

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2021年11月18日(18.11.2021)



(10) 国际公布号  
**WO 2021/228091 A1**

- (51) 国际专利分类号:  
C07K 16/28 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2021/093066
- (22) 国际申请日: 2021年5月11日(11.05.2021)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
202010397572.3 2020年5月12日(12.05.2020) CN
- (71) 申请人: 正大天晴药业集团股份有限公司 (CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。
- (72) 发明人: 张正平(ZHANG, Zhengping); 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。应树松(YING, Shusong); 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。徐宏江(XU, Hongjiang); 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。杨玲(YANG, Ling); 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。张喜全(ZHANG, Xiquan); 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。

郭峻(GUO, Jun); 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。施伟(SHI, Wei); 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。宋伟(SONG, Wei); 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。周云燕(ZHOU, Yunyan); 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。

(74) 代理人: 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙)(LINDA LIU & PARTNERS); 中国北京市东城区北三环东路36号北京环球贸易中心C座16层, Beijing 100013 (CN)。

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

(54) Title: ST2 ANTIGEN BINDING PROTEIN

(54) 发明名称: ST2抗原结合蛋白

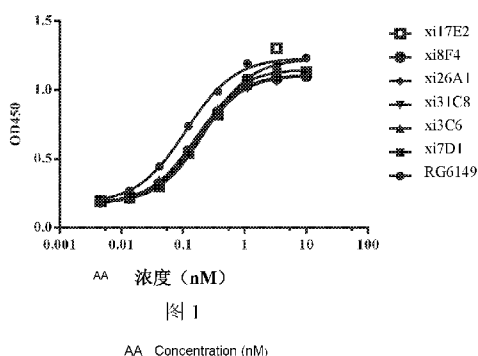


图 1

AA Concentration (nM)

(57) Abstract: Provided is an ST2 antigen binding protein, such as a mouse, human, chimeric or humanized antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds to ST2. Also provided are nucleic acid molecules encoding the above-mentioned antibodies and antigen binding fragments thereof, and an expression vector and host cell for expressing the antibodies or antigen binding fragments thereof. Further provided are methods for preparing and using the antibodies and antigen binding fragments thereof. The methods comprise treating and preventing IL33/ST2-mediated related diseases or conditions.

(57) 摘要: 提供一种ST2抗原结合蛋白, 例如特异性结合ST2的小鼠、人、嵌合或人源化的抗体或其抗原结合片段, 还提供了编码上述抗体及其抗原结合片段的核酸分子, 以及用于表达所述抗体或其抗原结合片段的表达载体和宿主细胞。进一步提供了所述的抗体及其抗原结合片段的制备方法和使用方法, 包括治疗和预防IL33/ST2介导的相关疾病和病症。



WO 2021/228091 A1

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

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

## ST2 抗原结合蛋白

### 相关申请的引用

本公开要求于 2020 年 5 月 12 日提交的中国专利申请 202010397572.3 号的优先权，通过援引加入的方式将其内容整体并入本公开，并用于所有目的。

### 技术领域

本公开涉及一种分离的抗体，具体而言，本公开提供了特异性结合 ST2 的小鼠、嵌合和人源化单克隆抗体或其抗原结合片段，以及用于生产所述抗体或其抗原结合片段的核酸、表达载体、宿主细胞。本公开进一步提供了包含所述抗体或其抗原结合部分的多肽融合物，多特异性分子，病毒载体和药物组合物，以及使用所述抗体或其抗原结合片段的诊断和治疗方法。

### 背景技术

白介素 33 (Interleukin 33, IL33) 是 IL-1 细胞因子家族成员，由组织内皮细胞或上皮细胞表达，当细胞接收到应激、感染及损伤等刺激时，IL33 作为“alarmin”在有损伤的细胞中表达，将外界的抗原刺激信号传递到 Th2 通路。IL33 的受体由两种蛋白质组成：IL-1 受体相关蛋白 (IL-1RL1, ST2) 和 IL-1 受体辅助蛋白 (IL-1RAP)。在 IL-1RAP 的参与下，IL33 与 ST2 的结合才能诱导信号转导，但 IL-1RAP 不能直接与 IL33 或 ST2 结合 (Chackerian et al., (2007)J Immunol. 179:2551-2555)。

ST2 属于 Toll/IL1 受体家族，有三种亚型：跨模型 ST2L，可溶型 sST2 以及突变型 ST2V，其中 ST2L 主要介导 IL33 的细胞内信号响应。ST2L 主要表达于 Th2 型细胞，ILC2 细胞，肥大细胞，Treg 细胞表面，亦可表达在 NK 细胞、NKT 细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞表面。

IL33 与细胞表面的 ST2L 结合，招募 IL-1RAcP，从而激活 MyD88/NF $\kappa$ B 细胞通路，诱导肥大细胞，Th2 细胞，Treg 细胞及 ILC2 等细胞分泌 IL-5, IL-6, IL-13, TNF, INF- $\gamma$  等促炎症因子及 CCL17, CCL22, CXCL8 等趋化因子，诱发炎症反应。IL-33 在粘膜组织炎症、关节炎以及慢性皮肤炎症的疾病中的表达异常升高，如过敏性鼻炎 (Kamekura R et al., (2012)Clin Exp Allergy. 42:218-28)，风湿性关节炎，强直性脊柱炎，特应性皮炎 (Savinko T et al., (2012)J Invest Dermatol. 132:1392-1400)，牛皮癣；且 IL33/ST2 信号途径失调与哮喘，慢性阻塞性肺病(Hacker, Lambers et al., (2009)J Clin Lab Anal. 23:372-9，支气管炎，炎症性肠病 (Beltran CJ et al., (2010)Inflamm Bowel Dis. 16:1097-107)，全身性红斑狼疮，肝纤维化，系统性硬化症等免疫介导的疾病密切相关。基因水平的分析发现，IL33 和 ST2 基因存在一些单核苷酸多态性 (SNP) 位点，它们与嗜碱性粒细胞数目相关，也与特应性皮炎和哮喘类疾病的发生密切相关 (Shimizu M et al., (2005)Hum Mol Genet. 14:2919-27; Gudbjartsson DF et al., (2009)Nat Genet. 41:342-7)。因此，阻断 IL33 与 ST2 的结合，抑制 IL33/ST2 信号通路及其诱发的炎症反应，成为炎症免疫相关疾病治疗的重要方向。

### 发明内容

本公开提供了一种高亲和力、高特异性、高生物活性的 ST2 抗体，适合用于治疗 IL33/ST2 介导的相关疾病。

本公开提供了分离的抗体，例如，与 ST2 结合 (例如，人 ST2 和猴 ST2) 的小鼠、人、嵌合或人源化

的单克隆抗体或其抗原结合片段。

本公开的抗体或其抗原结合片段具有多种用途，包括检测 ST2 蛋白，以及治疗和预防 IL33/ST2 介导的相关疾病和病症，所述 IL33/ST2 介导的相关疾病和病症包括哮喘，过敏性鼻炎，慢性阻塞性肺病，嗜酸粒细胞性支气管炎，嗜酸细胞性食管炎，特应性皮炎，牛皮癣，全身性红斑狼疮，类天疱疮，风湿性关节炎，强直性脊柱炎，炎症性肠病，肺纤维化，肝纤维化，系统性硬化症，结节病，移植抗宿主病（GVHD），糖尿病疾病，心血管疾病，或其组合。

一方面，本公开提供了分离的抗体或其抗原结合片段，其包含重链 CDR，所述重链 CDR 包含重链 CDR1，重链 CDR2 和重链 CDR3，其中，(1) 重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 11 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 15 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列和重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 20 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；(2) 重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 11 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 16 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列和重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 21 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；(3) 重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 12 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 17 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列和重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 22 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；(4) 重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 13 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 18 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列和重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 23 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；(5) 重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 14 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 19 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列和重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 22 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、

92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列；或(6)重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 11 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 18 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列和重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 24 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段与 ST2 结合，其中，SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列为 AIDPETGDTVYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>KFX<sub>3</sub>G，其中，X<sub>1</sub>=N 或 A，X<sub>2</sub>=Q, E 或 K，X<sub>3</sub>=K 或 Q。

在一些具体的实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段与 ST2 结合，其中，SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列为 AIDPETGDTVYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>KFX<sub>3</sub>G，其中，X<sub>1</sub>=N 或 A，X<sub>2</sub>=Q，X<sub>3</sub>=K 或 Q；X<sub>1</sub>=N 或 A，X<sub>2</sub>=E，X<sub>3</sub>=K 或 Q；或 X<sub>1</sub>=N 或 A，X<sub>2</sub>=K，X<sub>3</sub>=K 或 Q。

在一些具体的实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段与 ST2 结合，其中，SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列为 AIDPETGDTVYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>KFX<sub>3</sub>G，其中，X<sub>1</sub>=N，X<sub>2</sub>=Q，X<sub>3</sub>=K 或 Q；X<sub>1</sub>=A，X<sub>2</sub>=Q，X<sub>3</sub>=K 或 Q；X<sub>1</sub>=N，X<sub>2</sub>=E，X<sub>3</sub>=K 或 Q；X<sub>1</sub>=A，X<sub>2</sub>=E，X<sub>3</sub>=K 或 Q；X<sub>1</sub>=N，X<sub>2</sub>=K，X<sub>3</sub>=K 或 Q；或 X<sub>1</sub>=A，X<sub>2</sub>=K，X<sub>3</sub>=K 或 Q。

在一些具体的实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段与 ST2 结合，其中，SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列为 AIDPETGDTVYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>KFX<sub>3</sub>G，其中，X<sub>1</sub>=N，X<sub>2</sub>=Q，X<sub>3</sub>=K；X<sub>1</sub>=A，X<sub>2</sub>=E，X<sub>3</sub>=Q；或 X<sub>1</sub>=A，X<sub>2</sub>=K，X<sub>3</sub>=K。

在一些具体的实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段与 ST2 结合，并且其为单克隆抗体（例如，小鼠，嵌合或人源化抗体）。

在一些实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区，所述重链可变区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NOs: 35, 37, 39, 41, 43, 45, 71 或 73 所示的序列；或与 SEQ ID NOs: 35, 37, 39, 41, 43, 45, 71 或 73 所示的序列相比具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段与 ST2 结合，并且其为单克隆抗体（例如，小鼠，嵌合或人源化抗体）。

在一些具体的实施方案中，SEQ ID NO: 71 所示的氨基酸可以由 SEQ ID NO: 72 所示的核酸编码，SEQ ID NO: 73 所示的氨基酸可以由 SEQ ID NO: 74 所示的核酸编码。

在一些实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段包含轻链 CDR，所述轻链 CDR 包含轻链 CDR1，轻链 CDR2 和轻链 CDR3，其中，(1) 轻链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 25 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，轻链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 29 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列和轻链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 32 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列；(2) 轻链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 26 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、

82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，轻链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 30 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列和轻链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 34 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列；(3) 轻链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 27 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，轻链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 30 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列和轻链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 34 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列；或(4) 轻链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 28 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，轻链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 31 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列和轻链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 33 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段与 ST2 结合，其中 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列为 QX<sub>4</sub>SNLAS，X<sub>4</sub>=M 或 L。

在一些具体的实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段与 ST2 结合，并且其为单克隆抗体（例如，小鼠，嵌合或人源化抗体）。

在一些实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区，所述轻链可变区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NOs: 36, 38, 40, 42, 44, 46 或 79 所示的序列；或与如 SEQ ID NOs: 36, 38, 40, 42, 44, 46 或 79 所示的序列具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段与 ST2 结合，并且其为单克隆抗体（例如，小鼠，嵌合或人源化抗体）。

在一些具体的实施方案中，SEQ ID NO: 79 所示的氨基酸可以由 SEQ ID NO: 80 所示的核酸编码。

在一些实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段包含重链 CDR1，重链 CDR2 和重链 CDR3 以及轻链 CDR1，轻链 CDR2 和轻链 CDR3，其中，(1) 重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 11 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 15 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 20 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，轻链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 25 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、



92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列；(5) 重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 14 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 19 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 22 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，轻链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 27 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，轻链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 30 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列和轻链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 34 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列；或(6) 重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 11 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 18 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 24 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，轻链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 28 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，轻链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 31 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列和轻链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 33 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段与 ST2 结合；其中，SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列为 AIDPETGDTVYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>KFX<sub>3</sub>G，X<sub>1</sub>=N 或 A，X<sub>2</sub>=Q、E 或 K，X<sub>3</sub>=K 或 Q；并且，SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列为 QX<sub>4</sub>SNLAS，X<sub>4</sub>=M 或 L。

在一些具体的实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段与 ST2 结合；其中，SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列为 AIDPETGDTVYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>KFX<sub>3</sub>G，X<sub>1</sub>=N 或 A，X<sub>2</sub>=Q，X<sub>3</sub>=K 或 Q；X<sub>1</sub>=N 或 A，X<sub>2</sub>=E，X<sub>3</sub>=K 或 Q；X<sub>1</sub>=N 或 A，X<sub>2</sub>=K，X<sub>3</sub>=K 或 Q；并且，SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列为 QX<sub>4</sub>SNLAS，X<sub>4</sub>=M 或 L。

在一些具体的实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段与 ST2 结合；其中，SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列为 AIDPETGDTVYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>KFX<sub>3</sub>G，X<sub>1</sub>=N，X<sub>2</sub>=Q，X<sub>3</sub>=K 或 Q；X<sub>1</sub>=A，X<sub>2</sub>=Q，X<sub>3</sub>=K 或 Q；X<sub>1</sub>=N，X<sub>2</sub>=E，X<sub>3</sub>=K 或 Q；X<sub>1</sub>=A，X<sub>2</sub>=E，X<sub>3</sub>=K 或 Q；X<sub>1</sub>=N，X<sub>2</sub>=K，X<sub>3</sub>=K 或 Q；或 X<sub>1</sub>=A，X<sub>2</sub>=K，X<sub>3</sub>=K 或 Q；并且，SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列为 QX<sub>4</sub>SNLAS，X<sub>4</sub>=M 或 L。

在一些具体的实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段与 ST2 结合；其中，SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列为 AIDPETGDTVYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>KFX<sub>3</sub>G，X<sub>1</sub>=N，X<sub>2</sub>=Q，X<sub>3</sub>=K；X<sub>1</sub>=A，X<sub>2</sub>=E，X<sub>3</sub>=Q；或 X<sub>1</sub>=A，X<sub>2</sub>=K，X<sub>3</sub>=K；并且，SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列为 QX<sub>4</sub>SNLAS，X<sub>4</sub>=M 或 L。

在一些具体的实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段与 ST2 结合，并且其为单克隆抗体（例

如，小鼠，嵌合或人源化抗体)。

在一些实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中，(1) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 35 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 36 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；(2) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 37 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 38 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；(3) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 39 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 40 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；(4) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 41 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 42 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；(5) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 43 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 44 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；(6) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 45 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 46 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；(7) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 71 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 79 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；或(8) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 73 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 79 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段与 ST2 结合，并且其为单克隆抗体（例

如，小鼠，嵌合或人源化抗体)。

在一些实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段包含重链，所述重链的氨基酸序列包含如 SEQ ID NOs: 47, 51, 55, 59, 63, 67, 75 或 77 所示的序列；或与 SEQ ID NOs: 47, 51, 55, 59, 63, 67, 75 或 77 所示的序列相比具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段与 ST2 结合，并且其为单克隆抗体（例如，小鼠，嵌合或人源化抗体）。

在一些具体的实施方案中，前述 SEQ ID NOs: 47, 51, 55, 59, 63, 67, 75 和 77 所示的氨基酸分别可以由 SEQ ID NOs: 48, 52, 56, 60, 64, 68, 76 和 78 所示的核酸编码。

在一些实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段包含轻链，所述轻链的氨基酸序列包含如 SEQ ID NOs: 49, 53, 57, 61, 65, 69 或 81 所示的序列；或与如 SEQ ID NOs: 49, 53, 57, 61, 65, 69 或 81 所示的序列相比具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段与 ST2 结合，并且其为单克隆抗体（例如，小鼠，嵌合或人源化抗体）。

在一些具体的实施方案中，前述 SEQ ID NOs: 49, 53, 57, 61, 65, 69 和 81 所示的氨基酸分别可以由 SEQ ID NOs: 50, 54, 58, 62, 66, 70 和 82 所示的核酸编码。

在一些实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链，其中，(1) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 47 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，和所述轻链包含如 SEQ ID NO: 49 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；(2) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 51 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，和所述轻链包含如 SEQ ID NO: 53 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；(3) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 55 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，和所述轻链包含如 SEQ ID NO: 57 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；(4) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 59 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，和所述轻链包含如 SEQ ID NO: 61 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；(5) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 63 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，和所述轻链包含如 SEQ ID NO: 65 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列；(6) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 67 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，和所述轻链包含如 SEQ ID NO: 69 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；(7) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 75 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，和所述轻链包含如 SEQ ID NO: 81 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；或(8) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 77 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，和所述轻链包含如 SEQ ID NO: 81 所示的序列或与其具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，所述分离的抗体或其抗原结合片段与 ST2 结合，并且其为单克隆抗体（例如，小鼠，嵌合或人源化抗体）。

在一些实施方案中，所述分离的抗体（例如，小鼠，嵌合或人源化抗体）或其抗原结合片段包含重链和轻链，所述重链包含重链可变区和重链恒定区，所述轻链包含轻链可变区和轻链恒定区，其中，重链可变区和轻链可变区包含上述氨基酸序列，重链恒定区具有人 IgG1，IgG2 或 IgG4 恒定区，优选人 IgG2 恒定区；轻链恒定区具有人  $\kappa$  恒定区或  $\lambda$  恒定区，其中该抗体或抗原结合片段其与 ST2 结合。

在一些实施方案中，本公开的抗体包含两条重链和两条轻链，或由两条重链和两条轻链组成，重链和轻链通过二硫键相互连接，其中每个重链包含上述重链恒定区，重链可变区或 CDR 序列，每条轻链包含上述轻链恒定区，轻链可变区或 CDR 序列，其中重链可变区的 C-末端连接至重链恒定区的 N-末端，轻链可变区的 C-末端连接至轻链恒定区的 N-末端。本公开的抗体可以是例如 IgG1，IgG2 或 IgG4 同种型的全长抗体。在另一个实施方案中，本公开的抗体可以是单链抗体（scFv），或抗体片段，例如 Fab，F(ab')<sub>2</sub> 片段，Fd 片段、Fv 片段、dAb 或分离的 CDR 区。

一方面，本公开还提供多肽融合物，其包含本公开的抗体或其抗原结合片段以及其他功能分子，所述其他功能分子可以是肽或蛋白质或非蛋白质，所述多肽融合物具有结合 ST2 的功能以及一种或多种其他功能。一方面，本公开还提供了多特异性分子，其包含本公开的抗体或其抗原结合片段以及至少一个不同于所述抗体或抗原结合片段特异性的其他功能部分，所述其他功能部分可以是另一种肽或蛋白质，所述多特异性分子可以结合 ST2 和至少一种其他疾病相关蛋白，例如 IgE。在另一方面，本公开的 ST2 抗体或其抗原结合片段还可以由病毒载体编码或由病毒载体承载。

一方面，本公开还提供了药物组合物，其包含本公开的抗体或其抗原结合片段，或包含本公开的多特异性分子，多肽融合物，或病毒载体，以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

一方面，本公开还提供了编码本公开的抗体或其抗原结合片段的分离的核酸分子，包含所述核酸分子的表达载体，以及包含所述表达载体的宿主细胞。

一方面，本公开还提供了一种制备 ST2 抗体或其抗原结合片段的方法，其包括以下步骤：(i) 在宿主细胞中表达抗体或其抗原结合片段，和 (ii) 从宿主细胞或其细胞培养物中分离抗体或其抗原结合片段。

另一方面，本公开提供了一种检测受试者样品中 ST2 表达量的方法，该方法包括在允许本公开的抗体或其抗原结合片段和 ST2 结合的条件下（或与 ST2 形成复合物的条件下），使所述样品与抗体或其抗原结合片段接触的步骤。

另一方面，本公开提供了一种在有需要的受试者中治疗或减缓 IL33/ST2 介导的相关疾病和病症的方法，所述 IL33/ST2 介导的相关疾病和病症包括但不限于：哮喘，过敏性鼻炎，慢性阻塞性肺病，嗜酸粒细胞性支气管炎，嗜酸细胞性食道炎，特应性皮炎，牛皮癣，全身性红斑狼疮，类天疱疮，风湿性关节炎，强直性脊柱炎，炎症性肠病，肺纤维化，肝纤维化，系统性硬化症，结节病，移植抗宿主病（GVHD），糖尿病疾病，心血管疾病，或其组合，其包括向所述受试者施用治疗有效量的本公开抗体或其抗原结合片段，或其药物组合物。在一些实施方案中，该方法包括向所述受试者施用治疗有效量的编码本公开的抗体或其抗原结合片段的核酸分子。在一些实施方案中，该方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本公开的多肽融合物，多特异性分子，病毒载体，或其药物组合物。在一些实施方案中，所述多特异性分子可以结合 ST2 和至少另一种疾病相关蛋白，例如 TSLP，IgE，IL4，IL13 或 IL-5。在一些实施方案中，至少一种其他抗体可以与本公开的抗体或其抗原结合片段一起施用，例如 TSLP 抗体，TSLPR 抗体，IL4 抗体，IL4R 抗体，IgE 抗体。在一些实施方案中，至少一种另外的药物可以与本公开的抗体或其抗原结合片段一起施用，例如抗哮喘药，抗慢性阻塞性肺病药，抗溃疡性结肠炎药，抗异位性皮炎药，或抗牛皮癣药物。

基于以下具体描述和实施例，本公开的其他特征和优势之处将会更加明晰，具体描述和实施例不应解读为限制性的。在本公开中引用的所有文献、Genbank 记录、专利和已公开专利申请的内容通过引用的方式明确地包含在本公开中。

## 附图说明

图 1: 通过 ELISA 检测在一定浓度范围内嵌合抗 ST2 抗体与 hST2 的结合。图 1 示出嵌合抗体 xi17E2, xi8F4, xi26A1, xi31C8, xi3C6, xi7D1 与 hST2 的结合，RG6149 的结合作为对照示出。

图 2: 通过 ELISA 检测在一定浓度范围内嵌合抗 ST2 抗体与 cyno-ST2 的结合。图 2 示出嵌合抗体 xi17E2, xi8F4, xi26A1, xi31C8, xi3C6, xi7D1 与 cyno-ST2 的结合，RG6149 的结合作为对照示出。

图 3: 通过 ELISA 检测在一定抗体浓度范围内嵌合抗 ST2 抗体对 IL33/ST2 结合的阻断作用。图 3 示出嵌合抗体 xi26A1, xi7D1, xi17E2, xi31C8, xi3C6, xi8F4 对 IL33/ST2 结合的阻断，RG6149 的阻断作为对照示出。

图 4: 通过 ELISA 检测在一定浓度范围内人源化抗 ST2 抗体与 hST2 的结合。图 4 示出人源化抗体 hz31C8-1.1 和 hz31C8-1.2 与 hST2 的结合，嵌合抗体 xi31C8, RG6149 和 GSK3772847 的结合作为对照示出，IgG2 的结合作为阴性对照示出。

图 5: 通过 ELISA 检测在一定浓度范围内人源化抗 ST2 抗体与 cyno-ST2 的结合。图 5 示出人源化抗体 hz31C8-1.1 和 hz31C8-1.2 与 cyno-ST2 的结合，嵌合抗体 xi31C8, RG6149 和 GSK3772847 的结合作为对照示出，IgG2 的结合作为阴性对照示出。

图 6: 通过 ELISA 检测在一定抗体浓度范围内人源化抗 ST2 抗体对 IL33/ST2 结合的阻断作用。图 6 示出人源化抗体 hz31C8-1.1 和 hz31C8-1.2 对 IL33/ST2 结合的阻断，嵌合抗体 xi31C8, RG6149 和 GSK3772847 的阻断作为对照示出。

图 7: 通过 FACS 检测在一定抗体浓度范围内嵌合抗 ST2 抗体对过表达 hST2 细胞的结合作用。图 7

示出嵌合抗体 xi31C8, xi26A1, xi7D1, xi3C6, xi8F4, xi17E2 与过表达 hST2 的 HEK293T-hST2-NFκB-Luciferase 细胞的结合, RG6149 的结合作为对照示出, IgG4 的结合作为阴性对照示出。

图 8: 通过 FACS 检测在一定抗体浓度范围内嵌合抗 ST2 抗体对过表达 cyno-ST2 细胞的结合作用。图 8 示出嵌合抗体 xi31C8, xi26A1, xi7D1, xi3C6, xi8F4, xi17E2 与过表达 cyno-ST2 的 HEK293T-Cyno-ST2-NFκB-Luciferase 细胞的结合, RG6149 的结合作为对照示出, IgG4 的结合作为阴性对照示出。

图 9: 通过细胞活性检测在一定抗体浓度范围内嵌合抗 ST2 抗体对 IL33/ST2 结合的阻断作用。图 9 示出嵌合抗体 xi31C8, xi26A1, xi7D1, xi3C6 阻断 IL33 蛋白与表达 hST2 的 HEK293T-hST2-NFκB-Luciferase 细胞的相互作用, RG6149 的阻断作为对照示出。

图 10: 通过 FACS 检测在一定抗体浓度范围内人源化抗 ST2 抗体对过表达 hST2 细胞的结合作用。图 10 示出人源化抗体 hz31C8-1.1 和 hz31C8-1.2 与过表达 hST2 的 HEK293T-hST2-NFκB-Luciferase 细胞的结合, 嵌合抗体 xi31C8, RG6149 和 GSK3772847 的结合作为对照示出, IgG2 的结合作为阴性对照示出。

图 11: 通过细胞活性检测在一定抗体浓度范围内人源化抗 ST2 抗体对 IL33/ST2 结合的阻断作用。图 11 示出人源化抗体 hz31C8-1.1 和 hz31C8-1.2 阻断 IL33 蛋白与表达 hST2 的 HEK293T-hST2-NFκB-Luciferase 细胞的相互作用, 嵌合抗体 xi31C8, RG6149 和 GSK3772847 的阻断作为对照示出, IgG2 的阻断作为阴性对照示出。

图 12: 通过细胞活性检测在一定抗体浓度范围内人源化抗 ST2 抗体对 IL33/ST2 结合的阻断作用。图 12 示出人源化抗体 hz31C8-1.1 和 hz31C8-1.2 阻断 IL33 蛋白与表达 hST2 的 KU812-NFκB-Luciferase 细胞的相互作用, 嵌合抗体 xi31C8, RG6149 和 GSK3772847 的阻断作为对照示出, IgG2 的阻断作为阴性对照示出。

图 13: 通过细胞活性检测在一定抗体浓度范围内人源化抗 ST2 抗体在 CD4<sup>+</sup> T 细胞上阻断经 IL33/ST2 诱导的 IL5 分泌作用。图 13 示出人源化抗体 hz31C8-1.1 和 hz31C8-1.2 在 CD4<sup>+</sup> T 细胞上阻断经 IL33/ST2 诱导的 IL5 分泌, 嵌合抗体 xi31C8, RG6149 和 GSK3772847 的阻断作为对照示出。

## 发明详述

应当理解, 本公开所用的术语只是为了描述具体实施例, 并非旨在进行限制。除非另有定义, 否则本公开使用的所有技术和科学术语的含义与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同。

“ST2”包括 ST2 变体, 同源物, 直系同源物和旁系同源物。例如, 在一些实施例中, 对人 ST2 蛋白特异的抗体可以在某些情况下与另一物种(例如猴)的 ST2 蛋白交叉反应。在另一些实施方案中, 对人 ST2 蛋白特异的抗体可以完全地对人 ST2 蛋白特异而不与其他物种或其他类型的蛋白交叉反应, 或者仅与某些其他物种而非所有其他物种的 ST2 蛋白交叉反应。

术语“人 ST2”或“hST2”等在本公开中可以互换, 是指具有人 ST2 氨基酸序列的蛋白, 例如 SEQ ID NO: 1 所示的人 ST2 氨基酸序列, 所述蛋白质由若干结构域组成: 氨基酸 1-18 对应于前导序列, 氨基酸 19-331 对应于细胞外结构域, 氨基酸 332-350 对应于跨膜结构域, 氨基酸 351-556 对应于细胞内结构域。术语“猴 ST2”或“cyno-ST2”等在本公开中可以互换, 是指具有猴 ST2 氨基酸序列的蛋白, 例如 SEQ ID NO: 10 所示的猴 ST2 氨基酸序列。

本公开的“抗体”包括全长抗体及其任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链。全长抗体是包含

两条重（H）链和两条轻（L）链的糖蛋白，重链和轻链通过二硫键连接。每条重链由重链可变区（VH）和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域组成，即 CH1，CH2 和 CH3。每条轻链由轻链可变区（VL）和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。VH 和 VL 区还可以划分为高变区，即互补决定区（CDR），和序列较为保守的骨架区（FR）。每个 VH 和 VL 由三个 CDR 和四个 FR 组成，从氨基端到羧基端分别为：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合，所述宿主组织或因子包括免疫系统的多种细胞（例如，效应细胞）和经典补系统的第一成分（C1q）。

抗体的“抗原结合片段”或“抗体结合部分”是指抗体的一个或多个片段，其保留特异性结合抗原（例如，ST2 蛋白）的功能。已证实，抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段来实施。涵盖在术语抗体的“抗原结合部分/片段”中的实例包括：(i) Fab 片段：由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段；(ii) F(ab')<sub>2</sub> 片段，包含在铰链区二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段；(iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；(iv) 由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段；(v) 由 VH 结构域组成的 dAb 片段（参见 Ward et al., *Nature*. 341:544-546(1989)）；(vi) 分离的互补决定区（CDR）；以及(vii) 纳米抗体，一种包含单可变结构域和两个恒定结构域的重链可变区。此外，尽管 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由不同基因编码，但可以采用重组的方法通过合成接头将 VH 和 VL 连接成单蛋白链，其中 VL 和 VH 配对形成单价分子（称单链 Fv（scFv）；参见例如 Bird et al., *Science*. 242:423-426(1988)；Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-5883(1988)）。这些单链抗体也涵盖在术语抗原结合部分/片段中。这些抗体片段可以由本领域技术人员已知的常规技术获得，且片段可以通过与全长抗体相同的方法进行功能筛选。

“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体（例如，与 ST2 蛋白特异性结合的分离的抗体基本上不含特异性结合 ST2 蛋白以外抗原的抗体）。但是，特异性结合人 ST2 蛋白的分离抗体可能与其他抗原（例如，来自其他物种的 ST2 蛋白）具有交叉结合性。此外，分离的抗体基本上不含其他细胞成分和/或化学物质。

“小鼠抗体”或“鼠源抗体”是指可变区中骨架区和 CDR 区均来自小鼠种系免疫球蛋白序列的抗体。此外，如果抗体包含恒定区，则恒定区也来自小鼠种系免疫球蛋白序列。本公开的小鼠抗体可以包括不由小鼠种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如，通过体外随机突变或点突变或通过体内体细胞突变引入的突变），但“小鼠抗体”不包括在小鼠骨架序列中插入得自其他哺乳动物种系的 CDR 序列的抗体。

“嵌合抗体”是指通过将来自非人来源的遗传物质和来自人的遗传物质组合而成的抗体。或更笼统地说，嵌合抗体是指具有来自一种物种的遗传物质和来自另一物种的遗传物质的抗体。在本公开中，嵌合抗体也被表示为“Xi”。

“人源化抗体”是指来自非人物种但其蛋白质序列已被修改以增加其与人天然产生的抗体相似度的抗体。在本公开中，人源化抗体也被表示为“hz”。

“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别（例如，IgM 或 IgG1）。

“识别抗原的抗体”和“对抗原特异的抗体”在本公开中与术语“与抗原特异性结合的抗体”可互换使用。

“特异性结合人 ST2”的抗体是指与人 ST2 蛋白（还可能是其他非人物种的 ST2 蛋白）结合但基本上不结合非 ST2 蛋白的抗体。优选地，抗体以“高亲和力”结合人 ST2，即 KD 为  $5.0 \times 10^{-8}$  M 或更小， $1.0 \times 10^{-8}$  M 或更小，优选为  $5.0 \times 10^{-9}$  M 或更小， $1.0 \times 10^{-9}$  M 或更小，更优选为  $5.0 \times 10^{-10}$  M 或更小， $1.0 \times 10^{-10}$  M 或更小。

术语“基本上不结合”蛋白质或细胞是指不与蛋白质或细胞结合，或不以高亲和力与其结合，即结合蛋

白质或细胞的 KD 为  $1.0 \times 10^{-6}$  M 或更高, 优选为  $1.0 \times 10^{-5}$  M 或更高,  $1.0 \times 10^{-4}$  M 或更高, 更优选为  $1.0 \times 10^{-3}$  M 或更高,  $1.0 \times 10^{-2}$  M 或更高。

术语“高亲和力”对 IgG 而言, 是指 KD 为  $1.0 \times 10^{-6}$  M 或更小,  $1.0 \times 10^{-7}$  M 或更小, 优选  $1.0 \times 10^{-8}$  M 或更小,  $5.0 \times 10^{-9}$  M 或更小, 更优选为  $1.0 \times 10^{-9}$  M 或更小。但对于其他抗体同种型, “高亲和力”结合可能有所不同。例如, IgM 同种型的“高亲和力”结合是指 KD 为  $10^{-6}$  M 或更小, 优选  $10^{-7}$  M 或更小, 更优选  $10^{-8}$  M 或更小。

“同一性”是指两个核酸序列之间或两个多肽之间的相似性。本公开的序列同一性至少为 80%, 85%, 90% 或 95%, 优选为至少 95%。非限制性实施例包括: 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或 100%。两个序列之间的序列比较和同一性百分比测定可以通过 National Center For Biotechnology Institute 网站上的 BLASTN/BLASTP 算法的默认设置来进行。

术语“EC50”, 又称半数有效浓度, 是指在特定暴露时间后, 能达到 50% 最大效应的抗体浓度。

术语“IC50”, 又称半数抑制浓度, 是指相对于不存在抗体的情况, 将特异性生物学或生化功能抑制 50% 的抗体浓度。

术语“抑制”或“阻断”可互换使用, 并且包括部分和完全抑制/阻断。在一些实施方案中, ST2 抗体使 IL33/ST2 的结合抑制至少约 50%, 例如, 至少约 60%、70%、80%、90%、95%、99% 或 100%。

术语“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物, 例如哺乳动物及非哺乳动物, 优选哺乳动物, 例如非人的灵长类动物, 绵羊, 狗, 猫, 牛和马。

术语“治疗有效量”是指足以预防或改善疾病或病症和/或减轻疾病或病症的严重性的量, 优选引起疾病症状严重程度降低、无症状期频率和持续时间增加、或对疾病引起的损伤或无能的具有预防能力的量。治疗有效量与被治疗的疾病相关, 其中本领域技术人员可以方便地判别出实际的有效量。

除非另外特别说明, 否则单数的使用包括复数。除非另外特别说明, 否则词语“一个”或“一种”意指“至少一个”或“至少一种”。除非另外说明, 短语“至少一个”的含义等同于“一个或多个”的含义, “和/或”的使用意指“和”或者“或”。

本公开的多个方面在以下更加具体地加以描述。

#### 抗 ST2 抗体特异性结合 ST2, 并阻断 IL33/ST2 相互作用, 以及其他有益的功能特征

本公开的 ST2 抗体或其抗原结合片段以高亲和力特异性结合人 ST2。本公开的 ST2 抗体或其抗原结合片段特异性结合 ST2 (例如, 人 ST2 和猴 ST2), 并阻断 IL33/ST2 结合及其信号传导。本公开的 ST2 抗体或其抗原结合片段在  $CD4^+$  T 细胞上阻断经 IL33/ST2 诱导的 IL5 分泌。本公开的 ST2 抗体或其抗原结合片段基本上不结合其他 IL-1R 家族受体, 例如 IL1R1、IL1R2、IL1R3、IL1R7、IL1R8 和 IL1R9。本公开的 ST2 抗体或其抗原结合片段具有良好的物理稳定性 (例如, 热稳定性)。本公开的 ST2 抗体或其抗原结合片段具有较长的体内半衰期。

优选地, 本公开的 ST2 抗体是单克隆抗体。此外, 抗体可以是例如小鼠、嵌合或人源化单克隆抗体。

#### ST2 单克隆抗体

优选地, 本公开的 ST2 抗体或其抗原结合片段是结构和化学特性如下文所述的抗体。ST2 抗体或其抗原结合片段包含重链 CDR 区和轻链 CDR 区, 其中示例性重链 CDR 序列和轻链 CDR 序列提供于下表 1 和表 2 中; ST2 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区, 其中示例性重链可变区和轻链可变区

提供于下表 3 中。一些抗体具有相同的 CDR，一些抗体具有相同的 VH 或 VL。抗体的重链恒定区可以是人 IgG2 重链恒定区，抗体的轻链恒定区可以是人  $\kappa$  轻链恒定区。这些抗体还可包含小鼠 IgG1 或 IgG4 重链恒定区和/或小鼠  $\kappa$  轻链恒定区。

表 1 中的重链 CDR 区和表 2 中的轻链 CDR 区由 Kabat 编号系统定义。然而，如本领域所公知的，CDR 区也可以基于重/轻链可变区序列由其他编号系统例如 Chothia、IMGT、AbM 或 Contact 编号系统/方法确定。

表 1 重链 CDR 区的氨基酸序列列表

抗体	HV-CDR1	SEQ ID NO	HV-CDR2	SEQ ID NO	HV-CDR3	SEQ ID NO
7D1	DYEMH	11	TIDPETGDTAYNQKFKG	15	YSYTNSPYGMDY	20
3C6	DYEMH	11	AIDPETGDTAYSQNFKG	16	SATDYFAS	21
31C8	DSEMH	12	AIDPETGDTVYX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> KFX <sub>3</sub> G (X <sub>1</sub> =N 或 A; X <sub>2</sub> =Q,E 或 K; X <sub>3</sub> =K 或 Q)	17	STTDYFAY	22
26A1	DSEIH	13	AIDPETGDTAYNQKFKG	18	STTDCYFAY	23
8F4	DYEMQ	14	AFDPETGDTAYNQKFKG	19	STTDYFAY	22
17E2	DYEMH	11	AIDPETGDTAYNQKFKG	18	VDSNYDYFDY	24

表 2 轻链 CDR 区的氨基酸序列列表

抗体	LV-CDR1	SEQ ID NO	LV-CDR2	SEQ ID NO	LV-CDR3	SEQ ID NO
7D1	KASQSVSNDVA	25	YASNRYT	29	QQDYSSPYT	32
3C6	RSSKSLLSNGITYLY	26	QX <sub>4</sub> SNLAS(X <sub>4</sub> =M 或 L)	30	AQNLELPFT	34
31C8	RSSKSLLSNGIYLY	27	QX <sub>4</sub> SNLAS(X <sub>4</sub> =M 或 L)	30	AQNLELPFT	34
26A1	RSSKSLLSNGIYLY	27	QX <sub>4</sub> SNLAS(X <sub>4</sub> =M 或 L)	30	AQNLELPFT	34
8F4	RSSKSLLSNGIYLY	27	QX <sub>4</sub> SNLAS(X <sub>4</sub> =M 或 L)	30	AQNLELPFT	34
17E2	RASSVSYM	28	DTSNLAS	31	QQWSSNPLT	33

表 3 重/轻链可变区的氨基酸序列列表（下划线依次表示 CDR 区）

抗体			SEQ ID NO
7D1 鼠	HV	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLDW IGTIDPETGDTAYNQKFKGRATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCTR YSYTNSPYGMDYWGQGTSVTVSS	35
7D1 鼠	LV	DVVMVTQTPKFLLSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLIY YASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFITINTVQAEDLAVYFCQQDYSSPYTF GGGKLEIK	36
3C6 鼠	HV	QVQLQQSGAEVVRPGASVTLSCASDYTITDYEMHWVKQTPVHGLEW IGAIDPETGDTAYSQNFKGKATLTADESSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCSR SATDYFASWGQGTTLTVSS	37

3C6 鼠	LV	DIVMTQAAISNPVTLGTSASMSCR <u>SSK</u> SLLHSNGITYLYWYLQKPGHSP QLLIYQMSNLASGVPRFSSSGSGTDFTLKRISVEAEDVGVYYCAQNLLE LPFTFGSGTKLEIK	38
31C8 鼠	HV	QVQLQQSGPELVRPGASVTLSCASGYIFIDSEMHWVKQTPVHGLEWIG AIDPETGDTVYNQKFKGKATLTADKSSSTASMELSSLTSEDSAVYYCTGS TTDYYFAYWGQGTTLTVSS	39
31C8 鼠	LV	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCR <u>SSK</u> SLLHSNGIYLYWYLQKPGQSPQ LLIYQMSNLASGVPRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLLELP FTFGSGTKLEIK	40
26A1 鼠	HV	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASDYIFTDSEIHVWKQTLVHGLEWIG AIDPETGDTAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEGS AVYYCSG STTDCYFAYWGQGTTLTVSS	41
26A1 鼠	LV	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCR <u>SSK</u> SLLHSNGIYLYWYLQKPGQSPQ LLIYQMSNLASGVPRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLLELP FTFGSGTKLEIK	42
8F4 鼠	HV	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGHIFTDYEMQWVKQTPVHGLEWI GAFDPETGDTAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCSG STTDYYFAYWGQGTSLTVSS	43
8F4 鼠	LV	DVVMVTQAFSNPVTGTSASISCR <u>SSK</u> SLLHSNGIYLYWYLQKPGQSPQ LLIYQMSNLASGVPRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLLELP FTFGSGTKLEIK	44
17E2 鼠	HV	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFTDYEMHWVKQTPVGLLEWI GAIDPETGDTAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLASEDSAVYYCIR VDSNYDYFDYWGQDTTLTVSS	45
17E2 鼠	LV	DIVLTQSPPIALSASPGKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKPWIYDT SNLASGVPARFSGSGSSTYSLSISRVEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAG TKLELK	46
人源化的 31C8-1.1	HV	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGYIFIDSEMHWVQQAPGKGLEWM GAIDPETGDTVYAEKFOGRVTITADKSSSTAYMELSSLRSED TAVYYCTG STTDYYFAYWGQGTTLTVSS	71
人源化的 31C8-1.1	LV	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCR <u>SSK</u> SLLHSNGIYLYWYQQKPGKAPK LLIYQLSNLASGVPSRFSSSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQNLLELPFT FGQGTKVEIK	79
人源化的 31C8-1.2	HV	QVQLVQSGAKVKKPGATVKISCKASGYIFIDSEMHWVQQAPGKGLEW MGAIDPETGDTVYAKKFKGRVTITADKSSSTAYMELSSLRSED TAVYYCT GSTTDYYFAYWGQGTTLTVSS	73
人源化的 31C8-1.2	LV	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCR <u>SSK</u> SLLHSNGIYLYWYQQKPGKAPK LLIYQLSNLASGVPSRFSSSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQNLLELPFT FGQGTKVEIK	79

表 4 重链/轻链的氨基酸序列表（下划线表示恒定区）

抗体			SEQ ID NO
嵌合的 7D1	H	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLDWI GTIDPETGDTAYNQKFKGRATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCTRY SYTNSPYGMDYWGQGTSTVTVSS <u>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL</u>	47

		<u>VKD Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S N F G T Q</u> <u>T Y T C N V D H K P S N T K V D K T V E R K C C V E C P P C P A P P V A G P S V F L F P P K P K D T</u> <u>L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T</u> <u>F R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G O P R E P Q V</u> <u>Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I S V E W E S N G O P E N N Y K T T P P M L</u> <u>D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K</u>	
嵌合的 7D1	L	<u>D V V M T Q T P K F L L V S A G D R V T I T C K A S Q S V S N D V A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y</u> <u>Y A S N R Y T G V P D R F T G S G Y G T D F T I N T V Q A E D L A V Y F C Q Q D Y S S P Y T F G</u> <u>G G T K L E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K</u> <u>V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H</u> <u>Q G L S S P V T K S F N R G E C</u>	49
嵌合的 3C6	H	<u>Q V Q L Q Q S G A E V V R P G A S V T L S C K A S D Y T I T D Y E M H W V K Q T P V H G L E W I</u> <u>G A I D P E T G D T A Y S Q N F K G K A T L T A D E S S T A Y M E L S S L T S E D S A V Y Y C S R S</u> <u>A T D Y Y F A S W G Q G T T L T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D</u> <u>Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T Y T</u> <u>C N V D H K P S N T K V D K T V E R K C C V E C P P C P A P P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I</u> <u>S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V</u> <u>V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G O P R E P Q V Y T L P</u> <u>P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I S V E W E S N G O P E N N Y K T T P P M L D S D G</u> <u>S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K</u>	51
嵌合的 3C6	L	<u>D I V M T Q A A I S N P V T L G T S A S M S C R S S K S L L H S N G I T Y L Y W Y L Q K P G H S P Q</u> <u>L L I Y Q M S N L A S G V P D R F S S S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P</u> <u>F T F G S G T K L E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V</u> <u>Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E</u> <u>V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C</u>	53
嵌合的 26A1	H	<u>Q V Q L Q Q S G A E L V R P G A S V T L S C K A S D Y I F T D S E I H W V K Q T L V H G L E W I G A</u> <u>I D P E T G D T A Y N Q K F K G K A T L T A D K S S T A Y M E L S S L T S E G S A V Y Y C S G S T T</u> <u>D C Y F A Y W G Q G T T L T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P</u> <u>E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T Y T C N</u> <u>V D H K P S N T K V D K T V E R K C C V E C P P C P A P P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T</u> <u>P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S</u> <u>V L T V V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G O P R E P Q V Y T L P P S</u> <u>R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I S V E W E S N G O P E N N Y K T T P P M L D S D G S F</u> <u>F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K</u>	55
嵌合的 26A1	L	<u>D I V M T Q A A F S N P V T L G T S A S I S C R S S K S L L H S N G I I Y L Y W Y L Q K P G Q S P Q L</u> <u>L I Y Q M S N L A S G V P D R F S S S G S G T D F T L R I S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P F T</u> <u>F G S G T K L E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W</u> <u>K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T</u> <u>H Q G L S S P V T K S F N R G E C</u>	57
嵌合的 8F4	H	<u>Q V Q L Q Q S G A E L V R P G A S V T L S C K A S G H I F T D Y E M Q W V K Q T P V H G L E W I</u> <u>G A F D P E T G D T A Y N Q K F K G K A T L T A D K S S T A Y M E L S S L T S E D S A V Y Y C S G</u> <u>S T T D Y Y F A Y W G Q G T S L T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D</u> <u>Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T Y T</u> <u>C N V D H K P S N T K V D K T V E R K C C V E C P P C P A P P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I</u> <u>S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V</u> <u>V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G O P R E P Q V Y T L P</u> <u>P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I S V E W E S N G O P E N N Y K T T P P M L D S D G</u> <u>S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K</u>	59

嵌合的 8F4	L	DVVMTQTAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSHNGIYLYWYLQKPGQSPQL LIYQMSNLASGVDPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPFT FGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW <u>KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT</u> <u>HQGLSSPVTKSFNRGEC</u>	61
嵌合的 17E2	H	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVGLLEWI GAIDPETGDTAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLASEDSAVYYCIRV DSNYDYFDYWGQD TLT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK <u>DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTY</u> <u>TCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM</u> <u>ISRTPETCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR</u> <u>VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY</u> <u>LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGOPENNYKTTTPMLDS</u> <u>DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	63
嵌合的 17E2	L	DIVLTQSPPILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQKPGSSPKPWYDT SNLASGVPARFSGSGSSTYSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGT KLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN <u>ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHOGLS</u> <u>SPVTKSFNRGEC</u>	65
嵌合的 31C8	H	QVQLQQSGPELVRPGASVTLSCKASGYIFIDSEMHWVKQTPVHGLEWIG AIDPETGDTVYNQKFKGKATLTADKSSSTASMESSLTSEDSAVYYCTGST TDYYFAYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY <u>FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTC</u> <u>NVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR</u> <u>TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV</u> <u>SVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP</u> <u>SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGOPENNYKTTTPMLDSDGS</u> <u>FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	67
嵌合的 31C8	L	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSHNGIYLYWYLQKPGQSPQL LIYQMSNLASGVDPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPFT FGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW <u>KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT</u> <u>HQGLSSPVTKSFNRGEC</u>	69
人源化的 31C8-1.1	H	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGYIFIDSEMHWVQAPGKGLEWM GAIDPETGDTVYAEKFGQGRVTITADKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTGS TTDYYFAYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD <u>YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYT</u> <u>CNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI</u> <u>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV</u> <u>VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL</u> <u>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGOPENNYKTTTPMLDSDG</u> <u>SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	75
人源化的 31C8-1.1	L	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRSSKSLLSHNGIYLYWYQKPGKAPKL LIYQLSNLASGVPSRFSSSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQNLELPFTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW <u>KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT</u> <u>HQGLSSPVTKSFNRGEC</u>	81

人源化的 31C8-1.2	H	<p>QVQLVQSGAKVKKPGATVKISCKASGYIFIDSEMHVWVQAPGKGLEWM                  GAIDPETGDTVYAKKFKGRVTITADKSSSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTGS                  TTDYYFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD  <u>YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYT</u>  <u>CNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI</u>  <u>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV</u>  <u>VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPOVYTL</u>  <u>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISEVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDG</u>  <u>SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u></p>	77
人源化的 31C8-1.2	L	<p>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRSSKSLLSHNGIHYLYWYQKPKGAPKL                  LIYQLSNLASGVPSRFSSSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQNLELPFTF                  GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW  <u>KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT</u>  <u>HQGLSSPVTKSFNRGEC</u></p>	81

与人 ST2 结合的其他抗 ST2 抗体的 VH 和/或 VL 序列（或 CDR 序列）可以与本公开的抗体的 VH 和/或 VL 序列（或 CDR 序列）“混合并配对”。优选地，当 VH 和 VL 链（或其 CDR）混合并配对时，特定 VH/VL 对中的 VH 序列可以由结构相似的 VH 序列取代。同样，优选地将特定 VH/VL 对中的 VL 序列替换为结构相似的 VL 序列。

因此，在一个实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包括：

(a) 重链可变区，其包含列于表 3 中的氨基酸序列；和

(b) 轻链可变区，其包含列于表 3 中的氨基酸序列，或另一种 ST2 抗体的 VL，其中该抗体特异性结合人 ST2。

在另一个实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包括：

(a) 列于表 1 的重链 CDR1，CDR2 和 CDR3；和

(b) 列于表 2 的轻链 CDR1，CDR2 和 CDR3，或另一种 ST2 抗体的 CDRs，其中该抗体特异性结合人 ST2。

在另一个实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包括本公开的 ST2 抗体的重链 CDR2 以及其他结合人 ST2 抗体的 CDR，例如另一 ST2 抗体的重链 CDR1 和/或 CDR3，和/或轻链 CDR1，CDR2 和/或 CDR3。

此外，本领域内公知，CDR3 结构域独立于 CDR1 和/或 CDR2 结构域，可以单独确定抗体对同种抗原的结合特异性，并且可以预测到基于该 CDR3 序列可产生具有相同结合特异性的多种抗体。参见，例如，Klimka et al., *British J. of Cancer*.83(2):252-260(2000); Beiboer et al., *J. Mol. Biol.* 296:833-849(2000); Rader et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95:8910-8915(1998); Barbas et al., *J. Am.Chem. Soc.* 116: 2161-2162(1994); Barbas et al., *Proc.Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 92:2529-2533(1995); Ditzel et al., *J. Immunol.*157:739-749(1996); Berezov et al., *BIAjournal* 8:Scientific Review 8(2001); Igarashi et al., *J. Biochem(Tokyo)*.117:452-7(1995); Bourgeois et al., *J. Virol.* 72:807-10 (1998); Levi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:4374-8(1993); Polymenis and Stoller,*J. Immunol.*152: 5218-5329(1994)and Xu and Davis,*Immunity.* 13:37-45 (2000); U.S. Pat. Nos. 6,951,646; 6,914,128; 6,090,382; 6,818,216; 6,156,313; 6,827,925; 5,833,943; 5,762,905 和 5,760,185。这些参考文献均通过引用的方式全部并入本公开。

在另一个实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包含本公开的 ST2 抗体的重链 CDR2 以及至少

本公开的 ST2 抗体的重链和/或轻链 CDR3，或另一种 ST2 抗体的重链和/或轻链 CDR3，其中该抗体特异性结合人 ST2。优选地，这些抗体与本公开的 ST2 抗体 (a) 竞争结合 ST2；(b) 保留功能特征；(c) 结合相同的表位；和/或(d) 具有本公开具有相似的结合亲和力。在另一个实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段还可以包含本公开的 ST2 抗体的轻链 CDR2，或另一种 ST2 抗体的轻链 CDR2，其中该抗体特异性结合人 ST2。在另一个实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段还可以包括本公开的 ST2 抗体的重和/或轻链 CDR1，或另一种 ST2 抗体的重和/或轻链 CDR1，其中该抗体特异性结合人 ST2。

### 保守修饰

在另一个实施方案中，本公开的抗体或其抗原结合片段包含与本公开的 ST2 抗体存在一个或多个保守修饰的重链可变区和/或轻链可变区的 CDR1，CDR2 和 CDR3 序列。本领域应理解，一些保守的序列修饰不会使抗原结合性消失。参见，例如，Brummell et al., *Biochem* 32:1180-8(1993)；de Wildt et al., *Prot. Eng.* 10:835-41(1997)；Komissarov et al., *J. Biol. Chem.* 272: 26864-26870(1997)；Hall et al., *J. Immunol.* 149:1605-12(1992)；Kelley and O'Connell *Biochem.* 32:6862-35(1993)；Adib-Conquy et al., *Int. Immunol.* 10: 341-6(1998)；Beers et al., *Clin. Can. Res.* 6:2835-43(2000)。

因此，在一个实施方式中，抗体包含重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区分别包含 CDR1、CDR2 和 CDR3，其中：

- (a) 重链可变区的 CDR1 序列包含表 1 列出的序列，和/或其保守修饰；和/或
- (b) 重链可变区的 CDR2 序列包含表 1 列出的序列，和/或其保守修饰；和/或
- (c) 重链可变区的 CDR3 序列包含表 1 列出的序列，和/或其保守修饰；和/或
- (d) 轻链可变区的 CDR1 和/或 CDR2 和/或 CDR3 序列包含表 2 列出的序列；和/或其保守修改；且
- (e) 抗体特异性结合人 ST2。

本公开的抗体具有上述一种或多种以下功能特性，例如对人 ST2 具有高亲和力，以及阻断 IL33/ST2 结合及其信号传导。

在多个实施方案中，抗体可以是小鼠，嵌合或人源化抗体或其抗原结合片段。

本公开所用的术语“保守序列修饰”是指不显著影响或改变抗体结合特性的氨基酸修饰。这样的保守修饰包括氨基酸取代、添加和删除。可以通过本领域已知的标准技术将修饰引入本公开的抗体中，例如点突变和 PCR 介导的突变。保守氨基酸取代是指氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代。具有相似侧链的氨基酸残基家族在本领域中已知。这些氨基酸残基家族包括具有碱性侧链（例如，赖氨酸，精氨酸，组氨酸），酸性侧链（例如，天冬氨酸，谷氨酸），不带电极性侧链（例如，甘氨酸，天冬酰胺，谷氨酰胺，丝氨酸，苏氨酸，酪氨酸，半胱氨酸，色氨酸），非极性侧链（例如，丙氨酸，缬氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，脯氨酸，苯丙氨酸，甲硫氨酸）， $\beta$  支链侧链（例如，苏氨酸，缬氨酸，异亮氨酸）和芳香族侧链（例如，酪氨酸，苯丙氨酸，色氨酸，组氨酸）的氨基酸。因此，本公开的抗体的 CDR 区中一个或多个氨基酸残基可以被同侧链家族的其他氨基酸残基取代，且得到的抗体可以使用本公开所述的功能检测对其进行保留功能(即，上述的功能)的测试。

### 工程化和修饰的抗体

本公开的抗体可以用具备本公开 ST2 抗体的一个或多个 VH/VL 序列的抗体作为起始材料来工程化产生修饰抗体。抗体可以对一个或两个可变区（即 VH 和/或 VL）内（例如，在一个或多个 CDR 区和/或一个或多个骨架区）的一个或多个残基进行基因修饰。此外，或者，抗体可以对恒定区中的残基进行工程化

修饰，例如改变抗体的效应功能。

在某些实施方案中，CDR 移植可用于基因修饰抗体的可变区。抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区（CDR）中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。因此，各个抗体 CDR 内的氨基酸序列比 CDR 外的序列更加地多样。由于 CDR 序列负责主要的抗体-抗原相互作用，因此可以通过构建表达载体，其中特定天然抗体的 CDR 序列移植到不同特性的不同抗体的骨架序列，来表达模拟特定天然抗体的特性的重组抗体 (Riechmann et al., Nature.332:323-327(1998) ; Jones et al., Nature.321:522-525(1986) ; Queen et al.,Proc.Natl.Acad; U.S.A.86: 10029-10033(1989); U.S.Pat.Nos.5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 和 6,180,370)。

因此，本公开的另一个实施方案涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区和/或轻链可变区，重链可变区包含本公开上述序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3，轻链可变区包含本公开上述序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3。尽管这些抗体包含本公开单克隆抗体的 VH 和 VL 的 CDR 序列，它们可以含有不同的骨架序列。

这样的骨架序列可以从包括种系抗体基因序列的公开 DNA 数据库或公开参考文献中获得。例如，用于人重链可变区和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在 Vbase 人种系序列数据库 ([www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)) 以及 Kabat et al.,(1991), 同上; Tomlinson et al., J.Mol.Biol.227:776-798(1992); 和 Cox et al.,Eur.J.Immunol.24:827-836(1994) 中获得。另一个实施方案中，用于人重链可变区和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在 Genbank 数据库中得到。

使用本领域技术人员公知的 Gapped BLAST 的序列相似性搜索方法之一 (Altschul et al., (1997), 同上)，将抗体蛋白序列与蛋白序列数据库进行比较。

本公开的抗体的骨架序列优选地是与本公开的抗体所用的骨架序列在结构上相似的那些。可以将 VH CDR1, CDR2 和 CDR3 序列移植到与得到该骨架序列的种系免疫球蛋白基因具有相同序列的骨架区中，或者可以将 CDR 序列移植到与种系序列相比具有一个或多个突变的骨架区中。例如，在一些情况下，对骨架区中的残基进行突变是有益的，可以维持或增强抗体的抗原结合能力（参见，例如，U.S.Pat.Nos.5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 和 6,180,370）。

另一种类型的可变区修饰是将 VH 和/或 VL 的 CDR1, CDR2 和/或 CDR3 区内的氨基酸残基进行突变，从而改善目标抗体的一种或多种特性（例如，亲和力，理化性质）。可以通过定突变或 PCR 介导的突变引入突变，并可通过本领域已知的体外或体内测定评估突变对抗体结合或其他功能特性的影响。优选地，引入本领域中已知的保守的修饰。可以是对氨基酸进行取代、添加或删除，优选为取代。此外，通常改变每个 CDR 区内不多于一个、两个、三个、四个或五个的残基。

此外，在另一个实施方案中，本公开提供分离的 ST2 单克隆抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区和轻链可变区，其包含：(a) VH CDR1 区，包含本公开的序列，或具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸取代，删除或添加的氨基酸序列；(b) VH CDR2 区，其包含本公开的序列，或具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸取代，删除或添加的氨基酸序列；(c) VH CDR3 区，其包含本公开的序列，或具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸取代，删除或添加的氨基酸序列；(d) VL CDR1 区，其包含本公开的序列，或具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸取代，删除或添加的氨基酸序列；(e) VL CDR2 区，其包含本公开的序列，或具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸取代，删除或添加的氨基酸序列；(f) VL CDR3 区，其包含本公开的序列，或具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸取代，删除或添加的氨基酸序列。

本公开的基因改造抗体包括在 VH 和/或 VL 的骨架区残基进行修饰以改善抗体特性的那些抗体。通常，此类骨架区修饰可以降低抗体的免疫原性。例如，将一个或多个骨架残基“回复突变”为相应的种系序列。更具体地，经历体细胞突变的抗体可能包含不同于得到的抗体种系序列的骨架区残基。这些残基可以通过将抗体骨架序列与得到抗体的种系序列相比较而识别出来。

另一种类型的骨架修饰涉及对骨架区、或者甚至一个或多个 CDR 区的一个或多个残基进行突变，以去除 T 细胞表位，从而减少抗体可能导致的免疫原性。该方法也称为“去免疫化”，在美国专利公开号 20030153043 中有更详细描述。

此外，骨架区或 CDR 区修饰之外的另外一种修饰，例如通过基因改造对本公开的抗体 Fc 区进行修饰，通常用来改变抗体的一种或多种功能特性，例如血清半衰期，补体结合，Fc 受体结合，和/或抗原依赖性细胞毒性。此外，本公开的抗体还可以进行化学修饰（例如，连接一个或多个化学功能基团），或修饰以改变其糖基化，来改变抗体的一种或多种功能特性。

在一个实施方案中，修饰 CH1-铰链区，例如增加或减少铰链区中的半胱氨酸残基数目。该方法在美国专利 No.5,677,425 有具体描述。改变 CH1-铰链区中半胱氨酸残基的数目，例如可以促进轻链和重链的组装或增加或降低抗体的稳定性。

在另一个实施方案中，对抗体的 Fc-铰链区突变以增加或降低抗体的生物学半衰期。更具体地，将一个或多个氨基酸突变引入 Fc-铰链区的 CH2-CH3 区，使得抗体相对于天然 Fc-铰链域，具有减弱的葡萄球菌蛋白 A (SpA) 结合。该方法在美国专利 No.6,165,745 中有更详细的描述。

在另一个实施方案中，修饰抗体的糖基化。例如，可以制备去糖基化的抗体（即，该抗体缺少糖基化）。这样的糖基化修饰可通过例如改变抗体序列内一个或多个糖基化位点来实现。例如，可以进行一个或多个氨基酸取代，以消除一个或多个可变区骨架中的糖基化位点，从而消除该位点的糖基化。这种去糖基化可以增加抗体对抗原的亲和力。参见，例如，美国专利 No.5,714,350 和 6,350,861。

此外，可以制备具有改变的糖基化类型的抗体，例如岩藻糖残基量减少的低岩藻糖基化抗体，或者具有增加的平分型 GlcNac 结构的抗体。已经证明糖基化形式的改变增加了抗体的 ADCC 活性。这样的糖基化修饰可以通过例如在糖基化系统改变的宿主细胞中表达抗体来实现，糖基化系统改变的宿主细胞在本领域中已知，且可以用作表达本公开重组抗体的宿主细胞，以制备具有改变的糖基化的抗体。例如，细胞系 Ms704, Ms705 和 Ms709 缺少岩藻糖基转移酶基因 FUT8 ( $\alpha$  (1,6)-岩藻糖基转移酶)，因此在 Ms704, Ms705 和 Ms709 细胞系中表达的抗体缺少岩藻糖。Ms704, Ms705 和 Ms709 FUT8<sup>-/-</sup>细胞系是通过在 CHO/DG44 细胞中使用两种替换载体定向破坏 FUT8 基因而制备（参见美国专利 20040110704 和 Ohnuki et al., *Biotechnol Bioeng.* 87:614-22(2004)）。作为另一个例子，EP1,176,195 描述了 FUT8 基因功能破坏的细胞系，该基因编码岩藻糖基转移酶，使得在这种细胞系中表达的抗体通过降低或消除  $\alpha$ -1,6 键相关的酶而表现出低岩藻糖基化。EP1,176,195 还描述了一种细胞系，具有较低或缺乏向结合于抗体 Fc 区的 N-乙酰氨基葡萄糖添加岩藻糖的酶活性，例如大鼠骨髓瘤细胞系 YB2/0 (ATCC CRL 1662)。WO03/035835 描述了一种 CHO 变体细胞系，Lec13 细胞，其向 Asn (297)-相关糖添加岩藻糖的能力降低，从而使该宿主细胞表达的抗体低岩藻糖基化（参见 Shields et al., *J.Biol.Chem.* 277:26733-26740 (2002)）。如 WO06/089231 中所述，还可以在鸡蛋中制备具有改变的糖基化特征的抗体。或者可以在植物细胞如 *Lemna* 中制备具有改变的糖基化特征的抗体。WO99/54342 公开了一种细胞系，其基因改造成表达修饰糖蛋白的糖基转移酶（例如， $\beta$ (1,4)-N-乙酰葡萄糖胺转移酶 III (GnTIII)），使得在该细胞系中表达的抗体表现出增加的平分型 GlcNac

结构，从而引起抗体增强的 ADCC 活性（另参见 Umana et al., Nat. Biotech. 17:176-180 (1999)）。或者，使用岩藻糖苷酶将抗体的岩藻糖残基切割掉，例如  $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶从抗体移除岩藻糖残基（Tarentino et al., Biochem. 14:5516-23 (1975)）。

本公开的抗体的另一种修饰是聚乙二醇化（PEG 化）。将抗体 PEG 化例如可以增加抗体的生物学（例如，血清）半衰期。为了得到 PEG 化抗体，使抗体或其片段与聚乙二醇（PEG），例如 PEG 的反应性酯或醛衍生物，在使一个或多个 PEG 基团附着于抗体或抗体片段的条件下反应。优选地，通过与反应性 PEG 分子（或类似的反应性的水溶性聚合物）的酰化反应或烷基化反应进行。如本公开所用的术语“聚乙二醇”包括任何形式的用于衍生其他蛋白的 PEG，例如单（C1-C10）烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施方案中，需聚乙二醇化的抗体是去糖基化的抗体。PEG 化的方法是本领域已知的，并且可以应用于本公开的抗体。参见，例如，EP0154316 和 EP0401384。

### 抗体的物理性质

本公开的抗体可以用它们的多种物理特性进行表征，以检测和/或区别其分类。例如，抗体可以在轻链或重链可变区中包含一个或多个糖基化位点。这些糖基化位点可能会导致抗体的免疫原性增加，或由于抗原结合的改变而引起的抗体 pK 值的改变（Marshall et al., Annu Rev Biochem. 41:673-702 (1972)；Gala 和 Morrison, J Immunol. 172:5489-94 (2004)；Wallick et al., J Exp Med. 168:1099-109 (1988)；Spiro, Glycobiology. 12:43R-56R (2002)；Parekh et al., Nature 316:452-7 (1985)；Mimura et al., Mol Immunol 37:697-706 (2000)）。已知糖基化发生在含有 N-X-S/T 序列的基序中。在某些情况下，优选 ST2 抗体不包含可变区糖基化。可以选择可变区中不包含糖基化基序的抗体或突变糖基化区内的残基来实现。

在一个优选的实施方案中，抗体不包含天冬酰胺异构位点。天冬酰胺的脱酰胺作用可能发生在 N-G 或 D-G 序列中，并导致异天冬氨酸残基产生，降低稳定性。

各抗体具有独特的等电点（pI），通常在 6-9.5 的 pH 范围内。IgG1 抗体的 pI 通常在 7-9.5 的 pH 范围内，而 IgG4 抗体的 pI 通常在 6-8 的 pH 范围内。有人推测 pI 值在正常范围外的抗体，在体内条件下可能会发生一些解折叠且不稳定。因此，优选 pI 值在正常范围内的 ST2 抗体。可以通过选择 pI 在正常范围内的抗体或突变表面残基来实现。

### 编码本公开抗体的核酸分子

在另一方面，本公开提供了编码本公开抗体重链和/或轻链可变区或 CDR 的核酸分子。核酸可以完整细胞，细胞裂解物，或以部分纯化或基本上纯的形式存在。当通过标准技术从其他细胞组分或其他污染物，例如其他细胞核酸或蛋白质中纯化出来时，核酸是“分离的”或“基本上纯的”。本公开的核酸可以是例如 DNA 或 RNA，且可以包含或不包含内含子序列。在一个优选的实施方案中，核酸是 cDNA 分子。

本公开的核酸可以使用标准分子生物学技术获得。对于杂交瘤（例如，由携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠制备的杂交瘤）表达的抗体，可通过标准 PCR 扩增或 cDNA 克隆技术获得编码由杂交瘤制备的抗体的轻链和重链 cDNA。对于从免疫球蛋白基因文库获得的抗体（例如，使用噬菌体展示技术），可以从基因文库回收编码此类抗体的核酸。

优选地，本公开的核酸分子包括编码本公开的 ST2 单克隆抗体的 VH 和 VL 序列或 CDR 的核酸分子。一旦获得了编码 VH 和 VL 片段的 DNA 片段，就可以进一步通过标准重组 DNA 技术进行操作，例如将可变区基因转换为全长抗体链基因，Fab 片段基因或 scFv 基因。在这些操作中，将编码 VL 或 VH 的 DNA 片段与编码另一种蛋白质的另一种 DNA 片段可操作性地连接，例如抗体恒定区或柔性接头。在本公开中

使用的术语“可操作地连接”是指将两个 DNA 片段连接在一起，使得两个 DNA 片段编码的氨基酸序列都在阅读框内。

通过将编码 VH 的 DNA 与编码重链恒定区（CH1，CH2 和 CH3）的另一个 DNA 分子可操作地连接，可以将编码 VH 区的分离的 DNA 转化为全长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的，并且可以通过标准 PCR 扩增获得这些 DNA 片段。重链恒定区可以是 IgG1，IgG2，IgG3，IgG4，IgA，IgE，IgM 或 IgD 恒定区，但是最优选是 IgG2 恒定区。对于 Fab 片段重链基因，可以将编码 VH 的 DNA 与仅编码重链 CH1 恒定区的另一个 DNA 分子可操作地连接。

通过将编码 VL 的 DNA 与编码轻链恒定区（CL）的另一个 DNA 分子可操作地连接，可以将编码 VL 区的分离的 DNA 转化为全长轻链基因（以及 Fab 轻链基因）。人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的，并且可以通过标准 PCR 扩增获得这些 DNA 片段。在优选的实施方案中，轻链恒定区可以是  $\kappa$  或  $\lambda$  轻链恒定区。

为了制备 scFv 基因，将编码 VH 和 VL 的 DNA 片段可操作地与编码柔性接头例如编码氨基酸序列 (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub> 的另一片段连接，使得 VH 和 VL 序列可以作为连续的单链蛋白进行表达，其中该 VL 和 VH 区通过柔性接头连接（参见例如 Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988); Huston et al., *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); McCafferty et al., *Nature* 348: 552-554 (1990)）。

#### 本公开单克隆抗体的制备

本公开的单克隆抗体（mAb）可以使用 Kohler 和 Milstein *Nature*.256: 495 (1975) 的体细胞杂交（杂交瘤）技术来制备。制备单克隆抗体的其他实施方式包括 B 淋巴细胞的病毒或致癌性转化以及噬菌体展示技术。嵌合或人源化抗体也是本领域熟知的。参见例如美国专利 4,816,567; 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 和 6,180,370。

#### 制备单克隆抗体的转染瘤

本公开的抗体也可以使用例如重组 DNA 技术结合基因转染方法，在宿主细胞转染瘤中产生（例如，Morrison, S. *Science* 229:12021985）。在一个实施方案中，将由标准分子生物学技术获得的编码部分或全长轻链和重链的 DNA 插入一种或多种表达载体中，使得基因可操作地连接至转录和翻译调控序列。在该情况下，术语“可操作地连接”是指将抗体基因连接到载体中，使得载体内的转录和翻译调控序列发挥其既定的调节抗体基因的转录和翻译的功能。

术语“调控序列”包括控制抗体基因的转录或翻译的启动子、增强子和其他表达控制元件（例如，多腺苷酸化信号）。这样的调控序列在 Goeddel (*Gene Expression Technology. Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)) 中有过描述。优选的，用于哺乳动物宿主细胞表达的调控序列包括指导哺乳动物细胞中高水平蛋白表达的病毒元件，例如源自巨细胞病毒（CMV），猿猴病毒 40（SV40），腺病毒的启动子和/或增强子，如腺病毒主要晚期启动子（AdMLP）。或者使用非病毒调控序列，例如泛素启动子或  $\beta$ -珠蛋白启动子。另外，调控元件由不同来源的序列组成，例如 SR $\alpha$  启动子系统，该序列包含来自 SV40 早期启动子的序列和人 T 细胞白血病 I 型毒长末端重复序列的序列（Takebe et al., *Mol (Cell. Biol.)* 8:466-472 (1988)）。表达载体和表达调控序列与所使用的表达宿主细胞相容。

抗体轻链基因和抗体重链基因可以插入到同一或不同的表达载体中。在优选实施方式中，可变区通过插入到已经编码所需亚型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中而构建全长抗体基因，从而使 VH 与载体中的 CH 可操作地连接，VL 与载体中的 CL 可操作地连接。或者，重组表达载体可以编码促进抗体链从

宿主细胞分泌的信号肽。抗体链基因可以克隆到载体中，从而信号肽在阅读框内连接到抗体链基因的氨基端。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽（即，来自非免疫球蛋白的信号肽）。

除了抗体链基因和调控序列之外，本公开的重组表达载体还可以携带其他序列，例如调控载体在宿主细胞中复制的序列（例如，复制起点）和可选择标记基因。可选择标记基因可用于选择已导入载体的宿主细胞（参见，例如，美国专利 4,399,216；4,634,665 和 5,179,017）。例如，通常可选择标记基因在已导入载体的宿主细胞上赋予对药物如 G418，潮霉素或氨甲蝶呤的抗性。优选的可选择标记基因包括二氢叶酸还原酶（DHFR）基因（用于 dhfr 宿主细胞的甲氨蝶呤选择/扩增）和 neo 基因（用于 G418 选择）。

为了表达轻链和重链，通过标准技术将编码重链和轻链的表达载体转染到宿主细胞中。术语“转染”包括多种将外源 DNA 引入原核或真核宿主细胞中的技术，例如电穿孔，磷酸钙沉淀，DEAE-葡聚糖转染等。尽管在原核或真核宿主细胞中表达本公开的抗体在理论上是可行的，但优选在真核细胞，最优选在哺乳动物宿主细胞中表达抗体，因为真核细胞，特别是哺乳动物细胞，比原核细胞更可能组装并分泌适当折叠且具有免疫活性的抗体。

优选的用于表达本公开重组抗体的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢（CHO 细胞）（包括与 DHFR 可选择标记一起施用的 dhfr-CHO 细胞，如 Urlaub 和 Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220（1980）中描述，DHFR 可选择标记如 RJ Kaufman 和 PA Sharp. J. Mol. Biol. 159:601-621（1982）中所述）、NSO 骨髓瘤细胞、COS 细胞和 SP2 细胞。特别是在使用 NSO 骨髓瘤细胞时，另一优选的表达系统是 WO87/04462，WO89/01036 和 EP338,841 中公开的 GS 基因表达系统。当编码抗体基因的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞时，通过将宿主细胞培养足以使得宿主细胞中抗体表达、或优选地足以使得使抗体分泌到宿主细胞生长的培养基中的一段时间，从而制备抗体。抗体可以使用蛋白纯化方法从培养基中回收。

#### 多肽融合物

另一方面，本公开涉及包含一种或多种本公开的抗体或其抗原结合片段的多肽融合物，其中本公开的抗体或其抗原结合片段与至少一个其他功能分子连接，所述其他功能分子可以是肽或蛋白质或非蛋白质。在一个实施方案中，本公开的多肽融合物包括免疫缀合物，所述免疫缀合物包含一种或多种本公开的抗体或其抗原结合片段以及至少一种与本公开的抗体或其抗原结合片段相连接的治疗剂例如类固醇。在一个实施方案中，本公开的多肽融合物包括双功能分子，所述双功能分子包含一种或多种本公开的抗体或其抗原结合片段以及至少一种与本公开的抗体或其抗原结合片段相连接的免疫细胞因子或受体配体，所述免疫细胞因子或受体配体可以是针对 IgE，IL-4，IL-4R，IL-5，IL-5R，IL-6，IL-9，IL13、IL13R，IL-17，IL-23，IL-33，OX40 配体（OX40L），GM-CSF 或 TSLP，TSLPR/IL7R 的。在一个实施方案中，除 Fc 受体结合功能和 ST2 结合功能外，双功能分子还具有第三功能。所述第三功能可以是针对 IgE，IL-4，IL-4R，IL-5，IL-5R，IL-6，IL-9，IL13、IL13R，IL-17，IL-23，IL-33，OX40 配体（OX40L），GM-CSF 或 TSLP，TSLPR/IL7R 的。本文所用的“双功能分子”涵盖具有三种或更多种功能的分子。在其他实施方案中，本公开的多肽融合物还包含其他形式。这些和其他形式的多肽融合物可以通过基因改造、化学法等进行制备。

#### 多特异性分子

另一方面，本公开涉及包含一种或多种本公开的抗体或其抗原结合片段的多特异性分子，其中本公开的抗体或其抗原结合片段与至少一个不同于本公开的抗体或抗原结合片段特异性的其他功能部分连接，所述其他功能部分包括另一种肽或蛋白质（例如，另一种抗体或其抗原结合片段），以产生与至少两个不同结合位点或靶点结合的多特异性分子。因此，本公开所用的“多特异性分子”涵盖具有两种（即双特异性分

子)、三种(即三特异性分子)、四种(即四特异性分子)或更多种的特异性的分子。

在一个具体的实施方案中,本公开的多特异性分子,除抗 Fc 结合特异性和 ST2 结合特异性外,还可以具有一种或多种其他特异性。示例性的,所述其他特异性可以是针对 IgE, IL4, IL4R, IL5, IL5R, IL6, IL9, IL13, IL13R, IL17, IL23, IL33 或 TSLP, TSLPR/IL7R 的。

在一个具体的实施方案中,多特异性分子可以以多种不同的形式和尺寸出现。示例性的,对于双特异性分子,在尺寸谱的一端,双特异性分子保留了传统的抗体形式,不同的是具有两个结合臂且各臂具有不同特异性,而不是具有两个特异性相同的结合臂。在另一端,双特异性分子由两个经肽链连接的单链抗体片段(scFv)构成,称为 Bs(scFv)<sub>2</sub> 构建体。中间尺寸的双特异性分子包括由肽类接头连接的两个不同的 F(ab) 片段。这些和其他形式的双特异性分子可以通过基因改造、体细胞杂交或化学法进行制备。参见,例如 Kufer et al., cited supra; Cao and Suresh, *Bioconjugate Chemistry*.9(6).635-644(1998); 和 van Spriell et al., *Immunology Today*.21(8):391-397(2000)。

### 病毒载体

另一方面,本公开的抗体或其抗原结合片段还可以由病毒载体编码或由病毒载体承载。此外,本公开的抗体或其抗原结合片段也可以与病毒载体一起使用,或将编码或承载本公开抗体或其抗原结合片段的病毒载体引入人体中。

本公开还提供了包含本公开的多肽融合物,多特异性分子,病毒载体以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体的药物组合物。

### 药物组合物

另一方面,本公开提供了药物组合物,其包含本公开的抗体或其抗原结合片段,与药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体配制在一起。该药物组合物可以任选地包含一种或多种其他药学上的有效成分,例如另一种抗体或药物,例如另一 ST2 抗体,抗 IgE 抗体,另一抗炎药,抗哮喘药,抗慢性阻塞性肺病药,抗溃疡性结肠炎药,抗异位性皮炎药或抗牛皮癣药。

优选地,药物组合物适合于静脉内,肌内,皮下,肠道外,脊柱或表皮施用(例如,通过注射或输注)。基于施用途径的不同,可以将有效成分包在材料中以保护其不受酸和可能使其失活的其他自然条件的影响。“肠道外施用”是指不同于肠道和局部外用的方式,通常通过注射,包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、膜内、囊内、眶内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬脑膜上和胸骨内注射和推注。或者,本公开的药物组合物可以通过非肠道外路径施用,例如外用、表皮施用或粘膜施用,例如鼻内、经口、阴道、直肠、舌下、或局部外用。

药物组合物可以为无菌水溶液或分散液的形式。它们也可以配制在微乳剂、脂质体或其他适于高浓度药物的有序结构中。

给药方案经调整提供最佳的所需反应(例如,治疗反应)。例如,可以施用施用单次大剂量,可以随时间推移施用多个分剂量,或者剂量可以随治疗情况的危急程度成比例降低或提高。特别有利的是,以方便施用和剂量均匀的剂量单位型配置肠道外组合物。剂量单位型是指物理上分开的单位,适于治疗主体的单次给药;各单位包含计算出来与药学载体一起产生所需疗效的预定量的有效成分。或者,抗体可以以缓释剂施用,这种情况下所需的施用频率降低。

对于组合物的施用,剂量可以为约 0.0001 至 100mg/kg 宿主体重,更常见的是 0.01 至 5mg/kg。例如,剂量可以是 0.3mg/kg 体重, 1mg/kg 体重, 3mg/kg 体重, 5mg/kg 体重或 10mg/kg 体重或在 1-10mg/kg 的范

围内。示例性的治疗方案需要每周二次，每周一次，每两周一次，每三周一次，每四周一次，每月一次，每两月一次，每三个月一次或每三到六个月一次施用。

药物组合物可以是缓释试剂，包括植入体、透皮贴剂和微胶囊递送系统。可以使用生物可降解、生物相容的聚合物，例如乙烯-醋酸乙烯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯、和聚乳酸。

在某些实施方案中，本公开的抗体可以经配制，以确保合适的体内分布。例如，为确保本公开的治疗抗体穿越血脑屏障，抗体可以配制在脂质体中，其还可以额外地包含靶向功能基团，以增强对特定细胞或器官的选择性输送。

#### 本公开的用途和方法

本公开的抗体或其抗原结合片段（编码核酸分子、药物组合物、多肽融合物、多特异性分子或病毒载体）具有多种体外和体内应用，涉及 IL33/ST2 介导的相关疾病和病症的诊断、治疗和/或预防。所述 IL33/ST2 介导的相关疾病和病症包括但不限于：哮喘，过敏性鼻炎，慢性阻塞性肺病，嗜酸粒细胞性支气管炎，嗜酸细胞性食道炎，特应性皮炎，牛皮癣，全身性红斑狼疮，类天疱疮，风湿性关节炎，强直性脊柱炎，炎症性肠病，肺纤维化，肝纤维化，系统性硬化症，结节病，移植抗宿主病（GVHD），糖尿病疾病，心血管疾病，或其组合。本公开的抗体或其抗原结合片段可以施用至人受试者，以减轻、缓解或治疗所述疾病或病症。在诊断过程中，本公开的抗体可以在允许本公开的抗体或其抗原结合片段与 ST2 结合的条件下，与受试者的样品接触，以检测受试者样品中 ST2 蛋白的量。

本公开的这些和其他方法在以下进一步讨论。

#### 联合疗法

本公开提供本公开 ST2 抗体或其抗原结合片段（编码核酸分子、药物组合物、多肽融合物、多特异性分子或病毒载体）与一种或多种其他抗体或药物共同施用，其能减轻、缓解或治疗受试者中的 IL33/ST2 介导的相关疾病和病症，所述 IL33/ST2 介导的相关疾病和病症包括但不限于：哮喘，过敏性鼻炎，慢性阻塞性肺病，嗜酸粒细胞性支气管炎，嗜酸细胞性食道炎，特应性皮炎，牛皮癣，全身性红斑狼疮，类天疱疮，风湿性关节炎，强直性脊柱炎，炎症性肠病，肺纤维化，肝纤维化，系统性硬化症，结节病，移植抗宿主病（GVHD），糖尿病疾病，心血管疾病，或其组合。在一个实施方案中，本公开提供了一种治疗受试者哮喘，慢性阻塞性肺病，特应性皮炎的方法，其中本公开 ST2 抗体或其抗原结合片段以及一种或多种其他抗体一起施用，例如 TSLP 抗体，TSLPR 抗体，IL4 抗体，IL4R 抗体，IL13 抗体，IL13R 抗体，IL5 抗体，IL5R 抗体和/或 IgE 抗体。在另一个实施方案中，本公开提供一种治疗受试者哮喘，慢性阻塞性肺病，特应性皮炎的方法，其中本公开的 ST2 抗体或其抗原结合片段与至少一种另外的药物一起施用，例如抗哮喘药，抗慢性阻塞性肺病药，抗异位性皮炎药。在某些实施方案中，受试者是人。其他可以与本公开的 ST2 抗体或其抗原结合片段联合的疗法还包括：减少或避免变应原接触、激素治疗、手术等。

本公开讨论的治疗剂的组合（即，联合）可以作为在药学可接受载体中的单一组合物同时施用，或者作为分开的组合物同时施用，其中各药剂处于药学可接受载体中。在另一个实施方案中，治疗剂的组合可以按序施用。

此外，如果进行多次联合疗法施用，且药剂按序施用，则在各时间点的按序施用的次序可以反转或保持相同，按序施用可以与同时施用或其任何组合相结合。

尽管为了清楚理解的目的，已经通过举例说明和实施例详细地描述了前述发明，但是根据本公开的教义，本领域的普通技术人员将显而易见的是，可另外对本公开进行某些改变和修改而不背离所附权利要求

的精神和范围。本公开通过以下实施例进一步说明，并非旨在进行限制。本领域的技术人员将容易地识别多种非关键性参数，所述参数可发生改变或修改以产生基本上类似的结果。

除非另外指出，否则本公开的实践将采用本领域技术范围内的蛋白质化学、生物化学、重组 DNA 技术和药理学的常规方法。

## 实施例

### 实施例 1、ST2 抗原及检测蛋白的制备

以人 UniProt Interleukin-1 receptor-like 1 (ST2) isoform A (SEQ ID NO: 1) 的全长基因(hST2)作为本公开 ST2 的模板，获得编码本公开抗原及检测用蛋白的基因序列，可与鼠抗体重链 Fc 片段(如小鼠 IgG2a)重组连接形成 hST2-mFc，或者与人抗体重链 Fc 片段重组连接形成 hST2-hFc，用于小鼠的免疫或后期筛选检测。编码含小鼠抗体重链 Fc 标签的 hST2 胞外区重组蛋白(hST2-ECD-mFc, SEQ ID NO: 2)与含人抗体重链 Fc 标签的 hST2 胞外区重组蛋白(hST2-ECD-hFc, SEQ ID NO: 4)的 cDNA (分别为 SEQ ID NOs: 3 和 5) 通过基因合成获得，并且分别被亚克隆到表达载体 pcDNA3.1(Invitrogen,V-790)中，将上述构建的载体转染进 Expi293 细胞(Thermo, A14527)，进行瞬时表达。并用 Protein A 柱(GE healthcare)纯化 hST2-ECD-mFc 和 hST2-ECD-hFc 重组蛋白。

编码含 Avitag 的人 IL33 的重组蛋白的 cDNA (SEQ ID NO: 7) 通过基因合成获得，并被克隆到带 GST 标签的表达载体上，将上述构建的载体转化进 BL21 感受态细胞进行诱导表达。用 GST 纯化柱纯化 GST-IL33 Avitag 蛋白，Thrombin 酶 (Sigma, T4648-1KU) 酶切后去除 GST 获得 hIL33 Avitag (SEQ ID NO: 6)。

编码人 IL33 的重组蛋白的 cDNA (SEQ ID NO: 9) 通过基因合成获得，并被克隆到带 GST 标签的表达载体上，将上述构建的载体转化进 BL21 感受态细胞，进行诱导表达。用 GST 纯化柱纯化 GST-IL33 蛋白，Thrombin 酶 (Sigma, T4648-1KU) 酶切后去除 GST 获得 hIL33 蛋白 (SEQ ID NO: 8)。

实施例中的 ST2 抗体 RG6149 参见 CN104334582 中的抗体 Ab2，为内部制备，重链和轻链的氨基酸序列如本公开 SEQ ID NO: 83 和 SEQ ID NO: 84 所示；ST2 抗体 GSK3772847 参见 CN104411333 中的抗体 STL208，为内部制备，重链和轻链的氨基酸序列如本公开 SEQ ID NO: 85 和 SEQ ID NO: 86 所示。

### 实施例 2、抗 ST2 杂交瘤单克隆抗体的制备

将纯化的 hST2-ECD-mFc 重组蛋白 (按照 100  $\mu\text{g}$ /只小鼠) 与等体积的完全弗氏佐剂 (Sigma, F5881-10X10ML) (首次免疫) 或不完全弗氏佐剂(Sigma, F5506-10X10ML) (加强免疫) 充分混合并乳化，每 2 周皮下免疫 BALB/c 小鼠，持续 8 周。融合前 3 天，通过腹腔注射不含佐剂的 hST2-ECD-mFc 抗原 (50  $\mu\text{g}$ /只小鼠) 来加强免疫小鼠。采用 PEG 介导的融合步骤将来自免疫小鼠的脾细胞( $1 \times 10^8$ )与 SP2/0 骨髓瘤细胞( $2 \times 10^7$ )进行融合得到杂交瘤细胞。融合后，将细胞用 HAT 完全培养基(Gibco, 21060017)重悬，以 0.1 mL/孔分配到 96 孔板中，并且在 37°C、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行培养。通常在融合后第 10-15 天左右，使用 ELISA 方法检测细胞培养上清与 ST2 的结合活性(参见实施例 5)，并挑选出检测阳性的孔的细胞培养上清，采用 ELISA 方法检测其对 IL33/ST2 结合的阻断活性(参见实施例 6)。

挑选能够特异性结合 ST2 并能阻断 IL33/ST2 结合的孔，并根据细胞密度及时扩大至 24 孔板中。移入 24 孔板的细胞株经过复测后进行保种和第一次亚克隆。第一次亚克隆筛选为阳性的进行保种，并进行第二次亚克隆。第二次亚克隆为阳性的进行保种和蛋白表达。

### 实施例 3、抗 ST2 抗体的 cDNA 获取和嵌合抗体构建

使用总 RNA 提取试剂盒从上述具有结合和阻断功能的杂交瘤细胞中分离总 RNA 作为模板，按照说明

书使用 superscript III 逆转录酶(Thermo, 18080051)合成第一链 cDNA。然后使用简并小鼠 IgG 引物通过 PCR 反应扩增抗体的可变区序列。

将 PCR 混合物在含有 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溴化乙锭的 1% 琼脂糖/Tris-硼酸盐凝胶中进行电泳分离。从凝胶上切下具有预期大小(重链和轻链大约 500bp)的 DNA 片段并且对其进行纯化。将纯化的 PCR 产物克隆到 pMD-19T 载体(Takara, 6013)中, 并且转化到 DH5 $\alpha$  感受态大肠杆菌细胞(Takara, 9057)中。从 LB 固体培养平板上挑取 5 个菌落进行 DNA 测序。得到抗体的重链可变区序列和轻链可变区序列: 7D1 (SEQ ID NOs: 35, 36), 3C6 (SEQ ID NOs: 37, 38), 31C8 (SEQ ID NOs: 39, 40), 26A1 (SEQ ID NOs: 41, 42), 8F4 (SEQ ID NOs: 43, 44), 17E2 (SEQ ID NOs: 45, 46)。

嵌合抗体的构建和表达: 将小鼠 VL 区基因合成片段通过双酶切反应连接到人  $\kappa$  链恒定区来构建嵌合轻链。将小鼠 VH 区的基因合成片段通过双酶切反应连接到人 IgG2 恒定区来构建嵌合重链。

将包含上述嵌合轻链的 DNA 载体和包含上述嵌合重链的 DNA 载体共转染 Expi CHO 细胞(50 mL 体系,  $6 \times 10^6/\text{mL}$  细胞, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DNA)进行瞬时表达, 培养 7 天。然后用 Protein A 柱(GE healthcare)纯化细胞培养上清中的嵌合抗体。

#### 实施例 4、抗 ST2 抗体对 hST2 抗原的亲合力测定

按照产品说明书中所述的方法将抗鼠 IgG 抗体 (用于捕获人 ST2 抗原, Cytiva, 29215281) 或抗 his 抗体 (用于捕获食蟹猴 ST2 抗原, Cytiva, 29234602) 偶联于 CM5 生物芯片 (Cytiva, BR-1000-12) 上, 然后于芯片表面流经一系列浓度(32.8nM、16.4nM、8.2nM、4.1nM、2.05nM、1.0259nM、0.51297nM)的抗 ST2 抗体, 利用 Biacore 仪器(Cytiva, BiacoreT200)实时检测反应信号从而获得结合和解离曲线。在每个循环解离完成后, 使用再生溶液将生物芯片再生, 继而进行下一次捕获, 循环往复完成不同抗体对 ST2 亲和力的测定。最后使用 GE BIAevaluation 软件以 1: 1 (Langmuir)结合模型分析所得数据, 来测定缔合速率常数  $k_a$  ( $k_{on}$ )和解离速率常数  $k_d$  ( $k_{off}$ ), 通过  $KD = k_d/k_a$  计算解离常数 KD。测定抗 ST2 抗体对人 ST2 抗原 (hST2-ECD-mFc)、食蟹猴 ST2 抗原(Cyno-ST2-his, Sino biological, 90915-C08H) 的亲合力数据, 抗 ST2 嵌合抗体与 ST2 的亲合力结果如表 5 所示。

表 5 抗 ST2 嵌合抗体与 ST2 的亲合力

抗体	KD(M)	
	hST2	Cyno-ST2
RG6149	6.86E-11	4.90E-11
xi7D1	1.45E-10	1.24E-10
xi3C6	8.72E-11	1.52E-07
xi31C8	1.77E-11	3.23E-10
xi26A1	2.99E-11	6.98E-08
xi8F4	9.33E-11	4.04E-09
xi17E2	5.41E-11	2.57E-11

#### 实施例 5、抗 ST2 抗体基于 ELISA 的结合分析

通过 ELISA 方法, 分别使用 hST2-ECD-mFc (用于嵌合抗体和人源化抗体检测)、hST2-ECD-hFc 蛋白(用于杂交瘤抗体检测) 和 Cyno-ST2-his (Sino biological, 90915-C08H)作为抗原进行抗体的 ST2 结合筛选和分析。将 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 hST2-ECD-mFc 或者 Cyno-ST2-his 抗原以 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$  包被在高吸附 96 孔板(Costar, 9018)中, 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。充分洗去未吸附抗原后, 使用封闭缓冲液(含 2% 牛血清白蛋白的 PBS)封闭非特异性结

合位点。用洗涤缓冲液(含 0.05%(v/v)吐温 20 的 PBS)洗涤平板三次后, 添加 100  $\mu\text{L}$ /孔的抗 ST2 抗体(初始浓度为 10nM, 按照 3 倍浓度梯度稀释 8 个浓度, 即稀释为约 3.333nM、1.111nM、0.370nM、0.123nM、0.041nM、0.014nM、0.005nM、0.002nM 等)室温下孵育 1 小时。洗涤缓冲液洗涤平板后, 加入偶联辣根过氧化物酶(HRP)的二抗, 继续孵育 60 分钟。洗涤缓冲液洗涤平板后, 添加 100  $\mu\text{L}$ /孔底物 TMB 溶液(Thermo, 00-4201-56), 并将所述平板在室温下温育 2 分钟。添加 100  $\mu\text{L}$ /孔的终止溶液(2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )以停止反应。产生比色信号并且使用酶标仪(PE, Envision)在 450 nm 处读取所述比色信号, 使用 GraphPad Prism5 分析数据, 并计算 EC50。抗 ST2 嵌合抗体与 hST2 和 Cyno-ST2 结合的 EC50 如表 6 和图 1-2 所示。

表 6 抗 ST2 嵌合抗体在 ELISA 实验中与 hST2 和 Cyno-ST2 结合的 EC50

抗体	EC50(nM)	
	hST2	Cyno-ST2
RG6149	0.113	0.129
xi7D1	0.191	0.191
xi3C6	0.157	0.430
xi31C8	0.184	0.163
xi26A1	0.175	0.946
xi8F4	0.172	0.164
xi17E2	0.235	0.220

#### 实例 6、抗 ST2 抗体基于 ELISA 的阻断分析

基于 ELISA 方法, 检测抗 ST2 抗体是否能够阻断 hIL33 与 hST2 的结合。将 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 hST2-ECD-hFc 以 100  $\mu\text{L}$ /孔包被在高吸附 96 孔板中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。充分洗去未吸附抗原后, 使用封闭缓冲液(含 1% 牛血清白蛋白的 PBST)封闭非特异性结合位点。用洗涤缓冲液(含 0.05%(v/v)吐温 20 的 PBS, PBST)洗涤平板三次后, 添加 100  $\mu\text{L}$ /孔的抗 ST2 抗体(初始浓度为 66.67 nM, 按照 2 倍浓度梯度稀释 8 个浓度), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时, 洗涤缓冲液洗涤平板 3 次后, 每孔添加 100  $\mu\text{L}$  生物素标记的 hIL33 Avitag(浓度为 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 小时。洗涤缓冲液洗涤平板 3 次后, 加入 1:1000 稀释的二抗 Avidin HRP (Jackson immunoresearch, 016-030-084), 100  $\mu\text{L}$ /孔, 并在室温孵育 1 小时。洗涤缓冲液洗涤平板后, 添加 100 $\mu\text{L}$ /孔的底物 TMB 溶液(Thermo, 00-4201-56), 并将所述平板在室温下温育 3 分钟, 添加 50 $\mu\text{L}$  终止液(2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )终止反应。产生比色信号并且使用读板仪(PE, Envision)在 450nm 处读取所述信号。使用 GraphPad Prism5 分析数据, 并计算 IC50 值。抗 ST2 嵌合抗体阻断 IL33/ST2 结合的 IC50 如表 7 和图 3 所示。

表 7 抗 ST2 嵌合抗体在 ELISA 实验中阻断 IL33/ST2 结合的 IC50

抗体	IC50(nM)
RG6149	2.882
xi7D1	2.895
xi3C6	2.518
xi31C8	2.498
xi26A1	2.529
xi8F4	2.787
xi17E2	3.346

#### 实施例 7、抗 ST2 抗体基于细胞的结合分析

基于 FACS 的方法，通过与过表达 hST2(SEQ ID NO: 1) 的 HEK293T 细胞系 (HEK293T-hST2-NFκB-Luciferase) 和过表达食蟹猴 ST2(SEQ ID NO: 10) 的 HEK293T 细胞系 (HEK293T-Cyno-ST2-NFκB-Luciferase) 的结合实验，分析抗 ST2 抗体与过表达 hST2 的细胞系、过表达 cyno-ST2 的细胞系的结合能力。使用慢病毒转染系统，将 pLenti6.3-hST2 质粒和 pLenti6.3-NFκB-luciferasae 质粒转染至 HEK293 细胞，构建细胞系 HEK293T-hST2-NFκB-Luciferase；将质粒 pLenti6.3-cynoST2 和 pLenti6.3-NFκB-luciferasae 质粒转染至 HEK293T 细胞，构建细胞系 HEK293T-Cyno-ST2-NFκB-Luciferase。

将  $3 \times 10^5$  个 HEK293T-hST2-NFκB-Luciferase 或 HEK293T-Cyno-ST2-NFκB-Luciferase 细胞加入到 96 孔培养板中，将梯度稀释的抗 ST2 抗体（在 HEK293T-hST2-NFκB-Luciferase 细胞结合试验中，抗 ST2 抗体的初始浓度为 667nM，按照 4 倍浓度梯度稀释 8 个浓度；在 HEK293T-Cyno-ST2-NFκB-Luciferase 结合试验中，抗 ST2 抗体的初始浓度为 400nM，按照 4 倍浓度梯度稀释 8 个浓度）添加到细胞悬浮液中，室温下孵育 60 分钟后，将细胞用 PBS 洗涤 3 次，加入按照 1:200 稀释的 PE goat-anti-human-IgG 二抗 (Jackson immunoresearch, 109-116-170)，100 μL/孔，并在室温孵育 30 分钟。将细胞用 PBS 洗涤 3 次，并用 100ulL PBS 重悬细胞，然后使用流式细胞仪 (BD, Accuri C6) 分析检测荧光信号。通过染色的平均荧光强度 (MFI) 来测量抗 ST2 抗体与细胞系表面的 hST2 和 cyno-ST2 的结合能力。使用 GraphPad Prism5 分析数据，并计算 EC50 值。抗 ST2 嵌合抗体在细胞水平上与 hST2 和 Cyno-ST2 结合的 EC50 见表 8 和图 7-8。

表 8 抗 ST2 嵌合抗体在细胞水平上与 hST2 和 Cyno-ST2 结合的 EC50

抗体	EC50(nM)	
	HEK293T-hST2-NFκB-Luciferase	HEK293T-Cyno-ST2-NFκB-Luciferase
RG6149	0.589	0.647
xi7D1	0.265	0.394
xi3C6	0.349	104.6
xi31C8	0.298	0.830
xi26A1	NA	415.3
xi8F4	0.343	0.458
xi17E2	0.224	0.487

NA: 未达检测线

#### 实施例 8、抗 ST2 抗体阻断 IL33 蛋白与过表达 hST2 细胞系(HEK293T-hST2-NFκB-Luciferase)相互作用的分析

HEK293T 细胞天然高表达 IL1RAcP 蛋白，在此基础上使用慢病毒转染系统，将 pLenti6.3-hST2 质粒和 pLenti6.3-NFκB-Luciferasae 质粒转染至 HEK293 细胞，构建稳定转染细胞系 HEK293T-hST2-NFκB-Luciferase。IL33 与 ST2 结合，招募 IL-1RAcP，能激活下游 NFκB 信号通路，从而启动 Luciferase 的表达。当体系中存在抗 ST2 抗体时，能阻断 IL33 与 ST2 的结合，从而阻断 Luciferase 的表达，通过检测反应底物的荧光强度的强弱变化评价抗 ST2 抗体的阻断活性。

取处于指数生长期状态良好的 HEK293T-hST2-NFκB-Luciferase 细胞，稀释至  $2.5 \times 10^5$  个/mL，以每孔 20 μL 加入到 384 孔板 (Thermo, 262360)；然后每孔加入 15 μL 梯度稀释的抗 ST2 抗体 (初始浓度为 667nM，按照 4 倍浓度梯度稀释)，37°C 孵育 30 分钟；孵育结束后，每孔加入 15 μL hIL33 蛋白 (终浓度为 50pM)；混匀，37°C 孵育 5 小时。然后每孔加入 50 μL ONE-Glo™ Luciferase Assay (Promega, E6120)，避光反应 2-5 分钟。酶标仪 (PE, Envision) 读取化学发光信号。使用 GraphPad Prism5 分析数据，并计算 IC50 值。抗 ST2

嵌合抗体在细胞水平上阻断上 IL33/ST2 信号传导作用的 IC50 见表 9 和图 9。

表 9 抗 ST2 嵌合抗体在细胞水平阻断上 IL33/ST2 信号传导作用的 IC50

抗体	IC50(nM)
	HEK293T-hST2-NFκB-Luciferase
RG6149	11.880
xi7D1	0.120
xi3C6	0.673
xi31C8	2.534
xi26A1	7.567
xi8F4	ND
xi17E2	ND

“ND”代表未测

#### 实施例 9、抗 ST2 抗体阻断 IL33 蛋白与天然表达 hST2 细胞 (KU812-NFκB-Luciferase) 相互作用的分析

KU812 细胞天然表达 ST2 和 IL1RAcP 蛋白，使用慢病毒转染系统转染 pLenti6.3-NFκB-Luciferase 至 KU812 细胞，构建稳定转染细胞系 KU812-NFκB-Luciferase，实验原理见实施例 8。取处于指数生长期状态良好的 KU812-NFκB-Luciferase 细胞，稀释至  $2.5 \times 10^5$  个/mL，以每孔 20 μL 加入到 384 孔板 (Thermo, 262360)；然后每孔加入 15 μL 梯度稀释的抗 ST2 抗体 (初始浓度为 667nM，按照 4 倍浓度梯度稀释)，37°C 孵育 30 分钟；孵育结束后，每孔加入 15 μL hIL33 蛋白 (终浓度为 200pM)；混匀，37°C 孵育 5 小时。然后每孔加入 50 μL ONE-Glo™ Luciferase Assay (Promega, E6120)，避光反应 2-5 分钟。酶标仪 (PE, Envision) 读取化学发光信号。使用 GraphPad Prism5 分析数据，并计算 IC50 值。

#### 实施例 10、抗 ST2 抗体阻断 IL33 与 IL2 共刺激 CD4<sup>+</sup> T 细胞相互作用的分析

在 IL33 与 IL2 共刺激条件下，IL33 与 CD4<sup>+</sup> T 细胞表面的 ST2 结合，激活下游信号通路诱导细胞因子 IL5 的分泌。当体系中存在抗 ST2 抗体时，其能够阻断 IL33 与 CD4<sup>+</sup> T 细胞上的 ST2 结合，抑制 IL5 的分泌。通过检测 IL5 的含量来分析抗 ST2 抗体阻断 IL33 与 IL2 共刺激 CD4<sup>+</sup> T 细胞相互作用的能力。

使用人 CD4<sup>+</sup> T 细胞分选试剂盒 (stemcell, 17952) 从人 PBMC 中分选 CD4<sup>+</sup> T 细胞，以  $2.5 \times 10^5$  个细胞/孔接种到 96 孔 U 底细胞培养板中，60 μL/孔；然后每孔加入 15 μL 稀释的抗 ST2 抗体 (初始浓度为 53nM，按照 3 倍浓度梯度稀释)，37°C 孵育 30 分钟；孵育结束后，每孔加入 15 μL hIL33 蛋白 (终浓度为 4 ng/mL) 和 15 μL IL2 (终浓度 10 ng/mL) (PrimeGene, GMP-101-02)，混匀，37°C 孵育 48 小时。孵育结束后收集上清，按照 IL5 检测试剂盒 (R&D, DY205) 的说明书检测上清中 IL5 的含量。酶标仪 (PE, Envision) 读取 OD450 值。使用 GraphPad Prism5 分析数据，并计算 IC50 值。抗 ST2 嵌合抗体在 CD4<sup>+</sup> T 细胞上阻断经 IL33/ST2 诱导的 IL5 分泌作用的 IC50 结果见表 10。

表 10 抗 ST2 嵌合抗体在 CD4<sup>+</sup> T 细胞上阻断经 IL33/ST2 诱导的 IL5 分泌作用的 IC50

抗体	IC50(nM)
RG6149	0.320
xi7D1	0.120
xi3C6	ND

xi31C8	0.090
xi26A1	ND
xi8F4	ND
xi17E2	0.080

“ND”代表未测

#### 实施例 11、抗人 ST2 杂交瘤单克隆抗体的人源化

选取 31C8（重链可变区序列 SEQ ID NO: 39；轻链可变区序列 SEQ ID NO: 40）进行人源化设计。采用已建立的 CDR 移植方法，选择可用于小鼠抗体人源化的人类抗体骨架区。筛选与小鼠抗体可变区氨基酸具有最高序列同一性（即序列相似性）的人类种系抗体或其亚型，将小鼠抗体的重链可变区和轻链可变区 CDR 插入到筛选的骨架区中，并对骨架区中的残基进行突变。部分 CDR 在此基础上进行突变，以改善抗体的性质，例如改善理化性质或成药性。获得人源化抗体 hz31C8-1.1 和 hz31C8-1.2，其中 hz31C8-1.1 的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列分别是 SEQ ID NO: 71 和 SEQ ID NO: 79；编码人源化抗体 hz31C8-1.1 重链可变区和轻链可变区的 DNA 序列分别是 SEQ ID NO: 72 和 SEQ ID NO: 80；人源化抗体 hz31C8-1.2 重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列分别是 SEQ ID NO: 73 和 SEQ ID NO: 79；编码人源化抗体 hz31C8-1.2 重链可变区和轻链可变区的 DNA 序列分别是 SEQ ID NO: 74 和 SEQ ID NO: 80。

将人源化 VL 区基因合成片段通过双酶切反应连接到人  $\kappa$  链恒定区来构建人源化轻链，将人源化 VH 区的基因合成片段通过双酶切反应连接到人 IgG2 恒定区来构建人源化重链。将对应于每个抗体的人源化重链和轻链的 DNA 转染至表达载体，利用 ExpiCHO 表达系统进行蛋白表达，然后用 Protein A 柱纯化细胞培养上清中的人源化抗体。

#### 实施例 12、人源化抗 ST2 抗体生物学功能分析

按照实施例 4、实施例 5、实施例 6、实施例 7、实施例 8、实施例 9 和实施例 10 的方法对人源化抗体 hz31C8-1.1（重链序列 SEQ ID NO: 75，轻链序列 SEQ ID NO: 81）和 hz31C8-1.2（重链序列 SEQ ID NO: 77，轻链序列 SEQ ID NO: 81）进行亲和力、结合、阻断及细胞功能分析。本公开中“hz”和“xi”分别表示人源化抗体和嵌合抗体，例如“hz31C8-1.1”和“hz31C8-1.2”代表人源化的 31C8-1.1 和 31C8-1.2 抗体，“xi31C8”代表嵌合的 31C8 抗体。

抗 ST2 人源化抗体与 ST2 的亲和力结果如表 11 所示；抗 ST2 人源化抗体在 ELISA 实验中与 hST2 和 Cyno-ST2 结合的 EC50 见表 12 和图 4-5；抗 ST2 人源化抗体在 ELISA 实验中阻断 IL33/ST2 结合的 IC50 见表 13 和图 6；抗 ST2 人源化抗体在细胞水平上与 hST2 结合的 EC50 见表 14 和图 10；抗 ST2 人源化抗体在细胞水平上阻断 IL33/ST2 信号传导作用的 IC50 见表 15 和图 11-12；抗 ST2 人源化抗体在 CD4<sup>+</sup> T 细胞上阻断经 IL33/ST2 诱导的 IL5 分泌作用的 IC50 见表 16 和图 13。

表 11 抗 ST2 人源化抗体与 ST2 的亲和力

抗体	KD(M)	
	hST2	Cyno-ST2
GSK3772847	9.58E-11	9.23E-11
RG6149	1.28E-10	6.90E-11
xi31C8	1.29E-10	1.62E-09
hz31C8-1.1	8.36E-11	2.47E-09
hz31C8-1.2	1.45E-10	5.27E-09

表 12 抗 ST2 人源化抗体在 ELISA 实验中与 hST2 和 Cyno-ST2 结合的 EC50

抗体	EC50(nM)	
	hST2	Cyno-ST2
GSK3772847	0.1266	0.2418
RG6149	0.1125	0.1778
xi31C8	0.0865	0.0690
hz31C8-1.1	0.0879	0.0716
hz31C8-1.2	0.0937	0.0746

表 13 抗 ST2 人源化抗体在 ELISA 实验中阻断 IL33/ST2 结合的 IC50

抗体	IC50(nM)
GSK3772847	2.533
RG6149	2.151
xi31C8	1.933
hz31C8-1.1	1.893
hz31C8-1.2	2.241

表 14 抗 ST2 人源化抗体在细胞水平上与 hST2 结合的 EC50

抗体	EC50(nM)
	HEK293T-hST2-NFκB-Luciferase
GSK3772847	0.6756
RG6149	0.5814
xi31C8	0.4049
hz31C8-1.1	0.3844
hz31C8-1.2	0.4676

表 15 抗 ST2 人源化抗体在细胞水平上阻断 IL33/ST2 信号传导作用的 IC50

抗体	IC50(nM)	
	HEK293T-hST2-NFκB-Luciferase	KU812-NFκB-Luciferase
GSK3772847	29.160	0.111
RG6149	84.280	0.047
xi31C8	15.630	0.016
hz31C8-1.1	15.950	0.008
hz31C8-1.2	20.370	0.006

表 16 抗 ST2 人源化抗体在 CD4<sup>+</sup> T 细胞上阻断经 IL33/ST2 诱导的 IL5 分泌作用的 IC50

抗体	IC50(nM)
GSK3772847	0.794
RG6149	1.819

xi31C8	0.440
hz31C8-1.1	0.462
hz31C8-1.2	0.366

### 实例 13、人源化抗 ST2 抗体的稳定性分析

利用 DSC (Differential scanning calorimetry, 差示扫描量热法) 检测不同抗体的热稳定性, 将样品溶解在 PBS 缓冲液(PH7.4)中, 利用 MicroCal VP-Capillary DSC (Malvern Panalytical) 进行检测。结果如表 17 所示, 本公开的人源化抗 ST2 抗体 hz31C8-1.1 和 hz31C8-1.2 均表现出良好的热稳定性, 且优于对照组抗 ST2 抗体 RG6149 和 GSK3772847。

表 17 DSC 检测抗体的热稳定性

抗体	Tm 起始 (°C)	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tm3 (°C)
hz31C8-1.1	63.12	80.12	/	/
hz31C8-1.2	63.84	77.92	/	/
RG6149	57.47	64.51	76.94	/
GSK3772847	57.24	64.70	71.32	76.29

通过 SEC-HPLC 方法检测抗体在一定浓度条件下周期性稳定性, 示例性的条件比如将抗体浓度控制在约 1 mg/mL, 在 PBS 缓冲液(PH7.2)中比较比如 40°C保存 2 周的稳定性情况。采用 LC-20ADXR/DGU (Shimadzu) 进行检测。结果如下表 18 所示, 本公开的人源化抗 ST2 抗体 hz31C8-1.1 和 hz31C8-1.1 均表现出良好的稳定性。

表 18 SEC-HPLC 检测抗体周期性稳定性

抗体	纯度 (main area%)	聚体含量 (area%)	片段含量 (area%)
xi31C8	96.41	3.59	0
hz31C8-1.1	94.30	5.70	0
hz31C8-1.2	99.67	0.33	0
RG6149	93.21	6.79	0
GSK3772847	79.29	10.11	10.60

将抗 ST2 抗体用 PBS 缓冲液稀释成浓度为 1.5 mg/mL 的溶液, 经过 72°C处理 5 分钟后, 通过 ELISA 方法检测样品与抗原的结合活性。ELISA 检测流程为: 以 2 µg/mL 的 hST2-ECD-mFc 为抗原, 按 100 µL/孔包被 96 孔板, 4°C孵育过夜。充分洗去未吸附抗原后, 使用封闭缓冲液(含 1%牛血清白蛋白的 PBST)封闭非特异性结合位点。用洗涤缓冲液(含 0.05%(v/v)吐温 20 的 PBS, PBST)洗涤平板三次后, 加入 100 µL/孔的抗 ST2 抗体 (初始浓度为 1.5µg/mL, 按照 3 倍浓度梯度稀释 8 个浓度), 37°C孵育 1 小时。洗涤缓冲液洗涤平板后, 加入 anti-Human IgG Fcγ 二抗(Jackson ImmunoResearch, 109-035-008), 37°C孵育 1 小时。洗涤缓冲液洗涤平板后, 加入 100 µL/孔底物 TMB 溶液(Thermo, 00-4201-56)进行显色, 室温孵育 5 分钟后用终止溶液(2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)终止反应。使用读板仪(PE, Envision)在 450 nm 处读取信号, 并用 GraphPad Prism5 分析数据, 计算 EC50 值。结果如下表 19 所示, 本公开的人源化抗 ST2 抗体 hz31C8-1.1 和 hz31C8-1.1 均表现出良好的热稳定性。

表 19 ELISA 检测抗体加热后的结合活性

抗体	EC50(nM)	
	未加热	加热
RG6149	0.1428	1.064
GSK3772847	0.1089	0.1877
xi31C8	0.0744	0.0863
hz31C8-1.1	0.0906	0.0968
hz31C8-1.2	0.0920	0.1095

#### 实例 14、人源化抗 ST2 抗体与 IL1R 家族受体的交叉反应活性

ST2 属于 IL1R 受体家族，使用 ELISA 方法检测抗 ST2 抗体与 IL1R 家族受体的交叉反应活性，所述 IL1R 家族受体包括 IL1R1/CD121a (Sino biological,10126-H08H)、IL1R2/CD121b(Sino biological, 10111-H08H)、IL1R3/IL1RAP(Sino biological, 10121-H08H)、IL1R7/IL-18RAcP(Sino biological, 10176-H08H)、IL1R8/IL1RAPL1 (Sino biological, 10177-H08H)、IL1R9/IL1RAPL2(Sino biological, 10156-H08H)。以上述蛋白为抗原 (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 进行 ELISA 检测，具体的 ELISA 检测流程参见实施例 13。无结合是指抗体在最高浓度时与抗原依旧无结合；弱结合是指抗体在最高浓度时与抗原有微弱的结合，在低浓度时无结合；强结合是指结合数据能拟合出很好的结合曲线。

表 20 ELISA 方法检测人源化 ST2 抗体与 IL1R 家族受体的交叉反应活性

IL1R 家族	交叉反应				
	hz31C8-1.1	hz31C8-1.2	xi31C8	GSK3772847	RG6149
IL1R1/CD121a	—	—	—	—	—
IL1R2/CD121b	—	—	—	+	—
IL1R3/IL1RAP	—	—	—	—	—
IL1R7/IL-18RAcP	—	—	—	+	—
IL1R8/IL1RAPL1	—	—	—	—	—
IL1R9/IL1RAPL2	—	—	—	—	—
ST2	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++

(—: 未结合; +: 弱结合; +++++: 强结合)

#### 实例 15、人源化抗 ST2 抗体的药代动力学评价

实验用 Balb/c 小鼠 18 只，每组 6 只，12/12 小时观感调节，自由进食饮水，购买自南京大学模式动物所。实验当天对小鼠分别静脉注射给药，给药剂量为 10 mg/kg，样品浓度 1 mg/mL。分别于给药前 (0 min，可以提前一天及以上时间)，给药后 30 min、8 h、24 h、2 d (48 h)、4 d (96 h)、7 d、14 d 进行眼眶取血，收集血清，然后用 ELISA 方法检测血清中抗体浓度。检测流程如下：以 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 ST2-His (sinobiological, 10105-H08H) 为抗原，按 100 $\mu\text{L}$ /孔包被于 96 孔板中，4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。充分洗去未吸附抗原后，使用封闭缓冲液(含 1% 牛血清白蛋白的 PBST) 封闭非特异性结合位点。用洗涤缓冲液(具有 0.05% (v/v) 吐温 20 的 PBS, PBST) 洗涤平板三次后，加入 100 $\mu\text{L}$  的待测血清，37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1h。洗涤缓冲液洗涤平板后，加入 anti-Mouse IgG Fcy 二抗，37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1h。洗涤缓冲液洗涤平板后，加入 100 $\mu\text{L}$ /孔底物 TMB 溶液(Thermo, 00-4201-56)

进行显色，室温孵育 5 分钟后，用终止溶液(2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)终止反应。使用读板仪 (PE, Envision) 在 450nm 处读取信号，并用 GraphPad Prism5 分析数据。参见表 21，PK 分析结果表明，本公开的人源化抗 ST2 抗体 hz31C8-1.1 和 hz31C8-1.1 在 小鼠体内的半衰期约为 9.7 天和 7.33 天，优于对照组抗 ST2 抗体 RG6149。

表 21 人源化 ST2 抗体在 小鼠中的 T1/2

抗体	T1/2 (平均值±SD, d)
RG6149	4.61±2.40
hz31C8-1.1	9.70±3.11
hz31C8-1.2	7.33±4.37

虽然，上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本公开作了详尽的描述，但在本公开基础上，可以对之作一些修改或改进，这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此，在不偏离本公开精神的基础上所做的这些修改或改进，均属于本公开要求保护的 范围。

## 权利要求书

1. 一种分离的 ST2 抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(i) 重链 CDR1，重链 CDR2 和重链 CDR3，其中，

(1) 重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 11 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列，重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 15 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列和重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 20 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列；

(2) 重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 11 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列，重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 16 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列和重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 21 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列；

(3) 重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 12 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列，重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 17 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列和重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 22 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列；

(4) 重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 13 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列，重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 18 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列和重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 23 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列；

(5) 重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 14 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列，重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 19 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列和重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 22 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列；或

(6) 重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 11 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列，重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 18 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列和重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 24 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列；

(ii) 轻链 CDR1，轻链 CDR2 和轻链 CDR3，其中，

(1) 轻链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 25 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列，轻链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 29 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列和轻链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 32 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列；

(2) 轻链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 26 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列，轻链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 30 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列和轻链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 34 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列；

(3) 轻链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 27 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列，轻链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 30 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列和轻链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 34 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列；或

(4) 轻链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 28 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列，轻链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 31 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列和轻链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 33 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列；或

(iii) 如(i)所示的重链 CDR1，重链 CDR2 和重链 CDR3，以及如(ii)所示的轻链 CDR1，轻链 CDR2 和轻链 CDR3；其中，

SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列为 AIDPETGDTVYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>KFX<sub>3</sub>G，X<sub>1</sub>=N 或 A，X<sub>2</sub>=Q、E 或 K，X<sub>3</sub>=K 或 Q；

SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列为 QX<sub>4</sub>SNLAS，X<sub>4</sub>=M 或 L。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段，其中，

SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列为 AIDPETGDTVYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>KFX<sub>3</sub>G，其中，

(i) X<sub>1</sub>=N 或 A，X<sub>2</sub>=Q，X<sub>3</sub>=K 或 Q；

(ii)  $X_1=N$  或 A,  $X_2=E$ ,  $X_3=K$  或 Q; 或

(iii)  $X_1=N$  或 A,  $X_2=K$ ,  $X_3=K$  或 Q。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段, 所述抗体或其抗原结合片段包含重链 CDR1、重链 CDR2、重链 CDR3、轻链 CDR1、轻链 CDR2 和轻链 CDR3, 其中,

(1) 重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 11 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 15 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 20 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 轻链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 25 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 轻链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 29 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列和轻链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 32 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列;

(2) 重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 11 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 16 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 21 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 轻链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 26 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 轻链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 30 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列和轻链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 34 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列;

(3) 重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 12 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 17 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 22 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 轻链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 27 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 轻链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 30 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列和轻链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 34 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列;

(4) 重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 13 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 18 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 23 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 轻链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 27 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 轻链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 30 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列和轻链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 34 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列;

(5) 重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 14 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 19 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 22 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 轻链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 27 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 轻链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 30 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列和轻链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 34 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列; 或

(6) 重链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 11 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 重链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 18 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 重链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 24 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 轻链 CDR1 包含如 SEQ ID NO: 28 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 轻链 CDR2 包含如 SEQ ID NO: 31 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列和轻链 CDR3 包含如 SEQ ID NO: 33 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列; 其中,

SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列为 AIDPETGDTVYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>KFX<sub>3</sub>G, 其中,

- (i) X<sub>1</sub>=N 或 A, X<sub>2</sub>=Q, X<sub>3</sub>=K 或 Q;
- (ii) X<sub>1</sub>=N 或 A, X<sub>2</sub>=E, X<sub>3</sub>=K 或 Q; 或
- (iii) X<sub>1</sub>=N 或 A, X<sub>2</sub>=K, X<sub>3</sub>=K 或 Q;

并且, SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列为 QX<sub>4</sub>SNLAS, X<sub>4</sub>=M 或 L。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 所述抗体或其抗原结合片段是嵌合或人源化的。

5. 一种分离的 ST2 抗体或其抗原结合片段, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

- (i) 重链可变区, 所述重链可变区包含如 SEQ ID NOs: 35, 37, 39, 41, 43, 45, 71 或 73 所示的序列, 或与 SEQ ID NOs: 35, 37, 39, 41, 43, 45, 71 或 73 所示的序列相比具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;
- (ii) 轻链可变区, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NOs: 36, 38, 40, 42, 44, 46 或 79 所示的序列, 或与 SEQ ID NOs: 36, 38, 40, 42, 44, 46 或 79 所示的序列相比具有至少 80% 同一性的氨基酸序列; 或
- (iii) 如(i)所示的重链可变区以及如(ii)所示的轻链可变区。

6. 根据权利要求 5 所述的抗体或其抗原结合片段, 所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区, 其中,

- (1) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 35 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 36 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;
- (2) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 37 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 38 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;
- (3) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 39 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 40 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;
- (4) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 41 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 42 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;
- (5) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 43 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 44 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;
- (6) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 45 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 46 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;
- (7) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 71 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 79 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列; 或
- (8) 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 73 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 79 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列。

7. 一种分离的 ST2 抗体或其抗原结合片段, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

- (i) 重链, 所述重链包含如 SEQ ID NOs: 47, 51, 55, 59, 63, 67, 75 或 77 所示的序列, 或与 SEQ ID NOs: 47, 51, 55, 59, 63, 67, 75 或 77 所示的序列相比具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;
- (ii) 轻链, 所述轻链包含如 SEQ ID NOs: 49, 53, 57, 61, 65, 69 或 81 所示的序列, 或与 SEQ ID NOs: 49, 53, 57, 61, 65, 69 或 81 所示的序列相比具有至少 80% 同一性的氨基酸序列; 或
- (iii) 如(i)所示的重链以及如(ii)所示的轻链。

8. 根据权利要求 7 所述的抗体或其抗原结合片段, 所述抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链, 其中,

- (1) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 47 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列, 和所述轻链包含如 SEQ ID NO: 49 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列;
- (2) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 51 所示的序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列, 和所述轻链包

- 含如 SEQ ID NO: 53 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列;
- (3) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 55 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 和所述轻链包含如 SEQ ID NO: 57 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列;
- (4) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 59 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 和所述轻链包含如 SEQ ID NO: 61 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列;
- (5) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 63 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 和所述轻链包含如 SEQ ID NO: 65 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列;
- (6) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 67 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 和所述轻链包含如 SEQ ID NO: 69 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列;
- (7) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 75 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 和所述轻链包含如 SEQ ID NO: 81 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列; 或
- (8) 所述重链包含如 SEQ ID NO: 77 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 和所述轻链包含如 SEQ ID NO: 81 所示的序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列。
9. 根据权利要求 1-8 任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段选自单克隆抗体、Fab 片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、Fd 片段、Fv 片段、dAb、分离的 CDR 区、单链 Fv 分子或其组合。
10. 根据权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人或猴的 ST2, 并阻断 IL33/ST2 的结合及其信号传导。
11. 根据权利要求 1-10 任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段基本上不结合 IL1R1、IL1R2、IL1R3、IL1R7、IL1R8 和 IL1R9。
12. 根据权利要求 1-11 任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段在 CD4<sup>+</sup> T 细胞上阻断经 IL33/ST2 诱导的 IL5 分泌。
13. 一种分离的核酸分子, 其编码权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段。
14. 一种表达载体, 其包含权利要求 13 所述的核酸分子。
15. 一种宿主细胞, 其包含权利要求 13 所述的核酸分子或权利要求 14 所述的表达载体。
16. 一种多肽融合物或多特异性分子, 其包含权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段。
17. 一种病毒载体, 其包含编码权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段的核酸分子或权利要求 13 所述的核酸分子。
18. 一种药物组合物, 其包含权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。
19. 一种检测来源于受试者的样品中 ST2 表达量的方法, 该方法包括在使得权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段和 ST2 形成复合物的条件下, 将所述样品与所述抗体或其抗原结合片段接触的步骤。
20. 一种用于在有需要的受试者中治疗或缓解 IL33/ST2 介导的相关疾病和病症的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 13 所述的核酸分子。
21. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中, 所述 IL33/ST2 介导的相关疾病和病症包括哮喘, 过敏性鼻炎, 慢性阻塞性肺病, 嗜酸粒细胞性支气管炎, 嗜酸细胞性食道炎, 特应性皮炎, 牛皮癣, 全身性红斑狼疮, 类天疱疮, 风湿性关节炎, 强直性脊柱炎, 炎症性肠病, 肺纤维化, 肝纤维化, 系统性硬化症, 结节病, 移植抗宿主病(GVHD), 糖尿病疾病, 心血管疾病, 或其组合。

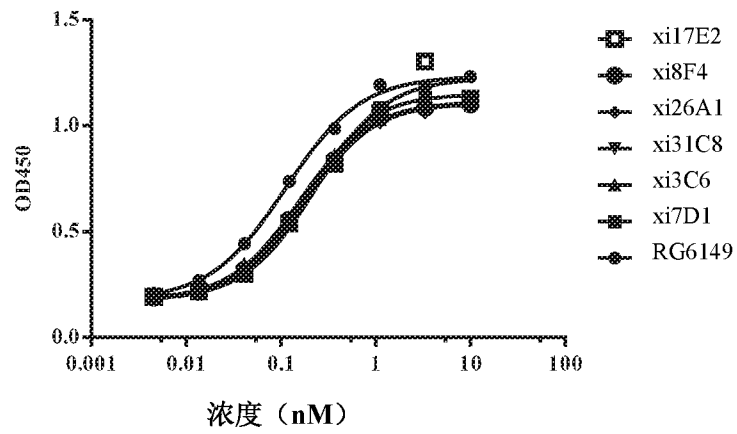


图 1

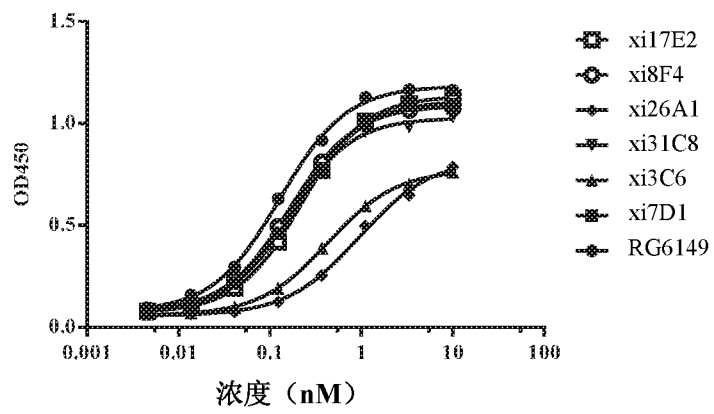


图2

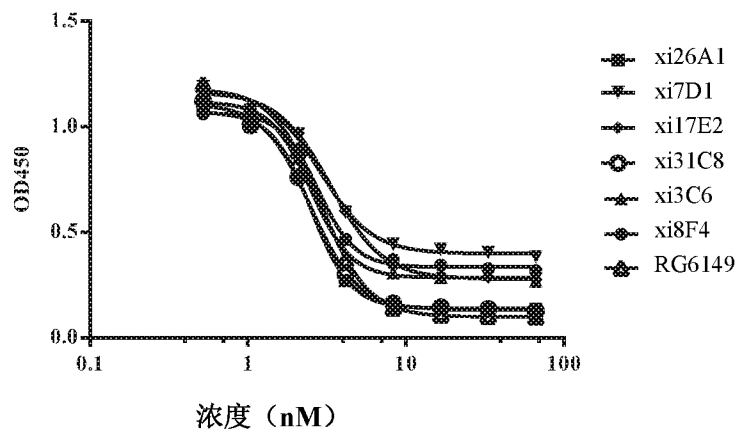


图 3

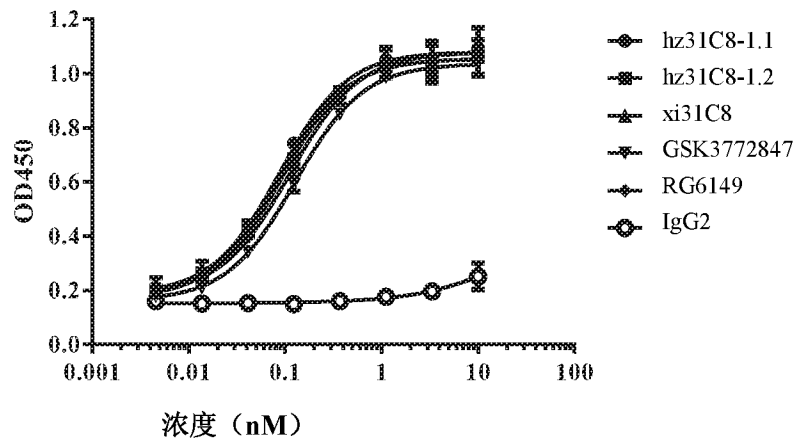


图4

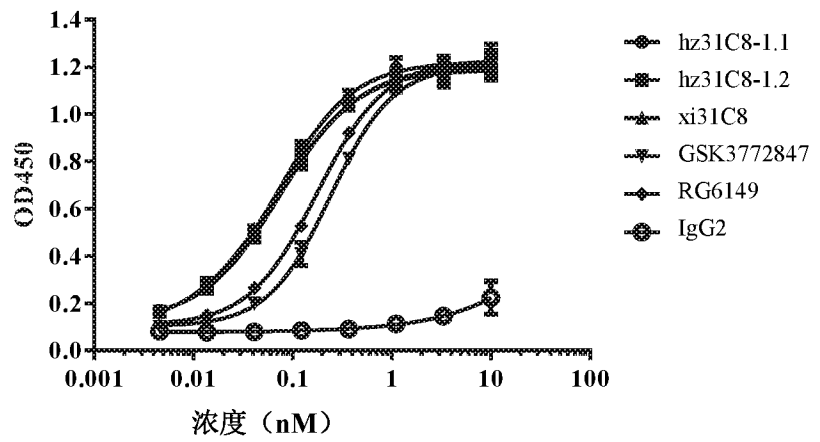


图5

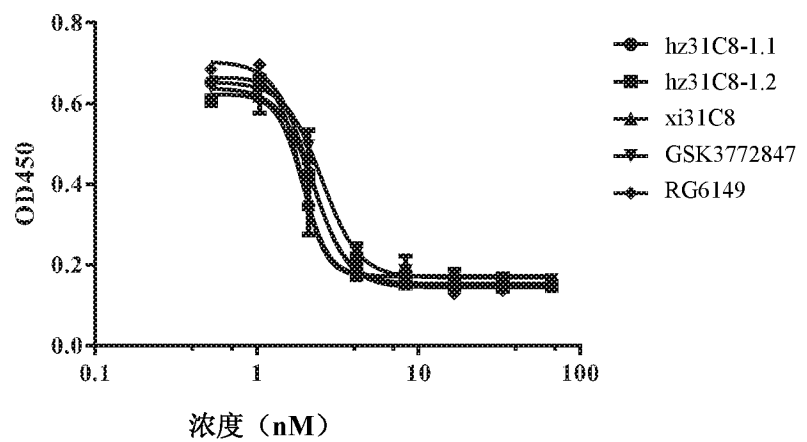


图6

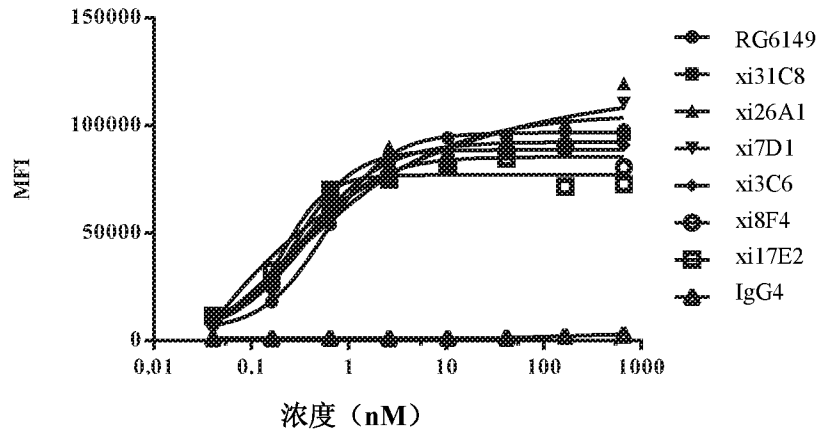


图7

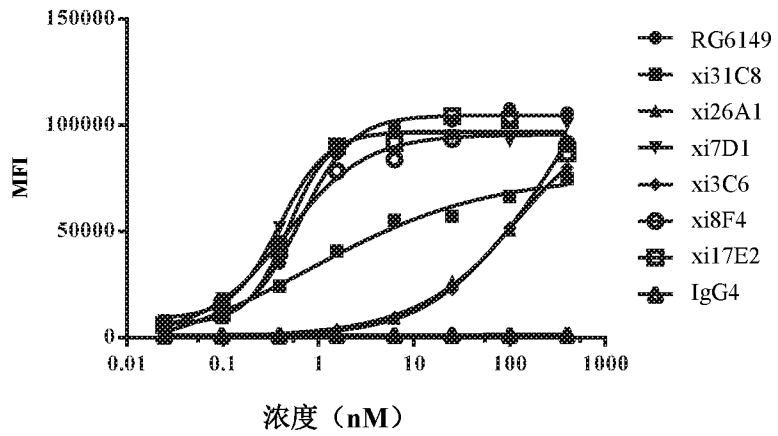


图8

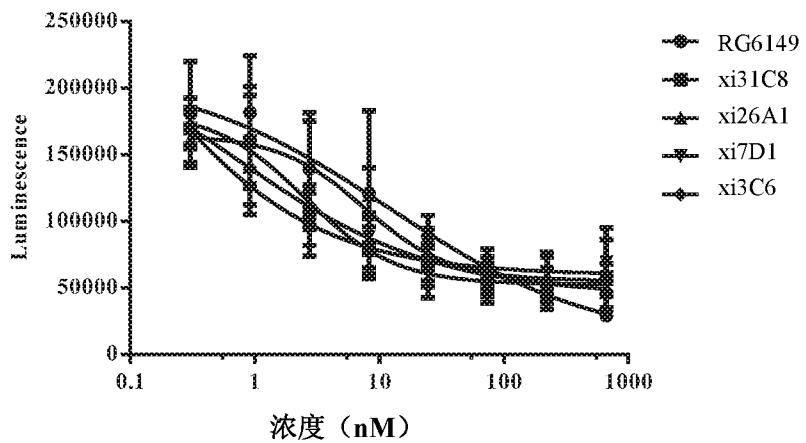


图9

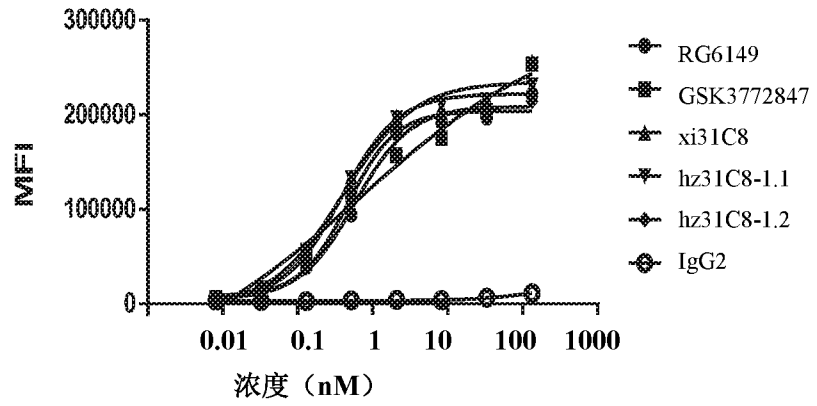


图10

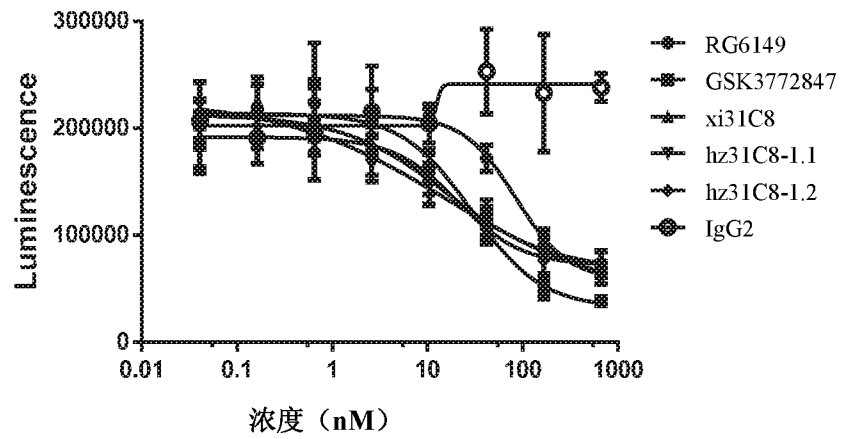


图11

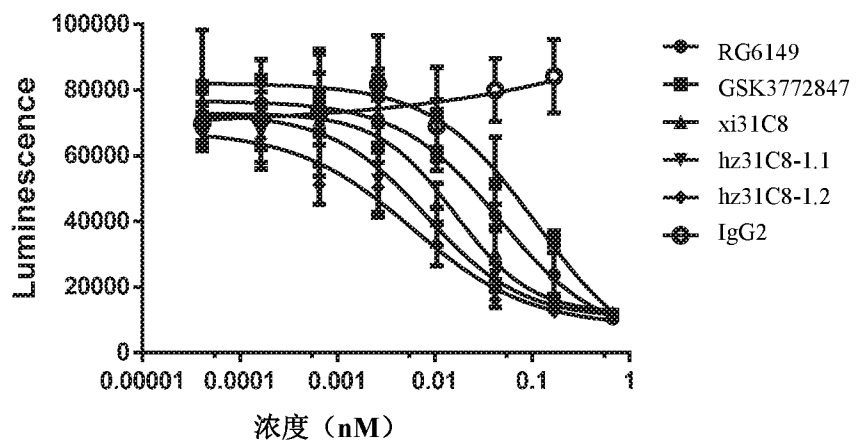


图12

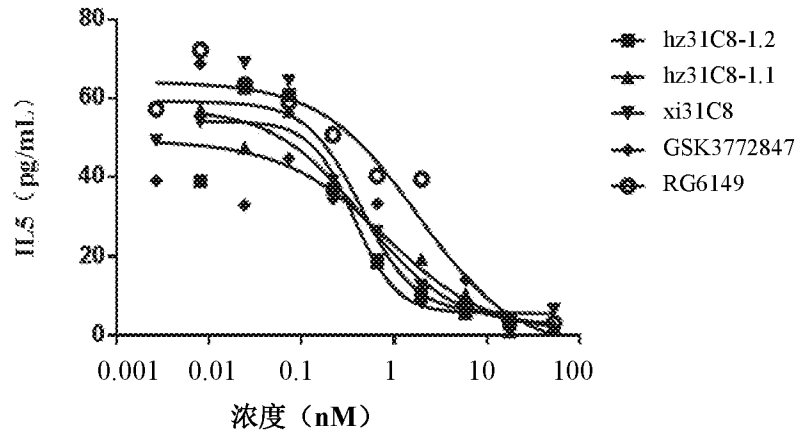


图13

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/093066

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C07K 16/28(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K16  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, CNTXT, SIPOABS, DWPI, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方数据库, WANFANG DATA, EMBL, NCBI, STN: ST2, IL-33, 特异性结合, 抗原结合片段, 重链可变区, 氨基酸序列, 核酸分子, 表达载体, 宿主细胞, 亲和力, 炎症, 特异性皮炎, 哮喘, 人白细胞介素-33R, 抗IL-33R抗体, IL-33R相关疾病, IL-33R活性抑制, IL-5分泌抑制, 免疫介导, interleukin-33 receptor, 序列检索, sequence search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 107446040 A (SHENZHEN ANQUN BIOENGINEERING CO., LTD.) 08 December 2017 (2017-12-08) entire document	1-21
A	US 2020141947 A1 (SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 07 May 2020 (2020-05-07) entire document	1-21
A	CN 110357963 A (BEIJING WISDOMAB BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 22 October 2019 (2019-10-22) entire document	1-21
A	CN 105051063 A (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 11 November 2015 (2015-11-11) entire document	1-21
A	CN 104334582 A (AMGEN INC.) 04 February 2015 (2015-02-04) entire document	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>28 July 2021</b>		Date of mailing of the international search report <b>10 August 2021</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China</b> Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer   Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2021/093066**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PERCIVAL-ALWYN, J.L. et al. "Generation of Potent Mouse Monoclonal Antibodies to Self-proteins Using T-cell Epitope "Tags"" <i>Mabs</i> , Vol. 7, No. 1, 28 February 2015 (2015-02-28), pp. 129-137	1-21
.....		

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

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

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

1.  Claims Nos.: **20-21**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  - [1] Claims 20 and 21 relate to a method of treating or alleviating IL33/ST2-mediated related diseases and conditions, i.e., claims 20 and 21 relate to the subject matter that does not warrant an international search according to the criteria set out in PCT Rule 39.1: (iv) methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods of the human or animal body. The international search is made on the basis of the use of preparations prepared to treat or alleviate IL33/ST2-mediated related diseases and conditions in subjects in need thereof.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2021/093066**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107446040	A	08 December 2017	CN	107446040	B	12 January 2021
US	2020141947	A1	07 May 2020	US	2018267059	A1	20 September 2018
				WO	2016122865	A1	04 August 2016
				US	10539572	B2	21 January 2020
CN	110357963	A	22 October 2019	CN	110357963	B	18 September 2020
				WO	2021017071	A1	04 February 2021
CN	105051063	A	11 November 2015	IL	261743	D0	31 October 2018
				EP	2970460	A2	20 January 2016
				RS	60503	B1	31 August 2020
				CL	2015002469	A1	10 June 2016
				PH	12015501656	B1	19 October 2015
				AU	2014248839	A1	20 August 2015
				HK	1220467	A1	05 May 2017
				HR	P20200846	T1	21 August 2020
				TW	201522370	A	16 June 2015
				JP	2019088311	A	13 June 2019
				IL	240354	A	24 September 2015
				PL	2970460	T3	05 October 2020
				IL	261743	A	30 November 2020
				JP	6479755	B2	06 March 2019
				EA	031745	B1	28 February 2019
				US	2016362487	A1	15 December 2016
				US	2018251542	A1	06 September 2018
				US	9453072	B2	27 September 2016
				CL	2018000101	A1	06 July 2018
				KR	102103159	B1	29 May 2020
				UY	35417	A	31 October 2014
				CA	2902172	A1	09 October 2014
				EP	3683235	A1	22 July 2020
				CN	105051063	B	16 August 2019
				EP	2970460	B1	29 April 2020
				BR	112015020470	A2	10 October 2017
				DK	2970460	T3	02 June 2020
				MX	2015010599	A	15 December 2015
				SI	2970460	T1	31 July 2020
				HU	E051018	T2	28 January 2021
				IL	240354	D0	24 September 2015
				KR	20150126598	A	12 November 2015
				TW	I633119	B	21 August 2018
				US	2020071396	A1	05 March 2020
				US	2014271658	A1	18 September 2014
				WO	2014164959	A2	09 October 2014
				US	10000564	B2	19 June 2018
				PH	12015501656	A1	19 October 2015
				AU	2014248839	B2	03 January 2019
				WO	2014164959	A3	19 February 2015
				SG	11201505745W	A	28 August 2015
				ES	2804592	T3	08 February 2021
				ZA	201505376	B	27 July 2016
				LT	2970460	T	10 June 2020

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2021/093066**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				PT	2970460	T	02 June 2020
				EA	201591716	A1	29 July 2016
				JP	6845876	B2	24 March 2021
				JP	2016513644	A	16 May 2016
				US	10519230	B2	31 December 2019
CN	104334582	A	04 February 2015	MX	2014013894	A	16 January 2015
				SG	11201407564T	A	30 December 2014
				EA	035160	B9	01 October 2020
				AR	091069	A1	30 December 2014
				PH	12014502527	B1	12 January 2015
				MX	356557	B	04 June 2018
				JP	2019004885	A	17 January 2019
				PT	2850103	T	01 October 2020
				WO	2013173761	A3	20 February 2014
				US	9982054	B2	29 May 2018
				EP	2850103	A2	25 March 2015
				AU	2013262593	B2	25 January 2018
				EA	201492149	A8	30 October 2015
				JP	2015523967	A	20 August 2015
				IL	235308	D0	31 December 2014
				JP	2020171305	A	22 October 2020
				TW	I600664	B	01 October 2017
				WO	2013173761	A2	21 November 2013
				JP	6382260	B2	29 August 2018
				EP	2850103	A4	31 August 2016
				CN	104334582	B	26 October 2018
				AP	2014008053	A0	30 November 2014
				KR	102161460	B1	07 October 2020
				CR	20140585	A	06 March 2015
				EP	3693395	A1	12 August 2020
				CO	7250445	A2	30 April 2015
				ZA	201407937	B	27 September 2017
				JP	2016180001	A	13 October 2016
				UY	34813	A	29 November 2013
				PE	20150023	A1	22 January 2015
				US	2017267769	A1	21 September 2017
				AU	2018202097	A1	31 May 2018
				CN	109206517	A	15 January 2019
				AU	2013262593	A1	30 October 2014
				PH	12014502527	A1	12 January 2015
				ES	2818571	T3	13 April 2021
				US	2019359720	A1	28 November 2019
				KR	20150013167	A	04 February 2015
				PE	20191408	A1	04 October 2019
				US	2017002079	A1	05 January 2017
				SI	2850103	T1	29 January 2021
				HK	1208479	A1	04 March 2016
				IL	267599	D0	29 August 2019
				NZ	700856	A	31 March 2017
				EP	2850103	B1	22 July 2020

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2021/093066**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		DK 2850103 T3	07 September 2020
		AP 201408053 A0	30 November 2014
		US 9382318 B2	05 July 2016
		TN 2014000434 A1	30 March 2016
<hr/>			

<b>A. 主题的分类</b> C07K 16/28 (2006.01) i  按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
<b>B. 检索领域</b> 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K16  包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献  在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CNTXT, SIPOABS, DWPI, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方数据库, EMBL, NCBI, STN:ST2, IL-33, 特异性结合, 抗原结合片段, 重链可变区, 氨基酸序列, 核酸分子, 表达载体, 宿主细胞, 亲合力, 炎症, 特应性皮炎, 哮喘, 人白细胞介素-33R, 抗IL-33R抗体, IL-33R相关疾病, IL-33R活性抑制, IL-5分泌抑制, 免疫介导, interleukin-33 receptor, 序列检索		
<b>C. 相关文件</b>		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 107446040 A (深圳市安群生物工程有限公司) 2017年 12月 8日 (2017 - 12 - 08) 全文	1-21
A	US 2020141947 A1 (SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 2020年 5月 7日 (2020 - 05 - 07) 全文	1-21
A	CN 110357963 A (北京智仁美博生物科技有限公司) 2019年 10月 22日 (2019 - 10 - 22) 全文	1-21
A	CN 105051063 A (瑞泽恩制药公司) 2015年 11月 11日 (2015 - 11 - 11) 全文	1-21
A	CN 104334582 A (安进公司) 2015年 2月 4日 (2015 - 02 - 04) 全文	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2021年 7月 28日		国际检索报告邮寄日期 2021年 8月 10日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员  电话号码

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	PERCIVAL-ALWYN, J.L. 等. "Generation of potent mouse monoclonal antibodies to self-proteins using T-cell epitope "tags" " MABS, 第7卷, 第1期, 2015年 2月 28日 (2015 - 02 - 28), 129-137页	1-21

## 第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a.  作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
  - 纸件或图形文件形式
- b.  根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c.  仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
  - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2.  另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.  权利要求： 20-21  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
[1] 权利要求20-21治疗或缓解IL33/ST2介导的相关疾病和病症的方法，也即权利要求20-21涉及PCT细则39.1定义的不要国际检索单位检索的主题：（4）通过外科手术或治疗对人体或动物体进行处置的方法及在人体或动物体上实施的诊断方法。国际检索基于制备在有需要的受试者中治疗或缓解IL33/ST2介导的相关疾病和病症的制剂的用途。
2.  权利要求：  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3.  权利要求：  
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN/

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	107446040	A	2017年 12月 8日	CN	107446040	B	2021年 1月 12日
US	2020141947	A1	2020年 5月 7日	US	2018267059	A1	2018年 9月 20日
				WO	2016122865	A1	2016年 8月 4日
				US	10539572	B2	2020年 1月 21日
CN	110357963	A	2019年 10月 22日	CN	110357963	B	2020年 9月 18日
				WO	2021017071	A1	2021年 2月 4日
CN	105051063	A	2015年 11月 11日	IL	261743	D0	2018年 10月 31日
				EP	2970460	A2	2016年 1月 20日
				RS	60503	B1	2020年 8月 31日
				CL	2015002469	A1	2016年 6月 10日
				PH	12015501656	B1	2015年 10月 19日
				AU	2014248839	A1	2015年 8月 20日
				HK	1220467	A1	2017年 5月 5日
				HR	P20200846	T1	2020年 8月 21日
				TW	201522370	A	2015年 6月 16日
				JP	2019088311	A	2019年 6月 13日
				IL	240354	A	2015年 9月 24日
				PL	2970460	T3	2020年 10月 5日
				IL	261743	A	2020年 11月 30日
				JP	6479755	B2	2019年 3月 6日
				EA	031745	B1	2019年 2月 28日
				US	2016362487	A1	2016年 12月 15日
				US	2018251542	A1	2018年 9月 6日
				US	9453072	B2	2016年 9月 27日
				CL	2018000101	A1	2018年 7月 6日
				KR	102103159	B1	2020年 5月 29日
				UY	35417	A	2014年 10月 31日
				CA	2902172	A1	2014年 10月 9日
				EP	3683235	A1	2020年 7月 22日
				CN	105051063	B	2019年 8月 16日
				EP	2970460	B1	2020年 4月 29日
				BR	112015020470	A2	2017年 10月 10日
				DK	2970460	T3	2020年 6月 2日
				MX	2015010599	A	2015年 12月 15日
				SI	2970460	T1	2020年 7月 31日
				HU	E051018	T2	2021年 1月 28日
				IL	240354	D0	2015年 9月 24日
				KR	20150126598	A	2015年 11月 12日
				TW	I633119	B	2018年 8月 21日
				US	2020071396	A1	2020年 3月 5日
				US	2014271658	A1	2014年 9月 18日
				WO	2014164959	A2	2014年 10月 9日
				US	10000564	B2	2018年 6月 19日
				PH	12015501656	A1	2015年 10月 19日
				AU	2014248839	B2	2019年 1月 3日
				WO	2014164959	A3	2015年 2月 19日
				SG	11201505745W	A	2015年 8月 28日
				ES	2804592	T3	2021年 2月 8日
				ZA	201505376	B	2016年 7月 27日
				LT	2970460	T	2020年 6月 10日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN/

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		PT 2970460 T	2020年 6月 2日
		EA 201591716 A1	2016年 7月 29日
		JP 6845876 B2	2021年 3月 24日
		JP 2016513644 A	2016年 5月 16日
		US 10519230 B2	2019年 12月 31日
CN 104334582 A	2015年 2月 4日	MX 2014013894 A	2015年 1月 16日
		SG 11201407564T A	2014年 12月 30日
		EA 035160 B9	2020年 10月 1日
		AR 091069 A1	2014年 12月 30日
		PH 12014502527 B1	2015年 1月 12日
		MX 356557 B	2018年 6月 4日
		JP 2019004885 A	2019年 1月 17日
		PT 2850103 T	2020年 10月 1日
		WO 2013173761 A3	2014年 2月 20日
		US 9982054 B2	2018年 5月 29日
		EP 2850103 A2	2015年 3月 25日
		AU 2013262593 B2	2018年 1月 25日
		EA 201492149 A8	2015年 10月 30日
		JP 2015523967 A	2015年 8月 20日
		IL 235308 D0	2014年 12月 31日
		JP 2020171305 A	2020年 10月 22日
		TW I600664 B	2017年 10月 1日
		WO 2013173761 A2	2013年 11月 21日
		JP 6382260 B2	2018年 8月 29日
		EP 2850103 A4	2016年 8月 31日
		CN 104334582 B	2018年 10月 26日
		AP 2014008053 A0	2014年 11月 30日
		KR 102161460 B1	2020年 10月 7日
		CR 20140585 A	2015年 3月 6日
		EP 3693395 A1	2020年 8月 12日
		CO 7250445 A2	2015年 4月 30日
		ZA 201407937 B	2017年 9月 27日
		JP 2016180001 A	2016年 10月 13日
		UY 34813 A	2013年 11月 29日
		PE 20150023 A1	2015年 1月 22日
		US 2017267769 A1	2017年 9月 21日
		AU 2018202097 A1	2018年 5月 31日
		CN 109206517 A	2019年 1月 15日
		AU 2013262593 A1	2014年 10月 30日
		PH 12014502527 A1	2015年 1月 12日
		ES 2818571 T3	2021年 4月 13日
		US 2019359720 A1	2019年 11月 28日
		KR 20150013167 A	2015年 2月 4日
		PE 20191408 A1	2019年 10月 4日
		US 2017002079 A1	2017年 1月 5日
		SI 2850103 T1	2021年 1月 29日
		HK 1208479 A1	2016年 3月 4日
		IL 267599 D0	2019年 8月 29日
		NZ 700856 A	2017年 3月 31日
		EP 2850103 B1	2020年 7月 22日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN/

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
		DK	2850103	T3	2020年 9月 7日
		AP	201408053	A0	2014年 11月 30日
		US	9382318	B2	2016年 7月 5日
		TN	2014000434	A1	2016年 3月 30日