



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104159920 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 19

(21) 申请号 201280070946. 4

C07K 16/46(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 12. 28

C12N 15/13(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395(2006. 01)

61/581964 2011. 12. 30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 08. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/072017 2012. 12. 28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/102042 EN 2013. 07. 04

(71) 申请人 艾伯维公司

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 谢仲明 T. 哈于尔 C.L. 古德罗

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 初明明 林森

(51) Int. Cl.

C07K 16/24(2006. 01)

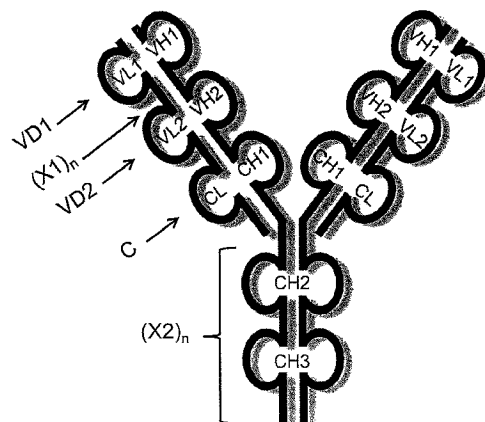
权利要求书9页 说明书71页 附图1页

(54) 发明名称

针对 IL-13 和 / 或 IL-17 的双重可变结构域
免疫球蛋白

(57) 摘要

提供结合 IL-13 和 / 或 IL-17 的经工程改造
的多价和多特异性双重可变结构域结合蛋白以及
制备方法和在疾病预防、诊断和 / 或治疗中的用
途。



1. 一种包含第一和第二多肽链的结合蛋白,各多肽链独立地包含 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n,其中

VD1 为第一可变结构域;

VD2 为第二可变结构域;

C 为恒定结构域;

X1 为接头,前提条件是 X1 不为 CH1;

X2 为 Fc 区;和

n 为 0 或 1;

其中所述第一和第二多肽链上的 VD1 结构域形成第一功能靶结合部位,以及所述第一和第二多肽链上的 VD2 结构域形成第二功能靶结合部位;和

其中所述结合蛋白能够结合 IL-13 和 IL-17,其中:

(i) 形成 IL-13 的功能靶结合部位的可变结构域包含:来自 SEQ ID NO: 30 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 31 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 32 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 33 的 3 个 CDR、或来自 SEQ ID NO: 34 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 35 的 3 个 CDR;和

(ii) 形成 IL-17 的功能靶结合部位的可变结构域包含:来自 SEQ ID NO: 36 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 37 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 38 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 39 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 40 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 41 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 42 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 52 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 42 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 53 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 43 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 50 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 44 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 51 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 45 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 54 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 46 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 51 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 47 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 54 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 48 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 51 的 3 个 CDR、或来自 SEQ ID NO: 49 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 51 的 3 个 CDR。

2. 一种包含两条第一和两条第二多肽链的结合蛋白,其各自独立地包含 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n,其中

VD1 为第一可变结构域;

VD2 为第二可变结构域;

C 为恒定结构域;

X1 为接头,前提条件是 X1 不为 CH1;

X2 为 Fc 区;和

n 为 0 或 1;

其中在每套第一和第二多肽链上的 VD1 结构域形成第一功能靶结合部位和在每套第一和第二多肽链上的 VD2 结构域形成第二功能靶结合部位;和

其中所述结合蛋白能够结合 IL-13 和 IL-17,其中:

(i) 形成 IL-13 的功能靶结合部位的可变结构域包含:

来自 SEQ ID NO: 30 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 31 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 32 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 33 的 3 个 CDR、或来自 SEQ ID NO: 34 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 35 的 3 个 CDR;和

(ii) 形成 IL-17 的功能靶结合部位的可变结构域包含：

来自 SEQ ID NO: 36 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 37 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 38 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 39 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 40 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 41 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 42 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 52 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 42 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 53 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 43 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 50 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 44 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 51 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 45 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 54 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 46 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 51 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 47 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 54 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 48 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 51 的 3 个 CDR、或来自 SEQ ID NO: 49 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 51 的 3 个 CDR。

3. 权利要求 1 或权利要求 2 的结合蛋白,其中所述结合蛋白结合 IL-13 和 IL-17,其:

(i) 对 IL-13 的 IC_{50} 为至多约 2.442 nM 和 / 或对 IL-17 的 IC_{50} 为至多约 0.7034 nM, 通过直接结合 ELISA 测量;

(ii) 对 IL-13 的结合速率常数 (K_{on}) 为至少约 $2.10 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$ 和 / 或对 IL-17 的结合速率常数 (K_{on}) 为至少约 $6.80 \times 10^3 M^{-1}s^{-1}$, 通过表面等离子体共振测量;

(iii) 对 IL-13 的解离速率常数 (K_{off}) 为至多约 $1.40 \times 10^{-4} s^{-1}$ 和 / 或对 IL-17 的解离速率常数 (K_{off}) 为至多约 $1.70 \times 10^{-4} s^{-1}$, 通过表面等离子体共振测量;和 / 或

(iv) 对 IL-13 的解离常数 (K_d) 为至多约 $1.10 \times 10^{-10} M$ 和 / 或对 IL-17 的解离常数 (K_d) 为至多约 $2.60 \times 10^{-8} M$, 通过表面等离子体共振测量。

4. 权利要求 1-3 中任一项的结合蛋白,其中:

(i) X1 为 SEQ ID NO: 1-29 中的任一个或 G4S 重复序列;

(ii) X1 不为 CL;

(iii) (X1)_n 为 (X1)₀ 和 / 或 (X2)_n 为 (X2)₀;

(iv) Fc 区为变体序列 Fc 区;

(v) Fc 区为来自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE 或 IgD 的 Fc 区;

(iv) 结合蛋白是结晶的结合蛋白;和 / 或

(v) 形成 IL-13 的功能靶结合部位的可变结构域包含:SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33、或 SEQ ID NO: 34 和 SEQ ID NO: 35, 并且形成 IL-17 的功能靶结合部位的可变结构域包含:

SEQ ID NO: 36 和 SEQ ID NO: 37,

SEQ ID NO: 38 和 SEQ ID NO: 39,

SEQ ID NO: 40 和 SEQ ID NO: 41,

SEQ ID NO: 42 和 SEQ ID NO: 52,

SEQ ID NO: 42 和 SEQ ID NO: 53,

SEQ ID NO: 43 和 SEQ ID NO: 50,

SEQ ID NO: 44 和 SEQ ID NO: 51,

SEQ ID NO: 45 和 SEQ ID NO: 54,

SEQ ID NO: 46 和 SEQ ID NO: 51,

SEQ ID NO: 47 和 SEQ ID NO: 54,
SEQ ID NO: 48 和 SEQ ID NO: 51, 或
SEQ ID NO: 49 和 SEQ ID NO: 51。

5. 一种包含权利要求 1-4 中任一项的结合蛋白的结合蛋白缀合物, 所述结合蛋白缀合物还包含作用剂, 其中所述作用剂是免疫黏着分子、成像剂、治疗剂或细胞毒性剂, 其中:

(i) 所述成像剂是放射性标记、酶、荧光标记、发光标记、生物发光标记、磁性标记或生物素, 且其中任选所述放射性标记是 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 或 ^{153}Sm ; 或

(ii) 所述治疗剂或细胞毒性剂是抗代谢物、烷化剂、抗生素、生长因子、细胞因子、抗血管生成剂、抗有丝分裂剂、蒽环类、毒素或细胞凋亡剂。

6. 一种编码权利要求 1-5 中任一项的结合蛋白的氨基酸序列的分离核酸。

7. 一种包含权利要求 6 的分离核酸的载体, 其中所述载体任选自 pcDNA、pTT、pTT3、pEFBOS、pBV、pJV、pcDNA3.1 TOPO、pEF6 TOPO、pHybE、pBOS 或 pBJ。

8. 一种包含权利要求 7 的载体的宿主细胞。

9. 权利要求 8 的宿主细胞, 其中所述宿主细胞为原核细胞、大肠杆菌、真核细胞、原生生物细胞、动物细胞、植物细胞、真菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞、Sf9 细胞、哺乳动物细胞、鸟类细胞、CHO 细胞或 COS 细胞。

10. 一种产生结合蛋白的方法, 所述方法包括在足以产生结合蛋白的条件下在培养基中培养权利要求 8 或权利要求 9 的宿主细胞。

11. 一种通过权利要求 10 的方法产生的蛋白质。

12. 一种包含权利要求 1 或权利要求 2 的结合蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物。

13. 权利要求 12 的药物组合物, 还包含至少一种其它的治疗剂, 其中所述其它的治疗剂任选自成像剂、细胞毒性剂、血管生成抑制剂、激酶抑制剂、共刺激分子阻断剂、黏着细胞阻断剂、抗细胞因子抗体或其功能片段、甲氨蝶呤、环孢菌素、雷帕霉素、FK506、可检测标记或报道分子、TNF 拮抗剂、抗风湿药、肌肉松弛药、麻醉剂、非甾体抗炎药 (NSAID)、镇痛药、麻醉药、镇静药、局部麻醉药、神经肌肉阻断剂、抗微生物药、抗银屑病药、皮质类固醇、同化类固醇、红细胞生成素、免疫剂、免疫球蛋白、免疫抑制剂、生长激素、激素替代药物、放射性药物、抗抑郁药、抗精神病药、兴奋剂、哮喘药物、 β 激动剂、吸入类固醇、肾上腺素或类似物、细胞因子或细胞因子拮抗剂。

14. 权利要求 1 或权利要求 2 的结合蛋白在制备通过给予受试者所述结合蛋白以治疗受试者的疾病或病症使得治疗得到实现的药物中的用途。

15. 权利要求 14 的用途, 其中所述病症是类风湿性关节炎、骨关节炎、青少年慢性关节炎、脓毒性关节炎、莱姆关节炎、银屑病性关节炎、反应性关节炎、脊椎关节病、系统性红斑狼疮、克罗恩病、溃疡性结肠炎、炎性肠病、胰岛素依赖性糖尿病、甲状腺炎、哮喘、变应性疾病、银屑病、皮炎、硬皮病、移植物抗宿主病、器官移植排斥反应、与器官移植有关的急性或慢性免疫性疾病、结节病、动脉粥样硬化、弥散性血管内凝血、川崎病、格雷夫斯病、肾病综合征、慢性疲劳综合征、韦格纳肉芽肿病、诺赫-舍恩莱因紫癜、肾微型血管炎、慢性活动性肝炎、葡萄膜炎、败血性休克、中毒性休克综合征、脓毒症综合征、恶病质、感染性疾病、寄

生虫病、获得性免疫缺陷综合征、急性横贯性脊髓炎、亨廷顿舞蹈病、帕金森病、阿尔茨海默病、中风、原发性胆汁性肝硬化、溶血性贫血、恶性肿瘤、心力衰竭、艾迪生病、散发性 I 型多腺缺乏和 II 型多腺缺乏、施密特综合征、成人（急性）呼吸窘迫综合征、脱发、斑秃、关节病、关节病、赖特病、牛皮癣性关节病、溃疡性结肠炎性关节病、肠病性滑膜炎、衣原体、耶尔森氏菌相关关节病、沙门氏菌相关关节病、动脉粥样化疾病、动脉硬化、特应性变态反应、自身免疫性大疱病、寻常性天疱疮、落叶状天疱疮、类天疱疮、线性 IgA 病、自身免疫性溶血性贫血、库姆斯阳性溶血性贫血、获得性恶性贫血、青少年恶性贫血、肌痛性脑炎 /Royal Free 病、慢性粘膜皮肤念珠菌病、巨细胞动脉炎、原发性硬化性肝炎、隐源性自身免疫性肝炎、获得性免疫缺陷相关疾病、乙型肝炎、丙型肝炎、普通变异性免疫缺陷（普通可变性低丙种球蛋白血症）、扩张型心肌病、女性不孕症、卵巢衰竭、卵巢功能早衰、纤维化肺病、隐源性致纤维性肺泡炎、炎症后间质性肺病、间质性肺炎、结缔组织病相关性间质性肺病、混合性结缔组织病相关性肺病、全身性硬皮病相关性间质性肺病、类风湿性关节炎相关性间质性肺病、系统性红斑狼疮相关性肺病、皮炎相关性肺病、多肌炎相关性肺病、斯耶格伦病相关性肺病、关节强硬性脊椎炎相关性肺病、脉管炎性弥散性肺病、含铁血黄素沉着症相关性肺病、药物诱发性间质性肺病、纤维变性、放射纤维变性、闭塞性细支气管炎、慢性嗜酸性肺炎、淋巴细胞浸润性肺病、感染后间质性肺病、痛风性关节炎、自身免疫性肝炎、1 型自身免疫性肝炎（经典自身免疫性或狼疮样肝炎）、2 型自身免疫性肝炎（抗 LKM 抗体肝炎）、自身免疫介导的低血糖、B 型胰岛素抵抗伴黑棘皮病、甲状旁腺功能减退症、与器官移植相关的急性免疫性疾病、与器官移植相关的慢性免疫性疾病、骨关节病、原发性硬化性胆管炎、1 型银屑病、2 型银屑病、特发性白细胞减少、自身免疫性中性粒细胞减少、肾病 NOS、肾小球性肾炎、肾微型血管炎、莱姆病、盘状红斑狼疮、特发性男性不育症、雄性不育症 NOS、精子自身免疫、多发性硬化（所有亚型）、交感性眼炎、结缔组织病继发性肺动脉高血压、古德帕斯彻综合征、结节性多动脉炎的肺表现、急性风湿热、类风湿性脊椎炎、史蒂尔病、全身性硬皮病、斯耶格伦综合征、无脉症 / 动脉炎、自身免疫性血小板减少、特发性血小板减少、自身免疫性甲状腺病、甲状腺功能亢进、甲状腺肿性自身免疫性甲状腺功能减退症（桥本病）、萎缩性自身免疫性甲状腺功能减退症、原发性黏液腺瘤病、晶状体源性葡萄膜炎、原发性血管炎、白癫风、急性肝病、慢性肝病、酒精性肝硬化、酒精引起的肝损伤、胆汁郁积、特应性肝病、药物诱发性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、变态反应和哮喘、B 族链球菌（GBS）感染、精神障碍、抑郁症、精神分裂症、Th2 型和 Th1 型介导的疾病、急性和慢性疼痛、不同形式的疼痛、癌症、肺癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、直肠癌、造血系统恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤、无 β 脂蛋白血症、手足发绀、急性和慢性寄生或感染过程、急性白血病、急性成淋巴细胞性白血病（ALL）、急性髓细胞性白血病（AML）、急性细菌感染、慢性细菌感染、急性胰腺炎、急性肾衰竭、腺癌、房性异位搏动、AIDS 痴呆综合征、酒精诱导的肝炎、变应性结膜炎、变应性接触性皮炎、变应性鼻炎、同种异体移植排斥、 α -1-抗胰蛋白酶缺乏症、肌萎缩性侧索硬化、贫血、心绞痛、前角细胞变性、抗 cd3 疗法、抗磷脂综合征、抗受体超敏反应、主动脉瘤、周围动脉瘤、主动脉壁夹层形成、动脉高血压、动脉硬化、动静脉瘘、共济失调、持续性心房颤动、阵发性心房颤动、心房扑动、房室传导阻滞、B 细胞淋巴瘤、骨移植排斥、骨髓移植（BMT）排斥、束支传导阻滞、伯基特淋巴瘤、烧伤、心律失常、心脏顿抑综合征、心脏肿瘤、心肌病、心肺分流术炎症反应、软骨移植排斥、小脑皮质变性、小脑病症、紊

乱性或多源性房性心动过速、化疗相关病症、慢性髓细胞性白血病 (CML)、慢性酒精中毒、慢性炎症病理、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、慢性阻塞性肺病 (COPD)、慢性水杨酸盐中毒、结肠直肠癌、充血性心力衰竭、结膜炎、接触性皮炎、肺源性心脏病、冠状动脉疾病、克罗伊茨费尔特-雅各布病、培养物阴性脓毒症、囊性纤维化、细胞因子疗法相关病症、拳击员痴呆、脱髓鞘性疾病、登革出血热、皮炎、皮肤病况、多尿症、糖尿病、糖尿病性动脉粥样硬化性疾病、弥散性路易体病、扩张性充血性心肌病、基底核病症、中年唐氏综合征、阻断 CNS 多巴胺受体的药物诱导的药物诱发性运动障碍、药物敏感性、湿疹、脑脊髓炎、心内膜炎、内分泌病、会厌炎、EB 病毒感染、红斑性肢痛病、锥体束外和小脑病症、家族性噬血细胞性淋巴组织细胞增多症、胎儿胸腺移植排斥、弗里德赖希共济失调、功能性周围动脉病症、真菌脓毒症、气性坏疽、胃溃疡、肾小球肾炎、任何器官的移植物排斥、任何组织的移植物排斥、革兰氏阴性脓毒症、革兰氏阳性脓毒症、胞内生物体所致肉芽肿、毛细细胞白血病、哈-施病、桥本甲状腺炎、枯草热、心脏移植排斥、血色素沉着症、血液透析、溶血性尿毒症综合征 / 血栓溶解性血小板减少性紫癜、出血、甲型肝炎、希氏束心律失常、HIV 感染 / HIV 神经病、霍奇金病、运动机能亢进性运动障碍、超敏反应、过敏性肺炎、高血压、运动功能减退性运动障碍、下丘脑-垂体-肾上腺轴评价、特发性艾迪生病、特发性肺纤维化、抗体介导的细胞毒性、虚弱、婴儿脊髓性肌萎缩、主动脉炎症、甲型流感、电离辐射暴露、虹膜睫状体炎、葡萄膜炎、视神经炎、缺血-再灌注损伤、缺血性中风、青少年类风湿性关节炎、青少年脊髓性肌萎缩、卡波西肉瘤、肾移植排斥、军团杆菌病、利什曼病、麻风、皮质脊髓系统损伤、脂肪水肿、肝移植排斥、淋巴水肿、疟疾、恶性淋巴瘤、恶性组织细胞增多症、恶性黑素瘤、脑膜炎、脑膜炎球菌血症、代谢性 / 特发性、偏头痛性头痛、线粒体多系统病症、混合型结缔组织病、单克隆丙种球蛋白病、多发性骨髓瘤、多系统变性、Mencel 变性、Dejerine-Thomas 变性、Shi-Drager 变性、Machado-Joseph 变性、重症肌无力、胞内鸟分枝杆菌、结核分支杆菌、脊椎增生异常综合征、心肌梗死、心肌缺血性病症、鼻咽癌、新生儿慢性肺疾病、肾炎、肾变病、神经变性疾病、神经原性肌萎缩、中性白细胞减少性发热、非霍奇金淋巴瘤、腹主动脉及其分支闭塞、闭塞性动脉病症、okt3 治疗、睾丸炎 / 附睾炎、睾丸炎 / 输精管切除逆转术、器官巨大症、骨质疏松症、胰腺移植排斥、胰腺癌、瘤外综合征 / 恶性高钙血症、甲状旁腺移植排斥、骨盆炎性疾病、常年性鼻炎、心包疾病、外周动脉粥样硬化性疾病、外周血管病症、腹膜炎、恶性贫血、卡氏肺囊虫肺炎、肺炎、POEMS 综合征 (多神经病、器官巨大症、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病和皮肤改变综合征)、灌注后综合征、泵后综合征、MI 心切开后综合征、先兆子痫、进行性核上性麻痹、原发性肺动脉高血压、放射疗法、雷诺现象和疾病、雷诺病、雷弗素姆病、规律性窄 QRS 心动过速、肾血管性高血压、再灌注损伤、限制性心肌病、肉瘤、硬皮病、老年性舞蹈病、路易体型老年性痴呆、血清反应阴性关节病、休克、镰状细胞贫血、皮肤同种异体移植排斥、皮肤改变综合征、小肠移植排斥、实体瘤、特殊心律失常、脊髓性共济失调、脊髓小脑变性、链球菌肌炎、小脑结构损伤、亚急性硬化性全脑炎、昏厥、心血管系统梅毒、全身性过敏反应、全身性炎症反应综合征、全身发作性青少年类风湿性关节炎、T 细胞或 FAB ALL、毛细管扩张、血栓闭塞性脉管炎、血小板减少、毒性、移植、创伤、出血、III 型超敏反应、IV 型超敏反应、不稳定心绞痛、尿毒症、尿脓毒症、荨麻疹、心脏瓣膜疾病、静脉曲张、血管炎、静脉疾病、静脉血栓形成、心室颤动、病毒感染、真菌感染、病毒性脑炎、无菌性脑膜炎、病毒相关性噬血细胞综合征、韦尼克-科尔萨科夫综合征、肝豆状核变性、任何器官的异种移植

物排斥、任何组织的异种移植物排斥、急性冠状动脉综合征、急性特发性多神经炎、急性炎性脱髓鞘性多神经根神经病、急性缺血、成人斯蒂尔病、过敏反应、抗磷脂抗体综合征、再生障碍性贫血、特应性湿疹、特应性皮炎、自身免疫性皮炎、与链球菌感染相关的自身免疫性疾病、自身免疫性肠病、自身免疫性听力丧失、自身免疫性淋巴细胞增生综合征 (ALPS)、自身免疫性心肌炎、自身免疫性卵巢功能早衰、睑炎、支气管扩张、大疱性类天疱疮、心血管疾病、灾难性抗磷脂综合征、乳糜泻、颈椎病、慢性缺血、疤痕性类天疱疮、具有多发性硬化风险的临床孤立综合征 (cis)、儿童期发病性精神病、泪囊炎、皮炎、糖尿病性视网膜病、椎间盘突出、盘脱垂、药物诱导的免疫性溶血性贫血、子宫内膜异位、眼内炎、巩膜外层炎、多形性红斑、重症多形性红斑、妊娠期类天疱疮、格 - 巴综合征 (GBS)、休斯综合征、特发性帕金森病、特发性间质性肺炎、IgE 介导的变态反应、免疫性溶血性贫血、包涵体肌炎、传染性眼炎性疾病、炎性脱髓鞘疾病、炎性心脏病、炎性肾病、IPF/UIP、虹膜炎、角膜炎、干燥性角膜结膜炎、Kussmaul 病或 Kussmaul-Meier 病、兰德里麻痹、朗格汉斯细胞组织细胞增多病、网状青斑、黄斑变性、微型多血管炎、morbus bechterev、运动神经元病症、粘膜类天疱疮、多器官衰竭、骨髓增生异常综合征、心肌炎、神经根病症、神经病、非甲非乙型肝炎、视神经炎、骨质溶解、少关节型 JRA、外周动脉闭塞性疾病 (PAOD)、外周血管疾病 (PVD)、外周动脉疾病 (PAD)、静脉炎、结节性多动脉炎、结节性动脉周围炎、多软骨炎、风湿性多肌痛、白发病、多关节型 JRA、多内分泌缺陷综合征、多肌炎、风湿性多肌痛 (PMR)、原发性帕金森综合征、前列腺炎、纯红细胞再生障碍、原发性肾上腺功能不全、复发性视神经脊髓炎、再狭窄、风湿性心脏病、sapho (滑膜炎、痤疮、脓疱病、骨肥厚和骨炎)、继发性淀粉样变性、休克肺、巩膜炎、坐骨神经痛、继发性肾上腺功能不全、硅酮相关性结缔组织病、斯 - 威皮肤病、关节强硬性脊椎炎、史 - 约综合征 (SJS)、颞动脉炎、弓形体性视网膜炎、中毒性表皮坏死松解、横贯性脊髓炎、TRAPS (肿瘤坏死因子受体、I 型变态反应、II 型糖尿病、普通型间质性肺炎 (UIP)、血管炎、春季结膜炎、病毒性视网膜炎、Vogt-Koyanagi-Harada 综合征 (VKH 综合征)、湿性黄斑变性或伤口愈合。

16. 权利要求 14 或权利要求 15 的用途, 其中所述药物经配制用于胃肠外、皮下、肌肉、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、推注、阴道、直肠、口腔、舌下、鼻内或透皮给药。

17. 一种通过免疫测定法测定试验样品中至少一种靶或其片段的的存在、量或浓度的方法,

其中所述免疫测定法包括使试验样品与至少一种结合蛋白和至少一种可检测标记接触,

其中所述至少一种结合蛋白包含权利要求 1 或权利要求 2 的结合蛋白。

18. 权利要求 17 的方法, 所述方法还包括:

(i) 使试验样品与至少一种结合蛋白接触, 其中所述结合蛋白与靶或其片段上的表位结合从而形成第一复合物, (ii) 使所述复合物与至少一种可检测标记接触, 其中所述可检测标记与结合蛋白或未被结合蛋白结合的靶或其片段上的表位结合, 以形成第二复合物, 和 (iii) 根据第二复合物中可检测标记产生的信号, 检测试验样品中的靶或其片段的存

在、量或浓度,其中所述靶或其片段的存在、量或浓度与可检测标记产生的信号正相关。

19. 权利要求 17 的方法,所述方法还包括:

(i) 使试验样品与至少一种结合蛋白接触,其中所述结合蛋白与靶或其片段上的表位结合从而形成第一复合物,(ii) 使复合物与至少一种可检测标记接触,其中所述可检测标记与靶或其片段竞争结合结合蛋白从而形成第二复合物,和 (iii) 根据第二复合物中可检测标记产生的信号检测试验样品中靶或其片段的存在、量或浓度,其中所述靶或其片段的存在、量或浓度与可检测标记产生的信号负相关。

20. 权利要求 17-19 中任一项的方法,其中所述试验样品来自患者,并且所述方法

(i) 还包括诊断、预测或评价患者的治疗性 / 预防性治疗的功效,

(ii) 还包括按需修改患者的治疗性 / 预防性治疗以改进功效;

(iii) 经修改以用于自动化系统或半自动化系统;和 / 或

(iv) 测定样品中一种以上靶的存在、量或浓度。

21. 一种用于针对靶或其片段的存在、量或浓度测定试验样品的试剂盒,所述试剂盒包含

(i) 用于针对靶或其片段测定试验样品的说明书;和

(ii) 至少一种结合蛋白,其包含权利要求 1-2 中任一项的结合蛋白。

22. 一种包含第一和第二多肽链的结合蛋白,其中所述第一多肽链包含 VD1-(X1)
n-VD2-C-(X2)n,其中:

VD1 为第一重链可变结构域;

VD2 为第二重链可变结构域;

C 为恒定结构域;

X1 为接头,前提条件是 X1 不为 CH1;

X2 为 Fc 区;和

n 为 0 或 1;和

其中所述第二多肽链包含 VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n,其中

VD1 为第一轻链可变结构域;

VD2 为第二轻链可变结构域;

C 为恒定结构域;

X1 为接头,前提条件是 X1 不为 CL;

X2 为 Fc 区;

n 为 0 或 1;和

其中第一和第二多肽链上的 VD1 结构域形成第一功能靶结合部位,以及第一和第二多肽链上的 VD2 结构域形成第二功能靶结合部位;和

其中所述结合蛋白能够结合 IL-13 和 IL-17,其中:

(i) 形成 IL-13 的功能靶结合部位的可变结构域包含:

来自 SEQ ID NO: 30 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 31 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 32 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 33 的 3 个 CDR、或来自 SEQ ID NO: 34 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 35 的 3 个 CDR;和

(ii) 形成 IL-17 的功能靶结合部位的可变结构域包含:

来自 SEQ ID NO: 36 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 37 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 38 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 39 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 40 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 41 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 42 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 52 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 42 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 53 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 43 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 50 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 44 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 51 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 45 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 54 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 46 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 51 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 47 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 54 的 3 个 CDR、来自 SEQ ID NO: 48 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 51 的 3 个 CDR、或来自 SEQ ID NO: 49 的 3 个 CDR 和来自 SEQ ID NO: 51 的 3 个 CDR。

23. 权利要求 22 的结合蛋白,其中所述结合蛋白结合 IL-13 和 IL-17,其

(i) 对于 IL-13 的 IC_{50} 为至多约 2.442 nM 和 / 或对于 IL-17 的 IC_{50} 为至多约 0.7034 nM,通过直接结合 ELISA 测量;

(ii) 对于 IL-13 的结合速率常数 (K_{on}) 为至少约 $2.10 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$ 和 / 或对于 IL-17 的结合速率常数 (K_{on}) 为至少约 $6.80 \times 10^3 M^{-1}s^{-1}$,通过表面等离子体共振测量;

(iii) 对于 IL-13 的解离速率常数 (K_{off}) 为至多约 $1.40 \times 10^{-4} s^{-1}$ 和 / 或对于 IL-17 的解离速率常数 (K_{off}) 为至多约 $1.70 \times 10^{-4} s^{-1}$,通过表面等离子体共振测量;和 / 或

(iv) 对于 IL-13 的解离常数 (K_d) 为至多约 $1.10 \times 10^{-10} M$ 和对于 IL-17 的解离常数 (K_d) 为至多约 $2.60 \times 10^{-8} M$,通过表面等离子体共振测量。

24. 权利要求 22 或权利要求 23 的结合蛋白,其中所述结合蛋白包含两条第一多肽链和两条第二多肽链。

25. 权利要求 1-3 或 22-24 中任一项的结合蛋白,其中所述结合蛋白包含: DVD2148H (包含 SEQ ID NO: 30 和 36) 和 DVD2148L (包含 SEQ ID NO: 31 和 37); DVD2149H (包含 SEQ ID NO: 36 和 30) 和 DVD2149L (包含 SEQ ID NO: 37 和 31); DVD2150H (包含 SEQ ID NO: 30 和 36) 和 DVD2150L (包含 SEQ ID NO: 31 和 37); DVD2151H (包含 SEQ ID NO: 36 和 30) 和 DVD2151L (包含 SEQ ID NO: 37 和 31); DVD2152H (包含 SEQ ID NO: 30 和 36) 和 DVD2152L (包含 SEQ ID NO: 31 和 37); DVD2153H (包含 SEQ ID NO: 36 和 30) 和 DVD2153L (包含 SEQ ID NO: 37 和 31); DVD 2154H (包含 SEQ ID NO: 30 和 38) 和 DVD2154L (包含 SEQ ID NO: 31 和 39); DVD2155H (包含 SEQ ID NO: 38 和 30) 和 DVD2155L (包含 SEQ ID NO: 39 和 31); DVD2156H (包含 SEQ ID NO: 30 和 38) 和 DVD2156L (包含 SEQ ID NO: 31 和 39); DVD2157H (包含 SEQ ID NO: 38 和 30) 和 DVD2157L (包含 SEQ ID NO: 39 和 31); DVD2158H (包含 SEQ ID NO: 30 和 38) 和 DVD2158L (包含 SEQ ID NO: 31 和 39); DVD2159H (包含 SEQ ID NO: 38 和 30) 和 DVD2159L (包含 SEQ ID NO: 39 和 31); DVD2160H (包含 SEQ ID NO: 30 和 40) 和 DVD2160L (包含 SEQ ID NO: 31 和 41); DVD2161H (包含 SEQ ID NO: 40 和 30) 和 DVD2161L (包含 SEQ ID NO: 41 和 31); DVD2162H (包含 SEQ ID NO: 30 和 40) 和 DVD2162L (包含 SEQ ID NO: 31 和 41); DVD2163H (包含 SEQ ID NO: 40 和 30) 和 DVD2163L (包含 SEQ ID NO: 41 和 31); DVD2164H (包含 SEQ ID NO: 30 和 40) 和 DVD2164L (包含 SEQ ID NO: 31 和 41); DVD2165H (包含 SEQ ID NO: 40 和 30) 和 DVD2165L (包含 SEQ ID NO: 41 和 31); DVD2166H (包含 SEQ ID NO: 32 和 36) 和 DVD2166L

(包含 SEQ ID NO: 33 和 37);DVD2167H (包含 SEQ ID NO: 36 和 32) 和 DVD2167L (包含 SEQ ID NO: 37 和 33);DVD2168H (包含 SEQ ID NO: 32 和 36) 和 DVD2168L (包含 SEQ ID NO: 33 和 37);DVD2169H (包含 SEQ ID NO: 36 和 32) 和 DVD2169L (包含 SEQ ID NO: 37 和 33);DVD2170H (包含 SEQ ID NO: 32 和 36) 和 DVD2170L (包含 SEQ ID NO: 33 和 37);DVD2171H (包含 SEQ ID NO: 36 和 32) 和 DVD2171L (包含 SEQ ID NO: 37 和 33);DVD2172H (包含 SEQ ID NO: 32 和 38) 和 DVD2172L (包含 SEQ ID NO: 33 和 39);DVD2173H (包含 SEQ ID NO: 38 和 32) 和 DVD2173L (包含 SEQ ID NO: 39 和 33);DVD2174H (包含 SEQ ID NO: 32 和 38) 和 DVD2174L (包含 SEQ ID NO: 33 和 39);DVD2175H (包含 SEQ ID NO: 38 和 32) 和 DVD2175L (包含 SEQ ID NO: 39 和 33);DVD2176H (包含 SEQ ID NO: 32 和 38) 和 DVD2176L (包含 SEQ ID NO: 33 和 39);DVD2177H (包含 SEQ ID NO: 38 和 32) 和 DVD2177L (包含 SEQ ID NO: 39 和 33);DVD2178H (包含 SEQ ID NO: 32 和 40) 和 DVD2178L (包含 SEQ ID NO: 33 和 41);DVD2179H (包含 SEQ ID NO: 40 和 32) 和 DVD2179L (包含 SEQ ID NO: 41 和 33);DVD2180H (包含 SEQ ID NO: 32 和 40) 和 DVD2180L (包含 SEQ ID NO: 33 和 41);DVD2181H (包含 SEQ ID NO: 40 和 32) 和 DVD2181L (包含 SEQ ID NO: 41 和 33);DVD2182H (包含 SEQ ID NO: 32 和 40) 和 DVD2182L (包含 SEQ ID NO: 33 和 41);DVD2183H (包含 SEQ ID NO: 40 和 32) 和 DVD2183L (包含 SEQ ID NO: 41 和 33);DVD2184H (包含 SEQ ID NO: 34 和 36) 和 DVD2184L (包含 SEQ ID NO: 35 和 37);DVD2185H (包含 SEQ ID NO: 36 和 34) 和 DVD2185L (包含 SEQ ID NO: 37 和 35);DVD2186H (包含 SEQ ID NO: 34 和 36) 和 DVD2186L (包含 SEQ ID NO: 35 和 37);DVD2187H (包含 SEQ ID NO: 36 和 34) 和 DVD2187L (包含 SEQ ID NO: 37 和 35);DVD2188H (包含 SEQ ID NO: 34 和 36) 和 DVD2188L (包含 SEQ ID NO: 35 和 37);DVD2189H (包含 SEQ ID NO: 36 和 34) 和 DVD2189L (包含 SEQ ID NO: 37 和 35);DVD2190H (包含 SEQ ID NO: 34 和 38) 和 DVD2190L (包含 SEQ ID NO: 35 和 39);DVD2191H (包含 SEQ ID NO: 38 和 34) 和 DVD2191L (包含 SEQ ID NO: 39 和 35);DVD2192H (包含 SEQ ID NO: 34 和 38) 和 DVD2192L (包含 SEQ ID NO: 35 和 39);DVD2193H (包含 SEQ ID NO: 38 和 34) 和 DVD2193L (包含 SEQ ID NO: 39 和 35);DVD2194H (包含 SEQ ID NO: 34 和 38) 和 DVD2194L (包含 SEQ ID NO: 35 和 39);DVD2195H (包含 SEQ ID NO: 38 和 34) 和 DVD2195L (包含 SEQ ID NO: 39 和 35);DVD2196H (包含 SEQ ID NO: 34 和 40) 和 DVD2196L (包含 SEQ ID NO: 35 和 41);DVD2197H (包含 SEQ ID NO: 40 和 34) 和 DVD2197L (包含 SEQ ID NO: 41 和 35);DVD2198H (包含 SEQ ID NO: 34 和 40) 和 DVD2198L (包含 SEQ ID NO: 35 和 41);DVD2199H (包含 SEQ ID NO: 40 和 34) 和 DVD2199L (包含 SEQ ID NO: 41 和 35);DVD2200H (包含 SEQ ID NO: 34 和 40) 和 DVD2200L (包含 SEQ ID NO: 35 和 41);或 DVD2201H (包含 SEQ ID NO: 40 和 34) 和 DVD2201L (包含 SEQ ID NO: 41 和 35)。

针对 IL-13 和 / 或 IL-17 的双重可变结构域免疫球蛋白

[0001] 相关申请

本申请要求 2011 年 12 月 30 日提交的美国临时申请号 61/581,964 的权益,其完整公开内容通过引用结合到本文中。

发明领域

[0002] 本文提供结合 IL-13 和 / 或 IL-17 的多价和多特异性结合蛋白、制备方法及其在诊断、预防和 / 或治疗急性和慢性炎性疾病、癌症和其它疾病中的用途。

[0003] 发明背景

经工程改造的蛋白质,例如能够结合两种或更多种抗原的多特异性结合蛋白,是本领域已知的。这类多特异性结合蛋白可采用细胞融合、化学缀合或重组 DNA 技术产生。有多种本领域已知的多特异性结合蛋白结构,并且许多结构和方法具有明显的缺点。

[0004] 已采用四源杂交瘤技术 (quadroma technology) 产生了双特异性抗体。然而,伴随这项技术的错配副产物的存在和产量显著下降意味着需要复杂的纯化程序。双特异性抗体还可通过两种不同的 mAb 的化学缀合产生。然而,这种方法不产生均质制备物。

[0005] 之前使用的其它方法包括两个亲本抗体与杂双官能交联剂偶联,产生串联的单链 Fv 分子、双抗体 (diabody)、双特异性双抗体、单链双抗体和双 - 双抗体 (di-diabody)。然而,这些方法的每一种都有缺点。另外,文献描述了在 IgG 重链中包含 2 个 Fab 重复序列且能够结合 4 个抗原分子的多价抗体构建体 (参见 PCT 公布号 W0 0177342 和 Miller 等 (2003) J. Immunol. 170(9): 4854-61)。

[0006] 美国专利号 7,612,181 提供能够以高亲和力结合两种或更多种抗原的结合蛋白的一个新家族,其被称为双重可变结构域结合蛋白 (DVD 结合蛋白) 或双重可变结构域免疫球蛋白 (DVD-IgTM)。

[0007] 虽然本领域提供了各种结构,一些有优点和缺点,但需要特定构建体以制备具有特定性质并与特定靶结合的多价结合蛋白。另外,新的可变结构域序列可进一步改进结合蛋白的性质。

[0008] 白介素 13 (IL-13) 是一种 17-kDa 糖蛋白,通过 Th2 谱系的活化 T 细胞产生。IL-13 的功能包括免疫球蛋白同种型在人 B 细胞中转变成 IgE 并抑制炎性细胞因子产生。IL-13 主要与气道炎症 (例如哮喘) 的诱发有关。它还与其它变应性疾病、纤维化病况、癌症和感染性疾病有关。

[0009] 白介素 -17 (IL-17, 亦称为 IL-17A) 是一种 20-30 kD 同二聚体糖蛋白,由炎症部位的活化 T 细胞分泌。IL-17 通过在各种组织中诱导多种黏着分子、炎性细胞因子和趋化因子的产生以将单核细胞和嗜中性粒细胞募集到炎症部位,而起促炎细胞因子的作用。IL-17 还在造血祖细胞的成熟中起重要作用。IL-17 的不当或过量产生与多种疾病或病症的病理学有关,包括类风湿性关节炎、哮喘、狼疮、同种异体移植排斥、其它炎性或自身免疫性疾病和癌症。

[0010] 本领域存在对能够结合 IL-13 和 / 或 IL-17 的改进的多价结合蛋白的需要。本文

提供结合 IL-13 和 IL-17 的新的结合蛋白。

[0011] 发明概述

提供能够结合 IL-13 和 / 或 IL-17 的结合蛋白。在一个实施方案中,提供能够以高亲和力和结合 IL-13 和 / 或 IL-17 的结合蛋白。

[0012] 在一个实施方案中,提供包含结合 IL-13 和 / 或 IL-17 的多肽链的结合蛋白,其中多肽链包含 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$,其中 VD1 为第一可变结构域,VD2 为第二可变结构域,C 为恒定结构域,X1 表示氨基酸或多肽,X2 表示 Fc 区,且 n 为 0 或 1。在一个实施方案中,结合蛋白中的 VD1 和 VD2 为重链可变结构域。在另一个实施方案中,VD1 和 VD2 能够结合相同的抗原。在另一个实施方案中,VD1 和 VD2 能够结合不同的抗原。在又一个实施方案中,C 为重链恒定结构域。例如,X1 为接头,前提条件是 X1 不为 CH1。

[0013] 在一个实施方案中,本文公开的结合蛋白包含结合 IL-13 和 / 或 IL-17 的多肽链,其中多肽链包含 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$,其中 VD1 为第一重链可变结构域,VD2 为第二重链可变结构域,C 为重链恒定结构域,X1 为接头,且 X2 为 Fc 区。在一个实施方案中,X1 为接头,前提条件是它不为 CH1。

[0014] 在一个实施方案中,本文公开的结合蛋白包含结合 IL-13 和 / 或 IL-17 的多肽链,其中多肽链包含 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$,其中 VD1 为第一轻链可变结构域,VD2 为第二轻链可变结构域,C 为轻链恒定结构域,X1 为接头,且 X2 不包含 Fc 区。在一个实施方案中,X1 为接头,前提条件是它不为 CL。

[0015] 在另一个实施方案中,提供包含两条多肽链的结合 IL-13 和 / 或 IL-17 的结合蛋白,其中第一多肽链包含 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$,其中 VD1 为第一重链可变结构域,VD2 为第二重链可变结构域,C 为重链恒定结构域,X1 为第一接头,且 X2 为 Fc 区;第二多肽链包含 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$,其中 VD1 为第一轻链可变结构域,VD2 为第二轻链可变结构域,C 为轻链恒定结构域,X1 为第二接头,且 X2 不包含 Fc 区。在一些实施方案中,第一和第二 X1 是相同的。在其它实施方案中,第一和第二 X1 是不同的。在一些实施方案中,第一 X1 不为 CH1 结构域和 / 或第二 X1 不为 CL 结构域。在一个实施方案中,第一 X1 和第二 X1 是短(例如 6 个氨基酸)接头。在另一个实施方案中,第一 X1 和第二 X1 为长(例如大于 6 个氨基酸)接头。在另一个实施方案中,第一 X1 为短接头,第二 X1 为长接头。在另一个实施方案中,第一 X1 为长接头,第二 X1 为短接头。

[0016] 在一个实施方案中,双重可变结构域(DVD)结合蛋白包含 4 条多肽链,其中第一两条多肽链的每一条包含 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$,其中 VD1 为第一重链可变结构域,VD2 为第二重链可变结构域,C 为重链恒定结构域,X1 为第一接头,且 X2 为 Fc 区;第二两条多肽链的每一条包含 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$,其中 VD1 为第一轻链可变结构域,VD2 为第二轻链可变结构域,C 为轻链恒定结构域,X1 为第二接头,且 X2 不包含 Fc 区。这类 DVD 结合蛋白具有 4 个抗原结合部位。在一些实施方案中,第一和第二 X1 是相同的。在其它实施方案中,第一和第二 X1 是不同的。在一些实施方案中,第一 X1 不为 CH1 结构域和 / 或第二 X1 不为 CL 结构域。在另一个实施方案中,本文公开的结合蛋白能够结合 IL-13 和 IL-17。因此,在一些实施方案中,结合蛋白包含能够以任何方向结合 IL-13 和 IL-17 的至少两个可变结构域序列(例如 VD1 和 VD2)。在一些实施方案中,VD1 和 VD2 是独立选择的。因此,在一些实施方案中,VD1 和 VD2 包含相同的 SEQ ID NO,而在其它实施方案中,VD1 和 VD2 包含不

同的 SEQ ID NO。

[0017] 在一个实施方案中，

(a) 结合蛋白结合 IL-13 和 IL-17；
(b) VD1 或 VD2 重链可变结构域包含来自 SEQ ID NO: 42、43、44、45、46、47、48 或 49 的 3 个 CDR；

(c) VD1 和 VD2 重链可变结构域独立地包含来自 SEQ ID NO: 42、43、44、45、46、47、48 或 49 的 3 个 CDR；

(d) VD1 重链可变结构域包含来自 SEQ ID NO: 36、38、40、42、43、44、45、46、47、48 或 49 的 3 个 CDR，VD2 重链可变结构域包含来自 SEQ ID NO: 30、32 或 34 的 3 个 CDR；或

(e) VD2 重链可变结构域包含来自 SEQ ID NO: 36、38、40、42、43、44、45、46、47、48 或 49 的 3 个 CDR，VD1 重链可变结构域包含来自 SEQ ID NO: 30、32 或 34 的 3 个 CDR。

[0018] 在另一个实施方案中，

(a) VD1 或 VD2 重链可变结构域包含 SEQ ID NO: 42、43、44、45、46、47、48 或 49；

(b) VD1 和 VD2 重链可变结构域独立地包含 SEQ ID NO: 42、43、44、45、46、47、48 或 49；

(c) VD1 重链可变结构域包含 SEQ ID NO: 36、38、40、42、43、44、45、46、47、48 或 49，VD2 重链可变结构域包含 SEQ ID NO: 30、32 或 34；或

(d) VD2 重链可变结构域包含 SEQ ID NO: 36、38、40、42、43、44、45、46、47、48 或 49，VD1 重链可变结构域包含 SEQ ID NO: 30、32 或 34。

[0019] 在一个实施方案中，

(a) 结合蛋白结合 IL-13 和 IL-17；

(b) VD1 或 VD2 轻链可变结构域包含来自 SEQ ID NO: 50、51、52、53 或 54 的 3 个 CDR；

(c) VD1 和 VD2 轻链可变结构域独立地包含来自 SEQ ID NO: 50、51、52、53 或 54 的 3 个 CDR；

(d) VD1 轻链可变结构域包含来自 SEQ ID NO: 37、39、41、50、51、52、53 或 54 的 3 个 CDR，VD2 轻链可变结构域包含来自 SEQ ID NO: 31、33 或 35 的 3 个 CDR，；或

(e) VD2 轻链可变结构域包含来自 SEQ ID NO: 37、39、41、50、51、52、53 或 54 的 3 个 CDR，VD1 轻链可变结构域包含来自 SEQ ID NO: 31、33 或 35 的 3 个 CDR。

[0020] 在另一个实施方案中，

(a) VD1 或 VD2 轻链可变结构域包含 SEQ ID NO: 50、51、52、53 或 54；

(b) VD1 和 VD2 轻链可变结构域独立地包含 SEQ ID NO: 50、51、52、53 或 54；

(c) VD1 轻链可变结构域包含 SEQ ID NO: 37、39、41、50、51、52、53 或 54，VD2 轻链可变结构域包含 SEQ ID NO: 31、33 或 35；或

(d) VD2 轻链可变结构域包含 SEQ ID NO: 37、39、41、50、51、52、53 或 54，VD1 轻链可变结构域包含 SEQ ID NO: 31、33 或 35。

[0021] 在另一个实施方案中，结合蛋白包含本文表 1 所示的重链和轻链序列。

[0022] 重链、轻链、两条链或四条链实施方案任一个的其它实施方案包括包含以下的至少一个 X1 接头：AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO: 1)；AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 2)；AKTTPKLG (SEQ ID NO: 3)；SAKTPKLG (SEQ ID NO: 4)；SAKTP (SEQ ID NO: 5)；RADAAP (SEQ ID NO: 6)；RADAAPT (SEQ ID NO: 7)；RADAAAAGGPGS (SEQ

ID NO: 8);RADAAAA(G₄S)₄ (SEQ ID NO: 9);SAKTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 10); ADAAP (SEQ ID NO: 11);ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO: 12);TVAAP (SEQ ID NO: 13); TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 14);QPKAAP (SEQ ID NO: 15);QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 16);AKTTPP (SEQ ID NO: 17);AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO: 18);akttap (SEQ ID NO: 19);akttapsvyplap (SEQ ID NO: 20);ASTKGP (SEQ ID NO: 21);ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 22);GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 23);GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO: 24);GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 25);或GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO: 26); TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 27);ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 28)或基于G/S的序列(例如G₄S (SEQ ID NO: 29)和G₄S重复序列)。在一个实施方案中,X₂为Fc区。在另一个实施方案中,X₂为变体Fc区。

[0023] 在又一个实施方案中,Fc区,如果存在于第一多肽中,则是天然序列Fc区或变异序列Fc区。在再一个实施方案中,Fc区为IgG1的Fc区、IgG2的Fc区、IgG3的Fc区、IgG4的Fc区、IgA的Fc区、IgM的Fc区、IgE的Fc区或IgD的Fc区。

[0024] 提供制备结合IL-13和/或IL-17的结合蛋白的方法。在一个实施方案中,制备结合IL-13和/或IL-17的结合蛋白的方法包括以下步骤:a)获得结合IL-13的第一亲本抗体或其抗原结合部分;b)获得结合IL-17的第二亲本抗体或其抗原结合部分;c)制备编码本文所述任何结合蛋白的构建体;和d)表达多肽链,使得产生结合第一和第二抗原的结合蛋白。

[0025] 在本文的实施方案的任一个中,VD1重链可变结构域(如果存在的话)和轻链可变结构域(如果存在的话),可来自第一亲本抗体或其抗原结合部分;VD2重链可变结构域(如果存在的话)和轻链可变结构域(如果存在的话)可来自第二亲本抗体或其抗原结合部分。第一和第二亲本抗体可以是相同的或不同的。

[0026] 在一个实施方案中,第一亲本抗体或其抗原结合部分结合第一抗原,第二亲本抗体或其抗原结合部分结合第二抗原。在一个实施方案中,第一和第二抗原是相同的抗原。在另一个实施方案中,亲本抗体结合相同抗原上的不同表位。在另一个实施方案中,第一和第二抗原是不同的抗原。在另一个实施方案中,第一亲本抗体或其抗原结合部分结合第一抗原的效价不同于第二亲本抗体或其抗原结合部分结合第二抗原的效价。在再一个实施方案中,第一亲本抗体或其抗原结合部分结合第一抗原的亲和力不同于第二亲本抗体或其抗原结合部分结合第二抗原的亲和力。

[0027] 在另一个实施方案中,第一亲本抗体或其抗原结合部分和第二亲本抗体或其抗原结合部分为人抗体、CDR移植抗体、人源化抗体和/或亲和力成熟抗体。

[0028] 在另一个实施方案中,结合蛋白具有第一亲本抗体或其抗原结合部分或第二亲本抗体或其抗原结合部分所显示的至少一种所需性质。或者,第一亲本抗体或其抗原结合部分和第二亲本抗体或其抗原结合部分具有结合蛋白所显示的至少一个所需性质。在一个实施方案中,所需性质是一个或多个抗体参数。在另一个实施方案中,抗体参数是抗原特异性、对抗原的亲和力、效价、生物学功能、表位识别、稳定性、溶解度、生产效率、免疫原性、药代动力学、生物利用度、组织交叉反应性或直系同源抗原结合。在一个实施方案中,结合蛋白是多价的。在另一个实施方案中,结合蛋白是多特异性的。本文所述多价和/或多特异性结合蛋白特别是从治疗角度来看具有合乎需要的性质。例如,多价和/或多特异性结合蛋

白:(1)可比二价抗体被表达抗体所结合的抗原的细胞更快地内化(和/或被分解代谢);(2)可以是激动剂结合蛋白;和/或(3)可诱导表达多价结合蛋白所能够结合的抗原的细胞的细胞死亡和/或凋亡。“亲本抗体”,其提供多价和/或多特异性结合蛋白的至少一种抗原结合特异性,可以是被表达抗体所结合的抗原的细胞内化(和/或被分解代谢)的抗体;和/或可以是激动剂、细胞死亡诱导抗体和/或凋亡诱导抗体,且本文所述的多价和/或多特异性结合蛋白在这些性质的一个或多个中可显示改进。此外,亲本抗体可缺乏这些性质的任一个或多个,但是当作为本文所述多价结合蛋白构建时可获得它们中的一个或多个。

[0029] 在另一个实施方案中,结合蛋白对一个或多个靶的结合速率常数(K_{on})为至少约 $10^2M^{-1}s^{-1}$ 、至少约 $10^3M^{-1}s^{-1}$ 、至少约 $10^4M^{-1}s^{-1}$ 、至少约 $10^5M^{-1}s^{-1}$ 或至少约 $10^6M^{-1}s^{-1}$,通过表面等离子体共振测量。在一个实施方案中,结合蛋白对一个或多个靶的结合速率常数(K_{on})为约 $10^2M^{-1}s^{-1}$ –约 $10^3M^{-1}s^{-1}$ 、约 $10^3M^{-1}s^{-1}$ –约 $10^4M^{-1}s^{-1}$ 、约 $10^4M^{-1}s^{-1}$ –约 $10^5M^{-1}s^{-1}$ 或约 $10^5M^{-1}s^{-1}$ –约 $10^6M^{-1}s^{-1}$,通过表面等离子体共振测量。

[0030] 在另一个实施方案中,结合蛋白对一个或多个靶的解离速率常数(K_{off})为至多约 $10^{-3}s^{-1}$ 、至多约 $10^{-4}s^{-1}$ 、至多约 $10^{-5}s^{-1}$ 或至多约 $10^{-6}s^{-1}$,通过表面等离子体共振测量。在一个实施方案中,结合蛋白对一个或多个靶的解离速率常数(K_{off})为约 $10^{-3}s^{-1}$ –约 $10^{-4}s^{-1}$ 、约 $10^{-4}s^{-1}$ –约 $10^{-5}s^{-1}$ 或约 $10^{-5}s^{-1}$ –约 $10^{-6}s^{-1}$,通过表面等离子体共振测量。

[0031] 在另一个实施方案中,结合蛋白对一个或多个靶的解离常数(K_d)为至多约 $10^{-7}M$ 、至多约 $10^{-8}M$ 、至多约 $10^{-9}M$ 、至多约 $10^{-10}M$ 、至多约 $10^{-11}M$ 、至多约 $10^{-12}M$ 或至多 $10^{-13}M$ 。在一个实施方案中,结合蛋白对其靶的解离常数(K_d)为约 $10^{-7}M$ –约 $10^{-8}M$ 、约 $10^{-8}M$ –约 $10^{-9}M$ 、约 $10^{-9}M$ –约 $10^{-10}M$ 、约 $10^{-10}M$ –约 $10^{-11}M$ 、约 $10^{-11}M$ –约 $10^{-12}M$ 或约 $10^{-12}M$ –约 $10^{-13}M$ 。

[0032] 在另一个实施方案中,结合蛋白是还包含作用剂的缀合物。在一个实施方案中,作用剂是免疫黏着分子、成像剂、治疗剂或细胞毒性剂。在一个实施方案中,成像剂是放射性标记、酶、荧光标记、发光标记、生物发光标记、磁性标记或生物素。在另一个实施方案中,放射性标记是 3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 或 ^{153}Sm 。在再一个实施方案中,治疗剂或细胞毒性剂是抗代谢物、烷化剂、抗生素、生长因子、细胞因子、抗血管生成剂、抗有丝分裂剂、蒽环类、毒素或细胞凋亡剂。

[0033] 在另一个实施方案中,结合蛋白是结晶的结合蛋白,并作为晶体存在。在一个实施方案中,晶体是无载体药物控释晶体。在另一个实施方案中,与结合蛋白的可溶性对应物相比,结晶的结合蛋白具有更长的体内半寿期。在再一个实施方案中,结晶的结合蛋白保持生物活性。

[0034] 在另一个实施方案中,本文所述结合蛋白是糖基化的。例如,糖基化模式是人糖基化模式。

[0035] 还提供编码本文公开的任一种结合蛋白的分离核酸。又一个实施方案提供包含本文公开的分离核酸的载体,其中载体为pcDNA;pTT(Durocher等(2002)Nucleic Acids Res. 30(2);pTT3(具有额外多个克隆位点的pTT;pEFBOS(Mizushima和Nagata(1990)Nucleic Acids Res. 18(17);pBV;pJV;pcDNA3.1 TOP0;pEF6 TOP0;pBOS;pHybE或pBJ。在一个实施方案中,载体是美国专利公布号20090239259公开的载体。

[0036] 另一方面,宿主细胞用本文公开的载体转化。在一个实施方案中,宿主细胞是原核细胞,例如大肠杆菌(*E. coli*)。在另一个实施方案中,宿主细胞是真核细胞,例如原生

生物细胞、动物细胞、植物细胞或真菌细胞。在一个实施方案中，宿主细胞是哺乳动物细胞，包括但不限于 CHO、COS、NS0、SP2、PER. C6 或真菌细胞，例如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或昆虫细胞，例如 Sf9。在一个实施方案中，在单一重组宿主细胞中产生例如具有不同特异性的两种或更多种结合蛋白。例如，抗体混合物的表达被称为 Oligoclones™ (Merus B. V., Netherlands) 美国专利号 7,262,028 和 7,429,486。

[0037] 提供产生本文公开的结合蛋白的方法，所述方法包括在足以产生结合蛋白的条件下在培养基中培养本文公开的任一种宿主细胞。在一个实施方案中，通过该方法产生的结合蛋白的 50%-75% 是双重特异性四价结合蛋白。在另一个实施方案中，通过该方法产生的结合蛋白的 75%-90% 是双重特异性四价结合蛋白。在另一个实施方案中，所产生的结合蛋白的 90%-95% 是双重特异性四价结合蛋白。

[0038] 一个实施方案提供用于释放结合蛋白的组合物，其中组合物包含结晶的结合蛋白、成分和至少一种聚合载体。在一个实施方案中，聚合载体为聚丙烯酸、聚氰基丙烯酸酯、聚氨基酸、聚酞、聚缩肽、聚酯、聚乳酸、乳酸-乙醇酸共聚物或 PLGA、聚 ϵ -羟基丁酸酯、聚己内酯、聚二噁烷酮、聚乙二醇、聚羟丙基甲基丙烯酸酯、聚有机磷腈、聚原酸酯、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、马来酞-烷基乙烯醚共聚物、普流罗尼克多元醇 (pluronic polyol)、白蛋白、藻酸盐 (alginate)、纤维素、纤维素衍生物、胶原、血纤蛋白、明胶、透明质酸、寡糖、糖胺聚糖 (glycaminoglycan)、硫酸化多糖或其共混物和共聚物。在一个实施方案中，所述成分是白蛋白、蔗糖、海藻糖、乳糖醇、明胶、羟丙基- β -环糊精、甲氧基聚乙二醇或聚乙二醇。

[0039] 另一个实施方案提供用于治疗哺乳动物的方法，其包括给予哺乳动物有效量的本文公开的组合物的步骤。

[0040] 提供包含本文公开的结合蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物。在又一个实施方案中，药物组合物包含至少一种用于治疗病症的其它治疗剂。例如，其它作用剂可以是治疗剂、成像剂、细胞毒性剂、血管生成抑制剂（包括但不限于抗 VEGF 抗体或 VEGF 截留剂 (trap)）、激酶抑制剂（包括但不限于 KDR 和 T I E-2 抑制剂）、共刺激分子阻断剂（包括但不限于抗 B7.1、抗 B7.2、CTLA4-Ig、抗 CD20）、黏着分子阻断剂（包括但不限于抗 LFA-1 抗体、抗 E/L 选择蛋白抗体、小分子抑制剂）、抗细胞因子抗体或其功能片段（包括但不限于抗 IL-18、抗 TNF 和抗 IL-6/ 细胞因子受体抗体）、甲氨蝶呤、环孢菌素、雷帕霉素、FK506、可检测标记或报道分子、TNF 拮抗剂、抗风湿药、肌肉松弛药、麻醉剂、非甾体抗炎药 (NSAID)、镇痛药、麻醉药、镇静药、局部麻醉药、神经肌肉阻断剂、抗微生物药、抗银屑病药、皮质类固醇、同化类固醇、红细胞生成素、免疫剂 (immunization)、免疫球蛋白、免疫抑制剂、生长激素、激素替代药物、放射性药物、抗抑郁药、抗精神病药、兴奋剂、哮喘药物、 β 激动剂、吸入类固醇、肾上腺素或类似物、细胞因子或细胞因子拮抗剂。

[0041] 提供用于治疗患有病症的人类受试者的方法，所述病症中能够被本文公开的结合蛋白结合的一个或多个靶是有害的，所述方法包括给予人类受试者本文公开的结合蛋白使得人类受试者中的一个或多个靶的活性受抑制、一个或多个症状被缓解或治疗得到实现。本文提供的结合蛋白可用来治疗患有自身免疫性疾病（例如与炎症有关的自身免疫性疾病）的人。在一个实施方案中，本文提供的结合蛋白或其抗原结合部分被用来治疗哮喘、变态反应、变应性肺病、变应性鼻炎、特应性皮炎、慢性阻塞性肺病 (COPD)、纤维变性、囊性纤维化 (CF)、纤维化肺病、特发性肺纤维变性、肝纤维变性、狼疮、乙型肝炎相关肝病和纤维变

性、脓毒症、系统性红斑狼疮 (SLE)、肾小球性肾炎、炎性皮肤病、银屑病、糖尿病、胰岛素依赖性糖尿病、HIV 所致感染性疾病、炎性肠病 (IBD)、溃疡性结肠炎 (UC)、克罗恩病 (CD)、类风湿性关节炎 (RA)、骨关节炎 (OA)、多发性硬化 (MS)、移植物抗宿主病 (GVHD)、移植排斥反应、缺血性心脏病 (IHD)、乳糜泻、接触性超敏反应、酒精性肝病、贝切特病、动脉粥样硬化血管病、眼表面炎性疾病或莱姆病。

[0042] 在另一个实施方案中,待治疗的病症或病况包括人的因例如以下病毒所致病毒感染引起的症状:HIV、人鼻病毒、肠病毒、冠状病毒、疱疹病毒、流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞体病毒或腺病毒。

[0043] 本文提供的结合蛋白可用来治疗神经病症。在一个实施方案中,本文提供的结合蛋白或其抗原结合部分用来治疗涉及神经元再生和脊髓损伤的神经变性疾病和病况。

[0044] 在一个实施方案中,可用本文公开的组合物和方法治疗或诊断的疾病包括但不限于原发性癌和转移癌,包括乳腺癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、口咽癌、喉咽癌、食管癌、胃癌、胰腺癌、肝癌、胆囊癌和胆管癌、小肠癌、泌尿道癌(包括肾癌、膀胱癌和尿路上皮癌)、女性生殖道癌(包括宫颈癌、子宫癌和卵巢癌以及绒毛膜癌和妊娠滋养层细胞病)、男性生殖道癌(包括前列腺癌、精囊癌、睾丸癌和生殖细胞肿瘤)、内分泌腺癌(包括甲状腺癌、肾上腺癌和脑垂体癌)和皮肤癌以及血管瘤、黑素瘤、肉瘤(包括发生在骨和软组织中的肉瘤以及卡波西肉瘤)、脑肿瘤、神经肿瘤、眼肿瘤和脑脊膜肿瘤(包括星形细胞瘤、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、成视网膜细胞瘤、神经瘤、成神经细胞瘤、神经鞘瘤和脑脊膜瘤)、造血系统恶性肿瘤(例如白血病)引起的实体瘤和淋巴瘤(霍奇金和非霍奇金两种淋巴瘤)。

[0045] 另一个实施方案提供结合蛋白在治疗疾病或病症中的用途,其中所述疾病或病症是类风湿性关节炎、骨关节炎、青少年慢性关节炎、脓毒性关节炎、莱姆关节炎、银屑病性关节炎、反应性关节炎、脊椎关节病、系统性红斑狼疮、克罗恩病、溃疡性结肠炎、炎性肠病、胰岛素依赖性糖尿病、甲状腺炎、哮喘、变应性疾病、银屑病、皮炎、硬皮病、移植物抗宿主病、器官移植排斥、与器官移植有关的急性或慢性免疫性疾病、结节病、动脉粥样硬化、弥散性血管内凝血、川崎病(Kawasaki's disease)、格雷夫斯病(Grave's disease)、肾病综合征、慢性疲劳综合征、韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、诺赫-舍恩莱因紫癜(Henoch-Schoenlein purpura)、肾微型血管炎、慢性活动性肝炎、葡萄膜炎、败血性休克、中毒性休克综合征、脓毒症综合征、恶病质、感染性疾病、寄生虫病、获得性免疫缺陷综合征、急性横贯性脊髓炎、亨廷顿舞蹈病(Huntington's chorea)、帕金森病(Parkinson's disease)、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、中风、原发性胆汁性肝硬化、溶血性贫血、恶性肿瘤、心力衰竭、艾迪生病(Addison's disease)、散发性 I 型多腺缺乏和 II 型多腺缺乏、施密特综合征(Schmidt's syndrome)、成人(急性)呼吸窘迫综合征、脱发、斑秃、关节病、赖特病(Reiter's disease)、牛皮癣性关节炎、溃疡性结肠炎性关节炎、肠病性滑膜炎、衣原体、耶尔森氏菌和沙门氏菌相关关节病、动脉粥样硬化疾病/动脉硬化、特应性变态反应、自身免疫性大疱病、寻常性天疱疮、落叶状天疱疮、类天疱疮、线性 IgA 病、自身免疫性溶血性贫血、库姆斯阳性(Coombs positive)溶血性贫血、获得性恶性贫血、青少年恶性贫血、肌痛性脑炎/Royal Free 病、慢性粘膜皮肤念珠菌病、巨细胞动脉炎、原发性硬化性肝炎、隐源性自身免疫性肝炎、获得性免疫缺陷相关疾病、乙型肝炎、丙型肝炎、普通变异性免疫缺陷(普通可变性低丙种球蛋白血症)、扩张型心肌病、女性不孕症、卵巢衰

竭、卵巢功能早衰、纤维化肺病、隐源性致纤维性肺泡炎、炎症后间质性肺病、间质性肺炎、结缔组织病相关性间质性肺病、混合性结缔组织病相关性肺病、全身性硬皮病相关性间质性肺病、类风湿性关节炎相关性间质性肺病、系统性红斑狼疮相关性肺病、皮炎 / 多肌炎相关性肺病、斯耶格伦病 (Sjögren's disease) 相关性肺病、关节强硬性脊椎炎相关性肺病、脉管炎性弥散性肺病、含铁血黄素沉着症相关性肺病、药物诱发性间质性肺病、纤维变性、放射纤维变性、闭塞性细支气管炎、慢性嗜酸性肺炎、淋巴细胞浸润性肺病、感染后间质性肺病、痛风性关节炎、自身免疫性肝炎、1 型自身免疫性肝炎 (经典自身免疫性或狼疮样肝炎)、2 型自身免疫性肝炎 (抗 LKM 抗体肝炎)、自身免疫介导的低血糖、B 型胰岛素抵抗伴黑棘皮病、甲状旁腺功能减退症、与器官移植相关的急性免疫性疾病、与器官移植相关的慢性免疫性疾病、骨关节病、原发性硬化性胆管炎、1 型银屑病、2 型银屑病、特发性白细胞减少 (idiopathic leucopaenia)、自身免疫性中性粒细胞减少、肾病 NOS、肾小球性肾炎 (glomerulonephritides)、肾微型血管炎、莱姆病、盘状红斑狼疮、特发性男性不育症或 NOS、精子自身免疫、多发性硬化 (所有亚型)、交感性眼炎、结缔组织病继发性肺动脉高血压、古德帕斯彻综合征 (Goodpasture's syndrome)、结节性多动脉炎的肺表现、急性风湿热、类风湿性脊椎炎、史蒂尔病 (Still's disease)、全身性硬皮病、斯耶格伦综合征 (Sjögren's syndrome)、无脉症 (Takayasu's disease) / 动脉炎、自身免疫性血小板减少、特发性血小板减少、自身免疫性甲状腺病、甲状腺功能亢进、甲状腺肿性自身免疫性甲状腺功能减退症 (桥本病 (Hashimoto's disease))、萎缩性自身免疫性甲状腺功能减退症、原发性黏液腺瘤病、晶状体源性葡萄膜炎 (phacogenic uveitis)、原发性血管炎、白癫风、急性肝病、慢性肝病、酒精性肝硬化、酒精引起的肝损伤、胆汁郁积 (choleostasis)、特应性肝病、药物诱发性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、变态反应和哮喘、B 族链球菌 (GBS) 感染、精神障碍、抑郁症、精神分裂症、Th2 型和 Th1 型介导的疾病、急性和慢性疼痛、不同形式的疼痛、癌症、肺癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、直肠癌、造血系统恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤、无 β 脂蛋白血症、手足发绀、急性和慢性寄生或感染过程、急性白血病、急性成淋巴细胞性白血病 (ALL)、急性髓细胞性白血病 (AML)、急性或慢性细菌感染、急性胰腺炎、急性肾衰竭、腺癌、房性异位搏动 (aerial ectopic beat)、AIDS 痴呆综合征、酒精诱导的肝炎、变应性结膜炎、变应性接触性皮炎、变应性鼻炎、同种异体移植排斥、 α -1-抗胰蛋白酶缺乏症、肌萎缩性侧索硬化、贫血、心绞痛、前角细胞变性、抗 cd3 疗法、抗磷脂综合征、抗受体超敏反应、主动脉和周围动脉瘤、主动脉壁夹层形成、动脉高血压、动脉硬化、动静脉瘘、共济失调、心房颤动 (持续性或阵发性)、心房扑动、房室传导阻滞、B 细胞淋巴瘤、骨移植排斥、骨髓移植 (BMT) 排斥、束支传导阻滞、伯基特淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma)、烧伤、心律失常、心脏顿抑综合征 (cardiac stun syndrome)、心脏肿瘤、心肌病、心肺分流术炎症反应、软骨移植排斥、小脑皮质变性、小脑病症、紊乱性或多样性房性心动过速、化疗相关病症、慢性髓细胞性白血病 (CML)、慢性酒精中毒、慢性炎症病理、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、慢性阻塞性肺病 (COPD)、慢性水杨酸盐中毒、结肠直肠癌、充血性心力衰竭、结膜炎、接触性皮炎、肺源性心脏病、冠状动脉疾病、克罗伊茨费尔特-雅各布病 (Creutzfeldt-Jakob disease)、培养物阴性脓毒症、囊性纤维化、细胞因子疗法相关病症、拳击员痴呆、脱髓鞘性疾病、登革出血热、皮炎、皮肤病况、多尿症、糖尿病、糖尿病性动脉粥样硬化性疾病、弥散性路易体病、扩张性充血性心肌病、基底核病症、中年

唐氏综合征 (Down's syndrome in middle age)、阻断 CNS 多巴胺受体的药物诱导的药物诱发性运动障碍、药物敏感性、湿疹、脑脊髓炎、心内膜炎、内分泌病、会厌炎、EB 病毒感染、红斑性肢痛病、锥体束外和小脑病症、家族性噬血细胞性淋巴组织细胞增多症、胎儿胸腺移植排斥、弗里德赖希共济失调 (Friedreich's ataxia)、功能性周围动脉病症、真菌脓毒症、气性坏疽、胃溃疡、肾小球肾炎、任何器官或组织的移植物排斥、革兰氏阴性脓毒症、革兰氏阳性脓毒症、胞内生物体所致肉芽肿、毛细胞白血病、哈 - 施病 (Hallervorden-Spatz disease)、桥本甲状腺炎 (Hashimoto's thyroiditis)、枯草热、心脏移植排斥、血色素沉着症、血液透析、溶血性尿毒症综合征 / 血栓溶解性血小板减少性紫癜、出血、甲型肝炎、希氏束心律失常、HIV 感染 / HIV 神经病、霍奇金病 (Hodgkin's disease)、运动机能亢进性运动障碍、超敏反应、过敏性肺炎、高血压、运动功能减退性运动障碍、下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴评价、特发性艾迪生病、特发性肺纤维化、抗体介导的细胞毒性、虚弱、婴儿脊髓性肌萎缩、主动脉炎症、甲型流感、电离辐射暴露、虹膜睫状体炎 / 葡萄膜炎 / 视神经炎、缺血 - 再灌注损伤、缺血性中风、青少年类风湿性关节炎、青少年脊髓性肌萎缩、卡波西肉瘤、肾移植排斥、军团杆菌病 (legionella)、利什曼病、麻风、皮质脊髓系统损伤、脂肪水肿、肝移植排斥、淋巴水肿、疟疾、恶性淋巴瘤、恶性组织细胞增多症、恶性黑素瘤、脑膜炎、脑膜炎球菌血症、代谢性 / 特发性、偏头痛性头痛、线粒体多系统病症、混合型结缔组织病、单克隆丙种球蛋白病、多发性骨髓瘤、多系统变性 (Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager 和 Machado-Joseph)、胞内鸟分枝杆菌、结核分支杆菌、脊椎增生异常综合征、心肌梗死、心肌缺血性病症、鼻咽癌、新生儿慢性肺疾病、肾炎、肾变病、神经变性疾病、神经原性肌萎缩、中性白细胞减少性发热、非霍奇金淋巴瘤、腹主动脉及其分支闭塞、闭塞性动脉病症、okt3 治疗、睾丸炎 / 附睾炎、睾丸炎 / 输精管切除逆转术、器官巨大症、骨质疏松症、胰腺移植排斥、胰腺癌、瘤外综合征 / 恶性高钙血症、甲状旁腺移植排斥、骨盆炎性疾病、常年性鼻炎、心包疾病、外周动脉粥样硬化性疾病、外周血管病症、腹膜炎、恶性贫血、卡氏肺囊虫肺炎、肺炎、POEMS 综合征 (多神经病、器官巨大症、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病和皮肤改变综合征)、灌注后综合征、泵后综合征、MI 心切开后综合征、先兆子痫、进行性核上性麻痹、原发性肺动脉高血压、放射疗法、雷诺现象和疾病 (Raynaud's phenomenon and disease)、雷诺病、雷弗素姆病 (Refsum's disease)、规律性窄 QRS 心动过速、肾血管性高血压、再灌注损伤、限制性心肌病、肉瘤、硬皮病、老年性舞蹈病、路易体型老年性痴呆、血清反应阴性关节病、休克、镰状细胞贫血、皮肤同种异体移植排斥、皮肤改变综合征、小肠移植排斥、实体瘤、特殊心律失常、脊髓性共济失调、脊髓小脑变性、链球菌肌炎、小脑结构损伤、亚急性硬化性全脑炎、昏厥、心血管系统梅毒、全身性过敏反应、全身性炎性反应综合征、全身发作性青少年类风湿性关节炎、T 细胞或 FAB ALL、毛细管扩张、血栓闭塞性脉管炎、血小板减少、毒性、移植、创伤 / 出血、III 型超敏反应、IV 型超敏反应、不稳定心绞痛、尿毒症、尿脓毒症、心脏瓣膜疾病、静脉曲张、血管炎、静脉疾病、静脉血栓形成、心室颤动、病毒和真菌感染、病毒性脑炎 / 无菌性脑膜炎、病毒相关性噬血细胞综合征、韦尼克 - 科尔萨科夫综合征 (Wernicke-Korsakoff syndrome)、肝豆状核变性 (Wilson's disease)、任何器官或组织的异种移植物排斥、急性冠状动脉综合征、急性特发性多神经炎、急性炎性脱髓鞘性多神经根神经病、急性缺血、成人史蒂尔病、过敏反应、抗磷脂抗体综合征、再生障碍性贫血、特应性湿疹、特应性皮炎、自身免疫性皮炎、与链球菌感染相关的自身免疫性病症、自身免疫性

肠病、自身免疫性听力丧失、自身免疫性淋巴细胞增生综合征 (ALPS)、自身免疫性心肌炎、自身免疫性卵巢功能早衰、睑炎、支气管扩张、大疱性类天疱疮、心血管疾病、灾难性抗磷脂综合征、乳糜泻、颈椎病、慢性缺血、疤痕性类天疱疮、具有多发性硬化风险的临床孤立综合征 (cis)、儿童期发病性精神病、泪囊炎、皮炎、糖尿病性视网膜病、椎间盘突出、盘脱垂、药物诱导的免疫性溶血性贫血、子宫内膜异位、眼内炎、巩膜外层炎、多形性红斑、重症多形性红斑、妊娠期类天疱疮、格 - 巴综合征 (Guillain-Barré syndrome, GBS)、休斯综合征 (Hughes syndrome)、特发性帕金森病、特发性间质性肺炎、IgE 介导的变态反应、免疫性溶血性贫血、包涵体肌炎、传染性眼炎性疾病、炎性脱髓鞘疾病、炎性心脏病、炎性肾病、IPF/UIP、虹膜炎、角膜炎、干燥性角膜结膜炎、Kussmaul 病或 Kussmaul-Meier 病、兰德里麻痹 (Landry's paralysis)、朗格汉斯细胞组织细胞增多病、网状青斑、黄斑变性、微型多血管炎、morbus bechterev、运动神经元病症、粘膜类天疱疮、多器官衰竭、重症肌无力、骨髓增生异常综合征、心肌炎、神经根病症、神经病、非甲非乙型肝炎、视神经炎、骨质溶解、少关节型 JRA、外周动脉闭塞性疾病 (PAOD)、外周血管疾病 (PVD)、外周动脉疾病 (PAD)、静脉炎、结节性多动脉炎 (或结节性动脉周围炎)、多软骨炎、白发病、多关节型 JRA、多内分泌缺陷综合征、多肌炎、风湿性多肌痛 (PMR)、原发性帕金森综合征、前列腺炎、纯红细胞再生障碍、原发性肾上腺功能不全、复发性视神经脊髓炎、再狭窄、风湿性心脏病、sapho (滑膜炎、痤疮、脓疱病、骨肥厚和骨炎)、继发性淀粉样变性、休克肺、巩膜炎、坐骨神经痛、继发性肾上腺功能不全、硅酮相关性结缔组织病、斯 - 威皮肤病 (sneddon-wilkinson dermatosis)、关节强直性脊椎炎、史 - 约综合征 (Stevens-Johnson syndrome, SJS)、颞动脉炎、弓形虫性视网膜炎、中毒性表皮坏死松解、横贯性脊髓炎、TRAPS (肿瘤坏死因子受体、1 型变态反应、II 型糖尿病、荨麻疹、普通型间质性肺炎 (UIP)、血管炎、春季结膜炎、病毒性视网膜炎、Vogt-Koyanagi-Harada 综合征 (VKH 综合征)、湿性黄斑变性或伤口愈合。

[0046] 在一个实施方案中,结合蛋白或其抗原结合部分当单独或与放射疗法和 / 或化学治疗剂组合使用时,用于治疗癌症或预防或抑制本文所述肿瘤的转移。

[0047] 另一方面,提供治疗患有病症的患者的方法,所述方法包括在给予第二药剂之前、同时或之后给予本文公开的任一种结合蛋白的步骤。在一个实施方案中,第二药剂为布地奈德 (budenoside)、表皮生长因子、皮质类固醇、环孢菌素、柳氮磺吡啶、氨基水杨酸盐、6- 巯基嘌呤、硫唑嘌呤、甲硝唑、脂加氧酶抑制剂、美沙拉秦、奥沙拉秦、巴柳氮、抗氧化剂、血栓烷抑制剂、IL-1 受体拮抗剂、抗 IL-1 β mAb、抗 IL-6 或 IL-6 受体 mAb、生长因子、弹性蛋白酶抑制剂、吡啶基 - 咪唑化合物;TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-18、IL-23、EMAP-II、GM-CSF、FGF 或 PDGF 的抗体或激动剂;抗 CD2、CD3、CD4、CD8、CD-19、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90 或其配体的抗体;甲氨蝶呤、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸酯、来氟米特、NSAID、布洛芬、泼尼松龙、磷酸二酯酶抑制剂、腺苷激动剂、抗血栓药、补体抑制剂、肾上腺素能药、IRAK、NIK、IKK、p38、MAP 激酶抑制剂、IL-1 β 转化酶抑制剂、TNF α - 转化酶抑制剂、T 细胞信号转导抑制剂、金属蛋白酶抑制剂、柳氮磺吡啶、硫唑嘌呤、6- 巯基嘌呤、血管紧张素转化酶抑制剂、可溶性细胞因子受体、可溶性 p55 TNF 受体、可溶性 p75 TNF 受体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R、抗炎细胞因子、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13 或 TGF β 。在一个具体实施方案中,通过胃肠外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、宫颈内、胃内、

肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、推注、阴道、直肠、口腔、舌下、鼻内或透皮给药，将本文公开的药物组合物给予患者。

[0048] 还提供本文公开的结合蛋白的抗独特型抗体。抗独特型抗体包括含有包含任何蛋白质或肽的分子，所述分子包含免疫球蛋白分子的至少一部分，例如但不限于重链或轻链的至少一个互补决定区 (CDR) 或其配体结合部分、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、构架区或其任何部分，其可掺入本文提供的结合蛋白中。

[0049] 提供测定试验样品中 IL-13 和 / 或 IL-17 或其片段的的存在、量或浓度的方法。所述方法包括通过免疫测定法针对抗原或其片段测定试验样品。免疫测定法 (i) 利用至少一种结合蛋白和至少一种可检测标记，和 (ii) 包括将由可检测标记产生的、作为试验样品中抗原或其片段的的存在、量或浓度的直接或间接指示的信号与对照或校准物中产生的、作为抗原或其片段的的存在、量或浓度的直接或间接指示的信号进行比较。校准物任选是一系列校准物的部分，其中每个校准物与该系列中的其他校准物通过抗原或其片段的浓度而区别。所述方法可包括 (i) 使试验样品与结合抗原或其片段上的表位的至少一种捕获剂 (capture agent) 接触，从而形成捕获剂 / 抗原或其片段的复合物，(ii) 使捕获剂 / 抗原或其片段的复合物与至少一种不被捕获剂结合、包含可检测标记并且结合抗原或其片段上的表位的检测剂接触，以形成捕获剂 / 抗原或其片段 / 检测剂的复合物，和 (iii) 根据 (ii) 中形成的捕获剂 / 抗原或其片段 / 检测剂的复合物的可检测标记产生的信号，测定试验样品中抗原或其片段的的存在、量或浓度，其中至少一种捕获剂和 / 或至少一种检测剂是所述至少一种结合蛋白。

[0050] 或者，所述方法可包括 (i) 使试验样品与结合抗原或其片段上的表位的至少一种捕获剂接触，从而形成捕获剂 / 抗原或其片段的复合物，并且同时或以任何顺序序贯地使试验样品与可检测标记的抗原或其片段接触，所述可检测标记的抗原或其片段可与试验样品中的任何抗原或其片段竞争结合所述至少一种捕获剂，其中试验样品中存在的任何抗原或其片段和可检测标记的抗原彼此竞争分别形成捕获剂 / 抗原或其片段的复合物和捕获剂 / 可检测标记的抗原或其片段的复合物，和 (ii) 根据 (ii) 中形成的捕获剂 / 可检测标记的抗原或其片段的复合物中的可检测标记产生的信号，测定试验样品中抗原或其片段的的存在、量或浓度，其中至少一种捕获剂是所述至少一种结合蛋白且其中由捕获剂 / 可检测标记的抗原或其片段的复合物中的可检测标记产生的信号与试验样品中抗原或其片段的量或浓度成反比。

[0051] 试验样品可来自患者，在此情况下，所述方法还可包括诊断、预测或评价患者的治疗性 / 预防性治疗的功效。如果该方法还包括评价患者的治疗性 / 预防性治疗的功效，则该方法任选还包括按需修改患者的治疗性 / 预防性治疗以改进功效。可对该方法进行改动以用于自动化系统或半自动化系统。因此，本文所述方法还可用来确定受试者是否患有给定的疾病、病症或病况或有发生给定的疾病、病症或病况的风险。具体而言，所述方法可包括以下步骤：

(a) 测定受试者试验样品中分析物或其片段的浓度或量 (例如采用本文所述方法或本领域已知方法) ;和

(b) 将步骤 (a) 测定的分析物或其片段的浓度或量与预定水平进行比较，其中，如果

步骤 (a) 中测定的分析物的浓度或量相对于预定水平是有利的,则确定受试者未患给定的疾病、病症或病况或没有给定的疾病、病症或病况的风险。然而,如果步骤 (a) 中测定的分析物的浓度或量相对于预定水平是不利的,则确定受试者患有给定的疾病、病症或病况或有给定的疾病、病症或病况的风险。

[0052] 另外,本文提供监测受试者的疾病进展的方法。所述方法最适宜包括以下步骤:

(a) 测定受试者试验样品中的分析物的浓度或量;

(b) 测定受试者的稍后试验样品中的分析物的浓度或量;和

(c) 将步骤 (b) 中测定的分析物的浓度或量与步骤 (a) 中测定的分析物的浓度或量进行比较,其中如果步骤 (b) 中测定的浓度或量当与步骤 (a) 中测定的分析物的浓度或量比较时未改变或是不利的,则确定受试者的疾病继续、进展或恶化。相比之下,如果步骤 (b) 中测定的分析物的浓度或量当与步骤 (a) 中测定的分析物的浓度或量比较时是有利的,则确定受试者的疾病中止、消退或改善。

[0053] 任选该方法还包括将步骤 (b) 中测定的分析物的浓度或量与例如预定水平进行比较。另外,如果该比较显示步骤 (b) 中测定的分析物的浓度或量例如相对于预定水平是不利的,则任选该方法包括用一种或多种药物组合物治疗受试者一段时间。

[0054] 还提供针对 IL-13 和 / 或 IL-17 或其片段测定试验样品的试剂盒。试剂盒包含用于测定试验样品的抗原或其片段的至少一种组分和测定试验样品的抗原或其片段的说明书,其中所述至少一种组分包括包含本文公开的结合蛋白的至少一种组合物,其中所述结合蛋白任选是可检测标记的。

[0055] 附图简述

图 1 是双重可变结构域 (DVD) 结合蛋白构建体的示意图。

[0056] 发明详述

提供能够结合 IL13 和 / 或 IL-17 的多价和 / 或多特异性结合蛋白。还提供双重可变结构域结合蛋白 (DVD 结合蛋白) 或双重可变结构域免疫球蛋白 (DVD-IgTM) 及其药物组合物以及用于制备这类 DVD 结合蛋白的核酸、重组表达载体和宿主细胞。还提供使用 DVD 结合蛋白体外或体内检测特异性抗原的方法。

[0057] 除非本文另有说明,否则本文所用的科学和技术术语具有本领域普通技术人员通常理解的含义。万一有任何潜在的歧义,本文提供的定义优先于任何字典或外来定义。除非文中另有要求,否则单数术语应包括复数形式,复数术语应包括单数形式。“或”的使用意指“和 / 或”,除非另有说明。术语“包括 (including)”以及其它形式例如“includes”和“included”的使用不是限制性的。

[0058] 一般而言,与本文描述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白和核酸化学和杂交联用的命名法是本领域众所周知和通常使用的那些。除非另有说明,否则本文提供的方法和技术一般按照本领域众所周知和整个本说明书中引用和论述的各种一般和更具体的参考文献中所述的常规方法来进行。酶促反应和纯化技术根据生产商的说明书、如本领域通常实施的或如本文所述来进行。与本文描述的分析化学、合成有机化学以及医学和药物化学联用的命名法以及其实验室程序和技术是本领域众所周知和通常使用的那些。使用标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及患者治疗。

[0059] 为了更容易地理解本公开内容,精选术语定义如下。

[0060] 术语“抗体”是指一般由 4 条多肽链(两条重(H)链和两条轻(L)链)组成的免疫球蛋白(Ig)分子或其保持 Ig 分子的表位结合特征的功能片段、突变体、变体或衍生物。这类片段、突变体、变体或衍生物抗体形式是本领域已知的。在全长抗体的一个实施方案中,每条重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。CH 由 3 个结构域 CH1、CH2 和 CH3 组成。每条轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。CL 由单一 CL 结构域组成。VH 和 VL 可进一步细分成超变区,称为互补决定区(CDR),中间散布有更保守的区域,称为构架区(FR)。每个 VH 和 VL 一般由按以下顺序自氨基端到羧基端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。免疫球蛋白分子可为任何类型(例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)、类别(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)或亚类。

[0061] 术语“双特异性抗体”是指在其两个结合臂之一(一对 HC/LC)上结合一个抗原(或表位),并且在第二结合臂(不同的 HC/LC 对)上结合不同的抗原(或表位)的抗体。双特异性抗体具有两个截然不同的抗原结合臂(在特异性和 CDR 序列两个方面),并且对于其所结合的各抗原而言是单价的。双特异性抗体包括通过四源杂交瘤技术(Milstein 和 Cuello (1983) Nature 305(5934):537-40)、通过两种不同的单克隆抗体的化学缀合(Staerz 等(1985) Nature 314(6012):628-31)或通过 knob-into-hole 或将突变引入 Fc 区的类似方法(Holliger 等(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(14):6444-6448)产生的那些双特异性抗体。

[0062] “亲和力成熟的”抗体是在其一个或多个 CDR 中具有一种或多种改变的抗体,与没有这些改变的亲本抗体相比,所述改变导致抗体对抗原的亲和力改进。示例性的亲和力成熟的抗体将对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲和力。亲和力成熟的抗体通过本领域已知方法来产生。Marks 等(1992) BioTechnology 10:779-783 描述了通过 VH 和 VL 结构域改组的亲和力成熟。Barbas 等(1994) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813; Schier 等(1995) Gene 169:147-155; Yelton 等(1995) J. Immunol. 155:1994-2004; Jackson 等(1995) J. Immunol. 154(7):3310-9; Hawkins 等(1992) J. Mol. Biol. 226:889-896 描述了 CDR 和 / 或框架残基的随机诱变,以及美国专利号 6,914,128 描述了在选择性诱变位置、接触或超变位置上具有活性提高的氨基酸残基的突变。

[0063] 术语“CDR 移植抗体”是指包含重链和轻链可变区序列的抗体,其中 VH 和 / 或 VL 的一个或多个 CDR 区的序列被另一抗体的 CDR 序列置换。例如,两种抗体可来自不同的物种,例如具有鼠重链和轻链可变区的抗体,其中一个或多个鼠 CDR 被人 CDR 序列置换。

[0064] 术语“人源化抗体”是指来自非人物种、已被变得更“像人的”(即更类似于人种序列)的抗体。人源化抗体的一个类型是其中非人 CDR 序列被引入到人 VH 和 VL 序列中以置换相应的人 CDR 序列的 CDR 移植抗体。“人源化抗体”亦是这样的抗体或其变体、衍生物、类似物或片段,其包含基本上具有人抗体的氨基酸序列(例如与之有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 同一性)的构架区(FR)序列和基本上具有非人抗体的氨基酸序列的至少一个 CDR。人源化抗体可包含基本上所有或至少一个、通常两个可变结构域(Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv),其中所有或基本上所有的 CDR 区的序列对应于非人免疫球蛋白(即供体抗体)的序列,且所有或基本上所有的 FR 区的序列为人免疫球蛋白的序列。人源化抗体还可包括重链的 CH1、铰链、CH2、CH3 和 CH4 区。在一个实施方案中,人

源化抗体还包含人免疫球蛋白 Fc 区的至少一部分。在一些实施方案中,人源化抗体只含有人源化轻链。在一些实施方案中,人源化抗体只含有人源化重链。在一些实施方案中,人源化抗体只含有轻链的人源化可变结构域和 / 或重链的人源化可变结构域。在一些实施方案中,人源化抗体含有轻链以及重链的至少可变结构域。在一些实施方案中,人源化抗体含有重链以及轻链的至少可变结构域。

[0065] 术语“双重可变结构域结合蛋白”和“双重可变结构域免疫球蛋白”是指在其两个结合臂的每个上(例如一对 HC/LC)具有两个可变结构域的结合蛋白(参见 PCT 公布号 WO 02/02773),其每一个能够与抗原结合。在一个实施方案中,每个可变结构域结合不同的抗原或表位。在另一个实施方案中,每个可变结构域结合相同的抗原或表位。在另一个实施方案中,双重可变结构域结合蛋白具有两个相同的抗原结合臂,其具有相同的特异性和相同的 CDR 序列,并且对其所结合的每个抗原而言是二价的。在一个实施方案中,DVD 结合蛋白可以是单特异性的(即能够结合一种抗原)或多特异性的(即能够结合两种或更多种抗原)。包含两条重链 DVD 多肽和两条轻链 DVD 多肽的 DVD 结合蛋白称为 DVD-IgTM。在一个实施方案中,四链 DVD 结合蛋白的每一半包含重链 DVD 多肽和轻链 DVD 多肽及两个抗原结合部位。在一个实施方案中,每个结合部位包含重链可变结构域和轻链可变结构域,其中每个抗原结合部位共有 6 个 CDR 参与抗原结合。

[0066] 术语“抗独特型抗体”是指针对另一抗体的抗原结合部位的氨基酸序列产生的抗体。可给予抗独特型抗体以提高针对抗原的免疫应答。

[0067] 术语“生物活性”是指分子的任一种或多种生物学性质(不论如体内存在一样是天然存在的,还是通过重组方法提供或使之成为可能)。生物学性质包括但不限于结合受体、诱导细胞增殖、抑制细胞生长、诱导其它细胞因子、诱导细胞凋亡和酶促活性。

[0068] 术语“中和”是指当结合蛋白特异性结合抗原时抵消抗原的生物活性。在一个实施方案中,中和结合蛋白结合抗原(例如细胞因子)并降低其生物活性达至少约 20%、40%、60%、80%、85% 或更高。

[0069] “特异性”是指结合蛋白选择性结合抗原的能力。

[0070] “亲和力”是结合蛋白和抗原之间的相互作用的强度,并取决于结合蛋白 CDR 的序列以及抗原的性质,例如其大小、形状和 / 或电荷。可针对提供所需治疗终点同时使负面副作用最小化的亲和力来选择结合蛋白。亲和力可采用本领域技术人员已知方法测量(US 20090311253)。

[0071] 术语“效价”是指结合蛋白达到所需作用的能力,并且是其治疗功效的度量。效价可采用本领域技术人员已知的方法评价(US 20090311253)。

[0072] 术语“交叉反应性”是指结合蛋白结合非其产生所针对的靶标的某一靶标的的能力。结合蛋白一般可以适当高的亲和力结合其靶组织 / 抗原,但对非靶正常组织将显示适当的亲和力。一般选择符合两个标准的各结合蛋白。(1) 适于抗体靶已知表达的组织染色。(2) 来自相同器官的人和 tox 物种(小鼠和食蟹猴)组织之间的相似染色模式。评价交叉反应性的这些和其它方法是本领域技术人员已知的(US 20090311253)。

[0073] 术语“生物学功能”是指结合蛋白具体的体外或体内作用。结合蛋白可通过多种作用机制靶向若干类别的抗原并达到所需治疗结果。结合蛋白可靶向可溶性蛋白、细胞表面抗原以及胞外蛋白质沉积物。结合蛋白可识别、拮抗或中和其靶标的活性。结合蛋白可

有助于其所结合的靶标的清除,或当与细胞结合时可引起细胞毒性。两种或更多种抗体的部分可掺入多价形式中以在单个结合蛋白分子中实现不同的功能。用于评价生物学功能的体外测定法和体内模型是本领域技术人员已知的(US 20090311253)。

[0074] “稳定的”结合蛋白是其中在贮存时结合蛋白基本保持其物理稳定性、化学稳定性和/或生物活性的结合蛋白。在不同温度下在体外长时间段保持稳定的多价结合蛋白是合乎需要的。稳定结合蛋白和评价其在不同温度下的稳定性的方法是本领域技术人员已知的(US 20090311253)。

[0075] 术语“溶解度”是指蛋白质保持分散在水溶液中的能力。蛋白质在含水制剂中的溶解度取决于疏水和亲水氨基酸残基的适当分布,因此,溶解度可能与正确折叠的蛋白质的产生相关联。本领域技术人员将能够采用本领域技术人员已知的常规 HPLC 技术和方法(US 20090311253),检测结合蛋白溶解度的增加或降低。

[0076] 结合蛋白可使用多种宿主细胞产生,或可体外产生,每次努力的相对收率决定“生产效率”。影响生产效率的因素包括但不限于宿主细胞类型(原核或真核)、表达载体的选择、核苷酸序列的选择和所采用的方法。用于结合蛋白生产的材料与方法和生产效率的测量是本领域技术人员已知的(US 20090311253)。

[0077] 术语“免疫原性”意指物质诱导免疫应答的能力。给予治疗性结合蛋白可导致免疫应答的必然发生。可在选择亲本抗体期间分析可能以多价形式诱导免疫原性的潜在要素,并在将其序列掺入多价结合蛋白形式之前采取降低这种风险的步骤以优化亲本抗体。降低抗体和结合蛋白的免疫原性的方法是本领域技术人员已知的(US 20090311253)。

[0078] 术语“标记”和“可检测标记”意指与特异性结合对的成员(例如抗体或其分析物)连接以赋予特异性结合对的成员之间反应(例如结合)为可检测的部分。特异性结合对的标记的成员称为“可检测标记的”。因此,术语“标记的结合蛋白”是指具有掺入的标记的蛋白质,所述标记提供结合蛋白的鉴定。在一个实施方案中,标记是可产生通过目视或仪器装置可检测的信号的可检测标志物,例如,掺入放射性标记的氨基酸或与可通过标记的抗生物素蛋白检测的生物素部分的多肽连接(例如可通过光学或比色方法检测的含有荧光标志物的链霉抗生物素或酶促活性)。多肽的标记的实例包括但不限于以下:放射性同位素或放射性核素(例如³H、¹⁴C、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁷⁷Lu、¹⁶⁶Ho 或 ¹⁵³Sm);色原、荧光标记(例如FITC、罗丹明、镧系元素磷光体)、酶标记(例如辣根过氧化物酶、萤光素酶、碱性磷酸酶);化学发光标记物;生物素基团;预先确定的被第二报道分子识别的多肽表位(例如亮氨酸拉链对序列、第二抗体的结合部位、金属结合结构域、表位标签);和磁性剂(magnetic agent),例如钆螯合物。常用于免疫测定法的标记的代表性实例包括产生光的部分(例如吡啶化合物)和产生荧光的部分(例如荧光素)。在这一方面,所述部分自身可以不是可检测标记的,但在与另一部分反应时可变成可检测的。

[0079] 术语“缀合物”是指与第二化学部分(例如治疗剂或细胞毒性剂)化学连接的结合蛋白(例如抗体)。术语“作用剂”包括化学化合物、化合物的混合物、生物大分子或从生物材料制备的提取物。在一个实施方案中,治疗剂或细胞毒性剂包括但不限于百日咳毒素、泰素、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、tenoposide、长春新碱、长春碱、秋水仙素、多柔比星、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、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、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌罗霉

素及其类似物或同系物。当在免疫测定法的情况下使用时,缀合物抗体可以是用作检测抗体的可检测标记的抗体。

[0080] 术语“晶体”和“结晶的”是指以晶体形式存在的结合蛋白(例如抗体)或其抗原结合部分。晶体是物质的一种固态形式,它与其它形式例如非晶形固态或液晶态截然不同。晶体由原子、离子、分子(例如蛋白质如抗体)或分子组件(例如抗原/抗体复合物)有序重复的三维排列组成。这些三维排列根据本领域公知的特殊数学关系排列。晶体中重复的基本单元或者构件称作不对称单元。符合给定的清晰可辨的结晶学对称性的排列中的不对称单元的重复提供晶体的“晶胞”。通过所有三个方向的规则平移的晶胞的重复提供晶体。参见 Giege, R. 和 Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999)。

[0081] 术语“载体”是指能将其所连接的另一个核酸转运的核酸分子。载体的一种类型是“质粒”,其是指其中可以连接另外的 DNA 区段的环状双链 DNA 环。载体的另一种类型是病毒载体,其中另外的 DNA 区段可连接到病毒基因组中。其它载体包括 RNA 载体。某些载体能在其所导入的宿主细胞中自主复制(例如有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如非附加型哺乳动物载体)可在导入宿主细胞中时整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。某些载体可指导其有效连接的基因的表达。这样的载体在本文称作“重组表达载体”(或者简称“表达载体”)。一般来说,重组 DNA 技术中使用的表达载体经常是质粒形式。本说明书中,“质粒”和“载体”可以互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,还包括其它形式的表达载体,例如病毒载体(例如复制缺陷逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),它们起同等功能。将一组 pHybE 载体(美国专利申请顺序号 61/021, 282)用于亲本抗体和 DVD- 结合蛋白克隆。衍生自 pJP183; pHybE-hCg1, z, non-a V2 的 V1 用于克隆具有野生型恒定区的抗体和 DVD 重链。衍生自 pJP191; pHybE-hCk V3 的 V2 用于克隆具有 κ 恒定区的抗体和 DVD 轻链。衍生自 pJP192; pHybE-hC1 V2 的 V3 用于克隆具有 λ 恒定区的抗体和 DVD 轻链。由 λ 信号肽和 κ 恒定区构建的 V4 用于克隆具有 λ - κ 杂合 V 结构域的 DVD 轻链。由 κ 信号肽和 λ 恒定区构建的 V5 用于克隆具有 κ - λ 杂合 V 结构域的 DVD 轻链。衍生自 pJP183; pHybE-hCg1, z, non-a V2 的 V7 用于克隆具有 (234, 235 AA) 突变恒定区的抗体和 DVD 重链。

[0082] 术语“重组宿主细胞”或“宿主细胞”是指其中已引入外源 DNA 的细胞。该术语不仅是指特定的受试细胞,而且还指这类细胞的后代。因为由于突变或环境影响所致,可能在传代中出现某些修饰,所以所述后代实际上可能与亲本细胞不同,但仍包括在如本文所用术语“宿主细胞”的范围内。在一个实施方案中,宿主细胞包括原核和真核细胞。在另一个实施方案中,真核细胞包括原生生物、真菌、植物和动物细胞。在另一个实施方案中,宿主细胞包括但不限于原核细胞系大肠杆菌;哺乳动物细胞系 CHO、HEK 293、COS、NS0、SP2 和 PER.C6;昆虫细胞系 Sf9 和真菌细胞酿酒酵母 (*saccharomyces cerevisiae*)。

[0083] 术语“转染”包括常用于将外源核酸(例如 DNA)导入宿主细胞的多种技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等。

[0084] 术语“细胞因子”是指由一种细胞群释放的作为胞内间质作用于另一种细胞群的蛋白质。术语“细胞因子”包括来自天然来源的蛋白质或来自重组细胞培养物的蛋白质以

及天然序列细胞因子的生物活性等同物。

[0085] 术语“生物样品”意指来自生物或之前为生物的一定数量的物质。这类物质包括但不限于血液（例如全血）、血浆、血清、尿液、羊水、滑液、内皮细胞、白细胞、单核细胞、其它细胞、器官、组织、骨髓、淋巴结和脾。

[0086] 术语“组分”是指组合物的成分。例如，与诊断试剂盒有关时，组分可以是捕获抗体、检测或缀合物抗体、对照、校准物、系列校准物、灵敏度板 (sensitivity panel)、容器、缓冲剂、稀释剂、盐、酶、酶的辅因子、检测试剂、预处理试剂 / 溶液、底物（例如作为溶液）、终止液等，其可包括在试剂盒中用于试验样品的测定。因此，“组分”可包括例如通过与抗分析物（例如抗多肽）抗体结合而固定在固相支持体上的上述多肽或其它分析物。一些组分可以在溶液或冻干以重配用于测定。

[0087] “对照”是指已知不是分析物（“阴性对照”）或含有分析物（“阳性对照”）的组合物。阳性对照可以包含已知浓度的分析物。在本文可互换使用“对照”、“阳性对照”和“校准物”，以指包含已知浓度的分析物的组合物。“阳性对照”可用于确立测定性能特性，并且是试剂（例如分析物）完整性的有用指示物。

[0088] “预定截断值 (Predetermined cutoff)”和“预定水平”一般是指测定截断值，其用于通过将测定结果与预定截断值 / 水平进行比较，来评价诊断 / 预测 / 治疗功效结果，其中预定截断值 / 水平已经与各种临床参数（例如疾病严重程度、进展 / 无进展 / 改善等）关联或相关。虽然本公开内容可以提供示例性预定水平，但众所周知，截断值可能随免疫测定的性质（例如所采用的抗体等）而变化。另外，完全在本领域技术人员的一般能力内的是，根据此公开内容，针对其它免疫测定对本文的公开内容进行改动以获得所述其它免疫测定的免疫测定专用的截断值。尽管预定截断值 / 水平的精确值可能在测定之间不同，但本文所述的相关性（如果存在的话）应当是普遍适用的。

[0089] “预处理试剂”，例如用于本文所述断测定裂解、沉淀和 / 或增溶试剂，是将存在于测试样品中的任何细胞裂解和 / 或任何分析物增溶的试剂。如本文进一步所述，预处理不是所有样品所必需的。此外，使分析物（例如目标多肽）增溶可能需要分析物从样品中存在的任何内源结合蛋白中释放。预处理试剂可以是均质的（不需要分离步骤）或异质的（需要分离步骤）。使用异质性预处理试剂时，在进行到测定的下一个步骤前，从测试样品将任何沉淀的分析物结合蛋白取出。

[0090] 在本文所述免疫测定法和试剂盒的情况下，“质量控制试剂”包括但不限于校准物、对照和灵敏度板。为了确立校准（标准）曲线以内推分析物（例如抗体或分析物）的浓度，通常使用“校准物”或“标准”（例如一种或多种，例如多种）。或者，可以使用接近预定阳性 / 阴性截断值的单个校准物。可以共同使用多种校准物（即多于一种校准物或不同量的校准物），从而构成“灵敏度板”。

[0091] 术语“特异性结合配偶体”是特异性结合对的成员。特异性结合对包含两个不同的分子，其通过化学或物理手段彼此特异性结合。因此，除了抗原和抗体特异性结合，其它特异性结合对可以包括生物素和抗生物素蛋白（或链霉抗生物素）、碳水化合物和凝集素、互补核苷酸序列、效应物与受体分子、辅因子和酶、酶抑制物和酶等。此外，特异性结合对可以包括作为最初特异性结合成员的类似物的成员，例如分析物 - 类似物。免疫反应性特异性结合成员包括抗原、抗原片段和抗体，包括单克隆抗体和多克隆抗体及其复合物、片段和

变体（包括变体的片段），无论是分离的还是重组产生的。

[0092] 术语“Fc 区”界定免疫球蛋白重链的 C 端区，它可以通过木瓜蛋白酶消化完整抗体来产生。Fc 区可以是天然序列 Fc 区或变体 Fc 区。免疫球蛋白的 Fc 区一般包含 2 个恒定结构域 CH2 结构域和 CH3 结构域，且任选包含 CH4 结构域。Fc 部分中改变抗体效应子功能的氨基酸残基置换是本领域已知的（例如美国专利号 5,648,260 和 5,624,821）。Fc 区介导几种重要的效应子功能，例如细胞因子诱导、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC）、吞噬作用、补体依赖性细胞毒性（CDC）以及抗体和抗原-抗体复合物的半寿期/清除率。根据治疗目的，在一些情况下这些效应子功能对于治疗性免疫球蛋白是所需的，但在其它情况下可能是不必要的或甚至有害的。

[0093] 术语结合蛋白的“抗原结合部分”意指结合蛋白（例如抗体）的一个或多个片段，其保留与抗原特异性结合的能力。结合蛋白的抗原结合部分可通过特异性结合两种或更多种不同的抗原的全长抗体的片段以及双特异性、双重特异性或多特异性形式来实现。包含在术语结合蛋白的“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括 (i) Fab 片段，一种由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段；(ii) F(ab')₂ 片段，一种包含由铰链区的二硫键连接的 2 个 Fab 片段的二价片段；(iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；(iv) 由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段；(v) dAb 片段，它包含单个可变结构域；和 (vi) 分离的互补性决定区（CDR）。此外，尽管 Fv 片段的 2 个结构域 VL 和 VH 由单独的基因编码，但它们可以使用重组方法通过合成接头来连接，所述合成接头使得它们能够作为单条蛋白质链制备，在所述单条蛋白质链中，VL 和 VH 区配对以形成单价分子（已知为单链 Fv（scFv））。预期所述单链抗体也包含在术语抗体的“抗原结合部分”内。还包含其它形式的单链抗体，例如双抗体。此外，单链抗体还包括包含一对串联 Fv 区段（VH-CH1-VH-CH1）的“线性抗体”，所述串联 Fv 区段连同互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区。

[0094] 术语“多价结合蛋白”意指包含两个或更多个抗原结合部位的结合蛋白。在一个实施方案中，多价结合蛋白被工程改造为具有 3 个或更多个抗原结合部位，且不是天然存在的抗体。术语“多特异性结合蛋白”是指能够结合两种或更多种相关或无关靶的结合蛋白。在一个实施方案中，本文提供的双重可变结构域（DVD）结合蛋白包含两个或更多个抗原结合部位，并且是四价或多价结合蛋白。

[0095] 术语“接头”意指氨基酸残基或包含通过用来连接两个多肽（例如两个 VH 或两个 VL 结构域）的肽键连接的两个或更多个氨基酸残基的多肽。这类接头多肽是本领域众所周知的（参见例如 Holliger 等（1993）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448；Poljak 等（1994）*Structure* 2:1121-1123）。

[0096] 术语“Kabat 编号”、“Kabat 定义”和“Kabat 标记”在本文中可交互使用。被本领域公认的这些术语是指对比抗体或其抗原结合部分的重链和轻链可变区中的其它氨基酸残基更可变（即超变）的氨基酸残基进行编号的系统（Kabat 等（1971）*Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391 和 Kabat 等（1991）*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版，U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242）。对于重链可变区，对于 CDR1，超变区的范围为氨基酸位置 31-35，对于 CDR2 为氨基酸位置 50-65，对于 CDR3 为氨基酸位置 95-102。对于轻链可变区，对于 CDR1，超变区的范围为氨基酸位置 24-34，对于 CDR2 为氨基酸位置 50-56，对于 CDR3 为氨基酸位置 89-97。

[0097] 术语“CDR”意指免疫球蛋白可变区序列内的互补性决定区。在重链和轻链的每个可变区中有 3 个 CDR,对于重链和轻链可变区的每一个,其被称为 CDR1、CDR2 和 CDR3。术语“CDR 组”是指在能够结合抗原的单个可变区中存在的一组 3 个 CDR。已经根据不同系统对这些 CDR 的精确界限进行了不同定义。Kabat 描述的系统 (Kabat 等 (1987) 和 (1991)) 不仅提供了适用于抗体的任何可变区的明确的残基编号系统,而且还提供了定义这三个 CDR 的精确残基界限。这些 CDR 可称为 Kabat CDR。Chothia 及其同事 (Chothia 和 Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia 等 (1989) *Nature* 342:877-883) 发现, Kabat CDR 内的某些亚部分采取了几乎相同的肽骨架构象,尽管在氨基酸序列水平上具有很大差异。这些亚部分被命名为 L1、L2 和 L3,或者 H1、H2 和 H3,其中“L”和“H”分别表示轻链和重链区。这些区域可以称为 Chothia CDR,其具有与 Kabat CDR 重叠的界限。Padlan ((1995) *FASEB J.* 9:133-139) 和 MacCallum ((1996) *J. Mol. Biol.* 262(5):732-45)) 描述了定义与 Kabat CDR 重叠的 CDR 的其它界限。还有其它 CDR 界限定义可能没有严格遵照本文系统之一,但是仍然与 Kabat CDR 重叠,尽管根据特定残基或残基组或甚至整个 CDR 不显著影响抗原结合的预测或实验研究结果,它们可以被缩短或延长。本文使用的方法可采用根据这些系统任一个定义的 CDR,尽管某些实施方案采用 Kabat 或 Chothia 定义的 CDR。

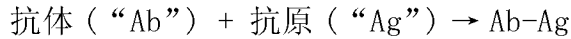
[0098] 术语“表位”意指被结合蛋白结合的抗原的区域,例如能够特异性结合免疫球蛋白或 T 细胞受体的多肽和 / 或其它决定簇。在某些实施方案中,表位决定簇包括分子例如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基的化学活性表面群聚,而在某些实施方案中,可以具有特定的三维结构特征和 / 或特定的电荷特征。在一个实施方案中,表位包含已知结合特定结合配偶体上的互补部位的抗原 (或其片段) 区域的氨基酸残基。抗原片段可含有一个以上表位。在某些实施方案中,结合蛋白当识别其在蛋白质和 / 或大分子的复杂混合物中的靶抗原时,特异性地结合抗原。如果抗体交叉竞争 (一个阻止另一个的结合或调变作用),则结合蛋白“结合相同表位”。另外,表位的结构定义 (重叠、类似、相同) 是提供信息的,功能定义包括结构 (结合) 和功能 (调变、竞争) 参数。蛋白质的不同区域可执行不同的功能。例如细胞因子的特定区域与其细胞因子受体相互作用以引起受体活化,而可能需要蛋白质的其它区域以稳定细胞因子。为了消除细胞因子信号转导的负面作用,可用特异性结合受体相互作用区的结合蛋白靶向细胞因子,从而防止其受体的结合。或者,结合蛋白可靶向负责细胞因子稳定的区域,从而指示蛋白质进行降解。表位识别可视化和建模的方法是本领域技术人员已知的 (US 20090311253)。

[0099] “药代动力学”是指药物籍此被生物吸收、分布、代谢和分泌的过程。为了产生具有所需药代动力学特征的多价结合蛋白分子,选择具有类似所需的药代动力学特征的亲本单克隆抗体。可采用本领域技术人员已知方法 (US 20090311253),容易地在啮齿动物中测定所选择的亲本单克隆抗体的 PK 特征。

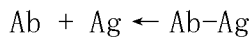
[0100] “生物利用度”是指在给药后达到其靶标的活性药物的量。生物利用度随几个之前描述的性质而变化,包括稳定性、溶解度、免疫原性和药代动力学,并可采用本领域技术人员已知方法评价 (US 20090311253)。

[0101] 术语“表面等离子体共振”意指允许通过例如采用 BIAcore® 系统 (BIAcore International AB, GE Healthcare company, Uppsala, Sweden 和 Piscataway, NJ) 检测生物传感器基质内蛋白质浓度的变化,来分析实时生物特异性相互作用的光学现象。有关更

多的描述,参见 Jönsson 等 (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26。术语“Kon”意指结合蛋白(例如抗体或 DVD-Ig 蛋白)与抗原缔合形成例如 DVD-Ig/抗原复合物的结合速率常数。术语“Kon”还指“缔合速率常数”,或“ka”,在本文可互换使用。表明结合蛋白与其靶抗原的结合速率或结合蛋白(例如抗体)与抗原之间形成复合物的速率的该值亦通过下列方程式表示:



如本领域已知,术语“Koff”意指结合蛋白(例如抗体或 DVD-Ig 蛋白)从例如 DVD-Ig 蛋白/抗原复合物解离的解离速率常数,或“分离速率常数”。该值表示结合蛋白(例如抗体)从其靶抗原的解离速率或 Ab-Ag 复合物随时间推移分离成游离抗体和抗原的解离速率,如以下方程式所示:



术语“ K_d ”和“平衡解离常数”意指在滴定测量中在平衡时获得的值、或者通过将解离速率常数(Koff)除以结合速率常数(Kon)所获得的值。使用结合速率常数、解离速率常数和平衡解离常数表示结合蛋白(例如抗体或 DVD-Ig 蛋白)对抗原的结合亲和力。确定结合和解离速率常数的方法是本领域众所周知的。使用基于荧光的技术提供了高灵敏度以及在生理缓冲液中在平衡时检查样品的能力。可以采用其它实验途径和仪器例如 BIAcore®(生物分子相互作用分析)测定法(例如仪器可获自一家 GE Healthcare 公司 BIAcore International AB, Uppsala, Sweden)。另外,也可以使用可以从 Sapidyne Instruments (Boise, Idaho) 获得的 KinExA®(动态排斥测定法(Kinetic Exclusion Assay))测定。

[0102] 术语“变体”意指通过氨基酸的添加(例如插入)、缺失或保守取代而在氨基酸序列上不同于给定多肽,但保持该给定多肽的生物活性(例如变体 IL-17 抗体可与抗 IL-17 抗体竞争结合 IL-17)的多肽。氨基酸保守取代,即将氨基酸用具有相似特性(例如亲水性和带电区域的程度和分布)的不同氨基酸置换,在本领域被公认为通常涉及较少改变。如本领域所理解的,可以部分通过考虑氨基酸的亲水指数来鉴定这些较少的改变(参见例如 Kyte 等 (1982) *J. Mol. Biol.* 157: 105-132)。氨基酸的亲水指数基于对其疏水性和电荷的考虑。本领域已知,可以取代蛋白质中有相似亲水指数的氨基酸,并且蛋白质仍然保持蛋白质功能。一方面,亲水指数为 ± 2 的氨基酸被取代。也可以使用氨基酸亲水性来揭示将导致蛋白质保持生物学功能的取代。在肽的情况下,考虑氨基酸的亲水性允许计算该肽的最大局部平均亲水性,这是已报道的与抗原性和免疫原性良好关联的有用度量(参见例如美国专利号 4,554,101)。如本领域所理解的,具有相似亲水性值的氨基酸的取代可以产生保持生物活性(例如免疫原性)的肽。一方面,取代用亲水性值彼此为 ± 2 以内的氨基酸来进行。氨基酸的疏水性指数和亲水性值都受该氨基酸的特定侧链影响。与该观察一致,认为与生物学功能相容的氨基酸取代取决于通过疏水性、亲水性、电荷、大小和其它特性显示的氨基酸、特别是所述氨基酸侧链的相对相似性。术语“变体”还包括已经过不同加工(例如蛋白酶解、磷酸化或其它翻译后修饰),仍然保持其生物活性或抗原反应性(例如结合 IL-17 的能力)的多肽或其片段。术语“变体”包括变体的片段,除非另有限定。变体可与野生型序列有 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76% 或 75% 同一性。

[0103] I. 结合蛋白的产生

提供能够结合 IL-13 和 / 或 IL-17 的结合蛋白和制备所述结合蛋白的方法。结合蛋白可采用各种技术产生。提供产生结合蛋白的表达载体、宿主细胞和方法,所述表达载体、宿主细胞和方法是本领域众所周知的。

[0104] A. 亲本单克隆抗体的产生

DVD 结合蛋白的可变结构域可获自亲本抗体,包括能够结合目标抗原的多克隆 Ab 和 mAb。这些抗体可以是天然存在的或可通过重组技术产生。本领域的普通技术人员十分熟悉用于产生抗体的许多方法,包括但不限于采用杂交瘤技术、选定淋巴细胞抗体方法 (SLAM)、使用噬菌体、酵母或 RNA-蛋白质融合物展示或其它文库、使包含至少一些人免疫球蛋白基因座的非人动物免疫以及嵌合、CDR 移植和人源化抗体的制备。参见例如美国专利公布号 20090311253 A1。可变结构域还可采用亲和力成熟技术制备。

[0105] B. 选择亲本单克隆抗体的标准

提供一个实施方案,其包括选择具有 DVD 结合蛋白分子中所需要的至少一种或多种性质的亲本抗体。在一个实施方案中,所需性质是一个或多个抗体参数,例如抗原特异性、对抗原的亲和力、效价、生物学功能、表位识别、稳定性、溶解度、生产效率、免疫原性、药代动力学、生物利用度、组织交叉反应性或直系同源抗原结合。参见例如美国专利公布号 20090311253。

[0106] C. 结合蛋白分子的构建

可以设计结合蛋白,使得来自两个不同亲本单克隆抗体的两个不同的轻链可变结构域 (VL) 直接或通过重组 DNA 技术经接头串联连接,接着是轻链恒定结构域 CL。同样,重链包含直接或通过接头串联连接的两个不同的重链可变结构域 (VH),接着是恒定结构域 CH1 和 Fc 区 (图 1)。

[0107] 可变结构域可以采用重组 DNA 技术从亲本抗体获得,所述亲本抗体通过本文所述的任一种方法生成。在一个实施方案中,可变结构域是鼠重链或轻链可变结构域。在另一个实施方案中,可变结构域是 CDR 移植的或人源化的可变重链或轻链结构域。在一个实施方案中,可变结构域是人重链或轻链可变结构域。

[0108] 接头序列可以是单个氨基酸或多肽序列。在一个实施方案中,接头序列的选择基于若干 Fab 分子的晶体结构分析。Fab 或抗体分子结构中可变结构域和 CH1/CL 恒定结构域之间存在一种天然柔性连接。这种天然连接包含约 10-12 个氨基酸残基,由来自 V 结构域 C 端的 4-6 个残基和来自 CL/CH1 结构域 N 端的 4-6 个残基构成。DVD 结合蛋白使用 CL 或 CH1 的 N 端 5-6 个氨基酸残基或 11-12 个氨基酸残基分别作为轻链和重链中的接头来生成。CL 或 CH1 结构域的 N 端残基,特别是头 5-6 个氨基酸残基,可采取环构象而无强的二级结构,因此可以用作两个可变结构域之间的柔性接头。CL 或 CH1 结构域的 N 端残基是可变结构域的天然延伸,因为它们是 Ig 序列的部分,因此其使用使可能由接头和连接处引起的任何免疫原性很大程度地降到最低。

[0109] 在重链、轻链、两链或四链实施方案中任一个的其它实施方案,包括包含以下的至少一个接头:AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO: 1);AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 2);AKTTPKLG (SEQ ID NO: 3);SAKTPKLG (SEQ ID NO: 4);SAKTP (SEQ ID NO: 5);RADAAP (SEQ ID NO: 6);RADAAPTVS (SEQ ID NO: 7);RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO: 8);RADAAA(G₄S)₄ (SEQ ID NO: 9);SAKTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 10);

ADAAP (SEQ ID NO: 11); ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO: 12); TVAAP (SEQ ID NO: 13); TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 14); QPKAAP (SEQ ID NO: 15); QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 16); AKTTPP (SEQ ID NO: 17); AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO: 18); akttap (SEQ ID NO: 19); akttapsvyplap (SEQ ID NO: 20); ASTKGP (SEQ ID NO: 21); ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 22), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 23); GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO: 24); GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 25); 或 GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO: 26); TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 27); ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 28); 或基于 G/S 的序列 (例如 G4S 重复序列; SEQ ID NO: 29)。在一个实施方案中, X2 为 Fc 区。在另一个实施方案中, X2 为变体 Fc 区。

[0110] 其它接头序列可包括 CL/CH1 结构域的任何长度但非 CL/CH1 结构域的所有残基的任何序列; 例如 CL/CH1 结构域的头 5-12 个氨基酸残基; 轻链接头可来自 C κ 或 C λ ; 重链接头可来源于任何同种型的 CH1, 包括 C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4、C α 1、C α 2、C δ 、C ϵ 和 C μ 。接头序列还可来源于其它蛋白质例如 Ig 样蛋白 (例如 TCR、FcR、KIR); 基于 G/S 的序列 (例如 G4S 重复序列; SEQ ID NO: 29); 铰链区来源的序列和来自其它蛋白质的其它天然序列。

[0111] 在一个实施方案中, 采用重组 DNA 技术使恒定结构域与 2 个连接的可变结构域连接。在一个实施方案中, 包含连接的重链可变结构域的序列与重链恒定结构域连接, 且包含连接的轻链可变结构域的序列与轻链恒定结构域连接。在一个实施方案中, 恒定结构域分别是人重链恒定结构域和人轻链恒定结构域。在一个实施方案中, DVD 重链与 Fc 区进一步连接。Fc 区可以是天然序列 Fc 区或变体 Fc 区。在另一个实施方案中, Fc 区是人 Fc 区。在另一个实施方案中, Fc 区包括来自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE 或 IgD 的 Fc 区。

[0112] 在另一个实施方案中, 将 2 条重链 DVD 多肽和 2 条轻链 DVD 多肽组合, 以形成 DVD 结合蛋白。表 1A-1C 列出了用于治疗疾病的示例性抗体的 VH 和 VL 区氨基酸序列。在一个实施方案中, 提供了以任何方向包含表 1A-1C 所列 VH 和 / 或 VL 区的至少两个的 DVD-Ig 蛋白。在一些实施方案中, VD1 和 VD2 是独立地选择的。因此, 在一些实施方案中, VD1 和 VD2 包含相同的 SEQ ID NO, 而在其它实施方案中, VD1 和 VD2 包含不同的 SEQ ID NO。下面提供的 VH 和 VL 结构域序列包含本领域中已知的或使用本领域已知的方法容易识别的互补性决定区 (CDR) 和构架序列。在一些实施方案中, 用来自本领域已知的结合相同抗原的结合蛋白的其它 CDR 和 / 或构架序列置换这些 CDR 和 / 或构架序列中的一个或多个而不丧失功能。

[0113] 表 1A: 用于产生结合蛋白包括多价结合蛋白的抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列列表 (CDR 序列用黑体字表示)

SEQ ID No.	ABT 唯一 ID	蛋白质区	序列 1234567890123456789012345678901234567890
30	AB397VH	VH-IL13 (seq. 1)	EVTLRRESGPGLVKPTQTLTLTCTLYGFSLSTSDMGVDWIR QPPGKGLEWLAHIWDDVKRYNPALKSRLTISKDTSKNQV VLKLTSDVDPVDATATYYCARTVSSGGYIYYAMDYWGQGLVT VSS
31	AB397VL	VL-IL13 (seq. 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITSCRASQDIRNYLNWYQQKP GKAPKLLIFYTSKLSHSGVPSRFRSGSGSGTDYTLTISLQF EDIATYYCQOGLTPPLTFGGGTKVEIKR
32	AB398VH	VH-IL13 (seq. 2)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCKASGYTFITYGVSWVRQA PGQGLEWMGEIYPGNYNTYYNEKFRGRVTMTDTSTSTAY MELRSLRSDDTAVYYCARWRYSYFSDYGYFDYWGQGTITV VSS
33	AB398VL	VL-IL13 (seq. 2)	DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSHGNTYLLHW YQQRPGQSPRLLIYTVSNRFRSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGGGTKVEIKR
34	AB399VH	VH-IL13 (seq. 3)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCKASGYTFITYGVSWVRQA PGQGLEWIGNINPKGGSNIYNEKFRGRVTMTDRDTSISTAY MELRSLRSDDTAVYYCARLDYFGDSFDLWGQGTITVTVSS
35	AB399VL	VL-IL13 (seq. 3)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDIRNYLNWYQQKP GKAPKLLIYASNLEVGVPSRFRSGSGSGTDYTLTISLQF EDFATYYCQQDNRFYTFGGGTKVEIKR
36	AB273VH	VH-IL17 (seq. 1)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSCKASGYTFDYEIHWVRQA PGQGLEWMGVNDPESGGTFYFNQKFDGRVTLTADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCTRYSKWDSFDGMDYWGQGTITVTVS S
37	AB273VL	VL-IL17 (seq. 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASSGIISYIDWFQQKP GKAPKRLIYATFDLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTISLQF EDFATYYCRQVGSYPETFGQGTKLEIKR
38	AB274VH	VH-IL17 (seq. 2)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSCKASGGSPGGYIGWVRQA PGQGLEWMGGITPFFFGFADYAQKFRVITTADESTTTAY MELSGLTSDDTAVYYCARDPNEFWNGYYSTHDFDSWGQGT TVTSS
39	AB274VL	VL-IL17 (seq. 2)	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQDIGSELHWYQQKP DQPPKLLIKYASHSTSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTINGLEA EDAGTYCHQTDLSLPHYTFGPGTKVDIKR
40	AB275VH	VH-IL17 (seq. 3)	EVQLVQSGAEVKKPGEVKISCKASGGSPFRSYGISWVRQA PGQGLEWMGGITHFFGITDYAQKFRVITTADESTTTAY MELSGLTSDDTAVYYCAREPNDFWNGYYDTHDFDSWGQGT TVTSS
41	AB275VL	VL-IL17 (seq. 3)	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQNIQSELHWYQQKP DQSPKLLIKYASHSISGVPSRFRSGSGSGTDFTLTINGLEA EDAATYYCHQSDTLPHYTFGQGTKVDIKR

表 1B. 来自用于产生结合蛋白包括多价结合蛋白的亲和力成熟克隆的各 IL-17 VH 序列

IL-17 VH 序列				
SEQ ID No.	蛋白质区			序列
				123456789012345678901234567890
42	h10f7VH.1 a.glm VH			EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFT DYEIHWVRQAPGQGLEWIGVNDPESGGTFY NQKFDGRATLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTRYRYYESFYGM DYWGQGT TTVT V S
	h10f7VH.1 a.glm VH	CDR-H1	SEQ ID NO.42 的残基 31-35	DYEIH
	h10f7VH.1 a.glm VH	CDR-H2	SEQ ID NO.42 的残基 50-66	VNDPESGGTFYNQKFDG
	h10f7VH.1 a.glm VH	CDR-H3	SEQ ID NO.42 的残基 99-110	YRYYESFYGM DY
43	J439M1S3 R5#10 VH			EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYT F D DYEIHWVRQAPGQGLEWIGVNDPESGGTFY NQKFDGRATLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTRYDKWDSFYGM DYWGQGT TTVT V S
	J439M1S3 R5#10 VH	CDR-H1	SEQ ID NO.43 的残基 31-35	DYEIH
	J439M1S3 R5#10 VH	CDR-H2	SEQ ID NO.43 的残基 50-66	VNDPESGGTFYNQKFDG
	J439M1S3 R5#10 VH	CDR-H3	SEQ ID NO.43 的残基 99-110	YDKWDSFYGM DY
44	J439M1S3 R5#11 VH			EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYT FT DYEIHWVRQAPGQGLEW MGVNDPESGGTFY NQKFDGRVTLT ADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTRYSKWDSFDGM DYWGQGT TTVT V S
	J439M1S3 R5#11 VH	CDR-H1	SEQ ID NO.44 的残基 31-35	DYEIH
	J439M1S3 R5#11 VH	CDR-H2	SEQ ID NO.44 的残基 50-66	VNDPESGGTFYNQKFDG
	J439M1S3 R5#11 VH	CDR-H3	SEQ ID NO.44 的残基 99-110	YSKWDSFDGM DY

IL-17 VH 序列				
SEQ ID No.	蛋白质区			序列
				123456789012345678901234567890
45	J439M1S2 (H)3 #A6 VH			EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFT DYEIHWVRQAPGQGLEWIGVNDPDSGGTLY NQKFDGRVTLTADDESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTRYDKWYSFEGMDIWGQGT TTVTVS S
	439M1S2 (H)3 #A6 VH	CDR-H1	SEQ ID NO.45 的残基 31-35	DYEIH
	439M1S2 (H)3 #A6 VH	CDR-H2	SEQ ID NO.45 的残基 50-66	VNDPDSGGTLYNQKFDG
	439M1S2 (H)3 #A6 VH	CDR-H3	SEQ ID NO.45 的残基 99-110	YDKWYSFEGMDI
46	J439M1S2 (H)3 #A11 VH			EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFT DYEIHWVRQAPGQGLEWIGVNDPESGGTFY NQKFDGRVTLTSADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTRYDKYWSFEGMDYWGQGT TTVTVS S
	J439M1S2 (H)3 #A11 VH	CDR-H1	SEQ ID NO.46 的残基 31-35	DYEIH
	J439M1S2 (H)3 #A11 VH	CDR-H2	SEQ ID NO.46 的残基 50-66	VNDPESGGTFYNQKFDG
	J439M1S2 (H)3 #A11 VH	CDR-H3	SEQ ID NO.46 的残基 99-110	YDKYWSFEGMDY
47	J439M1S2 (H)3 #A16 VH			EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFS DYEIHWVRQAPGQGLEWIMGVNDPESGGTFY NQKFDGRVTLTADDESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTRYDKWYSFEGMDIWGQGT TTVTVS S
	J439M1S2 (H)3 #A16 VH	CDR-H1	SEQ ID NO.47 的残基 31-35	DYEIH
	J439M1S2 (H)3 #A16 VH	CDR-H2	SEQ ID NO.47 的残基 50-66	VNDPESGGTFYNQKFDG
	J439M1S2 (H)3 #A16 VH	CDR-H3	SEQ ID NO.47 的残基 99-110	DKWYSFEGMDI

IL-17 VH 序列				
SEQ ID No.	蛋白质区			序列
				123456789012345678901234567890
48	J439M1S2 (H)3 #B13 VH			EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFS DYEIHWVRQAPGQGLEWMGVNDPESGGTFY NQKFDGRVTLTADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTRYDKYWSFEGMDYWGQGTITVTVS S
	J439M1S2 (H)3 #B13 VH	CDR-H1	SEQ ID NO.48 的残基 31-35	DYEIH
	J439M1S2 (H)3 #B13 VH	CDR-H2	SEQ ID NO.48 的残基 50-66	VNDPESGGTFYNQKFDG
	J439M1S2 (H)3 #B13 VH	CDR-H3	SEQ ID NO.48 的残基 99-110	DKYWSFEGMDY
49	J439M1S2 (H)3 #B20 VH			EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFT DYEIHWVRQAPGQGLEWMGVNDPESGGTFY NQKFDGRVTLTADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTRYDKWYSFEGMDI WGQGTITVTVS S
	J439M1S2 (H)3 #B20 VH	CDR-H1	SEQ ID NO.49 的残基 31-35	DYEIH
	J439M1S2 (H)3 #B20 VH	CDR-H2	SEQ ID NO.49 的残基 50-66	VNDPESGGTFYNQKFDG
	J439M1S2 (H)3 #B20 VH	CDR-H3	SEQ ID NO.49 的残基 99-110	DKWYSFEGMDI

表 1C. 来自用于产生结合蛋白包括多价结合蛋白的亲和力成熟克隆的各 IL-17 VL 序列

IL-17 VL 序列				
SEQ ID No.	蛋白质区			序列
				123456789012345678901234567890
50	J439M1S3 R5#10 VL			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSGSI SYIDWFAQKPKGKAPKRLIYATFELASGVPS RFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCHQ LGSPDTPGQGTKLEIK
	J439M1S3 R5#10 VL	CDR-L1	SEQ ID NO:50 的残基 24-34	SASSGSI SYID
	J439M1S3 R5#10 VL	CDR-L2	SEQ ID NO:50 的残基 50-56	ATFELAS
	J439M1S3 R5#10 VL	CDR-L3	SEQ ID NO:50 的残基 89-97	HQLGSPDTP
51	J439M1S3 R5#11 VL			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSGII SYIDWFAQKPKGKAPKRLIYATFDLASGVPS RFSGSGSGTDYTLTITSSLPEDFATYYCRQ VGSYPETFGQGTKLEIK
	J439M1S3 R5#11 VL	CDR-L1	SEQ ID NO:51 的残基 24-34	RASSGII SYID
	J439M1S3 R5#11 VL	CDR-L2	SEQ ID NO:51 的残基 50-56	ATFDLAS
	J439M1S3 R5#11 VL	CDR-L3	SEQ ID NO:51 的残基 89-97	RQVGSYPET

IL-17 VL 序列				
SEQ ID No.	蛋白质区			序列
				123456789012345678901234567890
52	J427M2S3 #12 VL			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSGIISSIDWFQQKPGKAPKRLIYATFALQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCSQMSSYPHTFGQGTKLEIK
	J427M2S3 #12 VL	CDR-L1	SEQ ID NO.52 的残基 24-34	SASSGISSID
	J427M2S3 #12 VL	CDR-L2	SEQ ID NO.52 的残基 50-56	ATFALQS
	J427M2S3 #12 VL	CDR-L3	SEQ ID NO.52 的残基 89-97	SQMSSYPHT
53	J427M2S3 #27 VL			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSDISYLNWFQQKPGKSPKRLIYRTSELQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSSYPWTFGQGTKLEIK
	J427M2S3 #27 VL	CDR-L1	SEQ ID NO.53 的残基 24-34	SASSDISSYLN
	J427M2S3 #27 VL	CDR-L2	SEQ ID NO.53 的残基 50-56	RTSELQS
	J427M2S3 #27 VL	CDR-L3	SEQ ID NO.53 的残基 89-97	QQWSSYPWT
54	J439M1S2 (H)3#A6 VL			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGIRSYIDWFQQKPGKSPKRLIYATFDLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCRQVGNYPGTFGQGTKLEIK
	J439M1S2 (H)3#A6 VL	CDR-L1	SEQ ID NO.54 的残基 24-34	SASQGIRSYID
	J439M1S2 (H)3#A6 VL	CDR-L2	SEQ ID NO.54 的残基 50-56	ATFDLAS
	J439M1S2 (H)3#A6 VL	CDR-L3	SEQ ID NO.54 的残基 89-97	RQVGNYPGT

在下面的实施例部分提供能够结合特定靶的特定 DVD 结合蛋白的详细描述和制备所述 DVD 结合蛋白的方法。

[0114] D. 结合蛋白的产生

本文提供的结合蛋白可通过本领域已知的许多技术的任一种产生。例如，自宿主细胞中表达，其中编码 DVD 重链和 DVD 轻链的表达载体通过标准技术转染至宿主细胞。虽然可能在原核或真核宿主细胞中表达本文提供的 DVD 结合蛋白，但 DVD 结合蛋白在真核细胞（例如哺乳动物宿主细胞）中表达，因为所述真核细胞（特别是哺乳动物细胞）比原核细胞更可能装配和分泌适当折叠的和有免疫活性的 DVD 结合蛋白。

[0115] 在 DVD 蛋白质重组表达的示例性系统中，通过磷酸钙介导的转染将编码 DVD 重链和 DVD 轻链两者的重组表达载体导入 dhfr-CHO 细胞中。在重组表达载体中，将 DVD 重链和

轻链基因各自与 CMV 增强子 / AdMLP 启动子调控元件有效连接, 驱动高水平的基因转录。重组表达载体还带有 DHFR 基因, 其允许使用甲氨喋呤筛选 / 扩增筛选用载体转染的 CHO 细胞。培养选定的转化子宿主细胞以供表达 DVD 重链和轻链, 并且从培养基回收完整 DVD 蛋白质。利用标准分子生物学技术来制备重组表达载体, 转染宿主细胞, 选择转化子, 培养宿主细胞, 并且从培养基回收 DVD 蛋白质。还提供合成本文提供的 DVD 蛋白质的方法, 其通过在合适的培养基中培养本文提供的宿主细胞直到合成 DVD 蛋白质。该方法还可包括从培养基分离 DVD 蛋白质。

[0116] DVD 结合蛋白的一个重要特征是它可按与常规抗体类似的方式制备和纯化。DVD 结合蛋白的产生导致具有所需双重特异性活性的均质单一主要产物, 而无需恒定区的序列修饰或化学修饰。产生“双特异性”、“多特异性”和“多特异性多价”全长结合蛋白的其它之前描述的方法可导致胞内或分泌性产生已装配的无活性、单特异性、多特异性、多价、全长结合蛋白和具有不同结合部位组合的多价全长结合蛋白的混合物。

[0117] 出乎意料的是, 本文提供的“双重特异性多价全长结合蛋白”的设计导致主要装配成所需的“双重特异性多价全长结合蛋白”的双重可变结构域轻链和双重可变结构域重链。

[0118] 至少 50%、至少 75% 和至少 90% 装配的和表达的双重可变结构域免疫球蛋白分子是所需的双重特异性四价蛋白质, 因此具有高的商业用途。因此, 提供在单个细胞中表达双重可变结构域轻链和双重可变结构域重链以产生“双重特异性四价全长结合蛋白”的单一主要产物的方法。

[0119] 提供在单个细胞中表达双重可变结构域轻链和双重可变结构域重链以产生“双重特异性四价全长结合蛋白”的“主要产物”的方法, 其中“主要产物”是超过包含双重可变结构域轻链和双重可变结构域重链的所有所装配的蛋白质的 50%, 例如超过 75% 和超过 90%。

[0120] II. 结合蛋白的用途

鉴于其结合两种或更多种抗原的能力, 可利用常规免疫测定法, 例如酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、放射免疫测定法 (RIA) 或组织免疫组织化学法, 采用本文提供的结合蛋白来检测抗原 (例如生物样品, 例如血清或血浆中的抗原)。结合蛋白用可检测物质直接或间接标记以利于结合或未结合抗体的检测。合适的可检测物质包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料和放射性材料。合适酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶; 合适的辅基复合物的实例包括链霉抗生物素 / 生物素和抗生物素蛋白 / 生物素; 合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹酰氯或藻红蛋白。发光材料的实例包括鲁米诺; 合适的放射性材料的实例包括 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 和 ^{153}Sm 。

[0121] 在一个实施方案中, 本文提供的结合蛋白在体外和体内都能够中和其抗原靶的活性。因此, 在例如含有抗原的细胞培养物中、在具有与本文提供的结合蛋白有交叉反应的抗原的人类受试者中或在其它哺乳动物受试者中, 可使用所述结合蛋白抑制抗原活性。在另一个实施方案中, 提供用于降低患有其中抗原活性是有害的疾病或病症的受试者的抗原活性的方法。可将本文提供的结合蛋白给予人类受试者用于治疗目的。

[0122] 术语“其中抗原活性是有害的病症”欲包括这样的疾病和其它病症, 其中在患有病症的受试者中抗原的存在已表明是或怀疑是所述疾病的病理生理原因或促使所述病症恶化的因素。因此, 其中抗原活性是有害的病症是其中预期抗原活性的降低会减轻病症的症

状和 / 或进展的病症。例如,可通过患有病症的受试者的生物体液中抗原浓度的增加(例如受试者的血清、血浆、滑液等中抗原浓度的增加)证实所述病症。可用本文提供的结合蛋白治疗的病症的非限制性实例包括下文和有关包含结合蛋白的药物组合物的部分论述的那些病症。

[0123] DVD 结合蛋白可用作同时阻断两种不同的靶以提高功效 / 安全性和 / 或增加患者覆盖度的治疗剂。

[0124] 另外,本文提供的 DVD 结合蛋白可应用于组织特异性递送(靶向组织标志物和疾病介质用于提高的局部 PK,因而有较高的功效和 / 或较低的毒性),包括胞内递送(靶向内化受体和胞内分子),递送至脑内(靶向运铁蛋白受体和 CNS 疾病介质以跨过血脑屏障)。DVD 结合蛋白还可用作载体蛋白,通过与抗原的非中和表位结合将抗原递送至特定位置,并且还延长抗原的半寿期。此外,可设计 DVD 结合蛋白与植入患者的医疗装置物理连接或靶向这些医疗装置(参见 Burke 等(2006) *Advanced Drug Deliv. Rev.* 58(3): 437-446; Hildebrand 等(2006) *Surface and Coatings Technol.* 200(22-23): 6318-6324;用于局部药物治疗和感染预防的药物 / 装置组合, Wu (2006) *Biomaterials* 27(11):2450-2467; 矫形装置植入时细胞因子网的介导, Marques (2005) *Biodegradable Systems in Tissue Engineer. Regen. Med.* 377-397)。简单地说,将合适的细胞类型引导至医学植入物的位置可促进愈合并恢复正常的组织功能。或者,还提供在装置植入时释放的介质(包括但不限于细胞因子)被与装置偶联或靶向装置的 DVD 抑制。

[0125] A. 结合蛋白在各种疾病中的用途

本文提供的结合蛋白分子可用作治疗性分子以治疗各种疾病,例如其中被结合蛋白识别的靶是有害的疾病。这类结合蛋白可以结合涉及特定疾病的一个或多个靶。IL-13 和 / 或 IL-17 的抑制也已表明加强动物模型中的抗病毒疫苗,并且在 HIV 和例如人鼻病毒、其它肠病毒、冠状病毒、疱疹病毒、流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞体病毒或腺病毒等其它感染性疾病的治疗中可能是有益的。

[0126] 在不限制本公开内容的情况下,提供有关某些疾病状况的更多信息。

[0127] 1. 人自身免疫性和炎性反应

IL-13 和 / 或 IL-17 参与一般自身免疫性和炎性反应,包括例如哮喘、变态反应、变应性肺病、变应性鼻炎、特应性皮炎、慢性阻塞性肺病 (COPD)、纤维变性、囊性纤维化 (CF)、纤维化肺病、特发性肺纤维化、肝纤维变性、狼疮、乙型肝炎相关肝病和纤维变性、脓毒症、系统性红斑狼疮 (SLE)、肾小球性肾炎、炎性皮肤病、银屑病、糖尿病、胰岛素依赖性糖尿病、炎性肠病 (IBD)、溃疡性结肠炎 (UC)、克罗恩病 (CD)、类风湿性关节炎 (RA)、骨关节炎 (OA)、多发性硬化 (MS)、移植物抗宿主病 (GVHD)、移植排斥、缺血性心脏病 (IHD)、乳糜泻、接触性超敏反应、酒精性肝病、贝切特病、动脉粥样硬化血管病、眼表面炎性疾病或莱姆病。

[0128] 本文提供的结合蛋白可用来治疗神经病症。在一个实施方案中,本文提供的结合蛋白或其抗原结合部分用于治疗神经变性疾病和涉及神经元再生和脊髓损伤的病症。

[0129] 2. 哮喘

变应性哮喘的特征在于存在嗜酸粒细胞增多、杯状细胞化生、上皮细胞改变、气道高反应性 (AHR) 及 Th2 和 Th1 细胞因子表达以及血清 IgE 水平升高。皮质类固醇是现今用于哮喘的最重要抗炎治疗,然而,其作用机制是非特异性的,且存在安全性顾虑,尤其是在

青少年患者群体中。因此有理由开发更具特异性和靶向的疗法。越来越多的证据表明小鼠中 IL-13 模拟许多哮喘特征,包括 AHR、粘液分泌过多和气道纤维化,独立于嗜酸性炎症 (Finotto 等 (2005) *Internat. Immunol.* 17(8): 993-1007; Padilla 等 (2005) *J. Immunol.* 174(12): 8097-8105)。

[0130] 已提示 IL-13 在引起与哮喘有关的病理反应中具有关键作用。开发抗 IL-13 mAb 疗法以降低 IL-13 在肺中的作用是令人兴奋的新方法,它提供了作为哮喘新治疗的可观前景。然而,除 IL-13 外,差异免疫途径的其它介质也参与哮喘发病机制,并阻断这些介质,可能提供额外的治疗益处。这类靶对包括但不限于 IL-13 和促炎细胞因子,例如 IL-17。有不断增加的证据表明,IL-17 参与哮喘的发病机制。IL-17 诱导嗜中性粒细胞进入气道,并且还加重哮喘的 T 辅助 2 (Th2) 细胞介导的嗜酸性气道炎症。最新研究证实,IL-17 的抑制剂和其它不同的调节剂减轻哮喘动物模型的抗原诱导的气道炎症、支气管高反应性和 Th2 细胞因子水平 (有关综述参见 Park 和 Lee (2010) *Respiratory Res.*, 11:78)。

[0131] 其中可评价炎症和 AHR 的动物模型例如 OVA 诱导的哮喘小鼠模型是本领域已知的,并且可用于测定各种结合蛋白分子治疗哮喘的能力。用于研究哮喘的动物模型公开于 Coffman 等 (2005) *J. Exp. Med.* 201(12):1875-1879; Lloyd 等 (2001) *Adv. Immunol.* 77: 263-295; Boyce 等 (2005) *J. Exp. Med.* 201(12):1869-1873; 以及 Snibson 等 (2005) *J. Brit. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 35(2):146-52。除了这些靶对的常规安全性评价外,可有理由进行免疫抑制程度的特异性测试,其在最佳靶对的选择中可能是有帮助的 (参见 Luster 等 (1994) *Toxicol.* 92(1-3):229-43; Descotes 等 (1992) *Dev. Biol. Standard.* 77:99-102; Hart 等 (2001) *J. Allergy Clin. Immunol.* 108(2):250-257)。

[0132] 3. 类风湿性关节炎

全身性疾病类风湿性关节炎 (RA) 的特征在于关节滑膜中的慢性炎症反应,并且与软骨变性和近关节骨侵蚀有关。许多促炎细胞因子、趋化因子和生长因子在患病关节中表达。最新研究表明,RA 中 T 细胞的参与被 IL-17 介导至重大程度。动物研究表明,在发生类似于人 RA 的关节病变的小鼠中检测到 IL-17 表达显著增加。在该疾病的不同动物模型中也观察到 IL-17 阻断的有益效果 (有关综述参见 Witowski 等 (2004) *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 567 - 579)。可使用临床前动物 RA 模型例如胶原诱导的关节炎小鼠模型,评价结合蛋白分子是否可用于治疗类风湿性关节炎。其它有用的模型也是本领域众所周知的 (参见 Brand (2005) *Comp. Med.* 55(2):114-22)。根据亲本抗体对于人和小鼠直向同源物的交叉反应性 (例如对人和小鼠 TNF、人和小鼠 IL-15 等的反应性),可在小鼠 CIA 模型中用“匹配替代抗体”来源的结合蛋白分子进行验证研究;简单地说,可将基于两种 (或更多种) 小鼠靶特异性抗体的结合蛋白与用于人结合蛋白构建的亲本人或人源化抗体的特性匹配到可能的程度 (例如相似的亲和力、相似的中和效价、相似的半寿期等)。

[0133] 4. 系统性红斑狼疮 (SLE)

SLE 的免疫致病性标志是多克隆 B 细胞活化,其导致血球蛋白过多症、自身抗体产生和免疫复合物形成。在系统性红斑狼疮患者中检测到 IL-13 和 IL-17 的水平显著升高 (Morimoto 等 (2001) *Autoimmunity*, 34(1):19-25; Wong 等 (2008) *Clin Immunol.* 127(3):385-93)。IL-17 代表 SLE 发病机制中的重要细胞因子。已表明在患有 SLE 的患者以及患有狼疮样疾病的动物中 IL-17 产生增加。动物模型证实阻断 IL-17 减少狼疮现象

(有关综述参见 Nalbandian 等 (2009) 157(2):209-215)。可根据亲本抗体对人和小鼠直向同源物的交叉反应性(例如对人和小鼠 CD20、人和小鼠干扰素 α 等的反应性),在小鼠狼疮模型用“匹配替代抗体”来源的结合蛋白分子进行了验证研究。简单地说,可将基于两种(或更多种)小鼠靶特异性抗体的结合蛋白与用于人结合蛋白构建的亲本人或人源化抗体的特性匹配到可能的程度(例如相似的亲和力、相似的中和效价、相似的半寿期等)。

[0134] 5. 多发性硬化

多发性硬化 (MS) 是病因基本未知的复杂的人自身免疫型疾病。遍及神经系统的髓鞘碱性蛋白 (MBP) 的免疫性破坏是多发性硬化的主要病理。主要的考虑是促成自身免疫发生的免疫学机制。具体来说,抗原表达、细胞因子和白细胞相互作用以及有助于平衡/调节其它 T 细胞例如 Th1 和 Th2 细胞的调节性 T 细胞,是治疗靶鉴定的重要方面。在 MS 中,在脑病变和自血液和脑脊液分离的单核细胞中检测到 IL-17 的表达增加。在活动性 MS 病变中极其富含产 IL-17 的细胞,这表明该细胞因子的中和具有有益潜力(有关综述参见 Witowski 等 (2004) *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 567-579)。

[0135] 用于评价结合蛋白治疗 MS 的有用性的几种动物模型是本领域已知的(参见 Steinman 等 (2005) *Trends Immunol.* 26(11):565-71; Lublin 等 (1985) *Springer Semin. Immunopathol.* 8(3):197-208; Genain 等 (1997) *J. Mol. Med.* 75(3):187-97; Tuohy 等 (1999) *J. Exp. Med.* 189(7):1033-42; Owens 等 (1995) *Neurol. Clin.* 13(1):51-73 以及 Hart 等 (2005) *J. Immunol.* 175(7):4761-8)。可根据亲本抗体对人和动物物种直向同源物的交叉反应性,在小鼠 EAE 模型中用“匹配替代抗体”来源的结合蛋白分子进行验证研究。简单地说,可将基于两种(或更多种)小鼠靶特异性抗体的结合蛋白与用于人结合蛋白构建的亲本人或人源化抗体的特性匹配到可能的程度(例如相似的亲和力、相似的中和效价、相似的半寿期等)。相同构思应用于其它非啮齿动物物种的动物模型中,其中可选择“匹配替代抗体”来源的结合蛋白用于预期的病理学和可能的安全性研究。除了这些靶对的常规安全性评价外,可有理由进行免疫抑制程度的特异性测试,其在最佳靶对的选择中可能是有帮助的(参见 Luster 等 (1994) *Toxicol.* 92(1-3): 229-43; Descotes 等 (1992) *Devel. Biol. Standard.* 77: 99-102; Jones (2000) *IDrugs* 3(4):442-6)。

[0136] 6. 脓毒症

巨大的炎症和免疫应答是败血性休克的基本特征,并且在由脓毒症诱导的组织损害、多器官衰竭和死亡的发病机制中起重要作用。已表明细胞因子是败血性休克的介质。这些细胞因子对组织具有直接的毒性作用;它们还激活磷脂酶 A2。这些和其它作用导致血小板激活因子浓度增加、促进一氧化氮合酶活性、促进由嗜中性粒细胞所致组织浸润并促进嗜中性粒细胞活性。已表明脓毒症的 IL-17 水平和临床预后呈负相关。IL-17A 的中和可显著提高脓毒症患者的生存率(参见 Flierl 等 (2008) *FASEB J.* 22:2198-2205)。

[0137] 一个实施方案涉及能够结合涉及脓毒症的一个或多个靶例如 IL-13 和 IL-17 的结合蛋白。可在本领域已知的临床前动物模型中评价这类结合蛋白治疗脓毒症的功效(参见 Buras 等 (2005) *Nat. Rev. Drug Discov.* 4(10):854-65 和 Calandra 等 (2000) *Nat. Med.* 6(2):164-70)。

[0138] 7. 神经病症

a. 神经变性疾病

神经变性疾病是慢性（在该情况下它们通常是年龄依赖性的）或急性的（例如中风、创伤性脑损伤、脊髓损伤等）。其特征在于神经元功能的渐进性丧失（例如神经元细胞死亡、轴突丢失、神经炎营养不良、脱髓鞘）、活动性丧失和记忆丧失。这些慢性神经变性疾病代表多种细胞类型和介质之间复杂的相互作用。这类疾病的治疗策略是有限的，且主要构成用非特异性抗炎剂（例如皮质类固醇、COX 抑制剂）或防止神经元丢失和 / 或突触功能的作用剂阻断炎症过程。这些治疗不能中止疾病进展。对于慢性神经变性疾病，靶向一种以上疾病介质的特殊疗法可提供甚至比用靶向单一疾病机制所观察到的更好的治疗功效（参见 Deane 等 (2003) *Nature Med.* 9:907-13；以及 Masliah 等 (2005) *Neuron.* 46:857）。

[0139] 本文提供的结合蛋白分子可以结合涉及慢性神经变性疾病（例如阿尔茨海默病）的一个或多个靶。可在过量表达淀粉状蛋白前体蛋白或 RAGE 和发生阿尔茨海默病样症状的临床前动物模型（例如转基因小鼠）中，验证结合蛋白分子的功效。另外，可构建结合蛋白分子，并在动物模型中测试功效，并且可选择最佳治疗性结合蛋白用于在人患者中进行测试。还可以将结合蛋白分子应用于其它神经变性疾病（例如帕金森病）的治疗。

[0140] b. 神经元再生和脊髓损伤

尽管病理学机制的知识增加，但脊髓损伤 (SCI) 仍是破坏性病况且代表特征在于高医学要求的医学适应症。大多数脊髓损伤是挫伤或压迫损伤，并且原发性损伤通常随后是继发性损伤机制（炎症介质例如细胞因子和趋化因子），所述继发性损伤机制使最初损伤恶化且导致损害区域显著扩大，有时超过 10 倍。IL-17 是继发性变性的介质，其促进神经炎症并阻碍功能恢复。使用 IL-17 KO 小鼠的研究证实，IL-17 在神经性损伤后促进神经炎症反应和疼痛超敏反应 (Kim 和 Moalem-Taylor (2010) *J Pain.* 12(3):370-83)。在小鼠脊髓挫伤损害后，IL-17 缺乏改善运动恢复和组织保留 (Hill 等 (2011) *Neurosci Lett.* 487(3):363-7)。

[0141] 可在脊髓损伤临床前动物模型中验证结合蛋白分子的功效。另外，可构建这些结合蛋白分子，在动物模型中测试功效，并可选择最佳治疗性结合蛋白用于在人患者中进行测试。一般来说，抗体不会以有效和实质性方式穿过血脑屏障 (BBB)。然而，在某些神经疾病（例如中风、创伤性脑损伤、多发性硬化等）中，BBB 可能受损，并允许结合蛋白和抗体向脑内的渗透增加。在其它不发生 BBB 渗漏的神经性病况中，可以采用靶向内源性转运系统，包括在 BBB 血管内皮上的载体介导的转运蛋白（例如葡萄糖和氨基酸载体）和受体介导的胞转介导细胞结构 / 受体，从而使得能够进行结合蛋白跨 BBB 转运。在 BBB 处使得能够进行此种转运的结构包括但不限于胰岛素受体、运铁蛋白受体、LRP 和 RAGE。另外，该策略也使得能够将结合蛋白亦用作将可能的药物转运到 CNS 中的穿梭物 (shuttle)，包括低分子量药物、纳米粒和核酸 (Coloma 等 (2000) *Pharm Res.* 17(3):266-74；Boado 等 (2007) *Bioconjug. Chem.* 18(2):447-55)。

[0142] 8. 肿瘤学病症

单克隆抗体治疗已显现为癌症的重要治疗方式 (von Mehren 等 (2003) *Annu. Rev. Med.* 54:343-69)。与单特异性疗法相比，靶向两种不同的肿瘤介质的双重特异性抗体的使用可能提供额外的益处。已表明 IL-17 可能通过刺激血管生成支持肿瘤生长。IL-13 在抗肿瘤免疫和肿瘤生长的调节中起重要作用。研究表明，IL-13 对其中 NKT 细胞抑制肿瘤免疫监视的新的免疫调节途径是最重要的（有关综述参见 Kolls 等 (2003) *Am. J.*

Respir. Cell Mol. Biol. 28: 9-11和Terabe等(2004) Cancer Immunol Immunother. 53(2):79-85)。

[0143] 在一个实施方案中,可用本文提供的组合物和方法治疗或诊断的疾病包括但不限于原发性癌和转移癌,包括乳腺癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、口咽癌、喉咽癌、食管癌、胃癌、胰腺癌、肝癌、胆囊癌和胆管癌、小肠癌、泌尿道癌(包括肾癌、膀胱癌和尿路上皮癌)、女性生殖道癌(包括宫颈癌、子宫癌和卵巢癌以及绒毛膜癌和妊娠滋养层疾病)、男性生殖道癌(包括前列腺癌、精囊癌、睾丸癌和生殖细胞肿瘤)、内分泌腺癌(包括甲状腺癌、肾上腺癌和脑垂体癌)和皮肤癌以及血管瘤、黑素瘤、肉瘤(包括发生在骨和软组织中的肉瘤以及卡波西肉瘤)、脑肿瘤、神经肿瘤、眼肿瘤和脑脊膜肿瘤(包括星形细胞瘤、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、成视网膜细胞瘤、神经瘤、成神经细胞瘤、神经鞘瘤和脑脊膜瘤)、造血系统恶性肿瘤(例如白血病)引起的实体瘤和淋巴瘤(霍奇金和非霍奇金两种淋巴瘤)。

[0144] 在一个实施方案中,本文提供的抗体或其抗原结合部分在单用或与放射疗法和/或其它化学治疗剂联用时用于治疗癌症或预防本文所述肿瘤的转移。

[0145] 9. 基因疗法

在一个具体实施方案中,通过基因疗法给予编码本文提供的结合蛋白或本文提供的另一种预防剂或治疗剂的核酸序列以治疗、预防、管理或改善病症或其一个或多个症状。基因疗法是指通过给予受试者已表达或可表达的核酸进行的疗法。在该实施方案中,核酸产生介导预防或治疗作用的本文提供的其编码的抗体或预防剂或治疗剂。

[0146] 本领域可获得的基因疗法的任何方法都可用于本文提供的方法。基因疗法的方法的一般性综述参见Goldspiel等(1993) Clin. Pharmacy 12:488-505;Wu和Wu(1991) Biotherapy 3:87-95;Tolstoshev(1993) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596;Mulligan(1993) Science 260:926-932;Morgan和Anderson(1993) Ann. Rev. Biochem. 62:191-217;以及May(1993) TIBTECH 11(5):155-215。可采用的重组DNA技术领域普遍已知的方法描述于Ausubel等(编辑), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY(1993);以及Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY(1990)。基因疗法的各种方法的详细描述公开于美国专利公布号US20050042664。

[0147] III. 药物组合物

提供包含单独或与预防剂、治疗剂和/或药学上可接受的载体组合的一种或多种结合蛋白的药物组合物。包含本文提供的结合蛋白的药物组合物用于但不限于诊断、检测或监测病症;预防、治疗、管理或改善病症或其一个或多个症状和/或研究。单独的或与预防剂、治疗剂和/或药学上可接受的载体组合的药物组合物的制剂是本领域技术人员已知的(美国专利公布号20090311253 A1)。

[0148] 给予本文提供的预防剂或治疗剂的方法包括但不限于胃肠外给药(例如皮内、肌内、腹膜内、静脉内和皮下)、硬膜外给药、肿瘤内给药、粘膜给药(例如鼻内和口腔途径)和肺部给药(例如用吸入器或喷雾器给予的雾化化合物)。用于具体给药途径的药物组合物的制剂和各种给药方法所需的材料和技术是对本领域技术人员而言是可获得的和已知的(美国专利公布号20090311253 A1)。

[0149] 可以调整剂量方案以提供最佳所需反应(例如治疗或预防反应)。例如,可以给予

单次推注,可以随着时间给予几个分剂量,或剂量可以按治疗情况紧急程度所表明按比例减少或增加。为了易于给药和剂量一致,以单位剂型配制肠胃外组合物是特别有利的。术语“单位剂型”是指适宜作为单位剂量用于待治疗的哺乳动物受试者的物理离散单位;每个单位包含经计算产生所需疗效的预定量的活性化合物以及所需的药用载体。本文提供的单位剂型的规格按照以下规定并直接取决于:(a) 活性化合物的独特特性和待达到的特定治疗或预防作用,和 (b) 调合这种活性化合物用于个体治疗敏感性的领域固有的局限性。

[0150] 本文提供的结合蛋白的治疗或预防有效量的示例性非限制性范围是 0.1-20 mg/kg,例如 1-10 mg/kg。应当指出的是,剂量值可随待减轻病况的类型和严重程度而变化。还要了解的是,对于任何具体受试者,可按照个体需要和给予或监督组合物给予的人的专业判断,随着时间调整具体的剂量方案,并且本文给出的剂量范围仅是示例性的,且无意限制要求保护的组合物的范围或实践。

[0151] IV. 联合疗法

本文提供的结合蛋白还可与用于治疗各种疾病的一种或多种其它治疗剂一起给予,其它治疗剂由技术人员选择用于其既定目的。例如,其它药剂可以是公知的作为可用于治疗通过本文提供的抗体治疗的疾病或病症的治疗剂。联合疗法还可包括一种以上的其它治疗剂,例如两种或三种其它治疗剂。

[0152] 联合治疗剂包括但不限于抗肿瘤剂、放射疗法、化学疗法例如 DNA 烷化剂、顺铂、卡铂、抗微管蛋白剂、紫杉醇、多西他赛、泰素、多柔比星、吉西他滨、健择 (gemzar)、葱环类、阿霉素、拓扑异构酶 I 抑制剂、拓扑异构酶 II 抑制剂、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、亚叶酸、伊立替康、受体酪氨酸激酶抑制剂 (例如埃罗替尼、吉非替尼)、COX-2 抑制剂 (例如塞来考昔)、激酶抑制剂和 siRNA。

[0153] 治疗自身免疫性和炎性疾病的组合为非甾体抗炎药物,亦称为 NSAIDS,其包括布洛芬等药物。其它组合为皮质类固醇包括泼尼松龙;当与本文提供的结合蛋白组合治疗患者时,可通过逐步减少类固醇剂量,来降低或甚至消除使用类固醇的众所周知的副作用。可与本文提供的抗体或其抗体结合部分组合用于类风湿性关节炎的治疗剂的非限制性实例包括:细胞因子抑制性抗炎药物 (CSAID);抗其它人细胞因子或生长因子的抗体或其拮抗剂,例如 TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、IL-21、IL-23、干扰素、EMAP-II、GM-CSF、FGF 和 PDGF。本文提供的结合蛋白或其抗原结合部分可与针对以下细胞表面分子的抗体组合:例如 CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80 (B7.1)、CD86 (B7.2)、CD90、CTLA 或其配体,包括 CD154 (gp39 或 CD40L)。

[0154] 治疗剂的组合可在自身免疫和随后的炎性级联的不同点上进行干扰。实例包括本文公开的结合蛋白和 TNF 拮抗剂如嵌合、人源化或人 TNF 抗体、阿达木单抗 (PCT 公布号 WO 97/29131)、CA2 (Remicade™)、CDP 571、可溶性 p55 或 p75 TNF 受体或其衍生物 (p75TNFR1gG (Enbrel™) 或 p55TNFR1gG (Lenercept))、TNF α 转化酶 (TACE) 抑制剂或 IL-1 抑制剂 (白介素 -1- 转化酶抑制剂、IL-1RA 等)。其它组合包括本文公开的结合蛋白和白介素 11。另外一种组合包括自身免疫应答的关键作用物,其与 IL-12 功能平行、依赖于 IL-12 功能或与 IL-12 功能合作起作用;尤其相关的是 IL-18 拮抗剂,包括 IL-18 抗体、可溶性 IL-18 受体或 IL-18 结合蛋白。已表明 IL-12 和 IL-18 具有重叠但不同的功能,且

针对二者的拮抗剂的组合可能是最有效的。另外一种组合是本文公开的结合蛋白和非耗尽性抗 CD4 抑制剂。另外的其它组合包括本文公开的结合蛋白和共刺激途径 CD80 (B7.1) 或 CD86 (B7.2) 的拮抗剂,包括抗体、可溶性受体或拮抗性配体。

[0155] 本文提供的结合蛋白还可以与以下药剂组合:例如甲氨蝶呤、6-MP、硫唑嘌呤、柳氮磺吡啶、美沙拉秦、奥沙拉秦氯喹/轻氯喹、青霉胺、硫化苹果酸金(肌内和口服)、硫唑嘌呤、秋水仙素、皮质类固醇(口服、吸入和局部注射)、 β 2 肾上腺素受体激动剂(沙丁胺醇、特布他林、沙美特罗)、黄嘌呤(茶碱、氨茶碱)、色甘酸盐、萘多罗米、酮替芬、异丙托铵(ipratropium)、氧托铵、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸酯、来氟米特、NSAID 例如布洛芬、皮质类固醇例如泼尼松龙、磷酸二酯酶抑制剂、腺苷激动剂、抗血栓药、补体抑制剂、肾上腺素能药、干扰通过促炎细胞因子(例如 TNF- α 或 IL-1)的信号转导的作用剂(例如 IRAK、NIK、IKK、p38 或 MAP 激酶抑制剂)、IL-1 β 转化酶抑制剂、TNF α 转化酶(TACE)抑制剂、T 细胞信号转导抑制剂例如激酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂、柳氮磺吡啶、硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤、血管紧张素转化酶抑制剂、可溶性细胞因子受体及其衍生物(例如可溶性 p55 或 p75 TNF 受体和衍生物 p75TNFRIgG (Enbrel™) 或 p55TNFRIgG (Lenercept)、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R)、抗炎细胞因子(例如 IL-4、IL-10、IL-11、IL-13 和 TGF β)、塞来昔布、叶酸、硫酸羟氯喹、罗非考昔、依那西普、英利昔单抗、萘普生、伐地考昔、柳氮磺吡啶、甲泼尼龙、美洛昔康、醋酸甲泼尼龙、金硫丁二钠、阿司匹林、曲安奈德、萘磺酸右丙氧芬/对乙酰氨基酚、叶酸盐、萘丁美酮、双氯芬酸、吡罗昔康、依托度酸、双氯酚酸钠、奥沙普秦、盐酸羟可酮、重酒石酸氢可酮/对乙酰氨基酚、双氯酚酸钠/米索前列醇、芬太尼、阿那白滞素、人重组体、盐酸曲马多、双水杨酯、舒林酸、氰钴胺素/fa/吡哆醇、对乙酰氨基酚、阿仑膦酸钠、泼尼松龙、硫酸吗啡、盐酸利多卡因、吲哚美辛、硫酸氨基葡萄糖/软骨素、盐酸阿米替林、磺胺嘧啶、盐酸羟考酮/对乙酰氨基酚、盐酸奥洛他定、米索前列醇、萘普生钠、奥美拉唑、环磷酰胺、利妥昔单抗、IL-1 TRAP、MRA、CTLA4-IG、IL-18 BP、抗 IL-18、抗 IL15、BIRB-796、SC10-469、VX-702、AMG-548、VX-740、罗氟司特、IC-485、CDC-801 或 Mesopram。组合包括甲氨蝶呤或来氟米特,并且在中度或重度类风湿性关节炎的情况下,为环孢菌素。

[0156] 在一个实施方案中,与下列药剂组合给予结合蛋白或其抗原结合部分以治疗类风湿性关节炎:KDR 的小分子抑制剂、Tie-2 的小分子抑制剂、甲氨蝶呤、泼尼松、塞来考昔、叶酸、硫酸羟氯喹、罗非考昔、依那西普、英利昔单抗、来氟米特、萘普生、伐地考昔、柳氮磺吡啶、甲泼尼龙、布洛芬、美洛昔康、醋酸甲泼尼龙、金硫丁二钠、阿司匹林、硫唑嘌呤、曲安奈德、萘磺酸右丙氧芬/对乙酰氨基酚、叶酸盐、萘丁美酮、双氯芬酸、吡罗昔康、依托度酸、双氯酚酸钠、奥沙普秦、盐酸羟考酮、重酒石酸氢可酮/对乙酰氨基酚、双氯酚酸钠/米索前列醇、芬太尼、阿那白滞素,人重组体、盐酸曲马多、双水杨酯、舒林酸、氰钴胺/fa/吡哆醇、对乙酰氨基酚、阿仑膦酸钠、泼尼松龙、硫酸吗啡、盐酸利多卡因、吲哚美辛、硫酸氨基葡萄糖/软骨素、环孢菌素、盐酸阿米替林、磺胺嘧啶、盐酸羟考酮/对乙酰氨基酚、盐酸奥洛他定、米索前列醇、萘普生钠、奥美拉唑、霉酚酸酯、环磷酰胺、利妥昔单抗、IL-1 TRAP、MRA、CTLA4-IG、IL-18 BP、IL-12/23、抗 IL 18、抗 IL 15、BIRB-796、SC10-469、VX-702、AMG-548、VX-740、罗氟司特、IC-485、CDC-801 或 mesopram。

[0157] 本文提供的结合蛋白可与之组合的用于炎性肠病的治疗剂的非限制性实例包括:布地奈德;表皮生长因子;皮质类固醇;环孢菌素,柳氮磺吡啶;氨基水杨酸盐;6-巯基嘌

呤 ; 硫唑嘌呤 ; 甲硝唑 ; 脂加氧酶抑制剂 ; 5-氨基水杨酸 ; 奥沙拉秦 ; 巴柳氮 ; 抗氧化剂 ; 血栓烷抑制剂 ; IL-1 受体拮抗剂 ; 抗 IL-1 β mAb ; 抗 IL-6 mAb ; 生长因子 ; 弹性蛋白酶抑制剂 ; 吡啶基 - 咪唑化合物 ; 针对其它人细胞因子或生长因子的抗体或其拮抗剂, 例如 TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF 或 PDGF。本文提供的抗体或其抗原结合部分可与针对以下的细胞表面分子的抗体组合 : 例如 CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90 或其配体。本文提供的抗体或其抗原结合部分还可与以下药剂组合 : 例如甲氨蝶呤、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸酯、来氟米特、NSAID 例如布洛芬、皮质类固醇例如泼尼松龙、磷酸二酯酶抑制剂、腺苷激动剂、抗血栓药、补体抑制剂、肾上腺素能药、干扰通过促炎细胞因子 (例如 TNF α 或 IL-1) 的信号转导的作用剂 (例如 IRAK、NIK、IKK、p38 或 MAP 激酶抑制剂)、IL-1 β 转化酶抑制剂、TNF α 转化酶抑制剂、T 细胞信号转导抑制剂例如激酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂、柳氮磺吡啶、硫唑嘌呤、6- 巯基嘌呤、血管紧张素转化酶抑制剂、可溶性细胞因子受体或其衍生物 (例如可溶性 p55 或 p75 TNF 受体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R) 或抗炎细胞因子 (例如 IL-4、IL-10、IL-11、IL-13 或 TGF β) 或 bc1-2 抑制剂。

[0158] 其中结合蛋白可与之组合用于克罗恩病的治疗剂的实例包括 : TNF 拮抗剂, 例如抗 TNF 抗体、阿达木单抗 (PCT 公布号 WO 97/29131 ; HUMIRA)、CA2 (REMICADE)、CDP 571、TNFR-Ig 构建体、(p75TNFR1gG (ENBREL) 或 p55TNFR1gG (Lenercept)) 抑制剂或 PDE4 抑制剂。本文提供的抗体或其抗原结合部分可与皮质类固醇例如布地奈德和地塞米松组合。本文提供的结合蛋白或其抗原结合部分还可与例如柳氮磺吡啶、5-氨基水杨酸和奥沙拉秦等药剂或干扰促炎细胞因子 (例如 IL-1) 的合成或作用的药剂 (例如 IL-1 β 转化酶抑制剂或 IL-1ra) 组合。本文提供的抗体或其抗原结合部分还可与 T 细胞信号转导抑制剂 (例如酪氨酸激酶抑制剂或 6- 巯基嘌呤) 一起使用。本文提供的结合蛋白或其抗原结合部分可与 IL-11 组合。本文提供的结合蛋白或其抗原结合部分可与以下药剂组合 : 5-氨基水杨酸、泼尼松、硫唑嘌呤、巯基嘌呤、英利昔单抗、甲泼尼龙琥珀酸钠、地芬诺酯 / 硫酸阿托品、盐酸洛哌丁胺、甲氨蝶呤、奥美拉唑、叶酸盐、环丙沙星 / 葡萄糖 - 水、重酒石酸氢可酮 / 对乙酰氨基酚、盐酸四环素、醋酸氟轻松、甲硝唑、硫柳汞 / 硼酸、消胆胺 / 蔗糖、盐酸环丙沙星、硫酸苊蓉碱、盐酸麦啉、盐酸咪达唑仑、盐酸羟考酮 / 对乙酰氨基酚、盐酸异丙嗪、磷酸钠、磺胺甲噁唑 / 甲氧苄啉、塞来考昔、聚卡波非、萘磺酸右丙氧芬、氢化可的松、多种维生素、巴柳氮二钠、磷酸可待因 / 对乙酰氨基酚、盐酸考来维仑、氰钴胺、叶酸、左氧氟沙星、甲泼尼龙、那他珠单抗或干扰素 - γ 。

[0159] 本文提供的结合蛋白可与之组合的用于多发性硬化的治疗剂的非限制性实例包括 : 皮质类固醇 ; 泼尼松龙 ; 甲泼尼龙 ; 硫唑嘌呤 ; 环磷酰胺 ; 环孢菌素 ; 甲氨蝶呤 ; 4-氨基吡啶 ; 替扎尼定 ; 干扰素 - β 1a (Avonex ; Biogen) ; 干扰素 - β 1b (Bseron ; Chiron/Berlex) ; 干扰素 α -n3 (Interferon Sciences/Fujimoto)、干扰素 - α (Alfa Wassermann/J&J)、干扰素 β 1A-IF (Serono/Inhale Therapeutics)、聚乙二醇化干扰素 α 2b (Enzon/Schering-Plough)、共聚物 1 (Cop-1 ; Copaxone ; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.) ; 高压氧 ; 静脉内免疫球蛋白 ; clabribine ; 针对其它人细胞因子或生长因子及其受体的抗体或其拮抗剂, 例如 TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-23、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF 或 PDGF。本文提供的结合蛋白可与针对以下细胞表面

分子的抗体组合：例如 CD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90 或其配体。本文提供的结合蛋白还可与以下药剂组合：例如甲氨蝶呤、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸酯、来氟米特、NSAID 例如布洛芬、皮质类固醇例如泼尼松龙、磷酸二酯酶抑制剂、腺苷激动剂、抗血栓药、补体抑制剂、肾上腺素能药、干扰通过促炎细胞因子（例如 TNF α 或 IL-1）的信号转导的治疗剂（例如 IRAK、NIK、IKK、p38 或 MAP 激酶抑制剂）、IL-1 β 转化酶抑制剂、TACE 抑制剂、T 细胞信号转导抑制剂例如激酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂、柳氮磺吡啶、硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤、血管紧张素转化酶抑制剂、可溶性细胞因子受体或其衍生物（例如可溶性 p55 或 p75 TNF 受体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R）、抗炎细胞因子（例如 IL-4、IL-10、IL-13 或 TGF β ）或 bcl-2 抑制剂。

[0160] 本文提供的结合蛋白可与之组合的用于多发性硬化的治疗剂的实例包括干扰素- β ，例如 IFN β 1a 和 IFN β 1b；克帕松、皮质类固醇、胱天蛋白酶抑制剂例如胱天蛋白酶-1 抑制剂、IL-1 抑制剂、TNF 抑制剂和抗 CD40 配体和 CD80 的抗体。

[0161] 本文提供的结合蛋白可与之组合的用于哮喘的治疗剂的非限制性实例包括：沙丁胺醇、沙美特罗 / 氟替卡松、孟鲁司特钠、丙酸氟替卡松、布地奈德、泼尼松、昔萘酸沙美特罗、盐酸左沙丁胺醇、硫酸沙丁胺醇 / 异丙托铵、泼尼松龙磷酸钠、曲安奈德、二丙酸倍氯米松、异丙托溴铵、阿奇霉素、醋酸吡布特罗、泼尼松龙、无水茶碱、甲泼尼龙琥珀酸钠、克拉霉素、扎鲁司特、富马酸福莫特罗、流感病毒疫苗、甲泼尼龙、阿莫西林三水合物、氟尼缩松、变态反应注射剂、色甘酸钠、盐酸非索非那定、氟尼缩松 / 薄荷醇、阿莫西林 / 克拉维酸盐、左氧氟沙星、吸入器辅助装置、愈创甘油醚、地塞米松磷酸钠、盐酸莫西沙星、海克多西环素、愈创甘油醚 / 右甲吗喃、p- 麻黄碱 / cod / 氯苯那敏 (chlorphenir)、加替沙星、盐酸西替利嗪、糠酸莫米松、昔萘酸沙美特罗、苯佐那酯、头孢氨苄、pe / 氢可酮 / 氯苯那敏、盐酸西替利嗪 / 伪麻黄碱 (pseudoephed)、去氧肾上腺素 / cod / 异丙嗪、可待因 / 异丙嗪、头孢丙烯、地塞米松、愈创甘油醚 / 伪麻黄碱、氯苯那敏 / 氢可酮、奈多罗米钠、硫酸特布他林、肾上腺素、甲泼尼龙、硫酸奥西那林。

[0162] 本文提供的结合蛋白可与之组合用于 COPD 的治疗剂的非限制性实例包括：硫酸沙丁胺醇 / 异丙托铵、异丙托溴铵、沙美特罗 / 氟替卡松、沙丁胺醇、昔萘酸沙美特罗、丙酸氟替卡松、泼尼松、无水茶碱、甲泼尼龙琥珀酸钠、孟鲁司特钠、布地奈德、富马酸福莫特罗、曲安奈德、左氧氟沙星、愈创甘油醚、阿奇霉素、二丙酸倍氯米松、盐酸左沙丁胺醇、氟尼缩松、头孢曲松钠、阿莫西林三水合物、加替沙星、扎鲁司特、阿莫西林 / 克拉维酸盐、氟尼缩松 / 薄荷醇、氯苯那敏 / 氢可酮、硫酸奥西那林、甲泼尼龙、糠酸莫米松、p- 麻黄碱 / cod / 氯苯那敏、醋酸吡布特罗、p- 麻黄碱 / 氯雷他定、硫酸特布他林、噻托溴铵、(R, R) - 福莫特罗、TgAAT、西洛司特、罗氟司特。

[0163] 本文提供的结合蛋白可与之组合用于银屑病的治疗剂的非限制性实例包括：KDR 的小分子抑制剂、Tie-2 的小分子抑制剂、卡泊三烯、丙酸氯倍他索、曲安奈德、丙酸卤倍他索、他扎罗汀、甲氨蝶呤、醋酸氟轻松、增强型二丙酸倍他米松、氟轻松、阿维 A、焦油洗发剂、戊酸倍他米松、糠酸莫米他松、酮康唑、普莫卡因 / 氟轻松、戊酸氢化可的松、氟氢缩松、脲、倍他米松、丙酸氯倍他索 / 润滑药 (emol1)、丙酸氟替卡松、阿奇霉素、氢化可的松、湿润配方、叶酸、地奈德、吡美莫司、煤焦油、双醋二氟拉松、叶酸依那西普、乳酸、甲氧沙林、hc / 碱式没食子酸铋 (bismuth subgal) / znox/resor、醋酸甲泼尼龙、泼尼松、遮光剂、哈西奈德、

水杨酸、地萘酚、新戊酸氯可托龙、煤提取物、煤焦油 / 水杨酸、煤焦油 / 水杨酸 / 硫、去羟米松、地西洋、润滑药、醋酸氟轻松 / 润滑药、矿物油 / 蓖麻油 / na lact、矿物油 / 花生油、石油 / 肉豆蔻酸异丙酯、补骨脂素、水杨酸、皂 / 三溴沙仑、硫柳汞 / 硼酸、塞来考昔、英利昔单抗、环孢菌素、阿来西普、依法珠单抗、他克莫司、吡美莫司、PUVA、UVB、柳氮磺吡啶。

[0164] 本文提供的结合蛋白可与之组合的用于 SLE (狼疮) 的治疗剂的实例包括: NSAIDS, 例如双氯芬酸、奈普生、布洛芬、吡罗昔康、吲哚美辛; COX2 抑制剂, 例如塞来考昔、罗非考昔、伐地考昔; 抗疟疾药, 例如羟氯喹; 类固醇类, 例如泼尼松、泼尼松龙、布地奈德、地塞米松; 细胞毒剂, 例如硫唑嘌呤、环磷酰胺、霉酚酸酯、甲氨蝶呤; PDE4 抑制剂或嘌呤合成抑制剂, 例如骁悉 (Cellcept)。本文提供的结合蛋白还可与以下治疗剂组合: 例如柳氮磺吡啶、5-氨基水杨酸、奥沙拉秦、依木兰和干扰促炎细胞因子 (例如 IL-1) 的合成、产生或作用的治疗剂, 例如胱天蛋白酶抑制剂, 如 IL-1 β 转化酶抑制剂和 IL-1ra。本文提供的结合蛋白还可以与 T 细胞信号转导抑制剂 (例如酪氨酸激酶抑制剂) 或靶向 T 细胞活化分子 (例如 CTLA-4-IgG 或抗 B7 家族抗体、抗 PD-1 家族抗体) 的分子一起使用。本文提供的结合蛋白可与 IL-11 或抗细胞因子抗体 (例如芳妥珠单抗 (fonotolizumab) (抗 IFN γ 抗体)) 或抗受体抗体 (例如抗 IL-6 受体抗体和抗 B 细胞表面分子抗体) 组合。本文提供的抗体或其抗原结合部分还可与以下作用剂一起使用: LJP 394 (阿贝莫司)、消耗或钝化 B 细胞的作用剂 (例如利妥昔单抗 (抗 CD20 抗体))、lymphostat-B (抗 BlyS 抗体)、TNF 拮抗剂 (例如抗 TNF 抗体)、阿达木单抗 (PCT 公布号 WO 97/29131; HUMIRA)、CA2 (REMICADE)、CDP 571、TNFR-Ig 构建体 (p75TNFR1IgG (ENBREL) 和 p55TNFR1IgG (Lenercept)) 和 bcl-2 抑制剂, 因为已证实转基因小鼠中 bcl-2 过量表达引起狼疮样表型 (参见 Marquina)。

[0165] 本文提供的药物组合物可包括“治疗有效量”或“预防有效量”的本文提供的结合蛋白。“治疗有效量”指在所需剂量和时间段有效达到所需治疗结果的量。结合蛋白的治疗有效量可以由本领域技术人员确定, 并且可以随以下因素而变化, 例如个体疾病状态、年龄、性别和体重以及结合蛋白在个体中引起所需反应的能力。治疗有效量也是其中治疗有益作用超过抗体或抗体结合部分的任何毒性或有害作用的量。“预防有效量”指在所需剂量和时间段有效达到所需预防结果的量。通常, 因为预防剂量在疾病前或疾病早期时在受试者中使用, 所以预防有效量将小于治疗有效量。

[0166] V. 诊断

本文的公开内容还提供诊断应用, 包括但不限于诊断测定方法、含有一种或多种结合蛋白的诊断试剂盒和修改所述方法和试剂盒用于自动化和 / 或半自动化系统。所提供的方法、试剂盒和修改可用来检测、监测和 / 或治疗个体的疾病或病症。下面将进一步阐明。

[0167] A. 测定方法

本公开内容还提供使用本文描述的至少一种结合蛋白测定试验样品中分析物或其片段的存在、量或浓度的方法。本领域已知的任何合适的测定法都可用于本方法。实例包括但不限于免疫测定法和 / 或采用质谱法的方法。

[0168] 本公开内容提供的免疫测定法尤其可包括夹心免疫测定法、放射免疫测定法 (RIA)、酶免疫测定法 (EIA)、酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、竞争 - 吸附免疫测定法、荧光偏振免疫测定法 (FPIA)、酶放大免疫测定技术 (EMIT)、生物发光共振能量转移 (BRET) 和均质化学发光测定法。

[0169] 化学发光微粒免疫测定法,特别是采用 ARCHITECT® 自动分析仪 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) 的化学发光微粒免疫测定法,是免疫测定法的实例。

[0170] 本公开内容提供应用质谱法的方法,其包括但不限于 MALDI (基质辅助激光解吸-电离) 或 SELDI (表面增强激光解吸-电离)。

[0171] 采用免疫测定法和质谱法以采集、处理、加工和分析生物试验样品的方法应是本领域技术人员熟知的,其提供用于实施本公开内容 (US 2009-0311253 A1)。

[0172] B. 试剂盒

还提供针对试验样品中分析物或其片段的存在、量或浓度测定试验样品的试剂盒。试剂盒包含测定试验样品的分析物或其片段的至少一种组分以及用于测定试验样品的分析物或其片段的说明书。测定试验样品的分析物或其片段的至少一种组分可以包括包含本文公开的结合蛋白和 / 或抗分析物结合蛋白 (或其片段、变体或其变体的片段) 的组合物,其任选固定在固相上。

[0173] 任选试剂盒可以包含校准物或对照,其可包含分离的或纯化的分析物。试剂盒可包含用于通过免疫测定法和 / 或质谱法测定试验样品的分析物的至少一种组分。试剂盒组分,包括分析物、结合蛋白和 / 或抗分析物结合蛋白或其片段,可以是使用任何本领域已知的可检测标记任选标记的。用于实施本公开内容所提供用于创造的材料与方法应是本领域技术人员已知的 (US 2009-0311253 A1)。

[0174] C. 试剂盒和方法的修改

可以修改试剂盒 (或其组分) 以及通过测定法 (例如本文所述的免疫测定法) 测定试验样品中分析物的存在、量或浓度的方法,以用于各种自动化和半自动化系统 (包括其中固相包含微粒的系统), 例如美国专利号 5, 089, 424 和 5, 006, 309 中所述和例如由 Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) 以 ARCHITECT® 销售的系统。

[0175] 可获自 Abbott Laboratories 的其它平台包括但不限于 AxSYM®、IMx® (参见例如美国专利号 5, 294, 404)、PRISM®、EIA (bead) 和 Quantum™ II 以及其它平台。另外,测定法、试剂盒和试剂盒组分可以其它形式使用,例如在电化学或其它手提式或现场即时测定系统上。本公开内容适用于例如进行夹心免疫测定的商用 Abbott Point of Care (i-STAT®, Abbott Laboratories) 电化学免疫测定系统。免疫传感器及其制造方法和在一次性用测验装置中的操作描述于例如美国专利号 5, 063, 081、7, 419, 821 和 7, 682, 833 及美国公布号 20040018577、20060160164 和 US 20090311253。

[0176] 本领域技术人员容易明白的是,本文所述方法的其它适当的修订和修改是显而易见的,而且在不背离本文公开的实施方案的范围的情况下,可以使用合适的等同方法进行修改。尽管现已详细描述了某些实施方案,但参照下列实施例将更清楚地理解本发明,所述实施例仅用于说明性目的而包括在内,无意是限制性的。

实施例

[0177] 实施例 1 :抗 IL-17 人源化单克隆抗体 h10F7 的产生

实施例 1.2 :人源化抗人 IL-17 抗体 h10F7 的亲和力成熟

之前公开了人源化抗人 IL-17 抗体。该抗体随后进行亲和力成熟以改进其对入、食蟹猴和小鼠 IL-17 的总体亲和力。按照以下规格制备了几个文库 :

H1 + H2 文库：

- 在 30、31、33、35、53、56、57 和 58 的 7 个残基上的有限诱变。

[0178] - 在人种系和 h10F7 序列之间在第 27、48、51、52、54、67 和 69 位处切换 (toggle)。

[0179] H3 文库：

- 在 95-100c 和 102 上的有限诱变。

[0180] - 在人种系和 h10F7 序列之间在 93 处的切换。

[0181] LC 文库 1：

- 在 30、31、32、34、50、53、89、91、92、93 和 96 处的有限诱变。

[0182] - 在人种系和 h10F7 序列之间第 4、24、27、29、33、36、43、47、52 和 55 位处切换。

[0183] LC 文库 2：在 CDR1 中的 G28 位用其它残基构建以提高与人抗体的同一性。

[0184] - 在 28、30、31、32、34、50、53、89、91、92、93 和 96 处的有限诱变。

[0185] - 在人种系和 h10F7 序列之间在第 24、27、29、33、37、44、48、52 和 55 位处切换。

[0186] - 在首先作为 scFv 测试的 FR1 (第 4 位) 中的一个构架种系突变 (framework germ-lining mutation)。如果结合不受影响, 则优先选择“M”胜过“L”。

[0187] rHC 文库 :H1 + H2 和 H3 文库的重组输出。

[0188] rHCLC 文库 :H1 + H2、H3 和 LC1 或 LC2 文库的重组输出。(如果 LC2 输出结合显得至少与 WT 一样好, 则选择 LC2 胜过 LC1, 否则重组 LC1 输出)。

[0189] 针对在递减浓度的生物素化抗原存在下结合人、食蟹猴和小鼠 IL-17 的能力, 分别选择所有 4 个文库。将从文库选择中回收的所有突变 CDR 序列重组成另外的文库, 并且在鉴定各个抗体之前, 对重组的文库进行更严格的选择条件。

[0190] 下表提供经过亲和力成熟选择方案的 h10F7 抗体的 VH 和 VL 的氨基酸序列的列表。各 VH 和 VL 序列的每个 CDR 的氨基酸残基用黑体字表示。

[0191] 表 2. 在亲和力成熟的抗 IL-17 抗体 h10F7 中观察到的氨基酸残基

h10f7 重链可变区	
h10f7VH.1	<p>1234567890123456789012345678901234567890123456789012a345678901</p> <p><u>EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFDTYIEHWVRQAPGQGLEWIGVNDPESGGTFY</u> <u>YNQ</u></p> <p>DE M I D S L S I Y A M E N P</p>
	<p>234567890123456789012abc345678901234567890abcd1234567890123</p> <p><u>KFDGRATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRYRYYESFYGMYWGQGTTVTVSS</u></p> <p>V I DKWDGLE I I SMFW YN C W Y S D E F V L L E N S S N M Q F F A H R A F M K H</p>
h10f7 轻链可变区	
h10f7VL.1	<p>1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901</p> <p><u>DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASS-</u> <u>SISYIYWFQQKPGKSPKRWIYATFELASGVPSR</u></p> <p>M R QGIRRCL Y A L R S D Q K SVSNSVN E A DLVGD F D Y Q NTN S S G A FPP Q G Q I GLI G T W V LDF Q L T PCA P H E K M M</p>
a	<p>234567890123456789012345678901234567890123456a</p> <p><u>FSGSGSDYTLTISSLPEDFATYYCHQRSSYPWTFGQGTKKLEIK</u></p> <p>R VGN E Q WTI L L LMR G N MNF F Y KRT Y S FKY P V PAL I A GDM D S W R Q K H I H Q T G N D C</p>

上述 I. C 部分的表 1B 和 1C 提供转化克隆的各 VH 和 VL 序列。这些亲和力成熟序列被转化成全长 IgG。

[0192] 表 3. 转化成全长 IgG 的 h10F7 亲和力成熟 scFv 克隆

ScFv 克隆名称	HC 质粒	LC 质粒	全长 IgG (蛋白质) 名称
J427 M2S3 #12	pHybE-h10F7VH.la.glm (SEQ ID NO: 42)	pHybE-hCk V3 J427 M2S3 #12 (SEQ ID NO: 52)	h10F7-M12
J427 M2S3 #27	pHybE-h10F7VH.la.glm (SEQ ID NO: 42)	pHybE-hCk V3 J427 M2S3 #27 (SEQ ID NO: 53)	h10F7-M27
J439MIS3R5#10	pHybE-hCgl,z.non-a,mut(234,235) V2 J439MIS3R5#10 (SEQ ID NO: 43)	pHybE-hCk V3 J439MIS3R5#10 (SEQ ID NO: 50)	h10F7-M10
J439MIS3R5#11	pHybE-hCgl,z.non-a,mut(234,235) V2 J439MIS3R5#11 (SEQ ID NO: 44)	pHybE-hCk V3 J439MIS3R5#11 (SEQ ID NO: 51)	h10F7-M11
J439MIS2(H)3 #A6	pHybE-hCgl,z.non-a,mut(234,235) V2 J439MIS2(H)3 #A6 (SEQ ID NO: 45)	pHybE-hCk V3 J439MIS2(H)3#A6 (SEQ ID NO: 54)	h10F7-A6
J439MIS2(H)3 #A11	pHybE-hCgl,z.non-a,mut(234,235) V2 J439MIS2(H)3 #A11 (SEQ ID NO: 46)	pHybE-hCk V3 J439MIS3R5#11 (SEQ ID NO: 51)	h10F7-A11
J439MIS2(H)3 #A16	pHybE-hCgl,z.non-a,mut(234,235) V2 J439MIS2(H)3 #A16 (SEQ ID NO: 47)	pHybE-hCk V3 J439MIS2(H)3#A6 (SEQ ID NO: 54)	h10F7-A16
J439MIS2(H)3 #B13	pHybE-hCgl,z.non-a,mut(234,235) V2 J439MIS2(H)3 #B13 (SEQ ID NO: 48)	pHybE-hCk V3 J439MIS3R5#11 (SEQ ID NO: 51)	h10F7-B13
J439MIS2(H)3 #B20	pHybE-hCgl,z.non-a,mut(234,235) V2 J439MIS2(H)3 #B20 (SEQ ID NO: 49)	pHybE-hCk V3 J439MIS3R5#11 (SEQ ID NO: 51)	h10F7-B20

实施例 2: 抗 IL-13 和抗 IL-17 双重可变结构域 (DVD) 结合蛋白的产生和表征

按照本领域已知方法, 通过合成编码 DVD 结合蛋白可变重链和 DVD 结合蛋白可变轻链序列的多核苷酸片段, 并将该片段克隆至 pHybC-D2 载体, 使用具有已知氨基酸序列的亲本抗体产生四链双重可变结构域 (DVD) 结合蛋白。按照本领域已知方法, 将 DVD 结合蛋白构建体克隆至 293 细胞中并在该细胞中表达并纯化。下面提供 DVD 结合蛋白的 DVD VH 和 VL 链。

[0193] 实施例 2.1: 结合 IL-13 和 IL-17 的 DVD 结合蛋白

表 4

DVD 可变结构域名称	外来可变结构域名称	接头	内部可变结构域	SEQ ID VD1 - X1 - VD2 式
DVD2148H	AB397VH	HG-短	AB273VH	30 - 21 - 36
DVD2148L	AB397VL	LK-短	AB273VL	31 - 13 - 37
DVD2149H	AB273H	HG-短	AB397VH	36 - 21 - 30
DVD2149L	AB273L	LK-短	AB397VL	37 - 13 - 31
DVD2150H	AB397VH	HG-短	AB273VH	30 - 21 - 36
DVD2150L	AB397VL	LK-长	AB273VL	31 - 14 - 37
DVD2151H	AB273VH	HG-短	AB397VH	36 - 21 - 30
DVD2151L	AB273VL	LK-长	AB397VL	37 - 14 - 31
DVD2152H	AB397VH	HG-长	AB273VH	30 - 22 - 36
DVD2152L	AB397VL	LK-短	AB273VL	31 - 13 - 37
DVD2153H	AB273VH	HG-长	AB397VH	36 - 22 - 30
DVD2153L	AB273VL	LK-短	AB397VL	37 - 13 - 31
DVD2154H	AB397VH	HG-短	AB274VH	30 - 21 - 38
DVD2154L	AB397VL	LK-短	AB274VL	31 - 13 - 39
DVD2155H	AB274VH	HG-短	AB397VH	38 - 21 - 30
DVD2155L	AB274VL	LK-短	AB397VL	39 - 13 - 31
DVD2156H	AB397VH	HG-短	AB274VH	30 - 21 - 38
DVD2156L	AB397VL	LK-长	AB274VL	31 - 14 - 39
DVD2157H	AB274VH	HG-短	AB397VH	38 - 21 - 30
DVD2157L	AB274VL	LK-长	AB397VL	39 - 14 - 31
DVD2158H	AB397VH	HG-长	AB274VH	30 - 22 - 38
DVD2158L	AB397VL	LK-短	AB274VL	31 - 13 - 39
DVD2159H	AB274VH	HG-长	AB397VH	38 - 22 - 30
DVD2159L	AB274VL	LK-短	AB397VL	39 - 13 - 31

DVD 可变 结构域名 称	外来可变结 构域名称	接头	内部可变 结构域	SEQ ID VD1 - XI - VD2 式
DVD2160H	AB397VH	HG-短	AB275VH	30 - 21 - 40
DVD2160L	AB397VL	LK-短	AB275VL	31 - 13 - 40
DVD2161H	AB275VH	HG-短	AB397VH	40 - 21 - 30
DVD2161L	AB275VL	LK-短	AB397VL	41 - 13 - 31
DVD2162H	AB397VH	HG-短	AB275VH	30 - 21 - 40
DVD2162L	AB397VL	LK-长	AB275VL	31 - 14 - 41
DVD2163H	AB275VH	HG-短	AB397VH	40 - 21 - 30
DVD2163L	AB275VL	LK-长	AB397VL	41 - 14 - 31
DVD2164H	AB397VH	HG-长	AB275VH	30 - 22 - 40
DVD2164L	AB397VL	LK-短	AB275VL	31 - 13 - 41
DVD2165H	AB275VH	HG-长	AB397VH	40 - 22 - 30
DVD2165L	AB275VL	LK-短	AB397VL	41 - 13 - 31
DVD2166H	AB398VH	HG-短	AB273VH	32 - 21 - 36
DVD2166L	AB398VL	LK-短	AB273VL	33 - 13 - 37
DVD2167H	AB273VH	HG-短	AB398VH	36 - 21 - 32
DVD2167L	AB273VL	LK-短	AB398VL	37 - 13 - 33
DVD2168H	AB398VH	HG-短	AB273VH	32 - 21 - 36
DVD2168L	AB398VL	LK-长	AB273VL	33 - 14 - 37
DVD2169H	AB273VH	HG-短	AB398VH	36 - 21 - 32
DVD2169L	AB273VL	LK-长	AB398VL	37 - 14 - 33
DVD2170H	AB398VH	HG-长	AB273VH	32 - 22 - 36
DVD2170L	AB398VL	LK-短	AB273VL	33 - 13 - 37
DVD2171H	AB273VH	HG-长	AB398VH	36-22 - 32
DVD2171L	AB273VL	LK-短	AB398VL	37 - 13 - 33
DVD2172H	AB398VH	HG-短	AB274VH	32 - 21 - 38
DVD2172L	AB398VL	LK-短	AB274VL	33 - 13 - 39
DVD2173H	AB274VH	HG-短	AB398VH	38 - 21 - 32
DVD2173L	AB274VL	LK-短	AB398VL	39 - 13 - 33
DVD2174H	AB398VH	HG-短	AB274VH	32 - 21 - 38

DVD 可变 结构域名 称	外来可变结 构域名称	接头	内部可变 结构域	SEQ ID VDI - XI - VD2 式
DVD2174L	AB398VL	LK-长	AB274VL	33 - 14 - 39
DVD2175H	AB274VH	HG-短	AB398VH	38 - 21 - 32
DVD2175L	AB274VL	LK-长	AB398VL	39 - 14 - 33
DVD2176H	AB398VH	HG-长	AB274VH	32 - 22 - 38
DVD2176L	AB398VL	LK-短	AB274VL	33 - 13 - 39
DVD2177H	AB274VH	HG-长	AB398VH	38 - 22 - 32
DVD2177L	AB274VL	LK-短	AB398VL	39 - 13 - 33
DVD2178H	AB398VH	HG-短	AB275VH	32 - 21 - 40
DVD2178L	AB398VL	LK-短	AB275VL	33 - 13 - 41
DVD2179H	AB275VH	HG-短	AB398VH	40 - 21 - 32
DVD2179L	AB275VL	LK-短	AB398VL	41 - 13 - 33
DVD2180H	AB398VH	HG-短	AB275VH	32 - 21 - 40
DVD2180L	AB398VL	LK-长	AB275VL	33 - 14 - 41
DVD2181H	AB275VH	HG-短	AB398VH	40 - 21 - 32
DVD2181L	AB275VL	LK-长	AB398VL	41 - 14 - 43
DVD2182H	AB398VH	HG-长	AB275VH	32 - 22 - 40
DVD2182L	AB398VL	LK-短	AB275VL	33 - 13 - 41
DVD2183H	AB275VH	HG-长	AB398VH	40 - 22 - 32
DVD2183L	AB275VL	LK-短	AB398VL	41 - 13 - 33
DVD2184H	AB399VH	HG-短	AB273VH	34 - 21 - 36
DVD2184L	AB399VL	LK-短	AB273VL	35 - 13 - 37
DVD2185H	AB273VH	HG-短	AB399VH	36 - 21 - 34
DVD2185L	AB273VL	LK-短	AB399VL	37 - 13 - 35
DVD2186H	AB399VH	HG-短	AB273VH	34 - 21 - 36
DVD2186L	AB399VL	LK-长	AB273VL	35 - 14 - 37
DVD2187H	AB273VH	HG-短	AB399VH	36 - 21 - 34
DVD2187L	AB273VL	LK-长	AB399VL	37 - 14 - 35
DVD2188H	AB399VH	HG-长	AB273VH	34 - 22 - 36
DVD2188L	AB399VL	LK-短	AB273VL	35 - 13 - 37

DVD 可变结构域名称	外来可变结构域名称	接头	内部可变结构域	SEQ ID VD1 - X1 - VD2 式
DVD2189H	AB273VH	HG-长	AB399VH	36 - 22 - 34
DVD2189L	AB273VL	LK-短	AB399VL	37 - 13 - 35
DVD2190H	AB399VH	HG-短	AB274VH	34 - 21 - 38
DVD2190L	AB399VL	LK-短	AB274VL	35 - 13 - 39
DVD2191H	AB274VH	HG-短	AB399VH	8 - 21 - 34
DVD2191L	AB274VL	LK-短	AB399VL	39 - 13 - 35
DVD2192H	AB399VH	HG-短	AB274VH	34-21 - 38
DVD2192L	AB399VL	LK-长	AB274VL	35 - 14 - 39
DVD2193H	AB274VH	HG-短	AB399VH	38 - 21 - 34
DVD2193L	AB274VL	LK-长	AB399VL	39 - 14 - 35
DVD2194H	AB399VH	HG-长	AB274VH	34 - 22 - 38
DVD2194L	AB399VL	LK-短	AB274VL	35 ¹ 3 - 39
DVD2195H	AB274VH	HG-长	AB399VH	38 - 22 - 34
DVD2195L	AB274VL	LK-短	AB399VL	39 - 13 - 35
DVD2196H	AB399VH	HG-短	AB275VH	34 - 21 - 40
DVD2196L	AB399VL	LK-短	AB275VL	35 - 13 - 41
DVD2197H	AB275VH	HG-短	AB399VH	40 - 21 - 34
DVD2197L	AB275VL	LK-短	AB399VL	41 - 13 - 35
DVD2198H	AB399VH	HG-短	AB275VH	34 - 21 - 40
DVD2198L	AB399VL	LK-长	AB275VL	35 - 14 - 41
DVD2199H	AB275VH	HG-短	AB399VH	40 - 21 - 34
DVD2199L	AB275VL	LK-长	AB399VL	41 - 14 - 35
DVD2200H	AB399VH	HG-长	AB275VH	34 - 22 - 40
DVD2200L	AB399VL	LK-短	AB275VL	35 - 13 - 41
DVD2201H	AB275VH	HG-长	AB399VH	40 - 22 - 34
DVD2201L	AB275VL	LK-短	AB399VL	41 - 13 - 35

表 5 含有在 293 细胞中以毫克 / 升表达的亲本抗体和 DVD-Ig 构建体的产量数据。

[0194] 表 5 : 在 293 细胞中亲本抗体和 DVD-Ig 构建体产量的瞬时表达

亲本抗体或 DVD-Ig ID	N 端可变结构 域(VD)	C 端可变结构域 (VD)	表达产量 (mg/L)
AB273	IL-17 (SEQ 1)		16.6
AB274	IL-17 (SEQ 2)		44.6
AB275	IL-17 (SEQ 3)		44.2
AB397	IL-13 (SEQ 1)		73.6
AB398	IL-13 (SEQ 2)		96.0
AB399	IL-13 (SEQ 3)		83.8
DVD2148	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 1)	14.4
DVD2149	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 1)	0.6
DVD2150	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 1)	6.2
DVD2151	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 1)	0.4
DVD2152	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 1)	25.6
DVD2153	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 1)	1.0
DVD2154	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 2)	35.0
DVD2155	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 1)	30.8
DVD2156	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 2)	37.2
DVD2157	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 1)	29.2
DVD2158	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 2)	57.2
DVD2159	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 1)	37.4
DVD2160	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 3)	65.8
DVD2161	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 1)	47.2
DVD2162	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 3)	38.2
DVD2163	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 1)	33.6
DVD2164	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 3)	64.4
DVD2165	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 1)	48.5
DVD2166	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 1)	13.7
DVD2167	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 2)	8.9
DVD2168	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 1)	7.8
DVD2169	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 2)	1.9
DVD2170	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 1)	10.4
DVD2171	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 2)	4.3
DVD2172	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 2)	26.5

DVD2173	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 2)	16.5
DVD2174	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 2)	28.3
DVD2175	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 2)	10.7
DVD2176	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 2)	21.5
DVD2177	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 2)	18.4
DVD2178	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 3)	9.5
DVD2179	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 2)	8.9
DVD2180	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 3)	8.5
DVD2181	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 2)	2.8
DVD2182	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 3)	14.0
DVD2183	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 2)	9.2
DVD2184	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 1)	0.2
DVD2185	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 3)	26.9
DVD2186	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 1)	0.0
DVD2187	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 3)	2.3
DVD2188	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 1)	0.0
DVD2189	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 3)	1.3
DVD2190	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 2)	31.5
DVD2191	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 3)	42.7
DVD2192	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 2)	2.6
DVD2193	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 3)	18.3
DVD2194	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 2)	0.0
DVD2195	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 3)	21.6
DVD2196	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 3)	27.4
DVD2197	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 3)	72.2
DVD2198	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 3)	0.1
DVD2199	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 3)	8.1
DVD2200	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 3)	1.1
DVD2201	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 3)	11.4

所有 DVD-Ig 分子在 293 细胞中良好表达。DVD-Ig 分子可容易地通过蛋白 A 柱纯化。在大多数情况下,可容易地从 293 细胞的上清液中获得 >5 mg/L 纯化的 DVD-Ig 蛋白。

[0195] 实施例 3:用于测定亲本抗体和 DVD-Ig 蛋白的功能活性的测定法

实施例 3.1:IL-13 生物测定和中和测定:将 A549 细胞以 $1.5-2 \times 10^5$ 个细胞/孔接种于 100 μ L 体积中,并在 37°C、5% CO₂ 下温育过夜。在 16-20 小时过夜温育后,除去最初的 100 μ L 培养基接种体积,将 100 μ L 的 400 ng/mL (2x 浓缩的) rhTNF- α 加入所有孔中。将板置于 37°C、5% CO₂ 下直到加入 IL-13 和抗体或 DVD-Ig 蛋白。在完全 F12 培养基中制备抗体或 DVD-Ig 蛋白的 20 μ g/mL 工作原液 (4x 浓缩的)。在 Marsh 稀释板中用完全 F12 进

行 8 点系列稀释 ($5 \mu\text{g/mL}$ – $0.0003 \mu\text{g/mL}$)。将 $60 \mu\text{L}$ / 孔的各抗体或 DVD-Ig 蛋白稀释液一式四份加入 96 孔 v 底 (Costar# 3894) 板中, 并将 $60 \mu\text{L}$ 4x 浓缩的 (20ng/mL) IL-13 溶液加到所有孔中, 除了仅细胞的对照。在 1 小时温育后, 将 $100 \mu\text{L}$ 的上述 IL-13/ 抗体或 DVD-Ig 蛋白复合物加到 A549 细胞中。全部孔体积等于 $200 \mu\text{L}$ 。重组 IL-13 的终浓度为 5ng/mL , rhTNF- α 为 200ng/mL 。然后所有板试剂是 1x 浓缩的。在 16–20 小时温育后, 将孔内容物 ($200 \mu\text{L}$) 转移到 96- 孔圆底板 (Costar# 3799), 并置于 -20°C 冷藏室中。在 Assay Lab 中通过 ELISA 测定上清液的 hTARC 水平。通过计算相对于仅 5ng/mL IL-13 的对照值的百分比抑制, 求出中和效价。应用 GraphPad Prism, 计算报告的 IC_{50} 值 (S 型曲线剂量反应)。

[0196] 表 6 : 用 IL-13 亲本抗体和 DVD-Ig 蛋白的 IL-13 中和测定

亲本抗体或 DVD-Ig ID	N 端可变结 构域(VD)	C 端可变结 构域(VD)	N 端 VD IL13 中和测定 IC50 nM	C 端 VD IL13 中和测定 IC50 nM
AB397	IL-13 (SEQ 1)		0.033	
AB398	IL-13 (SEQ 2)		0.082	
AB399	IL-13 (SEQ 3)		0.043	
DVD2148	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 1)	0.054	NA
DVD2149	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 1)	NA	1.426
DVD2150	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 1)	0.099	NA
DVD2151	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 1)	NA	0.526
DVD2152	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 1)	0.112	NA
DVD2153	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 1)	NA	2.442
DVD2154	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 2)	0.430	NA
DVD2155	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 1)	NA	1.180
DVD2156	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 2)	0.129	NA
DVD2157	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 1)	NA	0.244
DVD2158	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 2)	0.131	NA
DVD2159	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 1)	NA	0.876
DVD2160	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 3)	0.178	NA
DVD2161	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 1)	NA	0.812
DVD2162	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 3)	0.126	NA
DVD2163	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 1)	NA	0.195
DVD2164	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 3)	0.146	NA
DVD2165	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 1)	NA	0.355
DVD2166	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 1)	0.089	NA
DVD2167	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 2)	NA	1.700
DVD2168	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 1)	0.119	NA
DVD2169	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 2)	NA	0.309
DVD2170	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 1)	0.106	NA
DVD2171	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 2)	NA	0.506
DVD2172	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 2)	0.111	NA
DVD2173	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 2)	NA	2.136
DVD2174	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 2)	0.085	NA
DVD2175	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 2)	NA	0.115

DVD2176	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 2)	0.106	NA
DVD2177	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 2)	NA	0.155
DVD2178	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 3)	0.088	NA
DVD2179	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 2)	NA	0.916
DVD2180	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 3)	0.091	NA
DVD2181	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 2)	NA	0.040
DVD2182	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 3)	0.077	NA
DVD2183	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 2)	NA	0.086
DVD2184	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 1)	0.121	NA
DVD2185	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 3)	NA	1.254
DVD2187	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 3)	NA	0.811
DVD2189	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 3)	NA	0.172
DVD2190	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 2)	0.087	NA
DVD2191	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 3)	NA	0.165
DVD2192	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 2)	0.056	NA
DVD2193	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 3)	NA	0.028
DVD2195	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 3)	NA	0.052
DVD2196	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 3)	0.029	NA
DVD2197	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 3)	NA	0.081
DVD2199	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 3)	NA	0.088
DVD2200	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 3)	0.096	NA
DVD2201	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 3)	NA	0.092

在 N 端或 C 端位置含有来自 AB397、AB398 或 AB399 的 VD 的所有 DVD-Ig 蛋白在 A549 IL-13 中和测定中显示中和。

[0197] 实施例 3.2 :IL-17 生物测定和中和测定

人 HS27 细胞系 (ATCC #CRL-1634) 在响应 IL-17 时分泌 IL-6。IL-17 诱导的 IL-6 分泌被中和性抗 IL-17 抗体抑制 (参见例如 J. Imm. 155:5483-5486 (1995) 或 Cytokine 9:794-800 (1997))。

[0198] 将 HS27 细胞保持在测定培养基 (DMEM 高葡萄糖培养基 (Gibco #11965), 该培养基含 10% 胎牛血清 (Gibco#26140)、4 mM L- 谷氨酰胺、1 mM 丙酮酸钠、青霉素 G (100 U/500 ml) 和链霉素 (100 μ g/500 ml)) 中。使细胞在 T150 细颈瓶中生长, 直到它们在测定日为约 80-90% 汇合。将人 IL-17 (R&D Systems, #317-IL/CF) 在没有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 、冷冻保藏的新融化使用的无菌 PBS 中重配, 并在测定培养基中稀释到 40 ng/ml (4X)。在单独的板中制备抗体的系列稀释液 (4X 浓缩液), 与等体积 40ng/ml (4X) 的人 IL-17 混合, 并在 37°C 下温育 1 小时。将 HS27 细胞 (通常在 50 μ l 测定培养基中约 20,000 个细胞) 加到 96- 平底组织培养板 (Costar #3599) 的各孔中, 接着加入 50 μ l 预先温育的抗体或 DVD-Ig 蛋白加上 IL-17 混合物。IL-17 的终浓度为 10ng/ml。将细胞在 37°C 下温育约 24 小时。然

后收集培养基上清液。按照生产商的说明书,使用市售 Meso Scale Discovery 试剂盒,通过测定上清液中 IL-6 的量,来测量 IL-17 中和的水平。利用抗体或 DVD-Ig 蛋白的对数与 IL-6 量可变斜率拟合,得到 IC50 值。

[0199] 表 7 :用 IL-17 亲本抗体和 DVD-Ig 蛋白的 IL-17 中和测定

亲本抗体或 DVD-Ig ID	N 端可变 结构域(VD)	C 端可变 结构域(VD)	N 端 VD IL17 中和测 定 IC50 nM	C 端 VD IL17 中和 测定 IC50 nM
AB273	IL-17 (SEQ 1)		0.0198	
AB274	IL-17 (SEQ 2)		0.003	
AB275	IL-17 (SEQ 3)		0.0052	
DVD2148	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 1)	NA	0.0116
DVD2149	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 1)	0.0028	NA
DVD2150	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 1)	NA	0.004
DVD2151	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 1)	0.0179	NA
DVD2152	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 1)	NA	0.0069
DVD2153	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 1)	0.0049	NA
DVD2154	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 2)	NA	0.3508
DVD2155	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 1)	0.0078	NA
DVD2156	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 2)	NA	0.0155
DVD2157	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 1)	0.0066	NA
DVD2158	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 2)	NA	0.0998
DVD2159	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 1)	0.0081	NA
DVD2160	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 3)	NA	0.7034
DVD2161	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 1)	0.0144	NA
DVD2162	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 3)	NA	0.0213
DVD2163	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 1)	0.0151	NA
DVD2164	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 3)	NA	0.1354
DVD2165	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 1)	0.0133	NA
DVD2166	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 1)	NA	0.0164
DVD2167	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 2)	0.0029	NA
DVD2168	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 1)	NA	0.0025
DVD2169	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 2)	0.0021	NA
DVD2170	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 1)	NA	0.0053
DVD2171	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 2)	0.0011	NA
DVD2172	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 2)	NA	0.6781
DVD2173	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 2)	0.008	NA
DVD2174	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 2)	NA	0.0126

DVD2175	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 2)	0.0089	NA
DVD2176	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 2)	NA	0.1164
DVD2177	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 2)	0.0101	NA
DVD2178	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 3)	NA	0.6911
DVD2179	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 2)	0.0097	NA
DVD2180	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 3)	NA	0.0567
DVD2181	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 2)	0.0097	NA
DVD2182	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 3)	NA	0.266
DVD2183	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 2)	0.0125	NA
DVD2184	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 1)	NA	0.4054
DVD2185	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 3)	0.0013	NA
DVD2187	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 3)	0.0016	NA
DVD2189	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 3)	0.0017	NA
DVD2190	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 2)	NA	0.061
DVD2191	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 3)	0.013	NA
DVD2192	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 2)	NA	0.015
DVD2193	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 3)	0.014	NA
DVD2195	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 3)	0.0181	NA
DVD2196	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 3)	NA	0.0551
DVD2197	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 3)	0.005	NA
DVD2199	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 3)	0.0102	NA
DVD2200	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 3)	NA	0.0072
DVD2201	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 3)	0.0116	NA

在 N 端或 C 端位置含有来自 AB273、AB274 或 AB275 的 VD 的所有 DVD-Ig 蛋白在 HS27 IL-17 中和测定中显示中和。

[0200] 实施例 3.3 : 采用 BIACORE 技术测定亲和力

表 8 : 用于 Biacore 分析的试剂

测定	抗原	售方名称	售方	目录 #
	IL-17	重组人 IL-17	R&Dsystems	317-IL
	IL-13	重组人 IL-13	R&Dsystems	213-IL

BIACORE 方法 :

BIACORE 测定法 (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) 以结合速率和解离速率常数的动力学测量测定抗体或 DVD-Ig 的亲和力。在 25°C 下, 用 Biacore® 1000 或 3000 仪器 (Biacore® AB, Uppsala, Sweden), 使用流动的 HBS-EP (10 mM HEPES [pH 7.4]、150 mM NaCl、3 mM EDTA 和 0.005% 表面活性剂 P20), 通过基于表面等离子体共振的测量测定抗体或 DVD-Ig 蛋白与靶抗原 (例如纯化的重组靶抗原) 的结合。所有化学试剂获自 Biacore® AB (Uppsala, Sweden) 或另外获自文中所述的不同来源。例如, 按照生产商的说明书和程序, 在 25 μg/ml 下, 使用标准胺偶联试剂盒, 将在 10 mM 乙酸钠 (pH 4.5) 中稀释的约 5000 RU 山羊抗小

鼠 IgG, (Fc γ), 片段特异性多克隆抗体 (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) 直接固定在 CM5 研究级生物传感器芯片上。生物传感器表面上未反应的部分用乙醇胺封闭。在流动室 2 和 4 中的修饰的羧甲基葡聚糖表面用作反应表面。在流动室 1 和 3 中不含山羊抗小鼠 IgG 的未修饰的羧甲基葡聚糖用作参考表面。对于动力学分析, 应用 Biaevaluation 4.0.1 软件, 使来源于 1:1 Langmuir 结合模型的速率方程同时对所有 8 次注射的结合和解离相拟合 (使用总体拟合分析)。将纯化的抗体或 DVD-Ig 蛋白在 HEPES 缓冲盐水中稀释, 以用于在羊抗小鼠 IgG 特异性反应表面上捕获。将作为配体捕获的抗体或 DVD-Ig 蛋白 (25 $\mu\text{g/ml}$) 以 5 μl / 分钟的流速注入反应基质上。在 25 μl / 分钟的连续流速下, 测定结合和解离速率常数 k_{on} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) 和 k_{off} (s^{-1})。通过在 10-200 nM 范围的不同抗原浓度下进行动力学结合测量来获得速率常数。随后通过下式由动力学速率常数计算抗体或 DVD-Ig 蛋白和靶抗原之间的反应的平衡解离常数 (M) : $K_{\text{D}} = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 。将结合记录为时间的函数, 并计算动力学速率常数。在该测定中, 可以测量快至 $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 的结合速率和慢至 10^{-6} s^{-1} 的解离速率。

[0201] 表 9 : 亲本抗体和 DVD-Ig 蛋白的 BIACORE 分析

亲本抗体 或 DVD-Ig ID	N 端可变结构 域(VD)	C 端可变结构 域(VD)	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	k_D (M)
AB273	IL-17 (SEQ 1)		2.00E+06	<1.0e-6	<5.0E-13
AB274	IL-17 (SEQ 2)		1.10E+06	8.20E-06	7.40E-12
AB275	IL-17 (SEQ 3)		1.90E+06	6.50E-05	3.40E-11
AB397	IL-13 (SEQ 1)		9.20E+05	1.20E-04	1.30E-10
AB398	IL-13 (SEQ 2)		6.30E+05	2.80E-05	4.50E-11
AB399	IL-13 (SEQ 3)		3.40E+06	6.40E-05	1.90E-11
AB397	IL-13 (SEQ 1)		9.20E+05	1.20E-04	1.30E-10
AB274	IL-17 (SEQ 2)		1.10E+06	8.20E-06	7.40E-12
DVD2155	IL-17 (SEQ 2)		2.70E+06	6.90E-06	2.60E-12
DVD2155		IL-13 (SEQ 1)	2.30E+05	3.80E-05	1.60E-10
AB397	IL-13 (SEQ 1)		9.20E+05	1.20E-04	1.30E-10
AB274	IL-17 (SEQ 2)		1.10E+06	8.20E-06	7.40E-12
DVD2157	IL-17 (SEQ 2)		1.50E+06	2.60E-05	1.80E-11
DVD2157		IL-13 (SEQ 1)	3.30E+05	6.90E-05	2.10E-10
AB397	IL-13 (SEQ 1)		9.20E+05	1.20E-04	1.30E-10
AB274	IL-17 (SEQ 2)		1.10E+06	8.20E-06	7.40E-12
DVD2158	IL-13 (SEQ 1)		1.60E+06	1.40E-04	8.60E-11
DVD2158		IL-17 (SEQ 2)	2.00E+04	<1.0e-6	<5.0E-11
DVD2159	IL-17 (SEQ 2)		2.50E+06	1.20E-05	4.90E-12
DVD2159		IL-13 (SEQ 1)	2.60E+05	5.30E-05	2.00E-10
AB397	IL-13 (SEQ 1)		9.20E+05	1.20E-04	1.30E-10
AB275	IL-17 (SEQ 3)		1.90E+06	6.50E-05	3.40E-11
DVD2161	IL-17 (SEQ 3)		1.60E+06	4.50E-05	2.70E-11
DVD2161		IL-13 (SEQ 1)	1.10E+05	4.10E-05	3.80E-10
AB397	IL-13 (SEQ 1)		9.20E+05	1.20E-04	1.30E-10
AB275	IL-17 (SEQ 3)		1.90E+06	6.50E-05	3.40E-11
DVD2164	IL-13 (SEQ 1)		1.50E+06	1.70E-04	1.10E-10
DVD2164		IL-17 (SEQ 3)	1.80E+04	3.10E-05	1.70E-09
DVD2165	IL-17 (SEQ 3)		2.30E+06	3.20E-05	1.40E-11
DVD2165		IL-13 (SEQ 1)	2.60E+05	5.70E-05	2.20E-10
AB398	IL-13 (SEQ 2)		6.30E+05	2.80E-05	4.50E-11
AB273	IL-17 (SEQ 1)		2.00E+06	<1.0e-6	<5.0E-13
DVD2166	IL-13 (SEQ 2)		7.60E+05	2.60E-05	3.40E-11
DVD2166		IL-17 (SEQ 1)	1.30E+05	9.40E-06	7.50E-11
DVD2167	IL-17 (SEQ 1)		2.70E+06	<1.0e-6	<3.7E-13
DVD2167		IL-13 (SEQ 2)	2.10E+04	<1.0e-6	<4.8E-11
AB398	IL-13 (SEQ 2)		6.30E+05	2.80E-05	4.50E-11
AB273	IL-17 (SEQ 1)		2.00E+06	<1.0e-6	<5.0E-13
DVD2168	IL-13 (SEQ 2)		6.80E+05	3.70E-05	5.40E-11
DVD2168		IL-17 (SEQ 1)	4.00E+05	<1.0e-6	<2.5E-12

AB398	IL-13 (SEQ 2)		6.30E+05	2.80E-05	4.50E-11
AB273	IL-17 (SEQ 1)		2.00E+06	<1.0e-6	<5.0E-13
DVD2171	IL-17 (SEQ 1)		1.90E+06	2.10E-05	1.10E-11
DVD2171		IL-13 (SEQ 2)	2.00E+05	<1.0e-6	<5e-12
AB398	IL-13 (SEQ 2)		6.30E+05	2.80E-05	4.50E-11
AB274	IL-17 (SEQ 2)		1.10E+06	8.20E-06	7.40E-12
DVD2172	IL-13 (SEQ 2)		8.90E+05	2.90E-05	3.30E-11
DVD2172		IL-17 (SEQ 2)	6.80E+03	1.70E-04	2.60E-08
DVD2173	IL-17 (SEQ 2)		2.50E+06	9.00E-06	3.60E-12
DVD2173		IL-13 (SEQ 2)	3.10E+05	3.70E-05	1.20E-10
AB398	IL-13 (SEQ 2)		6.30E+05	2.80E-05	4.50E-11
AB274	IL-17 (SEQ 2)		1.10E+06	8.20E-06	7.40E-12
DVD2174	IL-13 (SEQ 2)		7.90E+05	2.80E-05	3.60E-11
DVD2174		IL-17 (SEQ 2)	1.80E+05	1.80E-05	9.80E-11
DVD2175	IL-17 (SEQ 2)		2.70E+06	5.40E-06	2.10E-12
DVD2175		IL-13 (SEQ 2)	5.20E+04	<1.0e-6	<1.9e-11
AB398	IL-13 (SEQ 2)		6.30E+05	2.80E-05	4.50E-11
AB274	IL-17 (SEQ 2)		1.10E+06	8.20E-06	7.40E-12
DVD2177	IL-17 (SEQ 2)		2.50E+06	1.00E-05	4.30E-12
DVD2177		IL-13 (SEQ 2)	1.10E+05	<1.0e-6	<9.1e-12
AB398	IL-13 (SEQ 2)		6.30E+05	2.80E-05	4.50E-11
AB275	IL-17 (SEQ 3)		1.90E+06	6.50E-05	3.40E-11
DVD2179	IL-17 (SEQ 3)		1.70E+06	6.40E-05	3.90E-11
DVD2179		IL-13 (SEQ 2)	2.80E+05	1.00E-06	3.60E-12
AB398	IL-13 (SEQ 2)		6.30E+05	2.80E-05	4.50E-11
AB275	IL-17 (SEQ 3)		1.90E+06	6.50E-05	3.40E-11
DVD2181	IL-17 (SEQ 3)		2.60E+06	4.20E-05	1.60E-11
DVD2181		IL-13 (SEQ 2)	8.20E+04	<1.0e-6	<1.2e-11
AB398	IL-13 (SEQ 2)		6.30E+05	2.80E-05	4.50E-11
AB275	IL-17 (SEQ 3)		1.90E+06	6.50E-05	3.40E-11
DVD2183	IL-17 (SEQ 3)		2.30E+06	3.60E-05	1.50E-11
DVD2183		IL-13 (SEQ 2)	2.40E+05	<1.0e-6	<4.2e-12
AB399	IL-13 (SEQ 3)		3.40E+06	6.40E-05	1.90E-11
AB273	IL-17 (SEQ 1)		2.00E+06	<1.0e-6	<5.0E-13
DVD2185	IL-17 (SEQ 1)		1.70E+06	1.50E-05	8.90E-12
DVD2185		IL-13 (SEQ 3)	1.10E+05	<1.0e-6	<9.1e-12
AB399	IL-13 (SEQ 3)		3.40E+06	6.40E-05	1.90E-11
AB273	IL-17 (SEQ 1)		2.00E+06	<1.0e-6	<5.0E-13
DVD2187	IL-17 (SEQ 1)		2.60E+06	<1.0e-6	<3.8E-13
DVD2187		IL-13 (SEQ 3)	2.90E+05	2.10E-05	7.20E-11
AB399	IL-13 (SEQ 3)		3.40E+06	6.40E-05	1.90E-11
AB273	IL-17 (SEQ 1)		2.00E+06	<1.0e-6	<5.0E-13
DVD2189	IL-17 (SEQ 1)		2.50E+06	<1.0e-6	<4.0E-13
DVD2189		IL-13 (SEQ 3)	4.10E+05	3.90E-05	9.40E-11

AB399	IL-13 (SEQ 3)	3.40E+06	6.40E-05	1.90E-11
AB274	IL-17 (SEQ 2)	1.10E+06	8.20E-06	7.40E-12
DVD2190	IL-13 (SEQ 3)	2.60E+06	5.70E-05	2.10E-11
DVD2190	IL-17 (SEQ 2)	8.90E+04	3.40E-06	3.80E-11
DVD2191	IL-17 (SEQ 2)	2.50E+06	1.20E-05	4.60E-12
DVD2191	IL-13 (SEQ 3)	2.60E+05	4.40E-05	1.70E-10
AB399	IL-13 (SEQ 3)	3.40E+06	6.40E-05	1.90E-11
AB274	IL-17 (SEQ 2)	1.10E+06	8.20E-06	7.40E-12
DVD2192	IL-13 (SEQ 3)	1.50E+06	5.10E-05	3.50E-11
DVD2192	IL-17 (SEQ 2)	2.60E+05	<1.0e-6	<3.8E-12
DVD2193	IL-17 (SEQ 2)	1.90E+06	2.20E-05	1.20E-11
DVD2193	IL-13 (SEQ 3)	5.90E+05	3.90E-05	6.60E-11
AB399	IL-13 (SEQ 3)	3.40E+06	6.40E-05	1.90E-11
AB274	IL-17 (SEQ 2)	1.10E+06	8.20E-06	7.40E-12
DVD2195	IL-17 (SEQ 2)	2.40E+06	4.80E-06	2.00E-12
DVD2195	IL-13 (SEQ 3)	2.60E+06	3.70E-05	1.40E-11
AB399	IL-13 (SEQ 3)	3.40E+06	6.40E-05	1.90E-11
AB275	IL-17 (SEQ 3)	1.90E+06	6.50E-05	3.40E-11
DVD2196	IL-13 (SEQ 3)	2.20E+06	6.40E-05	2.90E-11
DVD2196	IL-17 (SEQ 3)	1.10E+05	<1.0e-6	<9.1E-12
DVD2197	IL-17 (SEQ 3)	1.60E+06	6.20E-05	3.80E-11
DVD2197	IL-13 (SEQ 3)	3.10E+05	4.40E-05	1.40E-10
AB399	IL-13 (SEQ 3)	3.40E+06	6.40E-05	1.90E-11
AB275	IL-17 (SEQ 3)	1.90E+06	6.50E-05	3.40E-11
DVD2199	IL-17 (SEQ 3)	2.30E+06	4.40E-05	1.90E-11
DVD2199	IL-13 (SEQ 3)	1.30E+06	3.40E-05	2.60E-11
AB399	IL-13 (SEQ 3)	3.40E+06	6.40E-05	1.90E-11
AB275	IL-17 (SEQ 3)	1.90E+06	6.50E-05	3.40E-11
DVD2200	IL-13 (SEQ 3)	1.30E+06	6.00E-05	4.50E-11
DVD2200	IL-17 (SEQ 3)	1.80E+05	4.60E-06	2.50E-11
DVD2201	IL-17 (SEQ 3)	1.60E+06	6.30E-05	4.00E-11
DVD2201	IL-13 (SEQ 3)	2.40E+06	5.70E-05	2.40E-11

通过 Biacore 技术表征的所有 DVD-Ig 蛋白的结合均被保持,并且与亲本抗体的相当。所有可变结构域以与亲本抗体相似的高亲和力结合。

[0202] 实施例 4 :抗体和 DVD-Ig 蛋白的表征

例如,采用如实施例 3 中的细胞因子生物测定法,测定了纯化的 DVD-Ig 蛋白抑制功能活性的能力。采用如实施例 4 中描述的表面等离子体共振 (Biacore®) 测量,测定了 DVD-Ig 蛋白与重组人抗原的结合亲和力。对得自生物测定的 IC₅₀ 值以及抗体和 DVD-Ig 蛋白的亲和力排序。选择完整保持亲本 mAb 活性的 DVD-Ig 蛋白作为进一步开发的候选物。对最上面的 2-3 个最有利的 DVD-Ig 蛋白进行了进一步表征。

[0203] 实施例 4.1 :人源化抗体或 DVD-Ig 蛋白的药代动力学分析

在 Sprague-Dawley 大鼠和食蟹猴中进行了药物代谢动力学研究。用单剂量的 4 mg/kg mAb 或 DVD-Ig 蛋白对雄性和雌性大鼠和食蟹猴进行静脉内或皮下给药,使用抗原捕获 ELISA 分析样品,并且通过非区室分析测定药代动力学参数。简单地说,ELISA 板用山羊抗生物素抗体 (5 mg/ml, 4°C, 过夜) 包被,用 Superblock (Pierce) 封闭,并在室温下与 10%

Superblock TTBS中 50 ng/ml的生物素化的人抗原温育2小时。血清样品经连续稀释(0.5%血清,10% Superblock,在TTBS中),并在室温下在板上温育30分钟。使用HRP标记的山羊抗人抗体进行检测,并应用4参数逻辑斯谛拟合,借助标准曲线测定浓度。应用WinNonlin软件(Pharsight Corporation, Mountain View, CA),通过非区室模型测定药代动力学参数的值。选择具有良好药代动力学特征的人源化mAb(T_{1/2}为8-13天或更好,具有低清除率和优异的生物利用度50-100%)。

[0204] 实施例4.2:人源化单克隆抗体和DVD-Ig蛋白的物理化学和体外稳定性分析

大小排阻层析法

用水将抗体或DVD-Ig蛋白稀释到2.5 mg/mL,并使用TSK gel G3000 SWXL柱(Tosoh Bioscience,目录号k5539-05k)在Shimadzu HPLC系统上对20 mL进行分析。用211 mM硫酸钠、92 mM磷酸钠(pH 7.0),以0.3 mL/分钟的流速从柱上洗脱样品。HPLC系统操作条件如下:

流动相: 211 mM Na₂SO₄, 92 mM Na₂HPO₄*7H₂O, pH 7.0

梯度: 等度

流速: 0.3 mL/分钟

检测器波长: 280 nm

自动进样器冷却器温度: 4°C

柱式加热炉温度: 环境

运行时间: 50分钟

表10含有通过上述方案测定的表示为百分比单体(预期分子量的非聚集的蛋白质)的亲本抗体和DVD-Ig蛋白的纯度数据。

[0205] 表10:通过大小排阻层析法测定的亲本抗体和DVD-Ig蛋白的纯度

亲本抗体或 DVD-Ig ID	N 端可变结构域 (VD)	C 端可变结构域 (VD)	%单体(纯度)
AB273	IL-17 (SEQ 1)		100
AB274	IL-17 (SEQ 2)		70.7
AB275	IL-17 (SEQ 3)		94.5
AB397	IL-13 (SEQ 1)		93
AB398	IL-13 (SEQ 2)		92.8
AB399	IL-13 (SEQ 3)		98.8
DVD2148	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 1)	69.6
DVD2150	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 1)	68.7
DVD2152	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 1)	63.5
DVD2153	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 1)	79
DVD2154	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 2)	78.3
DVD2155	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 1)	93.2
DVD2156	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 2)	75.1
DVD2157	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 1)	92.5
DVD2158	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 2)	81.4
DVD2159	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 1)	94.9
DVD2160	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 3)	73.1
DVD2161	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 1)	85.6
DVD2162	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 3)	66
DVD2163	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 1)	70
DVD2164	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 3)	84
DVD2165	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 1)	84
DVD2166	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 1)	82.5
DVD2167	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 2)	94
DVD2168	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 1)	94
DVD2169	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 2)	68.5
DVD2170	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 1)	73
DVD2171	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 2)	83
DVD2172	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 2)	82
DVD2173	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 2)	91
DVD2174	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 2)	83
DVD2175	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 2)	88

DVD2176	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 2)	78
DVD2177	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 2)	94
DVD2178	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 3)	65
DVD2179	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 2)	81
DVD2180	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 3)	69
DVD2181	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 2)	88
DVD2182	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 3)	62
DVD2183	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 2)	89
DVD2185	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 3)	99.9
DVD2187	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 3)	84
DVD2189	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 3)	84
DVD2190	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 2)	99
DVD2191	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 3)	98
DVD2192	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 2)	99
DVD2193	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 3)	99
DVD2195	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 3)	96
DVD2196	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 3)	99
DVD2197	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 3)	96
DVD2199	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 3)	93
DVD2200	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 3)	92
DVD2201	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 3)	99

DVD-Ig 蛋白显示良好的 SEC 特征,其大多数 DVD-Ig 蛋白显示 >90% 单体。这种 DVD-Ig 蛋白特征与亲本抗体所观察到的类似。

[0206] SDS-PAGE

在还原和非还原两种条件下,通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析抗体和 DVD-Ig 蛋白。将阿达木单抗批次 AFP04C 用作对照。对于还原条件,将样品与含 100 mM DTT 的 2X tris 甘氨酸 SDS-PAGE 样品缓冲液 (Invitrogen, 目录号 LC2676, 批号 1323208) 1:1 混合,并于 60°C 加热 30 分钟。对于非还原条件,将样品与样品缓冲液 1:1 混合,并于 100°C 加热 5 分钟。将还原的样品 (10 mg/泳道) 加样到 12% 预制的 tris-甘氨酸凝胶 (Invitrogen, 目录号 EC6005box, 批号 6111021) 上,将非还原样品 (10 mg/泳道) 加样到 8%-16% 预制的 tris-甘氨酸凝胶 (Invitrogen, 目录号 EC6045box, 批号 6111021) 上。SeeBlue Plus 2 (Invitrogen, 目录号 LC5925, 批号 1351542) 用作分子量标志物。将凝胶在 XCell SureLock 微室凝胶盒 (mini cell gel box) (Invitrogen, 目录号 EI0001) 中运行,并且首先应用 75 的电压使样品堆积在凝胶中,随后应用 125 的恒定电压直至染料前沿到达凝胶的底部来分离蛋白质。所使用的运行缓冲液为 1X tris 甘氨酸 SDS 缓冲液,其从 10X tris 甘氨酸 SDS 缓冲液 (ABC, MPS-79-080106) 制备。将凝胶用胶态蓝染料 (Invitrogen 目录号 46-7015, 46-7016) 染色过夜,并用 Milli-Q 水脱色,直至背景透明。然后使用 Epson

Expression 扫描仪 (型号 1680, S/N DASX003641) 扫描染色的凝胶。

[0207] 沉降速度分析

将抗体或 DVD-Ig 蛋白加样到 3 个标准二区碳环氧类树脂中心杯 (two-sector carbon epon centerpiece) 每一个的样品室中。这些中心杯具有 1.2 cm 光程长度, 且由蓝宝石窗制造。对于参比缓冲液使用 PBS, 且各室含有 140 μ L。在 Beckman ProteomeLab XL-I 分析型超速离心机 (系列号 PL106C01) 中, 使用 4 孔 (AN-60Ti) 转子同时检查所有样品。

[0208] 运行条件是程序化的, 且使用 ProteomeLab (v5.6) 进行离心机控制。分析前使样品和转子热平衡 1 小时 (20.0 \pm 0.1 $^{\circ}$ C)。适当的各室加样的确认在 3000 rpm 进行, 并记录各室的单次扫描。沉降速度条件如下:

样品室体积 :420 mL

参比室体积 :420 mL

温度 :20 $^{\circ}$ C

转子速度 :35,000 rpm

时间 :8:00 小时

UV 波长 :280 nm

径向步长 :0.003 cm

数据采集 :每步一个数据点, 未取信号平均。

[0209] 扫描总数 :100

完整抗体的 LC-MS 分子量测量

通过 LC-MS 分析完整抗体和 DVD-Ig 蛋白的分子量。用水将各抗体或 DVD-Ig 蛋白稀释到约 1 mg/mL。使用具有蛋白质微截留 (microtrap) (Michrom Bioresources, Inc, 目录号 004/25109/03) 的 1100 HPLC (Agilent) 系统脱盐, 并将 5 mg 样品引入 API Qstar pulsar i 质谱仪 (Applied Biosystems) 中。使用短梯度来洗脱样品。用流动相 A (在 HPLC 水中的 0.08% FA、0.02% TFA) 和流动相 B (在乙腈中的 0.08% FA 和 0.02% TFA) 在 50 mL/分钟流速下运行梯度。按 4.5 千伏喷射电压以 2000 至 3500 质荷比的扫描范围操作质谱仪。

[0210] 抗体和 DVD-Ig 蛋白轻链和重链的 LC-MS 分子量测量

通过 LC-MS 分析抗体和 DVD-Ig 蛋白轻链 (LC)、重链 (HC) 和去糖基化 HC 的分子量测量。用水将抗体和 DVD-Ig 蛋白稀释到 1 mg/mL, 并在 37 $^{\circ}$ C 下用 10 mM DTT 的终浓度将样品还原为 LC 和 HC 达 30 分钟。为了将抗体和 DVD-Ig 蛋白去糖基化, 将 100 mg 抗体或 DVD-Ig 蛋白与 2 mL 的 PNGase F、5 mL 的 10% N-辛基葡糖苷以总体积 100 mL 在 37 $^{\circ}$ C 下温育过夜。去糖基化后, 用 10 mM DTT 的终浓度将样品在 37 $^{\circ}$ C 下还原 30 分钟。使用具有 C4 柱 (Vydac, 目录号 214TP5115, S/N 060206537204069) 的 Agilent 1100 HPLC 系统脱盐并将样品 (5 mg) 引入 API Qstar pulsar i 质谱仪 (Applied Biosystems) 中。使用短梯度来洗脱样品。用流动相 A (HPLC 水中的 0.08% FA, 0.02% TFA) 和流动相 B (乙腈中的 0.08% FA 和 0.02% TFA) 在 50 mL/分钟流速下运行梯度。按 4.5 千伏喷射电压以 800 至 3500 质荷比的扫描范围操作质谱仪。

[0211] 肽作图

用 75 mM 碳酸氢铵中的 6 M 盐酸胍的终浓度在室温下使抗体或 DVD-Ig 蛋白变性 15 分钟。变性的样品用 10 mM DTT 的终浓度在 37 $^{\circ}$ C 下还原 60 分钟, 随后用 50 mM 碘乙酸 (IAA)

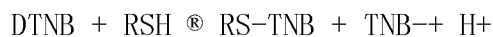
在 37°C 下避光烷基化 30 分钟。烷基化后,将样品在 4°C 下针对 4 升 10 mM 碳酸氢铵透析过夜。将透析的样品用 10 mM 碳酸氢铵 (pH 7.8) 稀释到 1 mg/mL,且将 100 mg 抗体或 DVD-Ig 蛋白用胰蛋白酶 (Promega, 目录号 V5111) 或 Lys-C (Roche, 目录号 11 047 825 001) 以 1:20 (w/w) 胰蛋白酶 /Lys-C: 抗体或 DVD-Ig 蛋白比例在 37°C 下消化 4 小时。消化物用 1 mL 的 1 N HCl 猝灭。对于利用质谱仪检测的肽作图,用 Agilent 1100 HPLC 系统,在 C18 柱 (Vydac, 目录号 218TP51, S/N NE9606 10.3.5) 上通过反相高效液相层析 (RPHPLC) 分离 40 mL 消化物。用使用流动相 A (HPLC 级水中的 0.02% TFA 和 0.08% FA) 和流动相 B (乙腈中的 0.02% TFA 和 0.08% FA) 的梯度以 50 mL/ 分钟的流速运行肽分离。以 4.5 千伏喷射电压和 800-2500 质荷比的扫描范围用正模式操作 API QSTAR Pulsar i 质谱仪。

[0212] 二硫键作图

为了使抗体变性,将 100 mL 抗体或 DVD-Ig 蛋白与 300 mL 在 100 mM 碳酸氢铵中的 8 M 盐酸胍混合。检查 pH 以确保它在 7 和 8 之间,且以 6 M 盐酸胍的终浓度在室温下使样品变性 15 分钟。用 Milli-Q 水将一部分变性样品 (100 mL) 稀释到 600 mL,得到 1 M 最终的盐酸胍浓度。将样品 (220 mg) 用胰蛋白酶 (Promega, 目录号 V5111, 批号 22265901) 或 Lys-C (Roche, 目录号 11047825001, 批号 12808000) 以 1:50 胰蛋白酶或 1:50 Lys-C: 抗体或 DVD-Ig 蛋白 (w/w) 比例 (4.4 mg 酶 :220 mg 样品) 在 37°C 下消化约 16 小时。将另外的 5 mg 胰蛋白酶或 Lys-C 加到样品中,且允许在 37°C 下再消化 2 小时。通过向各样品添加 1 mL TFA 终止消化。在 Agilent HPLC 系统上,使用 C18 柱 (Vydac, 目录号 218TP51 S/N NE020630-4-1A) 通过 RPHPLC 分离消化的样品。使用流动相 A (HPLC 级水中的 0.02% TFA 和 0.08% FA) 和流动相 B (乙腈中的 0.02% TFA 和 0.08% FA),以 50 mL/ 分钟的流速,用与用于肽作图相同的梯度运行分离。HPLC 操作条件与对于肽作图所使用的相同。以 4.5 千伏喷射电压和 800-2500 质荷比的扫描范围,以正模式操作 API QSTAR Pulsar i 质谱仪。通过使所观察到的肽的 MW 与通过二硫键连接的胰蛋白酶或 Lys-C 肽的预测 MW 匹配来指定二硫键。

[0213] 游离巯基测定

用于定量测定抗体或 DVD-Ig 蛋白中游离半胱氨酸的方法基于 Ellman 试剂 5, 5'-二硫 - 双 (2- 硝基苯甲酸) (DTNB) 与巯基 (SH) 的反应,其产生特有的发色产物 5- 硫 - (2- 硝基苯甲酸) (TNB)。下式说明该反应:



使用 Cary 50 分光光度计测量 412 nm 处的 TNB- 吸光度。使用 2 巯基乙醇 (b-ME) 稀释物作为游离 SH 标准绘制吸光度曲线,通过 412 nm 处样品的吸光度确定蛋白质中游离巯基的浓度。

[0214] 通过用 HPLC 级水将 14.2 M b-ME 连续稀释到终浓度 0.142 mM 来制备 b-ME 标准原液。然后制备各浓度的标准品一式三份。使用 amicon ultra 10,000 MWC0 离心过滤器 (Millipore, 目录号 UFC801096, 批号 L3KN5251),将抗体或 DVD-Ig 蛋白浓缩到 10 mg/mL,且将缓冲液更换为用于阿达木单抗的配制缓冲液 (5.57 mM 磷酸二氢钠,8.69 mM 磷酸氢二钠,106.69 mM NaCl,1.07 mM 柠檬酸钠,6.45 mM 柠檬酸,66.68 mM 甘露糖醇, pH 5.2,0.1% (w/v) Tween)。将样品在室温下在振荡器上混合 20 分钟。然后将 180 mL 的 100 mM Tris 缓冲液 (pH 8.1) 加到各样品和标准品中,随后加入 300 mL 在 10 mM 磷酸缓冲液 (pH 8.1)

中的 2 mM DTNB。充分混合后,在 Cary 50 分光光度计上测量 412 nm 处样品和标准品的吸收。通过对游离 SH 量和 b-ME 标准品的 OD₄₁₂ nm 绘图,获得标准曲线。减去空白值后,根据该曲线计算样品的游离 SH 含量。

[0215] 弱阳离子交换层析法

用 10 mM 磷酸钠 (pH 6.0) 将抗体或 DVD-Ig 蛋白稀释到 1 mg/mL。使用具有 WCX-10 ProPac 分析型柱 (Dionex, 目录号 054993, S/N 02722) 的 Shimadzu HPLC 系统分析电荷异质性。以 80% 流动相 A (10 mM 磷酸钠, pH 6.0) 和 20% 流动相 B (10 mM 磷酸钠, 500 mM NaCl, pH 6.0) 将样品加样在柱上,并以 1.0 mL/ 分钟的流速洗脱。

[0216] 寡糖特征分析

PNGase F 处理抗体或 DVD-Ig 蛋白后释放的寡糖用 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 标记试剂衍生化。荧光标记的寡糖通过正相高效液相色谱法 (NPHPLC) 分离,并根据与已知标准品的保留时间比较,对寡糖的不同形式进行表征。

[0217] 首先用 PNGaseF 消化抗体或 DVD-Ig 蛋白,以从重链 Fc 部分上切割 N- 连接寡糖。将抗体或 DVD-Ig 蛋白 (200 mg) 与 2 mL PNGase F 和 3 mL 10% N- 辛基葡萄糖苷一起置于 500 mL Eppendorf 管中。加入磷酸盐缓冲盐水,以使最终体积达到 60 mL。将样品在设定为 700 RPM 的 Eppendorf thermomixer 中在 37°C 下温育过夜。阿达木单抗批次 AFP04C 也用 PNGase F 消化作为对照。

[0218] 在 PNGase F 处理后,将样品在设定为 750 RPM 的 Eppendorf thermomixer 中于 95°C 温育 5 分钟,以沉淀出蛋白质,然后将样品置于 Eppendorf 离心机中以 10,000 RPM 2 分钟来离心沉淀的蛋白。将含有寡糖的上清液转移到 500 mL Eppendorf 管中,并在加速真空 (speed-vac) 下于 65°C 干燥。

[0219] 使用从 Prozyme 采购的 2AB 标记试剂盒 (目录号 GKK-404, 批号 132026), 将寡糖用 2AB 标记。按照生产商说明书制备标记试剂。将乙酸 (150 mL, 试剂盒中提供) 加到 DMSO 小瓶 (试剂盒中提供) 中,并通过上下吸放溶液几次来混合。将乙酸 /DMSO 混合物 (100 mL) 转移到 2-AB 染料小瓶中 (临使用前), 混合直至染料完全溶解。然后将染料溶液加到还原剂小瓶 (试剂盒中提供) 中,充分混合 (标记试剂)。将标记试剂 (5 mL) 加到各个干燥的寡糖样品小瓶中,充分混合。将反应小瓶置于设定为 65°C 和 700-800 RPM 的 Eppendorf thermomixer 中反应 2 小时。

[0220] 在标记反应后,使用来自 Prozyme 的 GlycoClean S 药筒 (目录号 GKI-4726) 除去过量的荧光染料。在添加样品之前,用 1 mL milli-Q 水洗涤药筒,接着为 1 mL 30% 乙酸溶液的 5 次洗涤 (ishe)。临添加样品前,将 1 mL 的乙腈 (Burdick and Jackson, 目录号 AH015-4) 加到药筒中。

[0221] 在所有乙腈通过药筒后,将样品点样在新洗涤的盘中央,并允许其吸附到盘上 10 分钟。盘用 1 mL 乙腈洗涤,接着为 1 mL 的 96% 乙腈的 5 次洗涤。将药筒置于 1.5 mL Eppendorf 管之中,并用 3 次 (每次 400 mL) milli Q 水洗脱 2-AB 标记的寡糖。

[0222] 使用与 Shimadzu HPLC 系统连接的 Glycosep N HPLC (目录号 GKI-4728) 柱分离寡糖。Shimadzu HPLC 系统由系统控制器、脱气器、二元泵、带有样品冷却器的自动进样器以及荧光探测器组成。

[0223] 在升温下的稳定性

使用 Amicon 超速离心过滤器的抗体或 DVD-Ig 蛋白的缓冲液是 5.57 mM 磷酸二氢钠、8.69 mM 磷酸氢二钠、106.69 mM NaCl、1.07 mM 柠檬酸钠、6.45 mM 柠檬酸、66.68 mM 甘露糖醇、0.1% (w/v) Tween, pH 5.2 ;或 10 mM 组氨酸、10 mM 甲硫氨酸、4% 甘露糖醇, pH 5.9。用合适的缓冲液将抗体或 DVD-Ig 蛋白的终浓度调整为 2 mg/mL。然后将抗体或 DVD-Ig 蛋白溶液过滤除菌,并在无菌条件下制备 0.25 mL 等分试样。将等分试样在 -80°C、5°C、25°C 或 40°C 下放置 1、2 或 3 周。温育时间段结束时,通过大小排阻层析法和 SDS-PAGE 分析样品。

[0224] 在还原和非还原两种条件下,通过 SDS-PAGE 分析稳定性样品。所用程序与本文所述相同。凝胶用胶态蓝染料 (Invitrogen 目录号 46-7015, 46-7016) 染色过夜,并用 Milli-Q 水脱色,直至背景透明。然后使用 Epson Expression 扫描仪 (型号 1680, S/N DASX003641) 对染色的凝胶进行扫描。为了获得更高灵敏度,相同的凝胶使用银染试剂盒 (Owl Scientific) 银染,并采用制造商提供的推荐程序。

[0225] 动态描述荧光测定法

将 DVD-Ig 蛋白在 10mM 柠檬酸盐、10mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中透析,得到 1 mg/ml 的终浓度。对于各 DVD-Ig 蛋白运行一式三份。对于各样品,将 27 μ l 的 DVD-Ig 蛋白加到 96 孔板的孔中,与 3 μ l 4X 稀释的 SYPRO 橙染料 (Invitrogen) 混合。染料以在 DMSO 中 5000X 的浓度供应,用水稀释至 4X 的工作浓度。将板离心 30 秒钟,以确保染料和蛋白质沉淀到各孔底部,通过用吸管端轻缓抽吸以确保完全混合。然后将板用粘性膜密封。

[0226] 采用实时 PCR (Applied Biosciences, 7500 系列) 以测量荧光强度随温度的变化。以约 0.5°C / 分钟的温度缓变率将板从 25°C 加热至 95°C,使用 TAMRA 滤片收集发射荧光。将数据输出到 Microsoft Excel,并且对于各 DVD-Ig 蛋白,以温度对荧光绘图。在温谱图上升超过基线荧光的温度时,注意到开始溶解。SYPRO 橙是疏水染料,优先与解折叠蛋白质分子暴露出的疏水残基结合。因此如荧光增加所测量的,开始解折叠的温度是 DVD-Ig 蛋白的热稳定性的指示。DVD-Ig 蛋白的解折叠温度可见表 11。

[0227] 表 11 :通过动态扫描荧光测定法测定的 DVD-Ig 蛋白的热稳定性

亲本抗体 或 DVD-Ig ID	N 端可变结构域 (VD)	C 端可变结构域(VD)	T 开始 (°C)
DVD2148	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 1)	62
DVD2150	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 1)	61
DVD2152	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 1)	60.5
DVD2154	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 2)	61.5
DVD2155	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 1)	
DVD2156	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 2)	59
DVD2157	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 1)	50.5
DVD2158	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 2)	63
DVD2159	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 1)	49.5
DVD2160	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 3)	64
DVD2161	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 1)	48
DVD2162	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 3)	60.5
DVD2163	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 1)	48
DVD2164	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 3)	61.5
DVD2165	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 1)	50

DVD2166	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 1)	62.5
DVD2167	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 2)	50.5
DVD2168	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 1)	46
DVD2170	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 1)	61.5
DVD2172	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 2)	63.5
DVD2173	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 2)	55.5
DVD2174	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 2)	64.5
DVD2175	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 2)	53
DVD2176	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 2)	64
DVD2177	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 2)	52.5
DVD2178	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 3)	64
DVD2179	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 2)	49.5
DVD2180	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 3)	62
DVD2182	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 3)	63
DVD2183	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 2)	48
DVD2185	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 3)	54.5
DVD2190	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 2)	48
DVD2191	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 3)	54.5
DVD2193	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 3)	51
DVD2195	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 3)	51.5
DVD2196	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 3)	48.5
DVD2197	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 3)	49
DVD2199	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 3)	45
DVD2201	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 3)	46

大多数 DVD-Ig 蛋白显示解折叠温度 >50。该 DVD-Ig 蛋白特征与亲本抗体所观察到的类似。

[0228] 溶解性测定

将 DVD-Ig 蛋白候选物在 15mM His (pH 6.0) 中透析。接着将其在具有 30K 截止值的 centricons 中浓缩至 50 μ l。在 4°C 下保存后,经目测证实因无沉淀而溶解,并通过在 280nm 处的 UV 吸光度测量来定量测定。

[0229] 表 12 :DVD-Ig 蛋白的溶解性

亲本抗体 或 DVD-Ig ID	N端可变结构域 (VD)	C端可变结构 域(VD)	目视观 测	溶解性 (mg/mL)
DVD2148	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 1)	透明	>53.0
DVD2150	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 1)	透明	>28.6
DVD2152	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 1)	透明	>57.3
DVD2154	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 2)	透明	>79.2
DVD2155	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 1)	Ppt	
DVD2156	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 2)	透明	>98.9
DVD2157	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 1)	透明	>23.2
DVD2158	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 2)	透明	>121.6
DVD2159	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 1)	Ppt	13.3
DVD2160	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 3)	透明	>122.3
DVD2161	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 1)	Ppt	10.5
DVD2162	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 3)	透明	>85.2
DVD2163	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 1)	透明	>8.6
DVD2164	IL-13 (SEQ 1)	IL-17 (SEQ 3)	透明	>99.1
DVD2165	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 1)	发乳光 的	-
DVD2166	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 1)	透明	>13.8
DVD2167	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 2)	透明	-
DVD2168	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 1)	透明	-
DVD2170	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 1)	Ppt	12.1
DVD2172	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 2)	透明	>58.9
DVD2173	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 2)	相分离	39.3
DVD2174	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 2)	透明	>75.4
DVD2175	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 2)	Ppt	
DVD2176	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 2)	透明	>43.5
DVD2177	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 2)	透明	>9.8

DVD2178	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 3)	透明	>69.8
DVD2179	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 2)	Ppt	12.1
DVD2180	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 3)	相分离	61.7
DVD2182	IL-13 (SEQ 2)	IL-17 (SEQ 3)	透明	>57.5
DVD2183	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 2)	Ppt	
DVD2185	IL-17 (SEQ 1)	IL-13 (SEQ 3)	相分离	
DVD2190	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 2)	透明	>62.4
DVD2191	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 3)	相分离	44
DVD2193	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 3)	Ppt	
DVD2195	IL-17 (SEQ 2)	IL-13 (SEQ 3)	透明	
DVD2196	IL-13 (SEQ 3)	IL-17 (SEQ 3)	透明	>59.8
DVD2197	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 3)	Ppt	31
DVD2199	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 3)	发乳光的	
DVD2201	IL-17 (SEQ 3)	IL-13 (SEQ 3)	发乳光的	

大多数 DVD-Ig 蛋白显示透明外观,并且可浓缩至大于 25 mg/ml。这种 DVD-Ig 蛋白特征与亲本抗体所观察到的类似。

[0230] 通过引用结合

贯穿本申请引用的所有引用的参考文献(包括文献参考书目、专利、专利申请和网站)的内容均通过引用以其整体明确结合到本文中用于任何目的,其中引用的参考文献亦如此。除非另有说明,否则本公开内容将采用本领域众所周知的免疫学、分子生物学和细胞生物学的常规技术。

[0231] 本公开内容亦通过引用以其分子生物学和药物递送领域众所周知的整体技术予以结合。这些技术包括但不限于下列出版物中描述的技术:

Ausubel 等(编辑), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993);

Ausubel, F.M. 等编辑, Short Protocols In Molecular Biology (第4版,1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X);

Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen 和 Ball (编辑), Wiley, New York (1984);

Giege, R. 和 Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., 第20 1-16页, Oxford University Press, New York, New York, (1999);

Goodson, 载于 Medical Applications of Controlled Release, 第2卷, 第115-138页 (1984);

Hammerling 等, 载于 *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981);

Harlow 等, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第 2 版, 1988);

Kabat 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) 和 (1991));

Kabat, E. A., 等 (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242;

Kontermann 和 Dubel 编辑, *Antibody Engineering* (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5);

Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990);

Lu 和 Weiner 编辑, *Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis* (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X);

Medical Applications of Controlled Release, Langer 和 Wise (编辑), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974);

Old, R. W. 和 S. B. Primrose, *Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering* (第 3 版, 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. *Studies in Microbiology*; 第 2 卷: 409 pp. (ISBN 0-632-01318-4);

Sambrook, J. 等编辑, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第 2 版, 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. 第 1-3 卷. (ISBN 0-87969-309-6);

Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson 编辑, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978;

Winnacker, E.L. *From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology* (1987) VCH Publishers, NY (由 Horst Ibelgaufts 译). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4)。

[0232] 等同方案

本发明可在不背离其精神或基本特征的情况下体现在其它具体形式上。前述实施方案因此在所有方面均被视为是说明性的, 而非限制本公开内容。本公开内容的范围因而由随附权利要求书而非由前述描述规定, 因此预期在权利要求书等同含义和范围内的所有改变都包含在其中。

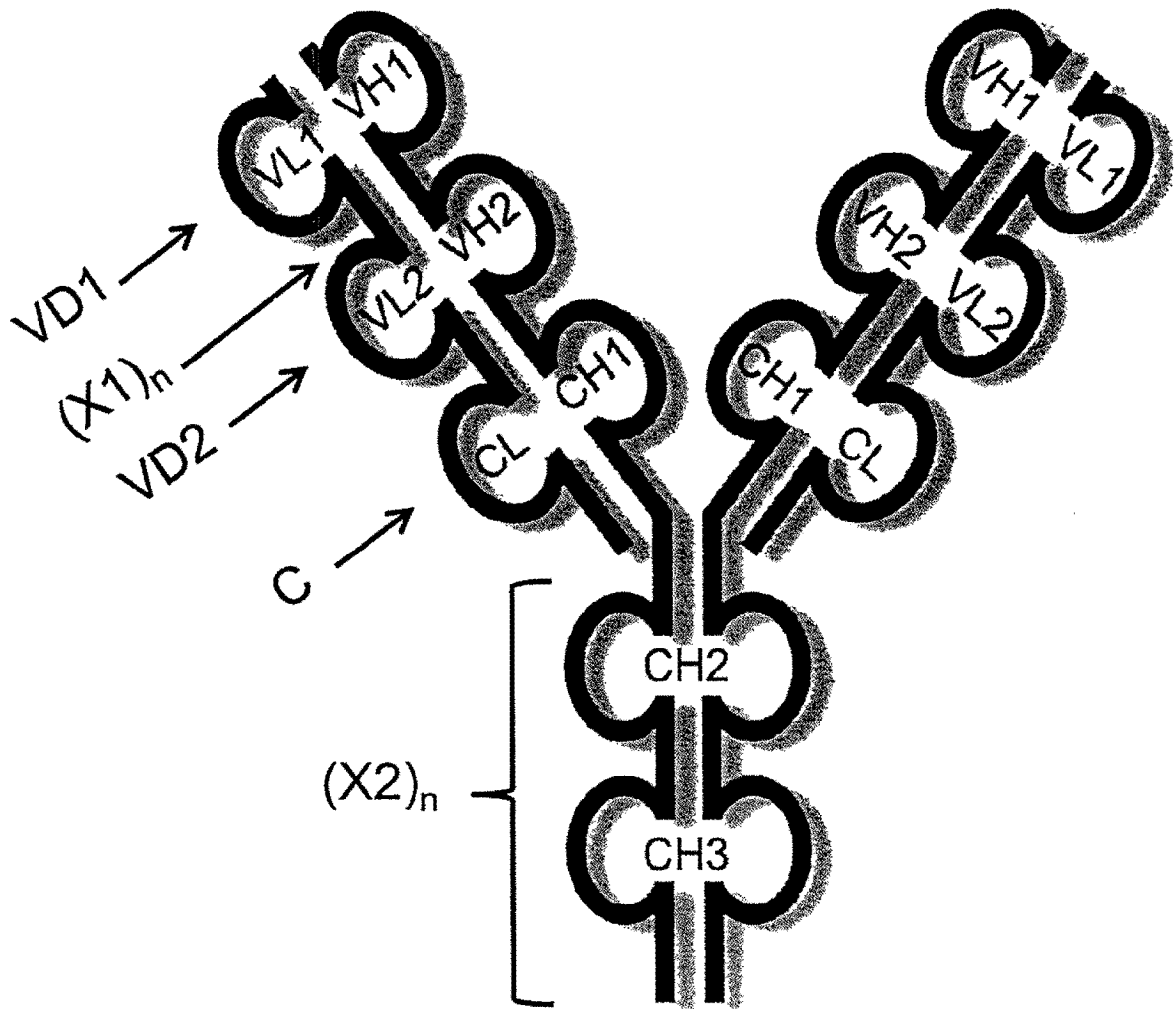


图 1