分，其中在向所述受试者施用所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分后实现选自下组的至少一种药代动力学特征：约 10-30mgh/ml 的曲线下面积 (AUC)，约 45-105mL/kg 的分布容积，约 7- 约 13 天的半衰期或约 0.1- 约 0.4ml/h/kg 的清除率，从而治疗所述受试者的疼

痛。

[0029] 所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分可以以约 5mg/kg 的剂量或约 4mg/kg 的剂量施用。

[0030] 在一个方面，本发明提供了治疗受试者的骨关节炎的方法。该方法包括向所述受试者皮下施用抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分，其中在向所述受试者施用所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分后实现选自下组的至少一种药代动力学特征：约 3-30mgh/ml 的曲线下面积 (AUC)，约 4- 约 30 天的半衰期或约 10- 约 65μg/ml 的峰浓度 (Cmax)，从而治疗所述受试者的骨关节炎。

[0031] 所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分可以以约 5mg/kg 的剂量或约 4mg/kg 的剂量施用。

[0032] 在另一个方面，本发明提供了治疗受试者的疼痛的方法，包括向所述受试者皮下施用抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分，其中在向所述受试者施用所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分后实现选自下组的至少一种药代动力学特征：约 3- 约 30mgh/ml 的曲线下面积 (AUC)，约 4- 约 30 天的半衰期或约 10- 约 65μg/ml 的峰浓度 (Cmax)，从而治疗所述受试者的疼痛。

[0033] 所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分可以以约 5mg/kg 的剂量或约 4mg/kg 的剂量施用。

[0034] 在一个实施方式中，所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分是 E26.13 或其抗原结合部分。在一个实施方式中，所述 E26.13-SS-X3 或其抗原结合部分包含含有 SEQ ID NO：212 所示的氨基酸序列的重链可变结构域。在另一个实施方式中，所述 E26.13-SS-X3 或其抗原结合部分包含含有 SEQ ID NO：215 所示的氨基酸序列的轻链可变结构域。

[0035] 所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分可以施用一次或每周施用。

[0036] 在一些实施方式中，所述方法进一步包括施用另外的药剂。在一个实施方式中，所述另外的药剂选自治疗剂、成像剂、细胞毒性剂、血管生成抑制剂、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性片段、甲氨蝶呤、环孢菌素、雷帕霉素、FK506、可检测的标记或报道分子、TNF 拮抗剂、抗风湿药、肌肉松弛药、麻醉品、非甾体抗炎药 (NSAID)、镇痛药、麻醉药、镇静剂、局部麻醉药、神经肌肉阻滞剂、抗微生物药、抗银屑病药、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、红细胞生成素、免疫接种、免疫球蛋白、免疫抑制药、生长激素、激素替代药物、放射药物、抗抑郁药、抗精神病药、兴奋剂、哮喘药物、β 激动剂、吸入型类固醇、肾上腺素或类似物、细胞因子和细胞因子拮抗剂。

[0037] 本发明还提供了包含抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分的分离的组合物，其中当以约 4mg/kg 或 5mg/kg 的剂量静脉内施用于受试者时，所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分表现出说明书、附图或表格中示出的任何药代动力学参数。

[0038] 在另一个方面，本发明提供了包含抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分的分离的组合物，其中当以约 4mg/kg 或 5mg/kg 的剂量皮下施用于受试者时，所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分表现出说明书、附图

或表格中示出的任何药代动力学参数。

[0039] 在一个方面，本发明提供了治疗或预防受试者的骨关节炎的方法。该方法包括以约 4mg/kg 或 5mg/kg 的剂量向所述受试者静脉内施用抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分，其中在向所述受试者施用所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分后实现说明书、附图或表格中示出的至少一种药代动力学特征。

[0040] 在另一个方面，本发明提供了治疗或预防受试者的骨关节炎的方法。该方法包括以约 4mg/kg 或 5mg/kg 的剂量向所述受试者皮下施用抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分，其中在向所述受试者施用所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分后实现说明书、附图或表格中示出的至少一种药代动力学特征。

[0041] 在另一个方面，本发明提供了治疗或预防受试者的疼痛的方法。该方法包括以约 4mg/kg 或 5mg/kg 的剂量向所述受试者静脉内施用抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分，其中在向所述受试者施用所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分后实现说明书、附图或表格中示出的至少一种药代动力学特征。

[0042] 在另一个方面，本发明提供了治疗或预防受试者的疼痛的方法。该方法包括以约 4mg/kg 或 5mg/kg 的剂量向所述受试者皮下施用抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分，其中在向所述受试者施用所述抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分后实现说明书、附图或表格中示出的至少一种药代动力学特征。

[0043] 附图简要说明

[0044] 图 1 是显示雄性 Balb/c 小鼠中 5mg/kg 静脉内或皮下剂量后 E26.13-SS-X3 的平均 (±SD) 血清浓度的曲线图。

[0045] 图 2 是显示雄性 Sprague Dawley 大鼠中 4mg/kg 静脉内或皮下剂量后 E26.13-SS-X3 的平均 (±SD) 血清浓度的曲线图。

[0046] 图 3 是显示雌性食蟹猴中单次 5mg/kg 静脉内或皮下剂量后 E26.13-SS-X3 的血清浓度的曲线图。

[0047] 图 4 是显示 Balb/c 小鼠中单次 5mg/kg 皮下剂量后单个动物 E26.13-SS-X3 血清浓度 - 时间分布的曲线图。

[0048] 图 5 是显示 Balb/c 小鼠中单次 5mg/kg 皮下剂量后单个动物 E26.13-SS-X3 血清浓度 - 时间分布的曲线图。

[0049] 图 6 是显示 Sprague Dawley 大鼠中单次 5mg/kg 皮下剂量后单个动物 E26.13-SS-X3 血清浓度 - 时间分布的曲线图。

[0050] 图 7 是显示 Sprague Dawley 大鼠中单次 5mg/kg 皮下剂量后单个动物 E26.13-SS-X3 血清浓度 - 时间分布的曲线图。

[0051] 图 8 是显示食蟹猴中单次 5mg/kg 皮下剂量后单个动物 E26.13-SS-X3 血清浓度 - 时间分布的曲线图。

[0052] 图 9 是显示食蟹猴中单次 5mg/kg 皮下剂量后单个动物 E26.13-SS-X3 血清浓度 - 时间分布的曲线图。

[0053] 图 10 显示 Biacore 分析的结果，其证明 E26.13-SS-X3 同时结合 IL-1α 和 IL-1β

两者。

[0054] 图 11 显示食蟹猴中 E26.13-SS-X3 的多剂量药代动力学分析的结果。

[0055] 本发明的详细描述

[0056] 本发明涉及 IL-1β 结合蛋白，包括但不限于结合 IL-1β 的抗 IL-1β 抗体或其抗原结合部分、以及结合 IL-1β 和另一靶标的多价、多特异性结合蛋白（如 DVD-Ig™）。本发明的各个方面涉及抗体和抗体片段、DVD-Ig 结合蛋白及其药物组合物，以及用于制备此类 IL-1β 结合蛋白（包括抗体、DVD-Ig 结合蛋白及其片段）的核酸、重组表达载体和宿主细胞。本发明也包括使用本发明的 IL-1β 结合蛋白来检测人 IL-1β，在体外或在体内抑制人 IL-1β 和调节基因表达的方法。

[0057] 本发明还包括能够与本文所述的 IL-1β 结合蛋白竞争的任何结合蛋白或抗体。

[0058] 除非本文另外定义，否则与本发明相关使用的科学和技术术语应当具有本领域普通技术人员通常理解的含义。所述术语的含义和范围应当是清楚的，然而，在任何潜在模糊性的情况下，本文中提供的定义优先于任何字典定义或外在定义。另外，除非上下文另有要求，否则单数术语应当包括复数，并且复数术语应当包括单数。在本申请中，除非另外声明，否则“或”的使用表示“和 / 或”。另外，术语“包括”以及其他形式（如“包括了”和“所包括的”）的使用不是限制性的。另外，除非另有具体声明，否则如“要素”或“组分”的术语既包括构成一个单元的要素和组分，也包括构成多于一个亚单元的要素和组分。

[0059] 通常，与本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学及蛋白质和核酸化学和杂交相联系所使用的专门术语及其技术是本领域熟知的和通常使用的那些。除非另外说明，否则本发明的方法和技术通常根据本领域熟知的和如本说明书通篇范围内所引用及讨论的各种一般和特定参考文献中所述的常规方法来实施。酶促反应和纯化技术根据制造商的说明书（如本领域中通常所完成或如本文所述的）来实施。与本文所述的分析化学、合成有机化学及医学和药物化学相联系所使用的专门术语及实验室程序和技术是本领域熟知的和通常使用的那些。标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送及患者的治疗。

[0060] 为了可以更容易地理解本发明，下文定义选择的术语。

[0061] 术语“AUC”或“曲线下面积”与清除相关。较高的清除率与较小的 AUC 关联，而较低的清除率与较大的 AUC 值关联。较大的 AUC 值表示较慢的清除率。

[0062] 在一个实施方式中，抗 -IL-1α / β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分（例如，E26.13-SS-X3 或其抗原结合部分）静脉内施用并表现出约 15- 约 30mgh/mL 的曲线下面积 (AUC)、约 10- 约 20mgh/mL 的 AUC、约 15- 约 25mgh/mL 的 AUC 及约 15mgh/mL、约 16、约 17、约 18、约 19、约 20、约 21、约 22、约 23、约 24、约 25、约 26、约 27、约 62850、约 29 或约 30mgh/mL 的 AUC。上述 AUC 中间的值和范围也意图是本发明的部分。

[0063] 在一个实施方式中，抗 -IL-1α / β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分（例如，E26.13-SS-X3 或其抗原结合部分）皮下施用并表现出约 15- 约 30mgh/mL 的曲线下面积 (AUC)、约 3- 约 30mgh/mL 的 AUC、约 15- 约 30mgh/mL 的 AUC 或约 3- 约 12mgh/mL 的 AUC 及约 3mgh/mL、约 4、约 5、约 6、约 7、约 8、约 9、约 10、约 11、约 12、约 13、约 14、约 15、约 16、约 17、约 18、约 19、约 20、约 21、约 22、约 23、约 24、约 25、约 26、约 27、约 62850、约 29 或约 30mgh/mL 的 AUC。上述 AUC 中间的值和范围也意图是本发明的部分。

[0064] 如本文中所用的，术语“分布容积”是用于量化药物如抗 IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分在给药后在血浆和身体的其余部分之间的分布的术语。分布容积是其中药物的总量需要均匀分布以产生所需的血药浓度的理论容积。

[0065] 在一个实施方式中，抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分（例如，E26.13-SS-X3 或其抗原结合部分）静脉内施用并表现出约 45- 约 105mL/kg、约 85- 约 105mL/kg、约 75- 约 95mL/kg 或约 45- 约 75mL/kg 的分布容积，约 45、约 50、约 55、约 60、约 65、约 70、约 75、约 80、约 85、约 90、约 95、约 100 或约 105mL/kg 的分布容积。上述分布容积中间的值和范围也意图是本发明的部分。

[0066] 如本文中所用的，术语“半衰期”(T1/2) 是用于量化药物的一半剂量被受试者排泄所花费的时间的术语。

[0067] 在一个实施方式中，抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分（例如，E26.13-SS-X3 或其抗原结合部分）静脉内施用并具有约 7-13 天或约 7 天和约 8 天、约 9 天、约 10 天、约 11 天、约 12 天或约 13 天的半衰期。上述半衰期中间的值和范围也意图是本发明的部分。

[0068] 在一个实施方式中，抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分（例如，E26.13-SS-X3 或其抗原结合部分）皮下施用并具有约 4-30 天、约 4-15 天、约 7-20 天或约 10-30 天的半衰期，或者约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 8 天、约 9 天、约 10 天、约 11 天、约 12 天、约 13 天、约 14 天、约 15 天、约 16 天、约 17 天、约 18 天、约 19 天、约 20 天、约 21 天、约 22 天、约 23 天、约 24 天、约 25 天、约 26 天、约 27 天、约 28 天、约 29 天或约 30 天的半衰期。上述半衰期中间的值和范围也意图是本发明的部分。

[0069] 如本文中所用的，术语“清除率”与 AUC 或曲线下面积相关。较高的清除率与较小的 AUC 关联，而较低的清除率与较大的 AUC 值关联。较大的 AUC 值代表较慢的清除率。

[0070] 在一个实施方式中，抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分（例如，E26.13-SS-X3 或其抗原结合部分）静脉内施用并表现出约 0.08- 约 0.2ml/h/kg、约 0.08- 约 0.15ml/h/kg、约 0.1- 约 0.4ml/h/kg 或者约 0.08、约 0.09、约 0.1、约 0.11、约 0.12、约 0.13、约 0.14、约 0.15、约 0.16、约 0.17、约 0.18、约 0.19、约 2.0、约 2.1、约 2.2、约 2.3、约 2.4、约 2.5、约 2.6、约 2.7、约 2.8、约 2.9、约 3、约 3.1、约 3.2、约 3.3、约 3.4、约 3.5、约 3.6、约 3.7、约 3.8、约 3.9、约 4、约 4.1、约 4.2、约 4.3 或约 4.4mL/h/kg 的清除率。上述清除率中间的值和范围也意图是本发明的部分。

[0071] 术语“C_{max}”是指在药剂施用后受试者中观察到的该药剂的最大或峰值血清或血浆浓度。

[0072] 在一个实施方式中，抗 -IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白或其抗原结合部分（例如，E26.13-SS-X3 或其抗原结合部分）皮下施用并表现出约 10- 约 65μg/mL 的最大血清浓度 (C_{max})、约 10- 约 30μg/ml 的峰浓度 (C_{max})、约 20- 约 40μg/mL 的 C_{max} 或约 40- 约 65μg/ml 的峰浓度 (C_{max})，或者约 10μg/mL、约 11、约 12、约 13、约 14、约 15、约 16、约 17、约 18、约 19、约 20、约 21、约 22、约 23、约 24、约 25、约 26、约 27、约 28、约 29、约 30、约 31、约 32、约 33、约 34、约 35、约 36、约 37、约 38、约 39、约 40、约 41、约 42、约 43、约 44、约 45、约 46、约 47、约 48、约 49、约 50、约 51、约 52、约 53、约 54、约 55、约 56、约 57、约 58、约 59、约 60、约 61、约 62、约 63、约 64 或约 65μg/ml 的 C_{max}。上述 C_{max} 中间的值和范围也意图是

本发明的部分。

[0073] 术语“T_{max}”是指 C_{max} 出现的时间。

[0074] 术语“生物利用度”或“F%”是指在施用给定剂型后被吸收和进入系统循环中的剂量分数或百分比。

[0075] 术语“多肽”指氨基酸的任何聚合链。术语“肽”和“蛋白质”可与术语多肽互换地使用，并且也指氨基酸的聚合链。术语“多肽”包括原始或人工的蛋白质、蛋白质片段和蛋白质序列的多肽类似物。多肽可以是单体的或多聚的。术语“多肽”包括其片段和变体（包括变体的片段），除非与上下文相矛盾。对于抗原性多肽，多肽的片段任选地含有多肽的至少一个连续或非线性表位。可以使用本领域的普通技术来证实该至少一个表位片段的精确边界。所述片段包含至少约 5 个连续氨基酸，例如至少约 10 个连续氨基酸、至少约 15 个连续氨基酸或至少约 20 个连续氨基酸。多肽的变体如本文所述。

[0076] 术语“分离的蛋白质”或“分离的多肽”是这样的蛋白质或多肽：根据其起源或衍生来源不与在其天然状态下伴随它的天然相关组分关联；基本上不含来自相同物种的其它蛋白质；由来自不同物种的细胞表达；或在自然界中不存在。因此，化学合成的或在与其天然起源的细胞不同的细胞系统中合成的多肽将是与其天然相关组分“分离的”。也可以使用本领域熟知的蛋白质纯化技术，通过分离使蛋白质基本上不含天然相关组分。

[0077] 术语“回收”指通过分离（例如使用本领域熟知的蛋白质纯化技术）使化学物质（如多肽）基本上不含天然相关组分的过程。

[0078] 术语“人 IL-1α”（本文中缩写为 hIL-1α 或 IL-1α）包括参与各种免疫反应、炎性过程和血细胞生成的多效细胞因子。例如，IL-1α 包括由活化的巨噬细胞产生的人细胞因子；它通过诱导 IL-2 释放、B 细胞成熟和增殖以及成纤维细胞生长因子活性来刺激胸腺细胞增殖。该术语人 IL-1α 意在包括可以通过标准重组表达方法来制备的重组人 IL-1α (rh IL-1α)。

[0079] 术语“人 IL-1β”（本文中缩写为 hIL-1β 或 IL-1β）包括参与各种免疫反应、炎性过程和血细胞生成的多效细胞因子。术语人 IL-1β 包括可以通过标准重组表达方法来制备的重组人 IL-1β (rhIL-1β)。

[0080] 表 1 中显示人 IL-1α 和 IL-1β 的氨基酸序列。

[0081] 表 1. 人 IL-1α 和人 IL-1β 的序列

[0082]

蛋白质	序列名称	序列
		123456789012345678901234567890
人成熟 IL-1α	SEQ ID NO:1	SAPFSFLSNVKYNFMRIIKYEFILNDALNQ SIIRANDQYLTAAALHNLDEAVKFDMGAYK SSKDDAKITVILRISKTQLYVTAQDEDQPV LLKEMPEIPKTITGSETNLLFFWETHGTKN YFTSVAHPNLFIATKQDYWVCLAGGPPSIT DFQILENQA
人成熟 IL-1β	SEQ ID NO:2	APVRSLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALH LQGQDMEQQVVFSMSFVQGEESNDKIPVAL GLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNY PKKKMEKRFVFNKIEINNKLEFESAQFPNW YISTSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQF VSS

[0083] 术语“生物学活性”指 IL-1 细胞因子（例如，IL-1α 和 / 或 IL-1β）的全部固有生物学性质。IL-1α 和 IL-1β 的生物学性质包括但不限于结合 IL-1 受体。

[0084] 在涉及抗体、蛋白质或肽与第二化学物质的相互作用时，术语“特异性结合”或“特异性地结合”意思是该相互作用依赖于所述化学物质上特定结构（例如，抗原决定簇或表位）的存在；例如，抗体识别特定的蛋白质结构并且与之结合，但不是一般地与蛋白质结合。若抗体对表位“A”是特异性的，则含有表位 A 的分子（或者游离的、未标记的 A）在含有标记的“A”和该抗体的反应中的存在将减少标记 A 与抗体结合的量。

[0085] 术语“抗体”广义地指由 4 条多肽链（两条重 (H) 链和两条轻 (L) 链）组成的任何免疫球蛋白 (Ig) 分子或保留 Ig 分子的必要表位结合特征的其任何功能性片段、突变体、变体或衍生物。此类突变体、变体或衍生物抗体形式是本领域已知的。下文讨论其非限制性实施方式。

[0086] 在全长抗体中，每条重链由重链可变区（本文中缩写为 HCVR 或 VH）和重链恒定区组成。重链恒定区由 3 个结构域组成：CH1、CH2 和 CH3。每条轻链由轻链可变区（本文中缩写为 LCVR 或 VL）和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 (CL) 组成。VH 和 VL 区可以进一步细分为超变区，称为互补决定区 (CDR)，其散置于更保守的区域（称为框架区 (FR)）。每个 VH 和 VL 由从氨基端至羧基端按以下顺序排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成：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）、类别（例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2）或亚类。

[0087] 术语“Fc 区”用来定义免疫球蛋白重链的 C 末端区域，其可以通过木瓜蛋白酶消化完整的抗体而产生。Fc 区可以是天然序列 Fc 区或变体 Fc 区。免疫球蛋白的 Fc 区通常包含 2 个恒定结构域 (CH2 结构域和 CH3 结构域），且任选地包含 CH4 结构域。替换 Fc 部分中的氨基酸残基以改变抗体效应子功能是本领域已知的 (Winter 等人，美国专利

No.5,648,260 和 5,624,821)。抗体的 Fc 部分介导几种重要的效应子功能,例如,细胞因子诱导、ADCC、吞噬作用、补体依赖性细胞毒性 (CDC) 及抗体和抗原 - 抗体复合物的半衰期 / 清除率。在一些情况下,这些效应子功能对于治疗性抗体是需要的,但是在其他情况下可能是不必要的或甚至有害的,这取决于治疗目标。某些人 IgG 同种型 (尤其 IgG1 和 IgG3) 通过分别与 FcγR 和补体 C1q 结合而介导 ADCC 和 CDC。新生儿 Fc 受体 (FcRn) 是决定抗体的循环半衰期的关键成分。在又另一个实施方式中,抗体的恒定区 (例如抗体的 Fc 区) 中的至少一个氨基酸残基被替换,以致改变该抗体的效应子功能。免疫球蛋白的两条相同重链的二聚化由 CH3 结构域的二聚化介导并且通过铰链区内的二硫键使其稳定 (Huber 等人, Nature,264 :415-420(1976) ;Thies 等人, J.Mol.Biol.,293 :67-79(1999))。铰链区内的半胱氨酸残基阻止重链 - 重链二硫键的突变将使 CH3 结构域的二聚化失稳定。已经鉴定了负责 CH3 二聚化的残基 (Dall'Acqua 等人, Biochemistry,37 :9266-9273(1998))。因此,有可能产生单价半 -Ig。有趣地,已经在自然界中发现 IgG 和 IgA 亚类的这些单价半 Ig 分子 (Seligmann 等人,Ann.Immunol.,129C :855-870(1978) ;Biewenga 等人,Clin.Exp.Immunol.,51 :395-400(1983))。已经确定 FcRn ∶ Ig Fc 区的化学计量比是 2 ∶ 1(West 等人, Biochemistry,39 :9698-9708(2000)),并且半 Fc 足以介导 FcRn 结合 (Kim 等人, Eur.J.Immunol.,24 :542-548(1994))。破坏 CH3 结构域二聚化的突变可以不对其 FcRn 结合造成更大的不利影响,因为对 CH3 二聚化重要的残基位于 CH3b 折叠结构的内部界面上,而负责 FcRn 结合的区域位于 CH2-CH3 结构域的外部界面上。然而,半 Ig 分子可以在组织渗透方面具有某种优点,这归因于其尺寸比正规抗体更小。在一个实施方式中,将本发明结合蛋白的恒定区 (例如 Fc 区) 中的至少一个氨基酸残基替换,以使得破坏重链的二聚化,从而产生半 DVD Ig 分子。IgG 的抗炎活性完全依赖于 IgG Fc 片段的 N- 连接聚糖的唾液酸化。已确定抗炎活性的精确聚糖要求,以致可以产生适当的 IgG1Fc 片段,从而生成效力极大增强的完全重组的唾液酸化 IgG1 Fc(Anthony 等人, Science,320 :373-376(2008))。

[0088] 术语抗体的“抗原结合部分”指抗体中保留与抗原 (例如, hIL-1β) 特异性结合的能力的一个或更多个片段。已经显示,可以由全长抗体的片段来实施抗体的抗原结合功能。此类抗体实施方式也可以是双特异性的、双重特异性的或多特异性的形式,从而与两种或更多种不同抗原 (例如, hIL-1β 和不同的抗原分子,如 hIL-1β 和 hIL-1α) 特异性结合。在术语抗体的“抗原结合部分”内所包括的结合片段的实例包括 (i)Fab 片段,一种由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段 ;(ii)F(ab′)$_2$ 片段,一种包含通过在铰链区的二硫键连接的两个 Fab 片段的双价片段 ;(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) 包含单一可变域的 dAb 片段 (Ward 等人, Nature,341 :544-546(1989) ;PCT 公开号 WO 90/05144) ;和 (vi) 分离的互补决定区 (CDR)。另外,虽然 Fv 片段的两个结构域 (VL 和 VH) 由单独基因编码,但是可以使用重组方法通过能够使这两个结构域作为单一蛋白链产生的合成接头将它们接合,在所述单一蛋白链中 VL 区和 VH 区配对以形成单价分子 (称作单链 Fv(scFv) ;见例如, Bird 等人, Science,242 :423-426(1988) 和 Huston 等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,85 :5879-5883(1988))。此种单链抗体也意图包括在术语抗体的“抗原结合部分”内。也包括单链抗体的其他形式,如双体抗体。双体抗体是二价的双特异性抗体,其中 VH 和 VL 结构域在单一多肽链上表达,但是使用的接头太短以至于不允许在相同链上的两个结构域

之间配对，从而迫使所述结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合位点（见例如，Holliger 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，90：6444-6448(1993)；Poljak，R. J.，Structure，2：1121-1123(1994))。此类抗体结合部分是本领域已知的 (Kontermann 和 Dübel 编著，Antibody Engineering(Springer-Verlag，New York，2001)，第 790 页 (ISBN3-540-41354-5))。此外，单链抗体还包括“线性抗体”，其包含与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区的一对串联 Fv 区段 (VH-CH1-VH-CH1)(Zapata 等人，Protein Eng.，8(10)：1057-1062(1995) 和美国专利 No. 5,641,870))。

[0089] 免疫球蛋白恒定 (C) 结构域指重链 (CH) 或轻链 (CL) 恒定结构域。鼠和人 IgG 重链和轻链恒定结构域氨基酸序列是本领域已知的。

[0090] 术语“IL-1β 结合蛋白构建体”(或“结合蛋白构建体”) 指包含与接头或免疫球蛋白恒定结构域连接的一个或多个本发明抗原结合部分的多肽。“接头多肽”包含通过肽键接合的两个或更多个氨基酸残基，并且用来连接一个或多个抗原结合部分。此类接头多肽是本领域熟知的 (见例如，Holliger 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，90：6444-6448(1993)；Poljak，R. J.，Structure，2 ： 1 121-1123(1994))。免疫球蛋白恒定结构域指重链或轻链恒定结构域。人 IgG 重链和轻链恒定结构域氨基酸序列是本领域已知的并且在表 2 中显示。

[0091] 表 2. 人 IgG 重链恒定结构域和轻链恒定结构域的序列

[0092]

蛋白质	序列名称	序列
		123456789012345678901234567890
Ig γ-1 恒定区	SEQ ID NO: 3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0093]

Ig γ-1 恒定区突变体	SEQ ID NO: 4	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Ig κ 恒定区	SEQ ID NO: 5	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
Ig λ 恒定区	SEQ ID NO: 6	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS

[0094] 再此外，IL-1β 结合蛋白（例如抗体或其抗原结合部分）可以是通过抗体或抗原结合部分与一种或多种其他蛋白质或肽共价或非共价缔合所形成的较大免疫粘附分子的部分。此类免疫粘附分子的实例包括使用链霉亲和素核心区域以产生四聚体 scFv 分子 (Kipriyanov 等人，Human Antibod. Hybridomas，6 :93-101(1995)) 和使用半胱氨酸残基、标记肽和 C 末端多组氨酸标签以产生二价的和生物素化的 scFv 分子 (Kipriyanov 等人，Mol. Immunol.，31 :1047-1058(1994))。可以使用常规技术（如分别用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化全抗体）从全抗体制备抗体部分，例如 Fab 和 $F(ab')_2$ 片段。另外，可以使用标准重组 DNA 技术来获得抗体、其抗原结合部分和免疫粘附分子。

[0095] “分离的抗体”意在指它基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体（例如，与 hIL-1β 特异性结合的分离的抗体基本上不合特异性结合 hIL-1β 之外的抗原的抗体）。然而，特异性结合 hIL-1β 的分离的抗体可以对来自其他物种的其他抗原（如 IL-1β 分子）具有交叉反应性。另外，分离的抗体可以基本上不含其他细胞物质和 / 或化学品。

[0096] 术语“单克隆抗体”或“mAb”指从基本上同质的抗体的群体中获得的抗体，即，构成该群体的单个抗体是相同的，除了可以少量存在的可能天然发生的突变之外。单克隆抗体是高度特异性的，从而针对单一抗原。另外，与通常包括针对不同决定簇（表位）的不同抗体的多克隆抗体制剂相反，每种 mAb 针对抗原上的单一决定簇。修饰语“单克隆的”不解

释为要求通过任何特定方法来产生该抗体。

[0097] 术语“人抗体”包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包括（例如在 CDR 中（尤其在 CDR3 中）包括）非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如，通过体外随机或定点诱变或通过体内体细胞突变引入的突变）。然而，术语“人抗体”不包括其中源自另一哺乳动物物种（如小鼠）的种系的 CDR 序列被移植到人框架序列上的抗体。

[0098] 术语“重组人抗体”包括通过重组手段制备、表达、产生或分离的所有人抗体，例如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体（在下文第 II C 部分中进一步描述）、从重组组合人抗体文库分离的抗体 (Hoogenboom, H.R., Trends Biotechnol., 15 : 62-70(1997) ;Azzazy 和 Highsmith, Clin.Biochem., 35 :425-445(2002) ;Gavilondo 和 Larrick, BioTechniques, 29 :128-145(2000) ;Hoogenboom 和 Chames, Immunol.Today, 21 :371-378(2000))、从对于人免疫球蛋白基因为转基因的动物（例如，小鼠）中分离的抗体（见例如，Taylor 等人，Nucl.Acids Res., 20 :6287-6295(1992) ;Kellermann 和 Green, Curr.Opin.Biotechnol., 13 :593-597(2002) ;Little 等 人，Immunol.Today, 21 : 364-370(2000)）或通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接至其他 DNA 序列的任何其他手段制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而，在某些实施方式中，此类重组人抗体经历体外诱变（或，当使用对于人 Ig 序列为转基因的动物时，经历体内体细胞诱变）并且因此重组抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列尽管源自人种系 VH 和 VL 序列和与之相关，但可以不是天然存在于体内人抗体种系组合 (repertoire) 内的序列。

[0099] 术语“嵌合抗体”指包含来自一个物种的重链和轻链可变区序列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链和轻链可变区的抗体。

[0100] 术语“CDR 移植抗体”指包含来自一个物种的重链和轻链可变区序列，但其中 VH 和 / 或 VL 的一个或多个 CDR 区的序列被另一个物种的 CDR 序列替换的抗体，例如其中一个或多个鼠 CDR（例如 CDR3）被人 CDR 序列替换的具有鼠重链和轻链可变区的抗体。

[0101] 术语“CDR”指抗体可变序列内的互补决定区。在重链和轻链的每个可变区中存在 3 个 CDR，它们针对各个可变区命名为 CDR1、CDR2 和 CDR3。如本文所用的术语“CDR 集”指在能够结合抗原的单一可变区中出现的一组 3 个 CDR。已经根据不同的体系差异地定义这些 CDR 的精确边界。由 Kabat 所描述的体系 (Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health, Bethesda, Maryland(1987) 和 (1991)) 不仅提供适用于抗体的任何可变区的明确的残基编号体系，而且提供限定该 3 个 CDR 的精确残基边界。这些 CDR 可以称作 Kabat CDR。Chothia 和合作者 (Chothia 和 Lesk, J.Mol.Biol., 196 :901-917(1987) 和 Chothia 等人，Nature, 342 :877-883(1989)) 发现，Kabat CDR 内的某些子部分尽管在氨基酸序列水平上具有高度的多样性，但采取几乎相同的肽主链构象。这些子部分命名为 L1、L2 和 L3 或 H1、H2 和 H3，其中“L”和“H”分别指轻链区域和重链区域。这些区域可以称作 Chothia CDR，它们具有与 Kabat CDR 重叠的边界。限定与 Kabat CDR 重叠的 CDR 的其他边界已经由 Padlan 等人 (ASEB J., 9 :133-139(1995)) 和 MacCallum 等人 (J.Mol.Biol., 262(5) :732-745(1996)) 描述。再其他的 CDR 边界定义可能不严格遵守以上体系之一，但是仍然会与 Kabat CDR 重叠，虽然可根据特定残基或残基

组或甚至整个 CDR 不显著地影响抗原结合的预测或实验发现来缩短或延长它们。本文所用的方法可以利用根据这些体系中的任何一种所定义的 CDR，尽管示例性的实施方式使用 Kabat 定义的 CDR 或 Chothia 定义的 CDR。

[0102] 术语“Kabat 编号”、“Kabat 定义”和“Kabat 标记”在本文中可互换地使用。本领域公认的这些术语指对在抗体或其抗原结合部分的重链和轻链可变区中比其他氨基酸残基更为可变（即，超变）的氨基酸残基编号的体系 (Kabat 等人，Ann.NY Acad.Sci.，190：382-391(1971) 和 Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版，U.S.Department of Health and Human Services，NIH 出版号 91-3242(1991))。对于重链可变区，超变区范围对于 CDR1 是氨基酸位置 31 至 35，对于 CDR2 是氨基酸位置 50 至 65，并且对于 CDR3 是氨基酸位置 95 至 102。对于轻链可变区，超变区范围对于 CDR1 是氨基酸位置 24 至 34，对于 CDR2 是氨基酸位置 50 至 56，并且对于 CDR3 是氨基酸位置 89 至 97。

[0103] 在过去 20 年期间，可变重链和轻链区的氨基酸序列的广泛公共数据库的增长和分析已经导致对可变区序列内的框架区 (FR) 和 CDR 序列之间典型边界的理解，并且使本领域技术人员能够根据 Kabat 编号体系、Chothia 编号体系或其他体系精确地确定 CDR。参见例如，Martin，“Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains”，第 31 章，引自 Antibody Engineering，(Kontermann 和 Dübel 编著）(Springer-Verlag，Berlin，2001)，尤其第 432-433 页。下文提供在可变重链区 (VH) 和可变轻链区 (VL) 的氨基酸序列内确定 Kabat CDR 的氨基酸序列的有用方法：

[0104] 为鉴定 CDR-L1 氨基酸序列：

[0105] 从 VL 区的氨基端大约 24 个氨基酸残基开始；

[0106] 在 CDR-L1 序列之前的残基总是半胱氨酸 (C)；

[0107] 在 CDR-L1 序列之后的残基总是色氨酸 (W) 残基，通常是 Trp-Tyr-Gln(W-Y-Q)，但也是 Trp-Leu-Gln(W-L-Q)、Trp-Phe-Gln(W-F-Q) 和 Trp-Tyr-Leu(W-Y-L)；

[0108] 长度通常是 10 至 17 个氨基酸残基。

[0109] 为鉴定 CDR-L2 氨基酸序列：

[0110] 总是在 CDR-L1 末端之后 16 个残基开始；

[0111] 在 CDR-L2 序列之前的残基通常是 Ile-Tyr(I-Y)，但也是 Val-Tyr(V-Y)、Ile-Lys(I-K) 和 Ile-Phe(I-F)；

[0112] 长度总是 7 个氨基酸残基。

[0113] 为鉴定 CDR-L3 氨基酸序列：

[0114] 总是在 CDR-L2 的末端之后 33 个氨基酸开始；

[0115] 在 CDR-L13 氨基酸序列之前的残基总是半胱氨酸 (C)；

[0116] 在 CDR-L3 序列之后的残基总是 Phe-Gly-X-Gly(F-G-X-G)(SEQ ID NO：11)，其中 X 是任意氨基酸；

[0117] 长度通常是 7 至 11 个氨基酸残基。

[0118] 为鉴定 CDR-H1 氨基酸序列：

[0119] 从 VL 区的氨基端大约 31 个氨基酸残基且总是在半胱氨酸 (C) 之后 9 个残基开始；

[0120] 在 CDR-H1 序列之前的残基总是 Cys-X-X-X-X-X-X-X-X(SEQ ID NO：12)，其中 X 是

任意氨基酸；

[0121] CDR-H1 序列之后的残基总是 Trp(W)，通常是 Trp-Val(W-V)，但也是 Trp-Ile(W-I) 和 Trp-Ala(W-A)；

[0122] 长度通常是 5 至 7 个氨基酸残基。

[0123] 为鉴定 CDR-H2 氨基酸序列：

[0124] 总是在 CDR-H1 末端之后 15 个氨基酸残基开始；

[0125] 在 CDR-H2 序列之前的残基通常是 Leu-Glu-Trp-Ile-Gly(L-E-W-I-G)(SEQ ID NO：23)，但是也有其他变化；

[0126] 在 CDR-H2 序列之后的残基是 Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/S er/Ile/Ala(K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A)；

[0127] 长度通常是 16 至 19 个氨基酸残基。

[0128] 为鉴定 CDR-H3 氨基酸序列：

[0129] 总是在 CDR-H2 末端之后 33 个氨基酸残基且总是在半胱氨酸 (C)’之后 3 个氨基酸残基开始；

[0130] 在 CDR-H3 序列之前的残基总是 Cys-X-X(C-X-X)，其中 X 是任意氨基酸，通常是 Cys-Ala-Arg(C-A-R)；

[0131] 在 CDR-H3 序列之后的残基总是 Trp-Gly-X-Gly(W-G-X-G)(SEQ ID NO：24)，其中 X 是任意氨基酸；

[0132] 长度通常是 3 至 25 个氨基酸残基。

[0133] 如本文所用的术语“正则”残基指 CDR 或框架中限定如 Chothia 等人 (J.Mol.Biol.，196：901-917(1987)) 和 Chothia 等人 (J.Mol.Biol.，227：799-817(1992))(这两份文献均通过引用并入本文）定义的特定正则 CDR 结构的残基。根据 Chothia 等人，许多抗体的 CDR 的关键部分尽管在氨基酸序列水平上存在极大的多样性，但是具有几乎相同的肽主链构象。每种正则结构主要指明形成环的氨基酸残基连续区段的一组肽主链扭转角。

[0134] “亲和力成熟的”抗体是在其一个或多个 CDR 中具有一种或多种改变的抗体，其与不具有所述一种或多种改变的亲本抗体相比导致抗体对靶抗原的亲和力的提高。示例性的亲和力成熟抗体将对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲和力。用于产生亲和力成熟的抗体的各种程序是本领域已知的。例如，Marks 等人，BioTechnology，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 / 或框架残基的随机诱变由 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)：3310-3319(1995)；Hawkins 等人，J.Mol.Biol.，226：889-896(1992) 描述。美国专利 No.6,914,128B1 中描述了在选择性诱变位置处和在接触或超变位置处用活性增强的氨基酸残基进行的选择性突变。

[0135] 术语“多价结合蛋白”表示包含两个或更多个抗原结合位点的结合蛋白。多价结合蛋白优选被工程化以具有 3 个或更多个抗原结合位点，并且通常不是天然存在的抗体。术语“多特异性结合蛋白”指能够结合两种或更多种相关或不相关靶标的结合蛋白。本发明的“双重可变结构域”（“DVD”）结合蛋白包含两个或更多个抗原结合位点，并且是四价或多价的结合蛋白。DVD 可以是单特异性的（即，能够结合一种抗原），或是多特异性的（即，

能够结合两种或更多种抗原）。包含两条重链 DVD 多肽和两条轻链 DVD 多肽的 DVD 结合蛋白称作“DVD 免疫球蛋白”或“DVD-Ig”。每半个 DVD-Ig 包含重链 DVD 多肽和轻链 DVD 多肽及两个或更多个抗原结合位点。每个结合位点包含重链可变结构域和轻链可变结构域，其中每个抗原结合位点总计 6 个参与抗原结合的 CDR。

[0136] 对设计、表达和表征 DVD-Ig 分子的描述在 PCT 公开号 WO 2007/024715；美国专利 No.7,612,181 和 Wu 等人，Nature Biotechnol.，25：1290-1297(2007) 中提供。此类 DVD-Ig 分子的优选实例包含含有结构式 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n 的重链，其中 VD1 是第一重链可变结构域，VD2 是第二重链可变结构域，C 是重链恒定结构域，X1 是接头，条件是它不是 CH1，X2 是 Fc 区，并且 n 是 0 或 1，但优选是 1；和含有结构式 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n 的轻链，其中 VD1 是第一轻链可变结构域，VD2 是第二轻链可变结构域，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；并且 n 是 0 或 1，但优选是 1。此类 DVD-Ig 可以包含两条这样的重链和两条这样的轻链，其中每条链包含在可变区之间没有插入的恒定区的串联连接的可变结构域，其中重链与轻链结合以形成串联的功能性抗原结合位点，并且一对重链和轻链可以与另一对重链和轻链结合以形成具有 4 个有功能性抗原结合位点的四聚体结合蛋白。在另一个实例中，DVD-Ig 分子可以包含重链和轻链，其各包含在可变结构域之间没有插入的恒定区的串联连接的 3 个可变结构域 (VD1、VD2、VD3)，其中一对重链和轻链可以结合以形成 3 个抗原结合位点，并且其中一对重链和轻链可以与另一对重链和轻链结合以形成具有 6 个抗原结合位点的四聚体结合蛋白。

[0137] DVD-Ig 结合蛋白可以结合 IL-1β 的一个或多个表位。DVD-Ig 结合蛋白也可以结合 IL-1β 的表位和 IL-1β 多肽以外的第二靶抗原的表位。

[0138] 如本文所用的术语“双特异性抗体”指通过以下方式产生的全长抗体：细胞杂交瘤 (quadroma) 技术（见 Milstein 和 Cuello，Nature，305：537-540(1983)）、两种不同单克隆抗体的化学偶联（见 Staerz 等人，Nature，314：628-631(1985)）或在 Fc 区中引入突变的杵 - 臼 (knob-into-hole) 或相似方法（见 Holliger 等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，90(14)：6444-6448(1993)），从而产生仅其中之一是功能性双特异抗体的多种不同免疫球蛋白种类。对于分子功能，双特异性抗体在其两个结合臂之一（一对 HC/LC）上结合一种抗原（或表位），并且在其第二臂（不同的 HC/LC 对）上结合不同的抗原（或表位）。根据这种定义，双特异性抗体具有两条（在特异性和 CDR 序列方面）截然不同的抗原结合臂，并且对于它结合的每种抗原是单价的。

[0139] 如本文所用的术语“双重特异性抗体”指可以在其两个结合臂的每条臂（一对 HC/LC）中结合两种不同抗原（或表位）的全长抗体（见 PCT 公开号 WO 02/02773）。因此，双重特异性结合蛋白具有两条相同的抗原结合臂（其具有相同特异性和相同 CDR 序列），并且相对于它结合的每种抗原是二价的。

[0140] 结合蛋白的“功能性抗原结合位点”是能够结合靶抗原的抗原结合位点。抗原结合位点的抗原结合亲和力不是必需与该抗原结合位点所来源的亲本抗体一样强，但是结合抗原的能力必须可使用已知用于评价抗体与抗原结合的多种方法中的任一种来测量。另外，本文中多价抗体的每个抗原结合位点的抗原结合亲和力不需要在量上是相同的。

[0141] 术语“细胞因子”是对于由一个细胞群体释放并且作为细胞间介质作用于另一细胞群体的蛋白质的类属术语。此类细胞因子的实例是淋巴因子、单核因子和传统的多肽

激素。在细胞因子中包括生长激素，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) 和促黄体激素 (LH)；肝生长因子；成纤维细胞生长因子；催乳素；胎盘催乳激素；肿瘤坏死因子，例如肿瘤坏死因子 -α (TNF-α) 和肿瘤坏死因子 -β (TNF-β)；缪勒管抑制物质；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-α (NGF-α)；血小板生长因子；胎盘生长因子；转化生长因子 (TGF)，例如 TGF-α (TGF-α) 和 TGF-β (TGF-β)；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 -α (IFN-α)、干扰素 -β (IFN-β) 和干扰素 -γ (IFN-γ)；集落刺激因子 (CSF)，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)；白介素 (IL)，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-17、IL-18、IL-21、IL-22、IL-23、IL-33；和其他多肽因子，包括 LIF 和 kit 配体 (KL)。如本文所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物的蛋白质及天然序列细胞因子的生物学活性等同物。

[0142] 如本文所用的术语“供体”和“供体抗体”指提供一个或多个 CDR 的抗体。在示例性实施方式中，供体抗体是来自与从中获得或衍生框架区的抗体不同的种类的抗体。在人源化抗体的情况中，术语“供体抗体”指提供一个或多个 CDR 的非人抗体。

[0143] 如本文所用的术语“框架”或“框架序列”指除去 CDR 的剩余的可变区序列。因为可以通过不同体系来确定 CDR 序列的精确定义，所以框架序列的含义相应地具有不同的解释。6 个 CDR(轻链的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 及重链的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3) 也将轻链和重链上的框架区划分为每条链上的 4 个亚区域 (FR1、FR2、FR3 和 FR4)，其中 CDR1 位于 FR1 和 FR2 之间，CDR2 位于 FR2 和 FR3 之间并且 CDR3 位于 FR3 和 FR4 之间。在不指明具体亚区域为 FR1、FR2、FR3 或 FR4 的情况下，如其他处所称的，框架区表示在单一天然存在的免疫球蛋白链的可变区内的组合 FR。如本文中所用的，FR 代表四个亚区域之一，并且 FRs 代表构成框架区的四个亚区域中的两个或更多个亚区域。

[0144] 如本文所用的术语“接受体”和“接受体抗体”指提供一个或多个框架区的至少 80％、至少 85％、至少 90％、至少 95％、至少 98％或 100％的氨基酸序列的抗体或编码一个或多个框架区的至少 80％、至少 85％、至少 90％、至少 95％、至少 98％或 100％氨基酸序列的核酸序列。在一些实施方式中，术语“接受体”指提供一个或多个恒定区的抗体氨基酸序列或编码一个或多个恒定区的核酸序列。在又另一个实施方式中，术语“接受体”指提供一个或多个框架区和恒定区的抗体氨基酸序列或编码一个或多个框架区和恒定区的核酸序列。在具体实施方式中，术语“接受体”指人抗体氨基酸或核酸序列，其提供或编码一个或多个框架区的氨基酸序列的至少 80％、优选地，至少 85％、至少 90％、至少 95％、至少 98％或 100％。根据这个实施方式，接受体可以含有不在人抗体的一个或多个特定位置处出现的至少 1 个、至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个或至少 10 个氨基酸残基。接受体框架区和 / 或接受体恒定区可以例如源自或获自种系抗体基因、成熟抗体基因、功能性抗体 (例如，本领域熟知的抗体、正在开发的抗体或市售的抗体)。

[0145] 人重链和轻链接受体序列是本领域中已知的。在本发明的一个实施方式中，人重链和轻链接受体序列选自 V-base(http ://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/) 或从 (IMGT®

，国际 ImMunoGeneTics 信息系统®）(http ://imgt. cines. fr/textes/IMGTrepertoire/LocusGenes/) 列出的序列。在本发明的另一个实施方式中，人重链和轻链接受体序列选自表 3 和表 4 中所描述的序列。

[0146] 表 3. 重链接受体序列

[0147]

SEQ ID NO:	蛋白质区域	序列
		123456789012345678901234567890
7	FR1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS
8	FR2	WVRQAPGKGLEWVA
9	FR3	RFTISRDNSKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCAR
10	FR4	WGQGTPVTVSS
240	VH3-7 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
241	VH3-7 FR2	WVRQAPGKGLEWVA

[0148]

242	VH3-7 FR3	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC AR
243	JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
244	VH3 共有 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
245	VH3 共有 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
246	VH3 共有 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AR
247	JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
248	VH1-46 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
249	VH1-46 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
250	VH1-46 FR3	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC AR
251	JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
252	VH3-30 FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
253	VH3-30 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
254	VH3-30 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AR
255	JH3 FR4	WGQGTMVTVSS
256	VH3 共有 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
257	VH3 共有 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
258	VH3 共有 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AR
259	JH3 FR4	WGQGTMVTVSS
260	VH2-70/JH6 FR1	EVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS
261	VH2-70/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
262	VH2-70/JH6 FR3	RLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYC AR
263	VH2-70/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
264	VH2-26/JH6 FR1	EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLS
265	VH2-26/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA

[0149]

266	VH2-26/JH6 FR3	RLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYC AR
267	VH2-26/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
268	VH3-72/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
269	VH3-72/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVG
270	VH3-72/JH6 FR3	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYC AR
271	VH3-72/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
272	VH3-21/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
273	VH3-21/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
274	VH3-21/JH6 FR3	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC AR
275	VH3-21/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
276	VH1-69/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS
277	VH1-69/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
278	VH1-69/JH6 FR3	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC AR
279	VH1-69/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
280	VH1-18/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
281	VH1-18/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
282	VH1-18/JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC AR
283	VH1-18/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
284	IGHV4-59 FR1	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS
285	IGHV4-59 FR2	WIRQPPGKGLEWIG
286	IGHV4-59 FR3	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC AR
287	IGHV4-59/JH FR4	WGQGTLVTVSS
288	IGHV3-66 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSIS
289	IGHV3-66 FR2	WIRQAPGKGLEWIG

[0150]

290	IGHV3-66 FR3	RVTISVDTSKNSFYLQMNSLRAEDTAVYYC AR
291	IGHV3-66/JH FR4	WGQGTLVTVSS
292	IGHV4-59 FR1	EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSIS
293	IGHV4-59 FR2	WIRQAPGKGLEWIG
294	IGHV4-59 FR3	RVTISVDTSKNQFYLKLSSVRAEDTAVYYC AR
295	IGHV4-59/JH FR4	WGQGTLVTVSS
296	IGHV5-51 FR1	EVQLVQSGTEVKKPGESLKISCKVSGGSIS
297	IGHV5-51 FR2	WIRQMPGKGLEWIG
298	IGHV5-51 FR3	QVTISVDTSFNTFFLQWSSLKASDTAMYYC AR
299	IGHV5-51/JH FR4	WGQGTMVTVSS
300	IGHV2-70 FR1	EVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTVSGGSIS
301	IGHV2-70 FR2	WIRQPPGKGLEWIG
302	IGHV2-70 FR3	RVTISVDTSKNQFVLTMTNMDPVDTATYYC AR
303	IGHV2-70/JH FR4	WGQGTTVTVSS
304	IGHV3-15 FR1	EVQLLESGGGLVKSGGSLRLSCAASGFTFR
305	IGHV3-15 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
306	IGHV3-15 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC AK
307	IGHV3-15/JH FR4	WGQGTMVTVSS
308	IGHV3-43 FR1	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFG
309	IGHV3-43 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
310	IGHV3-43 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYC AK
311	IGHV3-43/JH FR4	WGQGTMVTVSS
312	VH1-18/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
313	VH7-4.1/JH6 FR1	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT

[0151]

314	VH7-4.1/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
315	VH7-4.1/JH6 FR3	RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC AR
316	VH7-4.1/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS

[0152] 表 4. 轻链接受体序列

[0153]

SEQ ID NO:	蛋白质区域	序列
		123456789**0**123456789**0**1234567890
13	FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
14	FR2	WYQQTPGKAPKLLIY
15	FR3	GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATY YC
16	FR4	FGQGTKLQIT
25	O2 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
317	O2 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
318	O2 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YC
319	JK2 FR4	FGQGTKLEIK
320	L2 FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
321	L2 FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
322	L2 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVY YC
323	JK2 FR4	FGQGTKLEIK
324	B3/JK4 FR1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
325	B3/JK4 FR2	WYQQKPGQPPKLLIY
326	B3/JK4 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YC
327	B3/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
328	L2/JK4 FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
329	L2/JK4 FR2	WYQQKPGQAPRLLIY

[0154]

330	L2/JK4 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVY YC
331	L2/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
332	L15/JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
333	L15/JK4 FR2	WYQQKPEKAPKSLIY
334	L15/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YC
335	L15/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
336	L5/JK4 FR1	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC
337	L5/JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
338	L5/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YC
339	L5/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
340	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
341	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
342	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADY YC
343	IGLV3-1/JL FR4	FGYGTKVTVL
344	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
345	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
346	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADY YC
347	IGLV3-1/JL FR4	GGGTKLTVLG
348	IGLV3-1 FR1	YELTQPPSVSVSPGQTASITC
349	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
350	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADY YC
351	IGLV3-1/JL FR4	GGGTKLTVLG
352	IGLV3-1 FR1	LYVLTQPPSVSVSPGQTASITC
353	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY

[0155]

354	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQTMDEADY LC
355	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKVTVLG
356	IGKV6D-21 FR1	EYVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC
357	IGKV6D-21 FR2	WYQQKPDQSPKLVIY
358	IGKV6D-21 FR3	GVPSRFSGSNSGDDATLTINSLEAEDAATY YC
359	IGKV6D-21/JK FR4	FGQGTKVEIKR
360	IGKV3D-15 FR1	EYVLTQSPATLSVSPGERATLSC
361	IGKV3D-15 FR2	WYQQKPGQSPRLVIY
362	IGKV3D-15 FR3	DIPARFSGSNSGDEATLTISSLQSEDFAVY YC
363	IGKV3D-15/JK FR4	FGQGTRLEIKR
364	IGKV4-1 FR1	DYVLTQSPDSLAVSLGERATINC
365	IGKV4-1 FR2	WYQQKPGQSPKLVIY
366	IGKV4-1 FR3	GIPDRFSGSNSGDDATLTISSLQAEDVAVY YC
367	IGKV4-1/JK FR4	FGGGTKVEIKR
368	IGLV3-1 FR1	LPVLTQPPSVSVSPGQTASITC
369	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
370	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQTMDEADY LC
371	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKVTVL
372	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
373	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
374	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQTMDEADY LC
375	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKLTVL

[0156]

376	1-33/018/JK2 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
377	1-33/018/JK2 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
378	1-33/018/JK2 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATY YC
379	1-33/018/JK2 FR4	FGQGTKLEIKR
380	1-33/018/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR

[0157] 如本文所用的术语“种系抗体基因”或“基因片段”指由未经历成熟过程的非淋巴样细胞编码的免疫球蛋白序列，所述成熟过程导致基因重排和突变以表达特定免疫球蛋白（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式提供的优点之一源自以下认识：种系抗体基因比成熟抗体基因更可能使得物种中个体特有的必要氨基酸序列结构保守，因此在该物种中治疗性使用时较少可能被识别为来自外部来源。

[0158] 如本文所用的术语“关键”残基指可变区内对抗体（尤其人源化抗体）的结合特异性和/或亲和力具有较大影响的某些残基。关键残基包括但不限于以下残基中的一个或多个：与 CDR 相邻的残基、潜在糖基化位点（可以是 N- 糖基化或 O- 糖基化位点）、稀有残基、能够与抗原相互作用的残基、能够与 CDR 相互作用的残基、正则残基、重链可变区和轻链可变区之间的接触残基、Vernier 区内的残基及在可变重链 CDR1 的 Chothia 定义和第一重链框架的 Kabat 定义之间重叠的区域内的残基。

[0159] 术语“人源化抗体”指包含来自非人物种（例如，小鼠）的重链和轻链可变区序列，但其中 VH 和/或 VL 序列的至少一部分已经改变成更为“类人的”（即，与人种系可变序列更相似）的抗体。一种类型的人源化抗体是 CDR 移植抗体，其中人 CDR 序列引入非人 VH 和 VL 序列中以替换相应的非人 CDR 序列。另外，“人源化抗体”是与感兴趣的抗原免疫特异性地结合并且包含基本上具有人抗体的氨基酸序列的框架 (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) 的抗体或其变体、衍生物、类似物或片段。如本文所用的，术语“基本上”在 CDR 的情况中指具有与非人抗体 CDR 的氨基酸序列至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%相同的氨基酸序列的 CDR。人源化抗体包含基本上至少一个并且通常两个可变结构域的全部 (Fab、Fab′、$F(ab')_2$、FabC、Fv)，其中全部或基本上全部的 CDR 区对应于非人免疫球蛋白（即，供体抗体）的那些，且全部或基本上全部的框架区是人免疫球蛋白共有序列的那些。在一个实施方式中，人源化抗体也包含至少一部分免疫球蛋白恒定区 (Fc)，通常是人免疫球蛋白的恒定区。在一些实施方式中，人源化抗体含有轻链以及至少重链的可变结构域。所述抗体还可以包含重链的 CH1 区、铰链区、CH2 区、CH3 区和 CH4 区。在一些实施方式中，人源化抗体仅含有人源化轻链。在一些实施方式中，人源化抗体仅含有人源化重链。在具体的实施方式中，人源化抗体仅含有轻链的人源化可变结构域和/或人源化重链。

[0160] 人源化抗体可以选自任何类别的免疫球蛋白，包括 IgM、IgG、IgD、IgA 和 IgE，以及任何同种型，包括但不限于 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。人源化抗体可以包含来自多于一个

类别或同种型的序列，并且可以选择特定的恒定结构域以使用本领域熟知的技术来优化所需的效应子功能。

[0161] 人源化抗体的框架和 CDR 区不需要精确地对应于亲本序列，例如，可以通过置换、插入和 / 或缺失至少一个氨基酸残基来对供体抗体 CDR 或共有框架进行诱变，以使得 CDR 或框架残基在这个位点处不对应于供体抗体或共有框架。然而，在示例性实施方式中，此类突变将不是广泛的。通常，至少 80％、优选至少 85％、更优选至少 90％和最优选至少 95％的人源化抗体残基将对应于亲本 FR 和 CDR 序列的那些抗体残基。如本文所用的术语“共有框架”指共有免疫球蛋白序列中的框架区。如本文所用的术语“共有免疫球蛋白序列”指由相关免疫球蛋白序列的家族中最常出现的氨基酸（或核苷酸）形成的序列（见，例如，Winnaker,From Genes to Clones(Verlagsgesellschaft,Weinheim,德国 1987)）。在免疫球蛋白家族中，共有序列中的各个位置由该家族中这个位置处最常出现的氨基酸占据。如果两个氨基酸以相同频率出现，则可以在共有序列中包括任一者。

[0162] 关于构建 DVD-Ig 或其他结合蛋白分子，使用“接头”来表示单一氨基酸或包含通过肽键连接的两个或更多个氨基酸残基的多肽（“接头多肽“），并且用来连接一个或多个抗原结合部分。此类接头多肽是本领域熟知的（参见，例如，Holliger 等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90 :6444-6448(1993) ;Poljak, R.J., Structure,2 :1121-1123(1994)）。示例性接头包括但不限于 GGGGSG(SEQ ID NO :26)、GGSGG(SEQ ID NO :27)、GGGGSGGGGS(SEQ ID NO :28)、GGSGGGGSG(SEQ ID NO :223)、GGSGGGGSGS(SEQ ID NO :29)、GGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO :30)、GGGGSGGGGSGGGG(SEQ ID NO :31)、GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO :32)、ASTKGP(SEQ ID NO :33)、ASTKGPSVFPLAP(SEQ ID NO :34)、TVAAP(SEQ ID NO :35)、RTVAAP(SEQ ID NO :224)、TVAAPSVFIFPP(SEQ ID NO :36)、RTVAAPSVFIFPP(SEQ ID NO :225)、AKTTPKLEEGEFSEAR(SEQ ID NO :37)、AKTTPKLEEGEFSEARV(SEQ ID NO :38)、AKTTPKLGG(SEQ ID NO :39)、SAKTTPKLGG(SEQ ID NO :40)、SAKTTP(SEQ ID NO :41)、RADAAP(SEQ ID NO :42)、RADAAPTVS(SEQ ID NO :43)、RADAAAAGGPGS(SEQ ID NO :44)、RADAAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO :45)、SAKTTPKLEEGEFSEARV(SEQ ID NO :46)、ADAAP(SEQ ID NO :47)、ADAAPTVSIFPP(SEQ ID NO :48)、QPKAAP(SEQ ID NO :49)、QPKAAPSVTLFPP(SEQ ID NO :50)、AKTTPP(SEQ ID NO :51)、AKTTPPSVTPLAP(SEQ ID NO :52)、AKTTAP(SEQ ID NO :53)、AKTTAPSVYPLAP(SEQ ID NO :54)、GENKVEYAPALMALS(SEQ ID NO :55)、GPAKELTPLKEAKVS(SEQ ID NO :56) 和 GHEAAAVMQVQYPAS(SEQ ID NO :57)。

[0163] 如本文所用的“Vernier”区指可以调节 CDR 结构和精细调节与抗原的配合的框架残基子集，如 Foote 和 Winter, J.Mol.Biol.,224 :487-499(1992) 所描述的，其通过引用并入本文。Vernier 区残基形成作为 CDR 基础的层并且可以影响 CDR 的结构和抗体的亲和力。

[0164] 如本文所用的术语“中和”指当结合蛋白特异性结合抗原时中和抗原（例如，细胞因子 IL-1β）的生物学活性。优选地，本文所述的中和结合蛋白与 hIL-1β 结合，导致抑制 hIL-1β 的生物学活性。优选地，中和结合蛋白结合 hIL-1β 并且将 hIL-1β 的生物学活性降低至少约 20％、40％、60％、80％、85％或更多。可以通过测量本领域熟知的 hIL-1β 生物学活性的一个或多个指标来评估中和结合蛋白对 hIL-1β 生物学活性的抑制。例如，HS27 细胞中 IL-1β 诱导的人 IL-6 分泌的抑制。

[0165] 术语“活性”包括以下活性 :例如抗体对抗原的结合特异性 / 亲和力（例如，与

IL-1β 抗原结合的抗 hIL-1β 抗体）和 / 或抗体的中和效力（例如，其与 hIL-1β 的结合抑制 hIL-1β 生物学活性的抗 IL-1β 抗体），例如 HS27 细胞中 IL-1β 诱导的人 IL-6 分泌的抑制。

[0166] 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。在某些实施方式中，表位决定簇包括分子的化学活性表面群组，如氨基酸、糖侧链、磷酰基或磺酰基，并且在某些实施方式中，可以具有特定的三维结构特征和 / 或特定的电荷特征。表位是被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 / 或大分子的复杂混合物中优先识别其靶抗原时，该抗体称作特异性结合抗原。如果抗体交叉竞争（一种抗体阻止另一种抗体的结合或调节效应），该抗体称作“与相同的表位结合”。此外，表位的结构定义（重叠、相似、相同）是信息性的，但是功能定义通常更具有相关性，因为它们包括结构（结合）参数和功能（调节、竞争）参数。

[0167] 如本文所用的术语“表面等离子体共振”指允许通过（例如使用 BIAcore 系统 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, New Jersey)) 检测生物传感器基质内蛋白质浓度的改变来分析实时生物特异性相互作用的光学现象。对于进一步描述，参见 **Jönsson** 等人，Ann. Biol. Clin.，51 :19-26(1993)；**Jönsson** 等人，BioTechniques，11 :620-627(1991)；Johnsson 等人，J. Mol. Recognit.，8 :125-131(1995) 和 Johnsson 等人，Anal. Biochem.，198 :268-277(1991)。

[0168] 如本文所用的术语“K_{on}”（也为“Kon”、“kon”）意指，如本领域已知的，结合蛋白（例如，抗体）与抗原结合以形成结合复合物（例如，抗体 / 抗原复合物）的结合速率常数。“K_{on}”也称为术语“结合速率常数”或“ka”，如本文中可互换使用的。这个值表示抗体与其靶抗原的结合速率或抗体和抗原之间复合物形成的速率，如以下等式所显示：

[0169] 抗体（″ Ab″)+ 抗原（″ Ag″ ）→ Ab-Ag。

[0170] 如本文所用的术语“K_{off}”（也为“Koff”、“koff”）意指，如本领域已知的，结合蛋白（例如，抗体）从结合复合物（例如，抗体 / 抗原复合物）解离的脱离速率常数或“解离速率常数”。这个值表示抗体与其靶抗原解离的解离速率或 Ab-Ag 复合物随时间而分离成游离抗体和抗原的速率，如以下等式所显示：

[0171] Ab+Ag ← Ab-Ag。

[0172] 如本文所用的术语“K_D”（也为“K_d”）意指“平衡解离常数”并且指在滴定测量中在平衡时所获得的值或通过将解离速率常数 (Koff) 除以结合速率常数 (Kon) 所获得的值。结合速率常数 (Kon)、解离速率常数 (Koff) 和平衡解离常数 (Kd) 用来代表抗体对抗原的结合亲和力。用于测定缔合速率常数和解离速率常数的方法是本领域熟知的。使用基于荧光的技术提供了在生理缓冲液中，在平衡时检查样品的高灵敏度和能力。可以使用其他实验方法和仪器（例如 **BIAcore®**（生物分子相互作用分析）测定法）（例如，可从 BIAcore International AB, GE Healthcare 公司，Uppsala, Sweden 获得的仪器）。另外，也可以使用可获自 Sapidyne Instruments(Boise, Idaho) 的 **KinExA®** 测定法（动力排阻测定法）(Kinetic Exclusion Assay)。

[0173] 术语“标记”和“可检测标记”表示与特异性结合伴体（如抗体或分析物）连接以例如使得特异性结合对的成员（如抗体和分析物）之间的反应可检测的部分。如此标记的

特异性结合伴体（例如，抗体或分析物）称作“可检测地标记的”。因此，如本文所用的术语“标记的结合蛋白”指具有并入的标记的蛋白质，所述标记提供对结合蛋白的鉴定。在一个实施方式中，标记是可以产生可通过视觉或仪器手段检测的信号的可检测标志，例如，掺入放射标记的氨基酸或与生物素基部分的多肽结合，该生物素基部分可以通过标记的抗生物素蛋白或链霉亲合素检测（例如，可以通过光学或比色方法检测的含荧光标志或酶活性的链霉亲合素）。用于多肽的标记的实例包括但不限于以下：放射性同位素或放射性核素（例如，^{3}H、^{14}C、^{35}S、^{90}Y、^{99}Tc、^{111}In、^{125}I、^{131}I、^{177}Lu、^{166}Ho 或 ^{153}Sm）、色原体、荧光标记（例如，FITC、若丹明、镧系磷光体）、酶标记（例如辣根过氧化物酶、萤光素酶、碱性磷酸酶）、化学发光标志、生物素基团、由二级报道分子识别的预定多肽表位（例如，亮氨酸拉链对序列、二级抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签）和磁性试剂（例如，钆螯合物）。通常用于免疫测定的标记的代表性实例包括产生光的部分（例如吖啶鎓化合物）和产生荧光的部分（例如荧光素）。本文中描述了其他标记。就此方面而言，所述部分本身可不经过可检测地标记，但是在与又另一部分反应时可以变成可检测的。术语“可检测地标记”的使用意在包括后一类型的可检测的标记。

[0174] 术语“IL-1β 结合蛋白偶联物”指与第二化学部分（如治疗剂或细胞毒性剂）化学连接的本文所述的 IL-1β 结合蛋白。术语“药剂”在本文中用来表示化合物、化合物的混合物、生物大分子或由生物材料制备的提取物。优选地，治疗剂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、溴化乙啶、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、道诺霉素、二羟基炭疽菌素二酮 (dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素 D、1- 脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素及其类似物或同系物。当在免疫分析的情形下使用时，IL-1β 结合蛋白偶联物可以是可检测地标记的抗体，其用作检测抗体。

[0175] 如本文所用的术语“晶体”和“结晶的”指以晶体形式存在的结合蛋白（例如抗体）或其抗原结合部分。晶体是固态物质的一种形式，其与其他形式（例如无定形固态或液晶态）不同。晶体由原子、离子、分子（例如蛋白质，如抗体）或分子组装物（例如，抗原 / 抗体复合物）的规则、重复、三维阵列构成。这些三维阵列根据本领域充分理解的特定数学关系排列。在晶体中重复的基本单元或结构块称作非对称单元。非对称单元以符合给定的、良好定义的晶体学对称的排列方式的重复提供了晶体的“晶胞”。晶胞通过规则平移 (regular translation) 在全部三个维度上的重复提供了晶体。参见 Giegé 等人，第 1 章，Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach，第 2 版，(Ducruix 和 Giegé 编著）(Oxford University Press, New York, 1999)，第 1-16 页。

[0176] 术语“多核苷酸”表示两个或更多个核苷酸（核糖核苷酸或脱氧核苷酸或任一种类型的核苷酸的修饰形式）的多聚体形式。该术语包括单链和双链形式的 DNA。

[0177] 术语“分离的多核苷酸”应表示一种多核苷酸（例如基因组起源的、cDNA 起源的或合成起源的或其某种组合起源的多核苷酸）：根据其起源，“分离的多核苷酸”与自然界中同所述“分离的多核苷酸”一起发现的全部或一部分多核苷酸不相关联，与自然界中不与所述“分离的多核苷酸”连接的多核苷酸可操作地连接或不作为较大序列的部分出现于自然界中。

[0178] 如本文所用的术语“载体”指能够运输已经与之连接的另一核酸的核酸分子。一种

类型的载体是“质粒”，其指可将额外 DNA 区段连接于其中的环形双链 DNA 环。另一种类型的载体是病毒载体，其中可将额外的 DNA 区段连接到病毒基因组中。某些载体能够在其引入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附加型哺乳动物载体）。其他载体（例如非附加型哺乳动物载体）可以在引入宿主细胞中时整合到该宿主细胞的基因组中，并因此随宿主基因组一起复制。另外，某些载体能够指导与它们可操作地连接的基因的表达。此类载体在本文中称作“重组表达载体”（或简单地称作“表达载体”）。通常，在重组 DNA 技术中使用的表达载体经常为质粒形式。在本说明书中，“质粒”和“载体”可以互换地使用，因为质粒是最常用形式的载体。然而，本发明意在包括发挥同等功能的其他形式的这类表达载体，例如病毒载体（例如，复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒）。

[0179] 如本文中所用的术语“可操作地连接”指其中所描述的组分处在允许它们以其预期方式发挥功能的关系中的并列。与编码序列“可操作地连接”的控制序列以在与所述控制序列相容的条件下实现编码序列表达的方式连接。“可操作地连接的”序列包括与感兴趣的基因邻接的表达控制序列以及以反式（in trans）或以一定距离发挥作用以控制感兴趣的基因的表达控制序列。如本文所用的术语“表达控制序列”指实现与其连接的编码序列的表达和加工所必需的多核苷酸序列。表达控制序列包括适当的转录起始序列、终止序列、启动子序列和增强子序列；有效的 RNA 加工信号如剪接和多腺苷酸化信号；稳定胞质 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；和在需要时，增强蛋白质分泌的序列。此类控制序列的性质根据宿主有机体而不同；在原核生物中，此类控制序列通常包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列；在真核生物中，通常此类控制序列包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”意在包括其存在对于表达和加工必需的组分，并且也可以包括其存在是有利的额外成分，例如，前导序列和融合伴体序列。

[0180] 如本文定义的“转化”指外源 DNA 借以进入宿主细胞的任何过程。转化可以在天然或人工条件下使用本领域熟知的各种方法来发生。转化可以依赖于用于将外来核酸序列插入至原核或真核宿主细胞中的任意已知方法。该方法基于待转化的宿主细胞加以选择，并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。此类“转化的”细胞包括稳定转化的细胞，其中插入的 DNA 能够作为自主复制型质粒或作为宿主染色体的部分而复制。它们也包括以有限的时间段瞬时表达所插入的 DNA 或 RNA 的细胞。

[0181] 术语“重组宿主细胞”（或简单地称作“宿主细胞”）意指已将外源 DNA 引入其中的细胞。在一个实施方式中，宿主细胞包含两种或更多种（例如多种）编码抗体的核酸，例如美国专利 No. 7,262,028 中描述的宿主细胞。此类术语不仅意指特定的主体细胞，还意指此类细胞的后代。因为某些修饰可以由于突变或环境影响而出现于后续世代中，所以此类后代实际上可能不与亲本细胞相同，但仍包括于如本文中所用的术语“宿主细胞”的范围内。在一个实施方式中，宿主细胞包括选自生物界中任一种的原核细胞和真核细胞。在另一个实施方式中，真核细胞包括原生生物、真菌、植物和动物细胞。在另一个实施方式中，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、HEK293、COS、NS0、SP2 和 PER.C6；昆虫细胞系 Sf9；和真菌细胞酿酒酵母。

[0182] 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）。可以根据制造商的说明书或者如本领域中通常所完成或如本文所描述的那样实施酶促反应和纯化技术。前述技术和程序可通常根据本领域熟知的和如在本说明书通篇范

围内引用及讨论的各种一般性和更具体的参考文献中所描述的常规方法来实施。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)。

[0183] 如本领域已知的，“转基因有机体”指具有含转基因的细胞的有机体，其中引入有机体（或该有机体的祖先）中的转基因表达非在该生物中天然表达的多肽。“转基因”是DNA构建体，其稳定并可操作地整合入转基因有机体由此发育的细胞的基因组中，从而指导编码的基因产物在转基因有机体的一个或多个细胞类型或组织中的表达。

[0184] 术语“调整”和“调节”可互换地使用，并且如本文所用的，指感兴趣的分子的活性（例如，hIL-1β 的生物学活性）的改变或变化。调整可以是感兴趣分子的某种活性或功能在强度上的提高或降低。分子的示例性活性和功能包括但不限于结合特征、酶活性、细胞受体活化和信号转导。

[0185] 相应地，如本文所用的术语“调节剂”是能够改变或变化感兴趣分子的活性或功能（例如，hIL-1β 的生物学活性）的化合物。例如，与不存在调节剂的情况下所观察的活性或功能的强度相比，调节剂可以引起分子的某种活性或功能在强度上的提高或降低。在某些实施方式中，调节剂是抑制剂，其降低分子的至少一种活性或功能的强度。示例性的抑制剂包括但不限于蛋白质、肽、抗体、肽体(peptibody)、碳水化合物或有机小分子。肽体例如在PCT公开号WO 01/83525中描述。

[0186] 如本文所用的术语“激动剂”指，相比于不存在激动剂的情况下所观察的活性或功能的强度，当其与感兴趣的分子接触时引起所述分子的某种活性或功能在强度上的提高的调节剂。感兴趣的特定激动剂可以包括但不限于IL-1β 多肽、核酸、碳水化合物或与hIL-1β 结合的任何其他分子。

[0187] 如本文所用的术语“拮抗剂”和“抑制剂”指，相比于不存在拮抗剂的情况下所观察的活性或功能的强度，当其与感兴趣的分子接触时引起所述分子的某种活性或功能在强度上的降低的调节剂。感兴趣的特定拮抗剂包括阻断或调节人IL-1β 的生物学活性或免疫学活性的那些。人IL-1β 的拮抗剂和抑制剂可以包括但不限于与人IL-1β 结合的蛋白质、核酸、碳水化合物或任何其他分子。

[0188] 如本文所用的术语“有效量”指足以减轻或改善病症或其一种或多种症状的严重性和/或持续时间、防止病症发展、造成病症消退、防止与病症相关的一种或多种症状复发、发展、发作或进展、检测病症或者增强或改善另一种疗法（例如，预防药剂或治疗剂）的预防效果或治疗效果的治疗量。

[0189] “患者”和“受试者”可以在本文中可互换地用来指动物，如哺乳动物，包括灵长类（例如人、猴和黑猩猩）、非灵长类（例如牛、猪、骆驼、美洲驼、马、山羊、兔、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、犬、大鼠、小鼠、鲸）、鸟（例如鸭或鹅）和鲨鱼。优选地，患者或受试者是人，例如，正在因疾病、病症或病况而接受治疗或评估的人；存在疾病、病症或病况风险的人；患有疾病、病症或病况的人；和/或正在因疾病、病症或病况而接受治疗的人。

[0190] 如本文所用的术语“样品”以其最广泛的含义使用。如本文所用的“生物样品”包括但不限于任何量的来自活物或原先的活物的物质。此类活物包括但不限于人、非人灵长类、小鼠、大鼠、猴、犬、兔和其他动物。此类物质包括但不限于血液（例如，全血）、血浆、血清、尿、羊水、滑液、内皮细胞、白细胞、单核细胞、其他细胞、器官、组织、骨髓、淋巴结和脾。

[0191] “组分”、“多种组分”和“至少一种组分”通常指可以包括在用于根据本文所述的方法和本领域已知的其他方法分析测试样品（例如患者尿液、血清或血浆样品）的试剂盒中的捕获抗体、检测或偶联抗体、对照、校准物、一系列校准物、灵敏度组（sensitivity panel）、容器、缓冲剂、稀释剂、盐、酶、酶的辅因子、检测试剂、预处理试剂/溶液、底物（例如，作为溶液）、终止溶液等。因此，在本公开内容的上下文中，“至少一种组分”、“组分”和“多种组分”可以包括如上文所述的多肽或其他分析物，例如包含分析物（例如多肽）的组合物，其任选固定在固体支持物上，例如通过与抗分析物（例如，抗多肽）的抗体结合而固定在固体支持物上。一些组分可以处于溶液中或被冻干以便重构用于分析中。

[0192] “对照”指已知非分析物（“阴性对照“）或含有分析物（“阳性对照”）的组合物。阳性对照可以包含已知浓度的分析物。“对照”、“阳性对照”和“校准物”可以在本文中可互换地用来指包含已知浓度的分析物的组合物。“阳性对照“可以用来建立分析性能特征并且是试剂（例如，分析物）完整性的有用指示剂。

[0193] “预定截止值”和“预定水平”通常指用来通过针对预定截止值/水平比较分析结果来评估诊断/预后/治疗效力结果的分析截止值，其中所述预定截止值/水平已经与各种临床参数（例如，疾病的严重性、进展/无进展/改善等）关联或相关。尽管本公开内容可以提供示例性的预定水平，但是众所周知，截止值可以根据免疫分析法的性质（例如，所采用的抗体等）而变化。还完全处于本领域普通技术人员能力范围内的是，使本文公开内容适应于其他免疫分析法以基于本公开内容获得那些其他免疫分析法的免疫分析特异性截止值。尽管预定截止值/水平的精确值可以在分析法之间变化，但是如本文所述的相关性（如果有的话）应当总体上是适用的。

[0194] 如在本文所述的诊断分析使用的“预处理试剂”（例如，裂解、沉淀和/或增溶试剂）是裂解任何细胞和/或增溶测试样品中存在的任何分析物的试剂。如本文进一步描述的，预处理并非所有样品所必需的。其中，增溶分析物（例如，感兴趣的多肽）可以使得分析物从样品中存在的任何内源性结合蛋白释放。预处理试剂可以是均质的（不需要分离步骤）或异质的（需要分离步骤）。使用异质预处理试剂时，在进行至分析的下一个步骤之前，从测试样品中移除任何沉淀的分析物结合蛋白。

[0195] 在本文所述的免疫分析和试剂盒的情况中，“质量控制试剂”包括但不限于校准物、对照和灵敏度组。一般使用“校准物”或“标准品”（例如，一种或多种（例如多种））以建立校准（标准）曲线用于内插分析物（如抗体或分析物）的浓度。或者，可以使用单一校准物，其接近于预定的阳性/阴性截止值。可以联合使用多种校准物（即，多于一种校准物或可变量的校准物）以致包含“灵敏度组”。

[0196] “风险”指特定事件在目前或在未来某个时刻出现的可能性或概率。“风险分级”指允许医师将患者划分成发生特定疾病、病症或病况的低、中、高或最高风险的一系列已知临床风险因素。

[0197] 在特异性结合对（例如，抗原（或其片段）和抗体（或其抗原反应性片段））的成员之间的相互作用的情况中，“特异性的”和“特异性”指相互作用的选择反应性。短语“与.....特异性结合”和类似短语指抗体（或其抗原反应性片段）与分析物（或其片段）特异性结合并且不与其他实体特异性结合的能力。

[0198] “特异性结合伴体”是特异性结合对的成员。特异性结合对包含两种不同的分子，

它们通过化学或物理方式彼此特异性结合。因此，除了常见免疫分析的抗原和抗体特异性结合对之外，其他特异性结合对可以包括生物素和抗生物素蛋白（或链霉亲和素）、碳水化合物和凝集素、互补性核苷酸序列、效应物和受体分子、辅因子和酶、酶抑制剂和酶等。另外，特异性结合对可以包括作为原始特异性结合成员的类似物的成员（例如，分析物-类似物）。免疫反应性特异性结合成员包括抗原、抗原片段和抗体，包括单克隆和多克隆抗体以及复合物、其片段和变体（包括变体的片段），无论是分离的或重组产生的。

[0199] 如本文所用的“变体”表示通过氨基酸的添加（例如，插入）、缺失或保守性置换而在氨基酸序列方面与给定多肽（例如，IL-1β、BNP、NGAL 或 HIV 多肽或抗多肽抗体）不同，但是保留给定多肽的生物活性（例如，变体 IL-1β 可以与抗 IL-1β 抗体竞争结合 IL-1β）的多肽。本领域中将氨基酸的保守性置换（即，一种氨基酸被具有相似特性（例如，亲水性及带电区域的程度和分布）的不同氨基酸替换）公认为通常涉及较小变化。如本领域所理解的，可以通过考虑氨基酸的疏水性指数 (hydropathic index) 来部分地鉴定这些较小变化（见，例如，Kyte 等人，J.Mol.Biol.，157 :105-132(1982)）。氨基酸的疏水性指数基于对其疏水性和电荷的考虑。本领域已知，疏水性指数相似的氨基酸可以被置换而仍保留蛋白质功能。在一个方面，具有 ±2 的疏水性指数的氨基酸被置换。氨基酸的亲水性也可以用来揭示将产生保留生物学功能的蛋白质的置换。在肽的情况中考虑氨基酸的亲水性允许计算这种肽的最大局部平均亲水性（已经报道与抗原性和免疫原性充分相关的一种有用量度）（见，例如美国专利 No.4,554,101）。如本领域所理解的，具有相似亲水性值的氨基酸的置换可以产生保留生物学活性（例如免疫原性）的肽。在一个方面，用具有彼此 ±2 范围内的亲水性值的氨基酸实施置换。氨基酸的疏水性指数 (hydrophobicity index) 和亲水性值均受该氨基酸的特定侧链的影响。与这个观察结果一致，与生物学功能相容的氨基酸置换应理解为取决于氨基酸的相对相似性，并且尤其取决于那些氨基酸侧链（如通过疏水性、亲水性、电荷、大小和其他性能所揭示的）。“变体”也可以用来描述已经被差异性加工（例如通过蛋白水解、磷酸化或其他翻译后修饰）而仍保留其生物学活性或抗原反应性（例如，与 IL-1β 结合的能力）的多肽或其片段。除非与上下文矛盾，本文中“变体”的使用意在包括变体的片段。

[0200] I. 结合人 IL-1β 的抗体

[0201] 本发明的一个方面提供以高亲和力、慢解离速率和高中和能力与 IL-1β 结合的分离的鼠单克隆抗体或其抗原结合部分。本发明的第二个方面提供结合 IL-1β 的嵌合抗体。本发明的第三个方面提供结合 IL-1β 的 CDR 移植抗体或其抗原结合部分。本发明的第四个方面提供结合 IL-1β 的人源化抗体或其抗原结合部分。本发明的第五个方面提供结合 IL-1β 和一种其他靶标的双重可变结构域免疫球蛋白 (DVD-Ig™) 分子。优选地，抗体或其部分是分离的抗体。优选地，本发明的抗体是中和人抗 IL-1β 抗体。

[0202] A. 制备抗 IL-1β 抗体的方法

[0203] 本发明的抗 IL-1β 抗体可通过本领域已知的众多技术中的任一种来制备。

[0204] 1. 使用杂交瘤技术的抗 IL-1β 单克隆抗体

[0205] 单克隆抗体可使用本领域已知的多种多样的技术制备，包括使用杂交瘤技术、重组技术及噬菌体展示技术或其组合。例如，单克隆抗体可使用杂交瘤技术产生，包括本领域中已知且在例如以下参考文献中教导的那些技术 :Harlow 等人，Antibodies :A Laboratory

Manual，第 2 版 (Cold Spring Harbor Laboratory Press,1988)；Hammerling 等人编，“Monoclonal Antibodiess and T-Cell Hybridomas”，来自 Research Monographs in Immunology，第 3 卷 (J.L.Turk 总编辑)(Elsevier,New York,1981)，第 563-587 页（这些参考文献以全文引用的方式并入本文中）。如本文所用的术语“单克隆抗体”并不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”是指来源于单个克隆（包括任何真核、原核或噬菌体克隆）的抗体，而不是指其产生方法。

[0206] 使用杂交瘤技术产生及筛选特定抗 IL-1β 抗体的方法为常规的且在本领域中公知。在一个实施方式中，本发明提供产生单克隆抗体的方法以及由此方法产生的抗体，该方法包括培养分泌本发明抗体的杂交瘤细胞，其中优选地该杂交瘤通过使从用本发明抗原免疫的小鼠分离的脾细胞与骨髓瘤细胞融合，且随后在由融合产生的杂交瘤中筛选分泌能够结合本发明多肽的抗体的杂交瘤克隆而产生。简言之，可用 IL-1β 抗原免疫小鼠。在一个示例性实施方式中，将 IL-1β 抗原与佐剂一起施用以刺激免疫应答。这些佐剂包括完全或不完全弗氏佐剂、RIBI（胞壁酰二肽）或 ISCOM（免疫刺激复合物）。这些佐剂可通过将多肽隔离于局部沉积物中而保护其免于快速分散，或其可含有刺激宿主分泌对巨噬细胞及免疫系统的其它组分具有趋化性的因子的物质。优选地，若施用多肽，则免疫安排将包括两次或更多次多肽施用，为期数周。

[0207] 用 IL-1β 抗原免疫动物后，可自该动物获得抗体和 / 或产生抗体的细胞。通过将动物放血或处死而自该动物获得含有抗 IL-1β 抗体的血清。血清可以如获自动物时的原样来使用，可从血清获得免疫球蛋白部分，或可从血清纯化抗 IL-1β 抗体。以此方式获得的血清或免疫球蛋白为多克隆的，因此具有异质的性质组合。

[0208] 一旦检测到免疫反应，例如在小鼠血清中检测到对抗原 IL-1β 具特异性的抗体，则收获小鼠脾脏且分离脾细胞。随后通过公知技术使脾细胞与任何适合的骨髓瘤细胞（例如来自可从美国典型培养物保藏中心 (ATCC,Manassas,Virginia) 获得的细胞系 SP20 的细胞）融合。通过有限稀释选择杂交瘤并克隆。随后针对分泌能够结合 IL-1β 的抗体的细胞，通过本领域中已知的方法分析杂交瘤克隆。可通过用阳性杂交瘤克隆免疫小鼠来产生通常含有高水平抗体的腹水。

[0209] 在另一实施方式中，可由免疫的动物制备产生抗体的永生化杂交瘤。免疫后，将动物处死且如本领域中所公知的使脾 B 细胞与永生化骨髓瘤细胞融合。参见，例如 Harlow 等人，同上。在示例性实施方式中，骨髓瘤细胞不分泌免疫球蛋白多肽（非分泌性细胞系）。在融合及抗生素选择后，使用 IL-1β 或其部分或者表达 IL-1β 的细胞来筛选杂交瘤。在示例性实施方式中，使用酶联免疫吸附分析 (ELISA) 或放射免疫分析 (RIA)，优选 ELISA 来进行初始筛选。ELISA 筛选的实例于 PCT 公开号 WO 00/37504 中提供，其以引用的方式并入本文中。

[0210] 选择产生抗 IL-1β 抗体的杂交瘤，进行克隆，且针对所需特征（包括稳健的杂交瘤生长、高抗体产量及如以下进一步讨论的所需抗体特征）进一步筛选。杂交瘤可在同基因的动物中、缺乏免疫系统的动物（例如裸鼠）中体内培养及扩增，或在体外细胞培养物中培养及扩增。选择、克隆及扩增杂交瘤的方法为本领域技术人员所公知。

[0211] 在示例性实施方式中，杂交瘤为如上所述的小鼠杂交瘤。在另一优选实施方案中，杂交瘤在非人、非小鼠物种（诸如大鼠、绵羊、猪、山羊、牛或马）中产生。在另一实施方式

中，杂交瘤为人杂交瘤，其中人非分泌性骨髓瘤与表达抗 IL-1β 抗体的人细胞融合。

[0212] 可由已知技术产生识别特异性表位的抗体片段。例如，可通过使用诸如木瓜蛋白酶（以产生 Fab 片段）或胃蛋白酶（以产生 $F(ab')_2$ 片段）的酶蛋白酶切免疫球蛋白分子来产生本发明的 Fab 及 $F(ab')_2$ 片段。$F(ab')_2$ 片段含有可变区、轻链恒定区及重链 CHI 结构域。

[0213] 2. 使用 SLAM 的抗 IL-1β 单克隆抗体

[0214] 在本发明的另一方面中，使用如美国专利号 5,627,052；PCT 公开号 WO 92/02551 及 Babcook 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93：7843-7848(1996) 中所述的在本领域中称为选择淋巴细胞抗体法 (selected lymphocyte antibody method, SLAM) 的程序从单一的分离淋巴细胞产生重组抗体。在此方法中，使用抗原特异性溶血空斑分析来筛选分泌目标抗体的单细胞，例如来源于第 1 部分中所述的任一免疫动物的淋巴细胞，其中抗原 IL-1β、IL-1β 的亚基或其片段使用诸如生物素的接头与绵羊红细胞偶联，且用于鉴别分泌对 IL-1β 具特异性的抗体的单细胞。在鉴别分泌抗体的目标细胞后，通过逆转录酶 -PCR 从细胞中拯救 (rescue) 重链及轻链可变区 (VH 及 VL) cDNA，且随后在适当免疫球蛋白恒定区（例如人恒定区）的情况中，可在哺乳动物宿主细胞（诸如 COS 或 CHO 细胞）中表达这些可变区。随后用来源于体内选择的淋巴细胞的扩增免疫球蛋白序列转染的宿主细胞可进行进一步体外分析及选择，例如通过淘选转染的细胞来分离表达针对 IL-1β 的抗体的细胞。扩增的免疫球蛋白序列可进一步体外操作，诸如通过体外亲和力成熟方法（诸如 PCT 公开号 WO 97/29131 及 PCT 公开号 WO 00/56772 中所述的方法）。

[0215] 3. 使用转基因动物的抗 IL-1β 单克隆抗体

[0216] 在本发明的另一实施方式中，通过用 IL-1β 抗原免疫包含一些或全部人免疫球蛋白基因座的非人动物来产生抗体。在示例性实施方式中，非人动物为 XENOMOUSE 转基因小鼠，其为包含人免疫球蛋白基因座的大片段且缺乏小鼠抗体产生的工程化小鼠品系。参见，例如 Green 等人，Nature Genetics, 7：13-21(1994) 及美国专利号 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 1991 年 7 月 25 日公开的 PCT 公开号 WO 91/10741；1994 年 2 月 3 日公开的 WO 94/02602；1996 年 10 月 31 日公开的 WO 96/34096 与 WO 96/33735；1998 年 4 月 23 日公开的 WO 98/16654；1998 年 6 月 11 日公开的 WO 98/24893；1998 年 11 月 12 日公开的 WO 98/50433；1999 年 9 月 10 日公开的 WO 99/45031；1999 年 10 月 21 日公开的 WO 99/53049；2000 年 2 月 24 日公开的 WO 00/09560 及 2000 年 6 月 29 日公开的 WO 00/037504。XENOMOUSE® 转基因小鼠产生完全人抗体的成人样人集合 (adult-like human repertoire)，且生成抗原特异性人 Mab。XENOMOUSE® 转基因小鼠通过引入人重链基因座及 x 轻链基因座的百万碱基 (megabase) 大小的种系构型 YAC 片段而含有约 80％的人抗体组合。参见 Mendez 等人，Nature Genetics, 15：146-156(1997) 及 Green 和 Jakobovits, J. Exp. Med., 188：483-495(1998)，两者的公开内容以引用的方式并入本文中。

[0217] 4. 使用重组抗体文库的抗 IL-1β 单克隆抗体

[0218] 还可使用体外方法制备本发明的抗体，其中筛选抗体文库以鉴别具有所需结合特异性的抗体。用于这种重组抗体文库筛选的方法在本领域中公知且包括例如以下

文献中所描述的方法：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，Bio/Technology,9：1369-1372(1991)；Hay 等人，Hum.Antibod.Hybridomas,3：81-85(1992)；Huse 等人，Science,246：1275-1281(1989)；McCafferty 等人，Nature,348：552-554(1990)；Griffiths 等人，EMBO J.,12：725-734(1993)；Hawkins 等人，J.Mol.Biol.,226：889-896(1992)；Clackson 等人，Nature,352：624-628(1991)；Gram 等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89：3576-3580(1992)；Garrard 等人，Bio/Technology,9：1373-1377(1991)；Hoogenboom 等人，Nucl.Acids Res.,19：4133-4137(1991) 及 Barbas 等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88：7978-7982(1991)；美国公开号 2003/0186374 及 PCT 公开号 WO 97/29131，所述各文献的内容以引用的方式并入本文中。

[0219] 重组抗体文库可来自用 IL-1β 或 IL-1β 的一部分免疫的受试者。或者，重组抗体文库可来自未经处理的受试者，即未用 IL-1β 免疫的受试者，诸如来自未用人 IL-1β 免疫的人类受试者的人抗体文库。通过用包含人 IL-1β 的肽筛选重组抗体文库而选择出本发明的抗体，从而选择识别 IL-1β 的那些抗体。进行该筛选及选择的方法在本领域中公知，诸如前一段的参考文献中所描述的。为了选择对人 IL-1β 具有特定结合亲和力的本发明抗体，诸如以特定 K_{off} 速率常数与人 IL-1β 解离的抗体，可使用本领域已知的表面等离子体共振方法来选择具有所需 K_{off} 速率常数的抗体。为了选择对人 IL-1β 具有特定中和活性的本发明抗体，诸如具有特定 IC_{50} 的抗体，可使用本领域中已知用于评估人 IL-1β 活性抑制的标准方法。

[0220] 在一个方面，本发明涉及结合人 IL-1β 的分离的抗体或其抗原结合部分。该抗体优选为中和抗体。在各种实施方式中，该抗体为重组抗体或单克隆抗体。

[0221] 例如，还可使用本领域已知的各种噬菌体展示法来产生本发明的抗体。在噬菌体展示法中，功能抗体结构域展示在带有其编码多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面上。特别地，可利用该噬菌体以展示从集合 (repertoire) 或组合抗体文库（例如人或鼠）表达的抗原结合结构域。可利用抗原，例如使用标记的抗原或者结合或捕捉于固体表面或珠上的抗原来选择或鉴别表达与目标抗原结合的抗原结合结构域的噬菌体。这些方法中所用的噬菌体通常为丝状噬菌体，其包括从具有与噬菌体基因 III 或基因 VIII 蛋白质重组融合的 Fab、Fv 或二硫键稳定的 Fv 抗体结构域的噬菌体表达的 fd 和 M13 结合结构域。可用于制备本发明抗体的噬菌体展示方法的实例包括以下文献中所公开的方法：Brinkmann 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，Adv.Immunol.,57：191-280(1994)；PCT 公开号 WO 90/02809；WO 91/10737；WO 92/01047(PCT/GB91/01134)；WO 92/18619；WO 93/11236；WO 95/15982；WO 95/20401；及美国专利号 5,698,426；5,223,409；5,403,484；5,580,717；5,427,908；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；所述各文献以全文引用的方式并入本文中。

[0222] 如以上参考文献中所述，在噬菌体选择后，来自噬菌体的抗体编码区可被分离且

用于产生包括人抗体的完整抗体或任何其它所需抗原结合片段，且在任何所需宿主（包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母及细菌）中表达，例如如下详述的。例如，还可使用本领域中已知的方法来应用重组产生 Fab、Fab′ 及 F(ab′)2 片段的技术，诸如 PCT 公开号 WO 92/22324 ;Mullinax 等人，BioTechniques，12(6) :864-869(1992) 和 Sawai 等人，Am. J. Reprod. Immunol.，34 :26-34(1995) 及 Better 等人，Science，240 :1041-1043(1988)（这些参考文献以全文引用的方式并入）中所公开的方法。可用于产生单链 Fv 及抗体的技术的实例包括美国专利号 4,946,778 和 5,258,498 ;Huston 等人，Methods Enzymol.，203 :46-88(1991) ;Shu 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，90 :7995-7999(1993) 及 Skerra 等人，Science，240 :1038-1041(1988) 中所描述的技术。

[0223] 替代于通过噬菌体展示筛选重组抗体文库，本领域中已知用于筛选较大组合文库的其它方法可应用于鉴别本发明的双重特异性抗体。如 Szostak 和 Roberts 的 PCT 公开号 WO 98/31700 和 Roberts 及 Szostak，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，94 :12297-12302(1997) 中所述的，一种类型的可选表达系统是将重组抗体文库表达为 RNA- 蛋白质融合体的表达系统。在此系统中，通过体外翻译在 3′ 末端带有嘌呤霉素（肽基受体抗生素）的合成 mRNA 而在 mRNA 与其编码的肽或蛋白质之间形成共价融合体。因此，可基于所编码的肽或蛋白质（例如抗体或其部分）的性质（诸如抗体或其部分与双重特异性抗原的结合），从 mRNA 的复杂混合物（例如组合文库）富集特定 mRNA。可通过如上所述的重组方式（例如在哺乳动物宿主细胞中）表达从这些文库的筛选所回收的编码抗体或其部分的核酸序列，且另外可通过对向最初选择的序列中引入突变的 mRNA- 肽融合体的更多轮筛选或通过如上所述的用于重组抗体的体外亲和力成熟的其它方法来进行进一步亲和力成熟。

[0224] 在另一途径中，还可使用本领域中已知的酵母展示方法来产生本发明的抗体。在酵母展示方法中，使用遗传方法将抗体结构域栓系 (tether) 至酵母细胞壁上且使其展示在酵母表面上。具体而言，可利用这类酵母展示从集合或组合抗体文库（例如人或鼠）表达的抗原结合域。可用于制备本发明抗体的酵母展示方法的实例包括 Wittrup 等人在美国专利号 6,699,658 中所公开的方法，该专利以引用的方式并入本文中。

[0225] B. 产生重组 IL-1β 抗体

[0226] 可由本领域中已知的众多技术中的任一种来产生本发明的抗体。例如，从宿主细胞表达，其中通过标准技术将编码重链及轻链的表达载体转染至宿主细胞中。各种形式的术语“转染”意图涵盖通常用于将外源 DNA 引入原核或真核宿主细胞中的多种技术，例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE- 葡聚糖转染等。尽管有可能在原核或真核宿主细胞中表达本发明的抗体，但因为真核细胞（且尤其哺乳动物细胞）与原核细胞相比更可能组装和分泌适当折叠且具免疫活性的抗体，所以优选在这类真核细胞中且最优选在哺乳动物宿主细胞中表达抗体。

[0227] 用于表达本发明重组抗体的优选的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞 (CHO 细胞）（包括 Urlaub 和 Chasin，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，77 :4216-4220(1980) 中所述的 dhfr-CHO 细胞，其与 DHFR 可选择标记一起使用，如例如 Kaufman 和 Sharp，J. Mol. Biol.，159 :601-621(1982) 中所述）、NS0 骨髓瘤细胞、COS 细胞及 SP2 细胞。当将编码抗体基因的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞中时，通过培养宿主细胞足以允许抗体在宿主细胞中表达或更优选地允许抗体分泌至宿主细胞所生长的培养基中的一段时间来产生

抗体。可使用标准蛋白质纯化方法从培养基中回收抗体。

[0228] 还可使用宿主细胞产生功能性抗体片段，如 Fab 片段或 scFv 分子。应理解，上述程序的变型处于本发明的范围内。例如，可能需要用编码本发明抗体的轻链和 / 或重链的功能片段的 DNA 转染宿主细胞。还可使用重组 DNA 技术移除一些或全部编码并非目标抗原结合所必需的轻链及重链之一或两者的 DNA。本发明的抗体也包括从这类截断 DNA 分子表达的分子。另外，可通过使用标准化学交联方法使本发明抗体与第二抗体交联来产生双功能抗体，其中一条重链及一条轻链为本发明抗体且另一重链及另一轻链对目标抗原以外的抗原具特异性。

[0229] 在重组表达本发明的抗体或其抗原结合部分的示例性系统中，通过磷酸钙介导的转染将编码抗体重链和抗体轻链的重组表达载体引入 dhfr-CHO 细胞中。在重组表达载体内，使抗体重链及轻链基因各自可操作地连接至 CMV 增强子 /AdMLP 启动子调节元件以驱动基因的高水平转录。重组表达载体还带有 DHFR 基因，其允许使用甲氨蝶呤选择 / 扩增来选择已经用载体转染的 CHO 细胞。培养所选的转化体宿主细胞以允许抗体重链及轻链表达，且从培养基中回收完整抗体。使用标准分子生物学技术来制备重组表达载体，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抗体。再另外，本发明提供通过在适合的培养基中培养本发明的宿主细胞直至合成本发明的重组抗体来合成本发明重组抗体的方法。该方法可进一步包括从培养基中分离重组抗体。

[0230] 1. 抗人 IL-1β 嵌合抗体

[0231] 嵌合抗体为其中抗体的不同部分来源于不同动物物种的分子，诸如具有来源于鼠单克隆抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的抗体。产生嵌合抗体的方法在本领域中已知且于实施例部分中详细讨论。参见，例如 Morrison，S.L.，Science，229 :1202-1207(1985) ；Oi 等 人，BioTechniques，4 :214-221(1986) ；Gillies 等 人，J.Immunol.Methods，125 :191-202(1989) ；美国专利号 5,807,715 ；4,816,567 和 4,816,397，这些文献以全文引用的方式并入本文中。另外，可使用经开发用于通过将来自具有适当抗原特异性的小鼠抗体分子的基因与来自具有适当生物学活性的人抗体分子的基因剪接在一起来产生“嵌合抗体”的技术 (Morrison 等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，81 :6851-6855(1984) ；Neuberger 等人，Nature，312 :604-608(1984) ；Takeda 等人，Nature，314 :452-454(1985)，这些文献以全文引用的方式并入本文中)。

[0232] 在一个实施方式中，通过用人 IgG1 恒定区替换第 1 部分中所述的鼠单克隆抗人 IL-1β 抗体的重链恒定区而制备本发明的嵌合抗体。

[0233] 2. 抗 IL-1β CDR 移植抗体

[0234] 本发明的 CDR 移植抗体包含来自人抗体的重链及轻链可变区序列，其中 V_H 和 / 或 V_L 的一个或多个 CDR 区替换为本发明的鼠抗体的 CDR 序列。来自任何人抗体的框架序列可用作 CDR 移植的模板。然而，此类框架上的直接链置换通常导致与抗原的结合亲和力的一定损失。人抗体与原始鼠抗体的同源性越高，则鼠 CDR 与人框架组合向 CDR 中引入可降低亲和力的畸变的可能性会越小。因此，经选择来替换除 CDR 以外的鼠可变框架的人可变框架优选与鼠抗体可变区框架具有至少 65％的序列同一性。除 CDR 以外的人和鼠可变区更优选具有至少 70％的序列同一性。除 CDR 以外的人和鼠可变区甚至更优选具有至少 75％的序列同一性。除 CDR 以外的人和鼠可变区最优选具有至少 80％的序列同一性。产

生嵌合抗体的方法是本领域中已知的。参见例如欧洲专利号 EP 0 239 400 ;PCT 公开号 WO 91/09967 ;美国专利号 5,225,539 ;5,530,101 和 5,585,089。关于抗体的镶饰 (veneering) 或表面重塑,参见例如欧洲专利号 EP 0 592 106 和 EP 0 519 596 ;Padlan,Mol.Immunol.,28(4/5) :489-498(1991) ;Studnicka 等人,Protein Eng.,7(6) :805-814(1994) 及 Roguska 等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,91 :969-973(1994)。关于抗体链改组,参见例如美国专利号 5,565,352。

[0235] 3. 抗人 IL-1β 人源化抗体

[0236] 人源化抗体为来自结合所需抗原的非人物种抗体的抗体分子,其具有来自非人物种抗体的一个或多个互补决定区 (CDR) 及来自人免疫球蛋白分子的框架区。已知人 Ig 序列公开于例如以下互联网站点 :www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-/query.fcgi ;www.atcc.org/phage/hdb.html ;www.sciquest.com/ ;www.abcam.com/ ;www.antibodyresource.com/onlinecomp.html ;www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html ;www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html ;www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm ;www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibod y.html ;www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/ ;www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/m-ikeimages.html ;www.antibodyresource.com/ ;mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html.www.immunologylink.com/ ;pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.-html ;www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/ ;www.pebio.com/pa/340913/340913.html- ;www.hal.usda.gov/awic/pubs/antibody/ ;www.m.ehime-u.acjp/.about.yasuhito-/Elisa.html ;www.biodesign.com/table.asp ;www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html ;www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html ;www.isac-net.org/sites_geo.html ;aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html ;baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/linksl.html ;www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/ ;www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html ;www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html ;imgt.cnusc.fr :8104/ ;www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html ;antibody.bath.ac.uk/ ;abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html ;www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slide01.html ;www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/ ;www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm ;www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html ;www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html ;www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html ;www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html ;www.jerini.de/fr roducts.htm ;www.patents.ibm.com/ibm.html,Kabat 等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Dept.Health(1983),这些各自以全文引用的方式并入本文中。这些输入序列可用于降低免疫原性,或降低、增强或改变结合、亲和力、结合速率 (on-rate)、解离速率 (off-rate)、亲合力 (avidity)、特异性、半衰期或如本领域中已知的任何其它适合特征。

[0237] 人框架区中的框架 (FR) 残基可用来自 CDR 供体抗体的相应残基置换以改变、优选提高抗原结合。这些框架置换通过本领域中熟知的方法鉴别,例如通过建立 CDR 与框架残基的相互作用模型以鉴别对抗原结合重要的框架残基,和进行序列比较以鉴别特定位置处的异常框架残基。参见,例如 Queen 等人,美国专利号 5,585,089 ;Riechmann 等人,Nature,

332 :323-327(1988),这些文献以全文引用的方式并入本文中。三维免疫球蛋白模型通常可获得且为本领域技术人员所熟知。可获得说明及显示选定候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。对这些显示的研究允许分析残基在候选免疫球蛋白序列功能发挥方面可能起到的作用,即,分析影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基。以此方式,可从共有序列及输入序列选择并组合 FR 残基,以获得所需抗体特征,诸如对靶抗原的亲和力增加。通常,CDR 残基直接且最显著地参与影响抗原结合。可使用本领域中已知的多种技术对抗体进行人源化,诸如但不限于以下文献中所描述的技术 :Jones 等人, Nature, 321 :522-525(1986) ;Verhoeyen 等 人, Science,239 :1534-1536(1988) ;Sims 等 人, J. Immunol.,151 :2296-2308(1993) ;Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol.,196 :901-917(1987) ; Carter 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,89 :4285-4289(1992) ;Presta 等人, J. Immunol., 151 :2623-2632(1993) ;Padlan, Mol. Immunol.,28(4/5) :489-498(1991) ;Studnicka 等人, Protein Eng.,7(6) :805-814(1994) ;Roguska 等 人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,91 : 969-973(1994) ;PCT 公 开 号 WO 91/09967 ;WO 90/14443 ;WO 90/14424 ;WO 90/14430 ; WO 99/06834(PCT/US98/16280) ;WO 97/20032(PCT/US96/18978) ;WO 92/11272(PCT/ US91/09630) ;WO 92/03461(PCT/US91/05939) ;WO 94/18219(PCT/US94/01234) ;WO 92/01047(PCT/GB91/01134) 和 WO 93/06213(PCT/GB92/01755) ;欧洲专利号 EP 0 592 106 ;EP 0 519 596 和 EP 0 239 400 ;美国专利号 5,565,332 ;5,723,323 ;5,976,862 ; 5,824,514 ;5,817,483 ;5,814,476 ;5,763,192 ;5,723,323 ;5,766,886 ;5,714,352 ; 6,204,023 ;6,180,370 ;5,693,762 ;5,530,101 ;5,585,089 ;5,225,539 和 4,816,567,这些文献以全文引用的方式并入本文中,包括其中所引用的参考文献。

[0238] 5. 抗 IL-1β DVD-Ig™ 结合蛋白

[0239] 还提供结合 IL-1β 的一个或多个表位的双重可变域免疫球蛋白结合蛋白(DVD-Ig)。DVD-Ig 结合蛋白还可结合 IL-1β 的表位及 IL-1β 多肽以外的第二靶抗原的表位。这类 DVD-Ig 分子的示例性实施方式包含含有结构式 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n 的重链,其中 VD1 为第一重链可变结构域,VD2 为第二重链可变结构域,C 为重链恒定结构域,X1 为接头,条件为其不为 CH1, X2 为 Fc 区,且 n 为 0 或 1,优选为 1 ;及含有结构式 VD1-(X1) n-VD2-C-(X2)n 的轻链,其中 VD1 为第一轻链可变结构域,VD2 为第二轻链可结构变域,C 为轻链恒定结构域, X1 为接头,条件为其不为 CH1,和 X2 不包含 Fc 区 ;且 n 为 0 或 1,优选为 1。该 DVD-Ig 可包含两条这样的重链及两条这样的轻链,其中各链包含串联连接的可变结构域,而在可变区之间没有插入的恒定区,其中重链与轻链结合以形成两个串联的抗原结合位点,且一对重链和轻链可与另一对重链和轻链结合以形成具有四个抗原结合位点的四聚体结合蛋白。在另一实施方案中,DVD-Ig 分子可包含各含有串联连接的三个可变结构域(例如 VD1、VD2、VD3) 的重链和轻链,在可变结构域之间没有插入的恒定区,其中一对重链和轻链可结合以形成三个抗原结合位点,且其中一对重链和轻链可与另一对重链和轻链结合以形成具有六个抗原结合位点的四聚体结合蛋白。

[0240] DVD-Ig 中的各可变结构域 (VD) 可从结合一种或多种所需抗原或表位(诸如 IL-1β 和 / 或 IL-1α 抗原或表位)的一种或多种“亲本”单克隆抗体获得。

[0241] A. 生成亲本单克隆抗体

[0242] DVD-Ig 结合蛋白的可变结构域可从能够结合目标抗原的亲本抗体(包括单克隆

抗体 (mAb)) 获得。这些抗体可天然产生或可通过重组技术生成。应了解,如果结合所需靶抗原或表位的抗体为多克隆抗体,则仍有必要获得来自多克隆群体的单一抗体(即多克隆群体的单一单克隆成员)的抗原结合位点的可变结构域用于生成 DVD-Ig。单克隆抗体可通过本领域中已知的多种方法中的任一种生成,包括本文所述的那些方法(参见上文 A.1.-A.4. 部分)。

[0243] B. 选择亲本单克隆抗体的标准

[0244] 本发明的实施方式涉及选择具有在 DVD-Ig 分子中所需的至少一种或多种性质的亲本抗体。在一个实施方式中,所需性质选自一个或多个抗体参数。在另一实施方案中,抗体参数选自抗原特异性、与抗原的亲和力、效力、生物学功能、表位识别、稳定性、溶解度、生产效率、免疫原性、药代动力学、生物利用度、组织交叉反应性及直系同源抗原结合。

[0245] B1. 对抗原的亲和力

[0246] 治疗性 mAb 的所需亲和力可取决于抗原的性质及所需治疗终点。在实施方式中,因为细胞因子-细胞因子受体相互作用通常为高亲和力相互作用(例如<pM-<nM 范围),当单克隆抗体阻断该相互作用时,单克隆抗体具有较高亲和力 (Kd = 0.01-0.50pM)。在这些情况下,mAb 对于其靶标的亲和力应等于或超过细胞因子(配体)对于其受体的亲和力。另一方面,具有较小亲和力(>nM 范围)的 mAb 可例如治疗上有效地清除循环的潜在病理蛋白,例如结合、隔离和清除诸如 A-β 淀粉样蛋白的循环靶抗原物质的单克隆抗体。在其它情况下,通过定点诱变来降低现有高亲和力 mAb 的亲和力或使用对其靶标具有较低亲和力的 mAb 可用于避免潜在副作用,例如高亲和力 mAb 可隔绝或中和所有其预定靶,由此完全消耗/消除所靶向蛋白的功能。在此情况下,低亲和力 mAb 可隔离/中和可能会造成疾病症状的靶标的一部分(病理学水平或过量产生的水平),因此使得靶标的一部分可继续执行其正常生理功能。因此,可能会降低 Kd 以调节剂量和/或降低副作用。亲本 mAb 的亲和力可在适当地靶向细胞表面分子中起作用以实现所需治疗结果。例如,若靶标以高密度表达于癌细胞上且以低密度于正常细胞上表达,则与正常细胞相比,较低亲和力 mAb 将结合更大量的肿瘤细胞上的靶标,导致通过 ADCC 或 CDC 消除肿瘤细胞,且因此可具有所需治疗作用。因此,选择具有所需亲和力的 mAb 对于可溶性及表面靶标两者均有意义。

[0247] 经受体与其配体相互作用的信号传导可取决于受体-配体相互作用的亲和力。类似地,可以设想 mAb 对于表面受体的亲和力可决定细胞内信号传导的性质及 mAb 是否可传递激动信号或拮抗信号。mAb 介导的信号传导的基于亲和力的性质可影响其副作用谱。因此,治疗性单克隆抗体的所需亲和力及所需功能需要通过体外及体内实验小心地确定。

[0248] 结合蛋白(例如抗体)的所需 Kd 可根据所需治疗结果而以实验方式来确定。在一个实施方式中,选择对于特定抗原的亲和力 (Kd) 等于或超过 DVD-Ig 对于相同抗原的所需亲和力的亲本抗体。抗原结合亲和力及动力学通过 Biacore 或另一类似技术来评估。在一个实施方式中,各亲本抗体具有选自以下的与其抗原的解离常数 (Kd):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 及至多 10^{-13}M。从中获得 VD1 的第一亲本抗体及从中获得 VD2 的第二亲本抗体可具有对于相应抗原的类似或不同的亲和力 (K_D)。各亲本抗体如通过表面等离子共振所测量的具有选自以下的与抗原的结合速率常数 (Kon):至少约 $10^2M^{-1}s^{-1}$、至少约 $10^3M^{-1}s^{-1}$、至少约 $10^4M^{-1}s^{-1}$、至少约 $10^5M^{-1}s^{-1}$ 及至少约 $10^6M^{-1}s^{-1}$。从中获得例如 VD1 的第一亲本抗体及从中获得 VD2 的第二亲本抗体可具有对

于相应抗原的类似或不同的结合速率常数(Kon)。在一个实施方式中,各亲本抗体如通过表面等离子体共振所测量的具有选自以下的与抗原的解离速率常数(Koff):至多约 $10^{-3}s^{-1}$、至多约 $10^{-4}s^{-1}$、至多约 $10^{-5}s^{-1}$ 及至多约 $10^{-6}s^{-1}$。从中获得 VD1 的第一亲本抗体及从中获得 VD2 的第二亲本抗体可具有对于相应抗原的类似或不同的解离速率常数(Koff)。

[0249] B2. 效力

[0250] 亲本单克隆抗体的所需亲和力/效力取决于所需治疗结果。例如,对于受体-配体(R-L)相互作用,亲和力(kd)等于或超过 R-L kd(pM 范围)。对于病理性循环蛋白的简单清除,Kd 可在低 nM 范围中,例如各种循环 A-β 肽的清除。另外,Kd 还取决于靶标是否表达同一表位的多个拷贝,例如靶向 Aβ 寡聚物中的构象表位的 mAb。

[0251] 在 VDI 和 VD2 结合相同抗原但结合不同表位的情况下,DVD-Ig 含有针对同一抗原的结合位点,因此增大 DVD-Ig 的亲合力且由此增大表观 Kd。在实施方式中,选择具有与 DVD-Ig 中的所需 Kd 相等或较低的 kd 的亲本抗体。亲本 mAb 的亲和力考虑还可取决于 DVD-Ig 是否含有四个或更多的相同抗原结合位点(即来自单一 mAb 的 DVD-Ig)。在此情况下,表观 kd 将由于亲合力而大于 mAb。这类 DVD-Ig 可用于交联表面受体、增强中和效力、增强病理蛋白的清除等。

[0252] 在另一实施方式中,选择对于特异性抗原的中和效力等于或超过 DVD-Ig 对于相同抗原的所需中和潜力的亲本抗体。中和效力可通过靶依赖性生物测定法来评估,其中适当类型的细胞响应于靶刺激而产生可测量信号(即增殖或细胞因子产生),且 mAb 的靶中和可以按剂量依赖性方式降低信号。

[0253] B3. 生物学功能

[0254] 单克隆抗体可潜在地执行若干功能,这些功能中的一些列于表 5 中。这些功能可通过体外分析(例如基于细胞的分析及生物化学分析)及体内动物模型来评估。

[0255] 表 5. 治疗性抗体的一些潜在应用

[0256]

靶(类别)	作用机制(靶)
可溶性的(细胞因子,其它)	活性的中和(例如,细胞因子,如 IL-1β) 增强清除(例如,Aβ 寡聚体) 增加半衰期(例如,GLP 1)
细胞表面(受体,其它)	激动剂(例如,GLP1 R, EPO R 等) 拮抗剂(例如,整联蛋白等) 细胞毒性的(CD 20 等)
蛋白质沉积物	增强清除/降解(例如,Aβ 斑块,淀粉样蛋白沉积物)

[0257] 可选择具有在本文实施例中及表 5 中所述的不同功能的 mAb 以实现所需治疗结果。两种或更多种所选亲本单克隆抗体可随后用于 DVD-Ig 形式中以在单一 DVD-Ig 分子中实现两种不同功能。例如,DVD-Ig 可通过选择中和特定细胞因子(诸如 IL-1β)的功能的

亲本 mAb 和选择增强病理性蛋白的清除的亲本 mAb 来生成。类似地，可选择识别两种不同细胞表面受体的两种亲本 mAb，一种 mAb 具有对于一种受体的激动剂功能，而另一种 mAb 具有对于不同受体的拮抗剂功能。各自具有不同功能的这两种所选 mAb 可用于构建在单一分子中具有所选单克隆抗体的两种不同功能（激动剂和拮抗剂）的单一 DVD-Ig 分子。类似地，可以在 DVD-Ig 形式中使用针对细胞表面受体的两种拮抗性 mAb（各自阻断相应受体配体（例如 EGF 和 IGF）的结合）。相反地，可选择拮抗性抗受体 mAb（例如抗 EGFR）和中和性抗可溶性介质（例如抗 IGF1/2）mAb 来产生 DVD-Ig。

[0258] B4. 表位识别：

[0259] 蛋白质的不同区域可以执行不同的功能。例如，细胞因子（如 IL-1β）的特定区域与细胞因子受体相互作用以引起受体活化，而该蛋白质的其他区域可能是稳定细胞因子所需要的。在这种情况下中，可以选择与细胞因子上受体相互作用区域特异性结合并且从而阻断细胞因子-受体相互作用的 mAb。在一些情况下，例如结合多个配体的某些趋化因子受体，可以选择结合至仅与一个配体相互作用的表位（趋化因子受体上的区域）的 mAb。在其他情况下，单克隆抗体可以与靶标上不直接负责该蛋白质生理功能的表位结合，但是 mAb 与这些区域的结合可能干扰生理功能（空间位阻）或改变蛋白质的构象，从而该蛋白质不能发挥作用（针对具有多个配体的受体的 mAb，其改变受体构象从而没有一个配体可以结合）。也已经鉴定了不阻断细胞因子与其受体的结合，但阻断信号转导的抗细胞因子单克隆抗体（例如，125-2H，一种抗 IL-18mAb）。

[0260] 表位和 mAb 功能的实例包括但不限于阻断受体-配体 (R-L) 相互作用（结合 R- 相互作用位点的中和性 mAb）；导致削弱或无 R- 结合的空间位阻。抗体可以在受体结合位点之外的位点结合靶标，但仍通过诱导构象变化来干扰受体结合和靶标的功能及消除功能（例如 XOLAIR® 奥马珠单抗 (omalizumab)，Genetech/Novartis)，结合于 R 但阻断信号传导 (125-2H mAb)。

[0261] 在一个实施方式中，亲本 mAb 需要靶向适宜的表位以发挥最大功效。这类表位在 DVD-Ig 中应当是保守的。可以通过几种方法确定 mAb 的结合表位，包括共结晶学、mAb- 抗原复合物有限蛋白酶解法 + 质谱肽作图法 (Legros 等人，Protein Sci.，9：1002-1010(2000))、噬菌体展示肽文库 (O′ Connor 等人，J.Immunol.Methods.，299：21-35(2005)) 以及诱变 (Wu C. 等人，J.Immunol.，170：5571-5577(2003))。

[0262] B5. 物理化学和药学特性

[0263] 抗体的治疗性处理经常需要高剂量的施用，通常为几 mg/kg（这是由于由通常大分子量所致的基于质量的低效力）。为了适应患者依从性并且充分解决慢性疾病治疗和门诊患者治疗的问题，皮下 (s.c.) 或肌肉内 (i.m.) 施用治疗性 mAb 是合乎需要的。例如，皮下施用最大理想体积是约 1.0mL，并且因此需要 > 100mg/ml 的浓度以限制每剂的注射次数。在一个实施方式中，治疗性抗体以一个剂量施用。然而，这类制剂的开发受蛋白质 - 蛋白质相互作用（例如，聚集，这潜在地增加免疫原性风险）的制约，并受加工和递送过程中的局限性（例如，粘度）的制约。因此，临床疗效所要求的较大量和相关的开发制约因素限制了对抗体制剂潜力和以高剂量方案皮下施用的充分利用。显然，蛋白质分子和蛋白质溶液的物理化学和药学特性非常重要，例如，稳定性、溶解度和粘度特征。

[0264] B5.1. 稳定性

[0265] “稳定的”抗体制剂是其中的抗体在储存时基本上保留其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物学活性的制剂。稳定性可以在所选的温度下持续所选时间段来测量。在一个实施方式中，制剂中的抗体在室温（约30℃）或在40℃下稳定至少1个月和/或在约2-8℃下稳定至少1年，例如，至少2年。另外，在一个实施方式中，在制剂冷冻（至例如-70℃）和解冻（下文称作“冻/融循环”）后，制剂是稳定的。在另一个实例中，“稳定的”制剂可以是其中少于约10％和少于约5％的蛋白质在制剂中作为聚集物存在的制剂。

[0266] 在体外在各种温度下稳定延长时间段的DVD-Ig是合乎需要的。可以通过快速筛选在体外升高的温度（例如在40℃）下稳定2-4周的亲本mAb并且随后评估稳定性来实现该目的。在2-8℃下储存期间，蛋白质显示稳定至少12个月，例如，至少24个月。可以使用各种技术如阳离子交换层析、尺寸排阻层析、SDS-PAGE以及生物活性测试来评估稳定性（％单体的完整分子）。关于可以用来分析共价和构象修饰的分析技术的更全面清单，参见Jones，A.J.S.，“Analytical methods for the assessment of protein formulations and delivery systems”，第2章，Formulation and delivery of peptides and proteins，第1版，(Cleland和Langer编)(American Chemical Society，Washington，D.C.，1994)第22-45页及Pearlman和Nguyen，“Analysis of Protein drugs”，第6章，Peptide and protein drug delivery，第1版[Advances in Parenteral Sciences，第4卷](Lee，V.H.编)(Marcel Dekker，Inc.，New York，1991)第247-301页。

[0267] 异质性和聚集物形成：抗体的稳定性可以是使得制剂可以显示少于约10％，并且在一个实施方式中，少于约5％，在另一个实施方式中，少于约2％，或在一个实施方式中，处于0.5％至1.5％或更小的范围内的作为聚集物存在的GMP抗体物质。尺寸排阻层析是在检测蛋白质聚集物方面灵敏、可重现和非常稳定的方法。

[0268] 在一个实施方式中，除低聚集物水平之外，抗体还必须是化学稳定的。可以通过离子交换层析（例如，阳离子或阴离子交换层析）、疏水相互作用层析或其他方法（如等电聚焦或毛细管电泳法）来测定化学稳定性。例如，抗体的化学稳定性可以是使得在2-8℃下储存至少12个月后，与储存测试之前的抗体溶液相比，在阳离子交换层析中代表未修饰抗体的峰可以增加不多于20％，在一个实施方式中，不多于10％，或在另一个实施方式中，不多于5％。

[0269] 在一个实施方式中，亲本抗体显示结构完整性；正确的二硫键形成和正确的折叠：归因于抗体二级结构或三级结构变化的化学不稳定性可以影响抗体活性。例如，如抗体活性所指示的稳定性可以是使得在2-8℃下储存至少12个月后，与储存测试之前的抗体溶液相比，抗体的活性可以下降不多于50％，在一个实施方案中，不多于30％或甚至不多于10％，或在一个实施方式中不多于5％或1％。合适的抗原结合分析可以用来测定抗体活性。

[0270] B5.2.溶解度

[0271] mAb的“溶解度”与正确折叠的单体IgG的产生相关。可以因此通过HPLC评估IgG的溶解度。例如，可溶性（单体）IgG将在HPLC色谱图上产生单峰，而不溶性（例如，多聚和聚集的）IgG将产生多个峰。本领域技术人员将因此能够使用常规HPLC技术检测IgG溶解度的提高或降低。关于可以用来分析溶解度的分析技术的更全面清单，参见Jones，A.G.，Dep.Chem.Biochem.Eng.，Univ.Coll.London，“Particle formation and separation in

suspension crystallization processes",第4章,Process.Solid-Liquid Suspensions,(P.Ayazi Shamlou 编)(Butterworth-Heinemann,Oxford,UK,1993) 第 93-117 页 及 Pearlman 和 Nguyen,"Analysis of protein drugs",第 6 章,Peptide and protein drug delivery,第 1 版 [Advances in Parenteral Sciences,第 4 卷](Lee,V.H. 编)(Marcel Dekker,Inc.,New York,1991) 第 247-301 页。治疗性 mAb 的溶解度对于配制成通常充分给药所要求的高浓度是关键性的。如本文中概述的,为适应于有效抗体给药,可能要求>100mg/mL 的溶解度。例如,抗体溶解度可以在早期研究阶段不低于约 5mg/mL,在一个实施方式中在高级工艺科学阶段不低于约 25mg/mL,或在一个实施方式中不低于约 100mg/mL 或在一个实施方式中不低于约 150mg/mL。蛋白质分子的固有特性对蛋白溶液的物理化学特性(例如,稳定性、溶解度、粘度)是重要的。然而,本领域技术人员将理解,存在可用作添加剂以有益地影响最终蛋白质制剂的特征的广泛类型的赋形剂。这些赋形剂可以包括:(i) 液体溶剂、共溶剂(例如,醇类如乙醇);(ii) 缓冲剂(例如,磷酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、氨基酸缓冲剂);(iii) 糖或糖醇(例如,蔗糖、海藻糖、果糖、蜜三糖、甘露醇、山梨醇、葡聚糖);(iv) 表面活性剂(例如,聚山梨醇酯 20、40、60、80,泊洛沙姆);(v) 等渗调节剂(例如,盐如 NaCl、糖、糖醇);和 (vi) 其他(例如,防腐剂、螯合剂、抗氧化剂、螯合物质(例如,EDTA)、生物可降解聚合物、载体分子(例如,HSA、PEG))。

[0272] 就抗体制造和抗体加工(例如,渗滤/超滤)、填充-整饰 (fill-finish) 过程(泵送方面、过滤方面)和递送方面(可注射性、复杂装置递送)而言,粘度是十分重要的参数。低粘度使液态抗体溶液能够具有较高浓度。这使相同剂量能够以较小体积施用。较小的注射体积提供注射期间低疼痛的优点并且溶液不必需等渗以减轻患者注射时的疼痛。抗体溶液的粘度可以是使得在 100(1/s) 的剪切速率下,抗体溶液粘度低于 200mPa s,在一个实施方式中低于 125mPa s,在另一个实施方式中低于 70mPa s,并且在又另一个实施方式中低于 25mPa s 或甚至低于 10mPa s。

[0273] B5.3. 产生效率

[0274] 在一个实施方式中,产生在哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢细胞 (CHO)) 中有效表达的 DVD-Ig 需要本身在哺乳动物细胞中有效表达的两种亲本单克隆抗体。来自稳定哺乳动物细胞系(即,CHO) 的产量应当高于约 0.5g/L,在一个实施方式中高于约 1g/L,并且在另一个实施方式中处于约 2 至约 5g/L 或更高的范围内 (Kipriyanov 等人,Mol.Biotechnol.,12:173-201(1999);Carroll 等人,Expert Opin Biol Ther.,4:1821-1829(2004))。

[0275] 抗体和 Ig 融合蛋白在哺乳动物细胞中的产生受若干因素影响。通过并入强启动子、增强子和选择标记将表达载体工程化可以使目标基因从整合的载体拷贝的转录最大化。鉴定容许高水平基因转录的载体整合位点可以加强载体的蛋白质表达 (Wurm,F.M.,Nature Biotechnol.,22(11):1393-1398(2004))。另外,产生水平受抗体重链与轻链的比率和蛋白质装配和分泌过程中的各个步骤影响 (Jiang 等人,Biotechnol.Prog.,22(1):313-318(2006))。

[0276] B6. 免疫原性

[0277] 治疗性 mAb 的施用可以引起免疫反应(即,形成针对治疗性 mAb 的内源性抗体)的一定发生率。应当在选择亲本单克隆抗体期间分析可能诱导免疫原性的潜在要素,并且可以采取降低这类风险的步骤以在 DVD-Ig 构建之前优化亲本单克隆抗体。已发现源自小

鼠的抗体在患者中是高度免疫原性的。由小鼠可变区和人恒定区组成的嵌合抗体的产生呈现为降低治疗性抗体的免疫原性的下一逻辑步骤 (Morrison 和 Schlom, " Recombinant Chimeric Monoclonal Antibodies",第 1 章, Important Advances in Oncology1990(J. B.Lippincott Company,Philadelphia,(1990) 第 3-18 页)。可选地,可以通过将鼠 CDR 序列转移至人抗体框架中 (重构 /CDR 移植 / 人源化) 来降低免疫原性,如 Riechmann 等人, Nature,332 :323-327(1988) 对治疗性抗体所描述那样。另一种方法称作“表面重塑”或“镶饰”,其始于啮齿类可变轻链和重链结构域,仅将表面可及的框架氨基酸改变成人框架氨基酸,同时 CDR 和包埋的氨基酸仍来自亲本啮齿动物抗体 (Roguska 等人,Protein Eng., 9(10) :895-904(1996))。在另一种类型的人源化中,并非移植整个 CDR,一项技术仅移植“特异性决定区“(SDR),其定义为参与抗体与其靶标结合的 CDR 残基的子集 (Kashmiri 等人,Methods,36(1) :25-34(2005))。这需要通过分析抗体 - 靶标复合物的可得三维结构或对抗体 CDR 残基进行突变分析以确定哪些残基与靶标相互作用而鉴定 SDR。可选地,与鼠抗体、嵌合抗体或人源化抗体相比,完全人抗体可以具有降低的免疫原性。

[0278] 降低治疗性抗体免疫原性的另一种途径是消除经预测具有免疫原性的某些特定序列。在一种方法中,在第一代生物制品已经在人体测试并且发现存在不可接受的免疫原性后,可以将 B- 细胞表位作图并且随后将其改变以避免免疫探测。另一种方式使用预测和除去潜在 T- 细胞表位的方法。已经开发了计算方法来扫描并鉴定生物治疗药中具有与 MHC 蛋白结合的潜力的肽序列 (Desmet 等人, Proteins,58 :53-69(2005))。可选地,基于人树突细胞的方法可以用来鉴定潜在蛋白质变应原中的 $CD4^+$T- 细胞表位 (Stickler 等人, J.Immunother.,23 :654-660(2000) ;Morrison 和 Schlom,Important Adv.Oncol.(1990) 第 3-18 页 ;Riechmann 等人" Reshaping human antibodies for therapy",Nature.332 : 323-327(1988) ;Roguska 等 人, " A comparison oftwo murine mAbs humanized by CDR-grafting and variable domain resurfacing",Protein Eng.,9 :895-904(1996) ; Kashmiri 等人," SDR grafting-a new approach to antibody humanization",Methods, 36(1) :25-34(2005) ;Desmet 等 人, " Anchor profiles of HLA-specific peptides : analysis by a novel affinity scoring method and experimental validation ", Proteins,58 :53-69(2005) ;Stickler 等人," CD4+T-cell epitope determination using unexposed human donor peripheral blood mononuclear cells",J.Immunother.,23 : 654-660(2000))。

[0279] B7. 体内效力

[0280] 为了产生具有所需体内效力的 DVD-Ig 分子,重要的是产生并选择组合地提供时具有类似所需体内效力的 mAb。然而,在一些情况下, DVD-Ig 可以显示出不能以两种单独 mAb 的组合实现的体内效力。例如,DVD-Ig 可以使得两个靶标紧密靠近,从而产生不能以两种单独 mAb 组合实现的活性。本文在 B3 部分中描述额外的所需生物学功能。可以基于多种因素如药代动力学半衰期 (t1/2)、组织分布、可溶性靶标相对于细胞表面靶标以及靶浓度 - 可溶性 / 密度 - 表面来选择在 DVD-Ig 分子中具有所需特征的亲本抗体。

[0281] B8. 体内组织分布

[0282] 为了产生具有所需体内组织分布的 DVD-Ig 分子,在一个实施方式中,必须选择具有相似的所需体内组织分布概况的亲本 mAb。可选地,基于双重特异性靶向策略的机制,在

其他时候可能不需要选择当组合提供时具有类似的所需体内组织分布的亲本 mAb。例如在 DVD-Ig 的情况下，其中一个结合组分将 DVD-Ig 靶向于特定位点从而将第二结合组分引至相同靶位点。例如，DVD-Ig 的一种结合特异性可以靶向胰腺（胰岛细胞），和另一种特异性可以使得 GLP1 到达胰腺以诱导胰岛素。

[0283] B9. 同种型

[0284] 为了产生具有所需特性（包括但不限于同种型、效应子功能和循环半衰期）的 DVD-Ig 分子，根据治疗用途和所需的治疗终点选择拥有适宜 Fc- 效应子功能的亲本 mAb。存在 5 个主要重链类别或同种型，其中一些具有几个亚型，并且它们决定抗体分子的效应子功能。这些效应子功能存在于抗体分子的铰链区、CH2 和 CH3 结构域中。然而，在抗体分子其他部分中的残基也可以对效应子功能产生影响。铰链区 Fc- 效应子功能包括：(i) 抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)、(ii) 补体 (C1q) 结合、活化和补体依赖性细胞毒性 (CDC)、(iii) 抗原 - 抗体复合物的吞噬 / 清除和 (iv) 在一些情况下，细胞因子释放。抗体分子的这些 Fc- 效应子功能由 Fc 区与一组类别特异性细胞表面受体的相互作用来介导。IgG1 同种型的抗体是最有活性的，而 IgG2 和 IgG4 具有最小或没有效应子功能。IgG 抗体的效应子功能通过与 3 种在结构上同源的细胞 Fc 受体类型（和亚型）(FcgR1、FcgRII 和 FcgRIII) 的相互作用来介导。可以通过使下部铰链区中 FcgR 和 C1q 结合所需的特定氨基酸残基突变（例如，L234A、L235A) 来消除 IgG1 的这些效应子功能。在 Fc 区、尤其 CH2-CH3 结构域中的氨基酸残基也决定抗体分子的循环半衰期。这种 Fc 功能由 Fc 区与新生儿 Fc 受体 (FcRn) 的结合来介导，其负责从酸性溶酶体再循环抗体分子回至体循环中。

[0285] mAb 是否应当具有活性的或非活性的同种型将取决于抗体的所需治疗终点。下文列出同种型的用途和所需治疗结果的一些实例：

[0286] 1. 如果所需的终点是可溶性细胞因子的功能性中和，则可以使用非活性同种型；

[0287] 2. 如果所需的结果是清除病理性蛋白，则可以使用活性同种型；

[0288] 3. 如果所需的结果是清除蛋白质聚集物，则可以使用活性同种型；

[0289] 4. 如果所需的结果是拮抗表面受体，则使用非活性同种型 (Tysabri，IgG4；OKT3®，突变的 IgG1)；

[0290] 5. 如果所需的结果是消除靶细胞，则使用活性同种型（赫赛汀，IgG1（并且具有增强的效应子功能））；以及

[0291] 6. 如果所需的结果是从循环中清除蛋白质而不进入 CNS，可以使用 IgM 同种型（例如，清除循环型 Ab 肽物质）。

[0292] 可以通过本领域熟知的各种体外方法来确定亲本 mAb 的 Fc 效应子功能。

[0293] 如所讨论的，同种型的选择并且由此效应子功能将取决于所需的治疗终点。在其中需要单纯中和循环靶标（例如阻断受体 - 配体相互作用）的情况下，可以不需要效应子功能。在这类情况下，抗体 Fc 区内消除效应子功能的同种型或突变是合乎需要的。在其中消除靶细胞是治疗终点（例如消除肿瘤细胞）的其他情况下，Fc 区内增强效应子功能的同种型或突变或去岩藻糖基化是合乎需要的 (Presta，L.G.，Adv.Adv.Drug Del.Rev.，58：640-656(2006)；Satoh 等人，Expert Opin.Biol.Ther.，6：1161-1173(2006))。类似地，取决于治疗性用途，可以通过在 Fc 区内引入特定突变而调节抗体 -FcRn 相互作用来缩短 / 延长抗体分子的循环半衰期 (Dall'Acqua 等人，J.Biol.Chem.，281：23514-23524(2006)；

Petkova 等人，Int. Immunol.，18：1759-1769(2006)；Vaccaro 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，103：18709-18714(2006))。

[0294] 关于影响正常治疗性 mAb 的不同效应子功能的各种残基的公开信息可能需要针对 DVD-Ig 进行证实。以下情况是可能的：在 DVD-Ig 形式中，除经鉴定用于调节单克隆抗体效应子功能的那些残基之外，其它（不同）的 Fc 区残基可能是重要的。

[0295] 总体而言，关于哪种 Fc- 效应子功能（同种型）将在最终 DVD-Ig 形式中至关重要的判定将取决于疾病适应症、治疗靶标、所需的治疗终点和安全性考虑。下文列出示例性的适宜重链恒定区和轻链恒定区，包括但不限于：IgG1- 同种异型：G1mz；IgG1 突变体 -A234、A235；IgG2- 同种异型：G2m(n-)；κ -Km3；和 λ。

[0296] Fc 受体和 C1q 研究：可以通过铰链区突变（例如 L234A、L235A）来消除因抗体与细胞膜上任何过表达的靶标复合所致的不希望的抗体依赖性细胞介导细胞毒性 (ADCC) 和补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的可能性。这些置换的氨基酸（存在于 mAb 的 IgG1 铰链区内）预期导致 mAb 与人 Fc 受体（而非 FcRn）的结合减弱，原因是 FcgR 结合据认为在 IgG1 铰链区上的重叠位点内发生。mAb 的这个特征可以导致相对于含有野生型 IgG 的抗体改进的安全特征。可以通过流式细胞术实验使用细胞系（例如，THP-1、K562）和表达 FcgRIIb（或其他 FcgR）的工程化 CHO 细胞系来确定 mAb 与人 Fc 受体的结合。与 IgG1 对照单克隆抗体相比，mAb 显示与 FcgRI 和 FcgRIIa 的结合减少，而与 FcgRIIb 的结合不受影响。抗原 /IgG 免疫复合物导致的 C1q 结合和活化触发经典补体级联，伴随后续的炎症反应和 / 或免疫调节性反应。IgG 上的 C1q 结合位点已经定位至 IgG 铰链区内的残基。通过 C1q ELISA 评估 C1q 与增大浓度的 mAb 的结合。结果表明，如所预期那样，与野生型对照 IgG1 的结合相比，mAb 不能与 C1q 结合。总之，L234A、L235A 铰链区突变取消 mAb 与 FcgRI、FcgRIIa 和 C1q 的结合，但是不影响 mAb 与 FcgRIIb 的相互作用。这些数据表明，具有突变 Fc 的 mAb 在体内将正常地与抑制性 FcgRIIb 相互作用，但是将可能不与活化 FcgRI 和 FcgRIIa 受体或 C1q 相互作用。

[0297] 人 FcRn 结合：新生儿受体 (FcRn) 负责转运 IgG 跨过胎盘并且控制 IgG 分子的分解代谢半衰期。可能需要的是增加抗体的终末半衰期以改善效力、降低剂量或施用频率或者改善对靶标的定位。可选地，可能有利的是反其道而行之，即，减小抗体的终末半衰期以减少整个身体暴露量或改善靶标 - 非靶标结合比。调整 IgG 和其拯救受体 (salvage receptor)FcRn 之间的相互作用提供了增加或缩短 IgG 终末半衰期的方式。循环中的蛋白质（包括 IgG）通过某些细胞（如血管内皮的细胞）微胞饮作用而溶解于流体相中。IgG 可以在核内体中略酸性条件 (pH6.0-6.5) 下结合 FcRn 并且可以再循环至细胞表面，在此处，它在几乎中性条件 (pH7.0-7.4) 下释放。FcRn80、16、17 上的 Fc 区结合位点的作图显示物种间保守的两个组氨酸残基 His310 和 His435 负责这种相互作用的 pH 依赖性。使用噬菌体展示技术，鉴定了增加与 FcRn 的结合和延长小鼠 IgG 半衰期的小鼠 Fc 区突变（见 Ghetie 等人，Nature Biotechnol.，15(7)：637-640(1997))。也已经鉴定了增加人 IgG 在 pH6.0（而非 pH7.4）下对 FcRn 的结合亲和力的 Fc 区突变（见，Dall' Acqua 等人，J. Immunol.，169(9)：5171-5180(2002))。另外，在一种情况下，也对恒河猴 FcRn 观察到结合的相似 pH 依赖性增加（至多 27 倍），并且这导致与亲本 IgG 相比，在恒河猴中血清半衰期增加 2 倍（见，Hinton 等人，J. Biol. Chem.，279(8)：6213-6216(2004))。这些发现表明，通过调整 Fc 区与 FcRn 的

相互作用来延长抗体治疗剂的血浆半衰期是可行的。相反地，减弱与 FcRn 相互作用的 Fc 区突变可以缩短抗体半衰期。

[0298] B.10. 药代动力学 (PK)

[0299] 为了产生具有所需药代动力学特性的 DVD-Ig 分子，在一个实施方式中，选择了具有类似所需药代动力学特性的亲本 mAb。一个考虑因素是针对单克隆抗体的免疫原性反应（即，“HAHA”，人抗人抗体反应；“HACA”，人抗嵌合抗体反应）进一步使这些治疗剂的药代动力学复杂化。在一个实施方式中，将具有最小免疫原性或没有免疫原性的单克隆抗体用于构建 DVD-Ig 分子，从而所得到的 DVD-Ig 也将具有最小免疫原性或没有免疫原性。决定 mAb 的 PK 的一些因素包括但不限于 mAb 的固有特性 (VH 氨基酸序列)、免疫原性、FcRn 结合和 Fc 功能。

[0300] 选择的亲本单克隆抗体的 PK 特性可以在啮齿类中容易地确定，原因是啮齿类中的 PK 特性与单克隆抗体在食蟹猴和人中的 PK 特性良好相关（或密切预测在食蟹猴和人中的 PK 特性）。

[0301] 在选出具有所需 PK 特征（和如本文中讨论的其他所需功能特性）的亲本单克隆抗体后，构建 DVD-Ig。由于 DVD-Ig 分子含有来自两种亲本单克隆抗体的两种抗原结合结构域，故而也评估了 DVD-Ig 的 PK 特性。因此，在确定 DVD-Ig 的 PK 特性的同时，可以使用基于源自两种亲本单克隆抗体的两种抗原结合结构域的功能性来确定 PK 特性的 PK 分析。可以确定 DVD-Ig 的 PK 特性。可以影响 DVD-Ig 的 PK 特性的额外因素包括抗原结合结构域 (CDR) 取向、接头大小和 Fc/FcRn 相互作用。可以通过评定以下参数来评估亲本抗体的 PK 特征：吸收、分布、代谢和排泄。

[0302] 吸收：迄今，治疗性单克隆抗体的施用是经肠胃外途径（例如，静脉内 [Iv]、皮下 [SC] 或肌肉内 [IM])。在 SC 或 IM 施用后，mAb 从组织间隙吸收至体循环中主要通过淋巴途径。在血管外施用后，可饱和的、首过的 (presystemic)、蛋白酶解的降解可以导致可变的绝对生物利用度。通常，可以观察到随单克隆抗体剂量增加，绝对生物利用度增加，这归因于在较高剂量时饱和的蛋白酶解能力。mAb 的吸收过程通常相当缓慢，原因是淋巴液缓慢流入至脉管系统中，并且吸收持续时间可以持续数小时至几天。单克隆抗体在 SC 施用后的绝对生物利用度通常是 50％至 100％的范围。在 DVD-Ig 构建体靶向的血脑屏障 (BBB) 处转运介导结构的情况下，血浆中的循环时间可以缩减，这归因于增强血脑屏障 (BBB) 处跨细胞转运入 CNS 区室中，在其中 DVD-Ig 被释放以便能够通过其第二抗原识别位点发挥相互作用。

[0303] 分布：在 IV 施用后，单克隆抗体通常遵循双相血清（或血浆）浓度 - 时间分布，始于快速分布相，随后是缓慢消除相。通常，双指数型药代动力学模型最佳地描述这种药代动力学分布。mAb 在中央区室中的分布容量 (Vc) 通常等于或略微大于血浆容量 (2-3 升)。采用其他肠胃外施用途径如 IM 或 SC，血清（血浆）浓度对时间分布的清晰双相模式可能不明显，因为血清（血浆）浓度 - 时间曲线的分布相被长的吸收部分掩蔽。许多因素，包括物理化学特性、位点特异性和靶定向的受体介导的摄取、组织的结合能力和 mAb 剂量，可以影响 mAb 的生物分布。这些因素中的一些可以造成 mAb 生物分布的非线性。

[0304] 代谢和排泄：由于分子大小，完整的单克隆抗体不是经肾排泄至尿中。它们主要通过代谢（例如，分解代谢）失活。对基于 IgG 的治疗性单克隆抗体而言，半衰期一般是数小

时或 1-2 天至超过 20 天。mAb 的消除可能受许多因素影响，包括但不限于，对 FcRn 受体的亲和力、mAb 的免疫原性、mAb 的糖基化程度、mAb 对蛋白水解的易感性和受体介导的消除。

[0305] B.11. 在人类及毒理学物种 (tox species) 上的组织交叉反应性模式

[0306] 相同的染色样式表示，可以在毒理学物种中评估潜在的人类毒性。毒理学物种是在其中研究不相关毒性的那些动物。

[0307] 选择单个抗体以符合两个标准：(1) 适合于已知抗体靶标表达的组织染色；和 (2) 来自相同器官的人组织和毒理学物种组织之间相似的染色模式。

[0308] 标准 1：免疫和 / 或抗体选择一般使用重组或合成的抗原（蛋白质、糖类或其他分子）。与天然对应物结合和针对不相关抗原反向筛选 (counterscreen) 经常是用于治疗性抗体的筛选漏斗 (screening funnel) 的部分。然而，针对众多抗原的筛选经常是不实际的。因此，与来自全部主要器官的人组织的组织交叉性反应性研究起到排除抗体与任何不相关抗原的不当结合的作用。

[0309] 标准 2：采用人组织和毒理学物种组织（食蟹猴、犬、可能的啮齿类和其他物种，如人类研究中那样测试相同的 36 或 37 种组织）的对比组织交叉反应性研究有助于验证毒理学物种的选择。在对冷冻组织切片的典型组织交叉反应性研究中，治疗性抗体可以显示与已知抗原的预期结合和 / 或基于任一低水平相互作用（非特异性结合、与相似抗原的低水平结合、基于低水平电荷的相互作用）与组织的较低程度结合。在任何情况下，最相关的毒理学动物物种是与人组织和动物组织结合的一致性程度最高的物种。

[0310] 组织交叉反应性研究遵循适宜的规章准则，包括 EC CPMP Guideline III/5271/94″ Production and quality control of mAbs″ 和 1997US FDA/CBER″ Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use″。在尸体检查或活组织检查时获得的人组织的冷冻切片 (5μm) 在载玻片上固定和干燥。使用抗生物素蛋白 - 生物素系统进行组织切片的过氧化物酶染色。FDA 的指导″ Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use″。相关的参考文献包括 Clarke, J. (2004), Boon, L. (2002a), Boon, L. (2002b), Ryan, A. (1999)。

[0311] 组织交叉反应性研究经常以两个阶段进行，第一阶段包括来自一个人类供体的 32 种组织（通常是：肾上腺、胃肠道、前列腺、膀胱、心脏、骨骼肌、血细胞、肾、皮肤、骨髓、肝脏、脊髓、乳腺、肺、脾、小脑、淋巴结、睾丸、大脑皮质、卵巢、胸腺、结肠、胰、甲状腺、内皮、甲状旁腺、输尿管、眼、垂体、子宫、输卵管和胎盘）的冷冻切片。在第二阶段，对来自 3 位不相关成人的至多 38 种组织（包括肾上腺、血液、血管、骨髓、小脑、大脑、子宫颈、食道、眼、心脏、肾、大肠、肝脏、肺、淋巴结、乳腺、卵巢、输卵管、胰、甲状旁腺、外周神经、垂体、胎盘、前列腺、唾液腺、皮肤、小肠、脊髓、脾、胃、横纹肌、睾丸、胸腺、甲状腺、扁桃体、输尿管、膀胱和子宫）进行完整交叉反应性研究。研究一般最少以两个剂量水平进行。

[0312] 治疗性抗体（即，测试品）和同种型匹配的对照抗体可以进行生物素化以便用于抗生物素蛋白 - 生物素复合物 (ABC) 检测；其他检测方法可以包括用于 FITC（或其它）标记的测试品的三元抗体检测，或用于未标记测试品的与标记抗人 IgG 预复合。

[0313] 简而言之，将尸体检查或活组织检查时获得的人组织冷冻切片（约 5μm) 在载玻片上固定和干燥。使用抗生物素蛋白 - 生物素系统进行组织切片的过氧化物酶染色。首先

（在预复合检测系统的情况下），将测试品与第二生物素化抗人 IgG 孵育并且形成免疫复合物。将终浓度为 2μg/ml 和 10μg/ml 的测试品下的免疫复合物添加到载玻片上的组织切片上，并且随后使组织切片与抗生物素蛋白－生物素－过氧化物酶试剂盒反应 30 分钟。随后，将 DAB(3,3′－二氨基联苯胺，过氧化物酶反应的底物）应用 4 分钟用于组织染色。使抗原－琼脂糖珠作为阳性对照组织切片。

[0314] 基于所讨论的靶抗原的已知表达，任何特异性染色判定是预期的（例如，与抗原表达一致）或非预期的反应性。对判定为特异性的任何染色评定强度和频率。抗原或血清竞争或阻断研究可以进一步帮助确定观察到的染色是特异性还是非特异性的。

[0315] 如果发现两种选择的抗体符合选择标准（适宜的组织染色、在人和毒理学动物特定组织之间匹配的染色），则可以选择它们用于产生 DVD-Ig。

[0316] 组织交叉反应性研究必需用最终 DVD-Ig 构建体来重复，但是尽管这些研究遵循如本文中概述的相同方案，它们的评价更复杂，因为任何结合可能来自两种亲本抗体的任一种，并且需要用复杂的抗原竞争研究来证实任何未经说明的结合。

[0317] 显然，如果针对 (1) 缺少非预期组织交叉反应性的发现及 (2) 相应的人组织与毒理学动物物种组织之间组织交叉反应性发现的适当相似性来选择两种亲本抗体，则大大地简化采用多特异性分子（如 DVD-Ig) 的组织交叉反应性研究的复杂任务。

[0318] B.12. 特异性和选择性

[0319] 为了产生具有所需特异性和选择性的 DVD-Ig 分子，需要产生和选择具有类似所需特异性和选择性特性的亲本 mAb。

[0320] 采用 DVD-Ig 针对特异性和选择性的结合研究可能因 4 个或更多个结合位点（针对每种抗原的各两个结合位点）而复杂化。简而言之，使用 DVD-Ig 的 ELISA、BIAcore、KinExA 或其他相互作用研究的结合研究需要监测 1 种、2 种或更多种抗原与 DVD-Ig 分子的结合。尽管 BIAcore 技术可以解析多个抗原的依序、独立结合，但是更传统的方法（包括 ELISA) 或更现代的技术如 KinExA 则不能。因此，仔细地表征每种亲本抗体是关键的。在已经表征各单个抗体的特异性后，证实 DVD-Ig 分子中单个结合位点的特异性保留 (specificity retention) 大大简化。

[0321] 显然，如果在组合成 DVD-Ig 之前选择两个亲本抗体的特异性，则大大地简化确定 DVD-Ig 特异性的复杂任务。

[0322] 抗原－抗体相互作用研究可以采取许多形式，包括许多经典的蛋白质－蛋白质相互作用研究，包括 ELISA（酶联免疫吸附测定）、质谱、化学交联、采用光散射的 SEC、平衡透析、凝胶渗透、超滤、凝胶层析、大区带 (large-zone) 分析性 SEC、微量制备超速离心（沉降平衡法）、分光光度法、滴定微量热法、沉降平衡法（在分析型超速离心机中）、沉降速度（在分析型离心机中）、表面等离子体共振（包括 BIAcore)。相关参考文献包括 Current Protocols in Protein Science，第 3 卷，第 19 和 20 章 (Coligan 等人编著）(John Wiley&Sons,Inc.）和其中包括的参考文献；及 Current Protocols in Immunology，(Coligan 等人编著）(John Wiley&Sons,Inc.）和其中包括的相关参考文献。

[0323] 全血中的细胞因子释放：可以通过细胞因子释放分析来研究 mAb 与人血细胞的相互作用 (Wing 等人，Therapeutic Immunol.,2(4)：183-190(1995)；Current Protocols in Pharmacology，(Enna 等人编著）(John Wiley&Sons, Inc.)；Madhusudan 等人，Clin.

Cancer Res.,10(19):6528-6534(2004);Cox 等人,Methods,38(4):274-282(2006);Choi 等人,Eur.J.Immunol.,31(1):94-106(2001))。简而言之,将各种浓度的 mAb 与人全血一起孵育 24 小时。测试的浓度应当覆盖宽范围,包括模拟患者中典型血液水平的终浓度(包括但不限于 100ng/mL-100μg/ml)。在孵育后,对上清液和细胞裂解物分析 IL-1Rα、TNF-α、IL-1b、IL-6 和 IL-8 的存在。针对 mAb 产生的细胞因子浓度谱与阴性人 IgG 对照和阳性 LPS 或 PHA 对照所产生的谱比较。由源自细胞上清液和细胞裂解物两者的 mAb 所显示的细胞因子谱与使用人 IgG 对照的细胞因子谱比较。在一个实施方式中,单克隆抗体不与人血细胞相互作用以自发释放炎性细胞因子。

[0324] 针对 DVD-Ig 的细胞因子释放研究因 4 个或更多个结合位点(针对每种抗原的各两个结合位点)而复杂化。简而言之,如本文所述的细胞因子释放研究测量完整 DVD-Ig 分子对全血或其他细胞系统的影响,但是不能解析该分子的哪个部分引起细胞因子释放。一旦检测到细胞因子释放,则必须确定 DVD-Ig 制剂的纯度,因为一些共纯化的细胞组分本身可引起细胞因子释放。如果纯度不是问题,则可能需要 DVD-Ig 的片段化(包括但不限于移除 Fc 部分、分离结合位点等)、结合位点诱变或其他方法用来将任何观察结果去卷积(deconvolute)。显然,如果在组合成 DVD-Ig 之前针对缺少细胞因子释放来选择两个亲本抗体,则大大地简化这项复杂任务。

[0325] B.13. 与用于毒理学研究的其他物种的交叉反应性

[0326] 在一个实施方式中,选择对适宜毒理学物种(例如,食蟹猴)具有足够交叉反应性的单个抗体。亲本抗体需要与直系同源物种靶标(即,食蟹猴)结合并且诱发适宜的反应(调节、中和、活化)。在一个实施方式中,与直系同源物种靶标的交叉反应性(亲和力/效力)应当在人靶标的 10 倍以内。在实践中,针对多个物种(包括小鼠、大鼠、犬、猴(和其他非人灵长类))以及疾病模型物种(即,用于哮喘模型的绵羊)评估亲本抗体。来自亲本单克隆抗体的针对毒理学物种的可接受交叉反应性允许未来在相同物种中进行 DVD-Ig 的毒理学研究。出于这个原因,两种亲本单克隆抗体应当对常见的毒理学物种具有可接受的交叉反应性,因此允许在相同物种中进行 DVD-Ig 的毒理学研究。

[0327] 亲本 mAb 可以选自能够结合特异性靶标和本领域熟知的各种 mAb。这些包括但不限于 IL-1β、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(美国公开号 2005/0147610A1)、抗 C5、抗 CBL、抗 CD147、抗 gp120、抗 VLA-4、抗 CD11a、抗 CD18、抗 VEGF、抗 CD40L、抗 CD-40(例如,见 PCT 公开号 WO 2007/124299)、抗 Id、抗 ICAM-1、抗 CXCL13、抗 CD2、抗 EGFR、抗 TGF-β2、抗 HGF、抗 cMet、抗 DLL-4、抗 NPR1、抗 PLGF、抗 ErbB3、抗 E-选择蛋白、抗 Fact VII、抗 Her2/neu、抗 F gp、抗 CD11/18、抗 CD14、抗 ICAM-3、抗 RON、抗 CD-19、抗 CD80(例如,见 PCT 公开号 WO 2003/039486)、抗 CD4、抗 CD3、抗 CD23、抗 β2-整联蛋白、抗 α4β7、抗 CD52、抗 HLA DR、抗 CD22(见,例如,美国专利号 5,789,554)、抗 CD20、抗 MIF、抗 CD64(FcR)、抗 TCRα β、抗 CD2、抗 Hep B、抗 CA125、抗 EpCAM、抗 gp120、抗 CMV、抗 gpIIbIIIa、抗 IgE、抗 CD25、抗 CD33、抗 HLA、抗 IGF1,2、抗 IGFR、抗 VNR 整联蛋白、抗 IL-1α、抗 IL-1β、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-6R、RANKL、NGF、DKK、αVβ3、抗 IL-8、抗 IL-9、抗 IL-13、抗 IL-13 受体和抗 IL.23;IL-23p19(见,Presta,L.G.,″ Selection,design,and engineering oftherapeutic antibodies″,J.Allergy

Clin. Immunol.,116:731-736(2005)和互联网网址http://www.path.cam.ac.uk/～mrc7/humanisation/antibodies.html)。

[0328] 亲本mAb也可以选自批准用于临床试验或用于开发临床用途的各种治疗性抗体。这类治疗性抗体包括但不限于利妥昔单抗(rituximab)(Rituxan®,IDEC/Genentech/Roche)(参见例如美国专利号5,736,137),经批准用于治疗非霍奇金氏淋巴瘤的嵌合抗CD20抗体;HuMax-CD20,目前由Genmab开发的抗CD20,描述于美国专利号5,500,362中的抗CD20抗体,AME-133(Applied Molecular Evolution),hA20(Immunomedics,Inc),HumaL YM(Intracel)及PRO70769(PCT公开号WO 2004/056312(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),经批准用于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;描述于美国专利号4,753,894号中的抗Her2抗体;西妥昔单抗(cetuximab)(Erbitux®,ImClone)(美国专利号4,943,533号;PCT公开号WO 96/40210号),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;HuMax-EGFr(美国系列号10/172,317,以US 2003/0091561公开,现为美国专利号7,247,301),目前由Genmab开发;425、EMD55900、EMD62000及EMD72000(Merck KGaA)(美国专利号5,558,864号;Murthy等人,Arch. Biochem. Biophys.,252(2):773-783(1991));ICR62(Institute of Cancer Research)PCT公开号WO 95/20045;549-560(1987);Rodeck等人,J. Cell Biochem.,35(4):315-320(1987);Kettleborough等人,Protein Eng.,4(7);Modjtahedi等人,J. Cell Biophys.,22(1-3):129-146(1993);Modjtahedi等人,Br. J. Cancer,67(2):247-253(1993);Modjtahedi等人,Br. J. Cancer,73(2):228-235(1996);Modjtahedi等人,Int. J. Cancer,105(2):273-280(2003));TheraCIM hR3(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,Immunotechnology,3(1):71-81(1997));mAb-806(Ludwig Institue for Cancer Research,Memorial Sloan-Kettering)(Jungbluth等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,100(2):639-644(2003));KSB-102(KS Biomedix);MR1-1(IVAX,National Cancer Institute)(PCT公开号WO 01/62931);及SC100(Scancell)(PCT公开号WO 01/88138);阿伦单抗(alemtuzumab)(Campath®,Millenium),目前经批准用于治疗B细胞慢性淋巴细胞性白血病的人源化mAb;莫罗单抗(muromonab)-CD3(Orthoclone OKT3®),由Ortho Biotech/Johnson&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;阿法赛特(alefacept)(Amevive®),由Biogen开发的抗LFA-3Fc融合体;阿昔单抗(abciximab)(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;英夫利昔单抗(infliximab)(Remicade®),由Centocor开发的抗TNFα抗体;阿达木单抗(adalimumab)(Humira®),由Abbott Laboratories开发的抗

TNFα 抗体；Humicade®，由 Celltech 开发的抗 TNFα 抗体；戈利木单抗 (golimumab) (CNTO-148)，由 Centocor 开发的完全人 TNF 抗体；依那西普 (etanercept) (Enbrel®)，由 Immunex/Amgen 开发的 p75TNF 受体 Fc 融合体；来那西普 (lenercept)，先前由 Roche 开发的 p55TNF 受体 Fc 融合体；ABX-CBL，由 Abgenix 开发的抗 CD147 抗体；ABX-IL8，由 Abgenix 开发的抗 IL8 抗体；ABX-MA1，由 Abgenix 开发的抗 MUC18 抗体；帕木单抗 (Pemtumomab) (R1549、90Y-muHMFG1)，由 Antisoma 开发中的抗 MUC1；Therex(R1550)，由 Antisoma 开发的抗 MUC1 抗体；AngioMab(AS1405)，由 Antisoma 开发；HuBC-1，由 Antisoma 开发；Thioplatin(AS1407)，由 Antisoma 开发；Antegren®（那他珠单抗 (natalizumab))，由 Biogen 开发的抗 α-4-β-1(VLA-4) 及 α-4-β-7 抗体；VLA-1mAb，由 Biogen 开发的抗 VLA-1 整联蛋白抗体；LTBR mAb，由 Biogen 开发的抗淋巴毒素 β 受体 (LTBR) 抗体；CAT-152，由 Cambridge Antibody Technology 开发的抗 TGF-β2 抗体；ABT874(J695)，由 Abbott Laboratories 开发的抗 IL-12p40 抗体；CAT-192，由 Cambridge Antibody Technology and Genzyme 开发的抗 TGFβ1 抗体；CAT-213，由 Cambridge Antibody Technology 开发的抗嗜酸性粒细胞趋化因子 1(Eotaxinl) 抗体；LymphoStat-B®，由 Cambridge Antibody Technology and Human Genome Sciences Inc. 开发的抗 Blys 抗体；TRAIL-R1mAb，由 Cambridge Antibody Technology and Human Genome Sciences, Inc. 开发的抗 TRAIL-R1 抗体；Avastin® 贝伐珠单抗 (bevacizumab)(rhuMAb-VEGF)，由 Genentech 开发的抗 VEGF 抗体，由 Genentech 开发的抗 HER 受体家族抗体；抗组织因子 (ATF)，由 Genentech 开发的抗组织因子抗体；Xolair®（奥马珠单抗），由 Genentech 开发的抗 IgE 抗体；Raptiva®（依法珠单抗 (Efalizumab))，由 Genentech and Xoma 开发的抗 CD11a 抗体；MLN-02 抗体（先前为 LDP-02)，由 Genentech and Millenium Pharmaceuticals 开发；HuMax CD4，由 Genmab 开发的抗 CD4 抗体；HuMax-IL15，由 Genmab and Amgen 开发的抗 IL15 抗体；HuMax-Inflam，由 Genmab and Medarex 开发；HuMax-Cancer，由 Genmab and Medarex 及 Oxford GcoSciences 开发的抗肝素酶 I 抗体；HuMax-Lymphoma，由 Genmab and Amgen 开发；HuMax-TAC，由 Genmab 开发；IDEC-131 及由 IDEC Pharmaceuticals 开发的抗 CD40L 抗体；IDEC-151(克立昔单抗 (Clenoliximab))，由 IDEC Pharmaceuticals 开发的抗 CD4 抗体；IDEC-114，由 IDEC Pharmaceuticals 开发的抗 CD80 抗体；IDEC-152，由 IDEC Pharmaceuticals 开发的抗 CD23；抗巨噬细胞迁移因子 (MIF) 抗体，由 IDEC Pharmaceuticals 开发；BEC2，由 ImClone 开发的抗个体基因型抗体；IMC-1C11，由 ImClone 开发的抗 KDR 抗体；DC101，由 ImClone 开发的抗 flk-1 抗体；抗 VE 钙粘着蛋白抗体，由 ImClone 开发；CEA-Cide®（拉贝珠单抗 (labetuzumab))，抗癌胚抗原 (CEA) 抗体，由 Immunomedics 开发；LymphoCide®（依帕珠单抗 (Epratuzumab))，由 Immunomedics 开发的抗 CD22 抗体；AFP-Cide，由 Immunomedics 开发；MyelomaCide，由 Immunomedics 开发；LkoCide，由 Immunomedics 开发；ProstaCide，由 Immunomedics 开发；MDX-010，由 Medarex 开发的抗 CTLA4 抗体；MDX-060，由 Medarex 开发的抗 CD30 抗体；MDX-070，由 Medarex 开发；MDX-018，由 Medarex 开发；Osidem® (IDM-1)，由 Medarex and Immuno-Designed Molecules 开发的抗 Her2 抗体；HuMax® -CD4，由 Medarex and Genmab 开发的抗 CD4 抗体；HuMax-IL15，由 Medarex and Genmab 开发的抗 IL15 抗体；

CNTO148，由 Medarex and Centocor/Johnson&Johnson 开发的抗 TNFα 抗体；CNTO1275，由 Centocor/Johnson&Johnson 开发的抗细胞因子抗体；MOR101 及 MOR102，由 MorphoSys 开发的抗细胞间粘附分子 -1(ICAM-1)(CD54) 抗体；MOR201，由 MorphoSys 开发的抗成纤维细胞生长因子受体 3(FGFR-3) 抗体；Nuvion®（维利珠单抗 (visilizumab))，由 Protein Design Labs 开发的抗 CD3 抗体；HuZAF®，由 Protein Design Labs 开发的抗 γ 干扰素抗体；抗 α5β1 整联蛋白，由 Protein Design Labs 开发；抗 IL-12，由 Protein Design Labs 开发；ING-1，由 Xoma 开发的抗 Ep-CAM 抗体；Xolair®（奥马珠单抗），由 Genentech and Novartis 开发的人源化抗 IgE 抗体；及 MLN01，由 Xoma 开发的抗 β2 整联蛋白抗体。在另一实施方式中，治疗剂包括 KRN330(Kirin)；huA33 抗体 (A33，Ludwig Institute for Cancer Research)；CNTO95(αV 整联蛋白，Centocor)；MEDI-522(αVβ3 整联蛋白，Medimmune)；伏洛西单抗 (volociximab)(αVβ1 整联蛋白，Biogen/PDL)；人 mAb216(B 细胞糖基化表位，NCI)；BiTE MT103(双特异性 CD19×CD3，Medimmune)；4G7×H22(双特异性 B 细胞 ×FcγR1，Medarex/Merck KGa)；rM28(双特异性 CD28×MAPG，欧洲专利号 EP 1 444 268)；MDX447(EMD82633)(双特异性 CD64×EGFR，Medarex)；卡莫西单抗 (Catumaxomab)(雷默伏 (removab))(双特异性 EpCAM× 抗 CD3，Trion/Fres)；厄妥索单抗 (Ertumaxomab)(双特异性 HER2/CD3，Fresenius Biotech)；奥戈伏单抗 (oregovomab)(奥伏瑞 (OvaRex))(CA-125，ViRexx)；Rencarex® (WX G250)(碳酸酐酶 IX，Wilex)；CNTO888(CCL2，Centocor)；TRC105(CD105(内皮糖蛋白)，Tracon)；BMS-663513(CD137 激动剂，Brystol Myers Squibb)；MDX-1342(CD19，Medarex)；希利珠单抗 (Siplizumab)(MEDI-507)(CD2，Medimmune)；奥托莫单抗 (Ofatumumab)(Humax-CD20)(CD20，Genmab)；利妥昔单抗 (美罗华 (Rituxan))(CD20，Genentech)；维托珠单抗 (veltuzumab)(hA20)(CD20，Immunomedics)；依帕珠单抗 (CD22，Amgen)；鲁昔单抗 (lumiliximab)(IDEC152)(CD23，Biogen)；莫罗单抗 -CD3(CD3，Ortho)；HuM291(CD3fc 受体，PDL Biopharma)；HeFi-1(CD30，NCI)；MDX-060(CD30，Medarex)；MDX-1401(CD30，Medarex)；SGN-30(CD30，Seattle Genentics)；SGN-33(林妥珠单抗 (Lintuzumab))(CD33，Seattle Genentics)；扎木单抗 (Zanolimumab)(HuMax-CD4)(CD4，Genmab)；HCD122(CD40，Novartis)；SGN-40(CD40，Seattle Genentics)；Campathlh(阿伦珠单抗 (Alemtuzumab))(CD52，Genzyme)；MDX-1411(CD70，Medarex)；hLL1(EPB-1)(CD74.38，Immunomedics)；加利昔单抗 (Galiximab)(IDEC-144)(CD80，Biogen)；MT293(TRC093/D93)(裂解的胶原蛋白，Tracon)；HuLuc63(CS1，PDL Pharma)；伊力莫单抗 (ipilimumab)(MDX-010)(CTLA4，BrystolMyers Squibb)；曲力莫单抗 (Tremelimumab)(替力莫单抗 (Ticilimumab)，CP-675,2)(CTLA4，Pfizer)；HGS-ETR1(马妥莫单抗 (Mapatumumab))(DR4TRAIL-R1 激动剂，Human Genome Science/Glaxo Smith Kline)；AMG-655(DR5，Amgen)；艾坡单抗 (Apomab)(DR5，Genentech)；CS-1008(DR5，Daiichi Sankyo)；HGS-ETR2(来沙木单抗 (lexatumumab))(DR5TRAIL-R2 激动剂，HGS)；西妥昔单抗 (艾比特思 (Erbitux))(EGFR，ImClone)；IMC-11F8(EGFR，ImClone)；尼妥珠单抗 (Nimotuzumab)(EGFR，YM Bio)；盘尼图单抗 (Panitumumab)(维克替比 (Vectabix))(EGFR，Amgen)；扎妥木单抗 (Zalutumumab)(HuMaxEGFr)(EGFR，Genmab)；CDX-110(EGFRvIII，AVANT Immunotherapeutics)；阿德木单抗 (adecatumumab)(MT201)(Epcam，Merck)；依可洛单抗 (edrecolomab)(Panorex，17-1A)(Epcam，Glaxo/Centocor)；MORAb-003(叶酸受

体 a，Morphotech）；KW-2871（神经节苷脂 GD3，Kyowa）；MORAb-009(GP-9，Morphotech）；CDX-1307(MDX-1307)(hCGb，Celldex）；曲妥珠单抗（赫赛汀 (Herceptin))(HER2，Celldex）；帕妥珠单抗 (rhuMAb2C4)(HER2(DI)，Genentech）；阿泊珠单抗 (apolizumab)(HLA-DRβ 链，PDL Pharma）；AMG-479(IGF-1R，Amgen）；抗 IGF-1R R1507(IGF1-R，Roche）；CP751871(IGF1-R，Pfizer）；IMC-A12(IGF1-R，ImClone）；BIIB022(IGF-1R，Biogen）；Mik-β-1(IL-2Rb(CD122)，Hoffman LaRoche）；CNTO328(IL6，Centocor）；抗 KIR(1-7F9)（杀伤细胞 Ig 样受体 (KIR)，Novo）；Hu3S193(Lewis(y)，Wyeth，Ludwig Institute of Cancer Research）；hCBE-11(LTβR，Biogen）；HuHMFG1(MUC1，Antisoma/NCI）；RAV12(N-连接糖表位，Raven）；CAL（甲状旁腺激素相关蛋白 (PTH-rP)，University of California）；CT-011(PD1，CureTech）；MDX-1106(ono-4538)(PD1，Medarex/Ono）；MAb CT-011(PD1，Curetech）；IMC-3G3(PDGFRa，ImClone）；巴维昔单抗 (bavituximab)（磷脂酰丝氨酸，Peregrine）；huJ591(PSMA，Cornell Research Foundation）；muJ591(PSMA，Cornell Research Foundation）；GC1008(TGFb（泛 (pan)）抑制剂 (IgG4)，Genzyme）；英夫利昔单抗（雷米卡德 (Remicade))(TNFa，Centocor）；A27.15（转铁蛋白受体，Salk Institute，INSERM，PCT 公开号 WO 2005/111082）；E2.3（转铁蛋白受体，Salk Institute）；贝伐珠单抗（阿瓦斯汀 (Avastin))(VEGF，Genentech）；HuMV833(VEGF，Tsukuba Research Lab，PCT 公开号 WO2000/034337，University of Texas）；IMC-18F1(VEGFR1，ImClone）；IMC-1121(VEGFR2，ImClone)。

[0329] C.DVD-Ig™ 结合蛋白的构建

[0330] 设计多价多特异性双重可变域免疫球蛋白 (DVD-Ig™) 结合蛋白以使得来自两种不同亲本单克隆抗体的两个不同轻链可变结构域 (VL) 通过重组 DNA 技术以串联方式直接连接或经短接头连接，随后是轻链恒定域。类似地，重链包含以串联方式连接的两个不同的重链可变结构域 (VH)，随后是恒定结构域 CH1 和 Fc 区。

[0331] 可变结构域可以使用重组 DNA 技术从通过本文所述的任一方法产生的亲本抗体获得。在一个实施方式中，可变结构域是鼠重链或轻链可变结构域。在另一个实施方式中，可变域结构是 CDR 移植的或人源化的可变重链或轻链结构域。在一个实施方式中，可变结构域是人重链或轻链可变结构域。

[0332] 在一个实施方式中，使用重组 DNA 技术使第一和第二可变结构域彼此直接连接。在另一个实施方式中，可变结构域经接头序列连接。在一个实施方式中，连接 2 个可变结构域。3 个或更多个可变结构域也可以直接或经接头序列连接。可变结构域可以结合相同的抗原或可以结合不同的抗原。本发明的 DVD-Ig 分子可以包含一个免疫球蛋白可变结构域和一个非免疫球蛋白可变结构域，如受体的配体结合结构域、酶的活性结构域。DVD-Ig 分子也可以包含两个或更多个非 Ig 结构域。

[0333] 接头序列可以是单个氨基酸或包含通过肽键接合的两个或更多个氨基酸残基的接头多肽。在一个实施方式中，接头序列选自：GGGGSG(SEQ ID NO：26)、GGSGG(SEQ ID NO：27)、GGGGSGGGGS(SEQ ID NO：28)、GGSGGGGSG(SEQ ID NO：223)、GGSGGGGSGS(SEQ ID NO：29)、GGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO：30)、GGGGSGGGGSGGGG(SEQ ID NO：31)、GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO：32)、ASTKGP(SEQ ID NO：33)、ASTKGPSVFPLAP(SEQ ID NO：34)、TVAAP(SEQ ID NO：35)、RTVAAP(SEQ ID NO：224)、TVAAPSVFIFPP(SEQ

ID NO:36)、RTVAAPSVFIFPP(SEQ ID NO:225)、AKTTPKLEEGEFSEAR(SEQ ID NO:37)、AKTTPKLEEGEFSEARV(SEQ ID NO:38)、AKTTPKLGG(SEQ ID NO:39)、SAKTTPKLGG(SEQ ID NO:40)、SAKTTP(SEQ ID NO:41)、RADAAP(SEQ ID NO:42)、RADAAPTVS(SEQ ID NO:43)、RADAAAAGGPGS(SEQ ID NO:44)、RADAAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:45)、SAKTTPKLEEGEFSEARV(SEQ ID NO:46)、ADAAP(SEQ ID NO:47)、ADAAPTVSIFPP(SEQ ID NO:48)、QPKAAP(SEQ ID NO:49)、QPKAAPSVTLFPP(SEQ ID NO:50)、AKTTPP(SEQ ID NO:51)、AKTTPPSVTPLAP(SEQ ID NO:52)、AKTTAP(SEQ ID NO:53)、AKTTAPSVYPLAP(SEQ ID NO:54)、GENKVEYAPALMALS(SEQ ID NO:55)、GPAKELTPLKEAKVS(SEQ ID NO:56) 和 GHEAAAVMQVQYPAS(SEQ ID NO:57)。接头序列的选择基于对若干 Fab 分子的晶体结构分析。在 Fab 或抗体分子结构中可变结构域和 CH1/CL 恒定结构域之间存在天然的柔性连接。这种天然连接包含大约 10-12 个氨基酸残基,其由来自 V 结构域 C 端的 4-6 个残基和来自 CL/CH1 结构域 N 端的 4-6 个残基提供。可以使用 CL 或 CH1 的 N 端 5-6 个氨基酸残基或 11-12 个氨基酸残基分别作为 DVD-Ig 的轻链和重链中的接头产生本文所述的 DVD-Ig。CL 或 CH1 结构域的 N 端残基,尤其前 5-6 个氨基酸残基,采取没有强二级结构的环构象,并且因此可以充当两个可变域之间的柔性接头。CL 或 CH1 结构域的 N 端残基是可变结构域的天然延长部分,原因是它们为 Ig 序列的部分,并且因此很大程度使得可能从接头和接合区产生的任何免疫原性最小化。

[0334] 其他接头序列可以包括 CL/CH1 结构域的任何长度的任何序列,但是不包括 CL/CH1 结构域的全部残基 ;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 Cκ 或 Cλ ;和重链接头可以源自任何同种型的 CH1,包括 Cγ1、Cγ2、Cγ3、Cγ4、Cα1、Cα2、Cδ、Cε 及 Cμ。接头序列也可以源自其他蛋白质如 Ig 样蛋白(例如,TCR、FcR、KIR)、基于 G/S 的序列、铰链区来源的序列和来自其他蛋白质的其他天然序列。

[0335] 在一个实施方式中,使用重组 DNA 技术使恒定结构域与两个连接的可变结构域连接。在一个实施方式中,包含串联连接的重链可变结构域的序列与重链恒定结构域连接,并且包含串联连接的轻链可变结构域的序列与轻链恒定结构域连接。在一个实施方式中,恒定结构域分别是人重链恒定结构域和人轻链恒定结构域。在一个实施方式中,DVD 重链进一步与 Fc 区连接。Fc 区可以是天然序列 Fc 区或变体 Fc 区。在另一个实施方式中,Fc 区是人 Fc 区。在另一个实施方式中,Fc 区包括来自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE 或 IgD 的 Fc 区。

[0336] 在最优选的实施方式中,将两条重链 DVD 多肽和两条轻链 DVD 多肽组合以形成 DVD-Ig 分子。在以下的实施例部分中提供能够结合特定靶抗原(如 IL-1β)的特异性 DVD-Ig 分子和制造这种分子的方法的详细描述。

[0337] D. DVD-Ig 结合蛋白的产生

[0338] 本发明的 DVD-Ig 结合蛋白可以通过本领域已知的众多技术中任一种产生,所述技术包括例如从宿主细胞表达,其中通过标准技术将编码 DVD-Ig 重链和 DVD-Ig 轻链的表达载体转染至宿主细胞中。各种形式的术语“转染”意图包括常用于引入外源 DNA 至原核或真核宿主细胞中的多种技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE- 葡聚糖转染等。虽然可能在原核或真核宿主细胞中表达本发明的 DVD-Ig 蛋白,但是 DVD-Ig 蛋白在真核细胞(例如,哺乳动物宿主细胞)中表达,因为这类真核细胞(并且尤其哺乳动物细胞)比原核细胞更

有可能装配并分泌正确折叠和具有免疫活性的 DVD-Ig 蛋白。

[0339] 用于表达本发明重组抗体的示例性哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢 (CHO 细胞)(包括 Urlaub 和 Chasin, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77 :4216-4220(1980) 中所述的 dhfr-CHO 细胞,其与例如如 Kaufman 和 Sharp, J.Mol.Biol.,159 :601-621(1982) 中所述的 DHFR 选择标记一起使用)、NS0 骨髓瘤细胞、COS 细胞、SP2 细胞和 PER.C6 细胞。当将编码 DVD-Ig 蛋白的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞中时,通过培养宿主细胞足以允许 DVD-Ig 蛋白在宿主细胞中表达或分泌进入宿主细胞生长的培养基中的时间产生 DVD-Ig 蛋白。可以用标准蛋白质纯化方法从培养基回收 DVD-Ig 蛋白。

[0340] 在重组表达本发明 DVD-Ig 蛋白的示例性系统中,通过磷酸钙介导的转染将编码 DVD-Ig 重链和 DVD-Ig 轻链两者的重组表达载体引入 dhfr-CHO 细胞中。在重组表达载体内,DVD-Ig 重链基因和轻链基因各自可操作地与 CMV 增强子 /AdMLP 启动子调节元件连接以驱动高水平的基因转录。重组表达载体还携带 DHFR 基因,该基因允许使用甲氨蝶呤选择 / 扩增来选择已经用载体转染的 CHO 细胞。培养选择的转化体宿主细胞以允许表达 DVD-Ig 重链和轻链,并且从培养基回收完整的 DVD-Ig 蛋白。标准分子生物学技术用来制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化体、培养宿主细胞和从培养基回收 DVD-Ig 蛋白。另外,本发明还提供了通过在合适的培养基中培养本发明的宿主细胞直至合成本发明的 DVD-Ig 蛋白而合成本发明 DVD-Ig 蛋白的方法。这种方法还可以包括从培养基分离 DVD-Ig 蛋白。

[0341] DVD-Ig 的重要特征在于,它可以按照与常规抗体相似的方式产生和纯化。DVD-Ig 的产生导致均质、单一的主要产物,其具有所需的双重特异性活性,没有恒定区的任何序列修饰或任何种类的化学修饰。其他先前描述的产生“双特异性”、“多特异性”和“多特异性多价”全长结合蛋白的方法不产生单一初级产物,而是导致细胞内或分泌地产生装配的非活性、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的组合的多价全长结合蛋白的混合物。作为实例,基于 Miller 和 Presta(PCT 公开号 WO 2001/077342) 所描述的设计,存在重链和轻链的 16 种可能组合。因此,与其他 15 种可能的组合相比,仅 6.25% 的蛋白质可能处于所需的活性形式而非作为单一主要产物或单一初级产物。使用通常用于大规模生产中的标准层析技术分离所需的完全活性形式的蛋白质与非活性和部分活性形式的蛋白质尚有待证明。

[0342] 令人惊讶地,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,其主要装配成所需的“双重特异性多价全长结合蛋白”。

[0343] 至少 50%、至少 75%和至少 90%的装配和表达的 DVD-Ig 分子是所需的双重特异性四价蛋白质。本发明的这个方面特别增强本发明的商业用途。因此,本发明包括在单一细胞中表达双重可变结构域轻链和双重可变结构域重链,从而产生“双重特异性四价全长结合蛋白”的单一初级产物的方法。

[0344] 本发明提供在单一细胞中表达双重可变结构域轻链和双重可变结构域重链,从而产生“双重特异性四价全长结合蛋白”的“初级产物”的方法,其中“初级产物”是多于所有装配蛋白质的 50%,其包含双重可变结构域轻链和双重可变结构域重链。

[0345] 本发明提供在单一细胞中表达双重可变结构域轻链和双重可变结构域重链,从而产生“双重特异性四价全长结合蛋白”的单一“初级产物”的方法,其中“初级产物”是多于所有装配蛋白质的 75%,其包含双重可变结构域轻链和双重可变结构域重链。

[0346] 本发明提供在单一细胞中表达双重可变结构域轻链和双重可变结构域重链，从而产生“双重特异性四价全长结合蛋白”的单一“初级产物”的方法，其中“初级产物”是多于所有装配蛋白质的 90％，其包含双重可变结构域轻链和双重可变结构域重链。

[0347] 6. IL-1β 结合蛋白的产生和产生结合蛋白的细胞系

[0348] 优选地，本发明的 IL-1β 结合蛋白（包括抗 IL-1β 抗体）显示出降低或中和 IL-1β 活性的较高能力，例如，如通过本领域已知的几种体外和体内分析法中任一种评估的。优选地，本发明的 IL-1β 结合蛋白还显示降低或中和 IL-1β 活性的较高能力。

[0349] 在优选的实施方式中，结合蛋白或其抗原结合部分结合人 IL-1β，其中结合蛋白或其抗原结合部分以约 $0.1s^{-1}$ 或 $0.1s^{-1}$ 以下的 k_{off} 速率常数（如通过表面等离子体共振测定的）从人 IL-1β 解离，或以约 $1\times10^{-6}M$ 或以下的 IC_{50} 抑制人 IL-1β 活性。或者，结合蛋白或其抗原结合部分可以约 $1\times10^{-2}s^{-1}$ 或以下的 k_{off} 速率常数（如通过表面等离子体共振测定的）从人 IL-1β 解离，或可以约 $1\times10^{-7}M$ 或以下的 IC_{50} 抑制人 IL-1β 活性。或者，结合蛋白或其抗原结合部分可以约 $1\times10^{-3}s^{-1}$ 或以下的 k_{off} 速率常数（如通过表面等离子体共振测定的）从人 IL-1β 解离，或可以约 $1\times10^{-8}M$ 或以下的 IC_{50} 抑制人 IL-1β。或者，结合蛋白或其抗原结合部分可以约 $1\times10^{-4}s^{-1}$ 或以下的 k_{off} 速率常数（如通过表面等离子体共振测定的）从人 IL-1β 解离，或可以约 $1\times10^{-9}M$ 或以下的 IC_{50} 抑制人 IL-1β 活性。或者，结合蛋白或其抗原结合部分可以约 $1\times10^{-5}s^{-1}$ 或以下的 k_{off} 速率常数（如通过表面等离子体共振测定的）从人 IL-1β 解离，或可以约 $1\times10^{-10}M$ 或以下的 IC_{50} 抑制人 IL-1β 活性。或者，结合蛋白或其抗原结合部分可以约 $1\times10^{-5}s^{-1}$ 或以下的 k_{off} 速率常数（如通过表面等离子体共振测定的）从人 IL-1β 解离，或可以约 $1\times10^{-11}M$ 或以下的 IC_{50} 抑制人 IL-1β 活性。

[0350] 在某些实施方式中，结合蛋白包含重链恒定区，如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恒定区。优选地，重链恒定区是 IgG1 重链恒定区或 IgG4 重链恒定区。另外，抗体可以包含轻链恒定区，为 κ 轻链恒定区或 λ 轻链恒定区。优选地，抗体包含 κ 轻链恒定区。可选地，抗体部分可以例如是 Fab 片段或单链 Fv 片段。

[0351] 在 Fc 部分中替换氨基酸残基以改变抗体效应子功能是本领域已知的 (Winter 等人，美国专利号 5,648,260 和 5,624,821)。抗体的 Fc 部分介导几种重要的效应子功能，例如，细胞因子诱导、ADCC、吞噬作用、补体依赖性细胞毒性 (CDC) 及抗体和抗原－抗体复合物的半衰期／清除率。在一些情况下，这些效应子功能是治疗性抗体需要的，但是在其他情况下可能是不需要或甚至有害的，这取决于治疗目标。某些人 IgG 同种型，尤其 IgG1 和 IgG3，通过分别与 FcγR 和补体 C1q 结合而介导 ADCC 和 CDC。新生儿 Fc 受体 (FcRn) 是决定抗体的循环半衰期的重要成分。在又另一个实施方式中，将抗体的恒定区（例如抗体的 Fc 区）中的至少一个氨基酸残基替换，从而该抗体的效应子功能改变。

[0352] 一个实施方式提供标记的结合蛋白，其中本发明的抗体或抗体部分经衍生化或与另一种功能性分子（例如，另一种肽或蛋白质）连接。例如，可以通过以下方式衍生本发明的标记结合蛋白：将本发明的抗体或抗体部分（通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或其他方式）功能性连接至一种或多种其他分子实体，如另一种抗体（例如，双特异性抗体或双体）、可检测物质、细胞毒性剂、药物剂 (pharmaceutical agent) 和／或可以介导抗体或抗体部分与另一种分子（如链霉亲合素核心区或多组氨酸标签）的结合的蛋白质或肽。

[0353] 可以借以衍生化本发明的结合蛋白（如抗体或抗体部分）的有用可检测物质包括荧光化合物。示例性的荧光可检测物质包括荧光素、荧光素异硫氰酸酯、若丹明、5- 二甲胺 -1- 萘磺酰氯、藻红蛋白等。抗体也可以用可检测的酶如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶等衍生化。当抗体用可检测的酶衍生化时，其通过添加这种酶用来产生可检测反应产物的其它试剂来检测。例如，当存在可检测物质辣根过氧化物时，添加过氧化氢和二氨基联苯胺产生有色的反应产物，其是可检测的。抗体也可以用生物素衍生化，并且通过间接测量抗生物素蛋白或链霉亲合素结合来检测。

[0354] 本发明的另一个实施方式提供结晶的结合蛋白。优选地本发明涉及如本文中公开的完整抗 IL-1β 抗体及其片段的晶体、以及包含这些晶体的制剂配方和组合物。在一个实施方式中，结晶的结合蛋白具有比结合蛋白的可溶性对应物更长的体内半衰期。在另一个实施方式中，结合蛋白在结晶后保留生物学活性。

[0355] 本发明的结晶结合蛋白可以根据本领域已知和如 PCT 公开号 WO 02/072636 中公开的方法制备，所述专利公开通过引用方式并入本文。

[0356] 本发明的另一个实施方式提供糖基化的结合蛋白，其中抗体或其抗原结合部分包含一个或多个糖残基。新生体内蛋白质的产生可以经历进一步加工，称作翻译后修饰。具体而言，可以酶促添加糖（糖基）残基，一种称作糖基化的过程。所得到的携带共价连接的寡糖侧链的蛋白质称作糖基化蛋白或糖蛋白。

[0357] 天然存在的抗体是在 Fc 结构域以及可变结构域中具有一个或多个糖残基的糖蛋白。Fc 结构域中的糖残基对 Fc 结构域的效应子功能具有重要影响，对抗体的抗原结合或半衰期具有极小影响 (Jefferis, R., Biotechnol.Prog., 21 :11-16(2005))。相反，可变结构域的糖基化可以影响抗体的抗原结合活性。可变结构域中的糖基化可以负面影响抗体结合亲和力，这可能归因于空间位阻 (Co 等人，Mol.Immunol., 30 :1361-1367(1993))，或导致对抗原的亲和力提高 (Wallick 等人，J.Exp.Med., 168 :1099-1109(1988) ;Wright 等人，EMBO J., 10 :2717-2723(1991))。

[0358] 本发明的一个方面涉及产生其中结合蛋白的 O- 或 N- 连接糖基化位点已经突变的糖基化位点突变体。本领域技术人员可以使用标准的公知技术产生这类突变体。本发明的另一个目的是保留生物学活性但是具有提高或降低的结合活性的糖基化位点突变体。

[0359] 在又另一个实施方式中，本发明的抗体或抗原结合部分的糖基化经修饰。例如，可以产生非糖基化的抗体（即，抗体缺少糖基化）。可以改变糖基化以便例如提高抗体对抗原的亲和力。这类糖修饰也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，可以产生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，从而消除在该位点的糖基化。这类非糖基化可以提高抗体对抗原的亲和力。这种方法在 PCT 公开号 WO 2003/016466 及美国专利号 5,714,350 和 6,350,861 中进一步详细描述。

[0360] 另外地或可选地，可制备具有改变的糖基化类型的本发明修饰结合蛋白，如具有降低的岩藻糖残基量的低岩藻糖化的抗体（见，Kanda 等人，J.Biotechnol., 130(3) : 300-310(2007)）或具有增加的对分型 (bisecting)GlcNAc 结构的抗体。这类改变的糖基化模式已经证明提高抗体的 ADCC 能力。这类糖修饰可以通过例如在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体而完成。本领域中已经描述了具有改变的糖基化机制的细胞，并且它们可以用作表达本发明重组抗体的宿主细胞，从而产生具有改变的糖基化的抗体。见

例如，Shields 等人，J.Biol.Chem.，277 :26733-26740(2002) ;Umana 等人，"Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity",Nat.Biotechnol.，17 :176-180(1999) 以及欧洲公开号 EP 1,176,195 ;PCT 公开号 WO 03/035835 和 WO 99/54342。

[0361] 蛋白质糖基化取决于目标蛋白的氨基酸序列以及在其中表达蛋白质的宿主细胞。不同的生物体可以产生不同的糖基化酶（例如，糖基转移酶和糖苷酶），并且具有不同的可用底物（核苷酸糖）。因为这类因素，蛋白质糖基化模式和糖残基的组成可以根据其中表达特定蛋白质的宿主系统而不同。用于本发明中的糖残基可以包括但不限于葡萄糖、半乳糖、甘露糖、岩藻糖、N- 乙酰葡糖胺和唾液酸。优选地，糖基化结合蛋白包含使得糖基化模式是人类模式的糖残基。

[0362] 本领域技术人员已知，不同的蛋白质糖基化可以导致不同的蛋白质特征。例如，在微生物宿主（如酵母）中产生并且使用酵母内源性途径糖基化的治疗性蛋白的功效与在哺乳动物细胞（如 CHO 细胞系）中表达的相同蛋白质的功效相比可能降低。这类糖蛋白也可以在人类中呈现免疫原性，并且在施用后显示缩短的体内半衰期。人和其他动物中的特定受体可以识别特定糖残基并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、溶解度、蛋白酶易感性、运输、转运、区室化、分泌、其他蛋白质或因子的识别、抗原性或变应原性方面的变化。因此，实施者可能偏好具有特定糖基化组成和模式的治疗性蛋白，例如与在人细胞中或预定主体动物的物种特异性细胞中所产生的糖基化组成和模式相同或至少相似的糖基化组成和模式。

[0363] 可以通过遗传修饰宿主细胞以表达异源糖基化酶来实现与宿主细胞的糖基化蛋白不同的糖基化蛋白的表达。使用本领域已知的技术，实施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，酵母菌株进行遗传修饰以表达非天然产生的糖基化酶，从而在这些酵母菌株中产生的糖基化蛋白（糖蛋白）显示出与动物细胞、尤其人细胞相同的蛋白质糖基化（美国公开号 2004/0018590 和 2002/0137134）。

[0364] 除结合蛋白之外，本发明还涉及对本发明的这些结合蛋白特异性的抗独特型（抗 Id）抗体。抗 Id 抗体是识别通常与另一种抗体的抗原结合区相关的独特决定簇的抗体。可以通过用结合蛋白或其含 CDR 的区域免疫动物来制备抗 Id。免疫的动物将识别并且应答于免疫抗体的独特型决定簇并且产生抗 Id 抗体。显然，可能更容易产生针对并入 DVD-Ig 分子中的两种或更多种亲本抗体的抗独特型抗体；并且通过本领域公认的方法（例如，BIAcore、ELISA）证实结合研究以验证对每种亲本抗体的独特型特异性的抗独特型抗体也识别 DVD-Ig 情况中的独特型（例如，抗原结合位点）。对 DVD-Ig 的两个或更多个抗原结合位点中每一个特异性的抗独特型抗体提供了测量患者血清中人 DVD-Ig 的 DVD-Ig 浓度的理想试剂。例如，可以使用“夹心 ELISA 分析形式”建立 DVD-Ig 浓度测定法，其中将针对第一抗原结合区的抗体涂布在固相（例如，BIAcore 芯片、ELISA 平板等）上，用清洗缓冲液清洗，与血清样品一起孵育，进行另一个清洗步骤并且最终与针对其他抗原结合位点的另一种抗独特型抗体孵育，所述另一种抗独特型抗体本身用酶标记以定量结合反应。在一个实施方式中，对于具有超过两个不同结合位点的 DVD-Ig，针对（距恒定区最远端和近端的）两个最外结合位点的抗独特型抗体将不仅有助于测定人血清中的 DVD-Ig 浓度，而且反映分子在体内的完整性。每种抗 Id 抗体也可以用作诱导又另一种动物中免疫反应的“免疫原”，

从而产生所谓抗 - 抗 Id 抗体。

[0365] 另外，本领域技术人员理解，目标蛋白可以使用经遗传工程化以表达各种糖基化酶的宿主细胞文库来表达，从而这个文库的成员宿主细胞产生具有变异糖基化模式的目标蛋白。实施者随后可以选择和分离具有特定的新糖基化模式的目标蛋白。优选地，具有特别选择的新糖基化模式的蛋白质显示改善或改变的生物学特性。

[0366] 7. IL-1β 结合蛋白的用途

[0367] 鉴于它们与人 IL-1β 结合的能力，本发明的 IL-1β 结合蛋白或其抗原结合部分可以使用常规免疫分析如酶联免疫吸附分析 (ELISA)、放射免疫分析 (RIA) 或组织免疫组织化学，用来检测例如生物样品如血清或血浆中的 IL-1β。本发明提供一种用于检测生物样品中的 IL-1β 的方法，包括使生物样品与本发明的结合蛋白或抗原结合部分接触，并且检测与 IL-1β 结合的结合蛋白（或抗原结合部分）或未结合的结合蛋白（或结合部分），从而检测生物样品中的 IL-1β。结合蛋白直接或间接地用可检测物质标记以帮助检测结合或未结合的抗体。合适的可检测物质包括各种酶、辅基、荧光物质、发光物质和放射性物质。合适酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β - 半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶；合适辅基复合物的例子包括链霉亲合素 / 生物素和抗生物素蛋白 / 生物素；合适荧光物质的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪胺荧光素 (dichlorotriazinylamine fluorescein)、丹磺酰氯或藻红蛋白；发光物质的实例包括鲁米诺；且合适的放射性物质的实例包括 ^{3}H、^{14}C、^{35}S、^{90}Y、^{99}Tc、^{111}In、^{125}I、^{131}I、^{177}Lu、^{166}Ho 或 ^{153}Sm。

[0368] 作为标记结合蛋白的替代方式，可以使用以可检测物质标记的 rh IL-1β 标准品和未标记的人 IL-1β 结合蛋白通过竞争免疫分析来测定生物流体中的人 IL-1β。在这种分析中，将生物样品、标记的 rh IL-1β 标准品和人 IL-1β 结合蛋白合并并且测定与未标记抗体结合的标记的 rh IL-1β 标准品的量。生物样品中人 IL-1β 的量与 IL-1β 结合蛋白结合的标记 rh IL-1β 标准品的量成反比。类似地，也可以使用以可检测物质标记的 rh IL-1β 标准品和未标记的人 IL-1β 结合蛋白通过竞争免疫分析来测定生物流体中的人 IL-1β。

[0369] 本发明的结合蛋白和 IL-1β 结合部分优选能够在体外和体内中和人 IL-1β 活性。因此，本发明的这类结合蛋白及其 IL-1β 结合部分可以用来例如在含人 IL-1β 的细胞培养物中、在人受试者中或在具有本发明抗体与之交叉反应的 IL-1β 的其他哺乳动物受试者中抑制人 IL-1β 活性。在一个实施方式中，本发明提供一种用于抑制人 IL-1β 活性的方法，包括使人 IL-1β 与本发明的 IL-1β 结合蛋白或其结合部分接触，以使得人 IL-1β 活性被抑制。例如，在含有或疑似含有人 IL-1β 的细胞培养物中，可以将本发明的 IL-1β 结合蛋白或其结合部分添加至培养基中以抑制培养物中人 IL-1β 的活性。

[0370] 在另一个实施方式中，本发明提供一种用于在受试者中、有利地从患有其中 IL-1β 活性有害的疾病或病症的受试者中降低人 IL-1β 活性的方法。本发明提供用于在患有这种疾病或病症的受试者中降低 IL-1β 活性的方法，该方法包括向受试者施用本发明的抗体或抗体部分以使得受试者中的 IL-1β 活性降低。优选地，IL-1β 是人 IL-1β 并且受试者是人受试者。可选地，受试者可以是表达本发明的抗体能够与其结合的 IL-1β 的哺乳动物。再另外，受试者可以是已经向其中引入 IL-1β（例如通过施用 IL-1β 或通过表达 IL-1β 转基因）的哺乳动物。本发明的 IL-1β 结合蛋白可以出于治疗目的施用至人受

试者。另外，本发明的结合蛋白可以施用至表达所述抗体能够与其结合的 IL-1β 的非人哺乳动物用于兽医目的或用作人类疾病的动物模型。关于后者，这种动物模型可以用于评价本发明抗体的治疗功效（例如，测试给药剂量和时间过程）。

[0371] 如本文所用，术语“其中 IL-1β 活性有害的病症”意在包括其中已经显示在患有这种病症的受试者中 IL-1β 的存在造成或疑似造成这种病症的病理生理或者是促进这种病症加重的因素的疾病和其他病症。因此，其中 IL-1β 活性有害的病症是其中 IL-1β 活性的降低预期减缓病症的症状和 / 或进展的病症。这类病症可以例如由在患有这种病症的受试者的生物流体中 IL-1β 浓度的增加（例如，在受试者的血清、血浆、滑液等中 IL-1β 浓度的增加）得到证明，所述增加可以例如使用如上文所述的抗 IL-1β 抗体检测。可以用本发明抗体治疗的病症的非限制性实例包括在涉及本发明抗体的药物组合物的以下部分中讨论的那些病症。

[0372] 本发明的 DVD-Ig 可以结合单独的 IL-1β 或多种抗原（例如，人 IL-1β 和另一种非 IL-1β 抗原）。因此，DVD-Ig 可以阻断或降低 hu IL-1β 的活性和另一种靶抗原的活性。这类其他的靶抗原可以包括可溶性靶标（例如，IL-1α）和细胞表面受体靶标（例如，VEGFR、EGFR）。

[0373] 这类其他抗原包括但不限于在公开可获得的数据库中所列的靶标，所述数据库包括在互联网上可获得的并且通过引用方式并入本文的那些数据库。这些靶标数据库包括：

[0374] 治疗性靶标 (http ://xin.cz3.nus.edu.sg/group/cjttd/ttd.asp)；

[0375] 细胞因子和细胞因子受体 (http ://www.cytokinewebfacts.com/, http ://www.copewithcytokines.de/cope.cgi 和 http ://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgf/CGF_Database/cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/indexR.html)；

[0376] 趋化因子 (http ://cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/CK/Chemokine.html)；

[0377] 趋化因子受体和 GPCR(http ://csp.medic.kumamoto-u.ac.jp/CSP/Receptor.html, http ://WWW.gpcr.org/7tm/)；

[0378] 嗅觉受体 (http ://senselab.med.yale.edu/senselab/ORDB/default.asp)；

[0379] 受体 (http ://www.iuphar-db.org/iuphar-rd/list/index.htm)；

[0380] 癌症靶标 (http ://cged.hgc.jp/cgi-bin/input.cgi)；

[0381] 作为潜在抗体靶标的分泌型蛋白 (http ://spd.cbi.pku.edu.cn/)；

[0382] 蛋白激酶 (http ://spd.cbi.pku.edu.cn/)，和

[0383] 人 CD 标志物 (http ://content.labvelocity.com/tools/6/1226/CD_table_final_locked.pdf) 和 (Zola 等人，" CD molecules2005 :human cell differentiation molecules，" Blood, 106 :3123-3126(2005))。

[0384] DVD-Ig 作为治疗剂可用于同时阻断两种或更多种不同靶标，即人 IL-1β 和一种或多种其他非 IL-1β 靶抗原，以增强功效 / 安全性和 / 或增加患者适用范围。这类靶标可以包括可溶性靶标 (TNF) 和细胞表面受体靶标 (VEGFR 和 EGFR)。

[0385] 另外，本发明的 DVD-Ig 可以用于组织特异性递送（靶向组织标志物和疾病介质以用于获得增强的局部 PK，因此获得更高功效和 / 或更低毒性），包括细胞内递送（靶向内化受体和细胞内分子）、递送至脑内（靶向转铁蛋白受体和 CNS 疾病介质用于跨过

血脑屏障）。DVD-Ig 也可以充当载体蛋白以通过与抗原的非中和性表位结合而递送这种抗原至特定位置并且还增加这种抗原的半衰期。另外，DVD-Ig 可以设计成与植入患者中的医疗装置物理连接或靶向这些医疗装置（见 Burke 等人，″ Zotarolimus eluting stents ″ Adv.Drug Deliv.Rev.,58(3) :437-446(2006) ;Hildebrand 等人，″ Surface coatings for biological activation and functionalization of medical devices″，Surface and Coatings Technology,200(22-23) :6318-6324(2006) ;Wu 等人，″ Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis ″，Biomaterials,27 :2450-2467(2006) ;Marques 等人，″ Mediation of the Cytokine Network in the Implantation of Orthopedic Devices ″，第 21 章，Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine，(Reis 等人编著）(CRC Press LLC，Boca Raton,2005) 第 377-397 页）。简而言之，引导适宜类型的细胞至医用植入物部位可以促进愈合和恢复正常组织功能。可选地，还提供通过偶联于或靶向于装置的 DVD-Ig 来抑制当装置植入时释放的介质（包括但不限于细胞因子）。例如，支架已经多年用于介入性心脏病学以清理阻塞的动脉并且改善到达心肌的血流。然而，已知传统的金属裸支架在一些患者中造成再狭窄（治疗区域内动脉的再次变窄）和可以导致血凝块。近来，已经描述了抗 CD34 抗体涂覆的支架，其通过捕获在整个血液中循环的内皮祖先细胞 (EPC) 来减轻再狭窄并防止血凝块出现。内皮细胞是内衬血管的细胞，因而允许血液顺畅流动。EPC 附着于支架的坚硬表面而形成光滑层，其不仅促进愈合，而且防止再狭窄和血凝块（以往与使用支架相关的并发症）(Aoki 等人，J.Am.Coll.Cardiol.,45(10) :1574-1579(2005))。除改善需要支架的患者的结果之外，还牵涉到需要心血管搭桥术的患者。例如，用抗 EPC 抗体涂覆的假体血管导管（人工动脉）将不需要使用来自患者腿部或臂部动脉作为搭桥术移植体。这将减少手术时间和麻醉时间，其转而将减少冠状动脉手术死亡。DVD-Ig 以与细胞表面标志物（如 CD34) 以及已经包覆在植入装置上的蛋白质（或任何种类的表位，包括但不限于蛋白质、脂类和多糖）结合的方式设计，从而促进细胞募集。这类方法通常也可以应用于其他医用植入物。可选地，DVD-Ig 可以包覆在医疗装置上，并且一旦植入和从该装置释放全部 DVD（或可能要求额外的新鲜 DVD-Ig 的任何其他需要，包括已经加载的 DVD-Ig 的老化和变性），则可以通过全身性施用新的 DVD-Ig 至患者对这个装置再加载，其中 DVD-Ig 设计成与具有一组结合位点的目标靶标（细胞因子、细胞表面标志物（如 CD34) 等）和具有另一组结合位点的包覆在该装置上的靶标（包括蛋白质、任何种类的表位，包括但不限于脂类、多糖和聚合物）结合。这项技术具有扩展涂覆植入物的用途的优点。

[0386] A.DVD-Ig 在各种疾病中的用途

[0387] 本发明的 DVD-Ig 分子还可用作治疗性分子以治疗各种疾病。这类 DVD 分子可以结合参与特定疾病的一种或多种靶标。下文描述各种疾病中这类靶标的实例。

[0388] 人自身免疫及炎性反应

[0389] 在一个方面，本发明的 DVD-Ig 结合蛋白能够结合人 IL-1β 和参与一般性自身免疫反应和炎性反应的一种或多种抗原，包括 C5、CCL1(I-309)、CCL11（嗜酸细胞活化趋化因子）、CCL13(mcp-4)、CCL15(MIP-1d)、CCL16(HCC-4)、CCL17(TARC)、CCL18(PARC)、CCL19、CCL2(mcp-1)、CCL20(MIP-3a)、CCL21(MIP-2)、CCL23(MPIF-1)、CCL24(MPIF-2/ 嗜酸细胞活化趋化因子 -2)、CCL25(TECK)、CCL26、CCL3(MIP-1a)、CCL4(MIP-1b)、CCL5(RANTES)、

CCL7(mcp-3)、CCL8(mcp-2)、CXCL1、CXCL10(IP-10)、CXCL11(I-TAC/IP-9)、CXCL12(SDF1)、CXCL13、CXCL14、CXCL2、CXCL3、CXCL5(ENA-78/LIX)、CXCL6(GCP-2)、CXCL9、IL13、IL8、CCL13(mcp-4)、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CX3CR1、IL8RA、XCR1(CCXCR1)、IFNA2、IL10、IL13、IL17C、IL1A、IL1B、IL1F10、IL1F5、IL1F6、IL1F7、IL1F8、IL1F9、IL22、IL5、IL8、IL9、LTA、LTB、MIF、SCYE1(内皮单核细胞-活化细胞因子)、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、TGFB111、TGFB2、TGFB3、TGFBI、TGFBR1、TGFBR2、TGFBR3、TH1L、TNF、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF7、TNFRSF8、TNFRSF9、TNFRSF11A、TNFRSF21、TNFSF4、TNFSF5、TNFSF6、TNFSF11、VEGF、ZFPM2 和 RNF110(ZNF144)。

[0390] 哮喘

[0391] 过敏性哮喘的特征在于存在嗜曙红细胞增多、杯状细胞化生、上皮细胞改变、气道高反应性(AHR)及 Th2 和 Th1 细胞因子表达,以及升高的血清 IgE 水平。现在广泛认为,气道炎症是构成哮喘病理基础的关键因素,涉及炎性细胞如 T 细胞、B 细胞、嗜曙红细胞、肥大细胞和巨噬细胞以及它们的分泌介质(包括细胞因子和趋化因子)的复杂相互作用。皮质类固醇如今是最重要的哮喘抗炎疗法,然而它们的作用机制是非特异性的并且存在安全性顾虑,尤其在青少年患者群体中。因此有理由开发更特异性的和靶向的疗法。

[0392] 其中可以评估炎症和 AHR 的动物模型(如 OVA 诱导的哮喘小鼠模型)是本领域已知的,并且可以用来测定各种 DVD-Ig 分子治疗哮喘的能力。用于研究哮喘的动物模型在 Coffman 等人,J.Exp.Med.,201(12):1875-1879(2005);Lloyd 等人,Adv.Immunol.,77:263-295(2001);Boyce 等人,J.Exp.Med.,201(12):1869-1873(2005)和 Snibson 等人,Clin.Exp.Allergy,35(2):146-152(2005)中公开。除这些靶标对的常规安全性评估之外,用于免疫抑制程度的特定测试也可以是正当需要的,并且有助于选择最好的靶标对(见 Luster 等人,Toxicology,92(1-3):229-243(1994);Descotes,J.,Develop.Biol.Standard.,77:99-102(1992);Hart 等人,J.Allergy Clin.Immunol.,108(2):250-257(2001))。

[0393] 本发明的一个方面涉及能够结合 IL-1β 和选自 IL-4、IL-5、IL-8、IL-9、IL-13、

IL-18、IL-5R(α)、TNFSF4、IL-4R(α)、干扰素 α、嗜酸细胞活化趋化因子、TSLP、PAR-2、PGD2 和 IgE 的一种或多种（例如两种）靶标的 DVD-Ig 分子。一个实施方式包括作为治疗药有益于哮喘治疗的双重特异性抗 IL-1β/IL-1α DVD-Ig。

[0394] 类风湿性关节炎 (RA)

[0395] 类风湿性关节炎 (RA)，一种全身性疾病，特征在于关节滑膜中的慢性炎性反应并且与软骨变性和近关节骨侵蚀相关。许多促炎细胞因子（包括 TNF、趋化因子和生长因子）在发病的关节中表达。全身性施用抗 TNF 抗体或 sTNFR 融合蛋白至 RA 的小鼠模型显示具有抗炎和关节保护性。各种细胞因子，包括 IL-1β，已经牵涉到 RA。其中静脉内施用英夫利昔单抗（一种嵌合抗 TNF mAb）阻断 RA 患者中 TNF 活性的临床研究 (Harriman 等人，" Summary of clinical trials in rheumatoid arthritis using infliximab, an anti-TNFalpha treatment "，Ann. Rheum. Dis.，58(Suppl1)：161-164(1999)) 已经提供 TNF 调节 IL-6、IL-8、MCP-1 和 VEGF 产生、募集免疫细胞和炎症细胞至关节中、血管生成和降低基质金属蛋白酶 -1 和 -3 的血液水平的证据。对类风湿性关节炎中炎性途径的更好理解已经导致鉴定参与类风湿性关节炎的其他治疗靶标。有前景的治疗如白介素 -6 拮抗剂 (IL-6 受体抗体 MRA，由 Chugai，Roche 开发（见 Nishimoto 等人，Arthritis Rheum.，50(6)：1761-1769(2004))、CTLA4Ig（阿巴西普 (abatacept)，Genovese 等人，" Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition"，N. Engl. J. Med.，353：1114-1123(2005)) 和抗 B 细胞疗法（利妥昔单抗，Okamoto 等人，" Rituximab for rheumatoid arthritis"，N. Engl. J. Med.，351：1909(2004)) 已经在过去一年在随机对照试验中测试。IL-1β 和其他细胞因子如 IL-15 和 IL-18 已经使用 RA 动物模型鉴定为发挥作用（治疗性抗体 HuMax-IL_15，AMG714，见 Baslund 等人，Arthritis Rheum.，52(9)：52(9)：2686-2692(2005))。组合抗 TNF 和另一种介质（如 IL-1β）的双重特异性抗体疗法在增强临床功效和 / 或患者适用范围方面具有巨大潜力。例如，阻断 TNF 和 VEGF 两者（二者均参与 RA 的病理）可以潜在地根除炎症和血管生成。考虑了能够阻断 IL-1α 和 IL-1β 的 DVD-Ig 结合蛋白。除这些靶标对的常规安全性评估外，用于免疫抑制程度的特定测试也是正当需要的，并且有助于选择最好的靶标对（见 Luster 等人，Toxicology，92(1-3)：229-243(1994)；Descotes 等人，Develop. Biol. Standard.，77：99-102(1992)；Hart 等人，J. Allergy Clin. Immunol.，108(2)：250-257(2001))。可以使用前临床动物 RA 模型（如胶原蛋白诱导的关节炎小鼠模型）来评估 DVD-Ig 分子是否可用于治疗类风湿性关节炎。其他有用的模型也是本领域熟知的（见 Brand，D. D.，Comp. Med.，55：114-122(2005))。基于亲本抗体对人和小鼠直系同源物的交叉反应性（例如，对人和小鼠 TNF、人和小鼠 IL-15 等的反应性），可以在小鼠 CIA 模型中用源自 DVD-Ig 分子的“匹配的代用抗体”进行验证研究。简而言之，基于两种（或更多种）小鼠靶特异性抗体的 DVD-Ig 可以在可能的程度上与用于人 DVD-Ig 构建的亲本人抗体或人源化抗体的特征匹配（相似的亲和力、相似的中和效力、相似的半衰期等）。

[0396] 在一个实施方式中，结合人 IL-1β 和另一种非 IL-1β 靶标的本发明 DVD-Ig 也可以用来治疗其中 IL-1β 发挥作用的其他疾病。这类疾病包括但不限于 SLE、多发性硬化 (MS)、败血症、各种神经学疾病和癌症（包括宫颈癌、乳腺癌、胃癌）。下文也提供其中 IL-1β 发挥作用的疾病和病症的更广泛清单。

[0397] 本发明的实施方式涉及能够结合人 IL-1β 和选自 IL-1α、TNFa、IL-12、TWEAK、IL-23、CXCL13、CD40、CD40L、IL-18、VEGF、VLA-4、TNFβ、CD45RB、CD200、IFN-γ、GM-CSF、FGF、C5、CD52、硬骨素 (sclerostin) 和 CCR2 的一种或多种靶标的 DVD-Ig 分子。

[0398] 系统性红斑狼疮 (SLE)

[0399] SLE 的免疫病原性标志是多克隆 B 细胞活化，这导致高球蛋白血症、自身抗体产生和免疫复合物形成。这种根本异常似乎是因普遍化 T 细胞失调而导致 T 细胞不能抑制禁忌 B 细胞克隆 (forbidden B cell clone)。此外，B 细胞和 T 细胞相互作用受启动第二信号的几种细胞因子如 IL-10 以及共刺激分子如 CD40 和 CD40L、B7 和 CD28 和 CTLA-4 促进。这些相互作用连同受损的免疫复合物和凋亡物质的吞噬清除使免疫反应得以保持，导致组织损伤。

[0400] 在一个方面，本发明的 DVD-Ig 结合蛋白能够结合人 IL-1β 和牵涉 SLE 的以下抗原中的一种或多种：B 细胞靶向疗法：CD-20、CD-22、CD-19、CD28、CD4、CD80、HLA-DRA、IL10、IL2、IL4、TNFRSF5、TNFRSF6、TNFSF5、TNFSF6、BLR1、HDAC4、HDAC5、HDAC7A、HDAC9、ICOSL、IGBP1、MS4A1、RGS1、SLA2、CD81、IFNB1、IL10、TNFRSF5、TNFRSF7、TNFSF5、AICDA、BLNK、GALNAC4S-6ST、HDAC4、HDAC5、HDAC7A、HDAC9、IL10、IL11、IL4、INHA、INHBA、KLF6、TNFRSF7、CD28、CD38、CD69、CD80、CD83、CD86、DPP4、FCER2、IL2RA、TNFRSF8、TNFSF7、CD24、CD37、CD40、CD72、CD74、CD79A、CD79B、CR2、IL1R2、ITGA2、ITGA3、MS4A1、ST6GAL1、CD1C、CHST10、HLA-A、HLA-DRA 和 NT5E；共刺激信号：CTLA4 或 B7.1/B7.2；B 细胞存活的抑制：BlyS、BAFF；补体失活：C5；细胞因子调节：关键原则是任何组织中的净生物反应是促炎性或抗炎性细胞因子的局部水平之间平衡的结果（见 Sfikakis 等人，Curr.Opin.Rheumatol.，17：550-557(2005)）。据认为 SLE 是血清 IL-4、IL-6、IL-10 明显升高的 Th-2 驱动疾病。还设想了能够结合选自 IL-4、IL-6、IL-10、IFN-α 和 TNF-α 的一种或多种靶标的 DVD-Ig。本文中讨论的靶标的组合将增强针对可以在多种狼疮临床前模型中测试的 SLE 治疗功效（见，Peng S.L.，Methods Mol.Med.，102：227-272(2004)）。基于亲本抗体对人和小鼠直系同源物的交叉反应性（例如，对人和小鼠 CD20、人和小鼠干扰素 α 等的反应性），可以在小鼠狼疮模型中用源自 DVD-Ig 分子的“匹配的代用抗体”进行验证研究。简而言之，基于两种（或更多种）小鼠靶标特异性抗体的 DVD-Ig 可以在可能的程度上与用于人 DVD-Ig 构建的亲本人抗体或人源化抗体的特征匹配（相似的亲和力、相似的中和效力、相似的半衰期等）。

[0401] 多发性硬化 (MS)

[0402] 多发性硬化 (MS) 是病因基本上未知的一种复杂的人自身免疫型疾病。遍及神经系统的髓磷酯碱性蛋白 (MBP) 的免疫破坏是多发性硬化的主要病理。MS 是复杂病理疾病，其涉及 CD4+ 和 CD8+T 细胞浸润和中枢神经系统内的反应。细胞因子、活性氮物质和共刺激分子在 CNS 中的表达均已经在 MS 中描述。主要考虑因素是造成自身免疫性形成的免疫学机理。特别地，抗原表达、细胞因子和白细胞相互作用及帮助平衡 / 调节其它 T- 细胞如 Th1 和 Th2 细胞的调节性 T- 细胞是治疗靶标鉴定的重要领域。

[0403] IL-12 是由 APC 产生并促进 Th1 效应细胞分化的促炎性细胞因子。IL-12 在 MS 患者的正在形成病灶中以及在患有 EAE 的动物中产生。先前显示，干扰 IL-12 途径有效地防止啮齿动物中的 EAE，并且在普通狨猴的髓磷脂诱导 EAE 模型中使用抗 IL-12mAb 体内中和

IL-12p40 具有有益效果。

[0404] TwEAK 是在中枢神经系统 (CNS) 中组成型表达的 TNF 家族成员，其根据细胞类型，具有促炎、增殖或细胞凋亡效应。其受体 (Fn14) 在 CNS 中由内皮细胞、反应性星形细胞和神经元表达。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。当小鼠在激发阶段后治疗时，在 C57BL/6 小鼠的髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白 (MOG) 诱导的 EAE 中抗 TWEAK 抗体治疗导致疾病严重性和白细胞浸润的减轻。

[0405] 本发明的一个方面涉及能够结合 IL-1β 和选自 L-12、TWEAK、IL-23、CXCL13、CD40、CD40L、IL-18、VEGF、VLA-4、TNF、CD45RB、CD200、IFNγ、GM-CSF、FGF、C5、CD52、骨桥蛋白及 CCR2 的一种或多种（例如两种）靶标的 DVD-Ig 分子。一个实施方式包括作为有益于 MS 治疗的治疗剂的双重特异性抗 IL-1β/TWEAK DVD-Ig。

[0406] 用于评估 DVD-Ig 分子治疗 MS 的适用性的几种动物模型是本领域已知的（见 Steinman 等人，Trends Immunol.，26(11)：565-571(2005)；Lublin 等人，Springer Semin Immunopathol.，8(3)：197-208(1985)；Genain 等人，J.Mol.Med.，75(3)：187-197(1997)；Tuohy 等人，J. Exp.Med.，189(7)：1033-1042(1999)；Owens 等人，Neurol.Clin.，13(1)：51-73(1995)；和′ t Hart 等人，J.Immunol.，175(7)：4761-4768(2005))。基于亲本抗体对人和动物物种直系同源物的交叉反应性（例如，对人和小鼠 IL-1β、人和小鼠 TWEAK 等的反应性），可以在小鼠 EAE 模型中用源自 DVD-Ig 分子的“匹配的代用抗体”进行验证研究；简而言之，基于两种（或更多种）小鼠靶标特异性抗体的 DVD-Ig 可以在可能的程度上与用于人 DVD-Ig 构建的亲本人抗体或人源化抗体的特征匹配（相似的亲和力、相似的中和效力、相似的半衰期等）。相同概念适用于其他非啮齿类物种的动物模型，其中选择源自 DVD-Ig 的“匹配的代用抗体”用于预期的药理学和可能的安全性研究。除这些靶标标对的常规安全性评估之外，用于免疫抑制程度的特定测试也是正当需要的，并且有助于选择最好的靶标对（见 Luster 等人，Toxicology，92(1-3)：229-243(1994)；Descotes 等人，Develop.Biol. Standard.，77：99-102(1992)；Jones，R.，″ Rovelizumab-ICOS Corp″，IDrugs，3(4)：442-446(2000))。

[0407] 败血症

[0408] 败血症的病理生理由革兰氏阴性生物体的外膜组分（脂多糖 [LPS]、脂质 A、内毒素）和革兰氏阳性生物体的外膜组分（脂胞壁酸、肽聚糖）启动。这些外膜组分能够与单核细胞表面上的 CD14 受体结合。借助最近描述的 toll 样受体，信号随后传送至细胞，导致最终产生促炎细胞因子：肿瘤坏死因子 -α (TNF-α) 和白介素 -1(IL-1)。重度的炎性反应和免疫反应是脓毒性休克的重要特征并且在败血症引起的组织损伤、多器官衰竭和死亡的病理中发挥核心作用。细胞因子，尤其肿瘤坏死因子 (TNF) 和白介素 (IL-1)，已经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毒性效应；它们还激活磷脂酶 A2。这些及其他作用导致血小板激活因子浓度提高、促进一氧化氮合酶活性、促进嗜中性粒细胞的组织浸润和促进嗜中性粒细胞活性。

[0409] 败血症和脓毒性休克的治疗仍是一项临床难题，并且采用针对炎性反应的生物反应调节剂（即，抗 TNF、抗 MIF）的近期前瞻性试验仅显示不多的临床益处。最近，关注已经转向旨在逆转伴随的免疫抑制期的治疗。实验动物和危重患者中的研究已经显示，淋巴器官和一些实质组织的细胞凋亡增加造成这种免疫抑制、无反应性和器官系统功能障碍。在

脓毒症综合征期间，淋巴细胞凋亡可以因 IL-2 的不存在或因糖皮质激素、粒酶或所谓“死亡”细胞因子（肿瘤坏死因子 α 或 Fas 配体）的释放而触发。细胞凋亡通过胞质和 / 或线粒体胱天蛋白酶的自动活化而进行，其可以受 Bcl-2 家族的促凋亡和抗凋亡成员影响。在实验动物中，细胞凋亡抑制剂的治疗不仅可以防止淋巴样细胞凋亡；它也可以改善结局。虽然采用抗凋亡药物的临床试验大多因与其施用和组织靶向相关的技术难题而仍距实用尚远，但是抑制淋巴细胞凋亡代表了用于败血症患者的有吸引力的治疗靶标。同样，靶向炎性介质和凋亡性介质的双重特异性剂可以具有附加的益处。本发明的一个方面涉及能够结合 IL-1β 和选自 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、IL-10、IL-1B、NFKB1、PROC、TNFRSF1A、CSF3、CCR3、IL1RN、MIF、NFKR1、PTAFR、TLR2、TLR4、GPR44、HMOX1、HMG-B1、肝素结合细胞因子 (midkine)、IRAK1、NFKB2、SERPINA1、SERPINE1 和 TREM1 的一种或多种参与败血症的靶标的 DVD-Ig。可以在本领域已知的临床前动物模型中评估这类 DVD-Ig 用于败血症的功效（见，Buras 等人，Nat. Rev. DrugDiscov.，4(10)：854-865(2005) 和 Calandra 等人，Nature Med.，6(2)：164-170(2000)）。

[0410] 神经学病症和神经变性疾病

[0411] 神经变性疾病或是慢性的（在这种情况下它们通常是年龄依赖性的）或是急性的（例如，中风、创伤性脑损伤、脊髓损伤等）。它们以进行性神经元功能丧失（神经元细胞死亡、脱髓鞘）、活动性丧失和记忆丧失为特征。对作为慢性神经变性疾病（例如，阿尔茨海默病，AD) 基础的机制的最新认识显示复杂的病因学，并已经认识到多种因素造成其形成和进展，例如，年龄、血糖状态、淀粉样蛋白产生和多聚化、与其受体 RAGE(AGE 的受体）结合的高级糖化终产物积累 (AGE)、脑氧化应激增加、大脑血流量减少、神经炎症（包括释放炎性细胞因子和趋化因子）、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个细胞类型和介质之间复杂的相互作用。这类疾病的治疗策略是有限的并且大部分构成使用非特异性抗炎药（例如，皮质类固醇、COX 抑制剂）的阻断炎症过程或防止神经元丧失和 / 或突触功能的药剂。这些治疗不能停止病情进展。最近的研究表明，更具靶向性的疗法（如针对可溶性 Aβ 肽（包括 Aβ 寡聚体形式）的抗体）不仅可以帮助停止病情进展，还可以帮助维持记忆。这些初步观察结果表明，靶向多于一种疾病介质（例如，Aβ 和促炎性细胞因子如 TNF) 的特定疗法可以为慢性神经变性病提供比采用靶向单一疾病机制（例如，单独的可溶性 Aβ）时所观察到的甚至更好的治疗功效（见 Shepherd 等人，Neuropathol. Appl. Neurobiol.，31：503-511(2005)；Nelson，R. B.，Curr. Pharm. Des.，11：3335-3352(2005)；Klein，W. L，Neurochem. Int.，41：345-352(2002)；Janelsins 等人，″ Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor-alpha and monocyte chemoattractant protein-I expression specificaily within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer′ s disease mice″，J. Neuroinflammation，2(23)：1-12(2005)；Soloman，B.，Curr. Alzheimer. Res.，1：149-163(2004)；Klyubin 等人，Nature Med.，11：556-561(2005)；Arancio 等人，EMBO J.，23：4096-4105(2004)；Bornemann 等 人，Am. J. Pathol.，158：63-73(2001)；Deane 等 人，Nature Med.，9：907-913(2003) 和 Masliah 等人，Neuron，46：857-868(2005)）。

[0412] 本发明的 DVD-Ig 分子可以结合 IL-1β 和参与慢性神经变性疾病（如阿尔茨海

默病）的一种或多种靶标。这类靶标包括但不限于参与 AD 疾病发生的任何可溶性或细胞表面介质，例如，AGE(S100A，两性霉素）、促炎性细胞因子（例如，IL-1）、趋化因子（例如，MCP1）、抑制神经再生的分子（例如，Nogo，RGM A）、增强神经突生长的分子（神经营养因子）和可以在血脑屏障处介导转运的分子（例如，转铁蛋白受体、胰岛素受体或 RAGE）。DVD-Ig 分子的功效可以在临床前动物模型（如过表达淀粉样前体蛋白或 RAGE 并且形成阿尔茨海默病样症状的转基因小鼠）中验证。此外，可以构建 DVD-Ig 分子并且在动物模型中测试其功效，并且可以选择最佳治疗 DVD-Ig 用于在人类患者中的测试。DVD-Ig 分子也可以用于治疗其他神经变性疾病如帕金森病。α－突触核蛋白 (Synuclein) 涉及帕金森病的病理。能够靶向 IL-1β 和 LINGO-1、α－突触核蛋白和 / 或炎性介质如 TNF、IL-17、MCP-1 的 DVD-Ig 可以证明为帕金森病的有效疗法并且包括在本发明中。

[0413] 神经元再生和脊髓损伤

[0414] 尽管对病理学机制的知识增加，脊髓损伤 (SCI) 仍是一种灾难性的病状并且代表以高度医疗需要为特征的医学适应症。大部分脊髓损伤是挫伤或挤压性损伤，并且原发性损伤通常跟随使初始损伤恶化并导致损害区域明显扩大（有时超过 10 倍）的继发性损伤机制（炎性介质例如，细胞因子和趋化因子）。SCI 中的这些原发性和继发性机制与因其他方式（例如，中风）引起的脑损伤中的那些十分相似。不存在令人满意的疗法并且高剂量快速浓注甲泼尼龙 (MP) 是在损伤后 8 小时的狭窄时间窗内唯一使用的疗法。然而，这种治疗仅意图防止继发性损伤而不引起任何明显的功能恢复。它因缺少明确功效和严重副作用（如免疫抑制伴后续感染和严重组织病理学肌肉改变）而饱受批评。没有刺激内源性再生潜力的其他药物、生物制品或小分子得到批准，但是近年来，有前景的治疗原理和候选药物已经在 SCI 的动物模型中显示功效。很大程度上，人 SCI 中功能恢复的缺乏由损害部位处、瘢痕组织中、髓磷脂中以及损伤相关性细胞上抑制神经突生长的因子引起。这类因子是髓鞘相关蛋白 NogoA、Omgp 和 MAG、RGM A、瘢痕相关的 CSPG（硫酸软骨素蛋白聚糖）和反应性星形细胞上的抑制性因子（某些脑信号蛋白 (semaphorin) 及 ephrin)。然而，在损害部位处，不仅存在生长抑制性分子，还存在神经突生长刺激因子如神经营养因子、层粘连蛋白、L1 和其他。神经突生长抑制性和生长促进性分子的这种组合 (ensemble) 可以解释：阻断单一因子（如 NogoA 或 RGM A）在啮齿动物 SCI 模型中导致明显的功能恢复，原因在于抑制性影响的降低可以使平衡从生长抑制向生长促进转移。然而，在阻断单一神经突增生抑制性分子时所观察到的恢复不是完全的。为了实现更快和更明显的恢复，可能需要阻断两种神经突增生抑制性分子（例如，Nogo 和 RGM A）或阻断神经突增生抑制性分子并且增强神经突增生增强分子（例如，Nogo 和神经营养因子）或阻断神经突增生抑制性分子（例如，Nogo）和促炎性分子（例如，TNF)（见 McGee 等人，Trends Neurosci.，26：193-198(2003)；Domeniconi 等人，J.Neurol.Sci.，233：43-47(2005)；Makwana 等人，FEBS J.，272：2628-2638(2005)；Dickson，B.J.，Science，298：1959-1964(2002)；Teng 等 人，J.Neurosci.Res.，79：273-278(2005)；Kamezis 等人，Nature Neurosci.，7：736(2004)；Xu 等人，J.Neurochem.，91：1018-1023(2004))。

[0415] 在一个方面，结合人 IL-1β 的 DVD-Ig 也可以结合靶标对中的一个或两个靶标，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、肝素结合细胞因子、神经蛋白聚糖、多功能蛋白聚糖、磷酸蛋白聚糖

(phosphacan)、Te38 及 TNF-α ;提供了与促进树突和轴突出芽的抗体组合的 Aβ 球聚体(globulomer) 特异性抗体。树突病变是 AD 的极早期征兆并且已知 NOGO A 限制树突生长。可以将这种类型的 ab 与任一种 SCI- 候选 (髓鞘质 - 蛋白质)Ab 组合。其他 DVD-Ig 靶标可以包括 NgR-p75、NgR-Troy、NgR-Nogo66(Nogo)、NgR-Lingo、Lingo-Troy、Lingo-p75、MAG 或 OMgp 的任何组合。另外,靶标也可以包括参与神经突抑制的任何可溶性或细胞表面介质,例如,Nogo、OMgp、MAG、RGM A、信号蛋白、ephrin、可溶性 Aβ 、促炎性细胞因子 (例如,IL-1)、趋化因子 (例如,MIP1a)、抑制神经再生的分子。抗 nogo/ 抗 RGMA 或相似 DVD-Ig 分子的功效可以在脊髓损伤的临床前动物模型中验证。此外,可以构建这些 DVD-Ig 分子并且在动物模型中测试其功效,并且可以选择最佳治疗性 DVD-Ig 用于人类患者中的测试。此外,可以构建靶向单一受体上两个不同配体结合位点的 DVD-Ig 分子,例如,结合 3 个配体 Nogo、OMgp 和 MAG 的 Nogo 受体以及结合 Aβ 和 S100A 的 RAGE。另外,神经突增生抑制剂 (例如,nogo 和 nogo 受体) 也在免疫学疾病如多发性硬化中发挥阻止神经再生方面的作用。nogo-nogo 受体相互作用的抑制已经显示在多发性硬化的动物模型中增强恢复。因此,可以阻断一种免疫介质 (例如,细胞因子如 IL-12) 和神经突增生抑制分子 (例如,Nogo 或 RGM) 的功能的 DVD-Ig 分子可以比阻断单独免疫或神经突增生抑制剂分子提供更快和更大的功效。

[0416] 通常,抗体不以高效和有意义的方式跨过血脑屏障 (BBB)。然而,在某些神经学疾病 (例如,中风、创伤性脑损伤、多发性硬化等) 中,BBB 可能受损而允许 DVD-Ig 和抗体向脑内渗透增加。在其中不出现 BBB 泄漏的其他神经学病状中,可以利用内源性转运系统的靶向作用 (包括在 BBB 的血管内皮处载体介导的转运蛋白 (如葡萄糖和氨基酸载体) 和受体介导的转胞吞作用介导的细胞结构 / 受体),因此能够进行 DVD-Ig 的跨 BBB 转运。在 BBB 处能够进行这类转运的结构包括但不限于胰岛素受体、转铁蛋白受体、LRP 和 RAGE。此外,多种策略也能够使用 DVD-Ig 作为向 CNS 中转运潜在药物 (包括低分子量药物、纳米颗粒和核酸) 的穿梭物 (Coloma 等人,Pharm.Res.,17(3) :266-274(2000) ;Boado 等人,Bioconjug.Chem.,18(2) :447-455(2007))。

[0417] 肿瘤病症

[0418] 单克隆抗体疗法已经成为癌症的重要治疗方式 (von Mehren 等人,Ann.Rev.Med.,54 :343-369(2003))。抗体可以通过诱导细胞凋亡、重定向细胞毒性、干扰配体受体相互作用或阻止对肿瘤表型关键的蛋白质表达而发挥抗肿瘤作用。此外,抗体可以靶向肿瘤微环境的组分,从而扰动重要的结构,如肿瘤相关脉管系统的形成。抗体也可以靶向其配体是生长因子的受体,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所靶向的肿瘤细胞结合。可选地,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)。与单特异性疗法相比,靶向两种独立肿瘤介质的双重特异性抗体的使用将可能产生额外的益处。

[0419] 在另一个实施方式中,本发明的结合人 IL-1β 的 DVD-Ig 也可能能够结合涉及肿瘤疾病的另一种靶标,包括但不限于 :IGFR、IGF、VGFR1、PDGFRb、PDGFRa、IGF1,2、ERB3、CDCP、1BSG2、ErbB3、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、FGF10、FGF18、FGF2、FGF4、FGF7、IGF1R、IL2、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、ENO1、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、NR113、NR2F6、NR4A3、ESR1、ESR2、NR0B1、NR0B2、NR1D2、NR1H2、NR1H4、NR112、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、ROBO2、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、TGFBR1、CCL2、CDH5、COL18A1、EDG1、ENG、ITGAV、ITGB3、THBS1、THBS2、BAD、BAG1、BCL2、CCNA1、CCNA2、CCND1、CCNE1、CCNE2、CDH1(E-钙粘着蛋白)、cDKN1B(p27Kip1)、CDKN2A(p16INK4a)、COL6A1、CTNNB1(b-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(紧密连接蛋白-7)、CLU(簇集蛋白)、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)、RON、c-Met、CD64、DLL4、PLGF、CTLA4、磷脂酰丝氨酸、ROBO4、CD80、CD22、CD40、CD23、CD28、CD55、CD38、CD70、CD74、CD30、CD138、CD56、CD33、CD2、CD137、DR4、DR5、RANKL、VEGFR2、PDGFR、VEGFR1、MTSP1、MSP、EPHB2、EPHA1、EPHA2、EpCAM、PGE2、NKG2D、LPA、SIP、APRIL、BCMA、MAPG、FLT3、

PDGFRα、PDGFRβ、ROR1、PSMA、PSCA、SCD1 和 CD59。

[0420] D. 药物组合物

[0421] 本发明也提供药物组合物，其包含本发明的抗体（包括本文所述的 DVD-Ig）或其抗原结合部分及药学上可接受的载体。包含本发明抗体的药物组合物用于但不限于诊断、检测或监测病症、用于病症或其一个或多个症状的预防、治疗、处置或改善和 / 或用于研究中。在具体实施方式中，组合物包含本发明的一种或多种抗体。在另一个实施方式中，药物组合物包含本发明的一种或多种抗体和本发明抗体以外的一种或多种用于治疗其中 IL-1β 活性有害的病症的预防或治疗剂。在一个实施方案中，预防或治疗剂已知用于或已经用于或目前正在用于病症或其一个或多个症状的预防、治疗、处置或改善。根据这些实施方式，组合物还可以包含载体、稀释剂或赋形剂。

[0422] 本发明的抗体和抗体部分可以并入适于施用至受试者的药物组合物中。一般地，这种药物组合物包含本发明的抗体或抗体部分和药学上可接受的载体。如本文所用，“药学上可接受的载体”包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。药学上可接受的载体的实例包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等中的一种或多种及其组合。在许多情况下，优选在组合物中包括等渗剂例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇或氯化钠。药学上可接受的载体还可以包括增强抗体或抗体部分的储存期或有效性的少量辅助物质，如润湿或乳化剂、防腐剂或缓冲剂。

[0423] 各种递送体系是已知的并且可以用来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的组合及可用于病症或其一个或多个症状的预防、处置、治疗或改善的预防或治疗剂，例如，在脂质体中包封、微粒、微胶囊、能够表达所述抗体或抗体片段的重组细胞、受体介导的内吞（见，例如，Wu 和 Wu，J Biol Chem.，262：4429-4432(1987)）、构建作为逆转录病毒载体或其他载体的部分的核酸。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、肌肉内、腹膜内、静脉内和皮下）、硬膜外施用，肿瘤内施用和粘膜施用（例如，鼻内和经口途径）。此外，可以使用肺部施用，例如，通过使用吸入器或雾化器和含有雾化剂的制剂。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 和 5,290,540 及 PCT 公开号 WO 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346 和 WO 99/66903，其各自以全文通过引用方式并入本文。在一个实施方式中，使用 Alkermes AIR®肺部药物递送技术（Alkermes，Inc.，Cambridge，Massachusetts）施用本发明的抗体或抗体部分、联合疗法或本发明的组合物。在一个具体实施方式中，肌肉内、静脉内、肿瘤内、经口、鼻内、经肺或皮下施用本发明的预防或治疗剂。预防或治疗剂可以通过任何便利的途径，例如通过输注或快速浓注、通过经上皮底层或粘膜皮肤底层（例如，口腔粘膜、直肠和肠道粘膜等）吸收来施用，并且可以与其他生物活性剂一起施用。施用可以是全身性或局部性的。

[0424] 在一个实施方式中，抗体偶联的碳纳米管（CNT）在体外与肿瘤细胞特异性结合，随后用近红外（NIR）光使它们高度特异性消融，这可以用来靶向肿瘤细胞。例如，生物素化的极性脂质可以用来制备稳定的、生物相容的、非细胞毒性 CNT 分散体，所述分散体随后与针对一种或多种肿瘤抗原（例如，CD22）的一种或两种不同的 neutralite 抗生物素蛋白衍生化 DVD-Ig 连接（Chakravarty 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，105：8697-8702(2008)）。

[0425] 在一个具体实施方式中，可能需要的是局部地施用本发明的预防或治疗剂至需要

治疗的区域；这可以例如和非限制地通过局部输注，通过注射或借助植入物实现，所述植入物是多孔或非多孔材料，包括膜和基质，如赛莱膜 (sialastic membrane)、聚合物、纤维基质（例如，Tissuel®）或胶原蛋白基质。在一个实施方式中，将有效量的本发明的一种或多种抗体拮抗剂局部地施用至受试者的患病区域以预防、治疗、处置和 / 或改善病症或其症状。在另一个实施方式中，将有效量的本发明的一种或多种抗体与有效量的本发明抗体之外的一种或多种疗法（例如，一种或多种预防或治疗剂）组合地局部施用至受试者的患病区域以预防、治疗、处置和 / 或改善病症或其一个或多个症状。

[0426] 在另一个实施方式中，所述预防或治疗剂可以在控释或持续释放系统中递送。在一个实施方式中，可以使用泵来实现控释或持续释放（见 Langer，上文；Sefton，M.V.，CRC Crit.Rev.Biomed.Eng.，14：201-240(1987)；Buchwald 等人，Surgery，88：507-516(1980)；Saudek 等人，N.Engl.J.Med.，321：574-579(1989)）。在另一个实施方式中，聚合物材料可以用来实现本发明疗法的控释或持续释放（见，例如，Goodson，J.M.，第 6 章，引自 Medical Applications of Controlled Release，第 II 卷，Applications and Evaluation，(Langer 和 Wise 编著)(CRC Press，Inc.，Boca Raton，1984) 第 115-138 页；Langer 和 Peppas，J.Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.Phys.，C23(1)：61-126(1983)；还见 Levy 等人，Science，228：190-192(1985)；During 等人，Ann.Neurol.，25：351-356(1989)；Howard 等人，J.Neurosurg.，71：105-112(1989))；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 WO 99/15154 和 PCT 公开号 WO 99/20253)。在持续释放制剂中使用的聚合物的实例包括但不限于聚（甲基丙烯酸 2- 羟乙酯）、聚（甲基丙烯酸甲酯）、聚（丙烯酸）、聚（乙烯 - 共 - 乙酸乙烯酯）、聚（甲基丙烯酸）、聚乙交酯 (PLG)、聚酸酐、聚 (N- 乙烯吡咯烷酮)、聚（乙烯醇）、聚丙烯酰胺、聚（乙二醇）、聚丙交酯 (PLA)、聚（丙交酯 - 共 - 乙交酯）(PLGA) 和聚原酸酯。在一个示例性实施方式中，在持续释放制剂中使用的聚合物是惰性的，不含可浸出的杂质、储存时稳定、无菌和可生物降解。在又另一个实施方式中，可以将控释或持续释放系统靠近预防靶或治疗靶放置，因此仅需要全身性剂量的一部分（见，例如，Goodson，引自 Medical Applications of Controlled Release，同上，第 2 卷，第 15-138 页 (1984))。

[0427] 控释系统在 Langer(Science，249：1527-1533(1990)) 的综述中讨论。本领域技术人员已知的任何技术可以用来产生包含本发明的一种或多种治疗剂的持续释放制剂。见，例如，美国专利号 4,526,938、PCT 公开号 WO 91/05548，PCT 公开号 WO 96/20698；Ning 等人，"Intratumoral radioimmunotherapy of a human colon cancer xenograft using a sustained-release gel"，Radiotherapy Oncol.，39：179-189(1996)；Song 等人，"Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions"，PDA J.Pharm.Sci.Technol.，50：372-377(1996)；Cleek 等人，"Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application"，Proceed.Int ' l.Symp.Control.Rel.Bioact.Mater.，24：853-854(1997) 和 Lam 等人，"Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery"，Proceed.Int' l.Symp.Control Rel.Bioact.Mater.，24：759-760(1997)，每篇文献全文通过引用的方式并入本文。

[0428] 在其中本发明的组合物是编码预防或治疗剂的核酸的具体实施方式中，可以通

过以下方式在体内施用所述核酸以促进其编码的预防或治疗剂的表达：将核酸构建为适宜核酸表达载体的部分并且施用它以使得该核酸变成细胞内的，例如，通过使用逆转录病毒载体（见美国专利号 4,980,286）或通过直接注射或通过使用微粒轰击法（例如，基因枪；Biolistic®, DuPont）或用脂质或细胞表面受体或转染剂涂覆或通过将核酸与已知进入细胞核的同源框样肽连接施用（见，例如，Joliot 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88：1864-1868(1991)）。可选地，可以通过同源重组将核酸细胞内引入并且并入宿主细胞 DNA 内用于表达。

[0429] 将本发明的药物组合物配制成与其预期施用途径相容。施用途径的实例包括但不限于肠胃外，例如，静脉内、皮内、皮下、口服、鼻内（例如，吸入）、经皮（例如，局部）、经粘膜和直肠施用。在一个具体实施方式中，将组合物根据常规方法配制为适应于静脉内、皮下、肌肉内、口服、鼻内或局部施用至人类的药物组合物。一般地，用于静脉内施用的组合物是无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时，组合物也可以包含增溶剂和局部麻醉药，如利多卡因 (lignocamne)，以便减轻注射部位处的疼痛。

[0430] 如果本发明的组合物局部施用，则组合物可以按油膏剂、乳膏剂、透皮贴剂、洗剂、凝胶剂、洗发剂、喷雾剂、气溶胶、溶液、乳剂的形式或本领域技术人员熟知的其他形式配制。见，例如，Remington′s Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms，第 19 版，Mack Pub. Co.，Easton，Pennsylvania(1995)。对于不可喷雾的局部用剂型，一般使用包含载体或与局部施用相容并具有优选大于水的动态粘度的一种或多种赋形剂的粘稠至半固体或固体形式。合适的制剂包括而不限于溶液剂、混悬剂、乳剂、乳膏剂、油膏剂、粉末剂、搽剂、药膏剂等，如果需要，它们进行灭菌或与影响各种特性（例如，渗透压）的助剂（例如，防腐剂、稳定剂、润湿剂、缓冲剂或盐）混合。其他合适的局部用剂型包括可喷雾的气溶胶制剂，其中在具有加压的挥发性物质（例如，气态推进剂，如FREON®）的混合物中或在挤瓶中包装有效成分，其优选地与固体或液体惰性载体组合。如果需要，也可以将润湿剂或保湿剂添加至药物组合物和剂型。这类额外成分的实例是本领域熟知的。

[0431] 如果本发明的方法包括组合物的鼻内施用，则这种组合物可以按气溶胶形式、喷雾剂、雾化剂或滴剂形式配制。具体而言，根据本发明使用的预防或治疗剂可以在使用合适推进剂（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气体）的情况下，以气溶胶喷雾剂的呈现形式从加压的包装或雾化器中方便地递送。在加压气溶胶的情况下，可以通过提供递送计量的量的阀门确定剂量单位。可以配制用于吸入器或吹入器的胶囊剂和药盒（由例如明胶构成），其含有所述化合物及合适粉末剂基质（如乳糖或淀粉）的粉末混合物。

[0432] 如果本发明的方法包括口服施用，则组合物可以按口服方式以片剂、胶囊、扁囊、囊形片 (gelcap)、溶液、混悬液等形式配制。可以通过常规手段以药学上可接受的赋形剂如粘合剂（例如，预胶化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素）、填料（例如，乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙）、润滑剂（例如，硬脂酸镁、滑石或二氧化硅）、崩解剂（例如，马铃薯淀粉或淀粉羟乙酸钠）或湿润剂（例如，十二烷基硫酸钠）制备片剂或胶囊剂。片剂可以通过本领域熟知的方法包衣。口服施用的液体制剂可以采取但不限于溶液、糖浆或混悬液形式，或可以将它们作为使用之前与水或其他合适溶媒构成的干燥产品提供。此类液体

制剂可以通过常规手段用药学上可接受的添加剂如助悬剂（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）、非水性溶媒（例如，杏仁油、油质酯、乙醇或分馏植物油）和防腐剂（例如，对羟苯甲酸甲酯或丙酯或者山梨酸）制备。如果适宜，制剂也可以含有缓冲盐、矫味剂、着色剂和甜味剂。可以适当地配制口服施用的制剂用于预防或治疗剂的缓释、控释或持续释放。

[0433] 本发明的方法可以包括肺部施用以雾化剂配制的组合物，例如，通过使用吸入器或雾化器。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 和 5,290,540 及 PCT 公开号 WO 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346 和 WO 99/66903，其各自全文通过引用方式并入本文。在具体实施方式中，使用 Alkermes AIR® 肺部药物递送技术 (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts) 施用本发明的抗体、联合疗法和 / 或本发明的组合物。

[0434] 本发明的方法可以包括施用为通过注射（例如通过快速浓注或连续输注）进行肠胃外施用所配制的组合物。用于注射的制剂可以按具有添加的防腐剂的单位剂型（例如，在安瓿或多剂量容器中）提供。这些组合物可以采用如在油性或水性溶媒中的混悬液、溶液或乳液的形式，并且可以含有配制试剂，例如助悬剂、稳定剂和 / 或分散剂。可选地，有效成分可以是使用前以合适溶媒（例如无菌无热原水）构成的粉末形式。

[0435] 本发明的方法可以另外包括施用作为储库制剂配制的组合物。这种长效制剂可以通过（例如皮下或肌肉内）埋植或通过肌内注射施用。因此，例如，组合物可以用合适的聚合材料或疏水性材料（例如，作为可接受油中的乳液）或离子交换树脂配制，或配制为微溶性衍生物（例如，作为微溶性盐）。

[0436] 本发明的方法包括施用配制为中性或盐形式的组合物。药学上可接受的盐包括与阴离子如源自氢氯酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些阴离子形成的盐及与阳离子如源自钠、钾、铵、钙、铁氢氧化物、异丙胺、三乙胺、2- 乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的那些阳离子形成的盐。

[0437] 通常，将组合物的成分单独地或以单位剂型混合在一起供应，例如，作为标示有效药物的量的密封容器（如安瓿或小袋）中的干燥冻干粉末或无水浓缩物。在施用模式是输注的情况下，组合物可以用含有无菌药用级水或盐水的输液瓶分配。在施用模式是注射的情况下，可以提供无菌注射用水或盐水的安瓿，从而成分可以在施用之前混合。

[0438] 具体而言，本发明也提供本发明的一种或多种预防或治疗剂或药物组合物，其包装在显示药物量的密封容器（如安瓿或小袋）中。在一个实施方式中，本发明的一种或多种预防或治疗剂或药物组合物作为密封容器中干燥消毒的冻干粉末或无水浓缩物供应并且可以重构（例如，用水或盐水）成适宜浓度以施用于受试者。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密封容器中的干燥无菌冻干粉末以至少 5mg、更优选地至少 10mg、至少 15mg、至少 25mg、至少 35mg、至少 45mg、至少 50mg、至少 75mg 或至少 100mg 的单位剂量供应。本发明的冻干的预防或治疗剂或药物组合物应当在 2℃和 8℃之间在其原始容器中贮存，并且本发明的预防或治疗剂或药物组合物应当在重构后 1 周内、优选地在 5 日内、在 72 小时内、在 48 小时内、在 24 小时内、在 12 小时内、在 6 小时内、在 5 小时内、在 3 小时内或在 1 小时内施用。在可选实施方式中，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显示药物量和浓度的密封容器中供应。优选地，施用的组合物的液

体形式在密封容器中以至少 0.25mg/mL、更优选地至少 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 供应。这种液体形式应当在 2℃和 8℃之间在其原始容器中贮存。

[0439] 本发明的抗体和抗体部分可以并入适于肠胃外施用的药物组合物中。优选地，抗体或抗体部分将被制备为含有 0.1-250mg/mL 抗体的注射溶液。所述注射溶液可以由硬质或琥珀小瓶、安瓿或预填充注射器中的液体或冻干剂型组成。缓冲剂可以是 L- 组氨酸 (1-50mM)，最佳地 5-10mM，pH5.0 至 7.0（最佳 pH6.0）。其他合适的缓冲剂包括但不限于琥珀酸钠、柠檬酸钠、磷酸钠或磷酸钾。可以用浓度为 0-300mM（对于液体剂型，最佳地是 150mM）的氯化钠来调节溶液剂的毒性。对于冻干剂型，可以包含冷冻保护剂，主要是 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。对于冻干剂型，可以包含填充剂，主要是 1-10％甘露醇（最佳 2-4％）。稳定剂可以用于液体剂型和冻干剂型中，主要是 1-50mM L- 甲硫氨酸（最佳 5-10mM）。其他合适的填充剂包括甘氨酸、精氨酸，可以作为 0-0.05％聚山梨醇酯 80（最佳 0.005-0.01％）来包含。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。作为肠胃外施用的注射溶液而制备的包含本发明抗体或抗体部分的药物组合物还可以包含可用作辅剂的试剂，如用来增加治疗性蛋白（例如，抗体）吸收或分散的那些。一种特别有用的辅剂是透明质酸酶（如Hylenex®重组人透明质酸酶）。在注射溶液中添加透明质酸酶改善在肠胃外施用、尤其皮下施用后的人体生物利用度。它还允许更大的注射部位体积（即，大于 1ml），同时疼痛和不适较少并且注射部位反应的发生率最小（见，PCT 公开号 WO 2004/078140 和美国公开号 2006/104968）。

[0440] 本发明的组合物可以为多种形式。这些形式包括例如液体、半固体和固体剂型，如液体溶液（例如，注射溶液和输注溶液）、分散体或混悬液、片剂、丸剂、粉末、脂质体和栓剂。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗用途。常见的优选组合物为注射溶液或输注溶液形式，如与用于人以其他抗体被动免疫的那些组合物相似的组合物。优选的施用模式是肠胃外（例如，静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内）。在示例性实施方式中，通过静脉内输注或注射施用抗体。在另一优选实施方式中，通过肌肉内或皮下注射施用抗体。

[0441] 治疗性组合物通常必须是无菌并在制造和储存条件下稳定的。可以将组合物配制为溶液、微乳液、分散体、脂质体或适合高药物浓度的其他有序结构。可以通过在适宜的溶剂中以要求的量并入活性化合物（即抗体或抗体部分）和（根据需要）上文所列举的一种成分或成分组合，随后过滤除菌来制备无菌注射溶液。通常，通过将活性化合物并入无菌溶媒中来制备分散体，所述无菌溶媒含有基础分散介质和来自上文所列举那些成分的其他所要求的成分。在用于制备无菌注射溶液的无菌冻干粉末情况下，优选的制备方法是真空干燥和喷雾干燥，其从先前无菌过滤的溶液产生活性成分加任何额外的所需成分的粉末。可以例如通过使用包衣如卵磷脂、在分散体的情况下通过维持要求的粒度和通过使用表面活性剂，维持溶液的适宜流动性。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中包含延迟吸收的物质例如单硬脂酸盐和明胶而获得。

[0442] 本发明的结合蛋白可以通过本领域已知的多种方法施用，虽然对于许多治疗应用，优选的施用途径 / 模式是皮下注射、静脉内注射或输注。如技术人员理解的，施用途径和 / 或模式随所希望的结果而变动。在某些实施方式中，活性化合物可以用保护蛋白质免

于快速释放的载体制备，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性聚合物，如乙烯 - 乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的多种方法是专利授权的或总体上是本领域技术人员已知的。见，例如，Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems，(J.R.Robinson，编著)(Marcel Dekker，Inc.，New York，1978)。

[0443] 在某些实施方式中，本发明的抗体或抗体部分可以例如随惰性稀释剂或可吸收的可食用载体一起经口施用。化合物（和其他成分，如果需要）也可以包封在硬质或软质明胶胶囊中、压缩成片剂或直接掺入受试者的膳食中。对于口服治疗施用，所述化合物可以随赋形剂一起掺入并且以可摄取的片剂、含片、锭剂、胶囊剂、酏剂、混悬剂、糖浆剂、糯米纸囊剂 (wafer) 等形式使用。为了通过非肠胃外施用以外的方法施用本发明的化合物，可能需要将化合物用防止其失活的材料包衣或随这种材料共施用。

[0444] 补充活性化合物也可以并入组合物中。在某些实施方式中，将本发明的抗体或抗体部分与一种或多种另外的治疗剂一起共同配制和 / 或共施用，所述另外的治疗剂可用于治疗其中 IL-1β 活性有害的病症。例如，本发明的抗人 IL-1β 抗体或抗体部分可以和结合其他靶标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）一起共同配制和 / 或共施用。另外，本发明的一种或多种抗体可以与两种或更多种前述治疗剂组合使用。这类联合疗法可以有利地利用较低剂量的所施用治疗剂，因此避免与各种单一疗法相关的可能毒性或并发症。

[0445] 在某些实施方式中，针对 IL-1β 的抗体或其片段与本领域已知的延长半衰期的载体连接。这类载体包括但不限于 Fc 结构域、聚乙二醇和葡聚糖。这类载体例如在美国系列号 09/428,082（现在的美国专利号 6,660,843）中描述，所述文献因而为任何目的通过引用方式并入。

[0446] 在具体实施方式中，施用包含编码本发明抗体或本发明的另一种预防或治疗剂的核苷酸序列的核酸序列以通过基因治疗来治疗、预防、处置或改善病症或其一个或多个症状。基因治疗指通过向受试者施用表达的或可表达的核酸所进行的疗法。在本发明的这个实施方式中，核酸产生介导预防或治疗效果的其编码的本发明抗体或者预防或治疗剂。

[0447] 可以根据本发明使用本领域可获得的任何用于基因治疗的方法。对于基因治疗方法的一般综述，见 Goldspiel 等人，Clinical Pharm.，12 :488-505(1993) ;Wu 等人，"Delivery systems for gene therapy"，Biotherapy，3 :87-95(1991) ;Tolstoshev，P.，Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.，32 :573-596(1993) ;Mulligan，R.C.，Science，260 :926-932(1993) 及 Morgan 和 Anderson，"Human Gene Therapy"，Ann.Rev.Biochem.，62 :191-217(1993) ;Robinson，C.，Trends Biotechnol.，11 :155(1993)。可以使用的重组 DNA 技术的本领域共知方法在 Ausubel 等人（编著），Current Protocols in Molecular Biology，John Wiley & Sons，New York(1993) 和 Kriegler，Gene Transfer and Expression，A Laboratory Manual，Stockton Press，New York(1990) 中描述。各种基因治疗方法的详细描述在美国公开号 2005/0042664 A1 中公开，所述专利通过引用方式并入本文。

[0448] IL-1 家族成员 (IL-1β 和 IL-1α) 在与涉及免疫要素和炎性要素的多种病症相关的病理学中发挥关键作用。本文所述的 IL-1 结合蛋白可以施用至个体以治疗这类病

症。在一个实施方式中，可以通过本发明方法（其包括向受试者施用本文所述的 IL-1 结合蛋白）治疗的病症包括，但不限于：糖尿病、葡萄膜炎、神经性疼痛、骨关节炎性疼痛、炎性疼痛、类风湿性关节炎、骨关节炎、幼年型慢性关节炎、脓毒性关节炎、莱姆病关节炎、银屑病关节炎、反应性关节炎、脊椎关节病、系统性红斑狼疮 (SLE)、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、炎性肠病、自身免疫性糖尿病、胰岛素依赖性糖尿病、甲状腺炎、哮喘、过敏性疾病、银屑病、皮炎、硬皮病、移植物抗宿主病、器官移植排异、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、肉瘤样病、动脉粥样硬化、弥漫性血管内凝血 (DIC)、川崎病、格雷夫斯氏病、肾病综合征、慢性疲劳综合征、韦格纳肉芽肿病、过敏性紫癜 (Henoch-Schoenlein purpurea)、肾显微性血管炎、慢性活动性肝炎、自身免疫性葡萄膜炎、脓毒性休克、中毒性休克综合征、脓毒病综合征、恶病质、传染病、寄生虫病、急性横贯性脊髓炎、亨廷顿舞蹈症、帕金森病、阿尔茨海默病、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、阿狄森病、I 型散发性多腺性缺陷症、II 型多腺性缺陷症 (Schmidt 综合征）、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、脱发、斑秃、血清阴性关节病、关节病、莱特尔病、银屑病性关节病、溃疡性结肠炎关节病、肠病性滑膜炎、衣原体病、耶尔森菌和沙门氏菌相关关节病、脊椎关节病、动脉粥样硬化病 / 动脉硬化、异位性变态反应、自身免疫性大疱病、寻常天疱疮、落叶型天疱疮、类天疱疮、线状 IgA 病、自身免疫性溶血性贫血、库姆氏阳性溶血性贫血、获得性恶性贫血、青少年恶性贫血、肌痛脑脊髓炎 /Royal Free 病、慢性粘膜皮肤念珠菌病、巨细胞动脉炎 (GCA)、原发硬化性肝炎、隐源性自身免疫性肝炎、获得性免疫缺陷综合征 (AIDS)、获得性免疫缺陷相关性疾病、乙型肝炎、丙型肝炎、寻常变异型免疫缺陷（寻常变异型低丙种球蛋白血症）、扩张型心肌病、女性不育、卵巢衰竭、早发卵巢衰竭、纤维化肺病、隐原性纤维化肺泡炎、炎症后间质性肺病、间质性肺炎、结缔组织病相关间质性肺病、混合型结缔组织病相关性肺病、系统性硬化症相关间质性肺病、类风湿性关节炎相关间质性肺病、系统性红斑狼疮相关肺病；皮肌炎 / 多肌炎相关肺病、舍格伦病相关肺病、强直性脊柱炎相关肺病、血管炎弥散性肺病、含铁血黄素沉着症相关肺病、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、淋巴细胞浸润性肺病、感染后间质性肺病、痛风性关节炎、自身免疫性肝炎、1 型自身免疫性肝炎（经典自身免疫性或狼疮性肝炎）、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症、B 型胰岛素抵抗伴黑棘皮病、甲状旁腺功能减退、骨关节病、原发性硬化性胆管炎、1 型银屑病、2 型银屑病、特发性白细胞减少症、自身免疫性中性粒细胞减少症、肾病 NOS、肾小球性肾炎、肾显微性血管炎、莱姆病、盘状红斑狼疮、特发性男性不育、一氧化氮相关男性不育、精子自身免疫性、多发性硬化（全部亚型，包括原发进展型、继发进展型、复发缓解型）、交感性眼炎、继发于结缔组织病的肺性高血压、肺出血肾炎综合征、结节性多发性动脉炎的肺部表现、急性风湿热、类风湿性脊柱炎、斯蒂尔病、系统性硬化症、舍格伦综合征、塔卡亚萨病 / 动脉炎、自身免疫性血小板减少症 (AITP)、特发性血小板减少症、自身免疫性甲状腺病、甲状腺功能亢进症、甲状腺肿性自身免疫性甲状腺功能减退症（桥本氏病）、萎缩性自身免疫性甲状腺功能减退症、原发性粘液性水肿、晶状体源性葡萄膜炎、原发性血管炎、白斑症、急性肝病、慢性肝病、酒精性肝硬化、酒精诱导肝损伤、胆汁郁积、特异体质性肝病、药物诱导的肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、变态反应、B 组链球菌 (GBS) 感染、精神障碍（例如，抑郁和精神分裂症）、Th2 型和 Th1 型介导的疾病、急性和慢性疼痛（不同形

式的疼痛）、癌症（如肺癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌和直肠癌）、造血系统恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤、无 β 脂蛋白血症、肢端发绀症、急性和慢性寄生性或感染性过程、急性白血病、急性成淋巴细胞性白血病 (ALL)、T- 细胞 ALL、FAB ALL、急性髓性白血病 (AML)、急性或慢性细菌性感染、急性胰腺炎、急性肾衰竭、腺癌、心房异位搏动、AIDS 痴呆综合征、酒精诱导的肝炎、变应性结膜炎、变应性接触性皮炎、过敏性鼻炎、同种异体移植排斥、α -1 抗胰蛋白酶缺乏症、肌萎缩侧索硬化、贫血、心绞痛、前角细胞变性、抗 CD3 疗法、抗磷脂综合征、抗受体超敏反应、主动脉和外周动脉瘤、主动脉壁夹层形成、动脉高血压、动脉硬化、动静脉瘘、共济失调、心房纤颤（持久性或阵发性）、心房扑动、房室传导阻滞、B 细胞淋巴瘤、骨移植排斥、骨髓移植 (BMT) 排斥、束支传导阻滞、伯基特淋巴瘤、烧伤、心律不齐、心脏眩晕综合征、心脏肿瘤、心肌病、心肺分流炎症反应、软骨移植排斥、小脑皮质变性、小脑疾病、紊乱性或多灶性房性心动过速、化疗相关病症、慢性粒细胞性白血病 (CML)、慢性酒精中毒、慢性炎性病理、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、慢性阻塞性肺病 (COPD)、慢性水杨酸盐中毒、结直肠癌、充血性心力衰竭、结膜炎、接触性皮炎、肺原性心脏病、冠状动脉病、克 - 雅氏病、培养阴性脓毒症、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、皮炎、皮肤病状况、糖尿病、糖尿病性动脉硬化病、弥漫性 Lewy 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 多巴胺受体的药物引起的药物诱导型运动障碍、药物过敏、湿疹、脑脊髓炎、心内膜炎、内分泌病、会厌炎、Epstein-Barr 病毒感染、红斑性肢痛病、锥体束外及小脑病、家族性嗜血细胞性淋巴组织细胞增多症、胎儿胸腺植入物排斥、弗里德赖希共济失调、功能性外周动脉病、真菌性败血症、气性坏疽、胃溃疡、肾小球肾炎、任何器官或组织的移植排斥、革兰氏阴性脓毒症、革兰氏阳性脓毒症、归因于胞内生物体的肉芽肿、毛细胞白血病、哈 - 斯二氏病、桥本氏甲状腺炎、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 / 溶栓性血小板减少性紫癜、出血、甲型肝炎、希氏束心率失常、HIV 感染 /HIV 神经病、霍奇金病、多动性运动障碍、超敏反应、过敏性肺炎、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、特发性阿狄森病、特发性肺纤维化 (IPF)、抗体介导的细胞毒性、无力、婴儿脊髓性肌萎缩、主动脉炎症、甲型流感、电离辐射暴露、虹膜睫状体炎 / 葡萄膜炎 / 视神经炎、局部缺血 - 再灌注损伤、缺血性发作、幼年型类风湿关节炎、幼年期脊髓性肌萎缩、卡波西肉瘤、肾移植排斥、军团菌病、利什曼病、麻疯病、皮质脊髓系统的病变、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、代谢综合征偏头痛、特发性偏头痛、线粒体多系统障碍、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、鸟胞内分枝杆菌病、结核分枝杆菌病、骨髓增生异常综合征、心肌梗死、心肌缺血性病症、鼻咽癌、新生儿慢性肺病、肾炎、肾病、神经变性病、神经原性 I 肌萎缩、中性粒细胞减少性发热、非霍奇金淋巴瘤、腹主动脉及其分支闭塞、闭塞性动脉病、**OKT3®**疗法、睾丸炎 / 附睾炎、睾丸炎 / 输精管复通过程、器官巨大症、骨质疏松症、胰移植排斥、胰腺癌、副肿瘤性综合征 / 恶性肿瘤的高钙血症、甲状旁腺移植排斥、盆腔炎性疾病、常年性鼻炎、心包疾病、外周动脉粥样硬化性疾病、周围血管病、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 心切开术后综合征、先

兆子痫、进行性核上麻痹、原发性肺动脉高压、放射疗法、雷诺氏现象、雷诺病、雷夫苏姆病、规则性窄 QRS 心动过速、肾血管性高血压、再灌注损伤、限制型心肌病、肉瘤、老年舞蹈症、Lewy 体型老年性痴呆、血清阴性关节病、休克、镰状细胞性贫血、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、特殊心率失常、脊髓性共济失调、脊髓小脑退行性变、链球菌性肌炎、小脑结构性损伤、亚急性硬化性全脑炎、晕厥、心血管系统梅毒、全身过敏、全身性炎性反应综合征、全身发病型幼年类风湿性关节炎、毛细血管扩张症、闭塞性血栓性脉管炎、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、不稳定型心绞痛、尿毒症、尿脓毒病、荨麻疹、心脏瓣膜病、静脉曲张、血管炎、静脉病、静脉血栓形成、心室纤颤、病毒和真菌感染、病毒性脑炎 / 无菌性脑膜炎、病毒相关噬血细胞综合征、韦 - 科二氏综合征、肝豆状核变性、任何器官或组织的异体移植排斥、急性冠状动脉综合征、急性特发性多神经炎、急性炎性脱髓鞘多发性神经根性神经病、急性局部缺血、成人斯蒂尔病、斑秃、过敏反应、抗磷脂抗体综合征、再生障碍性贫血、动脉硬化、异位性湿疹、异位性皮炎、自身免疫性皮炎、与链球菌感染相关的自身免疫病症、自身免疫性肠病、自身免疫性听力损失、自身免疫性淋巴细胞增生综合征 (ALPS)、自身免疫性心肌炎、自身免疫性早发卵巢衰竭、眼睑炎、支气管扩张症、大疱性类天疱疮、心血管疾病、灾难性抗磷脂综合征、乳糜泻、颈椎病、慢性局部缺血、瘢痕性类天疱疮、存在多发性硬化风险的临床孤立的综合征 (CIS)、结膜炎、儿童期发病精神障碍、泪囊炎、皮肌炎、糖尿病性视网膜病变、椎间盘突出、椎间盘脱出、药物诱导的免疫性溶血性贫血、心内膜炎、子宫内膜异位症、眼内炎、巩膜外层炎、多形性红斑、重型多形性红斑、妊娠性类天疱疮、格巴二氏综合征 (GBS)、枯草热、休斯氏综合征、特发性帕金森病、特发性间质性肺炎、IgE 介导的变态反应、免疫性溶血性贫血、包涵体肌炎、感染性眼部炎性疾病、炎性脱髓鞘性疾病、炎性心脏病、炎性肾疾病、虹膜炎、角膜炎、干燥性角结膜炎、库斯毛尔病或 Kussmaul-Meier 病、兰德里麻痹、郎格罕氏细胞组织细胞增多症、网状青斑、黄斑变性、显微小血管炎、白赫铁列夫症、运动神经元病、粘膜类天疱疮、多器官功能衰竭、重症肌无力、骨髓增生异常综合征、心肌炎、神经根障碍、神经病、非甲非乙肝炎、视神经炎、骨质溶解、少关节 JRA、外周动脉闭塞性疾病 (PAOD)、外周血管疾病 (PVD)、外周动脉病 (PAD)、静脉炎、结节性多发性动脉炎 (或结节性动脉周围炎)、多软骨炎、风湿性多肌痛、白发病、多关节 JRA、多内分泌腺缺陷综合征、多肌炎、风湿性多肌痛 (PMR)、泵后综合征、原发性帕金森症、继发性帕金森症、前列腺炎、单纯红细胞再生障碍、原发性肾上腺功能不足、复发型视神经脊髓炎、再狭窄、风湿性心脏病、SAPHO(滑膜炎、痤疮、脓疱病、骨肥厚和骨炎)、继发性淀粉样变性、休克肺、巩膜炎、坐骨神经痛、继发性肾上腺功能不足、硅氧烷相关结缔组织病、角质层下脓疱性皮肤病、关节强硬性脊椎炎、斯约二氏综合征 (SJS)、全身性炎性反应综合征、颞动脉炎、弓形体性视网膜炎、毒性表皮坏死松解症、横贯性脊髓炎、TRAPS(1 型肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 相关周期性综合征)、B 型胰岛素抵抗伴黑棘皮病、I 型变态反应、II 型糖尿病、荨麻疹、普通间质性肺炎 (UIP)、春季结膜炎、病毒性视网膜炎、伏格特 - 小柳 - 原田三氏综合征 (VKH 综合征)、湿性黄斑变性、伤口愈合、耶尔森菌和沙门氏菌相关关节病。

[0449] 本发明的结合蛋白可以用来治疗患有自身免疫性疾病，尤其与炎症、类风湿性关节炎 (RA)、骨关节炎、银屑病、多发性硬化 (MS) 和其他自身免疫疾病相关的那些。

[0450] 本发明的抗体或抗体部分也可以随用于治疗自身免疫性疾病和炎性疾病的一种

或多种另外的治疗剂一起施用。

[0451] 在一个实施方式中，可以用本发明的组合物和方法治疗或诊断的疾病包括但不限于原发性和转移性癌症，包括乳腺、结肠、直肠、肺、口咽、下咽、食道、胃、胰、肝脏、胆囊和胆管、小肠、尿道（包括肾、膀胱和尿道上皮）、女性生殖道（包括子宫颈、子宫和卵巢以及绒毛膜癌和妊娠滋养细胞疾病）、男性生殖道（包括前列腺、精囊、睾丸和生殖细胞肿瘤）、内分泌腺（包括甲状腺、肾上腺和垂体腺）和皮肤的癌，以及血管瘤、黑色素瘤、肉瘤（包括源自骨和软组织的那些肉瘤以及卡波西肉瘤），脑、神经、眼和脑膜的肿瘤（包括星形细胞瘤、胶质瘤、胶质母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、神经瘤、神经母细胞瘤、神经鞘瘤和脑膜瘤），源自造血系统恶性肿瘤的实体瘤如白血病和淋巴瘤（霍奇金和非霍奇金淋巴瘤）。

[0452] 在另一个实施方式中，本发明的抗体或其抗原结合部分用来治疗癌症或用于防止肿瘤转移。这类治疗可以包括单独地施用或与另一种治疗剂或疗法（如放疗和 / 或化疗剂）组合施用抗体或其抗原结合部分。

[0453] 本发明的抗体或其抗原结合部分可以与包括但不限于抗肿瘤药、放疗、化疗如 DNA 烷基化剂、顺铂、卡铂、抗微管蛋白剂、红豆杉醇、多西紫杉醇、紫杉醇、多柔比星、吉西他滨、健择 (gemzar)、蒽环类、阿霉素、拓扑异构酶 I 抑制剂、拓扑异构酶 II 抑制剂、5- 氟尿嘧啶 (5-FU)、甲酰四氢叶酸、依立替康、受体酪氨酸激酶抑制剂（例如，厄洛替尼、吉非替尼）、COX-2 抑制剂（例如，塞来昔布）、激酶抑制剂和 siRNA 的药剂组合。

[0454] 本发明的结合蛋白也可以随用于治疗各种疾病的一种或多种另外治疗剂一起施用。

[0455] 本发明的抗体或其抗原结合部分可以单独或组合地用来治疗这类疾病。应当理解，本发明的抗体或其抗原结合部分可以单独或与另外的药剂（例如，治疗剂）组合使用，所述另外的药剂由技术人员选择用于其预期目的。例如，另外的药剂可以是本领域公认的可用来治疗由本发明抗体治疗的疾病或病状的治疗剂。另外的药剂也可以是对治疗组合物赋予有益属性的药剂，例如，影响组合物粘度的药剂。

[0456] 应当进一步理解，包含于本发明内的组合是用于其预期目的的那些组合。下文所述的药剂出于说明目的并且不意在起限制作用。作为本发明的部分的组合可以是本发明抗体和选自以下列表的至少一种另外的药剂。如果这种组合是使得形成的组合物可以履行其预期功能，则这种组合也可以包含多于一种的另外的药剂，例如，2 种或 3 种另外的药剂。

[0457] 优选的组合是非甾体抗炎药，也称作 NSAID，其包括如布洛芬的药物。其他优选的组合是皮质类固醇，包括泼尼松龙；可以通过逐步减少与本发明的抗 IL-1β 抗体组合情况下治疗患者时所需要的类固醇剂量来减轻或甚至消除使用类固醇的公知副作用。本发明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实例包括但不限于以下：细胞因子抑制性抗炎药 (CSAID)、针对其他人细胞因子或生长因子（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、干扰素、EMAP-II、GM-CSF、FGF 和 PDGF）的抗体或拮抗剂。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如 CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80(B7.1)、CD86(B7.2)、CD90、CTLA 或其配体包括 CD154(gp39 或 CD40L) 的抗体组合。

[0458] 优选的治疗剂组合可以在自身免疫和后续炎性级联中的不同点处发挥干扰作用；优选的实例包括 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™)、CDP571 和可溶性 p55 或 p75TNF 受体、其衍生物 (p75TNFR1gG(Enbrel™) 或 p55TNFR1gG(来那西普)并且还包括 TNFα 转化酶 (TACE) 抑制剂;类似地,IL-1 抑制剂(白介素酶 -1- 转化酶抑制剂,IL-1RA 等)可以出于相同原因是有效的。其他优选的组合包括白介素 11。又另一个优选的组合是自身免疫性反应的其他关键角色,它们可以与 IL-1β 功能平行地、相依赖地或协作地发挥作用。又另一个优选的组合是非耗竭性抗 CD4 抑制剂。再其他优选的组合包括共刺激途径的拮抗剂 CD80(B7.1) 或 CD86(B7.2),包括抗体、可溶性受体或拮抗性配体。

[0459] 本发明的抗体或其抗原结合部分也可以与以下药剂组合,如甲氨蝶呤、6-MP、硫唑嘌呤、柳氮磺胺吡啶、美沙拉嗪、奥沙拉嗪、氯喹 / 羟氯喹、青霉胺、金硫代苹果酸盐(肌肉内和口服)、硫唑嘌呤、秋水仙碱、皮质类固醇(口服、吸入型和局部注射)、β-2 肾上腺素能受体激动剂(沙丁胺醇、特布他林、沙美特罗)、黄嘌呤(茶碱、氨茶碱)、色甘酸盐、奈多罗米、酮替芬、异丙托铵和氧托品、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、麦考酚酸吗乙酯、来氟米特、NSAID 例如布洛芬、皮质类固醇如泼尼松龙、磷酸二酯酶抑制剂、腺苷激动剂、抗血栓药、补体抑制剂、肾上腺素能药、通过促炎性细胞因子如 TNF-α 或 IL-1(例如,IRAK、NIK、IKK、p38 或 MAP 激酶抑制剂)干扰信号传导的药物、IL-1β 转化酶抑制剂、TNFα 转化酶 (TACE) 抑制剂、T- 细胞信号传导抑制剂如激酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂、柳氮磺吡啶、硫唑嘌呤、6- 巯基嘌呤、血管紧张素转化酶抑制剂、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 p75TNFRIgG(Enbrel™ 和 p55TNFRIgG(来那西普))、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R)、抗炎性细胞因子(例如,IL-4、IL-10、IL-11、IL-13 和 TGFβ)、塞来昔布、叶酸、硫酸羟氯喹、罗非昔布、依那西普、英夫利昔单抗、萘普生、伐地考昔、柳氮磺吡啶、甲泼尼龙、美洛昔康、醋酸甲泼尼龙、金硫代苹果酸钠、阿司匹林、曲安奈德、萘磺酸右丙氧芬 /apap、叶酸、萘丁美酮、双氯芬酸、吡罗昔康、依托度酸、双氯芬酸钠、奥沙普嗪、盐酸羟考酮、重酒石酸氢可酮 /apap、双氯芬酸钠 / 米索前列醇、芬太尼、人重组阿那白滞素、盐酸曲马多、双水杨酯、舒林酸、氰钴胺 /fa/ 吡多辛、醋氨酚、阿仑膦酸钠、泼尼松龙、硫酸吗啡、盐酸利多卡因、吲哚美辛、硫酸氨基葡萄糖 / 软骨素、盐酸阿米替林、磺胺嘧啶、盐酸羟考酮 / 醋氨酚、盐酸奥洛他定、米索前列醇、萘普生钠、奥美拉唑、环磷酰胺、利妥昔单抗、IL-1TRAP、MRA、CTLA4-IG、IL-18BP、抗 IL-18、抗 IL-15、BIRB-796、SCIO-469、VX-702、AMG-548、VX-740、罗氟司特、IC-485、CDC-801 和甲泼尼龙。优选的组合包括甲氨蝶呤或来氟米特且在中度或重度类风湿性关节炎的情况中,包括环孢菌素。

[0460] 也可以与结合蛋白组合使用以治疗类风湿性关节炎 (RA) 的非限制性的另外的药剂包括但不限于以下:非甾体抗炎药 (NSAID)、细胞因子抑制性抗炎药 (CSAID)、CDP-571/BAY-10-3356(人源化抗 TNFα 抗体;Celltech/Bayer)、cA2/ 英夫利昔单抗(嵌合抗 TNFα 抗体;Centocor)、75kdTNFR-IgG/ 依那西普 (75kD TNF 受体 -IgG 融合蛋白;Immunex;见,例如,Moreland 等人,(摘要第 813 号),Arthritis Rheum.,37:S295(1994);Baumgartner 等人,J.Invest.Med.,44(3):235A(1996 年 3 月)、55kdTNF-IgG(55kD TNF 受体 -IgG 融合蛋白;Hoffmann-LaRoche)、IDEC-CE9.1/SB210396(非耗竭性灵长类化抗 CD4 抗体;IDEC/SmithKline;见,例如,Kaine 等人,(摘要第 195 号),Arthritis Rheum.,38:S185(1995))、DAB486-IL-2 和 / 或 DAB389-IL-2(IL-2 融合蛋白;Seragen;见,例如,Sewell 等人,Arthritis Rheum.,36(9):36(9):1223-1233(1993 年 9 月))、抗 Tac(人源化抗 IL-2Rα;

Protein Design Labs/Roche)、IL-4(抗炎性细胞因子;DNAX/Schering)、IL-10(SCH52000;重组 IL-10,抗炎性细胞因子;DNAX/Schering)、IL-4、IL-10 和/或 IL-4 激动剂(例如,激动剂抗体)、IL-1RA(IL-1 受体拮抗剂;Synergen/Amgen)、阿那白滞素(Kineret®,/Amgen)、TNF-bp/s-TNF(可溶性 TNF 结合蛋白;见,例如,Evans 等人,(摘要第 1540 号),Arthritis Rheum.,39(9)(增刊):S284(1996));Kapadia 等人,Amer.J.Physiol.-Heart and Circulatory Physiology,268:H517-H525(1995))、RP73401(磷酸二酯酶 IV 型抑制剂;见,例如,Chikanza 等人,(摘要第 1527 号),Arthritis Rheum.,39(9)(增刊):S282(1996))、MK-966(COX-2 抑制剂;见,例如,Erich 等人,(摘要第 328 和 329 号),Arthritis Rheum.,39(9)(增刊):S81(1996))、伊洛前列素(见,例如,Scholz,P.(摘要第 336 号),Arthritis Rheum.,39(9)(增刊):S82(1996))、甲氨蝶呤、沙立度胺(见,例如,Lee 等人,(摘要第 1524 号),Arthritis Rheum.,39(9)(增刊):S282(1996))和沙立度胺相关药物(例如,Celgen)、来氟米特(抗炎和细胞因子抑制剂;见,例如,Finnegan 等人,(摘要第 627 号),Arthritis Rheum.,39(9)(增刊):S131(1996));Thoss 等人,Inflamm.Res.,45:103-107(1996))、氨甲环酸(纤维蛋白溶酶原活化的抑制剂;见,例如,Ronday 等人,(摘要第 1541 号),Arthritis Rheum.,39(9)(增刊):S284(1996))、T-614(细胞因子抑制剂;见,例如,Hara 等人,(摘要第 1526 号),Arthritis Rheum.,39(9)(增刊):S282(1996))、前列腺素 E1(见,例如,Moriuchi 等人,(摘要第 1528 号),Arthritis Rheum.,39(9)(增刊):S282(1996))、替尼达普(非甾体抗炎药;见,例如,Guttadauria,M.(摘要第 1516 号),Arthritis Rheum.,39(9)(增刊):S280(1996))、萘普生(非甾体抗炎药;见,例如,Fiebich 等人,Neuro Report,7:1209-1213(1996))、美洛昔康(非甾体抗炎药)、布洛芬(非甾体抗炎药)、吡罗昔康(非甾体抗炎药)、双氯芬酸(非甾体抗炎药)、吲哚美辛(非甾体抗炎药)、柳氮磺吡啶(见,例如,Farr 等人,(摘要第 1519 号),Arthritis Rheum.,39(9)(增刊):S281(1996))、硫唑嘌呤(见,例如,Hickey 等人,(摘要第 1521 号),Arthritis Rheum.,39(9)(增刊):S281(1996))、ICE 抑制剂(白介素-1β 转化酶的抑制剂)、zap-70 和/或 lck 抑制剂(酪氨酸激酶 zap-70 或 lck 的抑制剂)、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的抑制剂;血管生成的抑制剂)、皮质类固醇抗炎药物(例如,SB203580)、TNF-转化酶抑制剂、抗 IL-12 抗体、抗 IL-18 抗体、白介素-11(见,例如,Keith Jr. 等人,(摘要第 1613 号),Arthritis Rheum.,39(9)(增刊):S296(1996))、白介素-13(见,例如,Bessis 等人,(摘要第 1681 号),Arthritis Rheum.,39(9)(增刊):S308(1996))、白介素-17 抑制剂(见,例如,Lotz 等人,(摘要第 559 号),Arthritis Rheum.,39(9)(增刊):S120(1996))、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、口服施用的肽和胶原蛋白、氯苯扎利二钠、细胞因子调节剂(CRA)HP228 和 HP466(Houghten Pharmaceuticals,Inc.)、ICAM-1 反义硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸(ISIS2302;Isis Pharmaceuticals,Inc.)、可溶性补体受体 1(TP10;T Cell Sciences,Inc.)、泼尼松、奥古蛋白、聚硫酸糖胺聚糖(glycosaminoglycan polysulphate)、米诺环素、抗 IL2R 抗体、海洋生物和植物脂质(鱼类和植物种子脂肪酸;见,例如,DeLuca 等人,Rheum.Dis.Clin.North Am.,21:759-777(1995))、金诺芬、苯基保泰松、甲氯芬那酸、氟芬那酸、静脉内免疫球蛋白、齐留通、阿扎立平、霉酚酸(RS-61443)、他克莫司(FK-506)、西罗

莫司（雷帕霉素）、氨普立糖（therafectin）、克拉屈滨（2- 氯脱氧腺苷）、甲氨蝶呤、bcl-2 抑制剂（见 Bruncko 等人，J. Med. Chem.，50(4)，641-662(2007)）、抗病毒药和免疫调节剂。

[0461] 在一个实施方式中，结合蛋白或其抗原结合部分与用于治疗类风湿性关节炎（RA）的以下药物之一组合施用：KDR 的小分子抑制剂、Tie-2 的小分子抑制剂、甲氨蝶呤、泼尼松、塞来昔布、叶酸、硫酸羟氯喹、罗非昔布、依那西普、英夫利昔单抗、来氟米特、萘普生、伐地考昔、柳氮磺吡啶、甲泼尼龙、布洛芬、美洛昔康、醋酸甲泼尼龙、金硫代苹果酸钠、阿司匹林、硫唑嘌呤、曲安奈德、萘磺酸右丙氧芬 /apap、叶酸、萘丁美酮、双氯芬酸、吡罗昔康、依托度酸、双氯芬酸钠、奥沙普嗪、盐酸羟考酮、重酒石酸氢可酮 /apap、双氯芬酸钠 / 米索前列醇、芬太尼、人重组阿那白滞素、盐酸曲马多、双水杨酯、舒林酸、氰钴胺 /fa/ 吡多辛、醋氨酚、阿仑膦酸钠、泼尼松龙、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、盐酸羟考酮 / 醋氨酚、盐酸奥洛他定、米索前列醇、萘普生钠、奥美拉唑、麦考酚酸吗乙酯、环磷酰胺、利妥昔单抗、IL-1TRAP、MRA、CTLA4-IG、IL-18BP、IL-12/23、抗 IL18、抗 IL15、BIRB-796、SCIO-469、VX-702、AMG-548、VX-740、罗氟司特、IC-485、CDC-801 和 mesopram。

[0462] 可以与本发明结合蛋白组合的用于炎性肠病的治疗剂的非限制性实例包括以下药物：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、甲硝哒唑、脂氧合酶抑制剂、美沙拉嗪、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-1β mAb、抗 IL-6mAb、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（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）的抗体或拮抗剂。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如 CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90 或其配体的抗体组合。本发明的抗体或其抗原结合部分也可以与如甲氨蝶呤、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、麦考酚酸吗乙酯、来氟米特、NSAID 如布洛芬、皮质类固醇如泼尼松龙、磷酸二酯酶抑制剂、腺苷激动剂、抗血栓药、补体抑制剂、肾上腺素能药、通过促炎性细胞因子如 TNF-α 或 IL-1 干扰信号传导的药物（例如，IRAK、NIK、IKK、p38 或 MAP 激酶抑制剂）、IL-1β 转化酶抑制剂、TNFα 转化酶抑制剂、T- 细胞信号传导抑制剂如激酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂、柳氮磺吡啶、硫唑嘌呤、6- 巯基嘌呤、血管紧张素转化酶抑制剂、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）和抗炎性细胞因子（例如，IL-4、IL-10、IL-11、IL-13 和 TGFβ）及 bcl-2 抑制剂的药物组合。

[0463] 可以与结合蛋白组合的用于克罗恩氏病的治疗药实例包括以下药物：TNF 拮抗剂，例如抗 TNF 抗体、阿达木单抗（PCT 公开号 WO 97/29131；HUMIRA®）、CA2（REMICADE）、CDP571、TNFR-Ig 构建体、(p75TNFRIgG（ENBREL®）和 p55TNFRIgG（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（例如布地奈德和地塞米松）组合。本发明的结合蛋白或其抗原结合部分也可以与如柳氮磺吡啶、5- 氨基水杨酸和奥沙拉嗪及干扰促炎性细胞因子（如 IL-1）的合成或作用的药物例如 IL-1 转化酶抑制剂和 IL-1ra 的药物组合。本发明的抗体或其抗原结合部分也可以与 T 细胞信号传导抑制剂（例如，酪氨酸激酶抑制剂 6- 巯基嘌呤）一起使用。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美沙拉嗪、泼尼松、

硫唑嘌呤、巯基嘌呤、英夫利昔单抗、琥珀酸甲泼尼龙钠、地芬诺酯 / 硫酸阿托品、盐酸洛哌丁胺、甲氨蝶呤、奥美拉唑、叶酸、环丙沙星 / 右旋糖 - 水、重酒石酸氢可酮 /apap、盐酸四环素、醋酸氟轻松、甲硝唑、硫柳汞 / 硼酸、考来烯胺 / 蔗糖、盐酸环丙沙星、硫酸莨菪碱、盐酸哌替啶、盐酸咪达唑仑、盐酸羟考酮 / 醋氨酚、盐酸异丙嗪、磷酸钠、磺胺甲噁唑 / 甲氧苄啶、塞来昔布、聚卡波非、萘磺酸右丙氧芬、氢化可的松、多维生素剂、巴柳氮二钠、磷酸可待因 / apap、盐酸考来维仑、氰钴胺、叶酸、左氧氟沙星、甲泼尼龙、那他珠单抗和干扰素 - γ 组合。

[0464] 可以与本发明结合蛋白组合的用于多发性硬化 (MS) 的治疗剂的非限制性实例包括以下药物 :皮质类固醇、泼尼松龙、甲泼尼龙、硫唑嘌呤、环磷酰胺、环孢菌素、甲氨蝶呤、4- 氨基吡啶、替扎尼定、干扰素 - β 1a(Avonex ;Biogen)、干扰素 - β 1b(BETASERON ;Chiron/Berlex)、干扰素 α -n3)(Interferon Sciences/Fujimoto)、干扰素 - α (Alfa Wassermann/J&J)、干扰素 β 1A-IF(Serono/Inhale Therapeutics)、PEG 化干扰素 α 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 (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) 和它们的受体的抗体或拮抗剂。本发明的结合蛋白可以与针对细胞表面分子如 CD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90 或其配体的抗体组合。本发明的结合蛋白也可以与如甲氨蝶呤、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、麦考酚酸吗乙酯、来氟米特、NSAID 例如布洛芬、皮质类固醇如泼尼松龙、磷酸二酯酶抑制剂、腺苷激动剂、抗血栓药、补体抑制剂、肾上腺素能药、借助促炎性细胞因子如 TNF-α 或 IL-1 干扰信号传导的药物 (例如,IRAK、NIK、IKK、p38 或 MAP 激酶抑制剂)、IL-1β 转化酶抑制剂、TACE 抑制剂、T- 细胞信号传导抑制剂如激酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂、柳氮磺吡啶、硫唑嘌呤、6- 巯基嘌呤、血管紧张素转化酶抑制剂、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)、抗炎性细胞因子 (例如,IL-4、IL-10、IL-13 和 TGFβ) 及 bc1-2 抑制剂的药物组合。

[0465] 可以与本发明结合蛋白组合的用于多发性硬化的治疗剂的实例包括干扰素 -β,例如,IFNβ 1a 和 IFNβ 1b、克帕松 (copaxone)、皮质类固醇、胱天蛋白酶抑制剂如胱天蛋白酶 -1 抑制剂、IL-1 抑制剂、TNF 抑制剂及针对 CD40 配体和 CD80 的抗体。

[0466] 本发明的结合蛋白也可以与如阿伦珠单抗、屈大麻酚、Unimed、达克珠单抗、米托蒽醌、盐酸扎利罗登、氨吡啶、醋酸格拉默、那他珠单抗、辛那比多 (sinnabidol)、a-immunokine NNS03、ABR-215062、AnergiX.MS、趋化因子受体拮抗剂、BBR-2778、卡勒胍素 (calagualine)、CPI-1189、LEM(脂质体包封的米托蒽醌)、THC.CBD(大麻素激动剂)MBP-8298、甲泼尼龙 (PDE4 抑制剂)、MNA-715、抗 IL-6 受体抗体、neurovax、吡非尼酮 allotrap1258(RDP-1258)、sTNF-R1、他仑帕奈、特立氟胺、TGF-β 2、替利莫肽、VLA-4 拮抗剂 (例如,TR-14035,VLA4Ultrahaler,Antegran-ELAN/Biogen)、干扰素 γ 拮抗剂、IL-4 激动剂的药物组合。

[0467] 可以与本发明结合蛋白组合的用于心绞痛的治疗剂的非限制性实例包括以下药物 :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、苯磺酸氨氯地平、盐酸地尔硫䓬、硝酸异山梨酯、硫酸氢氯吡格雷、硝苯地平、阿托伐他汀钙、氯化钾、呋塞米、辛伐他汀、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、依折替米贝 (ezetimibe)、布美他尼、氯沙坦钾、赖诺普利 / 氢氯噻嗪、非洛他平、卡托普利、延胡索酸比索洛尔。

[0468] 可以与本发明结合蛋白组合的用于强直性脊柱炎的治疗剂的非限制性实例包括以下药物 :布洛芬、双氯芬酸和米索前列醇、萘普生、美洛昔康、吲哚美辛、双氯芬酸、塞来昔布、罗非昔布、柳氮磺吡啶、甲氨蝶呤、硫唑嘌呤、米诺环、泼尼松、依那西普、英夫利昔单抗。

[0469] 可以与本发明结合蛋白组合的用于哮喘的治疗剂的非限制性实例包括以下药物 : 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、泼尼松、昔萘酸沙美特罗、盐酸左旋沙丁胺醇 (levalbuterol)、硫酸沙丁胺醇 / 异丙托铵、泼尼松龙磷酸钠、曲安奈德、丙酸倍氯米松、异丙托溴铵、阿奇霉素、醋酸吡布特罗、泼尼松龙、无水茶碱、琥珀酸甲泼尼龙钠、克拉霉素、扎鲁司特、延胡索酸福莫特罗、流感病毒疫苗、甲泼尼龙、三水合阿莫西林、氟尼缩松、过敏注射、色甘酸钠、盐酸非索非那定、氟尼缩松 / 薄荷醇、阿莫西林 / 克拉维酸盐、左氧氟沙星、吸入器辅助装置、愈创甘油醚、地塞米松磷酸钠、盐酸莫西沙星、盐酸多西环素、愈创甘油醚 /d- 吗喃甲醚、p- 麻黄碱 /cod/ 氯苯那敏、加替沙星、盐酸西替利嗪、糠酸莫米松、昔萘酸沙美特罗、苯佐那酯、头孢氨苄、pe/ 氢可酮 / 氯苯那敏、盐酸西替利嗪 / 伪麻黄碱、苯肾上腺素 /cod/ 异丙嗪、可待因 / 异丙嗪、头孢罗齐、地塞米松、愈创甘油醚 / 伪麻黄碱、氯苯那敏 / 氢可酮、奈多罗米钠、硫酸特布他林、肾上腺素、甲泼尼龙、硫酸奥西那林。

[0470] 可以与本发明结合蛋白组合的用于 COPD 的治疗剂的非限制性实例包括以下药物 :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、昔萘酸沙美特罗、丙酸氟替卡松、泼尼松、无水茶碱、琥珀酸甲泼尼龙钠、孟鲁司特钠、布地奈德、延胡索酸福莫特罗、曲安奈德、左氧氟沙星、愈创甘油醚、阿奇霉素、丙酸倍氯米松、盐酸左旋沙丁胺醇、氟尼缩松、头孢曲松钠、三水合阿莫西林、加替沙星、扎鲁司特、阿莫西林 / 克拉维酸盐、氟尼缩松 / 薄荷醇、氯苯那敏 / 氢可酮、硫酸奥西那林、甲泼尼龙、糠酸莫米松、p- 麻黄碱 / cod/ 氯苯那敏、醋酸吡布特罗、p- 麻黄碱 / 氯雷他定、硫酸特布他林、噻托溴铵、(R, R)- 福莫特罗、TgAAT、西洛司特、罗氟司特。

[0471] 可以与本发明结合蛋白组合的用于 HCV 的治疗剂的非限制性实例包括以下药物 : 干扰素 -α-2a、干扰素 -α-2b、干扰素 -α con1、干扰素 -α-n1、PEG 化干扰素 -α-2a、PEG 化干扰素 -α-2b、利巴韦林、PEG 化干扰素 α-2b+ 利巴韦林、熊去氧胆酸、甘草酸、胸腺法新、二盐酸组胺、VX-497 和用来通过干预以下靶标来治疗 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)。

[0472] 可以与本发明结合蛋白组合的用于特发性肺纤维化的治疗药的非限制性实例包括以下药物 :泼尼松、硫唑嘌呤、沙丁胺醇、秋水仙碱、硫酸沙丁胺醇、地高辛、γ 干扰素、甲泼尼龙琥珀酸钠、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、左氧氟沙星、硫酸奥西那林、硫酸吗啡、盐酸羟考酮、氯化钾、曲安奈德、无水他克莫司钙、干扰素 -α、甲氨蝶呤、麦考酚酸吗乙酯、干扰素 -γ-1β。

[0473] 可以与本发明结合蛋白组合的用于心肌梗死的治疗剂的非限制性实例包括以下药物 :阿司匹林、硝酸甘油、酒石酸美托洛尔、依诺肝素钠、肝素钠、硫酸氢氯吡格雷、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、辛伐他汀、雷米普利、替奈普酶、马来酸依那普利、托拉塞米、瑞替普酶 (retavase)、氯沙坦钾、盐酸喹那普利 / 碳酸镁、布美他尼、阿替普酶、依那普利拉、盐酸胺碘酮、一水合盐酸替罗非班、盐酸地尔硫䓬、卡托普利、厄贝沙坦、缬沙坦、盐酸普萘洛尔、福辛普利钠、盐酸利多卡因、依替巴肽、头孢唑林钠、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、盐酸咪达唑仑、盐酸哌替啶、硝酸异山梨酯、肾上腺素、多巴胺盐酸盐、比伐芦定、瑞舒伐他汀、依折麦布 / 辛伐他汀、阿伐麦布、卡立泊来德。

[0474] 可以与本发明结合蛋白组合的用于银屑病的治疗剂的非限制性实例包括以下药物 :KDR 的小分子抑制剂、Tie-2 的小分子抑制剂、卡泊三烯、丙酸氯倍他索、曲安奈德、丙酸卤倍他索、他佐罗汀、甲氨蝶呤、醋酸氟轻松、增强的二丙酸倍他米松 (betamethasone diprop augmented)、氟氯奈德、阿维 A、焦油香波 (tar shampoo)、戊酸倍他米松、糠酸莫米松、酮康唑、普莫卡因 / 氟轻松、戊酸氢化可的松、氟氢缩松、脲、倍他米松、丙酸氯倍他索 / emoll、丙酸氟替卡松、阿奇霉素、氢化可的松、湿润配方、叶酸、地奈德、吡美莫司、煤焦油、双醋二氟拉松、叶酸依那西普、乳酸、甲氧沙林、hc/ 碱式没食子酸铋 (bismuth subgal)/ znox/resor、醋酸甲泼尼龙、泼尼松、防晒剂、哈西奈德、水杨酸、地蒽酚、特戊酸氯可托龙、煤提取物、煤焦油 / 水杨酸、煤焦油 / 水杨酸 / 硫、去羟米松、地西泮、软化剂、醋酸氟轻松 / 软化剂、矿物油 / 蓖麻油 / 乳酸钠 (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、英夫利昔单抗、环孢菌素、阿法赛特 (alefacept)、依法珠单抗、他克莫司、吡美莫司、PUVA、UVB、柳氮磺吡啶。

[0475] 可以与本发明结合蛋白组合的用于银屑病性关节炎的治疗剂的非限制性实例包括以下药物 :甲氨蝶呤、依那西普、罗非昔布、塞来昔布、叶酸、柳氮磺吡啶、萘普生、来氟米特、醋酸甲泼尼龙、吲哚美辛、硫酸羟氯喹、泼尼松、舒林酸、增强的二丙酸倍他米松、英夫利昔单抗、甲氨蝶呤、叶酸、曲安奈德、双氯芬酸、二甲亚砜、吡罗昔康、双氯芬酸钠、酮洛芬、美洛昔康、甲泼尼龙、萘丁美酮、托美丁钠、卡泊三烯、环孢菌素、双氯芬酸钠 / 米索前列醇、醋酸氟轻松、硫酸葡糖胺、金硫代苹果酸钠、重酒石酸氢可酮 /apap、布洛芬、利塞膦酸钠、磺胺嘧啶、硫鸟嘌呤、伐地考昔、阿法赛特、依法珠单抗和 bcl-2 抑制剂。

[0476] 可以与本发明结合蛋白组合的用于再狭窄的治疗剂的非限制性实例包括以下药物 :西罗莫司、紫杉醇、依维莫司、他克莫司、唑罗莫司、醋氨酚。

[0477] 可以与本发明结合蛋白组合的用于坐骨神经痛的治疗剂的非限制性实例包括以下药物 :重酒石酸氢可酮 /apap、罗非昔布、盐酸环苯扎林、甲泼尼龙、萘普生、布洛芬、盐酸羟考酮 / 醋氨酚、塞来昔布、伐地考昔、醋酸甲泼尼龙、泼尼松、磷酸可待因 /apap、盐酸曲马多 / 醋氨酚、美他沙酮、美洛昔康、美索巴莫、盐酸利多卡因、双氯芬酸钠、加巴喷丁、地塞米松、卡立普多、酮咯酸氨丁三醇、吲哚美辛、醋氨酚、地西泮、萘丁美酮、盐酸羟考酮、盐酸替扎尼定、双氯芬酸钠 / 米索前列醇、萘磺酸右丙氧芬 /apap、asa/oxycod/ 羟考酮 ter、布洛芬 / 重酒石酸氢可酮、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、多维生素剂、萘普生钠、柠檬酸邻甲苯海拉明、替马西泮。

[0478] 可以与本发明结合蛋白组合的用于 SLE(狼疮) 的治疗剂的实例包括以下药物 :NSAIDS 例如双氯芬酸、萘普生、布洛芬、吡罗昔康、吲哚美辛 ;COX2 抑制剂例如塞来

昔布、罗非昔布、伐地考昔；抗疟药例如羟氯喹；类固醇例如泼尼松、泼尼松龙、布地奈德(budenoside)、地塞米松；细胞毒性剂例如硫唑嘌呤、环磷酰胺、麦考酚酸吗乙酯、甲氨蝶呤；PDE4 抑制剂或嘌呤合成抑制剂例如骁悉(Cellcept)。本发明的结合蛋白也可以与如柳氮磺吡啶、5-氨基水杨酸酸、奥沙拉嗪、依木兰和干扰促炎性细胞因子(如 IL-1)合成、产生或作用的药物如胱天蛋白酶抑制剂(例如 IL-1β 转化酶抑制剂和 IL-1ra)的药物组合。本发明的结合蛋白也可以与 T 细胞信号传导抑制剂(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)一起使用。本发明的结合蛋白可以与 IL-11 或抗细胞因子抗体(例如，芳妥珠单抗(fonotolizumab)(抗 IFNg 抗体))或抗受体受体抗体(例如，抗 IL-6 受体抗体)和针对 B- 细胞表面分子的抗体组合。本发明的抗体或其抗原结合部分也可以与 LJP394(阿贝莫司)、耗竭或灭活 B 细胞的药物(例如，利妥昔单抗(抗 CD20 抗体))、lymphostat-B(抗 BlyS 抗体)、TNF 拮抗剂(例如抗 TNF 抗体，阿达木单抗(PCT 公开号 WO 97/29131；HUMIRA®)、CA2(REMICADE®)、CDP571、TNFR-Ig 构建体、(p75TNFRIgG(ENBREL®)和 p55TNFRIgG(LENERCEPT®))和 bcl-2 抑制剂一起使用，因为已经显示转基因小鼠中 bcl-2 过量表达引起狼疮样表型(见 Marquina 等人，J. Immunol.，172(11)：7177-7185(2004))，因此抑制它预期具有治疗效果。

[0479] 本发明的药物组合物可以包含“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明抗体或抗体部分。“治疗有效量”指在需要的剂量上和需要的时间段内有效实现所需治疗结果的量。抗体或抗体部分的治疗有效量可以由本领域技术人员确定并且可以根据如疾病状态、个体的年龄、性别和重量及抗体或抗体部分在个体中引发所需反应的能力的因素而变动。治疗有效量也是其中抗体或抗体部分的任何有毒或有害效应被治疗有益效果超过的量。“预防有效量”指在需要的剂量上和需要的时间段内有效实现所需预防结果的量。通常，由于预防性剂量在疾病之前或在疾病较早阶段用于受试者中，故预防有效量将小于治疗有效量。

[0480] 可以调整剂量方案以提供最佳的所需反应(例如，治疗性或预防性反应)。例如，可以施用单一快速浓注，可以随时间施用几个分开的剂量，或该剂量可以如治疗情况的迫切需要所示按比例减少或增加。特别有利的是以便利于剂量施用和均匀性的剂量单位形式配制肠胃外组合物。如本文所用的剂量单位形式指适合作为用于待治疗的哺乳动物受试者的单一剂量的物理分散单元；每个单元含有与需要的药用载体结合的经计算以产生所需治疗效果的预定量的活性化合物。用于本发明的剂量单位形式的规格由以下决定并且直接取决于：(a) 活性化合物的独特特征和待实现的具体的治疗或预防效果和 (b) 复配这种活性化合物用于个体中治疗灵敏度的现有技术中固有的限制。

[0481] 应当指出，剂量值可以随待减轻的病状的类型和严重性变化。应进一步理解，对于任何特定的受试者，应当根据个体需要和施用组合物或监督其施用的人的专业判断随时间调节特定剂量方案，并且本文中所述的剂量范围仅是示例性而并不意在限制要求保护的组合物的范围或实施。

[0482] 诊断

[0483] 本公开在此还提供诊断性应用。这一点在下文进一步阐明。本发明的结合 IL-1β 的抗体可以按多种形式中的任一形式使用以在体内、在体外或离体(即，在从活的个体获得、经历某个过程、随后返回该个体的细胞或组织中)检测 IL-1β。本发明的 DVD-Ig 提供

了能够与 IL-1β 的表位以及各种诊断和检测分析形式中的其他抗原或表位结合的其他优点。

[0484] I. 分析方法

[0485] 本公开也提供一种使用如本文所述的至少一种抗 IL-1β 结合蛋白或其抗原结合部分（包括 DVD-Ig）确定测试样品中 IL-1β 或其片段（“分析物”）的存在、量或浓度的方法。可以在这种方法中使用如本领域已知的任何适合的测定法。实例包括但不限于免疫测定法，如夹心免疫测定（例如，单克隆、多克隆和 / 或 DVD-Ig 夹心免疫测定法或其任何变型（例如，单克隆 /DVD-Ig、DVD-Ig/ 多克隆等），包括放射性同位素检测（放射免疫测定 (RIA)）和酶检测（酶免疫测定 (EIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA)（例如，Quantikine ELISA 测定，R&D Systems，Minneapolis，Minnesota））、竞争性抑制免疫测定（例如，正向和反向）、荧光极化免疫测定 (FPIA)、酶倍增免疫测定技术 (EMIT)、生物发光共振能量转移 (BRET) 和均相化学发光测定法等。在基于 SELDI 的免疫测定法中，特异性结合目的分析物（或其片段）的捕获试剂与质谱探针的表面（如预活化的蛋白质芯片阵列）连接。随后在生物芯片上特异性捕获分析物（或其片段）并且通过质谱法检测捕获的分析物（或其片段）。可选地，分析物（或其片段）可以从捕获试剂洗脱并且通过传统 MALDI（基质辅助激光解吸附 / 电离）或通过 SELDI 检测。化学发光微粒免疫测定法，尤其使用 ARCHITECT® 自动化分析仪 (Abbott Laboratories，Abbott Park，Illinois) 的免疫测定法，是示例性免疫测定法的实例。

[0486] 在本公开的实施中使用本领域熟知的用于采集、操作和加工尿、血液、血清和血浆及其他体液的方法，例如，在如本文所述的抗 IL-1β 结合蛋白作为免疫诊断试剂使用和 / 或在分析物免疫测定试剂盒中使用时。测试样品可以包含除目的分析物之外的其他部分，如抗体、抗原、半抗原、激素、药物、酶、受体、蛋白质、肽、多肽、寡核苷酸和 / 或多核苷酸。例如，样品可以是从受试者获得的全血样品。可能需要或希望测试样品（尤其全血）在如本文所述的免疫测定之前例如用预处理试剂处理。甚至在其中不需要预处理的情况下（例如，大部分尿样品），任选地可以进行预处理（例如，作为商业平台上方案的部分）。

[0487] 预处理试剂可以是适宜与本发明的免疫测定法和试剂盒一起使用的任何试剂。预处理任选地包含：(a) 一种或多种溶剂（例如，甲醇和乙二醇）及任选地盐，(b) 一种或多种溶剂和盐及任选地去垢剂，(c) 去垢剂或 (d) 去垢剂和盐。预处理试剂是本领域已知的，并且例如这种预处理可以如用于 Abbott TDx、AxSYM® 知 ARCHITECT® 分析仪 (Abbott Laboratories，Abbott Park，Illinois) 上的测定法那样，如文献中所述（见，例如，Yatscoff 等人，"Abbott TDx Monoclonal Antibody Assay Evaluated for Measuring Cyclosporine in Whole Blood"，Clin. Chem.，36：1969-1973(1990) 和 Wallemacq 等人，"Evaluation of the New AxSYM Cyclosporine Assay：Comparison with TDx Monoclonal Whole Blood and EMIT Cyclosporine Assays"，Clin. Chem.，45：432-435(1999))，和 / 或如可商业获得那样使用。另外，预处理可以如 Abbott 的美国专利号 5,135,875；欧洲公开号 EP 0,471,293；PCT 公开号 WO 2008/082984 和美国公开号 2008/0020401 中所述那样进行（其关于预处理的教导通过引用的方式完整并入）。预处理试剂可以是多相试剂或均相试剂。

[0488] 使用多相预处理试剂时，预处理试剂使样品中存在的分析物结合蛋白（例如，可

以与分析物或其片段结合的蛋白质）沉淀。这种预处理步骤包括通过将因添加预处理剂至样品而形成的混合物的上清液与沉淀的分析物结合蛋白分开而移除任何分析物结合蛋白。在这种测定法中，不存在任何结合蛋白的混合物的上清液用于测定法中，从而直接进行至抗体捕获步骤。

[0489] 使用均相预处理试剂，不存在这个分离步骤。测试样品和预处理试剂的整个混合物与针对分析物（或其片段）的标记的特异性结合伴体（如标记的抗分析物抗体（或其抗原反应性片段））接触。用于这种测定法的预处理试剂一般在由第一特异性结合伴体捕获之前或在此期间，在预处理的测试样品混合物中稀释。尽管进行这种稀释，一定量的预处理试剂在捕获期间仍存在于（或保留在）测试样品混合物中。根据本发明，示例性的标记的特异性结合伴体可以是 DVD-Ig（或其片段、变体或变体片段）。

[0490] 在多相形式中，从受试者获得测试样品后，制备第一混合物。这种混合物含有评估分析物（或其片段）的测试样品和第一特异性结合伴体，其中测试样品中所含的第一特异性结合伴体和任何分析物形成第一特异性结合伴体－分析物复合物。优选地，第一特异性结合伴体是抗分析物抗体或其片段。第一特异性结合伴体可以是如本文所述的 DVD-Ig（或其片段、变体或变体片段）。添加测试样品和第一特异性结合伴体以形成混合物的顺序不是关键的。优选地，第一特异性结合伴体固定在固相上。免疫测定法中所用的固相（用于第一特异性结合伴体和任选地，第二特异性结合伴体）可以是本领域已知的任何固相，如，但不限于磁性颗粒、珠、试管、微量滴定板、小杯、膜、支架分子、薄膜、滤纸、盘和芯片。

[0491] 在含有第一特异性结合伴体－分析物复合物的混合物形成后，使用本领域已知的任何技术从复合物移除任何未结合的分析物。例如，可以通过洗涤移除未结合的分析物。然而，希望的是第一特异性结合伴体相对于测试样品中存在的任何分析物过量地存在，从而测试样品中存在的全部分析物被第一特异性结合伴体结合。

[0492] 在移除任何未结合的分析物后，将第二特异性结合伴体添加至混合物以形成第一特异性结合伴体－分析物－第二特异性结合伴体复合物。第二特异性结合伴体优选地是与分析物上的表位结合的抗分析物抗体，所述表位与分析物上由第一特异性结合伴体结合的表位不同。另外，还优选地，第二特异性结合伴体用如上文所述的可检测标记标记或含有该标记。第二特异性结合伴体可以是如本文所述的 DVD-Ig（或其片段、变体或变体片段）。

[0493] 可以使用如本领域已知的任何适合的可检测标记。例如，可检测标记可以是放射性标记（如 ^{3}H、^{125}I、^{35}S、^{14}C、^{32}P 和 ^{33}P）、酶标记（如辣根过氧化物酶、碱性过氧化物酶、葡萄糖 6-磷酸脱氢酶等）、化学发光标记（如吖啶酯、硫酯或磺酰胺；鲁米诺、异鲁米诺、菲啶鎓酯等）、荧光标记（如荧光素（例如，5-荧光素、6-羧基荧光素、3’6-羧基荧光素、5(6)-羧基荧光素、6-六氯－荧光素、6-四氯荧光素、异硫氰酸荧光素等））、罗丹明、藻胆蛋白、R-藻红蛋白、量子点（例如，硫化锌加帽的硒化镉）、量热标记或免疫聚合酶链反应标记。在 Polak 和 Van Noorden，Introduction to Immunocytochemistry，第 2 版，Springer Verlag，N.Y.(1997) 和 Haugland，Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals(1996)（其是 Molecular Probes，Inc.，Eugene，Oregon 出版的联合手册和目录）中存在标记、标记方法和标记的检测的介绍。荧光标记可以用于 FPIA 中（见，例如，美国专利号 5,593,896；5,573,904；5,496,925；5,359,093 和 5,352,803）。吖啶化合物可以用作均相或多相化学发光测定法中的可检测标记（见，例如，Adamczyk 等人，

Bioorg.Med.Chem.Lett.,16:1324-1328(2006);Adamczyk 等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,14:2313-2317(2004);Adamczyk 等 人,Biorg.Med.Chem.Lett.,14:3917-3921(2004) 和 Adamczyk 等人,Org.Lett.,5:3779-3782(2003))。

[0494] 示例性吖啶化合物是吖啶-9-甲酰胺。用于制备吖啶9-甲酰胺的方法在 Mattingly,J.Biolumin.Chemilumin.,6:107-114(1991);Adamczyk 等 人,J.Org.Chem.,63:5636-5639(1998);Adamczyk 等 人,Tetrahedron,55:10899-10914(1999);Adamczyk 等人,Org.Lett.,1:779-781(1999);Adamczyk 等人,Bioconjugate Chem.,11:714-724(2000);Adamczyk 和 Mattingly,Luminescence Biotechnology:Instruments and Applications;(Dyke,K.V. 编 著)(CRC Press:Boca Raton,2002) 第 77-105 页;Adamczyk 等人,Org.Lett.,5:3779-3782(2003) 及美国专利号 5,468,646,5,543,524 和 5,783,699 中描述。另一个优选的吖啶化合物是吖啶-9-羧酸芳基酯。吖啶-9-羧酸芳基酯的实例是 10-甲基-9-(苯氧羰基)吖啶氟代磺酸酯(从 Cayman Chemical,Ann Arbor,Michigan 可获得)。用于制备吖啶 9-羧酸芳基酯的方法在 McCapra 等人,Photochem.Photobiol.,4:1111-21(1965);Razavi 等 人,Luminescence,15:245-249(2000);Razavi 等人,Luminescence,15:239-244(2000) 和美国专利号 5,241,070 中描述。关于吖啶-9-羧酸芳基酯及其用途的其他细节在美国公开号 2008/0248493 中描述。

[0495] 化学发光测定法(例如,使用如上文所述的吖啶或其他化学发光剂)可以根据 Adamczyk 等人,Anal.Chim.Acta,579(1):61-67(2006) 中所述的方法进行。尽管可以使用任何适合的分析形式,微平板化学发光仪 (Mithras LB-940,Berthold Technologies USA.,LLC,Oak Ridge,Tennessee) 能够快速分析多个小体积的样品。

[0496] 添加测试样品和特异性结合伴体以形成用于化学发光测定法的混合物的顺序不是关键的。如果第一特异性结合伴体是用化学发光剂(如吖啶化合物)可检测地标记的,则可检测地标记的第一特异性结合伴体-分析物复合物形成。可选地,如果使用第二特异性结合伴体并且第二特异性结合伴体是用化学发光剂(如吖啶化合物)可检测地标记的,则可检测地标记的第一特异性结合伴体-分析物-第二特异性结合伴体复合物形成。可使用本领域已知的任何技术(如洗涤)从混合物中移除任何未结合的特异性结合伴体,无论是标记的或未标记的。

[0497] 可以在添加上述吖啶化合物之前、与其同时或之后,在混合物中原位产生过氧化氢或将其提供或供应至混合物(例如,过氧化氢源是已知含有过氧化氢的一种或多种缓冲剂或其他溶液)。过氧化氢可以按本领域技术人员显而易见的众多方式原位产生。

[0498] 当同时或随后添加至少一个碱性溶液至样品后,生成了指示分析物存在的可检测信号,即化学发光信号。碱性溶液含有至少一种碱并且具有大于或等于 10、优选地大于或等于 12 的 pH。碱性溶液的实例包括但不限于氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化铵、氢氧化镁、碳酸钠、碳酸氢钠、氢氧化钙、碳酸钙和重碳酸钙。添加至样品的碱性溶液的量取决于碱性溶液的浓度。基于所用碱性溶液的浓度,本领域技术人员可以容易地确定待添加至样品的碱性溶液的量。

[0499] 可以使用本领域技术人员已知的常规技术检测生成的化学发光信号。基于所生成信号的强度,可以将样品中分析物的量定量。具体而言,样品中分析物的量与生成的信号的强度成正比。可以通过将生成的光的量与分析物的标准曲线比较或通过与参比标准比较,

将存在的分析物的量定量。可以使用浓度已知的分析物系列稀释物或溶液通过质谱法、重量分析方法和本领域已知的其他技术生成标准曲线。尽管上文重点描述了使用吖啶化合物作为化学发光剂，但是本领域的普通技术人员可以容易地使这种描述适应于使用其他化学发光剂。

[0500] 分析物免疫测定法通常可以使用本领域已知的任何形式（如，但不限于夹心形式）实施。具体而言，在一种免疫测定形式中，至少两种抗体用来分离并定量样品中的分析物，如人类分析物或其片段。更具体地，所述至少两种抗体与分析物（或其片段）上的不同表位结合，从而形成免疫复合物，这称作“夹心”。通常，在免疫测定法中，一种或多种抗体可以用来捕获测试样品中的分析物（或其片段）（经常将这些抗体称作“捕获”抗体或多种“捕获”抗体），并且一种或多种抗体可以用来将可检测（即，可定量）的标记结合于夹心（经常将这些抗体称作“检测抗体”抗体、多种“检测抗体”抗体、“偶联物”或多种“偶联物”）。因此，在夹心免疫测定形式的情况下，可以使用如本文所述的 DVD-Ig（或其片段、变体或变体片段）作为捕获抗体、检测抗体或两者。例如，可以使用一种具有可以结合分析物（或其片段）上第一表位的结构域的 DVD-Ig 作为捕获抗体，和 / 或可以使用另一种具有可以结合分析物（或其片段）上第二表位的结构域的 DVD-Ig 作为检测抗体。就此方面而言，可以使用具有第一结构域和第二结构域的 DVD-Ig 作为捕获抗体和 / 或检测抗体，其中所述第一结构域可以结合分析物（或其片段）上的第一表位，所述第二结构域可以结合分析物（或其片段）上的第二表位。可选地，可以使用具有第一结构域和第二结构域的 DVD-Ig 作为捕获抗体和 / 或检测抗体以检测和任选地定量两种或更多种分析物，其中所述第一结构域可以结合第一分析物（或其片段）上的表位，所述第二结构域可以结合第二分析物（或其片段）上的表位。在分析物可以于样品中以多于一种形式（如单体形式和二聚 / 多聚形式（其可以是同型或异型的））存在的情况下，可以使用一种 DVD-Ig（其具有可以结合仅在单体形式上暴露的表位的结构域）和另一种 DVD-Ig（其具有可以结合二聚 / 多聚形式的不同部分上的表位的结构域）作为捕获抗体和 / 或检测抗体，从而能检测和任选地定量给定分析物的不同形式。另外，使用在单个 DVD-Ig 内和 / 或在 DVD-Ig 之间具有不同亲和力的 DVD-Ig 可以提供亲合力优势。在如本文所述的免疫测定法的背景下，在 DVD-Ig 的结构内并入一个或多个接头通常可能是有帮助或需要的。当存在时，接头最好应当具有足够的长度和结构灵活性以能够通过内结构域结合某个表位以及通过外结构域结合另一个表位。就此方面而言，如果 DVD-Ig 可以结合两种不同的分析物并且一种分析物大于另一种分析物，希望的是较大分析物由外结构域结合。

[0501] 一般来说，可以将正在测试（例如，疑似含有）IL-1β 蛋白（或其片段）的样品与至少一种捕获抗体（或多种捕获抗体）和至少一种检测抗体（其可以是第二检测抗体或第三检测抗体或甚至依次编号的抗体，例如，在其中捕获和 / 或检测抗体包括多种抗体的情况下）同时或依次地并且以任何顺序接触。例如，测试样品可以首先与至少一种捕获抗体接触并随后（依次）与至少一种检测抗体接触。可选地，测试样品可以首先与至少一种检测抗体接触并随后（依次）与至少一种捕获抗体接触。在又另一个可选形式中，测试样品可以同时与捕获抗体和检测抗体接触。

[0502] 在夹心测定法形式中，疑似含有 IL-1β（或其片段）的样品首先与至少一种第一捕获结合蛋白（例如，IL-1β 抗体）在允许形成第一结合蛋白 /IL-1β 复合物的条件下接

触。如果使用多于一种捕获结合蛋白，则形成包含两种或更多种捕获结合蛋白的第一捕获结合蛋白 /IL-1β 复合物。在夹心测定法中，结合蛋白，即优选地，至少一种捕获结合蛋白以相对于测试样品中预期的 IL-1β 分析物（或其片段）的最大量摩尔过量的量使用。例如，可以使用每 mL 缓冲液（例如，微粒包被缓冲液）约 5μg 至约 1mg 的抗体。

[0503] 竞争性抑制免疫测定法，其因为要求仅由一种抗体结合而通常用来测量小分析物，包括顺序形式和经典形式。在顺序竞争性抑制免疫测定法中，将针对 IL-1β 的捕获结合蛋白包被到微量滴定板的孔或其他固相支持物上。当添加含有 IL-1β 的样品至孔时，IL-1β 与捕获结合蛋白结合。在洗涤后，将已知量的标记（例如，生物素或辣根过氧化物酶 (HRP)）的 IL-1β 添加至该孔。对于酶标记物需要底物以生成信号。HRP 的合适底物的实例是 3,3′ ,5,5′ - 四甲基联苯胺 (TMB)。在洗涤后，测量由标记的分析物生成的信号并且它与样品中 IL-1β 的量成反比。在经典竞争性抑制免疫测定法中，将针对 IL-1β 的结合蛋白包被到固相支持物（例如，微量滴定板的孔）上。然而，不同于顺序竞争性抑制免疫测定法，将样品和标记的 IL-1β 同时添加至孔。样品中的任何 IL-1β 与标记的 IL-1β 竞争与捕获结合蛋白的结合。在洗涤后，测量由标记的 IL-1β 生成的信号并且它与样品中 IL-1β 的量成反比。

[0504] 任选地，在使测试样品与至少一种捕获结合蛋白（例如，第一捕获抗体）接触之前，至少一种捕获结合蛋白可以与固相支持物结合，这促进第一结合蛋白 /IL-1β（或其片段）复合物从测试样品分离。捕获结合蛋白与之结合的基底可以是促进捕获抗体 - 分析物复合物从样品中分离的任何适合的固体支持物或固相。

[0505] 实例包括平板（如微量滴定板）的孔、试管、多孔凝胶（例如，硅胶、琼脂糖、葡聚糖或明胶）、聚合物薄膜（例如，聚丙烯酰胺）、珠（例如，聚苯乙烯珠或磁珠）、滤纸 / 膜（例如，硝酸纤维素或尼龙）的条、微粒（例如，乳胶颗粒、可磁化微粒（例如，具有氧化铁或氧化铬芯和同聚或异聚物涂层且半径约 1-10 微米的微粒））。基底可以包括合适的多孔材料，其具有结合抗原的合适表面亲和力和允许检测抗体到达的足够孔隙度。微孔材料通常是优选的，虽然可以使用水合状态的凝胶性材料。这类多孔基底优选地为具有约 0.01 至约 0.5mm、优选地约 0.1mm 厚度的薄片形式。尽管孔径可以相当大地变动，但孔径优选地是约 0.025 至约 15 微米、更优选地约 0.15 至约 15 微米。这类基底的表面可以通过引起抗体与基底共价连接的化学过程活化。这导致抗原或抗体与基底的不可逆性结合（通常通过借助疏水力的吸附）；可选地，化学偶联剂或其他手段可以用来使抗体与基底共价结合，前提是这类结合不干扰抗体与分析物结合的能力。可选地，抗体可以与微粒结合，所述微粒事先用链霉亲和素（例如，DYNAL®磁珠，Invitrogen，Carlsbad，California）或生物素（例如，使用 Power-BindTM-SA-MP 链霉亲和素包被的微粒 (Seradyn，Indianapolis，Indiana)）或抗物种特异性单克隆抗体包被。如果需要，可以使基底衍生化以允许与抗体上各种官能团反应。这类衍生化需要使用某些偶联剂，其实例包括但不限于马来酸酐、N- 羟基琥珀酰亚胺和 1- 乙基 -3-(3- 二甲氨基丙基）碳二亚胺。如果需要，各自对分析物特异的一种或多种捕获试剂（如抗体（或其片段））可以在不同的物理或可寻址位置与固相连接（例如，如以生物芯片配置）（见，例如，美国专利号 6,225,047 ；PCT 公开号 WO 99/51773 ；美国专利号 6,329,209 ；PCT 公开号 WO 00/56934 和美国专利号 5,242,828）。如果捕获试剂与作为固相支持物的质谱探针连接，则可以通过激光解吸电离质谱法检测与该探针结合的分析物的

量。可选地，单一柱可以用一种或多种捕获试剂衍生化的不同的珠填充，从而捕获分析物于单一位置内（见，基于抗体衍生化珠的技术，例如，Luminex(Austin,Texas) 的 xMAP 技术）。

[0506] 在对分析物（或其片段）进行分析的测试样品与至少一种捕获抗体（例如，第一捕获抗体）接触后，将混合物孵育以便允许第一抗体（或多种抗体）- 分析物（或其片段）复合物的形成。孵育可以在约 4.5 至约 10.0 的 pH、约 2℃至约 45℃的温度下进行至少约一 (1) 分钟至约十八 (18) 小时、优选地约 1 分钟至约 24 分钟、最优选地约 4 分钟至约 18 分钟的时间。本文所述的免疫测定法可以在一个步骤中（意指，将测试样品、至少一种捕获抗体和至少一种检测抗体全部依次或同时添加至反应容器）或在多于一个步骤，如 2 个步骤、3 个步骤等中实施。

[0507] 在形成（第一或多种）捕获抗体 / 分析物（或其片段）复合物后，所述复合物随后与至少一种检测抗体在允许（第一或多种）捕获抗体 / 分析物（或其片段）/ 第二检测抗体复合物形成的条件下接触。尽管为了清楚而标称为“第二”抗体（例如，第二检测抗体），实际上，在多种抗体用于捕获和 / 或检测的情况下，所述至少一种检测抗体可以是免疫测定法中所用的第二、第三、第四等抗体。如果捕获抗体 / 分析物（或其片段）复合物与多于一种检测抗体接触，则形成（第一或多种）捕获抗体 / 分析物（或其片段）/（多种）检测抗体复合物。与捕获抗体（例如，第一捕获抗体）一样，当至少一种（例如，第二和任何后续）检测抗体与捕获抗体 / 分析物（或其片段）复合物接触时，形成（第一或多种）捕获抗体 / 分析物（或其片段）/（第二或多种）检测抗体复合物需要在与上文所述那些条件相似的条件下孵育一段时间。优选地，至少一种检测抗体含有可检测标记。可检测标记可以在形成（第一或多种）捕获抗体 / 分析物（或其片段）/（第二或多种）检测抗体复合物之前、与其同时或之后与至少一种检测抗体（例如，第二检测抗体）结合。可以使用本领域已知的任何可检测标记（见上文讨论，包括参考文献 Polak 和 Van Noorden(1997) 和 Haugland(1996)）。

[0508] 可检测标记可以直接或经偶联剂与抗体结合。可以使用的偶联剂的实例是 EDAC(1- 乙基 -3-(3- 二甲氨基丙基）碳二亚胺，盐酸盐），其可从 Sigma-Aldrich，St.Louis，Missouri 购得。可以使用的其他偶联剂是本领域已知的。用于使可检测标记与抗体结合的方法是本领域已知的。另外，可以购买或合成已含有促进可检测标记与抗体偶联的端基的许多可检测标记，如 CPSP- 吖啶酯（即，9-[N- 甲苯磺酰基 -N-(3- 羧丙基）]-10-(3- 磺丙基）吖啶甲酰胺）或 SPSP- 吖啶酯（即，N10-(3- 磺丙基）-N-(3- 磺丙基）- 吖啶 -9- 甲酰胺）。

[0509] （第一或多种）捕获抗体 / 分析物 /（第二或多种）检测抗体复合物可以在标记物的定量之前与测试样品的其余部分分离，但是不是必须如此。例如，如果至少一种捕获抗体（例如，第一捕获抗体）与固相支持物（如孔或珠）结合，可以通过移除（测试样品的）流体以不与固相支持物接触而完成分离。可选地，如果至少第一捕获抗体与固相支持物结合，它可以同时与含分析物的样品和至少一种第二检测抗体接触以形成第一（多种）抗体 / 分析物 / 第二（多种）抗体复合物，随后移除流体（测试样品）以不与固相支持物接触。如果至少一种第一捕获抗体不与固相支持物结合，则不必从测试样品中移除（第一或多种）捕获抗体 / 分析物 /（第二或多种）检测抗体复合物以定量标记物的量。

[0510] 在标记的捕获抗体 / 分析物 / 检测抗体复合物（例如，第一捕获抗体 / 分析物 /

第二检测抗体复合物）形成后，使用本领域已知的技术定量复合物中标记物的量。例如，如果使用酶标记，则标记的复合物与所述标记的底物反应，其产生可定量的反应如显色。如果标记物是放射性标记，使用适宜的手段如闪烁计数器对标记物定量。如果标记物是荧光标记，则通过用一种颜色的光（其称作“激发波长”）刺激标记物并且检测由标记物响应于所述刺激而发射的另一种颜色（其称作“发射波长”）将标记物定量。如果标记物是化学发光标记，则通过目视方式或使用光度计、x 射线胶片、高速照相胶片、CCD 照相机等检测所发射的光来定量标记物。一旦将复合物中标记物的量定量，通过适宜方式，如通过使用已经利用已知浓度的分析物或其片段的连续稀释物生成的标准曲线，确定测试样品中分析物或其片段的浓度。除使用分析物或其片段的连续稀释物之外，可以按重量分析方式、通过质谱法和通过本领域已知的其他技术生成标准曲线。

[0511] 在使用ARCHITECT®分析仪的化学发光微粒测定法中，偶联物稀释剂的 pH 应当是约 6.0+/-0.2，微粒包被缓冲液应当维持在约室温（即，在约 17℃至约 27℃），微粒包被缓冲液的 pH 应当是约 6.5+/-0.2，并且微粒稀释剂的 pH 应当是约 7.8+/-0.2。固形物优选地少于约 0.2%，如少于约 0.15%、少于约 0.14%、少于约 0.13%、少于约 0.12%或少于约 0.11%，如约 0.10%。

[0512] FPIA 是基于竞争性结合免疫分析原理。受线性偏振光激发时，荧光标记的化合物发射具有与其转速成反比的偏振度的荧光。当荧光标记的示踪剂－抗体复合物受线性偏振光激发时，发射光保持高度偏振，因为在光吸收的时间和光发射的时间之间荧光团转动受约束。当“游离”示踪化合物（即，不与抗体结合的化合物）受线性偏振光激发时，其转动比竞争性结合免疫分析中产生的相应示踪剂－抗体偶联物快得多。FPIA 比 RIA 有利，因为不存在需要特殊操作和处置的放射性物质。此外，FPIA 是可以容易和快速进行的均相测定法。

[0513] 鉴于以上情况，提供了一种确定测试样品中分析物（或其片段）的存在、量或浓度的方法。所述方法包括通过一种分析测定测试样品的分析物（或其片段），所述分析 (i) 使用 (i ‘) 抗体、能与分析物结合的抗体片段、能与分析物结合的抗体变体、能与分析物结合的抗体变体的片段和能与分析物结合的 DVD-Ig（或其片段、变体或变体片段）中的至少一种和 (ii’) 至少一种可检测标记，并且 (ii) 包括将可检测标记所生成的作为分析物（或其片段）在测试样品中的存在、量或浓度的直接或间接指示的信号与所生成的作为对照或校准物中分析物（或其片段）的存在、量或浓度的直接或间接指示的信号比较。校准物任选地是一系列校准物的部分，其中每种校准物因分析物的浓度而不同于其他校准物。

[0514] 所述方法可以包括 (i) 使测试样品与针对分析物（或其片段）的至少一种第一特异性结合伴体接触，所述第一特异性结合伴体选自抗体、能与分析物结合的抗体片段、能与分析物结合的抗体变体、能与分析物结合的抗体变体的片段和能与分析物结合的 DVD-Ig（或其片段、变体或变体片段），从而形成第一特异性结合伴体 / 分析物（或其片段）复合物，(ii) 使第一特异性结合伴体 / 分析物（或其片段）复合物与针对分析物（或其片段）的至少一种第二特异性结合伴体接触，所述第二特异性结合伴体选自可检测地标记的抗分析物抗体、可以与分析物结合的抗分析物抗体的可检测标记的片段、可以与分析物结合的抗分析物抗体的可检测标记变体、可以与分析物结合的抗分析物抗体变体的可检测标记片段和可检测标记的 DVD-Ig（或其片段、变体或变体片段），从而形成第一特异性结合伴

体 / 分析物（或其片段）/ 第二特异性结合伴体复合物，和（iii）通过检测或测量由（ii）中形成的第一特异性结合伴体 / 分析物（或其片段）/ 第二特异性结合伴体复合物中的可检测标记生成的信号，确定测试样品中分析物的存在、量或浓度。其中针对分析物（或其片段）的至少一种第一特异性结合伴体和 / 或针对分析物（或其片段）的至少一种第二特异性结合伴体是如本文所述的 DVD-Ig（或其片段、变体或变体片段）的方法可以是优选的。

[0515] 可选地，所述方法可以包括使测试样品与针对 IL-1β 分析物（或其片段）的至少一种第一特异性结合伴体接触，所述第一特异性结合伴体选自抗体、可以与分析物结合的抗体片段、可以与分析物结合的抗体变体、可以与分析物结合的抗体变体的片段和 DVD-Ig（或其片段、变体或变体片段），并且以任何顺序，同时或依次使测试样品与至少一种第二特异性结合伴体接触，所述第二特异性结合伴体可以与分析物（或其片段）竞争结合至少一种第一特异性结合伴体并且选自可检测标记的分析物、可以与第一特异性结合伴体结合的可检测标记的分析物片段、可以与第一特异性结合伴体结合的可检测标记的分析物变体和可以与第一特异性结合伴体结合的分析物变体的可检测标记的片段。测试样品中存在的任何 IL-1β（或其片段）和至少一种第二特异性结合伴体彼此竞争以分别形成第一特异性结合伴体 / 分析物（或其片段）复合物和第一特异性结合伴体 / 第二特异性结合伴体复合物。所述方法还包括通过检测或测量由（ii）中形成的第一特异性结合伴体 / 第二特异性结合伴体复合物中的可检测标记生成的信号，确定测试样品中分析物的存在、量或浓度，其中由第一特异性结合伴体 / 第二特异性结合伴体复合物中的可检测标记生成的信号与测试样品中分析物的量或浓度成反比。

[0516] 以上方法可以还包括诊断、预测或评估测试样品由其获得的患者的治疗性 / 预防性处理的功效。如果所述方法还包括评估测试样品由其获得的患者的治疗性 / 预防性处理的功效，则所述方法任选地还包括按照需要调整患者的治疗性 / 预防性处理以改善功效。可以使所述方法适应于用于自动化系统或半自动化系统中。

[0517] 就测定方法（和用于该方法的试剂盒）而言，可以使用市售抗分析物抗体或如文献中所述的用于产生抗分析物抗体的方法。各种抗体的商业供应包括但不限于 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz,California)、GenWay Biotech,Inc.(San Diego,California) 和 R&D Systems(RDS ;Minneapolis,Minnesota)。

[0518] 通常，预定的水平可以作为评估在分析测试样品的分析物或其片段时获得的结果的基准用于例如检测疾病或疾病风险。通常，在进行这种比较时，通过在适宜条件下进行足够次数的特定分析获得该预定的水平，从而可以作出分析物存在、量或浓度与疾病、病症或病状的特定阶段或终点或与特定临床指标的关联或联系。一般而言，用参考受试者（或受试者群体）的分析获得预定的水平。测量的分析物可以包括其片段、其降解产物和 / 或其酶切割产物。

[0519] 特别地，就用作监测病情进展和 / 或治疗的预定水平而言，分析物或其片段的量或浓度可以是“未改变的”、“有利的”、（或“有利地改变的”）或“不利的”（或“不利地改变的”）。“升高的”或“增加的”指测试样品中高于常见或正常水平或范围（例如，预定的水平）或高于另一参考水平或范围（例如，早期或基线样品）的量或浓度。术语“降低的”或“减小的”指测试样品中低于常见或正常水平或范围（例如，预定的水平）或低于另一参考水平或范围（例如，早期或基线样品）的量或浓度。术语“改变的”指样品中相对于常见或

正常水平或范围（例如，预定的水平）或相对于另一参考水平或范围（例如，早期或基线样品）改变（增加或减少）的量或浓度。

[0520] 分析物的常见或正常水平或范围根据标准实践定义。因为分析物的水平在一些情况下非常低，所以当与常见或正常水平或范围或参考水平或范围相比存在不能由实验误差或样品变化解释的任何净变化时，可以认为所谓改变的水平或改变已经发生。因此，特定样品中所测量的水平将与来自所谓正常受试者的相似样品中所测定的水平或水平范围比较。在这种情况下，“正常受试者”例如是不存在可检测疾病的个体，并且“正常”（有时称作“对照”）患者或群体例如分别是不显示可检测疾病的个体或群体。另外，假定分析物并不在大部分人群中以高水平常规地存在，可以认为“正常受试者”是不存在明显可检测的增加或升高的分析物量或浓度的个体并且“正常”（有时称作“对照”）患者或群体是不显示明显可检测的增加或升高的分析物量或浓度的患者或群体。“表观正常的受试者”是其中分析物仍未评估或正在评估的受试者。当分析物正常情况下检测不到（例如，正常水平是零或处于正常群体的约 25 至约 75 百分位范围内）但在测试样中检测到时以及当分析物在测试样品中以高于正常的水平存在时，将分析物的水平称作“升高的”。因此，特别地，本公开提供一种筛查患有特定疾病、病症或病状或存在特定疾病、病症或病状的风险的受试者的方法。分析方法也可以包括对其他标志物等的分析。

[0521] 因而，本文所述的方法也可以用来确定受试者是否患有给定疾病、病症或病状或存在产生给定疾病、病症或病状的风险。具体而言，这种方法可以包括步骤：

[0522] (a) 确定来自受试者的测试样品中 IL-1β（或其片段）的浓度或量（例如，使用本文所述的方法或本领域已知的方法）；和

[0523] (b) 将步骤 (a) 中所确定的 IL-1β（或其片段）的浓度或量与预定水平比较，其中，如果步骤 (a) 中所确定的分析物的浓度或量相对于预定水平是有利的，则确定这位受试者未患给定疾病、病症或病状或不存在给定疾病、病症或病状的风险。然而，如果步骤 (a) 中所确定的分析物的浓度或量相对于预定水平是不利的，则确定受试者患有给定疾病、病症或病状或存在给定疾病、病症或病状的风险。

[0524] 另外，本文中提供在受试者中监测疾病进展的方法。最佳地，所述方法包括步骤：

[0525] (a) 确定来自受试者的测试样品中 IL-1β 的浓度或量；

[0526] (b) 确定来自受试者的在后测试样品中 IL-1β 的浓度或量；和

[0527] (c) 将步骤 (b) 中所确定的分析物的浓度或量与步骤 (a) 中所确定的 IL-1β 的浓度或量比较，其中如果与步骤 (a) 中所确定的 IL-1β 的浓度或量相比，步骤 (b) 中所确定的浓度或量是未改变或不利的，则确定受试者中的疾病延续、进展或恶化。通过比较，如果与如步骤 (a) 中所确定的 IL-1β 的浓度或量相比时，步骤 (b) 中所确定的 IL-1β 的浓度或量是有利的，则确定受试者中的疾病中止、退行或改善。

[0528] 任选地，该方法还包括将步骤 (b) 中所确定的 IL-1β 分析物的浓度或量例如与预定的水平比较。另外，任选地，如果比较显示步骤 (b) 中所确定的分析物的浓度或量例如相对于预定的水平不利地改变，则所述方法包括用一种或多种药物组合物治疗受试者一段时间。

[0529] 再者，所述方法可以用来监测接受一种或多种药物组合物治疗的受试者中的治疗。具体而言，这类方法包括在受试者施用一种或多种药物组合物之前提供来自受试者的

第一测试样品。接下来，确定来自受试者的第一测试样品中 IL-1β 的浓度或量（例如，使用本文所述或如本领域已知的方法）。在确定 IL-1β 的浓度或量后，任选地随后将 IL-1β 的浓度或量与预定的水平相比较。如果如第一测试样品中所确定的 IL-1β 的浓度或量低于预定的水平，则受试者不用一种或多种药物组合物治疗。然而，如果第一测试样品中所确定的 IL-1β 的浓度或量高于预定的水平，则受试者用一种或多种药物组合物治疗一段时间。受试者用一种或多种药物组合物治疗的时间段可以由本领域技术人员确定（例如，这个时间段可以是约七 (7) 日至约 2 年，优选地约十四 (14) 日至约一 (1) 年）。

[0530] 在用一种或多种药物组合物治疗期间，随后从受试者获得第二和后续测试样品。测试样品的数目和其中从受试者获得所述测试样品的时间不是关键的。例如，第二测试样品可以在受试者首次施用一种或多种药物组合物后七 (7) 日获得，第三测试样品可以在受试者首次施用一种或多种药物组合物后两 (2) 周获得，第四测试样品可以在受试者首次施用一种或多种药物组合物后三 (3) 周获得，第五测试样品可以在受试者首次施用一种或多种药物组合物后四 (4) 周获得等。

[0531] 在从受试者各获得第二或后续测试样品后，确定第二或后续测试样品中 IL-1β 分析物的浓度或量（例如，使用本文所述或如本领域已知的方法）。随后第二和后续测试样品中各自所确定的 IL-1β 的浓度或量与第一测试样品（例如，最初任选地与预定水平比较的测试样品）中所确定的分析物的浓度或量比较。如果在与步骤 (a) 中所确定的分析物的浓度或量相比时，步骤 (c) 中所确定的 IL-1β 的浓度或量是有利的，则确定受试者中的疾病中止、退行或改善，并且受试者应当继续施用步骤 (b) 的一种或多种药物组合物。然而，如果在与步骤 (a) 中所确定的分析物的浓度或量相比时，步骤 (c) 中所确定的浓度或量是未改变或不利的，则确定受试者中的疾病延续、进展或恶化，并且受试者应当用更高浓度的步骤 (b) 中施用至受试者的一种或多种药物组合物治疗或受试者应当用与步骤 (b) 中施用至受试者的一种或多种药物组合物不同的一种或多种药物组合物治疗。具体而言，受试者可以用与受试者先前已经接受的一种或多种药物组合物不同的一种或多种药物组合物治疗以便减小或降低受试者中的分析物水平。

[0532] 通常，对于其中可以进行重复测试（例如，监测病情进展和 / 或治疗反应）的测定法，第二或后续测试样品在从受试者获得第一测试样品后的一段时间获得。具体而言，来自受试者的第二测试样品可以在从受试者获得第一测试样品后数分钟、数小时、数日、数周或数年获得。例如，第二测试样品可以在从受试者获得第一测试样品后约 1 分钟、约 5 分钟、约 10 分钟、约 15 分钟、约 30 分钟、约 45 分钟、约 60 分钟、约 2 小时、约 3 小时、约 4 小时、约 5 小时、约 6 小时、约 7 小时、约 8 小时、约 9 小时、约 10 小时、约 11 小时、约 12 小时、约 13 小时、约 14 小时、约 15 小时、约 16 小时、约 17 小时、约 18 小时、约 19 小时、约 20 小时、约 21 小时、约 22 小时、约 23 小时、约 24 小时、约 2 日、约 3 日、约 4 日、约 5 日、约 6 日、约 7 日、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 9 周、约 10 周、约 11 周、约 12 周、约 13 周、约 14 周、约 15 周、约 16 周、约 17 周、约 18 周、约 19 周、约 20 周、约 21 周、约 22 周、约 23 周、约 24 周、约 25 周、约 26 周、约 27 周、约 28 周、约 29 周、约 30 周、约 31 周、约 32 周、约 33 周、约 34 周、约 35 周、约 36 周、约 37 周、约 38 周、约 39 周、约 40 周、约 41 周、约 42 周、约 43 周、约 44 周、约 45 周、约 46 周、约 47 周、约 48 周、约 49 周、约 50 周、约 51 周、约 52 周、约 1.5 年、约 2 年、约 2.5 年、约 3.0 年、约 3.5 年、约 4.0 年、约 4.5 年、

约 5.0 年、约 5.5 年、约 6.0 年、约 6.5 年、约 7.0 年、约 7.5 年、约 8.0 年、约 8.5 年、约 9.0 年、约 9.5 年或约 10.0 年从受试者获得。

[0533] 当用来监测病情进展时，上述测定法可以用来监测患有急性病状的受试者中疾病的进展。急性病状，也称作危重护理病状，指急性的致命性疾病或涉及例如心血管系统或排泄系统的其他危重医学病状。通常，危重护理病状指需要在基于医院的环境（包括但不限于急诊室、重症监护单元、创伤中心或其他急诊护理环境）中或由急救医士或其他基于专业领域的医护人员实施的急性医学介入的那些病状。对于危重护理病状，重复监测通常在较短的时程内进行，即数分钟、数小时或数日（例如，约 1 分钟、约 5 分钟、约 10 分钟、约 15 分钟、约 30 分钟、约 45 分钟、约 60 分钟、约 2 小时、约 3 小时、约 4 小时、约 5 小时、约 6 小时、约 7 小时、约 8 小时、约 9 小时、约 10 小时、约 11 小时、约 12 小时、约 13 小时、约 14 小时、约 15 小时、约 16 小时、约 17 小时、约 18 小时、约 19 小时、约 20 小时、约 21 小时、约 22 小时、约 23 小时、约 24 小时、约 2 日、约 3 日、约 4 日、约 5 日、约 6 日或约 7 日），并且初始分析同样地通常在较短的时程内进行，例如，疾病或病状发作的约数分钟、数小时或数日内。

[0534] 所述测定法也可以用来监测患有慢性或非急性病状的受试者中疾病的进展。非危重护理病状或非急性病状指除急性的致命性疾病或涉及例如心血管系统和 / 或排泄系统的其他危重医学病状之外的病状。通常，非急性病状包括较长期或慢性持续的那些病状。对于非急性病状，重复监测通常以较长的时程进行，例如，数小时、数日、数周、数月或数年（例如，约 1 小时、约 2 小时、约 3 小时、约 4 小时、约 5 小时、约 6 小时、约 7 小时、约 8 小时、约 9 小时、约 10 小时、约 11 小时、约 12 小时、约 13 小时、约 14 小时、约 15 小时、约 16 小时、约 17 小时、约 18 小时、约 19 小时、约 20 小时、约 21 小时、约 22 小时、约 23 小时、约 24 小时、约 2 日、约 3 日、约 4 日、约 5 日、约 6 日、约 7 日、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 9 周、约 10 周、约 11 周、约 12 周、约 13 周、约 14 周、约 15 周、约 16 周、约 17 周、约 18 周、约 19 周、约 20 周、约 21 周、约 22 周、约 23 周、约 24 周、约 25 周、约 26 周、约 27 周、约 28 周、约 29 周、约 30 周、约 31 周、约 32 周、约 33 周、约 34 周、约 35 周、约 36 周、约 37 周、约 38 周、约 39 周、约 40 周、约 41 周、约 42 周、约 43 周、约 44 周、约 45 周、约 46 周、约 47 周、约 48 周、约 49 周、约 50 周、约 51 周、约 52 周、约 1.5 年、约 2 年、约 2.5 年、约 3.0 年、约 3.5 年、约 4.0 年、约 4.5 年、约 5.0 年、约 5.5 年、约 6.0 年、约 6.5 年、约 7.0 年、约 7.5 年、约 8.0 年、约 8.5 年、约 9.0 年、约 9.5 年或约 10.0 年），并且初始分析同样地通常在较长的时程内进行，例如，疾病或病状发作的约数小时、数日、数月或数年内。

[0535] 另外，以上分析可以使用从受试者获得的第一测试样品进行，其中所述第一测试样品从一个来源（如尿、血清或血浆）获得。任选地，以上分析可以随后使用从受试者获得的第二测试样品重复，其中所述第二测试样品从另一个来源获得。例如，如果第一测试样品从尿获得，则第二测试样品可以从血清或血浆获得。可以比较使用第一测试样品和第二测试样品从分析所获得的结果。这种比较可以用来评估受试者中疾病或病状的状态。

[0536] 而且，本公开也涉及确定倾向于患有或患有给定疾病、病症或病状的受试者是否将从治疗获益的方法。具体而言，本公开涉及分析物伴随诊断方法和产品。因此，如本文所述的“监测受试者中疾病的治疗”的方法最佳地还可以进一步包括选择或鉴定疗法候选者。

[0537] 因此，在特定的实施方式中，本公开还提供一种确定患有给定疾病、病症或病状或存在这种风险的受试者是否为疗法候选者的方法。通常，这种受试者是经历给定疾病、病症

或病状的一些症状或实际上已经被诊断为患有给定疾病、病症或病状或存在这种风险和/或显示出如本文所述的分析物或其片段的不利浓度或量的受试者。

[0538] 所述方法任选地包括如本文所述的测定法，其中在用一种或多种药物组合物（例如，特别用与涉及分析物的作用机制相关的药物）、用免疫抑制疗法或通过免疫吸附疗法治疗受试者之前和之后评估 IL-1β，或其中在这类治疗后评估分析物并且将分析物的浓度或量与预定的水平比较。在治疗后观察到的不利的 IL-1β 浓度或量确认受试者将不会获准于接受进一步或继续治疗，而在治疗后观察到有利的分析物浓度或量确认受试者将从接受进一步或继续治疗中受益。这种确认有助于临床研究的管理和提供改善的患者护理。

[0539] 不用说，尽管本文中的某些实施方式在用于评估如本文中所讨论的给定的疾病、病症或病状时是有利的，但是所述分析和试剂盒可以用来评估其他疾病、病症和病状中的分析物。分析方法也可以包括对其他标志物等的分析。

[0540] 分析方法也可以用来鉴定改善给定疾病、病症或病状的化合物。例如，表达分析物的细胞可以与候选化合物接触。使用本文所述的分析方法，可以将与化合物接触的细胞中分析物的表达水平与对照细胞中分析物的表达水平比较。

[0541] II. 试剂盒

[0542] 还提供一种用于测定测试样品中的分析物（或其片段）的存在、量或浓度的分析测试样品的试剂盒。所述试剂盒包含用于测定测试样品的 IL-1β（或其片段）的至少一种组分和用于分析测试样品的所述分析物（或其片段）的说明书。用于测定测试样品的分析物（或其片段）的至少一种组分可以包括包含如本文所述并且任选地固定在固相上的抗 IL-1β 结合蛋白，如单克隆抗体或 DVD-Ig（或其片段、变体或变体片段）的组合物。

[0543] 所述试剂盒可包含用于通过免疫测定法（例如化学发光微粒免疫测定法）分析测试样品的 IL-1β 分析物的至少一种组分和用于通过免疫测定法（例如化学发光微粒免疫测定法）分析测试样品的 IL-1β 分析物的说明。例如，所述试剂盒可以包含 IL-1β 的至少一种特异性结合伴体，如抗 IL-1β 单克隆/多克隆抗体（或可以与 IL-1β 分析物结合的其片段、可以与所述分析物结合的其变体或可以与所述分析物结合的其变体的片段）或者抗 IL-1β DVD-Ig（或其片段、变体或变体片段），其中任一种可以可检测地标记。可选地或额外地，所述试剂盒可以包含可检测地标记的 IL-1β 分析物（或可以与抗分析物单克隆/多克隆抗体或抗分析物 DVD-Ig（或其片段、变体或变体片段）结合的其片段），其可以与测试样品中的任何分析物竞争结合抗分析物单克隆/多克隆抗体（或可以结合所述分析物的其片段、可以结合所述分析物的其变体或可以结合所述分析物的其变体的片段）或者抗分析物 DVD-Ig（或其片段、变体或变体片段），其中任一种可以固定在固相支持物上。所述试剂盒可以包含校准物或对照，例如分离或纯化的分析物。所述试剂盒可以包含用于进行所述分析的至少一个容器（例如，管、微量滴定板或板条，其可以例如已经用第一特异性结合伴体包被）和/或缓冲液（如分析缓冲液或洗涤缓冲液，其中任一种可以作为浓缩溶液提供）、可检测标记（例如，酶标记）的底物溶液或终止溶液。优选地，试剂盒包含进行分析必需的全部组分，即试剂、标准物、缓冲液、稀释剂等。说明可以为纸件形式或计算机可读形式，如磁盘、CD、DVD 等。

[0544] 任何结合蛋白，如抗 IL-1β 结合蛋白或抗分析物 DVD-Ig 或示踪剂可以并入如本文所述的可检测标记，如荧光团、放射性部分、酶、生物素/亲和素标记、发色团、化学发光

标记等，或所述试剂盒可以包括用于实施可检测标记的试剂。抗体、校准物和/或对照可以在独立容器中提供或预分配成适宜的分析形式，例如，预分配到微量滴定板中。

[0545] 任选地，试剂盒包括质量控制组分（例如，灵敏度套组、校准物和阳性对照）。质量控制试剂的制备是本领域熟知的并且在多种免疫诊断产品的插页上描述。灵敏度套组成员任选地用来建立分析性能特征并且进一步任选地是免疫分析试剂盒试剂完整性和分析标准化的有用指示。

[0546] 试剂盒也可以任选地包括实施诊断分析或帮助质量控制评价所要求的其他试剂，如缓冲剂、盐、酶、酶辅因子、酶底物、检测试剂等。也可以在试剂盒中包含其他组分，如用于分离和/或处理测试样品的缓冲剂和溶液（例如，预处理试剂）。试剂盒可以额外地包含一种或多种其他对照。试剂盒的一种或多种组分可以是冻干的，在这种情况下，试剂盒还可以包含适于重构冻干组分的试剂。

[0547] 如需要，试剂盒的各种组分任选地在合适容器（例如，微量滴定板）中提供。试剂盒可以进一步包括用于容纳或储存样品的容器（例如，用于尿样的容器或盒）。如果适宜，试剂盒还可以任选地含有反应容器、混合容器和利于试剂或测试样品制备的其他组分。试剂盒也可以包含用于辅助获得测试样品的一个或多个工具，如注射器、吸液管、镊子、量勺等。

[0548] 如果可检测标记是至少一种吖啶化合物，则试剂盒可以包含至少一种吖啶-9-甲酰胺、至少一种吖啶-9-羧酸芳基酯或其任何组合。如果可检测标记是至少一种吖啶化合物，则试剂盒还可以包含过氧化氢源，如缓冲剂、溶液和/或至少一种碱性溶液。如果需要，试剂盒可以含有固相，如磁性颗粒、珠、试管、微量滴定板、小杯、膜、支架分子、薄膜、滤纸、盘或芯片。

[0549] III. 试剂盒和方法的适应

[0550] 可以使试剂盒（或其组分）以及通过分析（如本文所述的免疫测定法）确定测试样品中分析物的存在、量或浓度的方法适应用于在例如美国专利号 5,089,424 和 5,006,309 中描述和例如作为 ARCHITECT® 由 Abbott Laboratories(Abbott Park, Illinois) 销售的多种自动化和半自动化系统（包括其中固相包括微粒的那些）。

[0551] 与非自动化系统（例如，ELISA）相比，自动化或半自动化系统之间的一些差异包括与第一特异性结合伴体（例如，抗分析物单克隆/多克隆抗体（或其片段、其变体或其变体片段）或抗分析物 DVD-Ig（或其片段、其变体或其变体片段所连接的）；以任一种方式，夹心形成和分析物反应性可以受到影响）连接的基底，和捕获、检测和/或任何任选洗涤步骤的时长及时机。非自动化形式，如 ELISA，可能需要相对较长的样品和捕获试剂孵育时间（例如，约 2 小时），而自动化或半自动化形式（例如，ARCHITECT®,, Abbott Laboratories）可以具有相对较短的孵育时间（例如，对于 ARCHITECT® 大约 18 分钟）。类似地，非自动化形式，如 ELISA，可能需要将检测抗体（如偶联物试剂）孵育相对较长时间（例如，约 2 小时），而自动化或半自动化形式（例如，ARCHITECT®）可以具有相对较短的孵育时间（例如，对于 ARCHITECT® 大约 4 分钟）。

[0552] 从 Abbott Laboratories 可获得的其他平台包括但不限于 AxSYM®、IMx®

(见,例如,美国专利号 5,294,404)、PRISM®、EIA(珠)和 Quantum™ II 以及其他平台。另外,测定法、试剂盒和试剂盒组分可以以其他形式使用,例如,在电化学测定系统或其他手持式或即时 (point-of-care) 测定系统上。本公开例如适用于进行夹心免疫测定的商用 Abbott Point of Care(i-STAT®, Abbott Laboratories) 电化学免疫分析系统。一次性使用测试装置中的免疫传感器和它们的制造和操作方法例如在美国专利号 5,063,081、美国公开号 2003/0170881、美国公开号 2004/0018577、美国公开号 2005/0054078 和美国公开号 2006/0160164 中描述。

[0553] 特别地,就分析物测定法对于 I-STAT® 系统的适应而言,优选以下配置。用一对金电流测量工作电极和银 - 氯化银参比电极制造微加工的硅芯片。在工作电极之一上,带有固定的抗分析物单克隆 / 多克隆抗体(或其片段、其变体或其变体片段)或抗分析物 DVD-Ig(或其片段、其变体或其变体片段)的聚苯乙烯珠 (0.2mm 直径)粘附于电极上带图案的聚乙烯醇聚合物涂层。将这一芯片装配成具有适于免疫测定的射流形式的 I-STAT® 盒。在该盒的样品容纳室的一部分壁上,存在包含针对分析物的特异性结合伴体的层,所述特异性结合伴体是例如抗分析物单克隆 / 多克隆抗体(或可以与分析物结合的其片段、其变体或其变体片段)或抗分析物 DVD-Ig(或可以与分析物结合的其片段、其变体或其变体片段),可以可检测地标记其中任一种。在这个盒的流体袋内是包含磷酸对 - 氨基酚的含水试剂。

[0554] 在操作中,将疑似含有分析物的样品添加至测试盒的容纳腔,并将该盒插入 I-STAT® 阅读仪中。在分析物的特异性结合伴体溶解于样品中后,盒内的泵部件迫使样品进入含芯片的导管。在此将样品振荡以促进夹心的形成。在测定法的倒数第二个步骤中,迫使流体离开袋并且进入导管以将样品从芯片洗下并进入废物室。在测定法的最终步骤中,碱性磷酸酶标记与磷酸对 - 氨基酚反应以切下磷酸基团并且允许释放的对 - 氨基酚在工作电极处电化学氧化。基于测量的电流,阅读仪能够借助嵌入的算法和工厂确定的校正曲线计算样品中分析物的量。

[0555] 进一步不言而喻地,如本文所述的方法和试剂盒必然包括用于实施免疫测定的其他试剂和方法。例如,包括如本领域已知和 / 或可以轻易制备或优化以例如用于洗涤、用作偶联物稀释剂、微粒稀释剂和 / 或用作校准物稀释剂的各种缓冲液。示例性偶联物稀释剂是在某些试剂盒 (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois) 中使用并且含有 2-(N- 吗啉代)乙磺酸 (MES)、盐、蛋白质封闭剂、抗微生物剂和去垢剂的 ARCHITECT® 偶联物稀释剂。示例性校准物稀释剂是在某些试剂盒 (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois) 中使用的 ARCHITECT® 人校准物稀释剂,其包含含 MES 的缓冲液、其他盐、蛋白质封闭剂和抗微生物剂。另外,如美国系列号 12/650,241(美国公开号 2010/0167301 ;还见,PCT 公开号 WO 2010/078443) 中所述,使用与作为信号放大器的信号抗体连接的核酸序列可以获得改进的信号生成,例如,在 I-Stat 盒形式中。

[0556] 本领域技术人员将显而易见,对本文所述的本发明方法的其他合适修改和适应是明显的并且可以使用合适等同物进行而不脱离本文中公开的本发明或实施方案的范围。

[0557] 虽然现在详细描述了本发明,但通过参考以下实施例将更清楚地理解本发明,其中仅出于说明目的包括所述实施例并且不意在限制本发明。

[0558] 例证

[0559] 实施例 1 :从克隆 E26 产生亲和力成熟的人源化 IL-1β 抗体

[0560] 表 6 提供人源化小鼠 E26 抗体 (GlaxoSmithKline,PCT 公开号 WO 95/01997) 的 VH 和 VL 的氨基酸序列。各 VH 和 VL 序列的单个 CDR 的氨基酸残基以粗体显示。

[0561] 表 6. 人源化 E26 抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列

[0562]

SEQ ID NO:	**蛋白质区域**		**序列**
			123456789012345678901234567890
58	**VH E26**		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS **SYDMS**WVRQAPGKGLEWVA**YISSGGGGTYY PDTVKG**RFTISRDNSKNTLFLQMDSLRPED TGVYFCAR**GGVTKGYFDV**WGQGTPVTVSS
	VH E26 CDR-H1	SEQ-ID NO: 58 的残基 31-35	**SYDMS**
	VH E26 CDR-H2	SEQ-ID NO: 58 的残基 50-66	**YISSGGGGTYYPDTVKG**
	VH E26 CDR-H3	SEQ-ID NO: 58 的残基 99-108	**GGVTKGYFDV**
59	**VL E26**		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIH NYLT**WYQQTPGKAPKLLIY**NAKTLAD**GVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYC**QH FWSIPYT**FGQGTKLQIT
	VL E26 CDR-L1	SEQ-ID NO: 59 的残基 24-34	**RASGNIHNYLT**
	VL E26 CDR-L2	SEQ-ID NO: 59 的残基 50-56	**NAKTLAD**
	VL E26 CDR-L3	SEQ-ID NO: 59 的残基 89-97	**QHFWSIPYT**

[0563] 如下获得亲和力成熟的人源化小鼠 E26 抗体。构建一个在以下残基处含有有限诱变的轻链文库 :CDRL1 :30、31、32 ;CDRL2 :50、53、55、56 ;CDRL3 :92、93、94、96 和 97(Kabat 编号)。产生在 CDRH1 和 CDRH2 中的残基 31、33、50、52a、55、56、57、58 和 60(Kabat 编号) 处

或在 CDRH3 中的残基 95、96、97、98、99、100、100a、100b 和 102 处含有有限诱变的两个重链文库。这些重链文库还在残基 23(A/S)、24(A/S)、62(T/S)、84(P/A)、88(G/A)、91(F/Y) 和 108(P/L) 处含有双元多样化以允许在文库选择期间框架种系化 (germ-lining)。全部 3 个文库通过降低浓度的食蟹猴 (cyno) IL-1β 独立地选择。所有突变的 CDR 序列随后组合成仅在 VH CDR 中具有突变的一个文库和在全部 6 个 CDR 中具有突变的另一个文库。采用人 IL-1β 和 cyno IL-1β，使得这两个组合的文库经历更严格的选择条件，随后鉴定单个抗体并且将其表达为 IgG 蛋白用于进一步表征。

[0564] 表 7 提供了源自人源化 E26 的亲和力成熟的 IL-1β 抗体 VH 区的氨基酸序列的列表。各 VH 序列的单个 CDR 的氨基酸残基以粗体显示。

[0565] 表 7. 亲和力成熟的 E26VH 变体的氨基酸序列

[0566]

克隆	**SEQ ID NO:**	**序列** 12345678901234567890123456789012345678900
E26 #1	60	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTPVTVSS
E26 #11	61	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
E26 #35	62	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
E26 # 37	63	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
J318 #2	64	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKGR**FTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCAR**GGVTKGYFDV**WGQGTPVTVSS
J318 #12	65	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF

[0567]

		LQMDSLRPEDTGVYFCAR**GGVTKGYFDV**WGQGTPVTVSS
J318 #13	66	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCAR**GGVTKGYFDV**WGQGTPVTVSS
J348S2-10	67	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTPVTVSS
J348S2-85	68	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTLVTVSS
J348S2-1	69	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTPVTVSS
J348S2-37	70	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
J348S2-49	71	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTPVTVSS
J348S2-56	72	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTPVTVSS
J348S2-25	73	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
J348S2-45	74	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
J348S2-94	75	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS

[0568]

J348S2-34	76	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRVEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
J348S2-58	77	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
J348S2-61	78	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDL**WGQGTPVTVSS
J348S2-80	79	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYFCAR**GGVYKGYFDL**WGQGTPVTVSS
J348S2-96	80	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYFCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
J348S2-90	81	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTVSRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTPVTVSS
J348S2-21	82	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTPVTVSS
J348S2-39	83	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTPVTVSS
J348S2-53	84	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTPVTVSS
J348S2-74	85	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYFCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTPVTVSS
J348S2-30	86	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**RYDMS**WVRQA

[0569]

		PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTPVTVSS
J348S2-73	87	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDM**WGQGTPVTVSS
J348S2-12	88	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTLVTVSS
J348S2-92	89	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCASSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTLVTVSS
J348S2-14	90	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTLVTVSS
J348S2-33	91	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTLVTVSS
J348S2-2	92	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCVR**GGVYKGYFDQ**WGQGTLVTVSS
J348S2-65	93	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCVR**GGVYKGYFDQ**WGQGTLVTVSS
J348S2-20	94	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTLVTVSS
J348S2-54	95	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTLVTVGS
J348S2-13	96	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF

[0570]

		LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTLVTVSS
J348S2-17	97	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTLVTVSS
J348S2-44	98	EVQLVEGGGDVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTLVTVSS
J348S2-47	99	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTLVTVSS
J348S2-48	100	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTLVTVSS
J348S2-22	101	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTLVTVSS
J348S2-42	102	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTLVTVSS
J348S2-84	381	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTPVTVSS
gi10	103	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTPVTVSS
gi15	104	EVQLVESGGGVVQPGRGLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSRNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDY**WGQGTPVTVSS
gi68	105	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YVSHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDY**WGQGTPVTVSS

[0571]

gi80	106	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDY**WGQGTPVTVSS
gi5	107	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTPVTVSS
gi49	108	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi78	109	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLGCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi4	110	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi66	111	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMNSLRAEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi77	112	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi19	113	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTAKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi33	114	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYGMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi58	115	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSAGGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi79	116	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA

[0572]

		PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi37	117	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMG**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi9	118	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVHQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi1	119	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi2	120	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi38	121	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCAR**GGVYKGYFDQ**WGQGTPVTVSS
gi74	122	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYFCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi27	123	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**SYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISSGGGGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCAR**GGVTKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi64	124	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi85	125	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSL
gi46	126	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF

[0573]

		LQMDSLRAEDTAVYYCVR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi35	127	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi45	128	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSPRAEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi90	129	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi11	130	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi21	131	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**RVRLA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYHPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi59	132	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTLVTVSS
gi91	133	EVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YIGHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRNNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTLVTVSS
gi60	134	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTLVTVSS
gi36	135	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDL**WGQGTPVTVSS
gi12	136	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCASSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS

[0574]

gi55	137	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCASSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi13	138	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi17	139	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGPEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTPVTVSS
gi16	140	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGCFDV**WGQGTPVTVSS
gi39	141	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTAVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi24	142	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTGVYFCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTPVTVSS
gi67	143	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTPVTVSS
gi65	144	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi25	145	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDTVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi20	146	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**KYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
gi72	147	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA

[0575]

		PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTLVTVSS
gi84	148	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS**RYDMS**WVRQA PGKGLEWVA**YISHGGAGTYYPDSVKG**RFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS

[0576] 表 8 提供了源自 E26 的亲和力成熟的人源化 IL-1β 抗体的 VL 区氨基酸序列的列表。各个 VL 序列的单个 CDR 的氨基酸残基以粗体显示。在下表 8 中一些亲和力成熟的 VL 序列内见到的 N 端 D(Asp) 至 G(Gly) 的突变最可能是在文库构建期间进行的聚合酶链反应 (PCR) 过程中的非有意诱变的结果。当这些区域用于构建 IgG 分子时,可以除去 N 端 G 残基而无影响。

[0577] 表 8. 亲和力成熟的 E26VL 变体的氨基酸序列

[0578]

克隆	**SEQ ID NO:**	**序列** 12345678901234567890123456789012345678900
E26 #1	149	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYGWLA**WYQQTP GKAPKLLIY**QAKTLMD**GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWNIPAT**FGQGTKLQIT
E26 #37	150	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYTYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAD**GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWTLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-10	151	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYQYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAE**GVPSRFSGSSSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWKLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-84	152	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYQYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAE**GVPSRFSGSSSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWKLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-2	153	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYEYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAE**GVPSRFSGSSSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWKLPYT**FGQGTKLQIT

[0579]

J348S2-73	154	GIQMAQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYEYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAE**GVPSRFSGSSSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWKLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-13	155	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYTYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAE**GVPSRFSGSSSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWSLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-18	156	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYHYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**DAKTLAE**GVPSRFSGSSSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWSLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-24	157	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYHYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAE**GVPSRFSGSSSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWSLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-22	158	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYHYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAE**GVPSRFSGSCSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWSLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-12	159	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYNYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAD**GVPSRFSGSSSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWTLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-44	160	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYNYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAD**GVPSRFSGSSSGTDYTLTISSLQP EDIATYYC**QHFWTLPYI**FGQGTKLQIT
J348S2-37	161	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYTYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAD**GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWTLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-74	162	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYQYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAD**GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWTLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-57	163	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYNYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAD**GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWTLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-16	164	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYDYLT**WYQQTP

[0580]

		GKAPKLLIY**NAKTLAD**GVPSRFSGSCSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWTLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-33	165	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYDYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAD**GVPSRFSGSCSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWSLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-20	166	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYNYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAD**GVPSRFSGSCSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWKLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-15	167	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYKYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**DAKTLAD**GVPSRFSGSVSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWRLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-48	168	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYKYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**DAKTLAD**GVPSRFSGSSSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWRLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-32	169	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYHYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**DAKNLAD**GVPSRFSGSCSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWSLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-49	170	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYHYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**DAKTLAD**GVPSRFSGSSSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWSLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-78	171	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYQYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**DAKILAD**GVPSRFSGSSSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWKLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-96	172	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYHYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**DAKILAD**GVPSRFSGSSSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWKLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-1	173	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYGWLA**WYQQTP GKAPKLLIY**QAKTLMD**GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWNIPAT**FGQGTKLQIT
J348S2-25	174	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYTYLN**WYQQTP GKAPKLLIY**DAKTLAD**GVPSRFSGSSSGTDYTFTISSLQP

[0581]

		EDIATYYC**QHFWRLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-34	175	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYTYLN**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKELAE**GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWRLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-65	176	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYTYLN**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKSLAD**GVPSRFSGSCSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWRIPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-90	177	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYTYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**DAKTLAD**GVPSRFSGSSSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWKLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-56	178	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYNYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKNLAD**GVPSRFSGSVSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWRLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-61	179	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIWHYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**DAKTLAD**GVPSRFSGSSSGTDYTLTISSLQP EDIATYYC**QHFWRLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-80	180	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYHYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAS**GVPSRFSGSSSGTDYTLTISSLQP EDIATYYC**QHFWKLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-94	181	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYDYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKILAD**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQP EDIATYYC**QHFWMLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-14	182	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYTYLT**WYQQIP GKAPKLLIY**DAKTLAE**GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWKIPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-58	183	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYHYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAE**GVPSRFSGSCSGADYTFTISSLQP EDIATYYC**QQFWKIPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-95	184	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYNYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAE**GVPSRFSGSDSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWKLPYT**FGQGTKLQIT

[0582]

J348S2-42	185	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYNYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAA**GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWKLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-45	186	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYNYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAE**GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWKLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-17	187	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYNYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLEE**GVPSRFSGSSSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWTLPYT**FGQGTKLQIT
J348S2-53	188	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYGYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLEE**GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWTLPYN**FGQGTKLQIT
J348S2-47	189	GIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIYDYLT**WYQQTP GKAPKLLIY**NAKTLAE**GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC**QHFWTLPYT**FGQGTKLQIT

[0583] 可以比对上表中来自人源化 E26 的亲和力成熟的 IL-1β 抗体的 VH 和 VL 区的单个 CDR 的序列以提供共有 CDR 序列，如表 9 中的那些。

[0584] 表 9. 亲和力成熟的 VH 和 VL 序列的共有序列

[0585]

CDR 区	**序列识别符**	**共有序列**
CDR-H1	SEQ ID NO: 190	X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 **S Y D M S** **K** **R**
CDR-H2	SEQ ID NO: 191	X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17} **Y I S S G G G G T Y Y P D T V K G** **V H A S A**

[0586]

CDR -H3	SEQ ID NO: 192	X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} G G V T K G Y F D V Y C E L M Q Y
CDR -L1	SEQ ID NO: 193	X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11} R A S G N I H N Y L T Y G W A W T N Q E H D K
CDR -L2	SEQ ID NO: 194	X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 N A K T L A D Q N M E D I E S E A S
CDR -L3	SEQ ID NO: 195	X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 Q H F W S I P Y T Q N L A I T N K R M

[0587] 将表 10 中的序列转化成 IgG 用于进一步表征。克隆 E26.13 在分别称作 E26.13JM VH 和 E26.13JM VL 的可变重链区和可变轻链区的 J- 区中突变以除去非种系框架突变。单个 CDR 的氨基酸残基以粗体显示。

[0588] 表 10. 亲和力成熟的 E26VH 和 VL 变体的氨基酸序列

[0589]

SEQ ID NO:	蛋白质区域			序列
				123456789012345678901234567890
196	E26.1 VH			EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS **KYDMS**WVRQAPGKGLEWVA**YISHGGAGTYY** **PDSVKG**RFTISRDNSKNTLFLQMDSLRAED TGVYYCAR**GGVYKGYFDE**WGQGTPVTVSS
	E26.1 VH	CDR-H1	SEQ ID NO: 196 的残基 31-35	**KYDMS**
	E26.1 VH	CDR-H2	SEQ ID NO: 196 的残基 50-66	**YISHGGAGTYYPDSVKG**
	E26.1 VH	CDR-H3	SEQ ID NO: 196 的残基 99-108	**GGVYKGYFDE**
197	E26.1 VL			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIY** **GWLA**WYQQTPGKAPKLLIY**QAKTLMD**GVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYC**QH** **FWNIPAT**FGQGTKLQIT

[0590]

	E26.1 VL	**CDR-L1**	**SEQ ID NO: 197 的残基 24-34**	**RASGNIYGWLA**
	E26.1 VL	**CDR-L2**	**SEQ ID NO: 197 的残基 50-56**	**QAKTLMD**
	E26.1 VL	**CDR-L3**	**SEQ ID NO: 197 的残基 89-97**	**QHFWNIPAT**
198	**E26.2 VH**			EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFS **KYDMS**WVRQAPGKGLEWVA**YISHGGAGTYY** **PDSVKG**RFTISRDNSKNTLFLQMDSLRPED TGVYFCAR**GGVTKGYFDV**WGQGTPVTVSS
	E26.2 VH	**CDR-H1**	**SEQ ID NO: 198 的残基 31-35**	**KYDMS**
	E26.2 VH	**CDR-H2**	**SEQ ID NO: 198 的残基 50-66**	**YISHGGAGTYYPDSVKG**
	E26.2 VH	**CDR-H3**	**SEQ ID NO: 198 的残基 99-108**	**GGVTKGYFDV**

[0591]

199	**E26.2 VL**			与母本一样 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIH** **NYLT**WYQQTPGKAPKLLIY**NAKTLAD**GVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYC**QH** **FWSIPYT**FGQGTKLQIT
	E26.2 VL	**CDR-L1**	**SEQ ID NO: 199 的残基 24-34**	**RASGNIHNYLT**
	E26.2 VL	**CDR-L2**	**SEQ ID NO: 199 的残基 50-56**	**NAKTLAD**
	E26.2 VL	**CDR-L3**	**SEQ ID NO: 199 的残基 89-97**	**QHFWSIPYT**
200	**E26.11 VH**			EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS **RYDMS**WVRQAPGKGLEWVA**YISHGGAGTYY** **PDSVKG**RFTISRDNSKNTLFLQMDSLRPED TAVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
	E26.11 VH	**CDR-H1**	**SEQ ID NO: 200 的残基 31-35**	**RYDMS**
	E26.11 VH	**CDR-H2**	**SEQ ID NO: 200 的残基 50-66**	**YISHGGAGTYYPDSVKG**

[0592]

	E26.11 VH	**CDR-H3**	**SEQ ID NO: 200 的残基 99-108**	**GGVYKGYFDV**
201	**E26.11 VL**			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIH NYLT**WYQQTPGKAPKLLIY**NAKTLAD**GVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYC**QH FWSIPYT**FGQGTKLQIT
	E26.11 VL	**CDR-L1**	**SEQ ID NO: 201 的残基 24-34**	**RASGNIHNYLT**
	E26.11 VL	**CDR-L2**	**SEQ ID NO: 201 的残基 50-56**	**NAKTLAD**
	E26.11 VL	**CDR-L3**	**SEQ ID NO: 201 的残基 89-97**	**QHFWSIPYT**
202	**E26.12 VH**			EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFS **RYDMS**WVRQAPGKGLEWVA**YISHGGAGTYY PDSVKG**RFTISRDNSKNTLFLQMDSLRPED TGVYFCAR**GGVTKGYFDV**WGQGTPVTVSS
	E26.12 VH	**CDR-H1**	**SEQ ID NO: 202 的残基 31-35**	**RYDMS**

[0593]

	E26.12 VH	**CDR-H2**	**SEQ ID NO: 202 的残基 50-66**	**YISHGGAGTYYPDSVKG**
	E26.12 VH	**CDR-H3**	**SEQ ID NO: 202 的残基 99-108**	**GGVTKGYFDV**
203	**E26.12 VL**			与母本一样 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIH** **NYLT**WYQQTPGKAPKLLIY**NAKTLAD**GVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYC**QH** **FWSIPYT**FGQGTKLQIT
	E26.12 VL	**CDR-L1**	**SEQ ID NO: 203 的残基 24-34**	**RASGNIHNYLT**
	E26.12 VL	**CDR-L2**	**SEQ ID NO: 203 的残基 50-56**	**NAKTLAD**
	E26.12 VL	**CDR-L3**	**SEQ ID NO: 203 的残基 89-97**	**QHFWSIPYT**
204	**E26.13 VH**			EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS **RYDMS**WVRQAPGKGLEWVA**YISHGGAGTYY** **PDSVKG**RFTISRDNSKNTLFLQMDSLRPED TGVYFCAR**GGVTKGYFDV**WGQGTPVTVSS

[0594]

	E26.13 VH	**CDR-H1**	**SEQ ID NO: 04 的残基 31-35**	**RYDMS**
	E26.13 VH	**CDR-H2**	**SEQ ID NO: 204 的残基 50-66**	**YISHGGAGTYYPDSVKG**
	E26.13 VH	**CDR-H3**	**SEQ ID NO: 204 的残基 99-108**	**GGVTKGYFDV**
205	**E26.13 VL**			与母本一样 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIH** **NYLT**WYQQTPGKAPKLLIY**NAKTLAD**GVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYC**QH** **FWSIPYT**FGQGTKLQIT
	E26.13 VL	**CDR-L1**	**SEQ ID NO: 205 的残基 24-34**	**RASGNIHNYLT**
	E26.13 VL	**CDR-L2**	**SEQ ID NO: 205 的残基 50-56**	**NAKTLAD**
	E26.13 VL	**CDR-L3**	**SEQ ID NO: 205 的残基 89-97**	**QHFWSIPYT**

[0595]

206	E26.13 JM VH			EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS **RYDMS**WVRQAPGKGLEWVA**YISHGGAGTYY PDSVKG**RFTISRDNSKNTLFLQMDSLRPED TGVYFCAR**GGVTKGYFDV**WGQGTTVTVSS
	E26.13 JM VH	CDR-H1	SEQ ID NO: 206 的残基 31-35	**RYDMS**
	E26.13 JM VH	CDR-H2	SEQ ID NO: 206 的残基 50-66	**YISHGGAGTYYPDSVKG**
	E26.13 JM VH	CDR-H3	SEQ ID NO: 206 的残基 99-108	**GGVTKGYFDV**
207	E26.13 JM VL			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIH NYLT**WYQQTPGKAPKLLIY**NAKTLAD**GVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYC**QH FWSIPYT**FGQGTKLEIKR
	E26.13 JM VL	CDR-L1	SEQ ID NO: 207 的残基 24-34	**RASGNIHNYLT**
	E26.13 JM VL	CDR-L2	EQ ID NO: 207 的残基 50-56	**NAKTLAD**

[0596]

	E26.13 JM VL	**CDR-L3**	**SEQ ID NO: 207 的残基 89-97**	**QHFWSIPYT**
208	**E26.35 VH**			EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS **RYDMS**WVRQAPGKGLEWVA**YISHGGAGTYY PDSVKG**RFTISRDNSKNTLFLQMDSLRAED TAVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
	E26.35 VH	**CDR-H1**	**SEQ ID NO: 208 的残基 31-35**	**RYDMS**
	E26.35 VH	**CDR-H2**	**SEQ ID NO: 208 的残基 50-66**	**YISHGGAGTYYPDSVKG**
	E26.35 VH	**CDR-H3**	**SEQ ID NO: 208 的残基 99-108**	**GGVYKGYFDV**
209	**E26.35 VL**			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIH NYLT**WYQQTPGKAPKLLIY**NAKTLAD**GVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYC**QH FWSIPYT**FGQGTKLQIT
	E26.35 VL	**CDR-L1**	**SEQ ID NO: 209 的残基 24-34**	**RASGNIHNYLT**

[0597]

	E26.35 VL	**CDR-L2**	**SEQ ID NO: 209 的残基 50-56**	**NAKTLAD**
	E26.35 VL	**CDR-L3**	**SEQ ID NO: 209 的残基 89-97**	**QHFWSIPYT**
210	**E26.37 VH**			EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFIFS **KYDMS**WVRQAPGKGLEWVA**YISHGGAGTYY PDSVKG**RFTISRDNSKNTLFLQMDSLRPED TGVYYCAR**GGVYKGYFDV**WGQGTPVTVSS
	E26.37 VH	**CDR-H1**	**SEQ ID NO: 210 的残基 31-35**	**KYDMS**
	E26.37 VH	**CDR-H2**	**SEQ ID NO: 210 的残基 50-66**	**YISHGGAGTYYPDSVKG**
	E26.37 VH	**CDR-H3**	**SEQ ID NO: 210 的残基 99-108**	**GGVYKGYFDV**
211	**E26.37 VL**			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASGNIY TYLT**WYQQTPGKAPKLLIY**NAKTLAD**GVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYC**QH FWTLPYT**FGQGTKLQIT

[0598]

	E26.37 VL	**CDR-L1**	**SEQ ID NO: 211 的残基 24-34**	**RASGNIYTYLT**
	E26.37 VL	**CDR-L2**	**SEQ ID NO: 211 的残基 50-56**	**NAKTLAD**
	E26.37 VL	**CDR-L3**	**SEQ ID NO: 211 的残基 89-97**	**QHFWTLPYT**

[0599] 实施例 2 :IL-1β 抗体的功能性表征

[0600] 实施例 2.1 :IL-1β 酶联免疫吸附分析方案

[0601] 为了确定抗 IL-1βmAb 是否与人 IL-1β 结合，ELISA 平板 (Nunc，MaxiSorp，Rochester，New York) 用在 Pierce 包被缓冲液 (Jackson Immunoresearch，West Grove，Pennsylvania) 中以 2μg/ml 稀释的抗人 Fc 抗体在 4℃下孵育过夜。平板在洗涤缓冲液 (含有 0.05% Tween20 的 PBS) 中洗涤 5 次并且在 25℃下用每孔 200μl superblock 封闭缓冲液 (Thermo scientific，No.37515) 封闭 1 小时。通过平板放液除去封闭缓冲液，并且将含有 10% Superblock，0.5% Tween-20 的 PBS 中的 2μg/ml 的各种抗体以 100μl/ 孔添加至孔中并且在 25℃下孵育 1 小时。孔在 1XPBST 中洗涤 5 次，并且 1μg/ml 生物素化的抗原以 1 ： 6 连续稀释 (在含有 10% Superblock，0.05% Tween-20 的 PBS 中 μg 至 pg 范围) 滴定。将抗原的各稀释物随后添加至平板并且在 25℃下孵育 1 小时。孔在 1XPBST 中洗涤 5 次并且在 25℃下与多聚 HRP 链霉亲和素 (KPL No.474-3000，Gaithersburg，Maryland) 孵育 1 小时。孔在 1XPBST 中洗涤 5 次，并且每孔添加 100μl ULTRA-TMB ELISA(Pierce，Rockford，Illinois)。在显色后，反应用 1N HCL 终止并且在 450nM 处测量吸光度。结果在表 11 中显示和数值指示抗 IL-1β 抗体与人 IL-1β 的结合。

[0602] 表 11. 通过 ELISA 确定的抗体与人 IL-1β 的结合

[0603]

MAb	hIL-1βELISA 中的 EC50(pM)
E26.1	12.9
E26.2	567
E26.11	14
E26.12	306

E26.13	7.2
E26.13JM	7.4
E26.35	10.4
E26.37	17.7

[0604] 实施例 2.2 :IL-1β 抗体的中和效力

[0605] 为检验本发明中抗人 IL-1β 抗体的功能活性,在测量抗体抑制 IL-1β 活性的能力的 MRC-5 分析中使用这些抗体。MRC-5 细胞系是应答人 IL-1β 以剂量依赖性方式产生 IL-8 的人肺成纤维细胞系。这个细胞系还应答于食蟹猴 IL-1β (cyno IL-1β) 而产生 IL-8。MRC-5 细胞最初从 ATCC 获得并且在 10% FBS 完全 MEM 中传代培养并且在 37℃下 5% CO_2 培养箱中生长。为确定抗体针对 IL-1β 的中和效力,将抗体 (50μl) 添加至 96 孔板 (1E-7 至 1E-15M 终浓度范围) 并且在 37℃、5% CO_2 下与 50μl 人或 cyno IL-1β (终浓度 50pg/mL) 预孵育 1 小时。随后将抗原抗体复合物 (100μL) 添加至 MRC-5 细胞 (事先以 1E5/ml 的浓度按照 100μl 细胞 / 孔接种 24 小时)。分析平板在 37℃下 5% CO_2 培养箱中孵育过夜。通过抗体抑制 IL-8 产生的能力确定抗体效力。通过基于化学发光的测定法测量人 IL-8 产生。表 12 总结针对人和 cyno IL-1β 的抗体效力。

[0606] 表 12. IL-1β 抗体的中和效力

[0607]

	效力(pM)	
抗 IL-1β mAb	**hIL-1β (pM)**	**Cyno IL-1β (pM)**
E26.1	9.7	ND
E26.13	15.7	8.4
E26.35	7.2	3.0
E26.37	2.2	ND

[0608] ND :未测定

[0609] 实施例 2.3 :通过表面等离子体共振的 IL-1β 抗体亲和力测量

[0610] BIACORE 测定法 (Biacore, Inc, Piscataway, New Jersey) 以结合 (on)- 速率常数和解离 (off)- 速率常数的动力学测量值确定抗体的亲和力。在 25℃下使用流动的 HBS-EP(10mM HEPES[pH7.4]、150mM NaCl、3mM EDTA 和 0.005% 表面活性剂 P20),通过基于表面等离子体共振的测量用 Biacore® 3000 仪器 (Biacore® AB, Uppsala, Sweden) 确定抗体与重组纯化人 IL-1β 和食蟹猴 IL-1β 的结合。全部化学制剂均从 Biacore® AB(Uppsala, Sweden) 获得或另外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和方法按 25μg/ml,将在 10mM 乙酸钠 (pH4.5) 中稀释的大约 5000RU 的山羊抗小鼠 IgG, (Fcγ),片段特异性多克隆抗体 (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, Illinois) 直接固定在 CM5 研究级生物传感器芯片上。生物传感器表面上的未反应部分用

乙醇胺封闭。使用流动池 2 和 4 中修饰的羧甲基葡聚糖表面作为反应表面。使用流动池 1 和 3 中没有山羊抗小鼠 IgG 的未修饰的羧甲基葡聚糖表面作为参比表面。对于动力学分析，用 Biaevaluation4.0.1 软件，将源自 1 ： 1Langmuir 结合模型的速率公式同时与全部 8 次注射的结合相和解离相拟合（使用总体拟合分析）。纯化的抗体在 HEPES 缓冲盐水中稀释用于整个山羊抗人 IgG 特异性反应表面的捕获。在反应基质上按 5μl/ 分钟的流速注射待捕获的抗体作为配体 (25μg/ml)。在连续流速 25μl/ 分钟下测定结合和解离速率常数 k_{on}（单位 $M^{-1}s^{-1}$）和 k_{off}（单位 s^{-1}）。通过在 10-200nM 范围的 10 个不同抗原浓度进行动力学结合测量来得出速率常数。随后通过以下公式从动力学速率常数计算抗体和靶抗原之间反应的平衡解离常数（单位 M）：$K_D = k_{off}/k_{on}$。结合记录为时间和计算动力学速率常数的函数。在这个分析中，可以测量快至 $10^6M^{-1}s^{-1}$ 的结合速率和慢至 $10^{-6}s^{-1}$ 的解离速率。表 13 显示人抗 IL-1β 抗体的亲和力测量值。

[0611] 表 13. 通过 Biacore 确定的抗体对人和 Cyno IL-1β 的亲和力

[0612]

	人 IL-1β	Cyno IL-1β
E26.2(M)	$5.28x10^{-11}$	ND
Kon(1/Ms)	$8.95x10^{5}$	ND
Koff(1/s)	$4.72x10^{-5}$	ND
E26.12(M)	$7.86x10^{-11}$	ND
Kon(1/Ms)	$9.33x10^{5}$	ND

[0613]

Koff(1/s)	$7.37x10^{-5}$	ND
E26.13(M)	$4.45x10^{-11}$	$1.46x10^{-11}$
Kon(1/Ms)	$9.5x10^{5}$	$1.23x10^{6}$
Koff(1/s)	$4.23x10^{-5}$	$1.79x10^{-5}$
E26.35(M)	$2.39x10^{-11}$	$1.4x10^{-11}$
Kon(1/Ms)	$1.02x10^{6}$	$9.21x10^{5}$
Koff(1/s)	$2.50x10^{-5}$	$1.29x10^{-5}$

[0614] ND：未测定。

[0615] 实施例 3：IL-1α/βDVD-Ig™ 分子的产生

[0616] 实施例 3.1：IL-1α/βDVD-Ig DNA 构建体的构建

[0617] 通过重叠 PCR 扩增，采用间插性接头 DNA 序列将抗 IL-1α 抗体（“X3”；见，PCT 公

开号 WO 95/14780) 可变结构域与多种 IL-1β 抗体可变结构域组合成 DVD-Ig 形式 (Wu 等人,Nature Biotechnol.,25 :1290-1297(2007) ;PCT 公开号 WO 2007/024715 A2)。X3 也在可变重链和轻链区的 J- 区 (分别称作 X3JM VH 和 X3JM VL) 中突变以除去非种系框架突变。将扩增的 PCR 产物亚克隆至适于在 HEK293 细胞中瞬时表达的表达载体中,并且在 DVD-Ig 表达之前通过测序确认开放阅读框区域。

[0618] 实施例 3.2 :IL-1α / β DVD-Ig 结合蛋白的表达和产生

[0619] 在 DNA 序列确认后,将全部 DVD-Ig DNA 构建体在大肠杆菌中扩增,并且使用 Qiagen Hispeed Maxi Prep(目录号 12662,QIAGEN) 纯化 DNA。通过将 2 ∶ 1 比率的 PEI 和 DNA 与 0.2μg/ml 重链 DNA 和 0.3μg/ml 轻链 DNA 混合,将 DVD-Ig DNA 转染至对数期 293E 细胞中 (0.5×10^6/ml,存活力 > 95%)。DNA :PEI 复合物在室温下在 TC 罩内形成,持续 15 分钟,随后添加至 293E 细胞中。24 小时后,将 0.5% TN1 添加至 293E 细胞。在第 5 日,收集上清液用于人 IgG1 滴定测量。在第 7 日收获细胞上清液并且经 0.2μM PES 滤器过滤。上清液使用蛋白 A 琼脂糖亲和层析根据制造商的说明进行纯化。通过 0.1M 甘氨酸 (pH2.99) 从柱中洗脱纯化的 DVD-Ig 并且将其立即透析入 15mM 组氨酸缓冲液 (pH6.0) 中。通过 A280 对结合蛋白定量并且通过质谱法和 SEC 进行分析。

[0620] 实施例 3.3 :IL-1α / β DVD-Ig 构建体的序列

[0621] 确定了能够结合人 IL-1β 和人 IL-1α 的 DVD-Ig 蛋白的重链和轻链的氨基酸序列。下表 14 中显示 IL-1α / β DVD-Ig 结合蛋白的可变重链 (VH)、可变轻链 (VL)、恒定轻链 (CL) 和恒定重链 (CH) 的氨基酸序列。在表 14 中,E26.13VL 和 E26.35VL 区的氨基酸序列分别命名为 SEQ ID NO :238 和 SEQ ID NO :239 而不是先前在表 10 中显示的 SEQ ID NO :205 和 SEQ ID NO :209,以说明包含 C 端精氨酸 (R) 残基。抗体工程领域的技术人员理解,这一 C 端精氨酸残基是在 IgG 分子中 VL 区和 CLκ 区接合处的氨基酸残基并且有时包括在 CL 区或如下表 14 中那样在 VL 区中。

[0622] 表 14. IL-1α / β DVD-Ig 结合蛋白的可变区和恒定区的序列

[0623]

蛋白质 蛋白质区域	序列识别符	序列 12345678901234567890
E26.13-SS-X3 DVD-Ig 重链可变	**SEQ ID NO: 212**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQGTPVTVSSA STKGPQVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCTASGFTFSMFGVH WVRQAPGKGLEWVAAVSYDG SNKYYAESVKGRFTISRDNS KNILFLQMDSLRLEDTAVYY CARGRPKVVIPAPLAHWGQG TLVTFSS
E26.13 VH	**SEQ ID NO: 204**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQGTPVTVSS
接头	**SEQ ID NO: 33**	ASTKGP

[0624]

X3 VH	**SEQ ID NO: 213**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCTASGFTFSMFGVHWVRQA PGKGLEWVAAVSYDGSNKYY AESVKGRFTISRDNSKNILF LQMDSLRLEDTAVYYCARGR PKVVIPAPLAHWGQGTLVTF SS
CH	**SEQ ID NO: 214**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
E26.13-SS-X3 DVD-Ig 轻链可变	**SEQ ID NO: 215**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITRTVAAPDIQMTQS PSSVSASVGDRVTITCRASQ

[0625]

		GISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYEASNLETGVPSRFSGSGS GSDFTLTISSLQPEDFATYY CQQTSSFLLSFGGGTKVEHK R
E26.13 VL	**SEQ ID NO: 238**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITR
接头	**SEQ ID NO: 35**	TVAAP
X3 VL	**SEQ ID NO: 216**	DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISSLQP EDFATYYCQQTSSFLLSFGG GTKVEHKR
CL	**SEQ ID NO: 5**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
E26.13-LL-X3 DVD-Ig 重链可变	**SEQ ID NO: 217**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQGTPVTVSSA STKGPSVFPLAPQVQLVESG

[0626]

		GGVVQPGRSLRLSCTASGFT FSMFGVHWVRQAPGKGLEWV AAVSYDGSNKYYAESVKGRF TISRDNSKNILFLQMDSLRL EDTAVYYCARGRPKVVIPAP LAHWGQGTLVTFSS
E26.13 VH	**SEQ ID NO: 204**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQGTPVTVSS
接头	**SEQ ID NO: 34**	ASTKGPSVFPLAP
X3 VH	**SEQ ID NO: 213**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCTASGFTFSMFGVHWVRQA PGKGLEWVAAVSYDGSNKYY AESVKGRFTISRDNSKNILF LQMDSLRLEDTAVYYCARGR PKVVIPAPLAHWGQGTLVTF SS
CH	**SEQ ID NO: 214**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS

[0627]

		KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
E26.13-LL-X3 DVD-Ig 轻链可变	**SEQ ID NO: 218**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITRTVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISSLQP EDFATYYCQQTSSFLLSFGG GTKVEHKR
E26.13 VL	**SEQ ID NO: 238**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITR
接头	**SEQ ID NO: 36**	TVAAPSVFIFPP
X3 VL	**SEQ ID NO: 216**	DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISSLQP EDFATYYCQQTSSFLLSFGG GTKVEHKR

[0628]

CL	**SEQ ID NO: 5**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
X3-SS-E26.13 DVD-Ig 重链可变	**SEQ ID NO: 219**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCTASGFTFSMFGVHWVRQA PGKGLEWVAAVSYDGSNKYY AESVKGRFTISRDNSKNILF LQMDSLRLEDTAVYYCARGR PKVVIPAPLAHWGQGTLVTF SSASTKGPEVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCSASGFIFSRY DMSWVRQAPGKGLEWVAYIS HGGAGTYYPDSVKGRFTISR DNSKNTLFLQMDSLRPEDTG VYFCARGGVTKGYFDVWGQG TPVTVSS
X3 VH	**SEQ ID NO: 213**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCTASGFTFSMFGVHWVRQA PGKGLEWVAAVSYDGSNKYY AESVKGRFTISRDNSKNILF LQMDSLRLEDTAVYYCARGR PKVVIPAPLAHWGQGTLVTF SS
接头	**SEQ ID NO: 33**	ASTKGP
E26.13 VH	**SEQ ID NO: 204**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNSKNTLF

[0629]

		LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQGTPVTVSS
CH	**SEQ ID NO: 214**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
X3-SS- E26.13 DVD-Ig 轻链可变	**SEQ ID NO: 220**	DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISSLQP EDFATYYCQQTSSFLLSFGG GTKVEHKRTVAAPDIQMTQS PSSLSASVGDRVTITCRASG NIHNYLTWYQQTPGKAPKLL IYNAKTLADGVPSRFSGSGS GTDYTFTISSLQPEDIATYY CQHFWSIPYTFGQGTKLQIT R

[0630]

X3 VL	**SEQ ID NO: 216**	DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISSLQP EDFATYYCQQTSSFLLSFGG GTKVEHKR
接头	**SEQ ID NO: 35**	TVAAP
E26.13 VL	**SEQ ID NO: 238**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITR
CL	**SEQ ID NO: 5**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
X3-LL- E26.13 DVD-Ig 重链可变	**SEQ ID NO: 221**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCTASGFTFSMFGVHWVRQA PGKGLEWVAAVSYDGSNKYY AESVKGRFTISRDNSKNILF LQMDSLRLEDTAVYYCARGR PKVVIPAPLAHWGQGTLVTF SSASTKGPSVFPLAPEVQLV ESGGGVVQPGRSLRLSCSAS GFIFSRYDMSWVRQAPGKGL EWVAYISHGGAGTYYPDSVK GRFTISRDNSKNTLFLQMDS LRPEDTGVYFCARGGVTKGY

[0631]

		FDVWGQGTPVTVSS
X3 VH	**SEQ ID NO: 213**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCTASGFTFSMFGVHWVRQA PGKGLEWVAAVSYDGSNKYY AESVKGRFTISRDNSKNILF LQMDSLRLEDTAVYYCARGR PKVVIPAPLAHWGQGTLVTF SS
接头	**SEQ ID NO: 34**	ASTKGPSVFPLAP
E26.13 VH	**SEQ ID NO: 204**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQGTPVTVSS
CH	**SEQ ID NO: 214**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT

[0632]

		QKSLSLSPGK
X3-LL- E26.13 DVD-Ig 轻链可变	**SEQ ID NO: 222**	DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISSLQP EDFATYYCQQTSSFLLSFGG GTKVEHKRTVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITR
X3 VL	**SEQ ID NO: 216**	DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISSLQP EDFATYYCQQTSSFLLSFGG GTKVEHKR
接头	**SEQ ID NO: 36**	TVAAPSVFIFPP
E26.13 VL	**SEQ ID NO: 238**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITR
CL	**SEQ ID NO: 5**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS

[0633]

		FNRGEC
E26.35-SS-X3 JM DVD-Ig 重链可变	**SEQ ID NO: 226**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCARGG VYKGYFDVWGQGTPVTVSSA STKGPQVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCTASGFTFSMFGVH WVRQAPGKGLEWVAAVSYDG SNKYYAESVKGRFTISRDNS KNILFLQMDSLRLEDTAVYY CARGRPKVVIPAPLAHWGQG TLVTVSS
E26.35 VH	**SEQ ID NO: 208**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCARGG VYKGYFDVWGQGTPVTVSS
接头	**SEQ ID NO: 33**	ASTKGP
X3 JM VH	**SEQ ID NO: 227**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCTASGFTFSMFGVHWVRQA PGKGLEWVAAVSYDGSNKYY AESVKGRFTISRDNSKNILF LQMDSLRLEDTAVYYCARGR PKVVIPAPLAHWGQGTLVTV SS

[0634]

CH	**SEQ ID NO: 214**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
E26.35-SS-X3 JM DVD-Ig 轻链可变	**SEQ ID NO: 228**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITRTVAAPDIQMTQS PSSVSASVGDRVTITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYEASNLETGVPSRFSGSGS GSDFTLTISSLQPEDFATYY CQQTSSFLLSFGGGTKVEIK R
E26.35 VL	**SEQ ID NO: 239**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP

[0635]

		GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITR
接头	**SEQ ID NO: 35**	TVAAP
X3 JM VL	**SEQ ID NO: 229**	DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISSLQP EDFATYYCQQTSSFLLSFGG GTKVEIKR
CL	**SEQ ID NO: 5**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
E26.13 JM-SS-X3 DVD-Ig 重链可变	**SEQ ID NO: 230**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQGTTVTVSSA STKGPQVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCTASGFTFSMFGVH WVRQAPGKGLEWVAAVSYDG SNKYYAESVKGRFTISRDNS KNILFLQMDSLRLEDTAVYY CARGRPKVVIPAPLAHWGQG TLVTFSS
E26.13 JM VH	**SEQ ID NO: 206**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL

[0636]

		SCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQGTTVTVSS
接头	**SEQ ID NO: 33**	ASTKGP
X3 VH	**SEQ ID NO: 213**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCTASGFTFSMFGVHWVRQA PGKGLEWVAAVSYDGSNKYY AESVKGRFTISRDNSKNILF LQMDSLRLEDTAVYYCARGR PKVVIPAPLAHWGQGTLVTF SS
CH	**SEQ ID NO: 214**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
E26.13	**SEQ ID NO: 231**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT

[0637]

JM-SS-X3 DVD-Ig 轻链可变		ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLEIKRTVAAPDIQMTQS PSSVSASVGDRVTITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYEASNLETGVPSRFSGSGS GSDFTLTISSLQPEDFATYY CQQTSSFLLSFGGGTKVEHK R
E26.13 JM VL	**SEQ ID NO: 207**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLEIKR
接头	**SEQ ID NO: 35**	TVAAP
X3 VL	**SEQ ID NO: 216**	DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISSLQP EDFATYYCQQTSSFLLSFGG GTKVEHKR
CL	**SEQ ID NO: 5**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
E26.35-SS-X3	**SEQ ID NO: 232**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL

[0638]

DVD-Ig 重链可变		SCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCARGG VYKGYFDVWGQGTPVTVSSA STKGPQVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCTASGFTFSMFGVH WVRQAPGKGLEWVAAVSYDG SNKYYAESVKGRFTISRDNS KNILFLQMDSLRLEDTAVYY CARGRPKVVIPAPLAHWGQG TLVTFSS
E26.35 VH	**SEQ ID NO: 208**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNSKNTLF LQMDSLRAEDTAVYYCARGG VYKGYFDVWGQGTPVTVSS
接头	**SEQ ID NO: 33**	ASTKGP
X3 VH	**SEQ ID NO: 213**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCTASGFTFSMFGVHWVRQA PGKGLEWVAAVSYDGSNKYY AESVKGRFTISRDNSKNILF LQMDSLRLEDTAVYYCARGR PKVVIPAPLAHWGQGTLVTF SS
CH	**SEQ ID NO: 214**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP

[0639]

		KSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
E26.35-SS-X3 DVD-Ig 轻链可变	**SEQ ID NO: 233**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITRTVAAPDIQMTQS PSSVSASVGDRVTITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYEASNLETGVPSRFSGSGS GSDFTLTISSLQPEDFATYY CQQTSSFLLSFGGGTKVEHK R
E26.35 VL	**SEQ ID NO: 239**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITR
接头	**SEQ ID NO: 35**	TVAAP

[0640]

X3 VL	**SEQ ID NO: 216**	DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISSLQP EDFATYYCQQTSSFLLSFGG GTKVEHKR
CL	**SEQ ID NO: 5**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
E26.13-SS-X3 JM DVD-Ig 重链可变	**SEQ ID NO: 234**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQGTPVTVSSA STKGPQVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCTASGFTFSMFGVH WVRQAPGKGLEWVAAVSYDG SNKYYAESVKGRFTISRDNS KNILFLQMDSLRLEDTAVYY CARGRPKVVIPAPLAHWGQG TLVTVSS
E26.13 VH	**SEQ ID NO: 204**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQGTPVTVSS

[0641]

接头	**SEQ ID NO: 33**	ASTKGP
X3 JM VH	**SEQ ID NO: 227**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCTASGFTFSMFGVHWVRQA PGKGLEWVAAVSYDGSNKYY AESVKGRFTISRDNSKNILF LQMDSLRLEDTAVYYCARGR PKVVIPAPLAHWGQGTLVTV SS
CH	**SEQ ID NO: 214**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
E26.13-SS-X3 JM 抗-IL-1α/β DVD-Ig 轻链可变	**SEQ ID NO: 235**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITRTVAAPDIQMTQS

[0642]

		PSSVSASVGDRVTITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYEASNLETGVPSRFSGSGS GSDFTLTISSLQPEDFATYY CQQTSSFLLSFGGGTKVEIK R
E26.13 VL	**SEQ ID NO: 238**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLQITR
接头	**SEQ ID NO: 35**	TVAAP
X3 JM VL	**SEQ ID NO: 229**	DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISSLQP EDFATYYCQQTSSFLLSFGG GTKVEIKR
CL	**SEQ ID NO: 5**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
E26.13 JM-LL-X3 DVD-Ig 重链可变	**SEQ ID NO: 236**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQGTTVTVSSA

[0643]

		STKGPSVFPLAPQVQLVESG GGVVQPGRSLRLSCTASGFT FSMFGVHWVRQAPGKGLEWV AAVSYDGSNKYYAESVKGRF TISRDNSKNILFLQMDSLRL EDTAVYYCARGRPKVVIPAP LAHWGQGTLVTFSS
E26.13 JM VH	**SEQ ID NO: 206**	EVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCSASGFIFSRYDMSWVRQA PGKGLEWVAYISHGGAGTYY PDSVKGRFTISRDNSKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCARGG VTKGYFDVWGQGTTVTVSS
接头	**SEQ ID NO: 34**	ASTKGPSVFPLAP
X3 VH	**SEQ ID NO: 213**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCTASGFTFSMFGVHWVRQA PGKGLEWVAAVSYDGSNKYY AESVKGRFTISRDNSKNILF LQMDSLRLEDTAVYYCARGR PKVVIPAPLAHWGQGTLVTF SS
CH	**SEQ ID NO: 214**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK

[0644]

		EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
E26.13 JM-LL-X3 DVD-Ig 轻链可变	**SEQ ID NO: 237**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISSLQP EDFATYYCQQTSSFLLSFGG GTKVEHKR
E26.13 JM VL	**SEQ ID NO: 207**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASGNIHNYLTWYQQTP GKAPKLLIYNAKTLADGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYCQHFWSIPYTFGQ GTKLEIKR
接头	**SEQ ID NO: 36**	TVAAPSVFIFPP
X3 VL	**SEQ ID NO: 216**	DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYEASNLETGVPS RFSGSGSGSDFTLTISSLQP EDFATYYCQQTSSFLLSFGG

[0645]

		GTKVEHKR
CL	**SEQ ID NO: 5**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

[0646] 接头序列显示为加下划线的残基。

[0647] 实施例 4 :IL-1α/βDVD-Ig 蛋白的功能表征

[0648] 实施例 4.1 :IL-1α/β 酶联免疫吸附分析方案

[0649] 通过 ELISA(上文实施例 2.1 描述的分析) 评估 IL-1β/αDVD-Ig 结合蛋白对 IL-1β 和 IL-1α 的结合。表 15 中显示结果。

[0650] 表 15. 通过 ELISA 确定的 IL-1α/βDVD-Ig 蛋白与人 IL-1α 或 IL-1β 的结合

[0651]

MAb	**hIL-1β ELISA 中的 EC50 (pM)**	**hIL-1α ELISA 中的 EC50 (pM)**
E26.13-LL-X3	8.1	5.8
E26.13-SS-X3	7.5	6.4
E26.13-SS-X3 JM	6.9	4.3
E26.35-SS-X3	8	6.2
E26.35-SS-X3 JM	6.3	4.0
X3-SS-E26.13	70	4.5

[0652] 实施例 4.2 :IL-1α/β 生物分析和中和分析

[0653] MRC5 细胞以 100μL 体积中每孔 1.5-2×10^4 个细胞接种并且在 37℃下 5% CO_2 中孵育过夜。在完全 MEM 培养基中制备 DVD-Ig 的 20μg/mL 工作母液 (4 倍浓缩)。在 Marsh 稀释平板中的完全 MEM 中进行 8 点系列稀释 (5μg/mL-0.0003μg/mL)。65μL/ 孔的各抗体稀释物一式四份添加 96 孔 V 形底 (Costar No.3894) 平板,并且添加 65μL 的 IL-1α 或 IL-1β 的 200pg/mL 溶液或 65μL 混合溶液 (其含 50pg/mL 的 IL-1α 和 IL-1β 溶液)。对照孔接收 65μL 的 200pg/mL IL-1α 或 IL-1β 或者 50pg/mL 混合 IL-1α/β (4x 浓缩) 加 65μL MEM 培养基,并且培养基对照孔接收 130μL 培养基。在 1 小时孵育后,将 100μL DVD-Ig/Ag 混合物添加至 MRC5 细胞。全部孔体积均等于 200μL。全部平板试剂随后进行 1X 浓缩。在 16-20 小时孵育后,将孔内容物 (150μL) 转移入 96 孔圆底平板 (Costar No.3799) 中并且置于 -20℃冰箱中。通过使用 hIL-8ELISA 试剂盒 (R&D Systems,Minneapolis,Minnesota) 或 MSD hIL-8(化学发光试剂盒) 检测上清液的 hIL-8 水平。通过相对于 IL-1α、L-1β 或 IL-1α/β 单独对照值计算抑制百分数确定中和效力 (表 16)。

[0654] 表 16 :IL-1α/βDVD-Ig 分子对人 IL-1α 和 IL-1β 及食蟹猴 IL-1α 和 IL-1β 的效力

[0655]

IL-1α/β DVD-Ig	效力(pM)			
	hIL-1β	hIL-1α	Cyno IL-1β	Cyno IL-1α
E26.13-LL-X3	18.3	10.2	16.7	1053
E26.13-SS-X3	16.0	16.2	8.4	955
E26.13-SS-X3 JM	28.3	26.5	17.6	1880
E26.35-SS-X3	1.8	25.8	0.6	474
X3-LL-E26.13	1470	8.9	ND	ND
X3-SS-E26.13	2676	7.6	ND	ND

[0656] ND :未测定

[0657] 实施例 4.3 :IL-1α/βDVD-Ig 分子的亲和力测量

[0658] 使用如实施例 2.3 中所述表面等离子体共振法测定 IL-1α/βDVD-Ig 与纯化的重组人 IL-1β 和 IL-1α 及食蟹猴 IL-1β 和 IL-1α 的结合,并且在表 17 中显示结果。

[0659] 表 17. IL-1α/βDVD-Ig 分子的亲和力测量

[0660]

	人 IL-1β	人 IL-1α	Cyno IL-1β	Cyno IL-1α
E26.13-LL-X3	$7.82x10^{-12}$	$6.15x10^{-12}$	$1.24x10^{-11}$	$3.24x10^{-9}$
Kon(1/Ms)	$1.45x10^{6}$	$6.46x10^{5}$	$1.74x10^{6}$	$3.15x10^{5}$
Koff(1/s)	$1.13x10^{-5}$	$3.9x10^{-6}$	$2.16x10^{-5}$	$1.05x10^{-3}$
E26.13-SS-X3	$2.06x10^{-11}$	$7.61x10^{-12}$	$1.53x10^{-11}$	$4.11x10^{-9}$
Kon(1/Ms)	$1.77x10^{6}$	$1.98x10^{5}$	$1.45x10^{6}$	$6.37x10^{4}$
Koff(1/s)	$3.61x10^{-5}$	$1.5x10^{-6}$	$2.22x10^{-5}$	$2.61x10^{-4}$

[0661]

E26.35-SS-X3	$5.03x10^{-12}$	$1.33x10^{-11}$	$1.06x10^{-11}$	$3.27x10^{-9}$
Kon(1/Ms)	$1.32x10^{6}$	$1.62x10^{5}$	$1.84x10^{6}$	$7.24x10^{4}$
Koff(1/s)	$6.81x10^{-6}$	$2.14x10^{-6}$	$1.94x10^{-5}$	$2.36x10^{-4}$

[0662] 实施例 5 :在 Balb/c 小鼠、Sprague-Dawley 大鼠和食蟹猴中单剂施用后 IL-1α/βDVD,E26.13-SS-X3 的药代动力学

[0663] 材料和方法

[0664] 动物和给药

[0665] 抗人 IL-1α/β 双重可变结构域免疫球蛋白(DVD-Ig®),E26.13-SS-X3 通过缓慢静脉内浓注剂量或皮下注射施用于雄性 Balb/c 小鼠、雄性 Sprague-Dawley 大鼠和雌性食蟹猴,剂量为 4mg/kg(大鼠)或 5mg/kg(小鼠和猴)(表 18)。血样在给药后 1 和 24 小时及 4、10、14 和 21 天从各小鼠收集。血样在给药后 1、4、7 和 24 小时及 2、3、7、10、14、21 和 28 天从各大鼠收集。血样在给药后 1、4、9、12 和 24 小时及 2、3、7、10、14、21、28 和 35 天从各猴收集。所有血清样品储存在 -80℃下。

[0666] 表 18. 在 Balb/c 小鼠、Sprague-Dawley 大鼠和食蟹猴中 E26.13-SS-X3 的单剂静脉内和皮下药代动力学研究

[0667]

物种	研究#	组	剂量 (mg/kg)	剂量浓度 (mg/mL)	剂量体积 (mL/kg)	动物数 雌性	雄性
小鼠	W09-289	IV	5	1.13	4.42	N/A	6
		SC	5	1.13	4.42	N/A	6
大鼠	W09-226	IV	4	5.63	0.71	N/A	5
		SC	4	5.63	0.71	N/A	5
猴	V10-0830	IV	5	14.10	0.35	2	N/A
		SC	5	14.10	0.35	2	N/A

[0668] 生物分析和定量

[0669] 利用生物素化的 rhIL-1β 用于捕获和 Sulfo-Tag 标记的山羊抗-人抗体用于检测,血清样品使用 MSD 分析法进行分析。该分析在 1%血清终浓度中进行。定量下限 (LLOQ) 对于小鼠、大鼠和猴的研究分别为 0.1、0.025 和 0.075μg/mL。

[0670] 标准曲线拟合和数据评价使用 XLfit4 软件以四参数逻辑拟合进行。当 QC 的至少 2/3 在预期值的 30%之内时板通过测试。

[0671] 各动物的药代动力学参数使用 WinNonlin 软件 5.0.1 版 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA) 利用线性梯形拟合(对于 IV 和 SC 给药分别为 NCA Models#201 和 200) 通过非区室分析计算,对于 WinNonlin 中的计算,给药时间定义为第 0 天 0 时。

[0672] 结果和讨论

[0673] E26.13-SS-X3 的药代动力学性质在以下单次静脉内或皮下剂量后评估:(a) 雄性 Balb/c 小鼠中 5mg/kg,(b) 雄性 Sprague-Dawley 大鼠中 4mg/kg 和 (c) 雌性食蟹猴中 5mg/kg。

[0674] 血清浓度在静脉内剂量组的 6 只小鼠的 2 只中(图 1 和表 19) 和接受皮下剂量的 6 只小鼠的 5 只中(图 1 和表 20) 快速下降,符合 ADA 反应。这些动物从本文呈现的药代动

力学计算中排除。

[0675] 表 19. Balb/c 小鼠中单次静脉内 5mg/kg 剂量后的 E26. 13-SS-X3 血清浓度

[0676]

	浓度(μg/mL)						平均	SD
小鼠#	1	2	3	*4	*5	6		
时间(天)/BW (kg)	0.027	0.028	0.028	0.029	0.027	0.029	0.028	0.001
0.04	84.0	96.7	90.2	74.8	87.2	68.6	84.9	12.0
1	51.5	50.7	47.2	44.7	39.9	43.6	48.3	3.6
7	29.2	31.8	31.1	28.5	30.3	28.5	30.2	1.6
10	28.2	25.6	30.7	15.2	22.9	23.4	27.0	3.2
14	18.6	20.5	21.7	1.9	12.8	14.1	18.7	3.3
21	14.9	14.9	14.0	0.2	BQL	7.6	12.9	3.5

[0677] BQL :低于定量极限 (0. 1 μ g/mL)

[0678] * 从最终计算中忽略的动物

[0679] 表 20. Balb/c 小鼠中单次 5mg/kg 皮下剂量后的 E26. 13-SS-X3 血清浓度

[0680]

	浓度(μg/mL)					
小鼠#	*1	*2	3	*4	*5	*6
时间(hrs)/BW(kg)	0.029	0.027	0.030	0.029	0.030	0.028
0.04	1.6	2.0	0.9	0.9	1.5	0.9
1	32.6	35.7	29.2	27.9	31.2	21.9
7	27.7	33.9	26.2	12.7	20.6	10.1
10	15.6	28.5	22.4	0.2	5.4	0.1
14	BQL	7.0	22.7	BQL	BQL	BQL
21	BQL	0.4	15.7	BQL	BQL	BQL

[0681] BQL :低于定量极限 (0. 1 μ g/mL)

[0682] * 从最终计算中忽略的动物

[0683] 小鼠中静脉内给药后，E26. 13-SS-X3 表现出低清除率 (0. 27mL/h/kg)、小的分布容积 (95mL/kg) 和 10. 5 天的长半衰期 (表 21)。在皮下施用后，C_{max} 是 29. 2 μ g/ml，具有 20. 3 天的长半衰期和大于 100％的生物利用度 (图 4 和表 22)。

[0684] 表 21. Balb/c 小鼠中单次 5mg/kg 静脉内剂量后 E26. 13-SS-X3 的药代动力学参数

[0685]

参数/小鼠 #	1	2	3	6	平均	SD
$T_{1/2}$ (天)	13.3	13.1	11.4	7.1	10.5*	2.9**
$AUC_{0-\infty}$(mg•hr/mL)	21.4	21.8	20.6	13.9	19.4	3.7
$AUC_{0-\infty}$ /剂 (mg•hr/mL/mg/kg)	4.28	4.36	4.12	2.78	3.89	0.74
CL (mL/hr/kg)	0.23	0.23	0.24	0.36	0.27	0.06
MRT (day)	18	18	16	10	16	4
V_{ss} (mL/kg)	101	97	92	88	95	6
V_z (mL/kg)	107	104	96	89	99	8

[0686] * 调和平均值

[0687] ** 伪标准差

[0688] 表 22. Balb/c 小鼠中单次 5mg/kg 皮下剂量后 E26.13-SS-X3 的药代动力学参数

[0689]

参数/小鼠#	3
$T_{1/2}$ (天)	20.3
T_{max} (天)	1
C_{max} (μg/mL)	29
C_{max} /剂 (μg/mL/mg/kg)	5.8
$AUC_{0-\infty}$ (mg•hr/mL)	22.5
$AUC_{0-\infty}$ /剂 (mg•hr/mL/mg/kg)	4.50
%F	>100
MRT (天)	30

[0690] 血清浓度在静脉内剂量组的 6 只大鼠的 1 只中（图 2 和表 23）和接受皮下剂量的 6 只大鼠的 5 只中（图 2 和表 24）快速下降，其行为符合 ADA 反应。这些动物从本文呈现的药代动力学计算中排除。

[0691] 表 23. Sprague-Dawley 大鼠中单次 4mg/kg 静脉内剂量后 E26.13-SS-X3 的血清浓度

[0692]

大鼠#	浓度(μg/mL)					平均	SD
	1	2	3	4	5		
时间(天)/BW (kg)	0.323	0.320	0.315	0.348	0.303	0.32	0.02
0.04	139.1	111.8	138.4	116.0	115.9	124.2	13.4
0.17	104.9	89.8	99.8	82.2	96.4	94.6	8.8
0.29	80.6	69.2	85.6	68.2	85.0	77.7	8.5
1	53.4	49.1	53.5	40.8	52.5	49.9	5.4
2	40.5	34.9	38.6	34.8	42.9	38.3	3.5
3	32.2	33.7	32.6	30.9	31.9	32.3	1.0
7	26.1	23.7	24.9	20.6	23.1	23.7	2.1
10	19.2	17.9	20.0	16.2	18.6	18.4	1.4
14	14.1	13.5	14.0	12.3	14.2	13.6	0.8
21	9.9	10.4	9.5	8.3	10.5	9.7	0.9
28	5.5	5.6	5.4	3.5	6.2	5.2	1.0

[0693] 表 24. Sprague-Dawley 大鼠中单次 4mg/kg 皮下剂量后 E26.13-SS-X3 的血清浓度

[0694]

大鼠 #	浓度(μg/mL)				
	*6	*7	*8	9	*10
时间(天)/BW (kg)	0.290	0.253	0.272	0.278	0.267
0.04	0.2	0.5	0.1	0.1	0.2
0.17	0.6	3.3	0.7	0.3	1.0

[0695]

0.29	*6.4*	*6.2*	*1.5*	0.9	*4.0*
1	*7.7*	*13.0*	*7.9*	9.2	*12.5*
2	*13.3*	*16.8*	*12.7*	12.5	*15.7*
3	*17.1*	*17.2*	*14.7*	15.6	*18.6*
7	*14.5*	*15.3*	*13.2*	13.4	*14.7*
10	*0.6*	*6.5*	*7.4*	10.7	*11.1*
14	*BQL*	*0.2*	*0.2*	8.4	*3.4*
21	*BQL*	*BQL*	*BQL*	5.8	*BQL*
28	*BQL*	*BQL*	*BQL*	3.9	*BQL*

[0696] BQL :低于定量极限 (0.025μg/mL)

[0697] *从最终计算中忽略的动物

[0698] 在大鼠中静脉内给药后，E26.13-SS-X3 也表现出低清除率 (0.28mL/h/kg)、小的分布容积 (86mL/kg)，具有 10.0 天的长半衰期 (图 6 和表 25)。在大鼠中皮下剂量后观察到 16.0μg/ml 的 C_{max} 及 12.0 天的半衰期和 52%的生物利用度 (图 7 和表 26)。

[0699] 表 25. Sprague-Dawley 大鼠中单次 4mg/kg 静脉内剂量后 E26.13-SS-X3 的药代动力学参数

[0700]

参数/大鼠#	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**平均**	**SD**
$T_{1/2}$ (天)	9.9	10.7	9.8	8.7	11.5	10.0*	1.0**
$AUC_{0-\infty}$(mg•hr/mL)	15.2	14.6	15.0	12.2	15.6	14.5	1.3
$AUC_{0-\infty}$ /剂 (mg•hr/mL/mg/kg)	3.80	3.65	3.75	3.05	3.90	3.63	0.34
CL (mL/hr/kg)	0.26	0.27	0.27	0.33	0.26	0.28	0.03
MRT (天)	13	14	13	12	15	13	1
V_{ss} (mL/kg)	81	90	81	88	90	86	4
V_z (mL/kg)	90	101	90	98	102	96	6

[0701] *调和平均值

[0702] **伪标准差

[0703] 表 26. Sprague-Dawley 大鼠中单次 4mg/kg 皮下剂量后 E26.13-SS-X3 的药代动力学参数

[0704]

参数/大鼠#	9
$T_{1/2}$ (天)	12.0
T_{max} (天)	3
C_{max} (μg/mL)	16
C_{max} /剂 (μg/mL/mg/kg)	4.0
$AUC_{0-\infty}$ (mg•hr/mL)	7.5
$AUC_{0-\infty}$ /剂 (mg•hr/mL/mg/kg)	1.88
%F	52
MRT (天)	19

[0705] 在猴中静脉内给药后，E26.13-SS-X3 表现出低清除率 (0.22mL/h/kg)、小的分布容积 (61mL/kg) 和 10.4 天的长半衰期（图 3 和 8 及表 27 和 28）。

[0706] 表 27. 在食蟹猴中单次 5mg/kg 静脉内剂量后 E26.13-SS-X3 的血清浓度

[0707]

猴#	浓度(μg/mL)		平均
	1	2	
时间(天)/BW (kg)	3.2	3.3	3.3
0.004	137.5	122.0	129.8
0.17	120.9	125.6	123.3
0.38	111.1	117.3	114.2
0.5	95.3	108.5	101.9
1	82.8	84.9	83.9

[0708]

2	66.6	71.5	69.1
3	53.6	56.8	55.2
14	19.3	20.8	20.1
21	11.9	12.5	12.2
28	7.7	7.7	7.7
35	5.3	3.3	4.3

[0709] 表 28. 在食蟹猴中单次 5mg/kg 静脉内剂量后 E26.13-SS-X3 的药代动力学参数

[0710]

参数/猴#	1	2	平均
$T_{1/2}$ (天)	11.3	9.7	10.4*
$AUC_{0-\infty}$(mg•hr/mL)	22.8	22.8	22.8
$AUC_{0-\infty}$ /剂 (mg•hr/mL/mg/kg)	4.54	4.64	4.59
CL (mL/hr/kg)	0.22	0.22	0.22
MRT (天)	12.6	10.4	11.5
V_{ss} (mL/kg)	66	55	61
V_z (mL/kg)	86	74	80

[0711] *调和平均值

[0712] 血清浓度在接受皮下剂量的 2 只猴的 1 只中在第 20 天后快速降低，行为符合 ADA 反应。该动物从本文呈现的药代动力学计算排除。在皮下施用后，半衰期是 8.0 天，和生物利用度是 95%（图 3 和 9 及表 29 和 30）。

[0713] 表 29. 在食蟹猴中单次 5mg/kg 皮下剂量后 E26.13-SS-X3 的血清浓度

[0714]

	浓度(μg/mL)	
猴#	3	*4**
时间(天)/BW (kg)	4.6	*3.8*

[0715]

0.004	0.3	*0.2*
0.17	16.7	*8.3*
0.38	29.4	*17.8*
0.5	43.8	*23.8*
1	44.6	*25.5*
2	52.5	*35.4*
3	56.6	*42.7*
14	26.4	*20.0*
21	14.1	*13.5*
28	7.6	*0.8*
35	4.3	*BQL*

[0716] BQL：低于定量极限（0.075μg/mL）

[0717] 表 30. 在食蟹猴中单次 5mg/kg 皮下剂量后 E26.13-SS-X3 的药代动力学参数

[0718]

参数/猴#	**3**
$T_{1/2}$ (天)	8.0
T_{max} (天)	3
C_{max} (μg/mL)	57
C_{max} /剂 (μg/mL/mg/kg)	11.4
$AUC_{0-\infty}$ (mg•hr/mL)	21.6
$AUC_{0-\infty}$ /剂 (mg•hr/mL/mg/kg)	4.32
%F	95
MRT (天)	12

[0719] 也评估了在食蟹猴中每周单次 200mg/kg 静脉内剂量，共四周后 E26.13-SS-X3 的药代动力学参数。结果总结于图 11 中。

[0720] 总结

[0721] E26.13-SS-X3 的药代动力学性质在 Balb/c 小鼠（5mg/kg）、Sprague-Dawley 大鼠（4mg/kg）和食蟹猴（5mg/kg）中单次静脉内或皮下剂量后评估。在静脉内给药后，在所有三个物种中 E26.13-SS-X3 表现出低清除率（0.22-0.28mL/hr/kg）及小的分布容积（V_{ss}：

61-95mL/kg) 和约 10 天的长半衰期。在皮下施用后，生物利用度可从大鼠中的 52％变到小鼠和猴中的＞ 95％。皮下剂量后的血清消除半衰期是长的，在小鼠中 20.3 天，在大鼠中 12 天和在猴中 8.0 天。表 31 提供了该实施例中主要药代动力学测量的总结。

[0722] 表 31. 在 Balb/c 小鼠、Sprague-Dawley 大鼠和食蟹猴中单次静脉内或皮下剂量后 E26.13-SS-X3 的主要药代动力学参数的总结

[0723]

静脉内剂量

物种	性别: n§	剂量 (mg/kg)	T½° (天)	CL (mL/hr/kg)	V_z (mL/kg)	V_{ss} (mL/kg)	$AUC_{0-\infty}$ (mg•hr/mL)
小鼠	雄性: n=4(6)	5	10.5	0.27 (0.06)	99 (8)	95 (6)	19.4 (3.7)
大鼠	雄性: n=5(5)	4	10.0	0.28 (0.03)	96 (6)	86 (4)	14.5 (1.3)
猴	雌性: n=2(2)	5	10.4	0.22, 0.22	74, 86	55, 66	22.8, 22.8

皮下剂量

物种	性别: n§	剂量 (mg/kg)	T½ (天)	T_{max} (天)	C_{max} (μg/mL)	F (%)	$AUC_{0-\infty}$ (mg•hr/mL)
小鼠	雄性: n=1(6)	5	20.3	1.0	29.2	>100	22.5
大鼠	雄性: n=1(5)	4	12.0	3.0	16.0	52	7.5
猴	雌性: n=1(2)	5	8.0	3.0	57.0	95	21.6

[0724] o 调和平均值；数据提供为平均值 (SD)

[0725] § n = x(y)，包括在药代动力学计算中的动物数（给药的动物总数）

[0726] 最后，如图 10 中描绘的，Biacore 分析表明 E26.13-SS-X3 同时结合 IL-1α 和 IL-1β 两者。

[0727] 通过引用引入

[0728] 本发明通过引用的方式完整并入分子生物学和药物递送领域熟知的技术。这些技术包括但不限于在以下出版物中描述的技术：Ausubel 等人（编著），Current Protocols in Molecular Biology，John Wiley&Sons，NY(1993)；Ausubel，F.M. 等人 编 著，Short Protocols In Molecular Biology（第 4 版，1999）John Wiley&Sohs，NY.(ISBN0-471-32938-X). Controlled Drug Bioavailability Drug Product Design and Performance，Smolen 和 Ball（编著），Wiley，New York(1984)；Giegé 等人，第 1 章，Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, A Practical Approach, 第 2 版，(Ducruix 和 Giegé 编著）(Oxford University Press，New York，1999)1-16 页；Goodson，J.M.，第 6 章，Medical Applications of Controlled Release，Vol. II，Applications and Evaluation，(Langer 和 Wise 编著）(CRC Press，Inc.，Boca Raton，1984)，115-138 页；Hammerling 等人编著，" Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas，" Research

Monographs in Immunology,vol.3(J.L.Turk,General编著)(Elsevier,New York,1981),563-587 页;Harlow 等 人,Antibodies:A Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版,1988);Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987);Kabat,E.A. 等 人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242;Kontermann 和 Dübel 编著,Antibody Engineering(2001)Springer-Verlag.New York.790 页 (ISBN3-540-41354-5);Kriegler,Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual,Stockton Press,NY(1990);Lu 和 Weiner 编 著,Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis(2001)BioTechniques Press.Westborough,Mass.298 页 (ISBN1-881299-21-X);Goodson,J.M.,Medical Applications of Controlled Release,(Langer 和 Wise 编著)(CRC Press,Boca Raton,1974);Old 和 Primrose,Principles of Gene Manipulation:An Introduction To Genetic Engineering(第 3 版,1985)Blackwell Scientific Publications,Boston;Studies in Microbiology,V.2:409 页.(ISBN 0-632-01318-4);Sambrook,J. 等 人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第 2 版,1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY.Vols.1-3(ISBN 0-87969-309-6);Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems,(J.R.Robinson 编著)(Marcel Dekker,Inc.,New York,1978);Winnacker,E.L.From Genes To Clones:Introduction To Gene Technology(1987)VCH Publishers,N.Y.(Horst Ibelgaufts 翻译),634 页 (ISBN 0-89573-614-4)。

[0729] 整个本申请书中引用的全部引用的参考文献(包括文献参考资料、专利、专利申请和网站)的内容在此明确地通过引用的方式完整并入,其中引用的参考文献也以相同方式并入。除非另外说明,否则本发明的实施将使用本领域熟知的免疫学、分子生物学和细胞生物学的常规技术。

[0730] 等同

[0731] 本发明可以体现于其他具体的形式中而不脱离其精神或实质特征。因此将前述实施方式在所有方面认为是说明性的而非限制本文所述的发明。本发明的范围因此由所附的权利要求书而非前面的描述指明,并且属于权利要求的等同性含义和范围内的全部变化均意图包含于本发明中。

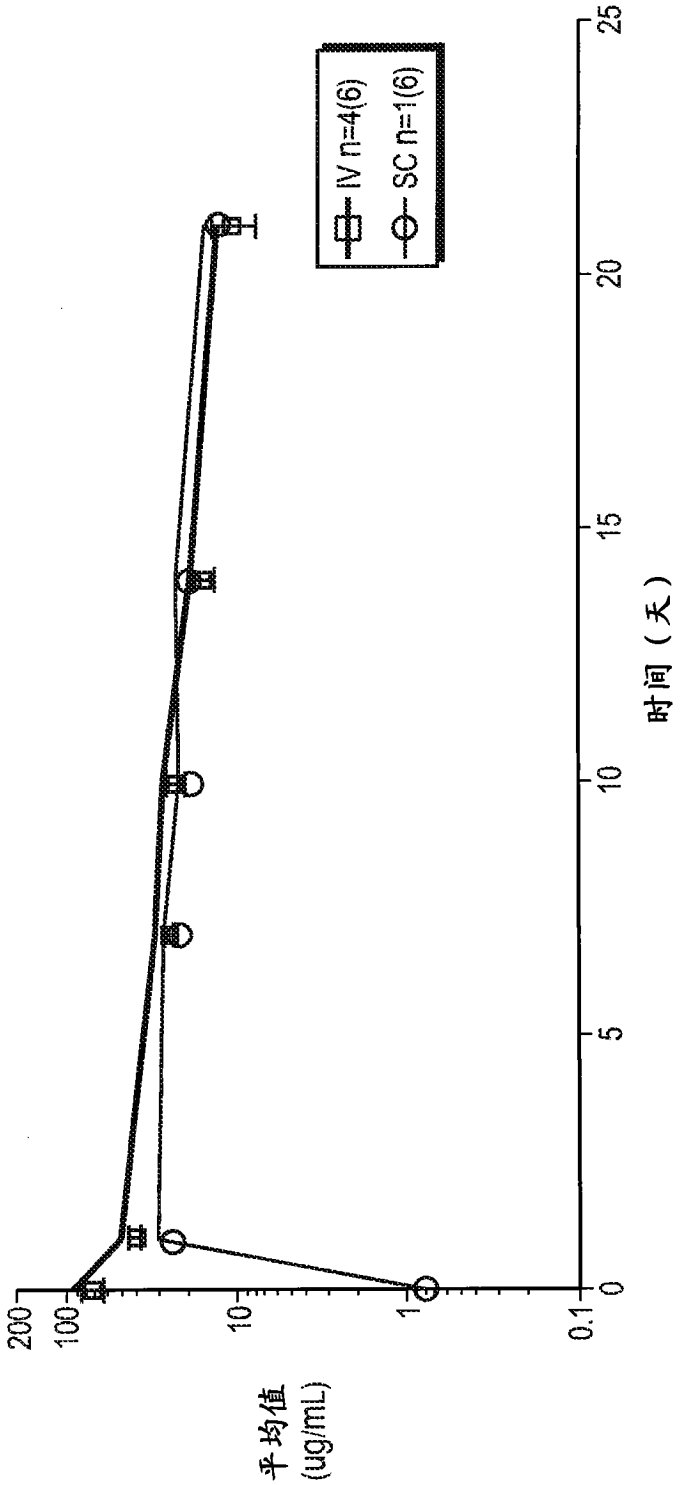


图 1

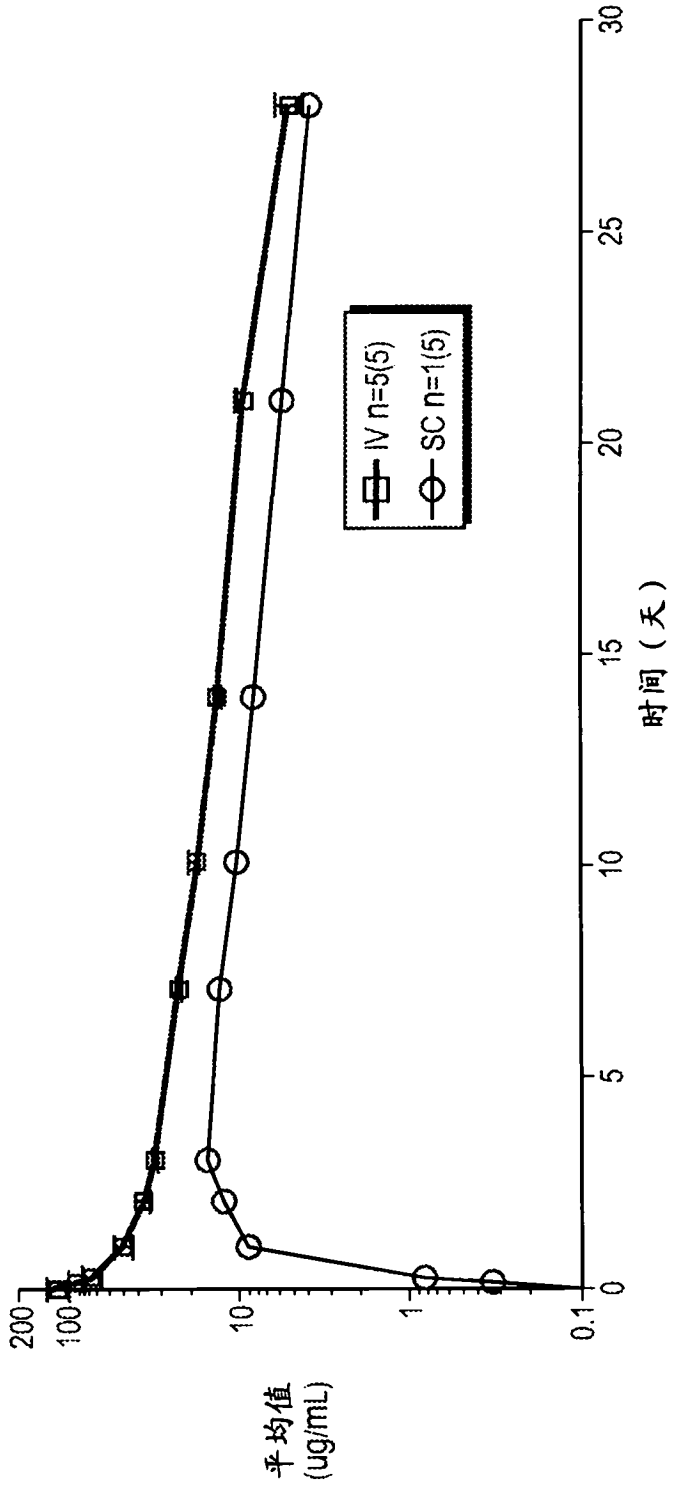


图 2

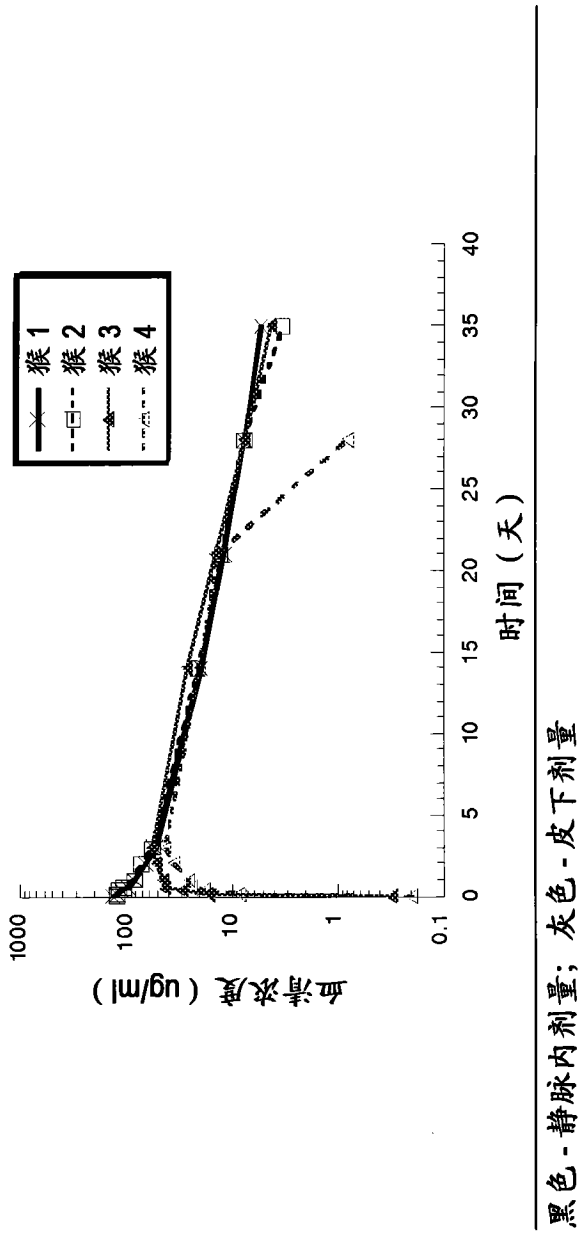

猴 1
猴 2
猴 3
猴 4
血清浓度（ug/ml）
1000
100
10
1
0.1
0
5
10
15
20
25
30
35
40
时间（天）
黑色 - 静脉内剂量；灰色 - 皮下剂量

图 3

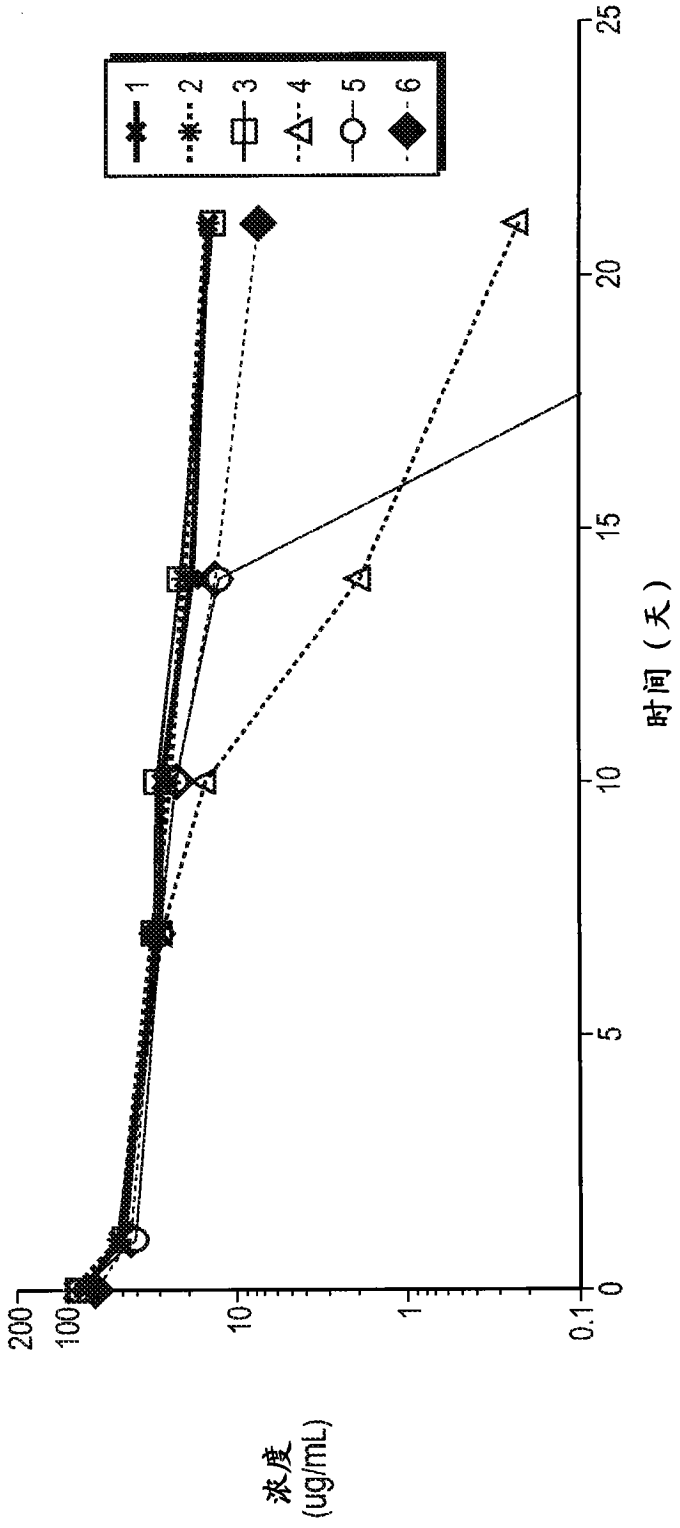


图 4

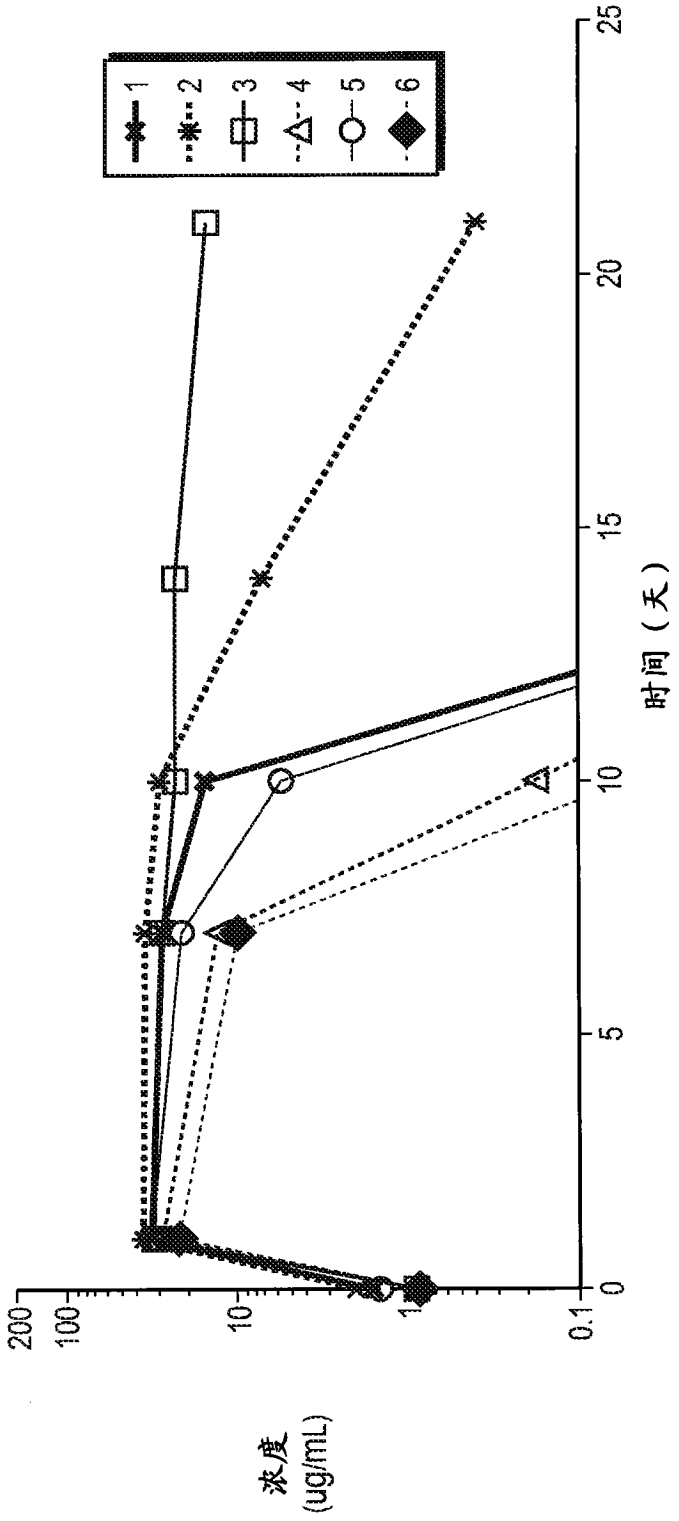


图 5

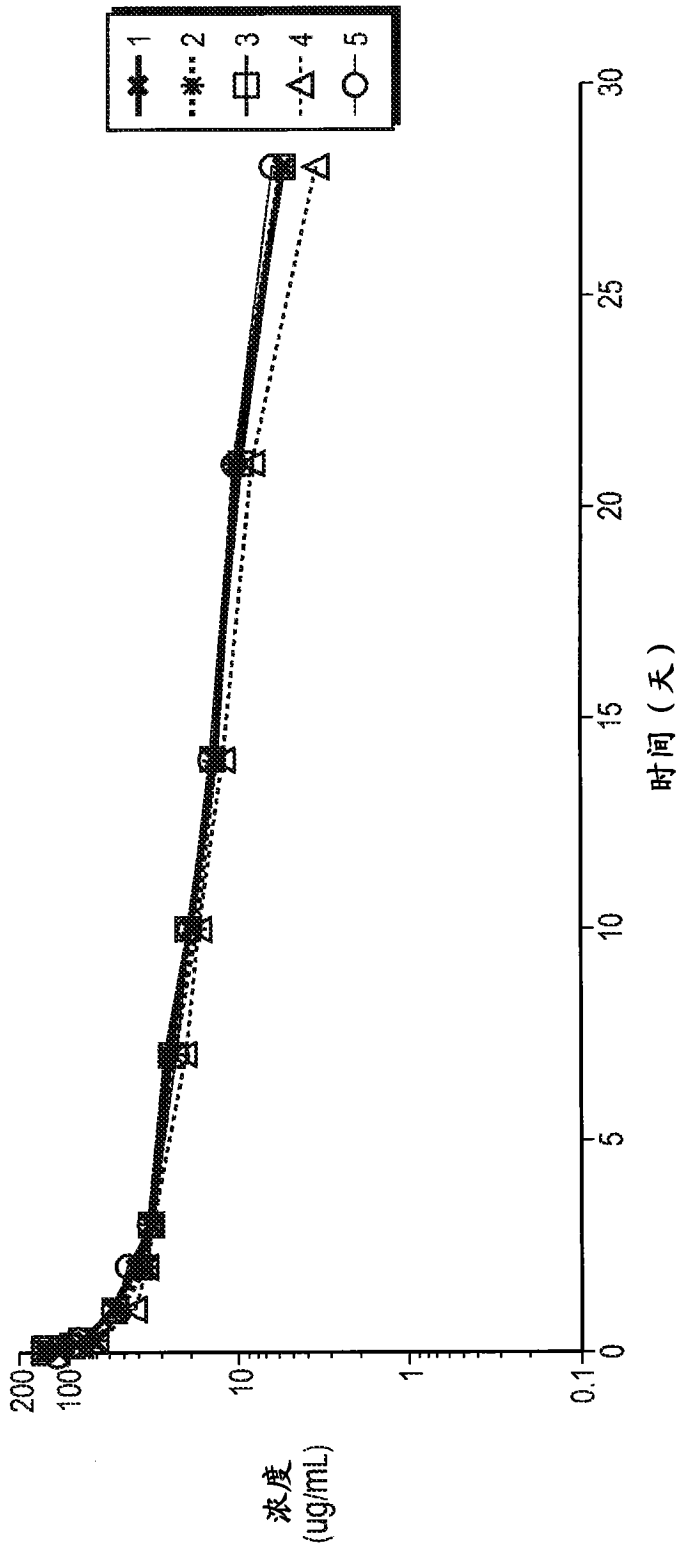


图 6

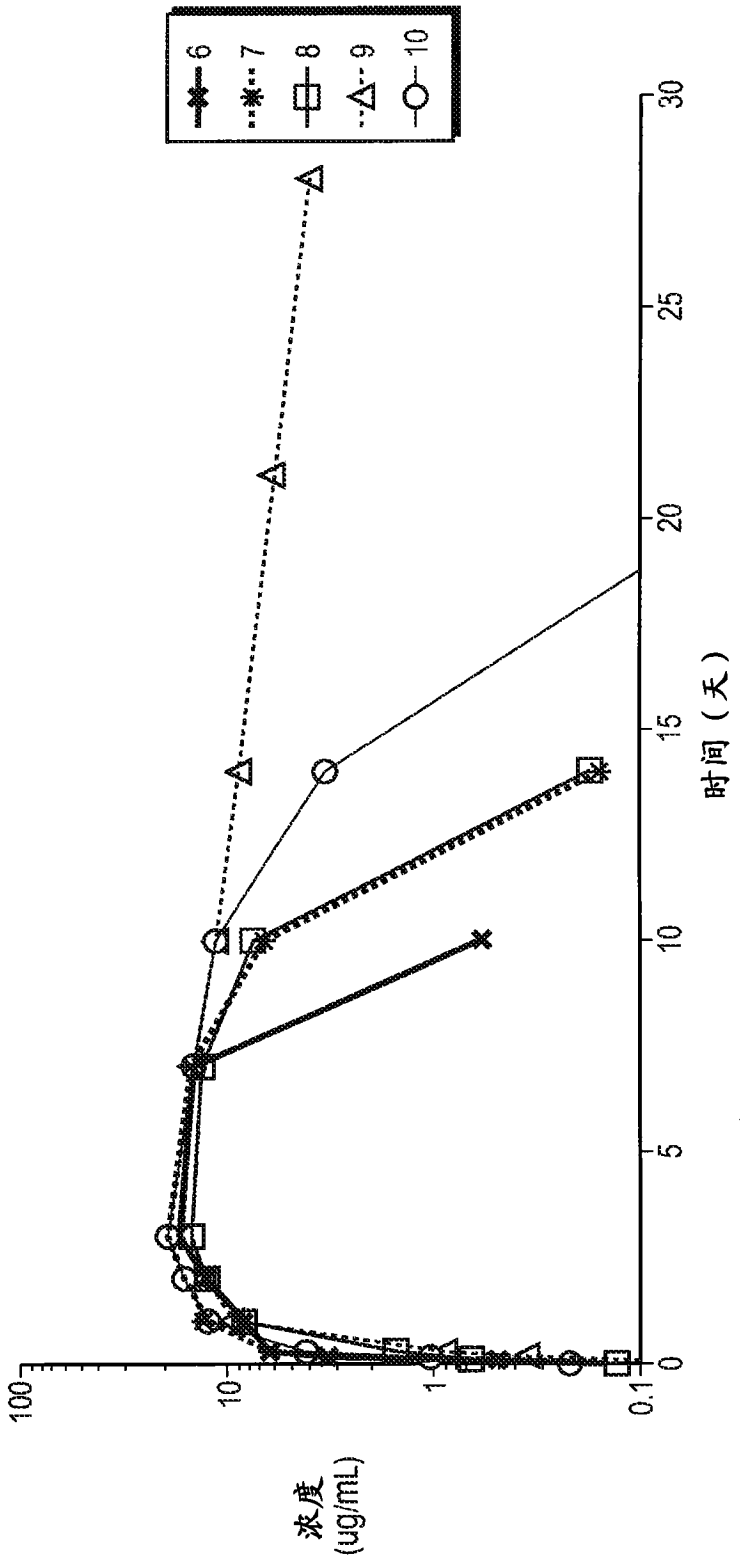


图 7

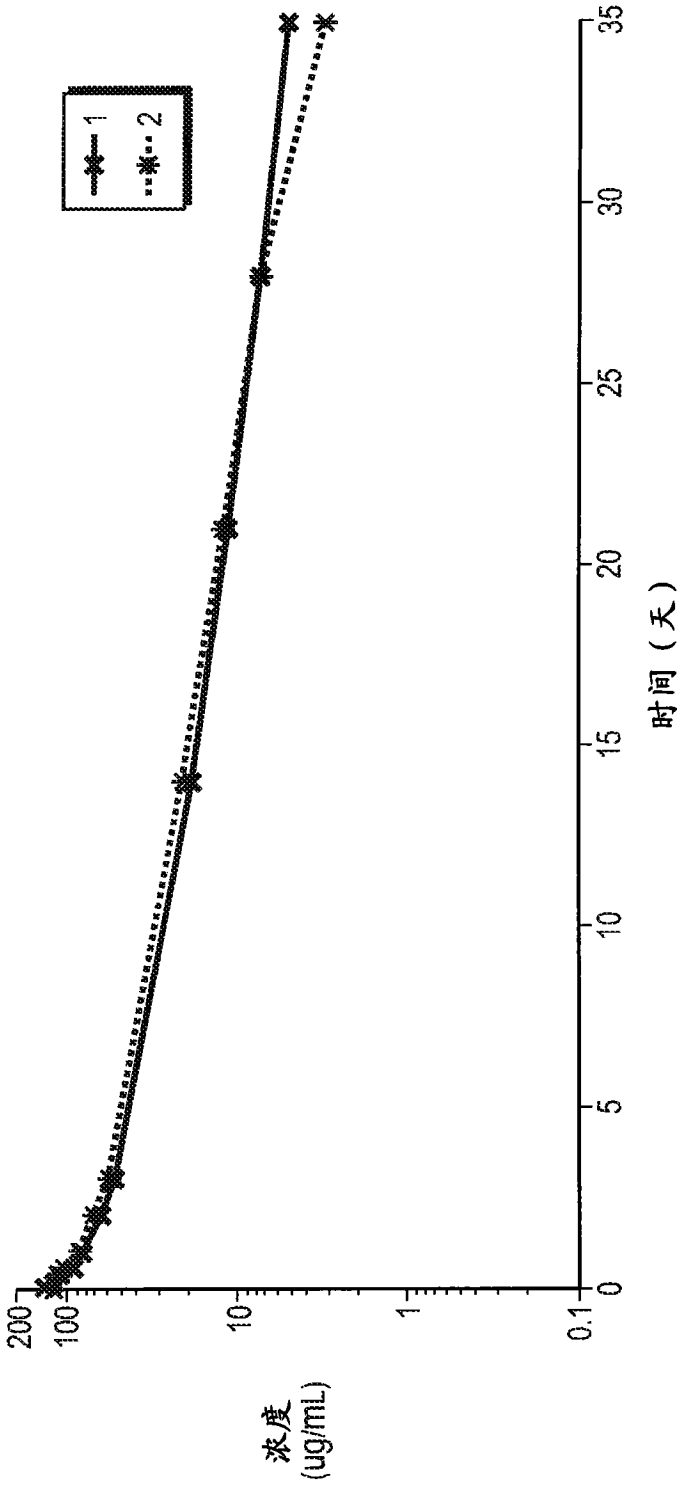


图 8

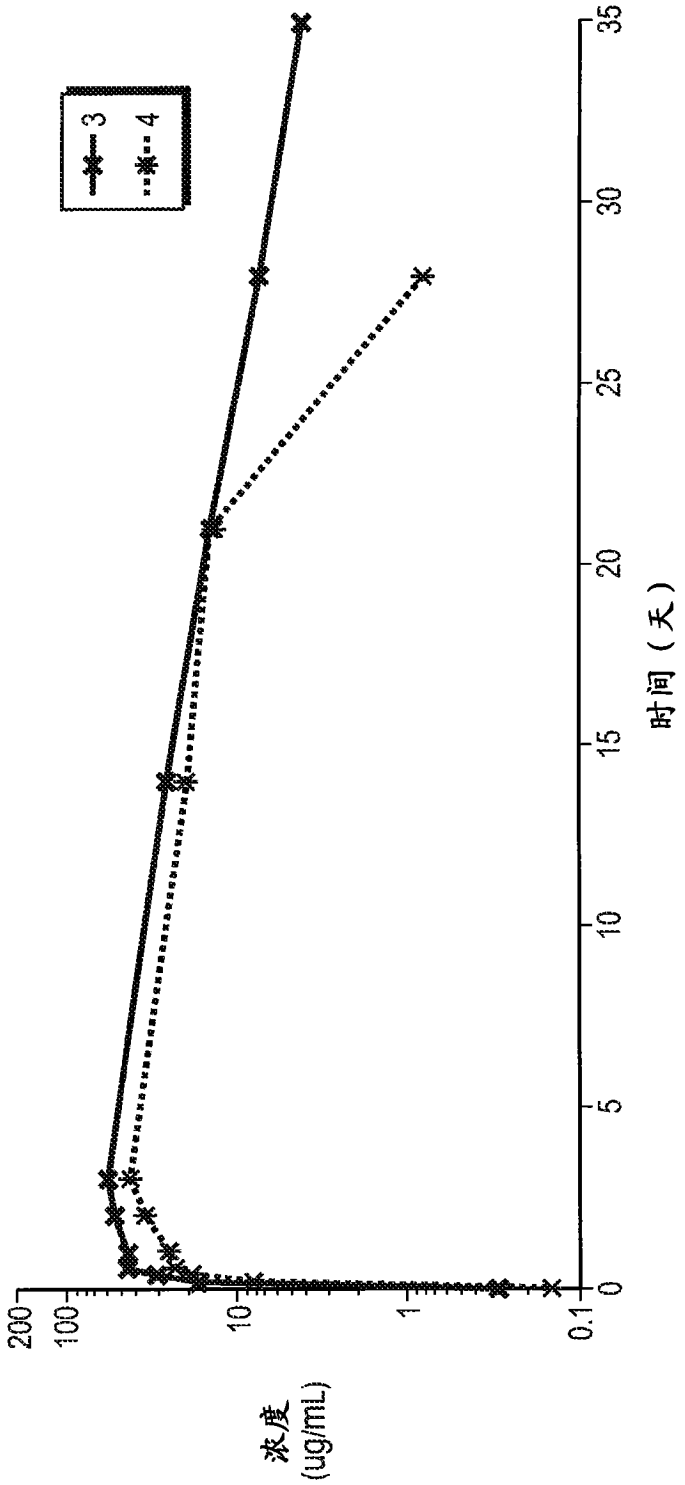
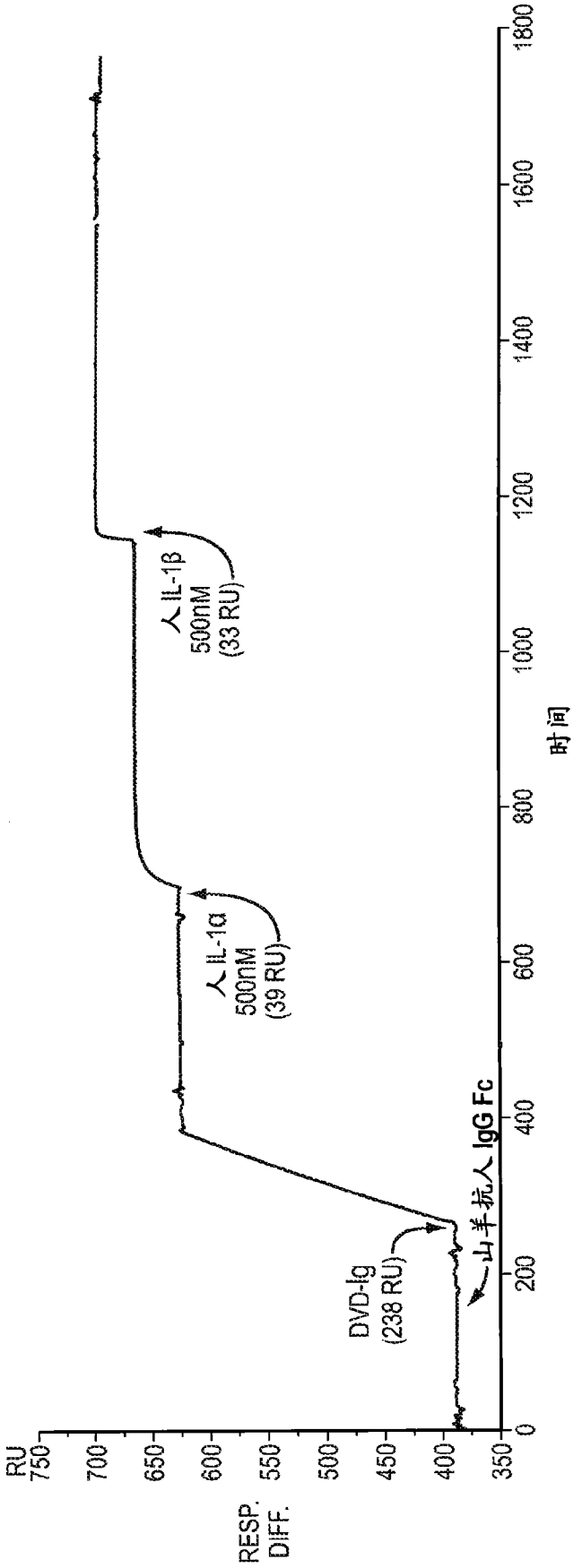


图 9



	第 1 次注射	化学计量	第 2 次注射	化学计量
DVD-Ig	IL-1α	1.8	IL-1β	1.6
	IL-1β	1.8	IL-1α	1.6

图 10

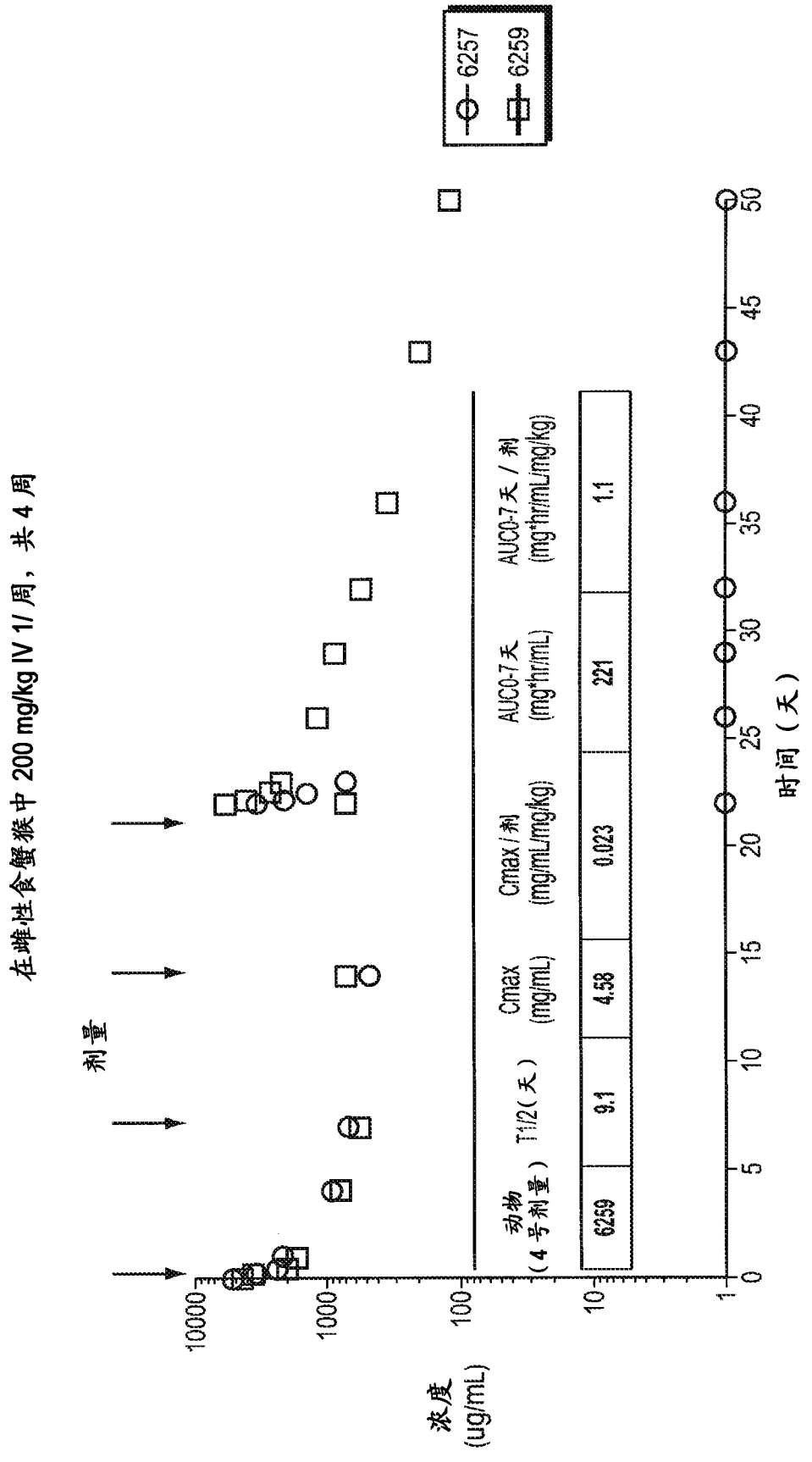

在雌性食蟹猴中 200 mg/kg IV 1/ 周，共 4 周
剂量
浓度 (ug/mL)
时间（天）
6257
6259
动物（4 号剂量）
T1/2（天）
Cmax (mg/mL)
Cmax / 剂 (mg/mL/mg/kg)
AUC0-7 天 (mg*hr/mL)
AUC0-7 天 / 剂 (mg*hr/mL/mg/kg)
6259
9.1
4.58
0.023
221
1.1

图 11