

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020年12月3日 (03.12.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/239134 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/28 (2006.01) A61P 11/02 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61P 11/06 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 37/08 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/097686

(22) 国际申请日: 2020年6月23日 (23.06.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201910456273.X 2019年5月29日 (29.05.2019) CN
201910456605.4 2019年5月29日 (29.05.2019) CN

(71) 申请人: 山东博安生物技术有限公司(SHANDONG BOAN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国山东省烟台市高新区科技大道39号知识产权部李菊, Shandong 264670 (CN)。

(72) 发明人: 宋德勇(SONG, Deyong); 中国山东省烟台市高新区科技大道39号, Shandong 264670 (CN)。董创创(DONG, Chuangchuang); 中国山东省烟台市高新区科技大道39号, Shandong 264670 (CN)。韩静(HAN, Jing); 中国山东省烟台市高新区科技大道39号, Shandong 264670 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(54) Title: INTERLEUKIN-4 RECEPTOR ANTIBODY AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 抗体白介素4受体的抗体及其应用

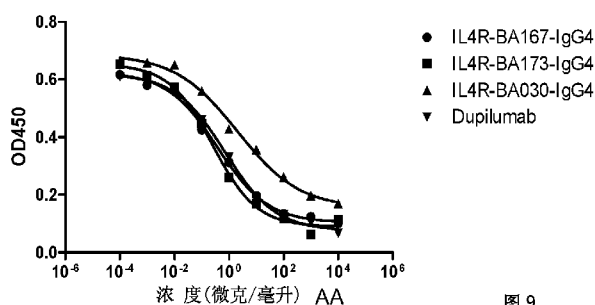


图9

AA Concentration (µg/ml)

(57) Abstract: Provided are an antibody or an antigen binding fragment thereof which specifically binds to the IL-4R antigen, and a preparation method, a composition and an application. The IL-4R antibody may be used for preparing a drug which treats and/or prevents inflammation or allergies, or for immunological IL-4R antigen detection.

(57) 摘要: 提供特异性结合IL-4R抗原的抗体或其抗原结合片段、其制备方法、组合物和应用。该IL-4R抗体可用于制备于治疗和/或预防炎症或过敏症得药物, 还可用于免疫学检测IL-4R抗原。



WO 2020/239134 A1

本国际公布：

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 在修改权利要求的期限届满之前进行，在收到该修改后将重新公布(细则48.2(h))。
- 包括关于请求恢复一项或多项优先权要求的信息(细则26之二.3和48.2(b)(vii))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

抗体白介素 4 受体的抗体及其应用

技术领域

本发明涉及生物学或生物制药技术领域，更具体地涉及人抗 IL-4R 的抗体，及其编码序列、制备方法、组合物和应用。

背景技术

白细胞介素-4(interleukin-4;IL-4)是由活化的 2 型 T 辅助细胞 (Th2) 产生的具有多种生物学功能的细胞因子，由 129 个氨基酸残基组成疏水性的球形蛋白质。IL-4 有很多靶细胞：T 细胞、B 细胞、造血细胞、成纤维细胞和各种肿瘤细胞等都具有 IL-4 受体。白细胞介素-4 受体 (IL-4R) 有两种类型：I 型主要由 IL-4R α 链和 γ_c 链组成，主要在造血细胞表面表达。II 型受体由 IL-4R α 链和 IL-13R α_1 链构成，主要在非造血细胞和肿瘤细胞表面常表达 (La Porte SL, Juo ZS, Vaclavikova J, et al. Cell, 2008, 132 (2) :259-272)。IL-4R α 是 2 型炎症通路中 I 型受体和 II 型受体的关键组成部分，阻断 IL-4R α 可同时阻断两个 2 型免疫反应的强效调节因子 IL-4 和 IL-13。在 II 型炎症通路中，Th2 细胞 (T helper 2, 属于 CD4+T 细胞) 扮演关键角色。II 型免疫是一种包含先天性免疫和适应性免疫并促使在黏膜表面形成免疫屏障清除病原体的特殊免疫反应。在过敏性疾病发生过程中，2 型炎症通路起到重要作用。因此，IL-4R α 是针对性治疗过敏性疾病 (包括特应性皮炎、哮喘、特发性荨麻疹、慢性鼻息肉性鼻窦炎以及食物过敏等) 的关键靶点之一。

目前，赛诺菲公司的靶向白介素 4 受体 (IL-4R) 的抗体药物 dupilumab 已获得美国 FDA 批准上市，商品名 DUPIXENT[®]，该抗体是白介素 4 受体 (IL-4R) 拮抗剂，抑制 IL-4 及 IL-13 信号。目前该抗体注射剂用于特应性皮炎及哮喘适应症的治疗。

然而，面对患者对于疾病治疗的药物需求，尤其是抗体药物的需求，仍然亟待有免疫原性更低、半衰期更长，药物效果更优的 IL-4R 抗体药物。

发明内容

本发明提供了具有新的氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段为包括单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv 或 dsFv 片段等。

本发明所提供的抗体或其抗原结合片段，包括：

- 1) 3 个轻链互补决定区，其中，LCDR1 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示，LCDR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示，LCDR3 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示；和
3 个重链互补决定区，其中，HCDR1 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示，HCDR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示，HCDR3 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16。或
- 2) 3 个轻链互补决定区，其中，LCDR1 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示，LCDR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示，LCDR3 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示；和
3 个重链互补决定区，其中，HCDR1 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示，HCDR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示，HCDR3 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8

在本发明的一个方面中，所述抗体或其抗原结合片段轻链包含轻链可变区 (VL)，所述轻链可变区包括 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:9 所示的任一氨基酸序列或包括与上述轻链可变区氨基酸序列具有至少 80%、85% 或 90% 序列同一性的氨基酸序列；所述抗体或其抗原结合片段重链包含重链可变区 (VH)，所述重链可变区包括 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:10 所示的

任一氨基酸序列或包括与上述重链可变区氨基酸序列具有至少 80%、85% 或 90% 序列同一性的氨基酸序列。优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含以下轻、重链可变区序列包含：

1) SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列轻链可变区和/或包含与 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的重链可变区，或者

2) SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列的轻链可变区和/或 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列的重链可变区。

在一个方面，所述抗体或其抗原结合片段包含重链恒定区，其中所述重链恒定区包含 γ -1、 γ -2、 γ -3 或 γ -4 人重链恒定区或所述人重链恒定区的变体，优选地，其序列为 ASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLG。在一个方面，所述抗体还包含轻链恒定区，其中所述轻链恒定区包含 λ 或 κ 人轻链恒定区，优选地，其序列为 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC

在本发明的一个方面，上述抗体或其抗原结合片段的结合抗原是 IL-4R，优选地，所述 IL-4R 是人 IL-4R。

本发明还提供了编码含有结合人 IL-4R 的抗体或其抗原结合片段的核酸序列。

在本发明的一个方面中，所述核酸编码含有以下轻链和重链互补决定区氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段：

1) LCDR1 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示，LCDR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示，LCDR3 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示；和 HCDR1 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示，HCDR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示，HCDR3 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16。或

2) LCDR1 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示，LCDR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示，LCDR3 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示；和 HCDR1 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示，HCDR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示，HCDR3 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8

3) SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列轻链可变区和/或包含与 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的重链可变区，或者

4) SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列的轻链可变区和/或 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列的重链可变区。

本发明涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少 50%，更佳地至少 70%，更佳地至少 80% 相同性的核酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述核酸可杂交的核酸。在本发明中，“严格条件”是指：(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如 0.2×SSC,0.1% SDS,60°C；或(2)杂交时加有变性剂，如 50%(v/v)甲酰胺，0.1%小牛血清/0.1%Ficoll，42°C等；或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在 90%以上，更好是 95%以上时才发生杂交。并且，可杂交的核酸编码的多肽与成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。本发明

所涉及的生物分子(核酸、蛋白等)包括以分离的形式存在的生物分子。

目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段,或其衍生物)的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子(或如载体)和细胞中。此外,还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

本发明还提供了含有编码结合 IL-4R 的抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列的载体,优选地,所述载体是表达载体,本发明所述载体包括但不限于,病毒载体,如腺病毒载体、逆转录病毒载体、腺相关病毒载体等;非病毒载体,如质粒、转座子载体等,其中质粒载体优选为 pCDNA3.4 (Life Technology) 载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

本发明还提供了用于表达结合人 IL-4R 的抗体或其抗原结合片段的宿主细胞,该宿主细胞含有编码结合人 IL-4R 的抗体或其抗原结合片段的表达载体或编码结合人 IL-4R 的抗体或其抗原结合片段的核酸。

本发明还提供了用于表达结合 IL-4R 的抗体或其抗原结合片段的细胞,该细胞含有编码结合 IL-4R 的抗体或其抗原结合片段的表达载体或编码结合 IL-4R 的抗体或其抗原结合片段的核酸,优选地,所述细胞是含有上述表达载体的宿主细胞。在本发明的一个方面中,表达结合 IL-4R 的抗体或其抗原结合片段的宿主细胞包括但不限于哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、真菌细胞、原核细胞。代表性例子有:大肠杆菌,链霉菌属;鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞;真菌细胞如酵母;果蝇 S2 或 Sf9 的昆虫细胞;CHO、COS7、293 细胞的动物细胞等。优选地,本发明提供用于表达结合 IL-4R 的抗体或其抗原结合片段的宿主细胞是 HEK293。

用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时,能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获,用 CaCl₂ 法处理,所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 MgCl₂。如果需要,转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物,可选用如下的 DNA 转染方法:磷酸钙共沉淀法,常规机械方法如显微注射、电穿孔,脂质体包装等。

获得的转化子可以用常规方法培养,表达本发明的基因所编码的抗体。根据所用的宿主细胞,培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后,用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子,将细胞再培养一段时间。

在上面的方法中的重组抗体可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

根据本发明的另一方面,还提供一种组合物,其包含上文所述结合人 IL-4R 的抗体或其抗原结合片段、以及药学上可接受的载体。所述药学上可接受的载体包括以下中的一种或多种:药学上可接受的溶剂、分散剂、附加剂、塑形剂、药物辅料。通常,这些物质是无毒的、惰性的和药学上可接受的载体介质。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但并不限于):瘤内、腹膜内、静脉内、或如局部给药(如注射给药)。

本发明还涉及一种试剂盒,其包含上文任一所述结合 IL-4R 抗原的抗体或其抗体片段、核酸。在本发明的一个方面中,所述试剂盒包含以下任一组 CDR 氨基酸序列的抗体或其抗原

结合片段:

- 1) LCDR1 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示, LCDR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示, LCDR3 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示; 和 HCDR1 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示, HCDR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示, HCDR3 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16; 或
- 2) LCDR1 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示, LCDR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示, LCDR3 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示; 和 HCDR1 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示, HCDR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示, HCDR3 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8。

在本发明的一个方面中, 所述试剂盒还包括用于对 IL-4R 抗原抗体反应进行检测的检测试剂、阴性对照、阳性对照。

在另一方面, 本发明涉及前述任一方面所述的抗体或其抗原结合片段、核酸、载体或细胞在制备治疗或预防疾病的药物组合物中的应用。

在另一方面, 本发明涉及前述任一方面所述的抗体或其抗原结合片段、核酸在制备诊断、检测试剂盒中的应用。

在另一方面, 提供一种治疗或预防疾病的方法, 包括将本发明的抗体或抗原结合片段、核酸、载体、细胞或药物组合物给予有需要的受试者。

在另一方面, 提供一种诊断、检测的方法, 包括将本发明的抗体或抗原结合片段、核酸或试剂盒给予有需要的受试者或样本。

在另一方面, 提供前述任一方面所述的抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、细胞或药物组合物用于治疗、预防疾病的用途。

在另一方面, 提供前述任一方面所述的抗体或其抗原结合片段、核酸、或试剂盒用于检测、诊断的用途。

根据本发明的另一方面, 所述疾病优选是 IL-4R 相关疾病, 进一步优选地, 所述 IL-4R 相关病症是炎症或过敏性疾病, 包括哮喘、特应性皮炎、瘙痒症、嗜中性白血球减少症、过敏反应、鼻息肉、嗜酸性食管炎、皮肤感染、慢性鼻窦炎等; 优选地, 所述炎症或过敏性疾病是哮喘; 进一步优选地, 所述哮喘的治疗和/预防包括减少哮喘加重发生率, 改善 1 至多种哮喘参数, 改善患者对吸入皮质类固醇和/或长效 β 激动剂的依赖性等。

本发明人通过广泛而深入的研究, 经过大量的筛选, 成功获得一类抗 IL-4R 抗体, 实验结果表明, 本发明获得的 IL-4R 抗体能够有效阻断 IL-4R 与其配体之间的相互作用, 令人意外的是, 经鉴定, 获得候选抗体具有与 dupilumab 不同表位结合特性, 并且免疫原性低, 体内半衰期长, 在哮喘等疾病动物模型中体内效果显著。在此基础上完成了本发明。

附图说明

图 1 示出了血清稀释 5000 倍的转基因小鼠血清滴度。

图 2 示出了候选抗体阻断 IL4/IL4R 的蛋白结合活性的比较。

图 3 示出了 BA167、BA173、BA030、Dupilumab 与 IL4R 蛋白结合活性的比较。

图 4 示出了 BA167、BA173、BA030、Dupilumab 阻断 IL4/IL4R 的蛋白结合活性比较。

图 5 示出了 BA167、BA173、BA030、Dupilumab 阻断 IL13+IL13RA1/IL4R 的蛋白结合活性比较。

图 6 示出了 BA167、BA173、BA030 和 Dupilimab 与 Human/Rhesus/Mouse IL4R 的结合

差异。

图 7 示出了 IL4 诱导的 TF-1 细胞增殖抑制实验。

图 8 示出了 IL13 诱导的 TF-1 细胞增殖抑制实验。

图 9 示出了候选抗体对 PBMC 细胞的增殖抑制作用。

图 10 示出了食蟹猴皮下注射 2.5mg/kg 处方 BA167、BA173、Dupilumab 后体内平均浓度-时间曲线。

图 11 示出了给药后 B-hIL4/hIL4R α 双人源化哮喘模型小鼠血清中 IgE 水平变化。

图 12 示出了给药后 B-hIL4/hIL4R α 双人源化哮喘模型小鼠 BALF 嗜酸细胞水平的变化。

图 13A-13C 依次分别示出了对 BA173、BA167 和 Dupilumab 抗体免疫原性检测。

具体实施方式

参照以下实施例可以更好地理解本发明。但是，应理解，以下实施例仅用于举例说明目的，而不应被理解为以任何方式限制本发明的保护范围。

实施例 1. 抗 IL4R 抗体的产生

1.1 免疫

用 IL4R (Sinobiological, 目录号 10402-H08H) 与弗氏佐剂乳化后免疫山东博安全人抗体转基因小鼠 BoAn-hMab。首免使用弗氏完全佐剂，二免至三免使用弗氏不完全佐剂，本次共免疫 9 只小鼠。选取血清滴度较高的小鼠加强免疫，3 天后处死小鼠取出脾脏用于后续实验。检测血清滴度主要采用 ELISA 法。以 CBS 包被液 (pH9.6 碳酸溶液) 包被浓度为 1 μ g/ml 的蛋白 IL4R (10402-H08H, 义翘神州), 100ul/孔 4 度过夜; 用 3%脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h; 用 PBST 将血清稀释至 200X、1000X、5000X、25000X, 每孔加 100ul。37 度孵育 1h; 然后加入 HRP-山羊抗人 H+L(474-1006, KPL), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 显色 10min 后, 用 2M 浓硫酸终止, 酶标仪上读取 OD450。检测血清滴度如图 1 所示。

1.2 噬菌体库的建立

取免疫小鼠的脾脏细胞, 加入 Trizol (Thermo Scientific, 目录货号 15596-026), 待裂解充分后加入 1/5 体积的氯仿, 充分混匀, 室温放置 20min 后 4 $^{\circ}$ C 12000rpm 离心 20min, 取上层水溶液, 并加入等体积的异丙醇, 室温放置 20min, 4 $^{\circ}$ C 12000rpm 离心 20min, 弃去上清水溶液, 加入 75%乙醇洗涤两次, 4 $^{\circ}$ C 12000rpm 离心 5min, 弃去水溶液, 保留沉淀, 室温风干后加入 DEPC 水重悬沉淀获得 RNA, 获得的 RNA 使用罗氏反转录试剂盒 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, 目录货号 4897030001) 按照其说明书将 RNA 反转录成 cDNA。噬菌体库的建立步骤参照 Carlos F.Barbas III, Phage display: A laboratory manual 中记载的方法进行, 以编号为 IL4R Q14 的小鼠建立的噬菌体库 IL4R Q14, 库容 9.28 x 10⁸; 以编号为 IL4R Q6 的小鼠建立的噬菌体库 IL4R Q6, 库容 2.8 x 10⁸; 以编号为 IL4R Q29 的小鼠建立的噬菌体库 IL4R Q29, 库容 6.4 x 10⁸。

1.3 筛选

1. 平板筛选用 IL4R-His 蛋白 (义翘神州, 10402-H08H) 以 1 μ g/孔包被平板, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜, 第二天通过 2% BSA 封闭平板 1h, 加入噬菌体库 (2 x 10¹²) 孵育 2h, 洗涤 4-10 次后用 Elution Buffer (pH 2.2) 洗脱 IL4R 结合的噬菌体。

2. 磁珠筛选, 将 IL4R-Fc 蛋白 (义翘神州, 10402-H02H) 按照常规步骤进行生物素化 (投入的 IL4R 蛋白与生物素摩尔比 1:2), 再与 Thermo 的磁珠 (Invitrogen Dynabeads M-280 Streptavidin, 00355871) 结合后与噬菌体库孵育, 洗涤 4-10 次后用 Elution Buffer (pH 2.2)

洗脱 IL4R 特异性结合的噬菌体。

平板筛选获得克隆 IL4RQ14-BA030\BA034、IL4RQ6-BA167\BA173、IL4RQ24-BA420、IL4RQ29-BA1301。其中，IL4RQ14 代表免疫的第 14 只野生型小鼠，BA 代表磁珠筛选。

将通过噬菌体酶联免疫 (Elisa) 法检测阳性的库涂布平板，挑取直接进行自主培养基的诱导表达，上清检测结合活性，挑选出的继续利用 ELISA 检测阻断 IL4 的表达。将具有 IL4 阻断活性的挑选出来，再进行一次 ELISA 检测，挑选出能阻断 IL13/IL13RA1 的阳性克隆。将这些阳性克隆进行分子构建与生产。

实施例 2. 阻断抗体的分子构建与生产

将克隆 IL4RQ14-BA030、BA034 (本发明中简称 BA030、BA034)、IL4RQ6-BA167、BA173(本发明中简称 BA167、BA173)、IL4RQ24-BA420(本发明中简称 BA1301)、IL4RQ29-BA1301(本发明中简称 BA1301)送 Invitrogen 生物技术有限公司测序。各克隆氨基酸序列如下表 1:

表 1 具有阻断活性克隆的氨基酸序列

克隆 ID	轻链序列	重链序列
BA030	DIVMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQS ISNWLAWYQQKPGKAPKRLIYKASSL ESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFF ATYYCQQYNRYFTFGQGTKLEIK	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYAIHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSKKY YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREYYYGMDVWGQGTTVTVSS
BA034	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQS FNSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKSSRL ESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFF ATYYCQQYNGYSWTFGQGTKVEIK	QVQLVESRGGAVQPGRSLRVSCAASGFTFS SHGMDWVRQVPGKGLEWVAVISYDGKKK YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAIYYCVKESRYYYGMDVWGQGTTV TVSS
BA167	EIVMTQSPSSLSASLGDRVITICRASQN IGSRLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLE SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFA TYYCQQYNSYSWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGLTTRGVLYWGQGTTLV VSS (SEQ ID NO:2)
	QNIGSR (SEQ ID NO:3)	GFTFSSYA(SEQ ID NO:6)
	KAS (SEQ ID NO:4) QQYNSYSWT(SEQ ID NO:5)	ISYDGSNK(SEQ ID NO:7) ARGLTTVRGVLY(SEQ ID NO:8)
BA173	DIVMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQS ISTRALAWYQQKPGKAPKLLVYWASSL ESGVPSRFSGSGSGTEFTLAISSLQPDFF FGTYCQQYTSYSWTFGQGTKLEIK (SEQ NO:9)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGLTTRGVLYWGQGTTLV VSS (SEQ NO:10)
	QSISTR (SEQ ID NO:11)	GFTFSSYA (SEQ ID NO:14)
	WAS (SEQ ID NO:12) QQYTSYSWT (SEQ ID NO:13)	ISYDGSNK (SEQ ID NO:15) ARGLTTVRGVLY (SEQ ID NO:16)
BA420	DIVMTQSPSTLSASVGDRVITICRASPS	QVQLVESGGGAVQPGRSLRVSCAASGFTFS

	ISSWLAWYQQKPGKAPKVLIIKSSRLE SGVPSRFSNGSGTEFTLTISSLQPDDF ATYYCQQYNGYSWTFGQGTKVEIK	SHGMDWVRQVPGKGLEWVAVISYDGKKK YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAIYYCVKESRYYYGMDVWGQGTTV TVSS
BA1301	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQS ITRRLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLE SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCQQYVFSRFTFGQGTKVEIK	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGLTFS SYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGFGYFDLWGRGTLTVSS

通过常规的分子生物学技术进行可变区基因扩增(2*EasyPfu PCR SuperMix 厂家: Transgen 货号: AS211 批号: #L11228)、信号肽与可变区重叠延伸, 将带有重链和信号肽基因的可变区同源重组(ClonExpress II One Step Cloning Kit 厂家: Vazyme 货号: C112-01 批号: TE222B8)连接入带有抗体重链恒定区(IgG4)序列的载体 pCDNA3.4 (Life Technology), 将带有轻链和信号肽基因的可变区同源重组(ClonExpress II One Step Cloning Kit 厂家: Vazyme 货号: C112-01 批号: TE222B8)连接入带有抗体轻链恒定区序列的载体 pCDNA3.4 (Life Technology, 序列如下所示。

重链恒定区(IgG4)序列:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPKNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLGLG-

轻链恒定区序列:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC-

然后共转染进入 HEK293 细胞, 在 37°C\8% CO₂\125rpm 摇床中培养, 6-7 天后的瞬时表达上清通过 Protein A 亲和层析, 纯化获得 IL4R 抗体, 并通过 UV280 结合消光系数确定抗体浓度。

对照抗体生产: 通过 IMGT 数据及专利 US2008160035A1 确定再生元 IL4R 抗体 Dupilumab 的氨基酸序列, 全基因合成后插入载体 pCDNA3.4 通过 HEK293 细胞表达。Dupilumab 氨基酸序列如下所示:

Dupilumab 轻链氨基酸序列:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSIGYNYLDWYLQKSGQSPQLLIYLGSNRA
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGFYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Dupilumab 重链氨基酸序列:

EVQLVESGGGLEQPGGSLRLSCAGSGFTFRDYAMTWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGNTYY

ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRLSITIRPRYYGLDVWVGQTTV
 TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGL-

实施例3 BA030、BA167、BA173与Dupilumab的比较

3.1 筛选抗体与IL4R蛋白的阻断活性的比较

包被浓度为0.2 μ g/ml的IL4(11846-HANE,义翘神州),100ul/孔4度过夜;用3%脱脂奶粉封闭1h;同时IL4R-Fc-biotin(0.4 μ g/ml)50ul和不同浓度(16 μ g/mL、4 μ g/mL、1 μ g/mL、0.25 μ g/mL、0.0625 μ g/mL、0.015625 μ g/mL、0.00390625 μ g/mL)候选抗体50ul共100ul,加入到封闭过的ELISA板上37 $^{\circ}$ C共孵育1h;PBST洗三次后,加入链霉素/HRP(R&D,目录号:890803),37 $^{\circ}$ C孵育1h;每孔加入100ulTMB显色液(北京梅科万德,目录号:1001)显色10min后,加入50ul2M的浓硫酸终止,酶标仪上读取OD450。结果见图2及表2所示。

表2 候选抗体阻断IL4/IL4R的蛋白结合活性

样品	Dupilumab	BA420	BA030	BA173	BA167	BA1301	BA034
IC50(μ g/ml)	~0.257	0.334	0.343	0.354	0.458	0.592	0.71

综合分析抗体序列、阻断数据等,我们选择IL4R-BA167-IgG4(以下或简称为BA167)、IL4R-BA173-IgG4(以下或简称为BA173)、IL4R-BA030-IgG4(以下或简称为BA030)与Dupilumab抗体进行比较实验。

3.2 BA167、BA173、BA030、Dupilumab与IL4R蛋白的结合活性的比较

以CBS包被液(pH9.6碳酸溶液)包被不同浓度(0.4 μ g/ml、0.2 μ g/ml、0.1 μ g/ml、0.05 μ g/ml、0.025 μ g/ml、0.0125 μ g/ml、0.00625 μ g/ml、0 μ g/ml)的蛋白IL4R(10402-H08H,义翘神州),100ul/孔4度过夜;用3%脱脂奶粉37 $^{\circ}$ C封闭1h;每孔加入2 μ g/ml候选抗体各100ul,37 $^{\circ}$ C孵育1h;然后加入山羊抗人IgG(H+L)/HRP(KPL,目录号:474-1006),37 $^{\circ}$ C孵育1h,显色10min后,每孔加入50 μ L2MH₂SO₄终止显色酶标仪上读取OD450。结果见图3及表3所示,3株抗体与对照抗体相比,具有对IL4R蛋白接近的结合灵敏度。

表3. 对IL4R蛋白的结合灵敏度

样品	IL4R-BA030-IgG4	IL4R-BA167-IgG4	IL4R-BA173-IgG4	Dupilumab
EC50(μ g/mL)	0.031	0.045	0.025	0.012

3.3 候选抗体阻断IL4/IL4R的蛋白结合

包被浓度为0.2 μ g/ml的IL4(11846-HANE,义翘神州),100ul/孔4度过夜;用3%脱脂奶粉封闭1h;同时IL4R-Fc-biotin(0.4 μ g/ml)和不同浓度(30 μ g/mL、7.5 μ g/mL、1.875 μ g/mL、0.46875 μ g/mL、0.1171875 μ g/mL、0 μ g/mL)候选抗体37 $^{\circ}$ C共孵育1h,然后加入到封闭过的ELISA板上,37 $^{\circ}$ C再孵育1h;继而加入链霉素/HRP(R&D,目录号:890803),37 $^{\circ}$ C孵育1h;显色10min后,每孔加入50 μ L2MH₂SO₄终止。酶标仪上读取OD450。结果见图4及表

4, 与对照相比, 3 株抗体都能够有效阻断 IL4 与 IL4R 的结合, 且具有接近的阻断活性。

表 4.

蛋白名称	IL4R-BA167-IgG4	IL4R-BA030-IgG4	IL4R-BA173-IgG4	Dupilumab
IC50 $\mu\text{g/ml}$	0.477	0.346	0.367	~ 0.2602

3.4 候选抗体阻断 IL13+IL13RA1/IL4R 的蛋白结合

包被浓度为 0.8 $\mu\text{g/ml}$ 的 IL13RA1 (10943-H08H, 义翘神州), 100ul/孔 4 度过夜; 用 3% 脱脂奶粉封闭 1h; 同时 IL4R-Fc-biotin (0.24 $\mu\text{g/ml}$)、IL13(1 $\mu\text{g/ml}$, 10369-HANE, 义翘神州) 和不同浓度 (30 $\mu\text{g/mL}$ 、7.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.875 $\mu\text{g/mL}$ 、0.46875 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1171875 $\mu\text{g/mL}$ 、0 $\mu\text{g/mL}$) 候选抗体 37 $^{\circ}\text{C}$ 共孵育 1h, 然后加入到封闭过的 ELISA 板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 再孵育 1h; PBST 清洗三次后, 加入链霉素/HRP(R&D, 目录号: 890803), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1h; PBST 清洗四次后, TMB 显色 10min, 每孔加入 50 μL 2M H_2SO_4 终止, 酶标仪上读取 OD450。结果见图 5 及表 5, 与对照抗体相比, 3 株抗体都能够有效阻断 IL13+IL13RA1 与 IL4R 的结合, 且具有相似的阻断活性。

表 5. 阻断 IL13+IL13RA1/IL4R 的蛋白结合活性

蛋白名称	IL4R-BA167-IgG4	IL4R-BA030-IgG4	IL4R-BA173-IgG4	Dupilumab
IC50 $\mu\text{g/ml}$	0.4071	0.3809	0.3025	~ 0.2396

3.5 BA167、BA173、BA030 和 Dupilumab 在不同种属上的结合

通过 Elisa 法检测 BA167、BA173、BA030 和 Dupilumab 分别与人、小鼠、食蟹猴 IL4R 的结合。

以 CBS 包被液 (pH9.6 碳酸溶液) 包被不同浓度 (5 $\mu\text{g/ml}$ 、1.25 $\mu\text{g/ml}$ 、0.3125 $\mu\text{g/ml}$ 、0.078125 $\mu\text{g/ml}$) 的 huamn IL4R (10402-H08H, 义翘神州)、Rhesus IL4R(ILR-C52H8,ACRO)、Mouse IL4R(ILR-M52H1,ACRO)100ul/孔 4 度过夜; 用 3%脱脂奶粉 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1h; 每孔加入 5 $\mu\text{g/ml}$ 候选抗体各 100ul, 37 度孵育 1h; 然后加入山羊抗人 IgG/HRP(KPL, 目录号: 474-1006), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1h。PBST 清洗四次后, TMB 显色 10min, 每孔加入 50 μL 2M H_2SO_4 终止, 酶标仪上读取 OD450。

结果显示 4 组抗体与人 IL-4R 蛋白具有相似的结合, 而在食蟹猴 IL4R 蛋白上具有不一样的结合表现, 见图 6, 该结果抗体预示 BA167、BA173、BA030 抗体与 Dupilumab 在 IL4R 上具有不同的表位。

3.6 BA030、BA167、BA173 与 Dupilumab 抗体在体外细胞功能上的比较

3.6.1 IL4 诱导的 TF-1 细胞增殖抑制实验

TF-1 细胞、IL4 (Sinobiological, 目录号: 11846-HNAE) 和抗体均用完全培养基 (90% RPMI 1640, 10% FBS) 进行稀释, 把 TF-1 细胞稀释至 4 $\times 10^5$ cells/mL, 接种于白色 96 孔板中, 50 μL /孔, 即 20000cells/孔。把 IL4 稀释至 2ng/mL。把抗体稀释至 5 $\mu\text{g/mL}$, 然后依次 4 倍稀释, 共 6 个浓度。把稀释的抗体和 IL4 等体积混合后加入到细胞孔中, 50 μL /孔。把 1ng/mL 的 IL4 加入细胞孔作为阴性对照。把完全培养基加入细胞孔作为阳性对照。所有样品设置复孔。培养 96h 后, 使用 CellTiter-Glo (Promega, 目录号: G7572) 试剂盒检测细胞量。实验结果见图 7 和表 6 所示。

3.6.2 IL13 诱导的 TF-1 细胞增殖抑制实验

TF 细胞、IL13 (Sinobiological, 目录号: 10369-HNAC) 和抗体均用完全培养基 (90% RPMI 1640, 10% FBS) 进行稀释, 把 TF-1 细胞稀释至 4×10^5 cells/mL, 接种于白色 96 孔板中, $50 \mu\text{L}$ /孔, 即 20000 cells/孔。把 IL13 稀释至 4 ng/mL 。把抗体稀释至 $7.5 \mu\text{g/mL}$, 然后依次 8 倍稀释, 共 6 个浓度。把稀释的抗体和 IL13 等体积混合后加入到细胞孔中, $50 \mu\text{L}$ /孔。把 2 ng/mL 的 IL13 加入细胞孔作为阴性对照。把完全培养基加入细胞孔作为阳性对照。所有样品设置复孔。培养 96h 后, 使用 CellTiter-Glo (Promega, 目录号: G7572) 试剂盒检测细胞量。实验结果见图 8 和表 6 所示。

3.6.3 对 PBMC 细胞的增殖抑制作用

IL4 可以促进 PBMC 细胞的增殖, 加入抗体后, 抗体与 IL4 的受体结合, 抑制了 PBMC 细胞的增殖。细胞、IL4 (Sinobiological, 目录号: 11846-HNAE) 和抗体均用完全培养基 (90% RPMI 1640, 10% FBS) 进行稀释。复苏 PBMC, 按 1:100 比例加入 PHA (Thermo, 目录号: 10576015), 培养 4 天。把抗体稀释至 $160 \mu\text{g/mL}$, 在依次 10 倍稀释, 共 9 个浓度。把 IL4 稀释至 400 ng/mL 。把抗体和 IL4 等体积混合后, 加入 96 孔板中, $50 \mu\text{L}$ /孔。加入 PHA 处理的 PBMC, $50 \mu\text{L}$ /孔。每孔加入 $10 \mu\text{L}$ CCK8 (Dojindo, 目录号: CK08), 显色 4h 后读取 OD450nm。实验结果见图 9 和表 6 所示。

表 6: 细胞活性 IC50 数据统计

抗体 ID	TF-1 Cells		PBMC
	IC50(IL4,ng/mL)	IC50(IL13,ng/mL)	IC50(IL4,ng/mL)
Dupilumab	65	9	2.868
IL4R-BA173-IgG4	66	6	1.018
IL4R-BA167-IgG4	139	5	1.525
IL4R-BA030-IgG4	227	9	8.086

TF-1 是人血液白血病细胞, IL4、IL13 可以通过结合细胞表面受体从而诱导 TF-1 细胞的生长, 加入抗体后, 抗体与 IL4/IL13 的受体结合, 从而抑制了 TF-1 细胞的增殖。从上述 3.6.1-3.6.2 实验可以发现, 在 TF-1 的细胞增殖抑制实验中, BA173 抗体的抑制 IL-4 诱导的 TF-1 细胞增殖效果优于其他候选抗体, 且 BA173 具有与 Dupilumab 相似的阻断活性。在 3.6.3 实验中, BA173 和 BA167 比 Dupilumab 的作用效果更好, 说明两个抗体能更好的与 IL4 的受体结合, 从而抑制 PBMC 的增殖。

实施例 4 BA167、BA173 与 Dupilumab 在食蟹猴 PK 上的研究

每个抗体选 3 只食蟹猴皮下注射给药, 剂量为 2.5 mg/kg , 两次给药, 第二次给药时间为 14 d (d 表示天), 给药前 0 h、给药后 1 h、4h、10 h 及 1d、2d、3d、4d、5d、7d、10d、14d 及第二次给药后 1 h、4h、10 h 及 1d、2d、3d、4d、5d、7d、10d、14d、21d 和 28d 采血清检测抗体浓度, 检测血清方法为 Elisa 法, 检测具体结果见下图 10 及表 7

表 7 食蟹猴皮下注射 2.5 mg/kg 处方 BA167、BA173、Dupilumab 后体内的药代参数

Antibody ID	$T_{1/2}$ day	Tmax day	C_{max} ng/mL	AUC_{last} d*ng/mL	V_z mL/kg	CL mL/d/kg	AUC_{1st} d*ng/mL	AUC_{2st} d*ng/mL	AUC_{2st} Fold
Dupilumab	4.2	18	44636.6	781485.7	17.5	3.2	290271.9	491263.6	
IL4R-BA173-IgG4	15.7	15.6	42284.2	994342.3	45.2	2	277345.5	716996.8	1.5x
IL4R-BA167-IgG4	22.2	18	42914.3	937874.6	56.8	1.8	254696.9	683177.7	1.4x

食蟹猴皮下第二次给药 Dupilumab、BA173、BA167 后, 出现不同程度的蓄积, 其 C_{max2}/C_{max1} 值接近 2, AUC_{2st}/AUC_{1st} 值 ≥ 2 。以第二次给药末端消除相求算 $T_{1/2}$ 值分别为 $4.2\pm 3.0d$ 、 $15.7\pm 1.9d$ 、 $22.2\pm 8.1d$ 。以上数据可以发现, 给药后 BA167、BA173 在食蟹猴血清中更加持久, 相比 Dupilumab 每周给药, 可显著延长给药周期。

实施例 5 BA167、BA173 与 Dupilumab 基于 B-hIL-4/hIL-4RA 双人源化小鼠哮喘模型的药物药效实验

配 $40\mu g$ OVA(卵清蛋白), 腹腔注射致敏, $200\mu L/只$ 。致敏时间为第 0、7、14 天。在第 21-25 天, 雾化吸入 2% OVA 激发, 每次 30min, 连续 5 天。受试品在第 20、23 天给药, 最后一次激发操作结束 24 小时后采集样本检测分析。末次雾化激发操作结束 24 小时后, 采小鼠外周血, 血清进行 OVA 特异性的 IgE 抗体检测; 采集肺泡灌洗液进行 OVA 特异性 IgE 抗体检测。末次雾化激发操作结束 24 小时后, 采集小鼠肺泡灌洗液通过流式细胞术进行嗜酸性粒细胞浸润检测。实验结果如图 11 和图 12 所示, 其中 G1: 1X Buffer; G2: Dupilumab; G3: BA173; G4: BA167。

在实验终点, 血清中 G1 对照组平均 IgE 水平为 $28.85 ng/mL$, Dupilumab、BA173 组和 BA167 组 IgE 水平分别为 $2.0 ng/mL$, $3.4 ng/mL$ 、 $2.1 ng/mL$; 嗜酸性粒细胞数对照组平均为 384.50×10^2 (个/mL), Dupilumab、BA173 组和 BA167 组嗜酸性粒细胞数分别为 31.1×10^2 (个/mL), 12.8×10^2 (个/mL), 14.0×10^2 (个/mL)。在本实验药效模型上, BA167、BA173 组在 $25mg/kg$ 剂量下可显著减少哮喘模型鼠血清中 IgE 水平以及肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞数量。有效缓解哮喘, 有助于减少哮喘加重发生率, 改善哮喘相关评价参数, 改善患者对吸入皮质类固醇和/或长效 β 激动剂的依赖性。

同时, 在特应性皮炎、瘙痒症、嗜中性白血球减少症、过敏反应、鼻息肉、嗜酸性食管炎、皮肤感染、慢性鼻窦炎动物模型中, 分别对各组动物给药, 结果显示, 候选抗体 BA173 和 BA167 在以上动物模型中均显示出与哮喘模型中相似的效果, 展现出对特应性皮炎、瘙痒症、嗜中性白血球减少症、过敏反应、鼻息肉、嗜酸性食管炎、皮肤感染、慢性鼻窦炎良好的缓解或治疗效果。

实施例 6 BA167、BA173 与 Dupilumab 在食蟹猴上的免疫原性

以 CBS 包被液(pH9.6 碳酸溶液)包被 BA167、BA173 与 Dupilumab 为 $0.125\mu g/ml$, $100\mu l/孔$ 4 度过夜; 用 3%脱脂奶粉 $37^\circ C$ 封闭 1h; 每孔加入 PBST 稀释的 100X 血清 $100\mu l$, $37^\circ C$ 孵育 1h; PBST 洗两次后加入 BA167-biotin、BA173-biotin 与 Dupilumab-biotin $0.125\mu g/ml$, 每孔 $100\mu l$, $37^\circ C$ 孵育 1h。PBST 洗两次后, 加入链霉素/HRP, $37^\circ C$ 孵育 1h; PBST 洗四次后 TMB 显色 10min, 每孔加入 $50\mu L$ 2M H_2SO_4 终止, 酶标仪上读取 OD450。

结果如图 13 所示 (101-303 代表猴编号), Dupilumab 实验组有一只猴子在第 21 天产生了较强的免疫原性, 在第 28 天时 OD 值接近 2。BA173 和 BA167 的 OD 值均未超过 0.3, 在食蟹猴上没有产生免疫原性。说明我们的抗体未来在疗效和安全性上会更高, 给药后体内副反应少, 具有更低肝脏毒性。

权 利 要 求 书

1. 一种抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或其抗原结合片段包括：
 - 1) 3个轻链互补决定区，其中，LCDR1氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示，LCDR2氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示，LCDR3氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示；和
3个重链互补决定区，其中，HCDR1氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示，HCDR2氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示，HCDR3氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16。或
 - 2) 3个轻链互补决定区，其中，LCDR1氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示，LCDR2氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示，LCDR3氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示；和
3个重链互补决定区，其中，HCDR1氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示，HCDR2氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示，HCDR3氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8
2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段，其特征在于包括氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1 的轻链可变区，和氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2 的重链可变区；或者包括氨基酸序列为 SEQ ID NO: 9 的轻链可变区，和氨基酸序列为 SEQ ID NO: 10 的重链可变区
3. 根据权利要求1至2任一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结合抗原是 IL-4R。
4. 一种核酸，其编码权利要求1-4任一项所述抗体或其抗原结合片段。
5. 一种载体，其包含权利要求4的核酸；优选地，所述载体是表达载体。
6. 一种细胞，其包含权利要求4的核酸或权利要求5的载体。
7. 一种药物组合物，其特征在于含有权利要求1-3任一项所述抗体或其抗原结合片段，或权利要求4所述的核酸，或权利要求5所述的载体，或权利要求6所述的细胞，及药学可接受的载体。
8. 一种试剂盒，含有权利要求1-3任一项所述抗体或其抗原结合片段，或权利要求5所述的核酸。
9. 权利要求1-3任一项所述抗体或其抗原结合片段，或权利要求5所述的核酸用于预防、治疗、检测或诊断与 IL-4R 相关的疾病的应用，优选地，所述 IL-4R 相关疾病是炎症或过敏性疾病。
10. 根据权利要求9所述应用，所述炎症或过敏性疾病包括哮喘、特应性皮炎、瘙痒症、嗜中性白血球减少症、过敏反应、鼻息肉、嗜酸性食管炎、皮肤感染、慢性鼻窦炎；优选地，所述炎症或过敏性疾病是哮喘。

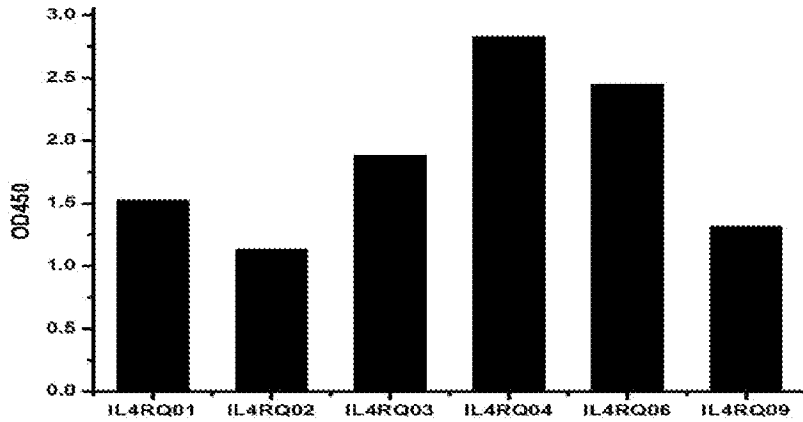


图 1

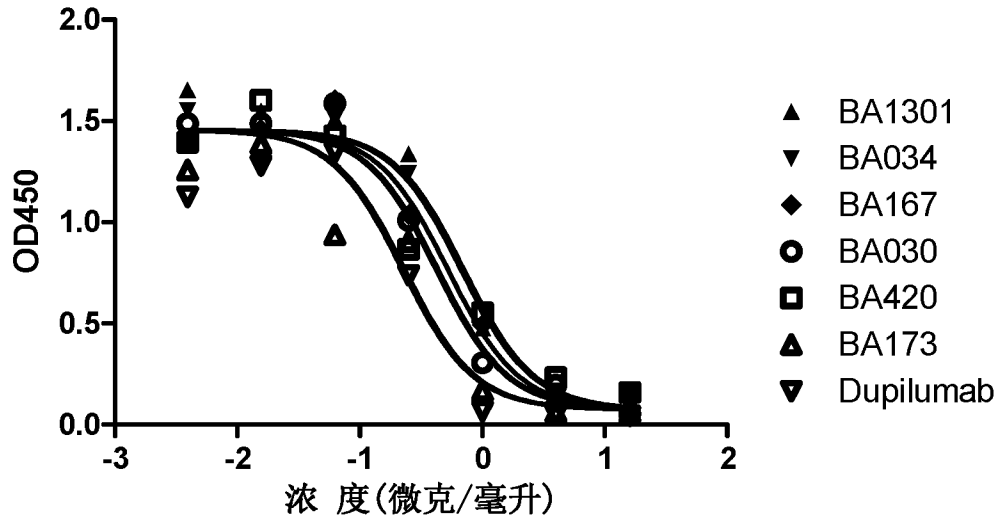


图 2

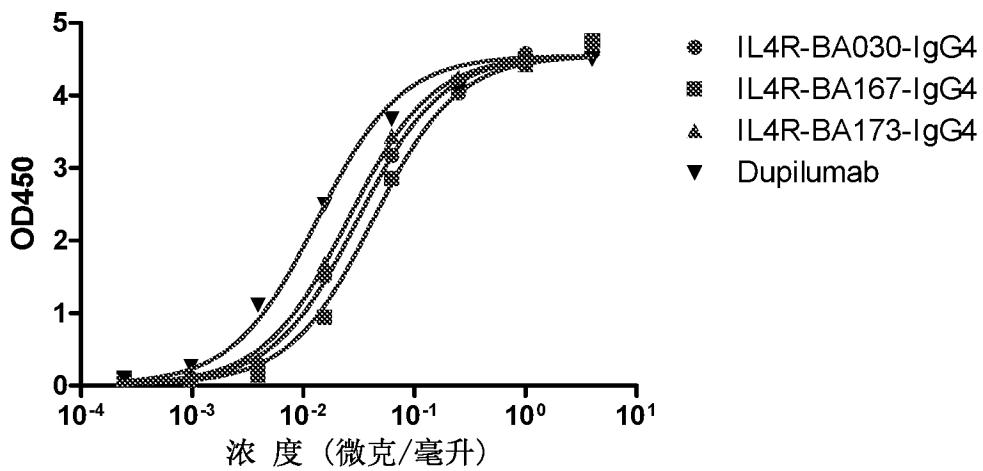


图 3

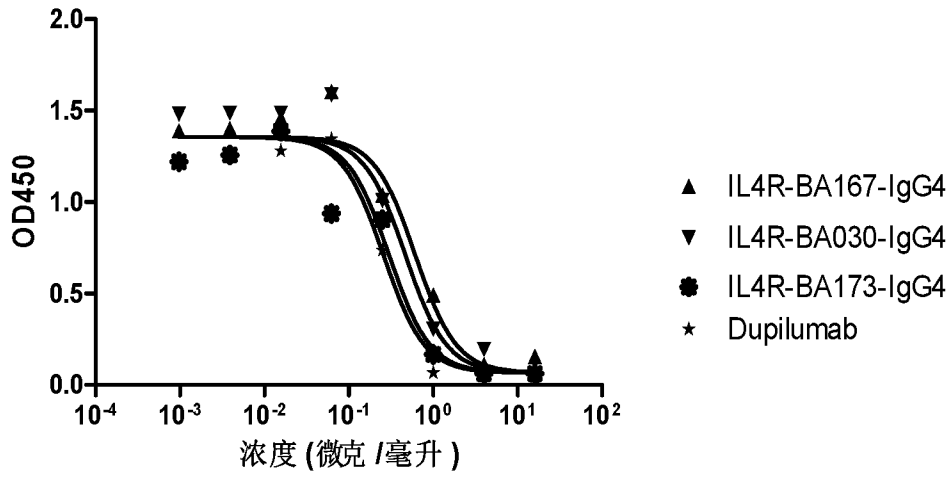


图 4

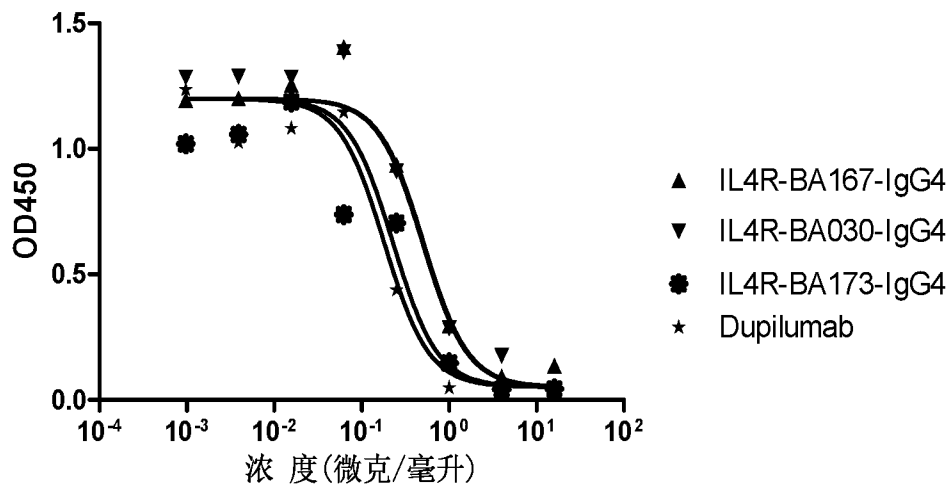


图 5

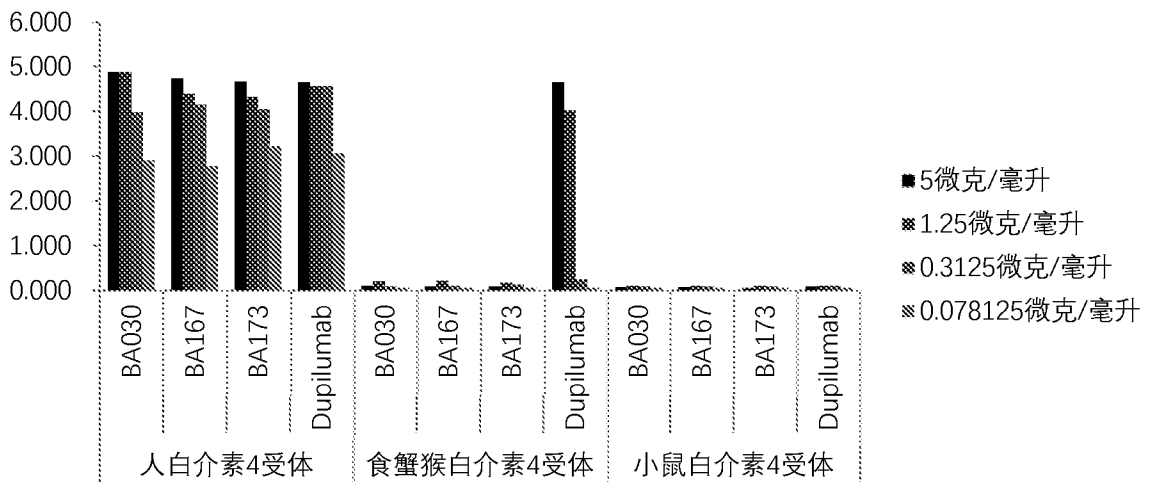


图 6

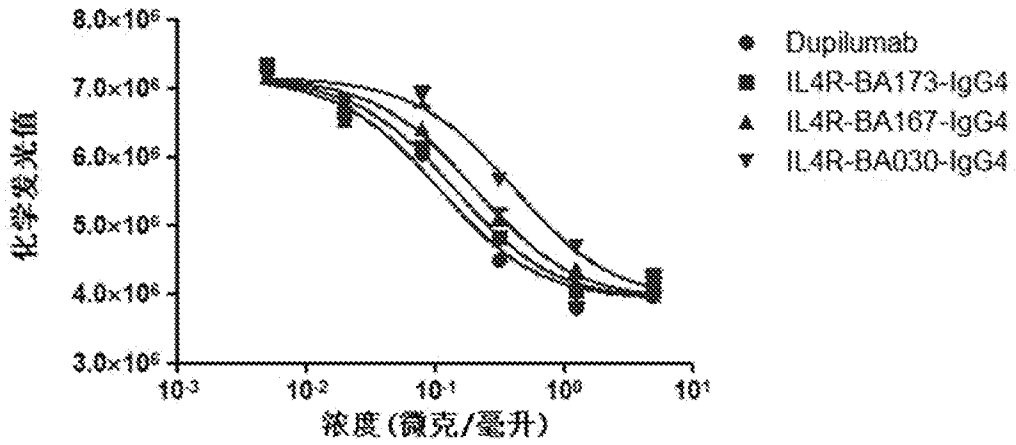


图 7

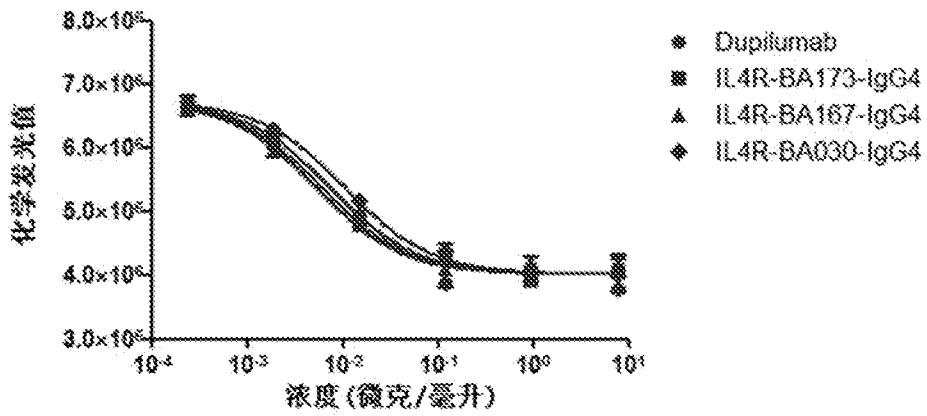


图 8

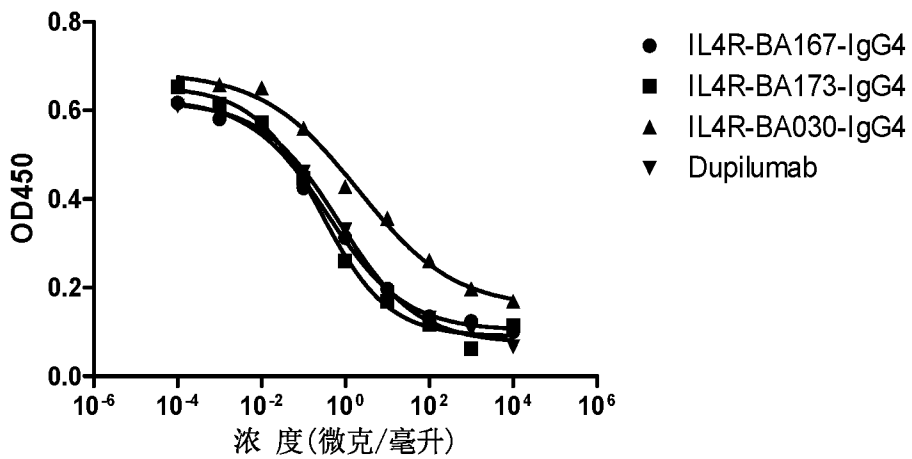


图 9

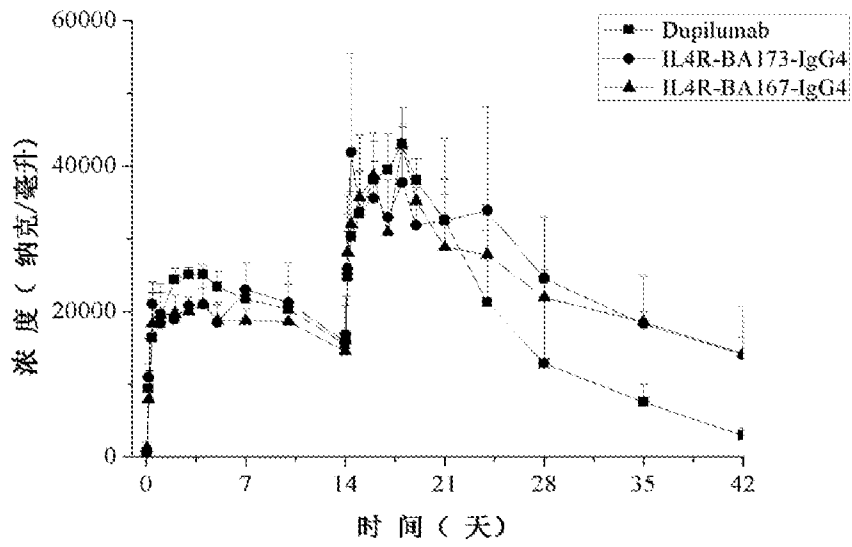


图 10

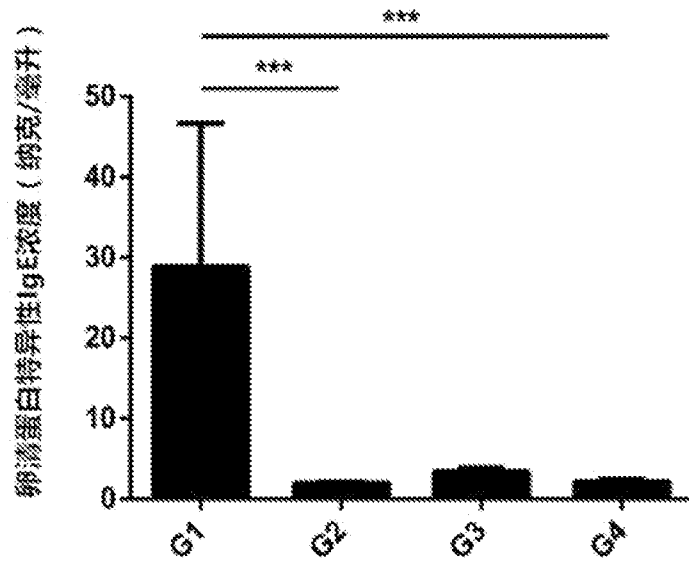


图 11

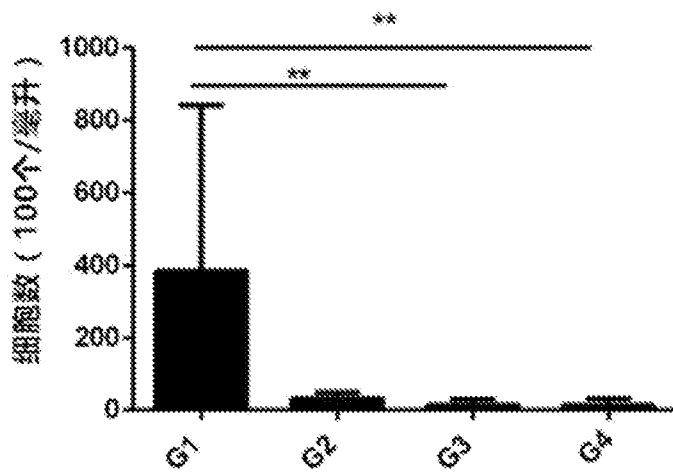


图 12

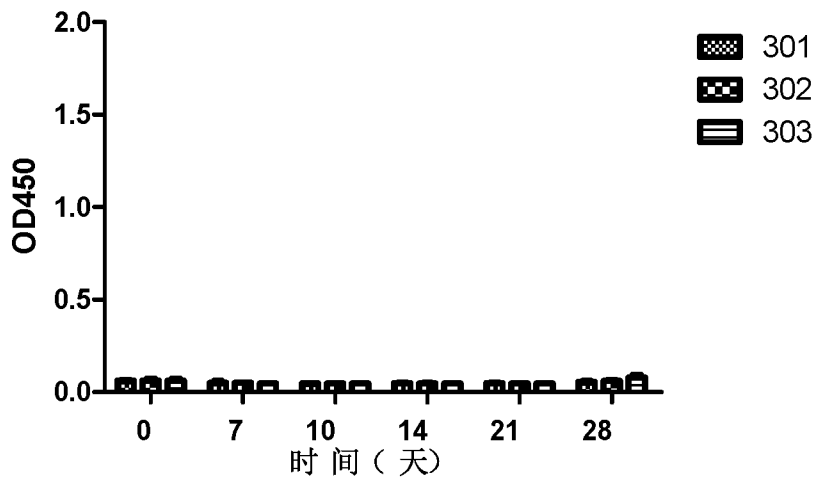


图 13A

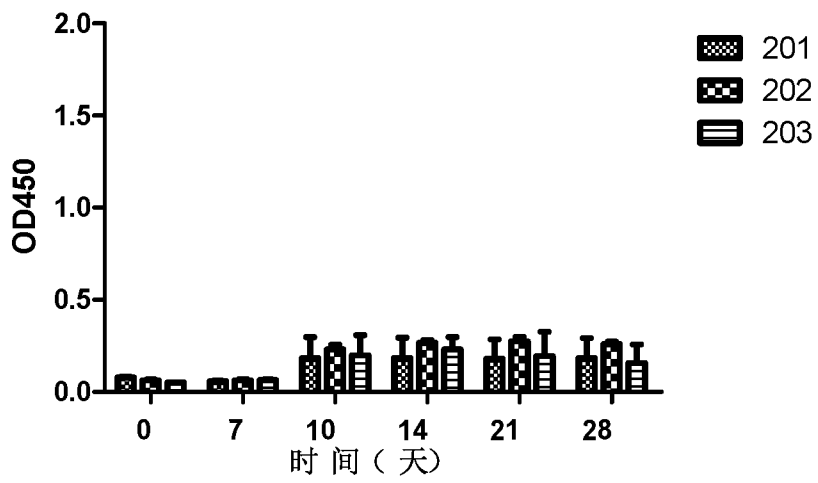


图 13B

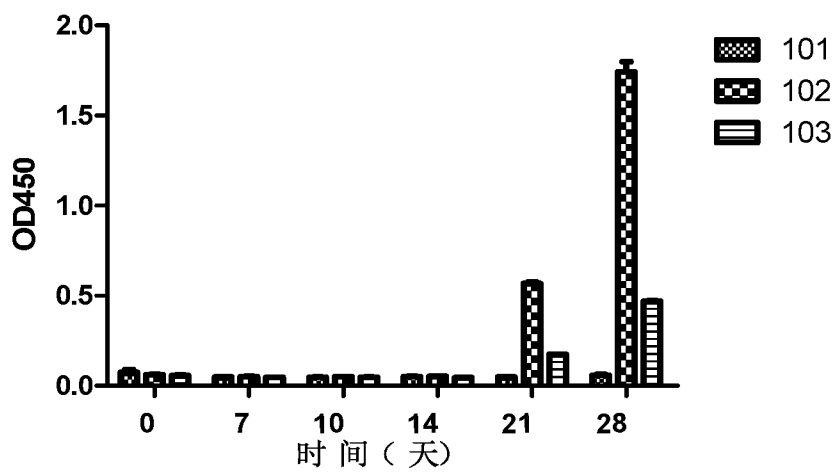


图 13C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/097686

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 11/02(2006.01)i; A61P 11/06(2006.01)i; A61P 17/00(2006.01)i; A61P 37/08(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N; A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNMED; CNABS; CPEA; TWMED; DWPI; SIPOABS; EPOQUE; CNKI; ISI; ELESEVER; NCBI; PUBMED; GOOGLE; GenBank; EMBL; STN; 万方; WANFANG; 中国专利生物序列检索系统数据库; Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System; Search Terms: 白细胞介素4受体, 白介素4受体, IL-4R, 抗体, interleukin-4 receptor, antibody, SEQ ID NOS: 1-16		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 108373505 A (BEIJING WISDOMAB BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 07 August 2018 (2018-08-07) see entire document	1-10
A	CN 107474134 A (SUZHOU CONNECT BIOPHARMACEUTICALS, LTD.) 15 December 2017 (2017-12-15) see entire document	1-10
A	CN 102197052 A (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 21 September 2011 (2011-09-21) see entire document	1-10
A	CN 105753987 A (GUIZHOU UNIVERSITY OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE) 13 July 2016 (2016-07-13) see entire document	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 August 2020		Date of mailing of the international search report 23 September 2020
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **9-10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Although claims 9 and 10 relate to a method of the treatment of diseases (PCT Rule 39.1(iv)), a search is still made according to the applications of the antibody or antigen-binding fragment thereof, nucleic acid in the claims in detecting or diagnosing diseases, and preparing pharmaceutical composition for preventing or treating related diseases.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/097686

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	108373505	A	07 August 2018	CN	108373505	B	20 August 2019
				WO	2019200787	A1	24 October 2019
CN	107474134	A	15 December 2017	EP	3470430	A4	03 June 2020
				BR	112018074325	A2	01 October 2019
				WO	2017211319	A1	14 December 2017
				AU	2017276473	A1	03 January 2019
				EP	3470430	A1	17 April 2019
				PH	12018502544	A1	07 October 2019
				CA	3026568	A1	14 December 2017
				IL	263268	D0	31 December 2018
				ZA	201808209	B	25 September 2019
				KR	20190015757	A	14 February 2019
				MX	2018014941	A	07 March 2019
				SG	11201810855V	A	30 January 2019
				US	2019177408	A1	13 June 2019
				JP	2019520816	A	25 July 2019
CN	102197052	A	21 September 2011	EP	2356151	A1	17 August 2011
				LT	PA2018002	I1	12 February 2018
				IL	211726	D0	30 June 2011
				JP	6608505	B2	20 November 2019
				HR	P20181148	T1	21 September 2018
				CN	106267190	A	04 January 2017
				TW	201615216	A	01 May 2016
				PH	12014500462	A1	01 June 2015
				SI	3064511	T1	31 August 2018
				NZ	596093	A	30 November 2012
				US	7608693	B2	27 October 2009
				MX	356882	B	19 June 2018
				SI	EP2356151	T1	31 July 2013
				LT	3064511	T	10 July 2018
				WO	2010053751	A1	14 May 2010
				JP	2020007378	A	16 January 2020
				LU	C00059	I1	03 January 2018
				MA	32802	B1	01 November 2011
				CL	2009002004	A1	05 March 2010
				MX	2011003346	A	21 April 2011
				EP	2511300	A2	17 October 2012
				HU	S1800014	I1	28 March 2018
				CO	6362024	A2	20 January 2012
				DK	3064511	T3	16 July 2018
				HN	2011001210	A	22 October 2013
				TW	I658833	B	11 May 2019
				LU	C00059	I2	28 March 2018
				BR	PI0919853	A2	15 March 2016
				AU	2009311496	B2	29 May 2014
				JP	2012507294	A	29 March 2012
				EP	3064511	A1	07 September 2016
				EP	2511300	A3	07 November 2012
				JP	2019055963	A	11 April 2019
				US	2010047254	A1	25 February 2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/097686

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		JP 5844772 B2	20 January 2016
		NI 201100064 A	02 November 2011
		EP 3351560 A1	25 July 2018
		ES 2404206 T3	24 May 2013
		JP 6449125 B2	09 January 2019
		US 8735095 B2	27 May 2014
		LT C2356151 I2	10 April 2019
		TW 201919700 A	01 June 2019
		CA 2737044 C	28 February 2017
		PT 3064511 T	17 July 2018
		US 2018179288 A1	28 June 2018
		SI 2356151 T1	31 July 2013
		PT 2356151 E	07 May 2013
		KR 101599706 B1	04 March 2016
		CY 1114123 T1	27 July 2016
		US 2014271681 A1	18 September 2014
<hr/>			
CN	105753987	A	13 July 2016
			None
<hr/>			

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 11/02(2006.01)i; A61P 11/06(2006.01)i; A61P 17/00(2006.01)i; A61P 37/08(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; C12N; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNMED; CNABS; CPEA; TWEMED; DWPI; SIPOABS; EPOQUE; CNKI; ISI; ELSEVEVER; NCBI; PUBMED; GOOGLE; GenBank; EMBL; STN; 万方; 中国专利生物序列检索系统数据库检索词: 白细胞介素4受体, 白介素4受体, IL-4R, 抗体, interleukin-4 receptor, antibody, SEQ ID NOS:1-16</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 108373505 A (北京智仁美博生物科技有限公司) 2018年 8月 7日 (2018 - 08 - 07) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107474134 A (苏州康乃德生物医药有限公司) 2017年 12月 15日 (2017 - 12 - 15) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102197052 A (瑞泽恩制药公司) 2011年 9月 21日 (2011 - 09 - 21) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105753987 A (贵阳中医学院) 2016年 7月 13日 (2016 - 07 - 13) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 108373505 A (北京智仁美博生物科技有限公司) 2018年 8月 7日 (2018 - 08 - 07) 参见全文	1-10	A	CN 107474134 A (苏州康乃德生物医药有限公司) 2017年 12月 15日 (2017 - 12 - 15) 参见全文	1-10	A	CN 102197052 A (瑞泽恩制药公司) 2011年 9月 21日 (2011 - 09 - 21) 参见全文	1-10	A	CN 105753987 A (贵阳中医学院) 2016年 7月 13日 (2016 - 07 - 13) 参见全文	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
A	CN 108373505 A (北京智仁美博生物科技有限公司) 2018年 8月 7日 (2018 - 08 - 07) 参见全文	1-10															
A	CN 107474134 A (苏州康乃德生物医药有限公司) 2017年 12月 15日 (2017 - 12 - 15) 参见全文	1-10															
A	CN 102197052 A (瑞泽恩制药公司) 2011年 9月 21日 (2011 - 09 - 21) 参见全文	1-10															
A	CN 105753987 A (贵阳中医学院) 2016年 7月 13日 (2016 - 07 - 13) 参见全文	1-10															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2020年 8月 27日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2020年 9月 23日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>马岚</p> <p>电话号码 86-(10)-62412181</p>															

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 9-10
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 虽然权利要求9-10涉及疾病的治疗方法（PCT实施细则第39.1(iv)），但仍对权利要求中所述的抗体或其抗原结合片段、核酸在检测或诊断疾病，以及制备预防或治疗相关疾病的药物组合物中的应用进行了检索。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/097686

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	108373505	A	2018年 8月 7日	CN	108373505	B	2019年 8月 20日
				WO	2019200787	A1	2019年 10月 24日
CN	107474134	A	2017年 12月 15日	EP	3470430	A4	2020年 6月 3日
				BR	112018074325	A2	2019年 10月 1日
				WO	2017211319	A1	2017年 12月 14日
				AU	2017276473	A1	2019年 1月 3日
				EP	3470430	A1	2019年 4月 17日
				PH	12018502544	A1	2019年 10月 7日
				CA	3026568	A1	2017年 12月 14日
				IL	263268	D0	2018年 12月 31日
				ZA	201808209	B	2019年 9月 25日
				KR	20190015757	A	2019年 2月 14日
				MX	2018014941	A	2019年 3月 7日
				SG	11201810855V	A	2019年 1月 30日
				US	2019177408	A1	2019年 6月 13日
				JP	2019520816	A	2019年 7月 25日
CN	102197052	A	2011年 9月 21日	EP	2356151	A1	2011年 8月 17日
				LT	PA2018002	I1	2018年 2月 12日
				IL	211726	D0	2011年 6月 30日
				JP	6608505	B2	2019年 11月 20日
				HR	P20181148	T1	2018年 9月 21日
				CN	106267190	A	2017年 1月 4日
				TW	201615216	A	2016年 5月 1日
				PH	12014500462	A1	2015年 6月 1日
				SI	3064511	T1	2018年 8月 31日
				NZ	596093	A	2012年 11月 30日
				US	7608693	B2	2009年 10月 27日
				MX	356882	B	2018年 6月 19日
				SI	EP2356151	T1	2013年 7月 31日
				LT	3064511	T	2018年 7月 10日
				WO	2010053751	A1	2010年 5月 14日
				JP	2020007378	A	2020年 1月 16日
				LU	C00059	I1	2018年 1月 3日
				MA	32802	B1	2011年 11月 1日
				CL	2009002004	A1	2010年 3月 5日
				MX	2011003346	A	2011年 4月 21日
				EP	2511300	A2	2012年 10月 17日
				HU	S1800014	I1	2018年 3月 28日
				CO	6362024	A2	2012年 1月 20日
				DK	3064511	T3	2018年 7月 16日
				HN	2011001210	A	2013年 10月 22日
				TW	1658833	B	2019年 5月 11日
				LU	C00059	I2	2018年 3月 28日
				BR	PI0919853	A2	2016年 3月 15日
				AU	2009311496	B2	2014年 5月 29日
				JP	2012507294	A	2012年 3月 29日
				EP	3064511	A1	2016年 9月 7日
				EP	2511300	A3	2012年 11月 7日
				JP	2019055963	A	2019年 4月 11日
				US	2010047254	A1	2010年 2月 25日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/097686

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		JP 5844772 B2	2016年 1月 20日
		NI 201100064 A	2011年 11月 2日
		EP 3351560 A1	2018年 7月 25日
		ES 2404206 T3	2013年 5月 24日
		JP 6449125 B2	2019年 1月 9日
		US 8735095 B2	2014年 5月 27日
		LT C2356151 I2	2019年 4月 10日
		TW 201919700 A	2019年 6月 1日
		CA 2737044 C	2017年 2月 28日
		PT 3064511 T	2018年 7月 17日
		US 2018179288 A1	2018年 6月 28日
		SI 2356151 T1	2013年 7月 31日
		PT 2356151 E	2013年 5月 7日
		KR 101599706 B1	2016年 3月 4日
		CY 1114123 T1	2016年 7月 27日
		US 2014271681 A1	2014年 9月 18日
.....
CN 105753987 A	2016年 7月 13日	无	
.....