



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104987419 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 21

(21) 申请号 201510202416. 6 *A61P 17/00*(2006. 01)  
(22) 申请日 2004. 07. 15 *A61P 11/02*(2006. 01)  
(30) 优先权数据 *A61P 37/08*(2006. 01)  
0407315. 1 2004. 03. 31 GB *A61P 1/00*(2006. 01)  
60/487512 2003. 07. 15 US *A61P 29/00*(2006. 01)  
60/558216 2004. 03. 31 US *A61P 35/00*(2006. 01)  
60/573791 2004. 05. 24 US *A61P 11/00*(2006. 01)

(62) 分案原申请数据  
200480026557. 7 2004. 07. 15

(71) 申请人 免疫医疗有限公司  
地址 英国剑桥郡

(72) 发明人 P. D. 蒙克 L. 耶尔穆图斯  
R. R. 明特 C. P. 索罗克

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公  
司 72001  
代理人 刘辛 李炳爱

(51) Int. Cl.  
*C07K 16/24*(2006. 01)  
*C12N 15/13*(2006. 01)  
*A61K 39/395*(2006. 01)  
*A61P 11/06*(2006. 01)

权利要求书4页 说明书71页  
序列表69页 附图29页

(54) 发明名称  
针对 IL-13 的人抗体分子

(57) 摘要  
特异性结合成员, 具体而言, 是人抗 -IL-13 抗体分子, 尤其是那些可中和 IL-13 活性的人抗体分子。在包括哮喘、特应性皮炎、过敏性鼻炎、纤维化、炎症性肠病和何杰金氏淋巴瘤在内的 IL-13 相关失调的诊断或治疗中利用抗 -IL-13 抗体分子的方法。

1. 针对人 IL-13 的分离的特异性结合成员,所述特异性结合成员包括由人抗体 VH 结构域和人抗体 VL 结构域构成的抗体抗原结合结构域位点,并包括一组 CDR,即 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3,其中 VH 结构域包括 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,VL 结构域包括 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3,其中该组 CDR 由选自下列的一组 CDR 组成:

BAK278D6 CDR 组,定义为其中 HCDR1 具有 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列,HCDR2 具有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列,HCDR3 具有 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列,LCDR1 具有 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列,LCDR2 具有 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列,和 LCDR3 具有 SEQ ID NO :6 所示的氨基酸序列;

BAK1167F02 CDR 组,定义为其中 HCDR1 具有 SEQ ID NO :61 所示的氨基酸序列,HCDR2 具有 SEQ ID NO :62 所示的氨基酸序列,HCDR3 具有 SEQ ID NO :63 所示的氨基酸序列,LCDR1 具有 SEQ ID NO :64 所示的氨基酸序列,LCDR2 具有 SEQ ID NO :65 所示的氨基酸序列,和 LCDR3 具有 SEQ ID NO :66 所示的氨基酸序列;

BAK1111D10 CDR 组,定义为其中 HCDR1 具有 SEQ ID NO :91 所示的氨基酸序列,HCDR2 具有 SEQ ID NO :92 所示的氨基酸序列,HCDR3 具有 SEQ ID NO :93 所示的氨基酸序列,LCDR1 具有 SEQ ID NO :94 所示的氨基酸序列,LCDR2 具有 SEQ ID NO :95 所示的氨基酸序列,和 LCDR3 具有 SEQ ID NO :96 所示的氨基酸序列;

BAK1166G02 CDR 组,定义为其中 HCDR1 具有 SEQ ID NO :67 所示的氨基酸序列,HCDR2 具有 SEQ ID NO :68 所示的氨基酸序列,HCDR3 具有 SEQ ID NO :69 所示的氨基酸序列,LCDR1 具有 SEQ ID NO :70 所示的氨基酸序列,LCDR2 具有 SEQ ID NO :71 所示的氨基酸序列,和 LCDR3 具有 SEQ ID NO :72 所示的氨基酸序列;

BAK1167F04 CDR 组,定义为其中 HCDR1 具有 SEQ ID NO :85 所示的氨基酸序列,HCDR2 具有 SEQ ID NO :86 所示的氨基酸序列,HCDR3 具有 SEQ ID NO :87 所示的氨基酸序列,LCDR1 具有 SEQ ID NO :88 所示的氨基酸序列,LCDR2 具有 SEQ ID NO :89 所示的氨基酸序列,和 LCDR3 具有 SEQ ID NO :90 所示的氨基酸序列;

BAK1184C8 CDR 组,定义为其中 HCDR1 具有 SEQ ID NO :73 所示的氨基酸序列,HCDR2 具有 SEQ ID NO :74 所示的氨基酸序列,HCDR3 具有 SEQ ID NO :75 所示的氨基酸序列,LCDR1 具有 SEQ ID NO :76 所示的氨基酸序列,LCDR2 具有 SEQ ID NO :77 所示的氨基酸序列,和 LCDR3 具有 SEQ ID NO :78 所示的氨基酸序列;

BAK1185E1 CDR 组,定义为其中 HCDR1 具有 SEQ ID NO :79 所示的氨基酸序列,HCDR2 具有 SEQ ID NO :80 所示的氨基酸序列,HCDR3 具有 SEQ ID NO :81 所示的氨基酸序列,LCDR1 具有 SEQ ID NO :82 所示的氨基酸序列,LCDR2 具有 SEQ ID NO :83 所示的氨基酸序列,和 LCDR3 具有 SEQ ID NO :84 所示的氨基酸序列;

BAK1185F8 CDR 组,定义为其中 HCDR1 具有 SEQ ID NO :103 所示的氨基酸序列,HCDR2 具有 SEQ ID NO :104 所示的氨基酸序列,HCDR3 具有 SEQ ID NO :105 所示的氨基酸序列,LCDR1 具有 SEQ ID NO :106 所示的氨基酸序列,LCDR2 具有 SEQ ID NO :107 所示的氨基酸序列,和 LCDR3 具有 SEQ ID NO :108 所示的氨基酸序列;和

BAK1183H4 CDR 组,定义为其中 HCDR1 具有 SEQ ID NO :97 所示的氨基酸序列,HCDR2 具有 SEQ ID NO :98 所示的氨基酸序列,HCDR3 具有 SEQ ID NO :99 所示的氨基酸序列,LCDR1 具有 SEQ ID NO :100 所示的氨基酸序列,LCDR2 具有 SEQ ID NO :101 所示的氨基酸序列,和

LCDR3 具有 SEQ ID NO :102 所示的氨基酸序列。

2. 权利要求 1 所述的特异性结合成员,其中该特异性结合成员具有 BAK1167F02 CDR 组,定义为其中 HCDR1 具有 SEQ ID NO :61 所示的氨基酸序列, HCDR2 具有 SEQ ID NO :62 所示的氨基酸序列, HCDR3 具有 SEQ ID NO :63 所示的氨基酸序列, LCDR1 具有 SEQ ID NO :64 所示的氨基酸序列, LCDR2 具有 SEQ ID NO :65 所示的氨基酸序列, 和 LCDR3 具有 SEQ ID NO :66 所示的氨基酸序列。

3. 权利要求 1 所述的特异性结合成员,其中该特异性结合成员具有 BAK1111D10 CDR 组,定义为其中 HCDR1 具有 SEQ ID NO :91 所示的氨基酸序列, HCDR2 具有 SEQ ID NO :92 所示的氨基酸序列, HCDR3 具有 SEQ ID NO :93 所示的氨基酸序列, LCDR1 具有 SEQ ID NO :94 所示的氨基酸序列, LCDR2 具有 SEQ ID NO :95 所示的氨基酸序列, 和 LCDR3 具有 SEQ ID NO :96 所示的氨基酸序列。

4. 权利要求 1 所述的特异性结合成员,其中该特异性结合成员具有 BAK1166G02 CDR 组,定义为其中 HCDR1 具有 SEQ ID NO :67 所示的氨基酸序列, HCDR2 具有 SEQ ID NO :68 所示的氨基酸序列, HCDR3 具有 SEQ ID NO :69 所示的氨基酸序列, LCDR1 具有 SEQ ID NO :70 所示的氨基酸序列, LCDR2 具有 SEQ ID NO :71 所示的氨基酸序列, 和 LCDR3 具有 SEQ ID NO :72 所示的氨基酸序列。

5. 权利要求 1 所述的特异性结合成员,其中该特异性结合成员具有 BAK1167F04 CDR 组,定义为其中 HCDR1 具有 SEQ ID NO :85 所示的氨基酸序列, HCDR2 具有 SEQ ID NO :86 所示的氨基酸序列, HCDR3 具有 SEQ ID NO :87 所示的氨基酸序列, LCDR1 具有 SEQ ID NO :88 所示的氨基酸序列, LCDR2 具有 SEQ ID NO :89 所示的氨基酸序列, 和 LCDR3 具有 SEQ ID NO :90 所示的氨基酸序列。

6. 权利要求 1 所述的特异性结合成员,其中该特异性结合成员具有 BAK1184C8 CDR 组,定义为其中 HCDR1 具有 SEQ ID NO :73 所示的氨基酸序列, HCDR2 具有 SEQ ID NO :74 所示的氨基酸序列, HCDR3 具有 SEQ ID NO :75 所示的氨基酸序列, LCDR1 具有 SEQ ID NO :76 所示的氨基酸序列, LCDR2 具有 SEQ ID NO :77 所示的氨基酸序列, 和 LCDR3 具有 SEQ ID NO :78 所示的氨基酸序列。

7. 权利要求 1 所述的特异性结合成员,其中该特异性结合成员具有 BAK1185E1 CDR 组,定义为其中 HCDR1 具有 SEQ ID NO :79 所示的氨基酸序列, HCDR2 具有 SEQ ID NO :80 所示的氨基酸序列, HCDR3 具有 SEQ ID NO :81 所示的氨基酸序列, LCDR1 具有 SEQ ID NO :82 所示的氨基酸序列, LCDR2 具有 SEQ ID NO :83 所示的氨基酸序列, 和 LCDR3 具有 SEQ ID NO :84 所示的氨基酸序列。

8. 权利要求 1 所述的特异性结合成员,其中该特异性结合成员具有 BAK1185F8 CDR 组,定义为其中 HCDR1 具有 SEQ ID NO :103 所示的氨基酸序列, HCDR2 具有 SEQ ID NO :104 所示的氨基酸序列, HCDR3 具有 SEQ ID NO :105 所示的氨基酸序列, LCDR1 具有 SEQ ID NO :106 所示的氨基酸序列, LCDR2 具有 SEQ ID NO :107 所示的氨基酸序列, 和 LCDR3 具有 SEQ ID NO :108 所示的氨基酸序列。

9. 权利要求 1 所述的特异性结合成员,其中该特异性结合成员具有 BAK1183H4 CDR 组,定义为其中 HCDR1 具有 SEQ ID NO :97 所示的氨基酸序列, HCDR2 具有 SEQ ID NO :98 所示的氨基酸序列, HCDR3 具有 SEQ ID NO :99 所示的氨基酸序列, LCDR1 具有 SEQ ID NO :100

所示的氨基酸序列, LCDR2 具有 SEQ ID NO:101 所示的氨基酸序列, 和 LCDR3 具有 SEQ ID NO:102 所示的氨基酸序列。

10. 权利要求 1 所述的特异性结合成员, 其中该特异性结合成员具有 BAK278D6CDR 组, 定义为其中 HCDR1 具有 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列, HCDR2 具有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列, HCDR3 具有 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列, LCDR1 具有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列, LCDR2 具有 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列, 和 LCDR3 具有 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列。

11. 权利要求 1 所述分离的特异性结合成员, 其具有选自如下的克隆的 VH 和 / 或 VL:

BAK278D6 (VH SEQ ID NO:15, VL SEQ ID NO:16),

BAK1167F02 (VH SEQ ID NO:35, VL SEQ ID NO:36),

BAK1111D10 (VH SEQ ID NO:41, VL SEQ ID NO:42),

BAK1166G02 (VH SEQ ID NO:53, VL SEQ ID NO:54),

BAK1167F04 (VH SEQ ID NO:43, VL SEQ ID NO:44),

BAK1184C8 (VH SEQ ID NO:45, VL SEQ ID NO:46),

BAK1185E1 (VH SEQ ID NO:47, VL SEQ ID NO:48),

BAK1185F8 (VH SEQ ID NO:49, VL SEQ ID NO:50), 和

BAK1183H4 (VH SEQ ID NO:37, VL SEQ ID NO:38)。

12. 如前述权利要求中任一项所述的特异性结合成员, 其包括 scFv 抗体分子。

13. 如前述权利要求中任一项所述的特异性结合成员, 其包括抗体恒定区。

14. 如权利要求 13 所述的特异性结合成员, 包括完整抗体。

15. 如权利要求 14 所述的特异性结合成员, 其中所述完整抗体为 IgG4。

16. 如前述权利要求中任一项所述的针对人 IL-13 的分离的特异性结合成员, 其与 BAK502G9 scFv 和 / 或 IgG4 竞争结合 IL-13。

17. 如前述权利要求中任一项所述分离的特异性结合成员, 其中 VH 结构域的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 位于种系构架内和 / 或 VL 结构域的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 位于种系构架内。

18. 权利要求 17 所述分离的特异性结合成员, 其中 VH 结构域的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 位于种系构架 VH1 DP14 内。

19. 权利要求 17 或 18 所述分离的特异性结合成员, 其中 VH 结构域的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 位于种系构架 VL  $\gamma$  33H 内。

20. 如前述权利要求中任一项所述分离的特异性结合成员, 其结合人 IL-13 变体, 该变体中 130 号位的精氨酸被取代为谷氨酰胺。

21. 如前述权利要求中任一项所述分离的特异性结合成员, 其结合非人灵长类动物 IL-13。

22. 权利要求 21 所述分离的特异性结合成员, 其中所述非人灵长类 IL-13 为恒河猴或猕猴 IL-13。

23. 如前述权利要求中任一项所述分离的特异性结合成员, 其能结合人 IL-13 蛋白的人 IL-13 氨基酸序列中从位置 99 的天冬氨酸到位置 132 的 C 末端天冬酰胺 (FSSLHVRDTKI EVAQFVKDLLLHLKFLFREGRFN) 的表位。



24. 如前述权利要求中任一项所述分离的特异性结合成员,其能结合人 IL-13 蛋白的人 IL-13 氨基酸序列中从位置 106 的天冬氨酸到位置 132 的 C 末端天冬酰胺 (DTKIEVAQFVKDLLHLKKLFREGRFN) 的表位。

25. 组合物,其包含如前述权利要求中任一项所述的特异性结合成员、抗体 VH 结构域或抗体 VL 结构域和至少一种附加组分。

26. 权利要求 25 所述的组合物,其包含药学上可接受的赋形剂、媒介物或载体。

27. 一种分离的核酸,包括编码权利要求 1-24 中任一项所述的特异性结合成员或特异性结合成员的抗体 VH 或 VL 结构域的核苷酸序列。

28. 由权利要求 27 所述核酸体外转化的宿主细胞。

29. 制备权利要求 1-24 中任一项所述的特异性结合成员或抗体 VH 或 VL 结构域的方法,该方法包括在用于生成该特异性结合成员或抗体 VH 或 VL 结构域的条件下培养权利要求 28 所述宿主细胞,任选进一步包括分离和 / 或纯化所述特异性结合成员或抗体 VH 或 VL 可变结构域,任选进一步包括将所述特异性结合成员或抗体 VH 或 VL 可变结构域配制至包含至少一种附加组分的组合物中,任选进一步包括将结合人 IL-13 的特异性结合成员与 IL-13 或 IL-13 的片段例如人 IL-13 或人 IL-13 的片段结合。

30. 权利要求 1-24 中任一项所述的特异性结合成员在制备用于治疗选自哮喘、特应性皮炎、过敏性鼻炎、纤维化、炎症性肠病和何杰金氏淋巴瘤的疾病或失调的药物中的用途。

## 针对 IL-13 的人抗体分子

[0001] 本申请是 2004 年 7 月 15 日提交的题为“针对 IL-13 的人抗体分子”的国家申请号为 200480026557.7 (PCT/GB2004/003059) 的发明专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及特异性结合成员,具体而言是人抗 -IL-13 抗体分子,尤其是那些可中和 IL-13 活性的人抗体分子。本发明进一步涉及在包括哮喘、特应性皮炎、过敏性鼻炎、纤维化、炎症性肠病和何杰金氏淋巴瘤在内的 IL-13 相关失调的诊断或治疗中利用抗 -IL-13 抗体分子的方法。

### 背景技术

[0003] 本发明的优选实施方案应用了在本文中被称为 BAK502G9 的抗体分子以及本文所定义的 BAK502G9 谱系和 BAK278D6 谱系中的其它抗体分子的抗体 VH 和 / 或 VL 结构域。进一步的优选实施方案应用了 BAK278D6 谱系,和优选的 BAK502G9 的互补性决定区 (CDRs),尤其是在其它抗体构架区内的 VH CDR3。本发明进一步的方面提供了含有本发明所述特异性结合成员的组合物,以及它们在抑制或中和 IL-13 方法中的应用,所述方法包括通过特定疗法治疗人或动物体的方法。

[0004] 正如本文包括的实验方法和进一步由支持性技术文献资料所指出的,本发明提供了在结合和中和 IL-13 方面具有特定意义的抗体分子,及其在多种治疗方案中的应用。

[0005] 白细胞介素 (IL)-13 是具有 114 个氨基酸的细胞因子,其未经修饰的分子量约为 12kDa [1,2]。IL-13 与 IL-4 最为紧密相关,它们在氨基酸水平上具有 30% 的序列相似性。人 IL-13 基因位于与 IL-4 基因相邻的染色体 5q31 上 [1][2]。染色体 5q 中的该区域含有用于其它的 Th2 淋巴细胞衍生细胞因子,包括 GM-CSF 和 IL-5 的基因序列,业已证实这些细胞因子与 IL-4 的水平与哮喘病患者和变应性炎症鼠模型的疾病严重程度相关 [3][4][5][6][7][8]。

[0006] 尽管 IL-13 最初被鉴定为 Th2 CD4+ 淋巴细胞衍生的细胞因子,但其还可由 Th1 CD4+T- 细胞、CD8+T 淋巴细胞、NK 细胞,以及诸如肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞和呼吸道平滑肌细胞的非 T- 细胞群体生成。

[0007] 据报道,IL-13 是通过包括本身可结合 IL-4 而不结合 IL-13 的 IL-4 受体  $\alpha$  链 (IL-4R  $\alpha$ ),以及至少两种其它的细胞表面蛋白 IL-13R  $\alpha$  1 和 IL-13R  $\alpha$  2 在内的受体系统介导自身的作用 [9][10]。IL-13R  $\alpha$  1 可与 IL-13 低亲和力结合,接着募集 IL-4R  $\alpha$ ,形成可发出信号的高亲和力功能性受体 [11][12]。Genbank 资料库提供了 IL-13R  $\alpha$  1 的氨基酸序列和核酸序列,分别为 NP\_001551 和 Y10659。对 STAT6 (信号转导和转录激活物 6) 缺陷型小鼠的研究表明 IL-13 是以与 IL-4 类似的方式通过利用 JAK-STAT6 途径发出信号 [13][14]。在氨基酸水平上,IL-13R  $\alpha$  2 与 IL-13R  $\alpha$  1 的序列同一性为 37%,并可与 IL-13 高亲和力结合 [15][16]。不过,IL-13R  $\alpha$  2 所具有的胞质尾区较短,缺乏已知的信号基序。IL-13R  $\alpha$  2 的表达细胞即使在 IL-4R  $\alpha$  存在条件下也不反应 IL-13 [17]。由此假设 IL-13R  $\alpha$  2 充当了

可调节 IL-13 而不调节 IL-4 功能的诱引受体。该假设在对 IL-13R  $\alpha$  2 缺陷型小鼠的研究中得到了证实,这种小鼠的表型与对 IL-13 而言增强的反应性相符 [18][19]。Genbank 资料库提供了 IL-13R  $\alpha$  2 的氨基酸序列和核酸序列,分别为 NP\_000631 和 Y08768。

[0008] 所述信号 IL-13R  $\alpha$  1/IL-4R  $\alpha$  受体复合体被表达在人 B 细胞、肥大细胞、单核细胞 / 巨噬细胞、树突细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、成纤维细胞、内皮细胞、呼吸道上皮细胞和呼吸道平滑肌细胞上。

[0009] 支气管哮喘是常见的肺部持续性炎症疾病,其特征不在于呼吸道高反应性、粘液超量产生、纤维化和血清 IgE 水平升高。呼吸道高反应性 (AHR) 指呼吸道因为诸如冷空气的非特异性刺激而产生的过度收缩。AHR 和粘液超量产生均被认为是造成可变呼吸道梗阻的原因,而可变呼吸道梗阻可导致哮喘发作 (加重) 的呼吸短促特征,是造成与该病有关的死亡率的原因 (在英国的死亡率约为 2000 例 / 年)。

[0010] 近年来,哮喘连同其它变应性疾病的发病率显著提高 [20][21]。例如,目前英国 (UK) 约有 10% 的人口被诊断患有哮喘。

[0011] 最近,英国胸科协会 (BTS) 和全球哮喘防治倡议 (GINA) 指导方针提出了治疗哮喘的逐步方法 [22][23]。轻微到中度哮喘通常可通过利用吸入性皮质类固醇,并结合  $\beta$ - 增效剂或白细胞三烯抑制剂而得以控制。不过,由于有资料表明皮质类固醇具有副作用,患者不愿遵照治疗方案,从而降低了治疗效果 [24-26]。

[0012] 对患有更严重疾病的患者,即通过吸入或口服哮喘指导方针所推荐的较高剂量皮质类固醇所获效果通常非常有限的患者而言,迫切需要新的疗法。长期口服皮质类固醇的治疗会导致诸如骨质疏松、降低儿童的生长速率、糖尿病和口腔白假丝酵母病的副作用 [88]。由于皮质类固醇的有利和不利效果均由相同受体介导,治疗是在安全和效能之间实现平衡。约占英国哮喘人口 6% 的患者因病情加重而接受的住院治疗占保健机构因哮喘所承担巨大经济负担中的大部分 [89]。

[0013] 哮喘的病因被认为是由于免疫系统对无害抗原的不当反应所产生的进行性 Th2 淋巴细胞介导炎症。越来越多的证据显示,在已确定的呼吸道疾病的发病机理中,关键介体是 IL-13,而不是传统的 Th2 衍生细胞因子 IL-4。

[0014] 将重组 IL-13 施用于被首次用于实验的非敏化鼠的呼吸道,导致出现了哮喘表型的很多方面,包括呼吸道炎症、粘液产生和 AHR [27][28][29][30]。在肺部特异性超量表达 IL-13 的转基因小鼠中观测到类似表型。在该模型中,更长期地接触 IL-13 还导致了纤维化 [31]。

[0015] 此外,在变应性疾病的鼠模型中,哮喘表型的很多方面均与 IL-13 有关。业已证实有效的 IL-13 中和剂,即可溶性鼠 IL-13R  $\alpha$  2 可抑制该鼠模型具有的几项特征,即 AHR、粘液超量分泌和炎症细胞内向通量 [27][28][30]。在补充研究中,已缺失 IL-13 基因的小鼠未出现变应原诱导的 AHR。通过施用重组 IL-13,可使这些 IL-13 缺陷型小鼠再次出现 AHR。与之相比,IL-4 缺陷型小鼠则出现了该模型中的呼吸道疾病 [32][33]。

[0016] Taube 等人利用长期变应原诱导的肺炎模型证实了可溶性鼠 IL-13R  $\alpha$  2 在治疗已确定的呼吸道疾病方面的效能 [34]。可溶性鼠 IL-13R  $\alpha$  2 抑制了 AHR、粘液超量产生并缓解了呼吸道炎症程度。与之相比,可结合并拮抗 IL-4 的可溶性 IL-4R  $\alpha$  则对该系统的 AHR 或呼吸道炎症几乎无效 [35]。Blease 等人研发出了哮喘的慢性真菌模型,从而证实了上述

发现,在该慢性真菌模型中,可抗 IL-13 而不抗 IL-4 的多克隆抗体能够减少粘液超量产生、AHR 和上皮下的纤维化 [36]。

[0017] IL-13 基因中的许多遗传多态性也与变应性疾病有关。具体而言,因 130 号氨基酸位的精氨酸残基被取代为谷氨酰胺 (Q130R) 而获的 IL-13 基因变体与支气管哮喘、特应性皮炎和血清 IgE 水平升高有关 [37][38][39][40]。将含有 20 个氨基酸的信号序列排除出该氨基酸计数的某些研究小组还将该特殊 IL-13 变体称为 Q110R 变体 (110 号氨基酸位的精氨酸残基被取代为谷氨酰胺)。Arima 等人 [41] 报道该变体与血清中的 IL-13 水平升高有关。WO 01/62933 论述了该 IL-13 变体 (Q130R) 及其抗体。可改变 IL-13 生成量的 IL-13 启动子多态性也与变应性哮喘有关 [42]。

[0018] 人们还在哮喘、遗传过敏性鼻炎 (枯草热)、过敏性皮炎 (湿疹) 和慢性鼻炎人类患者体内发现 IL-13 水平升高。例如,与对照患者相比,由哮喘患者所获支气管活组织检查标本、痰和支气管肺泡灌洗 (BAL) 细胞中的 IL-13 水平较高 [43][44][45][46]。此外,在被变应原激发的哮喘患者中,BAL 样品的 IL-13 水平升高了 [47][48]。业已进一步证实 CD4(+) T 细胞生成 IL-13 的能力是可用于判断新生儿并发变应性疾病风险的有效标记 [49]。

[0019] 最近,Li 等人 [114] 报道了中和抗鼠 IL-13 抗体在慢性鼠哮喘模型中的作用。在 OVA 敏化小鼠体内诱导了类慢性哮喘反应 (诸如 AHR、严重呼吸道炎症、粘液超量生成)。Li 等人报道,在每次 OVA 激发时施用 IL-13 抗体可抑制 AHR、嗜酸性粒细胞浸润、血清 IgE 水平、促炎细胞因子 / 趋化因子水平和呼吸道重构 [14]。

[0020] 概括而言,上述资料均指出 IL-13 比 IL-4 更适合作为靶,被用于治疗人变应性疾病。

[0021] IL-13 在炎症性肠病的发病机理中具有一定作用。据 Heller 等人 [116] 报道,通过施用可溶性 IL-13R  $\alpha$  2 中和 IL-13,缓解了人溃疡性结肠炎鼠模型的结肠炎症 [116]。相应地,与对照相比,溃疡性结肠炎患者来源的直肠活组织检查标本中的 IL-13 表达较高 [117]。

[0022] 除哮喘外,IL-13 还与其它纤维化病症有关。在系统性硬皮病患者的血清 [50] 和感染其它形式的肺部纤维化的患者来源的 BAL 样品 [51] 中均检测到升高的 IL-13 水平,高达比 IL-4 高 1000 倍。相应地,小鼠肺部的 IL-13 超量表达导致了显著的纤维化,而 IL-4 则无此效果 [52][53]。业已在寄生虫诱导的肝纤维化鼠模型中广泛研究了 IL-13 对除肺以外的其它组织纤维化的作用。通过施用可溶性 IL-13R  $\alpha$  2 或破坏 IL-13 基因,但不消除 IL-4 生成而对 IL-13 的特异性抑制阻止了肝的纤维发生 [54][55][56]。

[0023] 慢性梗阻性肺病 (COPD) 包括患有不同程度的慢性支气管炎、小呼吸道疾病和气肿的患者群体,其特征在于进行性不可逆的肺功能衰退,采用目前通用基于哮喘的疗法收效甚微 [90]。近年来,COPD 发病率显著上升,成为全世界第四大死因 (世界卫生组织)。因此,COPD 引发了一个巨大的尚未解决的医学需要。

[0024] COPD 的潜在病因尚不清楚。“Dutch 假设”认为 COPD 和哮喘具有共同的易感性,因而可能是类似机制对这两种失调的发病机理起作用 [57]。

[0025] Zheng 等人 [58] 证实 IL-13 在小鼠肺内的超量表达导致了气肿、粘液生成和炎症增加,表现了人 COPD 的若干方面。此外,业已证实变应性炎症鼠模型的一种 IL-13 依赖性反应,即 AHR 对吸烟者的肺功能衰退具有预报性 [59]。IL-13 启动子多态性与导致 COPD 的

易感性之间的联系也已确定 [60]。

[0026] 因此,有迹象表明 IL-13 在 COPD 的发病机理,尤其是在具有包括 AHR 和嗜酸性粒细胞增多在内的类哮喘特征的患者中具有重要作用。业已证实,与未被报告患有肺病的患者来源的肺样本相比,IL-13 在具有 COPD 病史的患者来源尸体剖检组织样本中的 mRNA 水平较高(J. Elias 于 2002 年的美国胸科协会年会上所作的口头报告)。另一项研究则通过在 COPD 患者来源的外周肺切片中进行的免疫组织化学证实了 IL-13 水平的升高 [91]。

[0027] 何杰金氏病是一种常见类型的淋巴瘤,在美国每年约发生 7,500 例。何杰金氏病在具有下述特征的恶性肿瘤中不常见,即在恶性肿瘤中,通常由 B 细胞衍生的赘生性 Reed-Sternberg 细胞仅包括小部分的临床可检测物质。何杰金氏病来源的细胞系和初级 Reed-Sternberg 细胞常表达 IL-13 及其受体 [61]。由于 IL-13 可促进正常 B 细胞的细胞存活和增殖,IL-13 因而被认为可充当 Reed-Sternberg 细胞的生长因子。Skinnider 等人证实抗 IL-13 的中和抗体可抑制何杰金氏病来源细胞系的体外生长 [62]。该发现表明 Reed-Sternberg 细胞可能通过 IL-13 自分泌和旁分泌细胞因子环而提高了自身的存活。与上述假设相符的是,和正常对照相比,在若干位何杰金氏病患者的血清中检测到升高的 IL-13 水平 [63]。因此,IL-13 抑制物可能通过抑制恶性 Reed-Sternberg 细胞的增殖以阻止疾病的进展。

[0028] 许多人癌症细胞可表达免疫原性肿瘤特异性抗原。不过,尽管许多肿瘤可自发退化,但大部分肿瘤是通过抑制 T 细胞介导的免疫性而回避了免疫系统(免疫监视)。Terabe 等人 [64] 证实了 IL-13 在特定小鼠模型的免疫抑制方面的作用,其中所述小鼠模型的肿瘤在最初生长后可自发退化并继而复发。用可溶性 IL-13R $\alpha$ 2 特异性抑制 IL-13 可使这些小鼠的肿瘤不再复发。Terabe 等人 [64] 继续证实 IL-13 可抑制介导了抗肿瘤免疫反应的肿瘤特异性 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性淋巴细胞的分化。

[0029] 因此,可在治疗中采用 IL-13 抑制物阻止肿瘤复发或转移。对 IL-13 的抑制已被证实可在动物模型中使抗病毒疫苗加强,并且可能有助于治疗 HIV 及其它传染病 [65]。

## 发明内容

[0030] 应当指出的是,除非另外指明,本文涉及的白细胞介素 -13 或 IL-13 通常指人 IL-13。在本文的若干处还指“抗原”。本发明提供了抗人 IL-13 的抗体,具体而言是与包括猕猴和恒河猴 IL-13 在内的非人灵长类动物 IL-13 具有交叉反应性的人抗体。本发明若干实施方案所述的抗体可识别因 130 号氨基酸位的精氨酸残基被取代为谷氨酰胺后而获得的 IL-13 变体。本发明的另一些方面和实施方案提供了抗鼠 IL-13,尤其是抗小鼠 IL-13 的特异性结合成员。

## 附图说明

[0031] 图 1 所示为 BAK167A11(实心方框)及其衍生物 BAK615E3(空心方框)在 TF-1 细胞增殖试验中作为 scFv 抗 25ng/ml 人 IL-13 的中和效价(%抑制)。三角形代表无关 scFv。数据如相同试验三次测定结果的平均值和标准误差带所示。

[0032] 图 2 所示为 BAK278D6(实心方框)及其衍生物 BAK502G9(空心方框)在 TF-1 细胞增殖试验中作为 scFv 抗 25ng/ml 人 IL-13 的中和效价(%抑制)。三角形代表无关 scFv。

数据如相同试验三次测定结果的平均值和标准误差条带所示。

[0033] 图 3 所示为 BAK209B11(实心方框)在 TF-1 细胞增殖试验中作为 scFv 抗 25ng/ml 鼠 IL-13 的中和效价(%抑制)。三角形代表无关 scFv。数据如相同试验三次测定结果的平均值和标准误差条带所示。

[0034] 图 4 所示为 BAK278D6(实心方框)在 TF-1 细胞增殖试验中作为 scFv 抗 IL-13 的中和效价(%抑制)。三角形代表无关 scFv。数据如相同试验三次测定结果的平均值和标准误差条带所示。

[0035] 图 4A 所示为抗 25ng/ml 人 IL-13 的效价。

[0036] 图 4B 所示为抗 25ng/ml 人变异 IL-13 的效价。

[0037] 图 4C 所示为抗 50ng/ml 非人灵长类动物 IL-13 的效能。

[0038] 图 5 所示为若干种抗人 IL-13 抗体在 TF-1 增殖试验中的效价比较。数据如 5-7 次抗 25ng/ml 人 IL-13 试验的平均中和效价和标准误差条带所示。相对于商业可提供抗体 B-B13 的性能是通过进行单向 ANOVA 和 Dunnett 检验而得以统计评估的。与 B-B13 相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

[0039] 图 6 所示为 BAK502G9(实心方框)、BAK1167F2(实心三角形)和 BAK1183H4(实心倒三角形)在 TF-1 细胞增殖试验中作为人 IgG4 抗标记 IL-13 的中和效价(%抑制)。空心三角形代表无关 IgG4。数据如三次不同试验的平均值和标准误差条带所示。

[0040] 图 6A 所示为抗 25ng/ml 人 IL-13 的效价。

[0041] 图 6B 所示为抗 25ng/ml 人变异 IL-13 的效价。

[0042] 图 6C 所示为抗 50ng/ml 非人灵长类动物 IL-13 的效价。

[0043] 图 7 所示为在天然 IL-13 依赖性 HDLM-2 细胞增殖试验中, BAK502G9(实心方框)、BAK1167F2(实心三角形)、BAK1183H4(实心倒三角形)作为人 IgG4 的中和效价(%抑制), 和商品抗人 IL-13 抗体(B-B13-空心方框; JES10-5A2-空心倒三角形)的中和效价(%抑制)。空心三角形代表无关 scFv。数据如相同试验三次测定结果的平均值和标准误差条带所示。

[0044] 图 8 所示为若干种抗人 IL-13 抗体在 NHLF 试验中的效价比较。数据如 NHLF 嗜酸性粒细胞趋化因子释放试验中所进行的 4-5 次抗 10ng/ml 人 IL-13 试验的平均中和效价( $IC_{50}pM$ )和标准误差条带所示。相对于商业可提供抗体 B-B13 的性能是通过单向 ANOVA 和 Dunnett 检验而得以统计评估的。与 B-B13 相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

[0045] 图 9 所示为 BAK502G9(实心方框)、BAK1167F2(实心三角形)、BAK1183H4(实心倒三角形)作为人 IgG4 在反应 10ng/ml 人 IL-13 的 HUVEC 表面上抗 VCAM-1 正调节的中和效价(%抑制)。空心三角形代表无关 IgG4。数据如相同试验三次测定结果的平均值和标准误差条带所示。

[0046] 图 10 所示为 BAK502G9(实心方框)、BAK1167F2(实心三角形)、BAK1183H4(实心倒三角形)作为人 IgG4 在反应 1ng/ml 人 IL-4(图 10A)或 0.5ng/ml 人 IL-1 $\beta$ (图 10B)的 HUVEC 表面上抗 VCAM-1 正调节所导致的嗜酸性粒细胞趋化因子释放的中和效价(%抑制)。空心三角形代表无关 IgG4。数据如相同试验三次测定结果的平均值和标准误差条带所示。

[0047] 图 11 所示为 BAK209B11(方框)在因子依赖性 B9 细胞增殖试验中抗 1ng/ml 鼠

IL-13 的中和效价 (% 抑制)。空心三角形代表无关 IgG4。数据如相同试验三次测定结果的平均值和标准误差带所示。

[0048] 图 12 所示为在急性肺变应性炎症鼠模型中, 激发后敏化 (s) (右侧柱) 和非敏化 (ns) (左侧柱) 小鼠来源的肺匀浆中 IL-13 的相对水平。敏化效果是通过利用 IL-13 的数量数据进行斯氏 t 检验而得以统计评估的。与非敏化对照动物 (n = 5-6 只小鼠) 相比, \* < 0.05, \*\* < 0.01。数据如平均值和标准误差带所示。

[0049] 图 13 图解了静脉施用不同量 BAK209B11 作为人 IgG4 在卵清蛋白敏化小鼠体内对卵清蛋白诱导的肺部白细胞募集的影响, 并与同种型匹配 IgG4 无关对照抗体进行对比。白细胞数如图所示 ( $\times 10^4$ )。抗体治疗效果是通过利用细胞分类计数数据进行单向 ANOVA 和 Dunnett 检验而得以统计评估的。与卵清蛋白激发的 PBS 对照动物 (= 0% 抑制; n = 5-8 只小鼠) 相比, \* < 0.05, \*\* < 0.01。数据如平均值和标准误差带所示。

[0050] 图 14 图解了静脉施用不同量 BAK209B11 作为人 IgG4 在卵清蛋白敏化小鼠体内对卵清蛋白诱导的肺部嗜酸性粒细胞募集的影响, 并与同种型匹配 IgG4 无关对照抗体进行对比。嗜酸性粒细胞数如图所示 ( $\times 10^4$ )。抗体治疗效果是通过利用细胞分类计数数据进行单向 ANOVA 和 Dunnett 检验而得以统计评估的。与卵清蛋白激发的 PBS 对照动物 (= 0% 抑制; n = 5-8 只小鼠) 相比, \* < 0.05, \*\* < 0.01。数据如平均值和标准误差带所示。

[0051] 图 15 图解了静脉施用不同量 BAK209B11 作为人 IgG4 在卵清蛋白敏化小鼠体内对卵清蛋白诱导的肺部嗜中性粒细胞募集的影响, 并与同种型匹配 IgG4 无关对照抗体进行对比。嗜中性粒细胞数如图所示 ( $\times 10^4$ )。抗体治疗效果是通过利用细胞分类计数数据进行单向 ANOVA 和 Dunnett 检验而得以统计评估的。与卵清蛋白激发的 PBS 对照动物 (= 0% 抑制; n = 5-8 只小鼠) 相比, \* < 0.05, \*\* < 0.01。数据如平均值和标准误差带所示。

[0052] 图 16 图解了静脉施用不同量 BAK209B11 作为人 IgG4 在卵清蛋白敏化小鼠体内对卵清蛋白诱导的肺部淋巴细胞募集的影响, 并与同种型匹配 IgG4 无关对照抗体进行对比。BAK209B11 以剂量依赖性方式抑制淋巴细胞的诱导, 可造成最大抑制的 BAK209B11 剂量为  $3 \mu\text{g/ml}$ 。抗体治疗效果是通过利用细胞分类计数数据进行单向 ANOVA 和 Dunnett 检验而得以统计评估的。与卵清蛋白激发的 PBS 对照动物 (= 0% 抑制; n = 5-8 只小鼠) 相比, \* < 0.05, \*\* < 0.01。数据如平均值和标准误差带所示。

[0053] 图 17 图解了静脉施用不同量 BAK209B11 作为人 IgG4 在卵清蛋白敏化小鼠体内对卵清蛋白诱导的肺部单核细胞 / 巨噬细胞募集的影响, 并与同种型匹配 IgG4 无关对照抗体进行对比。与对照动物相比, 敏化动物的单核细胞 / 巨噬细胞水平并未显著升高。但在敏化动物体内,  $\geq 36 \mu\text{g/ml}$  BAK209B11 可降低这些细胞的自然背景值。抗体治疗效果是通过利用细胞分类计数数据进行单向 ANOVA 和 Dunnett 检验而得以统计评估的。与卵清蛋白激发的 PBS 对照动物 (= 0% 抑制; n = 5-8 只小鼠) 相比, \* < 0.05, \*\* < 0.01。数据如平均值和标准误差带所示。

[0054] 图 18 所示为市售抗 -IL-13 中和抗体 JES10-5A2 对进入因施用细菌来源重组人 IL-13 所造成的鼠气囊内的细胞内向通量 (白细胞数如图所示 ( $\times 10^4$ )) 的影响。抗体治疗效果是通过利用细胞分类计数数据进行单向 ANOVA 和 Dunnett 检验而得以统计评估的。与 CMC 对照动物 (= 0% 抑制; n = 11-13 只小鼠) 相比, \* < 0.05, \*\* < 0.01。数据如平均值和标准误差带所示。

[0055] 图 19 所示为猕猴 IL-13 与人 IL-13 氨基酸序列的比对。人 IL-13 与猕猴 IL-13 不同的 7 个氨基酸残基如阴影部分所示。恒河猴 IL-13 和猕猴 IL-13 的氨基酸序列相同。

[0056] 图 20 图解了单次静脉施用集合药团剂量为 10mg/kg 的 BAK502G9 作为人 IgG4 在 29 天内对 4 只具有变应性但未被激发的猕猴灵长类动物 (2 只雄性 / 2 只雌性) 的血清 IgE 水平的影响。给药后第 4 和第 5 天, 血清 IgE 浓度由 100% (初始剂量) 显著降低至对照值的  $66 \pm 10\%$  ( $p < 0.05$ )。第 22 天, 该血清 IgE 浓度的降低恢复至对照水平的  $88 \pm 8\%$ 。与初始剂量 IgE 水平相比, 重复测定 ANOVA 后, 通过 Dunnett 多重比较检验可得  $* = p < 0.05$  ( $n = 4$  只动物)。

[0057] 图 20B 所示为单次静脉内施用剂量为 10mg/kg 的 BAK502G9 后, 雄性和雌性猕猴灵长类动物的相对血清 IgE 水平与时间的关系曲线。相对血清 IgE 数据被表示为算术平均值  $\pm$  基线值的 SEM 百分比。

[0058] 图 21 图解了腹膜内施用不同量 ( $H = 237 \mu\text{g}/\text{天}$ 、 $M = 23.7 \mu\text{g}/\text{天}$  和  $L = 2.37 \mu\text{g}/\text{天}$ ) BAK209B11 对卵清蛋白敏化和激发小鼠肺功能的影响, 并与同种型匹配 IgG1 无关对照抗体进行对比。图 21A 以  $\text{PC}_{50}$ s 的对数 (使基线 PenH 提高 50% 所需乙酰甲胆碱浓度的对数值) 形式显示了在所有治疗之前 (第 0 天) 和敏化、激发和药物治疗后 (第 25 天) 的肺功能。图 21A 所示为被用于计算图 21B 所示研究终点 ( $\Delta \log \text{PC}_{50}$ ) 的原始数据。数据如平均值和标准误差条带所示,  $n = 8$ 。

[0059] 在图 21B 中, 可变肺功能如个体小鼠  $\text{PC}_{50}$  对数值的变化 ( $\Delta \log \text{PC}_{50}$ ) 所示。 $\Delta \log \text{PC}_{50}$  的定义是个体小鼠第 25 天与第 0 天的  $\log \text{PC}_{50}$  之差。数据如组  $\Delta \log \text{PC}_{50}$  平均值 (由接受治疗的实验组内的个体变化平均所得) 和标准误差条带所示。抗体治疗效果是通过利用  $\Delta \log \text{PC}_{50}$  数据进行单向 ANOVA 和 Dunnett 检验而得以统计评估的。与卵清蛋白敏化和激发的对照动物 ( $n = 8$  只小鼠) 相比,  $** p < 0.01$ 。

[0060] 图 22 图解了局部 (气囊内) 和系统 (静脉内) 施用不同量 BAK502G9 作为人 IgG4 对进入 BALB/C 小鼠气囊内的白细胞总募集量 (图 22A) 和嗜酸性粒细胞总募集量 (图 22B) 的影响, 并与同种型匹配 IgG4 无关对照抗体进行对比。数据如平均值和标准误差条带所示,  $n = 10$ 。抗体治疗效果是通过利用变换数据对数值进行单向 ANOVA 和 Dunnett 检验而得以统计评估的。与 huIL-13 激发小鼠 ( $n = 10$ ) 相比,  $* p < 0.05$ ,  $** p < 0.01$ 。

[0061] 图 23 图解了腹膜内施用 BAK502G9 作为人 IgG4 对小鼠呼吸道在气管内施用人 IL-13 后所出现的 AHR 的影响, 并与同种型匹配 IgG4 无关对照抗体进行对比。抗体治疗效果是通过利用  $\text{PC}_{200}$  乙酰甲胆碱数据进行单向 ANOVA 和 Dunnett 检验而得以统计评估的。与人 IL-13 阳性对照组 ( $n = 6-8$  只小鼠) 相比,  $* < 0.05$ ,  $** < 0.01$ 。数据如平均值和标准误差条带所示。

[0062] 图 24 所示为 BAK502G9 (实心方框) 作为 IgG4 在人 B 细胞 IgE 生成试验中抗 30ng/ml IL-13 的中和效价 (% 最大反应)。空心方框代表无关 IgG4。数据如利用 6 个供体进行不同试验所获数据的平均值和标准误差条带所示。

[0063] 图 25 所示为 BAK502G9 对支气管平滑肌细胞内由 IL-13 诱导的增效剂诱导性  $\text{Ca}^{2+}$  信号增强的影响。测定了各抗体  $\pm$  IL-13 预处理条件下由反应组胺产生的  $\text{Ca}^{2+}$  信号所标绘的曲线下方的面积 (AUC)。利用无关抗体 CAT-001 (a) 和 BAK502G9 (b) 进行三次独立试验所获的组合数据均被显示为与未经处理细胞  $\text{AUC} \pm \text{SD}$  ( $\text{ns} =$  不显著 ( $p > 0.05$ )),  $* p < 0.05$ ,



\*\*  $p < 0.01$ ) 的差值百分比。利用单向方差分析 (ANOVA) 和 Bonferroni 多重对比后检验统计评估结果。

[0064] 图 26 所示为 II 期施用 BAK502G9 的作用。

[0065] 图 26A 所示为根据组胺剂量反应曲线下方面积的变化所测对 AHR 的影响 ( $n = 14$ )。

[0066] 图 26B 所示为根据  $PC_{30}$  的变化所测对 AHR 的影响 ( $n = 18$ )。

[0067] 图 26C 所示为对抗原引发的影响 ( $n = 20$ )。

[0068] 图 26D 所示为对 BAL 炎症的影响 ( $n = 21$ )。

[0069] 图 27 所示为 BAK502G9 对 IL-13 诱导的 CD23 表达的影响。数据被显示为与仅对 IL-13 (100%) 的反应的百分比,被表达为由 6 个独立供体进行 6 个独立试验 (各平行进行三次) 所获数据的平均值  $\pm$  对照的 SEM%。

[0070] 图 28 所示为 BAK502G9 和无关 IgG4 对 IL-13 和 / 或 IL-4 诱导的 PBMC CD23 表达的影响。数据被显示为与仅对 IL-4 (100%) 的反应的百分比,被表达为由 4 个独立供体进行 4 个独立试验 (各平行进行三次) 所获数据的平均值  $\pm$  对照的 SEM%。

[0071] 图 29A 所示为 BAK502G9 对通过用含有 IL-13/TNF- $\alpha$ /TGF- $\beta$  1 的培养基进行 48 小时培养所诱导的 NHLF 嗜酸性粒细胞趋化因子-1 生成的影响。数据被显示为通过在该研究中用所述培养基诱导白细胞形状的变化,并平行进行三次测定所获数据的平均值  $\pm$  SEM。

[0072] 图 29B 所示为 BAK502G9 对由条件培养基的 1 : 16 稀释液所诱导的人嗜酸性粒细胞形状变化的影响。数据点被显示为通过用 4 个独立供体进行独立试验所获数据的平均值  $\pm$  用空白培养基所获形状变化的 SEM%。

[0073] 图 30 所示为人 IL-13 与鼠 IL13 的比对,突出部分所示为被导入人 IL-13 并可生成第一个图框所示 IL-13 嵌合体的突变。方框内突出显示了 4 个  $\alpha$  螺旋,环 1 和环 3 被标记了。5 种嵌合蛋白是通过用鼠序列取代螺旋 B、C 和 D,以及环 1 和环 3 而生成的。生成另外 4 种嵌合蛋白,并根据人前蛋白中的氨基酸对其编号 (而不是根据上述多重比对的编号),其中 30 号位残基的精氨酸 (上述 34 号位) 被突变、33 和 34 号位残基 (上述 37 和 38 号位) 被突变、37 和 38 号位残基 (VH) 被突变 (上述 41 和 42 号位),以及 40 和 41 号位残基 (TQ) 被突变 (上述 44 和 45 号位)。

[0074] 图 31 所示人 IL-13 与鼠 IL13 的比对,突出部分所示为被导入人 IL-13 并可生成第二个图框所示 IL-13 嵌合体的突变。通过用人残基取代鼠残基 (如方框部分突出所示),可生成 6 种嵌合体。通过使 58 号残基的亮氨酸 (上图的 62 号位残基) 突变、119 号残基的亮氨酸 (上图的 123 号位残基) 突变、123 号残基的赖氨酸 (上图的 127 号位残基) 突变,以及 127 号残基的精氨酸 (上图的 132 号位残基) 突变 (上图的 132 号位残基),可生成另外 4 种嵌合蛋白 (根据人前蛋白的氨基酸位置编号)。

[0075] 图 32 所示为对人 IL-13 的突变。深灰色部分所示突变减弱了与 BAK502G9 的结合、浅灰色部分所示突变不改变该结合。具有突变残基的前人 IL-13 的线型序列如图所示。

[0076] 本发明的多个方面和实施方案提供了下文所包括权利要求的主旨。

[0077] 本发明提供了针对 IL-13,尤其是人和 / 或灵长类动物 IL-13 和 / 或变异 IL-13(Q130R),以及鼠 IL-13 的特异性结合成员。本发明的优选实施方案是抗体分子,而无论完整抗体 (例如 IgG,诸如 IgG4) 或抗体片段 (例如 scFv、Fab、dAb)。所提供的抗体抗原

结合区为抗体 VH 和 VL 结构域。VH 和 VL 结构域内可含有若干互补决定区 CDR, 这些互补决定区可被包括在不同构架区 FR 内, 并根据情况形成 VH 或 VL 结构域。抗原结合位点可由抗体 VH 结构域和 / 或 VL 结构域组成。

[0078] 通过使 CDR 定位于诸如纤连蛋白或细胞色素 B 等非抗体蛋白支架结构上, 可获得抗原结合位点 [115、116]。Nygren 等人详细论述了可用于设计蛋白质内新结合位点的支架结构 [116]。WO/0034784 公开了用于抗体模拟物的蛋白质支架结构, 其发明者在其中描述了包括具有至少一个随机化环的纤连蛋白 III 型结构域的蛋白质 (抗体模拟物)。可导入一个或多个 CDR, 例如一组 HCRR 的合适支架结构可由免疫球蛋白基因超家族的任意结构域部分提供。

[0079] 本发明的若干优选实施方案在本文被称为“BAK278D6 谱系”。其定义与含有一组如下所列 6 个 CDR 序列的 BAK278D6 有关: HCDR1 (SEQ ID NO :1)、HCDR2 (SEQ ID NO :2)、HCDR3 (SEQ ID NO :3)、LCDR1 (SEQ ID NO :4)、LCDR2 (SEQ ID NO :5) 和 LCDR3 (SEQ ID NO :6)。本发明的一个方面提供了针对人 IL-13 的特异性结合成员, 具有由人抗体 VH 结构域和人抗体 VL 结构域组成并包括一组 CDR 的抗体抗原结合位点, 其中 VH 结构域包括 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, VL 结构域包括 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 其中 HCDR1 具有 SEQ ID NO :1 所示氨基酸序列、HCDR2 具有 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列、HCDR3 具有 SEQ ID NO :3 所示氨基酸序列、LCDR1 具有 SEQ ID NO :4 所示氨基酸序列、LCDR2 具有 SEQ ID NO :5 所示氨基酸序列、LCDR3 具有 SEQ ID NO :6 所示氨基酸序列; 或者其中的 CDR 组与下述 CDR 组, 即具有 SEQ ID NO :1 所示氨基酸序列的 HCDR1、具有 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列的 HCDR2、具有 SEQ ID NO :3 所示氨基酸序列的 HCDR3、具有 SEQ ID NO :4 所示氨基酸序列的 LCDR1、具有 SEQ ID NO :5 所示氨基酸序列的 LCDR2、具有 SEQ ID NO :6 所示氨基酸序列的 LCDR3 相比, 含有一处或两处氨基酸取代。

[0080] 其中 HCDR1 具有 SEQ ID NO :1 所示氨基酸序列、HCDR2 具有 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列、HCDR3 具有 SEQ ID NO :3 所示氨基酸序列、LCDR1 具有 SEQ ID NO :4 所示氨基酸序列、LCDR2 具有 SEQ ID NO :5 所示氨基酸序列、LCDR3 具有 SEQ ID NO :6 所示氨基酸序列的 CDR 组在本文中被称为“BAK278D6CDR 组”。BAK278D6CDR 组内的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 被称为“BAK278D6HCDR 组”, BAK278D6CDR 组内的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 被称为“BAK278D6LCDR 组”。具有 BAK278D6CDR 组、BAK278D6HCDR 组或 BAK278D6LCDR 组, 或具有一处或两处取代的 CDR 组均被认为属于 BAK278D6 谱系。

[0081] 如上所述, 本发明的一个方面提供了针对人 IL-13 的特异性结合成员, 具有由人抗体 VH 结构域和人抗体 VL 结构域组成并包括一组 CDR 的抗体抗原结合位点, 其中所述 CDR 组为 BAK278D6CDR 组或与其相比含有一处或两处取代的 CDR 组。

[0082] 在优选实施方案中, 所述一处或两处取代位于 VH 和 / 或 VL 结构域所含 CDR 内下列残基位中的一处或两处, 编号采用 Kabat 标准编号法 [107]。

[0083] HCDR1 中的 31、32、34 号位

[0084] HCDR2 中的 52、52A、53、54、56、58、60、61、62、64、65 号位

[0085] HCDR3 中的 96、97、98、99、101 号位

[0086] LCDR1 中的 26、27、28、30、31 号位

[0087] LCDR2 中的 56 号位

[0088] LCDR3 中的 95A、97 号位

[0089] 与上述 BAK278D6CDR 组相比, 优选实施方案在 HCDR3 的 99 号残基和 LCDR1 的 27 号残基处具有两处取代。这些实施方案中的优选方案是将 HCDR3 的 99 号残基上的 N 取代为 S, 和 / 或将 LCDR1 的 27 号残基上的 N 取代为 I。还要进一步的实施方案具有位于 HCDR3 的 99 号残基并选自 S、A、I、R、P 和 K 的取代, 和 / 或位于 LCDR1 的 27 号残基并选自 I、L、M、C、V、K、Y、F、R、T、S、A、H 和 G 的取代。

[0090] 在优选实施方案中, 所述一处或两处取代位于 BAK278D6CDR 组内的下列残基位中的一处或两处, 并选自下列已确定的可能取代残基:

[0091]

| <u>取代位置</u>             | <u>取代残基选自</u>                |
|-------------------------|------------------------------|
| <b>HCDR1 中的 31 号位:</b>  | <b>Q、D、L、G 和 E</b>           |
| <b>HCDR1 中的 32 号位:</b>  | <b>T</b>                     |
| <b>HCDR1 中的 34 号位:</b>  | <b>V、I 和 F</b>               |
| <b>HCDR2 中的 52 号位:</b>  | <b>D、N、A、R、G 和 E</b>         |
| <b>HCDR2 中的 52A 号位:</b> | <b>D、G、T、P、N 和 Y</b>         |
| <b>HCDR2 中的 53 号位:</b>  | <b>D、L、A、P、T、S、I 和 R</b>     |
| <b>HCDR2 中的 54 号位:</b>  | <b>S、T、D、G、K 和 I</b>         |
| <b>HCDR2 中的 56 号位:</b>  | <b>T、E、Q、L、Y、N、V、A、M 和 G</b> |
| <b>HCDR2 中的 58 号位:</b>  | <b>I、L、Q、S、M、H、D 和 K</b>     |
| <b>HCDR2 中的 60 号位:</b>  | <b>R</b>                     |

[0092]

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>HCDR2 中的 61 号位:</b>  | <b>R</b>                                  |
| <b>HCDR2 中的 62 号位:</b>  | <b>K 和 G</b>                              |
| <b>HCDR2 中的 64 号位:</b>  | <b>R</b>                                  |
| <b>HCDR2 中的 65 号位:</b>  | <b>K</b>                                  |
| <b>HCDR3 中的 96 号位:</b>  | <b>R 和 D</b>                              |
| <b>HCDR3 中的 97 号位:</b>  | <b>N、D、T 和 P</b>                          |
| <b>HCDR3 中的 98 号位:</b>  | <b>R</b>                                  |
| <b>HCDR3 中的 99 号位:</b>  | <b>S、A、I、R、P 和 K</b>                      |
| <b>HCDR3 中的 101 号位:</b> | <b>Y</b>                                  |
| <b>LCDR1 中的 26 号位:</b>  | <b>D 和 S</b>                              |
| <b>LCDR1 中的 27 号位:</b>  | <b>I、L、M、C、V、K、Y、F、R、T、S、<br/>A、H 和 G</b> |
| <b>LCDR1 中的 28 号位:</b>  | <b>V</b>                                  |
| <b>LCDR1 中的 30 号位:</b>  | <b>G</b>                                  |
| <b>LCDR1 中的 31 号位:</b>  | <b>R</b>                                  |
| <b>LCDR2 中的 56 号位:</b>  | <b>T</b>                                  |
| <b>LCDR3 中的 95A 号位:</b> | <b>N</b>                                  |
| <b>LCDR3 中的 97 号位:</b>  | <b>I</b>                                  |

[0093] 优选实施方案具有 BAK278D6CDR 组, 其中 HCDR3 的 99 号残基上的 N 被取代为 S, LCDR1 的 27 号残基上的 N 被取代为 I。因此, 对 CDR 组的定义如下: HCDR1-SEQ ID NO:7; HCDR2-SEQ ID NO:8; HCDR3-SEQ ID NO:9; LCDR1-SEQ ID NO:10; LCDR2-SEQ ID NO:11; LCDR3-SEQ ID NO:12。本文将该 CDR 组称为“BAK502G9CDR 组”。

[0094] 进一步的优选实施方案具有含一处或两处取代的 BAK278D6CDR 组, 条件是排除了将 HCDR3 的 99 号残基上的 N 取代为 S 和将 LCDR1 的 27 号残基上的 N 取代为 I 的取代组合。

[0095] 一些优选实施方案如下: BAK 1166G2: HCDR1-SEQ ID NO:67、HCDR2--SEQ ID NO:68、HCDR3--SEQ ID NO:69、LCDR1--SEQ ID NO:70、LCDR2--SEQ ID NO:71、LCDR3--SEQ ID NO:72。

[0096] BAK1167F2: HCDR1-SEQ ID NO:61、HCDR2--SEQ ID NO:62、HCDR3--SEQ ID NO:63、LCDR1--SEQ ID NO:64、LCDR2--SEQ ID NO:65、LCDR3--SEQ ID NO:66。

[0097] BAK1184C8: HCDR1-SEQ ID NO:73、HCDR2--SEQ ID NO:74、HCDR3--SEQ ID NO:75、

LCDR1--SEQ ID NO :76、LCDR2--SEQ ID NO :77、LCDR3--SEQ ID NO :78。

[0098] BAK1185E1 :HCDR1--SEQ ID NO :79、HCDR2--SEQ ID NO :80、HCDR3--SEQ ID NO :81、LCDR1--SEQ ID NO :82、LCDR2--SEQ ID NO :83、LCDR3--SEQ ID NO :84。

[0099] BAK1167F4 :HCDR1--SEQ ID NO :85、HCDR2--SEQ ID NO :86、HCDR3--SEQ ID NO :87、LCDR1--SEQ ID NO :88、LCDR2--SEQ ID NO :89、LCDR3--SEQ ID NO :90。

[0100] BAK1111D10 :HCDR1--SEQ ID NO :91、HCDR2--SEQ ID NO :92、HCDR3--SEQ ID NO :93、LCDR1--SEQ ID NO :94、LCDR2--SEQ ID NO :95、LCDR3--SEQ ID NO :96。

[0101] BAK1183H4 :HCDR1--SEQ ID NO :97、HCDR2--SEQ ID NO :98、HCDR3--SEQ ID NO :99、LCDR1--SEQ ID NO :100、LCDR2--SEQ ID NO :101、LCDR3--SEQ ID NO :102。

[0102] BAK1185F8 :HCDR1--SEQ ID NO :103、HCDR2--SEQ ID NO :104、HCDR3--SEQ ID NO :105、LCDR1--SEQ ID NO :106、LCDR2--SEQ ID NO :107、LCDR3--SEQ ID NO :108。这些 CDR 组均是通过重链 CDR1 和 CDR2 随机化而来源于 BAK502G9,因而属于 BAK502G9 谱系。

[0103] 具有包括特定 CDR 组,即 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的 VH 结构域的所有克隆如表 1 所示。本发明提供了表 1,该表另外包括其所示克隆具有的包括特定 CDR 组,即 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的 VL 结构域。所述 VH 结构域优选地与所述 VL 结构域配对,该 VH 和 VL 结构域配对最优选地与表 1 所示克隆中的配对情况相同。

[0104] 本发明进一步提供了包括特定 CDR 组,即 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的 VH 结构域,其中该 CDR 组与表 1 所示所有克隆具有的 CDR 组相比,含有一处或两处氨基酸取代。

[0105] 本发明进一步提供了包括特定 CDR 组,即 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的 VL 结构域,其中该 CDR 组与表 1 所示所有克隆具有的 CDR 组相比,含有一处或两处氨基酸取代。

[0106] 本发明还提供了具有包括上述 VH 和 / 或 VL 结构域的抗体抗原结合结构域的特异性结合成员。

[0107] 发明者通过提供具有特殊意义的抗 IL-13 的人抗体抗原结合结构域,从而确定了 BAK278D6 谱系。该谱系内的 BAK502G9 被认为具有特殊意义。如上所述,还确定了 BAK278D6 和 BAK502G9 的 CDR 组。

[0108] 在计算化学率先应用多元数据分析技术分析了结构 / 特性 - 活性关系 [94] 后,可利用众所周知的数学方法,诸如统计回归、模式识别和分类方法,导出抗体活性 - 特性的定量关系 [95-100]。根据抗体序列、功能和三维结构的经验和理论模型(例如,对可能接触的残基的分析或计算所获的物理化学特性)可导出抗体特性,且这些特性可以被单独和组合考虑。

[0109] 包括 VH 结构域和 VL 结构域的抗体抗原结合位点由 6 个多肽环形成:3 个来自轻链可变结构域(VL),3 个来自重链可变结构域(VH)。对已知原子结构的抗体的分析已阐明了抗体结合位点的序列与三维结构之间的关系 [101、102]。这些关系意味着,除了 VH 结构域内的第三个区域(环)之外,结合位点环具有少数几种主链构象:规范结构中的一种。特定环内形成的规范结构已被证实可通过其大小以及在该环和构架区两处内的关键位点上所存在的某些残基而得以确定 [101、102]。

[0110] 对序列 - 结构关系的研究可被用于预测在序列已知但三维结构未知的抗体内,对维持其 CDR 环的三维结构和由此维持结合特异性而言具有重要作用的那些残基。通过与前导优化试验所获结果进行比较,便可证实这些预测。

[0111] 在结构方法中,利用可免费获得或市售的软件包,诸如 WAM[104],便可构建抗体分子模型 [103]。继而可采用蛋白质显色和分析软件包,诸如 Insight II[105] 或 Deep View[106],评估所述 CDR 内各位置处可能出现的取代。接着可利用该信息实现对活性的影响可能最小或有利的取代。

[0112] 发明者分析了所含 CDR 组如表 1 所示的克隆系列的序列数据。

[0113] 该分析检验了下述假设,即在已有 scFv 变体组来源的 CDR 中,所列氨基酸变异的任意二元组合均将导致出现至少具有亲本 scFv BAK278D6 的初始效价的 scFv 变体。

[0114] 表 1 所示列表中的所有 scFv 变体已被选择用于提高亲和力,并已被证实可表现较高的效价。

[0115] 所观测氨基酸变体对 scFv BAK278D6 在 44nM 的 TF-1 试验中的初始效价的影响可能有利、不利或者中性。

[0116] 在任意两种氨基酸变异之间均未观测到联系,说明任意两种选定氨基酸变异之间不存在“正”或“负”协同作用。

[0117] 有 4 种情况是所述二元组合可使上述假设成立,有 3 种情况是该假设无法成立。协同的氨基酸变体未被考虑在内,因为未观测到它们之间的联系。

[0118] 所述假设成立的情况是:

[0119] A1:突变 1 有利,突变 2 有利

[0120] A2:突变 1 有利,突变 2 中性

[0121] A3:突变 1 中性,突变 2 中性

[0122] A4:突变 1 有利,突变 2 不利(突变 1 的影响在重要性上胜过突变 2 的影响)。

[0123] 所述假设不成立的情况是:

[0124] B1:突变 1 不利,突变 2 中性

[0125] B2:突变 1 不利,突变 2 不利

[0126] B3:突变 1 有利,突变 2 不利(突变 2 的影响在重要性上胜过突变 1 的影响)。

[0127] 如果 A4 可能,突变 1 必须高度有利于平衡突变 2 对效价所造成的不利影响。由于这种高度有利的突变应存在于被用于筛选的变体文库中,因而可将其选出并使其频繁出现在变体列表中。由于可排除协同作用,这种突变在所有类型的序列中均是有利的,因此应该再次出现在不同的 scFv 变体中。这种常见氨基酸变化的实例是出现在轻链 CDR1Asn27Ile 中的变化。但该突变本身(在克隆 BAK531E2 中)对效价仅具有普通的 2 倍影响(最终 IC<sub>50</sub> 为 23.2nM)。该突变本身将不会使 A4 所述情况发生,因为其并非高度有利的突变。这表明(表 1)所列具有轻链 CDR1 Asn27Ile 变化以及 1 处或 2 处其它突变的 IL-13 结合克隆组内的每一种克隆至少与具有单个轻链 CDR1 Asn27Ile 突变的变体一样有效。其它突变则具有中性或有利影响,而不具有不利或有害的影响。

[0128] 进一步的实例出现在重链 CDR3 Asn99Ser 中(参见表 1)。由于未发现具有该特定单个氨基酸变异的克隆,通过下述理论估计这种克隆的效价约为 12.0nM:

[0129] BAK278D6 效价为 44nM。改造 VL CDR1 N27I+VH CDR3 N99S 可获得效价为 8nM 的 BAK502G9,即提高了 5.5 倍。

[0130] BAK278D6 效价为 44nM。改造 VL CDR1 N27I 可获得效价为 23nM 的 BAK531E2,即提高了 1.9 倍。

[0131] BAK278D6 效价为 44nM。改造 VH CDR3 N99S 可能获得效价为 12.2nM 的克隆,即提高了 2.9 倍 ( $5.5/1.9 = 2.9$ )。

[0132] 重链 CDR3 Asn99Ser 与轻链 CDR1 Asn27Ile 的二元组合可获得效价为 8nM 的 scFv BAK502G9。由于排除了协同作用,所以重链 CDR3 Asn99Ser 变化在 BAK502G9 中的作用是迭加的。

[0133] 因此,(表 1)所列具有重链 CDR3 AsnH99Ser 变化以及一处或多处其它突变的 IL-13 结合克隆组内的每一种克隆将具有至少为 12nM 或更高的效价,在  $n = 1-2$  的许可性试验窗口范围内,即 2.5 倍。

[0134] 因此,发明者指出尚未观测到可被优选的高度有利的氨基酸变异。如上所述,经过分析发现在表 1 所列 scFv 变体中主要存在的两种变异较接近。表 1 所列具有这两种变异之一以及一处或多处其它突变的所有 scFv 变体显示的效价至少比含有亲本 BAK278D6 中的 2 种单个氨基酸变异之一的克隆所显示的效价高。因此,尚无证据表明表 1 列表中存在可使 A4 所述情况发生的高度有利的氨基酸变异。

[0135] 发明者根据该观测结果所获结论如下,即该 scFv 变体组中不存在不利突变。这意味着 A4 和 B1-B3 所述情况无关,且所述假设成立。

[0136] 如上所述,本发明相应提供了包括上文所定义的 CDR 组,尤其是 BAK278D6 的 CDR 组,和 BAK278D6 谱系中具有一处或两处取代的 CDR 组,例如 BAK502G9 CDR 组的特异性结合成员。

[0137] 相关 CDR 组被包括在抗体构架区或其它蛋白质支架内,例如纤连蛋白或细胞色素 B[115、116]。优选应用抗体构架区,且当如此应用时,这些抗体构架区优选为种系,更优选的是,用于重链的抗体构架区可以是 VH1 家族来源的 DP14。用于轻链的优选构架区可以是  $\lambda$  3-3H。对 BAK502G9 CDR 组而言,优选的抗体构架区为 VH FR1 SEQ ID NO:27、VH FR2 SEQ ID NO:28、VH FR3 SEQ ID NO:29、轻链 FR1 SEQ ID NO:30、轻链 FR2 SEQ ID NO:31、轻链 FR3 SEQ ID NO:32。在一种高度优选的实施方案中,VH 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示,被称为“BAK502G9 VH 结构域”。在一种进一步的高度优选实施方案中,VL 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO:16 所示,被称为“BAK502G9 VL 结构域”。本发明提供的高度优选抗体抗原结合位点包括 BAK502G9 VH 结构域 SEQ ID NO:15 和 BAK502G9 VL 结构域 SEQ ID NO:16。正如本文其它部分所论述的,该抗体抗原结合位点可被包括在任意的目标抗体分子形式内,例如 scFv、Fab、IgG、IgG4、dAb 等。

[0138] 在一种进一步的高度优选实施方案中,本发明提供了包括 BAK502G9 VH 结构域 SEQ ID NO:15 和 BAK502G9 VL 结构域 SEQ ID NO:16 的 IgG4 抗体分子。本文将之称为“BAK502G9 IgG4”。

[0139] 本发明还提供了包括 BAK502G9 VH 结构域 SEQ ID NO:15 和/或 BAK502G9 VL 结构域 SEQ ID NO:16 的其它 IgG4 或其它抗体分子,以及抗体 VH 结构域内含有 BAK502G9 HCDR 组 (SEQ ID NO:7、8 和 9),和/或抗体 VL 结构域内含有 BAK502G9 LCDR 组 (SEQ ID NO:10、11 和 12) 的其它抗体分子。

[0140] 此处应指出的是,本文所用“和/或”应被理解为对两种特定特征或组成之一单独出现或与另一种特征或组成一起出现的特定描述。例如“A 和/或 B”应被理解为对 (i)A、(ii)B 和 (iii)A 和 B 这三种情况之一的特定描述,就如同本文将这三种情况单独列出而已。

[0141] 如上所述,本发明提供了可结合人 IL-13 并包括 BAK502G9 VH 结构域 (SEQ ID NO: 15) 和 / 或 BAK502G9 VL 结构域 (SEQ ID NO:16) 的特异性结合成员。

[0142] VH 结构域通常与 VL 结构域配对,可获得抗体抗原结合位点,但正如下文进一步论述的, VH 结构域本身就可被用于结合抗原。在一种优选实施方案中, BAK502G9 VH 结构域 (SEQ ID NO:15) 与 BAK502G9 VL 结构域 (SEQ ID NO:16) 配对,从而形成了同时包括上述 BAK502G9 VH 和 VL 结构域的抗体抗原结合位点。在另一些实施方案中, BAK502G9 VH 是与除 BAK502G9 VL 之外的其它 VL 结构域配对。轻链混杂是本领域熟知的。

[0143] 同样, BAK278D6 谱系的所有 HCDR 组均可被包括在被单独用作特异性结合成员或与 VL 结构域一起组合用作特异性结合成员的 VH 结构域内。VH 结构域可具有 BAK278D6 谱系抗体的一组 HCDR,例如,如表 1 所示,并且如果这种 VH 结构域与 VL 结构域配对,则该 VL 结构域可具有 BAK278D6 谱系抗体的一组 LCDR,例如,如表 1 所示。HCDR 组与 LCDR 组的配对可能如表 1 所示,可生成包括表 1 所示 CDR 组在内的抗体抗原结合位点。所述 VH 和 / 或 VL 结构域的构架区可能是种系构架。重链结构域的构架区可选自 VH-1 家族,且优选 VH-1 构架为 DP-14 构架。轻链的构架区可选自  $\lambda$  3 家族,且其优选构架为  $\lambda$  33H。

[0144] 可由 BAK502G9 VH 或 VL 结构域中取出一个或多个 CDR,并将它们整合进合适的构架内。本文对该内容进行了进一步的论述。BAK502G9 HCDR 1、2 和 3 分别如 SEQ ID NO:7、8 和 9 所示。BAK502G9 LCDR 1、2 和 3 分别如 SEQ ID NO:10、11 和 12 所示。

[0145] 对其它 BAK278D6 谱系 CDR 和 CDR 组而言的相同应用如表 1 所示。

[0146] 本发明进一步的实施方案涉及包括所述 VH 和 / 或 VL 结构域的特异性结合成员,或包括本文所公开抗体分子,诸如 167A11 (VH:SEQ ID NO:23 和 VL:SEQ ID NO:24) 及其衍生物 615E3 (VH:SEQ ID NO:33 和 VL:SEQ ID NO:34) BAK582F7 (VH CDR's SEQ ID's 141-143) 和 BAK612B5 (VH CDR's SEQ ID's 147-149) 的 VH 和 / 或 VL 结构域所含 CDRs 的抗原结合位点。上述抗体均可识别人 IL-13。167A11 通过 VH CDR3 随机化生成的衍生物是有效的 scFV 分子 (5-6nM)。正如本文针对其它分子所述,167A11 谱系可被应用在本发明的任意方面和实施方案中,例如,使抗原结合位点突变和筛选效价提高的抗原结合位点的方法。

[0147] 本发明所述 VH 和 VL 结构域和 CDRs 的变体包括本文提供了氨基酸序列的那些变体和可被应用在针对 IL-13 的特异性结合成员中的那些变体,均可通过序列变更或突变和筛选方法获得。本发明也提供了这些方法。

[0148] 正如本文所论述的,序列已被本文具体公开的任意 VH 和 VL 结构域的可变结构域氨基酸序列变体均可被应用在本发明中。特殊变体可能包括一处或多处氨基酸序列变更 (添加、缺失、取代和 / 或插入氨基酸残基),可能具有少于大约 20 处的变更、少于大约 15 处的变更、少于大约 10 处的变更或少于大约 5 处的变更、4 处、3 处、2 处或 1 处变更。可对一个或多个构架区和 / 或一个或多个 CDR's 进行改造。

[0149] 本发明进一步的方面提供了可与特定的特异性结合成员竞争结合抗原的特异性结合成员,所述特定的特异性结合成员可结合所述抗原,并且包括本文所公开的特异性结合成员、VH 和 / 或 VL 结构域,或本文公开的 HCDR3,或它们的变体。结合成员之间的竞争可通过体外试验轻松确定,例如,利用 ELISA 和 / 或通过用特异性报道分子标记其中一个可在其它未标记结合成员存在条件下被检出的结合成员,以鉴定可结合相同表位或重叠表位的



特异性结合成员。

[0150] 因此,本发明的一个进一步的方面提供了具有人抗体抗原结合位点的特异性结合成员,可与 BAK502G9 抗体分子,尤其是 BAK502G9 scFv 和 / 或 IgG4 竞争结合 IL-13。本发明进一步的方面提供了具有可与特定抗体抗原结合位点竞争结合 IL-13 的人抗体抗原结合位点的特异性结合成员,其中所述特定抗体抗原结合位点包括 VH 结构域和 VL 结构域,而其中所述 VH 和 VL 结构域则包括 BAK278D6 谱系的 CDR 组。

[0151] 本领域可应用多种方法获得可与 BAK502G9 抗体分子、具有 BAK502G9 CDR 组的抗体分子,或具有 BAK278D6 谱系的 CDR 组的抗体分子竞争结合 IL-13 的抗 IL-13 抗体。

[0152] 在一个进一步的方面中,本发明提供了可获得一种或多种能够与所述抗原结合的特异性结合成员的方法,该方法包括使本发明所述特异性结合成员的文库与所述抗原接触,并筛选该文库内能够结合该抗原的一个或多个特异性结合成员。

[0153] 该文库可被展示在噬菌体粒子表面上,其中所述噬菌体粒子均含有编码其表面所展示抗体 VH 可变结构域的核酸,任选地当其表面还展示 VL 结构域时,便还含有编码该 VL 结构域的核酸。筛选出能够结合所述抗原并可被展示在噬菌体粒子上的特异性结合成员之后,便可从展示了筛选所获特异性结合成员的噬菌体粒子中获得核酸。这种核酸可被用于继续生成特异性结合成员或抗体 VH 可变结构域(任选地生成抗体 VL 可变结构域),即通过表达具有特定核酸序列的核酸,该核酸序列获自可展示上述筛选所获特异性结合成员的噬菌体粒子中。

[0154] 具有上述筛选所获特异性结合成员的抗体 VH 可变结构域氨基酸序列的抗体 VH 可变结构域可能以分离形式出现,包括这种 VH 结构域的特异性结合成员也可能以分离形式出现。可进一步检验其结合 IL-13 的能力及其与 BAK502G9 竞争结合 IL-13 的能力(例如,以 scFv 形式和 / 或 IgG 形式,例如 IgG4)。正如下文进一步论述的,还可检验其中和 IL-13 的能力。

[0155] 本发明所述特异性结合成员可以 BAK502G9 抗体分子,例如 scFv,或优选 BAK502G9 IgG4 的亲和力,或更佳的亲和力与 IL-13 结合。

[0156] 本发明所述特异性结合成员可以 BAK502G9 抗体分子,例如 scFv,或优选 BAK502G9 IgG4 的效价,或更佳的效价中和 IL-13。

[0157] 本发明所述特异性结合成员可以 BAK502G9 抗体分子,例如 scFv,或优选 BAK502G9 IgG4 的效价,或更佳的效价中和天然存在的 IL-13。

[0158] 可在合适条件下比较不同特异性结合成员的结合亲和力和中和效价。

[0159] 本发明所述抗体具有优于现有市售抗 IL-13 抗体,尤其是三种市售鼠抗人 IL-13 抗体,即 JES10-5A2(BioSource)、B-B13(Euroclone) 和克隆 321166(R&D Systems) 的许多优势。将本发明所述抗体的效价与市售抗体 JES10-A2 和 B-B13 相比。未评估克隆 321166 是因为之前有试验表明该克隆的效价远低于其它已知的市售抗体。

[0160] 上述市售鼠 IL-13 抗体在人体内的效能和用途很可能是有限的,因为它们诱导免疫原性反应的可能提高了,并因此将更快速地被肌体清除。对本发明所述抗体在非人灵长类动物体内的动力学分析表明这些抗体的清除率近似于其它已知的人或人源化抗体的清除率。

[0161] 本发明多种实施方案提供的抗体可识别非人灵长类动物 IL-13,包括恒河猴和猕

猴 IL-13。对抗体在非人灵长类动物体内的效能和安全分布图的确定极为重要,因为这可以提供预测该抗体在人体内的安全、药物代谢动力学和药物动力学分布图的方法。

[0162] 此外,本发明多种实施方案中的抗体还可进一步识别与哮喘相关的人 IL-13 变体 Q130R。与变异 IL-13 的交叉反应性使本发明所述抗体和包括本发明所述抗体在内的组合物可以被用于治疗具有野生型和变异 IL-13 的患者。

[0163] 本发明的一种优选实施方案包括可以等同于或高于由 BAK502G9 VH 结构域 (SEQ ID NO:15) 和 BAK502G9 VL 结构域 (SEQ ID NO:16) 所形成 IL-13 抗原结合位点的效价的效价中和自然存在的 IL-13 的抗体。例如,发明者已证实诸如 BAK502G9、1167F2 和 1183H4 的代表性克隆抗自然存在的 IL-13 的效价显著地高于已知的市售抗体 (图 7)。

[0164] 本发明所述特异性结合成员除包括抗体序列外,还可包括其它氨基酸,例如,形成肽或多肽,诸如折叠结构域,或者赋予该分子以抗原结合能力之外的其它功能特征。本发明所述特异性结合成员可携带可检测标记,或者可与毒素或导向部分或酶结合 (例如,通过肽键或接头)。

[0165] 在进一步的方面中,本发明提供了包括编码本发明所述特异性结合成员、VH 结构域和 / 或 VL 结构域的序列的分离核酸,以及制备本发明所述特异性结合成员、VH 结构域和 / 或 VL 结构域的方法,该方法包括使上述核酸在特定条件下表达,以生成上述特异性结合成员、VH 结构域和 / 或 VL 结构域,并将其回收。

[0166] 本发明所述特异性结合成员可被应用在治疗或诊断人或动物体的方法中,诸如治疗人类患者的疾病或失调的方法 (可能包括预防性治疗),该方法包括对所述患者施用有效量的本发明所述特异性结合成员。根据本发明可治疗的病症包括有 IL-13 在其中发挥作用的疾病,尤其是哮喘、特应性皮炎、过敏性鼻炎、纤维化、慢性梗阻性肺病、硬皮病、炎症性肠病和何杰金氏淋巴瘤。此外,本发明所述抗体还可被用于治疗肿瘤和病毒感染,因为这些抗体均可抑制 IL-13 介导的免疫抑制 [64、65]。

[0167] 本发明的一个进一步的方面提供了通常为分离形式的编码本文所公开抗体 VH 可变结构域和 / 或 VL 可变结构域的核酸。

[0168] 本发明的另一个方面提供了通常为分离形式的编码本文所公开 VH CDR 或 VL CDR 序列,尤其是选自 SEQ ID NO:7、8 和 9 的 VH CDR 或选自 SEQ ID NO:10、11 和 12 的 VL CDR,最优选为 BAK502G9 VH CDR3 (SEQ ID NO:9) 的核酸。本发明还提供了编码 BAK502G9 CDR 组的核酸、编码 BAK502G9 HCDR 组的核酸和编码 BAK502G9 LCDR 组的核酸,以及编码 BAK278D6 谱系的单个 CDR、HCDR、LCDR 以及 CDR 组、HCDR 组、LCDR 组的核酸。

[0169] 一个进一步的方面提供了由本发明所述核酸转化的宿主细胞。

[0170] 另一个进一步的方面提供了生成抗体 VH 可变结构域的方法,该方法包括使编码核酸实现表达。这种方法可包括在特定条件下培养宿主细胞,以生成所述抗体 VH 可变结构域。

[0171] 本发明进一步的方面提供了生成 VL 可变结构域和具有 VH 和 / 或 VL 结构域的特异性结合成员类似方法。

[0172] 生成方法可包括分离和 / 或纯化上述产物的步骤。

[0173] 生成方法可包括将上述产物配制于包括至少一种其它组分,诸如制药学可接受赋形剂的组合物中。

[0174] 下文进一步具体描述了本发明的上述及其它方面。

[0175] 术语

[0176] 特异性结合成员

[0177] 该术语描述了一对彼此均具有结合特异性的分子的成员。该特异性结合对的成员可来源于自然或者全部或部分地通过合成法生成。该分子对其中一个成员的表面具有一个可与该分子对另一个成员的特定空间和极性组构特异性结合并从而互补的区域,或一个空间。因此,该分子对的成员具有彼此特异性结合的特性。特异性结合对的类型实例有抗原-抗体、生物素-抗生物素蛋白、激素-激素受体、受体-配体、酶-底物。本发明涉及抗原-抗体型反应。

[0178] 抗体分子

[0179] 该术语描述的是免疫球蛋白,而无论是天然免疫球蛋白还是部分或全部通过合成方法获得的免疫球蛋白。该术语还包括具有抗体结合结构域的所有多肽或蛋白质。具有抗体结合结构域的抗体片段是诸如 Fab、scFv、Fv、dAb、Fd 的分子,以及双功能抗体。

[0180] 利用单克隆及其它抗体和重组 DNA 技术生成保留了原始抗体的特异性的其它抗体或嵌合分子是可能的。这种技术可包括将编码抗体的免疫球蛋白可变区或互补决定区(CDRs)的 DNA 导入不同免疫球蛋白的恒定区或恒定区外加构架区。参见例如,EP-A-184187、GB2188638A 或 EP-A-239400 以及下述文献资料的内容。可使可生成抗体的杂交瘤或其它细胞发生可能或不可能改变所生成抗体的结合特异性的遗传突变或其它变化。

[0181] 由于可通过许多方法修饰抗体,术语“抗体分子”应被认为包括了所有具有特定抗体抗原结合结构域的特异性结合成员或物质,其中所述特定抗体抗原结合结构域具有必要的特异性。因此,该术语涵盖了抗体片段和衍生物,包括所有具有免疫球蛋白结合结构域的多肽,而无论是天然多肽还是全部或部分合成的多肽。该术语因而还包括具有免疫球蛋白结合结构域或等同物以及与其融合的另一个多肽的嵌合分子。EP-A-0120694 和 EP-A-0125023 以及下述文献有大量内容描述了嵌合抗体的克隆和表达。

[0182] 抗体工程领域可利用的其它技术使人 and 人源化抗体的分离成为可能。例如,可如 Kontermann 等人所述方法制备人杂交瘤 [107]。许多已公开文献,诸如 Kontermann 等人的报道 [107] 和 W092/01047(具体论述参见下文)具体描述了另一种可生成特异性结合成员的确定技术,即噬菌体展示。可利用特定的转基因小鼠分离抗人抗原的人抗体,其中所述转基因小鼠的小鼠抗体基因已失活,并被功能取代为人抗体基因,同时完整保留了小鼠免疫系统的其它组成 [108]。

[0183] 合成抗体分子可通过特定方法所生成基因的表达而得以形成,所述特定方法即在合适的表达载体内合成和组装寡核苷酸,实例参见 Knappik et al. J. Mol. Biol. (2000) 296, 57-86 或 Krebs et al. Journal of Immunological Methods 254 2001 67-84 所述。

[0184] 业已证实完整抗体的片段可实现结合抗原的功能。结合片段的实例即 (i) 由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的 Fab 片段;(ii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段;(iii) 由单个抗体的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段;(iv) 由 VH 结构域组成的 dAb 片段 (Ward, E. S. et al., Nature 341, 544-546 (1989), McCafferty et al (1990) Nature, 348, 552-554); (v) 分离的 CDR 区;(vi) 包括两个连接的 Fab 片段的二价片段 F(ab')<sub>2</sub> 片段;(vii) 单链 Fv 分子

(scFv), 其中 VH 结构域和 VL 结构域是通过可使这两个结构域相连形成抗原结合位点的肽接头而得以连接 (Bird et al., Science, 242, 423-426, 1988; Huston et al., PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988); (viii) 双特异性单链 Fv 二聚体 (PCT/US92/09965) 和 (ix) 通过基因融合构建的“双功能抗体”、多价或多特异性片段 (W094/13804; P. Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993)。Fv、scFv 或双功能抗体分子可通过整合可将 VH 和 VL 结构域连接在一起的二硫键而得以稳定化 (Y. Reiter et al., Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996)。还可制备含有 scFv 和与之结合的 CH3 结构域的微型抗体 (S. Hu et al., Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996)。

[0185] 在利用双特异性抗体的情况中, 这些双特异性抗体可能是可通过多种方法生成的常规双特异性抗体 (Holliger, P. 和 Winter G. Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449 (1993)), 例如, 通过化学方法或由杂合杂交瘤制备的双特异性抗体, 或者可能是上述任意一种双特异性抗体片段。双特异性抗体的实例包括 BiTE™ 技术所涉及的那些双特异性抗体, 其中该技术可利用具有不同特异性的两种抗体的结合结构域并通过短柔性肽将这两个结合结构域直接连接。这将两种抗体组合在了一条短的多肽单链上。仅利用可变结构域, 可构建不含 Fc 区的双功能抗体和 scFv, 从而潜在地减少抗独特型反应的影响。

[0186] 与双特异性完整抗体相对的双特异性双功能抗体也非常有用, 因其易于在大肠杆菌内被构建并表达。利用噬菌体展示可容易地从文库中筛选出具有合适的结合特异性的双功能抗体 (以及其它许多多肽, 诸如抗体片段) (W094/13804)。如果该双功能抗体的一个臂, 例如, 具有直接抗 IL-13 的特异性的臂保持恒定, 便可获得一个文库, 在其中改变另一个臂并筛选具有合适特异性的抗体。双特异性的完整抗体可通过 knobs-into-holes 工程而得以制备 (J. B. B. Ridgeway et al., Protein Eng., 9, 616-621, 1996)。

[0187] 抗原结合结构域

[0188] 该术语描述了具有可与完整抗原或其部分特异性结合和互补的区域的抗体分子的一部分。当抗原较大时, 抗体可能仅结合该抗原的特定部分, 该部分被称为表位。抗原结合结构域可由一个或多个抗体可变结构域提供 (例如由 VH 结构域组成的 Fd 抗体片段)。抗原结合结构域优选地包括抗体轻链可变区 (VL) 和抗体重链可变区 (VH)。

[0189] 特异性地

[0190] 该术语可被用于指下述情况, 即特异性结合对的一个成员显示与除其特异性结合配偶体之外的其它分子没有任何显著的结合。该术语还可应用于下述情况, 即例如, 抗原结合结构域对许多抗原均具有的特定表位具有特异性, 在该情况中, 具有所述抗原结合结构域的特异性结合成员能够与具有上述表位的多种抗原结合。

[0191] 包括

[0192] 该术语通常以包括之意应用, 即允许存在一种或多种特征或组成。

[0193] 分离的

[0194] 该术语指下述情况, 即本发明的特异性结合成员或编码该结合成员的核酸通常与本发明一致。分离部分或分离核酸不含或基本上不含其自然结合的物质, 诸如与其一起被发现存在于它们的自然环境, 或者当通过体外或体内实现的重组 DNA 技术制备该分离部分或分离核酸时与其一起被发现存在于该制备环境 (例如细胞培养物) 中的其它多肽或核酸。特异性结合成员和核酸可与稀释剂或佐剂配制在一起, 并仍适用于其分离状态时的实

际用途 – 例如, 如果该特异性结合成员被用于包被免疫测定所用的微量滴定板, 则通常将其与明胶或其它载体混合, 或者当其被应用在诊断或治疗中时, 则将其与制药学可接受载体或稀释剂混合。特异性结合成员可能自然地或被异源真核细胞 (例如 CHO 或 NS0 (ECACC 85110503) 细胞) 的系统糖基化、或者可能 (例如当其通过原核细胞内的表达而得以生成时) 是未糖基化的。

[0195] 天然存在的 IL-13

[0196] 该术语通常指所述 IL-13 蛋白或其片段可能出现的状态。天然存在的 IL-13 指由未经重组技术预先导入编码核酸的细胞所天然生成的 IL-13 蛋白。因此, 天然存在的 IL-13 可能由例如 CD4+T 细胞自然生成和 / 或从哺乳动物, 例如人、非人灵长类动物、诸如大鼠或小鼠的啮齿动物体内分离获得。

[0197] 重组 IL-13

[0198] 该术语指所述 IL-13 蛋白或其片段可能出现的状态。重组 IL-13 指由异源宿主内的重组 DNA 生成的 IL-13 蛋白或其片段。重组 IL-13 可能通过糖基化而不同于天然存在的 IL-13。

[0199] 被表达在原核细菌表达系统内的重组蛋白未糖基化, 而被表达在诸如哺乳动物或昆虫细胞的真核系统内的重组蛋白是糖基化的。但被表达在昆虫细胞内的蛋白质与被表达在哺乳动物细胞内的蛋白质的糖基化不同。

[0200] “基本上如本文所公开的”指本发明所述相关 CDR 或 VH 或 VL 结构域与序列已被本文公开的特定区域一致或高度相似。“高度相似”意指可在所述 CDR 和 / 或 VH 或 VL 结构域内进行 1-5 处, 优选 1-4 处, 诸如 1-3 处或 1 或 2、或 3 或 4 处氨基酸取代。

[0201] 用于支持本发明所述 CDR 或 CDR 组的结构通常属于抗体重或轻链序列或其主要部分, 其中所述 CDR 或 CDR 组位于与重排免疫球蛋白基因所编码的天然存在的 VH 和 VL 抗体可变结构域的 CDR 或 CDR 组对应的位置上。免疫球蛋白可变结构域的结构和位置可参考现已公开在因特网上 (<http://immuno.bme.nwu.edu> 或利用任意搜索引擎查找“Kabat”) 的由 US Department of Health and Human Services 1987 年出版 Kabat, E. A. 等人编辑的第四版 Sequences of Proteins of Immunological Interest 及其修正版而得以确定。

[0202] 诸如纤连蛋白或细胞色素 B 的其它支架结构也可具有 CDR[115、116]。

[0203] 基本上如本文公开的 CDR 氨基酸序列优选地作为 CDR 被包括在人可变结构域或其主要部分内。基本上如本文所公开的 HCDR3 序列体现了本发明的优选实施方案, 且这些序列优选地作为 HCDR3 被包括在人重链可变结构域或其主要部分内。

[0204] 本发明所应用的可变结构域可从任意种系或重排人可变结构域中获得, 或者可以是以已知人可变结构域的共有序列为基础所合成的合成可变结构域。利用重组 DNA 技术可将本发明所述 CDR 序列 (例如 CDR3) 导入缺乏 CDR (例如 CDR3) 的可变结构域的所有组成成分内。

[0205] 例如, Marks 等人 (Bio/Technology, 1992, 10:779-783) 描述了可获得抗体可变结构域的所有组成成分的方法, 其中组合应用了直接位于所述可变结构域 5' 末端或与之相邻的共有引物和针对人 VH 基因的第三个构架区的共有引物, 得以获得缺乏 CDR3 的 VH 可变结构域的所有组成成分。Marks 等人进一步描述了如何将该所有组成成分与特定抗体的 CDR3 组合的方法。利用类似技术, 可用缺乏 CDR3 的 VH 或 VL 结构域的所有组成成分改组

本发明所述的 CDR3 衍生序列,并将改组所获完整 VH 或 VL 结构域与关连 VL 或 VH 结构域组合,便可获得本发明所述的特异性结合成员。接着可将上述所有组成成分展示在合适的宿主系统内,诸如 W092/01047 或下述任意一份参考文献所述的噬菌体展示系统,包括 Kay, B. K., Winter, J. 和 McCafferty, J. (1996) Phage Display of Peptides and Proteins :A Laboratory Manual, San Diego :Academic Press,从而得以筛选合适的特异性结合成员。所有组成成分可由选自  $10^4$  个以上的独立成员,例如  $10^6$ – $10^8$  或  $10^{10}$  个成员组成。其它合适的宿主系统包括酵母展示、细菌展示、T7 展示、核糖体展示等系统。与核糖体展示相关的论述可参见 Lowe D 和 Jermutus L, 2004, Curr. Pharm, Biotech, 517–27 以及 W092/01047。

[0206] Stemmer 也公开了类似的改组或组合技术 (Nature, 1994, 370 :389–391), 其描述的是一种与  $\beta$  – 内酰胺酶基因相关的技术,却发现该方法可被用于生成抗体。

[0207] 进一步的可选方法是通过随机诱变一个或多个特定 VH 和 / 或 VL 基因,以使所述完整可变结构域内产生突变,从而生成具有本发明所述 CDR 衍生序列的新 VH 或 VL 区。Gram 等人描述了这种技术 (1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89 :3576–3580), 他们采用了易错 PCR 法。优选实施方案是在一组 HCDR 和 / 或 LCDR 内产生一处或两处氨基酸取代。

[0208] 可被采用的另一种方法是直接诱变 VH 或 VL 基因的 CDR 区。该技术由 Barbas 等人 (1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91 :3809–3813) 和 Schier 等人 (1996, J. Mol. Biol. 263 :551–567) 公开。

[0209] 上述所有技术同样是本领域已知的,它们本身不构成本发明的一部分。技术人员应能够利用这些技术和本领域的常规方法获得本发明所述的特异性结合成员。

[0210] 本发明的一个进一步的方面提供了获得对 IL-13 抗原具有特异性的抗体抗原结合结构域的方法,该方法包括通过在本文所公开 VH 结构域的氨基酸序列内添加、缺失、取代或插入一个或多个氨基酸,从而获得具有该 VH 结构域的氨基酸序列变体的 VH 结构域,任选地将这样获得的 VH 结构域与一种或多种 VL 结构域组合,并对该 VH 结构域或一种或多种 VH/VL 组合进行测试,以鉴定对 IL-13 抗原具有特异性并任选地具有一种或多种优选特性,优选中和 IL-13 活性的能力的特异性结合成员或抗体抗原结合结构域。上述 VL 结构域的氨基酸序列可能基本上与本文所公开的一致。

[0211] 可采用的类似方法是将本文所公开 VL 结构域的一个或多个序列变体与一个或多个 VH 结构域组合。

[0212] 在一种优选实施方案中,可使 BAK502G9 VH 结构域 (SEQ ID NO :15) 和 / 或 BAK502G9 VL (SEQ ID NO :16) 发生突变,从而获得一个或多个 VH 和 / 或 VL 结构域氨基酸序列变体。

[0213] 本发明的一个进一步的方面提供了制备对 IL-13 抗原具有特异性的特异性结合成员的方法,该方法包括:

[0214] (a) 提供特定 VH 结构域的编码核酸的初始所有组成成分,所述特定 VH 结构域或者含有待取代的 CDR3 或者缺乏 CDR3 编码区;

[0215] (b) 将上述初始所有组成成分与基本上如本文所公开的 VH CDR3 氨基酸序列的供体编码核酸组合,使该供体核酸插入上述所有组成成分的 CDR3 区,从而获得 VH 结构域的编码核酸的最终所有组成成分;

[0216] (c) 使该最终所有组成成分的核酸表达;

[0217] (d) 筛选对 IL-13 具有特异性的特异性结合成员 ;并

[0218] (e) 回收该特异性结合成员或其编码核酸。

[0219] 另一种可采用的类似方法是将本发明所述 VL CDR3 与特定 VL 结构域的编码核酸的所有组成成分组合,所述特定 VL 结构域或者含有待取代的 CDR3 或者缺乏 CDR3 编码区。

[0220] 同样,可将一个或多个或全部三个 CDR 导入 VH 或 VL 结构域的所有组成成分内,并接着筛选对 IL-13 具有特异性的一个或若干个特异性结合成员。

[0221] 在一种优选实施方案中,可应用选自 BAK502G9 HCDR1 (SEQ ID NO :7)、HCDR2 (SEQ ID NO :8) 和 HCDR3 (SEQ ID NO :9) 或 BAK502G9 HCDR 组的一种或多种 HCDR,和 / 或选自 BAK502G9 LCDR1 (SEQ ID NO :10)、LCDR2 (SEQ ID No :11) 或 BAK502G9 LCDR 组的一种或多种 LCDR。

[0222] 免疫球蛋白可变结构域的主要部分至少包括上述三个 CDR 区,以及它们的间插构架区。该部分优选地还至少包括第一和第四构架区二者或其中之一的大约 50%,该 50% 即第一构架区的 C- 末端 50% 和第四构架区的 N- 末端 50%。位于可变结构域主要部分的 N- 末端或 C- 末端的其它残基可以是通常与天然存在的可变结构域不相关的那些残基。例如,对通过重组 DNA 技术制备的本发明所述特异性结合成员的构建可能导入由特定接头编码的 N- 或 C- 末端残基,该接头被导入后将有助于进行克隆或其它操作步骤。其它操作步骤包括导入接头,以使本发明所述可变结构域与包括免疫球蛋白重链、本文其它部分更具体论述的其它可变结构域(例如在制备双功能抗体时)或蛋白质标记在内的其它蛋白序列相连。

[0223] 尽管本发明的一个优选方面优选具有一对 VH 和 VL 结构域的特异性结合成员,但基于 VH 或 VL 结构域序列的单个结合结构域也构成了本发明进一步的方面。已知单个免疫球蛋白结构域,尤其是 VH 结构域能够以特异性方式结合靶抗原。

[0224] 在任意一种单特异性结合结构域的情况中,这些结构域均可被用于筛选能够形成可结合 IL-13 的双结构域特异性结合成员的互补结构域。

[0225] 这可通过利用 W092/01047 所公开的被称作等级双重组合合法的噬菌体展示筛选法实现,其中含有 H 或 L 链克隆的单菌落被用于感染编码另一条链 (L 或 H) 的克隆的完整文库,并根据噬菌体展示技术,诸如参考文献所述的那些方法筛选由上所获的双链特异性结合成员。上述 Marks 等人的报道也公开了该技术。

[0226] 本发明所述特异性结合成员可进一步包括抗体恒定区或其部分。例如,VL 结构域可在其 C- 末端与包括人 C $\kappa$  或 C $\lambda$  链,优选 C $\lambda$  链的抗体轻链恒定结构域相连。同样,基于 VH 结构域的特异性结合成员可在其 C- 末端与任意抗体同种型,例如 IgG、IgA、IgE 和 IgM 和任意同种型亚类,尤其是 IgG1 和 IgG4 来源的完整免疫球蛋白重链或其部分(例如 CH1 结构域)相连。IgG4 是优选的。其优选原因是其不结合补体,因而不产生效应子功能。具有上述特性并可使可变区稳定的所有合成或其它恒定区变体也被优选应用在本发明的实施方案中。

[0227] 本发明所述特异性结合成员可被标记上可检测或功能标记。可检测标记包括可通过抗体成象领域已知的常规化学方法与本发明所述抗体相连的放射性标记,诸如  $^{131}\text{I}$  或  $^{99}\text{Tc}$ 。标记还包括诸如辣根过氧化物酶的酶标记。标记进一步包括化学部分,诸如可通过与特异性关连可检测部分,例如标记的抗生物素蛋白结合而得以检出的生物素。

[0228] 本发明所述特异性结合成员被设计应用在诊断或治疗人或动物患者,优选人患者的方法中。

[0229] 本发明进一步的方面相应提供了治疗方法,包括施用本发明所述特异性结合成员、含有该特异性结合成员的药物组合物,以及该特异性结合成员在生产施用药物方面的用途,例如在制备药物或药物组合物的方法中,该方法包括将本发明所述特异性结合成员与制药可接受赋形剂一起配制。

[0230] 可利用抗-IL-13 抗体提供治疗效果的临床适应症包括哮喘、特应性皮炎、过敏性鼻炎、纤维化、慢性梗阻性肺病、炎症性肠病、硬皮病和何杰金氏淋巴瘤。正如上文所述,抗 IL-13 治疗对这些疾病均有效。

[0231] 抗 IL-13 治疗可通过口服、注射(例如皮下、静脉内、腹膜内或肌内)、吸入或局部施用(例如眼内、鼻内、直肠、创伤内、皮肤上)而得以实现。施用途径可根据治疗的物理化学特征、对疾病的特殊考虑因素或使效能最优化或使副作用最小化的必要条件而得以确定。

[0232] 根据设想,抗 IL-13 治疗将不仅限于临床应用。因此,利用无针装置的皮下注射也是优选的。

[0233] 联合治疗可被用于提供显著的协同效果,尤其是抗 IL-13 特异性结合成员与一种或多种其它药物的组合。本发明所述特异性结合成员可与短或长效  $\beta$  增效剂、皮质类固醇、色甘酸盐、白细胞三烯(受体)拮抗剂、甲基黄嘌呤及其衍生物、IL-4 抑制剂、毒蕈碱受体拮抗剂、IgE 抑制剂、组胺抑制剂、IL-5 抑制剂、嗜酸性粒细胞趋化因子-CCR3 抑制剂、PDE4 抑制剂、TGF- $\beta$  拮抗剂、干扰素- $\gamma$ 、perfenidone、化疗剂和免疫治疗剂组合或加成。

[0234] 与一种或多种短或长效  $\beta$  增效剂、皮质类固醇、色甘酸盐、白细胞三烯(受体)拮抗剂、黄嘌呤、IgE 抑制剂、IL-4 抑制剂、IL-5 抑制剂、嗜酸性粒细胞趋化因子-CCR3 抑制剂、PDE4 抑制剂的联合治疗可被用于治疗哮喘。本发明所述抗体还可与皮质类固醇、抗代谢物、TGF- $\beta$  及其下游信号途径的拮抗剂组合用于治疗纤维化。这些抗体与 PDE4 抑制剂、黄嘌呤及其衍生物、毒蕈碱受体拮抗剂、短或长效  $\beta$  增效剂的联合治疗有助于治疗慢性梗阻性肺病。对抗 IL-13 治疗在特应性皮炎、过敏性鼻炎、慢性梗阻性肺病、炎症性肠病、硬皮病和何杰金氏淋巴瘤方面的应用而言也可考虑类似的组合。

[0235] 根据本发明获得的组合物可被施用于个体。给药量优选足以显示对患者具有益处的“治疗有效量”。该益处可能是至少改善了至少一种症状。实际施用量以及施用速率和时程安排取决于待治疗疾病的性质和严重程度。治疗处方,例如对剂量的选择等属于普通医师及其它医学医师的职责。抗体的合适剂量是本领域熟知的;参见 Ledermann J. A. et al. (1991) Int. J. Cancer 47:659-664; Bagshawe K. D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4:915-922。

[0236] 精确剂量取决于许多因素,包括该抗体是用于诊断还是治疗、待治疗位点的大小和位置、该抗体的准确性质(例如完整抗体、片段或双功能抗体)以及与该抗体相连的任意可检测标记或其它分子的性质。系统性应用的典型抗体剂量范围是 100  $\mu$ g-1gm,对局部应用而言,该范围是 1  $\mu$ g-1gm。该抗体典型地应为完整抗体,优选 IgG4 同种型。上述剂量范围是单次治疗成年患者所需的剂量,可经过适当调整后用于儿童和婴儿,也可根据分子量将其调整为其它抗体形式。治疗可根据医师的判断以每日一次、每周两次、每周一次或每月



一次的时间间隔重复进行。在本发明的优选实施方案中,治疗是周期性的,且两次给药的时间间隔约为两周或更长时间,优选大约三周或更长时间,更优选大约四周或更长时间,或者大约每月一次。

[0237] 本发明所述特异性结合成员通常以特定的药物组合物形式被施用,该药物组合物除包括该特异性结合成员外还包括至少一种组分。

[0238] 因此,本发明所述将根据本发明应用的药物组合物可能除含有有效成分外,还包括制药可接受赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或本领域技术人员熟知的其它物质。这些物质应无毒性,并且不应干扰所述有效成分的效能。所述载体或其它物质的确切性质取决于可能为口服或注射,例如静脉内注射的施用途径。

[0239] 用于口服的药物组合物可以是片剂、胶囊、粉剂或液体形式。片剂可包括诸如明胶或佐剂的固体载体。液体药物组合物通常包括诸如水、石油、动物或植物油、矿物油或合成油的液体载体。也可包括生理盐溶液、葡萄糖或其它糖溶液或诸如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇的乙二醇。

[0240] 对静脉内注射或位于不适位点的注射而言,所述有效成分的形式应为无热原并具有合适 pH、等渗性和稳定性的肠胃外方式可接受水溶液。本领域的相关技术人员是善于利用例如,诸如氯化钠注射液、林格注射液、乳酸化林格注射液的等渗载体制备合适溶液的。如需要,还可包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和 / 或其它添加剂。

[0241] 组合物可单独施用,或者根据待治疗病症与其它治疗同时或序贯地联合应用。

[0242] 根据本发明所述特异性结合成员分子的物理化学特性和施用途径,可将其配制成液体或固体形式。配方可包括赋形剂或赋形剂组合,例如:糖、氨基酸和表面活性剂。液体配方可包括广泛的抗体浓度和 pH。固体配方可通过冻干、喷雾干燥或通过例如,超临界流体技术实现的干燥法而得以制备。抗 IL-13 的配制取决于预定的施用途径:例如,肺部施用配方可由具有特定物理特性的粒子组成,该物理特性可确保粒子被吸入时渗透进入肺部深处;局部配方可包括粘度改良剂以延长使药物停留在作用位点上的时间。

[0243] 本发明提供了一种包括导致或允许本文所述特异性结合成员与 IL-13 结合的方法。如上所述,这种结合可能发生在体内,例如施用特异性结合成员或其编码核酸之后,或者可能发生在体外,例如在 ELISA、蛋白质印迹法、免疫细胞化学、免疫沉淀、亲和层析法或以细胞为基础的试验,诸如 TF-1 试验中。

[0244] 特异性结合成员与 IL-13 的结合量可以测定。定量可能与试样中可能具有诊断意义的抗原量相关。

[0245] 本文还以包括了本发明任意方面或实施方案所述特异性结合成员或抗体分子的试剂盒作为本发明的一个方面。本发明所述试剂盒中的特异性结合成员或抗体分子可以被标记,以便于确定其在样品中的反应性,例如正如下文进一步所述。试剂盒的组分通常无菌并被包含在密封小瓶或其它容器内。试剂盒可应用于诊断分析或采用抗体分子将有助于其实现的其它方法。试剂盒可含有针对特定方法,例如本发明所述方法所涉及组分的用途的说明书。本发明所述试剂盒内还可包括有助于或使所述方法能够实现的辅助物质。

[0246] 样品中抗体的反应性可通过任意适当方法确定。放射免疫测定法 (RIA) 是一种可能的方法。将放射性标记抗原与未标记抗原混合 (试样),并使其结合所述抗体。将结合抗原与未结合抗原物理分离,并测定与该抗体结合的放射性抗原量。试样所含抗原越多,可结

合抗体的放射性抗原越少。还可利用抗原或与报道分子连接的类似物,以及非放射性抗原进行竞争性结合试验。所述报道分子可能是荧光染料、磷光体或具有光谱分离吸收或发射特征的激光染料。合适的荧光染料包括荧光素、罗丹明、藻红蛋白和德克萨斯红。合适的显色染料包括二氨基联苯胺。

[0247] 其它报道分子包括大分子胶粒或颗粒物质,诸如着色、具有磁性或顺磁性的胶乳珠,以及可直接或间接地使可检测信号能够被目测、电子检测或通过其它方式记录的具有生物学或化学活性的试剂。这些分子可能是可催化反应,即例如,使颜色显示或改变或导致电特性改变的酶。它们可能具有分子可兴奋性,所以能态之间的电子跃迁可导致出现特征光谱吸收或发射。它们可能包括可与生物传感器结合应用的化学实体。可应用生物素/抗生物素蛋白或生物素/链霉抗生物素和碱性磷酸酶检测系统。

[0248] 由独立抗体/报道分子偶联物产生的信号可被用于推导样品(正常和试样)中相关抗体结合的可定量绝对或相对数值。

[0249] 本发明还提供了上述特异性结合成员在测定竞争性试验中的抗原水平方面的用途,即通过在竞争性试验中应用本发明所提供的特异性结合成员以测定样品中的抗原水平的方法。这可能是不需要物理分离已结合和未结合抗原的情况。一种可能性是报道分子与所述特异性结合成员的连接导致发生以结合为基础的物理或光学变化。该报道分子可能直接或间接地生成可检测,和优选可测定的信号。报道分子的连接可能是直接或间接、共价地,例如通过肽键,或非共价地。经由肽键的连接可能是编码抗体和报道分子的基因融合重组表达的结果。

[0250] 本发明还提供了通过,例如在生物传感器系统内,应用本发明所述特异性结合成员,以直接测定抗原水平的方法。

[0251] 确定结合的模式并非本发明的特征,且本领域技术人员均能够根据自己的偏好和常识选择合适的模式。

[0252] 正如上文所指出的,本发明的多个方面和实施方案提供了可与本文所定义的任意特异性结合成员竞争结合 IL-13 的特异性结合成员,例如 BAK502G9 IgG4。两个结合成员之间的竞争可通过特定方法在体外快速测定,例如用特异性报道分子标记其中一个结合成员,使其可以在另一个未标记结合成员存在条件下被检出,以鉴定可与所述相同表位或重叠表位结合的特异性结合成员。

[0253] 竞争可通过例如,ELISA 法确定,其中将 IL-13 固定在平板上,而将第一种标记结合成员连同一种或多种其它的未标记结合成员加入该平板。通过标记结合成员所发射信号的减量发现存在可与标记结合成员竞争的未标记结合成员。

[0254] 为检测竞争,可应用所述抗原的肽片段,尤其是包括目标表位的肽。可采用具有该表位序列且其任一末端还外加一个或多个氨基酸的肽。这种肽可以被描述为是由该特定序列“基本组成的”。本发明所述特异性结合成员可能存在下述情况,即具有或包括上述特定序列的肽抑制它们与抗原的结合。为检验该情况,可采用具有该特定序列并外加一个或多个氨基酸的肽。

[0255] 通过用特异性肽进行淘选,可从例如,噬菌体展示文库中分离出可与该特异性肽结合的特异性结合成员。

[0256] 本发明进一步提供了编码本发明所述特异性结合成员的分离核酸。核酸可包括

DNA 和 / 或 RNA。本发明的一个优选方面提供了编码上文所定义的本发明 CDR 或 CDR 组或 VH 结构域或 VL 结构域或抗体抗原结合位点或抗体分子,例如 scFv 或 IgG4 的核酸。

[0257] 本发明还提供了形式为包括上述至少一种多核苷酸的质粒、载体、转录或表达组件的构建体。

[0258] 本发明还提供了可包括上述一种或多种构建体的重组宿主细胞。编码上述任意 CDR 或 CDR 组或 VH 结构域或 VL 结构域或抗体抗原结合位点或抗体分子,例如 scFv 或 IgG4 的核酸本身以及生成其编码产物的方法构成了本发明的两个方面,其中所述方法包括使上述编码核酸进行表达。表达可通过在合适的条件下培养含有该核酸的重组宿主细胞而得以方便地实现。通过表达实现生产后,可利用任意一种合适的技术分离和或纯化 VH 或 VL 结构域,或特异性结合成员,并接着根据情况适当应用。

[0259] 本发明所述特异性结合成员、VH 和 / 或 VL 结构域,以及编码核酸分子和载体可以基本上纯或均一的形式从例如,它们的自然环境中分离和 / 或纯化获得,或者在核酸情况中,则是不含或基本上不含与编码具有必需功能的多肽的序列不同的核酸或基因起点。本发明所述核酸可包括 DNA 或 RNA,并且可能是全部或部分合成的。本文所提供的核苷酸序列的参照包括具有特定序列的 DNA 分子,也包括具有特定序列的 RNA 分子,其中上下文如无另外要求,U 被用于取代 T。

[0260] 适用于克隆和表达多种不同宿主细胞内的多肽的系统是众所周知的。合适的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、植物细胞、酵母和杆状病毒系统和转基因植物和动物。本领域中可用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、HeLa 细胞、小鼠肾细胞、NS0 小鼠黑素瘤细胞、YB2/0 大鼠黑素瘤细胞、人胚肾细胞、人胚视网膜细胞及其它许多细胞系。常用的优选细菌宿主是大肠杆菌。

[0261] 抗体和抗体片段在原核细胞,诸如大肠杆菌内的表达是本领域熟知的。相关论述参见例如,Plückthun, A. *Bio/Technology* 9 :545-551 (1991)。在培养中的真核细胞内的表达也是本领域技术人员可用于生成特异性结合成员的选择方案,例如 Chadd HE 和 Chamow SM (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12 :188-194, Andersen DC and Krummen L (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13 :117, Larrick JW and Thomas DW (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12 :411-418。

[0262] 可以选择或构建含有合适的调节序列,包括启动子序列、终止子序列、聚腺苷酸化序列、增强子序列、标记基因及其它合适序列的合适载体。根据需要,载体可能是质粒、病毒的例如噬菌体或噬菌粒。进一步的具体论述参见例如由 Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001 年出版 Sambrook 和 Russell 编辑的第 3 版 *Molecular Cloning :a Laboratory Manual*。由 John Wiley & Sons 1988 年出版 Ausubel 等人编辑的第 2 版 *Current Protocols in Molecular Biology* 和由 John Wiley & Sons 1999 年出版 Ausubel 等人编辑的第 4 版 *Short Protocols in Molecular Biology :A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology* 具体描述了操纵核酸,例如在制备核酸构建体、诱变、测序、将 DNA 导入细胞和基因表达,以及分析蛋白质方面适用的许多已知技术和方案。Sambrook 等人和 Ausubel 等人的公开文献 (均) 被引入本文作为参考。

[0263] 因此,本发明的一个进一步的方面提供了含有本文所公开核酸的宿主细胞。这种宿主细胞可能在体外和可能处于培养中。这种宿主细胞也可能在体内。该宿主细胞存在于

体内时可使本发明所述特异性结合成员以“内抗体”或胞内抗体的形式在细胞内表达。内抗体则可被用于基因治疗 [112]。

[0264] 另一个进一步的方面提供了包括将上述核酸导入宿主细胞内的方法。该导入可应用任意一种有效的技术。对真核细胞而言的合适技术可包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、脂质体介导转染和利用逆转录病毒或其它病毒，例如牛痘或对昆虫细胞而言的杆状病毒进行的转导。将核酸导入宿主细胞，尤其是真核细胞内可利用以病毒或质粒为基础的系统。质粒系统可以保持为游离体形式或者可以被整合进所述宿主细胞或人工染色体 [110、111]。整合可通过在单个或多个位点随机或导向整合一个或多个拷贝而得以实现。对细菌细胞而言的合适技术可包括氯化钙转化、电穿孔和利用噬菌体进行的转染。

[0265] 实现上述导入后，可通过例如，在适合上述基因表达的条件下培养宿主细胞，使或允许上述核酸表达。

[0266] 一种实施方案中，本发明所述核酸被整合进所述宿主细胞的基因组（例如染色体）内。通过根据标准技术将可促进与该基因组重组的序列包括在内，便可促进该整合。

[0267] 本发明还提供了包括在表达系统内应用上文所提及的构建体以表达上述特异性结合成员或多肽的方法。

[0268] 至此，本文将通过与下述实验相关的实施例说明本发明的若干方面和实施方案。

[0269] 实施例 1

[0270] 抗 IL-13 scFv 的分离

[0271] scFv 抗体的所有组成成分

[0272] 采用来源于 20 位供体的脾淋巴细胞并被克隆进噬菌粒载体的大单链 Fv(scFv) 人抗体文库进行筛选 [66]。

[0273] scFv 的筛选

[0274] 通过采用基本上如 [67] 所述的方法对重组细菌来源的人或鼠 IL-13(Peprotech) 进行一系列重复筛选循环，从噬菌体展示文库中分离出可识别 IL-13 的 scFv。简言之，用该文库温育后，通过磁分离法回收预先与顺磁珠偶联的固定抗原和已结合的噬菌体，同时洗涤除去未结合噬菌体。接着通过 Vaughan 等人所述的方法 [67] 和重复上述筛选过程拯救已结合的噬菌体。在不同的筛选循环中采用不同的固相表面和捕捉方法，以减少非特异性结合。抗原或者与珠 (Dynabeads M-270 羧酸) 共价偶联或者是在根据生产商所提供方法 (Dyna1) 被链霉抗生物素蛋白包被珠 (Dynabeads M-280) 次级捕捉之前经过生物素化修饰。如 Vaughan 等人 [67] 和 Osbourn 等人 [70] 所述的方法对上述筛选循环所获产物中占代表性比例的克隆进行 DNA 测序。对独特的克隆评估其作为纯化 scFv 制剂在 IL-13 依赖性细胞增殖试验中中和 IL-13 的能力。

[0275] 采用基本上如 Hanes 等人所述的方法 [113] 构建核糖体展示文库并筛选可特异性识别重组、细菌来源人或鼠 IL-13(Peprotech) 的 scFv。首先将最初筛选的 BAK278D6 前导克隆转化为核糖体展示形式，并随后将该模板用于构建文库。基于该 DNA 水平，将 T7 启动子添加在其 5' 末端，以有效转录为 mRNA。基于该 mRNA 水平的构建体含有原核核糖体结合位点 (Shine-Dalgarno 序列)。将所述单链 3' 末端的终止密码子除去，并加入一部分 gIII (基因 III) 充当间隔区 [113]。

[0276] 通过诱变抗体互补决定区 (CDRs) 构建 BAK278D6 来源的核糖体展示文库，其中 PCR

反应是利用非校正 Taq 聚合酶进行的。由此进行以亲和力为基础的筛选,即用该文库温育后,由链霉抗生物素蛋白包被的顺磁珠 (Dyna1 M280) 捕捉生物素化人 IL-13,并通过磁分离法回收已结合的三重复合体 (mRNA-核糖体-scFv-IL-13),同时洗涤除去未结合的复合体。接着通过如 Hanes 等人所述的 RT-PCR[113] 和通过逐渐降低筛选期间存在的生物素化人 IL-13 的浓度 (在 5 个循环内由 100nM 降至 100pM) 重复进行的筛选过程,回收编码已结合 scFvs 的 mRNA。

[0277] 还采用了易错 PCR 以进一步扩大文库。该筛选方案进行期间应用了三种强度的差错 (如生产商提供的方案 (Clontech) 所述,在标准 PCR 反应后,每 1,000bp 有 2.0、3.5 和 7.2 个突变)。最初的易错 PCR 反应发生在于 100nM 处开始的第一轮筛选之前。后续的易错 PCR 循环则是在于 10nM 生物素化人 IL-13 处开始三轮筛选之前进行。如上所述,如 Vaughan 等人 [67] 和 Osbourn 等人 [70] 所述的方法对上述筛选循环所获产物中占代表性比例的克隆进行 DNA 测序。对独特的克隆评估其作为纯化 scFv 制剂在 IL-13 依赖性细胞增殖试验中中和 IL-13 的能力。

#### [0278] 实施例 2

[0279] 抗 IL-13 在 IL-13 依赖性 TF-1 细胞增殖试验中的中和效价

[0280] 纯化 scFv 制剂抗人和鼠 IL-13 生物活性的中和效价是通过 TF-1 细胞增殖试验评估的。纯化 scFv 制剂的制备方法如 W001/66754 的实施例 3 所述。纯化 scFv 制剂的蛋白质浓度利用 BCA 法 (Pierce) 测定。TF-1 是从红白血病患者体内建立的人成髓细胞系 [68]。TF-1 细胞系的存活和增殖具有因子依赖性。就这一点而言,TF-1 细胞对人或鼠 IL-13 有反应 [69],并可被维持在含有人 GM-CSF (4ng/ml, R&D Systems) 的培养基中。对 IL-13 依赖性增殖的抑制是通过测定掺入分裂细胞新合成 DNA 内的氘标记胸苷的减量而得以确定的。

#### [0281] TF-1 细胞试验方案

[0282] 由 R&D Systems 获得 TF-1 细胞并根据其提供的方案维持该细胞系。试验培养基包括含有 GLUTAMAXI 的 RPMI-1640 (Invitrogen),并含 5% 胎牛血清 (JRH) 和 1% 丙酮酸钠 (Sigma)。每次试验之前,通过 300x g 离心 5 分钟,使 TF-1 细胞沉淀,吸除培养基并使细胞重悬浮于试验培养基中。重复该过程两次,使重悬浮于试验培养基中的细胞的最终浓度为  $10^5$  个细胞 / 毫升。用试验培养基将抗体试液 (一式三份) 稀释至预期浓度。以不直接抗 IL-13 的无关抗体作为阴性对照。将重组细菌来源的人或鼠 IL-13 (Peprotech) 与合适的试验抗体混合,终浓度为 50ng/ml,并以 100  $\mu$ l / 孔的总体积加入 96 孔培养板各孔内。该试验所用的 IL-13 浓度被选择作为可充当最终试验浓度产生相当于最大增殖反应的大约 80% 的增殖反应的剂量。室温温育所有样品 30 分钟。接着将 100  $\mu$ l 重悬浮细胞加至各试验点,所获总试验体积为 200  $\mu$ l / 孔。于 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 条件下,温育试验培养板 72 小时。接着将 25  $\mu$ l 氘标记胸苷 (10  $\mu$  Ci/ml, NEN) 加至各试验点,并将试验培养板再次放入培养箱内继续温育 4 小时。利用细胞收集器将细胞收集在玻璃纤维滤板 (Perkin Elmer) 上。胸苷掺入利用 Packard TopCount 微量滴定板液体闪烁计数器测定。数据用 Graphpad Prism 软件分析。

#### [0283] 结果

[0284] 即使改变人和鼠抗原之间的筛选循环,仍未获得交叉反应性中和抗体。通过筛选获得两种不同的抗人 IL-13 中和 scFvs 和一种抗鼠 IL-13 中和 scFv。BAK278D6 (VH SEQ

ID NO:13;VL SEQ ID NO:14) 和 BAK167A11(VH SEQ ID NO:23;VL SEQ ID NO:24) 可识别人 IL-13, 而 BAK209B11(VH SEQ ID NO:25;VL SEQ ID NO:26) 则可识别鼠 IL-13。BAK278D6(图 2) 和 BAK167A11(图 1) 作为 scFv 中和 25ng/ml 人 IL-13 的  $IC_{50}$  分别为 44nM 和 111nM。BAK209B11(图 3) 作为 scFv 中和 25ng/ml 鼠 IL-13 的  $IC_{50}$  为 185nM。

#### [0285] 实施例 3

[0286] 导向优化亲本克隆重链 CDR3 所获的前导克隆在 IL-13 依赖性 TF-1 细胞增殖试验中的中和效价

[0287] Osbourn 等人 [70] 证实导向诱变重链 CDR3 内的残基可显著提高抗体亲和力。如实施例 1 所述方法对 scFv 的所有组成成分进行筛选, 其中 BAK278D6(SEQ ID NO:6)、BAK167A11(SEQ ID NO:57) 重链 CDR3 内的残基已通过诱变而随机化。通过 DNA 测序鉴定该筛选所获产物中的独特克隆, 并如实施例 2 所述方法评估其作为 scFv 在 TF-1 细胞增殖试验中的中和效价。

#### [0288] 结果

[0289] 上述两个谱系的效价均有显著提高。BAK167A11 谱系中最有效的克隆为 BAK615E3、BAK612B5 和 BAK582F7, 三者作为 scFv 在 TF-1 细胞增殖试验中抗 25ng/ml 人 IL-13 的  $IC_{50}$  分别为 3nM(图 1)、6.6nM、6.65nM。BAK278D6 谱系中最有效的克隆为 BAK502G9, 其作为 scFv 在 TF-1 细胞增殖试验中抗 25ng/ml 人 IL-13 的  $IC_{50}$  为 8nM(图 2)。

#### [0290] 实施例 4

[0291] BAK167A11 和 BAK278D6 谱系在 TF-1 因子依赖性细胞增殖试验中抗非人灵长类动物 IL-13 和哮喘相关 IL-13 变体的中和效价

[0292] BAK167A11 和 BAK278D6 人 IL-13 中和谱系均与鼠 IL-13 不具有交叉反应性。因此, 发明者基于下述标准决定对所选谱系进行进一步优化和临床发展: 应优先与非人灵长类动物 IL-13 具有交叉反应性, 并应识别因 130 号氨基酸位的精氨酸被取代为谷氨酰胺(Q130R) 后所生成的 IL-13 变体。该变体在遗传上与哮喘及其它变应性疾病相关 [37、39、41、71]。交叉反应性是根据表面等离子共振技术(BIAcore) 分析纯化 scFv 制剂与非人灵长类动物 IL-13 和 IL-13 变体结合的能力而得以确定的。功能性活性利用 TF-1 细胞增殖试验测定。

#### [0293] 野生型、变异和非人灵长类动物 IL-13 的生成

[0294] 野生型人 IL-13 的 cDNA 获自 InvivoGen, 通过定点诱变(Stratagene **Quikchange®** 试剂盒) 将其修饰后可获得编码变异 IL-13 的 cDNA。通过采用基因组 DNA 模板和以上述人 IL-13 序列为基础的简并引物进行 PCR, 获得与恒河猴和猕猴 IL-13 均对应的编码序列。这两种非人灵长类动物(恒河猴和猕猴) 序列彼此一致, 但与人 IL-13 有 7 个氨基酸的差异(图 19)。利用杆状病毒表达系统(Invitrogen) 相继表达重组野生型、变异和非人灵长类动物 IL-13。表达构建体将羧基末端亲和力标记加至被表达蛋白上, 可使昆虫细胞条件培养基来源的纯化产物接近均匀。

#### [0295] 利用 BIAcore 进行的定性结合试验

[0296] 纯化 scFv 制剂与非人灵长类动物、变异和野生型 IL-13 的结合亲和力是通过利用 Karlsson 等人所述的 BIAcore 2000 生物传感器(BIAcore AB) 进行的表面等离子共振技术 [72] 而得以确定的。简言之, 利用胺偶联试剂盒(BIAcore) 使 IL-13 与 CM5 传感器芯片偶联, 表面密度约为 200Ru, 在 HBS-EP 缓冲液中形成的三个浓度的试验 scFv(约为 350nm、

175nM 和 88nM) 通过该传感器芯片表面。利用 BIA 评估 3.1 软件评估由上所获的传感器记录, 获得相对结合数据。

#### [0297] TF-1 试验方案

[0298] 该试验基本上如实施例 2 所述方法进行, 但进行了下述修改: 所用非人灵长类动物 IL-13、人变异 IL-13(Q130R) 和野生型人 IL-13 的浓度分别为 50ng/ml、25ng/ml 和 25ng/ml。

#### [0299] 结果

[0300] BIAcore 结合试验数据表明 BAK278D6 谱系具有进一步治疗性研发所必需的交叉反应性分布图, 而 BAK167A11 谱系则无 (表 2)。该发现可通过生物试验数据得以证实, 即 BAK278D6 (图 4) 和 BAK502G9 (图 6) 均能够在 TF-1 细胞增殖试验中以近乎相同的效价中和人 IL-13、人 IL-13(Q130R) 变体和非人灵长类动物 IL-13。与之相比, 尽管 BAK615E3 (VH SEQ ID NO:33; VL SEQ ID NO:34) 在 TF-1 细胞增殖试验中抗人 IL-13 的效价显著高于其亲本 BAK167A11 (VA SEQ ID NO:23; VL SEQ ID NO:24) (图 1), 但它们在 BIAcore 结合试验中均无与非人灵长类动物 IL-13 或变异 IL-13 结合的克隆。

#### [0301] BAK278D6 和 BAK502G9 的种系化构架区

[0302] 将 BAK278D6 VH (SEQ ID NO:13) 和 VL (SEQ ID NO:14) 的衍生氨基酸序列与 VBASE 数据库 [73] 中已知的人种系序列进行对比, 并根据序列相似性确定最接近的种系。与 BAK278D6 (SEQ ID NO:14) 及其衍生物的 VH 结构域最接近的种系为 DP14, 属于 VH1 家族成员。BAK278D6 VH 与 DP14 种系在构架区内存在 9 处差异。与 BAK278D6 的 VL 最接近的种系为 V<sub>λ</sub>3 3h。BAK278D6 VL 结构域 (SEQ ID NO:14) 与该种系在构架区内仅存在 5 处差异。通过定点诱变 (Stratagene Quikchange 试剂盒) 将 BAK278D6 及其衍生物的构架区恢复至种系, 同样与天然人抗体匹配。

#### [0303] 实施例 5

[0304] 导向优化 BAK502G9 重链 CDR1 和重链 CDR2 序列所获的前导克隆在人 IL-13 依赖性 TF-1 细胞增殖试验中的中和效价

[0305] 第二阶段的最优化是以具有种系化构架区的 BAK502G9 序列为模板进行的。基本上如实施例 1 所述方法对 scFv 的所有组成成分进行筛选, 其中 BAK502G9 的重链 CDR1 或重链 CDR2 的残基已通过诱变而随机化。通过 DNA 测序鉴定该筛选所获产物中的独特克隆, 并如实施例 2 所述评估其作为纯化 scFv 制剂在 TF-1 细胞增殖试验中的中和效价。根据 Persic 等人所述的方法 (1997 Gene 187:9-18) 并进行少许修改, 构建用于最有效的 scFv 克隆的载体, 使该克隆能够以完整人 IgG4 抗体的形式再表达。该载体包括 oriP 片段, 有助于与 HEK-EBNA 293 细胞一起应用, 并有助于实现游离型复制。将所述 VH 可变结构域克隆进位于表达载体 pEU8.1(+) 的分泌前导序列与人  $\gamma$ 4 恒定结构域之间的多位点接头内。将所述 VL 可变结构域克隆进位于表达载体 pEU4.1(-) 的分泌前导序列与人  $\lambda$  恒定结构域之间的多位点接头内。

[0306] 通过 A 蛋白亲和层析 (Amersham Pharmacia) 从经由可表达重和轻链的构建体共转染过的 EBNA-293 细胞的培养条件培养基中纯化完整抗体。无菌过滤纯化抗体制剂, 并在评估前将其 4°C 保存在磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 中。通过 BCA 法 (Pierce) 测定 280nm 波长的吸收以确定蛋白质浓度。通过如实施例 2 所述的 TF-1 增殖试验, 对重构的人 IgG4 完整抗体和

商业可提供抗人 IL-13 抗体进行比较。

[0307] 结果

[0308] 如图 5 所示,市售抗体 B-B13(小鼠 IgG1-Euroclone 5)在抗人 IL-13 方面显然比市售抗体 JES10-5A2(大鼠 IgG1-Biosource)更有效,二者的  $IC_{50}$  分别为 1021pM 和 471pM。由所含重链 CDR1 或 CDR2 已被导向的 BAK502G9 衍生的 8 个克隆,即 BAK1111D10、BAK1166G02、BAK1167F02、BAK1167F04、BAK1183H4、BAK1184C8、BAK1185E1、BAK1185F8(也被称为“BAK502G9 谱系”)作为 scFv 的效价均显示高于上述市售抗体。将它们转化为完整抗体人 IgG4 时仍保持了这些改良。在上述权利要求中,所述 VH 和 VL 结构域独立出现或以各自的配对形式出现的情况,和包括它们其中的一个或多个结构域并针对 IL-13 的特异性结合成员,以及包括 BAK502G9 谱系克隆来源的一个或多个 CDR 的特异性结合成员,优选包括 BAK502G9 谱系 HCDR 组的 VH 结构域和 / 或包括 BAK502G9 谱系 LCDR 组的 VL 结构域,均体现了本发明的一个方面或实施方案。正如本文其它部分所公开的,这些情况可被应用在本发明的任意和所有方面中。BAK502G9 的衍生物作为完整抗体 (IgG4) 的  $IC_{50}$  范围是 244pM-283pM。BAK502G9 作为完整抗体 IgG4 的  $IC_{50}$  是 384pM。概括而言,效能方面的主要改善可通过导向 BAK502G9 的重链 CDR1 (SEQ ID NO :7) 或 CDR2 (SEQ ID NO :8) 实现。与 B-B13 的统计学比较是相继利用 ANOVA 和 Dunnett 后检验分析 (InStat 软件) 进行的。

[0309] 进一步表征

[0310] 对从 BAK278D6 谱系筛选获得的抗人抗体进一步表征,以确定它们的特异性。这些抗体包括 BAK502G9 (VH SEQ ID NO :15 ;VL SEQ ID NO :16) 及其衍生物 BAK1167F2 (VH SEQ ID NO :35 ;VL SEQ ID NO :36) 和 BAK1183H4 (VH SEQ ID NO :37 ;VL SEQ ID NO :38),后两种抗体分别是对 BAK502G9 的重链 CDR1 和重链 CDR2 修饰后所获克隆的代表性实例。

[0311] 实施例 6

[0312] 导向优化 BAK502G9 重链 CDR1 和重链 CDR2 序列所获的前导克隆在 TF-1 因子依赖性细胞增殖试验中抗非人灵长类动物 IL-13 和哮喘相关 IL-13 变体的中和效价

[0313] 如实施例 4 所述,根据抗人 IL-13 抗体抑制非人灵长类动物 IL-13 和 IL-13 变体介导的 TF-1 细胞增殖的能力,确定其交叉反应性。

[0314] 结果

[0315] 优化的抗人 IL-13 抗体 BAK1167F2 (VH SEQ ID NO :35 ;VL SEQ ID NO :36) 和 BAK1183H4 (VH SEQ ID NO :37 ;VL SEQ ID NO :38) 保留了它们的亲本 BAK502G9 (VH SEQ ID NO :15 ;VL SEQ ID NO :16) 的特异性 (图 6)。抗野生型 IL-13 的效价增量是通过它们以基本上均等的效价中和非人灵长类动物 IL-13 和 IL-13 变体的能力而得以反映的。BAK502G9 抗人 IL-13、人变异 IL-13 和非人灵长类动物 IL-13 的  $IC_{50}$  分别为 1.4nM、1.9nM 和 2.0nM。BAK1167F2 抗人 IL-13、人变异 IL-13 和非人灵长类动物 IL-13 的  $IC_{50}$  分别为 1.0nM、1.1nM 和 1.3nM。BAK1183H4 抗人 IL-13、人变异 IL-13 和非人灵长类动物 IL-13 的  $IC_{50}$  分别为 0.9nM、1.0nM 和 1.6nM。这些克隆均适用于治疗用途。

[0316] 实施例 7

[0317] 前导抗人 IL-13 抗体在 HDLM-2 细胞增殖试验中抗天然人 IL-13 的中和效价

[0318] 人 IL-13 序列具有 4 个潜在的 N-糖基化位点。发明者已证实了 BAK278D6 及其衍生物中和细菌或杆状病毒表达系统所表达重组 IL-13 的能力。尽管有证据表明已知在哺乳



动物系统内发生的许多加工现象也出现在昆虫中,但在蛋白质糖基化,尤其是 N-糖基化方面仍存在关键差异 [74]。

[0319] 发明者研究了 BAK278D6 衍生物中和人细胞所释放的天然 IL-13 的能力。

[0320] HDLM-2 细胞由 Drexler 等人 [75] 分离自何杰金氏病患者。Skinnider 等人 [76] 证实 HDLM-2 细胞增殖部分地依赖于 IL-13 的自分泌和旁分泌释放。并评估了前导抗人 IL-13 抗体抑制由天然 (或自然存在的) IL-13 的释放所介导的 HDLM-2 细胞增殖的能力。

[0321] HDLM-2 细胞试验方案

[0322] 由 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen(DSMZ) 获得 HDLM-2 细胞,并根据 DSMZ 所提供的方案维持该细胞。试验培养基包括含 Glutamax I 的 RPI-1640(Invitrogen),并含有 20%胎牛血清。每次试验之前先通过 300x g 离心 5 分钟,使细胞沉淀,吸除培养基,并使细胞重悬浮于新鲜培养基中。重复该过程三次,并将细胞最终重悬浮于试验培养基中,终浓度为  $2 \times 10^5$  个细胞 / 毫升。将 50  $\mu$ l 重悬浮细胞加至 96 孔培养板的各试验点内。用试验培养基将抗体试液 (一式三份) 稀释至要求浓度。以不直接抗 IL-13 的无关同种型抗体为阴性对照。将合适的试验抗体以 50  $\mu$ l / 孔的总体积与培养板各孔内的细胞混合,各实验点的总试验体积为 100  $\mu$ l / 孔。于 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 条件下温育试验培养板 72 小时。接着将 25  $\mu$ l 氚标记胸苷 (10  $\mu$  Ci/ml, NEN) 加至各试验点内,并将试验培养板再次放入培养箱中继续温育 4 小时。利用细胞收集器将细胞收集在玻璃纤维滤板 (Perkin Elmer) 上。胸苷掺入利用 Packard TopCount 微量滴定板液体闪烁计数器测定。数据用 Graphpad Prism 软件分析。

[0323] 结果

[0324] 如图 7 所示, BAK502G9(VH SEQ ID NO:15;VL SEQ ID NO:16) 及其衍生物 BAK1183H4(VH SEQ ID NO:37;VL SEQ ID NO:38) 和 BAK1167F2(VH SEQ ID NO:35;VL SEQ ID NO:36) 对细胞增殖均可产生剂量依赖性抑制,且相对效价与在其它生物试验中观测到的结果近似。BAK502G9、BAK1183H4、BAK1167F2 作为人 IgG4 的 IC<sub>50</sub> 分别为 4.6nM、3.5nM 和 1.1nM。市售抗体 JES10-5A2 和 B-B13 的 IC<sub>50</sub> 分别为 10.7nM 和 16.7nM。

[0325] 实施例 8

[0326] 前导抗人 IL-13 抗体在疾病相关初级细胞中抗 IL-13 依赖性反应的中和效价

[0327] 第二类生物试验是利用与呼吸道疾病更为相关的初级细胞和读数进行的。这包括正常人肺成纤维细胞 (NHLF) 的嗜酸性粒细胞趋化因子释放和在人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 表面的血管粘着分子 1 (VCAM-1) 正调节。两种 IL-13 依赖性反应均有助于嗜酸性粒细胞的募集,而这是哮喘表型的一个特征 [92]。

[0328] NHLF 试验方案

[0329] 业已证实 IL-13 可使肺成纤维细胞释放嗜酸性粒细胞趋化因子 [77][78][79]。通过 ELISA 确定 NHLF 的因子依赖性嗜酸性粒细胞趋化因子释放。

[0330] 由 Biowhittaker 获得 NHLF,并根据其提供的方案维持该细胞。试验培养基为 FGM-2(Biowhittaker)。用试验培养基将抗体试液 (一式三份) 稀释至要求浓度。以不直接抗 IL-13 的无关抗体为阴性对照。接着将重组细菌来源的人 IL-13(Peprotech) 加至合适的试验抗体中,其终浓度为 10ng/ml,二者混合的总体积为 200  $\mu$ l。该试验所用的 IL-13 浓度被选择作为可产生约相当于最大反应的 80% 的反应的剂量。室温温育所有样品 30 分

钟。接着将试验样品与已被接种至 96 孔培养板各孔内且密度为  $1 \times 10^4$  个细胞 / 孔的 NHLF 混合。于 37℃ 和 5%  $\text{CO}_2$  条件下温育培养板 16-24 小时。以 300x g 离心培养板 5 分钟,使脱离的细胞沉淀。通过 ELISA 并采用生产商 (R&D Systems) 推荐的试剂和方法确定上清液中的嗜酸性粒细胞趋化因子水平。数据用 Graphpad Prism 软件分析。

#### [0331] 结果

[0332] BAK278D6 谱系克隆能够抑制 NHLF 的人 IL-13 依赖性嗜酸性粒细胞趋化因子释放。相对效价与在 TF-1 细胞增殖试验中所观测的结果近似 (图 8)。BAK502G9 (VH SEQ ID NO : 15 ; VL SEQ ID NO : 16)、BAK1183H4 (VH SEQ ID NO : 37 ; VL SEQ ID NO : 38)、BAK1167F2 (VH SEQ ID NO : 35 ; VL SEQ ID NO : 36) 抗 10ng/ml 人 IL-13 的  $\text{IC}_{50}$  分别为 207pM、118pM 和 69pM。市售抗体 JES10-5A2 和 B-B13 的  $\text{IC}_{50}$  分别为 623pM 和 219pM。

#### [0333] HUVEC 试验方案

[0334] 业已证实 IL-13 可正调节 HUVECs 细胞表面上的 VCAM-1 表达 [80,81]。因子依赖性 VCAM-1 表达是通过利用时间分辨荧光读数检测 VCAM-1 受体细胞表达的正调节而得以确定的。

[0335] 由 Biowhittaker 获得 HUVEC, 并根据其提供的方案维持该细胞。试验培养基为 EGM-2 (Biowhittaker)。用试验培养基将抗体试液 (一式三份) 稀释至要求浓度。以不直接抗 IL-13 的无关抗体为阴性对照。将重组细菌来源的人 IL-13 (Peprotech) 加至合适的试验抗体中, 终浓度为 10ng/ml, 二者混合的总体积为 200  $\mu\text{l}$ 。该试验所用的 IL-13 浓度被选择作为可产生约相当于最大反应的 80% 的反应的剂量。室温温育所有样品 30 分钟。接着将试验样品与已被接种至 96 孔培养板各孔内且密度为  $4 \times 10^4$  个细胞 / 孔的 HUVEC 混合。于 37℃ 和 5%  $\text{CO}_2$  条件下温育培养板 16-20 小时。接着吸除试验培养基, 取代以封闭液 (含 4% 干 **Marvel**<sup>®</sup> 奶粉的 PBS)。室温温育培养板 1 小时。用 PBST Tween 洗涤各孔 3 次后, 在各孔内加入 100  $\mu\text{l}$  (用 PBST/1% **Marvel**<sup>®</sup> 以 1 : 500 的比例稀释) 生物素化抗 VCAM-1 抗体 (Serotec)。室温温育培养板 1 小时。用 Delfia 洗涤缓冲液 (Perkin Elmer) 洗涤各孔 3 次后, 在各孔内加入 100  $\mu\text{l}$  钕标记的链霉抗生物素蛋白或抗鼠 IgG1 (用 Delfia 试验缓冲液以 1 : 1000 的比例稀释, Perkin Elmer)。接着于室温温育培养板 1 小时。用 Delfia 洗涤缓冲液 (Perkin Elmer) 洗涤各孔 7 次。最后, 将 100  $\mu\text{l}$  增强液 (Perkin Elmer) 加入各孔并利用 Wallac 1420 VICTOR2 读板仪 (标准钕方案) 测定荧光强度。数据用 Graphpad Prism 软件分析。

#### [0336] 结果

[0337] BAK502G9 (VH SEQ ID NO : 15 ; VL SEQ ID NO : 16)、BAK1183H4 (VH SEQ ID NO : 37 ; VL SEQ ID NO : 38)、BAK1167F2 (VH SEQ ID NO : 35 ; VL SEQ ID NO : 36) 作为完整抗体人 IgG4 的典型数据如图 9 所示。相对效价与在 TF-1 细胞增殖试验中观测到的结果近似。BAK502G9、BAK1183H4 和 BAK1167F2 抗 10ng/ml 人 IL-13 的  $\text{IC}_{50}$  分别为 235pM、58pM 和 55pM。

#### [0338] 实施例 9

[0339] 抗 IL-13 抗体抗 IL-1  $\beta$  和 IL-4 依赖性 VCAM-1 正调节的中和效价

[0340] 利用 HUVEC 生物试验的改良方法评估克隆中 BAK278D6 谱系的特异性。业已证实 IL-4 和 IL-1  $\beta$  连同 IL-13 一起可正调节 HUVECs 细胞表面上的 VCAM-1 表达 [80,81]。

[0341] HUVEC 试验方案

[0342] 该试验基本上如实施例 5 所述方法进行,但存在下述改动。采用重组人 IL-1 $\beta$  和 IL-4(R&D Systems) 分别代替 0.5ng/ml 和 1ng/ml 的人 IL-13,并以这两个浓度代表可提供约为最大反应的 80%的反应的剂量。

[0343] 结果

[0344] 从 BAK278D6 谱系角度评估时,没有克隆在反应人 IL-1 $\beta$  或 IL-4 时中和 VCAM-1 正调节,从而证实对 IL-13 具有特异性(图 10)。IL-4 与 IL-13 最接近相关,在氨基酸水平上具有 30%的序列同一性 [82]。

[0345] 实施例 10

[0346] BAK209B11 作为人 IgG4 在鼠 IL-13 依赖性鼠 B9 细胞增殖试验中的中和效价

[0347] 如实施例 5 所述方法,将通过实施例 1 所述方法被鉴定为是可作为 scFv 的抗鼠 IL-13 中和克隆,即 BAK209B11 重构成完整抗体人 IgG4,并通过鼠 IL-13 依赖性 B9 细胞增殖试验评估其效价。B9 是鼠 B-细胞杂交瘤细胞系 [83]。B9 的存活和增殖具有因子依赖性。就这一点而言,B 细胞对鼠 IL-13 有反应,并可被维持在含有人 IL-6(50pg/ml, R&D Systems) 的培养基中。对鼠 IL-13 依赖性增殖的抑制是通过测定掺入分裂细胞新合成 DNA 内的氘标记胸苷的减量而得以确定的。

[0348] B9 细胞试验方案

[0349] 由 European Collection of Animal Cell Culture ECACC 获得 B9 细胞,并根据其提供的方案维持该细胞。基本上如实施例 2 针对 TF-1 试验所述的方法进行该试验,但存在下述改动。试验培养基包括含 GLUTAMAX I 的 RPMI-1640(Invitrogen),并含 5%胎牛血清(Hyclone)和 50  $\mu$ M 2-巯基乙醇(Invitrogen)。并以重组细菌来源的鼠 IL-13(Peprotech)取代人 IL-13,最终试验浓度为 1ng/ml。

[0350] 结果

[0351] BAK209B11(VH SEQ ID NO :25 ;VL SEQ ID NO :26) 在 B9 试验中作为人 IgG4 中和 1ng/ml 鼠 IL-13 的 IC<sub>50</sub>为 776pM(图 11)。由此说明 BAK209B11 有助于研究 IL-13 在疾病鼠模型中的作用。这一点在实施例 12 得到明确证实,该实施例证实了 BAK209B11 在急性肺炎鼠模型中的效能。

[0352] 实施例 11

[0353] 通过 BIAcore 分析对抗 IL-13 抗体亲和力的确定

[0354] 基本上如 [72] 所述方法通过利用 BIAcore 2000 Biosensor(BIAcore AB) 进行的表面等离子共振技术测定 BAK502G9(VH SEQ ID NO :15 ;VL SEQ ID NO :16)、BAK1167F2(VH SEQ ID NO :35 ;VL SEQ ID NO :36) 和 BAK1183H4(VH SEQ ID NO :37 ;VL SEQ ID NO :38) 作为人 IgG4 与人 IL-13 的亲和力,以及 BAK209B11(VH SEQ ID NO :25 ;VL SEQ ID NO :26) 作为人 IgG4 与鼠 IL-13 的亲和力。简言之,利用胺偶联试剂盒(BIAcore) 使抗体与 CM5 传感器芯片偶联,表面密度约为 500Ru,用 HBS-EP 缓冲液系列稀释 IL-13 所获的系列稀释液(50nM-0.78nM) 通过该传感器芯片表面。利用 BIA 评估 3.1 软件评估由上所获传感器记录,获得动力学数据。

[0355] 结果

[0356] BAK502G9、BAK1167F2 和 BAK1183H4 IgG4 分别以 Kd 为 178pM、136pM 和 81pM 的高

亲和力结合人 IL-13,与它们在以细胞为基础的试验中的相对效价相对应。BAK209B11 则以 5.1nM 的亲和力结合鼠 IL-13(表 3)。

[0357] 实施例 12

[0358] BAK209B11 在急性变应性肺炎鼠模型中的效能

[0359] 急性变应性肺炎鼠模型

[0360] 在急性变应性肺炎鼠中研究 BAK209B11(VH SEQ ID NO:25;VL SEQ ID NO:26) 这种抗鼠 IL-13 中和人 IgG4 抗体的作用。基本上如 Riffo-Vasquez 等人所述的方法 [84] 构建该模型,其最终特征在于支气管肺泡灌洗 (BAL) IL-13 增多(图 12)、细胞浸润进入肺和 BAL(图 13)、血清 IgE 水平升高和呼吸道高反应性 (AHR)。

[0361] 建模方案

[0362] 用抗鼠 IL-13 抗体 BAK209B11(以 12、36、119 或 357  $\mu$ g 剂量)或同种型匹配对照抗体(357  $\mu$ g 剂量)处理雌性 Balb/C 小鼠(Charles River UK)。第 0 和第 7 天,通过腹膜内注射 10  $\mu$ g 溶解于 0.2ml 载体(含 2%  $Al_2O_3$ (Rehydralgel)作为佐剂的盐溶液)中的卵清蛋白(Ova),使各组小鼠敏化。未敏化小鼠对照组单独接受等量的上述载体。第 14、15 和 16 天用卵清蛋白激发小鼠。使卵清蛋白雾化前先用无菌盐水将其稀释至 1% (w/v)。所有吸入激发均在 Plexiglas 暴露室内进行。以 1 小时间隔进行一组 3 次的暴露,每次 20 分钟,用 deVilbiss Ultraneb 2000 喷雾器(Sunrise Medical)使卵清蛋白雾化。

[0363] 第一次激发前 1 天以及之后的每次激发前 2 小时静脉内施用 BAK209B11 或无关人 IgG4(共计 4 个剂量)。第 17 天,即最终激发后 24 小时终止建模。收集血液(血清)和 BAL。测定血清中的总 IgE。通过注射 3 等份盐水(0.3ml、0.3ml 和 0.4ml)和混合样品获得 BAL。从 BAL 细胞中获得总的白细胞和分类细胞计数。

[0364] 结果

[0365] 与未敏化但被激发的动物相比,对敏化小鼠的卵清蛋白激发导致总 BAL 细胞募集显著( $p < 0.05$ )提高。BAK209B11 以剂量依赖性方式抑制该募集;BAK209B11  $\geq 36 \mu$ g 时可观测到显著( $p < 0.05$ )抑制,而对照抗体则无(图 13)。BAK209B11 剂量最小为 36  $\mu$ g 时,也可发现其同样显著( $p < 0.05$ )抑制了嗜酸性粒细胞(图 14)和嗜中性粒细胞(图 15)的细胞内向通量。未发现对照抗体具有该抑制作用。被激发后,敏化小鼠体内还诱导产生了淋巴细胞,而未敏化小鼠体内则无。BAK209B11 以剂量依赖性方式抑制该诱导,BAK209B11 为 36  $\mu$ g 时可观测到最大抑制。对照抗体则不起作用(图 16)。与未敏化动物相比,尽管未在敏化动物体内诱导产生单核细胞/巨噬细胞,但 BAK209B11  $\geq 36 \mu$ g 时可降低自然背景值,对照抗体则不能(图 17)。与未敏化动物相比,敏化动物激发后的血清 IgE 水平显著( $p < 0.05$ )升高。用 36  $\mu$ g BAK209B11 治疗后可使该升高的水平降低,对照抗体则不能。

[0366] 概括而言,在变应性炎症鼠模型中,系统性施用鼠 IL-13 中和抗体 BAK209B11 可抑制炎症细胞内向通量以及敏化和后续卵清蛋白激发对血清 IgE 水平的正调节,而对照抗体则不行。

[0367] 实施例 13-20 为预示性实例。

[0368] 实施例 13

[0369] BAK209B11 在急性肺炎鼠模型中的效能

[0370] 急性变应性肺炎鼠模型

[0371] 在第二种急性变应性肺炎鼠模型中研究了抗鼠 IL-13 中和抗体 BAK209B11 (VH SEQ ID NO :25 ;VL SEQ ID NO :26) 的作用。基本上如 McMillan 等人所述的方法 [85] 构建该模型,其最终特征在于 BAL 和肺组织 IL-13 增多、细胞浸润进入肺和 BAL、血清 IgE 水平升高和呼吸道高反应性 (AHR)。

#### [0372] 建模方案

[0373] 如下所述,对雌性 Balb/C 小鼠 (Charles River UK) 施用不同剂量的抗鼠 IL-13 抗体 BAK209B11 或同种型匹配对照抗体。第 0 和第 12 天,通过腹膜内注射 10  $\mu$ g 溶解于 0.2ml 载体 (含有 2mg  $\text{Al}(\text{OH})_3$  作为佐剂的盐溶液 [ 计算如实施例 12 所述 ]) 中的卵清蛋白 (Ova),使各组小鼠敏化 (SN)。未敏化小鼠对照组 (NS) 单独接受等量的上述载体。第 19、20、21、22、23 和 24 天用卵清蛋白激发小鼠 20 分钟。使卵清蛋白雾化前先用盐水将其稀释至 5% (w/v)。所有吸入激发均在 Plexiglas 暴露室内进行。利用 deVilbiss Ultraneb 2000 喷雾器 (Sunrise Medical) 使卵清蛋白雾化。第 18、19、20、21、22、23 和 24 天,对小鼠腹膜内施用不同剂量 (237  $\mu$ g、23.7  $\mu$ g 或 2.37  $\mu$ g ;如图 21 中的 H、M 和 L 所示) 的抗鼠 IL-13 抗体 BAK209B11  $\mu$ IgG1 或同种型匹配对照抗体 (237  $\mu$ g)。第 0 和 25 天,通过增强乙酰甲胆碱激发并用意识体积描记器 (Buxco) 监控,评估呼吸道功能。根据与乙酰甲胆碱剂量 - 反应曲线拟合并有 4 个参数不固定的曲线,估计个体小鼠第 0 和第 25 天的  $\text{PC}_{50}$  (将基线 PenH 提高 50% 所必需的乙酰甲胆碱浓度)。

[0374] 第 25 天,即最终激发后 24 小时终止建模。收集血液、血清、BAL 和肺组织。

#### [0375] 结果

[0376] 评估了个体动物第 0 (处理前) 和第 25 天 (激发后) 的肺功能,并通过计算  $\text{PC}_{50}$  值 (将基线 PenH 提高 50% 所必需的乙酰甲胆碱浓度) 定量 (图 21A)。根据第 25 天相对于第 0 天的  $\log \text{PC}_{50}$  变化 (第 25 天的  $\log \text{PC}_{50}$  - 第 0 天的  $\log \text{PC}_{50}$ ) 确定个体的呼吸道高反应性 (AHR)。该  $\log \text{PC}_{50}$  是该研究的初步终点 ;将  $\text{PC}_{50}$  数据对数转化的原因是终点 ANOVA 的需要。将各组内的个体变化平均后可获得组平均  $\log \text{PC}_{50}$  (如图 21B 所示)。

[0377] 与未敏化但被激发的小鼠相比,卵清蛋白对敏化小鼠的激发导致了显著的 AHR ( $p < 0.01$ )。BAK209B11 以剂量依赖性方式明显缓解了 AHR,而对照抗体则无该作用。

#### [0378] 实施例 14

[0379] BAK209B11 在急性肺炎鼠模型中的效能

[0380] 在第三种急性变应性肺炎鼠模型中研究了抗鼠 IL-13 中和人 IgG4 抗体 BAK209B11 (VH SEQ ID NO :25 ;VL SEQ ID NO :26) 的作用。基本上如 Humbles 等人所述的方法 [86] 构建该模型,其最终特征在于 BAL 和肺组织 IL-13 增多、细胞浸润进入肺和 BAL、血清 IgE 水平升高和呼吸道高反应性 (AHR)。

#### [0381] 建模方案

[0382] 对雌性 Balb/C 小鼠 (Charles River UK) 施用不同剂量的抗鼠 IL-13 抗体 BAK209B11 或同种型匹配对照抗体。第 0、7 和 14 天,通过腹膜内注射 10  $\mu$ g 溶解于 0.2ml 载体 (含有 1.125mg  $\text{Al}(\text{OH})_3$  作为佐剂的盐溶液 [ 计算如实施例 12 所述 ]) 中的卵清蛋白 (Ova),使各组小鼠敏化 (SN)。未敏化小鼠对照组 (NS) 单独接受等量的上述载体。第 21、22、23 和 24 天,用卵清蛋白激发小鼠 20 分钟。使卵清蛋白雾化前先用盐水将其稀释至 5% (w/v)。所有吸入激发均在 Plexiglas 暴露室内进行。利用 deVilbiss Ultraneb 2000 喷

雾器 (Sunrise Medical) 使卵清蛋白雾化。

[0383] 第 25 天,即激发后 24 小时终止建模。收集血液、血清、BAL 和肺组织。

[0384] 实施例 15

[0385] BAK209B11 在肺炎症 Lloyd 慢性模型中的效能

[0386] 慢性变应性肺炎鼠模型

[0387] 在慢性变应性肺炎鼠模型中研究了抗鼠 IL-13 中和人 IgG4 抗体 BAK209B11 (VH SEQ ID NO:25;VL SEQ ID NO:26) 的作用。基本上如 Temelkovski 等人所述的方法 [87] 构建该模型,其最终特征在于细胞浸润进入肺和 BAL、血清 IgE 水平升高和呼吸道高反应性 (AHR)。

[0388] 建模方案

[0389] 对雌性 Balb/C 小鼠 (Charles River UK) 施用不同剂量的抗鼠 IL-13 抗体 BAK209B11 或同种型匹配对照抗体。第 0 和 11 天,通过腹膜内注射 10  $\mu$ g 溶解于 0.2ml 载体 (含有 2mg Al(OH)<sub>3</sub> 作为佐剂的盐溶液 [ 计算如实施例 12 所述 ]) 中的卵清蛋白 (Ova), 使各组小鼠敏化 (SN)。未敏化小鼠对照组 (NS) 单独接受等量的上述载体。第 18、19、20、21、22、23、28、30、32、35、37、39、42、44、46、49 和 51 天,用卵清蛋白激发小鼠 20 分钟。使卵清蛋白雾化前先用盐水将其稀释至 5% (w/v)。所有吸入激发均在 Plexiglas 暴露室内进行。利用 deVilbiss Ultraneb 2000 喷雾器 (Sunrise Medical) 使卵清蛋白雾化。

[0390] 第 52 天,即激发后 24 小时终止建模。收集血液、血清、BAL 和肺组织。

[0391] 实施例 16

[0392] 抗人 IL-13 抗体抗鼠气囊模型所施用外源人 IL-13 的效能

[0393] 在基础鼠模型中研究了抗人 IL-13 抗体对人 IL-13 促炎作用的影响。基本上如 Edwards 等人所述的方法 [93] 构建该模型,其最终特征在于细胞浸润进入所述气囊。

[0394] 建模方案

[0395] 通过第 0 天皮下注射 2.5ml 无菌空气,使雌性 Balb/C 小鼠背部形成气囊。第 3 天用另外 2.5ml 无菌空气使该气囊再次膨胀。第 6 天将溶解在 0.75% CMC 中的 2  $\mu$ g huIL-13 直接注射进该气囊。24 小时后,处死小鼠,并用 1mL 肝素化盐水冲洗该气囊。用 huIL-13 (进入该气囊) 或系统性进行抗体治疗。

[0396] 结果

[0397] 与接受载体 (将在盐水中形成的 0.75% 羧甲基纤维素 (CMC) 注射进气囊) 处理的小鼠相比,被注射进气囊 (i. po.) 的人 IL-13 在小鼠激发后 24 小时使总的白细胞 ( $p < 0.01$ ) 和嗜酸性粒细胞 ( $p < 0.01$ ) 浸润显著增加。

[0398] 局部施用的 BAK502G9 (200mg、20mg 或 2mg 气囊内) 以剂量依赖性方式显著抑制了总的白细胞 ( $p < 0.01$ ) 和嗜酸性粒细胞 ( $p < 0.01$ ) 漫润进入因 0.75% CMC 所含 2  $\mu$ g huIL-13 造成的气囊。

[0399] 系统性施用的 BAK209B11 (30mg/kg、10mg/kg 和 1mg/kg) 也以剂量依赖性方式显著抑制了总的白细胞 ( $p < 0.01$ ) 和嗜酸性粒细胞 ( $p < 0.01$ ) 漫润进入因 0.75% CMC 所含 2  $\mu$ g huIL-13 造成的气囊。

[0400] 实施例 17

[0401] 用于评估抗人 IL-13 抗体在肺变应性炎症模型中的效能的人 IL-13 加入 / 鼠

IL-13 剔除转基因小鼠的产生

[0402] 发明者通过基因导向获得了可表达人 IL-13 而不表达鼠 IL-13 的小鼠。所述小鼠 IL-13 基因从起始到终止密码子均被取代为人 IL-13 基因的相关部分。该小鼠品系与野生型小鼠反应相同刺激物时,表达的是人 IL-13 而不是小鼠 IL-13,但内源 IL-13 启动子和 IL-13pA 尾部保持不变。业已证实人 IL-13 可与小鼠 IL-13 受体结合并通过其发信号,可与由小鼠 IL-13 连接的小鼠 IL-13 受体所导致的信号一样产生相同的生理学结果。例如,内源人 IL-13 导致炎症细胞募集进小鼠气囊(图 18)。这些转基因动物使我们评估非鼠交叉反应性抗人 IL-13 抗体在已确定的疾病鼠模型中的作用。

[0403] 该小鼠已被应用在急性变应性呼吸道炎症模型(如实施例 18 和 19 所述)和慢性变应性呼吸道炎症模型(如实施例 20 所述)中,协助评估了抗人 IL-13 抗体在变应性呼吸道疾病中的药理学。

[0404] 实施例 18

[0405] 抗人 IL-13 抗体在急性肺炎 huIL-13- 转基因 Lloyd 鼠模型中的效能急性变应性肺炎鼠模型

[0406] 利用实施例 17 所获得的转基因小鼠研究了抗人 IL-13 中和人 IgG4 抗体在急性变应性肺炎鼠模型中的作用。基本上如 McMillan 等人所述的方法 [85] 和实施例 13 构建该模型。其最终特征在于 BAL 和肺组织 IL-13 增加、细胞浸润进入肺和 BAL、血清 IgE 水平升高和呼吸道高反应性(AHR)。

[0407] 建模方案

[0408] 该建模方案如实施例 13 所述,但所施用的是抗人 IL-13 抗体,而不是 BAK209B11。

[0409] 实施例 19

[0410] 抗人 IL-13 抗体在急性肺炎 huIL-13- 转基因 Gerard 鼠模型中的效能急性变应性肺炎鼠模型

[0411] 利用实施例 17 所获得的转基因小鼠研究了抗人 IL-13 中和人 IgG4 抗体在另一种急性变应性肺炎鼠模型中的作用。基本上如 Humbles 等人所述的方法 [86] 和实施例 14 构建该模型。其最终特征在于 BAL 和肺组织 IL-13 增加、细胞浸润进入肺和 BAL、血清 IgE 水平升高和呼吸道高反应性(AHR)。

[0412] 建模方案

[0413] 该建模方案如实施例 14 所述,但所施用的是抗人 IL-13 抗体,而不是 BAK209B11。

[0414] 实施例 20

[0415] 抗人 IL-13 抗体在慢性肺炎 huIL-13- 转基因 Lloyd 鼠模型中的效能

[0416] 利用实施例 17 所获得的转基因小鼠研究了抗人 IL-13 中和人 IgG4 抗体在慢性变应性肺炎鼠模型中的作用。基本上如 Temelkovski 等人所述的方法 [87] 和实施例 15 构建该模型。其最终特征在于细胞漫润进入肺和 BAL、血清 IgE 水平升高和呼吸道高反应性(AHR)。

[0417] 建模方案

[0418] 该建模方案如实施例 15 所述,但所施用的是抗人 IL-13 抗体,而不是 BAK209B11。

[0419] 实施例 21

[0420] 抗人 IL-13 抗体在猪蛔虫 - 变应性猕猴体内的药物代谢动力学和药物动力学

[0421] 评估了 BAK502G9 在 4 只具有变应性但未被激发的猕猴属灵长类动物 (2 雄 /2 雌) 单次静脉施用剂量为 10mg/kg 的集合药团后的药物代谢动力学和药物动力学。该试验进行 29 天。抗体的药物代谢动力学参数根据血清 - 药物浓度几何平均值曲线而定, 详见下表 4。

[0422] 在同一研究中还利用人 IgE ELISA 试剂盒 (Bethyl laboratories, USA) 追踪了血清 IgE 浓度。

[0423] 结果

[0424] 单次静脉内施用集合药团剂量为 10mg/kg 的 BAK502G9 后第 4 和 5 天, 血清 IgE 浓度由 100% 对照水平 (初始剂量) 显著降至对照值的  $66 \pm 10\%$  ( $p < 0.05$ )。第 22 天, 该血清 IgE 浓度恢复至对照水平的  $88 \pm 8\%$  (参见图 20)。通过将每只动物的血清 IgE 浓度归一化为初始剂量水平, 其中所述初始剂量浓度为 100%, 并接着对由 4 只试验动物获得的曲线进行平均, 便可再次导出这些数据。

[0425] 两只雄性猕猴具有相对低的初始剂量总血清 IgE (60ng/ml 和 67ng/ml)。它们的 IgE 水平未变化, 勉强说明 BAK502G9 适用于治疗 (图 20B)。两只雌性猕猴具有相对高的初始剂量总血清 IgE (1209ng/ml 和 449ng/ml)。接受 BAK502G9 治疗后, 它们的 IgE 水平于第 7 天降幅最大, 为 60%, 并于给药后 28 天大约恢复至初始剂量水平 (图 20B)。上述数据说明 BAK502G9 降低了动物的血清 IgE 浓度, 循环 IgE 在 IgE 中所占比例相对较高。

[0426] 实施例 22

[0427] 抗人 IL-13 抗体在皮肤变应反应猕猴模型中的效能

[0428] 在急性变应性皮肤炎症的灵长类动物模型中研究了抗人 IL-13 中和人 IgG4 抗体的效能。通过对猕猴皮内注射人 IL-13 和猪蛔虫抗原, 可构建该模型。24-96 小时后, 取得皮肤活组织检查标本和血清样品。该模型的最终特征在于细胞浸润进入皮肤。

[0429] 实施例 23

[0430] 抗人 IL-13 抗体在肺变应反应猕猴模型中的效能

[0431] 在急性变应性肺炎的灵长类动物模型中研究了抗人 IL-13 中和人 IgG4 抗体的作用。通过使猪蛔虫 - 变应性猕猴接触雾状猪蛔虫抗原, 使其产生变应性反应, 而得以构建该模型。该变应反应的最终特征在于细胞浸润进入肺和 BAL、血清 IgE 水平升高和呼吸道高反应性。

[0432] 还利用流式细胞法体外评估了药物动力学。CD23 是高亲和力 IgE 受体, 可被表达在外周人血单核细胞上。根据表达 CD23 的细胞数量以及每个细胞表达多少 CD23, 可用 IL-13 和 IL-4 诱导 CD23 表达。IL-13 介导的反应可被抗人 IL-13 抗体抑制, 而 IL-4 介导的反应则不受其抑制。

[0433] 基于之前通过雾状抗原 (猪蛔虫提取物) 激发而得以建立的 AHR, 预先筛选可进入 2 期研究的动物。I 期研究的第 1 和 11 天在静脉内组胺激发期间评估了呼吸道功能。PC<sub>30</sub>, 即使肺抵抗力 ( $R_L$ ) 高于基线 30% 所需的组胺剂量是根据各组胺剂量反应曲线确定的。第 9 和 10 天, 以之前显示可使  $R_L$  升高 40% 并使动态应变性 ( $C_{DYN}$ ) 下降 35% 的雾化抗原调整剂量分别激发每只动物。根据过去对该模型的研究, 用特定变应原剂量第二次激发后观测到的  $R_L$  高于第一次激发所获  $R_L$ ; 这是抗原引发。正如根据组胺剂量反应曲线下增加的面积和 / 或 PC<sub>30</sub> 的下降所测定的, 两次抗原激发均导致了 AHR, 以及 BAL, 与第 1 天相比, 第 11 天还出现了嗜曙红细胞增多。选择表现了 AHR 表型的动物进入 II 期研究。



[0434] II 期研究与 I 期完全一样,只是所有动物于第 1、5 和 9 天灌输的是 30mg/kg BAK502G9。通过比较个体动物 I 期变化和 II 期变化,评估 BAK502G9 的作用。

[0435] 收集血液、血清、BAL 和肺组织。通过 ELISA 监控血清 IgE 水平。从经过 BAK502G9 治疗的猕猴所获得的血清显示抑制了 IL-13 诱导的人外周血单核细胞上的 CD23 表达,而不是 IL-4 诱导的 CD23 表达。该抑制的量级与通过 PK ELISA 预测的血清 BAK502G9 水平相符。

[0436] 结果

[0437] 根据  $R_L$  AUC 所测定的结果,BAK502G9 显著抑制了 AHR( $p < 0.05$ ) (图 26A;表 7)。根据  $PC_{30}$ 测定的 BAK502G9 对 AHR 的抑制作用可观测到,但不具有统计显著性(图 26B;表 7)。BAK502G9 还显著抑制了两次抗原引发( $p < 0.01$ ) (图 26C;表 7)和 BAL 炎症。BAK502G9 显著抑制了进入 BAL 的总细胞( $p < 0.05$ )和嗜酸性粒细胞( $p < 0.05$ )的内向通量,而未抑制进入 BAL 的巨噬细胞、淋巴细胞或肥大细胞的内向通量(图 26D;表 7)。

[0438] 实施例 24

[0439] 抗人 IL-13 抗体对小鼠肺施用人 IL-13 后所出现的哮喘表型的效能

[0440] 呼吸道高反应性鼠模型

[0441] 该实施例研究了抗人 IL-13 中和抗体 BAK502G9 对小鼠肺施用人 IL-13 后所出现的呼吸道高反应性(AHR)的效能。基本上如 Yang 等人所述的方法 [119] 构建该模型,但采用人 IL-13 取代鼠 IL-13。

[0442] 建模方案

[0443] 通过使雄性 BALB/c 小鼠以 48 小时的时间间隔分别两次暴露于人 IL-13,以出现所述表型。简言之,静脉内注射 100  $\mu$ l saffan 溶液(1 : 4 稀释于水中)使小鼠麻痹。将 22 号导管针插入小鼠体内,以滴注人重组 IL-13(25  $\mu$ g 溶解于 20  $\mu$ l 磷酸缓冲盐溶液(PBS)中)或载体对照(PBS)。通过增强乙酰甲胆碱激发并用意识体积描记器(Buxco)监控,评估最终施用 IL-13 后 24 小时的呼吸道功能。根据与乙酰甲胆碱剂量-反应曲线拟合并有 4 个参数不固定的曲线测定  $PC_{200}$ (将基线 penH 提高 200%所必需的乙酰甲胆碱浓度)。每次施用 IL-13 之前 24 小时通过腹膜内注射进行抗体治疗。

[0444] 结果

[0445] 根据  $PC_{200}$ 乙酰甲胆碱浓度所测定的结果,与对照动物相比,将人 IL-13 气管内滴注进首次用于试验的野生型小鼠,导致其出现了显著( $p < 0.05$ )的呼吸道高反应性。系统性施用 BAK502G9(1mg/kg)显著( $p < 0.01$ )抑制了 AHR 的出现,而无关对照抗体则无该作用(图 23)。

[0446] 实施例 25

[0447] BAK502G9 作为人 IgG4 对人 B 细胞的人 IL-13 依赖性 IgE 释放的中和效价

[0448] B 细胞转换试验方案

[0449] 业已证实 IL-13 可诱导体外人 B 细胞内的 IgE 合成 [120]。通过 ELISA 确定人 B 细胞的因子依赖性 IgE 释放。评估了 BAK502G9 作为人 IgG4 对人 B 细胞的人 IL-13 依赖性 IgE 释放的中和效价。

[0450] 通过 1.077g/1 密度梯度离心从人血沉棕黄层(Blood Transfusion Service)中纯化出外周血单核细胞(PBMC)。利用 B 细胞分离试剂盒 II(Miltenyi Biotec)并采用生产商所述试剂和方法,从 PBMC 中纯化出 B 细胞。试验培养基包括 Iscoves 改良 dulbeccos

培养基 (Life Technologies), 并含 10% 胎牛血清和 20  $\mu\text{g/ml}$  人转铁蛋白 (Serologicals Proteins Inc.)。纯化后, 将 B 细胞重悬浮在试验培养基中, 最终浓度为  $10^6$  个细胞 /  $\text{ml}$ 。将 50  $\mu\text{l}$  重悬浮细胞加入 96 孔培养板的各实验点中。根据需要, 将 50  $\mu\text{l}$  4  $\mu\text{g/ml}$  抗 CD40 抗体 EA5 (Biosource) 加入各孔内。用试验培养基将抗体试液 (一式六份) 稀释至要求浓度。以不直接抗 IL-13 的无关抗体作为阴性对照。以 50  $\mu\text{l}$  / 孔的量将合适的试验抗体加入各孔内。再将重组细菌来源的人 IL-13 (Peprotech) 加入孔内, 其最终浓度为 30  $\text{ng/ml}$ , 所获总试验体积为 200  $\mu\text{l}$  / 孔。该试验所用 IL-13 浓度被选择用于实现最大反应。于 37°C 和 5%  $\text{CO}_2$  条件下温育试验培养板 14 天。通过 ELISA 并采用生产商 (BD Biosciences, Bethyl Laboratories) 提供的试剂和方案测定上清液中的 IgE 水平。数据用 Graphpad prism 软件分析。

#### [0451] 结果

[0452] 如图 24 所示, BAK502G9 (VH SEQ ID NO:15; VL SEQ ID NO:16) 能够抑制人 B 细胞以依赖于人 IL-13 的方式生成 IgE。BAK502G9 作为人 IgG4 抗 30  $\text{ng/ml}$  人 IL-13 的  $\text{IC}_{50}$  为 1.8  $\text{nM}$ 。

#### [0453] 实施例 26

[0454] BAK502G9 对初级人支气管平滑肌细胞中 IL-13 介导的组胺诱导性  $\text{Ca}^{2+}$  信号增强的效能

[0455] 业已证实 IL-13 可直接调节呼吸道平滑肌的收缩性 [121、122]。平滑肌收缩的前提是胞内钙转移。最近的研究显示 IL-13 改变平滑肌收缩性的能力是部分地通过调节收缩增效剂所诱导的  $\text{Ca}^{2+}$  信号而得以介导的 [123、124]。

[0456] 在  $\text{Ca}^{2+}$  信号试验中研究了抗人 IL-13 抗体 BAK502G9 以 IgG4 形式对 IL-13 介导的初级人支气管平滑肌细胞 (BSMC) 信号改变的效能, 其中所述初级人支气管平滑肌细胞信号是反应收缩增效剂组胺而产生的。

#### [0457] BSMC $\text{Ca}^{2+}$ 信号试验方案

[0458] 人初级 BSMC、平滑肌生长培养基-2 (SmGM-2) 和平滑肌基础培养基 (SmBM) 获自 Bio Whittaker。根据提供方的推荐在 SmGM-2 中维持 BSMC。以  $2 \times 10^4$  个细胞 / 孔的量将 BSMC 接种在 96 孔微量滴定细胞培养板中, 并使其附着 24 小时, 接着再次饲养并继续温育 24 小时。进行  $\text{Ca}^{2+}$  信号试验之前, 用最终浓度为 50  $\text{ng/ml}$  的 IL-13 (Peprotech) 连同或不连同抗体一起刺激 BSMC, 并温育 18-24 小时。评估最终浓度为 10  $\mu\text{g/ml}$  的 BAK502G9 和同种型匹配无关对照单克隆抗体 CAT-001。通过利用  $\text{Ca}^{2+}$  灵敏染料 Fluo-4 (Molecular Probes) 和 96 孔荧光成像读板仪 (FLIPR) (Molecular Devices) 进行的标准技术测定胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度反应从 20  $\mu\text{M}$  开始滴定的组胺 (Calbiochem) 时的变化。针对各细胞预处理条件测定  $\text{Ca}^{2+}$  信号的组胺反应曲线下方的面积 (AUC)。数据分析利用适用于 Windows 的 GraphPad Prism version 4 (GraphPad Software) 进行。

#### [0459] 结果

[0460] 用 IL-13 预先温育 BSMC 显著增强了  $\text{Ca}^{2+}$  反应组胺时所产生的信号。用 BAK502G9 和 IL-13 一起 (而不是无关同种型对照抗体 (图 25A)) 预先温育 BSMC (图 25B) 则显著抑制了反应组胺时  $\text{Ca}^{2+}$  信号的增强 (图 25)。

#### [0461] 实施例 27

[0462] 抗 IL-13 抗体在人 IL-13 依赖性 PBMC CD23 表达试验中的中和效价

[0463] 在人 IL-13 依赖性外周血单核细胞 (PBMC) CD23 表达试验中评估了代表性 IL-13 抗体的效价。PBMC 可通过提高细胞表面的 CD23 表达而对 IL-13 和 IL-4 均有反应 [120]。CD23 (FcεRII) 是 IgE 的低亲和力受体,被表达在包括单核细胞在内的多种炎症细胞上。通过利用流式细胞仪测定荧光标记的 CD23 单克隆抗体与 PBMC 结合的减量,可确定人 IL-13 依赖性 CD23 表达正调节的抑制。

[0464] 试验方案

[0465] 由 Blood Transfusion Service 获得人血,通过 40 分钟的葡聚糖-T500 (Pharmacia) 沉降 (0.6% 最终浓度) 除去红细胞。接着通过采用 3mL 64% 和 5mL 80% 的不连续 Percoll 梯度 (100% 指 9 份 Percoll 和 1 份 10x PBS) 进行 20 分钟 1137g 离心,分离富含白细胞和血小板的部分。从 64% 层的上部收集 PBMC,洗涤并将其重悬浮在试验缓冲液 (Invitrogen RPMI 1640, 10% FCS, 200IU/mL 青霉素, 100 μg/mL 链霉素, 2mM L-谷氨酰胺) 中。该试验在 24 孔培养板中进行,每孔含  $2 \times 10^6$  个细胞、±80pM 重组人 IL-13 (Peprotech) 或 21pM 重组人 IL-4 (R&D Systems)、±BAK502G9 或无关 IgG4, 终体积为 500μL。37°C 培养细胞 48 小时后,收获并于 4°C 用 CD23-PE (BD Pharmingen) 染色 20 分钟。最后,用流式细胞仪对细胞读数。根据 CD23 ‘评分’,即以染色“亮度”乘 CD23 阳性细胞百分比所获结果 (荧光几何平均值) 确定 CD23 表达。将无刺激物的 CD23 ‘评分’减去并将该数据表示为仅反应 IL-13 的百分比 (100%)。将由利用 4-6 名个体供体的细胞以各点重复三次的方式进行的 4-6 次独立试验所获的数据表达为平均值 ±SEM 的形式。

[0466] 结果

[0467] 用 80pM IL-13 或 21pM IL-4 温育 PBMC 48 小时导致出现明显的 CD23 表达 (图 27 和图 28)。BAK502G9 以剂量依赖性方式抑制 IL-13 诱导的 CD23 表达,几何平均值为 120.2pM (图 27)。与之相比,BAK502G9 不能抑制 21.4pM IL-4 诱导的 CD23 表达 ( $n = 4$  来自个体供体,图 28)。无关 IgG4 不抑制 PBMC 上的 IL-13 或 IL-4 依赖性 CD23 表达 (图 27 和图 28)。80pM IL-13 和 21.4pM IL-4 共同刺激 PBMC 产生了加性 CD23 反应。BAK502G9 将 CD23 表达水平降低至仅用 IL-4 刺激时所观测到的水平,而 CAT-001 不行 (图 28)。

[0468] 实施例 28

[0469] 人 IL-13 抗体在人 IL-13 依赖性嗜酸性粒细胞形状改变试验中的中和效价

[0470] 该研究的目的在于评估 IL-13 抗体对 NHLF 受哮喘患者肺内存在的因子,诸如 IL-13 [125、126]、TNF-α [127]、TGF-β 1 [128] 刺激后所释放介质诱导的嗜酸性粒细胞形状改变的影响。IL-13 与 TNF-α [129] 或 TGF-β 1 [130] 协同作用,可诱导成纤维细胞生成可接着产生作用直接化学吸引嗜酸性粒细胞的嗜酸性粒细胞趋化因子-1。白细胞形状变化反应是通过细胞支架的重排而得以介导的,并且对白细胞从微循环迁移进入炎症位点的过程而言是必要的。通过 ELISA 测定嗜酸性粒细胞趋化因子-1 分泌的减量和利用流式细胞仪测定嗜酸性粒细胞形状变化的减量,可确定对 NHLF 释放 IL-13 依赖性形状变化诱导因子的抑制。

[0471] 试验方案

[0472] 仅用培养基或含刺激物 (9.6nM IL-13、285.7pM TNF-α (R&D Systems) 和 160pM TGF-β 1 (R&D Systems)) 的培养基在 BAK502G9 (浓度范围 875nM-6.84nM) 缺乏或存在条件

下共培养 NHLF 细胞。接着于 37℃ 继续培养细胞 48 小时后,吸取培养所获的条件培养基并于 -80℃ 保存。利用 R&D systems 的 DuoSet ELISA 系统 (R&D Systems) 评估条件培养基中的嗜酸性粒细胞趋化因子-1 浓度。

[0473] 由 Blood Transfusion Service 获得人血,通过 40 分钟葡聚糖-T500 (Pharmacia) 沉降 (0.6% 最终浓度) 除去红细胞。接着通过采用 3mL 64% 和 5mL 80% 的不连续 Percoll 梯度 (100% 指 9 份 Percoll 和 1 份 10x PBS) 进行 20 分钟 1137g 离心,分离富含白细胞和血小板的部分。从 64% : 80% 界面收集粒细胞,洗涤并将其重悬浮在试验缓冲液 (Sigma PBS, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM HEPES, 10mM D- 葡萄糖, 0.1% Sigma BSA, pH7.3) 中。该试验在 FACS 管中进行,每管含  $5 \times 10^5$  个细胞、 $\pm 3$ nM 重组人嗜酸性粒细胞趋化因子-1 (R&D Systems) 或条件培养基,终体积为 400  $\mu$ L。37℃ 温育细胞 8.5 分钟后,转移至 4℃,用固定剂 (CellFix, BD Biosciences) 固定,最后用流式细胞仪读数。根据嗜酸性粒细胞的 FL-2 自身荧光和前向散射 (FSC) 参数读数鉴定嗜酸性粒细胞。根据嗜酸性粒细胞同时反应嗜酸性粒细胞趋化因子-1 和条件培养基时产生的 FSC 变化,便可衡量其形状变化。以高流速从试管中取样,并于 1000 个嗜酸性粒细胞通过或 1 分钟后终止采集,而无论哪一种情况较快。以占仅由形状变化缓冲液导致的 FSC 的百分比形式计算形状变化 (100% 为空白形状变化)。将 4 次独立试验所获数据表达为空白形状变化% 平均值  $\pm$  SEM。各试验均采用个体血沉棕黄层 (由个体供体提供) 中的细胞,各试验点重复进行两次。

#### [0474] 结果

[0475] 用 9.6nM IL-13、285.7pM TNF- $\alpha$  和 160pM TGF- $\beta$  1 协同刺激 NHLF 细胞并培养 48 小时后,该细胞分泌进入培养基中的嗜酸性粒细胞趋化因子-1 为 9.6nM。与之相比,仅用维持液培养 NHLF 细胞时,该细胞分泌进入培养基的嗜酸性粒细胞趋化因子-1 为 0.1nM。该嗜酸性粒细胞趋化因子-1 的生成依赖于 IL-13,因为 IL-13/TNF- $\alpha$  /TGF- $\beta$  1 协同刺激 NHLF 细胞所导致的嗜酸性粒细胞趋化因子-1 生成受 BAK502G9 的剂量依赖性方式抑制, IC<sub>50</sub> 为 32.4nM (图 29A)。

[0476] 该部分研究的主要目的在于检验嗜酸性粒细胞的形状变化。嗜酸性粒细胞反应 3nM 嗜酸性粒细胞趋化因子 (阳性对照) 时形状变化的量级为  $122.2 \pm 2.1\%$  ( $n = 4$ )。100nM 抗嗜酸性粒细胞趋化因子抗体 CAT-213 可完全抑制嗜酸性粒细胞趋化因子-1 诱导的形状变化,平均的形状变化为  $101.0 \pm 1.0\%$  ( $n = 4$ )。

[0477] 用 9.6nM IL-13、285.7pM TNF- $\alpha$  和 160pM TGF- $\beta$  1 协同刺激 NHLF 细胞并培养 48 小时后所获的培养基 (条件培养基) 可诱导产生明显的嗜酸性粒细胞形状变化 (图 29B)。与之相比,仅在 NHLF 维持液中培养 NHLF 48 小时后所获的培养基不能诱导嗜酸性粒细胞的形状变化 (图 29B)。

[0478] 在培养 NHLF 之前向经过协同刺激的培养基中加入抗 IL-13 抗体 BAK502G9,导致产生了对嗜酸性粒细胞形状变化的剂量依赖性抑制,以 1 : 16 稀释度进行测定时所获 IC<sub>50</sub> 的几何平均值为 16.8nM (图 29B)。

[0479] 试验还研究了刺激物 (IL-13、TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta$  1) 未与 NHLF 细胞一起培养时诱导嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞形状变化的能力。9.6nM IL-13、285.7pM TNF- $\alpha$  和 160pM TGF- $\beta$  1 未诱导产生明显的嗜酸性粒细胞形状变化。这说明将上述刺激物与 NHLF 细胞一起培养期间所获的条件培养基在使嗜酸性粒细胞形状变化方面的能力并非这些刺激物中的

任意一种单独作用或组合作用的结果（图 29B）。

[0480] 实施例 29

[0481] 抗 IL-13 抗体在人 IL-13 上的定位

[0482] 利用分子方法和标准肽切除法对代表性 IL-13 抗体 BAK502G9 进行表位定位。

[0483] 分子方法

[0484] 设计 IL-13 嵌合体, 将人 IL-13 序列部分取代为鼠序列。这些嵌合体与代表性 IL-13 抗体一起被应用在结合研究中, 有助于鉴定特异性表位。

[0485] 获得两组 IL-13 嵌合体。第一组含有 9 种嵌合体（图 30）, 被用于定位所述表位的大体位置。第二组含有 10 种嵌合体（图 31）, 被用于准确定位表位。

[0486] 通过 PCR 组装上述嵌合 IL-13 序列, 并将它们克隆进 **Gateway**<sup>®</sup> 进入载体中, 接着使这些序列与目标载体 pDEST8 重组（修饰后的编码有助于检测, 且该重组蛋白 C 末端具有亲和标记物）。这些表达载体被用于转化 DH10Bac<sup>™</sup> 化学感受态大肠杆菌, 可使标记嵌合 IL-13 发生位点特异性转座, 进入杆状病毒穿梭载体（杆粒）中。分离与各 IL-13 嵌合体对应的重组杆粒 DNA, 并利用 **Cellfectin**<sup>®</sup> 试剂将其转染进 Sf9（草地夜蛾）昆虫细胞中。转染后 72 小时收获重组杆状病毒, 并使其通过 Sf9 昆虫细胞两次以上。

[0487] 利用亲和柱纯化昆虫 2000-500ml 培养上清液, 并将洗脱部分从 16ml 浓缩至 1ml 后, 加样在尺寸排阻 Superdex 200 HR10/300GL 柱上, 进行最终的润饰和缓冲液交换。

[0488] 开发了一种利用生物素化人 IL-13、链霉抗生物素化 -anthophycocynate 和铕标记 BAK502G9 进行的同源竞争试验。该试验流程如下: Eu-BAK502G9 与生物素化人 IL-13 结合, 该复合物接着被链霉抗生物素化 APC 结合物识别, 当应用闪光时, 能量由 APC 标记转移至邻近的铕, 便可测定时间分辨荧光。借助于未标记的人 IL-13（作为对照）和嵌合构建体导入对该结合的竞争。对该竞争定量可计算 IL-13 突变体对 IL-13 抗体的相对亲和力, 以实现可改变待鉴定结合的突变。

[0489] 结果

[0490] 发现嵌合构建体 IL13-螺旋 D（表 5）是与生物素化人 IL-13 竞争结合 BAK502G9 时最弱的竞争者, 说明该 IL-13 分子内的螺旋 D 参与了 BAK502G9 表位结合（表 5）。还发现因亲本序列中 40、41 和 33、34 号位的残基变化而获得的 4041 和 3334 突变体的活性降低, 说明螺旋 A 潜在参与了对 BAK502G9 的识别。环 3 活性的降低不被重视的原因在于, 与人 IL-13 分子相比, 该环所含突变体中的氨基酸数目减少了, 并且可能改变所述蛋白的整体结构。嵌合 IL-13 分子在竞争 BAK502G9 结合的能力方面的其它降低被认为对这种氨基酸变化而言是不显著的。

[0491] 接着测试了螺旋 D 内一组更具有针对性的突变（图 26）。结果如表 6 所示, 如下:

[0492] 结果显示嵌合构建体 116117TK（116 号位赖氨酸被取代为苏氨酸, 117 号位天冬氨酸被取代为赖氨酸）、123KA（123 号位赖氨酸被取代）和 127RA（127 号位精氨酸被取代）至少能够竞争结合 BAK502G9（123KA 和 127RA 为 1  $\mu$ M 时不竞争结合）。由于在该竞争试验中的效率降低而被认为参与了结合 BAK502G9 的其它残基包括螺旋 D 的 124Q 残基（该处的赖氨酸被取代为谷氨酰胺）和 120121SY（亮氨酸组胺对被更换为丝氨酸酪氨酸对）。58L 号位赖氨酸的突变也使结合减少, 对 3D 结构的分析表明该残基的定位与螺旋 D 相反并可能与

BAK502G9 直接接触,或者可能影响螺旋 D 的排列。

[0493] 上述试验证实螺旋 D 内的残基对 BAK502G9 与 IL-13 的结合具有关键作用。123 号位的赖氨酸和 127 号位的精氨酸对该结合尤为关键,二者任意之一的突变均会破坏 BAK502G9 的结合。

[0494] 表位切除

[0495] 还采用标准肽切除方法对 BAK502G9 进行了表位定位。该方法是将 IgG 固定在固相上并使其捕捉 IL-13 配体。接着对由上所形成的复合体进行特异性蛋白水解消化,期间裂解了可及肽键,而被 IgG:配体界面保护的那些肽键仍保持完整。因此,含有所述表位的肽仍与 IgG 结合。接着可使二者解附,收集并通过质谱法 (ms) 进行鉴定。

[0496] 应用了两种互补技术,第一种技术利用了 Ciphergen ProteinChip Reader MALDI-TOF 质谱仪,可能使 IgG 与质谱仪芯片共价连接并继续进行消化和原位提取。第二种技术利用了生物素化 BAK502G9 和与之相连的链霉抗生物素化包被珠,可通过串联质谱计 (ms/ms) 收集足够的肽用以证实序列。

[0497] 上述两种方法的具体细节和规模尽管存在差异,但基本上包括相同步骤,即偶联 IgG、封闭未反应的结合位点、洗涤、捕捉配体、除去未结合配体、消化和最终的洗涤步骤。

[0498] MALDI-TOF 质谱法利用了经由羰基二咪唑活化的专利质谱芯片,羰基二咪唑可与游离伯胺基团结合,而 PBS 中所含 1-2mg/ml 的 IgG 则可在 4℃ 过夜条件下与该伯胺基团偶联。接着室温下用乙醇胺溶液封闭该芯片 1 小时后,用 PBS 或 HBS 外加合适的洗涤剂进行大量洗涤。随后使 1 皮摩尔 IL-13 等分试样在 PBS 或 HBS 中与上述芯片接触,使其室温下与化学固定的 IgG 结合 2 小时。接着用含有和不含洗涤剂的 PBS 或 HBS 进行进一步洗涤,以除去所有非特异性结合的 IL-13。接着对 IgG:配体复合体应用由胰蛋白酶在 PBS 或 HBS 中形成的浓度为 200 ~ 3.1  $\mu$ g/ml 的溶液,室温下进行 30 分钟消化后,相继用 PBS 或 HBS 外加洗涤剂、PBS 或 HBS 和最终用水洗涤芯片。应用合适的 MALDI-TPF 质谱基质后,将芯片直接置入质谱仪内进行分析。

[0499] 以珠为基础的方法首先是利用 NHS 生物素化合物使 IgG 生物素化,摩尔比例为 1 个 IgG:4 个生物素分子。接着通过凝胶过滤除去未结合的生物素和反应副产物。使生物素化 IgG 与中性抗生物素蛋白包被的琼脂糖珠结合,以尝试最大程度地捕捉 IgG。接着将等分试样的 IgG 包被珠分配进入浓缩器旋转柱内,用 Dulbecco 的 PBS+0.05% Tween20 洗涤后将其重悬浮于 Dulbecco 的 PBS+0.05% Tween 20 中。用脉冲输送 IL-13,使其与重悬浮 IgG 珠接触,进行 10 分钟结合后,通过离心除去液相,用 Dulbecco 的 PBS+0.05% Tween 20 洗涤珠后,将其重悬浮于 Dulbecco 的 PBS+0.05% Tween 20 中。接着通过用胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶于室温或 37℃ 温育,使该珠:IgG:配体复合体蛋白水解。接着再次用 Dulbecco 的 PBS+0.05% Tween 20 洗涤珠,再用 Dulbecco 的不含洗涤剂的 PBS 进一步洗涤。然后将珠重悬浮于水、乙腈、三氟乙酸混合液中,回收上清液。通过 MALDI-TOF 质谱或逆相 HPLC 质谱法,以不同方式进行分析,包括利用 ThermoQuest LCQ EST 离子阱质谱仪进行串联 (ms/ms) 片段化。接着尝试使由上所获的片段化样品与人 IL-13 序列和 BAK502G9 IgG 的独立重和轻链序列匹配。

[0500] 该试验性测序期间,应用了许多对照,主要是空白表面、单独的 IgG 和同种型对照,以证实所鉴定的肽特异性地来源于 IgG 所捕捉的 IL-13,而不是消化 BAK502G9 或非特异

性结合 IL-13 的产物。

[0501] 结果

[0502] 该试验系列的每次消化均一致地提供了单个 IL-13 特异性肽。由 LCQ 离子阱设备获得的数据表明胰蛋白酶解片段的单一同位素质量为 3258Da (MH<sup>+</sup>)，胰凝乳蛋白酶解片段的单一同位素质量为 3937Da (MH<sup>+</sup>)。

[0503] 将上述质量与计算机模拟消化人 IL-13 所获正确的单一同位素质量进行比较的结果说明这些酶解片段与该 IL-13 分子 C- 末端部分中的相关肽接近匹配。

[0504] 与胰蛋白酶肽质量 :3258Da 的匹配

[0505] 耐量为 1000ppm 时, 3258Da 与从 106 号位天冬氨酸到 132 号位 C- 末端天冬酰胺的序列匹配。该耐量情况下无其它匹配。该区域在下列前体形式的人 IL-13 的序列中由黑体着重显示。

[0506] MALLLTTVIALTCLGGFASPGVPVPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALES  
LINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKKLRFREGFRN

[0507] 与胰凝乳蛋白酶肽质量 :3937Da 的匹配

[0508] 耐量为 1000ppm 时, 3937Da 与从 99 号位丝氨酸到 132 号位 C- 末端天冬酰胺的序列匹配。该区域在下列前体形式的人 IL-13 的序列中由黑体着重显示。

[0509] MALLLTTVIALTCLGGFASPGVPVPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALES  
LINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKKLRFREGFRN

[0510] 上述两种匹配均显示 BAK502G9 IgG 在所述抗体 :配体复合体蛋白水解期间仍保留了 IL-13 分子的 C 末端部分。

[0511] 通过 ms/ms 成功证实了对上述两种肽的鉴定, 二者均未显示存在任何可与 BAK502G9 比拟的显著序列。被调整用于鉴定 Y 或 B 离子的 ms/ms 片段图谱与胰蛋白酶肽中可能存在的 104 个带一个电荷的离子中的 26 个匹配, 与胰凝乳蛋白酶肽中可能存在的 128 离子中的 19 个匹配。对所有电荷状态的观察显示鉴定了胰蛋白酶片段所含 27 个氨基酸残基中的 23 个, 和胰凝乳蛋白酶片段所含 33 个残基中的 29 个。这足以证实同一性。

[0512] 该试验性测序大体鉴定了位于人 IL-13 上的部分 BAK502G9 表位, 即属于 27 个 C 末端氨基酸残基的部分。这些结果证实了利用上文详述的分子方法时的发现。

[0513] 参考文献

[0514] 1. McKenzie, A. N., et al. J Immunol, 1993. 150(12) :p. 5436-44.

[0515] 2. Minty, A., et al. Nature, 1993. 362(6417) :p. 248-50.

[0516] 3. Nakamura, Y., et al. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996. 15(5) :p. 680-7.

[0517] 4. Robinson, D. S., et al. N Engl J Med, 1992. 326(5) :p. 298-304.

[0518] 5. Walker, C., et al. Am J Respir Crit Care Med, 1994. 150(4) :p. 1038-48.

[0519] 6. Humbert, M., et al. Am J Respir Crit Care Med, 1996. 154(5) :p. 1497-504.

[0520] 7. Corrigan, C. J. and A. B. Kay Int Arch Allergy Appl Immunol, 1991. 94(1-4) :  
p. 270-1.

[0521] 8. Bentley, A. M., et al. Am J Respir Cell Mol Biol, 1993. 8(1) :p. 35-42.

[0522] 9. Murata, T., et al. Int J Hematol, 1999. 69(1) :p. 13-20.

[0523] 10. Andrews, A. L., et al. J Biol Chem, 2002. 277(48) :p. 46073-8.

- [0524] 11. Miloux, B., et al. FEBS Lett, 1997. 401(2-3) :p. 163-6.
- [0525] 12. Hilton, D. J., et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(1) :p. 497-501.
- [0526] 13. Kuperman, D., et al. J Exp Med, 1998. 187(6) :p. 939-48.
- [0527] 14. Nelms, K., et al. Annu Rev Immunol, 1999. 17 :p. 701-38.
- [0528] 15. Zhang, J. G., et al. J Biol Chem, 1997. 272(14) :p. 9474-80.
- [0529] 16. Caput, D., et al. J Biol Chem, 1996. 271(28) :p. 16921-6.
- [0530] 17. Kawakami, K., et al. Blood, 2001. 97(9) :p. 2673-9.
- [0531] 18. Wood, N., et al. J Exp Med, 2003. 197(6) :p. 703-709.
- [0532] 19. Chiaramonte, M. G., et al. J Exp Med, 2003. 197(6) :p. 687-701.
- [0533] 20. Beasley, R., et al. J Allergy Clin Immunol, 2000. 105(2 Pt 2) :p. S466-72.
- [0534] 21. Peat, J. K. and J. Li J Allergy Clin Immunol, 1999. 103(1 Pt 1) :p. 1-10.
- [0535] 22. Society, B. T., British guideline on the management of asthma. Thorax, 2003. 58 Suppl 1 :p. i1-94.
- [0536] 23. GINA, Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2002, National Institute of Health.
- [0537] 24. Milgrom, H., B. Bender, and F. Wamboldt. Ann Allergy Asthma Immunol, 2002. 88(5) :p. 429-31.
- [0538] 25. Fish, L. and C. L. Lung, Adherence to asthma therapy. Ann Allergy Asthma Immunol, 2001. 86(6 Suppl 1) :p. 24-30.
- [0539] 26. Bender, B. G. J Allergy Clin Immunol, 2002. 109(6 Suppl) :p. S554-9.
- [0540] 27. Wills-Karp, M., et al. Science, 1998. 282(5397) :p. 2258-61.
- [0541] 28. Grunig, G., et al. Science, 1998. 282(5397) :p. 2261-3.
- [0542] 29. Venkayya, R., et al. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. 26(2) :p. 202-8.
- [0543] 30. Morse, B., et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. 282(1) :p. L44-9.
- [0544] 31. Zhu, Z., et al. J Clin Invest, 1999. 103(6) :p. 779-88.
- [0545] 32. Walter, D. M., et al. J Immunol, 2001. 167(8) :p. 4668-75.
- [0546] 33. Cohn, L., J. S. Tepper, and K. Bottomly. J Immunol, 1998. 161(8) :p. 3813-6.
- [0547] 34. Taube, C., et al. J Immunol, 2002. 169(11) :p. 6482-9.
- [0548] 35. Yang, E. S., et al. J Allergy Immunol., 2002. 109 :p. A168.
- [0549] 36. Blease, K., et al. J Immunol, 2001. 166(8) :p. 5219-24.
- [0550] 37. Heinzmann, A., et al. Hum Mol Genet, 2000. 9(4) :p. 549-59.
- [0551] 38. Howard, T. D., et al. Am J Hum Genet, 2002. 70(1) :p. 230-6.
- [0552] 39. Kauppi, P., et al. Genomics, 2001. 77(1-2) :p. 35-42.
- [0553] 40. Graves, P. E., et al. J Allergy Clin Immunol, 2000. 105(3) :p. 506-13.
- [0554] 41. Arima, K., et al. J Allergy Clin Immunol, 2002. 109(6) :p. 980-7.
- [0555] 42. van der Pouw Kraan, T. C., et al. Genes Immun, 1999. 1(1) :p. 61-5.
- [0556] 43. Humbert, M., et al. J Allergy Clin Immunol, 1997. 99(5) :p. 657-65.
- [0557] 44. Kotsimbos, T. C., P. Ernst, and Q. A. Hamid, Proc Assoc Am Physicians,



1996. 108(5) :p. 368-73.

[0558] 45. Komai-Koma, M., F.Y. Liew, and P.C. Wilkinson, J Immunol, 1995. 155(3) : p. 1110-6.

[0559] 46. Naseer, T., et al. Am J Respir Crit Care Med, 1997. 155(3) :p. 845-51.

[0560] 47. Huang, S. K., et al. J Immunol, 1995. 155(5) :p. 2688-94.

[0561] 48. Kroegel, C., et al. Eur Respir J, 1996. 9(5) :p. 899-904.

[0562] 49. Ohshima, Y., et al. Pediatr Res, 2002. 51(2) :p. 195-200.

[0563] 50. Hasegawa, M., et al. J Rheumatol, 1997. 24(2) :p. 328-32.

[0564] 51. Hancock, A., et al. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. 18(1) :p. 60-5.

[0565] 52. Lee, C. G., et al. J Exp Med, 2001. 194(6) :p. 809-21.

[0566] 53. Jain-Vora, S., et al. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. 17(5) :p. 541-51.

[0567] 54. Fallon, P. G., et al. J Immunol, 2000. 164(5) :p. 2585-91.

[0568] 55. Chiaramonte, M. G., et al. J Clin Invest, 1999. 104(6) :p. 777-85.

[0569] 56. Chiaramonte, M. G., et al. Hepatology, 2001. 34(2) :p. 273-82.

[0570] 57. Sluiter, H. J., et al. Eur Respir J, 1991. 4(4) :p. 479-89.

[0571] 58. Zheng, T., et al. J Clin Invest, 2000. 106(9) :p. 1081-93.

[0572] 59. Tashkin, D. P., et al., Methacholine reactivity predicts changes in lung function over time in smokers with early chronic obstructive pulmonary disease. The Lung Health Study Research Group. Am J Respir Crit Care Med, 1996. 153(6 Pt 1) :p. 1802-11.

[0573] 60. Van Der Pouw Kraan, T. C., et al. Genes Immun, 2002. 3(7) :p. 436-9.

[0574] 61. Skinnider, B. F., et al. Blood, 2001. 97(1) :p. 250-5.

[0575] 62. Kapp, U., et al. J Exp Med, 1999. 189(12) :p. 1939-46.

[0576] 63. Fiumara, P., F. Cabanillas, and A. Younes, Blood, 2001. 98(9) :p. 2877-8.

[0577] 64. Terabe, M., et al. Nat Immunol, 2000. 1(6) :p. 515-20.

[0578] 65. Ahlers, J. D., et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(20) :p. 13020-5.

[0579] 66. Hutchings, C., Generation of **Naïve** Human Antibody Libraries, in Antibody Engineering, R. Kontermann and S. Dubel, Editors. 2001, Springer Laboratory Manuals, Berlin. p. 93-108.

[0580] 67. Vaughan, T. J., et al. Nat Biotechnol, 1996. 14(3) :p. 309-14.

[0581] 68. Kitamura, T., et al. Blood, 1989. 73(2) :p. 375-80.

[0582] 69. Lefort, S., et al. FEBS Lett, 1995. 366(2-3) :p. 122-6.

[0583] 70. Osbourn, J. K., et al. Immunotechnology, 1996. 2(3) :p. 181-96.

[0584] 71. Howard, T. D., et al. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. 25(3) :p. 377-84.

[0585] 72. Karlsson, R., A. Michaelsson, and L. Mattsson, J Immunol Methods, 1991. 145(1-2) :p. 229-40.

[0586] 73. Tomlinson, VBASE. 1997, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK.

[0587] 74. Altmann, F., et al. Glycoconj J, 1999. 16(2) :p. 109-23.

- [0588] 75. Drexler, H. G. , et al. Leuk Res, 1986. 10 (5) :p. 487-500.
- [0589] 76. Skinnider, B. F. , U. Kapp, and T. W. Mak, Leuk Lymphoma, 2002. 43 (6) : p. 1203-10.
- [0590] 77. Terada, N. , et al. Clin Exp Allergy, 2000. 30 (3) :p. 348-55.
- [0591] 78. Wenzel, S. E. , et al. J Immunol, 2002. 169 (8) :p. 4613-9.
- [0592] 79. Richter, A. , et al. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. 25 (3) :p. 385-91.
- [0593] 80. Bochner, B. S. , et al. J Immunol, 1995. 154 (2) :p. 799-803.
- [0594] 81. Kotowicz, K. , et al. Int Immunol, 1996. 8 (12) :p. 1915-25.
- [0595] 82. McKenzie, A. N. , et al. Journal of Immunology, 1993. 150 (12) :p. 5436-44.
- [0596] 83. Bouteiller, C. L. , et al. J Immunol Methods, 1995. 181 (1) :p. 29-36.
- [0597] 84. Riffo-Vasquez, Y. , et al. Clin Exp Allergy, 2000. 30 (5) :p. 728-38.
- [0598] 85. McMillan, S. J. , et al. J Exp Med, 2002. 195 (1) :p. 51-7.
- [0599] 86. Humbles, A. A. , et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99 (3) :p. 1479-84.
- [0600] 87. Temelkovski, J. , et al. Thorax, 1998. 53 (10) :p. 849-56.
- [0601] 88. Belvisi, M. G. , et al. , Pulm Pharmacol Ther, 2001. 14 (3) :p. 221-7.
- [0602] 89. Barnes, P. J. , et al. Eur Respir J, 1996. 9 (4) :p. 636-42.
- [0603] 90. Barnes, P. J. , Pharmacol Ther, 2003. 97 (1) :p. 87-94.
- [0604] 91. Wardlaw, A. J. , Clin Med, 2001. 1 (3) :p. 214-8.
- [0605] 92. Edwards, J. C. , et al. J Pathol, 1981. 134 (2) :p. 147-56.
- [0606] 93. McDonough, J. E. , et al. W. M. Elliot, and J. C. Hogg. TGF-beta Isoform and IL-13 Immunostaining on Lung Tissue from Patients with COPD. in ATS 99th International Conference. 2003. Seattle.
- [0607] 94. Wold, et al. Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics-Mathematics and Statistics in Chemistry (Ed. :B. Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1984 (ISBN 90-277-1846-6).
- [0608] 95. Norman et al. Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience ;3rd edition (April 1998) ISBN :0471170828
- [0609] 96. Abraham Kandel, Eric Backer. Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR ; (May 11, 1995), ISBN :0133418847
- [0610] 97. Wojtek Krzanowski. Principles of Multivariate Analysis :A User ' s Perspective (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)). Oxford University Press ; (December 2000), ISBN :0198507089
- [0611] 98. Ian H. Witten, Elbe Frank. Data Mining :Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann ; (October 11, 1999), ISBN :1558605525
- [0612] 99. David G. T. Denison (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K. Mallick, Adrian F. M. Smith. Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons ; (July 2002), ISBN :0471490369

- [0613] 100. Arup K. Ghose, Vellarkad N. Viswanadhan. Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery. ISBN :0-8247-0487-8
- [0614] 101. Chothia C. et al. Journal Molecular Biology(1992)227,799-817.
- [0615] 102. Al-Lazikani, et al. Journal Molecular Biology(1997)273(4),927-948.
- [0616] 103. Chothia, et al. Science,233,755-758(1986).
- [0617] 104. Whitelegg, N. R. J. and Rees, A. R(2000). Prot. Eng. ,13,819-824.
- [0618] 105. Available from Accelerys Inc.
- [0619] 106. Guex, N. and Peitsch, M. C. (1997). Electrophoresis(1997)18,2714-2723.
- [0620] 107. Kabat E A et al(1991) :Sequences of Proteins of Immunological Interest,5<sup>th</sup> Edition. US Department of Health and Human Services,Public Service, NIH, Washington.
- [0621] 108. Kontermann R and Dubel Stefan ;(2001)Antibody Engineering, Springer Laboratory Manuals.
- [0622] 109. Mendez et al(1997) ;Nature Genetics Vol. 2 :146-156.
- [0623] 110. Csonka E et al(2000)Journal of Cell Science,113 :3207-3216.
- [0624] 111. Vanderbyl S et al(2002)Molecular Therapy,5(5) :10.
- [0625] 112. Marasco WA(1997)Gene Therapy,4(1) :11.
- [0626] 113. Hanes J et al(2000). Methods in Enzymology, Vol 328 :24.
- [0627] 114. Li et al(2003). Abstract for poster[605]submitted at The American Thoracic Society Annual Meeting,2003,Seattle.
- [0628] 115. Koide et al(1998). Journal of Molecular Biology, Vol284 :1141-1151.
- [0629] 116. Nygren et al(1997). Current Opinion in Structural Biology, Vol 7 : 463-469.
- [0630] 117. Heller, F. , et al. (2002) Immunity,17(5) :629-38.
- [0631] 118. Inoue, S. , et al. (1999) Am J Gastroenterol,94(9) :2441-6.
- [0632] 119. Yang, M. , et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2001. 25(4) :p. 522-30
- [0633] 120. Punnonen J. , et al 1993. Proc Natl Acad Sci. 90(8) :3730-4.
- [0634] 121. Grunstein, M. , et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol2002. 282 : p. L520-L528.
- [0635] 122. Laporte, J. , et al. Am J Respir Crit Care Med 2001. 164 :p. 141-148.
- [0636] 123. Tliba O. , et al. Br J Pharmacol 2003. 140(7) :p. 1159-62.
- [0637] 124. Deshpande, D. , et al. Am J Respir Cell Mol Biol 2004. 31(1) :p. 36-42 ; Epub Feb 5 as doi :10. 1165/rcmb. 2003-03130C.
- [0638] 125. Humbert et al. 1997. J. Allergy Clin. Immunol. ,99 :657.
- [0639] 126. Berry, M. A. , Parker, D. , Neale, N. , Woodman, L. , Morgan, A. Monk, P. D. . Submitted to J. Allergy Clin Immunol.
- [0640] 127. Obase et al. Ann Allergy Asthma Immunol. 2001 ;86(3) :304-10.
- [0641] 128. Chu et al. 2000 ;J. Allergy Clin. Immunol. 106 :1115

- [0642] 129. Terada et al. 2000. Clin. Exp. Allergy. ,30 :348-55.
- [0643] 130. Wenzel et al. 2000. J. Immunol. 169 :4613-19.
- [0644]





[0648]

|          | 人 IL-13 | 人 IL-13 变体 | 非人灵长类动物 IL-13 |
|----------|---------|------------|---------------|
| BAK278D6 | +       | +          | +             |
| BAK502G9 | +       | +          | +             |
| BAK615E3 | +       | -          | -             |

[0649] 表 3a

[0650] 对抗人 IL-13 抗体的动力学分析

[0651]

| IgG       | 脱离速率<br>( $s^{-1}$ ) | 附着速率<br>( $M^{-1} s^{-1}$ ) | KD<br>(pM) |
|-----------|----------------------|-----------------------------|------------|
| BAK278D6  | $7.41e^{-3}$         | $5.49e^5$                   | 13500      |
| BAK502G9  | $4.09e^{-4}$         | $2.49e^6$                   | 178        |
| BAK1167F2 | $4.05e^{-4}$         | $2.99e^6$                   | 136        |
| BAK1183H4 | $3.00e^{-4}$         | $3.7e^6$                    | 81         |

[0652] 表 3b

[0653] 对抗鼠 IL-13 抗体的动力学分析

[0654]

| IgG       | 脱离速率 ( $s^{-1}$ ) | 附着速率<br>( $M^{-1} s^{-1}$ ) | KD<br>(pM) |
|-----------|-------------------|-----------------------------|------------|
| BAK209B11 | $1.98e^{-2}$      | $3.9e^6$                    | 5100       |

[0655] 表 4

[0656] BAK502G9 在 4 只单次接受静脉内施用剂量为 10mg/kg 的集合药团 29 天后具有变应性但未被激发的猕猴 (2 雄 / 2 雌) 体内的药物代谢动力学。血清中的 BAK502G9 水平通过 ELISA 测定 (平均值)。

[0657]

|  |               |  |
|--|---------------|--|
| <b><math>C_{\max}</math></b><br><b>(t=0.25h)</b><br><b>(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>                     | <b>349.04</b> |  |
| <b><math>Vd_{\text{inf}}</math></b><br><b>(<math>\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}</math>)</b>                    | <b>75.03</b>  | <b>&lt;80mL/kg, 推断无组织结合</b>              |
| <b><math>Cl_{\text{inf}}</math></b><br><b>(<math>\text{mL}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}</math>)</b> | <b>0.23</b>   |  |
| <b><math>AUC_{\text{inf}}</math></b><br><b>(<math>\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}</math>)</b>      | <b>42.99</b>  |  |
| <b><math>AUC_{\text{ext}}</math></b><br><b>(%)</b>   | <b>17.34</b>  | <b>&lt;30%</b><br><b>所以清除率和分配体积应是准确的</b> |
| <b><math>T_{0.5}</math></b><br><b>(h)</b>  | <b>223.55</b> |  |

[0658]  $Vd_{\text{inf}} = 0$ —无限长时间内的分配体积, 根据外推 AUC 计算。

[0659]  $Cl_{\text{inf}} = 0$ —无限长时间内的清除率, 根据外推 AUC 计算。

[0660]  $AUC_{\text{inf}} = 0$ —无限长时间内的曲线 (总药物接触的量) 下方面积, 包括以清除速率常数 (k) 和最后观测到的血清药物浓度为基础的外推范围。

[0661]  $AUC_{\text{ext}}$  = 外推总 AUC 的百分比。

[0662]  $T_{0.5}$  = 清除期末期的药物半衰期。

[0663] 表 5

[0664] 第一组嵌合构建体

[0665]

| 嵌合构建体    | IC50nM          |
|----------|-----------------|
| BAK502G9 | $0.17 \pm 0.07$ |
| 环 1      | $0.71 \pm 0.35$ |
| hum-flag | $1.30 \pm 0.18$ |
| 30R      | $1.76 \pm 0.45$ |
| 3738VN   | $1.89 \pm 1.9$  |
| 螺旋 B     | $2.49 \pm 0.88$ |
| 螺旋 C     | $4.11 \pm 0.70$ |



|      |                  |
|------|------------------|
| 环 3  | $5.45 \pm 3.96$  |
| 4041 | $12.02 \pm 1.3$  |
| 3334 | $12.17 \pm 1.2$  |
| 螺旋 D | $110.07 \pm 9.9$ |

[0666] 表 6  
[0667] 第二组嵌合构建体  
[0668]

|          |                 |
|----------|-----------------|
| 嵌合构建体    | IC50nM          |
| BAK502G9 | $0.11 \pm 0.04$ |
| 113H     | $1.6 \pm 0.5$   |
| 128H     | $1.6 \pm 1.0$   |
| 119LA    | $1.96 \pm 1.0$  |
| 130P     | $2.22 \pm 0.8$  |
| 120121SY | $4.73 \pm 1.5$  |
| 58LA     | $5.2 \pm 2.0$   |
| 124Q     | $18.7 \pm 15.9$ |
| 116117T  | $82 \pm 11.3$   |
| 123KA    | 无               |
| 127RA    | 无               |

[0669] 表 7  
[0670] BAK502G9 对不同预定终点的影响  
[0671]

| 参数                   | I期变化         | N               | II期变化            | N               | 终点            |
|----------------------|--------------|-----------------|------------------|-----------------|---------------|
| AHR ( $R_L$ AUC)     | 0.020±0.003  | 14 <sup>a</sup> | 0.004±0.006      | 14 <sup>a</sup> | -0.016±0.006* |
| AHR ( $PC_{30}$ )    | -1.343±0.318 | 18 <sup>b</sup> | 1.061±0.244      | 18 <sup>b</sup> | 0.282±0.179   |
| 抗原引发<br>( $R_L$ AUC) | 0.159±0.033  | 20 <sup>c</sup> | 0.033±0.025      | 20 <sup>c</sup> | 0.126±0.043** |
| BAL总细胞               | 20.623±3.160 | 21 <sup>d</sup> | 14.597±1.95<br>1 | 21 <sup>d</sup> | -6.026±2.194* |
| BAL嗜酸性粒细胞            | 18.453±3.009 | 21 <sup>d</sup> | 13.412±1.73<br>7 | 21 <sup>d</sup> | -5.041±2.090* |
| BAL单核细胞              | 2.050±0.438  | 21 <sup>d</sup> | 1.176±0.481      | 21 <sup>d</sup> | -0.874±0.506  |

[0672] 对I期表现了AHR( $PC_{30}$ )的21只动物和另外一只具有抗原引发表型的动物进行II期测试(共22只)。同时根据AUC和 $PC_{30}$ 的测定结果可知并非所有动物均有AHR。AHR结果仅包括了在I期表现了AHR并且其AHR在I期和II期均获得评估的动物。统计学测试利用InStat进行。测试是针对虚假设进行的双向斯氏t-检验,即终点包括0(即与I期相比,II期无变化);\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ 。数据被表示为算术平均值 ± SEM(n = 14-21)。

[0673] <sup>a</sup>5只动物被AUC分析排除的原因是未在I期表现AHR(AUC加剧)。

[0674] 另外3只动物被排除的原因是II期呼吸道功能数据采集方面出现了技术错误。

[0675] <sup>b</sup>3只动物被 $PC_{30}$ 分析排除的原因是II期呼吸道功能数据采集方面出现了技术错误(与a中所述动物相同)。另外一只具有抗原引发表型的动物被排除的原因是未在I期表现 $PC_{30}$ AHR。

[0676] <sup>c</sup>2只动物被抗原引发分析排除的原因是I期呼吸道功能数据采集方面出现了技术错误。

[0677] <sup>d</sup>1只动物被BAL分析排除的原因是在研究开始时出现了显著的BAL炎症。

[0678] BAK278D6

[0679] 重链

[0680] CDR1-SEQ ID NO 1:NYGLS

[0681] CDR2-SEQ ID NO 2:WISANGDTNYGQEFQG

[0682] CDR3-SEQ ID NO 3:DSSSNWARWFFDL

[0683] BAK278D6

[0684] 轻链

[0685] CDR1-SEQ ID NO 4:GGNIGSKLVH

[0686] CDR2-SEQ ID NO 5:DDGDRPS

[0687] CDR3-SEQ ID NO 6:QVWDGTGSDPVV

[0688] BAK502G9

[0689] 重链

[0690] CDR1-SEQ ID NO 7:NYGLS

[0691] CDR2-SEQ ID NO 8:WISANGDTNYGQEFQG

[0692] CDR3-SEQ ID NO 9:DSSSSWARWFFDL

[0693] 轻链

- [0694] CDR1-SEQ ID NO 10 :GGNIIGSKLVH  
[0695] CDR2-SEQ ID NO 11 :DDGDRPS  
[0696] CDR3-SEQ ID NO 12 :QVWDTGSDPVV  
[0697] BAK278D6  
[0698] 重链结构域  
[0699] SEQ ID NO 13 :  
[0700] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFRNYGLSWVRQAPGQGLEWMGWISANNGDTNYGQEFQGRIT  
MTTETSTNTAHMELRSLRSDDTAVYYCVRDSSSNWARWFFDLWGKGMTVTVSS  
[0701] BAK278D6  
[0702] 轻链结构域  
[0703] SEQ ID NO 14 :  
[0704] SYVLTQPPSVSVAPGQTARIPCGGNNIGSKLVGWYQQKPGQAPVLVYDDGDRPSGIPERFSGSNSGNT  
ATLTISRIDAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL  
[0705] BAK502G9  
[0706] 重链结构域  
[0707] SEQ ID NO 15 :  
[0708] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLSWVRQAPGQGLEWMGWISANNGDTNYGQEFQGRVT  
MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLTVTVSS  
[0709] BAK502G9  
[0710] 轻链结构域  
[0711] SEQ ID NO 16 :  
[0712] SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPERFSGSNSGNT  
ATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL  
[0713] BAK278D6  
[0714] 重链  
[0715] FR1-SEQ ID NO 17 :EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFR  
[0716] FR2-SEQ ID NO 18 :WVRQAPGQGLEWMG  
[0717] FR3-SEQ ID NO 19 :RITMTTETSTNTAHMELRSLRSDDTAVYYCVR  
[0718] BAK278D6  
[0719] 轻链  
[0720] FR1-SEQ ID NO 20 :SYVLTQPPSVSVAPGQTARIPC  
[0721] FR2-SEQ ID NO 21 :WYQQKPGQAPVLVY  
[0722] FR3-SEQ ID NO 22 :GIPERFSGSNSGNTATLTISRIDAGDEADYYC  
[0723] BAK167A11  
[0724] 重链结构域  
[0725] SEQ ID NO 23 :  
[0726] EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT  
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGAAGEGYGYWGRGTLTVTVSS  
[0727] BAK167A11

[0728] 轻链结构域

[0729] SEQ ID NO 24 :

[0730] NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPTTVIYDDNQRPSGVPDRFSGSIDS  
SSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSNNDVFGGGTKVTVL

[0731] BAK209B11

[0732] 重链结构域

[0733] SEQ ID NO 25 :

[0734] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVSSISASGDSTFYADSVKGRF  
TISRDNKNMVFLLQVNSLRADDTAVYFCAKDWSQLVGDADFVWGRGTTVTVSS

[0735] BAK209B11

[0736] 轻链结构域

[0737] SEQ ID NO 26 :

[0738] DIQLTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSVSLWVAWYQQRPGKAPKLLIYDGSTLQSGVPARFSGSGSGT  
EFTLTISLQPDFFATYYCQYKTFSTFGQGTKVEIKRA

[0739] BAK502G9

[0740] 重链

[0741] FR1-SEQ ID NO 27 :QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT

[0742] FR2-SEQ ID NO 28 :WYRQAPGQGLEWMG

[0743] FR3-SEQ ID NO 29 :RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR

[0744] BAK502G9

[0745] 轻链

[0746] FR1-SEQ ID NO 30 :SYVLTQPPSVSVAPGKTARITC

[0747] FR2-SEQ ID NO 31 :WYQQKPGQAPVLIY

[0748] FR3-SEQ ID NO 32 :GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC

[0749] BAK615E3

[0750] 重链结构域

[0751] SEQ ID NO 33 :

[0752] EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT  
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGKATTEEGYYGYWGRGTLTVTVSS

[0753] BAK615E3

[0754] 轻链结构域

[0755] SEQ ID NO 34 :

[0756] NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPTTVIYDDNQRPSGVPDRFSGSIDS  
SSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSNNDVFGGGTKVTVL

[0757] BAK1167F2

[0758] 重链结构域

[0759] SEQ ID NO 35 :

[0760] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFEQTGVS WVRQAPGQGLEWMGWISANNGDTNYGQEFQGRVT  
MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLTVTVSS

- [0761] BAK1167F2  
[0762] 轻链结构域  
[0763] SEQ ID NO 36 :  
[0764] SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPERFSGSNSGNT  
ATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL  
[0765] BAK1183H4  
[0766] 重链结构域  
[0767] SEQ ID NO 37 :  
[0768] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINYDGGNTQYGGQEFQGRVT  
MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLTVTVSS  
[0769] BAK1183H4  
[0770] 轻链结构域  
[0771] SEQ ID NO 38 :  
[0772] SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPERFSGSNSGNT  
ATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL  
[0773] BAK1105H3  
[0774] 重链结构域  
[0775] SEQ ID NO 39 :  
[0776] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLSWVRQAPGQGLEWMGWISGLNGETLYGQEFQGRVT  
MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLTVTVSS  
[0777] BAK1105H3  
[0778] 轻链结构域  
[0779] SEQ ID NO 40 :  
[0780] SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPERFSGSNSGNT  
ATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL  
[0781] BAK1111D10  
[0782] 重链结构域  
[0783] SEQ ID NO 41 :  
[0784] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLSWVRQAPGQGLEWMGWIATPDGQTSYGQEFQGRVT  
MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLTVTVSS  
[0785] BAK1111D10  
[0786] 轻链结构域  
[0787] SEQ ID NO 42 :  
[0788] SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPERFSGSNSGNT  
ATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL  
[0789] BAK1167F4  
[0790] 重链结构域  
[0791] SEQ ID NO 43 :  
[0792] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDTGVSWVRQAPGQGLEWMGWISANNGDTNYGQEFQGRVT

MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLTVSS

[0793] BAK1167F4

[0794] 轻链结构域

[0795] SEQ ID NO 44 :

[0796] SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPERFSGSNSGNT  
ATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL

[0797] BAK1184C8

[0798] 重链结构域

[0799] SEQ ID NO 45 :

[0800] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLSWVRQAPGQGLEWMGWISGSNGYTSYGQEFQGRVT  
MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLTVSS

[0801] BAK1184C8

[0802] 轻链结构域

[0803] SEQ ID NO 46 :

[0804] SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPERFSGSNSGNT  
ATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL

[0805] BAK1185E1

[0806] 重链结构域

[0807] SEQ ID NO 47 :

[0808] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINDATGDTQYGQEFQGRVT  
MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLTVSS

[0809] BAK1185E1

[0810] 轻链结构域

[0811] SEQ ID NO 48 :

[0812] SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPERFSGSNSGNT  
ATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL

[0813] BAK1185F8

[0814] 重链结构域

[0815] SEQ ID NO 49 :

[0816] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYGLSWVRQAPGQGLEWMGWIRNIDGYTIYQEFQGRVT  
MTTDTSTSTAYMEIRSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLTVSS

[0817] BAK1185F8

[0818] 轻链结构域

[0819] SEQ ID NO 50 :

[0820] SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPERFSGSNSGNT  
ATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL

[0821] BAK118784

[0822] 重链结构域

[0823] SEQ ID NO 51 :

[0824] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLSWVRQAPGQGLEWMGWIDDDSGTTIYGQEFQGRVT  
MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLTVSS

[0825] BAK1187B4

[0826] 轻链结构域

[0827] SEQ ID NO 52 :

[0828] SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPERFSGSNSGNT  
ATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL

[0829] BAK1166G2

[0830] 重链结构域

[0831] SEQ ID NO 53 :

[0832] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFANTGISWVRQAPGQGLEWMGWISANNGDTNYGQEFQGRVT  
MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLTVSS

[0833] BAK1166G2

[0834] 轻链结构域

[0835] SEQ ID NO 54 :

[0836] SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVIYDDGDRPSGIPERFSGSNSGNT  
ATLTISRVEAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL

[0837] BAK167A11

[0838] 重链

[0839] CDR1-SEQ ID NO 55 :SYAMS

[0840] CDR2-SEQ ID NO 56 :AISGSGGSTYYADSVKG

[0841] CDR3-SEQ ID NO 57 :VGAAGEGYGY

[0842] BAK167A11

[0843] 轻链

[0844] CDR1-SEQ ID NO 58 :TRSSGSIASNYVQ

[0845] CDR2-SEQ ID NO 59 :DDNQRPS

[0846] CDR3-SEQ ID NO 60 :QSYDSNNDV

[0847] BAK1167F2

[0848] 重链

[0849] CDR1-SEQ ID NO 61 :QTGVS

[0850] CDR2-SEQ ID NO 62 :WISANNGDTNYGQEFQG

[0851] CDR3-SEQ ID NO 63 :DSSSSWARWFFDL

[0852] BAK1167F2

[0853] 轻链

[0854] CDR1-SEQ ID NO 64 :GGNIIGSKLVH

[0855] CDR2-SEQ ID NO 65 :DDGDRPS

[0856] CDR3-SEQ ID NO 66 :QVWDTGSDPVV

[0857] BAK1166G2

[0858] 重链

[0859] CDR1-SEQ ID NO 67 :NTGIS  
[0860] CDR2-SEQ ID NO 68 :WISANNGDTNYGQEFQG  
[0861] CDR3-SEQ ID NO 69 :DSSSSWARWFFDL  
[0862] BAK1166G2  
[0863] 轻链  
[0864] CDR1-SEQ ID NO 70 :GGNIIGSKLVH  
[0865] CDR2-SEQ ID NO 71 :DDGDRPS  
[0866] CDR3-SEQ ID NO 72 :QVWDTGSDPVV  
[0867] BAK1184C8  
[0868] 重链  
[0869] CDR1-SEQ ID NO 73 :NYGLS  
[0870] CDR2-SEQ ID NO 74 :WISGSNGYTSYGQEFQG  
[0871] CDR3-SEQ ID NO 75 :DSSSSWARWFFDL  
[0872] BAK1184C8  
[0873] 轻链  
[0874] CDR1-SEQ ID NO 76 :GGNIIGSKLVH  
[0875] CDR2-SEQ ID NO 77 :DDGDRPS  
[0876] CDR3-SEQ ID NO 78 :QVWDTGSDPVV  
[0877] BAK1185E1  
[0878] 重链  
[0879] CDR1-SEQ ID NO 79 :NYGLS  
[0880] CDR2-SEQ ID NO 80 :WINDATGDTQYGQEFQG  
[0881] CDR3-SEQ ID NO 81 :DSSSSWARWFFDL  
[0882] BAK1185E1  
[0883] 轻链  
[0884] CDR1-SEQ ID NO 82 :GGNIIGSKLVH  
[0885] CDR2-SEQ ID NO 83 :DDGDRPS  
[0886] CDR3-SEQ ID NO 84 :QVWDTGSDPVV  
[0887] BAK1167F4  
[0888] 重链  
[0889] CDR1-SEQ ID NO 85 :DTGVS  
[0890] CDR2-SEQ ID NO 86 :WISANNGDTNYGQEFQG  
[0891] CDR3-SEQ ID NO 87 :DSSSSWARWFFDL  
[0892] BAK1167F4  
[0893] 轻链  
[0894] CDR1-SEQ ID NO 88 :GGNIIGSKLVH  
[0895] CDR2-SEQ ID NO 89 :DDGDRPS  
[0896] CDR3-SEQ ID NO 90 :QVWDTGSDPVV  
[0897] BAK1111D10



- [0898] 重链  
[0899] CDR1-SEQ ID NO 91 :NYGLS  
[0900] CDR2-SEQ ID NO 92 :WIATPDGQTSYGQEFQG  
[0901] CDR3-SEQ ID NO 93 :DSNSSWARWFFDL  
[0902] BAK1111D10  
[0903] 轻链  
[0904] CDR1-SEQ ID NO 94 :GGNIIGSKLVH  
[0905] CDR2-SEQ ID NO 95 :DDGDRPS  
[0906] CDR3-SEQ ID NO 96 :QVWD TGSDPVV  
[0907] BAK1183H4  
[0908] 重链  
[0909] CDR1-SEQ ID NO 97 :NYGLS  
[0910] CDR2-SEQ ID NO 98 :WINDYDGGNTQYGQEFQG  
[0911] CDR3-SEQ ID NO 99 :DSSSSWARWFFDL  
[0912] BAK1183H4  
[0913] 轻链  
[0914] CDR1-SEQ ID NO 100 :GGNIIGSKLVH  
[0915] CDR2-SEQ ID NO 101 :DDGDRPS  
[0916] CDR3-SEQ ID NO 102 :QVWD TGSDPVV  
[0917] BAK1185H8  
[0918] 重链  
[0919] CDR1-SEQ ID NO 103 :DYGLS  
[0920] CDR2-SEQ ID NO 104 :WRINDGYTIYGQEFQG  
[0921] CDR3-SEQ ID NO 105 :DSSSSWARWFFDL  
[0922] BAK1185H8  
[0923] 轻链  
[0924] CDR1-SEQ ID NO 106 :GGNIIGSKLVH  
[0925] CDR2-SEQ ID NO 107 :DDGDRPS  
[0926] CDR3-SEQ ID NO 108 :QVWD TGSDPVV  
[0927] BAK278D6  
[0928] 重链 -SEQ ID NO :109  
[0929] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG  
GCTTCTGTTACACCTTTACAAATTATGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG  
ATGGATCAGCGCTAATAATGGCGACACAAATTATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACAT  
CCACGAGCACAGCCTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGACTCC  
AGCAGCAACTGGGCCCGCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTCACCGTCTCCTCA  
[0930] BAK278D6  
[0931] 轻链 -SEQ ID NO :110  
[0932] TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGTAAGACGGCCAGGATTACCTGTGGG

GGAAACAACATTGGAAGTAAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGA  
TGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCA  
GCAGGGTCGAGGCCGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTATTTCGGC  
GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

[0933] BAK502G9

[0934] 重链 -SEQ ID NO :111

[0935] CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG  
GCTTCTGGTTACACCTTTACAAATTATGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG  
ATGGATCAGCGCTAATAATGGCGACACAAATTATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACAT  
CCACGAGCACAGCCTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGACTCC  
AGCAGCAGCTGGGCCCCGCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTCACCGTCTCCTCA

[0936] BAK502G9

[0937] 轻链 -SEQ ID NO :112

[0938] TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGATTACCTGTGGG  
GGAAACATCATTGGAAGTAAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGA  
TGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCA  
GCAGGGTCGAGGCCGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTATTTCGGC  
GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

[0939] BAK1105H03

[0940] 重链 -SEQ ID NO :113

[0941] CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG  
GCTTCTGGTTACACCTTTACAAATTATGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG  
ATGGATCTCCGGCTTGAACGGCGAGACATTGTATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACAT  
CCACGAGCACAGCCTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGACTCC  
AGCAGCAGCTGGGCCCCGCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTCACCGTCTCCTCA

[0942] BAK1105H03

[0943] 轻链 -SEQ ID NO :114

[0944] TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGATTACCTGTGGG  
GGAAACATCATTGGAAGTAAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGA  
TGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCA  
GCAGGGTCGAGGCCGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTATTTCGGC  
GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

[0945] BAK1111D10

[0946] 重链 -SEQ ID NO :115

[0947] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG  
GCTTCTGGTTACACCTTTACAAATTATGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG  
ATGGATCGCAACCCAGACGGCCAGACAAGCTATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACAT  
CCACGAGCACAGCCTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGACTCC  
AACAGCAGCTGGGCCCCGCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTCACCGTCTCCTCA

[0948] BAK1111D10

[0949] 轻链-SEQ ID NO :116

[0950] TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGATTACCTGTGGG  
GGAAACATCATTGGAAGTAAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGA  
TGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCA  
GCAGGGTCGAGGCCGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTATTTCGGC  
GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

[0951] BAK 1167F2

[0952] 重链-SEQ ID NO :117

[0953] CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG  
GCTTCTGGTTACACCTTTGAGCAGACCGGCGTCTCCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG  
ATGGATCAGCGCTAATAATGGCGACACAAATTATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACAT  
CCACGAGCACAGCCTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGACTCC  
AGCAGCAGCTGGGCCCCGCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTCACCGTCTCCTCA

[0954] BAK 1167F2

[0955] 轻链-SEQ ID NO :118

[0956] TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGATTACCTGTGGG  
GGAAACATCATTGGAAGTAAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGA  
TGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCA  
GCAGGGTCGAGGCCGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTATTTCGGC  
GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

[0957] BAK 1167F04

[0958] 重链-SEQ ID NO :119

[0959] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG  
GCTTCTGGTTACACCTTTATCGACACCGGGGTCTCCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG  
ATGGATCAGCGCTAATAATGGCGACACAAATTATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACAT  
CCACGAGCACAGCCTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGACTCC  
AGCAGCAGCTGGGCCCCGCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTCACCGTCTCCTCA

[0960] BAK 1167F04

[0961] 轻链-SEQ ID NO :120

[0962] TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGATTACCTGTGGG  
GGAAACATCATTGGAAGTAAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGA  
TGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCA  
GCAGGGTCGAGGCCGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTATTTCGGC  
GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

[0963] BAK 1183H4

[0964] 重链-SEQ ID NO :121

[0965] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG  
GCTTCTGGTTACACCTTTACAAATTATGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG

ATGGATCAACTACGACGGCGGCAACACACAGTATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACAT  
CCACGAGCACAGCCTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGACTCC  
AGCAGCAGCTGGGCCCCGCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTCACCGTCTCCTCA

[0966] BAK 1183H4

[0967] 轻链 -SEQ ID NO :122

[0968] TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGATTACCTGTGGG  
GGAAACATCATTGGAAGTAAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGA  
TGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCA  
GCAGGGTCGAGGCCGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTATTTCGGC  
GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

[0969] BAK1184C8

[0970] 重链 -SEQ ID NO :123

[0971] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG  
GCTTCTGGTTACACCTTTACAAATTATGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG  
ATGGATCAGCGGGAGCAACGGCTACACATCTTATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACGT  
CCACGAGCACAGCCTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGACTCC  
AGCAGCAGCTGGGCCCCGCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTCACCGTCTCCTCA

[0972] BAK1184C8

[0973] 轻链 -SEQ ID NO :124

[0974] TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGATTACCTGTGGG  
GGAAACATCATTGGAAGTAAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGA  
TGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCA  
GCAGGGTCGAGGCCGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTATTTCGGC  
GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

[0975] BAK1185E1

[0976] 重链 -SEQ ID NO :125

[0977] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG  
GCTTCTGGTTACACCTTTACAAATTATGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG  
ATGGATCAACGACGCCACCGGCGACACACAGTATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACAT  
CCACGAGCACAGCCTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGACTCC  
AGCAGCAGCTGGGCCCCGCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTCACCGTCTCCTCA

[0978] BAK1185E1

[0979] 轻链 -SEQ ID NO :126

[0980] TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGATTACCTGTGGG  
GGAAACATCATTGGAAGTAAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGA  
TGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCA  
GCAGGGTCGAGGCCGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTATTTCGGC  
GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

[0981] BAK1185F8

[0982] 重链 -SEQ ID NO :127

[0983] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG  
GCTTCTGGTTACACCTTTACAGATTATGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTAGAGTGGATGGG  
ATGGATCCGCAACATCGACGGCTACACAATTTATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACAT  
CCACGAGCACAGCCTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGACTCC  
AGCAGCAGCTGGGCCCCGCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTCACCGTCTCCTCA

[0984] BAK1185F8

[0985] 轻链 -SEQ ID NO :128

[0986] TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGATTACCTGTGGG  
GGAAACATCATTGGAAGTAAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGA  
TGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGGCACCCTGACCATCA  
GCAGGGTCGAGGCCGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTATTTCGGC  
GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

[0987] BAK1187B4

[0988] 重链 -SEQ ID NO :129

[0989] CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG  
GCTTCTGGTTACACCTTTACAAATTATGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG  
ATGGATCGACGACGACAGCGGCACGACAATATATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACAT  
CCACGAGCACAGCCTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGACTCC  
AGCAGCAGCTGGGCCCCGCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGCCGGGGGACACTGGTCACCGTCTCCTCA

[0990] BAK1187B4

[0991] 轻链 -SEQ ID NO :130

[0992] TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGATTACCTGTGGG  
GGAAACATCATTGGAAGTAAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGA  
TGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCA  
GCAGGGTCGAGGCCGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTATTTCGGC  
GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

[0993] BAK1166G02

[0994] 重链 -SEQ ID NO :131

[0995] CAAGTGCAGTTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG  
GCTTCTGGTTACACCTTTGCGAACACCGGGATCTCGTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG  
ATGGATCAGCGCTAATAATGGCGACACAAATTATGGACAGGAATTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGATACAT  
CCACGAGCACAGCCTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGACTCC  
AGCAGCAGCTGGGCCCCGCTGGTTTTTCGATCTCTGGGGTCGGGGGACACTGGTCACCGTCTCCTCA

[0996] BAK1166G02

[0997] 轻链 -SEQ ID NO :132

[0998] TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGATTACCTGTGGG  
GGAAACATCATTGGAAGTAAACTTGTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATGA  
TGATGGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCA

GCAGGGTCGAGGCCGGGGATGAGGCCGACTATTATTGTCAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTATTCCGGC  
GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT

[0999] BAK165E7

[1000] 重链-SEQ ID NO :133

[1001] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYGLSWVRQAPGQGLEWMGWISANNGETNYGQEFQGRVT  
MTTETPTNTAHMELRSLTSDDTAVYYCVRDSSSNWARWYFDLWGQGTLVTVSS

[1002] BAK165E7

[1003] 轻链-SEQ ID NO :134

[1004] SYVLTQPPSVSVAPGQTARIPCGGNNIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVYDDGDRPSGIPERFSGSNSGNT  
ATLTISRIDAGDEADYYCQVWDTGSDPVVFGGGTKLTVLG

[1005] BAK165E7

[1006] 重链

[1007] CDR1-SEQ ID NO :135 NYGLS

[1008] CDR2-SEQ ID NO :136 WISANNGETNYGQEFQG

[1009] CDR3-SEQ ID NO :137 DSSSNWARWYFDL

[1010] BAK165E7

[1011] 轻链

[1012] CDR1-SEQ ID NO :138 GGNNIGSKLVH

[1013] CDR2-SEQ ID NO :139 DDGDRPS

[1014] CDR3-SEQ ID NO :140 QVWDTGSDPVV

[1015] BAK582F7

[1016] 重链

[1017] CDR1-SEQ ID NO 141 :SYAMS

[1018] CDR2-SEQ ID NO 142 :AISGSGGSTYYADSVKG

[1019] CDR3-SEQ ID NO 143 :VGAAGEGYGY

[1020] BAK582F7

[1021] 轻链

[1022] CDR1-SEQ ID NO 144 :TRSSGSIASNYVE

[1023] CDR2-SEQ ID NO 145 :DDNQRPS

[1024] CDR3-SEQ ID NO 146 :QSYDSNNDV

[1025] BAK612B5

[1026] 重链

[1027] CDR1-SEQ ID NO 147 :SYAMS

[1028] CDR2-SEQ ID NO 148 :AISGSGGSTYYADSVKG

[1029] CDR3-SEQ ID NO 149 :VGRATTDEGYGY

[1030] BAK612B5

[1031] 轻链

[1032] CDR1-SEQ ID NO 150 :TRSSGSIASNYVQ

[1033] CDR2-SEQ ID NO 151 :DDNQRPS

- [1034] CDR3-SEQ ID NO 152 :QSYDSNNDV
- [1035] BAK615E3
- [1036] 重链
- [1037] CDR1-SEQ ID NO 153 :SYAMS
- [1038] CDR2-SEQ ID NO 154 :AISGSGGSTYYADSVKG
- [1039] CDR3-SEQ ID NO 155 :VGKATTEEGYY
- [1040] BAK615E3
- [1041] 轻链
- [1042] CDR1-SEQ ID NO 156 :TRSSGSIASNYVQ
- [1043] CDR2-SEQ ID NO 157 :DDNQRPS
- [1044] CDR3-SEQ ID NO 158 :QSYDSNNDV
- [1045] BAK0278D6
- [1046] 重链
- [1047] CDR1-SEQ ID NO 159 :AATTATGGTCTCAGC
- [1048] CDR2-SEQ ID NO 160 :TGGATCAGCGCTAATAATGGCGACACAAATTATGGACAGGAATTCCAGG  
GC
- [1049] CDR3-SEQ ID NO 161 :GACTCCAGCAGCAACTGGGCCCCGCTGGTTTTTTCGATCTC
- [1050] BAK278D6
- [1051] 轻链
- [1052] CDR1-SEQ I D NO 162 :GGGGGAAACAACATTGGAAGTAACTTGTACACCDR2-SEQ ID NO  
163 :GATGATGGCGACCGGCCCTCA
- [1053] CDR3-SEQ ID NO 164 :CAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTA
- [1054] BAK502G9
- [1055] 重链
- [1056] CDR1-SEQ ID NO 165 :AATTATGGTCTCAGC
- [1057] CDR2-SEQ ID NO 166 :TGGATCAGCGCTAATAATGGCGACACAAATTATGGACAGGAATTCCAGG  
GC
- [1058] CDR3-SEQ ID NO 167 :GACTCCAGCAGCAGCTGGGCCCCGCTGGTTTTTTCGATCTC
- [1059] BAK502G9
- [1060] 轻链
- [1061] CDR1-SEQ ID NO 168 :GGGGGAAACATCATTGGAAGTAACTTGTACAC
- [1062] CDR2-SEQ ID NO 169 :GATGATGGCGACCGGCCCTCA
- [1063] CDR3-SEQ ID NO 170 :CAGGTGTGGGATACTGGTAGTGATCCCGTGGTA
- [1064] CH 结构域 -SEQ ID NO :171
- [1065] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
VTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV  
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQP  
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG  
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[1066] CL 结构域 -SEQ ID NO :172

[1067] QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASS  
YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS



[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; Cambridge Antibody Technology Limited

Monk, Phillip D

Jermutus, Lutz

Minter, Ralph R

Shorrocks, Celia P

&lt;120&gt; 针对 IL-13 的人抗体分子

&lt;130&gt; SMWCP6234918

&lt;140&gt; PCT/GB2004/003059

&lt;141&gt; 2004-07-15

&lt;150&gt; US 60/487, 512

&lt;151&gt; 2003-07-15

&lt;150&gt; US 60/558, 216

&lt;151&gt; 2004-03-31

&lt;150&gt; GB 0407315.1

&lt;151&gt; 2004-03-31

&lt;150&gt; US 60/573, 791

&lt;151&gt; 2004-05-24

&lt;160&gt; 249

[0002]

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Asn Tyr Gly Leu Ser  
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Trp Ile Ser Ala Asn Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Gly Gln Glu Phe Gln Gly  
1 5 10 15

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 3

Asp Ser Ser Ser Asn Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu  
1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

[0003]

<213> 人

<400> 4

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Leu Val His  
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 5

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser  
1 5

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro Val Val  
1 5 10

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 7

Asn Tyr Gly Leu Ser  
1 5

[0004]

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 8

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Trp | Ile | Ser | Ala | Asn | Asn | Gly | Asp | Thr | Asn | Tyr | Gly | Gln | Glu | Phe | Gln | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |     |

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 9

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ser | Ser | Ser | Ser | Trp | Ala | Arg | Trp | Phe | Phe | Asp | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 10

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Gly | Asn | Ile | Ile | Gly | Ser | Lys | Leu | Val | His |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

[0005]

&lt;400&gt; 11

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser  
1 5

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 12

Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro Val Val  
1 5 10

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 13

Glu 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 Tyr Thr Phe Arg Asn Tyr  
20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Asn Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Gly Gln Glu Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Ile Thr Met Thr Thr Glu Thr Ser Thr Asn Thr Ala His  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

[0006]

Val Arg Asp Ser Ser Ser Asn Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu Trp  
100 105 110

Gly Lys Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> 人

<400> 14

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Pro Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Leu Val  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr  
35 40 45

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ile Asp Ala Gly  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro  
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 15

<211> 122

<212> PRT

<213> 人

[0007]

&lt;400&gt; 15

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 Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Asn Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Gly Gln Glu Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu Trp  
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 16

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

[0008]

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro  
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 17

<211> 30

<212> PRT

<213> 人

<400> 17

Glu 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 Tyr Thr Phe Arg  
20 25 30

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 18

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly  
1 5 10

<210> 19

<211> 32

<212> PRT

[0009]



<213> 人

<400> 19

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Ile | Thr | Met | Thr | Thr | Glu | Thr | Ser | Thr | Asn | Thr | Ala | His | Met | Glu |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Arg | Ser | Leu | Arg | Ser | Asp | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Val | Arg |
|     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |     |

<210> 20

<211> 22

<212> PRT

<213> 人

<400> 20

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Tyr | Val | Leu | Thr | Gln | Pro | Pro | Ser | Val | Ser | Val | Ala | Pro | Gly | Gln |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Ala | Arg | Ile | Pro | Cys |
|     |     | 20  |     |     |     |

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> 人

<400> 21

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ala | Pro | Val | Leu | Val | Val | Tyr |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

<210> 22

<211> 32

<212> PRT

<213> 人

[0010]

&lt;400&gt; 22

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Ile Asp Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
20 25 30

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 23

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Val Gly Ala Ala Gly Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Trp Gly Arg  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

&lt;210&gt; 24

[0011]

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 24

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Phe | Met | Leu | Thr | Gln | Pro | His | Ser | Val | Ser | Glu | Ser | Pro | Gly | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Val | Thr | Ile | Ser | Cys | Thr | Arg | Ser | Ser | Gly | Ser | Ile | Ala | Ser | Asn |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Val | Gln | Trp | Tyr | Gln | Gln | Arg | Pro | Gly | Ser | Ala | Pro | Thr | Thr | Val |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Tyr | Asp | Asp | Asn | Gln | Arg | Pro | Ser | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Ser |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ser | Ile | Asp | Ser | Ser | Ser | Asn | Ser | Ala | Ser | Leu | Thr | Ile | Ser | Gly |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Lys | Thr | Glu | Asp | Glu | Ala | Asp | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Ser | Tyr | Asp | Ser |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Asn | Asp | Val | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Val | Thr | Val | Leu |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 123

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 25

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Gln | Leu | Gln | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Ser |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

[0012]

Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Val Ser Ser Ile Ser Ala Ser Gly Asp Ser Thr Phe Tyr Ala Asp Ser  
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asn Lys Asn Met Val  
65 70 75 80

Phe Leu Gln Val Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe  
85 90 95

Cys Ala Lys Asp Trp Ser Gln Trp Leu Val Gly Asp Ala Phe Asp Val  
100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 26

<211> 108

<212> PRT

<213> 人

<400> 26

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Trp  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Thr Phe Ser Thr  
85 90 95

[0013]

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala  
100 105

<210> 27

<211> 30

<212> PRT

<213> 人

<400> 27

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 Tyr Thr Phe Thr  
20 25 30

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 28

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly  
1 5 10

<210> 29

<211> 32

<212> PRT

<213> 人

<400> 29

Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
1 5 10 15

[0014]

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
20 25 30

<210> 30

<211> 22

<212> PRT

<213> 人

<400> 30

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys  
20

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> 人

<400> 31

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 32

<211> 32

<212> PRT

<213> 人

<400> 32

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
20 25 30

[0015]

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 33

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Val Gly Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Trp  
 100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 34

[0016]

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys  
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn  
20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val  
35 40 45

Ile Tyr Asp Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly  
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser  
85 90 95

Asn Asn Asp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 35

<211> 122

<212> PRT

<213> 人

<400> 35

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 Tyr Thr Phe Glu Gln Thr  
20 25 30

Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Asn Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Gly Gln Glu Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

[0017]



Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu Trp  
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 36

<211> 108

<212> PRT

<213> 人

<400> 36

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro  
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 37

<211> 122

[0018]

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 37

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 Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Tyr Asp Gly Gly Asn Thr Gln Tyr Gly Gln Glu Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu Trp  
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 38

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val  
20 25 30

[0019]

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro  
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 39

<211> 122

<212> PRT

<213> 人

<400> 39

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 Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Gly Leu Asn Gly Glu Thr Leu Tyr Gly Gln Glu Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

[0020]

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu Trp  
 100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 40

<211> 108

<212> PRT

<213> 人

<400> 40

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys  
 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro  
 85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 41

<211> 122

<212> PRT

<213> 人

[0021]

&lt;400&gt; 41

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 Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Ala Thr Pro Asp Gly Gln Thr Ser Tyr Gly Gln Glu Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Ser Asn Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu Trp  
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 42

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

[0022]

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro  
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 43

<211> 122

<212> PRT

<213> 人

<400> 43

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 Tyr Thr Phe Ile Asp Thr  
20 25 30

Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Asn Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Gly Gln Glu Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu Trp  
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

[0023]

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 44

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Tyr | Val | Leu | Thr | Gln | Pro | Pro | Ser | Val | Ser | Val | Ala | Pro | Gly | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Ala | Arg | Ile | Thr | Cys | Gly | Gly | Asn | Ile | Ile | Gly | Ser | Lys | Leu | Val |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ala | Pro | Val | Leu | Val | Ile | Tyr |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Asp | Gly | Asp | Arg | Pro | Ser | Gly | Ile | Pro | Glu | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Ser | Gly | Asn | Thr | Ala | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Arg | Val | Glu | Ala | Gly |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Glu | Ala | Asp | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Val | Trp | Asp | Thr | Gly | Ser | Asp | Pro |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Val | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Thr | Val | Leu |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 45

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

[0024]

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Gly Ser Asn Gly Tyr Thr Ser Tyr Gly Gln Glu Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu Trp  
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 46

<211> 108

<212> PRT

<213> 人

<400> 46

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80

[0025]



Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro  
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 47

<211> 122

<212> PRT

<213> 人

<400> 47

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 Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Asp Ala Thr Gly Asp Thr Gln Tyr Gly Gln Glu Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu Trp  
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 48

<211> 108

[0026]

<212> PRT

<213> 人

<400> 48

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro  
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 49

<211> 122

<212> PRT

<213> 人

<400> 49

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 Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

[0027]

Gly Trp Ile Arg Asn Ile Asp Gly Tyr Thr Ile Tyr Gly Gln Glu Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu Trp  
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 50

<211> 108

<212> PRT

<213> 人

<400> 50

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro  
85 90 95

[0028]

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 51

<211> 122

<212> PRT

<213> 人

<400> 51

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 Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Asp Asp Ser Gly Thr Thr Ile Tyr Gly Gln Glu Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu Trp  
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 52

<211> 108

<212> PRT

<213> 人

[0029]

&lt;400&gt; 52

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro  
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 53

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 Tyr Thr Phe Ala Asn Thr  
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Asn Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Gly Gln Glu Phe  
50 55 60

[0030]

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu Trp  
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 54

<211> 108

<212> PRT

<213> 人

<400> 54

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro  
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 55

[0031]

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 55

Ser Tyr Ala Met Ser  
1 5

<210> 56

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 56

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 57

Val Gly Ala Ala Gly Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr  
1 5 10

<210> 58

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

[0032]

<400> 58

Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln  
1 5 10

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 59

Asp Asp Asn Gln Arg Pro Ser  
1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 60

Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Asp Val  
1 5

<210> 61

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 61

Gln Thr Gly Val Ser  
1 5

<210> 62

[0033]



<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 62

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Trp | Ile | Ser | Ala | Asn | Asn | Gly | Asp | Thr | Asn | Tyr | Gly | Gln | Glu | Phe | Gln | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |

<210> 63

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 63

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ser | Ser | Ser | Ser | Trp | Ala | Arg | Trp | Phe | Phe | Asp | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 64

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Gly | Asn | Ile | Ile | Gly | Ser | Lys | Leu | Val | His |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 65

[0034]

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser  
1 5

<210> 66

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 66

Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro Val Val  
1 5 10

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 67

Asn Thr Gly Ile Ser  
1 5

<210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 68

Trp Ile Ser Ala Asn Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Gly Gln Glu Phe Gln Gly  
1 5 10 15

<210> 69

<211> 13

<212> PRT

[0035]

<213> 人

<400> 69

Asp Ser Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu  
1 5 10

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 70

Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val His  
1 5 10

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 71

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser  
1 5

<210> 72

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 72

Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro Val Val  
1 5 10

[0036]

<210> 73

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 73

Asn Tyr Gly Leu Ser  
1 5

<210> 74

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 74

Trp Ile Ser Gly Ser Asn Gly Tyr Thr Ser Tyr Gly Gln Glu Phe Gln Gly  
1 5 10 15

<210> 75

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 75

Asp Ser Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu  
1 5 10

<210> 76

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

[0037]

<400> 76

Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val His  
1 5 10

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 77

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser  
1 5

<210> 78

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 78

Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro Val Val  
1 5 10

<210> 79

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 79

Asn Tyr Gly Leu Ser  
1 5

<210> 80

<211> 17

<212> PRT

[0038]

<213> 人

<400> 80

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Trp | Ile | Asn | Asp | Ala | Thr | Gly | Asp | Thr | Gln | Tyr | Gly | Gln | Glu | Phe | Gln | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |

<210> 81

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 81

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ser | Ser | Ser | Ser | Trp | Ala | Arg | Trp | Phe | Phe | Asp | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 82

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Gly | Asn | Ile | Ile | Gly | Ser | Lys | Leu | Val | His |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 83

|     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Asp | Gly | Asp | Arg | Pro | Ser |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |

[0039]

<210> 84

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 84

Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro Val Val  
1 5 10

<210> 85

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 85

Asp Thr Gly Val Ser  
1 5

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 86

Trp Ile Ser Ala Asn Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Gly Gln Glu Phe Gln Gly  
1 5 10 15

<210> 87

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

[0040]

<400> 87

Asp Ser Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu  
1 5 10

<210> 88

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 88

Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val His  
1 5 10

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 89

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser  
1 5

<210> 90

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 90

Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro Val Val  
1 5 10

<210> 91

<211> 5

[0041]



<212> PRT

<213> 人

<400> 91

Asn Tyr Gly Leu Ser  
1 5

<210> 92

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 92

Trp Ile Ala Thr Pro Asp Gly Gln Thr Ser Tyr Gly Gln Glu Phe Gln Gly  
1 5 10 15

<210> 93

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 93

Asp Ser Asn Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu  
1 5 10

<210> 94

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 94

Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val His

[0042]

---

| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|
|---|---|----|

<210> 95

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 95

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser  
1 5

<210> 96

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 96

Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro Val Val  
1 5 10

<210> 97

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 97

Asn Tyr Gly Leu Ser  
1 5

<210> 98

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

[0043]

<400> 98

Trp Ile Asn Tyr Asp Gly Gly Asn Thr Gln Tyr Gly Gln Glu Phe Gln Gly  
1 5 10 15

<210> 99

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 99

Asp Ser Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu  
1 5 10

<210> 100

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 100

Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val His  
1 5 10

<210> 101

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 101

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser  
1 5

<210> 102

[0044]

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 102

Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro Val Val  
1 5 10

<210> 103

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 103

Asp Tyr Gly Leu Ser  
1 5

<210> 104

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<400> 104

Trp Arg Ile Asn Asp Gly Tyr Thr Ile Tyr Gly Gln Glu Phe Gln Gly  
1 5 10 15

<210> 105

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 105

[0045]

Asp Ser Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu  
1 5 10

<210> 106

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 106

Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val His  
1 5 10

<210> 107

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 107

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser  
1 5

<210> 108

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 108

Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro Val Val  
1 5 10

<210> 109

<211> 366

<212> DNA

[0046]

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 109

```

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcttgcgaagg cttctgggta cacctttaca aattatggtc tcagctgggt gcgacaggec      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgcta ataatggcga cacaaattat      180
ggacaggaat tccagggcag agtcaccatg accacagata catccacgag cacagcctac      240
atggagtga ggagcctgag atctgaagac acggccgttt attactgtgc gagagactcc      300
agcagcaact gggcccctg gtttttccat ctctggggcc gggggacact ggtcaccgtc      360
tcctca                                           366

```

&lt;210&gt; 110

&lt;211&gt; 327

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 110

```

tcctatgtgc tgactcagcc accctcggtg tcagtggccc caggtaagac ggccaggatt      60
acctgtgggg gaaacaacat tggaaagtaa cttgtacact ggtaccagca gaagccaggc      120
caggcccctg tgctggteat ctatgatgat ggcgaccgga cctcagggat ccctgagcga      180
ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaggccggg      240
gatgaggcgg actattattg tcagggtgtgg gatactggta gtgatccgt ggtattcggc      300
ggaggggacca agctgaccgt cctaggt                                           327

```

&lt;210&gt; 111

&lt;211&gt; 366

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 111

```

cagggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60

```

[0047]

|   |     |
|---|-----|
| tectgcaagg cttctgggta cacctttaca aattatgggc tcagctgggt ggcacaggcc | 120 |
| cctggacaag ggottgagtg gatgggatgg atcagcgcta ataatggcga cacaattat  | 180 |
| ggacaggaat tccagggcag agtcacatg accacagata catccacgag cacagcctac  | 240 |
| atggagttga ggagcctgag atctgacgac acggccggtt attactgtgc gagagactcc | 300 |
| agcagcagct ggcccgcctg gtttttcgat ctctggggcc gggggacact ggtcaccgtc | 360 |
| tectca  | 366 |

&lt;210&gt; 112

&lt;211&gt; 327

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 112

|   |     |
|---|-----|
| tectatgtgc tgactcagcc accctcgggt tcagtggccc caggaaagac ggccaggatt | 60  |
| acctgtgggg gaaacatcat tggaagtaaa cttgtacact ggtaccagca gaagccaggc | 120 |
| caggcccttg tctgtgtcat ctatgatgat ggccacgggc cctcagggat cctgagcga  | 180 |
| ttctctggtt ccaactctgg gaacaaggcc acctgacca tcagcagggt caggccggg   | 240 |
| gatgaggccg actattattg tcagggtgtg gatactggta gtgatccgt ggtattcggc  | 300 |
| ggagggacca agctgaccgt cctaggt                                     | 327 |

&lt;210&gt; 113

&lt;211&gt; 366

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 113

|  |     |
|--|-----|
| caggctccagc tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc | 60  |
| tectgcaagg cttctgggta cacctttaca aattatgggc tcagctgggt ggcacaggcc  | 120 |
| cctggacaag ggottgagtg gatgggatgg atctcggct tgaacggcga gacattgtat   | 180 |
| ggacaggaat tccagggcag agtcacatg accacagata catccacgag cacagcctac   | 240 |
| atggagttga ggagcctgag atctgacgac acggccggtt attactgtgc gagagactcc  | 300 |

[0048]

|  |     |
|--|-----|
| agcagcagct gggcccgtg gtttttcgat ctctggggcc gggggacact ggtcaccgtc   | 360 |
| tcctca   | 366 |
| <210> 114  |     |
| <211> 327  |     |
| <212> DNA  |     |
| <213> 人  |     |
| <400> 114  |     |
| tcctatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatt | 60  |
| acctgtgggg gaaacatcat tggaagtaaa cttgtacact ggtaccagca gaagccaggo  | 120 |
| caggccccctg tgetggteat ctatgatgat ggccaccgga cctcagggat cctgagcga  | 180 |
| ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgagcccggg  | 240 |
| gatgaggccg actattattg tcagggtgtg gatactggta gtgatccgt ggtattcggc   | 300 |
| ggagggacca agctgaccgt cctaggt                                      | 327 |
| <210> 115  |     |
| <211> 366  |     |
| <212> DNA  |     |
| <213> 人  |     |
| <400> 115  |     |
| cagggtgcagc tgggtgcagc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc | 60  |
| tcctgcaagg cttctgggta cacctttaca aattatgggc tcagctgggt ggcacaggcc  | 120 |
| cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcgcaacc cagacggcca gacaagctat   | 180 |
| ggacaggaat tccagggcag agtcaccatg accacagata catccacgag cacagcctac  | 240 |
| atggagtga ggagcctgag atctgaagac acggccgttt attactgtgc gagagactcc   | 300 |
| aacagcagct gggcccgtg gtttttcgat ctctggggcc gggggacact ggtcaccgtc   | 360 |
| tcctca   | 366 |
| <210> 116  |     |
| <211> 327  |     |

[0049]



&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 116

```

tctatgtgc tgactcagcc accctoggtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatt    60
accgtgtggg gaaacatcat tggaagtaaa cttgtacact ggtaccagca gaagccaggc    120
caggcccttg tgctggteat ctatgatgat ggcgaccggc cctcagggat cctgagcga    180
ttctctgget ccaactctgg gaacaaggcc accctgacca tcagcagggt cgaggccggg    240
gatgaggccg actattattg tcaggtgtgg gatactggta gtgatcccg tttattoggc    300
ggagggaacca agctgaccgt cctaggt                                     327

```

&lt;210&gt; 117

&lt;211&gt; 366

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 117

```

caagtgcagc tgggtgcagc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc    60
tcttgcaagg cttctgggta cacccttgag cagaccggcg tctcctgggt gcgacaggee    120
cctggacaag ggccttgagt gatgggatgg atcagcgcta ataattggca cacaattat    180
ggacaggaat tccagggcag agtcaccatg accacagata catccacgag cacagcctac    240
atggagttga ggagcctgag atctgacgac acggccgttt attactgtgc gagagactcc    300
agcagcagct gggcccctg gtttttcgat ctctggggcc gggggacaact ggtcacccgc    360
tctca                                             366

```

&lt;210&gt; 118

&lt;211&gt; 327

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 118

[0050]

|  |     |
|--|-----|
| tcctatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatt | 60  |
| acctgtgggg gaaacatcat tggaagtaaa cttgtacact ggtaccagca gaagccagge  | 120 |
| caggccccctg tgetggtcac ctatgatgat ggagaccgga cctcagggat cctgagcga  | 180 |
| ttctctgggt ccaactctgg gaacacggcc acctgacca tcagcagggt cgaggccggg   | 240 |
| gatgagcccg actattattg tcagggtgtg gatactggta gtgateccgt ggtattcggc  | 300 |
| ggagggacca agctgaccgt cctaggt                                      | 327 |

&lt;210&gt; 119

&lt;211&gt; 366

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 119

|  |     |
|--|-----|
| caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc | 60  |
| tcctgcaagg cttctgggta cacctttatc gacacggggg tctctgggt gcgacaggcc   | 120 |
| cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgta ataattggga cacaattat    | 180 |
| ggacaggaat tccagggcag agtcaccatg accacagata catcaagag cacagcctac   | 240 |
| atggagttga ggagcctgag atctgacgac acggccgttt attactgtgc gagagactcc  | 300 |
| agcagcagct ggcccgcctg gtttttcgat ctctggggcc gggggacact ggtcacccgc  | 360 |
| tctca  | 366 |

&lt;210&gt; 120

&lt;211&gt; 327

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 120

|  |     |
|--|-----|
| tcctatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatt | 60  |
| acctgtgggg gaaacatcat tggaagtaaa cttgtacact ggtaccagca gaagccagge  | 120 |
| caggccccctg tgetggtcac ctatgatgat ggagaccgga cctcagggat cctgagcga  | 180 |
| ttctctgggt ccaactctgg gaacacggcc acctgacca tcagcagggt cgaggccggg   | 240 |

[0051]

gatgaggecg actattattg tcaggtgtgg gatactggta gtgatcccggt ggtattcgge 300

ggagggacca agctgaccgt cctaggt 327

<210> 121

<211> 366

<212> DNA

<213> 人

<400> 121

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggccctc agtgaaggtc 60

tectgcaagg cttctggtta cacctttaca aattatggtc tcagctgggt gogacaggec 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaactacg acggcggaac cacacagtat 180

ggacaggaat tccagggcag agtcaccatg accacagata catcacgag cacagcctac 240

atggagttga ggagcctgag atctgaagac acggccgttt attactgtgc gagagactcc 300

agcagcagct gggcccgctg gtttttcgat ctctggggcc gggggacact ggtcaccgtc 360

tectca 366

<210> 122

<211> 327

<212> DNA

<213> 人

<400> 122

tcctatgtgc tgactcagcc accctcggtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatt 60

acctgtgggg gaaacatcat tggaagtaaa cttgtacact ggtaccagca gaagccagge 120

caggeccctg tgctggteat ctatgatgat ggagaccgge cctcagggat ccctgagoga 180

ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc acctgacca tcagcagggt cgaggecggg 240

gatgaggecg actattattg tcaggtgtgg gatactggta gtgatcccggt ggtattcgge 300

ggagggacca agctgaccgt cctaggt 327

<210> 123

<211> 366

[0052]

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 123

```

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcttgcaagg cttctgggta cacctttaca aattatggtc tcagctgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcggga gcaacggcta cacatcttat      180
ggacaggaat tccagggcag agtcaccatg accacagata cgccacgag cacagcctac      240
atggagtiga ggagcctgag atctgacgac acggccgttt attactgtgc gagagactcc      300
agcagcagct ggcccgcgtg gtttttcgat ctctggggcc gggggacact ggtcacccgc      360
tctca                                           366

```

&lt;210&gt; 124

&lt;211&gt; 327

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 124

```

tcttatgtgc tgactcagcc accctcggtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatt      60
acctgtgggg gaaacatcat tggaagttaa cttgtacact ggtaccagca gaagccaggc      120
caggeccctg tgctggtcat ctatgatgat ggccaccgga cctcagggat ccctgagcga      180
ttctctgget ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaggcgggg      240
gatgagggcc actattattg tcagggtgtg gatactggta gtgateccgt ggtattcggc      300
ggagggacca agctgaccgt cctaggt                                           327

```

&lt;210&gt; 125

&lt;211&gt; 366

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 125

[0053]

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcttgcaagg cttctgggta cacctttaca aattatggtc tcagctgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacgaag ccacgggcca cacacagtat 180  
 ggacaggaat tccagggcag agtcacatg accacagata catccacgag cacagcctac 240  
 atggagttga ggagcctgag atctgacgac acggccgttt attactgtgc gagagactcc 300  
 agcagcagct gggcccctg gtttttcgat ctctggggcc gggggacact ggtcaccgtc 360  
 tctcca 366

<210> 126

<211> 327

<212> DNA

<213> 人

<400> 126

tcttatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatt 60  
 acctgtgggg gaaacatcat tggaagtaaa ctgttacact ggtaccagca gaagccaggc 120  
 caggcccctg tgctgggtcat ctatgatgat ggccaccggc cctcagggat ccctgagcca 180  
 ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaggccggg 240  
 gatgaggccg actattattg tcagggtgtg gatactggta gtgatccgt ggtattcggc 300  
 ggagggacca agctgaccgt cctaggt 327

<210> 127

<211> 366

<212> DNA

<213> 人

<400> 127

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcttgcaagg cttctgggta cacctttaca gattatggtc tcagctgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacaag ggctagagtg gatgggatgg atccgcaaca tcgacggcta cacaatttat 180  
 ggacaggaat tccagggcag agtcacatg accacagata catccacgag cacagcctac 240

[0054]

|   |     |
|---|-----|
| atggagttga ggagcctgag atctgaagac acggccgttt attactgtgc gagagactcc | 300 |
| agcagcagct gggeccgctg gtttttcgat ctctggggcc gggggacact ggtcaccgtc | 360 |
| tectca  | 366 |

&lt;210&gt; 128

&lt;211&gt; 327

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 128

|  |     |
|--|-----|
| tcctatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatt | 60  |
| acctgtgggg gaaacatcat tggaagtaaa ctgttacact ggtaccagca gaagccagge  | 120 |
| caggcccttg tgctgggtcat ctatgatgat ggcgaccggc cctcagggat ccotgagcga | 180 |
| ttctctgggt ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaggccggg  | 240 |
| gatgagggcg actattattg tcagggtgtg gatactggta gtgateccgt ggtattegge  | 300 |
| ggagggacca agctgaccgt cctaggt                                      | 327 |

&lt;210&gt; 129

&lt;211&gt; 366

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 129

|   |     |
|---|-----|
| caggtcacgc tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc | 60  |
| tcctgcaagg cttctgggta cacctttaca aattatggtc tcagctgggt gcgacaggcc | 120 |
| cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcgacgacg acagcggcac gacaatatat | 180 |
| ggacaggaat tccagggcag agtcaccatg accacagata catccacgag cacagcctac | 240 |
| atggagttga ggagcctgag atctgaagac acggccgttt attactgtgc gagagactcc | 300 |
| agcagcagct gggeccgctg gtttttcgat ctctggggcc gggggacact ggtcaccgtc | 360 |
| tectca  | 366 |

&lt;210&gt; 130

[0055]

<211> 327

<212> DNA

<213> 人

<400> 130

```
tccatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatt    60
acctgtgggg gaaacatcat tggaagtaaa cttgtacct ggtaccagca gaagccaggc    120
caggcccttg tgetggatcat ctatgatgat ggagaccgga cctcagggat cctgagcga    180
ttctctgggt ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaggccggg    240
gatgaggccg actattattg tcagggtgtg gatactggta gtgatccgt ggtattcggc    300
ggagggacca agctgaccgt cctaggt                                     327
```

<210> 131

<211> 366

<212> DNA

<213> 人

<400> 131

```
caagtgcagt tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaage ctggggcctc agtgaaggtc    60
tccatcaagg cttctgggta cacccttgcc aacaccggga tctcgtgggt ggcacaggcc    120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgcta ataattggca cacaattat    180
ggacaggaat tccagggcag agtcaccatg accacagata catccacgag caccagctac    240
atggagttga ggagcctgag atctgacgac acggccgttt attactgtgc gagagactcc    300
agcagcagct ggcccgcctg gtttttcgat ctctggggtc gggggacact ggtcaccgtc    360
tccca                                             366
```

<210> 132

<211> 327

<212> DNA

<213> 人

[0056]

<400> 132  
 tcctatgtgc tgactcagcc accctcggtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatt 60  
 acctgtgggg gaaacatcat tggaagtaaa cttgtacaact ggtaccagca gaagccagge 120  
 caggcccctg tgctgggtcat ctatgatgat ggcgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180  
 ttctotgget ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaggccggg 240  
 gatgaggcgg actattattg tcagggtgtgg gatactggta gtgatccgt ggtattcggc 300  
 ggagggacca agctgaccgt cctaggt 327

<210> 133

<211> 122

<212> PRT

<213> 人

<400> 133

Glu 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 Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Asn Asn Gly Glu Thr Asn Tyr Gly Gln Glu Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Glu Thr Pro Thr Asn Thr Ala His  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Val Arg Asp Ser Ser Ser Asn Trp Ala Arg Trp Tyr Phe Asp Leu Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

[0057]



<210> 134

<211> 109

<212> PRT

<213> 人

<400> 134

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Pro Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Leu Val  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr  
35 40 45

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ile Asp Ala Gly  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro  
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105

<210> 135

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 135

Asn Tyr Gly Leu Ser  
1 5

<210> 136

[0058]

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 136

Trp Ile Ser Ala Asn Asn Gly Glu Thr Asn Tyr Gly Gln Glu Phe Gln  
1 5 10 15

Gly

<210> 137

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 137

Asp Ser Ser Ser Asn Trp Ala Arg Trp Tyr Phe Asp Leu  
1 5 10

<210> 138

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 138

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Leu Val His  
1 5 10

<210> 139

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

[0059]

<400> 139

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser  
1 5

<210> 140

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 140

Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro Val Val  
1 5 10

<210> 141

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 141

Ser Tyr Ala Met Ser  
1 5

<210> 142

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 142

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

[0060]

<210> 143

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 143

Val Gly Ala Ala Gly Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr  
1 5 10

<210> 144

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 144

Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr Val Glu  
1 5 10

<210> 145

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 145

Asp Asp Asn Gln Arg Pro Ser  
1 5

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

[0061]

<400> 146

Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Asp Val  
1 5

<210> 147

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 147

Ser Tyr Ala Met Ser  
1 5

<210> 148

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 148

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 149

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 149

Val Gly Arg Ala Thr Thr Asp Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr

[0062]

| 1   | 5 | 10 |
|---|---|----|
| <210> 150   |   |    |
| <211> 13  |   |    |
| <212> PRT   |   |    |
| <213> 人   |   |    |
| <400> 150   |   |    |
| Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln |   |    |
| 1   | 5 | 10 |
| <210> 151   |   |    |
| <211> 7   |   |    |
| <212> PRT   |   |    |
| <213> 人   |   |    |
| <400> 151   |   |    |
| Asp Asp Asn Gln Arg Pro Ser                         |   |    |
| 1   | 5 |    |
| <210> 152   |   |    |
| <211> 9   |   |    |
| <212> PRT   |   |    |
| <213> 人   |   |    |
| <400> 152   |   |    |
| Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Asp Val                 |   |    |
| 1   | 5 |    |
| <210> 153   |   |    |
| <211> 5   |   |    |
| <212> PRT   |   |    |
| <213> 人   |   |    |

[0063]

<400> 153

Ser Tyr Ala Met Ser  
1 5

<210> 154

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 154

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 155

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 155

Val Gly Lys Ala Thr Thr Glu Glu Gly Tyr Tyr  
1 5 10

<210> 156

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 156

Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln

[0064]

1 5 10

<210> 157

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 157

Asp Asp Asn Gln Arg Pro Ser  
1 5

<210> 158

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 158

Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Asp Val  
1 5

<210> 159

<211> 15

<212> DNA

<213> 人

<400> 159

aattatgggc tcagc

15

<210> 160

<211> 51

<212> DNA

<213> 人

[0065]



|  |    |
|--|----|
| <400> 160  |    |
| tggatcagcg ctaataatgg cgacacaaat tatggacagg aattccaggg c | 51 |
| <210> 161  |    |
| <211> 39   |    |
| <212> DNA  |    |
| <213> 人  |    |
| <400> 161  |    |
| gactccagca gcaactgggc ccgctgggtt ttgatctc                | 39 |
| <210> 162  |    |
| <211> 33   |    |
| <212> DNA  |    |
| <213> 人  |    |
| <400> 162  |    |
| gggggaaaca acattggaag taaattgta cac                      | 33 |
| <210> 163  |    |
| <211> 21   |    |
| <212> DNA  |    |
| <213> 人  |    |
| <400> 163  |    |
| gatgatggcg accggccctc a                                  | 21 |
| <210> 164  |    |
| <211> 33   |    |
| <212> DNA  |    |
| <213> 人  |    |
| <400> 164  |    |

[0066]

|   |    |
|---|----|
| cagggtgtggg atactggtag tgatcccggtg gta                                | 33 |
| <210> 165   |    |
| <211> 15  |    |
| <212> DNA   |    |
| <213> 人   |    |
| <400> 165<br>aattatgggc tcagc   | 15 |
| <210> 166   |    |
| <211> 51  |    |
| <212> DNA   |    |
| <213> 人   |    |
| <400> 166<br>tggatcagcg ctaataatgg cgacacaaat tatggacagg aattccaggg c | 51 |
| <210> 167   |    |
| <211> 39  |    |
| <212> DNA   |    |
| <213> 人   |    |
| <400> 167<br>gactccagca gcagctgggc ccgctggttt ttgatctc                | 39 |
| <210> 168   |    |
| <211> 33  |    |
| <212> DNA   |    |
| <213> 人   |    |
| <400> 168<br>gggggaaaca tcattggaag taaacttgta cac                     | 33 |

[0067]

<210> 169

<211> 21

<212> DNA

<213> 人

<400> 169

gatgatggcg accggccctc a

21

<210> 170

<211> 33

<212> DNA

<213> 人

<400> 170

caggtgtggg ataactggtag tgatcccggtg gta

33

<210> 171

<211> 327

<212> PRT

<213> 人

<400> 171

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

[0068]

| 65  | 70  | 75  | 80  |
|---|-----|-----|-----|
| Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys | 85  | 90  | 95  |
| Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro | 100 | 105 | 110 |
| Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys | 115 | 120 | 125 |
| Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val | 130 | 135 | 140 |
| Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp | 145 | 150 | 155 |
| Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe | 165 | 170 | 175 |
| Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp | 180 | 185 | 190 |
| Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu | 195 | 200 | 205 |
| Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg | 210 | 215 | 220 |
| Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys | 225 | 230 | 235 |
| Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp | 245 | 250 | 255 |
| Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys | 260 | 265 | 270 |
| Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser | 275 | 280 | 285 |
| Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser | 290 | 295 | 300 |

[0069]

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
325

<210> 172

<211> 105

<212> PRT

<213> 人

<400> 172

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val  
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
100 105

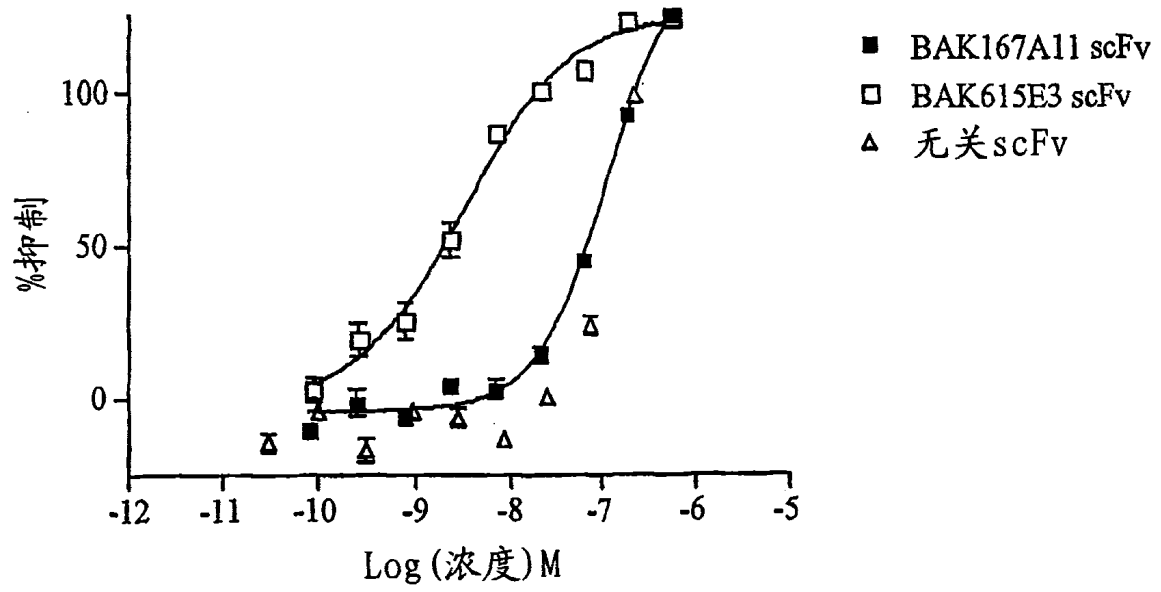


图 1

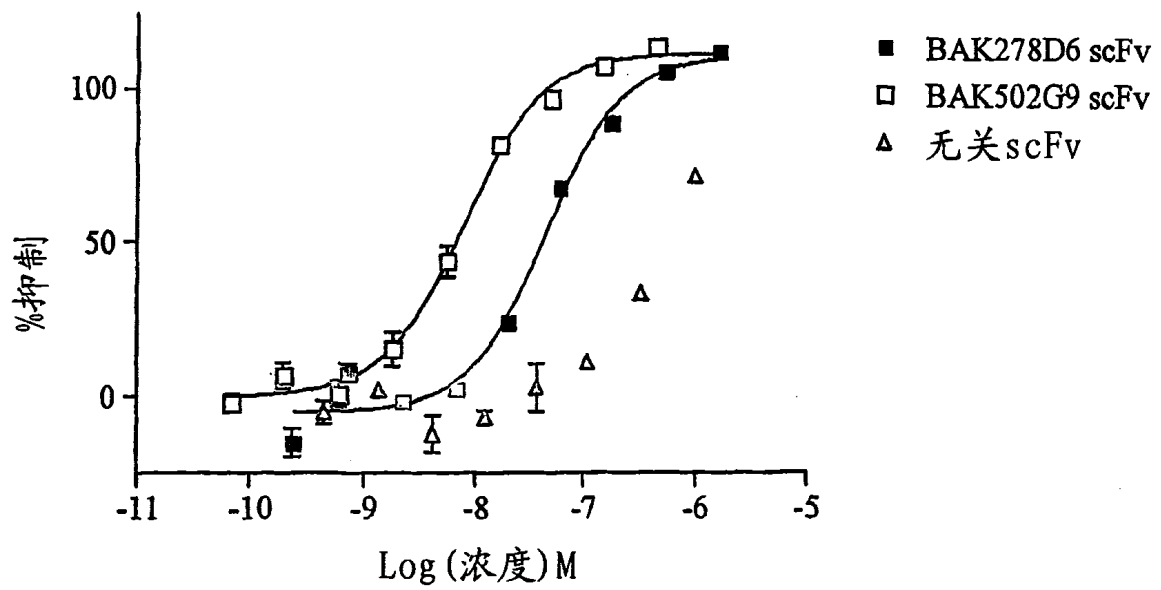


图 2

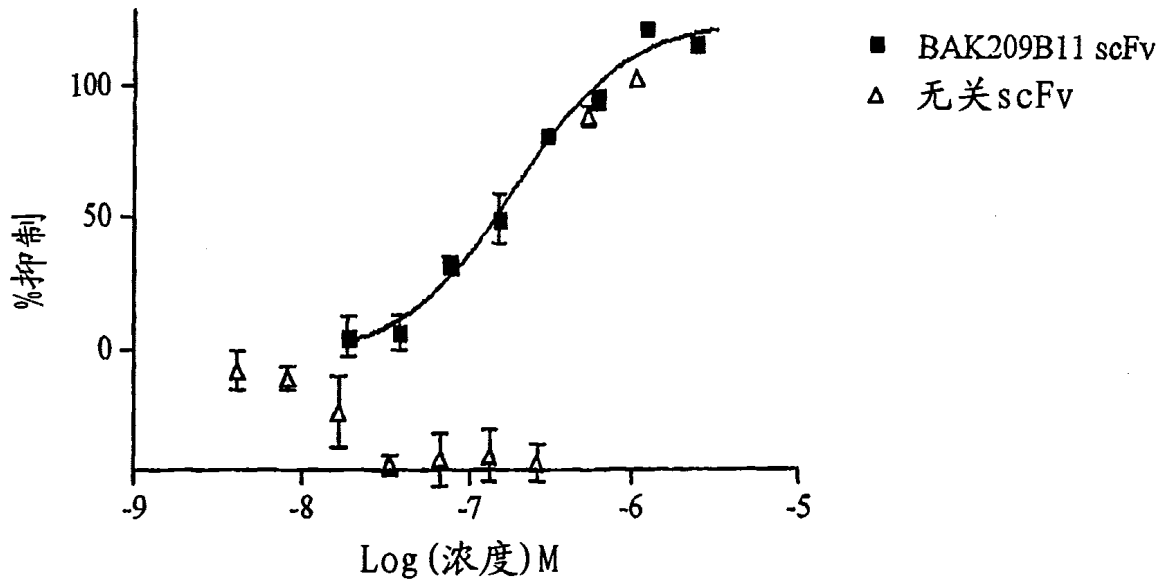


图 3

对人IL-13依赖性  
TF-1细胞增殖的抑制

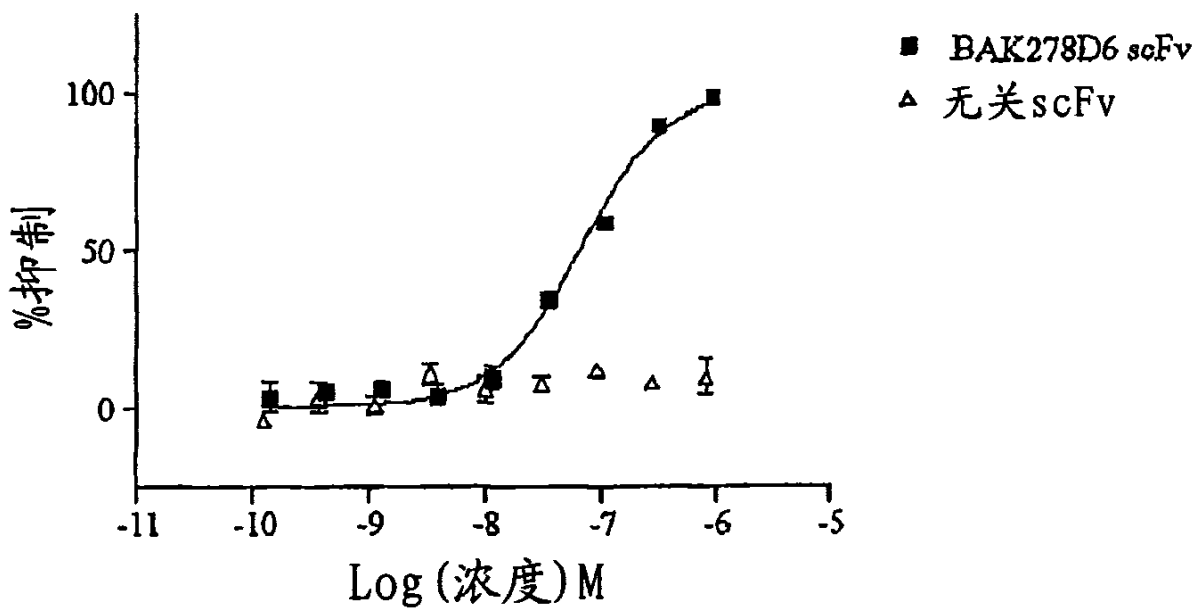


图 4A

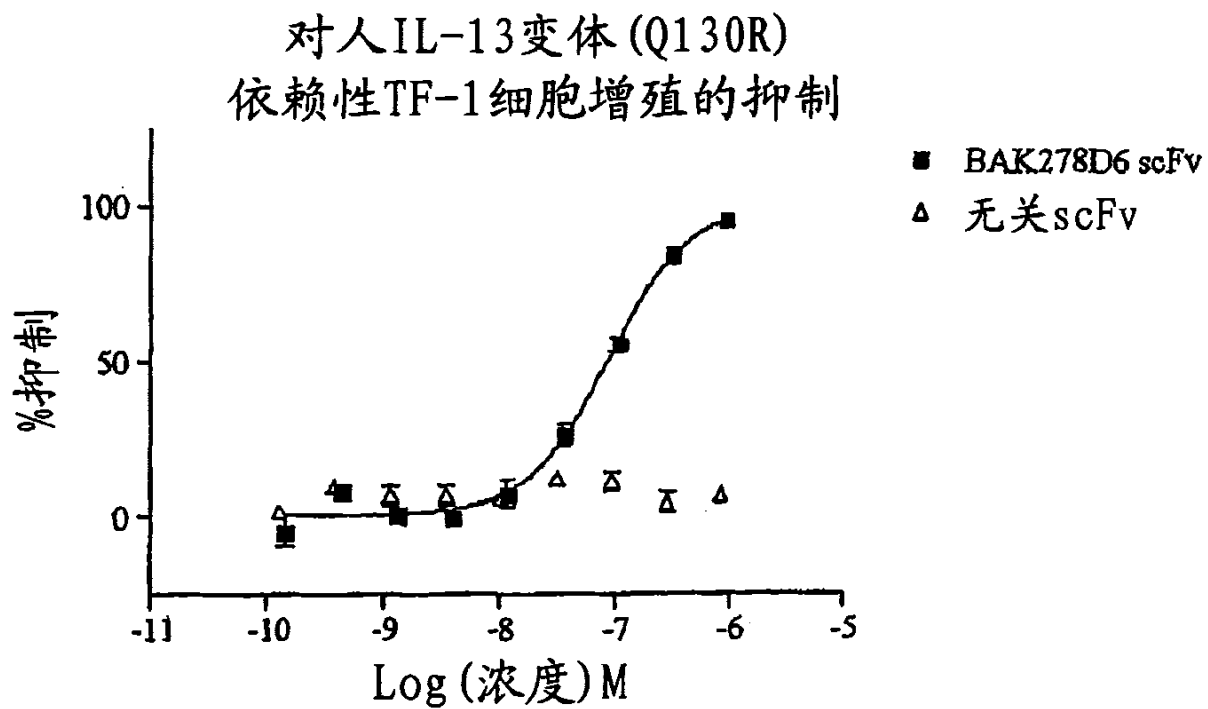


图 4B

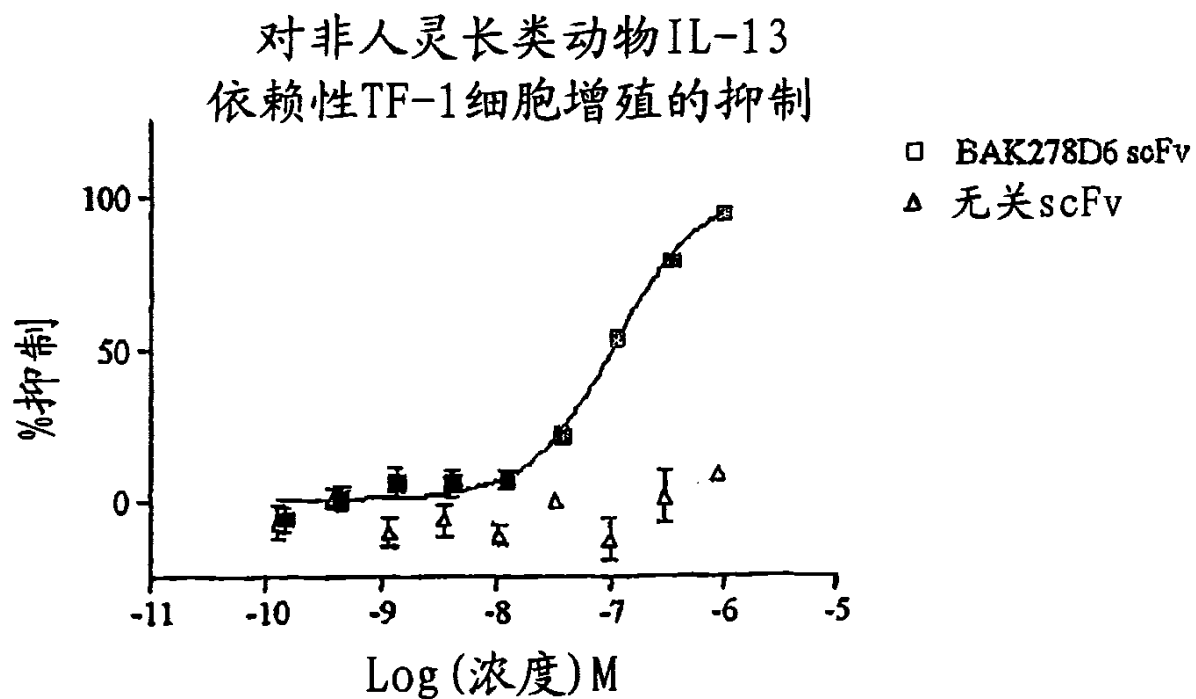


图 4C



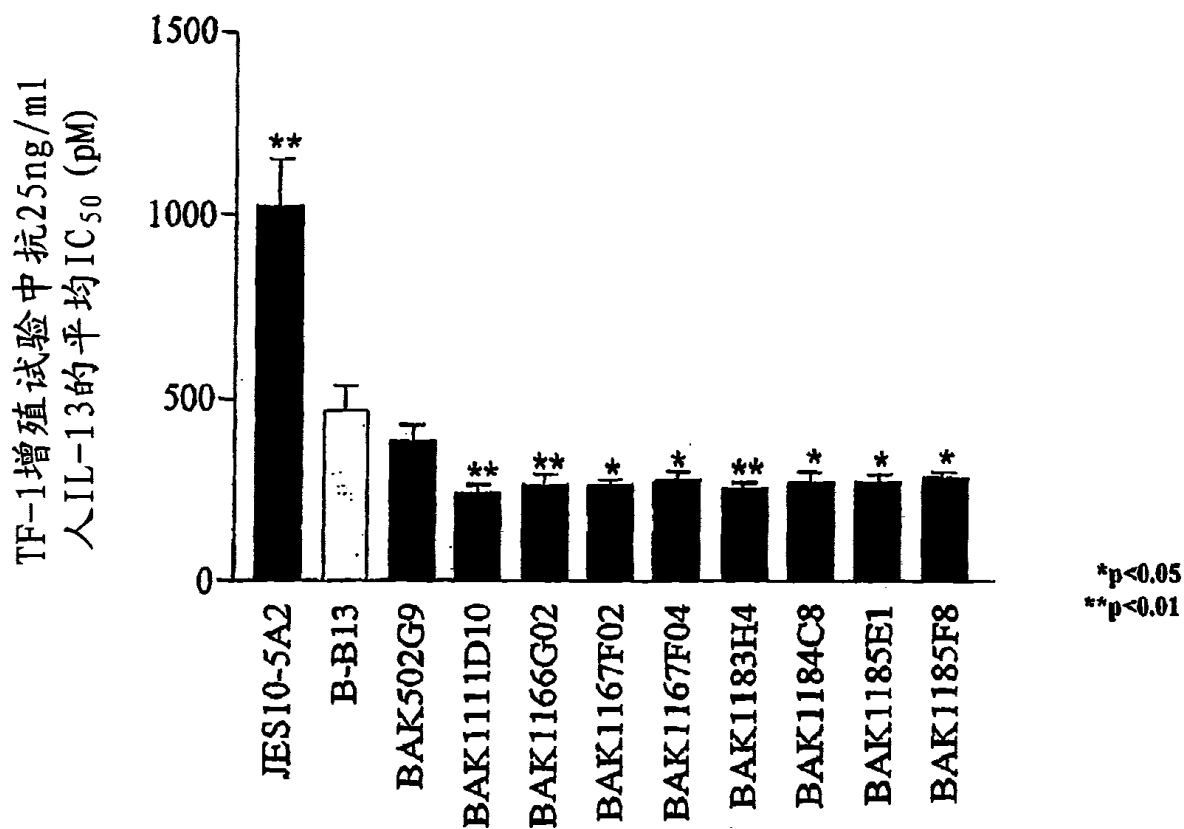


图 5

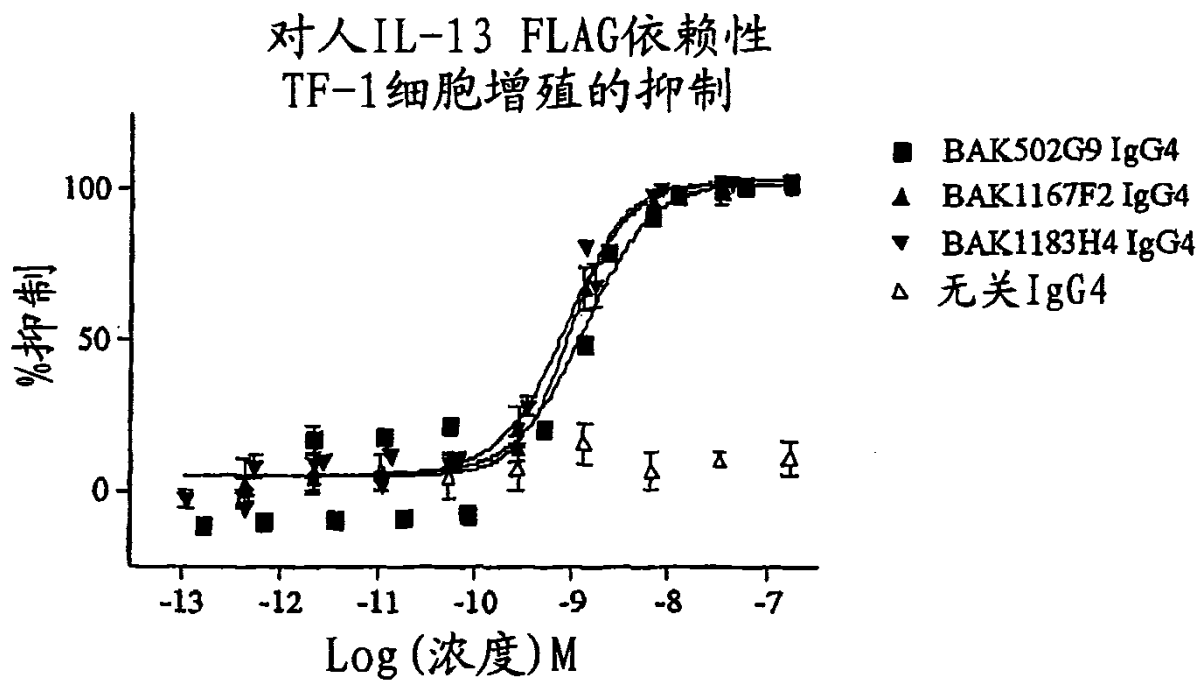


图 6A

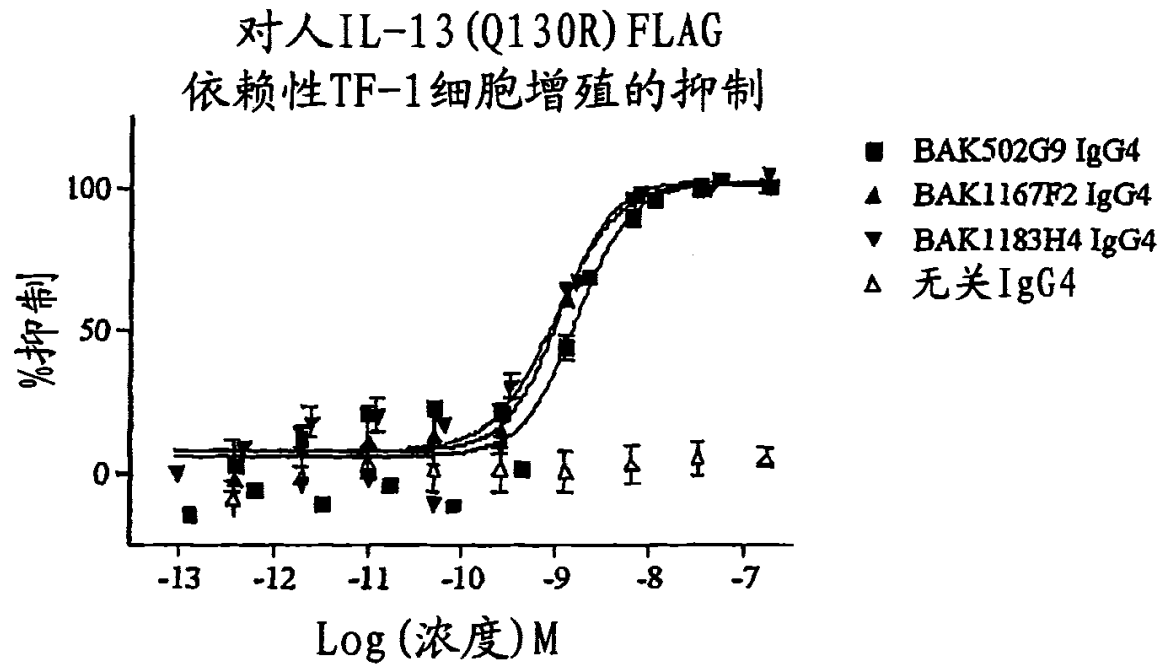


图 6B

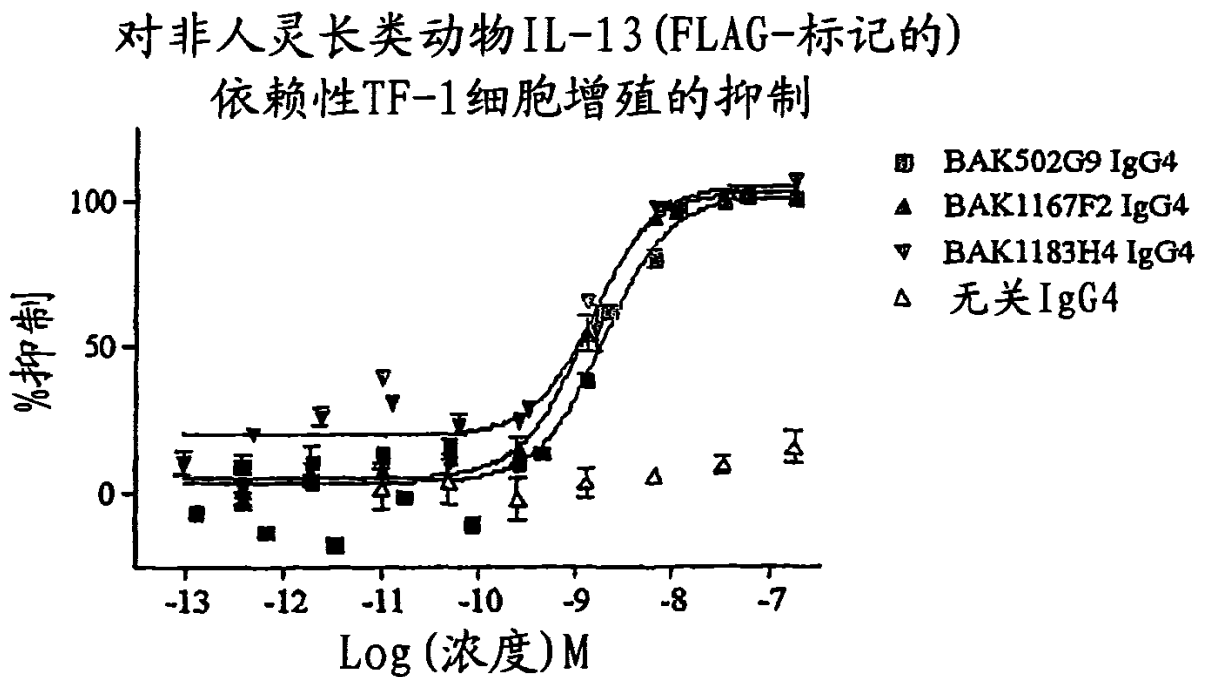


图 6C

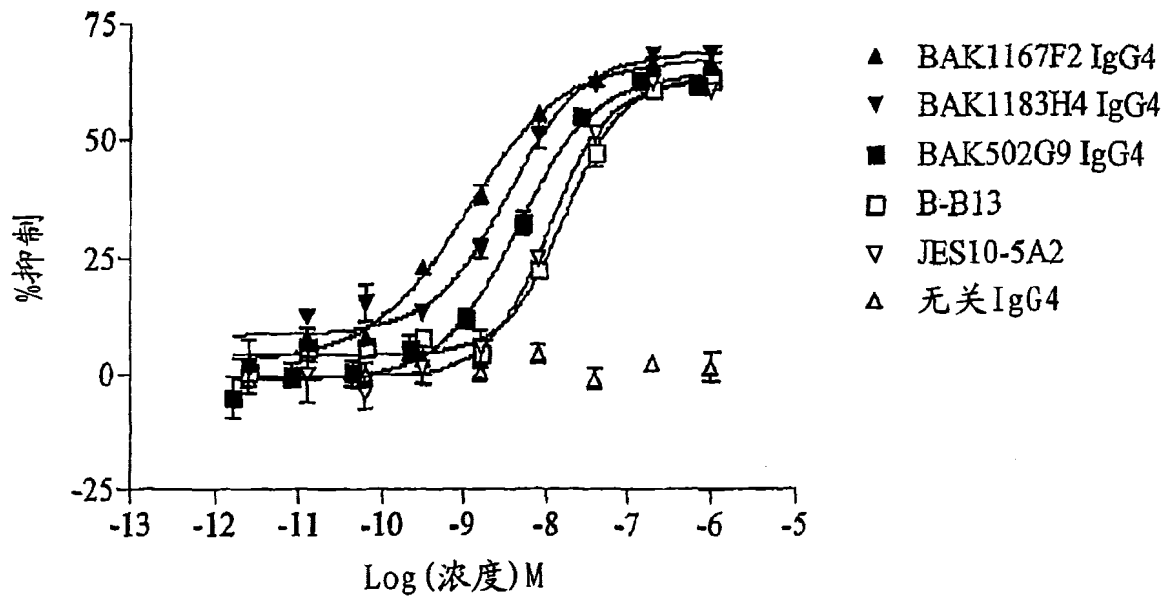


图 7

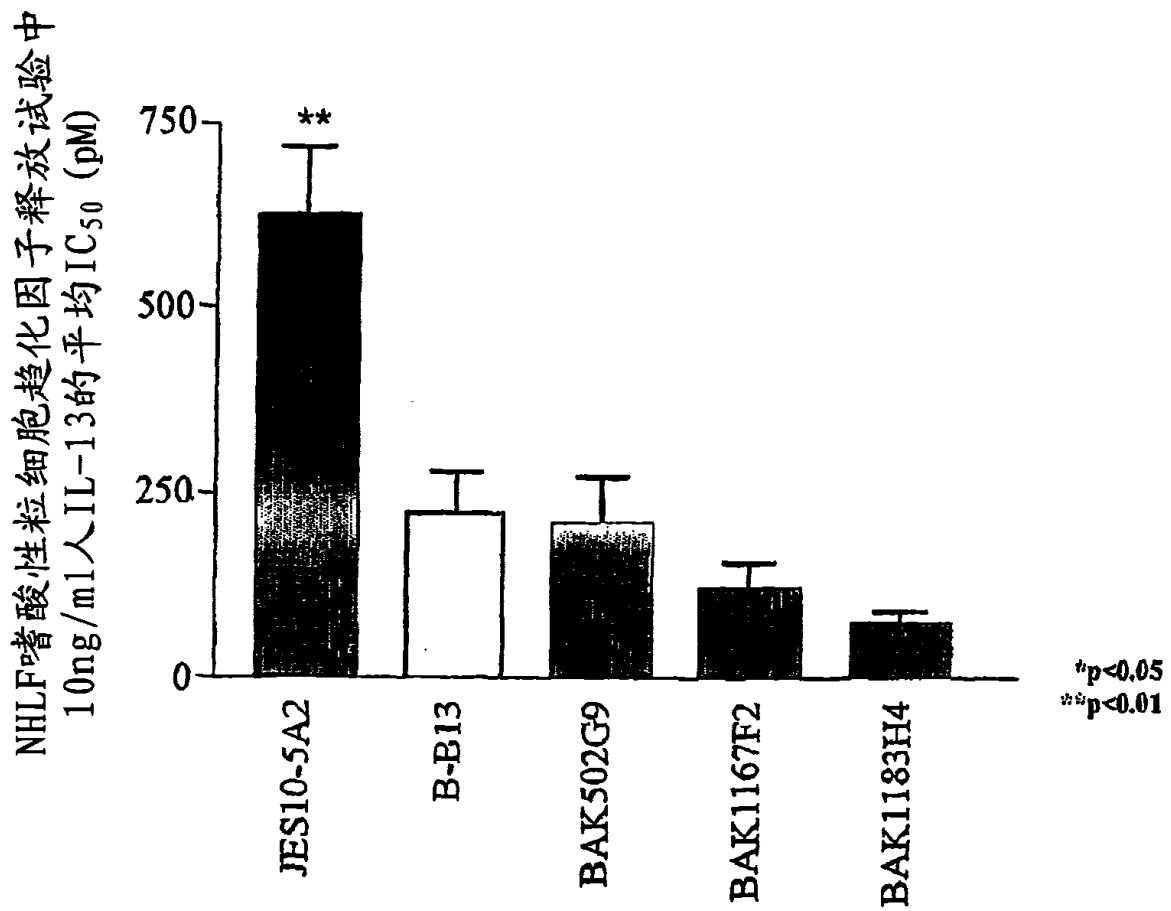


图 8

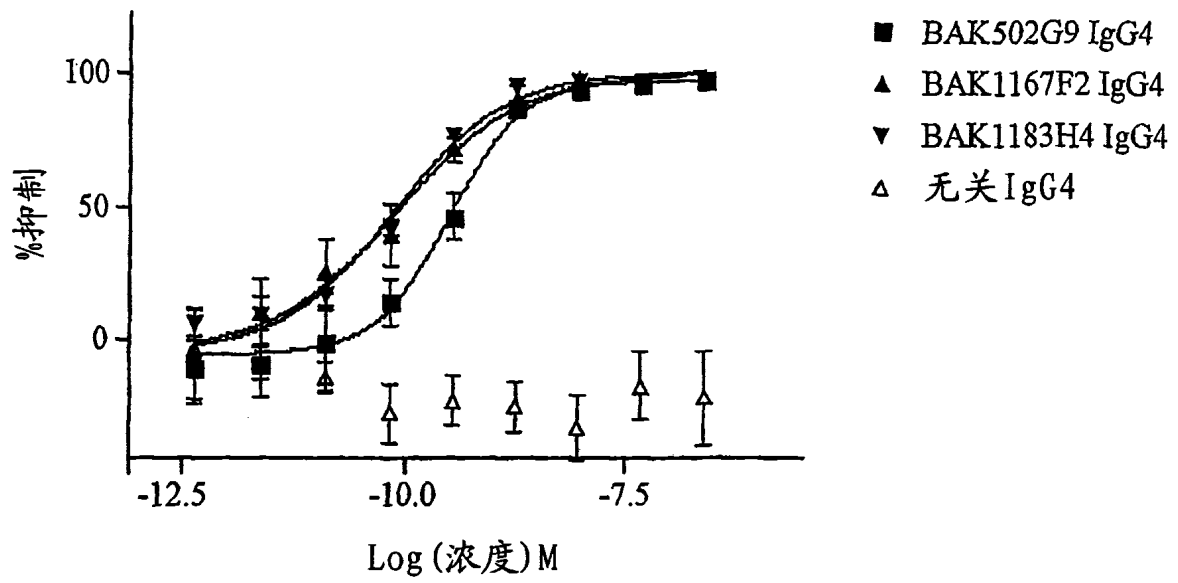


图 9

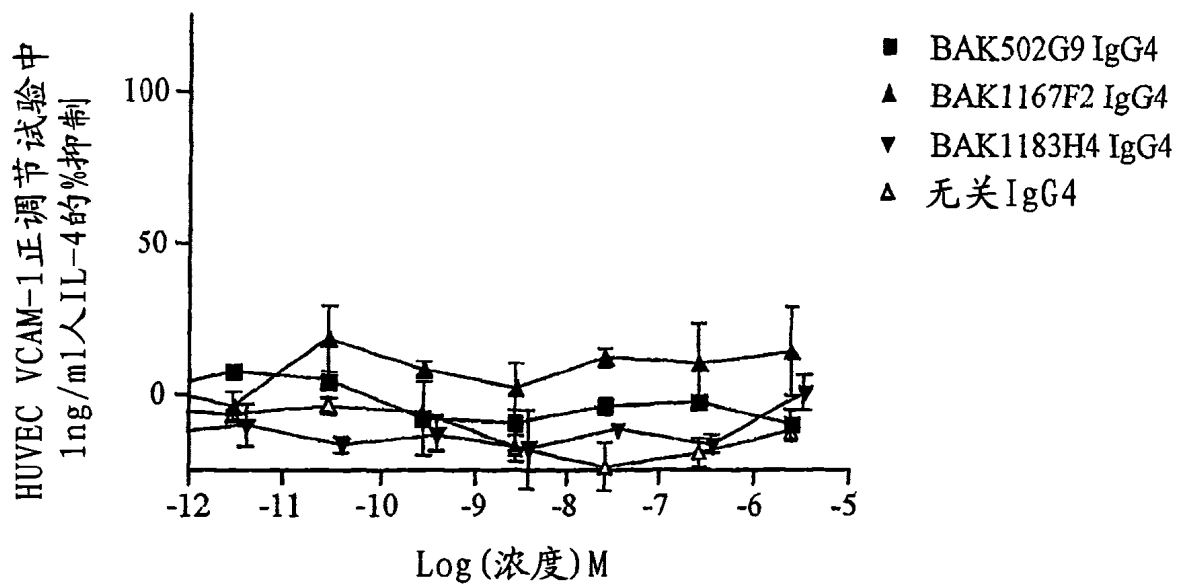


图 10A

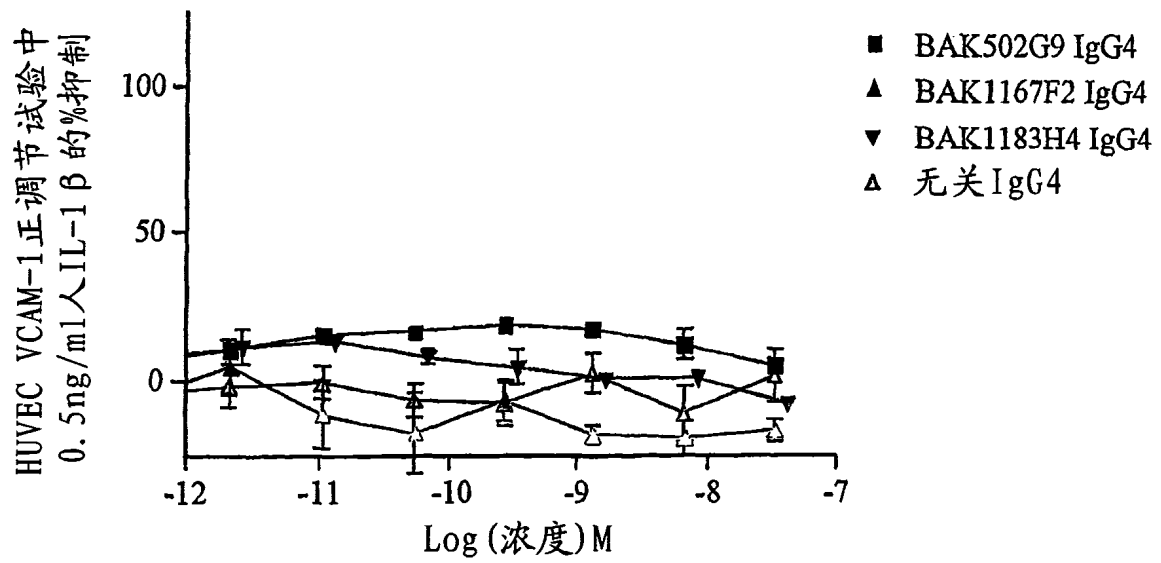


图 10B

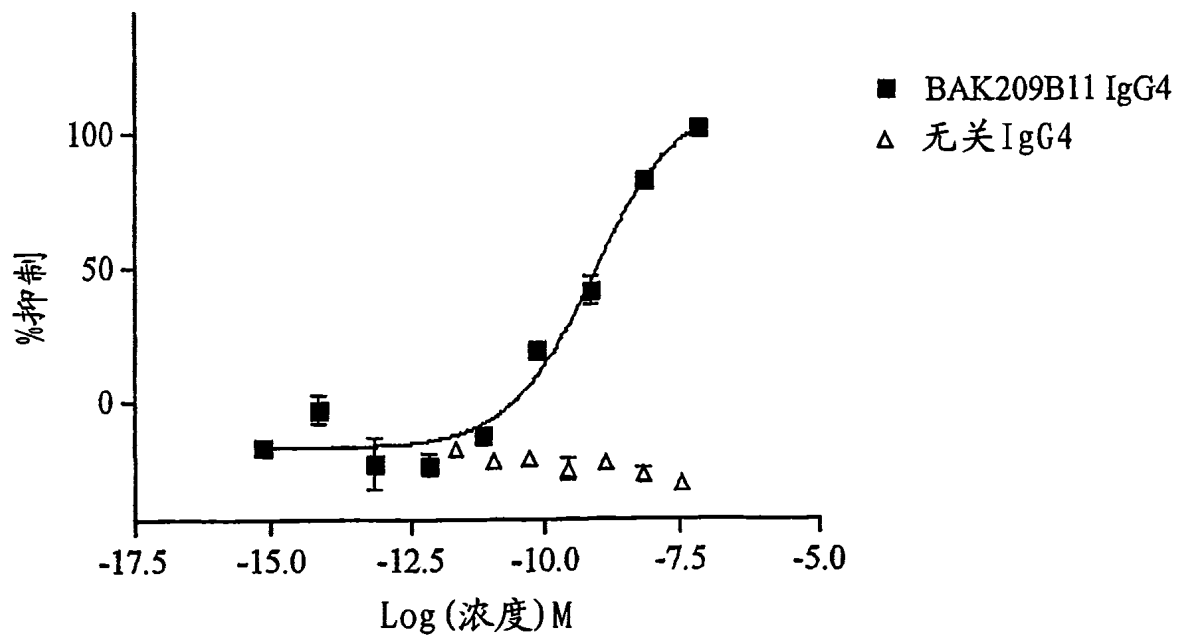


图 11

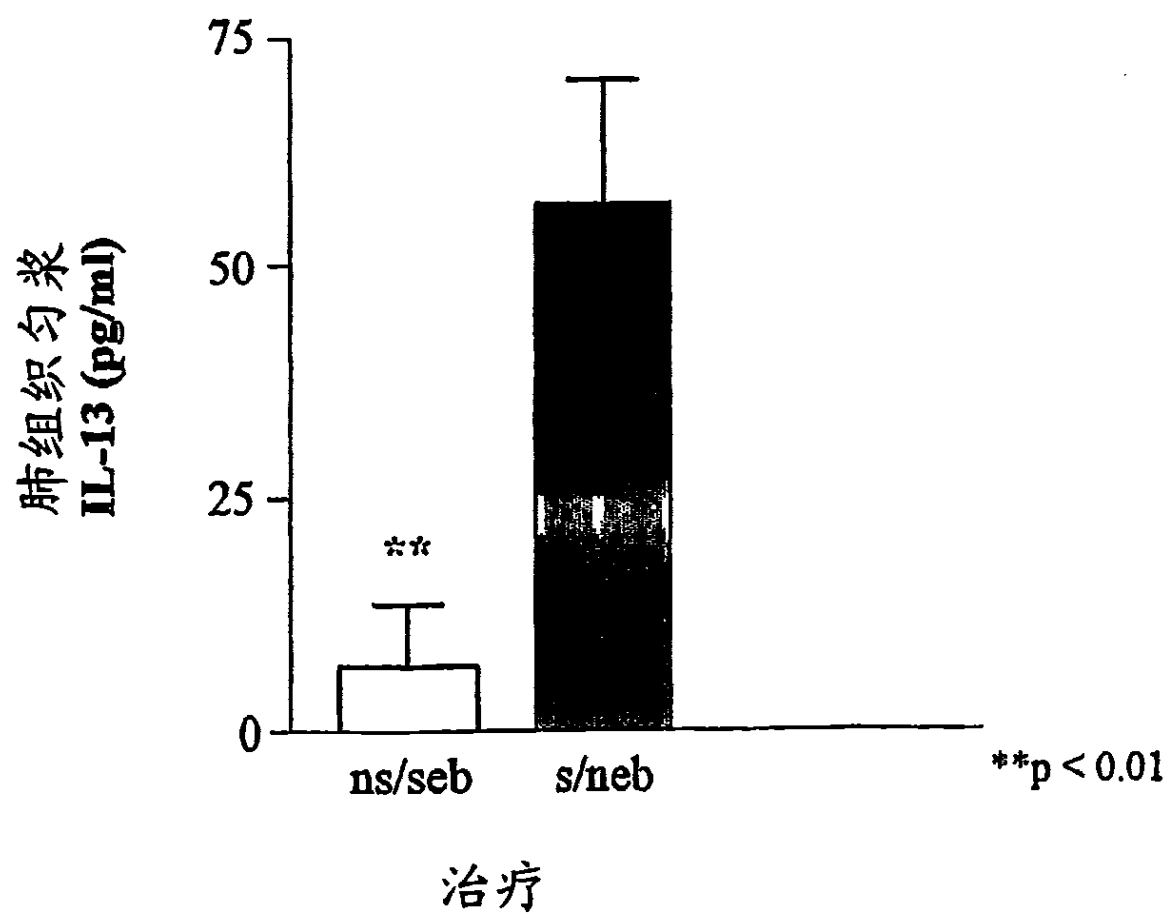


图 12

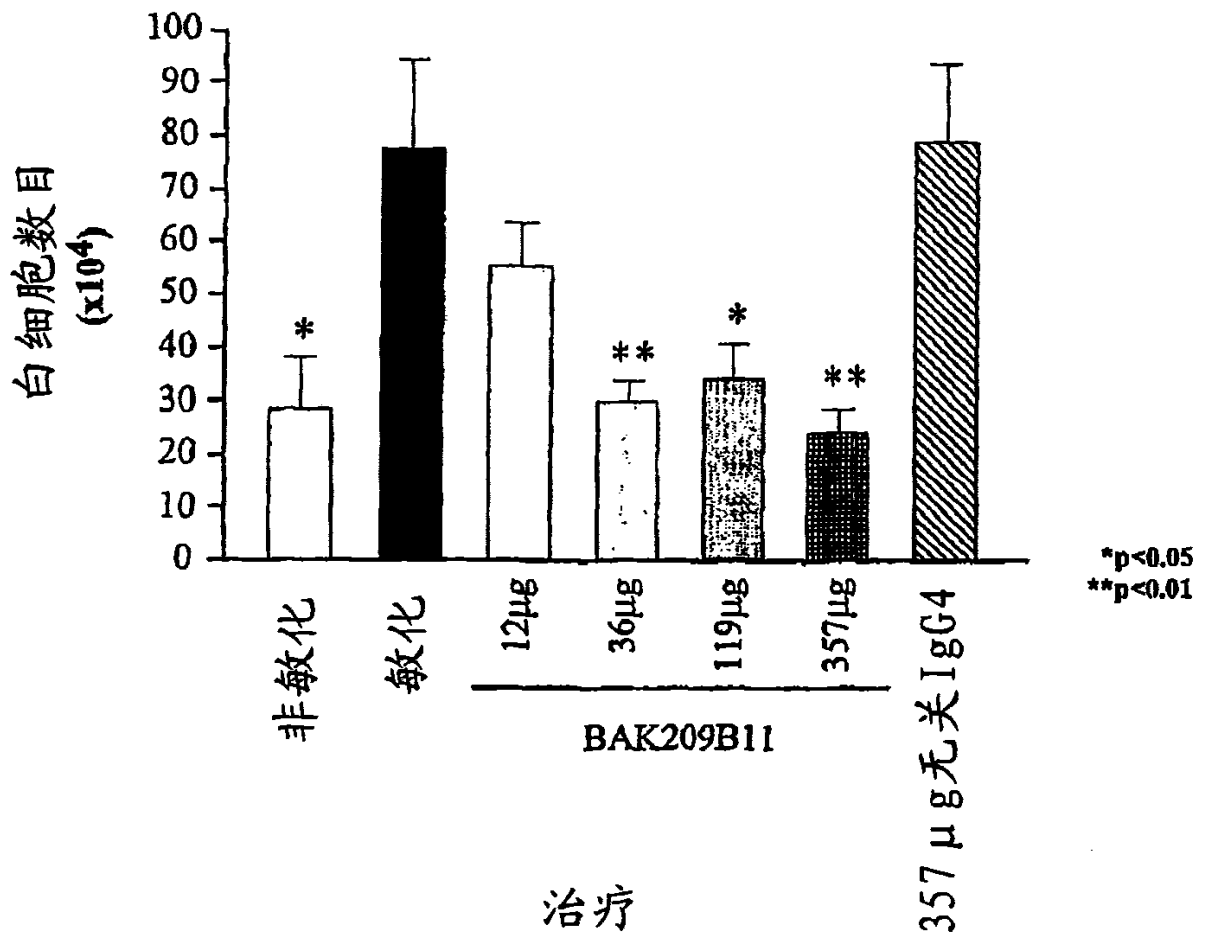


图 13

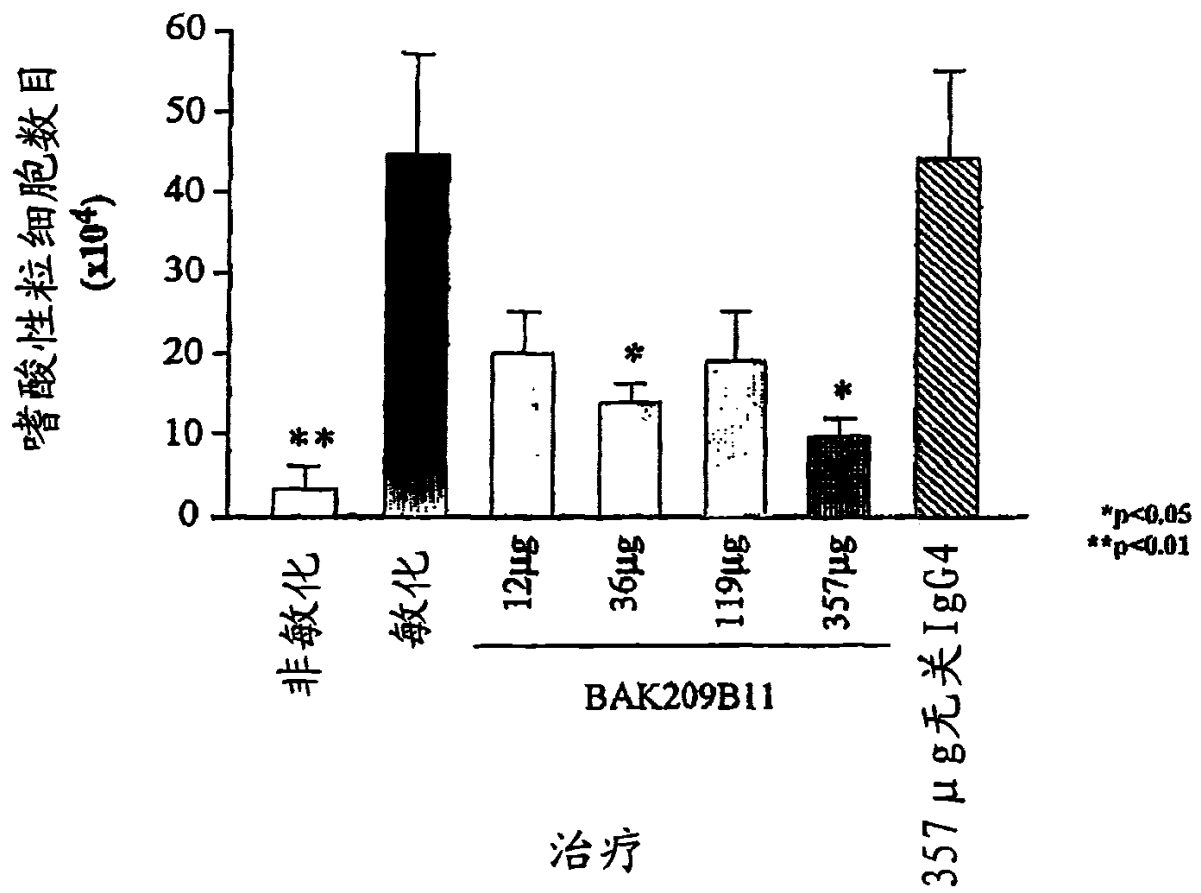


图 14



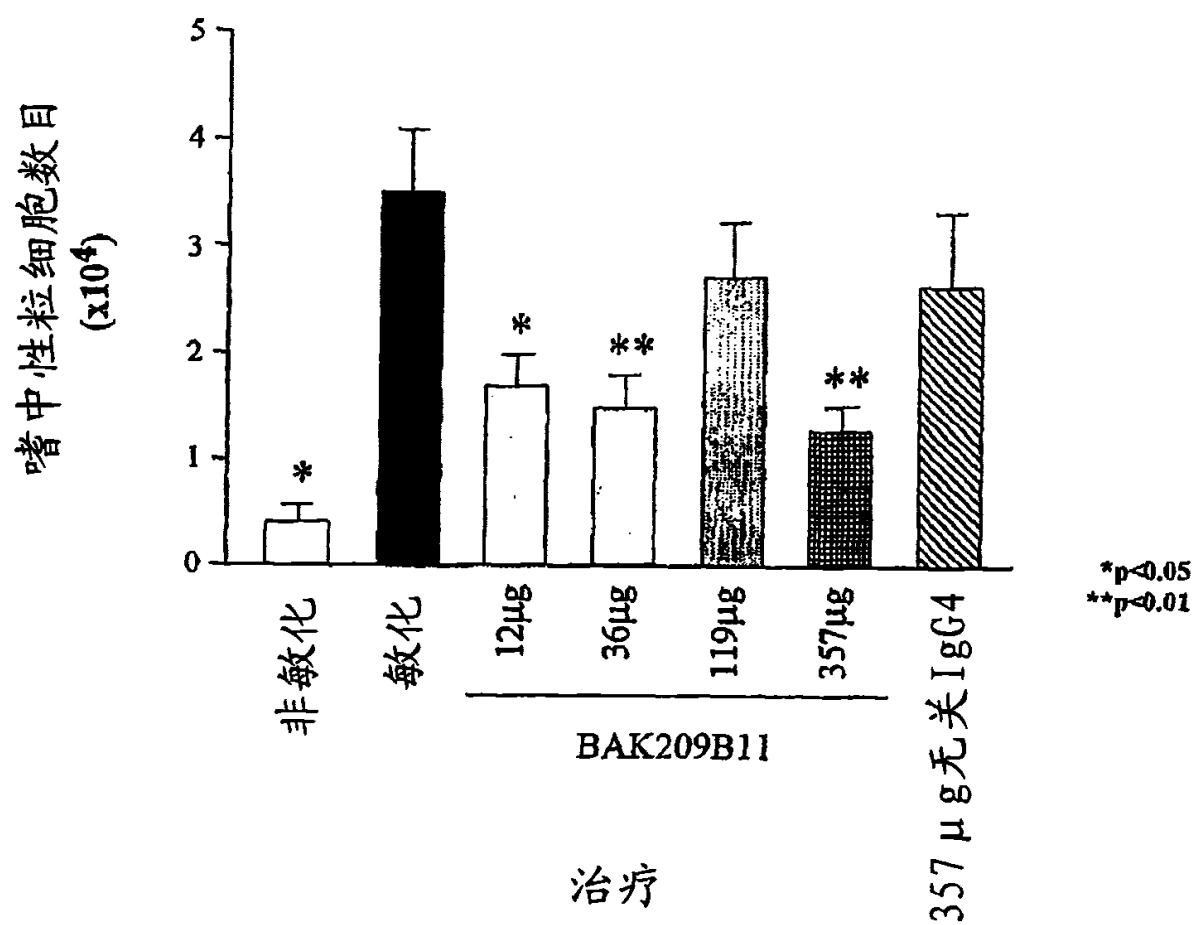


图 15

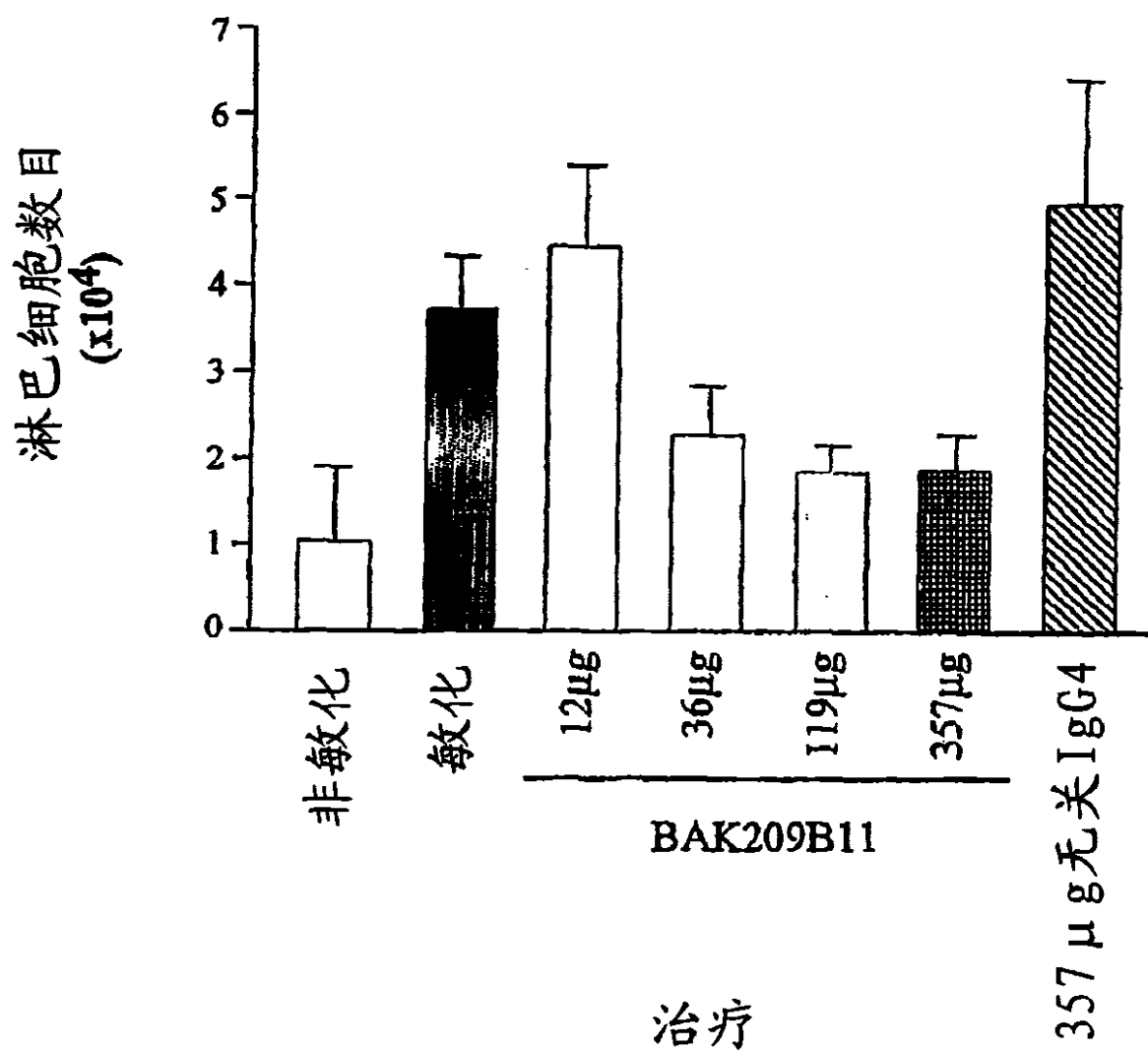


图 16

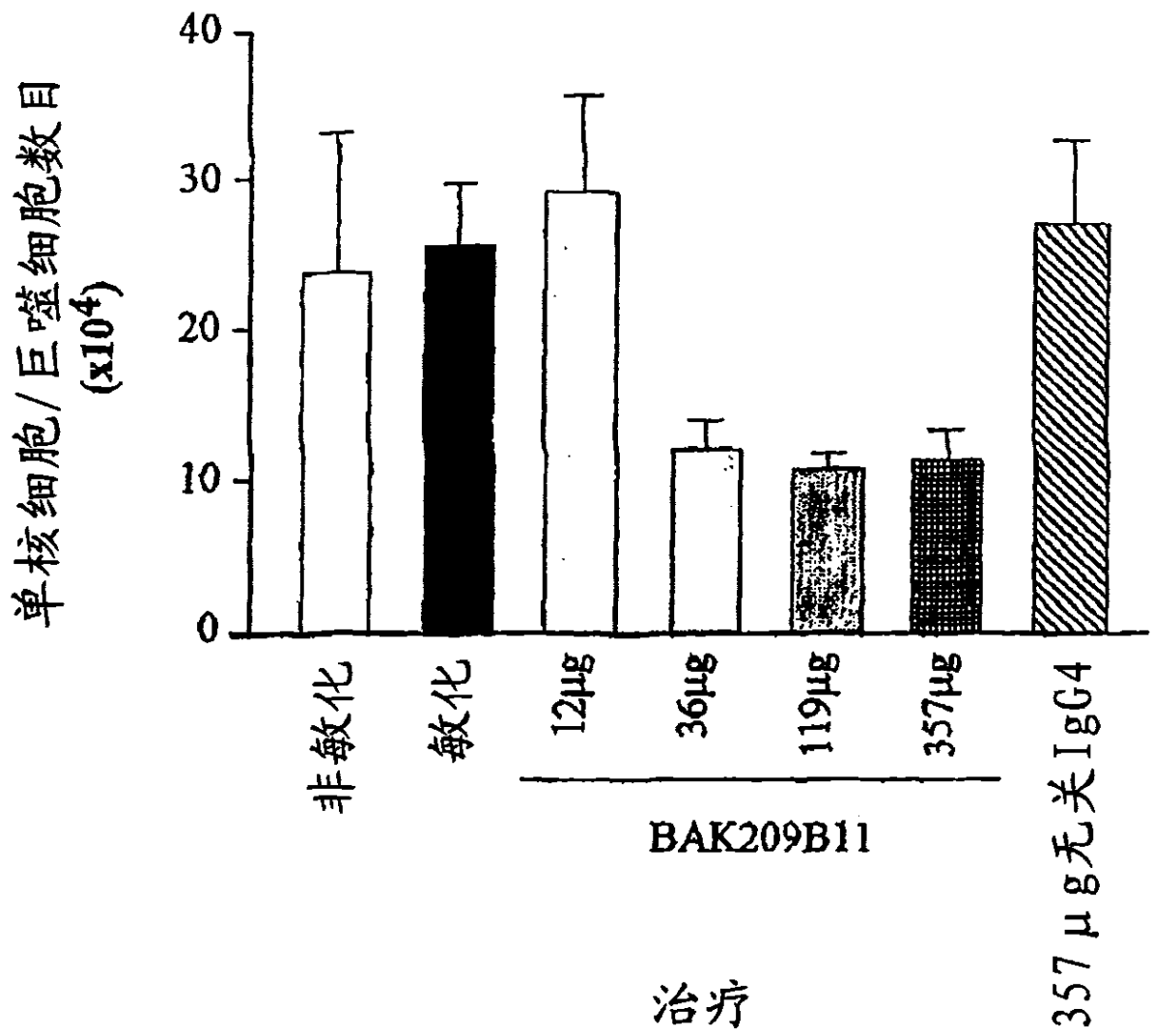


图 17

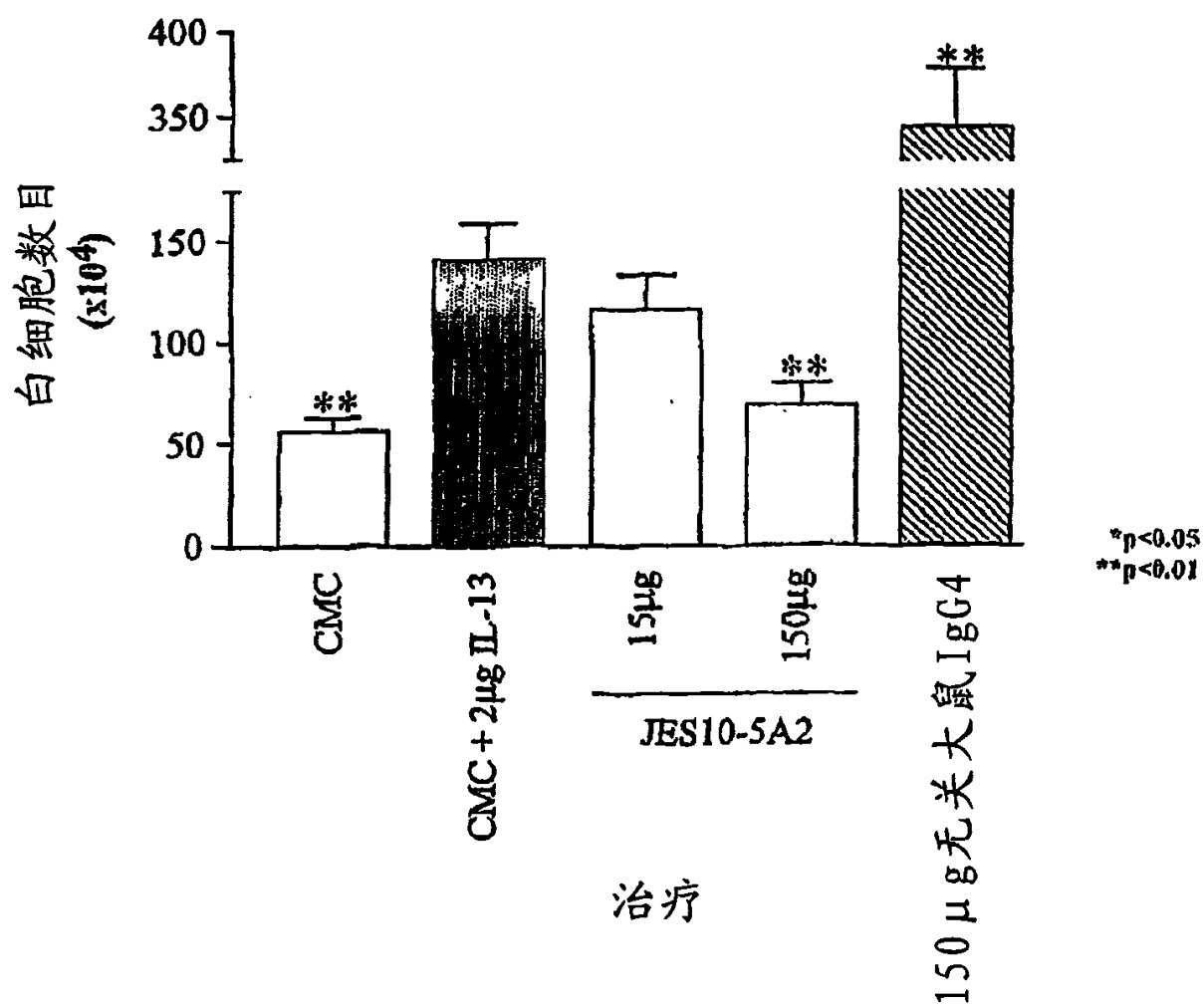


图 18

|         |                       |                   |                   |                  |
|---------|-----------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| 人IL-13  | 10                    | 20                | 30                | 40               |
| 猕猴IL-13 | MALLLTTVIALTCLGGFASPG | PVPPSTAL          | KELIEELVNIT       |                  |
|         | MALLLTTVIALTCLGGFASPS | PVPPSTAL          | KELIEELVNIT       |                  |
|         | MALLLTTVIALTCLGGFASP  | PVPPSTAL          | ELIEELVNIT        |                  |
| 人IL-13  | 50                    | 60                | 70                | 80               |
| 猕猴IL-13 | QNQKAPLCNGSMVWSINLTAG | MYCAALES          | LINVS             | GCSAIE           |
|         | QNQKAPLCNGSMVWSINLTAG | VYCAALES          | LINVS             | GCSAIE           |
|         | QNQKAPLCNGSMVWSINLTAG | YCAALES           | LINVS             | GCSAIE           |
| 人IL-13  | 90                    | 100               | 110               | 120              |
| 猕猴IL-13 | KTQRM                 | LSGFCPHKVSAGQFSSL | HVRDTKIEVAQFVKDLL |                  |
|         | KTQRM                 | LSGFCPHKVSAGQFSSL | RVRDTKIEVAQFVKDLL |                  |
|         | KTQRM                 | L                 | SGFCPHKVSAGQFSSL  | VRDTKIEVAQFVKDLL |
| 人IL-13  | 130                   |                   |                   |                  |
| 猕猴IL-13 | HLKKLFREG             | R                 | FN                |                  |
|         | HLKKLFREG             | Q                 | FN                |                  |
|         | HLKKLFREG             |                   | FN                |                  |

图 19

单次10mg/kg剂量的BAK502G9 (IgG4)对具有变应性但未激发猕猴体内的血清IgE水平的影响

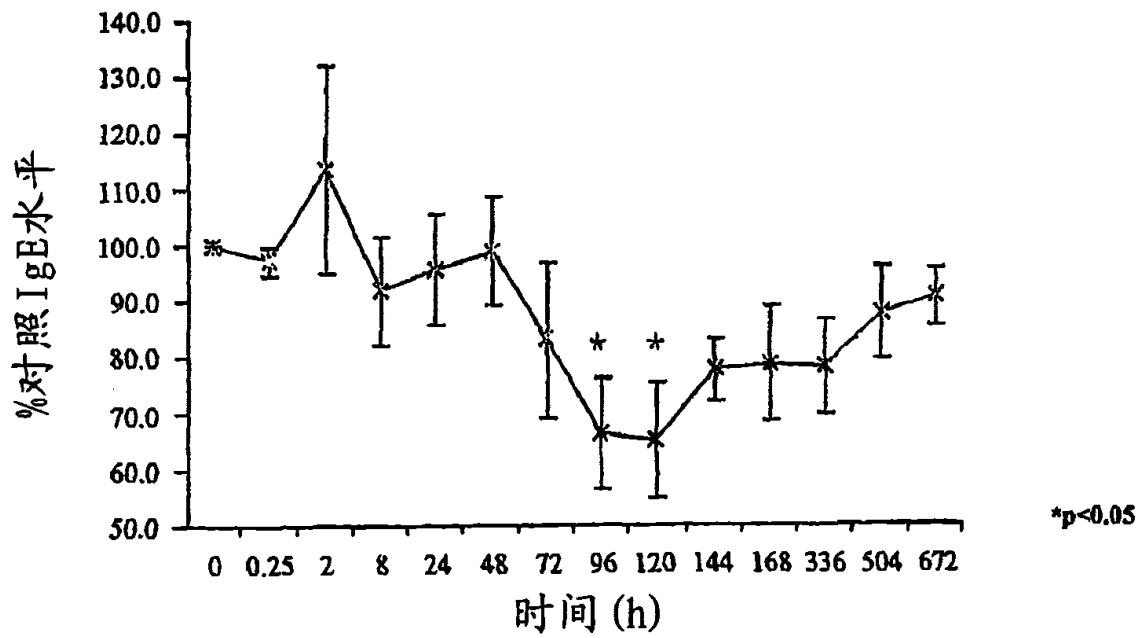


图 20

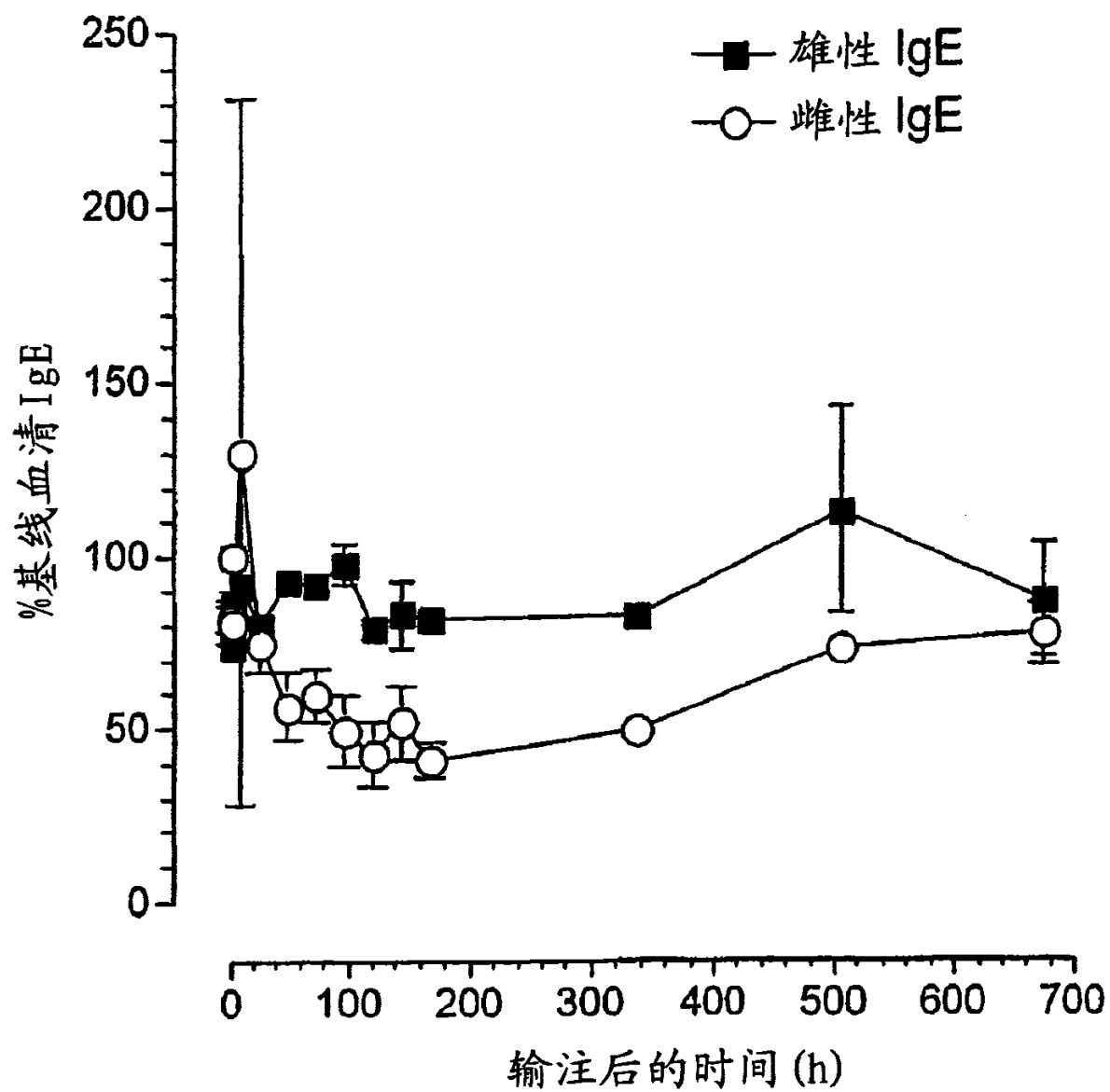
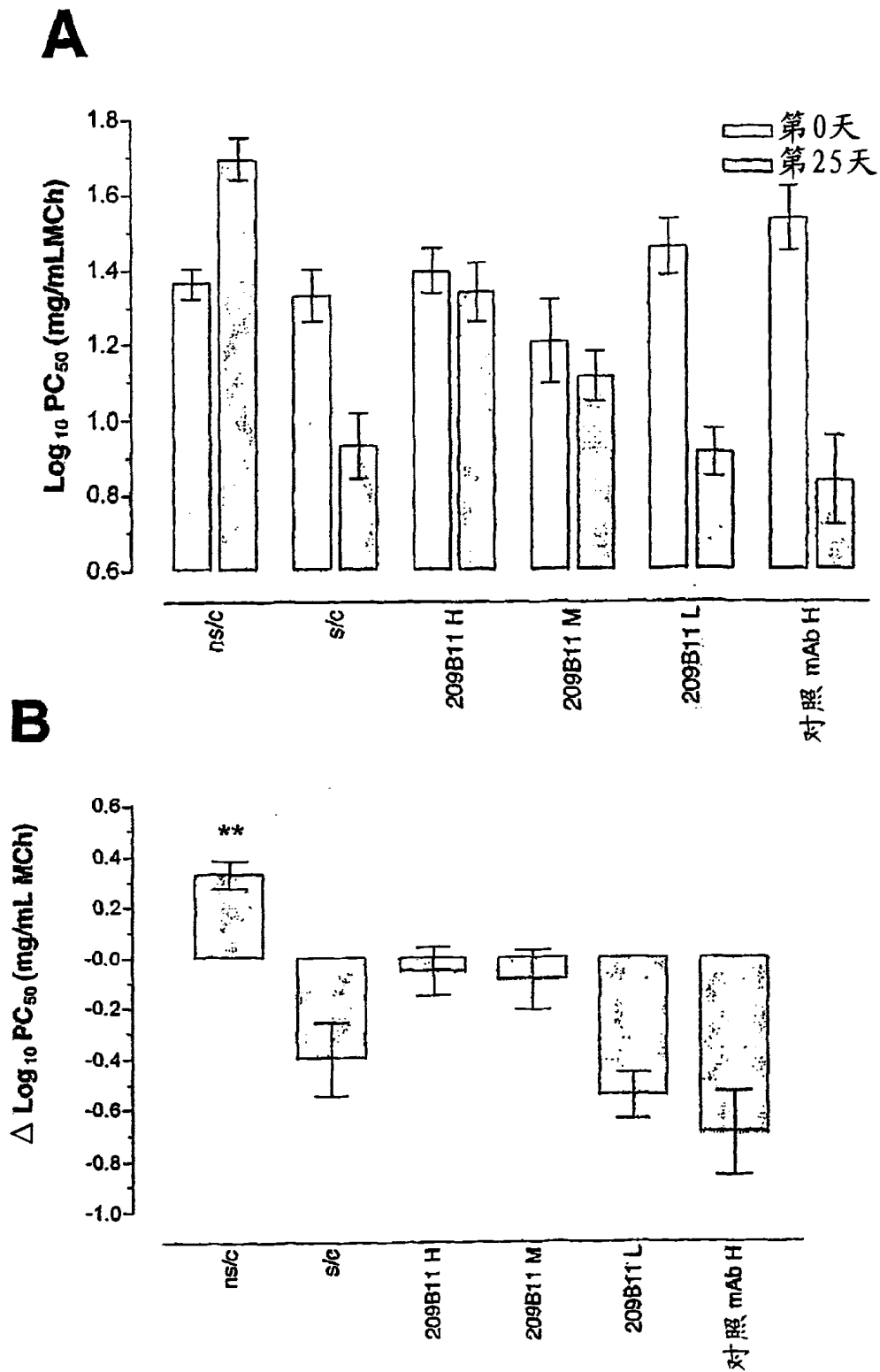


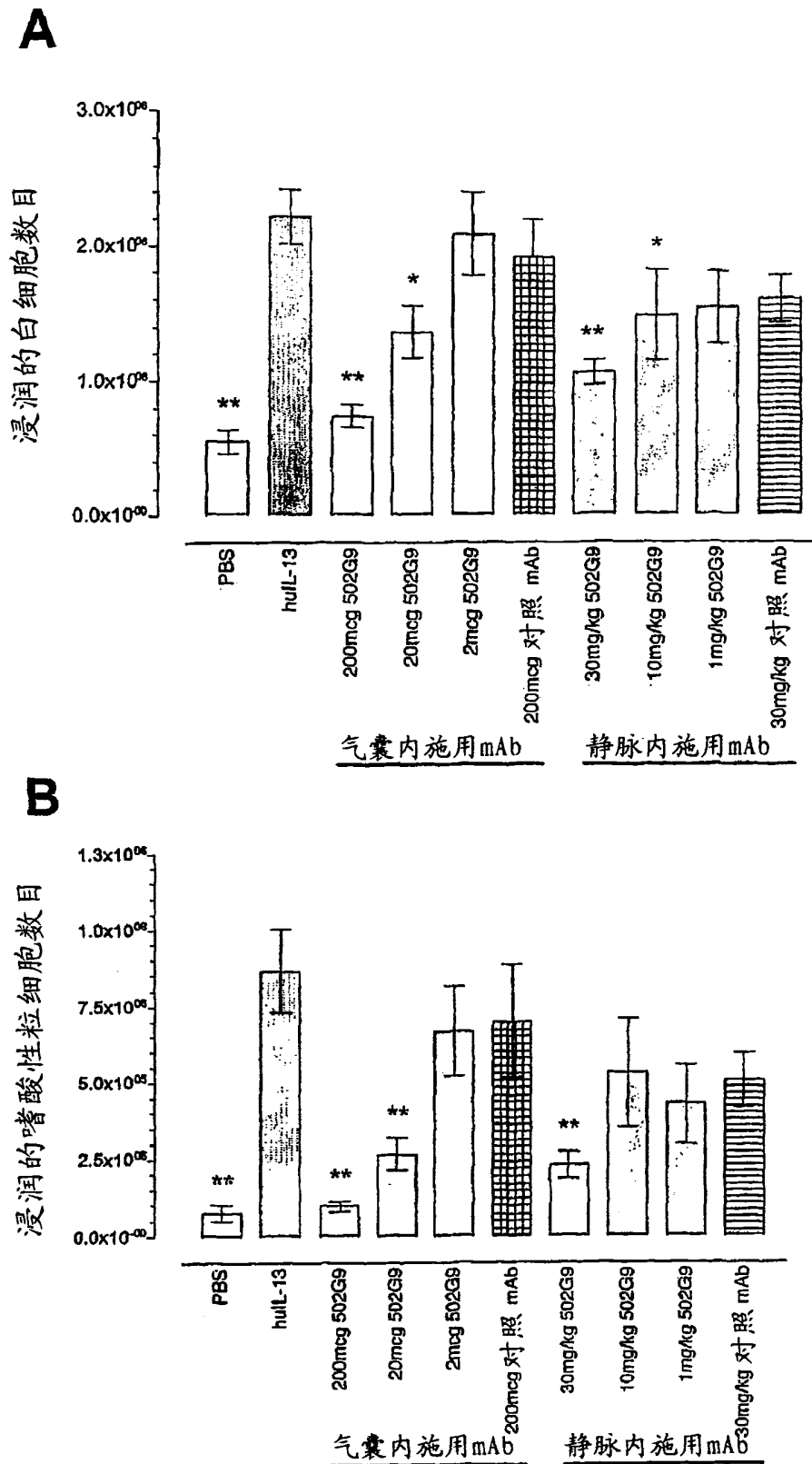
图 20B



\*\* $p < 0.01$  vs s/c对照; 单向ANOVA后进行Dunnett多重比较检验

图 21





A和B; 与huIL-13对照相比的\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; 基于对数转化数据进行单向ANOVA后进行Dunnnett多重比较检验

图 22

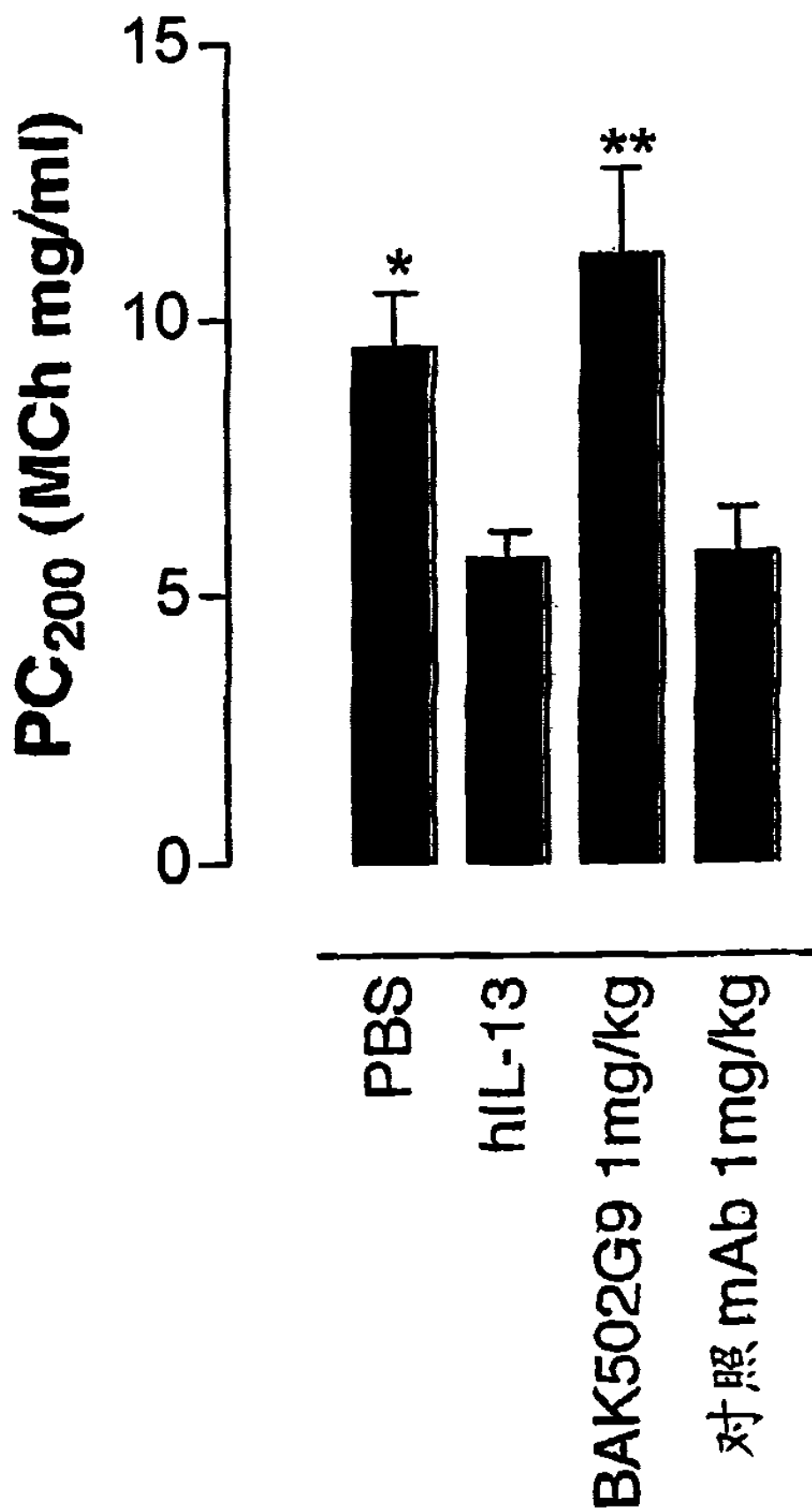


图 23

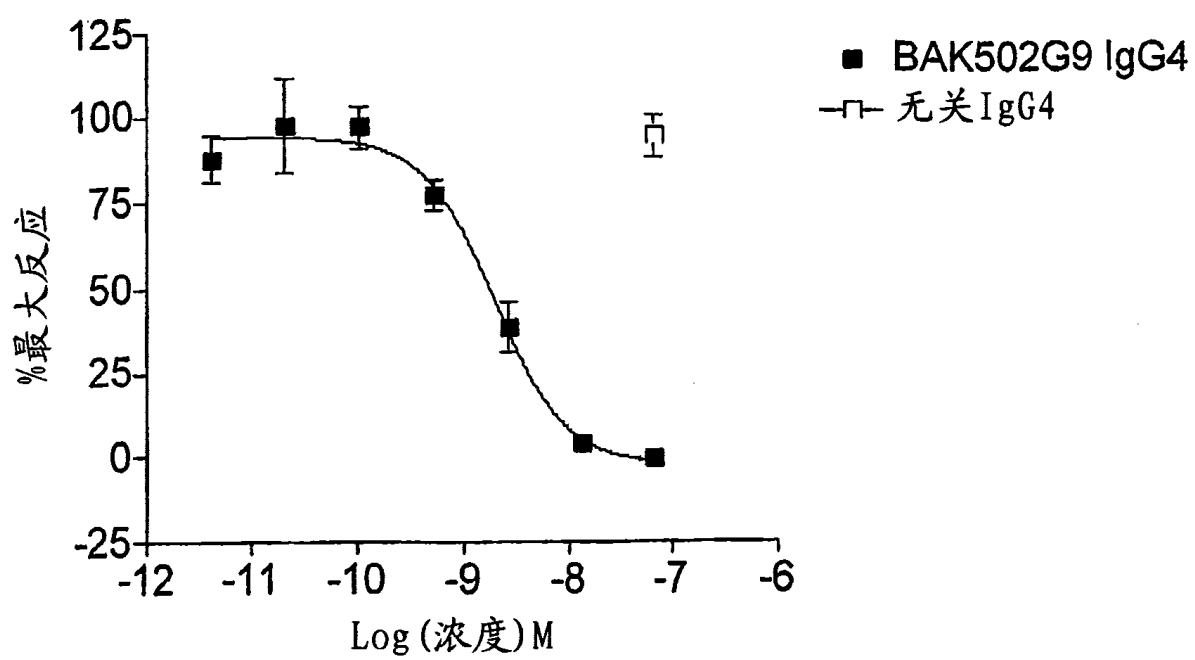


图 24

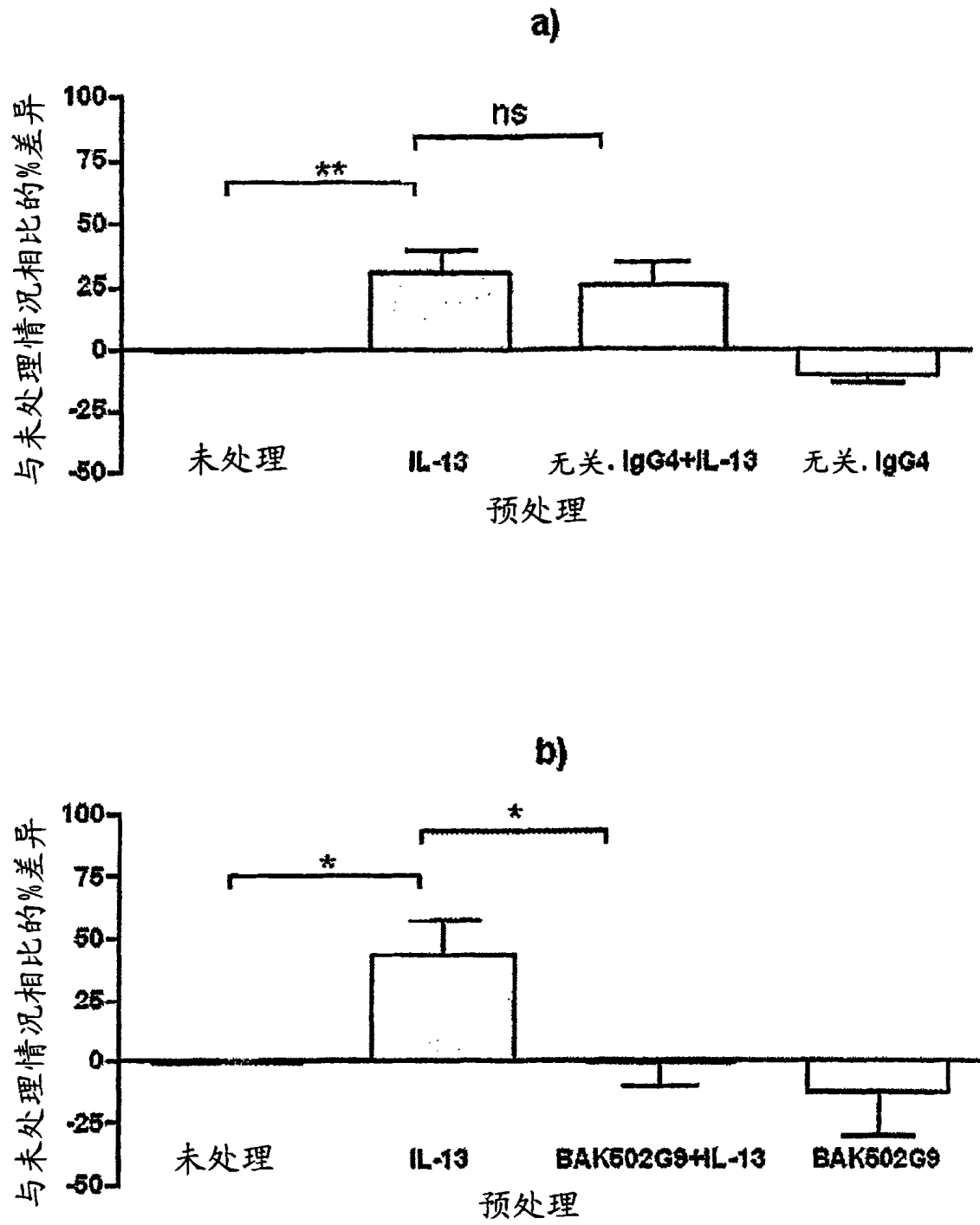


图 25

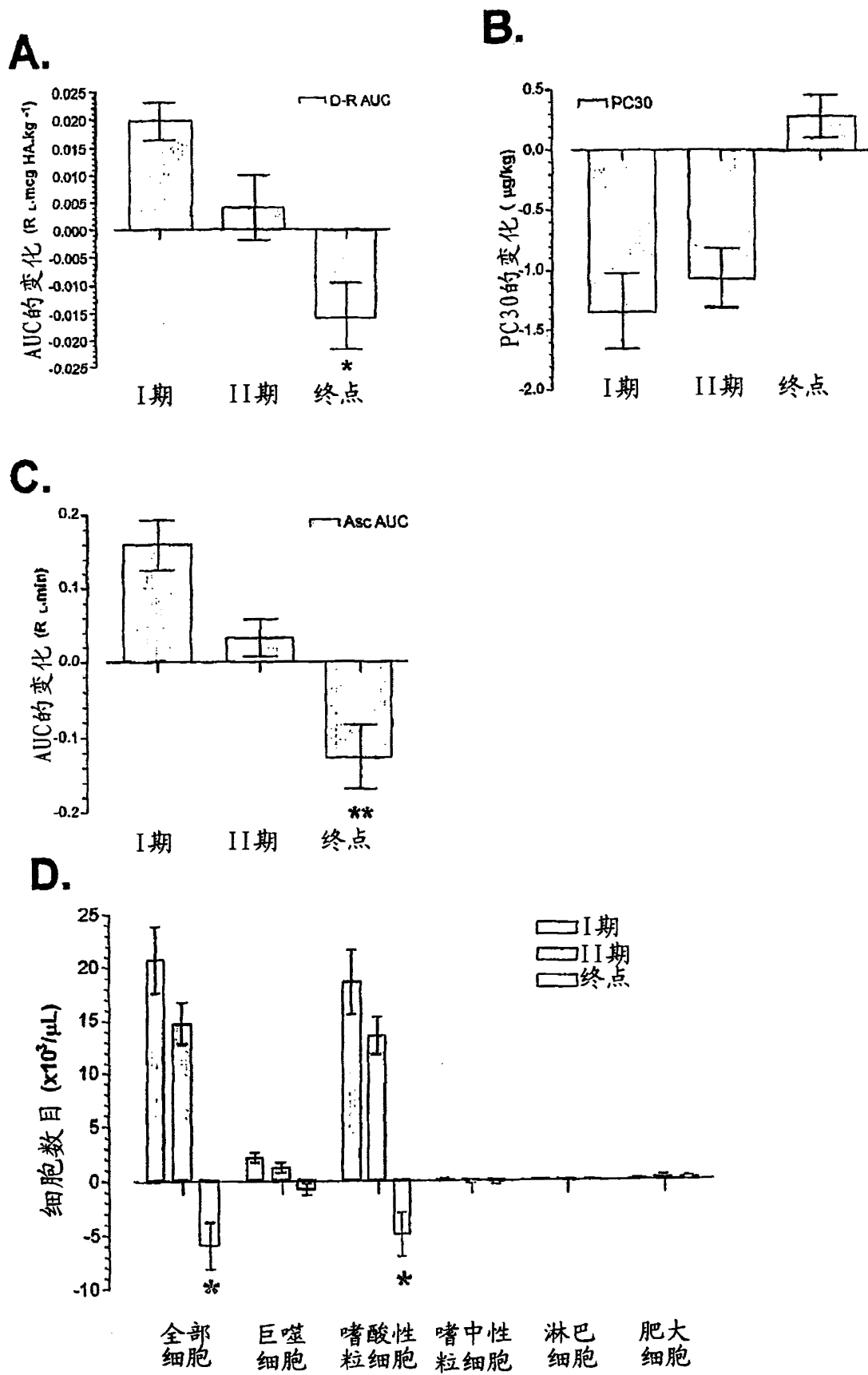


图 26

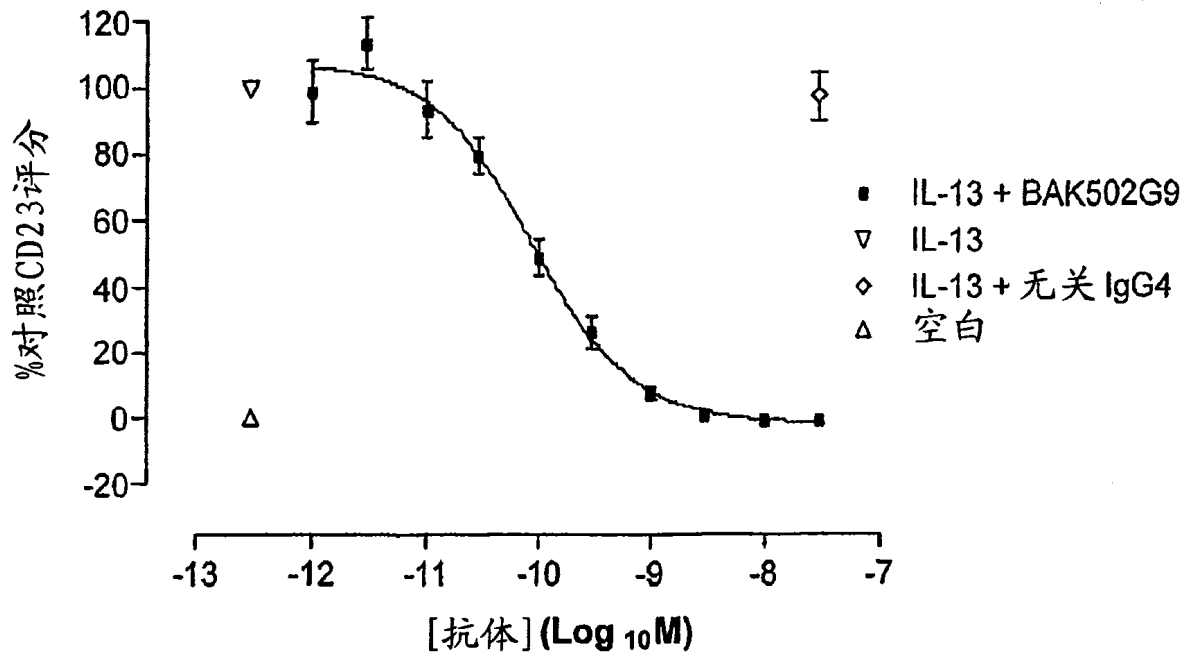


图 27

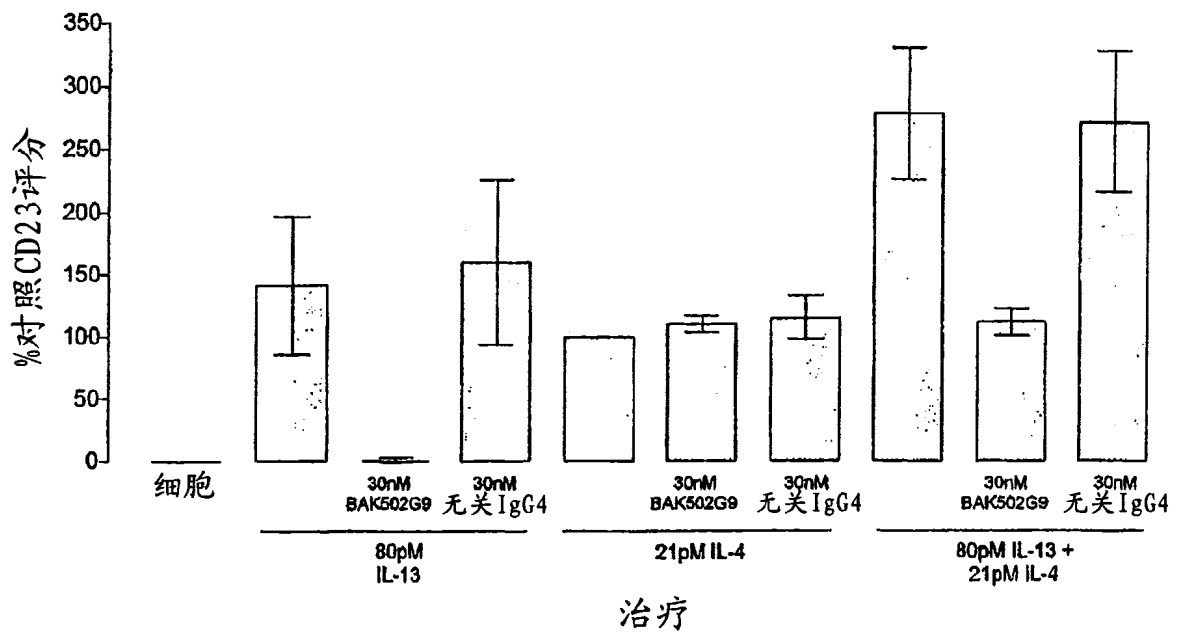


图 28

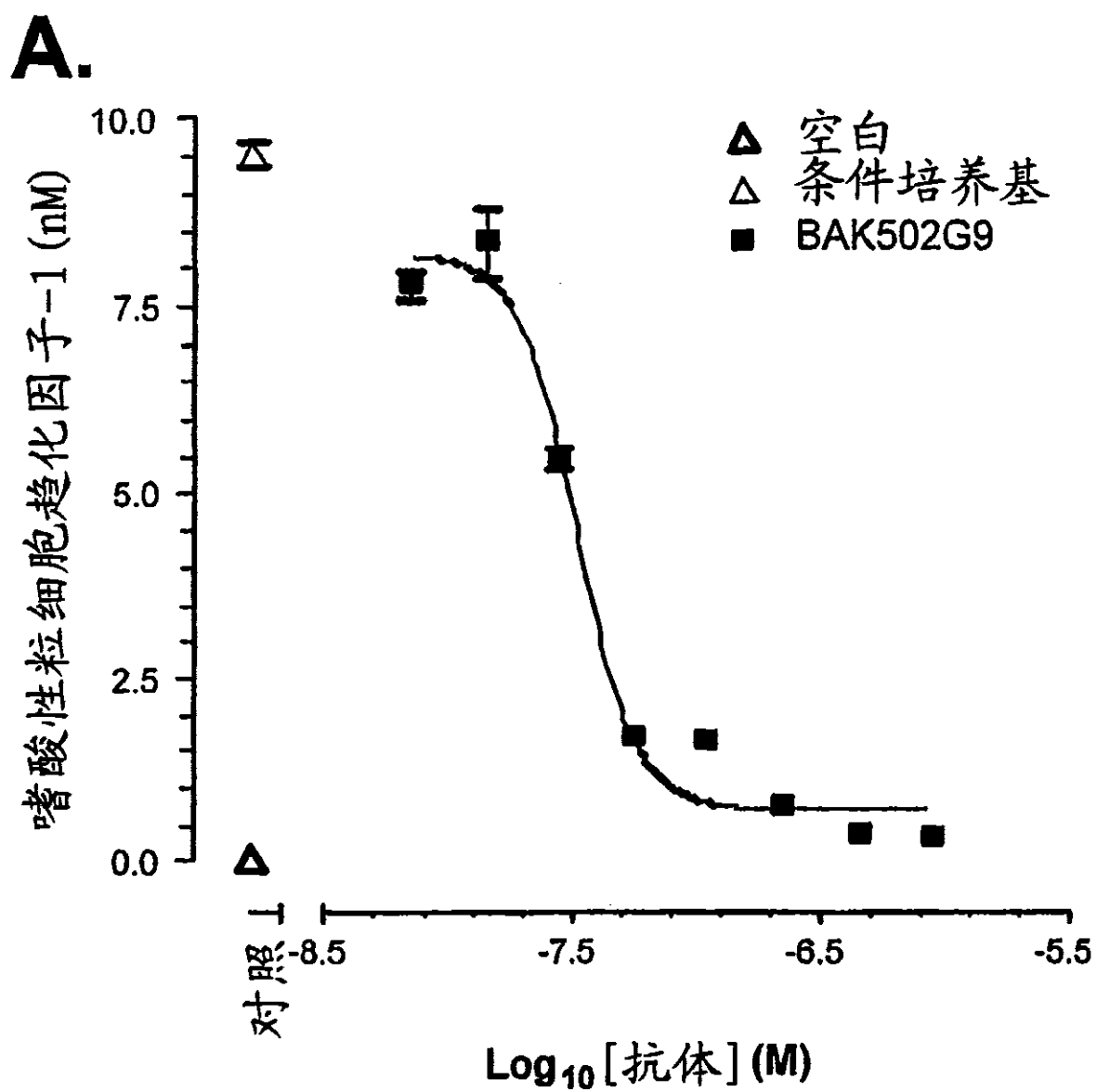


图 29A

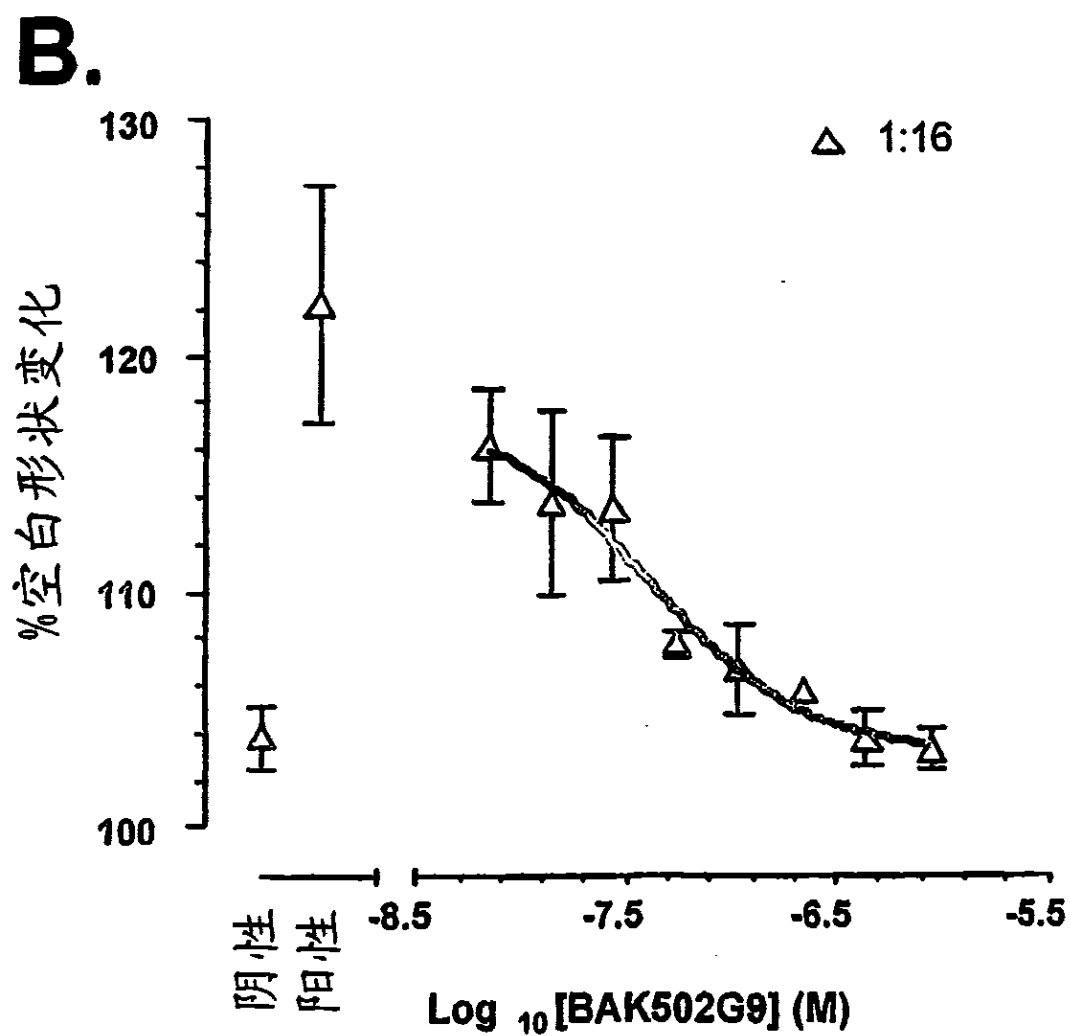


图 29B



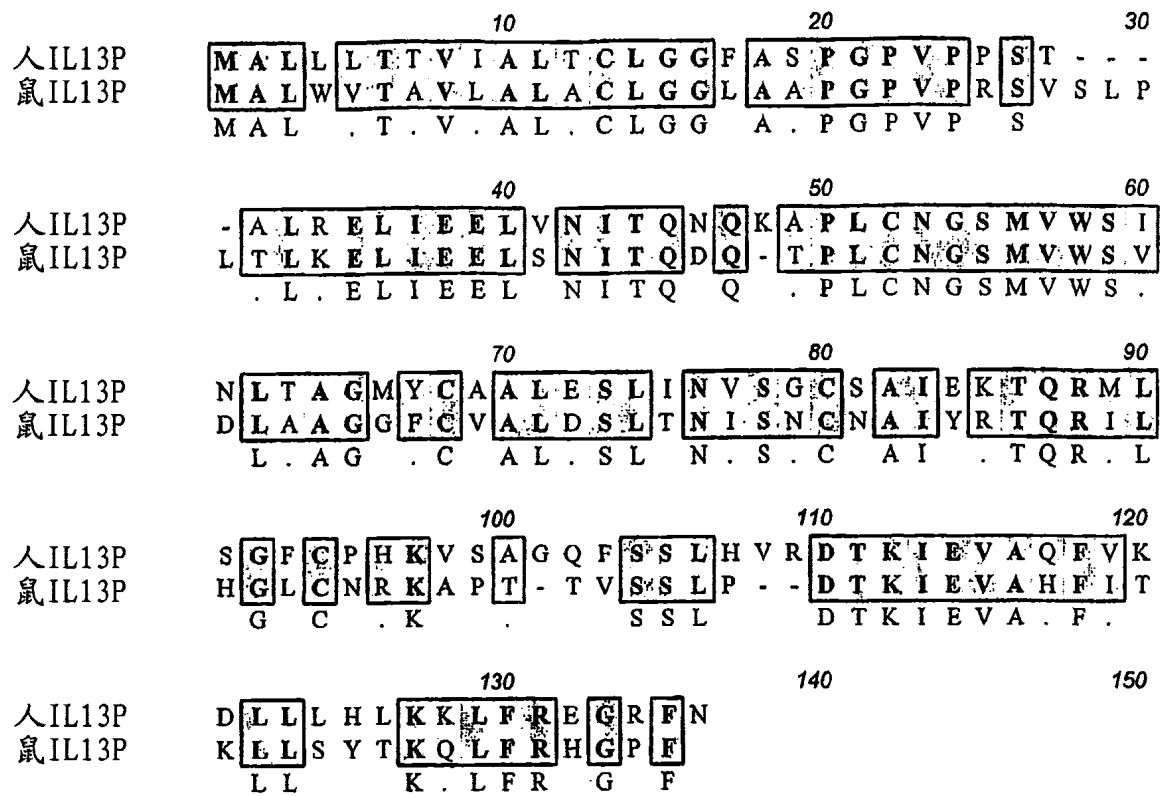


图 30

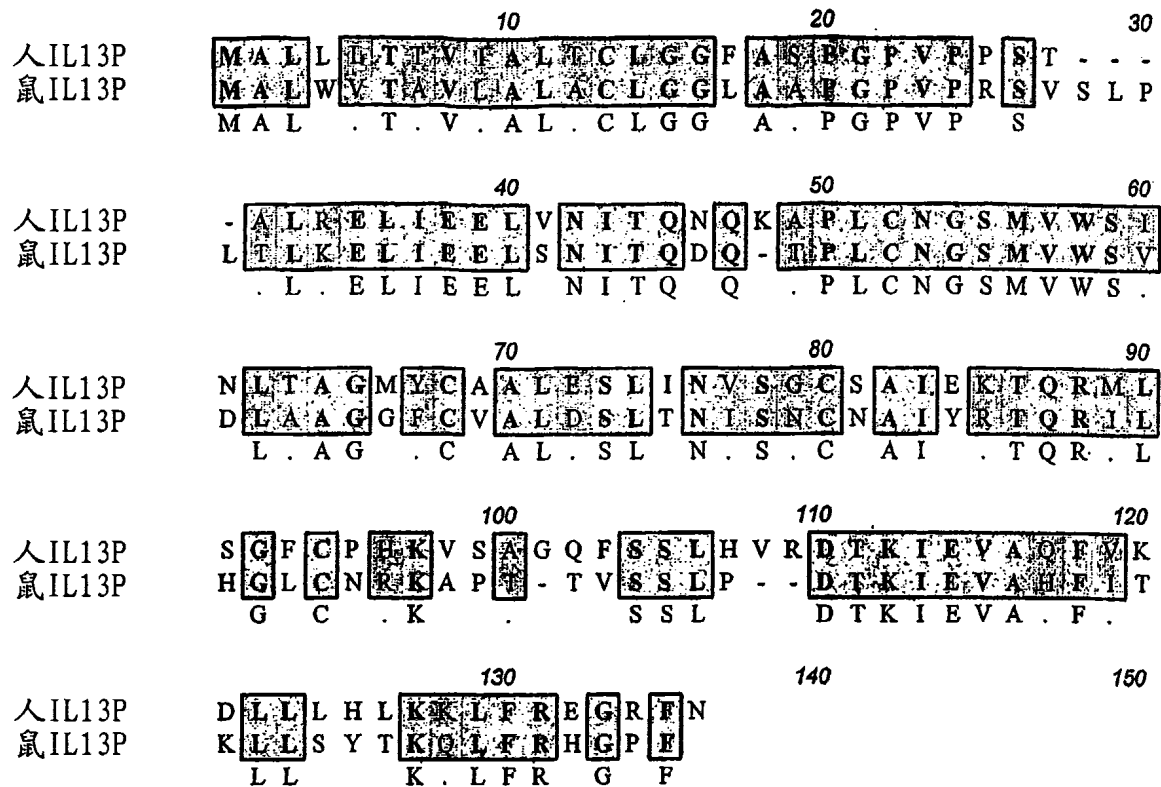


图 31

|                     |                     |                       |                     |                     |
|---------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| 10                  | 20                  | 30                    | 40                  | 50                  |
| M A L L L T T V I A | L T C L G G F A S P | G P V P P S T A L R   | E L I E E L V N I T | Q N O K A P L C N G |
| 60                  | 70                  | 80                    | 90                  | 100                 |
| S M V W S I N I T A | G M Y C A A L E S L | I N V S G C S A I E K | T O R M L S G F C P | H K V S A G Q F S   |
| 110                 | 120                 | 130                   |                     |                     |
| S L H V R D T K I E | V A Q F V K D L L L | H L K K L F R E G R   | F N                 |                     |

图 32

## **Abstract**

Specific binding members, in particular human anti-IL-13 antibody molecules and especially those which neutralise IL-13 activity. Methods for using anti-IL-13 antibody molecules in diagnosis or treatment of IL-13 related disorders, including asthma, atopic dermatitis, allergic rhinitis, fibrosis, inflammatory bowel disease and Hodgkin's lymphoma.