



(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 201238976 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：101105896 (22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 02 月 22 日
(51)Int. Cl. : C07K16/18 (2006.01) C12N15/13 (2006.01)
A61K39/395 (2006.01) A61P37/00 (2006.01)
(30)優先權：2011/02/23 歐洲專利局 11155684.1
(71)申請人：赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)
瑞士
(72)發明人：福堤格 基亞格 FERTIG, GEORG (DE)；費雪 詹斯 FISCHER, JENS (DE)；喬治
蓋伊 GEORGES, GUY (BE)；卡路扎 克勞斯 KALUZA, KLAUS (DE)；利夫卡
凡立瑞亞 LIFKE, VALERIA (DE)；莫嫩肯 喬治 MOELLEKEN, JOERG (DE)；
歐夫那 松加 OFFNER, SONJA (DE)；帕夏恩 阿凱爾 PASHINE, ACHAL (US)；
席伯 史蒂芬 SEEBER, STEFAN (DE)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：有 申請專利範圍項數：27 項 圖式數：0 共 67 頁

(54)名稱

抗人類 I L - 3 3 R 之抗體及其用途

ANTIBODIES AGAINST HUMAN IL33R AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明係關於一種結合至 IL33R 之抗體，其中該重鏈可變域包括 SEQ ID NO：1 之 CDR3 區、SEQ ID NO：2 之 CDR2 區及 SEQ ID NO：3 之 CDR1 區，及該輕鏈可變域包括 SEQ ID NO：4 之 CDR3 區、SEQ ID NO：5 之 CDR2 區及 SEQ ID NO：6 之 CDR1 區，或其嵌合、人源化或缺失 T 細胞抗原決定部位之抗體變體，其具有利於治療炎症性疾病之特性。



(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 201238976 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：101105896 (22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 02 月 22 日
(51)Int. Cl. : C07K16/18 (2006.01) C12N15/13 (2006.01)
A61K39/395 (2006.01) A61P37/00 (2006.01)
(30)優先權：2011/02/23 歐洲專利局 11155684.1
(71)申請人：赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)
瑞士
(72)發明人：福堤格 基亞格 FERTIG, GEORG (DE)；費雪 詹斯 FISCHER, JENS (DE)；喬治
蓋伊 GEORGES, GUY (BE)；卡路扎 克勞斯 KALUZA, KLAUS (DE)；利夫卡
凡立瑞亞 LIFKE, VALERIA (DE)；莫嫩肯 喬治 MOELLEKEN, JOERG (DE)；
歐夫那 松加 OFFNER, SONJA (DE)；帕夏恩 阿凱爾 PASHINE, ACHAL (US)；
席伯 史蒂芬 SEEBER, STEFAN (DE)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：有 申請專利範圍項數：27 項 圖式數：0 共 67 頁

(54)名稱

抗人類 I L - 3 3 R 之抗體及其用途

ANTIBODIES AGAINST HUMAN IL33R AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明係關於一種結合至 IL33R 之抗體，其中該重鏈可變域包括 SEQ ID NO：1 之 CDR3 區、SEQ ID NO：2 之 CDR2 區及 SEQ ID NO：3 之 CDR1 區，及該輕鏈可變域包括 SEQ ID NO：4 之 CDR3 區、SEQ ID NO：5 之 CDR2 區及 SEQ ID NO：6 之 CDR1 區，或其嵌合、人源化或缺失 T 細胞抗原決定部位之抗體變體，其具有利於治療炎症性疾病之特性。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於抗人類IL33R之抗體(IL33R抗體)，其產製方法，包含該抗體之醫藥組合物，及其用途。

【先前技術】

人類IL33為經由與IL-1受體相關之IL33受體(該受體之同義詞：IL1RL1、T1/ST2)傳導訊號之IL-1家族之介白素-1類細胞激素且包括與2型輔助性T相關之細胞激素。IL33(Swiss-Prot Acc.編號O95760)之同義詞為介白素-1家族成員11(IL-1F11)及高內皮小靜脈源性核因子(NF-HEV)。NF-HEV係於Baekkevold, E.S.等人, Am. J. Pathol. 163(2003)69-79中描述。Schmitz, J., 等人, Immunity 23(2005)479-490描述IL33。

人類IL33受體(IL33R)(ILRL1之同義詞；SwissProt Acc編號Q01638，其他名稱為ST2、T1/ST2、Fit-1及DER4)係藉由生長刺激纖維母細胞誘導，且亦可藉由抗原刺激Th2細胞誘導。根據本發明，IL33R與ST2指示人類IL33R。Tominaga, S., 等人, (FEBS Lett. 258(1989)301-304; Biochim. Biophys. Acta. 1171(1992)215-218)與Yanagisawa, K., (FEBS Lett. 318(1993)83-87)識別人類ST2(分泌型)、ST2L(跨膜受體型)及ST2V(變體Glu-78)。人類ST2僅於生長刺激之BALB/c-3T3細胞中表現且為生長因子誘導之初級反應基因家族之成員。ST2編碼序列類似於人類介白素1受體(1及2型)之胞外部之蛋白。IL33R剔除小鼠之研究顯

示IL33R涉及TH2-反應之早期事件(Kropf, P., 等人, *Infect. Immunity* 70(2002)5512-5520 ; Hoshino, K., 等人, *J. Exp. Med.* 190(1999)1541-1548 ; Senn, 等人, *Eur. J. Immunol.* 30(2000)1929-1938 ; Townsend, M.J., 等人, *J. Exp. Med.* 191(2000)1069-1076)。推測ST2為一種TH2免疫之標記物、活化劑及調節劑(Kumar, R.K., 等人, *Clin. Exp. Allergy* 32(2002)1394-1396)。

許多公開案描述有抗IL33R抗體及其於免疫功能中之作用。抗人類ST2抗體Mab523及多株抗體AF523係購自R&D Systems(<http://www.rndsystems.com>)。抗人類ST2抗體HB12係購自antibodies-online GmbH, Germany及MBL Int. Corp.(www.mblintl.com)。抗IL33R抗體導致TH2型免疫反應減少。該抗體抑制嗜酸性粒細胞浸潤、IL-5產生及IgE產生。動物模型中ST2針對哮喘之作用之評價結果係鼠科IL33R在CD4⁺T細胞上之表現增加，指示IL33R於過敏性或哮喘反應之作用(Löhning, M., 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(1998)6930-6935及Xu, D., 等人, *J. Exp. Med.* 187(1998)787-794 ; Coyle, A.J., 等人, *J. Exp. Med.* 190(1999)895-902)。Meisel, C., 等人, *J. Immunol.* 166(2001)3143-3150研究T1/ST2在CD4⁺T細胞上之表現之調控及功能及2型細胞激素因T1/ST2交聯之誘導產生。Löhning, M.等人於大鼠中產生抗鼠科ST2抗體。過敏原激發前1小時以20 µg(約0.8 mg/kg)該抗體進行預處理致使小鼠氣管中嗜酸性粒細胞之數量減少70%。Kumar, S., 等人

(Biochem. Biophys. Res. Comm. 235(1997)474-478 及 J. Biol. Chem. 270(1995)27905-27913)描述使用針對果蠅中表現之可溶性純ST2受體產生之兔多株抗體藉由免疫沉澱來偵測ST2蛋白之表現。BALB/c小鼠之研究顯示以抗IL33抗體處理誘導較高之TH1-型反應。Kuroiwa, K., 等人, Hybridoma 19(2000)151-159描述量化患者血清中人類ST2蛋白之ELISA系統。抗IL33R抗體亦減少因RSV之感染而引起之效應(Walzl, 等人, J. Exp. Med. 193(2001)785-792)。亦在關節炎之動物模型中研究抗IL33R抗體(Leung, B.P., 等人, J. Immunol. 173(2004)145-150; Walzl, 等人, J. Exp. Med. 193(2001)785-792)。Smithgall, M.D., 等人, Int. Immunol. 20(2008)1019-1030研究在抗-huST2抗體存在下干擾素 γ 在NK細胞中之含量。IL33R及/或抗IL33R之抗體在WO 2005/079844、US 7,087,396、WO 2001/021641、WO 2002/038794、WO 2003/094856中有所提及。Oboki, K., 等人, Allergology Int. 59(2010)143-160評論IL-33及IL-33受體於宿主防禦力及疾病中之作用及抗-ST2抗體、可溶性ST2及抗-IL-33抗體對小鼠氣管發炎之作用。

【發明內容】

本發明包括一種結合至IL33R之抗體，其特徵在於重鏈可變域包括SEQ ID NO:1之CDR3區、SEQ ID NO:2之CDR2區及SEQ ID NO:3之CDR1區及輕鏈可變域包括SEQ ID NO:4之CDR3區、SEQ ID NO:5之CDR2區及SEQ ID NO:6之CDR1區。較佳地，該抗體之特徵在於該重鏈可變域包

括 SEQ ID NO:7。較佳地，該抗體之特徵在於該重鏈可變域包括 SEQ ID NO:7 及該輕鏈可變域包括 SEQ ID NO:8。較佳地，結合至 IL33R 且特徵在於上述胺基酸序列及胺基酸序列片段之抗體為絞鏈區之介於 C_{H1} 與 C_{H2} 之間之胺基酸位置 216-214(較佳地，胺基酸位置 220-240) 及 / 或第二間域區之介於 C_{H2} 與 C_{H3} 之間之胺基酸位置 327-331 改質之人類 IgG1 同型物。較佳地，該抗體包括 L234A(胺基酸位置 234 以丙胺酸替代白胺酸) 及 L235A 突變。包括 L234A 及 L235A 突變之較佳重鏈恆定區示於 SEQ ID NO:9 中。較佳地，結合至 IL33R 且特徵在於上述胺基酸序列及胺基酸序列片段之抗體為絞鏈區之介於 C_{H1} 與 C_{H2} 之間之胺基酸位置 216-240(較佳地，胺基酸位置 220-240) 及 / 或第二間域區之介於 C_{H2} 與 C_{H3} 之間之胺基酸位置 327-331 改質之人類 IgG4 同型物。較佳地，該抗體包括 L235E(胺基酸位置 235 以麩胺酸替代白胺酸) 及 S228P 突變(胺基酸位置 228 以脯胺酸替代絲胺酸)。

抗體 ra170(Mab ra170) 為本發明之一較佳實施例。本發明之另一實施例為抗體 ra170 之嵌合、人源化或缺失 T 細胞抗原決定部位之抗體變體。

抗體 ra170 之較佳人源化抗體變體之特徵在於重鏈可變域包括 SEQ ID NO:24 之 CDR3 區、SEQ ID NO:23 之 CDR2 區及 SEQ ID NO:22 之 CDR1 區及輕鏈可變域包括 SEQ ID NO:33 之 CDR3 區、SEQ ID NO:32 之 CDR2 區及 SEQ ID NO:31 之 CDR1 區，或者特徵在於重鏈可變域包括 SEQ ID

NO:28之CDR3區、SEQ ID NO:27之CDR2區及SEQ ID NO:26之CDR1區及輕鏈可變域包括SEQ ID NO:33之CDR3區、SEQ ID NO:32之CDR2區及SEQ ID NO:31之CDR1區。較佳地，該人源化抗體之特徵在於重鏈可變域包括SEQ ID NO:21或25。較佳地，該人源化抗體之特徵在於輕鏈可變域包括SEQ ID NO:30。

該抗體係以 10^{-10} M或更低的親和力與IL33R特異性結合。

本發明進一步係關於一種結合至IL33R之抗體且其特徵在於結合至單株抗體ra170所結合之同一IL33R抗原決定部位。該抗體係以至少 10^{-8} M⁻¹至 10^{-12} M⁻¹之親和力結合至IL33R，較佳為絞鍵區之介於C_H1與C_H2之間之胺基酸位置216-240(較佳地，胺基酸位置220-240)及/或第二間域區之介於C_H2與C_H3之間之胺基酸位置327-331改質之人類IgG1同型物。較佳地，該抗體為包括L234A及L235A突變之人類IgG1同型物及包括L235E及S228P突變之人類IgG4同型物。

較佳地，該抗體為人源化或人類抗體。較佳地，根據本發明之抗體抑制IL33與IL33R之結合，且對於人類IL33/IL33R而言，IC₅₀值為0.32 nM，及對於食蟹猴IL33/IL33R而言，為0.13 nM。

根據本發明之抗體較佳於嗜酸性粒細胞檢定、肥大細胞檢定、Th2檢定、嗜鹼細胞檢定(IL-5)中顯示5 nM或更低之IC₅₀值，該等抗體尤其用於治療類風濕關節炎、哮喘或

潰瘍性結腸炎。

本發明之另一實施例為一種包含根據本發明之抗體之醫藥組合物。較佳地，該醫藥組合物包含一種抗體，該抗體特徵在於結合至單株抗體ra170所結合之同一IL33R抗原決定部位。較佳地，該醫藥組合物之該抗體係以至少 10^{-8} M^{-1} 至 10^{-12} M^{-1} 之親和力結合至IL33R，較佳為絞鍵區之介於 $\text{C}_{\text{H}1}$ 與 $\text{C}_{\text{H}2}$ 之間之胺基酸位置216-240(較佳地，胺基酸位置220-240)及/或第二間域區之介於 $\text{C}_{\text{H}2}$ 與 $\text{C}_{\text{H}3}$ 之間之胺基酸位置327-331改質之人類IgG1同型物。較佳地，該抗體為包含L234A(胺基酸位置234以丙胺酸替代白胺酸)及L235A突變之人類IgG1同型物或包含L235E及S228P突變之人類IgG4同型物。

本發明之另一實施例為一種以根據本發明之抗體於製造醫藥組合物之用途。較佳地，該醫藥組合物包含一種抗體，該抗體特徵在於結合至單株抗體ra170所結合之同一IL33R抗原決定部位。較佳地，該醫藥組合物之該抗體係以至少 10^{-8} M^{-1} 至 10^{-12} M^{-1} 之親和力結合至IL33R，較佳為絞鍵區之介於 $\text{C}_{\text{H}1}$ 與 $\text{C}_{\text{H}2}$ 之間之胺基酸位置216-240(較佳地，胺基酸位置220-240)及/或第二間域區之介於 $\text{C}_{\text{H}2}$ 與 $\text{C}_{\text{H}3}$ 之間之胺基酸位置327-331改質之人類IgG1同型物。較佳地，該抗體為包含L234A(胺基酸位置234以丙胺酸替代白胺酸)及L235A突變之人類IgG1同型物或包含L235E及S228P突變之人類IgG4同型物。

本發明之另一實施例為一種以根據本發明之抗體於治療

潰瘍性結腸炎或哮喘之用途。本發明之另一實施例為一種製造包含根據本發明之抗體之醫藥組合物之方法。較佳地，該醫藥組合物包含一種抗體，該抗體特徵在於結合至單株抗體ra170所結合之同一IL33R抗原決定部位。較佳地，該醫藥組合物之該抗體係以至少 10^{-8} M^{-1} 至 10^{-12} M^{-1} 之親和力結合至IL33R，較佳為絞鏈區之介於 C_{H1} 與 C_{H2} 之間之胺基酸位置216-240(較佳地，胺基酸位置220-240)及/或第二間域區之介於 C_{H2} 與 C_{H3} 之間之胺基酸位置327-331改質之人類IgG1同型物。較佳地，該抗體為包含L234A(胺基酸位置234以丙胺酸替代白胺酸)及L235A突變之人類IgG1同型物或包含L235E及S228P突變之人類IgG4同型物。

本發明之另一實施例為一種編碼結合至IL33R之抗體之重鏈之核酸，其特徵在於包含SEQ ID NO:1之重鏈CDR3區及較佳IgG1重鏈恆定域中包含L234A及L235A突變。較佳地，該抗體另外包含SEQ ID NO:2之重鏈CDR2區及SEQ ID NO:3之CDR1區。本發明之另一實施例為編碼結合至IL33R之抗體之輕鏈之核酸，其特徵在於包含SEQ ID NO:4之輕鏈CDR3區及較佳IgG1重鏈恆定域中包含L234A及L235A突變。較佳地，該抗體另外包含SEQ ID NO:5之輕鏈CDR2區及SEQ ID NO:6之CDR1區。本發明之另一實施例為一種編碼根據本發明之抗體之核酸，其特徵在於包含SEQ ID NO:7之重鏈可變域及SEQ ID NO:8之輕鏈可變域及較佳重鏈人類IgG1恆定域中包含L234A及L235A突變及重鏈人類IgG4恆定域中包含L235E及S228P突變。

本發明之另一實施例為一種編碼結合至IL33R之抗體之重鏈之核酸，其特徵在於包含SEQ ID NO:24之重鏈CDR3區及較佳IgG1重鏈恆定域中包含L234A及L235A突變。較佳地，該抗體另外包含SEQ ID NO:23之重鏈CDR2區及SEQ ID NO:22之CDR1區。本發明之另一實施例為一種編碼結合至IL33R之抗體之輕鏈之核酸，其特徵在於包含SEQ ID NO:33之輕鏈CDR3區及較佳IgG1重鏈恆定域中包含L234A及L235A突變。較佳地，該抗體另外包含SEQ ID NO:2之輕鏈CDR32區及SEQ ID NO:31之CDR1區。本發明之另一實施例為一種編碼根據本發明之抗體之核酸，其特徵在於包含SEQ ID NO:21之重鏈可變域及SEQ ID NO:30之輕鏈可變域及較佳重鏈人類IgG1恆定域中包含L234A及L235A突變或重鏈人類IgG4恆定域中包含L235E及S228P突變。

本發明之另一實施例為一種編碼結合至IL33R之抗體之重鏈之核酸，其特徵在於包含SEQ ID NO:28之重鏈CDR3區及較佳IgG1重鏈恆定域中包含L234A及L235A突變。較佳地，該抗體另外包含SEQ ID NO:27之重鏈CDR2區及SEQ ID NO:26之CDR1區。本發明之另一實施例為一種編碼結合至IL33R之抗體之輕鏈之核酸，其特徵在於包含SEQ ID NO:33之輕鏈CDR3區及較佳IgG1重鏈恆定域中包含L234A及L235A突變。較佳地，該抗體另外包含SEQ ID NO:2之輕鏈CDR2區及SEQ ID NO:31之CDR1區。本發明之另一實施例為一種編碼根據本發明之抗體之核酸，其特徵

在於包含 SEQ ID NO:25 之重鏈可變域及 SEQ ID NO:30 之輕鏈可變域及較佳重鏈人類 IgG1 恆定域中包含 L234A 及 L235A 突變或重鏈人類 IgG4 恆定域中包含 L235E 及 S228P 突變。

根據本發明之抗體較佳特徵在於恆定鏈係源自人類。該等恆定鏈已為當前技術所熟知且例如由 Kabat (Kabat, E.A., 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), 及 Johnson, G. 與 Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218) 描述。例如, 有效人類重鏈恆定區包括 SEQ ID NO:9 (包含 L234A 與 L235A 突變之人類 IgG1) 或 SEQ ID NO:29 (包含 L235E 及 S228P 突變之人類 IgG4) 之胺基酸序列。例如, 有效人類輕鏈恆定區包括 SEQ ID NO:12 或 34 之 κ -輕鏈恆定區之胺基酸序列。該抗體更佳係源自小鼠且包含根據 Kabat (Kabat, E.A., 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991); 及 Johnson, G. 與 Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218) 之小鼠抗體之抗體可變序列框架。

根據本發明之抗體特徵尤其在於抑制 IL33 與 IL33R 之結合且因此抑制經由 IL-33R/IL-1RacP 訊號傳導複合物傳導訊號。

根據本發明之抗體較佳係人類同型物 IgG1。較佳之 $\gamma 1$ 重鏈恆定區顯示於 SEQ ID NO:10 或 29 中及不含 L234A 及

L235A突變之SEQ ID NO:11中。較佳之 κ 輕鏈恆定區顯示於SEQ ID NO:12或34中。

根據本發明之抗體較佳特徵在於無法結合人類補體因子C1q及因此避免CDC效應物發揮作用。

根據本發明之抗體較佳係絞鏈區之介於 C_{H1} 與 C_{H2} 之間之胺基酸位置216-240(較佳地，胺基酸位置220-240)及/或第二間域區之介於 C_{H2} 與 C_{H3} 之間之胺基酸位置327-331改質之人類IgG1同型物。根據本發明之該抗體較佳特徵在於為人類IgG1同型物，其包含L234(胺基酸位置234之白胺酸)、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331及/或P329(根據EU索引編號)中之至少一處突變。較佳地，該抗體為包含L234A(胺基酸位置234以丙胺酸替代白胺酸)及L235A突變之人類IgG1同型物或包含L235E及S228P突變之人類IgG4同型物。

本發明進一步提供包含根據本發明之核酸之表現載體，其在原核或真核宿主細胞中可表現該核酸，及包含該等載體之宿主細胞用於重組製造該抗體。本發明進一步包括包含根據本發明之載體之原核或真核宿主細胞。本發明進一步包括一種製得根據本發明之重組人類或人源化抗體之方法，特徵為於原核或真核宿主細胞中表現根據本發明之核酸及自該細胞或該細胞培養上清液回收該抗體。本發明進一步包括可藉由該重組方法獲得之抗體。

根據本發明之抗體顯示對需IL33R標的治療之患者產生之效益。根據本發明之抗體具有新穎及發明特性，此點尤

其利於罹患此種免疫疾病，特定言之罹患類風濕關節炎、潰瘍性結腸炎或哮喘之患者。根據本發明之抗體不會使治療患者易感染葡萄球菌及腸細菌。本發明進一步提供一種治療罹患類風濕關節炎、潰瘍性結腸炎或哮喘之患者之方法，該方法包括對確診例如患有此種疾病(及因此需要此種治療)之患者投與有效量之根據本發明之結合至IL33R之抗體。該抗體較佳係以醫藥組合物形式投與。本發明之另一實施例為一種適用於治療罹患類風濕關節炎、潰瘍性結腸炎或哮喘之患者之方法，其特徵為對該患者投與根據本發明之抗體。本發明進一步包括一種以根據本發明之抗體於治療罹患類風濕關節炎、潰瘍性結腸炎或哮喘之患者及製造根據本發明之醫藥組合物之用途。此外，本發明包括一種製造根據本發明之醫藥組合物之方法。

本發明進一步包括一種醫藥組合物，其包含根據本發明之抗體，視需要之因醫藥目的而與抗體調配之緩衝劑及/或佐藥。本發明進一步提供醫藥可接受載劑中包含根據本發明之抗體之醫藥組合物。於一實施例中，該醫藥組合物可包括於一種製品或套組中。

【實施方式】

術語「抗體」包括多種形式之抗體結構，其包含(但不限於)整體抗體及抗體片段。根據本發明之抗體較佳為人源化抗體、嵌合抗體或其他基因改造抗體，只要保留本發明特性。「抗體片段」包括全長抗體之一部分(較佳其可變域)，或至少其抗原結合部位。抗體片段之實例包括雙功

能抗體、單鏈抗體分子及由抗體片段形成之多特異性抗體。scFv抗體例如述於Huston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203(1991)46-88中。此外，抗體片段包括具有V_H域(即可與V_L域組合在一起)，或結合至IL33R之V_L域(即可與V_H域一起組合至功能性抗原結合部位及因此提供本發明抗體之特性)之特性之單鏈多肽。本文所用術語「單株抗體」或「單株抗體組合物」係指單胺基酸組合物之抗體分子之製劑。術語「人源化抗體」係指其中架構及/或「補體決定區」(CDR)已改質而包含相較親本免疫球蛋白而言不同物種之免疫球蛋白之CDR之抗體。於一較佳實施例中，將小鼠CDR移植於人類抗體之架構區內以製造「人源化抗體」。參見，例如Riechmann, L., 等人, *Nature* 332(1988) 323-327；及Neuberger, M.S., 等人, *Nature* 314(1985)268-270。

本文所用術語「結合至IL33R」意指在ELISA結合試驗中使抗體結合至固定人類IL33R。若抗體在抗體濃度大於12 ng/ml下產生比不含抗體之對照之平均+3標準偏差或更大偏差的更強信號，則觀察到結合。

術語「親和力」係指分子(例如，抗體)之單結合部位與其結合搭配物(例如，抗原)間非共價相互作用之總強度。除非另外指明，否則，如本文所用，「結合親和力」係指反應結合對(例如，抗體與抗原)成員間之1:1相互作用之固有結合親和力。分子X對其搭配物Y之親和力一般可由解離常數(K_d)表示。親和力可藉由該技術已知的常用方法

測定，包括文中所述彼等方法。下文描述測定結合親和力之特定闡示性實施例。

術語「抗原決定部位」指示可特定結合至抗體之蛋白決定子。抗原決定部位通常係由諸如胺基酸或糖側鏈之分子之化學活性表面原子團組成且通常地，抗原決定部位具有特定的三維結構特性，以及特定的電荷特性。構形及非構形抗原決定部位之區別在於在變性溶劑存在下與前者而非後者的結合無法進行。較佳地，根據本發明之抗體特定結合至原始而非變性 IL33R。本發明之 IL33R 抗體結合至 IL33R 上之抗體 Mab ra170 所結合之同一抗原決定部位。本發明之 IL33R 抗體之抗原決定部位結合特性可採用該技藝悉知之技術確定。IL33R 抗體係由活體外交聯阻斷結合檢定測定以確定試驗抗體阻礙抗體 Mab ra170 結合至 IL33R 之能力。假若試驗抗體之至少 15% 由抗體 Mab ra170 置換，則該抗原決定部位近似臨近。

本文所用「可變域」(輕鏈可變域(V_L), 重鏈可變域(V_H))指示直接涉及抗體結合至抗原之各輕與重鏈域對。該等可變輕及重鏈域具有相同的一般結構且各域包含其序列廣泛保守，由 3 個「超變區」(或補體決定區, CDR)連接之 4 個架構(FR)區。該等架構區採用 β -折疊構形及該等 CDR 可形成連接該 β -折疊結構之環。各鏈中之 CDR 係藉由該等架構區以三維結構固定且與其他鏈之 CDR 共同形成抗原結合部位。該等抗體重及輕鏈 CDR3 區在根據本發明之抗體之結合特異性/親和力上發揮極其重要的作用且因此提供

本發明之另一目標。

術語「抗體之抗原結合部」用於本文中時係指負責抗原結合之抗體之胺基酸殘基。抗體之抗原結合部包括源自「補體決定區」或「CDR」之胺基酸殘基。「架構」或「FR」區為如本文所界定之非超變區殘基之彼等可變域區。因此，抗體之該等輕及重鏈可變域包括自N-至C-端之域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。尤其地，重鏈之CDR3為主要導致抗原結合且界定抗體特性之區。CDR及FR區係根據Kabat, 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991)之標準定義判定及/或「超變環」之彼等殘基。

用於本申請案中之術語「胺基酸」指天然生成之羧基 α -胺基酸之群，包括丙胺酸(三個字母代碼：ala，一個字母代碼：A)、精胺酸(arg, R)、天冬醯胺(asn, N)、天冬胺酸(asp, D)、半胱胺酸(cys, C)、穀胺醯胺(gln, Q)、麩胺酸(glu, E)、甘胺酸(gly, G)、組胺酸(his, H)、異白胺酸(ile, I)、白胺酸(leu, L)、離胺酸(lys, K)、甲硫胺酸(met, M)、苯丙胺酸(phe, F)、脯胺酸(pro, P)、絲胺酸(ser, S)、蘇胺酸(thr, T)、色胺酸(trp, W)、酪胺酸(tyr, Y)及纈胺酸(val, V)。

如本文所用，術語「核酸」或「核酸分子」包括DNA分子及RNA分子。核酸分子可為單股或雙股(然較佳雙股)DNA。核酸當與另一核酸呈功能性關係時為「可以操

作方式連結」。例如，若表現為參與多肽分泌之前蛋白質，則前序列或分泌引導序列之DNA可以操作方式連結至多肽DNA；若影響序列轉錄，則啟動子或增強子可以操作方式連結至編碼序列；或若定位利於轉譯，則核糖體結合部位可以操作方式連結至編碼序列。一般而言，「可以操作方式連結」意指連結之DNA序列係共線性，及就分泌引導序列而言，係鄰接的且呈閱讀框架形式。然而，增強子不一定係鄰接的。連結係藉由有利限制部位的接合實現。若不存有該等部位，則根據習知操作使用合成寡核苷酸銜接子或連接子。如本文所用，術語「細胞」、「細胞系」及「細胞培養物」可互換使用且所有該等名稱均包括子代。因此，術語「轉型體」及「轉型細胞」包括初級主體細胞及由此獲得的培養物而不考慮轉移次數。亦應明瞭所有子代之DNA含量不一定一致，歸因於有意或非有意的突變。包括具有一如在最初轉型細胞中所篩選之該功能或生物活性之變體子代。

抗體之「Fc部」並不直接涉及抗體與抗原之結合，然顯示不同效應子功能。「抗體之Fc部」為擅長者熟知之術語且基於抗體之木瓜蛋白酶切割界定。根據其重鏈之恆定區之胺基酸序列，抗體或免疫球蛋白分類為：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，及其中幾個可進一步分為亞類別(同型物)：例如，IgG1、IgG2、IgG3、及IgG4、IgA1及IgA2。根據重鏈恆定區，分別將不同類別之免疫球蛋白稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。抗體之Fc部直接涉及基於補體活化、C1q結

合及Fc受體結合之ADCC(抗體依賴性細胞介導之細胞毒性)及CDC(補體依賴性細胞毒性)。補體活化(CDC)係藉由補體因子C1q結合至大多數IgG抗體亞類別之Fc部而引發。儘管抗體對補體系統的影響係取決於特定的條件，然與C1q之結合係Fc部中所界定之結合部位引起。該等結合部位已為當前技術已知且由例如Boackle, R.J., 等人, Nature 282(1979)742-743 ; Lukas, T.J. 等人, J. Immunol. 127(1981)2555-2560 ; Brunhouse, R. 與 Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16(1979)907-917 ; Burton, D.R. 等人, Nature 288 (1980)338-344 ; Thommesen, J.E. 等人, Mol. Immunol. 37(2000)995-1004 ; Idusogie, E.E. 等人, J. Immunol. 164 (2000)4178-4184 ; Hezareh, M., 等人, J. Virology 75 (2001)12161-12168 ; Morgan, A., 等人, Immunology 86 (1995)319-324 ; EP 0 307 434描述。該等結合部位為例如L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331及P329(根據Kabat之EU索引編號, Kabat, E.A., 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991))。亞類別IgG1、IgG2及IgG3之抗體通常顯示補體活化及C1q結合，而IgG4既不活化補體系統亦不結合C1q。

根據本發明之抗體包括源自人類之Fc部，其為亞類別IgG1或IgG4之人類抗體之Fc部。對於根據本發明之抗體之Fc部，較佳不可偵測到如下文界定之C1q結合。

本發明因此包括根據本發明之抗體，特徵在於該抗體結合IL33R，包含源自人類之Fc部，且無法結合人類補體因子C1q及因此避免CDC效應子作用。

較佳地，根據本發明之抗體係關於人類IgG1或IgG2亞類別之Fc γ 受體結合，具有L234、L235及/或D265突變，及/或包含PVA236突變。以L234A、L235A、L235E及/或PVA236突變為較佳(PVA236意指IgG1之胺基酸位置233至236之胺基酸序列ELLG(以一字母胺基酸代碼表示)或IgG4之EFLG由PVA替換)。本發明因此提供根據本發明之抗體，其特徵在於該抗體為人類亞類別IgG1之抗體，包含L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331及/或P329中至少一處突變。於一實施例中，該抗體為人類抗體。於另一實施例中，該抗體為人源化抗體。於一實施例中，本發明提供一根據本發明之抗體，其包含源自人類之Fc部，且其特徵在於該抗體為人類亞類別IgG1之抗體，包含L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331中之至少一處突變及其中該抗體在BIA核試驗中係以小於 10^{-8} M之 K_D 值結合至IL33R。於另一實施例中， K_D 範圍為 10^{-11} 至 10^{-9} M。

C1q結合可根據Idusogie, E.E., 等人, J. Immunol. 164 (2000)4178-4184測定。不存有根據本發明之C1q結合之特徵在於假若在其中ELISA板係經不同濃度之抗體塗覆之試驗中，則添加人類C1q。C1q結合係藉由針對人類C1q之抗體偵測，接著進行與過氧化物酶基質ABTS®(2,2'-噁嗪基-

二-[3-乙基苯并噻唑啉磺酸酯])之過氧化物酶標記之共軛物偵測。若測試抗體在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下之405 nm光密度(OD)低於0.05，則未發現根據本發明之C1q結合。

根據本發明之抗體之較佳特徵在於恆定鏈係人類來源。該等恆定鏈為現有技術所熟知且例如由Kabat(Kabat, E.A., 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991); 及Johnson, G.,與Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28(2000)214-218)描述。例如，有效人類重鏈恆定區包括SEQ ID NO:10、11或29。例如，有效人類輕鏈恆定區包括SEQ ID NO:12或34之 κ -輕鏈恆定區之胺基酸序列。

本發明之另一實施例為編碼根據本發明之抗體之重及輕鏈之核酸。

本發明包括一種用於治療需治療之患者之方法，特徵在於對該患者投與治療有效量之根據本發明之抗體。本發明包括一種以根據本發明之抗體於治療之用途。本發明包括一種以根據本發明之抗體於製造特定言之預防及治療炎症性疾病之藥物之用途。本發明包括一種以根據本發明之抗體於治療炎症性疾病，較佳治療類風濕關節炎、潰瘍性結腸炎及哮喘之用途。

此外，根據本發明之抗體包括具有「保守序列修飾」之該等抗體(變體抗體)，核苷酸及胺基酸序列修飾不會影響或改變根據本發明之抗體之上述特徵。可藉由諸如定點誘

變及PCR-介導誘變之該技藝悉知之標準技術導入修飾。保守胺基酸取代包括其中胺基酸殘基係由具有類似側鏈之胺基酸殘基置換之取代。具有類似側鏈之胺基酸殘基之家族已於該技藝中界定。該等家族包括具有鹼性側鏈(例如，離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈(例如，天冬胺酸、麩胺酸)、不帶電荷之極性側鏈(例如，甘胺酸、天冬醯胺、麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、色胺酸)、非極性側鏈(例如，丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯并胺酸、甲硫胺酸)、 β -支化側鏈(例如，蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及芳族側鏈(例如，酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)之胺基酸。因此，人類抗IL33R抗體中之預測非必需胺基酸殘基可較佳由同一側鏈家族之另一胺基酸殘基置換。因此本文中「變體」抗IL33R抗體係指藉由在親本抗體之一或多個可變區中之至多10個(較佳約2至約5個)之加成、缺失及/或取代而使胺基酸序列不同於「親本」抗IL33R抗體胺基酸序列之分子。胺基酸取代可根據如 Riechmann, L., 等人, Nature 332 (1988)323-327及 Queen, C., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(1989)10029-10033所述之基於分子模型化之誘變實現。

本發明之另一實施例為一種產製不結合Fc γ 受體及/或C1q之抗IL33R之抗體之方法，特徵在於編碼結合至IL33R之人類IgG1型抗體之重鏈之核酸序列係經過改質，其改質方式使得該抗體不會結合C1q及/或Fc γ 受體，將該改質核

酸及編碼該抗體之輕鏈之核酸插入表現載體中，將該載體插入真核宿主細胞中，表現該編碼蛋白質且自宿主細胞或上清液回收。

序列之同一性或同源性於本文中界定為候選序列中胺基酸殘基與親本序列一致之百分比，若需要，在對準序列與導入間隙之後，以達到最大百分比序列同一性。抗體中N-端、C-端、或內部擴增、缺失或插入不應視為影響序列同一性或同源性。該變體保留結合人類IL33R之能力且較佳具有優於親本抗體之彼等特性。例如，該變體可減少處理期間之副反應。

「親本」抗體包括抗體ra170之CDR區且較佳用於製造變體。較佳地，該親本抗體具有人類架構區，及若存在，則具有人類抗體恆定區或人類抗體恆定域。例如，該親本抗體可為人源化或人類抗體。

根據本發明之抗體較佳係藉由重組方式產製。該等方法係現有技術中悉知者，且包括在原核及真核細胞中表現蛋白質，隨後分離抗體多肽，並通常純化達到醫藥可接受純度。進行蛋白質表現時，取編碼輕鏈及重鏈或其片段之核酸藉由標準方法插入表現載體中。在諸如CHO細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、HEK293細胞、COS細胞、酵母或大腸桿菌細胞之適宜原核或真核宿主細胞中進行表現，自該等細胞(自上清液或在細胞裂解之後)回收該抗體。抗體之重組製法係當前技藝中習知且例如述於評論文獻Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17(1999)183-202; Geisse, S.,等

人, *Protein Expr. Purif.* 8(1996)271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16(2000)151-160; Werner, R.G., *Drug Res.* 48(1998)870-880中。該等抗體可存在於全細胞中, 存在於細胞裂解物中, 或以部分純化或實質純形式存在。藉由包括管柱層析法及該技藝熟知之其他方法之標準技術進行純化以除去其他細胞組分或其他污染物, 例如, 其他細胞核酸或蛋白質。參見 Ausubel, F., 等人編輯, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York(1987)。例如, Barnes, L.M., 等人, *Cytotechnology* 32(2000)109-123; Barnes, L.M., 等人, *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270描述於NS0細胞中之表現。例如, Durocher, Y., 等人, *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9描述瞬時表現。Orlandi, R., 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(1989)3833-3837; Carter, P., 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(1992)4285-4289; Norderhaug, L., 等人, *J. Immunol. Methods* 204(1997)77-87描述可變域之選殖。Schlaeger, E.-J.與 Christensen, K., *Cytotechnology* 30 (1999)71-83, 及 Schlaeger, E.-J., *J. Immunol. Methods* 194 (1996)191-199描述一較佳瞬時表現系統(HEK 293)。單株抗體宜藉由諸如例如蛋白A-瓊脂糖凝膠、羥磷灰石色譜法、凝膠電泳、透析或親和色譜之習知免疫球蛋白純化程式自培養基分離出。編碼該等單株抗體之DNA與RNA極易分離並採用習知程式序列化。融合瘤細胞可作為該DNA與RNA之來源。分離後, 可將該DNA插入表現載體中, 然後

轉染於無法以其他方式產製免疫球蛋白之諸如HEK 293細胞、CHO細胞或骨髓瘤細胞之宿主細胞中，以在該等宿主細胞中合成重組單株抗體。

人類IL33R抗體之胺基酸序列變體係藉由將適宜核苷酸變化導入編碼抗體之DNA中，或藉由肽合成產製。然而，例如，如上所述，僅在極有限的範圍內進行該等修飾。例如，該等修飾不會改變諸如IgG同型物及抗原決定部位結合之上述抗體特徵，但可改良重組產率、蛋白質穩定性，或有利於純化。未涉及抗IL33R抗體之適宜構形之維持之任何半胱胺酸殘基亦可一般而言經絲胺酸取代，以改良分子之氧化穩定性並防止異常交聯。相反地，可將半胱胺酸鍵加入抗體來改良其穩定性(特定言之，其中該抗體為諸如Fv片段之抗體片段)。該抗體之另一種胺基酸變體改變該抗體之最初醣基化模式。「改變」意指移除該抗體中所見之一或多個碳水化合物部分及/或增加該抗體中不存在之一或多個醣基化部位。抗體之醣基化通常係N-連結。N-連結係指將碳水化合物部分附接至天冬醯胺殘基之側鏈。X為除脯胺酸外之任何胺基酸之三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸及天冬醯胺-X-蘇胺酸為將該碳水化合物部分以酶方式附接至該天冬醯胺側鏈之識別序列。因此，多肽中任一三肽序列產生可能的醣基化部位。將醣基化部位加入抗體亦藉由改變胺基酸序列以使其包含上述三肽序列中之一或多者(就N-連結醣基化部位而言)而實現。

編碼抗IL33R抗體之胺基酸序列變體之核酸分子製備係

藉由該技術所知之多種方法。該等方法包括(但不限於)自天然來源(就天然胺基酸序列變體而言)分離或藉由寡核苷酸介導(或定點)誘變、PCR誘變、及人源化抗IL33R抗體之初期產製之變體或非變體型之盒式誘變製備。

抗體之另一種共價修飾包括以美國專利案4,640,835；4,496,689；4,301,144；4,670,417；4,791,192；4,179,337中所述方式將抗體連結至多種非蛋白質聚合物中之一者，例如聚乙二醇、聚丙二醇或聚環氧烷。

根據本發明之該等重及輕鏈可變域係與啟動子之序列、轉譯起始、恆定區、3'未轉譯區、聚腺苷酸化、及轉錄終止結合以形成表現載體構築體。可將該等重及輕鏈表現構築體併入單載體中，共轉染、連續轉染、或分開轉染於宿主細胞內，然後融合形成表現兩種鏈之單宿主細胞。

於另一態樣中，本發明提供一種組合物，例如，醫藥組合物，其包含本發明之一單株抗體或組合或其抗原結合部分，並調配有醫藥可接受載劑。如本文所用，「醫藥可接受載劑」包括生理可相容之任何及所有溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌劑、等滲及吸附/回吸延遲劑及類似物。較佳地，該載劑適於注射或輸注。本發明之組合物可藉由該技術悉知之多種方法投與。如擅長者所了解，投與途徑及/或模式取決於所期結果。醫藥可接受載劑包括無菌水溶液或分散液及製備無菌可注射溶液或分散液之無菌粉劑。該技術悉知以該等介質及試劑於醫藥活性物質之用途。除水之外，該載劑可為(例如)等滲緩衝鹽溶液。

不管所選擇之投與途徑，本發明之該等化合物，其可以適宜之水合形式使用，及/或本發明之該等醫藥組合物係藉由該技術擅長者悉知之習知方法調配成醫藥可接受劑型。本發明之該等醫藥組合物中活性成分之實際劑量可改變以獲得有效量活性成分以實現針對特定患者之預期治療反應、組合物及投與模式，而對該患者而言無毒性(有效量)。選擇之劑量取決於多種藥物動力學因素，包括所使用之本發明特定組合物或其酯、鹽或醃胺之活性，投與途徑，投與時間，所用特定化合物、與所用特定組合物組合之其他藥物、化合物及/或材料之排泄速率，治療患者的年齡、性別、體重、病況、平時健康狀況及先前病史，及醫學界熟知之類似因素。

本發明包括一種以根據本發明之抗體於治療罹患類風濕關節炎、潰瘍性結腸炎或哮喘之患者之用途。

本發明之另一實施例為一種以抗IL33R抗體(較佳根據本發明之抗體)於治療罹患類風濕關節炎之患者之用途，該患者對TNF拮抗劑、抗CD20抗體、CTLA4Ig或抗IL6抗體之治療反應一般或無反應。本發明之另一實施例為一種以抗IL33R抗體(較佳根據本發明之抗體)於製造用於治療罹患類風濕關節炎、潰瘍性結膜炎或哮喘之患者之藥物之用途。

本發明進一步提供一種製造包含有效量之根據本發明之抗體與醫藥可接受載劑之醫藥組合物之方法及以根據本發明之該抗體於該方法之用途。本發明進一步提供一種以有

效量之根據本發明之抗體於製造用於治療罹患類風濕關節炎、潰瘍性結膜炎或哮喘之患者之較佳連同醫藥可接受載劑之藥劑之用途。本發明亦提供一種以有效量之根據本發明之抗體於製造用於治療罹患類風濕關節炎、潰瘍性結腸炎或哮喘之患者之較佳連同醫藥可接受載劑之藥劑之用途。

序列

- SEQ ID NO: 1 重鏈 CDR3, Mab ra170
- SEQ ID NO: 2 重鏈 CDR2, Mab ra170
- SEQ ID NO: 3 重鏈 CDR1, Mab ra170
- SEQ ID NO: 4 輕鏈 CDR3, Mab ra170
- SEQ ID NO: 5 輕鏈 CDR2, Mab ra170
- SEQ ID NO: 6 輕鏈 CDR1, Mab ra170
- SEQ ID NO: 7 重鏈可變域, Mab ra170
- SEQ ID NO: 8 輕鏈可變域, Mab ra170
- SEQ ID NO: 9 具有 L234A 及 L235A 突變之人類 γ 1 重鏈
恆定區 (Caucasian Allotype)
- SEQ ID NO: 10 人類 γ 1 重鏈恆定區 (Caucasian Allotype)
- SEQ ID NO: 11 人類 γ 1 重鏈恆定區 (Afroamerican
Allotype)
- SEQ ID NO: 12 人類 κ 輕鏈恆定區
- SEQ ID NO: 13 置換之 ST2 序列片段 1, mut1
- SEQ ID NO: 14 置換之 ST2 序列片段 2, mut1
- SEQ ID NO: 15 置換之 ST2 序列片段 3, mut1

- SEQ ID NO: 16 置換之ST2序列片段4，mut1
- SEQ ID NO: 17 IL-1R片段1 mut1，置換ST2片段SEQ13
- SEQ ID NO: 18 IL-1R片段2 mut2，置換ST2片段SEQ14
- SEQ ID NO: 19 IL-1R片段3 mut3，置換ST2片段SEQ15
- SEQ ID NO: 20 IL-1R片段4 mut4，置換ST2片段SEQ16
- SEQ ID NO: 21 重鏈可變域，人源化ra170 11.12(VH11)
- SEQ ID NO: 22 重鏈CDR1，Mab ra170 11.12
- SEQ ID NO: 23 重鏈CDR2，Mab ra170 11.12
- SEQ ID NO: 24 重鏈CDR3，Mab ra170 11.12
- SEQ ID NO: 25 重鏈可變域，人源化ra170 10.12(VH10)
- SEQ ID NO: 26 重鏈CDR1，Mab ra170 10.12
- SEQ ID NO: 27 重鏈CDR2，Mab ra170 10.12
- SEQ ID NO: 28 重鏈CDR3，Mab ra170 10.12
- SEQ ID NO: 29 人類IgG4 SPLE主鏈(具有L235E及S228P突變之人類 γ 4重鏈恆定域)
- SEQ ID NO: 30 輕鏈可變域，人源化ra170(11.12與10.12)
- SEQ ID NO: 31 輕鏈CDR1，Mab ra170 10.12與11.12
- SEQ ID NO: 32 輕鏈CDR2，Mab ra170 10.12與11.12
- SEQ ID NO: 33 輕鏈CDR3，Mab ra170 10.12與11.12
- SEQ ID NO: 34 人類 κ 主鏈

實例

實例1

免疫

免疫使用獲自 Charles River Laboratories International, Inc.之野生型新西蘭白(NZW)兔(西班牙野兔(*Oryctolagus cuniculus*))。根據機構動物護理與使用委員會指導方針(Institutional Animal Care and Use committee guidelines)及實驗動物護理評估和認可委員會(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care)(Germany, Europe)對其進行安置並飼養。

將融合至人類IgG之Fc區之人類IL-33R之純化NS0源性分泌可溶型以1 mg/ml之濃度溶於NaCl-組胺酸緩衝液(pH 6.1)中且與Freund氏完全佐劑(CFA)混合(1:1)直至產生穩定乳液。使3隻兔皮內(i.d.)注射2 ml乳液，接著每一週陸續接受一次1 ml肌肉(i.m.)及一次1 ml皮下(s.c.)注射。兩週後，進行1 ml之i.m.注射，接著，每隔4週再進行兩次1 ml s.c.注射。在第三、第四、第五及第六次注射後的4-6日收集各動物之10 ml周邊全血樣本並進行FACS之單細胞分選。同時另收集各動物之0.5 ml血清並用於特徵化IL33R特異性抗體反應。

抗體反應

免疫之抗體反應係藉由使用IL33R特異性ELISA連續稀釋血清量測，其中於37°C下，使96-孔MaxiSorp微量滴定盤塗以0.3 µg/ml rhIL33R蛋白之碳酸鹽緩衝液1 h。此後，於4°C下，使該等孔藉由補充1% Crotein C(Roche Diagnostics GmbH, DE)之PBS阻斷過夜。為偵測，以1:16000稀釋使用連結至辣根過氧化物酶之山羊抗兔

IgG(Jackson實驗室)。為目測，使用BM藍POD基質、沉澱劑四甲基聯苯胺(TMB)、獲自Roche Diagnostics GmbH, DE之即用型溶液。以1N HCl停止反應且利用Tecan Infinite以450/690 nm量測。

抗體選擇

於4°C下，使無菌細胞培養6-孔板塗以2 µg/ml IL33R蛋白之碳酸鹽緩衝液(0.1 M碳酸氫鈉，34 mM碳酸氫二鈉，H 9.55)過夜。使用之前，以無菌PBS洗滌該等板3次。在對哺乳動物淋巴細胞進行密度離心(Cedarlane實驗室)以分離兔PBMC之前，利用1×PBS稀釋含EDTA兔全血兩倍。在藉由抗體染色之前，將PBMC洗滌2次。

EL-4 B5培養基

補充10% FCS(Hyclone, Logan, UT, USA)、2 mM穀胺醯胺、1%青黴素/鏈黴素溶液、2 mM丙酮酸鈉、10 mM HEPES及0.05 mM β-巰基乙醇之RPMI 1640。

巨噬細胞/單核細胞之清除

無菌6-孔板(細胞培養級)係用以經由非特異性黏著清除巨噬細胞及單核細胞。各孔係最大程度地填有4 ml培養基及高達 6×10^6 周邊血液單核細胞(源自免疫兔)且使之在培養箱中於37°C下結合1 h。取上清液中該等細胞之50%用於淘選步驟；其餘50%細胞滯留於冰上直至進行免疫螢光染色。

B細胞於IL33R蛋白上之富集

使塗覆IL33R蛋白之6-孔組織培養板經高達 6×10^6 個細胞/

4 ml培養基接種且使其在培養箱中於37°C下結合1 h。在IL33R蛋白上富集之後，以1×PBS小心洗滌該等孔1至2次移去非黏附細胞。殘餘黏性細胞係藉由胰蛋白酶分離，在培養箱中於37°C下進行10 min然後利用培養基洗滌2次。使細胞滯留於冰上直至進行免疫螢光染色。

免疫螢光染色法及流式細胞儀

用於單細胞分選之抗兔IgG FITC係獲自AbD Serotec (STAR121F, Düsseldorf, Germany)。為表面染色，使來自清除及淘選步驟之細胞在暗處於4°C冷室中與在PBS中優化稀釋之抗兔IgG FITC抗體一起滾動培養30 min。離心之後，吸氣移去上清液。使PBMC經2次離心循環且利用冰冷PBS洗滌。最終，使PBMC再懸浮於冰冷PBS中並立刻進行FACS分析。在FACS分析之前添加濃度5 µg/ml之碘化丙啶 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)以區別死及活細胞。配備電腦及FACSDiva™軟體 (BD Biosciences, USA)之Becton Dickinson FACS Aria™係用以收集並分析數據。

B細胞培養

B細胞培養物製備方法類似於Zubler, 等人, Eur. J. Immunol. 14(1984)357-363, Zubler, 等人, J. Exp. Med. 160(1984)1170-1183所述之方法。簡言之，在37°C下，於培養箱內之5% CO₂氣氛中，使單分選B細胞於含有210 µl/孔培養基之96-孔板中與Pansorbin®細胞 (1:20000) (Calbiochem(Merck), Darmstadt, Deutschland)、5%兔胸腺細胞上清液(委託號 20080910, production Irmgard Thorey)

及經 γ -輻射之EL-4-B5鼠科胸腺瘤細胞(2×10^4 /孔)一起培養7日。移去B細胞培養上清液以進行篩選，然後，立刻收集該等細胞以回收可變區基因或在 -80°C 下冷凍於 $100 \mu\text{l}$ RLT緩衝液(Qiagen, Hilden, Germany)中。

核糖核酸(RNA)之分離

首先，離心粒化需分離出RNA之該等細胞。藉由添加含 $10 \mu\text{l/ml}$ β -巰基乙醇之 $100 \mu\text{l}$ RLT-緩衝液胞溶細胞丸粒。藉由移液管多次混合使該等細胞再懸浮並轉移至多孔板。立刻以 $200 \times g$ 離心該板繼而於 -20°C 下冷凍。根據製造商使用說明利用NucleoSpin® 96 RNA套組(Macherey & Nagel)分離RNA。

反轉錄聚合酶鏈反應

根據製造商使用說明利用SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix(Invitrogen)進行反轉錄。

聚合酶鏈反應

根據製造商使用說明利用AccuPrime Pfx SuperMix(Invitrogen)進行聚合酶鏈反應。於不同反應中擴增輕鏈及重鏈可變區。使用具有 25 bp 重疊的PCR-引物來標靶抗體表現載體。藉由NucleoSpin® 96 Extract II套組(Macherey & Nagel)純化PCR-產物。

序列化及SLIC選殖

使PCR產物序列化以確定重及輕鏈之可變區之DNA-序列。藉由所謂的SLIC-選殖法將該等PCR產物選殖於表現載體中，該方法由Haun, R.S., 等人, BioTechniques 13

(1992)515-518 頁及 Li, M.Z., 等人, Nature Methods 4 (2007)251-256 頁所述。用於抗體表現之質體係藉由限制酶消化線性化。線性化質體係藉由製備型瓊脂糖電泳純化且自凝膠萃取(Qiaquick Gel Extraction Kit/Qiagen)。將純化質體添加於使用用於選殖 PCR 產物之重疊引物(間距 25 bp)之 PCR-實驗。在 dNTP 不存在下,使載體與插入物均經 T4 DNA 聚合酶(Roche Applied Sciences)處理形成突出物,然後利用 RecA(New England Biolabs)蛋白及 ATP 培養載體與插入物以促進重組。將產物轉化於大腸桿菌中。分離輕鏈及重鏈之質體 DNA 且組合各對以瞬時轉染。

HEK293 細胞中抗體表現之瞬時轉染

使 HEK293 細胞(Invitrogen)於 F17-培養基(Gibco)中生長至 1×10^6 個細胞/ml。使 2×10^6 個 HEK293 細胞經懸浮於 293-free(Novagen)與 OptiMEM®(Gibco)中之 $1 \mu\text{g}$ HC+LC 質體轉染。7 日後,收集並分析培養上清液。

基於人類 UT-7 細胞中 IL33 誘導之 NF κ B 活化之抑制,根據本發明之抗體顯示高品質。較佳地,根據本發明之抗體顯示 0.05 nM 或更低,及更佳 0.03 nM 或更低之 IC₅₀ 值。此外,根據本發明之抗體於嗜酸性粒細胞檢定、肥大細胞檢定、嗜鹼細胞檢定(KU812)及 TH₂ 檢定之檢定組合中顯示傑出特性。觀察到顯示 0.05 nM 或更低,及更佳 0.03 nM 或更低之 IC₅₀ 值之於人類 UT-7 細胞中 IL33 誘導之 NF κ B 活化之抑制之抗體於類風濕關節炎、潰瘍性結腸炎及哮喘治療中尤其具有有用特性。進一步較佳者為在嗜酸性粒細胞檢定、

肥大細胞檢定、Th2檢定、嗜鹼細胞檢定(IL-5)中顯示5 nM或更低之IC₅₀值之抗體。

實例2

IL33結合至ST2之抑制(ELISA)

於RT下，在384孔MaxiSorp™微量滴定板(Sigma-Aldrich, Nunc. DE, Cat編號464718)上進行試驗。每次培養步驟之後，以PBST(經磷酸鹽緩衝之鹽溶液吐溫Tween®-20)洗滌該等板3次。開始時，使該等板塗以1 µg/ml山羊抗人類IgG Fc片段(Jackson Imm. Res., US, Cat編號109-006-170)至少2小時(h)。此後，使該等孔藉由補充0.1%吐溫®-20與2% BSA(Roche Diagnostics GmbH, DE)之PBS阻斷1 h。捕捉60 ng/ml之重組人類ST2/IL-1R4 Fc嵌合體(R&D Systems, UK, Cat編號523-ST)或重組食蟹猴ST2 Fc嵌合體1 h。使純化抗體稀釋液或自融合瘤/B-細胞於含有0.5% BSA與0.05%吐溫®-20之PBS中之上清液與受體蛋白一起培養1 h。另一小時添加生物素化人類IL33(PeproTech, US, Cat編號500-P261)以得到複合物。IL33係根據製造商協定以磺基-NHS-LC-生物素(Thermo Scientific Pierce, US, Cat編號21327)生物素化且使用Zeba™脫鹽旋轉柱(Thermo Scientific Pierce, US, Cat編號89889)純化。藉由經1:4000稀釋之鏈黴抗生物素蛋白HRP(Roche Diagnostics GmbH, DE, Cat編號11089153001)偵測到生物素化IL33與該複合物之結合。1 h後，以PBST洗滌該等板6次繼而於RT下藉由新製BM藍POD基質溶液(BM藍：3,3'-5,5'-四甲基聯苯胺，

Roche Diagnostics GmbH, DE, Cat編號11484281001)顯影12分鐘。在370 nm下測定吸光度。在未添加ST2/IL-1R4蛋白質下界定陰性對照及在存在所有組份然不存在抗體下界定陽性對照。

抗體ra170顯示抑制結合至人類ST2之0.32 nM之IC₅₀值及針對食蟹猴ST2之0.13 nM。

實例3

抗hST2抗體對人類ST2 ECD(His-Avitag單體)之親和力之測定

儀器：BIACORE® T100

晶片：CM4(GE Healthcare BR-1005-34)

偶聯：胺偶聯

緩衝液：10 mM含0.05%吐溫20之經磷酸鹽緩衝之鹽溶液(PBST)，pH 7.4，37°C

就親和力測定而言，使10 µg/ml山羊抗人類Fcγ抗體(Jackson Imm. Res., US, Cat編號115-005-098)偶合至晶片表面以捕捉結合至ST2之抗體。添加於溶液中濃度不同之具有6His Avitag™(Avidity, LLC, US)之單體人類ST2 ECD。締合測量係藉由在37°C下，注射ST2 ECD並接觸120秒(單循環-動力學)；解離測量係藉由在37°C下，以緩衝液洗滌晶片表面1800秒。為計算表觀K_D及其他動力學參數，使用朗繆爾(Langmuir)1:1模型。結果(兩測量值之平均值)顯示於表1中。

表 1：於 37°C，pH 7.4 下藉由在 10 mM PBST 中之
SPR(BIACORE T100)測得之親和力數據之平均值

抗體	表觀 K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (min)
ra170 IgG4 SPLE	2.7×10^{-12}	4.6×10^6	1.3×10^{-5}	881
ra170 10.12	1.1×10^{-09}	4.9×10^6	5.1×10^{-3}	2
ra170 11.12	1.4×10^{-10}	3.1×10^6	4.3×10^{-4}	27

實例 4

人類 UT-7 細胞中 IL33 誘導之 NF κ B 活化之抑制

a) 試劑：

UT-7 細胞系 (DSMZ # ACC 137)

培養基：RPMI1640(Gibco # 10509-24)，補充 2 mM L-穀
胺醯胺 (Gibco #25030)、1.0 mM 丙酮酸鈉 (Gibco #
11360-039)、0.1 mM NEAA(Gibco #11140-035)、10%
FCS(Gibco # 10509-24)、10 單位/mL rhGM-CSF(Roche #
11115138)

重組人類 IL-33(PeproTech #200-33)

PathScan® Phospho-NF κ B p65(Ser536)夾層 ELISA 抗體對
(細胞訊號傳導 #7834)

PathScan® 夾層 ELISA 溶胞緩衝液 (細胞訊號傳導 # 7018)
rhTNF α (Roche Applied Sci #11371843)。

b) 程式：

使 UT-7 細胞於 37°C 下在 7% CO₂/95% 空氣混合物中於補
充 2 mM L-穀胺醯胺、1.0 mM 丙酮酸鈉、0.1 mM NEAA、
10% FCS 及 10 單位/mL GM-CSF 之 RPMI 1640 中生長。細胞

達到 $\sim 1 \times 10^6$ 個細胞/ml之密度時傳代且稀釋至 2×10^5 個細胞/ml之密度。傳代2日後，使細胞用於NFkB試驗。爲了確定IL33之有效濃度，將UT-7細胞接種於96-孔聚丙稀細胞培養板($8.0E+05$ 個細胞/孔，總體積220 μ l生長培養基)中且於37°C下，經不同濃度之重組人類IL-33(0.1-10 ng/ml)刺激15 min。然後，將板離心，利用冰冷PBS洗滌繼而再離心。移去PBS然後每孔均添加60 μ l PathScan®夾層ELISA溶胞緩衝液。以溶胞緩衝液冰上培養細胞15 min。離心清除溶胞產物並收集上清液。將該等溶胞產物於-80°C下儲存直至使用PathScan® Phospho-NF-kB p65 ELISA確定NFkB活化。根據製造商使用說明進行ELISA。數據顯示NFkB活化之刺激於1 ng/ml IL33下最佳。對於抗體試驗，將UT7細胞接種於96-孔聚丙稀細胞培養板($8.0E+05$ 個細胞/孔)中且與在總體積220 μ l生長培養基中不同濃度之抗體(0.15 ng/ml-300 ng/ml之最終濃度)一起培養。使細胞在冰上與抗體一起培養1 h。隨後，於37°C下，以rhIL-33(1 ng/ml最終濃度)刺激細胞15 min。就對照組而言，在37°C下，使UT7細胞與TNF- α (30 ng/ml)培養15 min來確定UT7細胞之最大NFkB活化。如上述進行溶胞產物產製及NFkB分析。結果示於表2中。

表 2：人類 UT-7 細胞中 IL-33 誘導之 NFkB 活化之抑制

抗體	NFkB IC ₅₀ [nM]
ra170(兔 IgG1)	0.025
ra170 10.12	0.28
ra170 11.12	0.04
Mab523 ¹	1.90
AF523(PAB, 山羊 IgG1) ¹	0.56
HB12(小鼠 IgG1) ¹	1.43
2A5 ²	66.22
FB9 ²	0.95

¹：可獲自 R&D Systems (<http://www.rndsystems.com>)

²：可獲自 MBL International Corporation，定單編號：
D065-3、D066-3、D067-3 及 ABIN130564

實例 5

選殖 ra170 之結合部位界定

為界定抗體結合部位，選殖並表現人類 IL-33 受體 ST2。ST2 係由 3 個域 D1、D2、D3 組成。產生其 D1D2 變體，然後，測試 ra170 之殘餘結合。Ra170 結合至 ST2 及截短型變體 D1D2。

與 ST2-變體之結合係在 25°C 使用 BIAcore® T100 儀器 (GE Healthcare) 藉由表面電漿共振 (SPR) 測量。對於分子相互作用之研究，確定 BIAcore® 系統。SPR-技藝係基於靠近鍍金生物感測器晶片表面之折射率測量值。折射率之變化指示因固定配體與以溶液注射之分析物間之相互作用引起

之表面質量變化。若分子結合表面上之固定配體，則質量增加，在解離情況下，則質量減小，反映複合物發生解離。SPR可連續即時監控配體/分析物結合及因此確定締合速率常數(k_a)、解離速率常數(k_d)及平衡常數(K_D)。注射單一濃度值可明確表明分析物之結合能力，然亦大概地表明結合值。

捕捉系統(捕捉ST2-His特異性Penta-His, Qiagen, Cat編號34660)之約8000共振單元(RU)之胺偶合係使用由GE Healthcare提供之胺偶合套組於pH 5.0下在CM5晶片上實施。

就分析而言，His-標記ST2-變體係藉由在30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 流率下注射300 nM溶液1 min進行捕捉。然後，在30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 流率下以100 nM濃度注射待測試之抗體2 min。監控解離相長達1 min繼而藉由自樣本溶液轉換至運行緩衝液而觸發。藉由在30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 流率下甘胺酸pH 2.0溶液洗滌30秒再生表面。

整體折射率差係藉由減去空白偶合表面獲得的反應進行校正。亦減去空白注射(=雙重參照)。

ST2變體係藉由相當於ST2野生型之根據本發明之抗體結合且因此得出結合部位位於D1D2域之結論。

實例6

抗IL-33R抗體針對不同ST2變體之結合之測定

於37°C下，使用BIAcore® A100儀器(GE Healthcare)，藉由表面電漿共振(SPR)測量根據本發明之抗體與不同

ST2-變體之結合。已完整建立一種BIAcore®系統用於研究分子相互作用。SPR-技藝係基於接近鍍金生物感測器晶片表面之折射率測量值。折射率之變化指示因固定配體與以溶液注射之分析物間之相互作用引起之表面質量變化。若分子結合表面上之固定配體，則質量增加，在解離情況下，則質量減小，反映複合物發生解離。SPR可連續即時監控配體/分析物結合及因此確定締合速率常數(k_a)、解離速率常數(k_d)及平衡常數(K_D)。

捕捉系統(捕捉mFc γ -特異性抗-小鼠Fc γ , Jackson Imm. Res., Cat.nr. JIR115-005-071及rbFc γ -特異性抗-兔Fc γ , Jackson Imm. Res., Cat.nr. JIR111-005-046)之約800個共振單位(RU)之胺偶合法係使用由GE Healthcare提供之胺偶合套組於pH 5.0下，在CM5晶片上進行。

分析時，在10 μ l/min流率下注射10 nM兔抗體及約30 nM小鼠抗體溶液2 min，捕捉不同抗體。然後，在30 μ l/min流率下，以150 nM最大濃度之連續稀釋液注射待測試之His標記ST2變體2.5 min。追蹤解離期長達10 min，並藉由自樣本溶液轉換至操作緩衝液而開始追蹤。使用儀器制定之流程，以甘胺酸pH 1.5溶液洗滌60秒，接著以甘胺酸pH 2.0洗滌60秒，來再生抗小鼠捕捉抗體之表面。以甘胺酸pH 1.7溶液洗滌60秒兩次，來再生抗兔捕捉抗體之表面。

整體折射率差係藉由減去空白偶合表面獲得的反應進行校正。亦減去空白注射(=雙重參照)。

若 ST2 變體係藉由相當於 ST2 野生型之研究抗體結合，則該變化不會影響該抗體與 ST2 之結合且因此得出結合部位位於突變 ST2 區外部之結論。

若 ST2 變體未藉由相當於 ST2 野生型之研究抗體結合，則該變化影響該抗體與 ST2 之結合且因此得出結合部位位於突變 ST2 區內之結論。

抗體之結合特性示於表 3 中。Ra170 結合受 Mut2 及 Mut3 影響，指示其結合部位與突變序列延伸物重疊。Mab523 結合受 Mut2 及 Mut3 然亦及 Mut4 影響，指示結合區較寬。

表 3：抗 IL-33R 抗體對不同 ST2 變體之結合

抗體	結合			
	Mut1	Mut2	Mut3	Mut4
Ra170	+	-	-	+
MAB523	+	-	-	-

表 4：ST2 突變體

突變體	經置換之 ST2 序列片段	IL-1R 序列片段，置換 ST2 序列片段
Mut1	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:17
Mut2	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:18
Mut3	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:19
Mut4	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:20

實例 7

NK 試驗

IL33 經由活化不同白血球亦及 NK 細胞擴增 T_H1 及 T_H2 反應 (Smithgall, M.D., 等人, Int. Immunol. 20(2008)1019-

1030)。於以下試驗中，藉由共培養IL12與IL33誘發NK細胞分泌IFN- γ 及其抑制於定性抗IL33R抗體期間以讀取方式提供。

自健康血液分離出白血球(淋巴細胞)之後，使用陰性NK細胞分離套組(Miltenyi, #130-092-657)自PBMC純化NK細胞。平均純度>96%。

試劑

- 人類IL-12(Sigma, #I2276, 最終濃度[f.c.]=1 ng/ml)
- 人類IL-33(Peprotech, #200-33, 最終濃度=10 ng/ml)
- IFN- γ CBA flex set(BD, #558269)
- NK-細胞培養基：RPMI 1640(PAN, # P04-17500)，補充10% FCS(Invitrogen或PAA)、1%丙酮酸鈉(Gibco Invitrogen, #11360)及L-穀胺醯胺(Gibco Invitrogen, #25030-024)、以及0.1% β -巰基乙醇(Gibco Invitrogen, #31350-010)。

將 1×10^5 個NK細胞/孔接種於96孔平底板中，視需要經不同濃度之樣本或同型物對照抗體預處理且在37°C下培養1小時。然後藉由10 ng/ml IL-33及1 ng/ml IL-12刺激NK細胞並培養20小時。然後，收集上清液，離心，然後測試IFN- γ 產量。為量化IFN- γ ，使用CBA flex set平臺(BD™，使用FACS Canto II)。ra170之IC₅₀值確定為0.27 nM，ra170 10.12為1.3 nM，ra170 11.12為1.8 nM，PAB AF523為2.3 nM及Mab 523無抑制。

實例8

嗜酸性粒細胞活力試驗

為論述IL-33於延長嗜酸性粒細胞生存中之影響，使用剛分離之嗜酸性粒細胞建立基於Chow, J.Y.,等人, Cellular & Molecular Immunology 7 (2010) 26-34之試驗。由於人類嗜酸性粒細胞之活力取決於IL-33添加，因此，與不同濃度之抗人類IL-33R[ST2]mAbs一起預培養可抑制該效應。藉由Ficoll-Paque™ PLUS梯度離心(GE Healthcare, #17-1440-03)自全血分離出粒細胞。於紅血球裂解後，取沉降紅細胞/粒細胞丸粒以經由陰性嗜酸性粒細胞細胞分離套組(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, #130-092-010)純化嗜酸性粒細胞。

試劑：

- 人類IL-33 (20ng/ml)
- Cell Titer Glo[®]，螢光細胞活力試驗(Promega, #7571)
- 嗜酸性粒細胞細胞培養基：RPMI 1640，補充FCS、1%丙酮酸鈉、L-穀胺醯胺及0.1% β-巰基乙醇。

將 1×10^5 個嗜酸性粒細胞/孔轉移於96孔平底板中，然後添加含樣本抗體之培養基[5 μg/ml最終濃度]且於37°C下培養1小時。然後，以20 ng/ml最終濃度添加IL33且在人源化培養箱中於37°C下培養嗜酸性粒細胞。40小時後，測定嗜酸性粒細胞活力。發現ra170之IC₅₀值為1.3 nM。

實例9

原發性肥大細胞試驗

肥大細胞在藉由擴增先天性及自適應免疫反應之過敏性

反應之發展及維持中具重要性。肥大細胞係於組織中而非循環血液中。因此，為自血液獲得人類肥大細胞，在5-6週內，在人類幹細胞因子(SCF)、IL-3及IL-6存在下，使CD34⁺造血祖細胞分化為肥大細胞。以下方案係基於公開案 Saito, H. 等人, Nature Protocols 1 (2006), 2178-2183。

分離白血球(參見實例10)之後，使用CD34微珠套組(Miltenyi Biotec, #130-046-702)自PBMC純化CD34⁺造血祖細胞。平均產率為總計 $1-2 \times 10^5$ 個細胞/施體；通常獲得50% CD34⁺ CD117⁺細胞。

試劑及分化方案：

- Methocult® (Stem Cell Tech., # H4236)
- 胰島素-鐵傳遞蛋白-硒補充劑(Invitrogen, # 51300-044)
- BSA，牛血清白蛋白
- 人類SCF
- 人類IL3及IL6
- 鹼性肥大細胞培養基(bMC)：IMDM(Iscove氏改良之Dulbecco氏培養基)，補充0.1% β-巰基乙醇及1%青黴素/鏈黴素。

純化之後，將 1.5×10^5 個純化CD34⁺細胞再懸浮於補充IL-3、IL-6及SCF、BSA、Methocult®及胰島素-鐵傳遞蛋白-硒補充劑之bMC培養基中且接種於24-孔板之10-12個孔中並培養5至6週。

功能性肥大細胞試驗

擴增及分化階段之後，將肥大細胞用於功能性試驗中，分析抗-IL33R抗體之拮抗作用。

試劑及培養基

- 20 ng/ml人類IL-33
- 人類IL-5
- 人類IL-13
- 鹼性肥大細胞培養基。

將 10^5 個肥大細胞/孔接種於平底96孔板中。首先，於 37°C 下使肥大細胞經樣本或同型物對照抗體預處理1小時。為確定 IC_{50} ，使用不同濃度之抗體，通常以 $5\ \mu\text{g/ml}$ 最終濃度開始，以1:3稀釋。然後添加20 ng/ml IL-33繼而在 37°C 下培養細胞約40至48小時，然後量化 $\text{T}_\text{H}2$ 細胞激素(抑制)值。在指定培養時間後，將細胞懸浮液轉移於V-底板中及沉降($400\times\text{g}$ ，10 min，RT)。然後，將該上清液用以確定細胞激素值(IL-5及IL-13)。發現ra170之 IC_{50} 值高達0.4 nM(IL-13)及0.2(IL-5)。

實例 10

人類 Th2 試驗

藉由Ficoll Hypaque密度梯度自健康自願者分離出周邊血液單核細胞(PBMC)。以含有2 mM EDTA之PBS(pH 7.2)洗滌該等細胞之後，以含0.5% BSA及2 mM EDTA之PBS(pH 7.2)再次洗滌該等細胞。使用CD4+T細胞分離套組II(Miltenyi Biotec)及磁性分離自PBMC分離出初始CD4+T細胞。使用完全RPMI 1640(補充10% FCS、2-巰基乙醇、

L-穀胺醯胺、丙酮酸鈉、非必需胺基酸及青黴素/鏈黴素)洗滌所富集之T細胞3次，再懸浮及以 0.5×10^6 個細胞/ml塗佈於含有1:1比率之Dynabeads T-活化劑CD3/CD28 (Invitrogen)、10 ng/ml之IL-2、10 ng/ml之IL-4、5 μ g/ml之抗-IL-12(R&D System)及5 μ g/ml之抗-IFN γ (R&D System)之6孔平底板中，然後，於37°C下培養4日。使細胞分裂，然後，於同一培養條件下另維持4日。利用完全RPMI洗滌細胞2次然後以 1×10^6 個細胞/ml靜置於含2 ng/ml IL2之完全RPMI中3日。試驗前1日，使高結合力96-孔平底板(Costar)塗覆5 μ g/ml可溶性抗-CD3e(BD Bioscience)。於試驗當日，利用完全RPMI洗滌細胞2次，然後在無IL-2下再靜置4小時。利用PBS洗滌板3次。使 1×10^5 個細胞/孔塗覆補充1 μ g/ml抗-CD28(BD Bioscience)之完全RPMI中。隨後，利用抗-ST2 Ab或同型物對照Ab之連續稀釋液(0-10 μ g/ml)處理細胞30 min，然後，藉由總體積200 μ l之10 ng/ml IL33(Peprotech)再刺激，接著，在37°C下於5% CO₂中培養64小時。收集上清液用以IL-5/IL-13 ELISA(R&D Systems)。確定ra170之IC50值為 2.77 ± 2.58 nM(平均值 \pm SD, n=6)及IL-13為 1.10 ± 1.05 (平均值 \pm SD, n=5)。

實例 11

食蟹猴NK細胞試驗

藉由Ficoll Hypaque密度梯度自食蟹猴分離出周邊血液單核細胞(PBMC)。以含2 mM EDTA之PBS(pH 7.2)洗滌該等細胞之後，以含0.5% BSA及2 mM EDTA之PBS(pH 7.2)

再次洗滌該等細胞。在藉由非人類靈長類動物CD56微珠(Miltenyi Biotec)之單核細胞清除及藉由AutoMACS™分離器之磁性分離之後，遵照非人類靈長類動物CD16微珠陽性選擇自PBMC分離出NK細胞。使用完全RPMI 1640(補充10% FCS、2-巰基乙醇、L-穀胺醯胺、丙酮酸鈉、非必需胺基酸及青黴素/鏈黴素)洗滌所富集之NK細胞3次，再懸浮及以 2.5×10^4 個細胞/孔塗佈於含完全RPMI之96孔圓底板中。隨後，利用抗ST2 Ab或同型物對照Ab(0-10 $\mu\text{g/ml}$)之連續稀釋液處理細胞30 min，以總體積200 μl 之20 ng/ml人類IL-33及10 ng/ml重組食蟹猴IL-12再刺激，然後，在37°C下於5% CO₂中培養24小時。收集上清液用以食蟹猴IFN γ ELISA(MabTech)。ra170之IC₅₀值確定為 0.109 ± 0.073 nM(平均值 \pm SD, n=3)。

實例12

嗜鹼細胞系(KU812)試驗

使人類嗜鹼細胞系KU812(ATCC CRL 2099)於包含10% FBS及青黴素/鏈黴素之RPMI 1640培養基中培養。細胞以不超過0.5百萬個細胞/ml之細胞密度1週分裂2次。藉由FACS分析c-kit與FceRI之細胞表面表現進行常規品控。試驗當天，將KU812細胞(0.2百萬個細胞/孔)接種於含新製完全培養基之96孔圓底培養板中。於37°C下，以抗體或對照同型物之連續稀釋液處理細胞1小時。處理之後，在37°C培養箱中，藉由10 ng/ml IL-33(Peprotech)刺激細胞過夜。使細胞減速旋轉且收集上清液用以細胞激素分析。根據

MSD製造程式，分析細胞激素(IL-5、IL-13及GM-CSF)。
確定3個獨立實驗之ra170 IC₅₀值為3.49±3.43 nM(平均值±SD，IL-13)、1.48±0.75 nM(平均值±SD，IL-5)及1.31±1.22 nM(平均值±SD，GM-CSF)。確定ra170 IC₉₀值為7.51±0.99 nM(平均值±SD，IL-13)、4.60±1.65 nM(平均值±SD，IL-5)及9.10±4.74 nM(平均值±SD，GM-CSF)。

序列表

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份有限公司
 <120> 抗人類 IL33R 之抗體及其用途
 <130> 27240 FT
 <140> 101105896
 <141> 2012-02-22
 <150> EP11155684
 <151> 2011-02-23
 <160> 34
 <170> 專利案第 3.5 版
 <210> 1
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 西班牙野兔
 <400> 1
 Asp Gln Tyr Arg Ser Ser Gly Val Ser Asp Tyr Asp Ile
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 西班牙野兔
 <400> 2
 Tyr Ile Trp Ser Asp Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 西班牙野兔
 <400> 3
 Ser His Asp Met Ser
 1 5
 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 西班牙野兔
 <400> 4
 Leu Gly Gly Tyr Asp Asp Asp Ala Asp Asn Thr
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 西班牙野兔
 <400> 5
 Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 西班牙野兔

<400> 6

Gln Ser Ser Gln Ser Val Gly Asn Asn Asn Asp Leu Ala
1 5 10

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> 西班牙野兔

<400> 7

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

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

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

Tyr Ile Trp Ser Asp Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

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

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

Tyr Arg Ser Ser Gly Val Ser Asp Tyr Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8

<211> 111

<212> PRT

<213> 西班牙野兔

<400> 8

Ala Ala Val Leu Inr Gln Inr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Gly Asn Asn
20 25 30

Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Ile
35 40 45

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

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

Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Asp Asp
85 90 95

Asp Ala Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110
 <210> 9
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 現代人
 <400> 9
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 10
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 現代人
 <400> 10
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 11
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 現代人
 <400> 11
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 現代人
 <400> 12
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 置換之 ST2 序列片段 1, mut1

<400> 13

Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser
1 5

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 置換之 ST2 序列片段 2, mut1

<400> 14

Ser Glu Lys Asn Ser Lys Ile Tyr
1 5

<210> 15
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工

<220> 置換之 ST2 序列片段 3, mut1
<223>

<400> 15

Arg Ala His Lys Ser Phe Leu Val
1 5

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工

<220> 置換之 ST2 序列片段 4, mut1
<223>

<400> 16

Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

<220>

<223> IL-1R 片段 1 mut1，置換 ST2 片段 SEQ13

<400> 17

Ala Gln Ala Ile Phe Lys Gln Lys Leu
1 5

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> IL-1R 片段 2 mut2，置換 ST2 片段 SEQ14

<400> 18

Val Ala Gly Asp Gly Gly Leu Val
1 5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> IL-1R 片段 3 mut3，置換 ST2 片段 SEQ15

<400> 19

Ser Gly Val Lys Asp Arg Leu Ile
1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> IL-1R 片段 4 mut4，置換 ST2 片段 SEQ16

<400> 20

Ser Asp Ile Ala Tyr Trp Lys Trp
1 5

<210> 21

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈可變域，人源化 ra170 11.12 (VH11)

<400> 21

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

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser His Asp
20 25 30

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

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

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

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

Asp Gln Tyr Arg Ser Ser Gly Val Ser Asp Tyr Asp Ile Trp Gly Pro
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈 CDR1 , Mab ra170 11.12

<400> 22

Ser His Asp Ile Ser
1 5

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈 CDR2 , Mab ra170 11.12

<400> 23

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

<210> 24
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈 CDR3 , Mab ra170 11.12

<400> 24

Asp Gln Tyr Arg Ser Ser Gly Val Ser Asp Tyr Asp Ile
1 5 10

<210> 25
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 重鏈可變域 , 人源化 ra170 10.12 (VH10)

<400> 25

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

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser His Asp
20 25 30

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

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

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

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

Asp Gln Tyr Arg Ser Ser Gly Val Ser Asp Tyr Asp Ile Trp Gly Pro
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 26
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 重鏈 CDR1 , Mab ra170 10.12

<400> 26

Ser His Asp Ile Ser
 1 5

<210> 27
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 重鏈 CDR2 , Mab ra170 10.12

<400> 27

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

<210> 28
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 重鏈 CDR3 , Mab ra170 10.12

<400> 28

Asp Gln Tyr Arg Ser Ser Gly Val Ser Asp Tyr Asp Ile
 1 5 10

<210> 29
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 29

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 30
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈可變域，人源化 ra170 (11.12 與 10.12)
<400> 30

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Gly Asn Asn
20 25 30

Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe
50 55 60

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

Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Asp Asp
85 90 95

Asp Ala Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈 CDR1，Mab ra170 10.12 與 11.12
<400> 31

Arg Ser Ser Gln Ser Val Gly Asn Asn Asn Asp Leu Ala
1 5 10

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 輕鏈 CDR2，Mab ra170 10.12 與 11.12
<400> 32

Lys Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 輕鏈 CDR3，Mab ra170 10.12 與 11.12

<400> 33

Leu Gly Gly Tyr Asp Asp Asp Ala Asp Asn Thr
 1 5 10

<210> 34
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 34

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 101105896

※申請日： 101. 2. 22

※IPC 分類：C07K 16/18 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

抗人類IL-33R之抗體及其用途

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395

A61P 37/00

ANTIBODIES AGAINST HUMAN IL33R AND USES THEREOF

二、中文發明摘要：

本發明係關於一種結合至IL33R之抗體，其中該重鏈可變域包括SEQ ID NO:1之CDR3區、SEQ ID NO:2之CDR2區及SEQ ID NO:3之CDR1區，及該輕鏈可變域包括SEQ ID NO:4之CDR3區、SEQ ID NO:5之CDR2區及SEQ ID NO:6之CDR1區，或其嵌合、人源化或缺失T細胞抗原決定部位之抗體變體，其具有利於治療炎症性疾病之特性。

三、英文發明摘要：

An antibody binding to IL33R characterized in that the heavy chain variable domain comprises a CDR3 region of SEQ ID NO:1, a CDR2 region of SEQ ID NO:2 and a CDR1 region of SEQ ID NO:3 and in that the light chain variable domain comprises a CDR3 region of SEQ ID NO:4, a CDR2 region of SEQ ID NO:5 and a CDR1 region of SEQ ID NO:6 or a a chimeric, humanized or T cell epitope depleted antibody variant thereof has advantageous properties for the treatment of inflammatory diseases.

七、申請專利範圍：

1. 一種結合至人類IL33R之抗體，其特徵在於該重鏈可變域包括SEQ ID NO:1之CDR3區、SEQ ID NO:2之CDR2區及SEQ ID NO:3之CDR1區，及該輕鏈可變域包括SEQ ID NO:4之CDR3區、SEQ ID NO:5之CDR2區及SEQ ID NO:6之CDR1區。
2. 如請求項1之抗體，其中該重鏈可變域包括SEQ ID NO:7。
3. 如請求項2之抗體，其中該重鏈可變域包括SEQ ID NO:7及該輕鏈可變域包括SEQ ID NO:8。
4. 如請求項3之抗體，其中該抗體為嵌合、人源化或缺失T細胞抗原決定部位之抗體變體。
5. 一種結合至人類IL33R之抗體，其特徵在於該抗體為人源化變體，其中該重鏈可變域包括SEQ ID NO:24之CDR3區、SEQ ID NO:23之CDR2區及SEQ ID NO:22之CDR1區，及該輕鏈可變區包括SEQ ID NO:33之CDR3區、SEQ ID NO:32之CDR2區及SEQ ID NO:31之CDR1區。
6. 一種結合至人類IL33R之抗體，其特徵在於該抗體為人源化變體，其中該重鏈可變域包括SEQ ID NO:28之CDR3區、SEQ ID NO:27之CDR2區及SEQ ID NO:26之CDR1區，及該輕鏈可變域包括SEQ ID NO:33之CDR3區、SEQ ID NO:32之CDR2區及SEQ ID NO:31之CDR1區。

7. 如請求項5之抗體，其中該重鏈可變域包括SEQ ID NO:21。
8. 如請求項7之抗體，其中該重鏈可變域包括SEQ ID NO:21及該輕鏈可變域包括SEQ ID NO:30。
9. 如請求項6之抗體，其中該重鏈可變域包括SEQ ID NO:25。
10. 如請求項9之抗體，其中該重鏈可變域包括SEQ ID NO:25及該輕鏈可變域包括SEQ ID NO:30。
11. 如請求項1至10中任一項之抗體，其中該抗體為在絞鏈區胺基酸位置216-240，及/或第二間域區介於C_H2與C_H3之間之胺基酸位置327-331經過改質之人類IgG1或IgG4同型物。
12. 一種結合至人類IL33R之抗體，其特徵在於該抗體結合至如請求項3之抗體所結合之同一IL33R抗原決定部位，該抗體為在絞鏈區胺基酸位置216-240，及/或第二間域區介於C_H2與C_H3之間之胺基酸位置327-331經過改質之人類IgG1或IgG4同型物。
13. 如請求項11之抗體，其中包括胺基酸位置234之丙胺酸替代白胺酸之突變及胺基酸位置235之丙胺酸替代白胺酸之突變。
14. 如請求項12之抗體，其中包括胺基酸位置234之丙胺酸替代白胺酸之突變及胺基酸位置235之丙胺酸替代白胺酸之突變。
15. 如請求項11之抗體，其中包括胺基酸位置235之麩胺酸

替代白胺酸之突變及胺基酸位置228之脯胺酸替代絲胺酸之突變。

16. 如請求項12之抗體，其中包括胺基酸位置235之麩胺酸替代白胺酸之突變及胺基酸位置228之脯胺酸替代絲胺酸之突變。
17. 一種醫藥組合物，其特徵在於其包含如請求項1至16中任一項之抗體。
18. 一種醫藥組合物，其特徵在於其包含結合至如請求項3之抗體所結合之同一IL33R抗原決定部位之抗體。
19. 一種以如請求項1至16中任一項之抗體於製造醫藥組合物之用途。
20. 一種以結合至如請求項3之抗體所結合之同一IL33R抗原決定部位之抗體於製造醫藥組合物之用途。
21. 一種以如請求項1至16中任一項之抗體於製造適於治療類風濕關節炎、潰瘍性結腸炎或哮喘之藥物之用途。
22. 一種以結合至如請求項3之抗體所結合之同一IL33R抗原決定部位之抗體於製造適於治療類風濕關節炎、潰瘍性結腸炎或哮喘之藥物之用途。
23. 一種編碼結合至IL33R之抗體之重鏈之核酸，其特徵在於該抗體包括SEQ ID NO:1之重鏈CDR3區、SEQ ID NO:2之重鏈CDR2區、SEQ ID NO:3之重鏈CDR1區、SEQ ID NO:4之輕鏈CDR3區、SEQ ID NO:5之輕鏈CDR2區及SEQ ID NO:6之輕鏈CDR1區。
24. 一種編碼結合至IL33R之抗體之重鏈之核酸，其特徵在

於該抗體包括SEQ ID NO:24之CDR3區、SEQ ID NO:23之CDR2區及SEQ ID NO:22之CDR1區及該輕鏈可變域包括SEQ ID NO:33之CDR3區、SEQ ID NO:32之CDR2區及SEQ ID NO:31之CDR1區。

25. 一種編碼結合至IL33R之抗體之重鏈之核酸，其特徵在於該抗體包括SEQ ID NO:28之CDR3區、SEQ ID NO:27之CDR2區及SEQ ID NO:26之CDR1區，及該輕鏈可變域包括SEQ ID NO:33之CDR3區、SEQ ID NO:32之CDR2區及SEQ ID NO:31之CDR1區。
26. 一種表現載體，其特徵在於包括如請求項23、24或25之核酸，可於原核或真核宿主細胞中表現結合至IL33R之抗體。
27. 一種產製結合至IL33R之重組抗體之方法，其特徵在於在原核或真核宿主細胞中表現如請求項23、24或25之核酸及自該細胞或該細胞培養上清液回收該抗體。

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)