

## 抗 IL-1 $\beta$ 的抗体、其药物组合物及其用途

### 技术领域

本发明属于免疫学领域，涉及一种抗 IL-1 $\beta$  的抗体、其药物组合物及其用途。具体地，  
5 本发明涉及一种抗人 IL-1 $\beta$  的抗体；更具体地，本发明涉及一种抗人 IL-1 $\beta$  的单克隆抗体；  
特别具体地，本发明涉及一种抗人 IL-1 $\beta$  的人源化单克隆抗体。

### 背景技术

白介素-1 (Interleukin 1, IL-1) 家族由两种促炎因子 (IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ ) 和IL-1受体拮  
10 抗剂 (IL-1 receptor antagonist, IL-1Ra) 组成，IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 可以有效激动IL-1受体 (IL-1  
Receptor)，IL-1Ra则可以粘附在IL-1受体表面而阻断信号传导。IL-1 $\beta$ 主要由单核细胞和  
巨噬细胞合成，IL-1 $\beta$ 蛋白前体经半胱天冬酶-1 (caspase-1) 剪切变为活化形式。IL-1受体  
家族包括多个配体亚型，包括IL-1R1、IL-1R2、IL-1R3 (又称为白介素受体协同蛋白IL-1  
15 receptor accessory protein, 简称为IL-1RAcP)、IL-1R4、IL-1R5、IL-1R6、IL-1R7、IL-1R8、  
IL-18BP以及2个孤儿受体即IL-1R9和IL-1R10。

目前研究发现，IL-1 $\beta$ 可与IL-1R1、IL-1R2结合。IL-1R1 (又称为type 1 IL-1 Receptor，  
简称为IL-1R1) 为跨膜受体，可与IL-1 $\beta$ 结合并与IL-1RAcP结合形成受体复合物，激活下  
游胞内相关信号通路，介导IL-1 $\beta$ 相关生物学效应；IL-1R2与IL-1 $\beta$ 亲和力较IL-1R1高，然  
而由于IL-1R2胞内段较短，因此与IL-1 $\beta$ 结合后无法激活胞内相关信号通路；IL-1R1和  
20 IL-1R2均存在可溶性受体形式 (Boraschi 等人. Immunological Reviews. 281:197-232.  
(2018))。

IL-1 $\beta$ 调节参与先天性免疫和适应性免疫的效应细胞的募集和激活，也参与慢性疾病的  
发病机理，包括痛风性关节炎、各种自身免疫性疾病，如类风湿关节炎、多发性硬化、  
周期性发热综合征，和自身炎症性疾病，如全身型幼年特发性关节炎，以及儿童和成人的  
25 冷吡啉相关的周期性综合征等疾病的发生。IL-1 $\beta$ 通路近来被证实参与肿瘤如急性髓性白  
血病、肝癌、肺癌以及心脑血管疾病的发生，以IL-1 $\beta$ 为靶点的药物展现了良好的治疗和  
预防效果 (Cozzolino F等人. Proc Natl Acad Sci USA . 86: 2369(1989); Nakazaki H等人.  
Cancer. 70(3):709(1992); (Ridker PM等人. Lancet. 390(10105):1833-1842 (2017))。

类风湿关节炎 (Rheumatoid arthritis, RA) 是一种以关节病变为主的慢性、全身性  
30 的自身免疫疾病。IL-1 $\beta$ 在RA发病中发挥关键作用。高水平的IL-1 $\beta$ 存在于RA患者的关节

- 腔滑液中(van den Berg等人. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol.* 13:577-97(1999)), IL-1 $\beta$ 介导白细胞关节浸润以及关节中基质金属蛋白酶的分泌, 诱导软骨退化并抑制新的软骨基质合成, 从而导致关节破坏(van den Berg等人. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol.* 13:577-97(1999). ;Johnson LL等人. *Curr Opin Chem Biol.* 2:466-471(1998).);
- 5 在RA患者中, IL-1 $\beta$ 刺激破骨细胞分化和激活, 参与RA受累关节的骨侵蚀的发生(Gravallese EM等人. *Ann Rheum Dis.* 61:ii84-86 (2002). ;Ghivizzani SC等人. *J Immunol.* 1:3604-12(1997).; Horai R等人. *J Exp Med.*191:313-20(2000).; Gravallese EM等人. *Arthritis Rheum.* 43:250-8(2000).; Takayanagi H等人. *Arthritis Rheum.* 43:259-69(2000).). 另外, IL-1 $\beta$ 通过调控TNF- $\alpha$ 和IL-6在内的通路, 促进骨质丢失, 促进滑膜中白细胞浸润和
- 10 血管翳组织形成(Strand V等人. *Rheumatology (Oxford).* 43:iii10-iii16(2004).). 临床研究证实, IL-1 $\beta$ 拮抗剂显著改善RA的体征和症状(Mertens M等人. *J Rheumatol.* 36(6):1118-25 (2009)), 抗人IL-1 $\beta$ 单抗Canakinumab (Ilaris®) 可显著降低RA患者的疾病活动(Alten R等人. *Arthritis Res Ther.* 10:R67 (2008); Alten R等人. *BMC Musculoskeletal Disorders.*12:153(2011)).
- 15 痛风是由单钠尿酸盐沉积所致的晶体相关性关节病, 与嘌呤代谢紊乱和/或尿酸排泄减少所致的高尿酸血症直接相关, 特指急性特征性关节炎和慢性痛风石疾病, 主要包括急性发作性关节炎、痛风石形成、痛风石性慢性关节炎、尿酸盐肾病和尿酸性尿路结石; 重者可出现关节残疾和肾功能不全。痛风常伴腹型肥胖、高脂血症、高血压、2型糖尿病及心血管病等表现。IL-1 $\beta$ 是痛风炎症发生的驱动因素(Cumpelik A等人. *Ann Rheum Dis.* pii: annrheumdis-2015-207338 (2015)). 研究表明, 在痛风性关节炎患者中, 外周血单个核细胞IL-1 $\beta$  mRNA及血清IL-1 $\beta$ 的表达均显著高于健康对照组, 急性期组显著高于慢性期和间
- 20 歇期组, 患者血清IL-1 $\beta$ 的浓度与白细胞、中性粒细胞、红细胞沉降率等指标呈正相关, 提示IL-1 $\beta$ 可能同时参与了急性与慢性痛风性关节炎, 且与炎症程度相关, 间歇期组血清IL-1 $\beta$ 浓度仍然显著高于健康对照组, 提示尽管关节症状已消失但关节及组织炎症仍可能存在(李玲琴等人. *中华全科医师杂志.* 14: 29-31 (2015).). 动物实验研究表明, IL-1 $\beta$ 在急性痛风性关节炎和慢性痛风性关节炎中均起重要作用, 尿酸盐晶体刺激血液及关节液中单核细胞和吞噬细胞引起IL-1 $\beta$ 大量释放(Di Giovine FS等人. *J Immunol.* 138: 3213-3218(1987).); 在小鼠模型实验中发现, IL-1 $\beta$ 阻断剂可阻止腹腔内尿酸盐晶体注射引起的中性粒细胞聚集, 在小鼠缺乏IL-1 $\beta$ 受体的部位不发生聚集(Martinon F等人. *Nature.* 440:237-241 (2006)). 临床研究表明痛风急性发作期间IL-1 $\beta$ 诱导大量促炎症细胞因子产生
- 30

(Amaral FA等人. *Arthritis Rheum.* 64: 474-484 (2012); Torres R等人. *Ann Rheum Dis.* 68: 1602-1608 (2009))。

抗人IL-1 $\beta$ 单克隆抗体Canakinumab在评价治疗痛风的有效性 & 安全性临床试验中可有效缓解难治性痛风性关节炎患者的临床症状如疼痛，痛风复发率较曲安奈德组明显减  
5 低，生活质量有明显改善(So A等人. *Arthritis Rhum.* 62: 3064-3076(2010))。在另一项临床  
研究中发现，抗人IL-1 $\beta$ 单克隆抗体Canakinumab较秋水仙碱可明显减少痛风发作的次数  
(Schlesinger N等人. *Ann Rheum Dis.* 70: 1264-1271(2011).)。Canakinumab单抗目前已被欧  
洲医药管理局(European Medicines Agency)批准用于频繁发作的但对非甾体抗炎药、秋  
水仙碱、糖皮质激素不能耐受或无效的痛风性关节炎患者的治疗(Lyseng-Williamson KA  
10 等人. *BioDrugs.* 27: 401-406(2013))。以上研究提示抗IL-1 $\beta$ 抗体相较现有治疗手段可以更为  
有效的治疗痛风，缓解症状，减少复发，对于痛风的发作有潜在的防治作用。

多发性硬化是主要由Th1和Th17亚群T细胞介导的慢性脱髓鞘疾病。白介素IL-1家族  
因子在多发性硬化中具有重要作用。IL-1通过促进Th17亚群T细胞的发育来促进疾病发展，  
并且还引起脑血管中趋化因子CXCL12从实质侧的正常位置分布到内皮两侧，使其去极化  
15 分布，导致血管渗漏和T细胞在疾病进程早期进入脑实质(Chih-Chung Lin等人. *J*  
*Immunol.* 198:4553-4560 (2017).); 动物研究证明，在IL-1或IL-1R1缺陷小鼠中无法诱导出  
实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)，而IL-1 $\beta$   
抑制剂处理可以延迟野生型小鼠EAE发作，降低严重性并缩短疾病持续时间(Chih-Chung  
Lin等人. *J Immunol.* 198:4553-4560 (2017).)。

20 近期临床还研究发现，抗IL-1 $\beta$ 抗体通过拮抗IL-1 $\beta$ 通路发挥抗炎效用，显著降低心血  
管疾病的发病风险。动脉粥样硬化和血栓形成是冠心病病理基础(Dalek os GN等人. *J Lab*  
*Clin Med.* 129:300(1997))，在兔高胆固醇动脉粥样硬化模型中发现IL-1 $\beta$ 和IL-1 $\beta$ 的mRNA  
在脂质斑块中表达升高，而减少IL-1的合成可减慢动脉粥样硬化的发展(Dinarell o CA等  
人. *N Eng l J Med.* 328: 106. (1993))。在心肌梗死时IL-1 $\beta$ 水平增高，在梗死后心肌重  
25 构过程中，IL-1 $\beta$ 在血浆和心梗局部表达均增加，IL-1 $\beta$ 参与心梗发生后心肌肥厚、心肌纤  
维化和功能不全的发生、发展(Yue P等人. *A m J P hysiol.* 275(1Pt2) : H250 (1998))。心  
力衰竭是一种复杂综合征，研究表明，充血性心衰的患者循环血中IL-1 水平增高(Blum A  
等人. *Am Heart J.* 135( 2Part1) : 181 (1998). Kapadia S等人. *Cardiol Clin.* 16(4): 645  
(1998))。IL-1 $\beta$ 可能参与了慢性负荷增加导致充血性心衰的发生和发展过程；在心功能  
30 III~IV级心衰患者中血清IL-1 $\beta$ 水平明显增高，促进充血性心衰的发展(Yndestad A等人.

Curr Cardiol Rep.9:236-41 (2007))。评估抗人IL-1 $\beta$ 抗体Canakinumab对于既往心梗合并炎症性动脉粥样硬化性心血管病的有效性、安全性和耐受性CANTOS III临床研究显示,抗IL-1 $\beta$ 抗体联合标准治疗显著降低患者的心源性死亡、非致死性心肌梗死和非致死性卒中发生率(Ridker PM等人. N Engl J Med. 377:1119-1131 (2017))。

- 5 针对抗人IL-1 $\beta$ 抗体Canakinumab的CANTOS临床研究队列的另一项分析发现,抗IL-1 $\beta$ 抗体Canakinumab显著降低肺癌的发生和死亡风险(Ridker PM等人. Lancet. 390(10105):1833-1842 (2017))。在取自患者的急性髓细胞性白血病(Acute myeloid leukemia, AML)细胞体外培养发现,80%以上的原代AML患者的肿瘤细胞IL-1表达增加,IL-1 $\beta$ 可显著促进肿瘤细胞的生长,而抗IL-1 $\beta$ 或IL-1 $\alpha$ 抗体均可有效抑制肿瘤细胞的增
- 10 长(Cozzolino F等人. Proc Natl Acad Sci USA. 86: 2369(1989))。在肝细胞癌患者中,其血清中IL-1水平较健康人对照组明显增高,(Nakazaki H等人. Cancer. 70(3):709(1992))。

- 儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征(Cryopyrin-associated periodic syndromes, CAPS)是一类由单一基因突变引起IL-1 $\beta$ 过度产生的罕见疾病,造成虚弱乏力、潮红、发热、头痛、关节痛和结膜炎,可出现在初生儿或婴儿,可在患者一生中每日出现,长期可
- 15 造成严重疾病和可能致命,包括耳聋、骨和关节变形、中枢神经系统损伤导致失明和淀粉样变造成肾衰竭和早亡。儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征包括家族冷自主炎症综合征(Familial Cold Auto-Inflammatory Syndrome, FCAS),穆-韦二氏综合征(Muckle-Wells Syndrome, MWS),新生儿多系统炎性疾病(Neonatal-onset multisystem inflammatory disease)、慢性小儿神经皮肤关节综合征(Chronic infantile neurological
- 20 cutaneous and articular syndrome)、家族性冷荨麻疹(Familiar cold urticaria)。抗人IL-1 $\beta$ 的抗体Canakinumab可显著缓解Cryopyrin蛋白相关性周期综合征患者临床症状(Yokota S等人. Clin Exp Rheumatol.35 Suppl 108(6):19-26. (2017); Kone-Paut I等人. Arthritis Care Res (Hoboken).;69:903-911. (2017))因此被美国联邦食品药品监督管理局和欧洲医药管理局批准用于治疗儿童(年龄 $\geq 4$ 岁)和成人的Cryopyrin蛋白相关性周期综合征患者。

- 25 周期性发热综合征(Periodic Fever Syndromes)是一组罕见的自身免疫性疾病,通过免疫系统的非感染性激活导致严重反复性持续性发热和致病性炎症,往往导致残疾并可能伴有关节疼痛、肿胀、肌肉疼痛、皮疹及可致命的并发症(Wurster VM等人. Pediatr Ann. 40(1):48-54. (2011))。周期性发热综合征包括肿瘤坏死因子受体相关的周期性综合征(TNF receptor associated periodic syndrome, TRAPS)、高免疫球蛋白D综合征(Hyper-IgD syndrome, HIDS)/甲羟戊酸激酶缺乏症(Mevalonate kinase deficiency, MKD)、家族性
- 30

地中海热 (Familial mediterranean fever, FMF)。临床报道证实抗人IL-1 $\beta$ 单抗Canakinumab可有效治疗周期性发热综合征 (De Benedetti F等人, N Engl J Med. 378(20):1908-1919 (2018))。因此抗人IL-1 $\beta$ 单抗Canakinumab被美国联邦食品药品监督管理局等批准用于治疗周期性发热综合征。

- 5 全身型幼年特发性关节炎 (Systemic juvenile idiopathic arthritis, sJIA) 是幼年特发性关节炎 (Juvenile idiopathic arthritis) 中一种独特的亚型, 多以长期高热、皮疹、贫血等关节外表现起病, 常见于0-5岁幼儿, 以慢性关节滑膜炎为主要特征, 多伴有不同程度的器官、组织损害, 主要表现为发热、皮疹和关节痛, 具有长期缓解率低、功能障碍率和致残率高、死亡率较高等预后不良表现 (Woerner A等人, Expert Rev Clin Immunol.11(5):575-88. (2015)), 目前普遍认为sJIA是一种自身炎症性疾病, 非自身免疫性疾病 (孙娟等人, 现代生物医学进展. 8: 1584-1588 (2016))。临床研究证实, 抗人IL-1 $\beta$ 单克隆抗体药物Canakinumab单抗可有效治疗伴发热的活动性sJIA, 减少类固醇用量, 显著降低sJIA复发风险 (Orrock JE等人, Expert Rev Clin Pharmacol. 9:1015-24. (2016)), 因此抗IL-1 $\beta$ 单抗Canakinumab被美国联邦食品药品监督管理局等批准用于治疗全身型幼年特发性关节炎。

目前还需要开发新的抗IL-1 $\beta$ 的抗体药物。

#### 发明内容

- 20 本发明人经过深入的研究和创造性的劳动, 利用哺乳动物细胞表达系统表达出重组的IL-1 $\beta$ -His 作为抗原免疫小鼠, 经小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合获得杂交瘤细胞。发明人通过对大量样本进行筛选, 得到了如下的杂交瘤细胞株:

杂交瘤细胞株 LT010, 其于 2018 年 6 月 21 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏编号为 CCTCC NO: C2018133。

本发明人惊奇地发现:

- 25 杂交瘤细胞株 LT010 能够分泌产生与人 IL-1 $\beta$  特异性结合的特异性单克隆抗体 (命名为 3H6), 并且该单克隆抗体能够十分有效地阻断 IL-1 $\beta$  与 IL-1R1 的结合;

- 进一步地, 本发明人创造性地制得了抗人 IL-1 $\beta$  的人源化抗体 (分别命名为 3H6 H1L1, 3H6 H2L2, 3H6 H3L3, 3H6 H4L1), 能有效地结合人 IL-1 $\beta$ , 阻断 IL-1 $\beta$  与其受体 IL-1R1 的结合, 抑制 IL-1 $\beta$  下游信号通路的激活; 具有用于制备降低、预防或治疗类风湿关节炎、  
30 痛风、多发性硬化、心血管事件和/或心血管疾病、肿瘤、多发性硬化、儿童和成人的冷吡

淋相关的周期性综合征、周期性发热综合征、全身型幼年特发性关节炎等疾病的药物的潜力。

由此提供了下述发明：

5 本发明的一个方面涉及一种抗IL-1 $\beta$ 的抗体或其抗原结合片段，其中，  
所述抗体的重链可变区包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 17—SEQ ID NO: 19所示的HCDR1-HCDR3；和

所述抗体的轻链可变区包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 20—SEQ ID NO: 22所示的LCDR1-LCDR3。

10 优选地，所述IL-1 $\beta$ 为人IL-1 $\beta$ 。

重链可变区和轻链可变区决定抗原的结合；每条链的可变区均含有三个高变区，称互补决定区（CDR）（重链(H)的 CDR 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3，轻链（L）的 CDR 包含 LCDR1、LCDR2、LCDR3；其由 Kabat 等人命名，见 Sequences of Proteins of Immunological Interest. Fifth Edition (1991)，第 1-3 卷，NIH Publication 91-3242, Bethesda Md）。

15 通过本领域技术人员所熟知的技术手段，例如通过 VBASE2 数据库分析本发明的抗体 3H6、3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3 和 3H6H4L1，可以发现其具有相同的 HCDR1-3 和 LCDR1-3：

其重链可变区的 3 个 HCDR 区的氨基酸序列如下：

20 HCDR1: GFSLSSTSGMG (SEQ ID NO: 17)，

HCDR2: IYWDDDK (SEQ ID NO: 18)，

HCDR3: ARSAYYSFAY (SEQ ID NO: 19)；

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

LCDR1: QDVDT (SEQ ID NO: 20)，

25 LCDR2: WAS (SEQ ID NO: 21)，

LCDR3: QQYSSYPT (SEQ ID NO: 22)。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的抗体或其抗原结合片段，其中，

所述抗体的重链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 10和SEQ ID NO: 14；和

所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO: 4和SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12和SEQ ID NO: 16。

在本发明的一些实施方案中，所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体选自：

- (1) 如 SEQ ID NO: 2 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 4 所示的 VL;
- 5 (2) 如 SEQ ID NO: 6 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 8 所示的 VL;
- (3) 如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 12 所示的 VL; 和
- (4) 如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体  
10 (例如，scFv)、人源化抗体、嵌合抗体或双抗体。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述的抗体以小于 $10^{-5}$  M，例如小于 $10^{-6}$  M、小于 $10^{-7}$  M、小于 $10^{-8}$  M、小于 $10^{-9}$  M或小于 $10^{-10}$  M或更小的 $K_D$ 结合IL-1 $\beta$ 蛋白；优选地，所述 $K_D$ 通过Biacore分子相互作用仪测得。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述的抗体以小于大约 100 nM，例如小于大约 10 nM、小于大约 1 nM、小于大约 0.9 nM、小于大约 0.8 nM、  
15 小于大约 0.7 nM、小于大约 0.6 nM、小于大约 0.5 nM、小于大约 0.4 nM、小于大约 0.3 nM、小于大约 0.2 nM、小于大约 0.1 nM 或更小的 EC<sub>50</sub> 结合 IL-1 $\beta$  蛋白。具体地，所述 EC<sub>50</sub> 通过间接 ELISA 方法测得。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的抗体或其抗原结合片段，其中，  
20 所述的抗体包括非-CDR区，且所述非-CDR区来自不是鼠类的物种，例如来自人抗体。

在本发明的一些实施方案中，所述抗体的恒定区是人源化的，例如，重链恒定区均采用 Ig gamma-1 chain C region，例如 ACCESSION: P01857 或 Ig gamma-4 chain C region，例如 ACCESSION: P01861.1；轻链恒定区均采用 Ig kappa chain C region，例如 ACCESSION: P01834。

25 在本发明的一个或多个实施方案中，所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是由杂交瘤细胞株LT010产生的单克隆抗体，所述杂交瘤细胞株LT010保藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为CCTCC NO: C2018133。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述抗体为单克隆抗体。

30 本发明的另一方面涉及一种抗体药物偶联物（antibody-drug conjugate, ADC），其包

括抗体或其抗原结合片段以及小分子药物，其中，所述抗体或其抗原结合片段为本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段；优选地，所述小分子药物为小分子细胞毒药物；更优选地，所述小分子药物为化疗药物。

所述化疗药物可以是常规的肿瘤化疗药物，例如烷化剂、抗代谢药、抗肿瘤抗生素、植物类抗癌药、激素、免疫制剂等。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的抗体药物偶联物，其中，所述抗体或其抗原结合片段通过连接子与小分子药物连接；所述连接子可以是本领域技术人员知悉的连接子，例如，所述连接子为胺键、二硫键或肽键。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的抗体药物偶联物，其中，所述抗体或其抗原结合片段与小分子药物的摩尔比为1: (1—4)，例如1:1、1: 2、1: 3或1: 4。

本发明的再一方面涉及一种双特异性抗体（又称为双功能抗体），其包括第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区，其中：

所述第一蛋白功能区靶向IL-1 $\beta$ ，

所述第二蛋白功能区靶向不同于IL-1 $\beta$ 的靶点，例如IL-17A；

其中，所述第一蛋白功能区为本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段；

优选地，所述双特异性抗体为IgG-scFv模式；

优选地，

(1) 所述第一蛋白功能区为本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，并且所述第二蛋白功能区为单链抗体；

或者，

(2) 所述第一蛋白功能区为单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列如SEQ ID NO: 17—SEQ ID NO: 19所示的HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列如SEQ ID NO: 20—SEQ ID NO: 22所示的LCDR1—LCDR3，并且所述第二蛋白功能区为抗体（例如单克隆抗体）。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接；

优选地，所述连接片段为(GGGGS) $m$ ， $m$ 为正整数，例如1、2、3、4、5或6；

优选地，所述连接片段为SS(GGGGS) $n$ ， $n$ 为正整数，例如1、2、3、4、5或6。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，第(2)项中，

所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 10和SEQ ID NO: 14；和

所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO: 4和SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12和SEQ ID NO: 16。

5 在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，第（2）项中，

所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示；或者

所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示；或者

10 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 12所示；或者

所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 14所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 16所示。

15 在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区独立地为1个、2个或者2个以上。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，（2）项中，所述单克隆抗体的恒定区选自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的恒定区。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述单链抗体连接在抗体或单克隆抗体的重链的C末端。

20

本发明的再一方面涉及一种分离的核酸分子，其包含编码抗体重链可变区的核酸序列和编码抗体轻链可变区的核酸序列，其中，

25 所述抗体的重链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 17—SEQ ID NO: 19所示的HCDR1-HCDR3，和所述抗体的轻链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 20—SEQ ID NO: 22所示的LCDR1-LCDR3；

优选地，所述抗体的重链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 10和SEQ ID NO: 14，和所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO: 4和SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12和SEQ ID NO: 16；

30 更优选地，所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示，并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示；或者所述抗体的重链可变区的氨基酸序

列如SEQ ID NO: 6所示, 并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示; 或者所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示, 并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 12所示; 或者所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 14所示, 并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 16所示;

5 进一步优选地, 所述分离的核酸分子包含:

SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 3所示的核酸序列,

SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 7所示的核酸序列,

SEQ ID NO: 9和SEQ ID NO: 11所示的核酸序列, 或者

SEQ ID NO: 13和SEQ ID NO: 15所示的核酸序列。

10 所述分离的核酸分子, 可以是一个核酸分子, 也可以是多个核酸分子, 例如两个核酸分子。当是一个核酸分子时, 抗体的重链可变区和轻链可变区可以通过同一个核酸分子表达, 例如通过位于同一核酸分子上的相同或不同的表达框来表达。当是多个核酸分子例如两个核酸分子时, 抗体的重链可变区和轻链可变区可以通过不同的核酸分子分别表达。

15 本发明的再一方面涉及一种重组载体, 其包含本发明的分离的核酸分子。所述的重组载体可以是一个或多个。当所述核酸分子是多个(例如两个)时, 多个(例如两个)核酸分子可以通过同一重组载体表达, 也可以分别通过不同的重组载体来表达。

本发明的再一方面涉及一种宿主细胞, 其包含本发明的分离的核酸分子, 或者包含本发明的重组载体。

20 本发明的再一方面涉及一种制备本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法, 其包括在合适的条件下培养本发明的宿主细胞, 以及从细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段的步骤。

本发明的再一方面涉及一种杂交瘤细胞株LT010, 其保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC), 保藏编号为CCTCC NO: C2018133。

25

本发明的再一方面涉及一种药物组合物, 其包含本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的抗体药物偶联物或者本发明的双特异性抗体; 可选地, 其还包括药理学上可接受的载体和/或赋形剂。

30 本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的抗体

药物偶联物或者本发明的双特异性抗体在制备治疗和/或预防自身免疫性疾病、心脑血管疾病、肿瘤、儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征、全身型幼年特发性关节炎或痛风性关节炎的药物中的用途；

优选地，所述自身免疫性疾病选自类风湿性关节、多发性硬化和周期性发热综合征；

5 优选地，所述周期性发热综合征选自肿瘤坏死因子受体相关的周期性综合征（TRAPS）、高免疫球蛋白D综合征（HIDS）/甲羟戊酸激酶缺乏症（MKD）以及家族性地中海热（FMF）；

优选地，所述儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征选自家族冷自主炎症综合征、穆-韦二氏综合征、新生儿多系统炎性疾病、慢性小儿神经皮肤关节综合征以及家族性冷

10 荨麻疹；

优选地，所述心脑血管疾病选自心肌梗死、动脉粥样硬化、动脉血栓和脑卒中；

优选地，所述肿瘤选自肺癌、肝细胞癌和急性髓性白血病；

优选地，所述痛风性关节炎为急性痛风性关节炎或慢性痛风性关节炎。

本发明的再一方面本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的抗体药物

15 偶联物或者本发明的双特异性抗体在制备如下药物中的用途：

阻断人IL-1 $\beta$ 与人IL-1R1和/或人IL-1R2结合的药物，

下调人IL-1 $\beta$ 活性或水平的药物，或者

抑制由人IL-1 $\beta$ 与人IL-1R1和/或人IL-1R2结合介导的下游信号转导通路激活的药物。

在本发明的一个实施方案中，所述人IL-1R1和/或人IL-1R2是细胞表面的人IL-1R1和/

20 或人IL-1R2。

在本发明的一个实施方案中，所述用途是非治疗目的的和/或非诊断目的的。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的抗体药物偶联物或者本发明的双特异性抗体，其用于治疗/或预防自身免疫性疾病、心脑血管疾

25 病、肿瘤、儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征、全身型幼年特发性关节炎或痛风性关节炎；

优选地，所述自身免疫性疾病选自类风湿性关节、多发性硬化和周期性发热综合征；

优选地，所述周期性发热综合征选自肿瘤坏死因子受体相关的周期性综合征（TRAPS）、高免疫球蛋白D综合征（HIDS）/甲羟戊酸激酶缺乏症（MKD）以及家族性

30 地中海热（FMF）；

优选地，所述儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征选自家族冷自主炎症综合征、穆-韦二氏综合征、新生儿多系统炎性疾病、慢性小儿神经皮肤关节综合征以及家族性冷荨麻疹；

优选地，所述心脑血管疾病选自心肌梗死、动脉粥样硬化、动脉血栓和脑卒中；

5 优选地，所述肿瘤选自肺癌、肝细胞癌和急性髓性白血病；

优选地，所述痛风性关节炎为急性痛风性关节炎或慢性痛风性关节炎。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的抗体药物偶联物或者本发明的双特异性抗体，其用于：

阻断人IL-1 $\beta$ 与人IL-1R1和/或人IL-1R2结合，

10 下调人IL-1 $\beta$ 活性或水平，或者

抑制由人IL-1 $\beta$ 与人IL-1R1和/或人IL-1R2结合介导的下游信号转导通路激活。

在本发明的一个实施方案中，所述人IL-1R1和/或人IL-1R2是细胞表面的人IL-1R1和/或人IL-1R2。

15 本发明的再一方面涉及一种在体内或体外方法，包括施加细胞以有效量的本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的抗体药物偶联物或者本发明的双特异性抗体的步骤，所述方法选自如下：

阻断人IL-1 $\beta$ 与人IL-1R1和/或人IL-1R2结合的方法，

下调人IL-1 $\beta$ 活性或水平的方法，或者

20 抑制由人IL-1 $\beta$ 与人IL-1R1和/或人IL-1R2结合介导的下游信号转导通路激活的方法。

在本发明的一个实施方案中，所述人IL-1R1和/或人IL-1R2是细胞表面的人IL-1R1和/或人IL-1R2。

在本发明的一个实施方案中，所述体外方法是非治疗目的的和/或非诊断目的的。

25 本发明的再一方面涉及一种治疗和/或预防治疗和/或预防自身免疫性疾病、心脑血管疾病、肿瘤、儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征、全身型幼年特发性关节炎或痛风性关节炎的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的抗体药物偶联物或者本发明的双特异性抗体的步骤；

优选地，所述自身免疫性疾病选自类风湿性关节、多发性硬化、周期性发热综合征；

30 优选地，所述周期性发热综合征选自肿瘤坏死因子受体相关的周期性综合征（TRAPS）、高免疫球蛋白D综合征（HIDS）/甲羟戊酸激酶缺乏症（MKD）以及家族性

地中海热 (FMF);

优选地, 所述儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征选自家族冷自主炎症综合征、穆-韦二氏综合征、新生儿多系统炎性疾病、慢性小儿神经皮肤关节综合征以及家族性冷荨麻疹;

- 5 优选地, 所述心脑血管疾病选自心肌梗死、动脉粥样硬化、动脉血栓和脑卒中;
- 优选地, 所述肿瘤选自肺癌、肝细胞癌和急性髓性白血病;
- 优选地, 所述痛风性关节炎为急性痛风性关节炎或慢性痛风性关节炎。

10 本发明人通过动物实验发现, 本发明的抗体特别是 3H6H4L1 能够在 BALB/c 小鼠中有效地缓解转染人 IL-1 $\beta$  的 NIH/3T3 细胞诱导的类风湿关节炎模型的中的病理学改变, 表现为给予抗体药 3H6H4L1 可有效改善类风湿关节炎小鼠的病理行为, 减少类风湿性小鼠患肢的肿胀面积。

15 在本发明中, 除非另有说明, 否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且, 本发明中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时, 为了更好地理解本发明, 下面提供相关术语的定义和解释。

如本文中所使用的, 当提及 IL-1 $\beta$  的氨基酸序列 (GenBank ID: NP\_000567.1) 时, 其包括 IL-1 $\beta$  蛋白的全长, 还包括 IL-1 $\beta$  的融合蛋白, 例如与小鼠或人 IgG 的 Fc 蛋白片  
20 段 (mFc 或 hFc) 或者多个 His 进行融合的片段。然而, 本领域技术人员理解, 在 IL-1 $\beta$  的氨基酸序列中, 可天然产生或人工引入突变或变异 (包括但不限于置换, 缺失和/或添加), 而不影响其生物学功能。因此, 在本发明中, 术语“IL-1 $\beta$ ”应包括所有此类序列, 及其天然或人工的变体。并且, 当描述 IL-1 $\beta$  蛋白的序列片段时, 其不仅包括序列片段, 还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

25 如本文中所使用的, 当提及 IL-1R1 的氨基酸序列 (GenBank ID: NP\_000868) 时, 其包括 IL-1R1 蛋白的全长, 还包括 IL-1R1 的融合蛋白, 例如与小鼠或人 IgG 的 Fc 蛋白片段 (mFc 或 hFc) 或者多个 His 进行融合的片段。然而, 本领域技术人员理解, 在 IL-1R1 蛋白的氨基酸序列中, 可天然产生或人工引入突变或变异 (包括但不限于置换, 缺失和/或添加), 而不影响其生物学功能。因此, 在本发明中, 术语“IL-1R1”应包括所有此类序  
30 列以及其天然或人工的变体。并且, 当描述 IL-1R1 蛋白的序列片段时, 包括 IL-1R1 序列

片段,还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

如本文中所使用的,当提及 **IL-1R2** 的氨基酸序列 (**GenBank ID: CAA42441.1**) 时,其包括 **IL-1R2** 蛋白的全长,还包括 **IL-1R2** 的融合蛋白,例如与小鼠或人 **IgG** 的 **Fc** 蛋白片段 (**mFc** 或 **hFc**) 或者多个 **His** 进行融合片段。然而,本领域技术人员理解,在 **IL-1R2** 蛋白的氨基酸序列中,可天然产生或人工引入突变或变异 (包括但不限于置换,缺失和/或添加),而不影响其生物学功能。因此,在本发明中,术语“**IL-1R2**”应包括所有此类序列以及其天然或人工的变体。并且,当描述 **IL-1R2** 蛋白的序列片段时,包括 **IL-1R2** 序列片段,还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

如本文中所使用的,术语 **EC<sub>50</sub>** 是指半最大效应浓度 (**concentration for 50% of maximal effect**),是指能引起 **50%**最大效应的浓度。

如本文中所使用的,术语“抗体”是指,是指通常由两对多肽链(每对具有一条“轻”(L)链和一条“重”(H)链)组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为  $\kappa$  和  $\lambda$  轻链。重链可分类为  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\alpha$  或  $\epsilon$ ,并且分别将抗体的同种型定义为 **IgM**、**IgD**、**IgG**、**IgA** 和 **IgE**。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接,重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由 3 个结构域(CH1、CH2 和 CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。VH 和 VL 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区即 CDR),其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 VH 和 VL 由按下列顺序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(VH 和 VL)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 **Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991))**,或 **Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917**; **Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883** 的定义。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如,其包括,特别地,重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体,例如, **IgG** (例如, **IgG1**、**IgG2**、**IgG3** 或 **IgG4** 亚型)、**IgA1**、**IgA2**、**IgD**、**IgE** 或 **IgM** 抗体。

如本文中所使用的,术语抗体的“抗原结合片段”是指包含全长抗体的片段的多肽,其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力,和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性

结合,其也被称为“抗原结合部分”。通常参见, **Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第 2 版, Raven Press, N.Y. (1989))**, 其以其全文通过引用合并入本文,用于所有目的。可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。在一些情况下,抗原结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、dAb 和互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例如, scFv)、嵌合抗体、双抗体(diabody)和这样的多肽,其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。

在一些情况下,抗体的抗原结合片段是单链抗体(例如, scFv),其中 VL 和 VH 结构域通过使其能够产生为单个多肽链的连接体配对形成单价分子(参见,例如, Bird 等人, **Science 242:423-426 (1988)**和 Huston 等人, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988)**)。此类 scFv 分子可具有一般结构: NH<sub>2</sub>-VL-接头-VH-COOH 或 NH<sub>2</sub>-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成。例如,可使用具有氨基酸序列(GGGGS)<sub>4</sub> 的接头,但也可使用其变体(Holliger 等人(1993), **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448**)。可用于本发明的其他接头由 Alfthan 等人(1995), **Protein Eng. 8:725-731**, Choi 等人(2001), **Eur. J. Immunol. 31: 94-106**, Hu 等人(1996), **Cancer Res. 56:3055-3061**, Kipriyanov 等人(1999), **J. Mol. Biol. 293:41-56** 和 Roovers 等人(2001), **Cancer Immunol.**描述。

在一些情况下,抗体的抗原结合片段是双抗体,即,双价抗体,其中 VH 和 VL 结构域在单个多肽链上表达,但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对,从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见,例如, Holliger P.等人, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)**, 和 Poljak R. J.等人, **Structure 2:1121-1123 (1994)**)。

在另一些情况下,抗体的抗原结合片段是“双功能抗体”。双功能抗体亦称为双特异性抗体 (Bispecific Antibody),是同时靶向两种不同抗原的特异性药物,其可通过免疫分选纯化生产。另外,也可通过基因工程获得,基因工程在结合位点优化,合成形式的考量以及产量等方面都具有相应的灵活性,所以具有一定的优势。目前,其存在形式已被证明有超过 45 种 (Müller D, Kontermann RE. **Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: Current perspectives. BioDrugs 2010; 24:89-98**)。目前已开发的多种双特异性抗体为 IgG-ScFv 形式即 Morrison 模式(1997 Coloma MJ, Morrison SL. **Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies. Nature Biotechnology, 1997;15:159-163**),由于这种类似于天然存在的 IgG 形式,其在抗体工程、表达和纯化上所具有的优势,已被证明是双

功能抗体的其中一种理想存在形式 (Miller BR, Demarest SJ, et al., *Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies. Protein Eng Des Sel* 2010; 23:549-57; Fitzgerald J, Lugovskoy A. *Rational engineering of antibody therapeutics targeting multiple oncogene pathways. MAbs* 2011; 3:299-309)。

5        可使用本领域技术人员已知的常规技术 (例如, 重组 DNA 技术或酶促或化学断裂法) 从给定的抗体 (例如本发明提供的单克隆抗体 3H6、3H6H1L1、3H6H2L2、3H6 H3L3 或 3H6H4L1) 获得抗体的抗原结合片段 (例如, 上述抗体片段), 并且以与用于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

如本文中所使用的, 术语“单抗”和“单克隆抗体”是指, 来自一群高度同源的抗体分子  
10        中的一个抗体或抗体的一个片断, 也即除可能自发出现的自然突变外, 一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的, 其通常包含至少 2 种或更多种的不同抗体, 这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用 Kohler 等首次报道的杂交瘤技术获得 (*Nature*, 256:495, 1975), 但也可采用重组 DNA 技术获得 (如参见 U.S.P 4,816,567)。

15        如本文中所使用的, 术语“人源化抗体”是指, 人源免疫球蛋白 (受体抗体) 的全部或部分 CDR 区被一非人源抗体 (供体抗体) 的 CDR 区替换后得到的抗体或抗体片段, 其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性的非人源 (例如, 小鼠、大鼠或兔) 抗体。此外, 受体抗体的构架区 (FR) 的一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换, 或被其他抗体的氨基酸残基替换, 以进一步完善或优化抗体的性能。关于  
20        人源化抗体的更多详细内容, 可参见例如, Jones et al., *Nature*, 321:522 525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332:323 329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593 596 (1992); 和 Clark, *Immunol. Today* 21: 397 402 (2000)。

如本文中所使用的, 术语“分离的”或“被分离的”指的是, 从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分, 那么可能是其所处的天然环境发生了改变, 或从天然环境下分离出该物质, 或二者情况均有发生。例如, 某一活体动物体内  
25        天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽, 而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”或“被分离的”不排除混有人工或合成的物质, 也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

如本文中所使用的, 术语“载体 (vector)”是指, 可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸  
30        运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时, 载体称为表达载体。载

体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）或 P1 来源的人工染色体（PAC）；噬菌体如  $\lambda$  噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如 SV40）。一种载体可以含

5 有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。

如本文中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，

10 如大肠杆菌或枯草菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO 细胞，COS 细胞，NSO 细胞，HeLa 细胞，BHK 细胞，HEK 293 细胞或人细胞等的动物细胞。

如本发明中所使用的，术语“双特异性”、“双重特异性”或“双功能性”抗原结合蛋白或抗体是分别具有两个不同的抗原结合位点的杂交抗原结合蛋白或抗体。双特异性抗体是一种多特异性抗原结合蛋白或多特异性抗体，并且可通过多种方法产生，包括，但不限于杂交瘤的融合或 Fab' 片段的连接。参见，例如，Songsivilai 和 Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 ; Kostelny 等人. 1992, J. Immunol. 148: 1547-1553。双特异性抗原结合蛋白或抗体的两个结合位点将结合两个不同的表位，所述表位存在于相同或不同的蛋白质靶上。

15

如本文中所使用的，术语“特异性结合”是指，两分子间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。在某些实施方式中，特异性结合某抗原的抗体（或对某抗原具有特异性的抗体）是指，抗体以小于大约  $10^{-5}$  M，例如小于大约  $10^{-6}$  M、小于大约  $10^{-7}$  M、小于大约  $10^{-8}$  M、小于大约  $10^{-9}$  M 或小于大约  $10^{-10}$  M 或更小的亲和力 ( $K_D$ ) 结合该抗原。

20

如本文中所使用的，术语“ $K_D$ ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小，抗体-抗原结合越紧密，抗体与抗原之间的亲和力越高。通常，抗体（例如，本发明的单克隆抗体 3H6、3H6H1L1、3H6H2L2、或 3H6H3L3）以小于大约  $10^{-5}$  M，例如小于大约  $10^{-6}$  M、小于大约  $10^{-7}$  M、小于大约  $10^{-8}$  M、小于大约  $10^{-9}$  M 或小于大约  $10^{-10}$  M 或更小的解离平衡常数 ( $K_D$ ) 结合抗原（例如，IL-1 $\beta$  蛋白）。可以使用本领域技术人员知悉的方法测定  $K_D$ ，例如使用 Biacore 分子相互作用仪测定。

25

30

如本文中所使用的，术语“单克隆抗体”和“单抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多克隆抗体”和“多抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如，丙氨酸可用 A 或 Ala 表示。

- 5       如本文中所使用的，术语“杂交瘤”和“杂交瘤细胞株”可互换使用，并且当提及术语“杂交瘤”和“杂交瘤细胞株”时，其还包括杂交瘤的亚克隆和后代细胞。例如，当提及杂交瘤细胞株 LT010 时，其还指杂交瘤细胞株 LT010 的亚克隆和后代细胞。

- 如本文中所使用的，术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，其是本领域公知的（参见例如
- 10       Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995），并且包括但不限于：pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂。例如，pH 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液；表面活性剂包括但不限于阳离子，阴离子或者非离子型表面活性剂，例如 Tween-80；离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。

- 15       如本文中所使用的，术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如，预防疾病（例如 RA）有效量是指，足以预防，阻止，或延迟疾病（例如 RA）的发生的量；治疗疾病有效量是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如，对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其它治疗等。
- 20

发明的有益效果：

本发明的抗 IL-1 $\beta$  抗体特别是人源化的抗 IL-1 $\beta$  抗体具有如下技术效果中的一项或多项：

- 25       (1) 有效地结合人 IL-1 $\beta$ ，阻断 IL-1 $\beta$  与其受体 IL-1R1 的结合；
- (2) 抑制 IL-1 $\beta$  下游信号通路的激活；
- (3) 能够特异性抑制 IL-1 $\beta$  诱导 MRC-5 细胞分泌 IL-6 的活性；
- (4) 能够有效地阻断 IL-1 $\beta$  对 NF- $\kappa$ B 的激活；
- (5) 具有用于制备抑制 IL-1 $\beta$  的药物的潜力；
- 30       (6) 具有用于制备预防和/或治疗类风湿关节炎、痛风、多发性硬化、心血管事件和/

或心血管疾病、肿瘤、多发性硬化、儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征、周期性发热综合征、全身型幼年特发性关节炎等病症的药物的潜力。

#### 附图说明

5 图 1: 3H6、3H6H1L1、3H6H2L2 和 3H6H3L3 与人 IL-1 $\beta$ -His-Bio 的结合活性检测结果。

图 2: 3H6H4L1 与人 IL-1 $\beta$ -His-Bio 的结合活性检测结果。

图 3: 3H6、3H6H1L1、3H6H2L2 和 3H6H3L3 与人 IL-1R1(1-332)-his 竞争结合人 IL-1 $\beta$ -hFc 的活性检测结果。

10 图 4: 3H6H4L1 与人 IL-1R1(1-332)-his 竞争结合人 IL-1 $\beta$ -hFc 的活性检测结果。

图 5: 3H6H4L1 与人 IL-1 $\beta$  亲和力常数检测结果。注: 曲线 1~5 分别表示分析物的浓度分别为 25nM、12.5 nM、6.25 nM、3.13 nM、1.56 nM。

图 6: Canakinumab 与人 IL-1 $\beta$  亲和力常数检测结果。注: 曲线 1~5 分别表示分析物的浓度分别为 25nM、12.5 nM、6.25 nM、3.13 nM、1.56 nM。

15 图 7: 3H6H4L1 对 IL-1 $\beta$  诱导 MRC-5 分泌 IL-6 的影响。

图 8: IL-1 $\beta$  对 NF- $\kappa$ B 信号通路的梯度激活的影响。

图 9: 3H6H4L1 阻断 IL-1 $\beta$  的 reporter assay 图。

图 10: 3H6H4L1 对 Lenti-IL-1 $\beta$ -NIH/3T3 诱导的小鼠膝关节炎模型小鼠病理性行为的影响。

20 图 11: 3H6H4L1 对 Lenti-IL-1 $\beta$ -NIH/3T3 诱导的小鼠膝关节炎模型小鼠膝关节面积的影响。

图 12: 3H6H4L1 对 Lenti-IL-1 $\beta$ -NIH/3T3 诱导的小鼠膝关节炎模型小鼠体重的影响。

#### 具体实施方式

25 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解, 下面的实施例仅用于说明本发明, 而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者, 按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考 J.萨姆布鲁克等著, 黄培堂等译的《分子克隆实验指南》, 第三版, 科学出版社)或按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者, 为可以通过市场购买获得的常规产品。

在本发明的下述实施例中，使用的 BALB/c 小鼠购自广东省医学实验动物中心。

在本发明的下述实施例中，所用的同靶点已上市药物抗体 Canakinumab（商品名 Ilaris®）作为对照抗体，购自诺华（Novartis）。

5        制备例 1: 融合蛋白人 IL-1 $\beta$ -His、IL-1R1(1-332)-His、IL-1 $\beta$ -hFc 以及人 IL-1 $\beta$ -His-Bio 的制备

通过 NCBI GenBank 蛋白数据库查找人 IL-1 $\beta$  (Genbank ID: NP\_000567.1) 及 IL-1R1 (Genbank ID: NP\_000868) 的蛋白序列。将人 IL-1 $\beta$  及 IL-1R1 的氨基酸序列分别与 His 标签序列，人 IgG Fc 纯化标签序列进行融合设计；上述的融合蛋白分别简写命名为人  
10    IL-1 $\beta$ -His、IL-1R1(1-332)-His、IL-1 $\beta$ -hFc。

蛋白样品质量通过 SDS-PAGE 鉴定合格。

使用 EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit (Thermo scientific) 制备生物素化偶联的人 IL-1 $\beta$ -His 蛋白样品（简称为人 IL-1 $\beta$ -His-Bio）；具体制备方法参考该试剂盒的说明书进行。

15        制得的上述融合蛋白用于下面的实施例。

实施例 1: 抗 IL-1 $\beta$  鼠源抗体 3H6 的制备

1. 杂交瘤细胞株 LT010 的制备

以人 IL-1 $\beta$ -his 作为抗原免疫 BALB/c 小鼠（购自广东医学实验动物中心），取免疫后  
20    小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合，制成杂交瘤细胞。以 IL-1 $\beta$ -His-Bio 作为抗原，对杂交瘤细胞进行 ELISA 法筛选，获得能够分泌和 IL-1 $\beta$ -His-Bio 特异性结合的抗体的杂交瘤细胞。对 ELISA 筛选得到的杂交瘤细胞，通过竞争 ELISA 筛选出能够分泌与受体 IL-1R1(1-332)-His 竞争结合 IL-1 $\beta$ -hFc 的抗体的杂交瘤细胞，并经过有限稀释法得到稳定的杂交瘤细胞株。杂交瘤细胞制备的方法参考目前已确立的方法（例如，Stewart, S.J.,  
25    “Monoclonal Antibody Production”, in Basic Methods in antibody Production and Characterization, Eds. G.C. Howard and D.R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000）。

发明人将以上杂交瘤细胞株命名为杂交瘤细胞株 LT010 (IL-1 $\beta$ -3H6)，其分泌的单克隆抗体命名为 3H6。

杂交瘤细胞株 LT010 (IL-1 $\beta$ -3H6)，其于 2018 年 6 月 21 日保藏于中国典型培养物保  
30    藏中心 (CCTCC)，保藏编号为 CCTCC NO: C2018133，保藏地址为中国.武汉.武汉大学，

邮编：430072。

## 2. 抗 IL-1 $\beta$ 的抗体 3H6 的制备

用含杂交瘤无血清培养基对上面制得的 LT010 细胞株进行培养（杂交瘤无血清培养基，内含 1%青链霉素和 4%的 Glutamax，于 5% CO<sub>2</sub>，37°C 细胞培养箱中进行培养），7 天后收集细胞培养上清，通过高速离心、微孔滤膜抽真空过滤以及 HiTrap protein A HP 柱进行纯化，制得抗体 3H6。纯化后的 3H6 样品进行 SDS-PAGE 电泳检测合格。

## 实施例 2：抗 IL-1 $\beta$ 的抗体 3H6 的序列分析

按照培养细胞细菌总 RNA 提取试剂盒（Tiangen，货号 DP430）的方法，从实施例 1 中培养的 LT010 细胞株中提取 mRNA。按照 Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒说明书合成 cDNA，并进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物直接进行 TA 克隆，具体操作参考 pEASY-T1 Cloning Kit（Transgen CT101）试剂盒说明书进行。

将 TA 克隆的产物直接进行测序，测序结果如下：

编码抗体 3H6 的重链可变区的核酸序列：（354 bp）

CAGGTGACCCTGAAGGAGAGCGGACCAGGAATCCTGCAGCCTAGCCAGAC  
ACTGAGCCTGACTTGCAGCTTCAGCGGCTTCAGCCTGAGCACAAGCGGAATGG  
GCGTGTCTTGGATCAGGCAGCCATCAGGAAAGGGACTCGAGTGGCTGGCTCAC  
ATCTACTGGGACGACGACAAGCGGTACAACCCCTCCCTGAAGAGCAGGCTGAC  
CATCAGCAAGGACACCAGCAGCAACCAGGTGTTCTGAAGATCACCAGCGTGG  
ACACCGCCGATAGCGCTACCTACTATTGCGCCAGAAGCGCCTACTACAGCTTCG  
CCTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGTCCGTGTCAGCC（SEQ ID NO: 1）

抗体 3H6 的重链可变区的氨基酸序列如下：（118aa，其中下划线标记的氨基酸序列为 CDR 区域）

QVTLKESGPGILQPSQTL~~SLTCSFS~~GFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIY  
WDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADSATYYCARSAYYSFAYWGQG  
TLVSVSA（SEQ ID NO: 2）

编码抗体 3H6 的轻链可变区的核酸序列：（318 bp）

GATATCGTCATGACACAGTCACATAAGTTTATGTCTACTAGTGTGGGCGGG

CGGGTCAGAATTACCTGTAAGGCCTCTCAGGACGTGGATACAGACGTGGCTTG  
 GTTCCAGCAGAAGCCCGGACAGAGCCCTAAACTGCTGATCTACTGGGCCTCCA  
 CAAGGCACACTGGGGTGCCAGATCGGTTCCTGAGGATCTGGCTGACTATTTCTGC  
 TTTACTCTGACCATTTCCAACGTCCAGTCTGAGGATCTGGCTGACTATTTCTGC  
 5 CAGCAGTACAGCTCCTATCCACCTTTGGAGCAGGCACAAAGCTGGAAGTAA  
 A (SEQ ID NO: 3)

抗体 3H6 的轻链可变区的氨基酸序列如下: (106aa, 其中划线标记的氨基酸序列为 CDR 区域)

DIVMTQSHKFMSTSVGGRVRITCKASQDVDTDVAWFQQKPGQSPKLLIYWAST  
 10 RHTGVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPTEFGAGTKLELK (SEQ  
 ID NO: 4)

### 实施例 3: 抗 IL-1 $\beta$ 的人源化抗体 3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3 和 3H6H4L1 的设计和制备

15 1. 抗 IL-1 $\beta$  人源化抗体 3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3 和 3H6H4L1 的轻链和重链序列的设计

根据 IL-1 $\beta$  蛋白的三维晶体结构 (van Oostrum J, Priestle JP, Grütter MG, Schmitz A. The structure of murine interleukin-1 beta at 2.8 Å resolution. J Struct Biol. 1991, 107(2):189-95.) 以及实施例 2 获得的序列信息, 设计得到人源化抗体 3H6H1L1、3H6H2L2、  
 20 3H6H3L3 和 3H6H4L1 重链可变区的序列和轻链可变区的序列 (3H6H1L1、3H6H2L2 和 3H6H3L3 抗体恒定区序列, 来自 NCBI 的数据库, 重链恒定区为 Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857, 轻链恒定区为 Ig kappa chain C region, ACCESSION: P01834; 3H6H4L1 抗体恒定区序列, 来自 NCBI 的数据库, 重链恒定区为 Ig gamma-4 chain C region, ACCESSION: P01861.1; 轻链恒定区为 Ig kappa chain C region,  
 25 ACCESSION: P01834)。

人源化抗体 3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3 和 3H6H4L1 的重链可变区序列和轻链可变区序列如下:

#### (1) 人源化单克隆抗体 3H6H1L1

编码抗体 3H6H1L1 的重链可变区的核酸序列: (354 bp)

30 CAGGTGACACTGAAGGAGTCTGGCCCCGCCCTGCTGAAGCCTACCCAGAC

ACTGACCCTGACATGTACCTTCTCCGGCTTTTCTCTGAGCACCTCCGGCATGGG  
 CGTGTCTTGGATCAGGCAGCCAAGCGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCACACA  
 TCTACTGGGACGATGACAAGCGGTATAACCCCTCCCTGAAGTCTAGACTGACAA  
 TCTCTAAGGATACCAGCTCCAACCAGGTGTTCCCTGAAGATCACAAATGTGGATA  
 5 CCGTGGACACAGCCACCTACTATTGCGCCCCGGAGCGCCTACTATTCCTTTGCCT  
 ACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGTCTGTGAGCGCC (SEQ ID NO: 5)

抗体 3H6H1L1 的重链可变区氨基酸序列如下：(118 aa，其中下划线标记的氨基酸序  
 列为 CDR 区域)

QVTLKESGPALLKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSSGMGVSWIRQPSGKALEWLAHIY  
 10 WDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITNVDTVDTATYYCCARSAYYSFAYWGQG  
 TLVSVSA (SEQ ID NO: 6)

编码抗体 3H6H1L1 的轻链可变区的核酸序列：(318 bp)

GATATCCAGATGACCCAGTCCCACAGCTCCATGTCCACATCTGTGGGCGAC  
 15 CGGGTGAGAATCACCTGTCGGGCCTCCCAGGACGTGGATACAGACGTGGCCTG  
 GTTTCAGCAGAAGCCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCA  
 CCAGGCACTCCGGAGTGCCATCTCGCTTCAGCGGCTCCGGCTCTGGCACAGAC  
 TTCACCCTGACAATCAGCAACGTGCAGCCAGAGGATTTCGCCGACTACTATTGC  
 CAGCAGTACTCTAGCTATCCACCTTTGGCGCCGGCACAAAGCTGGAGCTGAAG  
 20 (SEQ ID NO: 7)

抗体 3H6H1L1 的轻链可变区的氨基酸序列如下：(106 aa，其中划线标记的氨基酸序  
 列为 CDR 区域)

DIQMTQSHSSMSTSVGDRVRITCRASQDVDTDVAWFQQKPGQAPKLLIYWAST  
 RHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISNVQPEDFADYYCQQYSSYPTFGAGTKLELK (SEQ  
 25 ID NO: 8)

## (2) 人源化单克隆抗体 3H6H2L2

编码抗体 3H6H2L2 的重链可变区的核酸序列：(354 bp)

CAGGTGACACTGAAGGAGTCCGGCCCCGCCCTGGTGAAGCCTACCCAGAC  
 30 ACTGACCCTGACATGTACCTTCAGCGGCTTTTCTCTGAGCACCTCCGGCATGGG

CGTGTCTTGATCAGGCAGCCATCTGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCCCACA  
 TCTACTGGGACGATGACAAGCGGTATTCTCCCAGCCTGAAGTCTAGACTGACAA  
 TCAGCAAGGATACCAGCTCCAACCAGGTGTTCTGACAATCACCAACGTGGACC  
 CCGTGGACACAGCCACCTACTATTGCGCCCGGAGCGCCTACTATTCTTTGCCT  
 5 ACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGTCCGTGTCTGCC (SEQ ID NO: 9)

抗体 3H6H2L2 的重链可变区的氨基酸序列如下: (118 aa, 其中下划线标记的氨基酸  
 序列为 CDR 区域)

QVTLKESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKALEWLAHIY  
WDDDKKRYSPSLKSRLTISKDTSSNQVFLTITNVDPVDTATYYCARSAYYSEAYWGQG  
 10 TLVSVSA (SEQ ID NO: 10)

编码抗体 3H6H2L2 的轻链可变区的核酸序列: (318 bp)

GATATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCTCCCTGAGCGCCTCCGTGGGCGAC  
 CGGGTGAGAATCACCTGTAGGGCCTCTCAGGACGTGGATACAGACGTGGCCTG  
 15 GTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTATTGGGCCTCTAC  
 CCTGCAGAGCGGAGTGCCATCCCGGTTCTCTGGCAGCGGCTCCGGAACAGACT  
 TCACCCTGACAATCTCTAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTATTGCC  
 AGCAGTACTCCTCTTATCCACCTTTGGCGCCGGCACAAAGCTGGAGCTGAAG  
 (SEQ ID NO: 11)

20 抗体 3H6H2L2 的轻链可变区的氨基酸序列如下: (106 aa, 其中划线标记的氨基酸序  
 列为 CDR 区域)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVRITCRASQDQDQDVAWYQQKPGKAPKLLIYWAST  
 LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSYPTEFGAGTKLELK (SEQ  
 ID NO: 12)

25

### (3) 人源化单克隆抗体 3H6H3L3

编码抗体 3H6H3L3 的重链可变区的核酸序列: (354bp)

CAGGTGACACTGAAGGAGAGCGGCCAGCCCTGGTGAAGCCAACCCAGAC  
 ACTGACCCTGACATGTACCTTCTCCGGCTTTAGCCTGTCCACCTCTGGCATGGG  
 30 CGTGTCTTGATCAGGCAGCCACCTGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCCCTGA

TCTACTGGGACGATGACAAGCGGTATAGCCCTTCCCTGAAGAGCAGACTGACAA  
TCTCCAAGGATACCTCTAAGAACCAGGTGGTGCTGACAATCACCAACGTGGACC  
CCGTGGACACAGCCACCTACTATTGCGCCCGGAGCGCCTACTATTCCTTTGCCT  
ACTGGGGGCCAGGGCACACTGGTGTCTGTGAGCGCC (SEQ ID NO: 13)

- 5 抗体 3H6H3L3 的重链可变区的氨基酸序列如下：(118 aa，其中下划线标记的氨基酸序列为 CDR 区域)

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLALIY  
WDDDKRYSPSLKSRLTISKDTSKNQVVLITITNVPVDTATYYCARSAYYSFAYWGQG  
TLVSVSA (SEQ ID NO: 14)

10

编码抗体 3H6H3L3 的轻链可变区的核酸序列：(318bp)

- GATATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCTCCCTGAGCGCCTCCGTGGGCGAC  
AGGGTGACCATCACATGTAGAGCCTCTCAGGACGTGGATACCGACCTGGCCTG  
GTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTATTGGGCCTCTAC  
15 CCTGCAGAGCGGAGTGCCATCCCGGTTCTCTGGCAGCGGCTCCGGAACAGACT  
TCACCCTGACAATCTCTAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTATTGCC  
AGCAGTACTCCTCTTATCCACCTTTGGCGCCGGCACAAAGCTGGAGCTGAAG  
(SEQ ID NO: 15)

- 20 抗体 3H6H3L3 的轻链可变区的氨基酸序列如下：(106 aa，其中划线标记的氨基酸序列为 CDR 区域)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVDTDLAWYQQKPGKAPKLLIYWAST  
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSYPTFGAGTKLELK (SEQ  
ID NO: 16)

- 25 (4) 人源化单克隆抗体 3H6H4L1

编码抗体 3H6H4L1 的重链可变区的核酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示。

抗体 3H6H4L1 的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示。

编码抗体 3H6H4L1 的轻链可变区的核酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示。

抗体 3H6H4L1 的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示。

30

## 2. 人源化抗体 3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3 及 3H6H4L1 的制备

3H6H1L1、3H6H2L2 和 3H6H3L3 的重链恒定区均采用 Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857; 轻链恒定区均采用 Ig kappa chain C region, ACCESSION: P01834;

- 5        3H6H4L1 的重链恒定区为 Ig gamma-4 chain C region, ACCESSION: P01861.1; 轻链恒定区为 Ig kappa chain C region, ACCESSION: P01834。

将 3H6H1L1 重链 cDNA 和轻链的 cDNA、3H6H2L2 的重链 cDNA 和轻链的 cDNA、3H6 H3L3 重链 cDNA 和轻链的 cDNA, 以及 3H6H4L1 重链 cDNA 和轻链的 cDNA 分别克隆到 pUC57simple 载体 (金斯瑞公司提供) 中, 分别获得 8 个重组质粒即  
10        pUC57simple-3H6H1 和 pUC57simple-3H6L1 ; pUC57simple3H6H2 和 pUC57simple-3H6L2; pUC57simple-3H6H3 和 pUC57simple-3H6L3; pUC57simple-3H6H4 和 pUC57simple-3H6L1。并分别亚克隆到 pcDNA3.1 载体中。将包含重链的质粒和包含轻链的重组质粒共转染 293F 细胞后收集培养液进行纯化获得人源化抗体 3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3 及 3H6H4L1; 并经 SDS-PAGE 检测, 结果正确。

15

### 实施例 4: 抗体 3H6、3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3 及 3H6H4L1 与人 IL-1 $\beta$ -his-bio 结合的活性研究 (ELISA 法)

- 以 2  $\mu$ g/mL 的 SA (链霉亲和素), 每孔 50  $\mu$ L 包被酶标板, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗板一次并除去残留液体, 每孔用 300  $\mu$ L 1% BSA 溶液 (用 PBS 溶解) 封闭, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。  
20        洗板三次并除去残留液体。用 PBST 将人 IL-1 $\beta$ -His-Bio 稀释成 0.2  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟, 洗板三次并除去残留液体。分别将抗体稀释至如表 1 的 1  $\mu$ g/mL 或如表 2 的 0.333  $\mu$ g/mL 作为起始浓度, 进行 1:3 的梯度稀释共 7 个浓度, 另设空白对照, 均做 2 个复孔, 每孔体积 100  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。洗板三次后通过拍打将包被好的酶标板除去残余液体, 每孔加入 50 $\mu$ L 辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG (H+L) 二抗工作液或辣  
25        根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (H+L) 二抗工作液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。其中, 50  $\mu$ L 辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG (H+L) 二抗工作液 (对应 3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3、3H6H4L1、Canakinumab 所在的孔) 和 50  $\mu$ L 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (H+L) 二抗工作液 (对应 3H6 所在的孔)。洗板四次并除去残留液体, 每孔加入 50  $\mu$ L TMB 显色液, 室温避光显色 5 分钟后, 每孔加入 50  $\mu$ L 终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶  
30        标仪中, 选择 450 nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值。

用 SoftMax Pro 6.2.1 软件对数据进行分析处理。以抗体浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标进行 4-parameter 拟合曲线作图, 结果分别如图 1 及图 2 所示。3H6、3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3 及 3H6H4L1 与人 IL-1 $\beta$ -His-Bio 的结合活性检测结果分别见表 1 和表 2。

5

表 1: 3H6、3H6H1L1、3H6H2L2 以及  
3H6H3L3 与人 IL-1 $\beta$ -His-Bio 的结合活性检测结果

| 抗体浓度<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | 抗原抗体结合 OD (450nm) 值                 |       |         |       |         |       |                                     |       |                                     |       |
|------------------------------|-------------------------------------|-------|---------|-------|---------|-------|-------------------------------------|-------|-------------------------------------|-------|
|                              | 3H6H1L1                             |       | 3H6H2L2 |       | 3H6H3L3 |       | 3H6                                 |       | Canakinumab                         |       |
| 1                            | 2.914                               | 2.927 | 2.864   | 2.879 | 2.865   | 2.905 | 2.516                               | 2.602 | 2.871                               | 2.874 |
| 0.333                        | 2.979                               | 2.980 | 2.953   | 2.928 | 2.880   | 2.874 | 2.617                               | 2.597 | 2.902                               | 2.883 |
| 0.111                        | 2.950                               | 2.989 | 2.958   | 2.953 | 2.892   | 2.865 | 2.411                               | 2.386 | 2.895                               | 2.887 |
| 0.037                        | 2.809                               | 2.771 | 2.777   | 2.732 | 2.634   | 2.662 | 2.036                               | 1.936 | 2.643                               | 2.682 |
| 0.012                        | 2.167                               | 2.267 | 2.197   | 2.182 | 2.001   | 2.016 | 1.225                               | 1.225 | 2.065                               | 2.118 |
| 0.004                        | 1.352                               | 1.264 | 1.300   | 1.439 | 1.225   | 1.178 | 0.598                               | 0.623 | 1.256                               | 1.199 |
| 0.001                        | 0.660                               | 0.619 | 0.630   | 0.669 | 0.590   | 0.566 | 0.287                               | 0.293 | 0.581                               | 0.559 |
| 0                            | 0.042                               | 0.042 | 0.041   | 0.041 | 0.050   | 0.039 | 0.039                               | 0.041 | 0.039                               | 0.040 |
| 第二抗体                         | HRP 羊抗人 IgG (H+L), 50 $\mu\text{L}$ |       |         |       |         |       | HRP 羊抗鼠 IgG (H+L), 50 $\mu\text{L}$ |       | HRP 羊抗人 IgG (H+L), 50 $\mu\text{L}$ |       |
| EC <sub>50</sub> (nM)        | 0.036                               |       | 0.034   |       | 0.042   |       | 0.099                               |       | 0.039                               |       |

表 2: 3H6H4L1 与人 IL-1 $\beta$ -His-Bio 的结合活性检测结果

| 抗体稀释                   | 抗原抗体结合 OD (450nm) 值 |  |         |  |
|------------------------|---------------------|--|---------|--|
|                        | Canakinumab         |  | 3H6H4L1 |  |
| 0.333 $\mu\text{g/mL}$ | 2.809               |  | 2.940   |  |
| 1:3                    | 2.679               |  | 2.875   |  |
| 1:9                    | 2.463               |  | 2.613   |  |
| 1:27                   | 1.702               |  | 1.959   |  |
| 1:81                   | 0.852               |  | 1.115   |  |

|                       |                               |       |       |       |
|-----------------------|-------------------------------|-------|-------|-------|
| 1:243                 | 0.408                         | 0.573 | 0.771 | 0.737 |
| 1:729                 | 0.315                         | 0.242 | 0.358 | 0.332 |
| 0                     | 0.075                         | 0.071 | 0.071 | 0.075 |
| 第二抗体                  | HRP 羊抗人 IgG (H+L), 50 $\mu$ L |       |       |       |
| EC <sub>50</sub> (nM) | 0.057                         |       | 0.029 |       |

结果显示:

3H6、3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3 及 3H6H4L1 均能够有效地结合人 IL-1 $\beta$ -His-Bio, 并且结合效率呈现剂量依赖关系;

在相同检测条件下, 3H6 H1L1、3H6 H2L2 及 3H6H4L1 与抗原人 IL-1 $\beta$ -His-Bio 的结合效率呈现剂量依赖关系, 并且结合活性优于同靶点已上市药物 Canakinumab; 3H6H3L3 结合活性与 Canakinumab 相当。

#### 实施例 5: 抗体 3H6、3H6H1L1、3H6H2L2、3H6H3L3 及 3H6H4L1 与人 IL-1R1(1-332)-his 竞争结合人 IL-1 $\beta$ -hFc 的活性研究 (ELISA 法)

以 4  $\mu$ g/mL 的人 IL-1 $\beta$ -hFc, 每孔 50  $\mu$ L 包被酶标板, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗板一次并除去残留液体, 每孔加入 300  $\mu$ L 1%BSA 溶液 (用 PBS 溶解) 封闭, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时, 洗板三次并除去残留液体。抗体稀释至 2  $\mu$ g/ mL (终浓度 1  $\mu$ g/ mL) 作为起始浓度, 进行 1:3 的梯度稀释共 7 个浓度, 另设空白对照, 均做 2 个复孔, 每孔体积 50  $\mu$ L, 室温孵育 10 分钟。将 0.08  $\mu$ g/mL (终浓度 0.04  $\mu$ g/ml) 或 0.1 $\mu$ g/ml (终浓度 0.05  $\mu$ g/ml) 的人 IL-1R1(1-332)-his 加入到酶标板中, 每孔体积 50  $\mu$ L 与抗体体积 1:1 轻柔混匀, 每孔终体积 100  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。洗板三次并除去残留液体, 每孔加入 50  $\mu$ L 抗 His 标签鼠单克隆抗体 (HRP 标记) 工作液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。洗板四次并除去残留液体, 每孔加入 50 $\mu$ L 的 TMB 显色液, 室温避光显色 10 分钟或 5 分钟后, 每孔加入 50  $\mu$ L 终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中, 选择 450 nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值。

用 SoftMax Pro 6.2.1 软件对数据进行分析处理, 以抗体浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标进行 4-parameter 拟合曲线作图, 结果如图 3 及图 4 所示。3H6、3H6H1L1、3H6H2L2 及 3H6H3L3 和 3H6H4L1 与人 IL-1R1(1-332)-his 竞争结合人 IL-1 $\beta$ -hFc 的活性检测结果见表 3 及表 4。

表 3: 3H6、3H6H1L1、3H6H2L2 以及 3H6H3L3

与人 IL-1R1(1-332)-his 竞争结合人 IL-1 $\beta$ -hFc 的活性检测结果

| 抗体浓度<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 抗体阻断抗原与受体人 IL-1R1(1-332)-his 结合 OD (450nm) 值 |       |         |       |         |       |       |       |             |       |
|------------------------------|----------------------------------------------|-------|---------|-------|---------|-------|-------|-------|-------------|-------|
|                              | 3H6H1L1                                      |       | 3H6H2L2 |       | 3H6H3L3 |       | 3H6   |       | Canakinumab |       |
| 1.000                        | 0.050                                        | 0.049 | 0.057   | 0.070 | 0.057   | 0.058 | 0.049 | 0.050 | 0.053       | 0.052 |
| 0.333                        | 0.051                                        | 0.050 | 0.071   | 0.073 | 0.069   | 0.067 | 0.050 | 0.052 | 0.059       | 0.057 |
| 0.111                        | 0.055                                        | 0.054 | 0.095   | 0.098 | 0.132   | 0.115 | 0.063 | 0.058 | 0.091       | 0.092 |
| 0.037                        | 0.206                                        | 0.221 | 0.242   | 0.198 | 0.361   | 0.348 | 0.266 | 0.283 | 0.366       | 0.379 |
| 0.012                        | 0.521                                        | 0.498 | 0.504   | 0.453 | 0.505   | 0.584 | 0.560 | 0.516 | 0.572       | 0.579 |
| 0.004                        | 0.635                                        | 0.677 | 0.681   | 0.618 | 0.693   | 0.697 | 0.682 | 0.712 | 0.727       | 0.684 |
| 0.001                        | 0.630                                        | 0.687 | 0.736   | 0.679 | 0.748   | 0.715 | 0.787 | 0.773 | 0.577       | 0.720 |
| 0.000                        | 0.621                                        | 0.693 | 0.804   | 0.779 | 0.780   | 0.807 | 0.810 | 0.818 | 0.555       | 0.765 |
| EC <sub>50</sub><br>(nM)     | 0.155                                        |       | 0.108   |       | 0.182   |       | 0.137 |       | 0.260       |       |

表 4: 3H6H4L1 与人 IL-1R1(1-332)-his

竞争结合人 IL-1 $\beta$ -hFc 的活性检测结果

| 抗 体 浓 度<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 抗体阻断抗原与受体人 IL-1R1(1-332)-his 结合 OD (450nm) 值 |       |         |       |
|---------------------------------|----------------------------------------------|-------|---------|-------|
|                                 | Canakinumab                                  |       | 3H6H4L1 |       |
| 1.000                           | 0.093                                        | 0.088 | 0.079   | 0.063 |
| 0.333                           | 0.104                                        | 0.126 | 0.055   | 0.055 |
| 0.111                           | 0.519                                        | 0.526 | 0.239   | 0.201 |
| 0.037                           | 0.736                                        | 0.705 | 0.629   | 0.547 |
| 0.012                           | 0.797                                        | 0.706 | 0.701   | 0.648 |
| 0.004                           | 0.765                                        | 0.735 | 0.710   | 0.673 |
| 0.001                           | 0.738                                        | 0.559 | 0.666   | 0.662 |
| 0.000                           | 0.669                                        | 0.719 | 0.659   | 0.621 |
| EC <sub>50</sub> (nM)           | 0.961                                        |       | 0.530   |       |

结果显示:

- 5        3H6、3H6H1L1、3H6H2L2 及 3H6H3L3 和 3H6H4L1 均能够有效地阻断抗原人 IL-1 $\beta$ -hFc 与其受体人 IL-1R1(1-332)-his 的结合, 且阻断效率呈现剂量依赖关系, 竞争结

合活性优于同靶点已上市药物 Canakinumab。

**实施例 6：抗体 3H6H4L1 与人 IL-1 $\beta$  的亲合力常数测定**

采用 Biacore 分子相互作用仪检测抗体与人 IL-1 $\beta$ -his 的亲合力常数。以 PBST 作为缓冲液，采用氨基偶联方式将抗体固定于 CM5 芯片表面，固定的信号值约为 1000RU。抗体与人 IL-1 $\beta$  结合，IL-1 $\beta$  浓度为 1.56-25nM（两倍梯度稀释），流速为 30 $\mu$ l/min，结合的时间为 120s，解离时间为 600s。芯片使用 3M MgCl<sub>2</sub> 再生，流速为 30 $\mu$ l/min，时间为 30s。使用 Biacore Control 2.0 软件进行数据采集，Biacore T200 Evaluation 2.0 软件进行数据分析。结果如表 5、图 5 和图 6 所示。

表 5：3H6H4L1 与人 IL-1 $\beta$  亲合力常数检测结果

| 抗体名称        | K <sub>D</sub> (M) | k <sub>a</sub> (1/Ms) | SE(k <sub>a</sub> ) | k <sub>d</sub> (1/s) | SE(k <sub>d</sub> ) | R <sub>max</sub> (RU) |
|-------------|--------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|
| 3H6H4L1     | 8.79E-11           | 1.44E+06              | 3.15E+03            | 1.27E-04             | 1.75E-07            | 112.49-122.37         |
| Canakinumab | 9.79E-11           | 5.24E+05              | 6.84E+02            | 5.13E-05             | 1.43E-07            | 76.61-86.37           |

结果显示：

3H6H4L1 与人 IL-1 $\beta$  的亲合力常数为 8.79E-11M，Canakinumab 与人 IL-1 $\beta$  的亲合力常数为 9.79E-11M，表明 3H6H4L1 与人 IL-1 $\beta$  有较强的结合能力。

**实施例 7：抗体 3H6 H4L1 的细胞生物学活性研究**

**1. 3H6 H4L1 阻断 IL-1 $\beta$  诱导 MRC-5 细胞分泌 IL-6 的细胞学活性检测**

人 MRC-5 细胞（购自中国科学院细胞中心）常规消化、计数，7,500 个/孔接种于平底 96 孔板中，置于细胞培养箱培养；24h 后（细胞生长达到 80%汇合度时），进行给药处理：抗体设 4 个浓度（0.37 nM、1.11 nM、3.33 nM、10nM），IL-1 $\beta$ （购自北京义翘神州生物技术有限公司）设三个浓度（5 pM、50 pM、500pM），抗体组 IL-1 $\beta$  用 50pM 的浓度（抗体和 IL-1 $\beta$  先在 37℃孵育 20min），另外同时设置空白对照组及同型对照组；加药处理后置于细胞培养箱中培养 24h；收集细胞上清，用 IL-6 ELISA Kit（购自达科为生物技术有限公司）进行检测。检测结果如图 7 和表 6 所示。

表 6: 3H6 H4L1 对 IL-1 $\beta$  诱导 MRC-5 分泌 IL-6 活性的梯度抑制活性

| 组别/浓度                  | OD (450nm) |       | 检 测 浓 度<br>(pg/mL) |       | 稀 释<br>倍数 | 原始浓度 (pg/mL)<br>(检测浓度*稀释倍数) |         |
|------------------------|------------|-------|--------------------|-------|-----------|-----------------------------|---------|
|                        | 孔 1        | 孔 2   | 孔 1                | 孔 2   |           | 孔 1                         | 孔 2     |
| PBS                    | 0.595      | 0.446 | 26.6               | 18.3  | 5         | 132.8                       | 91.4    |
| Human IgG/10nM         | 1.301      | 1.476 | 92.8               | 123.9 | 200       | 18552.6                     | 24781.8 |
| IL-1 $\beta$ /5pM      | 1.678      | 1.404 | 178.7              | 109.8 | 50        | 8936.3                      | 5490.7  |
| IL-1 $\beta$ /50pM     | 1.597      | 1.666 | 153.4              | 174.5 | 200       | 30681.6                     | 34898.6 |
| IL-1 $\beta$ /500pM    | 1.207      | 1.228 | 79.6               | 82.4  | 500       | 39817.0                     | 41182.0 |
| Canakinumab/0.3<br>7nM | 0.432      | 0.425 | 17.6               | 17.2  | 100       | 1758.0                      | 1720.1  |
| Canakinumab/1.1<br>1nM | 0.375      | 0.439 | 14.7               | 17.9  | 50        | 736.3                       | 896.3   |
| Canakinumab/3.3<br>3nM | 0.646      | 0.590 | 29.7               | 26.3  | 20        | 594.3                       | 525.0   |
| Canakinumab/10n<br>M   | 0.305      | 0.318 | 11.4               | 12.0  | 20        | 227.1                       | 239.3   |
| 3H6H4L1/0.37nM         | 1.029      | 1.143 | 59.7               | 71.8  | 50        | 2984.1                      | 3591.5  |
| 3H6H4L1/1.11nM         | 1.067      | 1.091 | 63.4               | 66.1  | 20        | 1268.8                      | 1321.0  |
| 3H6H4L1/3.33nM         | 0.665      | 0.666 | 30.9               | 30.9  | 20        | 618.0                       | 618.5   |
| 3H6H4L1/10nM           | 0.469      | 0.609 | 19.5               | 27.4  | 10        | 195.2                       | 274.4   |

结果显示, IL-1 $\beta$  能够显著促进 MRC-5 分泌 IL-6, 且呈剂量依赖性; 3H6 H4L1 能够特异性抑制 IL-1 $\beta$  诱导 MRC-5 细胞分泌 IL-6 的活性, 表现 3H6 H4L1 对 IL-1 $\beta$  的特异性中和活性。

5

## 2. 3H6 H4L1 阻断 IL-1 $\beta$ 激活 NF- $\kappa$ B 信号通路

本实验通过荧光报告基因方法检测 3H6 H4L1 阻断 IL-1 $\beta$  激活 NF- $\kappa$ B 信号通路的中和生物活性。

### (1) 293T-NF- $\kappa$ B-LUC 细胞构建

胰酶消化 293T 细胞，传代培养；转染前 2h，更换 opti-DMEM 培养基；在无菌 EP 管中，加入 500 $\mu$ L opti-DMEM 培养基，再加入 3 $\mu$ g 的质粒 pNF- $\kappa$ B-Luc2P-hygro；在无菌 EP 管中，加入 500 $\mu$ L opti-DMEM 培养基，再加入 8 $\mu$ L lipofectamine 2000；将稀释的 lipofectamine 2000 加入已稀释的质粒中，室温放置 15min，均匀滴加到细胞培养皿中；转染 8h 后，更换新鲜培养基；转染 24h 后，加入 Hygromycin，终浓度 100 $\mu$ g/mL 筛选，设对照孔 293T 未转染质粒。7-10 天后，对照孔细胞完全死亡为准，收获筛选完的细胞扩增培养。继续加药 100 $\mu$ g/mL 维持。得到 293T-NF- $\kappa$ B-LUC 稳转细胞株。

## (2) 3H6 H4L1 阻断 IL-1 $\beta$ 激活 NF- $\kappa$ B 信号通路的中和生物活性检测

常规消化 293T-NF- $\kappa$ B-LUC 细胞，按每孔 20,000 个细胞接种于 96 孔板中。待细胞贴壁后，添加 IL-1 $\beta$ ，使其终浓度 1.65ng/mL，设置空白对照。同时添加抗体，Canakinumab，3H6 H4L1，每个抗体 5 个梯度，终浓度分别为：400，100，25，6.25，1.56ng/mL。共培养 6 小时后，去上清，加入 50 $\mu$ L PBS，再加入 50 $\mu$ L Bright-Glo™ 底物，反应 5min，上机检测。

结果如图 8、图 9 所示。

结果显示：

IL-1 $\beta$  可有效激活 NF- $\kappa$ B 信号通路依赖的荧光素酶报告基因的表达，且呈显著剂量依赖性；

3H6 H4L1 可特异性阻断 IL-1 $\beta$  对 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活，且呈显著剂量依赖性。

以上结果表明，在 IL-1 $\beta$  依赖的 NF- $\kappa$ B 信号通路报告系统中，3H6 H4L1 可有效阻断 IL-1 $\beta$  对 NF- $\kappa$ B 的激活，表现其对 IL-1 $\beta$  特异性中和活性。

## 实施例 8：3H6 H4L1 缓解转染人的 IL-1 $\beta$ 的 NIH/3T3 细胞诱导的类风湿性关节炎模型小鼠治疗

将 46 只 BALB/c 小鼠根据体重分为 6 组，即：

正常组、模型组、阳性对照品组、3H6 H4L1 低剂量组、3H6 H4L1 中剂量组和 3H6 H4L1 高剂量组；除正常组 6 只外，其余每组均为 8 只。

在细胞接种前，根据小鼠体重和给药体积，阳性对照品组皮下注射 Canakinumab，模型组皮下注射 Anti-HEL，3H6 H4L1 各剂量组注射相应浓度 3H6 H4L1，正常组皮下注射等体积生理盐水。

在生物安全柜中收集 NIH/3T3（购自美国模式菌种收集中心）细胞和

Lenti-IL-1 $\beta$ -NIH/3T3 细胞，Lenti-IL-1 $\beta$ -NIH/3T3 细胞株是将 Lenti-IL-1 $\beta$  载体转染 NIH/3T3 细胞，经过筛选得到稳定分泌表达 IL-1 $\beta$  的 Lenti-IL-1 $\beta$ -NIH/3T3 细胞株。当 NIH/3T3、Lenti-IL-1 $\beta$ -NIH/3T3 细胞达到所需接种数量时，开始收集细胞。在生物安全柜内，吸掉旧的培养基，PBS 清洗一次后加入适量的 0.05% Trypsin-EDTA (1x) 室温消化 1 分钟，然后加入含有 10% FBS 的 DMEM 完全培养基终止消化，细胞悬液于 1200rpm/min 离心 4 分钟，去上清，使用无血清的 DMEM 培养基重悬并计数，将细胞浓度调整至 2,000,000 个每 ml，置于冰上备用。

以 3.5%水合氯醛 7.5ml/kg 腹腔注射麻醉 BALB/c 小鼠后，正常组小鼠膝关节腔内接种 NIH/3T3 细胞悬液 25 $\mu$ l/只 (50,000 个细胞/只)，其余小鼠膝关节腔内注射接种 Lenti-IL-1 $\beta$ -NIH/3T3 细胞悬液 25 $\mu$ l/只 (50,000 个细胞/只)。接种后对膝关节处创伤进行缝合，并涂拭生理盐水稀释 20 倍的青霉素。细胞接种后第 5 天，各组小鼠颈椎脱臼安乐死，解剖患肢膝关节处，用游标卡尺测量小鼠患肢膝关节滑膜的长 (mm) 和宽 (mm)。数据以均数 $\pm$ 标准误 ( $\pm$  SEM) 表示，组间比较采用 GraphPad Prism 5 统计学处理软件处理后，进行单因素方差分析评价结果， $P<0.05$  有显著性差异， $P<0.01$  有非常显著性差异。

结果如图 10、图 11 和图 12 所示。

图 10 显示，与正常组相比，模型组小鼠明显出现病理行为 ( $P<0.01$ )。给药后，与模型组相比，Canakinumab 与 3H6 H4L1 高、中剂量组均能够有效改善类风湿关节炎小鼠的病理行为 ( $P<0.01$ )，3H6 H4L1 低剂量对改善类风湿关节炎小鼠的病理行为药效不明显 ( $P>0.05$ )。同时 3H6 H4L1 对改善小鼠病理行为程度具有一定的量效关系。与阳性对照品组相比，阳性对照品组药效优于 3H6 H4L1 中、低剂量组 ( $P<0.01$ )，3H6 H4L1 高剂量与阳性对照品相当 ( $P>0.05$ )。

图 11 显示，与正常组相比，模型组小鼠患肢膝关节面积明显增大 ( $P<0.01$ )。给药后，与模型组相比，阳性对照品组 (Canakinumab) 和 3H6 H4L1 中、高剂量组均能明显减少类风湿关节炎小鼠患肢的肿胀面积 ( $P<0.01$ )，3H6 H4L1 低剂量组对减少类风湿性小鼠患肢的肿胀面积的药效不明显 ( $P>0.05$ )。同时 3H6 H4L1 对减少类风湿关节炎小鼠的患肢肿胀面积具有一定的量效关系。等剂量 3H6 H4L1 同靶点已上市药物 Canakinumab 药效相当 ( $P>0.05$ )。

图 12 显示，与正常组相比，模型组小鼠体重明显下降 ( $P<0.01$ )。给药后，与模型组相比，同靶点已上市药物 Canakinumab 和 3H6 H4L1 高剂量组均能明显减少关节炎小鼠体重下降 ( $P<0.05$ )。与阳性对照品组相比，等剂量 3H6 H4L1 同靶点已上市药物

**Canakinumab** 药效相当 ( $P>0.05$ )。

- 以上对本发明的较佳实施方式进行了具体说明，但本发明创造并不限于所述实施例，熟悉本领域的技术人员在不违背本发明精神的前提下还可做出种种的等同变型或替换，这
- 5 些等同的变型或替换均包含在本申请权利要求所限定的范围内。

## 权 利 要 求

1. 抗IL-1 $\beta$ 的抗体或其抗原结合片段，其中，

所述抗体的重链可变区包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 17—SEQ ID NO: 19所示的HCDR1-HCDR3；和

所述抗体的轻链可变区包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 20—SEQ ID NO: 22所示的LCDR1-LCDR3。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段，其中，

所述抗体的重链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 10和SEQ ID NO: 14；和

所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO: 4和SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12和SEQ ID NO: 16。

3. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段，其中，

所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示，并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示；或者

所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示，并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示；或者

所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示，并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 12所示；或者

所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 14所示，并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 16所示。

4. 根据权利要求1至3中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体、人源化抗体、嵌合抗体或双抗体。

5. 根据权利要求1至3中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述的抗体以小于10<sup>-5</sup> M，例如小于10<sup>-6</sup> M、小于10<sup>-7</sup> M、小于10<sup>-8</sup> M、小于10<sup>-9</sup> M或小于10<sup>-10</sup> M或

更小的 $K_D$ 结合IL-1 $\beta$ 蛋白；优选地，所述 $K_D$ 通过Biacore分子相互作用仪测得。

6. 根据权利要求1至3中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述的抗体包括非-CDR区，且所述非-CDR区来自不是鼠类的物种，例如来自人抗体。

7. 根据权利要求1至3中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述的抗体，其恒定区来自人抗体；

优选地，所述抗体的恒定区选自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的恒定区。

8. 根据权利要求1至3中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段，其中，

所述的抗体，其重链恒定区为Ig gamma-1 chain C region或Ig gamma-4 chain C region，并且其轻链恒定区为Ig kappa chain C region。

9. 根据权利要求1至3中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是由杂交瘤细胞株LT010产生的单克隆抗体，所述杂交瘤细胞株LT010保藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为CCTCC NO: C2018133。

10. 抗体药物偶联物，其包括抗体或其抗原结合片段以及小分子药物，其中，所述抗体或其抗原结合片段为权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段；优选地，所述小分子药物为小分子细胞毒药物；更优选地，所述小分子药物为肿瘤化疗药物。

11. 根据权利要求10所述的抗体药物偶联物，其中，所述抗体或其抗原结合片段通过连接子与小分子药物连接；例如，所述连接子为胺键、二硫键或肽键。

12. 根据权利要求10或11所述的抗体药物偶联物，其中，所述抗体或其抗原结合片段与小分子药物的摩尔比为1：（1-4）。

13. 一种双特异性抗体，其包括第一蛋白功能区和第二蛋白功能区，其中：

所述第一蛋白功能区靶向IL-1 $\beta$ ，

所述第二蛋白功能区靶向不同于IL-1 $\beta$ 的靶点（例如，IL-17A）；

其中，所述第一蛋白功能区为权利要求1—9中任一权利要求所述的抗体或抗原结合片段；

优选地，所述双特异性抗体为IgG-scFv模式；

优选地，所述第一蛋白功能区为权利要求1—9中任一权利要求所述的抗体，并且所述第二蛋白功能区为单链抗体；或者

优选地，所述第一蛋白功能区为权利要求4所述的单链抗体，并且所述第二蛋白功能区为抗体。

14. 根据权利要求13所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接；

优选地，所述连接片段为(GGGGS) $m$ ， $m$ 为正整数，例如1、2、3、4、5或6；

优选地，所述连接片段为SS(GGGGS) $n$ ， $n$ 为正整数，例如1、2、3、4、5或6。

15. 根据权利要求13所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区独立地为1个、2个或者2个以上。

16. 根据权利要求13至15中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，所述单链抗体连接在抗体的重链的C末端。

17. 分离的核酸分子，其包含编码抗体重链可变区的核酸序列和编码抗体轻链可变区的核酸序列，其中，

所述抗体的重链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 17—SEQ ID NO: 19所示的HCDR1-HCDR3，和所述抗体的轻链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 20—SEQ ID NO: 22所示的LCDR1-LCDR3；

优选地，所述抗体的重链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 10和SEQ ID NO: 14，和所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO: 4和SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12和SEQ ID NO: 16；

更优选地，所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示，并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示；或者所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示，并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示；

或者所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示, 并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 12所示; 或者所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 14所示, 并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 16所示;

进一步优选地, 所述核酸分子包含:

SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 3所示的核酸序列,

SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 7所示的核酸序列,

SEQ ID NO: 9和SEQ ID NO: 11所示的核酸序列, 或者

SEQ ID NO: 13和SEQ ID NO: 15所示的核酸序列。

18. 一种重组载体, 其包含权利要求17所述的分离的核酸分子。

19. 一种宿主细胞, 其包含权利要求17所述的分离的核酸分子, 或者包含权利要求18所述的重组载体。

20. 制备权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段的方法, 其包括在合适的条件下培养权利要求19的宿主细胞, 以及从细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段的步骤。

21. 杂交瘤细胞株LT010, 其保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏编号为CCTCC NO: C2018133。

22. 一种药物组合物, 其包含权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求10至12中任一权利要求所述的抗体药物偶联物或者权利要求13至16中任一权利要求所述的双特异性抗体; 可选地, 其还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。

23. 权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求10至12中任一权利要求所述的抗体药物偶联物或者权利要求13至16中任一权利要求所述的双特异性抗体在制备治疗和/或预防自身免疫性疾病、心脑血管疾病、肿瘤、儿童和成人的冷吡琳相关的周期性综合征、全身型幼年特发性关节炎或痛风性关节炎的药物中的用途;

优选地, 所述自身免疫性疾病选自类风湿性关节炎、多发性硬化和周期性发热综合征;

优选地，所述周期性发热综合征选自肿瘤坏死因子受体相关的周期性综合征（TRAPS）、高免疫球蛋白D综合征（HIDS）/甲羟戊酸激酶缺乏症（MKD）以及家族性地中海热（FMF）；

优选地，所述儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征选自家族冷自主炎症综合征、穆-韦二氏综合征、新生儿多系统炎性疾病、慢性小儿神经皮肤关节综合征以及家族性冷荨麻疹；

优选地，所述心脑血管疾病选自心肌梗死、动脉粥样硬化、动脉血栓和脑卒中；

优选地，所述肿瘤选自肺癌、肝细胞癌和急性髓性白血病；

优选地，所述痛风性关节炎为急性痛风性关节炎或慢性痛风性关节炎。

24. 权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求10至12中任一权利要求所述的抗体药物偶联物或者权利要求13至16中任一权利要求所述的双特异性抗体在制备如下药物中的用途：

阻断人IL-1 $\beta$ 与人IL-1R1和/或人IL-1R2结合的药物，

下调人IL-1 $\beta$ 活性或水平的药物，或者

抑制由人IL-1 $\beta$ 与人IL-1R1和/或人IL-1R2结合介导的下游信号转导通路激活的药物。

25. 根据权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求10至12中任一权利要求所述的抗体药物偶联物或者权利要求13至16中任一权利要求所述的双特异性抗体，其用于治疗 and/或预防自身免疫性疾病、心脑血管疾病、肿瘤、儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征、全身型幼年特发性关节炎或痛风性关节炎；

优选地，所述自身免疫性疾病选自类风湿性关节炎、多发性硬化和周期性发热综合征；

优选地，所述周期性发热综合征选自肿瘤坏死因子受体相关的周期性综合征（TRAPS）、高免疫球蛋白D综合征（HIDS）/甲羟戊酸激酶缺乏症（MKD）以及家族性地中海热（FMF）；

优选地，所述儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征选自家族冷自主炎症综合征、穆-韦二氏综合征、新生儿多系统炎性疾病、慢性小儿神经皮肤关节综合征以及家族性冷荨麻疹；

优选地，所述心脑血管疾病选自心肌梗死、动脉粥样硬化、动脉血栓和脑卒中；

优选地，所述肿瘤选自肺癌、肝细胞癌和急性髓性白血病；

优选地，所述痛风性关节炎为急性痛风性关节炎或慢性痛风性关节炎。

26. 根据权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求10至12中任一权利要求所述的抗体药物偶联物或者权利要求13至16中任一权利要求所述的双特异性抗体，其用于：

阻断人IL-1 $\beta$ 与人IL-1R1和/或人IL-1R2结合，

下调人IL-1 $\beta$ 活性或水平，或者

抑制由人IL-1 $\beta$ 与人IL-1R1和/或人IL-1R2结合介导的下游信号转导通路激活。

27. 一种治疗和/或预防治疗和/或预防自身免疫性疾病、心脑血管疾病、肿瘤、儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征、全身型幼年特发性关节炎或痛风性关节炎的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求10至12中任一权利要求所述的抗体药物偶联物或者权利要求13至16中任一权利要求所述的双特异性抗体的步骤；

优选地，所述自身免疫性疾病选自类风湿性关节、多发性硬化、周期性发热综合征；

优选地，所述周期性发热综合征选自肿瘤坏死因子受体相关的周期性综合征（TRAPS）、高免疫球蛋白D综合征（HIDS）/甲羟戊酸激酶缺乏症（MKD）以及家族性地中海热（FMF）；

优选地，所述儿童和成人的冷吡啉相关的周期性综合征选自家族冷自主炎症综合征、穆-韦二氏综合征、新生儿多系统炎性疾病、慢性小儿神经皮肤关节综合征以及家族性冷荨麻疹；

优选地，所述心脑血管疾病选自心肌梗死、动脉粥样硬化、动脉血栓和脑卒中；

优选地，所述肿瘤选自肺癌、肝细胞癌和急性髓性白血病；

优选地，所述痛风性关节炎为急性痛风性关节炎或慢性痛风性关节炎。

28. 一种在体内或体外方法，包括施加细胞以有效量的权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求10至12中任一权利要求所述的抗体药物偶联物或者权利要求13至16中任一权利要求所述的双特异性抗体的步骤，所述方法选自如下：

阻断人IL-1 $\beta$ 与人IL-1R1和/或人IL-1R2结合的方法，

下调人IL-1 $\beta$ 活性或水平的方法，或者

抑制由人IL-1 $\beta$ 与人IL-1R1和/或人IL-1R2结合介导的下游信号转导通路激活的方法。