



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103502274 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 06

(21) 申请号 201280021430. 0

A61P 29/00(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 02. 28

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

61/449, 005 2011. 03. 03 US

CN 101454345 A, 2009. 06. 10, 全文.

CN 101528778 A, 2009. 09. 09, 全文.

US 2007280945 A1, 2007. 12. 06,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 11. 01

审查员 赵天

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/026954 2012. 02. 28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/118813 EN 2012. 09. 07

(73) 专利权人 埃派斯进有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 李森伟 柯耀煌 张永克

(74) 专利代理机构 北京商专永信知识产权代理

事务所(普通合伙) 11400

代理人 郭玥 葛强

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006. 01)

C12N 15/13(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

权利要求书5页 说明书41页

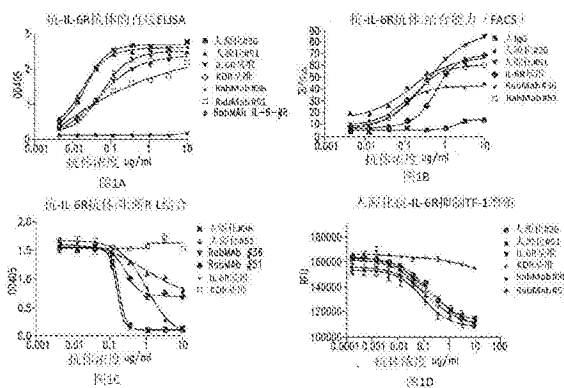
序列表40页 附图4页

(54) 发明名称

抗-IL-6受体抗体及其使用方法

(57) 摘要

本发明提供了抗 IL-6R 单克隆抗体及相关的组合物,其可用于治疗风湿性关节炎及其他疾病的多种治疗方法中的任何一种。



1. 一种分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,包括 (i) 重链可变区,所述重链可变区的 VHCDR1 区由 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列组成,所述重链可变区的 VHCDR2 区由 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列组成,并且所述重链可变区的 VHCDR3 区由 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列组成;以及 (ii) 轻链可变区,所述轻链可变区的 VLCDR1 区由 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列组成,所述轻链可变区的 VLCDR2 区由 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列组成,并且所述轻链可变区的 VLCDR3 区由 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列组成。

2. 根据权利要求 1 所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区由 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列组成。

3. 根据权利要求 1 所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链可变区由 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列组成。

4. 一种分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区由 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列组成,所述轻链可变区由 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列组成。

5. 一种分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,包括 (i) 重链可变区,所述重链可变区的 VHCDR1 区由 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列组成,所述重链可变区的 VHCDR2 区由 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列组成,并且所述重链可变区的 VHCDR3 区由 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列组成;以及 (ii) 轻链可变区,所述轻链可变区的 VLCDR1 区由 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列组成,所述轻链可变区的 VLCDR2 区由 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列组成,并且所述轻链可变区的 VLCDR3 区由 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列组成。

6. 根据权利要求 5 所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区由 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列组成。

7. 根据权利要求 5 所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链可变区由 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列组成。

8. 一种分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,其包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区由 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列组成,所述轻链可变区由 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列组成。

9. 根据权利要求 1 或权利要求 5 所述的分离的抗体,其中所述抗体为人源化的。

10. 根据权利要求 9 所述的分离的抗体,其中所述 VH 区由 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列组成,并且所述 VL 区由 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列组成。

11. 根据权利要求 9 所述的分离的抗体,其中所述 VH 区由 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列组成,并且所述 VL 区由 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列组成。

12. 根据权利要求 1 或权利要求 5 所述的分离的抗体,其中所述抗体选自下组:单链抗体、ScFv、缺乏铰链区的单价抗体,和微抗体。

13. 根据权利要求 1 或权利要求 5 所述的分离的抗体,其中所述抗体是 Fab 或 Fab' 片段。

14. 根据权利要求 1 或权利要求 5 所述的分离的抗体,其中所述抗体是 F(ab')₂ 片段。

15. 根据权利要求 1 或权利要求 5 所述的分离的抗体,其中所述抗体是完整的抗体。

16. 根据权利要求 1 或权利要求 5 所述的分离的抗体,所述抗体包括人 IgG 恒定结构

域。

17. 根据权利要求 16 所述的分离的抗体,其中所述 IgG 恒定结构域包括 IgG1 CH1 结构域。

18. 根据权利要求 16 所述的分离的抗体,其中所述 IgG 恒定结构域包括 IgG1 Fc 区。

19. 一种分离的抗体,或其抗原结合片段,其与权利要求 5 所述的抗体竞争结合人 IL-6R。

20. 根据权利要求 1-9 和 19 任意一项所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其中所述分离的抗体,或其抗原结合片段:

- a. 阻断 IL6 与 IL6R 结合;
- b. 抑制 IL6R 信号;
- c. 抑制 IL6 或 IL6R 介导的一种或多种生物学功能;
- d. 抑制 STAT3 磷酸化;
- e. a-d 中任意一项或多项的组合。

21. 根据权利要求 20 所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段阻断 IL-6 与 IL-6R 结合、抑制 IL-6R 信号、抑制 IL6 或 IL-6R 介导的一种或多种生物学功能,以及抑制 STAT3 磷酸化。

22. 根据权利要求 20 或 21 所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述 IL6 或 IL-6R 介导的一种或多种生物学功能选自下组:IL-6 诱导的细胞增殖、IL-6 诱导的细胞分化,以及 IL-6 诱导产生 CRP、纤维蛋白原或血清淀粉样蛋白 A。

23. 一种分离的多核苷酸,其编码如权利要求 1、5、10、11 和 19-22 中任意一项所述的分离的抗体,或其抗原结合片段。

24. 一种组合物,其包括生理学上可接受的载体,和治疗有效量的如权利要求 1、5、10、11 和 19-22 中任意一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段。

25. 根据权利要求 24 所述的组合物在制备用于治疗炎症性疾病的药物中的用途,其中所述炎症性疾病选自风湿性关节炎和青少年特发性关节炎。

26. 根据权利要求 24 所述的组合物在制备用于治疗卡斯特莱曼病 (Castleman's disease) 的药物中的用途。

27. 根据权利要求 24 所述的组合物在制备用于治疗系统性红斑狼疮的药物中的用途。

28. 根据权利要求 24 所述的组合物在制备用于治疗与 IL-6 表达异常相关的癌症的药物中的用途,其中所述癌症选自多发性骨髓瘤和浆细胞白血病。

29. 根据权利要求 24 所述的组合物在制备用于治疗与癌症相关的疲劳或恶病质的药物中的用途,其中所述癌症是大肠癌。

30. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,包括 (i) 重链可变区,所述重链可变区的 VHCDR1 区由 SEQ ID NO:45 所示的氨基酸序列组成,所述重链可变区的 VHCDR2 区由 SEQ ID NO:55 所示的氨基酸序列组成,并且所述重链可变区的 VHCDR3 区由 SEQ ID NO:65 所示的氨基酸序列组成;以及 (ii) 轻链可变区,所述轻链可变区的 VLCDR1 区由 SEQ ID NO:75 所示的氨基酸序列组成,所述轻链可变区的 VLCDR2 区由 SEQ ID NO:85 所示的氨基酸序列组成,并且所述轻链可变区的 VLCDR3 区由 SEQ ID NO:95 所示的氨基酸序列组成。

31. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,包括 (i) 重链可变区,所述重链可变区的 VHCDR1 区由 SEQ ID NO:46 所示的氨基酸序列组成,所述重链可变区的 VHCDR2 区由 SEQ ID NO:56 所示的氨基酸序列组成,并且所述重链可变区的 VHCDR3 区由 SEQ ID NO:66 所示的氨基酸序列组成;以及 (ii) 轻链可变区,所述轻链可变区的 VLCDR1 区由 SEQ ID NO:76 所示的氨基酸序列组成,所述轻链可变区的 VLCDR2 区由 SEQ ID NO:86 所示的氨基酸序列组成,并且所述轻链可变区的 VLCDR3 区由 SEQ ID NO:96 所示的氨基酸序列组成。

32. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,包括 (i) 重链可变区,所述重链可变区的 VHCDR1 区由 SEQ ID NO:47 所示的氨基酸序列组成,所述重链可变区的 VHCDR2 区由 SEQ ID NO:57 所示的氨基酸序列组成,并且所述重链可变区的 VHCDR3 区由 SEQ ID NO:67 所示的氨基酸序列组成;以及 (ii) 轻链可变区,所述轻链可变区的 VLCDR1 区由 SEQ ID NO:77 所示的氨基酸序列组成,所述轻链可变区的 VLCDR2 区由 SEQ ID NO:87 所示的氨基酸序列组成,并且所述轻链可变区的 VLCDR3 区由 SEQ ID NO:97 所示的氨基酸序列组成。

33. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,包括 (i) 重链可变区,所述重链可变区的 VHCDR1 区由 SEQ ID NO:48 所示的氨基酸序列组成,所述重链可变区的 VHCDR2 区由 SEQ ID NO:58 所示的氨基酸序列组成,并且所述重链可变区的 VHCDR3 区由 SEQ ID NO:68 所示的氨基酸序列组成;以及 (ii) 轻链可变区,所述轻链可变区的 VLCDR1 区由 SEQ ID NO:78 所示的氨基酸序列组成,所述轻链可变区的 VLCDR2 区由 SEQ ID NO:88 所示的氨基酸序列组成,并且所述轻链可变区的 VLCDR3 区由 SEQ ID NO:98 所示的氨基酸序列组成。

34. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,包括 (i) 重链可变区,所述重链可变区的 VHCDR1 区由 SEQ ID NO:49 所示的氨基酸序列组成,所述重链可变区的 VHCDR2 区由 SEQ ID NO:59 所示的氨基酸序列组成,并且所述重链可变区的 VHCDR3 区由 SEQ ID NO:69 所示的氨基酸序列组成;以及 (ii) 轻链可变区,所述轻链可变区的 VLCDR1 区由 SEQ ID NO:79 所示的氨基酸序列组成,所述轻链可变区的 VLCDR2 区由 SEQ ID NO:89 所示的氨基酸序列组成,并且所述轻链可变区的 VLCDR3 区由 SEQ ID NO:99 所示的氨基酸序列组成。

35. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,包括 (i) 重链可变区,所述重链可变区的 VHCDR1 区由 SEQ ID NO:50 所示的氨基酸序列组成,所述重链可变区的 VHCDR2 区由 SEQ ID NO:60 所示的氨基酸序列组成,并且所述重链可变区的 VHCDR3 区由 SEQ ID NO:70 所示的氨基酸序列组成;以及 (ii) 轻链可变区,所述轻链可变区的 VLCDR1 区由 SEQ ID NO:80 所示的氨基酸序列组成,所述轻链可变区的 VLCDR2 区由 SEQ ID NO:90 所示的氨基酸序列组成,并且所述轻链可变区的 VLCDR3 区由 SEQ ID NO:100 所示的氨基酸序列组成。

36. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,包括 (i) 重链可变区,所述重链可变区的 VHCDR1 区由 SEQ ID NO:51 所示的氨基酸序列组成,所述重链可变区的 VHCDR2 区由 SEQ ID NO:61 所示的氨基酸序列组成,并且所述重链可变区的 VHCDR3 区由 SEQ ID NO:71 所示的氨基酸序列组成;以及 (ii) 轻链可变区,所述轻链可变区的 VLCDR1 区由

SEQ ID NO:81 所示的氨基酸序列组成,所述轻链可变区的 VLCDR2 区由 SEQ ID NO:91 所示的氨基酸序列组成,并且所述轻链可变区的 VLCDR3 区由 SEQ ID NO:101 所示的氨基酸序列组成。

37. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,包括 (i) 重链可变区,所述重链可变区的 VHCDR1 区由 SEQ ID NO:52 所示的氨基酸序列组成,所述重链可变区的 VHCDR2 区由 SEQ ID NO:62 所示的氨基酸序列组成,并且所述重链可变区的 VHCDR3 区由 SEQ ID NO:72 所示的氨基酸序列组成;以及 (ii) 轻链可变区,所述轻链可变区的 VLCDR1 区由 SEQ ID NO:82 所示的氨基酸序列组成,所述轻链可变区的 VLCDR2 区由 SEQ ID NO:92 所示的氨基酸序列组成,并且所述轻链可变区的 VLCDR3 区由 SEQ ID NO:102 所示的氨基酸序列组成。

38. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,包括 (i) 重链可变区,所述重链可变区的 VHCDR1 区由 SEQ ID NO:53 所示的氨基酸序列组成,所述重链可变区的 VHCDR2 区由 SEQ ID NO:63 所示的氨基酸序列组成,并且所述重链可变区的 VHCDR3 区由 SEQ ID NO:73 所示的氨基酸序列组成;以及 (ii) 轻链可变区,所述轻链可变区的 VLCDR1 区由 SEQ ID NO:83 所示的氨基酸序列组成,所述轻链可变区的 VLCDR2 区由 SEQ ID NO:93 所示的氨基酸序列组成,并且所述轻链可变区的 VLCDR3 区由 SEQ ID NO:103 所示的氨基酸序列组成。

39. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,包括 (i) 重链可变区,所述重链可变区的 VHCDR1 区由 SEQ ID NO:54 所示的氨基酸序列组成,所述重链可变区的 VHCDR2 区由 SEQ ID NO:64 所示的氨基酸序列组成,并且所述重链可变区的 VHCDR3 区由 SEQ ID NO:74 所示的氨基酸序列组成;以及 (ii) 轻链可变区,所述轻链可变区的 VLCDR1 区由 SEQ ID NO:84 所示的氨基酸序列组成,所述轻链可变区的 VLCDR2 区由 SEQ ID NO:94 所示的氨基酸序列组成,并且所述轻链可变区的 VLCDR3 区由 SEQ ID NO:104 所示的氨基酸序列组成。

40. 根据权利要求 30 所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,所述重链可变区由 SEQ ID NO:25 所示的氨基酸序列组成。

41. 根据权利要求 31 所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,所述重链可变区由 SEQ ID NO:26 所示的氨基酸序列组成。

42. 根据权利要求 32 所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,所述重链可变区由 SEQ ID NO:27 所示的氨基酸序列组成。

43. 根据权利要求 33 所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,所述重链可变区由 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列组成。

44. 根据权利要求 34 所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,所述重链可变区由 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列组成。

45. 根据权利要求 35 所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,所述重链可变区由 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列组成。

46. 根据权利要求 36 所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,所述重链可变区由 SEQ ID NO:31 所示的氨基酸序列组成。

47. 根据权利要求 37 所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,所述

重链可变区由 SEQ ID NO:32 所示的氨基酸序列组成。

48. 根据权利要求 38 所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,所述重链可变区由 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列组成。

49. 根据权利要求 39 所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,所述重链可变区由 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列组成。

50. 根据权利要求 30 所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,所述轻链可变区由 SEQ ID NO:35 所示的氨基酸序列组成。

51. 根据权利要求 31 所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,所述轻链可变区由 SEQ ID NO:36 所示的氨基酸序列组成。

52. 根据权利要求 32 所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,所述轻链可变区由 SEQ ID NO:37 所示的氨基酸序列组成。

53. 根据权利要求 33 所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,所述轻链可变区由 SEQ ID NO:38 所示的氨基酸序列组成。

54. 根据权利要求 34 所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,所述轻链可变区由 SEQ ID NO:39 所示的氨基酸序列组成。

55. 根据权利要求 35 所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,所述轻链可变区由 SEQ ID NO:40 所示的氨基酸序列组成。

56. 根据权利要求 36 所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,所述轻链可变区由 SEQ ID NO:41 所示的氨基酸序列组成。

57. 根据权利要求 37 所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,所述轻链可变区由 SEQ ID NO:42 所示的氨基酸序列组成。

58. 根据权利要求 38 所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,所述轻链可变区由 SEQ ID NO:43 所示的氨基酸序列组成。

59. 根据权利要求 39 所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,所述轻链可变区由 SEQ ID NO:44 所示的氨基酸序列组成。

抗-IL-6 受体抗体及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2011 年 3 月 3 日提交的美国临时申请号 61 / 449,005 的优先权,其全部内容通过引用并入本申请。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与本申请附带的序列表以文本格式替代纸质副本,并通过引用并入说明书。包含序列表的文本文件的名称为 APEX_012_01W0_ST25.txt。该文本文件于 2012 年 2 月 28 日创建,大小为 53KB,通过 EFS-WEB 以电子形式提交。

[0005] 背景

技术领域

[0006] 本发明主要涉及抗 IL-6 受体 (IL-6R) 抗体,及其组合物和使用方法。更特别地,本发明涉及抗 IL-6R 抗体及其制备方法和用途。这些抗体可用于,例如,治疗多种炎症和癌症疾病的方法。

[0007] 相关技术的描述

[0008] 白细胞介素 -6 (IL-6) 是一种多功能细胞因子,其在宿主的防御机制中起着核心作用。Heinrich 等, Biochem. J. (1990) 26.5 :621 ;Van Snick, J. Annu. Rev. Immunol. (1990) 8 :253 ;以及 Himno 等, Immunol. Today (1990) 11 :443。然而,在多种人类炎症、自身免疫、肿瘤疾病中,可观察到 IL-6 产生异常,并且这已被认为在这些疾病的发病机制中发挥作用。Hirano 等,同上 ;Sehgal, P. B. , Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1990) 195 :183 ;Grau, G. E. , Eur. Cytokine Net (1990) 1 :203 ;Bauer 等, Ann. Hematol. (1991) 62 :203 ;Campbell 等, J. Clin. Invest (1991) 7 :739 ;和 Roodman 等, J. Clin. Invest. (1992) 89 :46。因此,IL-6 的生物活性抑制剂可能有助于研究 IL-6 在疾病中的作用,并可能具有广泛的治疗应用。

[0009] IL-6 是由 T 细胞, B 细胞, 单核细胞, 成纤维细胞, 角质形成细胞, 内皮细胞, 系膜细胞和多种肿瘤细胞系产生。通过增强 IL-2 受体的表达和 IL-2 的产生, IL-6 诱导 T 细胞生长和细胞毒性 T 细胞分化。IL-6 与 IL-3 协同作用, 以支持造血作用中多向母细胞集落的形成, 并诱导巨噬细胞, 巨核细胞和破骨细胞的分化。在急性期反应中, IL-6 刺激肝细胞产生急性期蛋白, 如 C-反应蛋白 (CRP), 纤维蛋白原, α 1-抗胰蛋白酶和血清淀粉样蛋白 A。体内给药时, IL-6 也会引起白细胞增多和发热, 并可作为肾小球系膜细胞、表皮角质形成细胞, 以及, 例如, 浆细胞瘤、多发性骨髓瘤, 和肾细胞癌中不同类型的肿瘤细胞的生长因子。

[0010] 脓毒症也涉及 IL-6 的过度产生 (Starnes, Jr. , H. F. 等, J. Immunol. (1990) 145 : 4185), 并且在多发性骨髓瘤, 或浆细胞白血病 (Klein, B. 等, Blood (1991) 78 :1198) 也涉及 IL-6 过度产生。其他疾病包括骨吸收 (骨质疏松症) (Roodman, G. D. 等, J. , Clin, Invest. (1992) 89 :46 ;Jilka, R. L 等, Science (1992) 257 :88-91)、恶病质 (Strassman, G. 等, J. Clin. Invest. (1992) 89 :1681)、牛皮癣、全身型青少年特发性关节炎、系统性红斑狼疮、系膜增生性肾小球肾炎、肾细胞癌、卡波济氏肉瘤、类风湿关节炎 (Eur. J. Immunol. 18, 1797-1801, 1988 ;Arthritis Rheum. 31, 784-788, 1988 ;Ann. Rheum. Dis. 52, 232-234,

1993)、高 γ 球蛋白血症 (Grau, G. E. et al., J. Exp. Med. (1990) 172 :1505)、卡斯特莱曼病 (Castleman's disease)、IgM 丙种球蛋白病、心脏粘液瘤和自身免疫性胰岛素依赖型糖尿病 (Campbell, I. L et al., J. Clin. Invest., (1991) 87 :739)。大鼠抗小鼠 IL-6R 抗体阻止 DBA / 1J 小鼠中胶原诱导的关节炎 (CIA) 的发展, 并且在猴 CIA 模型中, 抗人 IL-6 抗体对预防和治疗均有效。这些证据表明 IL-6 在关节炎的发病机制中起着至关重要的作用, 并支持这些动物模型可用于关节炎, 以及抗 IL-6 或 IL-6R 治疗效果的研究 (Arthritis Rheum. 41, 2117-2121, 1998; Clin Immunol. 2001Mar; 98 (3) :319-26; Biol Pharm Bull. 2008Jun; 31 (6) :1159-63)。

[0011] IL-6 通过与靶细胞表面至少两个特异性受体的相互作用而发挥作用。Taga 等, J. Exp. Med. (1987) 166 :967; 和 Coulie 等, Eur. J. Immunol., (1987) 17 :1435。这两种受体链的 cDNA 已被克隆, 它们编码两个跨膜糖蛋白 :80kDa 的 IL-6 受体“IL-6R”和 130kDa 的糖蛋白“gp130”。Yamasaki 等, Science (1988) 241 :825; 和 Hibi 等, Cell (1990) 63 :1149。IL-6 通过独特的机制与这些糖蛋白相互作用。首先, IL-6R 与 IL-6 以低亲和力 (Kd 值 = 约 1 nM) 结合, 并且不触发信号。Taga 等, Cell (1989) 58 :573。随后, IL-6 / IL-6R 复合体与 gp130 结合, 这将传导信号。Hibi 等, 同上; 和 Taga 等, 同上。在溶液中, gp130 本身与 IL-6 没有亲和力, 但它能在膜上稳定 IL-6 / IL-6R 复合体, 从而产生高亲和力的 IL-6 结合 (Kd 值 = 约 10pM)。Hibi 等, 同上。最近发现 gp130 也是制瘤素 M 的低亲和力受体, 以及 LIF 受体的亲和力转换物 (Gearing, D. P. 等, Science (1992) 255 :1434)。

[0012] 中和 IL-6 活性的一种方法是利用特异性结合 IL-6 的抗体。根据对 IL-6 分子上两个不同表位的识别, 针对 IL-6 的中和单克隆抗体 (Mab) 可被分为两组, 所述不同表位被指定为位点 I 和位点 II。位点 I 是构象表位, 其由 IL-6 分子的氨基末端和羧基末端组成 : 氨基末端部分包括氨基酸 Ile₃₀-Asp₃₅; 而羧基末端部分包括关键氨基酸 Arg₁₈₃-Met₁₈₅。位点 II 包括关键氨基酸 Ala₁₅₄-Thr₁₆₃。Brakenhoff 等 (1990, J. Immunol. 145 :561-568)。

[0013] 中和 IL-6 的活性的另一种方法是通过结合并阻断 IL-6R, 抑制配体 - 受体相互作用。本发明提供了如本申请中进一步描述的所述及其它优点。

[0014] 发明概述

[0015] 本申请一方面提供了一种分离的抗体, 或其抗原结合片段, 其与人 IL-6R 结合, 包括 (i) 重链可变区, 所述重链可变区包括与 SEQ ID NO :3 的氨基酸残基相同的 VHCDR1 区、与 SEQ ID NO :4 的氨基酸残基相同的 VHCDR2 区、和与 SEQ ID NO :5 的氨基酸残基相同的 VHCDR3 区; 以及 (ii) 轻链可变区, 所述轻链可变区包括与 SEQ ID NO :6 的氨基酸残基相同的 VLCDR1 区、与 SEQ ID NO :7 的氨基酸残基相同的 VLCDR2 区、和与 SEQ ID NO :8 的氨基酸残基相同的 VLCDR3 区; 或者所述抗体的变体, 或其抗原结合片段, 其包括与 (i) 和 (ii) 所述重链和轻链可变区相同的重链和轻链可变区, 但是在所述 CDR 区有至多 8 个氨基酸替换。在一个实施方式中, 所述重链可变区包括 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列。在本申请该方面的另一个实施方式中, 所述轻链可变区包括 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列。

[0016] 本申请另一方面提供了一种分离的抗体, 或其抗原结合片段, 其与人 IL-6R 结合, 包括重链可变区, 其包括 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列。在一个实施方式中, 所述抗体包括轻链可变区, 其包括与 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在另一个实施方式中, 所述抗体包括轻链可变区, 其包括 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序

列。

[0017] 本申请的另一个方面提供了一种分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,包括轻链可变区,其包括 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。在该方面的一个实施方式中,所述抗体包括重链可变区,其包括与 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

[0018] 本申请的另一个方面提供了一种分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,包括 (i) 重链可变区,所述重链可变区包括与 SEQ ID NO:13 的氨基酸残基相同的 VHCDR1 区、与 SEQ ID NO:14 的氨基酸残基相同的 VHCDR2 区、和与 SEQ ID NO:15 的氨基酸残基相同的 VHCDR3 区;以及 (ii) 轻链可变区,所述轻链可变区包括与 SEQ ID NO:16 的氨基酸残基相同的 VLCDR1 区、与 SEQ ID NO:17 的氨基酸残基相同的 VLCDR2 区、和与 SEQ ID NO:18 的氨基酸残基相同的 VLCDR3 区;或者所述抗体的变体,或其抗原结合片段,其包括与 (i) 和 (ii) 所述重链和轻链可变区相同的重链和轻链可变区,但是在所述 CDR 区有至多 8 个氨基酸替换。在本申请该方面的一个实施方式中,所述重链可变区包括 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列。在本申请这方面的另一个实施方式中,所述轻链可变区包括 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列。

[0019] 本申请的另一个方面提供了一种分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,包括重链可变区,其包括 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列。在一个实施方式中,所述抗体包括轻链可变区,其包括与 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在又一个实施方式中,所述抗体包括轻链可变区,其包括 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列。

[0020] 本申请的另一个方面提供了一种分离的抗体,或其抗原结合片段,其与人 IL-6R 结合,包括轻链可变区,其包括 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列。在一个实施方式中,所述分离的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区,其包括与 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

[0021] 在本申请的另一个方面,本申请所述分离的抗体是人源化的。在一个具体的实施方式中,所述人源化的抗体包括 VH 区,其包括如 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列,以及 VL 区,其包括如 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列。在另一个实施方式中,本申请所述的人源化的抗体包括 VH 区,其包括如 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列,以及 VL 区,其包括如 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列。

[0022] 在本申请的某些实施方式中,本申请所述的分离的抗体选自单链抗体, ScFv, 缺乏铰链区的单价抗体,和微抗体 (minibody)。在某些实施方式中,所述抗体是 Fab, Fab' 片段, F(ab')₂ 片段或完整的抗体。在另一个实施方式中,本申请所述抗体包括人 IgG 恒定结构域,并且在某些特定的实施方式中,所述 IgG 恒定结构域包括 IgG1CH1 结构域。在一个实施方式中,所述 IgG 恒定结构域包括 IgG1Fc 区。

[0023] 本申请的另一方面提供了分离的抗体,或其抗原结合片段,其与本申请所述抗体竞争结合人 IL-6R。

[0024] 本申请的一个方面提供了分离的抗体,或其抗原结合片段,其与 IL-6R 结合,结合的 KD 值为 1.3nM 或更低。

[0025] 本申请的另一方面提供了分离的抗体,或其抗原结合片段,其与 IL-6R 结合,结合

的 K_D 值为 0.5nM 或更低。

[0026] 在本申请所述的分离的抗体,或其抗原结合片段的另一个实施方式中,所述分离的抗体或其抗原结合片段阻断 IL-6 与 IL-6R 结合,抑制 IL-6R 信号,抑制 IL6 或 IL-6R 介导的一种或多种生物学功能或抑制 STAT3 磷酸化,或前述一项或多项的组合。在本申请所述任意抗体的另一个实施方式中,所述 IL6 或 IL-6R 介导的一种或多种生物学功能包括,但不限于,IL-6 诱导细胞增殖、IL-6 诱导细胞分化,以及 IL-6 诱导产生 CRP、纤维蛋白原或血清淀粉样蛋白 A。

[0027] 本申请的另一个方面提供了一种分离的多核苷酸,其编码如本申请所述的分离的抗体,或其抗原结合片段。

[0028] 本申请的另一个方面提供了一种组合物,其包含生理学上可接受的载体,和治疗有效量的如本申请所述的分离的抗体或其抗原结合片段。

[0029] 本申请的另一个方面提供了治疗炎性疾病,如风湿性关节炎的方法,所述方法包括向患有所述炎性疾病的患者给予如本申请所述的组合物,从而治疗患有所述炎性疾病的所述患者,所述组合物包含生理学上可接受的载体,和治疗有效量的如本申请所述的分离的抗体或其抗原结合片段。在另一个实施方式中,所述炎性疾病是青少年特发性关节炎。

[0030] 本申请的另一个方面提供了治疗卡斯特莱曼病 (Castleman's disease) 的方法,所述方法包括向患有卡斯特莱曼病的患者给予组合物,从而治疗所述卡斯特莱曼病,所述组合物包含生理学上可接受的载体,和治疗有效量的如本申请所述的分离的抗体或其抗原结合片段。

[0031] 本申请的另一个方面提供了治疗系统性红斑狼疮的方法,所述方法包括向患有系统性红斑狼疮的患者给予组合物,从而治疗所述系统性红斑狼疮,所述组合物包含生理学上可接受的载体,和治疗有效量的如本申请所述的分离的抗体或其抗原结合片段。

[0032] 本申请的另一个方面提供了治疗与 IL-6 表达异常相关的癌症的方法,所述方法包括向患有此种癌症的患者给予组合物,从而治疗所述与 IL-6 表达异常相关的癌症,所述组合物包含生理学上可接受的载体,和治疗有效量的如本申请所述的分离的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,所述癌症是多发性骨髓瘤。

[0033] 本申请的另一个方面提供了治疗与癌症相关的疲劳或恶病质的方法,所述方法包括向患有与癌症相关的疲劳或恶病质的患者给予组合物,从而治疗与癌症相关的疲劳或恶病质,所述组合物包含生理学上可接受的载体,和治疗有效量的如本申请所述的分离的抗体或其抗原结合片段。

[0034] 附图若干视图的简要说明

[0035] 图 1A- 图 1D :人源化的前导抗 IL-6R 候选抗体保留了其家兔相应部分的大多数活性。A 部分 :抗 IL-6R 抗体的直接 ELISA ;B 部分 :FACS 检测到抗 IL-6R 抗体与人骨髓瘤细胞 U266B1 上的 IL-6R 结合 ;C 部分 :抗 IL-6R 抗体阻断 IL-6 与 IL-6R 结合的能力 ;D 部分 :人源化抗 IL-6R 抗体抑制 IL-6 介导的 TF-1 细胞增殖。

[0036] 图 2A 和图 2B 显示 10 个抗 -IL6R 家兔抗体 VH(2A) 和 VL(2B) 区的氨基酸比对,所述抗体的鉴定如实施例 1 中所述,并总结在表 1 中。VH 和 VL 区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO :25-34 和 35-44 所示。下划线显示的是 CDR。所有克隆的 VHCDR1、VHCDR2 和 VHCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO :45-74 所示。所有克隆的 VLCDR1、VLCDR2 和 VLCDR3 的氨基酸序

列如 SEQ ID NO :75-104 所示。

[0037] 序列简述

- [0038] SEQ ID NO :1 是克隆 36 家兔抗 IL-6R 抗体 VH 区的氨基酸序列。
- [0039] SEQ ID NO :2 是克隆 36 家兔抗 IL-6R 抗体 VL 区的氨基酸序列。
- [0040] SEQ ID NO :3 是克隆 36 家兔抗 IL-6R 抗体 VHCDR1 区的氨基酸序列。
- [0041] SEQ ID NO :4 是克隆 36 家兔抗 IL-6R 抗体 VHCDR2 区的氨基酸序列。
- [0042] SEQ ID NO :5 是克隆 36 家兔抗 IL-6R 抗体 VHCDR3 区的氨基酸序列。
- [0043] SEQ ID NO :6 是克隆 36 家兔抗 IL-6R 抗体 VLCDR1 区的氨基酸序列。
- [0044] SEQ ID NO :7 是克隆 36 家兔抗 IL-6R 抗体 VLCDR2 区的氨基酸序列。
- [0045] SEQ ID NO :8 是克隆 36 家兔抗 IL-6R 抗体 VLCDR3 区的氨基酸序列。
- [0046] SEQ ID NO :9 是克隆 36 家兔抗 IL-6R 抗体 VH 区人源化序列的氨基酸序列。
- [0047] SEQ ID NO :10 是克隆 36 家兔抗 IL-6R 抗体 VL 区人源化序列的氨基酸序列。
- [0048] SEQ ID NO :11 是克隆 51 家兔抗 IL-6R 抗体 VH 区的氨基酸序列。
- [0049] SEQ ID NO :12 是克隆 51 家兔抗 IL-6R 抗体 VL 区的氨基酸序列。
- [0050] SEQ ID NO :13 是克隆 51 家兔抗 IL-6R 抗体 VHCDR1 区的氨基酸序列。
- [0051] SEQ ID NO :14 是克隆 51 家兔抗 IL-6R 抗体 VHCDR2 区的氨基酸序列。
- [0052] SEQ ID NO :15 是克隆 51 家兔抗 IL-6R 抗体 VHCDR3 区的氨基酸序列。
- [0053] SEQ ID NO :16 是克隆 51 家兔抗 IL-6R 抗体 VLCDR1 区的氨基酸序列。
- [0054] SEQ ID NO :17 是克隆 51 家兔抗 IL-6R 抗体 VLCDR2 区的氨基酸序列。
- [0055] SEQ ID NO :18 是克隆 51 家兔抗 IL-6R 抗体 VLCDR3 区的氨基酸序列。
- [0056] SEQ ID NO :19 是克隆 51 家兔抗 IL-6R 抗体 VH 区的人源化序列的氨基酸序列。
- [0057] SEQ ID NO :20 是克隆 51 家兔抗 IL-6R 抗体 VL 区的人源化序列的氨基酸序列。
- [0058] SEQ ID NO :21 :是包括 CH1, 铰链, CH2 和 CH3 结构域的人 IgG1 恒定区的氨基酸序列。
- [0059] SEQ ID NO :22 :编码如 SEQ ID NO :21 所示人 IgG1 恒定区的氨基酸序列的多核苷酸序列。
- [0060] SEQ ID NO :23 :是人 Ck 恒定区的氨基酸序列。
- [0061] SEQ ID NO :24 :是编码如 SEQ ID NO :23 所示的人 Ck 恒定区的氨基酸序列的多核苷酸序列。
- [0062] SEQ ID NO :25 是如图 2 所示克隆 5 家兔抗 IL-6R 抗体的 VH 区的氨基酸序列。
- [0063] SEQ ID NO :26 是如图 2 所示克隆 21 家兔抗 IL-6R 抗体的 VH 区的氨基酸序列。
- [0064] SEQ ID NO :27 是如图 2 所示克隆 23 家兔抗 IL-6R 抗体的 VH 区的氨基酸序列。
- [0065] SEQ ID NO :28 是如图 2 所示克隆 36 家兔抗 IL-6R 抗体的 VH 区的氨基酸序列。
- [0066] SEQ ID NO :29 是如图 2 所示克隆 37 家兔抗 IL-6R 抗体的 VH 区的氨基酸序列。
- [0067] SEQ ID NO :30 是如图 2 所示克隆 40 家兔抗 IL-6R 抗体的 VH 区的氨基酸序列。
- [0068] SEQ ID NO :31 是如图 2 所示克隆 42 家兔抗 IL-6R 抗体的 VH 区的氨基酸序列。
- [0069] SEQ ID NO :32 是如图 2 所示克隆 51 家兔抗 IL-6R 抗体的 VH 区的氨基酸序列。
- [0070] SEQ ID NO :33 是如图 2 所示克隆 R5 家兔抗 IL-6R 抗体的 VH 区的氨基酸序列。
- [0071] SEQ ID NO :34 是如图 2 所示克隆 R15 家兔抗 IL-6R 抗体的 VH 区的氨基酸序列。

- [0072] SEQ ID NO :35 是如图 2 所示克隆 5 家兔抗 IL-6R 抗体的 VL 区的氨基酸序列。
- [0073] SEQ ID NO :36 是如图 2 所示克隆 21 家兔抗 IL-6R 抗体的 VL 区的氨基酸序列。
- [0074] SEQ ID NO :37 是如图 2 所示克隆 23 家兔抗 IL-6R 抗体的 VL 区的氨基酸序列。
- [0075] SEQ ID NO :38 是如图 2 所示克隆 36 家兔抗 IL-6R 抗体的 VL 区的氨基酸序列。
- [0076] SEQ ID NO :39 是如图 2 所示克隆 37 家兔抗 IL-6R 抗体的 VL 区的氨基酸序列。
- [0077] SEQ ID NO :40 是如图 2 所示克隆 40 家兔抗 IL-6R 抗体的 VL 区的氨基酸序列。
- [0078] SEQ ID NO :41 是如图 2 所示克隆 42 家兔抗 IL-6R 抗体的 VL 区的氨基酸序列。
- [0079] SEQ ID NO :42 是如图 2 所示克隆 51 家兔抗 IL-6R 抗体的 VL 区的氨基酸序列。
- [0080] SEQ ID NO :43 是如图 2 所示克隆 R5 家兔抗 IL-6R 抗体的 VL 区的氨基酸序列。
- [0081] SEQ ID NO :44 是如图 2 所示克隆 R15 家兔抗 IL-6R 抗体的 VL 区的氨基酸序列。
- [0082] SEQ ID NO :45 是如图 2 所示克隆 5 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR1 区的氨基酸序列。
- [0083] SEQ ID NO :46 是如图 2 所示克隆 21 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR1 区的氨基酸序列。
- [0084] SEQ ID NO :47 是如图 2 所示克隆 23 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR1 区的氨基酸序列。
- [0085] SEQ ID NO :48 是如图 2 所示克隆 36 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR1 区的氨基酸序列。
- [0086] SEQ ID NO :49 是如图 2 所示克隆 37 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR1 区的氨基酸序列。
- [0087] SEQ ID NO :50 是如图 2 所示克隆 40 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR1 区的氨基酸序列。
- [0088] SEQ ID NO :51 是如图 2 所示克隆 42 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR1 区的氨基酸序列。
- [0089] SEQ ID NO :52 是如图 2 所示克隆 51 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR1 区的氨基酸序列。
- [0090] SEQ ID NO :53 是如图 2 所示克隆 R5 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR1 区的氨基酸序列。
- [0091] SEQ ID NO :54 是如图 2 所示克隆 R15 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR1 区的氨基酸序列。
- [0092] SEQ ID NO :55 是如图 2 所示克隆 5 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR2 区的氨基酸序列。
- [0093] SEQ ID NO :56 是如图 2 所示克隆 21 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR2 区的氨基酸序列。
- [0094] SEQ ID NO :57 是如图 2 所示克隆 23 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR2 区的氨基酸序列。
- [0095] SEQ ID NO :58 是如图 2 所示克隆 36 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR2 区的氨基酸序列。
- [0096] SEQ ID NO :59 是如图 2 所示克隆 37 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR2 区的氨基酸序列。
- [0097] SEQ ID NO :60 是如图 2 所示克隆 40 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR2 区的氨基酸序列。

列。

[0098] SEQ ID NO :61 是如图 2 所示克隆 42 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR2 区的氨基酸序列。

[0099] SEQ ID NO :62 是如图 2 所示克隆 51 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR2 区的氨基酸序列。

[0100] SEQ ID NO :63 是如图 2 所示克隆 R5 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR2 区的氨基酸序列。

[0101] SEQ ID NO :64 是如图 2 所示克隆 R15 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR2 区的氨基酸序列。

[0102] SEQ ID NO :65 是如图 2 所示克隆 5 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR3 区的氨基酸序列。

[0103] SEQ ID NO :66 是如图 2 所示克隆 21 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR3 区的氨基酸序列。

[0104] SEQ ID NO :67 是如图 2 所示克隆 23 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR3 区的氨基酸序列。

[0105] SEQ ID NO :68 是如图 2 所示克隆 36 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR3 区的氨基酸序列。

[0106] SEQ ID NO :69 是如图 2 所示克隆 37 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR3 区的氨基酸序列。

[0107] SEQ ID NO :70 是如图 2 所示克隆 40 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR3 区的氨基酸序列。

[0108] SEQ ID NO :71 是如图 2 所示克隆 42 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR3 区的氨基酸序列。

[0109] SEQ ID NO :72 是如图 2 所示克隆 51 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR3 区的氨基酸序列。

[0110] SEQ ID NO :73 是如图 2 所示克隆 R5 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR3 区的氨基酸序列。

[0111] SEQ ID NO :74 是如图 2 所示克隆 R15 家兔抗 IL-6R 抗体的 VHCDR3 区的氨基酸序列。

[0112] SEQ ID NO :75 是如图 2 所示克隆 5 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR1 区的氨基酸序列。

[0113] SEQ ID NO :76 是如图 2 所示克隆 21 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR1 区的氨基酸序列。

[0114] SEQ ID NO :77 是如图 2 所示克隆 23 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR1 区的氨基酸序列。

[0115] SEQ ID NO :78 是如图 2 所示克隆 36 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR1 区的氨基酸序列。

[0116] SEQ ID NO :79 是如图 2 所示克隆 37 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR1 区的氨基酸序列。

[0117] SEQ ID NO :80 是如图 2 所示克隆 40 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR1 区的氨基酸序列。

- [0118] SEQ ID NO :81 是如图 2 所示克隆 42 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR1 区的氨基酸序列。
- [0119] SEQ ID NO :82 是如图 2 所示克隆 51 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR1 区的氨基酸序列。
- [0120] SEQ ID NO :83 是如图 2 所示克隆 R5 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR1 区的氨基酸序列。
- [0121] SEQ ID NO :84 是如图 2 所示克隆 R15 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR1 区的氨基酸序列。
- [0122] SEQ ID NO :85 是如图 2 所示克隆 5 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR2 区的氨基酸序列。
- [0123] SEQ ID NO :86 是如图 2 所示克隆 21 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR2 区的氨基酸序列。
- [0124] SEQ ID NO :87 是如图 2 所示克隆 23 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR2 区的氨基酸序列。
- [0125] SEQ ID NO :88 是如图 2 所示克隆 36 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR2 区的氨基酸序列。
- [0126] SEQ ID NO :89 是如图 2 所示克隆 37 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR2 区的氨基酸序列。
- [0127] SEQ ID NO :90 是如图 2 所示克隆 40 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR2 区的氨基酸序列。
- [0128] SEQ ID NO :91 是如图 2 所示克隆 42 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR2 区的氨基酸序列。
- [0129] SEQ ID NO :92 是如图 2 所示克隆 51 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR2 区的氨基酸序列。
- [0130] SEQ ID NO :93 是如图 2 所示克隆 R5 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR2 区的氨基酸序列。
- [0131] SEQ ID NO :94 是如图 2 所示克隆 R15 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR2 区的氨基酸序列。
- [0132] SEQ ID NO :95 是如图 2 所示克隆 5 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR3 区的氨基酸序列。
- [0133] SEQ ID NO :96 是如图 2 所示克隆 21 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR3 区的氨基酸序列。
- [0134] SEQ ID NO :97 是如图 2 所示克隆 23 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR3 区的氨基酸序列。
- [0135] SEQ ID NO :98 是如图 2 所示克隆 36 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR3 区的氨基酸序列。
- [0136] SEQ ID NO :99 是如图 2 所示克隆 37 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR3 区的氨基酸序列。
- [0137] SEQ ID NO :100 是如图 2 所示克隆 40 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR3 区的氨基酸序列。
- [0138] SEQ ID NO :101 是如图 2 所示克隆 42 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR3 区的氨基酸序

列。

[0139] SEQ ID NO:102 是如图 2 所示克隆 51 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR3 区的氨基酸序列。

[0140] SEQ ID NO:103 是如图 2 所示克隆 R5 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR3 区的氨基酸序列。

[0141] SEQ ID NO:104 是如图 2 所示克隆 R15 家兔抗 IL-6R 抗体的 VLCDR3 区的氨基酸序列。

[0142] 发明详述

[0143] 本申请涉及与 IL-6R 特异性结合的抗体及其抗原结合片段,特别是具有特异性表位专属性和功能性质的抗体。本发明的一个实施方式包括特异性人源化抗体及其片段,其能够与 IL-6R 结合,阻断 IL-6R 与 IL-6 结合,并抑制 IL-6 诱导的下游细胞信号和生物学效应。在本发明更特定的实施方式中,本申请所述的抗体以约 199 皮摩尔的亲和力与 IL-6R 特异性结合,并阻断 IL-6R 与 IL-6 结合。

[0144] 本发明的实施方式涉及抗 IL-6R 抗体或其抗原结合片段在诊断、评估和治疗与 IL-6 或其异常表达相关的疾病和病症中的用途。所述抗体用于治疗或预防类风湿关节炎、多发性硬化症、卡斯特莱曼病、和浆细胞瘤 / 多发性骨髓瘤以及其他疾病。

[0145] 除了有明确的相反说明以外,本发明的方法涉及本领域技术人员公知的常规病毒学、免疫学、微生物学、和分子生物学方法以及 DNA 重组技术,出于说明目的,在下文中对其中的多数进行描述。在文献中对此类技术进行了详细的解释。参见,例如, Current Protocols in Molecular Biology or Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons, New York, N.Y. (2009); Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, 3rded., Wiley&Sons, 1995; Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第 3 版, 2001); Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I&II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames&S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames&S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984) 和其他类似文献。

[0146] 如本说明书和所附权利要求中所使用的,除了另有明示以外,单数形式的“一个”、“一种”和“所述”包括复数形式。

[0147] 在本说明书中,除了另有要求以外,可以理解词语“包含”,或其变体如“包括”或“含有”是指包括所述的元素或整数,或者元素或整数的组,但不排除任意其他的元素或整数,或者元素或整数的组。

[0148] 除了另有明示以外,本说明书的各实施方式在细节上做必要的修改可适用于其他各实施方式。

[0149] 可以将标准技术用于 DNA 重组、寡核苷酸合成、以及组织培养和转化(例如,电穿孔,脂质转染)。可以根据生产厂商的说明书、或根据本领域的常规方法、或根据本申请中的描述进行酶反应和纯化技术。通常,可以根据本领域公知的常规方法和根据本说明书中引用和讨论的多种一般和更特定的文献中的描述执行这些以及相关的技术和程序。除了有

特别的定义以外,本申请所描述的术语以及实验程序和分子生物学、分析化学、合成有机化学、以及医学和药物化学技术均是本领域公知和常用的那些。可以将标准技术用于重组技术、分子生物学、微生物学、化学分析、药物制备、制剂、和递送,以及患者治疗。

[0150] 本发明的实施方式涉及与 IL-6 受体 (IL-6R) 结合的抗体。特别地,本申请所述的抗体以意想不到的高亲和性与 IL-6R 特异性结合,阻断 IL-6 与 IL-6R 结合,阻断 IL-6 活性并具有用于治疗与 IL-6 异常表达相关疾病的治疗用途。本申请所述的抗体还具有有益性质,如具有抑制多种 IL-6 介导的生物学效应(例如,STAT3 磷酸化和下游信号活动,Ras-Raf 细胞内信号传导,IL-6 诱导的细胞增殖,IL-6 诱导的细胞分化,IL-6 诱导产生 CRP,纤维蛋白原,血清淀粉样蛋白 A,及本领域技术人员已知的其他 IL-6 介导的效应)的能力。本申请所述的抗体还具有影响 IL-6R 受体内化的作用。

[0151] 示例性抗体,或其抗原结合片段或其互补决定区 (CDR) 的序列如 SEQ ID NO:1-20 和 25-104 所示。

[0152] 如本领域公知的,抗体是一种免疫球蛋白分子,其能够通过位于免疫球蛋白分子可变区的至少一个表位识别位点与靶点如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等特异性结合。如本申请所使用的,该术语不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体,还包括其片段(如 dAb、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链 (ScFv)、其合成变体、天然产生的变体、包括与特异性所需的抗原结合片段结合抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体、以及包括抗原结合位点和特异性所需片段(表位识别位点)的免疫球蛋白分子的任意其他修饰构型。“双体”,通过基因融合构建的多价或多特异性片段(W094 / 13804 ;P.Holliger et al.,Proc. Natl. Acad. Sci. USA906444-6448,1993)也是本申请中抗体的特殊形式。包含连接至 CH3 结构域的 scFv 的微抗体也包括在本申请中(S. Hu 等,Cancer Res.,56,3055-3061,1996)。参见,例如Ward,E. S. et al.,Nature341,544-546(1989);Bird et al.,Science,242,423-426,1988;Huston et al.,PNAS USA,85,5879-5883,1988;PCT / US92 / 09965;W094 / 13804 ;P. Holliger et al.,Proc. Natl. Acad. Sci. USA906444-6448,1993;Y. Reiter et al.,Nature Biotech,14,1239-1245,1996;S. Hu et al.,Cancer Res.,56,3055-3061,1996。

[0153] 如本申请所使用的,术语“抗原结合片段”指多肽片段,其含有免疫球蛋白重链和 / 或轻链的至少一个 CDR,所述免疫球蛋白与感兴趣的抗原特别是 IL-6 受体结合。在这一点上,本申请所述抗体的抗原结合片段可以含有本申请所示与 IL-6R 结合抗体的 VH 和 VL 序列的 1、2、3、4、5、或全部 6 个 CDR。本申请所述的 IL-6R- 特异性抗体的抗原结合片段能够与 IL-6R 结合。在一些实施方式中,抗原结合片段或包含抗原结合片段的抗体阻止或抑制 IL-6 与 IL-6R 结合以及随后的信号活动。在一些实施方式中,抗原结合片段与人 IL-6R 特异性结合,和 / 或抑制或调节人 IL-6R 的生物学活性。

[0154] 术语“抗原”指能够与选择性结合剂(如抗体)结合的分子或分子的一部分,并且还能够将其用于动物来生产能够与该抗原表位结合的抗体。抗原可以具有一个或多个表位。

[0155] 术语“表位”包括任意决定簇,优选多肽决定簇,其能够与免疫球蛋白或 T- 细胞受体特异性结合。表位是与抗体结合的抗原区域。在一些实施方式中,表位决定簇包括分子的化学活性表面簇,如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基,以及可能在一些实施方式中具有特定的三维结构特性,和 / 或特定的电荷特性。在一些实施方式中,当抗体在蛋白和 / 或大

分子的复杂混合物中优选识别其靶抗原时,将抗体称为与抗原特异性结合。当平衡解离常数 $\leq 10^{-7}$ 或 10^{-8} M时,将抗体称为与抗原特异性结合。在某些实施方式中,平衡解离常数可以是 $\leq 10^{-9}$ M或 $\leq 10^{-10}$ M。

[0156] 在一些实施方式中,本申请所述的抗体及其抗原结合片段包括重链和轻链 CDR 集合,其分别嵌入重链和轻链框架区 (FR) 集合之间,框架区对 CDR 提供支持并决定 CDR 彼此之间的空间关系。如本申请所使用的,术语“CDR 集合”指重链或轻链 V 区的三个高变区。从重链或轻链的 N-末端开始,将这些区域分别表示为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。因此,抗原结合位点包括六个 CDR,其包含位于各重链和轻链 V 区的 CDR。在本申请中将包含单一 CDR (例如,CDR1、CDR2 或 CDR3) 的多肽称为“分子识别单位”。对若干抗原-抗体复合物的结晶学分析证明,CDR 的氨基酸残基与结合的抗原广泛接触,其中最广泛的抗原接触是与重链 CDR3 的接触。因此,分子识别单位主要负责抗原结合位点的特异性。

[0157] 如本申请所使用的,术语“FR 集合”指四个翼侧氨基酸序列,其构成重链或轻链 V 区的 CDR 集合中 CDR 的框架。某些 FR 残基可以与结合的抗原接触;但是,FR 主要负责将 V 区折叠成抗原结合位点,特别是那些与 CDR 直接相邻的 FR 残基。在 FR 内,一些氨基酸残基和一些结构特征是高度保守的。在这一点上,所有 V 区序列均含有约 90 个氨基酸残基的内部二硫键环。当 V 区折叠成结合位点时,CDR 展示出为突出的环基序,其形成抗原结合表面。普遍认为,FR 的保守结构区将 CDR 环的折叠形状引导成某些“规范”的结构——不管 CDR 具有何种精确的氨基酸序列。而且,已知一些 FR 残基参与非共价的结构域内接触,从而稳定抗体重链和轻链的相互作用。

[0158] 可以通过参考 Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4th Edition. US Department of Health and Human Services. 1987 以及即时从网上 (immuno.bme.nwu.edu) 获得的更新版本确定免疫球蛋白可变结构域的结构和位置。

[0159] “单克隆抗体”指同质性的抗体群,其中单克隆抗体包括与表位选择性结合有关的氨基酸 (天然存在的或非天然存在的)。单克隆抗体具有较高的特异性,其直接针对单一表位。术语“单克隆抗体”不仅包括完整的单克隆抗体和全长单克隆抗体,还包括其片段 (如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链 (ScFv)、其变体、包括抗原结合部分的融合蛋白、人源化单克隆抗体、嵌合单克隆抗体、以及包括具有所需特异性和与表位结合能力的抗原结合片段 (表位识别位点) 的免疫球蛋白分子的任意其他修饰构型。本申请并非旨在对抗体的来源或其制备方法 (例如,杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物等等) 进行限定。本术语包括上文在“抗体”的定义下所述的完整免疫球蛋白及其片段等。

[0160] 木瓜蛋白酶优选地裂解 IgG 分子以产生若干片段,其中 (F(ab) 片段) 的两个均包含含有完整的抗原结合位点的共价异源二聚体。胃蛋白酶能够裂解 IgG 分子,以提供若干片段,其包括包含两个抗原结合位点的 F(ab')₂ 片段。根据本发明的一些实施方式,可以优选通过蛋白裂解 IgM,以及在少数情况下通过裂解 IgG 或 IgA 免疫球蛋白分子生产供使用的 Fv 片段。但是,更通常地使用本领域公知的重组技术制备 Fv 片段。Fv 片段包括非共价的 V_H:V_L 异源二聚体,其包含抗原识别位点,这些抗原识别位点保留了天然抗体分子的大部分抗原识别和结合能力。Inbar et al., (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69:2659-2662; Hochman et al., (1976) Biochem 15:2706-2710; 和 Ehrlich et al., (1980) Biochem 19:4091-4096。

[0161] 在一些实施方式中,涉及单链 Fv 或 scFv 抗体。例如,κ 体 (Ill et al., Prot.Eng. 10 :949-57(1997)); 微 抗 体 (Martin et al., EMBO J13 :5305-9(1994)); 双 体 (Holliger et al., PNAS90 :6444-8(1993)); 或 Janusin 抗体 (Traunecker et al., EMBOJ10 :3655-59(1991) 和 Traunecker et al., Int. J. CancerSuppl. 7 :51-52(1992)), 其可以在本申请关于选择具有所需特异性的抗体的教导下采用标准分子生物学技术制备。在又一个实施方式中,可以制备包括本申请所述配体的双特异性或嵌合抗体。例如,嵌合抗体可以包括来自不同抗体的 CDR 和框架区,而双特异性抗体可以通过一个结合结构域与 IL-6R 特异性结合,并通过另一个结合结构域与第二个分子结合。可以通过重组分子生物学技术制备这些抗体,或者可以将这些抗体物理偶联在一起。

[0162] 单链 Fv (sFv) 多肽是共价连接的 V_H : V_L 异源二聚体,其由融合基因表达,融合基因包括 V_H - 和 V_L - 编码基因,通过编码肽的连接子连接。Huston et al., (1988) Proc. Nat. AcadSci. USA85(16) :5879-5883。已有多种方法描述了化学结构的识别方法,用于从抗体 V 区将天然聚集的 (但化学分离的) 轻链和重链多肽链转化成 sFv 分子,使其折叠成基本上与抗原结合位点的结构类似的三维结构。参见,例如美国专利号 5,091,513 和 5,132,405, Huston et al.; 和美国专利号 4,946,778, Ladner et al.。

[0163] 在一些实施方式中,本申请所述的 IL-6R 结合抗体是双体形式。双体是多肽的多聚体,各多肽均包括包含免疫球蛋白轻链结合区的第一结构域和包含免疫球蛋白重链结合区的第二结构域,这两个结构域是连接的 (例如,通过肽接头),但彼此间不能结合以形成抗原结合位点:通过使多聚体内的一个多肽的第一结构域与多聚体内的另一个多肽的第二结构域相结合以形成抗原结合位点 (W094 / 13804)。

[0164] 抗 体 的 dAb 片 段 由 V_H 结 构 域 组 成 (Ward, E. S. et al., Nature341, 544-546(1989))。

[0165] 当使用双特异性抗体时,可以是常规的双特异性抗体,其能够通过多种方法制备 (Holliger, P. and Winter G. Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449(1993)), 例如,化学制备或来自杂交瘤,或可以是上文提及的任意双特异性抗体片段。双体和 scFv 的构建可以不用 Fc 区、而仅仅使用可变结构域,这样可以有助于降低抗独特型反应的效应。

[0166] 相对于双特异性完整抗体而言,双特异性双体还可能特别有用,因为其易于在大肠杆菌中构建和表达。使用噬菌体展示 (W094 / 13804) 能够容易地将具有适宜的结合特异性的双体 (和多种其他的多肽如抗体片段) 从文库中筛选出来。如果双体的一个臂保持恒定,例如,其对抗原 X 具有特异性,则可以制备另一臂变化的文库,并选择具有适宜特异性的抗体。可以通过凹凸匹配 (knobs-into-holes) 技术制备双特异性完整抗体 (J. B. B. Ridgeway et al., Protein Eng., 9, 616-621, 1996)。

[0167] 在一些实施方式中,本申请所述的抗体可以是 UniBody® 形式。UniBody® 是除去铰链区的 IgG4 抗体 (参见 GenMab Utrecht, The Netherlands; 亦可参见,例如 US20090226421)。该专利抗体技术能够制备出稳定的、更小的抗体形式,其与目前的小抗体形式相比具有更长的治疗窗。认为 IgG4 抗体是惰性的,因而其不与免疫系统发生相互作用。可以通过除去抗体的铰链区对完整的人 IgG4 抗体进行修饰,以获得与相应的完整 IgG4 (GenMab, Utrecht) 相比具有明显稳定性性质的半 - 分子片段。将 IgG4 分子一分为二仅在 UniBody® 上留下一个可以与同源抗原 (例如,疾病靶点) 结合的区域,因此 UniBody®

仅与靶细胞上的一个位点单价结合。对于某些癌细胞表面抗原而言,该单价结合可能不会刺激癌细胞生长,而在使用具有相同抗原特异性的二价抗体时可能出现这种情况,因此,UniBody® 技术可能为常规抗体难以治疗的某些类型的癌症提供了治疗选择。当治疗某些类型的癌症时,UniBody® 的小尺寸可能非常有益,其使得分子在更大的实体瘤上具有更好的分布,并且可能增加疗效。

[0168] 在一些实施方式中,本申请的抗体可以是纳米抗体形式。纳米抗体由单基因编码,其可以在几乎所有的原核和真核宿主中有效生产,例如大肠杆菌(参见,例如美国专利号 6,765,087)、霉菌(例如曲霉属真菌(*Aspergillus*)或木霉属真菌(*Trichoderma*))和酵母(例如酵母菌属(*Saccharomyces*)、克鲁维酵母属(*Kluyvermyces*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)或毕赤酵母属(*Pichia*))(参见,例如美国专利号 6,838,254)。生产工艺是可扩展的,已生产出几千克量级的纳米抗体。可以将纳米抗体制成具有较长有效期的即用型溶液。用于生产针对所需靶点的纳米抗体的纳米克隆方法是一种专利方法(参见,例如 W006 / 079372),其基于 B- 细胞的自动化高通量筛选。

[0169] 在一些实施方式中,本申请所述的抗-IL-6R 抗体或其抗原结合片段是人源化的。其指一般采用重组技术制备的嵌合分子,具有衍生自非人种属的免疫球蛋白的抗原结合位点,并且该分子的其余免疫球蛋白结构基于人免疫球蛋白的结构和/或序列。抗原结合位点可以包括融合至恒定结构域的完整的可变结构域,或者仅是移植至可变结构域适宜框架区的 CDR。表位结合位点可以是野生型的,或通过一个或多个氨基酸替换修饰。其消除了恒定区对在个体中的免疫原性,但是仍保留针对外源性可变区产生免疫应答的可能性(LoBuglio, A. F. et al., (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86 :4220-4224 ;Queen et al., *PNAS* (1988) 86 :10029-10033 ;Riechmann et al., *Nature* (1988) 332 :323-327)。将本申请公开的抗-IL-6R 抗体人源化的示例性方法包括美国专利号 7,462,697 中所描述的方法。根据本发明的一些实施方式的示例性人源化抗体包括 SEQ ID NOs :9、10、19 和 20 中的人源化序列。

[0170] 另一种方法不仅着重于提供来自于人的恒定区,还着重于修饰可变区,以便对其进行改造使其尽可能的接近于人的形式。已知重链和轻链可变区均含有三个互补决定区(CDR),其对关注的表位的应答有所不同,并决定结合能力。CDR 侧接有四个框架区(FR),其在给定的种属中相对保守,并且推测其为 CDR 提供支架。当针对特定表位制备非人抗体时,可以通过将来自非人抗体的 CDR 移植到待修饰的人抗体的 FR,从而对可变区进行“整形”或“人源化”。Sato, K. et al., (1993) *Cancer Res* 53 :851-856 已报道了该方法在制备不同抗体中的应用。Riechmann, L. et al., (1988) *Nature* 332 :323-327 ;Verhoeyen, M. et al., (1988) *Science* 239 :1534-1536 ;Kettleborough, C. A. et al., (1991) *Protein Engineering* 4 :773-778 ;Maeda, H. et al., (1991) *Human Antibodies Hybridoma* 2 :124-134 ;Gorman, S. D. et al., (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88 :4181-4185 ;Tempest, P. R. et al., (1991) *Bio / Technology* 9 :266-271 ;Co, M. S. et al., (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88 :2869-2873 ;Carter, P. et al., (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89 :4285-4289 ;和 Co, M. S. et al., (1992) *J Immunol* 148 :1149-1154。在某些实施方式中,人源化的抗体保留了所有的 CDR 序列(例如,人源化的小鼠抗体,其含有来自小鼠抗体的全部六个 CDR)。在其他实施方式

中,人源化抗体含有的一个或多个(一个、两个、三个、四个、五个、六个)CDR与原始抗体相比进行过改造,也将其称为“衍生自”原始抗体一个或多个 CDR 的一个或多个 CDR。

[0171] 在一些实施方式中,本申请的抗体可以是嵌合抗体。在这一点上,嵌合抗体包含抗-IL-6R抗体的抗原结合片段,其可操作地连接至或融合至不同抗体的异源性Fc部分。在一些实施方式中,异源性Fc结构域是人源的。在其他实施方式中,异源性Fc结构域可以来自母体抗体的不同Ig类型,包括IgA(包括IgA1和IgA2亚类)、IgD、IgE、IgG(包括IgG1、IgG2、IgG3、和IgG4亚类)、和IgM。在进一步的实施方式中,异源性的Fc结构域可以包括来自一个或多个不同Ig类的CH2和CH3结构域。如上文所述的人源化的抗体,嵌合抗体的抗-IL-6R抗原结合片段可以仅包含一个或多个本申请所述的抗体的CDR(例如,本申请所述抗体的1个、2个、3个、4个、5个、或6个CDR),或可以包括完整的可变结构域(VL、VH或二者)。

[0172] 在一些实施方式中,IL-6R结合抗体包括本申请所述抗体的一个或多个CDR。在这一点上,在某些例子中已显示,可以仅转移抗体的VHCDR3,同时仍保留所需的特异性结合(Barbas et al., PNAS(1995)92:2529-2533)。还可参见,McLane et al., PNAS(1995)92:5214-5218, Barbas等, J. Am. Chem. Soc. (1994)116:2161-2162。

[0173] Marks等(Bio / Technology,1992,10:779-783)描述了抗体可变结构域的储库的生产方法,其中将位于或邻近可变结构域区域5'末端的通用引物与人VH基因第三框架区的通用引物联合使用,以提供缺乏CDR3的VH可变结构域的储库。Marks等进一步描述了该储库是如何与特定抗体的CDR3组合的。使用类似技术,可以利用缺乏CDR3的VH或VL结构域的储库与本申请所述抗体的CDR3衍生的序列重新排列,并将重新排列的完整的VH或VL结构域与同源的VL或VH结构域组合,以提供与IL-6R结合的抗体或其抗原结合片段。然后可以将储库在适宜的宿主系统中展示,如W092 / 01047中的噬菌体展示系统,这样可以选择出适宜的抗体或其抗原结合片段。储库可以由至少约 10^4 个成员以及若干数量级以上组成,例如,约从 10^6 至 10^8 或 10^{10} 或更多成员。Stemmer也公开了类似的重新排列或组合技术(Nature,1994,370:389-391),其描述了该技术与 β -内酰胺酶基因之间的关系,但观察到该方法可以用于产生抗体。

[0174] 亦或通过将一个或多个选定的VH和/或VL基因随机突变以使整个可变结构域内产生突变的方法产生新的VH或VL区,这些VH或VL区携带本发明实施方式中描述的一个或多个CDR衍生的序列。Gram等对此技术进行了描述(1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580),其使用了易错配PCR。还可以使用另一种方法将VH或VL基因的CDR区直接诱变。Barbas等(1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:3809-3813)和Schier等(1996, J. Mol. Biol. 263:551-567)公开了此技术。

[0175] 在一些实施方式中,可以使用本申请所述抗体的特定VH和/或VL筛选互补可变结构域文库,以鉴定具有所需性质的抗体,如对IL-6R亲和性增加的抗体。此类方法已在例如Portolano et al., J. Immunol. (1993)150:880-887;Clarkson et al., Nature(1991)352:624-628中进行了描述。

[0176] 还可以使用其他方法混合和匹配CDR,以鉴定具有所需结合活性的抗体,如与IL-6R结合的抗体。例如:Klimka et al., British Journal of Cancer(2000)83:252-260,其描述的筛选方法使用小鼠VL和人VH文库,但CDR3和FR4仍然来自小鼠VH。获得抗体

后,针对人 VL 文库对 VH 进行筛选以获得结合抗原的抗体。Beiboer et al., J. Mol. Biol. (2000) 296 :833-849 描述了使用完整小鼠重链和人轻链文库的筛选方法。获得抗体后,将一个 VL 与保留了小鼠 CDR3 的人 VH 文库组合。获得了能够与抗原结合的抗体。Rader et al., PNAS(1998) 95 :8910-8915 描述了一种与上述 Beiboer 等类似的方法。

[0177] 这些刚刚所述的技术均是本领域公知的。但是,本领域技术人员将能够使用此类技术,根据本申请所述的本发明的若干实施方式,通过本领域的常规方法获得抗体或其抗原结合片段。

[0178] 本申请还公开了一种获得对 IL-6R 抗原具有特异性的抗体抗原结合结构域的方法,该方法包括通过在本申请所示的 VH 结构域的氨基酸序列中增加、删除、替换或插入一个或多个氨基酸,形成 VH 结构域的氨基酸序列变体,任选地将由此得到的 VH 结构域与一个或多个 VL 结构域组合,并检测 VH 结构域或 VH / VL 的组合以识别特定的结合成员,或对 IL-6R 具有特异性的抗体抗原结合结构域,且任选地还具有一个或多个所需的性质。VL 结构域可以具有基本上如本申请所列出的氨基酸序列。可以使用类似方法将本申请所公开的 VL 结构域的一个或多个序列变体与一个或多个 VH 结构域组合。

[0179] 与抗体或多肽“特异性结合”或“优先结合”(在本申请中可以互换使用)的表位是本领域公知的术语,并且确定此类特异性或优先结合的方法也是本领域公知的。如果与其他细胞或底物相比,所述分子与特定细胞或底物反应或结合时的频率更高、速度更快、持续时间更长和 / 或亲和性更高,则认为显示出“特异性结合”或“优先结合”。如果与同其他底物结合相比,抗体结合的亲和性、亲合力更高、更容易,和 / 或持续时间更长,则认为抗体“特异性结合”或“优先结合”至靶点。例如,特异性或优先结合至 IL-6R 表位的抗体是指,与结合至其他 IL-6R 表位或非 -IL-6R 表位相比,与一个 IL-6R 表位结合的亲和性、亲合力更高、更容易,和 / 或持续时间更长的抗体。通过阅读该定义还可以理解,例如,与第一个靶点特异性或优先结合的抗体(或部分或表位)可以与或不与第二个靶点特异性或优先结合。正因如此,“特异性结合”或“优先结合”不是必然要求排他结合(虽然可以将其包括在内)。通常,但非必然地,提到结合时是指优先结合。

[0180] 免疫结合通常是指免疫球蛋白分子与对免疫球蛋白具有特异性的抗原之间发生非共价类型的相互作用,例如用于解释而非限制,其为静电、离子、亲水和 / 或疏水性吸引或排斥、空间力、氢键、范德华力、以及其他相互作用。可以用相互作用的解离常数(K_d)来表述免疫结合相互作用的力、或亲和性,其中 K_d 越小表示亲和性越高。可以使用本领域公知的方法对选定多肽的免疫结合性质进行定量。一个此类方法涉及测定抗原-结合位点 / 抗原复合物形成和解离的速率,其中该速率依赖于复合物各部分的浓度、相互作用的亲和性、以及同样影响两个方向速率的几何参数。因此,可以通过计算浓度以及聚合和解离的实际速率确定“开速率常数”(K_{on})和“关速率常数”(K_{off})。 K_{off} / K_{on} 的比率能够删去与亲和性无关的所有参数,这样其相当于解离常数 K_d 。参见,一般地, Davies et al., (1990) Annual Rev. Biochem. 59 :439-473。

[0181] 在一些实施方式中,本申请所述的抗 -IL-6R 抗体具有的亲和性为约 100、150、155、160、170、175、180、185、190、191、192、193、194、195、196、197、198 或 199 皮摩,以及在某些实施方式中,抗体对 IL-6R 可能具有甚至更高的亲和性。

[0182] 术语“免疫活性”,当用在具有或“保留免疫活性”的表位中时,指在不同条件下抗

体（例如，抗-IL-6R 抗体）与表位结合的能力，例如表位经还原或变性条件处理后。

[0183] 根据本申请的某些优选实施方式，抗体或其抗原结合片段可以是与本申请所述的任意抗体竞争结合的 IL-6R，其 (i) 与抗原特异性结合，并且 (ii) 包含本申请所公开的 VH 和 / 或 VL 结构域，或包含本申请所公开的 VH CDR3、或任意这些的变体。可以容易地在体外对抗体间的竞争进行检测，例如使用 ELISA 和 / 或在一个抗体上标记特异性的报告分子，其能够在存在其他非标记抗体时被检测到，以使得能够识别与相同表位或重叠表位结合的特异性抗体。这些检测被描述于，例如，实施例 1 中，其中确定了本申请所公开的克隆 #51 的抗 IL-6R 抗体结合至与已知抗 IL-6R 抗体，即托珠单抗 (tocilizumab) 不同的表位。因此，本申请提供了一种特异性抗体或其抗原结合片段，包括人抗体的抗原结合位点，其与本申请所述的抗体竞争结合 IL-6R。

[0184] 在这一点上，如本申请所使用的，术语“与……竞争”、“抑制结合”和“阻止结合”（例如，指抑制 / 或阻断 IL-6 与 IL-6R 结合，或指抑制 / 阻断抗-IL-6R 抗体与 IL-6R 结合）在本申请中可以互换使用，包括部分和完全抑制 / 阻断。抑制 / 阻断 IL-6 与 IL-6R 的结合，可优选地降低或改变当 IL-6 结合至 IL-6R、且不存在抑制或阻断时，细胞信号的正常水平或类型。抑制和阻断还旨在包括当与本申请所公开的抗-IL-6R 抗体接触时，与配体不接触抗-IL-6R 抗体相比，任意可检测的 IL-6 与 IL-6R 结合的降低，例如阻止 IL-6 与 IL-6R 结合至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%。

[0185] 与可变区相比，免疫球蛋白恒定区的序列多样性较低，其负责与多种天然蛋白结合以激发重要的生化事件。在人类中，有五种不同类型的抗体，包括 IgA（包括 IgA1 和 IgA2 亚类）、IgD、IgE、IgG（包括 IgG1、IgG2、IgG3、和 IgG4 亚类）、和 IgM。这些抗体类型之间的区别特征为其恒定区，尽管其 V 区可能存在细微差别。

[0186] 抗体的 Fc 区与多数 Fc 受体和配体之间发生相互作用，以传递一系列重要的功能性能力，称为效应器功能。对于 IgG 而言，Fc 区包括 Ig 结构域 CH2 和 CH3，且 N-末端铰链与 CH2 连接。针对 IgG 类型的 Fc 受体的重要家族为 Fc γ 受体 (Fc γ Rs)。这些受体介导抗体与免疫系统细胞臂之间的联系 (Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12: 181-220; Ravetch et al., 2001, Annu Rev Immunol 19: 275-290)。在人类中，该蛋白家族包括 Fc γ RI (CD64)，其包括亚型 Fc γ RIa、Fc γ RIb、和 Fc γ RIc；Fc γ RII (CD32)，其包括亚型 Fc γ RIIa（包括同种异型 H131 和 R131）、Fc γ RIIb（包括 Fc γ RIIb-1 和 Fc γ RIIb-2）、和 Fc γ RIIc；以及 Fc γ RIII (CD16)，包括亚型 Fc γ RIIIa（包括同种异型 V158 和 F158）和 Fc γ RIIIb（包括同种异型 Fc γ RIIIb-NA1 和 Fc γ RIIIb-NA2）(Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82: 57-65)。典型地，这些受体具有介导结合至 Fc 的细胞外结构域、跨膜区、和可能介导某些细胞内信号事件的细胞内结构域。这些受体在多种免疫细胞中表达，包括单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、血小板、B 细胞、大颗粒淋巴细胞、朗格罕氏细胞、自然杀伤 (NK) 细胞、和 T 细胞。Fc / Fc γ R 复合物的形成将这些效应器细胞募集至结合抗原的位点，典型地导致细胞内的信号事件以及重要的随后免疫应答，如炎症介质释放、B 细胞活化、胞吞作用、吞噬作用、和细胞毒攻击。

[0187] 介导细胞毒性和吞噬性效应器功能的能力是抗体破坏靶细胞的潜在机制。表达 Fc γ R 的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体，并且随后导致靶细胞裂解，

这种细胞介导的反应被称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) (Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol12:181-220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol18:739-766; Ravetch et al., 2001, Annu Rev Immunol19:275-290)。表达 Fc γ R 的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体, 并且随后导致靶细胞吞噬, 这种细胞介导的反应被称为抗体依赖性细胞介导的吞噬作用 (ADCP)。所有的 Fc γ R 结合 Fc 上的相同区域, 在 Cg2(CH2) 结构域和前面铰链的 N-末端。该相互作用在结构上已被很好地鉴定 (Sondermann et al., 2001, J Mol Biol309:737-749), 并且结合至人 Fc γ RIIIb 细胞外结构域的人 Fc 的若干结构已被解析 (pdb 登记代码 1E4K) (Sondermann et al., 2000, Nature406:267-273.) (pdb 登记代码 1IIS 和 1IIX) (Radaev et al., 2001, J Biol Chem276:16469-16477.)

[0188] 不同的 IgG 亚类对 Fc γ R 具有不同的亲和性, 典型地 IgG1 和 IgG3 与受体的结合基本上优于 IgG2 和 IgG4 (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett82:57-65)。所有的 Fc γ R 与 IgG Fc 上的相同区域结合, 但是其亲和性不同: 高亲和性结合子 Fc γ RI 与 IgG1 的 Kd 为 10^{-8}M^{-1} , 而低亲和性受体 Fc γ RII 和 Fc γ RIII 通常分别在 10^{-6} 和 10^{-5} 结合。Fc γ RIIIa 和 Fc γ RIIIb 的细胞外结构域具有 96% 的同一性, 而 Fc γ RIIIb 不具有细胞内信号结构域。而且, Fc γ RI、Fc γ RIIa / c 和 Fc γ RIIIa 反而是免疫复合物触发活化的正向调节子, 其特征为具有细胞内结构域, 其具有免疫受体酪氨酸活化基序 (ITAM), Fc γ RIIb 具有免疫受体酪氨酸抑制基序 (ITIM), 因而其是抑制的。因此, 将前者称为激活受体, 将 Fc γ RIIb 称为抑制受体。受体在不同免疫细胞中的表达类型和水平也不同。还有另一层面的复杂性, 即在人蛋白质组中存在多种 Fc γ R 的多态性。具有临床意义的特别相关的多态性为 V158 / F158 Fc γ RIIIa。与 F158 同种异型相比, 人 IgG1 与 V158 同种异型的结合亲和性更高。已表明, 在亲和性上的这种差异, 以及可能地其对 ADCC 和 / 或 ADCP 的影响, 是抗-CD20 抗体利妥昔单抗 (Rituxan®, IDEC Pharmaceuticals Corporation 的注册商标) 效能的显著的决定因素。具有 V158 同种异型的患者对利妥昔单抗治疗的应答有利; 然而, 具有低亲和性 F158 同种异型的患者的应答较差 (Cartron et al., 2002, Blood99:754-758)。约有 10-20% 的人是 V158 / V158 纯合的, 45% 是 V158 / F158 杂合的, 以及 35-45% 的人是 F158 / F158 纯合的 (Lehrnbecher et al., 1999, Blood94:4220-4232; Cartron et al., 2002, Blood99:754-758)。因此, 80-90% 的人是较差的应答者, 其具有至少一个 F158 Fc γ RIIIa 等位基因。

[0189] Fc 区也与补体级联的活化相关。在经典的补体途径中, C1 与其 C1q 亚基结合至 IgG 或 IgM 的 Fc 片段, 其与抗原形成复合物。在本发明的一些实施方式中, 对 Fc 区的修饰作用包括改变 (增强或减弱) 本申请所述的 IL-6R- 特异性抗体的能力以活化补体系统的修饰作用 (参见, 例如美国专利 7, 740, 847)。为评估补体的活化, 可以进行补体依赖性细胞毒性 (CDC) 检测 (参见, 例如 Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996))。

[0190] 因此, 在一些实施方式中, 本发明提供了一种具有修饰的 Fc 区的抗-IL-6R 抗体, 其具有改变的功能性质, 如 CDC 活性减弱, CDC、ADCC、或 ADCP 活性增强, 或对特定的 Fc γ R 的结合亲和性增强或血清半衰期增加。本申请中涉及的其他修饰的 Fc 区已在下述文献中描述, 例如已授权的美国专利 7, 317, 091; 7, 657, 380; 7, 662, 925; 6, 538, 124; 6, 528, 624; 7, 297, 775; 7, 364, 731; 公开的美国专利申请 US2009092599; US20080131435; US20080138344; 和公开的国际申请 WO2006 / 105338; WO2004 / 063351; WO2006 /

088494 ;W02007 / 024249。

[0191] 因此,在一些实施方式中,将具有所需结合特异性的抗体可变结构域融合至免疫球蛋白恒定结构域序列。在一些实施方式中,与 Ig 重链恒定结构域融合,包括至少部分铰链、 C_H2 和 C_H3 区。优选在至少一个融合中存在含有轻链结合必须位点的第一重链恒定区 (C_H1)。在单独的表达载体中插入编码免疫球蛋白重链融合的 DNA,以及如有需要的话,免疫球蛋白轻链,并共转染至适宜的宿主细胞。这样能够更灵活地调整三种多肽片段的各自比例,在某些实施方式中,需要在构建中使用比例不相等的三种多肽链以便为所需的双特异性抗体提供理想的收率。然而,当相等比例的至少两种多肽链表达的收率较高,或者当比例对所需链组合的收率不具有显著影响时,将两种或全部三种多肽链的编码序列插入一个表达载体也是有可能的。

[0192] 还可以对本发明的抗体(及其抗原结合片段和变体)进行修饰以包括表位标签或标记,例如,用于纯化或诊断应用。本领域公知有多种用于制备抗体偶联物的连接基团,包括例如美国专利号 5,208,020 或 EP 专利 0425235B1,以及 Chari et al., Cancer Research52:127-131(1992) 中公开的那些。连接基团包括二硫键基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团、或酯酶不稳定基团,如上述的专利所公开的,优选二硫键和硫醚基团。

[0193] 在另一个实施方式中,本申请所述的抗-IL-6R-特异性抗体可以偶联,或可操作地连接至另一个治疗化合物,在本申请中称为偶联物。偶联物可以是细胞毒剂、化疗剂、细胞因子、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、毒素、放射性同位素、或其他治疗活性剂。化疗剂、细胞因子、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、和上文所述的其他治疗剂、以及所有这些前述的治疗剂均可以用作抗体偶联剂。

[0194] 在一个替代实施方式中,抗体偶联或可操作地连接至毒素,包括但不限于细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素和酶活性毒素,包括其片段和/或变体。小分子毒素包括但不限于皂素(Kuroda K et al., The Prostate70:1286-1294(2010);Lip, WL et al., 2007Molecular Pharmaceutics4:241-251;Quadros EV et al., 2010Mol Cancer Ther; 9(11):3033-40;Polito L et al., 2009British Journal ofHaematology, 147, 710-718)、刺孢霉素、美登素(美国专利号 5,208,020)、单端孢霉烯、和 CC1065。毒素包括但不限于 RNase、白树毒素、烯二炔、蓖麻毒素、相思豆毒素、白喉毒素、霍乱毒素、白树毒素、假单胞菌外毒素(PE40)、志贺杆菌毒素、产气荚膜梭状芽胞杆菌毒素、和商陆抗病毒蛋白。

[0195] 在一个实施方式中,本申请的抗体及其抗原结合片段偶联至一种或多种美登素分子。美登素是通过抑制微管蛋白聚合发挥作用的有丝分裂抑制剂。美登素首次从东非灌木齿叶美登木中分离得到(美国专利号 3,896,111)。随后,发现某些微生物也产生美登素,如美登醇和 C-3 美登醇酯(美国专利号 4,151,042)。合成的美登醇及其衍生物和类似物已在如下文献中公开:例如美国专利号 4,137,230;4,248,870;4,256,746;4,260,608;4,265,814;4,294,757;4,307,016;4,308,268;4,308,269;4,309,428;4,313,946;4,315,929;4,317,821;4,322,348;4,331,598;4,361,650;4,364,866;4,424,219;4,450,254;4,362,663;和 4,371,533。包含美登素的免疫偶联物及其治疗用途已在例如美国专利号 5,208,020, 5,416,064 和欧洲专利 EP0425235B1 中公开。Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA93:8618-8623(1996) 中描述了免疫偶联物,其包含命名为 DM1 的美登素,DM1

连接至针对人结直肠癌的单克隆抗体 C242。已发现该偶联物对培养的结肠癌细胞具有较高的细胞毒性,且在体内肿瘤生长检测中显示出抗肿瘤活性。

[0196] 通过将抗体与美登素分子化学连接制备抗体-美登素偶联物,抗体或美登素分子的生物学活性均未出现显著降低。每个抗体分子偶联平均 3-4 个美登素分子显示出有效增加靶分子的细胞毒性,且不会对抗体的功能或溶解度带来负面影响,尽管与使用裸抗体相比,预计即使是一分子的毒素/抗体也将会增强细胞毒性。美登素是本领域公知的,其可以通过已知技术合成或从天然来源分离。适宜的美登素已在例如美国专利号 5,208,020 和上文所述的其他专利和非专利出版物中公开。优选的美登素是美登醇以及在美登醇分子的芳香环或其他位置修饰的美登醇类似物,如不同的美登醇酯。

[0197] 感兴趣的另一种偶联物包括偶联至一个或多个卡里奇霉素分子的抗体。卡里奇霉素家族的抗生素在皮摩尔以下的浓度下就能够使双链 DNA 断裂。也可以使用卡里奇霉素的结构类似物 (Hinman et al., 1993, Cancer Research 53:3336-3342; Lode et al., 1998, Cancer Research 58:2925-2928) (美国专利号 5,714,586; 美国专利号 5,712,374; 美国专利号 5,264,586; 美国专利号 5,773,001)。尾海兔素 10 类似物,如奥里斯他汀 E (auristatin E (AE)) 和单甲基奥里斯他汀 E (MMAE),可以用作本申请公开的抗体或其变体的偶联物 (Doronina et al., 2003, Nat Biotechnol 21(7):778-84; Francisco et al., 2003 Blood 102(4):1458-65)。有用的酶活性毒素包括但不限于白喉 A 链、白喉毒素无结合活性的片段、外毒素 A 链 (来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒素 A 链、相思豆毒素 A 链、蒴莲素 A 链、 α -帚曲霉素、油桐蛋白、香石竹毒蛋白、美洲商陆蛋白 (PAPI、PAPII、和 PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、有丝分裂毒素 (mitogellin)、局限曲霉素、酚霉素、伊诺霉素和单端孢霉烯族化合物。参见例如 PCT W093 / 21232。本申请进一步涉及这样的实施方式,在这些实施方式中,本申请所述的 IL-6R- 特异性抗体与具有核溶解活性的化合物,例如核糖核酸酶或 DNA 核酸内切酶如脱氧核糖核酸酶 (DNase),之间形成偶联或融合。

[0198] 在一个替代实施方式中,本申请公开的抗体可以偶联或可操作地连接至放射性同位素以形成放射性偶联物。可以利用多种具有放射活性的同位素生产放射性偶联物抗体。例子包括但不限于 ^{90}Y 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 、和 ^{212}Bi 。

[0199] 在某些其他实施方式中,本申请所述的抗体可以偶联至治疗性基团,如细胞毒素 (例如,细胞抑制剂或杀细胞剂)、治疗剂或放射性元素 (例如, α -发射体、 γ -发射体等)。细胞毒素或细胞毒剂包括对细胞有害的任意试剂。例子包括紫杉醇 (paclitaxel) / 紫杉醇 (paclitaxol)、细胞松弛素 B、短杆菌肽 D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春花碱、秋水仙碱、阿霉素、柔红霉素、二羟基蒽蒽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素 D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、皂草素、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、和嘌呤霉素及其类似物或同源物。治疗剂包括但不限于,抗代谢药 (例如,甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪)、烷化剂 (例如,氮芥、噻替派、苯丁酸氮芥、苯丙氨酸氮芥、卡莫司汀 (BSNU) 和洛莫司汀 (CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、丝裂霉素 C、和顺二氯二胺铂 (II) (DDP) 顺铂)、蒽环类 (例如,柔红霉素 (曾用名道诺霉素) 和阿霉素)、抗生素 (例如,放线菌素 (曾用名更生霉素)、博来霉素、光神霉素、和氨基霉素 (AMC))、和抗有丝分裂剂 (例如,长春新碱和长春花碱)。

[0200] 此外,在一些实施方式中,IL-6R- 特异性抗体(如本申请所述包括其功能片段,如抗原结合片段)可以偶联至治疗性基团,如放射性材料或大环螯合剂用于偶联放射金属离子。在一些实施方式中,大环螯合剂是 1,4,7,10- 四氮杂环十二烷 -N,N',N'',N''' - 四乙酸(DOTA),可以通过接头分子将其连接至抗体。此类接头分子是本领域公知的,且在 Denardo et al.,1998,Clin Cancer Res. 4 :2483-90 ;Peterson et al.,1999,Bioconjug. Chem. 10 :553 ;和 Zimmerman et al.,1999,Nucl. Med. Biol. 26 :943-50 中进行了描述。

[0201] 在又一个实施方式中,可以将抗体偶联至“受体”(如链霉亲和素)用于在肿瘤中预定位,其中将抗体-受体偶联物给予患者,随后使用清除剂将未结合的偶联物从循环中除去,然后再给予“配体”(例如亲和素),其偶联至细胞毒剂(例如,放射性核苷酸)。在一个替代实施方式中,抗体偶联或可操作地连接至酶,以引入抗体依赖性酶介导的前药治疗(ADEPT)。可以通过将抗体偶联或可操作地连接至前药活化酶来使用 ADEPT,前药活化酶可以将前药(例如,肽酰化疗剂,参见 PCT W081 / 01145) 转化为活性抗癌药物。参见,例如 PCT W088 / 07378 和美国专利号 4,975,278。用于 ADEPT 的免疫偶联物的酶成分包括能够以使其转化为活性更高的细胞毒形式的方式作用于前药的任意酶。用于这些方法和相关实施方式的酶包括但不限于,用于将含有磷酸盐的前药转化为游离药物的碱性磷酸酶;用于将含有硫酸盐的前药转化为游离药物的芳基硫酸酯酶;用于将无毒性的 5- 氟胞嘧啶转化为抗癌药 5- 氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶;蛋白酶,如沙雷氏菌蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶(如组织蛋白酶 B 和 L),其用于将含有肽的前药转化为游离药物;D- 丙氨酰羧肽酶,其用于转化含有 D- 氨基酸取代的前药;碳水化合物裂解酶,如 β - 半乳糖苷酶和胞嘧啶脱氨酶,其用于将糖基化的前药转化为游离药物; β - 内酰胺酶,其用于将 β - 内酰胺衍生化的药物转化为游离药物;以及青霉素酰胺酶,如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶,其分别用于将胺基上的氮被苯氧乙酰基或苯乙酰基基团衍生化的药物转化为游离药物。或者,可以使用具有酶活性的抗体,在本领域亦称为“抗体酶”,将前药转化为游离的活性药物(参见,例如 Massey,1987,Nature328 :457-458)。可以制备用于将抗体酶递送至肿瘤细胞群的抗体-抗体酶偶联物。

[0202] 可以使用多种双功能蛋白偶联剂制备免疫偶联物,如 N- 琥珀酰亚胺 -3-(2- 吡啶二硫代) 丙酸(SPDP)、琥珀酰亚胺 -4-(N- 马来酰亚胺) 环己烷 -1- 羧酸、亚胺基四氢噻吩(IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(如二甲基二亚酰胺盐酸盐)、活性酯(如二琥珀酰亚胺辛二酸)、醛(如戊二醛)、双-叠氮基化合物(如双(p- 叠氮基苯甲酰基) 己二胺)、双-重氮衍生物(如双-(p- 二重氮苯甲酰基)- 乙二胺)、二异氰酸酯(如甲苯 2,6- 二异氰酸酯)、以及双- 活性氟化合物(如 1,5- 二氟 -2,4- 二硝基苯)。特定的偶联剂包括 N- 琥珀酰亚胺 -3-(2- 吡啶二硫代) 丙酸(SPDP)(Carlsson et al., Biochem. J. 173 :723-737[1978]) 和 N- 琥珀酰亚胺 -4-(2- 吡啶硫代) 戊酸(SPP) 以提供二硫键。接头可以是易于释放一个或多个可裂解组分的“可裂解的接头”。例如,可以使用酸不稳定接头(Cancer Research52 : 127-131(1992) ;美国专利号 5,208,020)。

[0203] 本申请还涉及本发明抗体(和多肽)的其他修饰。例如,抗体可以连接至多种非蛋白性聚合物之一,例如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧乙烯、或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物。还可以通过例如凝聚技术或通过界面聚合(例如,分别为羟甲基纤维素或明胶微囊和聚-(甲基甲基丙烯酸酯) 微囊) 将抗体包埋于微囊、胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微

球、微乳、纳米粒子和纳米胶囊)、或粗乳。此类技术已在 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Oslo, A., Ed., (1980) 中公开。

[0204] 本申请所使用的“载剂”包括药学上可接受的载剂、赋形剂、或稳定剂,其在所使用的剂量和浓度下,对暴露于其中的细胞或哺乳动物无毒性。通常生理学上可接受的载剂是水性 pH 缓冲溶液。生理学上可接受载剂的例子包括缓冲液,如磷酸盐、柠檬酸盐、和其他有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸;低分子量(小于约 10 个残基)多肽;蛋白,如血清白蛋白、明胶、或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖、和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖、或糊精;螯合剂,如 EDTA;糖醇,如甘露醇或山梨醇;成盐的抗衡离子,如钠;和/或非离子表面活性剂,如聚山梨醇酯 20(吐温™)、聚乙二醇(PEG)、和泊洛沙姆(PLURONICS™)等。

[0205] 可以采用多种本领域技术人员公知的方法评估抗-IL-6R 抗体所需的功能性性质,如亲和性/结合检测(例如,表面等离子体共振,竞争性抑制检测);细胞毒性试验,细胞活力检测,响应于 IL-6 的细胞增殖或分化检测(例如,TF-1 细胞增殖试验),体外或体内模型癌细胞和/或肿瘤生长抑制。其他检测可以测试本申请所述抗体阻断正常 IL-6 / IL-6R 介导的反应的能力,所述反应例如 STAT3 磷酸化或 STAT3 信号活动,或其他下游信号活动。可以采用本领域技术人员公知的已建立的方案(参见,例如 Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY); Current Protocols in Immunology (Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY) 或商品化的试剂盒进行此类检测。

[0206] 在一些实施方式中,本发明进一步包括分离的核酸,其编码本申请所述的抗体或其抗原结合片段,例如编码本申请所述的 CDR 或 VH 或 VL 结构域的核酸。核酸包括 DNA 和 RNA。如本申请所述的这些和相关实施方式可以包括多核苷酸,其编码与 IL-6R 结合的抗体。如本申请所使用的,术语“分离的多核苷酸”指基因组、cDNA、或合成来源的多核苷酸或其组合,凭借其来源分离的多核苷酸(1)与在自然界中发现的分离的多核苷酸中的全部或部分多核苷酸无关,(2)连接至在自然界中并不与之连接的多核苷酸,或(3)在自然界中并未作为更长序列的一部分存在。

[0207] 术语“可操作地连接”指应用该术语的组分所处的关系,即允许其在适宜条件下实施其固有功能。例如,转录控制序列“可操作地连接”至蛋白编码序列,这样在与控制序列的转录活性兼容的条件下实现蛋白编码序列的表达。

[0208] 如本申请所使用的,术语“控制序列”指能够影响与之连接或可操作地连接的编码序列表达、加工或细胞内定位的多核苷酸序列。这样的控制序列的性质可能取决于宿主生物体。在特定实施方式中,原核生物的转录控制序列可以包括启动子、核糖体结合位点、和转录终止序列。在其他特定实施方式中,真核生物的转录控制序列可以包括包含一个或多个转录因子识别位点的启动子、转录增强子序列、转录终止序列和多聚腺苷酸化序列。在一些实施方式中,“控制序列”可以包括前导序列和/或融合伴侣序列。

[0209] 如本申请所使用的,术语“多核苷酸”指单链或双链核酸聚合物。在一些实施方式中,包含多核苷酸的核苷酸可以是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或者这两种核苷酸类型之一的修饰形式。所述修饰包括碱基修饰如溴尿核苷,核糖修饰如阿糖胞苷

和 2', 3' - 二脱氧核糖以及核苷酸间键修饰如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯 (phosphoroselenoate)、二硒代磷酸酯 (phosphorodiselenoate)、缩苯胺硫代磷酸酯 (phosphoroanilothioate)、缩苯胺磷酸酯 (phosphoranilate) 和氨基磷酸酯。术语“多核苷酸”特别地包括单链和双链形式的 DNA。

[0210] 术语“天然存在的核苷酸”包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。术语“修饰的核苷酸”包括糖基等被修饰或取代的核苷酸。术语“寡核苷酸键”包括例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯 (phosphoroselenoate)、二硒代磷酸酯 (phosphorodiselenoate)、缩苯胺硫代磷酸酯 (phosphoroanilothioate)、缩苯胺磷酸酯 (phosphoranilate)、氨基磷酸酯等寡核苷酸键。参见, 例如 LaPlanche et al., 1986, Nucl. Acids Res., 14 :9081 ;Stec et al., 1984, J. Am. Chem. Soc., 106 :6077 ;Stein et al., 1988, Nucl. Acids Res., 16 :3209 ;Zon et al., 1991, Anti-Cancer Drug Design, 6 :539 ;Zon et al., 1991, OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES :A PRACTICAL APPROACH, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed.), Oxford University Press, Oxford England ;Stec et al., 美国专利号 5,151,510 ;Uhlmann and Peyman, 1990, Chemical Reviews, 90 :543, 出于任何目的公开的内容在此通过引用并入。寡核苷酸可以包括能够检测寡核苷酸或其杂交的可检测标记。

[0211] 使用的术语“载体”指用于将编码信息转移至宿主细胞的任意分子 (例如, 核酸、质粒、或病毒)。术语“表达载体”指适宜宿主细胞的转化并且含有指引和 / 或控制插入异源核酸序列表达的核酸序列的载体。表达包括但不限于, 方法如转录、翻译、和 RNA 剪接, 如果存在内含子。

[0212] 本领域技术人员应当理解, 多核苷酸可以包括表达或可能适于表达蛋白、多肽、肽等的基因组序列、额外的基因组和质粒编码序列以及较小的设计基因片段。此类片段可以是天然分离的, 或由本领域技术人员合成修饰的。

[0213] 本领域技术人员还知晓, 多核苷酸可以是单链 (编码或反义) 或双链的, 并可以是 DNA (基因组、cDNA 或合成的) 或 RNA 分子。RNA 分子可以包括 HnRNA 分子, 其含有内含子且以一一对应的方式对应于 DNA 分子, 以及不含内含子的 mRNA 分子。本申请的多核苷酸中可以含有, 但不是必须含有, 附加的编码或非编码序列, 以及多核苷酸可以, 但不是必须, 连接至其他分子和 / 或支持材料。多核苷酸可以包括天然序列, 或可以包括编码此类序列的变体或衍生物的序列。

[0214] 因此, 根据这些和相关的实施方式, 本申请还提供了编码本申请所述的抗 -IL-6R 抗体的多核苷酸。在一些实施方式中, 所提供的多核苷酸包括编码本申请所述的抗体和此类多核苷酸补体的某些或全部多核苷酸序列。

[0215] 在其他相关实施方式中, 多核苷酸变体可能与编码本申请所述的抗 -IL-6R 抗体的多核苷酸序列基本上具有同一性。例如, 使用本申请所述的方法 (例如, 使用标准参数的 BLAST 分析, 如下文所述), 与参比多核苷酸序列如编码本申请所述抗体的序列相比, 多核苷酸可以是包含至少 70% 序列同一性, 优选至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99% 或更高的序列同一性的多核苷酸。本领域技术人员将认识到, 考虑到密码子的简并性、氨基酸的相似性、阅读框架位置等, 可以对这些值进行适当调整, 以确定由两个核苷酸序列编码的蛋白相应的同一性。

[0216] 通常, 多核苷酸变体将含有一个或多个替换、添加、删除和 / 或插入, 优选地变体

多核苷酸编码的抗体的结合亲和性基本上不低于本申请所示的特定多核苷酸序列编码的抗体。

[0217] 在一些其他相关实施方式中,多核苷酸片段可以包含或基本上由不同长度连续的序列组成,所述序列与本申请所述的编码抗体的序列相同或互补。例如,所提供的多核苷酸包含或基本上由至少约 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、200、300、400、500 或 1000 个或更多连续的核苷酸序列组成,所述序列编码本申请所公开的抗体或其抗原结合片段以及其间的所有中间长度。容易理解,“中间长度”在本申请中指所述值之间的任意长度,如 50、51、52、53 等;100、101、102、103 等;150、151、152、153 等;包括 200-500、500-1,000 等之间的所有整数。可以在一个或两个末端通过加入天然序列中不存在的核苷酸对本申请所述的核苷酸序列延长。该附加序列可能由编码本申请所述抗体的多核苷酸一个末端或编码本申请所述抗体多核苷酸两个末端的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 个核苷酸组成。

[0218] 在另一个实施方式中,所提供的多核苷酸序列能够在中度至高度严格条件下与本申请提供的编码抗体或其抗原结合片段的多核苷酸序列、或其片段、或其互补序列杂交。杂交技术是分子生物学领域所公知的。出于说明的目的,用于检测本申请所提供的多核苷酸与其他多核苷酸杂交的适宜中度严格条件包括,在 5X SSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH8.0) 溶液中预洗;在 50℃ -60℃、5X SSC 杂交过夜;随后使用含 0.1% SDS 的 2X、0.5X 和 0.2X SSC,在 65℃ 下洗涤两次,每次 20 分钟。本领域技术人员将理解,杂交的严格性可以很容易地操作,如通过改变杂交溶液的盐含量和 / 或杂交进行的温度。例如,在另一个实施方式中,适宜的高度严格杂交条件包括上文所描述的那些条件,但是杂交温度增至例如 60℃ -65℃ 或 65℃ -70℃。

[0219] 在一些实施方式中,上文所描述的多核苷酸,例如多核苷酸变体、片段和杂交序列,编码结合 IL-6R 的抗体或其抗原结合片段。在其他实施方式中,此类多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段,或其 CDR,其与 IL-6R 的结合能力与本申请所示特定的抗体序列至少约 50%、至少约 70%,和在一些实施方式中,至少约 90% 相同。在进一步的实施方式中,此类多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段或其 CDR 结合至 IL-6R 的亲和性高于本申请所示的抗体,例如其结合力在数量上是本申请所示特定的抗体序列的至少约 105%、106%、107%、108%、109%、或 110%。

[0220] 如本申请其他地方描述的,可以通过常规方法,例如用选定的天然或非天然氨基酸替换、添加、删除或插入一种或多种氨基酸,制得示例多肽(例如,如本申请所提供的变体 IL-6R- 特异性抗体,如具有本申请所提供的抗原结合片段的抗体蛋白),其三维结构可以通过计算机模拟进行测定,以确定这样衍生的结构变体保留了在此公开的种类的空间填充性质。本领域技术人员公知有多种计算机程序,可用于确定在抗体内适宜的氨基酸取代(或编码氨基酸序列的适宜多核苷酸),从而例如维持亲和性或获得更好的亲和性。

[0221] 本申请所描述的多核苷酸,或其片段,无论其编码序列自身的长度如何,均可以与其他 DNA 序列组合,如启动子、多腺苷酸化信号、附加限制性酶位点、多克隆位点、其他编码片段等等,这样其全长可能有很大变化。因此,预计可以采用几乎任意长度的核酸片段,优选将其总长度限制在易于在计划的重组 DNA 方案中制备和使用。例如,预计使用的示例性

多核苷酸片段的总长度为约 10,000、约 5000、约 3000、约 2,000、约 1,000、约 500、约 200、约 100、约 50 个碱基对等（包括所有中间长度）。

[0222] 当对多核苷酸序列进行比较时，当两个序列按下文所述进行比对以达到最大对应时，如果核苷酸序列相同，则将两个序列称为是“同一的”。一般通过在比较窗口内比较序列，以识别和比较序列的局部区域的相似性，从而进行两个序列之间的比较。如本申请所使用，“比较窗口”指至少约 20 个连续位置的片段，通常为 30 至约 75、40 至约 50，在这个片段中，在两个序列优化比对后，将一个序列与具有相同数量连续位置的参比序列进行比较。

[0223] 可以使用 Lasergene 生物信息学软件套装 (DNASTAR, Inc., Madison, WI) 中的 Megalign 程序，采用默认参数进行用于比较的序列优化比对。该程序体现了下述参考文献中描述的几个比对方案：Dayhoff, M. O. (1978) A model of evolutionary change in proteins—Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M. O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345–358; Hein J., Unified Approach to Alignment and Phylogenesis, pp. 626–645 (1990); Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D. G. 和 Sharp, P. M., CABIOS 5: 151–153 (1989); Myers, E. W. 和 Muller W., CABIOS 4: 11–17 (1988); Robinson, E. D., Comb. Theor 11: 105 (1971); Santou, N. Nes, M., Mol. Biol. Evol. 4: 406–425 (1987); Sneath, P. H. A. 和 Sokal, R. R., Numerical Taxonomy—the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA (1973); Wilbur, W. J. and Lipman, D. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 726–730 (1983)。

[0224] 或者，可以通过 Smith and Waterman, Add. APL. Math 2: 482 (1981) 的局部同一性算法、通过 Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970) 的同一性比对算法、通过 Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988) 的相似性方法探索、通过这些算法（威斯康辛遗传学软件包中的 GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、和 TFASTA, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) 的计算机执行、或通过检视进行用于比较的序列优化比对。

[0225] 适于确定序列同一性和序列相似性百分率的算法的一个优选的例子为 BLAST 和 BLAST 2.0 算法，已分别在 Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25: 3389–3402 (1977)，和 Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403–410 (1990) 中对其进行了描述。BLAST 和 BLAST 2.0 可以使用例如本申请所描述的参数，以确定两个或多个多核苷酸之间的序列同一性百分率。美国国家生物技术信息中心公开提供了用于进行 BLAST 分析的软件。在一个说明性的例子中，可以使用参数 M（匹配残基对的奖励分数；始终 >0）和 N（错配残基的罚分；始终 <0）计算核苷酸序列的累积得分。在下列情况下停止在各方向上对字码采样的延伸：累积比对得分从其达到的最大值下降数量 X；由于一个或多个负分残基比对的累积，使累积得分达到零或以下；或到达任一序列的末端。BLAST 算法参数 W、T 和 X 确定比对的灵敏度和速度。BLASTN 程序（用于核苷酸序列）使用的缺省值为：字长 (W) 11，和期望 (E) 10，以及 BLOSUM62 评分矩阵（参见 Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)）算法 (B) 50，期望 (E) 10，M=5，N=-4 和对两条链进行比较。

[0226] 在一些实施方式中，通过在至少 20 个位置的比较窗内对两个优化比对的序列进

行比较,以确定“序列同一性百分率”,其中为达到两个序列的优化比对,多核苷酸序列在比较窗中的部分与参比序列(不包含添加或删除)相比,可以包括 20%或以下的添加或删除(即,间隙),通常 5 至 15%,或 10 至 12%。所述百分率如下计算,确定在两个序列中均出现相同核酸的位置数,得到匹配的位置数,将匹配位置数除以在参比序列中的总位置数(即,窗尺寸),并将得到的结果乘以 100,从而得到序列同一性百分率。

[0227] 本领域的普通技术人员将理解,由于遗传密码简并性,有多个编码本申请所述抗体的核苷酸序列。这些多核苷酸中的某些与编码结合 IL-6R 的抗体的天然或原始多核苷酸序列具有最小的序列同一性。尽管如此,因使用不同密码子导致的多核苷酸改变是本申请可以明确预期的。在一些实施方式中,特别关注了已经过密码子优化的用于哺乳动物表达的序列。

[0228] 因此,在本发明的另一个实施方式中,可以使用诱变方法如位点特异性诱变制备本申请所述抗体的变体和/或衍生物。通过该方法,可以通过对编码其的多核苷酸诱变,以制备在多肽序列中的特异性修饰。这些技术提供了制备和检测序列变体的直接方法,例如通过在多核苷酸中引入一个或多个核苷酸序列的改变,从而引入一个或多个前述考虑因素。

[0229] 位点特异性诱变通过使用编码所需突变的 DNA 序列的特异性寡核苷酸序列,以及足够数量的邻近核苷酸,以提供具有足够大小和序列复杂性的引物序列,以便越过被删除的接点在其两侧形成稳定双螺旋,从而产生突变体。可以在选定的多核苷酸序列中引入突变,以使多核苷酸本身改善、改变、减少、修饰或改变其性质,和/或改变编码的多肽的性质、活性、组分、稳定性、或主要序列。

[0230] 在一些实施方式中,发明人关注了编码本申请公开的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸序列的诱变,以改变所编码的多肽的一种或多种性质,如抗体或其抗原结合片段的结合亲和性,或特定 Fc 区的功能,或针对特定 Fc γ R 的 Fc 区的亲和性。位点特异性诱变技术是本领域公知的,已广泛用于产生多肽和多核苷酸的变体。例如,位点特异性诱变经常用于改变 DNA 分子的特定部分。在此类实施方式中,一般使用含有约 14 至约 25 个核苷酸或其左右的长度的引物,在被改变序列的接点处的两侧具有约 5 至约 10 个残基。

[0231] 本领域技术人员将理解,位点特异性诱变技术经常采用以单链和双链形式存在的噬菌体载体。在位点定向诱变中使用的典型载体包括如 M13 噬菌体的载体。这些噬菌体易于购买获得,并且其使用是本领域技术人员所公知的。双链噬菌体也常规地用于位点定向诱变,其减少了将感兴趣的基因从质粒转移至噬菌体的步骤。

[0232] 在通常情况下,按照本申请进行的位点定向诱变通过首先获得单链载体或两条链熔化分开的双链载体进行,所述载体的序列包括编码所需肽的 DNA 序列。一般通过合成制备产生具有所需突变序列的寡核苷酸引物。然后用单链载体对该引物进行退火,并加入 DNA 聚合酶如大肠杆菌聚合酶 I Klenow 片段,以完成突变链的合成。因此,形成异源双链,其中一条链编码原始非突变的序列,另一条链带有所需突变。然后使用该异源双链载体转化适宜细胞,如大肠杆菌细胞,并选择包括携带突变序列排布的重组载体的克隆。

[0233] 使用位点定向突变制备选定肽编码 DNA 片段的序列变体提供了一种生产可能有用的种类的方法,但并不意味着限制,因为还有其他方法可以获得肽序列变体和编码其的 DNA 序列。例如,可以使用诱变剂,如羟胺,处理编码所需肽序列的重组载体以获得序列变

体。关于这些方法和方案的具体细节参见 Maloy et al., 1994; Segal, 1976; Prokop and Bajpai, 1991; Kuby, 1994; 以及 Maniatis et al., 1982 的教导, 其均通过引用并入本申请, 用于该目的。

[0234] 如本申请所使用的, 术语“寡核苷酸定向诱变操作”指模板依赖性过程和载体介导的繁殖, 其导致特定核酸分子的浓度相对于其初始浓度增加, 或可检测信号的浓度增加, 如扩增。如本申请所使用的, 术语“寡核苷酸定向诱变操作”是用来指涉及引物分子的模板依赖性延伸的过程。术语模板依赖性过程指 RNA 或 DNA 分子的核酸合成, 其中新合成核酸链的序列是由公知的碱基互补配对规则决定的 (参见, 例如 Watson, 1987)。通常, 载体介导的方法涉及将核酸片段引入 DNA 或 RNA 载体、载体的克隆扩增、和扩增核酸片段的恢复。这种方法的例子参见美国专利号 4, 237, 224, 其全部内容通过引用特别地并入本申请。

[0235] 在用于生产多肽变体的另一种方法中, 可以采用如美国专利号 5, 837, 458 中所描述的递归序列重组。在该方法中, 进行重组和筛选或选择的迭代循环, 以“进化”出例如结合亲和性增加的个体多核苷酸变体。一些实施方式还以质粒、载体、转录或表达盒的形式提供了构建体, 其包括至少一个如本申请所述的多核苷酸。

[0236] 根据一些相关的实施方式, 提供了一种重组的宿主细胞, 其包括一种或多种本申请所描述的构建体; 一种核酸, 其编码任意抗体、CDR、VH 或 VL 结构域, 或其抗原结合片段; 以及编码产物的生产方法, 该方法包括从编码的核酸表达。通过在适宜条件下培养含有核酸的重组宿主细胞方便地实现表达。通过表达生产后, 可以采用任意适宜的技术分离和 / 或纯化抗体或其抗原结合片段, 然后根据需要使用。

[0237] 如本申请提供的抗体或其抗原结合片段, 以及编码核酸分子和载体, 可以是基本上纯净或均质的形式, 例如从其自然环境中被分离和 / 或纯化, 或者就核酸而言, 不含或基本不含除编码具有所需功能多肽的序列以外来源的核酸或基因。核酸可以包括 DNA 或 RNA, 并且可以是全部或部分合成的。除非上下文另有要求, 否则本申请所示的核苷酸序列包括具有特定序列的 DNA 分子, 并且包括具有特定序列的 RNA 分子, 所述特定序列中 U 被替换为 T。

[0238] 在多种不同的宿主细胞中克隆和表达多肽的系统是公知的。适宜的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、酵母和杆状病毒系统。本领域用于表达异源性多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾细胞、NSO 小鼠黑色素瘤细胞和多种其他细胞。通常优选的细菌宿主是大肠杆菌。

[0239] 抗体和抗原结合片段在原核细胞如大肠杆菌中的表达已在本领域中成功建立。综述参见, 例如 Pluckthun, A. Bio / Technology 9 :545-551 (1991)。本领域技术人员也可以利用在培养的真核细胞中的表达作为生产抗体或其抗原结合片段的选择, 参见最新综述, 例如 Ref, M. E. (1993) Curr. Opinion Biotech. 4 :573-576; Trill J. J. et al., (1995) Curr. Opinion Biotech 6 :553-560。

[0240] 可以选择或构建含有适当调节序列的适宜载体, 包括启动子序列、终止子序列、多聚腺苷酸化序列、增强子序列、标记物基因和其他适当的序列。载体可以是质粒、病毒例如噬菌体、或嗜菌粒, 视情况而定。有关进一步的详细情况, 参见例如 Molecular Cloning : a Laboratory Manual :2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press。针对核酸的操作有多种已知的技术和方法, 例如核酸构建体的制备、

诱变、测序、将 DNA 引入细胞和基因的表达、以及蛋白分析,其在 Current Protocols in Molecular Biology,第二版,Ausubel 等编著,John Wiley&Sons,1992,或随后的更新版中对其进行了详细的描述。

[0241] 术语“宿主细胞”用于指被引入,或能够引入编码本申请所述的一种或多种抗体的核酸序列的细胞,并且其进一步表达或能够表达感兴趣的选定基因,如编码任意本申请所述抗体的基因。该术语包括亲代细胞的子代,无论其在形态学或遗传组成上是否与亲代相同,只要存在选定基因即可。因此,还涉及一种包括将此类核酸引入宿主细胞的方法。该引入可以使用任何可用的技术。对于真核细胞而言,适宜的技术可以包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染以及使用逆转录病毒或其他病毒的转导,例如牛痘,对于昆虫细胞,使用杆状病毒。对于细菌细胞而言,适宜的技术包括氯化钙转染、电穿孔和使用细菌噬菌体的转染。例如通过在使基因表达的条件下培养宿主细胞,在引入之后引起或允许核酸的表达。在一个实施方式中,将核酸整合至宿主细胞的基因组(例如,染色体)。按照标准技术,通过包含促进与基因组重组的序列可以促进整合。

[0242] 在一些实施方式中,本发明还提供了一种方法,其包括在表达系统中使用上文所述的构建体以表达特定多肽,如本申请所描述的 IL-6R-特异性抗体。术语“转导”用于指将基因从一个细菌中传递至另一个,通常使用噬菌体。“转导”也指通过逆转录病毒获得和转移真核细胞序列。术语“转染”用于指细胞携带外来的或外源性 DNA,当外源性 DNA 被引入细胞膜内时,细胞被“转染”。多种转染技术均是本领域所公知的,并且在本申请中公开。参见例如,Graham et al.,1973,Virology52:456;Sambrook et al.,2001,MOLECULAR CLONING,A LABORATORY MANUAL,Cold Spring Harbor Laboratories;Davis et al.,1986,BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,Elsevier;和 Chu et al.,1981,Gene13:197。可以使用此类技术将一种或多种外源性的 DNA 部分引入适宜的宿主细胞。

[0243] 如本申请所使用的,术语“转化”指细胞遗传特性的改变,当其被修饰以含有新的 DNA 时细胞被转化。例如,当从其天然状态被遗传修饰后,细胞被转化。转染或转导后,转化 DNA 可以通过物理地整合至细胞的染色体与细胞重组,或者可以作为不复制的附加体元件瞬时保持,或者可以作为质粒独立地复制。当 DNA 随着细胞的分裂而复制时,则认为细胞已被稳定转化。当术语“天然存在的”或“天然的”与生物学材料如核酸分子、多肽、宿主细胞等联用时,指在自然界中发现且未经过人为处理的材料。类似地,如本申请所使用的“非天然存在的”或“非天然的”指在自然界中不存在或已被人为地进行结构修饰或合成的材料。

[0244] 术语“多肽”、“蛋白”、“肽”和“糖蛋白”可以互换使用,指并不限定任何特定长度的氨基酸的聚合物。该术语并未排除修饰,如十四烷基化、硫酸化、糖基化、磷酸化和信号序列的添加或删除。术语“多肽”或“蛋白”指一条或多条氨基酸链,其中每条链均包含通过肽键共价连接的氨基酸,并且其中所述多肽或蛋白可以包括非共价和/或通过肽键共价连接在一起的多条链,具有天然蛋白的序列,即蛋白是通过天然存在的且特别是非重组的细胞生产的,或通过遗传工程化或重组的细胞生产的序列,并且包括具有天然蛋白氨基酸序列的分子,或者天然序列的一个或多个氨基酸被删除、添加和/或替换的分子。术语“多肽”和“蛋白”特别地包括本申请的与 IL-6R 结合的抗体,或抗 IL-6R 抗体的一个或多个氨基酸被删除、添加、和/或替换的序列。因此,“多肽”或“蛋白”可以包括一条(称为“单体”)或多条(称为“多聚体”)氨基酸链。

[0245] 术语“分离的蛋白”在本申请中指对象蛋白(1)不含至少某些在自然界中常见的其他蛋白,(2)基本不含其他来自相同来源的蛋白,例如来自相同物种,(3)被来自不同物种的细胞表达,(4)已从至少约50%的多核苷酸、脂质、碳水化合物、或在自然界与其相关的其他材料中分离,(5)与同“分离的蛋白”在自然界相关联的蛋白的部分不相关联(通过共价或非共价相关作用),(6)与在自然界同其不相关联的多肽可操作地相关联(通过共价或非共价相关作用),或者(7)在自然界中不存在。此类分离的蛋白可以由基因组DNA、cDNA、mRNA或其他RNA编码,可以是合成来源的,或其任意组合。在一些实施方式中,分离的蛋白基本上不含存在于自然环境中干扰其使用(治疗、诊断、预防、研究或其他用途)的蛋白或多肽或其他污染物。

[0246] 术语“多肽片段”指多肽,可以是单体或多聚体,其具有天然存在的或重组生产的多肽的氨基末端删除、羧基末端删除、和/或内部删除或替换。在一些实施方式中,多肽片段可以包括至少5至约500个氨基酸长度的氨基酸链。将理解在一些实施方式中,片段为至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、150、200、250、300、350、400、或450个氨基酸长度。特别有用的多肽片段包括功能性结构域,包括抗体的抗原结合结构域或片段。在抗-IL-6R抗体中,有用的片段包括,但不限于:CDR区,特别是重链或轻链的CDR3区;重链或轻链的可变区;抗体链的一部分或仅仅是其包括两个CDR的可变区;等等。

[0247] 多肽可以包含位于蛋白N-末端的信号(或前导)序列,其为共翻译或翻译后蛋白的转移定向。多肽还可以融合于框架或与接头或其他序列偶联,以使多肽(例如,聚-His)易于合成、纯化或鉴定,或者增强多肽与固体支持物的结合。

[0248] 如有必要,还可以引入肽接头/间隔区序列以通过足够的距离分隔多种多肽组分,以确保将各多肽折叠成其二级和/或三级结构。使用本领域公知的标准技术,可以将此类肽接头序列整合至融合多肽。

[0249] 可以基于例如下述标准选择一些肽间隔区序列:(1)其能够采用柔性伸展构象;(2)其不能采用能够与第一和第二多肽上的功能性表位相互作用的二级结构;和/或(3)缺乏可能与多肽功能性表位反应的疏水性或带电荷的残基。

[0250] 在一个说明性实施方式中,肽间隔区序列含有例如Gly、Asn和Ser残基。也可以将其他近似的中性氨基酸如Thr和Ala包括在间隔区序列中。

[0251] 可以将可能有用的其他氨基酸序列引入作为间隔区,包括那些在Maratea et al., Gene40:3946(1985);Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA83:82588262(1986);美国专利号4,935,233和美国专利号4,751,180中描述的氨基酸序列。

[0252] 其他示例性的间隔区可以包括,例如

[0253] Glu-Gly-Lys-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Glu-Ser-Lys-Val-Asp(Chaudhary et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87:1066-1070) 和

[0254] Lys-Glu-Ser-Gly-Ser-Val-Ser-Ser-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Phe-Arg-Ser-Leu-Asp(Bird et al., 1988, Science242:423-426)。

[0255] 在某些实施方式中,当第一和第二多肽具有能够用于分隔功能性结构域和阻止立体干扰的非必需的N-末端氨基酸区域时,不需要间隔区序列。可以将两个编码序列直接融

合,不需要任何间隔区,或通过使用例如由五聚体 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser 重复 1 至 3 次组成的柔性聚合接头。通过将此类间隔区插入 VH 和 VL 之间构建单链抗体 (scFv) (Bird et al., 1988, Science 242 :423-426 ;Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85 : 5979-5883)。

[0256] 在一些实施方式中,设计肽间隔区以便能够在形成单链抗体可变区的两个 β 片层之间发生正确的相互作用。

[0257] 在一些示例性的实施方式中,肽间隔区在 1 至 5 个氨基酸之间、在 5 至 10 个氨基酸之间、在 5 至 25 个氨基酸之间、在 5 至 50 个氨基酸之间、在 10 至 25 个氨基酸之间、在 10 至 50 个氨基酸之间、在 10 至 100 个氨基酸之间,或者氨基酸的任意插入范围。

[0258] 在其他示例性的实施方式中,肽间隔区的长度包括约 1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50 或更多个氨基酸。

[0259] 涉及本申请所描述抗体的氨基酸序列的修饰。例如,其可能是改善抗体的结合亲和性和 / 或其他生物学性质所需的。例如,可以通过将适宜的核苷酸改变引入编码抗体、或其链的多核苷酸,或通过肽合成制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括,例如在抗体的氨基酸序列内删除、和 / 或插入和 / 或替换残基。在最终的抗体中可以引入删除、插入、和替换的任意组合,只要最终的构建体具有所需特性 (例如,与 IL-6R 的高结合亲和性)。氨基酸改变还可以改变抗体的翻译后过程,如改变糖基化位点的数量或位置。上文所描述的针对本发明多肽的任意变体和修饰均可以包括在本发明的抗体中。

[0260] 本申请提供了本申请的抗体的变体。在一些实施方式中,此类变体抗体或抗原结合片段,或其 CDR 结合至 IL-6R 至少约 50%、至少约 70%,以及在一些实施方式中,至少约 90% 以及与本申请所示特定的抗体序列相同。在进一步的实施方式中,此类抗体变体或其抗原结合片段,或其 CDR,与本申请所示的抗体相比,其以更高的亲和性结合至 IL-6R,例如在数量上结合至少约 105%、106%、107%、108%、109%、或 110% 以及与本申请所示特定的抗体序列相同。

[0261] 在特定实施方式中,对象抗体可以具有 :a) 重链可变结构域,其具有的氨基酸序列与本申请所描述的抗 -IL-6R 抗体的重链可变区具有至少 80% 的同一性、至少 95% 的同一性、至少 90%、至少 95% 或者至少 98% 或 99% 的同一性 ;和 b) 轻链可变区,其具有的氨基酸序列与本申请所描述的抗 -IL-6R 抗体的轻链可变结构域具有至少 80% 的同一性、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或者至少 98% 或 99% 的同一性。示例性重链和轻链区的氨基酸序列如 SEQ IDNO :1、2、9-12、19、20 和 25-44 所示。

[0262] 在特定实施方式中,抗体可以包括 :a) 重链可变区,其包含 :i. CDR1 区,其与本申请所描述的选定抗体的重链 CDR1 区的氨基酸序列具有同一性 ;ii. CDR2 区,其与本申请所述选定抗体的重链 CDR2 区的氨基酸序列具有同一性 ;和 iii. CDR3 区,其与本申请所述选定抗体的重链 CDR3 区的氨基酸序列具有同一性 ;以及 b) 轻链可变结构域,其包含 :i. CDR1 区,其与本申请所述选定抗体的轻链 CDR1 区的氨基酸序列具有同一性 ;ii. CDR2 区,其与本申请所述选定抗体的轻链 CDR2 区的氨基酸序列具有同一性 ;和 iii. CDR3 区,其与本申请所述选定抗体的轻链 CDR3 区的氨基酸序列具有同一性 ;其中抗体与选定靶点 (例如, IL-6R) 特异性结合。在进一步的实施方式中,抗体或其抗原结合片段是变体抗体,其中变体包含与选定抗体具有同一性的重链和轻链,除了在 VH 和 VL 区的 CDR 区有至多 8、9、10、11、12、13、

14、15 个、或更多的氨基酸替换以外。在这一点上,在选定抗体的 CDR 区可能有 1、2、3、4、5、6、7、8 个,或者在一些实施方式中,有 9、10、11、12、13、14、15 个、或更多的氨基酸替换。替换可以在 VH 和 / 或 VL 区的 CDR(参见例如 Muller, 1998, Structure 6 :1153-1167)。

[0263] 可以通过常规方法,例如用选定的天然或非天然氨基酸替换、添加、删除或插入一种或多种氨基酸,制得示例多肽(例如,如本申请所提供的变体 IL-6R- 特异性抗体,如具有本申请所提供的抗原结合片段的抗体蛋白),其三维结构可以通过计算机模拟进行测定,以确定这样衍生的结构变体保留了在此公开的种类的空间填充性质。参见,例如 Donate et al., 1994 Prot. Sci. 3 :2378 ;Bradley et al., Science 309 :1868-1871 (2005) ; Schueler-Furman et al., Science 310 :638 (2005) ;Dietz et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 103 :1244 (2006) ;Dodson et al., Nature 450 :176 (2007) ;Qian et al., Nature 450 :259 (2007) ;Raman et al., Science 327 :1014-1018 (2010)。可以用于这些和相关的实施方式的计算机算法的一些附加的非限制性例子,如针对本申请提供的 IL-6R- 特异性抗体及其抗原结合结构域的合理设计,包括 VMD,这是一个使用 3-D 图形和内置脚本用于显示、动画和分析较大的分子生物系统的分子可视化程序(参见 Theoretical and Computational Biophysics Group 的网站, University of Illinois at Urbana-Champaign, at ks.uiuc.edu / Research / vmd /)。多种其他计算机程序均是本领域技术人员公知的和可用的,其可以用于通过能量最小化构象的空间填充模型(范德华半径)确定原子的尺寸 ;GRID,其用于确定不同化学基团的高亲和性区域,以增强结合, Monte Carlo 检索,用于数学比对,以及 CHARMM (Brooks et al., (1983) J. Comput. Chem. 4 :187-217) 和 AMBER (Weiner et al., (1981) J. Comput. Chem. 106 :765), 其评估力场计算结果和分析(亦参见, Eisenfield et al., (1991) Am. J. Physiol. 261 :C376-386 ;Lybrand (1991) J. Pharm. Belg. 46 :49-54 ; Froimowitz (1990) Biotechniques 8 :640-644 ;Burbam et al., (1990) Proteins 7 :99-111 ; Pedersen (1985) Environ. Health Perspect. 61 :185-190 ; 和 Kini et al., (1991) J. Biomol. Struct. Dyn. 9 :475-488)。多种适宜的计算用计算机程序也可购买获得,如从 Schrödinger (Munich, Germany) 购买。

[0264] 在本发明的另一个实施方式中,抗-IL-6R 抗体及其人源化形式是衍生自家兔单克隆抗体,并且特别地使用 RabMab® 技术产生。这些抗体是有利的,因为其需要最小的序列修饰,以利于在使用突变谱系引导 (MLG) 人源化技术(参见,例如美国专利号 7,462,697) 进行人源化后保留功能性质。因此,用于制备本申请的抗-IL-6R 抗体的示例性方法包括,例如在美国专利 5,675,063 和 7,429,487 中已描述的 RabMab® 家兔单克隆抗体技术。在这一点上,在一些实施方式中,本申请的抗-IL-6R 抗体在家兔中生产。在特定实施方式中,将能够与家兔脾细胞融合的家兔来源的永生化 B- 淋巴细胞用于生产产生抗体的杂交细胞。永生化的 B- 淋巴细胞并不会可检测地表达内源性的免疫球蛋白重链,并且在某些实施方式中可能含有改变的免疫球蛋白重链编码基因。

[0265] 组合物和使用方法

[0266] 本申请提供了包含 IL-6R- 特异性抗体及其抗原结合片段的组合物,以及在多种治疗设置中给予此类组合物。

[0267] 术语“主体”是指包括任何哺乳动物或任何脊椎动物,其可以用作人类疾病的模型系统。主体的例子包括人类,猴,猩猩,狗,猫,小鼠,大鼠,鱼,斑马鱼,鸟,马,猪,牛,绵羊,山

羊,鸡,鸭,驴,火鸡,孔雀,龙猫,雪貂,沙鼠,兔,豚鼠,仓鼠,及它们的转基因物种。在特定的实施方式中,主体是患有需要治疗的特定疾病的人类患者,如本申请中进一步所述。

[0268] 以纯化形式或适宜的药物组合物形式给予本申请所述的 IL-6R- 特异性抗体可以通过类似用途试剂的任意可接受给药模式实现。药物组合物可以通过将抗体或含有抗体的组合物与适宜的生理学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂组合制备,可以被制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂,如片剂、胶囊、粉剂、颗粒、软膏、溶液剂、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶、微球、和气雾剂。此外,其他药物活性成分(包括如本申请其他地方所描述的其他抗癌剂)和 / 或适宜的赋形剂如盐、缓冲剂和稳定剂可以,但并非必须,存在于组合物中。可以通过多种不同途径实现给药,包括口服、胃肠外、鼻内、静脉、皮内、皮下或局部。优选的给药方式取决于待治疗或预防状况的性质。给药后,将降低、抑制、阻止或延迟癌症的进展和 / 或转移的量认为是有效的。

[0269] 在一些实施方式中,给药量足以导致肿瘤消退,这可以由存活肿瘤的量在数据学上显著减少来指示,例如,肿瘤质量至少减少 50%,或通过扫描尺寸的改变(例如,具有统计学意义的减少)。在其它实施方式中,给药量足以导致风湿性关节炎症状临床有关的减少,比如,但不限于,疲劳,食欲不振,低热,腺体肿大,乏力,关节肿胀,关节疼痛,晨僵,温热(warm),压痛(tender),和不使用一小时时关节僵硬,双侧关节疼痛(可能影响手指(而不是指尖),腕,肘,肩,臀部,膝盖,脚踝,脚趾,下巴,颈部);受影响关节活动范围减少,胸膜炎,眼烧灼感,眼痒,眼分泌物,皮肤下结节,肢体麻木,刺痛,或手脚灼烧感中一种或多种的减轻。

[0270] 精确的剂量和治疗持续时间是所治疗疾病的函数,可以根据经验使用本领域公知的检测方法确定,或通过在本领域已知的模型系统中测试组合物外推确定。也可以进行受控的临床试验。可以依据待缓解状况的严重程度改变剂量。通常将药物组合物制成制剂并给药,以发挥有用的治疗效果,同时使不需要的副作用最小化。组合物可以一次给予,或者可以分成多个更小的剂量在时间间隔下给予。对于任何特定对象而言,可以根据个体的需要随时间调整特定给药方案。

[0271] 含有 IL-6R- 特异性抗体的组合物可以单独给药,或与其他已知的癌症疗法联合给药,如放疗、化疗、移植、免疫疗法、激素疗法、光动力学疗法等。组合物还可以与抗生素联合给药。

[0272] 因而,这些和相关的药物组合物的典型给药途径包括,但不限于,口服、局部、经皮、吸入、胃肠外、舌下、直肠、阴道、和鼻内。如本申请所使用的,术语胃肠外包括皮下注射、静脉、肌内、胸骨内注射或输注技术。根据本发明的一些实施方式,将药物组合物制成制剂,以使得将药物组合物给予患者后,其中含有的活性成分成为生物可利用的。将给予对象或患者的组合物可以是具有一种或多种剂量单位的形式,其中例如片剂可以是单一剂量单位,和本申请所描述的 IL-6R- 特异性抗体以气雾剂形式在其中的容器,其可以具有多个剂量单位。制备此类剂型的实际方法是已知的,或对于本领域技术人员而言是显而易见的;例如参见 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 20 版 (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000)。在任何情况下,待给予的组合物将含有本申请的治疗有效量的抗体,在本申请的教导下用于治疗感兴趣的疾病或状况。

[0273] 药物组合物可以是固体或液体形式。在一个实施方式中,载剂是颗粒,以使得组合

物是,例如,片剂或粉剂形式。载剂可以是液体,组合物是例如口服油、可注射液体或气雾剂,其用于例如吸入给药。当用于口服给药时,药物组合物优选固体或液体形式,半固体、半液体、混悬剂和凝胶形式包括在本申请所述的固体或液体形式内。

[0274] 作为用于口服给药的固体组合物,可以将药物组合物制成粉剂、颗粒、压制片、丸剂、胶囊、口香糖、或薄片等。此类固体组合物将典型地含有一种或多种惰性稀释剂或可食用载剂。此外,可以存在下述中的一种或多种:粘合剂如羧甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素、西黄耆胶或明胶;赋形剂如淀粉、乳糖或糊精;崩解剂如海藻酸、海藻酸钠、羧甲基淀粉钠(Primogel)、玉米淀粉等;润滑剂如硬脂酸镁或氢化植物油(Sterotex);助流剂如胶体二氧化硅;甜味剂如蔗糖或糖精;调味剂如薄荷油、水杨酸甲酯或桔子调味剂;和着色剂。当药物组合物是胶囊形式时,例如明胶胶囊,除上述类型的材料以外,其还可能含有液体载剂,如聚乙烯乙二醇或油。

[0275] 药物组合物可以是液体形式,例如酏剂、糖浆、溶液、乳剂或混悬剂。作为两个例子,液体可以用于口服给药或用于通过注射递送。当用于口服给药时,除了本化合物以外,优选的组合物还含有一种或多种甜味剂、防腐剂、染料/着色剂和增香剂。在用于注射给药的组合物中,可以包括一种或多种表面活性剂、防腐剂、润湿剂、分散剂、混悬剂、缓冲剂、稳定剂和等张剂。

[0276] 液体药物组合物,无论其是溶液、混悬液或其他形式,其可以包括一种或多种下述辅剂:无菌稀释剂如注射用水、盐溶液,优选生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化钠、不挥发性油如合成甘油单酯或二酯,其可以作为溶剂或混悬基质、聚乙烯乙二醇、甘油、丙二醇或其他溶剂;抗菌剂如苯甲醇或尼泊金甲酯;抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂如乙二胺四乙酸;缓冲剂如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐和调节张力的试剂,如氯化钠或右旋糖。可以将胃肠外制剂密封于由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量药瓶中。生理盐水是优选的辅剂。可注射的药物组合物优选是无菌的。

[0277] 用于胃肠外或口服给药的液体药物组合物应含有一定量的本申请公开的IL-6R-特异性抗体,以获得适宜的剂量。通常,该剂量为组合物中至少0.01%的抗体。当用于口服给药时,该剂量可以在组合物重量的0.1至约70%之间变化。一些口服药物组合物含有约4%至约75%的抗体。在一些实施方式中,根据本发明制备药物组合物和制备物,使得在稀释前胃肠外剂量单位中含有以重量计0.01至10%的抗体。

[0278] 药物组合物可以用于局部给药,在这种情况下适宜的载剂可以包括溶液、乳剂、软膏或凝胶基质。基质,例如,可以包括下述中的一种或多种:凡士林油、羊毛脂、聚乙烯乙二醇、蜂蜡、矿物油、稀释剂,如水和醇、以及乳化剂和稳定剂。在用于局部给药的药物组合物中可以存在增稠剂。如果用于经皮给药,组合物可以包括经皮贴片或离子电渗疗法设备。药物组合物可以用于直肠给药,例如栓剂形式,其将在直肠内融化并释放药物。用于直肠给药的组合物可以含有油状基质作为适宜的非刺激性赋形剂。此类基质包括,但不限于,羊毛脂、可可豆脂和聚乙烯乙二醇。

[0279] 药物组合物可以包括多种材料,其修饰固体或液体剂量单位的物理形式。例如,组合物可以包括在活性成分外形成衣壳的材料。形成衣壳的材料一般是惰性的,可以选自,例如糖、虫胶、和其他肠溶性包衣剂。或者,可以将活性成分包装在明胶胶囊中。固体或液体形式的药物组合物可以包括与本发明抗体结合的试剂,从而辅助化合物的递送。可以发挥该

作用的适宜试剂包括其他单克隆或多克隆抗体,一种或多种蛋白或脂质体。药物组合物可以基本上由能够作为气雾剂给予的剂量单元组成。术语气雾剂用于表示多种系统,其范围为具有胶体性质的系统至由加压包装组成的系统。可以通过液化或压缩气体或通过使活性成分分散的适宜的泵系统递送。气雾剂可以在单相、二相、或三相系统中递送,以递送活性成分。气雾剂的递送包括必须的容器、活性剂、阀、内部容器等,其在一起可以形成试剂盒。在不需要过度实验的情况下,本领域普通技术人员就可以确定优选的气雾剂。

[0280] 可以通过药物领域公知的方法制备药物组合物。例如,用于注射给药的药物组合物可以通过将包含本申请所述的 IL-6R- 特异性抗体的组合物与任选地一种或多种盐、缓冲剂和 / 或稳定剂组合,加入无菌蒸馏水以形成溶液。可以加入表面活性剂以便于形成均一的溶液或混悬液。表面活性剂是与抗体组合物发生非共价相互作用以便于抗体在水性递送系统中溶解或均匀混悬的化合物。

[0281] 可以以治疗有效量给予组合物,治疗有效量取决于多种因素,包括所使用的特定化合物(例如,IL-6R- 特异性抗体)的活性;化合物的代谢稳定性和作用长度;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别、和饮食;给药方式和时间;排泄速率;药物合用;特定疾病或状况的严重程度;以及接受治疗的对象。一般情况下,每日治疗有效量(针对 70kg 的哺乳动物)为约 0.001mg / kg(即,0.07mg)至约 100mg / kg(即,7.0g);优选地治疗有效量(针对 70kg 的哺乳动物)为约 0.01mg / kg(即,0.7mg)至约 50mg / kg(即,3.5g);更优选地,治疗有效量(针对 70kg 的哺乳动物)为约 1mg / kg(即,70mg)至约 25mg / kg(即,1.75g)。

[0282] 包含本申请的 IL-6R- 特异性抗体的组合物还可以与一种或多种其他治疗剂同时、在其之前或之后给药。此类联合治疗可以包括给予单一药物剂型,其含有本发明的化合物和一种或多种附加活性剂,以及给予组合物,其包含本发明的抗体,并且各活性剂分别在其各自药物剂型中。例如,本申请所描述的抗体和另一种活性剂可以在单一口服剂型组合物如片剂或胶囊中一并给予患者,或各试剂分别在单独的口服剂型中给予。类似地,本申请所描述的抗体和另一种活性剂可以在单一胃肠外剂型组合物如溶液或其他生理学可接受的溶液中一并给予患者,或各试剂分别在单独的胃肠外剂型中给予。当使用单独剂型时,包含抗体和一种或多种附加活性剂的组合物可以基本上同时给予,即同时地,或在单独的交错时间,即连续地和以任何顺序给予;将联合治疗理解为包括所有这些方案。

[0283] 因此,在一些实施方式中,还涉及将本申请的抗 -IL-6R 抗体组合物与一种或多种其他治疗剂联合给予。本领域可以接受此类治疗剂作为本申请所描述的特定疾病状态的标准治疗,如类风湿性关节炎、炎症或癌症。示例性的治疗剂包括细胞因子、生长因子、类固醇、NSAID、DMARD、抗炎剂、化疗剂、放疗剂、或其他活性和辅助试剂。

[0284] 在一些实施方式中,本申请公开的抗 -IL-6R 抗体可以与任意量的放疗剂联合给予。放疗剂的例子包括:烷化剂,如噻替派和环磷酰胺(CYTOXAN™);烷基磺酸盐,如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶类,如苯多巴(benzodopa)、卡巴醌、偏尿多巴(meturedopa)、和尿多巴(uredopa);乙撑亚胺和甲基蜜胺,包括六甲蜜胺、曲他胺、三亚乙基膦酰胺、三亚乙基硫化膦酰胺和三羟甲基蜜胺;氮芥类,如苯丁酸氮芥、蔡氮芥、氯磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、盐酸甲氧氮芥、美法仑、新恩比兴、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺、乌拉莫司汀;亚硝基脲,如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫

司汀；抗生素，如阿克拉霉素、放线菌素、蒽霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素 C、卡里奇霉素、卡柔比星、洋红霉素、嗜癌霉素、色霉素、更生霉素、柔红霉素、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、紫菜霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链脲菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星；抗代谢类，如甲氨蝶呤和 5-氟尿嘧啶 (5-FU)；叶酸类似物，如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙；嘌呤类似物，如氟达拉滨、6-巯嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤；嘧啶类似物，如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、脱氧氟脲苷、依诺他滨、氟尿苷、5-FU；雄激素，如卡普睾酮、屈他雄酮丙酸酯、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯；抗肾上腺素剂，如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦；叶酸补充剂，如亚叶酸；醋葡醛内酯；醛磷酰胺糖苷；氨基乙酰丙酸；安吡啶；阿莫斯汀 (bestrabucil)；比生群；依达曲沙；地磷酰胺；地美可辛；地吡啶；艾弗咪辛 (elformithine)；依利醋铵；依托格鲁；硝酸镓；羟基脲；蘑菇多糖；氯尼达明；米托胍脲；米托蒽醌；莫派达醇；硝基可润；喷司他丁；苯来美特；吡柔比星；鬼臼酸；2-乙酰肼；丙卡巴肼；PSK. RTM.；雷佐生；西佐喃；锗螺胺；细交链孢菌酮酸；三亚胺醌；2,2',2''-三氯三乙胺；乌拉坦；长春地辛；达卡巴嗪；甘露莫司汀；二溴甘露醇；二溴卫矛醇；哌泊溴烷；伽胞嘧啶 (gacytosine)；阿糖胞苷 ("Ara-C")；环磷酰胺；塞替派；紫杉烷类，例如紫杉醇 (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.) 和多西他赛 (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, France)；苯丁酸氮芥；吉西他滨；6-巯鸟嘌呤；巯嘌呤；甲氨蝶呤；铂类似物，如顺铂和卡铂；长春碱；铂；依托泊苷 (VP-16)；异环磷酰胺；丝裂霉素 C；米托蒽醌；长春新碱；长春瑞滨；诺维本；诺安托；替尼泊苷；柔红霉素；氨基蝶呤；希罗达；伊班膦酸盐；CPT-11；拓扑异构酶抑制剂 RFS2000；二氟甲基鸟氨酸 (DMFO)；维甲酸衍生物，如蓓萨罗丁™ (贝沙罗汀)、Panretin™ (阿利维甲酸)；ONTAK™ (地尼白介素-毒素连接物)；埃斯培拉霉素；卡培他滨；以及任意上述药物的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在该定义中还包括抗激素剂，其在肿瘤中调节或抑制激素的作用，如抗雌激素，其包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、芳香酶抑制剂 4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、雷洛昔芬、LY117018、奥那司酮和托瑞米芬 (法乐通)；和抗雄激素，如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、醋酸亮丙瑞林、和戈舍瑞林；以及任意上述药物的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0285] 多种其他治疗剂可以用于与本申请所描述的抗-IL-6R 抗体联用。在一个实施方式中，抗体与抗炎剂联合给药。抗炎剂或药物包括，但不限于，甾体激素和糖皮质激素（包括倍他米松、布地奈德、地塞米松、醋酸氢化可的松、氢化可的松、氢化可的松、甲基强的松龙、泼尼松龙、泼尼松、曲安西龙）、非甾体抗炎药 (NSAIDs)，其包括阿司匹林、布洛芬、萘普生、甲氨蝶呤、柳氮磺吡啶、来氟米特，抗-TNF 药物、环磷酰胺，和霉酚酸酯。

[0286] 可以将包含本申请所描述的 IL-6R-特异性抗体的组合物给予罹患本申请所描述的疾病的主体，所述疾病如炎症性疾病或癌症。在这个方面，可以将包含如本申请所描述的 IL-6R 特异性抗体的所述组合物给予患有炎症性疾病的主体，所述炎症性疾病例如，但不限于，青少年特发性关节炎、克隆氏病、结肠炎、皮炎、牛皮癣、憩室炎、肝炎、肠易激综合征 (IBS)、红斑狼疮、肾炎、帕金森氏病、溃疡性结肠炎、多发性硬化症 (MS)、阿尔茨海默氏症、关节炎、类风湿性关节炎、哮喘、和多种心血管疾病，如动脉粥样硬化和血管炎。在某些实施方式中，

所述炎性疾病选自糖尿病、痛风、冷吡啉 (cryopyrin) 相关的周期性综合症、慢性阻塞性肺疾病。在这方面,一个实施方式提供了一种方法,其通过给予所需患者治疗有效量的本申请组合物来治疗、减轻炎性疾病的严重程度或预防炎性疾病。

[0287] 一个实施方式提供了一种治疗,减轻癌症的严重程度或预防癌症,所述癌症包括,但不限于,多发性骨髓瘤,血浆细胞白血病,肾细胞癌,卡波济氏肉瘤,大肠癌,胃癌,黑色素瘤,白血病,淋巴瘤,神经胶质瘤,多形性胶质母细胞瘤,肺癌(包括但不限于非小细胞肺癌(NSCLC;腺癌和鳞状细胞癌)),非霍奇金淋巴瘤,霍奇金病,浆细胞瘤,肉瘤,胸腺瘤,乳腺癌,前列腺癌,肝细胞癌,膀胱癌,子宫癌,胰腺癌,食道癌,脑肿瘤,头颈部癌,卵巢癌,宫颈癌,睾丸癌,胃癌,食道癌,肝癌,急性淋巴细胞白血病(ALL),T-ALL,急性髓系白血病(AML),慢性髓系白血病(CML)和慢性淋巴细胞白血病(CLL),唾液腺癌或其他癌症。

[0288] 本申请的另一个实施方式提供了一种治疗,减轻疾病的严重程度或预防疾病的方法,所述疾病选自败血症,骨吸收(骨质疏松症),恶病质,与癌症有关的疲劳,银屑病,全身型青少年特发性关节炎,系统性红斑狼疮(SLE),系膜增生性肾小球肾炎,高 γ 球蛋白血症,卡斯特莱曼病(Castleman's disease),IgM丙种球蛋白病,心脏粘液瘤和自身免疫性胰岛素依赖型糖尿病。

[0289] 在体内使用用于治疗疾病,特别是人类疾病时,一般在给药前将本申请所描述的抗体混入药物组合物。药物组合物包含本申请所描述的一种或多种抗体联合本申请其他地方描述的生理学上可接受的载剂或赋形剂。为制备药物组合物,将有效量的一种或多种化合物与本领域技术人员公知的适于特定给药形式的任意药物载剂或赋形剂混合。药物载剂可以是液体、半液体或固体。用于胃肠外、皮内、皮下或局部应用的溶液或混悬液可以包括,例如无菌稀释剂(如水)、盐水溶液、不挥发性油、聚乙烯乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗微生物剂(如苯甲醇和尼泊金甲酯);抗氧化剂(如抗坏血酸和酸性亚硫酸钠)和螯合剂(如乙二胺四乙酸(EDTA));缓冲剂(如醋酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐)。如果静脉给药,适宜的载剂包括生理盐水或磷酸缓冲盐(PBS),以及含有增稠剂和增溶剂的溶液,如葡萄糖、聚乙烯乙二醇、丙二醇及其混合物。

[0290] 包含本申请所描述的 IL-6R- 特异性抗体的组合物可以由载剂制备,其保护抗体不从机体迅速消除,如缓释制剂和包衣。此类载剂包括控释制剂,例如但不限于,植入剂和微囊递送系统,以及生物可降解的、生物相容性的聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、聚原酸酯、聚乳酸和本领域普通技术人员公知的那些聚合物。

[0291] 本申请提供了使用与 IL-6R 结合的抗体治疗的方法。在一个实施方式中,本发明的抗体给予患有与 IL-6 的不适宜表达有关的疾病的患者,在本申请的上下文中的意思中包括,以 IL-6 的表达或活化异常为特征的疾病和病症,由于例如蛋白存在量的改变(例如,统计学显著增加或减少)、或存在突变蛋白、或二者兼有导致。过量可能由任何原因导致,包括但不限于,分子水平的过表达、在作用位点的延迟或蓄积出现、或相对于正常可检测的 IL-6(或 IL-6R) 的活性增加(例如,以具有统计学意义的方法)。可以相对于正常表达、外观、或 IL-6 或 IL-6R 信号事件的活性对此类 IL-6 的过表达进行检测,并且所述检测在本申请所描述的抗体的开发和/或临床检测中发挥重要作用。

[0292] 特别地,本发明的抗体可用于多种与 IL-6 表达相关的癌症的治疗。例如,本发明的一个实施方式提供了一种用于治疗癌症的方法,癌症包括,但不限于,多发性骨髓瘤,浆

细胞白血病,肾细胞癌,卡波济氏肉瘤,口腔鳞状细胞癌,胰腺癌和结肠癌,所述方法通过向癌症患者给予治疗有效量的本发明公开的 IL-6R 特异性抗体。给药后,统计学意义上显著(即,相对于本领域技术人员已知的适当的对照)抑制,阻止或延迟癌症的进展和/或转移的量被认为是有效的。

[0293] 另一个实施方式提供了一种用于预防癌症转移的方法,癌症包括,但不限于,多发性骨髓瘤,浆细胞白血病,肾细胞癌,卡波济氏肉瘤,口腔鳞状细胞癌,胰腺癌,结肠癌,所述方法通过向癌症患者给予治疗有效量的本发明公开的 IL-6R 特异性抗体(例如,给药后,统计学意义上显著抑制,阻止或延迟癌症转移的量,即,相对于本领域技术人员已知的适当的对照)。

[0294] 另一个实施方式提供了一种用于预防癌症的方法,癌症包括,但不限于,多发性骨髓瘤,浆细胞白血病,肾细胞癌,卡波济氏肉瘤,口腔鳞状细胞癌,胰腺癌,结肠癌,所述方法通过向癌症患者给予治疗有效量的本发明公开的 IL-6R 特异性抗体。

[0295] 另一个实施方式提供了一种治疗,抑制疾病进展或预防疾病的方法,所述疾病为败血症,骨吸收(骨质疏松症),恶病质,与癌症有关的疲劳,银屑病,全身型青少年特发性关节炎,系统性红斑狼疮(SLE),系膜增生性肾小球肾炎,类风湿关节炎,高 γ 球蛋白血症,卡斯特莱曼病(Castleman's disease),心脏粘液瘤,IgM 丙种球蛋白病和自身免疫性胰岛素依赖型糖尿病,所述方法通过向患有一个或多个这些疾病的患者给予治疗有效量的本申请公开的 IL-6R 特异性抗体。

[0296] 在另一个实施方式中,本发明的抗-IL-6R 抗体用于确定结合抗原的结构,例如构象表位,然后可以用该结构,通过例如化学建模和 SAR 方法来开发具有或模拟该结构的化合物。

[0297] 本发明的其他各实施方式,部分地,涉及用于检测是否存在表达 IL-6R 的细胞或组织的诊断应用。因此,本申请提供了一种检测样品中的 IL-6R 的方法,如检测表达 IL-6R 的细胞或组织。此类方法可以应用于多种已知的检测形式,包括但不限于,免疫组织化学(IHC)、免疫细胞化学(ICC)、原位杂交(ISH)、整体原位杂交(WISH)、荧光 DNA 原位杂交(FISH)、流式细胞术、酶免疫法(EIA)、和酶联免疫检测(ELISA)。

[0298] ISH 是一种杂交类型,其使用标记的互补 DNA 或 RNA 链(即,第一结合剂),以便在细胞或组织(原位)的一部分或切片上定位特定的 DNA 或 RNA 序列,或者如果组织足够小,则可以在整个组织上定位(整体 ISH)。本领域普通技术人员可以理解,这与免疫组织化学不同,后者使用抗体作为第一结合剂在组织切片上定位蛋白。DNA ISH 可以用于基因组 DNA 以确定染色体的结构。荧光 DNA ISH(FISH) 可以,例如,用于医疗诊断以评价染色体的完整性。RNA ISH(杂交组织化学)用于在组织切片或全组织标本中检测和定位 mRNA 和其他转录物。

[0299] 在不同实施方式中,本申请所描述的抗体偶联至可以被直接或间接检测的可检测标记。在这一点上,抗体“偶联”指共价连接至可检测标记的抗-IL-6R 抗体。在本发明中,DNA 探针、RNA 探针、单克隆抗体、及其抗原结合片段和其抗体衍生物,如单链可变片段抗体或表位标签抗体,均可以共价连接至可检测标记。在“直接检测”中,仅使用一个可检测抗体,即第一可检测抗体。因此,直接检测指偶联至可检测标记的抗体本身可以被检测,而不需要加入另一个抗体(二抗)。

[0300] “可检测标签”是能够产生可检测（如可见地、电子地或其他）信号的分子或材料，所述信号指示样品中存在标记和 / 或其浓度。当偶联至抗体时，可检测标记可以用于定位和 / 或定量特异性抗体指示的靶点。因此，可以通过检测可检测标记产生的信号来检测样品中靶点的存在情况和 / 或其浓度。可以直接或间接地检测可检测标记，可以使用偶联至不同特异性抗体的若干不同可检测标记联合检测一种或多种靶点。

[0301] 可以被直接检测的可检测标记的例子包括，荧光染料和放射性物质以及金属粒子。而相反地，间接检测要求在使用一抗后使用一种或多种附加抗体，即二抗。因此，通过检测二抗或结合剂与第一检测抗体的结合进行该检测。需要加入第二结合剂或抗体的第一检测结合剂的例子包括，酶检测结合剂和半抗原检测结合剂或抗体。

[0302] 在某些实施方式中，可检测标记偶联至核酸聚合物，其包含第一结合剂（例如，在 ISH、WISH、或 FISH 过程中）。在其他实施方式中，可检测标记偶联至抗体，其包含第一结合剂（例如，在 IHC 过程中）。

[0303] 可以偶联至本申请方法中使用的抗体的可检测标记的例子包括，荧光标记、酶标记、放射性同位素、化学发光标记、电化学发光标记、生物发光标记、聚合物、聚合物粒子、金属粒子、半抗原、和染料。

[0304] 荧光标记的例子包括，5-（和 6）- 羧基荧光素、5- 或 6- 羧基荧光素、6-（荧光素）-5-（和 6）- 羧酰胺基己酸、异硫氰酸酯荧光素、罗丹明、四甲基罗丹明、和染料，如 Cy2、Cy3、和 Cy5，任选取代的香豆素，包括 AMCA、PerCP，藻胆蛋白包括 R- 藻红蛋白（RPE）和别藻红蛋白（APC）、得克萨斯红、普林斯顿红、绿色荧光蛋白（GFP）及其类似物、和 R- 藻红蛋白或别藻红蛋白的偶联物，无机荧光标记如基于半导体材料如涂覆 CdSe 纳米晶的粒子。

[0305] 聚合物粒子标记的例子包括，聚苯乙烯微粒或胶乳粒子、PMMA 或二氧化硅，其可以嵌入荧光染料，或者聚合物胶束或胶囊，其含有染料、酶或底物。

[0306] 金属粒子标记的例子包括金粒子和涂层金粒子，其可以通过银染被转化。半抗原的例子包括 DNP、荧光素异硫氰酸酯（FITC）、生物素、和地高辛。酶标记的例子包括辣根过氧化物酶（HRP）、碱性磷酸酶（ALP 或 AP）、 β - 半乳糖苷酶（GAL）、葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶、 β -N- 乙酰氨基葡萄糖苷酶、 β - 葡萄糖醛酸苷酶、蔗糖酶、黄嘌呤氧化酶、萤火虫荧光素酶和葡萄糖氧化酶（GO）。辣根过氧化物酶常用底物的例子包括，3,3'- 二氨基联苯胺（DAB）、镍增强的二氨基联苯胺、3- 氨基 -9- 乙基咔唑（AEC）、联苯胺二盐酸盐（BDHC）、Hanker-Yates 试剂（HYR）、靛酚蓝（IB）、四甲基联苯胺（TMB）、4- 氯 -1- 萘酚（CN）、 α - 萘酚派洛宁（ α -NP）、邻联茴香胺（OD）、5- 溴 -4- 氯 -3- 吡啶磷酸盐（BCIP）、硝基四氮唑蓝（NBT）、2-（p- 碘苯基）-3-p- 硝基苯基 -1-5- 苯基氯化四氮唑（INT）、四硝基四氮唑蓝（TNBT）、5- 溴 -4- 氯 -3- 吡啶酚 - β -D- 半乳糖苷 / 铁 - 铁氰化钾（BCIG / FF）。

[0307] 碱性磷酸酶常用底物的例子包括，萘酚 -AS-B1- 磷酸盐 / 快速红 TR（NABP / FR）、萘酚 -AS-MX- 磷酸盐 / 快速红 TR（NAMP / FR）、萘酚 -AS-B1- 磷酸盐 / - 快速红 TR（NABP / FR）、萘酚 -AS-MX- 磷酸盐 / 快速红 TR（NAMP / FR）、萘酚 -AS-B1- 磷酸盐 / 新品红（NABP / NF）、溴氯吡啶磷酸盐 / 硝基四氮唑蓝（BCIP / NBT）、5- 溴 -4- 氯 -3- 吡啶基 -b--d- 吡喃半乳糖苷（BCIG）。

[0308] 发光标记的例子包括鲁米诺、异鲁米诺、吖啶酯、1,2- 二氧戊环和吡啶并哒嗪。电化学发光标记的例子包括钌衍生物。放射性标记的例子包括碘、钴、硒、氚、碳、硫和磷的同

位素。

[0309] 可以将可检测标记连接至本申请所描述的抗体或与感兴趣的生物学标记物特异性结合的任意其他分子,例如抗体、核酸探针、或聚合物。而且,本领域的普通技术人员将理解,还能够将可检测标记偶联至第二、和 / 或第三、和 / 或第四、和 / 或第五结合剂或抗体等。此外,本领域技术人员将理解,用于表征感兴趣的生物学标记物的每个附加的结合剂或抗体可以用于信号放大步骤。当可检测底物是例如染料、胶体金粒子、发光剂时,可以使用例如光学显微镜、荧光显微镜、电子显微镜对生物学标记物进行目测检测。还可以使用质谱对连接至生物学标记物的目测检测底物进行检测。当可检测底物是放射性同位素时,可以通过放射自显影目测检测,或使用闪烁计数器非目测检测。参见例如, Larsson, 1988, Immunocytochemistry: Theory and Practice, (CRC Press, Boca Raton, Fla.) ; Methods in Molecular Biology, vol. 80 1998, John D. Pound (ed.) (Humana Press, Totowa, N. J.)。

[0310] 本发明进一步提供了用于检测样品中的 IL-6R 或者表达 IL-6R 的细胞或组织的试剂盒,其中所述试剂盒含有本申请所描述的至少一种抗体、多肽、多核苷酸、载体或宿主细胞。在一些实施方式中,试剂盒可以含有缓冲剂、酶、标记、底物、小珠或供本发明的抗体附着的其他表面等等,以及使用说明。

实施例

[0311] 实施例 1

[0312] 抗-IL-6R 抗体的生产和人源化

[0313] 使用在完全弗氏佐剂 (Sigma-Aldrich) 中的 0.4mg 重组人 IL-6R- 细胞外结构域 (ECD) 皮下免疫四只新西兰白兔。初次免疫后,使用在不完全弗氏佐剂中的 0.2mg IL-6R 加强免疫动物 5 次,间隔 3 周。在用于细胞融合的脾切除术前,向具有最高血清滴度和 IL-6R-ECD 中和活性的家兔连续 4 天静脉给予在 PBS 中的 0.4mg IL-6R-ECD。

[0314] 抗体产生

[0315] 从免疫家兔中收获脾细胞,并使用 PEG4000 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) 与家兔浆细胞瘤细胞 240E-W2 融合。在通过 HAT (次黄嘌呤、氨基蝶呤、和胸腺嘧啶) 选择后,将在原始 96 孔板中生长的杂交瘤克隆转移至更换培养基的新 96 孔板中。收集杂交瘤上清液并筛选在直接 ELISA 中与 IL-6R-ECD 的特异性结合。在 ELISA 结合检测中筛选出 572 个阳性克隆,对其进行功能性筛选。

[0316] 杂交瘤的功能性筛选

[0317] 对于功能性筛选而言,对 24 孔板中已确证的 572 个阳性克隆的上清进行检测,通过 ELISA 测定 IL-6R / IL-6 结合的中和。这些实验鉴定出 25 个独特的阳性克隆,进一步测定其 IL-6- 诱导的 TF-1 细胞 (人骨髓细胞系) 增殖的中和。发现十六个克隆具有中和 IL-6 的活性。进一步选择中和 IL-6 活性最高的 10 个克隆进行分子克隆和重组表达,以用于进一步的功能鉴定。

[0318] 重组抗-IL-6R 抗体

[0319] 利用 PCR 扩增来自最高的 10 个克隆的家兔 IgG 的 L 链和 H 链可变区 (VH) 的 DNA 片段。将 L 链片段在 Hind III 和 Not I 位点克隆至 pTT5 载体,将 VH 片段在 Hind III 和 KpnI 位点克隆至 pTT5 载体 H 链的恒定区。对于各杂交瘤而言,将 L 或 H 链的三个 DNA 克隆

测序, 鉴定带有共有序列的质粒, 并用于重组表达。为表达重组抗体, 将 L 和 H 链质粒共转染至 293-6E 细胞 (National Research Council Canada)。5 天后, 收集上清液并使用 ELISA 检测进行定量, 以在功能性检测之前测定 IgG 的浓度。

[0320] 重组抗-IL-6R 抗体的功能性筛选

[0321] 进行多种实验以表征如前所鉴定的最高的 10 个抗 IL-6R 抗体。特别地, 测试抗 IL-6R 抗体与表达 IL-6R 的 U266B1 细胞上的 IL-6R 的结合, 测试其在 ELISA 中阻断受体-配体结合的能力, 测试其抑制 IL-6- 诱导的 TF1 细胞生长的能力, 以及其抑制 STAT-3 磷酸化的能力。这些研究结果总结在下面的表 1 中。

[0322] 表 1: 最高的 10 个克隆的总结

[0323]

克隆编号	直接 ELISA	FACS 结合	RL-ELISA	TF-1 增殖	STAT3 磷酸化抑制
	EC50 ug/ml	EC50 ng/ml	IC50 ug/ml	IC50 ug/ml	
# 5	0.04	26.11	0.38	0.03	(++++)
# 21	0.04	32.55	0.47	0.11	(+)
# 23	0.07	26.26	0.38	0.07	(+)
# 36	0.02	20.29	0.23	0.04	(++++++)
# 37	0.05	33.12	0.39	0.09	(+)
# 40	0.02	57.31	1.36	0.02	(+)
# 42	0.04	96.06	0.34	0.03	(+)
# 51	0.03	68.73	0.80	0.02	(+++++)
R #5	0.04	41.08	0.26	0.09	(++)
R #15	0.07	178.00	0.43	0.19	(+)
hPM-1 (基准)		206.20	0.56	0.04	(+)

[0324] 总结在表 1 的最高的 10 个克隆的 VH 和 VL 区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 25-34 和 35-44 所示。图 2 显示了 VH 和 VL 氨基酸序列的比对。下划线部分表示 CDR。所有克隆的 VHCDR1, VHCDR2 和 VHCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 45-74 所示。所有克隆的 VLCDR1, VLCDR2 和 VLCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 75-104 所示。

[0325] 值得注意的是克隆 #36 和 #51, 特别是克隆 #36, 其 STAT3 磷酸化抑制比托珠单抗 (tocilizumab) (hPM-1) 的高出 >10 倍。选择最高的两个候选克隆 #36 和 #51 以进行人源化和进一步表征。

[0326] 人源化设计

[0327] 通过将 CDR 移植至人生殖细胞框架对克隆 #36 和 #51 进行人源化。首先, 将克隆 36 和 51 的重链 (VH) 和轻链 (VK) 可变区序列与人生殖细胞 VH 和 VK 数据库进行比对。将鉴定得到的最接近的人生殖细胞序列 VH3-66 和 VK-A20 (克隆 36) 和 VK-L12 (克隆 51) 作为人源化的模板。其次, 基于所掌握的人和家兔抗体的知识, 对框架区内可能参与 CDR 接触

或链内接触的家兔残基进行鉴定。根据从之前人源化兔抗体所获得的知识,对认为对抗体的结构活性不具有关键作用的残基进行鉴定。在人源化后,人源化的 #36 和 #51 框架分别与人生殖细胞框架具有 92.35%和 91.8%的同一性。克隆 #36 人源化的 VH 和 VL 区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO :9 和 10 所示。克隆 #51 人源化的 VH 和 VL 区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO :19 和 20 所示。

[0328] 人源化克隆 #36 和 #51 的表达

[0329] 编码人源化 #36 和 #51 的 VK 和 VH 的 DNA 由 MCLab (South San Francisco, CA, USA) 合成。DNA 片段包括信号肽和 5' 末端的 Kozak 序列。为表达人源化的 #36 和 #51, 将人源化的 VK 片段在 Hind III 和 Nhe I 位点克隆至构建于 pTT5 载体的人 CK。将人源化的 VH 在 Hind III 和 BsiW I 位点克隆至构建于 pTT5 载体的人 IgG1CH。将人 CK (分别为 SEQ ID NO : 24 和 23) 和 IgG1CH (分别为 SEQ ID NO :22 和 21) 的 DNA 和氨基酸序列选择为恒定区。在 293-6E 细胞中表达人源化的 #36 和 #51, 通过蛋白 A 柱进行纯化, 并在使用 PBS 缓冲液透析后利用 UV280 定量。

[0330] 人源化候选物的功能性筛选

[0331] 抗 IL-6R 抗体 #36 和 #51

[0332] 进行多种实验以表征如前所鉴定的 #36 和 #51 人源化候选抗 IL-6R 抗体的效价。特别地, 测试兔抗 -IL-6R 抗体及其人源化的相应抗体与表达 IL-6R 的 U266B1 细胞上的 IL-6R 的结合, 测试其在 ELISA 中阻断受体-配体结合的能力, 测试其抑制 IL-6 诱导的 TF-1 细胞生长的能力, 以及其抑制 STAT-3 磷酸化的能力。这些实验的结果如图 1 中所示, 并总结在下面的表 2 中, 结果表明, 最高的 2 个人源化抗 IL-6R 的前导抗体保留了其大部分活性。在阻断受体-配体结合方面, 克隆 #51 显示的结果稍差。结果表明, 在配体-受体结合试验中, 克隆 #36 比基准托珠单抗高 6 倍, 在抑制 STAT3 磷酸化方面其要高 6-10 倍, 这证明该人源化抗 IL-6R 抗体为“生物更好的”。

[0333] 表 2 :人源化抗 -IL-6R 抗体前导的总结

克隆	直接 ELISA	FACS 结合	RL-ELISA	TF-1 增殖
	EC50 ug/ml	EC50 ug/ml	IC50 ug/ml	IC50 ug/ml
36	0.05953	0.0776	0.2347	0.1625
人源化的 36	0.02157	0.1446	0.3903	0.1815
51	2.18E-09	0.1644	0.2878	0.1541
人源化的 51	0.01693	0.3556	0.26	1.061
托珠单抗	0.04576	0.6016	1.099	0.2137

[0335] 前导人源化抗 IL-6R 抗体的抗原结合亲和力通过表面等离子体激元共振 (SPR) 测定。各抗体的 Kd 值示于表 3。人源化克隆的 KD 等于或优于基准托珠单抗, 其中人源化克隆 #36 表现出比克隆 #51 更高的 IL-6R 亲和力。

[0336] 表 3 :人源化抗 -IL-6R 抗体前导的 KD 等于或优于基准

[0337]

克隆	k_a (1 / Ms)	k_d (1 / s)	K_D (nM)	χ^2
5	5.33E5	2.79E-4	0.523	0.182
R5	4.11E5	7.23E-4	1.76	0.252
36	5.38E5	3.42E-4	0.635	0.241
51	3.93E5	4.63E-4	1.17	0.404
人源化的 36	5.89E5	3.1E-4	0.526	0.246
人源化的 51	3.11E5	4E-4	1.29	0.114
托珠单抗	2.52E5	9.7E-4	3.85	0.172

[0338] 候选抗 IL-6R 抗体 #36 和 #51 的交叉反应

[0339] 人类和猴 IL-6R 的 ECD 具有 97.3% 的同一性。实验结果表明, 克隆 #36 和 #51 并不与小鼠 IL-6R 交叉反应, 但能识别恒河猴 (猕猴) IL-6R。因此, 可以将这些候选抗体用于胶原诱导的猴关节炎, 其为广泛接受并与关节炎有关的动物模型。

[0340] 可以对上文所描述的不同实施方式进行组合以提供进一步的实施方式。本说明书中涉及的和 / 或申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物其全部内容均通过引用并入本申请。如果有必要, 采用不同专利、申请文件和公开文件的概念, 可以对实施方式的方面进行修改, 以提供进一步的实施方式。

[0341] 在上述详细描述的指导下, 可以对实施方式进行这些和其他改变。一般而言, 在下述权利要求中, 使用的术语不应被解释为将权利要求限制为说明书和权利要求所公开的特定实施方式, 而是应该被解释为包括所有可能的实施方式, 以及此类权利要求等同物的全部范围。因此, 权利要求并不受本申请的限定。

[0001]

序列表

<110> 埃派斯进有限公司
李森伟
柯耀煌
张永克

<120> 抗-IL-6受体抗体及其使用方法

<130> APEX-012/01US

<140> 美国

<141> 2012-02-28

<160> 104

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 1

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

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

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

Ser Pro Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Gly
85 90 95

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

Val Thr Val Ser Ser
115

[0002]

<210> 2
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 2

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn
 20 25 30

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

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

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

Cys Asp Asn Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Tyr Asn Gly Val
 85 90 95

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

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 3

Ser Tyr Tyr Met Ser
 1 5

<210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 4

Ile Thr Thr Thr Ser Thr Asn Thr Phe Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

[0003]

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 5

Tyr Gly Gly Asn Ser Ala Tyr Tyr Ala Phe Ser Leu
1 5 10

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 6

Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 7

Gly Ala Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 8

Gln Gly Tyr Tyr Asn Gly Val Ile Phe Val
1 5 10

<210> 9
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆36兔抗-IL6R抗体VH区的人源化序列

<400> 9

[0004]

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

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

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Arg Tyr Gly Gly Asn Ser Ala Tyr Tyr Ala Phe Ser Leu Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆36兔抗-IL6R抗体VL区的人源化序列

<400> 10

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30

Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu
35 40 45

[0005]

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

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

Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Tyr Asn Gly
85 90 95

Val Ile Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 11

<211> 117

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 11

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

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

Leu Gln Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
35 40 45

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

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

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

Asp Ile Ser Ser Asp Tyr Phe Pro Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12

[0006]

<211> 109
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 12

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ala Ser Glu Ser Val Tyr Asn Lys Asn
 20 25 30

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

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

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

Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Gly Ser Gly Asn
 85 90 95

Val Tyr Asp Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 13

Ser Tyr Ser Leu Gln
 1 5

<210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 14

Phe Ile Arg Pro Asp Gly Ser Ala His Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

[0007]

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 15

Asp Asp Ile Ser Ser Asp Tyr Phe Pro Asn Leu
1 5 10

<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 16

Gln Ala Ser Glu Ser Val Tyr Asn Lys Asn Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 17

Asp Ala Ser Asp Leu Ala Ser
1 5

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 18

Ala Gly Gly Gly Ser Gly Asn Val Tyr Asp
1 5 10

<210> 19
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆51兔抗-IL6R抗体VH区的人源化序列

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0008]

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

<210> 20
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克隆51兔抗-IL6R抗体VL区的人源化序列

<400> 20

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

[0009]

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

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

Asn Val Tyr Asp Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 21
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人

<400> 21

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

[0010]

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 22
<211> 993
<212> DNA
<213> 智人

<400> 22
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaacct cctccaagag caectctggg

60

[0011]

ggcacagcgg cectgggctg cctggteaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg	120
tggaactcag ggccectgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtctgtcct acagtectca	180
ggactctact cectcagcag cgtgggtgacc gtgcectcca gcagcttggg caccagacc	240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300
aaatettgtg acaaaactca cacatgceca cctgcccag cacctgaact cctgggggga	360
ccgtcagtct tectettccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct	420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag	600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	660
aaagccaaag ggcagecccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccate ccgggatgag	720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg	840
ctggactccg acggctctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	900
cagcagggga acgtctctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag	960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa taa	993

<210> 23
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 23

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

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

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

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

[0012]

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

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

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

<210> 24

<211> 324

<212> DNA

<213> 智人

<400> 24

cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccccat ctgatgagca gttgaaatct 60

ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120

tggaagggtg ataacgcct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180

agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240

aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300

agcttcaaca ggggagagtg ttag 324

<210> 25

<211> 135

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 25

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser
35 40 45

Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

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

[0013]

65	70	75	80
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys	85	90	95
Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg	100	105	110
Gly Ile Asp Thr Gly Ile Ala Thr Thr Phe Asn Leu Trp Gly Pro Gly	115	120	125
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	130	135	
<210> 26			
<211> 136			
<212> PRT			
<213> 家兔			
<400> 26			
Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly	5	10	15
Val Gln Cys Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro	20	25	30
Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser	35	40	45
Asn Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu	50	55	60
Trp Ile Gly Ile Ser Ser Thr Thr Ser Asn Thr Phe Tyr Ala Ser Trp	65	70	75
Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ala Thr Val Asp Leu	85	90	95
Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala	100	105	110
Arg Tyr Gly Gly Asn Ser Ala Tyr Tyr Ala Phe Ser Leu Trp Gly Gln	115	120	125

[0014]

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 27
<211> 135
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 27

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser
35 40 45

Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Ile Gly Met Ile Ser Gly Gly Asn Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala
65 70 75 80

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys
85 90 95

Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
100 105 110

Gly Ile Asp Thr Gly Ile Ala Thr Thr Phe Asn Leu Trp Gly Pro Gly
115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 28
<211> 136
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 28

[0015]

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45

Ser Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Ile Gly Ile Thr Thr Thr Ser Thr Asn Thr Phe Tyr Ala Ser Trp
65 70 75 80

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ala Thr Val Asp Leu
85 90 95

Lys Ile Thr Ser Pro Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
100 105 110

Arg Tyr Gly Gly Asn Ser Ala Tyr Tyr Ala Phe Ser Leu Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 29

<211> 135

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 29

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser
35 40 45

Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu

[0016]

50	55	60
Trp Ile Gly Met Ile Ser Gly Gly Asn Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala		
65	70	75 80
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys		
	85	90 95
Ile Ile Ser Pro Thr Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg		
	100	105 110
Gly Ile Asp Thr Gly Ile Ala Thr Thr Phe Asn Leu Trp Gly Pro Gly		
	115	120 125
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	130	135
<210> 30		
<211> 141		
<212> PRT		
<213> 家兔		
<400> 30		
Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly		
1	5	10 15
Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Ser Pro		
	20	25 30
Gly Gly Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Asp Leu Asn		
	35	40 45
Thr Tyr Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
	50	55 60
Cys Ile Gly Val Ile Leu Gly Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp		
65	70	75 80
Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp		
	85	90 95
Leu Lys Met Thr Asn Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys		
	100	105 110

[0017]

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

Asp Leu Trp Gly Pro Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 31
<211> 133
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 31

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45

Asn Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Ile Ala Phe Ile Gly Gly Gly Asn Thr Phe Tyr Ala Ser Trp Ala
65 70 75 80

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu
85 90 95

Ser Met Pro Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
100 105 110

Arg Gly Tyr Gly Ala Pro Gly Tyr Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
115 120 125

Val Thr Val Ser Leu
130

<210> 32
<211> 136
<212> PRT

[0018]

<213> 家兔

<400> 32

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asp Ile Ser
35 40 45

Ser Tyr Ser Leu Gln Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Tyr Ile Gly Phe Ile Arg Pro Asp Gly Ser Ala His Tyr Ala Thr Trp
65 70 75 80

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp
85 90 95

Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
100 105 110

Ala Arg Asp Asp Ile Ser Ser Asp Tyr Phe Pro Asn Leu Trp Gly Pro
115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 33

<211> 140

<212> PRT

<213> 家兔

<220>

<221> 变体

<222> (122)..(122)

<223> Xaa = 任意氨基酸

<220>

<221> 变体

<222> (123)..(123)

<223> Xaa = 任意氨基酸

[0019]

<220>
 <221> 变体
 <222> (125)..(125)
 <223> Xaa = 任意氨基酸

<220>
 <221> 变体
 <222> (126)..(126)
 <223> Xaa = 任意氨基酸

<400> 33

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Val Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 35 40 45

Thr Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Ile Gly Met Ile Tyr Gly Asp Ser Asn Asn Lys Phe Tyr Ala Asn
 65 70 75 80

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val
 85 90 95

Asp Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
 100 105 110

Cys Ala Arg Glu Tyr Phe Ala Asp Ser Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Phe Gly
 115 120 125

Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 34
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> 家兔

<220>
 <221> 变体

[0020]

<222> (114)..(114)
 <223> Xaa = 任意氨基酸

<220>
 <221> 变体
 <222> (115)..(115)
 <223> Xaa = 任意氨基酸

<220>
 <221> 变体
 <222> (120)..(120)
 <223> Xaa = 任意氨基酸

<220>
 <221> 变体
 <222> (122)..(122)
 <223> Xaa = 任意氨基酸

<400> 34

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

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

Gly Gly Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
 35 40 45

Thr Tyr Asn Val Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Ile Gly Ile Ile Gly Gly Thr Gly Asn Thr His Tyr Thr Thr Trp
 65 70 75 80

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu
 85 90 95

Arg Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 100 105 110

Arg Xaa Xaa Leu Gly Gly Gly Xaa Asp Xaa Asp Phe Asp Ile Trp Gly
 115 120 125

Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

[0021]

<210> 35
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 35

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser
 20 25 30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser
 35 40 45

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

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
 85 90 95

Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Gln Gly Tyr Tyr Ser Gly Val Ile Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu
 115 120 125

Val Val Val Lys
 130

<210> 36
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 36

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro
 20 25 30

[0022]

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser
35 40 45

Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Glu Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gly Tyr Tyr Asn Gly Val Ile Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125

Val Val Val Lys
130

<210> 37
<211> 132
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 37

Met Asp Thr Arg Ala Ala Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser
20 25 30

Val Ser Thr Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser
35 40 45

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

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu Pro Ser
65 70 75 80

[0023]

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gly Tyr Tyr Ser Gly Val Ile Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125

Val Val Val Lys
130

<210> 38

<211> 132

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 38

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Ala Ser Ser
20 25 30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser
35 40 45

Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Asp Asn Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gly Tyr Tyr Asn Gly Val Ile Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125

[0024]

Val Val Val Lys
130

<210> 39
<211> 132
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 39

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser
20 25 30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser
35 40 45

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

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gly Tyr Tyr Ser Gly Val Ile Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125

Val Val Val Lys
130

<210> 40
<211> 134
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 40

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

[0025]

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala
20 25 30

Ser Val Glu Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala
35 40 45

Ser Gln Asn Ile Tyr Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala
50 55 60

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly
65 70 75 80

Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gly Tyr Thr Leu
85 90 95

Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110

Ser Ala Tyr Tyr Thr Ser Tyr Ile Asp His Asn Val Phe Gly Gly Gly
115 120 125

Thr Glu Val Val Val Glu
130

<210> 41
<211> 134
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 41

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser
20 25 30

Lys Ser Val Pro Val Gly Asp Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Glu Ser Val Tyr Thr Asn Asn Arg Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

[0026]

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Asp Val Val Cys Asp Asn Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Val Gly Tyr Lys Ser Ser Asp Gly Asp Gly Thr Ala Phe Gly Gly Gly
115 120 125

Thr Glu Val Val Val Lys
130

<210> 42
<211> 132
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 42

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro
20 25 30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Glu Ser Val Tyr Asn Lys Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

[0027]

Ala Gly Gly Gly Ser Gly Asn Val Tyr Asp Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125

Val Val Val Lys
130

<210> 43
<211> 132
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 43

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro
20 25 30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser
35 40 45

Gln Ser Val Tyr Lys Asn Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Glu Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Val Cys
100 105 110

Gln Gly Tyr Tyr Ser Gly Pro Ile Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125

Val Val Val Lys
130

<210> 44
<211> 132
<212> PRT
<213> 家兔

[0028]

<400> 44

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
20 25 30

Val Glu Val Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Gln Asn Ile Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60

Arg Pro Lys Leu Leu Ile Asp Ala Ala Ala Asn Leu Ala Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Gly Tyr Ser Val Ile Asn Val Asp Asn Ile Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125

Val Val Val Lys
130

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 45

Gly Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Trp Met Ser
1 5 10

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 46

[0029]

Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Tyr Met Ser
1 5 10

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 47

Gly Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Trp Met Ser
1 5 10

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 48

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Tyr Met Ser
1 5 10

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 49

Gly Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Trp Met Ser
1 5 10

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 50

Gly Val Asp Leu Asn Thr Tyr Ala Met Gly
1 5 10

<210> 51
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 51

Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr Trp Met Ser

[0030]

1 5 10

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 52

Gly Phe Asp Ile Ser Ser Tyr Ser Leu Gln
1 5 10

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 53

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Trp Met Ser
1 5 10

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 54

Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 55

Met Ile Ser Gly Gly Asn Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 56

<211> 16

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 56

Ile Ser Ser Thr Thr Ser Asn Thr Phe Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

[0031]

<210> 57
<211> 15
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 57

Met Ile Ser Gly Gly Asn Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 58
<211> 16
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 58

Ile Thr Thr Thr Ser Thr Asn Thr Phe Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 59
<211> 15
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 59

Met Ile Ser Gly Gly Asn Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 60
<211> 16
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 60

Val Ile Leu Gly Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 61
<211> 15
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 61

Phe Ile Gly Gly Gly Asn Thr Phe Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

[0032]

<210> 62
<211> 16
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 62

Phe Ile Arg Pro Asp Gly Ser Ala His Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 63
<211> 17
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 63

Met Ile Tyr Gly Asp Ser Asn Asn Lys Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 64
<211> 16
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 64

Ile Ile Gly Gly Thr Gly Asn Thr His Tyr Thr Thr Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 65
<211> 12
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 65

Gly Ile Asp Thr Gly Ile Ala Thr Thr Phe Asn Leu
1 5 10

<210> 66
<211> 12
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 66

[0033]

Tyr Gly Gly Asn Ser Ala Tyr Tyr Ala Phe Ser Leu
1 5 10

<210> 67

<211> 12

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 67

Gly Ile Asp Thr Gly Ile Ala Thr Thr Phe Asn Leu
1 5 10

<210> 68

<211> 12

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 68

Tyr Gly Gly Asn Ser Ala Tyr Tyr Ala Phe Ser Leu
1 5 10

<210> 69

<211> 12

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 69

Gly Ile Asp Thr Gly Ile Ala Thr Thr Phe Asn Leu
1 5 10

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 70

Asp Arg Tyr Gly Ser Leu Glu Glu Val Ile Thr Pro Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 71

Gly Tyr Gly Ala Pro Gly Tyr Asp Leu ...

[0034]

1 5

<210> 72
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 72

Asp Asp Ile Ser Ser Asp Tyr Phe Pro Asn Leu
1 5 10

<210> 73
<211> 14
<212> PRT
<213> 家兔

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(8)
<223> Xaa可以是任意天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(11)
<223> Xaa可以是任意天然存在的氨基酸

<400> 73

Glu Tyr Phe Ala Asp Ser Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Phe Gly Ile
1 5 10

<210> 74
<211> 13
<212> PRT
<213> 家兔

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> Xaa可以是任意天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa可以是任意天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Xaa可以是任意天然存在的氨基酸

[0035]

<400> 74

Xaa Xaa Leu Gly Gly Gly Xaa Asp Xaa Asp Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 75

<211> 13

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 75

Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Arg Leu Ser
1 5 10

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 76

Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 77

<211> 13

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 77

Gln Ser Ser Gln Asn Val Tyr Asn Asn Asn Arg Leu Ser
1 5 10

<210> 78

<211> 13

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 78

Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 79

<211> 13

<212> PRT

<213> 家兔

[0036]

<400> 79

Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Ser Asn Asn Arg Leu Ser
1 5 10

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 80

Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Asn Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 81

<211> 13

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 81

Gln Ala Ser Glu Ser Val Tyr Thr Asn Asn Arg Leu Ser
1 5 10

<210> 82

<211> 13

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 82

Gln Ala Ser Glu Ser Val Tyr Asn Lys Asn Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 83

<211> 13

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 83

Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn Asn Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 84

<211> 11

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 84

[0037]

Gln Ala Ser Gln Asn Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 85
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 85

Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 86

Gly Ala Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 87

Tyr Thr Ser Thr Leu Pro Ser
1 5

<210> 88
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 88

Gly Ala Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 89
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 89

[0038]

Tyr Thr Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 90
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 90

Ser Ala Ser Thr Leu Glu Ser
1 5

<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 91

Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 92
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 92

Asp Ala Ser Asp Leu Ala Ser
1 5

<210> 93
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 93

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 94
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 94

Ala Ala Ala Asn Leu Ala Ser

[0039]

1

5

<210> 95
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 95

Gln Gly Tyr Tyr Ser Gly Val Ile Asn Val
1 5 10

<210> 96
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 96

Gln Gly Tyr Tyr Asn Gly Val Ile Phe Val
1 5 10

<210> 97
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 97

Gln Gly Tyr Tyr Ser Gly Val Ile Asn Val
1 5 10

<210> 98
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 98

Gln Gly Tyr Tyr Asn Gly Val Ile Phe Val
1 5 10

<210> 99
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 99

Gln Gly Tyr Tyr Ser Gly Val Ile Asn Val
1 5 10

[0040]

<210> 100
<211> 13
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 100

Gln Ser Ala Tyr Tyr Thr Ser Tyr Ile Asp His Asn Val
1 5 10

<210> 101
<211> 12
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 101

Val Gly Tyr Lys Ser Ser Asp Gly Asp Gly Thr Ala
1 5 10

<210> 102
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 102

Ala Gly Gly Gly Ser Gly Asn Val Tyr Asp
1 5 10

<210> 103
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 103

Gln Gly Tyr Tyr Ser Gly Pro Ile Tyr Val
1 5 10

<210> 104
<211> 12
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 104

Gln Gln Gly Tyr Ser Val Ile Asn Val Asp Asn Ile
1 5 10

[0041]

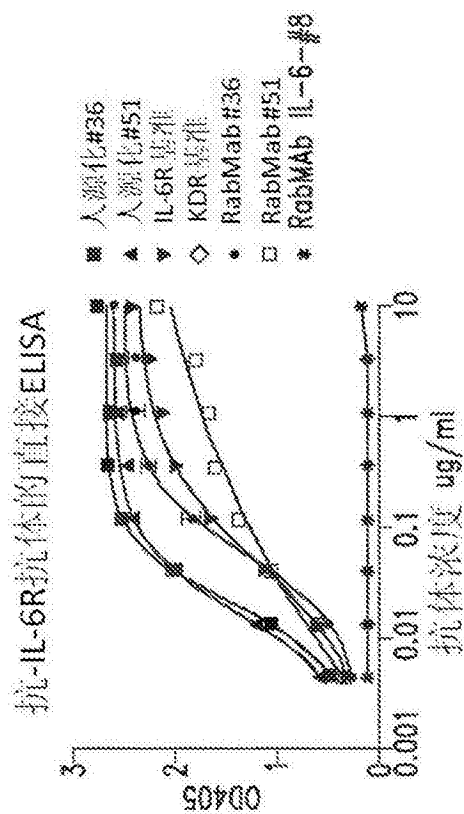


图 1A

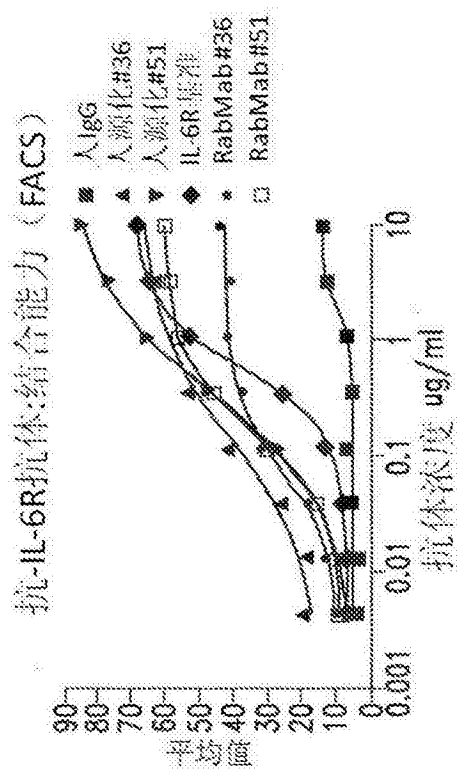


图 1B

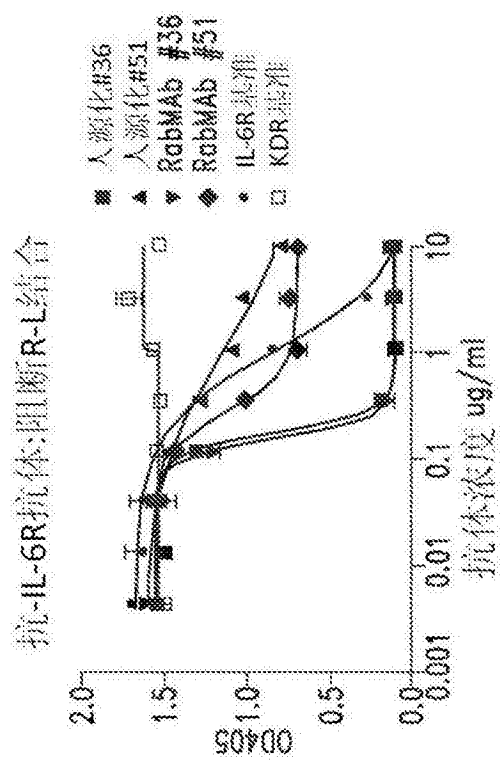


图 1C

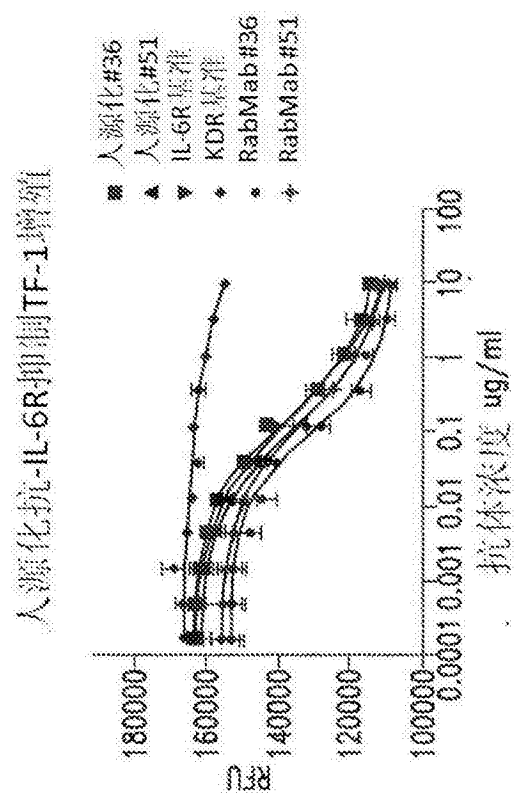


图 1D

=====OIR=====

~~~~~

100%

xxx-xxx-xxx-xxx-CDR1-xxx-xxx-xxxxxx

=====CDR 3=====