



(10) 授权公告号 CN 114829398 B

(45) 授权公告日 2025.05.27

(21) 申请号 202080088108.4

(22) 申请日 2020.12.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114829398 A

(43) 申请公布日 2022.07.29

(30) 优先权数据
1919062.8 2019.12.20 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.06.17

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2020/087053 2020.12.18

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/123190 EN 2021.06.24

(73) 专利权人 UCB生物制药有限责任公司
地址 比利时布鲁塞尔

(72) 发明人 D·J·莱特伍德 R·亚当斯
R·T·帕尔夫拉曼

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038
专利代理师 李程达

(51) Int.Cl.
C07K 16/24 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101326195 A, 2008.12.17
WO 2013102042 A2, 2013.07.04

审查员 刘超亚

权利要求书2页 说明书22页
序列表12页 附图5页

(54) 发明名称

对人IL-13具有结合特异性的抗体

(57) 摘要

本发明涉及对人IL-13的抗原决定簇具有特异性的抗体分子、抗体分子的治疗用途和产生抗体分子的方法。

1. 结合人IL-13的抗体或其抗原结合片段,包含:
 - (a) 轻链可变区,其包含:
 - i. 由SEQ ID NO:1组成的CDR-L1,
 - ii由SEQ ID NO:2组成的CDR-L2,和
 - iii由SEQ ID NO:3组成的CDR-L3;
 - 以及
 - (b) 重链可变区,其包含:
 - i. 由SEQ ID NO:4组成的CDR-H1,
 - ii由SEQ ID NO:5组成的CDR-H2,和
 - iii由SEQ ID NO:6组成的CDR-H3。
2. 根据权利要求1所述的抗体或抗原结合片段,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:17中给出的序列。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的抗体或抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:18中给出的序列。
4. 根据权利要求1或权利要求2所述的抗体或抗原结合片段,其中所述轻链可变区由SEQ ID NO:13中给出的序列或与其至少95%相同的序列组成,并且所述重链可变区由SEQ ID NO:14中给出的序列或与其至少95%相同的序列组成。
5. 根据权利要求1或权利要求2所述的抗体或抗原结合片段,其中所述轻链可变区由SEQ ID NO:17中给出的序列或与其至少95%相同的序列组成,并且所述重链可变区由SEQ ID NO:18中给出的序列或与其至少95%相同的序列组成。
6. 根据权利要求1或权利要求2所述的抗体或抗原结合片段,其中所述CDR-L1/CDR-L2/CDR-L3/CDR-H1/CDR-H2/CDR-H3序列分别由SEQ ID NO:1/2/3/4/5/6组成,并且所述轻链和重链可变区的其余部分分别与SEQ ID NO:13和14或SEQ ID NO:17和18具有至少95%的同一性。
7. 根据权利要求1或权利要求2所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体是嵌合、人源化或完全人抗体。
8. 根据权利要求1或权利要求2所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体是全长抗体。
9. 根据权利要求1或权利要求2所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、dsFv、scFv或dsscFv。
10. 根据权利要求9所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是包含SEQ ID NO:21中给出的序列的scFv或包含SEQ ID NO:23中给出的序列的dsscFv。
11. 一种分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸编码根据权利要求1至10中任一项所述的抗体或抗原结合片段。
12. 一种表达载体,所述表达载体携带根据权利要求11所述的多核苷酸。
13. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含根据权利要求12所述的载体。
14. 一种产生根据权利要求1至10中任一项所述的抗体或抗原结合片段的方法,所述方法包括在允许产生所述抗体或抗原结合片段的条件下培养根据权利要求13所述的宿主细胞,并回收所产生的抗体或抗原结合片段。

15. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求1至10中任一项所限定的抗体或抗原结合片段和药学上可接受的佐剂。

16. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求1至10中任一项所限定的抗体或抗原结合片段和药学上可接受的载体。

17. 根据权利要求1至10中任一项所述的抗体或抗原结合片段或者根据权利要求15所述的药物组合物,用于通过疗法治疗人或动物体的方法中。

18. 根据权利要求17所述的抗体、抗原结合片段或药物组合物,用于治疗特应性皮炎、慢性手部湿疹、鼻小息肉病、食物过敏或嗜酸性食管炎。

19. 根据权利要求17所述的抗体、抗原结合片段或药物组合物,用于治疗息肉病。

对人IL-13具有结合特异性的抗体

发明领域

[0001] 本发明涉及IL-13抗体及其片段,例如其结合片段,包含其的组合物,并且特别涉及其在预防和/或治疗IL-13相关疾病中的用途。

背景技术

[0002] IL-13是与IL-4共享25%序列同一性的短链细胞因子。它包含约132个氨基酸,形成跨越残基10-21(螺旋A)、43-52(螺旋B)、61-69(螺旋C)和92-110(螺旋D)的四个螺旋的二级结构,以及跨越残基33-36和87-90的两个 β 链。IL-13的溶液结构已被解析,揭示了预测的向上-向上-向下-向下四螺旋束构象,该构象也在IL-4中观察到。

[0003] 人IL-13是17kDa糖蛋白,并且由Th2谱系的活化T细胞产生,尽管Th0和Th1 CD4+T细胞、CD8+T细胞和几种非T细胞群如肥大细胞也产生IL-13。IL-13的功能包括在人B细胞中将免疫球蛋白同种型转换为IgE和在人和小鼠中抑制炎症细胞因子产生。

[0004] IL-13与其细胞表面受体IL-13R- α 1和IL-13R- α 2结合。IL-13R- α 1以低亲和力($K_D \sim 10\text{nM}$)与IL-13相互作用,随后募集IL-4R- α 以形成高亲和力($K_D \sim 0.4\text{nM}$)信号传导异二聚体受体复合物。

[0005] IL-4R/IL-13R- α 1复合物在许多细胞类型上表达,例如B细胞、单核细胞/巨噬细胞、树突细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、成纤维细胞、内皮细胞、气道上皮细胞和气道平滑肌细胞。IL-13R- α /IL-4R受体复合物的连接导致多种信号转导通路的激活,包括信号转导和转录激活因子6(STAT6)和胰岛素受体底物2(IRS2)通路。

[0006] 单独的IL-13R- α 2链对IL-13具有高亲和力($K_D \sim 0.25\text{-}0.4\text{nM}$)。它既作为负调节IL-13结合的诱饵受体起作用,又作为在巨噬细胞和可能的其他细胞类型中通过AP-1通路诱导TGF- β 合成和纤维化的信号传导受体起作用。

[0007] IL-13涉及许多人类病症的发病机理,并且已经设计了治疗策略来抑制或抵消IL-13活性。特别地,已寻求结合并中和IL-13的抗体作为抑制IL-13活性的手段。然而,本领域需要能够结合IL-13的合适的和/或改进的抗体,尤其是人IL-13,特别是能够中和人IL-13的抗体。本发明提供了结合蛋白、CDR移植抗体、人源化抗体及其片段的新家族,其能够结合人IL-13,以高亲和力结合,以及结合和中和人IL-13。

发明内容

[0008] 本发明提供了与人IL-13结合的改进的抗体,特别是抑制IL-13生物学活性的中和抗体。本发明进一步提供了包含所述抗体的药物组合物及其在治疗IL-13相关疾病中的用途。

[0009] 附图的简要说明

[0010] 图1. Ab650人源化比对。

[0011] 大鼠抗体(供体)V区序列与人种系(受体)V区序列以及设计的人源化序列的比对。

[0012] (A) 轻链移植体650:

[0013] 650=大鼠可变轻链序列。

[0014] 650gL8=使用IGKV1-39人种系作为受体框架的650的人源化移植物的可变轻链。

[0015] CDR以粗体/下划线显示。

[0016] 供体残基以粗体/斜体显示并突出显示:I58和Y71。

[0017] (B) 重链移植植物650:

[0018] 650=大鼠可变重链序列。

[0019] 650gH9=使用IGHV1-69人种系作为受体框架的650的人源化移植物的可变重链。

[0020] CDR以粗体/下划线显示。

[0021] 供体残基以粗体/斜体显示并突出显示:A67、F69和V71。

[0022] 图2. 抗IL 13的氨基酸和DNA序列。

[0023] 编码抗体650的CDR、重链和轻链可变区、scFv和dsscFV形式的氨基酸和DNA序列。

[0024] 发明详述

[0025] 抗体

[0026] 在本公开的上下文中使用的抗体包括全抗体及其功能活性片段,即包含特异性结合IL-13的抗原结合结构域分子,也称为抗原结合片段。除非上下文另有规定,否则本文关于抗体描述的特征也适用于抗体片段。

[0027] 全抗体,也称为“免疫球蛋白(Ig)”,通常涉及完整或全长抗体,即包含通过二硫键相互连接的两条重链和两条轻链的元件,其组装成限定特征性Y形三维结构。经典的天然完整抗体是单特异性的,因为它们结合一种抗原类型,并且是二价的,因为它们具有两个独立的抗原结合结构域。术语“完整抗体”、“全长抗体”和“全抗体”可互换使用,是指具有与天然抗体结构类似的结构单特异性二价抗体,包括如本文所定义的Fc区。

[0028] 每条轻链由轻链可变区(本文缩写为 V_L)和轻链恒定区(C_L)组成。每条重链由重链可变区(在本文中缩写为 V_H)和重链恒定区(C_H)组成,所述重链恒定区(C_H)由三个恒定结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 或四个恒定结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} 和 C_{H4} 构成,这取决于Ig类别。Ig或抗体的“类别”是指恒定区的类型,并且包括IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且它们中的几种可以进一步被分成亚类,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0029] 根据本发明的抗体的 V_H 和 V_L 区可以进一步细分为决定抗原识别的高变区(或“高变区”),称为互补决定区(CDR),其间散布有结构上更保守的区域,称为框架区(FR)。每个 V_H 和 V_L 由三个CDR和四个FR组成,从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。CDR和FR一起形成可变区。按照惯例,抗体或其抗原结合片段的重链可变区中的CDR被称为CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,轻链可变区中的CDR被称为CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。它们在每条链的N-末端到C-末端的方向上按顺序编号。

[0030] CDR通常根据Kabat等人设计的系统编号。该系统在Kabat等人,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Department of Health and Human Services,NIH,USA(下文称为“Kabat等人(同上)”)中阐述。除非另有说明,否则本说明书中使用该编号系统。

[0031] Kabat残基名称并不总是与氨基酸残基的线性编号直接对应。实际的线性氨基酸序列可以包含比严格Kabat编号更少或额外的氨基酸,对应于基本可变结构域结构的结构

组分(无论是框架还是互补决定区)的缩短或插入。可以通过将抗体序列中具有同源性的残基与“标准”Kabat编号序列进行比对来确定给定抗体残基的正确Kabat编号。

[0032] 根据Kabat编号系统,重链可变结构域的CDR位于残基31-35(CDR-H1)、残基50-65(CDR-H2)和残基95-102(CDR-H3)。然而,根据Chothia(Chothia C.和Lesk A.M.J.Mol.Biol.,196,901-917(1987)),等同于CDR-H1的环从残基26延伸至残基32。因此,除非另有说明,否则本文所用的‘CDR-H1’意指残基26至35,如Kabat编号系统和Chothia拓扑环定义的组合所述。

[0033] 根据Kabat编号系统,轻链可变结构域的CDR位于残基24-34(CDR-L1)、残基50-56(CDR-L2)和残基89-97(CDR-L3)。

[0034] 除了CDR环之外,第四环存在于CDR-2(CDR-L2或CDR-H2)和CDR-3(CDR-L3或CDR-H3)之间,其由框架3(FR3)形成。Kabat编号系统将框架3定义为重链中的位置66-94和轻链中的位置57-88。

[0035] 基于免疫球蛋白家族的不同成员的序列的比对,已经提出了编号方案,例如描述于Kabat等人,1991和Dondelinger等人,2018,Frontiers in Immunology,第9卷,第2278条中。

[0036] 如本文所用,术语“恒定结构域”、“恒定区”可互换使用,是指位于可变区之外的抗体结构域。恒定结构域在相同同种型的所有抗体中是相同的,但在一种同种型与另一种同种型之间是不同的。通常,重链的恒定区从N至C末端由CH1-铰链-CH2-CH3-任选地CH4形成,其包含三个或四个恒定结构域。

[0037] 本发明的抗体分子的恒定结构域(如果存在的话)可以考虑所提出的抗体分子的功能,特别是可能需要的效应子功能来选择。例如,恒定结构域可以是人IgA、IgD、IgE、IgG或IgM结构域。特别地,当抗体分子旨在用于治疗用途并且需要抗体效应子功能时,可以使用人IgG恒定结构域,特别是IgG1和IgG3同种型。或者,当抗体分子旨在用于治疗目的并且不需要抗体效应子功能时,可以使用IgG2和IgG4同种型。应当理解,也可以使用这些恒定结构域的序列变体。例如,可以使用IgG4分子,其中241位的丝氨酸(根据Kabat编号系统编号)已经改变为脯氨酸,如Angal等人所述(Angal等人,1993,A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human(IgG4) antibody as observed during SDS-PAGE analysis,Mol Immunol 30,105-108)并在本文中称为IgG4P。

[0038] “Fc”、“Fc片段”和“Fc区”可互换使用,是指抗体的C末端区,其包含除第一恒定免疫球蛋白结构域之外的抗体恒定区。因此,Fc是指IgA、IgD和IgG的最后两个恒定结构域C_{H2}和C_{H3},或IgE和IgM的最后三个恒定结构域,以及这些结构域N末端的柔性铰链。人IgG1重链Fc区在本文中定义为包含残基C226至其羧基末端,其中编号是根据Kabat中的EU索引。在人IgG1的背景下,根据Kabat中的EU索引,下铰链指位置226-236,CH2结构域指位置237-340,CH3结构域指位置341-447。可以通过序列比对鉴定其他免疫球蛋白的相应Fc区。

[0039] 在本公开的上下文中,当存在时,恒定区或Fc区可以是天然的,如上所定义,或者可以以各种方式修饰,条件是其包含功能性FcR结合结构域,并且优选功能性FcRn结合结构域。优选地,修饰的恒定区或Fc区导致改善的功能和/或药代动力学。修饰可以包括Fc片段的某些部分的缺失。修饰可以进一步包括能够影响抗体的生物学特性的各种氨基酸取代。

也可以存在用于增加FcRn结合并因此增加体内半衰期的突变。修饰可以进一步包括抗体的糖基化谱的修饰。天然Fc片段在CH2结构域中糖基化,其中在两条重链中的每一条上都存在与位置297处的天冬酰胺残基(Asn297)结合的N-聚糖。在本公开的上下文中,抗体可以是糖基修饰的,即工程化以具有特定的糖基化谱,其例如导致改善的性质,例如改善的效应子功能或改善的血清半衰期。

[0040] 本文所述的抗体是分离的。“分离的”抗体是已经与其天然环境的组分分离(例如通过纯化手段)的抗体。

[0041] 术语“抗体”涵盖单价抗体,即仅包含一个抗原结合结构域的抗体(例如包含互连的全长重链和全长轻链的单臂抗体,也称为“半抗体”),和多价抗体,即包含多于一个抗原结合结构域的抗体。

[0042] 根据本发明的术语“抗体”还涵盖抗体的抗原结合片段。抗体的抗原结合片段包括单链抗体(例如scFv和dsccfv)、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单结构域抗体或纳米抗体(例如V_H或V_L,或V_{HH}或V_{NAR})。用于本发明的其他抗体片段包括国际专利申请W02011/117648、W02005/003169、W02005/003170和W02005/003171中描述的Fab和Fab'片段。

[0043] 用于产生和制造这些抗体片段的方法是本领域熟知的(参见例如Verma等人,1998,Journal of Immunological Methods,216,165-181)。

[0044] 如本文所用的术语“Fab片段”是指包含轻链片段的抗体片段,所述轻链片段包含轻链的VL(轻链可变区)结构域和恒定结构域(CL),以及重链的VH(重链可变区)结构域和第一恒定结构域(CH1)。

[0045] 典型的“Fab'片段”包含重链和轻链对,其中重链包含可变区VH、恒定结构域CH1和天然或修饰的铰链区,轻链包含可变区VL和恒定结构域CL。根据本公开的Fab'的二聚体产生F(ab')₂,其中例如可以通过铰链二聚化。

[0046] 如本文所用的术语“单结构域抗体”是指由单个单体可变抗体结构域组成的抗体片段。单结构域抗体的实例包括V_H或V_L或V_{HH}或V-NAR。

[0047] “Fv”是指两个可变结构域,例如协同可变结构域,例如同源对或亲和力成熟的可变结构域,即VH和VL对。

[0048] 如本文所用的“单链可变片段”或“scFv”是指通过VH和VL可变结构域之间的肽接头稳定的单链可变片段。

[0049] 本文所用的“二硫键稳定的单链可变片段”或“dsccFv”是指通过V_H和V_L可变结构域之间的肽接头稳定的单链可变片段,并且还包括V_H和V_L之间的域间二硫键。(参见例如,Weatherill等人,Protein Engineering,Design&Selection,25(321-329),2012,W02007109254。

[0050] 在一个实施方式中,可变结构域V_H和V_L或V₁或V₂之间的二硫键在下面列出的两个残基之间(除非上下文另有说明,否则在下面的列表中使用Kabat编号)。无论在何处提及Kabat编号,相关参考文献是Kabat等人,1991(5th edition,Bethesda,Md.),Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Department of Health and Human Services,NIH,USA。

[0051] 在一个实施方式中,二硫键处于选自包含以下的组中的位置:

[0052] • V_H37+V_L95C,参见例如Protein Science 6,781-788,Zhu等人,(1997);

- [0053] • V_H44+V_L100 , 参见例如Weatherill等人, *Protein Engineering, Design & Selection*, 25(321-329), 2012;
- [0054] • V_H44+V_L105 , 参见例如 *J Biochem*, 118, 825-831, Luo等人, (1995);
- [0055] • V_H45+V_L87 , 参见例如 *Protein Science*, 6, 781-788, Zhu等人, (1997);
- [0056] • V_H55+V_L101 , 参见例如 *FEBS Letters*, 377, 135-139, Young等人, (1995);
- [0057] • V_H100+V_L50 , 参见例如 *Biochemistry*, 29, 1362-1367, Glockshuber等人, (1990);
- [0058] • $V_H100b+V_L49$; 参见例如 *Biochemistry*, 29, 1362-1367, Glockshuber等人, (1990);
- [0059] • V_H98+V_L46 , 参见例如 *Protein Science*, 6, 781-788, Zhu等人, (1997);
- [0060] • V_H101+V_L46 ; 参见例如 *Protein Science*, 6, 781-788, Zhu等人, (1997);
- [0061] • V_H105+V_L43 , 参见例如; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 90, pp. 7538-7542, Brinkmann等人, (1993); 或 *Proteins* 19, 35-47, Jung等人 (1994),
- [0062] • V_H106+V_L57 , 参见例如 *FEBS Letters*, 377, 135-139, Young等人, (1995) 以及位于分子中的可变区对中与其对应的一个或多个位置。
- [0063] 在一个实施方式中, 二硫键在位置 V_H44 和 V_L100 之间形成。
- [0064] 在一个实施方式中, 本发明的抗IL13抗体是拮抗性抗体。如本文所用, 术语“拮抗性抗体”描述了能够抑制或中和IL-13的生物信号传导活性的抗体, 例如通过阻断IL-13与IL-13受体的结合或减少IL-13与IL-13受体的结合, 从而抑制受体的活化。
- [0065] 抑制IL-13活性的抗体可以通过几种可能的作用机制起作用。Bin1代表结合人IL-13并阻止IL-13 α 1结合并因此也阻断IL-4R结合的抗体。Bin 1抗体还可以阻止IL-13与IL-13 α 2的结合。Bin 2代表以允许结合IL-13 α 1但阻止IL-4R募集到复合物中的方式结合hIL-13的抗体。我们选择通过Bin 1起作用的抗体。
- [0066] 在一个实施方式中, 抗IL13抗体结合人IL-13并阻止IL-13 α 1的结合。
- [0067] 在一个实施方式中, 抗IL13抗体结合人IL-13并阻止IL-13 α 2的结合。
- [0068] 在一个实施方式中, 抗IL13抗体结合人IL-13并阻止IL-13 α 1和IL-13 α 2的结合。
- [0069] 在一个实施方式中, 抗IL13抗体以 $<100\text{pM}$ 的 K_D 结合人IL-13。
- [0070] 用于本发明的抗体可以是但不限于单克隆抗体、人源化抗体、完全人抗体或嵌合抗体。
- [0071] 单克隆抗体可以通过本领域已知的任何方法制备, 例如杂交瘤技术 (Kohler & Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497)、三源杂交瘤技术 (the trioma technique)、人B细胞杂交瘤技术 (Kozbor等人, 1983, *Immunology Today*, 4:72) 和EBV-杂交瘤技术 (Cole等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, 第77-96页, Alan Rliss, Inc., 1985)。
- [0072] 还可以使用单淋巴细胞抗体方法通过克隆和表达免疫球蛋白可变区cDNA来产生抗体, 所述免疫球蛋白可变区cDNA由选择用于产生特异性抗体的单淋巴细胞产生, 所述方法例如由Babcook J. 等人, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(15):7843-78481; W092/02551; W02004/051268 和国际专利申请号W02004/106377描述。
- [0073] 可以使用测量与IL-13的结合的测定法和/或测量阻断IL-13与其受体中的一种或多种的结合的能力的测定法来进行抗体的筛选。结合测定法的实例是ELISA, 例如, 使用固定在板上的IL-13的融合蛋白, 并使用结合的二抗来检测与IL-13结合的抗IL-13抗体。阻断

测定法的实例是基于流式细胞术的测定,其测量IL-13配体蛋白与IL-13R结合的阻断。荧光标记的第二抗体用于检测与IL-13R结合的IL-13配体蛋白的量。

[0074] 人源化抗体(其包括CDR移植抗体)是具有来自非人物种的一个或多个互补决定区(CDR)和来自人免疫球蛋白分子的框架区的抗体分子(参见例如US 5,585,089;W091/09967)。应当理解,可能仅需要转移CDR的特异性决定残基而不是整个CDR(参见例如Kashmiri等人,2005,Methods,36,25-34)。人源化抗体可以任选地进一步包含一个或多个框架残基,所述框架残基来源于衍生CDR的非人物种。

[0075] 嵌合抗体由衍生自两种不同物种的元件组成,使得该元件保留其所来源物种的特征。通常,嵌合抗体将包含来自一个物种(例如小鼠、大鼠、兔等)的可变区和来自另一物种(例如人)的恒定区。

[0076] 还可以使用本领域已知的各种噬菌体展示方法产生抗体,并且包括Brinkman等人(在J.Immunol.Methods,1995,182:41-50-325)、Ames等人(J.Immunol.Methods,1995,184:177-186)、Kettleborough等人(Eur.J.Immunol.,1994,24:952-958)、Persic等人(Gene,1997,187,9-18)、Burton等人(Advances in Immunology,1994,57:191-280)和W0 90/02809;W0 91/10737;W0 92/01047;W0 92/18619;W0 93/11236;W0 95/15982;W0 95/20401;和US 5,698,426;5,223,409;5,403,484;5,580,717;5,427,908;5,750,753;5,821,047;5,571,698;5,427,908;5,516,637;5,780,225;5,658,727;5,733,743和5,969,108公开的那些方法。

[0077] 完全人抗体是其中重链和轻链的可变区和恒定区(如果存在)都是人来源的,或与人来源的序列基本上相同,但不一定来自相同抗体的那些抗体。完全人抗体的实例可以包括例如通过上述噬菌体展示方法产生的抗体和由小鼠产生的抗体,其中鼠免疫球蛋白可变区基因和任选的恒定区基因已被其人对对应物替代,例如,在EP 0546073、US 5,545,806、US 5,569,825、US 5,625,126、US 5,633,425、US 5,661,016、US 5,770,429、EP 0438474和EP 0463151中的一般术语所述。

[0078] 本发明的抗体可以是多特异性抗体。如本文所用的“多特异性或多特异性抗体”是指如本文所述的抗体,其具有至少两个结合结构域,即两个或更多个结合结构域,例如两个或三个结合结构域,其中至少两个结合结构域独立地结合两个不同的抗原或相同抗原上的两个不同表位。多特异性抗体对于每种特异性(抗原)通常是单价的。本文所述的多特异性抗体涵盖单价和多价,例如二价、三价、四价多特异性抗体。

[0079] 在一个实施方式中,构建体是双特异性抗体。如本文所用的“双特异性或双特异性抗体”是指具有两种抗原结合特异性的抗体。在一个实施方式中,所述抗体包含两个抗原结合结构域,其中一个结合结构域结合抗原1,另一个结合结构域结合抗原2,即每个结合结构域对于每个抗原是单价的。在一个实施方式中,抗体是四价双特异性抗体,即抗体包含四个抗原结合结构域,其中例如两个结合结构域结合抗原1,并且另外两个结合结构域结合抗原2。在一个实施方式中,抗体是三价双特异性抗体。

[0080] 在一个实施方式中,抗体构建体是三特异性抗体。如本文所用的“三特异性或三特异性抗体”是指具有三种抗原结合特异性的抗体。例如,抗体是具有三个抗原结合结构域(三价)的抗体,其独立地结合三种不同的抗原或相同抗原上的三个不同的表位,即每个结合结构域对于每种抗原是单价的。

[0081] 互补位是识别并结合抗原的抗体区域。本发明的抗体可以是多互补位抗体。如本文所用的“多互补位抗体”是指如本文所述的抗体,其包含两个或更多个不同互补位,其与来自相同抗原或来自两种不同抗原的不同表位相互作用。本文所述的多互补位抗体可以是双互补位的、三互补位的、四互补位的。

[0082] 如本文所用的“抗原结合结构域”是指抗体的一部分,其包含与靶抗原特异性相互作用的一个或多个可变结构域的一部分或全部,例如一对可变结构域VH和VL的一部分或全部。结合结构域可以包含单结构域抗体。在一个实施方式中,每个结合结构域是单价的。优选地,每个结合结构域包含不超过一个VH和一个VL。

[0083] 已经产生了多种多特异性抗体形式。已经提出了不同的分类,但是多特异性IgG抗体形式通常包括双特异性IgG、附加的IgG、多特异性(例如双特异性)抗体片段、多特异性(例如双特异性)融合蛋白和多特异性(例如双特异性)抗体缀合物,如例如Spiess等人, *Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies*, *Mol Immunol*, 67 (2015) :95-106中所述

[0084] 用于制备双特异性抗体的技术包括但不限于CrossMab技术(Klein等人, *Engineering therapeutic bispecific antibodies using CrossMab technology*, *Methods* 154 (2019) 21-31)、杵臼工程(例如W01996027011, W01998050431)、DuoBody技术(例如W02011131746)、Azymetric技术(例如W02012058768)。用于制备双特异性抗体的其他技术已经描述于例如Godar等人, 2018, *Therapeutic bispecific antibody formats: a patent applications review (1994-2017)*, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 28:3, 251-276中。双特异性抗体特别包括CrossMab抗体、DAF(二合一)、DAF(四合一)、Dutamab、DT-IgG、杵臼共同LC、杵臼组装、电荷对、Fab臂交换、SEEDbody、Triomab、LUZ-Y、Fcab、 $\kappa\lambda$ -body和正交Fab。

[0085] 附加的IgG通常包含通过将另外的抗原结合结构域或抗原结合片段附加到IgG的重链和/或轻链的N-和/或C-末端而工程化的全长IgG。此类另外的抗原结合片段的实例包括sdAb抗体(例如VH或VL)、Fv、scFv、dsscFv、Fab、scFav。附加的IgG抗体形式特别包括DVD-IgG、IgG(H)-scFv、scFv-(H) IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L) IgG、IgG(L,H)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgC(L)-V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig、Zybody和DVI-IgG(四合一), 例如如Spiess等人, *Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies*, *Mol Immunol*, 67 (2015) :95-106中所述。

[0086] 多特异性抗体片段包括纳米抗体、纳米抗体-HAS、BiTEs、diabody、DART、TandAb、scDiabody、sc-Diabody-CH3、Diabody-CH3、三体(Triple Body)、微型抗体(Miniantibody);微抗体(Minibody)、Tri Bi微抗体、scFv-CH3 KIH、Fab-scFv、scFv-CH-CL-scFv、F(ab')₂、F(ab')₂-scFv2、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四价HCAb、scDiabody-Fc、Diabody-Fc、串联scFv-Fc;和胞内抗体,如例如Spiess等人, *Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies*, *Mol Immunol*, 67 (2015) :95-106中所述。

[0087] 多特异性融合蛋白包括Dock和Lock、ImmTAC、HSAbody、scDiabody-HAS和串联scFv-毒素。

[0088] 多特异性抗体缀合物包括IgG-IgG;Cov-X-Body;和scFv1-PEG-scFv2。

[0089] 另外的多特异性抗体形式已经描述于例如Brinkmann和Kontermann, The making of bispecific antibodies, mAbs, 9:2, 182-212 (2017), 特别是图2中, 例如串联scFv、triplebody、Fab-VHH、TaFv-Fc、scFv₄-Ig、scFv₂-Fcab、scFv₄-IgG。双体(Bibody)、三体(tribody)及其制备方法公开于例如W099/37791中。

[0090] 用于本发明的优选抗体包括附加的IgG和附加的Fab, 其中完整IgG或Fab片段分别通过将至少一个另外的抗原结合结构域(例如两个、三个或四个另外的抗原结合结构域), 例如单结构域抗体(例如VH或VL, 或VHH)、scFv、dsscFv、dsFv附加到所述IgG或Fab的重链和/或轻链的N-和/或C-末端来工程化, 例如如W02009/040562、W02010/035012、W02011/030107、W02011/061492、W02011/061246和W02011/086091中所述。特别地, Fab-Fv形式描述于W02009/040562中, 并且其二硫化物稳定的形式Fab-dsFv描述于W02010/035012中。单接头Fab-dsFv描述于W02014/096390, 其中dsFv通过Fv的VL或VH结构域与Fab的LC或HC的C末端之间的单接头与Fab连接。包含全长IgG1的附加的IgG描述于W02015/197789, 其通过将dsFv附加到IgG的重链或轻链的C末端来工程化。

[0091] 用于本发明的另一种优选抗体包含与两个scFv或dsscFv连接的Fab, 每个scFv或dsscFv结合相同或不同的靶标(例如, 一个scFv或dsscFv结合治疗靶标, 并且一个scFv或dsscFv通过结合例如白蛋白来增加半衰期)。此类抗体描述于W02015/197772中。用于本发明片段的另一种优选抗体包含仅与一个scFv或dsscFv连接的Fab, 如例如W02013/068571和Dave等人, Mabs, 8(7) 1319-1335 (2016) 中所述。

[0092] 在一个实施方式中, 本发明提供了对人IL-13具有特异性的抗体或其抗原结合片段, 其包含轻链可变结构域, 所述轻链可变结构域包含至少一个用于CDR-L1的具有SEQ ID NO:1中给出序列的CDR、用于CDR-L2的具有SEQ ID NO:2中给出序列的CDR和用于CDR-L3的具有SEQ ID NO:3中给出序列的CDR。

[0093] 在一个实施方式中, 本发明提供了对人IL-13具有特异性的抗体或其抗原结合片段, 其包含轻链可变结构域, 所述轻链可变结构域包含用于CDR-L1的具有SEQ ID NO:1中给出序列的CDR、用于CDR-L2的具有SEQ ID NO:2中给出序列的CDR和用于CDR-L3的具有SEQ ID NO:3中给出序列的CDR。

[0094] 在一个实施方式中, 本发明提供了对人IL-13具有特异性的抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变结构域, 所述重链可变结构域包含至少一个用于CDR-H1的具有SEQ ID NO:4给出序列的CDR、用于CDR-H2的具有SEQ ID NO:5给出序列的CDR或用于CDR-H3的具有SEQ ID NO:6给出序列的CDR。

[0095] 在一个实施方式中, 本发明提供了对人IL-13具有特异性的抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变结构域, 所述重链可变结构域包含用于CDR-H1的具有SEQ ID NO:4给出序列的CDR、用于CDR-H2的具有SEQ ID NO:5给出序列的CDR和用于CDR-H3的具有SEQ ID NO:6给出序列的CDR。

[0096] 本发明的抗体分子可以分别包含互补轻链或互补重链。

[0097] 因此, 在一个实施方式中, 本发明提供了结合人IL-13的抗体或其抗原结合片段, 其包含:

[0098] (a) 轻链可变区, 其包含:

[0099] i.包含SEQ ID NO:1的CDR-L1,
[0100] ii.包含SEQ ID NO:2的CDR-L2,和
[0101] iii.包含SEQ ID NO:3的CDR-L3;
[0102] 以及

[0103] (b)重链可变区,其包含:

[0104] i.包含SEQ ID NO:4的CDR-H1,
[0105] ii.包含SEQ ID NO:5的CDR-H2,和
[0106] iii.包含SEQ ID NO:6的CDR-H3;以及

[0107] 应当理解,可以对本发明提供的CDR进行一个或多个氨基酸取代、添加和/或缺失,而不显著改变抗体结合IL-13和中和IL-13活性的能力。本领域技术人员可以容易地测试任何氨基酸取代、添加和/或缺失的效果,例如通过使用本文所述的方法,特别是实例中说明的那些,以确定IL-13结合和IL-13/IL-13受体相互作用的抑制。

[0108] 因此,本发明提供了对人IL-13具有特异性的抗体,其包含选自CDR-L1 (SEQ ID NO:1)、CDR-L2 (SEQ ID NO:2)、CDR-L3 (SEQ ID NO:3)、CDR-H1 (SEQ ID NO:4)、CDR-H2 (SEQ ID NO:5)和CDR-H3 (SEQ ID NO:6)的一个或多个CDR,其中一个或多个CDR中的一种或多种氨基酸已被另一种氨基酸取代,例如如下文定义的类似氨基酸。

[0109] 在一个实施方式中,本发明提供了对人IL-13具有特异性的抗体,其包含CDR-L1 (SEQ ID NO:1)、CDR-L2 (SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:20)、CDR-L3 (SEQ ID NO:3)、CDR-H1 (SEQ ID NO:4)、CDR-H2 (SEQ ID NO:5)和CDR-H3 (SEQ ID NO:6),例如其中一个或多个CDR中的一种或多种氨基酸已被另一种氨基酸取代,例如如下文定义的类似氨基酸。

[0110] 如本文所用,“同一性”表示在比对序列中的任何特定位置,氨基酸残基在序列之间是相同的。如本文所用,“相似性”表示在比对序列中的任何特定位置,氨基酸残基在序列之间具有相似类型。例如,亮氨酸可以取代为异亮氨酸或缬氨酸。通常可以彼此取代的其他氨基酸包括但不限于:

[0111] -苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸(具有芳族侧链的氨基酸);

[0112] -赖氨酸、精氨酸和组氨酸(具有碱性侧链的氨基酸);

[0113] -天冬氨酸和谷氨酸(具有酸性侧链的氨基酸);

[0114] -天冬酰胺和谷氨酰胺(具有酰胺侧链的氨基酸);以及

[0115] -半胱氨酸和甲硫氨酸(具有含硫侧链的氨基酸)。可以容易地计算同一性和相似性的程度(Computational Molecular Biology,Lesk A.M.ed.,Oxford University Press,New York,1988;Biocomputing.Informatics and Genome Projects,Smith D.W.,ed.,Academic Press,New York,1993;Computer Analysis of Sequence Data,Part 1,Griffin A.M.,和Griffin H.G.,eds.,Humana Press,New Jersey,1994;Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje G.,Academic Press,1987,Sequence Analysis Primer,Gribskov M.和Devereux J.,eds.,M Stockton Press,New York,1991,BLAST™软件可从NCBI获得(Altschul S.F.等人,1990,J.Mol.Biol.,215:403-410;Gish W.&States D.J.1993,Nature Genet.,3:266-272.Madden T.L.等人,1996,Meth.Enzymol.,266:131-141;Altschul S.F.等人,1997,Nucleic Acids Res.,25:3389-3402;Zhang J.&Madden T.L.,1997,Genome Res,7:649-656,)。

[0116] 在一个实施方式中,本发明的抗体包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含三个CDR,其中CDR-L1的序列与SEQ ID NO:1中给出的序列具有至少70%、80%、90%、95%或98%同一性或相似性,CDR-L2与SEQ ID NO:2中给出的序列具有至少70%、80%、90%、95%或98%同一性或相似性,和/或CDR-L3与SEQ ID NO:3中给出的序列具有至少70%、80%、90%、95%或98%同一性或相似性。

[0117] 在一个实施方式中,本发明的抗体包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含三个CDR,其中CDR-H1的序列与SEQ ID NO:4中给出的序列具有至少70%、80%、90%、95%或98%同一性或相似性,CDR-H2与SEQ ID NO:5中给出的序列具有至少70%、80%、90%、95%或98%同一性或相似性,和/或CDR-H3与SEQ ID NO:6中给出的序列具有至少70%、80%、90%、95%或98%同一性或相似性。

[0118] 在一个实施方式中,本发明的抗体包含轻链可变区,其包含SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:17中给出的序列。在一个实施方式中,本发明的抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:17中给出的序列具有至少70%、80%、90%、95%或98%同一性或相似性的序列。

[0119] 在一个实施方式中,本发明的抗体包含重链可变区,其包含SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:18中给出的序列。在一个实施方式中,本发明的抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:18中给出的序列具有至少70%、80%、90%、95%或98%同一性或相似性的序列。

[0120] 在一个实施方式中,本发明的抗体包含轻链可变区和重链可变区,其中轻链可变区包含SEQ ID NO:13中给出的序列,重链可变区包含SEQ ID NO:14中给出的序列。在一个实施方式中,本发明的抗体包含轻链可变区和重链可变区,其中轻链可变区包含与SEQ ID NO:13中给出的具有至少70%、80%、90%、95%或98%同一性或相似性的序列和/或重链可变区包含与SEQ ID NO:14中给出的具有至少70%、80%、90%、95%或98%同一性或相似性的序列。

[0121] 在一个实施方式中,本发明的抗体包含分别包含SEQ ID NO:1/2/3/4/5/6的CDR-L1/CDR-L2/CDR-L3/CDR-H1/CDR-H2/CDR-H3序列,并且轻链和重链可变区的其余部分分别与SEQ ID NO:13和14或SEQ ID NO:17和18具有至少70%、80%、90%、95%或98%同一性或相似性。

[0122] 在一个实施方式中,本发明的抗体是Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、dsFv、scFv或dsScFv。在一个实施方式中,本发明的抗体是单结构域抗体或纳米抗体,例如V_H或V_L或V_{HH}或V_{NAR}。

[0123] 在一个实施方式中,本发明的抗体是scFv,其包含SEQ ID NO:21中给出的序列,或与SEQ ID NO:21中给出的序列具有至少70%、80%、90%、95%或98%同一性或相似性的序列。

[0124] 在一个实施方式中,本发明的抗体是scFv,其包含分别在SEQ ID NO:1/2/3/4/5/6中给出的CDR-L1/CDR-L2/CDR-L3/CDR-H1/CDR-H2/CDR-H3序列,并且scFv的其余部分与SEQ ID NO:21具有至少70%、80%、90%、95%或98%的同一性或相似性。

[0125] 在一个实施方式中,本发明的抗体是dsScFv,其包含SEQ ID NO:23中给出的序列,或与SEQ ID NO:23中给出的序列具有至少70%、80%、90%、95%或98%同一性或相似性的序列。

[0126] 在一个实施方式中,本发明的抗体是dsscFv,其包含分别在SEQ ID NO:1/2/3/4/5/6中给出的CDR-L1/CDR-L2/CDR-L3/CDR-H1/CDR-H2/CDR-H3序列,并且dsscFv的其余部分与SEQ ID NO:23具有至少70%、80%、90%、95%或98%的同一性或相似性。

[0127] 在一个实施方式中,抗体包含重链和轻链,其中重链包含CH1结构域,轻链包含CL结构域, κ 或 λ 。

[0128] 生物分子,例如抗体或片段,含有酸性和/或碱性官能团,从而给予分子净正电荷或负电荷。总“观察到的”电荷的量将取决于实体的绝对氨基酸序列、3D结构中带电基团的局部环境和分子的环境条件。等电点(pI)是特定分子或表面不携带净电荷时的pH。在一个实施方式中,根据本公开的抗体或片段具有至少7的等电点(pI)。在一个实施方式中,抗体或片段具有至少8,例如8.5、8.6、8.7、8.8或9的等电点。在一个实施方式中,抗体的pI为8。

[0129] 本发明的IL-13抗体和片段可以被工程化以具有适当的等电点。这可以导致抗体和/或片段具有更稳健的性质,特别是合适的溶解度和/或稳定性特征。因此,在一个方面,本发明提供了人源化IL-13抗体,其被工程化以具有与最初鉴定的抗体不同的等电点。可以例如通过替换氨基酸残基,例如用一个或多个碱性氨基酸残基替换酸性氨基酸残基来工程化抗体。或者,可以添加碱性氨基酸残基或可以去除酸性氨基酸残基。或者,如果分子具有不可接受的高pI值,则可以根据需要引入酸性残基以降低pH。工程化抗体或片段的pI可以是例如8或更高,例如8.5或9。重要的是,当操纵PI时,必须小心以保持期望的抗体或片段的活性。因此,在一个实施方式中,工程化抗体或片段具有与“未修饰的”抗体或片段相同或基本上相同的活性。

[0130] 程序例如**EXPASY http://www.expasy.ch/Tools/pi_tool.htm和http://www.iut-arles.up.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.htm可用于预测抗体或片段的等电点。

[0131] 表位

[0132] 表位是被抗体结合的抗原区域。表位可以定义为结构性或功能性的。功能性表位通常是结构表位的子集,并且具有直接有助于相互作用亲和力的那些残基。表位也可以是构象的,即由非线性氨基酸组成。在某些实施方式中,表位可以包括作为分子的化学活性表面基团的决定簇,例如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基,并且在某些实施方式中,可以具有特定的三维结构特征和/或特定的电荷特征。

[0133] 通过使用本领域已知的常规方法,可以容易地确定抗体是否与参比抗体结合相同的表位或竞争结合。例如,为了确定测试抗体是否与本发明的参比抗体结合相同的表位,允许参比抗体在饱和条件下结合蛋白质或肽。接下来,评估测试抗体结合蛋白质或肽的能力。如果测试抗体能够在参比抗体饱和结合后与蛋白质或肽结合,则可以得出测试抗体与参比抗体结合不同表位的结论。另一方面,如果测试抗体在参比抗体饱和结合后不能结合蛋白质或肽,则测试抗体可以结合与本发明的参比抗体所结合的表位相同的表位。

[0134] 为了确定抗体是否与参比抗体竞争结合,以两个方向进行上述结合方法。在第一方向上,允许参比抗体在饱和条件下与蛋白质/肽结合。然后评估测试抗体与蛋白质/肽分子的结合。在第二方向上,允许测试抗体在饱和条件下与蛋白质/肽结合,然后评估参比抗体与蛋白质/肽的结合。如果在两个方向上,只有第一(饱和)抗体能够结合蛋白质/肽,则得出测试抗体和参比抗体竞争结合蛋白质/肽的结论。如本领域技术人员将理解的,与参比抗

体竞争结合的抗体可能不一定与参比抗体结合相同的表位,但可以通过结合重叠或相邻表位来空间阻断参比抗体的结合。

[0135] 如果每种抗体竞争性抑制(阻断)另一种抗体与抗原的结合,则两种抗体结合相同或重叠的表位。也就是说,如在竞争性结合测定中测量的(参见例如Junghans等人,Cancer Res,1990:50:1495-1502),1、5、10、20或100倍过量的一种抗体抑制另一种抗体至少50%、75%、90%或甚至99%的结合。或者,如果抗原中减少或消除一种抗体结合的基本上所有氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合,则两种抗体具有相同的表位。如果减少或消除一种抗体结合的一些氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合,则两种抗体具有重叠的表位。

[0136] 然后可以进行另外的常规实验(例如,肽突变和结合分析)以确认观察到的测试抗体的结合缺乏实际上是否是由于与参比抗体结合相同的表位,或者空间阻断(或另一种现象)是否是观察到的结合缺乏的原因。可以使用ELISA、RIA、表面等离子体共振、流式细胞术或本领域可用的任何其他定量或定性抗体结合测定法进行这种实验。

[0137] 抗体可以与上文在轻链、重链、轻链可变区(LCVR)、重链可变区(HCVR)或CDR序列方面定义的那些竞争结合IL-13,或结合相同的表位。特别地,抗体可以与包含SEQ ID NOs:1/2/3/4/5/6的CDR-L1/CDR-L2/CDR-L3/CDR-H1/CDR-H2/CDR-H3序列组合的抗体竞争结合IL-13,或与其结合相同的表位。抗体可以与包含SEQ ID NOs:13/14或17/18的LCVR和HCVR序列对的抗体竞争结合IL-13或结合相同的表位。抗体可以与包含SEQ ID NO:21中给出的序列的scFv或包含SEQ ID NO:23中给出的序列的dsScFv竞争结合IL-13,或与之结合相同的表位。

[0138] 效应分子

[0139] 如果需要,用于本发明的抗体可以与一种或多种效应分子缀合。应当理解,效应分子可以包含单个效应分子或两个或更多个这样的分子,其连接以形成可以附接至本发明的抗体的单个部分。当需要获得与效应分子连接的抗体片段时,这可以通过标准化学或重组DNA程序制备,其中抗体片段直接或通过偶联剂与效应分子连接。用于将此类效应分子与抗体缀合的技术是本领域熟知的(参见Hellstrom等人,Controlled Drug Delivery,2nd Ed,Robinson等人eds,1987,pp.623-53;Thorpe等人,1982,Immunol.Rev.,62:119-58和Dubowchik等人,1999,Pharmacology and Therapeutics,83,67-123)。具体的化学方法包括例如WO 93/06231、WO 92/22583、WO 89/00195、WO 89/01476和WO 03031581中描述的那些。或者,当效应分子是蛋白质或多肽时,可以使用重组DNA方法实现连接,例如如WO 86/01533和EP 0392745中所述。

[0140] 如本文所用的术语效应分子包括例如抗肿瘤剂、药物、毒素、生物活性蛋白质(例如酶)、其他抗体或抗体片段、合成或天然存在的聚合物、核酸及其片段(例如DNA、RNA及其片段)、放射性核素(特别是放射性碘)、放射性同位素、螯合金属、纳米颗粒和报告基因(例如荧光化合物或可通过NMR或ESR光谱法检测的化合物)。

[0141] 效应分子的实例可以包括细胞毒素或细胞毒性剂,包括对细胞有害(例如杀死细胞)的任何试剂。实例包括考布他汀、多拉司他汀、埃坡霉素、星形孢菌素、美登素、海绵抑制素、根瘤菌素、软海绵素、杆孢菌素、哈密特林、紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、道诺霉素、

二羟基蒽二酮、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素及其类似物或同系物。

[0142] 效应分子还包括但不限于抗代谢物(例如甲氨蝶呤、6-巯嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶达卡巴嗪(5-fluorouracil decarbazine))、烷化剂(例如氮芥、硫代依帕苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、丝裂霉素C和顺-二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂(cis-dichlorodiamine platinum(II)(DDP)cisplatin))、蒽环类药物(例如柔红霉素(以前称为道诺霉素)和多柔比星)、抗生素(例如更生霉素(以前称为放线菌素)、博来霉素、光辉霉素、安曲霉素(AMC)、加利车霉素或倍癌霉素)和抗有丝分裂剂(例如长春新碱和长春碱)。

[0143] 其他效应分子可以包括整合的放射性核素,例如 ^{111}In 和 ^{90}Y , Lu^{177} 、铋 213 、Californium 252 、铯 192 和钨 188 /铼 188 ;或药物,例如但不限于烷基磷酸胆碱、拓扑异构酶I抑制剂、紫杉烷类和苏拉明。

[0144] 其他效应分子包括蛋白质、肽和酶。感兴趣的酶包括但不限于蛋白水解酶、水解酶、裂解酶、异构酶、转移酶。感兴趣的蛋白质、多肽和肽包括但不限于免疫球蛋白,毒素(如相思子毒素、蓖麻毒素A、假单胞菌外毒素或白喉毒素),蛋白质(如胰岛素、肿瘤坏死因子、 α -干扰素、 β -干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子或组织纤溶酶原激活剂,血栓形成剂或抗血管生成剂(例如血管抑素或内皮抑素)),或生物反应调节剂(如淋巴因子、白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-2(IL-2)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、神经生长因子(NGF)或其他生长因子和免疫球蛋白)。

[0145] 其他效应分子可以包括可用于例如诊断的可检测物质。可检测物质的实例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料、放射性核素、正电子发射金属(用于正电子发射断层扫描)和非放射性顺磁性金属离子。关于可以与抗体缀合以用作诊断剂的金属离子,通常参见美国专利号4,741,900。合适的酶包括辣根酶、过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基包括链霉亲和素、亲和素和生物素;合适的荧光材料包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯和藻红蛋白;合适的发光材料包括鲁米诺;合适的生物发光材料包括荧光素酶、荧光素和水母发光蛋白;合适的放射性核素包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 和 ^{99}Tc 。

[0146] 在另一个实例中,效应分子可以增加抗体在体内的半衰期,和/或降低抗体的免疫原性和/或增强抗体穿过上皮屏障向免疫系统的递送。这种类型的合适效应分子的实例包括聚合物、白蛋白、白蛋白结合蛋白或白蛋白结合化合物,例如WO 05/117984中所述的那些。

[0147] 当效应分子是聚合物时,其通常可以是合成或天然存在的聚合物,例如任选取代的直链或支链聚亚烷基、聚亚烯基或聚氧化烯聚合物或支链或非支链多糖,例如同多糖或杂多糖。

[0148] 可存在于上述合成聚合物上的具体任选取代基包括一个或多个羟基、甲基或甲氧基。

[0149] 合成聚合物的具体实例包括任选取代的直链或支链聚(乙二醇)、聚(丙二醇)、聚(乙烯醇)或其衍生物,尤其是任选取代的聚(乙二醇)如甲氧基聚(乙二醇)或其衍生物。

[0150] 特定的天然存在的聚合物包括乳糖、直链淀粉、葡聚糖、糖原或其衍生物。

[0151] 如本文所用的“衍生物”旨在包括反应性衍生物,例如硫醇选择性反应性基团,例如马来酰亚胺等。反应性基团可以直接或通过接头区段连接至聚合物。应当理解,在一些情况下,这种基团的残基将形成产物的一部分,作为抗体片段和聚合物之间的连接基团。

[0152] 聚合物的尺寸可以根据需要变化,但通常在500Da至50000Da的平均分子量范围内,例如5000至40000Da,例如20000至40000Da。聚合物尺寸可以特别地基于产品的预期用途来选择,例如定位于某些组织(如肿瘤)或延长循环半衰期的能力(综述参见Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545)。因此,例如,在产品旨在离开循环并穿透组织的情况下,使用小分子量聚合物(例如分子量为约5000Da)可能是有利的。对于产物保留在循环中的应用,使用更高分子量的聚合物(例如分子量在20000Da至40000Da的范围内)可能是有利的。

[0153] 合适的聚合物包括聚亚烷基聚合物,例如聚(乙二醇)或特别是甲氧基聚(乙二醇)或其衍生物,并且特别是分子量在约15000Da至约40000Da的范围内。

[0154] 在一个实例中,用于本发明的抗体与聚(乙二醇)(PEG)部分连接。在一个具体实例中,抗体是抗体片段,并且PEG分子可以通过位于抗体片段中的任何可用的氨基酸侧链或末端氨基酸官能团(例如任何游离氨基、亚氨基、硫醇基、羟基或羧基)连接。此类氨基酸可以天然存在于抗体片段中,或者可以使用重组DNA方法工程化到片段中(参见例如US 5,219,996、US 5,667,425、WO 98/25971)。在一个实例中,本发明的抗体分子是修饰的Fab片段,其中修饰是向其重链的C末端添加一个或多个氨基酸以允许附接效应分子。适当地,另外的氨基酸形成修饰的铰链区,其包含一个或多个半胱氨酸残基,效应子可以附接在所述半胱氨酸残基上。多个位点可用于连接两个或更多个PEG分子。

[0155] 合适地,PEG分子可以通过位于抗体片段中的至少一个半胱氨酸残基的硫醇基团共价连接。与修饰的抗体片段连接的每个聚合物分子可以与位于片段中的半胱氨酸残基的硫原子共价连接。共价键通常是二硫键或特别是硫-碳键。其中硫醇基团被用作适当活化的效应分子的连接点,例如可以使用硫醇选择性衍生物,例如马来酰亚胺和半胱氨酸衍生物。活化的聚合物可用作制备如上所述的聚合物修饰的抗体片段的起始材料。活化的聚合物可以是含有硫醇反应性基团的任何聚合物,例如 α -卤代羧酸或酯,例如碘乙酰胺、酰亚胺,例如马来酰亚胺、乙烯基砜或二硫化物。这样的起始材料可以商购获得(例如从Nektar,前身为Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA)或可以使用常规化学程序由市售起始材料制备。具体的PEG分子包括20K甲氧基-PEG-胺(可从Nektar,前身为Shearwater; Rapp Polymere和SunBio获得)和M-PEG-SPA(可从Nektar,前身为Shearwater获得)。

[0156] 在一个实施方式中,抗体是PEG化的修饰的Fab片段或diFab,即具有与其共价连接的PEG(聚(乙二醇)),例如根据EP 0948544或EP 1090037中公开的方法[还参见“Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications”, 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, “Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications”, 1997, J. Milton Harris和S. Zalipsky (ed), American Chemical Society, Washington DC和“Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences”, 1998, M. Aslam和A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002, 54: 531-545]。在一个实例中,PEG连接至铰链区中的半胱氨酸。在一个实例中,PEG修饰的Fab片

段具有共价连接至修饰的铰链区中的单个硫醇基的马来酰亚胺基。赖氨酸残基可以共价连接至马来酰亚胺基,并且赖氨酸残基上的每个胺基可以连接至分子量为约20,000Da的甲氧基聚(乙二醇)聚合物。连接至Fab片段的PEG的总分子量因此可以为约40,000Da。

[0157] 在一个实施方式中,本发明提供了对人IL-13具有特异性的拮抗性抗体分子,其是修饰的Fab'片段,所述修饰的Fab'片段在其重链的C末端具有修饰的铰链区,所述修饰的铰链区含有至少一个与效应分子连接的半胱氨酸残基。合适地,效应分子是PEG,并且使用(WO 98/25971和WO 2004072116或WO 2007/003898中描述的方法连接。效应分子可以使用国际专利申请WO 2005/003169、WO 2005/003170和WO 2005/003171中描述的方法连接至抗体片段。

[0158] 在一个实施方式中,抗体或片段不与效应分子连接。

[0159] 抗体产生

[0160] 本发明还提供了编码本发明的抗体分子的重链和/或轻链的分离的DNA序列。适当地,DNA序列编码本发明的抗体分子的重链或轻链。本发明的DNA序列可包含合成DNA(例如通过化学加工产生)、cDNA、基因组DNA或其任何组合。

[0161] 编码本发明的抗体分子的DNA序列可以通过本领域技术人员熟知的方法获得。例如,编码部分或全部抗体重链和轻链的DNA序列可以根据需要从确定的DNA序列或基于相应的氨基酸序列合成。

[0162] 编码受体框架序列的DNA是本领域技术人员可广泛获得的,并且可以基于其已知的氨基酸序列容易地合成。

[0163] 分子生物学的标准技术可用于制备编码本发明的抗体分子的DNA序列。可以使用寡核苷酸合成技术完全或部分地合成期望的DNA序列。可以适当地使用定点诱变和聚合酶链反应(PCR)技术。

[0164] 本文提供了合适序列的实例。因此,在一个实施方式中,本发明提供了编码抗体或抗原结合片段的分离的多核苷酸,其包含SEQ ID NO:8、10、15、16、19、20、22或24中给出的序列。

[0165] 可以构建载体的一般方法、转染方法和培养方法是本领域技术人员熟知的。在这方面,参考“Current Protocols in Molecular Biology”,1999,F.M.Ausubel(ed),Wiley Interscience,New York和Cold Spring Harbor Publishing出版的Maniatis Manual。

[0166] 还提供了包含一种或多种克隆或表达载体的宿主细胞,所述克隆或表达载体包含编码本发明抗体的一种或多种DNA序列。任何合适的宿主细胞/载体系统可用于表达编码本发明抗体分子的DNA序列。可以使用细菌(例如大肠杆菌)和其他微生物系统,或者也可以使用真核(例如哺乳动物)宿主细胞表达系统。合适的哺乳动物宿主细胞包括CHO、骨髓瘤或杂交瘤细胞。

[0167] 本发明还提供了用于产生根据本发明的抗体分子的方法,其包括在适于从编码本发明抗体分子的DNA表达蛋白质的条件下培养含有本发明载体的宿主细胞,并分离抗体分子。

[0168] 抗体分子可以仅包含重链或轻链多肽,在这种情况下,仅需要使用重链或轻链多肽编码序列来转染宿主细胞。为了产生同时包含重链和轻链的产物,可以用两种载体转染细胞系,第一载体编码轻链多肽,第二载体编码重链多肽。或者,可以使用单一载体,所述载

体包括编码轻链和重链多肽的序列。

[0169] 根据本公开的抗体和片段以良好水平从宿主细胞表达。因此,抗体和/或片段的性质似乎被优化并且有助于商业加工。

[0170] 药物组合物、剂量和给药方案

[0171] 本发明的抗体可以在药物组合物中提供。药物组合物通常是无菌的,并且通常包括药学上可接受的载体和/或佐剂。本发明的药物组合物可另外包含药学上可接受的佐剂和/或载体。

[0172] 如本文所用,“药学上可接受的载体”包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。载体可适用于肠胃外,例如静脉内、肌肉、皮内、眼内、腹膜内、皮下、脊柱或其他肠胃外施用途径,例如通过注射或输注。或者,载体可适用于非肠胃外给药,例如局部、表皮或粘膜施用途径。载体可以适合于口服施用。根据施用途径,调节剂可以包被在材料中以保护化合物免受酸和其他可能使化合物失活的天然条件的作用。

[0173] 本发明的药物组合物可包含一种或多种药学上可接受的盐。“药学上可接受的盐”是指保留母体化合物的所需生物活性并且不赋予任何不希望的毒理学作用的盐。此类盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。

[0174] 药学上可接受的载体包含水性载体或稀释剂。可用于本发明的药物组合物中的合适的水性载体的实例包括水、缓冲水和盐水。其它载体的实例包括乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油(例如橄榄油)和可注射的有机酯(例如油酸乙酯)。在许多情况下,期望在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(例如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。

[0175] 治疗组合物通常在制造和储存条件下必须是无菌和稳定的。组合物可以配制成溶液、微乳液、脂质体或适合于高药物浓度的其他有序结构。

[0176] 本发明的药物组合物可包含另外的活性成分。

[0177] 包含本发明的抗体或调节剂和使用说明书的试剂盒也在本发明的范围内。试剂盒可以进一步包含一种或多种另外的试剂,例如如上所述的另外的治疗剂或预防剂。

[0178] 可以施用本发明的调节剂和/或抗体或其制剂或组合物用于预防性和/或治疗性治疗。

[0179] 在治疗应用中,将化合物以足以治愈、减轻或部分阻止病症或其一种或多种症状的量施用于已经患有如上所述的疾病或病症的受试者。这种治疗性治疗可导致疾病症状严重程度降低,或无症状期的频率或持续时间增加。足以实现这一点的量被定义为“治疗有效量”。

[0180] 在预防性应用中,将制剂以足以预防或减少病症或其一种或多种症状的后续影响的量施用于处于如上所述的疾病或病症风险中的受试者。足以实现这一点的量被定义为“预防有效量”。用于每种目的的有效量将取决于疾病或损伤的严重程度以及受试者的体重和一般状态。

[0181] 施用的受试者可以是人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。对人的施用是典型的。

[0182] 本发明的抗体/调节剂或药物组合物可以使用本领域已知的多种方法中的一种或多种通过一种或多种施用途径施用。如本领域技术人员将理解的,施用的途径和/或方式将根据所需结果而变化。本发明的化合物或药物组合物的施用途径的实例包括静脉内、肌内、皮内、眼内、腹膜内、皮下、脊柱或其他肠胃外施用途径,例如通过注射或输注。如本文所用的短语“肠胃外施用”是指除肠内和局部施用之外的施用方式,通常通过注射。或者,本发明的抗体/调节剂或药物组合物可以通过非肠胃外途径施用,例如局部、表皮或粘膜施用途径。本发明的抗体/调节剂或药物组合物可以用于口服施用。

[0183] 本发明的抗体/调节剂或药物组合物的合适剂量可以由熟练的医疗从业者确定。可以改变本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平,以便获得有效实现特定患者、组合物和施用方式所需治疗反应而对患者无毒的活性成分的量。所选择的剂量水平将取决于多种药代动力学因素,包括本发明所用的特定组合物的活性、施用途径、施用时间、所用的特定化合物的排泄速率、治疗持续时间、与所用的特定组合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料、所治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、一般健康状况和既往病史,以及医学领域熟知的类似因素。

[0184] 合适的剂量可以是,例如待治疗患者的约0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约1000 mg/kg 体重,通常约0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约100 mg/kg 体重的范围内。例如,合适的剂量可以是每天约1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约10 mg/kg 体重或每天约10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约5 mg/kg 体重。

[0185] 可以调整剂量方案以提供最佳的期望反应(例如治疗反应)。例如,可以施用单剂量,可以随时间施用几个分开的剂量,或者可以根据治疗情况的紧急程度按比例减少或增加剂量。如本文所用的剂量单位形式是指适合作为待治疗受试者的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位包含经计算产生所需治疗效果的预定量的活性化合物以及联合所需的药物载体。

[0186] 施用可以是单剂量或多剂量。多剂量可以通过相同或不同的途径施用至相同或不同的位置。或者,可以通过缓释制剂给药,在这种情况下需要较低频率的施用。剂量和频率可以根据患者体内拮抗剂的半衰期和所需治疗持续时间而变化。

[0187] 如上所述,本发明的调节剂/抗体或药物组合物可以与一种或多种其他治疗剂共同施用。

[0188] 两种或更多种药剂的组合施用可以以许多不同的方式实现。两者可以在单一组合物中一起施用,或者它们可以作为组合疗法的一部分在单独的组合物中施用。例如,一种可以在另一种之前、之后或同时施用。

[0189] 治疗适应症

[0190] 本发明的抗体可用于治疗、预防或改善与IL-13活性相关的任何病症;例如,全部或部分由通过IL-13受体的信号传导引起的任何病症。

[0191] IL-13相关疾病包括原发性和转移性癌症,包括乳腺癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、口咽癌、下咽癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、肝癌、胆囊癌和胆管癌、小肠癌、泌尿道癌(包括肾癌、膀胱癌和尿路上皮癌)、女性生殖道癌(包括宫颈癌、子宫癌和卵巢癌以及绒毛膜癌和妊娠滋养细胞疾病)、男性生殖道癌(包括前列腺癌、精囊癌、睾丸癌和生殖细胞肿瘤)、内分泌腺癌(包括甲状腺癌、肾上腺癌和垂体癌)和皮肤癌,以及血管瘤、黑色素瘤、肉瘤(包括由骨和软组织引起的那些以及卡波西肉瘤)、脑、神经、眼和脑膜的肿瘤(包括星形细胞瘤、神经胶

质瘤、胶质母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、神经瘤、神经母细胞瘤、神经鞘瘤和脑膜瘤)、由造血系统恶性肿瘤(例如白血病)和淋巴瘤(霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)引起的实体瘤、类风湿性关节炎、骨关节炎、幼年慢性关节炎、脓毒性关节炎、莱姆病关节炎、银屑病关节炎、反应性关节炎、脊椎关节病、系统性红斑狼疮、溃疡性结肠炎、炎性肠病、胰岛素依赖性糖尿病、甲状腺炎、过敏性疾病、银屑病、皮炎硬皮病、移植物抗宿主病、器官移植排斥、与器官移植相关的急性或慢性免疫性疾病、结节病、动脉粥样硬化、弥漫性血管内凝血、川崎病、格雷夫病(Grave's disease)、肾病综合征、慢性疲劳综合征、韦格纳肉芽肿、过敏性紫癜、肾脏显微镜血管炎(microscopic vasculitis of the kidneys)、慢性活动性肝炎、葡萄膜炎、脓毒性休克、中毒性休克综合征、脓毒症综合征、恶病质、感染性疾病、寄生虫病、获得性免疫缺陷综合征、急性横贯性脊髓炎、亨廷顿舞蹈病、帕金森病、阿尔茨海默病、中风、原发性胆汁性肝硬化、溶血性贫血、恶性肿瘤、心力衰竭、艾迪生病、散发性(sporadic)、多腺体缺陷I型(polyglandular deficiency type I)和多腺体缺陷II型(polyglandular deficiency type II)、施密特综合征、成人(急性)呼吸窘迫综合征、脱发、斑秃、关节病、赖特病(Reiter's disease)、银屑病性关节炎、溃疡性结肠炎性关节炎、肠病性滑膜炎、衣原体、耶尔森氏菌和沙门氏菌相关的关节病、动脉粥样硬化疾病/动脉硬化、特应性变态反应、自身免疫性大疱性疾病、寻常型天疱疮、落叶型天疱疮、类天疱疮、线性IgA疾病、自身免疫性溶血性贫血、Coombs阳性溶血性贫血、获得性恶性贫血、幼年恶性贫血、肌痛性脑炎/Royal Free Disease、慢性皮肤黏膜念珠菌病、巨细胞动脉炎、原发性硬化性肝炎、隐源性自身免疫性肝炎、获得性免疫缺陷相关疾病、乙型肝炎、丙型肝炎、常见变异型免疫缺陷(常见变异型低丙种球蛋白血症)、扩张型心肌病、女性不育症、卵巢衰竭、卵巢早衰、纤维化肺病、隐源性纤维化肺泡炎、炎后间质性肺病、间质性肺炎、结缔组织病相关的间质性肺病、混合性结缔组织病相关的肺病、系统性硬化症相关的间质性肺病、类风湿性关节炎相关的间质性肺病、系统性红斑狼疮相关的肺病、皮炎/多发性肌炎相关的肺病、干燥综合征相关的肺病、强直性脊柱炎相关的肺病、血管炎性弥漫性肺病、铁血黄素沉着症相关的肺病、药物诱导的间质性肺病、纤维化、放射性纤维化、闭塞性细支气管炎、慢性嗜酸性粒细胞性肺炎、淋巴细胞浸润性肺病、感染后间质性肺病、痛风性关节炎、自身免疫性肝炎、1型自身免疫性肝炎(经典自身免疫或狼疮性肝炎)、2型自身免疫性肝炎(抗-LKM抗体肝炎)、自身免疫性低血糖、伴黑棘皮病B型胰岛素抵抗、甲状旁腺功能减退、与器官移植相关的急性免疫性疾病、与器官移植相关的慢性免疫性疾病、骨关节病、原发性硬化性胆管炎、1型银屑病、2型银屑病、特发性白细胞减少症、自身免疫性中性粒细胞减少症、肾病NOS、肾小球肾炎、肾显微镜下血管炎、莱姆病、盘状红斑狼疮、特发性男性不育或NOS、精子自身免疫、多发性硬化症(所有亚型)、交感性眼炎、结缔组织病继发的肺高血压、Goodpasture综合征(Goodpasture's syndrome)、结节性多动脉炎的肺部表现、急性风湿热、类风湿性脊椎炎、斯蒂尔病(Still's disease)、系统性硬化症、Sjorgren综合征(Sjorgren's syndrome)、高安氏病(Takayasu's disease)/动脉炎、自身免疫性血小板减少症、特发性血小板减少症、自身免疫性甲状腺疾病、甲状腺机能亢进症、甲状腺肿性自身免疫性甲状腺功能减退症(桥本氏病(Hashimoto's disease))、萎缩性自身免疫性甲状腺功能减退症、原发性粘液性水肿、晶状体源性葡萄膜炎、原发性血管炎、白癩风急性肝病、慢性肝病、酒精性肝硬化、酒精性肝损伤、胆脂腺炎、特发性肝病、药物诱导的肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、变态反应、B群链球菌(GBS)感染、精神障

碍、抑郁症、精神分裂症、Th2型和Th1型介导的疾病、急性和慢性疼痛、不同形式的疼痛、癌症、肺癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、直肠癌、造血系统恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤、无 β 脂蛋白血症、肢端部紫绀、急性和慢性寄生或感染过程、急性白血病、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、急性或慢性细菌感染、急性胰腺炎、急性肾衰竭、腺癌、空中异位搏动、AIDS痴呆综合征、酒精性肝炎、过敏性结膜炎、过敏性接触性皮炎、过敏性鼻炎(包括季节性过敏性鼻炎)、非过敏性鼻炎、同种异体移植物排斥、 α -1-抗胰蛋白酶缺乏症、肌萎缩性侧索硬化、贫血、心绞痛、前角细胞变性、抗cd3疗法、抗磷脂综合征、抗受体超敏反应、主动脉和外周动脉瘤、主动脉夹层、动脉高血压、动脉硬化、动静脉瘘、共济失调、心房纤颤(持续性或阵发性)、心房扑动、房室传导阻滞、B细胞淋巴瘤、骨移植排斥、骨髓移植(BMT)排斥、束支传导阻滞、伯基特淋巴瘤、烧伤、心律失常、心脏眩晕综合征、心脏肿瘤、心肌病、心肺旁路炎症反应、软骨移植排斥、小脑皮质变性、小脑功能失调、紊乱性或多元性房性心动过速、化疗相关疾病、慢性粒细胞白血病(CML)、慢性酒精中毒、慢性炎症性疾病、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性阻塞性肺病(COPD)、慢性水杨酸盐中毒、结肠直肠癌、充血性心力衰竭、结膜炎、接触性皮炎、肺心病、冠状动脉疾病、克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)、培养阴性败血症、囊性纤维化、细胞因子疗法相关病症、拳击手痴呆、脱髓鞘疾病、登革出血热、皮炎、皮肤病、糖尿病(diabetes)、糖尿病(diabetes mellitus)、糖尿病性动脉粥样硬化疾病、弥漫性路易体病、扩张性充血性心肌病、基底神经节病症、中年唐氏综合征、由阻断CNS多巴胺受体的药物诱导的运动障碍、药物敏感性、湿疹、脑脊髓炎、心内膜炎、内分泌病、会厌炎、EB病毒感染、红斑性肢痛、锥体外系和小脑障碍、家族性噬血淋巴组织细胞增多症、胎儿胸腺植入排斥、弗里德赖希氏共济失调(Friedreich's ataxia)、功能性外周动脉障碍、真菌败血症、气性坏疽、胃溃疡、肾小球肾炎、任何器官或组织的移植排斥、革兰氏阴性败血症、革兰氏阳性败血症、由于细胞内生物体引起的肉芽肿、毛细胞白血病、Hallervorden-Spatz病、桥本氏甲状腺炎、花粉症、心脏移植排斥、血液病、血液透析、溶血性尿毒症综合征/溶栓性血小板减少性紫癜、出血、甲型肝炎、希氏束状心律失常(His bundle arrhythmias)、HIV感染/HIV神经病变、霍奇金病、多动性运动障碍、超敏反应、超敏性肺炎、高血压、低动力性运动障碍、下丘脑-垂体-肾上腺轴评估、特发性艾迪生病、特发性肺纤维化、抗体介导的细胞毒性、虚弱、婴儿脊髓性肌萎缩、主动脉炎症、甲型流感、电离辐射暴露、虹膜睫状体炎/葡萄膜炎/视神经炎、缺血-再灌注损伤、缺血性中风、幼年型类风湿性关节炎、幼年型脊髓性肌萎缩、卡波西肉瘤、肾移植排斥、军团菌、利什曼病、麻风病、皮质脊髓系统病变、脂肪水肿、肝移植排斥、淋巴水肿、疟疾、恶性淋巴瘤、恶性组织细胞增多症、恶性黑素瘤、脑膜炎、脑膜炎球菌血症、代谢性/特发性偏头痛、线粒体多系统障碍、混合性结缔组织病、单克隆丙种球蛋白病、多发性骨髓瘤、多系统变性(Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager和Machado-Joseph)、细胞内鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium intracellulare*)、结核分枝杆菌、骨髓增生异常综合征、心肌梗塞、心肌缺血性疾病、鼻咽癌、新生儿慢性肺病、肾炎、肾病、神经变性疾病、神经源性肌肉萎缩、中性粒细胞减少性发热、非霍奇金淋巴瘤、腹主动脉及其分支闭塞、闭塞性动脉疾病、okt3疗法、睾丸炎/附睾炎、睾丸炎/输精管切除逆转术、器官肥大、骨质疏松症、胰腺移植排斥、胰腺癌、副肿瘤综合征/恶性肿瘤高钙血症、甲状旁腺移植排斥、盆腔炎症性疾病、常年性鼻炎、心包疾病、外周动脉粥样硬化性疾病、外周血管疾病、腹膜炎、恶性贫血、卡氏肺囊虫

肺炎、肺炎、POEMS综合征(多发性神经病、器官肥大、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病和皮肤变化综合征)、灌注后综合征、泵后综合征、MI后心脏疾病、先兆子痫、进行性核上性麻痹、原发性肺动脉高血压、放射治疗、雷诺现象和疾病、雷诺氏病、雷夫叙姆病(Refsum's disease)、规则性窄QRS心动过速、肾血管性高血压、再灌注损伤、限制性心肌病、肉瘤、老年性舞蹈病、路易体型老年性痴呆、血清阴性关节病、休克、镰状细胞性贫血、皮肤同种异体移植排斥、皮肤变化综合征、小肠移植排斥、实体瘤、特异性心律失常、脊髓性共济失调、脊髓小脑变性、链球菌性肌炎、小脑结构性病变、亚急性硬化性全脑炎、晕厥、心血管系统梅毒、全身性过敏、全身性炎症反应综合征、全身发作性幼年类风湿性关节炎、T细胞或Fab ALL毛细血管扩张症、血栓闭塞性脉管炎、血小板减少、毒性、移植、创伤/出血、III型超敏反应、IV型超敏反应、不稳定型心绞痛、尿毒症(uremia)、尿脓毒血症(urosepsis)、瓣膜性心脏病、静脉曲张、血管炎、静脉疾病、静脉血栓形成、心室纤颤、病毒和真菌感染、致命性脑炎/无菌性脑膜炎、致死相关嗜血细胞综合征(vitalassociated hemaphagocytic syndrome)、Wernicke-Korsakoff综合征、威尔逊病(Wilson's disease)、任何器官或组织的异种移植排斥、急性冠状动脉综合征、急性特发性多神经炎、急性炎性脱髓鞘性多发性神经根神经病、急性缺血、成人斯蒂尔病、过敏反应、抗磷脂抗体综合征、再生障碍性贫血、特应性湿疹、特应性皮炎、自身免疫性皮炎、与链球菌感染相关的自身免疫性疾病、自身免疫性肠病、自身免疫性听力损失、自身免疫性淋巴增殖综合征(ALPS)、自身免疫性心肌炎、自身免疫性卵巢早衰、睑炎、支气管扩张、大疱性类天疱疮、心血管疾病、灾难性抗磷脂综合征、乳糜泻、颈椎病、慢性缺血、瘢痕性类天疱疮、具有多发性硬化风险的临床孤立综合征(cis)、儿童发病的精神障碍、泪囊炎、皮炎、糖尿病视网膜病、椎间盘突出、椎间盘突出、药物诱导的免疫性溶血性贫血、子宫内膜异位症、眼内炎、巩膜外层炎、多形性红斑、重型多形性红斑、妊娠性类天疱疮、吉兰-巴雷综合征(GBS)、休斯综合征、特发性帕金森病、特发性间质性肺炎、IgE介导的变态反应、免疫性溶血性贫血、包涵体肌炎、感染性眼炎性疾病、炎性脱髓鞘病、炎性心脏病、炎性肾病、IPF/UIP、虹膜炎、角膜炎、干燥性角膜结膜炎、Kussmaul病或Kussmaul-Meier病、Landry麻痹、朗格罕细胞组织细胞增生症、网状青斑、黄斑变性、显微镜下多血管炎、morbus bechterev、运动神经元疾病、粘膜类天疱疮、多器官衰竭、肌无力重症、骨髓增生异常综合征、心肌炎、神经根疾病、神经病变、非甲非乙型肝炎、视神经炎、骨质溶解、少关节型JRA、外周动脉闭塞性疾病(PAOD)、外周血管疾病(PVD)、外周动脉疾病(PAD)、静脉炎、结节性多动脉炎(或结节性动脉周围炎)、多软骨炎、脊髓灰质炎、多关节型JRA、多内分泌缺乏综合征、多肌炎、风湿性多肌痛(PMR)、原发性帕金森综合征、前列腺炎、纯红细胞再生障碍性贫血、原发性肾上腺功能不全、复发性视神经脊髓炎、再狭窄、风湿性心脏病、sapho(滑膜炎、痤疮、脓疱病、骨质增生和骨炎)、继发性淀粉样变性、休克肺、巩膜炎、坐骨神经痛、继发性肾上腺功能不全、硅酮相关性结缔组织病、sneddon-wilkinson皮肤病、强制性脊柱炎、史蒂文斯-约翰逊综合症(SJS)、颞动脉炎、弓形体视网膜炎、中毒性表皮坏死松解症、横贯性脊髓炎、TRAPS(肿瘤坏死因子受体、I型过敏反应、II型糖尿病、荨麻疹、普通型间质性肺炎(UIP)、血管炎、春季结膜炎、病毒性视网膜炎、Vogt-Koyanagi-Harada综合征(VKH综合征)、湿性黄斑变性或伤口愈合、阿司匹林敏感性哮喘、特应性哮喘、慢性手部湿疹、过敏性支气管肺曲霉病、乳糜泻、Churg-Strauss综合征(结节性动脉周围炎加特异性)、嗜酸性粒细胞性肌痛综合征、嗜酸性粒细胞增多综合征、水肿反应包括发作性血管水肿、蠕虫感

染、盘尾丝虫病皮炎、嗜酸性粒细胞相关胃肠道疾病、嗜酸性食管炎、嗜酸性胃炎、嗜酸性肠炎、嗜酸性结肠炎、鼻小息肉瘤和息肉瘤、食物过敏、阿司匹林不耐受、以及阻塞性睡眠呼吸暂停、慢性哮喘、克罗恩病和心内膜心肌纤维化、癌症(例如,胶质母细胞瘤(如多形性胶质母细胞瘤)、非霍奇金淋巴瘤(NHL))、纤维化、炎性肠病、肺纤维化(包括特发性肺纤维化(IPF)和继发于硬化的肺纤维化)、COPD和肝纤维化。

[0192] 本发明的抗体可特别用于治疗或预防特应性皮炎、慢性手部湿疹、鼻小息肉病或息肉病、食物过敏或嗜酸性食管炎。

[0193] 因此,在一个实施方式中,提供本发明的抗体或药物组合物用于通过疗法治疗人或动物体的方法中。

[0194] 在一个实施方式中,提供抗体或药物组合物用于治疗特应性皮炎、慢性手部湿疹、鼻小息肉病或息肉病、食物过敏或嗜酸性食管炎的方法。

[0195] 在一个实施方式中,本发明提供了治疗或预防特应性皮炎、慢性手部湿疹、鼻小息肉病或息肉病、食物过敏或嗜酸性食管炎的方法,其包括向有需要的患者施用治疗有效量的抗体或药物组合物。

[0196] 在一个实施方式中,本发明提供了抗体或药物组合物在制备用于治疗或预防如本文所述的一种或多种医学适应症的药物中的用途。

[0197] 以下实施例说明本发明。

实施例

[0198] 实施例1:治疗性抗IL-13抗体CA650的产生和选择

[0199] 用纯化的人IL-13(Peprotech)或表达人IL-13的大鼠成纤维细胞(在培养上清液中表达约 $1\mu\text{g}/\text{ml}$)或在一些情况下两者的组合免疫大鼠。3至6次注射后,处死动物并收获PBMC、脾、骨髓和淋巴结。在ELISA中监测血清与人IL-13的结合以及在HEK-293IL-13R-STAT-6报告细胞测定(HEK-Blue测定,Invivogen)中中和hIL-13的能力。

[0200] 建立B细胞培养物,并且首先在Applied Biosystems FMAT测定中在基于珠的测定中筛选上清液结合hIL-13的能力。这是使用包被在链霉亲和素珠上的生物素化的人IL-13和山羊抗大鼠Fc-Cy5缀合物作为揭示剂(reveal agent)的均相测定。然后将来自该测定的阳性进行到HEK-293IL-13R-STAT-6报告细胞测定(HEK-Blue测定,Invivogen)中以鉴定中和剂。然后在Biacore中分析中和上清液以估计解离速率并表征中和的作用模式。将中和分类为bin1或bin2。Bin1代表与人IL-13结合并阻止IL-13R α 1的结合并因此也阻断IL-4R结合的抗体。Bin 1抗体还可以阻止IL-13与IL-13R α 2的结合。Bin 2代表以允许结合IL-13R α 1但阻止IL-4R募集到复合物中的方式结合hIL-13的抗体。我们选择通过Bin 1起作用的抗体。

[0201] 从总共 27×100 板SLAM实验中,在初级FMAT筛选中鉴定出约7500个IL-13特异性阳性。800个孔在HEK-Blue测定中显示出中和作用。170个孔具有期望的Biacore谱,即解离速率 $<5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 的bin 1抗体。尝试从这170个孔克隆可变区,其中160个成功产生荧光灶(fluorescent foci)。在逆转录(RT)-PCR后,100个孔产生重链和轻链可变区基因对。将这些V区基因克隆为小鼠IgG1全长抗体,并在HEK-293瞬时表达系统中再表达。序列分析结果显示,有27个独特的抗人IL-13抗体家族。然后在基于细胞的测定中重新测试这些重组抗体阻断重组hIL-13(大肠杆菌来源的和哺乳动物来源的)、重组变体hIL-13(R130Q)(大肠杆菌

来源的)、天然野生型和变体hIL-13(人供体来源的)和食蟹猴IL-13(哺乳动物来源的)的能力。还在Biacore中测试了重组抗体结合变体人IL-13(R130Q)和食蟹猴IL-13的能力。在该表征之后,选择抗体家族以满足我们的标准,即低于100pM的抗体,其对于所有人和食蟹猴IL-13制剂的效力和亲和力下降最小。

[0202] 基于人源化移植物中的中和效力、亲和力和供体含量(参见下文),选择人源化CA650用于进一步进展。

[0203] 实施例2. 抗体CA650人源化

[0204] 通过将来自大鼠V区的CDR移植到人种系抗体V区框架上来人源化抗体650。为了恢复抗体的活性,来自大鼠V区的许多框架残基也保留在人源化序列中。使用Adair等人(1991)(Humanised antibodies,WO 91/09967)概述的方案选择这些残基。显示了大鼠抗体(供体)V-区序列与人种系(受体)V-区序列的比对,以及设计的人源化序列。(图1(A)轻链移植物650和图1(B)重链移植物650)。从供体移植到受体序列的CDR如Kabat所定义(Kabat等人,1987),除了其中使用组合的Chothia/Kabat定义的CDR-H1(参见Adair等人,1991,Humanised antibodies,WO91/09967)。

[0205] 通过Entelechon GmbH的自动合成方法设计和构建编码初始V-区序列的基因,并通过寡核苷酸定向诱变修饰以产生移植形式gL8和gH9。将gL8序列亚克隆到UCB Celltech人轻链表达载体pVhCK中,其包含编码人C- κ 恒定区(Km3同种异型)的DNA。将gH9序列亚克隆到pVhg1Fab中,其包含编码人重链 γ -1CH1恒定区的DNA。

[0206] 选择人V区IGRV1-39加JK2J区(国际免疫遗传学信息系统®(IMGT), <http://www.imgt.org>)作为抗体650轻链CDR的受体。移植物gL8中的轻链框架残基全部来自人种系基因,除了残基58和71(根据Kabat编号),其中分别保留供体残基异亮氨酸(I58)和酪氨酸(Y71)。残基I58和Y71的保留对于人源化抗体的完全效力是必需的。

[0207] 选择人V区IGHV1-69加JH4 J区(IMGT, <http://www.imgt.org>)作为抗体650的重链CDR的受体。移植物gH9中的重链框架残基全部来自人种系基因,除了残基67、69和71(根据Kabat编号),其中分别保留供体残基丙氨酸(A67)、苯丙氨酸(F69)和缬氨酸(V71)。保留残基A67、F69和V71对于人源化抗体的完全效力是必需的。将人框架的位置1处的谷氨酰胺残基替换为谷氨酸(E1),以提供表达和纯化均匀产物:在抗体和抗体片段的N末端谷氨酰胺向焦谷氨酸的转化被广泛报道。最终选择的可变移植序列gL8和gH9分别显示在图1(A)和图1(B)中。

[0208] 编码抗体650的CDR、重链和轻链可变区、scFv和dsFcV形式的DNA序列和氨基酸显示于图2中。

[0209] 实施例3. 抗IL13抗体的生物学活性

[0210] 证实了抗原结合和IL-13中和,数据未显示。

[0039]	<213>	人工序列
[0040]	<220>	
[0041]	<223>	重组序列
[0042]	<400>	4
[0043]	Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His	
[0044]	1	5 10
[0045]	<210>	5
[0046]	<211>	17
[0047]	<212>	PRT
[0048]	<213>	人工序列
[0049]	<220>	
[0050]	<223>	重组序列
[0051]	<400>	5
[0052]	Arg Ile Gly Pro Gly Ser Gly Asp Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys	
[0053]	1	5 10 15
[0054]	Gly	
[0055]	<210>	6
[0056]	<211>	7
[0057]	<212>	PRT
[0058]	<213>	人工序列
[0059]	<220>	
[0060]	<223>	重组序列
[0061]	<400>	6
[0062]	Phe His Tyr Asp Gly Ala Asp	
[0063]	1	5
[0064]	<210>	7
[0065]	<211>	106
[0066]	<212>	PRT
[0067]	<213>	人工序列
[0068]	<220>	
[0069]	<223>	重组序列
[0070]	<400>	7
[0071]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Pro Val Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0072]	1	5 10 15
[0073]	Asp Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Glu Asn	
[0074]		20 25 30
[0075]	Leu Asp Trp Tyr His Gln Lys His Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
[0076]		35 40 45
[0077]	Tyr Tyr Thr Asp Ile Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly	

[0078]	50	55	60	
[0079]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
[0080]	65	70	75	80
[0081]	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Tyr Ser Gly Tyr Thr			
[0082]		85	90	95
[0083]	Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0084]		100	105	
[0085]	<210>	8		
[0086]	<211>	318		
[0087]	<212>	DNA		
[0088]	<213>	人工序列		
[0089]	<220>			
[0090]	<223>	重组序列		
[0091]	<400>	8		
[0092]	gacatccaga tgaccagtc tctccagtc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcact	60		
[0093]	ctcagttgca aagcaagtca gaatattaat gagaacttag actggtatca tcaaaagcat	120		
[0094]	ggcgaagctc caaaactcct gatatattat acagacattt tgcaaacggg catcccatca	180		
[0095]	aggttcagtg gcagtgatc tggtagatc tacacactca ccatcagcag cctgcagcct	240		
[0096]	gaagatgttg ccacatatta ctgctatcag tattacagtg ggtacacggt tggacctggg	300		
[0097]	accaagctgg aaataaaa			318
[0098]	<210>	9		
[0099]	<211>	116		
[0100]	<212>	PRT		
[0101]	<213>	人工序列		
[0102]	<220>			
[0103]	<223>	重组序列		
[0104]	<400>	9		
[0105]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser			
[0106]	1	5	10	15
[0107]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr			
[0108]		20	25	30
[0109]	Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[0110]		35	40	45
[0111]	Gly Arg Ile Gly Pro Gly Ser Gly Asp Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe			
[0112]		50	55	60
[0113]	Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Lys Tyr Phe Ser Thr Ala Tyr			
[0114]	65	70	75	80
[0115]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Ser Pro Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys			
[0116]		85	90	95

[0117]	Ala Arg Phe His Tyr Asp Gly Ala Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
[0118]	100	105 110
[0119]	Thr Val Ser Ser	
[0120]	115	
[0121]	<210> 10	
[0122]	<211> 348	
[0123]	<212> DNA	
[0124]	<213> 人工序列	
[0125]	<220>	
[0126]	<223> 重组序列	
[0127]	<400> 10	
[0128]	caggtacaac tgcagcagtc tggagctgag ttggtgaagc ctgggtcttc agtgaagatg	60
[0129]	tcctgcaagg cttctggcta cagtttcacc agctactaca tacactggat aaagcagagg	120
[0130]	cctggacagg gccttgagtg gattgggcgt attggtcctg gaagtggaga tattaattac	180
[0131]	aatgagaagt tcaagggcaa ggccacatth actgtggaca aatatttcag cacagcctac	240
[0132]	atgcaactca gcagcctgtc acctgaggac actgcggtct tttactgtgc aagatttcac	300
[0133]	tatgatgggg ctgactgggg ccaaggcact ctggtcacag tctcgagc	348
[0134]	<210> 11	
[0135]	<211> 107	
[0136]	<212> PRT	
[0137]	<213> 人工序列	
[0138]	<220>	
[0139]	<223> 重组序列	
[0140]	<400> 11	
[0141]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0142]	1 5 10 15	
[0143]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr	
[0144]	20 25 30	
[0145]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
[0146]	35 40 45	
[0147]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[0148]	50 55 60	
[0149]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
[0150]	65 70 75 80	
[0151]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr	
[0152]	85 90 95	
[0153]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[0154]	100 105	
[0155]	<210> 12	

[0156]	<211>	113
[0157]	<212>	PRT
[0158]	<213>	人工序列
[0159]	<220>	
[0160]	<223>	重组序列
[0161]	<400>	12
[0162]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
[0163]	1	5 10 15
[0164]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr	
[0165]		20 25 30
[0166]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[0167]		35 40 45
[0168]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	
[0169]		50 55 60
[0170]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
[0171]	65	70 75 80
[0172]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0173]		85 90 95
[0174]	Ala Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	
[0175]		100 105 110
[0176]	Ser	
[0177]	<210>	13
[0178]	<211>	106
[0179]	<212>	PRT
[0180]	<213>	人工序列
[0181]	<220>	
[0182]	<223>	重组序列
[0183]	<400>	13
[0184]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0185]	1	5 10 15
[0186]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Glu Asn	
[0187]		20 25 30
[0188]	Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
[0189]		35 40 45
[0190]	Tyr Tyr Thr Asp Ile Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[0191]		50 55 60
[0192]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
[0193]	65	70 75 80
[0194]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Tyr Ser Gly Tyr Thr	

[0195]		85		90		95
[0196]	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
[0197]		100		105		
[0198]	<210>	14				
[0199]	<211>	116				
[0200]	<212>	PRT				
[0201]	<213>	人工序列				
[0202]	<220>					
[0203]	<223>	重组序列				
[0204]	<400>	14				
[0205]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser					
[0206]	1	5		10		15
[0207]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr					
[0208]		20		25		30
[0209]	Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met					
[0210]		35		40		45
[0211]	Gly Arg Ile Gly Pro Gly Ser Gly Asp Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe					
[0212]		50		55		60
[0213]	Lys Gly Arg Ala Thr Phe Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr					
[0214]	65	70		75		80
[0215]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
[0216]		85		90		95
[0217]	Ala Arg Phe His Tyr Asp Gly Ala Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val					
[0218]		100		105		110
[0219]	Thr Val Ser Ser					
[0220]		115				
[0221]	<210>	15				
[0222]	<211>	318				
[0223]	<212>	DNA				
[0224]	<213>	人工序列				
[0225]	<220>					
[0226]	<223>	重组序列				
[0227]	<400>	15				
[0228]	gacatccaga tgaccagtc cccctcctcc ctgtccgcct ccgtgggcca cagggtgacc					60
[0229]	atcacctgca aggcctccca gaacatcaac gagaacctgg actggtacca gcagaagccc					120
[0230]	ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accgacatcc tgcagaccgg catcccctcc					180
[0231]	aggttctccg gctccggctc cggcaccgac tacacctga ccatctctc cctgcagccc					240
[0232]	gaggacttgc ccacctacta ctgctaccag tactactccg gctacacctt cggccagggc					300
[0233]	accaagctgg agatcaag					318

[0234]	<210>	16	
[0235]	<211>	348	
[0236]	<212>	DNA	
[0237]	<213>	人工序列	
[0238]	<220>		
[0239]	<223>	重组序列	
[0240]	<400>	16	
[0241]		gaggtgcagc tgggtgcagtc cggcgccgag gtgaagaagc cggctcctc cgtgaaggtg	60
[0242]		tcctgcaagg cctccggcta ctcttcacc tcctactaca tccactgggt gaggcaggcc	120
[0243]		cccggccagg gcctggagtg gatgggcagg atcgccccg gctccggcga catcaactac	180
[0244]		aacgagaagt tcaagggcag ggccaccttc accgtggaca agtccacctc caccgcctac	240
[0245]		atggagctgt cctccctgag gtccgaggac accgccgtgt actactgcgc caggttccac	300
[0246]		tacgacggcg ccgactgggg ccagggcacc ctggtgaccg tctcgagc	348
[0247]	<210>	17	
[0248]	<211>	106	
[0249]	<212>	PRT	
[0250]	<213>	人工序列	
[0251]	<220>		
[0252]	<223>	重组序列	
[0253]	<400>	17	
[0254]		Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0255]		1 5 10 15	
[0256]		Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Glu Asn	
[0257]		20 25 30	
[0258]		Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
[0259]		35 40 45	
[0260]		Tyr Tyr Thr Asp Ile Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[0261]		50 55 60	
[0262]		Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
[0263]		65 70 75 80	
[0264]		Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Tyr Ser Gly Tyr Thr	
[0265]		85 90 95	
[0266]		Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[0267]		100 105	
[0268]	<210>	18	
[0269]	<211>	116	
[0270]	<212>	PRT	
[0271]	<213>	人工序列	
[0272]	<220>		

[0273]	<223>	重组序列	
[0274]	<400>	18	
[0275]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
[0276]	1	5	10 15
[0277]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr		
[0278]		20	25 30
[0279]	Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met		
[0280]		35	40 45
[0281]	Gly Arg Ile Gly Pro Gly Ser Gly Asp Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe		
[0282]		50	55 60
[0283]	Lys Gly Arg Ala Thr Phe Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
[0284]		65	70 75 80
[0285]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0286]		85	90 95
[0287]	Ala Arg Phe His Tyr Asp Gly Ala Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
[0288]		100	105 110
[0289]	Thr Val Ser Ser		
[0290]		115	
[0291]	<210>	19	
[0292]	<211>	318	
[0293]	<212>	DNA	
[0294]	<213>	人工序列	
[0295]	<220>		
[0296]	<223>	重组序列	
[0297]	<400>	19	
[0298]	gacatccaga tgaccagtc cccctcctcc ctgtccgcct ccgtgggcga cagggtgacc	60	
[0299]	atcacctgca aggcctcca gaacatcaac gagaacctgg actggtacca gcagaagccc	120	
[0300]	ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accgacatcc tgcagaccgg catcccctcc	180	
[0301]	aggttctccg gctccggctc cggcaccgac tacacctga ccatctcctc cctgcagccc	240	
[0302]	gaggacttgc ccactacta ctgctaccag tactactccg gctacacctt cggctgcggc	300	
[0303]	accaagctgg agatcaag	318	
[0304]	<210>	20	
[0305]	<211>	348	
[0306]	<212>	DNA	
[0307]	<213>	人工序列	
[0308]	<220>		
[0309]	<223>	重组序列	
[0310]	<400>	20	
[0311]	gaggtgcagc tgggtgcagtc cggcgccgag gtgaagaagc ccggctcctc cgtgaagggtg	60	

[0312] tcctgcaagg cctccggcta ctccttcacc tctactaca tccactgggt gaggcaggcc 120
 [0313] cccggccagt gcctggagt gatgggcagg atcgccccg gctccggcga catcaactac 180
 [0314] aacgagaagt tcaagggcag ggccaccttc accgtggaca agtccacctc caccgcctac 240
 [0315] atggagctgt cctccctgag gtccgaggac accgccgtgt actactgcgc caggttccac 300
 [0316] tacgacggcg ccgactgggg ccagggcacc ctggtgaccg tgtcctcc 348
 [0317] <210> 21
 [0318] <211> 242
 [0319] <212> PRT
 [0320] <213> 人工序列
 [0321] <220>
 [0322] <223> 重组序列
 [0323] <400> 21
 [0324] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 [0325] 1 5 10 15
 [0326] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 [0327] 20 25 30
 [0328] Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 [0329] 35 40 45
 [0330] Gly Arg Ile Gly Pro Gly Ser Gly Asp Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 [0331] 50 55 60
 [0332] Lys Gly Arg Ala Thr Phe Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 [0333] 65 70 75 80
 [0334] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0335] 85 90 95
 [0336] Ala Arg Phe His Tyr Asp Gly Ala Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 [0337] 100 105 110
 [0338] Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 [0339] 115 120 125
 [0340] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
 [0341] 130 135 140
 [0342] Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys
 [0343] 145 150 155 160
 [0344] Ala Ser Gln Asn Ile Asn Glu Asn Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 [0345] 165 170 175
 [0346] Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Asp Ile Leu Gln Thr
 [0347] 180 185 190
 [0348] Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
 [0349] 195 200 205
 [0350] Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

[0351]	210	215	220	
[0352]	Tyr Gln Tyr Tyr Ser Gly Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu			
[0353]	225	230	235	240
[0354]	Ile Lys			
[0355]	<210>	22		
[0356]	<211>	726		
[0357]	<212>	DNA		
[0358]	<213>	人工序列		
[0359]	<220>			
[0360]	<223>	重组序列		
[0361]	<400>	22		
[0362]	gaggtgcagc	tggtgcagtc	cggcgccgag	gtgaagaagc cgggtcctc cgtgaaggtg 60
[0363]	tcttgcaagg	cctccggeta	ctccttcacc	tctactaca tccactgggt gaggcaggcc 120
[0364]	cccggccagg	gcctggagtg	gatgggcagg	atcgccccg gctccggcga catcaactac 180
[0365]	aacgagaagt	tcaagggcag	ggccaccttc	accgtggaca agtccacctc caccgcctac 240
[0366]	atggagctgt	cctccctgag	gtccgaggac	accgccgtgt actactgcgc caggttccac 300
[0367]	tacgacggcg	ccgactgggg	ccagggcacc	ctggtgaccg tgtcctccgg aggtggcgg 360
[0368]	tctggcgggtg	gcggttccgg	tggcgggtgga	tcgggaggtg gcggttctga catccagatg 420
[0369]	accagtccc	cctcctcct	gtccgcctcc	gtgggcgaca gggtgaccat cacctgcaag 480
[0370]	gcctcccaga	acatcaacga	gaacctggac	tggtaccagc agaagccccg caaggcccc 540
[0371]	aagctgctga	tctactacac	cgacatcctg	cagaccggca tcccctccag gttctccggc 600
[0372]	tccggctccg	gcaccgacta	caccctgacc	atctcctccc tgcagcccga ggacttcgcc 660
[0373]	acctactact	gctaccagta	ctactccggc	tacaccttcg gccagggcac caagctggag 720
[0374]	atcaag			726
[0375]	<210>	23		
[0376]	<211>	242		
[0377]	<212>	PRT		
[0378]	<213>	人工序列		
[0379]	<220>			
[0380]	<223>	重组序列		
[0381]	<400>	23		
[0382]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser			
[0383]	1	5	10	15
[0384]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr			
[0385]	20	25	30	
[0386]	Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met			
[0387]	35	40	45	
[0388]	Gly Arg Ile Gly Pro Gly Ser Gly Asp Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe			
[0389]	50	55	60	

[0429]	aagctgctga tctactacac cgacatcctg cagaccggca tcccctccag gttctccggc	600
[0430]	tccggctccg gcaccgacta caccctgacc atctctctccc tgcagcccga ggacttcgcc	660
[0431]	acctactact gctaccagta ctactcggc tacaccttcg gctgcggcac caagctggag	720
[0432]	atcaag	726

图 1 (A)

轻链移植物 650

```

1   5  10  15  20  25  30  35  40  45  50  55  60  65  70  75  80  85  90  95  100 105
DIQMTQSPFVLSASVGRVITLSCKASQININELDWHYHQKGEAPKLLIYYTDIILDTGIPSRFRSGSGGIDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYISG-YTFGFGTKLEIK
IGKV1-39
DIQMTQSPSSLASVGRVITICRASQSISSYLWYQKPKGAPKLLIYAASSIQSGVPSRFRSGSGGIDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFFGQGTKLEIK
650gL8
DIQMTQSPSSLASVGRVITICKASQININELDWHYQKPKGAPKLLIYYTDIILDTGIPSRFRSGSGGIDYTLTISSLQPEDFATYYCYQYISG-YTFGQGTKLEIK

```

图例

650=大鼠可变轻链序列
 650gL8=使用 IGKV1-39 人种系作为受体框架的 650 的人源化移植植物可变轻链。
 CDR 以粗体/下划线显示。
 供体残基以粗体/斜体显示并突出显示: I58 和 Y71。

图 1 (B)

重链移植物 650

```

1   5  10  15  20  25  30  35  40  45  50  55  60  65  70  75  80  85  90  95  100 105 110
QVQLQQSGAELVKPGSSVRMSCKASGYSTSYIHWIKRPGQGLEWIGRIGPGSGDINYNKEKFGKATFIVDKYFSTAYMQLSSLSPEDTAVFYCARFHY-DGADRWQGGTIVYSS
IGHV1-69
QVQLVQSGAELVKKPGSSVKVSKASGGTFSYALISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFGQVRIITADKSTIAYMELSSLRSEDVAVYCAR -YFDXWGQGTIVYSS
650gH9
EVQLVQSGAELVKKPGSSVKVSKASGYSTSYIHWVRQAPGQGLEWMGRIGPGSGDINYNKEKFGKATFIVDKSISTAYMELSSLRSEDVAVYCARFHY-DGADRWQGGTIVYSS

```

图例

650=大鼠可变重链序列
 650gH9=使用 IGHV1-69 人种系作为受体框架的 650 的人源化移植植物可变重链。
 CDR 以粗体/下划线显示。
 供体残基以粗体/斜体显示并突出显示: A67、F69 和 V71。

图1:Ab650人源化比对

抗 IL-13Ab 650 (1539) 的 CDR 序列

SEQ ID NO: 1 Ab 650 (1539) 的 CDRL1

KASQNINENLD

SEQ ID NO: 2 Ab 650 (1539) 的 CDRL2

YTDILQT

SEQ ID NO: 3 Ab 650 (1539) 的 CDRL3

YQYYSGYT

SEQ ID NO: 4 Ab 650 (1539) 的 CDRH1

GYSFTSYYIH

SEQ ID NO: 5 Ab 650 (1539) 的 CDRH2

RIGPGSGDINYNKFKG

SEQ ID NO: 6 Ab 650 (1539) 的 CDRH3

FHYDGAD

SEQ ID NO: 7 大鼠 Ab 650 (1539) VL 区

DIQMTQSPPVLSASVGRVTLSCASQNINENLDWYHQKHGEAPKLLIYYTDILQTGIPSRFSGSGSG
TDYTLTISSLQPEDVATYYCYQYYSGYTFGPGTKLEIK

SEQ ID NO: 8 大鼠 Ab 650 (1539) VL 区

gacatccagatgaccagtcctcctccagtcctgtctgcatctgtgggagacagagtcactctcagttg
caaagcaagtcagaatattaatgagaacttagactggatcatcaaaagcatggcgaagctccaaaac
tctgatataattatacagacatcttgcacacgggcatcccatcaagggtcagtgccagtgatctggg
acagattacacactcaccatcagcagcctgcagcctgaagatggtgccacatattactgctatcagta
ttacagtggttacacgcttggacctgggaccaagctggaaataaaa

SEQ ID NO: 9 大鼠 Ab 650 (1539) VH 区

QVQLQQSGAELVKPGSSVKMSCKASGYSFYSYIHWIKRPGQGLEWIGRIGPGSGDINYNKFKGKA
TFTVDKYFSTAYMQLSSLSPEDTAVFYCARFHYDGADWGQGTLLVTVSS

SEQ ID NO:10 大鼠 Ab 650 (1539) VH 区

caggtacaactgcagcagctctggagctgagttggtgaagcctgggtcttcagtgaagatgtcctgcaa
ggcttctggctacagtttcaccagctactacatacactggataaagcagaggcctggacagggccttg
agtggattggcgctattggctcctggaagtggagatattaattacaatgagaagttcaagggcaaggcc
acatttactgtggacaaatatttcagcacagcctacatgcaactcagcagcctgtcacctgaggacac
tgcggtcttttactgtgcaagatttcactatgatggggctgactggggccaaggcactctggtcacag
tctcgagc

SEQ ID NO:11 人 IGKV1-39 IGKJ2 受体框架

DIQMTQSPSSLSASVGRVITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:12 人 IGHV1-69 IGHJ4 受体框架

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAIHWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRV
TITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYFDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:13 Ab 650 (1539) gL8 V-region (未突变*)

DIQMTQSPSSLSASVGRVITCKASQININENLDWYQQKPKAPKLLIYYTDILQTGIPSRFSGSGSG
TDYTLTISSLQPEDFATYYCYQYYSYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:14 Ab 650 (1539) gH9 V-region (未突变*)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYSFTSYIHWVRQAPGQGLEWMGRIGPGSGDINYNKFKGRA
TFTVVKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARFHYDGADWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:15 Ab 650 (1539) gL8 V-region (未突变*)

gacatccagatgaccagtccccctcctcctgtccgcctccgtgggcgacaggggtgaccatcacctg
caaggcctcccagaacatcaacgagaacctggactggtagcagcagaagcccggcaaggcccccaagc
tgctgatctactacaccgacatcctgcagaccggcatcccctccaggttctccggctccggctccggc
accgactacacctgaccatctcctccctgcagcccaggacttcgccacctaactactgctaccagta
ctactccggctacaccttcggccagggcaccaagctggagatcaag

SEQ ID NO:16 Ab 650 (1539) gH9 V-region (未突变*)

gaggtgcagctggtgcagtcggcgccgaggtgaagaagcccggctcctccgtgaaggtgtcctgcaa
ggcctccggctactccttcacctcctactacatccactgggtgaggcaggccccggccagggcctgg
agtggatgggagcagatcggccccggctccggcgacatcaactacaacgagaagttcaagggcagggcc
accttcaccgtggacaagtccacctccaccgctacatggagctgtcctcctgaggtccgaggacac
cgccgtgtactactgcgccaggttccactacgacggcgccgactggggccagggcacctcctggtgaccg
tctcgagc

