201536321

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201536321 A

(43)公開日： 中華民國 104 (2015) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：104112966 (22)申請日： 中華民國 97 (2008) 年 10 月 15 日

(51)Int. Cl.： *A61K39/395 (2006.01)* *C07K16/24 (2006.01)*
A61P11/06 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2007/10/15 歐洲專利局 07291259.5
2008/03/17 美國 61/037,128

(71)申請人：賽諾菲阿凡提斯公司 (法國) SANOFI-AVENTIS (FR)
法國

(72)發明人：雷 艾克 RAO, ERCOLE (DE)；麥 寇爾 MIKOL, VINCENT (FR)；李丹西 LI, DANXI (US)；克 魯普 KRUIP, JOCHEN (DE)；戴 維遜 DAVISON, MATTHEW (GB)

(74)代理人：林秋琴；何愛文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：2 共 113 頁

(54)名稱

結合ＩＬ-４及／或ＩＬ-１３之抗體及其用途（一）

ANTIBODIES THAT BIND IL-4 AND/OR IL-13 AND THEIR USES

(57)摘要

本發明係關於一種新穎的人類化抗 IL-4 和 IL-13 抗體及其片段，以及特異地結合到 IL-4 和 IL-13 的新穎雙特異抗體及其片段。本發明還包括使用這些抗體來治療或預防 IL-4 和/或 IL-13 介導的疾病或失調之用途，包括過敏性哮喘和皮炎。

The present invention relates to novel humanized anti-IL-4 and IL-13 antibodies and fragments thereof and novel bispecific antibodies and fragments thereof that specifically bind to IL-4 and IL-13. The invention also includes uses of the antibodies to treat or prevent IL-4 and/or IL-13 mediated diseases or disorders, including allergic asthma and dermatitis.

圖 2

Anti-IL13 hB-B13 VL3 (SEQ ID NO: 1):
DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISC**RASESVD SYGQSYMH**WY QQKAGQPPKL
LIY**LASNLES** GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQAEDAATY YC**QQNAEDSR**
TFGGGTKLEI K

Anti-IL13 hB-B13 VH2 (SEQ ID NO: 2):
EVQLKESGPG LVAPGGSLSI TCTVS**GFSLT DSSIN**WVRQP PGKGLEWLGM
IWG**DGRID**YA DALKSRLSIS KDSSKSQVFL EMTSLRTDDT ATYYCAR**DGY**
FPYAMDFWGQ GTSVTVSS

Anti-IL4 h8D4-8 VL1 (SEQ ID NO: 3):
DIQMTQSPAS LSVSVGDTIT LTC**HASQNID VWLS**WFQQKP GNIPKLLIY**K**
ASNLHTGVPS RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYC**QQ AHSYPFT**FGG
GTKLEIKR

Anti-IL4 h8D4-8 VH1 (SEQ ID NO: 4):
QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKAS**GYSFT SYWIH**WIKQR PGQGLEWIGM
IDPSDGETRL NQRFQGRATL TVDESTSTAY MQLRSPTSED SAVYYCTR**LK**
EYGNYDSFYF DVWGAGTLVT VSSA

Anti-IL4 h8D4-8 VH2 (SEQ ID NO: 5):
QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKAS**GYSFT SYWIH**WIKQR PGQGLEWIGM
IDASDGETRL NQRFQGRATL TVDESTSTAY MQLRSPTSED SAVYYCTR**LK**
EYGNYDSFYF DVWGAGTLVT VSSA

201536321

發明摘要

※申請案號：104112966(由97139453分割)

※申請日：97.10.15 ※IPC 分類：A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】

結合 IL-4 及/或 IL-13 之抗體及其用途

ANTIBODIES THAT BIND IL-4 AND/OR IL-13 AND THEIR USES

【中文】

本發明係關於一種新穎的人類化抗 IL-4 和 IL-13 抗體及其片段，以及特異地結合到 IL-4 和 IL-13 的新穎雙特異抗體及其片段。本發明還包括使用這些抗體來治療或預防 IL-4 和/或 IL-13 介導的疾病或失調之用途，包括過敏性哮喘和皮炎。

【英文】

The present invention relates to novel humanized anti-IL-4 and IL-13 antibodies and fragments thereof and novel bispecific antibodies and fragments thereof that specifically bind to IL-4 and IL-13. The invention also includes uses of the antibodies to treat or prevent IL-4 and/or IL-13 mediated diseases or disorders, including allergic asthma and dermatitis.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(　2　)圖

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】

結合 IL-4 及/或 IL-13 之抗體及其用途

ANTIBODIES THAT BIND IL-4 AND/OR IL-13 AND THEIR USES

【技術領域】

本發明之領域

本發明係關於新穎的抗 IL-4 抗體、抗 IL-13 抗體以及雙特異抗 IL-4 和/或抗 IL-13 抗體及其在因不當的 IL-4 和/或 IL-13 活性或代謝而造成的哺乳動物包括人類的疾病或失調的改善、治療和預防上的用途。所研究的抗體可能阻斷配體如 IL-4 或 IL-13 與受體或受體複合物如 IL-4Rα、IL-13Rα1 和 IL-13Rα2 的結合和/或信號發送。本發明還揭示包含所研究抗體的預防、免疫治療和診斷組成物以及它們在預防或治療哺乳動物包括人類的疾病的方法中的用途，這些疾病是由淋巴細胞和非淋巴細胞，包括單核細胞、纖維母細胞和內皮細胞的不適當代謝和/或活性而引起。這些疾病包括自體免疫缺陷以及由炎症引起或以炎症為特徵的疾病，如過敏性哮喘和皮炎。

【先前技術】

本發明之背景

白介素-4 (IL-4)是一種對於淋巴 B 和 T 細胞以及許多非淋巴細胞，包括單核細胞、內皮細胞和纖維母細胞具有廣譜生物效應的多效性細胞激素。例如，IL-4 刺激幾個依賴於 IL-2 和 IL-3 的細胞系，誘導 II 類主要組織相容性複合分子在靜息 B 細胞上的表現，並增強人類 B 細胞的 IgG4 和 IgE 分泌。IL-4 與 Th2-型的免疫反應有關，

是由 Th2 細胞產生，並促進 Th2 細胞的分化。多種失調都牽涉到 IL-4，如過敏和哮喘。

IL-13 是最近發現的由活化 T 淋巴細胞、B 淋巴細胞以及活化後的肥大細胞分泌的由 112 個胺基酸組成的細胞激素(Minty, A. et al., Nature, 1993, 362, 248-250, and McKenzie, A. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 1993, 90, 3735-3739)。

由於和 IL-4 具有許多共同的生物特性，IL-13 被描述為一個 IL-4 樣的細胞激素。在 B 細胞(Defrance, T. et al., J. Exp. Med., 1994, 179, 135-143, Punnonen, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 1993, 90, 3730-3734, Fior, R. et al., Eur. Cytokine Network, 1994, 5, 593-600)、單核細胞(Muzio, M. R. F. et al., Blood, 1994, 83, 1738-1743, De Waal Malefyt, R. et al., J. Immunol, 1993, 151, 6370-6381, Doyle, A. et al., Eur. J. Immunol. 1994, 24, 1441-1445, Montaner, L. J. et al., J. Exp. Med., 1993, 178, 743-747, Sozzani, P. et al., J. Biol. Chem., 1995, 270, 5084-5088)以及其他非造血細胞(Herbert, J. M. et al., Febs Lett., 1993, 328, 268-270 及 Derocq, J. M. et al., Febs Lett. 1994, 343, 32-36)上，其活性確實類似於 IL-4 的活性。另一方面，與 IL-4 相反，它對靜息細胞或活化的 T 細胞並沒有特異效應(Zurawuki, G. et al., Immunol. Today, 1994, 15, 19-26)。

A. J. Minty 以及關於 IL-13 的評論文章詳細地描述 IL-13 在單核細胞/巨噬細胞、B 淋巴細胞以及有些造血細胞前體上的各種生物活性。此外，還有幾份資料表明，此細胞激素在其他細胞類型上具有多效作用。這些直接受到 IL-13 影響的非造血細胞為內皮細胞、小膠質細胞、角質細胞以及腎和結腸癌細胞。

細胞內生物分子所發射信號的分析步驟之一是識別其膜受體。針對 IL-13 受體的研究表明，IL-13 和 IL-4 有一個共同的受體，

或者至少具有某種共同受體複合物的一些組份，以及共同的信號轉導元素 (Zurawski S. M. et al., Embo Journal, 1993, 12, 2663-2670, Aversa, G. et al., J. Exp. Med., 1993, 178, 2213-2218, Vita, N. et al., Biol. Chem., 1995, 270, 3512-3517, Lefort, S. et al., Febs Lett., 1995, 366, 122-126)。這一受體存在於各種類型細胞的表面，其數目隨細胞類型不同而有變化。A. J. Minty 指出 IL-13 和 IL-4 受體之相當的分佈(Interleukin-13 for Cytokines in Health and Disease (健康和疾病中的細胞激素白介素-13). Eds D. G. Remick and J. S. Frie, Marcel Decker, N.Y. 1996)。

細胞表面受體和受體複合物以不同的親和力與 IL-4 和/或 IL-13 結合。與 IL-4 和/或 IL-13 受體和受體複合物的主要組份為 IL-4Rα、IL-13Rαl 和 IL-13Rα2。這些鏈係以 IL-4Rα/IL-13Rαl (II 型 IL-4R)或 IL-4Rα/γc (I 型 IL-4R)的單體或異質二聚體表現在細胞表面上。IL-4Rα 單體和 IL-4Rα/γc 異質二聚體與 IL-4 結合，但不與 IL-13 結合。IL-13Rα1 和 IL-13Rα2 單體與 IL-13 結合，但不與 IL-4 結合。IL-4Rα/IL-13Rα1 異質二聚體與 IL-4 與 IL-13 二者結合 (Murata et al., Int. J. Hematol., 1999, 69, 13-20)。

Th2-型免疫反應促進抗體生成和體液免疫，並被精心設計用來抵禦細胞外病原體。Th2 細胞是產生 Ig 的介導體(體液免疫)並產生 IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10 和 IL-13 (Tanaka, et, al., Cytokine Regulation of Humoral Immunity (體液免疫的細胞激素調控)，251-272, Snapper, ed., John Wiley and Sons, New York (1996))。Th2-型免疫反應的特徵是產生某些類型的細胞激素(如 IL-4，IL-13)以及特定類型的抗體(IgE，IgG4)，屬於典型的過敏性反應，可能造成流眼水和哮喘症狀，如氣道發炎和肺中氣道肌肉細胞的收縮。

根據其生物學功能，IL-4 和 IL-13 都是具有重要治療意義的細胞激素，且在許多疾病包括哮喘中扮演關鍵的角色(Curr Opin Allergy Clin Immunol 2005, Vo. 5, 161-166)。IL-4 已被證明能夠抑制自體免疫疾病，IL-4 和 IL-13 都證明具有增強抗癌免疫反應的潛力。由於這兩個細胞激素都涉及到過敏性疾病的發病機制，因此，這些細胞激素的抑制劑應該能夠提供治療上的益處。

因此，需要能夠分別抑制 IL-4 和 IL-13 的抑制劑，以及同時抑制 IL-4 與 IL-13 二者的抑制劑。

【發明內容】

本發明之概要

本發明提供可特異地結合到 IL-4 和/或 IL-13 的人類化單株和雙特異新穎抗體及其片段或衍生物。有些抗 IL-4 和/或 IL-13 單或雙特異抗體及其片段可以改變，以防止形成鏈內雙硫鍵，從而形成一個在製造和體內使用過程中均穩定的分子。本發明的抗體在此處所述的生物分析中使 IL-4 和/或 IL-13 失去活性。

本發明包括抗體的可變重鏈和輕鏈的胺基酸序列及其對應的核酸序列。

本發明的另一具體實施例包括攜帶有本發明抗體序列的細胞系和載體。

本發明的另一具體實施例是抗體在製備用於治療與 IL-4 和/或 IL-13 功能和代謝有關的疾病和障礙的醫藥組成物之用途。尤其是，本發明與癌症、自體免疫缺陷以及由炎症引起或以炎症為特徵的疾病，如過敏性哮喘和皮炎的治療有關。

本文還敘述其他特點和優點，將在下列詳細說明和圖式中闡述。

本發明之詳細說明

本發明不侷限於本文所述的具體方法學、實驗方案、細胞系、載體或試劑，這是因為它們可不偏離本發明的精神和範圍而改變。而且，本文所使用的術語僅出於例示具體實施例之目的，並非意在限制本發明之範圍。除非另有定義，本文所使用的所有技術和科學術語和任何首字母縮略詞的含義與本發明領域技術人員通常理解的含義相同。實施本發明時可使用任何類似或相當於本文所述的方法和材料，本文僅敘述了例示性方法、設備和材料。

出於敘述和揭示可與本發明一同使用和可在本發明中使用的所報導的蛋白質、酵素、載體、宿主細胞和方法學的目的，本文所提及的所有專利和出版物均以參考方式整體併入本文。但是，本文任何部分均不可解釋為承認因先前發明的緣故，本發明無權聲稱早於這些揭示內容。

在教示製備和使用 IL-4 和/或 IL-13 相關的方法和目標產物之前，提供了一些術語和短語的下列非限制性定義，以指導技術人員。

“白介素” 與天然出現或內生的哺乳動物 IL-4 蛋白或與天然出現或內生的相應哺乳動物 IL-4 蛋白(如重組蛋白，合成蛋白 (即用合成有機化學方法製備的蛋白質))具有同樣胺基酸序列的蛋白有關。相應地，如此處所定義的，該術語包括成熟的 IL-4 蛋白、多形或等位變體、IL-4 的其他異構體，以及上述各成份的變化的或未變化的形式 (如脂化或糖基化)。天然出現或內生的 IL-4 包括野生型蛋白質如成熟的 IL-4、多形或等位變體以及其他在哺乳動物(如人類，非人類靈長類動物)中天然出現的異構體和突變體。這些蛋白可從如天然產生 IL-4 的來源回收或分離出來。這些蛋白質以及與天然出現或內生的相應 IL-4 有相同胺基酸序列的蛋白質是按相應的哺乳動物之名稱命名的。例如，當相應的哺乳動物是人類時，

該蛋白質則稱為人類 IL-4。本領域已知有幾種突變型 IL-4 蛋白質，如 WO 03/038041 中所揭露者。

“白介素-13” (IL-13)指的是天然出現或內生的哺乳動物 IL-13 蛋白或與天然出現或內生的相應哺乳動物 IL-13 蛋白 (如重組蛋白，合成蛋白(即用合成有機化學方法製備的蛋白質))具有同樣胺基酸序列的蛋白。相應地，如此處所定義的，該術語包括成熟的 IL-13 蛋白、多形或等位變體、IL-13 的其他異構體（如透過其他剪接或細胞過程所產生的），以及上述各成份的變化的或未變化的形式(如脂化或糖基化)。天然出現或內生的 IL-13 包括野生型蛋白質如成熟的 IL-13、多形或等位變體以及其他在哺乳動物中天然出現的異構體和突變體 (如人類，非人類靈長類動物)。例如，此處所用的 IL-13 包括人類 IL-13 變種，其中位於成熟的 IL-13 之 110 位置的 Arg 被 Gin 所置換 (成熟的 IL-13 的 110 位置相當於前體蛋白質的 130 位置)，Gin 與哮喘(變應性和非應變性哮喘)以及其他 IL-13 的變種有關 9:549-559 (2000))。這些蛋白可從如天然產生 IL-13 的來源回收或分離出來。這些蛋白質以及與天然出現或內生的相應 IL-13 有相同胺基酸序列的蛋白質是按相應的哺乳動物之名稱命名的。例如，當相應的哺乳動物是人類時，該蛋白質則稱為人類 IL-13。本領域已知有幾種突變型 IL-13 蛋白質，如 WO 03/035847 中所揭露者。

就抗體鏈多肽序列而言，短語「基本相同」可理解為表現出與參照多肽序列至少 70%、80%、90%、95%或更多的序列相同度的抗體鏈。就核酸序列而言，該術語可理解為表現出與參照核酸序列至少 85%、90%、95%或 97%或更高的序列相同度的核苷酸序列。

術語「相同度」或「同源性」可指候選序列中核苷酸鹼基或胺基酸殘基與相應序列進行比較，經比對序列和引入間隔(若有必要)

以實現整段序列的最大相同度百分數且不把任何保守性取代視為部分序列相同度後，二者殘基相同的比例。無論 N 端或 C 端延伸或插入均不應理解為降低相同度或同源性。用於比對的方法和電腦程式均易獲得，並為本領域所熟知。可使用序列分析軟體測量序列相同度。

抗體或抗原的「功能片段、變異體、衍生物或類似物」等以及它們的各種形式等短語和術語是指具有與全長目的抗體或抗原的生物活性相同性質的化合物或分子。例如，抗 IL-4 抗體的功能片段或類似物是可結合 IL-4 分子的片段或類似物，或是可防止或實質降低配體或激動或拮抗性抗體結合 IL-4 的能力的片段或類似物。

「取代型」變異體是一段天然序列中至少一個胺基酸殘基被除去並被一個不同的胺基酸插入其相同位置的變異體。所述取代可為單個的，其中該分子中僅有一個胺基酸被取代；或可為多個的，其中該相同分子有兩個或更多的胺基酸被取代。多個取代可位於連續的位點。同樣，一個胺基酸可被多個殘基取代，其中該變異體包括取代和插入部分。「插入型」變異體是一個或多個胺基酸被插入到緊鄰一段天然序列某個特定位置處的胺基酸的變異體。緊鄰胺基酸意指藉該胺基酸的 α-羧基或 α-胺基官能基連接。「刪除型」變異體是天然胺基酸序列中一個或多個胺基酸被除去的變異體。通常情況下，刪除型變異體在其分子的特定區域內有一個或兩個胺基酸被刪除。

術語「抗體」被用於最寬泛的含義，具體涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)、攜帶一個或多個 CDR 或源自 CDR 序列的抗體片段或合成多肽，只要這些多肽表現出所需的生物活性。抗體(Abs)和免疫球蛋白(Igs)是具有相同結構特徵的糖蛋白。一般情況下，抗體被認為是具有確定

或公認的特異性的 Igs。因此，儘管抗體表現出與特異靶的結合特異性，但免疫球蛋白包括抗體和其他缺乏靶特異性的抗體樣分子。本發明所述抗體可為任何種類(例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 等)、或亞類(例如 IgG_1、IgG_2、IgG_{2a}、IgG_3、IgG_4、IgA_1、IgA_2 等)的抗體(「類型」和「種類」、以及「亞型」和「亞類」在本文中可互換使用)。天然或野生型(即得自未人工操縱的群體成員)抗體和免疫球蛋白通常為約 150,000 道爾頓的異四聚體糖蛋白，其由兩個相同的輕鏈(L)和兩個相同的重鏈(H)組成。每條重鏈的一端具有一個可變域(V_H)，隨後是一系列恒定域。每條輕鏈的一端具有一個可變域(V_L)，另一端具有一個恒定域。所謂「未人工操縱」意指未經旨在使其含有或表現外源抗原結合分子的處理。野生型可指一個群體中最普遍的等位基因或種類或指得自未操縱動物的抗體，後者相比較於得自以某種形式的操縱例如誘變、使用重組方法等改變該抗原結合分子的胺基酸的等位基因或多態型或變異體或衍生物。

正如本文所使用，「抗 IL-4 抗體」意指可特異結合本文所定義的 IL-4 的抗體或源自這些抗體的多肽(衍生物)，其包括但不限於抑制或實質降低 IL-4 與其配體的結合或抑制 IL-4 活性的分子。

正如本文所使用，「抗 IL-13 抗體」意指可特異結合本文所定義的人 IL-13 的抗體或源自這些抗體的多肽(衍生物)，其包括但不限於抑制或實質降低 IL-13 與其配體的結合或抑制 IL-13 活性的分子。

就抗體的可變域而言，術語「可變」係指抗體之間有廣泛序列差異的相關分子的某些部分，且被用於特異識別和針對其特異靶而結合某特異抗體。但是，可變性在抗體的整個可變域內不是均勻分佈的。可變性集中在被稱為互補決定區域(CDRs；即 CDR1、CDR2 和 CDR3)或超變區的三個區段，它們均位於輕鏈和重鏈的可變域

內。可變域內保守程度更高的部分被稱為框架(FR)區或框架序列。天然重鏈和輕鏈的每個可變域均包括四個 FR 區，其主要採用 β-折疊構型，它們藉三個 CDRs 連接起來，CDRs 形成環連接 β-折疊結構並在某些場合下形成部分的 β-折疊結構。每條鏈的 CDRs 通常被 FR 區或來自其他鏈的 CDRs 維繫在一起，促進抗體靶結合位點(抗原決定部位或決定簇)的形成(參看 Kabat 等人 Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, MD (1987))。正如本文所使用，免疫球蛋白胺基酸殘基的編號是依據 Kabat 等著的免疫球蛋白胺基酸殘基編號系統而進行的，除非另有說明。一個 CDR 可具有特異結合同源抗原決定部位的能力。

本發明所用的術語「絞鏈」或「絞鏈區」係指由抗體的第一和第二恆定域之間的胺基酸構成的柔性多肽。

術語「抗體片段」係指完整或全長鏈或抗體的一部分，一般是靶結合區域或可變區域。抗體片段的實例包括但不限於 F_{ab}、$F_{ab'}$、$F_{(ab')2}$ 和 F_v 片段。「功能片段」或「抗 IL-4 和/或 IL-13 抗體的類似物」是可防止或實質降低所述受體結合配體或啟動信號轉導的能力的片段或類似物。正如本文所使用，功能片段一般與「抗體片段」含義相同，且就抗體而論，可指能防止或實質降低所述受體結合配體或啟動信號轉導的能力的片段，例如 F_v、F_{ab}、$F_{(ab')2}$。「F_v」片段由一條重鏈的可變域和一條輕鏈的可變域藉非共價結合方式而形成的二聚體(V_H-V_L 二聚體)組成。在該構型中，每個可變域的三個 CDRs 交互作用，以確定 V_H-V_L 二聚體表面上的靶結合位點，與完整抗體的情況一樣。所述六個 CDRs 共同賦予完整抗體的靶結合特異性。但是，即使是單個可變域(或僅包括 3 個特異識別某靶點的 CDRs 的 F_v 的一半)，仍可具有識別和結合靶的能力。

「單鏈 F_v」、「sF_v」或「scAb」抗體片段包括抗體的 V_H 和 V_L 域，其中這些域位於單條多肽鏈上。一般而言，所述 F_v 多肽還包括一段位於 V_H 和 V_L 域之間的多肽連接體，其通常為柔性分子，可使 sFv 形成適合於靶結合的所需結構。

術語「雙體抗體」係指具有兩個抗原結合位點的抗體片段，這些片段可包括與同一多肽鏈的一個輕鏈可變域(V_L)結合的一個重鏈可變域(V_H)。通過使用一條過短的連接體使得同一條鏈上的兩個可變域無法配對，所述雙體抗體區域被迫與另一條鏈的結合域配對，生成兩個抗原結合位點。

F_{ab} 片段含有輕鏈的可變域和恒定域以及重鏈的第一個恒定域(C_{H1})。$F_{ab'}$片段與 F_{ab} 片段的不同之處在於前者在 C_{H1} 區域的羧基端加入數個殘基，以包括一個或多個來自抗體鉸鏈區的半胱胺酸。通過裂解位於 $F_{(ab')2}$ 胃蛋白酵素消化產物的鉸鏈半胱胺酸處的二硫鍵，可生成 $F_{ab'}$片段。對抗體另外進行酵素處理和化學處理可生成其他目的功能片段。

術語「線性 Fab」係指 Miller 等所述之四價抗體(Miller et al. (2003), J Immunol. 170: 4854-4861)。「線性 Fab」是由一連串相同的 CH1-VH 域組成的，在每一個 CH1-VH 位置與相同的輕鏈配對。研發了這些分子是為了增加抗體的價態並透過親合力效應來增強其功能性親和力，但是，它們是單特異性的。

術語「雙特異抗體(BsAbs)」係指在同一個分子裡結合了兩個抗體的抗原結合點。因此，雙特異抗體能夠同時結合兩個不同的抗原。除了診斷用途之外，藉由將強力致效劑系統轉向發病位置，或加強抗體的中和或刺激活性，BsAbs 為開發新的治療應用上鋪平道路。

最初試圖將兩個完整抗體的結合特異性連結到不同的目標抗體以用於治療目的之嘗試採用了化學融合的異軛合分子(Staerz et al.(1985), Nature 314: 628-631)。

已經透過異種融合瘤技術從融合瘤細胞中製備了雙特異抗體，體外試驗顯示其具有與異軛合物類似的性質(Milstein & Cuello (1983) Nature 305:537-540)。

儘管利用細胞融合製備的異軛合抗體或雙特異抗體所得到的結果給人希望，但是幾個因素卻使大規模治療應用變得不實際。這些因素包括：體內大量異軛合抗體的快速清除、產生任何一類分子所需要的高勞動強度的技術、需要大量分離操作將異軛合抗體從單軛合或單特異抗體分離出來，而且通常產率很低。

基因工程越來越多地被用於設計、改變、生產具有一組期望的結合特性和致效劑功能的抗體或抗體衍生物。

現已研發了各種重組技術來有效地生產雙特異抗體，既可能是抗體片段(Carter et al. (1995), J. Hematotherapy 4: 463-470; Pluckthun et al. (1997) Immunotechology 3: 83-105; Todorovska et al. (2001) J. Immunol. Methods 248: 47-66)，也可能是全長 IgG 形式(Carter (2001) J. Immunol. Methods 248: 7-15)。

將兩個不同的 scFvs 結合則形成具有最小分子量的稱為 sc-BsAbs 或 Ta-scFvs 的雙特異抗體形式(Mack et al.(1995), Proc. Acad. Sci.USA. 92: 7021-7025; Mallender et al. (1994) J. Biol. Chem. 269: 199-206)。基因工程上，藉由二聚化功能如一個亮胺酸拉鍊融合兩個 scFvs 從而產生雙特異抗體(Kostelny et al. (1992) J. Immunol. 148: 1547-53; de Kruif et al. (1996) J. Biol. Chem. 271: 7630-4)。

如上所述，雙體抗體是很小的二價雙特異抗體片段。這些片段在同一肽鏈上由一個連結到 VL 的 VH 組成，兩者之間的連結體太

短(少於 12 個胺基酸) 使得同一肽鏈上的兩個域無法配對。這些域被迫與另一個鏈上互補的域進行分子間配對，從而產生兩個抗原結合位點。這些二聚抗體片段，或稱“雙體抗體” ，為二價並具有雙特異性。(Holliger et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 6444-6448)。雙體抗體的大小與一個 Fab 段類似。以具有 3 到 12 個胺基酸的連結體連結的 VH 和 VL 域的多肽主要形成二聚體 (雙體抗體)，而由具有 0 到 2 個胺基酸殘基的連結體連結的多肽則有利於形成三聚體(三體抗體)和四聚體(四體抗體)。除了連結體的長度外，低聚反應的確切樣式似乎取決於 V-域的組成和取向 (Hudson et al. (1999), J Immunol Methods 231: 177-189)。雙體抗體最後結構的可預測性很差。

儘管基於 sc-BsAbs 和雙體抗體的結構顯示很有趣的臨床潛力，但是，已經證明，這樣的非共價鍵結合的分子在生理條件下卻不夠穩定。一個 scFv 片段的總體穩定性取決於 VL 和 VH 域自身的穩定性以及域介面的穩定性。有人指出，scFv 片段 VH-VL 介面的穩定性不夠是不可逆 scFv 去活化的主要原因，因為肽連接體所允許的介面瞬態打開會使有利於集結的疏水區塊曝露，因此造成不穩定和低產率 (Wörn and Plückthun (2001), J. Mol. Biol. 305: 989-1010)。

美國第 5,989,830 號專利揭示了另外一種從 VH 和 VL 域製造雙特異二價抗原結合蛋白的方法。這樣的雙頭抗體片段是藉由表現一個編碼兩個肽鏈的雙順反子獲得的，其中一個多肽鏈有兩倍的 VH，由一個肽連接體連接(VH1-linker-VH2)，另一個多肽鏈由互補的 VL 域組成，由一個肽連接體連接(VL1-linker-VL2)。美國第 5,989,830 號專利描述，每個連接體應該由至少 10 個胺基酸殘基組成。

美國 2005/0003403 A1 描述價態增加的多價蛋白複合物(PPC)。多價蛋白複合物由兩個多肽鏈，通常彼此側向排列。每個多肽鏈通常包含 3 或 4 個由胺基酸序列組成的"v 區"，當與相對的多肽鏈上的對應的 v 區匹配時，這些胺基酸序列能夠形成抗原結合點。每個多肽鏈上可用多達大約 6 個"v 區"。每個多肽鏈上的 v 區彼此線性連接，可由散佈的連接區連接在一起。當排列成 PPC 形式時，每個多肽鏈上的 v 區形成單個的抗原結合位點。複合物可能包含一種或幾種結合特異性。

但是，利用這樣的分子顯示了集結，不穩定性以及很差的表現產率(Wu et al. (2001) Prot. Eng. 14: 1025-1033)。這些是表現基於單鏈的抗體時通常可能出現的穩定性問題(Wörn and Plückthun (2001), J. Mol. Biol. 305: 989-1010)。

因此，本發明的目的就是要提供一種雙特異多價抗體，利用其可避免形成集結物。此外，它應具有穩定性，使之可用於治療目的。

本文所使用的術語「單株抗體」係指得自基本同質抗體群的抗體，即組成該群體的單個抗體除可能有少數天然突變外，均是相同的。

本文的單株抗體具體包括「嵌合」抗體，其中一部分重鏈和/或輕鏈與源自某特定物種或屬於某特定抗體種類或亞類(類型或亞型)的相應序列相同或相似，其中所述鏈的其餘部分與源自另一物種或屬於另一抗體種類或亞類的抗體以及所述抗體片段的相應序列相同或相似，只要這些抗體片段表現出結合 IL-4 和/或 IL-13 或影響 IL-4 和/或 IL-13 活性或代謝的所需生物活性(美國專利 4,816,567；和 Morrison et al., Proc Natl Acad Sci USA 81:6851 (1984))。因此，來自同一類別抗體的 CDRs 可移植到不同種類或亞類抗體的 FR。

單株抗體是高度特異性的抗體，它們識別單個靶位點、抗原決定部位或決定簇。而且，與通常包括針對抗原不同決定簇(抗原決定部位)的不同抗體的常規(多株)抗體製劑不同的是，每個單株抗體針對靶上的單個決定簇。除其特異性以外，單株抗體在宿主細胞內的合成是有利的，不受其他免疫球蛋白的污染，並為選殖編碼其抗體鏈的相關基因和 mRNA 提供。修飾語「單株」提示得自基本同質抗體群的抗體的性質，其不應理解為需要藉任何特定方法產生所述抗體。例如，用於本發明的單株抗體可從噬菌體抗體庫經使用眾所周知的技術分離或從多株製品純化。依據本發明使用的親代單株抗體可通過 Kohler 等人在 Nature 256:495 (1975)中所述的融合瘤方法製備，或通過本領域內眾所周知的重組方法製備。

本文所使用的術語「多價抗體」係指一個包含兩個或多個抗原結合位點、因而能夠同時結合兩個或多個具有相同或不同結構的抗原之抗體。此處的術語「二價」表示抗體包含兩個抗原結合位點。此處的術語「四價」表示抗體包含四個抗原結合位點。

本文所使用的術語「抗原結合位點」係指抗體中這樣的部份，其中包含一個特異地與抗原之部份或全部結合，並與抗原之部份或全部成互補的區域。當抗原很大時，抗體可能只能結合到抗原的一個特定的部份，該部份被稱為抗原決定部位。抗原結合域可由一個或多個抗體可變域提供。優選的是，抗原結合域是由一個抗體輕鏈可變域(VL)和一個抗體重鏈可變域(VH)結合形成的。

本文所使用的術語「抗原」係指能夠被本發明的抗體所結合的一個分子或分子之一部份。抗原可有一個或多於一個抗原決定部位。本發明抗體可辨識的抗原之實例包括但不限於血清蛋白如細胞激素，例如 IL-4、IL5、IL9 和 IL-13，生物活性肽、細胞表面分子如受體、運載蛋白、離子通道、病毒和細菌蛋白。

本文所使用的術語「單特異的」係指本發明的多價抗體僅可辨識出一個抗原，所有的抗原結合位點都是相同的。

本文所使用的術語「雙特異的」係指本發明的多價抗體可在同一或兩個不同的抗原上辨識出兩個不同的抗原決定位。

本文所使用的術語「多特異的」係指本發明的多價抗體可在同一或多個不同的抗原上辨識出多個不同的抗原決定位。

本文所使用的術語「連接體」係指一個經過調整連接到本發明抗體結構可變域的肽。肽連接體可包含任何胺基酸，優選的為甘胺酸(G)和絲胺酸(S)。在重鏈多肽和輕鏈多肽之間或內部，連接體彼此可為相同或不同。此外，連接體的長度可為 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 個胺基酸。重鏈域和輕鏈域的優選的肽連接體單元為 GGGGS。重鏈和輕鏈的連接體單元的數目可以是相同的(對稱的)，也可以是彼此不同的(非對稱的)。

肽連接體最好足夠長以便能夠提供適當的柔性以防止抗體部分干擾彼此的活性，例如透過位阻而允許蛋白質適當地摺疊，如有必要，還可讓抗體分子與同一細胞上兩個或多個可能分得很開的受體相互作用；然而，優選的是足夠短以允許抗體部份在細胞中保持穩定。

因此，肽連接體的長度、組成和/或構像可很容易地由本領域熟練的技術人員選定，以便優化需要的多鍵抗體屬性。

非人類(例如鼠)抗體的「人類化」形式是嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或它們的片段(例如抗體的 F_v、F_{ab}、$F_{ab'}$、$F_{(ab')2}$ 或其他靶結合序列)，與人抗體相比，其含有源自非人類免疫球蛋白的序列。一般而言，所述人類化抗體基本上總共包括一個、典型為兩個的可變域，其中所有或基本上所有 CDR 區域對應於非人類免疫

球蛋白的 CDR 區域，以及所有或基本上所有 FR 區域是人類免疫球蛋白範本序列的 FR 區域。所述人類化抗體還可包括至少一部分免疫球蛋白恒定區(F_c)，通常是所選擇的人免疫球蛋白範本的恒定區。一般而言，目的是擁有在人體內免疫原性最低的抗體分子。因此，有可能一個或多個 CDRs 中的一個或多個胺基酸也可被更換成在人宿主體內免疫原性更低的胺基酸，但卻基本不減少所述一個或多個 CDRs 對 IL-4 和/或 IL-13 的特異結合功能。或者，FR 可為非人類的，但免疫原性最強的胺基酸被替換為免疫原性較低的胺基酸。但是，上文所討論的 CDR 移植並非是獲得人類化抗體的唯一途徑。例如，僅修飾 CDR 區域可能不夠充分，因為框架區殘基參與決定 CDR 環的三維結構和抗體與其配體的總親和力的現象並非鮮見。因此，可實施任何方法，以使非人類親代抗體分子被修飾為對人免疫原性更低的抗體分子，而且並非總是需要與人抗體的總序列相同。因此，也可通過例如僅取代數個殘基實現人類化，尤其是取代暴露在抗體分子外且沒有被包埋在該分子內部從而不易接近宿主免疫系統的殘基。本文在取代抗體分子上的「活動」或「柔性」殘基方面講授了該方法，其目標是降低或減少所形成分子的免疫原性，卻不破壞所述抗體對其抗原決定部位或決定簇的特異性。例如參見 Studnicka et al., Prot Eng 7(6)805-814, 1994; Mol Imm 44:1986-1988, 2007；Sims et al., J Immunol 151:2296 (1993); Chothia et al., J Mol Biol 196:901 (1987)；Carter et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:4285 (1992)；Presta et al., J Immunol 151:2623 (1993), WO 2006/042333 和美國專利 5,869,619。

所研究的人類化方法基於所述抗體的分子柔性在免疫識別中的影響。蛋白質柔性與蛋白分子的分子運動有關。蛋白質柔性是整個蛋白、部分蛋白或單個胺基酸殘基採取構象集合的能力，其中該

構象集合中每個構象各自顯著不同。有關蛋白質柔性的資訊可從蛋白質 X 射線結晶學實驗(參見例如 Kundu et al., 2002, Biophys J 83:723–732.)、核磁共振實驗(參見例如 Freedberg et al., J Am Chem Soc 1998, 120(31):7916-7923)或進行分子動力學(MD)模擬而獲得。在電腦上進行蛋白質的 MD 模擬，可通過計算原子之間的物理交互作用測定所有蛋白質原子在一段時間內的運動。MD 模擬的輸出是所研究蛋白在模擬時間段內的軌跡。該軌跡是蛋白質構象即瞬間運動圖的集合，蛋白質構象在模擬期間例如每隔 1 皮秒(ps)內定期采樣。正是通過分析瞬間運動圖的集合，人們能夠定量分析蛋白質胺基酸殘基的柔性。因此，就含有柔性殘基的多肽而言，柔性殘基是採取不同構象集合的殘基。MD 方法為本領域所周知，參見例如 Brooks et al., Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics (Wiley, New York, 1988)。數種軟體可進行 MD 模擬，例如 Amber (參見 Case et al. (2005) J Comp Chem 26:1668-1688), Charmm (參見 Brooks et al. (1983) J Comp Chem 4:187-217; 和 MacKerell et al. (1998) The Encyclopedia of Computational Chemistry vol. 1:271-177, Schleyer et al. eds. Chichester: John Wiley & Sons) 或 Impact (參見 Rizzo et al., J Am Chem Soc; 2000; 122(51):12898-12900)。

大多數蛋白質複合物共用相對較大和較平的被包埋表面，業已表明結合伴侶的柔性提供了其彈性的來源，使其能夠適應彼此的構象(Structure (2000) 8, R137-R142)。因此，業已表明「誘導契合」的實例在蛋白質-蛋白質的介面起了主要作用。此外，穩定增長的資料表明蛋白質實際上結合各種形狀、大小和組成的配體(Protein Science (2002) 11:184-187)，且構象多樣性似乎是識別不同伴侶能

力的基本組分(Science (2003) 299, 1362-1367)。柔性殘基參與了蛋白質-蛋白質伴侶的結合(Structure (2006) 14, 683-693)。

柔性殘基可採取許多構象，它們提供了交互作用區域的集合，其有可能被記憶 B 細胞識別並觸發免疫原性反應。因此，可通過修飾許多來自框架區的殘基使抗體人類化，使得構象集合和受修飾抗體所展示的識別區域集合盡可能類似於人抗體所採取的構象集合和識別區域集合。

這一點可通過以下列方法修飾有限數目的殘基得以實現：(1)構築母體 mAb 的同源模型，進行 MD 模擬；(2)分析柔性殘基和鑑定非人抗體分子最靈活的殘基，以及鑑定有可能是異質性或降解反應來源的殘基或基序；(3)鑑定展示出與親代抗體最相似的識別區域集合的人抗體；(4)測定待突變的柔性殘基，可能為異質性和降解來源的殘基或基序也發生突變；(5)檢查是否存在已知 T 細胞或 B 細胞抗原決定部位。使用本文所講授的 MD 計算經使用連續的溶劑模型可發現柔性殘基，該溶劑模型描述了水溶劑與蛋白質原子在模擬期間內的交互作用。一旦在輕鏈和重鏈的可變域內鑑定出一組柔性殘基，即鑑定出與目的抗體高度類似的一組人類重鏈和輕鏈可變區域框架。例如可使用 BLAST（基本區域排比搜尋工具）在抗體人生殖細胞系序列的數據庫中檢索柔性殘基進行上述鑑定。還可通過比較母體 mAb 與生殖細胞系經典結構庫的動力學，進行上述鑑定。檢索時排除 CDR 殘基和鄰近殘基，以確保對於抗原的高度親和力得以保留。

隨後取代柔性殘基。當幾個人類殘基表現出類似同源性時，通過可能影響人類化抗體的溶液行為的殘基性質驅動該選擇。例如，暴露的柔性環上優選極性殘基，而不是疏水殘基。可能為不穩定性和異質性來源的殘基也發生突變，即使它們在 CDRs 上被發現。這

些殘基包括暴露的甲硫胺酸，因為亞碸可能是由氧自由基、對酸敏感的鍵例如 Asp-Pro 二肽的鍵的蛋白水解(Drug Dev Res (2004) 61:137-154)而形成的；位於暴露的天冬醯胺殘基和隨後的小胺基酸例如 Gly、Ser、Ala、His、Asn 或 Cys 處的脫醯胺作用位點(J Chromatog (2006) 837:35-43)和 N-糖化位點例如 Asn-X-Ser/Thr 位點。一般情況下，暴露的甲硫胺酸會被 Leu 所取代，暴露的天冬醯胺會被殼氨醯胺或天冬胺酸所取代，或其隨後的殘基會被更換。對於糖化位點(Asn-X-Ser/Thr)而言，可更換 Asn 或 Ser/Thr 殘基。

檢查形成的複合序列是否存在已知的 B 細胞或線性 T 細胞抗原決定部位。例如，可利用公眾可用的 IEDB 進行檢索。如果在該複合序列中發現已知抗原決定部位，則檢索和取代另一組人序列。

與美國專利 5,639,641 的表面重塑方法不同的是，該方法探討了 B 細胞介導和 T 細胞介導的免疫原性反應。該方法還避免了有時使用 CDR 移植可觀察到的活性丟失問題(美國專利 5,530,101)。此外，在設計和選擇過程中還考慮了穩定性和溶解度的問題，從而形成具有低免疫原性、高抗原親和力和改善生物物理性質的優化抗體。

例如美國專利 5,639,641 揭露用於表面重塑抗體的策略和方法以及降低抗體在不同宿主體內免疫原性的其他方法。簡而言之，在一較佳方法中，(1)生成抗體重鏈和輕鏈可變區域庫的位置比對，得到重鏈和輕鏈可變區域框架表面暴露的位置，其中所有可變區域的比對位置至少約 98%是相同的；(2) 確定一組重鏈和輕鏈可變區域框架表面暴露的胺基酸殘基，以用於非人類例如嚙齒動物抗體(或其抗體片段)；(3)鑑定一組與所述嚙齒動物抗體表面暴露的胺基酸殘基最為一致的重鏈和輕鏈可變區域框架表面暴露的胺基酸殘基；以及(4)除了距離所述嚙齒動物抗體 CDR 的任何殘基的任何原

子 5Å 以內的胺基酸殘基，將步驟(2)所確定的一組重鏈和輕鏈可變區域框架表面的暴露胺基酸替換為步驟(3)所鑑定的一組重鏈和輕鏈可變區域框架表面的暴露胺基酸殘基，以生成保留結合特異性的人類化例如嚙齒動物抗體。

抗體可利用許多其他技術例如 CDR 移植(EPO 0 239 400；WO 91/09967 和美國專利 5,530,101 以及 5,585,089)、鑲飾或表面重塑(EPO 0 592 106; EPO 0 519 596; Padlan, 1991, Molec Imm 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Prot Eng 7(6):805-814 和 Roguska et al., 1994, PNAS 91:969-973)和鏈替換(美國專利 5,565,332)進行人類化。人抗體可藉許多本領域知曉的方法進行製備，例如但不限於噬菌體展示方法(參見美國專利 4,444,887, 4,716,111, 5,545,806 和 5,814,318 和 WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 和 WO 91/10741)和使用基因轉殖動物例如嚙齒類以及使用嵌合細胞等。

「抗體同源物」或「同源物」係指任何按此處所教示的方式特異結合 IL-4 和/或 IL-13 的分子。因此，抗體同源物包括不論修飾與否的天然或重組抗體、抗體部分，例如 F_{ab} 或 F_v 分子、單鏈抗體以及攜帶一個或多個 CDR 區域的多肽等，它們保留了目的生物性質如結合 IL-4 和/或 IL-13 的性質。所述同源物的胺基酸序列無需與天然存在的抗體胺基酸序列相同，但可經改變或修飾以攜帶取代胺基酸、插入胺基酸、刪除胺基酸、除蛋白質上正常存在的 20 個胺基酸以外的胺基酸等，以獲得具有增強或其他有利性質的多肽。

具有同源序列的抗體是其胺基酸序列與本發明的 IL-4、IL-13 或雙特異 IL-4/IL-13 抗體的胺基酸序列具有序列同源性的抗體。較佳情況下，同源性位於本發明抗體的可變區域的胺基酸序列。應用於本文胺基酸序列的「序列同源性」定義為經例如根據 Pearson &

Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 85, 2444-2448 (1988)的 FASTA 檢索方法測定與其他胺基酸序列具有至少約 90%、91%、92%、93%、94%或更多的序列同源性，更優選地為至少約 95%、96%、97%、98%或 99%的序列同源性。

嵌合抗體是具有不同部分的抗體，其源自不同來源例如不同抗體、不同種類的抗體、不同動物物種，例如具有一個源自鼠單株抗體的可變區以及一個配對的人免疫球蛋白恒定區的抗體等。因此，人類化抗體是一種嵌合抗體。用於生產嵌合抗體的方法為本領域所知曉，例如 Morrison, 1985, Science 229:1202; Oi 等人 l., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J Immunol Methods 125:191-202 和美國專利 5,807,715、4,816,567 和 4,816,397。

人工抗體包括單鏈抗體、scFv 片段、嵌合抗體、雙價抗體、三價抗體、四價抗體和 mru (參見 Winter & Milstein 的綜述, 1991, Nature 349:293-299 ; 和 Hudson, 1999, Curr Opin Imm 11:548-557)，其中每種均具有抗原結合或抗原決定部位結合能力。在單鏈 F_v片段(scF_v)中，抗體的 V_H和 V_L域藉柔性胜肽連接起來。一般情況下，所述連接體是約為 15 個胺基酸的胜肽。如果連接體小得多，例如為 5 個胺基酸，則會形成雙體抗體。抗體的最小結合單元為一個 CDR，典型情況下為具有足夠特異辨識和結合能力的重鏈 CDR2。這種片段被稱為分子辨識單元或 mru。幾個該類 mrus 可藉短的連接胜肽連接到一起，從而形成具有高於單個 mru 親和力的人工結合蛋白。

目的抗體的功能等效物也包括在本發明的範圍以內。術語「功能等效物」包括帶有同源物序列的抗體、抗體同源物、嵌合抗體、人共抗體和改變的抗體，例如，其中每個功能等效物是按照其結合 IL-4 和/或 IL-13、抑制 IL-4 和/或 IL-13 信號發送能力或功能，或

抑制 IL-4 和/或 IL-13 結合到其受體的能力定義的。技術人員會理解名為「抗體片段」的一組分子與名為「功能等效物」的一組有重疊。製備保留 IL-4 和/或 IL-13 結合能力的功能等效物的方法為本領域技術人員知曉，並為例如 WO 93/21319, EPO Ser. No. 239,400, WO 89/09622, EPO Ser. No. 338,745 和 EPO Ser. No. 332,424 所揭露。

本申請的功能等效物還包括修飾抗體，例如被任何類型的分子經共價連接而修飾的抗體。例如，修飾抗體包括業已被已知的保護/封閉基經過例如糖化、乙醯化、聚乙烯二醇化、脫醯胺化、磷酸化、醯胺化、衍生化、蛋白裂解、連接到細胞配體、連接到毒素或細胞毒性部分或其他蛋白等修飾的抗體。共價連接無需生成不能產生抗獨特型反應的抗體。所述修飾可通過已知技術實現，其包括但不限於特異化學切割、乙醯化、甲醯化、代謝合成等。此外，被修飾抗體可含有一個或多個非典型的胺基酸。

本領域技術人員可利用許多技術來實現結合親和力的優化。一般情況下，這些技術包括取代目的位置處的各種胺基酸、隨後篩選分析突變多肽對同源抗原或抗原決定部位的結合親和力。

一旦抗體被鑑定和分離，通常可生成變異抗體或突變體或突變蛋白質，其中例如所述抗體的一個或多個高變區域的一個或多個胺基酸殘基被改變。作為一種替換方式，或在上述基礎上，可向抗體引入框架區殘基的一個或多個變動(例如取代)，導致這些變動導致抗體突變體對 IL-4 和/或 IL-13 的結合親和力升高。可經修飾的框架區殘基的實例包括非共價直接結合抗原的殘基(Amit et al., Science 233:747-753 (1986))；影響 CDR 構象或與其交互作用的殘基(Chothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987))；和/或參與 V_L-V_H 介面的殘基(EP 239 400)。在某些實施例中，一個或多個這類框架

區殘基的修飾導致抗體與同源抗原的結合親和力增加。例如，在本發明的該實施例中可改變約 1 個到約 5 個框架區殘基。有時，這足以產生適合用於臨床前試驗的抗體突變體，即使其中高變區的任何殘基都沒有改變。但正常情況下抗體突變體可包括一個或多個高變區變動。也可改變恒定區以獲得理想或更加理想的效應物性質。

被變動的高變區殘基可隨機改變，尤其是當親代抗體的初始結合親和力可使隨機產生的抗體突變體容易被本文所講授的檢測進行篩選。

一種獲得抗體突變體例如 CDR 突變體的方法是「丙胺酸掃描誘變」(Cunningham & Wells, Science 244:1081-1085 (1989)和 Cunningham & Wells, Proc Nat Acad Sci USA 84:6434-6437 (1991))。一個或多個高變區殘基被丙胺酸或聚丙胺酸殘基取代。對所述取代表現出功能敏感性的這些高變區殘基隨後通過在取代位點引入進一步或其他突變而改進。因此，儘管事先確定了引入胺基酸序列變動的位點，但突變本身的性質無需事先確定。根據被掃描殘基的所需性質，可嘗試使用其他胺基酸進行類似取代。

一種鑑定待修飾胺基酸殘基更為系統的方法包括鑑定參與結合 IL-4 和/或 IL-13 的高變區殘基和很少或沒有參與 IL-4 和/或 IL-13 結合的高變區殘基。進行非結合高變區殘基的丙胺酸掃描，其中檢測每個 ala 突變體對 IL-4 和/或 IL-13 的結合是否增強。在另一實施例中，選擇明顯參與 IL-4 和/或 IL-13 結合的這些殘基進行修飾。修飾可包括刪除殘基或在目的殘基旁插入一個或多個殘基。但是，正常情況下修飾包括以另一個胺基酸取代殘基。保守性取代可以是第一取代。如果該取代導致生物活性發生變化(例如結合親和力)，那麼可進行另一次保守取代以確定是否得到更多實質性變化。

通過選擇其性質與正常情況下位於某位點處的胺基酸有更多實質差異的胺基酸，可對抗體範圍和生物性質的呈現進行更為實質性的修飾。因此，在維持下列情況下可進行該取代：(a)多肽骨架取代區域的結構，例如折疊或螺旋構象；(b) 該分子在靶位點處的電荷或疏水性，或(c)側鏈的大小。

例如，根據常見側鏈性質，天然存在的胺基酸可分為以下幾組：

(1)疏水：甲硫胺酸(M 或 met)、丙胺酸(A 或 ala)、纈胺酸(V 或 val)、白胺酸(L 或 leu)和異白胺酸(I 或 ile)；

(2)中性、親水：半胱胺酸(C 或 cys)、絲胺酸(S 或 ser)、蘇胺酸(T 或 thr)、天冬醯胺(N 或 asn)和穀氨醯胺(Q 或 gln)；

(3)酸性：天冬胺酸(D 或 asp)和穀胺酸(E 或 glu)；

(4)鹼性：組胺酸(H 或 his)、賴胺酸(K 或 lys)和精胺酸(R 或 arg)；

(5)影響鏈取向的殘基：苷胺酸(G 或 gly)和脯胺酸(P 或 pro)，以及

(6)芳香族：色胺酸(W 或 trp)、酪胺酸(Y 或 tyr)苯丙胺酸(F 或 phe)。

非保守取代需要以來自另一組的胺基酸調換胺基酸。保守性取代需要以來自組內的胺基酸調換另一胺基酸。

較佳的胺基酸取代包括下列胺基酸取代：(1)降低對蛋白水解的敏感性，(2)降低對氧化的敏感性，(3)改變結合親和力以及(4)賦予或修飾這些類似物的其他生理-化學或功能性質。類似物可包括除天然存在胜肽序列以外的一段序列的各種突變蛋白質。例如，可對天然存在的序列(優選在形成分子間接觸的區域以外的多肽部分)進行單個或多個胺基酸的取代(優選為保守性胺基酸取代)。除 R 基或側鏈的大小或構象的改變以外，保守性胺基酸取代不應實質性改

變母體序列的結構特徵(例如胺基酸取代不應會打斷母體序列中的螺旋，或破壞表現為母體序列特徵的其他類型的二級結構(Proteins, Structures and Molecular Principles, Creighton, ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (Branden & Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)); and Thornton et al. Nature 354:105 (1991)。

通常情況下，生物學性質改善的抗體突變體具有與母體抗人 IL-4 和/或 IL-13 抗體的重鏈或輕鏈可變域的胺基酸序列至少 75%的胺基酸序列相同度或相似性的胺基酸序列，和至少 80%、至少 85%、至少 90%以及通常為至少 95%的相同度。就親代抗體序列而言，相同度或相似性在本文中定義為經比對序列和引入間隔(若有必要)以實現最大程度的序列相同度後，候選序列的胺基酸殘基與親代抗體殘基相同(即相同殘基)或類似(即基於相同側鏈性質而來自同一組的胺基酸殘基，參見上文)的百分比。

或者，通過重鏈和輕鏈的 FR 或 CDR 區域或抗 IL-4、抗 IL-13 或雙特異 IL-4/IL-13 抗體的 F_c 區域的系統突變，可生成抗體突變體。生成抗體突變體的另一種方法包括使用噬菌體展示進行親和力成熟(Hawkins et al., J Mol Biol 254:889-896 (1992)和 Lowman et al., Biochemistry 30(45):10832-10838(1991))。已知噬菌體外殼蛋白融合(Smith, Science 228:1315 (1985); Scott & Smith, Science 249:386 (1990); Cwirla et al., Proc Natl Acad Sci USA 8:309 (1990); Devlin et al., Science 249:404 (1990); Wells & Lowman, Curr Opin Struct Biol 2:597 (1992)和美國專利 5,223,409)可用於將所展示的蛋白或胜肽的表現型與編碼它們的噬菌體顆粒的基因型聯繫在一起。抗體的 F_{ab} 區域也已被展示在噬菌體上(McCafferty et al., Nature 348: 552

(1990); Barbas et al., Proc Natl Acad Sci USA 88:7978 (1991); 和 Garrard et al., Biotechnol 9:1373 (1991))。

單價噬菌體展示由一組作為噬菌體外殼蛋白融合體而被展示於噬菌體顆粒上的蛋白變異體組成(Bass et al., Proteins 8:309 (1990)。以前業已通過連續應用誘變、單價噬菌體展示和功能分析(Lowman & Wells, J Mol Biol 234:564 578 (1993); 美國專利5,534,617)例如藉由集中分析抗體的 CDR 區域(Barbas et al., Proc Natl Acad Sci USA 91:3809 (1994); and Yang et al., J Mol Biol 254:392 (1995))而達到親和力成熟或各種蛋白平衡結合親和力的提高。

可在噬菌體顆粒上構築許多(例如 10^6 或更多)其序列特定位置上有差異的蛋白變異體的庫，其中每個噬菌體顆粒含有編碼特定蛋白變異體的 DNA。經使用固定抗原進行多輪親和力純化後，分離單個噬菌體選殖株，並從 DNA 推演出所展示蛋白的胺基酸序列。

生成抗體變異體後，可依據本文教示測定該分子相對於親代抗體的生物活性。正如上文指出，該過程涉及測定抗體的結合親和力和/或其他生物活性或物理性質。在本發明的一個較佳實施例中，製備一組抗體突變體，篩選其對抗原的結合親和力。視需要可對選自篩選的一個或多個抗體突變體另外進行一次或多次生物活性測定，以確定抗體突變體具有新的或改進的性質。在一個較佳實施例中，所述抗體突變體保留了與親代抗體類似或更好/更高的結合 IL-4 和/或 IL-13 的能力。

通常根據抗體的用途，可對依此選擇的抗體突變體進行進一步修飾。這類修飾可包括進一步改變胺基酸序列，與異質多肽的融合和/或共價修飾。例如，一般可使用絲胺酸取代未參與維持抗體突變體適宜構象的半胱胺酸殘基，以改善該分子的氧化穩定性和防止

異常交聯。相反，可向抗體加入半胱胺酸以提高穩定性(尤其當抗體是抗體片段例如 F_v 片段時)。

另一類型的抗體突變體具有改變的糖化類型。可通過刪除抗體上的一個或多個碳水化合物部分和/或加入一個或多個抗體上沒有的糖化位點實現這一點。抗體的糖化一般為 N 連接到 Asn 或 O 連接到 Ser 或 Thr。三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸和天冬醯胺-X-蘇胺酸是碳水化合物部分經酵素催化連接到天冬醯胺側鏈的常見辨識序列，其中 X 是除脯胺酸以外的任何胺基酸。例如 N-乙醯半乳糖胺、半乳糖、海藻糖或木糖連接到羥基胺基酸，大多數為絲胺酸或蘇胺酸，儘管也可使用 5-羥脯胺酸或 5-羥賴胺酸。向原抗體的序列加入或取代一個或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基可增加 O-連接糖化的概率。

理想情況下可修飾本發明所述抗體的效應物功能，以增強抗體的效用。例如，可在 F_c 區引入半胱胺酸殘基，從而在該區域形成鏈間二硫鍵。依此生成的同型二聚抗體可具有改善的內化能力和/或增加的補體-介導的細胞殺死以及抗體依賴的細胞毒性(ADCC)，參見 Caron et al., J Exp Med 176:1191-1195 (1992)和 Shopes, Immunol 148:2918-2922 (1993)。或者，可改造具有兩個 F_c 區的抗體，因而該抗體可具有增強的補體裂解和 ADCC 能力，參見 Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219 230 (1989)。

抗體的共價修飾涵蓋在本發明的範圍內。可通過化學合成或通過抗體的酵素切割或化學切割(若可行)實現這一點。通過抗體的靶向胺基酸與有機衍生劑發生反應可向抗體分子引入抗體的其他類型共價修飾，其中有機衍生劑可與所選側鏈或與 N 端或 C 端殘基反應。

半胱氨醯殘基可與 α-鹵代乙酸酯(以及相應的胺)例如氯乙酸或氯乙醯胺發生反應，生成羧甲基或羧醯胺甲基衍生物。還可通過例如與溴三氟丙酮、α-溴-β-(5-咪唑基)丙酸、氯乙醯磷酸鹽、N-烷基馬來醯亞胺、3-硝基-2-吡啶二硫化物、甲基 2-吡啶二硫化物、對氯汞苯甲酸、2-氯汞-4-硝基苯酚或氯-7-硝基苯並-2-氧雜-1,3-二唑發生反應，衍化得到半胱氨醯殘基。

可通過與焦碳酸二乙酯在 pH 5.5-7.0 下反應衍化得到組胺醯基殘基。還可使用對溴苯醯基溴，該反應優選在 pH 6.0 的 0.1 M 二甲胂酸鈉中進行。

賴胺醯基和 α 末端殘基可與琥珀酸或其他羧酸酐發生反應，以逆轉殘基的電荷。用於衍化得到含有 α-胺基殘基的其他適宜試劑包括亞胺酸酯例如吡啶亞醯胺甲酯、吡哆醛磷酸、吡哆醛、氯硼氫化物、三硝基苯磺酸、O-甲基異脲和 2,4-戊二酮，胺基酸可被轉胺酵素以乙醛酸催化。

可通過與一種或多種常規試劑例如苯乙二醛、2,3-丁二酮、1,2-環己二酮和茚三酮修飾精胺醯基殘基。精胺酸殘基的衍化通常需要鹼性反應條件。而且，這些試劑可與賴胺酸以及精胺酸的 ε-胺基發生反應。

可使用芳香族重氮化合物或四硝基甲烷進行酪胺醯基殘基的特異修飾。例如，使用 N-乙醯基咪唑和四硝基甲烷分別形成 O-乙醯酪胺醯基種類和 3-硝基衍生物。使用 ^{125}I 或 ^{131}I 可碘化酪氨醯殘基以製備用於放射免疫分析的標記蛋白。

通過與碳二亞胺(R-N=C=C-R')反應，羧基側鏈基團(天冬胺醯基或穀胺醯基)可被修飾，其中 R 和 R'可為不同的烷基，例如 1-環己基-3-(2-嗎啉-4-乙基) 碳二亞胺或 1-乙基-3-(4-氮鎓-4,4-二甲戊

基)碳二亞胺。而且，天冬胺醯基和穀胺醯基殘基經與銨離子反應可被轉化為天冬醯胺醯基和穀胺醯胺醯基殘基。

穀胺醯胺和天冬醯胺殘基常在中性或鹼性條件下被脫去醯胺基，分別生成相應的穀胺醯和天冬氨醯殘基。這些殘基脫去醯胺的形式落在本發明的範圍以內。

其他修飾包括脯胺酸和賴胺酸的羥化、絲胺醯或蘇胺醯殘基的羥基磷酸化、賴胺酸、精胺酸和組胺酸側鏈 α-胺基的甲基化(Creighton, Proteins:Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983))、N 端胺基的乙醯化和任意 C 端羧基的醯胺化。

另一類型的共價修飾涉及通過化學方式或酵素催化方式將配糖體軛合到抗體上。這些方法不需要在具有 N-連接或 O-連接的糖化能力的宿主細胞內產生抗體。根據所使用的軛合方法，糖可被連接到：(a)精胺酸和組胺酸；(b)游離羧基；(c)游離硫氫基，例如半胱胺酸的硫氫基；(d)游離羥基，例如絲胺酸、蘇胺酸或羥脯胺酸的羥基；(e)芳香殘基例如苯丙胺酸或色胺酸的芳香殘基；或(f)穀胺醯胺的醯胺基。WO 87/05330 和 Aplin & Wriston, CRC Crit Rev Biochem, pp.259-306 (1981)敘述這類方法。259-306 (1981)。

可通過化學或酵素催化方式除去位於抗體上的任何碳水化合物部分。例如化學去糖化需要抗體與化合物三氟甲磺酸或相當的化合物接觸，從而導致除連接糖基以外的多數或全部糖基的切割，並保持抗體的完整性。例如 Hakimuddin et al., Arch Biochem Biophys 259:52 (1987)和 Edge et al., Anal Biochem 118:131 (1981)敘述了化學去糖化。可通過例如 Thotakura et al., Meth Enzymol 138:350(1987)所述的許多內切苷酶和外切苷酶中的任一種實現抗體上碳水化合物部分的酵素催化切割。

另一類型的抗體共價修飾包括依據美國專利 4,640,835、4,496,689、4,301,144、4,670,417、4,791,192 或 4,179,337 所述相同的方式將該抗體連接到許多非蛋白質聚合物例如聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯類的一種。

獲得突變體或突變蛋白質的另一種較佳技術是藉噬菌體展示進行親和力成熟(Hawkins et al., J Mol Biol 254:889-896 (1992)和 Lowman et al., Biochemistry 30(45):10832-10838(1991))。簡而言之，幾個高變區位點(例如 6-7 個位點)發生突變，導致了每個位點所有可能的胺基酸取代。依此得到的抗體突變體作為噬菌體顆粒上的融合蛋白以單價被展示於噬菌體顆粒上。表現各種突變體的噬菌體可經歷多輪結合選擇以及隨後對展示出高親和力的突變體而進行的分離和測序。

選擇新結合多肽的方法可使用結構相關多肽的庫。通過誘變產生與例如噬菌體外殼蛋白融合的結構相關多肽的庫，並將其展示在顆粒表面。隨後這些顆粒與靶分子接觸。將對靶分子具有最高親和力的顆粒從具有低親和力的顆粒分離出來。隨後通過感染適宜的細菌宿主擴增高親和力的結合顆粒，並重複競爭性結合步驟。重複該過程，直至得到所需親和力的多肽。

或者，還可使用多價噬菌體(McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554 和 Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628)來表現隨機點突變(例如藉使用易錯 DNA 聚合酶生成)，以生成噬菌體抗體片段的庫，並隨後篩選該庫對 IL-4 和/或 IL-13 的親和力(Hawkinset al. (1992) J Mol Biol 254:889-896)。

優選情況下，在親和力成熟過程中，可複製的表現載體處於轉錄調節元件的嚴密調控下，調節培養條件使得展示一個以上融合蛋白拷貝的顆粒的量或數目小於約 1%。同樣在優選情況下，展示一

個以上融合蛋白拷貝的顆粒的量小於展示單個融合蛋白拷貝的顆粒量的 10%。優選情況下該量小於 20%。

通過互換不同抗體鏈框架區內或源自多個抗體的複合 FR 的不同 CDR，可產生功能等效物。因此對於一組特定的 CDRs 而言，通過取代不同的重鏈例如 IgG_{1-4}、IgM、IgA_{1-2} 或 IgD，不同種類的抗體有可能生成不同的 IL-4 和/或 IL-13 抗體類型和同型。與之類似，通過將一組特定 CDRs 植入整個合成的框架區內，可產生位於本發明範圍內的人工抗體。

本發明的抗體片段和功能等效物包括其特異結合 IL-4 和/或 IL-13 的程度可被檢測的分子。可檢測程度的結合包括目的抗體結合能力的至少 10-100%範圍內的所有值，優選為至少 50、60%或 70，更優選為至少 75%、80%、85%、90%、95%或 99%。具有大於目的抗體 100%親和力的等效物也包括在內。

一般 CDRs 對於抗原決定部位識別和抗體結合是重要的。但是，可對組成 CDRs 的殘基進行變動，而不干擾抗體識別和結合同源抗原決定部位的能力。例如，可進行不影響抗原決定部位識別但卻增加抗體對抗原決定部位的結合親和力的變動。基於對主要抗體序列的瞭解，幾項研究調查了向抗體序列多個位點引入一個或多個胺基酸變動後對抗體性質的效應，例如結合和表現水準(Yang et al., 1995, J Mol Biol 254:392-403; Rader et al., 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95:8910-8915; 和 Vaughan et al., 1998, Nature Biotechnology 16, 535-539)。

因此，使用諸如寡核苷酸介導的定點誘變、盒式誘變、錯配 PCR、DNA 重排或大腸桿菌的突變株等方法改變重鏈和輕鏈基因的 CDR1、CDR2 或 CDR3 或框架區序列，可生成目的抗體的等效物(Vaughan et al., 1998, Nat Biotech 16:535-539; 和 Adey et al.,

1996, Chap.16, pp.277-291, in Phage Display of Peptides and Proteins, eds. Kay et al., Academic Press)。改變主要抗體核酸序列的方法可導致抗體的親和力提高(Gram et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:3576-3580; Boder et al., 2000, Proc Natl Acad Sci USA 97:10701-10705; Davies & Riechmann, 1996, Immunotech 2:169-179; Thompson et al., 1996, J Mol Biol 256:77-88; Short et al., 2002, J Biol Chem 277:16365-16370; 和 Furukawa et al., 2001, J Biol Chem 276:27622-27628)。

通過例如選擇歷經多輪選擇的多個胺基酸變化，可使用重複數輪的「多肽選擇」以選擇越來越高的親和力結合。第一輪選擇後可對配體的其他區域或胺基酸進行其他輪的選擇，其中第一輪選擇涉及對配體或抗體多肽的首個區域的胺基酸進行選擇。重複多輪選擇，直到實現所需的親和力性質。

改良抗體還包括具有改良特徵的抗體，它們藉動物免疫、融合瘤形成和選擇具有特異特徵的抗體等標準技術而製備。

「拮抗劑」係指可抑制靶分子一種或多種生物活性(例如藉 IL-4 和/或 IL-13 的信號轉導)的分子。拮抗劑通過滅活或殺滅被配體活化的細胞和/或干擾受體或配體活化(例如酪胺酸激酶活化)或配體結合到受體後的信號轉導，可干擾受體結合到配體或反之亦然。拮抗劑可完全阻斷受體-配體的交互作用，或實質降低這種交互作用。

「激動劑」係指包括活化 IL-4 和/或 IL-13 一種或多種生物活性的蛋白質、多肽、胜肽、抗體、抗體片段、軛合物、大分子、小分子等化合物。激動劑可作為被配體活化的細胞的分裂原或在配體結合到受體後干擾細胞失活或信號轉導抑制，從而與受體對配體的

結合交互作用，反之亦然。出於本發明的目的，激動劑的所有干擾位點均被視為相當的。

術語「細胞」、「細胞系」和「細胞培養物」包括它們的後代。還應理解，由於有意或無意的突變，所有的後代不一定需精確相同，例如 DNA 含量。包括具有相同目的功能或生物性質的各種後代，其中目的功能或生物性質用於篩選原始細胞。

術語「載體」意為核酸構築體、載體，其含有核酸、轉殖基因、外源基因或目的基因，它們被可操作地連接到適宜的調控序列以便在適宜的宿主內進行轉殖基因的表現。這類調控序列包括例如影響轉錄的啟動子、控制轉錄的任選操縱子序列、編碼適宜 mRNA 核糖體結合位點的序列以及調控轉錄和轉譯終止的序列。載體可為質體、噬菌體顆粒或僅僅是潛在的基因組插入物。一旦被轉化到適宜的宿主體內，載體可獨立於宿主的基因組進行複製和發揮功能，或在某些場合下可整合到宿主細胞的基因組上。在本說明書中，「質體」和「載體」可互換使用，因為質體是載體常見的使用形式。但是，本發明旨在包括發揮等效載體功能的其他形式的載體，它們為或正為本領域所知曉，例如病毒、攜帶核酸的合成分子、脂質體等。

就治療而言「哺乳動物」係指可被歸類為哺乳動物的任何動物，其包括人類、家畜和農場動物、人類以外的靈長類和動物園動物、競技動物或玩賞動物，例如狗、馬、貓、牛等。

可在本文所述或本領域知曉的分析中篩選或使用目的抗體。這類分析通常需要可檢測如被標記的試劑。本文所使用的詞語「標記」係指可直接或間接結合到分子或蛋白例如抗體上的可檢測化合物或組成物。標記可本身為可檢測的(例如放射性同位素標記、顆粒或螢光標記)，或就酵素標記而言可催化能被檢測的受質化合物或組成物的化學變化。

正如本文所使用，「固相」意為實體或分子例如本發明所述抗體可粘附其上的非水基質。本文所包括的固相實例包括部分或全部由玻璃(例如可控孔徑玻璃)、多糖(例如瓊脂糖)、聚丙烯醯胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇和矽酮形成的固相。在一些實施例中，根據上下文，所述固相可包括分析板的孔；在其他情況下可用於純化柱(例如親和力層析柱)。因此，所述固相可以是紙、珠、塑膠、晶片等，可從許多材料例如硝化纖維素、瓊脂糖、聚苯乙烯、聚丙烯、矽等製備，還可採取許多構型。

依據為本領域技術人員熟知的方法或例如參見下文，本領域業已知曉的編碼 IL-4 和/或 IL-13 的基因或 cDNA 可被選殖到質體或其他表現載體，並在眾多表現體系的任意一種中進行表現。

編碼胺基酸序列突變體的核酸序列可通過許多本領域知曉的方法進行製備。這些方法包括但不限於先前製備的目的分子的突變體或非突變體的寡核苷酸-介導(或定點)誘變、PCR 誘變和盒式誘變(參見例如 Kunkel, Proc Natl Acad Sci USA 82:488 (1985))。

本發明抗體或本發明抗體的片段、衍生物或類似物(例如本發明抗體的重鏈或輕鏈、本發明的單鏈抗體或本發明的抗體突變蛋白質)的重組表現包括建構含有編碼本文所述的抗體或抗體片段的多聚核苷酸的表現載體。一旦獲得編碼抗體分子的多聚核苷酸，可通過本領域知曉的重組 DNA 技術產生用於生產所述抗體的載體。建構含有抗體編碼序列和適宜轉錄和轉譯調控信號的表現載體。這些方法包括例如體外重組 DNA 技術、合成技術和體內基因重組。

通過常規技術將表現載體轉移到宿主細胞體內，隨後通過常規技術培養被轉染的細胞，以產生本發明的抗體或片段。在本發明的一個方面，編碼重鏈和輕鏈的載體可在宿主細胞內共表現，以表現本文詳述的整個免疫球蛋白分子。

可使用許多宿主/表現載體體系來表現本發明的抗體分子。這些表現體系不僅代表可產生和隨後純化目的編碼序列的載體，還代表了以適宜核苷酸編碼序列轉化或轉染後可原位表現本發明抗體分子的細胞。細菌細胞例如大腸桿菌和真核細胞常用於重組抗體分子的表現，尤其是用於全長重組抗體分子的表現。例如，哺乳動物細胞例如 CHO 細胞與例如攜帶來自人巨細胞病毒的主要中間體早期基因啟動子元件的載體是抗體的有效表現體系(Foecking et al., Gene 45:101 (1986); and Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990))。正如本領域所知曉，還可使用植物和植物細胞培養、昆蟲細胞等來生產目的蛋白。

此外，選擇可調節插入序列表現或以所需的特異方式修飾和加工基因產物的宿主細胞。蛋白產物的這些修飾(例如糖化)和加工(例如切割)對於蛋白功能可能是重要的。不同的宿主細胞具有蛋白質及基因產物轉譯後加工和修飾的特有和特異機制。可選擇適宜的細胞系或宿主體系，以確保所表現的目的抗體的正確修飾和加工。因此，可使用擁有用於主要轉錄物適宜加工、基因產物糖化和磷酸化的細胞裝置的真核宿主細胞。這些哺乳動物宿主細胞包括但不限於 CHO、COS、293、3T3 或骨髓瘤細胞。

穩定表現對於長期高產率生產重組蛋白而言是優選的。例如可改造穩定表現抗體分子的細胞系。與其使用含有病毒複製起點的表現載體，可使用受適宜表現調控元件(例如啟動子、增強子、序列、轉錄終止子、多聚腺苷酸位點等)調控的 DNA 轉化宿主細胞。引入外源 DNA 後，可讓改造細胞在富集培養基上生長 1 至 2 天，隨後將其轉移至選擇性培養基上。重組質體的選擇性標記賦予對選擇的抗性，使得細胞將質體穩定整合到其染色體上，並在細胞系中擴增

質體。這些改造的細胞系不僅可用於抗體製備，還可用於篩選和評估直接或簡介與抗體分子交互作用的化合物。

可使用許多篩選系統，其包括但不限於單純皰疹病毒胸腺嘧啶激酶(Wigler et al., Cell 11:223 (1977))、次黃嘌呤-鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶(Szybalska et al., Proc Natl Acad Sci USA 48:202 (1992))、谷胺酸合成酶在蛋胺酸磺醯亞胺的存在下選擇(Adv Drug Del Rev 58, 671, 2006 並參看 Lonza Group Ltd.的網站或文獻)以及 tk、hgprt 或 aprt 細胞中的腺嘌呤磷酸核糖轉移酶基因(Lowy et al., Cell 22:817 (1980))。同樣，可使用抗代謝的抗性作為選擇下列基因的基礎：dhfr，其賦予甲胺蝶呤抗性(Wigler et al., Proc Natl Acad Sci USA 77:357 (1980); O'Hare et al., Proc Natl Acad Sci USA 78:1527 (1981))；gpt，其賦予黴酚酸抗性(Mulligan et al., Proc Natl Acad Sci USA 78:2072 (1981))；neo，其賦予胺基糖苷 G-418 抗性(Wu et al., Biotherapy 3:87 (1991))；以及 hygro，其賦予潮黴素抗性(Santerre et al., Gene 30:147 (1984))。可常規應用重組 DNA 技術領域知曉的方法來選擇所需的重組選殖體，這些方法的描述見於例如 Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press (1990); Dracopoli et al., eds., Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons (1994); 和 Colberre-Garapin et al., J Mol Biol 150:1 (1981)。

通過載體擴增可增加抗體分子的表現水準(例如參見 Bebbington et al., DNA Cloning, Vol. 3. Academic Press (1987))。當表現抗體的載體系統中的標記物可擴增時，培養物中抑制劑水準的升高會增加標記物基因的拷貝數目。由於被擴增區域與抗體基因有

關聯，抗體的產生也會上升(Crouse 等人, Mol Cell Biol 3:257 (1983))。

可使用本發明的兩種或更多表現載體對宿主細胞進行共轉染，例如第一載體編碼源自重鏈的多肽，而第二載體編碼源自輕鏈的多肽。這兩個載體可含有相同的選擇標記物，這些標記物可使重鏈和輕鏈多肽的表現相同。或者，可使用編碼並可同時表現重鏈和輕鏈多肽的單個載體。在這種情況下，輕鏈應置於重鏈之前，以避免產生過多不含毒性的重鏈(Proudfoot, Nature 322:52 (1986); and Kohler, Proc Natl Acad Sci USA 77:2197 (1980))。重鏈和輕鏈的編碼序列可包括 cDNA 或基因組 DNA。

一旦通過動物、化學合成或重組表現產生本發明的抗體分子，可通過本領域知曉的任何純化免疫球蛋白分子的方法例如層析(例如離子交換、親和力等，尤其是經蛋白質 A 和分子排阻層析後對 IL-4 和/或 IL-13 進行親和層析)、離心、溶解度差異或通過蛋白純化的任何其他標準技術純化抗體分子。此外，本發明所述抗體或抗體片段可被融合到本文所述的異質多肽序列或本領域知曉的其他多肽序列，以便於純化。

可通過本領域知曉的任何適宜方法生成本發明所述抗體。本發明所述抗體可包括多株抗體，儘管由於抗體修飾以優化其在人體內的使用以及優化抗體本身的使用，但單株抗體仍是優選的，這是因其生產和操縱特定蛋白方便。製備多株抗體的方法為本領域技術人員所知曉(Harlow et al., Antibodies:a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988))。

本發明所述抗體優選包括單株抗體。可使用例如由 Kohler et al., Nature 256:495 (1975); 美國專利 4,376,110; Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory

Press, 2nd ed. (1988)和 Hammerling et al., Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier (1981)描述的融合瘤技術、重組 DNA 方法例如製備和使用轉染瘤或為技術人員知曉的其他方法製備單株抗體。可用於產生單株抗體的方法的其他實例包括但不限於人 B 細胞融合瘤技術(Kosbor et al., Immunology Today 4:72 (1983); 和 Cole et al., Proc Natl Acad Sci USA 80:2026 (1983))和 EBV-融合瘤技術(Cole 等人，Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp.77-96, Alan R. Liss (1985))。這些抗體可為包括 IgG、IgM、IgE、IgA 和 IgD 的任何免疫球蛋白類別和其任何亞類的抗體。可在體外或體內培養產生本發明 mAb 的融合瘤。

在融合瘤模型中，對宿主例如小鼠、人類化小鼠、攜帶人免疫系統基因的基因轉殖小鼠、倉鼠、兔、大鼠、駱駝或其他任何適宜的宿主動物進行免疫，以引發產生或可產生特異結合 IL-4 或 IL-13 的抗體的淋巴細胞。使用適宜的融合劑例如聚乙二醇使淋巴細胞隨後與骨髓瘤細胞融合，形成融合瘤細胞(Goding, Monoclonal Antibodies:Principles and Practice, Academic Press, pp. 59-103 (1986))。

一般而言，製備產生抗體的融合瘤時，如欲細胞為人來源的可使用外周血淋巴細胞(「PBL」)，或如欲細胞為非人類來源的則可使用脾臟細胞或淋巴結細胞。永生細胞系通常是轉化的哺乳動物細胞，尤其是嚙齒類、牛或人來源的骨髓瘤細胞。一般使用大鼠或小鼠的骨髓瘤細胞系。可在適宜的培養基上培養融合瘤細胞，該培養基優選含有可抑制未融合的永生細胞的生長或生存的一種或多種物質。例如，如果母體細胞缺乏次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶(HGPRT 或 HPRT)，用於融合瘤的培養基一般會含有次黃嘌呤、氨

蝶呤和胸腺嘧啶(「HAT 培養基」)和防止缺乏 HGPRT 的細胞生長的物質。

優選的永生細胞系是有效融合並支持所選擇的產生抗體的細胞穩定高水準表現抗體的細胞系，它們對培養基例如 HAT 培養基敏感。這些骨髓瘤細胞系中有鼠骨髓瘤系，例如源自可從 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif 獲得的 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠腫瘤和可從 American Type Culture Collection, Manassas, VA 獲得的 SP2/0、FO 或 X63-Ag8-653 細胞。

還描述了人骨髓瘤和小鼠-人種間骨髓瘤細胞系用於產生人單株抗體(Kozbor, J Immunol 133:3001 (1984); 和 Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc, pp.51-63 (1987))。51-63 (1987)). 還可使用小鼠骨髓瘤細胞系 NSO(European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wilshire, UK)。

另外一種選擇是使用電融合而非化學融合來形成融合瘤。可使用例如 Epstein Barr 病毒或其他轉化基因而不使用融合，例如參見 Zurawaki et al., Monoclonal Antibodies, ed., Kennett 等人, Plenum Press, pp.19-33. (1980)使 B 細胞無限增殖。19-33. (1980)。還可使用表現免疫球蛋白的基因轉殖小鼠和移植有人 B 淋巴細胞的重症聯合免疫缺陷(SCID)小鼠。

分析生長有融合瘤細胞的培養基是否產生識別 IL-4 和/或 IL-13 的單株抗體。可通過免疫沉澱或通過體外結合測定例如放射免疫分析(RIA)、螢光細胞測量分析(FACS)或酵素連接免疫吸附分析(ELISA)測定融合瘤細胞所產生的單株抗體的結合特異性。這些技術為本領域知曉，並在技術人員的技藝範圍之內。可通過例如

Scatchard 分析(Munson et al., Anal Biochem 107:220 (1980))測定單株抗體對 IL-4 和/或 IL-13 的結合親和力。

鑑定融合瘤細胞所產生抗體的所需特異性、親和力和/或活性後，這些克隆可通過有限稀釋方法進行次克隆，並按標準方法(Goding, Monoclonal Antibodies:Principles and Practice, Academic Press, pp. 59-103 (1986)進行培養。適宜的培養基包括例如 Dulbecco 改良的 Eagle 培養基 (D-MEM)或 RPMI-1640 培養基。此外，融合瘤細胞可作為腹水癌在動物體內生長。

通過常規免疫球蛋白純化方法例如蛋白質 A-Sepharose、蛋白質 G-Sepharose、羥磷灰石層析、凝膠排阻層析、凝膠電泳、透析或親和層析從培養基中被適宜分離出經次克隆而分泌的單株抗體。

本領域存在許多用於產生單株抗體的方法，因此本發明不侷限於它們僅在融合瘤中的製備。例如，可通過重組 DNA 方法例如美國專利 4,816,567 所述方法製備單株抗體。在這種情況下，術語「單株抗體」係指源自單個真核生物、噬菌體或原核生物克隆的抗體。

使用常規方法(例如使用可特異結合編碼鼠抗體重鏈和輕鏈基因的寡核苷酸探針或使用可特異結合編碼來自人、人類化或其他來源抗體的重鏈和輕鏈基因的寡核苷酸探針)可輕易分離和測序編碼本發明所述單株抗體的 DNA (Innis et al., PCR Protocols.A Guide to Methods and Applications, Academic (1990)和 Sanger et al., Proc Natl Acad Sci 74:5463 (1977))。融合瘤細胞作為這類 DNA 的來源。分離後，該 DNA 可被置於表現載體中，隨後表現載體被轉染到本身不產生免疫球蛋白的宿主細胞例如大腸桿菌細胞、NSO 細胞、COS 細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞中，以在重組的宿主細胞體內獲得單株抗體的合成。還可通過例如用人重鏈和輕鏈恒定區的編碼序列取代同源鼠序列(美國專利 4,816,567；和

Morrison et al., Proc Natl Acad Sci USA 81:6851 (1984))或通過將非免疫球蛋白多肽的全部或部分編碼序列共價結合到免疫球蛋白編碼序列，從而對該 DNA 進行修飾。這些非免疫球蛋白多肽可被替換為本發明抗體的恒定區，或可被替換為本發明抗體的 IL-4 和/或 IL-13 結合位點的可變域，以形成嵌合的二價抗體。

這些抗體可為單價抗體。用於製備單價抗體的方法為本領域所熟知。例如，一種方法涉及免疫球蛋白輕鏈和修飾重鏈的重組表現。重鏈一般在 F_c 區的任意位點被截短，以防止重鏈交聯。或者，相關半胱胺酸殘基可被另一胺基酸殘基取代或被刪除，以防止交聯。

可通過已知技術生成識別特異抗原決定部位的抗體片段。傳統上通過完整抗體的蛋白裂解消化得到這些片段(例如參見 Morimoto et al., J Biochem Biophys Methods 24:107 (1992); and Brennan et al., Science 229:81 (1985))。例如使用酵素如木瓜酵素(產生 F_{ab} 片段)或胃蛋白酶(產生 $F_{(ab')2}$ 片段)對免疫球蛋白分子進行蛋白切割，可產生本發明的 F_{ab} 和 $F_{(ab')2}$ 片段。$F_{(ab')2}$ 片段含有可變區、輕鏈恒定區和重鏈的 C_{H1} 域。但是可直接通過重組的宿主細胞產生這些片段。例如，這些抗體片段可從抗體噬菌體庫分離得到。或者，$F_{(ab')2}$-SH 片段可直接從大腸桿菌中回收並藉化學方式軛合形成 $F(ab')_2$ 片段(Carter et al., Bio/Technology 10:163 (1992)。根據另一方法，$F_{(ab')2}$ 片段可直接從重組的宿主細胞培養物中分離得到。產生抗體片段的其他技術對於本領域技術人員是顯而易見的。在其他實施例中，最佳抗體是單鏈 F_v 片段(F_v) (WO 93/16185)。

對於某些用途包括人體內使用抗體和體外檢測而言，可優選使用嵌合的人類化或人抗體。產生嵌合抗體的方法為本領域所知曉，例如參見 Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al.,

BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., J Immunol Methods 125:191 (1989); 和美國專利 5,807,715; 4,816,567 以及 4,816,397。

人類化抗體源自在非人類物種體內生成的可結合 IL-4 和/或 IL-13 的抗體分子，其中來自結合 IL-4 和/或 IL-13 的抗體的一個或多個 CDRs 被插入到來自人免疫球蛋白分子的 FR 區。使用許多本領域知曉的技術例如 CDRs 移植(EPO 239,400; WO 91/09967; 和美國專利 5,225,539；5,530,101；以及 5,585,089), 鑲飾或表面重塑(EPO 592,106; EPO 519,596; Padlan, Molecular Immunology 28:489 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7:805 (1994); 和 Roguska et al., Proc Natl Acad Sci USA 91:969 (1994)), 以及鏈交換(美國專利 5,565,332)可人類化抗體。

人類化抗體具有一個或多個來自非人類來源的胺基酸殘基。這些非人類的胺基酸殘基通常被稱作「導入」殘基，它們一般取自「導入」的可變域。依據 Winter 及其同事等人的方法(Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988) 和 Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988))通過以非人類的 CDR 或 CDRs 序列的部分替換人抗體的相應序列，可基本上進行人類化。因此，這些「人類化」抗體是嵌合抗體(美國專利 4,816,567)，其中實質小於完整人可變域的序列已被來自非人類物種的相應序列所取代。實踐中，人類化抗體一般是人抗體，其中一些 CDRs 殘基和可能部分 FR 殘基被嚙齒動物抗體的類似位點所取代。重鏈恆定區和鉸接區可來自任何類別或亞類以獲得需要的效果，如一個特定的致效劑功能。

通常，人框架區的框架殘基可被來自 CDR 供體抗體的相應殘基替換，從而改變並有可能提高抗原結合。框架取代可藉本領域知曉方法進行鑑定，例如經建立 CDR 與框架殘基交互作用的模型來

鑑定參與抗原結合的重要框架殘基，以及經序列比較以鑑定特定位置處的異常框架殘基，例如參閱美國專利 5,585,089 和 Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)。

更為可取的是，人類化抗體保留對 IL-4 和/或 IL-13 的高親和力，並且保留或獲得其他有利的生物性質。因此，利用母體序列和人類化序列的三維模型，通過分析母體序列和各種概念性人類化產物，製備成人類化抗體。三維免疫球蛋白模型通常可為本領域技術人員利用和熟知。可利用圖示和展示所選擇候選免疫球蛋白序列的可能三維構象結構的電腦程式。考量此展示可分析某些殘基在候選免疫球蛋白序列發揮功能中的可能作用，即分析影響候選免疫球蛋白結合 IL-4 和/或 IL-13 能力的殘基。藉此種方式，可從接收和導入序列選擇和合併 FR 殘基，使得所需抗體特性得到最大化，例如增加對靶抗原的親和力，儘管是 CDR 殘基直接並最實質性地影響 IL-4 和/或 IL-13 結合。還可修飾 CDR 區域，使其含有一個或多個與得自親代抗體(CDR 得自親代抗體)胺基酸不同的胺基酸，以提供增強或不同的目的性質，例如更大的親和力或親抗原性。

可操縱和改變抗體恒定區的某些區域，以提供具有不同與或優於親代抗體性質的抗體同源物、衍生物、片段等。因此，例如許多 IgG4 抗體在鉸鏈區附近形成鏈內二硫鍵。鏈內二硫鍵可使母體雙價分子變得不穩定，形成含有一條重鏈及與之相連輕鏈的單價分子。這類分子可重新結合，但為隨機結合。

經觀察，修飾 IgG4 分子鉸鏈區的胺基酸可降低鏈內二硫鍵形成的機率，從而穩定 IgG4 分子，這將最大程度降低雙特異性分子形成的機率。若治療用抗體是 IgG4 分子，這種修飾則是有利的，這是因為穩定性增強可將最大程度降低分子在生產和製備過程中以及在體內的解離機率。單價抗體可能沒有與雙價母體分子相同的

有效性。例如，當將雙價 IgG4 輸給患者時，雙價 IgG4 的比例在兩周內衰變為約 30%。位點 228 的胺基酸取代增強了 IgG4 穩定性。位於位點 228 的絲胺酸可為另一胺基酸替換，例如其餘 19 種胺基酸中的一種。尤其可對重組抗體作出這種變動，其中核酸編碼序列經突變可得到 228 位點處的胺基酸取代。例如 S 可被替換為脯胺酸。

另一組適合修飾的胺基酸包括鉸鏈區域的胺基酸，這些胺基酸影響含有重鏈的分子與 F_c 受體之間的結合和被結合抗體的內化。這類胺基酸包括 IgG1 分子中從約 233 至約 237 的殘基(Glu-Leu-Leu-Gly-Gly)；(SEQ ID NO:49)中從約 252 至約 256 的殘基(Met-Ile-Ser-Arg-Thr)和(SEQ ID NO:50)中從約 318(Glu)至約 331(Pro)的殘基，例如包括 Lys_{320}、Lys_{322} 和 Pro_{329}。

完全人抗體特別適合於人患者的治療性處置。可藉許多本領域知曉的方法製備人抗體，其中包括利用源自人免疫球蛋白序列的抗體文庫而進行的上述噬菌體展示方法，參閱美國專利 4,444,887 和 4,716,111；WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 和 WO 91/10741。還可利用 Cole 等人和 Boerder 等人的技術製備人單株抗體(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss (1985); 和 Boerner et al., J Immunol 147:86 (1991))。

還可使用基因轉殖小鼠生產人抗體，這些小鼠不能表現有功能的內源免疫球蛋白，但也表現某些人免疫球蛋白基因。例如，可藉隨機方式或同源重組將人重鏈和輕鏈免疫球蛋白基因複合物引入到小鼠的胚胎幹細胞。或者，除了人重鏈和輕鏈基因以外，可將人的可變區、恒定區和多變區引入到小鼠胚胎幹細胞中。通過同源重組引入人免疫球蛋白位點，可使小鼠重鏈和輕鏈免疫球蛋白基因分別或同時失去功能。具體而言，JH 區的純合缺失可防止內源抗體

生成。被修飾的胚胎幹細胞經擴增，被顯微注射到胚泡中，形成嵌合小鼠。隨後繁育嵌合小鼠，產生表現人抗體的純合後代，例如參閱 Jakobovitis et al., Proc Natl Acad Sci USA 90:2551 (1993); Jakobovitis et al., Nature 362:255 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol 7:33 (1993); 和 Duchosal et al., Nature 355:258 (1992))。

基因改造的小鼠按正常方式用 IL-4 或 IL-13 細胞激素如 IL-4 或 IL-13 的全部或部份進行免疫。利用常規融合瘤技術可從免疫的基因轉殖小鼠得到抗 IL-4 和 IL-13 的單株抗體。基因轉殖小鼠所攜帶的人免疫球蛋白轉殖基因在 B 細胞分化過程中發生重排，隨後經歷類別轉換和體細胞突變。因此，利用這種技術有可能產生治療用的 IgG、IgA、IgM 和 IgE 抗體。若欲瞭解概況，可參閱 Lonberg et al., Int Rev Immunol 13:65-93 (1995)。若欲瞭解對生產人抗體和人單株抗體以及生產這類抗體的試驗方案的討論，可參閱例如 WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; EPO No. 0 598 877; 和美國專利 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 5,885,793; 5,916,771 以及 5,939,598. 此外，例如 Amgen (Fremont, CA)、Genpharm (San Jose, CA)和 Medarex, Inc. (Princeton, NJ)等公司利用與上述類似的技術可從事抗 IL-4 和/或 IL-13 人抗體的生產。

同樣，可免疫移植有人外周血白血球、脾細胞或骨髓(以色列 XTL Biopharmaceuticals 公司的三體融合瘤技術)的小鼠，製備人 mAbs。可利用被稱為「導向選擇」的技術生成的識別所選擇抗原決定部位的完全人抗體。在該方法中，使用經選擇的非人類單株抗體如小鼠抗體來引導識別相同抗原決定部位的完全人抗體的選擇 (Jespers et al., Bio/technology 12:899 (1988))。

使用重組技術時，抗體變異體可在細胞內、細胞周質空間內產生，或直接被分泌到培養基中。如果抗體變異體是在細胞內產生的，則可首先通過離心或超濾除去微小碎片，其或是宿主細胞或是被裂解的片段。Carter et al., Bio/Technology 10:163 (1992)描述了一種分離被分泌到大腸桿菌周質空間的抗體的方法。簡而言之，細胞漿與乙酸鈉(pH 3.5)和 EDTA 接觸。可通過離心除去細胞碎片。當抗體變異體被分泌到培養基中時，一般首先利用市售蛋白質濃縮過濾器如 Amicon 或 Millipore Pellicon 的超濾元件濃縮來自這些表現體系的上清液。可加入蛋白酶抑製劑例如 PMSF 以抑制蛋白酶解，還可加入抗生素以防止外來污染物的生長。

可使用例如羥磷灰石層析、凝膠電泳、透析和親和層析純化從細胞製備的抗體組成物。蛋白質 A 或蛋白質 G 是否適合作為親和配體取決於抗體變異體上任意免疫球蛋白 F_c 域的物種和同型。可使用蛋白質 A 純化基於人 IgG1、IgG2 或 IgG4 重鏈的抗體(Lindmark et al., J Immunol Meth 62:1 (1983))。可使用蛋白質 G 用於小鼠同型和人 IgG3 (Guss et al., EMBO J 5:1567 (1986))。親和配體所結合的基質通常多數是瓊脂糖，但也可使用其他基質。機械穩定的基質例如可控孔徑玻璃或聚苯乙烯二乙烯苯可實現比瓊脂糖更快的流速和更短的處理時間。當抗體變異體包括 C_{H3} 域時，可使用 Bakerbond ABXTM 樹脂(JT Baker; Phillipsburg, NJ)進行純化。還可利用其他蛋白質純化技術，例如離子交換柱分級、乙醇沉澱、反相 HPLC、矽膠層析、肝素瓊脂糖層析、陰離子或陽離子交換樹脂層析(例如多聚天冬胺酸柱)、色譜聚焦、SDS-PAGE 和硫酸銨沉澱，這取決於待回收的抗體或變異體。

進行任何初步純化步驟後，含有目的抗體或目的變異體和污染物的混合物可進行低 pH 疏水交互作用層析，其中使用 pH 約 2.5-4.5 的洗脫緩衝液，優選在低鹽濃度(例如約 0-0.25 M 鹽)下進行。

本發明的抗體可為雙特異性抗體。雙特異性抗體可為單株抗體，優選為具有至少兩種不同抗原結合特異性的人或人類化抗體。在一個優選的實施例中，雙特異抗體、其片段等等對 IL-4 和 IL-13 具有結合特異性。

生產雙特異性抗體的方法是眾所周知的。傳統上，雙特異性抗體的重組生產是基於兩個免疫球蛋白重鏈/輕鏈對的共表現，其中兩條重鏈具有不同的特異性(Milstein et al., Nature 305:537 (1983))。由於免疫球蛋白重鏈和輕鏈的隨機分配，融合瘤(四體融合瘤)產生 10 種不同抗體分子的潛在混合物，其中僅有一種具有正確的雙特異性結構。通常通過親和層析步驟進行正確分子的純化。類似方法揭示於 WO 93/08829 和 Traunecker et al., EMBO J 10:3655 (1991)。例如 Kufer et al., Trends Biotech 22:238-244, 2004 提供了生產雙特異性抗體的其他方法。

可將具有所需結合特異性的抗體可變域融合到免疫球蛋白的恒定域序列上。優選以包括至少部分鉸鏈區、C_{H2} 和 C_{H3} 區的免疫球蛋白重鏈恒定域進行融合。它可具有首個重鏈恒定區(C_{H1})，其含有至少在一次融合中出現的輕鏈結合所需的位點。將編碼免疫球蛋白重鏈融合區和免疫球蛋白輕鏈(若需要)的 DNAs 插入到不同的表現載體，並共轉化到適宜的宿主生物體內。若欲瞭解產生雙特異性抗體的更多細節，可參閱例如 Suresh et al., Meth Enzym 121:210 (1986)。

本發明也考慮了異源軛合抗體。異源軛合抗體由兩個共價鍵連接的抗體組成。有人建議用這類抗體對準免疫系統細胞至無用細胞

（美國專利 4,676,980）。並考慮，該抗體可用合成蛋白化學的已知方法在體外製備，包括涉及交聯劑的那些方法。例如，免疫毒素可用一種二硫化物交換反應或形成硫酯鍵的方式來構築。適合於該目的之試劑的例子包括硫雜環戊烷亞胺鹽(iminothiolate)和甲基-4-巯基丁醯亞胺鹽(methyl-4- mercaptobutyrimidate)，以及如美國專利 4,676,980 中所揭露者。

此外，可以產生結合到 IL-4 和/或 IL-13 的單域抗體。這種技術的某些例子，已在 WO9425591 談及源自駱駝重鏈 Ig 的抗體時有所敘述，在 US20030130496 談及從噬菌體文庫分離單域全人源抗體時也有所敘述。

此外，某些生產單鏈抗體的技術（美國專利 4,946,778；Bird, Science 242:423 (1988)；Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 85:5879 (1988)；以及 Ward, et al., Nature 334:544 (1989)）也可適應於生產單鏈抗體。單鏈抗體是通過將 F_v 域的重鏈和輕鏈片段以一個胺基酸橋連接生成一個單鏈多肽而形成的。大腸桿菌中的功能 F_v 片段的組合技術也可以利用（Skerra et al., Science 242:1038 (1988)）。

本發明包括了以重組方式與一個多肽融合或化學軛合（包括共價和非共價軛合）的抗體。本發明的融合或軛合的抗體可用於簡化純化，參閱例如 WO 93/21232；EP 439,095；Naramura et al., Immunol Lett 39:91 (1994)；美國專利 5,474,981；Gillies et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:1428 (1992)；以及 Fell et al., J Immunol 146:2446 (1991)。標記胺基酸序列可以是一個六組胺酸肽，如 pQE 載體提供的標籤（QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA），此外，其中許多還可經商業渠道獲得，Gentz et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:821 (1989)。其他可用於純化的多肽標籤包括但不限於「HA」標籤，它

對應於一個源自流感血凝素蛋白的抗原決定部位（Wilson et al., Cell 37:767 (1984)）以及「flag」標記。

還可創造一種單肽鏈結合分子，其中重鏈和輕鏈 F_v 域相連。單鏈抗體(「scF_v」) 和它們的構築方法在例如美國專利 4,946,778 中有所敘述。或者，F_{ab} 可以類似方式構築和表達。與完全的鼠類單株抗體相比，所有完全和部分的人源抗體均可具有較小的免疫原性，片段和單鏈抗體也可具有較小的免疫原性。

抗體或抗體片段，可從用 McCafferty et al., Nature 348:552 (1990)所述技術產生的抗體噬菌體文庫分離。Clarkson et al., Nature 352:624 (1991)和 Marks et al., J Mol Biol 222:581 (1991) 分別敘述了使用噬菌體文庫分離鼠類和人源抗體的技術。隨後的出版物敘述了以鏈替換方式生產高親和力（在 nm 的範圍內）人源抗體的方法（Marks et al., Bio/Technology 10:779 (1992)），以及以組合感染和體內重組作為構築很大噬菌體文庫的策略（Waterhouse et al., Nucl Acids Res 21:2265 (1993)）。因此，這些技術是分離單株抗體的傳統單株抗體融合瘤技術的可行替代技術。

候選的抗 IL-4 和/或 IL-13 抗體是用酶聯免疫吸附分析（ELISA）、FACS、西方免疫印跡技術或本技術領域內已知的其他免疫化學技術檢測的。

為了確定某種特定的抗體同源物是否與人類 IL-4 和/或 IL-13 結合，任何傳統的結合測定均可應用。有用的 IL-4 和 IL-13 結合分析包括 FACS 分析、ELISA、表面細胞質基因組共振(Biacore)、放射免疫分析等等，這些分析方法檢測抗體與人類 IL-4 和/或 IL-13 的結合以及由此產生的功能。本文所講授的全長和可溶性人類 IL-4 和 IL-13 在這類分析中是有用的。抗體或同源物與 IL-4 和/或 IL-13 或其可溶性片段的結合，可很方便地通過使用對該物種的免疫球蛋

白具有特異性的第二種抗體來檢測，所檢測的抗體或同源物源自上述物種。

為了確定某種特定的抗體或同源物是否顯著地阻斷 IL-4 和/或 IL-13 的結合，任何適宜的競爭分析法均可使用。有用的分析方法包括例如 ELISA 分析、FACS 分析、放射免疫分析等，它們可定量分析抗體或同源物與 IL-4 和/或 IL-13 結合的競爭能力。較佳的是，配體阻斷帶標記人類 IL-4 和/或 IL-13 與固定化抗體或同源物結合的能力得以測量。

本發明之抗體可以抗體識別或特異性結合的 IL-4 和/或 IL-13 的抗原決定部位或部分來描述或規定。該抗原決定部位或多肽部分可按本文所述而規定，例如根據 N 端和 C 端的位置、根據毗連胺基酸殘基的大小、構象抗原決定部位等。

本發明之抗體也可以交叉反應性來描述或規定。跟與 IL-4 和/或 IL-13 有至少 95 %、至少 90 %、至少 85 %、至少 80 %、至少 75 %、至少 70 %、至少有 65 %、至少有 60 %、至少 55 %，以及至少 50 %同一性（使用本技術領域內已知和本文所述的方法計算）的 IL-4 和/或 IL-13 多肽結合的抗體，也包括在本發明內。

本發明之抗體也可以與目的 IL-4 和/或 IL-13 的結合親和力來描述或規定。抗 IL-4 和/或 IL-13 抗體可以低於約 10^{-7} M、低於約 10^{-6} M，或低於約 10^{-5} M 的 K_D 結合，目的抗體的較高結合親和力可以是有益的，例如具有約 10^{-8} 至 10^{-15}、約 10^{-8} 至 10^{-12}、約 10^{-9} 至 10^{-11}，或約 10^{-8} 至 10^{-10} 平衡解離常數或 K_D 的那些抗體。本發明還提供了一些抗體，如本技術領域內任何已知的測定競爭性結合的方法如本文所述的免疫分析所確定，這些抗體競爭性地抑制一種抗體與本發明之抗原決定部位的結合。在一些較佳的實施例中，抗體競爭性地抑制與抗原決定部位的結合達至少 95 %、至少

90 %、至少 85 %、至少 80 %、至少 75 %、至少 70 %、至少為 60 %，或至少 50 %。

本發明還包括含有目的抗體的軛合物(conjugate)。該軛合物包含兩個主要組分，一個目的抗體和可以是一種細胞結合劑、細胞毒性劑等的第二個組分。

本文所用的術語「細胞結合劑」是指一種能特異性識別細胞表面的分子並與其結合的試劑。因此，細胞結合劑可以是一種 CD 抗原、病原體抗原如病毒抗原，分化抗原，腫瘤抗原，細胞特異性抗原，組織特異性抗原，Ig 或 Ig 類分子等。

細胞結合劑可以是目前已知或剛為人所知的任何類型，包括肽、非肽、糖、核酸、配體、受體等，或其組合。該細胞結合劑可以是能與細胞結合的任何化合物，無論是以特異性或非特異性方式結合。一般而言，細胞結合劑可以是一種抗體（尤其是單株抗體）、淋巴因子、激素、生長因子、維生素，營養輸送分子（如轉鐵蛋白），或其他任何細胞結合分子或物質。

可利用的細胞結合劑的其他例子包括：多株抗體；單株抗體；抗體片段，如 F_{ab}、$F_{ab'}$、$F_{(ab')2}$ 以及 F_v (Parham, J. Immunol. 131:2895-2902 (1983)；Spring et al., J. Immunol. 113:470-478 (1974)；以及 Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys. 89：230-244 (1960))。

第二個組分也可以是一種細胞毒性劑。本文所用的術語「細胞毒性劑」是指一種能降低或阻斷細胞的功能或增長，和/或導致細胞破壞的物質。因此，細胞毒性劑可以是一種紫杉醇、美登素（maytansinoids），如 DM1 或 DM4、CC-1065 或 CC－106 類似物、蓖麻毒素、絲裂黴素 C 等。在某些實施例中，如同本發明之軛合

物的任何結合劑，細胞毒性劑是以共價鍵與目的抗體直接或通過一個可切割的或不可切割的連接分子連接的。

適宜的美登素的例子包括美登素醇（maytansinol）和美登素醇類似物。美登素能抑制微管的形成並對哺乳動物細胞具有很強的毒性。

適宜的美登素醇類似物的例子包括含有一個經修飾芳環和在其他位置有修飾的那些美登素醇類似物。在下列美國專利中揭示這類適宜的美登素：4,424,219；4,256,746；4,294,757；4,307,016；4,313,946；4,315,929；4,331,598；4,361,650；4,362,663；4,364,866；4,450,254；4,322,348；4,371,533；6,333,410；5,475,092；5,585,499；以及 5,846,545。

適宜的含有一個經修飾芳環的美登素醇類似物的例子包括：（1）C-19-脫氯（美國專利 4,256,746）（例如通過美坦西醇 P2（ansamytocin P2）的 LAH 還原而製備）；（2）C-20-羥基（或 C-20-脫甲基）+/- C-19-脫氯（美國專利 4,361,650 和 4,307,016）（例如用鏈黴菌或放線菌脫甲基或用氫化鋰鋁（LAH）脫氯而製備）；以及（3）C-20-脫甲氧基、C-20-乙醯氧基（-OCOR），+/-脫氯（美國專利 4,294,757）（用醯基氯醯化而製備）。

適宜的在其他位置有修飾的美登素醇類似物的例子包括：（1）C-9-SH（美國專利 4,424,219）（通過美登素醇與 H_2S 或 P_2S_5 的反應而製備）；（2）C-14 烷氧基甲基（脫甲氧基/CH_2OR）（美國專利 4,331,598）；（3）C-14-羥甲基或乙醯氧基甲基（CH_2OH 或 CH_2OAc）（美國專利 4,450,254）（從諾卡氏菌製備）；（4）C-15-羥基/乙醯氧基（美國專利 4,364,866）（通過鏈黴菌使美登素醇轉化而製備）；（5）C-15-甲氧基（美國專利 4,313,946 和 4,315,929）（從 Trewia nudiflora 分離）；（6）C-18-N-脫甲基（美國專利

4,362,663 和 4,322,348）（通過鏈黴菌使美登素醇脫甲基化而製備）；以及（7）4,5-脫氧（美國專利 4,371,533）（通過美登素醇的三氯化鈦/LAH 還原而製備）。

細胞毒性軛合物可以體外方法製備。為了將細胞毒性劑、藥物或前體藥與抗體連接，通常使用一個連接基。適宜的連接基是本技術領域內周知的，包括二硫基、硫醚基、酸不穩定基、光不穩定基，肽酶不穩定基以及酯酶不穩定基。例如，利用二硫鍵交換反應，或在目的抗體和藥物或前體藥之間形成硫醚鍵，即可構築軛合物。

如上所討論，本發明提供了編碼本文所揭示抗體或其功能變體的分離的核酸序列，含有編碼本發明 IL-4 和/或 IL-13 結合的抗體部分或其功能片段的核苷酸序列的載體構築體，含有這種載體的宿主細胞，以及生產多肽的重組技術。

該載體通常包含本技術領域內已知的組分，且一般包括但不限於一個或多個下列元件：一個信號序列、一個複製起點，一個或多個標記或選擇基因，促進和/或加強轉譯的序列，一個增強子等。因此，該表現載體包括一個與適宜的轉錄或轉譯調控核苷酸序列，例如那些源自哺乳動物、微生物、病毒或昆蟲基因的核苷酸序列，可操作地連接的核苷酸序列。其他調控序列的例子包括操作子、mRNA 的核糖體結合位點，和/或其他控制轉錄和轉譯（例如其起始和終止）的適宜序列。當調控序列在功能上與相應多肽的核苷酸序列相關時，核苷酸序列就是「可操作地連接的」。因此，如果一個啟動子核苷酸序列控制該核苷酸序列的轉錄，那麼該啟動子核苷酸序列就是與例如抗體重鏈序列可操作地連接的。

此外，編碼與抗體重鏈和/或輕鏈序列非天然相連的相應信號肽的序列，可納入表現載體。例如，一個信號肽（分泌前導）的核苷酸序列可與多肽序列融合，使得該抗體被分泌到周質空間或進入

介質。在預定宿主細胞中起作用的信號肽，加強了相應抗體或其部分的細胞外分泌。該信號肽可在細胞分泌抗體時從多肽上裂解。這類分泌信號的例子是眾所周知的並包括例如在美國專利 5,698,435、5,698,417，以及 6,204,023 中所述的那些分泌信號。

載體可以是質體、單鏈或雙鏈病毒載體、單鏈或雙鏈 RNA 或 DNA 的噬菌體載體、噬菌體、黏粒或任何其他目的轉基因的載體。採用眾所周知的將 DNA 和 RNA 導入細胞的技術，可將這種載體作為聚核苷酸導入細胞。在噬菌體和病毒載體的情況下，也可採用眾所周知的感染及轉導技術，將載體作為包裝或包裹病毒導入細胞。病毒載體可以是可複製型或複製缺陷型。在後一種情況下，病毒的繁殖一般只會在輔助型宿主細胞中發生，並需使用載有產生一個顆粒所必須的各種病毒成分的多種載體。使用源自現有 DNA 構築體的 RNA，無細胞轉譯系統也可用於生產蛋白（參閱例如 WO 86/05807 和 WO 89/01036，以及美國專利 5,122,464）。

本發明之抗體可從任何適宜的宿主細胞表達。可用於本發明的宿主細胞的例子包括原核細胞、酵母或較高級的真核細胞，並包括但不限於微生物如用含有本發明抗體編碼序列的重組噬菌體 DNA、DNA 質體或黏粒 DNA 表現載體轉化的細菌（如大腸桿菌、枯草芽孢桿菌、腸桿菌，歐文氏菌，肺炎克雷伯氏菌，變形桿菌、沙門氏菌、沙雷氏菌、志賀氏菌，以及桿菌、綠膿桿菌和鏈黴菌）；用含有抗體編碼序列的重組酵母表現載體轉化的酵母（例如釀酒酵母、巴氏酵母、放線菌、克魯維酵母菌、裂殖酵母、念珠菌、木黴菌，鏈孢黴菌，以及絲狀真菌，如鏈孢黴菌、青黴菌、彎頸黴菌和曲黴菌）；用含有抗體編碼序列的重組病毒表現載體（如桿狀病毒）感染的昆蟲細胞系統；用重組病毒表現載體（如花椰菜花葉病毒、CaMV；或煙草花葉病毒，TMV）感染的，或用含有抗體編碼序列

的重組質體表現載體（例如 Ti 質體）轉化的植物細胞系統；或包含重組表達構築體的哺乳動物細胞系統（例如 COS、CHO、BHK、293 或 3T3 細胞）。該構築體含有源自哺乳動物細胞基因組的啟動子（例如金屬硫蛋白啟動子）或源自哺乳動物病毒的啟動子（例如腺病毒後期啟動子；或疫苗病毒 7.5K 啟動子）。

用於原核宿主細胞的表現載體，一般含有一個或多個表型選擇標記基因。表型選擇標記基因可以是，例如一種編碼賦予耐藥性或提供自養要求的蛋白的基因。有用的原核宿主細胞的表現載體的例子包括從經商業渠道獲得的質體如 pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)、pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI)、pET (Novagen, Madison, WI)以及 pRSET (Invitrogen, Carlsbad, CA)系列載體(Studier, J Mol Biol 219:37 (1991)；以及 Schoepfer, Gene 124:83 (1993))所衍生的那些載體。通常用於重組原核宿主細胞表現載體的啟動子序列包括 T7，(Rosenberg et al., Gene 56:125 (1987))、β-內醯胺酶（青黴素酶）、乳糖啟動子系統(Chang et al., Nature 275:615 (1978)；以及 Goeddel et al., Nature 281:544 (1979))、色胺酸(trp)啟動子系統(Goeddel et al., Nucl Acids Res 8:4057 (1980))，以及 tac 啟動子(Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990))。

酵母載體往往含有一個複製起點序列，如 2μ 酵母質體、自主複製序列(ARS)、啟動區、多聚腺苷化序列、轉錄終止序列以及可選擇標記基因。酵母載體的適宜的啟動子序列包括但不限於金屬硫蛋白啟動子、3-磷酸甘油酸激酶（Hitzeman et al., J Biol Chem 255:2073 (1980)）或其他糖酵解酶（Holland et al., Biochem 17:4900 (1978)）如烯醇化酶、甘油醛-3-磷酸脫氫酶、己糖激酶、丙酮酸脫

羧酶、果糖磷酸激酶、葡糖-6-磷酸異構酶、3-磷酸甘油酸變位酶、丙酮酸激酶、丙糖磷酸異構酶、磷酸葡糖異構酶以及葡糖激酶。其他用於酵母表達的適宜載體和啟動子，在 Fleer et al., Gene 107:285 (1991)中進一步說明。其他酵母和酵母轉化方案的適宜啟動子和載體是本技術領域內眾所周知的。酵母轉化方案也是眾所周知的。Hinnen et al., Proc Natl Acad Sci 75:1929 (1978)敘述了這樣的一個方案，它在一種選擇性培養基中選擇 Trp^+ 轉化。

任何真核細胞培養液都是可行的，無論是源自脊椎動物還是無脊椎動物的培養液。無脊椎動物細胞的例子，包括植物和昆蟲細胞（Luckow et al., Bio/Technology 6:47 (1988)；Miller et al., Genetic Engineering, Setlow et al., eds., vol. 8, pp. 277-9, Plenum Publishing (1986)；以及 Maeda et al., Nature 315:592 (1985)）。例如，桿狀病毒系統可用於生產異源蛋白。在昆蟲系統中，苜蓿銀蚊夜蛾核型多角體病毒（*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus，AcNPV）可作為載體用來表現外源基因。該病毒在草地貪夜蛾（*Spodoptera frugiperda* ）細胞中生長。抗體編碼序列可在 AcNPV 啟動子（例如多角體蛋白啟動子）的控制下被克隆。其他已經鑑定的宿主包括白紋伊蚊(Aedes)、黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)和家蠶(*Bombyx mori*)。各種各樣的轉染病毒株可從市面上獲得，例如 AcNPV 的 L-1 變種和家蠶 NPV 的 Bm-5 株。此外，如本技術領域內眾所周知，棉花、玉米、馬鈴薯、大豆、矮牽牛、番茄、煙草的植物細胞培養液也可作為宿主。

脊椎動物細胞、脊椎動物細胞在培養基（組織培養基）中的繁殖，可以是一種常規步驟，雖然苛求細胞系確實存在，它需要例如一種具有獨特因子的專門培養基、飼養細胞等，參閱 Tissue Culture, Kruse et al., eds., Academic Press (1973)。有用的哺乳動物

宿主細胞系的例子為猴腎細胞；人胚腎細胞；幼倉鼠腎細胞；中國倉鼠卵巢細胞//-DHFR （CHO, Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77:4216 (1980)）；小鼠塞爾托利氏細胞；人宮頸癌細胞（例如 HeLa）；犬腎細胞；人肺癌細胞；人肝細胞；小鼠乳腺腫瘤；以及 NS0 細胞。

宿主細胞是用載體轉化以產生抗體，並在常規營養培養基中培養。該培養基含有生長因子、維生素、礦物質等，以及適合於所用細胞和載體的誘導劑。常用的啟動子序列和增強子序列是源自多瘤病毒、腺病毒 2、猴病毒 40 （SV40）以及人的巨細胞病毒（CMV）。源自 SV40 病毒基因組的 DNA 序列可用於提供其他遺傳元件，以在哺乳動物宿主細胞（如 SV40 起點、早期和晚期啟動子、增強子、剪接和多聚腺苷化位點）中表達一個結構基因序列。病毒性早期和晚期啟動子是特別有用的，因為兩者都很容易從病毒基因組作為一個片段獲得。該片段也可能含有一個病毒複製起點。用於哺乳動物宿主細胞的典型表現載體可從商業渠道獲得。

可從商業上可得的培養基如 Ham's F10、最小必須培養基（MEM）、RPMI-1640 和 Dulbecco 改良的 Eagle 培養基（DMEM）都適合於培養宿主細胞。此外，Ham et al., Meth Enzymol 58:44 (1979)和 Barnes et al., Anal Biochem 102:255 (1980)，以及美國專利 4,767,704；4,657,866；4,560,655；5,122,469；5,712,163；或 6,048,728 中所述的任何培養基也可作為宿主細胞的培養基使用。這些培養基中任何一種，必要都可補充激素和/或其他生長因子（如胰島素，轉鐵蛋白或表皮生長因子），鹽（如氯化物，如氯化鈉、氯化鈣或氯化鎂；以及磷酸鹽）、緩衝液（如 HEPES）、核苷酸（如腺苷和胸苷）、抗生素，微量元素（定義為無機化合物，通常其最終濃度在微莫耳的範圍內），以及葡萄糖或一種相當的能量來源。任何

其他必要的補充，都可以適當的濃度包括在內，作為一項設計選擇。培養基條件，如溫度、pH 值等，都是本技術領域內已知適合於細胞的，並使轉基因能夠理想表達。

使用本技術領域內任何已知的方法，就可獲得目的聚核苷酸，並確定該聚核苷酸的核苷酸序列。例如，如果抗體的核苷酸序列是已知的，就可從化學合成的寡核苷酸組裝編碼抗體的聚核苷酸（例如 Kutmeier et al., Bio/Techniques 17:242 (1994)所敘述的），然後擴增連接的寡核苷酸，例如通過 PCR。

或者，編碼抗體的聚核苷酸可從表達相同抗體的核酸細胞產生。如果不具備含有編碼某特定抗體的核酸的克隆，但抗體分子的序列是已知的，則可從適當來源如文庫獲得編碼免疫球蛋白的核酸，這也許是一種對產生抗體的細胞具有特異性的核酸，如選定表達本發明之抗體的融合瘤細胞。可為 PCR 擴增配置適宜的引子。然後，使用本技術領域內眾所周知的任何方法，可將 PCR 所產生的擴增核酸選殖到可複製的選殖載體中去。

一旦核苷酸序列和對應於抗體的胺基酸序列被確定，就可使用本技術領域內已知的操縱核苷酸序列的方法，如 DNA 重組技術、定點誘變，PCR 等（參閱，例如 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990)；以及 Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998)，操縱該抗體的核苷酸序列以獲得本文所述的等效物，產生含有不同胺基酸序列的抗體，例如，引起胺基酸取代、刪除和/或插入。

可以眾所周知的方法檢查重鏈和/或輕鏈可變域的胺基酸序列，以鑑定 CDR 序列，例如，通過與其他重鏈和輕鏈可變域的已知胺基酸序列的比較可確定序列高可變性的區域。使用常規 DNA

重組技術，可將一個或多個 CDR 插入構架區，例如插入人的構架區使非人源抗體人類化，如上所述。通過該構架區與一個或多個 CDR 的結合而產生的聚核苷酸，可編碼與 IL-4 和/或 IL-13 特異性結合的抗體或至少編碼其 ED 域。例如，這種方法可用於一個或多個參與鏈內二硫鍵可變域半胱胺酸殘基的胺基酸取代或刪除，以產生缺乏一個或多個鏈內二硫鍵的抗體分子。

本發明的抗體或抗體片段可用來在體外或體內檢測生物樣品中的 IL-4 和/或 IL-13，因此也就可以檢測表現 IL-4 和/或 IL-13 的細胞。在一個實施例中，本發明的抗 IL-4 和/或 IL-13 抗體被用來確定一個組織中或從組織中獲得的細胞中 IL-4 和/或 IL-13 的存在及濃度。例如，在用本發明之抗體或抗體片段進行的免疫分析中，可測定 IL-4 和/或 IL-13 在該組織或活檢樣本中的水平。組織或活檢樣本可冷凍或固定。同一方法或其他方法也可用於測定 IL-4 和/或 IL-13 的其它性能，如它的水平、細胞定位、mRNA 水平、基因突變等等。

上述方法可用於例如為已知或疑患癌症的患者診斷癌症，將該患者的 IL-4 和/或 IL-13 水平與一個正常對照或標準相比。本發明的分析也可用於診斷關節炎或其他以 B 細胞的浸潤和富集以及分化淋巴組織發展為特徵的自體免疫性疾病。

本發明還提供了為了研究或診斷應用而進一步標記的單株抗體、人類化抗體及其抗原決定部位結合片段。在某些實施例中，該標記是一種放射性標記、螢光團、生色團、顯像劑，或金屬離子。

此外還提供了一種診斷方法，其中將所述標記抗體或其抗原決定部位結合片段輸給一位疑患癌症、關節炎、自體免疫性疾病或其他 IL-4 和/或 IL-13 介導的疾病的患者，該標記在患者體內的分佈予以測量或監視。

本發明之抗體及其片段可作為親和純化劑使用。在此過程中，使用本技術領域已知的方法，將抗體固定在一種固相載體如右旋糖酐或瓊脂糖樹脂或濾紙上。被固定的抗體與含有 IL-4 和/或 IL-13 的樣本或載有 IL-4 和/或 IL-13 的待純化細胞接觸，然後用一種適宜的溶劑洗滌載體，該溶劑將洗去樣本中除 IL-4 和/或 IL-13 或待純化細胞以外幾乎所有的物質，IL-4 和/或 IL-13 或待純化細胞則結合在被固定的本發明之抗體上。最後，用另一種適宜的溶劑（如苷胺酸緩衝液，pH 值 5.0）洗滌載體，這將從抗體上釋放 IL-4 和/或 IL-13 或細胞。

為了診斷應用，目的抗體通常會用一種可檢測的成分加以標記。有許多標記可供利用，大致可分為以下幾類：（a）放射性同位素，如 ^{36}S、^{14}C、^{125}I、^{3}H 和 ^{131}I（抗體可用放射性同位素標記，使用 Current Protocols in Immunology, vol. 12, Coligen et al., ed., Wiley-Interscience, New York (1991)所述的技術，例如，放射性可用閃爍計數技術來衡量）；（b）螢光標籤，如稀土螯合物（銪螯合物）、螢光素及其衍生物、羅丹明及其衍生物、丹磺醯、麗絲胺、藻紅蛋白以及得克薩斯紅；螢光標籤可用 Current Protocols in Immunology（同上）揭示的技術結合到抗體上，例如，螢光可用螢光儀量化；以及（c）有各種酶受質標籤可供利用（美國專利 4,275,149 提供了一段評述），酶通常可催化產色受質的化學改變，這可採用各種技術來測量，例如酶可催化受質顏色的變化，這可用分光光度來衡量；或者，酶可以改變受質的螢光或化學發光。定量測定螢光變化的技術是眾所周知的，例如使用發光計，或者該標記可向一種螢光受體提供能量。酶標記的例子包括螢光素酶（例如，螢火蟲螢光素酶和細菌螢光素酶；美國專利 4,737,456）、螢光素、2,3-二氫二氮雜萘二酮、蘋果酸脫氫酶、脲酶，過氧化物酶如辣根

過氧化物酶(HRPO)、鹼性磷酸酶，β-半乳糖苷酶、葡糖糖化酶、溶菌酶、糖氧化酶（如葡糖氧化酶、半乳糖氧化酶，葡糖-6-磷酸脫氫酶）、雜環氧化酶（如尿酸酶和黃嘌呤氧化酶）、乳過氧化物酶、微過氧化物酶等。使酶與抗體結合的技術在 O'Sullivan et al., Meth Enz, ed. Langone & Van Vunakis, Academic Press, New York, 73 (1981)中有所敘述。

當使用這些標記時，有適宜的受質可供利用，例如：(i) 對於辣根過氧化物酶可用過氧化氫酶作為受質，過氧化氫酶可氧化一種染料前體（例如鄰苯二胺(OPD)或 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺鹽酸鹽(TMB)）；(ii) 對於鹼性磷酸酶(AP)可用對硝基苯磷酸酯作為產色受質；以及(iii) β-D-半乳糖苷酶（β-D-Gal）可用產色受質（例如對硝基苯-β-D-半乳糖苷酶），或螢光受質如 4-甲基傘形酮醯-β-D-半乳糖苷酶。

其他酶-受質組合可供本技術領域專業人員利用。對於一般性評述，可參閱美國專利 4,275,149 和 4,318,980。

有時，標記與抗體是間接地結合。例如，抗體可與生物素結合，上述任何報導子都可與親和素結合，反之亦然。生物素與親和素選擇性地結合，因此，標記可與抗體以間接方式結合。或者，為了實現標記的間接結合，抗體與一種小的半抗原（如地高辛）結合，一種不同類型的標記或上述的報導子與一種抗地高辛抗體結合。因此，使用第二種抗體可以實現標記與抗體或突變蛋白的間接結合。

在本發明的另一個實施例中，抗體不必加以標記，它的存在可使用一種與該抗體結合的標記抗體來檢測，另一種形式的第二抗體。

本發明之抗體可用於任何已知的分析方法，如競爭性結合分析、直接和間接夾心分析以及免疫分析。Zola, Monoclonal Antibodies：A Manual of Techniques (CRC Press, Inc. 1987)。

競爭性結合分析取決於一種帶標記的標準物與試驗樣本在與有限量抗體結合過程中的競爭能力。試驗樣本中抗原的量與跟抗體結合的標準物的量成反比。為便於測定跟抗體結合的標準物的量，抗體在競爭之前或之後通常是不溶解的。結果，與抗體結合的標準物和試驗樣本可與未結合的標準物和試驗樣本方便地分離。

夾心分析涉及使用兩種抗體，每一種都有能力與待檢測目標的不同免疫原部分（決定子或抗原決定部位）結合。在夾心分析中，待分析試驗樣本與直接或間接固定在一種固體載體上的第一種抗體結合，然後直接或間接地加以標記的第二種抗體與已經結合的試驗樣本結合，從而形成一種不溶性三部分複合物，參閱例如美國專利 4,376,110。第二種抗體本身可用一種可檢測的成分加以標記（直接夾心分析），或可用一種抗免疫球蛋白抗體或用可檢測成分加以標記的結合對（例如抗體/抗原、受體/配體、酶/受質）的其他適宜成員測量（間接夾心法）。例如，一種夾心分析是 ELISA 分析，在這種情況下，該可檢測成分是一種酶。

本發明還包括試劑套組，例如包括抗體、其片段、同源物、其衍生物等的試劑套組，例如一種帶標記或具有細胞毒性的軛合物，以及抗體使用說明書、殺死特定類型細胞的軛合物等等。該說明書可包括在體外、體內或體內外使用抗體、軛合物等的指示。抗體可以是液態或固態，通常是凍乾形式。該試劑套組可包含其他適宜的試劑，如緩衝液、重組溶液以及為了預定用途的其他必要成分。成套的預定劑量組合試劑與使用說明書，例如用於治療用途或診斷分析，都是經過精心考慮的。如果抗體是帶標記的，例如用酶標記的，

那麼該套組可包括受質和酶所需的輔因子(例如提供可檢測生色團或螢光團的受質前體)。此外,其他添加劑,如穩定劑、緩衝液(例如阻斷緩衝液或裂解緩衝液)等也可包括在內。各種試劑的相對量可以改變而提供試劑溶液的濃縮物,這就提供了用戶靈活性、節省空間、節省試劑等優越性。這些試劑也可以乾粉形式提供,通常是凍乾形式,包括賦形劑,它在溶解時可提供具有適當濃度的試劑溶液。

本發明之抗體可用於治療哺乳動物。在一個實施例中,出於獲得臨床前數據的目的,將目的抗體或等效物輸給一個非人類哺乳動物。代表性的待治療非人類哺乳動物,包括非人靈長類動物、狗、貓、鼠類以及其他哺乳動物,其中進行了臨床前研究。這種哺乳動物可為一種需用抗體治療的疾病建立動物模型,或可用於研究目的抗體的毒性。在每個這樣的實施例中,可在哺乳動物中進行劑量遞增研究。

一種抗體,無論有無第二個組分(如作為一種治療成分與抗體結合),無論是單獨或與細胞毒性因子一起施用,均可作為一種治療劑使用。本發明是關於以抗體為基礎的治療,其中涉及給動物、哺乳動物或人施用本發明之抗體,以治療 IL-4 和/或 IL-13 介導的疾病、異常或狀況。

本文所使用的術語「治療」既包括治療也包括預防措施。它指的是預防、治癒、逆轉、減弱、減輕、儘量減低、抑制或制止急病狀態、疾病進程、致病原(如細菌或病毒)或其他不正常狀況的有害效應。

因此,本發明還包含多價抗體,包括雙特異抗 IL-4/IL-13 抗體,其中包含具有診斷或治療功能的致效劑分子、原子或其他物質。例如,抗體可能附有一個放射性診斷標籤或放射性細胞毒性原

子或金屬或細胞毒性物質如蓖麻毒素鏈，用於癌症的體內診斷和治療。

此外，本發明的抗體還可用於免疫分析、純化方法以及其他用到免疫球蛋白或其片段的方法。此類用途在本領域為人所熟知。

因此，本發明還提供由抗 IL-13 和/或抗 IL-4 的抗體或其片段構成的組成物，方便地和藥學上可接受的載體、稀釋劑或賦形劑結合在一起，這也是本領域的常規做法。

本文所使用的術語「醫藥組成物」係指各種製備物的調配物。含有有效治療量的多價抗體的調配物為無菌液體溶液、液體懸浮劑或凍乾粉劑，可選地包含穩定劑或賦形劑。

本文所使用的術語「失調」係指任何能夠得益於本發明抗體治療的症狀。這包括慢性和急性紊亂或疾病，包括那些傾向於使哺乳動物，尤其是人類染上所論疾病的病態狀況。非限制性的有待治療的失調之實例包括癌症、炎症、自體免疫疾病、感染、心血管疾病、呼吸系統疾病、神經系統疾病以及代謝性疾病。

本發明的抗體可用來治療、抑制或預防疾病，如過敏性疾病、Th2 介導的疾病、IL-13 介導的疾病、IL-4 介導的疾病和/或 IL-4/IL-13 介導的疾病。此類疾病的實例包括霍奇金病、哮喘、過敏性哮喘、異位性皮炎、異位性過敏 、潰瘍性結腸炎、硬皮病、變應性鼻炎、COPD3 先天性肺纖維化、慢性移植排斥、博來黴素誘發的肺纖維化、輻射誘發的肺纖維化、肺肉芽瘤、進行性系統性硬化症、血吸蟲病、肝纖維化、腎癌、伯基特淋巴瘤、霍奇金病、非-霍奇金病、塞扎里症候群、哮喘、濃毒性關節炎、疱疹樣皮炎、慢性先天性風疹、潰瘍性結腸炎、硬皮病、肥厚性疤痕、輝波病、良性攝護腺增生、其中 IL-4 受體扮演一角色之肺病、IL-4 受體介導的上皮屏障破壞起作用的症狀、IL-4 受體起作用的一種消化系統

症狀、對藥物的變應性反應、川崎病、鐮狀細胞病、變應性肉芽腫（Churg-Strauss syndrome）、葛瑞福滋病、先兆子癇、修格連氏症（Sjogren's syndrome）、自體免疫性淋巴增生症候群、自體免疫性溶血性貧血、巴瑞特氏食道症、自體免疫性葡萄膜炎、肺結核、囊腫性纖維化、變應性支氣管肺真菌病、慢性阻塞性肺病、博來黴素誘發的肺病和纖維化、肺泡蛋白沉積症、成人呼吸窘迫症候群、結節病、高免疫球蛋白 E 症候群、原發性嗜伊紅性白血球增多症候群(idiopathic hypereosinophil syndrome)、自體免疫性大疱病、尋常型天疱瘡、大疱性類天疱瘡、重症肌無力、慢性疲勞症候群、腎病。

術語「過敏性疾病」係指一種病態的狀況，其中患者對一種正常情況下不產生免疫反應的物質表現出超過敏並作出免疫反應。過敏性疾病的一般特徵是 IgE 引起肥大細胞活化而造成炎症反應（如局部反應、全身反應），這類反應可能是良性的，如流鼻涕，也可能是危及生命的過敏性休克和死亡。過敏性疾病的實例包括但不限於過敏性鼻炎（如稻草熱）、哮喘（如過敏性哮喘）、過敏性皮炎（如濕疹）、接觸性皮炎、食物過敏和風疹（蕁麻疹）。

此處所使用的術語「Th2 介導的疾病」係指一種疾病，其病理特徵是（全部或部份）由 $CD4^+$ Th2 T 淋巴細胞調控的免疫反應（Th2 型免疫反應）造成的，這些淋巴細胞特徵地形成 IL-4、IL-5、IL-9 和 IL-13。Th2 型免疫反應與某些細胞激素(如 IL-4, IL-13)和某些類別的抗體(如 IgE)的產生以及體液免疫有關。Th2-介導的疾病的特徵是 Th2 細胞激素 (如 IL-4, IL-13)和/或某些類別的抗體(如 IgE)的含量增高，包括過敏性疾病(如過敏性鼻炎、異位性皮炎、哮喘(如過敏性哮喘)、過敏性氣道疾病 (AAD)、過敏性休克、結膜炎)，與 IL-4 和/或 IL-13 含量增高有關的自體免疫紊亂 (如類風濕性關節炎、宿主與移植物疾病、腎病(如腎炎症候群、狼瘡性腎炎))，以及

與 IL-4 和/或 IL-13 含量高有關的感染(如病毒、寄生蟲、真菌(如白色念珠菌)感染)。有些癌症與 IL-4 和/或 IL-13 高含量有關，或與 IL-4 誘導的和/或 IL-13 誘導的癌細胞增殖有關(如 B 細胞淋巴瘤、T 細胞淋巴瘤、多發性骨髓瘤、頭頸癌、乳腺癌和卵巢癌)。這些癌症可用本發明的配體治療、抑制或預防。

本文所使用的術語「癌症」係指哺乳動物尤其是人類的生理狀況，其典型特點是細胞無節制地生長。癌症的實例包括但不限於惡性腫瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤和白血病。

本文所使用的術語「自體免疫疾病」係指起源於自身並攻擊自身組織的非惡性疾病或紊亂。自體免疫疾病或紊亂包括但不限於炎症性反應如炎症性皮膚病，包括銀屑病和皮炎；過敏性疾病如濕疹和哮喘；其他涉及 T 細胞浸潤和慢性炎症反應的症狀；糖尿病 (如 I 型糖尿病或胰島素依賴型糖尿病)；多發性硬化症和中樞神經系統炎症性疾病。

本發明的抗體可以作為單獨的組分使用，也可與其他製劑結合使用。抗體可以與現有的 IL-13 療法 (例如現有的 IL-13 製劑如抗 IL-13Rαl、IL-4/13 Trap、抗 IL-13)加抗 IL-4 抗體，以及現有的 IL-4 製劑(如抗 IL-4R、IL-4 突變蛋白質、IL-4/13 Trap)加抗 IL-13 抗體和 IL-4 抗體(如 WO05/0076990 (CAT), WO03/092610 (Regeneron), WO00/64944 (Genetic Inst.)以及 WO2005/062967 (Tanox))結合使用。

本發明的抗體可以與一個或多個另外的治療或活性成份一起施用或配製。當一個配體與另外的治療成份一起施用時，配體可在另外的成份施用前或施用後施用，或與其同時施用。一般來說，配體和另外的成份通常是以治療效果重疊的方式施用。能夠與本發明的配體一起施用或一起配製的另外成份包括各種免疫治療藥物，諸

如環孢靈素、甲氨蝶呤、阿黴素或順鉑、抗生素、抗真菌藥、抗病毒劑和免疫毒素。例如，當施用拮抗劑來預防、抑制或治療肺部炎症或呼吸疾病時(如哮喘)，拮抗劑可與磷酸二酯酶抑制劑(如磷酸二酯酶 4 抑制劑)、支氣管擴張劑 (如 β2 激動劑、抗膽鹼藥、茶鹼)、短效貝塔激動劑(如沙丁胺醇、柳丁胺醇、巴布妥、菲諾特洛、異他林、異丙腎上腺素、左旋沙丁胺醇、澳西那林、吡布特羅、特布他林和比托特羅)、長效貝塔激動劑 (如福莫特羅和沙美特羅)、短效抗膽鹼藥(如異丙托溴銨和氧托溴銨)、長效抗膽鹼藥(如噻托溴銨)、茶鹼(如短效調配物、長效調配物)、吸入式類固醇(如倍氯米松、布地奈德、氟尼縮松、丙酸氟替卡松和曲安奈德)、口服類固醇(如甲基波尼龍、波尼龍、波尼松)、短效貝塔激動劑與抗膽鹼藥組合(如沙丁胺醇/柳丁胺醇/異丙托溴銨以及菲諾特洛/異丙托溴銨)、長效貝塔激動劑與吸入式類固醇組合(如沙美特羅/氟替卡松以及福莫特羅/布地奈德)以及黏液溶解劑(如厄多司坦、乙醯半胱胺酸(痰易淨)、溴己新、羥甲半胱胺酸、呱芬那辛和碘化甘油。

其他能夠與本發明的抗體共同施用以預防、抑制或治療哮喘(如過敏性哮喘)的合適的共治療劑包括皮質類甾醇(如倍氯米松、布地奈德、氟替卡松)、色苷酸酯、奈多蘿米、貝塔激動劑(如沙丁胺醇、特布他林、班布特羅、芬諾特羅、茶丙特羅、妥洛特羅、沙美特羅、福莫特羅)、扎魯司特、沙美特羅、波尼松、波尼松龍、茶鹼、齊留通、孟魯司特以及白三烯改性劑。本發明的配體可以與很多適合治療疾病(如 Th-2 介導的疾病、YL-A 介導的疾病、IL-13 介導的疾病、IL-4 介導的疾病以及癌症)的共治療劑共同施用，包括細胞激素、鎮痛藥/退熱劑、止吐劑以及化療藥物。

如本技術領域內眾所周知或本文所述，本發明之抗體可以藥學上可接受的組成物形式提供。「生理上可接受的」、「藥理學上可

接受的」等術語意為已經聯邦或州政府的監管機構批准，或已列入美國藥典或其他普遍公認的用於動物尤其是人類的藥典。

可以任何可接受的方式對哺乳動物，尤其是人類施用抗 IL-4、抗 IL-13 以及雙特異抗 IL-4/IL-13 抗體。輸入方法包括但不限於胃腸外、皮下、腹腔內、肺內、鼻內、硬膜外、吸入和口服途徑；若欲進行免疫抑制治療，則輸入病灶內。胃腸外輸液包括肌內、皮內、靜脈內、動脈內或腹腔內輸入。抗體或組成物可以任何方便途徑施用，例如通過輸液或快速注射、通過上皮或粘膜（例如口腔粘膜、直腸和腸道粘膜等）吸收，並可與其他生物活性藥劑一起施用。給藥可以是全身性或局部性。此外，也許需要以任何適當途徑將本發明的治療抗體或組成物輸入中樞神經系統，包括心室內和鞘內注射；心室內注射借助於一心室內導管，例如與一個貯器如奧莫耶貯器(Ommaya reservoir)連接的導管。此外，該抗體適合於以脈衝輸液方式給藥，尤其是以抗體劑量遞減的方式。較佳的是，以注射方式給藥，更佳的是靜脈注射或皮下注射，部分地取決於給藥時間的長短。

各種其他給藥系統是眾所周知的，可用於本發明之抗體的給藥，包括例如封裝於脂質體、微粒、微膠囊（參閱 Langer, Science 249:1527 (1990)；Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer；Lopez-Berestein et al., eds., p. 353-365 (1989)；以及 Lopez-Berestein, ibid., p. 317-327）以及能表達該化合物的重組細胞；受體介導的胞吞（參閱 Wu et al., J Biol Chem 262:4429 (1987)）；核酸作為逆轉錄病毒或其他載體等組成部分的構築。

活性成分也可封裝在以凝聚技術或界面聚合法製備的微膠囊中，例如分別用於膠體藥物給藥系統（例如脂質體、白蛋白微球、

微乳液、納米粒子和納米膠囊）或微乳液的羥甲基纖維素或明膠微膠囊和聚甲基丙烯酸酯微膠囊。Remington's Pharmaceutical Sciences（雷氏藥學大全）, 16th edition, A. Osal, Ed. (1980)中透露了這些技術。

也可應用經肺給藥，例如使用一種吸入器或噴霧器，以及用一種霧化劑形成霧狀。抗體也可以乾粉組成物的形式輸入患者肺部，參閱例如美國專利 6,514,496。

在一個具體實施例中，也許希望在需要治療的局部區域施用本發明之治療抗體或組成物；這可通過以下方式實現：例如但不限於，局部輸液、局部敷用、注射、經由導管、以栓劑或植入的方式；所植入的是一種多孔、非多孔或凝膠狀物質，包括薄膜如矽橡膠膜或纖維。較佳的是，當施用本發明之抗體時，應注意採用蛋白不吸收或不吸附的材料。

在另一實施例中，該抗體可經由一種控制釋放系統給藥。在一個實施例中，可使用泵（參閱 Langer, Science 249:1527 (1990)；Sefton, CRC Crit Ref Biomed Eng 14:201 (1987)；Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980)；以及 Saudek et al., N Engl J Med 321:574 (1989)）。在另一實施例中，可使用聚合材料（參閱 Medical Applications of Controlled Release, Langer et al., eds., CRC Press (1974)；Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen et al., eds., Wiley (1984)；Ranger et al., J Macromol Sci Rev Macromol Chem 23:61 (1983)；see also Levy et al., Science 228:190 (1985)；During et al., Ann Neurol 25:351 (1989)；以及 Howard et al., J Neurosurg 71:105 (1989)）。在又一實施例中，控制釋放系統可放在治療對象的附近。

通過混合具有所需純度的多肽與任選的「藥學上可接受的」載體、稀釋劑、賦形劑或常用於本技術領域的穩定劑(即緩衝液、穩定劑)、防腐劑、等滲劑、非離子型洗滌劑、抗氧劑以及其他添加劑，參閱 Remington's Pharmaceutical Sciences （雷氏藥學大全），16th ed., Osol, ed. (1980)，多肽或抗體治療製劑可製備成凍乾製劑或水溶液儲存。這些添加劑在所用劑量和濃度下，對接受治療者一般都沒有毒性，因此，賦形劑、稀釋劑、載體等是藥學上可接受的。

「分離」或「純化」抗體基本上不含細胞物質，或來自細胞或組織來源或衍生蛋白的培養基的其他污染蛋白，或在化學合成的情況下基本上不含化學前體或其他化合物。「基本上不含細胞物質」這一措詞包括抗體製劑，其中多肽/蛋白從細胞中分離或以重組方式產生，但是與該細胞的組分是分開的。因此，基本上不含細胞物質的抗體包括污染蛋白含量低於約 30 %、20 %、10 %、5 %、2.5 %或 1%（以乾重計）的抗體製劑。當抗體是以重組方式產生時，最好是基本上不含培養基，即以蛋白製劑體積計，培養基含量低於約 20 %、10 %、5 %、2.5 %或 1 %。當抗體是以化學合成方式產生時，最好是基本上不含化學前體或其他化合物和試劑，即目的抗體是與化學前體或涉及蛋白合成的其他化合物分開的。因此，這些抗體製劑含有低於約 30 %、20 %、10 %、5 %或 1 %（乾重）的化學前體或目的抗體以外的其他化合物。在本發明一個較佳的具體實施例中，抗體是分離或純化的。

本文所用的術語「低至不可檢測的聚集水平」，是指樣本中含有不超過 5 %、不超過 4%、不超過 3 %、不超過 2 個%、不超過 1%且往往不超過 0.5 %的聚集量（按蛋白重量計，例如以高效尺寸排阻層析法（HPSEC）測量）。

本文所用的術語「低至不可檢測的碎片水平」，是指例如在HPSEC所確定的一個單峰處，或還原毛細凝膠管電泳（rCGE）所確定的兩個（2）峰（重鏈和輕鏈）處，樣本中含有等於或高於80%、85%、90%、95%、98%或99%總蛋白，且不含分別高於5%、高於4%、高於3%、高於2%、高於1%，或高於0.5%總蛋白的其他單峰。本文所用的rCGE是指還原條件下的毛細管膠管電泳，該還原條件足以使抗體或抗體類型或衍生物分子中的二硫鍵還原。

就含有 IL-4 和/或 IL-13 抗體或其結合片段的液體製劑而論，本文所用的術語「穩定」和「穩定的」是指製劑中的抗體或其抗原結合片段，在給定的製造、製備、運輸和儲存條件下，對於熱力和化學解折疊、聚集、降解或片段化的抵抗力。本發明的「穩定的」製劑在給定的製造、製備、運輸和儲存條件下，可保持等於或高於80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%的生物活性。所述抗體製劑的穩定性，可根據聚集、降解或片段化的程度來評估，並與一參照物比較；採用的方法是本技術領域內專業人員已知的，包括但不限於 rCGE、十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳（SDS-PAGE）以及HPSEC。

術語「載體」是指一種與治療劑一起施用的稀釋劑、佐劑、賦形劑或載體。這類生理載體可以是無菌液體，例如水和油，包括來源於石油、動物、植物或合成的油，例如花生油、豆油、礦物油、芝麻油等等。當醫藥組成物為靜脈內注射時，水是適宜的載體。鹽水溶液以及葡萄糖和甘油的水溶液也可作為液體載體使用，尤其是用於注射溶液。適宜的醫藥賦形劑包括澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、大米、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、單硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化鈉、脫脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等等。如果需要，該組成物也可含有少量的潤濕劑或乳化劑，或pH緩衝

劑。該組成物可採取溶液、懸浮液、乳液、片劑、丸劑、膠囊、粉劑、緩釋調配物、肌內貯庫等形式。該組成物可用傳統的黏合劑和載體如甘油三酯配製成栓劑的形式。口服劑調配物可含有標準載體，如醫藥級的甘露醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、糖精鈉、纖維素、碳酸鎂等。適宜載體的例子在「雷氏藥學大全」（Remington's Pharmaceutical Sciences, Martin）中有描述。這類組成物將含療效量的抗體，較佳的是純抗體，以及適量的載體以形成適合給患者施用的形式。如本領域內周知，該藥劑將配製成適合於施用的方式。

緩衝劑有助於將 pH 值維持在近似於生理條件的範圍內。最好有緩衝溶液存在，濃度範圍為 2 mM 到大約 50mM。適宜用於本發明的緩衝劑包括有機酸和無機酸及其鹽，例如檸檬酸鹽緩衝劑（例如檸檬酸單鈉-檸檬酸二鈉混合物、檸檬酸-檸檬酸三鈉混合物、檸檬酸-檸檬酸單鈉混合物等）、琥珀酸鹽緩衝劑（例如琥珀酸-琥珀酸單鈉混合物、琥珀酸-氫氧化鈉混合物、琥珀酸-琥珀酸二鈉混合物等）、酒石酸鹽緩衝劑（例如酒石酸-酒石酸鈉混合物、酒石酸-酒石酸鉀混合物、酒石酸-氫氧化鈉混合物等）、富馬酸鹽緩衝劑（例如富馬酸-富馬酸單鈉混合物、富馬酸 富馬酸二鈉混合物、富馬酸單鈉-富馬酸二鈉混合物等）、葡糖酸鹽緩衝劑（例如葡糖酸-葡糖酸鈉混合物、葡糖酸-氫氧化鈉混合物、葡糖酸-葡糖酸鉀混合物等）、草酸鹽緩衝劑（例如草酸-草酸鈉混合物、草酸-氫氧化鈉混合物、草酸-草酸鉀混合物等）、乳酸鹽緩衝劑（例如乳酸-乳酸鈉混合物、乳酸-氫氧化鈉混合物、乳酸-乳酸鉀混合物等）以及乙酸鹽緩衝劑（例如乙酸-乙酸鈉混合物、乙酸-氫氧化鈉混合物等）。磷酸鹽緩衝劑、碳酸鹽緩衝劑、組胺酸緩衝劑、三乙胺鹽例如 Tris、HEPES 以及其它已知的此類緩衝劑均可以使用。

可加入防腐劑以阻滯微生物生長，加入量範圍可為0.2%-1%(w/v)。適用於本發明的防腐劑包括苯酚、苄醇、間甲酚、羥苯甲酸甲酯、羥苯甲酸丙酯、氯化十八烷基二甲基苄基銨、烷基二甲基苄基銨鹵化物（例如氯化物、溴化物和碘化物）、氯化己烷雙胺、羥苯甲酸烷酯如羥苯甲酸甲酯或丙酯、兒茶酚、間苯二酚、環己醇以及 3-戊醇。

等滲劑的存在可確保本發明之液體組成物的生理等滲性，其包括多元糖醇、較佳的是三元或三元以上的糖醇，例如甘油、赤蘚醇、阿糖醇、木糖醇、山梨醇以及甘露醇。考慮到其它成分的相對含量，多元醇可以約 0.1%至約 25%（以重量計）的含量存在，較佳的是1%至約 5%。

穩定劑是指種類廣泛的賦形劑，其功能範圍可從填充劑至將治療劑溶解或有助於預防治療劑變性或粘在容器壁上的添加劑。典型的穩定劑可以是多元糖醇；胺基酸，如精胺酸、賴胺酸、苷胺酸、穀氨醯胺、天冬醯胺、組胺酸、胺基丙酸、鳥胺酸、L-亮胺酸、2-苯基胺基丙酸、谷胺酸、蘇胺酸等；有機糖或糖醇、如乳糖、海藻糖、水蘇糖、阿糖醇、赤蘚醇、甘露醇、山梨糖醇、木糖醇、核糖醇、肌醇、半乳糖醇、甘油等，包括環多醇如環己六醇；聚乙二醇；胺基酸聚合物；含硫還原劑，如尿素、谷胱苷肽、硫辛酸、硫基乙醇酸鈉、硫代甘油、α-單硫代甘油和硫代硫酸鈉；低分子量多肽（即<10 殘基）；蛋白質，如人血清白蛋白、胎牛血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水聚合物、如聚乙烯吡咯烷酮、糖類；單糖，如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖；二糖，如乳糖、麥芽糖和蔗糖；三糖，如棉子糖；多糖，如右旋糖苷等等。穩定劑係以每部分活性蛋白質的 0.1 至 10,000 重量/重量範圍間存在。

其他各種賦形劑包括填充劑（如澱粉）、螯合劑（如 EDTA）、抗氧劑（如抗壞血酸、蛋胺酸或維他命 E）以及共溶劑。

根據所治療特定適應症的需要，本文的調配物也可包含一種以上活性化合物，較佳的是那些具有互補活性的化合物；這類互補活性不會在相互之間造成不良影響。例如，也許希望進一步提供一種免疫抑制劑。這類化合物分子以適宜的量結合，以有效地實現預期目的。

本文所用的術語「表面活性劑」是指具有兩親結構的有機物，即具有由相反溶解傾向的基團，通常是一個油溶性烴鏈和一個水溶性離子基，組成的結構。表面活性劑可根據表面活性基團所帶的電荷而劃分為陰離子型、陽離子型和非離子型表面活性劑。表面活性劑經常作為潤濕劑、乳化劑、增溶劑和分散劑，用於各種各樣的醫藥組成物以及生物材料製劑。

可加入非離子型表面活性劑或洗淨劑（又稱為潤濕劑）以助於治療劑的增溶，並保護治療蛋白以避免振盪引起的聚集，也使得藥劑暴露於表面剪切應力而不會發生蛋白的變性。適宜的非離子型表面活性劑包括聚山梨酯（20、80 等）、聚環氧烷（184、188 等）、Pluronic® 多元醇以及聚氧乙烯山梨糖醇酐單醚（TWEEN-20®、TWEEN-80® 等）。非離子型表面活性劑的含量範圍可為約 0.05 mg/ml 至約 1.0 mg/ml，較佳的是約 0.07 mg/ml 至約 0.2 mg/ml。

本文所用的術語「無機鹽」是指任何因酸分子中一部分或所有氫原子被金屬或起金屬作用的基團置換而生成的不含碳化合物，並在醫藥組成物和生物材料製劑中經常作為滲透壓調節化合物。最常見的無機鹽是 NaCl、KCl、NaH_2PO_4 等。

本發明包括在醫生診所或實驗室的醫用冰箱和冷凍室溫度（如約-20° C 至約 5° C）下儲存時（例如約 60 天、約 120 天、約 180

天、約 1 年、約 2 年或以上）具有穩定性的液體製劑，上述穩定性是用例如高效尺寸排除層析法(HPSEC)來評估的。本發明的液體製劑在室溫下也顯示了至少幾小時的穩定性，例如根據 HSPEC 的評估，在使用之前穩定 1 小時、2 小時或約 3 小時。

術語「小分子」和類似術語包括但不限於肽、擬肽類物質、胺基酸、胺基酸類似物、聚核苷酸、聚核苷酸類似物、核苷酸、核苷酸類似物、分子量為每莫耳小於約 10,000 克的有機或無機化合物（包括雜有機和/或有機金屬化合物）、分子量為每莫耳小於約 5,000 克的有機或無機化合物、分子量為每莫耳小於約 1,000 克的有機或無機化合物、分子量為每莫耳小於約 500 克的有機或無機化合物，以及這類化合物的鹽、酯及其他藥學上可接受的形式。

因此，在癌症的情況下，本發明的抗體可以單獨使用，也可與其他類型的癌症治療劑結合使用，包括傳統的化療劑（紫杉醇（paclitaxel）、卡鉑（carboplatin）、順鉑（cisplatin）和阿黴素（doxorubicin）），抗 EGFR 劑（吉菲特尼（gefitinib）、得舒緩（erlotinib）和西妥昔單抗（cetuximab）），抗血管生成劑（癌思停（bevacizumab）和紓癌特（sunitinib）），以及免疫調節劑如干擾素α和沙利度胺（thalidomide）。

本文所用的術語「治療劑」是指可用於與異常 IL-4 和/或 IL-13 代謝和活性相關的疾病、障礙等的治療、管理或改善的任何藥劑。

此外，本發明的抗體可以與各種效應分子軛合，例如異源的多肽、藥物、放射性核苷酸或毒素，參閱例如 WO 92/08495；WO 91/14438；WO 89/12624；美國專利 5,314,995；以及 EPO 396,387。一種抗體及其片段可與一種治療組分軛合，例如一種細胞毒素（例如一種細胞靜止劑或殺細胞劑）、一種治療劑或放射性金屬離子（例如 α 發射體如 ^{213}Bi）。細胞毒素或細胞毒性劑包括任何損害細胞

的試劑。其例子包括紫杉醇（paclitaxol）、松胞菌素 B（cytochalasin B）、短桿菌肽 D（gramicidin D）、溴乙啡啶（ethidium bromide）、依米丁（emetine）、絲裂黴素（mitomycin）、依託泊苷（etoposide）、替尼泊苷（tenoposide）、長春新鹼（vincristine）、長春鹼（vinblastine）、秋水仙鹼（colchicine）、艾黴素（doxorubicin）、唐黴素（daunorubicin）、二羥基蒽醌（dihydroxy anthracindione）、米托蒽醌（mitoxantrone）、普卡黴素（mithramycin）、放線菌素（actinomycin D）、1-去氫睾酮（1-dehydrotestosterone）、糖皮質激素（glucocorticoids）、普魯卡因（procaine）、丁卡因（tetracaine）、利度卡因（lidocaine）、普萘洛爾（propranolol）和嘌呤黴素（puromycin）及其類似物或同源物。治療劑包括但不限於抗代謝物（例如甲氨蝶呤(methotrexate)、6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine)、6-硫代鳥嘌呤(6-thioguanine)、塞德薩(cytarabine)、5-氟脲嘧啶(5-fluorouracil)和氮烯咪胺（decarbazine)），烷基化劑（例如氮芥(mechlorethamine)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、苯丙胺酸氮芥(melphalan)、亞硝基脲氮芥(carmustine (BSNU))和洛莫司汀(lomustine (CCNU))、環磷醯胺(cyclophosphamide)、硫酸布他卡因(busulfan)、二溴甘露糖醇(dibromomannitol)、鏈脲佐菌素(streptozotocin)、絲裂黴素 C (mitomycin C)和順二氯二胺鉑(II)(DDP)順鉑(cisplatin))，蒽環黴素(anthracyclines)（例如道諾魯比辛(daunorubicin)、道諾黴素(daunomycin)和杜薩魯比辛(doxorubicin))，抗生素（例如更生黴素(dactinomycin)、放線菌素(actinomycin)、博萊黴素(bleomycin)、光神黴素(mithramycin)和氨茴黴素(anthramycin (AMC))），以及抗有絲分裂劑（例如長春新鹼(vincristine)和長春花鹼(vinblastine)）。

使一個治療組分與抗體軛合之類的技術是眾所周知的，參閱例如 Arnon et al., in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy（單株抗體和癌症治療）, Reisfeld et al.(eds.), p. 243-56 Alan R. Liss (1985); Hellstrom et al., in Controlled Drug Delivery（控制給藥）, 2nd ed., Robinson et al., eds., p. 623-53, Marcel Dekker (1987); Thorpe, in Monoclonal Antibodies '84:Biological And Clinical Applications（生物和臨床應用）, Pinchera et al., eds., p. 475-506 (1985)；Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy（用於癌症檢測和治療的單株抗體）, Baldwin et al., eds., p. 303-16, Academic Press (1985)；以及 Thorpe, et al., Immunol Rev （免疫學評論）62:119 (1982)。或者，一種抗體也可以與第二種抗體軛合，以形成一種異源耦聯抗體，如雙功能抗體，參閱例如美國第 4,676,980 號專利。

本發明的軛合物可用於改變一定的生物反應，治療劑或藥物組分不應被理解為只限於傳統的化學治療劑。例如，該藥物組分可以是一種具有某種所需生物活性的蛋白或多肽。這類蛋白可包括，例如一種毒素，如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白 A、假單胞菌屬外毒素，或白喉毒素；一種蛋白，如腫瘤壞死因子、α-干擾素、β-干擾素、神經生長因子、血小板衍生生長因子、組織纖維蛋白溶酶原活化劑；一種凋亡劑，例如 TNF-α、TNF-β、AIM I (WO 97/33899)、AIM II (WO 97/34911)、Fas 配體(Takahashi et al., Int Immunol, 6:1567 (1994)), VEGF (WO 99/23105)；一種血栓形成劑；一種抗血管生成劑，例如血管生長抑素或內皮細胞抑素；或生物反應修飾劑，例如淋巴因子、白細胞介素-1 (IL-1)、白細胞介素-2 (IL-2)、白細胞介素-6 (IL-6)，粒細胞巨噬細胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒細胞集落刺激因子(GCSF)或其他生長因子。

用於體內施用的藥劑必須是無菌的。這可通過例如無菌過濾膜過濾而實現。例如，本發明的液體藥劑可通過用 0.2 μm 或 0.22 μm 過濾器過濾而滅菌。

可以製備緩釋型製劑。緩釋型製劑的適宜例子包括含有抗體的用固體疏水型聚合物製成的半滲透基質，該基質以成形物體的形式出現，例如薄膜或基質。緩釋型基質的例子包括聚酯、水凝膠（例如聚 2－羥乙基甲基丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚乳酸酯（美國第 3,773,919 號專利）、L-谷胺酸和乙基-L-谷胺酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-醋酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物（例如由乳酸-乙醇酸共聚物構成的可注射微球粒）以及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。乙烯-醋酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸之類的聚合物能夠釋放分子長達 100 天以上，但某些水凝膠釋放蛋白的時間則較短。取決於所涉及的機制，可以制訂出達到穩定的合理策略。例如，如果發現聚集機制是通過硫代-二硫化物交換而形成分子間的 S-S 鍵，那麼通過修飾硫氫殘基、從酸性溶液冷凍乾燥、控制濕含量、使用適當的添加劑、胺基酸置換和開發特異的聚合物基質組成物就可以達到穩定。

抗體或其變體和組成物將以符合優良醫療規範的方式配製、定量以及施用。這方面考慮的因素包括包括所治的具體疾病、所治的具體哺乳動物或人類、患者的臨床情況、致病原因、給藥部位、給藥方法、給藥方案以及醫療工作者所知的其他因素。即將施用的抗體或其變體的「有效治療量」將取決於這些考慮，並可以是為了預防、減輕或治療某種 IL-4 和/或 IL-13 介導的疾病、症狀或障礙所必須的最低量。

作為一種選擇，抗體或其變體也可與目前用於預防或治療該疾病的一種或多種藥劑配製在一起。上述其他藥劑的有效量取決於藥劑中抗體的含量、疾病或治療的種類，以及上面討論的其他因素。

這些量通常與此前所用的劑量一樣且通過同樣的給藥途徑，或為此前所用劑量的約 1 至 99%。

此處所使用的術語「有效量」係指足以降低 IL-4 和/或 IL-13 介導的疾病之嚴重性和/或縮短其持續時間，減輕其一種或多種症狀，防止 IL-4 和/或 IL-13 介導的疾病的發展或引起疾病的退化的治療方法(如預防藥物或治療藥物) 的劑量，或足以防止 IL-4 和/或 IL-13 介導的疾病或其一種或多種症狀的形成、復發、發作或進展，或加強或改善另一種對治療 IL-4 和/或 IL-13 介導的疾病有用的治療方法（如另一種治療藥劑）的預防或治療效果的劑量。

在某種疾病或狀況的治療中，治療用抗體或其片段的有效量將取決於該疾病或狀況的性質，並可通過標準的臨床技術測定。當可能時，可先在體外試驗的條件下得出一種劑量－反應曲線以及本發明的醫藥組成物。如果具備一種適宜的動物模型系統，同樣可獲得一種劑量－反應曲線，並運用本技術領域已知的方法外推出一種適宜的人類劑量。但是，基於本技術領域的常識，一種能有效地降低炎症影響的醫藥組成物，可形成的局部治療劑濃度為例如約 5 至 20 ng/ml 之間，較佳的是約 10 至 20 ng/ml 之間。

在一項較佳的實施例中，一種治療用多肽、抗體或其片段的水溶液可以皮下注射的方式施用。每次劑量的範圍按每公斤體重計可為約 0.5 mg 至約 50 mg ，或較佳的是，按每公斤體重計為約 3 mg 至約 30 mg。針對具體的疾病、患者群體、施用方式等，可採用本技術領域內已知的藥學方法憑經驗確定該劑量。

取決於許多臨床因素，包括疾病類型、疾病嚴重程度以及患者對治療劑的敏感度，皮下注射的劑量安排可在每週一次至每天一次的範圍內變化。

本發明提供了製備抗體或其 IL-4 和/或 IL-13 結合片段的液體製劑的方法，其包括將純化抗體的一部分濃縮至約 15 mg/ml、約 20 mg/ml、約 30 mg/ml、約 40 mg/ml、約 50 mg/ml、約 60 mg/ml、約 70 mg/ml、約 80 mg/ml、約 90 mg/ml、約 100 mg/ml、約 200 mg/ml、約 250 mg/ml、約 300 mg/ml 或更高的最終濃度，例如使用一種具有適當分子量（mw）限度（例如對於 $F_{(ab')_2}$ 片段的限度為 30 K_D；對於 F_{ab} 片段的限度為 10 K_D ）的半滲透膜來進行濃縮。

此外，本發明也包括了穩定的、改善體內半衰期的產品的液體製劑。因此，本發明的抗體在患者（較佳的是人）體內的半衰期為 3 天以上、7 天以上、10 天以上、15 天以上、25 天以上、30 天以上、35 天以上、40 天以上、45 天以上、2 月以上、3 月以上、4 月以上、5 月以上或更長。

為了延長抗體在體內的血清循環，可採用各種各樣的技術。例如，惰性聚合物分子如高分子量聚乙二醇（PEG），可以通過 PEG 的位點特異性軛合或通過賴胺酸殘基上的 ε 胺基連接到抗體的 N 端或 C 端上，其中可以經過一個多功能連接子，也可以不經過。可以採用導致生物活性損失最小的直鏈或支鏈聚合物衍生。軛合程度可通過 SDS-PAGE 和質譜密切監測，以確保 PEG 分子與抗體的妥善軛合。未反應的 PEG 可通過尺寸排除法或離子交換色譜法與抗體-PEG 軛合物分離。採用本領域專業人員已知的方法，例如本文所述的免疫測定法，可以測定 PEG 衍生抗體的結合活性以及體內功效。

在體內具有較長半衰期的抗體，也可通過將一個或多個胺基酸修飾（即取代、插入或缺失）引入 IgG 恒定區或其 F_cR 結合片段（如 F_e 或鉸鏈 F_e 區域片段）來產生，參閱例如 WO 98/23289；WO 97/34631；以及美國第 6,277,375 號專利。

而且，抗體可與白蛋白軛合使得抗體在體內更穩定，或在體內具有較長的半衰期。這些技術是本領域內眾所周知的，參閱例如 WO 93/15199、WO 93/15200 和 WO 01/77137；以及 EPO 413,622。抗體也可通過其他方法來修飾，例如糖基化、乙醯化、磷醯化、醯胺化、用已知保護劑/封端劑實現衍生化、蛋白水解裂解、與一種細胞配體或其他蛋白實現鍵合等。

在一項實施例中，按照常規步驟將該組成物配製成適合於人類靜脈給藥的醫藥組成物。通常，靜脈給藥的醫藥組成物是以無菌等滲緩衝水溶液配製的溶液。在必要的場合，該組成物也可包含一種穩定劑和局部麻醉劑如利度卡因或其他「卡因」類麻醉劑，以減輕注射部位的疼痛。通常，各種成分是以單位劑量的形式單獨供應或混合後供應，例如作為一種凍乾粉末或無水濃縮物裝在一種密封容器中，如安瓿瓶或小袋，並標明有效成分的量。當醫藥組成物以輸注方式給藥時，可通過裝有無菌醫藥級水或鹽水的輸注瓶給藥。當醫藥組成物以注射方式給藥時，可提供裝有無菌注射用水或鹽水的安瓿瓶，例如以套組形式提供，使得醫藥成分可在注射前先混合。

本發明也說明，本發明的液體製劑是裝在一種密封容器中，如安瓿瓶或小袋中，並標明產品的量。本發明的液體製劑可裝在一種密封容器中，並標明抗體或抗體片段的量和濃度。例如，本發明的液體製劑可裝在一種密封容器中，其 IL-4 和/或 IL-13 抗體濃度至少為 15 mg/ml、20 mg/ml、30 mg/ml、40 mg/ml、50 mg/ml、60 mg/ml、70 mg/ml、80 mg/ml、90 mg/ml、100 mg/ml、150 mg/ml、200 mg/ml、250 mg/ml，或 300 mg/ml ，抗體量為 1 ml、2 ml、3 ml、4 ml、5 ml、6 ml、7 ml、8 ml、9 ml、10 ml、15 ml 或 20 ml。

提供了一種含有對上述疾病治療有用物質的製造產品。該製造產品包括一個容器和一個標籤。適宜的容器包括例如瓶子、小瓶、

注射器和試管。容器可用各種材料製造，例如玻璃或塑膠。該容器容納能有效地診斷、預防或治療 IL-4 和/或 IL-13 症狀或疾病的組成物，並可設有一個無菌入口（例如該容器可以是一種靜脈注射液小袋或小瓶，設有一個能被皮下注射針頭刺破的塞子。容器上貼的標籤或附帶的標籤標明該組成物是用於治療所選的症狀。該產品還可包括第二個容器，裝有藥學上可接受的緩衝液，如磷酸緩衝鹽水、任格氏(Ringer's)溶液和葡萄糖溶液。它還可包括從商業和用戶的立場看來所需的其他材料，包括緩衝液、稀釋劑、過濾器、針頭、注射器以及使用說明等附帶文字說明。

本發明將以下列非限制性實例進一步加以說明。這些實例描述了某些本發明可藉以實施的實施例。

【圖式簡單說明】

圖 1 是一個含有 4 個多肽鏈的雙特異抗 IL-4/IL-13 抗體分子的示意圖。兩個較輕的鏈由 N-VL_{hB-B13}-連接體 r-VL_{h8D4-8}-CL-C (CL，輕鏈恆定區)組成，兩個較重的鏈由 N-VH_{hB-B13}-連接體 -VH_{h8D4-8}-CH1-CH2-CH3-C 組成。鏈結序列 $(G4S)_2$ 為 GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6)。

圖 2 顯示人類化的 B-B13 抗 IL-13 抗體(SEQ ID NOS: 1 和 2)的可變域之胺基酸序列以及人類化的 8D4-8 抗 IL-4 抗體(SEQ ID NOS: 3, 4 和 5)的可變域之胺基酸序列。下劃線表示對胺基酸作改變。粗體表示 CDR。

【實施方式】

實例

實例 1:小鼠抗人類 IL-13 單株抗體選殖株 B-B13 的 Fv 域序列

測定

下面的方法中所使用的試劑為購自 Cell Sciences, Inc. (Canton, MA, USA) 的小鼠抗 IL-13 單株抗體 B-B13。Cell Sciences 為抗體 B-B13 的製造商 Diaclone (Besançon, France) 的美國分銷商。

抗 IL-13 單株抗體 B-B13 的胺基酸序列是利用 Edman N 端序列測定技術和質譜分析測定的。抗體經過下述不同方法的處理，以便產生多肽或肽片段，這些片段然後用不同的方法分成多份以便製備樣品用於後面的 Edman N 端序列測定和液相色譜/質譜/質譜 (LC-MS/MS) 分析，並與相關的蛋白質序列資料庫肽匹配對比。

抗體的 SDS-Page，經過或不經過焦穀胺酸肽酶處理以分離重鏈和輕鏈，然後印跡到聚偏二氟乙烯(PVDF) 膜和 Edman N 端序列測定帶上。

用抗體的特異蛋白酶有限地部分水解，接著進行 SDS-Page 並印跡到 PVDF 膜和 Edman N 端序列測定帶上。

整個抗體或重鏈和輕鏈 SDS-Page 膠帶出現部分化學裂解，接著進行 SDS-Page 並印跡到 PVDF 膜和 Edman N 端序列測定帶上。

整個抗體或重鏈和輕鏈的 SDS-Page 膠帶以特異蛋白酶水解並進行 LC/MS/MS 分析。

重鏈和輕鏈的 SDS-Page 膠帶以特異蛋白酶水解，接著用反向高壓色譜分離成不同的部分(rp-hplc)，再進行各部分的 Edman N 端序列測定和 LC/MS/MS 分析。

以木瓜蛋白酶對抗體作有限的水解，Fd (抗體重鏈 VH-CH1 片段) 膠帶以 SDS-Page 分離成不同的部分，以特異蛋白酶水解，反向高壓液相色譜，再進行各部分的 Edman N 端序列測定和 LC/MS/MS 分析。

實例 2:小鼠抗人類 IL-4 單株抗體選殖株 8D4-8 的 Fv 域序列測定

試劑小鼠抗 IL-4 單株抗體選殖株 8D4-8 購自 Biozol diagnostica Vertrieb GmbH (Eching, 德國)。Biozol 為生產 8D4-8 抗體的 BioLegend (San Diego, CA, USA) 之德國分銷商。

小鼠抗 IL-4 單株抗體(選殖株 8D4-8) 的胺基酸序列是利用 Edman 序列測定和質譜分析組合方法測定的 (Pham et al., 2006, Anal. Biochem. 352: 77-86; Roberts et al., 2005, Anal. Chem. 67: 3613-25)。首先，抗體被簡單地分離成輕鏈和重鏈，然後每個鏈用序列特異的蛋白酶或化學方法裂解。得到的肽用反向色譜分離並用基體輔助雷射解吸/電離質譜 (MALDI) 和/或 LC-MS/MS 分析。獨特的肽以及完整的重鏈和輕鏈然後進行 Edman 測序，以準確地測定蛋白質的序列。

實例 3:小鼠抗人類 IL-13 單株抗體選殖株 B-B13 的 Fv 域的人類化

此處所描述的人類化規程被用來實現 B-B13 選殖株的人類化。建議獲得六個人類化的樣品形式，包括 CDR 中的突變來解決有問題的殘基 (脫醯胺位點、接觸溶劑的蛋胺酸、酸不穩定位置)。

B-B13 的 VL & VH 序列與 2007 年 7 月的蛋白質資料庫 (PDB) 進行對比。檢索出大多數類似的輕鏈和重鏈胺基酸序列。發現可變輕鏈中最接近的同源物為 1EGJ。發現可變重鏈中最接近的同源物為 1FNS。1EGJ & 1FNS 結構被用來建造一個可變域的同源性模型，然後利用分子操作環境 (MOE) 中實施的標準程序進行能量最小化。MOE 是由 Chemical Computing group 出售的一套綜合性的電腦輔助藥物設計軟體。其後對 B-B13 的 3D 同源性模型以廣義波恩隱

含溶劑進行了 1.7 奈秒的分子動力學(MD) 計算。然後對每一個 B-B13 胺基酸，利用得到的 1,700 個 MD 軌跡快照，與一個參考代表性 medoid 位置相比較，計算其均方根差的分佈。最後用一個統計試驗對每個胺基酸的均方根差分佈與全局均方根差分佈進行比較，以決定該胺基酸從 MD 計算來看，是否有足夠的柔性而有可能與 B 細胞受體作用，從而成為免疫反應活化的原因。將鼠 B-B13 可變區的柔性位置與下載到本地的 2007 年 1 月版 ImMunoGeneTics 資料庫中人類抗體序列對應的位置進行了比較。只有那些柔性大於平均值三倍的殘基以及一些保存了這些柔性殘基 3D 結構的少數側向殘基才被保留在搜索結果中。選擇含相同柔性殘基最多的人抗體可變區，特別考慮位於 CDR 的 5.0 Å 範圍內的位置，以便替換鼠 B-B13 抗體可變區的柔性殘基。CDR 中的一些突變也包括在提議的形式中以避免有問題的殘基'. 研究了下面的基序：Asp-Pro (酸性不穩定結合)、Asn-X-Ser/Thr (糖基化)、Asn-Gly/Ser/Thr (曝露區域的脫醯胺化位點)、Met (曝露區域的氧化)。將產生的人類化序列就序列相似性而在 UniProtKB/Swiss-Prot 資料庫中檢索，得出了已經作出合理假設的置信度。結果發現，所有序列都顯示出與人類抗體有很高的相似性。此外，所有的序列都不含任何列在免疫抗原決定部位資料庫和分析資源 (IEDB 資料庫) 中的已知 B- 或 T-細胞抗原決定部位。

對重鏈提出三種形式(H1, H2, H3)並且對輕鏈提出三種形式(L1、L2 和 L3)。輕鏈的三種形式得自 CAA83271.1 (基因庫存取號 CAA83271)。L1 形式包含 4 個突變。L2 形式包含一個另外的突變以除去 CDR3 中的 DP 位點。與 L2 相比，L3 在 CDRs 中加入了兩個另外的突變，它們是假定的脫醯胺位點 (N34Q, N96A)。重鏈的 H1, H2 和 H3 形式得自 CAC39364.1 (基因庫存取號 CAC39364)。

這些模板不是得分最高的模板，但它是不包含顯示高同源性 (>70%) 具有已知免疫性序列的得分最高的模板。H1 形式包含 6 個突變，H2 序列加入了兩個另外的突變來考慮三個脫醯胺位點 (N60A、N73T 和 N83T)。胺基酸的序列編號反映了其在蛋白之中的天然次序 (N 端到 C 端)。H3 包含兩個另外的被認為能夠提高效力的突變 (Y100R & D106K)。對 VL 和 VH 的變體建議 6 個組合以產生人類化抗體：VL1xVH1, VL2xVH2, VL1xVH3, VL3xVH1, VL3xVH2 and VL3xVH3。如表 1 所示，對人類化的 B-B13 VL 和 VH 變體中的胺基酸利用本申請書詳細說明一節中給出的表面重整技術進行了改變。左邊一欄表示原始的胺基酸以及它們在鼠 B-B13 mAb 中的位置。

表 1

輕鏈 **(序列編號)**	**(VL1)**	**(VL2)**	**(VL3)**
Asn1	Asp	Asp	Asp
Asn34	Asn	Asn	Gln
Pro44	Ala	Ala	Ala
Glu83	Gln	Gln	Gln
Asp85	Glu	Glu	Glu
Asn96	Asn	Asn	Ala
Pro99	Pro	Ser	Ser
	4 個突變	5 個突變	7 個突變
重鏈	**(VH1)**	**(VH2)**	**(VH3)**
Gln1	Glu	Glu	Glu
Ser15	Gly	Gly	Gly

Gln16	Gly	Gly	Gly
Asn60	Asn	Ala	Ala
Ser61	Asp	Asp	Asp
Asn73	Asn	Ser	Ser
Lys81	Glu	Glu	Glu
Asn83	Asn	Thr	Thr
Gln86	Arg	Arg	Arg
Tyr100	Tyr	Tyr	Arg
Asp106	Asp	Asp	Lys
	6 個突變	9 個突變	11 個突變

實例 4:小鼠抗人類 IL-4 單株抗體選殖株 8D4-8 的 Fv 域的人類化

採用本文上面所述的人類化(表面重整)技術來實現 8D4-8 **選殖株**的人類化。製備了兩種人類化形式。一種形式在重鏈的 CDR 中包括一個被認為能解決一個有問題的殘基 (曝露的酸性不穩定位置)的突變。

在 2007 年 7 月的 PDB 庫中對 8D4-8 的 VL & VH 序列進行了對比。檢索出了大多數類似的輕鏈和重鏈胺基酸序列。可變輕鏈的最接近的同源物為 1YDJ。發現重鏈中最接近的同源物為 1IQW。1YDJ 和 1IQW 結構被用來建造一個可變域的同源性模型，然後利用 MOE 中實施的標準程序進行能量最小化。其後對 8D4-8 的 3D 同源性模型以廣義波恩隱含溶劑進行了 1.7 奈秒的分子動力學(MD) 計算。然後對每一個 8D4 胺基酸，利用得到的 1,700 個 MD 軌跡快照，與一個參考代表性 medoïd 位置相比較，計算其均方根差的分佈。最

後用一個統計試驗對每個胺基酸的均方根差分佈與全局均方根差分佈進行比較，以決定該胺基酸從 MD 計算來看，是否有足夠的柔性而有可能與 B 細胞受體作用，從而成為免疫反應活化的原因。將鼠 8D4-8 可變區的柔性位置與下載到本地的 ImMunoGeneTics 資料庫中人類抗體序列對應的位置進行了比較。只有那些柔性大於平均值三倍的殘基以及一些保存了這些柔性殘基 3D 結構的少數側向殘基才被保留在搜索結果中。選擇含相同柔性殘基最多的人抗體可變區，特別考慮位於 CDR 的 5.0 Å 範圍內的位置，以便替換鼠 8D4-8 抗體可變區的柔性殘基。最後，還增加了一些突變以避免有問題的殘基。研究了下面的基序：Asp-Pro (酸性不穩定結合)、Asn-X-Ser/Thr (糖基化)、Asn-Gly/Ser/Thr (曝露區域的脫醯胺化位點)、Met (曝露區域的氧化)。發現的唯一有問題的殘基為重鏈 CDR2 中的 DP 位點。將產生的人類化序列就序列相似性而在 UniProtKB/Swiss-Prot 資料庫中檢索，得出了已經作出合理假設的置信度。全部序列都顯示出與眾多人抗體的高度相似性。此外，所有序列均不含有 IEDB 中所列的任何已知 B 細胞或 T 細胞抗原決定部位。

對重鏈獲得了兩種形式(H1, H2)並且對輕鏈獲得了一種形式(L1)。輕鏈的 L1 形式得自 BAC01676.1 (基因庫存取號 BAC01676)。L1 形式包含 3 個突變。重鏈的 H1 和 H2 形式得自 BAC02418.1 (基因庫存取號 BAC02418)。H1 形式包含 9 個突變，H2 形式包含一個額外的突變來除去 CDR2 中的 DP 位點 (Pro53)。製備了兩個組合，VL1xVH1 和 VL1xVH2。

表 2 顯示利用人類化 (表面重整) 技術對人類化的 8D4-8 VL 和 VH 變體中的胺基酸所作的改變。左邊一欄表示原始的胺基酸以及它們在鼠 8D4-8 mAb 中的位置。

表 2

輕鏈 **(序列編號)**	**(VL1)**	
Asn5	Thr	
Leu15	Val	
Ser39	Lys	
	3 個突變	
重鏈	**(VH1)**	**(VH2)**
Gln10	Glu	Glu
Arg13	Lys	Lys
Thr16	Ala	Ala
Pro53	Pro	Ala
Lys65	Gln	Gln
Asp66	Gly	Gly
Arg74	Glu	Glu
Ser76	Thr	Thr
Leu93	Val	Val
Thr118	Leu	Leu
	9 個突變	10 個突變

實例 5：嵌合抗 IL-13 選殖株 B-B13 單株抗體、嵌合抗 IL-4 選殖株 8D4-8 單株抗體以及人類化變體的選殖和生成

抗 IL-13 選殖株 B-B13 和抗 IL-4 選殖株 8D4-8 的可變重鏈和輕鏈的胺基酸序列被逆轉譯為核酸序列，並用 Young L. and Dong Q. (Nucl. Acids Res. (2004), 32(7), e59) 描述的重疊擴展 PCR

(OE-PCR)修改規程分別生成。PCR 產物用 Invitrogen TOPO TA 選殖套組(目錄號：45-0641)被選殖到 pCR®4-TOPO 中，並用 M13 正向和 M13 反向引子測序。可變域被分別融合到恆定的重鏈(IGHG1，基因庫存取號 Q569F4) 或輕鏈(IGKC)基因庫存取號 Q502W4)中，用 NheI 和 HindIII 消化，每個域被綑綁到 Durocher et al. (2002), Nucl. Acids Res. 30(2), E9 描述的 pTT 載體的類似物游離基因表現載體 pXL 的 NheI/HindIII 位點，從而產生了嵌合的 B-B13 重鏈和輕鏈以及嵌合的 8D4-8 重鏈和輕鏈的哺乳動物表現質體。

編碼抗 IL-13 選殖株 B-B13 和抗 IL-4 選殖株 8D4-8 的人類化變體的表現選殖株也透過重疊擴展 PCR (OE-PCR)方法，基於提議的原始序列胺基酸交換合成產生。

編碼該抗體重鏈和輕鏈的表現質體在大腸桿菌 DH5a 中繁殖。用於轉染的質體是利用 Qiagen EndoFree Plasmid Mega Kit 試劑套組從大腸桿菌中製備。

轉染時，在 500 mL 振動容量瓶裡的 100 mL 的無血清 FreeStyle 介質 (Invitrogen)中按 3 x 10^5 細胞/mL 加入 HEK293FreeStyle 細胞(Invitrogen)。細胞在一個 37°C、含有 8% CO_2 加濕空氣的培養箱中培養，樣品在軌道震動平台上的旋轉速度為每分鐘 110 轉。

加種三天後，利用一台 CASY 電子細胞計數器 (Schärfe System GmbH) 測定了存活的細胞數和總細胞數。存活率大於 90%的細胞用於轉染，細胞密度為 1-1.5 x 10^6 細胞/mL。100 mL 細胞在一個盛有重鏈和輕鏈表現質體混合物(5x10^{-7}μgDNA/細胞)的 500 mL 振動容量瓶裡利用 FugeneHD (Roche) 在製造商說明的條件下進行轉染，DNA:FugeneHD 比率為 2:7。轉染後的細胞在一個放在轉速為每分鐘 110 轉的軌道振動平台上的 37°C 培養箱 (8% CO_2) 中培養 7 天。

mM 碳酸鈉 pH 9.6) 中稀釋到 10 ug/ml，每孔加樣 50 uL。免疫測試板用膠帶封好，在 4 °C 下儲存過夜。用淋洗緩衝液(PBS pH 7.4, 0.1% Tween20) 淋洗免疫板三次。每孔加入 150 uL 阻斷液(1% BSA / PBS)以覆蓋免疫板。室溫下經過 1 小時後，用淋洗緩衝液洗三次。加入 100 uL 樣品或標準 (濃度範圍為 1500 ng/ml 到 120 ng/ml)，並在室溫下放置 1 小時。用淋洗緩衝液洗免疫板三次。加入用培養液(0.1%BSA, PBS pH 7.4, 0.05% Tween20)按 1:10.000 稀釋的 100 uL 山羊抗人類 IgG-FC – HRP 偶合抗體[NatuTec A80-104P-60]。室溫下經過 1 小時培養後，用淋洗緩衝液洗三次。向每孔中加入 100 uL ABTS 受質(10 mg ABTS 片 (Pierce 34026)溶於_ml 0.1 M Na_2HPO_4，0.05 M 檸檬酸溶液，pH 5.0。使用前加入 10 uL 30% H_2O_2 /10 ml 受質緩衝液)，並等待顯色。顯色後(大約 10 到 15 分鐘)，加入 50 uL 的 1% SDS 溶液以終止反應。免疫測試板在 A405 讀出數值。

蛋白質在蛋白質 A (HiTrap™ Protein A HP Columns, GE Life Sciences)上以親和力層析法純化。用 100 mM 含有 100 mM NaCl pH 3.5 的乙酸酯緩衝液洗提後，單株抗體配製成 PBS 溶液並經過 0.22 μm 過濾。蛋白質濃度通過測量在 280 nm 的吸光度而測定。每一批用 Protein 200 Plus LabChip 套組在 Agilent 2100 生物分析儀上在還原和非還原條件下進行分析，以測定每個子單元和單體的純度和分子量。

實例 6：人類化抗 IL-13 選殖株 B-B13 變異體和人類化抗 IL-4 選殖株 8D4-8 變異體的表徵

重組人類 IL-13 和 IL-4 試劑購自 Chemicon (USA)。按下述方法進行了 Biacore 動力學分析。

利用表面胞質基因組共振技術在一台 Biacore 3000 (GE Healthcare)上對純化的抗體進行了詳細的動力學表徵。採用了一種捕獲分析，利用一種物種特異的抗體(例如 human-Fc specific MAB 1302, Chemicon) 對所研究的抗體進行捕獲和定向。捕獲的抗體用標準程序透過伯胺(10000 RU)固定在一個研究級 CM5 切片上。捕獲所分析的抗體並調節 RU 值，結果在流速為 10 µl/min 時得到最大的 30 RU 分析物結合。在 0 到 50 nM 之間的 HBS EP 濃度範圍(10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 %表面活性劑 P20)，流速為 30 µl/min 時，測量抗體相對於 IL-4 和 IL-13 的結合動力學。用 10 mM 甘胺酸 pH2.5 重新生成切片表面。利用一個沒有捕獲的抗體的流動池作為參考，在 BIA 評估計劃軟體包中對動力學參數進行了分析和計算。為了研究兩個抗原的加成結合，應用一個精靈驅動的共注射方法，其中一個抗原注射後，立即注射 IL-13/IL-4 的抗原混合物。

藉由測量 TF-1 細胞中 IL-4 或 IL-13 介導的細胞繁殖的抑制，測定了本發明抗體的生物活性。簡而言之，申請人用 IL-4 或 IL-13 來刺激 TF-1 細胞的生長。TF-1 是一個生長依賴於細胞激素並對很多細胞激素，包括 IL-4 和 IL-13 有反應的細胞系。誘發的生長(與不存在細胞激素時的基線狀況相比) 則代表了 IL-4 或 IL-13 的生物活性。抗 IL-4、抗 IL-13 以及雙特異的抗 IL-4/IL-13 抗體被證明可以阻斷 IL-4 或 IL-13 誘導的 TF-1 細胞生長。此外，雙特異的抗 IL-4/IL-13 抗體已被證明可以阻斷由 IL-4 和 IL-13 結合刺激所誘發的 TF-1 細胞繁殖。阻斷效應按劑量依賴方式測量以產生 IC50 (50% 抑制時的抗體濃度)作為抗體對目標，即 IL-4 或 IL-13 的抑制強度。下面更詳細地介紹所採用的方法。

抑制時的抗體濃度)作為抗體對目標，即 IL-4 或 IL-13 的抑制強度。下面更詳細地介紹所採用的方法。

TF-1 細胞(ATCC, CRL-2003)被保持在新加入 hGM-CSF、最終濃度為 4 ng/ml 的完全培養基 (含有高葡萄糖的 DMEM、25mM Hepes 緩衝液和穀醯胺、10% FBS、1x P/S、1 mM 丙酮酸鈉) 中。IL-13 (15 ng/ml)或 IL-4 (1 ng/ml)處理前 24 小時。細胞在 96 孔板上按 0.05 x106/m 在不含 hGM-CSF 的完全培養基中加種。用對應的細胞激素系列稀釋的抗體在加入細胞之前在 37°C 預培養了 30 分鐘。細胞培養了 72 小時(37°C、5% CO2)。加入了 cellTiter 96 水溶液的 MTS/PMS 溶液。然後培養細胞 3 小時。過後，在 490 nm 利用一個培養板讀數器記錄吸收率。用 Speed 軟體計算了 IC50 值。

人類化 B-B13 變異體的結合動力學和抑制活性示於表 3 中(nt、未測)。

表 3

抗體	開速率 ($M^{-1}\times S^{-1}$)	關速率 (S^{-1})	KD (M)	IC50 (M)
鼠 B-B13	8.64E+05	3.73E-04	5.63E-10	Nt
chB-B13 WT	1.76E+06	4.61E-04	2.61E-10	7.4E-9
huB-B13 VL1×VH1	1.74E+06	6.91E-04	3.96E-10	1.57E-8
huB-B13 VL1×VH3	1.93E+06	3.95E-04	2.05E-10	Nt
huB-B13 VL2×VH2	1.13E+06	1.77E-04	1.57E-10	Nt

huB-B13 VL3×VH1	1.93E+06	3.33E-04	1.72E-10	5.2E-9
huB-B13 VL3×VH2	2.55E+06	1.12E-04	4.39E-11	3.2E-9
huB-B13 VL3×VH3	2.14E+06	4.05E-04	1.89E-10	Nt

與原來的鼠 B-B13 (13 倍)和嵌合 B-B13 (6 倍)相比，一種人類化的 B-B13 變異體，huB-B13 VL3xVH2，具有顯著更高的親和力。當這些人類化的抗 IL-13 抗體用於治療哮喘患者時，改善的親和力可能導致藥效強度和效力的提高。此外，用於人類時，與鼠抗體或嵌合抗體相比，人類化抗體可能具有較低的免疫原性。

人類化 8D4-8 變異體的結合動力學和抑制活性示於表 4 中。

表 4

抗體	開速率 ($M^{-1}\times S^{-1}$)	關速率 (S^{-1})	KD (M)	IC50 (M)
鼠 8D4-8	5.57E+06	2.17E-04	3.77E-11	9.7E-11
ch8D4-8 WT	2.49E+07	1.95E-04	7.83E-12	8.4E-11
Hu8D4-8 VL1×VH1	4.72E+07	1.55E-04	3.29E-12	4.1E-11
Hu8D4-8 VL1×VH2	2.57E+07	3.48E-04	1.39E-11	1.35E-10

與原來的鼠 8D4-8 (11 倍) 和嵌合 8D4-8 (2 倍)相比，一個人類化的 8D4-8 變異體，hu8D4-8 VL1xVH1，具有顯著更高的親和力。當這個人類化的抗 IL-4 抗體用於治療哮喘患者時，改善的親和力可能導致藥效強度和效力的提高。此外，用於人類時，與鼠抗體或嵌合抗體相比，人類化抗體可能具有較低的免疫原性。

實例 7：人類化抗 IL-4/IL-13 雙特異抗體的克隆和生成

用於表現雙特異抗體(BsAb)的形式是美國專利 5,989,830 描述的一個雙域雙頭形式的 IgG 變體。這一形式中，IgG 分子在其相應的重鏈和輕鏈的 N 端被第二個抗體的另外一個可變域拉長。因此，得到的 IgG 分子是個由兩個重鏈和兩個輕鏈組成的異四聚體。重鏈由兩個可變的重域(VH1-VH2)組成，它們由一個連接體連接兩個不同的由十個胺基酸$(G4S)_2$組成並被融合到 IgG4 恆定域的抗體組成。輕鏈由兩個可變的輕域(VL1-VL2)組成，它們由一個連接體連接兩個不同的由十個胺基酸$(G4S)_2$組成並被融合到恆定 κ 域的抗體組成。

8D4-8 變體的可變重域和輕域的序列是由 PCR 產生的，在各自的 5'-端引入了一個編碼$(G4S)_2$-(GGA TCC)-8D4-8 之一部份的 BamHI 限制位點(GGA TCC)。8D4-8 人類化變體 VH 的 3'序列以一個 ApaI 限制位點(編碼 CH1 域的第一個胺基酸) 結束，供後面融合到 IGHG4 序列 (刪除了 Lys 端並帶有 S241P 和 L248E 雙突變的 Q569F4)。VL8D4-8 的 3'-端以一個編碼恆定 κ 鏈的前兩個胺基酸的 BsiWI 限制位點結束，供後面融合到 IGKC (基因庫存取號 Q502W4)。

B-B13 變體的可變重域和輕域的序列是由 PCR 產生的，在各自的 3'-端引入了一個編碼$(G4S)_2$-(B-B13)-(GGA GGC GGA GGG TCC

GGA GGC GGA GGA TCC (SEQ ID NO: 7)) 之一部份的 BamHI 限制位點。B-B13 變體的 VH 和 VL 序列是由一個 NheI 限制位點在各自的 5'-端產生的，接著是 ATG 起始密碼子和一個編碼序列的前導肽。

B-B13 和 8D4-8 的 VH 透過$(G4S)_2$連接體內的 BamHI 位點被融合到一起。B-B13 和 8D4-8 的 VL 透過$(G4S)_2$連接體內的 BamHI 位點被彼此融合到一起。因此，產生的重鏈和輕鏈的前後排列具有以下組成。

雙特異抗體重鏈：NheI-前導肽-VH-B-B13-$(G4S)_2$-VH 8D4-8-ApaI。

雙特異抗體輕鏈：NheI-前導肽-VL-B-B13-$(G4S)_2$-VL 8D4-8-BsiWI。

所有 PCR 中間片段用 Invitrogen TOPO TA 選殖套組(目錄號：45-0641)克隆到 pCR®4-TOPO 中，並用 M13 正向和 M13 反向引子進行序列測定。

序列確認後，重鏈前後排列透過其 ApaI 位點融合到 IGHG4 序列，可變的輕鏈前後排列透過其 BsiWI 位點融合到 IGKC。產生的雙域重鏈和輕鏈用 NheI 和 HindIII 消化，每個被綑綁到游離基因表現載體 pXL 的 NheI/HindIII 位點，分別產生了 TBTI 重鏈和輕鏈哺乳動物表現的質體。

根據下面圖 5 所示的 B-B13 和 8D4-8 的人類化 VH 和 VL 形式的組合，產生了四個人類化雙特異抗 IL-4/抗 IL-13 結構。

表 5

雙特異抗 IL-4/抗 IL-13 Ab	抗 IL-13 Fv	抗 IL-4 Fv
huTBTI3_1_1	B-B13 VL3xVH2	8D4-8 VL1xVH2
huTBTI3_2_1	B-B13 VL3xVH2	8D4-8 VL1xVH1
huTBTI3_1_2	B-B13 VL2xVH2	8D4-8 VL1xVH2
huTBTI3_2_2	B-B13 VL2xVH2	8D4-8 VL1xVH1

實例 8：人類化雙特異抗體的表徵

合和抑制活性分析按上面實例中的說明進行。

表 6 給出了四個人類化的抗 IL-4/IL-13 抗體變異體的結合動力學。所有四個雙特異抗體結構均以高親和力結合到 IL-4 和 IL-13。

表 6

	IL-13 親和力			IL-4 親和力		
BsAB	開速率 ($M^{-1}\times S^{-1}$)	關速率 (S^{-1})	KD (M)	開速率 ($M^{-1}\times S^{-1}$)	關速率 (S^{-1})	KD (M)
huTBTI3-1_1	2,27E+06	1,70E-04	7,47E-11	2,55E+06	3,78E-04	1,48E-10
huTBTI3-2_1	2,17E+06	1,69E-04	7,80E-11	4,00E+06	1,39E-04	3,47E-11
huTBTI3-1_2	8,50E+05	1,64E-04	1,93E-10	2,23E+06	3,08E-04	1,38E-10
huTBTI3-2_2	8,20E+05	2,12E-04	2,59E-10	3,96E+06	1,32E-04	3,32E-11

人類化抗 IL-4/IL-13 雙特異抗體變異體的抑制活性列於表 7 中。在下面顯示的 IC50 條件下，huTBTI3-1_1 和 huTBTI3-2_1 都完全抑制了 IL-13 或 IL-4 誘發的 TF-1 細胞繁殖。

表 7

抗體	IC50 (nM)於 IL-13 分析	IC50 (nM)於 IL-4 分析
huTBTI3-1_1	3.7	1.7
huTBTI3-2_1	4.1	0.32

眾所周知，一個突變的 IL-13 等位基因常常與哮喘有相關連(Heinzmann A. et al., 2000, Hum Mol Genet 9, 4, p549-559)。因此，研究了雙特異抗體對突變的 IL-13 蛋白質(人類 IL-13 R112Q 變體，PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) 的結合動力學。結果表明，huTBTI3-1_1 和 huTBTI3-2_1 與 IL-13 變體的結合和與野生型 IL-13 的結合類似。

表 8 顯示人類化抗 IL-4/IL-13 分子與突變的 IL-13 蛋白質的結合動力學。

表 8

	IL13 變異體親和力		
BsAB	開速率 ($M^{-1}\times S^{-1}$)	關速率 (S^{-1})	KD (M)
huTBTI3-1_1	9.74E+05	1.18E-04	1.21E-10
huTBTI3-2_1	9.48E+05	2.00E-04	2.11E-10

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

【序列表】(請換頁單獨記載)

序列表

<110> sanofi-aventis US Inc
Rao, Ercole
Mikol, Vincent
Li, Danxi
Kruip, Jochen
Davison, Matthew

<120> 結合 L-4 和/或 IL-13 的抗體及其用途

<130> US2008/020

<160> 7

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化小鼠/小鼠 VL3 區域

<400> 1

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 Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Gly Gln Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala
85 90 95

Glu Asp Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 2
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化小鼠/小鼠 VH2 區域

<400> 2

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser
20 25 30

Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化小鼠/小鼠 VL1 區域

<400> 3

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 4
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化小鼠/小鼠 VH1 區域

<400> 4

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

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

Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe
50 55 60

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

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

Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 5
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化小鼠/小鼠 VH2 區域

<400> 5

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

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

Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile Asp Ala Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe
50 55 60

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

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

Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接體

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 7
ggaggcggag ggtccggagg cggaggatcc 30

申請專利範圍

1. 一種特異地結合到 IL-4 的分離抗體或其片段，其中該抗體或其片段包含：

(a) 包含 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列的可變輕鏈域(domain)以及包含 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列的可變重鏈域；

(b) 包含 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列的可變輕鏈域以及包含 SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列的可變重鏈域；

(c) 包含 HASQNIDVWLS (CDR1; SEQ ID NO: 14)、KASNLHTG (CDR2; SEQ ID NO: 15)及 QQAHSYPFT (CDR3; SEQ ID NO: 16)之胺基酸序列的可變輕鏈域以及包含 GYSFTSYWIH (CDR1; SEQ ID NO: 17)、IDPSDGETR (CDR2; SEQ ID NO: 18)、及 LKEYGNYDSFYFDV (CDR3; SEQ ID NO: 19)之胺基酸序列的可變重鏈域；或

(d) 包含 HASQNIDVWLS (CDR2; SEQ ID NO: 14)、KASNLHTG (CDR2; SEQ ID NO: 15)及 QQAHSYPFT (SEQ ID NO: 16)之胺基酸序列的可變輕鏈域以及包含 GYSFTSYWIH (CDR1; SEQ ID NO: 20)、IDASDGETR (CDR2; SEQ ID NO: 21)及 LKEYGNYDSFYFDV (CDR3; SEQ ID NO: 22)之胺基酸序列的可變重鏈域。

2. 一種特異地結合到 IL-4 的分離抗體或其片段，其中該抗體或其片段包含：

(a) 包含與 SEQ ID NO: 3 的胺基酸序列至少 95%相同度之胺基酸序列的可變輕鏈域以及包含與 SEQ ID NO: 4 的胺基酸序列至少 95%相同度之胺基酸序列的可變重鏈域；或

(b) 包含與 SEQ ID NO: 3 的胺基酸序列至少 95%相同度之胺基酸序列的可變輕鏈域以及包含與 SEQ ID NO: 5 的胺基酸序列至少 95%相同度之胺基酸序列的可變重鏈域。

3. 一種分離抗體或其片段，其特異地結合到 IL-4 上與包含下列抗體或其片段相同之抗原決定部位：

(a) 包含 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列的可變輕鏈域以及包含 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列的可變重鏈域；

(b) 包含 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列的可變輕鏈域以及包含 SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列的可變重鏈域；

(c) 包含 HASQNIDVWLS (CDR1; SEQ ID NO: 14)、KASNLHTG (CDR2; SEQ ID NO: 15)及 QQAHSYPFT (CDR3; SEQ ID NO: 16)之胺基酸序列的可變輕鏈域以及包含 GYSFTSYWIH (CDR1; SEQ ID NO: 17)、IDPSDGETR (CDR2; SEQ ID NO: 18)、及 LKEYGNYDSFYFDV (CDR3; SEQ ID NO: 19)之胺基酸序列的可變重鏈域；或

(d) 包含 HASQNIDVWLS (CDR1; SEQ ID NO: 14)、KASNLHTG (CDR2; SEQ ID NO: 15)及 QQAHSYPFT (SEQ ID NO: 16)之胺基酸序列的可變輕鏈域以及包含 GYSFTSYWIH (CDR1; SEQ ID NO: 20)、IDASDGETR (CDR2; SEQ ID NO: 21)及 LKEYGNYDSFYFDV (CDR3; SEQ ID NO: 22)之胺基酸序列的可變重鏈域。

4. 一種特異地結合到 IL-4 的分離抗體或其片段，其中該抗體或其片段係競爭地抑制與包含下列的抗體或其片段之結合：

(a) 包含 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列的可變輕鏈域以及包含 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列的可變重鏈域；

(b) 包含 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列的可變輕鏈域以及包含

SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列的可變重鏈域；

(c) 包含 HASQNIDVWLS (CDR1; SEQ ID NO: 14)、KASNLHTG (CDR2; SEQ ID NO: 15)及 QQAHSYPFT (CDR3; SEQ ID NO: 16)之胺基酸序列的可變輕鏈域以及包含 GYSFTSYWIH (CDR1; SEQ ID NO: 17)、IDPSDGETR (CDR2; SEQ ID NO: 18)、及 LKEYGNYDSFYFDV (CDR3; SEQ ID NO: 19)之胺基酸序列的可變重鏈域；或

(d) 包含 HASQNIDVWLS (CDR1; SEQ ID NO: 14)、KASNLHTG (CDR2; SEQ ID NO: 15)及 QQAHSYPFT (SEQ ID NO: 16)之胺基酸序列的可變輕鏈域以及包含 GYSFTSYWIH (CDR1; SEQ ID NO: 20)、IDASDGETR (CDR2; SEQ ID NO: 21)及 LKEYGNYDSFYFDV (CDR3; SEQ ID NO: 22)之胺基酸序列的可變重鏈域。

5. 如專利申請範圍第 1 至 4 項中任一項之抗體或其片段，其中該抗體或其片段包含恆定區域。

6. 如專利申請範圍第 5 項之抗體或其片段，其中該恆定區域選自由 C_{H1}、C_{H2}、C_{H3} 及 C_L 所組成之群組。

7. 如專利申請範圍第 1-4 項中任一項之抗體或其片段，其中該抗體或其片段是一種 IgG 抗體或其片段。

8. 如專利申請範圍第 7 項之抗體或其片段，其中該 IgG 抗體或其片段是一種 IgG4 抗體或其片段。

9. 如專利申請範圍第 1-4 項中任一項之抗體或其片段，其進一步被接合到一種致效劑分子。

10. 如專利申請範圍第 9 項之抗體或其片段，其中該致效劑分子為異質多肽、藥物、放射性核苷酸或毒素。

11. 一種醫藥組成物，其包含如專利申請範圍第 1-10 項中任一項之

抗體或其片段以及一種藥學上可接受的載體。

12.如專利申請範圍第 1-4 項中任一項之抗體或其片段，其進一步包含一種標記，其中該標記為一種放射性標記、螢光團、生色團、顯像劑或金屬離子。

13.一種治療上有效量之根據專利申請範圍第 1-8 項中任一項之抗體或其片段的用途，係用於製備治療 IL-4 介導之疾病的藥物。

14.如專利申請範圍第 13 項的用途，其中該 IL-4 介導之疾病為過敏疾病、癌症、哮喘、IL-4 異常生成有關的疾病、自體免疫疾病、硬皮病或先天性肺纖維化。

15.一種根據專利申請範圍第 1-4 項中任一項之抗體或其片段的用途，係用於製備治療、抑制或預防哺乳動物中 IL-4 介導之疾病的藥物。

16.如專利申請範圍第 15 項的用途，其中該 IL-4 介導之疾病係選自由下列組成之群組：過敏疾病、癌症、哮喘、IL-4 異常生成有關的疾病、自體免疫疾病、硬皮病及先天性肺纖維化。

17.一種治療上有效量之根據專利申請範圍第 1-8 項中任一項之抗體或其片段的用途，其中該抗體或其片段係用於製備抑制 TH-2 介導之反應的藥物。

18.如專利申請範圍第 1-4 項中任一項之抗體或其片段，其係用於抑制哺乳動物中 TH-2 介導之反應的藥物。

19.一種分離核酸分子，其編碼如專利申請範圍第 1-8 項中任一項的抗體或其片段。

20.一種載體，其包含如專利申請範圍第 19 項的核酸分子。

21.一種分離宿主細胞，其包含如專利申請範圍第 20 項的載體。

圖式

圖 1

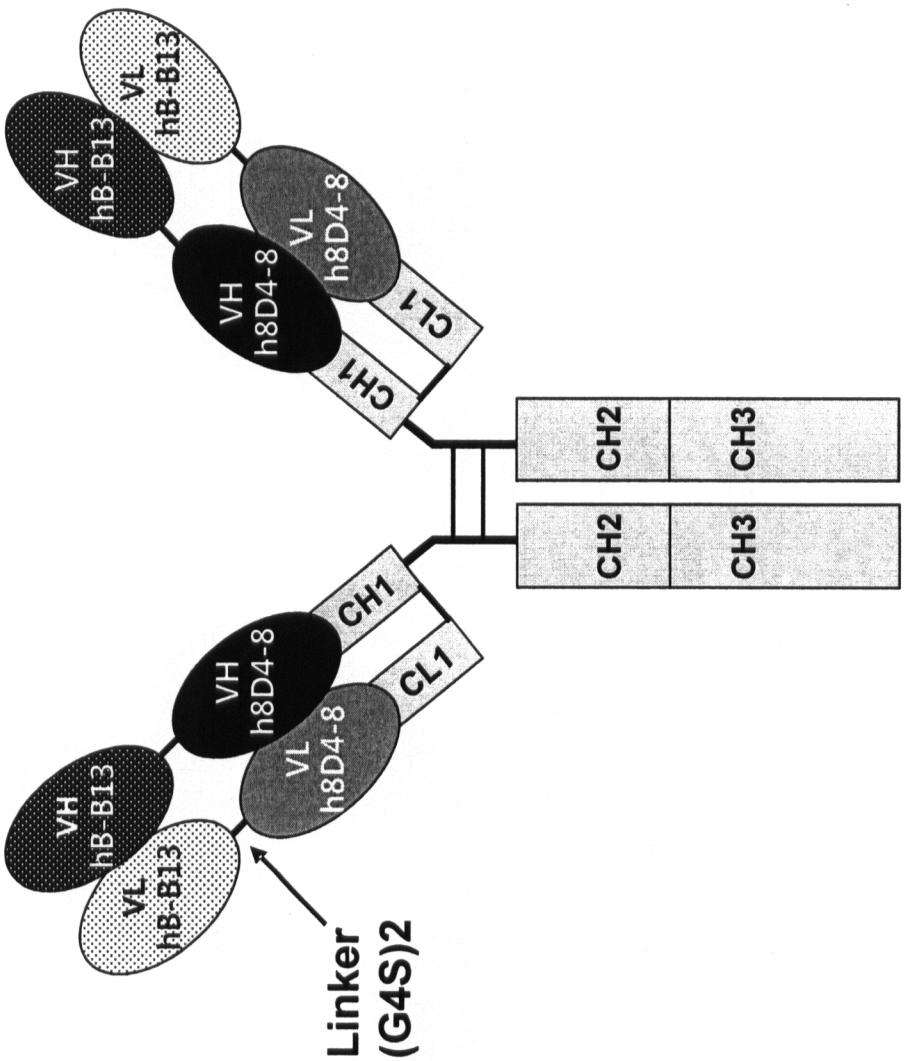

VH
hB-B13
VL
hB-B13
VH
h8D4-8
VL
h8D4-8
CH1
CL1
CH2
CH3
CH2
CH3
VH
h8D4-8
VL
h8D4-8
CH1
CL1
VH
hB-B13
VL
hB-B13
Linker
(G4S)2

圖 2

Anti-IL13 hB-B13 VL3 (SEQ ID NO: 1):
DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISC**RASESVD SYGQSYMH**WY QQKAGQPPKL LIY**LASNLES** GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQAEDAATY YC**QQNAEDSR TF**GGGTKLEI K

Anti-IL13 hB-B13 VH2 (SEQ ID NO: 2):
EVQLKESGPG LVAPGGSLSI TCTVS**GFSLT DSSIN**WVRQP PGKGLEWLGM IWG**DGRID**YA DALKSRLSIS KDSSKSQVFL EMTSLRTDDT ATYYCAR**DGY FPYAMDF**WGQ GTSVTVSS

Anti-IL4 h8D4-8 VL1 (SEQ ID NO: 3):
DIQMTQSPAS LSVSVGDTIT LTC**HASQNID VWLS**WFQQKP GNIPKLLIY**K ASNLHTG**VPS RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYC**QQ AHSYPFT**FGG GTKLEIKR

Anti-IL4 h8D4-8 VH1 (SEQ ID NO: 4):
QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKAS**GYSFT SYWIH**WIKQR PGQGLEWIGM **IDPSDGETR**L NQRFQGRATL TVDESTSTAY MQLRSPTSED SAVYYCTR**LK EYGNYDSFYF DV**WGAGTLVT VSSA

Anti-IL4 h8D4-8 VH2 (SEQ ID NO: 5):
QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKAS**GYSFT SYWIH**WIKQR PGQGLEWIGM **IDASDGETR**L NQRFQGRATL TVDESTSTAY MQLRSPTSED SAVYYCTR**LK EYGNYDSFYF DV**WGAGTLVT VSSA