(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110872349 A
(43)申请公布日 2020.03.10

(21)申请号 201811023880.9

(22)申请日 2018.09.04

(71)申请人 三生国健药业(上海)股份有限公司
地址 201203 上海市浦东新区自由贸易试验区李冰路399号

(72)发明人 赵杰 蒋良丰 陈臣 吴惠玲 黄玉平 黄浩旻 朱祯平

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 17/00(2006.01)
A61P 37/08(2006.01)
A61P 11/06(2006.01)
A61P 1/00(2006.01)
A61P 31/00(2006.01)
A61P 11/02(2006.01)

权利要求书2页 说明书14页
序列表12页 附图13页

(54)发明名称

结合人IL-4R的抗体、其制备方法和用途

(57)摘要

本发明公开了一系列结合人IL-4R的抗体，它们具有相同的可变区和不同的恒定区，其可变区能够特异性与人IL-4R结合，恒定区通过独特的机制影响整个抗体的活性。上述一系列抗体可应用于制备治疗IL-4R过表达的疾病(例如特应性皮炎、哮喘等)的药物，具有良好的临床应用前景。

CN 110872349 A

1.结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,包括:

(a)重链互补决定区HCDR1、HCDR2、HCDR3,所述的HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,所述的HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示,所述的HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示,和

(b)轻链互补决定区LCDR1、LCDR2、LCDR3,所述的LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示,所述的LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,所述的LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示。

2.如权利要求1所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述的抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

3.如权利要求2所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述的抗体为单克隆抗体。

4.如权利要求1所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述的抗体为鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

5.如权利要求1所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述的抗体为IgG1型抗体或IgG4型抗体。

6.如权利要求1所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述的抗原结合片段包括Fab片段、F(ab')2片段、Fv片段。

7.如权利要求1所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段能够阻断IL-4与IL-4R之间的相互作用。

8.如权利要求1所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示;或所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示。

9.如权利要求8所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段的重链的氨基酸序列如SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17所示,轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示。

10.如权利要求1-9中任一项所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段包括Fc段,所述的Fc段包括如下突变位点:S267E和L328F。

11.核苷酸序列,其特征在于,所述的核苷酸序列编码如1-10中任一项所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段。

12.如权利要求11所述的核苷酸序列,其特征在于,所述的核苷酸序列编码重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示,编码轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示;或所述的核苷酸序列编码重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:12所示,编码轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:14所示。

13.表达载体,其特征在于,所述的表达载体含有如权利要求11或12所述的核苷酸序列。

14.宿主细胞,其特征在于,所述的宿主细胞含有如权利要求13所述的表达载体。

15.如权利要求1-10中任一项所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段的制备方法,所述方法包括以下步骤:

(a)在表达条件下,培养如权利要求14所述的宿主细胞,从而表达所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段;

(b)分离并纯化(a)所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段。

16.药物组合物,其特征在于,所述药物组合物含有如权利要求1-10中任一项所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体。

17.如权利要求1-10中任一项所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段或如权利要求16所述的药物组合物在制备治疗IL-4R过表达的疾病的药物中的用途。

18.如权利要求17所述的用途,其特征在于,所述的IL-4R过表达的疾病包括特应性皮炎、哮喘、过敏反应、嗜酸性食道炎、皮肤感染、鼻息肉症。

19.用于提高如权利要求1-9中任一项所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段的活性的方法,所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段包括Fc段,其特征在于,所述的Fc段包括如下突变位点:S267E和L328F。

结合人IL-4R的抗体、其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体领域，更具体地，本发明公开了一种结合人IL-4R的抗体、其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 白细胞介素-4受体(interleukin-4 receptor，IL-4R)是由α链及γc链组成的异二聚体；其中α链(IL-4Rα)能够特异结合白细胞介素-4(IL-4)，然后再与γc链形成三元复合体，转导IL-4促进增殖及基因转录激活的信号。白细胞介素-13受体(interleukin-13 receptor，IL-13R)是由IL-13Rα1链及IL-4Rα链组成的异二聚体；其中IL-13Rα1能够特异结合白细胞介素-13，然后再与IL-4Rα链形成三元复合体，转导IL-13促进增殖及基因转录激活的信号。IL-4和IL-13在过敏性皮炎和哮喘等过敏性疾病的病理机制中起重要作用。

[0003] DUPIXENT® (Dupilumab)注射液是目前已上市的以IL-4Rα链为靶点的单克隆抗体药物，由Regeneron Pharmaceuticals(再生元公司)和Sanofi-aventis(赛诺菲公司)共同开发。Dupilumab是一种全人IgG4型单克隆抗体，分子量约147kDa，能够特异性地结合至被IL-4和IL-13受体复合物共享的IL-4Rα亚单位，从而抑制IL-4和IL-13细胞因子介导的炎症反应。Dupilumab分别于2017年3月28日、2017年9月27日和2018年1月19日获得美国FDA、欧洲EMA和日本PMDA批准上市。DUPIXENT®批准的适应症为患有局部治疗不可控或治疗不当的中度至重度特应性皮炎的成年患者的治疗，可以与或不与局部皮质类固醇共同使用。

[0004] 最近的两项三期试验(Castro M,Corren J,Pavord I D,et al.Dupilumab efficacy and safety in moderate-to-severe uncontrolled asthma[J].New England Journal of Medicine,2018;378:2486-2496,DOI:10.1056/NEJMoa1804092)显示，接受dupilumab治疗的患者比接受安慰剂的对照组患者的严重哮喘恶化率显著降低，同时也有更好的肺功能和哮喘控制；在嗜酸性粒细胞水平较高的患者中，获益更加明显。基于上述临床试验结果，美国食品和药物管理局(FDA)已经接受了dupilumab作为对某些患有中度至重度哮喘的成人和青少年(12岁及以上)的附加维持治疗的补充生物许可申请(sBLA)。

[0005] 目前，dupilumab已获FDA批准上市，用于治疗特应性皮炎，后续还可能被批准用于治疗中度至重度哮喘。然而，仍亟待开发新型、特异、高效的以IL-4Rα为靶点的药物填补国内同类药物市场空白，从而能够改善我国患有过敏性自身免疫疾病人群的生活质量，造福国内患者。

发明内容

[0006] 为了解决上述技术问题，本发明的发明人进行了大量试验，从抗原免疫、杂交瘤筛选、抗体表达纯化到生物活性鉴定，筛选获得了一个特异性结合人IL-4R的鼠源4-2号抗体，并在此基础上，进一步构建获得其嵌合抗体4-2-Chimeric-IgG1以及人源化抗体4-2-Humanized-IgG1和4-2-Humanized-IgG4。实验结果表明嵌合抗体4-2-Chimeric-IgG1以及人源化抗体4-2-Humanized-IgG1和4-2-Humanized-IgG4能够有效地阻断IL-4与IL-4R之间

的相互作用,且具有抑制IL-4诱导的TF-1细胞增殖和人外周血单个核细胞(PBMC)表达CD23和分泌IgE的活性。因此,本发明开发的结合人IL-4R的抗体可用于制备IL-4R过表达疾病患者的治疗药物。

[0007] 因此,本发明的第一个目的在于提供一种结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段。

[0008] 本发明的第二个目的在于提供编码所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列。

[0009] 本发明的第三个目的在于提供含有所述核苷酸序列的表达载体。

[0010] 本发明的第四个目的在于提供含有所述表达载体的宿主细胞。

[0011] 本发明的第五个目的在于提供所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段的制备方法。

[0012] 本发明的第六个目的在于提供含有所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段的药物组合物。

[0013] 本发明的第七个目的在于提供所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段或所述的药物组合物的用途。

[0014] 本发明的第八个目的在于提供用于提高所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段的活性的方法。

[0015] 为了实现上述目的,本发明采用了如下技术方案:

[0016] 本发明的第一个方面提供了一种结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段,包括:

[0017] (a)重链互补决定区HCDR1、HCDR2、HCDR3,所述的HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,所述的HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示,所述的HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示,和

[0018] (b)轻链互补决定区LCDR1、LCDR2、LCDR3,所述的LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示,所述的LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,所述的LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示。

[0019] 根据本发明,所述的抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。优选的,所述的抗体为单克隆抗体。

[0020] 根据本发明,所述的抗体为鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体等。

[0021] 根据本发明,所述的抗体为IgG1型抗体或IgG4型抗体。

[0022] 根据本发明,所述的抗原结合片段包括Fab片段、F(ab')2片段、Fv片段等。

[0023] 根据本发明,所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段能够阻断IL-4与IL-4R之间的相互作用。

[0024] 根据本发明的优选实施例,所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示;或所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示。

[0025] 根据本发明的优选实施例,所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段的重链的氨基酸序列如SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17所示,轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示。

[0026] 根据本发明的优选实施例,所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段包括Fc

段,所述的Fc段包括如下突变位点:S267E和L328F。

[0027] 本发明的第二个方面提供了一种核苷酸序列,所述的核苷酸序列编码如上任一项所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段。

[0028] 根据本发明的优选实施例,所述的核苷酸序列编码重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示,编码轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示;或所述的核苷酸序列编码重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:12所示,编码轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:14所示。

[0029] 本发明的第三个方面提供了一种表达载体,所述的表达载体含有如上任一项所述的核苷酸序列。

[0030] 本发明的第四个方面提供了一种宿主细胞,所述的宿主细胞含有如上所述的表达载体。

[0031] 本发明的第五个方面提供了如上所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段的制备方法,所述方法包括以下步骤:

[0032] (a)在表达条件下,培养如上所述的宿主细胞,从而表达所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段;

[0033] (b)分离并纯化(a)所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段。

[0034] 本发明的第六个方面提供了一种药物组合物,所述药物组合物含有如上任一项所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体。

[0035] 本发明的第七个方面提供了如上任一项所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段或如上所述的药物组合物在制备治疗IL-4R过表达的疾病的药物中的用途。

[0036] 根据本发明的优选实施例,所述的IL-4R过表达的疾病包括特应性皮炎、哮喘、过敏反应、嗜酸性食道炎、皮肤感染、鼻息肉症等。

[0037] 本发明的第八个目的在于提供用于提高如上任一项所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段的活性的方法,所述的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段包括Fc段,其特征在于,所述的Fc段包括如下突变位点:S267E和L328F。

[0038] 有益效果:

[0039] 本发明制备了一系列结合人IL-4R的抗体,它们具有相同的可变区和不同的恒定区,其可变区能够特异性与人IL-4R结合,恒定区通过独特的机制影响整个抗体的活性。上述一系列抗体可应用于制备治疗IL-4R过表达的疾病(例如特应性皮炎、哮喘等)的药物,具有良好的临床应用前景。

附图说明

[0040] 图1为采用TF-1细胞检测IL-4R-ECD-hFc和IL-4R-ECD-FLAG对IL-4诱导的TF-1细胞增殖的抑制作用的结果。

[0041] 图2为采用ELISA检测纯化的鼠源抗人IL-4R单克隆抗体对IL-4R抗原的相对亲和力的结果。

[0042] 图3为采用TF-1细胞检测纯化的鼠源抗人IL-4R单克隆抗体对IL-4诱导的TF-1细胞增殖的抑制作用的结果。

[0043] 图4为采用ELISA检测4-2-Chimeric-IgG1和4-2-Humanized-IgG1对IL-4R抗原的

相对亲和力的结果。

[0044] 图5为采用TF-1细胞检测4-2-Chimeric-IgG1和4-2-Humanized-IgG1对IL-4诱导的TF-1细胞增殖的抑制作用的结果。

[0045] 图6为采用TF-1细胞检测4-2-Chimeric-IgG1和4-2-Humanized-IgG1对IL-13诱导的TF-1细胞增殖的抑制作用的结果。

[0046] 图7为采用TF-1细胞检测4-2-Humanized-IgG1和4-2-Humanized-IgG4对IL-4诱导的TF-1细胞增殖的抑制作用的结果。

[0047] 图8为采用ELISA检测4-2-Humanized-IgG1、4-2-Humanized-IgG4和4-2-Humanized-IgG1-SELF对IL-4和IL-4R相互作用的阻断活性的结果。

[0048] 图9为采用TF-1细胞检测4-2-Humanized-IgG1、4-2-Humanized-IgG4、4-2-Humanized-IgG1-SELF和4-2-Humanized-IgG4-SELF对IL-4诱导的TF-1细胞增殖的抑制作用的结果。

[0049] 图10为采用PBMC检测4-2-Humanized-IgG1、4-2-Humanized-IgG4和4-2-Humanized-IgG1-SELF对IL-4诱导PBMC表达CD23的抑制作用的结果。

[0050] 图11为采用PBMC检测4-2-Humanized-IgG1、4-2-Humanized-IgG4和4-2-Humanized-IgG1-SELF对IL-4诱导PBMC分泌IgE的抑制作用的结果。

[0051] 图12为4-2-Humanized-IgG4的药代动力学研究的结果。

具体实施方式

[0052] 本发明中，术语“抗体(Ab)”和“免疫球蛋白G(IgG)”是有相同结构特征的约150000道尔顿的异四聚糖蛋白，其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连，而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH)，其后是恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL)，另一端有恒定区；轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对，轻链的可变区与重链的可变区相对。本发明的抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)、抗体的抗原结合片段等。本发明的抗体包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体等。

[0053] 本发明中，术语“单克隆抗体(单抗)”指从一类基本均一的群体获得的抗体，即该群体中包含的单个抗体是相同的，除少数可能存在的天然发生的突变外。单克隆抗体高特异性地针对单个抗原位点。而且，与常规多克隆抗体制剂(通常是具有针对不同决定簇的不同抗体)不同，各单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性外，单克隆抗体的好处还在于它们是通过杂交瘤培养来合成的，不会被其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示了抗体的特性，是从基本均一的抗体群中获得的，这不应被解释成需要用任何特殊方法来生产抗体。

[0054] 本发明中，术语“鼠源抗体”是指来源于大鼠或小鼠的抗体，优选小鼠。本发明的鼠源抗体为使用人IL-4R的胞外域为抗原免疫小鼠并进行杂交瘤细胞筛选获得。优选的，本发明的鼠源抗体为4-2号抗体。

[0055] 本发明中，术语“嵌合抗体”是指包含来源于一个物种的重和轻链可变区序列以及来源于另一个物种的恒定区序列的抗体，例如具有与人恒定区连接的鼠重和轻链可变区的

抗体。优选的，本发明的嵌合抗体是由鼠源抗体4-2号抗体的重链可变区序列和轻链可变区序列与人的恒定区拼接获得。更优选的，本发明的嵌合抗体的重链由鼠源抗体4-2号抗体的重链可变区序列与人的IgG1或IgG4(S228P)恒定区拼接获得，轻链由鼠源抗体4-2号抗体的轻链可变区序列与人的kappa链拼接获得。最优选的，本发明的嵌合抗体为4-2-Chimeric-IgG1。

[0056] 本发明中，术语“人源化抗体”是指其CDR来源于非人物种(优选小鼠)抗体，抗体分子中残余的部分(包括框架区和恒定区)来源于人抗体。此外，框架区残基可被改变以维持结合亲和性。优选的，本发明的人源化抗体由鼠源抗体4-2号抗体的CDR区和来源自人抗体的非CDR区重组，并对包埋残基、与CDR区有直接相互作用的残基，以及对4-2号抗体的VL和VH的构象有重要影响的残基进行回复突变获得。更优选的，本发明的人源化抗体包括4-2-Humanized-IgG1和4-2-Humanized-IgG4。

[0057] 本发明中，术语“抗原结合片段”是指能够与人IL-4R表位特异性结合的抗体的片段。本发明的抗原结合片段的例子包括Fab片段、F(ab')2片段、Fv片段等。Fab片段是用木瓜蛋白酶消化抗体产生的片段。F(ab')2片段是用胃蛋白酶消化抗体产生的片段。Fv片段是由抗体的重链可变区和轻链可变区紧密非共价关联的二聚物组成。

[0058] 本发明中，术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同，它形成各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而，可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区，它们大致上呈β-折叠构型，由形成连接环的三个CDR相连，在某些情况下可形成部分β折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位(参见Kabat等，NIH Publ.No.91-3242，卷I，647-669页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但是它们表现出不同的效应功能，例如参与抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(ADCC，antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)等。

[0059] 本发明中，术语“Fc段”是指木瓜蛋白酶可将抗体裂解为两个完全相同的Fab段和一个Fc段，Fc段即可结晶片段(fragment crystallizable，Fc)，由抗体的CH2和CH3结构域组成。Fc段无抗原结合活性，是抗体与效应分子或细胞相互作用的部位。

[0060] 本发明中，术语“结合人IL-4R的抗体”或“抗人IL-4R抗体”是指与人IL-4R特异性结合的抗体。优选的，所述的人IL-4R为人IL-4R的胞外域。更优选的，所述的人IL-4R的胞外域具有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。优选的，本发明的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段能够阻断IL-4和IL-4R之间的相互作用。

[0061] 本发明中，术语“表达载体”可以为pTT5，pSECtag系列，pCGS3系列，pCDNA系列载体等，以及其它用于哺乳动物表达系统的载体等，表达载体中包括连接有合适的转录和翻译调节序列的融合DNA序列。

[0062] 本发明中，术语“宿主细胞”是指适用于表达上述表达载体的细胞，可以是真核细胞，如哺乳动物或昆虫宿主细胞培养系统均可用于本发明的融合蛋白的表达，CHO(中国仓鼠卵巢，Chinese Hamster Ovary)，HEK293，COS、BHK等及上述细胞的衍生细胞均可适用于本发明。

[0063] 本发明中，术语“药物组合物”是指本发明的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片

段可以和药学上可以接受的载体一起组成药物制剂组合物从而更稳定地发挥疗效，这些制剂可以保证本发明公开的结合人IL-4R的抗体或其抗原结合片段的氨基酸核心序列的构像完整性，同时还保护蛋白质的多官能团防止其降解(包括但不限于凝聚、脱氨或氧化)。

[0064] 本发明中，术语“IL-4R过表达的疾病”是指处于异常疾病状态的细胞中IL-4R的表达水平高于相同组织类型的正常细胞中的IL-4R表达水平。本发明的IL-4R过表达的疾病包括但不限于：特应性皮炎、哮喘、过敏反应、嗜酸性食道炎、皮肤感染、鼻息肉症等。

[0065] 以下实施例、实验例是对本发明进行进一步的说明，不应理解为对本发明的限制。实施例不包括对传统方法的详细描述，如那些用于构建载体和质粒的方法，将编码蛋白的基因插入到这样的载体和质粒的方法或将质粒引入宿主细胞的方法。这样的方法对于本领域中具有普通技术的人员是众所周知的，并且在许多出版物中都有所描述，包括Sambrook,J.,Fritsch,E.F.and Maniais,T.(1989)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,2nd edition,Cold spring Harbor Laboratory Press。

[0066] 实施例1鼠源抗人IL-4R单克隆抗体的筛选和制备

[0067] 实施例1.1 IL-4R抗原以及阳性对照抗体Dupilumab的制备

[0068] 作为抗原的人IL-4Rα胞外域(IL-4R-ECD)序列来自于http://www.uniprot.org，氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。该氨基酸序列经过密码子优化后，全基因合成并连接至原核克隆载体。用重组PCR法在IL-4R-ECD编码区的末端添加一个hFc(IgG1)或FLAG标签，将基因重组之后构建到pTT5瞬时转染载体(购自NRC biotechnology Research Institute)中。将上述载体按照标准操作流程转染到HEK293细胞(购自NRC biotechnology Research Institute)中，在Freestyle 293Expression Medium(购自Gibco)培养基中进行培养，5天之后从细胞培养上清中纯化表达的IL-4R-ECD-hFc和IL-4R-ECD-FLAG抗原。上述抗原分别用protein A和anti-FLAG亲和层析柱进行纯化。

[0069] 阳性对照抗体Dupilumab的重链和轻链的序列来自WHO Drug Information(2013,27(3):284-285)，该抗体的重链可变区和轻链可变区基因合成之后，分别与人重链IgG4(S228P)和轻链Kappa恒定区重组，并分别构建到pTT5瞬转表达载体中，用HEK293E系统表达，用Protein A亲和层析纯化。

[0070] 上述蛋白纯化完毕后，采用TF-1细胞检测IL-4R-ECD-hFc、IL-4R-ECD-FLAG和Dupilumab对IL-4诱导TF-1细胞增殖的抑制作用的能力。处于对数生长期的TF-1细胞(购买自ATCC)用37℃预热的RPMI1640完全培养基(RPMI1640基础培养基(购自Gibco)中含有10％胎牛血清)洗2遍，1000rpm，离心5min；TF-1细胞计数，用含RPMI1640完全培养基悬浮到适当密度，接种到96孔板中，10000个/150μl/孔；在RPMI1640完全培养基中加入IL-4(购自R&D systems)使其浓度达到80ng/ml；然后用加有IL-4的培养基将人IL-4R抗原和阳性对照抗体Dupilumab稀释到适当浓度，然后按照适当倍率稀释9个梯度；将稀释好的抗原和抗体加入96孔细胞培养板中，50μl/孔；96孔板周围用200μl/孔的蒸馏水补齐；在37℃、5％CO_2条件的孵箱中孵育培养4天；4天后在96孔板中每孔加入20μl CCK-8(购自Dojindo)溶液，在37℃孵箱中继续培养8h；震荡混匀后用酶标仪(SpectraMax 190,Molecular Devices)读取OD450值；GraphPad Prism6进行数据分析，作图并计算IC50。

[0071] 结果如图1所示，IL-4R-ECD-hFc、IL-4R-ECD-FLAG和Dupilumab均能有效抑制IL-4诱导TF-1细胞增殖，IC50分别是280.2ng/ml、315.1ng/ml和502.8ng/ml。

[0072] 实施例1.2抗原免疫小鼠

[0073] 将实施例1.1中制备的IL-4R-ECD-hFc抗原用生理盐水稀释成到合适的浓度，与等体积的弗氏完全佐剂混合，并经超声乳化完全后对4-5周龄的Balb/c小鼠(购自上海灵畅生物科技有限公司，动物生产许可证号：SCXK(沪)2013-0018)进行皮下多点注射，每只小鼠注射50μg抗原/100μl。三周后，等量蛋白与等体积弗氏不完全佐剂混合，超声乳化完全后对小鼠进行皮下多点免疫，两周后再次重复此免疫步骤。所有小鼠在第三次免疫后的第七天取一滴血，分离血清，利用ELISA进行血清滴度的检测。对于血清抗体效价>100000的小鼠，在滴度测定后一周进行冲击免疫：尾静脉注射10μg抗原蛋白/100μl生理盐水/鼠。

[0074] 其中，利用ELISA进行血清滴度检测的方法说明如下：用碳酸钠缓冲液(1.59g Na_2CO_3和2.93g $NaHCO_3$溶于1L纯水中)将IL-4R-ECD-hFc稀释至1000ng/ml，然后100μl每孔加入ELISA板中；室温孵育4小时；用含0.05％Tween-20的磷酸盐缓冲液(简写为PBST：KH_2PO_4 0.2g，$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.9g，NaCl 8.0g，KCl 0.2g，Tween-20 0.5ml，加纯水至1000ml)洗板；每孔加入含有1％牛血清白蛋白(BSA)的PBST进行封闭；用PBST洗板，加入梯度稀释的小鼠血清，孵育适当时间；用PBST洗板，加入适当稀释的HRP标记的羊抗鼠二抗，孵育适当时间；洗板后加入显色液(底物显色A液：醋酸钠·三水13.6g，柠檬酸·一水1.6g，30％双氧水0.3ml，纯水500ml；底物显色B液：乙二胺四乙酸二钠0.2g，柠檬酸·一水0.95g，甘油50ml，TMB：0.15g溶于3ml DMSO中，纯水500ml；使用前A和B液等体积混匀)进行显色，用终止液(2M硫酸溶液)终止显色反应；用酶标仪读取OD450；用GraphPad Prism6进行数据分析，作图并计算血清滴度。

[0075] 实施例1.3杂交瘤的制备和筛选

[0076] 小鼠冲击免疫三天后取脾细胞进行融合。生长状态良好的杂交瘤sp2/0细胞(来源自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)在37℃、5％CO_2孵箱中培养，融合前一天换液。融合与筛选过程如下：取小鼠脾脏，研磨洗涤后计数。按照脾细胞：sp2/0细胞＝2:1混合两种细胞，1500rpm离心7分钟。洗去上清液。以1000rpm离心5min的条件，加入20ml细胞融合缓冲液(购自BTX)洗涤细胞三次。细胞沉淀以1×10^7个/ml的密度悬浮于细胞融合缓冲液中。加2ml细胞悬液于融合池中，置于电融合仪ECM2001上，30秒内按一定条件(AC 60V，30S；DC 1700V，40μS，3X；POST AC 60V，3S)进行电融合。电融合后轻轻地将融合细胞转移至37度预热的含有10％血清(购自Gibco)的RPMI1640培养基中，室温继续放置60min。100μl/孔，将细胞按10^4个/孔接种入96孔板。次日每孔补加100μl的含有2×HAT(购自Gibco)和10％血清的RPMI1640培养基。于融合后第四天用新鲜的含有1×HAT和RPMI1640培养基置换一半旧培养液。于融合后第七天用新鲜的含有1×HAT和RPMI1640培养基置换大部分旧培养液。于融合后第九天取样进行ELISA检测。挑选出阳性杂交瘤克隆于24孔板中扩大培养并通过有限稀释法进行亚克隆。通过前述方法获得稳定表达目的抗体的杂交瘤株，对这些克隆进行扩增和细胞冻存。前述杂交瘤株用无血清培养基HybriGRO SF(购自Corning)培养7天，然后用Protein A/G亲和层析柱从培养上清中纯化鼠源抗人IL-4R单克隆抗体。

[0077] ELISA检测实验方法参见实施例1.2。区别在于将IL-4R-ECD-hFc更换为IL-4R-ECD-FLAG。

[0078] 实施例1.4 ELISA检测

[0079] 本实施例用ELISA方法检测纯化的鼠源抗人IL-4R单克隆抗体对IL-4R抗原的相对

亲和力。

[0080] 实验方法参见实施例1.2。区别在于用碳酸钠缓冲液将IL-4R-ECD-hFc稀释至100ng/ml,其中,使用的阴性对照抗体是不结合人IL-4R的鼠源抗体。

[0081] 结果如图2所示,根据EC50数据,选择具有较高相对亲和力的抗体,推进到下一个筛选环节。

[0082] 实施例1.5 IL-4诱导的TF-1细胞增殖的抑制作用

[0083] 本实施例采用TF-1细胞检测纯化的鼠源抗人IL-4R单克隆抗体对IL-4诱导的TF-1细胞增殖的抑制作用。

[0084] 实验方法参见实施例1.1。

[0085] 结果如图3所示,根据IC50数据,选择具有较强对IL-4诱导的TF-1细胞增殖的抑制作用能力的单克隆抗体,推进到下一步实验。

[0086] 实施例2鼠源抗人IL-4R单克隆抗体的人源化

[0087] 实施例2.1鼠源抗人IL-4R单克隆抗体可变区序列的确定

[0088] 根据实施例1.4和1.5中ELISA和细胞水平的功能实验筛选结果,最终挑取了21号、31号、40号和4-2号克隆作为先导抗体。使用Trizol(购自Life technologies)从四个单抗对应的杂交瘤单克隆细胞株中提取总RNA,用逆转录试剂盒(购自Takara公司)将mRNA逆转录成cDNA,通过文献报道的组合引物(《Antibody Engineering》Volume1,Edited by Roland Kontermann and Stefan Dübel,组合引物的序列来自第323页)用PCR扩增鼠源的抗人IL-4R单克隆抗体的轻链可变区和重链可变区基因,然后将PCR产物克隆入pMD18-T载体,测序并分析可变区基因序列。对各个克隆的可变区序列进行对比分析后发现,4-2号抗体的序列比较适合进行人源化,因此选择4-2号克隆作为最终的候选抗体。其序列信息如下:重链可变区基因序列全长360bp,编码120个氨基酸残基,核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示;轻链可变区基因序列全长318bp,编码106个氨基酸残基,核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示。在GenBank中对氨基酸序列进行比对分析,二者均符合小鼠IgG可变区基因的特征。

[0089] 实施例2.2鼠源抗人IL-4R单克隆抗体的人源化

[0090] 对上述轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列进行分析,依据Kabat规则确定4-2号抗体的3个抗原互补决定区(CDR)和4个框架区(FR)。其中,重链互补决定区的氨基酸序列为HCDR1:DDYIN(SEQ ID NO:6)、HCDR2:WIFPGNGNSYYNEKFKD(SEQ ID NO:7)和HCDR3:GLVRYRALFDY(SEQ ID NO:8),轻链互补决定区的氨基酸序列为LCDR1:RASSSINYMH(SEQ ID NO:9)、LCDR2:AASNLAS(SEQ ID NO:10)和LCDR3:QQWSSYPIT(SEQ ID NO:11)。

[0091] 通过在NCBI IgBlast与人IgG胚系序列(Germline)进行同源性比较,选择IGHV1-3*01为重链CDR移植模板,将鼠源的4-2号抗体的重链CDR移植入IGHV1-3*01骨架区,构建成重链CDR移植抗体。同样地,经过与人IgG胚系序列同源性比较,选择IGKV1-16*01为轻链CDR移植模板,将鼠源4-2号抗体的轻链CDR移植入IGKV1-16*01的骨架区,构建成轻链的CDR移植抗体,所得的抗体定义为4-2-Grafted。同时,在此基础上,对一些框架区的氨基酸位点进行了回复突变,回复突变就是将人源框架区的某些氨基酸突变成鼠源框架区同一位置的氨基酸。在进行回复突变时,将氨基酸序列进行了Kabat编码,位点的位置由Kabat码指示。优选的,对于重链可变区序列,将Kabat编码第48位的M回复为鼠源的V,第67位的V回复为A,第

69位的I回复为L,第71位的R回复为V,第73位的T回复为K,第91位的Y回复为F。对于轻链可变区序列,将Kabat编码第36位的F回复为Y,第46位的S回复为P,第47位的L回复为W。上述可变区基因序列由苏州金唯智公司按照Cricetulus griseus的密码子使用偏好进行密码子优化并合成。将合成的人源化重链可变区序列分别与人IgG1和IgG4(S228P)恒定区相连,得到的基因分别命名为4-2-Humanized-IgG1-HC和4-2-Humanized-IgG4-HC;人源化轻链可变区与人Kappa链恒定区相连,得到的基因命名为4-2-Humanized-LC。另外,将鼠源重链可变区序列分别与人IgG1和IgG4(S228P)恒定区相连,得到的基因分别命名为4-2-Chimeric-IgG1-HC和4-2-Chimeric-IgG4-HC;鼠源轻链可变区与人Kappa链恒定区相连,得到的基因命名为4-2-Chimeric-LC。

[0092] 最终,4-2号抗体人源化重链可变区基因序列全长360bp,编码120个氨基酸残基,核苷酸序列如SEQ ID NO:12所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示;人源化轻链可变区基因序列全长318bp,编码106个氨基酸残基,核苷酸序列如SEQ ID NO:14所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示。人源化重链可变区与人IgG1恒定区相连后,最终得到447个氨基酸的4-2-Humanized-IgG1-HC重链(序列如SEQ ID NO:16所示);人源化重链可变区与人IgG4(S228P)恒定区相连后,最终得到447个氨基酸的4-2-Humanized-IgG4-HC重链(序列如SEQ ID NO:17所示);轻链可变区与人Kappa恒定区相连后,得到213个氨基酸的4-2-Humanized-LC轻链(序列如SEQ ID NO:18所示)。

[0093] 上述抗体的轻重链基因构建到pTT5表达载体中,将上述轻重链表达载体组合后利用HEK293E系统(购自NRC biotechnology Research Institute)进行瞬时转染并表达抗体。HEK293细胞在Free Style 293 Expression Medium培养基中培养,利用PEI转染法将质粒转入细胞5天后收取细胞上清,利用Protein A亲和层析后获得纯化抗体。4-2-Humanized-IgG1-HC和4-2-Humanized-IgG4-HC分别与4-2-Humanized-LC组合表达后获得的抗体分别定义为4-2-Humanized-IgG1和4-2-Humanized-IgG4。另外,4-2-Chimeric-IgG1-HC与4-2-Chimeric-LC组合表达后获得的抗体定义为4-2-Chimeric-IgG1。

[0094] 实施例3嵌合抗体4-2-Chimeric-IgG1和人源化抗体4-2-Humanized-IgG1的功能活性的检测

[0095] 实施例3.1 ELISA检测

[0096] 本实施例采用ELISA方法检测4-2-Chimeric-IgG1和4-2-Humanized-IgG1对IL-4R抗原的相对亲和力。

[0097] 实验方法参见实施例1.2。区别在于将IL-4R-ECD-hFc更换为IL-4R-ECD-FLAG,用碳酸钠缓冲液将IL-4R-ECD-FLAG稀释至100ng/ml,其中,使用的阴性对照抗体是不结合人IL-4R的人源化抗体。

[0098] 如图4所示,4-2-Humanized-IgG1、4-2-Chimeric-IgG1和Dupilumab均能有效结合抗原IL-4R-ECD-FLAG,EC50分别是12.39ng/ml、11.81ng/ml和12.52ng/ml。

[0099] 实施例3.2 IL-4诱导的TF-1细胞增殖的抑制作用

[0100] 本实施例采用TF-1细胞检测4-2-Chimeric-IgG1和4-2-Humanized-IgG1对IL-4诱导的TF-1细胞增殖的抑制作用。

[0101] 实验方法参见实施例1.1。其中,使用的阴性对照不含IL-4但含有不结合人IL-4R的阴性对照抗体;阳性对照含有IL-4也含有不结合人IL-4R的阴性对照抗体。

[0102] 如图5所示,Dupilumab、4-2-Chimeric-IgG1和4-2-Humanized-IgG1均能有效抑制IL-4诱导TF-1细胞增殖,IC50分别是289.4ng/ml、225.2ng/ml和207.4ng/ml。

[0103] 实施例3.3 IL-13诱导的TF-1细胞增殖的抑制作用

[0104] 本实施例采用TF-1细胞检测4-2-Chimeric-IgG1和4-2-Humanized-IgG1对IL-13诱导的TF-1细胞增殖的抑制作用。

[0105] 实验方法参见实施例1.1。区别在于将IL-4替换为IL-13,其中,使用的阴性对照不含IL-13但含有不结合人IL-4R的阴性对照抗体;阳性对照含有IL-13也含有不结合人IL-4R的阴性对照抗体。

[0106] 如图6所示,Dupilumab、4-2-Chimeric-IgG1和4-2-Humanized-IgG1均能有效抑制IL-13诱导TF-1细胞增殖,IC50分别是73.8ng/ml、81.6ng/ml和34.3ng/ml。

[0107] 实施例4人源化抗体4-2-Humanized-IgG1和4-2-Humanized-IgG4的功能活性的检测

[0108] 实施例4.1 IL-4诱导的TF-1细胞增殖的抑制作用

[0109] 本实施例采用TF-1细胞检测人源化抗体4-2-Humanized-IgG1和4-2-Humanized-IgG4对IL-4诱导的TF-1细胞增殖的抑制作用。

[0110] 实验方法参见实施例1.1。其中,使用的阴性对照不含IL-4但含有不结合人IL-4R的阴性对照抗体;阳性对照含有IL-4也含有不结合人IL-4R的阴性对照抗体。

[0111] 第一次实验结果如图7-1所示,Dupilumab、4-2-Humanized-IgG1和4-2-Humanized-IgG4抑制IL-4诱导TF-1细胞增殖的IC50分别是841.6ng/ml、560.6ng/ml和1291ng/ml。第二次重复实验结果如图7-2所示,Dupilumab、4-2-Humanized-IgG1和4-2-Humanized-IgG4抑制IL-4诱导TF-1细胞增殖的IC50分别是616.1ng/ml、426.9ng/ml和1113ng/ml。第三次重复实验结果如图7-3所示,Dupilumab、4-2-Humanized-IgG1和4-2-Humanized-IgG4抑制IL-4诱导TF-1细胞增殖的IC50分别是687.1ng/ml、520.4ng/ml和1145ng/ml。三次独立重复实验的功能活性强弱排序一致如下:4-2-Humanized-IgG1>Dupilumab>4-2-Humanized-IgG4。对三次实验结果进行统计分析,发现4-2-Humanized-IgG1和Dupilumab之间存在显著性差异(P=0.026<0.05;统计方法为T-test,P<0.05认为具有统计学上的显著性差异),说明4-2-Humanized-IgG1功能活性强于Dupilumab。

[0112] 实施例4.2 Biacore检测

[0113] 本实施例通过Biacore T200(GE healthcare)检测4-2-Humanized-IgG1和4-2-Humanized-IgG4与IL-4R之间的亲和力。

[0114] 利用氨基偶联试剂盒(购自GE healthcare)中的活化试剂EDC/NHS和封闭试剂Ethanolamine将捕获分子Protein A/G共价偶联至芯片表面;在BiacoreT200上,使用偶联有Protein A/G的CM5芯片捕获IL-4R抗体,再将IL-4R-ECD-FLAG进样,得到结合-解离曲线,用6M盐酸胍再生缓冲液洗脱后重复下一个循环;利用Biacore T200Evaluation Software对数据进行分析。结果如表1所示。

[0115] 表1.4-2-Humanized-IgG1/4对人IL-4R的亲和力检测

[0116]

样品名称	*Kon*（1/Ms）	*Koff*（1/s）	KD（M）
Dupilumab	5.88E+04	3.95E-05	6.71E-10
4-2-Humanized-IgG1	1.86E+05	1.33E-04	7.17E-10
4-2-Humanized-IgG4	1.88E+05	1.30E-04	6.92E-10

[0117] 实验结果显示,4-2-Humanized-IgG1和4-2-Humanized-IgG4对IL-4R的亲和力与阳性抗体Dupilumab基本相当,分别是7.17E-10、6.92E-10和6.71E-10,4-2-Humanized-IgG1和4-2-Humanized-IgG4能够比阳性对照抗体更加快速地结合IL-4R。

[0118] 实施例5抗人IL-4R人源化抗体SELF突变体的构建

[0119] 实施例4.1中实验结果显示,与4-2-Humanized-IgG1相比,4-2-Humanized-IgG4在抑制IL-4诱导TF-1细胞增殖的功能活性方面稍弱;实施例4.2中Biacore亲和力检测结果显示,4-2-Humanized-IgG1和4-2-Humanized-IgG4对IL-4R的亲和力基本一致,表明这种差异不是亲和力变化导致的。上述结果提示了实施例4.1中4-2-Humanized-IgG1和4-2-Humanized-IgG4之间的活性差异,可能由抗体Fc段之间的差异导致。

[0120] Xencor公司公开的专利US20090136485A1中报道,在抗体的Fc段恒定区引入S267E+L328F突变(同时将第267位的S突变成E,第328位的L突变成F)能够增强Fc段与CD32分子(一种Fc受体分子)之间的相互作用大约400倍(Chu S Y,Vostiar I,Karki S,et al.Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19and FcγRIIb with Fc-engineered antibodies[J].Molecular immunology,2008,45(15):3926-3933.)。本发明将S267E+L328F突变引入4-2-Humanized-IgG1-HC的Fc段编码区,突变后的抗体重链基因命名为4-2-Humanized-IgG1-HC-SELF,该重链基因与4-2-Humanized-LC组合后,在HEK293E细胞中进行表达,具体表达和纯化方法如实施例1.1和2.2中所述。最终获得的突变抗体分别定义为4-2-Humanized-IgG1-SELF。本实施例中抗体序列的氨基酸位置采用Eu编码法,具体方案参见链接http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html。其中,4-2-Humanized-IgG1-SELF抗体重链的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示。

[0121] 实施例6抗人IL-4R人源化抗体的SELF突变体和非SELF突变体的功能活性的检测

[0122] 实施例6.1 IL-4和IL-4R相互作用的阻断活性

[0123] 本实施例采用ELISA检测4-2-Humanized-IgG1、4-2-Humanized-IgG4和4-2-Humanized-IgG1-SELF对IL-4和IL-4R相互作用的阻断活性。

[0124] 人IL-4序列来自于http://www.uniprot.org,氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示。该氨基酸序列经过密码子优化后,全基因合成并连接至原核克隆载体。用重组PCR法在人IL-4编码区的末端添加一个hFc(IgG1)标签,将基因重组之后构建到pTT5瞬时转染载体中。将上述载体按照标准操作流程转染到HEK293细胞中,在Freestyle 293Expression Medium培养基中进行培养,5天之后从细胞培养上清中纯化表达的IL-4-hFc。上述抗原分别用protein A亲和层析柱进行纯化。纯化的IL-4-hFc作为阻断检测的配体。IL-4R-ECD-hFc,经过透析和浓度测定后,用Biotin N-hydroxysuccinimide ester(Sigma/货号:H1759-

100MG)进行生物素化标记。

[0125] 用碳酸钠缓冲液将IL-4-hFc稀释至2000ng/ml,然后100μl每孔加入ELISA板中;室温孵育4小时;用含0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液(PBST)洗板;每孔加入含有1%牛血清白蛋白的PBST进行封闭;用PBST洗板;将Biotin化的IL-4R-ECD-hFc稀释到PBST中,使其终浓度达到100ng/ml,并用此溶液将待测抗体适当稀释,然后在96孔板中进行梯度稀释;将稀释好的抗体转移到上述包被有IL-4-hFc的ELISA酶标板中,室温孵育1小时;用PBST洗板;加入用含1%BSA的PBST稀释的Streptavidin-HRP,稀释比例为1:1000,100μl/孔,37℃孵育30min;加显色液(TMB底物溶液),100μl/孔,室温孵育1～5min;加终止液终止显色反应,50μl/孔;用酶标仪读OD450值;用GraphPad Prism6进行数据整理分析和作图,计算IC50。其中,使用的阴性对照抗体是不结合人IL-4R的人源化抗体。

[0126] 如图8所示,Dupilumab、4-2-Humanized-IgG4、4-2-Humanized-IgG1和4-2-Humanized-IgG1-SELF均能有效阻断IL-4和IL-4R的相互作用,IC50分别为137.9ng/ml、140.3ng/ml、138.3ng/ml和144.1ng/ml。以上结果表明,Dupilumab、4-2-Humanized-IgG4、4-2-Humanized-IgG1和4-2-Humanized-IgG1-SELF阻断IL-4和IL-4R相互作用的能力基本一致,无明显差别。

[0127] 实施例6.2 IL-4诱导TF-1细胞增殖的抑制作用

[0128] 本实施例采用TF-1细胞检测人源化抗体4-2-Humanized-IgG1、4-2-Humanized-IgG4和4-2-Humanized-IgG1-SELF对IL-4诱导的TF-1细胞增殖的抑制作用。

[0129] 实验方法参见实施例1.1。其中,使用的阴性对照不含IL-4但含有不结合人IL-4R的阴性对照抗体;阳性对照含有IL-4也含有不结合人IL-4R的阴性对照抗体。

[0130] 如图9所示,Dupilumab、4-2-Humanized-IgG1、4-2-Humanized-IgG4和4-2-Humanized-IgG1-SELF抑制IL-4诱导TF-1细胞增殖的IC50分别是1008ng/ml、667.7ng/ml、2782ng/ml和291.9ng/ml。功能活性强弱排序如下:4-2-Humanized-IgG1-SELF>4-2-Humanized-IgG1>Dupilumab>4-2-Humanized-IgG4。

[0131] 实施例6.3 IL-4诱导PBMC表达CD23的抑制作用

[0132] IL-4能够诱导人外周血单个核细胞(PBMC)表达CD23分子,CD23分子是一种与过敏反应相关的低亲和力IgE受体。本实施例采用PBMC检测人源化抗体4-2-Humanized-IgG1、4-2-Humanized-IgG4和4-2-Humanized-IgG1-SELF对IL-4诱导PBMC表达CD23的抑制作用。

[0133] 用Histopaque从人全血中分离PBMC;细胞计数后用RMPI-1640完全培养基(含有10%胎牛血清)接种至96孔圆底细胞培养板中,每孔$2E^5$个细胞/150μl;将IL-4用RMPI-1640稀释至80ng/ml,用此培养基梯度稀释抗IL-4R抗体;在上述96孔板中加入50μl用RPMI-1640梯度稀释的抗IL-4R抗体和IL-4的混合液;将96孔板置于37℃培养箱中孵育2天;2天后用PE Mouse Anti-Human CD23荧光标记抗体将上述细胞染色,染色后加入4%的多聚甲醛固定;300g离心,洗涤后在流式细胞仪上(CytoFLEXCytometer System,购自Beckman Coulter)检测PE通道的荧光强度,用FCS/SSC或CD14荧光标记强度确定单核细胞群体;用流式细胞仪自带软件处理实验数据并计算平均荧光强度;用GraphPad Prism6进行数据整理分析和作图,计算IC50。

[0134] 第一次实验结果如图10-1所示,Dupilumab、4-2-Humanized-IgG1、4-2-Humanized-IgG4和4-2-Humanized-IgG1-SELF均能有效抑制IL-4诱导PBMC表达CD23,IC50

分别为90.91ng/ml、29.38ng/ml、232.1ng/ml和7.404ng/ml。第二次重复实验结果如图10-2所示，Dupilumab、4-2-Humanized-IgG1、4-2-Humanized-IgG4和4-2-Humanized-IgG1-SELF抑制IL-4诱导PBMC表达CD23的IC50分别为20.65ng/ml、3.56ng/ml、34.00ng/ml和0.49ng/ml。两次独立重复实验的功能活性强弱排序一致如下：4-2-Humanized-IgG1-SELF>4-2-Humanized-IgG1>Dupilumab>4-2-Humanized-IgG4。其中，两次实验使用的血液来自不同捐献者。

[0135] 为了进一步验证上述实验结果，用Histopaque从6份来自不同捐献者的血液中分离PBMC；细胞计数后用RMPI-1640完全培养基接种至96孔圆底细胞培养板中，每孔2E5个细胞；然后加入抗IL-4R抗体(终浓度25ng/ml)和IL-4(终浓度20ng/ml)；将96孔板置于37℃培养箱中孵育2天；2天后按照上述实验方法用流式细胞仪分析CD23的表达。其中，使用的阴性对照不含IL-4但含有不结合人IL-4R的阴性对照抗体；阳性对照含有IL-4也含有不结合人IL-4R的阴性对照抗体。实验结果如图10-3所示，4-2抗体的功能活性强弱排序如下：4-2-Humanized-IgG1-SELF>4-2-Humanized-IgG1>4-2-Humanized-IgG4，并且具有统计学上的显著性差异(统计方法为T-test，$P<0.05$认为具有统计学上的显著性差异)。

[0136] 实施例6.4 IL-4诱导PBMC分泌IgE的抑制作用

[0137] IL-4能够诱导人外周血单个核细胞(PBMC)分泌IgE分子，IgE分子与过敏反应相关高度相关。本实施例采用PBMC检测人源化抗体4-2-Humanized-IgG1、4-2-Humanized-IgG4和4-2-Humanized-IgG1-SELF对IL-4诱导PBMC分泌IgE的抑制作用。

[0138] 用Histopaque从人全血中分离PBMC；细胞计数后用RMPI-1640完全培养基(含有10％胎牛血清)接种至96孔圆底细胞培养板中，每孔$2E^5$个细胞/150μl；将IL-4用RMPI-1640稀释至80ng/ml，并同时补加地塞米松至终浓度400ng/ml，用此培养基梯度稀释IL-4R抗体；在上述96孔板中加入50μl用RPMI-1640梯度稀释的抗IL-4R抗体、IL-4和地塞米松的混合溶液；将96孔板置于37℃培养箱中孵育14天；14天后取细胞培养上清，Anti-Human IgE antibody作为捕获抗体，Biotin-anti-Human IgE antibody作为检测抗体，利用双抗夹心法检测细胞培养上清中IgE的分泌量；用GraphPad Prism6进行数据整理分析和作图，计算IC50。

[0139] 第一次实验结果如图11-1所示，Dupilumab、4-2-Humanized-IgG1、4-2-Humanized-IgG4和4-2-Humanized-IgG1-SELF均能有效抑制IL-4诱导PBMC分泌IgE，IC50分别为995.7ng/ml、448.0ng/ml、1953ng/ml和50.85ng/ml。第二次重复实验结果如图11-2所示，Dupilumab、4-2-Humanized-IgG1、4-2-Humanized-IgG4和4-2-Humanized-IgG1-SELF抑制IL-4诱导PBMC分泌IgE的IC50分别是189.4ng/ml、61.34ng/ml、412.9ng/ml和26.61ng/ml。两次独立重复实验的功能活性强弱排序一致如下：4-2-Humanized-IgG1-SELF>4-2-Humanized-IgG1>Dupilumab>4-2-Humanized-IgG4。其中，两次实验使用的血液来自不同捐献者。

[0140] 实施例7抗人IL-4R人源化抗体的药代动力学研究

[0141] 本实施例采用大鼠进行静脉注射(Intravenous Injection，I.V.)检测4-2-Humanized-IgG4的药代动力学。

[0142] 每组四只大鼠，体重200g左右，每只大鼠通过静脉注射剂量为1mg的抗IL-4R抗体；分别在给药后的特定时间眼眶取血，血液自然凝固后离心取血清。血清中抗体药物浓度的

测量方法如下:用羊抗人Fc段抗体(购自Sigma;该抗体经过种属交叉吸附处理,不结合大鼠内源抗体)包被ELISA板,浓度为100ng/ml,100μl/孔;包被完毕后用PBST+1%BSA封闭;然后加入适当稀释的大鼠血清;经过一段时间的孵育之后,洗板并最终加入HRP标记的羊抗人抗体(购自Sigma;该抗体经过种属交叉吸附处理,不识别大鼠内源抗体);再经过一段时间的孵育之后,洗板并加入显色液进行显色,用终止液终止显色反应后检测OD450;用标准曲线将OD450换算成抗体浓度;用GraphPad Prism6进行数据整理分析和作图;用Phoenix软件计算抗体药物在大鼠体内的半衰期。

[0143] 如图12所示,静脉注射药代动力学结果显示,4-2-Humanized-IgG4抗体在大鼠体内的半衰期与阳性对照抗体Dupilumab相当,分别是282.4小时和281.6小时。

序列表

<110> 沈阳三生制药有限责任公司

<120> 结合人IL-4R的抗体、其制备方法和用途

<130> 2018

<160> 20

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 207

<212> PRT

<213> Homo

<400> 1

Met Lys Val Leu Gln Glu Pro Thr Cys Val Ser Asp Tyr Met Ser Ile
1 5 10 15
Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met Asn Gly Pro Thr Asn Cys Ser Thr Glu
20 25 30
Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu Val Phe Leu Leu Ser Glu Ala His Thr
35 40 45
Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly Gly Ala Gly Cys Val Cys His Leu Leu
50 55 60
Met Asp Asp Val Val Ser Ala Asp Asn Tyr Thr Leu Asp Leu Trp Ala
65 70 75 80
Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys Gly Ser Phe Lys Pro Ser Glu His Val
85 90 95
Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn Leu Thr Val His Thr Asn Val Ser Asp
100 105 110
Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser Asn Pro Tyr Pro Pro Asp Asn Tyr Leu
115 120 125
Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala Val Asn Ile Trp Ser Glu Asn Asp Pro
130 135 140
Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn Val Thr Tyr Leu Glu Pro Ser Leu Arg
145 150 155 160
Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys Ser Gly Ile Ser Tyr Arg Ala Arg Val
165 170 175
Arg Ala Trp Ala Gln Cys Tyr Asn Thr Thr Trp Ser Glu Trp Ser Pro
180 185 190
Ser Thr Lys Trp His Asn Ser Tyr Arg Glu Pro Phe Glu Gln His
195 200 205

<210> 2

<211> 360
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 2
caggtccaac tacagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
tcttgcacgg cttctggctc caccctcact gacgactata taaactgggt gaagcagagg 120
cctggacggg gacttgagtg ggttggatgg atttttcctg gaaatggtaa ttcttactac 180
aatgagaagt tcaaggacaa ggccacattg attgtagaca aatcttccag cacagcctac 240
atgttgctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagagggcta 300
gtacggtatc gcgccctttt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca 360
<210> 3
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 3
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Thr Ala Ser Gly Ser Thr Leu Thr Asp Asp
20 25 30
Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ser Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Ile Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Leu Val Arg Tyr Arg Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 4
<211> 318
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 4
caaattgttc tctcccagtc tccagcaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca 60
atgacttgca gggccagctc aagtattaat tacatgcact ggtaccagca gaagccagga 120
tcctccccca aaccctggat ttatgccgca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg gacctctttc tctctcacaa tcagcagagt ggaggctgaa 240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtagttacc caatcacgtt cggctcgggg 300
acaaagttgg aaataaaa 318

<210> 5
<211> 106
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 5

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Ile Asn Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45
Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Phe Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Ile Thr
85 90 95
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 6

Asp Asp Tyr Ile Asn
1 5

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 7

Trp Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ser Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Asp

<210> 8
<211> 11

<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 8
Gly Leu Val Arg Tyr Arg Ala Leu Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 9
Arg Ala Ser Ser Ser Ile Asn Tyr Met His
1 5 10
<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 10
Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser
1 5
<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 11
Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Ile Thr
1 5
<210> 12
<211> 360
<212> DNA
<213> Synthetic
<400> 12
caggtgcagc tggtgcagtc cggagccgag gtgaaaaagc ccggcgcctc cgtgaaggtg 60
tcctgcaagg cctccggctc caccctgacc gacgactaca tcaactgggt gaggcaggct 120
cctggacaga ggctggagtg ggtgggctgg atcttccccg gcaacggcaa cagctactac 180
aacgagaagt tcaaggacag ggccaccctg accgtcgaca agtccgcctc caccgcctac 240
atggagctgt cctccctgag gtccgaggac accgccgtgt atttctgcgc taggggcctg 300
gtgaggtaca gggccctgtt cgactactgg ggccagggca ccctggtgac agtgtcctcc 360
<210> 13
<211> 120

<212> PRT
<213> Synthetic
<400> 13

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Thr Leu Thr Asp Asp
20 25 30
Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ser Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Leu Val Arg Tyr Arg Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 318
<212> DNA
<213> Synthetic
<400> 14

gacatccaga tgacccagtc cccttcctcc ctgagcgctt ccgtgggcga cagggtgacc 60
atcacctgca gggcctcctc ctccatcaac tacatgcact ggtaccagca gaagcccggc 120
aaggctccca agccctggat ctacgccgcc tccaacctgg cctccggagt gccttccagg 180
ttttccggct ccggctccgg cacagacttc accctgacca tctcctccct gcagcccgag 240
gacttcgcca cctactactg ccagcagtgg tcctcctacc ccatcacctt cggccagggc 300
accaaggtgg agatcaag 318

<210> 15
<211> 106
<212> PRT
<213> Synthetic
<400> 15

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Ile Asn Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45
Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Ile Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 16
<211> 450
<212> PRT
<213> Synthetic
<400> 16

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Thr Leu Thr Asp Asp
20 25 30
Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ser Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Leu Val Arg Tyr Arg Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Lys
450

<210> 17
<211> 447
<212> PRT
<213> Synthetic
<400> 17

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Thr Leu Thr Asp Asp
20 25 30
Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ser Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Leu Val Arg Tyr Arg Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 18
<211> 213
<212> PRT
<213> Synthetic
<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Ile Asn Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45
Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Ile Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205
Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 19
<211> 450
<212> PRT
<213> Synthetic
<400> 19

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Thr Leu Thr Asp Asp
20 25 30
Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asn Ser Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Leu Val Arg Tyr Arg Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Lys

450

<210> 20

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo

<400> 20

His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser
1 5 10 15
Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile
20 25 30
Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala
35 40 45
Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg
50 55 60
Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile
65 70 75 80
Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu
85 90 95
Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe
100 105 110
Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser
115 120 125
Ser

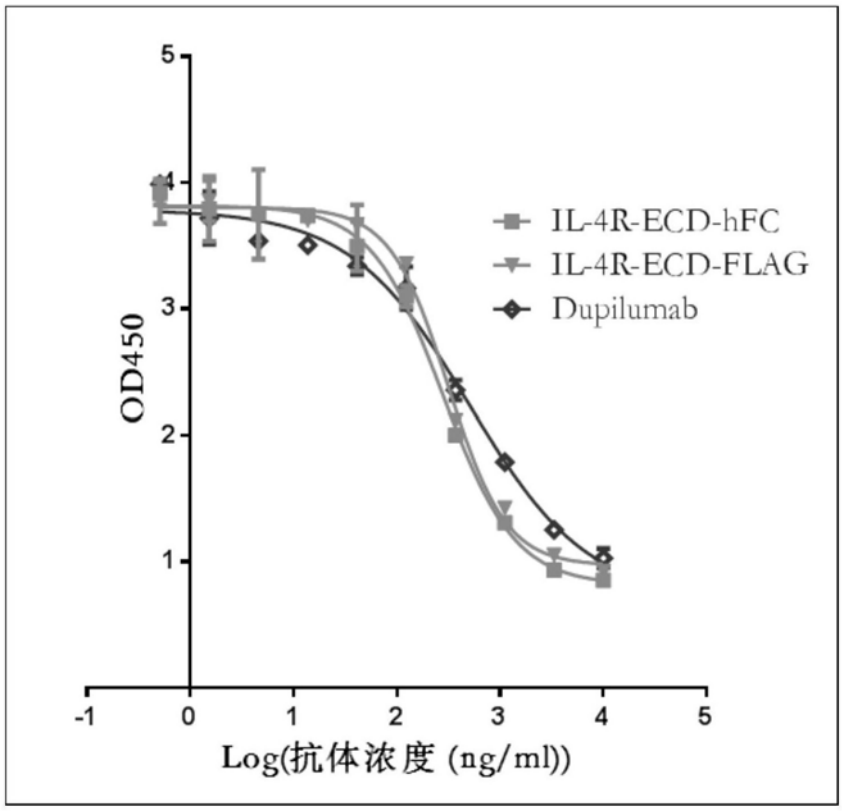

IL-4R-ECD-hFC
IL-4R-ECD-FLAG
Dupilumab
OD450
Log(抗体浓度 (ng/ml))

图1

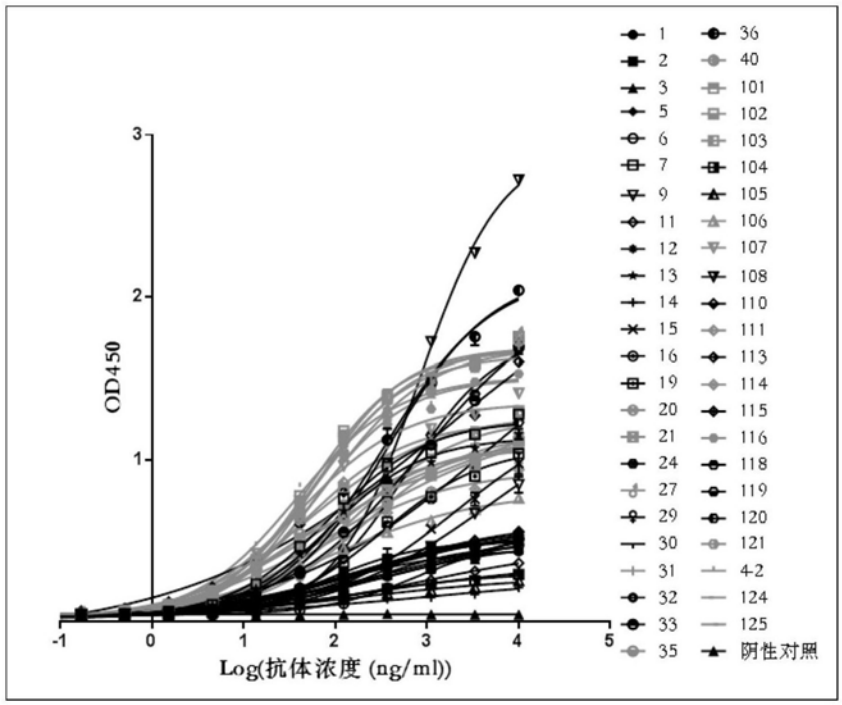

OD450
Log(抗体浓度 (ng/ml))
1
2
3
5
6
7
9
11
12
13
14
15
16
19
20
21
24
27
29
30
31
32
33
35
36
40
101
102
103
104
105
106
107
108
110
111
113
114
115
116
118
119
120
121
4-2
124
125
阴性对照

图2

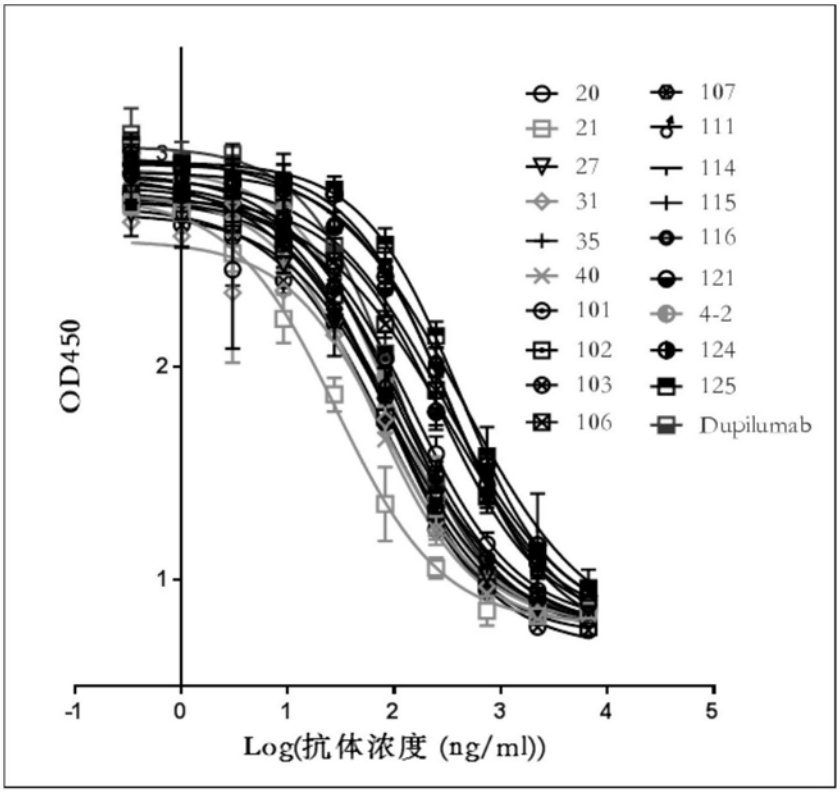

OD450
Log(抗体浓度 (ng/ml))
20
21
27
31
35
40
101
102
103
106
107
111
114
115
116
121
4-2
124
125
Dupilumab

图3

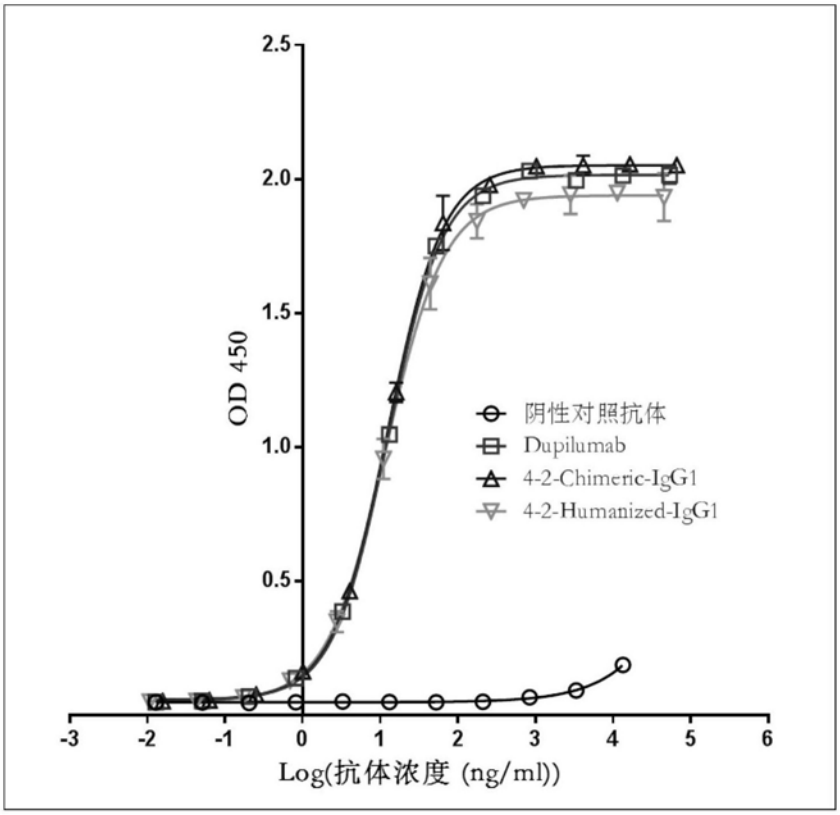

2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
OD 450
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
5
6
Log(抗体浓度 (ng/ml))
阴性对照抗体
Dupilumab
4-2-Chimeric-IgG1
4-2-Humanized-IgG1

图4

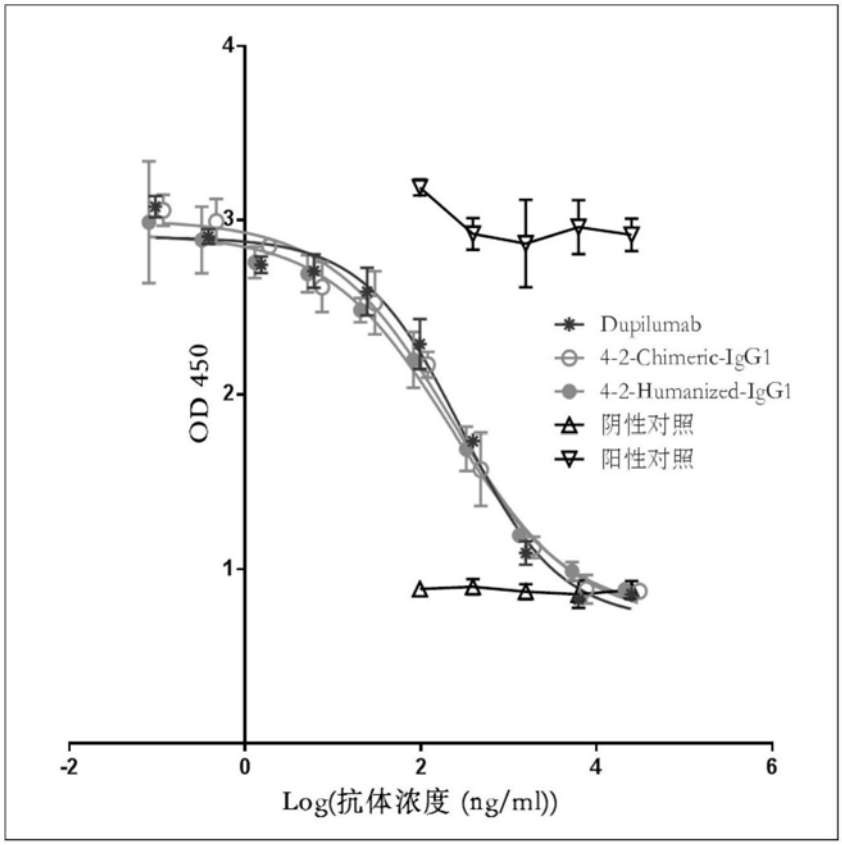

4
3
2
1
OD 450
-2
0
2
4
6
Log(抗体浓度 (ng/ml))
Dupilumab
4-2-Chimeric-IgG1
4-2-Humanized-IgG1
阴性对照
阳性对照

图5

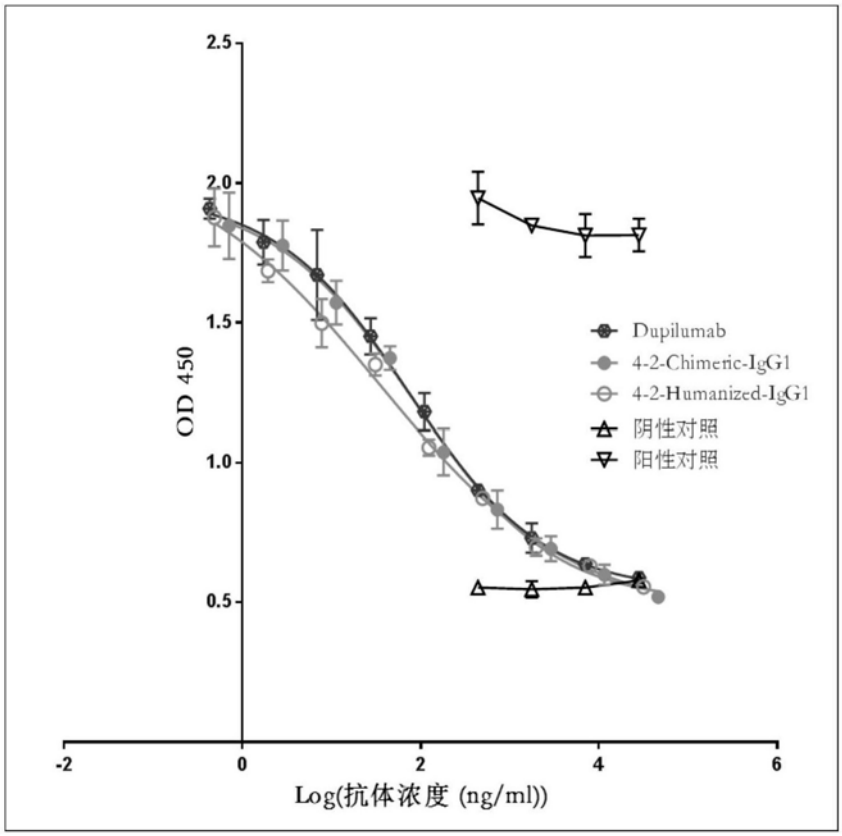

2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
OD 450
-2
0
2
4
6
Log(抗体浓度 (ng/ml))
Dupilumab
4-2-Chimeric-IgG1
4-2-Humanized-IgG1
阴性对照
阳性对照

图6

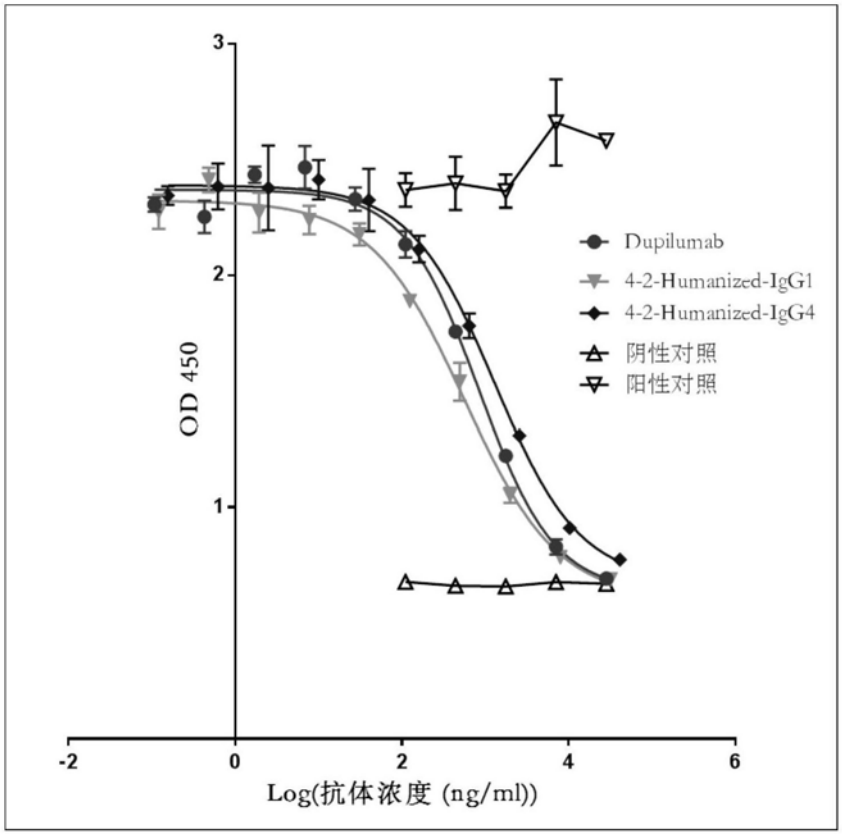

3
2
1
OD 450
-2
0
2
4
6
Log(抗体浓度 (ng/ml))
Dupilumab
4-2-Humanized-IgG1
4-2-Humanized-IgG4
阴性对照
阳性对照

图7-1

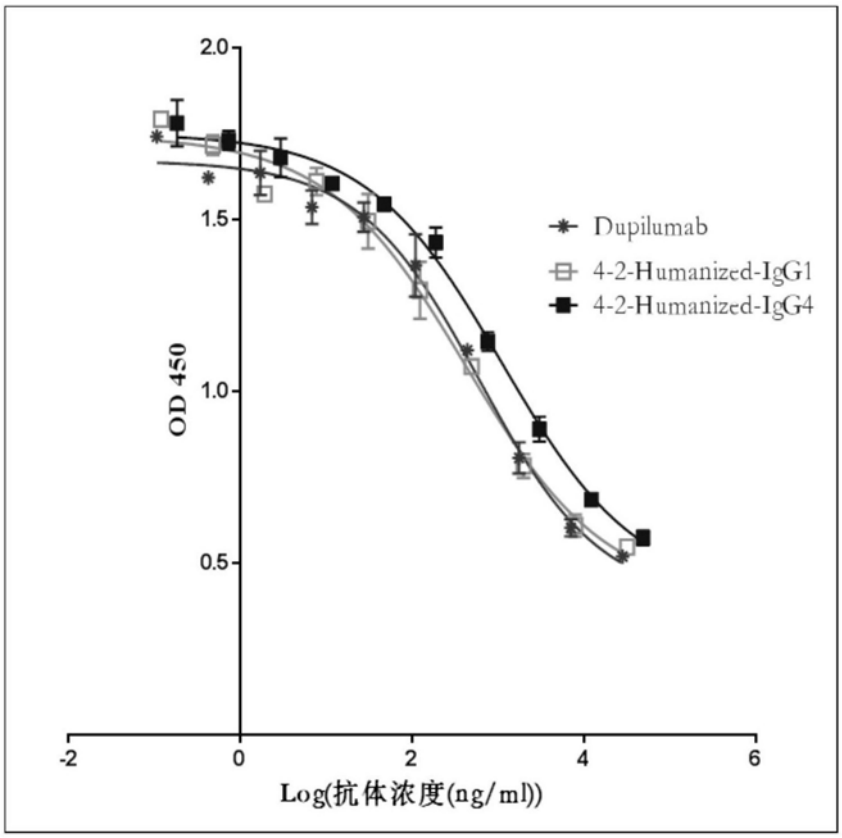

2.0
1.5
1.0
0.5
OD 450
-2
0
2
4
6
Log(抗体浓度(ng/ml))
Dupilumab
4-2-Humanized-IgG1
4-2-Humanized-IgG4

图7-2

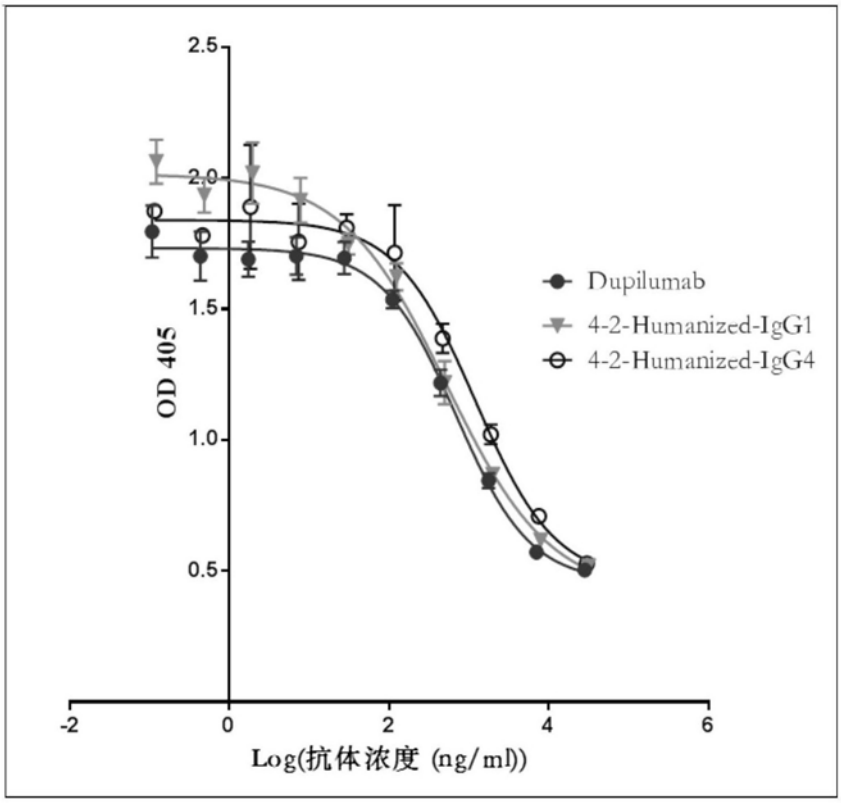

2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
OD 405
-2
0
2
4
6
Log(抗体浓度 (ng/ml))
Dupilumab
4-2-Humanized-IgG1
4-2-Humanized-IgG4

图7-3

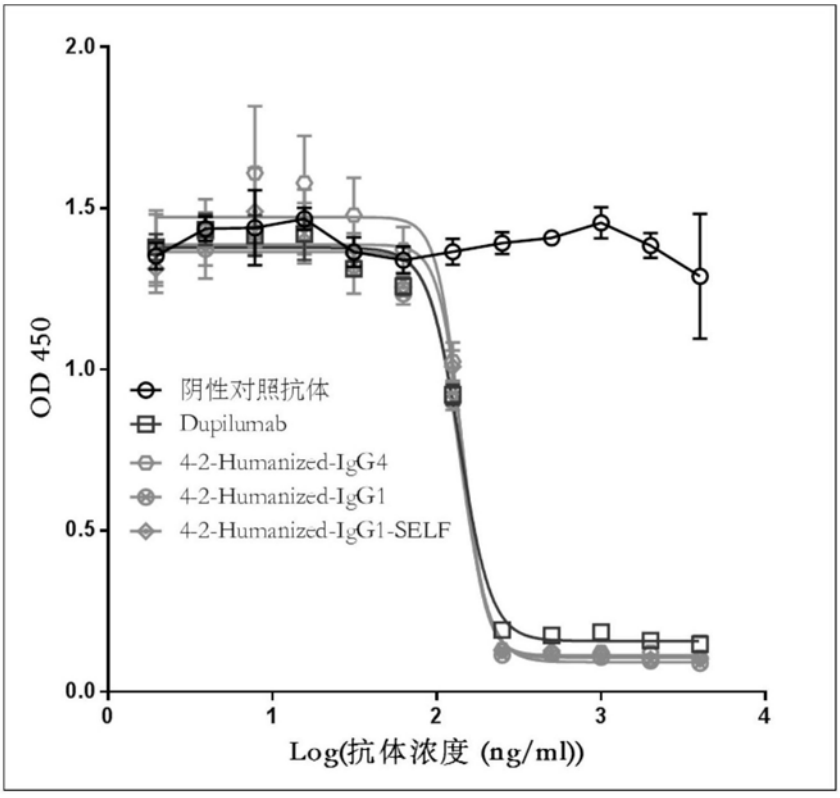

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
OD 450
0
1
2
3
4
Log(抗体浓度 (ng/ml))
阴性对照抗体
Dupilumab
4-2-Humanized-IgG4
4-2-Humanized-IgG1
4-2-Humanized-IgG1-SELF

图8

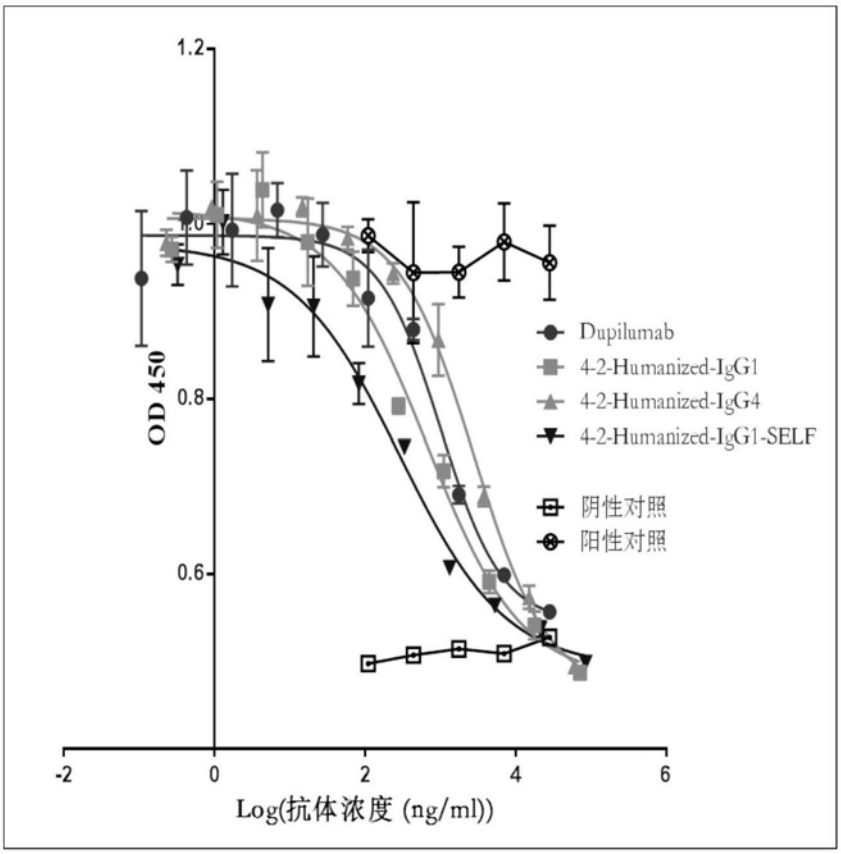

1.2
0.8
0.6
OD 450
-2
0
2
4
6
Log(抗体浓度 (ng/ml))
Dupilumab
4-2-Humanized-IgG1
4-2-Humanized-IgG4
4-2-Humanized-IgG1-SELF
阴性对照
阳性对照

图9

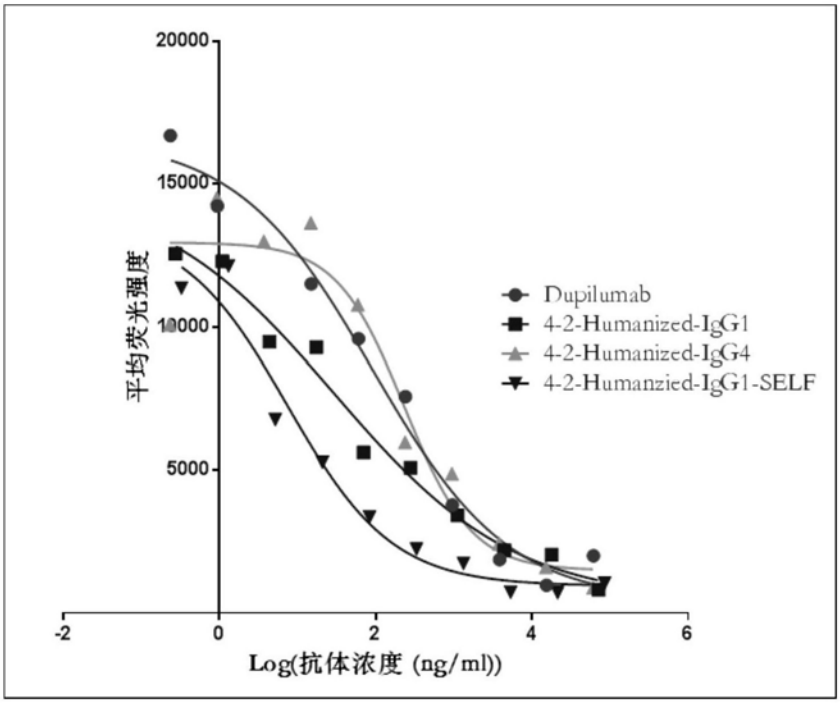

20000
15000
10000
5000
平均荧光强度
-2
0
2
4
6
Log(抗体浓度 (ng/ml))
Dupilumab
4-2-Humanized-IgG1
4-2-Humanized-IgG4
4-2-Humanzied-IgG1-SELF

图10-1

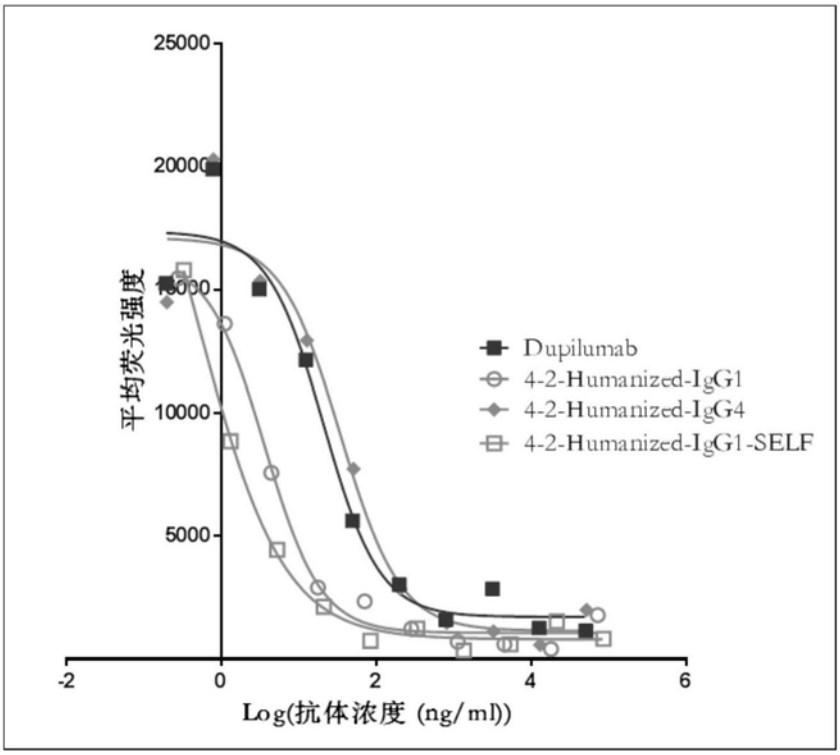

25000
20000
15000
10000
5000
平均荧光强度
-2
0
2
4
6
Log(抗体浓度 (ng/ml))
Dupilumab
4-2-Humanized-IgG1
4-2-Humanized-IgG4
4-2-Humanized-IgG1-SELF

图10-2

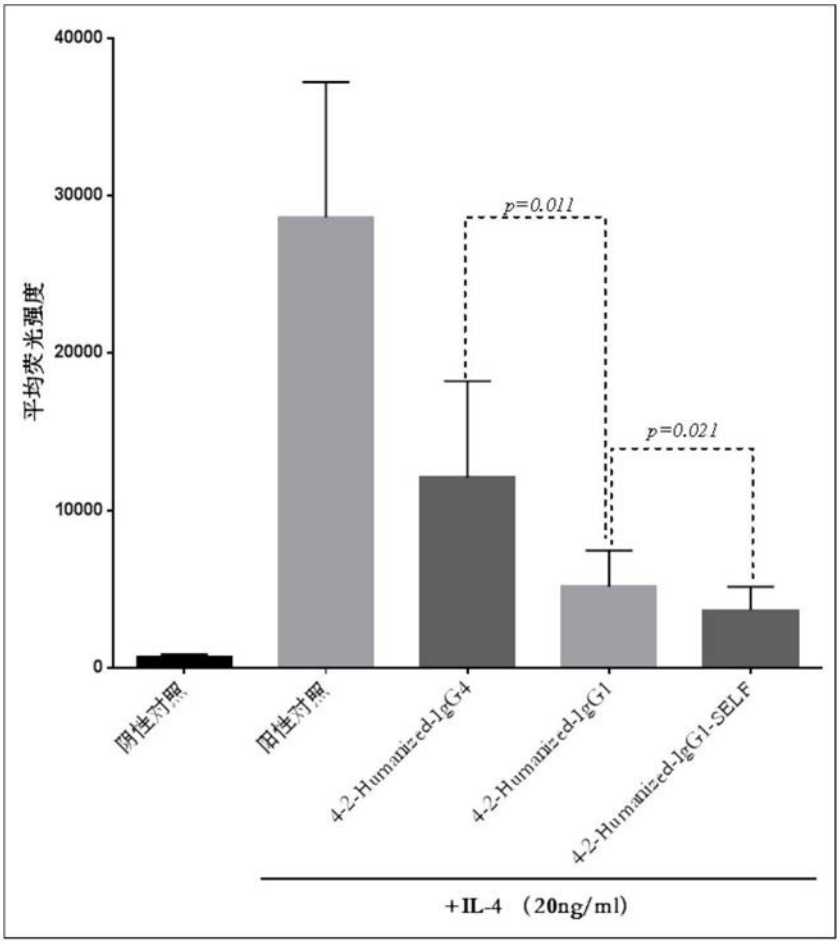

40000
30000
20000
10000
0
平均荧光强度
p=0.011
p=0.021
阴性对照
阳性对照
4-2-Humanized-IgG4
4-2-Humanized-IgG1
4-2-Humanized-IgG1-SELF
+IL-4 (20ng/ml)

图10-3

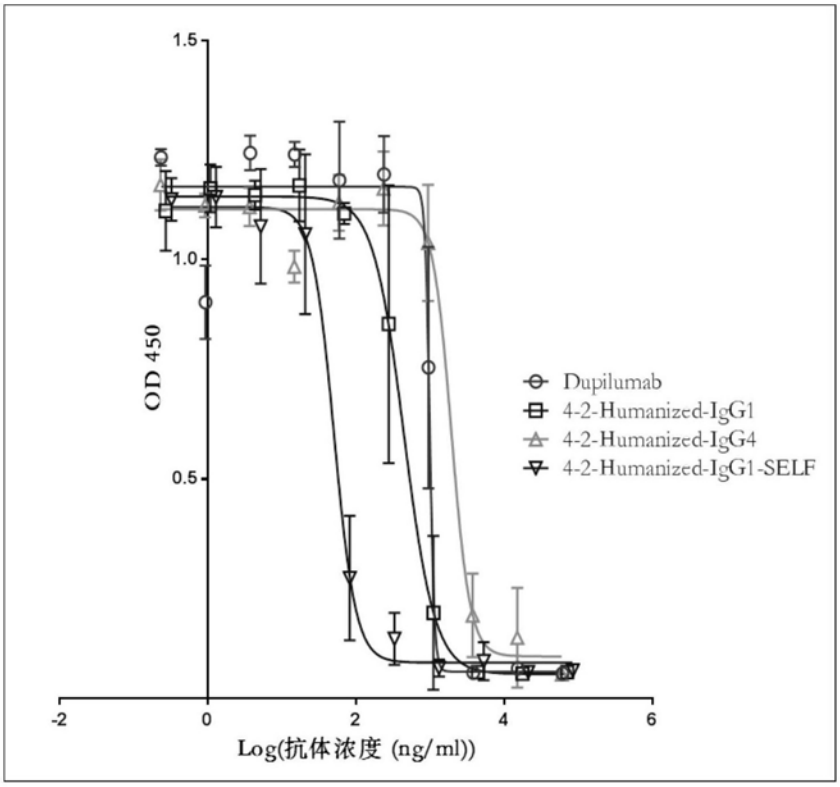

1.5
1.0
0.5
OD 450
-2
0
2
4
6
Log(抗体浓度 (ng/ml))
Dupilumab
4-2-Humanized-IgG1
4-2-Humanized-IgG4
4-2-Humanized-IgG1-SELF

图11-1

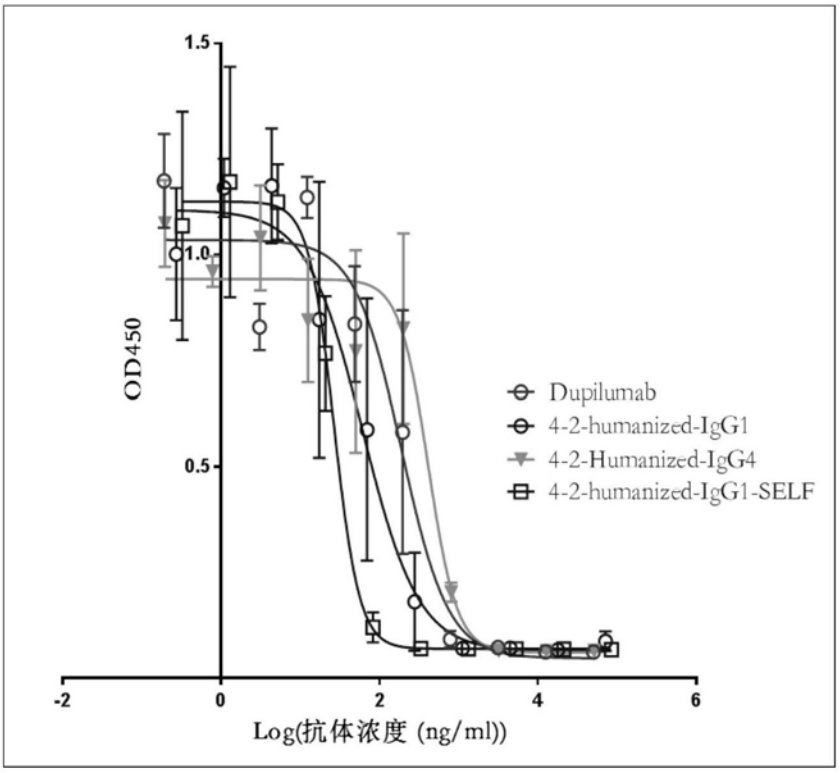

1.5
1.0
0.5
OD450
-2
0
2
4
6
Log(抗体浓度 (ng/ml))
Dupilumab
4-2-humanized-IgG1
4-2-Humanized-IgG4
4-2-humanized-IgG1-SELF

图11-2

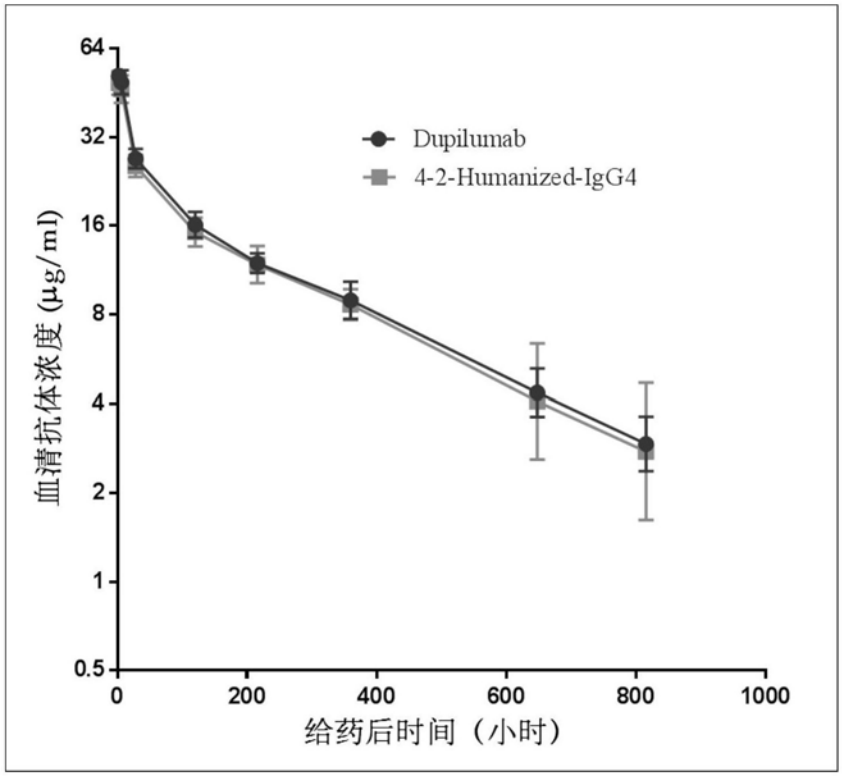

64
32
16
8
4
2
1
0.5
0
200
400
600
800
1000
血清抗体浓度 (μg/ml)
给药后时间（小时）
Dupilumab
4-2-Humanized-IgG4

图12