



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119174816 A

(43) 申请公布日 2024.12.24

(21) 申请号	202411571032.7	A61K 47/26 (2006.01)
(22) 申请日	2022.08.25	A61K 47/12 (2006.01)
(66) 本国优先权数据		A61K 47/02 (2006.01)
	202110988008.3 2021.08.26 CN	A61K 47/22 (2006.01)
(62) 分案原申请数据		A61P 17/00 (2006.01)
	202280046126.5 2022.08.25	A61P 37/08 (2006.01)
(71) 申请人	正大天晴药业集团股份有限公司	A61P 11/02 (2006.01)
地址	222062 江苏省连云港市郁州南路369号	A61P 11/06 (2006.01)
		A61P 35/00 (2006.01)
(72) 发明人	程艳菊 李盈淳 孔令婕 郭晓璐 赵伟	
(51) Int.Cl.		
	A61K 39/395 (2006.01)	
	C07K 16/28 (2006.01)	
	A61K 9/19 (2006.01)	

权利要求书3页 说明书30页
序列表（电子公布）

(54) 发明名称

抗IL4R抗体的药物组合物及其用途

(57) 摘要

本发明提供了一种抗IL4R抗体的药物组合物及其用途,所述药物组合物包含抗IL4R抗体或其抗原结合片段和缓冲剂,所述药物组合物还可以包含表面活性剂和稳定剂。

1. 一种药物组合物,其包含:(a)抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b)缓冲剂,(c)表面活性剂,以及(d)稳定剂。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区CDR1、重链可变区CDR2、重链可变区CDR3、轻链可变区CDR1、轻链可变区CDR2和轻链可变区CDR3,所述重链可变区CDR1、重链可变区CDR2、重链可变区CDR3、轻链可变区CDR1、轻链可变区CDR2和轻链可变区CDR3分别包含与SEQ ID NOs:1、2、3、4、5和6所示的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NOs:7、8或9所示的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,其中,SEQ ID NO:8的氨基酸序列为:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSSWRQAPGKGLVX₁VX₂TINSNGGSTSYPDSSVKGRF TISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWGQGLTVTVSS,其中SEQ ID NO:8中的X₁=W和X₂=S,X₁=L和X₂=A,或X₁=W和X₂=A;和/或

所述抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含与SEQ ID NOs:10、11或12所示的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,其中,SEQ ID NO:11的氨基酸序列为:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLAWEYQQKPKAPKX₁LX₂YNAKTLAEGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQHYYPPTWTFGQGTKVEIK,其中SEQ ID NO:11中的X₁=L和X₂=I,X₁=F和X₂=V,或X₁=F和X₂=I。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的药物组合物,其中所述抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含:(1)分别与SEQ ID NOs:7和10所示的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列;(2)分别与SEQ ID NOs:8和11所示的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:8中的X₁=W和X₂=S;(3)分别与SEQ ID NOs:8和12所示的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:8中的X₁=W和X₂=S;(4)分别与SEQ ID NOs:9和11所示的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列;(5)分别与SEQ ID NOs:9和12所示的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列;(6)分别与SEQ ID NOs:8和11所示的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:8中的X₁=L和X₂=A;(7)分别与SEQ ID NOs:8和12所示的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:8中的X₁=L和X₂=A;(8)分别与SEQ ID NOs:8和11所示的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:8中的X₁=W和X₂=A;或(9)分别与SEQ ID NOs:8和12所示的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:8中的X₁=W和X₂=A;

其中SEQ ID NO:8的氨基酸序列为:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSSWRQAPGKGLVX₁VX₂TINSNGGSTSYPDSSVKGRF TISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWGQGLTVTVSS;

其中SEQ ID NO:11的氨基酸序列为:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLAWEYQQKPKAPKX₁LX₂YNAKTLAEGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQHYYPPTWTFGQGTKVEIK,其中,SEQ ID NO:11中的X₁=L和X₂=I,X₁=F和X₂=V,或X₁=F和X₂=I。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的药物组合物,其中所述抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段还包含重链恒定区和轻链恒定区,所述重链恒定区包含SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列,所述轻链恒定区包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的药物组合物,其中所述抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段的浓度为30mg/mL至300mg/mL,50mg/mL至250mg/mL,70mg/mL至200mg/mL,100mg/mL至180mg/mL,120mg/mL至180mg/mL,120mg/mL至150mg/mL,或150mg/mL至180mg/mL。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的药物组合物,其中所述缓冲剂包括磷酸盐缓冲剂、醋酸盐缓冲剂或组氨酸盐缓冲剂;优选地,所述磷酸盐缓冲剂是磷酸钠缓冲剂,所述醋酸盐缓冲剂是醋酸钠-醋酸缓冲剂,和/或所述组氨酸盐缓冲剂是组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂;

可选地,其中所述缓冲剂的浓度为1mM至100mM,2mM至80mM,4mM至60mM,8mM至40mM,10mM至30mM,10mM至20mM,或20mM至30mM。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的药物组合物,其中所述表面活性剂包括聚山梨酯80或聚山梨酯20;可选地,其中所述表面活性剂的浓度为0.01mg/mL至2mg/mL,0.05mg/mL至1mg/mL,0.1mg/mL至0.8mg/mL,0.2mg/mL至0.6mg/mL,或0.2mg/mL至0.4mg/mL。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的药物组合物,其中所述稳定剂选自海藻糖、甘露醇、蔗糖、精氨酸或其药学上可接受的盐、脯氨酸或氯化钠中的一种或几种;

可选地,其中所述蔗糖的浓度为10mg/mL至100mg/mL,20mg/mL至80mg/mL,30mg/mL至60mg/mL,40mg/mL至50mg/mL,或50mg/mL至60mg/mL;所述精氨酸或其药学上可接受的盐的浓度为10mM至100mM,20mM至80mM,30mM至60mM,40mM至50mM,或50mM至60mM;所述脯氨酸的浓度为60mM至600mM,80mM至500mM,100mM至450mM,120mM至400mM,150mM至350mM,200mM至350mM,或250mM至350mM;和/或,所述氯化钠的浓度为1mM至80mM,2mM至60mM,4mM至50mM,8mM至40mM,10mM至30mM,或10mM至20mM。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物的pH为4至7,5至7,5至6.5,5.3至6.5,5.3至6.3,5.3至5.8,或5.8至6.3。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物包含:

(a) 30mg/mL至300mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,

(b) 1mM至100mM的缓冲剂,

(c) 0.01mg/mL至2mg/mL的表面活性剂,以及

(d) 稳定剂,所述稳定剂包含海藻糖、甘露醇、蔗糖、精氨酸或其药学上可接受的盐、脯氨酸和/或氯化钠,并且所述药物组合物的pH为4至7,5至7,5至6.5,5.3至6.5,5.3至6.3,5.3至5.8,或5.8至6.3;可选地,其中所述药物组合物包含:

(a) 30mg/mL至300mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,

(b) 1mM至100mM的磷酸盐缓冲剂、醋酸盐缓冲剂或组氨酸盐缓冲剂,

(c) 0.01mg/mL至2mg/mL的聚山梨酯80或聚山梨酯20,以及

(d) 10mg/mL至100mg/mL的蔗糖、10mM至100mM的精氨酸或其药学上可接受的盐、60mM至600mM的脯氨酸、和/或1mM至80mM的氯化钠,

并且所述药物组合物的pH为4至7,5至7,5至6.5,5.3至6.5,5.3至6.3,5.3至5.8,或5.8至6.3。

12. 一种含有抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段的冻干制剂,所述冻干制剂通过将权利要

求1-11中任一项所述的药物组合物经冷冻干燥获得;或者所述冻干制剂经复溶后可形成权利要求1-11中任一项所述的药物组合物。

13.一种治疗受试者中与过度的IL4和/或IL13信号传导相关的过敏性疾病的方法,所述方法包括向受试者施用权利要求1-11中任一项所述的药物组合物或权利要求12所述的冻干制剂;

优选地,所述过敏性疾病是特应性皮炎、过敏反应、过敏性鼻炎或过敏性哮喘。

14.一种治疗受试者中与STAT6活化增加相关的肿瘤的方法,所述方法包括向受试者施用权利要求1-11中任一项所述的药物组合物或权利要求12所述的冻干制剂;

优选地,所述肿瘤是实体瘤;更优选地,所述肿瘤为黑色素瘤、肺癌、肾癌、前列腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌和/或尿路上皮癌。

15.一种减少受试者中IL4和/或IL13信号传导或降低受试者中2型免疫应答的方法,所述方法包括向受试者施用权利要求1-11中任一项所述的药物组合物或权利要求12所述的冻干制剂;

优选地,所述IL4和/或IL13信号传导表现为B细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞的活化和/或增殖,成纤维细胞的增殖,和平滑肌的增殖;优选地,所述平滑肌细胞的增殖为气道平滑肌细胞的增殖。

抗IL4R抗体的药物组合物及其用途

[0001] 本申请是申请日为2022年08月25日、中国申请号为202280046126.5、发明名称为“抗IL4R抗体的药物组合物及其用途”的发明申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本公开属于制剂领域,具体而言,本公开涉及包含抗IL4R抗体或其抗原结合片段的稳定的药物组合物,以及该药物组合物用于治疗 and/或预防过度的IL4和/或IL13信号传导相关的疾病的用途。

背景技术

[0003] 2型炎症相关的过敏性疾病,例如特应性皮炎、过敏反应、过敏性鼻炎和过敏性哮喘,困扰着全世界超过30亿人,并且发病率持续上升。根据卫生假说,高发病率的部分原因是随着生活水平的提高,接触传染源的机会减少,使免疫系统对某些原本无害的过敏原更加敏感(Stephen J.Galli et al., (2008) Nature 454 (7203):445-454)。白介素4(IL4或IL-4)和IL-13是2型免疫中两个关键因子,它们是驱动大多数2型炎症相关的关键标志所必需的,例如,免疫球蛋白E的产生和先天性细胞在炎症部位的募集(Gruning G et al., (1998) Science 282:2261-2263; Rankin JA et al., (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93:7821-7825; Wills-Karp M et al., (1998) Science 282:2258-2261)。

[0004] IL-4和IL-13通过结合细胞表面受体以调节细胞功能并激活转录机制,具体而言,IL-4首先以皮摩尔级亲和力与IL-4R α 链结合,然后募集IL-2R γ (γ c)形成I型受体复合物,或募集IL-13R α 1形成II型受体复合物。研究发现,非造血细胞不表达或低表达 γ c,但高表达IL-13R α 1,而淋巴细胞则反之。骨髓细胞则介于这两类细胞之间。II型受体复合物也可以通过IL-13与IL-13R α 1链的结合(以纳摩尔级亲和力结合),并进一步募集IL-4R α 链而形成。此外,IL-13还能够以皮摩尔级亲和力结合IL-13R α 2从而启动诱饵受体的形成(Irina G.Luzina et al., (2012) J Leukoc Biol 92(4):753-764)。IL-4受体复合物一旦形成,细胞内的信号分子就会被激活,其中STAT6和IRS信号传导会响应I型IL-4受体而激活,而II型IL-4受体则无法显著激活IRS(Heller NM et al., (2008) Sci Signal 1(51):ra17-ra17)。STAT6信号传导对于T_H2细胞分化和IL-4的产生非常重要,而IRS能够激活PI3K和mTOR信号通路(Gadani SP et al., (2012) J Immunol 189:4213-4219)。研究表明,过度的IL-4和/或IL-13信号传导可能会引起过敏性疾病。还有研究发现STAT6抑制剂可以抑制前列腺癌细胞的生长(Nappo G et al., (2017) Oncogenesis 6(5):e342)。因此,一些调节IL-4和/或IL-13介导的信号传导的治疗性抗体被相继开发,例如,针对IL4R的抗体Dupilumab。

[0005] 用于人类受试者的抗体药物应在储存和随后的使用过程中保持生物学活性和稳定性,但抗体药物的分子量大,结构复杂,容易降解、聚合或发生不希望发生的化学修饰等而变得不稳定。因此,本领域需要开发稳定的抗体药物组合物(例如抗IL4R抗体药物组合物)来克服上述问题,使抗体药物具有较长的保存期限,并且适于生产和施用于患者。然而,当抗体以高浓度存在时,还需要克服高水平的聚集性、高于生理学的渗透压、特别是由于粘

度增加而导致的低注射性等问题。

发明概述

[0007] 本公开提供了药物组合物,其包含高浓度的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,并且具有可接受的粘度水平,另外,本公开的药物组合物不会导致高水平的聚集。

[0008] 本公开提供的药物组合物,其包含:(a) 抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b) 缓冲剂,(c) 表面活性剂,以及(d) 稳定剂。

[0009] 在一些实施方案中,前述药物组合物中所述抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段的浓度为30mg/mL至300mg/mL,50mg/mL至250mg/mL,70mg/mL至200mg/mL,100mg/mL至180mg/mL,120mg/mL至180mg/mL,120mg/mL至150mg/mL,或150mg/mL至180mg/mL。在一些实施方案中,前述药物组合物中所述抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段的浓度为约150mg/mL。在一些实施方案中,前述药物组合物中所述抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段的浓度为约175mg/mL。在一些实施方案中,前述药物组合物中所述抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段的浓度的实例包括但不限于:约70mg/mL,约80mg/mL,约90mg/mL,约100mg/mL,约110mg/mL,约120mg/mL,约125mg/mL,约130mg/mL,约135mg/mL,约140mg/mL,约145mg/mL,约150mg/mL,约155mg/mL,约160mg/mL,约165mg/mL,约170mg/mL,约175mg/mL,约180mg/mL,约190mg/mL,或约200mg/mL。

[0010] 在一些实施方案中,前述药物组合物中所述缓冲剂的实例包含磷酸盐缓冲剂、醋酸盐缓冲剂或组氨酸盐缓冲剂。优选地,前述药物组合物中所述缓冲剂的实例包含组氨酸盐缓冲剂。在一些具体实施方案中,所述磷酸盐缓冲剂的实例包括磷酸钠缓冲剂或磷酸钾缓冲剂,所述醋酸盐缓冲剂的实例包括醋酸钠缓冲剂、醋酸钾缓冲剂或醋酸钠-醋酸缓冲剂,所述组氨酸盐缓冲剂的实例包括组氨酸-盐酸缓冲剂、组氨酸-醋酸缓冲剂、组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂或盐酸组氨酸缓冲剂。

[0011] 在一些具体的实施方案中,所述磷酸钠缓冲剂包含磷酸氢二钠和磷酸二氢钠。在一些具体的实施方案中,所述醋酸钠-醋酸缓冲剂包含醋酸钠和醋酸。在一些具体的实施方案中,所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂包含组氨酸和盐酸组氨酸。

[0012] 在一些实施方案中,前述药物组合物中所述缓冲剂的浓度为1mM至100mM,2mM至80mM,4mM至60mM,8mM至40mM,10mM至30mM,10mM至20mM,或20mM至30mM。在一些实施方案中,前述药物组合物中所述缓冲剂的浓度为约20mM。在一些实施方案中,前述药物组合物中所述缓冲剂的浓度的实例包括但不限于:约8mM,约9mM,约10mM,约11mM,约12mM,约13mM,约14mM,约15mM,约16mM,约17mM,约18mM,约19mM,约20mM,约21mM,约22mM,约23mM,约24mM,约25mM,约26mM,约27mM,约28mM,约30mM,约32mM,约34mM,约36mM,约38mM,或约40mM。

[0013] 在一些实施方案中,前述药物组合物中所述缓冲剂的pH为4至7,5至7,5至6.5,5.3至6.5,5.3至6.3,5.3至5.8,或5.8至6.3。在一些实施方案中,前述药物组合物中所述缓冲剂的pH为约5.8。在一些实施方案中,前述药物组合物中所述缓冲剂的pH为约6。在一些实施方案中,前述药物组合物中所述缓冲剂的pH为约5。在一些实施方案中,前述药物组合物中所述缓冲剂的pH的实例包括但不限于:约5,约5.1,约5.2,约5.3,约5.4,约5.5,约5.6,约5.7,约5.8,约5.9,约6,约6.1,约6.2,约6.3,约6.4,约6.5,约6.6,约6.7,约6.8,约6.9,或约7。

[0014] 在一些实施方案中,前述药物组合物中所述表面活性剂选自聚山梨酯(如聚山梨

酯20、聚山梨酯40、聚山梨酯60、聚山梨酯65、聚山梨酯80、聚山梨酯81或聚山梨酯85), 泊洛沙姆(如泊洛沙姆181、泊洛沙姆188或泊洛沙姆407), 聚乙二醇或聚羟体等。在一些实施方案中, 前述药物组合物中所述表面活性剂是聚山梨酯80。在一些实施方案中, 前述药物组合物中所述表面活性剂是聚山梨酯20。

[0015] 在一些实施方案中, 前述药物组合物中所述表面活性剂的浓度为0.01mg/mL至2mg/mL, 0.05mg/mL至1mg/mL, 0.1mg/mL至0.8mg/mL, 0.2mg/mL至0.6mg/mL, 或0.2mg/mL至0.4mg/mL。在一些实施方案中, 前述药物组合物中所述表面活性剂的浓度为约0.4mg/mL。在一些实施方案中, 前述药物组合物中所述表面活性剂的浓度的实例包括但不限于: 约0.05mg/mL, 约0.06mg/mL, 约0.07mg/mL, 约0.08mg/mL, 约0.09mg/mL, 约0.1mg/mL, 约0.2mg/mL, 约0.3mg/mL, 约0.4mg/mL, 约0.5mg/mL, 约0.6mg/mL, 约0.7mg/mL, 约0.8mg/mL, 约0.9mg/mL, 或约1mg/mL。

[0016] 在一些实施方案中, 前述药物组合物中所述稳定剂选自海藻糖、甘露醇、蔗糖、精氨酸或其药学上可接受的盐、脯氨酸或氯化钠中的一种或几种。在一些实施方案中, 前述药物组合物中所述稳定剂包含蔗糖。在一些实施方案中, 前述药物组合物中所述稳定剂包含精氨酸或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中, 前述药物组合物中所述稳定剂包含脯氨酸。在一些实施方案中, 前述药物组合物中所述稳定剂包含氯化钠。所述精氨酸药学上可接受的盐的实例包括盐酸精氨酸或醋酸精氨酸。在一些具体的实施方案中, 前述药物组合物中所述稳定剂包含蔗糖和盐酸精氨酸。在一些具体的实施方案中, 前述药物组合物中所述稳定剂包含脯氨酸和氯化钠。在一些具体的实施方案中, 前述药物组合物中所述稳定剂包含蔗糖、脯氨酸和氯化钠。

[0017] 在一些实施方案中, 前述药物组合物中所述蔗糖的浓度为10mg/mL至100mg/mL, 20mg/mL至80mg/mL, 30mg/mL至60mg/mL, 40mg/mL至50mg/mL, 或50mg/mL至60mg/mL。在一些实施方案中, 前述药物组合物中所述蔗糖的浓度为约50mg/mL。在一些实施方案中, 前述药物组合物中所述蔗糖的浓度的实例包括但不限于: 约20mg/mL, 约22mg/mL, 约24mg/mL, 约26mg/mL, 约28mg/mL, 约30mg/mL, 约32mg/mL, 约34mg/mL, 约36mg/mL, 约38mg/mL, 约40mg/mL, 约42mg/mL, 约44mg/mL, 约46mg/mL, 约48mg/mL, 约50mg/mL, 约52mg/mL, 约54mg/mL, 约56mg/mL, 约58mg/mL, 约60mg/mL, 约62mg/mL, 约64mg/mL, 约66mg/mL, 约68mg/mL, 约70mg/mL, 约72mg/mL, 约74mg/mL, 约76mg/mL, 约78mg/mL, 或约80mg/mL。

[0018] 在一些实施方案中, 前述药物组合物中所述精氨酸或其药学上可接受的盐(例如, 盐酸精氨酸)的浓度为10mM至100mM, 20mM至80mM, 30mM至60mM, 40mM至50mM, 或50mM至60mM。在一些实施方案中, 前述药物组合物中所述精氨酸或其药学上可接受的盐(例如, 盐酸精氨酸)的浓度为约50mM。在一些实施方案中, 前述药物组合物中所述精氨酸或其药学上可接受的盐(例如, 盐酸精氨酸)的浓度的实例包括但不限于: 约20mM, 约22mM, 约24mM, 约26mM, 约28mM, 约30mM, 约32mM, 约34mM, 约36mM, 约38mM, 约40mM, 约42mM, 约44mM, 约46mM, 约48mM, 约50mM, 约52mM, 约54mM, 约56mM, 约58mM, 约60mM, 约62mM, 约64mM, 约66mM, 约68mM, 约70mM, 约72mM, 约74mM, 约76mM, 约78mM, 或约80mM。

[0019] 在一些实施方案中, 前述药物组合物中所述脯氨酸的浓度为60mM至600mM, 80mM至500mM, 100mM至450mM, 120mM至400mM, 150mM至350mM, 200mM至350mM, 或250mM至350mM。在一些实施方案中, 前述药物组合物中所述脯氨酸的浓度为约250mM。在一些实施方案中, 前述

药物组合物中所述脯氨酸的浓度为约350mM。在一些实施方案中,前述药物组合物中所述脯氨酸的浓度的实例包括但不限于:约120mM,约130mM,约140mM,约150mM,约160mM,约170mM,约180mM,约190mM,约200mM,约210mM,约220mM,约230mM,约240mM,约250mM,约260mM,约270mM,约280mM,约290mM,约300mM,约310mM,约320mM,约330mM,约340mM,约350mM,约360mM,约370mM,约380mM,约390mM,或约400mM。

[0020] 在一些实施方案中,前述药物组合物中所述氯化钠的浓度为1mM至80mM,2mM至60mM,4mM至50mM,8mM至40mM,10mM至30mM,或10mM至20mM。在一些实施方案中,前述药物组合物中所述氯化钠的浓度为约20mM。在一些实施方案中,前述药物组合物中所述氯化钠的浓度的实例包括但不限于:约8mM,约9mM,约10mM,约11mM,约12mM,约13mM,约14mM,约15mM,约16mM,约17mM,约18mM,约19mM,约20mM,约21mM,约22mM,约23mM,约24mM,约25mM,约26mM,约27mM,约28mM,约29mM,约30mM,约32mM,约34mM,约36mM,约38mM,或约40mM。

[0021] 在一些实施方案中,前述药物组合物的pH为pH为4至7,5至7,5至6.5,5.3至6.5,5.3至6.3,5.3至5.8,或5.8至6.3。在一些实施方案中,前述药物组合物的pH为约5.8。在一些实施方案中,前述药物组合物的pH为约6。在一些实施方案中,前述药物组合物的pH为约5。在一些实施方案中,前述药物组合物的pH的实例包括但不限于:约5,约5.1,约5.2,约5.3,约5.4,约5.5,约5.6,约5.7,约5.8,约5.9,约6,约6.1,约6.2,约6.3,约6.4,约6.5,约6.6,约6.7,约6.8,约6.9,或约7。

[0022] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a)抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b)磷酸盐缓冲剂、醋酸盐缓冲剂和/或组氨酸盐缓冲剂,(c)聚山梨酯80或聚山梨酯20,以及(d)海藻糖、甘露醇、蔗糖、精氨酸或其药学上可接受的盐、脯氨酸和/或氯化钠。

[0023] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a)抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b)磷酸盐缓冲剂或组氨酸盐缓冲剂,(c)聚山梨酯80,以及(d)蔗糖、精氨酸或其药学上可接受的盐、脯氨酸和/或氯化钠。

[0024] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a)抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b)组氨酸盐缓冲剂,(c)聚山梨酯80,以及(d)蔗糖和精氨酸或其药学上可接受的盐。

[0025] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a)抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b)组氨酸盐缓冲剂,(c)聚山梨酯80,以及(d)蔗糖、脯氨酸和氯化钠。

[0026] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a)抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b)组氨酸盐缓冲剂,(c)聚山梨酯80,以及(d)脯氨酸和氯化钠。

[0027] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a)抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b)组氨酸盐缓冲剂,(c)聚山梨酯80,以及(d)脯氨酸。

[0028] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a)30mg/mL至300mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b)1mM至100mM的缓冲剂,(c)0.01mg/mL至2mg/mL的表面活性剂,以及(d)稳定剂,所述稳定剂包含海藻糖、甘露醇、蔗糖、精氨酸或其药学上可接受的盐、脯氨酸和/或氯化钠;并且所述药物组合物的pH为4至7,5至7,5至6.5,5.3至6.5,5.3至6.3,5.3至5.8,或5.8至6.3。

[0029] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a)50mg/mL至250mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b)2mM至80mM的缓冲剂,(c)0.05mg/mL至1mg/mL的表面活性剂,以及(d)稳定剂,所述稳定剂包含海藻糖、甘露醇、蔗糖、精氨酸或其药学上可接受的盐、脯氨酸

和/或氯化钠;并且所述药物组合物的pH为4至7,5至7,5至6.5,5.3至6.5,5.3至6.3,5.3至5.8,或5.8至6.3。

[0030] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a) 70mg/mL至200mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b) 4mM至60mM的缓冲剂,(c) 0.1mg/mL至0.8mg/mL的表面活性剂,以及(d) 稳定剂,所述稳定剂包含海藻糖、甘露醇、蔗糖、精氨酸或其药学上可接受的盐、脯氨酸和/或氯化钠;并且所述药物组合物的pH为4至7,5至7,5至6.5,5.3至6.5,5.3至6.3,5.3至5.8,或5.8至6.3。

[0031] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a) 100mg/mL至180mg/mL或120mg/mL至180mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b) 8mM至40mM或10mM至30mM的缓冲剂,(c) 0.2mg/mL至0.6mg/mL的表面活性剂,以及(d) 稳定剂,所述稳定剂包含海藻糖、甘露醇、蔗糖、精氨酸或其药学上可接受的盐、脯氨酸和/或氯化钠;并且所述药物组合物的pH为4至7,5至7,5至6.5,5.3至6.5,5.3至6.3,5.3至5.8,或5.8至6.3。

[0032] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a) 120mg/mL至150mg/mL或150mg/mL至180mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b) 10mM至20mM或20mM至30mM的缓冲剂,(c) 0.2mg/mL至0.4mg/mL的表面活性剂,以及(d) 稳定剂,所述稳定剂包含海藻糖、甘露醇、蔗糖、精氨酸或其药学上可接受的盐、脯氨酸和/或氯化钠;并且所述药物组合物的pH为4至7,5至7,5至6.5,5.3至6.5,5.3至6.3,5.3至5.8,或5.8至6.3。

[0033] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a) 30mg/mL至300mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b) 1mM至100mM的磷酸盐缓冲剂、醋酸盐缓冲剂或组氨酸盐缓冲剂,(c) 0.01mg/mL至2mg/mL的聚山梨酯80或聚山梨酯20,以及(d) 10mg/mL至100mg/mL的蔗糖、10mM至100mM的精氨酸或其药学上可接受的盐、60mM至600mM的脯氨酸、和/或1mM至80mM的氯化钠;并且所述药物组合物的pH为4至7,5至7,5至6.5,5.3至6.5,5.3至6.3,5.3至5.8,或5.8至6.3。

[0034] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a) 50mg/mL至250mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b) 2mM至80mM的磷酸盐缓冲剂、醋酸盐缓冲剂或组氨酸盐缓冲剂,(c) 0.05mg/mL至1mg/mL的聚山梨酯80或聚山梨酯20,以及(d) 20mg/mL至80mg/mL的蔗糖、20mM至80mM的精氨酸或其药学上可接受的盐、80mM至500mM的脯氨酸、和/或2mM至60mM的氯化钠;并且所述药物组合物的pH为4至7,5至7,5至6.5,5.3至6.5,5.3至6.3,5.3至5.8,或5.8至6.3。

[0035] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a) 70mg/mL至200mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b) 4mM至60mM的磷酸盐缓冲剂、醋酸盐缓冲剂或组氨酸盐缓冲剂,(c) 0.1mg/mL至0.8mg/mL的聚山梨酯80或聚山梨酯20,以及(d) 30mg/mL至60mg/mL的蔗糖、30mM至60mM的精氨酸或其药学上可接受的盐、100mM至450mM或120mM至400mM的脯氨酸、和/或4mM至50mM的氯化钠;并且所述药物组合物的pH为4至7,5至7,5至6.5,5.3至6.5,5.3至6.3,5.3至5.8,或5.8至6.3。

[0036] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a) 100mg/mL至180mg/mL或120mg/mL至180mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b) 8mM至40mM或10mM至30mM的磷酸盐缓冲剂、醋酸盐缓冲剂或组氨酸盐缓冲剂,(c) 0.2mg/mL至0.6mg/mL的聚山梨酯80或聚山梨酯20,以及(d) 40mg/mL至50mg/mL的蔗糖、40mM至50mM的精氨酸或其药学上可接受的盐、150mM至

350mM的脯氨酸、和/或8mM至40mM的氯化钠;并且所述药物组合物的pH为4至7,5至7,5至6.5,5.3至6.5,5.3至6.3,5.3至5.8,或5.8至6.3。

[0037] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a) 120mg/mL至150mg/mL或150mg/mL至180mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b) 10mM至20mM或20mM至30mM的磷酸盐缓冲剂、醋酸盐缓冲剂或组氨酸盐缓冲剂,(c) 0.2mg/mL至0.4mg/mL的聚山梨酯80或聚山梨酯20,以及(d) 50mg/mL至60mg/mL的蔗糖、50mM至60mM的精氨酸或其药学上可接受的盐、200mM至350mM或250mM至350mM的脯氨酸、和/或10mM至30mM或10mM至20mM的氯化钠;并且所述药物组合物的pH为4至7,5至7,5至6.5,5.3至6.5,5.3至6.3,5.3至5.8,或5.8至6.3。

[0038] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a) 30mg/mL至300mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b) 1mM至100mM的磷酸盐缓冲剂或组氨酸盐缓冲剂,(c) 0.01mg/mL至2mg/mL的聚山梨酯80,以及(d) 60mM至600mM的脯氨酸和1mM至80mM的氯化钠,任选地,还包括10mg/mL至100mg/mL的蔗糖;并且所述药物组合物的pH为4至7,5至7,5至6.5,5.3至6.5,5.3至6.3,5.3至5.8,或5.8至6.3。

[0039] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a) 50mg/mL至250mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b) 2mM至80mM的磷酸盐缓冲剂或组氨酸盐缓冲剂,(c) 0.05mg/mL至1mg/mL的聚山梨酯80,以及(d) 80mM至500mM的脯氨酸和2mM至60mM的氯化钠,任选地,还包括20mg/mL至80mg/mL的蔗糖;并且所述药物组合物的pH为4至7,5至7,5至6.5,5.3至6.5,5.3至6.3,5.3至5.8,或5.8至6.3。

[0040] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a) 70mg/mL至200mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b) 4mM至60mM的磷酸盐缓冲剂或组氨酸盐缓冲剂,(c) 0.1mg/mL至0.8mg/mL的聚山梨酯80,以及(d) 100mM至450mM或120mM至400mM的脯氨酸,和4mM至50mM的氯化钠,任选地,还包括30mg/mL至60mg/mL的蔗糖;并且所述药物组合物的pH为4至7,5至7,5至6.5,5.3至6.5,5.3至6.3,5.3至5.8,或5.8至6.3。

[0041] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a) 100mg/mL至180mg/mL或120mg/mL至180mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b) 8mM至40mM或10mM至30mM的磷酸盐缓冲剂或组氨酸盐缓冲剂,(c) 0.2mg/mL至0.6mg/mL的聚山梨酯80,以及(d) 150mM至350mM的脯氨酸和8mM至40mM的氯化钠,任选地,还包括40mg/mL至50mg/mL的蔗糖;并且所述药物组合物的pH为4至7,5至7,5至6.5,5.3至6.5,5.3至6.3,5.3至5.8,或5.8至6.3。

[0042] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a) 120mg/mL至150mg/mL或150mg/mL至180mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b) 10mM至20mM或20mM至30mM的磷酸盐缓冲剂或组氨酸盐缓冲剂,(c) 0.2mg/mL至0.4mg/mL的聚山梨酯80,以及(d) 200mM至350mM或250mM至350mM的脯氨酸,和10mM至30mM或10mM至20mM的氯化钠,任选地,还包括50mg/mL至60mg/mL的蔗糖;并且所述药物组合物的pH为4至7,5至7,5至6.5,5.3至6.5,5.3至6.3,5.3至5.8,或5.8至6.3。

[0043] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a) 150mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b) 20mM的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂,(c) 0.4mg/mL的聚山梨酯80,和(d) 50mg/mL蔗糖和50mM的盐酸精氨酸;并且所述药物组合物的pH为5.8。

[0044] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a) 150mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b) 20mM的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂,(c) 0.4mg/mL的聚山梨酯80,和(d) 250mM

的脯氨酸和20mM的氯化钠;并且所述药物组合物的pH为5.8。

[0045] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a) 150mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b) 20mM的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂,(c) 0.4mg/mL的聚山梨酯80,和(d) 350mM的脯氨酸;并且所述药物组合物的pH为5.8。

[0046] 在一些实施方案中,前述药物组合物包含:(a) 150mg/mL的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段,(b) 20mM的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂,(c) 0.4mg/mL的聚山梨酯80,和(d) 50mg/mL的蔗糖、250mM的脯氨酸和20mM的氯化钠;并且所述药物组合物的pH为5.8。

[0047] 在任选的实施方案中,前述药物组合物中所述的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含重链可变区CDR1、重链可变区CDR2和重链可变区CDR3,其中重链可变区CDR1、重链可变区CDR2和重链可变区CDR3分别包含与SEQ ID NOs:1、2和3所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0048] 在任选的实施方案中,前述药物组合物中所述的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NOs:7、8或9所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。其中,SEQ ID NO:8的氨基酸序列为:

[0049] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSWVRQAPGKGLVX₁VX₂TINSNGGSTSYPD₁SVKGRF TISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWGQGT₁LVTVSS,其中,X₁=W和X₂=S,X₁=L和X₂=A,或X₁=W和X₂=A。

[0050] 在任选的实施方案中,前述药物组合物中所述的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含轻链可变区CDR1、轻链可变区CDR2和轻链可变区CDR3,其中轻链可变区CDR1、轻链可变区CDR2和轻链可变区CDR3分别包含与SEQ ID NOs:4、5和6所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0051] 在任选的实施方案中,前述药物组合物中所述的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含与SEQ ID NOs:10、11或12所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。其中,SEQ ID NO:11的氨基酸序列为:

[0052] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKAPKX₁LX₂YNAKTLAEGVPSRFSGSGS GT DFTLT₁TISSLQPEDFATYYCQHYYPPTWTFTGQGT₁KVEIK,其中,X₁=L和X₂=I,X₁=F和X₂=V,或X₁=F和X₂=I。

[0053] 在任选的实施方案中,前述药物组合物中所述的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区分别包含CDR1、CDR2和CDR3,其中重链可变区CDR1、重链可变区CDR2、重链可变区CDR3、轻链可变区CDR1、轻链可变区CDR2和轻链可变区CDR3分别包含与SEQ ID NOs:1、2、3、4、5和6所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0054] 在任选的实施方案中,前述药物组合物中所述的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含:(1) 分别与SEQ ID

NOs:7和10所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列；(2)分别与SEQ ID NOs:8和11所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:8中的 $X_1=W$ 和 $X_2=S$ ；(3)分别与SEQ ID NOs:8和12所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:8中的 $X_1=W$ 和 $X_2=S$ ；(4)分别与SEQ ID NOs:9和11所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列；(5)分别与SEQ ID NOs:9和12所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列；(6)分别与SEQ ID NOs:8和11所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:8中的 $X_1=L$ 和 $X_2=A$ ；(7)分别与SEQ ID NOs:8和12所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:8中的 $X_1=L$ 和 $X_2=A$ ；(8)分别与SEQ ID NOs:8和11所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:8中的 $X_1=W$ 和 $X_2=A$ ；或(9)分别与SEQ ID NOs:8和12所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:8中的 $X_1=W$ 和 $X_2=A$ 。

[0055] 其中,SEQ ID NO:8的氨基酸序列为:

[0056] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTYGMSSWRQAPGKGLVX₁VX₂TINSNGGSTSYPDSEVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWGQGTLLVTVSS;

[0057] 其中,SEQ ID NO:11的氨基酸序列为:

[0058] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKAPKX₁LX₂YNAKTLAEGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQHYGPPPTWTFGQGTKVEIK,其中, $X_1=L$ 和 $X_2=I$, $X_1=F$ 和 $X_2=V$,或 $X_1=F$ 和 $X_2=I$ 。

[0059] 在任选的实施方案中,前述药物组合物中所述的抗IL4R α 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,其中重链可变区和轻链可变区包含上述的氨基酸序列,重链恒定区具有如SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的人IgG4恒定区,轻链恒定区具有如SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的人 κ 恒定区。

[0060] 在任选的实施方案中,前述药物组合物中所述的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段可以是全长抗体,例如IgG1、IgG2或IgG4同种型全长抗体,优选为IgG4同种型全长抗体。在其他实施方案中,前述药物组合物中所述的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段可以是单链可变区(scFv)抗体,或抗体片段,例如Fab或F(ab')₂片段。

[0061] 在任选的实施方案中,前述药物组合物中所述的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段

是申请号为PCT/CN2021077784的专利文件中记载的C2C1A1A1抗体。

[0062] 本公开还提供一种制备前述药物组合物的方法,其包括使上述抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段与缓冲剂接触的步骤,例如将抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段置换到缓冲剂中,所述缓冲剂包含磷酸盐缓冲剂、醋酸盐缓冲剂或组氨酸盐缓冲剂等,进一步地还包括加入表面活性剂和稳定剂,不区分先后顺序,其中所述稳定剂包含海藻糖、甘露醇、蔗糖、精氨酸或其药学上可接受的盐、脯氨酸和/或氯化钠,所述表面活性剂包含聚山梨酯、泊洛沙姆、聚乙二醇或聚羟体。

[0063] 本公开还提供一种制备包含抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段的冻干制剂的方法,其包括将前述药物组合物经冷冻干燥的步骤。在一些实施方案中,所述冷冻干燥按照本领域公知的方法进行,包括但不限于预冻、一次干燥和二次干燥的步骤。本领域技术人员理解,任何将水从本公开的药物组合物中移除的方法均适用于本公开。

[0064] 本公开还提供一种包含抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段的冻干制剂,其是经前述制备冻干制剂的方法制备所得。

[0065] 本公开还提供一种包含抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段的冻干制剂,所述冻干制剂经复溶后可形成前述药物组合物。

[0066] 本公开还提供一种制品,其包括容器,该容器中装有前述药物组合物或前述冻干制剂。

[0067] 本公开的药物组合物或冻干制剂可根据已知的方法施用,例如以合适的方式在一段时间内注射或输注,例如,通过皮下的、静脉的、腹膜内的、肌肉内的、动脉内的、病灶内的或关节内的途径,局部施用,吸入或通过持续释放或延时释放。本公开的药物组合物或冻干制剂在施用前可以用合适的稀释液稀释成合适的浓度,以提供最佳的所需反应(例如,治疗反应)。

[0068] 本公开提供了一种减少受试者中IL4和/或IL13信号传导的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开的药物组合物、冻干制剂或制品。IL4通过包含IL-4R α 和 γ c的受体传导信号,而IL13通过包含IL-4R α 和IL13 R α 1的受体传导信号。IL4和/或IL13信号传导表现为B细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞的活化和/或增殖,成纤维细胞的增殖,和平滑肌细胞的增殖(例如气道平滑肌细胞的增殖等)。

[0069] 本公开提供了一种降低受试者中2型免疫应答的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开的药物组合物、冻干制剂或制品。

[0070] 本公开提供了一种治疗受试者中与过度的IL4和/或IL13信号传导相关的疾病的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开的药物组合物、冻干制剂或制品。所述与过度的IL4和/或IL13信号传导相关的疾病是过敏性疾病,非限制性实例包括特应性皮炎、过敏反应、过敏性鼻炎或过敏性哮喘。

[0071] 本公开提供了一种治疗受试者中与STAT6活化增加相关的肿瘤的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开的药物组合物、冻干制剂或制品。在一些实施方案中,所述肿瘤包括实体瘤或非实体瘤。在一些实施方案中,所述肿瘤的实例包括但不限于黑色素瘤、肺癌、肾癌、前列腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌和尿路上皮癌。

[0072] 基于以下的具体描述与实施例,本发明的其他特征与优点将变得清晰,具体描述与实施例不应解读为限制性的。本申请引用的所有文献、Genbank记录、专利、以及已公开的

专利申请的内容通过引用的方式明确地并入本文中。

发明详述

[0074] 为了更好地理解本公开,首先定义一些术语。其他定义则贯穿详述部分而列出。除非在本文中另有明确定义,本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本发明所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

[0075] “缓冲剂”是指在药学上可接受的、能够维持药物组合物的pH至期望的pH范围的物质或物质混合物。适用于本公开的药物组合物的缓冲剂的示例包括磷酸盐缓冲剂、醋酸盐缓冲剂或组氨酸盐缓冲剂。

[0076] “磷酸盐缓冲剂”是包含磷酸根离子的缓冲剂,例如包含磷酸和/或磷酸盐的缓冲剂,其中磷酸包括磷酸和/或其水合物,磷酸盐包括磷酸盐和/或其水合物。磷酸盐缓冲剂的示例包括但不限于磷酸钠缓冲剂或磷酸钾缓冲剂,优选的磷酸盐缓冲剂是磷酸钠缓冲剂。在一个具体的实例中,磷酸钠缓冲剂包括磷酸二氢钠一水合物($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)和磷酸氢二钠十二水合物($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)。

[0077] “醋酸盐缓冲剂”是包括醋酸根离子的缓冲剂,例如包含醋酸和/或醋酸盐的缓冲剂,其中醋酸包括醋酸和/或其水合物,醋酸盐包括醋酸盐和/或其水合物。醋酸盐缓冲剂的示例包括但不限于醋酸钾缓冲剂、醋酸铵缓冲剂或醋酸钠缓冲剂、醋酸钠-醋酸缓冲剂,优选的醋酸盐缓冲剂是醋酸钠-醋酸缓冲剂。醋酸钠-醋酸缓冲剂包含醋酸和醋酸钠,其中醋酸包括醋酸和/或其水合物,醋酸钠包括醋酸钠和/或其水合物,在一个具体的实例中,醋酸钠-醋酸缓冲剂包括醋酸与醋酸钠三水合物($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)。

[0078] “组氨酸盐缓冲剂”是包括组氨酸根离子的缓冲剂,例如包含组氨酸和/或组氨酸盐的缓冲剂,其中组氨酸包括组氨酸和/或其水合物,组氨酸盐包括组氨酸盐和/或其水合物。组氨酸盐缓冲剂的示例包括组氨酸-盐酸缓冲剂、组氨酸-醋酸缓冲剂、组氨酸-盐酸组氨酸或盐酸组氨酸缓冲剂,优选的组氨酸盐缓冲剂是组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂。组氨酸-盐酸组氨酸包括组氨酸和盐酸组氨酸,其中组氨酸包括组氨酸和/或其水合物,盐酸组氨酸包括盐酸组氨酸和/或其水合物,在一个具体的实例中,组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂包括组氨酸与盐酸组氨酸一水合物($\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$)。

[0079] “稳定剂”是指在药学上可接受的、用于维持药物组合物中活性成分稳定的物质或物质混合物。在本公开中,稳定剂亦可以作为降粘剂和/或等渗剂等。

[0080] “药物组合物”意在涵盖以任选地特定的量包含特定活性成分(例如抗体)的产物,以及任何通过以任选地特定的量组合特定活性成分直接或间接产生的任何产物。药物组合物的目的是使活性成分适于生产和施用于患者,并且在储存和随后的使用过程中保持生物学活性和/或稳定性。在一些方案中,所述药物组合物为水溶性注射液,所述水溶性注射液包括但不限于未经冻干的水溶性制剂或冻干粉重构的水溶性制剂。在另一些方案中,所述药物组合物为冻干制剂。在本公开中,“药物组合物”和“制剂”不相互排斥。

[0081] “稳定的”或“稳定化的”药物组合物是指活性成分(例如抗体)保存在其中时基本保持其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物学活性的药物组合物。本领域已有多种用于测量活性成分稳定性的分析技术,例如在Peptide and Protein Drug Delivery,247-301, Vincent Lee Ed.,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,Pubs.(1991) Jones,A.Adv.Drug

Delivery Rev.10:29-90(1993)中进行了综述。稳定性可以在所选温度和其他保存条件下在所选时间段进行测量。举例来说,如果在目检颜色和/或澄清度后,或者通过UV光散射、分子排阻色谱法(SEC)、差示扫描量热法(DSC)或差示扫描荧光法(DSF)测得,活性成分没有显示出显著的聚集增加、沉淀和/或变性,那么所述活性成分在药物组合物中“保留它的物理稳定性”。优选地,当使用本公开的药物组合物时,如通过SEC或任何其他合适的用于测量聚集形成的方法时,10%或更少,5%或更少,4%或更少的活性成分形成聚集物(也称为高分子杂质)。如果活性成分(例如抗体)没有显示出显著的化学改变,那么所述活性成分在药物组合物中“保留它的化学稳定性”。通过检测和定量化学上改变的形式抗体,可以评估化学稳定性。经常改变蛋白化学结构的过程包括水解或截短(通过诸如分子排阻色谱法和SDS-PAGE等方法来评价)、氧化(通过诸如与质谱法或MALDI/TOF/MS结合的肽谱法等方法来评价)、脱酰胺作用(通过诸如离子交换色谱法、毛细管等电聚焦电泳、肽谱法、异天冬氨酸测量等方法来评价)和异构化(通过测量异天冬氨酸含量、肽谱法等来评价)。如果活性成分(例如抗体)在给定时间内的生物学活性在制备药物组合物时所表现出的生物活性的预定范围内,则活性成分在药物组合物中于给定时间内“保持其生物学活性”,例如通过抗原结合测定来确定。

[0082] “高分子杂质”或“聚集物”是指分子量大于目标活性成分(例如抗体)的杂质的总称。

[0083] “电荷变异体”是指抗体经过糖基化、脱酰胺作用、氧化和/或异构化等直接或间接地引起抗体分子所带电荷发生改变的变异体,这些电荷变异体可以通过毛细管等电聚焦电泳(CIEF)和阳离子交换色谱(CEX-HPLC)等进行检测。

[0084] 冠词“一种”、“一个”和“所述”在此用于指代该冠词的语法对象的一个/种或多于一个/种(即至少一个/种)。举例来说,“一种/个药物组合物”指一种/个药物组合物或多于一种/个药物组合物。

[0085] “约”或“大约”是指数值在本领域一般技术人员所测定的具体值的可接受误差范围内,所述数值部分取决于怎样测量或测定(即测量体系的限度)。例如,在本领域中“约”或“大约”可意味着在1内或超过1的标准差。或者“约”或“大约”表示所述值加上或减去15%、10%、5%或1%的范围。此外,特别对于生物学系统或过程而言,该术语可意味着至多一个数量级或数值的至多5倍。除特别说明,否则“约XX”或“大约XX”或“基本上包含XX”的含义是该具体值“XX”的可接受误差范围内的数值(包括数值“XX”本身,以及本领域一般技术人员测定该数值的可接受误差范围内的数值)。

[0086] 如本文中所述,任何百分比范围、比率范围或整数范围应当理解为包括在列举的范围内的任意整数的值,且适当时,包括其分数(诸如整数的十分之一和百分之一),除非另外指出。

[0087] 在本文中,除非上下文另有规定,词语“包含”、“包括”和“含有”将被理解为表示包括所述的步骤或要素或一组步骤或要素,但不排除任何其他步骤或要素或一组步骤或要素。“由……组成”所表示的是包括并且限于短语“由……组成”之后的内容。因此,短语“由……组成”表示所列出的要素是需要的或必需的,并且没有其他要素可存在。“基本由……组成”所表示的是包括列于此短语之后的任意要素,并且限于不妨碍或有助于所列的要素的如在本发明详述的活性或作用的其他要素。因此,短语“基本由……组成”表示所

列出的要素是需要的或必需的,但其他要素是可选的并可取决于其是否影响所列出的要素的活性或作用而存在或不存在。

[0088] 术语“IL4R α ”是指白介素4受体 α 亚基。术语“IL4R α ”包括变体、亚型、同系物、直系同源物和旁系同源物。例如,在某些情况下,对人IL4R α 蛋白具有特异性的抗体可与人以外的物种(例如猴)的IL4R α 蛋白发生交叉反应。在其他实施方案中,对人IL4R α 蛋白具有特异性的抗体可以对人IL4R α 蛋白完全特异,并且不与其他物种或其他类型的蛋白发生交叉反应,或者可以与来源于某些其他物种但并非所有其他物种的IL4R α 发生交叉反应。

[0089] 术语“人IL4R α ”是指具有人氨基酸序列的IL4R α 蛋白,例如Genbank登录号为NP_001244335.1的人IL4R α 的氨基酸序列。术语“食蟹猴IL4R α ”和“狨猴IL4R α ”是指IL4R α 序列,其分别具有例如Genbank登录号为EHH60265.1和NP_001244161.1的氨基酸序列。

[0090] 本文中的术语“抗体”包括全长抗体及其任何抗原结合片段或其单链。全长抗体是包含两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白,重链和轻链由二硫键连接。每条重链由重链可变区(简称V_H)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域构成,即C_{H1}、C_{H2}和C_{H3}。每条轻链由轻链可变区(简称V_L)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域C_L构成。V_H和V_L区还可以划分为称作互补决定区(CDR)的高变区,其由较为保守的骨架区(FR)区分隔开。每个V_H和V_L由三个CDR以及四个FR构成,从氨基端到羧基端以FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4的顺序排布。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。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多种免疫系统细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)。

[0091] 如本文所用,抗体的“抗原结合片段”(或简称为“抗体片段”),是指抗体中保留特异性结合抗原(例如,IL4R α 蛋白)能力的一个或多个片段。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。涵盖在抗体的“抗原结合片段”中的结合片段的例子包括:(i) Fab片段,由V_L、V_H、C_L和C_{H1}结构域构成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由V_H和C_{H1}构成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂V_L和V_H构成的Fv片段;(v) 由V_H构成的dAb片段(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546);(vi) 分离的互补决定区(CDR);以及(vii) 纳米抗体,即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V_L和V_H由不同的基因编码,它们可以通过重组的方法,使两者经合成接头连接成为蛋白单链,其中V_L和V_H区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如Bird et al., (1988) Science 242:423-426;和Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。这样的单链抗体也涵盖在术语抗体的“抗原结合片段”中。这些抗体片段可通过本领域技术人员已知的常用技术获得,且可以通过与全长抗体相同的方式进行功能筛选。

[0092] 如本文所用,术语“分离的抗体”是指基本不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,与IL4R α 蛋白特异性结合的分离抗体基本不含特异性结合IL4R α 蛋白以外抗原的抗体)。但是,特异性结合人IL4R α 蛋白的分离抗体可能对其他抗原例如其他物种的IL4R α 蛋白具有交叉反应性。此外,分离的抗体基本不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0093] 如本文所用,术语“小鼠抗体”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。本文的小鼠抗体可以包含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而引入的突变)。但本文所用的术语“小鼠抗体”不包括在小鼠骨架区序列中插入来自其他哺乳动物物种的CDR序列的抗体。

[0094] 术语“嵌合抗体”是指通过组合非人来源的遗传物质与人来源的遗传物质而得来的抗体。或者更笼统地说,嵌合抗体是指组合某一物种的遗传物质与另一物种遗传物质的抗体。

[0095] 如本文所用,术语“人源化抗体”是指来源于非人物种但其蛋白序列已经被修改以增加其与人天然抗体的相似度的抗体。在一些具体的实例中,“人源化抗体”含有衍生自非人抗体的互补决定区(CDR)和衍生自人抗体的骨架区(FR)以及恒定区。

[0096] 术语“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类(例如IgM或IgG1)。

[0097] 短语“识别抗原的抗体”以及“对抗原特异的抗体/对抗原具有特异性的抗体”在本文中术语“特异性结合抗原的抗体”可互换使用。

[0098] 如本文所用,“特异性结合人IL4R α ”的抗体是指与人IL4R α 蛋白(还可能是一个或多个非人物种的IL4R α 蛋白)结合但基本不与非IL4R α 蛋白结合的抗体。优选地,抗体以“高亲和力”结合人IL4R α 蛋白,即以 5.0×10^{-8} M或更小,优选为 1.0×10^{-8} M或更小,更优选为 7.0×10^{-9} M或更小的K_D结合人IL4R α 蛋白。

[0099] 如本文所用,术语“基本不结合”蛋白或细胞是指不与蛋白或细胞结合,或者不以高亲和力与其结合,即以 1.0×10^{-6} M或更大,优选为 1.0×10^{-5} M或更大,更优选为 1.0×10^{-4} M或更大,更优选为 1.0×10^{-3} M或更大,更优选为 1.0×10^{-2} M或更大的K_D结合蛋白或细胞。

[0100] 术语“高亲和力”对于IgG抗体而言,是指对于抗原,抗体具有 1.0×10^{-6} M或更小,优选为 5.0×10^{-8} M或更小,更优选为 1.0×10^{-8} M或更小,更优选为 7.0×10^{-9} M或更小,更优选为 1.0×10^{-9} M或更小的K_D。但是对于其他抗体同种型,“高亲和力”结合可能有所不同。例如,对于IgM同种型,“高亲和力”是指抗体具有 1.0×10^{-6} M或更小,优选为 1.0×10^{-7} M或更小,更优选为 1.0×10^{-8} M或更小的K_D。

[0101] 本文所用的术语“K_{assoc}”或“K_a”是指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率,而本文所用的术语“K_{dis}”或“K_d”是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。本文所用的术语“K_D”是指解离常数,其为K_d与K_a之比(即K_d/K_a)并用摩尔浓度(M)表示。抗体的K_D值可以使用本领域熟知的方法测定。测定抗体K_D值的优选方法是使用表面等离子体共振,优选使用生物传感器系统,例如Biacore™系统进行测定。

[0102] 术语“EC₅₀”,又叫半数最大效应浓度,是指在特定暴露时间后,诱导反应达到基线和最大值之间的一半的抗体浓度。术语“IC₅₀”,又叫半数最大抑制浓度,是指相对于不存在抗体时,将特异性生物学或生化功能抑制50%的抗体浓度。

[0103] 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,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人灵长类、羊、狗、猫、牛、马、鸡、两栖类和爬行类;优选为哺乳动物,例如非人灵长类、羊、狗、猫、牛和马。

[0104] 术语“治疗有效量”是指足以防止或改善与疾病或病症(例如癌症)相关的症状,和/或减轻疾病或病症的严重性的本发明的抗体的量。应当理解,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。

[0105] 术语“同一性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。两个序列之间的序列比较和同一性百分比可以通过美国国家生物技术信息中心网站上的BLASTN/

BLASTP算法的默认设置进行测定。

[0106] 术语“Xn”和“Xaa”等同,是指未指定的氨基酸(Unspecified Amino Acid),通过相关表述中的后续定义来指定其涵盖的范围。

[0107] 本发明的多个方面在以下更加具体地被描述。

[0108] 抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段

[0109] 本公开中的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段与人IL4R α 特异性结合,与已报道的抗IL4R α 抗体(如Dupilumab)相比,具有相当的(如果不是更好的话)结合亲和力/能力。

[0110] 本公开中的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段能够阻断IL4R α 与IL4或IL13-IL13R α 1的结合,从而阻断相应的胞内信号转导,与已报道的抗IL4R α 抗体(如Dupilumab)相比,具有相当的或更高的阻断活性。

[0111] 优选地,本发明的抗IL4R α 抗体是人源化单克隆抗体。此外,或者,本发明的抗IL4R α 抗体可以是例如,小鼠、嵌合或人单克隆抗体。

[0112] 本公开中的抗IL4R α 抗体是结构和化学特性如下文和实施例中所述的单克隆抗体。抗体的重/轻链可变区的氨基酸序列ID汇总在下表1中,一些抗体具有相同的V_H或V_L。抗体的重链恒定区可以是具有如SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的人IgG4重链恒定区,且抗体的轻链恒定区可以是具有如SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的人 κ 恒定区。

[0113] 表1. 重/轻链可变区的氨基酸序列ID

抗体	VH- CDR1	VH- CDR2	VH- CDR3	VH	VL- CDR1	VL- CDR2	VL- CDR3	VL
C2C1A1A1	1	2	3	7	4	5	6	10
huC2C1A1A1-V1				8, X ₁ =W, X ₂ =S				11, X ₁ =L, X ₂ =I
huC2C1A1A1-V2				8, X ₁ =W, X ₂ =S				12
huC2C1A1A1-V3				8, X ₁ =W, X ₂ =S				11, X ₁ =F, X ₂ =V

[0115]

huC2C1A1A1-V4			8, X ₁ =W, X ₂ =S			11, X ₁ =F, X ₂ =I
huC2C1A1A1-V5			9			11, X ₁ =L, X ₂ =I
huC2C1A1A1-V6			9			12
huC2C1A1A1-V7			9			11, X ₁ =F, X ₂ =V
huC2C1A1A1-V8			9			11, X ₁ =F, X ₂ =I
huC2C1A1A1-V9			8, X ₁ =L, X ₂ =A			11, X ₁ =L, X ₂ =I
huC2C1A1A1-V10			8, X ₁ =L, X ₂ =A			12
huC2C1A1A1-V11			8, X ₁ =L, X ₂ =A			11, X ₁ =F, X ₂ =V
huC2C1A1A1-V12			8, X ₁ =L, X ₂ =A			11, X ₁ =F, X ₂ =I
huC2C1A1A1-V13			8, X ₁ =W, X ₂ =A			11, X ₁ =L, X ₂ =I
huC2C1A1A1-V14			8, X ₁ =W, X ₂ =A			12
huC2C1A1A1-V15			8, X ₁ =W, X ₂ =A			11, X ₁ =F, X ₂ =V
huC2C1A1A1-V16			8, X ₁ =W, X ₂ =A			11, X ₁ =F, X ₂ =I

[0116] 表1中的重链可变区CDRs和轻链可变区CDRs已由Kabat编号系统定义。然而,如本领域所熟知的,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。在涉及用具体CDR序列限定抗体或其抗原结合片段时,所述抗体的范围涵盖本领域任意编号系统(例如Chothia、IMGT、AbM或Contact编号系统)定义的CDR序列限定的抗体或其抗原结合片段。

[0117] 与人IL4R α 结合的其他抗IL4R α 抗体的V_H和V_L序列(或CDR序列)可以与本公开中的抗IL4R α 抗体的V_H和V_L序列(或CDR序列)“混合并配对”。优选地,当V_H和V_L链(或这些链中的CDR)混合并配对时,来自特定V_H/V_L对中的V_H序列被结构相似的V_H序列取代。同样地,优选将来自特定V_H/V_L对中的V_L序列替换为结构相似的V_L序列。

[0118] 因此,在一个实施方案中,本公开中的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段包括:

[0119] (a) 重链可变区,其包含列于表1中氨基酸序列;和

[0120] (b) 轻链可变区,其包含列于表1中氨基酸序列,或另一种抗IL4R α 抗体的V_L,其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人IL4R α 。

[0121] 在另一个实施方案中,本公开中的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段包含:

[0122] (a) 列于表1中的重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3;和

[0123] (b) 列于表1中的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3,或另一种抗IL4R α 抗体的CDRs,其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人IL4R α 。

[0124] 在另一个实施方案中,本公开中的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段包括本公开的抗IL4R α 抗体的重链可变区的CDR2以及其他结合人IL4R α 的抗体的CDRs,例如来自另一抗IL4R α 抗体的重链可变区的CDR1和/或CDR3,和/或轻链可变区的CDR1、CDR2和/或CDR3。

[0125] 此外,本领域所熟知的是,不依赖于CDR1和/或CDR2结构域,单独的CDR3结构域能够确定抗体对同源抗原的结合特异性,并且基于共同CDR3序列可以预测性地产生具有相同

结合特异性的多种抗体。

[0126] 因此,在另一个实施方案中,本公开中的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段包含本公开的抗IL4R α 抗体的重链可变区的CDR2以及至少本公开的抗IL4R α 抗体的重链可变区和/或轻链可变区的CDR3,或另一抗IL4R α 抗体的重链可变区和/或轻链可变区的CDR3,其中该抗体特异性结合人IL4R α 。这些抗体优选与本公开中的抗IL4R α 抗体(a)竞争结合IL4R α ; (b)保留功能特性; (c)结合相同表位;和/或(d)具有相似的结合亲和力。在另一个实施方案中,本公开中的抗IL4R α 抗体还可以包含本公开的抗IL4R α 抗体的轻链可变区的CDR2,或者另一抗IL4R α 抗体的轻链可变区的CDR2,其中该抗体特异性结合人IL4R α 。在另一个实施方案中,本公开中的抗IL4R α 抗体还可以包括本公开的抗IL4R α 抗体的重链可变区和/或轻链可变区的CDR1,或另一抗IL4R α 抗体的重链可变区和/或轻链可变区的CDR1,其中该抗体特异性结合人IL4R α 。

[0127] 在另一个实施方案中,本公开中的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和/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CDR1、CDR2和CDR3序列不同于本公开中的抗IL4R α 抗体的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述不同是源于一个或多个保守修饰。本领域中应理解,某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., (1993) Biochem 32:1180-8; de Wildt et al., (1997) Prot. Eng. 10:835-41; Komissarov et al., (1997) J. Biol. Chem. 272:26864-26870; Hall et al., (1992) J. Immunol. 149:1605-12; Kelley and O'Connell (1993) Biochem. 32:6862-35; Adib-Conquy et al., (1998) Int. Immunol. 10:341-6和Beers et al., (2000) Clin. Can. Res. 6:2835-43。

[0128] 因此,在一个实施方案中,本公开中的抗IL4R α 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和/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:

[0129] (a) 重链可变区的CDR1包含表1列出的序列,和/或其保守修饰;和/或

[0130] (b) 重链可变区的CDR2包含表1列出的序列,和/或其保守修饰;和/或

[0131] (c) 重链可变区的CDR3包含表1列出的序列,和/或其保守修饰;和/或

[0132] (d) 轻链可变区的CDR1、和/或CDR2、和/或CDR3包含表1列出的序列,和/或其保守修饰;和

[0133] (e) 该抗体或其抗原结合片段特异性结合人IL4R α 。

[0134] 如本文所用,术语“保守序列修饰”是指不会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替换、添加和缺失。可以通过本领域已知的标准技术将修饰引入本公开中的抗体中,例如点突变和PCR介导的突变。保守氨基酸替换是指将氨基酸残基替换为具有相似侧链的氨基酸残基。具有相似侧链的氨基酸残基组在本领域中已知。这些氨基酸残基组包括具有碱性侧链(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)、 β -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,本公开中的抗IL4R α 抗体的CDR区中的一个或多个氨基酸残基可以用来自相同侧链组的其他氨基酸残基进行替换,且得到的抗体可以使用本公开中所述的功能检测对其进行保留功能(即,上述的功能)测试。

[0135] 本公开的药物组合物、冻干制剂或制品具有多种体外和体内的用途,涉及例如,过度的IL4和/或IL13信号传导相关的疾病的治疗。

[0136] 一方面,由于抗IL4 α 抗体或其抗原结合片段可以阻断IL4 α 与IL4或IL13-IL13 α 1的结合以降低2型免疫。本公开提供了在受试者中治疗2型免疫相关的过敏性疾病的方法,所述方法包括向受试者施用本公开的药物组合物、冻干制剂或制品。所述过敏性疾病可以是特应性皮炎、过敏反应、过敏性鼻炎或过敏性哮喘。

[0137] 在另一方面,由于IL4或IL13信号传导能够激活STAT6,并且已经发现STAT6抑制剂可以抑制癌细胞生长。本公开提供了一种在受试者中抑制肿瘤细胞生长的方法,所述方法包括向受试者施用本公开的药物组合物、冻干制剂或制品。所述肿瘤的非限制性实例包括但不限于黑色素瘤、肺癌、肾癌、前列腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌和尿路上皮癌。

[0138] 在另一方面,本公开提供了一种在受试者中减少或抑制对IL-4或IL-13应答的细胞活化的方法。在一些实施方案中,抑制活化包括抑制细胞因子的产生或分泌。在一些实施方案中,抑制活化包括抑制增殖。通过激活杂合IL-4 α / γ c受体来应答IL-4的细胞包括但不限于B细胞、嗜酸性粒细胞和巨噬细胞。通过激活杂合IL-4 α /IL-13 α 1受体来应答IL-13的细胞包括但不限于成纤维细胞和平滑肌细胞。因此,在一个实施方案中,本公开提供了抑制平滑肌细胞增殖的方法。在另一个实施方案中,本公开提供了抑制成纤维细胞增殖的方法。

[0139] 本发明通过以下实施例进行进一步描述,实施例不应当解读为限制性的。本申请引用的所有参考文献、Genbank序列、专利和已公开的专利申请都通过引用的方式明确并入本文。

实施例

[0140] 本公开的抗IL4 α 抗体的制备、纯化方法已在申请号为PCT/CN2021077784的专利文件中记载,PCT/CN2021077784申请文件的全部内容均引入本公开。

[0141] 实施例1使用BIAcore表面等离子共振测定抗IL4 α 抗体的亲和力

[0142] 通过Biacore T200系统(GE Healthcare,Pittsburgh,PA,USA)对本公开中的抗IL4 α 抗体(mAb)的结合亲和力和结合动力学进行表征。

[0143] 简而言之,使用Biacore(GE Healthcare,Pittsburgh,PA,USA)提供的标准胺偶联试剂盒,通过伯胺基团将山羊抗人IgG(GE healthcare,产品目录BR100839,Human Antibody Capture Kit)共价连接至CM5芯片(羧甲基化葡聚糖涂层芯片)上。用乙醇胺封闭生物传感器表面上未反应的部分。然后,将浓度为66.67nM的本公开中的抗IL4 α 抗体和浓度为10 μ g/mL的抗IL4 α 抗体参照品(Dupilumab[®],也称为BM)以10 μ L/分钟的流速流过芯片。然后,将HBS EP缓冲液(由Biacore提供)梯度稀释的重组人IL4 α -his蛋白(内部制备,氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示)、食蟹猴IL4 α -his蛋白(Sino biological inc.,产品目录90897-C08H)、或狨猴IL4 α -his蛋白(Sino biological inc.定制产品,也称为cal-IL4 α -his,氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示)以30 μ L/min的流速流过芯片。追踪抗原-抗体结合动力学2分钟,并追踪解离动力学10分钟。使用BIA evaluation软件将结合和解离曲线拟合至1:1Langmuir结合模型,测定K_D、K_A和K_D值。

[0144] 实施例2抗IL4R α 抗体与IL4R α 的结合活性

[0145] 通过捕获ELISA、流式细胞术 (FACS) 和间接ELISA测定本公开中的抗IL4R α 抗体与IL4R α 的结合活性。

[0146] 2.1捕获ELISA

[0147] 简而言之,溶于PBS的浓度为2 μ g/mL的亲纯化山羊抗人IgG (Fc γ 片段特异性, Jackson ImmunoResearch, 产品目录109-005-098) 以100 μ L/孔包被在96孔板中,于4 $^{\circ}$ C孵育过夜。用洗涤缓冲液 (PBS+0.05%w/v Tween-20, PBST) 洗涤板1次,然后加入200 μ L/孔的封闭缓冲液 (含5%w/v脱脂牛奶的PBST),于37 $^{\circ}$ C封闭2小时。再次洗涤板,每孔加入100 μ L梯度稀释 (以66.7nM为起始浓度,在含2.5%w/v脱脂牛奶的PBST中5倍梯度稀释) 的本公开中的抗IL4R α 抗体、参照品或阴性对照品hIgG (用于静脉注射的人免疫球蛋白 (pH 4), Hualan Biological Engineering Inc.), 于37 $^{\circ}$ C共孵育40分钟,然后洗涤板4次。在捕获有抗IL4R α 抗体的96孔板中加入100 μ L/孔的生物素标记的人IL4R α -his蛋白 (内部制备,氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示,溶于含2.5%w/v脱脂牛奶的PBST中,浓度为0.14nM), 于37 $^{\circ}$ C共孵育40分钟,洗涤板4次,然后加入100 μ L/孔的HRP标记链霉亲和素 (在PBST中以1:10000的比例稀释, Jackson Immuno Research, 产品目录016-030-084), 于37 $^{\circ}$ C孵育40分钟。最后一次洗涤后,加入100 μ L/孔的ELISA底物TMB (Innorenagents, 产品目录TMB-S-002) 进行孵育。10分钟后,于25 $^{\circ}$ C加入50 μ L/孔的1M H₂SO₄以终止反应,并在450nm处读取吸光度值。使用Graphpad Prism软件分析数据,并得到EC₅₀值。

[0148] 2.2基于细胞的结合FACS

[0149] 通过流式细胞术 (FACS) 检测本公开中的抗IL4R α 抗体与表达于293F-IL4R α 细胞表面的IL4R α 的结合活性。简而言之,用pCMV-T-P质粒构建体转染293F细胞 (ThermoFisher Inc., 产品目录11625019), 该构建体在EcoRI和XbaI之间具有编码人IL4R α (uniprot# P24394-1的第1-825位氨基酸残基) 的核苷酸,并选择稳定细胞池 (命名为293F-IL4R α) 进行后续基于细胞的结合FACS和基于细胞的配体阻断FACS分析。从细胞培养瓶中收获293F-IL4R α 细胞,洗涤两次,并重悬于FACS缓冲液 (含有2%v/v胎牛血清的磷酸盐缓冲液 (PBS)) 中。然后,在含有2 $\times 10^5$ 个细胞/孔的96孔板中加入100 μ L/孔于FACS缓冲液中梯度稀释 (以80nM为起始浓度,4倍梯度稀释) 的抗IL4R α 抗体或对照品,冰浴40分钟。将细胞用FACS缓冲液洗涤两次后,加入100 μ L/孔的R-藻红蛋白标记的亲纯化山羊抗人IgG (Fc γ 片段特异性, Jackson ImmunoResearch, 产品目录109-115-098, 在FACS缓冲液中以1:1000的比例稀释)。于4 $^{\circ}$ C避光孵育40分钟后,将细胞洗涤3次后重悬于FACS缓冲液中。使用Becton Dickinson FACS Canto II-HTS测量荧光值。使用Graphpad Prism软件分析数据,并得到EC₅₀值。

[0150] 2.3间接ELISA

[0151] 检测本公开中的抗IL4R α 抗体与食蟹猴IL4R α 蛋白或cal-IL4R α -his蛋白的交叉反应。简而言之,溶于碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液 (pH 9.6) 的浓度为2 μ g/mL的食蟹猴IL4R α -his蛋白 (Sino biological inc., 产品目录90897-C08H) 或溶于碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液 (pH 9.6) 的浓度为0.2 μ g/mL cal-IL4R α -his蛋白 (Sino biological inc.定制产品, 产品目录BAX2) 分别以100 μ L/孔包被在96孔板中,于37 $^{\circ}$ C孵育2小时。用洗涤缓冲液 (PBS+0.05%w/v Tween-20, PBST) 洗涤板1次,然后加入200 μ L/孔的封闭缓冲液 (含5%w/v脱脂牛奶的PBST),

于37℃封闭2小时。再次洗涤板,每孔加入100μL梯度稀释的本公开中的抗IL4Rα抗体或对照品(0.004-66.7nM,以66.7nM为起始浓度,在含2.5%w/v脱脂牛奶的PBST中5倍梯度稀释),于37℃孵育40分钟。洗涤板4次,然后加入100μL/孔的过氧化物酶标记的亲纯化F(ab')₂片段化山羊抗人IgG(Fc γ 片段特异性,Jackson ImmunoResearch,产品目录109-036-098,在PBST缓冲液中以1:5000的比例稀释),于37℃孵育40分钟。最后一次洗涤后,加入100μL/孔的TMB(Innoreagents)进行孵育。3-10分钟后,于25℃加入50μL/孔的1M H₂SO₄以终止反应,并在450nm处读取吸光度值。使用Graphpad Prism软件分析数据,并得到EC₅₀值。

[0152] 实施例3抗IL4Rα抗体对IL4Rα-参照品或IL4Rα-IL4相互作用的阻断活性

[0153] 3.1配体阻断ELISA

[0154] 通过竞争ELISA测定本公开中的抗IL4Rα抗体阻断IL4-IL4Rα相互作用的能力。简而言之,溶于PBS的浓度为2μg/mL的人IL4Rα-his蛋白(内部制备,氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示)以100μL/孔包被于96孔板中,于4℃孵育过夜。第二天,用洗涤缓冲液(PBS+0.05%w/v Tween-20,PBST)洗涤板,并加入含5%w/v脱脂牛奶的PBST,在37℃中封闭2小时。然后,用洗涤缓冲液再次洗涤板。

[0155] 用含2.5%w/v脱脂牛奶的PBST缓冲液梯度稀释本公开中的抗IL4Rα抗体或对照品(以80nM为起始浓度,4倍梯度稀释),并将梯度稀释的抗IL4Rα抗体或对照品以100μL/孔添加到包被有IL4Rα的板中,在37℃下与人IL4Rα-his蛋白共孵育40分钟。用洗涤缓冲液洗涤板4次,然后每孔加入100μL浓度为0.56nM的生物素标记的人IL4蛋白(Sino biological inc.,产品目录11846-HNAE),于37℃孵育40分钟。再次用洗涤缓冲液洗涤板,然后加入100μL/孔的HRP标记链霉亲和素(在PBST缓冲液中以1:10000的比例稀释,Jackson ImmunoResearch,产品目录016-030-084),于37℃共孵育40分钟。再次用洗涤缓冲液洗涤板。最后,加入TMB,并用1M H₂SO₄以终止反应,在450nm处读取吸光度值。使用Graphpad Prism软件分析数据,并得到IC₅₀值。

[0156] 3.2参照品阻断ELISA

[0157] 通过竞争ELISA测定本公开中的抗IL4Rα抗体阻断参照品-人IL4Rα结合的能力。简而言之,溶于PBS的浓度为2μg/mL的参照品以100μL/孔包被于96孔板中,于4℃孵育过夜。第二天,用洗涤缓冲液(PBS+0.05%w/v Tween-20,PBST)洗涤板,并加入含5%w/v脱脂牛奶的PBST,于37℃封闭2小时。在封闭96孔板期间,用生物素标记的人IL4Rα-his蛋白(内部制备,氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示,溶于含2.5%w/v脱脂牛奶的PBST中,浓度为0.55nM)稀释本公开中的抗IL4Rα抗体或对照品(以100nM为起始浓度,4倍梯度稀释),于25℃孵育40分钟。洗涤板之后,将100μL/孔的抗体/IL4Rα-his混合物加到包被有参照品的板中。于37℃孵育40分钟,再用洗涤缓冲液洗涤板。然后向板中加入100μL/孔的HRP标记链霉亲和素,于37℃孵育40分钟,以检测结合到板上的生物素标记的人IL4Rα-his。再次用洗涤缓冲液洗涤板。最后,加入TMB,并用1M H₂SO₄以终止反应,在450nm处读取吸光度值。使用Graphpad Prism软件分析数据,并得到IC₅₀值。

[0158] 3.3基于细胞的配体阻断FACS

[0159] 使用上述制备的293F-IL4Rα细胞,利用流式细胞术(FACS)评估抗IL4Rα抗体阻断IL4蛋白与细胞表面IL4Rα的结合活性。

[0160] 简而言之,从细胞培养瓶中收获293F-IL4Rα细胞,洗涤两次,并重悬于FACS缓冲液

(含有2% v/v胎牛血清的PBS)中。然后,在含有 1×10^5 个细胞/孔的96孔板中加入100 μ L/孔于FACS缓冲液中梯度稀释(以80nM为起始浓度,4倍梯度稀释)的抗IL4 α 抗体或对照品,冰浴40分钟。将板用FACS缓冲液洗涤两次后,每孔加入100 μ L浓度为1.67nM的生物素标记的人IL4蛋白(Sino biological inc.,产品目录11846-HNAE),于4 $^{\circ}$ C避光孵育40分钟。用FACS缓冲液洗涤板两次后,每孔加入100 μ L R-藻红蛋白标记链霉亲和素(用FACS缓冲液以1:500的比例稀释,Jackson Immunoresearch,产品目录016-110-084),于4 $^{\circ}$ C避光孵育40分钟。将细胞洗涤两次后,重悬于FACS缓冲液中。使用Becton Dickinson FACS Canto II-HTS测定荧光值。使用Graphpad Prism软件分析数据,并得到IC₅₀值。

[0161] 实施例4抗IL4 α 抗体基于细胞的功能测定

[0162] IL4和IL13能够与IL4 α 结合并诱导HEK293T-IL4 α -STAT6-STAT6LUC-LB2细胞中的STAT6磷酸化。STAT6磷酸化在IL4/IL13信号通路中至关重要。

[0163] 简而言之,用pcDNA3.1-Puro(YouBio biological inc.,产品目录VT9222)质粒构建体(在BamHI和XhoI之间具有编码人IL4 α 的核苷酸)、STAT6质粒(Sino biological inc.,产品目录HG13190-NH)(在KpnI和XbaI之间具有编码人STAT6的核苷酸)、和STAT6荧光素酶报告基因质粒STAT6-Luc(Yeasen biological inc.,产品目录11588ES03)稳定转染天然表达IL13 α 1的HEK293T细胞(ATCC CRL-11268),在内部制备HEK293T-IL4 α -STAT6-STAT6LUC-LB2细胞。然后选择单细胞克隆LB2进行所有后续的功能测定。

[0164] 检测本公开中的抗IL4 α 抗体对IL4和IL13诱导的STAT6磷酸化的抑制作用。

[0165] 简而言之,将对数期的HEK293T-IL4 α -STAT6-STAT6LUC-LB2细胞重悬于培养基(RPMI1640+10%FBS)中,以100 μ L/孔接种到96孔板中,每孔含 5×10^5 个细胞。然后,每孔加入50 μ L梯度稀释的本公开中的抗IL4 α 抗体或对照品(包括内部制备的抗CD22抗体)(以100nM为起始浓度,5倍梯度稀释),并于37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。然后每孔加入50 μ L IL4蛋白(600pg/mL,Sino biological inc.,产品目录11846-HNAE)或IL13蛋白(50ng/mL,Sino biological inc.,产品目录10369-HNAC),于37 $^{\circ}$ C孵育20分钟。将板离心并用染色缓冲液(内部制备,DPBS+0.5% w/v BSA+2mM EDTA)洗涤板两次,然后每孔加入50 μ L固定缓冲液(BD biosciences inc.,产品目录5545655),于4 $^{\circ}$ C孵育30分钟。将细胞洗涤两次,每孔加入200 μ L透化缓冲液(BD biosciences inc.,目录号558050),冰浴30分钟。用染色缓冲液将板洗涤3次。然后加入抗pSTAT6抗体(pSTAT6储备液稀释20倍,BD biosciences inc.,产品目录562079),于冰上静置60分钟。最后将板洗涤两次,并重悬于染色缓冲液中。使用Becton Dickinson FACS Canto II-HTS测量荧光值。使用Graphpad Prism软件分析数据,并得到IC₅₀值。

[0166] 实施例5嵌合抗体的产生和表征

[0167] 对小鼠抗IL4 α 单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区进行了测序,序列ID汇总在表1中。

[0168] 将小鼠抗IL4 α 单克隆抗体C2C1A1A1的重链可变区和轻链可变区分别克隆至含人IgG4重链恒定区(SEQ ID NO:13)的载体和含人 κ 轻链恒定区(SEQ ID NO:14)的载体中,其中可变区的C末端与相应恒定区的N末端相连。

[0169] 包含编码连接至人IgG4重链恒定区的重链可变区的核苷酸的载体,和包含编码连接至人 κ 轻链恒定区的轻链可变区的核苷酸的载体,按60%:40%的轻链构建体:重链构建

体的比例,用1mg/mL PEI瞬时转染至50mL 293F悬浮细胞中。

[0170] 在摇瓶中培养六天后收获细胞上清液,通过离心沉淀上清液中的细胞,并通过0.22 μ m滤器过滤以进行免疫球蛋白分离。嵌合抗体通过蛋白A亲和层析进行纯化。简而言之,以5至10倍柱体积的PBS缓冲液洗涤蛋白A琼脂糖柱(bestchrom (Shanghai) Biosciences,产品目录AA0273)。使细胞上清液流过蛋白A琼脂糖柱,然后用PBS缓冲液洗涤柱直到蛋白质的吸光度达到基线。用洗脱缓冲液(0.1M甘氨酸-HCl,pH 2.7)洗脱柱,并立即将洗脱液收集到1.5mL管中,用中和缓冲液(1M Tris-HCl,pH 9.0)中和。合并含免疫球蛋白的部分,并在PBS中于4℃透析过夜。

[0171] 按照前述实施例中的方案,通过捕获ELISA、竞争ELISA、BIAcore亲和力测定、基于细胞的结合FACS测定和基于细胞的功能测定检测纯化的抗体;其中针对小鼠C2C1A1A1,检测方法基于前述实施例进行了如下所述的小幅修改:

[0172] 对于捕获ELISA,用2 μ g/mL的山羊抗鼠IgG (Fc γ 片段特异性, Jackson ImmunoResearch,产品目录115-005-008)替代山羊抗人IgG,100 μ L/孔;

[0173] 对于BIAcore,用山羊抗鼠IgG (GE healthcare,产品目录BR100838, Mouse Antibody Capture Kit)替代山羊抗人IgG,共价连接至CM5芯片;

[0174] 对于基于细胞的结合FACS,用R-藻红蛋白标记的亲纯化F(ab')₂片段化山羊抗鼠IgG (Jackson ImmunoResearch,产品目录115-116-146)替代R-藻红蛋白标记的亲纯化山羊抗人IgG,100 μ L/孔。

[0175] 结果如表2所示,数据表明,嵌合抗体与其亲本小鼠抗体具有相似的结合亲和力/能力和阻断活性。

[0176] 表2.嵌合抗体的结合和功能活性

mAb ID#	对人 IL4R 的捕获 ELISA (EC ₅₀ , nM)	对人 IL4R 的 BIAcore 亲和力 (K _D , M)	基于细胞 的结合 FACS (EC ₅₀ , nM)	IL4-IL4R α 阻断 ELISA (IC ₅₀ , nM)	基于细胞的功能测定	
					对 IL4 诱导的 STAT6 磷酸化 的抑制 (IC ₅₀ , nM)	对 IL13 诱导的 STAT6 磷酸化 的抑制 (IC ₅₀ , nM)
[0177] 小鼠 C2C1A1A1	0.03	1.195E-10	0.31	1.89	0.19	0.27
嵌合 C2C1A1A1	0.05	5.219E-10	0.63	3.12	0.27	0.56
参照品	0.05	4.656E-10	0.46	2.06	0.37	0.48

[0178] 实施例6抗IL4R α 单克隆抗体的人源化

[0179] 对小鼠抗IL4R α 抗体C2C1A1A1进行人源化并进行进一步表征。小鼠抗体的人源化是使用已建立的CDR移植方法进行的,如下所述。

[0180] 为了选择用于小鼠抗体C2C1A1A1人源化的接收体骨架,将各个小鼠抗体轻链可变区和重链可变区的序列与人免疫球蛋白基因数据库进行BLAST。选择具有最高同源性的物种抗体作为用于人源化的接收体骨架。将小鼠抗体重/轻链可变区CDRs插入到选出的骨架中,并进一步回复突变骨架中的残基以获得更多候选的重/轻链可变区。总共获得16个示例性人源化C2C1A1A1抗体,即huC2C1A1A1-V1至huC2C1A1A1-V16,其重/轻链可变区序列ID如表1中所示。

[0181] 包含编码连接至人IgG4重链恒定区 (SEQ ID NO:13) 的人源化重链可变区的核苷酸的载体,和包含编码连接至人 κ 轻链恒定区 (SEQ ID NO:14) 的人源化轻链可变区的核苷酸的载体,按60%:40%的轻链构建体:重链构建体的比例,用1mg/mL PEI瞬时转染至50mL

293F悬浮细胞中。

[0182] 在摇瓶中培养六天后收获细胞上清液,通过离心沉淀上清液中的细胞,并通过0.22 μ m滤器过滤以进行免疫球蛋白分离。抗体通过蛋白A亲和层析进行纯化。简而言之,以5至10倍柱体积的PBS缓冲液洗涤蛋白A琼脂糖柱(bestchrom (Shanghai) Biosciences, 产品目录AA0273)。使细胞上清液流过蛋白A琼脂糖柱,然后用PBS缓冲液洗涤柱直到蛋白质的吸光度达到基线。用洗脱缓冲液(0.1M甘氨酸-HCl, pH 2.7)洗脱柱,并立即将洗脱液收集到1.5mL管中,用中和缓冲液(1M Tris-HCl, pH 9.0)中和。合并含免疫球蛋白的部分,并在PBS中于4℃透析过夜。

[0183] 实施例7人源化抗体的表征

[0184] 按照前述实施例中的方案,通过BIAcore技术评估了人源化抗体对人IL4R α 的结合亲和力,测定 K_a , K_d 和 K_D 值,并将其汇总在表3中。

[0185] 表3. 人源化C2C1A1A1单克隆抗体的结合亲和力

mAb	BIAcore 动力学					
	人 IL4Rα					
	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Start (RU)	End (RU)	解离%
嵌合 C2C1A1A1	3.29E+05	<1.00E-05	<3.04E-11	67.1	65.8	-1.94%
含嵌合 C2C1A1A1 的 上清液	3.64E+05	4.04E-05	1.11E-10	40	40.4	1.00%
huC2C1A1A1-V1	1.29E+05	<1.00E-05	<7.73E-11	43.9	44	0.23%
huC2C1A1A1-V2	2.26E+05	<1.00E-05	<4.42E-11	50.4	50.3	-0.20%
huC2C1A1A1-V3	2.57E+05	<1.00E-05	<3.89E-11	48.6	48.3	-0.62%
huC2C1A1A1-V4	4.55E+05	<1.00E-05	<2.20E-11	49.5	49.6	0.20%
huC2C1A1A1-V5	2.65E+06	7.50E-05	2.83E-11	65.8	64.3	-2.28%
huC2C1A1A1-V6	3.83E+05	<1.00E-05	<2.61E-11	50.9	50.6	-0.59%
huC2C1A1A1-V7	2.63E+05	<1.00E-05	<3.80E-11	60.5	60.1	-0.66%
huC2C1A1A1-V8	2.78E+05	<1.00E-05	<3.60E-11	65.2	64.4	-1.23%
huC2C1A1A1-V9	1.97E+05	<1.00E-05	<5.07E-11	41.2	41.1	-0.24%
huC2C1A1A1-V10	3.29E+05	<1.00E-05	<3.04E-11	64.9	63.9	-1.54%
huC2C1A1A1-V11	3.30E+05	<1.00E-05	<3.03E-11	54.2	53.7	-0.92%
huC2C1A1A1-V12	3.02E+05	1.42E-05	4.70E-11	53.1	52.1	-1.88%
huC2C1A1A1-V13	1.193E+05	<1.00E-05	<8.38E-11	36.4	36.7	0.82%
huC2C1A1A1-V14	1.53E+05	<1.00E-05	<6.54E-11	50.1	50.5	0.80%
huC2C1A1A1-V15	2.30E+05	<1.00E-05	<4.35E-11	69	69.2	0.29%
huC2C1A1A1-V16	2.96E+05	<1.00E-05	<3.38E-11	47.3	47.1	-0.42%
参照品	3.33E+05	6.25E-05	1.88E-10	71.9	70	-2.64%

[0187] 解离% = (End (RU) - Start (RU)) / Start (RU)

[0188] 结果表明,人源化抗体与嵌合抗体具有相似的人IL4R α 结合亲和力,并且与参照品相比,所有的人源化huC2C1A1A1抗体均显示出更高的人IL4R α 结合亲和力。

[0189] 按照前述实施例中的方案,通过Biacore、捕获ELISA、间接ELISA、基于细胞的结合FACS、竞争ELISA、基于细胞的配体阻断FACS和基于细胞的功能测定,对人源化抗体huC2C1A1A1-V14和huC2C1A1A1-V15进行了进一步检测。

[0190] 还检测了人源化抗体huC2C1A1A1-V15的热稳定性。简而言之,使用GloMelt™ Thermal Shift Protein Stability Kit (Biotium, 产品目录33022-T, 批号181214), 通过蛋白质热位移测定法测定 T_m (溶解温度)。简而言之,将GloMelt™染料解冻至室温。将含有染

料的小瓶涡旋并离心。然后,将5 μ L 200 $\times$ 染料添加至95 μ L PBS中制备10 $\times$ 染料。反应体系中加入2 μ L 10 $\times$ 染料和10 μ g人源化抗体,并添加PBS至总反应体积为20 μ L。将含有染料和抗体的离心管短暂离心,并置于实时PCR热循环仪(Roche,LightCycler480II)中,该热循环仪中Melt Curve程序使用表4中的参数进行设置。结果如表5-1、5-2和5-3所示,数据显示,与参照品相比,人源化C2C1A1A1抗体显示出相当的(如果不是更好的话)人IL4R α 结合亲和力/活性和对IL4R α -IL4/IL13的阻断能力。

[0191] 表4.Melt Curve程序的参数

[0192]	Profile 步骤	温度	升温速率	持续时间
[0193]	Initial hold	25°C	NA	30 s
	Melt curve	25-99°C	0.1°C/s	NA

[0194] 表5-1.人源化单克隆抗体的结合活性和功能活性

mAb ID#	结合测定				
	人 IL4R α -his			食蟹猴 IL4R α -his	
	捕获 ELISA (EC ₅₀ , nM)	Biacore (K _D , M)	基于细胞的 结合 FACS (EC ₅₀ , nM)	Biacore (K _D , M)	间接 ELISA (EC ₅₀ , nM)
[0195] 嵌合 C2C1A1A1	0.05	3.88E-10	0.33	弱结合	0.60
huC2C1A1A1-V15	0.05	4.47E-10	0.31	弱结合	0.52
huC2C1A1A1-V14	0.06	6.42E-10	0.39	弱结合	0.68
参照品	0.05	7.46E-10	0.40	未结合	0.67

[0196] 表5-2.人源化单克隆抗体的结合活性和功能活性

mAb ID#	结合测定		竞争 ELISA		基于细胞的 配体阻断 FACS (IC ₅₀ , nM)
	猿猴 IL4R α -his		IL4-IL4R α	参照品阻	
	Biacore (K _D , M)	间接 ELISA (EC ₅₀ , nM)	阻断 ELISA (IC ₅₀ , nM)	断 ELISA (IC ₅₀ , nM)	
[0197] 嵌合 C2C1A1A1	弱结合	0.62	2.46	0.17	0.48
huC2C1A1A1-V15	弱结合	0.41	2.03	0.16	0.50
huC2C1A1A1-V14	弱结合	0.55	2.17	0.17	0.58
参照品	未结合	1.72	1.74	0.19	0.42

[0198] 表5-3.人源化单克隆抗体的结合活性和功能活性

mAb ID#	基于细胞的功能测定 (IC ₅₀ , nM)		T _m (溶解温 度) °C	
	对 IL4 诱导的 STAT6 磷酸化的抑制	对 IL13 诱导的 STAT6 磷酸化的抑制	T _{m1}	T _{m2}
[0199] 嵌合 C2C1A1A1	0.26	0.39	*	*
huC2C1A1A1-V15	0.61	0.60	NA	72.0
huC2C1A1A1-V14	0.64	0.73	65.5	74.0
参照品	0.70	0.84	*	*

[0200] “*”表示未检测。

[0201] 实施例8药物组合物的制备和筛选

[0202] 检测方法:

[0203] (1) 分子排阻色谱法 (SEC-UPLC): 用于测定样品中抗体的纯度, 采用Thermo Vanquish F高效液相色谱, Waters ACQUITY UPLC Protein BEH SEC Column(200Å, 1.7 μ m,

4.6mm×300mm) 色谱柱, Waters ACQUITY UPLC Protein BEH SEC Guard Column(200Å, 1.7 μm, 4.6mm×30mm) 为预柱, 以50mmol/L磷酸盐缓冲液+200mmol/L氯化钠(pH 7.0) 为流动相进行洗脱, 检测波长为280nm。按面积归一化法计算高分子杂质和免疫球蛋白单体的百分含量。

[0204] (2) 差示扫描荧光法(DSF): 采用蛋白质稳定性分析仪(NanoTemper, Promethus NT.48) 分析样品的解折叠温度(T_m), 毛细管取10μl样品放入样品室, 程序如下: 扫描开始温度为25℃, 扫描结束温度为95℃, 升温速率为0.3℃/分钟。

[0205] (3) 采用HVR0C-S粘度计(Rheosense, μVISC) 分析样品的粘度, 选择Auto模式, 记录检测结果。

[0206] (4) 全柱成像毛细管等电聚焦(iCIEF): 用于测定样品的电荷变异体, 采用成像毛细管等电聚焦电泳仪(ProteinSimple iCE3)、快速全自动蛋白质表征分析系统(Protein Simple, Maurice), 涂层石英毛细管(Protein Simple), 紫外检测器, 在紫外检测波长280nm下进行检测。设置进样时间60秒、1500伏预聚焦1分钟、300伏聚焦10分钟。按峰面积归一化法计算个电荷变异体的峰面积百分比。

[0207] 缓冲剂的配制:

[0208] (1) 组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂包含组氨酸和盐酸组氨酸, 在一个具体的实施例中, 组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂包含组氨酸和盐酸组氨酸一水合物, 例如, 20mM组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂(pH 5.8) 由约1.17mg/mL组氨酸和约2.62mg/mL盐酸组氨酸一水合物组成;

[0209] (2) 磷酸钠缓冲剂包含磷酸氢二钠和磷酸二氢钠, 在一个具体的实施例中, 磷酸钠缓冲剂包含磷酸二氢钠一水合物和磷酸氢二钠十二水合物, 例如, 20mM磷酸钠缓冲剂(pH 6.0) 是由约2.539mg/mL磷酸二氢钠一水合物和约0.573mg/mL磷酸氢二钠十二水合物配制而成;

[0210] (3) 醋酸钠-醋酸缓冲剂包含醋酸钠和醋酸, 在一个具体的实施例中, 醋酸钠-醋酸缓冲剂包含醋酸钠三水合物和醋酸, 例如, 20mM醋酸钠-醋酸缓冲剂(pH 6.0) 是由约2.605mg/mL醋酸钠三水合物和约0.141mg/mL的醋酸配而成。

[0211] 通过超滤的方式, 将抗IL4Rα抗体(huC2C1A1A1-V15) 分别置换到表6的缓冲剂中, 置换完成后进行浓缩, 然后按照表6添加表面活性剂和稳定剂。混合均匀后, 经0.22μm滤膜过滤除菌, 并分装至西林瓶中, 加塞并压盖。药物组合物F1-F4的SEC-UPLC检测结果见表7, 其中F4在40℃储存1月后高分子杂质的增长(由1.36%增加至5.66%) 高于F1-F3。

[0212] 表6. 药物组合物的成分

[0213]

编号	抗 IL4Rα 抗体	缓冲剂	表面活性剂	稳定剂
F1	175 mg/mL	20 mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 5.0	0.4 mg/mL 聚山梨酯 80	50 mg/mL 蔗糖
F2	175 mg/mL	20 mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 6.0	0.4 mg/mL 聚山梨酯 80	50 mg/mL 蔗糖
F3	175 mg/mL	20 mM 磷酸钠 pH 6.0	0.4 mg/mL 聚山梨酯 80	50 mg/mL 蔗糖
F4	175 mg/mL	20 mM 醋酸钠-醋酸 pH 6.0	0.4 mg/mL 聚山梨酯 80	50 mg/mL 蔗糖

[0214] 表7. 药物组合物的SEC-UPLC检测结果

[0215]

样品	取样点	SEC-UPLC (%)	
		高分子杂质	主峰
F1	0 天	0.77	99.02
	40°C 1 周	1.29	97.37
	40°C 2 周	1.57	96.26
	40°C 1 月	2.46	93.68
F2	0 天	0.95	98.84
	40°C 1 周	1.5	98.27
	40°C 2 周	1.9	97.44
	40°C 1 月	2.42	96.83
F3	0 天	1.35	98.44
	40°C 1 周	2.16	96.93
	40°C 2 周	2.44	96.54

[0216]

	40°C 1 月	3.37	95.46
F4	0 天	1.36	98.44
	40°C 1 周	2.43	97.34
	40°C 2 周	2.10	96.35
	40°C 1 月	5.66	93.45

[0217] 示例性地,选择20mM组氨酸-盐酸组氨酸作为缓冲剂。通过超滤的方式,将抗IL4R α 抗体(huC2C1A1A1-V15)置换到表8的缓冲剂中,置换完成后进行浓缩,然后按照表8添加表面活性剂和稳定剂。混合均匀后,经0.22 μ m滤膜过滤除菌,并分装至西林瓶中,加塞并压盖。药物组合物F5-F7的T_m和SEC-UPLC检测结果见表9,其中,F6在40°C储存1月后高分子杂质的增长最少。

[0218] 表8. 药物组合物的成分

[0219]

编号	抗 IL4R α 抗体	缓冲剂	表面活性剂	稳定剂		
F5	150 mg/mL	20 mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 5.8	0.4 mg/mL 聚山梨酯 80	50 mg/mL 蔗糖	50 mM 盐酸精氨酸	/
F6	150 mg/mL	20 mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 5.8	0.4 mg/mL 聚山梨酯 80	/	250 mM 脯氨酸	20 mM 氯化钠
F7	150 mg/mL	20 mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 5.8	0.4 mg/mL 聚山梨酯 80	50 mg/mL 蔗糖	250 mM 脯氨酸	20 mM 氯化钠

[0220] “/”表示无。

[0221] 表9. 药物组合物的T_m和SEC-UPLC检测结果

[0222]

样品	取样点	T _m (°C)		SEC-UPLC (%)	
		T _m Onset	T _m 1	高分子杂质	主峰
F5	0 天	60.0	64.4	0.79	98.28
	40°C 1 周	*	*	1.12	98.04
	40°C 2 周	*	*	1.34	97.68
	40°C 1 月	*	*	1.59	97.27
	2~8°C 1 月	*	*	0.83	98.3
F6	0 天	60.0	64.3	0.81	98.35
	40°C 1 周	*	*	1.25	97.82
	40°C 2 周	*	*	1.46	97.52
	40°C 1 月	*	*	1.42	97.44
	2~8°C 1 月	*	*	0.86	98.32
F7	0 天	60.6	65.2	0.76	98.52
	40°C 1 周	*	*	1.19	97.88
	40°C 2 周	*	*	1.42	97.58
	40°C 1 月	*	*	1.74	97.2
	2~8°C 1 月	*	*	0.86	98.35

[0223] “*”表示未检测。

[0224] 示例性地,选择20mM组氨酸-盐酸组氨酸作为缓冲剂。通过超滤的方式,将抗IL4R α 抗体(huC2C1A1A1-V15)置换到表10的缓冲剂中,置换完成后进行浓缩,然后按照表10添加表面活性剂和稳定剂。混合均匀后,经0.22 μ m滤膜过滤除菌,并分装至西林瓶中,加塞并压盖。药物组合物F8和F9的T_m、粘度、SEC-UPLC和iCIEF检测结果见表11,其中,F8的粘度低于F9。

[0225] 表10. 药物组合物的成分

[0226]

编号	抗 IL4R α 抗体	缓冲剂	表面活性剂	稳定剂	
F8	150 mg/mL	20 mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 5.8	0.4 mg/mL 聚山梨酯 80	250 mM 脯氨酸	20 mM 氯化钠
F9	150 mg/mL	20 mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 5.8	0.4 mg/mL 聚山梨酯 80	350 mM 脯氨酸	/

[0227] “/”表示无。

[0228] 表11. 药物组合物的T_m、粘度、SEC-UPLC和iCIEF检测结果

[0229]

样品	取样点	T _m (°C)		粘度 (mPa.s)	SEC-UPLC (%)		iCIEF (%)		
		T _m Onset	T _m 1		高分子杂质	主峰	酸性峰	主峰	碱性峰
F8	0 天	59.4	63.8	12.46	0.89	98.76	16.0	74.6	9.4
	40°C 1 周	*	*	*	1.29	98.27	19.3	70.0	10.7
	40°C 1 月	*	*	*	1.67	97.17	31.6	59.9	8.6
	2~8°C 1 周	*	*	*	0.95	98.73	/	/	/
	2~8°C 1 月	*	*	*	0.98	98.67	18.8	71.0	10.2
	2~8°C 3 月	*	*	*	0.91	98.7	19.9	71.3	8.8
	2~8°C 6 月	*	*	*	1.07	98.58	20.7	69.1	10.2
F9	0 天	60.4	64.7	15.98	0.77	98.99	15.7	74.9	9.4
	40°C 1 周	*	*	*	1.24	98.4	19.1	70.8	10.1
	40°C 1 月	*	*	*	1.47	97.78	33.4	59.0	7.6
	2~8°C 1 周	*	*	*	1.00	98.66	/	/	/
	2~8°C 1 月	*	*	*	0.96	98.72	20.4	70.6	8.9
	2~8°C 3 月	*	*	*	0.92	98.7	19.5	69.7	10.8
	2~8°C 6 月	*	*	*	1.08	98.44	20.1	70.7	9.2

[0230] “*”表示未检测。

[0231] 尽管本公开已结合一个或多个实施方案进行了描述,应当理解的是,本公开不仅涵盖这些实施方案,还意在涵盖包括在所附权利要求的精神和范围内的所有可替代、修饰和等同物。本文引用的所有文献均通过引用的方式全部并入本文。

[0232] 本公开的序列信息总结于下表12中。

[0233] 表12.序列信息

[0234]

描述 序列/SEQ ID NO.
小鼠、嵌合和人源化 C2C1A1A1 的 VH-CDR1 TYGMS (SEQ ID NO: 1)
小鼠、嵌合和人源化 C2C1A1A1 的 VH-CDR2 TINSNGGSTSYPD SVKG (SEQ ID NO: 2)
小鼠、嵌合和人源化 C2C1A1A1 的 VH-CDR3 FFRFRNAMDY (SEQ ID NO: 3)
小鼠、嵌合和人源化 C2C1A1A1 的 VL-CDR1 RTSENIYSYLA (SEQ ID NO: 4)
小鼠、嵌合和人源化 C2C1A1A1 的 VL-CDR2 NAKTLAE (SEQ ID NO: 5)
小鼠、嵌合和人源化 C2C1A1A1 的 VL-CDR3 QHYYGPPTWT (SEQ ID NO: 6)
小鼠和嵌合 C2C1A1A1 的 VH EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYGMSWVRQTPDKRLELVATINSNGGSTSYPD SVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMSSLKSEDAMFYCARFFRFRNAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 7) 小鼠 C2C1A1A1 的 VH GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGT GCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACTTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGACAAGAGGC TGGAGTTGGTCGCAACCATTAAATAGTAATGGTGGTAGTACCAGTTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAG GACACAGCCATGTTTTACTGTGCAAGATTTTCCGCTTAGGAATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGG AACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 17) 嵌合 C2C1A1A1 的 VH GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGAGGATCCCTGAAGCTGTCCTG CGCCGCTCCGGCTTACCTTCTCCACATACGGCATGTCTTGGGTGAGACAGACCCCTGATAAGAGA CTGGAGCTGGTGGCCACCATCAACAGCAACGGCGGCAGCACCAGCTACCCCGACAGCGTGAAGGG CAGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGTCCAGCCTGAAGAG CGAGGATACAGCCATGTTCTACTGTGCCAGGTTCTTTAGGTTTCAGAAATGCCATGGACTACTGGGGC CAGGGCACCTCCGTGACAGTGAGCAGC (SEQ ID NO: 18)
huC2C1A1A1-V1 至 huC2C1A1A1-V4 的 VH EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSWVRQAPGKGLVX ₁ VX ₂ TINSNGGSTSYPD SVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 8) X ₁ =W, X ₂ =S EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSWVRQAPGKGLVWVSTINSNGGSTSYPD SVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWGQGTSLVTVSS
huC2C1A1A1-V5 至 huC2C1A1A1-V8 的 VH EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSWVRQSPDKRLEWVSTINSNGGSTSYPD SVKGRFT ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 9)
huC2C1A1A1-V9 至 huC2C1A1A1-V12 的 VH EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSWVRQAPGKGLVX ₁ VX ₂ TINSNGGSTSYPD SVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 8) X ₁ =L, X ₂ =A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSWVRQAPGKGLVLVATINSNGGSTSYPD SVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWGQGTSLVTVSS
huC2C1A1A1-V13 至 huC2C1A1A1-V16 的 VH EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSWVRQAPGKGLVX ₁ VX ₂ TINSNGGSTSYPD SVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 8) X ₁ =W, X ₂ =A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSWVRQAPGKGLVWVATINSNGGSTSYPD SVKGRFT ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWGQGTSLVTVSS GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCCGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTG CGCTGCCTCCGGCTTACCTTTAGCACCTACGGCATGAGCTGGGTGAGACAAGCCCCGGCAAAGG ACTGGTGTGGGTGGCTACCATCAACAGCAACGGCGGCTCCACAAGCTACCCCGACAGCGTGAAGGG AAGATTACCATCTCTAGAGACAACGCCAAGAACACACTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAGAGCC GAAGACACCGCTGTGTACTACTGCGCTAGATTCTTTAGATTTAGAAACGCCATGGACTACTGGGGCC

[0235]

AAGGCACACTGGTGACAGTGTCTCC (SEQ ID NO: 19)	
小鼠和嵌合 C2C1A1A1 的 VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRTSENIYSYLA WYQQKQKGKSPQFLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQ
FSLNINSLQSEDFGSYYCQHYYGPPTWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 10)	
小鼠 C2C1A1A1 的 VL	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCAACATCACATG
TCGAACAAGTGAGAATATTTACAGTTATTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAG	
TTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGCAGAAAGGTGTGCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAG	
GCACACAGTTTTCTCTGAATATCAACAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACAT	
TATTATGGTCCCTCCACGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 20)	
嵌合 C2C1A1A1 的 VL	GACATCCAGATGACACAGAGCCCCGCCAGCCTGTCCGCCTCCGTTGGAGAGACCGTGACCATCACC
TGTAGGACCTCCGAGAATATCTACAGCTACCTGGCCTGGTATCAACAGAAGCAGGGCAAGTCCCCTC	
AGTTTCTGGTGTACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCCTCTAGGTTCTCCGGCTCCGGCA	
GCGGCACCCAGTTCAGCCTGAATATCAACAGCCTGCAGAGCGAGGACTTTGGCAGCTACTACTGTCA	
GCACTACTACGGCCCTCCACCTGGACATTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 21)	
huC2C1A1A1-V1、huC2C1A1A1-V5、huC2C1A1A1-V9 和 huC2C1A1A1-V13 的 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLA WYQQKPGKAPKX ₁ LX ₂ YNAKTLAEGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 11) X ₁ =L, X ₂ =I	
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLA WYQQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTD	
FTLTISLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGQGTKVEIK	
huC2C1A1A1-V2、huC2C1A1A1-V6、huC2C1A1A1-V10 和 huC2C1A1A1-V14 的 VL	DIQMTQSPSSLSASVGQRTITCRTSENIYSYLA WYQQKQKGPFRFLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTEF
TLTITSLQAEDFGVYYCQHYYGPPTWTFGPGTKLEIK (SEQ ID NO: 12)	
huC2C1A1A1-V3、huC2C1A1A1-V7、huC2C1A1A1-V11 和 huC2C1A1A1-V15 的 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLA WYQQKPGKAPKX ₁ LX ₂ YNAKTLAEGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 11) X ₁ =F, X ₂ =V	
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLA WYQQKPGKAPKFLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTD	
FTLTISLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGQGTKVEIK	
GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTCTCTGAGCGCTTCCGTGGGAGATAGAGTGACCATCACAT	
GCAGAACCTCCGAGAACATCTACAGCTATCTGGCTTGGTATCAGCAGAAAGCCCGCAAGGCCCCCA	
AGTTCTCTGGTGTACAACGCCAAGACACTGGCTGAGGGCGTGCTAGCAGATTACGCGGCTCCGGCA	
GCGGCACAGACTTACACTGACAATCAGCTCTCTGCAACCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCA	
GCACTACTATGGCCCCCTACATGGACCTTTGGCCAAGGCACCAAGGTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 22)	
huC2C1A1A1-V4、huC2C1A1A1-V8、huC2C1A1A1-V12 和 huC2C1A1A1-V16 的 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLA WYQQKPGKAPKX ₁ LX ₂ YNAKTLAEGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 11) X ₁ =F, X ₂ =I	
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLA WYQQKPGKAPKFLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDF	
TLTISLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGQGTKVEIK	
嵌合和人源化抗体的重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGKTITCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV	
VVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL	
PSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD	
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 13)	
GCCAGCACAAAGGGCCCTCCGTGTTCCCTGGCCCCCTGCAGCAGGAGCACCTCTGAGTCCACC	
GCCGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCTGGAATTCCGGC	
GCCCTGACATCCGGCGTGACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGTCCCTCCGGCTGTACAGCTGAGCT	
CCGTGGTGACAGTGCTTCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACATGTAATGTGGATCACAAGCC	
CAGCAACACAAAGGTGGATAAGAGAGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTCCCTGTCTGC	
CCCAGAGTTCTTGGGCGGCCCTCTGTGTTCTGTTCCCCCTAAGCCCAAGGACACACTGATGATC	
TCCAGGACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAGGACCCCTGAGGTGCAGTT	
CAATTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACAAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTTAA	
TTCCACATACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGCAAGGAGTA	
CAAGTGTAAGGTGAGCAACAAGGGCCTGCCTTCTCCATCGAGAAGACAATCAGCAAGGCCAAGG	
GCCAGCCTAGGGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCCAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAG	

[0236]

GTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAAC
GGCCAGCCCGAGAATAACTACAAGACAACACCCCCGTGCTGGATTCCGATGGCAGCTTCTTTCTGT
ACTCCAGGCTGACCGTGGATAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGCAATGTGTTCACTGCTCCGTGATGC
ACGAGGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGAGCCTGGGCAAGTGA (SEQ ID
NO: 23)

嵌合和人源化抗体的轻链恒定区

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 14)
CGTACGGTGGCGGCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGC
CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAAC
GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG
CCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAG
TCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA (SEQ ID
NO: 24)

人 IL4R α -his

MGWLCSGLLFPVSCLVLLQVASSGNMKVLQEPTCVSDYMSISTCEWKMNPTNCSTELRLLYQLVFLLS
EAHTCIPENNGGAGCVCHLLMDDVVSADNYTLDLWAGQQLLWKGSFKPSEHVKPRAPGNLTVHTNVS
DTLLLTWSNPYPDPNYLYNHLTYAVNIWSENDPADFRIYNVTYLEPSLRIAASTLKSGISYRARVRAWAQ
CYNTTWSEWSPSTKWHNSYREPFEQHSHHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 15)

猴 IL4R α -his

MGWLCSGLLFPVSYLVLLQVAGSGSMKVLQEPTCVSDYISLSTCEWKMGPTNCSAELRLVYQLVFLIS
ETNMCVPENNGAAGCVCHLFMEDMVGADNYTLDLWAGQQLLWKGSFKPSEHVKPKAPENLTVYTNV
SETLLLTWSNPYPDPNYLYEKLTYAVNIWNENDPTDSRIYDVTYQEPTLRIAASTLKSGVSYRARVRAWA
QSYNSTWSEWSPSTKWYNAYKEPFEKSHHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 16)