



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104066439 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 24

(21) 申请号 201280046036. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 07. 27

A61K 38/20 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C07K 14/545 (2006. 01)

61/513, 453 2011. 07. 29 US

B01D 15/36 (2006. 01)

61/591, 727 2012. 01. 27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 03. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/048631 2012. 07. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/019652 EN 2013. 02. 07

(71) 申请人 十一生物治疗股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 T. M. 巴恩斯 J. 侯

G. 扎比斯 - 帕帕斯托伊西斯

E. B. 希尔莫 G. L. 麦克尼尔

K. 戈尔登

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴

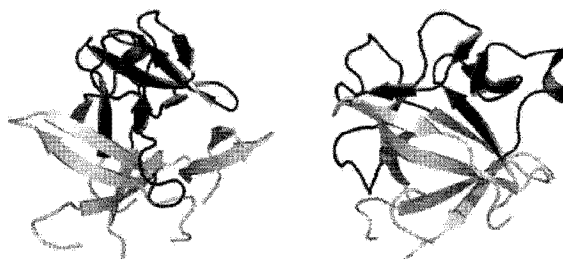
权利要求书9页 说明书78页 附图19页

(54) 发明名称

纯化的蛋白质

(57) 摘要

本发明提供了用于制备和递送嵌合细胞因子蛋白的方法和组合物,包括细胞培养物、纯化方法和纯化的组合物。



1. 一种纯化包含与 SEQ ID NO:21 的序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列的嵌合细胞因子蛋白质制剂的方法,所述方法包括使用阳离子交换柱、阴离子交换柱或羟基磷灰石柱的至少两种来纯化所述蛋白质制剂。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其包括使用阳离子交换柱、阴离子交换柱和羟基磷灰石柱的全部 3 种来纯化所述蛋白质制剂。

3. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的方法,其中从在至少 1 升培养基中培养的大肠杆菌细胞收获所述嵌合细胞因子蛋白质制剂,其中所述大肠杆菌细胞含有包含核酸序列的质粒,所述核酸序列在诱导型启动子下表达所述嵌合细胞因子蛋白。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法,其中在 0.05mM 至 0.8mMEDTA 存在的情况下培养所述细胞。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法,其中在至少 2.5mM EDTA 存在的情况下裂解所述细胞。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中:

(a) 将所述嵌合细胞因子蛋白质制剂施用于阳离子交换柱 (CEX);

(b) 用不洗脱所述嵌合细胞因子蛋白的洗涤缓冲液洗涤所述阳离子交换柱,并且用洗脱缓冲液从所述阳离子交换柱洗脱结合的蛋白质以提供包含所述嵌合细胞因子蛋白的 CEX 洗脱物;

(c) 将所述 CEX 洗脱物施用于阴离子交换表面;

(d) 收集来自所述阴离子交换柱的所述流通液 (AEX 流通液),将其加载至陶瓷羟基磷灰石柱 (CHA) 上;

(f) 从所述 CHA 柱洗脱所述结合的蛋白质;

从而纯化所述嵌合细胞因子蛋白质制剂。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中完整蛋白质对 des-Ala 蛋白质亚型、甲二磺酰化蛋白质亚型和乙酰化蛋白质亚型的比率在纯化后增加。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述纯化的制剂包含少于 10% 的所述蛋白质的 des-Ala 形式,少于 10% 的所述蛋白质的乙酰化形式和少于 10% 的所述蛋白质的甲二磺酰化形式。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述纯化的制剂包含少于百万分之 50 的宿主细胞蛋白质。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述纯化的蛋白质制剂包含:

70% 至 100% 的完整蛋白质;

0% 至 15% 的 Des-Ala 蛋白质亚型;

0% 至 10% 的甲二磺酰化蛋白质亚型;和

0% 至 15% 的乙酰化蛋白质亚型。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述纯化的蛋白质制剂包含:

80% 至 99% 的完整蛋白质;

2% 至 7% 的 Des-Ala 蛋白质亚型;

0.1% 至 4% 的甲二磺酰化蛋白质亚型;和

0% 至 5% 的乙酰化蛋白质亚型。

12. 一种纯化嵌合细胞因子蛋白的方法,所述蛋白包含与 SEQ ID NO:21 的所述序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列,所述方法包括:

(a) 将包含所述嵌合细胞因子蛋白的完整形式和任选地 des-Ala 形式的负载制剂施用于阳离子交换表面;

(b) 用不洗脱所述嵌合细胞因子蛋白的洗涤缓冲液洗涤所述阳离子交换表面,并且用所述洗脱缓冲液洗脱所述阳离子交换表面以提供包含所述嵌合细胞因子蛋白的完整形式的 CEX 洗脱物;

(c) 将所述 CEX 洗脱物施用于阴离子交换表面;

(d) 从所述阴离子交换表面收集流通液(AEX 流通液);

(e) 将所述 AEX 流通液加载至陶瓷羟基磷灰石柱(CHA)上;

(f) 洗脱所述 CHA 柱;

(g) 收集包含纯化的嵌合细胞因子蛋白的所述洗脱物;

(h) 任选地将所述洗脱物经历超滤和/或渗滤步骤,并且收集包含纯化的嵌合细胞因子蛋白的所述渗余物。

13. 一种嵌合细胞因子蛋白的纯化的制剂,所述蛋白包含与 SEQ ID NO:21 的序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列,所述制剂使用根据权利要求 9 所述的方法产生。

14. 根据权利要求 13 所述的纯化的制剂,其中所述蛋白质的纯度大于 90%,其中所述制剂包含少于 10% 的 des-Ala 形式,少于 10% 的乙酰化形式和少于 10% 的甲二磺酰化形式。

15. 根据权利要求 13 或权利要求 14 所述的纯化制剂,其中所述制剂包含少于百万分之 50 的宿主细胞蛋白质。

16. 一种方法,其包括将包含嵌合细胞因子蛋白的完整形式和任选 des-Ala、乙酰化或甲二磺酰化形式的负载制剂施用于阳离子交换表面,所述嵌合细胞因子蛋白包含与 SEQ ID NO:21 的序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列;

用不洗脱所述嵌合细胞因子蛋白的洗涤缓冲液洗涤所述阳离子交换表面,并且用洗脱缓冲液洗脱所述阳离子交换表面以提供包含所述嵌合细胞因子蛋白的完整形式的 CEX 洗脱物。

17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述负载制剂具有小于 5、4、3.5、3.3mS/cm 的电导率。

18. 根据权利要求 16 或 17 中任一项所述的方法,其中所述负载制剂不含去垢剂。

19. 根据权利要求 16 至 18 中任一项所述的方法,其中从先前未被层析的裂解物制备所述负载制剂。

20. 根据权利要求 16 所述的方法,其中通过离心和/或过滤澄清所述负载制剂。

21. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述负载制剂具有低于 6.0、5.8、5.6 或 5.4 或 5.3 的 pH。

22. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述负载制剂包含少于 30%、25% 或 20% 的所述嵌合细胞因子蛋白的 des-Ala 形式。

23. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述负载制剂包含少于 30%、25% 或 20% 的所述嵌合细胞因子蛋白的乙酰化形式。

24. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述负载制剂包含少于 30%、25% 或 20% 的所述

嵌合细胞因子蛋白的甲二磺酰化形式。

25. 根据权利要求 16 所述的方法,其还包括将所述裂解物调整至低于 6.0 的 pH 以制备所述负载制剂。

26. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述阳离子交换表面是强阳离子交换 (CEX) 表面。

27. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述表面包含可被填充至柱子中的 CEX 基质。

28. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述 CEX 基质包含交联的聚(苯乙烯-二乙烯苯)珠粒。

29. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述表面包含磺丙基官能团。

30. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述 CEX 基质是 **Poros®XS**、CMC-纤维素、**SP-Sephadex®**和**SP-Sepharose®** FF。

31. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述 CEX 基质存在于大于 20ml 体积的柱子中。

32. 根据权利要求 27 所述的方法,其中用大于 1.5 或 10 倍柱体积洗涤所述柱子。

33. 根据权利要求 27 所述的方法,其中用具有小于 5、4、3.5 或 3.3mS/cm 的电导率的缓冲液洗涤所述柱子。

34. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述洗涤缓冲液具有低于 40、30 或 25mM 的 NaCl 并且所述洗涤缓冲液具有至少 5、10 或 15mM 的 NaCl。

35. 根据权利要求 27 所述的方法,其中用两种不同的缓冲液洗涤所述阳离子交换表面。

36. 根据权利要求 35 所述的方法,其中一种洗涤缓冲液具有 pH5.3,并且另一种洗涤缓冲液具有 pH6.2。

37. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述洗脱包括分步洗脱。

38. 根据权利要求 37 所述的方法,其中所述分步洗脱包括使用具有更高 pH 的洗脱缓冲液。

39. 根据权利要求 37 所述的方法,其中所述分步洗脱是从低于 5.5 的 pH 至高于 5.9 的 pH。

40. 根据权利要求 37 所述的方法,其中所述分步洗脱包括使用具有增加的盐浓度和/或增加的电导率的洗脱缓冲液。

41. 根据权利要求 37 所述的方法,其中所述盐浓度从小于 30mM NaCl 的浓度增加至大于 40mM NaCl 的浓度。

42. 根据权利要求 37 所述的方法,其中所述洗脱缓冲液中的主要盐是 NaCl。

43. 根据权利要求 37 所述的方法,其中所述洗脱缓冲液具有大于 4 的电导率。

44. 根据权利要求 37 所述的方法,其中所述洗脱缓冲液包括具有在至少 pH5.9-6.1 的范围内的缓冲能力的缓冲液。

45. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述嵌合细胞因子蛋白的完整形式和 des-Ala 形式以不同的动力学洗脱。

46. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述 des-Ala 形式在所述完整形式之后洗脱。

47. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述方法通过使所述 des-Ala 形式在所述 CEX 洗脱物中的百分比相对于负载制剂减少至少 1、3、5、7 或 8% 来相对于所述 des-Ala 形式富

集所述完整形式。

48. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述 CEX 洗脱物中的所述 des-Ala 形式低于 20、15、12 或 10% 的所述总嵌合细胞因子蛋白。

49. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述乙酰化和甲二磺酰化形式在所述完整形式之前洗脱。

50. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述方法通过使所述乙酰化和甲二磺酰化形式在所述 CEX 洗脱物中的百分比相对于所述负载制剂减少至少 1、3、5、7 或 8% 来相对于所述乙酰化和甲二磺酰化形式富集所述完整形式。

51. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述 CEX 洗脱物中的所述乙酰化和甲二磺酰化形式各自低于 20、15、12 或 10% 的所述总嵌合细胞因子蛋白。

52. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述嵌合细胞因子蛋白在所述 CEX 洗脱物中的纯度为至少 50、60、70、80、85、90 或 95%。

53. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述 CEX 洗脱物具有比所述负载制剂更低的 HCP 水平。

54. 根据权利要求 27 所述的方法,其中将所述 CEX 洗脱物在其中所述嵌合细胞因子蛋白大体上不结合所述阴离子交换表面的条件下施用于阴离子交换表面。

55. 一种嵌合细胞因子蛋白的制剂,所述嵌合细胞因子蛋白包含与 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列,其中所述制剂包含通过根据权利要求 16 所述的方法获得的所述 CEX 洗脱物。

56. 一种方法,其包括将包含含有与 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列的嵌合细胞因子蛋白的制剂施用于阴离子交换(AEX)表面;和从所述阴离子交换表面收集所述 AEX 流通液。

57. 根据权利要求 56 所述的方法,其中所述 AEX 流通液包含比用于阴离子交换表面的制剂更少的宿主细胞蛋白质。

58. 根据权利要求 56 或 57 所述的方法,其中所述阴离子交换表面具有 100-300 微摩尔 Cl⁻/ml 的离子容量。

59. 根据权利要求 56 所述的方法,其中所述阴离子交换表面是强季铵阴离子交换器。

60. 根据权利要求 56 所述的方法,其中所述阴离子交换表面包括 Poros® HQ 或 Capto™ Q 阴离子交换树脂。

61. 根据权利要求 56 所述的方法,其中所述阴离子交换表面包括膜。

62. 根据权利要求 52 所述的方法,其中所述 AEX 流通液中的内毒素相对于施用于所述阴离子交换表面的制剂减少。

63. 一种产生分批蛋白质制剂的方法,所述蛋白质包含与 SEQ ID NO:21 的序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列,所述方法包括如下步骤:

提供来自在羟基磷灰石柱上纯化的所述蛋白质的分批制剂的级分;

通过 wCEX 层析评价所述级分以测定所述蛋白质的 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式的一种或多种的存在;和

基于所述测定,通过方法进一步处理所述分批蛋白质制剂,所述方法包括一个或多个选自澄清、选择、接受、丢弃、释放、扣留、加工成药品、运送、移至不同位置、配制、贴标签、包

装、释放至商业中、销售和提供用以销售所述批次的步骤。

64. 根据权利要求 63 所述的方法,其中所述蛋白质的 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式的一种或多种被测定为以低于 10% 的水平存在于所述批次中。

65. 根据权利要求 63 所述的方法,其中进一步加工的步骤包括接受所述批次以产生所述蛋白质制剂。

66. 根据权利要求 63 所述的方法,其中评价包括基于所述蛋白质的 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式的一种或多种的水平确定所述批次是否满足预定参照值。

67. 根据权利要求 66 所述的方法,其中评价额外地包括储存所述测定。

68. 根据权利要求 67 所述的方法,其中储存包括储存于计算机可读记录中。

69. 根据权利要求 66 所述的方法,其中所述参照值是从商购可得蛋白质样品或从先前批次测定的值。

70. 根据权利要求 66 所述的方法,其中所述参照值是或包括由监管机构强加的生产标准。

71. 根据权利要求 66 所述的方法,其中所述参照值是或包括颁布标准。

72. 根据权利要求 63 所述的方法,其还包括基于测定而改变所述蛋白质制剂的产生中的步骤。

73. 根据权利要求 63 所述的方法,其中所述测定步骤包括测定与所述蛋白质制剂的期望性质相关的存在或量。

74. 根据权利要求 73 所述的方法,其中所述性质列于蛋白质产品说明书上。

75. 根据权利要求 73 所述的方法,其中所述性质出现在蛋白质的美国药典中。

76. 一种提供嵌合细胞因子蛋白的方法,所述方法包括:

培养包含编码含有与 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列的蛋白质的核酸序列的大肠杆菌细胞,

以提供所述嵌合细胞因子蛋白。

77. 根据权利要求 76 所述的方法,其中所述核酸序列包含在质粒中。

78. 根据权利要求 76 所述的方法,其中所述核酸序列处于诱导型启动子系统的控制之下。

79. 根据权利要求 76 所述的方法,其中在至少 1 升、10L、100L、1000L 或 5000L 的培养基中培养所述细胞。

80. 根据权利要求 76 所述的方法,其中所述核酸序列包含 SEQ ID NO:29 的核苷酸序列。

81. 根据权利要求 76 所述的方法,其中所述细胞在具有比 LB 培养基更丰富的营养物含量的培养基中生长。

82. 根据权利要求 76 所述的方法,其中所述细胞在含有至少 0.5% 或 1% 或 1.2% 胰脲蛋白,至少 1%、2%、2.2% 或 2.4% 的酵母提取物和 / 或至少 0.1、0.2 或 0.4% 的甘油的培养基中生长。

83. 根据权利要求 76 所述的方法,其中所述核酸序列的转录可用 IPTG 诱导。

84. 根据权利要求 76 所述的方法,其中在 OD 大于 5、10、20、30、35 或 40 时诱导所述细胞。

85. 根据权利要求 76 所述的方法,其还包括在金属螯合剂存在的情况下裂解所述大肠

杆菌细胞以提供包含蛋白质的制剂。

86. 根据权利要求 85 所述的方法,其中所述金属螯合剂是 EDTA 并且以大于 2.5mM 的浓度存在。

87. 根据权利要求 85 所述的方法,其中所述裂解缓冲液的 pH 低于 7.5。

88. 根据权利要求 85 所述的方法,其中所述裂解缓冲液不含去垢剂。

89. 根据权利要求 85 所述的方法,其中所述裂解缓冲液具有低于 200mM 的 NaCl 或小于具有这样的 NaCl 浓度的盐溶液的电导率。

90. 根据权利要求 85 所述的方法,其还包括通过不超过 3 或 2 个柱层析步骤从所述裂解物纯化所述蛋白质。

91. 根据权利要求 90 所述的方法,其中所述嵌合细胞因子蛋白在第一柱层析步骤后纯度为至少 50、60、70、80、90 或 95%。

92. 一种包含嵌合细胞因子蛋白的组合物,其中所述组合物通过根据权利要求 85 所述的裂解方法获得,其中所述蛋白包含与 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列。

93. 一种嵌合细胞因子蛋白的纯化的制剂,所述嵌合细胞因子蛋白包含与 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列,其中所述嵌合细胞因子蛋白具有大于 90% 的纯度,其中所述制剂包含低于 10% 的 des-Ala 形式、低于 10% 的乙酰化形式和低于 10% 的甲二磺酰化形式。

94. 根据权利要求 93 所述的制剂,其中 HCP 水平低于 1000ppm。

95. 根据权利要求 93 所述的制剂,其基本上不含核酸和内毒素。

96. 根据权利要求 93 所述的制剂,其是冷冻干燥的。

97. 根据权利要求 93 所述的制剂其是含水的。

98. 根据权利要求 93 所述的制剂,其中所述蛋白为 1-100mg/ml。

99. 一种评价包含蛋白质的制剂的方法,所述蛋白质包含与 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列,所述方法包括:

获得如下水平的一个或多个或全部的测定:

a) 所述蛋白质的 des-Ala 形式的水平;

b) 所述蛋白质的乙酰化形式的水平;或

c) 所述蛋白质的甲二磺酰化形式的水平;

从而评价所述制剂。

100. 根据权利要求 99 所述的方法,其中所述方法还包括将 a、b 和 c 的全部的一项或多项的测定水平与参照值相比较,其中每一项可具有其自己的参照值。

101. 根据权利要求 100 所述的方法,其中从以下测定所述参照值:所述蛋白质的商购可得样品;所述蛋白质的另一个批次;由监管机构推荐、公开或要求的数值组;颁布规范或标准;由药典当局推荐、公开或要求的数值组。

102. 根据权利要求 100 所述的方法,其中所述测定包括层析分析。

103. 根据权利要求 102 所述的方法,其还包括确定所述制剂是否具有与参照值的预先选择的关系。

104. 根据权利要求 103 所述的方法,其中响应所述测定,处理所述制剂,其中处理包括

选择、接受、加工成药品、运送、配制、贴标签、包装或销售制剂的一项或多项。

105. 根据权利要求 103 所述的方法,其中响应所述测定,改变用于产生所述蛋白质的方法的参数。

106. 根据权利要求 99 所述的方法,其中如果 a、b 或 c 中的形式的一个或多个的水平按重量 / 重量计低于 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15 或 20%,则处理所述制剂,其中处理包括选择、接受、加工成药品、运送、配制、贴标签、包装或销售制剂的一项或多项。

107. 根据权利要求 99 所述的方法,其中通过将前体制剂经历纯化步骤来制备所述制剂。

108. 根据权利要求 99 所述的方法,其中通过将前体制剂与层析基质的一种或多种或全部接触来制备所述制剂。

109. 根据权利要求 99 所述的方法,其中通过将前体制剂以下列顺序与阳离子交换、阴离子交换和羟基磷灰石基质接触来制备所述制剂。

110. 根据权利要求 99 所述的方法,其中所述制剂是纯化过程中的中间产物。

111. 根据权利要求 99 所述的方法,其中所述制剂包含来自纯化过程的洗脱液。

112. 根据权利要求 99 所述的方法,其中所述制剂包含来自阳离子交换柱的洗脱液。

113. 根据权利要求 99 所述的方法,其中所述制剂包含来自阴离子交换柱的洗脱液。

114. 根据权利要求 99 所述的方法,其还包括将前体制剂经历纯化步骤。

115. 根据权利要求 99 所述的方法,其还包括将前体制剂与层析基质接触。

116. 根据权利要求 99 所述的方法,其还包括将前体制剂与层析基质的一种或多种或全部接触。

117. 根据权利要求 99 所述的方法,其还包括将前体制剂以下列顺序与阳离子交换、阴离子交换和羟基磷灰石基质接触。

118. 根据权利要求 99 所述的方法,其中所述处理包括配制用于眼内施用的制剂。

119. 根据权利要求 99 所述的方法,其还包括储存所述评价。

120. 根据权利要求 119 所述的方法,其中储存包括储存于计算机可读记录中。

121. 一种评价蛋白质制剂的方法,其包括:

提供来自在羟基磷灰石柱上纯化的蛋白质的制剂的分离级分,其中所述蛋白质包含与 SEQ ID NO:21 的序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列;

利用弱阳离子交换 (wCEX) 层析分析级分以测定所述蛋白质的 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式的一种或多种的水平;

其中如果所述蛋白质的 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式的一种或多种以低于 10% 存在,则处理所述制剂,其中处理包括选择、接受、加工成药品、运送、配制、贴标签、包装或销售制剂的一项或多项;

从而分析所述蛋白质制剂。

122. 一种分析制备蛋白质制剂的过程的方法,所述蛋白质包含与 SEQ ID NO:21 的序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列,所述方法包括:

提供所述蛋白质的制剂的分离级分,

使用根据权利要求 97 所述的方法分析所述级分,和

如果所述蛋白质的 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式的一种或多种以低于

10% 存在, 则至少部分基于所述分析而维持所述过程。

123. 一种处理蛋白质制剂的方法, 所述蛋白质包含与 SEQ ID NO:21 的序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列, 所述方法包括:

提供制剂中所述蛋白质的 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式的一种或多种的水平, 和

如果所述蛋白质的 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式的一种或多种以低于 10% 存在, 则处理所述制剂, 其中处理包括选择、接受、加工成药品、运送、配制、贴标签、包装或销售制剂的一项或多项。

124. 根据权利要求 123 所述的方法, 其中所述处理包括配制用于眼内施用的制剂。

125. 根据权利要求 123 所述的方法, 其还包括测定所述蛋白质的活性。

126. 一种包含蛋白质、盐、张度剂和去垢剂的组合物, 所述蛋白质包含与 SEQ ID NO:21 的序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列。

127. 根据权利要求 126 所述的组合物, 其中所述盐是柠檬酸钠、醋酸钠或氯化钠或三羟基氨甲烷醋酸盐。

128. 根据权利要求 126 所述的组合物, 其中所述去垢剂是泊洛沙姆 188、聚山梨酯 20、聚山梨酯 80 或聚乙氧基化物。

129. 根据权利要求 126 所述的组合物, 其中所述张度剂是山梨醇、甘露醇、蔗糖、海藻糖或甘油。

130. 根据权利要求 126 所述的组合物, 所述组合物具有 pH5.5、pH5.6、pH5.8、pH5.9、pH6、pH6.1、pH6.3、pH6.5 或 pH6.6。

131. 根据权利要求 126 所述的组合物, 其包含 1mg/mL 至 20mg/mL 的含有 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列的蛋白质、10mM 柠檬酸钠、5% 山梨醇、0.1% 泊洛沙姆 188 并且具有 pH6。

132. 根据权利要求 126 所述的组合物, 其适合给眼施用。

133. 一种包含蛋白质的制剂, 所述蛋白质包含与 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列, 所述制剂包含:

a) 0% 至 15% 的所述蛋白质的 des-Ala 形式;

b) 0% 至 15% 的所述蛋白质的乙酰化形式; 和

c) 0% 至 15% 的所述蛋白质的甲二磺酰化形式。

134. 根据权利要求 133 所述的制剂, 其中所述制剂中至少 80、90、95、99% 的蛋白质是所述蛋白质和来自 a、b 和 c 的形式。

135. 根据权利要求 133 所述的制剂, 其包含至少 6 克、60 克、600 克、6000 克、10kg、50kg、100kg 或 150kg 的所述蛋白质。

136. 一种包含多肽的制剂, 所述制剂包含:

70% 至 100% 的所述多肽;

0% 至 15% 的 Des-Ala 多肽;

0% 至 10% 的甲二磺酰化多肽; 和

0% 至 15% 的乙酰化多肽,

其中所述多肽包含与 SEQ ID NO:21 的序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列。

137. 根据权利要求 136 所述的制剂, 所述制剂包含:

80% 至 99% 的所述多肽；
2% 至 7% 的 Des-Ala 多肽；
0.1% 至 4% 的甲二磺酰化多肽；和
0% 至 5% 的乙酰化多肽。

纯化的蛋白质

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2011 年 7 月 29 日提交的美国临时申请系列 No. 61/513, 453 ; 2012 年 1 月 27 日提交的美国临时申请系列 No. 61/591, 727 的优先权。将这些临时申请的完整内容通过引用并入本申请。

[0003] 背景

[0004] 白细胞介素 -1 α (IL-1 α) 和 β (IL-1 β) 是免疫调节细胞因子的家族的原型成员并且在调节免疫系统中具有几个显著作用。IL-1 α 和 IL-1 β 结合白细胞介素 -1 受体 I (IL-1RI), 从而导致第二受体白细胞介素 -1 受体辅助蛋白 (IL-1RAcP) 的衔接。被 IL-1 α 和 IL-1 β 激动 (agonized) 的信号转导导致放大的 T 细胞反应, 包括初始 T 细胞的增殖和存活以及 T_H17 细胞的发育。

[0005] 概述

[0006] 本文中表征了非天然存在的细胞因子结构域, 其可用于, 除其它以外, 调节对白细胞介素 -1 受体 I (IL-1RI) 的细胞信号反应, 治疗障碍, 以及检测和 / 或结合细胞受体以及其它试剂。

[0007] 本文中還表征了白细胞介素 -1 (IL-1) 嵌合抑制剂的纯化制剂和用于纯化这样的蛋白质的方法。嵌合抑制剂可包括至少两种不同白细胞介素的表面特性, 例如, 与 IL-1RI 相互作用的表面特性。表面特性可来自 IL-1 β 和 IL-1Ra、IL-1 α 和 IL-1RA 或所有这三种细胞因子。IL-1 嵌合抑制剂的合成可产生具有未知效应的产物相关种类。本文中表征的本发明提供了以大大减少的量的这样的产物相关种类产生蛋白质制剂的方法。令人惊讶地, 方法中使用的阳离子和阴离子柱对于除去大量的产物相关种类是有效的。

[0008] 在一个方面, 本公开内容表征了提供嵌合细胞因子蛋白的方法。方法包括在例如至少 1 升培养基中培养包含质粒的大肠杆菌 (E. coli) 细胞, 所述质粒包含在诱导型启动子系统控制之下的编码嵌合细胞因子蛋白的核酸序列。培养体积可以是例如 1L 至 15, 000L, 例如, 5L 至 10, 000L。例如, 培养体积可大于 2L、10L、90L、100L、400L、500L、800L、1000L、5000L、8000L、10, 000L 或 12, 000L。例如嵌合细胞因子蛋白包括与实施例 1 中的氨基酸序列具有至少 90、95、98 或 100% 的同一性的氨基酸序列, 例如 P03、P04 或 P05。例如, 蛋白质是 P05。核酸序列可包括实施例 1 中列出的核酸序列例如编码 P05 的序列。

[0009] 可将细胞培养在具有比 LB 培养基更丰富的营养物含量的培养基中。例如, 将细胞生长在包含至少 0.5% 或 1% 或 1.2% 胰蛋白胨、至少 1%、2%、2.2% 或 2.4% 的酵母提取物、至少 0.5mM EDTA (例如, 0.05mM 至 0.8mM EDTA) 和 / 或至少 0.1、0.2 或 0.4% 甘油的培养基中。可用微量元素补充培养基。可在培养过程中给细胞喂饲葡萄糖, 例如至少 3、5、6、7、8 或 9g/L/hr。可以例如根据培养基 pH、OD 和 / 或细胞生长条件, 以超过一个速率, 例如至少两个不同的速率喂饲细胞。

[0010] 例如, 在培养过程中, 例如以 5-60、30-60、40-60 或 20-40% 的溶解氧给细胞充氧。可将培养基维持在 pH6-7.5 或 6.7-7.2 或 6.9-7.1。

[0011] 例如, 可在大于 5、10、20、30、35 或 40 的 OD 下, 例如, 通过添加 IPTG 来诱导细胞。

例如,诱导型启动子系统包括在一个或多个 lac 操纵子的控制下的 T7 启动子和编码 T7 聚合酶的基因。可将编码核酸序列有效地连接于 T7 启动子。

[0012] 方法还可包括例如在金属螯合剂存在的情况下裂解大肠杆菌细胞以提供包含嵌合细胞因子蛋白的裂解物。金属螯合剂可以是例如 EDTA 或 EGTA。例如,其是 EDTA 并且以大于 2.5mM,例如大于 2.6、3、4、5、7 或 8mM,例如,4 – 11mM 的浓度存在。可使用包含金属螯合剂的裂解缓冲液裂解细胞。

[0013] 裂解缓冲液可具有低于 8.0、7.9、7.5、7.1、7.0、6.9,例如,5.0 至 7.0 或 5.9 至 7.5 或 5.9 至 7.1 的 pH。裂解缓冲液可具有低于 0.1%Triton X-100 的去垢剂浓度 / 胶束浓度。例如,裂解缓冲液不含去垢剂。裂解缓冲液可具有低于 500mM、400mM、300mM、200mM、100mM、50mM 或 10mM 的 NaCl 或低于具有这样的 NaCl 浓度的盐溶液的电导率。

[0014] 方法还可包括例如通过不超过 3 或 2 个柱层析步骤从裂解物纯化嵌合细胞因子蛋白。因此,可将裂解物用于制备如本文中所述的例如用于阳离子交换层析的负载制剂 (load preparation)。

[0015] 在一些实施方案中,方法可包括下列层析步骤的至少 1、2 或 3 个步骤:(i) 阳离子交换步骤,(ii) 阴离子交换步骤,和 (iii) 羟基磷灰石柱层析步骤。

[0016] 在一些实施方案中,嵌合细胞因子蛋白使用不超过一个柱层析步骤来进行纯化。例如,嵌合细胞因子蛋白在第一柱层析步骤后纯度为至少 50、60、70、80、90 或 95%。

[0017] 在一些实施方案中,用于层析柱的负载制剂包括一个或多个过滤步骤,例如使用 0.8/0.45 μm 的过滤 (Sartorius Sartopore® 2); 和 / 或 0.45/0.2 μm 的过滤 (Sartorius Sartopore® 2)。

[0018] 在一个方面,本发明表征了使用阳离子交换柱和阴离子交换柱以及羟基磷灰石柱纯化嵌合细胞因子蛋白制剂的方法。可从在至少 500mL、1 升、2 升或 5 升或更多培养基中培养的细胞例如细菌细胞,例如大肠杆菌细胞回收嵌合细胞因子蛋白制剂,其中大肠杆菌细胞包含具有在诱导型启动子下表达嵌合细胞因子蛋白的核酸序列的质粒。

[0019] 在一个实施方案中,将嵌合细胞因子蛋白制剂用于阳离子交换柱 (CEX); 用不洗脱嵌合细胞因子蛋白的洗涤缓冲液洗涤阳离子交换柱,利用洗脱缓冲液从阳离子交换柱洗脱结合的蛋白质以提供包含嵌合细胞因子蛋白的 CEX 洗脱物。随后将 CEX 洗脱物例如在其中嵌合细胞因子蛋白大体上不结合阴离子交换表面的条件下用于阴离子交换表面; 和收集从阴离子交换柱 (AEX 流通液) 通过的流通液,将其加载至陶瓷羟基磷灰石柱 (CHA)。缓冲条件是使嵌合细胞因子蛋白结合 CHA 柱的条件。随后从柱洗脱纯化的蛋白质。完整蛋白质对污染性蛋白质亚型例如 des-Ala 蛋白质亚型、甲二磺酰化蛋白质亚型和乙酰化蛋白质亚型的比率在纯化后增加。例如,在一个实施方案中,纯化制剂包含少于 10% 的蛋白质的 des-Ala 形式,少于 10% 的蛋白质的乙酰化形式和少于 10% 的蛋白质的甲二磺酰化形式。在另一个实施方案中,纯化制剂包含少于百万分之 50 的宿主蛋白质。

[0020] 纯化的蛋白质制剂可包含例如 70% 至 100%,例如,80% 至 99% 的完整蛋白质; 0% 至 15%,例如,2% 至 7% 的 Des-Ala 蛋白质亚型; 0% 至 10%,例如,0.1% 至 4% 的甲二磺酰化蛋白质亚型; 和 0% 至 15%,例如,0% 至 5% 的乙酰化蛋白质亚型。

[0021] 在另一个方面,本公开内容表征了方法,其包括: 将包含嵌合细胞因子蛋白的完整

形式和任选地 minus-Ala(例如, des-Ala)、甲二磺酰化和乙酰化形式的一种或多种的负载制剂用于阳离子交换表面;用不洗脱嵌合细胞因子蛋白的洗涤缓冲液洗涤阳离子交换表面,和用洗脱缓冲液洗脱阳离子交换表面以提供包含嵌合细胞因子蛋白的完整形式的 CEX 洗脱物。例如嵌合细胞因子蛋白的完整形式包括与实施例 1 中的氨基酸序列具有至少 90、95、98 或 100% 的同一性的氨基酸序列,例如 P03、P04 或 P05。例如,蛋白质是 P05。核酸序列可包括实施例 1 中所列的核酸序列,例如,编码 P05 的序列。完整蛋白质例如 P05 蛋白的 Des-Ala 形式、甲二磺酰化和乙酰化形式是蛋白制剂例如 P05 蛋白质制剂中的杂质,其通过本发明中表征的纯化方法来除去。完整蛋白质的 des-Ala 形式是蛋白质的完整形式,其中 N 末端 Ala 已通过蛋白水解除去;完整蛋白质的甲二磺酰化形式是具有附加的 N 末端甲硫氨酸的完整蛋白质;嵌合细胞因子蛋白的乙酰化形式是乙酰化完整蛋白质或完整蛋白质的乙酰化甲二磺酰化形式。

[0022] 例如,负载制剂可具有小于 5、4、3.5 或 3.3mS/cm 的电导率。负载制剂可不含去垢剂。负载制剂可具有小于 6.0、5.8、5.6 或 5.4 的 pH,例如约 5.3。在一些实施方案中,从先前未被层析的裂解物制备负载制剂。方法可包括例如使用弱酸,例如使用醋酸(例如,通过添加少于 800、600、400、300 或优选约 200mM 醋酸的溶液)将裂解物调整至低于 6.0 的 pH 以制备负载制剂。可以例如通过离心和/或过滤澄清负载制剂。负载制剂可具有低于 5、4、3 或 2g/L 的蛋白质浓度。在一些实施方案中,作为总的嵌合细胞因子蛋白的百分比,负载制剂包含少于 30%、25% 或 20% 的嵌合细胞因子蛋白的 des-Ala 形式,少于 30%、25% 或 20% 的嵌合细胞因子蛋白乙酰化形式和少于 30%、25% 或 20% 的嵌合细胞因子蛋白甲二磺酰化形式。在一些实施方案中,作为总的嵌合细胞因子蛋白的百分比,负载制剂包含 5% 至 20% 或 7% 至 17% 的 des-Ala 形式;1% 至 10% 或 2% 至 7% 的甲二磺酰化形式;和 5% 至 20% 或 8% 至 15% 的乙酰化形式。阳离子交换表面可以是例如强阳离子交换(CEX)表面。在一些实施方案中,表面包括磺丙基官能团。表面可以是可被填充进柱子中的基质(CEX 基质)。例如,CEX 基质包括交联的聚(苯乙烯-二乙烯苯)珠粒。示例性 CEX 基质包括 Poros®XS、CM-Sepharose、CMC-纤维素、SP-Sephadex®和 SP Sepharose® Fast flow。

[0023] 可以以例如低于 40mg/ml 的 CEX 基质的浓度加载嵌合细胞因子蛋白。例如,基质具有 50-200、80-140 或 88-120 微摩尔 Na⁺/ml 的离子容量(ionic capacity)。

[0024] 在一些实施方案中,CEX 基质存在于 0.5 - 20ml 的柱子中或 10mL 至 1000L 的柱子中,例如大于 10mL、15mL、20mL、100mL、200mL、500mL、1L、2L、6L、10L、50L、100L、250L、500L、600L、700L 或 800L 的柱子中。例如,用大于 1、5 或 10 个柱体积洗涤柱子。可用小于 5、4、3.5、3.3mS/cm 的电导率的缓冲液洗涤柱子。例如,洗涤缓冲液具有低于 40、30 或 25mM NaCl;和/或洗涤缓冲液具有至少 5、10 或 15mM NaCl 或相当浓度的其它盐。洗涤缓冲液可包含醋酸。在一些实施方案中,洗涤缓冲液具有低于 6.5、6.0、5.9、5.6 或 5.5,例如,5 - 5.5,例如,约 5.3 或 5 至 5.5,例如,约 5.9 的 pH。

[0025] 在一些实施方案中,洗脱不包括梯度。例如,洗脱包括分步洗脱。分步洗脱可包括使用具有高于结合缓冲液和每一种先前的洗脱缓冲液的 pH 的洗脱缓冲液。分步洗脱是从例如低于 5.7 的 pH 至高于 5.7 的 pH,例如,从低于 5.6 的 pH 至高于 5.85 的 pH,例如从低于 5.5 的 pH 至高于 5.9 的 pH,例如,从约 5.3 的 pH 至至少 6.0 的 pH 或从约 5.3 的 pH 至至

少 6.8 的 pH。分步洗脱可包括应用具有增加的盐浓度和 / 或增加的电导率的洗脱缓冲液。例如, 盐浓度从低于或等于 30mM NaCl 的浓度增加至大于或等 40mM NaCl 或相当浓度的其它盐的浓度。在一些实施方案中, 洗脱缓冲液的主要盐是 NaCl。

[0026] 洗脱缓冲液可具有大于 3.5、4、5、5.5、6mS/cm 例如 5.5 - 7, 例如 6-7, 例如约 6.6mS/cm 的电导率。洗脱缓冲液可包括具有在至少 pH5.9-6.1 的范围内的缓冲能力的缓冲液。例如, 洗脱缓冲液包括 MOPS, 例如, 至少 50mM MOPS, 例如 100-250mM MOPS。洗脱缓冲液还可包括至少 20mM MOPS、pH 高至约 8.0。

[0027] 嵌合细胞因子蛋白的完整形式和 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式可以例如以不同的动力学和 / 或不同的盐浓度或 pH 从阳离子交换表面差异洗脱。例如, 例如在分步或梯度洗脱过程中, des-Ala 形式在完整形式之后洗脱, 乙酰化形式在甲二磺酰化形式和完整形式之前洗脱, 甲二磺酰化形式在完整形式之前洗脱。

[0028] 方法可用于例如通过使一种或多种 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式的百分比减少至少 1%、3%、5%、7% 或 8% 来相对于 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式的一种或多种富集完整形式。例如, 洗脱物中的 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式的一种或多种少于 20%、15%、12%、10% 或 8% 的总的嵌合细胞因子蛋白。

[0029] 方法可用于通过使 des-Ala 形式的百分比减少至少 1%、3%、5%、7% 或 8% 或至少 10%、20%、40% 或 60% 或 70% 或更多来相对于 des-Ala 形式富集完整形式。例如, 洗脱物中的 des-Ala 形式少于 20%、15%、12%、10% 或 8% 的总的嵌合细胞因子蛋白。例如, 洗脱物中的 des-Ala 形式为 2% 至 20%、3% 至 10% 或 4% 至 7% 的总的嵌合细胞因子蛋白。

[0030] 方法可用于通过使乙酰化形式的百分比减少至少 1%、3%、5%、7% 或 8% 或至少 70%、80%、90% 或 99% 来相对于乙酰化形式富集完整形式。例如, 洗脱物中的乙酰化形式少于 10%、5%、3%、1% 或 0.5% 的总的嵌合细胞因子蛋白。例如, 洗脱物中的乙酰化形式为 0.01% 至 5%、1% 至 3% 或 2% 至 2.5% 的总的嵌合细胞因子蛋白。

[0031] 方法还可用于通过使甲二磺酰化形式的百分比减少至少 1%、3%、5%、7% 或 8% 或至少 10%、20%、40%、70% 或 80% 来相对于甲二磺酰化形式富集完整形式。例如, 洗脱物中的甲二磺酰化形式少于 10%、8%、5%、3% 或 2% 的总的嵌合细胞因子蛋白。例如, 洗脱物中的甲二磺酰化形式为 1% 至 10%、2% 至 8% 或 3% 至 5% 的总的嵌合细胞因子蛋白。

[0032] 在一些实施方案中, 嵌合细胞因子蛋白的回收率大于 20%、30%、40%、50%、60%、70% 或 80%, 例如, 60% 至 80%。在一些实施方案中, 嵌合细胞因子蛋白在 CEX 洗脱物中的纯度为至少 50%、60%、70%、80%、85%、90% 或 95%。例如, 在一些实施方案中, 嵌合细胞因子蛋白在 CEX 洗脱物中的纯度为至少 70% 至 99%、80% 至 98%、90% 至 95%。通常地, 宿主细胞蛋白质 (HCP) 浓度相对于负载制剂减小。宿主细胞蛋白质是指与受体结合剂不同的制剂中的蛋白质, 例如是从其制备受体结合剂的宿主细胞的内源蛋白质, 通常地大肠杆菌蛋白质。

[0033] 例如, CEX 洗脱物具有低于 1000ppm、800ppm、600ppm 或 500ppm 的 HCP。在一些实施方案中, HCP 浓度降低至少 70%、80%、90% 或 99%。例如, HCP 浓度降低 80% 至 99.99% 或 90% 至 99.5%。

[0034] 在一个方面, 本发明表征 CEX 洗脱物, 其包含例如完整的嵌合细胞因子蛋白和任选地蛋白质的 des-Ala 形式、甲二磺酰化形式和乙酰化形式。洗脱物可包含 80% 至 99% 的完整蛋白质 (例如, 80%、85%、90% 或 95% 或更多的完整蛋白质); 3% 至 20% 的 des-Ala 种类

(例如, 5%、10%、15% 或 20% des-Ala 种类); 0.1% 至 15% 的甲二磺酰化种类 (0.2%、0.5%、1%、5% 或 10% 的甲二磺酰化种类); 和 0% 至 5% 的乙酰化种类 (0.001%、0.01%、0.1%、1% 或 3% 的乙酰化种类)。

[0035] 在一些方面, 将 CEX 洗脱物在例如其中嵌合细胞因子蛋白大体上不结合阴离子交换表面的条件下用于阴离子交换表面。在其它实施方案中, 使用结合 - 和 - 洗脱阴离子交换层析处理 CEX 洗脱物。

[0036] 方法可用于纯化过程, 例如, 其包括总共不超过 3 或 2 个额外的柱层析步骤。在一些实施方案中, 使用单个柱层析步骤。例如, 在层析步骤中不进行梯度洗脱。

[0037] 另一个方法包括将包含嵌合细胞因子蛋白的制剂用于阴离子交换表面; 和从阴离子交换表面收集流通液 (AEX 流通液)。可将方法与例如阳离子交换层析组合使用, 例如, 如上文和本文中描述的。例如, AEX 流通液包含为用于阴离子交换表面的制剂的例如 1/2、1/10 或 1/50 倍的 HCP。内毒素和核酸例如 DNA 相对于用于阴离子交换表面的制剂可得以减少。在一些实施方案中, 使用的制剂包含低于 5000ppm 的 HCP, AEX 流通液包含低于 1000、500、400 或 300ppm 的 HCP。在一些实施方案中, AEX 流通液中的 HCP 进一步减少 50%、60%、70%、80% 或 90%。在一些实施方案中, AEX 流通液中的 HCP 减少 50% 至 90%、60% 至 80% 或 65% 至 75%。

[0038] 例如, 阴离子交换表面是强季铵阴离子交换器。在一些实施方案中, 阴离子交换表面包括 Capto™ Q 阴离子交换树脂。在一些实施方案中, 阴离子交换表面包括 Poros® HQ 阴离子交换树脂。在一些实施方案中, 阴离子交换表面具有 50-400 或 100-300 微摩尔 Cl⁻/ml 的离子容量。阴离子交换柱的体积可在 40mL 至 20L 的范围内。例如, 阴离子交换柱可具有约 50mL、500mL、1L、5L、10L、20L、50L、80L、100L、120L、150L、300L、500L、600L 或 700L 的体积。

[0039] 阴离子交换表面可以是膜。

[0040] 在一个方面, 本发明表征了 AEX 流通液, 其包含完整的嵌合细胞因子蛋白和任选地蛋白质的 des-Ala 形式、甲二磺酰化形式和乙酰化形式。流通液可包括例如 80% 至 99% 的完整蛋白质 (例如, 80%、85%、90% 或 95% 或更多的完整蛋白质); 3% 至 20% 的 des-Ala 种类 (例如, 5%、10%、15% 或 20% 的 des-Ala 种类); 0.1% 至 15% 的甲二磺酰化种类 (0.2%、0.5%、1%、5% 或 10% 的甲二磺酰化种类); 和 0% 至 5% 的乙酰化种类 (0.001%、0.01%、0.1%、1% 或 3% 的乙酰化种类)。

[0041] 另一个方法包括在例如其中嵌合细胞因子蛋白结合 CHA 柱的条件下将包含嵌合细胞因子蛋白的制剂用于陶瓷羟基磷灰石柱 (CHA); 和在例如其中嵌合细胞因子蛋白从 CHA 柱释放的条件下洗脱 CHA 柱, 和收集包含纯化的嵌合细胞因子蛋白的洗脱物。例如, 从 CHA 柱的洗脱物收集的纯化的嵌合细胞因子蛋白包含更少的宿主细胞蛋白质; 和 / 或减少量的嵌合细胞因子蛋白的形式例如 des-Ala、乙酰化和甲二磺酰化形式的形式。在一些实施方案中, 从 CHA 柱的洗脱物收集的制剂包含低于 500ppm、200ppm、100ppm 或低于 50ppm 的 HCP。在一些实施方案中, CHA 柱的洗脱物中的 HCP 进一步减少 50%、60%、70%、80%、90%、92%、96% 或 98%。在一些实施方案中, CHA 柱的洗脱物中的 HPC 减少 50% 至 99%、60% 至 98% 或 80% 至 95%。

[0042] 嵌合细胞因子蛋白的完整形式和 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式可

以以不同的动力学和 / 或以不同的盐浓度或 pH 从 CHA 交换表面差异洗脱。例如,在例如分步或梯度洗脱过程中,des-Ala 形式在完整形式之前洗脱,甲二磺酰化形式在 Des-Ala 形式之前洗脱。

[0043] 方法可用于例如通过使一种或多种 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式的百分比减少至少 1%、3%、5%、7% 或 8% 来相对于 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式的一种或多种富集完整形式。例如,洗脱物中的 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式的一种或多种少于 20%、15%、12%、10% 或 8% 的总的嵌合细胞因子蛋白。

[0044] 方法可用于通过使 des-Ala 形式的百分比减少至少 1%、3%、5%、7% 或 8% 或至少 10%、20%、40%、60% 或 70% 或更多来相对于 des-Ala 形式富集完整形式。例如,洗脱物中的 des-Ala 形式是 1% 至 10%、2% 至 8% 或 3% 至 6% 的总的嵌合细胞因子蛋白。洗脱物中的 des-Ala 形式可少于 20%、15%、12%、10% 或 8% 的总的嵌合细胞因子蛋白。

[0045] 方法可用于通过使乙酰化形式的百分比减少至少 1%、3%、5%、7% 或 8% 或至少 70%、80%、90% 或 99% 来相对于乙酰化形式富集完整形式。例如,CHA 洗脱物中的乙酰化形式少于 10%、5%、3%、1% 或 0.5% 的总的嵌合细胞因子蛋白。例如,洗脱物中的乙酰化形式为 0.01% 至 5%、1% 至 3% 或 2% 至 2.5% 的总的嵌合细胞因子蛋白。

[0046] 方法还可用于通过使甲二磺酰化形式的百分比减少至少 1%、3%、5%、7% 或 8% 或至少 10%、20%、40%、70%、80% 或 90% 来相对于甲二磺酰化形式富集完整形式。例如,洗脱物中的甲二磺酰化形式少于 10%、5%、2%、1%、0.5% 或 0.05% 的总的嵌合细胞因子蛋白。例如,洗脱物中的甲二磺酰化形式为 0.05% 至 10%、1% 至 8% 或 3% 至 5% 的总的嵌合细胞因子蛋白。

[0047] 在一些实施方案中,嵌合细胞因子蛋白的回收率大于 50%、60%、80% 或 90%,例如,80% 至 99%。在一些实施方案中,嵌合细胞因子蛋白在 CHA 洗脱物中的纯度为至少 50%、60%、70%、80%、85%、90% 或 95%。例如,在一些实施方案中,嵌合细胞因子蛋白在 CHA 洗脱物中的纯度为至少 70% 至 99%、80% 至 98%、90% 至 95%。通常地,HCP 浓度相对于负载制剂减小。

[0048] 例如,CHA 洗脱物具有少于 1000ppm、800ppm、600ppm 或 500ppm 的 HCP。在一些实施方案中,HCP 浓度减少至少 70%、80%、90% 或 99%。例如,HCP 浓度减少 80% 至 99.99% 或 90% 至 99.5%。

[0049] CHA 柱的体积可以例如 150mL 至 500L。例如,阴离子交换柱可具有约 200mL、220mL、500mL、1L、5L、10L、30L、100L、500L、600L、700L 或 800L 的体积。

[0050] 在一个方面,本发明表征 CHA 洗脱物,其包含例如完整嵌合细胞因子蛋白和任选地蛋白质的 des-Ala 形式、甲二磺酰化形式和乙酰化形式。洗脱物可包括例如 80% 至 99% 的完整蛋白质(例如,80%、85%、90% 或 95% 或更多的完整蛋白质);0.1% 至 15% 的 des-Ala 种类(例如,2%、5% 或 10% 的 des-Ala 种类);0.1% 至 10% 的甲二磺酰化种类(0.01%、0.5%、1% 或 5% 的甲二磺酰化种类);和 0% 至 5% 的乙酰化种类(0.001%、0.01%、0.1%、1% 或 3% 的乙酰化种类)。

[0051] 本文中描述的纯化方法还可包括评价材料以检测 des-Ala 形式、乙酰化形式和 / 或甲二磺酰化形式。例如,评价包括分析性弱阳离子交换层析。

[0052] 纯化方法还可包括进行额外的层析步骤、陶瓷羟基磷灰石步骤和 / 或超滤 / 渗滤。

[0053] 嵌合细胞因子蛋白的总回收率可以为 30%、40%、50%、60%、70% 或 80% 的起始蛋白质制剂。嵌合细胞因子蛋白的回收率可以为 30% 至 90%、40% 至 80% 或 50% 至 70% 的总起始蛋

白质。

[0054] 在另一个方面,本公开内容表征了包含嵌合细胞因子蛋白的纯化制剂。例如,嵌合细胞因子蛋白是实施例 1 中所列的蛋白质,例如 P03、P04 或 P05 或与这样的蛋白质具有至少 90% 的同一性的蛋白质。例如,蛋白质是 P05。完整形式对 des-Ala 形式的比率为至少 1:1、2:1、3:1、5:1、8:1 或 10:1,完整形式对乙酰化形式的比率为至少 1:1、2:1、3:1、5:1、8:1 或 10:1,以及完整形式对甲二磺酰化形式的比率为至少 1:1、2:1、3:1、5:1、8:1 或 10:1。

[0055] 嵌合细胞因子蛋白可具有大于 90%、92%、94% 或 95% 的纯度。例如,纯化制剂包含至少 50%、60%、70%、80%、90% 的完整形式作为总的蛋白质的百分比。例如,des-Ala 形式少于 50%、40%、30%、20%、15% 或 10% 的制剂中的蛋白质,和 / 或少于 50%、40%、30%、20%、15% 或 10% 的总的嵌合细胞因子蛋白。完整、des-Ala、乙酰化和甲二磺酰化形式的相对量可通过分析法例如分析性弱阳离子交换层析来测定。制剂可包括少于 10% 的含量的嵌合细胞因子蛋白的其它形式(即,除 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式的其它形式)。

[0056] 纯化制剂中的嵌合细胞因子蛋白的浓度可以为至少 0.001mg/ml、0.1mg/ml、1mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、20mg/mL 或 50mg/ml。例如,蛋白质为 10-100mg/ml、1mg/mL - 20mg/mL、1 - 50mg/ml、10 - 50mg/ml 或 25 - 75mg/ml 或 40 - 105mg/ml。

[0057] 制剂可以是含水制剂并且还可包括缓冲剂和药学上可接受的盐。制剂可以是无菌含水制剂(例如,包括注射用水)。制剂可具有不同的体积,并且可包含至少 1mg、100mg、1g、10g、50g、100g 或 1kg 的完整蛋白质。

[0058] 可冷冻干燥制剂。制剂,例如如果含水,可进行冷冻或可在 4℃ -8℃ 或室温保存。在一些实施方案中,制剂(例如,液体制剂或冻干制剂)在室温(例如,21℃ 至 25℃,例如,23℃)稳定至少两周、至少 1 个月、至少 3 个月、至少 6 个月、至少 1 年或更长。在一个实施方案中,制剂稳定冷冻(例如,在 -20℃ 或 -70℃ 或 -80℃)至少 6 个月、至少 1 年、至少 2 年或更长时间。在一些实施方案中,制剂包括少于 20%、15%、10% 或 5% 的 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式。

[0059] 制剂可大体上不含核酸和内毒素。例如,其具有低于 1000ppm、500ppm、400ppm、300ppm、200ppm、100ppm 或 50ppm 的 HCP 水平。

[0060] 在一些实施方案中,制剂包括本文中描述的缓冲条件。在一些实施方案中,制剂具有 5-6、6-7 或 7-8,例如,5.5-7.5 的 pH。在一些实施方案中,制剂具有小于 10mS/cm、8mS/cm、7mS/cm、6mS/cm、5mS/cm 或 4mS/cm 的电导率。制剂可包括 MOPS 或其它缓冲剂,例如 Tris 或醋酸盐。制剂可不含去垢剂。制剂可包含磷酸盐或可不含磷酸盐。制剂可包含螯合剂。

[0061] 制剂可包含盐、张度剂和去垢剂的一种或多种。盐可以是例如柠檬酸钠、醋酸钠、氯化钠等。示例性张度剂包括山梨醇、甘露醇、蔗糖、海藻糖和甘油。示例性去垢剂包括例如泊洛沙姆 188、聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 80、脱水山梨糖醇的其它脂肪酸酯以及聚氧乙烯醚。

[0062] 在一个实施方案中,制剂包含 1mg/mL 至 30mg/mL 嵌合细胞因子蛋白、5mM 至 15mM 柠檬酸钠、2% 至 8% 山梨醇、0.05% 至 0.15% 泊洛沙姆 188, pH5.5-6.5。在另一个实施方案中,制剂包含 1mg/mL 至 20mg/mL 嵌合细胞因子蛋白、10mM 柠檬酸钠、5% 山梨醇、0.1% 泊洛沙姆 188, pH6.0。

[0063] 在一个实施方案中,制剂还包含类固醇。类固醇可以是例如地塞米松、肤轻松

(fluocinolone)、氟轻松 (fluocinolone acetonide)、曲安西龙、曲安奈德或其盐或混合物。

[0064] 在一个方面,制剂适合用于施用至眼中,例如,局部地施用至眼中。

[0065] 在一个方面,本发明表征了评估制剂的方法,所述制剂包含本文中描述的细胞因子蛋白,例如包含与 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列的蛋白,所述方法包括获得(例如直接获得)如下水平的一个或多个或全部水平的测定:(a) 所述蛋白质的 des-Ala 形式的水平;(b) 所述蛋白质的乙酰化形式(其中乙酰化形式可以是全长序列例如嵌合细胞因子蛋白或 des-Ala 形式的全长序列的乙酰化形式)的水平;或(c) 所述蛋白质的甲二磺酰化形式(其中甲二磺酰化形式可以是全长序列例如嵌合细胞因子蛋白的全长序列的甲二磺酰化形式)的水平。方法还可包括将 a、b 和 c 的全部的一项或多项的测定水平与参照值相比较,其中每一项可具有其自己的参照值。例如,方法可包括如下方面的一个或多个或全部方面:可将 a 的测定水平与 des-Ala 形式的水平的参照值相比较,可将 b 的测定水平与乙酰化形式的水平的参照值相比较,可将 c 的测定水平与甲二磺酰化形式的水平的参照值相比较。

[0066] 在一个实施方案中,从例如所述蛋白质的商购可得样品;另一个批次,例如所述蛋白质的更早批次;由管理机构推荐、公布或要求的数值组;发表的说明书或标准;由药典当局例如美国药典(U. S. PHARMACOPEIA)推荐、公布或要求的数值组测定参照值。

[0067] 测定可包括例如层析分析例如弱阳离子交换层析分析。

[0068] 在一个实施方案中,方法包括确定制剂是否具有预先选择的与参照值的关系,例如其是否大于、等于或小于参照值。

[0069] 在一个实施方案中,对测定的反应,处理制剂,其中处理包括选择、接受、加工成药品、运送、配制、贴标签、包装或销售制剂的一项或多项。

[0070] 在一个实施方案中,改变对施用的反应、用于产生蛋白质的方法的参数。在实施方案中,在已完成给定的改变后重复测定。

[0071] 如果乙酰化、甲二磺酰化或完整形式的一种或多种的水平按例如重量/重量计低于 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15 或 20%,则处理制剂,其中处理包括选择、接受、加工成药品、运送、配制、贴标签、包装或销售制剂的一项或多项。

[0072] 制剂可以例如通过将前体制剂经历纯化步骤来制备。制剂还可通过将前体制剂与层析基质例如阳离子交换、阴离子交换或羟基磷灰石基质接触来制备。制剂还可通过将前体制剂与层析基质例如阳离子交换、阴离子交换或羟基磷灰石基质的一种或多种或全部接触来制备。在一个实施方案中,制剂可通过将前体制剂与以下列顺序与阳离子交换、阴离子交换和羟基磷灰石基质接触来制备。

[0073] 在一些实施方案中,制剂是纯化过程中的中间物,在该情况下,制剂可以是例如来自层析过程的浓缩或稀释的洗脱液。

[0074] 制剂可包括例如来自阳离子交换柱的洗脱液,例如来自阳离子交换柱的浓缩或稀释的洗脱液或制剂可包括来自阴离子交换柱的洗脱液。

[0075] 在一个实施方案中,方法还包括将前体制剂经历纯化步骤。例如,可将前体制剂与层析基质例如阳离子交换、阴离子交换或羟基磷灰石基质的一种或多种或全部接触。与前体制剂的接触可以是与阳离子交换基质,和随后与阴离子交换基质,和随后与羟基磷灰石

基质的接触。

[0076] 处理可包括例如配制用于给眼内施用的制剂。

[0077] 在一个实施方案中,将评价储存在例如计算机可读记录中。

[0078] 本发明的一个方面表征了通过例如下列步骤评价蛋白质制剂的方法:提供来自在羟基磷灰石柱上纯化的蛋白质制剂的分离的级分,其中蛋白质具有与 SEQ ID NO:21 的序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列,和利用弱阳离子交换 (wCEX) 层析分析级分以测定蛋白质的 des-Ala 形式、乙酰化形式或甲二磺酰化形式的一种或多种的水平。如果蛋白质的 des-Ala 形式、酰化形式或甲二磺酰化形式的一种或多种以低于 10% 的水平存在,则例如通过选择、接受、加工成药品、运送、配制、贴标签、包装或销售制剂来处理制剂。

[0079] 在一个方面,本发明表征了例如通过提供蛋白质的制剂的分离的级分,使用根据权利要求 93 所述的方法进行分析,来分析制备包含与 SEQ ID NO:21 的序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列的蛋白质的制剂的过程的方法,如果蛋白质的 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式的一种或多种以少于 10% 的百分比存在,则至少部分基于分析维持所述过程。

[0080] 在另一个方面,本发明表征了例如通过提供制剂中蛋白质的 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式的一种或多种的水平的 wCEX 测定,来处理包含与 SEQ ID NO:21 的序列具有至少 90% 的同一性的氨基酸序列的蛋白质制剂的方法,如果蛋白质的 des-Ala 形式、乙酰化形式和甲二磺酰化形式的一种或多种以少于 10% 的百分比存在,则处理所述制剂,其中处理包括选择、接受、加工成药品、运送、配制、贴标签、包装或销售制剂的一项或多项。在一个

[0081] 处理可包括例如配制用于眼内施用的制剂。

[0082] 在一个实施方案中,处理包括测定蛋白质的活性。

[0083] 在另一个方面,本公开内容表征了分离的蛋白质,包括包含来自至少两个亲代细胞因子结构域的氨基酸残基(例如受体结合特性、表面特性、 β 链)和来自至少两个亲代细胞因子结构域的环的细胞因子结构域。

[0084] 在一些实施方案中,细胞因子结构域结合 IL-1RI 并且包括来自不同亲代细胞因子结构域,例如来自受体激动剂和受体拮抗剂(例如 IL-1 β 和 IL-1Ra 或 IL-1 α 和 IL-1Ra),来自 IL-1 β 的 IL-1 α 或来自 IL-1Ra、IL-1 α 和 IL-1Ra 的全部三种的受体结合特性。受体结合特性可对应于位点 A 和 B 中的残基、区段或区域。关于这样的对应于位点 A 和 B 的残基、区段和区域,在 IL-1 (IL-1 β 、IL-1 α 和 IL-1Ra) 的背景中,参见下文中进一步的定义。

[0085] 关于位点 A,细胞因子结构域可具有:(a) (i) 与第一亲代细胞因子结构域中的对应残基具有至少 60%、70%、80%、85%、88%、90%、92%、95%、98% 或 100% 的同一性的位点 A 残基;(a) (ii) 与第一亲代细胞因子结构域中的对应残基具有至少 60%、70%、80%、85%、88%、90%、92%、95%、98% 或 100% 的同一性的延伸的位点 A 残基;(a) (iii) 与第一亲代细胞因子结构域中的对应区域具有至少 80%、85%、88%、90%、92%、95% 或 100% 的同一性的位点 A 区段 A1 和 A2;和 / 或 (a) (iv) 与第一亲代细胞因子结构域中的对应区域具有至少 80%、85%、88%、90%、92%、95% 或 100% 的同一性的位点 A 区域。

[0086] 关于位点 B,细胞因子结构域可具有:(b) (i) 与第二亲代细胞因子结构域中的对

应残基具有至少 60%、70%、80%、85%、88%、90%、92%、95%、98% 或 100% 的同一性的位点 B 残基；(b) (ii) 与第二亲代细胞因子结构域中的对应残基具有至少 60%、70%、80%、85%、88%、90%、92%、95%、98% 或 100% 的同一性的延伸的位点 B 残基；(b) (iii) 与第二亲代细胞因子结构域的对应该区域具有至少 80%、85%、88%、90%、92%、95% 或 100% 的同一性的位点 B 区段 B1、B2 和 B3；和 / 或 (b) (iv) 与第二亲代细胞因子结构域的对应该区域具有至少 80%、85%、88%、90%、92%、95% 或 100% 的同一性的位点 B 区域。

[0087] 在一些实施方案中，细胞因子结构域包括特性：(a) (i) 和 b(i)、(a) (ii) 和 b(ii)、(a) (iii) 和 (b) (iii) 或 (a) (iv) 和 (b) (iv)，例如，其中每一个特性进一步通过 80、85、88、90、92、95 或 100% 的同一性来定义。例如，第一亲代细胞因子结构域可以是 IL-1 β ，并且第二亲代细胞因子结构域可以是 IL-1Ra。例如，第一亲代细胞因子结构域可以是 IL-1 α ，并且第二亲代细胞因子结构域可以是 IL-1Ra。

[0088] 细胞因子结构域还可在结构域中的一个或多个位置上包括减弱与细胞因子第二受体（例如，IL-1RAcP）的相互作用的来自第二亲代细胞因子结构域的氨基酸。例如，第二亲代细胞因子结构域是 IL-1Ra。在一些实施方案中，细胞因子结构域包括一个或多个来自 IL-1Ra 的位点 C 和 / 或 D 区段（例如，C1、D1、D2、D3、D4 和 / 或 D5）或与这样的区段具有至少 80、85、88、90、92、95 或 100% 的同一性的序列。例如，细胞因子结构域包括 (i) 与 IL-1Ra 中的对应残基具有至少 60、70、80、85、88、90、92、95、98 或 100% 的同一性的位点 C 残基；(ii) 与 IL-1Ra 中的对应残基具有至少 60、70、80、85、88、90、92、95、98 或 100% 的同一性的位点 D 残基；(iii) 与 IL-1Ra 中的对应残基具有至少 70、75、80、85、88、90、92、95、98 或 100% 的同一性的 C1 区段；或 (iv) 与在至少 3、4 或 5 个残基上与 IL-1Ra 中的对应残基相同的 D2 区段。细胞因子结构域可包括特性 (i) 和 (ii) 或 (ii) 和 (iii)，例如，其中每一个特性进一步通过 80、85、88、90、92、95 或 100% 的同一性来定义，或 (iii) 和 (iv)

[0089] 结构域可包括来自至少两个不同的人 IL-1 家族细胞因子结构域的区域，其中区域选自 A 区域（具有 A1 和 A2 区段）、B 区域（具有 B1、B2 和 B3 区段）、C 区域和 D 区域（具有 D1、D2、D3、D4 和 D5 区段）。

[0090] 细胞因子结构域可包括来自不同细胞因子结构域的位点 A 区域和位点 B 区域。位点 A 区域可来自天然存在的受体激动剂或拮抗剂；位点 B 区域可来自天然存在的受体激动剂。其可包括来自天然存在的受体拮抗剂的位点 C 区域和 / 或来自天然存在的受体拮抗剂的位点 D 区域。

[0091] 例如，结构域可以是嵌合结构域，其具有在长度上为至少 5、6、10、15、20 或 25 个氨基酸并且与来自至少两个不同亲代细胞因子结构域例如第一和第二亲代细胞因子结构域的对应该区段具有至少 80、85、88、90、92、95 或 100% 的同一性的区段。亲代细胞因子结构域可以是 IL-1RI 结合细胞因子，例如 IL-1 β 、IL-1 α 和 IL-1Ra。在一些实施方案中，不存在于来自第一亲代细胞因子结构域的区段中的氨基酸来自两个或更多个其它亲代细胞因子结构域。

[0092] 在一些实施方案中，细胞因子结构域包括至少两个在长度上具有至少 5、6、10、15、20 或 25 个氨基酸的区段，所述区段与第一亲代细胞因子结构域的对应该区段具有至少 80、85、88、90、92、95 或 100% 的同一性，并且不存在于这样的区段上的氨基酸与第二亲代细胞因子结构域中的对应残基具有显著（例如，至少 50、60、70、80、85、88、90、92、95 或 100%）同

一性。

[0093] 在一些实施方案中,细胞因子结构域包含 (i) 至少两个在长度上具有至少 5、6、10、15、20 或 25 个氨基酸的区段,所述区段与第一亲代细胞因子结构域的对应区段具有至少 80、85、88、90、92、95 或 100% 的同一性,和 (ii) 至少 1、2 或 3 个例如在长度上具有至少 5、6、7、8、10 或 15 个氨基酸的区段,所述区段与第二亲代细胞因子结构域相同。

[0094] 例如,细胞因子结构域可包括具有 20-50、25-50、30-45 或 30-40 个氨基酸(例如,29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 或 40) 的第一区段,和具有 20-45、20-40、25-40 或 25-35 个氨基酸(例如,25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 或 35) 的第二区段,每一个区段与第一亲代细胞因子结构域(例如,IL-1Ra) 相同(或至少 80、85、88、90、92、95 或 98% 的同一性),和与第二亲代细胞因子结构域(例如,IL-1 β 或 IL-1 α) 相同(或至少 80、85、88、90、92、95 或 98% 的同一性)的第三区段。例如,第三区段在长度上可以为 55-90、60-90、60-85 或 70-85 个氨基酸,例如,在长度上为 75、76、77、78、79、80、81、82、83、84 或 85 个氨基酸。

[0095] 在一些实施方案中:第一区段可以是与 WDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPV (SEQ ID NO:9,在本文中也称为 A1 区段,对应于 SEQ ID NO:3 的残基 16-40 和根据 IL-1 β 编号的残基 11-36) 具有至少 80、85、88、90、92、95、98 或 100% 的同一性的区段。第二区段可以是与 SEQ ID NO:3 (IL-1Ra) 的残基 120-140 或 120-141(对应于残基 121-139 或 121-140(根据 IL-1 β 编号)) 具有至少 80、85、88、90、92、95、98 或 100% 的同一性的区段。第三区段可以与来自 IL-1 β (SEQ ID NO:1) 的残基 45-100 或 42-120 具有至少 80、85、88、90、92、95、98 或 100% 的同一性。

[0096] 在一些情况下,第一区段可以是与 SEQ ID NO:3 的残基 14-45(对应于根据 IL-1 β 编号的残基 9-41) 具有至少 80、85、88、90、92、95、98 或 100% 的同一性的区段。第二区段可以是与 SEQ ID NO:3 的残基 120-145(对应于根据 IL-1 β 编号的残基 121-145) 或 SEQ ID NO:3 的残基 120-147(对应于根据 IL-1 β 编号的残基 121-147) 具有至少 80、85、88、90、92、95、98 或 100% 的同一性的区段。在一些实施方案中,至少残基 11-41 和 120-147(根据 IL-1 β 编号) 总体上与 IL-1Ra 中对应残基具有至少 80、85、88、90、92、95、98 或 100% 的同一性。

[0097] 在一些实施方案中,第一 IL-1 家族细胞因子结构域的区段之一的末端位于 SEQ ID NO:1 的氨基酸 41 的 5、4、3、2 或 1 个氨基酸内,并且第一 IL-1 家族细胞因子结构域的区段之一的末端位于 SEQ ID NO:1 的氨基酸 121 的 5、4、3、2 或 1 个氨基酸内。

[0098] 在一些实施方案中,结构域包括在 SEQ ID NO:1 的氨基酸 42 的 5、4、3、2 或 1 个氨基酸内的位置上具有 N 末端并且在 SEQ ID NO:1 的氨基酸 120 的 5、4、3、2 或 1 个氨基酸内具有 C 末端的区段、和 / 或在 SEQ ID NO:1 的氨基酸 121 的 5、4、3、2 或 1 个氨基酸内的位置上具有 N 末端并且在 SEQ ID NO:1 的氨基酸 145 的 5、4、3、2 或 1 个氨基酸内具有 C 末端的区段。在一些实施方案中,结构域中对应于残基 11-41 和 120-147(根据 IL-1 β 编号) 的位置上的残基总体上与 IL-1Ra 中的对应残基具有至少 80、85、88、90、92、95、98 或 100% 的同一性。结构域还可基于 IL-1 细胞因子家族成员的例如在与前述位置类似的位置上的序列。

[0099] 在一些实施方案中,细胞因子结构域包括下列序列的 1、2、3 或更多个:

- [0100] WDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVN (SEQ ID NO :9) ;NLEEK (SEQ ID NO :10) ;
- [0101] RIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVNLEEK (SEQ ID NO :11) ;AMEADQP (SEQ ID NO :12) ;
- [0102] FLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFY (SEQ ID NO :13) ;和 / 或与前述序列具有至少 80、85、88、90、92、95、98 或 100% 的同一性的序列。在一些实施方案中,细胞因子结构域包括下列序列的 1、2、3 或更多个 :
- [0103] VQGEESNDKI (SEQ ID NO :14) ;KKKMEKRF (SEQ ID NO :15) ;和
- [0104] FSMSFVQGEESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKN
- [0105] YPKKKMEKRFVFNKIEINNLEFES (SEQ ID NO :16) ;
- [0106] 和 / 或与前述序列具有至少 80、85、88、90、92、95、98 或 100% 的同一性的序列。
- [0107] 在一些实施方案中, $\beta 1 \beta 2$ 、 $\beta 2 \beta 3$ 、 $\beta 8 \beta 9$ 和 $\beta 10 \beta 11$ 环的一个或多个或全部与来自 IL-1 拮抗剂例如 IL-1Ra 的对应的环具有至少 80、85、88、90、92、95 或 100% 的同一性。在一些实施方案中, $\beta 4 \beta 5$ 、 $\beta 5 \beta 6$ 、 $\beta 6 \beta 7$ 和 $\beta 7 \beta 8$ 环的一个或多个或全部与来自与人亲代细胞因子不同的 IL-1 家族细胞因子结构域的对应环具至少 80、85、88、90、92、95 或 100% 的同一性,所述对应环与 $\beta 1 \beta 2$ 、 $\beta 2 \beta 3$ 、 $\beta 8 \beta 9$ 和 $\beta 10 \beta 11$ 环最相似。例如, $\beta 4 \beta 5$ 、 $\beta 5 \beta 6$ 、 $\beta 6 \beta 7$ 和 $\beta 7 \beta 8$ 环的一个或多个或全部与来自 IL-1 激动剂例如 IL-1 β 的这样的环具有至少 80、85、88、90、92、95 或 100% 的同一性。在一些实施方案中, $\beta 11 \beta 12$ 环与来自 IL-1 拮抗剂例如 IL-1Ra 的对应环具有至少 80、85、88、90、92、95 或 100% 的同一性。
- [0108] 在一些实施方案中,细胞因子结构域包含与 IL-1Ra 的 β 链 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 10$ 和 $\beta 11$ 的 1、2、3 个或全部具有至少 80、85、88、90、92、95 或 100% 的同一性的序列。在一些实施方案中,细胞因子结构域包括与 IL-1 β 的 $\beta 4$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 7$ 和 $\beta 8$ 或 IL-1 β 的 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 7$ 和 $\beta 8$ 的 1、2、3 个或全部具有至少 80、85、88、90、92、95 或 100% 的同一性的序列。
- [0109] 在一些实施方案中,细胞因子结构域不包含与 SEQ ID NO:3 的氨基酸 I46-G59、A55-G59、A55-V83、I60-V83、N84-D95、I46-S110、V49-S110 或 I46-G118 具有超过 80、85、90、95 或 100% 的同一性的区段。在一些实施方案中,细胞因子结构域不包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸 N7-V41、R11-M36、N102-D145 或 Y121-D145 具有超过 80、85、90、95 或 100% 的同一性的区段。
- [0110] 一般而言、细胞因子结构域不是天然存在的。其与人 IL-1 家族细胞因子结构域相异。例如,其与 IL-1Ra (SEQ ID NO:3)、IL-1 β (SEQ ID NO:1) 和 / 或 IL-1 α (SEQ ID NO:2) 具有少于 98、95、90、85、80、75、70、65、60 或 55% 的同一性。细胞因子结构域还可与这样的细胞因子具有至少 30、40、45、50、55、60、65、70% 的同一性。例如,嵌合结构域可与 IL-1Ra、IL-1 β 和 IL-1 α 具有 30-95%、40-90% 或 45-85% 的同一性。例如,嵌合结构域可与 IL-1 β 具有 40-90% 的同一性和与 IL-1Ra 具有 35-85% 的同一性;与 IL-1 β 具有 40-80% 的同一性和与 IL-1Ra 具有 45-80% 的同一性;与 IL-1 β 具有 45-72% 的同一性和与 IL-1Ra 具有 45-80% 的同一性;与 IL-1 β 具有 45-72% 的同一性和与 IL-1Ra 具有 53-80% 的同一性;与 IL-1 β 具有 50-72% 的同一性和与 IL-1Ra 具有 53-70% 的同一性;与 IL-1 β 具有 60-72% 的同一性和与 IL-1Ra 具有 53-68% 的同一性;与 IL-1 β 具有 65-72% 的同一性和与 IL-1Ra 具有 54-60% 的同一性;或与 IL-1 β 具有 68-72% 的同一性和与 IL-1Ra 具有 54-57% 的同一性。例如,嵌合结构域可与 IL-1 α 具有 40-90% 的同一性和与 IL-1Ra 具有 35-85% 的同

一性；与 IL-1 α 具有 40-80% 的同一性和与 IL-1Ra 具有 45-80% 的同一性；与 IL-1 α 具有 45-72% 的同一性和与 IL-1Ra 具有 45-80% 的同一性；与 IL-1 α 具有 45-72% 的同一性和与 IL-1Ra 具有 53-80% 的同一性；与 IL-1 α 具有 50-72% 的同一性和与 IL-1Ra 具有 53-70% 的同一性；与 IL-1 α 具有 60-72% 的同一性和与 IL-1Ra 具有 53-68% 的同一性；与 IL-1 α 具有 65-72% 的同一性和与 IL-1Ra 具有 54-60% 的同一性；或与 IL-1 α 具有 68-72% 的同一性和与 IL-1Ra 具有 54-57% 的同一性。

[0111] 在一些实施方案中，细胞因子结构域与 IL-1Ra 相异，并且结合受体，同时包括天然存在的受体拮抗剂（例如 IL-1Ra）的位点 C 和 / 或位点 D 特征。例如，结构域与人 IL-1 β 和 / 或 IL-1Ra 具有少于 98、95、92、90、85 和 80% 的同一性。例如，结构域与 IL-1Ra 具有 40-95%、40-90% 或 45-85% 的同一性。结构域还可与 IL-1 家族细胞因子激动剂例如 IL-1 α 或 IL-1 β 具有 40-95%、40-90% 或 45-85% 的同一性。在一些实施方案中，细胞因子结构域包括：来自第一亲代细胞因子的至少 40、45、50、55、60、65、70、75、80 或 85% 的氨基酸，其为细胞因子信号转导的激动剂。

[0112] 在一些实施方案中，细胞因子结构域与受体激动剂（例如 IL-1 β 或 IL-1 α ）的氨基酸同一性（例如，至少大于 5、10、15 或 20%）大于与受体拮抗剂（IL-1Ra）的同一性，但用作 IL-1RI 的拮抗剂。

[0113] 在一些实施方案中，细胞因子结构域是完全嵌合的，例如，结构域中的每一个氨基酸来自亲代细胞因子结构域之一，例如两个亲代细胞因子结构域之一或 3 个或更多个亲代细胞因子之一。例如，亲代细胞因子结构域是人细胞因子结构域或非人灵长类动物细胞因子结构域。在一些实施方案中，细胞因子结构域是部分嵌合的，例如结构域中的所有氨基酸不全来自亲代细胞因子结构域之一。

[0114] 例如，分离的蛋白质结合 IL-1RI 并且通过受体调节信号转导，例如，激动或拮抗 IL-1RI 受体信号转导活性。在一些实施方案中，蛋白质当与 IL-1 β 反应性人细胞接触时未显著诱导 IL-6 的产生，和 / 或大体上不诱导 IL-1 β 反应性受体基因的产生（例如，以 10 μ g/ml、100 μ g/ml 或 1mg/ml 的浓度）。一般而言，蛋白质通过 IL-1 β （例如，在本文中描述的细胞测定中以 0.1ng/ml 的浓度），以小于 100、50、20、10 或 5nM 的 IC₅₀ 抑制信号转导。蛋白质可以通过 IL-1 β 以小于 IL-1Ra 的 IC₅₀（例如，至少小于 10、20 或 50%）的 IC₅₀ 抑制信号转导。

[0115] 在某些实施方案中，细胞因子结构域例如以与亲代细胞因子结构域之一相同或更好的亲和力结合。在一些实施方案中，细胞因子结构域以小于 100nM、50nM、20nM、10nM、5nM 或 1nM 或小于 500pM、400pM、100pM 或 50pM 的 K_d 结合 IL-1RI。例如，缔合常数可大于 1 $\times$ 10⁴、3 $\times$ 10⁴、1 $\times$ 10⁵ 或 1 $\times$ 10⁶M⁻¹s⁻¹，解离常数可小于 1 $\times$ 10⁻³、1 $\times$ 10⁻⁴、6 $\times$ 10⁻⁴ 或 6 $\times$ 10⁻⁵s⁻¹。

[0116] 在一些实施方案中，细胞因子结构域以比 IL-1 β 或 IL-1Ra 更好的亲和力（例如，更低的 K_d）和 / 或更慢的解离结合 IL-1RI。例如，细胞因子结构域可以以小于或等于 IL-1Ra 的解离常数的解离常数和 / 或以大于或等于 IL-1 β 的缔合常数结合 IL-1RI。

[0117] 细胞因子结构域在长度上可为约 120-180 个氨基酸，在长度上可为 140-170 个氨基酸，在长度上可为 148-160 个氨基酸，或在长度上可为 150-156 个氨基酸。在一些实施方案中，结构域在长度上为 152 个氨基酸，在长度上为 153 个氨基酸或在长度上为 154 个氨基酸。通常地，结构域包括至少 10、11 或 12 个 β -链，并且是稳定折叠的。在一些实施方

案中,细胞因子结构域具有至少 38°C、40°C、42°C、44°C、46°C、48°C、50°C、52°C、54°C、56°C、58°C、60°C、62°C 或 64°C 的 T_m ,如本文中描述的。其可具有 51-61°C、51-66°C、56-61°C 或 56-66°C 的 T_m 。在一些实施方案中,细胞因子结构域在至少 48°C、50°C、51°C、55°C、57°C、58°C 或 59°C 后才开始展开。例如,其在生理缓冲液中具有至少在 IL-1Ra 和 / 或 IL-1 β 的 T_m 的 10°C 或 5°C 内的 T_m 。在一些实施方案中,其在生理缓冲液中比 IL-1Ra 和 / 或 IL-1 β 更具热稳定性。例如结构域在生理缓冲液中可具有比 IL-1Ra 和 / 或 IL-1 β 的 T_m 高至少 2°C、4°C、6°C、7°C 或 8°C,例如在约 0.5mg/ml 的浓度下比 IL-1Ra 和 / 或 IL-1 β 的 T_m 高约 5-12°C、5-10°C 或 7-10°C 的 T_m 。

[0118] 蛋白质可包括本文中描述的其它特性。

[0119] 在另一个方面,本公开内容表征了包括嵌合 IL-1 家族细胞因子结构域的分离的蛋白质。IL-1 细胞因子家族成员的实例包括 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1Ra、IL-18、IL-1F5、IL-1F6、IL-1F7、IL-1F8、IL-1F9、IL-1F10 和 IL-33。细胞因子结构域可包括前述细胞因子之一的受体结合区域或包括一种或多种这样的细胞因子的元件的蛋白质序列。例如,细胞因子结构域可包括两个或更多个 IL-1 细胞因子家族成员的嵌合结构域。

[0120] 在一个实施方案中,嵌合结构域包括至少一个长度为至少 5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65 或 70 个氨基酸并且具有与第一 IL-1 家族细胞因子相同的氨基酸(或与其具有至少 80、82、85、87、90、92、94、95、96、97、98 或 99% 的同一性)的区段,和长度为至少 5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35 或 40 个氨基酸并且具有与第二 IL-1 家族细胞因子相同的氨基酸(或与其具有至少 80、82、85、87、90、92、94、95、96、97、98 或 99% 的同一性)的另一个区段。嵌合结构域可与第一和第二 IL-1 家族细胞因子的之一或两者具有少于 90、85、80 或 75% 的同一性。

[0121] 在一个实施方案中,第一和第二 IL-1 家族细胞因子选自 IL-1 β 、IL-1 α 和 IL-1Ra。在另一个实施方案中,第一和第二 IL-1 家族细胞因子选自 IL-1F5、IL-1F6、IL-1F7 和 IL-1F8。在另一个实施方案中,第一 IL-1 家族细胞因子选自激动剂并且第二家族细胞因子选自拮抗剂。在一些实施方案中,嵌合结构域包括少于 120、110、100、90 或 80 个来自相同亲代细胞因子结构域连续氨基酸。

[0122] 在一个实施方案中,嵌合结构域在至少 50、60、70、80、90、100、110 或 120 个位置上与第一 IL-1 家族细胞因子相同,并且在至少 50、60、70、80、90、100、110 或 120 个位置(包括可单独地与这两种细胞因子相同的位置)上与第二 IL-1 家族细胞因子相同。

[0123] 在一个实施方案中,嵌合结构域包括至少 2、3 或 4 个不连续区段,每一个具有至少 5、6、7、8、9、10、15 或 20 个氨基酸的长度并且具有与第一 IL-1 家族细胞因子的对应区段相同的氨基酸(或与其具有至少 80、82、85、87、90、92、94、95、96、97、98 或 99% 的同一性),并且在其余位置上包括主要来自第二 IL-1 家族细胞因子的氨基酸。在一个实施方案中,嵌合结构域包括 4、5、6 或 7 个区段,其中相邻区段来自不同的亲代 IL-1 家族细胞因子结构域。例如,结构域中的每一个氨基酸位于来自天然存在的人 IL-1 家族细胞因子结构域的长度为至少 5 或 6 个氨基酸的肽中。在一个实施方案中,嵌合结构域包括如下区段的至少 1、2 或 3 个:(i) 来自 IL-1 β 的长度为至少 50、60、65、70 或 75 个氨基酸的区段、(ii) 来自 IL-1Ra 的长度为至少 15、20、25 个氨基酸的区段;和 (iii) 来自 IL-1Ra 的长度为至少 15、20、25 个氨基酸的另一个区段。

[0124] 在一个实施方案中,不连续区段包括根据 IL-1 β 中的这样的位置的编号的残基 (i) 1-6 和 45-61、(ii) 1-6 和 86-95、(iii) 45-61 和 86-95、(iv) 1-6 和 148-153、(v) 45-61 和 148-153 或 (vi) 86-95 和 148-153。来自第一 IL-1 家族细胞因子的 3 个不连续区段可包括例如根据 IL-1 β 中的这样的位置的编号的残基 1-8、42-120 和 141-153、残基 1-10、37-125 和 131-153 或残基 1-6、45-61、86-95 和 148-153。嵌合结构域在其余位置上可与第二 IL-1 家族细胞因子具有至少 80、82、85、87、90、92、94、95、96、97、98、99 或 100% 的同一性。在一个实施方案中,不连续区段的边界的一个或多个位于其中第一和第二 IL-1 家族细胞因子相同或保守的位置上。蛋白质可具有本文中描述的其它特性。

[0125] 在另一个方面,本公开内容表征了分离的 IL-1 抑制剂,包括结合 IL-1RI 的 IL-1 家族细胞因子结构域。例如,IL-1 抑制剂包括上述或本文中其它地方描述的一个或多个特性。在一些实施方案中,细胞因子结构域包括:(a) 在下列位置 ARG11、SER13、GLN14、GLN15、GLU25、LYS27、LEU29、HIS30、LEU31、GLN32、GLY33、GLN34、ASP35、MET36、GLN38、GLN39、ALA127、GLU128、ASN129、MET130 和 GLN141(根据 IL-1 β 的编号)上与 IL-1Ra 相同的氨基酸,和 (b) 在下列位置:ALA1、PRO2、VAL3、ARG4、LEU6、PHE46、GLN48、GLU51、SER52、ASN53、LYS55、ILE56、PRO57、LYS92、LYS93、LYS94、LYS103、GLU105、ASN108、GLN149、PHE150 和 SER152 上与 IL-1 β 相同的氨基酸。在一些实施方案中,位点 A 区段 A1 和 A2 与 IL-1Ra 的对应区段具有至少 80% 的同一性(总体上)。在一些实施方案中,位点 B 区段 B1、B2 和 B3 与 IL-1 β 的对应区段具有至少 80% 的同一性(总体上)。例如,位点 A 区段 A1 和 A2 与 IL-1Ra 的对应区段具有至少 90% 的同一性(总体上);并且位点 B 区段 B1、B2 和 B3 与 IL-1 β 的对应区段具有至少 90% 的同一性(总体上)。例如,位点 A 区段 A1 和 A2 与 IL-1Ra 的对应区段相同;以及位点 B 区段 B1、B2 和 B3 与 IL-1 β 的对应区段相同。

[0126] 在一些实施方案中,细胞因子结构域包括与 IL-1Ra 的 β 链 β 2、 β 3、 β 10 和 β 11 具有至少 80% 的同一性(总体上)的序列和与 IL-1 β 的 β 链 β 4、 β 6、 β 7 和 β 8 具有至少 80% 的同一性(总体上)的序列。在一些实施方案中,细胞因子结构域包括与 IL-1Ra 的 β 链 β 2、 β 3、 β 10 和 β 11 相同的序列和与 IL-1 β 的 β 链 β 4、 β 6、 β 7 和 β 8 相同的序列。在一些实施方案中,上文中鉴定的来自 IL-1 β 的区段和特性来源于 IL-1 α 或 IL-1 β 或 IL-1 α 的组合。

[0127] 在一些实施方案中,IL-1 抑制剂包括下列性质的一个或多个(例如,至少 2、3、4、5、6 或 7 个):(i) 与 IL-1 β 、IL-1 α 或 IL-1Ra 中的对应残基具有至少 60、70、80、85、88、90、92、95、98 或 100% 的同一性的位点 A 或位点 B 残基(和/或延伸的位点 A 和延伸的位点 B 残基);(ii) 在总体上与 IL-1Ra 中的对应残基具有至少 80、85、88、90、92、95、98 或 100% 的同一性的 A1 和 A2 区段;(iii) 在总体上与 IL-1 β 或 IL-1 α 中的对应残基具有至少 80% 的同一性的 B1、B2 和 B3 区段;(iv) 与 IL-1Ra 中的对应残基具有至少 80、85、88、90、92、95、98 或 100% 的同一性的位点 A 区域;(v) 与 IL-1 β 或 IL-1 α 中对应的残基具有至少 80、85、88、90、92、95、98 或 100% 的同一性的位点 B 区域;(vi) 与 IL-1Ra 或 IL36Ra 中对应的残基具有至少 50、60、70、80、85、88、90、92、95、98 或 100% 的同一性的位点 C 和/或位点 D 残基,(vii) 与 IL-1Ra 中对应的残基具有至少 70、75、80、85、88、90、92、95、98 或 100% 的同一性的 C1 区段;(viii) 在至少 3、4 或 5 个残基上与 IL-1Ra 中对应的残基相同的 D2 区段。细胞因子结构域与 IL-1Ra 相异,例如,细胞因子结构域与 IL-1Ra 具有少于 99、98、95、90、85、

80、75、70、65、60% 的同一性和 / 或与 IL-1Ra 具有至少 30、40、45、50、55、60、65、70% 的同一性,例如与 IL-1Ra 具有 40-95%、40-90% 或 45-85% 的同一性。在一些实施方案中,细胞因子结构域不包含与 SEQ ID NO:3 的氨基酸 I46-G59、A55-G59、A55-V83、I60-V83、N84-D95、I46-S110、V49-S110 或 I46-G118 具有大于 80、85、90、95 或 100% 的同一性的区段。在一些实施方案中,细胞因子结构域不包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸 N7-V41、R11-M37、N102-D144 或 Y121-D144 具有大于 80、85、90、95 或 100% 的同一性的区段。

[0128] 在一些实施方案中,抑制剂以小于 100、50、20、10、5 或 1nM 的 K_D 结合 IL-1RI。在一些实施方案中,抑制剂以比 IL-1 β 或 IL-1Ra 更好的亲和力(例如,更低的 K_D)和 / 或更慢的解离速率结合 IL-1RI。

[0129] 在一些实施方案中,抑制剂,当与 IL-1 β 反应性人细胞接触时大体上不诱导 IL-6 表达。一般而言,抑制剂通过 IL-1 β ,例如例如以小于 100、50、20、10 或 5nM 的 IC₅₀ 抑制信号转导。

[0130] 在一些实施方案中,细胞因子结构域包括下列序列的 1、2、3 或更多个:WDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVN (SEQ ID NO:9);NLEEK (SEQ ID NO:10);RIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVNNLEEK (SEQ ID NO:11);AMEADQP (SEQ ID NO:12);FLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFY (SEQ ID NO:13);和 / 或与前述序列具有至少 80、85、88、90、92、95、98 或 100% 的同一性。在一些实施方案中,细胞因子结构域包括下列序列的 1、2、3 或更多个:VQGEESNDKI (SEQ ID NO:14);KKKMEKRF (SEQ ID NO:15);和 FSMSFVQGEESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVD PKN YPKKKMEKRFVFNKIEINNKLFEFES (SEQ ID NO:16);和 / 或与前述序列具有至少 80、85、88、90、92、95、98 或 100% 的同一性的序列。抑制剂可包括本文中描述的其它特性。

[0131] 在另一个方面,本公开内容提供了分离的蛋白质,其包括与本文中描述的序列例如表 4 和实施例 1 中所列的序列(例如,P01、P02、P03、P04、P05、P06 或 P07 的氨基酸序列)或实施例 1、5、6 或本文中其它地方的序列具有至少 80、82、85、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99% 或 100% 的同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,氨基酸序列包括至少至少一个置换、插入或缺失。氨基酸序列可包括少于 15、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3 或 2 个非保守置换或少于 15、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3 或 2 个总的置换。氨基酸序列可包括至少 1、2、3、4 或 5 个置换例如保守置换。

[0132] 还提供了分离的蛋白质,所述蛋白质在 P01、P02、P03、P04、P05、P06 或 P07 的氨基酸序列或实施例 1、5、6 中或本文中其它地方的序列的 N 末端包括甲硫氨酸,以及包括 P01、P02、P03、P04、P05、P06 或 P07 或实施例 1、5、6 中或本文中其它地方的序列的氨基酸序列,其中 N 末端上的丙氨酸不存在。这些形式分别代表完整蛋白质的甲二磺酰化和 des-Ala 亚型。还提供了乙酰化的分离的蛋白质。乙酰化形式包括乙酰化的完整蛋白质、乙酰化甲二磺酰酯化蛋白质和乙酰化 des-Ala 亚型。前述序列可包括本文中公开的其它特性。例如,序列还可在例如相对于 IL-1RI 结合序列的 N 末端或 C 末端包括标签,例如六组氨酸序列。序列还可包括改变 IL-1RI 结合序列的稳定性或药代动力学的部分。序列还可包括血清白蛋白和 / 或其 Fc 结构域或其一个或多个结构域,例如一个或多个免疫球蛋白恒定结构域或一个或多个白蛋白结构域。蛋白质可具有本文中描述的其它特性。在一些实施方案中,分离的蛋白质由本文中公开的序列或嵌合结构域组成或基本上由所述序列或结构域组成。

[0133] 在其它方面,本公开内容提供了分离的蛋白质,其包括具有本文中描述的细胞因

子结构域例如表 4 中所列的细胞因子结构域的环状排列形式的结构域和 / 或包括 SEQ ID NO:3 的结构域。蛋白质还可在互换形式的 N 或 C 末端具有任选地通过接头间隔的异源序列（例如 Fc 结构域或白蛋白）。蛋白质可具有本文中描述的其它特性。

[0134] 本公开内容还表征了包含一种或多种本文中描述的受体结合剂（例如包括嵌合细胞因子结构域的蛋白质）的药物组合物。组合物可以是眼科药物组合物、局部组合物或用于胃肠外施用的组合物。

[0135] 在另一个方面，本公开内容表征了调节受试者的免疫或炎症反应的方法。方法可包括以有效地调节受试者的免疫或炎症反应的量给受试者施用包含本文中描述的受体结合剂的组合物。

[0136] 在另一个方面，本公开内容表征了治疗受试者的 IL-1 介导的障碍的方法。方法包括给受试者施用包含可结合 IL-1RI 的蛋白，例如本文中描述的受体结合剂的组合物。例如，障碍可以是自身免疫障碍例如类风湿关节炎或幼年型慢性关节炎、硬皮病、斯耶格伦氏综合征、强直性脊柱炎、白塞氏综合征、炎性肠病、哮喘、脉管炎或银屑病。障碍可以是与聚集体形成相关的障碍，例如，高尿酸血症、痛风、糖尿病（包括非胰依赖性糖尿病）、阿尔茨海默病、第二反应性淀粉样变性、肌萎缩侧索硬化（ALS）、亨廷顿病或帕金森氏病。障碍可以是 CAPS (CIAS1 相关周期性综合征) 障碍或本文中描述的其它障碍。

[0137] 在另一个方面，本公开内容表征了治疗受试者的 IL-1 介导的眼障碍的方法。方法可包括给受试者施用包含可结合 IL-1RI 的蛋白例如本文中描述的受体结合剂的组合物。例如，组合物是给受试者的眼或周围区域局部施用的眼科组合物。在一个实施方案中，障碍是干眼障碍。在一些实施方案中，受试者不显示全身性自身免疫性病的表现。在一些实施方案中，受试患有斯耶格伦氏综合征。在一些实施方案中，受试者具有移植物抗宿主病 (GVHD)。在其它实施方案中，障碍是葡萄膜炎。

[0138] 在另一个方面，本公开内容表征了抑制 IL-1 活性的方法。方法包括将可结合 IL-1RI 的受体结合剂与响应 IL-1 的细胞或与受试者接触。一般而言，以有效地抑制与细胞相关的 IL-1 活性或受试者中的 IL-1 活性的量提供蛋白质。可将蛋白质离体地与来自受试者的细胞接触。

[0139] 在另一个方面，本公开内容表征了分离的核酸，其包括一个或多个编码本文中描述的蛋白质的序列或本文中（例如，表 5 中）描述的核酸，与这样的核酸杂交或与这样的核酸具有至少 80、82、85、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99% 或 100% 的同一性的序列。示例性杂交序列可在长度上具有至少 200、300、400、420 或 450 个核苷酸，例如长度为 420-480 个核苷酸。核酸还可包括本文中公开的其它特性。

[0140] 还表征了重组宿主细胞，其包含包括一个或多个编码本文中描述的蛋白质的序列的核酸及其多肽链。受体结合剂可通过这样的方法产生，所述方法包括将宿主细胞维持在允许受体结合剂表达的条件下，和任选地例如从细胞或与宿主细胞相关的培养基回收受体结合剂。例如，可从细胞的裂解物纯化受体结合剂。可以例如利用赋形剂、稳定剂和缓冲剂的一种或多种配制纯化的受体结合剂。

[0141] 还表征了提供嵌合蛋白质结构域的方法。方法包括鉴定至少 2 个具有共同折叠的亲代蛋白质（例如，第一亲代蛋白质和第二亲代蛋白质）、定位第一亲代蛋白质内的至少两个区段和构建核酸，所述核酸具有编码包括两个来自第一亲代蛋白质的区段和在其余位置

上主要来自第二亲代蛋白质的残基的嵌合氨基酸序列的序列。结构域可以是主要由 β -折叠片组成的结构域或主要由 α -螺旋组成的结构域或具有这样的元件的组合物。例如,结构域可具有细胞因子的折叠。第一和第二亲代蛋白质可通过同源性例如 10-40% 氨基酸的同一性相关。在一些实施方案中,来自第一蛋白质的区段位于单个折叠的蛋白质结构域内,并且嵌合氨基酸序列包括与第一和第二亲代蛋白质中的对应结构域不同的折叠蛋白质结构域的形式。在一些实施方案中,两个亲代蛋白质具有不同的功能性质,并且嵌合结构域可具有亲代蛋白质之一或两者的性质。在一些实施方案中,嵌合结构域具有一个来自第一亲代蛋白质的结合界面,和另一个来自第二亲代蛋白质的结合界面。

[0142] 在本文中参考 IL-1 家族细胞因子中与位点 A、B、C 和 D 相关的不同区域、区段和残基。这样的残基、区段和区域在人 IL-1 β (SEQ ID NO:1) 的序列中的定位及对应的位置提供于下文中和图 1 中:

[0143] 位点 A。IL-1 β 中的位点 A 残基包括: ARG11、SER13、GLN14、GLN15、SER21、GLU25、LYS27、LEU29、HIS30、LEU31、GLN32、GLY33、GLN34、ASP35、MET36、GLU128、ASN129 和 MET130, 其它 IL1 细胞因子家族成员的对应该残基(在本文中称为“位点 A 残基”)。在某些特别地与 IL-1 β 相关的上下文中,参考“延伸的位点残基”,其包括位点 A 残基以及 GLN149 和 PHE150, 以及其它 IL1 细胞因子家族成员的对应该残基。此外,其可能定义如图 4 中所示的“位点 A 区域”,包括例如 A1 区段(在 IL-1 β 中对应于 SEQ ID NO:1 的 11-36) 和 A2 区段(在 IL-1 β 中对应于 SEQ ID NO:1 的 125-131) 和其它 IL1 细胞因子家族成员中的对应区段。

[0144] 位点 B。IL-1 β 中的位点 B 残基包括: ALA1、PRO2、ARG4、GLN48、GLU51、ASN53、ILE56、LYS92、LYS93、LYS94、LYS103、GLU105 和 ASN108, 以及其它 IL1 细胞因子家族成员的对应该残基(在本文中称为“位点 B 残基”)。在某些特别地与 IL-1 β 相关的上下文中,参考“延伸的位点 B 残基”,其包括位点 B 残基以及在图 4 中的位点 B 区域外的 PHE46 和 SER152。此外,其可能定义如图 4 中所示的“位点 B 区域”,包括例如 B1 区段(在 IL-1 β 中对应于 SEQ ID NO:1 的 1-5)、B2 区段(在 IL-1 β 中对应于 SEQ ID NO:1 的 48-56) 和 B3 区段(在 IL-1 β 中对应于 SEQ ID NO:1 的 92-98), 以及其它 IL1 细胞因子家族成员中的对应区段。

[0145] 位点 C。IL-1 β 中的位点 C 残基包括: ILE104、ILE106、ASN107、LYS109、GLU111、THR137、LYS138、GLY139、GLY140、GLN141、THR144 和 ASP145 以及其它 IL1 细胞因子家族成员的对应该残基(在本文中称为“位点 C 残基”)。此外,其可能定义如图 4 中所示的“位点 C 区域”,包括例如 C1 区段(在 IL-1 β 中对应于 SEQ ID NO:1 的 136-145) 和其它 IL1 细胞因子家族成员中的对应区段。

[0146] 位点 D。IL-1 β 中的位点 D 残基包括: LEU6、THR9、LYS63、GLU64、LYS65 和 ASN66 以及其它 IL1 细胞因子家族成员的对应该残基(在本文中称为“位点 D 残基”)。此外,其可能定义如图 4 中所示的“位点 D 区域”,包括例如 D1 区段(在 IL-1 β 中对应于 SEQ ID NO:1 的 6-9)、D2 区段(在 IL-1 β 中对应于 SEQ ID NO:1 的 37-41)、D3 区段(在 IL-1 β 中对应于 SEQ ID NO:1 的 63-66)、D4 区段(在 IL-1 β 中对应于 SEQ ID NO:1 的 86-91) 和 D5 区段(在 IL-1 β 中对应于 SEQ ID NO:1 的 150-153), 以及其它 IL1 细胞因子家族成员中的对应区段。

[0147] 位点 A、B、C 和 D 的残基和区域的位置的进一步鉴定可通过所述细胞因子与图 4 中显示的序列的比对来发现。

[0148] 本文中参照的 IL-1 β (人) 的氨基酸序列是 :APVRS LNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALH LQGQDMEQQVVFMSFSVQ GEESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEK RFVFNKIEI NNKLEFESAQFPNWIYSTSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFT MQFVSS (SEQ ID NO:1)。

[0149] 本文中参照的 IL-1 α (人) 的氨基酸序列是 :SAPFSFLSNVKYNFMRI IKYEFILNDALNQ SIIRANDQYLTAALHNLDEA VKFDMGAYKSSKDDAKITVILRISKTLQLYVTAQDEDQPVLLKEMPEIPKTI TGSE TNLFFWETHGTKNYFTSVAHPNLFIA TKQDYWVCLAGGPPSITDF QILENQA (SEQ ID NO:2)。

[0150] 本文中参照的 IL-1Ra (人) 的氨基酸序列是 :RPSGRKSSKMQAFRIWDVNQKTFYLRNNQ LVAGYLQGPVNLEEKIDV VPIEPHALFLGIHGGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSNRKQDKRF AFIRSDS GPTTSFESAACPGWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFY FQED (SEQ ID NO:3)。本文中使用的术语 IL-1 β 、IL-1 α 和 IL-1Ra 是指各自成熟的蛋白质。

[0151] 本文中参照的和图 4 中显示的 β 折叠片是指下列序列：

[0152] 表 1

折叠片	IL-1 β (SEQ ID NO:1)	IL-1Ra (SEQ ID NO:3)	环	IL-1 β SEQ ID NO:1)	IL-1Ra(SEQ ID NO:3)
β 1	6-12	11-17	β 1 β 2	13-17	18-22
β 2	18-21	23-26	β 2 β 3	22-24	27-28
β 3	25-28	29-32	β 3 β 4	29-41	33-45
β 4	42-46	46-50	β 4 β 5	47-56	51-54
β 5	57-62	55-60	β 5 β 6	63-66	61-64
β 6	67-70	65-68	β 6 β 7	71-80	69-78
β 7	81-83	79-81	β 7 β 8	84-99	82-98
β 8	100-105	99-104	β 8 β 9	106-109	105-108
β 9	110-114	109-113	β 9 β 10	115-120	114-119
β 10	121-123	120-122	β 10 β 11	124-130	123-129
β 11	131-135	130-134	β 11 β 12	136-145	135-145
β 12	146-150	146-150			

[0154] 如下进行两个序列之间的“同源性”或“序列同一性”(术语在本文中可互换使用)的计算。按照本文中提供的比对,或在适当的比对不存在的情况下,按照如使用 Needleman 和 Wunsch 算法(如使用 Blosom62 评分矩阵以及为 10 的缺口罚分和为 1 的缺口延伸罚分在 EMBOSS 包的 Needle 算法中执行的)产生的最佳评分测定的最佳比对对齐序列。参见 Needleman, S. B. 和 Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453 ;Kruskal, J. B. (1983) An overview of sequence comparison In D. Sankoff 和 J. B. Kruskal, (编著), Time warps, string edits and macromolecules :the theory and practice of sequence comparison, 第 1-44 页 Addison Wesley, 和可从欧洲生物信息研究所 (Cambridge UK)

EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000), Rice, P. 等人, A., Trends in Genetics 16, (6) 第 276—277 页获得的和可在 ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html 和 emboss.open-bio.org/wiki/Appdoc:Needle 上在线获得的工具。随后比较对应氨基酸位置或核苷酸位置上的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中对应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则分子在该位置上是同一的(如本文中所用,氨基酸或核酸“同一性”等同于氨基酸或核酸“同源性”)。两个序列之间的百分比同一性是由序列共有的相同位置的数目的函数。为了测定一个目标序列与一组参照序列的集体同一性,如果位置与参照序列的组的任一个或多个中的对应位置上的至少一个氨基酸相同,则该位置被认为是同一的。关于成列的区段、特性或区域,可整体地地计算这样的列表的所有成员的同一性以获得总体百分比同一性。

[0155] 本文中提供了与本文中公开的序列具有至少 80、82、85、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99% 的同一性的序列。

[0156] 如本文中所用,术语“获得”或“获取”是指通过“直接获得”或“间接获得”物理实体或值来获得物理实体或值例如数值的拥有。“直接获得”意指进行获得物理实体或值的方法(例如,进行合成或分析方法)。“间接获得”是指从另一方或来源(例如,直接获得物理实体或值的第三方实验室)接受物理实体或值。间接获得物理实体包括进行这样的方法,所述方法包括物理物质例如起始材料的物理改变。示例性改变包括从两个或更多个起始材料产生物理实体,剪切或片段化物质,分离或纯化物质,将两种或更多种分开的实体组合成混合物,进行包括断裂或形成共价键或非共价键的化学反应。直接获得值包括进行这样的方法,所述方法包括样品或另一种物质的物理改变,例如,进行包括物质例如样品、分析物或试剂的物理改变的分析方法(在本文中有时称为“物理分析”),进行分析法,例如包括如下步骤的一个或多个的方法:将分析物或其片段或其它衍生物与另一种物质分离或纯化所述分析物或其片段或其它衍生物;将分析物或其片段或其它衍生物与另一种物质例如缓冲剂、溶剂或反应物组合;或通过例如断裂或形成分析物的第一与第二原子之间的共价或非共价键改变分析物或其片段或其它衍生物的结构;或通过例如通过断裂或形成试剂的第一与第二原子之间的共价或非共价键改变试剂或其片段或其它衍生物的结构。

[0157] 如本文中所用,术语“对应于”用于指定目标多肽相对于参照多肽的氨基酸残基的位置。一般地,位置是通过本文中提供的比对指定的位置(例如,图 4)。

[0158] 如本文中所用,术语“在高严格条件下杂交”描述了用于杂交和洗涤的条件。用于进行杂交反应的指导可见于 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, N. Y. (1989), 6. 3. 1-6. 3. 6(将其通过引用并入本文)中。含水和无水法描述于该参考资料中并且可使用任一种方法。高严格杂交条件包括在约 45°C 于 6X SSC 中杂交,随后在 65°C 于 0. 2X SSC, 0. 1%SDS 中或大体上相似的条件下进行 1 次或多次洗涤。本文中提供了分离的核酸,其包含在高严格条件下与编码本文中公开的氨基酸序列的核酸和与本文中例如实施例 1 中公开的核酸杂交的序列。

[0159] 本文中提及的天然存在的蛋白质明确地包括这样的蛋白质的人形式,以及还有来自其它哺乳动物物种的形式。

[0160] 本文中引用的所有专利、公布的专利申请和出版的参考资料为了所有目的通过引用并入本文。

[0161] 附图概述

[0162] 图 1 是根据 X 射线晶体学数据测定的 P04 的结构的图。来自 IL-1Ra 的残基的主链以黑色显示,来自 IL- β 的残基的主链以灰色显示。

[0163] 图 2 描述了结合至人 IL-1RI 的胞外结构域的 P05 蛋白的模型的 3 个视图。在 P05 中,以黑色描述 IL-1Ra 残基,以白色描述 IL-1 β 残基。

[0164] 图 3 描述其中以黑色描述 IL-1Ra 残基和以白色描述 IL-1 β 残基的嵌合蛋白质的模型。模型描述蛋白质:P01(图 3A)、P03(图 3B)、P04(图 3C)、P05(图 3D)、P07(图 3E) 和 P06(图 3F)。

[0165] 图 4 提供了几个人 IL-1 家族细胞因子:IL-1 β (SEQ ID NO:1)、IL-1 α (SEQ ID NO:2)、IL-1Ra (SEQ ID NO:3)、IL-33 (SEQ ID NO:4)、IL-36Ra (SEQ ID NO:5)、IL-36 α (SEQ ID NO:6)、IL-36 β (SEQ ID NO:7) 和 IL-36 γ (SEQ ID NO:8) 的比对。在比对下鉴定了本文中的文本中参考的区段。此外,还鉴定了 β - 折叠片和这样的折叠片之间的环。

[0166] 图 5A 是 P01 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:17) 的列表。图 5B 是 P02 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:18) 的列表。图 5C 是 P03 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:19) 的列表。图 5D 是 P04 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:20) 的列表。图 5E 是 P05 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:21) 的列表。来自 IL-1 β 的区段以粗斜体字显示。也参见下文中的实施例 1。

[0167] 图 6 是显示从表达受体结合剂的大肠杆菌细胞纯化的蛋白质的示例性样品的 SDS-PAGE 凝胶的图像。15 和 20kDa 分子量标准示于左边。泳道如下:分子量标准(泳道 1 和 6)、提取物(泳道 2 和 7)、通过阳离子交换层析(泳道 3 和 8)纯化的材料、通过额外地阴离子交换层析纯化的材料(泳道 4 和 9)以及这样的材料的还原样品(泳道 5 和 10)。泳道 2-5 是 P05 纯化,泳道 6-10 是 P04 纯化。也参见实施例 2。

[0168] 图 7A 是显示 P06、P07 和 P01 蛋白相对于 IL-1 β 和阴性对照 β - 葡糖醛酸糖苷酶 (GUS) 蛋白的激动信号转导的能力的表和附随条线图。图 7B 是描述 P01 在不同 IL-1 β 浓度上对 IL-1 β 的拮抗的图。

[0169] 图 8A 是描述在 0.1ng/ml IL-1 β (人) 存在的情况下 P03(六组氨酸标记的)、P04(六组氨酸标记的)、P05(六组氨酸标记的)和 IL-1Ra 对 IL-1 β 的拮抗的图。图 8B 是描述在 0.1ng/ml IL-1 β (人) 存在的情况下,包含 P01、P02、P03、P04 和 P05 以及 IL-1Ra 的未标记形式的裂解物对 IL-1 β 的拮抗和使用各自裂解物中蛋白质的浓度的评估的图。

[0170] 图 9 包括显示下列蛋白:IL-1 β (图 9A)、IL-1Ra (图 9B)、P04(图 9C) 和 P05(图 9D) 的对固定的可溶性 IL-1RI 的结合动力学的 SPR 数据的图。

[0171] 图 10A 是描述如实施例 7 中描述的 IL-1Ra、IL-1 β 、P03、P04 和 P05 的热变性的图。图 10B 描述图 10A 中的图的阴性第一衍生物。

[0172] 图 11A 是显示干眼模型中小鼠在第 0、3、7、9 和 11 天的平均角膜染色评分 $\pm$ SEM(如通过两个独立研究的每眼角膜的荧光染色测试的)的条线图。小鼠不接受处理 (n=18)、接受 10mg/ml P05 (n=19) 或 1.25 $\times$ PBS、媒介物 (n=20)。星号显示如下 P05 相对于媒介物的统计显著性:*(P<0.05) 和 **(P<0.005)。

[0173] 图 11B 是表示来自单独的实验的数据的条线图,所述条形图显示干眼模型中小鼠在第 0、3、7、9 和 11 天的平均角膜染色评分 $\pm$ SEM。小鼠未接受处理 (n=8)、接受 1.25 $\times$ PBS 媒介物 (n=8)、10mg/ml 鼠血清白蛋白 (MSA) (n=8) 或 10mg/ml P05 (n=9)。星号显示如下 P05

相对于鼠血清白蛋白的统计显著性 :*($P<0.05$) 和 ***($P<0.0005$)。

[0174] 图 11C 是包括在与图 11B 相同的实验中利用 **Restasis®** (0.05% 环孢素乳剂) 处理的小鼠 ($n=8$) 的数据的条线图。星号显示如下 P05 相对于鼠血清白蛋白的统计显著性 : **($P<0.005$) 和 ***($P<0.0005$)。

[0175] 图 12A 描述了覆盖在其结构的计算模型 (灰色) 上的 P04 的 X 射线晶体学结构 (黑色) 的结构。图 12B 举例说明 P04 的 K64 与 E39 之间的相互作用 ;图 12C 举例说明 P04 的 C 末端残基 Q149 和 S152 与 K40 和 R9 之间的相互作用。

[0176] 图 13 是包括描述洗涤和在 pH6.0 和 35%B 进行的洗脱的洗脱特征谱的扩展的层析谱的图。

[0177] 图 14 是包括描述洗涤和在 pH6.0 和 35%B 进行的洗脱的洗脱特征谱的扩展的层析谱的图。

[0178] 图 15 是显示在 pH6.0 和 35%B 使用洗脱从实验纯化的蛋白质的示例性样品的 SDS-PAGE 凝胶的图像。

[0179] 图 16 是显示在 pH6.0 和 30%B 使用洗脱从实验纯化的蛋白质的示例性样品的 SDS-PAGE 凝胶的图像。

[0180] 图 17A、17B、17C 和 17D 是比较在 2L 和 100L 蛋白质生产系列中进行的终分批补料发酵过程的图。

[0181] 详述

[0182] 细胞因子的 IL-1 家族包括几个成员,其全都具有由 6 个 β -链组成的共同 b-三叶形折叠,所述 6 个 β -链形成被另外 6 个 β -链盖住的 β -桶。这些细胞因子的人和和其它哺乳动物形式的一级结构是已知的。几个人 IL-1 家族成员的示例性结构比对示于图 1 中。

[0183] 我们已发现,除其它以外,IL-1 折叠是高度可塑的。具体地,可将来自不同成员的组件组合以提供激动或拮抗细胞因子信号转导的蛋白质。这些蛋白质的实例包括嵌合细胞因子结构域,其在另一种细胞因子或细胞因子共有序列的背景中包括例如来自一种细胞因子的 2 或更多个区段或表面残基,从而产生来自不同 IL-1 家族细胞因子的受体相互作用位点的非天然存在的组合。

[0184] IL-1 家族细胞因子可包括至少两个主要受体相互作用位点 (称为位点 A 和位点 B)。位点 A 和 B 参与与主要细胞因子受体 (例如,IL-1RI) 的接触。在 IL-1Ra 和 IL-1 β 的情况下,例如两种蛋白质在位点 A 和 B 上显著不同,以便 IL-1Ra 在位点 B 中产生比在位点 A 中更少的受体接触。

[0185] 我们已发现,可能构建包括来源于一种细胞因子的位点 A 和来源于另一种细胞因子的位点 B 的结构功能性嵌合细胞因子结构域。IL-1 折叠的可塑性允许构建多种嵌合细胞因子结构域来拮抗 IL-1 信号转导。

[0186] 此外,IL-1 家族细胞因子可包括两个二级受体相互作用位点 (称为位点 C 和位点 D),其参与激动和 / 或拮抗,并且可决定细胞因子与其第二细胞因子受体 (例如,IL-1RAcP) 相互作用的能力。来自天然受体拮抗剂 (例如 IL-1Ra) 的位点 C 和 / 或位点 D 残基的包含可赋予拮抗性质。可构建嵌合细胞因子结构域,其包括来自一种或多种 IL-1 激动剂 (例如 IL-1 β 和 IL-1 α) 和 / 或 IL-1 受体拮抗剂 (例如 IL-1Ra) 的位点 A 和 B 之一或两者以及

来自 IL-1 受体拮抗剂（例如 IL-1Ra）的位点 C 和 D 之一或两者。因此，可能产生拮抗信号转导和包括来自 IL-1 激动剂的位点 B 残基的嵌合细胞因子结构域。

[0187] 示例性组合也提供于下面的表 2 中。

[0188] 表 2

[0189]

	A	B	C	D
1.	IL-1 β 或 1 α	IL-1 β 或 1 α	IL-1Ra	IL-1 β 或 1 α
2.	IL-1 β 或 1 α	IL-1 β 或 1 α	IL-1 β 或 1 α	IL-1Ra
3.	IL-1 β 或 1 α	IL-1 β 或 1 α	IL-1Ra	IL-1Ra
4.	IL-1Ra	IL-1 β 或 1 α	IL-1Ra	IL-1 β 或 1 α
5.	IL-1Ra	IL-1 β 或 1 α	IL-1 β 或 1 α	IL-1Ra
6.	IL-1Ra	IL-1 β 或 1 α	IL-1Ra	IL-1Ra

[0190]

[0191] 来源序列可与鉴定的细胞因子结构域的人序列相同，或可相对于人序列包含突变，例如以便它们与各自区域中人序列具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或更高的同一性，例如，它们可包括来自每一个区域的一个或多个区段。

[0192] 可选择位点 A 残基和位点 B 残基的来源来最大化对于主要受体的亲和力。例如，为了结合 IL-1RI，位点 A 残基可来源于 IL-1Ra，位点 B 残基可来源于 IL-1 β 。

[0193] 嵌合细胞因子结构域可具有结合 IL-1 家族受体的能力，例如，以小于 10^{-8} 、 10^{-9} 或 10^{-10} 的 K_D ，例如以在相同条件下的天然受体配体（例如，IL-1 β 、IL-1 α 或 IL-1Ra）的 K_D 的 10 或 100 倍内的 K_D 或小于在相同条件下的天然配体（例如，IL-1 β 、IL-1 α 或 IL-1Ra）的 K_D 的 K_D 结合人 IL-1RI。此外，在某些实施方案中，嵌合细胞因子结构域以比其亲代细胞因子结构域的至少一个的更小的 K_D 、更快的 K_{on} 或更慢的 K_{off} 结合。

[0194] 结合 IL-1 家族受体并且拮抗受体信号转导的嵌合细胞因子结构域可用作受体结合剂，例如，以治疗由下述 IL-1 家族细胞因子信号转导介导的障碍。例如，在一些实施方案中，嵌合细胞因子结构域结合 IL-1RI 并且拮抗 IL-1 信号转导。例如，其具有小于 100、10、1、0.6 或 0.3nM 的 IC_{50} 。

[0195] 在某些实施方案中，细胞因子结构域可与第一 IL-1 家族细胞因子结构域具有至少 40、45 或 50% 的同一性，但少于完全同一性，例如少于 95、90、85 或 80% 的同一性。同时，细胞因子结构域还可以与第二 IL-1 家族细胞因子结构域具有至少 40、45 或 50% 的同一性，但少于完全同一性，例如少于 95、90、85 或 80% 的同一性。第一和第二 IL-1 家族细胞因子结构域可彼此具有少于 50% 的同一性。例如，第一 IL-1 家族细胞因子结构域可以是激动剂（例如，IL-1 β 或 IL-1 α ），然而第二 IL-1 家族细胞因子结构域可以是受体拮抗剂（例如，IL-1Ra）。

[0196] 在一些实施方案中，细胞因子结构域内至少 80、85、90、92、94、95、97、98、99 或

100% 的位置具有这样的性质,即在每一个这样的位置上,存在的氨基酸与第一 IL-1 家族细胞因子结构域或与第二 IL-1 家族细胞因子结构域(或如果第一和第二 IL-1 家族细胞因子在特定位点上相同则两者)是相同的。当细胞因子结构域中 100% 的氨基酸位置具有该性质时,结构域是两种细胞因子的完全嵌合体。嵌合细胞因子结构域还可从超过两种细胞因子来制备,并且还可相对于其亲代细胞因子具有突变(例如,一个或多个其中存在的氨基酸与其亲代细胞因子的每一个中的对应氨基酸相异的特定位置)。

[0197] 细胞因子结构域可具有来自不同 IL-1 细胞因子结构域的位点 A、B、C 和 D 残基,并且同样地可具有来自不同 IL-1 细胞因子结构域的位点 A、B、C 和 D 区域。

[0198] 位点 A。例如,在某些实施方案中,细胞因子结构域在上文中鉴定的位点 A 残基的至少 5、10、12、15、16、17 或 18 个上或上文中鉴定的延伸的位点 A 残基的至少 5、10、12、15、16、17、18、19 或 20 个上,包含来自受体拮抗剂(例如,IL-1Ra)或激动剂的残基或这样的残基或至少 50、65、75、80、90、95 或 100% 的这样的残基的保守置换。在一些实施方案中,细胞因子结构域包含与受体拮抗剂(例如,IL-1Ra)或激动剂(例如,IL-1 β 或 IL-1 α)中的区段 A1、A2 或 A1+A2 具有至少 70、75、80、85、88、90、92、95 或 100% 的同一性的残基。

[0199] 在某些实施方案中,细胞因子结构域与本文中鉴定的位点 A 残基的至少 5、10、12、15、16、17 或 18 个残基或上文中鉴定的延伸的位点 A 残基的至少 5、10、12、15、16、17 或 18 个上,包含与 IL-1 激动剂(例如,IL-1 β 残基)相同的残基和这样的残基或至少 50、65、75、80、90、95 或 100% 的这样的残基的保守置换。

[0200] 位点 B。在某些实施方案中,细胞因子结构域在本文中鉴定的位点 B 残基的至少 2、3、5、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个上包含与 IL-1 激动剂(例如,IL-1 β 或 IL-1 α 残基)相同的残基或这样的残基或至少 50、65、75、80、90、95 或 100% 的这样的残基的保守置换。在一些实施方案中,细胞因子结构域包含与 IL-1 细胞因子激动剂(例如,IL-1 β 或 IL-1 α)中的区段 B1、B2、B3、B1+B2、B1+B3、B2+B3 或 B1+B2+B3 具有至少 70、75、80、85、88、90、92、95 或 100% 的同一性的残基。

[0201] 位点 C。在某些实施方案中,细胞因子结构域在本文中鉴定的位点 C 残基的至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个上包含与受体拮抗剂(例如,IL-1Ra 残基)相同的残基或这样的残基或至少 50、65、75、80、90 或 100% 的这样的残基的保守置换。在一些实施方案中,细胞因子结构域包含与受体拮抗剂(例如,IL-1Ra)中的区段 C1 具有至少 50、65、75、80、90 或 100% 的同一性的残基。

[0202] 在某些实施方案中,细胞因子结构域可包含例如如下氨基酸的一个或多个:对应于 SEQ ID NO:1 的 THR137 的位置上的疏水氨基酸残基(例如,Met 或 Ile)、或对应于 SEQ ID NO:1 的 GLN141 的位置上的疏水性例如脂肪族氨基酸(例如,Val 或 Ile),和对应于 SEQ ID NO:1 的 ASP145 的位置上的非酸性氨基酸例如碱性氨基酸(例如,Lys 或 Arg),以及对应于其在其它 IL-1 细胞因子中的位置上的这样的残基。证据显示 Asp145 对于 IL-1RAcP 的募集是非常重要的,因此对非酸性残基的突变破坏激动剂活性,并且可用于赋予拮抗性质。因此,在某些实施方案中,非酸性氨基酸例如碱性氨基酸(例如,Lys 或 Arg)或疏水性氨基酸位于对应于 SEQ ID NO:1 的 ASP145 的位置上。

[0203] 位点 D。在某些实施方案中,细胞因子结构域在本文中鉴定的位点 D 残基的至少 1、2、3、4、5 或 6 个上包含与受体拮抗剂(例如,IL-1Ra 残基)相同的残基或这样的残基或

至少 50、65、75、80、90、95 或 100% 的这样的残基的保守置换。在一些实施方案中,细胞因子结构域包含与受体拮抗剂(例如,IL-1Ra)中的区段 D1、D2、D3、D4、D5、D1+D2、D1+D2+D3 及其组合具有至少 50、65、75、80、90、95 或 100% 的同一性的残基。

[0204] IL-1 β 中的几个残基与 IL-1RI 接触或与 IL-1RI 靠近,例如:ALA1、PRO2、VAL3、ARG4、LEU6、ARG11、SER13、GLN14、GLN15、GLU25、LYS27、LEU29、HIS30、LEU31、GLN32、GLY33、GLN34、ASP35、MET36、GLN38、GLN39、PHE46、GLN48、GLU51、SER52、ASN53、LYS55、ILE56、PRO57、LYS92、LYS93、LYS94、LYS103、GLU105、ASN108、ALA127、GLU128、ASN129、MET130、GLN141、GLN149、PHE150 和 SER152。除至上述位置的指定外,这些残基可被分类成两组:组 1 和组 2。

[0205] IL-1 β 中的示例性组 1 残基包括:ARG11、SER13、GLN14、GLN15、GLU25、LYS27、LEU29、HIS30、LEU31、GLN32、GLY33、GLN34、ASP35、MET36、GLN38、GLN39、ALA127、GLU128、ASN129、MET130 和 GLN141 和其它 IL-1 细胞因子家族成员中的对应残基。延伸的组 1 残基包括相互作用组 1 残基和 1ITB 结构中上述残基的 4 埃内的残基。IL-1 β 中的示例性组 2 残基包括:ALA1、PRO2、VAL3、ARG4、LEU6、PHE46、GLN48、GLU51、SER52、ASN53、LYS55、ILE56、PRO57、LYS92、LYS93、LYS94、LYS103、GLU105、ASN108、GLN149、PHE150 和 SER152 以及其它 IL-1 细胞因子家族成员中的对应残基。延伸的组 2 残基包括相互作用组 2 残基和 1ITB 结构中上述残基的 4 埃内的残基。在某些实施方案中,细胞因子结构域在上文中鉴定的组 1 残基的至少 15、16、17、18、19、20 或 21 个上包含 IL-1 β 残基。在某些实施方案中,细胞因子结构域在上文中鉴定的组 2 残基的至少 15、16、17、18、19、20、21 或 22 个上包含 IL-1 β 残基。在一些实施方案中,细胞因子结构域在延伸的组 1 残基的至少 15、16、17、18、19、20 或 21 个上包含 IL-1 β 残基。在一些实施方案中,细胞因子结构域在延伸的组 2 残基的至少 15、16、17、18、19、20 或 21 个上包含 IL-1 β 残基。

[0206] 可用作受体结合剂的其它变体包括具有来源于两个或更多个 IL-1 细胞因子家族成员的序列的蛋白质。这样的变体的实例包括基于 IL-1 β 和 IL-1Ra 的嵌合结构域。例如,变体可包括来自 IL-1Ra 的组 1 的一个或多个氨基酸残基(例如,来自 IL-1Ra 的所有组 1 残基)和来自 IL-1 β 的组 2 的一个或多个氨基酸残基(例如,来自 IL-1 β 的所有组 2 残基)。

[0207] 示例性嵌合蛋白质在下列氨基酸位置(即,基于与 IL-1 β 中的这些位置的对应性):SEQ ID NO:1 的残基 1-8、42-120 和 141-153;SEQ ID NO:1 的残基 1-6、45-61、86-95 和 148-153;和 SEQ ID NO:1 的残基 1-10、37-125 和 131-153 上与 IL-1 β 具有显著(例如,至少 50、60、70、75、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、97、98、99 或 100%)的同一性。

[0208] 其余残基可与 IL-1Ra 具有显著(例如,至少 50、60、70、75、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、97、98、99 或 100%)的同一性。例如,下列氨基酸位置可与 IL-1Ra 具有显著的同一性:SEQ ID NO:1 的残基 9-41 和 121-140;SEQ ID NO:1 的残基 7-44、62-85 和 96-147;和 SEQ ID NO:1 的残基 11-36 和 126-130。

[0209] 在某些实施方案中,细胞因子结构域在 IL-1 β 的除了氨基酸位置 Gln48 - Asn53 以外的至少 2、4、5、10 或 20 个位置上与 IL-1 β 相同并且,例如,细胞因子结构域与除 IL-1 β 外的细胞因子具有显著例如至少 50、60、70、75、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、97、98、99 或 100% 的同一性。

[0210] 在某些实施方案中,细胞因子结构域在对应于 SEQ ID NO:1 的 1-8 的位置上包括至少 3、4、5、6、7 或 8 个与 IL-1 β 相同的残基。例如,其在对应于 :ALA1、PRO2、VAL3、ARG4 和 LEU6 的 3、4 或全部 5 个的位置上包含与 IL-1 β 相同的残基。

[0211] 在某些实施方案中,细胞因子结构域在与 SEQ ID NO:1 的 45-61 的位置对应的位置上包含至少 8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17 个与 IL-1 β 相同的残基。例如,其在对应于 PHE46、GLN48、GLU51、SER52、ASN53、LYS55、ILE56 和 PRO57 的 3、4、5、6、7 或 8 个的位置上包含与 IL-1 β 相同的残基。

[0212] 在某些实施方案中,细胞因子结构域在对应于 SEQ ID NO:1 的 86-95 的位置上包含至少 5、6、7、8、9 或 10 个与 IL-1 β 相同的残基。例如,其在对应于 LYS92、LYS93 和 LYS94 的 1、2 或全部 3 个的位置上包含与 IL-1 β 相同的残基。

[0213] 在某些实施方案中,细胞因子结构域在对应于 SEQ ID NO:1 的 148-153 的位置上包含至少 3、4、5 或 6 个与 IL-1 β 相同的残基。例如,其在对应于 GLN149、PHE150 和 SER152 的 1、2 或全部 3 个的位置上包含与 IL-1 β 相同的残基。

[0214] 在某些实施方案中,细胞因子结构域在对应于 IL-1 β 的 THR147 的位置上不包含苏氨酸。例如,该位置可以是芳香族氨基酸例如酪氨酸。对应于 IL-1 β 的 THR147 的位置上的芳香族氨基酸可堆叠在在几个实施方案中存在位置 11(根据 IL-1 β 编号)上的另一个芳香族氨基酸(例如,色氨酸)上。

[0215] 在某些实施方案中,细胞因子结构域在对应于 IL-1 β 的 CYS8 的位置上不包含芳香族氨基酸。例如,该位置可以是除苯丙氨酸外或除芳香族氨基酸外的氨基酸。例如,其可以是半胱氨酸、缬氨酸、丝氨酸、苏氨酸或丙氨酸。该位置位于其它大残基特别地 MET44 和 MET148(根据 IL-1 β 编号)的附近。优选,并非全部 3 个位置 8、43 和 148 是大残基。

[0216] 在某些实施方案中,细胞因子结构域在对应于 SEQ ID NO:1 的 30-36 的位置上包含至少 5、6 或 7 个与 IL-1Ra 相同的残基,例如至少 5、6 或 7 个与 YLQGPNV(SEQ ID NO:43) 相同的残基。例如,细胞因子结构域在对应于 SEQ ID NO:1 的 11-36 的位置上包含至少 10、12、14、16、18、19、20、21、22、23、24、25 或 26 个与 IL-1Ra 相同的残基。细胞因子结构域还可在对应于 SEQ ID NO:1 的 145 的位置上包含碱性残基。

[0217] 在某些实施方案中,细胞因子结构域包含:(a) 对应 IL-1 β 的 Val140 的位置上的谷氨酸和对应于 IL-1 β 的 Lys65 的位置上的赖氨酸;(b) 对应于 IL-1 β 的 Thr9 的位置上的精氨酸和对应于 IL-1 β 的 Gln149 的位置上的谷氨酰胺;和/或(c) 对应于 IL-1 β 的 Val1 的位置上的赖氨酸和对应于 IL-1 β 的 Ser152 的位置上的丝氨酸。

[0218] 细胞因子结构域还可在对应于 126-132 的位置上包含至少 4、5、6 或 7 个与 IL-1Ra 相同的残基,例如至少 4、5、6 或 7 个与 MEADQPVS(SEQ ID NO:44) 相同的残基。

[0219] 在某些实施方案中,细胞因子结构域在对应于 SEQ ID NO:1 的 62-85 的位置上包含至少 10、12、14、16、18、19、20、21、22、23 或 24 个与 IL-1 β 相同的残基。

[0220] 在一些实施方案中,细胞因子结构域包含下列氨基酸序列的一个或多个(例如,全部 4 个):RSLAFR(SEQ ID NO:45)、IDVSFV(SEQ ID NO:46)、KKMDKR(SEQ ID NO:47) 和 KFYMQF(SEQ ID NO:48);下列序列的一个或多个(例如,全部 4 个):RSLAFR(SEQ ID NO:45)、IDVSFV(SEQ ID NO:46)、NKLSFE(SEQ ID NO:49) 和 KFYMQF(SEQ ID NO:48);下列序列的一个或多个(例如,全部 4 个):RSLAFR(SEQ ID NO:45)、EEKFSM(SEQ ID NO:50)、RFVFIR(SEQ ID

NO:51 和 VTKFTM(SEQ ID NO:52); 下列序列的一个或多个(例如,全部4个):RSLAFR(SEQ ID NO:45)、EEKFSM(SEQ ID NO:50)、FESAAC(SEQ ID NO:53)和 VTKFTM(SEQ ID NO:54);或下列序列的一个或多个(例如,全部4个):LNCRIW(SEQ ID NO:55)、EEKFSM(SEQ ID NO:50)、PNWFLC(SEQ ID NO:56)和 KFYMQF(SEQ ID NO:48)。

[0221] 嵌合蛋白质可用于多种目的。例如,它们可用于增强或减弱受体信号转导活性,检测表达受体的细胞或纯化它们所结合的细胞或蛋白质。

[0222] 在下文的实施例1中提供了基于 IL-1 β 和 IL-1Ra 的嵌合细胞因子结构域的特定实例,其包括拮抗 IL-1 信号转导的下列示例性细胞因子结构域:

[0223] P01。P01 结构域包含来自 IL-1Ra 的对应于 SEQ ID NO:3 的氨基酸 Ala12-Val48、Ile60-Val83 和 Asp95-Tyr147 的3个区段,和来自 IL-1 β 的其余4个区段。总体上,P01 结构域具有来自 IL-1 β 的153个氨基酸中的74个(约48%的同一性)和来自 IL-1Ra 的119个氨基酸(约77%的同一性)。这些百分比加起来超过100%,因为 P01 和本文中公开的其它示例性蛋白质中的许多氨基酸是在 IL-1 β 与 IL-1Ra 之间是保守的氨基酸,因此为 IL-1 β 和 IL-1Ra 的百分比同一性作出贡献。

[0224] P02。P02 结构域包含来自 IL-1Ra 的对应于 SEQ ID NO:3 的氨基酸 Ala12-Val48、Ile60-Val83 和 Ser110-Tyr147 的3个区段和来自 IL-1 β 的其余4个区段。总体上,P02 结构域具有来自 IL-1 β 的153个氨基酸中的85个(约55%的同一性)和来自 IL-1Ra 的108个氨基酸(约70%的同一性)。

[0225] P03。P03 结构域包含来自 IL-1Ra 的对应于 SEQ ID NO:3 的氨基酸 Ala12-Lys45 和 Phe100-Lys145 的两个区段和来自 IL-1 β 的其余3个区段。总体上,P03 结构域具有来自 IL-1 β 的153个氨基酸中的94个(约61%的同一性)和来自 IL-1Ra 的91个氨基酸(约64%的同一性)。

[0226] P04。P04 结构域包含来自 IL-1Ra 的对应于 SEQ ID NO:3 的氨基酸 Ala12-Lys45 和 Ala114-Lys145 的两个区段和来自 IL-1 β 的其余3个区段。总体上,P04 结构域具有来自 IL-1 β 的153个氨基酸中的104个(约68%的同一性)和来自 IL-1Ra 的89个氨基酸(约58%的同一性)。

[0227] P05。P05 结构域包含来自 IL-1Ra 的对应于 SEQ ID NO:3 的氨基酸 Arg14-Lys45 和 Phe120-Tyr147 的两个区段和来自 IL-1 β 的其余3个区段。总体上,P05 结构域具有来自 IL-1 β 的153个氨基酸中的108个(约70%的同一性)和来自 IL-1Ra 的85个氨基酸(约55%的同一性)。

[0228] 可类似地构建其它嵌合蛋白质。例如,可在 IL-1 α 与 IL-1Ra 之间制备嵌合蛋白质,例如,具体地对于上述实例的每一个,结构域包含与来自 IL-1 α 而非 IL-1 β 的对应残基组合的 IL-1Ra 的已鉴定的区段。

[0229] 蛋白质修饰和置换。蛋白质序列例如本文中描述的那些序列可以例如通过产生一个或多个保守置换来改变。可产生保守置换以保留功能或使功能产生适度的变化。示例性保守置换描述于下表中。

[0230] 表3

[0231]

原始	示例性置换	其它特定置换
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; leu	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; ile; val; met; ala; phe	Ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; leu; 正亮氨酸	ala

[0232] 可基于它们对如下方面的潜在效应选择置换：(a) 置换附近的主链结构例如折叠片或螺旋构象，(b) 分子在靶位点上的电荷或疏水性或 (c) 侧链的体积和分枝。可基于侧链性质分类氨基酸残基：(1) 疏水性：正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile；(2) 中性亲水性：cys、ser、thr；asn；gln；(3) 酸性：asp、glu；(4) 碱性：his、lys、arg；(5) 影响主链构象的残基：gly、pro；和 (6) 芳香族：trp、tyr、phe。

[0233] 非保守置换可包括用这些种类之一的成员置换不同种类的成员。保守置换可包括用这些种类之一的成员置换相同种类的另一个成员。

[0234] 还可在氨基酸的亲水指数的上下文中评价特定残基的重要性。基于其疏水性和电荷特征给每一个氨基酸赋予亲水指数：异亮氨酸 (+4.5)；缬氨酸 (+4.2)；亮氨酸 (+3.8)；苯丙氨酸 (+2.8)；半胱氨酸 (+2.5)；甲硫氨酸 (+1.9)；丙氨酸 (+1.8)；甘氨酸 (-0.4)；苏氨酸 (-0.7)；丝氨酸 (-0.8)；色氨酸 (-0.9)；酪氨酸 (-1.3)；脯氨酸 (-1.6)；组氨酸 (-3.2)；谷氨酸 (-3.5)；谷氨酰胺 (-3.5)；天冬氨酸 (-3.5)；天冬酰胺 (-3.5)；赖氨酸 (-3.9)；和精氨酸 (-4.5)。关于亲水氨基酸指数及其重要性的论述，参见，例如，Kyte 等人，1982, J. Mol. Biol. 157:105-131。

[0235] 蛋白质的序列可通过任何方法来改变，所述方法包括寡核苷酸介导的（定点）诱变（Carter 等人，Nucl. Acids Res., 13:4331, 1986；Zoller 等人，Nucl. Acids Res., 10:6487, 1987）、盒式诱变（Wells 等人，Gene, 34:315, 1985）、限制性选择诱变（Wells 等人，Philos. Trans. R. Soc. London, 317:415, 1986）和 PCR 诱变。也参见 In Vitro Mutagenesis Protocols：第 3 版，Braman（编著），Humana Press, (2010) ISBN：1607616513 和 PCR Cloning Protocols：From Molecular Cloning to Genetic Engineering, Chen 和 Janes（编著），Humana Press, (2002) ISBN：0896039730。

[0236] 扫描氨基酸分析可用于评价沿着连续序列的 1 个或多个氨基酸。方法可包括将

区域中的每一个或几乎每一个氨基酸突变成特定氨基酸,例如,突变成相对小的中性氨基酸例如丙氨酸、丝氨酸或缬氨酸。通常选择丙氨酸,因为其消除了 β -碳原子旁的侧链,并且不太可能改变变体的主链构象(Cunningham和Wells, Science, 244:1081-1085, 1989)。其还是最常见的氨基酸并且频繁地发现于被包埋和暴露的位置(Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman&Co., N.Y.) ;Chothia, J. Mol. Biol., 150:1, 1976)。还可改造扫描过程以使之适合用于产生更明显的变化,例如可将带电荷的残基改变成具有相反电荷的残基,可用具有大侧链的残基替代具有短侧链的残基。例如,精氨酸扫描是可用于替代丙氨酸扫描或除了丙氨酸扫描以外的方法。可将扫描用于区域中的每一个残基或用于具有特定性质的残基,例如蛋白质表面上或表面附近的残基,或可能存在于蛋白质的表面上或蛋白质的表面附近的残基。

[0237] 可以例如通过进行基于同源性的建模、能量最小化和/或其它建模,使用已知的解析的结构对蛋白质、其结构域之一或包括蛋白质的复合物的结构进行建模。这样的方法包括:Accelrys Software Inc., Discovery Studio®, Release 3.0, San Diego: Accelrys Software Inc., 2010, AMBER™ 建模软件(Case等人(2005) J. Computat. Chem. 26, 1668-1688和Case等人(2010), AMBER11, University of California, San Francisco, CA USA)以及CHARMM™ 建模软件(Molecular Simulations Inc.)。通常也参见Baker和Sali, Science 294(5540):93-6, 2001)。还可以例如使用X-射线晶体学和/或NMR光谱学直接测定结构。

[0238] 描述IL-1家族细胞因子的结构的示例性PDB结构包括:1I1B、1ILR、1IRA、1ITB、2I1B、2ILA、2KLL、4I1B、5I1B、6I1B、7I1B、8I1B、9ILB和1MD6(可在来自RCSB-Rutgers, Piscataway NJ, USA的pdb.org上在线获得,和从美国国立医学图书馆(Bethesda, MD, USA)获得)。例如,单独的和与受体IL-1RI复合的IL-1 β 的结构已被解析。参见,例如,Finzel等人(1989) J. Mol. Biol. 209:779-791, PDB1ITB, 和Vigers等人(1997) Nature 386:190-194。IL-1Ra与IL-1RI一起的结构已被解析。参见,例如, PDB1IRA和Schreuder等人, (1997) Nature 386:194-200。

[0239] 可以例如使用计数机软件例如碱基局部对准检索工具(BLAST)、PSI-BLAST、PHI-BLAST、WU-BLAST-2, 和/或MEGABLAST通过序列比对来帮助同源性建模。参见Altschul等人, 1990, J. Mol. Biol. 215, 403-410; Altschul等人, 1996, Methods in Enzymology 266, 460-480; 和Karlin等人, 1993, PNAS USA 90, 5873-5787。用于对齐大分子(氨基酸序列和核酸序列)的其它算法包括FASTA(Pearson, 1995, Protein Science 4, 1145-1160)、ClustalW(Higgin等人, 1996, Methods Enzymol. 266, 383-402)、DbClustal(Thompson等人, 2000, Nucl. Acids Res. 28, 2910-2926)和Molecular Operating Environment(Chemical Computing Group, Montreal, Quebec Canada H3A2R7)。此外,可使用集成至GCG序列比对软件包的ALIGN程序(2.0版)中的Myers和Miller的算法(Myers&Miller, CABIOS 4, 11-17, 1988)。

[0240] IL-1 β 和IL-1Ra的共有序列可通过比较两个序列和鉴定为相同的或高度保守的残基来获得。本文中描述的嵌合细胞因子结构域可具有至少60、70、80、90、95或100%的这样的相同残基或高度保守的残基。示例性共有序列是:DXXQKX₍₈₋₉₎L-AXXLQGX₍₁₈₋₂₈₎LGX₍₇₎LSCVXXXDXXXLQLEXVX₍₈₋₉₎KXXKRFXX₍₁₀₎FESAXXPWXXXTXXXXXPVXLX₍₅₋₆₎GXXXTXFXFXQ(SEQ ID NO:57),其中X独立地是任何氨基酸并且下标数字或范围是发生数量。本文中描述的嵌合

细胞因子结构域可与共有序列具有至少 60、70、80、90、95 或 100% 的同一性（其中对于同一性不计数 X 残基）。可以以类似方式鉴定其它共有序列。

[0241] IL-1 细胞因子家族成员的其它变体可使用基于展示的系统或其它基于文库的筛选来制备和评价。例如，可展示或表达蛋白质变体，以及评价其结合 IL-1 细胞因子家族成员的受体的能力。例如，可评价本文中描述的 IL-1 β 、IL-1Ra 或细胞因子结构域的变体的结合 IL-1RI 的可溶性胞外结构域的能力。基于展示的系统的一般描述包括下列内容：对于细胞展示，Chao 等人 Nat Protoc. 2006 ;1(2):755-68 ;Colby 等人 Methods Enzymol. 2004 ;388:348-58 ;Boder 等人 ,Methods Enzymol. 2000 ;328:430-44)，对于噬菌体展示（例如，Viti 等人 ,Methods Enzymol. 2000 ;326:480-505 和 Smith(1985)Science228:1315-1317)，以及对于核糖体展示（例如，Mattheakis 等人 (1994)Proc. Natl. Acad. Sci. USA91:9022 和 Hanes 等人 (2000)Nat Biotechnol. 18:1287-92 ;Hanes 等人 (2000)Methods Enzymol. 328:404-30 ;和 Schaffitzel 等人 (1999)J Immunol Methods. 231(1-2):119-3。

[0242] 虽然本文中许多实施方案使用人 IL-1 细胞因子序列作为亲代结构域来举例说明，但也可使用其它序列。许多例如来自其它物种的其它 IL-1 细胞因子是已知的并且是可获得的，并且可见于公共数据库例如 Entrez（美国国立医学图书馆，Bethesda MD）和 EBI-EMBL(Hinxton, Cambridge UK)。来自 UNIPROT 数据库（可在 UniProt.org 上获得和参见 The UniProt Consortium, Nucleic Acids Res. D142-D148(2010)）的这样的序列的实例包括下列：

蛋白质	登录号
IL-1 α	P01583, P01582, P16598, P08831, Q28385, Q28579, O46612, P48089, P18430, P04822, P46647, O46613, Q3HWU1, P79161, Q60480, P79340
IL-1 β	P01584, P10749, Q28386, P09428, P14628, P21621, Q63264, P41687, P48090, Q9YGD3, P26889, Q2MH07, Q28292, Q9WVG1, P46648, P79182, P51493, Q865X8
IL-1Ra	P18510, P25085, O18999, P26890, P25086, Q9GMZ4, Q9BEH0, O77482, Q866R8, Q29056
IL-1RI	Q02955, P14778, P13504
IL-1RAcP	Q9NPH3, Q61730, P59822, Q63621

[0244] 本文中描述的细胞因子结构域还可包括存在于变体细胞因子结构域中的置换，所述变体细胞因子结构域能够结合 IL-1RI。例如，SEQ ID NO:1 的位置 15（对应于 SEQ ID NO:3 的位置 20）可以是 Met 或 Asn。SEQ ID NO:1 的位置 30（对应于 SEQ ID NO:3 的位置 34）可以是 Gly、His、Trp 或 Met。

[0245] IL-1 β 和 IL-1Ra 的其它示例性变体包括 Boraschi 等人 (1996)Frontiers in Bioscience :A Journal and Virtual Library1,d270-308, Evans 等人 ,J. Biol. Chem. , 270:11477(1995) 和 Greenfeder 等人, J. Biol. Chem. , 270:22460(1995) 中描述的那些变体。例如，IL-1 β 的变体包括 R11G、R11A、Q15H、E105G 和 T147G。参见，例如，Evans 等人。IL-1Ra 的变体包括 W16Y、Q20M、Q20N、Y34G、Y34H、Y34W、Y34M、Y147G、Y147H、Y147M、K145D、H54P、V18S、T108K、C116F、C122S、C122A、Y147G、H54P、H54I 和 Evans 等人和 Greenfeder 等人, J. Biol. Chem. , 270:22460(1995) 中的其它变体。细胞因子结构域可在前述位置之一上包含与 IL-1Ra 相同的残基。细胞因子结构域还可在对应的位置上包含与前述突变之一不同的残基。

[0246] 此外，IL-1 家族细胞因子可包含一个或多个未配对的半胱氨酸残基。可将一个或

多个,例如 2、3 或全部这样的未配对的半胱氨酸残基突变成另一种氨基酸,例如,不带电荷的氨基酸例如丙氨酸或丝氨酸。例如, P01 在 SEQ ID NO:17 的位置 67、70、116 和 122 上包含半胱氨酸。可用另一种氨基酸例如不带电荷的氨基酸例如丙氨酸或丝氨酸置换 1、2、3 或全部 4 个这样的半胱氨酸。P02 在 SEQ ID NO:18 的位置 67、70、116 和 122 上包含半胱氨酸。可用另一种氨基酸例如不带电荷的氨基酸例如丙氨酸或丝氨酸置换 1、2、3 或全部 4 个这样的半胱氨酸。P03 在 SEQ ID NO:19 的位置 70、116 和 122 上包含半胱氨酸。可用另一种氨基酸例如不带电荷的氨基酸例如丙氨酸或丝氨酸置换 1、2 或全部 3 个这样的半胱氨酸。P04 在 SEQ ID NO:20 的位置 70、116 和 122 上包含半胱氨酸。可用另一种氨基酸例如不带电荷的氨基酸例如丙氨酸或丝氨酸置换 1、2 或全部 3 个这样的半胱氨酸。P05 在 SEQ ID NO:21 的位置 8、70 和 122 上包含半胱氨酸。可用另一种氨基酸例如不带电荷的氨基酸例如丙氨酸或丝氨酸置换 1、2 或全部 3 个这样的半胱氨酸。

[0247] 还可环状排列 IL-1 家族细胞因子结构域,包括本文中描述的嵌合细胞因子结构域。例如,可重置来自结构域的 C 末端区段以便其为原始 N 端和 N 末端区段(通常在 C 末端区段切除后包含原始蛋白质的剩余部分)的 N 末端。两个重置的区段可通过接头(例如,约 3 至 10 个氨基酸的)分隔。一般而言,除顺序变化外,排列前的结构域中的全部氨基酸得以保留。在一些实施方案中,用于排列的切点可存在于柔性区域,例如柔性环例如 b6-b7(例如,对应 SEQ ID NO:3 的 71-80 的氨基酸)或 b7-b8 环(例如,对应于 SEQ ID NO:3 的 84-99 的氨基酸)中。

[0248] 在一些实施方案中,本文中描述的受体结合剂例如包含 IL-1 家族细胞因子结构域的受体结合剂具有小于 30、25、22、20、19、18 或约 17kDa 的分子量。在一些实施方案中,受体结合剂具有大于 18、19、20、22、25、30、40、45 或 50kDa 的分子量。例如,受体结合剂可包括其它肽、聚合或非聚合组分,例如改变试剂药代动力学、稳定性、免疫原性和/或分子量的组分。蛋白质可包含其它修饰,例如翻译后或合成修饰。在某些实施方案中,受体结合剂未被糖基化。在其它实施方案中,受体结合剂包括至少一个糖基化。

[0249] 例如,本文中描述的受体结合剂可包含另外的结构域和特性。例如,可将受体结合剂直接或间接融合至抗体蛋白质的结构域,例如,融合至 Fc 结构域或一个或多个恒定结构域(例如, CH1、CH2 或 CH3)。例如,结构域可以是人结构域或人结构域的变体。Fc 结构域或一个或多个恒定结构域可位于受体结合剂的 N 末端或 C 末端。

[0250] Fc 结构域可获自任何适当的免疫球蛋白,例如来自人抗体,例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚型、IgA、IgE、IgD 或 IgM 的抗体。在一个实例中,Fc 结构域包含从 Fc 结构域的大致位置 Cys226 上的氨基酸残基或从大致位置 Pro230 至羧基端的序列。Fc 结构域通常包含两个恒定结构域 CH2 结构域和 CH3 结构域,和任选地包含 CH4 结构域。在其 Fc 区域中具有置换的抗体以及增加的血清半衰期也描述于 W000/42072, W002/060919;Shields 等人, J. Biol. Chem. 276:6591-6604(2001);Hinton, J. Biol. Chem. 279:6213-6216(2004)) 中。IgG 重链的残基编号是如 Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版. Public Health Service, NIH, MD(1991) 中关于其中的人 IgG1EU 抗体的编号的 EU 指数的编号。

[0251] 在一个实施方案中,受体结合剂包括增加体内血清半衰期的挽救受体-结合表位,如例如美国专利 5,739,277 和 Ghetie 等人, Ann. Rev. Immunol. 18:739-766(2000)) 中

描述的。在一些实施方案中,表位包含在融合至受体结合剂的 Fc 区域中。

[0252] 在一个实施方案中,受体结合剂包含血清白蛋白序列或这样的蛋白质的结合 FcRn 受体的部分或结合血清白蛋白例如人血清白蛋白的序列。例如,可将结合血清白蛋白的某些肽与受体结合剂例如序列 DICLP RWGLW (SEQ ID NO:22) 缔合。也参见, Dennis 等人 J. Biol. Chem. 277:35035-35043 (2002)。

[0253] 受体结合剂可被修饰来包含增加试剂的尺寸和稳定性的序列,例如 W02008/155134 或 W02009/023270 中描述的序列。这样的序列通常不具有生物活性,例如,其不调节由 IL-1 细胞因子家族成员介导的信号转导。可使用多种稳定多肽序列,例如富含甘氨酸和 / 或丝氨酸以及其它氨基酸例如谷氨酸、天冬氨酸、丙氨酸或脯氨酸的序列。例如,序列可被设计来具有至少 30、40、50、60、70、80、90 或 100% 的甘氨酸和 / 或丝氨酸残基。在一些实施方案中,连接至蛋白质的稳定多肽序列的组合长度可为至少 20、25、35、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、300、350、400、500、600、700、800、900 或超过 1000 或 2000 个氨基酸。可将稳定序列例如融合至生物活性肽,例如融合至受体结合剂的 N 或 C 末端。稳定序列的融合可导致融合蛋白质相对于未修饰蛋白质的流体动力学半径的显著增加,这可通过超速离心、大小排阻层析或光散射来检测。在一些实施方案中,稳定序列包含少数下列氨基酸或不包含下列氨基酸:半胱氨酸(以避免二硫键形成和氧化)、甲硫氨酸(以避免氧化)、天冬酰胺和谷氨酰胺(以避免脱酰胺)和天冬氨酸。稳定序列可被设计来包含倾向于减小对蛋白水解降解的敏感性的脯氨酸残基。

[0254] 结合测定

[0255] 受体结合剂与其靶的相互作用可使用任何适当的方法来分析,所述方法包括例如放射免疫测定、细胞结合测定和表面等离子体共振技术 (SPR)。使用放射性碘化的蛋白质竞争的示例性细胞结合测定描述于 Boraschi 等人, J. Immunol., 155(10):4719-25 (1995) 中。

[0256] SPR 或生物分子相互作用分析 (BIA) 可实时检测生物特异性相互作用而无需标记任何相互作用物。BIA 芯片的结合表面上质量的变化(表明结合事件)导致表面附近的光折射率的改变(表面等离子体共振 (SPR) 的光学现象)。折射率的变化产生可检测信号,可将所述信号测量为生物分子之间实时相互作用的指标。使用 SPR 的方法描述于例如 Raether, 1988, Surface Plasmons Springer Verlag; Sjolander 和 Urbaniczky, 1991, Anal. Chem. 63:2338-2345; Szabo 等人, 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705 和由 BIAcore International AB (Uppsala, Sweden) 提供的在线资源中。**BIACORE®** 系统或 Reichert SR7000DC Dual Channel SPR 可用于在动力学、亲和力或特异性方面实时比较相互作用和对相互作用进行评级,而无需使用标记物。受体结合剂对于细胞因子受体胞外结构域(例如, IL-1RI 的胞外结构域)的结合亲和力可在接近生理条件(例如 10mM HEPES pH7.4, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.005% Tween-20)下使用 SPR 来测量。还可使用不依赖于 SPR 的其它方法例如来测量结合和亲和力。

[0257] 来自结合测定的信息可用于提供受体结合剂对靶的结合的平衡解离常数 (K_D) 和动力学参数(例如, K_{on} 和 K_{off}) 的精确定量测量。这样的数据可用于比较不同蛋白质、靶和条件。该信息还可用于开发结构-活性关系 (SAR)。例如,可将变体蛋白质的动力学和平衡结合参数与参照或亲代蛋白质的参数相比较。可鉴定与特定结合参数例如高亲和力和缓慢 K_{off} 的相关的给定位置上的变体氨基酸。可将该信息与结构建模组合(例如,使用同源

性建模、能量最小化或利用 x 射线晶体学或 NMR 的结构测定)。

[0258] 用于评价亲和力的蛋白质可以以重组形式产生,并且可包含适合用于纯化或固定的标签例如 FLAG 标签、myc 标签、血凝素标签、His 标签或 Fc 结构域融合。受体蛋白(例如 IL-1RI 和 IL-1RAcP)的胞外结构域可以通过例如在细菌或昆虫细胞中表达,例如在 Sf9 细胞中使用杆状病毒表达来以重组形式产生。可以例如使用芯片将适当的受体蛋白固定在 BIAcore 系统中,所述芯片包含结合它们的标签的试剂,例如,利用对于 Fc 结构域是特异性的 IgG 或其它标签涂覆的芯片。

[0259] 细胞活性测定。可以例如在基于细胞的测定中评价受体结合剂用作受体拮抗剂的能力。例如,可能评价受体结合剂对 IL-1RI 的抑制。IL-1 活性的几个示例性测定描述于 Boraschi 等人(同上)中,包括 T 细胞增殖测定、IL-6 和 IL-8 产生测定和钙流入的抑制。

[0260] 在一个示例性测定中,评价受体结合剂抑制 IL-1 β 刺激的 IL-6 从人成纤维细胞释放的能力。IL-1 β - 刺激的细胞因子在 MRC5 细胞中释放的抑制与试剂体内抑制 IL-1 介导的活性的能力相关。测定的细节描述于 Dinarello 等人,Current Protocols in Immunology, Ch. 6. 2. 1-6. 2. 7, John Wiley and Sons Inc., 2000 中。简而言之,将人 MRC5 人成纤维细胞(ATCC#CCL-171, Manassas VA, USA) 在多孔板中生长至汇合。利用滴定的剂量的受体结合剂和对照处理细胞。随后在滴定的试剂和 / 或对照存在的情况下将细胞与 100pg/ml 的 IL-1 β 接触。不用 IL-1 β 刺激阴性对照细胞。使用 IL-6ELISA 试剂盒(例如, BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA) 测量每一个处理的细胞的组中释放的 IL-6 的量。可使用的对照包括单独的缓冲液、IL-1Ra 和针对 IL-1 β 的抗体。

[0261] 还可体内评价受体结合剂的效率。示例性测定描述于 Economides 等人, Nature Med., 9:47-52(2003) 中。简而言之,利用滴定的剂量的受体结合剂和对照腹腔内注射小鼠。注射后 24 小时,以 1mg/kg 的剂量用重组人 IL-1 β 皮下注射小鼠。IL-1 β 注射后 2 小时(峰值 IL-6 反应时间),处死小鼠,收集血液,进行处理以获得血清。利用 ELISA 测定血清 IL-6 水平。可基于实验性动物血清中检测到的 IL-6 针对对照中检测到的 IL-6 的比率来计算百分比抑制。

[0262] IL-1 体内活性的其它示例性测定描述于 Boraschi 等人(同上),包括厌食症、低血糖症和中性白细胞增多症测定。

[0263] 生产。受体结合剂可通过在重组宿主细胞中表达来产生,而且还可通过其它方法例如体外转录和翻译以及化学合成来产生。

[0264] 对于细胞表达,可将一个或多个编码受体结合剂的核酸(例如, cDNA 或基因组 DNA) 插入可复制载体以用于克隆或表达。各种载体是公共可获得的。载体可以例如是质粒、粘粒、病毒基因组、噬菌粒、噬菌体基因组或其它自主复制序列。可通过多种方法将适当的编码核酸序列插入载体。例如,可对适当的限制性内切核酸酶位点进行工程化(例如,使用 PCR)。随后可将限制性消化和连接用于将编码核酸序列插入在适当的位置。载体元件通常包括一个或多个复制起点、一个或多个标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。

[0265] 受体结合剂可通过分离,还可通过至一个或多个其它组件例如信号序列、表位或纯化部分以及标记物的融合来重组地产生。受体结合剂可包括白细胞介素 -1 家族成员的前结构域,例如,随后可通过蛋白水解处理除去所述前结构域。

[0266] 对于细菌表达,可产生具有或不具有信号序列的受体结合剂。例如,可在细胞内

产生其,以便其积累在包涵体中或可溶性级分中。还可例如通过添加原核生物信号序列,例如适当的前导序列(例如来自碱性磷酸酶、青霉素酶或耐热肠毒素 II)来分泌其。用于表达的示例性细菌宿主细胞包括任何可转化的大肠杆菌 K-12 株(例如大肠杆菌 BL21、C600、ATCC23724;大肠杆菌 HB101NRRLB-11371、ATCC-33694;大肠杆菌 MM294ATCC-33625;大肠杆菌 W3110ATCC-27325 和大肠杆菌 BLR(DE3))、枯草杆菌 (*B. subtilis*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 或其它杆菌的菌株。细菌系统中产生的蛋白质通常不存在糖基化。因此,在一些实施方案中,本文中描述的受体结合剂大体上不含糖基化,例如不含哺乳动物或其它真核细胞的糖基化修饰。

[0267] 可在酵母宿主细胞例如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、汉逊酵母属 (*Hansenula*) 或巴斯德毕赤酵母中表达受体结合剂。对于酵母表达,还可在细胞内或通过分泌,例如使用酵母转化酶前导序列或 α 因子前导序列(包括酵母属和克鲁维酵母属)或酸性磷酸酶前导序列或白色念珠菌 (*C. albicans*) 葡糖淀粉酶前导序列(1990 年 4 月 4 日公布的 EP362, 179)来产生受体结合剂。在哺乳动物细胞表达中,哺乳动物信号序列可用于指导蛋白质分泌,例如来自相同或相关物种的分泌性多肽的信号序列以及病毒分泌前导序列。或者,可产生具有白细胞介素 -1 家族成员的前结构域例如 IL-1 α 或 IL-1 β 前结构域的受体结合剂。

[0268] 表达和克隆载体都包含使得载体能够在一种或多种选择的宿主细胞中复制的核酸序列。这样的序列对于多种细菌、酵母和病毒是公知的。来自质粒 pBR322 的复制起点适合用于大多数革兰阴性细菌;2 μ 质粒复制起点适合用于酵母;各种病毒复制起点(SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV 或 BPV)用于哺乳动物细胞的克隆载体。

[0269] 表达和克隆载体通常包含选择基因或标记。常见选择基因编码蛋白质,所述蛋白质(a)赋予对抗生素或其它毒性例如氨苄青霉素、新霉素、氨甲蝶呤或四环素的抗性,(b)互补营养缺陷型缺陷(例如酵母属中的 URA3 标记)或(c)提供不可从复合培养基获得的关键营养物,例如编码杆菌的 D-丙氨酸消旋酶的基因。各种标记也可获得用于哺乳动物细胞,例如 DHFR 或胸苷激酶。可将 DHFR 与缺乏 DHFR 活性的细胞系(例如 CHO 细胞系)(如由 Urlaub 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216(1980)所述制备和繁殖的)结合使用。

[0270] 表达和克隆载体通常包含有效地连接至编码受体结合剂的核酸序列的启动子以指导 mRNA 合成。适合与原核宿主一起使用的示例性启动子包括 b-内酰胺酶和乳糖启动子系统(Chang 等人, Nature, 275:615(1978);Goeddel 等人, Nature, 281:544(1979))、碱性磷酸酶、色氨酸(trp)启动子系统(Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057(1980); EP36, 776)和杂交启动子例如 tac 启动子(deBoer 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25(1983))。用于细菌系统的启动子还可包含适当定位的 Shine-Dalgarno 序列。T7 聚合酶系统还可用于驱动置于 T7 启动子控制之下的核酸编码序列的表达。参见,例如, pET 载体(EMD Chemicals, Gibbstown NJ, USA)和宿主细胞,例如如可从 EMD Chemicals 和 US5, 693, 489 获得的 Novagen 用户方案 TB053 中描述的。例如,可将这样的载体与 BL21(DE3)细胞和 BL21(DE3)pLysS 细胞组合用于产生蛋白质(例如,至少 0.05、0.1 或 0.3mg/ml 的细胞培养物)。可使用的其它细胞系包含 B834、BLR、HMS174、NovaBlue(包括具有 pLysS 质粒的细胞)的 DE3 溶素原。

[0271] 与酵母一起使用的示例性启动子包括 3-磷酸甘油酸酯激酶(Hitzeman 等

人, J. Biol. Chem., 255:2073(1980)) 或其它糖酵解酶 (Hess 等人, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149(1968); Holland, Biochemistry, 17:4900(1978)) 例如烯醇化酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、6-磷酸葡萄糖异构酶和丙酮酸激酶的启动子。其它示例性酵母启动子是诱导型的并且具有受生长条件控制的转录的额外有利方面。诱导型启动子的实例包括醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、金属硫蛋白和响应麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区域。

[0272] 可以例如通过从病毒 (例如多瘤病毒、腺病毒 (例如腺病毒 2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和猴病毒 40 (SV40)) 的基因组获得的启动子, 通过异源哺乳动物启动子例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子以及通过热激启动子在哺乳动物宿主细胞中控制编码受体结合剂的 mRNA 从载体的表达。还可使用异源启动子系统例如响应四环素的启动子。参见, Urlinger, S., 等人 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(14):7963-7968。转录还可由顺式或反式定位的增强子序列驱动。示例性哺乳动物增强子序列包括珠蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、 α -胎蛋白和胰岛素的增强子序列。其它实例包括复制起点的晚期侧上的 SV40 增强子 (bp100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点晚期侧上的多瘤病毒增强子和腺病毒增强子。可将增强子在受体结合剂的编码序列的位置 5' 或 3' 上拼接入载体, 但优选位于启动子的 5' 位点。

[0273] 用于真核宿主细胞 (酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其它多细胞生物体的有核细胞) 的表达载体还可包含终止转录和稳定 mRNA 所必需的序列。这样的序列通常可从真核生物或病毒 DNA 或 cDNA 的非翻译区域的 5' 以及偶尔地 3' 获得。这些区域在编码受体结合剂的 mRNA 的非翻译部分包含转录为多腺苷酸化片段的核苷酸区段。表达载体还可包含一个或多个内含子序列。

[0274] 还可在昆虫细胞例如 Sf9 或 SF21 细胞中使用 pFAST-BAC™ 系统表达受体结合剂。其它示例性杆状病毒表达载体可获自 Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad CA, USA。还可在哺乳动物细胞中表达受体结合剂。例如, 还可使用哺乳动物来源的细胞系。哺乳动物宿主细胞系的实例包括猴肾细胞的 COS-7 品系 (ATCC CRL1651) (Gluzman 等人, Cell 23:175, 1981)、L 细胞、C127 细胞、3T3 细胞 (ATCC CCL163)、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、HeLa 细胞和 BHK (ATCC CRL10) 细胞系, 以及来源于非洲绿猴肾细胞系 CV1 (ATCC CCL70) 的 CV1/EBNA 细胞系 (如由 McMahan 等人 (EMBO J. 10:2821, 1991) 描述的)。已描述了用于将 DNA 引入哺乳动物细胞的已建立的方法 (Kaufman, R. J., Large Scale Mammalian Cell Culture, 1990, pp. 1569)。

[0275] 适合用于在重组细胞中合成受体结合剂的其它方法、载体和宿主细胞描述于 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 3 版, Sambrook 等人 (编著), Cold Spring Harbor Press, (2001) (ISBN:0879695773) 中。

[0276] 当在细胞中表达后, 可从培养基、包涵体或细胞裂解物回收受体结合剂。可通过各种物理或化学方法, 例如冻融循环、超声处理、机械破碎或细胞裂解剂 (例如, 去垢剂) 来破碎细胞。

[0277] 可将受体结合剂从可在细胞裂解物或细胞培养基中发现的其它细胞蛋白质或多肽纯化出来。可使用蛋白质纯化的各种方法, 这样的方法在本领域是已知的并且描述于例如 Deutscher, Methods in Enzymology, 182(1990); 和 Scopes, Protein Purification:

Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (2010) (ISBN :1441928332) 中。纯化方法的实例包括：通过在离子-交换柱上进行分级分离；乙醇沉淀；反相 HPLC；硅土上或阳离子-交换树脂例如 DEAE 上的层析；层析聚集；SDS-PAGE；硫酸铵沉淀；使用例如 **Sephadex®** G-75 的凝胶过滤；除去污染物例如 IgG 的蛋白 A **Sepharose®** 柱；和亲和柱（例如，结合蛋白质的表位标记形式的金属螯合柱和具有各种结合与受体结合剂缔合的任何纯化部分的配体的柱子）。纯化法可包括两个不同离子-交换层析步骤的组合（例如，阳离子交换层析，随后阴离子交换层析或反之亦然）。可通过多种方法包括盐和 / 或 pH 梯度或阶梯从离子交换树脂洗脱受体结合剂。在一些实施方案中，受体结合剂包括纯化部分（例如表位标签和亲和柄）。这样的部分可用于亲和层析和可任选地通过蛋白水解切割除去。

[0278] 离子交换层析还可用作离子交换分离技术。离子交换层析基于分子的总电荷之间的差异分离分子，并且可用于将受体结合剂的完整形式与这样的蛋白质的其它形式分离。

[0279] 可将阴离子或阳离子取代物连接至基质以形成用于层析的阴离子或阳离子支持物。阴离子交换取代物包括二乙胺基乙基 (DEAE)、季铵基乙基 (QAE) 和季胺 (Q) 基团。阳离子取代物包括羧甲基 (CM)、磺乙基 (SE)、磺丙基 (SP)、磷酸盐 (P) 和磺酸盐 (S)。纤维素离子交换树脂例如 DE23、DE32、DE52、CM-23、CM-32 和 CM-52 可获自 Whatman Ltd. (Maidstone, Kent, U. K)。 **Sephadex®** 和其它交联离子交换剂也是已知的。例如，DEAE-、QAE-、CM- 和 **SP-Sephadex®** 以及 DEAE-、Q-、CM- 和 **S-Sepharose®** 和 **Sepharose®** Fast Flow 可获自 Pharmacia AB。DEAE 和 CM 衍生的乙二醇-甲基丙烯酸酯共聚物例如 **Toyopearl®** DEAE-650S 或 M 和 **Toyopearl®** CM-650S 或 M 可获自 Toso Haas Co. (Philadelphia, PA, USA)。

[0280] 阳离子交换表面具有共价结合的带负电荷的配体的离子交换表面，从而其具有游离阳离子以与溶液中与表面接触的阳离子交换。示例性表面包括阳离子交换树脂，例如其中共价结合的基团是羧酸盐或磺酸盐的那些阳离子交换树脂。商购可得的阳离子交换树脂包括 CMC- 纤维素、**SP-Sephadex®** 和 **SP-Sepharose®** Fast Flow (Pharmacia)。

[0281] 阴离子交换表面是具有共价结合的带正电荷的基团例如季胺基团的离子交换表面。示例性阴离子交换表面是阴离子交换树脂例如 DEAE 纤维素、TMAE、QAE **Sephadex®**、Fast Q **Sepharose®** (Pharmacia) 和 Q **Sepharose®** Fast Flow。

[0282] 受体结合剂的示例性纯化方案包括在裂解缓冲液中裂解大肠杆菌，随后进行深度过滤。随后将材料经历阳离子交换层析 (CEX)。随后在 CEX 洗脱物在阴离子交换层析 (AEX) 步骤中于阴离子交换介质上方流过。可将 AEX FT 经历抛光步骤。随后通过超滤 / 渗滤处理材料例如以浓缩材料或使材料脱盐。可基于理论截留分子量 ("NMWCO") 选择超滤 / 渗滤膜以将蛋白质保留在渗余物中，同时允许低分子材料例如盐通过滤膜。可以例如取决于产物的期望终 pH 和电导率，在终缓冲液交换步骤中使用任何缓冲液或无菌水。

[0283] 可将受体结合剂在多种溶液（包括水、PBS 和缓冲液）中贮存。示例性缓冲液包括醋酸钠 pH4.5、醋酸钠 pH4.7、醋酸钠 pH4.9、醋酸钠 pH5.1、醋酸钠 pH5.3、醋酸钠 pH5.5、

琥珀酸盐 pH5.2、琥珀酸盐 pH5.4、琥珀酸盐 pH5.6、琥珀酸盐 pH5.8、组氨酸 pH5.7、组氨酸 pH6.0、组氨酸 pH6.3、组氨酸 6.6、磷酸钠 pH6.5、磷酸钠 pH6.7、磷酸钠 7.0、磷酸钠 pH7.3、磷酸钠 pH7.7、咪唑 pH6.5、咪唑 pH6.8、咪唑 pH7.2、Tris pH7.0、Tris pH7.5、Tris pH7.7。缓冲剂可以以例如约 1-100mM、5-50mM、10-50mM 或 5-25mM 的浓度存在。溶液还可包含盐例如 NaCl（例如，50mM、150mM 或 250mM 以及其间的范围）、精氨酸（例如，以约 1%、2%、3%、4%、5%、7.5% 和其间的范围）、蔗糖（例如，以约 1%、2%、3%、4%、5%、7.5%、8.5%、10%、15% 和其间的范围）、甘油（例如，以约 0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、7.5%、8.5%、10%、15% 和其间的范围）和 / 或去垢剂例如 TX-100 和 Tween-80（聚山梨酯）（例如，以约 0.001%、0.02%、0.05%、0.1%、0.2%、0.5%、1.0% 和其间的范围）。

[0284] 受体结合剂可以以至少 50mg、100mg、500mg、1g、5g、10g 或更多的量存在于组合物中。

[0285] 分析法。宿主细胞蛋白质 (HCP) 是指制剂中与受体结合剂不同的蛋白质，例如是从其制备受体结合剂的宿主细胞的内源性蛋白质，通常地大肠杆菌蛋白。优选地，宿主细胞蛋白质以低于 10000、1000、900、800 或 700ppm（百万分之一）的浓度存在。可以例如通过 ELISA 或其它检测法来检测 HCP。例如，ELISA 可使用针对 HCP 的多克隆抗体。示例性试剂盒可获自 Cygnus Technologies (CN#F410 ;Southport NC USA)。另一种示例性试剂盒使用 AlphaScreen 技术（**AlphaLisa®** 大肠杆菌 HCP 试剂盒，产品编号 AL261C/F, Perkin Elmer, Waltham MA USA）。

[0286] 可以例如使用高压液相色谱评价包含或潜在地包含受体结合剂的材料。示例性分析技术包括弱阳离子交换高效液相色谱 (wCEX-HPLC)、大小排阻高效液相色谱 (SE-HPLC)、反相液相色谱、ESI-MS、涡轮喷雾电离质谱、纳喷雾电离质谱、热喷雾电离质谱、声波喷雾电离质谱、SELDI-MS 和 MALDI-MS。其它分析技术包括光散射光谱测定法。

[0287] 在几个实施方案中，受体结合剂的 N 末端区域包含与来自 IL-1 β 的 N 末端区域的肽例如肽 APVRS (SEQ ID NO:58) 相同的序列。表达这样的蛋白质的重组细胞（特别地大肠杆菌细胞）可产生完整蛋白质以及其它亚型，包括 des-Ala 亚型、乙酰化亚型和具有额外的甲硫氨酸（例如，Ala1 的 N 末端）的亚型。在氨基酸位置 2 上包含脯氨酸的受体结合剂（其中 N 末端残基在位置 1 上）可对由大肠杆菌蛋白酶例如氨肽酶 P 产生的切割易感，所述氨肽酶 P 具有对于 X-PRO 的切割特异性。该切割可除去 N 末端氨基酸。例如，P03、P04 和 P05 在位置 2 上具有脯氨酸。P03、P04 和 P05 的完整形式在长度上具有 153 个氨基酸并且始于丙氨酸，然而 des-Ala 种类在长度上具有 152 个氨基酸并且始于脯氨酸。甲二磺酰化亚型在长度具有 154 个氨基酸并且始于甲硫氨酸，其为 Ala1 的 N 末端。

[0288] 分析技术例如上述那些分析技术可用于区分完整形式与其它形式，例如 des-Ala 种类、乙酰化 des-Ala 种类或甲二磺酰化种类。示例性分析技术是 wCEX-HPLC。例如，可如下面实施例 9 中所述，使用 Dionex **ProPac®** WCX-104x250mm 柱（产品编号 054993）评价 P05。可通过与质谱串联的 C4 反相 (RP)-HPLC 评价 WCX-HPLC 峰值。完整 P05 具有理论质量：17700.4Da 并且可检测为 17700.4Da。des-Ala 种类可检测为 17629.4Da，其比完整 P05 的质量少 71Da。71Da 的质量减少对应于单个丙氨酸残基的去除。甲二磺酰化完整 P05 种类可检测为 17830.80Da，甲基化甲二磺酰化 P05 种类可检测为 17845.59Da。乙酰化形式可以例如通过胰蛋白酶作图（通过 C18 反相高效液相色谱 (RP/HPLC)）来检测。

[0289] 药物组合物。可将受体结合剂配制为药物组合物。通常地,组合物是无菌的并且包含缓冲剂、药学上可接受的盐和赋形剂或稳定剂的一种或多种。例如,组合物可以是含水组合物。可按照用于生物学的标准方法配制本文中描述的受体结合剂。参见,例如, Gennaro(编著), Remington :The Science and Practice of Pharmacy, 第20版, Lippincott , Williams&Wilkins(2000) (ISBN :0683306472) ;Ansel 等人, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 第7版., Lippincott Williams&Wilkins Publishers(1999) (ISBN :0683305727) ;Kibbe(编著), Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第3版(2000) (ISBN :091733096X) ;Protein formulation and delivery, McNally 和 Hastedt(编著), Informa Health Care (ISBN :0849379490) (2007)。

[0290] 用于药物组合物的受体结合剂通常具有至少 10、20、50、70、80、90、95、98、99 或 99.99% 的纯度,并且通常不含人蛋白质。其可以是组合物中的唯一蛋白质或组合物中唯一的活性蛋白质。还可将其与一种或多种其它活性蛋白质例如一种或多种其它纯化的活性蛋白质例如相关或无关蛋白质组合。在一些实施方案中,组合物可以以约 0.001 - 10%,例如, 0.001 - 0.1%、0.01 - 1% 或 0.1%-10% 的浓度包含受体结合剂。

[0291] 因此,本文中表征了本文中描述的试剂的纯化和分离形式。术语“分离的”是指从其原始环境(例如,从其产生受体结合剂的细胞或材料)取出的材料。药物组合物可大体上不含热原材料,大体上不含核酸,和/或大体上不含细胞酶和组分,例如聚合酶、核糖体蛋白以及伴侣蛋白。

[0292] 药物组合物可包含药学上可接受的载体。如本文中所用,“药学上可接受的载体”包括生理上相容的任何或全部溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。“药学上可接受的盐”是指保留亲代化合物的期望的生物活性,但不赋予任何不期望的毒理学效应的盐(参见例如, Berge, S. M., 等人 (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19),例如, 酸加成盐和碱加成盐。

[0293] 在一个实施方案中,利用一种或多种赋形剂例如氯化钠和磷酸缓冲液(例如,磷酸氢二钠七水合物、磷酸二氢钠)和聚山梨酯配制受体结合剂。可在例如缓冲液中例如以约 5-100、5-30、30-50 或 50-100mg/ml 的浓度提供其,可将其在 2-8℃ 保存。药物组合物还可以以多种其它形式存在。这些形式包括例如液体、半固体和固体剂型例如液体溶液(例如,可注射和不溶液性溶液)、分散体或悬浮液以及脂质体。优选形式可取决于施用和治疗性应用的预期模式。用于本文中描述的试剂的组合物通常以可注射或不溶性溶液的形式存在,或用于局部或经眼递送(参见下文)。

[0294] 药物组合物通常是无菌的并且在制造和贮存条件下是稳定的。还可测试药物组合物以确保其满足用于施用的监管和工业标准。可将组合物配制为溶液、微乳剂、分散体、脂质体或其它适合于高药物浓度的有序结构。无菌可注射液可通过将本文中描述的试剂以需要的量与上文中列举的成分的一种或其组合(按需)一起掺入适当的溶剂中,随后进行过滤灭菌来制备。通常地,分散体通过将本文中描述的试剂掺入无菌媒介物来制备,所述媒介物包含基本分散介质和来自上文中列举的那些成分的需要的其它成分。在将无菌粉剂用于制备无菌可注射液的情况下,优选制备方法是真空干燥和冷冻干燥,所述方法产生本文中描述的试剂的粉剂+来自其先前无菌过滤的溶液的任何另外的期望成分。可以通过使用包衣例如卵磷脂,在分散体的情况下通过维持所需粒度以及通过使用表面活性剂来维持溶液

的适当流动性。可通过包含延迟吸收的试剂例如单硬脂酸盐和明胶来对可注射组物的延长的吸收进行工程化。

[0295] 例如,可将受体结合剂与聚合物例如大体上无抗原性聚合物例如例如聚环氧乙烷或聚氧化乙烯缔合。在一些实施方案中,将聚合物例如直接或间接地共价连接至受体结合剂。适当的聚合物按重量计显著地变化。可使用具有从约 200 变化至约 35,000 道尔顿(或约 1,000 至约 15,000 和 2,000 至约 12,500) 的数均分子量的聚合物。例如,可将受体结合剂缀合至水溶性聚合物,例如,亲水性聚乙烯聚合物例如聚乙烯醇或聚乙烯吡咯烷酮。这样的聚合物的非限定性列表包括聚环氧乙烷同聚物例如聚乙二醇(PEG)或聚丙二醇、聚氧乙酰多元醇、其共聚物和其嵌段共聚物,只要嵌段共聚物的溶解度得以维持即可。其它有用的聚合物包括聚羟烯烴例如聚氧乙烯、聚氧丙烯以及聚氧乙烯与聚氧丙烯的嵌段共聚物(Pluronic);聚甲基丙烯酸酯;卡波姆;分枝的或未分枝的多糖,其包含糖单体 D-甘露糖、D-和 L-半乳糖、岩藻糖、果糖、D-木糖、L-阿拉伯糖、D-葡萄糖醛酸、唾液酸、D-半乳糖醛酸、D-甘露糖醛酸(例如多聚甘露糖醛酸或海藻酸)、D-葡萄糖胺、D-半乳糖胺、D-葡萄糖和神经氨酸,包括同聚多糖和异聚多糖例如乳糖、支链淀粉、淀粉、羟乙基淀粉、直链淀粉、硫酸葡聚糖、葡聚糖、糊精、糖原或酸性粘多糖例如透明质酸的多糖单位;糖醇的聚合物例如聚山梨醇和聚甘露醇;肝素或乙酰肝素。

[0296] 在某些实施方案中,可利用将保护化合物免受快速释放的载体制备受体结合剂。可将其作为受控释放制剂递送,通过植入或微型胶囊化递送系统进行递送。可使用生物可降解的生物相容性聚合物,例如乙烯醋酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、多正酯和聚乳酸。通常参见例如, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, 编著, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0297] 施用。可通过多种方法给受试者例如人受试者施用受体结合剂,所述方法是例如静脉内施用(以推注的方式)或通过在规定时间内连续输注,通过肌内、肌内、动脉内、硬膜内、囊内、眶内、心内、真皮内、腹膜内、滑膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外注射、胸骨内注射和输注。其它施用模式包括局部(例如,经皮肤或粘膜)或吸入(例如,鼻内或肺内)途径。对于许多应用,施用途径是如下之一:静脉内注射或输注、皮下注射或肌内注射。

[0298] 可以以固定剂量或以 mg/kg 剂量施用受体结合剂。可静脉内(IV)或皮下(SC)施用它。可以例如每日、每隔一日、每三日、每四日或每五日、每周、每 3 至 5 周,例如每 4 周或每月施用受体结合剂一次。

[0299] 药物组合物可包含“治疗有效量”的本文中描述的试剂。试剂的治疗有效量可根据因素例如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及化合物引发个体的期望的反应(例如至少一个障碍参数的改善或障碍的至少一个症状的改善)的能力(和任选地待施用的任何额外试剂的效应)而变化。治疗有效量也是其中组合物的任何毒性或有害效应远小于治疗有益效应的量。通常以治疗有效量施用受体结合剂。

[0300] 可使用医疗装置例如植入物、输注泵、皮下注射针和无针皮下注射装置来施用药物组合物。装置可包括一个或多个例如用于贮存药物组合物的容器,并且可被构造来递送单位剂量的受体结合剂,和任选地第二试剂。剂量可以是固定剂量,即适合作为用于待治疗的受试者的单一剂量的物理上分开的单位;每一个单位可包含与药物载体结合和任选地与

另一种试剂结合的经计算产生期望的治疗效应的预定量的受体结合剂。

[0301] 在一些实施方案中,为了治疗本文中描述的障碍,可以以足以诱导至少一个反映障碍的严重度的指标持续改善的量和时间给患有障碍的受试者施用受体结合剂。如果受试者在至少两个相隔 1 至 4 周的场合上显示改善,则改善被认为是“持续的”。改善的程度可基于体征或症状来测定,也可使用发给受试者的问卷例如生活质量问卷。

[0302] 可评估反映疾病程度的各种指标以确定治疗的量和时间是否充足。选择的指标的基线值通过在施用第一剂量的受体结合剂之前进行的受试者检查来确立。优选地,在施用第一剂量的约 60 天内进行基线检查。

[0303] 改善可通过重复施用一定剂量的受体结合剂直至受试者对于选择的指标表现高于基线的改善来诱导。在治疗慢性病况中,改善的程度可通过在至少一个月或更长,例如 1、2 或 3 个月或更长或无限期的时期中重复施用来获得。在治疗急性病况中,可施用试剂进行 1 至 6 周的时期或甚至施用单个剂量。

[0304] 虽然治疗后疾病的程度可根据一个或多个指标表现改善,但可以以相同的水平或以减小的剂量或频率无限期地持续治疗。还可以例如在病症改善或消失后中断治疗。一旦治疗减少或中断,如果症状将重现可重新开始治疗。

[0305] 治疗。受体结合剂例如结 IL-1RI 和拮抗 IL-1 信号转导的受体结合剂可用于治疗“IL-1 介导的障碍”,所述障碍包括 (i) 至少部分通过 IL-1 激动引起的, (ii) 与 IL-1 信号转导组分 (例如 IL-1 α 、IL-1 β 或 IL-1RI) 的升高的水平或活性或升高的 IL-1 信号转导相关的、和 / 或 (iii) 通过减小 IL-1 活性改善的任何疾病或医学病况。IL-1 介导的障碍包括急性和慢性障碍,包括免疫障碍和炎性障碍。IL-1 介导的障碍包括全身性和非全身性障碍。已确认 IL-1 α 和 IL-1 β 是牵涉感染性反应以及炎性疾病 (包括类风湿关节炎) 的强效促炎细胞因子。在具有严重自身免疫性障碍、缺血和各种癌症的患者中已观察到增加的 IL-1 产生,从而 IL-1 牵涉这些疾病和相关疾病。

[0306] 通常也参见 Sims 和 Smith, The IL-1 family: regulators of immunity, Nature Reviews Immunology, doi:10.1038/nri2691 (2010)。

[0307] 术语“治疗”是指将本文中描述的试剂,例如以有效地改善与障碍例如本文中描述的障碍相关的病况、症状或参数,或防止障碍进展至统计上显著的程度或对于本领域技术人员来说是可检测的程度的量、方式和 / 或模式,给受试者例如患者施用。治疗可以期望治疗、治愈、缓和、减轻、改变、恢复、改善、缓解、好转或影响障碍、障碍的症状或对障碍的易感性。有效量、方式或模式可取决于受试者而变化,并且可针对受试者进行定制。示例性受试者包括人、灵长类动物和其它非人哺乳动物。还可预防性提供受体结合剂来减小障碍或其症状发生的风险。

[0308] IL-1 介导的障碍可以是自身免疫障碍。IL-1 介导的自身免疫障碍的实例包括:类风湿关节炎、强直性脊柱炎、白塞氏综合征、炎性肠病 (包括克罗恩病和溃疡性结肠炎)、哮喘、银屑病、I 型糖尿病和本文中鉴定的其它障碍。可给患有这样的 IL-1 介导的自身免疫障碍或处于发生所述障碍的风险中的受试者施用本文中描述的受体结合剂。IL-1 介导的障碍可以是炎性障碍例如下文中描述的障碍。可给患有这样的 IL-1 介导的炎性障碍或处于发生所述障碍的风险中的受试者施用本文中描述的受体结合剂。

[0309] 示例性 IL-1 介导的障碍包括:

[0310] 类风湿关节炎和相关关节炎。受体结合剂可用于治疗患有类风湿关节炎或处于发生所述疾病的风险中的受试者。类风湿关节炎 (RA) 是影响关节的滑膜并且破坏关节软骨的慢性全身性自身免疫炎性疾病。RA 的发病机理是 T 淋巴细胞依赖性的, 并且可包括称为类风湿因子的自身抗体的产生。类风湿因子与抗原的复合物可形成并且积累在关节液和血液中, 从而诱发淋巴细胞、中性粒细胞和单核细胞至滑膜的浸润。关节通常以对称模式受影响, 但关节外疾病也可发生, 例如引发肺纤维化、脉管炎和皮肤溃疡或表现为嗜性粒细胞减少症、血小板减少症和脾肿大的费尔提氏综合征。患者还可显示受影响的关节区域中的类风湿性小结、心包炎、肋膜炎、冠状动脉炎和具有肺纤维化的间质性肺炎。IL-1Ra 的形式表明适度至严重活动的 RA。参见, 例如, Cohen, S. 等人 *Arthritis&Rheumatism*46, 614-24 (2002); Fleischmann, R. M. 等人 *Arthritis&Rheumatism*48, 927-34 (2003); Nuki, G., 等人 *Arthritis&Rheumatism*46, 2838-46 (2002); Schiff, M. H. 等人 *Arthritis&Rheumatism*50, 1752-60 (2004)。

[0311] 活动 RA 的症状包括疲劳、缺乏食欲、低热、肌肉和关节疼痛以及僵硬。肌肉和关节僵硬通常在早晨和间歇期后最明显。在潮红过程中, 通常作为滑膜炎的结果关节通常变红、肿胀、疼痛和触痛。用于评估 RA 和 RA 的症状的标准包括类风湿关节炎严重度标准 (RASS; Bardwell 等人, (2002) *Rheumatology*41(1):38-45), SF-36 Arthritis Specific Health Index (ASHI; Ware 等人, (1999) *Med. Care.* 37 (5Suppl):MS40-50), Arthritis Impact Measurement Scales 或 Arthritis Impact Measurement Scales2 (AIMS 或 AIMS2; Meenan 等人 (1992) *Arthritis Rheum.* 35(1):1-10); the Stanford Health Assessment Questionnaire (HAQ), HAQII 或 modified HAQ (参见, 例如, Pincus 等人 (1983) *Arthritis Rheum.* 26(11):1346-53)。

[0312] 可给患有 RA 或处于发生 RA 的风险中的受试者施用本文中描述的受体结合剂以延迟前述体征和症状的一个或多个的发作和 / 或改善。受试者可具有适度至严重的活动 RA。受试者可以是 TNF 抑制疗法 (例如, 利用 **ENBREL®** (依那西普)、**HUMIRA®** (阿达木单抗) 或 **REMICADE®** (英夫利昔单抗) 的疗法) 的非反应者; 受试者可以先前已施用了 TNF 抑制剂; 或受试者还可继续接受 TNF 抑制剂 (并且反应或不反应)。

[0313] 还可给受试者施用氨甲蝶呤。可给受试者施用一种或多种其它 DMARDs (疾病修饰抗风湿药)、皮质类固醇和 / 或非类固醇抗炎剂。可与受体结合剂共同施用的其它药物包括 CD28 的抑制剂 (例如, CTLA4-Ig)、RANKL、IFN γ 、IL-6、IL-8 和 IL-17 的抑制剂。抑制剂包括针对这类介质、对于这样的介质是特异性的可溶性受体的抗体和 / 或针对这样的介质的受体的抗体。

[0314] 幼年型慢性关节炎。可将受体结合剂用于治疗例如 21、18、17、16、15 或 14 岁以下的受试者的幼年型慢性关节炎。幼年型慢性关节炎在几个方面与 RA 相似。受试者可以是类风湿因子阳性的。受试者可具有疾病的少关节、多关节或全身性形式。关节炎可引起关节强直和生长阻滞, 还可导致慢性前葡萄膜炎和全身性淀粉样变性。受体结合剂可用于延迟一个或多个这样的症状的发作或改善所述症状。

[0315] 受体结合剂可用于治疗幼年特发性关节炎, 包括全身型幼年类风湿性关节炎 (SO-JIA)。受试者可具有失败的先前皮质类固醇治疗或需要等于或超过 0.3mg/kg 的日剂量的皮质类固醇治疗。参见例如, Quartier 等人 (2011) *Ann Rheum Dis.* 70 (5):747-54。

[0316] 其它类风湿障碍。本文中描述的受体结合剂还可用于治疗其它类风湿障碍,包括硬皮病、系统性红斑狼疮、痛风、骨关节炎、风湿性多肌痛、牛皮癣关节炎和慢性莱姆关节炎、随意肌和其它肌肉的炎症,包括皮炎、包涵体肌炎、多肌炎和淋巴管平滑肌瘤、化脓性关节炎综合征、儿科肉芽肿性关节炎 (PGA)/Blau 综合征以及本文中论述的其它类风湿性障碍。

[0317] 受体结合剂可用于治疗代谢类风湿障碍,例如,与高尿酸血症相关的障碍,例如痛风,包括慢性急性痛风和其它结晶介导的关节病。试剂可用于治疗药物诱导的与痛风相关的潮红,包括例如由黄嘌呤氧化酶抑制剂、尿酸氧化酶或尿酸剂诱导的潮红。在痛风中,尿酸的结晶可激活炎性体并且触发 IL-1 β 的释放。

[0318] 脊椎关节病。受体结合剂可用于治疗脊椎关节病,所述疾病包括障碍例如强直性脊柱炎、莱特尔综合征、与炎性肠病相关的关节炎、与银屑病相关的脊柱炎、幼年脊柱关节病和未分化脊柱关节病。脊柱关节病通常与 HLA-B27 基因相关。受试者可以不存在类风湿因子并且可显示具有或不具有脊柱炎和炎性不对称关节的骶髂关节炎 (sacroileitis)。受试者还可具有眼睛炎症 (参见下文)。

[0319] 硬皮病。受体结合剂可用于治疗硬皮病或系统性硬化症。硬皮病特征在于可以是局部的或全身性的皮肤的硬化。微脉管系统中血管损伤和内皮细胞损伤也可存在。受试者可在皮肤损伤中显示单核细胞浸润并且具有抗核抗体。显示发病机理的其它器官可包括:可具有平滑肌萎缩和纤维化 (从而导致异常蠕动 / 运动) 的胃肠道;可具有同心内皮下血管内膜增生 (影响小弓状动脉和小叶间动脉使得肾皮质血流量减少) 以及可引起蛋白尿、氮血症和高血压的肾;可牵涉萎缩、间质纤维化、炎症、肺、间质性肺炎和间质纤维化的骨骼肌;和可显示例如收缩带坏死和结疤 / 纤维化的心脏。可给患有硬皮病或处于发生所述疾病的风险中的受试者施用本文中描述的受体结合剂以改善前述体征和症状的一个或多个。

[0320] 斯耶格伦氏综合征。受体结合剂可用于治疗斯耶格伦氏综合征。斯耶格伦氏综合征的特征在于免疫介导的炎症和随后泪腺和唾液腺的功能性破坏。疾病可与炎性结缔组织疾病相关或伴随所述疾病。疾病与针对 Ro 和 La 抗原 (这两者是小的 RNA- 蛋白质复合物) 的自身抗体产生相关。损伤可导致干燥性角结膜炎、口腔干燥症和其它表现或联系,包括胆汁性肝硬化、周围感觉神经病以及可触知的紫癜。与斯耶格伦氏相关的眼障碍的治疗也描述于下文中。

[0321] 甲状腺障碍。受体结合剂可用于治疗甲状腺障碍。示例性甲状腺障碍包括格雷夫斯氏病、淋巴细胞性甲状腺炎、青少年淋巴细胞性甲状腺炎和萎缩性甲状腺炎,并且是针对甲状腺抗原的自身免疫反应 (产生与存在于甲状腺中并且通常对于甲状腺是特异性的蛋白质的反应的抗体) 的结果。实验模型是可获得的,包括自发模型:大鼠 (BUF 和 BB 大鼠) 和鸡 (肥胖鸡品系) 和通过用甲状腺球蛋白、甲状腺微粒体抗原 (甲状腺过氧化物酶) 免疫动物产生的诱导型模型。

[0322] 糖尿病和代谢障碍。受体结合剂可用于治疗糖尿病障碍例如幼年型糖尿病 (包括自身免疫型糖尿病和糖尿病的胰岛素依赖类型) 和成年型糖尿病 (包括非胰岛素依赖性和肥胖介导的糖尿病)、I 型糖尿病和 II 型糖尿病。例如, I 型糖尿病或胰岛素依赖性糖尿病与由自身抗体和自身反应性 T 细胞引起的胰岛细胞的自身免疫破坏相关。此外,减小 IL-1 β 活性可改善葡萄糖控制和 β 细胞功能,从而可用于治疗 II 型糖尿病。参见例如, Owyang 等

人 Endocrinology. 2010 ;151 (6) :2515-27。例如,在一些实施方案中,可给没有施用胰岛素的受试者(例如受试者不是胰岛素依赖的)施用本文中描述的受体结合剂。例如,受试者可以是前期糖尿病患者。受试者可具有葡萄糖耐受性受损或空腹葡萄糖受损。受试者可以是肥胖症患者或具有高于 23、25、30、35 或 40kg/m² 的人体质量指数。受试者可以是抗胰岛素的,和/或特征在于高血糖症或超高胰岛素血症。受试者可处于进展至 II 型糖尿病的风险中。也参见 Larsen, 等人 (2007) NEJM356:1517-26 和 Larsen, 等人 (2009)。Diabetes Care32:1663-8。在一些实施方案中,受试者具有大于 6.1、6.5、7 或 8mmol/L 的空腹血糖。在一些实施方案中,受试者具有大于 5.5、5.7、6、6.4、7、7.5 或 8% 的 A1C 水平。

[0323] 在一些实施方案中,还给受试者施用刺激胰岛素分泌的胰岛素促泌素例如磺酰脲(例如,氯磺丙脲、妥拉磺脲、醋酸己脲、甲苯磺丁脲、格列本脲、格列美脲、格列吡嗪)和/或氯茴苯酸类(例如,瑞格列奈、那格列胺)。还可给受试者施用双胍(例如,二甲双胍)。可施用受体结合剂以减少胰岛素 β 细胞的损失和/或对其的损害。

[0324] 在一些实施方案中,受试者对于位于基因 IL1RN 的 5'附近的 rs4251961 的 C 等位基因是杂合的或纯合的。

[0325] 利用受体结合剂的治疗包括改善或防止与糖尿病相关的继发性病况的恶化,例如糖尿病患者的糖尿病视网膜病变、肾移植排斥、肥胖介导的胰岛素抗性和肾功能衰竭,所述病况与蛋白尿和高血压相关。

[0326] 胃肠道障碍。本文中描述的受体结合剂可用于治疗炎性胃肠道障碍,包括例如腹部疾病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、特发性胃肌轻瘫胰腺炎,包括慢性胰腺炎、急性胰腺炎、炎性肠病和溃疡,包括胃溃疡和十二指肠溃疡。

[0327] 肺障碍。受体结合剂可用于治疗由 IL-1 介导的肺病。可治疗的示例性肺病包括慢性阻塞性肺疾病(例如肺气肿和慢性支气管炎)、肺泡蛋白沉着症、博来霉素诱导的肺病和纤维化、肺纤维化,包括特发性肺纤维化和辐射诱发的肺纤维化、肺结节病、囊性纤维化、胶原在肺中的积累、ARDS、支气管肺发育不良(BPD)、慢性阻塞性肺疾病和早产儿的慢性纤维化肺疾病。此外,本文中描述的受体结合剂可用于治疗职业性肺部疾病,包括石棉肺、煤工尘肺、矽肺或与对灰尘的长期暴露相关的相似病况。炎性和纤维化肺疾病(包括嗜酸细胞性肺炎、特发性肺纤维化和过敏性肺炎)可包括可使用受体结合剂治疗的失调性免疫-炎症反应。

[0328] 结节病是特征在于上皮样肉芽肿存在于身体中几乎任何组织的病因未明的病况;肺的牵涉是最常见的。发病机理包括活化巨噬细胞和淋巴细胞在疾病部位的持续存在,随后局部和全身性活性产物(由这些细胞类型释放的)的释放引起的慢性后遗症。

[0329] 心血管障碍。本文中描述的受体结合剂可用于治疗心血管障碍或损伤,例如主动脉瘤、急性冠状动脉综合征、动脉炎、血管闭塞(包括脑动脉闭塞)、冠状动脉架桥手术的并发症、局部缺血/再灌注损伤、心脏病(包括动脉粥样硬化性心脏病)、心肌炎(包括慢性自身免疫性心肌炎和病毒性心肌炎)、心力衰竭(包括慢性心力衰竭、充血性心力衰竭)、心肌梗塞、心脏手术后或颈动脉气囊血管成形术后再狭窄和/或动脉粥样硬化、无症状性心肌缺血、左心室泵功能障碍、左心室辅助设备的植入后并发症、雷诺氏现象、血栓性静脉炎、脉管炎(包括川崎氏脉管炎)、静脉闭塞性病、巨细胞动脉炎、韦格纳氏肉芽肿和许兰-亨诺紫癜。还可例如预防性地提供受体结合剂来减小这样的心血管障碍的风险。在一些实施方案

中,给患者施用受体结合剂以治疗动脉粥样硬化或减小其风险。

[0330] IL-1 介导的信号转导可被急性心肌梗塞活化,并且可起始梗塞周围的心肌细胞的凋亡细胞死亡,从而扩大梗塞区域的尺寸。可施用本文中描述的受体结合剂以减小因心肌梗塞引起的损伤。例如,可给处于发生心肌梗塞的风险中的受试者或经历心脏梗塞,特别地急性心肌梗塞(例如,在最近 2、4、6、12、24 或 48 小时内)的受试者施用受体结合剂。可将试剂与包括例如肝素和阿司匹林的其它试剂组合施用。

[0331] 受体结合剂还可用于治疗中风、蛛网膜下腔出血、头损伤或脑损伤,和 / 或与心血管障碍相关的炎症。例如,升高的水平的 IL-1 β 牵涉与中风和脑损伤相关的神经炎症 (Rothwell, N. J., 等人, TINS23 (12):618-625, 2000)。可施用受体结合剂以减少这样的炎症和与缺血和 / 或缺氧相关的其它炎症。此外,还可以预防性提供受体结合剂来例如减小这样的障碍和 / 或与这样的障碍相关的炎症的风险。例如,可给处于发生中风、缺血事件、其它心血管事件或出血事件(例如蛛网膜下腔出血)的风险中的受试者,或已经历中风、缺血事件、其它心血管事件或出血事件(例如蛛网膜下腔出血)(例如,在最近 2、4、6、12、24 或 48 小时内)的受试者施用受体结合剂。

[0332] 泌尿生殖器和肾障碍。泌尿生殖系统的障碍还可由本文中描述的本文中描述的受体结合剂来治疗。这样的障碍包括肾小球肾炎,包括自身免疫性肾小球肾炎、因对毒素的暴露而引起的肾小球肾炎或继发于溶血链球菌(streptococci)或其它感染剂的感染的肾小球肾炎。免疫介导的肾病,包括肾小球肾炎和肾小管间质性肾炎,是抗体或 T 淋巴细胞介导的对肾组织的损伤(作为自体反应抗体或抗肾抗原的 T 细胞的结果直接地,或作为与其它非肾抗原反应的抗体和 / 或免疫复合物在肾中的沉积的结果间接地)的结果。因此导致免疫复合物形成的其它免疫介导的疾病还可诱发免疫介导的肾病作为间接后遗症。直接和间接免疫机制都导致炎症反应,所述炎症反应产生 / 诱导肾组织的损伤发生,使得器官功能受损并且在一些情况下进展至肾功能衰竭。体液和细胞免疫机制都可参与损伤的发病机理。

[0333] 受体结合剂还可用于治疗尿毒症综合征及其临床并发症(例如,肾衰竭、贫血和肥厚型心肌病),包括与对环境毒素暴露、药物或其它病原的暴露相关的尿毒症综合征。还可治疗从胆囊壁的炎症产生的并发症,所述并发症导致吸收功能的改变。包括在这样的并发症中的是胆石症(胆石)和胆总管结石(choliedocholithiasis)(胆管结石)以及胆石症和胆总管结石的复发。可治疗的其它病况是血液透析并发症:前列腺病况,包括良性前列腺肥大、非细菌性前列腺炎和慢性前列腺炎;和血液透析并发症。受体结合剂还可用于治疗慢性疼痛病况,例如慢性骨盆痛,包括慢性前列腺炎 / 骨盆痛综合征和疱疹后疼痛。

[0334] 血液学和肿瘤学障碍。本文中描述的受体结合剂可用于治疗不同形式的癌症,包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、EB 病毒阳性鼻咽癌、神经胶质瘤、结肠癌、胃癌、前列腺癌、肾细胞癌、颈和卵巢癌、肺癌(SCLC 和 NSCLC),包括癌症相关恶病质、疲劳、无力、恶病质和血钙过多的副肿瘤性综合征。参见,例如, Voronov 等人 (2003) PNAS100:2645-2650。实体瘤,包括肉瘤、骨肉瘤和癌例如腺癌(例如,乳腺癌)和鳞状细胞癌也是可治疗的。关于 IL-1 β 在某些肿瘤中的作用,参见,例如, Krelin 等人 (2007) Cancer Res. 67:1062-1071。其它癌症包括食道癌、胃癌、胆囊膀胱癌、白血病,包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、髓样白血病、慢性或急性成淋巴细胞性白血病和多毛细胞白血病。具有侵袭转移潜能的其

它恶性肿瘤,包括多发性骨髓瘤,可用受体结合剂治疗。参见,例如,Lust 等人 (2009) Mayo Clin Proc 84(2):114-122。

[0335] 受体结合剂还可用于治疗贫血和血液学失调,包括慢性特发性中性粒细胞减少症、慢性病性贫血、再生障碍性贫血,包括范科尼再生障碍性贫血;特发性血小板减少性紫癜 (ITP);血栓性血小板减少性紫癜、脊髓发育不良综合征(包括难治性贫血、难治性贫血伴环状铁粒幼红细胞、未成熟细胞过多的难治性贫血、转化型原始细胞增多的难治性贫血);骨髓纤维化/髓样化生;和镰刀状细胞血管阻塞危象。

[0336] 自身免疫性溶血性贫血、免疫全血细胞减少症和发作性睡眠性血经蛋白尿可因抗体(所述抗体与在红细胞(和在一些情况下也在其它红细胞包括血小板)的表面上表达的抗原反应)的产生而引起,并且是通过补体介导的裂解和/或 ADCC/Fc-受体-介导的机制除去这些抗体包被的细胞的结果。在自身免疫性血小板减少症(包括血小板减少性紫癜)以及免疫介导性血小板减少症(在其它临床背景中)中,血小板破坏/去除作为抗体或补体连接至血小板,随后通过补体裂解、ADCC 或 FC-受体介导的机制除去的结果发生。

[0337] 还可给患有各种淋巴组织增殖性障碍或处于发生所述障碍的风险中的受试者施用受体结合剂,所述淋巴组织增殖性障碍包括自身免疫性淋巴组织增生性综合征 (ALPS)、慢性淋巴母细胞白血病、多毛细胞白血病、慢性淋巴性白血病、外周 T 细胞淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、外套细胞淋巴瘤、滤泡淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、EB 病毒阳性 T 细胞淋巴瘤、组织细胞淋巴瘤、何杰金氏病、弥漫性进行性淋巴瘤、急性淋巴性白血病、T γ 淋巴增生性、皮肤 B 细胞淋巴瘤、皮肤 T 淋巴细胞瘤(即,蕈样肉芽肿)和塞扎里综合征。

[0338] 肝脏障碍。本文中公开的受体结合剂还用于治疗肝的病况例如肝炎,包括急性酒精性肝炎、急性药物诱导的或病毒性肝炎、甲型、乙型和丙型肝炎、硬化性胆管炎、肝血窦上皮细胞和因未知病因引起的肝的炎症。

[0339] 听力障碍。受体结合剂还可用于治疗牵涉听力丧失和与异常 IL-1 表达相关的障碍。这样的障碍包括被认为由自身免疫过程产生的耳蜗神经相关听力丧失,例如自身免疫性听力丧失、美尼尔氏综合征和胆脂瘤、通常与听力丧失相关的中耳障碍。

[0340] 骨障碍。骨和关节的非关节炎障碍也可用本文中描述的受体结合剂来治疗。这包括骨或关节的炎性障碍、导致骨损失的破骨细胞障碍,例如但不限于骨质疏松症,包括闭经后骨质疏松、骨关节炎、导致牙松动或损失的牙周炎以及关节置换术后假体松脱(通常与对磨损碎片的炎症反应相关),例如,矫形外科植入物骨质溶解。

[0341] 淀粉样蛋白障碍。此外,本文中描述的受体结合剂可用于治疗原发性淀粉样变性和继发性淀粉样变性,所述变性的特征在于各种病况,包括阿尔茨海默病、继发性反应性淀粉样变性;唐氏综合征;和透析相关淀粉样变性。此外,受体结合剂可用于治疗肌萎缩侧索硬化 (ALS)、亨廷顿病和帕金森氏病。这些疾病还可包括聚集体和淀粉样蛋白的形成,这可促发炎症反应。

[0342] 神经性障碍。受体结合剂还可用于治疗中枢和周围神经系统的神经炎症和脱髓鞘疾病,包括多发性硬化;特发性脱髓鞘性多神经病或格林-巴利综合征;和慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病。这些障碍据信具有自身免疫基础,并且作为引起的直接对少突神经胶质细胞或对髓磷脂的损害的结果导致神经脱髓鞘。在多发性硬化中,疾病诱发牵涉 T 淋巴细胞。多发性硬化具有复发缓解过程或慢性进展过程。损伤包括主要地 T 淋巴细胞介导的小

神经胶质细胞和浸润巨噬细胞的浸润;CD4⁺T 淋巴细胞是伤口处的主要细胞类型。少突胶质细胞死亡和随后脱髓鞘的机制还不清楚,但可以是 T 淋巴细胞驱动的。

[0343] 肌病。受体结合剂可用于治疗与炎症和自身免疫相关的肌病。特发性炎性肌病包括皮肌炎、多肌炎和其它肌炎是导致肌无力的病因未知的慢性肌肉炎症的障碍。肌肉损伤/炎症通常是对称的和进行性的。自身抗体与大多数形式相关。这些肌炎特异性自身抗体是针对参与蛋白质合成的组分、蛋白质和 RNA 的,并且抑制其功能。

[0344] 血管炎障碍。本文中描述的受体结合剂可用于治疗血管炎障碍,例如系统性血管炎。系统性血管炎包括其中原发病灶是炎症和随后对血管的损伤的疾病,所述血管的损伤导致由受影响的血管供血的组织局部缺血/坏死/退化,以及在一些情况下导致最终的终末器官功能障碍。血管炎还可作为其它免疫炎症介导的疾病例如类风湿关节炎、系统性硬化病等(特别地在与免疫复合物形成相关的疾病中)的继发性损伤或后遗症发生。

[0345] 原发性系统性脉管炎类群中的疾病包括:系统性坏死性血管炎;结节性多发性动脉炎、变应性脉管炎和肉芽肿病、多血管炎;韦格纳氏肉芽肿;淋巴瘤样肉芽肿病;和巨细胞动脉炎。混杂血管炎包括:皮肤粘膜淋巴结综合征(MLNS 或川崎氏病)、分离的 CNS 血管炎、贝切特病、闭塞性血栓性脉管炎(伯格氏病)和引起皮肤坏死的血管炎。这些血管炎障碍的致病机理据信主要归因于免疫球蛋白复合物在血管壁中的沉着和随后通过 ADCC、补体活化或两者进行的炎症反应的诱导。

[0346] CAPS。受体结合剂可用于治疗 CAPS 障碍即 CIAS1 相关周期综合征。CAPS 包括 3 个遗传综合征:早发型多系统炎性疾病(NOMID)、Muckle-Wells 综合征(MWS)和家族性寒冷性自身炎性综合征(FCAS)。(Hoffman 等人 2001Naure29:301-305;Feldmann 等人 2002Am J Hum Genet71:198-203;Aksentijevich 等人 2002Arthritis Rheum46:3340-3348)。CAPS 以散发性或家族性模式以常染色体显性方式遗传。CIAS1 编码 NALP3,一种“炎性体”的蛋白质组分,调节胱天蛋白酶 1 的活性的亚细胞酶复合物。CIAS1 的突变导致增加的 IL-1 和许多病理学后果的产生(Aksentijevich 等人 2002 同上)。IL-1 强劲地诱导急性期反应物在肝中产生,例如 C-反应蛋白(CRP)和血清淀粉样蛋白 A(SAA)。

[0347] CAPS 障碍共有共同的临床特性并且呈现为连续的临床严重度。NOMID 是最严重的失能,MWS 比之略轻一些,FCAS 是最不严重的。CAPS 障碍具有严重的重叠特性,并且个体可具有独特的一系列体征和症状。所有这些病况的共同特性包括发热、荨麻疹样疹、关节炎或关节痛、肌痛、全身乏力和结膜炎。

[0348] 在 NOMID 中,慢性无菌性脑膜炎可导致智力低下,并且这些患者还可遭受毁损面容和在骨髓和骺骨处使骨生长过度而导致失能。这些患者还可因视神经萎缩(因颅内压高而导致的)而遭受失明。MWS 和 NOMID 通常与严重的炎症相关,所述炎症可包括听觉系统、脑膜和关节。这些患者可每日患有高热以及在分布和强度上频繁变化的慢性皮疹。患者可患听力丧失或耳聋。频繁观察到结膜炎和视乳头水肿。淀粉样变性可发展并且因慢性炎症和急性期反应物(特别地 SM)的过度产生而导致肾衰竭。可给患有 NOMID、MWS 或 FCAS 或经诊断具有与 NOMID、MWS 或 FCAS 相关的基因型的受试者施用受体结合剂。此外,可给患有 TRAPS(TNF 受体相关周期综合征)的受试者施用受体结合剂。

[0349] 皮肤病学障碍。受体结合剂可用于治疗皮肤病学障碍例如炎性皮肤病学障碍或自身免疫或免疫介导的皮肤病。示例性障碍是银屑病。其它自身免疫或免疫介导的皮肤病,

包括大疱性皮肤病、多形红斑和接触性皮炎是由自身抗体介导的,其发生是 T 淋巴细胞依赖性的。银屑病是 T 细胞介导的炎症性疾病。损伤包括 T 淋巴细胞、巨噬细胞和抗原加工细胞和一些嗜中性粒细胞的浸润。

[0350] 可治疗的皮肤或粘膜的其它障碍包括皮肤棘层松解病,包括 Darier 病、毛囊角化病和寻常天疱疮。其它另外的障碍包括:痤疮、红斑痤疮、斑秃、口疮性口炎、大疱性类天疱疮、烧伤、湿疹、红斑,包括多形红斑和大疱性多形红斑 (Stevens-Johnson 综合征)、炎性皮肤病、扁平苔癣、线性 IgA 大疱性病 (儿童的慢性大疱性皮肤病)、皮肤弹性的损失、粘膜表面溃疡,包括胃溃疡、嗜中性染色皮炎 (斯威特氏综合征)、皮炎、毛发红糠疹、银屑病、坏疽性脓皮病、多中心网状组织细胞增多症和中毒性表皮坏死松解症。可利用受体结合剂治疗的其它皮肤相关障碍包括疱疹样皮炎 (杜林氏病)、特应性皮炎、接触性皮炎和荨麻疹 (包括慢性特发性荨麻疹)。

[0351] 变应性障碍。受体结合剂可用于治疗变应性障碍例如哮喘、变应性鼻炎、特应性皮炎、食物超敏反应、变应性结膜炎 (也参见下文) 和荨麻疹。这些疾病通常由 T 淋巴细胞诱导的炎症、IgE 介导的炎症或两者介导。

[0352] 哮喘是牵涉呼吸系统的慢性病况,在所述呼吸系统中气道偶尔通常响应一种或多种触发剂而收缩,开始发炎,并且衬以过量的粘膜。发作可通过这样的情况如对环境刺激物 (或变应原) 例如冷空气、暖空气、湿空气、锻炼或用力、情绪应激和病毒性疾病的暴露触发。气道变窄引起症状例如哮喘、呼吸短促、胸部紧迫感 and 咳嗽。受体结合剂可用于治疗哮喘,并且可经配制用于局部或经肺递送,以进行这样的治疗,或可进行胃肠外递送。

[0353] 移植。可给将要经历、正在经历移植或正从移植恢复的受试者施用受体结合剂。移植相关疾病,包括移植排斥和移植物抗宿主病 (GVHD) 是 T 淋巴细胞依赖性的;T 淋巴细胞功能的抑制起着改善作用。角膜移植可与可通过利用受体结合剂的治疗改善的新生血管形成相关。受体结合剂还可用于治疗由实质器官移植例如心脏、肝、皮肤、肾、肺 (肺移植气道闭塞) 或其它移植物 (包括骨髓移植物) 引起的并发症。

[0354] 感染性疾病。本文中描述的受体结合剂用于治疗原生动物病,包括疟疾和血吸虫病以及治疗麻风结节性红斑;细菌或病毒性脑膜炎;结核病,包括肺结核;和继发于细菌或病毒感染 (包括流感和传染性单核细胞增多症) 的肺炎。

[0355] 也可用受体结合剂治疗的是遗传周期性发热综合征,包括家族性地中海热、超免疫球蛋白 D 和周期性发热综合征以及 TNF- 受体相关周期性综合征 (TRAPS),和成人斯蒂尔病、施尼茨勒综合征和纤维化肺泡炎。

[0356] 在一些实施方案中,给受试者施用受体结合剂来减小 IL-6 在受试者中的活性或表达。例如,受试者可具有与 IL-6 相关或至少部分地由 IL-6 介导的障碍。

[0357] 眼障碍和经眼递送。本文中描述的受体结合剂可用于治疗眼障碍,包括影响眼睛表面的眼障碍、炎性眼障碍和至少部分由自身免疫反应介导的眼障碍。

[0358] 在一些实施方案中,眼障碍是影响眼睛表面的干眼障碍。障碍包括也称为干燥性角结膜炎、干性角膜炎、肖格伦氏综合征、干眼病、泪膜障碍、减少的泪产生、泪水缺乏症和睑板腺功能不良的病况。干眼可包括与斯耶格伦氏综合征 (SS),例如,与干燥性角结膜炎相关的斯耶格伦氏综合征相关的形式,而且还包括不这样相关的形式,例如与干燥性角结膜炎相关的非斯耶格伦氏综合征相关的形式。患者可以具有或不具有全身性自身免疫性

障碍的其它表现。IL-1 牵涉干眼障碍的发病机理。参见,例如, Enriquez de Salamanca 等人 (2010), Mol. Vis. 16:862-873。

[0359] 具有干眼综合征的受试者可显示干眼的炎症,并且可经历发痒、刺痛、灼烧或压觉、刺激、疼痛和发红。干眼可与过多流泪和相反地不充足的泪产生相关。可给这样的受试者施用受体结合剂来改善或防止一个或多个这样的症状的发作或恶化。受体结合剂还可用于减轻经历这样的疼痛的受试者的疼痛,例如眼痛(例如因神经炎症引起的)。

[0360] 在一些实施方案中,眼障碍是与全身性自身免疫性障碍(例如斯耶格伦氏综合征和类风湿关节炎)相关的或与与 IL-1 或另一种 IL-1 细胞因子家族成员相关的障碍相关的眼障碍。患者可具有或不具有全身性自身免疫性障碍或全身性自身免疫障碍的其它表现。

[0361] 受体结合剂还可用于治疗影响眼的表面例如眼角膜的其它障碍。这样的障碍包括角膜眼表面炎性病况、角膜新生血管化、角膜炎,包括外周溃疡性角膜炎和微生物角膜炎。受体结合剂可用于治疗正在经历角膜伤口愈合的受试者(例如,具有角膜创伤的受试者)。可给将接受、正在经历牵涉眼的手术例如角膜移植/角膜移植术、人工角膜手术、板层移植、选择性内皮移植或从所述手术恢复的受试者施用受体结合剂。参见,例如, Dana (2007) Trans Am Ophthalmol Soc 105 :330-43 ; Dekaris 等人 (1999) Curr Eye Res 19 (5) :456-9 ; 和 Dana 等人 (1997) Transplantation 63 :1501-7。受体结合剂可用于治疗影响结膜的障碍,包括结膜瘢痕障碍和结膜炎。受体结合剂可用于治疗其它障碍例如类天疱疮综合征和 Stevens-Johnson 综合征。可给受试者施用本文中描述的受体结合剂来调节眼中或眼周围的新生血管形成。参见,例如, Dana (2007) Trans Am Ophthalmol Soc 105 :330-43。

[0362] 可给具有影响眼的变态反应的受试者,例如正在经历严重变应性(特应性)眼疾病例如变应性结膜炎的受试者施用受体结合剂。例如,可局部施用受体结合剂。也参见,例如, Keane-Myers AM 等人 (1999) Invest Ophthalmol Vis Sci, 40 (12) :3041-6。

[0363] 可给具有影响眼的自身免疫性障碍的受试者施用受体结合剂。示例性自身免疫性眼障碍包括交感性眼炎、Vogt-Koyanagi Harada (VKH) 综合征、散射状视网膜脉络膜病变、眼瘢痕性类天疱疮、富克斯氏虹膜睫状体炎和葡萄膜炎的各种形式。可给受试者施用受体结合剂来治疗任何前述障碍。

[0364] 可给患有糖尿病视网膜病变或处于发生所述疾病的风险中的受试者施用受体结合剂。参见,例如, Demircan 等人 (2006) Eye 20 :1366-1369 和 Doganay 等人 (2006) Eye, 16 :163-170。

[0365] 葡萄膜炎包括急性和慢性形式,包括虹膜、睫状体和脉络膜的一种或多种的炎症。慢性形式可与全身性自身免疫性疾病例如白塞氏综合征、强直性脊柱炎、幼年型类风湿关节炎、莱特尔氏综合征和炎性肠病相关。在前葡萄膜炎中,炎症主要在虹膜中(也称为虹膜炎)。前葡萄膜炎可影响患有全身性自身免疫性疾病的受试者,而且还影响不具有全身性自身免疫性疾病的受试者。中间葡萄膜炎包括前部玻璃体、周边视网膜和睫状体的炎症,通常具有极小前部或脉络膜视网膜炎。扁平部睫状体炎 (Pan planitis) 由虹膜与脉络膜之间的睫状环的炎症引起。后葡萄膜炎牵涉葡萄膜和主要地脉络膜,也称为脉络膜炎。后葡萄膜炎可与全身性感染或自身免疫性疾病相关。其可持续数月甚至数年。可给受试者施用受体结合剂来治疗葡萄膜炎的上述形式的任一种。也参见,例如, Tsai 等人 (2009) Mol

Vis15:1542-1552 和 Trittibach P 等人 (2008) Gene Ther. 15 (22) :1478-88。

[0366] 在一些实施方案中,受体结合剂用于治疗患有年龄相关性黄斑变性 (AMD) 或处于发生所述疾病的风险中的受试者。可将受体结合剂局部用于眼,将其注射 (例如,玻璃体内) 或全身性提供。参见,例如,Olson 等人 (2009) Ocul Immunol Inflamm 17 (3) :195-200。

[0367] 本文中描述的受体结合剂可通过任何模式施用来治疗眼病。可通过胃肠外模式递送试剂。或者或此外,可将试剂直接递送至眼或眼的附近。例如,可局部或眼内施用蛋白质,例如,如下文中描述的。

[0368] 用于眼递送的制剂和方法。可递送包含受体结合剂的眼用制剂以用于局部施用,例如用于以液滴或药膏的形式施用或用于植入例如眼前房或结膜囊。可使用滴眼管递送液滴。当配制用于眼递送时,受体结合剂可以以 0.0001-0.1%、0.001-5%,例如,0.005-0.5%、0.05-0.5%、0.01-5%、0.1-2% 或 1%-5% 的浓度存在。通常地,将眼用制剂直接施用于眼,包括局部施用至眼睑或滴入眼球与眼睑之间的空间 (cul-de-sac)。眼用制剂可被设计来与泪液容易地混合并且在角膜和结膜的表面上扩散。借助于常用施用技术,将大部分药物沉积在下穹窿中。毛细作用、扩散力和瞬目反射驱动药物掺入其从之渗入并且通过角膜的角膜前膜。

[0369] 眼用制剂还可包括一种或多种其它试剂例如抗炎类固醇例如利美索龙、氯替泼诺、甲羟松和氢化可的松或非类固醇抗炎药。例如,类固醇可以以 0.001 至 1% 的浓度存在。在一些实施方案中,不存在类固醇。例如,受体结合剂是制剂中的唯一活性剂。

[0370] 制剂还可包含下列组分的一种或多种:表面活性剂、张度剂、缓冲剂、防腐剂、共溶剂和粘性构建剂。张度剂可用于将组合物的张度调整至例如天然泪的张度。例如,可添加氯化钾、氯化钠、氯化镁、氯化钙、葡萄糖和 / 或甘露醇以获得适当的张度,例如生理张度。可以以足以提供约 150-450mOsm 或 250-350mOsm 的重量摩尔渗透压浓度的量添加张度剂。

[0371] 制剂还可包含适合用于眼递送的缓冲液。缓冲液可包含一种或多种缓冲组分 (例如,磷酸钠、醋酸钠、柠檬酸钠、硼酸钠或硼酸) 来应对 pH 的变化 (特别地在贮存条件下)。例如,缓冲剂可被选择来提供在 pH5.5-7.5、6.0-7.5 或例如 6.5-7.5 的范围内的目标 pH。

[0372] 制剂可包含含水或磷脂载体。特别地为了治疗干眼障碍,制剂可包含试剂来提供短期缓解,例如润滑眼和帮助泪形成的化合物。例如,磷脂载体 (其包含一种或多种磷脂) 可用于提供短期缓解。用作人工泪液载体的人工泪液组合物的实例包括商业产品例如 Tears Naturale™ (Alcon Labs, Inc., TXUSA)。例如,每 ml 制剂可包含:1mg 葡聚糖、70 和 3mg 羟丙基甲基纤维素和任选地防腐剂如 POLYQUAD® (聚季胺盐-1) 0.001% (m/v)。磷脂载体制剂的实例包括 US4,804,539、US4,883,658、US5,075,104、US5,278,151 和 US5,578,586 中公开的磷脂载体制剂。

[0373] 制剂还可包含用作润滑剂或湿润剂的其它化合物。这些化合物包括粘性剂例如:单体多元醇例如甘油、丙二醇、乙二醇;多聚体多元醇例如聚乙二醇、纤维素家族的各种聚合物;羟丙基甲基纤维素 (“HPMC”)、羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素 (“HPC”)、葡聚糖例如葡聚糖 70;水溶性蛋白质例如明胶;和乙烯基聚合物例如聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚维酮和卡波姆例如卡波姆 934P、卡波姆 941;卡波姆 940、卡波姆 974P。其它实例包括多糖,例如透明质酸及其盐和硫酸软骨素及其盐,以及丙烯酸聚合物。在某些实施方案中,制剂具有 1 至 400cP 的粘度。

[0374] 可将制剂包装在具有伴随滴管或一组一次性使用的滴管的瓶子中以用于单剂量或多剂使用。制剂可包含一种或多种防腐剂,例如以在使用过程中防止微生物和真菌污染,和/或一种或多种去垢剂例如以溶解蛋白质。示例性防腐剂包括:苯扎氯铵、三氯叔丁醇、苜十二烷基二甲基铵溴化物、尼泊金甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯乙基醇、依地酸二钠、山梨酸和聚季铵盐-1,并且可以以0.001至1.0%w/v的浓度包含在制剂中。还可能提供包含受体结合剂的灭菌且不含防腐剂的制剂。示例性去垢剂包括Triton X-100、Elugent、Tween-20和Tween-80,并且可以以0.001至1.0%w/v的浓度包含在制剂中。还可能提供不含去垢剂的制剂。制剂可被制备来用于单次使用应用。

[0375] 眼用包装可用于提供眼用制剂与眼的延伸的接触。棉拭子用制剂来进行饱和,随后将其插入上或下穹窿。受体结合剂还可通过离子透入法来施用。该方法使溶液保持与角膜在具有电极的洗眼杯中接触。药物的扩散通过电位差来实现。

[0376] 受体结合剂还可通过注射,例如结膜下注射来施用。可将制剂注射在结膜下面,从而促进通过简单扩散穿过巩膜并进入眼中。还可将制剂注射在结膜下面和眼的更前部分的眼球筋膜下面,以将试剂递送至睫状体、脉络膜和视网膜。还可通过球后注射施用制剂。

[0377] 对于干眼和其它表面障碍,可使用例如下列方法的一种或多种来评价受试者:眼表面疾病指数(OSDI)、角膜和结膜染色以及希尔默测试(Schirmer test)。可使用本领域已知的其它方法。

[0378] 眼表面疾病指数(OSDI)是12项问卷法,其提供与眼表面炎性障碍包括DES一致的眼刺激的症状以及它们对视觉相关功能的影响的快速评估。参见例如,Ocul Immunol Inflamm. 2007Sep-Oct;15(5):389-93。将OSDI问卷法的12项按0至4的等级进行分级。评分基于反应得出,以按0至100的等级提供OSDI评分,更高的评分代表更大的失能。相对于基线的负变化表示视觉相关功能和眼炎性障碍的改善。

[0379] 角膜和结膜染色:角膜染色是上皮疾病或眼表面上皮屏障的破裂(通常对于眼表面炎性障碍例如干眼中看到的)的测量。角膜染色可以甚至在不临床明显干眼的情况下存在,如果存在显著的眼睑疾病例如后眼睑炎的话。角膜染色与许多(尽管并非全部)患者的眼睛不适相关;通常地,角膜染色与OSDI中的高评分相关,如上文所述的。对于角膜荧光染色,将盐水湿润的荧光素测试条或1%荧光素钠溶液用于对泪膜进行染色。随后利用黄色屏障滤光片(#12Wratten)和钴蓝色照明,使用裂隙灯评价检查整个角膜。按照Oxford方案对染色进行分级。结膜染色同样地是上皮疾病或眼表面上皮屏障的断裂的测量。使用丽丝胺绿,在裂隙灯下进行结膜染色。将盐水湿润的测试条或1%丽丝胺绿溶液用于对泪膜进行染色,随后评价睑间结膜染色超过30秒但少于2分钟。通过使用中等强度的白光,使用Oxford方案仅对鼻的睑间区域和短暂结膜染色进行分级。

[0380] 希尔默测试:在麻醉存在和不存在的条件下,通过将窄滤纸条(Whatman#41滤纸的5x35mm测试条)置于下cul-de-sac中进行希尔默测试。在光线昏暗的房间中进行该测试。患者轻轻地闭上他的/她的眼直至5分钟流逝,并且移开测试条。因为在泪前沿离开眼后,其将继续前行数毫米,因此在精确地5分钟时用圆珠笔标记泪前沿。通过以毫米表示的长度测量泪水的产量,滤纸条在5分钟的过程中湿润。在不麻醉的情况下对于希尔默测试10mm或更短的结果以及在麻醉的情况下对于希尔默测试5mm或更短的结果被认为是不正常的。相较于基线的正改变表明本文中描述的眼炎性障碍的一个或多个症状的改善。

[0381] 用于肺递送的制剂和方法。可配制受体结合剂以用于肺递送的吸入或其它模式，例如以将试剂施用至呼吸道例如上呼吸道和下呼吸道的组织。可用于将试剂局部递送至肺气道的 3 个常用系统包括干粉吸入器 (DPI)、定量雾化吸入器 (MDI) 和喷雾器。MDI 可用于以溶解形式或以分散体的形式递送受体结合剂。通常地，MDI 包含氟利昂或在激活装置后将雾化的药剂迫入呼吸道的其它相对蒸汽压的喷射剂。相反地，DPI 通常依赖于患者吸气努力来将药剂以干粉形式引入肺。喷雾器形成通过将能量赋予液体溶液来吸入的药剂气溶胶。试剂可以以冻干形式（例如，在室温）贮存以及在吸入前于溶液中重建。在液体通气或使用含氟化合物介质的肺灌洗过程中进行药物的直接肺递送也是可能的递送模式。这些和其它方法可用于递送受体结合剂。例如，可以以至少为约 0.02、0.1、0.5、1、1.5、2、5、10、20、40 或 50mg/ 喷出或更多的剂量单位形式递送试剂。

[0382] 受体结合剂可通过使用适当的喷射剂例如二氟二氯甲烷、三氯氟甲烷、dielilorotetrafluorooctliane、二氧化碳或其它适当气体，以气雾喷雾呈送的形式方便地从加压袋或喷雾器递送。在加压气溶胶的情况下，剂量单位可通过提供阀门以递送计量的量来测定。用于吸入器或吹入器的胶囊和药筒可被配制来包含受体结合剂与适当的粉末基质例如乳糖或淀粉的粉剂混合物，如果颗粒是配制的颗粒的话。除了配制或未配制的受体结合剂以外，还可将其它材料例如 100%DPPC 或其它表面活性剂混合在一起来促进配制的或未配制的受体结合剂的递送和扩散。还可改变粒度来控制递送朝向下呼吸道还是朝向上呼吸道。例如，1-5 微米或 10-50 微米的尺寸范围内的颗粒可分别用于下呼吸道和上呼吸道。

[0383] 递送增强剂例如表面活性剂可用于进一步增强肺递送。表面活性剂通常是具有亲水和亲脂部分的化合物，其通过与两种非混溶相之间的界面相互作用来促进药物的吸收。表面活性剂因几个原因例如颗粒聚集的减少和巨噬细胞吞噬作用的减少而用于干燥颗粒。表面活性剂在本领域是公知的，包括磷酸甘油酯例如磷脂酰胆碱、L- α -二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC) 和二磷脂酰甘油 (DPPG)；十六醇；脂肪酸；聚乙二醇 (PEG)；聚氧乙烯-9-；月桂基乙醚；棕榈酸；油酸；三油酸山梨坦 (Span85)；甘胆酸盐；枯草菌脂肽；泊洛沙姆；山梨糖醇酐脂肪酸酯；三油酸山梨坦；泰洛沙泊和磷脂。

[0384] 本文中表征了特异性识别本文中描述的嵌合细胞因子结构域的抗体，例如相对于任何亲代细胞因子结构域优先结合嵌合结构域的这类抗体。例如，特异性抗体可结合包括来自第一亲代细胞因子的区段与第二亲代细胞因子之间的接合处的表位。

[0385] 核酸递送。可递送编码受体结合剂并且可表达其的核酸来将受体结合剂提供给受试者。例如，可将编码受体结合剂的核酸序列置于转录控制序列的控制之下和置于用于基因递送的核酸载体例如病毒载体中。示例性病毒载体包括腺病毒、逆转录病毒或腺病毒相关病毒载体。载体可以以质粒或线性分子例如线性双链 DNA 的形式存在。递送的核酸可被设计来整合进入靶细胞的基因组，例如，整合进入靶细胞的基因组。或者，可这样设计递送的核酸，以便在递送后，其自主地存在于细胞中。

[0386] 可对转录控制序列进行工程化以提供瞬时或组成型表达。瞬时控制可包括通过外源试剂例如通过使用响应外源试剂（例如，类固醇激素或 FK506）或环境信号的转录因子的转录反应元件调节的控制。

[0387] 可以例如通过检测由基因编码的蛋白质（例如，使用抗体）或通过检测 mRNA（例

如使用 PCR 或 Northern 杂交) 来评价在递送的核酸上提供的基因的表达。通常这样工程化递送的核酸, 以使转录和翻译调控性 DNA 相对于受体结合剂的编码序列适当地定位, 以便可起始转录, 并且从所得的信使翻译该蛋白质。核酸可包括来自哺乳动物细胞 (特别地人) 转录和翻译调控性核酸序列。这样的序列包括例如启动子序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列以及增强子或激活物序列。

[0388] 此外, 表达载体可包括额外的元件。例如, 为了整合表达载体, 表达载体可包含至少一个或两个与宿主细胞基因组同源的序列, 例如侧翼连接表达构建体。可通过选择适当的同源序列包含在载体中来将整合载体导向宿主细胞中的特定基因座。用于整合载体的构建体在本领域是公知的。

[0389] 示例性腺病毒载体包括人腺病毒载体的修饰形式例如 Ad2 或 Ad5, 其中病毒体内复制所必需的基因元件已被除去。例如, 可除去 E1 区域, 还可进一步修饰基因组以接受编码受体结合剂的表达盒。

[0390] 示例性逆转录病毒载体包括 LNL6、LXSN、LNCX 和慢病毒载体。具体的慢病毒载体由 Pawliuk 等人 (2001) Science 294:2368 和 Imren 等人 (2002) PNAS 99:14380 进行了描述, 包括但不限于人免疫缺陷病毒 (例如, HIV-1、HIV-2)、猫免疫缺陷病毒 (FIV)、猿猴免疫缺陷病毒 (SIV)、牛免疫缺陷病毒 (BIV) 和马感染性贫血病毒 (EIAV)。构建这些载体, 通过例如将必需基因 (例如, gag 和 pol) 分离至分开的载体上和通过使逆转录病毒变成复制缺陷型来使这些载体变得安全。随后利用标准技术, 通过使用辅助病毒或包装细胞系将复制缺陷型逆转录病毒包装在病毒体中。用于产生重组逆转录病毒和用于利用这样的病毒体外或体内感染细胞的方案可见于 Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. 等人 (编著) Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14 和其它标准实验室手册。逆转录病毒载体, 除了用于表达受体结合剂的序列以外, 还可包含左 (5') 逆转录病毒 LTR; 逆转录病毒输出元件, 任选地逆反应元件 (RRE); 启动子和基因座控制区域 (LCR) 或其它转录隔离序列和右 (3') 逆转录 LTR。逆转录载体还可包含中枢聚嘌呤区 (cPPT) 或 DNA 翼 (DNA flap) 来增加病毒滴度和转导效率。

[0391] 可将包含编码受体结合剂的序列的核酸例如离体或体内递送至任何适当的靶细胞。示例性靶细胞包括滑膜细胞、造血细胞、表皮细胞等。可将核酸递送至与眼相关的靶细胞例如角膜上皮细胞。递送可包括角膜上皮的清创术或刮术, 以暴露上皮的基底层。随后添加用于递送的核酸。在另一个实施方案中, 将核酸递送至角膜内皮细胞、角膜周围下面的小梁网的细胞、眼脉络膜层的细胞、视网膜、巩膜或睫状体的细胞、视网膜或眼脉管系统的细胞或玻璃体的细胞或晶状体例如晶状体上皮的细胞。

[0392] 递送法包括例如逆转录病毒感染、腺病毒感染、利用质粒的转化、利用包含外源核酸的脂质体的转化、微粒轰击核酸递送 (例如, 将核酸加载至金或其它金属颗粒上并且射入或注射入细胞)、腺病毒相关病毒感染和 EB 病毒感染。可通过任何方法包括针注射、皮下注射器、电穿孔或基因枪来递送进入细胞或组织。

[0393] 用于基因递送的其他方法可见于例如 Kay, M. A. (1997) Chest 111 (6 Supp.): 138S-142S; Ferry, N. 和 Heard, J. M. (1998) Hum. Gene Ther. 9:1975-81; Shiratory, Y. 等人 (1999) Liver 19:265-74; Oka, K. 等人 (2000) Curr. Opin. Lipidol. 11:179-86; Thule, P. M. 和 Liu, J. M. (2000) Gene Ther. 7:1744-52; Yang, N.

S. (1992) Crit. Rev. Biotechnol. 12:335-56 ;Alt, M. (1995) J. Hepatol. 23:746-58 ; Brody, S. L. 和 Crystal, R. G. (1994) Ann. N. Y. Acad. Sci. 716:90-101 ;Strayer, D. S. (1999) Expert Opin. Investig. Drugs 8:2159-2172 ;Smith-Arica, J. R. 和 Bartlett, J. S. (2001) Curr. Cardiol. Rep. 3:43-49 ;和 Lee, H. C. 等人 (2000) Nature 408:483-8。

[0394] 示例性第二试剂。可将本文中描述的受体结合剂与第二试剂一起施用。可共施用或例如使用不同的方案单独施用两种试剂。示例性第二试剂包括抗炎剂。

[0395] 在一个实施方案中,第二试剂是 IL-17 拮抗剂(包括所有 IL-17 家族成员的拮抗剂,例如,IL-17A、IL-17F、IL-17B、IL-17C、IL-17D 和 IL-17E 的拮抗剂)。示例性 IL-17 拮抗剂包括:结合 IL-17(包括 IL-17A、IL-17F、IL-17B、IL-17C、IL-17D 和 IL-17E)并且拮抗 IL-17 介导的信号转导的试剂(例如抗体和其它结合蛋白);结合一种或多种 IL-17 的受体例如 IL-17RA 和 IL-17RC 并且拮抗 IL-17 介导的信号转导的试剂(例如抗体和其它结合蛋白);结合包含 IL-17 和至少一个受体亚单位的复合物例如 IL-17 和 IL-17RA 或 IL-17、IL-17RA 和 IL-17RC 并且拮抗 IL-17 介导的信号转导的试剂(例如抗体和其它结合蛋白);和包含 IL-17RA 和 IL-17RC 的可溶性胞外结构域的一个或多个并且拮抗 IL-17 介导的信号转导的试剂例如可溶性受体。

[0396] 在另一个实施方案中,第二试剂是 IL-12 拮抗剂。示例性 IL-12 拮抗剂包括:结合 IL-12(包括 p35 和 p40)并且拮抗 IL-12 介导的信号转导的试剂(例如抗体和其它结合蛋白);结合 IL-12 的受体的一个或多个例如 IL-12R β 1 或 IL-12R β 2 并且拮抗 IL-12 介导的信号转导的试剂(例如抗体和其它结合蛋白);结合包含 p35、p40 和至少一个受体亚单位例如 IL-12R β 1 或 IL-12R β 2 的复合物并且拮抗 IL-12 介导的信号转导的试剂(例如抗体和其它结合蛋白);和包含 IL-12R β 1 或 IL-12R β 2 的可溶性胞外结构域的一个或多个并且拮抗 IL-12 介导的信号转导的试剂例如可溶性受体。

[0397] 在另一个实施方案中,第二试剂是 IL-23 拮抗剂。示例性 IL-23 拮抗剂包括:结合 IL-23(包括 p19 和 p40)并且拮抗 IL-23 介导的信号转导的试剂(例如抗体和其它结合蛋白);结合 IL-23 的一个或多个受体例如 IL-12R β 1 或 IL-23R 并且拮抗 IL-23 介导的信号转导的试剂(例如抗体和其它结合蛋白);结合包含 p19、p40 和至少一个受体亚单位例如 IL-12R β 1 或 IL-23R 的复合物并且拮抗 IL-23 介导的信号转导的试剂(例如抗体和其它结合蛋白);和包含 IL-12R β 1 或 IL-23R 的可溶性胞外结构域的一个或多个并且拮抗 IL-23 介导的信号转导的试剂例如可溶性受体。

[0398] 针对 IL-23 的示例性抗体已被描述。参见例如, Beyer 等人, J. Mol. Biol. (2008), doi:10.1016/j.jmb.2008.08.001。

[0399] 动物模型。可在人疾病例如人自身免疫和/或人炎性疾病的动物模型中评价受体结合剂。试剂可具有对于动物中的对应靶蛋白的特异性。

[0400] 类风湿关节炎模型。可在类风湿关节炎的动物模型例如胶原诱发的关节炎(CIA)模型中评价受体结合剂。参见,例如, McIndoe 等人, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:2210-2214 ;Issekutz, A. C. 等人, Immunology(1996)88:569 ; 和 Current Protocols in Immunology, Unit 15.5, Coligan 等人(编著), John Wiley&Sons, Inc.。通过用天然 II 型胶原免疫大鼠/小鼠的易感品系来产生模型。将胶原在完全弗氏佐剂(CFA)中乳化并且皮内注射(100mg 胶原:100mg CFA/小鼠)注射在尾的基部。用 0.05ml 的蒸馏

水 /CFA 乳剂皮内注射对照小鼠。初始免疫后 21 天提供不完全佐剂中的胶原的加强注射。疾病因胶原免疫后诱导的自身免疫反应而引起。

[0401] 使用定义的等级对关节的关节炎、炎症、血管翳、软骨破坏和骨质吸收进行评分。例如可如下对关节炎的严重度评分：0= 无可见关节炎效应；1= 一个趾或关节的水肿和红斑；2=2 个关节的水肿和红斑；3= 超过 2 个关节的水肿和红斑；4= 整个爪和趾的严重关节炎，伴随踝关节的僵硬和肢体的变形。将每一个肢体的评分求和，记录为每一个个体动物的关节炎指数 (AI)。还可将其它评分方案用于这些和其它标准。

[0402] 多发性硬化。实验性变应性脑脊髓炎 (EAE) 是多发性硬化的有用鼠模型。可在 EAE 模型中评价受体结合剂。EAE 是 T 细胞介导的自身免疫性障碍，其特征在于 T 细胞和单核细胞炎症以及随后中枢神经系统的轴突的脱髓鞘作用。(参见，例如，Bolton, C., 1995, Multiple Sclerosis, 143)。示例性方案可见于 Current Protocols in Immunology, 单元 15.1 和 15.2; Coligan 等人 (编著), John Wiley&Sons, Inc. 还可获得髓磷脂疾病的模型，其中少突神经胶质细胞或许旺细胞被移植入中枢神经系统，例如，如在 Duncan 等人, 1997, Molec. Med. Today, 554-561 中描述的。

[0403] 同种异体移植。可以例如使用鼠尾 - 皮肤移植，在同种移植皮片排异反应的动物模型中评价受体结合剂。同种移植皮片排异反应由 T 细胞、辅助 T 细胞和杀伤细胞 - 效应 T 细胞介导。参见，例如，Current Protocols in Immunology, 单元 4.4; Coligan 等人 (编著), 1995, John Wiley&Sons, Inc. 还可使用其它移植排斥模型。参见，例如，Tinubu 等人, 1994, J. Immunol., 4330-4338。

[0404] IBD 和结肠炎模型。炎症肠病的示例性模型是使用高 CD4+CD45Rb 细胞转移至 SCID 小鼠。参见，例如，Hirano 等人, J Pharmacol Sci. 2009 Jun; 110(2):169-81 和使用 IL-10 缺陷型转基因小鼠。参见，例如，Inaba 等人, Inflamm Bowel Dis., DOI:10.1002/ibd.21253(2010)。另一个示例性结肠炎模型使用葡聚糖硫酸钠 (DSS) 来诱导急性结肠炎。例如，可通过随意施用 5%(wt/vol) 的饮用水中的 DSS (分子质量 30 - 40kDa; ICN Biomedicals, Aurora, OH) 来诱导小鼠的结肠炎。由该处理引起的症状是血性腹泻、体重减轻、结肠缩短和具有嗜中性粒细胞浸润的粘膜溃疡形成。DSS 诱发的结肠炎的组织学特征在于炎症细胞至粘膜固有层的浸润，具有淋巴样组织增生、局灶性隐窝损害和上皮溃疡形成。这些变化被认为因 DSS 对上皮的毒性效应以及因固有层细胞的吞噬作用和 TNF- α 及 IFN- γ 的产生而发生。参见，例如，Hassan 等人 PLoS One. 2010 Jan 25; 5(1):e8868。

[0405] 干眼病模型。可使用本领域已知的方法在干眼病的小鼠模型中评价受体结合剂。例如，可通过皮下注射东莨菪碱，随后将小鼠置于人工气候室来诱发小鼠的干眼。以具体实例为例，可通过在人工气候室中连续暴露于干燥环境来诱发正常健康的 6 至 10 周龄雌性 C57BL/6 小鼠具有干眼。人工气候室具有小于 30% (通常约 19%) 的低相对湿度、高气流 (15 升 / 分钟) 和恒温 (约 22°C)。置于人工气候室中的小鼠也用东莨菪碱进行处理以抑制眼泪分泌。持续释放东莨菪碱经皮吸收贴剂可获自 Novartis (Summit, N. J.)。每隔 48 小时将 1/4 的贴剂用于小鼠的脱毛中尾。人工气候室与东莨菪碱的组合在相对短的时间 (约 2-4 天) 内产生严重干眼。可如 Barbino 等人, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 46:2766-2711(2005) 中所述制备人工气候室，使得能够控制气流、湿度和温度。

[0406] 可以例如通过进行下列测试来监测小鼠的干眼体征：a) 测量泪水产生的棉线测

试,所述泪水产生在干眼患者中通常减少;b)角膜荧光染色,其为角膜表面损伤的标志;和一般眼科检查。

[0407] 棉线测试:可用利用酚红 (Zone-Quick, Lacrimedics, Eastsound, Wash.) 浸透的棉线测试测量眼泪产生。在放大荧光下,用珠宝商镊夹住线,将其置于右眼的结膜穹的外眦中进行 30 或 60 秒。使用血细胞计数器的标度在显微镜下读取以 mm 表示的泪距。

[0408] 角膜荧光染色:可通过用微量移液管将 1.0 μ l 的 5% 荧光素施用于眼的下结膜囊内来评价角膜荧光染色。在荧光素滴注后 3 分钟,利用裂隙灯活组织显微镜,使用钴蓝色光检查角膜。对于 5 个其中角膜表面已分裂的区域的每一个区域,使用 0-3 的标准化国立眼科研究所 (NEI) 分级系统以隐蔽方式记录点状染色。

[0409] 可使用其它适当的方法,例如参见实施例 8(在下文中)。

[0410] 诊断和其它用途。本文中描述的受体结合剂可用于检测表达这样的受体的样品或细胞中的 IL-1R1。例如,可用作标记物或产生信号的部分例如酶、放射性标记物、表位或荧光蛋白(例如绿色荧光蛋白)直接或间接标记试剂。可将试剂与样品或细胞接触以测定受体是否存在于样品中或细胞上,例如,使用标准免疫印迹、免疫荧光、酶免疫测定 (EIA)、放射性免疫测定 (RIA)、荧光能量转移、Western 印迹和其它诊断及检测技术。

[0411] 受体结合剂还可被标记以用于体内检测和给受试者施用。可以例如通过 NMR 或其它体层摄影方法给受试者摄像。例如,可用放射性标记物例如 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 和 ^{188}Rh 、荧光标记物例如荧光素和罗丹明、核磁共振活性标记物、可通过正电子发射体层摄影术 (“PET”) 扫描仪检测的正电子发射同位素、化学发光剂例如萤光素和酶促标记例如过氧化物酶或磷酸酶标记结合剂。可用造影剂例如顺磁剂和磁性铁或超顺磁性造影剂(其主要改变 T2 反应)标记试剂。

[0412] 受体结合剂还可用于纯化表达其所结合的受体的细胞。例如,可将受体结合剂偶联至固定的支持物(例如,磁珠或柱子基质),将其与可表达受体的细胞接触。支持物可以例如用生理缓冲液洗涤,可从所述支持物回收细胞。

[0413] 受体结合剂还可用于纯化其所结合的受体的可溶性形式。例如,可将包含可溶性受体的样品与固定的受体结合剂接触,随后,例如在洗涤后,可从固定的试剂回收它。

[0414] 下列非限定性实施例进一步举例说明本文中描述的本发明的实施方案。

实施例

[0415] 实施例 1。将编码具有表 4(下文中)中所列的氨基酸序列的蛋白质的核酸构建于包含 T7 启动子和氨苄青霉素 (pET31 系列) 或卡那霉素抗性基因 (pET28 系列) (EMD Chemicals, Gibbstown NJ, USA) 的 pET 载体中,并且进行表达。可用于表达的编码序列的实例提供于表 5 中。

[0416] 表 4

[0417]

	示例性嵌合蛋白	SEQ ID NO:
P01	APVRSIAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPNNLEEKIDVSFVQGEESNDK IPVALGIHGGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEINN TSFESAACPGWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYMQFVSS	17
P02	APVRSIAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPNNLEEKIDVSFVQGEESNDK IPVALGIHGGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEINN LSFESAACPGWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYMQFVSS	18
P03	APVRSIAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPNNLEEKFSMSFVQGEESNDK IPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEINN TSFESAACPGWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYMQFVSS	19
P04	APVRSIAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPNNLEEKFSMSFVQGEESNDK IPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEINN LEFESAACPGWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYMQFVSS	20
P05	APVRSINCRWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPNNLEEKFSMSFVQGEESNDK IPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEINN LEFESAQFPNWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYMQFVSS	21
P06	APVRSINCTLWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPNNLEEKFSMSFVQGEESNDK IPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEINN LEFESAQFPNWIISTMEADQPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS	23
P07	APVRSINCRWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPNNLEEKFSMSFVQGEESNDK IPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEINN LEFESAQFPNWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGQDITDFTMQFVSS	24

[0418] 编码上述蛋白质的示例性核酸列于表 5 中。在一些实施方案中,核酸序列还在下面所列的第一个核苷酸之前包含 ATG。在一些实施方案中,核酸序列还在下面所列的最后一个核苷酸之后包含终止密码子(例如 TAA、TAG 或 TGA)。

[0419] 表 5

[0420]

	编码示例性嵌合蛋白的核酸	SEQ ID NO:
P01	GCACCTGTACGATCACTGGCCTTCAGAATCTGGGATGTTAACCAGAAGACCTTC TATCTGAGGAACAACCACTAGTTGCTGGATACTTGCAAGGACCAAATGTCAAT TTAGAAGAAAAGATAGATGTGTCTTTGTACAAGGAGAAGAAAGTAATGACAAA ATACCTGTGGCCTTGGGCATCCATGGAGGGAAGATGTGCCTGTCTGTGTCAAG TCTGGTGATGAGACCAGACTCCAGCTGGAGGCAGTTGATCCCAAAATTAACCA AAGAAGAAGATGGACAAGCGCTTCGCCTTCATCCGCTCAGACAGCGGCCCCACC ACCAGTTTTGAGTCTGCCGCTGCCCCGGTTGGTTCTCTGCACAGCGATGGAA GCTGACCAGCCCGTCAGCCTCACC AATATGCCTGACGAAGGCGTCATGGTCACC AAATTCTACATGCAATTTGTGTCTTC	25
P02	GCACCTGTACGATCACTGGCCTTCAGAATCTGGGATGTTAACCAGAAGACCTTC TATCTGAGGAACAACCACTAGTTGCTGGATACTTGCAAGGACCAAATGTCAAT TTAGAAGAAAAGATAGATGTGTCTTTGTACAAGGAGAAGAAAGTAATGACAAA ATACCTGTGGCCTTGGGCATCCATGGAGGGAAGATGTGCCTGTCTGTGTCAAG TCTGGTGATGAGACCAGACTCCAGCTGGAGGCAGTTGATCCCAAAATTAACCA AAGAAGAAGATGGAAAAGCGATTGTCTTCAACAAGATAGAAATCAATAACAG CTGAGTTTTGAGTCTGCCGCTGCCCCGGTTGGTTCTCTGCACAGCGATGGAA GCTGACCAGCCCGTCAGCCTCACC AATATGCCTGACGAAGGCGTCATGGTCACC AAATTCTACATGCAATTTGTGTCTTC	26
P03	GCACCTGTACGATCACTGGCCTTCAGAATCTGGGATGTTAACCAGAAGACCTTC TATCTGAGGAACAACCACTAGTTGCTGGATACTTGCAAGGACCAAATGTCAAT TTAGAAGAAAAGTTCTCCATGTCTTTGTACAAGGAGAAGAAAGTAATGACAAA ATACCTGTGGCCTTGGGCCTCAAGGAAAAGAAATCTGTACCTGTCTCGCTGTG AAAGATGATAAGCCCACTCTACAGCTGGAGAGTGTAGATCCCAAAATTAACCA AAGAAGAAGATGGAAAAGCGATTGTCTTCAACAAGATAGAAATCAATAACAG CTGGAATTTGAGTCTGCCGCTGCCCCGGTTGGTTCTCTGCACAGCGATGGAA GCTGACCAGCCCGTCAGCCTCACC AATATGCCTGACGAAGGCGTCATGGTCACC AAATTCAACCATGCAATTTGTGTCTTC	27
P04	GCACCTGTACGATCACTGGCCTTCAGAATCTGGGATGTTAACCAGAAGACCTTC TATCTGAGGAACAACCACTAGTTGCTGGATACTTGCAAGGACCAAATGTCAAT TTAGAAGAAAAGTTCTCCATGTCTTTGTACAAGGAGAAGAAAGTAATGACAAA ATACCTGTGGCCTTGGGCCTCAAGGAAAAGAAATCTGTACCTGTCTCGCTGTG AAAGATGATAAGCCCACTCTACAGCTGGAGAGTGTAGATCCCAAAATTAACCA AAGAAGAAGATGGAAAAGCGATTGTCTTCAACAAGATAGAAATCAATAACAG CTGGAATTTGAGTCTGCCGCTGCCCCGGTTGGTTCTCTGCACAGCGATGGAA GCTGACCAGCCCGTCAGCCTCACC AATATGCCTGACGAAGGCGTCATGGTCACC AAATTCAACCATGCAATTTGTGTCTTC	28
P05	GCACCTGTACGATCACTGAAGTGCAGAATCTGGGATGTTAACCAGAAGACCTTC TATCTGAGGAACAACCACTAGTTGCTGGATACTTGCAAGGACCAAATGTCAAT TTAGAAGAAAAGTTCTCCATGTCTTTGTACAAGGAGAAGAAAGTAATGACAAA ATACCTGTGGCCTTGGGCCTCAAGGAAAAGAAATCTGTACCTGTCTCGCTGTG AAAGATGATAAGCCCACTCTACAGCTGGAGAGTGTAGATCCCAAAATTAACCA AAGAAGAAGATGGAAAAGCGATTGTCTTCAACAAGATAGAAATCAATAACAG CTGGAATTTGAGTCTGCCGCTGCCCCGGTTGGTTCTCTGCACAGCGATGGAA GCTGACCAGCCCGTCAGCCTCACC AATATGCCTGACGAAGGCGTCATGGTCACC AAATTCTACATGCAATTTGTGTCTTC	29
P06	GCACCTGTACGATCACTGAAGTGCACGCTCTGGGATGTTAACCAGAAGACCTTC TATCTGAGGAACAACCACTAGTTGCTGGATACTTGCAAGGACCAAATGTCCAG CAACAAGTGGTGTCTCCATGTCTTTGTACAAGGAGAAGAAAGTAATGACAAA ATACCTGTGGCCTTGGGCCTCAAGGAAAAGAAATCTGTACCTGTCTCGCTGTG AAAGATGATAAGCCCACTCTACAGCTGGAGAGTGTAGATCCCAAAATTAACCA AAGAAGAAGATGGAAAAGCGATTGTCTTCAACAAGATAGAAATCAATAACAG CTGGAATTTGAGTCTGCCGCTGCCCCAAGTGGTACATCAGCACCTCTATGGAA GCTGACCAGCCCGCTTCTCTGGGAGGGACCAAGGCGGCCAGGATATAACTGAC TTCACCATGCAATTTGTGTCTTC	30
P07	GCACCTGTACGATCACTGAAGTGCAGAATCTGGGATGTTAACCAGAAGACCTTC TATCTGAGGAACAACCACTAGTTGCTGGATACTTGCAAGGACCAAATGTCAAT TTAGAAGAAAAGTTCTCCATGTCTTTGTACAAGGAGAAGAAAGTAATGACAAA ATACCTGTGGCCTTGGGCCTCAAGGAAAAGAAATCTGTACCTGTCTCGCTGTG AAAGATGATAAGCCCACTCTACAGCTGGAGAGTGTAGATCCCAAAATTAACCA AAGAAGAAGATGGAAAAGCGATTGTCTTCAACAAGATAGAAATCAATAACAG CTGGAATTTGAGTCTGCCGCTGCCCCAAGTGGTACATCAGCACCTCTATGGAA GCTGACCAGCCCGTCAGCCTCACC AATATGCCTGACGAAGGCGGCCAGGATATAACT GACTTCACCATGCAATTTGTGTCTTC	31

[0421] 蛋白质可包括一系列来自下文中举例说明的 IL-1 β 和 IL-1Ra 的不同残基。在这些实例 P01、P02、P03、P04 和 P05 当中,细胞因子结构域可具有 48-70% 的来自 IL-1 β 的残

基和 55-78% 的来自 IL-1Ra 的残基。(因为许多氨基酸残基在两种蛋白质之间是保守的,因此与 IL-1 β 和与 IL-1Ra 的百分比同一性之和可大于 100%)。

[0422] 表 6

[0423]

	IL-1 β 残基	IL-1RA 残基	总的残基	%IL-1 β	%IL-1RA
P06	130	62	152	85.5	40.8
P07	113	80	153	73.9	52.3
P05	108	85	153	70.6	55.6
P04	104	89	153	68.0	58.2
P03	94	99	153	61.4	64.7
P02	85	108	153	55.6	70.6
P01	74	119	153	48.4	77.8

[0424] **实施例 2.** 通过在 LB 液体培养基中,在 37℃ 利用 1mM IPTG 诱导 3 小时,在大肠杆菌细胞 BL21 (DES) 株或 BLR(DE3) 中表达包含六组氨酸标签的蛋白质。在 20-50mM Tris, 0.5M NaCl, 2.5mM EDTA, 0.1%Triton X-100, pH8.0 中裂解细胞。针对 1.25x PBS(包含 0.1% 聚山梨醇 80) 透析裂解物,随后将其通过 0.8/0.2 μ m 滤器进行无菌过滤,随后使用 HisTrap **HP**® 预装柱 (GE Healthcare, Piscataway NJ, USA) 将其经历 IMAC 层析。将柱在 50mM 磷酸盐, 500mM NaCl, pH7.1 中进行平衡,加载,用相同的缓冲液洗涤。用 25mM 咪唑对其进行预洗脱,在相同的缓冲液中用 125mM 咪唑进行洗脱。将洗脱的蛋白质针对 1.25x PBS, 0.1% 聚山梨醇 80, pH7.4 进行充分透析。

[0425] 将蛋白质加载在 20mM 磷酸钠, 0.5M NaCl 10mM 咪唑, pH7.4 缓冲液中。用 200mM 咪唑, 20mM 磷酸钠, 0.5M NaCl pH7.4 缓冲液对其进行洗脱。将洗脱的蛋白质针对 PBS, 0.1% 聚山梨醇 80, pH7.4 进行充分透析,使用 Amicon **Ultra**® (10K) 过滤器将其浓缩,于 4° 或 -80℃ 贮存。

[0426] 通过离子交换层析纯化缺乏六组氨酸标签的蛋白质。通过离子交换层析纯化 P05 蛋白。在盐不存在的情况下(电导率约 1mS/cm)将来自表达细胞的裂解物施用至具有低 pH(约 pH5.5)的 GigaCapS™ 柱 (Tosoh Bioscience LLC, King of Prussia, PA, USA)。随后利用 pH 梯度(缓冲液 A=10mM 醋酸, pH5.5;缓冲液 B=20mM Tris pH8)洗脱柱子。随后用 5ml 的 H₂O 和 5ml 的 20mM Tris pH8 稀释 5ml 包含洗脱的蛋白质的级分,随后将其用于 Capto™ Q 树脂 (GE Healthcare, Piscataway NJ, USA),利用 0mM 至 250mM 的 20mM Tris pH8.0 中的 NaCl 梯度进行洗脱。将洗脱的蛋白质针对 1.25X PBS 0.1% **TWEEN**® 80 或不存在 **Tween**® 的 1.25X PBS 进行充分透析,随后贮存。参见图 6。使用类似的方法纯化 P03 和 P04 蛋白。

[0427] 还将表达 P05 的细胞在具有非动物大豆胨的 (#T7660) 的 Teknova™ Terrific 液体培养基(补充有 10g/L 葡萄糖、10mM MgSO₄、微量元素 (1mg/ml Teknova™1000X 微量元

素, #T1001) 和 Sartorius 2L Biostat™A+ 中的抗生素) 中生长并且, 在 OD35-40 时用 1mM IPTG 诱导约 6 小时。将细胞在 37℃ 和 30% 的溶解氧, pH7.0 下生长, 以 200-800rpm 搅拌, 以 2L/min 的速度喷射氧。当葡萄糖被耗尽 (如通过 pH 增加检测到的) 时, 给细胞喂饲 9g 葡萄糖 /L/hr。当 pH 下降时 (诱导后约 2.5hr), 将喂饲减少至 6g 葡萄糖 /L/hr。

[0428] 收集细胞, 于裂解缓冲液 (20mM Tris, 10mM EDTA, 0.1% Triton, pH8.0; 20mM Tris, 10mM EDTA, 0.1% Triton, pH7.0; 50mM MOPS, 10mM EDTA, 0.1% Triton, pH6.5; 或 50mM MOPS, 10mM EDTA, 0.1% Triton, pH6.0) 中进行裂解。将裂解物加载至具有 pH5.3 和 3mS/cm (35mg 产物 /ml 柱子树脂) 的 **Poros®** XS 阳离子交换介质 (Life Technologies Corp., Carlsbad CA USA) 上。

[0429] 在示例性方法中, 使用包含 100mM MOPS 25mM NaCl pH7.0 的缓冲液, 通过至 pH7.0 的阶梯洗脱 P05 蛋白。弃去第一洗脱峰, 收集第二洗脱峰, 将其混合, 其包含 P05 蛋白。早期混合物相对于 des-Ala 种类富集了完整 P05 蛋白。随后将该洗脱的材料流过 CaptoQ™ 阴离子交换树脂。收集包含完整 P05 蛋白的流通液。

[0430] 在另一个示例性方法中, 用 100mM MOPS 20mM NaCl pH6.0 洗涤介质。使用包含 100mM MOPS 50-58mM NaCl pH6.0 的缓冲液, 通过至 pH6.0 的阶梯洗脱 P05 蛋白。将第一洗脱峰与随后的峰分离, 所述第一洗脱峰包含完整的 P05 蛋白。随后将该洗脱的材料流过 CaptoQ™ 阴离子交换树脂。收集包含完整 P05 蛋白的流通液。

[0431] **实施例 3.** 在基于细胞的测定中评价包含蛋白质的蛋白质或上清液的 IL-1 活性。HEK-Blue™ IL-1 β 反应性细胞用于监测 IL-1 β 活性 (可获自 InvivoGen Inc., San Diego CA, USA)。这些细胞包含在融合至 5 个 NF-κB 和 5 个 AP-1 结合位点的 IFN-β 最小启动子的控制下的 SEAP 报告基因。细胞表面上 IL-1 受体的 IL-1 β 衔接导致 NF-κB 活化和 SEAP 产生。可以例如使用 QUANTI-Blue™ (InvivoGen Inc., San Diego CA, USA) 和分光光度计测量分析来检测 SEAP 报告。从培养至 70-80% 汇合的细胞制备 HEK-Blue IL-1 β 细胞悬浮液。将悬浮细胞于新鲜生长培养基 (DMEM, 4.5g/l 葡萄糖, 2mM L- 谷氨酰胺, 10%(v/v) 热灭活的胎牛血清 (在 56℃ 进行 30min), 50U/ml 青霉素, 50mg/ml 链霉素, 100mg/ml NormocinT) 中调整至 ~ 330,000 个细胞 /ml。

[0432] 将试剂: 10ml 的 20ng/ml 的 IL-1 β, 1μl 的目标试剂和 30ml 的细胞培养基添加至平底 96 孔细胞培养板的孔中至 50ml 的终体积。平行地制备阳性和阴性对照。随后将 150ml HEK-Blue IL-1 β 细胞悬浮液 (~ 50,000 个细胞) 添加至每一个孔, 将板在 37℃ 于 5% CO2 组织培养箱中培养过夜。通常地, 终 IL-1 β 浓度 (于 200ml 终体积中) 为 0.1ng/ml。第二天 (12-15 小时后) 评价 IL-1 β 活性。在定量之前, 按照制造商的说明书制备 QUANTI-Blue™ 试剂。制备平底 96 孔测定板, 其中将 150ml 的 QUANTI-Blue™ 溶液添加至每一个孔中。将 50ml 的来自 96 孔组织培养板的孔的条件培养基添加至测定板的每一个孔中。将板在 37℃ 温育约 15-20 分钟。随后使用分光光度计在 620-655nm 测量 SEAP 水平。

[0433] 结果。如图 7A 中所示, 在该测定中, P06 蛋白表现为 IL-1RI 激动剂, P07 蛋白表现为部分激动剂, P01 蛋白不能激动。事实上, 当在 IL-1 β 存在的情况下测定时, P01 蛋白表现为拮抗剂。图 7B 显示通过使用上述 HEKBlue™ 细胞测定, P01 在一系列 IL-1 β 蛋白浓度上对 IL-1 β 活性的拮抗。拮抗随增加 P01 的量增加而增强 (x- 轴反映包含 P01 的上清液的微升)。

[0434] 蛋白质 P01、P02、P03、P04 和 P05 各自拮抗 IL-1 β 活性。例如,参见图 8A 和 8B。P05 的 IC₅₀ 小于约 5ng/ml。在该测定中测试 P05 的激动 IL-1RI 的能力,即使在最高测试浓度 1mg/ml 下也未观察到 P05 具有任何可检测的激动活性。P01、P02、P03、P04 和 P05 还抑制 IL-1 β 诱导的 MG-63 细胞(响应 IL-1 β 的人骨肉瘤细胞系)的 IL-6 表达。在干眼病的鼠模型中,观察到六组氨酸标记的 P05 具有生物活性。关于未标记的 P05,也参见下面的实施例 8。

[0435] 实施例 4. 使用表面等离子体共振术,利用 Reichert SR7000DC Dual Channel SPR 系统评价蛋白质对可溶性重组人 IL-1RI(对应于 IL-1RI 的胞外结构域)的结合性质。在具有 0.005% Tween20 的磷酸缓冲盐溶液中评价结合。观察到 IL-1 β 具有 8-9nM 的 K_D 和 $2-3 \times 10^{-3} s^{-1}$ 的解离常数 (K_d),在另一个实验中,约 2nM 的 K_D , $1.3-1.5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 的缔合常数和约 $2.9-3.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ 的解离常数 (K_d)。参见图 9A。P01 蛋白以与 IL-1 β 相似的缔合动力学结合,但在结合实验的解离相(约 180 秒)中不解离。因此, P01 以比 IL-1 β 在相似条件下显示的亲和力更大的亲和力结合 IL-1RI。

[0436] 观察到 IL-1Ra 的结合具有约 0.33nM 的 K_D , 约 $2 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 的缔合常数 (K_a) 和约 $6.6 \times 10^{-5} s^{-1}$ 的解离常数 (K_d)。参见图 9B。观察到嵌合细胞因子结构域 P01、P02、P03、P04 和 P05 具有在约 12-1700pM 的范围内的 K_D , 从约 $3 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 变化至 $3 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 的缔合常数 (K_a) 和从约 2×10^{-5} 变化至 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 的解离常数 (K_d)。参见例如图 9C 和 9D 和下面的表 7。

[0437] 表 7

[0438]

蛋白质	$k_a (M^{-1} s^{-1})$	$K_d (s^{-1})$	$K_D (pM)$
IL-1 β	$1.47 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$	$2.95 \times 10^{-3} s^{-1}$	2010
IL-1Ra	$2.01 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$	$6.58 \times 10^{-5} s^{-1}$	326
P01	$4.93 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$	$2.32 \times 10^{-5} s^{-1}$	470
P02	$3.39 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$	$2.16 \times 10^{-5} s^{-1}$	636
P03	$4.1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$	$1.2 \times 10^{-3} s^{-1}$	290
P04	$3.00 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$	$5.14 \times 10^{-4} s^{-1}$	1714
P05	$3.47 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$	$4.15 \times 10^{-5} s^{-1}$	12
P06	$4.8 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$	$1.7 \times 10^{-3} s^{-1}$	410
P07	$1.58 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$	$1.46 \times 10^{-3} s^{-1}$	92553

[0439] 实施例 5

[0440] 其它示例性嵌合 IL-1 家族蛋白还包括下列蛋白:

[0441] P08 APVRSALAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPNNLEEKFSMSFVQGEESND SEQ ID NO :32

- [0442] KIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEIN
- [0443] NKLEFESAQFPNWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYMQFVSS
- [0444] P09 APVRSQAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVNLEEKFSMSFVQGEESND SEQ ID NO :33
- [0445] KIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEIN
- [0446] NKLEFESAQFPNWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYMQFVSS
- [0447] P10 APVRSLAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVNLEEKIDVSFVQGEESND SEQ ID NO :34
- [0448] KIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEIN
- [0449] NKLEFESAQFPNWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYMQFVSS
- [0450] P11 APVRSLNCRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVNLEEKIDVSFVQGEESND SEQ ID NO :35
- [0451] KIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEIN
- [0452] NKLEFESAQFPNWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYMQFVSS
- [0453] P12 APVRSLNCRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVNLEEKFSMSFVQGEESND SEQ ID NO :36
- [0454] KIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEIN
- [0455] NKLEFESAQFPNWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFTMQFVSS
- [0456] P13 APVRSLAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVNLEEKFSMSFVQGEESND SEQ ID NO :37
- [0457] KIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEIN
- [0458] NKLEFESAQFPNWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQED
- [0459] P14 APVRSLNCRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVNLEEKFSMSFVQGEESND SEQ ID NO :38
- [0460] KIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEIN
- [0461] NKLEFESAQFPNWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQED
- [0462] 下面的多肽是包含至少 2 个来自 IL-1 α 的区段和至少 2 个来自 IL-1Ra 的区段的嵌合结构域。
- [0463] SAPFSFLSNVKYNFMRI IKYEFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVNLEEKFSMSFVQGEESND SEQ ID NO :39
- [0464] DMGAYKSSKDDAKITVILRISKTLQYVTAQDEDQPVLLKEMPEIPKTITGSETNL
- [0465] LFFWETHGTKNYFTSVAHPNLFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYILENQA
- [0466] 实施例 6

[0467] 可通过使用接头序列和为每一个末端的选择新位置将分子的 N 末端连接至 C 末端来构建环状排列的 IL-1 嵌合结构域。对于具有来源于 IL-1 β 的末端的蛋白质,接头长度可为 5 至 10 个,例如约 7 个氨基酸。新末端的优选位置在背离受体的环,例如 $\beta 6-\beta 7$ 环(例如,对应于 SEQ ID NO :1 的 71-80 的氨基酸)或 $\beta 7-\beta 8$ 环(例如,对应于 SEQ ID NO :1 的 84-99 的氨基酸)中。

[0468] 这样的环状排列的 IL-1 嵌合结构域的实例包括:

[0469] DKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEINNKLFEESAQFPNWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYMQFVSSGGSGGGSAPVRSLNCRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVNLEEKFSMSFVQGEESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKD (SEQ ID NO :40);和

[0470] NYPKKKMEKRFVFNKIEINNKLFEESAQFPNWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYMQFVSSGGSGGGSAPVRSLNCRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVNLEEKFSMSFVQGEESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPK (SEQ ID NO :41)

[0471] 实施例 7. 在磷酸缓冲盐溶液 (PBS), pH7.4 中以 0.5mg / ml 的浓度制备蛋白质

P03、P04、P05、mIL-1Ra (甲硫氨酰 IL-1Ra) 和 IL-1 β 。将蛋白质以 1 : 500 的原液浓度的稀释度与 SYPRO 橙染料 (Invitrogen, CA) 组合, 随后将其经历差示扫描荧光测定法。参见, 例如, He 等人 (2010) J. Pharm. Sciences, 99:1707-1720。随着温度以每分钟 1°C 的速度从 25°C 升高至 95°C, 使用 Agilent Mx3005QPCR 仪监测荧光测量。解链温度 (T_m) 值从荧光跃迁的第一衍生物最大值推导而来。观察到蛋白 P03、P04 和 P05 具有高于 50°C 和高至 59°C 的解折叠发生, 和高于 59、60、62 和 64°C 的 T_m 。结果示于下面的表 8 和图 10A&10B 中:

[0472] 表 8

	蛋白质	T_m (°C)	解折叠发生(°C)
[0473]	mIL-1Ra	56	48
	IL-1 β	56	41
	P03	65	59
	P04	60	51
	P05	65	59

[0474] P04 具有比 mIL-1Ra 和 IL-1 β 高约 4°C 的 T_m , 并且显示比 mIL-1Ra 高约 3°C 和比 IL-1 β 高约 10°C 的解折叠发生。P03 和 P05 具有比 mIL-1Ra 和 IL-1 β 高约 9°C 的 T_m , 并且显示比 mIL-1Ra 高约 11°C 和比 IL-1 β 高约 18°C 的解折叠发生。

[0475] **实施例 8.** 在 1.25x PBS 中制备纯化的 P05 (缺乏六组氨酸标签), 在干眼病的鼠模型中进行测试。在该模型中, 在第 0 天对来自 Jackson 实验室的 6 至 10 周龄雌性 C57BL / 6 小鼠 (在具有 $\geq 30\%$ 相对湿度、水凝胶食品补充剂和 enVirodry 环境丰度的动物保温室中适应 1 至 2 周) 的荧光染色进行预筛选。对于荧光染色, 将以 10mg / mL 于 WFI H₂O 中稀释的新制备的荧光素以 0.4 μ L 给每只眼施用。施用后约 8-13 分钟, 使用 Olympus 荧光解剖显微镜对眼进行评分。对于 5 个其中角膜表面已分裂 (评分范围 0-15/眼) 的区域的每一个区域, 使用 0-3 的标准化国立眼科研究所 (NEI) 分级系统记录点状染色。通过使用教导桥, 两个隐蔽评分同时评价小鼠以为每一只眼提供单个集体评分。

[0476] 第 1 天将每只眼具有 ≤ 7 的评分 (其中 15 为最大评分) 的小鼠置于干眼室 (20% $\pm$ 2% 的湿度和 ~ 21 L/min/ 笼的恒定气流), 将其在实验过程中维持在该室中 (除检查外)。在第 3 天, 再次给小鼠评分, 将其随机化至处理组 (8 至 10 只小鼠 / 组) 中。将小鼠随机化, 以便具有 4 至 5 只小鼠的每一个笼具有大致相同的平均疾病评分。始于第 3 天和随机化后, 以 3 μ L/ 眼 BID 频率在滴眼剂中给小鼠局部施用 P05 或媒介物 (1.25X PBS)。在第 7、9 和 11 天检查小鼠并且如上所述对小鼠的角膜荧光染色进行评分。在实验过程中, 对于处理组评分是在盲测的情况下进行的。

[0477] 图 11A 是在下列每日两次的处理下来自两个相同实验的小鼠的第 0、3、7、9 和 11 天的平均角膜染色评分 $\pm$ SEM 的条线图: 无处理、媒介物 (1.25X PBS) 和 10mg/mL (1%) P05。10mg/mL P05 显著减少实验的第 7、9 和 11 天的角膜染色。对于低至 0.1mg/mL P05 的剂量, 亦观察到通过角膜染色的减少评价的效率。重组 IL-1Ra 也在动物模型中适度地减少角膜染色。

[0478] 如图 11B 中显示的, 基于与相同媒介物中的 10mg/mL 鼠血清白蛋白的比较, 10mg/mL P05 的效应是特异性。对于 10mg/mL 鼠血清白蛋白 (MSA) 相对于媒介物未看到效应,

10mg/ml P05 的效应相对于 10mg/ml 鼠血清白蛋白在统计上是显著的。如图 11C 中显示的, 还将 10mg/ml P05 与 0.05% 的眼用乳剂 (**Restasis®**) 中的环孢素相比较。尽管 P05 减少角膜染色, 但在约 1 周的每日 2 次给药后, 对于 0.05% 的环孢素眼用乳剂未观察到效应。

[0479] **实施例 9.** 捕获步骤已被开发来纯化通过在 BLR(DE3) 大肠杆菌细胞中发酵产生的 P05。通过统计设计在 1mL 柱子上进行的实验方法 (DOE) 来确定洗脱条件。在中等规模 (10mL 柱子) 上进行最优化的条件。

[0480] 通过在由 20mM Tris, pH7.0 和添加的 10mM EDTA 组成的裂解缓冲液中进行微流化来提取产物。将澄清的裂解物调整至 pH5.3 和 3mS/cm 的电导率。以 2min 的停留时间将条件裂解物加载至 **Poros® XS** (强阳离子交换树脂) 上, 至 25-30mg P05/mL 柱的容量。用平衡缓冲液洗涤柱子以除去未结合的种类。将在 pH6.0 和 3mS/cm 下进行的第二洗涤用于除去一组杂质。在 pH6.0 和 6.6mS/cm 下洗脱产物。在 pH6.0 和 12.4mS/cm 下洗脱产物相关种类。用高盐缓冲液和 NaOH 清洁柱子。

[0481] P05 是具有 6.58 的理论 pI 的 17kDa 蛋白质。des-ALA 种类的理论 pI 为 6.8。甲二磺酰化种类的理论 pI 为 6.3, 乙酰化种类的理论 pI 值小于 6.3。这三种亚型和 P05 蛋白可通过分析性弱阳离子交换层析来容易地分离。des-ALA 种类可能是在大肠杆菌中发现的氨肽酶 P 活性的产物。亚型可通过质谱法、肽谱和 HPLC 法来鉴定。

[0482] 层析材料。**Poros® XS** 基于具有标称 50um 粒度的交联的聚(苯乙烯-二乙烯苯)珠粒。层析基质具有磺丙基表面化学药品, 并且被设计来在结合过程中耐受升高的水平的盐。以散装泥浆的形式获得 **Poros® XS** (CN4404339, Life Technologies) 材料, 将其填充入具有 1mL 的终柱体积 (床高 5cm) 的 5×50mm Tricorn 柱 (CN28-4064-09, GE Healthcare) 或填充入 10×150mm Tricorn 柱 (CN28-4064-16, GE Healthcare) (填充至 10.5mL 的终体积 (床高 13.4cm))。

[0483] 缓冲液。按容量利用 MilliQ 水制备所有缓冲液。为了达到期望的 pH, 添加 10N HCl 或 1M NaOH (从 10M NaOH 的原液制备的) 以滴定缓冲液。在制备后, 将所有缓冲液通过 0.2mm PES 瓶顶过滤器来进行过滤。在室温 (~20-25°C) 下进行所有 pH 和电导率的测量。

[0484] **Poros® XS** 缓冲液: CEX 平衡缓冲液 - 通过每升缓冲液添加 0.57mL 的冰醋酸和 2.44g NaCl 制备的具有 21mM NaCl 的 10mM 醋酸 (HoAc)。终 pH 为 5.3 并且终电导率为 3mS/cm。

[0485] CEX 洗涤缓冲液 - 通过每升缓冲液添加 19.5g 的 MOPS 游离酸、1.5g 的 MOPS 钠盐和 1.28g NaCl 制备的具有 22mM NaCl 的 100mM MOPS。终 pH 为 5.7-6.6 (按需要) 并且终电导率为 3mS/cm。

[0486] CEX 洗脱缓冲液 - 通过每升缓冲液添加 19.5g 的 MOPS 游离酸、1.5g 的 MOPS 钠盐和 6.93g NaCl 制备的具有 118mM NaCl 的 100mM MOPS。终 pH 为 5.7-6.6 (按需要) 并且终电导率为 12.4mS/cm。

[0487] CEX 剥离缓冲液 - 通过每升缓冲液添加 0.57mL 的冰醋酸和 175g NaCl 制备的具有 3M NaCl 的 10mM 醋酸。终 pH 为 5.3 并且终电导率为 188mS/cm。

[0488] 裂解物制剂。使用 200mM 的 pH4.5 的醋酸 (通过混合 11.5mL 的冰醋酸 /L 的缓冲液制备的) 调整裂解物的 pH。使用 1M NaOH 将溶液滴定至终 pH4.5。使用该溶液以避免因

浓酸或强酸的低 pH 引起的局部沉淀。

[0489] 用于这些实验的加载材料是来自 2L 分批补料生物反应器运行的提取物。使用 20mM 的 pH7.0 的 Tris 和添加的 10mM EDTA 从细胞沉淀提取产物。利用 MilliQ 水（通常地 1:1-1.5 的稀释度）将新鲜提取物稀释至为 3mS/cm 的电导率。将稀释的提取物在 41mL 等分中于 -20℃ 冷冻。为了制备负载制剂，在室温下解冻等分，使用 pH4.5 的 200mM 醋酸将其滴定至 pH5.3。当在滴定后需要时，通过添加 MilliQ 水进行电导率的小调整。最后，使用 CEX 平衡缓冲剂将负载制剂稀释 2.5 倍至 ~1.7g/L 的浓度。将负载制剂通过 0.8/0.2μm 滤器进行无菌过滤。在制备的同一天使用条件负载制剂。

[0490] 宿主细胞蛋白质的测定。利用对于大肠杆菌表达系统是特异性的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (CN F410, Cygnus Technologies) 测定宿主细胞蛋白质 (HCP) 水平。完全一样地进行与试剂盒一起提供的方案。使用样品稀释剂 (CN I028, Cygnus Technologies) 以最小的 10 倍稀释度稀释待测定 HCP 水平的样品。通常以 2 个稀释度运行样品，对于每一个稀释度以一式二份将其涂板。HCP 的水平以百万分率 (ppm) 或 ng-HCP/mg-产物来表示。

[0491] SDS-PAGE 分析。对于利用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行的纯度分析，使用 1mm×10 孔、1mm×12 孔或 1mm×15 孔 NuPAGE4-12%BisTris 凝胶（分别地 CN NP0322Box 和 NP0323Box, Invitrogen）。电泳缓冲液为从 20× 浓度 (CN NP0002, Invitrogen) 制备的 1×MES SDS 电泳缓冲液。Novex sharp 预染的蛋白质标准 (CN57318, Invitrogen) 用作分子量指示器。通过用 MilliQ 水稀释至 30mL 的终体积制备用于分析的样品，将 10mL 的 4× 十二烷基硫酸锂 (LDS) (CN NP0008, Invitrogen) 添加至为 1× 的终浓度。通过涡旋 5 秒混合样品。基于从 A280/A320 测量计算的蛋白质浓度，加载每孔 3 μg 的靶。

[0492] wCEX。使用 Dionex ProPac® WCX-104x250mm 柱（产品编号 054993），使用 10mM 醋酸钠 pH5.5（缓冲液 A）和 10mM 醋酸钠 pH5.5, 250mM NaCl（缓冲液 B）的流动相溶液以 1.2mL/min 的流速通过弱阳离子交换层析 (wCEX) 评价 P05。在 20 分钟内进行从 10%B 至 25%B 的梯度。运行 10 分钟后，乙酰化种类最早洗脱出来。甲二磺酰化种类第二洗脱出来，随后在梯度的更后部分，完整 P05 在 des-Ala 种类之前约 1.5 至 2.5 分钟洗脱出来。

[0493] 阳离子交换捕获层析。在 AKTA Explorer100 层析系统上进行层析。填充 10mL Poros® XS 柱。将材料以 40mg P05/mL 加载或可以以 25-30mg P05/mL 加载。层析法概述于表 9 中。在加载和洗脱步骤过程中使停留时间恒定地保持在 2 分钟。制备模拟洗脱混合物，测定产物回收、HCP 水平和完整蛋白质的百分比。利用 pH6.0 的 30% 和 35% 的 %B 在 10mL 柱子上完成总共 2 个运行。

[0494] 表 9

[0495]	步骤	柱体积(CV)	缓冲液
	平衡	10	10 mM HoAC + 21 mM NaCl pH 5.3
	加载	40	条件裂解物, 3 mS/cm pH 5.3
	洗涤#1	5-10	10 mM HoAC + 21 mM NaCl pH 5.3
	洗涤#2	9-10	100 mM MOPS + 22 mM NaCl pH 6.0(3 mS/cm)
	洗脱#1	30	与30-35% 100 mM MOPS + 118 mM NaCl pH 6.0混合的100 mM MOPS + 22 mM NaCl pH 6.0(3 mS/cm)
	洗脱#2	6	100 mM MOPS + 118 mM NaCl pH 6.0
	剥离	5-6	10 mM HoAC + 3 M NaCl pH 5.3
	清洁	20	1 M NaOH
	中和(NaCl)	10	100 mM MOPS + 118 mM NaCl pH 6.0
	再平衡	20	10 mM HoAC + 21 mM NaCl pH 5.3

[0496] 洗涤 #2 导致主要由杂质组成的峰。利用 30% 和 35% 的 B 的洗脱 #1 导致超过 95% 的纯度的产物（通过 SDS-PAGE 分析）。洗涤 #2 的盐浓度可少量增加以除去洗脱峰上的肩。也参见图 13 至 16。终产物混合物回收率大于 50%, des-Ala 种类的回收率小于 10%, 并且洗脱物中 HCP 的浓度小于 600ppm HCP。

[0497] 在 2L 培养制剂中, 将 250mL Poros® XS 柱用于培养物层析, 使用 50mL PorosHQ 阴离子柱, 将 220mL CHA (羟基磷灰石柱) 用于进一步除去杂质。

[0498] 在 100L 培养制剂中, 将 6.25L PorosXS 柱用于捕获层析, 将 1L PorosHQ 柱用于阴离子层析, 将 30L CHA 羟基磷灰石柱用于进一步除去杂质。需要 3 个循环来处理整个 100L 的发酵罐。

[0499] 在 1000L 培养制剂中, 可将具有约 50L 至约 80L, 例如约 60L 或约 70L 的体积的 PorosXS 柱用于捕获层析; 可将具有约 5L 至约 20L, 例如约 10L 或约 15L 的体积的 PorosHQ 柱用于阴离子交换层析, 将具有约 250L 至约 500L, 例如约 300L 或约 400L 的体积的 CHA 羟基磷灰石柱用于进一步除去杂质。任选地, 更小的柱子可用于以几个批次处理大发酵罐。

[0500] 实施例 10. 纯化 P04, 在 20°C 于 25%PEG1500、0.1M PCB(pH4.0) 中生长衍射高质量晶体。蛋白质在空间群 P212121 中结晶, 常见晶胞尺度为 :a=44.5, b=46.4, c=64.8。晶体衍射成高分辨率, 在先进光子源, 光束线 LS-CAT21ID-F(Chicago IL, USA) 上收集扩展至 1.47 Å 的数据集组。使用整合来自 PDB 结构 1ITB 和 1IRA 的已知 IL-1β 和 IL-1Ra 结构的相关部分的模型, 通过分子置换来解析 P04 的 X 射线结构 (Vigers 等人, (1997) Nature386 :190-194 和 Schreuder 等人, (1997) Nature386 :194-200)。最终的模型被优化成 17.6%/20.4% 的 R_{work}/R_{free} 并且包含一个 P04 分子 (140 个残基) 和 98 个水分子 (表 10)。P04 个残基 1-2、48-49 和 85-93 在电子密度上是不可视的并且将在最终模型中消失。

[0501] 表 10

晶体学数据收集和优化的统计	
数据收集统计	
空间群	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
晶胞尺度	
a, b, c(Å)	44.5, 46.4, 64.8
α, β, γ(°)	90, 90, 90
波长(Å)	0.9787
[0502] 分辨率(Å)	50.0 – 1.47(1.52 – 1.47)
R _{merge}	0.039(0.56)
I/σI	37.7(2.9)
完备性(%)	99.8(100)
冗余度	6(5.9)
优化统计	
分辨率(Å)	
反射的编号	28.64 – 1.47(1.53 – 1.47)
R _{work} /R _{free}	22926
平均B(Å)	17.6/20.4
[0503] Rmsd键长(Å)	22.3
Rmsd键角(°)	0.0071.137

[0504] 刮弧中的数字对应于最高分辨率壳

$$[0505] R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} \left[\sum_i |I_i - \langle I \rangle| / \sum_i I_i \right]$$

[0506] $R_{\text{work}} = \sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|$, 其中 F_{obs} 和 F_{calc} 被观察到, 并且是计算的结构因子

[0507] 从未用于优化的一个亚组的反射 (5%) 计算 R_{free} 。

[0508] P04 晶体结构具有与通过建模预测的折叠相似的折叠。该结构的视图示于图 1 中。两个结构的重迭示于图 12A 中。对于 IL-1β 和 IL-1Ra 区段, 相对于各自亲代分子上的相同残基, 主链碳的 RMSD 为 1.41 Å 和 1.09 Å。P04 具有至少一个独特的盐桥和两个独特的氢键, 所述氢键参与来源于 IL-1β 的残基与来源于 IL-1Ra 的对应残基之间的相互作用: (i) Glu39-Lys64 (来自 IL-1Ra 的 Glu39; 来自 IL-1β 的 Lys64), 如图 12B 中显示的, (ii) Arg9-Gln149 (来自 IL-1Ra 的 Arg9; 来自 IL-1β 的 Gln149), 如图 12C 中显示的, 和 (iii) Ser152-Lys40 (来自 IL-1Ra 的 Ser152; 来自 IL-1β 的 Lys50), 如图 12C 中显示的。这些独特的相互作用可解释 P04 的增加的热稳定性, 因为这些相互作用在 IL-1β 和 IL-1Ra 结

构中是不存的。参与这些相互作用的残基也存在于 P03 和 P05 (同样地具有增加的热稳定性的蛋白质) 中。

[0509] 实施例 11. 为了进一步纯化从细胞培养物产生的蛋白质, 例如以帮助分离出产物相关种类, 例如 des-ALA、乙酰化和甲二磺酰化种类, 例如, 甲二磺酰化完整蛋白质, 可使用额外的纯化步骤。这样的纯化步骤可以例如使用陶瓷羟基磷灰石柱 (CHA), 将宿主细胞蛋白质 (HCP) 水平降至低于 50ppm。CHA I 型是基于电荷和 / 或钙离子协调分离生物分子的多峰层析介质。从 Bio-Rad Laboratories (CN732-4322) 获得具有 5mL 的柱体积和 40um 的粒度的预装柱。

[0510] 缓冲液制备。利用 MilliQ 水按体积制备所有缓冲液。所有缓冲液组分与提供商和目录信息概述于表 11 中。为了达到期望的 pH, 将 10N HCl 或 1N NaOH (从 10N NaOH 的原液制备的) 用于滴定缓冲液。制备后, 将所有缓冲液通过 0.2um PES 瓶顶过滤器单位来进行过滤。在室温 (~ 20-25°C) 下进行所有 pH 和电导率测量。

[0511] 表 11. 缓冲液组分信息 .

	化学药品	提供商	目录号
	10 N HCl	Fisher Scientific	SA49
	10 M NaOH	BDH/VWR	BDH3247-1
[0512]	NaCl	Fisher Scientific	S671-500
	磷酸二氢钾	Fisher Scientific	BP362-500
	磷酸氢二钾	Fisher Scientific	BP363-500
	冰醋酸	Fisher Scientific	
	乙醇(200酒精纯度(proof))	Decon Labs, Inc	2701

[0513] CHA 缓冲液制备

[0514] CHA 平衡和洗涤缓冲液 - 通过每升缓冲液添加 1.18g 的磷酸二氢钾、0.21g 的磷酸氢二钾和 0.79g NaCl 来制备具有 13.5mM NaCl 的 10mM 磷酸钾。终 pH 为 6.5 并且终电导率为 2.5mS/cm。

[0515] CHA 洗脱缓冲液 - 通过每升缓冲液添加 14.1g 的磷酸二氢钾、9.8g 的磷酸氢二钾来制备 160mM 磷酸钾。终 pH 为 6.5 并且终电导率为 ~ 18mS/cm。

[0516] CHA 测试条 / 条件缓冲液 - 通过每升缓冲液添加 19.2g 的磷酸二氢钾和 45.1g 的磷酸氢二钾来制备 400mM 磷酸钾。终 pH 为 6.8 并且终电导率为 ~ 52mS/cm。

[0517] 进料流制备。使用超滤 (10,000kDa Hydrosart membrane, Sartorius-Stedim) 将 AEX 流通液浓缩 5 倍。对这些实验不进行渗滤。浓缩后, 使用 10% 醋酸 (通过用 MilliQ 水将冰醋酸稀释 10 倍制备的) 调整 pH。使用 MilliQ 水调整电导率。

[0518] 进料流制备。从在 2L 分批补料生物反应器实验中发酵的大肠杆菌提取这些实验的负载制剂材料。使用 20mM 的 pH7.0 的 Tris (具有 0.1%TritonX) 和添加的 10mM EDTA 进行提取。利用 MilliQ 水 (通常地 1-1.5 倍的稀释度) 将新鲜提取物稀释至为 3mS/cm 的电导率, 将其滴定至 pH5.3 以用于通过 CEX 进行纯化。将稀释的提取物通过

0.8/0.2 μ m Sartopore® 2XLG 滤器 (CN5441307G4--00, Sartorius-Stedim) 进行无菌过滤。将裂解物加载至 Poros® XS 柱上, 收集约 12CV 的洗脱物。使用 2M Tris 碱将洗脱物滴定至 pH7.5, 使用 MilliQ 水将其稀释至 5mS/cm, 随后加载至 Poros® HQ 柱上。将 50mM Tris, 2M NaCl pH7.5 缓冲液用于 Poros® HQ 柱层析。如上所述将 Poros® HQ 流通液混合物浓缩 5 倍, 随后调整至 pH6.5 和 2.5mS/cm。

[0519] 通过 A280/A320 测量蛋白质浓度。通过使用分光光度计 (NanoDrop2000, Thermo Scientific), 扣除 320nm 处的基线来测量 280nm 处的吸光度。通过下列公式计算浓度:

$$[0520] \quad C = \frac{(A280 - A320)}{\epsilon l}$$

[0521] 其中 C 是以 mg/mL 表示的浓度, A280 和 A320 分别是 280 和 320nm 处的吸光度, ϵ 是蛋白质的消光系数 ($1\text{AU}\cdot\text{mL}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), l 是路径长度。在不进行稀释的情况下, 2mL 的等分经测量是纯净的。

[0522] 宿主细胞蛋白质的测定。利用对于大肠杆菌表达系统是特异性的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (CN F410, Cygnus Technologies) 测定宿主细胞蛋白质 (HCP) 水平。完全一样地进行与试剂盒一起提供方案。使用样品稀释剂 (CN I028, Cygnus Technologies) 稀释待测定 HCP 水平的样品。由于纯化的样品中 HCP 的水平较低, 因此 CHA 洗脱物经测定是纯净的。通常在单个稀释度上测定样品, 对于每一稀释度以一式两份将样品涂板。针对特定样品的常见稀释度概述于表 12 中。HCP 的水平以百万分率 (ppm) 或 ng-HCP/mg-P05 表示。

[0523] 表 12. 用于 HCP ELISA 的常用稀释度。

	样品	稀释因子
[0524]	CHA 负载制剂	10
	CHA 洗脱物	1

[0525] 弱阳离子交换层析 (wCEX)。使用设置至 5°C 的温度受控自动注射室和利用在 280nm 收集的数据的 PDA 检测器, 在 Agilent1260HPLC 或 BioInert 系统上进行分析性 wCEX 分析。流动相 A 是 pH5.5 的 10mM 醋酸钠。流动相 B 是 pH5.5 的添加有 250mM NaCl 的 10mM 醋酸钠。将约 10–50 μ g 的产物注射至 Dionex ProPac WCX-10 柱 (CN054993, Dionex Corporation) 上。以 1.2mL/min 的速度运行柱子。完整的 P05 在约 16min 洗脱出来。des-ALA 种类在约 18min 分钟洗脱出来, 甲二磺酰化种类在约 14min 洗脱出来, acP05 在约 9min 洗脱出来。

[0526] 大小排阻层析 (SEC)。使用设置至 5°C 的温度受控自动注射室和利用在 214nm 和 280nm 收集的数据的 PDA 检测器, 在 Agilent1200Bio-inert HPLC 系统上进行分析性 SEC 分析。流动相是从 10 $\times$ PBS 原液 (CN BP3994, Fisher) 的稀释制备的 1 $\times$ PBS。将约 10–50 μ g 的产物注射至 Zenix SEC-150 (CN213150-7820, Sepax) 上。以 1mL/min 的速度运行柱子。P05 单体在约 5.2min 洗脱出来。更高等级的分子量种类在 3.7–4.9min 洗脱出来。

[0527] CHA 柱的当前运行条件。注意: 由于用于发展的较小的柱体积 (5mL) 和相对大的层

析系统体积,可能在按比例放大过程中必需调整体积。CHA 柱的当前运行条件概述于表 13 中。以 2min 的停留时间 (2.5mL/min) 和在室温下进行所有步骤。靶向 15mg-P05/mL-柱的加载。在 2CV 级分中收集洗脱峰,在制备最终的洗脱混合物之前通过 A280/A320、wCEX、SEC 和 HCP ELISA 测定所述洗脱峰。

[0528] 表 13. 用于 CHA 的层析方法。

	步骤	柱体积(CV)	缓冲液
	柱条件化	10	400 mM磷酸钾, pH 6.8
	平衡	10	10 mM磷酸钾 + 13.5 mM NaCl, pH 6.5(2.5 mS/cm)
	加载		条件Poros®HQ FT, 2.5 mS/cm pH 6.5. 加载的~15 mg-P05/mL-柱
[0529]	洗涤	10	10 mM磷酸钾 + 13.5 mM NaCl, pH 6.5(2.5 mS/cm)
	洗脱	20	10-90%B线性梯度(B为160 mM 磷酸钾, pH 6.5)
	清洁	8	0.5 M NaOH
	柱条件化	10	400 mM磷酸钾, pH 6.8
	再平衡	10	10 mM磷酸钾 + 13.5 mM NaCl pH 6.5(2.5 mS/cm)

[0530] 陶瓷羟基磷灰石 (CHA) 层析的概述。CHA 层析的概述提供于表 14 中。使用 PorosXS (一种耐受盐的强阳离子交换树脂) 通过阳离子交换层析捕获产物。对 PorosXS 洗脱物进行条件化,以流通模式将其加至 PorosHQ 上。将产物收集在通过柱子的级分中。可通过超滤 / 渗滤或稀释 / 滴定将流通级分调整至 pH6.5 和 2.5mS/cm。随后将产物流加载至 CHA 柱上,利用来自 10-90%B 的 20CV 梯度进行洗脱。在梯度洗脱过程中,收集级分,通过 wCEX 进行分析,以在最终混合之前测定杂质和产物相关种类的水平。进一步发展将包括结合能力及其对分辨率的影响,以及负载制剂中产物相关种类的升高的水平对分辨率的影响的研究。还可评价更大规模的 CHA 柱 (~ 150mL) 以确保可扩展性。

[0531] 表 14. CHA 层析的概述

	%+ALA	%des-ALA	%+MET	产物回收率 (%)	单体 (%)	HCP (ppm)	HCP 的减少 (%)	洗脱体积 (CV)
[0532] 负载制剂	88	3.8	4.8	--	98.3	179	--	--
洗脱混合物 1	89	3.7	4.5	109	99.0	26	86	12
洗脱混合物 2	90	3.5	3.6	104	99.4	18	90	10
洗脱混合物 3	94	2.7	1.0	90	99.4	12	93	8

[0533] 实施例 12. 如下进行 100L 运行, 从而表达和纯化 P05。

[0534] (A) 按照实施例 9 在 100L 生物反应器中进行的发酵导致 4.45g/L x103.2L=459.2g 的 P05 蛋白产生。

[0535] (B) 通过 **Poros®** XS 阳离子交换柱 [Poros XS19.9cm 床 x20cm ID(6.25L)] 进行的 3 个循环, 随后进行的洗脱导致下列 P05 的捕获:

[0536] 第一循环: 97.8L x1.41g/L=137.9g

[0537] 第二循环: 105L x1.28g/L=134.4g

[0538] 第三循环: 102L x1.42g/L=144.8g

[0539] 总计 P05 负载制剂=417.1g(90.8%)

[0540] **Poros®** XS+ 洗脱混合物的 3 个循环: 187.5L x1.82g/L=341.2g P05

[0541] **Poros®** XS%P05 回收率=(341.2/417.1)x100=81.8%

[0542] (C) 通过 **Poros®** HQ 阴离子交换柱 [Poros HQ13.0cm 床 x10cm ID(1.02L)] 进行的 2 个循环; 随后进行 **Poros®** HQ Flowthrough 和 **Poros®** HQ 的两个额外循环导致下列 P05 的捕获:

[0543] 第一循环: 210L x0.725g/L=152.5g

[0544] 第二循环: 200L x0.725g/L=145.0g; 总的 P05 负载制剂=297.5g

[0545] **Poros®** HQ Flowthrough

[0546] 第一循环: 210L x0.713g/L=149.7g

[0547] 第二循环: 200L x0.71g/L=142.0g; 总的 P05 负载制剂=291.7g

[0548] **Poros®** HQ%P05 回收率=(291.7/297.5)x100=98.1%

[0549] (D) 羟基磷灰石 (CHA) 柱 [羟基磷灰石 1 型 40 μm 19.2cm 床 x44.6cm ID(30.0L)] 负载制剂和洗脱导致下列 P05 的捕获:

[0550] 负载制剂 1: 460L x0.33g/L=151.8g

[0551] 负载制剂 2: 420L x0.32g/L=134.4g; 总的 P05 负载制剂=286.2g

[0552] 洗脱混合物: 285L x0.95g/L=270.75g

[0553] 羟基磷灰石 %P05 回收率=(270.75/286.2)x100=94.6%

[0554] (E) 洗脱的 P05 的超滤 / 渗滤导致下列 P05 的捕获:

[0555] 负载制剂 285L x0.95g/L=270.75g

[0556] 渗余物: 3.96L x65.3g/L=258.6g 回收率=(258.6/270.75)x100=95.5%

[0557] 超滤 / 渗滤缓冲液是 pH 为 6.5 的 10mM 磷酸钠和 5% 山梨醇。

[0558] (F) 使用 10% Lutrol 的缓冲液 ; 和 10mM 磷酸钠、5% 山梨醇以及 0.1% Lutrol, pH6.5 进行递送。

[0559] 终产物混合回收率大于 70%, 洗脱物中 des-Ala 种类少于 10%, HCP 少于 50ppm。

[0560] 实施例 13.

[0561] P05 的分批补料发酵法。 在具有 Biostat A+ 控制器和 1.6L 工作体积的 Sartorius 2L Univessel 生物反应器中进行分批补料培养。将生物反应器在 121°C 高压灭菌 60 分钟, 高压灭菌后使用无菌瓶和管道焊接器添加分批培养基。

[0562] 分批培养基由具有非动物大豆胨 (Teknova) 的 Terrific 液体培养基 (补充有 10g/L 葡萄糖和 2mM 硫酸镁) 组成。使用 0.2 μ m PES 膜过滤器将该溶液过滤。通过在生物安全柜中将成等分的无菌浓缩原液添加至过滤的 Terrific 液体培养基来获得补充剂的终浓度 : 0.08g/L 止泡剂 204 (Sigma)、0.1mM EDTA (Caliber)、50mg/L 硫酸卡那霉素 (Teknova) 和 1mL/L 微量元素溶液 (1000X 微量元素, Teknova)。微量元素溶液包含 50mM 氯化铁、20mM 氯化钙、10mM 氯化锰、10mM 氯化锌、2mM 氯化钴、2mM 氯化铜、2mM 氯化镍、2mM 钼酸钠、2mM 亚硒酸钠和 2mM 硼酸。

[0563] 在 37°C 和 pH7.0 $\pm$ 0.05 下进行分批补料培养。使用上限 85% 的磷酸 (Amresco) 和下限 28% 的氢氧化铵 (Ricca) 调整 pH。利用止泡剂 204 溶液 (Sigma) 控制泡沫。将气流和初始搅拌速率分别设置在 1.25v/v/m 和 200rpm。使用达 800rpm 的高落搅拌和富氧鼓风以 30% 的饱和度控制溶解氧张力。

[0564] 一旦初始葡萄糖水平 (10g/L) 被耗尽并且观察到 pH 和溶解氧的快速增加, 开始进料。进料培养基由具有非动物大豆胨 (Teknova) 的 Terrific 液体培养基 (补充有 400g/L 葡萄糖 (Sigma) 和 30mM 硫酸镁 (Sigma)) 组成。初始进料速度为约 0.6mL/min。(9g 葡萄糖 /L/ 小时)。诱导培养物后 4 小时, 将进料速度降至约 0.4mL/min (6g 葡萄糖 /L/ 小时) 以避免葡萄糖积累。

[0565] 一旦达到为 35 - 40 的 OD₆₀₀, 通过注射器用 1mM 异丙基 B-D-1- 半乳糖硫吡喃糖苷 (IPTG, Applied Biosystems) 诱导培养物。在 6 小时的诱导后, 收获培养物。

[0566] 每小时对培养物采样以测定下列参数 : 离线 pH (Orion 4Star pH 计, Thermo Scientific)、OD₆₀₀ (Ultrospec 2100Pro, Amersham Biosciences)、葡萄糖和乳酸盐浓度 (YSI 7100, YSI Life Sciences)、产物浓度 (浓度使用 SDS-PAGE 凝胶的光密度测定法), 10mL 样品 (用于分析性 wCEX) 和 1mL 样品 (用于细胞湿重和干重量)。对于细胞湿重和干重样品, 将 1mL 的培养物在预称重的微量离心管中以 14,000g 旋转 2 分钟以进行沉淀 (MiniSpin Plus centrifuge, Eppendorf)。弃去上清液, 将沉淀在 1mL 1.25X 磷酸缓冲盐溶液 (PBS, Calbiochem) 中洗涤 2 次。随后将沉淀和管称重, 测定细胞湿重。随后将管在 65°C 干燥至少 48 小时。再次对沉淀和管称重, 测定细胞干重。

[0567] 在摇瓶实验中生长和表达表达不同 IL-1 β / IL-1Ra 杂交体的细菌菌株。对于最优化生长条件, 所有 5 个菌株都显示相似的生产率。在基于细胞的活性测定中, P05 以 12pM 的对 IL-1R1 受体的 K_d 显示最大活性, 比仅次于其的杂交分子强一个数量级 (参见表 15)。虽然 P01 和 P02 分子也显示良好的活性, 但发现它们是不溶性的并且在提取后存在于包涵体中。P03 至 P05 产物存在于可溶性级分中。由于这 3 种杂交分子的增强的生产容易性, 集

中对 P03 至 P05 进行初始稳定性研究。

[0568] 表 15 :不同杂交分子的活性和稳定性的比较

[0569]

杂交分子	Kd (pM)	T _m (°C)
P01	470	
P02	640	
P03	290	65
P04	1700	60
P05	12	65
IL-1 β	2000	56
IL-1Ra	330	

[0570] 使用定量 PCR 仪 (Agilent) 通过差示扫描荧光测定法测定这 3 种可溶性杂交分子的解链温度, 将其示于表 15 中。所有 3 种杂交分子具有高于 IL-1Ra 的解链温度, 但 P03 和 P04 具有 65°C 的最高解链温度。

[0571] 通过发酵法的发展进行的产物相关种类的减少。为了测定碳源对 P05 蛋白质量的影响, 进行一式两份 2L 分批补料实验。在每一个实验中, 一个反应器包含 10g/L 的基础培养基中的葡萄糖和 400g/L 的上述进料培养中的葡萄糖, 并且一个反应器包含 10g/L 的基础培养基中的甘油 (Fisher Scientific) 和 400g/L 的进料培养基中的甘油。虽然两个反应器之间的细胞生长的差异不显著 (参见表 16), 但含甘油的发酵物产生比含葡萄糖的发酵物更少的 P05 (5.4g/L, 而非 7.0g/L)。使用甘油产生的材料包含更大百分比的乙酰化种类 (14.7% 的总蛋白质, 而非对照反应器中的 8.9%), 以及更大百分比的 des-Ala 种类 (17.3% 的总蛋白质, 而非对照反应器中的 13.4%)。由于还观察到含甘油发酵物使用增加的氧气的事实, 因此假设这些培养物中产物的增加的乙酰化可由缺氧或一些其它应激条件引起。从而确认葡萄糖为用于 P05 发酵的优良碳源。

[0572] 高温、微碱性环境 (pH7.5 - 9) 和 Mn^{2+} (作为催化剂) 的存在全都增加氨肽酶 -P 的酶促活性。进行几个实验来研究使用对于氨肽酶 -P 活性不太有利的培养条件的益处。在 32°C 进行摇瓶实验, 但观察到相较于对照培养瓶生产率的显著减小。该特征, 除了技术转移和按比例放大中增加的处理时间和添加的复杂性以外, 还使得该方法能够改善不期望的 P05 蛋白质质量。

[0573] 通过发酵法的发展进行的产物相关种类的减少。为了测定培养 pH 对 P05 蛋白质量的影响, 在 pH6.8 $\pm$ 0.05 进行 2L 分批补料发酵。虽然 des-Ala 种类的百分比在控制在 pH6.8 的发酵物中更低 (6.9% 的总蛋白质, 而非对照反应器中的 13.4%), 但在更低 pH 的细胞生长和生产率在对照发酵物显著更低 (参见表 16)。大于 40% 的生产率的损失使得该方法能够改善不期望的 P05 蛋白质量。

[0574] 收获、提取和澄清。收获后,将培养物分成 5 个相等的 300 - 320mL 的体积,以 6000g(具有 GS-3 转子的 Sorvall RC5C Plus 离心机, Dupont) 在 4℃ 旋转 20 分钟。如果不立即提取,则将冷冻的沉淀于 -80℃ 冷冻。为了提取产物,将沉淀重悬浮于由 20mM Tris 碱 (Fisher)、0.1% Triton X-100 (Fisher) 和 10mM EDTA (Caliber), pH7.0 组成的裂解缓冲液。随后将细胞沉淀以 18,000psi 通过微射流机 (M-110P microfluidizer, Microfluidics) 3 次。随后将溶液在 4℃ 以 6000g 离心 20 分钟。如果不立即澄清,则将提取物于 -20℃ 冷冻。

[0575] 表 16 :通过不同 2L 分批补料发酵产生的材料的生长、生产率和蛋白质质量数据

策略	终OD ₆₀₀	DCW	生产率	完整 %	Des-Ala%	乙酰化 %	甲二磺酰化 %
对照	140	28 g/L	7.0 g/L	75.1 %	13.4 %	8.9 %	2.6 %
甘油	130	24 g/L	5.4 g/L	~ 65 %	17.3 %	14.7 %	N/A
pH 6.8	115	25 g/L	4.0 g/L	81.6 %	6.9 %	8.9 %	2.6 %
-MnCl ₂	105	N/A	4.5 g/L	77.2 %	4.8 %	10.2 %	7.8 %
[0576] 0.1mM EDTA	150	29 g/L	8.0 g/L	73.8 %	9.3 %	10.8 %	6.1 %
0.2mM EDTA	145	27 g/L	6.7 g/L	71.9 %	8.5 %	13.6 %	6.0 %
0.4mM EDTA	150	27 g/L	8.7 g/L	73.5 %	6.7 %	13.8 %	6.0 %

[0577] 具体地配制不包含氯化锰的微量元素溶液 (1000X 微量元素 - MnCl₂, Teknova)。在 2L 分批补料发酵中评价该溶液的使用。如在利用更低 pH 的实验中看到的,通过除去氯化锰来负面地影响细胞生长和生产率 (参见表 16)。虽然 des-Ala 种类的百分比下降 (4.8% 的总蛋白质,而非对照反应器中的 13.4%),但乙酰化和甲二磺酰化种类的百分比分别增加超过 1% 和 5%。为了减小所有基于金属的酶促活性,研究在基础培养基中使用 EDTA 的情况。进行研究在基础培养基中使用 0 - 0.8mM EDTA 的摇瓶实验。增加 EDTA 的基线浓度对生长没有负面影响。终 OD₆₀₀ 值增加。观察到生产率略微减小,但完整产生种类的相对百分比显著增加 (参见表 17)。例如,0.4mM EDTA 至基础培养基的添加使 des-Ala 种类的相对百分比从 6.3% 降至 2.5%。

[0578] 表 17 :通过包含不同浓度的 EDTA 的摇瓶产生的材料的生长、生产率和蛋白质质量数据。

[0579]

EDTA 浓度	终 OD ₆₀₀	生产率	完整 %	Des-Ala%
0mM	11.3	0.78g/L	93.7%	6.3%
0.05mM	11.7	0.73g/L	96.2%	3.8%

0. 2mM	12. 4	0. 71g/L	97. 1%	2. 9%
0. 4mM	12. 5	0. 71g/L	97. 5%	2. 5%
0. 8mM	12. 7	0. 71g/L	97. 1%	2. 9%

[0580] 基于这些小规模实验,在 2L 分批补料发酵中测试 0. 1mM、0. 2mM 和 0. 4mM 的 EDTA 浓度。如在摇瓶研究中看到的,含 EDTA 发酵物生长至略微更高的终 OD₆₀₀ 值(参见表 16)。生产率得以维持或略微提高。含 0. 1mM EDTA 的培养物例如生长至 150 的终 OD₆₀₀, 29g/L 的细胞干重和产生 8g/L 的 P05(分别相较于对照培养物的 1400OD₆₀₀, 28g/L, 和 7g/L)。虽然产生的 des-Ala 种类的百分比随 EDTA 的浓度增加而下降,但乙酰化种类的百分比增加。甲二磺酰化种类的百分比在所有含 EDTA 的发酵物也更大(6. 0 - 6. 1%,相较于对照培养物的 2. 6%)。0. 1mM EDTA 的条件被确定为减少不期望的产物相关种类的最有效的发酵策略。虽然乙酰化和甲二磺酰化种类的百分比大于对照培养物中的所述百分比,但 0. 1mM EDTA 至基础培养基的添加有效地减少 des-Ala 种类,而对生长和按比例放大考虑几乎无影响,同时增加总体生产率。

[0581] 发酵法的按比例放大。将内部开发的分批补料发酵法技术转移至 CMO(FujiFilm Diosynth Biotechnologies, Billingham, UK)。在具有 DCU2 控制器和 3L 工作体积的 5L B. Braun Biostat ED 生物反应器中进行技术转移分批补料发酵。随后将内部 GMP- 适应的 Terrific 液体培养基和微量元素溶液用于将来的发酵,发现其在性能上等同于研究培养基制剂。在具有 DCU-3 控制器,使用 100L 的工作体积的 100L B. Braun D 生物反应器中进行终 100L 级的方法。

[0582] 在进行柱层析后从 2L 和 100L 反应物进行的蛋白质回收分别描述于实施例 14 和 15 中。层析步骤包括使用捕获 P05 蛋白的 PorosXS 阳离子交换柱、阴离子交换柱和进一步从 P05 制剂纯化杂质的陶瓷羟基磷灰石 (CHA) 柱。

[0583] 对于 PorosXS 捕获步骤,通过将来自 100L 发酵物的负载大肠杆菌裂解物的 pH/ 电导率调整至 pH5. 3,随后以 15, 000xg 离心 30 分钟来进行负载制剂的制备。离心后,在 30 英寸 0. 8/0. 45 μ m 过滤器上,随后在 30 英寸 0. 45/0. 2 μ m 过滤器上分批过滤过程流。其它方法开发努力已研究了负载制剂制备过程中在 5. 3-5. 9 的 pH 范围内的调整。当加载至 40mg- 蛋白质 /mL- 树脂时,捕获柱的产物容量未受影响。P05 的乙酰化和甲二磺酰化形式的减少随负载制剂的 pH 增加而增大。des-Ala 的析出随着 pH 增加而减少,但仍然在可接受的水平上。

[0584] 如下开发用于陶瓷羟基磷灰石 (CHA) 柱的洗脱条件。洗脱条件包括 20CV 梯度,使得必需在随后下游过程中处理大体积,即超滤和渗滤。调查各种参数以在产物回收、低洗脱体积和产物种类的析出方面最优化 CHA 柱的洗脱。改进的梯度 / 步骤组合被开发来减少 CHA I 型柱的洗脱体积。简而言之,进行从 10mM 磷酸盐至 32-64mM 磷酸盐的 5CV 梯度,随后进行至 160mM 磷酸盐的阶梯。在 5CV 梯度过程中,富集洗脱级分的 P05 的甲二磺酰化和 des-Ala 形式。按照期望的产物特征谱(即 <1% 的甲二磺酰化, <4% 的 des-ALA) 富集在至 160mM 磷酸盐的阶梯过程中获得的洗脱混合物的 P05。进行完全因子试验来描述该过程的运行窗口。研究 6. 2 至 6. 8 的 pH 值和上文中指出的 5CV 梯度过程的磷酸盐浓度的范围。在产物相关

种类减少、过程相关杂质减少 (HCP) 和产物回收方面在该窗口内观察到强劲的运行。将该窗口内的最佳条件按比例变成 12mL 柱来显示~ 2 倍的按比例放大。此外,在最佳条件下研究利用升高的水平的 P05 的 des-ALA 和甲二磺酰化形式的攻击负载制剂。洗脱特征谱表现相似。

[0585] 实施例 14. 如上文中实施例 13 中所述,进行 2 个 2L 培养反应以表达和纯化 P05。

[0586] 结果如下

[0587] (A) 按照实施例 13 的 2L 生物反应器中的发酵导致以下列百分比存在的蛋白质的收获:

[0588]

	第一运行	第二运行
P05:	70.7%	75.4%
Des-ALA:	15.4%	10.3%
甲二磺酰化的:	2.27%	2.55%
乙酰化的:	9.49%	10.0%
HCP:	30363 ppm	26676 ppm

[0589] (B) 通过 Poros® XS 阳离子交换柱 [235mL 的体积],随后通过洗脱从收获的蛋白质捕获 P05,这导致以下列百分比存在的蛋白质收集:

[0590]

	第一运行	第二运行
P05:	91.7% (75.7%的回收率)	94.2%(76.3%的回收率)
Des-ALA:	5.18%(66.4%的减少)	4.28%(58.4%的减少)
甲二磺酰化的:	1.87%(17.6%的减少)	1.10%(57.1%的减少)
乙酰化的:	0.0%(99.99%的减少)	0.0%(99.99%的减少)
HCP:	188 ppm(99.4%的减少)	95.5 ppm(99.6%的减少)

[0591] (C) 通过 Poros® HQ 阴离子交换柱 [50mL 的体积] 处理来自 PorosXS 收集的蛋白质,这产生以下列百分比存在的蛋白质:

[0592]

	第一运行	第二运行
P05:	91.7%(92.9%的回收率)	94.2%(92.9%的回收率)
Des-ALA:	5.37%	4.28%
甲二磺酰化的:	2.09%	1.10%
乙酰化的:	0.0%	0.0%
HCP:	40.5 ppm(78.5%的减少)	30.8 ppm(67.7%的减少)

[0593] 注意：阴离子交换柱的主要目的是除去 DNA、内毒素和 HCP（宿主细胞蛋白质）。

[0594] (D) 通过羟基磷灰石 (CHA) 柱 [羟基磷灰石 1 型, 体积 220mL] 处理来自 Poros HQ 收集的蛋白质, 这产生以下列浓度存在的蛋白质:

[0595]

	第一运行	第二运行
P05:	94.9%(87.2%的回收率)	95.8%(88.4%的回收率)
Des-ALA:	3.84%(28.5%的减少)	3.42%(21.2%的减少)
甲二磺酰化的:	0.37%(82.1%的减少)	0.52%(52.1%的减少)
乙酰化的:	0.0%	0.0%
HCP:	3.9 ppm(90.5%的减少)	2.5 ppm(92.0%的减少)

[0596]

[0597] (E) 将来自 CHA 柱的蛋白质经历超滤 / 渗滤, 这产生以下列浓度存在的蛋白质:

[0598]

	第一运行	第二运行
P05:	94%(97.7%的回收率)	94%(97.7%的回收率)
Des-ALA:	4.27%	4.27%
甲二磺酰化的:	0.82%	0.82%
乙酰化的:	0.0%	0.0%
HCP:	0.7 ppm(81.8%的减少)	0.7(71.7%的减少)

[0599] 注意: 超滤 / 渗滤步骤的主要目的是交换缓冲液和浓缩蛋白质:

[0600] 第一运行 第二运行

[0601] 在步骤 (A) 至 (E) 后

[0602] 总的 P05 回收率: 60% 63%

[0603] 实施例 15.

[0604] 如上文中实施例 13 中所述进行 2 个 100L 的运行以表达和纯化 P05。在 R&D (研究和开发) 条件下进行第一运行, 和在 GMP (质生产规范) 条件下进行第二运行。

[0605] 结果如下

[0606] (A) 按照实施例 13 的 100L 生物反应器中的发酵导致以如下百分比存在的蛋白质的收获: :

[0607]

	第一运行	第二运行
P05:	65.7%	55.8%
Des-ALA:	8.83%	12.5%
甲二磺酰化的:	6.12%	4.72%
乙酰化的:	11.5%	14.6%

[0608] (B) 通过Poros® XS 阳离子交换柱 [6. 25L 的体积], 随后通过洗脱从收获的蛋白质捕获 P05, 这导致以下列百分比存在的蛋白质收集: :

[0609]

	第一运行	第二运行
P05:	90.25%(73%的回收率)	93.15%(64%的回收率)
Des-ALA:	6.95%(21.3%的减少)	4.79%(61.7%的减少)
甲二磺酰化的:	1.96%(67.9%的减少)	1.36%(71.2%的减少)
乙酰化的:	0.02%(99.8%的减少)	0.02%(99.9%的减少)

[0610]

[0611] (C) 通过 Poros® HQ 阴离子交换柱 [1L 的体积] 处理来自 PorosXS 收集的蛋白质, 这产生以下列百分比存在的蛋白质:

[0612]

	第一运行	第二运行
P05:	91.225%(98%的回收率)	ND(91%的回收率)
Des-ALA:	5.62%	ND
甲二磺酰化的:	2.55%	ND
乙酰化的:	0.0%	ND

[0613] (D) 通过羟基磷灰石 (CHA) 柱 [羟基磷灰石 1 型, 体积 30L] 处理来自 PorosHQ 收集的蛋白质, 这产生以下列百分比存在的蛋白质混合物:

[0614]

	第一运行	第二运行
P05:	94.9%(91%的回收率)	96.18%(89%的回收率)
Des-ALA:	3.82%(32%的减少)	3.41%(50.4%的减少)
甲二磺酰化的:	0.51%(80%的减少)	0.10%
乙酰化的:	0.01%	0.0%

[0615] (E) 将来自 CHA 柱的蛋白质经历超滤 / 渗滤, 这产生以下列百分比存在的蛋白质:

[0616]

	第一运行	第二运行
P05:	94.1%(100%的回收率)	ND(104%的回收率)
Des-ALA:	4.15%	ND
甲二磺酰化的:	1.13%	ND
乙酰化的:	0.0%	ND
[0617]	注意:超滤 / 渗滤步骤的主要目的是交换缓冲液和浓缩蛋白质。	
[0618]	第一运行	第二运行
[0619]	在步骤 (A) 至 (E) 后	
[0620]	总的 P05 回收率:	65% 54%
[0621]	其它实施方案在下列权利要求的范围内。	

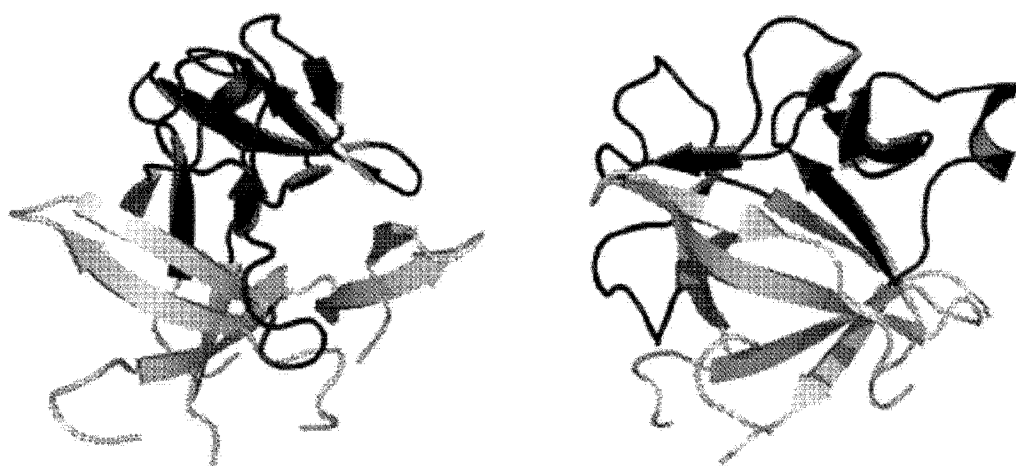


图 1

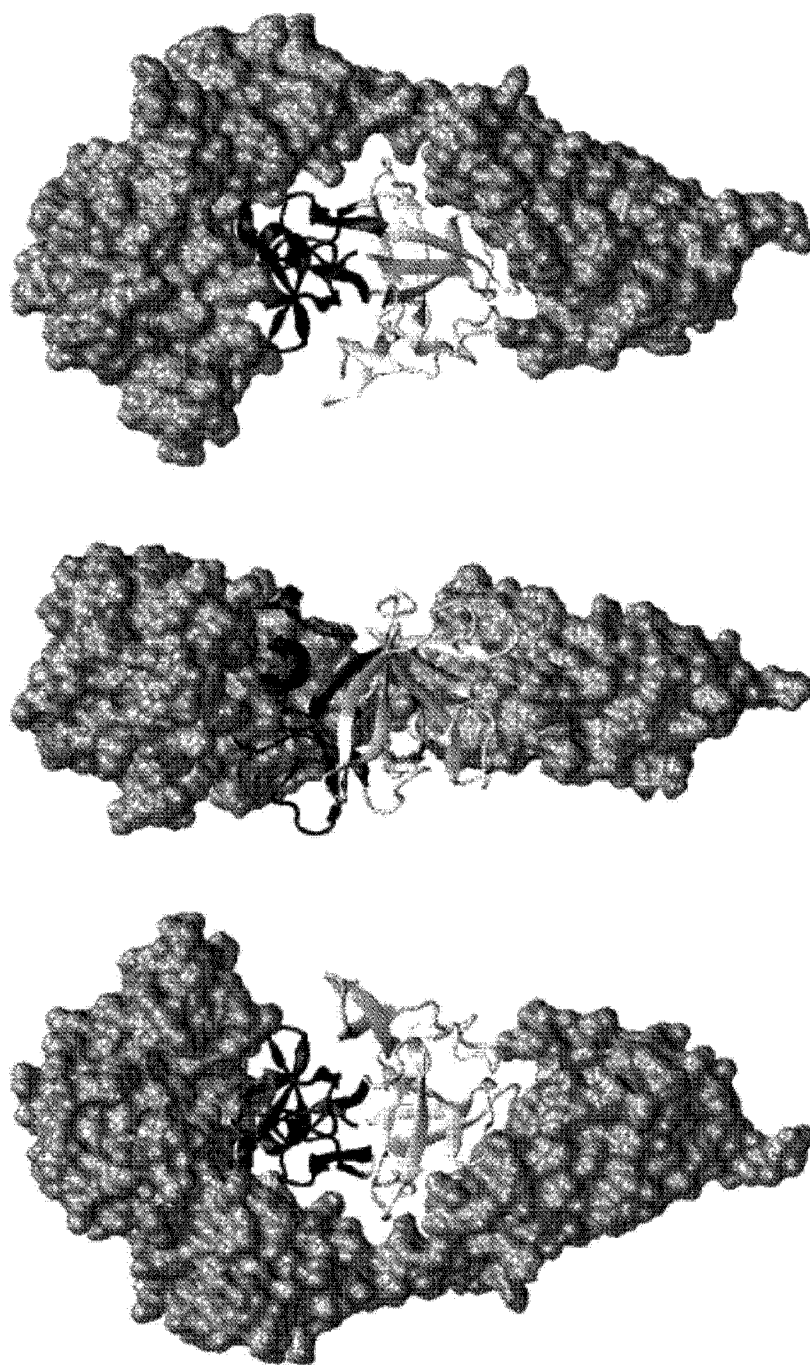


图 2

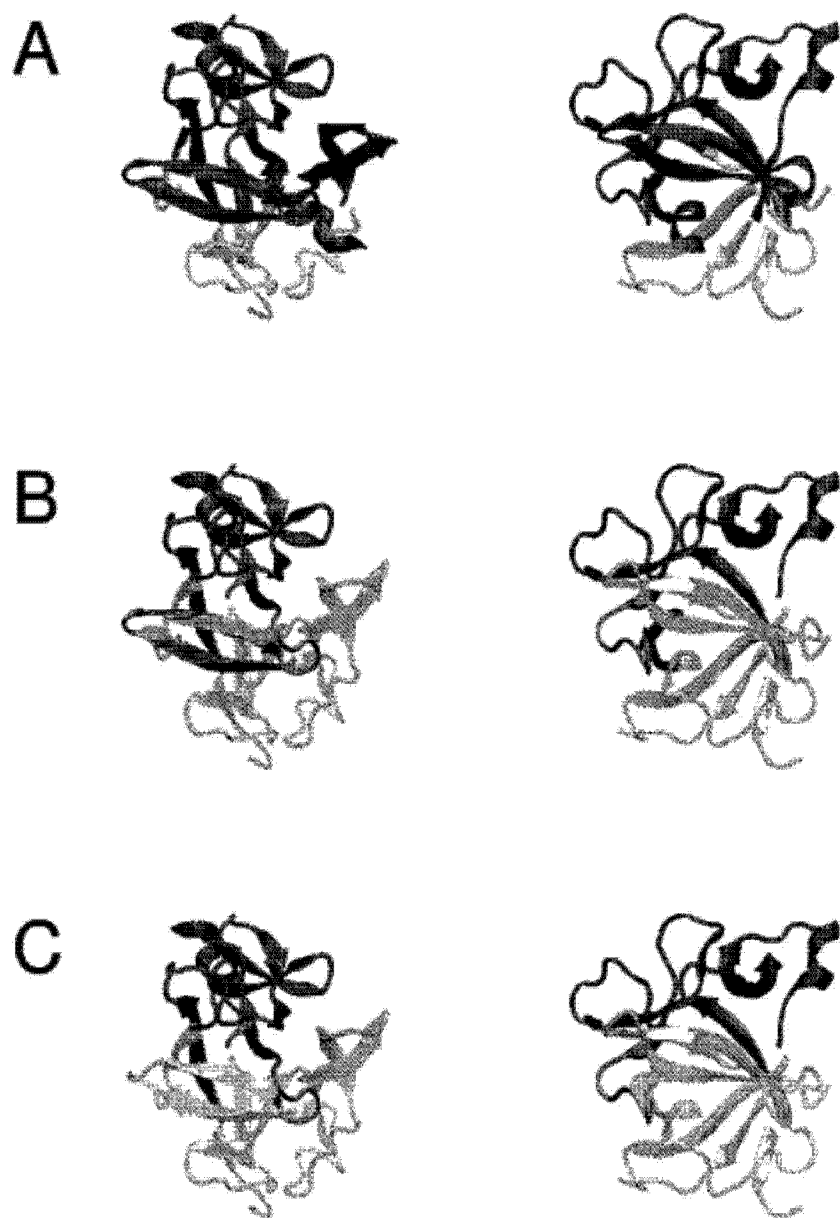


图 3

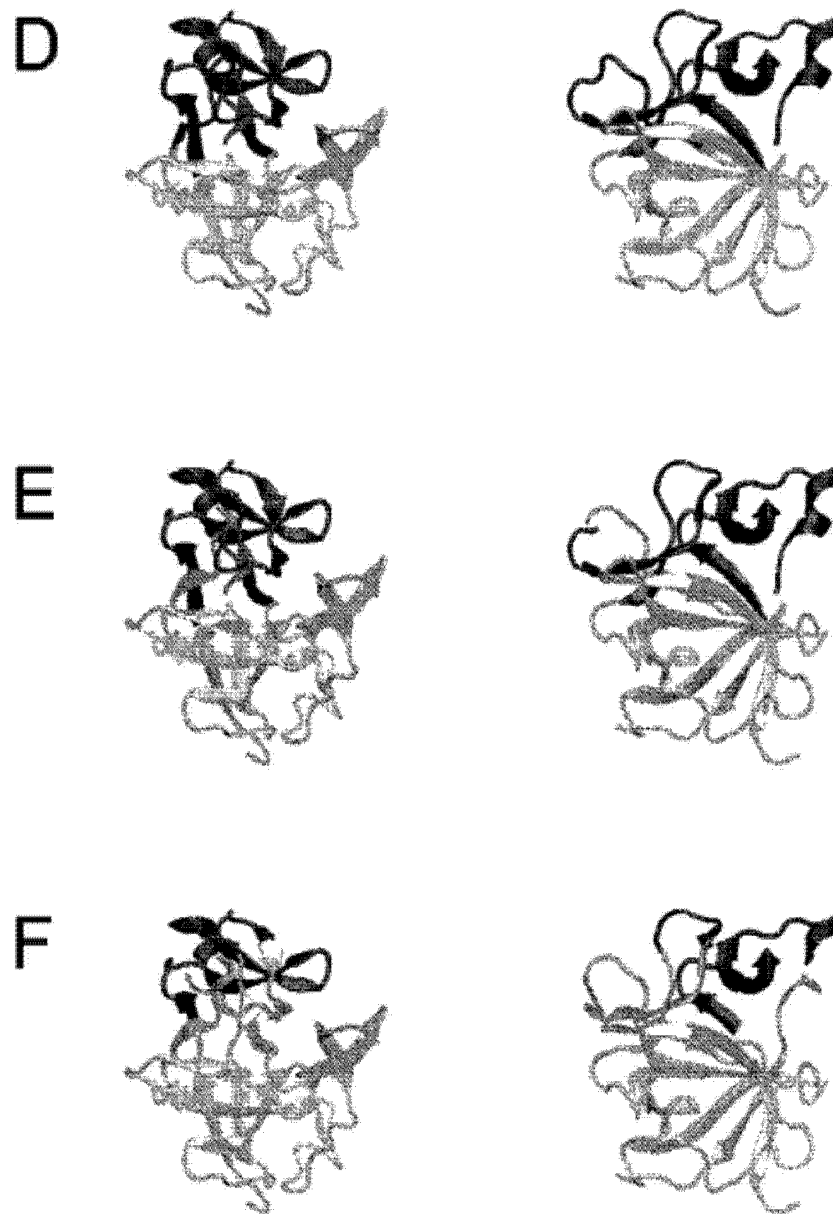


图 3



APVRSLAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQ
GPNVNLEEKIDV**SFVQGEESNDKIPVALGIHG**
GKMCLSCVKSGDETRLQLEAV**DPKNYPKKKM**
DKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTAME
ADQPVSLTNMPDEGVMVTKFY**MQFVSS**
(SEQ ID NO:17)

图 5A:P01

APVRSLAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQ
GPNVNLEEKIDV**SFVQGEESNDKIPVALGIHG**
GKMCLSCVKSGDETRLQLEAV**DPKNYPKKKM**
EKRFVFNKIEINNKL**SFESAACPGWFLCTAME**
ADQPVSLTNMPDEGVMVTKFY**MQFVSS**
(SEQ ID NO:18)

图 5B:P02

APVRSLAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQ
GPNVNLEEK**FSMSFVQGEESNDKIPVALGLKE**
KNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKM
EKRFVFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTAME
ADQPVSLTNMPDEGVMVTK**FTMQFVSS**
(SEQ ID NO:19)

图 5C:P03

APVRSLAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQ**GPNVNLEE**
KFSMSFVQGEESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTL
QLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEINNKL**EFESAACPG**
WFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTK**FTMQFVSS**
(SEQ ID NO:20)

图 5D:P04

APVRSLNCRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPNVNLE
EK**F**S**M**S**F**VQ**G**EESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPT
LQ**L**ESVDPKNYP**K**KK**M**EKR**F**VFNKIEINN**K**LEFESAQFPN
WFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFY**M**Q**F**VSS
(SEQ ID NO:21)

图 5E:P05

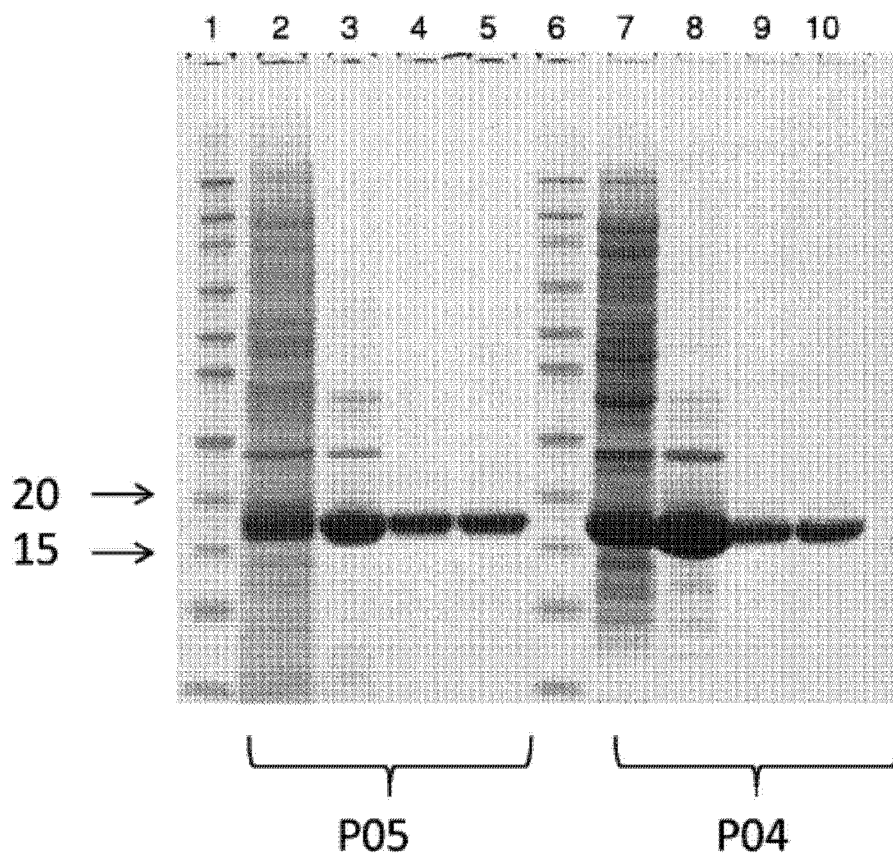


图 6

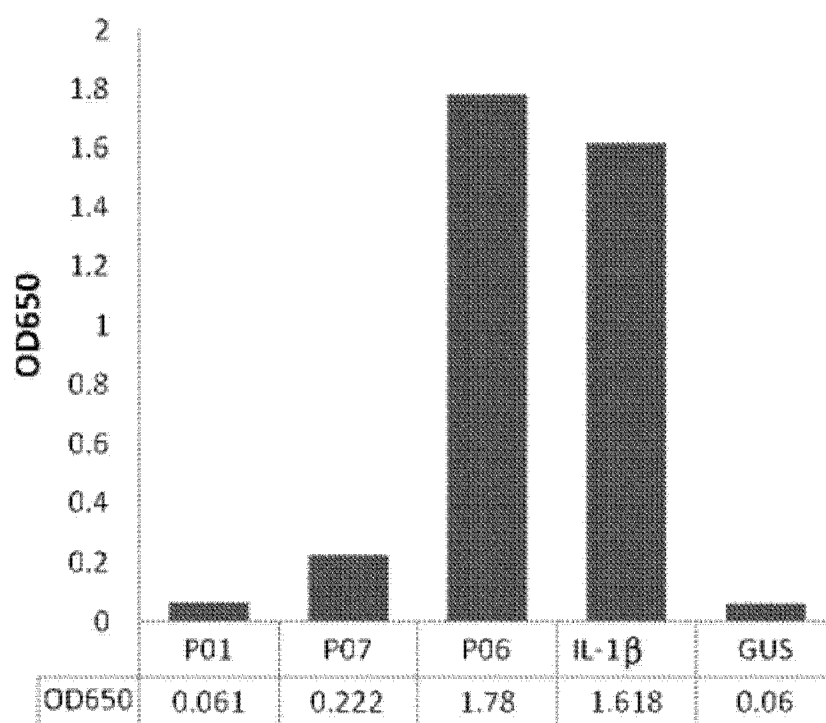


图 7A

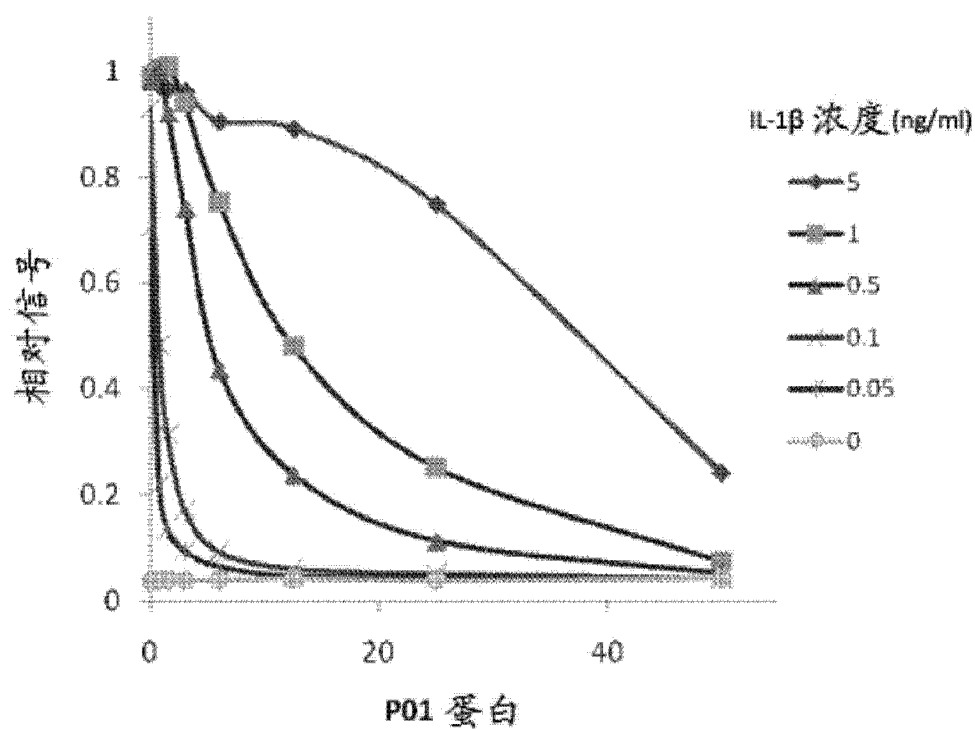
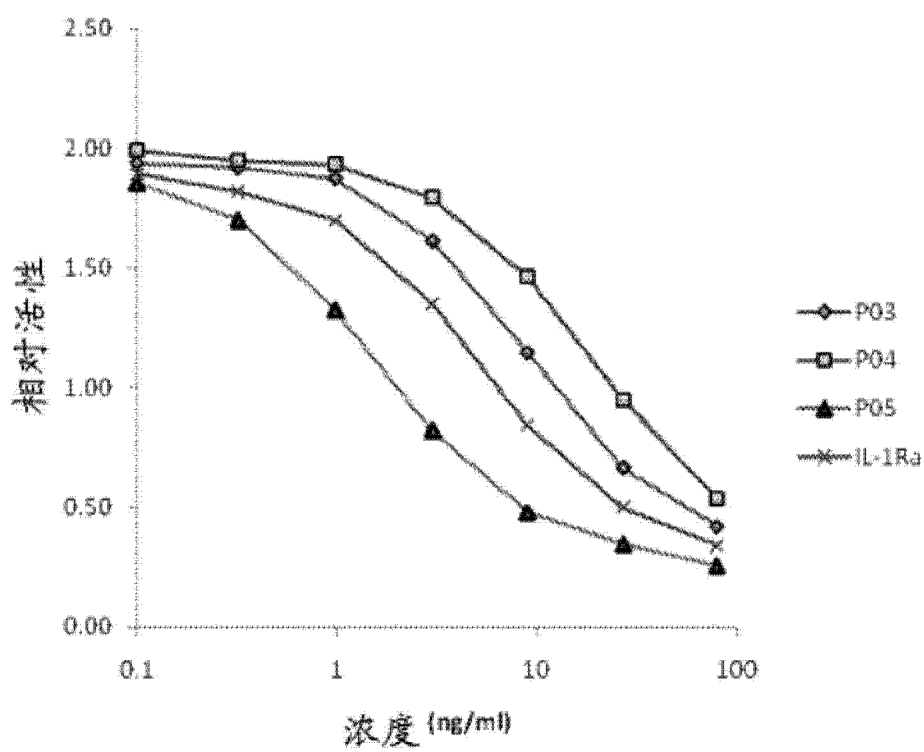


图 7B



IL-1 β 浓度 = 0.1 ng/ml

图 8A

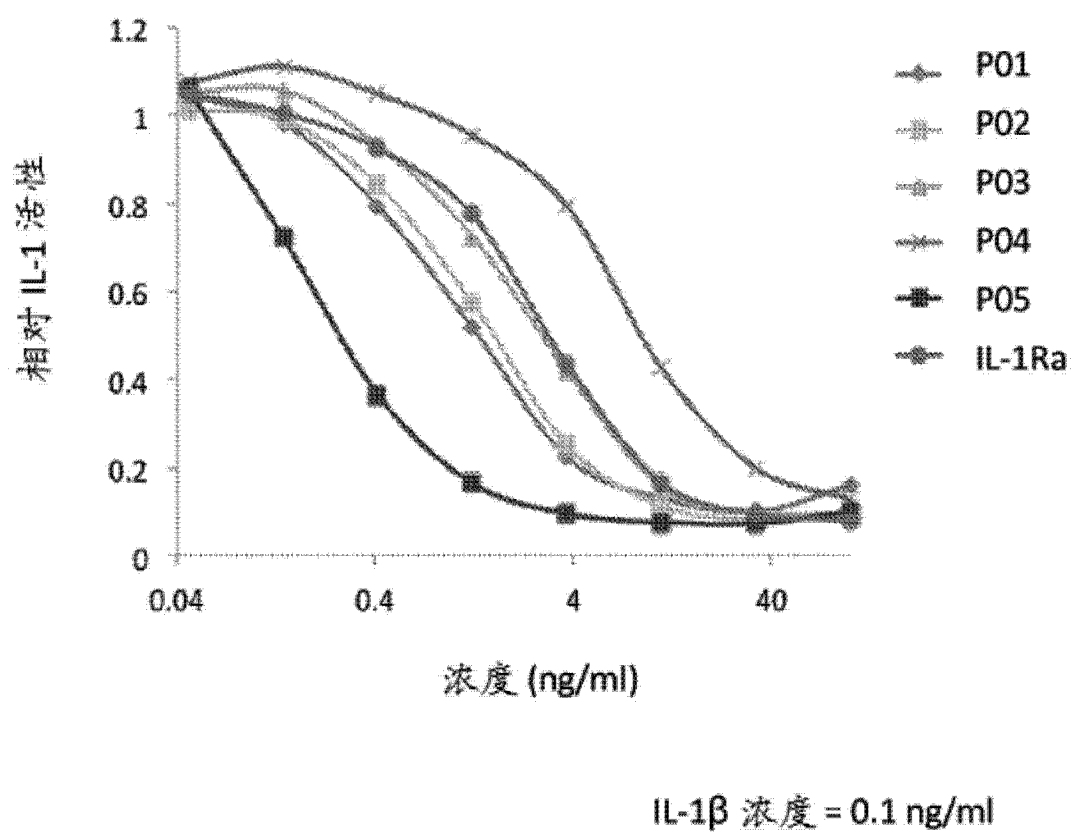


图 8B

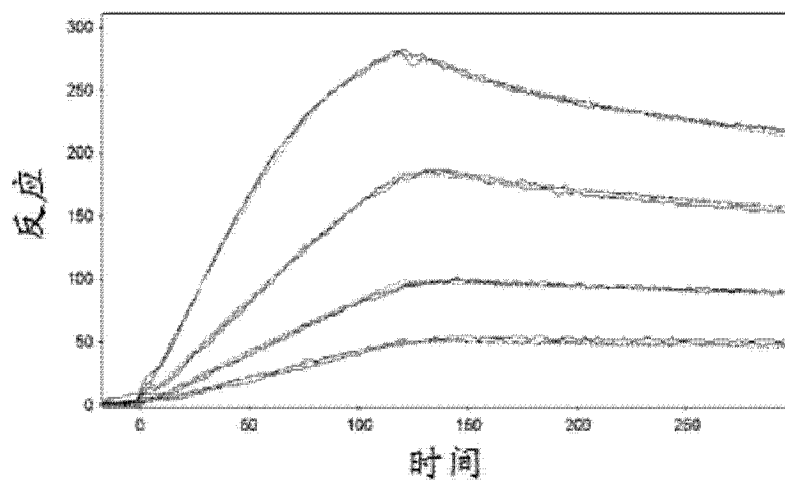


图 9A

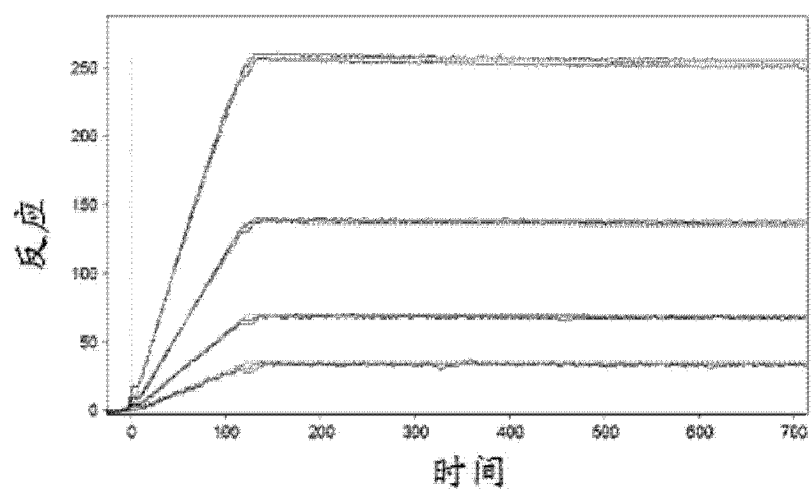


图 9B

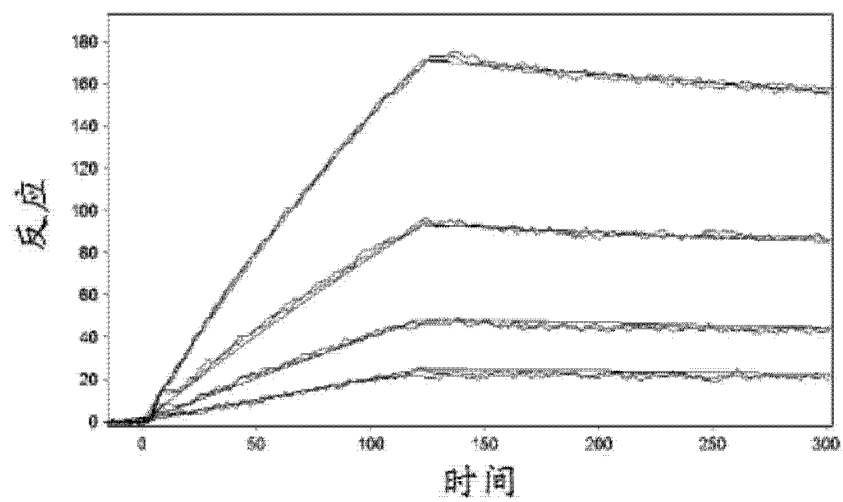


图 9C

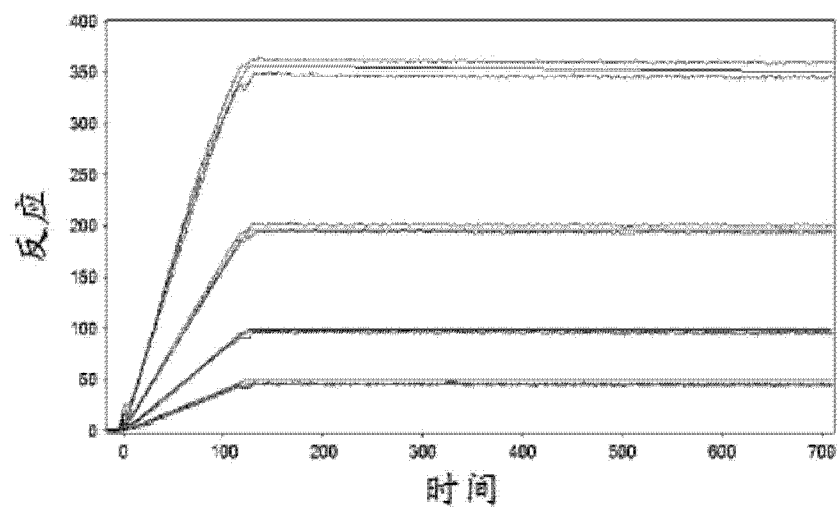


图 9D

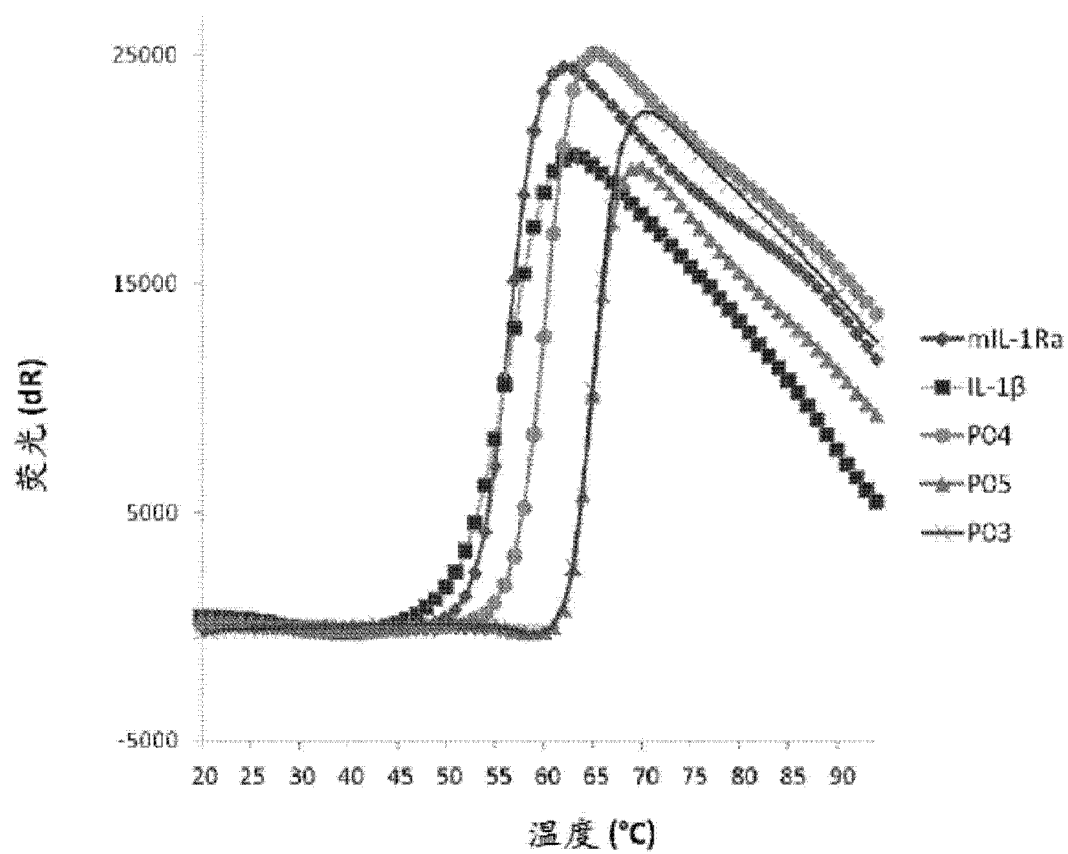


图 10A

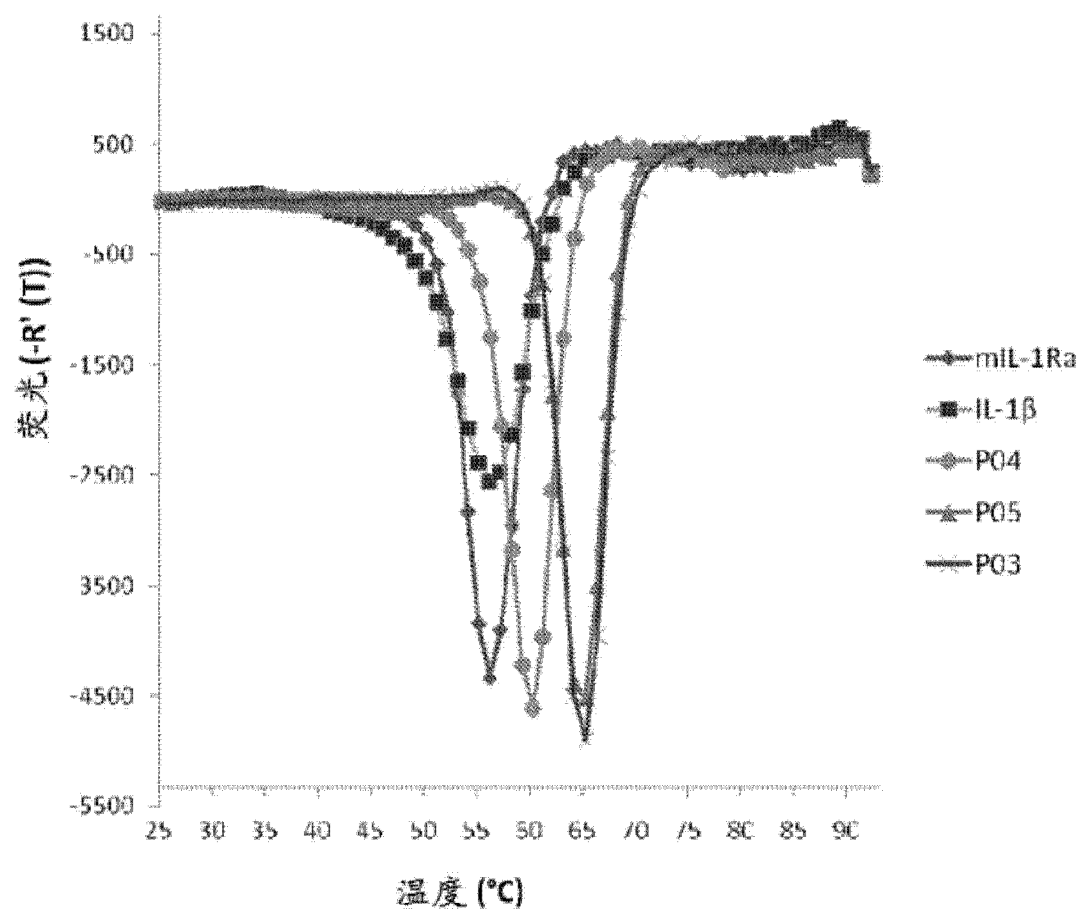


图 10B

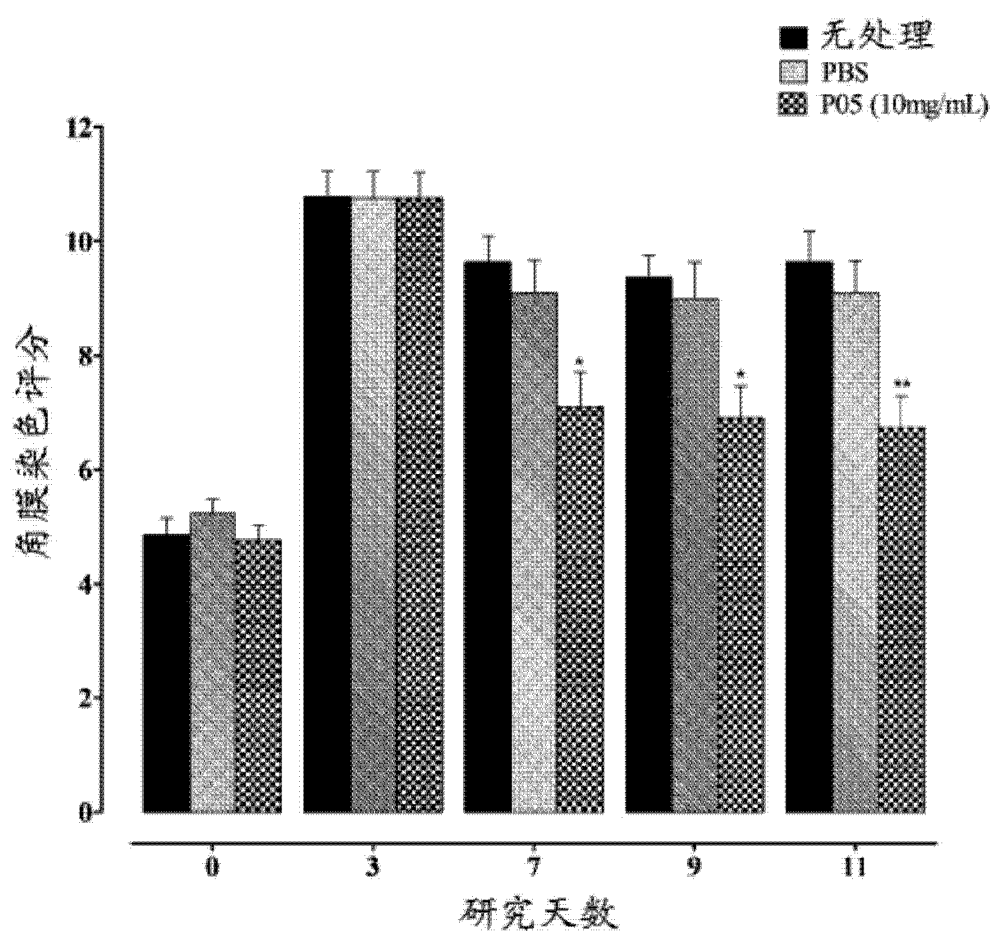


图 11A

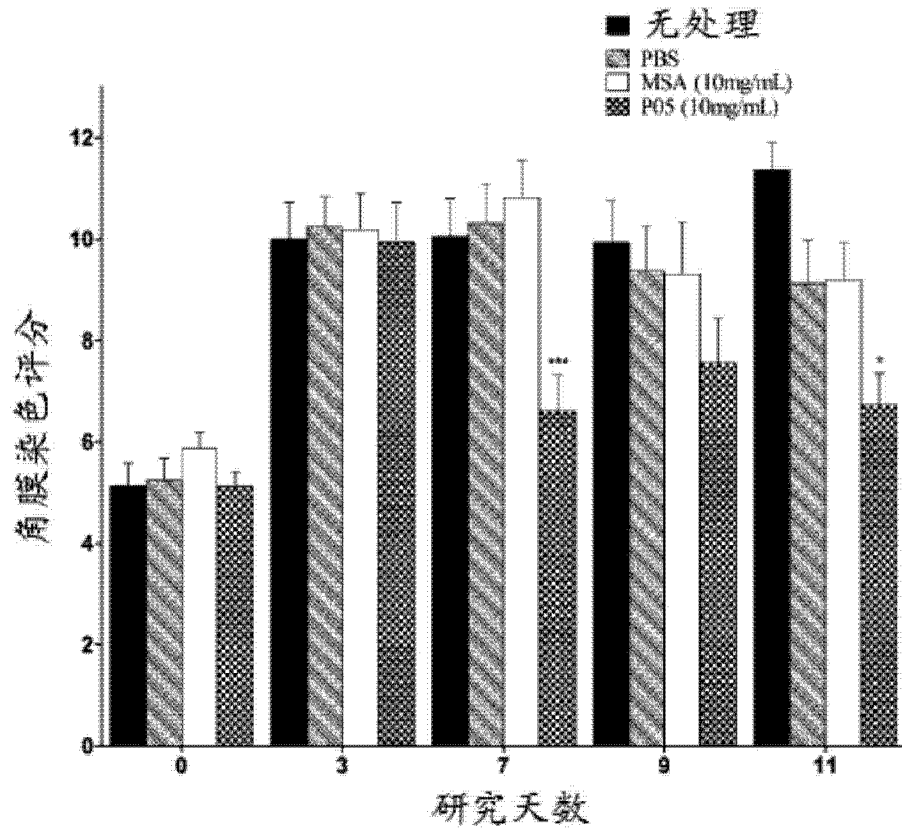


图 11B

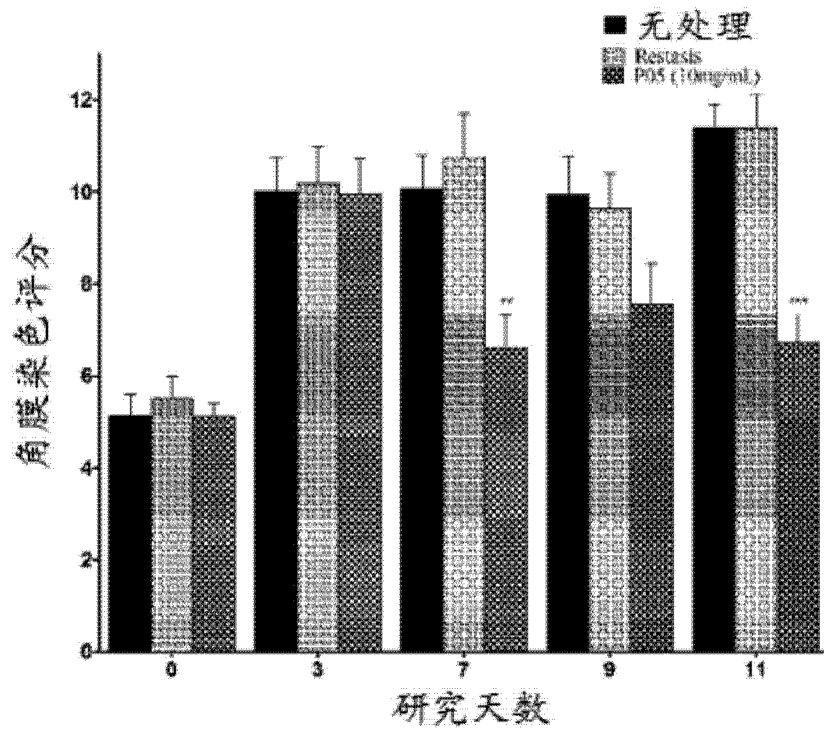


图 11C

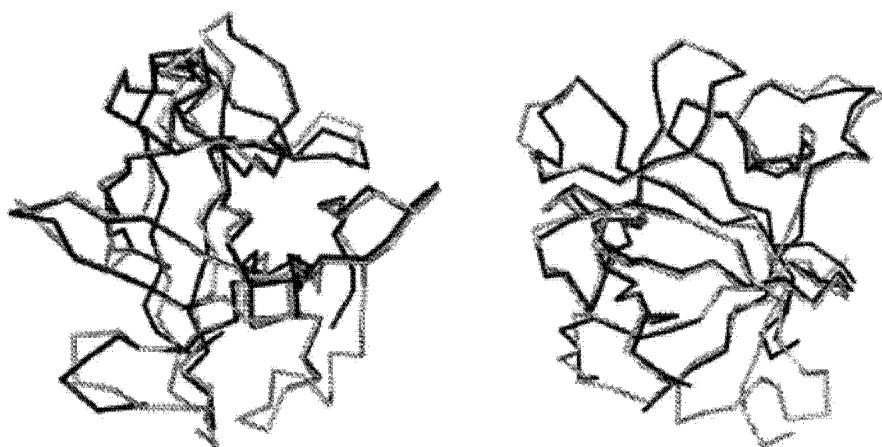


图 12A

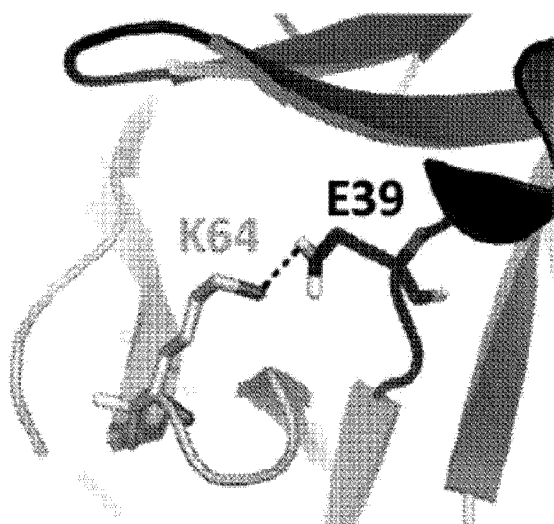


图 12B

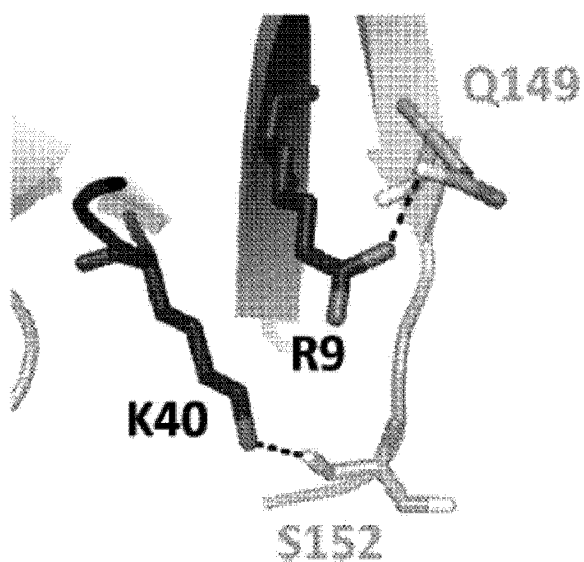


图 12C

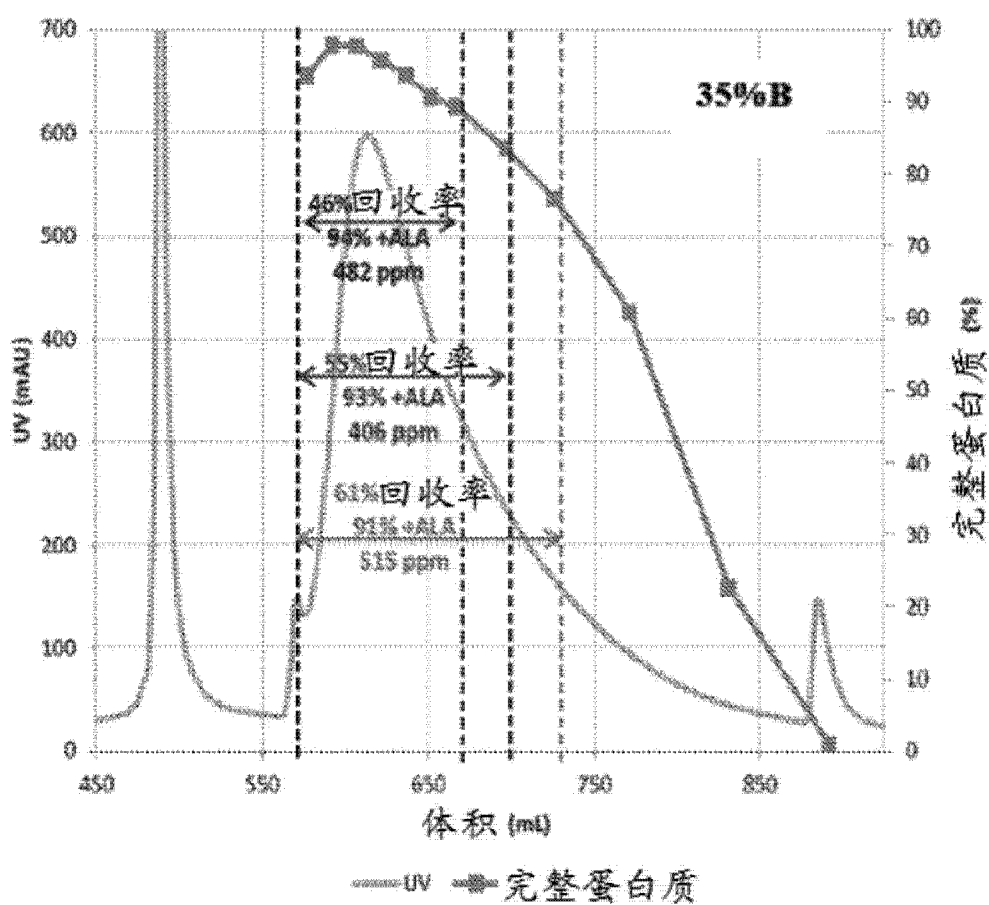


图 13

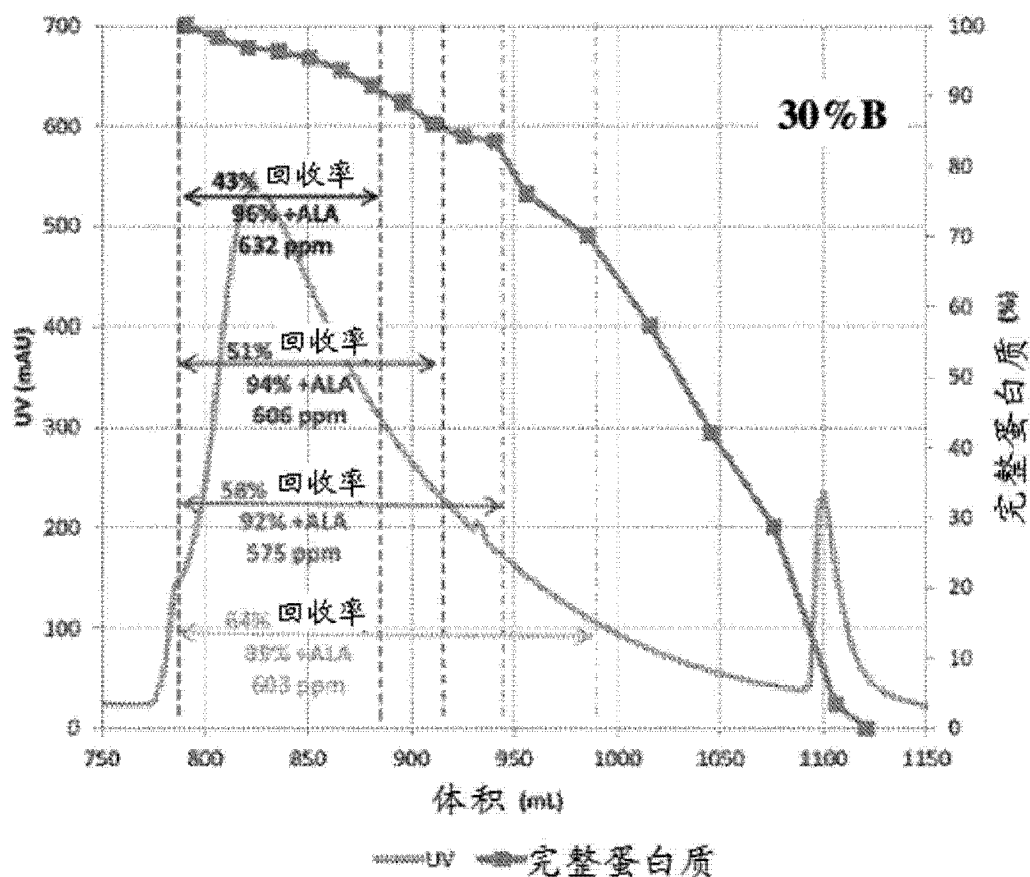


图 14

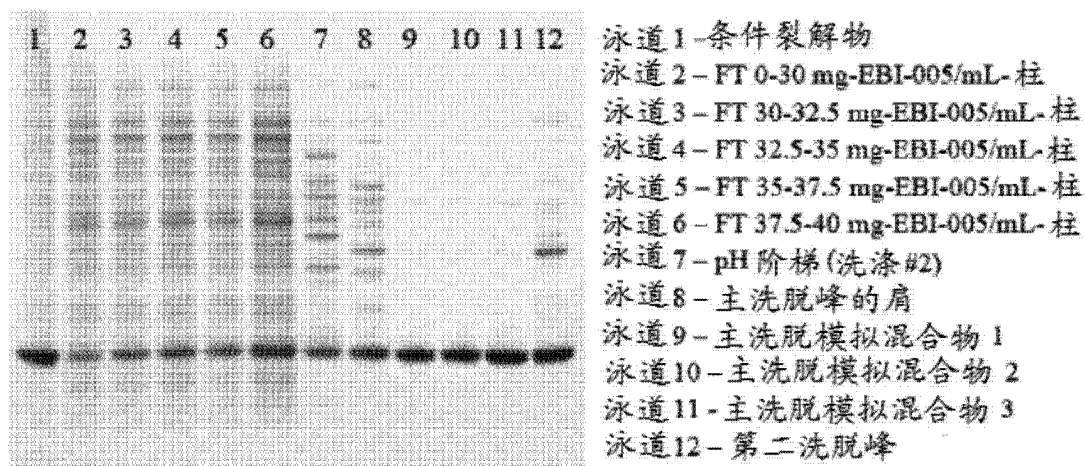
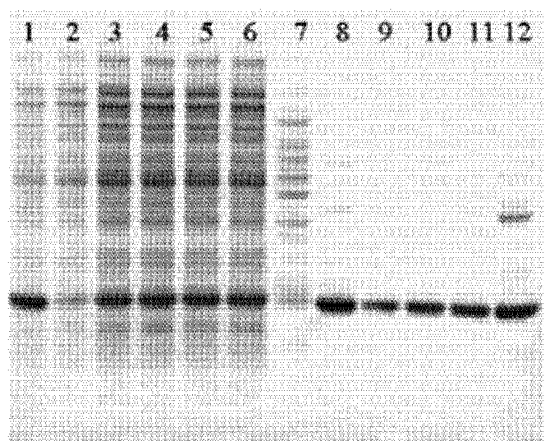


图 15



泳道1-条件裂解物
 泳道2-FT 0-30 mg-EBI-005/mL-柱
 泳道3-FT 30-32.5 mg-EBI-005/mL-柱
 泳道4-FT 32.5-35 mg-EBI-005/mL-柱
 泳道5-FT 35-37.5 mg-EBI-005/mL-柱
 泳道6-FT 37.5-40 mg-EBI-005/mL-柱
 泳道7-pH 阶梯(洗涤#2)
 泳道8-主洗脱峰的肩
 泳道9-主洗脱模拟混合物 1
 泳道10-主洗脱模拟混合物 2
 泳道11-主洗脱模拟混合物 3
 泳道12-第二洗脱峰

图 16

图 17A

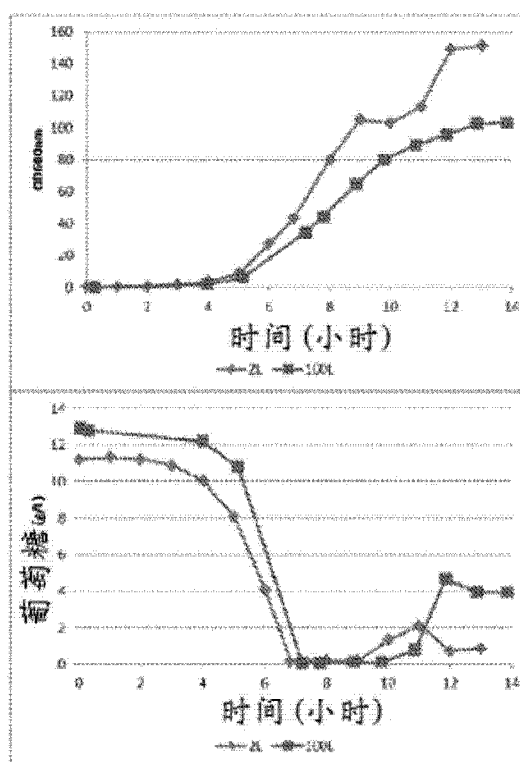


图 17C

图 17B

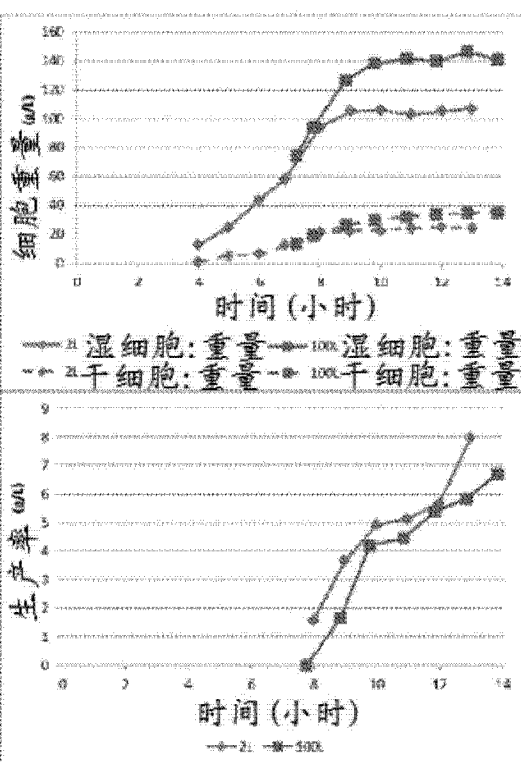


图 17D