



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102120773 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 13

(21) 申请号 201010583812. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2001. 06. 28

C07K 19/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 5/16 (2006. 01)

60/215379 2000. 06. 29 US

C40B 40/08 (2006. 01)

C12N 15/09 (2006. 01)

(62) 分案原申请数据

01814818. 2 2001. 06. 28

(71) 申请人 雅培制药有限公司

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 A·科林森 T·哈于尔

G·阿夫格里诺斯 R·迪克松

Z·凯马克卡兰

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 李波 刘健

权利要求书 2 页 说明书 27 页

(54) 发明名称

双特异性抗体及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明涉及双特异性抗体及其制备方法和用途。本发明提供了对两个不同的但结构上相关的抗原具有双特异性的抗体。所述的抗体可以是,例如,完全的人抗体,重组抗体,或单克隆抗体。优选的抗体具有对 IL-1 α 和 IL-1 β 的双特异性并能在体外和体内中和 IL-1 α 和 IL-1 β 的活性。本发明的抗体可以是全长抗体或其抗原-结合部分。另外,本发明还提供了制备和使用本发明的抗体的方法。本发明的抗体,或抗体部分可用于检测两个不同的但结构上相关的抗原(例如, IL-1 α 和 IL-1 β) 和用以抑制所述抗原的活性(例如,在患有 IL-1 α 和 / 或 IL-1 β 的活性起有害作用的疾病的人受试者中。

1. 一种获得可特异地与两种不同但结构相关的蛋白结合的双特异性抗体或其抗原结合部分的方法,该方法包括:

提供抗原,其是基于共同剪接所述两种不同但结构相关的蛋白中的重叠部分以产生杂合肽而设计的,其中所述杂合肽具有结构 X-Y-Z,其中 Y 代表两种相关蛋白间的同一或高度相似的区域, X 代表来自一种所述相关分子的区域, Z 代表来自另一种所述相关分子的区域;

将抗体所有组分暴露于所述抗原;和

从抗体所有组分中筛选可特异地与所述两种不同但结构相关的蛋白结合的抗体,从而获得所述双特异性抗体。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述的抗体所有组分通过用所述抗原体内免疫非人动物而暴露于所述抗原。

3. 如权利要求 2 所述的方法,其进一步包括由所述动物的淋巴细胞制备一系列杂交瘤,并筛选能分泌可特异地与所述两种不同但结构相关的蛋白结合的抗体的杂交瘤。

4. 如权利要求 2 所述的方法,其中,所述的动物选自小鼠、大鼠、兔和山羊。

5. 如权利要求 2 所述的方法,其中,所述的动物是所述抗原内源形式缺陷的剔除小鼠。

6. 如权利要求 2 所述的方法,其中,所述的动物是转有人免疫球蛋白基因的小鼠,因此所述的小鼠在受到抗原刺激后产生人抗体。

7. 如权利要求 2 所述的方法,其中,所述的动物是具有重度联合免疫缺陷 (SCID) 的小鼠,所述的小鼠已用人外周血单核细胞或淋巴细胞或其前体重建。

8. 如权利要求 2 所述的方法,其中,所述的动物是接受了致死剂量的全身辐射处理,接下来用重度联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠的骨髓细胞进行辐射保护,再移植功能性的人淋巴细胞的小鼠。

9. 如权利要求 1 所述的方法,其中,通过用所述抗原筛选重组抗体文库,使所述的抗体所有组分在体外暴露于所述抗原。

10. 如权利要求 9 所述的方法,其中,所述的重组抗体文库表达在噬菌体表面。

11. 如权利要求 9 所述的方法,其中,所述的重组抗体文库表达在酵母细胞表面。

12. 如权利要求 9 所述的方法,其中,所述的重组抗体文库表达在细菌细胞表面。

13. 如权利要求 9 所述的方法,其中,所述的重组抗体文库作为 RNA- 蛋白融合体表达。

14. 如权利要求 9 所述的方法,其中,所述的重组抗体文库是 scFv 文库或 Fab 文库。

15. 如权利要求 1 所述的方法,其中,通过用所述的抗原在体内免疫非人动物,使所述的抗体所有组分暴露于所述抗原,接下来用所述抗原在体外筛选由所述动物淋巴细胞制备的重组抗体文库。

16. 如权利要求 1 所述的方法,其中,通过用所述的抗原在体内免疫非人动物,使所述的抗体所有组分暴露于所述抗原,接下来体外亲和成熟由所述动物淋巴细胞制备的重组抗体文库。

17. 如权利要求 1 所述的方法,其中,通过用所述的抗原在体内免疫非人动物,使所述的抗体所有组分暴露于所述抗原,接下来筛选分泌可与所述抗原结合的抗体的单细胞,并从所述单细胞回收重 - 和轻链可变区域 cDNA。

18. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述的双特异性抗体是完全的人抗体。

19. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述的双特异性抗体是嵌合抗体。
20. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述的双特异性抗体是 CDR 移植的抗体。
21. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述的两种不同但结构相关的蛋白是白细胞介素 -1α 和白细胞介素 -1β 。
22. 如权利要求 21 所述的方法,其中,所述的抗原包含氨基酸序列 TKGGQDITDFQILENQ(SEQ ID NO :3)。
23. 如权利要求 20 所述的方法,其中,所述的抗体所有组分通过用所述抗原体内免疫非人动物而暴露于所述抗原。
24. 如权利要求 23 所述的方法,其进一步包括由所述动物的淋巴细胞制备一系列杂交瘤,并筛选能分泌可与白细胞介素 -1α 和白细胞介素 -1β 特异结合的抗体的杂交瘤。
25. 如权利要求 23 所述的方法,其中,所述的动物选自小鼠、大鼠、兔和山羊。
26. 如权利要求 23 所述的方法,其中,所述的动物是白细胞介素 -1α 、白细胞介素 $-\beta$ 或白细胞介素 -1α 和白细胞介素 $-\beta$ 缺陷的剔除小鼠。
27. 如权利要求 23 所述的方法,其中,所述的动物是转有免疫球蛋白基因的小鼠,因此所述的小鼠在受到抗原刺激后产生人抗体。
28. 如权利要求 23 所述的方法,其中,所述的动物是具有重度联合免疫缺陷 (SCID) 的小鼠,所述的小鼠已用人外周血单核细胞或淋巴细胞或其前体重建。
29. 如权利要求 23 所述的方法,其中,所述的动物是接受了致死剂量的全身辐射处理,接下来用重度联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠的骨髓细胞进行辐射保护,再移植功能性的人淋巴细胞或其前体的小鼠。
30. 如权利要求 21 所述的方法,其中,通过用所述抗原筛选重组抗体文库,使所述的抗体所有组分在体外暴露于所述抗原。
31. 如权利要求 30 所述的方法,其中,所述重组抗体文库表达在噬菌体的表面。
32. 如权利要求 30 所述的方法,其中,所述的重组抗体文库表达在酵母细胞表面。
33. 如权利要求 30 所述的方法,其中,所述的重组抗体文库表达在细菌细胞表面。
34. 如权利要求 30 所述的方法,其中,所述的重组抗体文库作为 RNA- 蛋白融合体表达。
35. 如权利要求 30 所述的方法,其中,所述的重组抗体文库是 scFv 文库或 Fab 文库。
36. 如权利要求 21 所述的方法,其中,通过用所述的抗原在体内免疫非人动物,使所述的抗体所有组分暴露于所述抗原,接下来用所述抗原在体外筛选由所述动物淋巴细胞制备的重组抗体文库。
37. 如权利要求 21 所述的方法,其中,通过用所述的抗原在体内免疫非人动物,使所述的抗体所有组分暴露于所述抗原,接下来体外亲和成熟由所述动物淋巴细胞制备的重组抗体文库。
38. 如权利要求 21 所述的方法,其中,通过用所述的抗原在体内免疫非人动物,使所述的抗体所有组分暴露于所述抗原,接下来筛选分泌可与 所述抗原结合的抗体的单细胞,并从所述单细胞回收重 - 和轻链可变区域 cDNA。
39. 如权利要求 21 所述的方法,其中,所述的双特异性抗体是完全的人抗体。
40. 如权利要求 21 所述的方法,其中,所述的双特异性抗体是嵌合抗体。
41. 如权利要求 21 所述的方法,其中,所述的双特异性抗体是 CDR 移植的抗体。

双特异性抗体及其制备方法和用途

[0001] 本申请是申请日为 2001 年 6 月 28 日的中国专利申请 01814818.2“双特异性抗体及其制备方法和用途”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及双特异性抗体及其制备方法和用途。本发明提供了对两个不同的但结构上相关的抗原具有双特异性的抗体。所述的抗体可以是,例如,完全的人抗体,重组抗体,或单克隆抗体。

背景技术

[0003] 哺乳动物免疫系统包括 B 淋巴细胞,其总的说来,表达数千亿具有不同抗体特异性的抗体组分。对特定抗原的标准免疫应答包括从所有的抗体组分中筛选出一种或多种能与所述抗原特异结合的抗体,免疫应答的成功至少部分基于这些抗体特异性识别(并最终排除)上述的刺激性抗原,并“忽略”抗体环境中的其他分子的能力。

[0004] 抗体特异性识别一种特定靶抗原的有用性导致了单克隆抗体技术的发展。目前,标准的杂交瘤技术能够制备对相关抗原具有单一特异性的抗体。最近,重组抗体技术已开发出来,例如体外抗体文库。这些技术也能用于制备对相关抗原具有单一特异性的抗体。

[0005] 对单一的靶抗原具有特异性的抗体,至少在某些条件下可显示出非所需要的交叉反应性、或与其他抗原结合所造成的背景。然而,这种交叉反应性或结合背景通常是不可预知的(也就是说,不可能预知所述的抗体与哪种抗原发生交叉反应)。而且上述情况通常可以与特定的抗原结合相区别,这是由于它们典型地只是表现所述抗体结合能力的非常次要的部分(例如,总的抗体结合能力的 1%或更少)并且典型地,只是在高抗体浓度(例如,是可观察到特异抗原结合的浓度的 1000 倍或更高)下才能观察到。尽管存在属于结构上相关的蛋白家族的几种抗原,所述抗体与特定的家族成员的应答仍是高特异性的。另外,有这样几个例子,即蛋白家族成员(例如 IL-1 和 TNF 家族成员)可与相同受体、受体组分或结构上相关的受体结合,但针对所述家族成员之一的单克隆抗体并不与其他家族成员表现高的交叉反应性。Mabs 对不同的家族成员缺乏交叉反应性可能有两种原因。首先,在标准的杂交瘤制备中,人们仅搜寻很少的对所述靶抗原具有高特异性/亲合力的抗体,然后检查所选择的这少数抗体的交叉反应性和结合背景。第二,尽管一个家族内的蛋白结构上相关,它们可能具有唯一的优势免疫表位。因此,用全长蛋白培育的 Mabs 可能不与其他结构上相关的蛋白产生交叉反应。

[0006] 也存在下述的例子,即所培育的针对一个物种的某种抗原的单克隆抗体可与另一物种中具有相同功能的抗原特异性地结合。例如,抗-小鼠 X 抗体可迅速地来自人的抗原 X 相结合。这是由于,尽管上述抗原不是同一的,但它们具有显著的序列和结构相似性。但是,鉴于这种物种-交叉反应抗体对来自不同物种的相同抗原具有特异性,故而它们不构成“双特异性”抗体。

[0007] 因此,仍然需要具有可预测的双或多特异性的单克隆抗体,即对两种或两种以上

不同抗原具有准确特异性的抗体。

发明内容

[0008] 本发明提供制备对至少两种结构上相关,但不同的抗原具有双重特异性的抗体的方法。所述的方法通常包括:提供一种抗原,这种抗原具有两种不同、但结构相关的分子的共同结构特征;将所有的抗体组成成分暴露于所述抗原;从所述的抗体组分中筛选出可与上述两个不同但结构上相关的分子特异结合的抗体,由此获得双特异性的抗体。在临床状况下,几个相同蛋白家族的成员促成疾病过程中的不同症状。因此,使用本发明的可与同一蛋白家族的成员相结合以阻断该蛋白家族中一个以上成员的功能的双特异性抗体,有益于减轻疾病症状或中止该疾病过程本身。而且,本发明的这种双特异性抗体对检测结构上相关的抗原以纯化结构上相关的抗原,并在包括结构上相关的抗原的诊断试验中是有用的。

[0009] 在优选的实施方案中,所述的抗原是基于两个不同、但结构上相关的分子间邻近的拓扑识别区域而设计的。例如,两个不同但结构上相关的分子可以是蛋白,并且所述的抗原可以是包含两蛋白间邻近的拓扑识别区域的氨基酸序列的肽。

[0010] 在另一实施方案中,所述的抗原是基于结构上模拟两个不同但结构上相关的分子的共有折叠的环而设计的。

[0011] 在又一实施方案中,所述的抗原是基于共同剪接两个不同但结构上相关的分子的交替和/或重叠部分,以产生新的杂交分子。例如,所述的抗原可以是共同剪接两个不同、但结构上相关的蛋白的交替和/或重叠氨基酸序列所形成的杂合肽。

[0012] 在又一实施方案中,所述的抗原可以包括两个不同但结构上相关的分子的其中之一,并且所述的方法包括筛选特异性识别两相关分子的抗体。

[0013] 在本发明的方法中,所述的抗体所有组分可在体内或体外暴露于所述的相关抗原。例如在一个实施方案中,将所述的所有组分暴露于所述抗原包括用所述抗原对动物进行体内免疫。这一体内方法可进一步包括:制备一组来自所述动物淋巴细胞的杂交瘤,并筛选能分泌可特异性地与两个不同、但结构上相关的分子相结合的抗体的杂交瘤。所免疫的动物可以是小鼠,大鼠,兔,或山羊或上述动物的转基因形式,如转入了人免疫球蛋白基因的小鼠在抗原刺激下产生人抗体。其他可免疫的动物类型包括经下述处理的小鼠,即已用人外周血单核细胞(hu-PBMC-SCID 嵌合小鼠)或淋巴细胞或其前体重建的具有重度联合免疫缺损(SCID)的小鼠,所述小鼠经致死剂量全身辐射处理,接下来用重度联合免疫缺损(SCID)的小鼠的骨髓细胞进行辐射防护,接下来移入功能性的人淋巴细胞(Trimera 系统)。另一种可被免疫的动物可以是其基因组中编码相关抗原的内源基因已被“剔除”(例如通过同源重组)的动物(例如小鼠),当用相关抗原免疫时,所述的KO动物将上述抗原作为外来物识别。

[0014] 在另一实施方案中,通过用所述抗原筛选重组抗体文库,在体外使所述的抗体所有组分暴露于所述抗原。所述的重组抗体文库可以,例如在噬菌体表面或酵母细胞表面或细菌细胞表面表达。在不同的实施方案中,所述的重组抗体文库是,例如 scFv 文库或 Fab 文库。在又一实施方案中,抗体文库作为 RNA-蛋白融合体表达。

[0015] 另一种制备双特异性抗体的方法包括,结合体内和体外的方法使所述的所有抗体组分暴露于所述抗原,例如:用所述抗原体内免疫动物,接下来用所述抗原在体外筛选由所

述动物淋巴细胞制备的抗体文库。再一种方法包括通过下述步骤使所述的所有抗体组分暴露于所述抗原：用所述抗原体内免疫动物，接下来体外亲和成熟由所述动物淋巴细胞制备的抗体文库。又一种方法包括通过下述步骤使所述的所有抗体组分暴露于所述抗原：用所述抗原体内免疫动物，接下来筛选分泌相关抗体的抗体产生细胞，从这些所选择的细胞中回收相关抗体的重链和轻链可变区 cDNA（例如通过 PCR 的方法），并在哺乳动物宿主细胞中体外表达上述重链和轻链可变区域（视为所选择的淋巴细胞抗体方法或 SLAM），由此可以进一步筛选，并对所选择的抗体基因序列进行操作。更进一步，可通过表达克隆筛选单克隆抗体，在哺乳动物细胞中表达重链和轻链抗体基因，再筛选分泌具有必需结合特异性的抗体的哺乳动物细胞。

[0016] 本发明的方法可以制备多种不同类型的双特异性抗体，包括完全的人抗体，嵌合抗体和 DCR- 嫁接的抗体和其抗原结合部分。还提供按照本发明的方法制备的双特异性抗体。优选的本发明的双功能抗体是特异地与 IL-1 α 和 IL-1 β 结合的抗体。这种双特异性抗体可用于检测 IL-1 α 或 IL-1 β 的方法，其包括用所述的双-特异性抗体，或其抗原-结合部分与 IL-1 α 或 IL- β 相接触，由此检测出 IL-1 α 或 IL- β 。中和双特异性抗体也可用于本发明的抑制 IL-1 α 或 IL-1 β 活性的方法，该方法包括使 IL- α 或 IL- β 与所述双特异性抗体，或其抗原结合部分相接触，由此使 IL-1 α 或 IL- β 受到抑制。这种双特异性抗体也可用于治疗 IL-1- 相关疾病的方法，该方法包括向 IL-1- 相关疾病受试者施用所述的双特异性抗体，或其抗原结合部分。

[0017] 在又一实施方案中，本发明提供制备抗体或其抗原结合部分文库的方法，该方法包括下述步骤：a) 由暴露于第一抗原的所有抗体组分获得重组重链或其抗原结合部分文库 A；b) 由暴露于第一抗原的所有抗体组分获得重组轻链或其抗原结合部分文库 B；c) 由暴露于第二抗原的所有抗体组分获得重组重链或其抗原结合部分文库 C；d) 由暴露于第二抗原的所有抗体组分获得重组轻链或其抗原结合部分文库 D；和 e) 将重组重链或其抗原结合部分文库 A 与重组轻链或其抗原结合部分文库 D 相结合获得抗体或其抗原结合部分文库 X 和 / 或，将重组重链或其抗原结合部分文库 C 与重组轻链或其抗原结合部分文库 B 结合获得抗体或其抗原结合部分文库 Y。

[0018] 在本发明的又一实施方案中，上述本发明的方法可进一步包括下述步骤，即将抗体或其抗原结合部分文库 X 与抗体或其抗原结合部分文库 Y 相结合以获得抗体或其抗原结合部分文库 Z。

[0019] 在又一实施方案中，本发明涉及抗体或其抗原结合部分文库 X, Y 和 Z。

[0020] 在又一实施方案中，本发明的方法可用于通过选自文库 X, Y 和 / 或 Z 的、与所述的第一和第二抗原均可结合的抗体或其抗原结合部分鉴定双特异性抗体或其抗原结合部分。

[0021] 在进一步的实施方案中，本发明涉及由任意一种本发明的方法所制备和 / 或筛选的双特异性抗体。

[0022] 在又一实施方案中，本发明涉及编码抗体或其抗原结合部分的文库 X, Y 和 Z 中的任意成员的核苷酸序列；以及所述的双特异性抗体或其抗原结合部分，含上述核酸序列的载体，和由所述载体转化的宿主细胞。

[0023] 在优选的实施方案中，所述的第一和第二抗原分别选自蛋白，多肽和肽，条件是所述的第一和第二抗原不相同。在进一步的实施方案中，所述的蛋白，多肽和肽是分泌蛋

白或表面受体,其中所述的分泌蛋白选自 IFN, TNF 和 IL, IP-10, PF4, GRO, 9E3, EMAP-II,, CSF, FGF 和 PDGF。在又一优选的实施方案中,所述的第一抗原是 BL-1 α , 所述的第二抗原是 IL-1 β 。

具体实施方式

[0024] 本发明涉及设计和应用抗原以产生双特异性抗体,即对至少两个不同、但结构相关的分子具有特异性的抗体,以及这种双特异性抗体的筛选,制备和应用。本发明的抗原的结构相关性可以是覆盖整个抗原(例如,蛋白)或是在某个结构相关区域中。本发明提供获得可特异性地与两不同但结构上相关的分子结合的双特异性抗体的方法,所述的方法包括:

[0025] 提供含有两个不同但结构上相关的分子结构上共有特征的抗原;

[0026] 将所有抗体组分暴露于上述抗原;

[0027] 再筛选可特异地与两个不同但结构上相关的分子相结合的抗体,由此获得所述的双特异性抗体。

[0028] 应当提及的是,虽然本发明此处所述的是有关识别两个不同的但相关的抗原,应当理解此处所述的“双特异性抗体”指的是包括可特异性地识别两个以上不同但相关的抗原的抗体,例如可识别三个,四个,五个或更多结构相关但不同的抗原。而且,术语“不同但结构上相关的抗原”是指包括其整个结构相关的抗原(例如,蛋白),以及共有一个或多个结构上相关的区域但其它并不相关的抗原。因此“不同但结构上相关的抗原”可能是例如,两个具有共同结构且属于同一蛋白家族成员的蛋白,也可能是两个整体结构不类似(不相关)但都包括结构上相关的结构域。

[0029] 不同类型的抗原可用于引发本发明的抗体,可利用不同的制备抗体的方法获得本发明的双特异性抗体,这将在下述的各段中进行详细地描述。

[0030] I. 双特异性抗原

[0031] 为了制备本发明的双特异性抗体,针对能引发双特异性抗体的抗原培养抗体。这种抗原通常指此处的双特异性抗原。多种不同类型的双特异性抗原均可用于本发明,在下述各段中详细描述了多种不同类型的双特异性抗原的设计。

[0032] A. 邻近的拓扑区域

[0033] 在一个实施方案中,本发明的双特异性抗原包括,将针对其培养双特异性抗体的,两个不同但结构上相关的分子间相同和/或相似区域的邻近拓扑区域。优选地,所述抗原包括两个不同但结构上相关的分子间相同和/或相似区域的最大的临近拓扑区域。优选地,两个不同但结构上相关的分子是蛋白,并且所述的双特异性抗原包括相应于两个不同但结构上相关的分子间相同和/或相似区域的最大(例如最长的)临近拓扑区域的线性肽。尽管也可以使用相同/相似区域的其它部分,上述所选择的相同/相似的适当区域,优选地是受体或配体结合区域。

[0034] 为确定两分子(例如蛋白)间同一区域的邻近拓扑区域,将两分子(例如蛋白)相比较(例如同源性模拟,结构信息或对比),鉴定出相同或相似的区域。对于蛋白,可用对比算法创建理想的序列对比,并鉴定出两蛋白间相同和/或相似区域的最大(例如最长的)临近拓扑区域。用于对两序列进行比较的,优选但非限定性的数学算法是

Karlin 和 Altschul(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68 的算法,在 Karlin 和 Altschul(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77 中进行了修改。此种算法已并入 Altschul,等(1990)J. Mol. Biol. 215:403-10 的 NBLAST 和 XBLAST 程序中。若为比较的目的要获得缺口对比(gapped alignments),可依照 Altschul 等,(1997)Nucleic Acids Research 25(17):3389-3402 中的描述应用 Gapped BLAST。当应用 BLAST 和 Gapped BLAST 程序时,可使用每个程序(例如,XBLAST 和 NBLAST)的缺省参数。参见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。可应用的另一种数学算法是在 Myers 和 Miller(1988)Comput. Appl. Biosci. 4:11-17 中描述的 ALIGN 程序中所应用的。

[0035] 当选择出相同/相似区域中的合适区域后,相应于该区域的所述的双特异性抗原可通过化学合成。例如,对于肽抗原,所述的肽可通过标准的肽合成方法合成。

[0036] 在一个实施方案中,所述的肽抗原包含 L 氨基酸。在另一实施方案中,所述的肽抗原可能部分或全部由 D 氨基酸组成。在实施例 1 中进行详细描述了一个基于两个不同、但结构上相关蛋白间相同和/或相关区域的连续拓扑区域的双特异性抗原的例子。

[0037] B. 模拟结构环的环状肽

[0038] 在又一实施方案中,本发明的双特异性抗原包括环状分子,优选环状肽,其在结构上模拟针对其培养双特异性抗体的两个不同但结构上相关的分子(例如,蛋白)共有折叠中的关键环。为制备此种类型的抗原,比较两个相关的分子的结构,鉴定在两分子中所发现的共有折叠的环。应用标准的分子生物学模型和晶体学分析有助于这种环和共有折叠的鉴定。鉴定了相同和相似的区域(例如,两蛋白间的氨基酸序列)后,即可设计相对于相似、但不相同区域的共有序列。线性分子,例如线性肽是基于这些相似但不相同的区域而设计,并且此种线性分子可以通过已知的化学手段环化,以产生模拟该关键环的抗原。例如,可将脯氨酸或甘氨酸添加到线性肽的末端以使所述的肽环化。

[0039] 在实施例 2 中详细的描述了设计双特异性抗原的例子,所述的抗原是基于模拟两个不同但结构上相关的蛋白共有的结构环的环状肽。

[0040] C. 杂交分子

[0041] 在又一实施方案中,本发明的双特异性抗原包括杂交分子,优选杂合肽,其包括用于培养双特异性抗体的两个不同、但结构上相关的分子(例如,蛋白)可替换的和/或重叠的区域。为制备此种类型的抗原,比较两分子的结构,鉴定两分子间的重叠区域(即同一的区域)以及非同一区域。制备杂交分子(例如,当两相关的分子是蛋白时的杂合肽),其优选的包括两分子各自的(例如,氨基酸序列)可替换区域,以及两分子所共有的重叠区域。按照图示这种杂交分子可表示为:X-Y-Z,其中 Y 代表两相关分子间的同一或高度相似的区域(即,重叠区域),X 代表来自一个相关分子的区域,Z 代表来自另一个相关分子的区域。在实施例 3 中详细描述了设计双特异性抗原的例子,所述的抗原是基于包含两个不同但结构上相关的蛋白序列的杂合肽。

[0042] 另一种杂交分子类型是将一种肽导入全长的蛋白(指“靶”蛋白)。选择出代表两个不同但结构上相关的蛋白功能区域的肽,例如受体相互作用区域。这种肽在此处指功能肽。来自相关蛋白之一的功能肽引入其他相关蛋白或非相关蛋白的全长蛋白中。例如,鉴定了相应于 IL-1 α 受体相互作用区域的 IL-1 α 肽,并且这一 IL-1 α 功能肽引入全长的 IL-1 β 蛋白以构建 IL-1 α 或/IL- β 分子。类似地,鉴定了相应于 IL-1 β 受体相互作用区

域的 IL-1 β 肽,并且这一 IL-1 β 功能肽引入全长的 IL-1 α 蛋白以构建 IL-1 α 或 /IL- β 分子。这一功能肽引入相关的全长蛋白限制所述的功能肽在两端,并保持所述功能肽的折叠结构。

[0043] 对于 IL-1 α /IL-1 β 杂合体,所述的功能肽优选地插入(替换天然的氨基酸)代表 IL-1 α 和 IL-1 β 共同折叠结构的靶区域。这种区域出现在所述蛋白的全长区域内(例如,N-末端区域,蛋白的中部或C-末端区域)。而且,所述的代表共有的 IL-1 α /IL-1 β 折叠结构的功能肽也可能插入到非相关的蛋白中,例如白蛋白或其他天然存在的蛋白。在这种情况下所述肽的优选插入位点是,允许其保持所需折叠结构的区域。因此,所述的插入位点可能是在蛋白的N-末端,中部或C-末端。选择所述肽在任何天然存在的靶蛋白中的定位,以模仿由衍生所述肽的天然蛋白施与所述肽的结构限制。虽然所述的功能肽可简单地插入到靶蛋白中,使所述的功能肽的氨基酸序列也添加到靶蛋白中,但优选以所述功能肽的氨基酸替换所述靶蛋白中被插入的部分。

[0044] 作为一个非限制性的例子,构建杂交分子作为培养针对 IL-1 α 和 IL- β 的双特异性抗体的双特异性抗原,其中,将相应于 IL- α 或 IL- β 特异结构元件的所述的功能肽引入到全长的 IL-1 β 或 IL-1 α 的相应结构位置。

[0045] 所选择的杂交分子用 IL-1 α 的 168-184 位残基替换 IL- β 的 160-176 位残基所得的分子具有下述的氨基酸序列,其中带有下列线的是被取代的 IL-1 α 序列(168-184 位残基):

[0046] APVRS LNCTLRDSOOKSLVMSGPYELKALHLOGODMEQOVVFSMGAYKSSKDDAKITVILGLKEKNLY
LSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEINNKLFEFESAQFPNWIYSTSQAENMPVFLGGTKGGQDIT
DFTMQFVSS(SEQ ID NO:4)

[0047] 这一分子可利用公众可以获得的 IL-1 α 和 IL- β cDNA 序列和重组蛋白表达技术,通过标准的分子生物学方法制备(例如,克隆,多聚酶链式反应)。可制备杂合的 cDNA,引入到合适的表达载体中,所述的多肽可通过将上述表达载体引入合适的宿主细胞中进行表达。

[0048] D. 基于疏水性图的肽

[0049] 在又一实施方案中,本发明的双特异性抗原基于疏水性图选择,以筛选出预计具有高抗原性的肽。例如,肽的抗原指数可利用 Jameson 和 Wolf(CABIOS,4(1),181-186(1988))中描述的,利用计算机软件进行计算。可选择抗体结合的相关区域使抗原性几率最大化。

[0050] E. 用抗原转染细胞免疫

[0051] 在又一实施方案中,本发明的双特异性抗体通过抗原转染细胞免疫制备(即,本发明的抗原-转染细胞可能是双特异性抗原)。可以生产稳定表达两个不同的但结构上相关的抗原,或其杂交分子的细胞系。例如,可以生产稳定表达 IL-1 α 或 IL-1 β 或 IL1 α /IL- β 杂交分子(例如,SEQ ID NO:4)的细胞系。所述的相关分子可由所述细胞分泌(对于可溶性蛋白的情况),或在细胞表面表达(针对受体和酶的情况)。可通过若干种常规的方法将基因递送到宿主细胞中使所述抗原在宿主细胞中表达,上述的常规方法包括但不限于转染,电穿孔,细胞融合,脂质转染,粒子轰击,微注射或病毒转染。表达相关抗原的细胞系可通过一种或一种以上不同的途径(腹膜内的,皮下的,肌内的等)移植到动物中以产生

相关抗体。使所述细胞成为相关抗原的缓释源。优选地,所述细胞表达全长的蛋白。但也可以表达抗原片段。对于可溶性蛋白,优选地由所述细胞分泌所述蛋白。若要产生针对邻近的相关受体的胞外结构域,所述的受体优选地在细胞表面表达。

[0052] F. 用结构相关的分子中的一个进行免疫

[0053] 在又一实施方案中,所述的双特异性抗原仅仅是两个不同但结构上相关的分子之一,并由此培养双特异性抗体。将两个相关分子之一用作免疫试剂,筛选所得的所有抗体组分以获得能够结合,优选中和两个不同但结构上相关的分子的抗体。例如可用 IL- α 或 IL-1 β 进行免疫,然后筛选 α/β 结合剂,或更优选中和剂。在这一实施方案中所用到的术语“免疫”,广义上包括在体内或体外将所述的所有抗体组分暴露于所述抗原,例如 IL-1 α 或 IL-1 β 。因此,这一实施方案包括用 IL- α 或 IL-1 β 筛选所得的用于选择可与 IL- α 和 IL-1 β 均可结合的抗体的抗体,以及在体外用 IL- α 或 IL- β 筛选重组抗体文库,然后选择可与 IL-1 α 和 IL-1 β 结合的重组抗体。

[0054] II 制备双特异性抗体的方法

[0055] 为制备本发明的双特异性抗体,按照前述部分中所描述的方法,将所有抗体组分(在体内或体外)暴露于双特异性抗原。然后从上述所有组分中筛选双特异性抗体。某种抗原的关于抗体识别的两个要素是结构识别和基于特异分子相互作用的亲和成熟。在天然免疫应答过程中,易于培养识别结构基元的低亲和抗体(例如通过特定模式识别受体识别的抗原),在天然免疫应答的早期通过随后的体细胞突变以提高一些克隆的亲和性。已通过不同的体内和体外方法模仿这一天然过程。低亲和性的双特异性抗体可由此处所描述的任意一种体外和体内方法制备,高亲和性的双特异性 Mabs 可通过此处所描述的体细胞诱变的方法制备。而且,为优化高亲和性双特异性 Mabs,可制备所需抗原与低亲和力 Mabs 的共结晶结构。如此处所描述的,所获得的结构信息可以指导通过改变(突变)Mabs 的特异接触残基进一步加强特异分子的相互作用。

[0056] 下面将详细介绍通过体内、体外或两者结合的途径制备双特异性抗体的方法。

[0057] A. 体内途径

[0058] 制备抗体的标准体内途径是用抗原免疫合适的受试动物,由此使体内的所有抗体组分暴露于该抗原,接下来从相关的动物中回收抗体。可修改这种方法使其适用于用双特异性抗原制备双特异性抗体,然后筛选可特异性识别两个结构上相关的分子的抗体。双特异性抗体可通过双特异性抗原的免疫原性制剂免疫合适的受试者(例如,兔,山羊,小鼠,或其它哺乳动物,包括转基因的和经剔除的上述哺乳动物)制备。合适的免疫原性制剂可以是,例如化学合成的或重组表达的双特异性抗原。所述的制剂可进一步包含佐剂,例如弗氏完全或不完全佐剂或类似的免疫刺激化合物。而且,当用于制备抗体时,特别是通过体内免疫的方式,本发明的双特异性抗原可以单独使用,或优选地作为与载体蛋白的偶联物。这种加强抗体应答的方法是本领域所公知的。与双特异性抗原相偶联的合适的载体蛋白包括匙孔血蓝蛋白(KLH)和白蛋白。

[0059] 由受试动物中获得抗体-产生细胞,并通过常规方法制备单克隆抗体,例如 Kohler 和 Milstein(1975, Nature 256:495-497)的杂交瘤技术(再参见, Brown 等(1981) J. Immunol 127:539-46; Brown 等(1980) J Biol Chem 255:4980-83; Yeh 等(1976) PNAS 76:2927-31; 和 Yeh 等(1982) Irait. J. Cancer 29:269-75)。产生单克隆抗体的杂交瘤

技术是本领域已知的（参见 R. H. Kenneth, in *monoclonal Antibody: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); E. A. Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54 :387-402; M. L. Gefter 等 (1977) *Somatic Cell Genet.*, 3 :231-36)。简言之,无限繁殖细胞系（典型地是骨髓瘤）与来自上述双特异性免疫源免疫的哺乳动物的淋巴细胞（典型地,脾细胞或淋巴结细胞或外周血淋巴细胞）相融合,筛选所得杂交瘤细胞培养物的上清液,以鉴定产生对相关的两个不同但结构上相关的分子具有双特异性的抗体的杂交瘤。任何一种已知的用于融合淋巴细胞和无限增殖细胞系的方法,均可以用于产生双特异性单克隆抗体（参见,例如, G. Galfre 等 (1977) *Nature* 266 :550-52; Gefter 等 *Somatic Cell Genet.*, cited supra; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*, cited supra; Kenneth, *Monoclonal Antibody*, cited supra)。而且,本领域的技术人员可以理解,这些方法可以有多种变换且都是有用的。典型地,所述的无限增殖细胞系（例如,骨髓瘤细胞系）与淋巴细胞系衍生自相同的哺乳动物种。例如小鼠杂交瘤可通过用本发明的免疫原制剂免疫的小鼠淋巴细胞和无限增殖的小鼠细胞系相融合而制备。优选的无限增殖细胞系是对含有次黄嘌呤,氨基蝶呤和胸腺嘧啶核甙的培养基（“HAT培养基”）敏感的小鼠骨髓瘤细胞系。任何一定数量的骨髓瘤细胞系依照现有技术均可作为进行融合的一部分,例如, P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63 Ag8.653 或 Sp2/O-Ag14 骨髓瘤细胞系。这些骨髓瘤细胞系可由美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 获得, Rockville, Md。典型地, HAT-sensitive 小鼠骨髓瘤细胞和小鼠脾细胞用聚乙二醇（“PEG”）融合。所得的杂交瘤用 HAT 培养基筛选,这种培养基能杀死非融合的和非成功融合的骨髓瘤细胞（非融合的脾细胞在几天后,由于不转化而死亡）。产生可特异地识别两个有用的结构相关的分子的抗体的杂交瘤,通过在所述杂交瘤培养物上清液中筛选所述抗体进行鉴定,例如用标准的 ELISA 试验以筛选那些可特异地与两个相关分子结合的抗体。

[0060] 根据所需的抗体不同,可使用不同的动物宿主进行体内免疫。可使用自身表达有用的内源抗原的宿主,或使用已导致有用内源抗原缺陷的宿主。例如,已表明在相应的内源基因处进行同源重组而导致特定的内源蛋白缺陷的小鼠（即,“剔除”小鼠）当用所述蛋白进行免疫时,可对该蛋白产生体液免疫应答,因此,可用于产生对该蛋白具有高亲和力的单克隆抗体（参见,例如, Roes, J. 等 (1995) *J. Immunol. Methods* 183 :231-237; Lunn, M. P. 等 (2000) *J. Neurochem.* 75 :404-412)。

[0061] 多种非人哺乳动物可作为生产非人抗体（例如,针对人双特异性抗原的）的合适宿主,其包括但不限于小鼠,大鼠,兔和山羊（以及上述动物的剔除形式），但对于生产杂交瘤而言,小鼠是优选的。而且对于生产针对人双特异性抗原的完全的人抗体,也可以利用表达所有人抗体组分的非人动物宿主。所述的非人动物包括转基因带有人免疫球蛋白转基因的动物（例如,小鼠）, hu-PBMC-SCID 嵌合小鼠, 和人 / 小鼠辐射嵌合体, 其在下面进行详细讨论。

[0062] 由此,在一个实施方案中,用双特异性抗原免疫的动物是非人哺乳动物,优选小鼠,其对于人免疫球蛋白而言是转基因的,因此,这种非人哺乳动物（例如,小鼠）对于抗原刺激产生人抗体。在这些动物中,典型地,人种系结构重链和轻链免疫球蛋白转基因引入工程化的动物,由此使所述动物的内源重链和轻链位点失活。当所述动物受到抗原（例如,人抗原）刺激时,产生人免疫球蛋白序列衍生的抗体（即,人抗体）,所述的人单克隆抗

体可利用标准的杂交瘤技术通过淋巴细胞制备。对人免疫球蛋白转基因小鼠以及它们在生产抗体中的用途的进一步描述参见例如, U. S. Patent No. 5, 939, 598, PCT Publication No. WO 96/33735, PCT Publication No. WO96/34096, PCT Publication WO 98/24893 和 PCT Publication WO 99/53049 to Abgenix Inc., 和 U. S. Patent No. 5, 545, 806, No. 5, 569, 825, No. 5, 625, 126, No. 5, 633, 425, No. 5, 661, 016, No. 5, 770, 429, No. 5, 814, 318, No. 5, 877, 397 和 PCT Publication WO 99/45962 to Genpharm Inc. See also MacQuitty, J. J. 和 Kay, R. M. (1992) *Science* 257 :1188; Taylor, L. D. 等 (1992) *Nucleic Acids. Res.* 20 : 6287-6295; Lonberg, N. 等 (1994) *Nature* 368 :856-859; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13 :65-93; Harding, F. A. 和 Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764 : 536-546; Fishwild, D. M. 等 (1996) *Nature Biotechnology* 14 :845-851; Mendez, M. J. 等 (1997) *Nature Genetics* 15 :146-156; Green, L. L. 和 Jakobovits, A. (1998) *J. Exp. Med.* 188 :483-495; Green, L. L. (1999) *J. Immunol. Methods* 231 :11-23; Yang, X. D. 等 (1999) *J. Leukoc. Biol.* 66 :401-410; Gallo, M. L. 等 (2000) *Eur. J. Immunol.* 30 :534-540。

[0063] 在又一实施方案中, 所述的用双特异性抗原免疫的小鼠是用人外周血单核细胞或淋巴细胞或其前体重建的重度联合免疫缺损 (SCID) 的小鼠。这种小鼠, 即 hu-PBMC-SCID 嵌和小鼠, 已表明其对抗原刺激产生人免疫球蛋白应答。对于这些小鼠以及其在抗体产生方面的进一步描述参见例如 Leader, K. A. 等 (1992) *Immunology* 76 :229-234; Bombil, F. 等 (1996) *Immunobiol.* 195 :360-375; Murphy, W. J. 等 (1996) *Semin. Immunol.* 8 :233-241; Herz, U. 等 (1997) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113 :150-152; Albert, S. E. 等 (1997) *J. Inanaul.* 159 :1393-1403; Nguyen, H. 等 (1997) *Microbiol. Immunol.* 41 :901-907; Arai, K. 等 (1998) *J. Immunol. Methods* 217 :79-85; Yoshinari, K. and Arai, K. (1998) *hybridoma* 17 :41-45; Hutchins, W. A. 等 (1999) *hybridoma* 18 :121129; Murphy, W. J. 等 (1999) *Clin. Immunol.* 90 :22-27; Smithson, S. L. 等 (1999) *Mol. Immunol.* 36 :113-124; Chamat, S. 等 (1999) *J. Infect. Diseases* 180 :268-277; 和 Heard, C. 等 (1999) *Molec. Med.* 5 :35-45。

[0064] 在又一实施方案中, 所述的用双特异性抗原免疫的动物是下述的小鼠, 所述小鼠经致死剂量全身辐射处理, 接下来用重度联合免疫缺损 (SCID) 的小鼠的骨髓细胞进行辐射防护, 接下来移入功能性的人淋巴细胞。这种嵌和类型指 Trimer 系统已用于通过有用抗原免疫小鼠产生单克隆抗体, 再通过标准的杂交瘤技术筛选单克隆抗体。对于这些小鼠以及它们在抗体产生方面的用途的进一步描述参见例如 Eren, R. 等 (1998) *Immunology* 93 :154-161; Reisner, Y 和 Dagan, S. (1998) *Trends Biotechnol.* 16 :242-246; Ilan, E. 等 (1999) *Hepatology* 29 :553-562; 和 Bocher, W. O. 等 (1999) *Immunology* 96 :634-641。

[0065] B. 体外途径

[0066] 作为通过体内免疫和筛选制备双特异性抗体的替代方式, 本发明的双特异性抗体可通过, 由双特异性抗原筛选重组的免疫球蛋白文库鉴定和分离 (例如, 抗体噬菌体展示文库), 由此分离可特异性结合有用的两个结构上相关、但并不相同的免疫球蛋白文库成员。产生和筛选噬菌体展示文库的试剂盒是可商购的 (例如, Pharmacia 的重组噬菌体抗体系统 Catalog No. 279400-01; 和 the Stratagene Su7JZAP™ 噬菌体展示试剂盒, Catalog No. 240612)。在不同的实施方案中, 所述的噬菌体展示文库是 scFv 文库或 Fab 文

库。筛选重组抗体文库的噬菌体展示技术已在现有技术中有详细描述。特别适合于产生和筛选噬菌体展示文库的方法实施例和化合物可以参考例如, McCafferty 等 International Publication No. WO 92/01047, U. S. Patent No. 5, 969, 108 和 EP 589, 877(特别描述了 scFv 的展示), Ladner 等 U. S. Patent No. 5, 223, 409, No. 5, 403, 484, No. 5, 571, 698, No. 5, 837, 500 和 EP436, 597(描述了例如, pIII 融合); Dower 等 International Publication No. WO 91/17271, U. S. Patent No. 5, 427, 908, U. S. Patent No. 5, 580, 717 和 EP527, 839(特别描述了 Fab 的展示); Winter 等 International Publication W092/20791 和 EP 368, 684(特别描述了免疫球蛋白可变结构域序列的克隆); Griffiths 等 U. S. Patent No. 5, 885, 793 和 EP 589, 877(特别描述了通过重组文库筛选针对人抗原的人抗体); Garrard 等 International Publication No. WO 92/09690(特别描述了噬菌体表达技术); Knappik 等 International Publication No. WO 97/08320(描述了人重组抗体文库 HuCal); Salfeld 等 International Publication No. WO 97/29131, 描述了针对人抗原(人肿瘤坏死因子 α) 的重组人抗体的制备, 以及重组抗体的体外亲和成熟), Salfeld 等 U. S. Provisional Application No. 60/126, 603 描述了针对人抗原(人 IL-12) 的重组人抗体的制备体外, 以及重组抗体的体外亲和成熟)。

[0067] 其他有关筛选重组抗体文库的描述参见科学出版物, 例如 Fuchs 等 (1991) Bio/technique 9:1370-1372; Hay 等 (1992) Hum Antibod hybridomas 3:81-85; Huse 等 (1989) Science 246:1275-1281; Griffiths 等 (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins 等 (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clarkson 等 (1991) Nature 352:624-628; Gram 等 (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrard 等 (1991) Biol 技术 9:1373-1377; Hoogenboom 等 (1991) NucAcid Res 19:4133-4137; Barbas 等 (1991) PNAS 88:7978-7982; McCafferty 等 Nature(1990) 348:552-554; 和 Knappik 等 (2000) J. Mol. Biol. 296:57-86。

[0068] 作为使用细菌噬菌体展示系统的替代, 重组抗体也可以在酵母细胞表面和细菌细胞表面表达。制备和筛选在酵母细胞表面表达的文库的方法在 PCT Publication WO 99/36569 中有进一步的描述。制备和筛选在酵母细胞表面表达的文库的方法在 PCT Publication WO 98/49286 中有进一步的描述。

[0069] 当有用的抗体从重组文库中鉴定出来后, 可通过标准的生物学技术分离编码所述抗体重链和轻链的 DNAs, 例如通过 PCR 扩增在文库筛选过程中分离的展示包装(例如, 噬菌体)的 DNA。现有技术中已知由抗体轻链和重链的核苷酸序列可制备 PCR 引物。例如, 已公开了许多这样的序列, 如 Kabat, E. A., 等 (1991) Sequences of protein of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 和 "Vbase" 人种系序列数据库。

[0070] 抗体, 或抗体的一部分可通过在宿主细胞中重组表达免疫球蛋白轻链和重链基因而制备。为表达重组抗体, 用一种或多种带有编码抗体免疫球蛋白轻链和重链的 DNA 片段的重组表达载体转化宿主细胞, 以使得所述的轻链和重链在宿主细胞中表达, 并优选地, 分泌到培养宿主细胞的培养基中, 再从所述培养基中回收所述的抗体。用标准的重组 DNA 方法获得抗体重链和轻链基因, 将这些基因整合到重组表达载体中, 再将所述载体引入宿主细胞, 如下述文献中所述, 例如 Sambrook, Fritsch 和 Maniatis(eds), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989),

Ausubel, F. M. 等 (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989) 和 in U. S. Patent No. 4, 816, 397 by Boss 等。

[0071] 在获得了编码有用抗体 VH 和 VL 节段的 DNA 片段后, 这些片段可通过标准的重组 DNA 技术进一步操作, 例如将可变区基因转变为全长的抗体链基因, Fab 片段基因或 scFv 基因。在这些操作中, 编码 VL- 或 VH 的 DNA 片段可操作地与编码另一蛋白, 例如抗体恒定区或可变接头的 DNA 片段相连接。在本文中所用的术语“可操作地连接”是指结合所述的 DNA 片段, 使得所述氨基酸序列的编码 DNA 片段的保持阅读框不变。

[0072] 所分离的编码 VH 区域的 DNA 可通过下述方式转化成全长的重链基因, 所述的方式为将所述的 VH- 编码 DNA 可操作地与另一编码重链恒定区 (CH1, CH2 和 CH3) DNA 的分子相连接。所述的人重链恒定区基因是本领域已知的 (参见例如, Kabat, E. A., 等 (1991) *Sequences of protein of Immunological Interest*, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) 包含这些区域的 DNA 片段可由标准的 PCR 扩增获得。所述的重链恒定区可能是 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 或 IgD 恒定区, 但最优选的是 IgG1 或 IgG4 恒定区。对于 Fab 片段重链基因, 所述 VH- 编码 DNA 可以可操作地与另一仅编码重链恒定区的 DNA 分子相连接。

[0073] 所分离的编码 VL 区域的 DNA 可通过下述的方式转化成全长轻链基因 (以及 Fab 轻链基因), 所述的方式为, 将 VL- 编码 DNA 与另一编码所述轻链恒定区, CL 的 DNA 分子可操作地连接。所述的人轻链恒定区基因序列是本领域已知的 (参见例如, Kabat, E. A., 等 (1991) *Sequences of protein of Immunological Interest*, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) 包含这些区域的 DNA 片段可通过标准的 PCR 扩增获得。所述的轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区, 但最优选的是 κ 恒定区。

[0074] 为构建 scFv 基因, 所述的 VH- 和 VL- 编码 DNA 片段可操作地与另一编码可变接头的片段相连接, 例如编码所述氨基酸序列 (Gly4-Ser)₃, 从而使所述的 VH 和 VL 序列作为连续的单链蛋白表达, 所述的 VL 和 VH 由可变接头连接 (参见例如, Bird 等 (1988) *Science* 242 :423-426 ;Huston 等 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 :5879-5883 ;McCafferty 等, *Nature* (1990) 348 :552-554)。

[0075] 为表达本发明的重组抗体, 或抗体的一部分, 由上述方法获得的编码部分或全长轻链和重链的 DNA 可以插入到表达载体中, 从而使所述基因可操作地与转录和翻译控制序列相连接。在本文中所用的术语“可操作地与 相连接”是指将抗体基因连接到载体中, 以使得在所述载体内的转录和翻译控制序列发挥其各自的功能, 调节所述抗体基因的转录和翻译。选择所述的表达载体和表达调控序列要适合于表达用的宿主细胞。所述的抗体轻链和抗体重链可插入到不同的载体中, 或典型地, 两基因均插入到同一表达载体中。所述的抗体基因可通过标准的方法 (例如, 将抗体基因片段和载体上互补的限制性酶切位点相连接, 或者在没有限制性位点时用平末端连接) 插入到载体中。在插入轻或重链序列之前, 所述的载体可能已经载有抗体恒定区序列。例如一种将 VH 和 VL 序列转化为全长抗体基因的方法是将它们插入到已分别包含编码重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中, 由此使所述 VH 节段在载体内即与 CH 节段可操作地连接, 所述的 VL 节段也在载体内与 CL 节段相连接。附加的或可替代地, 所述的重组表达载体可编码使所述抗体链易于从宿主细胞中分

泌出来的信号肽。所述的抗体链基因可以克隆到载体中,由此使得所述信号肽框内连接到所述抗体链基因的氨基末端。所述的信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即,来源于非免疫球蛋白的信号肽)。

[0076] 除所述抗体链基因外,本发明的重组带有在宿主细胞中控制抗体链基因表达的调控序列。所用的术语“调控序列”是指包括控制抗体链基因表达的启动子,增强子和其他表达调控元件(例如,聚腺苷酸信号)。这些调控序列在下述文献中已有描述,例如,Goeddel; Gene Expression 技术:Methods in Envmology 185, Academic Press, San Diego, CA(1990)。本领域技术人员应当理解,对所述表达载体的设计,包括选择调控序列应当根据与对被转化的宿主细胞的选择、所需蛋白的表达水平等相同的影响因素进行。优选地用于哺乳动物细胞表达的调控序列包括可指导蛋白在哺乳动物细胞中高水平表达的病毒元件,例如来自下述病毒的启动子和/或增强子,来自巨细胞病毒(CMV)的(例如CMV启动子/增强子),来自猴病毒40(SV40)的(例如SV40启动子/增强子),来自腺病毒的(例如腺病毒主要的晚期启动子(AdMLP))和来自多瘤病毒的。对病毒调控元件和其序列的详细描述参见例如,U.S. Patent No. 5,168,062 by Stinski, U.S. Patent No. 4,510,245 by Bell等和U.S. Patent No. 4,968,615 by Schaffner等。

[0077] 除所述的抗体链基因和调控序列外,本发明的重组表达载体可以带有其它的序列,例如调控载体在宿主细胞中复制的序列(例如,复制起点)和选择标记基因。所述的选择标记基因便于将已引入了所述载体的宿主细胞筛选出来(参见例如,U.S. Patents Nos. 4,399,216,4,634,665和5,179,017,all by Axel等)。例如典型地,所述选择标记基因赋予转入了所述载体的宿主细胞对药物的抗性,例如G418,潮霉素或氨甲喋呤。优选的选择标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(对dhfr-的宿主细胞用氨甲喋呤筛选/扩增)和neo基因(G418筛选)。

[0078] 为使轻和重链表达,所述的编码重和轻链的表达载体通过标准的技术转染到宿主细胞。术语“转染”的多种形式指包括多种通常用于将外源DNA引入原核或真核宿主细胞的方法,例如电穿孔,磷酸钙沉淀,DEAE葡聚糖转染等。尽管从理论上讲,在原核和真核宿主细胞中均可以表达本发明的抗体,但最优选的是真核细胞或哺乳动物细胞,这是因为与原核细胞相比,真核细胞特别是哺乳动物细胞更易于分泌经适当折叠并具有免疫活性的抗体。有报道,抗体基因在原核生物中表达高收率的活性抗体的效率低(Boss,M.A.和Wood,C.R.(1985)Immunology Today 6:12-13)。

[0079] 优选的表达本发明的重组抗体的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)(包括dhfr-CHO细胞,参见Urlaub和Chasin,(1980)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220,used with a DHFR selectable marker,例如,as described in R.J.Kaufman和P.A.Sharp(1982)Mol. Biol. 159:601-621),NS0骨髓瘤细胞,COS细胞和SP2细胞。当将编码抗体基因的重组表达载体引入哺乳动物细胞中后,所述的抗体由该宿主细胞在足以使所述抗体在该宿主细胞中表达或分泌到该宿主细胞生长的培养基中的一段时间内产生。可利用标准的蛋白纯化方法从培养基中回收所述的抗体。

[0080] 宿主细胞也可用于生产完整抗体的一个部分,例如Fab片段或scFv分子。应当理解,对上述方法的变异也包含在本发明的范围内。例如,可能需要用编码本发明的抗体的重链或轻链(不是两者兼有)转染宿主细胞。重组DNA技术也可以用于去除一些或全部与结

合有用抗原无关的编码轻链和 / 或重链的 DNA。由截短的 DNA 分子表达的分子也包含在本发明的抗体的范围内。另外, 双功能抗体也可通过下述方式产生, 其中一条轻链和一条重链是本发明的抗体, 另一条重链和轻链对所述有用抗原之外的抗原具有特异性, 它们是通过化学交联方法使本发明的抗体和另外的抗体交联起来形成的。

[0081] 优选的用于使本发明的抗体或其抗原结合部分重组表达的系统, 编码抗体重链和抗体轻链的重组表达载体通过磷酸钙沉淀介导的转染引入到 dhfr-CHO 细胞中。在重组表达载体内, 所述的抗体重链和轻链基因分别可操作地连接到 CMV 增强子 / AdMLP 启动子上, 以驱动所述基因的高水平转录。所述的重组表达载体还带有 DHFR 基因, 以利于通过氨甲喋呤筛选 / 扩增筛选已经所述载体的转染 CHO 细胞。培养筛选出的转化宿主细胞使抗体重链和轻链表达, 并从培养基中回收完整的抗体。可利用标准的分子生物学技术制备重组表达载体, 转染宿主细胞, 筛选转化子, 培养宿主细胞并从培养基中回收抗体。本发明进一步提供合成本发明的重组抗体的方法, 该方法包括在合适的培养基上培养本发明的宿主细胞, 直到本发明的重组抗体合成为止。该方法进一步包括从培养基中分离重组抗体。

[0082] 作为用噬菌体展示筛选重组抗体文库的替代, 本领域已知的其他用于大量筛选重组文库的方法均可用于鉴定本发明的双特异性抗体。一种作为替代的表达系统是重组抗体文库作为 RNA- 蛋白融合体表达, 参见 PCT Publication No. WO 98/31700 by Szostak 和 Roberts, 和 in Roberts, R. W. 和 Szostak, J. W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 : 12297-12302。在这一系统中创建了 mRNA 和肽或蛋白的共价融合, 其通过合成 mRNA 的体外翻译编码, 所述的 mRNA 的 3' 末端带有嘌呤霉素, 肽基受体抗生素。由此可以从基于所编码的肽或蛋白例如, 抗体, 或其中部分的复杂 mRNA 混合物 (例如重组文库) 中富集 mRNA 例如, 使抗体, 或其中的部分与所述的双特异性抗原相结合。通过筛选这种文库回收的编码抗体或其部分的核酸序列可通过上述的重组方式表达 (例如在哺乳动物宿主细胞中), 并且可通过下述方式进行进一步的亲和成熟, 即通过附加的对 mRNA- 肽融合体的筛选, 其中在最初筛选出的序列中已引入了突变; 或通过上述的其他重组抗体体外亲和成熟方式

[0083] C. 组合的方法

[0084] 本发明的双特异性抗体可通过结合了体内和体外方法制备, 例如下述的方法, 其中, 所述的双特异性抗原暴露于哺乳动物体内所有抗体组分以刺激可与所述的双特异性抗原结合的抗体产生, 但进一步用一种或多种体外技术进行抗体筛选和 / 或成熟 (即改进)。

[0085] 在一个实施方案中, 这种组合方法包括, 首先免疫非人动物 (例如, 小鼠, 大鼠, 兔或山羊或或这些动物的转基因形式, 或嵌合小鼠) 用所述的双特异性抗原刺激针对所述抗原的抗体应答, 接下来用淋巴细胞的免疫球蛋白序列制备和筛选噬菌体展示抗体文库, 所述的淋巴细胞在体内通过暴露于所述的双特异性抗原而受到刺激。这一结合方法的第一步骤可通过上述的 IIA 部分进行, 第二步可通过上述的 IIB 部分进行。优选的非人动物超免疫方法, 接下去是体外噬菌体展示文库的体外筛选, 所述的噬菌体文库是通过受到刺激的淋巴细胞制备的, 包括 BioSite Inc. 所描述的, 参见例如, PCT Publication WO 98/47343, PCT Publication WO 91/17271, U. S. Patent No. 5, 427, 908 和 U. S. Patent No. 5, 580, 717。

[0086] 在又一实施方案中, 组合的方法包括, 首先免疫非人动物 (例如, 小鼠, 大鼠, 兔或山羊或这些动物的剔除和 / 或转基因形式或嵌合小鼠), 用所述的双特异性抗原刺激针对该抗原的抗体应答, 并筛选产生所需双特异性抗体 (例如通过筛选所免疫的动物制备的杂

交瘤)的淋巴细胞。然后分离来自所选择的克隆的抗体基因(通过标准的克隆方法,例如反转录酶-聚合酶链式反应)和易于体外亲和成熟,由此增强所选择的抗体的结合特性。这一结合方法的第一步骤可通过上述的 IIA 部分进行,第二步可通过上述的 IIB 部分进行,具体说来利用体外亲和方法,例如在 PCT Publication W097/29131 和 PCT Publication W000/56772 中所描述的。

[0087] 在另一组合方法中,利用在本领域中称为筛选的淋巴细胞抗体方法(SLAM)通过单一的、分离的淋巴细胞产生,参见 U. S. Patent No. 5,627,052, PCT Publication W092/02551 和 Babcock, J. S. 等(1996)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848。在这一方法中,在应用于本发明的双特异性抗体时,首先用所述的双特异性抗原在体内免疫非人动物(例如,小鼠,大鼠,兔,山羊,或这些动物的转基因形式,或嵌合小鼠),刺激针对所述抗原的抗体应答,然后通过抗原-特异的溶血空斑试验(例如,所述的双特异性抗原自身,或所述的有用的结构相关的分子用接头,例如生物素与绵羊红细胞相偶联,由此通过溶血空斑试验鉴定分泌具有合适特异性的抗体的单细胞)筛选分泌有用抗体的单细胞,例如对所述的双特异性抗原具有特异性的抗体。在鉴定了有用的抗体-分泌细胞后,从所述细胞中通过转录酶-PCR 回收重-和轻-链可变区域 cDNA,然后这些可变区域可在所述哺乳动物宿主细胞,例如 COS 或 CHO 细胞中的适当的免疫球蛋白恒定区(例如,人恒定区 s)表达。用扩增的免疫球蛋白序列转染的宿主细胞可进行进一步地分析和体外筛选,例如通过从转染细胞中淘选表达具有所需的双特异性的抗体的分离细胞,所述的免疫球蛋白可来自体内筛选的淋巴细胞。所扩增的免疫球蛋白序列可进一步进行体外操作,例如通过上述的体外亲和成熟。

[0088] 在又一实施方案中,所述的产生双特异性抗体的结合方法包括下述步骤。首先用第一抗原免疫非人动物,用第二个不同的抗原免疫第二非人动物体内刺激抗体应答,其中,优选地,第二抗原与第一抗原结构上类似。如 IIB 中所述,分别由第一非人动物和第二非人动物构建重组重链文库和重组轻链文库。将用第一抗原免疫的动物制备的所述的重链文库与用第二抗原免疫的动物制备的所述的轻链文库结合产生抗体文库 X。类似地,由用第二抗原免疫的动物制备的所述重链文库与用第一抗原免疫的动物制备的所述的轻链文库结合制备抗体文库 Y。此外,可结合文库 X 和 Y 以产生文库 XY。可由 X, Y 和 / 或 XY 文库鉴定和分离可与第一和第二抗原结合的双特异性抗体。

[0089] III 双特异性抗体的特征

[0090] 本发明提供双特异性抗体及其抗体部分,其可依照本发明的方法制备。优选地,所述的抗体,或其部分,是分离的抗体。优选地,所述抗体,或其部分是中和抗体。本发明的抗体包括单克隆和重组抗体,及其部分。在多种实施方案中,所述的抗体,或其部分可以包括完全由单一的种衍生的氨基酸序列,例如完全的人或完全的小鼠抗体,或其部分。在另一实施方案中,所述的抗体,或其部分可以是嵌合抗体或 CDR- 移植的抗体或其他人源抗体形式。

[0091] 此处所用的术语“抗体”是指免疫球蛋白分子,其包括四条多肽链,两重链(H)链和两轻(L)链通过二硫键在中间连接起来。每一重链包括重链可变(在此处缩写为 HCVR 或 VH)和重链恒定区。所述的重链恒定区由三个结构域 CH1, CH2 和 CH3。每一条轻链包括轻链可变区域(此处缩写为 LCVR 或 VL)和轻链恒定区。所述的轻链恒定区包括一个结构

域 CL。所述的 VH 和 VL 区域可进一步细分为高变区,成为互补决定区 (CDR),其间散布的较为保守的区域,成为框架区 (FR)。每一 VH 和 VL 包括三个 CDRs 和四个 FR,依照下述顺序从氨基末端到羧基末端排列:FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。

[0092] 此处所用术语抗体的“抗原-结合部分”(或简写为“抗体部分”)是指一个或多个保持了与两个不同、但结构上相关的抗原相结合能力的双特异性抗体结合片段。已表明抗体的抗原-结合功能也可由全长抗体的片段执行。包含在术语抗体的“抗原-结合部分”中的结合片段包括 (i) Fab 片段,由 VL, VH, CL 和 CH1 结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂ 片段包括在铰链区通过二硫键相结合的两个 Fab 片段的二价片段 (iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段;(iv) 由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段;(v) dAb 片段 (Ward 等, (1989) *Nature* 341:544-546), 其由 VH 结构域组成;和 (vi) 分离的互补决定区域 (CDR)。而且,尽管 Fv 片段的两个区域, VL 和 VH 由不同的基因编码,但可以利用重组技术通过合成的接头相连接,从而使它们成为单一的蛋白链,其中 VL 和 VH 区域配对形成单价分子 (已知为单链 Fv (scFv); 参见例如, Bird 等 (1988) *Science* 242:423-426; 和 Huston 等 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)。这种抗体也包含在术语抗体的“抗原-结合部分”中。其它形式的单链抗体,例如双抗也包含在内。双抗是二价的双特异性抗体,其中 VH 和 VL 结构域在一条多肽链上表达,但使用一种过短以至于不能在一条链的两结构域之间进行配对的接头,由此迫使所述结构域与另一条链上的互补结构域配对,从而创建了两个抗原结合位点 (参见例如, Holliger, P., 等 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J., 等 (1994) *Structure* 2:1121-1123)。

[0093] 更进一步,所述的抗体或其抗原结合部分可以是大的免疫粘附分子的一部分,由抗体或抗体的一部分与一个或多个其他蛋白或肽通过供价或非共价方式缔合。这种免疫粘附分子的例子包括应用链霉抗生物素蛋白核心区域制备四部分的 scFv 分子 (Kipriyanov, S. M., 等 (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) 和利用半胱氨酸残基,标记肽和 C-末端聚组氨酸标记以制备二价和生物素酰化的 scFv 分子 (Kipriyanov, S. M., 等 (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058)。抗体部分,例如 Fab 和 F(ab')₂ 片段可由完整的抗体通过常规技术,例如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化,分别消化完整抗体制备。而且,抗体,抗体部分和免疫粘附分子可以通过标准的重组 DNA 技术制备。

[0094] 此处所用的“分离的双特异性抗体”是指基本上没有具有不同抗原特异性抗体的双特异性抗体 (例如经分离的抗体,其能特异性结合两个不同的但结构上相关的抗原,或其它非相关的抗原的结构上相关的区域,但其基本上不含与其它非相关的抗原特异结合的抗体)。而且,分离的双特异性抗体可基本上不含有任何细胞物质和/或化学物质。

[0095] 此处所用到的“中和抗体”是指某种抗体,其与特定抗原的结合导致该抗原生物活性受到抑制。该抗原生物活性的抑制可以用合适的体外或体内试验测定一种或多种该抗原生物活性的指示物进行评估。

[0096] 此处所用到的“单克隆抗体”是指杂交瘤衍生的抗体 (例如,通过杂交瘤技术,例如标准的 Kohler 和 Milstein 杂交瘤方法,制备的杂交瘤分泌的抗体)。因此,杂交瘤-衍生的本发明的双特异性抗体也指对不止一种抗原具有抗原特异性的单克隆抗体。

[0097] 词组“重组抗体”指通过重组技术制备、表达、创建或分离的抗体,例如由转染入宿主细胞的重组表达载体表达的抗体,由重组子、重组抗体文库分离的抗体,由转入了人免

疫球蛋白基因的动物（例如，小鼠）中分离的抗体（参见例如，Taylor, L. D., 等 (1992) Nucl. Acids Res. 20 :6287-6295) 或由其它, 包括剪接特定的免疫球蛋白基因序列（例如人免疫球蛋白基因序列）成为其它 DNA 序列的途径制备、表达、创建或分离的抗体。重组抗体的例子包括嵌合的, CDR- 移植的和人化的抗体。

[0098] 术语“人抗体”指具有相应于或来源于人种免疫球蛋白可变区和恒定区的抗体, 参见例如, Kabat 等 (See Kabat, 等 (1991) Sequences of protein of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。本发明所述的人抗体可以包括不由人种免疫球蛋白编码的氨基酸残基（例如, 由随机或体外定点诱变或体内体细胞突变引入的突变), 例如在 CDRs 和特别是 CDR3。

[0099] 本发明的重组人抗体具有可变区, 也可能包括来源于人种免疫球蛋白序列的恒定区（参见 Kabat, E. A., 等 (1991) Sequences of protein of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 913242)。在特定的实施方案中, 这种重组人抗体易于进行体外诱变（或当用人 Ig 序列转化动物时是体内体细胞突变）因此, 当衍生自或与入种 VH 和 VL 序列相关时, 所述的重组抗体的 VH 和 VL 区域的氨基酸序列不是天然存在于人抗体种系所有组分中的序列。在特定的实施方案中, 这种重组抗体是选择性诱变或回复突变的结果。

[0100] 术语“回复突变”指一个过程, 其中一些或全部体细胞突变的人抗体氨基酸被来自同源种系抗体序列的相应种系残基所替代。本发明人抗体的重和轻链序列分别与 VBASE 数据库中的种系序列相对比以鉴定出具有最高同源性的序列。通过对所定义的编码这些不同氨基酸的核苷酸位置突变, 使在本发明人抗体的差异恢复到所述的种系序列。应当研究通过回复突变鉴定出的每一氨基酸的功能在抗原结合中的直接或间接的作用, 突变后影响所需人抗体特性的任何氨基酸都不应当包括在最终的人抗体中。为减少易于回复突变的氨基酸的数量那些与最接近的种系序列不同但与第二种系相应氨基酸相同的氨基酸的位置可以保留, 条件是上述第二种系序列与本发明的人抗体序列在所研究的氨基酸的两侧有至少 10, 优选 12 个氨基酸是相同或共线性的。恢复突变可能出现在抗体优化的任何阶段。

[0101] 术语“嵌合抗体”指包含来自一个种的重和轻链可变区序列和来自另一种的恒定区序列的抗体, 例如鼠重和轻链可变区与人恒定区相连接的抗体。

[0102] 术语“CDR- 移植的抗体”指包含来自一个种的重和轻链可变区序列, 但其中 VH 和 / 或 VL 的一个或多个 CDR 区域被另一种的 CDR 序列所替代的抗体, 例如具有鼠重和轻链可变区, 但其中一个或多个鼠 CDR (例如, CDR3) 被人 CDR 序列所替代的抗体。

[0103] 术语“人化的抗体”指包含来自非人种（例如, 小鼠）的重和轻链可变区序列, 但其中 VH 和 / 或 VL 序列的至少一部分被改变为更“类似于人”, 即与人种可变区序列更相似的抗体。人化的抗体的一种类型是 CDR- 移植的抗体, 其中将人 CDR 序列引入到非人 VH 和 VL 序列中以替代相应的非人 CDR 序列。

[0104] 一种测定抗体结合动力学的方法是通过表面胞质团共振。此处所用的术语“表面胞质团共振”指一种光学现象, 其通过检测生物传感器基质内蛋白浓度的改变, 例如利用 BIAcore 系统 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden 和 Piscataway, NJ) 可进行实时生物特异的相互作用分析。进一步的描述参见 Jönsson, U., 等 (1993) Ann. Biol.

Clin. 51 :19-26 ; Jönsson, U. , 等 (1991) Biotechniques 11 :620-627 ; Johnsson, B. , 等 (1995) J. Mol. Recognit. 8 :125-131 ; and Johnsson, B. , et al. (1991) Anal. Biochem. 198 : 268-277。

[0105] 此处所用的术语 " K_{off} " 是指抗体从抗体 / 抗原复合物中解离出来的解离速率常数。

[0106] 此处所用的术语 " K_d " 是指特定抗体 - 抗原相互作用的解离常数。

[0107] 用上述第 II 部分中所描述的不同的制备抗体的方法制备本发明的双特异性抗体。本发明的双特异性抗体可直接针对本质上任何结构上相关的抗原,而优选地,本发明的双特异性抗体是那些特异结合于 IL-1 α 和 IL- β 的抗体,其可用双特异性抗原,例如那些在实施例 1-4 中描述的特异性抗原制备。其他可应用于本发明的结构上相关的抗原包括,但不限于 caspase 家族成员,细胞因子家族,例如 IL-1 家族成员 (例如, IL-1/IL-18), TNF 家族成员 (例如, TNF α /TNF β), IL-6 家族成员,干扰素, TGF β 家族成员, EGF 家族成员, FGF 家族成员, PDGF 家族成员, VEGF 家族成员,血管形成素 (Angiopoietin) 家族成员,骨形成蛋白,分泌的蛋白酶 (金属蛋白酶),和细胞因子受体家族,例如 IL-1- 受体家族成员, TNF- 受体家族成员 TGF β 受体家族成员, EGF 受体家族成员, FGF 受体家族成员, PDGF 受体家族成员, VEGF 受体家族成员和血管形成素 (Angiopoietin) 受体家族成员。

[0108] 本发明的双特异性抗体可表现对其所结合的两个不同的但结构上相关的抗原等同的结合活性,或者所述的双特异性抗体优先与上述两抗原之一结合,但与非相关的抗原相比,对上述两个相关的抗原仍具有特异性。双特异性抗体对上述结构上相关的抗原以及对非相关的抗原的结合活性可利用标准的体外免疫测定,例如 ELISA 或 BIAcore 试验进行评估。优选地,所述抗体对非相关的抗原的 K_d 与抗体对结构上相关的抗原的 K_d 的比率应当至少为 3,更优选地,所述比率至少为 5,更优选地,所述比率至少为 10,或更优选地,所述比率至少为 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 或 1000。

[0109] 在定量的术语中,背景结合及双特异性是水平或程度上的差异。例如,背景结合是低水平结合,如低于 5%,更优选低于 3%和最优选约为 0.1-1%,而特异性交叉反应性或双特异性结合是高水平结合如,高于 1%,更优选高于 3%,更优选高于 5%和更优选高于 10%。另外,优选地,针对靶抗原的双特异性抗体的 IC_{50} 接近于给定生物实验中抗原的 ED_{50} 。

[0110] 优选地选择本发明的双特异性抗体,或其抗原结合部分是对其所结合的一个,优选两个抗原具有所需的结合动力学的 (例如高亲和,低解离,慢解离速率,强中和活性) 例如,所述的双特异性抗体,或其部分与一个或优选两个结构上相关的抗原以由表面等离子共振测定的下述 k_{off} 速率常数相结合, k_{off} 速率常数为 0.1s^{-1} 或更低,更优选 k_{off} 常数为 $1 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ 或更低,更优选 k_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 或更低,更优选 k_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 或更低,或更优选 k_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ 或更低。可替代地,或可附加地,双特异性抗体,或其部分可以下述 IC_{50} 抑制一个,优选两个结构上相关的抗原的活性, IC_{50} 为 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 或更低,更优选 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-7}\text{M}$ 或更低,更优选 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 或更低,更优选 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-9}\text{M}$ 或更低,更优选 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-10}\text{M}$ 或更低,或更优选 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-11}\text{M}$ 或更低。优选地, IC_{50} 应当用灵敏的生物学实验测定,在所述实验中, IC_{50} 值应当接近于抗原的 ED_{50} 值。

[0111] 本发明还提供药物组合物,其包含本发明的双特异性抗体,或其抗原结合部分和

药理学上可接受的载体。本发明的药物组合物可进一步包含至少一种附加的治疗试剂,例如一种或多种治疗疾病的附加试剂,其中应用所述的双特异性抗体有利于改善所述疾病。例如,当所述的双特异性抗体特异性地与 IL- α 和 IL- β 结合时,所述的药物组合物可进一步包含一种或多种治疗试剂,在所述疾病中 IL-1 的活性是有害的。

[0112] 本发明的抗体和抗体-部分可并入适合施用于受试者的药物组合物中。典型地,所述药物组合物包括本发明的抗体或抗体部分和药理学上可接受的载体。此处所用的“药理学上可接受的载体”包括任意或全部的溶剂,分散介质,糖衣,抗菌剂和抗真菌剂,等渗的和延迟吸收试剂等生理上可配伍的试剂。药理学上可接受的载体的例子包括,一种或多种水,盐溶液,磷酸盐缓冲液,葡萄糖,甘油,乙醇等,以及它们的组合。在许多情况下,其优选地在组合物中包括等渗剂,例如,糖,聚乙醇,如甘露醇,山梨醇,或氯化钠。药理学上可接受的载体可进一步包括微量的辅助物质,例如湿润或乳化剂,防腐剂或缓冲剂,其可增强抗体或抗体部分的保存期或效力。

[0113] 本发明的抗体和抗体-部分可并入适合于非肠道施用的药物组合物中。优选地,抗体或抗体-部分制备成含有 0.1250mg/ml 抗体的可注射溶液。所述的可注射溶液可以液体或冻干的剂量形式包含在打火石或琥珀瓶,安瓿瓶或预先灌注的注射器中。缓冲液可以是 L-组氨酸 (1-50mM),理想的是 5-10mM, pH 5.0 到 7.0 (理想的是 pH 6.0)。其他合适的缓冲液包括,但不限于琥珀酸钠,柠檬酸钠,磷酸钠或磷酸钾。氯化钠可在 0-300mM (理想的是 150mM 的液体剂量形式) 的浓度范围内用于改变溶液的毒性。冻干的剂量形式还可以包含抗冻剂,主要是 0-10% 的蔗糖 (理想的是 0.5-1.0%)。其他合适的抗冻剂包括海藻糖和乳糖。冻干的剂量形式还可以包括膨胀剂,主要是 1-10% 甘露糖醇 (理想的是 2-4%)。在液体和和冻干的剂量形式中还可以包含稳定剂,主要是 1-50mM L-甲硫氨酸 (理想的是 5-10mM)。其它合适的膨胀剂包括甘氨酸,精氨酸,可以 0-0.05% 的聚山梨酸酯-80 (理想的是 0.005-0.01%) 的形式。其他的表面活性剂包括但不限于聚山梨酸酯 20 和 BRU 表面活性剂。

[0114] 本发明的组合物可以是多种形式。其包括例如,液体,半固体和固体的剂量形式,例如液体溶液 (例如,可注射的和不可熔化的溶液) 分散剂或悬浮剂片剂,丸剂,粉剂,脂质体和栓剂。优选的方式依赖于施用方式和治疗用途。典型的优选组合物是可注射的或不可熔化的溶液,例如那些类似于用其他抗体对人进行被动免疫的组合物。优选的施用形式是非肠道的 (例如静脉内,皮下,腹膜内,肌内)。在优选的实施方案中,所述的抗体通过静脉内注入或注射施用。在另一优选的实施方案中,所述的抗体通过肌内或皮下注射。

[0115] 治疗组合物典型地需经过灭菌并在操作和贮存条件下保持稳定。所述的组合物的配置成溶液,微量乳化作用,分散剂,脂质体,或其它适合于高药物浓度的有序结构。无菌注射溶液可通过下述方式制备,将所需剂量的活性化合物 (即,抗体或抗体部分) 按照要求掺入带有一种或相组合的上述成分的溶剂中,然后过滤除菌。一般将活性化合物与无菌载体整合以制备分散剂,所述的载体包含碱性分散介质和上述列举的其他所需成分。对于用无菌冻干粉末制备无菌的可注射溶液的情况,优选的制备方法是真空干燥和喷雾干燥获得活性组分粉末,以及来自预先无菌过滤的溶液的其他所需的附加成分。可保持液体的适当流动性,例如可以利用包膜,如卵磷脂,对于分散剂的情况保持所需的颗粒大小以及利用表面活性剂。可通过在所述组合物中添加延迟吸收的试剂,例如一硬脂酸盐和明胶以延长可注

射组合物的吸收。

[0116] 本发明的抗体和抗体一部分可以通过多种已知的方式施用, 尽管对于许多治疗应用而言优选的施用途径/方式是皮下注射, 静脉内注射或注入。本领域技术人员可以理解的是所述的施用途径和/或方式依所需结果而定。在一定的实施方案中, 所述的活性化合物可与载体一起制备, 所述的载体可以保护上述化合物, 使之不至于急速释放, 例如可控制的释放配方, 包括嵌入, 透皮贴剂, 和微胶囊包裹的释放系统。可使用能进行生物降解的, 生物亲和的聚合物, 例如乙烯醋酸乙烯 (ethylene vinyl acetate), 聚酞类, 聚乙二醇酸 (polyglycolic acid), 胶原, 聚原酸酯 (polyorthoesters), 和聚乳酸 (polylactic acid)。许多制备这些试剂的方法都是已有专利或为本领域已知的, 参见例如, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0117] 在一定的实施方案中, 本发明的抗体或抗体部分可以口头施用, 例如利用惰性稀释剂或可同化的食用载体。所述的化合物 (和其它组分, 如果需要的话) 可包裹在硬或软壳明胶胶囊中, 压缩成片状或直接掺入受试者的日常饮食中。对于口服治疗施用所述的化合物可与赋形剂一起, 以可摄取的片剂, 口腔片剂, 锭剂, 胶囊, 酏剂, 悬浮液, 糖浆, 糯米纸囊剂等形式使用。若以除非肠道之外的途径施用本发明的化合物, 则需要用防止所述化合物灭活的物质包被, 或与防止所述化合物灭活的物质共同施用。

[0118] 所述组合物中还可以包含追加的活性化合物。在一定的实施方案中, 本发明的抗体或抗体部分与一种或多种其他的治疗试剂共同配制和/或共同施用, 上述的其他治疗试剂是对 IL-1 活性对起有害的疾病的治疗中有益。例如, 本发明的抗-IL- α /IL-1 β 双特异性抗体, 或抗体部分可与一种或多种附加的与其他靶物质结合的抗体 (例如, 与其他细胞因子结合的抗体或与细胞表面分子相结合的抗体) 共同配置和/或共同施用。而且本发明的一种或多种抗体还可以与两种或两种以上的上述的治疗试剂结合施用。这种结合治疗的益处在于可以使用低剂量的治疗试剂, 从而避免了可能的毒性或与多种单一疗法相关的复杂作用。

[0119] IV. 双特异性抗体的应用

[0120] 鉴于它们具有与两个不同的但结构上相关的抗原相结合的能力, 本发明的双特异性抗体, 或其部分可通过常规的免疫学分析方法, 例如酶联免疫吸附试验 (ELISA), 放射免疫分析 (RIA) 或组织免疫组织化学用于检测任一或所有这些抗原 (例如在生物样品, 如血清或血浆中)。本发明提供检测生物样品中的抗原的方法, 该方法包括: 使所述生物样品与本发明的可特异识别所述抗原的双特异性抗体, 或抗体部分抗原相接触, 并检测与抗原结合的抗体 (或抗体部分), 或非结合抗体 (或抗体部分), 由此检测所述生物样品中的所述抗原。所述抗体用可检测的物质进行直接或间接的标记, 以便于检测结合或非结合抗体。合适的可检测物质包括多种酶, 修复基团, 荧光物质, 发光物质和放射性物质。合适的酶的例子包括, 辣根过氧化物酶, 碱性磷酸酶, β -半乳糖苷酶, 乙酰胆碱酯酶; 合适的修复基团复合物的例子包括链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素; 合适的荧光物质的例子包括 7-羟基香豆素, 荧光素, 荧光素异硫氰酸盐, 硷性蕊香红 B, 二氯三嗪基胺荧光素, 丹磺酰氯或藻红蛋白; 发光物质的例子包括 3-氨基邻苯二甲酰环脒; 合适的放射性物质的例子包括 I^{125} , I^{131} , ^{35}S 或 3H 。

[0121] 作为对抗体进行标记的替代,用可检测的物质标记的标准抗原物质和所述抗原特异的未标记的双特异性抗体通过竞争免疫分析,在生物流体中对所述的抗原进行试验。在这一试验中,所述的生物样品,经标记的标准抗原和所述的双特异性抗体相结合,确定与非标记的抗体相结合的标记的标准抗原的量。在所述生物样品中的抗原的量和与非标记的抗体相结合的标记的标准抗原的量成反比。

[0122] 在优选的实施方案中,所述的双特异性抗体特异性识别 IL-1 α 和 IL- β 和前述的检测方法用于检测 IL-1 α 和 / 或 IL- β 。由此,本发明进一步提供检测生物样品或组织中的 IL- α 或 IL- β 的方法,该方法包括使怀疑含有 IL- α 或 IL- β 的生物样品或组织与本发明的双特异性抗体,或抗原结合部分相接触,并检测所述生物样品或组织中的 IL- α 或 IL- β 。所述的生物样品可以是,例如体外样品,如细胞、组织或体液样品(例如血液,血浆,尿,唾液等)。而且,所检测的组织可以是定位于受试者体内的样品,例如通过所述组织体内成像所观察的组织(例如,利用标记的抗体)。

[0123] 本发明的双特异性抗体也可用于诊断目的。在一个实施方案中,本发明的抗体用于体外诊断试验,例如检测有用抗原的实验室试验或在检测有用抗原的保健试验(care test)中。已建立的应用抗体的体外试验包括 ELISAs, RIAs, Western 印迹等。在又一实施方案中,本发明的抗体用于体内诊断试验,例如体内成像试验。例如所述的抗体用能在体内检测的可检测的物质标记,所述的标记抗体可施用于受试者,并且所述的标记抗体可在体内检测,由此可以进行体内成像。

[0124] 本发明的可特异识别 IL-1 α 和 IL- β 的双特异性抗体可用于诊断目的检测 IL- α 和 / 或 IL- β ,例如在多种炎症疾病和机能紊乱,以及胎儿自发的吸收作用疾病中。对于特异的疾病和机能紊乱类型,本发明的抗 IL-1 α / IL- β 双特异性抗体可以诊断目的用于此处所描述的任何涉及所述抗体(见下)治疗用途的疾病 / 机能紊乱,例如 IL-1 活性在其中起有害作用的疾病,以下进行详细讨论。

[0125] 本发明的双特异性抗体和抗体部分,优选地,能在体外和体内中和其所结合的抗原。因此本发明的这种抗体和抗体部分可用于抑制上述抗原的活性,例如包括所述抗原的细胞培养物,或具有能与本发明的抗体相互作用的抗原的人受试者或其他哺乳动物。在一个实施方案中,本发明提供抑制抗原活性的方法,该方法包括使所述抗原与本发明的双特异性抗体或抗体部分相接触,以使所述抗原活性受到抑制。在优选的实施方案中,所述的双特异性抗体与 IL-1 α 和 IL- β 相结合,所述的方法通过 IL-1 α 和 / 或 IL-1 β 与双特异性抗体,或其部分相结合可以抑制 IL-1 α 和 / 或 IL- β 的活性。所述的 IL-1 α 和 / 或 IL-1 β 活性可以受到抑制,例如在体外。例如,在含有或怀疑含有 IL-1 α 和 / 或 IL-1 β 的细胞培养物中,本发明的抗体或抗体部分可以添加到培养基中以抑制培养物中的 IL-1 α 和 / 或 IL-1 β 活性。另外,也可以在受试者体内抑制 IL-1 α 和 / 或 IL-1 β 的活性。

[0126] 在又一实施方案中,本发明提供抑制受试者中抗原活性的方法,所述的受试者患有某种上述抗原在其中其有害作用的疾病。本发明提供抑制患有疾病的受试者中抗原活性的方法,该方法包括对受试者施用本发明的双特异性抗体或抗体部分,从而使受试者中的抗原活性受到抑制。优选地,所述抗原是人抗原,所述受试者是人。本发明的抗体可以治疗目的施用于人受试者。而且本发明的抗体可以施用于表达某种上述抗体可以兽医目的与之结合的抗原的非人哺乳动物或作为人疾病的动物模型的非人哺乳动物。对于后者,所述的

动物模型可用于评价本发明的抗体的治疗效果（例如试验剂量和施用的时间过程）。

[0127] 优选地，所述双特异性抗体结合 IL-1 α 和 IL-1 β ，所述的在受试者中抑制抗原活性的方法是在受试者中抑制 IL-1 活性的方法，例如患有 IL-1 活性在其中起有害作用的疾病的受试者。此处所用到的术语“IL-1 活性在其中起有害作用的疾病”指包括下述的疾病或技能紊乱，在患有所述疾病的受试者中已表明 IL-1（其包括 IL-1 α 和 IL-1 β ）或是或怀疑是与所述疾病的病理学相关，或者是与所述疾病恶化相关的因素。因此，对于 IL-1 活性起有害作用的疾病，抑制 IL-1 的活性（即，IL-1 α 和 IL-1 β 之一或两者）有望减轻所述症状和 / 或疾病的进程。这种疾病可由下述证明，例如，患有所述疾病的受试者的生物流体中 IL-1 浓度升高（例如，受试者的血清，血浆，滑液等处的 IL-1 浓度升高），其可由，例如上述的抗 IL-1 抗体检测。

[0128] IL-1 在与包括免疫和炎症因素的多种疾病的相关病理学中起关键作用。上述的疾病包括但不限于类风湿病关节炎，骨关节炎，少年慢性关节炎，Lyme 关节炎，牛皮癣的关节炎，反应性关节炎，脊椎关节病，系统性红斑狼疮，克罗恩氏病，溃疡性结肠炎，炎症性肠疾病，胰岛素依赖性糖尿病，甲状腺炎，哮喘，变态反应性疾病，牛皮癣，硬皮病皮炎，移植物抗宿主病，器官移植排异反应，与器官移植相关的急性或慢性免疫疾病，结节病，动脉粥样硬化，散播性血管性凝血，Kawasaki 病，Grave 病，肾变病综合症，慢性疲劳综合症，眶坏死性肉芽肿病，荷 - 索紫癜症，微观肾脉管炎，慢性活动性肝炎，葡萄膜炎，脓毒性休克，毒性休克综合症，脓毒综合症，恶病质，传染性疾病，寄生虫病，获得性免疫缺陷综合症，急性横贯性脊髓炎，慢性舞蹈病，帕金森氏病，阿尔察默病，中风，夏科氏肝硬变，溶血性贫血，恶性肿瘤，心力衰竭，心肌梗塞，阿狄森病，偶发性 I 型多腺缺陷和 II 型多腺缺陷，施密特氏综合症，成人（急性）呼吸困难综合症，脱发，斑秃，血清反应阴性关节病，关节病，莱特尔氏病，牛皮癣关节病，溃疡性鲕状结构关节病，肠滑膜炎 (enteropathic synovitis)，衣原体，耶尔森氏菌属和沙门氏菌属相关的关节病，脊椎结核关节病，粥样疾病 / 动脉硬化，特异反应性过敏，自身免疫肠疾病，慢性天疱疮，落叶状天疱疮，类天疱疮，线性 IgA 疾病 (linear IgA disease)，自身免疫溶血性贫血，库姆斯阳性溶血性贫血，获得性恶性贫血，幼年恶性贫血，肌痛性脑炎 / Royal Free Disease，慢性皮肤粘膜假丝酵母病，巨细胞性动脉炎，原发性硬化性肝炎 (primary sclerosing hepatitis)，隐源性自身免疫肝炎，获得性免疫缺陷疾病综合症，获得性免疫缺陷相关疾病，丙型肝炎，共有变换免疫缺陷 (common varied immunodeficiency)（共有可变化的血内两种免疫球蛋白过少），扩张性心肌病，女性不育症，卵巢衰竭，卵巢功能早期衰退，纤维变性的肺部疾病，隐源性纤维肺泡炎，炎症后的间质肺疾病 (postinflammatory interstitial lung disease)，间质肺炎，与结缔组织疾病相关的间质肺部疾病，混合结缔组织疾病相关的肺部疾病，全身硬化相关的间质肺病，类风湿病关节炎相关的间质肺病，系统性红斑狼疮相关的肺部疾病，皮炎 / 多肌炎相关的肺部疾病，Sjögren 病相关的肺部疾病，强直性脊柱炎相关的肺部疾病，脉管炎弥漫性肺部疾病，含铁血黄素沉着病相关的肺部疾病，药物诱导的间质肺部疾病，辐射纤维化，闭塞性支气管炎，慢性嗜酸性肺炎，淋巴细胞浸润的肺部疾病，感染后间质肺部疾病，痛风性关节炎，自身免疫性肝炎，I 型自身免疫性肝炎（典型地自身免疫的或狼疮状肝炎），II 型自身免疫的肝炎（抗 LKM 抗体肝炎），自身免疫介导的低血糖，B 型抗胰岛素微黑的棘皮症，甲状旁腺机能减退，与器官移植相关的急性免疫疾病，与器官移植相关的慢性免疫疾病，骨关节

病,初期的致硬化胆管炎, I 型牛皮癣, II 型牛皮癣, 自发性 leucopaenia, 自身免疫性中性白细胞减少症, 肾脏疾病 NOS, 肾小球肾炎 (glomerulonephritides), 肾微观 vasculitis, 莱姆病, 盘状红斑狼疮, 自发的或 NOS 雄性不育, 精子自身免疫, 多发性硬化 (所有的亚型), 交感性眼炎, 肺动脉高血压症继发性结缔组织疾病 (pulmonary hypertension secondary to connective tissue disease), 古德帕斯彻氏综合症, 结节性动脉周围炎的肺部表现, 急性风湿热, 类风湿性脊椎炎, 斯提耳病, 系统性硬化, Sjorgren 综合症, 高安氏病 / 动脉炎, 自身免疫血小板病, 自发性血小板病, 自身免疫甲状腺病, 甲状腺机能亢进, 致甲状腺肿的自身免疫的甲状腺机能减退 (Hashimoto 病), 萎缩的自身免疫甲状腺功能减退, 初期的粘液水肿, 晶状体眼色素层炎, 初期的结节性脉管炎, 白癜风, 中枢神经系统疾病 (例如, 抑郁, 精神分裂症, 阿尔采默氏病, 帕金森氏症等), 急性和慢性疼痛, 和脂质失调。本发明的人抗体及其抗体部分可用于治疗自身免疫疾病的病人, 具体说来是与炎症, 包括类风湿病性脊椎炎, 变态反应, 自身免疫的糖尿病, 自身免疫的眼色素层炎。

[0129] 优选地, 本发明的 IL- α 或 /IL- β 双特异性抗体或其抗原-结合部分用于治疗类风湿病关节炎, 克罗恩氏病, 多发性硬化, 胰岛素依赖的糖尿病, 糖尿病和牛皮癣。

[0130] 本发明的 IL-1 α /IL- β 双特异性抗体, 或抗体部分也可以与一种或多种对治疗自身免疫和炎症性疾病有用的其他治疗试剂一起施用。

[0131] 本发明的抗体或其抗原结合部分可以单独地, 也可以与其他治疗试剂相结合以治疗上述疾病。应当理解本发明的抗体或其抗原结合部分可以单独使用也可以与其他的试剂, 例如治疗试剂结合使用, 本领域的技术人员可以根据其需要选择所述的附加试剂。例如, 所述的附加试剂可以是本领域已知的对由本发明的抗体所治疗的疾病或机能紊乱有用治疗试剂。所述的附加试剂也可以是能赋予所述治疗组合有益属性的试剂, 例如, 影响组合物粘性的试剂。

[0132] 还应当理解的是包含在本发明范围内的组合是指那些有益于相应目的的组合。下述的试剂只是为了进行说明, 不起任何限定作用。作为本发明一部分的所述组合可以是本发明的抗体和至少一种选自下述的试剂。所述的组合还可以包含多余一种附加试剂。例如, 如果所形成的组合能够行使相关的功能其可包含两种或三种附加的试剂。

[0133] 优选的组合是非类固醇抗炎症药物, 也指 NSAIDS 其包括类似于布洛芬和 COX-2 抑制剂的药物。其他优选的组合是包括氢化泼尼松的皮质类固醇; 使用类固醇已知的副作用可通过下述方式降低或根除, 即在与本发明的抗-IL-1 抗体结合对病人进行治疗时逐渐减少所需类固醇的剂量。与本发明的抗体或抗体部分相结合治疗类风湿病关节炎的治疗性试剂的非限制性的例子包括: 细胞因子抑制的抗-炎症药物 (CSAIDS); 人细胞因子或生长因子的抗体或拮抗物, 例如, TNF, LT, IL-2, IL6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, 和 PDGF。本发明的抗体或其抗原结合部分可与下述的细胞表面分子相结合, 如 CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7. 1), CD86 (B7. 2), CD90, 或其配体包括 (gp39 或 CD40L)。

[0134] 优选的治疗试剂组合可干预自身免疫的和后续炎症级联的不同点; 优选的例子包括 TNF 拮抗物, 如嵌和的人化的或人 TNF 抗体, D2E7, (PCTPublication No. WO 97/29131), CA2 (Remicade), CDP 571, CDP 870, 萨力多胺和可溶的 p55 或 p75 TNF 受体及其衍生物 (p75TNFR1gG (Enbrel) 或 p55TNFR1gG (Lenercept), 和 TNF (X 转化酶 (TACE) 抑制剂; 类似

地, IL-1 抑制剂 (IL-1 转化酶抑制剂, IL-1 RA 等) 也由于相同的原因而起作用。其他优选的组合包括 IL 11。再有优选的组合是其他平行于, 依赖于或与 IL-1 功能一致的自身免疫应答关键因素; 特别优选的是 IL-12 和 / 或 IL-18 拮抗剂, 包括 IL-12 和 / 或 IL-18 抗体或可溶性的 IL-12 和 / 或 IL-18 受体, 或 IL-12 和 / 或 IL-18 结合蛋白。已表明 IL-12 和 IL-18 具有相重叠但有区别的功能, 与两者拮抗剂的组合可能是最有效的。另一优选的组合是非耗减的抗 -CD4 抑制剂。另一优选的组合包括共刺激途径 CD80 (B7. 1) 或 CD86 (B7. 2) 的拮抗剂, 包括抗体, 可溶受体或拮抗性配体。

[0135] 本发明的抗体或其抗原结合部分也可以与下述试剂结合, 例如氨甲喋呤, 6-MP, 硫唑嘌呤, 柳氮磺胺吡啶, 5-氨基水杨酸, 偶氮水杨酸奎宁 / 羟氯喹, 青霉胺, 金硫苹果酸盐 (肌内和口服), 硫唑嘌呤, cochlaine, 皮质类固醇 (口服, 吸入和局部注射), β -2 肾上腺受体激动剂 (沙丁胺醇, 特布他林, 沙美特罗), 黄嘌呤 (茶叶碱, 氨茶碱), 色甘酸盐, 茶多罗米, 甲哌唑庚酮, 己丙基阿托品和乙东莨菪碱, 环孢菌素, FK506, 雷帕霉素, 霉酚酸莫非替克, 来氟米特, NSAIDs, 例如, 布洛芬, 皮质类固醇例如氢化泼尼松, 磷酸二酯酶抑制剂, 阿糖腺苷激动剂, 抗血栓形成试剂, 补体抑制剂, 释放出肾上腺素的试剂, 所述试剂通过下述前炎症细胞因子干扰信号传输, 所述细胞因子例如 TNF α 或 IL-1 (例如 IRAK, NIK, IKK, p38 或 MAP 激酶抑制剂), IL- β 转化酶抑制剂, TNF α 转化酶 (TACE) 抑制剂, T- 细胞信号传输抑制剂, 例如激酶抑制剂, 金属蛋白酶抑制剂, 水杨酸偶氮磺胺吡啶, 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 受体及其衍生物 p75TNFRlgG (Enbrel 和 p55TNFRlgG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) 和抗炎症细胞因子 (例如 IL-4, IL10, IL-11, IL-13 和 TGF β s)。优选的组合包括氨甲喋呤或来氟米特, 对于中等或严重的类风湿病关节炎包括环孢菌素。

[0136] 本发明的抗体或抗体部分可与之结合的治疗炎症性肠疾病治疗剂的非限定性的例子包括: 布地奈德; 表皮生长因子; 皮质类固醇; 环孢菌素, 水杨酸偶氮磺胺吡啶; 氨基水杨酸盐; 6- 巯基嘌呤; 硫唑嘌呤; 甲硝唑; 脂氧合酶抑制剂; mesalamine; 奥沙拉嗪; 巴柳氮; 抗氧化剂; 血栓烷抑制剂; IL-1 受体拮抗剂; 抗 -IL-1 β 单克隆抗体; 抗 -IL-6 单克隆抗体; 生长因子; 弹性蛋白酶抑制剂; pyridinyl- 咪唑化合物; 其他人细胞因子或生长因子的抗体或拮抗剂, 例如, TNF, LT, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, 和 PDGF。本发明的抗体可与细胞表面分子, 例如 CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 或它们的配基的抗体相结合。本发明的抗体或其抗原结合部分可与下述试剂相结合, 例如氨甲喋呤, 环孢菌素, FK506, 雷帕霉素, 霉酚酸莫非替克, 来氟米特, NSAIDs, 例如, 布洛芬, 皮质类固醇, 例如氢化泼尼松, 磷酸二酯酶抑制剂, 腺苷激动剂, 抗血栓形成剂, 补体抑制剂, 肾上腺素试剂, 所述试剂通过下述前炎症细胞因子干扰信号传输, 所述的细胞因子例如 TNF (X 或 IL-1 β 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- 细胞信号传输抑制剂例如激酶抑制剂, 金属蛋白酶抑制剂, 水杨酸偶氮磺胺吡啶, 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 (例如可溶的 p55 或 p75 TNF 受体, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) 和抗炎症的细胞因子 (例如 IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 和 TGF β)。

[0137] 优选地治疗克罗恩氏病且本发明的抗体或其抗体部分能与之结合的试剂包括: TNF 拮抗剂, 例如, 抗 -TNF 抗体, D2E7 (PCT Publication No. WO 97/29131), CA2 (Remicade),

CDP 571, TNFR-Ig 构建体, (p75TNFRIGG(Enbrel) 和 p55TNFRIGG(Lenercept)) 抑制剂和 PDE4 抑制剂。抗体,或其抗原结合部分可与皮质类固醇结合,例如,布地奈德和地塞米松。本发明的抗体或其抗原结合部分,还可与下述试剂结合,例如水杨酸偶氮磺胺吡啶,5- 对氨基水杨酸和奥沙拉嗪,所述试剂可干扰前炎症细胞因子,例如 IL-1,的合成或作用,例如, IL- β 转化酶抑制剂和 IL-1ra。本发明的抗体或其抗原结合部分还可以与 T 细胞信号传输抑制剂,例如,酪氨酸激酶抑制剂 6- 巯基嘌呤。本发明的抗体或其抗原结合部分可与 IL-11 相结合。

[0138] 非限制性的治疗多发性硬化且可与本发明的抗体或其抗原结合部分相结合的治疗试剂包括:皮质类固醇;氢化泼尼松;甲基强的松龙;硫唑嘌呤;环磷酰胺;环孢菌素;氨甲喋呤;4- 氨基吡啶;替托尼定;干扰素- β 1a(Avonex;Biogen);干扰素- β 1b(Betaseron; Chiron/Berlex);Copolymer 1(Cop-1;Copaxone;Teva Pharmaceutical Industries, Inc.);高压氧;静脉内的免疫球蛋白;clabribine;其他人细胞因子或生长因子的抗体或拮抗剂,例如,TNF,LT,IL-2,IL-6,IL-7,IL-8,IL-12,IL-15,IL-16,IL-18,EMAP-II,GMCSF, FGF,和 PDGF。本发明的抗体或其抗原结合部分可与细胞表面分子,例如 CD2,CD3,CD4,CD8, CD25,CD28,CD30,CD40,CD45,CD69,CD80,CD86,CD90 或其配基的抗体相结合。

[0139] 本发明的抗体或其抗原结合部分还可与下述试剂相结合,例如氨甲喋呤,环孢菌素,FK506,雷帕霉素,霉酚酸莫非替克,来氟米特,NSAIDs,例如,布洛芬,COX-2 抑制剂,皮质类固醇,例如氢化泼尼松,磷酸二酯酶抑制剂,腺苷激动剂,抗血栓形成剂,补体抑制剂,肾上腺素能的剂,所述试剂通过下述细胞因子干扰信号传输,所述细胞因子例如 TNF(X 或 IL-1(例如 IRAK, NIK, IKK, p38 或 MAP 激酶抑制剂), IL- β 转化酶抑制剂, TACE 抑制剂, T- 细胞信号传输抑制剂,例如激酶抑制剂,金属蛋白酶抑制剂,水杨酸偶氮磺胺吡啶,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,sIL-1RI,sIL-1RII,sIL-6R) 和抗炎症细胞因子(例如 IL-4,IL-10, IL-13 和 TGF β)。

[0140] 优选的治疗多发性硬化且可与本发明的抗体或其抗原结合部分相结合的治疗试剂包括干扰素- β ,例如,IFN β 1a 和 IFN β 1b;copaxone,皮质类固醇,IL-1 抑制剂,TNF 抑制剂,和 CD40 配体和 CD80 的抗体。

[0141] 本发明的药物组合物还可以包括“治疗有效量的”或“预防有效量的”本发明的抗体或其抗体部分。”治疗有效量”指为达到所需的治疗效果,在剂量和所需的时间阶段内的总共的效果。所述抗体或抗体部分的治疗有效量因下述因素而不同,例如个体的疾病状态,年龄,性别和重量,以及所述的抗体或抗体部分在所述个体中引发所需应答的能力。治疗有效量也指所述抗体或抗体部分的有益治疗效果超出了其毒性或有害效果。”预防有效量”指为达到所需的预防效果,在剂量和所需的时间阶段内的总共的效果。典型地,由于在受试者中应用的预防剂量在患病前或在所述疾病的早期阶段应用于受试者,所以预防有效量要比治疗有效量低。

[0142] 可以调整剂量方案以达到理想的所需应答(例如,治疗或预防应答)。例如可以单独的大丸剂施用,也可以一段时间内以分散的剂量施用,或者所述的剂量也可以依照治疗状态所指示的紧迫性成比例地减少或增加。这特别有助于以剂量单元的形式配置非肠道组合物以灵活施用并均匀分配剂量。此处所用的剂量单元形式指生理上不连续的单元适合

于作为施用于受试哺乳动物的单位剂量 ;每一单元包含预定量的经计算以产生与所需药物载体有关的治疗效果的活性化合物。本发明剂量单元形式的规格受限于并直接依赖于 : (a) 所述活性化合物的独有特征和所要达到的治疗和预防效果, 和 (b) 使所述活性化合物符合个体治疗灵敏性在本领域中的固有限制。

[0143] 示范性地,本发明的抗体或抗体部分的治疗有效量或预防有效量的非限定性的范围是 0.1-20mg/kg,更优选 1-10mg/kg。值得注意的是所述的剂量值可能依所述类型和所要减轻的疾病的严重性而有所不同。还应当了解的是,对于任何特定的受试者,都应当依照个体的需要调整特定的剂量方案,施用或监控所述组合物施用的人员的专业性的调整和此处所述的剂量范围都只是示例性的,其并不是为了限制或实验请求保护的药物组合物的范围。

[0144] 本发明通过下述的实施例进行详细描述,但其不对本发明构成任何形式的限制。所有引述的参考文献的内容,包括参考文献,已颁发的专利,和已出版的专利申请,在本申请中均全部清楚地引入作为参考。

[0145] 实施例 1: 基于相同的邻近拓扑区域的双特异性抗原设计

[0146] 在这一实施例中,确定了两个不同但结构上相关的蛋白,IL-1 α 和 IL-1 β 间最大的邻近的相同拓扑区域,将其作为设计产生抗 IL-1 α 和 IL-1 β 双特异性抗体的双特异性抗原的基础。用 BLAST 算法对两蛋白进行比较,使人们能够估计在相似的结构或功能区用一种残基替代另一种残基的可能性。通过这一试验可以鉴定 IL-1 α 和 IL-1 β 间最大的邻近的相同拓扑区域,并可通过合理的相似性延伸扩展这一区域以创建作为双特异性抗原的线性肽。最为符合这一原则的肽具有下述的氨基酸序列:

[0147] NEAQNITDF (SEQ ID NO :1)

[0148] * ****

[0149] 标注的星号(*)表示在两蛋白中同一的残基,其他残基依照BLAST算法非常相似。例如,赖氨酸经常替代同源蛋白中的精氨酸,但不能替代苯丙氨酸。SEQ ID NO:1中的肽是取自所述结构中两不同部分的杂合肽,它们的取向相反,因此这一表位另一种可能的表示法是:dNdEdAdQNITDF(其中的前缀"d"表示所述的氨基酸残基是D氨基酸残基)。L氨基酸组成的所述肽和部分由D氨基酸残基取代的所述肽均是由标准的化学方法合成的。然后将所述的肽与载体蛋白(例如,KLH或白蛋白)相偶联,偶联形成的肽用于通过体外或体内方法筛选抗体。

[0150] 实施例 2: 基于模拟共有折叠环的环状肽的双特异性抗原的设计

[0151] 在这一实施例中,构建下述的环状肽作为产生抗 IL-1 α 和 IL-1 β 双特异性抗体的双特异性抗原,所述的环状肽在结构上模拟两个不同但结构上相关的蛋白,IL-1 α 和 IL-1 β 的共有折叠中的关键的环。所选择的环表现为 IL-1 α 的 168-184 位残基,和 IL-1 β 的 160-176 位残基。所述的共有序列是 :Cyc10-MAFLRANQNGKISVAL(PG)(SEQ ID NO :2)

[0152] * c bc c c c c c c c **c * b*

[0153] 所标注的星号(*)表示 IL-1 α 和 IL-1 β 间同一的残基,c表示共有残基,即,类似于 IL-1 α 和 IL-1 β 中的残基,而实际上在两蛋白中的这一位置上均不存在的残基,b表示此处没有明显的共有残基,所以保留了 IL-1 β 序列的特性。所述的线性肽是通过标准的化学合成方法合成的。为使该肽环化,添加了脯氨酸和甘氨酸残基。所述的环化肽可以利用

标准的偶联条件,在 N, N- 二甲基甲酰胺 (1mg/ml) 中高度稀释而合成。典型的反应是使用过量的偶联试剂,例如苯并三唑-1-yl-含氧-三-吡咯烷-磷酸六氟磷酸盐 (PyBOP; 2eq) 和重碳酸钠 (10eq) 在室温下进行的。然后将所述的肽与载体蛋白 (例如, KLH 或白蛋白) 相偶联,偶联形成的肽用于通过体外或体内方法筛选抗体。

[0154] 实施例 3: 基于杂合肽的双特异性抗原的设计

[0155] 在这一实施例中,构建包括两个不同但结构上相关的蛋白, IL-1 α 和 IL-1 β 的可替代或重叠序列杂合肽,用作产生抗 IL-1 α 和 IL-1 β 双特异性抗体的双特异性抗原。为创建所述的杂合肽,鉴定了 IL-1 α 和 IL-1 β 中的可替代和重叠氨基酸序列,并将其剪接成下述的肽:

[0156] TKGGQDITDFQILENQ (SEQ ID NO :3)

[0157] b b b bb bb bbb

[0158] a aaa aaaa a a

[0159] 上述的 a 和 b 表示哪一个蛋白是上述残基的来源蛋白 (a = IL-1 α ; b = IL-1 β)。所述的 ITDF (SEQ ID NO :4) 在两蛋白中是共同的,其包含在所述杂合肽中。而且,这一杂合肽集中于来自两蛋白羧基端的序列,已知其也对两蛋白中的中和抗体具有抗原性。所述杂合肽通过标准的化学合成方法制备。然后将所述的肽与载体蛋白 (例如, KLH 或白蛋白) 相偶联,偶联形成的肽用于通过体外或体内方法筛选抗体。

[0160] 实施例 4: 生产针对 IL-1 α 和 IL-1 β 的双特异性抗体

[0161] NEAQNTTDF (SEQ ID NO :1)

[0162] Cyclo-MAFLRANQNNGKISVAL (PG) (SEQ ID NO :2)

[0163] TKGGQDITDFQILENQ (SEQ ID NO :3)

[0164] SEQ ID NO :1, 2 和 3 的肽与 KLH 相偶联,分别用来免疫兔。用上述三种肽免疫的兔的抗血清表现出针对作为抗原的肽的良好免疫应答。但是,只有用 SEQ ID NO :3 的肽免疫的兔的抗血清能与 IL-1 α 蛋白和 IL-1 β 蛋白都结合。

[0165] 五只小鼠 (BA119-BA123) 用与 KLH 偶联的 SEQ ID NO :3 的肽 (FIA) 加上弗氏不完全佐剂经皮下免疫,每三周免疫一次共三次,然后用与 KLH 偶联的 SEQ ID NO :3 的肽以静脉内方式进行两次加强。每次免疫后 10 天从每只小鼠取血,通过 ELISA 测定抗体滴度。小鼠 BA119 和 BA123 的脾细胞分别与 IIA 部分中所述的骨髓瘤细胞系 P3X36Ag8.653 相融合,通过有限稀释在 96-孔培养板中每孔接种一个上述融合细胞。首先以标准的 ELISA 测定所述的杂交瘤的 IgG 和 IgM 的产量,以鉴定抗体-产生克隆。总共分离了来自小鼠 #BA123 融合体的 945 个克隆。用 ELISA 检测的 355 个克隆的上清液表现出对 IL-1 α , IL-1 β , 或 IL-1 α 和 IL-1 β 的抗原结合活性。

[0166]

克隆	抗原特异性(针对全长的 IL-1 α 和/或 IL-1 β)	同种型
249	仅 IL-1 α	IgG
19	仅 IL-1 α	IgM
15	仅 IL-1 β	IgG
2	仅 IL- β	IgM
57	IL- α 和 β	IgG
13	IL- α 和 β	IgM

[0167] 等价形式

[0168] 通过不多的试验本领域的技术人员就可以认识到或能够明了,此处所述的特定实施方案还存在等价形式。这些等价形式也包含在下述权利要求的范围之内。

专利名称(译)	双特异性抗体及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN102120773A	公开(公告)日	2011-07-13
申请号	CN201010583812.5	申请日	2001-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	雅培制药有限公司		
[标]发明人	A科林森 T哈于尔 G阿夫格里诺斯 R迪克松 Z凯马克卡兰		
发明人	A·科林森 T·哈于尔 G·阿夫格里诺斯 R·迪克松 Z·凯马克卡兰		
IPC分类号	C07K19/00 C12N5/16 C40B40/08 C12N15/09 G01N33/50 A61K39/395 A61K47/48 A61K49/00 A61P1/04 A61P17/06 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/06 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/13 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	C07K2317/31 C07K2317/34 C07K2317/33 A61K47/48546 C07K16/46 G01N33/6869 A61K2039/505 C07K14/545 C07K16/245 A61K47/6845 A61P1/04 A61P17/06 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/06 C07K16/468 C07K2317/10 C07K2317/56 C07K2317/76		
代理人(译)	李波 刘健		
优先权	60/215379 2000-06-29 US		
其他公开文献	CN102120773B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及双特异性抗体及其制备方法和用途。本发明提供了对两个不同的但结构上相关的抗原具有双特异性的抗体。所述的抗体可以是，例如，完全的人抗体，重组抗体，或单克隆抗体。优选的抗体具有对IL-1 α 和IL-1 β 的双特异性并能在体外和体内中和IL-1 α 和IL-1 β 的活性。本发明的抗体可以是全长抗体或其抗原-结合部分。另外，本发明还提供了制备和使用本发明的抗体的方法。本发明的抗体，或抗体部分可用于检测两个不同的但结构上相关的抗原(例如，IL-1 α 和IL-1 β)和用以抑制所述抗原的活性(例如，在患有IL-1 α 和/或IL-1 β 的活性起有害作用的疾病的人受试者中)。

克隆	抗原特异性(针对全长的IL-1 α 和/或 IL-1 β)	同种型
249	仅 IL-1 α	IgG
19	仅 IL-1 α	IgM
15	仅 IL-1 β	IgG
2	仅 IL-1 β	IgM
57	IL-1 α 和 β	IgG
13	IL-1 α 和 β	IgM