



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105307676 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201480031775. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 04. 04

A61K 39/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395(2006. 01)

61/808, 748 2013. 04. 05 US

C07K 16/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 12. 03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/032998 2014. 04. 04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/165771 EN 2014. 10. 09

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 D·G·延苏拉 N·Y·蒋

M·S·丹尼斯 M·狄龙 G·G·弗

G·R·纳卡穆拉 C·施皮斯

L·C·吴 Y·张

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 张莉 黄革生

权利要求书6页 说明书69页

序列表34页 附图25页

(54) 发明名称

抗 IL-4 抗体和双特异性抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及抗 IL-4 抗体和双特异性抗体及其使用方法。

1. 多特异性抗体,其包含抗原结合结构域,所述抗原结合结构域包含特异地结合 IL-4 的第一 VH/VL 单位和特异地结合 IL-13 的第二 VH/VL 单位,其中所述抗体:

- a) 抑制 IL-4 与 IL-4 受体 α (IL-4R α) 的结合,
- b) 在体外抑制 IL-4- 诱导的细胞增殖,和 / 或
- b) 在体外抑制 IL-13- 诱导的细胞增殖。

2. 权利要求 1 的多特异性抗体,其中第一 VH/VL 单位包括包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3、包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3、和包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2。

3. 权利要求 1 或权利要求 2 的多特异性抗体,其中第一 VH/VL 单位包括包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1、包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2、和包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3。

4. 权利要求 1-3 之任一项的多特异性抗体,其中第一 VH/VL 单位包括包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1、包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2、和包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3。

5. 权利要求 1-4 之任一项的多特异性抗体,其中第一 VH/VL 单位包含:(a) 与 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性的 VH 序列;(b) 与 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性的 VL 序列;或 (c) (a) 的 VH 序列和 (b) 的 VL 序列。

6. 权利要求 1-5 之任一项的多特异性抗体,其中第一 VH/VL 单位包含选自 SEQ ID NOs:1 和 3 至 9 的 VH 序列。

7. 权利要求 1-6 之任一项的多特异性抗体,其中第一 VH/VL 单位包含选自 SEQ ID NOs:2、10 和 11 的 VL 序列。

8. 权利要求 1 的多特异性抗体,其中第一 VH/VL 单位包含 SEQ ID NO:9 的 VH 序列和 SEQ ID NO:10 的 VL 序列。

9. 权利要求 1-8 之任一项的多特异性抗体,其中第二 VH/VL 单位包含:

(a) 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的 HVR-H3、包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的 HVR-L3、和包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的 HVR-H2;或

(b) 包含 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列的 HVR-H3、包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列的 HVR-L3、和包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列的 HVR-H2。

10. 权利要求 1-9 之任一项的多特异性抗体,其中第二 VH/VL 单位包含:

(a) 包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列或 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列的 HVR-H1、包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的 HVR-H2、和包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的 HVR-H3;或

(b) 包含 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列的 HVR-H1、包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列的 HVR-H2、和包含 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列的 HVR-H3。

11. 权利要求 1-10 之任一项的多特异性抗体,其中第二 VH/VL 单位包含:

(a) 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的 HVR-L1、包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列的 HVR-L2、和包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的 HVR-L3;或

(b) 包含 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列的 HVR-L1、包含 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列的 HVR-L2、和包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列的 HVR-L3。

12. 权利要求 1-11 之任一项的多特异性抗体,其中第二 VH/VL 单位包含:

- (a) 与 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性的 VH 序列；
- (b) 与 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性的 VL 序列；
- (c) (a) 的 VH 序列和 (b) 的 VL 序列；
- (d) 与 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性的 VH 序列；
- (e) 与 SEQ ID NO:48 的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性的 VL 序列；或
- (f) (d) 的 VH 序列和 (e) 的 VL 序列。

13. 权利要求 1-12 之任一项的多特异性抗体,其中第二 VH/VL 单位单位包含选自 SEQ ID NOs:19、56 或 49 的 VH 序列。

14. 权利要求 1-13 之任一项的多特异性抗体,其中第二 VH/VL 单位单位包含选自 SEQ ID NOs:20、57 或 48 的 VL 序列。

15. 权利要求 1-14 之任一项的多特异性抗体,其中第二 VH/VL 单位单位包含选自 SEQ ID NOs:19 或 56 的 VH 序列和 SEQ ID NO:20 或 57 的 VL 序列;或 SEQ ID NOs:49 的 VH 序列和 SEQ ID NO:48 的 VL 序列。

16. 权利要求 1-15 之任一项的多特异性抗体,其中该抗体与包含 SEQ ID NOs:9 的 VH 序列和 SEQ ID NO:10 的 VL 序列的抗体竞争结合 IL-4。

17. 权利要求 1-16 之任一项的多特异性抗体,其中该抗体与包含 SEQ ID NOs:19 的 VH 序列和 SEQ ID NO:20 的 VL 序列的抗体,或与包含 SEQ ID NOs:49 的 VH 序列和 SEQ ID NO:48 的 VL 序列的抗体,竞争结合 IL-13。

18. 权利要求 1-17 之任一项的多特异性抗体,其中该抗体结合 SEQ ID NO:29 的氨基酸 77 至 89 中的、或 SEQ ID NO:29 的氨基酸 82 至 89 中的表位。

19. 多特异性抗体,其包含特异地结合 IL-4 的第一 VH/VL 单位和特异地结合 IL-13 的第二 VH/VL 单位,其中第一 VH/VL 单位包含 SEQ ID NOs:9 的 VH 序列和 SEQ ID NO:10 的 VL 序列,且第二 VH/VL 单位包含 SEQ ID NO:19 的 VH 序列和 SEQ ID NO:20 的 VL 序列。

20. 前述权利要求任一项的多特异性抗体,其中该抗体是 IgG 抗体。

21. 权利要求 20 的多特异性抗体,其中所述抗体是 IgG1 或 IgG4 抗体。

22. 权利要求 21 的多特异性抗体,其中所述抗体是 IgG4 抗体。

23. 前述权利要求任一项的多特异性抗体,其中该抗体包含第一重链恒定区和第二重链恒定区,其中第一重链恒定区包含 G 突变,第二重链恒定区包含 D 突变。

24. 权利要求 23 的多特异性抗体,其中第一重链恒定区与结合 IL-4 的 VH/VL 单位的重链可变区部分融合。

25. 权利要求 23 或 24 的多特异性抗体,其中第二重链恒定区与结合 IL-13 的 VH/VL 单位的重链可变区部分融合。

26. 权利要求 23 的多特异性抗体,其中第一重链恒定区与结合 IL-13 的 VH/VL 单位的重链可变区部分融合。

27. 权利要求 23 或 26 的多特异性抗体,其中第二重链恒定区与结合 IL-4 的 VH/VL 单位的重链可变区部分融合。

28. 权利要求 23 至 27 任一项的多特异性抗体,其中所述抗体是 IgG1 抗体,所述 G 突变包含 T366W 突变。

29. 权利要求 23 至 28 任一项的多特异性抗体,其中所述抗体是 IgG1 抗体,其中所述 D

突变包含选自 T366S, L368A, 和 Y407V 的至少一个、至少两个、或三个突变。

30. 权利要求 23 至 27 任一项的多特异性抗体, 其中所述抗体是 IgG4 抗体, 所述杆突变包含 T366W 突变。

31. 权利要求 23 至 27 和 30 任一项的多特异性抗体, 其中所述抗体是 IgG4 抗体, 其中所述白突变包含选自 T366S, L368A, 和 Y407V 突变的至少一个、至少两个、或三个突变。

32. 权利要求 23 的多特异性抗体, 其中该抗体包含含有 SEQ ID NO:34 的序列的第一重链恒定区。

33. 权利要求 23 或 32 的多特异性抗体, 其中该抗体包含含有 SEQ ID NO:35 的序列的第二重链恒定区。

34. 权利要求 23 的多特异性抗体, 其中该抗体包含含有 SEQ ID NO:36 的序列的第一重链恒定区。

35. 权利要求 23 或 34 的多特异性抗体, 其中该抗体包含含有 SEQ ID NO:37 的序列的第二重链恒定区。

36. 结合 IL-4 和 IL-13 的多特异性抗体, 其中该抗体包含含有 SEQ ID NO:38 的序列的第一重链、含有 SEQ ID NO:39 的序列的第一轻链、含有 SEQ ID NO:40 的序列的第二重链、含有 SEQ ID NO:41 的序列的第二轻链。

37. 结合 IL-4 的分离抗体, 其中所述抗体包含 :

(a) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3、包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3、和包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2 ;或

(b) 包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1、包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2、和包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3 ;或

(c) 包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1、包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2、和包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3 ;或

(d) 与 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性的 VH 序列 ;或

(e) 与 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性的 VL 序列。

38. 权利要求 37 的分离的抗体, 其中该抗体包括包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1、包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2、包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3、包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1、包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2、包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3。

39. 权利要求 37 或 38 的分离的抗体, 其中该抗体包括与 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性的 VH 序列和与 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性的 VL 序列。

40. 权利要求 37-39 之任一项的分离的抗体, 其中该抗体包含选自 SEQ ID NOs:1 和 3 至 9 的 VH 序列。

41. 权利要求 37-40 之任一项的分离的抗体, 其中该抗体包含选自 SEQ ID NOs:2、10 和 11 的 VL 序列。

42. 分离的抗体, 其中该抗体包含 SEQ ID NOs:9 的 VH 序列和 SEQ ID NO:10 的 VL 序列。

43. 分离的核酸, 其编码 :

- (a) 权利要求 1 至 42 之任一项目的抗体；
- (b) 权利要求 1-34 之任一项目的多特异性抗体的第一 VH/VL 单位；或
- (c) 权利要求 1-34 之任一项目的多特异性抗体的第二 VH/VL 单位。

44. 宿主细胞,其包含权利要求 43 的核酸。

45. 权利要求 44 的宿主细胞,其中所述宿主细胞是大肠杆菌细胞或 CHO 细胞。

46. 产生抗体的方法,包括培养权利要求 44 或权利要求 45 的宿主细胞。

47. 免疫缀合物,其包含权利要求 1 至 42 之任一项目的抗体和细胞毒性剂。

48. 包含权利要求 1-42 之任一项目的抗体和可药用载体的药物制剂。

49. 权利要求 1 至 42 之任一项目的抗体用作药物。

50. 权利要求 1 至 42 之任一项目的抗体用于治疗嗜酸性粒细胞病症、IL-13 介导的病症、IL-4 介导的病症、或呼吸病症。

51. 权利要求 50 的抗体,其中嗜酸性粒细胞病症选自:哮喘、重度哮喘、慢性哮喘、特应性哮喘、特应性皮炎、变态反应、变应性鼻炎、非变应性鼻炎、接触性皮炎、多形红斑、大疱性皮肤病、银屑病、湿疹、类风湿性关节炎、幼年慢性关节炎、慢性嗜酸性肺炎、变应性支气管肺曲霉病、腹腔疾病、丘斯综合征(特应性结节性动脉外膜炎)、嗜酸粒细胞增多肌痛综合征、嗜酸性粒细胞增多综合征、水肿反应,包括周期性血管性水肿、蠕虫感染、荨麻疹、盘尾丝虫皮炎、嗜酸性粒细胞相关胃肠道病症、嗜酸性粒细胞性食管炎、嗜酸性粒细胞性胃炎、嗜酸性粒细胞性胃肠炎、嗜酸性粒细胞性肠炎、嗜酸性粒细胞性结肠炎、溃疡性结肠炎、惠普尔病、鼻微息肉病、鼻息肉病、阿司匹林不耐受、阻塞性睡眠呼吸暂停、局限性回肠炎、硬皮病、心肌内膜纤维化、纤维化、炎性肠病、特发性间质性肺炎、嗜酸性肺炎、超敏性肺炎、杯状细胞化生、肺纤维化、特发性肺纤维化(IPF)、硬化症继发的肺纤维化、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肝纤维化、眼色素层炎、癌症、成胶质细胞瘤、霍奇金淋巴瘤、和非霍奇金淋巴瘤。

52. 权利要求 50 的抗体,其中 IL-13 介导的疾病选自:特应性皮炎、变应性鼻炎、哮喘、纤维化、炎性肠病、局限性回肠炎、肺炎性病症、肺纤维化、特发性肺纤维化(IPF)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肝纤维化、癌症、成胶质细胞瘤、和非霍奇金淋巴瘤。

53. 权利要求 50 的抗体,其中 IL-4 介导的疾病选自:特应性皮炎、变应性鼻炎、哮喘、纤维化、炎性肠病、局限性回肠炎、肺炎性病症、肺纤维化、特发性肺纤维化(IPF)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肝纤维化、癌症、成胶质细胞瘤、和非霍奇金淋巴瘤。

54. 权利要求 50 的抗体,其中呼吸病症选自:哮喘、变应性哮喘、非变应性哮喘、支气管炎、慢性支气管炎、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺气肿、香烟诱导的肺气肿、气道炎症、囊性纤维化、肺纤维化、变应性鼻炎、和支气管扩张。

55. 权利要求 1 至 42 之任一项目的抗体在制备用于治疗嗜酸性粒细胞病症、IL-13 介导的病症、IL-4 介导的病症、或呼吸病症的药物中的用途。

56. 权利要求 55 的用途,其中嗜酸性粒细胞病症选自:哮喘、重度哮喘、慢性哮喘、特应性哮喘、特应性皮炎、变态反应、变应性鼻炎、非变应性鼻炎、接触性皮炎、多形红斑、大疱性皮肤病、银屑病、湿疹、类风湿性关节炎、幼年慢性关节炎、慢性嗜酸性肺炎、变应性支气管肺曲霉病、腹腔疾病、丘斯综合征(特应性结节性动脉外膜炎)、嗜酸粒细胞增多肌痛综合征、嗜酸性粒细胞增多综合征、水肿反应,包括周期性血管性水肿、蠕虫感染、荨麻疹、盘尾丝虫皮炎、嗜酸性粒细胞相关胃肠道病症、嗜酸性粒细胞性食管炎、嗜酸性粒细胞

性胃炎、嗜酸性粒细胞性胃肠炎、嗜酸性粒细胞性肠炎、嗜酸性粒细胞性结肠炎、溃疡性结肠炎、惠普尔病、鼻微息肉病、鼻息肉病、阿司匹林不耐受、阻塞性睡眠呼吸暂停、局限性回肠炎、硬皮病、心肌内膜纤维化、纤维化、炎性肠病、特发性间质性肺炎、嗜酸性肺炎、超敏性肺炎、杯状细胞化生、肺纤维化、特发性肺纤维化 (IPF)、硬化症继发的肺纤维化、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、肝纤维化、眼色素层炎、癌症、成胶质细胞瘤、霍奇金淋巴瘤、和非霍奇金淋巴瘤。

57. 权利要求 55 的用途, 其中 IL-13 介导的疾病选自: 特应性皮炎、变应性鼻炎、哮喘、纤维化、炎性肠病、局限性回肠炎、肺炎性病症、肺纤维化、特发性肺纤维化 (IPF)、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、肝纤维化、癌症、成胶质细胞瘤、和非霍奇金淋巴瘤。

58. 权利要求 55 的用途, 其中 IL-4 介导的疾病选自: 特应性皮炎、变应性鼻炎、哮喘、纤维化、炎性肠病、局限性回肠炎、肺炎性病症、肺纤维化、特发性肺纤维化 (IPF)、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、肝纤维化、癌症、成胶质细胞瘤、和非霍奇金淋巴瘤。

59. 权利要求 55 的用途, 其中呼吸病症选自: 哮喘、变应性哮喘、非变应性哮喘、支气管炎、慢性支气管炎、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、肺气肿、香烟诱导的肺气肿、气道炎症、囊性纤维化、肺纤维化、变应性鼻炎、和支气管扩张。

60. 治疗患有嗜酸性粒细胞病症的个体的方法, 包括向个体施用有效量的权利要求 1-42 之任一项的抗体。

61. 权利要求 60 的方法, 其中嗜酸性粒细胞病症选自: 哮喘、重度哮喘、慢性哮喘、特应性哮喘、特应性皮炎、变态反应、变应性鼻炎、非变应性鼻炎、接触性皮炎、多形红斑、大疱性皮肤病、银屑病、湿疹、类风湿性关节炎、幼年慢性关节炎、慢性嗜酸性肺炎、变应性支气管肺曲霉病、腹腔疾病、丘斯综合征 (特应性结节性动脉外膜炎)、嗜酸粒细胞增多肌痛综合征、嗜酸性粒细胞增多综合征、水肿反应, 包括周期性血管性水肿、蠕虫感染、荨麻疹、盘尾丝虫皮炎、嗜酸性粒细胞相关胃肠道病症、嗜酸性粒细胞性食管炎、嗜酸性粒细胞性胃炎、嗜酸性粒细胞性胃肠炎、嗜酸性粒细胞性肠炎、嗜酸性粒细胞性结肠炎、溃疡性结肠炎、惠普尔病、鼻微息肉病、鼻息肉病、阿司匹林不耐受、阻塞性睡眠呼吸暂停、局限性回肠炎、硬皮病、心肌内膜纤维化、纤维化、炎性肠病、特发性间质性肺炎、嗜酸性肺炎、超敏性肺炎、杯状细胞化生、肺纤维化、特发性肺纤维化 (IPF)、硬化症继发的肺纤维化、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、肝纤维化、眼色素层炎、癌症、成胶质细胞瘤、霍奇金淋巴瘤、和非霍奇金淋巴瘤。

62. 权利要求 60 的方法, 其中 IL-13 介导的疾病选自: 特应性皮炎、变应性鼻炎、哮喘、纤维化、炎性肠病、局限性回肠炎、肺炎性病症、肺纤维化、特发性肺纤维化 (IPF)、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、肝纤维化、癌症、成胶质细胞瘤、和非霍奇金淋巴瘤。

63. 权利要求 60 的方法, 其中 IL-4 介导的疾病选自: 特应性皮炎、变应性鼻炎、哮喘、纤维化、炎性肠病、局限性回肠炎、肺炎性病症、肺纤维化、特发性肺纤维化 (IPF)、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、肝纤维化、癌症、成胶质细胞瘤、和非霍奇金淋巴瘤。

64. 权利要求 60 的方法, 其中呼吸病症选自: 哮喘、变应性哮喘、非变应性哮喘、支气管炎、慢性支气管炎、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、肺气肿、香烟诱导的肺气肿、气道炎症、囊性纤维化、肺纤维化、变应性鼻炎、和支气管扩张。

65. 权利要求 60-64 之任一项的方法, 还包括向个体施用 TH2 途径抑制剂。

66. 权利要求 65 的方法, 其中 TH2 途径抑制剂抑制选自以下的至少一个靶标: ITK, B

TK, IL-9, IL-5, IL-13, IL-4, OX40L, TSLP, IL-25, IL-33, IgE, IL-9 受体, IL-5 受体, IL-4 受体 α , IL-13 受体 $\alpha 1$, IL-13 受体 $\alpha 2$, OX40, TSLP-R, IL-7R α , IL17RB, ST2, CCR3, CCR4, CRT H2, Fc ϵ RI, Fc ϵ RII/CD23, Flap, Syk 激酶; CCR4, TLR9, CCR3, IL5, IL3, 和 GM-CSF。

67. 根据权利要求 60-66 之任一项的方法, 其中所述个体正患有中度至重度哮喘。

68. 根据权利要求 60-66 之任一项的方法, 其中所述个体正患有特发性肺纤维化。

抗 IL-4 抗体和双特异性抗体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2013 年 4 月 5 日提交的美国临时申请号 61/808,748 的优先权利益,其公开内容整体合并入本文作为参考。

[0003] 序列列表

[0004] 本申请包括通过 EFS-Web 提交的序列列表,该序列列表在此整体引入作为参考。在 2014 年三月 12 日创建的所述 ASCII 副本命名为 2014.MAR.12P5609R1-WO_SL 并且大小是 75,442 比特。

技术领域

[0005] 本发明涉及抗 IL-4 抗体和双特异性抗体及其使用方法。

背景技术

[0006] 哮喘是一种复杂疾病,全球发病率日益增加。除了其他事件,嗜酸性粒细胞炎症已在哮喘患者的气道中报道。该疾病的病理生理学具有如下特征:变化的气流阻塞、气道炎症、粘液分泌过多和上皮下纤维化。临床上,患者可以呈现咳嗽、哮鸣和呼吸短促。虽然许多患者用目前可得的疗法足够治疗,但一些哮喘患者尽管使用目前疗法仍具有持续性疾病。

[0007] 许多研究已经提示在哮喘和变态反应的发病机理中牵涉 IL-4、IL-13 及其受体(参见,例如,Wills-Karp,2004,Immunol.Rev.202,175-190;Brightling等,2010,Clin.Exp.Allergy 40,42-49;Finkelman等,2010,J.Immunol.184,1663-1674;Maes等,2012,Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.47,261-270;Steinke and Borish,2001,Respir.Res.2,66-70)。IL-4 结合两个受体,一个是 IL-4R α 和共同 γ 链 (γ c) 的异二聚体,另一是 IL-4 受体 α (IL-4R α) 和 IL-13 受体 α 1 (IL-13R α 1) 的异二聚体。后一受体 IL-4R α / IL-13R α 1 是与 IL-13 共享的受体,IL-13 也独特地结合由 IL-13 受体 α 2 (IL-13R α 2) 组成的单链受体。IL-4, IL-13, 和 IL-4R α 基因的多态性与哮喘和变态反应,包括特征例如 IgE 水平、特应性的流行性、和哮喘疾病的严重性,相关。此外,在哮喘和其它变态性疾病中 IL-4、IL-13 及其受体的表达增加。而且,在哮喘的临床前模型中,IL-4、IL-13 及其受体的中和或缺乏可以改善疾病。

[0008] 林林总总的用于治疗哮喘的药物在销售中或在开发中。哮喘治疗的众多靶标之一是 IL-13。IL-13 是由活化的 T 细胞、NKT 细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和肥大细胞产生的多效性 TH2 细胞因子,并且它已被强烈提示在临床前模型中牵涉哮喘发病机理。IL-13 拮抗剂,包括抗 IL-13 抗体,之前已经有描述。参见,例如,国际专利申请公布号 WO 2005/062967。这些抗体也已经被开发用作人类治疗剂。近来,几项研究已经证实抗 IL-13 单克隆抗体在哮喘治疗中的临床活性(参见,例如,Corren等,2011,N.Engl.J.Med.365,1088-1098;Gauvreau等,2011,Am.J.Respir.Crit.Care Med.183,1007-1014;Ingram and Kraft,2012,J.Allergy Clin.Immunol.130,829-42;Webb,2011,Nat Biotechnol 29,860-863)。其中,lebrikizumab,一种中和 IL-13 活性的人源化 IgG4 抗

体,在尽管进行了治疗(对于大多数,使用了吸入皮质类固醇和长效 β 2-肾上腺素能受体激动剂)但仍保持症状的哮喘患者中,改善了肺功能(Corren等,2011,N.Engl. J. Med. 365,1088-1098)。此外,结合IL-13和IL-4的双特异性抗体已有描述。参见,例如,美国申请公布号2010/0226923。

[0009] 然而,中度至重度哮喘患者仍然需要备选的治疗可选方案。因此,需要鉴定用于治疗哮喘的更佳疗法和用于理解如何治疗哮喘患者的改良方法。

[0010] 特发性肺纤维化(Idiopathic pulmonary fibrosis(IPF))是一种限制性肺疾病,特征在于肺实质的进行性间质性纤维化,在美国影响大约100,000名患者(Raghu等,Am J Respir Crit Care Med 174:810-816(2006))。与IPF相关的该间质性纤维化导致肺功能的进行性丧失,导致大多数患者因呼吸衰竭而死亡。自诊断时起平均存活时间为2-3年(RAGHU等,AM J RESPIR CRIT CARE MED 183:788-824(2011))。IPF的病因学和关键分子及病理生理学驱动因子未知。经证实在IPF患者中可以延长存活的唯一治疗是肺移植(THABUT等,ANNALS OF INTERNAL MEDICINE151:767-774(2009))。然而,肺移植与显著的发病率相关,并非所有IPF患者均适用于该治疗,并且相对缺乏合适的供体肺。尽管进行了许多努力,但迄今仍没有药物疗法被证实可以在随机化、安慰剂对照干预试验中在IPF患者中实质性地延长存活,尽管一些干预看起来可以在一些患者中减慢肺功能下降的速度(RAGHU等,AM J RESPIR CRIT CARE MED183:788-824(2011);RICHELDI等,THE NEW ENGLAND J. OF MED. 365:1079-1087(2011))。

[0011] IL-4和IL-13信号传导在体外可以从许多细胞类型诱导纤维发生反应(fibrogenic responses)。已经证实,使用IL-4或IL-13处理成纤维细胞可以诱导胶原产生和分化为成肌纤维细胞(myofibroblast)表型(BOROWSKI等,J. BRITISH SOC. ALLERGY CLIN. IMMUNOL.,38:619-628(2008);HASHIMOTO等,J. ALLERGY CLIN. IMMUNOL.,107:1001-1008(2001);MURRAY,等,INT. J. BIOCHEM. CELL BIOL.,40:2174-2182(2008);SAITO等,INTL. ARCHIVES ALLERGY IMMUNOL.,132:168-176(2003))。也已经提出,选择性活化(alternatively activated)的巨噬细胞,部分地基于其能够产生刺激成纤维细胞和成肌纤维细胞的生长因子例如TGF β 和PDGF,而是纤维发生进程的主要贡献者。IL-4和IL-13是选择性活化的巨噬细胞表型的有力诱导者,并可以至少部分地通过其对这些细胞的活性而驱动纤维发生反应(DOYLE等, EUR. J. IMMUNOL.,24:1441-1445(1994);SONG等,CELL. IMMUNOL.,204:19-28(2000);WYNN AND BARRON,SEMINARS LIVER DIS.,30:245-257(2010))。

[0012] IL-4和IL-13也可以在体内在多种组织中驱动纤维发生反应。IL-4或IL-13在小鼠肺中的转基因过表达足以诱导胶原蛋白基因表达和显著的上皮下纤维化(Lee等,J. Exper. Med.,194:890-821(2001);Ma等 J. Clin. Invest.,116:1274-1283(2006);Zhu等,J. Clin. Invest.103:779-788(1999))。此外,许多研究表明IL-4和IL-13在临床前动物模型中作为纤维化驱动者的作用。IL-13被靶向破坏的小鼠或用特异于IL-13的阻断性抗体处理的小鼠在博来霉素-和FITC诱导的肺纤维化模型中表现出减少的胞外基质沉积(BELPERIO等,AM. J. RESPIR. CELL MOL. BIOL.,27:419-427(2002);KOLODSICK等,J. IMMUNOL.,172:4068-4076(2004);LIU等,J. IMMUNOL.,173:3425-3431(2004))。类似地,已经证实在博来霉素诱导的肺纤维化模型中IL-4在维持纤维化反应中是重要的(HUAUX

等, J. IMMUNOL., 170:2083-2092(2003)。

[0013] 大量研究得出结论, IL-4 和 / 或 IL-13 的表达和活性在 IPF 患者中升高。已经发现, 与正常对照相比, 在来自 IP 患者的肺活检样品中 IL-4, IL-13 和 IL-4/IL-13 受体亚基的表达在 mRNA 和蛋白质两个水平上均增加 (JAKUBZIAK 等, J. CLIN. PATHOL., 57:477-486(2004))。值得注意的是, 在该研究中, 在 IPF 活检物中通过免疫组织化学发现 IL-13R α 2——被 IL-4 或 IL-13 信号传导高度诱导的基因 (DAVID 等, ONCOGENE, 22:2286-3394(2003))——在成纤维病灶中表达, 提示在这些细胞中活跃的 IL-4 或 IL-13 信号传导。还发现, 与正常对照相比, 在 IPF 患者的支气管肺泡灌洗液中 IL-4 和 IL-13 升高。值得注意的是, 这些样品中的 IL-13 水平与肺功能的关键量度——预计的 FVC 和 DLCO 百分数 (PARK 等, J. KOREAN MED. SCI., 24:614-620(2009))——负相关。

[0014] IPF 患者仍然需要替代性治疗可选方案。因此, 需要鉴定用于治疗 IPF 的更佳疗法和用于理解如何治疗 IPF 患者的改良方法。

[0015] 本文引用的所有参考文献, 包括专利申请和出版物, 为了任何目的整体引入此处作为参考。

[0016] 发明概述

[0017] 在一些实施方案中, 提供多特异性抗体, 其中该多特异性抗体包含抗原结合结构域, 所述抗原结合结构域包含特异地结合 IL-4 的第一 VH/VL 单位和特异地结合 IL-13 的第二 VH/VL 单位。在一些实施方案中, 多特异性抗体:

[0018] a) 抑制 IL-4 与 IL-4 受体 α (IL-4R α) 的结合,

[0019] b) 在体外抑制 IL-4- 诱导的细胞增殖, 和 / 或

[0020] b) 在体外抑制 IL-13- 诱导的细胞增殖。

[0021] 在一些实施方案中, 多特异性抗体的第一 VH/VL 单位包括包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3、包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3、和包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2。在一些实施方案中, 第一 VH/VL 单位包括包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1、包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2、和包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3。在一些实施方案中, 第一 VH/VL 单位包括包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1、包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2、和包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3。在一些实施方案中, 第一 VH/VL 单位包括:(a) 与 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性的 VH 序列; (b) 与 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性的 VL 序列; 或 (c) (a) 的 VH 序列和 (b) 的 VL 序列。在一些实施方案中, 第一 VH/VL 单位包含选自 SEQ ID NOs:1 和 3 至 9 的 VH 序列。在一些实施方案中, 第一 VH/VL 单位包含选自 SEQ ID NOs:2、10 和 11 的 VL 序列。在一些实施方案中, 第一 VH/VL 单位包含 SEQ ID NO:9 的 VH 序列和 SEQ ID NO:10 的 VL 序列。

[0022] 在本文所述任何实施方案中, 多特异性抗体的第二 VH/VL 单位可以包含:(a) 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的 HVR-H3、包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的 HVR-L3、和包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的 HVR-H2; 或 (b) 包含 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列的 HVR-H3、包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列的 HVR-L3、和包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列的 HVR-H2。

在本文所述任何实施方案中, 多特异性抗体的第二 VH/VL 单位可以包含:(a) 包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列或 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列的 HVR-H1、包含 SEQ ID NO:22 的氨基

酸序列的HVR-H2、和包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的HVR-H3 ;或 (b) 包含 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列的HVR-H1、包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列的HVR-H2、和包含 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列的HVR-H3。在本文所述任何实施方案中,多特异性抗体的第二 VH/VL 单位可以包含:(a) 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的HVR-L1、包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列的HVR-L2、和包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的HVR-L3 ;或 (b) 包含 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列的HVR-L1、包含 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列的HVR-L2、和包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列的HVR-L3。在本文所述任何实施方案中,多特异性抗体的第二 VH/VL 单位可以包含:(a) 与 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性的 VH 序列 ;(b) 与 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性的 VL 序列 ;或 (c) (a) 的 VH 序列和 (b) 的 VL 序列 ;(d) 与 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性的 VH 序列 ;(e) 与 SEQ ID NO:48 的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性的 VL 序列 ;或 (f) (d) 的 VH 序列和 (e) 的 VL 序列。在本文所述任何实施方案中,多特异性抗体的第二 VH/VL 单位可以包含 SEQ ID NO:19、56、或 49 的 VH 序列。在本文所述任何实施方案中,多特异性抗体的第二 VH/VL 单位可以包含 SEQ ID NO:20、57, 或 48 的 VL 序列。在本文所述任何实施方案中,多特异性抗体的第二 VH/VL 单位可以包含 SEQ ID NO:19 或 56 的 VH 序列和 SEQ ID NO:20 或 57 的 VL 序列 ;或 SEQ ID NOs:49 的 VH 序列和 SEQ ID NO:48 的 VL 序列。

[0023] 在一些实施方案中,多特异性抗体与包含 SEQ ID NOs:9 的 VH 序列和 SEQ ID NO:10 的 VL 序列的抗体竞争结合 IL-4。在一些实施方案中,多特异性抗体与包含 SEQ ID NOs:19 的 VH 序列和 SEQ ID NO:20 的 VL 序列的抗体,或与包含 SEQ ID NOs:49 的 VH 序列和 SEQ ID NO:48 的 VL 序列的抗体,竞争结合 IL-13。一些实施方案中,多特异性抗体结合 SEQ ID NO:29 的氨基酸 77 至 89 中的、或 SEQ ID NO:29 的氨基酸 82 至 89 中的表位。

[0024] 在一些实施方案中,提供多特异性抗体,其包含特异地结合 IL-4 的第一 VH/VL 单位和特异地结合 IL-13 的第二 VH/VL 单位,其中第一 VH/VL 单位包含 SEQ ID NO:9 的 VH 序列和 SEQ ID NO:10 的 VL 序列,且第二 VH/VL 单位包含 SEQ ID NOs:19 的 VH 序列和 SEQ ID NO:20 的 VL 序列。

[0025] 在本文所述任何实施方案中,多特异性抗体可以是 IgG 抗体。在本文所述任何实施方案中,多特异性抗体可以是 IgG1 或 IgG4 抗体。在本文所述任何实施方案中,多特异性抗体可以是 IgG4 抗体。

[0026] 在本文所述任何实施方案中,多特异性抗体可以包含第一重链恒定区和第二重链恒定区,其中第一重链恒定区包含杵 (knob) 突变,第二重链恒定区包含臼 (hole) 突变。一些实施方案中,第一重链恒定区与结合 IL-4 的 VH/VL 单位的重链可变区部分融合。一些实施方案中,第二重链恒定区与结合 IL-13 的 VH/VL 单位的重链可变区部分融合。一些实施方案中,第一重链恒定区与结合 IL-13 的 VH/VL 单位的重链可变区部分融合。一些实施方案中,第二重链恒定区与结合 IL-4 的 VH/VL 单位的重链可变区部分融合。

[0027] 一些实施方案中,多特异性抗体是包含杵突变的 IgG1 抗体,所述杵突变包含 T366W 突变。一些实施方案中,多特异性抗体是包含臼突变的 IgG1 抗体,所述臼突变包含选自 T366S, L368A, 和 Y407V 的至少一个、至少两个、或三个突变。一些实施方案中,多特异性抗体是包含杵突变的 IgG4 抗体,所述杵突变包含 T366W 突变。一些实施方案中,多特异性抗体是包含臼突变的 IgG4 抗体,所述臼突变包含选自 T366S, L368A, 和 Y407V 的至少一

个、至少两个、或三个突变。在一些实施方案中,多特异性抗体包含含有 SEQ ID NO:34 或 SEQ ID NO:36 的序列的第一重链恒定区。在一些实施方案中,多特异性抗体包含含有 SEQ ID NO:35 或 SEQ ID NO:37 的序列的第二重链恒定区。

[0028] 一些实施方案中,提供多特异性抗体,其中该抗体包含含有 SEQ ID NO:38 的序列的第一重链、含有 SEQ ID NO:39 的序列的第一轻链、含有 SEQ ID NO:40 的序列的第二重链、含有 SEQ ID NO:41 的序列的第二轻链。

[0029] 在一些实施方案中,提供与 IL-4 结合的分离的抗体。在一些实施方案中,抗体包含:(a) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3、包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3、和包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2 ;或 (b) 包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1、包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2、和包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3 ;或 (c) 包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1、包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2、和包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3 ;或 (d) 与 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性的 VH 序列 ;或 (e) 与 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性的 VL 序列 ;在一些实施方案中,抗体包括包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1、包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2、包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3、包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1、包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2、和包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3。在一些实施方案中,抗体包括与 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性的 VH 序列和与 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性的 VL 序列。在一些实施方案中,抗体包含选自 SEQ ID NOs:1 和 3 至 9 的 VH 序列。在一些实施方案中,抗体包含选自 SEQ ID NOs:2、10 和 11 的 VL 序列。

[0030] 在一些实施方案中,提供结合 IL-4 的分离的抗体,其中该抗体包含 SEQ ID NOs:9 的 VH 序列和 SEQ ID NO:10 的 VL 序列。

[0031] 在一些实施方案中,提供编码本文所述任何双特异性抗体或分离抗体的分离核酸。在一些实施方案中,提供编码本文所述任何多特异性抗体的第一 VH/VL 单位的分离核酸。在一些实施方案中,提供编码本文所述任何多特异性抗体的第二 VH/VL 单位的分离核酸。一些实施方案中,提供包含分离核酸的宿主细胞。一些实施方案中,宿主细胞是大肠杆菌 (*E. coli*) 细胞或 CHO 细胞。一些实施方案中,提供产生抗体的方法,包括培养宿主细胞。

[0032] 在一些实施方案中,提供免疫缀合物,其中所述免疫缀合物包含本文所述任何多特异性抗体或分离抗体和细胞毒性剂。

[0033] 在一些实施方案中,提供药物制剂,其包含本文所述任何多特异性抗体或分离抗体和可药用载体。

[0034] 一些实施方案中,提供本文所述抗体用作药物。一些实施方案中,提供本文所述抗体用于治疗嗜酸性粒细胞病症、IL-13 介导的病症、IL-4 介导的病症、或呼吸病症。一些实施方案中,提供本文所述抗体用于制备治疗嗜酸性粒细胞病症、IL-13 介导的病症、IL-4 介导的病症、或呼吸病症的药物的用途。一些实施方案中,提供在个体中治疗嗜酸性粒细胞病症、IL-13 介导的病症、IL-4 介导的病症、或呼吸病症的方法,包括向个体施用有效量的本文所述抗体。在一些此类实施方案中,方法还包括向个体施用 TH2 途径抑制剂。在一些实施方案中,TH2 途径抑制剂抑制选自以下的至少一个靶标:ITK, BTK, IL-9, IL-5, IL-1

3, IL-4, OX40L, TSLP, IL-25, IL-33, IgE, IL-9 受体, IL-5 受体, IL-4 受体 α , IL-13 受体 α 1, IL-13 受体 α 2, OX40, TSLP-R, IL-7R α , IL17RB, ST2, CCR3, CCR4, CRTH2, Fc ϵ RI, Fc ϵ R II/CD23, Flap, Syk 激酶; CCR4, TLR9, CCR3, IL5, IL3, 和 GM-CSF。在一些实施方案中,个体患有中度至重度哮喘。在一些实施方案中,个体患有特发性肺纤维化。

[0035] 在本文所述任何实施方案中,嗜酸性粒细胞病症可以选自:哮喘 (asthma)、重度哮喘 (severe asthma)、慢性哮喘 (chronic asthma)、特应性哮喘 (atopic asthma)、特应性皮炎 (atopic dermatitis)、变态反应 (allergy)、变应性鼻炎 (allergic rhinitis)、非变应性鼻炎 (non-allergic rhinitis)、接触性皮炎 (contact dermatitis)、多形红斑 (erythema multiform)、大疱性皮肤病 (bullous skin disease)、银屑病 (psoriasis)、湿疹 (eczema)、类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis)、幼年慢性关节炎 (juvenile chronic arthritis)、慢性嗜酸性肺炎 (chronic eosinophilic pneumonia)、变应性支气管肺曲霉病 (allergic bronchopulmonary aspergillosis)、腹腔疾病 (coeliac disease)、丘斯综合征 (Churg-Strauss syndrome) (特应性结节性动脉外膜炎 (periarteritis nodosa plus atopy))、嗜酸粒细胞增多肌痛综合征 (eosinophilic myalgia syndrome)、嗜酸性粒细胞增多综合征 (hypereosinophilic syndrome)、水肿反应 (oedematous reactions), 包括周期性血管性水肿 (episodic angioedema)、蠕虫感染 (helminth infections)、荨麻疹 (urticaria)、盘尾丝虫皮炎 (onchocercal dermatitis)、嗜酸性粒细胞相关胃肠道病症、嗜酸性粒细胞性食管炎 (eosinophilic esophagitis)、嗜酸性粒细胞性胃炎 (eosinophilic gastritis)、嗜酸性粒细胞性胃肠炎 (eosinophilic gastroenteritis)、嗜酸性粒细胞性肠炎 (eosinophilic enteritis)、嗜酸性粒细胞性结肠炎 (eosinophilic colitis)、溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis)、惠普尔病 (Whipple's disease)、鼻微息肉病 (nasal micropolyposis)、鼻息肉病 (nasal polyposis)、阿司匹林不耐受 (aspirin intolerance)、阻塞性睡眠呼吸暂停 (obstructive sleep apnea)、局限性回肠炎 (Crohn's disease)、硬皮病 (scleroderma)、心肌内膜纤维化 (endomyocardial fibrosis)、纤维化 (fibrosis)、炎性肠病 (inflammatory bowel disease)、特发性间质性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonia)、嗜酸性肺炎 (eosinophilic pneumonia)、超敏性肺炎 (hypersensitivity pneumonitis)、杯状细胞化生 (goblet cell metaplasia)、肺纤维化 (pulmonary fibrosis)、特发性肺纤维化 (IPF)、硬化症继发的肺纤维化 (pulmonary fibrosis secondary to sclerosis)、慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、肝纤维化 (pulmonary fibrosis)、眼色素层炎 (uveitis)、癌症、成胶质细胞瘤 (glioblastoma)、霍奇金淋巴瘤 (Hodgkins lymphoma)、和非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkins lymphoma)。一些实施方案中, IL-13 介导的疾病选自:特应性皮炎、变应性鼻炎、哮喘、纤维化、炎性肠病、局限性回肠炎、肺炎性病症、肺纤维化、特发性肺纤维化 (IPF)、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、肝纤维化、癌症、成胶质细胞瘤、和非霍奇金淋巴瘤。一些实施方案中, IL-4 介导的疾病选自:特应性皮炎、变应性鼻炎、哮喘、纤维化、炎性肠病、局限性回肠炎、肺炎性病症、肺纤维化、特发性肺纤维化 (IPF)、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、肝纤维化、癌症、成胶质细胞瘤、和非霍奇金淋巴瘤。在本文所述任何实施方案中,呼吸病症可以选自:哮喘 (asthma), 变应性哮喘 (allergic asthma), 非变应性哮喘 (non-allergic asthma), 支气管炎 (bronchitis), 慢性支气管炎 (chronic bronchitis), 慢性阻塞性肺

疾病 (COPD), 肺气肿 (emphysema), 香烟诱导的肺气肿 (cigarette-induced emphysema), 气道炎症 (airway inflammation), 囊性纤维化 (cystic fibrosis), 肺纤维化 (pulmonary fibrosis), 变应性鼻炎 (allergic rhinitis), 和支气管扩张 (bronchiectasis)。

[0036] 附图简述

[0037] 图 1 显示, 抗体 19C11 是 IL-4 受体激活的有力拮抗剂, 见实施例 2 的描述。(A) 19C11 阻断 IL-4 与固定化 IL-4R α 的结合。19C11 (实心圆), 对照 IgG (空心方块), 无 IgG (空心三角)。B) 19C11 抗体抑制 IL-4- 诱导的 TF-1 细胞增殖。19C11 (实心圆), 对照 IgG (空心方块), 无 IgG (空心三角), 无 IL-4 添加 (实心三角)。

[0038] 图 2 显示, 在大肠杆菌中作为 IgG1- 同种型产生的抗 -IL-13. 杵和抗 -IL-4. 白的 (A) 未还原的和 (B) 还原的样品的 Western 印迹, 见实施例 4 描述。片段名称为重链 (H) 和轻链 (L), 泳道标记物是 M (分子量标准) 和 C (对照, 无抗体表达质粒)。图 2 还显示免疫印迹, 比较抗 -IL-13. 杵 (C) 和抗 -IL-4. 白 (D) 的不同同种型和突变, 见实施例 5 描述。上方小图显示非还原条件, 显示组装的半抗体 (HL); 而下方小图显示还原条件, 证实对于所有变体均合成了相似量的重链和轻链。

[0039] 图 3 显示对双特异性抗体的分析性表征, 见实施例 6 描述。(A) 组装的双特异性抗体的大小排阻层析。插入的小图显示相同图在分子量区域上的放大视图。(B) 组装的双特异性抗体的非还原 CE-SDS PAGE 证实了铰链二硫键的形成和链间二硫键的完整性。主峰区域对应于具有形成的链间二硫键的完整抗体。少数次峰反映缺乏全部链间二硫键以稳定异源二聚体的完整抗体。(C) 还原性 CE-SDS 证实了存在轻链和重链的预期分布并显示了该物质的纯度。除了完整轻链和重链的主峰, 仅检测到痕量峰。

[0040] 图 4 显示, 完整 (A) IgG1-, (B) IgG4- 和 (C) IgG4_{R409K}- 同种型基的双特异性抗体的 ESI-TOF 质谱分析, 见实施例 6 描述。

[0041] 图 5 显示, 针对人 IL-4-(A), 人 IL-13-(B), 或人 IL-4/IL-13-(C) 诱导的增殖, 抗 -IL-4/IL-13IgG1 同种型和抗 -IL-4/IL-13IgG4- 同种型双特异性抗体的剂量依赖性抑制作用, 见实施例 8 描述。抗 -IL-4/IL-13IgG1- 同种型 (实心圆), 抗 -IL-4/IL-13IgG4 同种型 (空心三角)、无抗体添加 (空心方块), 无细胞因子和抗体添加 (实心方块)。

[0042] 图 6 显示, 针对食蟹猴 (cynomolgus monkey) IL-4-(A), 食蟹猴 IL-13-(B) 诱导的增殖, 抗 -IL-4/IL-13IgG1 同种型和抗 -IL-4/IL-13IgG4- 同种型双特异性抗体的剂量依赖性抑制作用, 见实施例 8 描述。抗 -IL-4/IL-13IgG1- 同种型 (实心圆), 抗 -IL-4/IL-13IgG4 同种型 (在 (A) 中实心圆, 在 (B) 中空心三角)、无抗体添加 (空心方块), 无细胞因子和抗体添加 (实心方块)。

[0043] 图 7 显示, 在食蟹猴中单剂静脉内或皮下施用后, 血清抗 -IL-4/IL-13IgG4 (A) 和 IgG1 (B) 双特异性抗体浓度的平均值 (\pm SD), 见实施例 9 描述。ELISA 的量化限 (LOQ) 是 0.078 μ g/mL。使用 LOQ 以上的所有数据, 排除 LOQ 以下的所有数据。当 $n \leq 2$ 时, 未计算 SD。

[0044] 图 8 显示, 在向食蟹猴静脉内施用后, 抗 -IL-4/IL-13IgG4 和抗 -IL-4/IL-13IgG1 抗体的支气管肺泡灌洗 (BAL) 液浓度和上皮衬液 (epithelial lining fluid (ELF)) 浓度, 其中所述食蟹猴用 A. suum 提取物进行了攻击以引发类似暴露于变应原的哮喘患者的变应性炎症反应, 见实施例 10 描述。对于抗 -IL-4/IL-13, ELISA 的量化限 (LOQ) 是 0.078 μ g/

mL。使用 LOQ 以上的所有数据,排除 LOQ 以下的所有数据。当 $n \leq 2$ 时,未计算 SD。

[0045] 图 9 显示 (A) 用于治疗变应性气道炎症和哮喘小鼠模型的研究设计,见实施例 11 描述。图 9 也显示,在各种处理后在变应性气道炎症和哮喘小鼠模型动物中,(B) 肺嗜酸性粒细胞数,(C) 支气管肺泡灌洗液嗜酸性粒细胞数,(D) 抗原特异性 IgE 水平,和 (E) 血清 TARC 水平,见实施例 11 描述。对于每个条形图,头 4 个柱从左向右为:对照处理、抗-IL-4 抗体处理、抗-IL-13 抗体处理、和抗-IL-4/IL-13 双特异性抗体处理。第五和第六个柱,如果存在的话,是幼稚 (naive) 小鼠。

[0046] 图 10 显示,人 $\kappa 1$ 轻链可变区共有序列 (SEQ ID NO:61)、mu19C11 抗体轻链可变区 (SEQ ID NO:2)、和 19C11- $\kappa 1$ 嫁接轻链可变区 (SEQ ID NO:10) 的氨基酸序列,见实施例 3 描述。根据 Kabat 进行位置编号,从 mu19C11 嫁接到可变轻链 κI 共有构架上的高变区被加框。

[0047] 图 11 显示,人 $\kappa 3$ 轻链可变区共有序列 (SEQ ID NO:62)、mu19C11 抗体轻链可变区 (SEQ ID NO:2)、和 19C11- $\kappa 3$ 嫁接轻链可变区 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸序列,见实施例 3 描述。根据 Kabat 进行位置编号,从 mu19C11 嫁接到可变轻链 κI 共有构架上的高变区被加框。

[0048] 图 12 显示,人 VH1 重链可变区共有序列 (SEQ ID NO:63)、mu19C11 抗体重链可变区 (SEQ ID NO:1)、和 19C11-VH1 嫁接物 (SEQ ID NO:3)、19C11-VH1.L (SEQ ID NO:4)、和 19C11-VH1.FFL (SEQ ID NO:5) 重链可变区的氨基酸序列,见实施例 3 描述。根据 Kabat 进行位置编号,从 mu19C11 嫁接到可变重链亚组 I 共有构架上的高变区和 vernier 位置被加框。

[0049] 图 13 显示,人 VH3 重链可变区共有序列 (SEQ ID NO:64)、mu19C11 抗体重链可变区 (SEQ ID NO:1)、和 19C11-VH3 嫁接物 (SEQ ID NO:6)、19C11-VH3.FLA (SEQ ID NO:7)、19C11-VH3.LA (SEQ ID NO:8) 和 19C11-VH3.LA.SV (SEQ ID NO:9) 重链可变区的氨基酸序列,见实施例 3 描述。根据 Kabat 进行位置编号,从 mu19C11 嫁接到可变重链亚组 I 共有构架上的高变区和 vernier 位置被加框。

[0050] 图 14 显示人源化抗体对 IL-4 的表面等离子体共振 (SPR) 亲和力测量表,见实施例 3 描述。

[0051] 图 15 显示,生物素化的人 IL-4 与人 IL-4R 的结合被递增浓度的抗-IL-4/IL-13 双特异性抗体抑制的曲线图,见实施例 7 描述。

[0052] 图 16 显示,生物素化的人 IL-13 与人 IL-13R $\alpha 1$ 的结合被递增浓度的抗-IL-4/IL-13 双特异性抗体抑制的曲线图,见实施例 7 描述。

[0053] 图 17 显示,生物素化的人 IL-13 与人 IL-13R $\alpha 2$ 的结合被递增浓度的抗-IL-4/IL-13 双特异性抗体抑制的曲线图,见实施例 7 描述。

[0054] 图 18 显示,在抗-IL-4/IL-13 双特异性抗体存在下 IL-13 与人 IL-13R $\alpha 2$ 结合的 SPR 传感图 (sensograms),见实施例 7 描述。显示的线条表示受体从 12.5nM 至 200nM 的二倍浓度系列。

[0055] 发明详述

[0056] 除非另有定义,本文使用的技术和科学术语具有本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义。Singleton 等人,DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY

2ND ED., J. WILEY&SONS (NEW YORK, N. Y. 1994), 和 MARCH, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY REACTIONS, MECHANISMS AND STRUCTURE 4TH ED., JOHN WILEY&SONS (NEW YORK, N. Y. 1992), 为本领域技术人员提供有关本申请使用的许多术语的一般指导。

[0057] 一些定义

[0058] 为了解释本说明书的目的, 将应用下述定义, 并且在合适时, 以单数使用的术语也涵盖复数形式, 并且反之亦然。当下文给出的任何定义与引入本文作为参考的任何文献发生冲突时, 以下文给出的定义为准。

[0059] 如本说明书和后附权利要求中使用的, 除非上下文另有明确说明, 单数形式“a”、“an”和“the”涵盖对复数形式的提及。因此, 例如, 提及“蛋白质”或“抗体”分别涵盖多个蛋白质或抗体; 提及“细胞”包括细胞的混合物等。

[0060] 如本文使用的术语“生物样品”包括但不限于血液、血清、血浆、痰、支气管肺泡灌洗液、组织活检物(例如肺样品)、和鼻样品, 包括鼻拭子或鼻息肉。

[0061] FE_{NO} 测定法指测量 FE_{NO} (呼出气一氧化氮分数)水平的测定法。此水平可以使用例如手提式便携装置 NIOX MINO™ (Aerocrine, Solna, 瑞典), 依照在 2005 年由 American Thoracic Society (ATS) 公开的指南, 进行评估。 FE_{NO} 可以记为其他相似方式例如 FeNO 或 FENO, 并且应当理解所有这些相似的变化形式具有相同含义。

[0062] 哮喘是一种复杂病症, 具有如下特征: 变化和复发的症状、可逆的气流阻塞(例如通过支气管扩张剂)和支气管高反应性, 其可以与潜在的炎症相关或不相关。哮喘的例子包括, 阿司匹林敏感性/恶化的哮喘、特应性哮喘、重度哮喘、轻度哮喘、中度至重度哮喘、未接受过皮质类固醇的哮喘(corticosteroid naïve asthma)、慢性哮喘、皮质类固醇抵抗哮喘、皮质类固醇难治性哮喘、新近诊断且未治疗的哮喘、吸烟引起的哮喘、在皮质类固醇应用时得不到控制的哮喘、和如 J Allergy Clin Immunol (2010) 126 (5): 926-938 中提及的其他哮喘。

[0063] “嗜酸性粒细胞病症”意指, 与过量嗜酸性粒细胞数目相关的病症, 其中由于身体局部或全身的嗜酸性粒细胞水平或活性, 可以表现为非典型症状。与过量嗜酸性粒细胞数目或活性相关的病症包括但不限于, 哮喘(包括阿司匹林敏感性哮喘、慢性哮喘和重度哮喘); 特应性哮喘; 特应性皮炎; 变态反应; 变应性鼻炎(包括季节性变应性鼻炎); 非变应性鼻炎; 接触性皮炎(contact dermatitis); 多形红斑(erythema multiform); 大疱性皮肤病(bullous skin diseases); 银屑病(psoriasis); 湿疹(eczema); 类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis); 幼年慢性关节炎(juvenile chronic arthritis); 慢性嗜酸性肺炎(chronic eosinophilic pneumonia); 变应性支气管肺曲霉病(allergic bronchopulmonary aspergillosis); 腹腔疾病(coeliac disease); 丘斯综合征(Churg-Strauss syndrome)(特应性结节性动脉外膜炎(periarteritis nodosa plus atopy)); 嗜酸粒细胞增多肌痛综合征(eosinophilic myalgia syndrome); 嗜酸性粒细胞增多综合征(hypereosinophilic syndrome); 水肿反应(oedematous reactions), 包括周期性血管性水肿(episodic angiodema); 蠕虫感染(helminth infections); 荨麻疹(urticaria); 盘尾丝虫皮炎(onchocercal dermatitis); 嗜酸性粒细胞相关胃肠道病症(EGID)(包括但不限于, 嗜酸性粒细胞性食管炎(eosinophilic esophagitis)、嗜酸性粒细胞性胃炎(eosinophilic gastritis)、嗜酸性粒细胞性胃肠炎(eosinophilic

gastroenteritis)、嗜酸性粒细胞性肠炎 (eosinophilic enteritis)、和嗜酸性粒细胞性结肠炎 (eosinophilic colitis); 溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis); 惠普尔病 (Whipple's disease); 鼻微息肉病 (nasal micropolyposis) 和息肉病 (polyposis); 阿司匹林不耐受 (aspirin intolerance); 阻塞性睡眠呼吸暂停 (obstructive sleep apnea); 局限性回肠炎 (Crohn's disease); 硬皮病 (scleroderma); 心肌内膜纤维化 (endomyocardial fibrosis); 癌症 (例如, 成胶质细胞瘤 (glioblastoma) (例如, 多形性成胶质细胞瘤)、非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、霍奇金淋巴瘤 (Hodgkins lymphoma)); 纤维化 (fibrosis); 炎性肠病 (inflammatory bowel disease); 特发性间质性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonia); 嗜酸性肺炎 (eosinophilic pneumonia); 超敏性肺炎 (hypersensitivity pneumonitis); 杯状细胞化生 (goblet cell metaplasia); 肺纤维化 (pulmonary fibrosis) (包括特发性肺纤维化 (IPF) 和硬化症继发的肺纤维化 (pulmonary fibrosis secondary to sclerosis)); 慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD); 肝纤维化 (hepatic fibrosis); 和眼色素层炎 (uveitis)。嗜酸性粒细胞衍生的分泌产物也已与以下关联: 肿瘤中血管发生和结缔组织形成的促进、在病状例如慢性哮喘、局限性回肠炎、硬皮病和心肌内膜纤维化中可见的纤维化反应 (MUNITZ A, LEVI-SCHAFFER F. ALLERGY 2004 ;59:268-75, ADAMKO 等 ALLERGY 2005 ;60:13-22, OLDHOFF, 等 ALLERGY 2005 ;60:693-6)。

[0064] IL-13 介导的病征意指与过量 IL-13 水平或活性相关的病症, 其中由于身体局部和 / 或全身的 IL-13 水平或活性, 可以表现为非典型症状。IL-13 介导的病征的例子包括: 癌症 (例如非霍奇金淋巴瘤、成胶质细胞瘤)、特应性皮炎、变应性鼻炎、哮喘、纤维化、炎性肠病、局限性回肠炎、肺炎性病征 (包括肺纤维化例如 IPF)、COPD、和肝纤维化。

[0065] IL-4 介导的病征意指与过量 IL-4 水平或活性相关的病症, 其中由于身体局部和 / 或全身的 IL-4 水平或活性, 可以表现为非典型症状。IL-4 介导的病征的例子包括: 癌症 (例如非霍奇金淋巴瘤、成胶质细胞瘤)、特应性皮炎、变应性鼻炎、哮喘、纤维化、炎性肠病、局限性回肠炎、肺炎性病征 (包括肺纤维化例如 IPF)、COPD、和肝纤维化。

[0066] 哮喘样症状包括选自下述的症状: 呼吸短促、咳嗽 (痰产生和 / 或痰质量和 / 或咳嗽频率的变化)、哮鸣、胸闷、支气管狭窄 (bronchioconstriction) 和归因于上述症状之一或这些症状的组合的夜间觉醒 (JUNIPER ET AL (2000) AM. J. RESPIR. CRIT. CARE MED. , 162(4), 1330-1334.)。

[0067] 术语“呼吸病症”包括但不限于, 哮喘 (例如变应性和非变应性哮喘 (例如, 由于感染, 例如呼吸道合胞病毒 (RSV) 感染, 例如在幼儿中)); 支气管炎 (例如慢性支气管炎); 慢性阻塞性肺疾病 (COPD) (例如肺气肿 (例如香烟诱导的肺气肿)); 涉及气道炎症、嗜酸性粒细胞增多症、纤维化和过量粘液产生的状况, 例如囊性纤维化、肺纤维化和变应性鼻炎。可以具有气道炎症、过量气道分泌物和气道阻塞的特征的疾病的例子包括, 哮喘、慢性支气管炎、支气管扩张和囊性纤维化。

[0068] 恶化 (通常被称为哮喘发作或急性哮喘) 是下述状况的新的或进行性增加的事件: 呼吸短促、咳嗽 (痰产生和 / 或痰质量和 / 或咳嗽频率的变化)、哮鸣、胸闷、归于上述症状之一或这些症状的组合的夜间觉醒。恶化常特征在于: 呼出气流 (PEF 或 FEV1) 的减少。然而, PEF 变异性在恶化过程中通常不增加, 但它可以增加从而导致自恶化的恢复、或

它可以在从恶化恢复的过程中增加。恶化的严重性可以从轻度到威胁生命,并且可以基于症状和肺功能两者进行评估。如本文描述的重度哮喘恶化包括导致下述之任一或组合的恶化:随后的住院哮喘治疗、高皮质类固醇使用(例如翻两番皮质类固醇日总剂量、或大于或等于 500 微克 FP 或等价物的日总剂量持续连续三天或更多天)、或经口/肠胃外皮质类固醇使用。

[0069] “TH2 途径抑制剂”或“TH2 抑制剂”是抑制 TH2 途径的活性剂。TH2 途径抑制剂的例子包括选自下述的任何一种靶标的活性的抑制剂:ITK、BTK、IL-9(例如 MEDI-528)、IL-5(例如美泊利单抗, CAS 编号 196078-29-2;resilizumab)、IL-13(例如 IMA-026、IMA-638(也称为安芦珠单抗, INN 编号 910649-32-0;QAX-576;IL4/IL13 拮)、tralokinumab(也称为 CAT-354, CAS 编号 1044515-88-9);AER-001、ABT-308(也称为人源化 13C5.5 抗体)、IL-4(例如 AER-001、IL4/IL13 拮)、OX40L、TSLP、IL-25、IL-33 和 IgE(例如 XOLAIR、QGE-031;MEDI-4212);和受体例如:IL-9 受体、IL-5 受体(例如 MEDI-563(贝那利珠单抗, CAS 编号 1044511-01-4))、IL-4 受体 α (例如 AMG-317、AIR-645)、IL-13 受体 α 1(例如 R-1671)和 IL-13 受体 α 2、OX40、TSLP-R、IL-7R α (TSLP 的共受体)、IL17RB(IL-25 的受体)、ST2(IL-33 的受体)、CCR3、CCR4、CRTH2(例如 AMG-853、AP768、AP-761、MLN6095、ACT129968)、Fc ϵ RI、Fc ϵ RII/CD23(IgE 的受体)、Flap(例如 GSK2190915)、Syk 激酶(R-343、PF3526299);CCR4(AMG-761)、TLR9(QAX-935),和 CCR3、IL5、IL3、GM-CSF 的多细胞因子抑制剂(例如 TPI ASM8)。上述靶标的抑制剂的例子公开于例如 WO2008/086395;WO2006/085938;US 7,615,213;US 7,501,121;WO2006/085938;WO 2007/080174;US 7,807,788;WO2005007699;WO2007036745;WO2009/009775;WO2007/082068;WO2010/073119;WO2007/045477;WO2008/134724;US2009/0047277;和 WO2008/127,271 中。

[0070] 术语“小分子”指具有 50 道尔顿 - 2500 道尔顿的分子量的有机分子。

[0071] 术语“抗体”以最广泛含义使用且特别涵盖例如单克隆抗体、多克隆抗体、具有多表位特异性的抗体、单链抗体、多特异性抗体和抗体片段。此类抗体可以是嵌合、人源化、人和合成的。此类抗体和生成其的方法在下文更详细地描述。

[0072] 术语“多特异性抗体”以最广的含义使用,尤其涵盖包含具有多表位特异性(即,能够特异地结合一个生物分子上的两个或更多个不同表位或能够特异地结合两个或更多个不同生物分子上的表位)的抗原结合结构域的抗体。一些实施方案中,多特异性抗体(例如双特异性抗体)的抗原结合结构域包含两个 VH/VL 单位,其中第一 VH/VL 单位特异地结合第一表位,第二 VH/VL 单位特异地结合第二表位,其中每个 VH/VL 单位均包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)。此类多特异性抗体包括,但不限于,全长抗体、具有两个或更多个 VL 和 VH 结构域的抗体、抗体片段例如 Fab、Fv、dsFv、scFv、双抗体(diabody)、双特异性双抗体和三抗体(triabody)、已共价或非共价连接的抗体片段。还包含至少一部分重链恒定区和/或至少一部分轻链恒定区的 VH/VL 单位也可以称作“hemimer”或“半抗体”(half antibody)。根据一些实施方案,多特异性抗体是以 5 μ M 至 0.001pM、3 μ M 至 0.001pM、1 μ M 至 0.001pM、0.5 μ M 至 0.001pM、或 0.1 μ M 至 0.001pM 的亲合力与每个表位结合的 IgG 抗体。一些实施方案中, hemimer 包含足以允许与第二 hemimer 形成分子内二硫键的重链可变区部分。一些实施方案中, hemimer 包含杆突变或臼突变,例如,以允许与

包含互补白突变或杵突变的第二 hemimer 或半抗体异二聚体化。杵突变和白突变将在下面进一步讨论。

[0073] “双特异性抗体”是包含能够特异地结合一个生物分子上的两个不同表位或能够特异地结合两个不同生物分子上的表位的抗原结合结构域的多特异性抗体。双特异性抗体在本文中也可以称作具有“双重特异性”或是“双重特异性的”。

[0074] 如此处提及的术语“杵入白”(“Knob-into-hole”)或“KnH”技术是指这样的技术,即通过在两个多肽相互作用的界面上将突出物(protuberance)(杵)引入一条多肽并将腔(白(hole))引入另一条多肽,从而引导两条多肽在体外或体内配对在一起。例如,已将 KnH 引入到抗体的 Fc:Fc 结合界面、C_L:C_{H1} 界面或 VH/VL 界面(参见,例如,US 2011/0287009, US2007/0178552, WO 96/027011, WO 98/050431, 和 ZHU 等,1997, PROTEIN SCIENCE 6:781-788)。在一些实施方案中,在制备多特异性抗体的过程中 KnHs 驱动两条不同重链配对在一起。例如,在其 Fc 区中具有 KnH 的多特异性抗体还可以包含与各 Fc 区分别连接的可变域,或还可以包含与相似或不同轻链可变域配对的不同重链可变域。KnH 技术也可用于配对两个不同受体胞外域或含有不同靶识别序列的任何其他多肽序列(例如,包括 affibody、肽体(peptibody)和其他 Fc 融合物)。

[0075] 如本文所用,术语“杵突变”指,将突出物(杵)引入多肽中的突变,其中所述突出物被引入到该多肽与另一条多肽相互作用的界面上。一些实施方案中,另一多肽具有白突变。

[0076] 如本文所用,术语“白突变”指,将腔(白)引入多肽中的突变,其中所述腔被引入到该多肽与另一条多肽相互作用的界面上。一些实施方案中,另一多肽具有杵突变。

[0077] 术语“治疗剂”指用于治疗疾病的任何活性剂。治疗剂可以是,例如,多肽(一种或多种)(例如抗体、免疫粘附素或肽体(peptibody))、可以与蛋白质结合的适体或小分子、或可以与编码靶标的核酸分子结合的核酸分子(即, siRNA)、等等。

[0078] 术语“控制剂”或“防止剂”指用于控制哮喘炎症的任何治疗剂。控制剂的例子包括皮质类固醇、白三烯受体拮抗剂(例如抑制白三烯的合成或活性,例如孟鲁司特(montelukast)、齐留通(zileuton)、普仑司特(pranlukast)、扎鲁司特(zafirlukast))、LABAs、皮质类固醇/LABA 联合组合物、茶碱(包括氨茶碱(aminophylline))、色甘酸钠(cromolyn sodium)、萘多罗米钠(nedocromil sodium)、奥马珠单抗(omalizumab)、LAMAs、MABA(例如双功能毒蕈碱拮抗剂-β2 激动剂)、5-脂加氧酶活化蛋白质(FLAP)抑制剂、和酶 PDE-4 抑制剂(例如罗氟司特(roflumilast))。“第二控制剂”典型地指与第一控制剂不同的控制剂。

[0079] 术语“省皮质类固醇的”或“CS”意指,在服用皮质类固醇治疗疾病的患者中,由于另一种治疗剂的施用,减少了用于治疗该疾病的皮质类固醇的频率和/或量、或消除了对皮质类固醇的使用。“CS 剂”指可以在服用皮质类固醇的患者中引起 CS 的治疗剂。

[0080] 术语“皮质类固醇”包括但不限于,氟替卡松(fluticasone)(包括丙酸氟替卡松(FP))、倍氯米松(beclometasone)、布地奈德(budesonide)、环索奈德(ciclesonide)、莫米他松(mometasone)、去氟肤轻松(flunisolide)、倍他米松(betamethasone)和曲安西龙(triamcinolone)。“可吸入皮质类固醇”意指适于通过吸入递送的皮质类固醇。示例性可吸入皮质类固醇是氟替卡松、二丙酸倍氯米松、布地奈德、糠酸莫米他松(mometasone

furoate)、环索奈德、去氟肤轻松、醋酸曲安缩松 (Triamcinolone Acetonide)、和目前可获得或将来可获得的任何其他皮质类固醇。可以吸入且与长效 β 2- 激动剂组合的皮质类固醇的例子包括但不限于：布地奈德 / 福莫特罗 (formoterol) 和氟替卡松 / 沙美特罗 (salmeterol)。

[0081] 皮质类固醇 /LABA 组合药物的例子包括糠酸氟替卡松 / 三氟甲磺酸维兰特罗 (vilanterol trifenate) 和茛达特罗 (indacaterol) / 莫米他松。

[0082] 术语“LABA”意指长效 β 2- 激动剂,所述激动剂包括例如沙美特罗 (salmeterol)、福莫特罗 (formoterol)、班布特罗 (bambuterol)、舒喘灵 (albuterol)、茛达特罗、阿福特罗 (arformoterol) 和克伦特罗 (clenbuterol)。

[0083] 术语“LAMA”意指长效毒蕈碱拮抗剂,所述拮抗剂包括：噻托溴铵 (tiotropium)。

[0084] LABA/LAMA 组合的例子包括但不限于：奥达特罗噻托溴铵 (Boehringer Ingelheim's) 和茛达特罗 glycopyrronium (Novartis)。

[0085] 术语“SABA”意指短效 β -2 激动剂,所述激动剂包括但不限于,沙丁胺醇 (salbutamol)、左沙丁胺醇 (levosalbutamol)、非诺特罗 (fenoterol)、特布他林 (terbutaline)、吡布特罗 (pirbuterol)、丙卡特罗 (procaterol)、比托特罗 (bitolterol)、利米特罗 (rimiterol)、卡布特罗 (carbuterol)、妥洛特罗 (tulobuterol) 和瑞普特罗 (reproterol)。

[0086] 白三烯受体拮抗剂 (有时称为 leukast) (LTRA) 是抑制白三烯的药物。白三烯抑制剂的例子包括孟鲁司特、齐留通、普仑司特和扎鲁司特。

[0087] 术语“FEV₁”指在用力呼气的第一秒内呼出的空气体积。它是气道阻塞的量度。诱导 20% 的 FEV₁ 下降所需的乙酰甲胆碱 (methacholine) 激发浓度 (provocative concentration) (PC20) 是气道高反应性的量度。FEV₁ 可以以其他相似方式例如 FEV₁ 表示,并且应当理解所有这些相似的变化形式具有相同含义。

[0088] 术语“FEV₁ 的相对变化” = (在治疗第 12 周时的 FEV₁ - 在治疗开始前的 FEV₁) 除以 FEV₁。

[0089] 如本文所用,“FVC”指“用力肺活量” (Forced Vital Capacity),指用于测量在完全吸气和最大呼出至残留体积之间肺空气体积变化的标准检查 (相对于 FEV₁ 中一秒内排出的空气体积)。它是功能性肺容量 (functional lung capacity) 的量度。在限制性肺疾病,例如间质性肺疾病包括 IPF、超敏性肺炎 (hypersensitivity pneumonitis)、结节病 (sarcoidosis)、和全身性硬化症 (systemic sclerosis) 的患者中,典型地由于肺实质的结疤,FVC 减少。

[0090] 术语“轻度哮喘”指患者一般经历每周小于两次的症状或恶化、每月小于两次的夜间症状,并且在两次恶化之间是无症状的。轻度、间歇性哮喘常根据需要用下述进行治疗:吸入性支气管扩张剂 (短效吸入 β 2- 激动剂);已知触发剂的避免;每年流感疫苗接种;每 6 - 10 年肺炎球菌疫苗接种,以及在一些情况下,在暴露于鉴定的触发剂前,吸入性 β 2- 激动剂、色甘酸或茶多罗米。如果患者对短效 β 2- 激动剂具有增加的需要 (例如对于急性恶化,在 1 天内使用短效 β 2- 激动剂超过三到四次;或针对症状,每月使用超过一盒 (canister)),则患者可能需要治疗的逐步增加。

[0091] 术语“中度哮喘”一般指这样的哮喘,其中患者经历每周超过两次的恶化,且恶

化影响睡眠和活动；患者具有每月超过两次的由哮喘导致的夜间觉醒；患者具有慢性哮喘症状，所述症状每天或每隔一天需要短效吸入 β 2- 激动剂；以及患者的治疗前基线 PEF 或 FEV1 是预计的 60% - 80%，并且 PEF 变异性是 20 - 30%。

[0092] 术语“重度哮喘”一般指这样的哮喘，其中患者具有几乎连续的症状、频繁恶化、频繁的由哮喘导致的夜间觉醒、有限的活动、小于预计的 60% 的 PEF 或 FEV1 基线、和 20 - 30% 的 PEF 变异性。

[0093] 急救药品 (rescue medications) 的例子包括舒喘灵 (albuterol)、万托林 (ventolin) 及其他。

[0094] “抵抗”指在用治疗剂治疗后几乎未表现出或根本未表现出临床上显著改善的疾病。例如，需要用高剂量 ICS (例如，翻两番皮质类固醇总日剂量或大于或等于 500 微克日总剂量的 FP (或等价物)) 治疗至少连续三天或更多天、或全身皮质类固醇治疗两周试验以确立哮喘是否保持不受控制或 FEV1 不改善的哮喘，通常被视为重度难治性哮喘。

[0095] 如本文提供的治疗剂可以通过任何合适的方式进行施用，包括肠胃外、皮下、腹膜内、肺内和鼻内。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。在一些实施方案中，治疗剂是吸入剂。根据一些实施方案，给药是通过注射例如静脉内或皮下注射给予。在一些实施方案中，治疗剂使用注射器 (例如预装或非预装) 或自动注射器进行施用。

[0096] 对于疾病的预防或治疗，治疗剂的合适剂量可以依赖待治疗疾病的类型、疾病的严重性和过程、治疗剂是施用用于预防还是治疗目的、先前治疗、患者的临床史和对治疗剂的应答、和主治医生的判断。治疗剂可以适宜地一次性地或经过一系列治疗而施用于患者。可以以与良好医疗实践相符的方式配制、定剂量和施用治疗剂组合物。在此考虑的因素包括待治疗的特定病症、待治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床状况、病症原因、活性剂递送部位、施用方法、施用时间安排和医学从业者已知的其他因素。

[0097] “患者应答”或“应答” (及其语法变体) 可以使用指示有益于患者的任何终点进行评价，包括但不限于 (1) 疾病进展的一定程度抑制，包括减慢和完全停滞；(2) 疾病发作数和 / 或症状的减少；(3) 损伤大小的减少；(4) 疾病细胞向邻近周围器官和 / 或组织浸润的抑制 (即减少、减慢或完全停止)；(5) 疾病扩散的抑制 (即减少、减慢或完全停止)；(6) 自身免疫反应的降低，其可以，但不必，导致疾病损伤的消退或消除；(7) 与病症相关的一种或多种症状的一定程度缓解；(8) 在治疗后无疾病呈现的长度 (length of disease-free presentation) 的增加；和 / 或 (9) 在治疗后在给定时间点上减少的死亡率。

[0098] “亲和力”指在分子 (例如抗体) 的单个结合位点及其结合配偶体 (例如抗原) 之间的非共价相互作用的总和强度。除非另外指出，否则如本文所用，“结合亲和力”指反映结合对子的成员 (例如，抗体和抗原) 之间 1:1 相互作用的固有结合亲和力。分子 X 对于其配偶体 Y 的亲和力一般可以通过解离常数 (Kd) 表示。亲和力可以通过本领域已知的常见方法，包括本文描述的那些，进行测量。在本文中描述用于测量结合亲和力的特定举例说明性和示例性实施方案。

[0099] “亲和力成熟的”抗体指与不具有此类改变的亲本抗体相比较，在一个或多个高变区 (HVRs) 中具有一个或多个改变的抗体，此类改变导致抗体对于抗原的亲和力的改善。

[0100] 术语“抗 -IL-4 抗体”和“结合 IL-4 的抗体”指这样的抗体，所述抗体能够以足够的亲和力结合 IL-4 从而使抗体可以用作为靶定 IL-4 的诊断剂和 / 或治疗剂。在一些实施

方案中,例如通过放射免疫测定法(RIA)所测定,抗 IL-4 抗体对不相关的非 IL-4 蛋白质的结合程度低于抗体对 IL-4 结合的约 10%。在特定实施方案中,与 IL-4 结合的抗体具有 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更少,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M) 的解离常数(Kd)。在某些实施方案中,抗 IL-4 抗体结合在来自不同物种的 IL-4 间保守的 IL-4 表位上。在一些实施方案中,抗 IL-4 抗体是多特异性抗体,例如双特异性抗体。

[0101] 术语“抗 -IL-13 抗体”和“结合 IL-13 的抗体”指这样的抗体,所述抗体能够以足够的亲和力结合 IL-13 从而抗体可以用作为靶定 IL-13 的诊断剂和 / 或治疗剂。在一些实施方案中,例如通过放射免疫测定法(RIA)所测定,抗 IL-13 抗体对不相关的非 IL-13 蛋白质的结合程度低于抗体对 IL-13 结合的约 10%。在特定实施方案中,与 IL-13 结合的抗体具有 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更少,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M) 的解离常数(Kd)。在某些实施方案中,抗 IL-13 抗体结合在来自不同物种的 IL-13 间保守的 IL-13 表位上。在一些实施方案中,抗 IL-13 抗体是多特异性抗体,例如双特异性抗体。

[0102] 术语“抗体”在本文中以最广泛的含义使用,并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段,只要它们显示出所需抗原结合活性即可。

[0103] “抗体片段”指非完整抗体的分子,其包含完整抗体中与完整抗体所结合的抗原结合的部分。抗体片段的例子包括但不限于 Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂; 双抗体; 线性抗体; 单链抗体分子(例如 scFv); 和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0104] 与参考抗体“结合相同表位的抗体”指,该抗体在竞争测定法中阻断参考抗体与其抗原的结合达 50% 或更多,且反过来地,参考抗体在竞争测定法中阻断该抗体与其抗原的结合达 50% 或更多。示例性竞争测定法在本文中提供。

[0105] 用于本文目的的“受体人构架”是包含衍生自人免疫球蛋白构架或人共有构架(如下文定义)的轻链可变结构域(VL)构架或重链可变结构域(VH)构架的氨基酸序列的构架。“衍生自”人免疫球蛋白构架或人共有构架的受体人构架可以包含与其相同的氨基酸序列,或它可以含有氨基酸序列变化。在一些实施方案中,氨基酸变化数目是 10 个或更少、9 个或更少、8 个或更少、7 个或更少、6 个或更少、5 个或更少、4 个或更少、3 个或更少、或 2 个或更少。在一些实施方案中,VL 受体人构架在序列上与 VL 人免疫球蛋白构架序列或人共有构架序列相同。

[0106] 术语“嵌合”抗体指这样的抗体,其中重和 / 或轻链的部分衍生自特定来源或物种,而重和 / 或轻链的剩余部分衍生自不同来源或物种。

[0107] 抗体的“类”指抗体重链具有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五大类抗体: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,并且其中几个可以进一步分为亚类(同种型),例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。与不同免疫球蛋白类别相对应的重链恒定域分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0108] 如本文使用的术语“细胞毒素剂”指抑制或阻止细胞功能和 / 或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒素剂包括但不限于放射性同位素(例如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹² 和 Lu 的放射性同位素); 化学治疗剂或药物(例如

氨甲蝶呤 (methotrexate)、阿霉素 (adriamycin)、长春花生物碱 (vinca alkaloids) (长春新碱 (vincristine)、长春碱 (vinblastine)、依托泊苷 (etoposide))、多柔比星 (doxorubicin)、美法仑 (melphalan)、丝裂霉素 C (mitocycin C)、苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、柔红霉素 (daunorubicin) 或其他嵌入剂);生长抑制剂;酶及其片段例如溶核酶;抗生素;毒素例如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物源的酶活性毒素,包括其片段和 / 或变体;和下文公开的多种抗肿瘤或抗癌剂。

[0109] “效应子功能”指可归于抗体的 Fc 区的那些生物活性,其随着抗体同种型而改变。抗体效应子功能的例子包括:C1q 结合和补体依赖性细胞毒性 (CDC);Fc 受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如 B 细胞受体)的下调;和 B 细胞活化。

[0110] 活性剂例如药物制剂的“有效量”指,在所需剂量和时间段,有效地实现期望的治疗或预防结果的量。

[0111] 术语“Fc 区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的 C 端区域,其含有恒定区的至少部分。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。在一些实施方案中,人 IgG 重链 Fc 区从 Cys226 或 Pro230 延伸到重链的羧基末端。然而,Fc 区的 C 末端赖氨酸 (Lys447) 可以存在或不存在。除非本文另有说明,Fc 区或恒定区中的氨基酸残基编号根据 EU 编号系统,也称为 EU 索引,见 Kabat 等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中描述。

[0112] “构架”或“FR”指除了高变区 (HVR) 残基外的可变结构域残基。可变结构域的 FR 一般由四个 FR 结构域组成:FR1、FR2、FR3 和 FR4。相应地,HVR 和 FR 序列一般以下述顺序在 VH(或 VL) 中出现:FR1-H1 (L1)-FR2-H2 (L2)-FR3-H3 (L3)-FR4。

[0113] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用,指具有基本上类似于天然抗体结构的结构或具有含有如本文定义的 Fc 区的重链的抗体。

[0114] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且指外源核酸已引入其内的细胞,包括此细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,其包括原代转化的细胞和由其衍生的后代,不考虑传代数目。后代可以在核酸内容上与亲本细胞不完全等同,而是可以含有突变。在本文中涵盖具有针对原始转化细胞所筛选或选择的相同功能或生物活性的突变体后代。

[0115] “人抗体”是具有氨基酸序列的抗体,所述氨基酸序列对应于通过人或人细胞产生的抗体或者衍生自如下非人来源的抗体的氨基酸序列,其中所述非人来源利用人抗体库或其他人抗体编码序列。人抗体的这个定义特别地排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0116] “人共有构架”是代表在选择的人免疫球蛋白 VL 或 VH 构架序列中最常出现的氨基酸残基的构架。一般地,该选择的人免疫球蛋白 VL 或 VH 序列来自可变结构域序列亚组。一般地,该序列亚组是如 Kabat 等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991),第 1-3 卷中的亚组。在一些实施方案中,对于 VL,亚组是如 Kabat 等人,同上引文中的亚组 κ I。在一些实施方案中,对于 VH,亚组是如 Kabat 等人,同上引文中的亚组 III。

[0117] “人源化”抗体指包含来自非人 HVRs 的氨基酸残基和来自人 FRs 的氨基酸残基的

嵌合抗体。在特定实施方案中,人源化抗体将包含至少一个和一般两个可变结构域的基本上全部,其中HVRs(例如CDRs)的全部或基本上全部对应于非人抗体的,而FRs的全部或基本上全部对应于人抗体的。人源化抗体任选可以包含衍生自人抗体的抗体恒定区的至少部分。抗体例如非人抗体的“人源化形式”指已经历人源化的抗体。

[0118] 如本文使用的,术语“高变区”或“HVR”指抗体可变结构域中在序列上高变(“互补决定区”或“CDRs”)和/或形成结构上限定的环(“高变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触者”)的各个区域。一般而言,抗体包含六个HVR;三个在VH中(H1、H2、H3),三个在VL中(L1、L2、L3)。在本文中,示例性HVR包括:

[0119] (a) 出现在氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)位的高变环(CHOTHIA AND LESK, J. MOL. BIOL. 196:901-917(1987));

[0120] (b) 出现在氨基酸残基24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)位的高变环(KABAT等, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5TH ED. PUBLIC HEALTH SERVICE, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, BETHESDA, MD(1991));

[0121] (c) 出现在氨基酸残基27c-36(L1), 46-55(L2), 89-96(L3), 30-35b(H1), 47-58(H2), 和93-101(H3)位的抗原接触者(MACCALLUM等 J. MOL. BIOL. 262:732-745(1996));和

[0122] (d) (a), (b), 和/或(c)的组合,包括HVR氨基酸残基46-56(L2), 47-56(L2), 48-56(L2), 49-56(L2), 26-35(H1), 26-35b(H1), 49-65(H2), 93-102(H3), 和94-102(H3)。

[0123] 在一些实施方案中,HVR残基包含图10至13中或在本说明书其它地方鉴定的那些残基。

[0124] 除非另有所指,HVR残基和可变域中的其他残基(如FR残基)在本文中根据Kabat等(见上引文)编号。

[0125] “免疫缀合物”是缀合至一种或多种异源分子,包括但不限于细胞毒素剂,的抗体。

[0126] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养动物(例如牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类动物(例如人和非人灵长类动物例如猴)、兔和啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。在特定实施方案中,个体或受试者是人。

[0127] “分离的”抗体是已与其天然环境中的组分分离的抗体。在一些实施方案中,抗体纯化至大于95%或99%纯度,如通过例如电泳(例如SDS-PAGE、等电点聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱法(例如离子交换或反相HPLC)测定的。关于用于评价抗体纯度的方法的综述,参见例如Flatman等人, J. Chromatogr. B 848:79-87(2007)。

[0128] “分离的”核酸指已与其天然环境中的组分分离的核酸分子。分离的核酸包括包含在通常含有该核酸分子的细胞中的核酸分子,但是该核酸分子存在于染色体外或存在于与其天然染色体位置不同的染色体位置上。

[0129] “编码抗IL-4抗体的分离核酸”指编码抗体重和轻链(或其片段)的一个或多个核酸分子,包括在单个载体中或在分开载体中的此(一个或多个)核酸分子,以及存在于宿主细胞中的一个或多个位置上的此(一个或多个)核酸分子。

[0130] “编码抗IL-13抗体的分离核酸”指编码抗体重和轻链(或其片段)的一个或多个核酸分子,包括在单个载体中或在分开载体中的此(一个或多个)核酸分子,以及存在于宿主细胞中的一个或多个位置上的此(一个或多个)核酸分子。

[0131] 如本文使用的术语“单克隆抗体”指得自基本上同质的抗体群体的抗体,所谓基本上同质的抗体群体是指,除了一般以微小量存在的可能的变体抗体(例如含有天然突变或在单克隆抗体制品的生产过程中出现)外,群体中的各抗体是相同的和/或结合相同的表位。与一般包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂形成对比,单克隆抗体制剂的每个单克隆抗体都针对抗原上的一个决定簇。因此,修饰词“单克隆”是指抗体得自基本上同质的抗体群体的特征,并不应解释为要求通过任何特定方法生产该抗体。例如,单克隆抗体可以通过多种技术进行制备,包括但不限于杂交瘤法、重组 DNA 法、噬菌体展示法、和利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,这些方法和用于制备单克隆抗体的其他示例性方法在本文中描述。在一些实施方案中,单克隆抗体为多特异性抗体(例如双特异性)抗体。

[0132] “裸抗体”指不缀合至异源部分(例如细胞毒部分)或放射性标记的抗体。裸抗体可以存在于药物制剂中。

[0133] “天然抗体”指具有各种结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如,天然 IgG 抗体是约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白,由二硫键连接的两条相同轻链和两条相同重链组成。从 N 到 C 末端,每条重链具有可变区(VH),也称为可变重链结构域或重链可变结构域,随后为三个恒定结构域(CH1、CH2 和 CH3)。类似地,从 N 到 C 末端,每条轻链具有可变区(VL),也称为可变轻链结构域或轻链可变结构域,随后为恒定轻链(CL)结构域。抗体的轻链,基于其恒定结构域的氨基酸序列,可以分至称为 kappa(κ) 和 lambda(λ) 的两个类型之一。

[0134] 术语“包装说明书”用于指:习惯上包括在治疗产品的商业包装中的说明书,其含有与此治疗产品使用相关的如下信息:适应症、用法、剂量、施用、联合治疗、禁忌和/或警告。术语“包装说明书”也用于指习惯上包括在诊断产品的商业包装中的说明书,其含有关于如下的信息:预期用途、测试原理、试剂的准备和操作、样本的收集和准备、测定法和测定方案的校准、性能和精确度数据,例如测定法的灵敏度与特异性。

[0135] 相对于参考多肽序列而言,“氨基酸序列同一性百分比(%)”定义为,在比对参考序列和候选序列且在需要时引入空位以实现最大序列同一性百分比后,不将任何保守置换考虑为序列同一的部分,在候选序列中与参考多肽序列的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比目的的比对可以在本领域内的多种方法实现,例如使用可公开获得的计算机软件例如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign(DNASTAR)软件。技术人员可以确定用于比对序列的合适参数,包括为在待比较的序列的全长上实现最大对齐所需的任何算法。然而,对于本文的目的,%氨基酸序列同一性值使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 生成。ALIGN-2 序列比较计算机程序由 Genentech, Inc. 创作,并且源代码已与用户文档一起提交给美国版权局(U. S. Copyright Office), Washington D. C., 20559, 其注册为美国版权登记号 TXU510087。ALIGN-2 程序可从 Genentech, Inc., South San Francisco, California 公开获得,或可以由源代码编译。ALIGN-2 程序应编译以用于在 UNIX 操作系统(包括数字 UNIX V4.0D)上使用。所有序列比较参数通过 ALIGN-2 程序设置并且不改变。

[0136] 在 ALIGN-2 用于氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列 A 与或相对于给定氨基酸序列 B 的%氨基酸序列同一性(其可以可替代地表达为,与或相对于给定氨基酸序列

B, 具有或包含特定%氨基酸序列同一性的给定氨基酸序列 A) 如下计算:

[0137] 100 乘以分数 X/Y,

[0138] 其中 X 是在 ALIGN-2 程序的 A 和 B 比对中由序列比对程序 ALIGN-2 评为相同匹配的氨基酸残基的数目, 其中 Y 是 B 中的氨基酸残基的总数目。应当理解, 当氨基酸序列 A 的长度不等于氨基酸序列 B 的长度时, A 相对于 B 的%氨基酸序列同一性不等于 B 相对于 A 的%氨基酸序列同一性。除非另有具体说明, 本文使用的所有%氨基酸序列同一性值, 如紧先前段落中所述, 通过 ALIGN-2 计算机程序获得。

[0139] 术语“药物制剂”指这样的制品, 该制品的形式使得其中含有的活性成分的生物活性是有效的, 并且不含有对制剂将施用于的受试者具有无法接受的毒性的另外组分。

[0140] “药学可接受的载体”指, 在药物制剂中除了活性成分外的对受试者无毒的成分。药学可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0141] 除非另有说明, 如本文使用的, 术语“IL-4”指来自任何脊椎动物来源的任何天然 IL-4, 所述脊椎动物来源包括哺乳动物例如灵长类动物(例如人)和啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。该术语包含“全长”、未加工 IL-4, 以及由细胞中的加工而产生的任何形式的 IL-4。该术语还包含天然存在的 IL-4 变体, 例如剪接变体或等位基因变体。示例性人 IL-4 的氨基酸序列显示在 SEQ ID NOS:27 和 28, 以及 Swiss-Prot 登录号 P05112.2 中。示例性食蟹猴 IL-4 的氨基酸序列显示在 SEQ ID NO:33 中。

[0142] 除非另有说明, 如本文使用的, 术语“IL-13”指来自任何脊椎动物来源的任何天然 IL-13, 所述脊椎动物来源包括哺乳动物例如灵长类动物(例如人)和啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。该术语包含“全长”、未加工 IL-13, 以及由细胞中的加工而产生的任何形式的 IL-13。该术语还包含天然存在的 IL-13 变体, 例如剪接变体或等位基因变体。示例性人 IL-13 的氨基酸序列显示在 SEQ ID NOS:29 和 30, 以及 Swiss-Prot 登录号 P35225.2 中。示例性食蟹猴 IL-13 的氨基酸序列显示在 SEQ ID NO:32 中。

[0143] 如本文使用的, “治疗”(及其语法变体)指, 尝试改变所治疗个体的自然过程的临床干预, 其可以执行用于预防或在临床病理学的过程中执行。治疗的期望效应包括但不限于, 防止疾病的出现或复发、减轻症状、减弱疾病的任何直接或间接病理后果、防止转移、降低疾病进展速率、改善或缓和疾病状态、和缓解或改善预后。在一些实施方案中, 抗体用于延迟疾病的发展或减慢疾病的进展。

[0144] 术语“可变区”或“可变结构域”指参与抗体与抗原结合的抗体重或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为 VH 和 VL)一般具有相似结构, 其中每个结构域包含四个保守构架区(FRs)和三个高变区(HVRs)。(参见, 例如, Kindt 等 *Kuby Immunology*, 6th ed., W. H. Freeman and Co., page 91 (2007).) 单个 VH 或 VL 结构域可能足以赋予抗原结合特异性。此外, 结合特定抗原的抗体可以使用来自结合该抗原的抗体的 VH 或 VL 结构域分别筛选互补 VL 或 VH 结构域的文库, 以分离。参见, 例如, Portolano 等, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson 等, *Nature* 352:624-628 (1991)。

[0145] 如本文使用的, 术语“载体”指能够扩增与之连接的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自主复制核酸结构的载体以及掺入已引入其的宿主细胞的基因组内的载体。特定载体能够指导与之可操作地连接的核酸的表达。此类载体在本文中被称为表达载体”。

[0146] 组合物和方法

[0147] 在一些实施方案中,提供与 IL-4 结合的抗体。在一些实施方案中,提供与 IL-4 和 IL-13 结合的双特异性抗体。这些抗体可以用于例如诊断或治疗嗜酸性粒细胞病症,包括呼吸病症(例如哮喘和 IPF)、IL-4 介导的病症和 IL-13 介导的病症。

[0148] 示例性抗 IL-4 抗体

[0149] 在一些实施方案中,提供与 IL-4 结合的分离的抗体。在一些实施方案中,抗 IL-4 抗体包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个 HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b) 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2;(c) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3;(d) 包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1;(e) 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2;和 (f) 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0150] 在一些实施方案中,抗体包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VH HVR 序列:(a) 包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b) 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2;和 (c) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3。一些实施方案中,抗体包含含有 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3。一些实施方案中,抗体包含含有 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3 和含有 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3。在一些实施方案中,抗体包含含有 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3、含有 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3、和包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2。一些实施方案中,抗体包含 (a) 含有 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b) 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2;和 (c) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3。

[0151] 在一些实施方案中,抗体包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VL HVR 序列:(a) 包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1;(b) 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2;和 (e) 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3。一些实施方案中,抗体包含 (a) 含有 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1;(b) 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2;和 (e) 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0152] 在一些实施方案中,抗体包含 (a) 包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VH HVR 序列的 VH 结构域:(i) 包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1、(ii) 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2、和 (iii) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3;和 (b) 包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VL HVR 序列的 VL 结构域:(i) 包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1、(ii) 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2、和 (iii) 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0153] 一些实施方案中,提供抗体,所述抗体包含 (a) 含有 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b) 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2;(c) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3;(d) 包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1;(e) 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2;和 (f) 包含选自 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3。一些实施方案中,提供抗体,所述抗体包含 (a) 含有 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b) 包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列的 HVR-H2;(c) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3;(d) 包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1;(e) 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2;和 (f) 包含选自 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0154] 在任何上述实施方案中,抗 IL-4 抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗 IL-4 抗体包含如任何上述实施方案中的 HVRs,并且进一步包含受体人构架,例如人免疫球蛋白构架或人共有构架。在一些实施方案中,抗 IL-4 抗体包含如任何上述实施方案中的 HVRs,并且进一步包含含有 SEQ ID NOS:3 至 9 之任一的 FR1,FR2,FR3, 和 FR4 的 VH。在一些实施方案中,抗 IL-4 抗体包含如任何上述实施方案中的 HVRs,并且进一步包含含有 SEQ ID NO:9 的 FR1,FR2,FR3, 和 FR4 的 VH。在一些实施方案中,抗 IL-4 抗体包含如任何上述实施方案中的 HVRs,并且进一步包含含有 SEQ ID NOS:10 至 11 之任一的 FR1,FR2,FR3, 和 FR4 的 VL。在一些实施方案中,抗 IL-4 抗体包含如任何上述实施方案中的 HVRs,并且进一步包含含有 SEQ ID NO:10 的 FR1,FR2,FR3, 和 FR4 的 VL。

[0155] 在一些实施方案中,抗 IL-4 抗体包含与 SEQ ID NOS:1 和 3 至 9 之任一的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性的重链可变结构域 (VH) 序列。在一些实施方案中,具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的 VH 序列,相对于参考序列,含有置换(例如保守置换)、插入或缺失,但包含该序列的抗 IL-4 抗体保留与 IL-4 结合的能力。在一些实施方案中,总共 1 - 10 个氨基酸已在 SEQ ID NO:9 中被置换、插入和 / 或缺失。在特定实施方案中,置换、插入或缺失发生在 HVRs 外的区域中(即在 FRs 中)。任选地,抗 IL-4 抗体包含 SEQ ID NO:9 中的 VH 序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个特定实施方案中,VH 包含选自以下的一个、两个或三个 HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1、(b) 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2、和 (c) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3。

[0156] 在一些实施方案中,提供了抗 IL-4 抗体,其中所述抗体包含与 SEQ ID NO:2, 10, 和 11 之任一的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性的轻链可变结构域 (VL)。在特定实施方案中,具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的 VL 序列,相对于参考序列,含有置换(例如保守置换)、插入或缺失,但包含该序列的抗 IL-4 抗体保留与 IL-4 结合的能力。在一些实施方案中,总共 1 - 10 个氨基酸已在 SEQ ID NO:10 中被置换、插入和 / 或缺失。在特定实施方案中,置换、插入或缺失发生在 HVRs 外的区域中(即在 FRs 中)。任选地,抗 IL-4 抗体包含 SEQ ID NO:10 中的 VL 序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个特定实施方案中,VL 包含选自以下的一个、两个或三个 HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1、(b) 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2、和 (c) 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0157] 在一些实施方案中,提供了抗 IL-4 抗体,其中所述抗体包含如上文提供的任何实施方案中的 VH 和如上文提供的任何实施方案中的 VL。在一些实施方案中,抗体包含分别在 SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10 中的 VH 和 VL 序列,包括这些序列的翻译后修饰。

[0158] 在一些实施方案中,提供抗体,所述抗体与包含 SEQ ID NOS:9 的 VH 序列和 SEQ ID NO:10 的 VL 序列的抗 IL-4 抗体竞争结合 IL-4。在一些实施方案中,本发明提供与本文提供的抗 IL-4 抗体结合相同表位的抗体。例如,在特定实施方案中,提供了与抗 IL-4 抗体结合相同表位的抗体,其中所述抗 IL-4 抗体包含 SEQ ID NO:9 的 VH 序列和 SEQ ID NO:10 的 VL 序列。

[0159] 在一些实施方案中,根据任何上述实施方案的抗 IL-4 抗体可以是单克隆抗体,包括嵌合、人源化或人抗体。在一些实施方案中,抗 IL-4 抗体是抗体片段,例如 Fv、Fab、Fab'、scFv、双抗体或 F(ab')₂ 片段。在一些实施方案中,抗体是全长抗体,例如完整 IgG1 或 IgG4 抗体或如本文定义的其他抗体类或同种型。

[0160] 在一些实施方案中,根据任何上述实施方案的抗 IL-4 抗体可以并入单独或组合的如下文章节 1-7 中所述的任何特征。

[0161] 示例性抗 IL-13 抗体

[0162] 在一些实施方案中,提供与 IL-13 结合的分离的抗体。在一些实施方案中,抗 IL-13 抗体包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个 HVR: (a) 包含 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列的 HVR-H1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的 HVR-H2 ;(c) 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的 HVR-H3 ;(d) 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的 HVR-L1 ;(e) 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (f) 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0163] 在一些实施方案中,提供抗体,所述抗体包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VH HVR 序列 : (a) 包含 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列的 HVR-H1 ; (b) 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的 HVR-H2 ;和 (c) 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的 HVR-H3。一些实施方案中,抗体包含含有 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的 HVR-H3。一些实施方案中,抗体包含含有 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的 HVR-H3 和含有 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的 HVR-L3。在一些实施方案中,抗体包括包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的 HVR-H3、包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的 HVR-L3、和包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的 HVR-H2。一些实施方案中,抗体包含 (a) 含有 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列的 HVR-H1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的 HVR-H2 ;和 (c) 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的 HVR-H3。

[0164] 在一些实施方案中,提供抗体,所述抗体包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VL HVR 序列 : (a) 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的 HVR-L1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (e) 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的 HVR-L3。一些实施方案中,抗体包含 (a) 含有 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的 HVR-L1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (e) 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0165] 在一些实施方案中,抗体包含 : (a) 包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VH HVR 序列的 VH 结构域 : (i) 包含 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列的 HVR-H1、(ii) 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的 HVR-H2、和 (iii) 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的 HVR-H3 ;和 (b) 包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VL HVR 序列的 VL 结构域 : (i) 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的 HVR-L1、(ii) 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列的 HVR-L2、和 (iii) 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0166] 一些实施方案中,提供抗体,所述抗体包含 (a) 含有 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列的 HVR-H1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的 HVR-H2 ;(c) 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的 HVR-H3 ;(d) 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的 HVR-L1 ;(e) 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (f) 包含选自 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0167] 在任何上述实施方案中,抗 IL-13 抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗 IL-13 抗体包含如任何上述实施方案中的 HVRs,并且进一步包含受体人构架,例如人免疫球蛋白构架或人共有构架。在一些实施方案中,抗 IL-13 抗体包含如任何上述实施方案中的 HVRs,并且进一步包含含有 SEQ ID NO:19 的 FR1,FR2,FR3,和 / 或 FR4 序列的 VH。在一些实施方案中,抗 IL-13 抗体包含如任何上述实施方案中的 HVRs,并且进一步包含含有 SEQ ID NO:20 的 FR1,FR2,FR3,和 / 或 FR4 序列的 VL。在一些实施方案中,抗 IL-13 抗体包含如任何上述实施方案中的 HVRs,并且进一步包含含有 SEQ ID NO:56 的 FR1,FR2,FR3,和 / 或 FR4 序列的 VH。在一些实施方案中,抗 IL-13 抗体包含如任何上述实施方案中的 HVRs,并且进一步包含含有 SEQ ID NO:57 的 FR1,FR2,FR3,和 / 或 FR4 序列的 VL。

[0168] 在一些实施方案中,抗 IL-13 抗体包含与 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性的重链可变结构域 (VH) 序列。在一些实施方案中,具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的 VH 序列,相对于参考序列,含有置换 (例如保守置换)、插入或缺失,但包含该序列的抗 IL-13 抗体保留与 IL-13 结合的能力。在一些实施方案中,总共 1 - 10 个氨基酸已在 SEQ ID NO:19 中被置换、插入和 / 或缺失。在特定实施方案中,置换、插入或缺失发生在 HVRs 外的区域中 (即在 FRs 中)。在一些实施方案中,抗 IL-13 抗体包含 SEQ ID NO:19 中的 VH 序列,包括该序列的翻译后修饰。在一些实施方案中,抗 IL-13 抗体包含 SEQ ID NO:56 中的 VH 序列,包括该序列的翻译后修饰。在一些实施方案中,VH 包含选自以下的一个、两个或三个 HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列的 HVR-H1、(b) 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的 HVR-H2、和 (c) 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的 HVR-H3。

[0169] 在一些实施方案中,提供了抗 IL-13 抗体,其中所述抗体包含与 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性的轻链可变结构域 (VL)。在特定实施方案中,具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的 VL 序列,相对于参考序列,含有置换 (例如保守置换)、插入或缺失,但包含该序列的抗 IL-13 抗体保留与 IL-13 结合的能力。在一些实施方案中,总共 1 - 10 个氨基酸已在 SEQ ID NO:20 中被置换、插入和 / 或缺失。在特定实施方案中,置换、插入或缺失发生在 HVRs 外的区域中 (即在 FRs 中)。在一些实施方案中,抗 IL-13 抗体包含 SEQ ID NO:20 中的 VL 序列,包括该序列的翻译后修饰。在一些实施方案中,抗 IL-13 抗体包含 SEQ ID NO:57 中的 VL 序列,包括该序列的翻译后修饰。在一些实施方案中,VL 包含选自以下的一个、两个或三个 HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的 HVR-L1、(b) 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列的 HVR-L2、和 (c) 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0170] 在一些实施方案中,提供了抗 IL-13 抗体,其中所述抗体包含如上文提供的任何实施方案中的 VH 和如上文提供的任何实施方案中的 VL。在一些实施方案中,抗体包含在 SEQ ID NO:19 或 SEQ ID NO:56 中的 VH 和在 SEQ ID NO:20 或 SEQ ID NO:57 中 VL 序列,包括这些序列的翻译后修饰。

[0171] 在一些实施方案中,提供抗体,所述抗体与包含 SEQ ID NOs:19 的 VH 序列和 SEQ ID NO:20 的 VL 序列的抗 IL-13 抗体竞争结合 IL-13。在一些实施方案中,本发明提供与本文提

供的抗 IL-13 抗体结合相同的表位的抗体。参见, 例如, Ultsch, M. 等, Structural Basis of Signaling Blockade by Anti-IL-13 Antibody Lebrikizumab, J. Mol. Biol. (2013), dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2013.01.024. 在一些实施方案中, 本发明提供与本文提供的抗 IL-13 抗体结合相同的表位的抗体。例如, 在特定实施方案中, 提供与抗 IL-13 抗体结合相同的表位的抗体, 其中所述抗 IL-13 抗体包含 SEQ ID NO:19 的 VH 序列和 SEQ ID NO:20 的 VL 序列。一些实施方案中, 提供抗体, 所述抗体结合人前体 IL-13 (SEQ ID NO:29) 的氨基酸 63 至 74 中的、或成熟形式的人 IL-13 (SEQ ID NO:30) 的氨基酸 45 至 56 中的表位, 其中所述氨基酸是 YCAALES LINVS (SEQ ID NO:43)。一些实施方案中, 提供抗体, 所述抗体结合人前体 IL-13 (SEQ ID NO:29) 的氨基酸 68 至 75 中的、或成熟形式的人 IL-13 (SEQ ID NO:30) 的氨基酸 50 至 57 中的表位, 其中所述氨基酸是 ESLIN VSG (SEQ ID NO:42)。

[0172] 另一示例性抗 IL-13 抗体是 11H4 及其人源化形式, 包括 hu11H4v6。Mu11H4 包含分别含有 SEQ ID NOs:45 和 44 的氨基酸序列的重链和轻链可变区。人源化 hu11H4v6 包含分别含有 SEQ ID NOs:49 和 48 的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。人源化 hu11H4v6 包含分别含有 SEQ ID NOs:47 和 46 的氨基酸序列的重链和轻链。

[0173] 在一些实施方案中, 抗 IL-13 抗体包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个 HVR: (a) 包含 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列的 HVR-H1; (b) 包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列的 HVR-H2; (c) 包含 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列的 HVR-H3; (d) 包含 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列的 HVR-L1; (e) 包含 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列的 HVR-L2; 和 (f) 包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0174] 在一些实施方案中, 提供抗体, 所述抗体包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VH HVR 序列: (a) 包含 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列的 HVR-H1; (b) 包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列的 HVR-H2; 和 (c) 包含 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列的 HVR-H3。一些实施方案中, 抗体包含含有 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列的 HVR-H3。一些实施方案中, 抗体包含含有 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列的 HVR-H3 和含有 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列的 HVR-L3。在一些实施方案中, 抗体包括包含 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列的 HVR-H3、包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列的 HVR-L3、和包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列的 HVR-H2。一些实施方案中, 抗体包含 (a) 含有 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列的 HVR-H1; (b) 包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列的 HVR-H2; 和 (c) 包含 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列的 HVR-H3。

[0175] 在一些实施方案中, 提供抗体, 所述抗体包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VL HVR 序列: (a) 包含 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列的 HVR-L1; (b) 包含 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列的 HVR-L2; 和 (e) 包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列的 HVR-L3。一些实施方案中, 抗体包含 (a) 含有 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列的 HVR-L1; (b) 包含 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列的 HVR-L2; 和 (e) 包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0176] 在一些实施方案中, 抗体包含: (a) 包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VH HVR 序列的 VH 结构域: (i) 包含 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列的 HVR-H1、(ii) 包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列的 HVR-H2、和 (iii) 包含选自 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列的 HVR-H3; 和 (b) 包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VL HVR 序列的 VL 结构域: (i) 包含 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列的 HVR-L1、(ii) 包含 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列的 HVR-L2、和 (iii) 包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0177] 一些实施方案中,提供抗体,所述抗体包含:(a)包含 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b)包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列的 HVR-H2;(c)包含 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列的 HVR-H3;(d)包含 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列的 HVR-L1;(e)包含 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列的 HVR-L2;和 (f)包含选自 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0178] 在任何上述实施方案中,抗 IL-13 抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗 IL-13 抗体包含如任何上述实施方案中的 HVRs,并且进一步包含受体人构架,例如人免疫球蛋白构架或人共有构架。在一些实施方案中,抗 IL-13 抗体包含如任何上述实施方案中的 HVRs,并且进一步包含含有 SEQ ID NO:49 的 FR1, FR2, FR3, 和 / 或 FR4 序列的 VH。在一些实施方案中,抗 IL-13 抗体包含如任何上述实施方案中的 HVRs,并且进一步包含含有 SEQ ID NO:48 的 FR1, FR2, FR3, 和 / 或 FR4 序列的 VL。

[0179] 在一些实施方案中,抗 IL-13 抗体包含与 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性的重链可变结构域 (VH) 序列。在一些实施方案中,具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的 VH 序列,相对于参考序列,含有置换(例如保守置换)、插入或缺失,但包含该序列的抗 IL-13 抗体保留与 IL-13 结合的能力。在一些实施方案中,总共 1 - 10 个氨基酸已在 SEQ ID NO:49 中被置换、插入和 / 或缺失。在特定实施方案中,置换、插入或缺失发生在 HVRs 外的区域中(即在 FRs 中)。任选地,抗 IL-13 抗体包含 SEQ ID NO:49 中的 VH 序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个特定实施方案中,VH 包含选自以下的一个、两个或三个 HVR:(a)包含 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列的 HVR-H1、(b)包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列的 HVR-H2、和 (c)包含 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列的 HVR-H3。

[0180] 在一些实施方案中,提供了抗 IL-13 抗体,其中所述抗体包含与 SEQ ID NO:48 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性的轻链可变结构域 (VL)。在特定实施方案中,具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的 VL 序列,相对于参考序列,含有置换(例如保守置换)、插入或缺失,但包含该序列的抗 IL-13 抗体保留与 IL-13 结合的能力。在一些实施方案中,总共 1 - 10 个氨基酸已在 SEQ ID NO:48 中被置换、插入和 / 或缺失。在特定实施方案中,置换、插入或缺失发生在 HVRs 外的区域中(即在 FRs 中)。任选地,抗 IL-13 抗体包含 SEQ ID NO:48 中的 VL 序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个特定实施方案中,VL 包含选自以下的一个、两个或三个 HVR:(a)包含 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列的 HVR-L1、(b)包含 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列的 HVR-L2、和 (c)包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0181] 在一些实施方案中,提供了抗 IL-13 抗体,其中所述抗体包含如上文提供的任何实施方案中的 VH 和如上文提供的任何实施方案中的 VL。在一些实施方案中,抗体包含分别在 SEQ ID NO:49 和 SEQ ID NO:48 中的 VH 和 VL 序列,包括这些序列的翻译后修饰。

[0182] 在一些实施方案中,提供抗体,所述抗体与包含 SEQ ID NOs:49 的 VH 序列和 SEQ ID NO:48 的 VL 序列的抗 IL-13 抗体竞争结合 IL-13。在一些实施方案中,本发明提供与本文提供的抗 IL-13 抗体结合相同的表位的抗体。参见,例如,Ultsch, M. 等, Structural Basis of Signaling Blockade by Anti-IL-13 Antibody Lebrikizumab, J. Mol. Biol. (2013), dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2013.01.053。在一些实施方案中,本发明提供与本文提供的抗

IL-13 抗体结合相同的表位的抗体。例如,在特定实施方案中,提供了与抗 IL-13 抗体结合相同的表位的抗体,其中所述抗 IL-13 抗体包含 SEQ ID NO:49 的 VH 序列和 SEQ ID NO:48 的 VL 序列。

[0183] 在一些实施方案中,根据任何上述实施方案的抗 IL-13 抗体可以是单克隆抗体,包括嵌合、人源化或人抗体。在一些实施方案中,抗 IL-13 抗体是抗体片段,例如 Fv、Fab、Fab'、scFv、双抗体或 F(ab')₂ 片段。在一些实施方案中,抗体是全长抗体,例如完整 IgG1 或 IgG4 抗体或如本文定义的其他抗体类或同种型。

[0184] 在一些实施方案中,根据任何上述实施方案的抗 IL-13 抗体可以并入单独或组合的如下文章节 1-7 中所述的任何特征。

[0185] 示例性抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体

[0186] 在一些实施方案中,提供包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域的多特异性抗体(例如双特异性抗体)。一些实施方案中,抗原结合结构域不特异结合其它靶标。结合 IL-4 和 IL-13 的多特异性抗体可以包含根据本文中针对抗 IL4 抗体描述的任何实施方案的第一组可变区(VH 和 VL;也称作 VH/VL 单位)和根据本文中针对抗 IL13 抗体描述的任何实施方案的第二组可变区(VH 和 VL;也称作 VH/VL 单位)。

[0187] 一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位包含含有 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列的 VH(重链可变结构域)。一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位包含含有 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列的 VL(轻链可变结构域)。一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位包含含有 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列的 VH 和含有 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列的 VL。一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位与包含含有 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列的 VH 和含有 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列的 VL 的抗体竞争结合 IL-4。

[0188] 一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含含有 SEQ ID NO:19 或 SEQ ID NO:56 的氨基酸序列的 VH(重链可变结构域)。一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含含有 SEQ ID NO:20 或 SEQ ID NO:57 的氨基酸序列的 VL(轻链可变结构域)。一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含含有 SEQ ID NO:19 或 SEQ ID NO:56 的氨基酸序列的 VH 和含有 SEQ ID NO:20 或 SEQ ID NO:57 的氨基酸序列的 VL。一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位与包含含有 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列的 VH 和含有 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列的 VL 的抗体竞争结合 IL-13。一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位结合由 SEQ ID NO:29 的氨基酸 82 至 89 组成的 IL-13 表位。一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第

二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位结合由 SEQ ID NO:29 的氨基酸 77 至 89 组成的 IL-13 表位。

[0189] 一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含含有 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列的 VH(重链可变结构域)。一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含含有 SEQ ID NO:48 的氨基酸序列的 VL(轻链可变结构域)。一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含含有 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列的 VH 和含有 SEQ ID NO:48 的氨基酸序列的 VL。一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位与包含含有 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列的 VH 和含有 SEQ ID NO:48 的氨基酸序列的 VL 的抗体竞争结合 IL-13。

[0190] 一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位包含含有 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列的第一 VH 和含有 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列的第一 VL;且该抗体包含第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含包含 SEQ ID NO:19 或 SEQ ID NO:56 的氨基酸序列的第二 VH 和含有 SEQ ID NO:20 或 SEQ ID NO:57 的氨基酸序列的第二 VL。

[0191] 一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位包含含有 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列的第一 VH 和含有 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列的第一 VL;且包含第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含含有 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列的第二 VH 和含有 SEQ ID NO:48 的氨基酸序列的第二 VL。

[0192] 一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位包含与 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列具有至少 90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或 100%序列同一性的 VH、和与 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列具有至少 90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或 100%序列同一性的 VL。一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含与 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列具有至少 90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或 100%序列同一性的 VH、和与 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列具有至少 90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或 100%序列同一性的 VL。一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含与 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列具有至少 90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或 100%序列同一性的 VH、和与 SEQ ID NO:48 的氨基酸序列具有至少 90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或 100%序列同一性的 VL。在一些实施方案中,总共 1-10 个氨基酸已在上述序列中被置换、插入和/或缺失。在特定实施方案中,置换、插入或缺失发生在 HVRs 外的区域中(即在 FRs 中)。

[0193] 一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构

域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位包含与 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列具有至少 90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或 100%序列同一性的第一 VH、和与 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列具有至少 90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或 100%序列同一性的第一 VL;和第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含与 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性的第二 VH、和与 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性的第二 VL。在一些实施方案中,总共 1 - 10 个氨基酸已在上述序列中被置换、插入和 / 或缺失。在特定实施方案中,置换、插入或缺失发生在 HVRs 外的区域中(即在 FRs 中)。

[0194] 一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位包含与 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列具有至少 90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或 100%序列同一性的第一 VH、和与 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列具有至少 90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或 100%序列同一性的第一 VL;和第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含与 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性的第二 VH、和与 SEQ ID NO:48 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性的第二 VL。在一些实施方案中,总共 1 - 10 个氨基酸已在上述序列中被置换、插入和 / 或缺失。在特定实施方案中,置换、插入或缺失发生在 HVRs 外的区域中(即在 FRs 中)。

[0195] 一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个 HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b) 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2;(c) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3;(d) 包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1;(e) 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2;和 (f) 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3。一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个 HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b) 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的 HVR-H2;(c) 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的 HVR-H3;(d) 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的 HVR-L1;(e) 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列的 HVR-L2;和 (f) 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的 HVR-L3。一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个 HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b) 包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列的 HVR-H2;(c) 包含 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列的 HVR-H3;(d) 包含 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列的 HVR-L1;(e) 包含 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列的 HVR-L2;和 (f) 包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0196] 一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个 HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b) 包含 SEQ

ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2 ;(c) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3 ;(d) 包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1 ;(e) 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (f) 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3 ;和第二 VH/VL 单位, 所述第二 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个 HVR : (a) 包含 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列的 HVR-H1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的 HVR-H2 ;(c) 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的 HVR-H3 ;(d) 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的 HVR-L1 ;(e) 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (f) 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0197] 一些实施方案中, 多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域, 其中该抗体包含第一 VH/VL 单位, 所述第一 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个 HVR : (a) 包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2 ;(c) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3 ;(d) 包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1 ;(e) 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (f) 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3 ;和第二 VH/VL 单位, 所述第二 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个 HVR : (a) 包含 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列的 HVR-H1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列的 HVR-H2 ;(c) 包含 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列的 HVR-H3 ;(d) 包含 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列的 HVR-L1 ;(e) 包含 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (f) 包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0198] 一些实施方案中, 多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域, 其中该抗体包含第一 VH/VL 单位, 所述第一 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VH HVR 序列 : (a) 包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2 ;(c) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3。;一些实施方案中, 多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域, 其中该抗体包含第二 VH/VL 单位, 所述第二 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VH HVR 序列 : (a) 含有 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列的 HVR-H1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的 HVR-H2 ;(c) 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的 HVR-H3。一些实施方案中, 多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域, 其中该抗体包含第二 VH/VL 单位, 所述第二 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VH HVR 序列 : (a) 含有 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列的 HVR-H1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列的 HVR-H2 ;(c) 包含 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列的 HVR-H3。

[0199] 一些实施方案中, 多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域, 其中该抗体包含第一 VH/VL 单位, 所述第一 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VH HVR 序列 : (a) 含有 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2 ;(c) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3 ;和第二 VH/VL 单位, 所述第二 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VH HVR 序列 : (a) 含有 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列的 HVR-H1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的 HVR-H2 ;(c) 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸

序列的 HVR-H3 ;一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VH HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2 ;(c) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3 ;和第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VH HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列的 HVR-H1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列的 HVR-H2 ;(c) 包含 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列的 HVR-H3。

[0200] 一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VL HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (e) 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3。一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VL HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的 HVR-L1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (e) 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的 HVR-L3。一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VL HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列的 HVR-L1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (e) 包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0201] 一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VL HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (c) 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3 ;和第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VL HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的 HVR-L1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (e) 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的 HVR-L3。一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VL HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (c) 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3 ;和第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含选自以下的至少一个、至少两个、或所有三个 VL HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列的 HVR-L1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (c) 包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0202] 一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位包含选自以下的三个 VH HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2 ;(c) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3 ;和选自以下的三个 VL HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1 ;(b) 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2 ;和 (c) 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3。一些实施方案中,多

特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位包含选自以下的三个 VH HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b) 包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列的 HVR-H2;(c) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3;和选自以下的三个 VL HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1;(b) 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2;和 (c) 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0203] 一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含选自以下的三个 VH HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b) 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的 HVR-H2;(c) 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的 HVR-H3;和选自以下的三个 VL HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的 HVR-L1;(b) 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列的 HVR-L2;和 (c) 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0204] 一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含选自以下的三个 VH HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b) 包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列的 HVR-H2;(c) 包含 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列的 HVR-H3;和选自以下的三个 VL HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列的 HVR-L1;(b) 包含 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列的 HVR-L2;和 (c) 包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0205] 一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位包含选自以下的三个 VH HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b) 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2;(c) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3;和选自以下的三个 VL HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1;(b) 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2;和 (c) 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3;和第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含选自以下的三个 VH HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b) 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的 HVR-H2;(c) 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的 HVR-H3;和选自以下的三个 VL HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的 HVR-L1;(b) 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列的 HVR-L2;和 (c) 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0206] 一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位包含选自以下的三个 VH HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b) 包含 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的 HVR-H2;(c) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3;和选自以下的三个 VL HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1;(b) 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2;和 (c) 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3;和第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含选自以下的三个 VH HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b) 包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列的 HVR-H2;(c) 包含 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列的 HVR-H3;和选自以下的三个 VL HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列的 HVR-L1;(b) 包含 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列的 HVR-L2;和 (c) 包含 SEQ ID NO:55 的

氨基酸序列的 HVR-L3。

[0207] 一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位包含选自以下的三个 VH HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b) 包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列的 HVR-H2;(c) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3;和选自以下的三个 VL HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1;(b) 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2;和(c) 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3;和第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含选自以下的三个 VH HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b) 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的 HVR-H2;(c) 包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的 HVR-H3;和选自以下的三个 VL HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的 HVR-L1;(b) 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列的 HVR-L2;和(c) 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0208] 一些实施方案中,多特异性抗体包含特异地结合 IL-4 和 IL-13 的抗原结合结构域,其中该抗体包含第一 VH/VL 单位,所述第一 VH/VL 单位包含选自以下的三个 VH HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b) 包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列的 HVR-H2;(c) 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的 HVR-H3;和选自以下的三个 VL HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的 HVR-L1;(b) 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的 HVR-L2;和(c) 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的 HVR-L3;和第二 VH/VL 单位,所述第二 VH/VL 单位包含选自以下的三个 VH HVR 序列:(a) 含有 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列的 HVR-H1;(b) 包含 SEQ ID NO:51 的氨基酸序列的 HVR-H2;(c) 包含 SEQ ID NO:52 的氨基酸序列的 HVR-H3;和选自以下的三个 VL HVR:(a) 包含 SEQ ID NO:53 的氨基酸序列的 HVR-L1;(b) 包含 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列的 HVR-L2;和(c) 包含 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列的 HVR-L3。

[0209] 在多个实施方案中,多特异性抗体包含第一 hemimer 和第二 hemimer,所述第一 hemimer 包含结合 IL-4 的第一 VH/VL 单位,其中第一 hemimer 在重链恒定区中包含杵突变,所述第二 hemimer 包含结合 IL-13 的第二 VH/VL 单位,其中第二 hemimer 在重链恒定区中包含臼突变。在多个实施方案中,多特异性抗体包含第一 hemimer 和第二 hemimer,所述第一 hemimer 包含结合 IL-4 的第一 VH/VL 单位,其中第一 hemimer 在重链恒定区中包含臼突变,所述第二 hemimer 包含结合 IL-13 的第二 VH/VL 单位,其中第二 hemimer 在重链恒定区中包含杵突变。在一些实施方案中,包含臼突变的重链恒定区具有 SEQ ID NO:35(IgG1) 或 SEQ ID NO:37(IgG4) 中所示的序列。在一些实施方案中,包含杵突变的重链恒定区具有 SEQ ID NO:34(IgG1) 或 SEQ ID NO:36(IgG4) 中所示的序列。一些实施方案中,多特异性抗体包含第一 hemimer 和第二 hemimer,其中第一 hemimer 包含具有 SEQ ID NO:38 的序列的第一重链和具有 SEQ ID NO:39 的序列的第一轻链,第二 hemimer 包含具有 SEQ ID NO:40 或 58 的序列的第二重链和具有 SEQ ID NO:41 或 59 的序列的第二轻链。一些实施方案中,多特异性抗体包含第一 hemimer 和第二 hemimer,其中第一 hemimer 包含具有 SEQ ID NO:38 的序列的第一重链和具有 SEQ ID NO:39 的序列的第一轻链,第二 hemimer 包含具有 SEQ ID NO:40 的序列的第二重链和具有 SEQ ID NO:41 的序列的第二轻链。

[0210] 在一些实施方案中,根据任何上述实施方案的抗 -IL-4/IL-13 多特异性抗体可以是单克隆抗体,包括嵌合、人源化或人抗体。在一些实施方案中,抗 IL-4/IL-13 多特异性抗

体是抗体片段,例如 Fv、Fab、Fab'、scFv、双抗体或 F(ab')₂ 片段。在一些实施方案中,抗体是全长抗体,例如完整 IgG1 或 IgG4 抗体或如本文定义的其他抗体类或同种型。

[0211] 在一些实施方案中,根据任何上述实施方案的抗-IL-4/IL-13 多特异性抗体可以并入单独或组合的如下文章节 1-7 中所述的任何特征。

[0212] 1. 抗体亲和力

[0213] 在一些实施方案中,本文提供的抗体对抗原具有 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更少,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M) 的解离常数 (Kd)。

[0214] 在一些实施方案中,Kd 通过放射性标记抗原结合测定法 (RIA) 进行测量。在一些实施方案中,RIA 用目的抗体的 Fab 形式及其抗原实施。例如,Fabs 对于抗原的溶液结合亲和力通过下述进行测量:在滴定系列的未标记抗原的存在下用最低浓度的 (^{125}I) 标记的抗原平衡 Fab,随后用抗 Fab 抗体包被的板捕获结合的抗原 (参见例如 Chen 等人, J. Mol. Biol. 293:865-881(1999))。为了建立用于该测定法的条件, **MICROTITER**[®] 多孔板 (Thermo Scientific) 用在 50mM 碳酸钠 (pH 9.6) 中的 $5 \mu\text{g/ml}$ 捕获抗 Fab 抗体 (Cappel Labs) 包被过夜,并且随后用在 PBS 中的 2% (w/v) 牛血清白蛋白在室温 (约 23°C) 封闭二到五小时。在非吸附性板 (Nunc#269620) 中,将 100pM 或 26pM [^{125}I]-抗原与系列稀释的目的 Fab 混合 (例如,与在 Presta 等人, Cancer Res. 57:4593-4599 (1997) 中抗 VEGF 抗体 Fab-12 的评价一致)。目的 Fab 随后温育过夜;然而,温育可以继续更长时间 (例如约 65 小时),以确保达到平衡。其后,将混合物转移至捕获板用于在室温温育 (例如一小时)。随后去除溶液并且将板用在 PBS 中的 0.1% 聚山梨醇酯 20 (**TWEEN-20**[®]) 洗涤八次。当板干燥后,加入 $150 \mu\text{l}$ /孔的闪烁剂 (MICROSCINT-20[™];Packard),并且将板在 TOPCOUNT[™] γ 计数器 (Packard) 上计数十分钟。选择给出小于或等于 20% 最大结合的每种 Fab 的浓度,用于在竞争结合测定法中使用。

[0215] 根据一些实施方案,Kd 使用 **BIACORE**[®] 表面等离子体共振测定法测量。例如,在 25°C 使用 **BIACORE**[®]-2000 或 **BIACORE**[®]-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 实施的测定法,其中以 ~ 10 反应单位 (RU) 使用固定化抗原 CM5 芯片。在一些实施方案中,根据供应商的说明书,用 N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片 (CM5, BIAcore, Inc.)。将抗原用 10mM 乙酸钠, pH 4.8 稀释至 $5 \mu\text{g/ml}$ ($\sim 0.2 \mu\text{M}$),之后以 $5 \mu\text{l}/\text{分钟}$ 的流速注射,以实现约 10 反应单位 (RU) 的偶联蛋白质。在抗原注射后,注射 1M 乙醇胺以封闭未反应的基团。对于动力学测量,在 25°C 以约 $25 \mu\text{l}/\text{分钟}$ 的流速注射在具有 0.05% 聚山梨醇酯 20 (TWEEN-20[™]) 表面活性剂的 PBS (PBST) 中两倍系列稀释的 Fab (0.78nM - 500nM)。通过同时拟合结合和解离传感图,使用简单的一对一兰米尔结合模型 (**BIACORE**[®] Evaluation Software 版本 3.2),计算结合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。平衡解离常数 (Kd) 计算为 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 比值。参见,例如,Chen 等, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)。如果通过上文表面等离子体共振测定法结合速率超过 $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$,则结合速率可以通过使用荧光猝灭技术进行测定,所述荧光猝灭技术测量在递增浓度的抗原的存在下在 25°C 在 PBS, pH 7.2 中 20nM 抗-抗原抗体 (Fab 形式) 的荧光发射强度 (激发 = 295nm; 发射 =

340nm, 16nm 带通) 的增加或降低, 其中测量可以使用例如分光光度计, 例如配备停流的分光光度计 (Aviv Instruments) 或具有搅拌比色杯的 8000 系列 SLM-AMINCO™ 分光光度计 (ThermoSpectronic)。

[0216] 2. 抗体片段

[0217] 在特定实施方案中, 本文提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括但不限于 Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv 和 scFv 片段及下文描述的其他片段。关于一些抗体片段的综述, 参见 HUDSON 等 NAT. MED. 9:129-134(2003)。关于 scFv 片段的综述, 参见例如, Pluckthün, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315(1994); 也参见 WO 93/16185; 和 U. S. Patent Nos. 5, 571, 894 和 5, 587, 458。关于包含补救受体结合表位残基且具有增加的体内半衰期的 Fab 和 F(ab')₂ 片段的讨论, 参见美国专利号 5, 869, 046。

[0218] 双抗体 (diabody) 是具有两个抗原结合位点的抗体片段, 其可以是二价或双特异性的。参见例如, EP 404, 097; WO 1993/01161; HUDSON 等, NAT. MED. 9:129-134(2003); 和 HOLLINGER 等, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 90:6444-6448(1993)。三抗体 (triabody) 和四抗体 (tetrabody) 也在 Hudson 等人 NAT. MED. 9:129-134(2003) 中描述。

[0219] 单结构域抗体是包含抗体的重链可变结构域的全部或部分或者轻链可变结构域的全部或部分的抗体片段。在特定实施方案中, 单结构域抗体是人单结构域抗体 (Domantis, Inc., Waltham, MA; 参见例如美国专利号 6, 248, 516B1)。

[0220] 抗体片段可以通过多种技术进行制备, 包括但不限于, 完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞 (例如大肠杆菌或噬菌体) 产生, 如本文描述的。

[0221] 3. 嵌合和人源化抗体

[0222] 在特定实施方案中, 本文提供的抗体是嵌合抗体。特定嵌合抗体例如在 U. S. PATENT NO. 4, 816, 567; 和 MORRISON 等, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 81:6851-6855(1984) 中描述。在一个例子中, 嵌合抗体包含非人可变区 (例如衍生自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物例如猴的可变区) 和人恒定区。在进一步例子中, 嵌合抗体是“类别转换的”抗体, 其中类或亚类已相对于亲本抗体发生改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0223] 在特定实施方案中, 嵌合抗体是人源化抗体。一般地, 将非人抗体人源化, 以减少对人的免疫原性, 同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。一般地, 人源化抗体包含一个或多个可变结构域, 其中 HVRs 例如 CDRs (或其部分) 衍生自非人抗体, 并且 FRs (或其部分) 衍生自人抗体序列。人源化抗体任选地还可以包含人恒定区的至少部分。在一些实施方案中, 在人源化抗体中的一些 FR 残基被置换为来自非人抗体 (例如 HVR 残基所源自的抗体) 的相应残基, 例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0224] 人源化抗体和制备其的方法例如在 ALMAGRO AND FRANSSON, FRONT. BIOSCI. 13:1619-1633(2008) 中综述, 并且例如在下述文献中进一步描述: RIECHMANN 等, NATURE 332:323-329(1988); QUEEN 等, PROC. NAT' L ACAD. SCI. USA 86:10029-10033(1989); 美国专利号 5, 821, 337, 7, 527, 791, 6, 982, 321, 和 7, 087, 409; KASHMIRI 等, METHODS 36:25-34(2005) (描述特异性决定区 (SDR) 嫁接); PADLAN, MOL. IMMUNOL. 28:489-498(1991) (描述“表面重建” (resurfacing)); DALL' ACQUA 等, METHODS

36:43-60(2005) (描述“FR改组”);和 OSBOURN 等, METHODS 36:61-68(2005) 和 KLIMKA 等, BR. J. CANCER, 83:252-260(2000) (描述“引导选择”方法到 FR 改组)。

[0225] 可以用于人源化的人构架区包括但不限于:使用“最佳配合”法选择的构架区(参见,例如, SIMS 等 J. IMMUNOL. 151:2296(1993));衍生自特定亚组的轻或重链可变区的人抗体共有序列的构架区(参见,例如, CARTER 等 PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 89:4285(1992);和 PRESTA 等 J. IMMUNOL., 151:2623(1993));人成熟(体细胞成熟的)构架区或人种系构架区(参见,例如, ALMAGRO 和 FRANSSON, FRONT. BIOSCI. 13:1619-1633(2008));和自筛选 FR 文库得到的构架区(参见,例如, BACA 等, J. BIOL. CHEM. 272:10678-10684(1997) 和 ROSOK 等, J. BIOL. CHEM. 271:22611-22618(1996))。

[0226] 4. 人抗体

[0227] 在特定实施方案中,本文提供的抗体是人抗体。人抗体可以使用本领域已知的多种技术产生。人抗体一般描述于 VAN DIJK 和 VAN DE WINKEL, CURR. OPIN. PHARMACOL. 5:368-74(2001) 和 LONBERG, CURR. OPIN. IMMUNOL. 20:450-459(2008)。

[0228] 人抗体可以通过给转基因动物施用免疫原进行制备,所述转基因动物已经修饰为响应抗原攻击而产生完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。此类动物一般含有全部或部分的人免疫球蛋白基因座,其替换内源免疫球蛋白基因座、或在染色体外存在或随机整合到动物的染色体。在此类转基因小鼠中,内源免疫球蛋白基因座一般已灭活。关于用于从转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见 LONBERG, NAT. BIOTECH. 23:1117-1125(2005)。还参见例如描述 XENOMOUSE™技术的美国专利号 6,075,181 和 6,150,584;描述 **HUMAB®**技术的美国专利号 5,770,429;描述 K-M **MOUSE®**技术的美国专利号 7,041,870,和描述 **VELOCIMOUSE®**技术的美国专利申请公开号 US 2007/0061900)。来自此类动物生成的完整抗体的人可变区可以进一步修饰,例如与不同人恒定区组合。

[0229] 人抗体还可以通过基于杂交瘤的方法进行制备。用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤细胞系已得到描述。(参见,例如, Kozbor J. Immunol., 133:3001(1984);Brodeur 等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987);和 Boerner 等, J. Immunol., 147:86(1991).) 经由人 B 细胞杂交瘤技术生成的人抗体也在 Li 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562(2006) 中描述。其它方法包括例如描述于美国专利号 7,189,826(描述了从杂交瘤细胞系中产生单克隆人 IgM 抗体)和 Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268(2006)(描述了人-人杂交瘤)中的那些方法。人杂交瘤技术(三源杂交瘤技术(trioma technology))还描述于 VOLLMERS 和 BRANDLEIN, HISTOLOGY and HISTOPATHOLOGY, 20(3):927-937(2005) 和 VOLLMERS 和 BRANDLEIN, METHODS and FINDINGS IN EXPERIMENTAL and CLINICAL PHARMACOLOGY, 27(3):185-91(2005)。

[0230] 人抗体还可以通过分离从人衍生的噬菌体展示文库选择的 Fv 克隆可变结构域序列而生成。此类可变结构域序列随后可以与所需人恒定结构域组合。用于从抗体文库中选择人抗体的技术在下文描述。

[0231] 5. 文库衍生的抗体

[0232] 本文所述抗体可以通过在组合文库中筛选具有一种或多种期望活性的抗体进行

分离。例如,本领域已知多种方法可以用于生成噬菌体展示文库且在此类文库中筛选具有所需结合特征的抗体。此类方法综述在例如 HOOGENBOOM 等, METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY 178:1-37 (O' BRIEN 等, ED., HUMAN PRESS, TOTOWA, NJ, 2001) 中, 并进一步描述在例如 THE MCCAFFERTY 等, NATURE 348:552-554 ; CLACKSON 等, NATURE 352:624-628 (1991) ; MARKS 等, J. MOL. BIOL. 222:581-597 (1992) ; MARKS 和 BRADBURY, METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY 248:161-175 (LO, ED., HUMAN PRESS, TOTOWA, NJ, 2003) ; SIDHU 等, J. MOL. BIOL. 338(2):299-310 (2004) ; LEE 等, J. MOL. BIOL. 340(5):1073-1093 (2004) ; FELLOUSE, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 101(34):12467-12472 (2004) ; 和 LEE 等, J. IMMUNOL. METHODS 284(1-2):119-132 (2004) 中。

[0233] 在特定噬菌体展示方法中, VH 和 VL 基因库通过聚合酶链反应 (PCR) 分开克隆, 且随机重组在噬菌体文库中, 随后可以如 Winter 等人, Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994) 中所述在所述噬菌体文库中筛选抗原结合性噬菌体。噬菌体一般以单链 Fv (scFv) 片段的形式或以 Fab 片段的形式展示抗体片段。来自经免疫的来源的文库提供了针对免疫原的高亲和力抗体, 无需构建杂交瘤。可替代地, 可以克隆 (例如从人中) 幼稚库 (naïve repertoire), 不经任何免疫接种, 以提供针对广泛的非自身以及自身抗原的单个抗体来源, 如通过 Griffiths 等, EMBO J, 12:725-734 (1993) 描述的。最后, 幼稚文库还可以通过下述方式合成地制备: 从干细胞中克隆未重排的 V 基因区段, 且使用含有随机序列的 PCR 引物以编码高可变 CDR3 区, 在体外实现重排, 如通过 Hoogenboom 和 Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992) 描述的。描述人抗体噬菌体文库的专利出版物包括, 例如: 美国专利号 5, 750, 373, 和美国专利公布号 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, 和 2009/0002360。

[0234] 从人抗体文库中分离的抗体或抗体片段在本文中被视为人抗体或人抗体片段。

[0235] 6. 多特异性抗体

[0236] 在特定实施方案中, 本文提供的抗体是多特异性抗体, 例如双特异性抗体。多特异性抗体是具有针对至少两个不同位点的结合特异性的单克隆抗体。在特定实施方案中, 结合特异性之一针对 IL-4, 并且另一个针对任何其他抗原。在特定实施方案中, 结合特异性之一针对 IL-4, 并且另一个针对 IL-13。在特定实施方案中, 双特异性抗体可以与 IL-4 的两个不同表位结合。双特异性抗体还可以用于将细胞毒素剂定位至细胞。双特异性抗体可以制备为全长抗体或抗体片段。

[0237] 用于制备多特异性抗体的技术包括但不限于, 具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达 (参见 Milstein 和 Cuello, Nature 305:537 (1983)), WO 93/08829, 和 Traunecker 等, EMBO J. 10:3655 (1991))、和“杵进臼 (knob-in-hole)”工程 (参见, 例如, 美国专利号 5, 731, 168 ; 美国申请公布号 2011/0287009)。多特异性抗体还可以通过下述进行制备: 改造静电转向效应 (electrostatic steering effects) 用于制备抗体 Fc- 异二聚体分子 (WO 2009/089004A1) ; 交联两种或更多种抗体或片段 (参见, 例如, 美国专利号 4, 676, 980, 和 BRENNAN 等, SCIENCE, 229:81 (1985)) ; 使用亮氨酸拉链以产生双特异性抗体 (参见, 例如, KOSTELNY 等, J. IMMUNOL., 148(5):1547-1553 (1992)) ; 在单个 VH/VL 单位中在 CL 结构域和 VH 结构域之间使用弗林 (furin) 可切割拴链 (参见, 例如, 国际专利申请号 PCT/US2012/059810) ; 使用“双抗体”技术用于制备双特异性抗体片

段（参见，例如，HOLLINGER 等，PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 90:6444-6448(1993)）；使用单链 Fv (sFv) 二聚体（参见，例如 GRUBER 等，J. IMMUNOL., 152:5368(1994)）；和制备三特异性抗体，如例如 TUTT 等 J. IMMUNOL. 147:60(1991) 中所述的。

[0238] 具有三个或更多个功能性抗原结合位点的改造抗体，包括章鱼抗体（“Octopus antibodies”），也包括在本文中（参见，例如 US 2006/0025576A1）。

[0239] 本文的抗体或片段还包括包含抗原结合位点的“双重作用 Fab”或“DAF”，其中所述抗原结合位点与 IL-4 以及另一不同抗原例如 IL-13 结合（参见例如 US 2008/0069820）。

[0240] 杵进臼

[0241] 在例如美国专利号 5, 731, 168, WO2009/089004, US2009/0182127, US2011/0287009, MARVIN 和 ZHU, ACTA PHARMACOL. SIN. (2005) 26(6):649-658, 和 KONTERMANN(2005) ACTA PHARMACOL. SIN., 26:1-9 中，描述了将杵进臼用作产生多特异性抗体的方法。以下提供简要的非限制性讨论。

[0242] “突起”指从第一多肽表面突出的至少一个氨基酸侧链，由此该氨基酸侧链可以置入相邻界面（即，第二多肽的界面）的互补腔中，例如以稳定该异二聚体，并由此相比同二聚体形成更利于异二聚体形成。突起可以存在于原始界面中，或可以通过合成引入（例如通过改变编码界面的核酸）。在一些实施方案中，编码第一多肽的界面的核酸被改变以编码突起。为此，将编码第一多肽界面中至少一个“原始”氨基酸残基的核酸替换为编码至少一个“输入”氨基酸残基的核酸，其中所述输入氨基酸残基比原始氨基酸残基具有更大的侧链体积。可以明了，可以存在一个以上原始和相应的输入残基。各种氨基酸残基的侧链体积显示在例如 US2011/0287009 的表 1 中。

[0243] 一些实施方案中，用于形成突起的输入残基是选自精氨酸 (R)，苯丙氨酸 (F)，酪氨酸 (Y) 和色氨酸 (W) 的天然氨基酸残基。一些实施方案中，输入残基是色氨酸或酪氨酸。一些实施方案中，用于形成突起的原始残基具有小侧链体积，例如丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸或缬氨酸。

[0244] “腔”指自第二多肽界面凹入并由此可以容纳相邻第一多肽界面上的相应突起的至少一个氨基酸侧链。腔可以存在于原始界面中，或可以通过合成引入（例如通过改变编码界面的核酸）。在一些实施方案中，编码第二多肽的界面的核酸被改变以编码腔。为此，将编码第二多肽界面中至少一个“原始”氨基酸残基的核酸替换为编码至少一个“输入”氨基酸残基的 DNA，其中所述输入氨基酸残基比原始氨基酸残基具有较小的侧链体积。可以明了，可以存在一个以上原始和相应的输入残基。一些实施方案中，用于形成腔的输入残基是选自丙氨酸 (A)，丝氨酸 (S)，苏氨酸 (T) 和缬氨酸 (V) 的天然氨基酸残基。一些实施方案中，输入残基是丝氨酸、丙氨酸或苏氨酸。一些实施方案中，用于形成腔的原始残基具有大侧链体积，例如酪氨酸、精氨酸、苯丙氨酸或色氨酸。

[0245] 突起“可以置入”腔中，意指突起和腔分别位于第一多肽和第二多肽界面上的空间位置以及突起和腔的大小使得该突起可以位于腔中而不显著地干扰第一多肽和第二多肽在该界面的正常相关性 (association)。由于突起例如 Tyr, Phe 和 Trp 典型地不从界面轴垂直地伸出和具有优选的构象，因此突起与相应腔的对齐可以，在一些情况下，依赖于基于三维结构（例如通过 X 射线晶体学或核磁共振 (NMR) 获得的三维结构）模建该突起 / 腔对。这可以使用本领域中广泛接受的技术实现。

[0246] 一些实施方案中, 桦突变在 IgG1 恒定区中是 T366W。一些实施方案中, 白突变在 IgG1 恒定区中包含选自 T366S, L368A 和 Y407V 的一个或多个突变。一些实施方案中, 白突变在 IgG1 恒定区中包含 T366S, L368A 和 Y407V。SEQ ID NO:34 显示具有桦突变的示例性 IgG1 恒定区, SEQ ID NO:35 显示具有白突变的示例性 IgG1 恒定区。

[0247] 一些实施方案中, 桦突变在 IgG4 恒定区中是 T366W。一些实施方案中, 白突变在 IgG4 恒定区中包含选自 T366S, L368A 和 Y407V 的一个或多个突变。一些实施方案中, 白突变在 IgG4 恒定区中包含 T366S, L368A 和 Y407V。SEQ ID NO:36 显示具有桦突变的示例性 IgG4 恒定区, SEQ ID NO:37 显示具有白突变的示例性 IgG4 恒定区。

[0248] 7. 抗体变体

[0249] 在特定实施方案中, 考虑本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如, 可能期望改善抗体的结合亲和力和 / 或其他生物性质。抗体的氨基酸序列变体可以通过将合适修饰引入编码抗体的核苷酸序列内、或通过肽合成, 进行制备。此类修饰包括例如在抗体的氨基酸序列内的残基的缺失、和 / 或插入和 / 或置换。可以制备缺失、插入和置换的任何组合, 以达到最终构建体, 条件是最终构建体具有所需特征, 例如抗原结合。

[0250] 置换、插入和缺失变体

[0251] 在特定实施方案中, 提供了具有一个或多个氨基酸置换的抗体变体。用于置换诱变的目的位点包括 HVRs 和 FRs。保守置换显示于表 1 中标题“保守置换”下。更实质性的变化在表 1 中标题“示例性置换”下提供, 并且在下文参考氨基酸侧链种类进一步描述。可以将氨基酸置换引入目的抗体内且就所需活性筛选产物, 例如保留 / 改善的抗原结合、减少的免疫原性或改善的 ADCC 或 CDC。

[0252] 表 1

[0253]

原始残基	示例替代	保守替代
Ala(A)	Val ;Leu ;Ile	Val
Arg(R)	Lys ;Gln ;Asn	Lys
Asn(N)	Gln ;His ;Asp, Lys ;Arg	Gln
Asp(D)	Glu ;Asn	Glu
Cys(C)	Ser ;Ala	Ser
Gln(Q)	Asn ;Glu	Asn
Glu(E)	Asp ;Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn ;Gln ;Lys ;Arg	Arg

Ile (I)	Leu ;Val ;Met ;Ala ;Phe ;正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸 ;Ile ;Val ;Met ;Ala ;Phe	Ile
Lys (K)	Arg ;Gln ;Asn	Arg
Met (M)	Leu ;Phe ;Ile	Leu
Phe (F)	Trp ;Leu ;Val ;Ile ;Ala ;Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val ;Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ;Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp ;Phe ;Thr ;Ser	Phe
Val (V)	Ile ;Leu ;Met ;Phe ;Ala ;正亮氨酸	Leu

[0254] 氨基酸可以根据共同侧链性质进行分组：

[0255] (1) 疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0256] (2) 中性亲水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0257] (3) 酸性：Asp、Glu；

[0258] (4) 碱性：His、Lys、Arg；

[0259] (5) 影响链方向的残基：Gly、Pro；

[0260] (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

[0261] 非保守置换造成这些类型之一的成员交换为另一类型的成员。

[0262] 一类置换变体涉及置换亲本抗体（例如人源化或人抗体）的一个或多个高变区残基。一般地，选择用于进一步研究的所得变体将相对于亲本抗体在特定生物性质（例如增加的亲和力、减少的免疫原性）上具有修饰（例如改善）、和/或基本上保留了亲本抗体的特定生物性质。示例性置换变体是亲和力成熟抗体，其可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术，例如本文描述的，方便地生成。简言之，使一个或多个 HVR 残基突变，并且将变体抗体展示在噬菌体上且筛选特定生物活性（例如结合亲和力）。

[0263] 可以在 HVRs 中作出改变（例如置换），例如以改善抗体亲和力。此类改变可以在 HVR “热点”（即，由在体细胞成熟过程中高频率经历突变的密码子编码的残基）（参见例如 Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)）、和/或 SDRs (a-CDRs) 中作出，测试所得到的变体 VH 或 VL 的结合亲和力。通过构建二级文库且从中再选择而进行的亲和力成熟，已例如描述在 HOOGENBOOM 等, *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY* 178:1-37 (O' BRIEN 等, ED., HUMAN PRESS, TOTOWA, NJ, (2001).) 中。在亲和力成熟的一些实施方案中，可以通过多种方法（例如易错 PCR、链改组、或寡核苷酸定向诱变）中的任何，将多样性引入选择用

于成熟的可变基因内。随后制备二级文库。随后筛选文库以鉴定具有所需亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及 HVR 指导的方法,其中几个 HVR 残基(例如一次 4-6 个残基)被随机化。参与抗原结合的 HVR 残基可以例如使用丙氨酸扫描诱变或建模,特别鉴定。特别常靶向 CDR-H3 和 CDR-L3。

[0264] 在特定实施方案中,置换、插入或缺失可以在一个或多个 HVRs 内发生,只要此类改变基本上不减少抗体结合抗原的能力即可。例如,可以在 HVRs 中进行基本上不减少结合亲和力的保守改变(例如如本文提供的保守置换)。此类改变可以在 HVR “热点”或 SDRs 外。在上文提供的变体 VH 和 VL 序列的特定实施方案中,每个 HVR 或者是未改变的、或者含有不超过一个、两个或三个氨基酸置换。

[0265] 用于鉴定可以作为靶标进行诱变的抗体残基或区域的一个有用方法称为“丙氨酸扫描诱变”,如通过 Cunningham 和 Wells (1989) Science, 244: 1081-1085 描述的。在此方法中,鉴定残基或靶标残基组(例如荷电残基例如 arg、asp、his、lys 和 glu),并且替换为中性或带负电荷的氨基酸(例如丙氨酸或聚丙氨酸),以确定抗体与抗原的相互作用是否受影响。可以在对该最初置换显示出功能性敏感的氨基酸位置上引入进一步的置换。可替代地或另外地,可以利用抗原-抗体复合物的晶体结构,鉴定在抗体和抗原之间的接触点。此类接触残基和邻近残基可以作为用于置换的候选物被靶向或消除。可以筛选变体,以确定它们是否含有所需性质。

[0266] 氨基酸序列插入包括氨基和/或羧基末端融合(长度范围从一个残基到含有一百个或更多个残基的多肽)、以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有 N 末端甲硫氨酰残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的 N 或 C 末端与酶(例如对于 ADEPT)或增加抗体血清半衰期的多肽的融合。

[0267] 糖基化变体

[0268] 在特定实施方案中,改变本文提供的抗体,以增加或减少抗体糖基化的程度。糖基化位点向抗体的添加或缺失可以通过改变氨基酸序列从而产生或去除一个或多个糖基化位点,而方便地完成。

[0269] 当抗体包含 Fc 区时,可以改变与之附着的碳水化合物。通过哺乳动物细胞产生的天然抗体一般包含分支的、二天线型的寡糖,其一般通过 N 连接附着于 Fc 区的 CH2 结构域的 Asn297。参见,例如, Wright 等 TIBTECH 15:26-32 (1997)。寡糖可以包括各种碳水化合物,例如甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及附着在二天线型寡糖结构的“茎”中的 GlcNAc 上的岩藻糖。在一些实施方案中,可以在本文提供的抗体中进行寡糖的修饰,以便产生具有特定改善性质的抗体变体。

[0270] 在一些实施方案中,提供了具有缺乏(直接或间接)附着在 Fc 区上的岩藻糖的碳水化合物结构的抗体变体。例如,此类抗体中的岩藻糖量可以是 1% -80%、1% -65%、5% -65% 或 20% -40%。如例如 WO 2008/077546 中所述的,如通过 MALDI-TOF 质谱法测量的,相对于与 Asn297 附着的所有糖结构(例如复杂的、杂合的和甘露糖的结构)的总和,通过计算在 Asn297 的糖链内岩藻糖的平均量,确定岩藻糖的量。Asn297 指位于 Fc 区的大约位置 297 上的天冬酰胺残基(Fc 区残基的 Eu 编号);然而,由于抗体中的微小序列变异,Asn297 也可以位于位置 297 的上游或下游的约 ±3 个氨基酸处,即位置 294 和 300 之间。此类岩藻糖基化变体可以具有改善的 ADCC 功能。参见,例如,美国专利公布号 US

2003/0157108(Presta, L.) ;US 2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。与“去岩藻糖化的”或“岩藻糖缺陷的”抗体变体有关的出版物的例子包括 :US 2003/0157108 ;WO 2000/61739 ;WO 2001/29246 ;US 2003/0115614 ;US 2002/0164328 ;US 2004/0093621 ;US 2004/0132140 ;US 2004/0110704 ;US 2004/0110282 ;US 2004/0109865 ;WO 2003/085119 ;WO 2003/084570 ;WO 2005/035586 ;WO 2005/035778 ;WO2005/053742 ;WO2002/031140 ;Okazaki 等 J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004) ;Yamane-Ohnuki 等 Biotech. Bioeng. 87:614(2004)。能够产生去岩藻糖基化的抗体的细胞系的例子包括具有蛋白质岩藻糖基化缺陷的 Lec13CHO 细胞 (RIPKA 等 ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 249:533-545(1986) ; US PAT APPL NO US 2003/0157108 A1, PRESTA, L ;和 WO 2004/056312 A1, ADAMS 等, 尤其是实施例 11), 和敲除细胞系, 例如 α -1, 6-岩藻糖基转移酶基因, FUT8, 敲除 CHO 细胞 (参见, 例如, YAMANE-OHNUKI 等 BIOTECH. BIOENG. 87:614(2004) ;KANDA, Y. 等, BIOTECHNOL. BIOENG., 94(4):680-688(2006) ;和 WO2003/085107)。

[0271] 进一步提供了具有平分型寡糖 (bisected oligosaccharide) 的抗体变体, 例如其中与抗体的 Fc 区附着的二天线寡糖通过 GlcNAc 平分。此类抗体变体可以具有减少的岩藻糖化和 / 或改善的 ADCC 功能。此类抗体变体的例子例如在 WO 2003/011878 (Jean-Mairet 等) ;美国专利号 6, 602, 684 (Umana 等) ;和 US 2005/0123546 (Umana 等) 中描述。还提供了在与 Fc 区附着的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体可以具有改善的 CDC 功能。此类抗体变体例如在 WO 1997/30087 (Patel 等) ;WO 1998/58964 (Raju, S.) ;和 WO 1999/22764 (Raju, S.) 中描述。

[0272] Fc 区变体

[0273] 在特定实施方案中, 一个或多个氨基酸修饰可以引入本文提供的抗体的 Fc 区内, 从而生成 Fc 区变体。Fc 区变体可以包括包含在一个或多个氨基酸位置上的氨基酸修饰 (例如置换) 的人 Fc 区序列 (例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4Fc 区)。

[0274] 在一些实施方案中, 抗体恒定区, 例如重链恒定区, 包含杆突变和 / 或臼突变以利于多特异性抗体形成。非限制性示例性杆突变和臼突变、和杆进臼技术一般地描述在例如, 美国专利号 5, 731, 168, WO2009/089004, US2009/0182127, US2011/0287009, Marvin 和 Zhu, Acta Pharmacol. Sin. (2005) 26 (6) :649-658, 和 Kontermann (2005) Acta Pharmacol. Sin., 26:1-9. 中。杆突变和臼突变的一些非限制性实例将本文中讨论。

[0275] 在特定实施方案中, 本发明提供具有有一些但并非所有效应子功能的抗体变体, 这使得其成为用于如下应用的期望候选物, 在所述应用中抗体在体内的半衰期是重要的, 而一些效应子功能 (例如补体和 ADCC) 是不需要的或有害的。可以进行体外和 / 或体内细胞毒性测定, 以证实 CDC 和 / 或 ADCC 活性的减少 / 耗竭。例如, 可以进行 Fc 受体 (FcR) 结合测定试验, 以确保抗体缺乏 Fc γ R 结合 (从而可能缺乏 ADCC 活性), 但保留 FcRn 结合能力。用于介导 ADCC 的主要细胞即 NK 细胞仅表达 Fc γ RIII, 而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。在造血细胞上的 FcR 表达概括在 Ravetch 和 Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492(1991) 的第 464 页表 3 中。评估目的分子的 ADCC 活性的体外测定试验的非限制性例子在美国专利号 5, 500, 362 中描述 (参见, 例如 Hellstrom, I. 等 Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 83:7059-7063(1986)) 和 Hellstrom, I 等, Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 82:1499-1502(1985) ;5, 821, 337 (参见 Bruggemann, M. 等, J. Exp.

Med. 166:1351-1361(1987))。可替代地,可以采用非放射性测定试验方法(参见例如,用于流式细胞术的 ACT1™非放射性细胞毒性测定试验(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA);和 **CytoTox 96®**非放射性细胞毒性测定试验(Promega, Madison, WI)。可以用于此类测定试验的效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可替代地或另外地,目的分子的 ADCC 活性可以在体内评估,例如在动物模型中,例如公开于 Clynes 等人 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656(1998) 中的。还可以执行 C1q 结合测定试验,以证实抗体不能结合 C1q 且因此缺乏 CDC 活性。参见,例如,WO 2006/029879 和 WO 2005/100402 中 C1q 和 C3c 结合 ELISA。为了评估补体激活,可以执行 CDC 测定试验(参见,例如, Gazzano-Santoro 等, J. Immunol. Methods 202:163(1996); Cragg, M. S. 等, Blood 101:1045-1052(2003); 和 Cragg, M. S. 和 M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743(2004))。FcRn 结合和体内清除率/半衰期确定还可以使用本领域已知的方法进行(参见,例如, Petkova, S. B. 等, Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769(2006))。

[0276] 具有减少的效应子功能的抗体包括具有 Fc 区残基 238、265、269、270、297、327 和 329 中的一个或多个的置换的那些(美国专利号 6,737,056)。此类 Fc 突变体包括在氨基酸位置 265、269、270、297 和 327 的两个或更多个上具有置换的 Fc 突变体,包括具有残基 265 和 297 至丙氨酸的置换的所谓“DANA”Fc 突变体(美国专利号 7,332,581)。

[0277] 描述了具有改善或减少的 FcRs 结合的特定抗体变体。(参见,例如,美国专利号 6,737,056;WO 2004/056312, 和 Shields 等, J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604(2001)。)

[0278] 在特定实施方案中,抗体变体包含具有改善 ADCC 的一个或多个氨基酸置换的 Fc 区,例如在 Fc 区的位置 298、333 和 / 或 334 上的置换(残基的 EU 编号)。

[0279] 在一些实施方案中,在 Fc 区中作出改变,以导致改变的(例如改善或减少的) C1q 结合和 / 或补体依赖性细胞毒性(CDC),例如美国专利号 6,194,551,WO 99/51642, 和 Idusogie 等 J. Immunol. 164:4178-4184(2000) 中所述的。

[0280] 在 US2005/0014934A1 (Hinton 等) 中描述了具有增加的半衰期和改善的新生儿 Fc 受体(FcRn)结合的抗体,所述新生儿 Fc 受体负责母源 IgGs 至胎儿的转移(Guyer 等, J. Immunol. 117:587(1976) 和 Kim 等, J. Immunol. 24:249(1994))。这些抗体包含其中具有一个或多个置换的 Fc 区,所述一个或多个置换改善 Fc 区与 FcRn 的结合。此类 Fc 变体包括在如下 Fc 区残基的一个或多个上具有置换的那些:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424 或 434,例如 Fc 区残基 434 的置换(美国专利号 7,371,826)。

[0281] 关于 Fc 区变体的其他例子,还参见 Duncan&Winter, Nature 322:738-40(1988);美国专利号 5,648,260;美国专利号 5,624,821;和 WO 94/29351。

[0282] 一些实施方案中,抗体恒定区包含本文讨论的一个以上突变(例如,杵和 / 或臼突变和 / 或增加稳定性的突变和 / 或减少 ADCC 的突变,等等)。

[0283] 半胱氨酸工程化抗体变体

[0284] 在特定实施方案中,可能期望制备半胱氨酸工程化抗体,例如“thioMAbs”,其中抗体的一个或多个残基由半胱氨酸残基置换。在特定实施方案中,被置换的残基位于抗体的可接近位点上。通过用半胱氨酸置换这些残基,从而将反应性巯基基团置于抗体的可接近位点上,这些巯基基团可以用于使抗体缀合至其他部分例如药物部分或接头-药物部分,

以产生免疫缀合物,如本文进一步描述的。在特定实施方案中,下述残基中的任何一个或多个可以由半胱氨酸残基置换:轻链的 V205(Kabat 编号);重链的 A118(EU 编号);和重链 Fc 区的 S400(EU 编号)。半胱氨酸工程化抗体可以如例如美国专利号 7,521,541 中所述生成。

[0285] 抗体衍生物

[0286] 在特定实施方案中,本文提供的抗体可以进一步被修饰,以含有本领域已知的且可容易获得的另外非蛋白质性部分。适于衍生化抗体的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(同聚物或随机共聚物)、和葡聚糖或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、propylene glycol 同聚物、环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛,由于其在水中的稳定性,可以在制造中具有优点。聚合物可以具有任何分子量,并且可以是分支或未分支的。附着至抗体的聚合物数目可以改变,并且如果附着超过一个聚合物,那么它们可以是相同或不同分子。一般而言,用于衍生化的聚合物的数目和/或类型可以基于如下考虑进行确定,所述考虑包括但不限于待改善的抗体的特定性质或功能,抗体衍生物是否用于在限定条件下的治疗中,等。

[0287] 在一些实施方案中,提供了抗体和可以通过暴露于辐射线而被选择性加热的非蛋白质性部分的缀合物。在一些实施方案中,非蛋白质性部分是碳纳米管(KAM 等,PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 102:11600-11605(2005))。辐射线可以具有任何波长,并且包括但不限于,这样的波长,所述波长不伤害普通细胞、但使非蛋白质性部分加热至可杀死抗体-非蛋白质性部分附近的细胞的温度。

[0288] 重组方法和组合物

[0289] 抗体可以使用重组方法和组合物进行生产,例如如美国专利号 4,816,567 中所述的。在一些实施方案中,提供了编码本文描述的抗 IL-4 抗体的分离核酸。在一些实施方案中,提供了编码本文描述的抗 IL-13 抗体的分离核酸。在一些实施方案中,提供了编码本文描述的抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体的分离核酸。此核酸可以编码包含抗体的 VL 的氨基酸序列和/或包含抗体的 VH 的氨基酸序列(例如抗体的轻和/或重链)。在一些实施方案中,提供了包含此核酸的一个或多个载体(例如表达载体)。在一些实施方案中,提供了包含此核酸的宿主细胞。在一个此实施方案中,宿主细胞包含(例如已转化了):(1) 包含编码含有抗体 VL 的氨基酸序列和含有抗体 VH 的氨基酸序列的核酸的载体,或(2) 包含编码含有抗体 VL 的氨基酸序列的核酸的第一载体、和包含编码含有抗体 VH 的氨基酸序列的核酸的第二载体。

[0290] 在一些实施方案中,宿主细胞是真核的,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如 Y0、NS0、Sp20 细胞)。在一些实施方案中,提供了制备抗体的方法,其中所述方法包括在适于抗体表达的条件下培养如上文提供的包含编码抗体的核酸的宿主细胞,且任选从宿主细胞(或宿主细胞培养基)中回收抗体。

[0291] 在一些实施方案中,提供了制备多特异性抗体的方法,其中所述方法包括在适于抗体表达的条件下培养包含编码多特异性抗体的核酸的宿主细胞,且任选从宿主细胞(或宿主细胞培养基)中回收多特异性抗体。在一些实施方案中,提供制备多特异性抗体的方

法,其中所述方法包括在适于第一 VH/VL 单位表达的条件下培养包含编码多特异性抗体的第一 VH/VL 单位(包括恒定区(如果有的话),有时称作“hemimer”或“半抗体”)的核酸的第一宿主细胞,且任选从宿主细胞(或宿主细胞培养基)中回收第一 VH/VL 单位;和在适于第二 VH/VL 单位表达的条件下培养包含编码多特异性抗体的第二 VH/VL 单位(包括恒定区(如果有的话))的核酸的第二宿主细胞,且任选从宿主细胞(或宿主细胞培养基)中回收第二 VH/VL 单位。在一些实施方案中,该方法还包括从分离的第一 VH/VL 单位和分离的第二 VH/VL 单位组装多特异性抗体。该组装可以包括,在一些实施方案中,氧化还原步骤以在两个 VH/VL 单位(或 hemimers)之间形成分子内二硫键。生产多特异性抗体的非限制性示例方法描述在例如 US 2011/0287009, US 2007/0196363, US2007/0178552, 美国专利号 5,731,168, WO 96/027011, WO 98/050431, 和 ZHU 等,1997, PROTEIN SCIENCE6:781-788 中。非限制性示例方法也描述在以下实施例中。

[0292] 对于抗 IL-4 抗体或抗 -IL-4/IL-13 双特异性抗体的重组生产,分离编码抗体,例如如上所述的抗体,的核酸,并且插入一个或多个载体内用于进一步克隆和/或在宿主细胞中表达。此核酸可以使用常规程序(例如通过使用能够与编码抗体重和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)容易地分离且测序。

[0293] 用于抗体编码载体的克隆或表达的合适宿主细胞包括本文描述的原核或真核细胞。例如,特别是当不需要糖基化和 Fc 效应子功能时,抗体可以在细菌中生产。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达,参见例如美国专利号 5,648,237, 5,789,199, 和 5,840,523。(还参见 CHARLTON, METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 248 (B. K. C. LO, ED., HUMANA PRESS, TOTOWA, NJ, 2003), PP. 245-254, 描述抗体片段在大肠杆菌中的表达)。在表达后,抗体可以在可溶级分中从细菌细胞糊分离且可以进一步纯化。

[0294] 除了原核生物外,真核微生物例如丝状真菌或酵母是用于抗体编码载体的合适克隆或表达宿主,包括其糖基化途径已被人源化的真菌和酵母菌株,这导致具有部分或全人糖基化模式的抗体生产。参见 Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414(2004), 和 Li 等, Nat. Biotech. 24:210-215(2006)。

[0295] 用于糖基化抗体表达的合适宿主细胞也可以源自多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已鉴定了众多杆状病毒株,其可以与昆虫细胞结合使用,特别用于草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞的转染。

[0296] 植物细胞培养物也可以用作宿主。参见,例如,美国专利号 5,959,177; 6,040,498; 6,420,548; 7,125,978; 和 6,417,429(描述用于在转基因植物中生产抗体的 PLANTIBODIES™ 技术)。

[0297] 脊椎动物细胞也可以用作宿主。例如,悬浮生长适应化的哺乳动物细胞系可以是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他例子是 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7);人胚肾系(如例如 Graham 等人, J. Gen. Virol. 36:59(1977) 中所述的 293 或 293 细胞);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠塞尔托利细胞(如例如 Mather, Biol. Reprod. 23:243-251(1980) 中所述的 TM4 细胞);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);Buffalo 大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳房肿瘤(MMT 060562);如例如 Mather 等人, Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68(1982) 中所述的 TRI 细胞;MRC 5 细胞;和 FS4 细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵

巢 (CHO) 细胞, 包括 DHFR CHO 细胞 (Urlaub 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)) ; 和骨髓瘤细胞系例如 Y0、NS0 和 Sp2/0。对于适合于抗体生产的一些哺乳动物宿主细胞系的综述, 参见例如, Yazaki 和 Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)。

[0298] 示例性测定法

[0299] 结合测定法及其他测定法

[0300] 在一些实施方案中, 可以就其抗原结合活性, 例如通过已知方法例如 ELISA、蛋白质印迹等, 测试本文提供的抗体。

[0301] 在一些实施方案中, 竞争测定法可以用于鉴定与本文所述 IL-4 抗体竞争结合 IL-4 的抗体。在一些实施方案中, 竞争测定法可以用于鉴定与本文所述 IL-4/IL-13 双特异性抗体竞争结合 IL-4 和 / 或 IL-13 的抗体。一些实施方案中, 此类竞争抗体与结合 IL-4 的抗体结合相同的表位 (例如线性或构象表位), 其中所述结合 IL-4 的抗体包含含有 SEQ ID NO:9 的 VH 氨基酸序列和含有 SEQ ID NO:10 的 VL 氨基酸序列。一些实施方案中, 此类竞争抗体与结合 IL-13 的抗体结合相同的表位 (例如线性或构象表位), 其中所述结合 IL-13 的抗体包含含有 SEQ ID NO:19 的 VH 氨基酸序列和含有 SEQ ID NO:20 的 VL 氨基酸序列。一些实施方案中, 此类竞争抗体与结合 IL-13 的抗体结合相同的表位 (例如线性或构象表位), 其中所述结合 IL-13 的抗体包含含有 SEQ ID NO:49 的 VH 氨基酸序列和含有 SEQ ID NO:48 的 VL 氨基酸序列。用于抗体所结合的表位的作图的详细示例性方法在 MORRIS (1996) “EPITOPE MAPPING PROTOCOLS, ”METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY VOL. 66 (HUMANA PRESS, TOTOWA, NJ) 中提供。

[0302] 在示例性竞争测定法中, 在溶液中温育固定化的 IL-4, 所述溶液包含与 IL-4 结合的第一标记的抗体 (例如, 包含含有 SEQ ID NO:9 的 VH 氨基酸序列和含有 SEQ ID NO:10 的 VL 氨基酸序列的抗体)、和待测试其与第一抗体竞争结合 IL-4 的能力的第二未标记的抗体。第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照, 在溶液中温育固定化的 IL-4, 所述溶液包含第一标记的抗体但不包含第二未标记的抗体。在允许第一抗体与 IL-4 结合的条件下温育后, 去除过量的未结合的抗体, 测量与固定化的 IL-4 结合的标记量。如果与固定的 IL-4 结合的标记量在测试样品中相对于在对照样品中有实质性的减少, 那么这指示第二抗体与第一抗体竞争结合 IL-4。参见 Harlow 和 Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

[0303] 在再一示例性竞争测定法中, 在溶液中温育固定化的 IL-13, 所述溶液包含与 IL-13 结合的第一标记的抗体 (例如, 包含含有 SEQ ID NO:19 的 VH 氨基酸序列和含有 SEQ ID NO:20 的 VL 氨基酸序列的抗体, 或包含含有 SEQ ID NO:49 的 VH 氨基酸序列和含有 SEQ ID NO:48 的 VL 氨基酸序列的抗体)、和待测试其与第一抗体竞争结合 IL-13 的能力的第二未标记的抗体。第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照, 在溶液中温育固定化的 IL-13, 所述溶液包含第一标记的抗体但不包含第二未标记的抗体。在允许第一抗体与 IL-13 结合的条件下温育后, 去除过量的未结合的抗体, 测量与固定化的 IL-13 结合的标记量。如果与固定的 IL-13 结合的标记量在测试样品中相对于在对照样品中有实质性的减少, 那么这指示第二抗体与第一抗体竞争结合 IL-13。

[0304] 活性测定法

[0305] 在一些实施方案中,提供了用于鉴定具有生物活性的抗 IL-4 抗体和抗 -IL-4/IL-13 双特异性抗体的测定法。生物活性可以包括,例如,抑制 IL-4 结合 IL-4 受体、抑制 IL-4- 诱导的 STAT6 磷酸化、抑制 IL-4 诱导的细胞增殖、抑制 IL-4- 诱导的 B 细胞向 IgE 的类型转换、在哮喘中的活性、和在 IPF 中的活性。在一些实施方案中,生物活性包括,例如,抑制 IL-13 结合 IL-13 受体(例如,包含 IL-4R α 和 IL-13R α 1 的异二聚体受体)、抑制 IL-13- 诱导的 STAT6 磷酸化、抑制 IL-13 诱导的细胞增殖、抑制 IL-13- 诱导的 B 细胞向 IgE 的类型转换、抑制 IL-13- 诱导的粘液产生、在哮喘中的活性、和在 IPF 中的活性。还提供了在体内和 / 或在体外具有此类生物活性的抗体。用于检测这些生物活性的非限制性示例测定法在本文描述和 / 或是本领域已知的。

[0306] 免疫缀合物

[0307] 在一些实施方案中,提供了包含与一或多个细胞毒性剂缀合的抗 IL-4 抗体或抗 -IL-4/IL-13 双特异性抗体的免疫缀合物。非限制性示例细胞毒性剂包括化学治疗剂或药物、生长抑制剂、毒素(例如蛋白质毒素,细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素,或其片段)、和放射性同位素。

[0308] 在一些实施方案中,免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中抗体缀合至一种或多种药物,包括但不限于类美登素(maytansinoid)(参见,例如,美国专利号 5,208,020,5,416,064 和欧洲专利 EP 0 425 235 B1);澳瑞他汀(auristatin)例如单甲基澳瑞他汀药物部分 DE 和 DF(MMAE 和 MMAF)(参见,例如,美国专利号 5,635,483 和 5,780,588, 和 7,498,298);多拉司他汀(dolastatin);加利车霉素(calicheamicin)或其衍生物(参见,例如,美国专利号 5,712,374,5,714,586,5,739,116,5,767,285,5,770,701,5,770,710,5,773,001, 和 5,877,296;HINMAN 等,CANCER RES. 53:3336-3342(1993);和 LODE 等,CANCER RES. 58:2925-2928(1998));蒽环类例如道诺霉素(daunomycin)或多柔比星(参见,例如,KRATZ 等,CURRENT MED. CHEM. 13:477-523(2006);JEFFREY 等,BIOORGANIC&MED. CHEM. LETTERS 16:358-362(2006);TORGOV 等,BIOCONJ. CHEM. 16:717-721(2005);NAGY 等,PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 97:829-834(2000);DUBOWCHIK 等,BIOORG. &MED. CHEM. LETTERS12:1529-1532(2002);KING 等,J. MED. CHEM. 45:4336-4343(2002);和美国专利号 6,630,579);氨甲蝶呤;长春地辛(vindesine);紫杉烷(taxane)例如多西他赛(docetaxel)、紫杉醇(paclitaxel)、larotaxel、tesetaxel 和 ortataxel;单端孢霉烯;和 CC1065。

[0309] 在一些实施方案中,免疫缀合物包含缀合至酶促活性毒素或其片段的如本文描述的抗体,所述酶促活性毒素或其片段包括但不限于白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链(来自铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa))、蓖麻毒蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、蒴莲根毒蛋白 A 链、 α -帚曲霉素、油桐(Aleurites fordii)蛋白质、香石竹毒蛋白、美洲商陆(Phytolaca americana)蛋白质(PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜(momordica charantia)抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(sapaonaria officinalis)抑制剂、多花白树毒蛋白、mitogellin、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢菌毒素类。

[0310] 在一些实施方案中,免疫缀合物包含缀合至放射性原子的如本文描述的抗体,以形成放射性缀合物。多种放射性同位素可用于放射性缀合物的产生。例子包括 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²和 Lu 的放射性同位素。当放射性缀合物用于检测

时,它可以包含用于闪烁研究的放射性原子,例如 ^{99m}Tc 或 ^{112}In ,或用于核磁共振 (NMR) 成像 (也称为磁共振成像, MRI) 的自旋标记,例如碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0311] 抗体和细胞毒素剂的缀合物可以使用多种双官能蛋白质偶联剂进行制备,例如 3-(2-吡啶二巯基)丙酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SPDP)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯 (SMCC)、亚氨基硫烷 (IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物 (例如二甲基己二酸酯 HCl)、活性酯 (例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛 (例如戊二醛)、双-叠氮基化合物 (例如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双-重氮~~基~~衍生物 (例如双(对重氮~~基~~苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯 (例如 2,6-二异氰酸甲苯酯)、和双-活性氟化合物 (例如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,蓖麻毒蛋白免疫毒素可以如 VITETTA 等, SCIENCE 238:1098(1987) 中所述进行制备。碳-14 标记的 1-异硫氰基苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于放射性核素与抗体缀合的示例性螯合剂。参见,例如, W094/11026。接头可以是促进细胞毒药物在细胞中释放的“可断裂接头”。例如,可以使用对酸敏感的接头、对肽酶敏感的接头、光敏接头、二甲基接头或含二硫键的接头 (CHARI 等, CANCER RES. 52:127-131(1992); 美国专利号 5,208,020)。

[0312] 免疫缀合物或 ADCs 在本文中明确考虑,但不限于,用交联接头试剂制备的此类缀合物,包括但不限于 BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC 和磺基-SMPB 和 SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基砜)苯甲酸酯),其是商购可得的(例如来自 Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)。

[0313] 用于诊断和检测的方法和组合物

[0314] 在特定实施方案中,本文提供的任何抗 IL-4 抗体可以用于检测生物样品中 IL-4 的存在。在特定实施方案中,本文提供的任何抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体可以用于检测生物样品中 IL-4 和 / 或 IL-13 的存在。如本文使用的术语“检测”涵盖定量或定性检测。在特定实施方案中,生物样品包括细胞或组织,例如血清、血浆、鼻拭子、支气管肺泡灌洗液、和痰。

[0315] 在一些实施方案中,提供了抗 IL-4 抗体用于在诊断或检测方法中使用。在进一步方面,提供了检测生物样品中 IL-4 的存在的方法。在特定实施方案中,该方法包括在允许抗 IL-4 抗体与 IL-4 结合的条件下,使生物样品与如本文描述的抗 IL-4 抗体接触,并且检测是否在抗 IL-4 抗体和 IL-4 之间形成复合物。此方法可以是体外或体内方法。在一些实施方案中,抗 IL-4 抗体用于选择如下疗法的合格受试者,所述疗法使用抗 IL-4 抗体或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体或任何其它 TH2 途径抑制剂来进行,例如,当 IL-4 是用于患者选择的生物标记时。

[0316] 在一些实施方案中,提供了抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体用于在诊断或检测方法中使用。在进一步方面,提供了检测生物样品中 IL-4 和 / 或 IL-13 的存在的方法。在一些实施方案中,该方法包括在允许抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体与 IL-4 和 / 或 IL-13 结合的条件下,使生物样品与如本文描述的抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体接触,并且检测是否在抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体和 IL-4 和 / 或 IL-13 之间形成复合物。此方法可以是体外或体

内方法。在一些实施方案中,抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体用于选择如下疗法的合格受试者,所述疗法使用抗 -IL-4/IL-13 双特异性抗体或任何其它 TH2 途径抑制剂来进行,例如,当 IL-4 和 / 或 IL-13 是用于患者选择的生物标记时。

[0317] 可以使用抗 IL-4 抗体或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体诊断的示例性病征在本文中提供。

[0318] 在特定实施方案中,提供了标记的抗 IL-4 抗体。在特定实施方案中,提供了标记的抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体。标记包括但不限于,可以直接检测的标记或部分(例如荧光、生色、电子致密、化学发光和放射性标记),以及可以间接(例如通过酶促反应或分子相互作用)检测的部分,例如酶或配体。示例性标记包括但不限于,放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{131}I , 荧光团例如稀土螯合物或荧光素及其衍生物,罗丹明及其衍生物,丹磺酰,伞形酮,萤光素酶例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶(美国专利号 4,737,456),萤光素,2,3-二氢酞嗪二酮,辣根过氧化物酶(HRP),碱性磷酸酶, β -半乳糖苷酶,葡糖淀粉酶,溶菌酶,糖氧化酶例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶,杂环氧化酶例如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶,与采用过氧化氢以氧化染料前体的酶例如 HRP、乳过氧化物酶或微过氧化物酶偶联,生物素 / 抗生物素蛋白,自旋标记,噬菌体标记,稳定自由基等。

[0319] 药物制剂

[0320] 可以制备如本文描述的抗 IL-4 抗体和 / 或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体的药物制剂,例如通过使具有所需纯度的抗体与一种或多种任选的药学可接受的载体(REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES 16TH EDITION, OSOL, A. ED. (1980)) 混合,以冻干制剂或水溶液形式制备。药学可接受的载体在采用的剂量和浓度下对接受者一般是无毒的,并且包括但不限于:缓冲剂例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八基二甲基苄基氯化铵;氯己双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯例如对羟基苯甲酸甲或丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约 10 个残基)多肽;蛋白质例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂例如 EDTA;糖例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子例如钠;金属络合物(例如 Zn-蛋白质络合物);和 / 或非离子型表面活性剂例如聚乙二醇(PEG)。示例性药学可接受的载体在本文中进一步包括间质(interstitial)药物分散剂例如可溶性中性-活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性 PH-20 透明质酸酶糖蛋白,例如 rHuPH20 (**HYLENEX®**, Baxter International, Inc.)。在美国专利出版号 2005/0260186 和 2006/0104968 中描述了某些示例性 sHASEGPs 和使用方法,包括 rHuPH20。在一些实施方案中,将 sHASEGP 与一种或多种另外的葡糖胺聚糖酶例如软骨素酶组合。

[0321] 示例性冻干抗体制剂在美国专利号 6,267,958 中描述。水性抗体制剂包括美国专利号 6,171,586 和 W02006/044908 中所述的那些,后面的制剂包括组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0322] 本文制剂还可以针对所治疗的特定适应症按照需要含有一种以上的活性成分,优选具有互补活性且不会不利地彼此影响的那些。例如,可能期望进一步与抗 IL-4 抗体和 / 或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体一起提供控制剂和 / 或 TH2 途径抑制剂。此类活性成分适于以对于预期目的有效的量组合存在。

[0323] 活性成分可以截留在例如通过凝聚技术 (coacervation) 或通过界面聚合制备的微囊中 (例如分别地羟甲基纤维素或明胶 - 微囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊)、在胶体药物递送系统 (例如脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米颗粒和纳米囊) 中、或在粗乳液中。此类技术公开于 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES 16TH EDITION, OSOL, A. ED. (1980) 中。

[0324] 可以制备持续释放的制剂。持续释放的制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质, 所述基质可以为成形物品例如薄膜或微胶囊的形式。

[0325] 待用于体内施用的制剂一般是无菌的。无菌性可以通过例如经由无菌过滤膜过滤而容易地达到。

[0326] 治疗方法和组合物

[0327] 本文提供的任何抗 IL-4 抗体均可以用于本文描述的治疗方法中。本文提供的任何抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体均可以用于本文描述的治疗方法中。

[0328] 在一些实施方案中, 提供了抗 IL-4 抗体和 / 或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体用作药物。在一些实施方案中, 提供了抗 IL-4 抗体和 / 或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体用于治疗哮喘、IPF、呼吸病症、嗜酸性粒细胞病症、IL-13 介导的病症、或 IL-4 介导的病症。在一些实施方案中, 提供了抗 IL-4 抗体和 / 或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体用于治疗患有如下病症的个体的方法中: 哮喘、呼吸病症、嗜酸性粒细胞病症、IL-13 介导的病症、或 IL-4 介导的病症, 所述方法包括向个体施用有效量的抗 IL-4 抗体或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体。在一些实施方案中, 所述方法还包括向个体施用有效量的至少一种其它的治疗剂, 例如如下述的其它治疗剂。

[0329] 根据上述任何实施方案的“个体”优选是人。

[0330] 在一些实施方案中, 提供了抗 IL-4 抗体和 / 或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体用于制备或生产药物的用途。一些实施方案中, 所述药物用于治疗哮喘、呼吸病症、嗜酸性粒细胞病症、IL-13 介导的病症、或 IL-4 介导的病症。在再一实施方案中, 药物用于治疗哮喘、IPF、呼吸病症、嗜酸性粒细胞病症、IL-13 介导的病症、或 IL-4 介导的病症的方法中, 所述方法包括向患有哮喘、呼吸病症、嗜酸性粒细胞病症、IL-13 介导的病症、或 IL-4 介导的病症的个体施用有效量的药物。在一个该实施方案中, 所述方法还包括向个体施用有效量的至少一种其它的治疗剂, 例如如下述的其它治疗剂。

[0331] 在一些实施方案中, 提供包含本文所述任何抗 IL-4 抗体和 / 或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体的药物制剂, 例如用于任何上述治疗方法中。在一些实施方案中, 提供包含本文所述任何抗 IL-4 抗体和 / 或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体和可药用载体的药物制剂。在一些实施方案中, 提供包含本文所述任何抗 IL-4 抗体和 / 或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体和至少一种其它治疗剂 (例如下文描述的其它治疗剂) 的药物制剂。

[0332] 本文提供的抗体可以单独或其它活性剂组合地在治疗中使用。例如, 本文提供的抗体可以与至少一种其它治疗剂共施用。在特定实施方案中, 其它治疗剂是 TH2 抑制剂。在一些实施方案中, 其它治疗剂是哮喘炎症的控制剂, 例如皮质类固醇、白三烯受体拮抗剂、LABAs、皮质类固醇 / LABA 联合组合物、茶碱 (theophylline)、色甘酸钠 (cromolyn sodium)、萘多罗米钠 (nedocromil sodium)、奥马珠单抗 (omalizumab)、LAMAs、MABA (例如

多功能毒蕈碱拮抗剂- β 2 激动剂)、5-脂加氧酶活化蛋白质 (FLAP) 抑制剂、或酶 PDE-4 抑制剂。

[0333] 上述组合治疗涵盖联合施用 (其中两个或更多个治疗剂包括在相同或分开的制剂中), 和分开施用, 在此情况下, 抗 IL-4 抗体和 / 或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体的施用可以在其它治疗剂 (一种或多种) 施用之前、同时和 / 或之后进行。在一些实施方案中, 抗 IL-4 抗体和 / 或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体的施用和其它治疗剂的施用可以发生在彼此的大约一个月内、或大约一、两或三周内、或大约一、二、三、四、五、或六天内。

[0334] 在一些实施方案中, 抗 IL-4 抗体和 / 或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体用于治疗癌症, 例如成胶质细胞瘤或非霍奇金淋巴瘤。在一些实施方案中, 本文提供的抗体可以与放射治疗联合使用。

[0335] 抗 IL-4 抗体和 / 或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体 (和任何其它治疗剂) 可以通过任何合适方法进行施用, 包括肠胃外、肺内和鼻内、和如果需要局部治疗的话, 损伤内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。给药可以通过任何合适途径, 例如通过注射, 例如静脉内或皮下注射 (部分取决于施用是短暂的还是长期的)。本文考虑各种给药方案, 包括但不限于, 单次或经过多个时间点的多次施用、快速浓注施用 (bolus administration) 和脉冲输注。

[0336] 抗 IL-4 抗体和 / 或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体将以符合良好医疗实践的方式配制, 给药和施用。在此考虑的因素包括待治疗的特定病症、待治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床状况、病症原因、活性剂递送部位、施用方法、施用时间安排和医学从业者已知的其他因素。抗体无需但可以任选地与目前用于预防或治疗所讨论的病症的一种或多种活性剂配制在一起。此类其他活性剂的有效量取决于存在于制剂中的抗体量、病症或治疗的类型、和上文讨论的其他因素。这些活性剂一般可以以与本文描述相同的剂量和施用途径使用, 或以本文描述的剂量的约 1-99% 使用, 或以经验 / 临床上确定为合适的任何剂量和任何途径使用。

[0337] 对于疾病预防或治疗, 抗 IL-4 抗体和 / 或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体的合适剂量 (当单独或与一种或多种其他的另外治疗剂组合使用时) 将取决于待治疗的疾病类型、抗体类型、疾病严重性和病程、抗体是施用用于预防还是治疗目的、先前疗法、患者的临床史和对抗体的应答、和主治医师的判断。本发明抗体适宜一次或经过一系列治疗而施用于患者。本领域技术人员可以基于疾病类型和严重度来确定抗体的合适剂量。抗 IL-13 抗体剂量的非限制性示例描述在例如 PCT 公布号 WO 2012/083132 中。抗体剂量的一般指导可以见于例如 BAI 等, CLINICAL PHARMACOKINETICS, 51:119-135 (2012) 和 DENG 等, EXPERT OPIN. DRUG METAB. TOXICOL. 8 (2):141-160 (2012)。抗体疗法的进展可以通过常规技术和测定法监控。

[0338] 应当理解, 可以使用免疫缀合物代替或加上抗 IL-4 抗体或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体, 实施上述任何制剂或治疗方法。

[0339] 制造品

[0340] 在一些实施方案中, 提供含有可以用于治疗、预防和 / 或诊断上述病症的材料的制造品。制造品可以包含容器和在容器上或与容器结合的标签或包装说明书。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器、IV 溶液袋等。容器可以由多种材料例如玻璃或塑料形成。容器

容纳单独或与对于治疗、预防和 / 或诊断所述状况有效的另外组合物组合的组合物,且可以具有无菌入口(例如容器可以是具有可被皮下注射针穿透的塞子的静脉溶液袋或小瓶)。组合物中至少一种活性剂是抗-IL-4 抗体和 / 或抗-IL-4/IL-13 双特异性抗体。标签或包装说明书指示组合物用于治疗所选择的状况。此外,制造品可以包含(a)含有组合物的第一容器,其中所述组合物包含抗-IL-4 抗体和 / 或抗-IL-4/IL-13 双特异性抗体;和(b)含有组合物的第二容器,其中所述组合物包含其它的细胞毒性剂或另外的治疗剂。在一些实施方案中,制造品可以进一步包含指示组合物可以用于治疗特定状况的包装说明书。可替代地或另外地,制造品可以进一步包括包含药学可接受的缓冲液的第二(或第三)容器,所述药学可接受的缓冲液例如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。它可以进一步包括从商业和用户观点来看希望的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、滤器、针头和注射器。

[0341] 应当理解,任何上述制成品可以包括替代抗 IL-4 抗体或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体的免疫缀合物,或可以除抗 IL-4 抗体或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体之外还包括免疫缀合物。

实施例

[0342] 以下是本发明方法和组合物的实例。应当理解,鉴于上文提供的一般描述,可以实施多种其他实施方案。

[0343] 实施例 1- 一些方法和试剂

[0344] 表面等离子体共振 (SPR) BIAcore 亲和力测量

[0345] 在 Biacore 3000 仪器 (GE Healthcare) 上,使用表面等离子体共振 (SPR),测量了抗 IL-4、抗 IL-13 和抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体的结合动力学。使用厂商提供的方案,通过基于胺的偶联,将抗人 Fc (GE Healthcare) 固定在 CM5 传感器芯片上。以 1200 共振单位 (RU) 的水平捕获抗体。

[0346] 测量了与浓度 0、3、13、6、25、12.50、25.0、和 50.0nM 的人 IL-4、食蟹猴 IL-4、人 IL-13、人 IL-13R130Q (SEQ ID NO:31)、和食蟹猴 IL-13 的双特异性结合。使用 2 分钟注射时间和 30 μ l/min 流速,在 25 $^{\circ}$ C 温度,以 10mM HEPES, pH 7.4, 150mM NaCl 和 0.005% Tween 20 的运行缓冲液,记录了细胞因子结合的传感图。注射后,在运行缓冲液中对细胞因子自抗体的解离进行了 1000 秒监测。在结合周期之间通过注射 60 μ l 的 3M 氯化镁,再生表面。在扣除仅含有运行缓冲液的空白对照后,使用 1:1 Langmuir 结合模型,利用厂商提供的软件,分析针对细胞因子与抗 IL-13/ 抗 IL-4 双特异性抗体的结合所观察到的传感图,以计算动力学和结合常数。

[0347] 表面等离子体共振 (SPR) BIAcore 结合竞争试验

[0348] 在 Biacore 3000 仪器 (GE Healthcare) 上,使用表面等离子体共振 (SPR),检测了抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体对人 IL-13 和人 IL-13R α 2 结合的抑制作用。使用厂商提供的方案,通过基于胺的偶联,将抗人 IL-13 固定在 CM5 传感器芯片上。在流动池 4 (FC4) 上以 985 共振单位 (RU) 的水平固定了 IL-13,并随后使用 1M 乙醇胺-HCl 封闭未反应的位点。FC3 用作测量的参照池,其通过活化和随后以乙醇胺封闭而预备。使用 2 分钟注射时间和 30 μ l/min 流速,在 25 $^{\circ}$ C 温度,以 10mM HEPES, pH 7.4, 150mM NaCl 和 0.005% Tween 20 的

运行缓冲液,记录了 IL-13R α 2(根据本领域标准方法制备和纯化的、带组氨酸标签的重组人 IL-13R α 2) 结合的传感图。为了确定 IL-13R α 2 与 IL-13 结合的结合常数,针对浓度从 12.5 至 200nM 变化(2 倍稀释)的一系列 IL-13R α 2 溶液,记录了传感图。注射后,在运行缓冲液中对受体自细胞因子的解离进行了 600 秒监测。在结合周期之间通过注射 60 μ l 的 10mM 甘氨酸-HCl pH 1.7,再生表面。

[0349] 为了评价在抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体存在下 IL-13R α 2 与 IL-13 的结合,加入一个额外步骤——注射 60 μ l 250nM 抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体,以评价在竞争性抗体存在下受体与细胞因子的结合。在扣除仅含有运行缓冲液的空白对照后,使用 1:1Langmuir 结合模型,利用厂商提供的软件,分析在竞争性抗体不存在和存在的情况下针对受体与细胞因子的结合所观察到的传感图,以计算动力学和结合常数。

[0350] ELISA 结合竞争试验

[0351] 为了确定抗体是否抑制 IL-4 与 IL-4 受体(IL-4R) 结合,使用了 ELISA 测定法。在 96 孔板中,将 150 μ g/mL(1000nM) 抗体溶液三倍系列稀释在测试缓冲液(磷酸盐缓冲盐水 [PBS], pH 7.5, 含有 0.05% Tween 20 和 0.5% 牛血清白蛋白 [BSA]) 中,以提供 0.0009, 0.003, 0.008, 0.02, 0.07, 0.21, 0.62, 1.9, 5.6, 16.7, 50.0, 和 150 μ g/mL(分别为, 0.0056, 0.017, 0.05, 0.15, 0.46, 1.37, 4.12, 12.3, 37, 111, 333, 和 1000nM)。每个稀释物的体积均为 35 μ L。向每个孔中加入 35 μ L 11.6ng/mL(780pM) 生物素化 IL4 溶液。室温孵育混合物 40 分钟。孵育后,将孔中的内容物转移到用 50 μ L 2.0 μ g/mL 可溶性 IL-4R 蛋白(R&D Systems, Cat. No. 230-4R/CF) 在 PBS 中的溶液包被过夜并用含有 1% BSA 的 PBS 封闭的 96 孔 Nunc Maxisorp 板(Roskilde, Denmark)。40 分钟孵育后,在洗涤缓冲液(含有 0.05% Tween20 的 1X PBS) 中洗涤板 5 次。然后每孔接受 50 μ L 链霉亲和素辣根过氧化物酶溶液(Caltag Laboratories, Invitrogen ;Carlsbad, CA), 孵育 40 分钟。用洗涤缓冲液洗涤 5 次后,向每孔加入 50 μ L 四甲基联苯胺(TMB) 底物(KPL ;Gaithersburg, MD)。几分钟后,加入 50 μ L 1N HCl 溶液以终止该反应。使用 Spectra Max 340 读板器(Molecular Devices ; Sunnyvale, CA) 在 450nm 读板。对于每个样品,相对于浓度,绘制 450nm 读取的光密度(OD) 图。在 Kaleidagraph(Synergy Software ;Reading, PA) 中绘制曲线并使用 4 参数拟合进行拟合或点到点绘图。

[0352] 为了确定是否抗体抑制 IL-13 与 IL-13R α 1 受体的结合,除了使用生物素化 IL-13R130Q(SEQ ID NO:31) 替代生物素化的 IL-4、和使用可溶性 IL-13R α 1-Fc 蛋白(R&D Systems, Cat. No. 146-IR-100) 替代可溶性 IL-4R-Fc,基本上如上述进行 ELISA 试验。

[0353] 为了确定是否抗体抑制 IL-13 与 IL-13R α 2 受体的结合,除了使用生物素化 IL-13 替代生物素化的 IL-4、和使用可溶性 IL-13R α 2-Fc 蛋白(R&D Systems, Cat. No. 614-IR-100) 替代可溶性 IL-4R-Fc,基本上如上述进行 ELISA 试验。

[0354] 质粒构建和抗体表达

[0355] 如前述(SIMMONS 等, 2002, J IMMUNOL METHODS 263, 133 - 147), 将抗体克隆到表达载体中。对于重链和轻链两者,在编码成熟抗体的序列之前为具有翻译起始强度 1 的 STII 信号序列。为了表达蛋白,30 $^{\circ}$ C 在 LB(100 μ g/ml 羧苄青霉素) 中生长在适宜的 W3110 衍生物(Reilly 和 Yansura, 2010, Antibody Engineering(Berlin, Heidelberg:Springer Berlin Heidelberg)) 中的过夜培养物,1:100 稀释到 CRAP 培养基(100 μ g/ml 羧苄青

霉素) 中并 30℃ 生长 24 小时。对于更大的制备, 在 10L 发酵罐中, 例如如前述 (SIMMONS 等, 2002, J IMMUNOL METHODS 263, 133 - 147), 生长培养物。

[0356] 对于非还原条件下 SDS-PAGE 分析, 收获 200 μ l 过夜培养物并重悬在 100 μ l NR- 裂解缓冲液 (88 μ l PopCulture Reagent (Novagen), 10 μ l 100mM 碘乙酰胺, 2 μ l lysonase 试剂 (EMD Biosciences)) 中。在室温温育 10 分钟后, 9300rcf 离心样品 2', 将 50 μ l 上清液转移到新鲜管中, 与相同体积的 2x SDS 样品缓冲液 (Invitrogen) 混合。在将 10 μ l 样品上样到 NuPAGE4-12% Bis-Tris/MES 凝胶 (Invitrogen) 上前, 95℃ 加热样品 5', 16000rcf 离心 1'。通过 iBlot (Invitrogen) 将凝胶转移到硝酸纤维素膜上, 用 IRDye800CW 缀合的抗人 IgG F(c) 抗体 (Rockland) 进行免疫印迹, 用 LiCOR Odyssey 成像仪成像。

[0357] 对于完全还原的细胞样品, 将细胞沉淀重悬在 R- 裂解缓冲液 (10 μ l 1M DTT, 88 μ l PopCulture Reagent (Novagen), 2 μ l lysonase) 中, 室温温育 10 分钟, 之后样品与 2x SDS 样品缓冲液混合。除了使用 IRDye800CW 缀合的抗人抗体 (Rockland) 用于免疫检测之外, 如前所述对 Western 印迹进行成像。

[0358] 双特异性抗体的纯化和组装

[0359] 使用 GEA 的 Niro-Soavi 匀浆器 (Bedford, NH, U. S. A), 匀浆大肠杆菌全细胞培养液。所得的匀浆物然后通过加入聚乙烯亚胺絮凝剂至终浓度 0.4% 而进行提取, 用纯化的水稀释并室温混合 16 小时。离心澄清提取物, 使用冷却至 15℃ 的 0.2 μ m 无菌过滤器过滤后, 上样至预平衡的 (25mM Tris, 25mM NaCl 5mM EDTA pH 7.1) 蛋白 A 柱上。用平衡缓冲液和 0.4M 磷酸钾 pH 7.0 洗涤柱子, 并最后用 100mM 乙酸 pH 2.9 洗脱。然后在组装反应中合并蛋白 A 池。

[0360] 分开的半抗体蛋白 A 池分别用 0.2M 精氨酸调理, 用 1.5M Tris 碱将 pH 调整至 pH 8.0, 合并, 以 200x 摩尔过量于双特异性抗体的量加入 L- 还原型谷胱甘肽 (GSH), 20℃ 温育 48 小时。温育后, 通过阴离子交换层析步骤和阳离子交换层析步骤, 纯化组装的双特异性抗体。浓缩阳离子交换洗脱物, 将缓冲液更换为最终制剂缓冲液。

[0361] 通过完整和还原的质谱分析对抗体进行分析性表征

[0362] 使用偶联 nano-Chip-LC 系统的 Agilent 6210ESI-TOF 质谱仪, 通过 LC/MS 分析, 获得双特异性抗体的还原的和完整的质量。经和不经之前 TCEP 还原的双特异性样品, 以每次注射大约 5ng 抗体的量, 通过 RP HPLC 脱盐用于直接线上 MS 分析。针对还原和非还原样品所得的质谱显示出了多重荷电蛋白离子的分布, 使用 MassHunter 工作站软件 / 定量分析 B. 03. 01 (AGILENT TECHNOLOGIES INC. 2009) 将该质谱解卷积至零电荷态。

[0363] 分析性大小排阻层析

[0364] 使用 TosoHaas TSK G3000SW_{XL} 柱 (7.8x 300mm), 分离大小变体, 用由 0.2M 磷酸钾和 0.25M 氯化钾 (pH 6.2) 组成的移动相进行等度洗脱。所述分离在室温以 0.5mL/min 流速进行。在 280nm 监控柱流出液。使用 Dionex Corporation 的 Chromeleon 软件 v6.80SR11, 获得高分子量物 (HMWS) (主峰) 和低分子量物 (LMWS) 的峰面积的相对百分数。

[0365] 毛细管电泳 - 十二烷基硫酸钠分析 (CE-SDS)

[0366] 首先用柠檬酸 - 磷酸缓冲液 pH 6.6 稀释双特异性样品, 用 SDS 和 N- 乙基马来酰亚胺 70℃ 处理 3 分钟。冷却后, 将样品在 50℃ 用 3-(2- 呋喃甲酰基) 喹啉 -2- 甲醛) (FQ) 在过量氰化钾存在下标记 10 分钟。通过缓冲液更换淬灭标记反应, 然后用 1% SDS 处理。

非还原样品在 70°C 加热 5 分钟。还原的样品用 50mM 二硫苏糖醇 (DTT) 在 70°C 处理 10 分钟。

[0367] 使用 Beckman PA 800CE 系统 (具有 50 μ m 直径、未包被的熔融石英毛细管 (fused silica capillary)), 通过 CE SDS 分析了非还原的和还原的样品。电动态地 (electrokinetically) (以 5kV, 40 秒) 注射样品, 并在 15kV 恒压以反向极性进行 35 分钟分离。毛细管温度维持在 40°C。通过 LIF 检测, 监测标记的成分的迁移; 在 488nm 激发, 在 600nm 监测发射。

[0368] 细胞培养 (TF-1 细胞)

[0369] 在增湿温育箱中以 37 °C 和 5 % CO₂ 将人 TF-1 (红白血病细胞, R&D Systems, Minneapolis, MN) 培养在包含 RPMI 1640 (GENENTECH MEDIA PREPARATION FACILITY, SOUTH SAN FRANCISCO, CA) 的生长培养基中, 其中所述生长培养基含有 10% 热灭活胎牛血清 (FBS) (目录号 SH30071.03, HYCLONE LABORATORIES, INC., LOGAN, UT); 以及 1X 青霉素: 链霉素: 谷氨酰胺 (目录号 10378-016, GIBCO INVITROGEN CORP., CARLSBAD, CA) 和 2ng/mL rhGM-CSF (目录号 215-GM, R&D SYSTEMS, MINNEAPOLIS, MN)。测试培养基是不含 2ng/mL rhGM-CSF 的生长培养基。将细胞因子以如下终浓度加入所述的测试培养基中: 0.2ng/ml 人 IL-4 (目录号 204-IL, R&D SYSTEMS, MINNEAPOLIS, MN), 10ng/ml 人 IL-13 (GENENTECH, SO. SAN FRANCISCO, CA), 10ng/ml 人 IL-13R130Q (GENENTECH, SO. SAN FRANCISCO, CA), 2ng/ml 食蟹猴 IL-4 (GENENTECH, SO. SAN FRANCISCO, CA), 和 20ng/ml 食蟹猴 IL-13 (GENENTECH, SO. SAN FRANCISCO, CA)。

[0370] 实施例 2- 产生结合 IL-4 的抗体

[0371] 使用商业可得人 IL-4 (R&D SYSTEMS, MINNEAPOLIS, MN), 产生了选择性结合人白介素-4 (IL-4) 的一组抗体。用 0.5 μ g IL-4 (重悬在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的单磷酸脂质 A 和海藻糖二棒分枝菌酸 (dicorynomycolate) (MPLTM+TDM) 基佐剂 (CORIXA, HAMILTON, MT) 中, 总共 25 μ l), 以 3 至 4 天间隔, 注射 5 只 BALB/c 小鼠的每个后脚垫。在 7 次加强后取血清样品, 通过酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 确定滴度, 以鉴定具有 IL-4 阳性免疫反应的小鼠。通过脚垫 (0.5 μ g 在 25 μ l 中 / 脚垫), 腹腔腔 (2 μ g 在 100 μ l 中), 和静脉内 (1 μ g 在 50 μ l 中) 途径, 使用在 PBS 中的佐剂, 再加强免疫小鼠两次。最后一次加强后三天, 处死表现出 ELISA 阳性血清滴度的动物, 并且使用电融合 (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD), 将脾细胞的单细胞悬浮液与小鼠骨髓瘤细胞系 P3X63Ag. U. 1 (美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA) 融合。使用次黄嘌呤-氨甲喋呤-胸苷 (HAT) 选择, 在来自 **ClonaCell®** 杂交瘤选择试剂盒 (StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada) 的培养基 D 中, 从未融合的脾、淋巴结或骨髓瘤细胞中, 选择出融合的杂交瘤细胞。将杂交瘤细胞培养在 **ClonaCell®** 杂交瘤选择试剂盒的培养基 E 中, 细胞培养物上清液用于进一步表征和筛选。为了筛选产生的 1921 个杂交瘤细胞系, 如前面所述 (BAKER, K. N., 等, TRENDS BIOTECHNOL. 20, 149 - 156 (2002)), 实施了酶联免疫吸附测定法 (ELISA)。

[0372] 我们鉴定了克隆 19C11, 其以 ≤ 10 pM 的亲合力结合人 IL-4 (通过表面等离子体共振 (SPR) 分析确定)。为了确定 19C11 是否阻断人 IL-4 与 IL-4R α 结合, 将生物素化的 IL-4 (0.17nM) 与 50 μ l 的来自克隆 19C11 的系列稀释 IgG 上清液 (1000, 200, 40, 8, 1.6, 和 0.32nM, 终浓度) 或对照抗体预先混合。在 30 分钟室温孵育后, 将混合物转移到含有固

定化的可溶性人 IL-4R α (R&D Systems, Minneapolis, MN) 的 Nunc Maxisorp 板中。为了固定化, 4 $^{\circ}$ C 在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中用 2 μ g/ml IL-4R α 包被板子过夜, 以固定可溶性人 IL-4R α 。用 200 μ L 稀释在 PBS 中的 0.5% 牛血清白蛋白 (SIGMA, ST. LOUIS, MO) 溶液封闭板子, 之后加入抗体 /IL-4。加入抗体 /IL-4 混合物后, 室温温育板子 60 分钟。温育后, 用含有 0.05% 聚山梨醇酯 20 (Sigma) 的 PBS 洗涤板子 3 次。将辣根过氧化物酶缀合的链霉亲和素 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 以 1:5000 稀释在测试缓冲液中, 向每孔中加入 100 μ L。30 分钟室温温育后, 如上所述洗涤板子。加入 100 μ L TMB 底物, 温育板子 5 至 15 分钟。通过加入 1N 磷酸终止反应。使用 Spectra Max 340 读板器 (Molecular Devices; Sunnyvale, CA) 在 OD450 读 ELISA 板。使用 Kaleidagraph 绘图软件 (Synergy Software, Reading, PA) 绘制曲线。

[0373] 为了确定 19C11 是否封闭 IL-4 诱导的 TF-1 细胞增殖, 将系列稀释的纯化 19C11 或无关对照抗体与 IL-4 及 TF-1 细胞一起孵育。48 小时孵育后, 每个样品接受 3 H- 胸苷, 并在 4 小时孵育后确定 3 H- 胸苷的掺入。

[0374] 19C11 阻断了生物素化 IL-4 与 IL-4R α 的结合 (图 1A), 提示 IL-4 上的表位与参与结合 IL-4R α 的区域重叠。19C11 也抑制了 IL-4- 诱导的 TF-1 细胞增殖 (图 1B)。对于阻断 IL-4 诱导的 TF-1 细胞增殖, IC₅₀ 经确定为 0.014 μ g/ml, 而 IC₉₀ 经确定为 0.07 μ g/ml (数据未显示)。随后通过将高变区嫁接到具有选择点突变的人 V κ -1/VHIII 受体构架中, 人源化 19C11。在人源化过程中保留了 19C11 的结合亲和力、表位、和细胞活性 (数据未显示)。

[0375] 实施例 3-19C11 的人源化

[0376] 将来自 mu19C11 的高变区 (HVRs) 嫁接入人 VL kappa I (huKI), VL kappa III (huKIII), VH 亚组 I (huVH1) 和 VH 亚组 III (huVHIII) 共有受体构架, 以产生 CDR 嫁接物 (19C11- κ 1 嫁接物, 19C11- κ 3 嫁接物, 19C11-VH1 嫁接物, 19C11-VH3 嫁接物) (见图 10 至 13)。在 VL 结构域中, 嫁接了如下区域: 位置 24-34 (HVRL1, SEQ ID NO:15), 50-56 (HVRL2, SEQ ID NO:16) 和 89-97 (HVRL3, SEQ ID NO:17)。在 VH 结构域中, 嫁接了位置 26-35b (HVRH1, SEQ ID NO:12), 49-65 (HVRH2, SEQ ID NO:13) 和 95-102 (HVRH3, SEQ ID NO:14)。

[0377] 使用针对各高变区的分开寡核苷酸, 通过 Kunkel 诱变, 作为 IgG 表达构建体, 产生了这些 19C11- 嫁接物。通过 DNA 测序, 鉴定了正确克隆。为了潜在地加强 19C11 嫁接物的亲和力和功能, 在 VH 结构域嫁接物中恢复了一些鼠 vernier 构架位置 (见图 12 和 13)。特别地, 19C11-VH1 嫁接物的位置 67, 69 和 71 和 19C11-VH3 嫁接物的位置 69, 71 和 78 被多样化, 以产生 19C11-VH1. L, 19C11-VH1. FFL, 19C11-VH3. LA, 和 19C11-VH3. FLA。此外, 将突变 D62S 和 F63V 引入 19C11-VH3. LA 的 CDR-H2, 产生 19C11-VH3. LA. SV (见图 13)。

[0378] 为了筛选目的, 最初在 6 孔板中在 293 细胞中产生 IgG 变体。使用 FuGene 系统将编码 VL 和 VH 的载体 (各 2 μ g) 转移到 293 细胞中。将 6 μ l FuGene 与不含 PBS 的 100 μ l DMEM 培养基混合, 室温温育 5 分钟。向此混合物中加入每条链 (2 μ g), 室温孵育 20 分钟, 然而转移到 6 孔板用于在 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 中转染过夜。下一日, 移出含有转染混合物的培养基, 替换为 2ml 细胞培养基, 例如含有 FBS 的 DMEM。再孵育细胞 5 天, 之后以 1000rpm 5 分钟收获培养基, 使用 0.22 μ m 低蛋白结合滤器无菌过滤。样品储存在 4 $^{\circ}$ C。

[0379] 使用 BIAcoreTM-A100, 通过表面等离子体共振测定亲和力。抗人 Fc γ 抗体 (大约~

7000RU) 在 10mM 乙酸钠 pH 4.8 中固定在 CM5 芯片上。293 细胞中表达的人源化 19C11IgG 变体通过抗人 Fc γ 抗体捕获。然后以 30 μ L/min 流速注射重组 IL-4。每次注射后,使用 3M MgCL₂,再生芯片。通过从人源化 19C11 变体 IgG 流动池中扣除对照流动池,校正结合反应。使用同步拟合 kon 和 koff 的 1:1Languir 模型,进行动力学分析。

[0380] 制备了十二种不同的人源化 19C11 变体,每个人源化轻链 (19C11- κ 1 嫁接物,19C11- κ 3 嫁接物) 分别与每个人源化重链 (19C11-VH1 嫁接物,19C11-VH1.L,19C11-VH1.FFL,19C11-VH3 嫁接物,19C11-VH3.LA,和 19C11-VH3.FLA) 组合。通过 SPR 测试了十二种人源化 19C11 变体的 IL-4 亲合力,以及嵌合 19C11 (其中鼠可变区与人 IgG 恒定区组合) 的 IL-4 亲合力 (图 14)。大多数变体保持了小于 10pM 的 IL-4 亲和力,除了 19C11-VH1 嫁接物/ κ 1 嫁接物,19C11-VH3 嫁接物/ κ 1 嫁接物,19C11-VH3.FLA/ κ 1 嫁接物,和 19C11-VH3 嫁接物/ κ 3 嫁接物。19C11-VH1.FFL/ κ 3 嫁接物和 19C11-VH3.FLA/ κ 3 嫁接物具有 11pM 的 IL-4 亲合力。

[0381] 19C11-VH3.LA.SV/ κ 1 嫁接物被选择用于进一步研究。SEQ ID NOS:9 和 10 中分别显示了人源化抗体 19C11-VH3.LA.SV/ κ 1 嫁接物 (在以下实施例中称作抗-IL-4) 的重链和轻链可变区序列。SEQ ID NOS:12 至 14 中显示了抗体 19C11-VH3.LA.SV/ κ 1 嫁接物的重链高变区 (HVRs),SEQ ID NOS:15 至 17 中显示轻链 HVRs。

[0382] 实施例 4- 产生 IL-4/IL-13IgG1 双特异性抗体

[0383] 我们以前已经建立了在大肠杆菌中产生具有两种不同轻链的人 IgG1 双特异性抗体的技术 (YU 等,2011,SCI TRANSL MED 3,84RA44)。该方法利用杵进臼技术 (RIDGWAY 等,1996,PROTEIN ENG. 9,617 - 621 ;ATWELL 等,1997,J MOL BIOL 270,26 - 35) 促进免疫球蛋白重链的异二聚化。为了可以使用两种不同轻链而无轻链错配,我们在分开的大肠杆菌细胞中分别以 hemimer 的形式培养了各臂。我们应用该方法,通过将抗-IL-4 和抗-IL-13 亲本抗体亚克隆到载体中,允许抗 IL-4 臂表达为人 IgG1 臼和抗-IL-13 臂表达为人 IgG1 杵,产生抗-IL-4/IL-13 双特异性抗体。SEQ ID NO:34 中显示 IgG1 杵恒定区的序列,SEQ ID NO:35 中显示 IgG1 臼恒定区的序列。

[0384] 对于双特异性抗体的抗 IL-13Fab,我们以之前已经产生并表征过的 lebrizumab 为基础。参见,例如,PCT 公布号 WO 2005/062967A2。以低于 10pM 检测限的 Biacore- 源 Kd,Lebrizumab 结合可溶性人 IL-13。lebrizumab 与 IL-13 的结合不抑制该细胞因子与 IL-13R α 1 的结合,但确实阻断能够进行信号传导的异源二聚体 IL-4R α / IL-13R α 1 复合物的随后形成 (ULTSCH,M. 等,2013,J. MOL. BIOL.,DX. DOI. ORG/10. 1016/J. JMB. 2013. 01. 024 ;CORREN 等,2011,N. ENGL. J. MED. 365,1088 - 1098)。

[0385] 为了抗体表达,使用大肠杆菌菌株 64B4。30 $^{\circ}$ C 在 LB(100 μ g/ml 羧苄青霉素) 中生长过夜培养物,1:100 稀释到 5ml CRAP 培养基 (100 μ g/ml 羧苄青霉素) (SIMMONS 等,2002,J. IMMUNOL. METHODS,263:133-147) 中并 30 $^{\circ}$ C 培养 24 小时。表达后,可溶性级分进行 SDS-PAGE,之后抗 Fc 免疫染色以分析半抗体物的形成。杵和臼突变两者均导致显著的半抗体物。为了将规模放大到 10L 发酵罐,将开始的起子培养物 (500ml) 培养到静止相,用于接种 10L 发酵罐 (SIMMONS 等,2002,J. IMMUNOL. METHODS,263:133-147)。

[0386] 抗 IL-13IgG1 杵 hemimer 在大肠杆菌中的最初表达比预计的低。以前已经证实,Fab 序列的随机诱变和 / 或置换疏水性表面残基可以导致改善的 Fab 稳定性和折叠

(FORSBERG 等, 1997, J. BIOL. CHEM., 272:12430-12436 ;DEMAREST 等, 2006, PROTEIN ENG. DES. SEL., 19:325-336 ;KUGLER 等, 2009, PROTEIN ENG. DES. SEL., 22:135-147)。

[0387] 在大肠杆菌细胞中表达变体,通过非还原 SDS-PAGE 和随后的抗 Fc 免疫印迹分析了非还原的全细胞提取物。使用 **Odyssey®** (LiCOR Biosciences) 定量 hemimer 带,并相对于 lebrikizumab 信号进行了标化。

[0388] 发现重链和轻链中的几个变化可以改善 hemimer 产量和 / 或折叠。选择了其中一个改变,即,轻链中的 M4L。此外,在重链中引入 Q1E 改变。在单个 hemimer 中组合这两个变化,发现得到的 hemimer 具有优于野生型 hemimer 的改善产量和折叠。lebrikizumab Q1E 重链可变区的序列示于 SEQ ID NO:19 中, lebrikizumab M4L 轻链可变区的序列示于 SEQ ID NO:20 中。使用这些变体区域构建抗 IL-4/IL-13IgG1 双特异性抗体。

[0389] 使用先前描述的方法,例如,在美国专利公布号 2011/0287009 和国际专利申请号 PCT/US2012/059810 中描述的方法,通过氧化还原化学,从分离的半抗体组装了完整的双特异性抗体。

[0390] 实施例 5- 产生 IL-4/IL-13IgG4 双特异性抗体

[0391] 在建立了人 IgG1 同种型抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体的产生后,我们将该双特异性平台变为人 IgG4 同种型。我们希望产生人 IgG4 抗体形式的抗 -IL-4/IL-13 双特异性抗体以匹配 lebrikizumab 的同种型,该抗 IL-13 抗体 lebrikizumab 已经在中度至重度的不受控哮喘治疗中显示出临床益处 (Corren 等., 2011, N. Engl. J. Med. 365, 1088 - 1098)。

[0392] 相对于 IgG1, IgG4 的重 - 轻链间二硫键由不连续的二硫键形成。该不连续二硫键连接模式对于大肠杆菌蛋白是不常见的 (BERKMEN, 2005, J. BIOL. CHEM. 280, 11387-11394)。此外, S228 残基可以使 IgG4 的铰链区失稳定,且 IgG4 的 CH3 二聚体界面含有失稳定性 R409 残基 (Dall'Acqua et al., 1998, Biochemistry 37, 9266-9273) (EU 编号惯例) 我们设计了几种构建体以解剖 IgG4Fc 区序列、链间二硫键模式、和 CH3R409 对半抗体在大肠杆菌中的功能性表达和随后的双特异性分子组装的影响。在每种情况下,我们均在铰链区中引入了稳定性 S228P 突变以减少组装后 Fab 臂交换 (STUBENRAUCH 等, 2010, DRUG METAB. DISPOS. 38, 84-91)。我们首先将具有相应杆 / 臼突变 (杆 :T366W ;臼 :T366S, L368A, Y407V) 的 IgG4Fc 区嫁接到 IgG1Fab 上,以评价 IgG4Fc 区对半抗体功能性表达的影响。对于两种抗体,抗 -IL-4 和抗体 -IL-13, 这均产生了与 IgG1 同种型相似量的二硫键连接的物质 (图 2C 和 2D), 说明 Fc 区中同种型的差异不影响半抗体在大肠杆菌中的功能性表达。接着我们将重链的整个恒定区转变为 IgG4 亚类。尽管这导致了功能性表达的半抗体的减少,但证实了,大肠杆菌原则上能够在抗体恒定区中从非连续半胱氨酸形成分子内二硫键。

[0393] 由于位置 409 可能对于 CH3 稳定性是重要的 (Dall'Acqua et al., 1998, Biochemistry 37, 9266 - 9273), 并且由于在该阶段 R409 对于下游组装过程的影响不清楚,所以我们也设计了具有 R409K 突变的构建体,以重新产生 IgG1 同种型中的 CH3 界面。对于两种抗体,这部分地挽救了 IgG4 同种型功能性表达的轻微下降 (图 2C 和 2D)。

[0394] 实施例 6- 组装和纯化 IL-4/IL-13 双特异性抗体

[0395] 为了比较不同双特异性抗体构建体的组装,我们生长了以 IgG1, IgG4 和 IgG4R409K 形式表达半抗体的培养物。通过蛋白 A 层析纯化半抗体后,混合 hemimer 对,通

过异二聚体化的杵 / 臼对的氧化还原化学步骤形成了完整双特异性抗体。通过阴离子和阳离子交换层析步骤,移出过量的半抗体。最终层析步骤后,将物质以 45g/l 配制在 0.2M 精氨酸琥珀酸盐 pH5.5, 0.02% - 聚山梨醇酯 20 中。为了证实组装的抗体从半抗体物转移为稳定的完整抗体,我们通过大小排阻层析进行了抗体表征。所有三个构建体均以相应于完整 150kDa 抗体的保留时间洗脱(图 3A)。此外,没有检测到显著量的聚集物(对于 IgG1/IgG4/IgG4R409K, 0.6/0.4/0.4%) 并仅检测到痕量的低分子量物(对于 IgG1/IgG4/IgG4R409K, 0.2/0.4/4.4%),说明两种同种型均能够用于组装具有低聚集倾向的抗体。

[0396] 双特异性组装过程中一个步骤是形成铰链二硫键。由于大小排阻层析不能解析链间二硫键的氧化态,我们对抗体进行了毛细管电泳 - 十二烷基硫酸钠分析(CE-SDS),发现所有三种形式均以相似效率形成了铰链 - 二硫键。对于 IgG1, IgG4 和 IgG4R409K, 分别观察到 89.3%, 91.4% 和 86.7% 的物质为完全氧化的构象(图 3B)。接着我们还还原了样品,重新通过 CE-SDS 进行分析,以确定轻链和重链的相应比率(图 3C)。所有三种形式均具有相似的和预期的轻链(对于 IgG1/IgG4/IgG4R409K, 31.3/31.4/30.9%) 和重链(对于 IgG1/IgG4/IgG4R409K, 65.8/64.9/65.4%) 分布,进一步证实天然抗体构象的存在。

[0397] 为了确保在组装过程中产生异二聚物,我们通过质谱分析了最终的双特异性分子。完整的和还原的质量总结在表 2、图 4 和表 3 中。对于所有三种双特异性抗体,实验质量与理论质量紧密匹配,未能检测到相应于同二聚物的任何质量。反相 HPLC 测定法进一步证实,这些抗体是双特异性的,没有同二聚体抗体的迹象(数据未显示)。

[0398] 表 2 非还原抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体的质谱分析

[0399]

	理论质量 (Da)	实验质量 (Da)
抗-IL-4/IL-13 IgG1 双特异性	145298.4	145304.5
抗-IL-4 IgG1 同二聚体	144798.6	n.o.
抗-IL-13 IgG1 同二聚体	145798.3	n.o.
抗-IL-4/IL-13 IgG4 双特异性	144923.7	144929.6
抗-IL-4 IgG4 同二聚体	144423.9	n.o.
抗-IL-13 IgG4 同二聚体	145423.5	n.o.
抗-IL-4/IL-13 IgG4 _{R409K} 双特异性	144867.7	144874.0
抗-IL-4 IgG4 _{R409K} 同二聚体	144367.8	n.o.
抗-IL-13 IgG4 _{R409K} 同二聚体	145367.5	n.o.

[0400] n. o. 未观察到

[0401] 表 3 :还原的抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体的质谱分析

[0402]

	理论质量 (Da)	实验质量 (Da)
抗-IL-4 LC IgG1	23522	23521
抗-IL-4 HC IgG1	48893	48893
抗-IL-13 LC IgG1	23815	23815
抗-IL-13 HC IgG1	49100	49099
抗-IL-4 LC IgG4	23522	23523
抗-IL-4 HC IgG4	48706	48708
抗-IL-13 LC IgG4	23815	23816
抗-IL-13 HC IgG4	48913	48914
抗-IL-4 LC IgG4 _{R409K}	23522	23523
抗-IL-4 HC IgG4 _{R409K}	48678	48679
抗-IL-13 LC IgG4 _{R409K}	23815	23816
抗-IL-13 HC IgG4 _{R409K}	48885	48886

[0403] LC 轻链, HC 重链

[0404] 由于未能在 R409 和 R409K IgG4 双特异性杵进白抗体组装中检测到任何显著差异, 故所有其它研究均使用野生型 (R409) IgG4 双特异性抗体形式。

[0405] 实施例 7-IL-4/IL-13IgG1 双特异性抗体的生化表征

[0406] 接着, 我们表征了 IgG1 和 IgG4 双特异性抗体以评价是否它们对 IL-4 和 IL-13 的结合亲和力以及它们阻断 IL-4 和 IL-13 结合其受体的能力是相当的。IgG1 和 IgG4 双特异性抗体对 IL-4 和 IL-13 的亲和力如实施例 1 所述通过 Biacore 测量, 发现它们是相当的 (表 4) 并与亲本抗体是相似的, 说明结合配体的能力不受双特异性形式或同种型的影响。

[0407] 抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体以高亲和力结合人 IL-13、人 IL-13R130Q (SEQ ID NO:31), 和食蟹猴 IL-13。针对这些细胞因子分别计算了 0.056, 0.142, 和 0.048 (nM) 的解离常数。表 4 提供了动力学常数。其它 SPR 实验显示, 抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体以高亲和力结合人 IL-4 和食蟹猴 IL-4。针对这些细胞因子分别计算了 0.046 和 0.076nM 的解离常数。表 4 提供了动力学常数。

[0408] 表 4 抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体的结合动力学

[0409]

同种型	配体	$K_{on}/10^4 (M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}/10^{-4} (s^{-1})$	$K_d (nM)$
IgG1	人 IL-4	134.4±49.8	0.848±0.05	0.068±0.020
IgG4	人 IL-4	287.00±4.58	1.327±0.058	0.046±0.001
IgG1	人 IL-13	71.4±4.0	0.170±0.119	0.023±0.015
IgG4	人 IL-13	53.73±2.1	0.301±0.109	0.056±0.020
IgG4	人 IL-13 R130Q	1.84±0.13	0.262±0.036	0.142±0.013
IgG4	cyno IL-4	201.67±39.15	1.507±0.153	0.076±0.013
IgG4	cyno IL-13	60.80±4.94	0.283±0.202	0.048±0.036

[0410] 为了确保双特异性分子能阻断细胞因子与其受体的结合, 使用了基本上如实施

例 1 所述的 ELISA 结合竞争测定法。抗 -IL-4/IL-13 双特异性抗体抑制了生物素化的人 IL-4(5.8ng/mL) 与人 IL-4R 的直接结合(见图 15)。以 0.035 至 25 $\mu\text{g/mL}$ (0.23 至 167nM) 的双特异性抗体,观察到生物素化 IL-4 结合 IL-4R 的减少。

[0411] 相反地,抗 -IL-4/IL-13 双特异性抗体不抑制生物素化的人 IL-13(0.625 $\mu\text{g/mL}$) 与人 IL-13R α 1 的直接结合(见图 16)。以测试的浓度加入双特异性抗体,没有观察到生物素化的人 IL-13 与 IL-13R α 1 结合的减少。

[0412] 抗 -IL-4/IL-13 双特异性抗体不实质性地抑制生物素化的人 IL-13(0.056 $\mu\text{g/mL}$) 与人 IL-13R α 2 的直接结合(见图 17)。观察到生物素化的人 IL-13 与 IL-13R α 2 结合的部分减少。

[0413] 如实施例 1 所述,使用 SPR 观察 IL-13R α 2 与 IL-13 的结合。将一系列浓度的 IL-13R α 2 注射到固定化的 IL-13 上,收集传感图。基于这些传感图,观察到 0.365nM 的结合常数(Kd)($k_{on} = 24.27 \times 10^4 \pm 0.49 \text{Ms}^{-1}$, $k_{off} = 0.891 \times 10^{-4} \pm 0.026 \text{s}^{-1}$)。之前已经在分开的 SPR 实验中证实了抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体以高亲和力(Kd = 56pM)结合人 IL-13(见表 4)。为了检查对 IL-13R α 2 结合 IL-13 的抑制作用,将 250nM 抗 -IL-4/IL-13 双特异性抗体注射到固定化的 IL-13 上,之后注射 IL-13R α 2。双特异性抗体的结合没有阻止 IL-13R α 2 与固定化的 IL-13 结合(见图 18)。IL-13R α 2 与双特异性抗体:IL-13 复合物结合的 Kd 是 1.09nM($k_{on} = 10.06 \times 10^4 \pm 0.56 \text{Ms}^{-1}$, $k_{off} = 1.10 \times 10^{-4} \pm 0.12 \text{s}^{-1}$)。固定化 IL-13 用双特异性抗体预饱和和仅仅适度地破坏了 IL-13R α 2 与 IL-13 的结合,说明双特异性抗体对 IL-13 与 IL-13R α 2 结合的抑制作用不显著。

[0414] 因此,类似于亲本抗 -IL-4 和抗 IL-13 抗体,双特异性抗体完全地抑制了 IL-4 与 IL-4R α 的结合,并且不实质性地抑制 IL-13 与 IL-13R α 1 或 IL-13R α 2 的结合。这些发现说明,IL-13 和 IL-4 臂的结合表位和单价亲和力均在双特异性抗体中得到保留。

[0415] 实施例 8- 在细胞测定法中中和 IL-4 和 IL-13 活性。

[0416] 在体外细胞测定法中评价了抗 -IL-4/IL-13IgG1 和抗 IL-4/IL-13IgG4 双特异性抗体两者的活性,在所述测定法中 IL-4 和 IL-13 诱导 TF-1 细胞增殖。如下所述评价了每种双特异性抗体阻断人 IL-4 和人 IL-13 单独和组合地诱导 TF-1 细胞增殖的能力。

[0417] 在 96 孔组织培养板(目录号 353072, FALCON BD, FRANKLIN LAKES, NJ) 中,在 50 μl 含有细胞因子的测定培养基中将抗体 3.3 倍系列稀释。37 $^{\circ}\text{C}$ 温育板子 30 分钟。在测定培养基中洗涤 TF-1 细胞两次,并以 2.5×10^5 细胞/ml 的终体积重悬。向每孔加入 50 μl 细胞,得到总体积 100 μl 。板子在增湿保温箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO₂ 中孵育 4 天,之后每孔加入 1 μCi ^3H 胸苷。再孵育 4 小时后,使用液体闪烁计数器,通过细胞相关的 ^3H 胸苷掺入,测量了增殖。从一式两份样品获得的结果以平均值表达。使用 KaleidaGraph (SYNERGY SOFTWARE, READING, PA) 制图。

[0418] 抗 -IL-4/IL-13IgG1 和抗 -IL-4/IL-13IgG4 双特异性抗体两者均以剂量依赖性方式抑制了人 IL-4 和 IL-13 诱导的 TF-1 细胞增殖,两种不同双特异性抗体在体外中和 IC₅₀ 方面没有显著差异(图 5 和表 5)。

[0419] 表 5: 抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体的 TF-1 增殖抑制测定试验的 IC₅₀

[0420]

	IC ₅₀ (µg/ml)		
	IL-4	IL-13	IL-4 + IL-13
IgG1 双特异性	0.06	0.03	0.07
IgG4 双特异性	0.05	0.03	0.05

[0421] 进行了相似分析,以确定针对食蟹猴 IL-4 和 IL-13 诱导的 TF-1 细胞增殖,抗 -IL-4/IL-13IgG1 和抗 -IL-4/IL-13IgG4 双特异性抗体是否以剂量依赖性方式发挥抑制作用(图 6)。

[0422] 实施例 9- 在食蟹猴中的药代动力学研究

[0423] 我们评价了在向食蟹猴单次静脉内 (IV) 或皮下 (SC) 施用后 IgG4 和 IgG1 抗 -IL-4/IL-13 双特异性抗体的体内药代动力学。在食蟹猴中的该药代动力学 (PK) 研究获得实验动物保护和使用协会 (IACUC) 批准。在 Charles River 实验室 (CRL) 临床前服务站 (Reno, NV), 进行了抗 -IL-4/IL-13IgG4 的 PK 研究。来自 CRL 库存的总共 15 只雌性食蟹猴 (2.2 - 2.6kg) 随机分成 5 组 (n = 3/组)。组 1 的动物接受对照运载体 (vehicle) 的静脉内 (IV) 和皮下 (SC) 给药。组 2, 3, 和 4 的动物分别接受 10, 30, 和 100mg/kg 抗 -IL-4/IL-13IgG4 的单剂 IV 快速浓注 (bolus) 给药。组 5 的动物接受 10mg/kg 抗 -IL-4/IL-13IgG4 的 SC 给药。

[0424] 在 Shin Nippon 生物化学实验室 (SNBL) USA (Everett, WA), 进行了抗 -IL-4/IL-13IgG1 的 PK 研究。来自 SNBL 库存的总共 12 只雌性食蟹猴 (2.4 - 3.1kg) 随机分成 4 组 (n = 3/组)。组 1 的动物接受对照运载体 (vehicle) 的静脉内 (IV) 给药。组 2, 3, 和 4 的动物分别接受 10, 30, 和 60mg/kg 抗 -IL-4/IL-13IgG1 的单剂 IV 快速浓注给药。

[0425] 对于两个研究,在不同时间点收集血清样品直到给药后 4-5 周,通过定量限 0.078 µg/mL 的 ELISA 评价了抗 IL-4/IL-13IgG4 或抗 -IL-4/IL-13IgG1 的浓度,并通过桥式 ELISA 评价了抗治疗性抗体 (ATA)。对于 PK 数据收集,将研究第 1 日转化为 PK 第 0 日,以指示剂量施用开始。在该实际 (in life) 给药日后的所有时间点均计算为研究日减 1。使用 2 室分析,采用 **WinNonlin®** 的 5.2.1 版本 (Pharsight; Mountain View, CA), 分析了每个动物的血清浓度数据。

[0426] 抗 IL-4/IL-13IgG4 和抗 IL-4/IL-13IgG1 双特异性抗体的血清浓度 - 时间曲线显示了双相处置 (biphasic disposition) 和跨测试剂量范围的线性药代动力学 (图 7A 和 7B)。对于两种抗体,中央室的最初体积与血清体积相似,说明限制的分布。如针对人 IgG4 和 IgG1 抗体在食蟹猴中预期的一样,两种抗体均具有相对慢的清除 (CL) 和长终末半衰期 (terminal half-life) (平均 CL = 5.79 至 6.70mL/天/kg 对于抗 -IL-4/IL-13IgG4, 3.59 至 4.09mL/天/kg 对于抗 -IL-4/IL-13IgG1)。基于针对 10mg/kg 剂量组计算的曲线下面积 (AUC), 抗 IL-4/IL-13IgG4 抗体的 SC 生物利用率是 95.1%。在 50% 的抗 -IL-4/IL-13IgG4 给药的动物中检测到存在抗治疗性抗体 (ATA), 包括在 100mg/kg IV 剂量组中的所有 3 只动物,ATA 的存在看起来与第 14 天后抗 -IL-4/IL-13IgG4 的清除增加相关。在抗 IL-4/IL-13IgG1 处理的动物中检测到低 ATA 发生率,其看起来不影响 PK。总之,抗 -IL-4/IL-13IgG4 和抗 -IL-4/IL-13IgG1 双特异性抗体的药代动力学是相似的,并与其它人源化 IgG1 和 IgG4 单克隆抗体在食蟹猴中的药代动力学是相当的。

[0427] 实施例 10- 在食蟹猴哮喘模型中的肺分配

[0428] 我们在食蟹猴哮喘模型中评价了 IgG4 相对于 IgG1 抗-IL-4/IL-13 双特异性抗体在肺分配上的潜在差异。在该哮喘模型中,对 *Ascaris suum* (A. suum) 天然敏化的食蟹猴进行 A. suum 提取物的气雾剂攻击,以引发可以模拟暴露于变应原的哮喘患者的变应性炎症反应。

[0429] 在食蟹猴中的该肺分配研究获得 IACUC 批准。在 CRL 临床前服务站 (Reno, NV), 进行了比较抗-IL-4/IL-13IgG4 和抗-IL-4/IL-13IgG1 的该研究。研究由两个不同部分组成。第一部分,来自 CRL 库存的食蟹猴 (3-10kg) 接受基线 *Ascaris suum* (A. suum) 气雾剂攻击以确定 A. suum 攻击在每只动物中引发合适气道反应的适宜性。在整个攻击期间监测动物的窘迫迹象,在该部分中不给予抗体。4 周后,开始第二部分,总共 7 只雄性食蟹猴随机分为 2 组 (在 IgG4 组 $n = 3$; 在 IgG1 组 $n = 4$)。然后,这些食蟹猴通过 IV 快速浓注给药在第 1 研究日和第 8 研究日接受 10mg/kg 抗-IL-4/IL-13IgG4 或抗-IL-4/IL-13IgG1。随后,在第 9 研究日,通过气雾剂吸入 A. suum,攻击动物。在不同时间点直到给药后 23 天,收集支气管肺泡灌洗液 (BAL) 和血清样品,通过定量限 $0.078 \mu\text{g/mL}$ 的 ELISA 分析抗-IL-4/IL-13IgG4 或抗-IL-4/IL-13IgG1 浓度。对于数据计算,将研究第 1 日转化为 PK 第 0 日,以指示剂量施用开始。在该实际 (in life) 给药日后的所有时间点均计算为研究日减 1。在 BAL 和血清中测量尿素和白蛋白以分别估计上皮衬液 (ELF) 浓度以及就炎症诱导的血管渗漏进行校正。也通过 ELISA 在血清中测量了 *Ascaris* 特异性 IgE。如 RENNARD 等, 1986, J. APPL. PHYSIOL., 60 (2): 532-538 所述,使用 BAL 和血清尿素浓度数据估计了稀释因子。

[0430] 在第 1 和 8 研究日进行 10mg/kg IV 施用和第 9 研究日用 A. suum 提取物进行肺攻击后,我们比较了抗-IL-4/IL-13IgG4 和抗-IL-4/IL-13IgG1 抗体的血清浓度和上皮衬液 (ELF) 浓度。如例如 RENNARD 等, 1986, J. APPL. PHYSIOL., 60 (2): 532-538. 所述,针对 BAL 液体收集程序固有的稀释,校正 BAL 液 IgG 浓度数据,从而获得 ELF 中 IgG 浓度值。抗-IL-4/IL-13IgG4 和抗-IL-4/IL-13IgG1 双特异性抗体的血清与肺分配在整个研究长度上是相当的 (图 8)。在变应原攻击前,两种抗体的 ELF 浓度均大约为 IgG 血清浓度的 1% -4%,说明仅小部分系统抗体达到 ELF。第 9 研究日 A. suum 的吸入攻击看起来导致两种抗体的增加的肺分配。然而,当将 IgG 浓度相对于 ELF 中的白蛋白浓度标化并将这些值与血清 IgG 浓度比较时,这些数据表明,在呼吸攻击后增加的 ELF IgG 浓度是由攻击诱导的非特异性大分子血管渗漏导致的。

[0431] 实施例 11- 抗-IL-4, 抗-IL-13, 和抗-IL-4/IL-13 抗体在小鼠变应性气道炎症和哮喘模型中的功效

[0432] 在本研究中使用了 8 只 BALB/c 小鼠 (Charles River Laboratories)。在第 0 日,所有小鼠用 $100 \mu\text{l}$ 无菌 PBS 中在 2mg 明矾中的 $50 \mu\text{g}$ 三硝基苯基-卵白蛋白 (trinitrophenyl-ovalbumin, TNP-OVA) 腹膜内 (IP) 免疫。免疫后第 35 天开始,所有小鼠每日用 PBS 中 1% TNP-OVA 通过雾化器进行 30 分钟的气雾剂攻击,连续 7 日。如图 9A 所示,第 37 天开始,每日用单克隆抗体 (mAbs) 处理小鼠,其中在每次气雾剂攻击 (7 天) 前 4 小时 IP 施用所述抗体。

[0433] 第 42 天,麻醉下对所有小鼠进行眶后取血以最终获得 $200 \mu\text{l}$ 血清 (以测量研究期间达到的 TNP-OVA- 特异性 IgE, IgG1, 和抗体血清浓度)。在异氟烷麻醉下进行小鼠眶内采血以获得血清样品用于 TNP-OVA 特异性免疫球蛋白和血清 TARC (胸腺活化调节趋化因

子, thymus and activation regulated chemokine) 的 ELISA 测量。收集支气管肺泡灌洗液样品用于差异计数。用冷 PBS 灌洗肺, 之后通过 FACS 分析。将肺切成片, 然后通过金属捣碎机捣碎, 以获得单细胞悬液, 然后通过 $0.7 \mu\text{m}$ 尼龙滤器过滤。肺样品重悬在 5ml 中。将固定体积的细胞悬液加入固定浓度的 FITC 标记的荧光珠中, 在流式细胞仪上分析, 每样品收集 5000 个珠事件以获得细胞计数。对于肺的定量和表型分析, 用抗表面白细胞标记物的荧光染料标记的 mAb (CD44-FITC, CD4-APC, CCR3-Pe 和 CD4-APC, 或 CD11c-FITC, CD11b-PE 和 Gr-1-APC ;BD Biosciences, San Jose, CA), 染色每样品的 3 百万个肺细胞。在 BD FACSCalibur (BD, San Jose, CA) 上运行样品, 并在 Flowjo 软件 (Ashland, OR) 上分析。

[0434] 图 9B-9E 中显示实验结果。抗 -IL-4/IL-13 双特异性抗体的施用与抗 IL-4 抗体相比以更大程度抑制了肺嗜酸性粒细胞 ($p = 0.0381$), 并且看起来比抗 IL-13 抗体以更大程度抑制肺嗜酸性粒细胞, 尽管该差异没有达到统计学显著性 ($p = 0.1803$) (图 9B)。相似地, 抗 -IL-4/IL-13 双特异性抗体的施用与抗 IL-4 抗体 ($p = 0.0031$) 或抗 IL-13 抗体 ($p = 0.0135$) 相比以更大程度抑制了支气管肺泡灌洗液中的嗜酸性粒细胞 (图 9C)。与对照处理相比, 施用抗 IL-4 抗体或抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体看起来减少 TNP-OVA- 特异性 IgE, 尽管该结果没有达到统计学显著性 (图 9D)。最后, 抗 -IL-4/IL-13 双特异性抗体的施用与抗 IL-4 抗体或抗 IL-13 抗体 (分别为 $p < 0.0001$ 和 $p = 0.0323$) 相比以更大程度抑制了血清 TARC 水平 (图 9E)。

[0435] 讨论

[0436] 在此, 我们应用了以前开发的杵进臼双特异性抗体平台产生抗细胞因子 IL-4 和 IL-13 的人 IgG1 和人 IgG4 双特异性抗体。鉴于 IL-4 和 IL-13 的重叠的和独特的生物学、以及抗 IL-13 抗体在中度至重度哮喘治疗中的活性, 靶向 IL-4 和 IL-13 两者的双特异性抗体可能是优于抗 IL-13 的用于哮喘治疗的改良疗法。实施例 11 中给出的数据支持了此假设。我们的抗 -IL-4/IL-13 双特异性抗体是抗 IL-13 抗体 lebrikizumab 的延伸, lebrikizumab 在中度至重度不受控哮喘中在 II 期研究中显示了临床功效。由于 lebrikizumab 是人 IgG4 抗体, 我们使用了杵进臼双特异性抗体平台和人 IgG4 以使我们的抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体的同种型与 lebrikizumab 的匹配。

[0437] 人 IgG1 和 IgG4 同种型的一个关键区别是 CH3 二聚体界面, 其影响二聚体稳定性。差异由位置 409 驱动。我们的结果证实, 杵进臼突变与 IgG4CH3 结构域中的 Arg409, 在半抗体表达和双特异抗体组装方面, 均是相容的。我们未检测到两种不同同种型在组装效率或在最终抗体物质的质量上的任何显著差异。

[0438] 尽管在哺乳动物细胞中成熟建立了各种同种型的人抗体的表达, 但是一直较少尝试在大肠杆菌中表达不同人抗体同种型, 因此, 全长或半抗体人 IgG4 同种型在大肠杆菌中的表达并没有充分的文献报道。在此, 我们针对这些抗 IL-4/IL-13 双特异性抗体证实, 人 IgG4hemimer 可以成功地在大肠杆菌细胞中大量地表达, 并和人 IgG1 双特异性抗体一样容易地组装为双特异性抗体。

[0439] 杵进臼技术的标志之一是, 在最终双特异性分子中单价亲本抗体的生物物理性质的保持。IgG1 和 IgG4 双特异性抗体均保留了亲本 Fab 的靶表位和结合性质, 包括对 IL-4 或 IL-13 靶细胞因子的高亲合力, 从而在体外细胞测定试验中导致高效力。

[0440] 食蟹猴中药代动力学研究证实 IgG1 和 IgG4 双特异性抗体两者的缓慢清除和相似

的终末半衰期。此外, IgG1 和 IgG4 双特异性抗体两者以如下水平相当地从血清向肺分配, 所述水平使得可以完全中和肺中的致病性 IL-4 和 IL-13, 这对于哮喘治疗是重要的。尽管在食蟹猴中与 IgG1 双特异性抗体相比 IgG4 双特异性抗体表现出具有更高 ATA 率, 但是考虑到我们研究中使用的动物数量小以及缺乏人源化抗体在食蟹猴中相对于在人中免疫原性的明确关系, 有关我们的抗 IL-4/IL-13 IgG4 和 IgG1 双特异性抗体在人中的相对免疫原性, 不能作出任何结论。然而, 应当注意, 除了抗体 Fab 的 CDR 区外, 我们的双特异性抗体由全人 IgG1 和 IgG4 序列组成, 其应当在人中表现出极小的免疫原性。因此, 我们产生的双特异性抗体是临床开发哮喘和 IPF 及其它呼吸病症治疗的良好候选者。而且, 基于本文提供的体内数据, 自然可以达到治疗人病症, 例如哮喘、IPF 和其它呼吸病症的方法。

[0441] 不同人同种型的抗体可以因在结合血清补体蛋白和免疫效应细胞上的 Fc γ 受体方面的差异而具有非常不同的体外和体内性质 (Nirula, A. et al., 2011, *Curr Opin Rheumatol* 23, 119 - 124)。特别地, 人 IgG1 同种型抗体可以有效地激活补体系统和与 Fc γ 受体结合以触发抗体依赖性细胞毒性 (ADCC), 而人 IgG4 同种型抗体不激活补体系统并具有减少的 ADCC。重要的是, 抗体效应子功能中的这些性质要求抗体糖基化 (在哺乳动物细胞中在表达过程中产生)。在细菌细胞例如大肠杆菌中产生的抗体无论何种同种型均由于缺乏抗体糖基化而缺乏抗体效应子功能 (Jung, S. T. et al., 2011, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 858 - 867 ; Simmons, L. C., et al., 2002, *J Immunol Methods* 263, 133 - 147)。尽管在本研究中产生的双特异性抗体在大肠杆菌中产生并因此缺乏糖基化和 Fc 效应子功能, 但是本文所述双特异性抗体也可以在哺乳动物细胞中产生。该方法可以将用于这些抗体的杵进白双特异性抗体平台有效地延伸至包括完全糖基化的双特异性抗 IL-4/IL-13 人 IgG1 和 IgG4 抗体同种型, 并且这又可以提供广泛范围的具有不同效应子功能的治疗性双特异性抗体。

[0442] 尽管为了用于理解清楚的目的本发明已通过举例说明和实施例一定详细地进行了描述, 但说明书和实施例不应解释为限制本发明的范围。本文引用的所有专利和科学文献的公开内容明确地整体引入作为参考。

[0443] 序列表

[0444]

SEQ ID NO:	描述	序列
1	mu19C11 VH	QIQLVQSGPE LRRPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWRKQA PCKGLKRWVW INTETGEPTY ADDPKGRFAF SLETSANTAY LKINNLKNEE TATYFCAPGG IFYGM DYWGO GTSVTVSS
2	mu19C11 VL	SIVMTQTPKF LLISAGDRVT ITCKASQSVI NDAAWYQQNP GQSPRLLIYY TSHRYTGVFD RFTGSGYGTD FTFITISTVQA EDLAVYFCQQ DYTSEFTFQG GTKLEIKR
3	hu19C11 VH1 嫁接物	QVQLVQSGAE VKKPQASVRY SCKASGYTFT DYSMHWRKQA PCQGLEWMVW INTETGEPTY ADDPKGRVTI TRDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARGG IFYGM DYWGO GTLVTVSS
4	hu19C11 VH1.L 嫁接物	QVQLVQSGAE VKKPQASVRY SCKASGYTFT DYSMHWRKQA PCQGLEWMVW INTETGEPTY ADDPKGRVTI TLDTSTSTAY LELSSLRKSED TAVYYCARGG IFYGM DYWGO GTLVTVSS
5	hu19C11 VH1.FFL 嫁接物	QVQLVQSGAE VKKPQASVRY SCKASGYTFT DYSMHWRKQA PCQGLEWMVW INTETGEPTY ADDPKGRPTF TLDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARGG IFYGM DYWGO GTLVTVSS
6	hu19C11 VH3 嫁接物	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT DYSMHWRKQA PCKGLEWVWVW INTETGEPTY ADDPKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG IFYGM DYWGO GTLVTVSS
7	hu19C11 VH3.FLA 嫁接物	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT DYSMHWRKQA PCKGLEWVWVW INTETGEPTY ADDPKGRPTF SLDNSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARGG IFYGM DYWGO GTLVTVSS
8	hu19C11 VH3. LA 嫁接物	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT DYSMHWRKQA PCKGLEWVWVW INTETGEPTY ADDPKGRFTI SLDNSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARGG IFYGM DYWGO GTLVTVSS
9	hu19C11 VH3. LA.SV 嫁接物	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT DYSMHWRKQA PCKGLEWVWVW INTETGEPTY ADSVKGKFTI SLDNSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARGG IFYGM DYWGO GTLVTVSS
10	hu19C11 VL κ1 嫁接物	DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCKASQSVI NDAAWYQQNP GKAPKLLIYY TSHRYTGVPS RFTGSGSGTD FTLTISLQP EDEATYYCQQ DYTSEFTFQG GTKVEIKR
11	hu19C11 VL κ3 嫁接物	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCKASQSVI NDAAWYQQNP GQAPKLLIYY TSHRYTGIPA RFTGSGSGTD FTLTISLSP EDFAVYYCQQ DYTSEFTFQG GTKVEIKR
12	19C11 HVRH1	GYTFTDYSMR
13	19C11 HVRH2.SV	VWINTETGEPTYADSVNG
14	19C11 HVRH3	GGIFYGMDY
15	19C11 HVRL1	KASQSVINDAA
16	19C11 HVRL2	YTSRYT
17	19C11 HVRL3	QQDYTSFWT
18	19C11 HVRH2	VWINTETGEPTYADDFNG
56	lebrikizumab VH	QVTLFESGPA LVRFTQTLTL TCTVSGFSLA AYSVNWIRQP PCKALEWVWVW INTETGEPTY ADDPKGRVTI TRDTSTSTAY TMTNMDPVDT ATYYCAGDGY YPYAMDNWGO GSLVTVSS
57	lebrikizumab VL	DIVMTQSPDS LSVSLGERAT INCRASKSVD SYGNSFMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQNMDPR TFGGGTKVEI KR
19	lebrikizumab VH Q1E	QVTLFESGPA LVRFTQTLTL TCTVSGFSLA AYSVNWIRQP PCKALEWVWVW INTETGEPTY ADDPKGRVTI TRDTSTSTAY TMTNMDPVDT ATYYCAGDGY YPYAMDNWGO GSLVTVSS
20	lebrikizumab VL M4L	DIVLTQSEDS LSVSLGERAT INCRASKSVD SYGNSFMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQNMDPR TFGGGTKVEI KR
21	lebrikizumab HVRH1	GFSLSAYSVNW
60	lebrikizumab HVRH1 (替代)	AYSVN

[0445]

22	lebrikizumab HVRH2	MINGDGKIVYNSALKS
23	lebrikizumab HVRH3	DGYYPYAMDN
24	lebrikizumab HVRL1	RASKSVDSYGNSEFMH
25	lebrikizumab HVRL2	LASNLES
26	lebrikizumab HVRL3	QQNNEDPRT
27	人IL-4 前体 (Swiss-Prot 登录号 P05112.1)	MGLTSQQLLPP LFFLLACAGN FVHGKCDIT LQEIITLNS LTEQKTLCTE LTVTDIFAAS KNTTEKETFC RAATVLRQFY SHHEKDRCL GATAQQFHRH KQLIRFLKRL DRNLWGLAGL NSCFVKEANQ STLENFLERL KTIMREKYSK CSS
28	人IL-4 成熟形式 (无信号序列)	HECDIT LQEIITLNS LTEQKTLCTE LTVTDIFAAS KNTTEKETFC RAATVLRQFY SHHEKDRCL GATAQQFHRH KQLIRFLKRL DRNLWGLAGL NSCFVKEANQ STLENFLERL RTIMPEKYSK CSS
29	人IL-13 前体 (Swiss-Prot 登录号 P35225.2)	MALLLT TVIALTCIGG FASPGVPPS TALRELIEEL VNITQNKAF LCNGSMVWSI NLTAGMYCAA LESLINVSGC SAIEKTQML SGFCPHKUSA GQFSSLHVRD TKIEVAQFVK DLLLHLKCLF REGRFN
30	人IL-13 成熟形式 (无信号序列)	SP GVPVPSTALK ELIEELVNIT QNQRAPLNG SMVWSINLTA GMYCAALESL INVSGCSAIE KQRMVLSGFC PHKVSAGQFS SLHVRDTKIE VAQFVKULLL HLKCLFREGR FN
31	人IL-13 R130Q 成熟形式	LTCLGGFASP GVPVPSTALK ELIEELVNIT QNQRAPLNG SMVWSINLTA GMYCAALESL INVSGCSAIE KQRMVLSGFC PHKVSAGQFS SLHVRDTKIE VAQFVKULLL HLKCLFREGQ FN
32	食蟹猴IL-13 前体 (GenBank 登录号 ABG75889.1)	MALLLTNVIA LTCLGGFASP SPVVPSTALK ELIEELVNIT QNQRAPLNG SMVWSINLTA GMYCAALESL INVSGCSAIE KQRMVLSGFC PHKVSAGQFS SLHVRDTKIE VAQFVKULLL HLKCLFREGQ FN
33	食蟹猴IL-4 前体 (Swiss-Prot 登录号 P79339.2); 成熟形式是 氨基酸 25-153	MGLTSQQLLPP LFFLLACAGN FVHGKCDIT LQEIITLNS LTEQKTLCTE LTITDILAAS KNTTEKETFC RAATVLRQFY SHHEKDRCL GATAQQFHRH KQLIRFLERL DRNLWGLAGL NSCFVKEANQ STLENFLERL KTIMREKYSK CSS
34	IgG1 T366W 重链恒定区	ASTNGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTS WNSGALTSGV HTFFAVLQSS GLYSLSVVVT VPSSSLGTQT YICNVNHHKPS NTKVDRKVEP KSCDEHTHCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTF EYTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLNQDNLNGK RYKCKVSNKA LPAPIEKTIK KAKGQPREPO VYTLPPSREE MINKQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV

[0446]

		LDSDG8FFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MREALNRRYF QSSLSLS9PGK
35	IgG1 T366S/ L368A/Y407V 重链恒定区	ASTKGPSVFPP LAFSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHHKPS NTKVDRKVEP KSCDKTHTCP FCPAPPELLGG RSVFLFPPPKP KDTLMISSRF EVTCVVVDVSE HEDPEVRFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNKG EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTRKQVSLSC AVEGFPYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSDG8FFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MREALNRRYF QSSLSLS9PGK
36	IgG4 T366W / S228P 重链恒定区	ASTKGPSVFPP LAFCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDRRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLPPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVDSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTIISKAK GQPREPQVYV LPPSQEEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDL DG8FFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALNRRYVQKS LSLSLQK
37	IgG4 T366S/ L368A/Y407V/ S228P 重链恒定区	ASTKGPSVFPP LAFCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDRRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLPPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVDSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTIISKAK GQPREPQVYV LPPSQEEMTK NQVSLSCAVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDL DG8FFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALNRRYVQKS LSLSLQK
38	hu19C11 IgG4 T366S/ L368A/Y407V/ S228P 重链	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT DYSMHWRVQR PKRGLEWVWV INTETGEPY ADGVKGRFTI SLDSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARGG IFYGMIDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SCALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGKTITYT CNVDHHPKNT KVDKRVESKY GPCCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVDSQEDPE VQFNWYVDG EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGREYCK VSNKGLPSSI EKTISKARGQ PREPQVYTLF PSQEEMTNQ VSLSCAVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HHHYVQKSL LSLQK
39	hu19C11 轻链	DIQMTQSPSS LSASVGDRAV ITCKASQSVI NDRRWYQOKP GRAPKLLIYY TSHRYTGVPS RPSGSGSGTD FTLTISLQP EDFATYYCQQ DYTSEPTFQQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNPFY PREAKVQWVY DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK
40	Icbrikizumab Q1E IgG4 T366W/S228P 重链	EVTLEKSGPA LVEPTQTLFL TCTVSGFSLA AYSVNWIRQP PGKALEWLM INGDKRIVN SALKSRLTIS KDTSRNQVVL TMTNEDPVDT ATYYCAGDGY YPYAMDNWGQ GSLTVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SCALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGKTITYT CNVDHHPKNT KVDKRVESKY GPCCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVDSQEDPE VQFNWYVDG EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGREYCK VSNKGLPSSI EKTISKARGQ PREPQVYTLF PSQEEMTNQ VSLWCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HHHYVQKSL LSLQK
41	Icbrikizumab M4L 轻链	DIVLTQSPDS LSVSLGERAT INCRASKSVD SYGN5FMHWY QQKPGQPEKL LIYLA5NLES GVEDRF5GSG SGTDFILTIS SLQAEDVAVY YCQQNEDPR TFGGGTVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL5 STLTL5KADY EKRRVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

[0447]

58	lebrikizumab IgG4 T366W/ S228P 重链	QVTLRESGPA LVEPTQTLFL TCTVSGFSLA AYSVNAIRQP FGKALEWLAM INGDGRIVYN SALKSRPLTIS KDTSEKNGVVL TMTNMDPVDY ATYYCAGDGY YPYAMDNWGO GSLNIVSSAS TKGFSVFFLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SCALTSQVHT FFAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGKTYT CNVDHKFSNT KVDKRVESKY GPECPFCFAP EFLGGPSVFL FFPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSGQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNQKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSQSEMTKNQ VSLWCLVKGK YPSDIAVEWE SNGQPEMNYK TTPFVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL ENHYTQKSLA LSLAK
59	lebrikizumab 轻链	DIVMTQSPDS LSVSLGERAT INCRASQSVS SYGNSFMHWY QKPKGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCOQNNESER TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLE NNFFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLA STLTLAKADY EKHKVIYACEV TRQGLSSPVY KSFNRGEC
42	IL-13 表位, SEQ ID NO: 29的 氨基酸68至75 (SEQ ID NO: 30 的氨基酸50至57)	EGLINVSQ
43	IL-13 表位, SEQ ID NO: 29的 氨基酸63至74 (SEQ ID NO: 30 的氨基酸45至56)	YCAALESLINVS
44	抗-IL-13 mu1H4 VL	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAI ISCRASQSVS TSSYSYMNWY QKTPGQPPKL LIKYASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH FVEEEDTATY YCOHSWEIPIY TFGGGT
45	抗-IL-13 mu1H4 VH	QVTLRESGFG ILQPSQFLSL TCSFSGFSLA TSDMGVGVIR QPSGRGLEWL AHIWDDVVKR YNPALKSRLT ISKDTSSSQV FLKIASVDTA DTATYYCARI GTNYGYDGLF DYWGQGTTLT VSS
46	抗-IL-13 hu1H4v6 轻链	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASQSVS TSSYSYMNWY QKPKGQPPKL LIKYASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCOHSWEIPIY TFGGQTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLE NNFFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLA STLTLAKADY EKHKVIYACEV TRQGLSSPVY KSFNRGEC
47	抗-IL-13 hu1H4v6 重链	EVQLVESGPA LVRPTQTLFL TCTFSGFSLA TSDMGVGVIR QPPGKALEWL AHIWDDVVKR YNPALKSRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARI GTNYGYDALF DYWGQGTTLV VCSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTEVDK FEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLP FPKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDEPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVV VLTVLHQDNL NGKEYKCKV NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQV LTCLVGGFYF SDIAVEWESN GPENNYKTT PFVLDSDGSE FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLA PGK
48	抗-IL-13 hu1H4v6 VL	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASQSVS TSSYSYMNWY QKPKGQPPKL LIKYASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCOHSWEIPIY TFGGQTKVEI K
49	抗-IL-13 hu1H4v6 VH	EVQLVESGPA LVEPTQTLFL TCTFSGFSLA TSDMGVGVIR QPPGKALEWL AHIWDDVVKR YNPALKSRLT ISKDTSEKNGV VLTMTNMDPV DTATYYCARI GTNYGYDALF DYWGQGTTLV VSS

[0448]

50	hu1H4v6 HVRH1	GFSLSTSDMGVS
51	hu1H4v6 HVRH2	ARIWWDGVKRYNFALKS
52	hu1H4v6 HVRH3	ARIGTNYGYDALFDY
53	hu1H4v6 HVRL1	SASQSVSTSSYSYNN
54	hu1H4v6 HVRL2	YASNLES
55	hu1H4v6 HVRL3	QRSWEIPYT

[0001]

序列表

<110> 豪夫迈·罗氏有限公司 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG)

<120> 抗 IL-4 抗体和双特异性抗体及其用途

<130> P5609R1-W0

<140>

<141>

<150> 61/808, 748

<151> 2013-04-05

<160> 64

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<400> 1

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

115

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<400> 2

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

[0002]


```

      35              40              45
Val Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
      50              55              60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65              70              75              80
Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
Ala Arg Gly Gly Ile Phe Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      100             105             110
Leu Val Thr Val Ser Ser
      115
<210> 5
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的 多肽
<400> 5
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1              5              10              15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
      20              25              30
Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35              40              45

Val Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
      50              55              60
Lys Gly Arg Phe Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65              70              75              80
Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
Ala Arg Gly Gly Ile Phe Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      100             105             110
Leu Val Thr Val Ser Ser
      115
<210> 6
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的 多肽
<400> 6
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1              5              10              15

```

[0004]

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Ile Phe Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的 多肽

<400> 7

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Ile Phe Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的 多肽

[0005]

<400> 8
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Val Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Ile Phe Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的 多肽

<400> 9

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

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

[0006]

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的 多肽

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ile Asn Asp

20 25 30

Ala Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser His Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Thr Ser Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的 多肽

<400> 11

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ile Asn Asp

20 25 30

Ala Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser His Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Thr Ser Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的 肽

[0007]

<400> 12
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Met His
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 肽
 <400> 13
 Val Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly

 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 肽
 <400> 14
 Gly Gly Ile Phe Tyr Gly Met Asp Tyr
 1 5
 <210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 肽
 <400> 15
 Lys Ala Ser Gln Ser Val Ile Asn Asp Ala Ala
 1 5 10
 <210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 肽
 <400> 16
 Tyr Thr Ser His Arg Tyr Thr
 1 5
 <210> 17
 <211> 9

[0008]

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 肽
 <400> 17
 Gln Gln Asp Tyr Thr Ser Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 18
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 肽
 <400> 18
 Val Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 1 5 10 15
 Lys Gly

 <210> 19
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 多肽
 <400> 19
 Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr
 20 25 30
 Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
 65 70 75 80
 Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 20
 <211> 112
 <212> PRT

[0009]

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 多肽
 <400> 20
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 <210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 肽
 <400> 21
 Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr Ser Val Asn Trp
 1 5 10
 <210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 肽
 <400> 22
 Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 肽
 <400> 23

[0010]

Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 肽
 <400> 24

Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
 1 5 10 15
 <210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 肽
 <400> 25

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 肽
 <400> 26

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Thr
 1 5
 <210> 27
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 27

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

[0011]

Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys
 50 55 60
 Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu
 65 70 75 80
 Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala
 85 90 95
 Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala
 100 105 110
 Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu
 115 120 125
 Gly Arg Phe Asn
 130

<210> 30

<211> 114

<212> PRT

<213> 智人

<400> 30

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

<210> 31

<211> 122

<212> PRT

<213> 智人

<400> 31

Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser
 1 5 10 15
 Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn
 20 25 30
 Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu
 35 40 45

[0013]

Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser
 50 55 60
 Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys
 65 70 75 80
 Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp
 85 90 95
 Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu
 100 105 110
 Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Gln Phe Asn
 115 120
 <210> 32
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 食蟹猴(Macaca fascicularis)
 <400> 32
 Met Ala Leu Leu Leu Thr Met Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly
 1 5 10 15
 Phe Ala Ser Pro Ser Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Lys Glu Leu
 20 25 30
 Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys
 35 40 45
 Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Val Tyr Cys
 50 55 60
 Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu
 65 70 75 80
 Lys Thr Gln Arg Met Leu Asn Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala
 85 90 95
 Gly Gln Phe Ser Ser Leu Arg Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala
 100 105 110
 Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Val His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu
 115 120 125
 Gly Gln Phe Asn
 130
 <210> 33
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> 食蟹猴
 <400> 33
 Met Gly Leu Thr Ser Gln Leu Leu Pro Pro Leu Phe Phe Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Cys Ala Gly Asn Phe Val His Gly His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln
 20 25 30
 Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys
 35 40 45

[0014]

Thr Lys Leu Thr Ile Thr Asp Ile Leu Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr
 50 55 60
 Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr
 65 70 75 80
 Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln
 85 90 95
 Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg
 100 105 110
 Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala
 115 120 125
 Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met
 130 135 140
 Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser Ser
 145 150
 <210> 34
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 多肽
 <400> 34
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

[0015]

```

180          185          190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195          200          205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210          215          220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225          230          235          240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245          250          255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260          265          270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275          280          285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290          295          300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305          310          315          320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325          330
<210> 35
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的 多肽
<400> 35
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1          5          10          15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20          25          30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35          40          45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50          55          60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65          70          75          80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85          90          95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100         105         110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115         120         125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

```

[0016]

130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 36
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 多肽
 <400> 36
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

[0017]

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325
 <210> 37
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 多肽
 <400> 37
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

[0018]

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

 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 38

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的 多肽

<400> 38

[0019]

340 345 350
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 <210> 39
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 多肽
 <400> 39
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ile Asn Asp
 20 25 30
 Ala Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser His Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Thr Ser Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

[0021]

180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 40
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 多肽
 <400> 40
 Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr
 20 25 30
 Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
 65 70 75 80
 Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

[0022]

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 <210> 41
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 多肽
 <400> 41
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

[0023]

100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 42
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 42
 Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly
 1 5
 <210> 43
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 43
 Tyr Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser
 1 5 10
 <210> 44
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 多肽
 <400> 44
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

[0024]

130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 48
 <211> 111
 <212> PRT

[0027]

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 多肽
 <400> 48
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
 85 90 95
 Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 49
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 多肽
 <400> 49
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Asp Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ile Gly Thr Asn Tyr Gly Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 50
 <211> 12
 <212> PRT

[0028]

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 肽
 <400> 50
 Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Asp Met Gly Val Gly
 1 5 10
 <210> 51
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 肽
 <400> 51
 Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys
 1 5 10 15
 Ser

 <210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 肽
 <400> 52
 Ala Arg Ile Gly Thr Asn Tyr Gly Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10 15
 <210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 肽
 <400> 53
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met Asn
 1 5 10 15
 <210> 54
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 肽
 <400> 54
 Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

[0029]

<210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 肽
 <400> 55
 Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 56
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 多肽
 <400> 56
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr
 20 25 30
 Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
 65 70 75 80
 Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 57
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 多肽
 <400> 57
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

[0030]

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 <210> 59
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的 多肽
 <400> 59
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

[0032]

	85	90	95
Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	100	105	
<210> 64			
<211> 110			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成的 多肽			
<400> 64			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
	20	25	30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ser Val Ile Ser Ser Lys Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
	65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	100	105	110

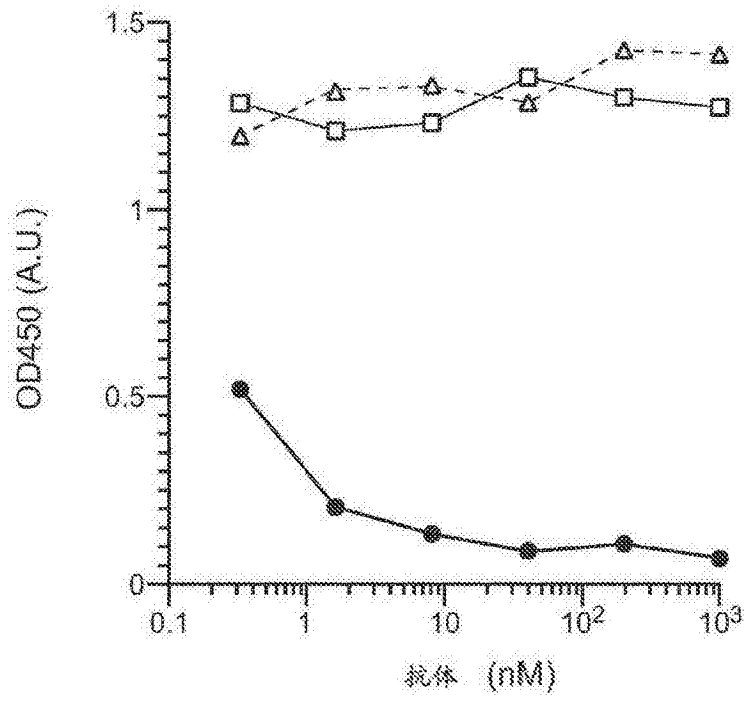


图 1A

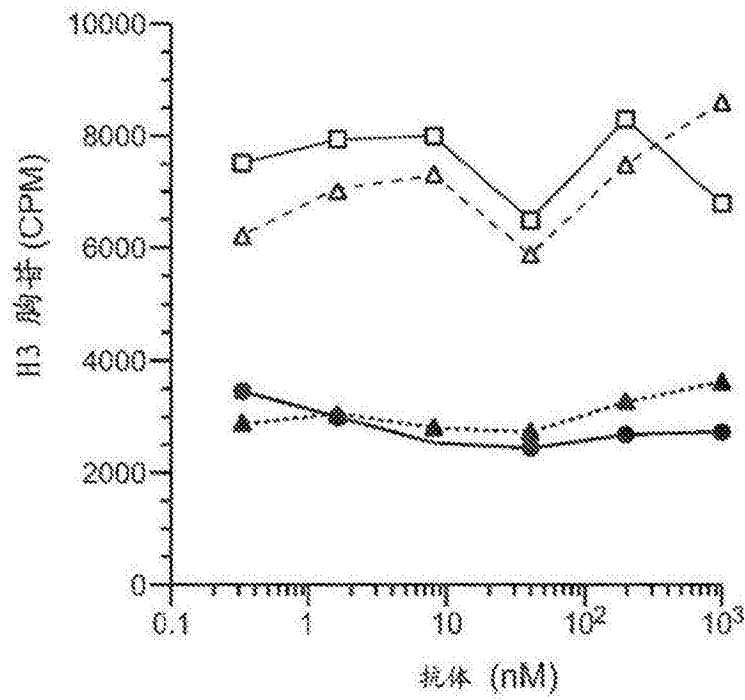


图 1B

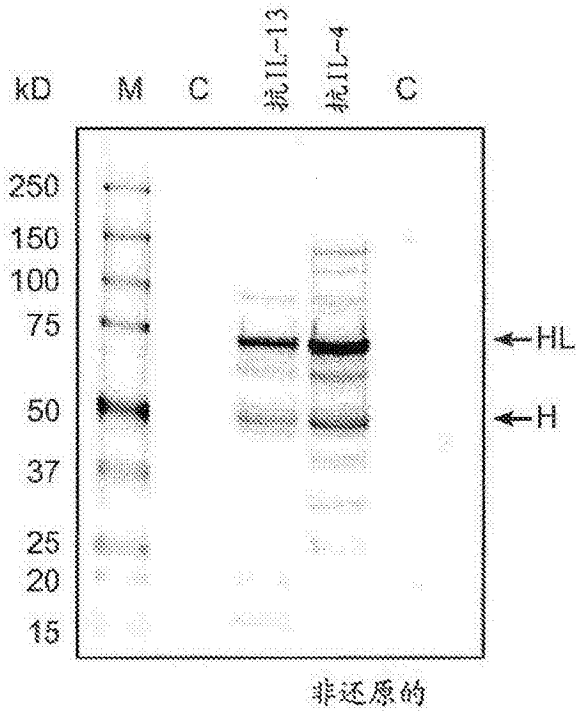


图 2A

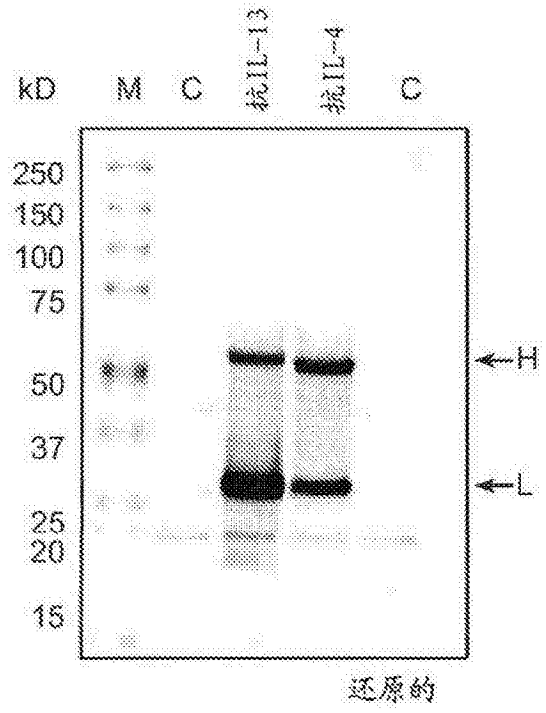


图 2B

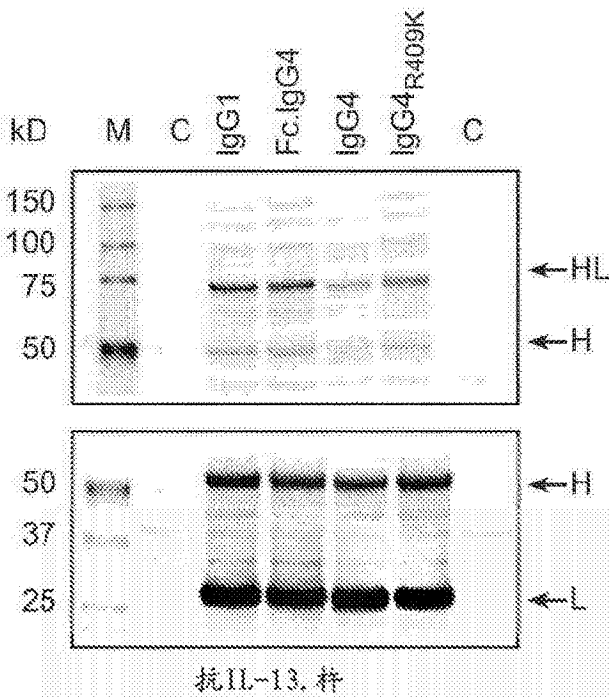


图 2C

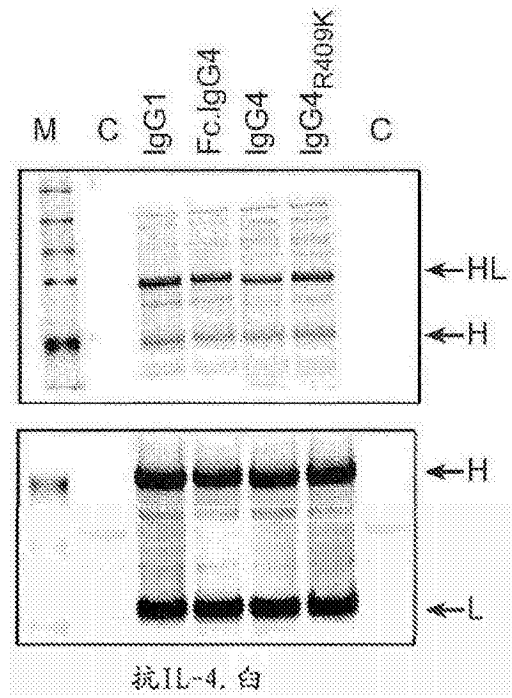


图 2D

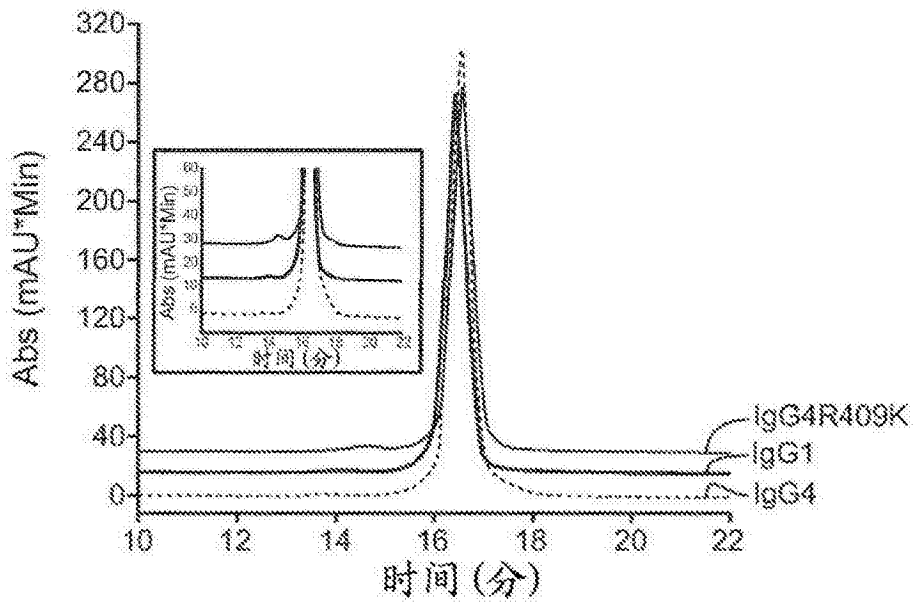


图 3A

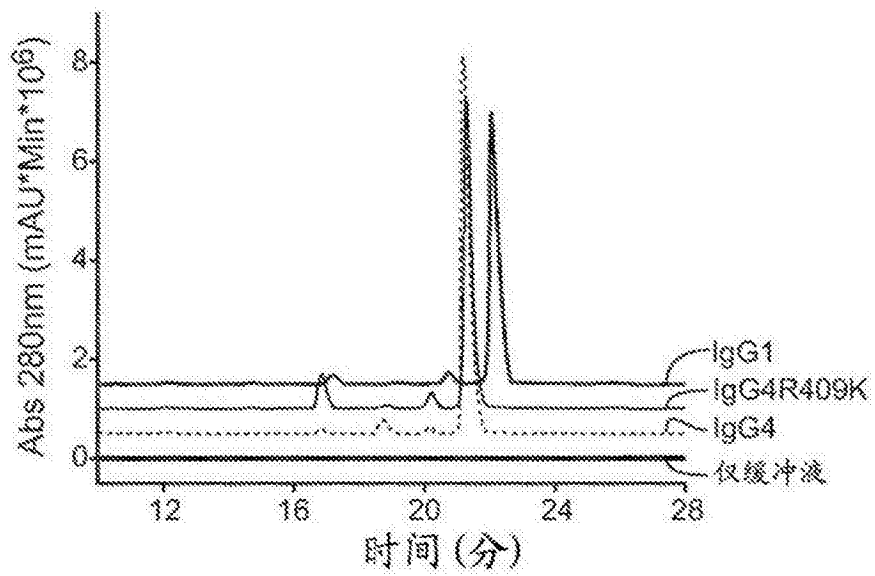


图 3B

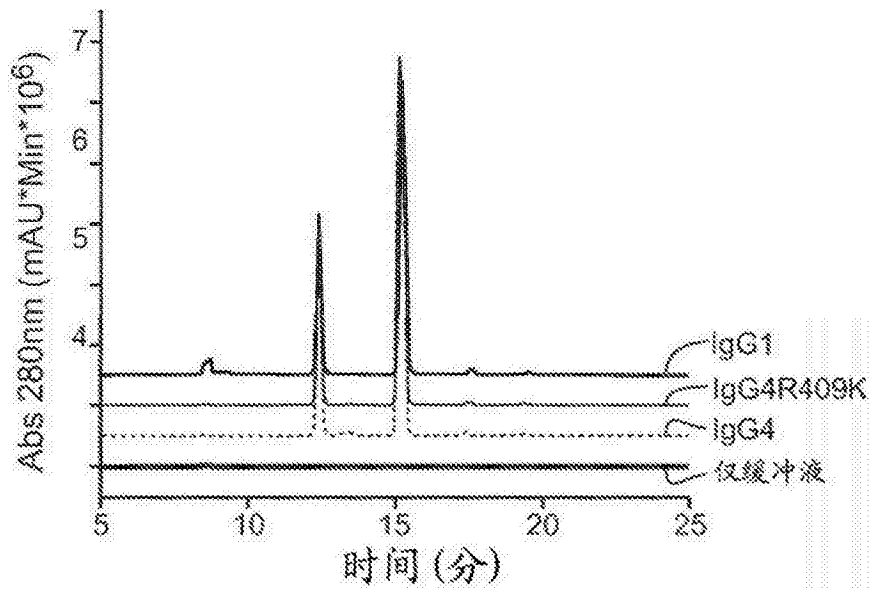


图 3C

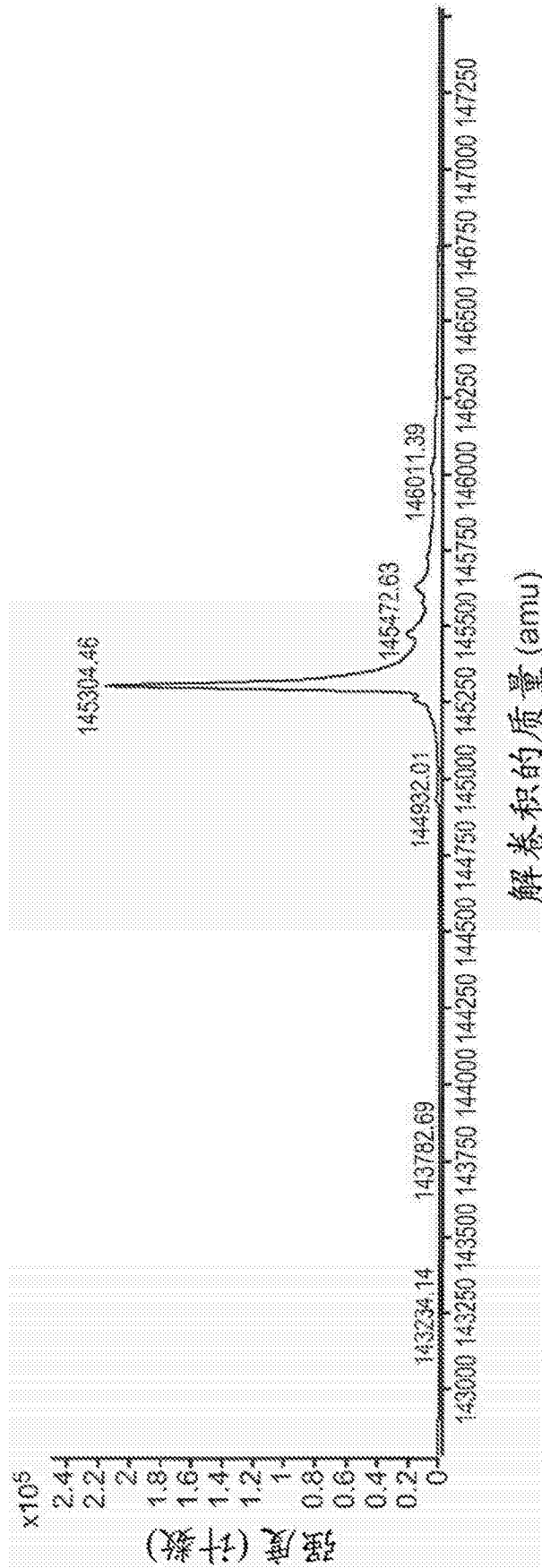


图 4A

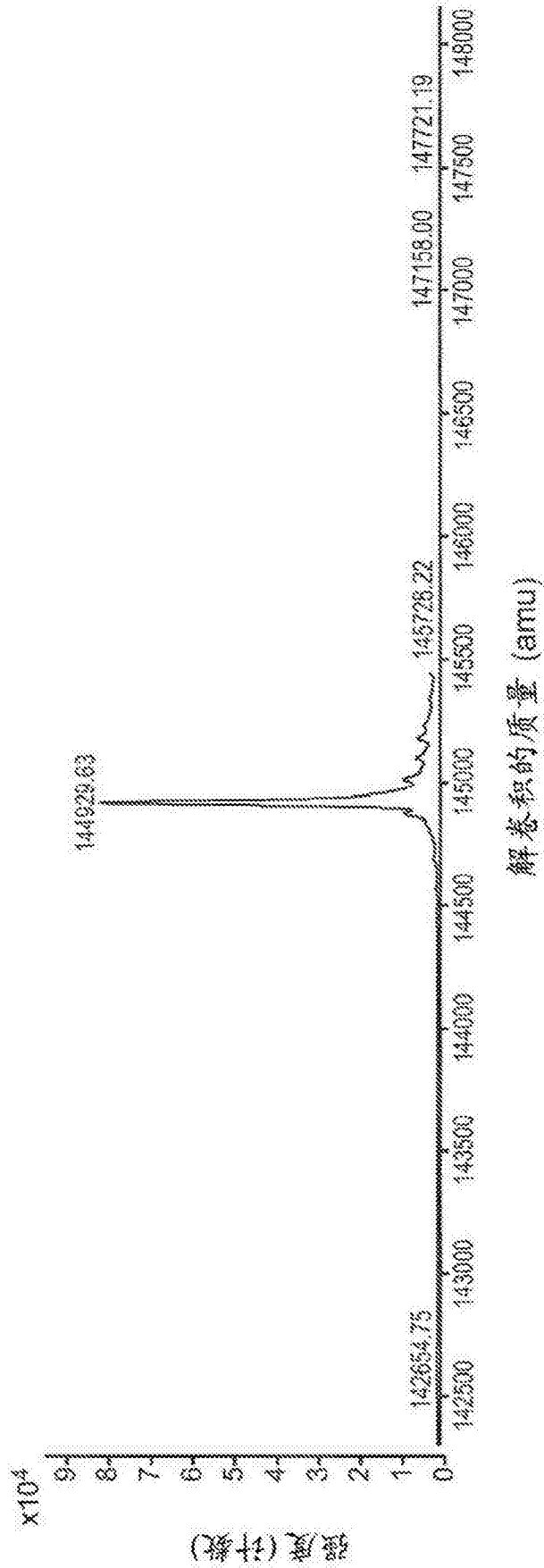


图 4B

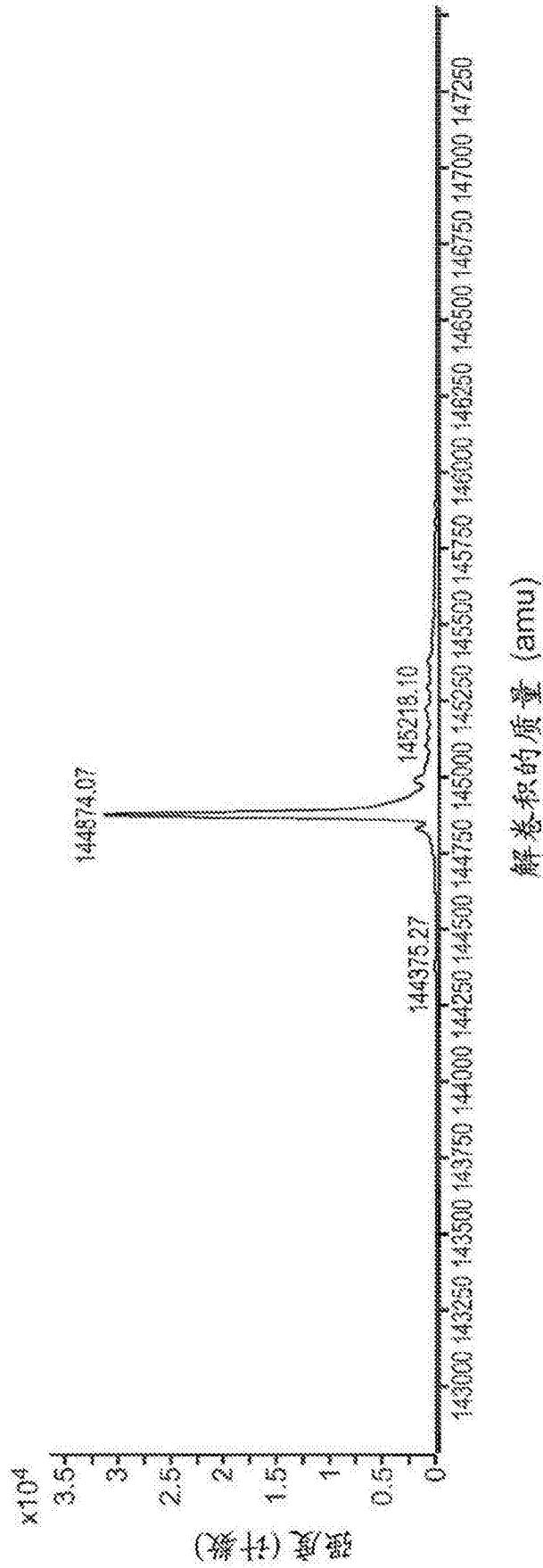


图 4C

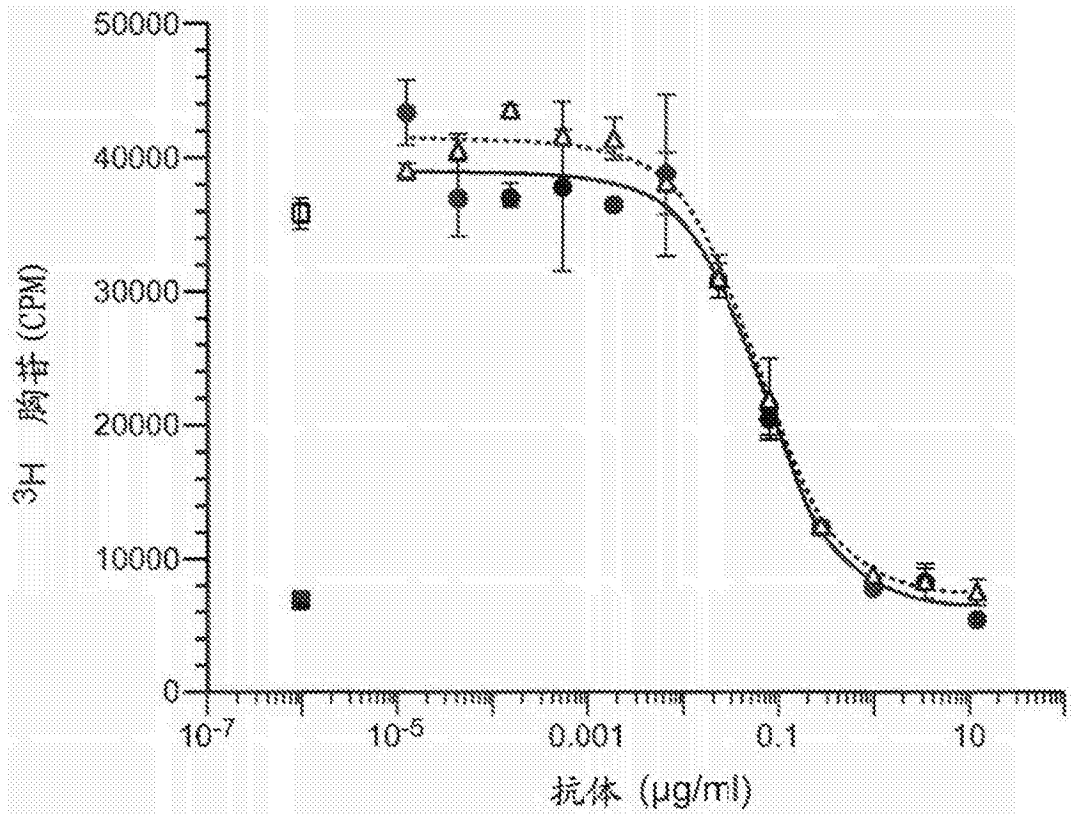


图 5A

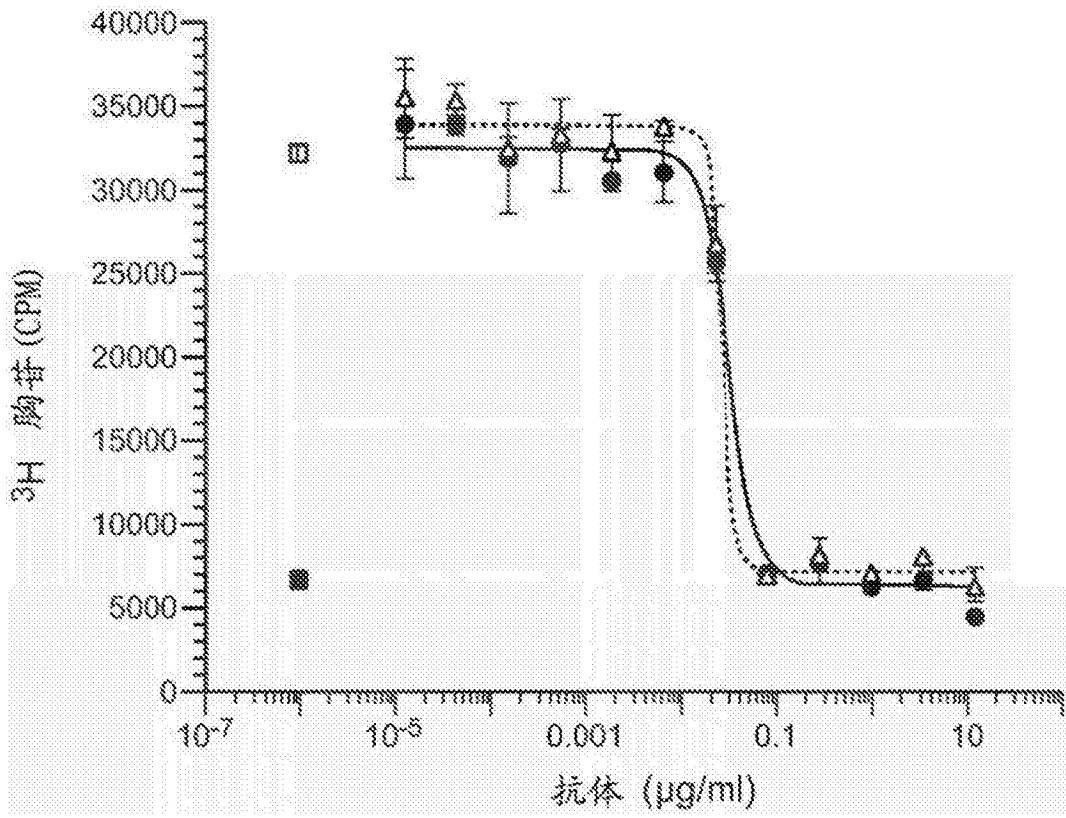


图 5B

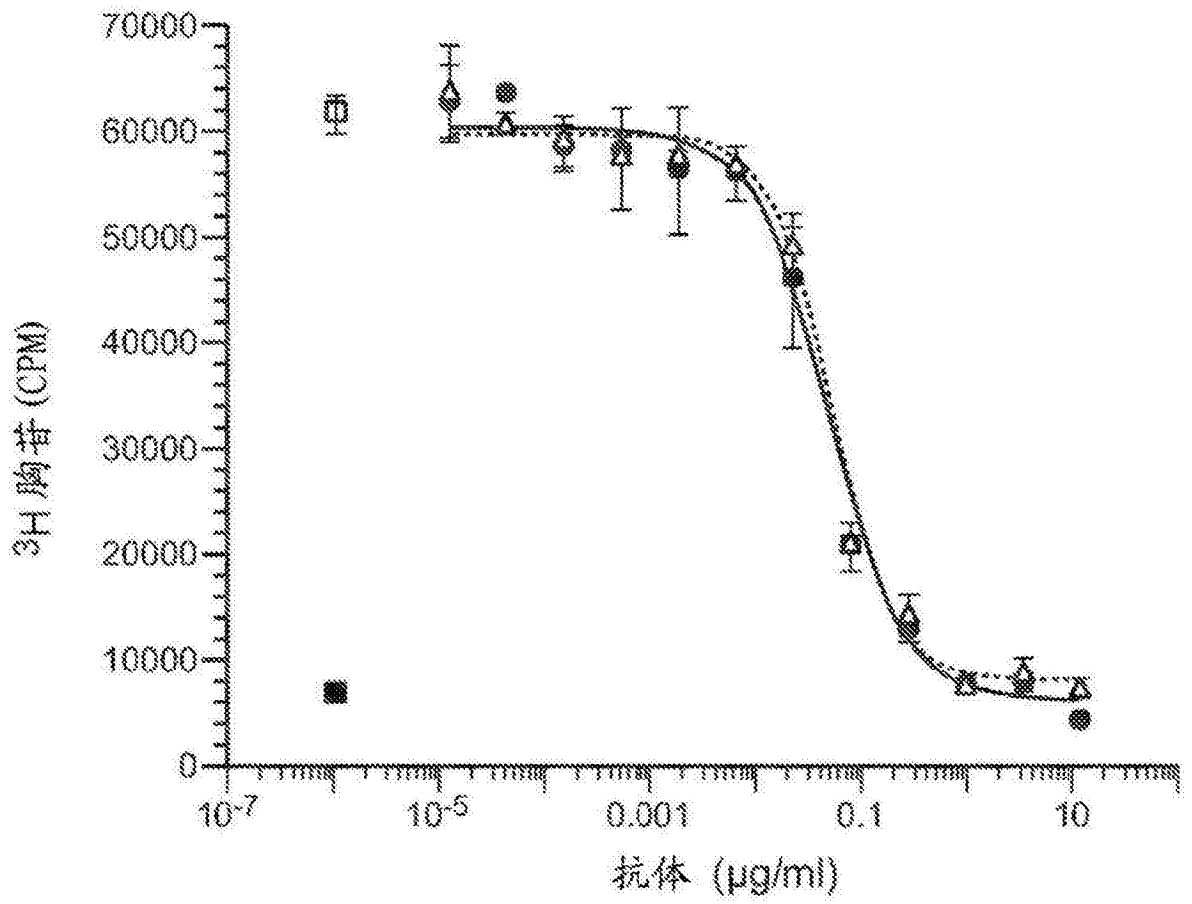


图 5C

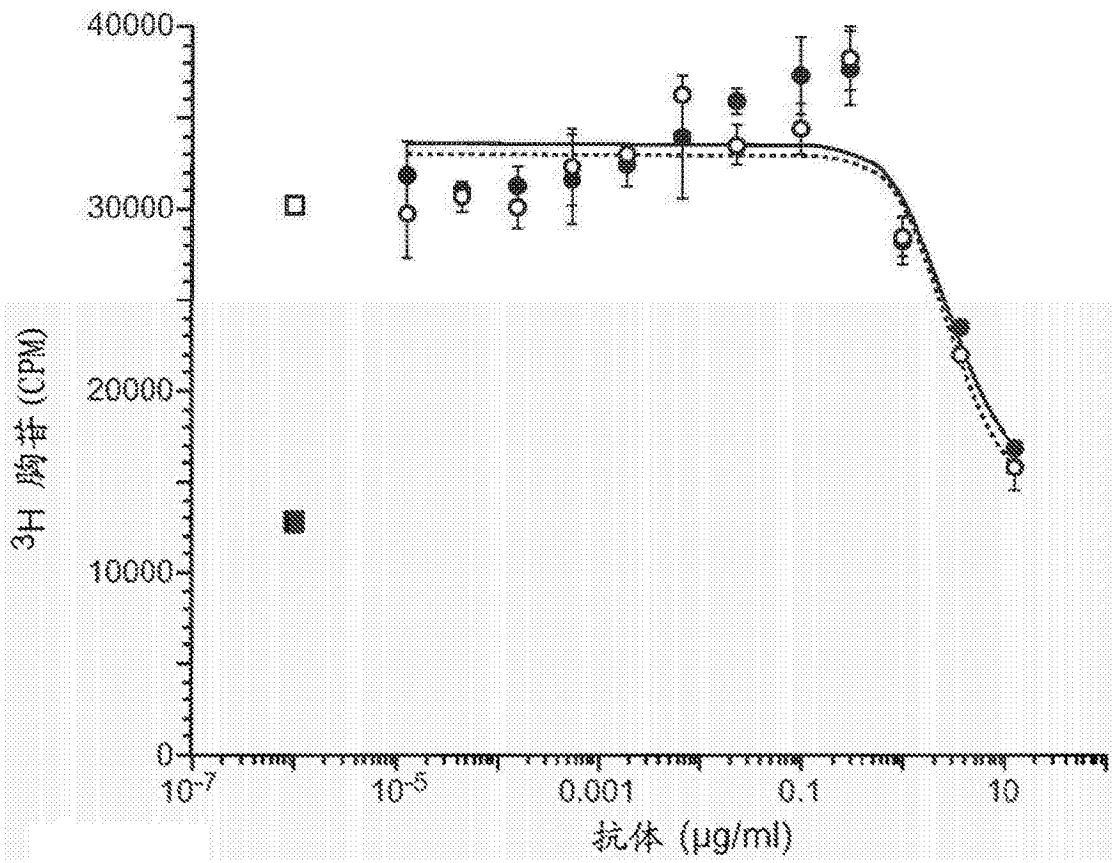


图 6A

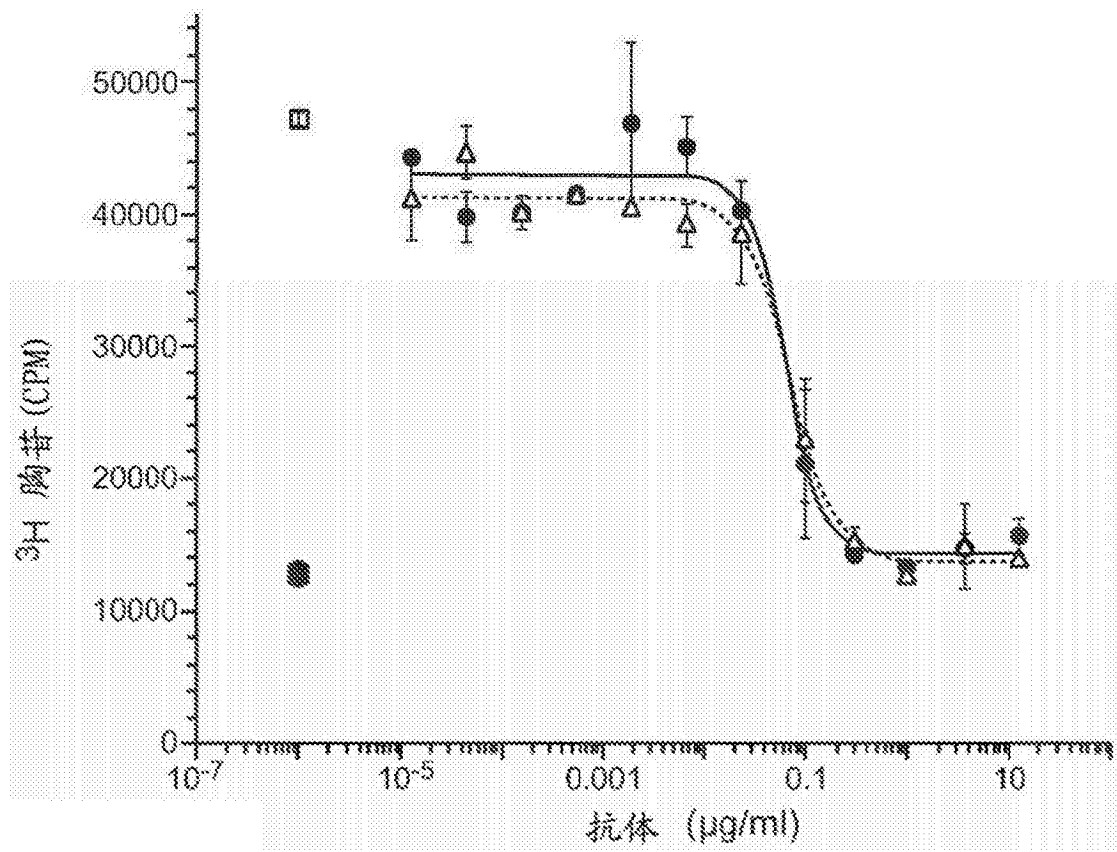


图 6B

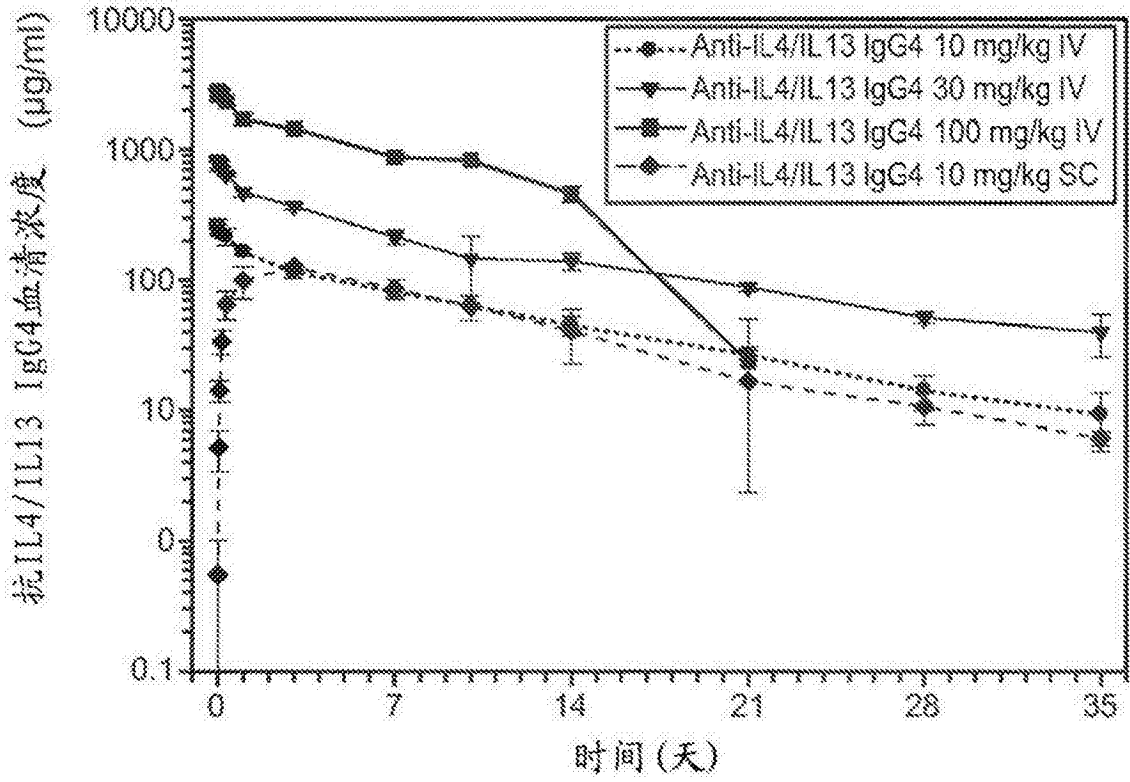


图 7A

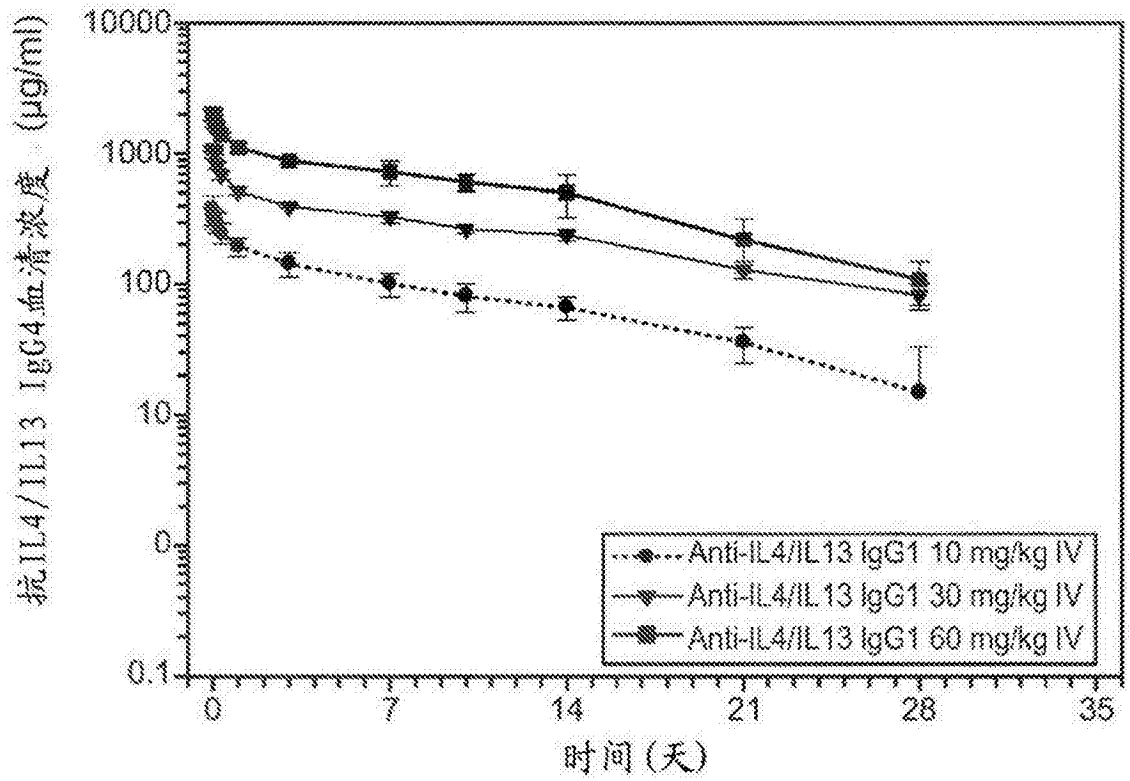


图 7B

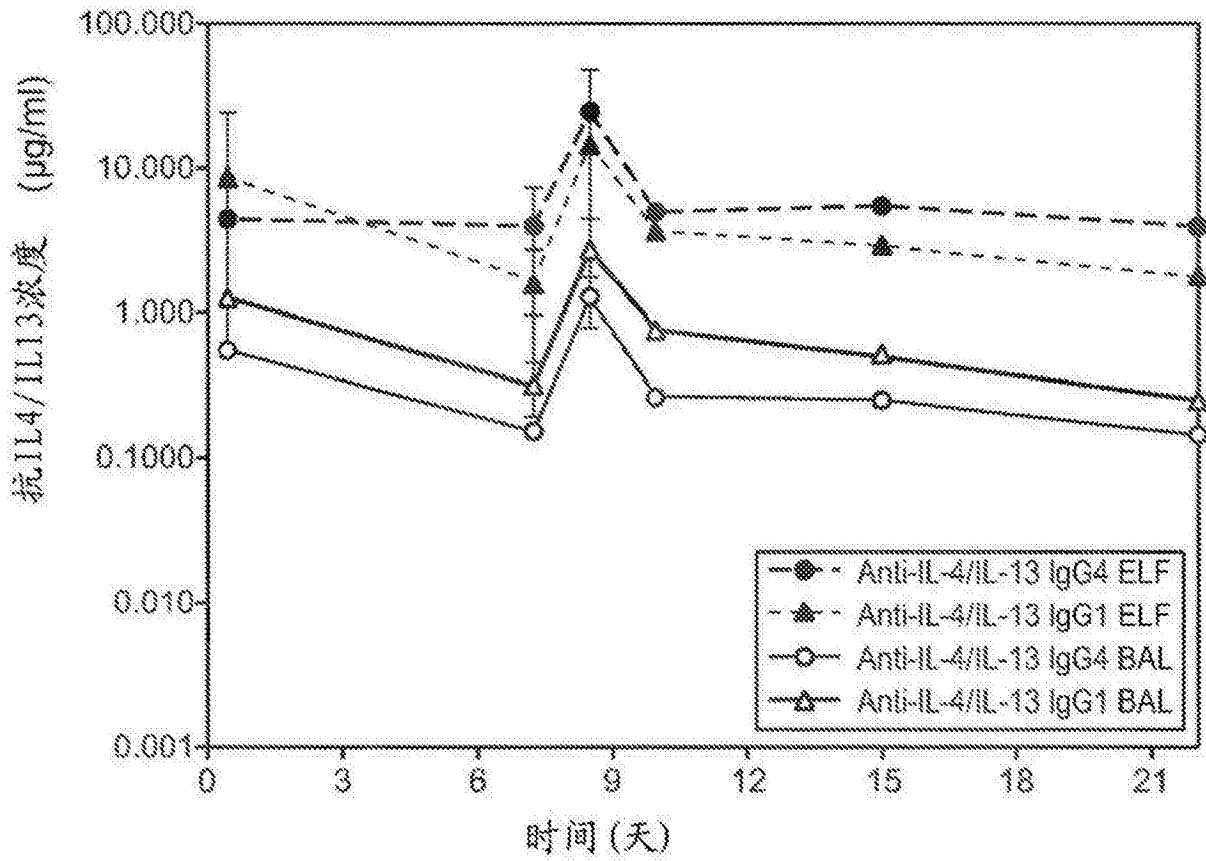


图 8

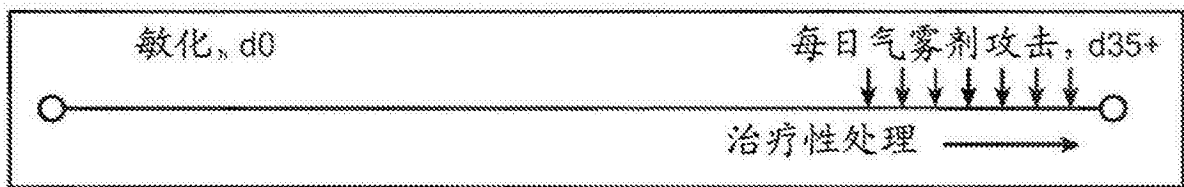


图 9A

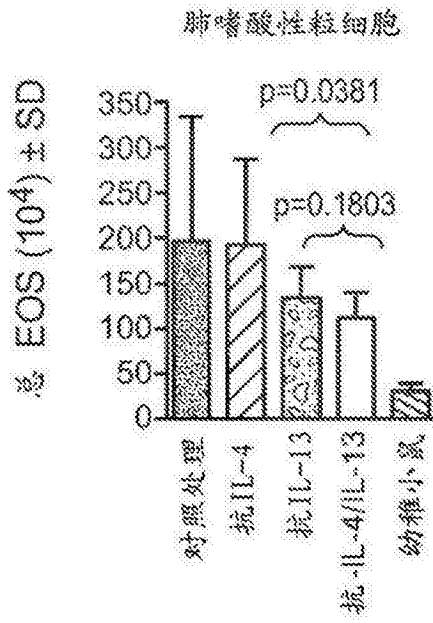


图 9B

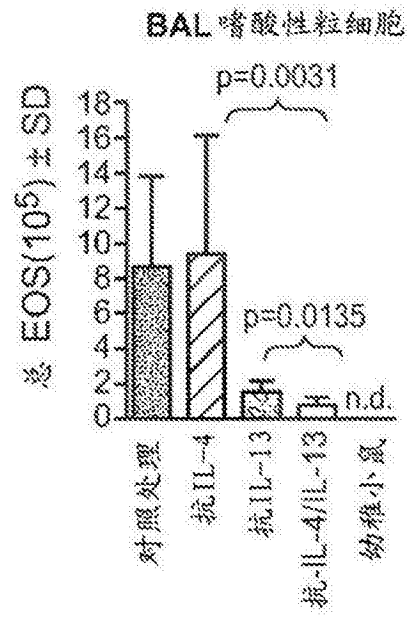


图 9C

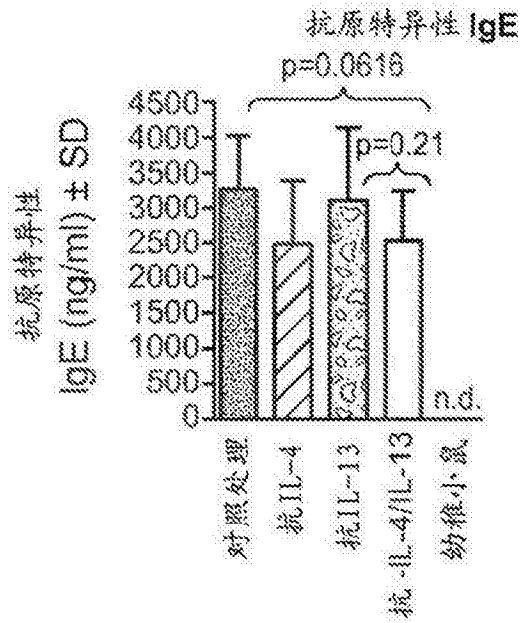


图 9D

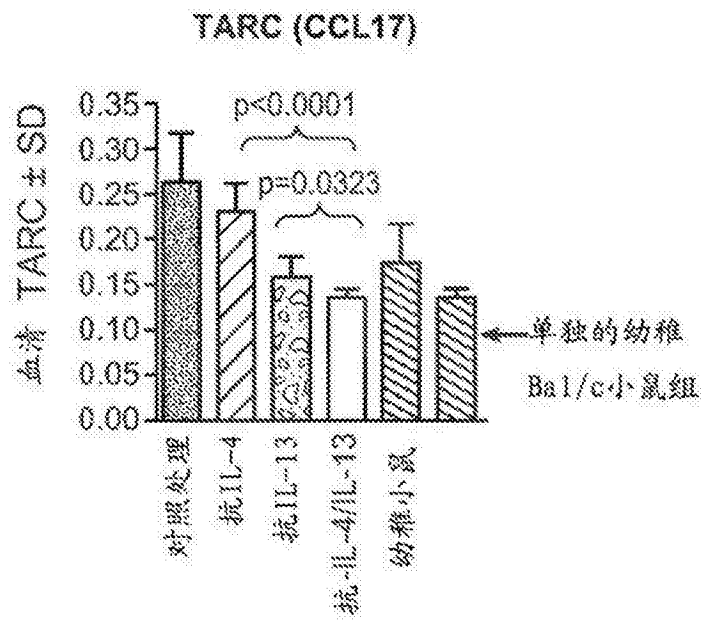


图 9E

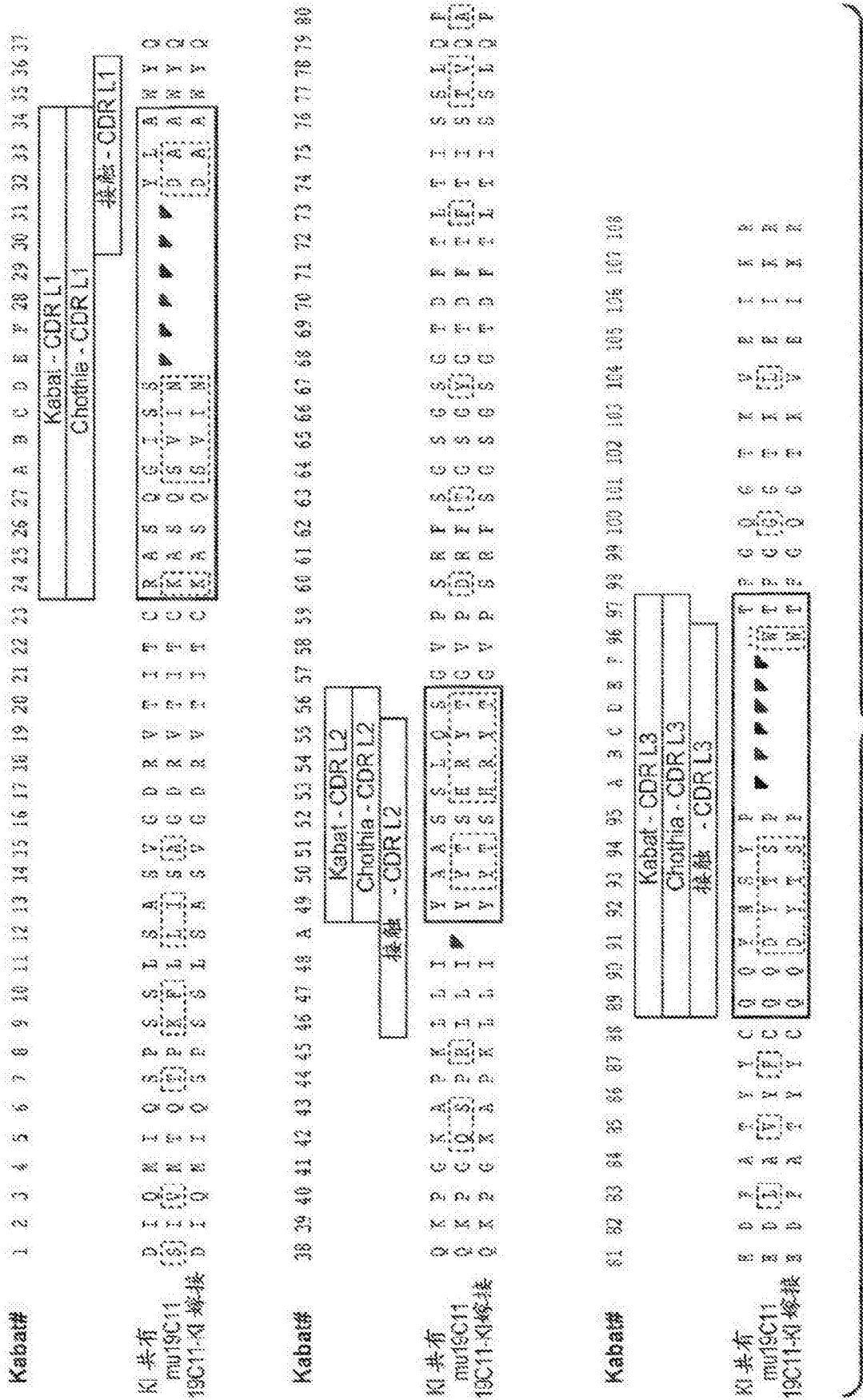


图 10

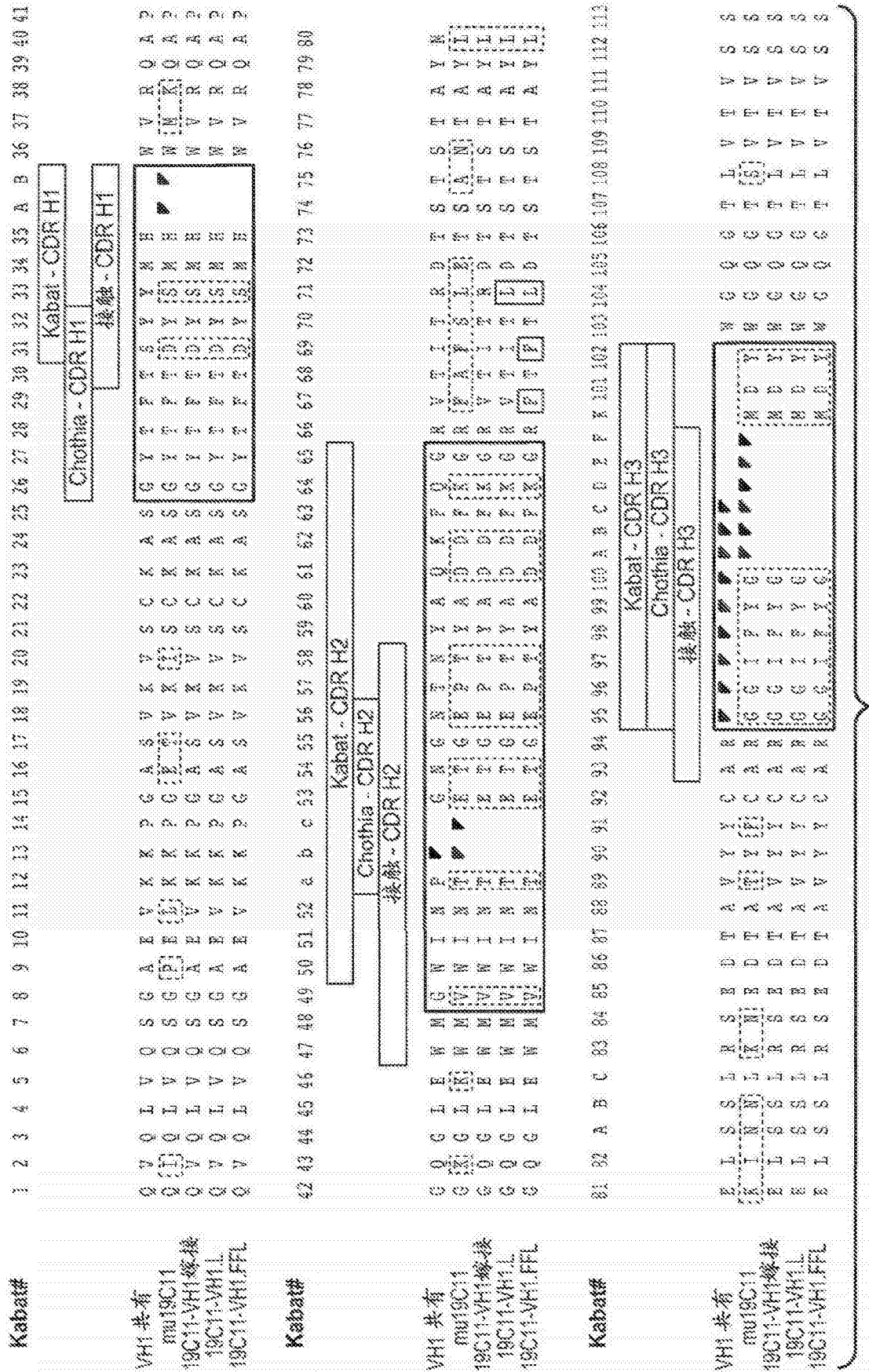


图 12

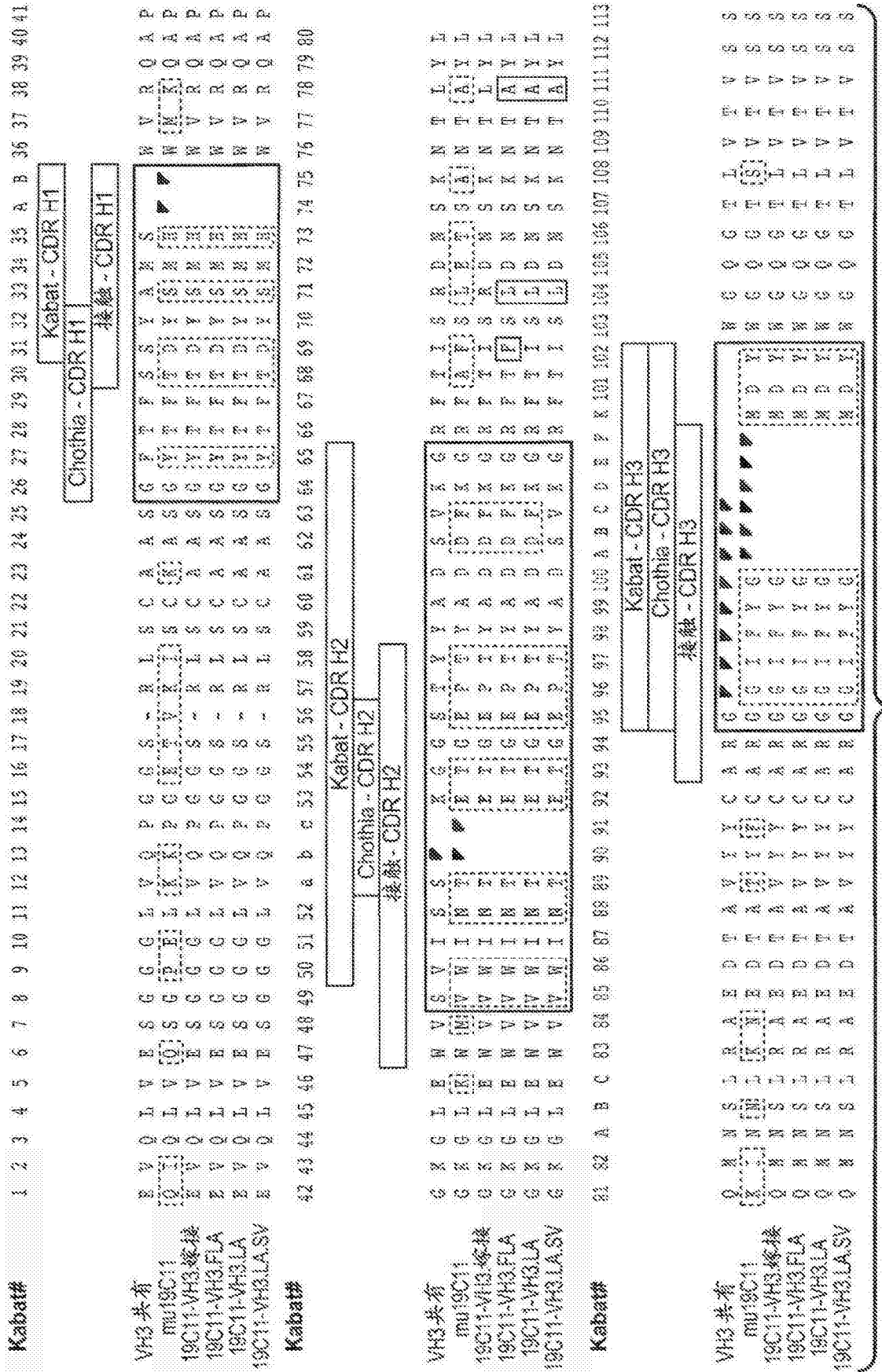


图 13

	HuKI Kd (pM)	HuKIII Kd (pM)
HuVH _I	24	<10
HuVH _I (L)	<10	<10
HuVH _I (FFL)	<10	11
HuVH _{III}	84	26
HuVH _{III} (LA)	<10	<10
HuVH _{III} (FLA)	140	11
19C11 嵌合体	<10	




图 14

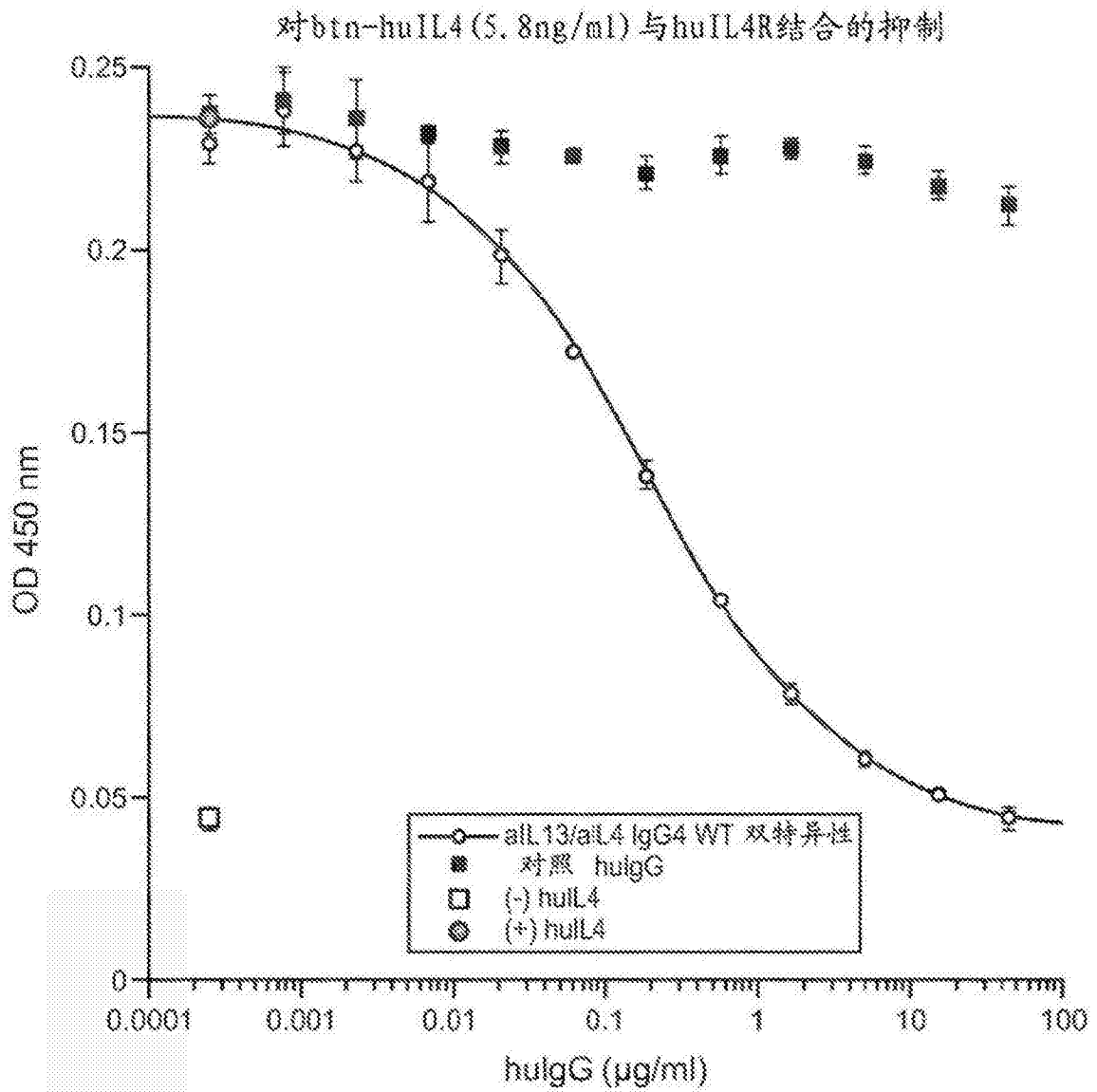


图 15

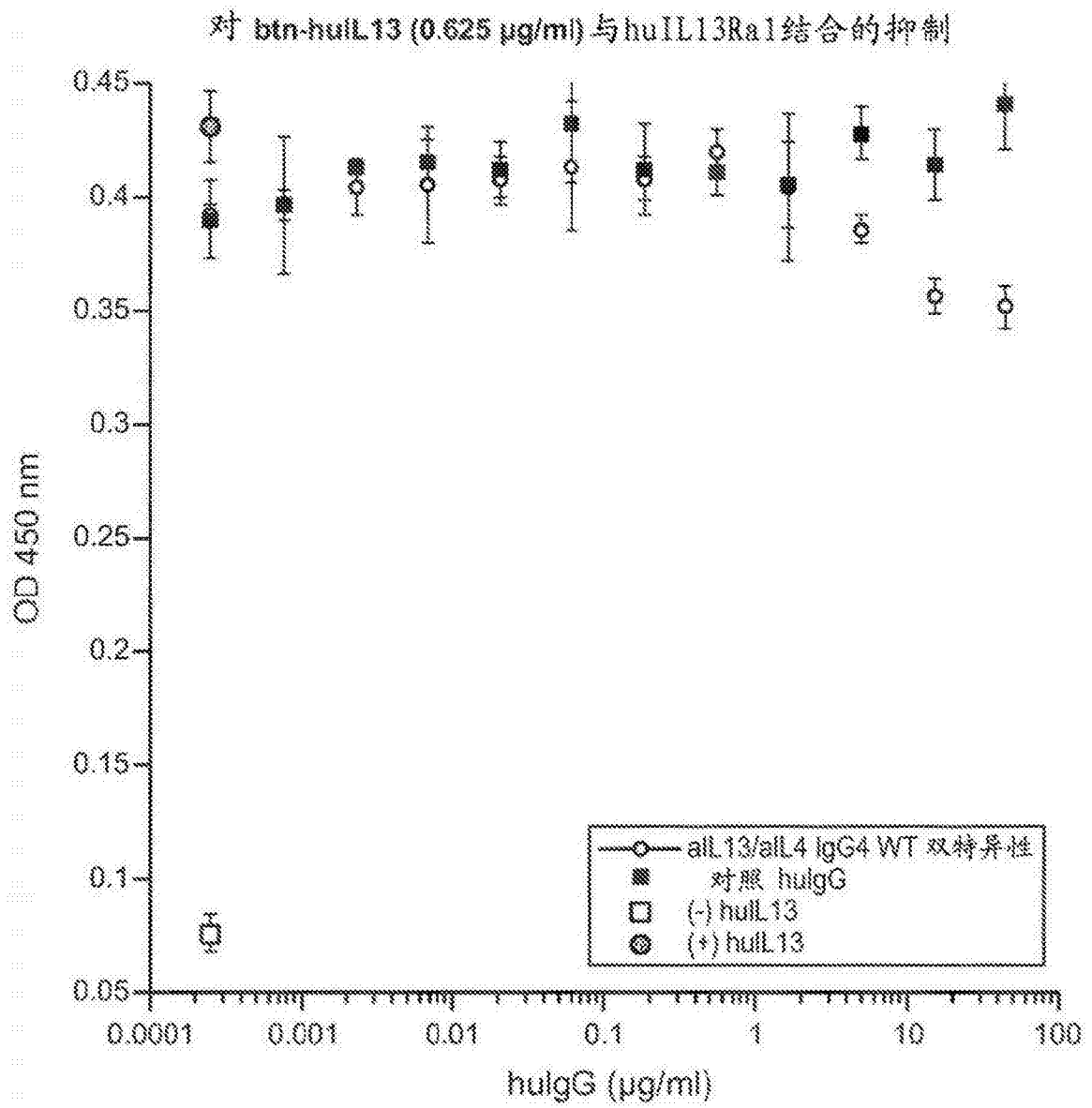


图 16

对 b1n-huIL13 (0.056 $\mu\text{g/ml}$) 与 huIL-13Ra2 结合的抑制

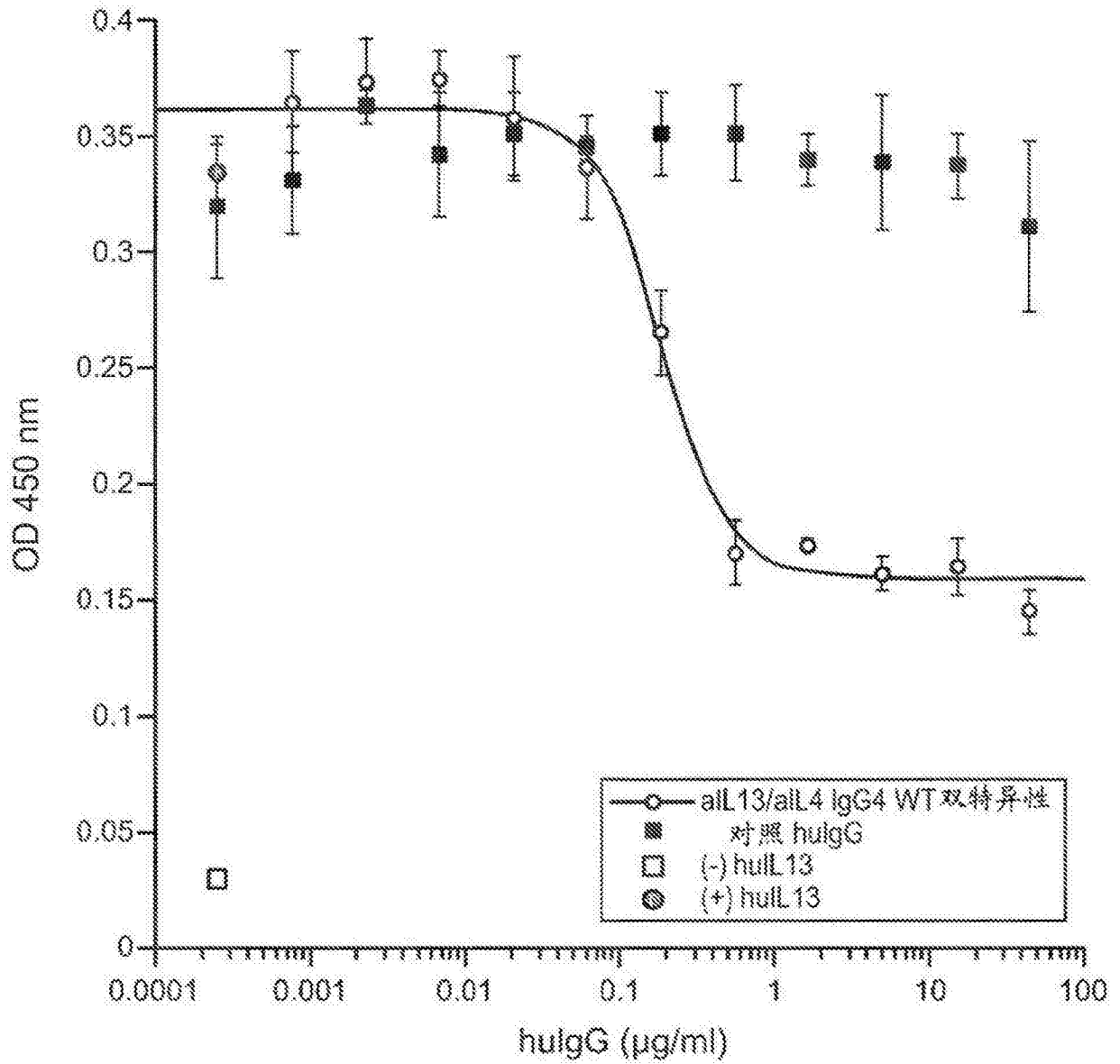


图 17

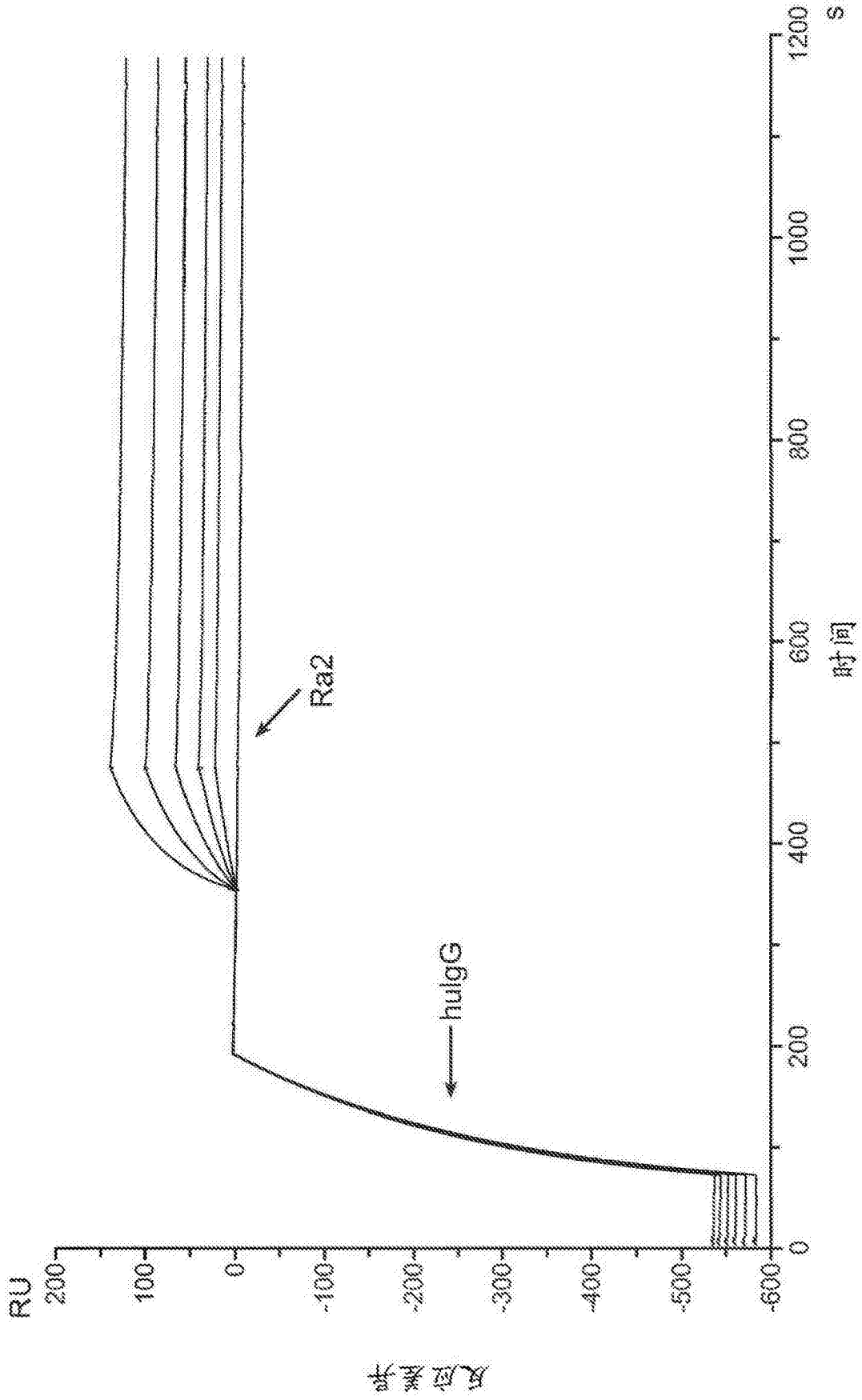


图 18