(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119708230 A
(43)申请公布日 2025.03.28

(21)申请号 202411913207.8

(22)申请日 2021.02.25

(30)优先权数据
62/982,521 2020.02.27 US

(62)分案原申请数据
202180015046.9 2021.02.25

(71)申请人 正大天晴药业集团股份有限公司
地址 222062 江苏省连云港市郁州南路369号

(72)发明人 陈明久 谭巍 仲晓燕 马志清 夏树开 张正平 徐宏江 卢志坚

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 37/08(2006.01)

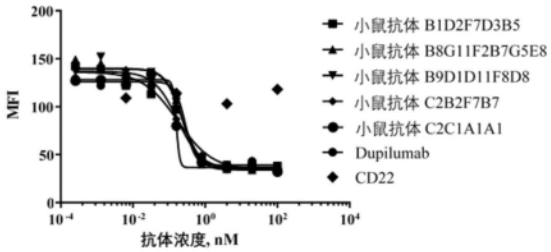
权利要求书4页 说明书42页
序列表（电子公布） 附图18页

(54)发明名称

结合IL4R的抗体及其用途

(57)摘要

本发明涉及抗体领域,提供了一种结合IL4R的抗体及其用途。具体地,本发明提供了特异性结合人IL4Rα的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分。本发明还提供了编码抗体或其抗原结合部分的核酸分子、用于表达抗体或其抗原结合部分的表达载体、宿主细胞和方法。本发明进一步提供了包含抗体或其抗原结合部分的双特异性分子、溶瘤病毒和药物组合物,以及使用本发明的抗IL4Rα抗体或其抗原结合部分进行治疗的方法。



	小鼠抗体 B1D2F7D3B5	小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8
IC50	0.1739	0.2332

小鼠抗体 B9D1D11F8D8	小鼠抗体 C2B2F7B7	小鼠抗体 C2C1A1A1	Dupilumab
0.2331	0.1745	~0.1583	0.2795

CN 119708230 A

1.一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,所述单克隆抗体或其抗原结合部分结合白介素4受体α亚基(IL4Rα),其包含重链可变区,所述重链可变区包含CDR1、CDR2和CDR3,其中所述CDR1、CDR2和CDR3包含:(1)分别与SEQ ID NOs:1、5和10所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(2)分别与SEQ ID NOs:1、6和11所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(3)分别与SEQ ID NOs:2、7和12所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(4)分别与SEQ ID NOs:3、8和13所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(5)分别与SEQ ID NOs:4、8和13所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;或(6)分别与SEQ ID NOs:3、9和14所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

2.根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述重链可变区包含与SEQ ID NOs:32、33(X1=W、X2=S;X1=L、X2=A;X1=W、X2=A)、34、38、40、41(X1=A、X2=K、X3=V、X4=H;X1=V、X2=K、X3=V、X4=H;X1=A、X2=Q、X3=V、X4=H;X1=A、X2=K、X3=M、X4=H;X1=A、X2=K、X3=V、X4=Y;X1=V、X2=K、X3=M、X4=H)、42(X1=R、X2=A、X3=S、X4=N;X1=K、X2=V、X3=S、X4=N;X1=K、X2=A、X3=T、X4=N;X1=K、X2=A、X3=S、X4=D;X1=R、X2=V、X3=T、X4=N)、43、44、47、49、51或53所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

3.根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含轻链可变区,所述轻链可变区包含CDR1、CDR2和CDR3,其中所述CDR1、CDR2和CDR3包含:(1)分别与SEQ ID NOs:15、22和26所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(2)分别与SEQ ID NOs:16、22和27所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(3)分别与SEQ ID NOs:17、23和28所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(4)分别与SEQ ID NOs:18、24和29所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(5)分别与SEQ ID NOs:19、24和30所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(6)分别与SEQ ID NOs:20、25和31所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;或(7)分别与SEQ ID NOs:21、25和31所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

4.根据权利要求3所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述轻链可变区包含与SEQ ID NOs:35、36(X1=L、X2=I;X1=F、X2=V;X1=F、X2=I)、37、39、45、46、48、50、52或54所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

5.根据权利要求3所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述重链可变区和轻链可变区包含:(1)分别与SEQ ID NOs:1、5、10、15、22和26所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(2)分别与SEQ ID NOs:1、6、11、16、22和27所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(3)分别与SEQ ID NOs:2、7、12、17、23和28所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(4)分别与SEQ ID NOs:3、8、13、18、24和29所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(5)分别与SEQ ID NOs:4、8、13、19、24和30所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(6)分别与SEQ ID NOs:3、9、14、20、25和31所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;或(7)分别与SEQ ID NOs:3、9、14、21、25和31所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

6.根据权利要求5所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述重链可变区和轻链可变区包含:(1)分别与SEQ ID NOs:32和35所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(2)分别与SEQ ID NOs:33(X1=W、X2=S)和36(X1=L、X2=I;X1=F、X2=V;X1=F、X2=I)所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(3)分别与SEQ ID NOs:33(X1=W、X2=S)和37所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(4)分别与SEQ ID NOs:34和36(X1=L、X2=I;X1=F、X2=V;X1=F、X2=I)所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(5)分别与SEQ ID NOs:34和37所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(6)分别与SEQ ID NOs:33(X1=L、X2=A)和36(X1=L、X2=I;X1=F、X2=V;X1=F、X2=I)所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(7)分别与SEQ ID NOs:33(X1=L、X2=A)和37所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(8)分别与SEQ ID NOs:33(X1=W、X2=A)和36(X1=L、X2=I;X1=F、X2=V;

X1＝F、X2＝I)所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列;(9)分别与SEQ ID NOs:33(X1＝W、X2＝A)和37所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列;(10)分别与SEQ ID NOs:38和39所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列;(11)分别与SEQ ID NOs:40和45所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列;(12)分别与SEQ ID NOs:41(X1＝A、X2＝K、X3＝V、X4＝H;X1＝V、X2＝K、X3＝V、X4＝H;X1＝A、X2＝Q、X3＝V、X4＝H;X1＝A、X2＝K、X3＝M、X4＝H;X1＝A、X2＝K、X3＝V、X4＝Y;X1＝V、X2＝K、X3＝M、X4＝H)和46所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列;(13)分别与SEQ ID NOs:42(X1＝R、X2＝A、X3＝S、X4＝N;X1＝K、X2＝V、X3＝S、X4＝N;X1＝K、X2＝A、X3＝T、X4＝N;X1＝K、X2＝A、X3＝S、X4＝D;X1＝R、X2＝V、X3＝T、X4＝N)和46所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列;(14)分别与SEQ ID NOs:43和46所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列;(15)分别与SEQ ID NOs:44和46所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列;(16)分别与SEQ ID NOs:47和48所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列;(17)分别与SEQ ID NOs:49和50所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列;(18)分别与SEQ ID NOs:51和52所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列;或(19)分别与SEQ ID NOs:53和54所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列;

可选地,其包含连接至所述重链可变区的重链恒定区,和连接至所述轻链可变区的轻链恒定区,所述重链恒定区具有SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列,所述轻链恒定区具有SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列。

7.根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述单克隆抗体或其抗原结合部分(a)与人IL4Rα结合;(b)与猴IL4Rα结合;(c)阻断IL4Rα-IL4的相互作用;和(d)阻断IL4Rα-IL13-IL13Rα1的相互作用;

可选地,所述单克隆抗体或其抗原结合部分是小鼠、人、嵌合或人源化抗体;

可选地,所述单克隆抗体或其抗原结合部分是IgG1、IgG2或IgG4同种型。

8.一种核苷酸,其编码权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分。

9.一种表达载体,其包含权利要求8所述的核苷酸。

10.一种宿主细胞,其包含权利要求8所述的核苷酸或权利要求9所述的表达载体。

11.一种药物组合物,其包含权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分、权利要求8所述的核苷酸、权利要求9所述的表达载体或权利要求10所述的宿主细胞,以及药学上可接受的载体;

可选地,所述药物组合物进一步包含抗过敏剂或抗肿瘤剂;

可选地,所述抗过敏剂是抗组胺药、皮质类固醇、β-肾上腺素能受体激动剂、靶向cyc-LTs的药物或靶向IgE的药物。

12.一种治疗与过度的IL4和/或IL13信号传导相关的过敏性疾病的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的权利要求11所述的药物组合物;

可选地,所述过敏性疾病是特应性皮炎、过敏反应、过敏性鼻炎或过敏性哮喘。

13.一种治疗受试者中与STAT6活化增加相关的肿瘤的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的权利要求11所述的药物组合物;

可选地,所述肿瘤是实体瘤。

结合IL4R的抗体及其用途

相关申请及以引用方式并入

[0001] 本申请要求2020年2月27日提交的美国临时申请No.62/982,521的优先权。本申请是申请日为2021年02月25日、中国申请号为202180015046.9、发明名称为“结合IL4R的抗体及其用途”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 上述申请以及本申请引用或其审查程序中的所有文献(“申请引用的文献”)、本申请引用或参考的所有文献(包括但不限于本申请引用的所有文献、专利、已公开的专利申请)(“本申请引用的文献”)以及本申请引用的文献中引用或参考的所有文献,连同本申请或通过引用并入本申请的任何文献提及的任何产品的任何制造商的说明、描述、产品规格和产品页,均通过引用的方式并入,并可以用于本发明的实践。更具体地,本申请引用的所有参考文献都以相同程度通过引用的方式并入,就如同各文献被具体地和单独地指出通过引用的方式并入本申请一样。本发明提及的任何Genbank序列均通过引用Genbank序列的方式并入,以此引用日期作为本发明最早生效的申请日。

技术领域

[0003] 本发明涉及一种分离的单克隆抗体,特别涉及一种小鼠、嵌合或人源化单克隆抗体或其抗原结合部分,其以高亲和力和功能性结合人IL4R特别是IL4Rα。本发明还提供了编码本发明的抗体或其抗原结合部分的核酸分子,用于表达本发明的抗体或其抗原结合部分的表达载体、宿主细胞和方法。本发明进一步提供了包含本发明的抗体或其抗原结合部分的双特异性分子、免疫缀合物、嵌合抗原受体、溶瘤病毒和药物组合物,以及使用本发明的抗IL4Rα抗体或其抗原结合部分进行治疗的方法。

背景技术

[0004] 2型炎症相关的过敏性疾病,例如特应性皮炎、过敏反应、过敏性鼻炎和过敏性哮喘,困扰着全世界超过30亿人并且发病率持续上升。根据卫生假说,高发病率的部分原因是随着生活水平的提高,接触传染源的机会减少,使免疫系统对某些原本无害的过敏原更加敏感(Stephen J.Galli et al.,(2008)Nature454(7203):445-454)。白介素4(IL-4)和IL-13是2型免疫中两个关键因子。它们是驱动大多数2型炎症相关的关键标志所必需的,例如,免疫球蛋白E的产生,和先天性细胞在炎症部位的募集(Gruning G etal.,(1998)Science 282:2261-2263;Rankin JA et al.,(1996)Proc Natl Acad Sci USA 93:7821-7825;Wills-Karp Met al.,(1998)Science 282:2258-2261)。

[0005] IL-4和IL-13在人的5号染色体上彼此相邻,并且共享调控元件。在2型辅助性T细胞(T_H2)中,观察到这两种细胞因子的协调和非协调表达(Katherine Bao et al.,(2015)Cytokine 75(1):25-37)。这两种细胞因子结合细胞表面受体以调节细胞功能并激活转录机制。具体而言,IL-4首先以皮摩尔级亲和力与IL-4Rα链结合,然后募集IL-2Rγ链γc形成I型受体复合物,或募集IL-13Rα1形成II型受体复合物。IL-2Rγ γc和IL-13Rα1的水平或可用性决定了其中哪一个会被募集以形成受体复合物。已经发现,非造血细胞不表达或低表

达IL-2Rγ γc,但高表达IL-13Rα1,而淋巴细胞则反之。骨髓细胞则介于这两类细胞之间。II型IL-4受体复合物的形成也可以通过IL-13与IL-13Rα1链的结合(以纳摩尔级亲和力结合)而启动,并进一步募集IL-4Rα链。除了II型IL-4受体外,IL-13还能够以皮摩尔级亲和力结合IL-13Rα2,该受体被认为是诱饵受体(Irina G.Luzina et al.,(2012)J Leukoc Biol 92(4):753-764)。IL-4受体复合物一旦形成,细胞内的信号分子就会被激活,其中STAT6和IRS信号传导会响应I型IL-4受体的激活,而II型IL-4受体则无法显著激活IRS(Heller NM et al.,(2008)Sci Signal 1(51):ra17-ra17)。STAT6信号传导对于T_H2的细胞分化和IL-4的产生非常重要,而IRS分子能够激活PI3K和mTOR信号通路(Gadani SP et al.,(2012)J Immunol 189:4213-4219)。

[0006] 研究表明,过度的IL-4/IL-13信号传导可能会引起过敏性疾病,因此一些调节IL-4和IL-13介导的信号传导的治疗性抗体已被开发。例如,结合IL-13的Leprikizumab、Anrukinzumab和Tralokinumab,和靶向IL-4的Pascolizumab。Dupilumab和Pitrakinra是IL-4Rα拮抗剂,其中Pitrakinra与IL-4Rα结合后会同时阻断I型和II型IL-4受体(Antoniu SA(2010)Curr Opin Investig Drugs 11:1286-1294)。此外,已发现STAT6抑制剂可以抑制前列腺癌细胞的生长,表明IL-4/IL-13的靶向治疗可能有利于癌症治疗(Nappo G et al.,(2017)Oncogenesis 2017,6(5):e342)。因此,需要更多具有更理想治疗特性的靶向IL-4、IL-13及其受体(特别是IL-4Rα)的抗体。

发明概述

[0007] 本发明提供了一种分离的单克隆抗体,例如小鼠、人、嵌合或人源化单克隆抗体或其抗原结合部分,其与IL4Rα(例如,人IL4Rα)结合,并且与现有技术中的抗IL4Rα抗体例如Dupilumab相比,具有相当的或更高的人IL4Rα和/或猴IL4Rα结合亲和力/能力,以及对IL4Rα-IL4/IL13-IL13Rα1相互作用和相应的胞内信号转导具有相当的或更高的阻断活性。

[0008] 本发明的抗体或其抗原结合部分具有多种用途,包括检测IL4Rα蛋白,以及治疗和预防IL4、IL13或IL4R相关疾病,例如过敏性疾病和癌症。

[0009] 因此,在一方面,本发明提供了一种分离的单克隆抗体(例如,小鼠、嵌合或人源化抗体)或其抗原结合部分,所述单克隆抗体或其抗原结合部分与IL4Rα结合,其包含重链可变区,所述重链可变区包含CDR1区、CDR2区和CDR3区,其中CDR1区、CDR2区和CDR3区包含:(1)分别与SEQ ID NOs:1、5和10所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(2)分别与SEQ ID NOs:1、6和11所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(3)分别与SEQ ID NOs:2、7和12所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(4)分别与SEQ ID NOs:3、8和13所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(5)分别与SEQ ID NOs:4、8和13所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;或(6)分别与SEQ ID NOs:3、9和14所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、

90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列。

[0010] 在一方面,本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分包含重链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NOs:32、33(X1＝W、X2＝S;X1＝L、X2＝A;X1＝W、X2＝A)、34、38、40、41(X1＝A、X2＝K、X3＝V、X4＝H;X1＝V、X2＝K、X3＝V、X4＝H;X1＝A、X2＝Q、X3＝V、X4＝H;X1＝A、X2＝K、X3＝M、X4＝H;X1＝A、X2＝K、X3＝V、X4＝Y;X1＝V、X2＝K、X3＝M、X4＝H)、42(X1＝R、X2＝A、X3＝S、X4＝N;X1＝K、X2＝V、X3＝S、X4＝N;X1＝K、X2＝A、X3＝T、X4＝N;X1＝K、X2＝A、X3＝S、X4＝D;X1＝R、X2＝V、X3＝T、X4＝N)、43、44、47、49、51或53所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列,其中所述抗体或其抗原结合部分结合IL4Rα。如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列可以由SEQ ID NOs:59或60所示的核苷酸序列编码。如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列可以由SEQ ID NOs:65或66所示的核苷酸序列编码。如SEQ ID NOs:33(X1＝W、X2＝A)和41(X1＝V、X2＝K、X3＝M、X4＝H)所示的氨基酸序列可以分别由SEQ ID NOs:61或67所示的核苷酸序列编码。

[0011] 在一方面,本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分与IL4Rα结合,所述单克隆抗体或其抗原结合部分包含轻链可变区,所述轻链可变区包含CDR1区、CDR2区和CDR3区,其中CDR1区、CDR2区和CDR3区包含:(1)分别与SEQ ID NOs:15、22和26所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列;(2)分别与SEQ ID NOs:16、22和27所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列;(3)分别与SEQ ID NOs:17、23和28所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列;(4)分别与SEQ ID NOs:18、24和29所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列;(5)分别与SEQ ID NOs:19、24和30所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列;(6)分别与SEQ ID NOs:20、25和31所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列;或(7)分别与SEQ ID NOs:21、25和31所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列。

[0012] 在一方面,本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分包含轻链可变区,所述轻链可变区包含与SEQ ID NOs:35、36(X1＝L、X2＝I;X1＝F、X2＝V;X1＝F、X2＝I)、37、39、45、46、48、50、52或54所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列,其中所述抗体或其抗原结合部分结合IL4Rα。如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列可以由SEQ ID NOs:62或63所示的核苷酸序列编码。如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列可以由SEQ ID NOs:68或69所示的核苷酸序列编码。如SEQ ID NOs:36(X1＝F、X2＝V)和46所示的氨基酸序列可以分别由SEQ ID NOs:64或70所示的核苷酸序列编码。

[0013] 在一方面,本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链

可变区,所述重链可变区和轻链可变区分别包含CDR1区、CDR2区和CDR3区,其中重链可变区CDR1、CDR2和CDR3以及轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3包含:(1)分别与SEQ ID NOs:1、5、10、15、22和26所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(2)分别与SEQ ID NOs:1、6、11、16、22和27所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(3)分别与SEQ ID NOs:2、7、12、17、23和28所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(4)分别与SEQ ID NOs:3、8、13、18、24和29所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(5)分别与SEQ ID NOs:4、8、13、19、24和30所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(6)分别与SEQ ID NOs:3、9、14、20、25和31所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;或(7)分别与SEQ ID NOs:3、9、14、21、25和31所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,其中所述抗体或其抗原结合部分结合IL4Rα。

[0014] 在一方面,本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区包含:(1)分别与SEQ ID NOs:32和35所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(2)分别与SEQ ID NOs:33(X1=W、X2=S)和36(X1=L、X2=I;X1=F、X2=V;X1=F、X2=I)所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(3)分别与SEQ ID NOs:33(X1=W、X2=S)和37所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(4)分别与SEQ ID NOs:34和36(X1=L、X2=I;X1=F、X2=V;X1=F、X2=I)所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(5)分别与SEQ ID NOs:34和37所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(6)分别与SEQ ID NOs:33(X1=L、X2=A)和36(X1=L、X2=I;X1=F、X2=V;X1=F、X2=I)所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(7)分别与SEQ ID NOs:33(X1=L、X2=A)和37所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(8)分别与SEQ ID NOs:33(X1=W、X2=A)和36(X1=L、X2=I;X1=F、X2=V;X1=F、X2=I)所示的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;(9)分别与SEQ ID NOs:33(X1=W、X2=A)和37所示的氨基酸序列具有至少85%、

86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列；(10)分别与SEQ ID NOs:38和39所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列；(11)分别与SEQ ID NOs:40和45所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列；(12)分别与SEQ ID NOs:41(X1＝A、X2＝K、X3＝V、X4＝H;X1＝V、X2＝K、X3＝V、X4＝H;X1＝A、X2＝Q、X3＝V、X4＝H;X1＝A、X2＝K、X3＝M、X4＝H;X1＝A、X2＝K、X3＝V、X4＝Y;X1＝V、X2＝K、X3＝M、X4＝H)和46所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列；(13)分别与SEQ ID NOs:42(X1＝R、X2＝A、X3＝S、X4＝N;X1＝K、X2＝V、X3＝S、X4＝N;X1＝K、X2＝A、X3＝T、X4＝N;X1＝K、X2＝A、X3＝S、X4＝D;X1＝R、X2＝V、X3＝T、X4＝N)和46所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列；(14)分别与SEQ ID NOs:43和46所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列；(15)分别与SEQ ID NOs:44和46所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列；(16)分别与SEQ ID NOs:47和48所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列；(17)分别与SEQ ID NOs:49和50所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列；(18)分别与SEQ ID NOs:51和52所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列；或(19)分别与SEQ ID NOs:53和54所示的氨基酸序列具有至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列，其中所述抗体或其抗原结合部分结合IL4Rα。

[0015] 在一个实施方案中，本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链，所述重链和轻链通过二硫键连接，所述重链包含重链可变区和重链恒定区，所述轻链包含轻链可变区和轻链恒定区，其中重链可变区的C末端连接至重链恒定区的N末端，轻链可变区的C末端连接至轻链恒定区的N末端，其中重链可变区和轻链可变区包含上述的氨基酸序列，并且所述抗体或其抗原结合部分结合IL4Rα。重链恒定区可以是具有如SEQ ID NO:55所示氨基酸序列的人IgG4恒定区，轻链恒定区可以是具有如SEQ ID NO:56所示氨基酸序列的人κ恒定区。如SEQ ID NOs:55和56所示的氨基酸序列可以分别由SEQ ID NOs:71和72所示的核苷酸序列编码。

[0016] 在一些实施方案中，本发明的抗体包含两条重链和两条轻链，或由两条重链和两条轻链组成，其中每条重链包含上述的重链恒定区、上述的重链可变区或CDR序列，并且每条轻链包含上述的轻链恒定区、上述的轻链可变区或CDR序列，其中所述抗体结合IL4Rα。本发明的抗体可以是全长抗体，例如IgG1、IgG2或IgG4同种型全长抗体，优选为具有弱ADCC活性的IgG4同种型全长抗体。轻链恒定区可以是κ恒定区。在其他实施方案中，本发明的抗体

可以是单链可变区(scFv)抗体,或抗体片段,例如Fab或$F(ab')_2$片段。

[0017] 与现有技术中的抗IL4Rα抗体例如Dupilumab相比,本发明的抗体或其抗原结合部分具有相当的(如果不是更高的话)人IL4Rα和/或猴IL4Rα结合亲和力/能力,以及对IL4Rα-IL4/IL13-IL13Rα1相互作用和相应的胞内信号转导具有相当的(如果不是更高的话)阻断活性。

[0018] 本发明还提供了包含本发明的抗体或其抗原结合部分的双特异性分子,其中所述抗体或其抗原结合部分和与其具有不同结合特异性的第二功能分子(例如,第二抗体)相连接。本发明还提供了包含本发明的抗体或其抗原结合部分的免疫缀合物,例如抗体药物偶联物,其中所述抗体或其抗原结合部分与治疗剂(例如细胞毒素)相连接。在另一方面,本发明的抗体或其抗原结合部分可以是嵌合抗原受体(CAR)的一部分。本发明还提供了包含嵌合抗原受体的免疫细胞,例如T细胞。本发明的抗体或其抗原结合部分还可以由溶瘤病毒编码或与溶瘤病毒一起使用。

[0019] 本发明还提供了组合物,其包含本发明的抗体或其抗原结合部分、免疫缀合物、双特异性分子、溶瘤病毒、CAR或CAR-T细胞,以及药学上可接受的载体。在一些实施方案中,药物组合物可进一步包含抗过敏剂或抗肿瘤剂。

[0020] 本发明还提供了包含编码本发明的抗体或其抗原结合部分的核酸分子,以及包含所述核酸分子的表达载体和包含所述表达载体的宿主细胞。本发明还提供了一种使用包含表达载体的宿主细胞制备抗IL4Rα抗体或其抗原结合部分的方法,其包括以下步骤:(i)在宿主细胞中表达抗体,和(ii)从宿主细胞或其细胞培养物中分离抗体。

[0021] 在另一方面,本发明提供了减少IL4/IL13信号传导的方法。IL4通过包含IL-4Rα和γC的受体传导信号,而IL13通过包含IL-4Rα和IL13 Rα1的受体传导信号。IL4/IL13信号传导的非限制性实例包括B细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞(例如,活化的巨噬细胞)的活化和/或增殖,成纤维细胞的增殖,和平滑肌的增殖例如气道平滑肌细胞的增殖。

[0022] 在另一方面,本发明提供了一种治疗与过度的IL4/IL13信号传导相关的疾病的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本发明的抗体或其抗原结合部分。

[0023] 所述疾病可以是过敏性疾病。所述过敏性疾病可以是特应性皮炎、过敏反应、过敏性鼻炎或过敏性哮喘。在一些实施方案中,治疗过敏性疾病的方法包括向所述受试者施用本发明的组合物、双特异性分子、或编码抗体或带有抗体的溶瘤病毒,或者能够在受试者中表达前述相同成分的核酸分子或载体。该方法还包含施用抗过敏剂。所述抗过敏剂可以是抗组胺药、皮质类固醇、β-肾上腺素能受体激动剂、靶向cyc-LTs的药物或靶向IgE的药物。

[0024] 所述疾病可以是肿瘤疾病。所述肿瘤可以是实体瘤或非实体瘤。在一些实施方案中,所述肿瘤是前列腺癌。在一些实施方案中,所述方法包括向所述受试者施用本发明的组合物、双特异性分子、免疫缀合物如抗体药物偶联物、CAR-T细胞、或编码抗体或带有抗体的溶瘤病毒,或者能够在受试者中表达前述相同成分的核酸分子或载体。在一些实施方案中,至少一种另外的抗癌抗体可以与本发明的抗体或其抗原结合部分一起施用,例如抗VISTA抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗LAG-3抗体、抗CTLA-4抗体、抗TIM 3抗体、抗STAT3抗体和/或抗ROR1抗体。在另一个实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合部分可以与细胞因子(例如,IL-2、IL-21和/或GM-CSF)或共刺激抗体(例如,抗CD137和/或抗GITR抗体)一起施用。本发明的抗体可以是例如,小鼠、人、嵌合或人源化抗体。

[0025] 在另一方面,本发明提供了降低2型免疫应答的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本发明的抗体或其抗原结合部分。在一些实施方案中,所述方法包括向所述受试者施用本发明的组合物、双特异性分子、或编码抗体或带有抗体的溶瘤病毒,或者能够在受试者中表达前述相同成分的核酸分子或载体。

[0026] 在另一方面,本发明提供了诊断的方法、组合物和试剂盒。在一个实施方案中,本发明的抗体用于确定IL4Rα在细胞或组织中的存在和表达,来确定预后以及合适的治疗和随访。

[0027] 基于以下的具体描述与实施例,本发明的其他特征与优点将变得清晰,具体描述与实施例不应解读为限制性的。本申请引用的所有文献、Genbank记录、专利、以及已公开的专利申请的内容通过引用的方式明确地并入本文中。

附图说明

[0028] 图1A-1C示出小鼠抗体B1D2F7D3B5(A)、B8G11F2B7G5E8和B9D1D11F8D8(B)、C2C1A1A1和C2B2F7B7(C)与人IL4Rα的结合能力。

[0029] 图2A-2D示出小鼠抗体B1D2F7D3B5(A)、B8G11F2B7G5E8(B)、B9D1D11F8D8(C)、C2C1A1A1和C2B2F7B7(D)与细胞表面的人IL4Rα的结合能力。

[0030] 图3示出小鼠抗体B1D2F7D3B5、B8G11F2B7G5E8、B9D1D11F8D8、C2C1A1A1和C2B2F7B7与食蟹猴IL4Rα的结合能力。

[0031] 图4A-4B示出小鼠抗体B1D2F7D3B5、B8G11F2B7G5E8和B9D1D11F8D8(A)、C2C1A1A1和C2B2F7B7(B)对人IL4Rα-IL4相互作用的阻断能力。

[0032] 图5A-5B示出小鼠抗体B1D2F7D3B5、B8G11F2B7G5E8和B9D1D11F8D8(A)、C2C1A1A1和C2B2F7B7(B)对参照品与人IL4Rα结合的阻断能力。

[0033] 图6A-6C示出小鼠抗体B1D2F7D3B5和B8G11F2B7G5E8(A)、B9D1D11F8D8(B)、C2C1A1A1和C2B2F7B7(C)对人IL4与细胞表面的人IL4Rα相互作用的阻断能力。

[0034] 图7示出小鼠抗体B1D2F7D3B5、B8G11F2B7G5E8、B9D1D11F8D8、C2C1A1A1和C2B2F7B7对HEK293T-IL4Rα-STAT6-STAT6LUC-LB2细胞中IL4诱导的STAT6磷酸化的抑制活性。

[0035] 图8示出小鼠抗体B1D2F7D3B5、B8G11F2B7G5E8、B9D1D11F8D8、C2C1A1A1和C2B2F7B7对HEK293T-IL4Rα-STAT6-STAT6LUC-LB2细胞中IL13诱导的STAT6磷酸化的抑制活性。

[0036] 图9示出嵌合抗体B8G11F2B7G5E8和C2C1A1A1与人IL4Rα的结合能力。

[0037] 图10示出嵌合抗体B8G11F2B7G5E8和C2C1A1A1与细胞表面的人IL4Rα的结合能力。

[0038] 图11示出嵌合抗体B8G11F2B7G5E8和C2C1A1A1对人IL4Rα-IL4相互作用的阻断能力。

[0039] 图12示出嵌合抗体B8G11F2B7G5E8和C2C1A1A1对HEK293T-IL4Rα-STAT6-STAT6LUC-LB2细胞中IL4诱导的STAT6磷酸化的抑制活性。

[0040] 图13示出嵌合抗体B8G11F2B7G5E8和C2C1A1A1对HEK293T-IL4Rα-STAT6-STAT6LUC-LB2细胞中IL13诱导的STAT6磷酸化的抑制活性。

[0041] 图14A-14B示出人源化抗体huB8G11F2B7G5E8-V2、huB8G11F2B7G5E8-V4和

huB8G11F2B7G5E8-V14(A)、huC2C1A1A1-V14和huC2C1A1A1-V15(B)与人IL4Rα的结合能力。

[0042] 图15A-15B示出人源化抗体huB8G11F2B7G5E8-V2、huB8G11F2B7G5E8-V4和huB8G11F2B7G5E8-V14(A)、huC2C1A1A1-V14和huC2C1A1A1-V15(B)与食蟹猴IL4Rα的结合能力。

[0043] 图16A-16B示出人源化抗体huB8G11F2B7G5E8-V2、huB8G11F2B7G5E8-V4和huB8G11F2B7G5E8-V14(A)、huC2C1A1A1-V14和huC2C1A1A1-V15(B)与cal-IL4Rα的结合能力。

[0044] 图17A-17B示出人源化抗体huB8G11F2B7G5E8-V2、huB8G11F2B7G5E8-V4和huB8G11F2B7G5E8-V14(A)、huC2C1A1A1-V14和huC2C1A1A1-V15(B)与细胞表面的人IL4Rα的结合能力。

[0045] 图18A-18B示出人源化抗体huB8G11F2B7G5E8-V2、huB8G11F2B7G5E8-V4和huB8G11F2B7G5E8-V14(A)、huC2C1A1A1-V14和huC2C1A1A1-V15(B)对人IL4与表达人IL4Rα的293F细胞相互作用的阻断能力。

[0046] 图19A-19B示出人源化抗体huB8G11F2B7G5E8-V2、huB8G11F2B7G5E8-V4和huB8G11F2B7G5E8-V14(A)、huC2C1A1A1-V14和huC2C1A1A1-V15(B)对人IL4Rα-IL4相互作用的阻断能力。

[0047] 图20A-20B示出人源化抗体huB8G11F2B7G5E8-V2、huB8G11F2B7G5E8-V4和huB8G11F2B7G5E8-V14(A)、huC2C1A1A1-V14和huC2C1A1A1-V15(B)对参照品与人IL4Rα结合的阻断能力。

[0048] 图21示出人源化抗体huB8G11F2B7G5E8-V2、huB8G11F2B7G5E8-V4和huB8G11F2B7G5E8-V14(A)、huC2C1A1A1-V14和huC2C1A1A1-V15(B)对HEK293T-IL4Rα-STAT6-STAT6LUC-LB2细胞中IL4诱导的STAT6磷酸化的抑制活性。

[0049] 图22示出人源化抗体huB8G11F2B7G5E8-V2、huB8G11F2B7G5E8-V4和huB8G11F2B7G5E8-V14(A)、huC2C1A1A1-V14和huC2C1A1A1-V15(B)对HEK293T-IL4Rα-STAT6-STAT6LUC-LB2细胞中IL13诱导的STAT6磷酸化的抑制活性。

[0050] 通过结合以示例给出的以下详细描述和附图,可以得到最好的理解,但不应该将本发明仅限于所述的特定实施方案。

发明详述

[0051] 为了更好地理解本发明,首先定义一些术语。其他定义则贯穿详述部分而列出。

[0052] 术语“IL4Rα”是指白介素4受体α亚基。术语“IL4Rα”包括变体、亚型、同系物、直系同源物和旁系同源物。例如,在某些情况下,对人IL4Rα蛋白具有特异性的抗体可与人以外的物种(例如猴)的IL4Rα蛋白发生交叉反应。在其他实施方案中,对人IL4Rα蛋白具有特异性的抗体可以对人IL4Rα蛋白完全特异,并且不与其他物种或其他类型的蛋白发生交叉反应,或者可以与来源于某些其他物种但并非所有其他物种的IL4Rα发生交叉反应。

[0053] 术语“人IL4Rα”是指具有人氨基酸序列的IL4Rα蛋白,例如Genbank登录号为NP_001244335.1的人IL4Rα的氨基酸序列。术语“食蟹猴IL4Rα”和“狨猴IL4Rα”是指IL4Rα序列,其分别具有例如Genbank登录号为NOs.EHH60265.1和NP_001244161.1的氨基酸序列。

[0054] 本文中的术语“抗体”包括全长抗体及其任何抗原结合片段(即,抗原结合部分)或

其单链。全长抗体是包含两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白,重链和轻链由二硫键连接。每条重链由重链可变区(简称V_H)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域构成,即C_{H1}、C_{H2}和C_{H3}。每条轻链由轻链可变区(简称V_L)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域C_L构成。V_H和V_L区还可以划分为称作互补决定区(CDR)的高变区,其由较为保守的骨架区(FR)区分隔开。每个V_H和V_L由三个CDR以及四个FR构成,从氨基端到羧基端以FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4的顺序排布。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括多种免疫系统细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0055] 如本文所用,抗体的"抗原结合部分"(或简称为"抗体部分"),是指抗体中保留特异性结合抗原(例如,IL4Rα蛋白)能力的一个或多个片段。已证实,抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段来实施。涵盖在抗体的"抗原结合部分"中的结合片段的例子包括:(i)Fab片段,由V_L、V_H、C_L和C_{H1}结构域构成的单价片段;(ii)$F(ab')_2$片段,包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)由V_H和C_{H1}构成的Fd片段;(iv)由抗体单臂V_L和V_H构成的Fv片段;(v)由V_H构成的dAb片段(Ward et al.,(1989)Nature 341:544-546);(vi)分离的互补决定区(CDR);以及(vii)纳米抗体,即一种包含单可变结构域和两个恒定结构域的重链可变区。此外,尽管Fv片段的两个结构域V_L和V_H由不同的基因编码,它们可以通过重组的方法,使两者经合成接头连接成为蛋白单链,其中V_L和V_H区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如Bird et al.,(1988)Science 242:423-426;和Huston et al.,(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)。这样的单链抗体也涵盖在术语抗体的"抗原结合部分"中。这些抗体片段可以通过本领域技术人员已知的常用技术获得,且可以通过与全长抗体相同的方式进行功能筛选。

[0056] 如本文所用,术语"分离的抗体"是指基本不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,与IL4Rα蛋白特异性结合的分离抗体基本不含特异性结合IL4Rα蛋白以外抗原的抗体)。但是,特异性结合人IL4Rα蛋白的分离抗体可能对其他抗原例如其他物种的IL4Rα蛋白具有交叉反应性。此外,分离的抗体基本不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0057] 本文所用的术语"单克隆抗体"或"单克隆抗体组成"是指单一分子组成的抗体分子制品。单克隆抗体组成呈现出对于特定表位的单一结合特异性和亲和力。

[0058] 如本文所用,术语"小鼠抗体"是指可变区中骨架区和CDR区均来自小鼠种系免疫球蛋白序列的抗体。此外,如果抗体包含恒定区,则恒定区也来自小鼠种系免疫球蛋白序列。本发明的小鼠抗体可以包含不由小鼠种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机突变或点突变、或通过体内体细胞突变而引入的突变)。但本文所用的术语"小鼠抗体"不包括在小鼠骨架区序列中插入来自其他哺乳动物物种的CDR序列的抗体。

[0059] 术语"嵌合抗体"是指通过组合非人来源的遗传物质与人来源的遗传物质而得来的抗体。或者更笼统地说,嵌合抗体是指组合某一物种的遗传物质与另一物种遗传物质的抗体。

[0060] 如本文所用,术语"人源化抗体"是指来源于非人物种但其蛋白序列已经被修改以增加其与人天然抗体的相似度的抗体。

[0061] 术语"同种型"是指由重链恒定区基因编码的抗体类(例如IgM或IgG1)。

[0062] 短语"识别抗原的抗体"以及"对抗原特异的抗体/对抗原具有特异性的抗体"在本

文中与术语“特异性结合抗原的抗体”可互换使用。

[0063] 如本文所用,“特异性结合人IL4Rα”的抗体是指与人IL4Rα蛋白(还可能是一个或多个非人物种的IL4Rα蛋白)结合但基本不与非IL4Rα蛋白结合的抗体。优选地,抗体以“高亲和力”结合人IL4Rα蛋白,即以5.0×$^{-8}$M或更小,优选为1.0×10^{-8}M或更小,更优选为7.0×10^{-9}M或更小的K_D结合人IL4Rα蛋白。

[0064] 如本文所用,术语“基本不结合”蛋白或细胞是指不与蛋白或细胞结合,或者不以高亲和力与其结合,即以1.0×10^{-6}M或更大,优选为1.0×10^{-5}M或更大,更优选为1.0×10^{-4}M或更大,更优选为1.0×10^{-3}M或更大,更优选为1.0×10^{-2}M或更大的K_D结合蛋白或细胞。

[0065] 术语“高亲和力”对于IgG抗体而言,是指对于抗原,抗体具有1.0×10^{-6}M或更小,优选为5.0×10^{-8}M或更小,更优选为1.0×10^{-8}M或更小,更优选为7.0×10^{-9}M或更小,更优选为1.0×10^{-9}M或更小的K_D。但是对于其他抗体同种型,“高亲和力”结合可能有所不同。例如,对于IgM同种型,“高亲和力”是指抗体具有1.0×10^{-6}M或更小,优选为1.0×10^{-7}M或更小,更优选为1.0×10^{-8}M或更小的K_D。

[0066] 本文所用的术语“K_{assoc}”或“K_a”是指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率,而本文所用的术语“K_{dis}”或“K_d”是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。本文所用的术语“K_D”是指解离常数,其为K_d与K_a之比(即K_d/K_a)并用摩尔浓度(M)表示。抗体的K_D值可以使用本领域熟知的方法测定。测定抗体K_D值的优选方法是使用表面等离子体共振,优选使用生物传感器系统,例如Biacore™系统进行测定。

[0067] 术语“EC_{50}”,又叫半数最大效应浓度,是指在特定暴露时间后,诱导反应达到基线和最大值之间的一半的抗体浓度。

[0068] 术语“IC_{50}”,又叫半数最大抑制浓度,是指相对于不存在抗体时,将特异性生物学或生化功能抑制50%的抗体浓度。

[0069] 术语“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人灵长类、羊、狗、猫、牛、马、鸡、两栖类和爬行类;优选为哺乳动物,例如非人灵长类、羊、狗、猫、牛和马。

[0070] 术语“治疗有效量”是指足以防止或改善与疾病或病症(例如癌症)相关的症状,和/或减轻疾病或病症的严重性的本发明的抗体的量。应当理解,治疗有效量与被治疗的疾病相关,其中本领域技术人员可以方便地判别出实际的有效量。

[0071] 本发明所用的术语“同一性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。两个序列之间的序列比较和同一性百分比可以通过美国国家生物技术信息中心网站上的BLASTN/BLASTP算法的默认设置进行测定。

[0072] 本发明的多个方面在以下更加具体地被描述。

[0073] 抗IL4Rα抗体具有更强的人IL4Rα结合亲和力以及对IL4/IL13信号传导的阻断能力

[0074] 本发明的抗体或其抗原结合部分与人IL4Rα特异性结合,与已报道的抗IL4Rα抗体(如Dupilumab)相比,具有相当的(如果不是更好的话)结合亲和力/能力。

[0075] 本发明的抗体或其抗原结合部分能够阻断IL4Rα与IL4或IL13-IL13Rα1的结合,从而阻断相应的胞内信号转导,与已报道的抗IL4Rα抗体(如Dupilumab)相比,具有相当的或更高的阻断活性。

[0076] 优选地,本发明的抗体是人源化单克隆抗体。此外,或者,本发明的抗体可以是例如,嵌合单克隆抗体。

[0077] 抗IL4Rα单克隆抗体

[0078] 本发明的抗体是结构和化学特性如下文和实施例中所述的单克隆抗体。抗体的重/轻链可变区的氨基酸序列ID汇总在下表1中,一些抗体具有相同的V_H或V_L。抗体的重链恒定区可以是具有如SEQ IDNO:55所示氨基酸序列的人IgG4重链恒定区,且抗体的轻链恒定区可以是具有如SEQ ID NO:56所示氨基酸序列的人κ恒定区。

表1.重/轻链可变区的氨基酸序列ID

抗体 ID	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3	VH	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3	VL
C2C1A1A1	1	5	10	32	15	22	26	35
huC2C1A1A1-V1				33, X1=W, X2=S				36, X1=L, X2=I
huC2C1A1A1-V2				33, X1=W, X2=S				37
huC2C1A1A1-V3				33, X1=W, X2=S				36, X1=F, X2=V
huC2C1A1A1-V4				33, X1=W, X2=S				36, X1=F, X2=I
huC2C1A1A1-V5				34				36, X1=L, X2=I
huC2C1A1A1-V6				34				37
huC2C1A1A1-V7				34				36, X1=F, X2=V
huC2C1A1A1-V8				34				36, X1=F, X2=I
huC2C1A1A1-V9				33, X1=L, X2=A				36, X1=L, X2=I
huC2C1A1A1-V10				33, X1=L, X2=A				37
huC2C1A1A1-V11				33, X1=L, X2=A				36, X1=F, X2=V
huC2C1A1A1-V12				33, X1=L, X2=A				36, X1=F, X2=I
huC2C1A1A1-V13				33, X1=W, X2=A				36, X1=L, X2=I
huC2C1A1A1-V14				33, X1=W, X2=A				37
huC2C1A1A1-V15				33, X1=W, X2=A				36, X1=F, X2=V
huC2C1A1A1-V16				33, X1=W, X2=A				36, X1=F, X2=I
C2B2F7B7	1	6	11	38	16	22	27	39
B8G11F2B7G5E8	2	7	12	40	17	23	28	45
huB8G11F2B7G5E8-V1				41, X1=A, X2=K, X3=V, X4=H				46
huB8G11F2B7G5E8-V2				41, X1=V, X2=K, X3=V, X4=H				46
huB8G11F2B7G5E8-V3				41, X1=A, X2=Q, X3=V, X4=H				46
huB8G11F2B7G5E8-V4				41, X1=A, X2=K, X3=M, X4=H				46

huB8G11F2B7G5E8-V5				42, X1=R, X2=A, X3=S, X4=N				46
huB8G11F2B7G5E8-V6				42, X1=K, X2=V, X3=S, X4=N				46
huB8G11F2B7G5E8-V7				42, X1=K, X2=A, X3=T, X4=N				46
huB8G11F2B7G5E8-V8	2	7	12	42, X1=K, X2=A, X3=S, X4=D	17	23	28	46
huB8G11F2B7G5E8-V9				41, X1=A, X2=K, X3=V, X4=Y				46
huB8G11F2B7G5E8-V10				42, X1=R, X2=V, X3=T, X4=N				46
huB8G11F2B7G5E8-V11				43				46
huB8G11F2B7G5E8-V13				44				46
huB8G11F2B7G5E8-V14				41, X1=V, X2=K, X3=M, X4=H				46
B8D10G7G6E4	3	8	13	47	18	24	29	48
B9A7C9A4H5	4	8	13	49	19	24	30	50
B9D1D11F8D8	3	9	14	51	20	25	31	52
B1D2F7D3B5	3	9	14	53	21	25	31	54

[0079] 表1中的重链可变区CDRs和轻链可变区CDRs已由Kabat编号系统定义。然而,如本领域所熟知的,CDR区也可以基于重/轻链可变区序列由其他编号系统例如Chothia、IMGT、AbM或Contact编号系统/方法确定。

[0080] 与人IL4Rα结合的其他抗IL4Rα抗体的V_H和V_L序列(或CDR序列)可以与本发明的抗IL4Rα抗体的V_H和V_L序列(或CDR序列)“混合并配对”。优选地,当V_H和V_L链(或这些链中的CDR)混合并配对时,来自特定V_H/V_L对中的V_H序列被结构相似的V_H序列取代。同样地,优选将来自特定V_H/V_L对中的V_L序列替换为结构相似的V_L序列。

[0081] 因此,在一个实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合部分包括:

(a)重链可变区,其包含列于表1中氨基酸序列;和

(b)轻链可变区,其包含列于表1中氨基酸序列,或另一种抗IL4Rα抗体的V_L,其中所述抗体特异性结合人IL4Rα。

[0082] 在另一个实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合部分包含:

(a)列于表1中的重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3;和

(b)列于表1中的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3,或另一种抗IL4Rα抗体的CDRs,其中所述抗体特异性结合人IL4Rα。

[0083] 在另一个实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合部分包括抗IL4Rα抗体的重链可变区的CDR2以及其他结合人IL4Rα的抗体的CDRs,例如来自另一抗IL4Rα抗体的重链可变区的CDR1和/或CDR3,和/或轻链可变区的CDR1、CDR2和/或CDR3。

[0084] 此外,本领域所熟知的是,不依赖于CDR1和/或CDR2结构域,单独的CDR3结构域能够确定抗体对同源抗原的结合特异性,并且基于共同的CDR3序列可以预测性地产生具有相同结合特异性的多种抗体。参见例如,Klimka et al.,,British J.of Cancer 83(2):252-260(2000);Beiboer et al.,,J.Mol.Biol.296:833-849(2000);Rader et al.,,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.95:8910-8915(1998);Barbas et al.,,J.Am.Chem.Soc.116:2161-2162(1994);Barbas et al.,,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.92:2529-2533(1995);Ditzel et al.,,J.Immunol.157:739-749(1996);Berezov et al.,,BIAjournal 8:Scientific Review 8(2001);Igarashi et al.,,J.Biochem(Tokyo)117:452-7(1995);Bourgeois et al.,,J.Virol 72:807-10(1998);Levi et al.,,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:4374-8(1993);Polymenis and Stoller,J.Immunol.152:5218-5329(1994)和Xu and Davis,Immunity 13:37-45(2000)。另参见美国专利NOs.6,951,646;6,914,128;6,090,382;6,818,216;6,156,313;6,827,925;5,833,943;5,762,905和5,760,185。这些参考文献均通过引用的方式全部并入本文。

[0085] 因此,在另一个实施方案中,本发明的抗体包含抗IL4Rα抗体的重链可变区的CDR2以及至少抗IL4Rα抗体的重链可变区和/或轻链可变区的CDR3,或另一抗IL4Rα抗体的重链可变区和/或轻链可变区的CDR3,其中该抗体特异性结合人IL4Rα。这些抗体优选与本发明的抗IL4Rα抗体(a)竞争结合IL4Rα;(b)保留功能特性;(c)结合相同表位;和/或(d)具有相似的结合亲和力。在另一个实施方案中,本发明的抗体还可以包含抗IL4Rα抗体的轻链可变区的CDR2,或者另一抗IL4Rα抗体的轻链可变区的CDR2,其中该抗体特异性结合人IL4Rα。在另一个实施方案中,本发明的抗体还可以包括抗IL4Rα抗体的重链可变区和/或轻链可变区的CDR1,或另一抗IL4Rα抗体的重链可变区和/或轻链可变区的CDR1,其中该抗体特异性结合人IL4Rα。

[0086] 保守修饰

[0087] 在另一个实施方案中,本发明的抗体包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区分别包含CDR1、CDR2和CDR3,其中CDR1、CDR2和CDR3序列不同于本发明的抗IL4Rα抗体的CDR1、CDR2和CDR3序列,所述不同是源于一个或多个保守修饰。本领域中应理解,某些保守的序列修饰不会使抗原结合性消失。参见,例如Brummell et al.,(1993)Biochem 32:1180-8;de Wildt et al.,(1997)Prot.Eng.10:835-41;Komissarov et al.,(1997)J.Biol.Chem.272:26864-26870;Hall et al.,(1992)J.Immunol.149:1605-12;Kelley and O'Connell(1993)Biochem.32:6862-35;Adib-Conquy et al.,(1998)Int.Immunol.10:341-6和Beers et al.,(2000)Clin.Can.Res.6:2835-43。

[0088] 因此,在一个实施方案中,本发明的抗体包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区分别包含CDR1、CDR2和CDR3,其中:

(a)重链可变区的CDR1包含表1列出的序列,和/或其保守修饰;和/或

(b)重链可变区的CDR2包含表1列出的序列,和/或其保守修饰;和/或

(c)重链可变区的CDR3包含表1列出的序列,和/或其保守修饰;和/或

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

(e)该抗体特异性结合人IL4Rα。

[0089] 本发明的抗体具有一种或多种上述功能特性,例如对人IL4Rα的高亲和力以及对IL4Rα-IL4结合或IL4Rα-IL13-IL13Rα1结合的阻断活性。

[0090] 在多个实施方案中,抗体可以是例如,小鼠、人、人源化或嵌合抗体。

[0091] 如本文所用,术语"保守序列修饰"是指不会显著影响或改变抗体结合特性的氨基酸修饰。这样的保守修饰包括氨基酸替换、添加和缺失。可以通过本领域已知的标准技术将修饰引入本发明的抗体中,例如点突变和PCR介导的突变。保守氨基酸替换是指将氨基酸残基替换为具有相似侧链的氨基酸残基。具有相似侧链的氨基酸残基组在本领域中已知。这些氨基酸残基组包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、β-支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,本发明的抗体的CDR区中的一个或多个氨基酸残基可以用来自相同侧链组的其他氨基酸残基进行替换,且得到的抗体可以使用本发明所述的功能检测对其进行保留功能(即,上述的功能)测试。

[0092] 工程化和修饰的抗体

[0093] 本发明的抗体可以用包含本发明抗IL4Rα抗体的一个或多个V_H/V_L序列的抗体作为起始材料来工程化产生修饰抗体。抗体可以通过修饰一个或两个可变区(即,V_H和/或V_L)内(例如,在一个或多个CDR区和/或一个或多个骨架区)的一个或多个残基来进行工程化修饰。此外,或者,可以对恒定区中的残基进行修饰,例如改变抗体的效应功能。

[0094] 在某些实施方案中,CDR移植可以用来修饰抗体的可变区。抗体主要通过位于重链和轻链的六个互补决定区(CDRs)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。因此,CDRs内的氨基酸序列比CDRs外的氨基酸序列在各种抗体之间更加的多样。因为CDR序列负责主要的抗体-抗原相互作用,可以通过构建这样的表达载体,其中特定天然抗体的CDR序列移植到具有不同特性的另一抗体的骨架区序列,来表达模拟特定天然抗体特性的重组抗体(参见,例如,Riechmann et al.,(1998)Nature 332:323-327;Jones et al.,(1986)Nature 321:522-525;Queen et al.,(1989)Proc.Natl.Acad。另外参见U.S.A.86:10029-10033;美国专利NOs.5,225,539;5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。

[0095] 因此,本发明的另一个实施方案涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包含本发明上述的CDR1、CDR2和CDR3,所述轻链可变区包含本发明上述的CDR1、CDR2和CDR3。尽管这些抗体包含本发明的单克隆抗体V_H和V_L的CDR序列,它们可以含有不同的骨架序列。

[0096] 这样的骨架序列可以从包括种系抗体基因序列的公开DNA数据库或发表的参考文献中获得。例如,人重链可变区基因和人轻链可变区基因的种系DNA序列可以在Vbase人种系序列数据库(www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase),以及Kabat et al.,(1991),同上;Tomlinson et al.,(1992)J.Mol.Biol.227:776-798;和Cox et al.,(1994)Eur.J.Immunol.24:827-836文献中获得,其内容各以引用的方式明确地并入本文。另一个实施方案中,人重链可变区基因和人轻链可变区基因的种系DNA序列可以在Genbank数据库中获得。例如,下列来自HCo7 HuMAb小鼠的重链种系序列的Genbank登录号为:1-69(NG--0010109,NT--024637&BC070333)、3-33(NG--0010109&NT--024637)和3-7(NG--0010109&

NT--024637)。另一个实施方案中,以下来自HCo12 HuMAb小鼠的重链种系序列的Genbank登录号为:1-69(NG--0010109,NT--024637&BC070333)、5-51(NG--0010109&NT--024637)、4-34(NG--0010109&NT--024637)、3-30.3(CAJ556644)和3-23(AJ406678)。

[0097] 使用本领域技术人员所熟知的序列相似性搜索方法之一Gapped BLAST(Altschul et al.,(1997),同上),将抗体蛋白序列与编译蛋白序列数据库进行比较。

[0098] 本发明所用的抗体骨架序列,优选在结构上与本发明的抗体骨架序列相似的那些。V_H的CDR1、CDR2和CDR3序列可以移植到与得到该骨架序列的种系免疫球蛋白基因具有相同序列的骨架区中,或者CDR序列可以移植到包含与种系序列相比具有一个或多个突变的骨架区中。例如,在某些情况下,将骨架区中的残基进行突变是有益的,可以保持或增强抗体的抗原结合能力(参见例如美国专利NOs.5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。

[0099] 另一类的可变区修饰是将V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基进行突变,从而改进目标抗体的一种或多种结合特性(例如,亲和力)。可以通过点突变或PCR介导的突变引入突变,并且可以通过本领域已知的体外或体内检测来评价突变对抗体结合或其他功能特性的影响。优选地,引入本领域已知的保守修饰。突变可以是氨基酸替换、添加或缺失,但优选为替换。而且,通常改变一个CDR区内不超过一个、两个、三个、四个或五个的残基。

[0100] 因此,在另一个实施方案中,本发明提供分离的抗IL4Rα单克隆抗体或其抗原结合部分,包含重链可变区和轻链可变区,其包含:(a)V_H CDR1区,其包含本发明的V_H CDR1序列,或具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列;(b)V_H CDR2区,其包含本发明的V_H CDR2序列,或具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列;(c)V_H CDR3区,其包含本发明的V_H CDR3序列,或具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列;(d)V_L CDR1区,其包含本发明的V_L CDR1序列,或具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列;(e)V_L CDR2区,其包含本发明的V_L CDR2序列,或具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列;和(f)V_L CDR3区,其包含本发明的V_L CDR3序列,或具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列。

[0101] 本发明的工程化抗体包括在V_H和/或V_L的骨架区残基中进行修饰以例如改善抗体特性的那些抗体。通常而言,此类骨架区修饰可用来降低抗体的免疫原性。例如,将一个或多个骨架区残基“回复突变”成相应的种系序列。更具体地,经历体细胞突变的抗体可能包含不同于得到该抗体的种系序列的骨架残基。这些残基可以通过将抗体骨架序列与得到该抗体的种系序列相比较而鉴别出来。

[0102] 另一类的骨架区修饰包括对骨架区的、或者甚至一个或多个CDR区的一个或多个残基进行突变,以去除T细胞表位,从而减少抗体可能导致的免疫原性。该方法也称为“去免疫化”,在美国专利公开NO.20030153043中有更加详细的描述。

[0103] 此外,或作为骨架区或CDR区修饰之外的另一种选择,可以对本发明的抗体进行Fc修饰,通常用来改变抗体的一个或多个功能特性,例如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合、和/或抗体依赖的细胞毒性。此外,可以对本发明的抗体进行化学修饰(例如,可以将一个或多个化学功能基团连接至抗体),或者修饰改变其糖基化,来改变抗体的一个或多个功能特

性。

[0104] 在一个实施方案中,对C_{H1}-铰链区进行修饰,从而改变(例如增加或减少)铰链区的半胱氨酸残基的数量。该方法在美国专利No.5,677,425中有具体描述。改变C_{H1}-铰链区的半胱氨酸残基的数量,例如可以促进重链和轻链的组装、或增加/降低抗体的稳定性。

[0105] 在另一个实施方案中,对抗体的Fc-铰链区进行突变,以降低抗体的生物半衰期。更具体地,将一个或多个氨基酸突变引入Fc-铰链片段的C_{H2}-C_{H3}结构域界面区,使得抗体相对于天然Fc-铰链结构域,具有减弱的葡萄球菌A蛋白(SpA)结合力。该方法在美国专利No.6,165,745中有更详细的描述。

[0106] 在另一个实施方案中,改变抗体的糖基化。例如,可以制备去糖基化的抗体(即,抗体缺少糖基化)。改变糖基化,可以例如增加抗体对抗原的亲和力。这样的糖化修饰可以通过例如改变抗体序列中的一个或多个糖基化位点来实现。例如,可以进行一个或多个氨基酸替换,以消除一个或多个可变区的骨架区的糖基化位点,从而消除该位点的糖基化。这样的去糖基化可以增加抗体对抗原的亲和力。参见,例如美国专利NOs.5,714,350和6,350,861。

[0107] 此外,或者,可以制备糖基化类型改变的抗体,例如岩藻糖残基量减少的低岩藻糖基化抗体,或者具有平分型GlcNac结构增加的抗体。已经证明这种糖基化形式的改变能增加或减少抗体的ADCC活性。这样的糖化修饰可以通过例如在糖基化机制改变的宿主细胞中表达抗体来实现。糖基化机制改变的细胞在本领域中已知,且可以用作表达本发明的重组抗体的宿主细胞,以制备糖基化改变的抗体。例如,细胞系Ms704、Ms705和Ms709缺少岩藻糖基转移酶基因FUT8(α(1,6)-岩藻糖基转移酶基因),从而在Ms704、Ms705和Ms709细胞系中表达的抗体在其糖中缺失岩藻糖。使用两种替换载体靶向破坏CHO/DG44细胞中的FUT8基因,来制备Ms704、Ms705和Ms709 FUT8-/-细胞系(参见美国专利公开No.20040110704和Yamane-Ohnuki et al.,(2004)Biotechnol Bioeng 87:614-22)。作为另一个例子,EP1,176,195记载了FUT8基因功能破坏的细胞系,该基因编码岩藻糖基转移酶,从而使在该细胞系中表达的抗体因减少或消除了α-1,6键相关的酶而表现出低岩藻糖基化。EP1,176,195也描述了一种细胞系,其具有较低的或缺乏向结合抗体Fc区的N-乙酰葡萄糖胺添加岩藻糖的酶活性,例如大鼠骨髓瘤细胞系YB2/0(ATCC CRL 1662)。PCT公开WO03/035835描述了一种CHO变体细胞系,Lec13细胞,其具有降低的向Asn(297)-连接的糖上添加岩藻糖的能力,从而导致该宿主细胞中表达的抗体为低岩藻糖基化(另外参见Shields et al.,(2002)J.Biol.Chem.277:26733-26740)。如WO06/089231中所述,也可以在鸡蛋中制备糖基化图谱改变的抗体。或者,可以在植物细胞如Lemna中制备糖基化图谱改变的抗体。在植物系统中生产抗体的方法披露于美国专利申请中,该专利申请对应于2006年8月11日提交的Alston&Bird LLP代理案卷号040989/314911。可以使用岩藻糖苷酶将抗体的岩藻糖残基切割,例如,利用α-L-岩藻糖苷酶移除抗体的岩藻糖残基(Tarentino etal.,(1975)Biochem.14:5516-23)。

[0108] 本发明抗体的另一种修饰是聚乙二醇化(PEG化)。将抗体PEG化,可以例如增加抗体的生物(例如,血清)半衰期。为使抗体PEG化,抗体或其片段与聚乙二醇(PEG)如PEG的反应性酯或醛类衍生物,在使一个或多个PEG基团附于抗体或抗体片段的条件下进行反应。优选地,通过与反应性PEG分子(或类似的有反应性的水溶性聚合物)的酰化反应或烷化反应

进行PEG化。本文所用的术语“聚乙二醇”包括用于衍生其他蛋白的任何形式的PEG,例如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施方案中,PEG化的抗体是去糖基化的抗体。PEG化蛋白的方法在本领域是已知的,且可以用于本发明的抗体。参见,例如EP0154316和EP0401384。

[0109] 抗体的物理特性

[0110] 本发明的抗体可以用它们的多种物理特性进行表征,以检测和/或区分其类别。

[0111] 例如,抗体可以在轻链可变区或重链可变区包含一个或多个糖基化位点。这些糖基化位点可能导致抗体免疫原性的增加,或由于抗原结合的改变而引起的抗体pK值的改变(Marshall et al(1972)Annu Rev Biochem 41:673-702;Gala and Morrison(2004)J Immunol 172:5489-94;Wallick et al(1988)J Exp Med 168:1099-109;Spiro(2002)Glycobiology 12:43R-56R;Parekh et al(1985)Nature 316:452-7;Mimura et al.,(2000)Mol Immunol 37:697-706)。已知糖基化发生在含有N-X-S/T序列的基序中。在一些情况下,优选可变区不包含糖基化的抗IL4Rα抗体。可以选择可变区不包含糖基化基序的抗体或通过突变糖基化区域的残基来实现。

[0112] 在优选的实施方案中,抗体不包含天冬酰胺异构位点。天冬酰胺的脱酰胺作用可能发生在N-G或D-G序列,并导致异天冬氨酸残基的产生,其向多肽骨架中引入一个扭结并降低其稳定性(异天冬氨酸作用)。

[0113] 各抗体具有独特的等电点(pI),通常落在6-9.5的pH范围内。IgG1抗体的pI通常落在7-9.5的pH范围内,而IgG4抗体的pI基本落在6-8的pH范围内。推测pI在正常范围外的抗体在体内可能会发生一些解折叠且不稳定。因此,优选pI值落在正常范围内的抗IL4Rα抗体。这可以选择pI在正常范围内的抗体或通过突变带电的表面残基来实现。

[0114] 编码本发明的抗体的核酸分子

[0115] 在另一方面,本发明提供编码本发明的抗体的重链可变区和/或轻链可变区或CDR的核酸分子。核酸可以存在于完整细胞中、细胞裂解液中、或以部分纯化或基本上纯的形式存在。通过标准技术将核酸从其他细胞组分或其他污染物例如其他细胞核酸或蛋白中纯化出来后,核酸是“分离的”或“基本上纯的”。本发明的核酸可以是DNA或RNA,且可包含或不包含内含子序列。在优选的实施方案中,核酸是cDNA分子。

[0116] 本发明的核酸可以通过标准的分子生物学技术获得。对于由杂交瘤(例如,由下文所述的携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠制备的杂交瘤)表达的抗体,可以通过标准PCR扩增或cDNA克隆技术获得编码杂交瘤制备的抗体的轻链和重链的cDNA。对于从免疫球蛋白基因文库(例如使用噬菌体展示技术)中获得的抗体,可以从基因文库中回收编码这类抗体的核酸。

[0117] 优选地,本发明的核酸分子包括编码IL4Rα单克隆抗体的V_H和V_L序列或CDR的那些。一旦获得了编码V_H和V_L的DNA片段,这些DNA片段可以进一步通过标准重组DNA技术进行操作,例如将可变区基因转变为全长抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操作中,将编码V_H或V_L的DNA片段与编码另一蛋白质的DNA片段例可操作地连接,如采用抗体恒定区或柔性接头可操作地连接。这种情况下所使用的术语“可操作地连接”是指两个DNA片段连接在一起,从而使两个DNA片段编码的氨基酸序列都在阅读框内。

[0118] 将编码V_H的DNA与编码重链恒定区(C_{H1}、C_{H2}和C_{H3})的另一DNA分子可操作地连接,可

以将编码V_H区的分离的DNA转变成全长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的,且可以通过标准PCR扩增获得包括人重链恒定区基因的DNA片段。重链恒定区可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区,但是优选为IgG1或IgG4恒定区。对于Fab片段重链基因,可将编码V_H区的DNA可操作地连接至仅编码重链C_{H1}恒定区的另一DNA分子。

[0119] 将编码V_L的DNA与编码轻链恒定区C_L的另一DNA分子可操作地连接,可以将编码V_L区的分离的DNA转变成全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的,且可以通过标准PCR扩增获得包括人轻链恒定区基因的DNA片段。在优选的实施方案中,轻链恒定区是κ或λ恒定区。

[0120] 为了制备scFv基因,将编码V_H和V_L的DNA片段可操作地连接至编码柔性接头例如编码氨基酸序列(Gly4-Ser)3的另一片段,使得V_H和V_L序列可以作为连续的单链蛋白进行表达,其中V_L和V_H区域通过该柔性接头连接(参见,例如Bird et al.,(1988)Science 242:423-426;Huston et al.,(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;McCafferty et al.,,(1990)Nature 348:552-554)。

[0121] 本发明单克隆抗体的制备

[0122] 本发明的单克隆抗体(mAbs)可以使用本领域熟知的Kohler and Milstein(1975)Nature 256:495的体细胞杂交(杂交瘤)技术进行制备。制备单克隆抗体的其他实施方案包括B淋巴细胞的病毒或致癌性转化以及噬菌体展示技术。嵌合或人源化抗体也是本领域熟知的。参见,例如美国专利NOs.4,816,567;5,225,539;5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370,其全部内容通过引用的方式明确地并入本文。

[0123] 制备本发明单克隆抗体的转染瘤的生成

[0124] 本发明的抗体还可以使用例如本领域熟知的重组DNA技术结合基因转染的方法,在宿主细胞转染瘤中制备(例如Morrison,S.(1985)Science 229:1202)。在一个实施方案中,将通过标准分子生物技术得到的编码部分或全长轻链和重链的DNA插入一个或多个表达载体中,使得基因可操作地连接至转录和翻译调控序列。在这种情况下术语“可操作地连接”是指抗体基因连接到载体中,使得载体内的转录和翻译调控序列行使它们既定的调控抗体基因转录和翻译的功能。

[0125] 术语“调控序列”包括控制抗体基因转录或翻译的启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,多腺苷酸化信号)。这样的调控序列在例如Goeddel(Gene Expression Technology.Methods in Enzymology 185,Academic Press,San Diego,Calif.(1990))中有过描述。优选的用于哺乳动物宿主细胞表达的调控序列包括在哺乳动物细胞中的引导高水平蛋白表达的病毒元件,例如源自巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)、腺病毒(如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和多瘤病毒的启动子和/或增强子。或者,可以使用非病毒调控序列,例如泛素启动子或β-珠蛋白启动子。另外,调控元件由不同来源的序列构成,例如SRα启动子系统,其包含来自SV40早期启动子的序列和人T细胞白血病病毒1型的长末端重复序列(Takebe et al.,(1988)Mol.Cell.Biol.8:466-472)。选择与所使用的表达宿主细胞相容的表达载体和表达调控序列。

[0126] 抗体轻链基因和抗体重链基因可以插入到同一或不同的表达载体中。在优选的实施方案中,将可变区插入到已经编码所需同种型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中构建全长抗体基因,使V_H与载体中的C_H可操作地连接,V_L与载体中的C_L可操作地连接。此外,

或者,重组表达载体可以编码促进抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。抗体链基因可以克隆到载体中,使得信号肽在阅读框内连接到抗体链基因的氨基端。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即,来自非免疫球蛋白的信号肽)。

[0127] 为了表达轻链和重链,通过标准技术将编码重链和轻链的表达载体转染到宿主细胞中。不同形式的“转染”包括多种常用于将外源DNA导入原核或真核宿主细胞的技术,例如,电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等。尽管在原核或真核宿主细胞中表达本发明的抗体在理论上是可行的,但抗体优选在真核细胞中表达,最优选在哺乳动物宿主细胞中表达,因为真核细胞,特别是哺乳动物细胞,比原核细胞更可能组装抗体并分泌适当折叠且有免疫活性的抗体。

[0128] 优选的用于表达本发明的重组抗体的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)(包括与DHFR选择性标记物一起使用的dhfr-CHO细胞,在Urlaub and Chasin,(1980)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216-4220中有过描述,DHFR选择性标记物在例如R.J.Kaufman and P.A.Sharp(1982)J.Mol.Biol.159:601-621中描述)、NSO骨髓瘤细胞、COS细胞和SP2细胞。特别是在使用NSO骨髓瘤细胞时,另一优选的表达系统是GS基因表达系统,记载于WO87/04462、WO89/01036和EP338,841。当编码抗体基因的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞后,通过将宿主细胞培养足以使得抗体在宿主细胞中表达、或优选足以使得使抗体分泌到宿主细胞生长的培养基中的一段时间,来制备抗体。可以使用标准蛋白纯化方法从培养基中回收抗体。

[0129] 双特异性分子

[0130] 另一方面,本发明提供一种双特异性分子,其包含一种或多种本发明的抗体,所述抗体与至少一个其他功能分子如另一种肽或蛋白(例如,另一抗体或受体的配体)相连接,以产生与至少两个不同结合位点或靶分子结合的双特异性分子。因此,本发明所用的“双特异性分子”包括具有三种或更多种特异性的分子。

[0131] 在一个实施方案中,除Fc结合特异性和IL4Rα结合特异性外,双特异性分子还具有第三特异性。

[0132] 双特异性分子可以多种形式和尺寸出现。在尺寸谱的一端,双特异性分子保留了传统的抗体形式,不同的是两个结合臂具有不同的特异性而不是具有相同的特异性。在尺寸谱的另一端,双特异性分子由两个经肽链连接的单链抗体片段(scFv)构成,即所谓的Bs(scFv)2构建体。中间尺寸的双特异性分子包括由肽类接头连接的两个不同的F(ab)片段。这些和其他形式的双特异性分子可以通过基因改造、体细胞杂交或化学法进行制备。参见,例如See,e.g.,Kufer et al,cited supra;Cao and Suresh,Bioconjugate Chemistry,9(6),635-644(1998);和van Spriel et al.,Immunology Today,21(8),391-397(2000),以及其中所引用的参考文献。

[0133] 免疫缀合物

[0134] 本发明的抗体可以与治疗剂偶联形成免疫缀合物,例如抗体-药物偶联物(ADC)。合适的治疗剂包括细胞毒素、烷化剂、DNA小沟结合分子、DNA嵌入剂、DNA交联剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂、核输出抑制剂、蛋白酶体抑制剂、拓扑异构酶I或II的抑制剂、热休克蛋白抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、抗生素和抗有丝分裂剂。在ADC中,抗体和治疗剂优选地通过可裂解的接头偶联,例如肽类接头、二硫类接头或腙类接头。更优选的接头是肽类接头,例如

Val-Cit、Ala-Val、Val-Ala-Val、Lys-Lys、Pro-Val-Gly-Val-Val、Ala-Asn-Val、Val-Leu-Lys、Ala-Ala-Asn、Cit-Cit、Val-Lys、Lys、Cit、Ser或Glu。ADC可以根据美国专利NOs.7,087,600;6,989,452;和7,129,261;PCT公开WO02/096910;WO07/038,658;WO07/051,081;WO07/059,404;WO08/083,312;和WO08/103,693;美国专利公开NOs.20060024317;20060004081;和20060247295中的描述进行制备,其公开的内容通过引用的方式并入本文。

[0135] 编码抗体或带有抗体的溶瘤病毒

[0136] 溶瘤病毒偏好地侵染并杀灭癌细胞。本发明的抗体可与溶瘤病毒一起使用。或者,可以将编码本发明抗体的溶瘤病毒引入人体中。

[0137] 嵌合抗原受体

[0138] 本发明还提供了包含抗IL4RαscFv的嵌合抗原受体(CAR),该抗IL4RαscFv包含本发明所述的CDR和重/轻链可变区。

[0139] 抗IL4RαCAR可以包含(a)包含抗IL4RαscFv的胞外抗原结合结构域;(b)跨膜结构域;(c)胞内信号传导结构域。

[0140] CAR可以在胞外抗原结合结构域的N端包含指导新生受体进入内质网的信号肽,和在胞外抗原结合结构域的N端包含使受体更易于结合的铰链肽。优选地,CAR的胞内信号传导结构域包括初级胞内信号传导结构域和一个或多个共刺激信号传导结构域。常用且最有效的初级胞内信号传导结构域是CD3-zeta胞质结构域,其包含ITAMs,ITAMs的磷酸化导致T细胞活化。共刺激信号传导结构域可源自共刺激蛋白,例如CD28、CD137和OX40。

[0141] CARs可以进一步添加增强T细胞扩增、持久性和抗肿瘤活性的要素,例如细胞因子和共刺激配体。

[0142] 本发明还提供了工程化免疫效应细胞,其包含本发明提供的CAR。在一些实施方案中,免疫效应细胞是T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞或胚胎干细胞。在一些实施方案中,免疫效应细胞是T细胞。

[0143] 药物组合物

[0144] 在另一方面,本发明提供一种药物组合物,其包含与药学上可接受的载体配制在一起的本发明的一种或多种抗体(或抗体的抗原结合部分、双特异性分子、CAR-T细胞、溶瘤病毒或免疫缀合物)。当组合物包含一种以上抗体(或抗体的抗原结合部分、双特异性分子、CAR-T细胞、溶瘤病毒或免疫缀合物)时,可以分开施用抗体(或抗体的抗原结合部分、双特异性分子、CAR-T细胞、溶瘤病毒或免疫缀合物)。药物组合物可以任选地包含一种或多种其他药物活性成分,例如另一种抗体或药物,例如抗肿瘤药物或抗过敏剂。

[0145] 药物组合物可以包含任何数量的赋形剂。可以使用的赋形剂包括载体、表面活性剂、增稠或乳化剂、固体粘合剂、分散或混悬剂、增溶剂、着色剂、矫味剂、包衣、崩解剂、润滑剂、甜味剂、防腐剂、等渗剂及其组合。合适的赋形剂的选择和使用在Gennaro,ed.,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,20th Ed.(Lippincott Williams& Wilkins 2003)中有教导,其公开的内容通过引用的方式并入本文。

[0146] 优选地,药物组合物适合于静脉内、肌内、皮下、肠道外、脊柱或表皮施用(例如通过注射或输注)。基于给药途径,可以将活性成分包被在材料中,以保护其不受酸和可能使其失活的其他自然条件的影响。本发明所用的短语“肠道外施用”是指除肠内和局部施用以外的施用方式,通常采用注射,包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、

皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。或者,本发明的抗体可以通过非肠道外途径施用,例如局部、表皮或粘膜途径施用,如鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部施用。

[0147] 药物组合物可以是无菌水溶液或分散液的形式。它们也可以配制在微乳剂、脂质体或其他适于高浓度药物的有序结构中。

[0148] 与载体材料一起制备成单一剂量的活性成分的量根据所治疗的受试者和特定给药方式而变化,通常是产生疗效的组合物的量。通常,以百分比计算,该量为约0.01%至约99%的,优选为约0.1%至约70%的,最优选为约1%至约30%的与药学上可接受的载体组合的活性成分。

[0149] 调整给药方案以提供最佳的所需反应(例如,治疗反应)。例如,可以施用单次大剂量,可以随时间推移施用多个分剂量,或者可以随治疗情况的危急程度按比例降低或提高剂量。特别有利的是,以易于施用和剂量均匀的剂量单位形式配制肠道外施用的组合物。此处所用的剂量单位形式是指适于待治疗受试者的单一剂量的物理上离散的单位;每个单位包含经计算可与所需的药物载体一起产生所需的治疗效果的预定量的活性成分。或者,抗体可以作为缓释制剂施用,这种情况下所需的施用频率降低。

[0150] 对于组合物的施用,剂量可以为约0.0001至100mg/kg宿主体重,更通常为0.01至5mg/kg宿主体重。例如,剂量可以是0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重或10mg/kg体重,或在1-10mg/kg体重的范围内。示例性治疗方案需要每周给药一次、每两周给药一次、每三周给药一次、每四周给药一次、每月给药一次、每三个月给药一次或每三到六个月给药一次。本发明的抗IL4Rα抗体的优选剂量方案包括经静脉给药1mg/kg体重或3mg/kg体重,该抗体的给予使用以下给药方案之一:(i)每四周一次,共6次,然后每三个月一次;(ii)每三周一次;(iii)3mg/kg体重一次,然后每三周1mg/kg体重。在一些方法中,调整剂量以达到约1-1000μg/mL的血浆抗体浓度,在一些方法中,达到约25-300μg/ml的血浆抗体浓度。

[0151] “治疗有效量”的本发明的抗IL4Rα抗体或其抗原结合部分、双特异性分子、CAR-T细胞、溶瘤病毒或免疫缀合物,优选能引起疾病症状严重程度降低、疾病无症状期频率和持续时间增加,或预防疾病病痛引起的损伤或残疾。例如,对于肿瘤受试者的治疗,与未治疗的受试者相比,“治疗有效量”优选为抑制至少约20%、优选为抑制至少约40%,更优选为抑制至少约60%,更优选为抑制至少约80%的肿瘤生长。治疗有效量的治疗性抗体可以减小肿瘤尺寸,或者减轻受试者的症状,受试者通常是人或其他哺乳动物。

[0152] 药物组合物可以是控释制剂,包括植入物、透皮贴剂和微胶囊递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。参见,例如,Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems,J.R.Robinson,ed.,Marcel Dekker,Inc.,New York,1978。

[0153] 可以通过下述医疗装置施用药物组合物,例如(1)无针皮下注射装置(例如,美国专利NOs.5,399,163;5,383,851;5,312,335;5,064,413;4,941,880;4,790,824;和4,596,556);(2)微量输液泵(美国专利No.4,487,603);(3)经皮给药装置(美国专利No.4,486,194);(4)输注装置(美国专利NOs.4,447,233和4,447,224);和(5)渗透装置(美国专利NOs.4,439,196和4,475,196),其公开内容通过引用的方式并入本文。

[0154] 在某些实施方案中,本发明的单克隆抗体可以经配制,以确保合适的体内分布。例如,为确保本发明的治疗性抗体穿过血脑屏障,可以将抗体配制在脂质体中,该包含抗体的脂质体还可以额外地包含具有靶向功能的基团,以增强对特定细胞或器官的选择性输送。参见,例如美国专利NOs.4,522,811;5,374,548;5,416,016;和5,399,331;V.V.Ranade(1989)J.Clin.Pharmacol.29:685;Umezawa et al.,(1988)Biochem.Biophys.Res.Commun.153:1038;Bloeman et al.,(1995)FEBS Lett.357:140;M.Owais et al.,(1995)Antimicrob.Agents Chemother.39:180;Briscoe et al.,(1995)Am.J.Physiol.1233:134;Schreier et al.,(1994)J.Biol.Chem.269:9090;Keinanen and Laukkanen(1994)FEBS Lett.346:123;和Killion and Fidler(1994)Immunomethods4:273。

[0155] 本发明的用途和方法

[0156] 本发明的包含抗体或其抗原结合部分、双特异性分子、CAR-T细胞、溶瘤病毒、或免疫缀合物的组合物具有多种体外和体内的用途,涉及例如,过度的IL4和/或IL13信号传导相关的过敏性疾病的治疗。

[0157] 鉴于本发明的抗IL4Rα抗体具有阻断IL4Rα与IL4或IL13-IL13Rα1结合以降低2型免疫的能力,本发明提供了治疗2型免疫相关的过敏性疾病的方法,包括向受试者施用本发明的组合物。过敏性疾病可以是特应性皮炎、过敏反应、过敏性鼻炎或过敏性哮喘。

[0158] 在另一方面,由于IL4或IL13信号传导能够激活STAT6,并且已经发现STAT6抑制剂可以抑制癌细胞生长,本发明提供了一种抑制受试者肿瘤细胞生长的方法,所述方法包括向受试者施用本发明的组合物,从而抑制受试者中肿瘤的生长。可以通过本发明的抗体治疗的肿瘤的非限制性实例包括但不限于黑色素瘤、肺癌、肾癌、前列腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌和尿路上皮癌。

[0159] 在另一方面,本发明提供了一种减少或抑制对IL-4或IL-13应答的细胞活化的方法。在一些实施方案中,抑制活化包括抑制细胞因子的产生或分泌。在一些实施方案中,抑制活化包括抑制增殖。通过激活杂合IL-4Rα/γC受体来应答IL-4的细胞包括但不限于B细胞、嗜酸性粒细胞和巨噬细胞。通过激活杂合IL-4Rα/IL-3Rα1受体来应答IL-13的细胞包括但不限于成纤维细胞和平滑肌细胞。因此,在一个实施方案中,本发明提供了抑制平滑肌细胞增殖的方法。在另一个实施方案中,本发明提供了抑制成纤维细胞增殖的方法。

[0160] 在另一方面,本发明提供了诊断的方法、组合物和试剂盒。在一个实施方案中,本发明的抗体用于确定IL4Rα在细胞或组织中的存在和表达。在一个实施方案中,所述诊断可以指示预后和/或指导治疗和/或随访。例如,已发现人膀胱癌中IL4Rα的过表达与疾病的病理等级和阶段相关。在一个实施方案中,本发明的抗体用于诊断膀胱癌的等级和阶段。已发现IL-4Rα高表达与口腔癌的发生或复发的增加相关。在一个实施方案中,本发明的抗体可用于口腔癌诊断试剂盒或诊断方法中,来确定预后以及合适的治疗和随访。肿瘤的IL-4Rα表达与上皮恶性胸膜间皮瘤(MPM)手术切除患者的生存率呈负相关。在一个实施方案中,本发明的抗体可用于诊断试剂盒或诊断方法中,来确定MPM的预后以及合适的治疗和/或随访。

[0161] 联合疗法

[0162] 在一方面,本发明提供了联合疗法,所述联合疗法是将本发明的抗IL4Rα抗体或其

抗原结合部分、双特异性分子或溶瘤病毒与一种或多种可有效缓解2型免疫相关的过敏性疾病的其他药物共同施用。所述药物可以是临床上用于过敏性鼻炎治疗的抗组胺药(靶向H_1组胺受体),或临床上用于哮喘治疗的皮质类固醇、β-肾上腺素能受体激动剂和靶向cyc-LTs的药物。Omalizumab,一种抗IgE抗体,也可以与本发明的抗体或其抗原结合部分、双特异性分子或溶瘤病毒一起用于过敏性疾病的治疗。在某些实施方案中,受试者是人。

[0163] 在另一方面,本发明提供了联合治疗的方法,所述方法是将本发明的抗IL4Rα抗体或其抗原结合部分、双特异性分子、CAR-T细胞、溶瘤病毒或免疫缀合物与一种或多种可有效抑制受试者肿瘤生长的其他抗体共同施用。在一个实施方案中,本发明提供了一种在受试者中抑制肿瘤生长的方法,其包括向受试者施用抗IL4Rα抗体(或其抗原结合部分、双特异性分子、溶瘤病毒、CAR-T细胞或免疫缀合物)和一种或多种其他抗体,例如抗OX40抗体、抗TIM-3抗体、抗CD137抗体、抗GITR抗体、抗LAG-3抗体、抗PD-L1抗体和抗PD-1抗体。在某些实施方案中,受试者是人。IL4Rα通路抑制剂还可以进一步联合癌症的标准治疗方法。例如,可以将IL4Rα通路抑制剂与LAG-3和/或PD-1抑制剂以及化疗方案组合。例如,可以将化疗药物与抗IL4Rα抗体一起施用,所述化疗药物可以是细胞毒性药物。例如,可以向正在接受抗IL4Rα治疗的患者施用表柔比星、奥沙利铂和5-氟尿嘧啶。任选地,抗IL4Rα和一种或多种其他抗体(例如抗LAG-3和/或抗PD-1抗体)的组合可以进一步联合免疫原性剂,所述免疫原性剂如癌细胞、纯化的肿瘤抗原(包括重组蛋白、肽和糖分子)和经编码免疫刺激细胞因子的基因转染的细胞(He et al.,(2004)J.Immunol.173:4919-28)。可用的肿瘤疫苗的非限制性实例包括黑色素瘤抗原肽如gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1和/或酪氨酸酶,或经转染以表达细胞因子GM-CSF的肿瘤细胞。可以与抗IL4Rα抗体联合的其他疗法包括但不限于施用白介素2(IL-2)、放射、手术或激素阻断。

[0164] 本发明讨论的治疗剂的组合或联合可以作为在药学可接受载体中的单一组合物同时施用,或者作为分开的组合物同时施用,其中各药剂处于药学可接受载体中。在另一个实施方案中,治疗剂的组合可以按序施用。

[0165] 此外,如果按序进行多次联合疗法施用,则在各时间点的按序施用的次序可以反转或保持相同,按序施用可以与同时施用或其任何组合相结合。

[0166] 本发明通过以下实施例进行进一步描述,实施例不应当解读为限制性的。本申请的所有附图以及本申请中引用的所有参考文献、Genebank序列、专利和已公开的专利申请都通过引用的方式明确并入本文。

实施例

[0168] 实施例1:使用杂交瘤技术产生小鼠抗IL4Rα单克隆抗体

[0169] 免疫接种

[0170] 根据E Harlow,D.Lane,Antibody:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1998中所述的方法免疫小鼠。重组人IL4Rα-his蛋白(Sino biological inc.,产品目录10402-H08H)作为免疫原,内部制备的人IL4Rα-his蛋白(氨基酸序列如SEQ ID NO:57所示)用于确定抗血清的滴度和筛选分泌抗原特异性抗体的杂交瘤。初次免疫和加强免疫的免疫剂量均为每只小鼠每次注射20μg人IL4Rα-his蛋白。为了增加免疫反应,初次免疫和加强免疫分别使用了完全弗氏佐剂和不完全弗氏

佐剂(Sigma,St.Louis,Mo.,USA)。简而言之,佐剂-免疫原混合物的制备如下:首先通过涡旋仪将佐剂温和混合于小瓶中;将所需量的佐剂转移至高压灭菌过的1.5mL微量离心管中;用PBS或盐水稀释免疫原至浓度范围为0.2-0.3mg/mL;然后将计算量的免疫原与佐剂一起添加到微量离心管中,并温和涡旋混合2分钟,使混合物形成油包水型乳液。用合适的注射器吸入佐剂-免疫原乳液进行动物注射。总共以150-200μL的体积注射了20μg免疫原。每只动物免疫后,根据抗血清滴度加强免疫2至3次。在细胞融合前,通过腹腔注射对滴度较好的动物进行最后一次加强免疫。

[0171] 杂交瘤融合与筛选

[0172] 在细胞融合之前,培养鼠骨髓瘤细胞系(SP2/0-Ag14,ATCC#CRL-1581)的细胞至对数期。根据Kohler G,and Milstein C,"Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity,"Nature,256:495-497(1975)中所述的方法,无菌取出免疫小鼠的脾细胞,并将其与骨髓瘤细胞融合。随后将存在于DMEM/20%FCS/HAT培养基中的融合"杂交细胞"加到96孔板中。融合后7至10天,在显微镜下观察到存活的杂交瘤细胞集落。两周后,使用重组人IL4Rα-his蛋白对每个孔的上清液进行ELISA检测。简而言之,溶于PBS的人IL4Rα-his蛋白(2.0μg/mL)以60μL/孔包被于ELISA板中,于4℃孵育过夜。用PBST洗涤板4次,然后每孔加入200μL封闭缓冲液(含5%w/v脱脂牛奶的PBST)进行封闭。每孔加入60μL稀释的杂交瘤上清液,于37℃孵育40分钟。然后洗涤板4次,使用HRP-山羊抗鼠IgG(Jackson Immuno research,产品目录115-036-071)进行检测,并在450nm下检测结合的OD值。筛选出分泌结合人IL4Rα-his蛋白的抗体的阳性杂交瘤,并将其转移至24孔板中。通过有限稀释法,对产生具有IL4Rα高特异性结合活性和IL4Rα-IL4或IL4Rα-13Rα1-IL13阻断活性的抗体的杂交瘤克隆进行亚克隆,以确保细胞系的克隆性,然后纯化单克隆抗体。简而言之,以5至10倍柱体积的PBS缓冲液洗涤蛋白A琼脂糖柱(bestchrom(Shanghai)Biosciences,产品目录AA0273)。使细胞上清液流过蛋白A琼脂糖柱,然后用PBS缓冲液洗涤柱直到蛋白质的吸光度达到基线。用洗脱缓冲液(0.1M甘氨酸-HCl,pH 2.7)洗脱柱,并立即将洗脱液收集到1.5mL管中,用中和缓冲液(1M Tris-HCl,pH 9.0)中和。合并含免疫球蛋白的部分,并在PBS中于4℃透析过夜。随后,根据如下所述的方法对纯化的单克隆抗体的体外功能活性进行表征。

[0173] 实施例2:使用BIACORE表面等离子共振对小鼠抗IL4Rα单克隆抗体进行亲和力测定

[0174] 通过Biacore T200系统(GE Healthcare,Pittsburgh,PA,USA)对实施例1中纯化的抗IL4Rα小鼠单克隆抗体(mAb)的结合亲和力和结合动力学进行表征。

[0175] 简而言之,使用Biacore(GE Healthcare,Pittsburgh,PA,USA)提供的标准胺偶联试剂盒,通过伯胺基团将山羊抗鼠IgG(GE healthcare,产品目录BR100838,Mouse Antibody Capture Kit)共价连接至CM5芯片(羧甲基化葡聚糖涂层芯片)上。用乙醇胺封闭生物传感器表面上未反应的部分。然后,将浓度为66.67nM的纯化的本发明的抗IL4Rα抗体和浓度为10μg/mL的抗IL4Rα抗体参照品(Dupilumab®,也称为BM)以10μL/分钟的流速流过芯片。然后,将HBS EP缓冲液(由Biacore提供)梯度稀释的重组人IL4Rα-his(内部制备,氨基酸序列如SEQ ID NO:57所示)、食蟹猴IL4Rα-his蛋白(Sino biological inc.,产品目录90897-C08H)、或狨猴IL4Rα-his蛋白(Sino biological inc.定制产品,也称为cal-IL4Rα-

his,氨基酸序列如SEQ ID NO:58所示)以30μL/min的流速流过芯片。追踪抗原-抗体结合动力学2分钟,并追踪解离动力学10分钟。使用BIA evaluation软件将结合和解离曲线拟合至1:1Langmuir结合模型。测定K_D、K_a和K_d值,并将其汇总在下表2中。

表2.小鼠抗IL4Rα抗体的结合亲和力

小鼠单克隆抗体ID#	Biacore 动力学				
	人 IL4Rα			食蟹猴 IL4Rα	狨猴 IL4Rα
	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (M)	K_D (M)	K_D (M)
B1D2F7D3B5	4.27E+05	2.66E-04	6.23E-10	*	*
B8G11F2B7G5E8	1.97E+05	2.93E-04	1.49E-09	*	*
B9D1D11F8D8	4.18E+05	2.74E-04	6.55E-10	*	*
C2C1A1A1	2.90E+05	1.16E-05	4.01E-11	*	*
C2B2F7B7	2.51E+05	1.39E-04	5.54E-10	*	*
参照品	2.22E+05	3.77E-05	1.70E-10	*	*

*未检测。

[0176] 本发明所有的小鼠抗体均与人IL4Rα特异性结合,其中大多数抗体与参照品相比具有相当的或更高的结合亲和力。

[0177] 实施例3:小鼠抗IL4Rα单克隆抗体与IL4Rα的结合活性

[0178] 通过捕获ELISA、流式细胞术(FACS)和间接ELISA测定本发明的小鼠抗IL4Rα抗体与IL4Rα的结合活性。

[0179] 3.1捕获ELISA

[0180] 简而言之,溶于PBS的浓度为2μg/mL的山羊抗鼠IgG(Fcγ片段特异性)(Jackson Immuno Research,产品目录115-005-008)以100μL/孔包被在96孔板中,于4℃孵育过夜。用洗涤缓冲液(PBS+0.05%w/v Tween-20,PBST)洗涤板1次,然后加入200μL/孔的封闭缓冲液(含5%w/v脱脂牛奶的PBST),于37℃封闭2小时。再次洗涤板,每孔加入100μL梯度稀释(以66.7nM为起始浓度,在含2.5%w/v脱脂牛奶的PBST中5倍梯度稀释)的本发明的抗IL4Rα抗体、参照品或阴性对照品hIgG(用于静脉注射的人免疫球蛋白(pH 4),Hualan Biological Engineering Inc.),于37℃共孵育40分钟,然后洗涤板4次。在含有捕获抗IL4Rα抗体的96孔板中加入100μL/孔的生物素标记的人IL4Rα-his蛋白(SEQ ID NO:57,内部制备,溶于含2.5%w/v脱脂牛奶的PBST中,浓度为0.14nM),于37℃共孵育40分钟,洗涤板4次,然后加入100μL/孔的HRP标记链霉亲和素(在PBST中以1:10000的比例稀释,Jackson Immuno Research,产品目录016-030-084),于37℃孵育40分钟。最后一次洗涤后,加入100μL/孔的ELISA底物TMB(Innoreagents,产品目录TMB-S-002)进行孵育。10分钟后,于25℃加入50μL/孔的1M H_2SO_4终止反应,并在450nm处读取吸光度值。使用Graphpad Prism软件分析数据,并得到EC_{50}值。

[0181] 3.2基于细胞的结合FACS

[0182] 通过流式细胞术(FACS)检测小鼠抗IL4Rα抗体与表达于293F-IL4Rα细胞表面的IL4Rα的结合活性。简而言之,用pCMV-T-P质粒构建体转染293F细胞(Thermofisher Inc.,产品目录11625019),该构建体在EcoRI和XbaI之间具有编码人IL4Rα(uniprot#P24394-1的第1-825位氨基酸残基)的核苷酸,并选择稳定细胞池(命名为293F-IL4Rα)进行后续基于细胞的结合FACS和基于细胞的配体阻断FACS分析。从细胞培养瓶中收获293F-IL4Rα细胞,洗

涤两次,并重悬于FACS缓冲液(含有2%v/v胎牛血清的磷酸盐缓冲液(PBS))中。然后,在含有2×10^5个细胞/孔的96孔板中加入100μL/孔于FACS缓冲液的梯度稀释(以80nM为起始浓度,4倍梯度稀释)的抗IL4Rα抗体或对照品,冰浴40分钟。将细胞用FACS缓冲液洗涤两次后,加入100μL/孔的R-藻红蛋白标记的亲和纯化F(ab')$_2$片段化山羊抗鼠IgG(H+L)(在FACS缓冲液中以1:1000的比例稀释,Jackson Immunoresearch,产品目录115-116-146)。于4℃避光孵育40分钟后,将细胞洗涤3次后重悬于FACS缓冲液中。使用Becton Dickinson FACS Canto II-HTS测量荧光值。使用Graphpad Prism软件分析数据,并得到EC_{50}值。

[0183] 3.3间接ELISA

[0184] 检测抗IL4Rα抗体与食蟹猴IL4Rα蛋白或cal-IL4Rα-his蛋白的交叉反应。简而言之,溶于碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液(pH 9.6)的浓度为2μg/mL的食蟹猴IL4Rα-his蛋白(Sino biological inc.,产品目录90897-C08H)或溶于碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液(pH 9.6)的浓度为0.2μg/mL cal-IL4Rα-his蛋白(Sino biological inc.定制产品,产品目录BAX2)以100μL/孔包被在96孔板中,于37℃孵育2小时。用洗涤缓冲液(PBS+0.05%w/v Tween-20,PBST)洗涤板1次,然后加入200μL/孔的封闭缓冲液(含5%w/v脱脂牛奶的PBST),于37℃封闭2小时。再次洗涤板,每孔加入100μL梯度稀释的本发明的抗IL4Rα抗体或对照品(0.004-66.7nM,以66.7nM为起始浓度,在含2.5%w/v脱脂牛奶的PBST中5倍梯度稀释),于37℃孵育40分钟。洗涤板4次,然后加入100μL/孔的过氧化物酶标记的亲和纯化山羊抗鼠IgG(Fcγ片段特异性)(在PBST缓冲液中以1:5000的比例稀释,Jackson Immunoresearch,产品目录115-036-071),于37℃孵育40分钟。最后一次洗涤后,加入100μL/孔的TMB(Innoreagents)进行孵育。3-10分钟后,于25℃加入50μL/孔的1M H_2SO_4终止反应,并在450nm处读取吸光度值。使用Graphpad Prism软件分析数据,并得到EC_{50}值。

[0185] 三种测定的结果如表3和图1A-1C、2A-2D、3所示。

[0186] 结果显示,本发明的小鼠抗IL4Rα抗体能够以高结合力特异性结合人IL4Rα,并且其中一些抗体与猴IL4Rα蛋白的结合活性高于参照品。

表3.小鼠抗IL4Rα抗体的结合活性

小鼠单克隆抗体ID#	结合:捕获ELISA (EC_{50}, nM)	细胞结合:FACS (EC_{50}, nM)	食蟹猴IL4Rα交叉反应:间接ELISA (EC_{50}, nM)	狨猴IL4Rα交叉反应:间接ELISA (EC_{50}, nM)
B1D2F7D3B5	0.06	0.25	不结合	*
B8G11F2B7G5E8	0.04	0.25	0.29	*
B9D1D11F8D8	0.07	0.22	不结合	*
C2C1A1A1	0.08	0.16	0.33	*
C2B2F7B7	0.13	0.18	108.2	*
参照品	0.05	0.08	0.95	*

*未检测。

[0187] 实施例4:小鼠抗IL4Rα抗体对IL4Rα-参照品或IL4Rα-IL4相互作用的阻断活性

[0188] 4.1配体阻断ELISA

[0189] 通过竞争ELISA测定本发明的抗IL4Rα抗体阻断IL4-IL4Rα相互作用的能力。简而言之,溶于PBS的浓度为2μg/mL的人IL4Rα-his蛋白(SEQ ID NO:57,内部制备)以100μL/孔包被于96孔板中,于4℃孵育过夜。第二天,用洗涤缓冲液(PBS+0.05%w/v Tween-20,PBST)洗涤板,并加入含5%w/v脱脂牛奶的PBST,在37℃中封闭2小时。然后,用洗涤缓冲液再次洗

涤板。

[0190] 用含2.5%w/v脱脂牛奶的PBST缓冲液梯度稀释抗IL4Rα抗体或对照品(以80nM为起始浓度,4倍梯度稀释),并将梯度稀释的抗IL4Rα抗体或对照品以100μL/孔添加到包被有IL4Rα的板中,在37℃下与人IL4Rα-his蛋白共孵育40分钟。用洗涤缓冲液洗涤板4次,然后每孔加入100μL浓度为0.56nM的生物素标记的人IL4蛋白(Sino biological inc.,产品目录11846-HNAE),于37℃孵育40分钟。再次用洗涤缓冲液洗涤板。然后加入100μL/孔的HRP标记链霉亲和素(在PBST缓冲液中以1:10000的比例稀释,Jackson Immunoresearch,产品目录016-030-084),于37℃共孵育40分钟。再次用洗涤缓冲液洗涤板。最后,加入TMB,并用1M H_2SO_4终止反应,在450nm处读取吸光度值。使用Graphpad Prism软件分析数据,并得到IC_{50}值。

[0191] 4.2参照品阻断ELISA

[0192] 通过竞争ELISA测定本发明的抗IL4Rα抗体阻断参照品-人IL4Rα结合的能力。简而言之,溶于PBS的浓度为2μg/mL的参照品以100μL/孔包被于96孔板中,于4℃孵育过夜。第二天,用洗涤缓冲液(PBS+0.05%w/v Tween-20,PBST)洗涤板,并加入含5%w/v脱脂牛奶的PBST,于37℃封闭2小时。在封闭96孔板期间,用生物素标记的人IL4Rα-his蛋白(SEQ ID NO:57,内部制备,溶于含2.5%w/v脱脂牛奶的PBST中,浓度为0.55nM)稀释本发明的抗IL4Rα抗体或对照品(以100nM为起始浓度,4倍梯度稀释),于25℃孵育40分钟。洗涤板之后,将100μL/孔的抗体/IL4Rα-his混合物加到包被有参照品的板中。于37℃孵育40分钟,再用洗涤缓冲液洗涤板。然后向板中加入100μL/孔的HRP标记链霉亲和素,于37℃孵育40分钟,以检测结合到板上的生物素标记的人IL4Rα-his。再次用洗涤缓冲液洗涤板。最后,加入TMB,并用1M H_2SO_4终止反应,在450nm处读取吸光度值。使用Graphpad Prism软件分析数据,并得到IC_{50}值。

[0193] 4.3基于细胞的配体阻断FACS

[0194] 使用上述制备的293F-IL4Rα细胞,利用流式细胞术(FACS)评估抗IL4Rα抗体阻断IL4蛋白与细胞表面IL4Rα的结合活性。

[0195] 简而言之,从细胞培养瓶中收获293F-IL4Rα细胞,洗涤两次,并重悬于FACS缓冲液(含有2%v/v胎牛血清的PBS)中。然后,在含有1×10^5个细胞/孔的96孔板中加入100μL/孔溶于FACS缓冲液的梯度稀释(以80nM为起始浓度,4倍梯度稀释)的抗IL4Rα抗体或对照品,冰浴40分钟。将板用FACS缓冲液洗涤两次后,每孔加入100μL浓度为1.67nM的生物素标记的人IL4蛋白(Sino biological inc.,产品目录11846-HNAE),于4℃避光孵育40分钟。用FACS缓冲液洗涤板两次后,每孔加入100μL R-藻红蛋白标记链霉亲和素(用FACS缓冲液以1:500的比例稀释,Jackson Immunoresearch,产品目录016-110-084),于4℃避光孵育40分钟。将细胞洗涤两次后,重悬于FACS缓冲液中。使用Becton Dickinson FACS Canto II-HTS测定荧光值。使用Graphpad Prism软件分析数据,并得到IC_{50}值。

[0196] 三种测定的结果如表4和图4A-4B、5A-5B、6A-6C所示。

[0197] 如表4和图4A-4B所示,本发明所有的抗IL4Rα抗体均能以与参照品相当的阻断活性阻断人IL4-人IL4Rα相互作用。

[0198] 图5A和5B显示,本发明的一些抗体能够阻断人IL4Rα-参照品的结合,表明他们结合的表位可能与参照品结合的表位相同或相似。

[0199] 此外,如表4和图6A-6C所示,所有抗IL4Rα抗体均能够阻断IL4与细胞表面IL4Rα的结合,并且其阻断能力与参照品非常接近(尽管其IC_{50}值略高于参照品)。

表4.抗IL4Rα抗体对参照品-IL4Rα或IL4-IL4Rα结合的阻断活性

小鼠单克隆抗体	竞争 ELISA (IC_{50}, nM)		基于细胞的测定 (IC_{50}, nM)
	IL4-IL4Rα	IL4Rα-参照品	基于细胞的配体阻断 FACS
B1D2F7D3B5	1.80	0.02	0.78
B8G11F2B7G5E8	0.81	0.02	0.80
B9D1D11F8D8	2.88	0.02	0.75
C2C1A1A1	0.81	0.04	0.44
C2B2F7B7	0.73	0.72	0.40
参照品	0.68	0.02	0.22

[0200] 实施例5:小鼠抗IL4Rα抗体基于细胞的功能测定

[0201] IL4和IL13能够与IL4Rα结合并诱导HEK293T-IL4Rα-STAT6-STAT6LUC-LB2细胞中的STAT6磷酸化。STAT6磷酸化在IL4/IL13信号通路中至关重要。

[0202] 简而言之,用pcDNA3.1-Puro(YouBio biological inc.,产品目录VT9222)质粒构建体(在BamHI和XhoI之间具有编码人IL4Rα的核苷酸)、STAT6质粒(Sino biological inc.,产品目录HG13190-NH)(在KpnI和XbaI之间具有编码人STAT6的核苷酸)、和STAT6荧光素酶报告基因质粒STAT6-Luc(Yeasen biological inc.,产品目录11588ES03)稳定转染天然表达IL13Rα1的HEK293T细胞(ATCC CRL-11268),在内部制备HEK293T-IL4Rα-STAT6-STAT6LUC-LB2细胞。然后选择单细胞克隆LB2进行所有后续的功能测定。

[0203] 检测本发明的抗IL4Rα抗体对IL4和IL13诱导的STAT6磷酸化的抑制作用。

[0204] 简而言之,将对数期的HEK293T-IL4Rα-STAT6-STAT6LUC-LB2细胞重悬于培养基(RPMI1640+10% FBS)中,以100μL/孔接种到96孔板中,每孔含5×10^5个细胞。然后,每孔加入50μL梯度稀释的抗IL4Rα抗体或对照品(包括内部制备的抗CD22抗体)(以100nM为起始浓度,5倍梯度稀释),并于37℃孵育30分钟。然后每孔加入50μL IL4蛋白(600pg/mL,Sino biological inc.,产品目录11846-HNAE)或IL13蛋白(50ng/mL,Sino biological inc.,产品目录10369-HNAC),于37℃孵育20分钟。将板离心并用染色缓冲液(内部制备,DPBS+0.5% w/v BSA+2mM EDTA)洗涤板两次,然后每孔加入50μL固定缓冲液(BD biosciences inc.,产品目录5545655),于4℃孵育30分钟。将细胞洗涤两次,每孔加入200μL透化缓冲液(BD biosciences inc.,目录号558050),冰浴30分钟。用染色缓冲液将板洗涤3次。然后加入抗pSTAT6抗体(pSTAT6储备液稀释20倍,BD biosciences inc.,产品目录562079),于冰上静置60分钟。最后将板洗涤两次,并重悬于染色缓冲液中。使用Becton Dickinson FACS Canto II-HTS测量荧光值。使用Graphpad Prism软件分析数据,并得到IC_{50}值。

[0205] 结果如表5和图7、8所示。

[0206] 结果显示,所有抗IL4Rα抗体均能以与参照品相当的或更高的阻断活性,阻断HEK293T-IL4Rα-STAT6-STAT6LUC-LB2细胞中IL4或IL13诱导的STAT6磷酸化。

表5.抗IL4Rα抗体的功能测定结果

小鼠单克隆抗体 ID#	对 IL4 诱导的 STAT6 磷酸化的抑制 (IC_{50}, nM)	对 IL13 诱导的 STAT6 磷酸化的抑制 (IC_{50}, nM)
B1D2F7D3B5	0.17	0.48
B8G11F2B7G5E8	0.23	0.47
B9D1D11F8D8	0.23	0.36
C2C1A1A1	0.16	0.23
C2B2F7B7	0.17	0.31
参照品	0.28	0.53

[0207] 实施例6:嵌合抗体的产生和表征

[0208] 对抗IL4Rα小鼠单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区进行了测序,序列ID汇总在表1中。

[0209] 将抗IL4Rα小鼠单克隆抗体C2C1A1A1和B8G11F2B7G5E8的重链可变区和轻链可变区分别克隆至含人IgG4重链恒定区(SEQ ID NO:55)的载体和含人κ轻链恒定区(SEQ ID NO:56)的载体中,其中可变区的C末端与相应恒定区的N末端相连。

[0210] 包含编码连接至人IgG4重链恒定区的重链可变区的核苷酸的载体,和包含编码连接至人κ轻链恒定区的轻链可变区的核苷酸的载体,按60%:40%的轻链构建体:重链构建体的比例,用1mg/mL PEI瞬时转染至50mL 293F悬浮细胞中。

[0211] 在摇瓶中培养六天后收获细胞上清液,通过离心沉淀上清液中的细胞,并通过0.22μm滤器过滤以进行免疫球蛋白分离。嵌合抗体通过蛋白A亲和层析进行纯化。简而言之,以5至10倍柱体积的PBS缓冲液洗涤蛋白A琼脂糖柱(bestchrom(Shanghai) Biosciences,产品目录AA0273)。使细胞上清液流过蛋白A琼脂糖柱,然后用PBS缓冲液洗涤柱直到蛋白质的吸光度达到基线。用洗脱缓冲液(0.1M甘氨酸-HCl,pH 2.7)洗脱柱,并立即将洗脱液收集到1.5mL管中,用中和缓冲液(1M Tris-HCl,pH 9.0)中和。合并含免疫球蛋白的部分,并在PBS中于4℃透析过夜。

[0212] 按照前述实施例中的方案(对其进行了如下所述的小幅修改),通过捕获ELISA、竞争ELISA、BIAcore亲和力测定、基于细胞的结合FACS测定和基于细胞的功能测定检测纯化的抗体。

[0213] 对于捕获ELISA,用2μg/mL山羊抗人IgG(亲和纯化的山羊抗人IgG,Fcγ片段特异性,Jackson Immunoresearch,产品目录109-005-098)替代山羊抗鼠IgG(Fcγ片段特异性),100μL/孔。

[0214] 对于间接ELISA,用过氧化物酶标记的亲和纯化$F(ab')_2$片段化山羊抗人IgG(Fcγ片段特异性,Jackson Immunoresearch,产品目录109-036-098)替代过氧化物酶标记的亲和纯化山羊抗鼠IgG(Fcγ片段特异性),100μL/孔。

[0215] 对于BIAcore,用山羊抗人IgG(GE healthcare,产品目录BR100839,Human Antibody Capture Kit)替代山羊抗鼠IgG,共价连接至CM5芯片。

[0216] 对于基于细胞的结合FACS,用R-藻红蛋白标记的亲和纯化山羊抗人IgG(Fcγ片段特异性,Jackson Immunoresearch,产品目录109-115-098)替代R-藻红蛋白标记的亲和纯化$F(ab')_2$片段化山羊抗鼠IgG(H+L),在FACS缓冲液中以1:1000的比例稀释,100μL/孔。

[0217] 结果如表6和图9-13所示。数据表明,嵌合抗体与其亲本小鼠抗体具有相似的结合亲和力/能力和阻断活性。

表6.嵌合抗体的结合和功能活性

单克隆抗体 ID#	对人 IL4R 的捕获 ELISA (EC_{50}, nM)	对人 IL4R 的 BIAcore 亲和力 (K_D, M)	基于细胞的结合 FACS (EC_{50}, nM)	IL4-IL4Rα 阻断 ELISA (IC_{50}, nM)	基于细胞的功能测定	
					对 IL4 诱导的 STAT6 磷酸化的抑制 (IC_{50}, nM)	对 IL13 诱导的 STAT6 磷酸化的抑制(IC_{50}, nM)
小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8	0.14	2.976E-9	0.41	1.64	0.26	0.60
嵌合抗体 B8G11F2B7G5E8	0.27	2.987E-9	0.78	1.82	0.26	0.76
小鼠抗体 C2C1A1A1	0.03	1.195E-10	0.31	1.89	0.19	0.27
嵌合抗体 C2C1A1A1	0.05	5.219E-10	0.63	3.12	0.27	0.56
参照品	0.05	4.656E-10	0.46	2.06	0.37	0.48

[0218] 实施例7:抗IL4Rα单克隆抗体B8G11F2B7G5E8和C2C1A1A1的人源化

[0219] 对小鼠抗IL4Rα抗体B8G11F2B7G5E8和C2C1A1A1进行人源化并进行进一步表征。小鼠抗体的人源化是使用已建立的CDR移植方法进行的,如下所述。

[0220] 为了选择用于小鼠抗体B8G11F2B7G5E8和C2C1A1A1人源化的接收体骨架,将各个小鼠抗体轻链可变区和重链可变区的序列与人免疫球蛋白基因数据库进行BLAST。选择具有最高同源性的人种系抗体作为用于人源化的接收体骨架。将小鼠抗体重/轻链可变区CDRs插入到选出的骨架中,并进一步回复突变骨架中的残基以获得更多候选的重/轻链可变区。总共获得13个示例性人源化B8G11F2B7G5E8抗体,即huB8G11F2B7G5E8-V1至huB8G11F2B7G5E8-V11、huB8G11F2B7G5E8-V13和huB8G11F2B7G5E8-V14,以及16个示例性人源化C2C1A1A1抗体,即huC2C1A1A1-V1至huC2C1A1A1-V16,其重/轻链可变区序列ID如表1中所示。

[0221] 包含编码连接至人IgG4重链恒定区(SEQ ID NO:55)的人源化重链可变区的核苷酸的载体,和包含编码连接至人κ轻链恒定区(SEQ ID NO:56)的人源化轻链可变区的核苷酸的载体,按60%:40%的轻链构建体:重链构建体的比例,用1mg/mL PEI瞬时转染至50mL 293F悬浮细胞中。

[0222] 在摇瓶中培养六天后收获细胞上清液,通过离心沉淀上清液中的细胞,并通过0.22μm滤器过滤以进行免疫球蛋白分离。抗体通过蛋白A亲和层析进行纯化。简而言之,以5至10倍柱体积的PBS缓冲液洗涤蛋白A琼脂糖柱(bestchrom(Shanghai)Biosciences,产品目录AA0273)。使细胞上清液流过蛋白A琼脂糖柱,然后用PBS缓冲液洗涤柱直到蛋白质的吸光度达到基线。用洗脱缓冲液(0.1M甘氨酸-HCl,pH 2.7)洗脱柱,并立即将洗脱液收集到1.5mL管中,用中和缓冲液(1M Tris-HCl,pH 9.0)中和。合并含免疫球蛋白的部分,并在PBS中于4℃透析过夜。

[0223] 实施例8:人源化抗体的表征

表7.人源化B8G11F2B7G5E8单克隆抗体的结合亲和力

单克隆抗体	BIAcore 动力学 人 IL4Rα		
	K_a (1/Ms)	K_d (s^{-1})	K_D (M)
嵌合抗体 B8G11F2B7G5E8	5.29E+05	0.001426	2.69E-09
huB8G11F2B7G5E8-V1	5.57E+05	0.002079	3.73E-09
huB8G11F2B7G5E8-V2	5.21E+05	0.001616	3.10E-09
huB8G11F2B7G5E8-V3	5.58E+05	0.001991	3.57E-09
huB8G11F2B7G5E8-V4	5.77E+05	0.001851	3.21E-09
huB8G11F2B7G5E8-V5	5.84E+05	0.002414	4.13E-09
huB8G11F2B7G5E8-V6	5.54E+05	0.002188	3.95E-09
huB8G11F2B7G5E8-V7	5.92E+05	0.002219	3.75E-09
huB8G11F2B7G5E8-V8	5.78E+05	0.002827	4.89E-09
huB8G11F2B7G5E8-V9	6.21E+05	0.003305	5.32E-09
huB8G11F2B7G5E8-V10	5.85E+05	0.002803	4.79E-09
huB8G11F2B7G5E8-V11	1.65E+09	24.57	1.49E-08
参照品	7.42E+05	3.30E-04	4.44E-10
嵌合抗体 B8G11F2B7G5E8	3.06E+05	0.001124	3.68E-09
huB8G11F2B7G5E8-V13	3.10E+05	0.0012	3.87E-09
huB8G11F2B7G5E8-V14	3.06E+05	0.001129	3.69E-09

[0224] 按照前述实施例中的方案,通过BIAcore技术评估了人源化抗体对人IL4Rα的结合亲和力。测定K_a,K_d和K_D值,并将其汇总在表7和8中。

表8.人源化C2C1A1A1单克隆抗体的结合亲和力

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

解离%＝(End(RU)-Start(RU))/Start(RU)

[0225] 结果表明,人源化抗体与嵌合抗体具有相似的人IL4Rα结合亲和力,并且与参照品相比,所有的人源化huC2C1A1A1抗体均显示出更高的人IL4Rα结合亲和力。

[0226] 按照前述实施例中的方案(对其进行了如下所述的小幅修改),通过Biacore、捕获ELISA、间接ELISA、基于细胞的结合FACS、竞争ELISA和基于细胞的功能测定,对人源化抗体huB8G11F2B7G5E8-V2、huB8G11F2B7G5E8-V4、huB8G11F2B7G5E8-V14、huC2C1A1A1-V14和huC2C1A1A1-V15进行了进一步检测。

[0227] 对于捕获ELISA,用2μg/mL山羊抗人IgG(亲和纯化的山羊抗人IgG,Fcγ片段特异性,Jackson Immunoresearch,产品目录109-005-098)替代山羊抗鼠IgG(Fcγ片段特异性),100μL/孔。

[0228] 对于间接ELISA,用过氧化物酶标记的亲和纯化$F(ab')_2$片段化山羊抗人IgG(Fcγ片段特异性,Jackson Immunoresearch,产品目录109-036-098)替代过氧化物酶标记的亲和纯化山羊抗鼠IgG(Fcγ片段特异性),100μl/孔。

[0229] 对于BIAcore,用山羊抗人IgG(GE healthcare,产品目录BR100839,Human Antibody Capture Kit)替代山羊抗鼠IgG,共价连接至CM5芯片。

[0230] 对于基于细胞的结合FACS,用R-藻红蛋白标记的亲和纯化山羊抗人IgG(Fcγ片段特异性,Jackson Immunoresearch,产品目录109-115-098)替代R-藻红蛋白标记的亲和纯化$F(ab')_2$片段化山羊抗鼠IgG(H+L)在FACS缓冲液中以1:1000的比例稀释,100μL/孔。

[0231] 还检测了人源化抗体huB8G11F2B7G5E8-V14和huC2C1A1A1-V15的热稳定性。简而言之,使用GloMelt™ Thermal Shift Protein Stability Kit(Biotium,产品目录33022-T,批号181214),通过蛋白质热位移测定法测定Tm(熔解温度)。简而言之,将GloMelt™染料解冻至室温。将含有染料的小瓶涡旋并离心。然后,将5μL 200×染料添加至95μL PBS中制备10×染料。反应体系中加入2μL 10×染料和10μg人源化抗体,并添加PBS至总反应体积为20μL。将含有染料和抗体的离心管短暂离心,并置于实时PCR热循环仪(Roche,LightCycler 480II)中,该热循环仪中Melt Curve程序使用表9中的参数进行设置。

表9.Melt Curve程序的参数

Profile步骤	温度	升温速率	持续时间
Initial hold	25℃	NA	30s
Melt curve	25-99℃	0.1℃/s	NA

[0232] 结果如表10-1至10-3和图14A-14B至22所示。

表10-1.人源化单克隆抗体的结合活性和功能活性

单克隆抗体 ID#	结合测定				
	人 IL4Rα-his			食蟹猴 IL4Rα-his	
	捕获 ELISA (EC_{50}, nM)	Biacore (K_D, M)	细胞结合 FACS (EC_{50}, nM)	Biacore (K_D, M)	间接 ELISA (EC_{50}, nM)
嵌合抗体 C2C1A1A1	0.05	3.88E-10	0.33	弱结合	0.60
huC2C1A1A1-V15	0.05	4.47E-10	0.31	弱结合	0.52
huC2C1A1A1-V14	0.06	6.42E-10	0.39	弱结合	0.68
参照品	0.05	7.46E-10	0.40	未结合	0.67
小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8	0.21	*	0.33	*	0.50
嵌合抗体 B8G11F2B7G5E8	0.32	3.23E-09	0.44	弱结合	1.06
huB8G11F2B7G5E8-V14	0.24	3.88E-09	0.52	弱结合	137.4
huB8G11F2B7G5E8-V2	0.27	4.10E-09	0.43	弱结合	914.1
huB8G11F2B7G5E8-V4	0.27	5.50E-09	0.41	弱结合	7.12
参照品	0.05	7.46E-10	0.53	未结合	3.34

*未检测。

表10-2.人源化单克隆抗体的结合活性和功能活性

单克隆抗体 ID#	结合测定		竞争 ELISA		IL4-IL4Rα 阻断 FACS (IC_{50}, nM)
	狨猴 IL4Rα-his		IL4-IL4Rα 阻断 ELISA (IC_{50}, nM)	参照品阻断 ELISA (IC_{50}, nM)	
	Biacore (K_D, M)	间接 ELISA (EC_{50}, nM)			
嵌合抗体 C2C1A1A1	弱结合	0.62	2.46	0.17	0.48
huC2C1A1A1-V15	弱结合	0.41	2.03	0.16	0.50
huC2C1A1A1-V14	弱结合	0.55	2.17	0.17	0.58
参照品	未结合	1.72	1.74	0.19	0.42
小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8	*	0.87	1.00	*	0.50
嵌合抗体 B8G11F2B7G5E8	弱结合	1.01	1.42	1.52	0.36
huB8G11F2B7G5E8-V14	弱结合	1.06	1.02	0.76	0.60
huB8G11F2B7G5E8-V2	弱结合	0.80	1.00	1.20	0.54
huB8G11F2B7G5E8-V4	弱结合	0.73	0.82	1.24	0.51
参照品	未结合	1.84	1.56	0.13	0.51

*未检测。

表10-3.人源化单克隆抗体的结合活性和功能活性

单克隆抗体 ID#	基于细胞的功能测定 (IC_{50}, nM)		Tm（熔解温度）℃	
	对 IL4 诱导的 STAT6 磷酸化的抑制	对 IL13 诱导的 STAT6 磷酸化的抑制	Tm1	Tm2
chC2C1A1A1	0.26	0.39	*	*
huC2C1A1A1-V15	0.61	0.60	NA	72.0
huC2C1A1A1-V14	0.64	0.73	65.5	74.0
参照品	0.70	0.84	*	*
mAb B8G11F2B7G5E8	*	*	*	*
chB8G11F2B7G5E8	0.45	0.50	*	*
huB8G11F2B7G5E8-V14	0.26	0.66	65.5	80.5
huB8G11F2B7G5E8-V2	0.40	0.63	65.0	80.0
huB8G11F2B7G5E8-V4	0.30	0.81	65.0	80.0
参照品	0.70	0.84	*	*

*未检测。

[0233] 数据显示,与参照品相比,人源化C2C1A1A1抗体显示出相当的(如果不是更好的话)人IL4Rα结合亲和力/活性和对IL4Rα-IL4/IL13的阻断能力,而人源化B8G11F2B7G5E8抗体对IL4/IL13-IL13Rα1-IL4Rα相互作用明显具有更好的阻断能力。

[0234] 尽管本发明已结合一个或多个实施方案进行了描述,应当理解的是,本发明不仅涵盖这些实施方案,还意在涵盖包括在所附权利要求的精神和范围内的所有可替代、修饰和等同物。本文引用的所有文献均通过引用的方式全部并入本文。

[0235] 本申请的序列信息总结于下表。

描述 序列/SEQ ID NO.
小鼠、嵌合和人源化 C2C1A1A1 的 VH-CDR1 TYGMS (SEQ ID NO:1)
小鼠、嵌合和人源化 C2C1A1A1 的 VH-CDR2 TINSNGGSTSYPDSVKG (SEQ ID NO:5)
小鼠、嵌合和人源化 C2C1A1A1 的 VH-CDR3 FFRFRNAMDY (SEQ ID NO:10)
小鼠、嵌合和人源化 C2C1A1A1 的 VL-CDR1

RTSENIYSYLA (SEQ ID NO:15)
小鼠、嵌合和人源化 C2C1A1A1 的 VL-CDR2 NAKTLAE (SEQ ID NO:22)
小鼠、嵌合和人源化 C2C1A1A1 的 VL-CDR3 QHYYGPPTWT (SEQ ID NO:26)
小鼠和嵌合 C2C1A1A1 的 VH EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYGMSWVRQTPDKRLELVATINSNGGSTSYPDSVKGRF TISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMFYCARFFRFRNAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:32) 小鼠 C2C1A1A1 的 VH GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTG TGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACTTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGACAAGAG GCTGGAGTTGGTCGCAACCATTAATAGTAATGGTGGTAGTACCAGTTATCCAGACAGTGTGAAGG GCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAG TCTGAGGACACAGCCATGTTTTACTGTGCAAGATTTTTCCGCTTTAGGAATGCTATGGACTACTGG GGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:59) 嵌合 C2C1A1A1 的 VH GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGAGGATCCCTGAAGCTGTCCT GCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCACATACGGCATGTCCTGGGTGAGACAGACCCCTGATAAG AGACTGGAGCTGGTGGCCACCATCAACAGCAACGGCGGCAGCACCAGCTACCCCGACAGCGTGA AGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGTCCAGCCTG AAGAGCGAGGATACAGCCATGTTCTACTGTGCCAGGTTCTTTAGGTTCAGAAATGCCATGGACTA CTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACAGTGAGCAGC (SEQ ID NO:60)
huC2C1A1A1-V1 至 huC2C1A1A1-V4 的 VH EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSWVRQAPGKGLVX1VX2TINSNGGSTSYPDSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:33) X1=W, X2=S EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSWVRQAPGKGLVWVSTINSNGGSTSYPDSVKGR FTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWGQGTLVTVSS
huC2C1A1A1-V5 至 huC2C1A1A1-V8 的 VH EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSWVRQSPDKRLEWVSTINSNGGSTSYPDSVKGRF TISRDNAKNTLYLQMRSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:34)
huC2C1A1A1-V9 至 huC2C1A1A1-V12 的 VH EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSWVRQAPGKGLVX1VX2TINSNGGSTSYPDSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:33) X1=L, X2=A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSWVRQAPGKGLVLVATINSNGGSTSYPDSVKGR FTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWGQGTLVTVSS
huC2C1A1A1-V13 至 huC2C1A1A1-V16 的 VH EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSWVRQAPGKGLVX1VX2TINSNGGSTSYPDSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:33) X1=W, X2=A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSWVRQAPGKGLVWVATINSNGGSTSYPDSVKGR FTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFFRFRNAMDYWGQGTLVTVSS GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCCGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCT GCGCTGCCTCCGGCTTCACCTTTAGCACCTACGGCATGAGCTGGGTGAGACAAGCCCCCGGCAAA GGACTGGTGTGGGTGGCTACCATCAACAGCAACGGCGGCTCCACAAGCTACCCCGACAGCGTGAA GGGAAGATTCACCATCTCTAGAGACAACGCCAAGAACACACTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGA GAGCCGAAGACACCGCTGTGTACTACTGCGCTAGATTCTTTAGATTTAGAAACGCCATGGACTAC TGGGGCCAAGGCACACTGGTGACAGTGTCCTCC (SEQ ID NO:61)
小鼠和嵌合 C2C1A1A1 的 VL DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRTSENIYSYLAWYQQKQGKSPQFLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGT QFSLNINSLQSEDFGSYYCQHYYGPPTWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:35) 小鼠 C2C1A1A1 的 VL GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAACTGTCACCATCACA TGTCGAACAAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCC TCAGTTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTG GATCAGGCACACAGTTTTCTCTGAATATCAACAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACT

GTCAACATTATTATGGTCCTCCCACGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:62) 嵌合 C2C1A1A1 的 VL GACATCCAGATGACACAGAGCCCCGCCAGCCTGTCCGCCTCCGTTGGAGAGACCGTGACCATCAC CTGTAGGACCTCCGAGAATATCTACAGCTACCTGGCCTGGTATCAACAGAAGCAGGGCAAGTCCC CTCAGTTTCTGGTGTACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCCTCTAGGTTCTCCGGCTCCG GCAGCGGCACCCAGTTCAGCCTGAATATCAACAGCCTGCAGAGCGAGGACTTTGGCAGCTACTAC TGTCAGCACTACTACGGCCCTCCCACCTGGACATTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO:63)
huC2C1A1A1-V1、huC2C1A1A1-V5、huC2C1A1A1-V9 和 huC2C1A1A1-V13 的 VL DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKAPKX1LX2YNAKTLAEGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:36) X1=L, X2=I DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGQGTKVEIK
huC2C1A1A1-V2、huC2C1A1A1-V6、huC2C1A1A1-V10 和 huC2C1A1A1-V14 的 VL DIQMTQSPSSLSASVGQRVTITCRTSENIYSYLAWYQQKQGKPPRFLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTE FTLTITSLQAEDFGVYYCQHYYGPPTWTFGPGTKLEIK (SEQ ID NO:37)
huC2C1A1A1-V3、huC2C1A1A1-V7、huC2C1A1A1-V11 和 huC2C1A1A1-V15 的 VL DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKAPKX1LX2YNAKTLAEGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:36) X1=F, X2=V DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKAPKFLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGQGTKVEIK GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTCTCTGAGCGCTTCCGTGGGAGATAGAGTGACCATCAC ATGCAGAACCTCCGAGAACATCTACAGCTATCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCC CCAAGTTCCTGGTGTACAACGCCAAGACACTGGCTGAGGGCGTGCCTAGCAGATTCAGCGGCTCC GGCAGCGGCACAGACTTTACACTGACAATCAGCTCTCTGCAACCCGAGGACTTCGCCACCTACTA CTGCCAGCACTACTATGGCCCCCCTACATGGACCTTTGGCCAAGGCACCAAGGTGGAGATCAAG (SEQ ID NO:64)
huC2C1A1A1-V4、huC2C1A1A1-V8、huC2C1A1A1-V12 和 huC2C1A1A1-V16 的 VL DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKAPKX1LX2YNAKTLAEGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:36) X1=F, X2=I DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKAPKFLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQHYYGPPTWTFGQGTKVEIK
小鼠 C2B2F7B7 的 VH CDR1 TYGMS (SEQ ID NO:1)
小鼠 C2B2F7B7 的 VH CDR2 TINSNGGSTNYPDSVKG (SEQ ID NO:6)
小鼠 C2B2F7B7 的 VH CDR3 FFRIRNAMDY (SEQ ID NO:11)
小鼠 C2B2F7B7 的 VL CDR1 RASENIYSYLA (SEQ ID NO:16)
小鼠 C2B2F7B7 的 VL CDR2 NAKTLAE (SEQ ID NO:22)
小鼠 C2B2F7B7 的 VL CDR3 QHYYGTPTWT (SEQ ID NO:27)
小鼠 C2B2F7B7 的 VH EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYGMSWVRQTPDKRLELVATINSNGGSTNYPDSVKGRF TISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARFFRIRNAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:38)
小鼠 C2B2F7B7 的 VL DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQGKSPQFLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGT QFSLKINSLQPEDFGSYYCQHYYGTPTWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:39)
小鼠和嵌合 B8G11F2B7G5E8 的 VH CDR1 DTYMH (SEQ ID NO:2)
小鼠和嵌合 B8G11F2B7G5E8 的 VH CDR2 RIDPTNGYTIYASKFQG (SEQ ID NO:7)
小鼠和嵌合 B8G11F2B7G5E8 的 VH CDR3 RRPWFAY (SEQ ID NO:12)

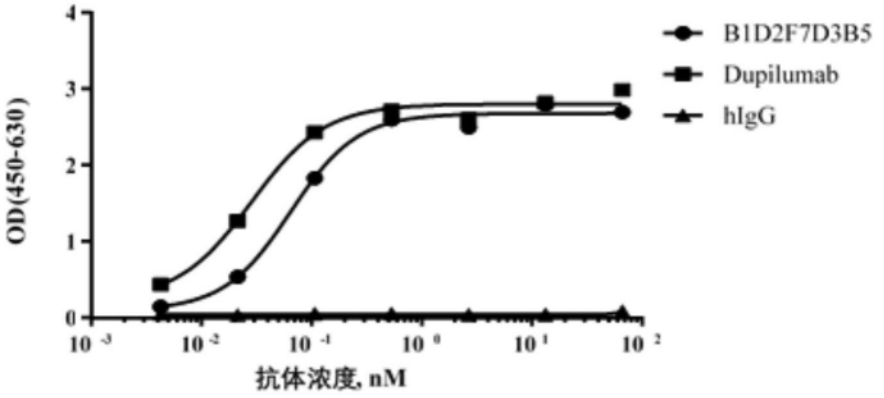
小鼠和嵌合 B8G11F2B7G5E8 的 VL CDR1 RSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO:17)
小鼠和嵌合 B8G11F2B7G5E8 的 VL CDR2 KVTNRFS (SEQ ID NO:23)
小鼠和嵌合 B8G11F2B7G5E8 的 VL CDR3 FQGSHVPYT (SEQ ID NO:28)
小鼠和嵌合 B8G11F2B7G5E8 的 VH EVQLQQSGADLVRPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHWVKQRPEQGLEWVGRIDPTNGYTIYASKFQGK ATITADTSSNTAYMQLSSLTSGDTAVYHCVSRRPWFAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:40) 小鼠 B8G11F2B7G5E8 的 VH GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGATCTTGTGAGGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTG CACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGG GCCTGGAGTGGGTTGGAAGGATTGATCCTACGAATGGTTATACTATATATGCCTCAAAGTTCCAG GGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCATCCAACACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGAC ATCTGGGGACACTGCCGTCTATCATTGTGTTAGTCGGAGGCCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGG GACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO:65) 嵌合 B8G11F2B7G5E8 的 VH GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGCGCCGACCTGGTGAGGCCAGGAGCTTCCGTGAAGCTGAGCTG CACAGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACATACATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCCGAGCAG GGCCTGGAGTGGGTGGGAAGAATCGACCCCACCAACGGCTACACCATCTACGCCTCCAAGTTCCA GGGCAAGGCCACCATCACAGCCGATACCTCCTCCAACACAGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGA CAAGCGGCGATACCGCCGTGTACCACTGCGTGTCCAGAAGGCCTTGGTTCGCCTACTGGGGCCAG GGCACCCTGGTGACAGTGTCCGCC (SEQ ID NO:66)
huB8G11F2B7G5E8-V1 的 VH EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKX1SGFNIKDTYMHWVX2QAPGKGLEWX3GRIDPTNGYTIYASKFQ GKATITADTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYX4CVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:41) X1=A, X2=K, X3=V, X4=H EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDTYMHWVKQAPGKGLEWVGRIDPTNGYTIYASKFQGK ATITADTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYHCVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS
huB8G11F2B7G5E8-V2 的 VH EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKX1SGFNIKDTYMHWVX2QAPGKGLEWX3GRIDPTNGYTIYASKF QGKATITADTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYX4CVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:41) X1=V, X2=K, X3=V, X4=H EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDTYMHWVKQAPGKGLEWVGRIDPTNGYTIYASKFQGK ATITADTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYHCVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS
huB8G11F2B7G5E8-V3 的 VH EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKX1SGFNIKDTYMHWVX2QAPGKGLEWX3GRIDPTNGYTIYASKF QGKATITADTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYX4CVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:41) X1=A, X2=Q, X3=V, X4=H EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDTYMHWVQQAPGKGLEWVGRIDPTNGYTIYASKFQGK ATITADTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYHCVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS
huB8G11F2B7G5E8-V4 的 VH EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKX1SGFNIKDTYMHWVX2QAPGKGLEWX3GRIDPTNGYTIYASKF QGKATITADTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYX4CVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:41) X1=A, X2=K, X3=M, X4=H EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDTYMHWVKQAPGKGLEWMGRIDPTNGYTIYASKFQG KATITADTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYHCVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS
huB8G11F2B7G5E8-V5 的 VH EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDTYMHWVKQAPGKGLEWVGRIDPTNGYTIYASKFQGX 1X2TITADTSX3X4TAYMELSSLRSEDTAVYHCVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:42) X1=R, X2=A, X3=S, X4=N EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDTYMHWVKQAPGKGLEWVGRIDPTNGYTIYASKFQGR ATITADTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYHCVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS
huB8G11F2B7G5E8-V6 的 VH EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDTYMHWVKQAPGKGLEWVGRIDPTNGYTIYASKFQGX 1X2TITADTSX3X4TAYMELSSLRSEDTAVYHCVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:42) X1=K, X2=V, X3=S, X4=N

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDTYMHWVKQAPGKGLEWVGRIDPTNGYTIYASKFQGK VTITADTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYHCVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS
huB8G11F2B7G5E8-V7 的 VH EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDTYMHWVKQAPGKGLEWVGRIDPTNGYTIYASKFQGX 1X2TITADTSX3X4TAYMELSSLRSEDTAVYHCVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:42) X1=K, X2=A, X3=T, X4=N EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDTYMHWVKQAPGKGLEWVGRIDPTNGYTIYASKFQGK ATITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYHCVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS
huB8G11F2B7G5E8-V8 的 VH EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDTYMHWVKQAPGKGLEWVGRIDPTNGYTIYASKFQGX 1X2TITADTSX3X4TAYMELSSLRSEDTAVYHCVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:42) X1=K, X2=A, X3=S, X4=D EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDTYMHWVKQAPGKGLEWVGRIDPTNGYTIYASKFQGK ATITADTSSDTAYMELSSLRSEDTAVYHCVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS
huB8G11F2B7G5E8-V9 的 VH EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKX1SGFNIKDTYMHWVX2QAPGKGLEWX3GRIDPTNGYTIYASKF QGKATITADTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYX4CVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:41) X1=A, X2=K, X3=V, X4=Y EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDTYMHWVKQAPGKGLEWVGRIDPTNGYTIYASKFQGK ATITADTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYYCVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS
huB8G11F2B7G5E8-V10 的 VH EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDTYMHWVKQAPGKGLEWVGRIDPTNGYTIYASKFQGX 1X2TITADTSX3X4TAYMELSSLRSEDTAVYHCVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:42) X1=R, X2=V, X3=T, X4=N EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIKDTYMHWVKQAPGKGLEWVGRIDPTNGYTIYASKFQGR VTITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYHCVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS
huB8G11F2B7G5E8-V11 的 VH EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDTYMHWVQQAPGKGLEWMGLIDPTNGYTIYAEKFQG RVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:43)
huB8G11F2B7G5E8-V13 的 VH QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHWVKQRPEQGLEWVGRIDPTNGYTIYASKFQGK ATITADTSSNTAYMQLSSLTSEDTAVYHCVSRRPWFAYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:44)
huB8G11F2B7G5E8-V14 的 VH EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKX1SGFNIKDTYMHWVX2QAPGKGLEWX3GRIDPTNGYTIYASKF QGKATITADTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYX4CVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:41) X1=V, X2=K, X3=M, X4=H EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDTYMHWVKQAPGKGLEWMGRIDPTNGYTIYASKFQG KATITADTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYHCVSRRPWFAYWGQGTLVTVSS GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCACCGTGAAGATCAGCT GCAAGGTGAGCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTGAAGCAAGCCCCCGGCAA AGGACTGGAGTGGATGGGAAGAATCGACCCCACCAACGGCTACACCATCTACGCCAGCAAGTTCC AAGGCAAGGCCACCATCACCGCCGACACCTCCAGCAATACCGCCTACATGGAGCTGAGCTCTCTG AGAAGCGAGGACACCGCCGTGTACCACTGTGTGAGCAGAAGACCTTGGTTCGCCTACTGGGGCCA AGGCACACTGGTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO:67)
小鼠和嵌合 B8G11F2B7G5E8 的 VL DILMTQTPLSLPVSLGAQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVTNRFSGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:45) 小鼠 B8G11F2B7G5E8 的 VL GATATTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGCTCAAGCCTCCATCTCTT GCAGATCAAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAA CCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTACCAATCGATTTTCTGGGGTCCCAGATAGG TTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCT GGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGG AAATAAAA (SEQ ID NO:68) 嵌合 B8G11F2B7G5E8 的 VL GACATCCTGATGACACAGACACCCCTGTCCCTGCCTGTGTCCCTGGGCGCTCAGGCCTCCATCTCC TGTAGGAGCAGCCAGTCCATCGTGCACAGCAATGGCAACACCTACCTGGAGTGGTACTTGCAGAA GCCTGGCCAGAGCCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGTGACCAACAGATTCAGCGGCGTGCCCGATA

GGTTCAGCGGCTCCGGCAGCGGCACCGATTTCACACTGAAGATCTCCAGGGTGGAGGCCGAGGAC CTGGGCATCTACTACTGCTTCCAGGGCTCCCACGTGCCTTACACCTTTGGCGGCGGCACAAAGCTG GAGATCAAG (SEQ ID NO:69)
huB8G11F2B7G5E8-V1 至 huB8G11F2B7G5E8-V11、huB8G11F2B7G5E8-V13 和 huB8G11F2B7G5E8-V14 的 VL DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVTNRFSGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:46) GACATCGTGATGACCCAGACCCCTCTGAGCCTGTCCGTGACACCCGGCCAGCCTGCCAGCATCAG CTGTAGGAGCTCCCAGTCCATCGTGCACTCCAATGGCAATACATACCTGGAGTGGTACTTGCAGA AGCCCGGCCAGTCCCCTCAGCTGCTGATCTACAAGGTGACCAATAGATTCTCCGGCGTGCCCGAT AGGTTCTCCGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTTCACACTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCCGAGG ACGTGGGCGTGTACTACTGCTTCCAGGGCTCCCACGTGCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAG CTGGAGATCAAG (SEQ ID NO:70)
小鼠 B8D10G7G6E4 的 VH CDR1 SYAMS (SEQ ID NO:3)
小鼠 B8D10G7G6E4 的 VH CDR2 GIRSGGSYTYYPDTVKG (SEQ ID NO:8)
小鼠 B8D10G7G6E4 的 VH CDR3 GDKLRPYHFDY (SEQ ID NO:13)
小鼠 B8D10G7G6E4 的 VL CDR1 KASQDVTTAVA (SEQ ID NO:18)
小鼠 B8D10G7G6E4 的 VL CDR2 SASYRYT (SEQ ID NO:24)
小鼠 B8D10G7G6E4 的 VL CDR3 QQHYSDPYT (SEQ ID NO:29)
小鼠 B8D10G7G6E4 的 VH EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVAGIRSGGSYTYYPDTVKGR FTISRDNARNTLYLQMNSLRSEDTAIYYCARGDKLRPYHFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:47)
小鼠 B8D10G7G6E4 的 VL DIVMTQSHKFMSTSVGDKVSITCKASQDVTTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRFAGSGS GTDFTVTISTVQAEDLAVYYCQQHYSDPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:48)
小鼠 B9A7C9A4H5 的 VH CDR1 NYAMS (SEQ ID NO:4)
小鼠 B9A7C9A4H5 的 VH CDR2 GIRSGGSYTYYPDTVKG (SEQ ID NO:8)
小鼠 B9A7C9A4H5 的 VH CDR3 GDKLRPYHFDY (SEQ ID NO:13)
小鼠 B9A7C9A4H5 的 VL CDR1 KASQDVSTAVV (SEQ ID NO:19)
小鼠 B9A7C9A4H5 的 VL CDR2 SASYRYT (SEQ ID NO:24)
小鼠 B9A7C9A4H5 的 VL CDR3 QQHYSAPYT (SEQ ID NO:30)
小鼠 B9A7C9A4H5 的 VH EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMSWVRQTPEKRLEWVAGIRSGGSYTYYPDTVKGR FTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDTAIYYCARGDKLRPYHFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:49)
小鼠 B9A7C9A4H5 的 VL DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVVWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSG TDFTFTIITVQAEDLAVYYCQQHYSAPYTFGGGTQLEIK (SEQ ID NO:50)
小鼠 B9D1D11F8D8 的 VH CDR1 SYAMS (SEQ ID NO:3)
小鼠 B9D1D11F8D8 的 VH CDR2 SISSGDSTYYLDSVKG (SEQ ID NO:9)
小鼠 B9D1D11F8D8 的 VH CDR3 SGGSAPY (SEQ ID NO:14)
小鼠 B9D1D11F8D8 的 VL CDR1

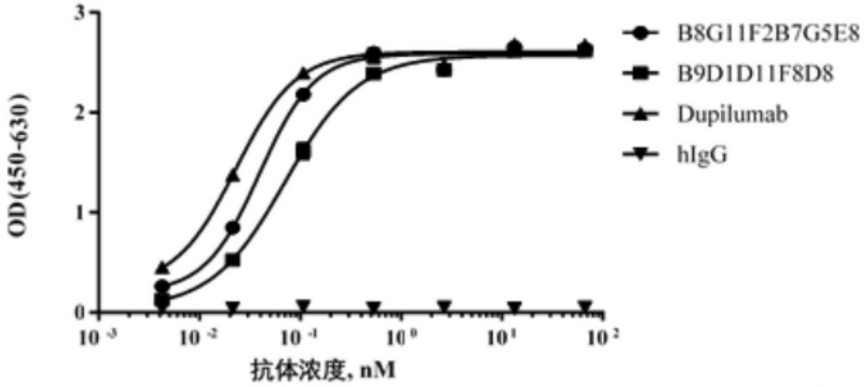
SASSSVNYMY (SEQ ID NO:20)
小鼠 B9D1D11F8D8 的 VL CDR2 RTSNLAS (SEQ ID NO:25)
小鼠 B9D1D11F8D8 的 VL CDR3 QQYHSFPLT (SEQ ID NO:31)
小鼠 B9D1D11F8D8 的 VH EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGDSTYYLDSVKGRFT ISRDNARNILYLQVSSLRSEDTAMYYCERSGGSAPYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:51)
小鼠 B9D1D11F8D8 的 VL QIVLTQSPAIMSASPGDMVTISCSASSSVNYMYWYQQKPGSSPKPWIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTS YSLTISSMEAEDAATYYCQQYHSFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:52)
小鼠 B1D2F7D3B5 的 VH CDR1 SYAMS (SEQ ID NO:3)
小鼠 B1D2F7D3B5 的 VH CDR2 SISSGDSTYYLDSVKG (SEQ ID NO:9)
小鼠 B1D2F7D3B5 的 VH CDR3 SGGSAPY (SEQ ID NO:14)
小鼠 B1D2F7D3B5 的 VL CDR1 SASSSVSYMY (SEQ ID NO:21)
小鼠 B1D2F7D3B5 的 VL CDR2 RTSNLAS (SEQ ID NO:25)
小鼠 B1D2F7D3B5 的 VL CDR3 QQYHSFPLT (SEQ ID NO:31)
小鼠 B1D2F7D3B5 的 VH EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGDSTYYLDSVKGRFT ISRDNAMNILYLQMSSLRSEDTAVYYCERSGGSAPYWGQGTLVSVSA (SEQ ID NO:53)
小鼠 B1D2F7D3B5 的 VL QIVLTQSPAIMSASPGEMVTISCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPKPWIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTS YSLTISSMEAEDAATYYCQQYHSFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:54)
嵌合和人源化抗体的重链恒定区 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:55) GCCAGCACAAAGGGCCCTTCCGTGTTTCCCCTGGCCCCCTGCAGCAGGAGCACCTCTGAGTCCAC CGCCGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCTGGAATTCCG GCGCCCTGACATCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACAGCCTGA GCTCCGTGGTGACAGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACATGTAATGTGGATCACA AGCCCAGCAACACAAAGGTGGATAAGAGAGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTCCCTGT CCTGCCCCAGAGTTCCTGGGCGGCCCCTCTGTGTTCCTGTTCCCCCCTAAGCCCAAGGACACACTG ATGATCTCCAGGACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAGGACCCTGAGGT GCAGTTCAATTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACAAAGCCCAGAGAGGAG CAGTTTAATTCCACATACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGG CAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGAGCAACAAGGGCCTGCCTTCCTCCATCGAGAAGACAATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCCAGCCAGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAATAACTACAAGACAACACCCCCCGTGCTGGATTCCGATGG CAGCTTCTTTCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGATAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGCAATGTGTTCA GCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGAGCCTG GGCAAGTGA (SEQ ID NO:71)
嵌合和人源化抗体的轻链恒定区 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO:56) CGTACGGTGGCGGCGCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGA TAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC

TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA (SEQ ID NO:72)
人 IL4Rα-his MGWLCSGLLFPVSCLVLLQVASSGNMKVLQEPTCVSDYMSISTCEWKMNGPTNCSTELRLLYQLVFL LSEAHTCIPENNGGAGCVCHLLMDDVVSADNYTLDLWAGQQLLWKGSFKPSEHVKPRAPGNLTVHT NVSDTLLLTWSNPYPPDNYLYNHLTYAVNIWSENDPADFRIYNVTYLEPSLRIAASTLKSGISYRARVR AWAQCYNTTWSEWSPSTKWHNSYREPFEQHHHHHHHHHHH (SEQ ID NO:57)
狨猴 IL4Rα-his MGWLCSGLLFPVSYLVLLQVAGSGSMKVLQEPTCVSDYISLSTCEWKMGGPTNCSAELRLVYQLVFLI SETNMCVPENNGAAGCVCHLFMEDMVGADNYTLDLWAGQQLLWKGSFKPSEHVKPKAPENLTVYT NVSETLLLTWSNPYPPDNYLYEKLTYAVNIWNENDPTDSRIYDVTYQEPTLRIAASTLKSGVSYRARV RAWAQSYNSTWSEWSPSTKWYNAYKEPFEKHHHHHHHHHHH (SEQ ID NO:58)



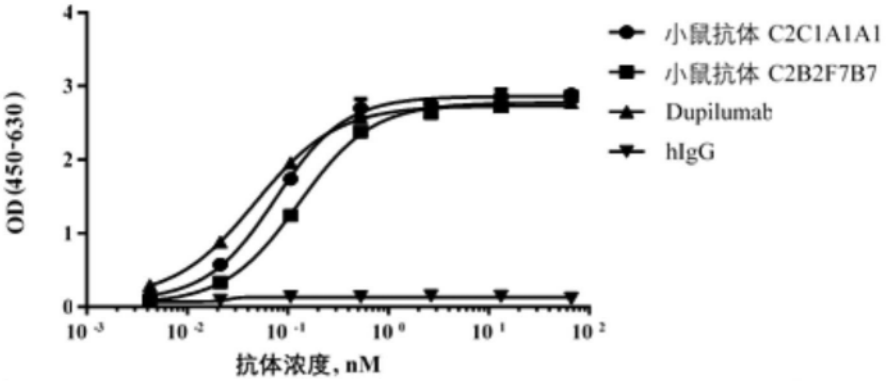
	B1D2F7D3B5	Dupilumab
EC50	0.0644	0.02845

图1A



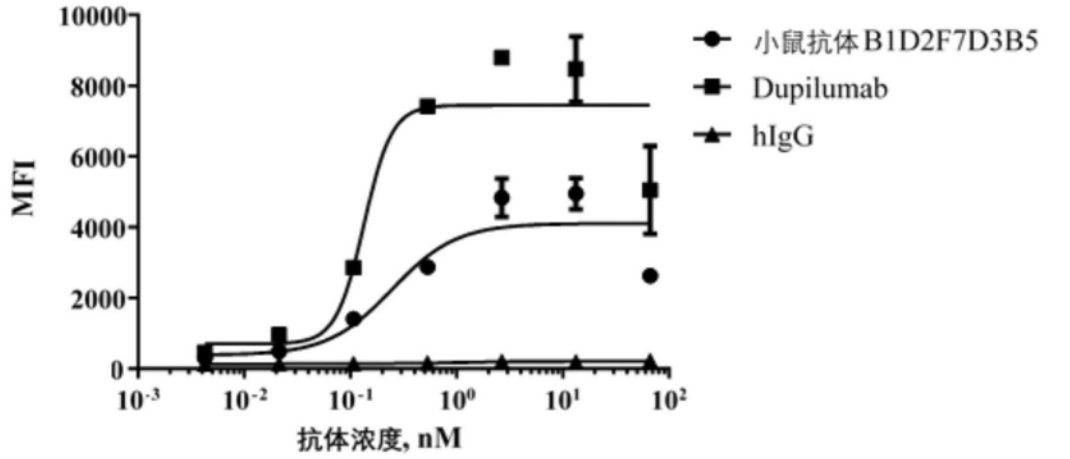
	B8G11F2B7G5E8	B9D1D11F8D8	Dupilumab
EC50	0.03934	0.07034	0.02281

图1B



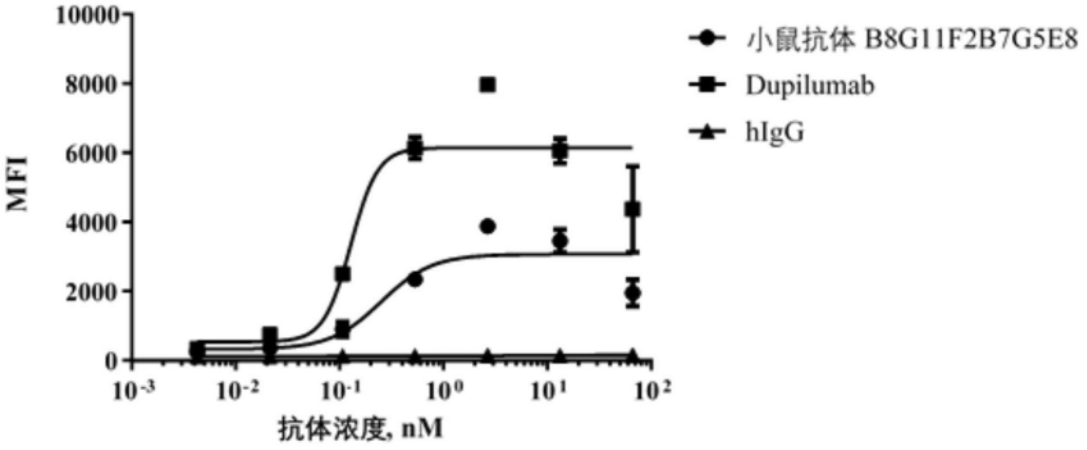
	小鼠抗体 C2C1A1A1	小鼠抗体 C2B2F7B7	Dupilumab
EC50	0.07586	0.1288	0.04789

图1C



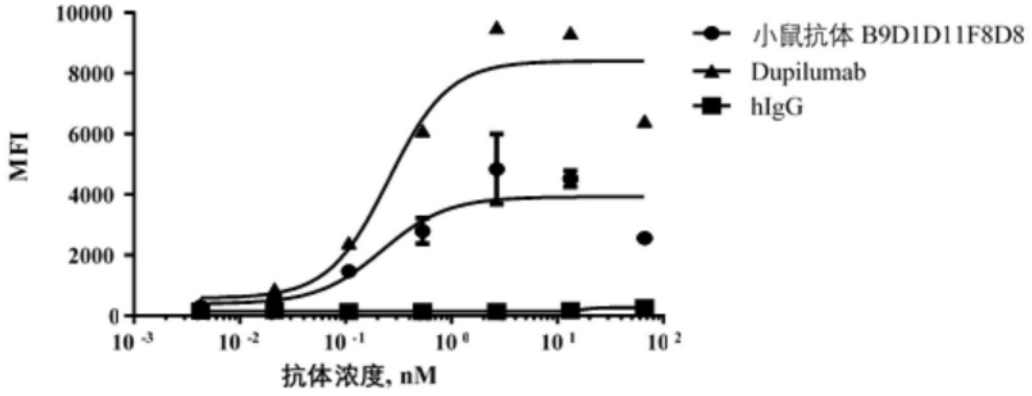
	小鼠抗体 B1D2F7D3B5	Dupilumab
EC50	0.2464	0.134

图2A



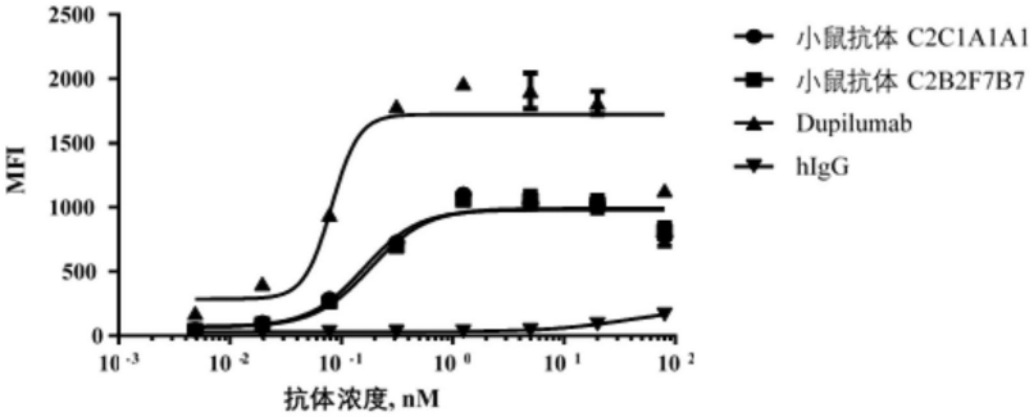
	小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8	Dupilumab
EC50	0.2509	0.1282

图2B



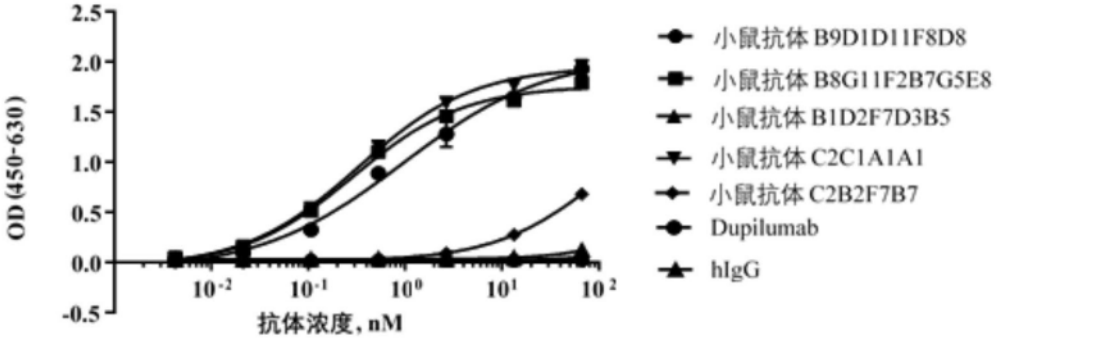
	小鼠抗体 B9D1D11F8D8	Dupilumab
EC50	0.2209	0.2544

图2C



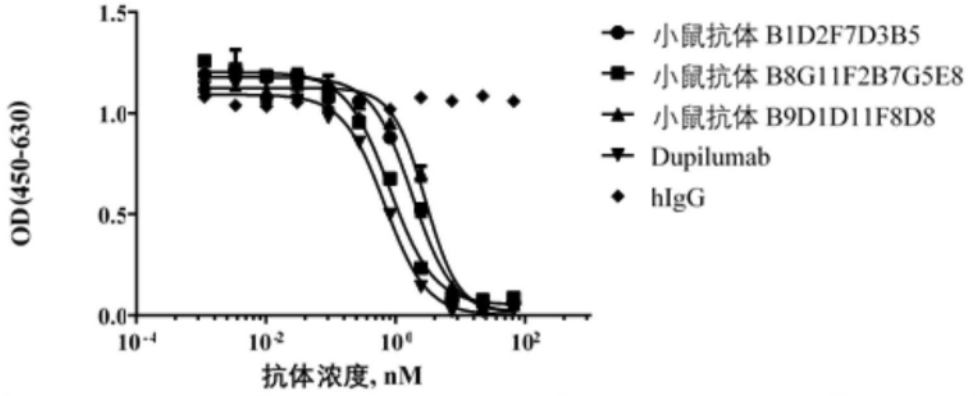
	小鼠抗体 C2C1A1A1	小鼠抗体 C2B2F7B7	Dupilumab
EC50	0.159	0.1831	0.08156

图2D



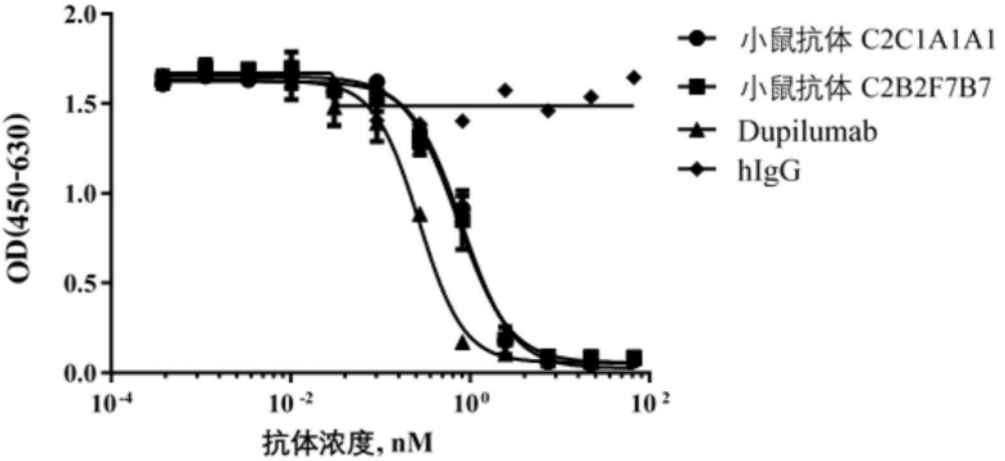
	小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8	小鼠抗体 C2C1A1A1	小鼠抗体 C2B2F7B7	Dupilumab
EC50	0.291	0.329	108.2	0.9544

图3



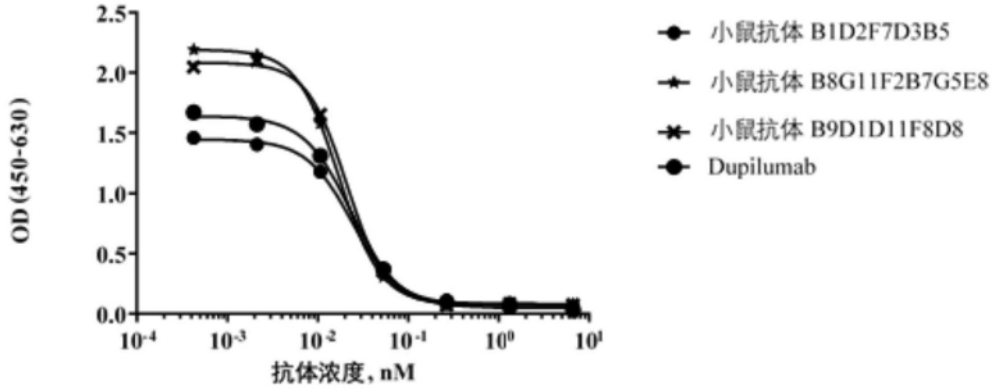
	小鼠抗体 B1D2F7D3B5	小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8	小鼠抗体 B9D1D11F8D8	Dupilumab
IC50	1.796	0.81	2.881	0.6821

图4A



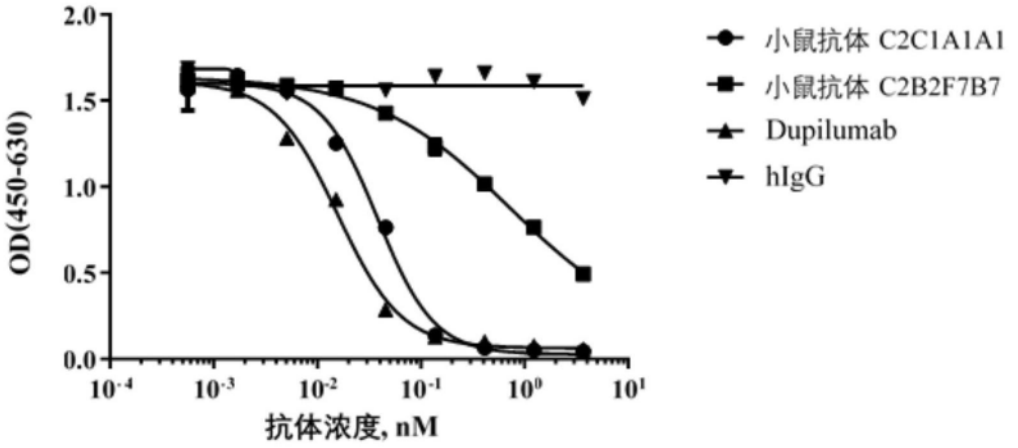
	小鼠抗体 C2C1A1A1	小鼠抗体 C2B2F7B7	Dupilumab
IC50	0.8124	0.7263	0.2692

图4B



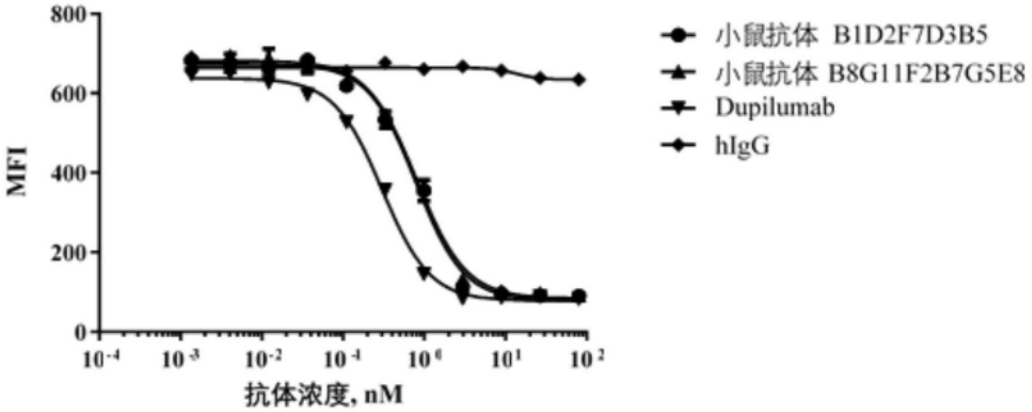
	小鼠抗体 B1D2F7D3B5	小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8	小鼠抗体 B9D1D11F8D8	Dupilumab
IC50	0.02397	0.01715	0.02089	0.0235

图5A



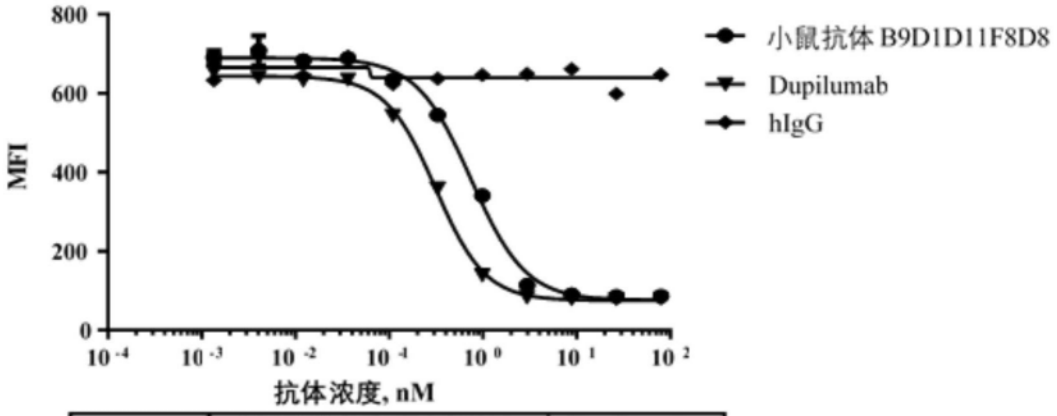
	小鼠抗体 C2C1A1A1	小鼠抗体 C2B2F7B7	Dupilumab
IC50	0.03826	0.7161	0.01579

图5B



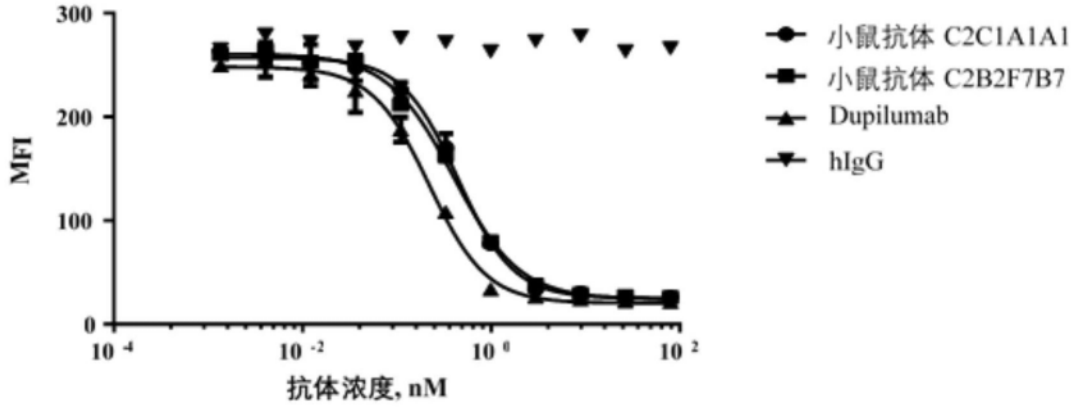
	小鼠抗体 B1D2F7D3B5	小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8	Dupilumab
IC50	0.7873	0.8042	0.3017

图6A



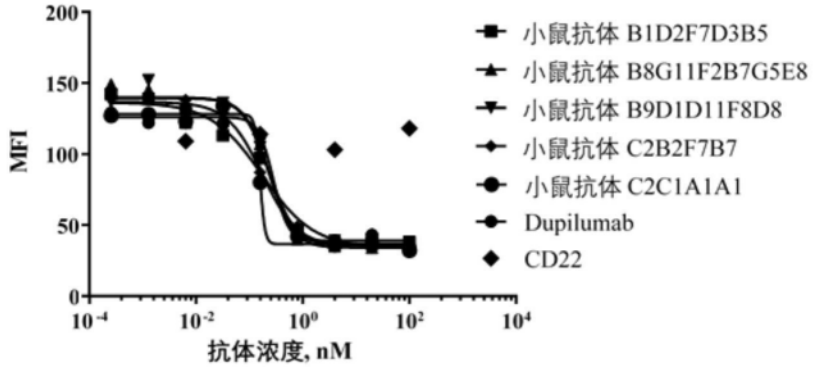
	小鼠抗体 B9D1D11F8D8	Dupilumab
IC50	0.7478	0.313

图6B



	小鼠抗体 C2C1A1A1	小鼠抗体 C2B2F7B7	Dupilumab
IC50	0.4398	0.3967	0.2203

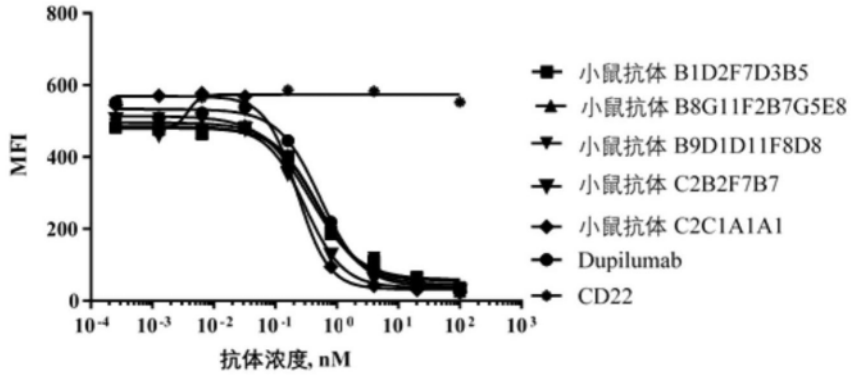
图6C



	小鼠抗体 B1D2F7D3B5	小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8
IC50	0.1739	0.2332

小鼠抗体 B9D1D11F8D8	小鼠抗体 C2B2F7B7	小鼠抗体 C2C1A1A1	Dupilumab
0.2331	0.1745	~0.1583	0.2795

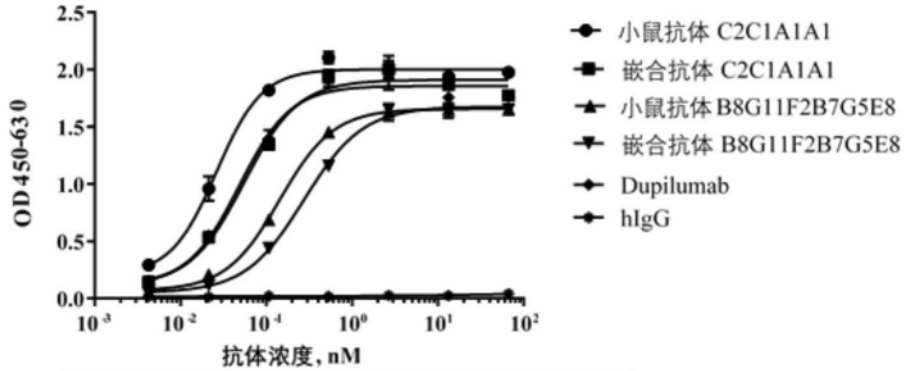
图7



	小鼠抗体 B1D2F7D3B5	小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8
IC50	0.4834	0.4693

小鼠抗体 B9D1D11F8D8	小鼠抗体 C2B2F7B7	小鼠抗体 C2C1A1A1	Dupilumab
0.3634	0.3066	0.2266	0.5328

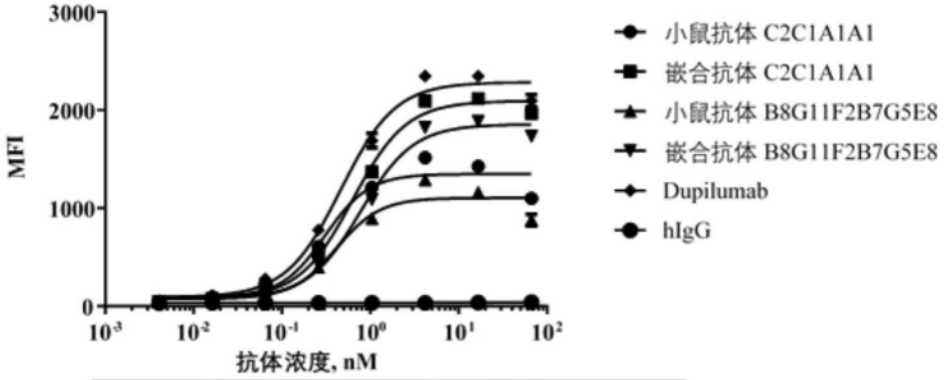
图8



	小鼠抗体 C2C1A1A1	嵌合抗体 C2C1A1A1
EC50	0.02617	0.05485

小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8	嵌合抗体 B8G11F2B7G5E8	Dupilumab
0.1432	0.2749	0.04849

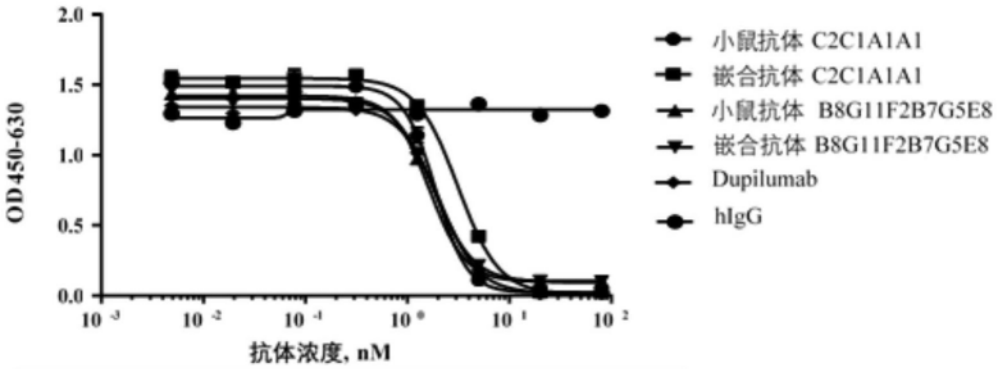
图9



	小鼠抗体 C2C1A1A1	嵌合抗体 C2C1A1A1
EC50	0.3071	0.6305

小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8	嵌合抗体 B8G11F2B7G5E8	Dupilumab
0.4124	0.7753	0.4623

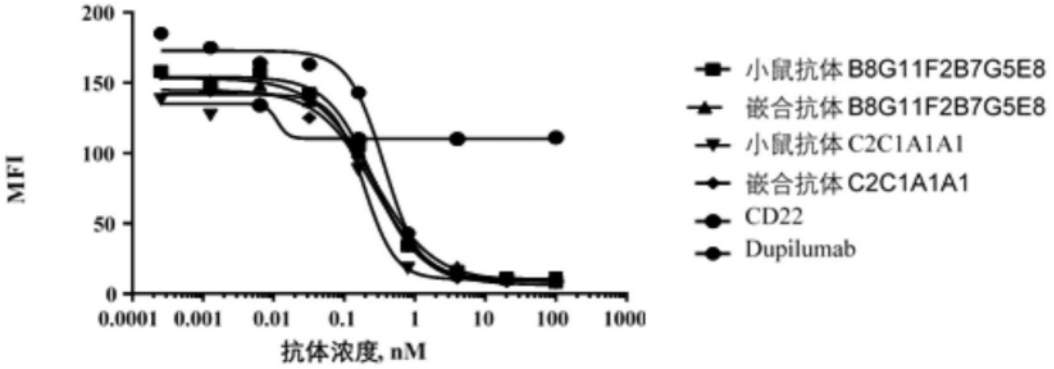
图10



	小鼠抗体 C2C1A1A1	嵌合抗体 C2C1A1A1
IC50	1.891	3.12

小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8	嵌合抗体 B8G11F2B7G5E8	Dupilumab
1.638	1.823	2.061

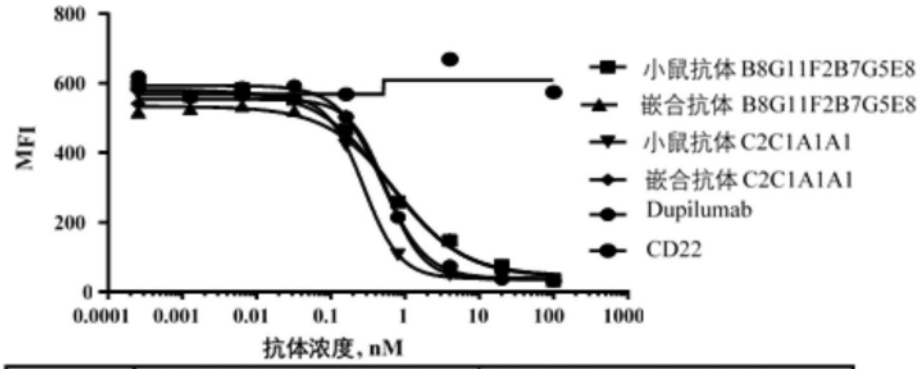
图11



	小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8	嵌合抗体 B8G11F2B7G5E8
IC50	0.256	0.2594

小鼠抗体 C2C1A1A1	嵌合抗体 C2C1A1A1	Dupilumab
0.193	0.2665	0.3701

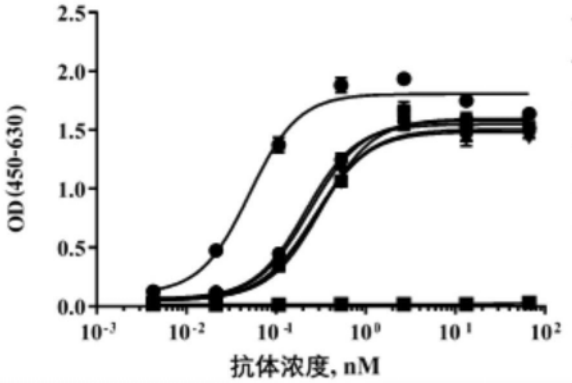
图12



	小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8	嵌合抗体 B8G11F2B7G5E8
IC50	0.6008	0.7593

小鼠抗体 C2C1A1A1	嵌合抗体 C2C1A1A1	Dupilumab
0.2742	0.5578	0.4849

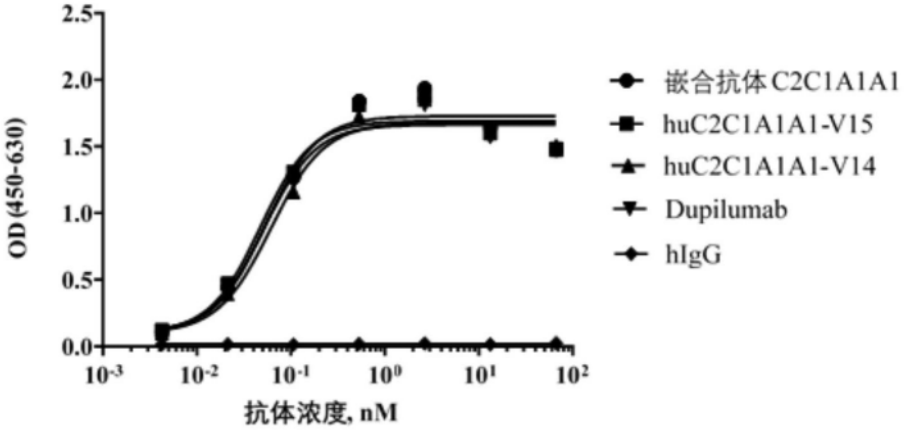
图13



	小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8	嵌合抗体 B8G11F2B7G5E8	huB8G11F2B7G5E8-V2
EC50	0.2128	0.3186	0.2738

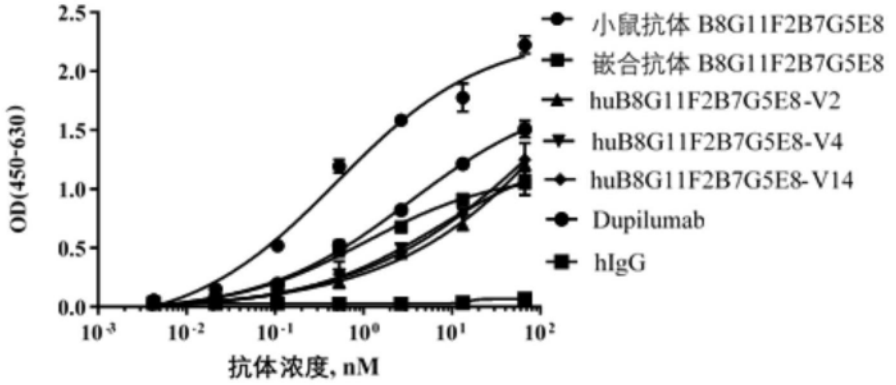
huB8G11F2B7G5E8-V4	huB8G11F2B7G5E8-V14	Dupilumab
0.2746	0.237	0.05048

图14A



	嵌合抗体 C2C1A1A1	huC2C1A1A1-V15	huC2C1A1A1-V14	Dupilumab
EC50	0.05415	0.04743	0.06158	0.05167

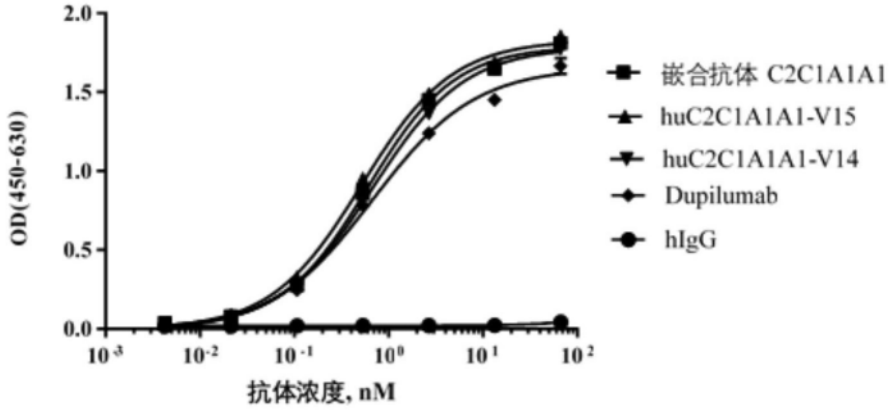
图14B



	小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8	嵌合抗体 B8G11F2B7G5E8	huB8G11F2B7G5E8-V2
EC50	0.4998	1.06	914.1

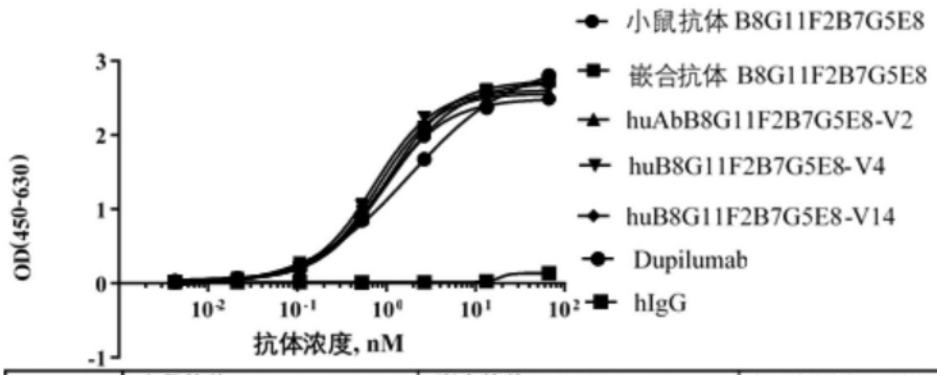
huB8G11F2B7G5E8-V4	huB8G11F2B7G5E8-V14	Dupilumab
7.122	137.4	3.335

图15A



	嵌合抗体 C2C1A1A1	huC2C1A1A1-V15	huC2C1A1A1-V14	Dupilumab
EC50	0.6031	0.5173	0.6773	0.6742

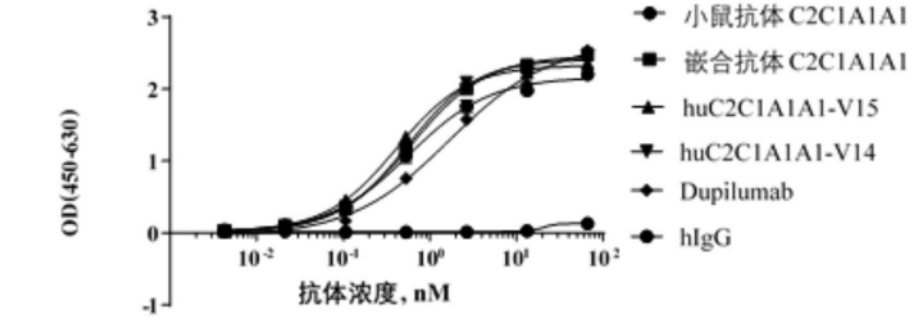
图15B



	小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8	嵌合抗体 B8G11F2B7G5E8	huAbB8G11F2B7G5E8-V2
EC50	0.8728	1.012	0.7992

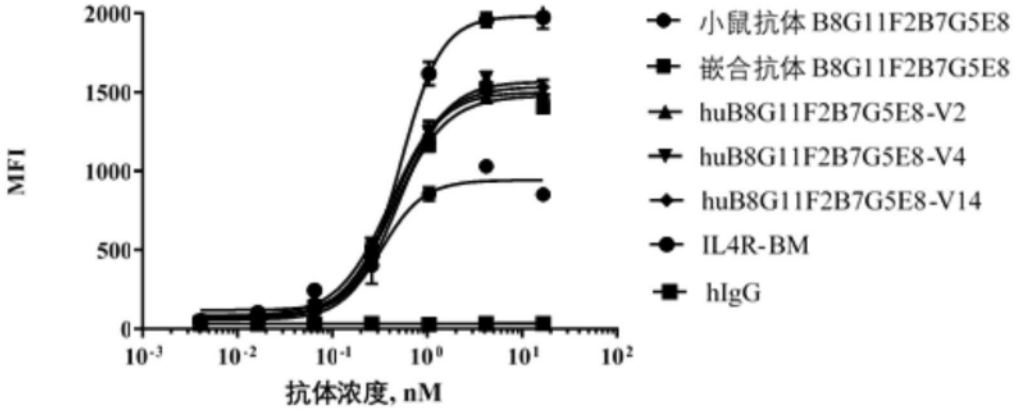
huB8G11F2B7G5E8-V4	huB8G11F2B7G5E8-V14	Dupilumab
0.7258	1.058	1.838

图16A



	小鼠抗体 C2C1A1A1	嵌合抗体 C2C1A1A1	huC2C1A1A1-V15	huC2C1A1A1-V14	Dupilumab
EC50	0.5744	0.6232	0.4122	0.5546	1.715

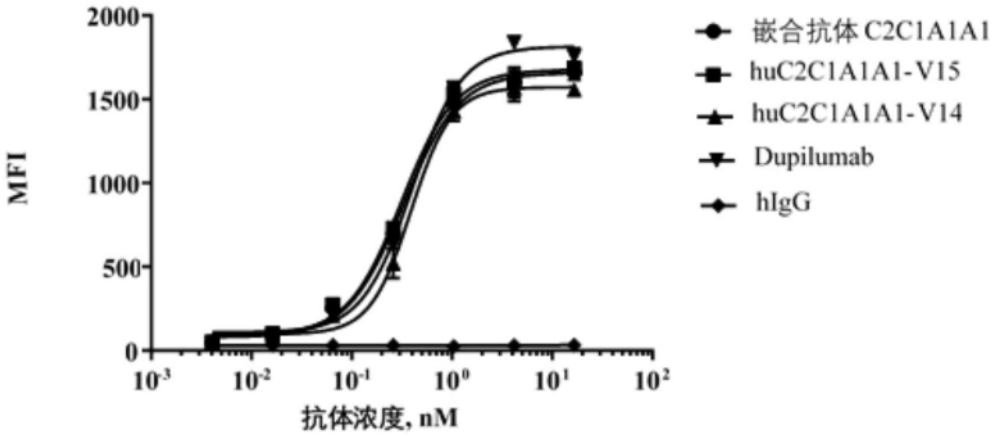
图16B



	小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8	嵌合抗体 B8G11F2B7G5E8	huB8G11F2B7G5E8-V2
EC50	0.3251	0.4421	0.426

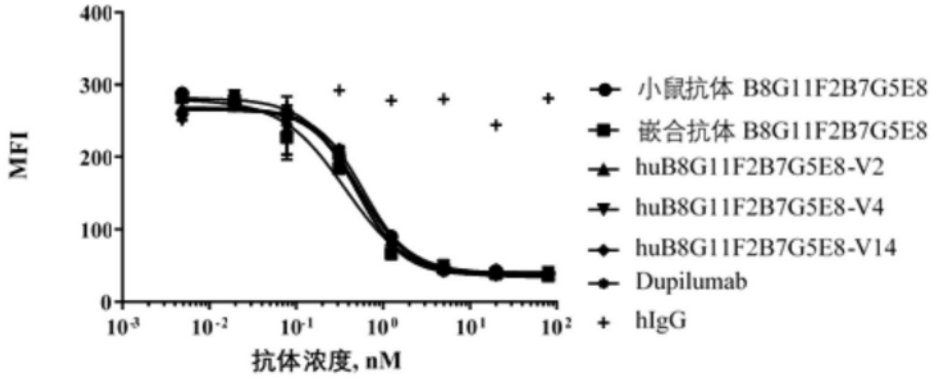
huB8G11F2B7G5E8-V4	huB8G11F2B7G5E8-V14	Dupilumab
0.4145	0.5166	0.526

图17A



	嵌合抗体 C2C1A1A1	huC2C1A1A1-V15	huC2C1A1A1-V14	Dupilumab
EC50	0.3259	0.3109	0.3901	0.397

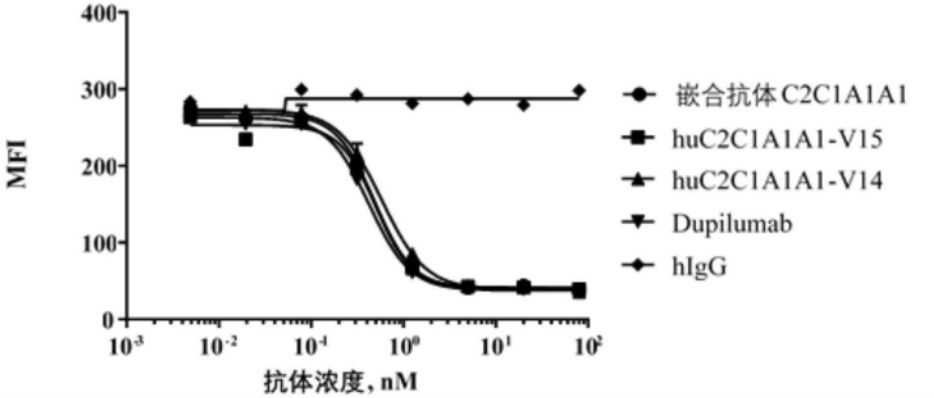
图17B



	小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8	嵌合抗体 B8G11F2B7G5E8	huB8G11F2B7G5E8-V2
IC50	0.5003	0.3642	0.5385

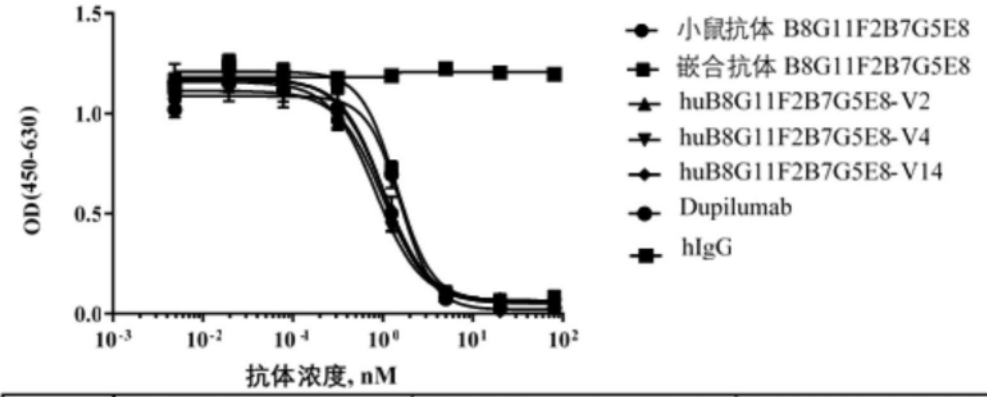
huB8G11F2B7G5E8-V4	huB8G11F2B7G5E8-V14	Dupilumab
0.513	0.6012	0.5052

图18A



	嵌合抗体C2C1A1A1	huC2C1A1A1-V15	huC2C1A1A1-V14	Dupilumab
IC50	0.4824	0.5016	0.5782	0.4211

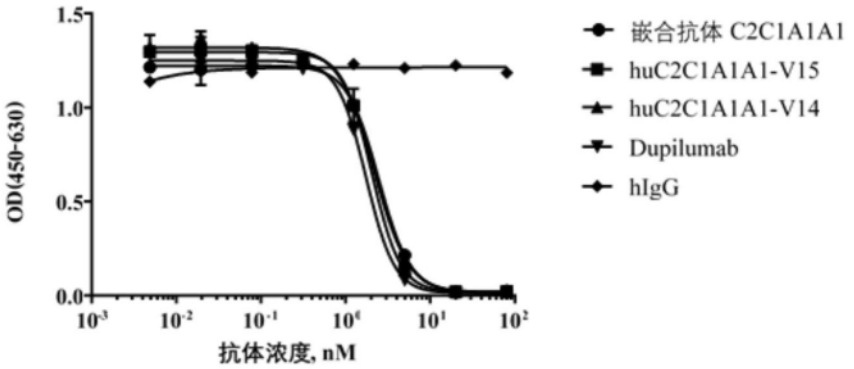
图18B



	小鼠抗体 B8G11F2B7G5E8	嵌合抗体 B8G11F2B7G5E8	huB8G11F2B7G5E8-V2
IC50	0.9999	1.415	1.004

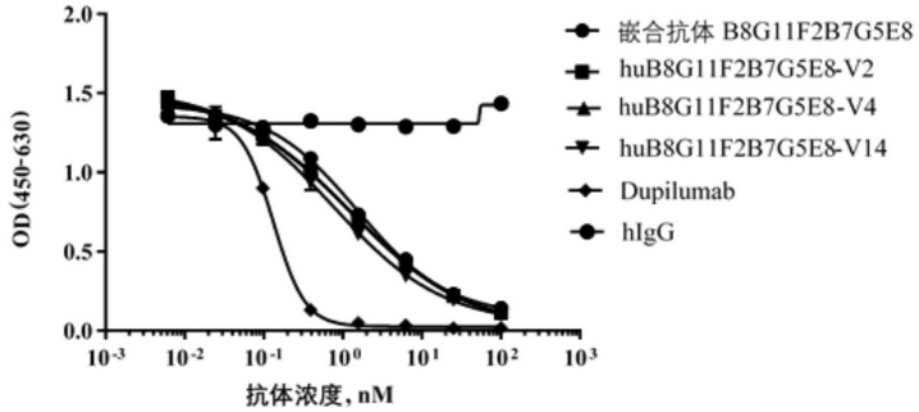
huB8G11F2B7G5E8-V4	huB8G11F2B7G5E8-V14	Dupilumab
0.8246	1.02	1.561

图19A



	嵌合抗体 C2C1A1A1	huC2C1A1A1-V15	huC2C1A1A1-V14	Dupilumab
IC50	2.459	2.031	2.168	1.741

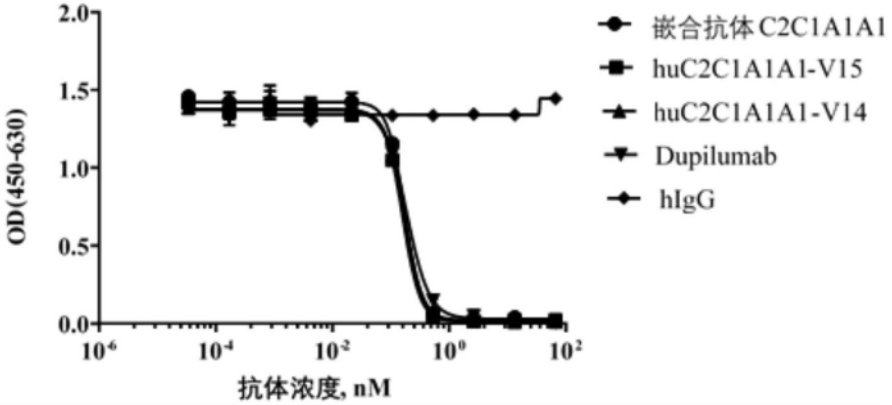
图19B



	嵌合抗体 B8G11F2B7G5E8	huB8G11F2B7G5E8-V2
IC50	1.517	1.204

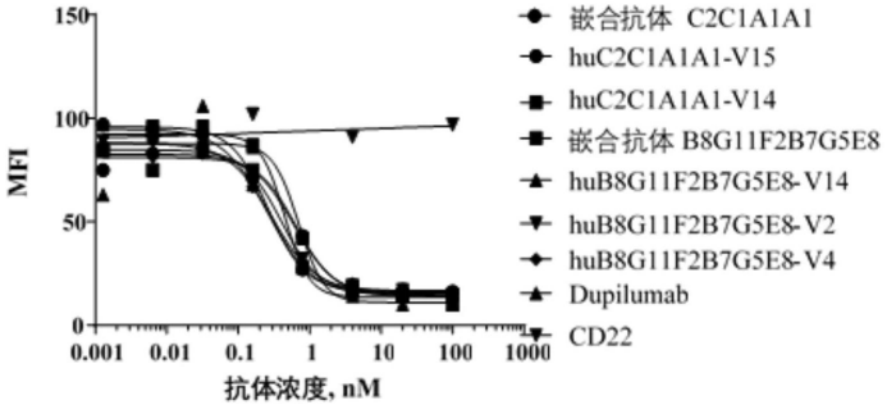
huB8G11F2B7G5E8-V4	huB8G11F2B7G5E8-V14	Dupilumab
1.235	0.7631	0.1315

图20A



	嵌合抗体 C2C1A1A1	huC2C1A1A1-V15	huC2C1A1A1-V14	Dupilumab
IC50	0.1719	0.1588	0.1711	0.1893

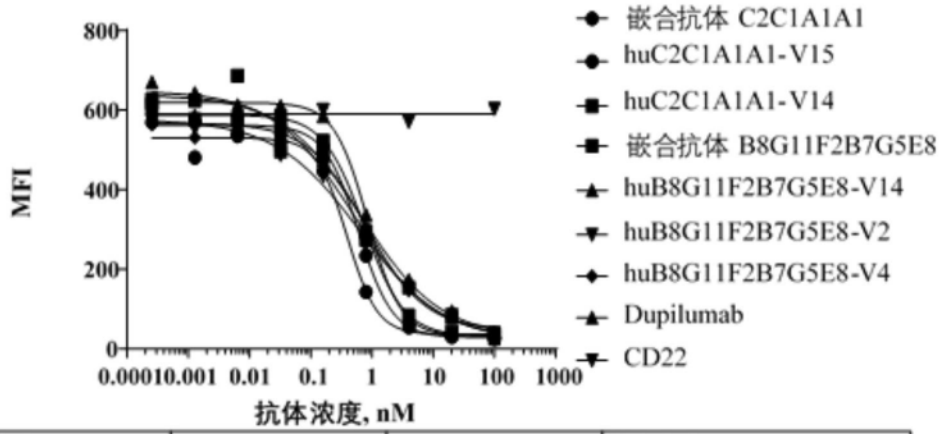
图20B



	嵌合抗体 C2C1A1A1	huC2C1A1A1-V15	huC2C1A1A1-V14	嵌合抗体 B8G11F2B7G5E8
IC50	0.2626	0.6093	0.6411	0.4465

huB8G11F2B7G5E8-V14	huB8G11F2B7G5E8-V2	huB8G11F2B7G5E8-V4	Dupilumab
0.257	0.4036	0.2984	0.7007

图21



	嵌合抗体 C2C1A1A1	huC2C1A1A1-V15	huC2C1A1A1-V14	嵌合抗体 B8G11F2B7G5E8
IC50	0.3913	0.6012	0.7344	0.5033

huB8G11F2B7G5E8-V14	huB8G11F2B7G5E8-V2	huB8G11F2B7G5E8-V4	Dupilumab
0.6624	0.626	0.808	0.8422

图22