



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101141980 B

(45) 授权公告日 2012.10.31

(21) 申请号 200580019138.5

A · M · 温德姆 K · D · 帕里斯

(22) 申请日 2005.06.09

S · J · 戈尔德曼

(30) 优先权数据

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

60/578,473 2004.06.09 US

11247

60/578,736 2004.06.09 US

代理人 黄革生 林柏楠

60/581,375 2004.06.22 US

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

G01N 33/53 (2006.01)

2006.12.11

审查员 袁实

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/020160 2005.06.09

(87) PCT申请的公布数据

W02005/123126 EN 2005.12.29

(73) 专利权人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 M · T · 卡塞安 L · 奇斯提科娃

权利要求书 6 页 说明书 57 页
序列表 37 页 附图 41 页

G · M · 韦尔德曼 K · A · 马凯特

X-Y · 谭 D · D · 唐纳森 L · L · 林

T · 沙内 A · S · 塔姆 E · 费凡特

N · L · 伍德 L · J · 菲茨

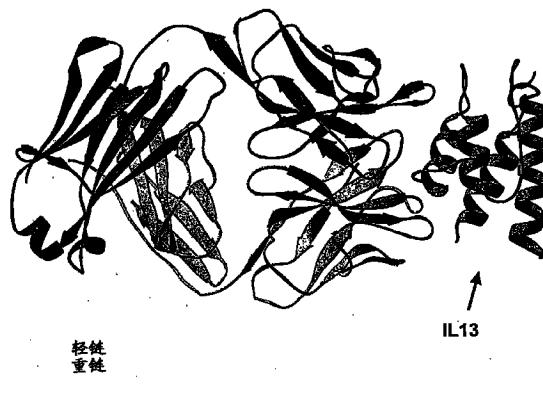
(54) 发明名称

针对人白介素-13的抗体及其用途

(57) 摘要

本申请涉及结合白介素-13(IL-13),尤其结合人IL-13的抗体,例如,人源化抗体,和其抗原结合片段,还涉及它们在调节IL-13介导的免疫应答中的用途。本文公开的抗体可用于诊断、预防和/或治疗受试者,例如,诊断、预防和/或治疗人类患者的一种或多种IL-13相关的病症,例如,呼吸病症(例如,哮喘);特应性病症(例如,变应性鼻炎);皮肤的炎性和/或自身免疫状况(例如,特应性皮炎),和胃肠器官的炎性和/或自身免疫状况(例如,炎性肠病(IBD)),以及纤维变性和癌性病症。

CN 101141980 B



1. 抗体或其抗原结合片段,其包含重链免疫球蛋白可变结构域和轻链免疫球蛋白可变结构域,以少于 $10^{-7}M$ 的 K_D 结合 IL-13,其中轻链免疫球蛋白可变结构域包含如下的氨基酸序列:

- (i) 在 CDR1 中, KASESVDNYGKSLMH (SEQ ID NO :19),
- (ii) 在 CDR2 中, RASNLES (SEQ ID NO :20), 和
- (iii) 在 CDR3 中, QQSNEPDW (SEQ ID NO :21) ;

或包含通过少于 3 个保守氨基酸替代而不同于任何 SEQ ID NO :19-21 的氨基酸序列的氨基酸序列;

并且其中重链免疫球蛋白可变结构域包含如下的氨基酸序列:

- (i) 在 CDR1 中, SYAMS (SEQ ID NO :22),
- (ii) 在 CDR2 中, SISSGGNTYYYPDSVK (SEQ ID NO :23), 和
- (iii) 在 CDR3 中, LDGYYFGFAY (SEQ ID NO :24),

或包含通过少于 3 个保守氨基酸替代而不同于任何 SEQ ID NO :22-24 的氨基酸序列的氨基酸序列。

2. 抗体或其抗原结合片段,其包含重链免疫球蛋白可变结构域和轻链免疫球蛋白可变结构域,以少于 $10^{-7}M$ 的 K_D 结合 IL-13,其中轻链免疫球蛋白可变结构域包含如下的氨基酸序列:

- (i) 在 CDR1 中, KASESVDNYGKSLMH (SEQ ID NO :19),
- (ii) 在 CDR2 中, RASNLES (SEQ ID NO :20), 和
- (iii) 在 CDR3 中, QQSNEPDW (SEQ ID NO :21) ;

并且其中重链免疫球蛋白可变结构域包含如下的氨基酸序列:

- (i) 在 CDR1 中, SYAMS (SEQ ID NO :22),
- (ii) 在 CDR2 中, SISSGGNTYYYPDSVK (SEQ ID NO :23), 和
- (iii) 在 CDR3 中, LDGYYFGFAY (SEQ ID NO :24)。

3. 权利要求 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段,其中轻链免疫球蛋白可变结构域以 SEQ ID NO :11、12 或 35 的残基 ASN31(CDR1)、TYR32(CDR1)、LYS34(CDR1)、ARG54(CDR2)、ASN96(CDR3)、ASP98(CDR3) 和 TRP100(CDR3) 接触 IL-13,并且重链免疫球蛋白可变结构域以 SEQ ID NO :15、16 或 36 的残基 ILE30、SER31(CDR1)、ALA33(CDR1)、TRP47、SER50(CDR2)、SER52(CDR2)、SER53(CDR2)、TYR58(CDR2), LEU98(CDR3)、ASP99(CDR3)、GLY100(CDR3)、TYR101(CDR3)、TYR102(CDR3) 和 PHE103(CDR3) 接触 IL-13。

4. 权利要求 3 的抗体或其抗原结合片段,其中轻链免疫球蛋白可变结构域利用范德瓦尔斯力在 SEQ ID NO :11、12 或 35 的残基 ASN31(CDR1)、TYR32(CDR1)、LYS34(CDR1)、ARG54(CDR2)、ASN96(CDR3)、ASP98(CDR3) 和 TRP100(CDR3) 处接触 IL-13,并且

重链免疫球蛋白可变结构域利用范德瓦尔斯力在 SEQ ID NO :15、16 或 36 的残基 ILE30、SER31(CDR1)、ALA33(CDR1)、TRP47、SER50(CDR2)、SER52(CDR2)、SER53(CDR2)、TYR58(CDR2), LEU98(CDR3)、ASP99(CDR3)、GLY100(CDR3)、TYR101(CDR3)、TYR102(CDR3) 和 PHE103(CDR3) 处接触 IL-13。

5. 权利要求 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段,其中重链免疫球蛋白可变结构域的氨基酸序列与 SEQ ID NO :15、16 或 36 至少 95% 同一。

6. 权利要求 1 或 5 的抗体或其抗原结合片段, 其中轻链免疫球蛋白可变结构域的氨基酸序列与 SEQ ID NO :11、12 或 35 至少 95% 同一。

7. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合片段, 其中重链免疫球蛋白可变结构域包含 SEQ ID NO :15、16 或 36 的氨基酸序列。

8. 权利要求 1 或 7 的抗体或其抗原结合片段, 其中轻链免疫球蛋白可变结构域包含 SEQ ID NO :11、12 或 35 的氨基酸序列。

9. 权利要求 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段, 其具有突变以减少下列之一或多项 :Fc 受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基之数目、效应细胞功能或补体功能的恒定区。

10. 权利要求 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段, 其还包含人 IgG1 恒定区, 所述恒定区在 SEQ ID NO :17 的一个或多个残基 116 和 119 处被突变。

11. 权利要求 9 的抗体或其抗原结合片段, 其还包含人 κ 轻链。

12. 权利要求 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段, 其还包含重链恒定区, 所述恒定区与 SEQ ID NO :17 的氨基酸序列有至少 95% 同一。

13. 权利要求 1 或 12 的抗体或其抗原结合片段, 其还包含轻链恒定区, 所述恒定区与 SEQ ID NO :18 的氨基酸序列至少 95% 同一。

14. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合片段, 其还包含重链恒定区, 所述恒定区包含 SEQ ID NO :17 的氨基酸序列。

15. 权利要求 1 或 14 的抗体或其抗原结合片段, 其还包含轻链恒定区, 所述恒定区包含 SEQ ID NO :18 的氨基酸序列。

16. 权利要求 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段, 其中重链免疫球蛋白可变区包含由下述核酸编码的氨基酸序列, 所述核酸在高严格条件下与编码包含 SEQ ID NO :15、16 或 36 的氨基酸序列的重链可变结构域的核酸的互补序列杂交, 或者与包含 SEQ ID NO :7、8 或 34 的核苷酸序列的核酸的互补序列杂交。

17. 权利要求 16 的抗体或其抗原结合片段, 其中轻链免疫球蛋白可变区包含由下述核酸编码的氨基酸序列, 所述核酸在高严格条件下与编码包含 SEQ ID NO :11、12 或 35 的氨基酸序列的轻链可变结构域的核酸的互补序列杂交, 或者与包含 SEQ ID NO :3、4 或 33 的核苷酸序列的核酸的互补序列杂交。

18. 权利要求 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段, 其中重链免疫球蛋白可变区包含由包含 SEQ ID NO :7、8 或 34 的核苷酸序列的核酸编码的氨基酸序列。

19. 权利要求 18 的抗体或其抗原结合片段, 其中轻链免疫球蛋白可变区包含由包含 SEQ ID NO :3、4 或 33 的核苷酸序列的核酸编码的氨基酸序列。

20. 分离的重组 IgG 抗体, 其包含两个免疫球蛋白链 : 轻链和重链, 所述轻链包含由 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 33 编码的氨基酸序列或在高严格条件下与 SEQ ID NO :1、2、3、4 或 33 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列编码的氨基酸序列, 所述重链包含由 SEQ ID NO :5、6、7、8 或 34 编码的氨基酸序列或在高严格条件下与 SEQ ID NO :5、6、7、8 或 34 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列编码的氨基酸序列。

21. 分离的重组 IgG 抗体, 其包含两个免疫球蛋白链 : 轻链和重链, 所述轻链包含由 SEQ ID NO :4 或在高严格条件下与 SEQ ID NO :4 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列编码的氨基酸序列, 所述重链包含由 SEQ ID NO :8 或在高严格条件下与 SEQ ID NO :8 的核苷酸序列杂交

的核苷酸序列编码的氨基酸序列。

22. 分离的重组 IgG 抗体, 其包含两个免疫球蛋白链: 包含 SEQ ID NO:12 的轻链和包含 SEQ ID NO:16 的重链。

23. 权利要求 22 的分离的重组 IgG 抗体, 其中重链还包含 SEQ ID NO:17 且轻链还包含 SEQ ID NO:18。

24. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合片段, 其具有一种或多种下面的性质:

(a) 重链免疫球蛋白可变区包含 mAb13.2 的重链 CDR3 (SEQ ID NO:24), 或与 mAb13.2 的对应的重链 CDR3 相差少于 3 个保守性氨基酸替代的重链 CDR3;

(b) 轻链免疫球蛋白可变区包含 mAb13.2 的轻链 CDR1 (SEQ ID NO:19), 或与 mAb13.2 的对应的轻链 CDR1 相差少于 3 个保守性氨基酸替代的轻链 CDR1;

(c) 重链免疫球蛋白可变区与 h13.2 的重链可变结构域 (SEQ ID NO:15, 16 或 36) 具有至少 90% 的同一性;

(d) 轻链免疫球蛋白可变区与 h13.2 的轻链可变结构域 (SEQ ID NO:11, 12 或 35) 具有至少 90% 的同一性;

(e) 抗体或者其抗原结合片段与 mAb13.2 竞争结合人 IL-13;

(f) 抗体或者其抗原结合片段在 SEQ ID NO:31 的氨基酸残基 68、72、88、91、92、93 和 105 处结合 IL-13;

(g) 重链可变区与 mAb13.2 具有相同的规范结构;

(h) 轻链可变区与 mAb13.2 具有相同的规范结构;

(i) 重链可变区和 / 或轻链可变区分别具有来自种系基因 DP-54 和 DPK-9 编码的 VH 节段或者来自与种系基因 DP-54 和 DPK-9 编码的 VH 节段具有至少 95% 同一性的序列的 FR1、FR2 和 FR3 构架区; 和 / 或

(j) 在绵羊模型中注射后至少 6 周赋予对暴露于蛔虫抗原的注射后保护效果。

25. 经分离的重组 IgG 抗体, 其包含两条免疫球蛋白链: 含有 SEQ ID NO:9、10、11、12 或 35 的氨基酸序列或与 SEQ ID NO:9、10、11、12 或 35 至少 95% 同一的氨基酸序列的轻链, 和含有 SEQ ID NO:13、14、15、16 或 36 的氨基酸序列或与 SEQ ID NO:13、14、15、16 或 36 至少 95% 同一的氨基酸序列的重链。

26. 权利要求 25 的经分离的重组 IgG 抗体, 其中重链还包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列或与 SEQ ID NO:17 至少 95% 同一的氨基酸序列且轻链还包含 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列或与 SEQ ID NO:18 至少 95% 同一的氨基酸序列。

27. 权利要求 1、2 或 24 的抗体或者其抗原结合片段, 其具有一种或多种下面的性质:

(a) 它特异结合人 IL-13 的表位, 该表位包含一个或多个下面的氨基酸残基: SEQ ID NO:32 的 49 位的谷氨酸、53 位的天冬酰胺、69 位的甘氨酸、72 位的脯氨酸、73 位的组氨酸、74 位的赖氨酸, 和 86 位的精氨酸, 或者其保守氨基酸替代;

(b) 它结合 IL-13 和 IL13R α 1 的复合体;

(c) 它干扰 IL-13 和 IL-4R α 之间的结合相互作用;

(d) 它干扰 IL-13/IL-13R α 1 和 IL-4R α 之间的结合相互作用; 和 / 或

(e) 它特异结合人 IL-13 并且竞争性抑制第二种抗体与所述人 IL-13 的结合, 其中所述第二种抗体选自 mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 或 h13.2v3。

28. 权利要求 27 的抗体或者其抗原结合片段, 其恒定区经突变以减少下面的一项或多项: Fc 受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基数目、效应细胞功能或补体功能。

29. 权利要求 27 的抗体或者其抗原结合片段, 其还包含在 SEQ ID NO:17 的一个或多个残基 116 和 119 处突变的人 IgG1 恒定区。

30. 权利要求 27 或 28 的抗体或者其抗原结合片段, 其还包含人 κ 轻链。

31. 权利要求 27 的抗体或者其抗原结合片段, 其包含至少一个互补性决定区域, 该互补性决定区域包含选自由 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列、SEQ ID NO:20 的氨基酸序列、SEQ ID NO:21 的氨基酸序列、SEQ ID NO:22 的氨基酸序列、SEQ ID NO:23 的氨基酸序列、SEQ ID NO:24 的氨基酸序列组成的组的氨基酸序列。

32. 权利要求 27 的抗体或者其抗原结合片段, 其中该片段为 scFv、Fab 或 $F(ab')$ ₂ 片段。

33. 权利要求 27 的抗体或者其抗原结合片段, 其还包含轻链和重链, 所述轻链包含人 κ 恒定区或其活性片段, 所述重链包含人 IgG 恒定区或其活性片段。

34. 权利要求 33 的抗体或者其抗原结合片段, 其中所述轻链的人 κ 恒定区包含 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列或其活性片段。

35. 权利要求 33 的抗体或者其抗原结合片段, 其中所述重链的人 IgG 恒定区经突变以减小 FcR 及补体结合。

36. 权利要求 35 的抗体或者其抗原结合片段, 其中所述重链的突变的人 IgG 恒定区包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列或其活性片段。

37. 权利要求 1、3、24、25 或 27 中任一项的抗体或者其抗原结合片段, 其为经纯化的或经重组的。

38. 权利要求 1、3、24、25 或 27 中任一项的抗体或者其抗原结合片段, 其为重组的全长 IgG。

39. 权利要求 1、3、24 或 25 中任一项的抗体或者其抗原结合片段, 其为 Fab 或 scFv。

40. 权利要求 1、3、24、25 或 27 中任一项的抗体或者其抗原结合片段, 其包含与人种系构架区具有至少 90% 同一性的构架区。

41. 权利要求 1、3、24、25 或 27 中任一项的抗体或者其抗原结合片段, 其包含人构架区、人 Fc 区或它们两者。

42. 权利要求 1、3、24、25 或 27 中任一项的抗体或者其抗原结合片段, 其中重链可变区利用氢键与 IL-13 在 SEQ ID NO:15、16 或 36 的 SER50(CDR2)、SER53(CDR2)、TYR101(CDR3) 和 TYR102(CDR3) 处相接触; 并且轻链免疫球蛋白可变结构域利用氢键与 IL-13 在 SEQ ID NO:11、12 或 35 的残基 ASN31、TYR32(CDR1)、LYS34(CDR1)、ASN96(CDR3) 和 ASN98(CDR3) 处相接触。

43. 权利要求 1、2、24、25 或 27 中任一项的抗体或者其抗原结合片段, 其以 90 到 120pM 的 K_D 结合人 IL-13。

44. 权利要求 1、2、24、25 或 27 中任一项的抗体或者其抗原结合片段, 其以小于 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 的 k_{off} 结合人 IL-13。

45. 权利要求 1、2、24、25 或 27 中任一项的抗体或者其抗原结合片段, 其以 5×10^4 到 $8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 的 k_{on} 结合人 IL-13。

46. 权利要求 1、2、24、25 或 27 中任一项的抗体或者其抗原结合片段,其降低 IL-13 结合 IL-4R α 的能力。

47. 权利要求 1、2、24、25 或 27 中任一项的抗体或者其抗原结合片段,其结合体外与 IL-13R $\alpha 1$ 形成复合体的 IL-13。

48. 药物组合物,其包含权利要求 1、2、24、25 或 27 中的抗体或者其抗原结合片段和药学上可接受的载体。

49. 权利要求 48 的药物组合物,其适用于皮下、吸入或局部施用。

50. 核酸,其包含的序列:

(i) 编码包含重链免疫球蛋白可变区的多肽,该可变区:

(a) 包含如下的氨基酸序列:

(i) 在 CDR1 中, SYAMS (SEQ ID NO:22),

(ii) 在 CDR2 中, SISSGGNTYYYPDSVKG (SEQ ID NO:23), 和

(iii) 在 CDR3 中, LDGYYFGFAY (SEQ ID NO:24), 或包含通过少于 3 个保守氨基酸替代而不同于任何 SEQ ID NO:22-24 的氨基酸序列的氨基酸序列;或者

(b) 与 h13.2 的重链可变结构域 (SEQ ID NO:15、16 或 36) 具有至少 90% 同一性;或者

(ii) 在高度严格条件下与编码 h13.2 的重链可变结构域 (SEQ ID NO:15、16 或 36) 的核酸的互补序列杂交。

51. 核酸,其包含的序列:

(i) 编码包含轻链免疫球蛋白可变区的多肽,该可变区:

(a) 包含如下的氨基酸序列:

(i) 在 CDR1 中, KASESVDNYGKSLMH (SEQ ID NO:19),

(ii) 在 CDR2 中, RASNLES (SEQ ID NO:20), 和

(iii) 在 CDR3 中, QQSNEDPWT (SEQ ID NO:21);

或包含通过少于 3 个保守氨基酸替代而不同于任何 SEQ ID NO:19-21 的氨基酸序列的氨基酸序列;或者

(b) 与 h13.2 的轻链可变结构域 (SEQ ID NO:11、12 或 35) 具有至少 90% 同一性;或者

(ii) 在高度严格条件下与编码 h13.2 的轻链可变结构域 (SEQ ID NO:11、12 或 35) 的核酸的互补序列杂交。

52. 用于产生抗体或其抗原结合片段的宿主细胞,所述宿主细胞包含编码权利要求 1、2、24、25 或 27 的抗体或其抗原结合片段的核酸序列。

53. 提供重组抗体的方法,该方法包括:

提供包含核酸序列的宿主细胞,所述核酸序列编码根据权利要求 1、2、24、25 或 27 的抗体或其抗原结合片段;和

将该细胞保持在表达所述抗体或其抗原结合片段的条件下。

54. 权利要求 53 的方法,其还包括从所述宿主细胞或保持该宿主细胞的培养基分离所述蛋白质。

55. 权利要求 54 的方法,其还包括将所分离的蛋白质配制为药物组合物。

56. 用于治疗 IL-13 相关的病症的组合物,其包含根据权利要求 1、2、24、25 或 27 抗体或其抗原结合片段。

57. 权利要求 56 的组合物,其中 IL-13 相关的病症选自由:哮喘病症、特应性病症、慢性阻塞性肺病 (COPD)、涉及呼吸道炎症的状况、嗜伊红细胞增多、纤维变性和黏液生成过量、炎性状况、自身免疫状况、肿瘤或癌症、病毒感染、和 1 型保护性免疫反应的表达的抑制组成的组。

58. 权利要求 56 的组合物,其中所述病症是哮喘病症或者变应性鼻炎。

59. 权利要求 56 的组合物,其中所述病症是炎性肠病。

60. 权利要求 56 的组合物,其中所述病症是慢性阻塞性肺病 (COPD)。

61. 权利要求 56 的组合物,其中所述病症是特应性病症。

62. 权利要求 56 的组合物,其中通过皮下、吸入或者局部途径施用所述蛋白质。

63. 权利要求 48 的药物组合物,其中抗体或其抗原结合片段具有一种或多种下面的性质:

(i) 在绵羊模型中注射后至少 6 周赋予对暴露于蛔虫抗原的注射后保护效果,或者

(ii) 阻止 IL-13 结合 IL-4R α ,但是不阻止 IL-13 结合 IL-13R $\alpha 1$ 。

64. 检测样品中 IL-13 的存在的方法,该方法包括:

(i) 将样品与根据权利要求 1、2、24、25 或 27 中任一项的抗 -IL-13 抗体或者其片段接触;和

(ii) 检测抗 -IL-13 抗体或者其片段与样品之间复合体的形成,其中样品中该复合体的形成表明样品中存在哺乳动物 IL-13。

65. 权利要求 64 的方法,其中所述样品来自哺乳动物受试者。

66. 权利要求 48 的药物组合物,其用来治疗显示出选自由喘鸣、气促、支气管收缩、呼吸道反应过度、肺容量减少、纤维变性、呼吸道炎症和黏液生成组成的组的哮喘症状的哺乳动物受试者。

针对人白介素 -13 的抗体及其用途

[0001] 相关申请的交互参考

[0002] 本申请要求 2004 年 6 月 9 日提交的美国专利申请序号 60/578,473 和 2004 年 6 月 22 日提交的美国专利申请序号 60/581,375, 以及 2004 年 6 月 9 日提交的美国专利申请序号 60/578,736 的优先权。其全部内容并入本文作为参考。2005 年 6 月 9 日提交的美国专利申请序号 11/149,025 和 2005 年 6 月 9 日提交的 PCT/US2005/020160 也引入作为参考。

[0003] 发明领域

[0004] 本申请涉及结合白介素 -13(IL-13), 尤其是人 IL-13 之抗体 (如人源化抗体) 及其抗原结合片段, 以及其于调节由 IL-13 介导的免疫反应中的用途。此文中所揭示之抗体可用来诊断、预防和 / 或治疗个体, 如: 人患者体内一种或多种与 IL-13 相关之病症, 如: 呼吸病症 (如: 哮喘); 特应性病症 (如: 变应性鼻炎); 皮肤的炎性和 / 或自身免疫状况 (如: 特应性皮炎), 胃肠道器官的炎性和 / 或自身免疫状况 (如: 炎性肠病 (IBD)), 以及纤维变性和癌症。

[0005] 发明背景

[0006] 白介素 -13(IL-13) 为一种由 T 淋巴细胞和肥大细胞分泌的细胞因子 (McKenzie et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90 :3735-39; Bost et al. (1996) Immunology 87 : 663-41)。IL-13 与 IL-4 共有数种生物学活性。例如, IL-4 或 IL-13 引起 B 细胞中 IgE 同种型转换 (Tomkinson et al. (2001) J. Immunol. 166 :5792-5800)。再者, 曾有哮喘患者中细胞表面 CD23 和血清 CD23(sCD23) 之水平增加的报导 (Sanchez-Guererro et al. (1994) Allergy 49 :587-92; DiLorenzo et al. (1999) Allergy Asthma Proc. 20 :119-25)。另外, IL-4 或 IL-13 可上调 B 细胞和单核细胞上之 II 类 MHC 和低亲和力 IgE 受体 (CD23) 之表达, 如此可增加抗原呈递, 并调节巨噬细胞之功能 (Tomkinson, 等人, 如上述)。重要地, IL-4 或 IL-13 其中之一可增加内皮细胞上之 VCAM-1 的表达, 此点可协助嗜酸性粒细胞 (及 T 细胞) 优先募集至呼吸道组织 (Tomkinson, 等人, 如上述)。IL-4 或 IL-13 其中之一亦可增加呼吸道黏液之分泌, 此点可加重呼吸道反应性 (Tomkinson, 等人, 如上述)。这些观察提出: 虽然 IL-13 对诱导 Th2 发育并非必要的, 或者, 其甚至不能诱导 Th2 发育, 但 IL-13 在呼吸道嗜伊红细胞增多和 AHR 之发展中可能扮演着关键角色。

[0007] 发明概述

[0008] 本申请特别提供以高亲和力和特异性结合白介素 -13 (" IL-13 "), 尤其是人 IL-13 的 IL-13 结合剂, 其是 IL-13 拮抗剂, 包括抗体及其抗原结合片段。本公开之抗体及其抗原结合片段在此文中亦分别称为 " 抗 -IL-13 抗体 " 和 " 其片段 "。在一个实施方案中, 抗 -IL-13 抗体或其片段降低、中和, 和 / 或拮抗至少一种与 IL-13 相关之活性。例如, 抗 -IL-13 抗体或其片段可结合 IL-13, 如: IL-13 之表位, 并干扰 IL-13 与 IL-13 受体复合体 (" IL-13R ") (如: 包含 IL-13 受体 α 1 (" IL-13R α 1 ")) 和白介素 -4 受体 α 链 (" IL-4R α ") 或其亚基 (如: IL-13R α 1 或 IL-4R α 之个别亚基) 的复合体) 间之相互作用 (如: 结合)。因此, 此文所描述之抗体及其片段可用来干扰 (如: 抑制、阻断或降低) IL-13 与 IL-13 受体之复合体, 或其亚基间之相互作用 (如: 结合), 以藉此干扰功能性信号

传递复合体之形成。

[0009] 另外,我们已经分别在非人灵长类和绵羊体内证明施用中和性抗-IL-13 抗体可改善,尤其是,由抗原引起之肺部炎症,如:嗜伊红细胞增多和支气管收缩。因此,IL-13 拮抗剂,如:中和性抗-IL-13 抗体及其片段,可在体内改善至少一种与 IL-13 相关之活性,如:炎症状况(如:肺部炎症)。另外,中和性抗-IL-13 抗体及其片段,可用来改善从特应性患者分离出之细胞对 IL-13 之增强的敏感性。因此,所述抗体或者其片段可以用于如:治疗季节性过敏(如:变应性鼻炎)。因此,抗-IL-13 抗体或其片段(包括此文所描述的)可用来诊断、治疗和/或预防个体(如:人患者)内一种或多种与 IL-13 相关之病症,如:呼吸病症(如:哮喘,包括变应性和非变应性哮喘,慢性阻塞性肺病(COPD)),以及涉及呼吸道炎症之状况、嗜伊红细胞增多、纤维变性和黏液生成过量(如:囊性纤维化和肺纤维化);特应性病症(如:变应性鼻炎);皮肤(如:特应性皮炎)、胃肠道器官(如:炎性肠病(IBD))、肝脏(如:硬化)之炎症和/或自身免疫状况;病毒感染;硬皮病和其它器官之纤维变性,诸如:肝脏纤维变性。

[0010] 因此,一方面,本申请描述了 IL-13 结合剂,如 IL-13 拮抗剂。IL-13 结合剂可以是蛋白质,例如,抗体或其抗原结合片段、肽或者支架结构域,其与 IL-13,尤其是哺乳动物 IL-13(如:人、绵羊、非人灵长类 IL-13)相互作用,如结合和/或中和。在一个实施方案中,抗体可以是分离的抗体。在一个实施方案中,该抗体或其片段为一种中和性抗体,如:其降低和/或抑制一种或多种与 IL-13 相关之活性,包括,但不限于:诱导 CD23 表达;由人 B 细胞产生 IgE;转录因子,如:STAT 蛋白质(如:STAT6 蛋白质)之磷酸化;活体内由抗原诱导的嗜伊红细胞增多;体内由抗原诱导的支气管收缩;或者,体内由药物诱导的呼吸道超应性等。

[0011] 此文所描述之 IL-13 拮抗剂,如:抗-IL-13 抗体或其片段可以高亲和力结合 IL-13,如:以少于 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 或更佳的 Kd 值结合 IL-13。例如:抗-IL-13 抗体或其片段可以介于 50 和 500pM 间(如:介于 90 和 120pM 间,如:介于 95 和 105pM 间)之亲和力结合 IL-13。在其它实施方案中,抗-IL-13 抗体或其片段可以至少约 50nM 至 5pM(通常约 100 至 250pM 或更强)之 IC_{50} 中和一种或多种与 IL-13 相关之活性。在其它实施方案中,抗-IL-13 抗体或其片段以在 10^3 至 $10^7 M^{-1}s^{-1}$ (通常为 10^4 至 $10^6 M^{-1}s^{-1}$)之范围内的动力学与 IL-13 结合。例如:抗-IL-13 抗体或其片段以在 5×10^4 至 $8 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ 之范围内的动力学与 IL-13 结合。而在另一个实施方案中,抗-IL-13 抗体或其片段之解离动力学在 10^{-2} 至

[0012] $10^{-6}s^{-1}$ (通常为 10^{-3} 至 $10^{-6}s^{-1}$,如:较 $5 \times 10^{-5}s^{-1}$ 为慢,如: $9,8,6 \times 10^{-5}s^{-1}$)之范围内的。在一个实施方案中,抗-IL-13 抗体或其片段以类似于单克隆抗体 13.2("mAb13.2"),或其修饰形式,如:嵌合型(如:"ch13.2"),或其人源化之形式(如:"h13.2v1"、"h13.2v2" 或 "h13.2v3")之亲和力和/或动力学结合 IL-13。抗-IL-13 抗体或其片段之亲和力和结合动力学可利用,如:生物传感器技术(BIACORETM))测试(见下列实例 1.2)。

[0013] 在一个实施方案中,抗-IL-13 抗体或其片段(如:Fab、F(ab')₂、Fv 或单链 Fv 片段)为一种单克隆抗体或具单一特异性之抗体。该抗体或其片段亦可为人、人源化的、嵌合的,或在体外产生之抗体。在一个实施方案中,抗-IL-13 抗体或其片段为人源化的抗体。在

一个实施方案中,该抗体有效地为人的抗体。

[0014] 抗-IL-13 抗体之重和轻链可为全长 (如:抗体可包括至少一条,优选二条完整之重链,及至少一条,优选二条完整之轻链),或可包括抗原结合片段 (如:Fab、F(ab')₂、Fv 或单链 Fv 片段)。而在其它实施方案中,该抗体具有选自,如:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD 和 IgE 之重链恒定区,尤其是选自,如:IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 之重链恒定区,更特别的是 IgG1 (如:人 IgG1) 之重链恒定区。在另一实施方案中,该抗体具有选自,如:κ 或 λ,优选 κ (如:人 κ) 的轻链恒定区。在一个实施方案中,该恒定区系经过改变,如:突变,以修改该抗体之性质 (如:增加或减少下列之一或多项:Fc 受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基之数目、效应细胞功能或补体功能)。例如:人 IgG1 恒定区可在一或多个残基上发生突变,如:SEQ ID NO:17 的残基 234 和 237 之一或多个,如:当位置 1 之丝氨酸移为第 119 号残基 (接着,如:VH 链之 118 个氨基酸) 时为残基 234 和 237;如 SEQ ID NO:17 中所示,当丝氨酸在位置 1 处时,这些相同残基为第 116 和 119 号残基。在一个实施方案中,该抗-IL-13 抗体包含如 SEQ ID NO:17 所示之人 IgG1 恒定区。在另一个实施方案中,该抗-IL-13 抗体包含如 SEQ ID NO:18 所示之人 κ 序列。

[0015] 在另一实施方案中,该 IL-13 拮抗剂,如:抗-IL-13 抗体或其片段特异结合 IL-13,尤其是哺乳动物,如:非人灵长类、绵羊、人 IL-13 (如:具有 SEQ ID NO:31 之氨基酸序列的人 IL-13 (图 11),或 SEQ ID NO:31 之从约氨基酸 21 至 132 的成熟人 IL-13 序列 (图 11) (成熟人 IL-13 序列之编号 亦见于 SEQ ID NO:32) 或与其具有至少 85%、90%、95%、99% 或更高之同一性的序列)。在一个实施方案中,该抗-IL-13 抗体或其片段结合人 IL-13 之变体,如:在 SEQ ID NO:31 之 130 位置处以谷氨酰胺 (Q) 取代精氨酸 (R) 之人 IL-13 的变体 (图 11)。在其它实施方案中,该抗体或其片段特异结合 IL-13 之片段,如:具有 SEQ ID NO:31 中所列之氨基酸序列的至少 10、20、50、75、100、120 或 130 个连续氨基酸的片段,或与其具有至少 85%、90%、95%、99% 或更高之同一性的序列。在一个实施方案中,该抗-IL-13 抗体或其片段特异结合人 IL-13,但不会与来自非人物种之 IL-13 交叉反应。在其它实施方案中,该抗-IL-13 抗体或其片段结合二或更多多种形式之哺乳动物 IL-13,如:人、绵羊和 / 或非人灵长类 IL-13。

[0016] 在一个实施方案中,该 IL-13 拮抗剂,如:抗-IL-13 抗体或其片段特异结合 IL-13 (如:尤其是,哺乳动物,如:人 IL-13) 之一种表位,如:线性或构象表位。在一个实施方案中,该抗-IL-13 抗体或其片段结合包含人 IL-13 之残基 81-93 和 / 或 114-132 的表位 (SEQ ID NO:31),或其经过修饰之形式 (如:其片段或经替代 (如:经保守替代) 之形式)。在另一个实施方案中,该抗-IL-13 抗体或其片段特异结合包含一或多个下列氨基酸残基或其保守性氨基酸替代之人 IL-13 的表位:在 SEQ ID NO:31 之位置 68[48] 处的谷氨酸、在位置 72[53] 处之天冬酰胺、在位置 88[68] 处之甘氨酸、在位置 91[71] 处之脯氨酸、在位置 92[73] 处之组氨酸、在位置 93[74] 处之赖氨酸及在位置 105[85] 处之精氨酸 [在成熟序列中之位置;SEQ ID NO:32]。

[0017] 在另一实施方案中,该 IL-13 拮抗剂,如:抗-IL-13 抗体或其片段结合选自下列之复合体,如:IL-13 和 IL-13R α 1 (" IL-13/IL-13R α 1 ") ;IL-13 和 IL-4R α (" IL-13/IL-4R α 1 ") ;及 IL-13,IL-13R α 1 和 IL-4R α (" IL-13/IL-13R α 1/IL-4R α ")。在其它实施方案中,IL-13 拮抗剂,如:抗体或其片段结合 IL-13,并干扰 (如:抑制、阻断或降低)

IL-13 与 IL-13 受体复合体 (如 : 包含 IL-13R α 1 和 IL-4R α 的复合体) 间的相互作用 (如 : 结合)。在其它实施方案中, IL-13 拮抗剂, 如 : 抗 -IL-13 抗体或其片段结合 IL-13, 并干扰 (如 : 抑制、阻断或降低) IL-13 与 IL-13 受体复合体之亚基 (如 : 个别地, IL-13R α 1 或 IL-4R α) 间的相互作用 (如 : 结合)。在另一实施方案中, 该 IL-13 拮抗剂, 如 : 抗 -IL-13 抗体或其片段结合 IL-13, 并干扰 (如 : 抑制、阻断或降低) IL-13/IL-13R α 1 和 IL-4R α 间之相互作用 (如 : 结合)。在另一实施方案中, 该 IL-13 拮抗剂, 如 : 抗 -IL-13 抗体或其片段结合 IL-13, 并干扰 (如 : 抑制、阻断或降低) IL-13/IL-4R α 和 IL-13R α 1 间之相互作用 (如 : 结合)。典型地, 该抗 -IL-13 抗体或其片段干扰 (如 : 抑制、阻断或降低) IL-13/IL-13R α 1 与 IL-4R α 间之相互作用 (如 : 结合)。代表性抗体抑制或者防止三级复合体 IL-13/IL-13R α 1/IL-4R α 的形成。

[0018] 干扰 IL-13 结合 IL-13R (例如, IL-13 受体复合体), 或其亚基之抗 -IL-13 抗体的实例包括 "mAb13.2" 及其经修饰, 如 : 嵌合形式或人源化形式。此文中 mAb13.2 之重链可变区的氨基酸和核苷酸序列分别为如 SEQ ID NO :13 和 SEQ ID NO :5 所列者。mAb13.2 之轻链可变区的氨基酸和核苷酸序列分别为如 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :1 所列者。此文中, 嵌合形式 (例如, 包含 mAb13.2 之重和轻链可变区的形式) 称为 "ch13.2"。此文中, ch13.2 之重链可变区的氨基酸和核苷酸序列分别为如 SEQ ID NO :14 (如 : 图 15) 和 SEQ ID NO :6 所列者。此文中, ch13.2 之轻链可变区的氨基酸和核苷酸序列分别为如 SEQ ID NO :10 (如 : 图 16) 和 SEQ ID NO :2 中所列者。mAb13.2 之人源化形式 (此文中称为 "h13.2v1") 之重链可变区的氨基酸和核苷酸序列分别为如 SEQ ID NO :15 (图 15) 和 SEQ ID NO :7 中所列者。此文中 h13.2v1 之轻链可变区的氨基酸和核苷酸序列分别为如 SEQ ID NO :11 (图 16) 和 SEQ ID NO :3 所列者。另一种 mAb13.2 之人源化形式 (此文中称为 "h13.2v2") 之重链可变区的氨基酸和核苷酸序列分别为如 SEQ ID NO :16 (图 17) 和 SEQ ID NO :8 所列者。h13.2v2 之轻链可变区的氨基酸和核苷酸序列分别为如 SEQ ID NO :12 (图 18) 和 SEQ ID NO :6 所列者。另一种 mAb13.2 之人源化形式 (此文中称为 "h13.2v3") 的重链可变区的氨基酸和核苷酸序列分别为如 SEQ ID NO :36 (图 27) 和 SEQ ID NO :34 所列者。h13.2v3 之轻链可变区的氨基酸和核苷酸序列分别为如 SEQ ID NO :35 (图 28) 和 SEQ ID NO :33 所列者。

[0019] 在一个实施方案中, IL-13 拮抗剂, 如 : 抗体或其片段特异结合 IL-13 (如 : 人、非人灵长类、绵羊 IL-13), 并竞争性地抑制第二种抗体结合 IL-13, 如 : 结合 IL-13 (如 : 人、非人灵长类、绵羊 IL-13) 上之靶标表位。第二种抗体可为选自, 如 : 此文所描述之 mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 和 / 或 h13.2v3 的抗体。

[0020] 在一个实施方案中, 在绵羊模型中之 IL-13 抗体或其片段可于注射后至少 6 周在绵羊暴露于蛔虫 (Ascaris) 抗原时赋予其对抗该抗原之注射后保护效果。

[0021] 在另一个实施方案中, 该抗体或其片段包含至少一抗原 - 结合区来自, 如可变区, 其来自选自 mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 和 / 或 h13.2v3 的抗体。而在另一个实施方案中, 该抗体或其片段包括至少一、二、三或四个可变区, 其来自, 如 : 选自此文所描述之 mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 和 / 或 h13.2v3 的抗体。在另一个实施方案中, 该抗体或其片段包含来自, 如 : 选自此文所描述之 mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 和 / 或 h13.2v3 的抗体的至少一或二个重链可变区。在另一个实施方案中, 该抗体或其片段包含来

自,如:选自此文所描述之 mAb13. 2、ch13. 2、h13. 2v1、h13. 2v2 和 / 或 h13. 2v3 抗体的至少一或二个轻链可变区。在另一个实施方案中,该抗体或其片段包含来自,如:选自此文所描述之 mAb13. 2、ch13. 2、h13. 2v1、h13. 2v2 和 / 或 h13. 2v3 的抗体的重链可变区的至少一、二或三个互补性决定区域 (CDR),或者至少尤其来自接触 IL-13 的那些 CDR 的氨基酸。而在另一个实施方案中,该抗体或其片段包含来自,如:选自此文所描述之 mAb13. 2、ch13. 2、h13. 2v1、h13. 2v2 和 / 或 h13. 2v3 抗体的轻链可变区的至少一、二或三个 CDR,或者至少包括来自接触 IL-13 的那些 CDR 的氨基酸。而在另一个实施方案中,该抗体或其片段包含来自,如:选自此文所描述之 mAb13. 2、ch13. 2、h13. 2v1、h13. 2v2 和 / 或 h13. 2v3 抗体的重链和轻链可变区的至少一、二、三、四、五或六个 CDR。

[0022] 在一个优选的实施方案中,所述蛋白质包括来自 mAb13. 2、ch13. 2、h13. 2v1、h13. 2v2 和 / 或 h13. 2v3 的所有 6 个 CDR,或者相关的 CDR,例如,相同或者具有至少一个氨基酸改变,但是不超过 2、3、或者 4 个改变(例如,替代、缺失、或者插入,例如,保守替代)的 CDR。任选地,所述蛋白质包括本文描述的任一 CDR。

[0023] 在再一个实施方案中,所述抗体或者其片段包括至少 1、2 或者 3 个 Chothia 高变环,其来自选自例如本文描述的 mAb13. 2、ch13. 2、h13. 2v1、h13. 2v2 和 / 或 h13. 2v3 的抗体的重链可变区,或者包括至少来自那些高变环的接触 IL-13 的氨基酸。在再一个实施方案中,所述抗体或者其片段包括至少 1、2 或者 3 个高变环,其来自选自例如本文描述的 mAb13. 2、ch13. 2、h13. 2v1、h13. 2v2 和 / 或 h13. 2v3 的抗体的轻链可变区,或者至少包括来自那些高变环的接触 IL-13 的氨基酸。在再一个实施方案中,所述抗体或者其片段包括至少 1、2、3、4、5 或者 6 个高变环,其来自选自例如本文描述的 mAb13. 2、ch13. 2、h13. 2v1、h13. 2v2 和 / 或 h13. 2v3 的抗体的重链和轻链的可变区。

[0024] 在一个优选实施方案中,所述蛋白质包括来自 mAb13. 2、ch13. 2、h13. 2v1、h13. 2v2 和 / 或 h13. 2v3 的所有 6 个高变环或者密切相关的环,例如,相同或者具有至少一个氨基酸改变,但是不超过 2、3、或者 4 个改变(例如,替代、缺失、或者插入,例如,保守替代)的高变环。任选地,蛋白质包括本文描述的任一高变环。

[0025] 在再一个实例中,所述蛋白质包括至少 1、2 或者 3 个高变环,其具有与 mAb13. 2、ch13. 2、h13. 2v1、h13. 2v2 和 / 或 h13. 2v3 的对应的高变环相同的规范结构 (canonical structure),例如,与 mAb13. 2、ch13. 2、h13. 2v1、h13. 2v2 和 / 或 h13. 2v3 的重和 / 或轻链可变结构域的至少环 1 和 / 或环 2 相同的规范结构。关于高变环规范结构的描述,见,例如, Chothia et al. (1992) J. Mol. Biol. 227 :799-817; Tomlinson et al. (1992) J. Mol. Biol. 227 :776-798。通过检查这些参考文献中描述的表格可以确定这些结构。

[0026] 在一个实施方案中,轻或者重链可变构架(例如,包含至少 FR1、FR2、FR3 和任选地 FR4 的区域)可以选自:(a) 轻或者重链可变构架,其包括至少 80%、85%、87%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、或优选 100% 的来自人轻或者重链可变构架的氨基酸残基,例如,来自本文描述的人成熟抗体、人种系序列、人共有序列,或者人抗体的轻或者重链可变构架残基;(b) 轻或者重链可变构架,其包括 20% -80%、40% -60%、60% -90%、或 70% -95% 的人轻或者重链可变构架的氨基酸残基,例如,来自人成熟抗体、人种系序列、人共有序列的轻或者重链可变构架;(c) 非人构架(例如,啮齿动物构架);或者 (d) 非人构架,其已经修饰,例如以除去抗原性或者细胞毒性决定簇,例如,脱免疫或者部分人源化。

在一个实施方案中,轻或者重链可变构架区(尤其FR1、FR2和/或FR3)包括与人种系基因,例如DP-54或DPK9的VH节段的构架区至少70、75、80、85、87、88、90、92、94、95、96、97、98、99%同一或者完全同一的轻或者重链可变构架序列。在一个实施方案中,重链可变区在一个或多个下面的位置(优选至少5个、10个、12个或者所有位置)包括人残基或者人共有序列残基:(在轻链的可变结构域的FR中)4L、35L、36L、38L、43L、44L、58L、46L、62L、63L、64L、65L、66L、67L、68L、69L、70L、71L、73L、85L、87L、98L、和/或(在重链的可变结构域的FR中)2H、4H、24H、36H、37H、39H、43H、45H、49H、58H、60H、67H、68H、69H、70H、73H、74H、75H、78H、91H、92H、93H、和/或103H(根据Kabat编号)。

[0027] 在一个实施方案中,蛋白质包括至少一个非人CDR,例如,鼠CDR,例如,mAb13.2的CDR,或者其突变体,和与mAb13.2的构架有至少1个氨基酸,例如,至少5、8、10、12、15或者18个氨基酸不同的至少一个构架。例如,所述蛋白质包括1、2、3、4、5、或者6个此类非人CDR,并且在HC FR1、HC FR2、HC FR3、LC FR1、LC FR2和LC FR3的至少三种中包括至少一个氨基酸差异。

[0028] 在一个实施方案中,抗体的重或者轻链可变结构域包括氨基酸序列,该氨基酸序列与本文描述抗体(例如,mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2和/或h13.2v3)的可变区有至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或者更高的同一性;或者与本文描述的抗体(例如,mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2和/或h13.2v3)的可变区有至少1或5个残基差异,但是小于40、30、20或者10个残基的差异。

[0029] 在一个实施方案中,可变结构域的一个或两个包括构架区中的氨基酸位置,其不同地来自非人抗体(例如,鼠抗体,如mAb13.2)和人抗体或者种系序列。例如,可变结构域将包括许多位置,在所述位置上氨基酸残基与非人抗体和人抗体(或者人种系序列)相同,因为这两种抗体在该位置相同。在非人和人抗体不同的剩余构架位置中,可变结构域的至少50、60、70、80或者90%的位置优选与人抗体(人种系序列)相同而不是与非人抗体相同。例如,没有或者有至少1、2、3或者4个这种剩余的构架位置可以与非人抗体而不是人抗体相同。例如在HC FR1中,一个或两个这种位置可以是非人的;在HC FR2中,一个或两个这种位置可以是非人的;FR3中,1、2、3或者4个这种位置可以是非人的;在LC FR1中,1、2、3或者4个这种位置可以是非人的;在LC FR2中,一个或两个这种位置可以是非人的;在LC FR3中,一个或两个这种位置可以是非人的。

[0030] 在一个实施方案中,蛋白质的重或者轻链可变区包括本文描述的核酸序列或者与本文描述的核酸序列(例如,特定核酸序列或者编码本文描述的氨基酸序列的核酸序列)或者其互补序列例如在低严格性、中严格性、高严格性或者极高严格条件下,或者本文描述的其他杂交条件下杂交的核酸所编码的氨基酸序列。

[0031] 在另一个实施方案中,该抗体或其片段包含至少一、二、三或四个抗原-结合区,如可变区,其具有如表3中所列之氨基酸序列(VH方面为SEQID NO:13、14、15、16或36,和/或VL方面为SEQ ID NO:9、10、11、12或35),或大体上与其同一之序列(如:与SEQ ID NO:9、10、11、12、13、14、15、16、35或36具有至少约85%、90%、95%、99%或更高之同一性的序列,或与其相差不超过1、2、5、10或15个氨基酸的序列)。在另一个实施方案中,该抗体包括VH和/或VL结构域,其由具有表2中所列之核苷酸序列(VH方面为SEQ ID NO:5、6、7、8或34,和/或VL方面为SEQ ID NO:1、2、3、4或33),或大体上与其同一之序列(如:

与 SEQID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、33 或 34 具有至少约 85%、90%、95%、99% 或更高之同一性的序列, 或与其相差不超过 3、6、15、30 或 45 个核苷酸的序列) 的核酸所编码。而在另一个实施方案中, 该抗体或其片段包含至少一、二或三个来自重链可变区的 CDR, 其具有表 1 中所列之氨基酸序列 (VH CDR1-3 分别为 SEQ ID NO:22、23 或 24), 或大体上与其同源之序列 (如: 与其具有至少约 85%、90%、95%、99% 或更高之同一性的序列, 和 / 或具有一或多个替代, 如: 保守替代)。而在另一个实施方案中, 该抗体或其片段包含至少一、二或三个来自轻链可变区的 CDR, 其具有表 1 中所列之氨基酸序列 (VL CDR1-3 分别为 SEQ ID NO:19、20 或 21), 或大体上与其同源之序列 (如: 与其具有至少约 85%、90%、95%、99% 或更高之同一性的序列, 和 / 或具有一或多个替代, 如: 保守替代)。而在另一个实施方案中, 该抗体或其片段包含至少一、二、三、四、五或六个来自重链和轻链可变区的 CDR, 其具有表 1 中所列之氨基酸序列 (VH CDR1-3 分别为 SEQ ID NO:22、23 或 24; 而 VL CDR1-3 分别为 SEQ ID NO:19、20 或 21), 或大体上与其同源之序列 (如: 与其具有至少约 85%、90%、95%、99% 或更高之同一性的序列, 和 / 或具有一或多个替代, 如: 保守替代)。

[0032] 在另一个实施方案中, 所述抗体或者其片段包含重链可变区的至少 1、2 或者 3 个 Chothia 高变环, 其分别具有 VH Chothia 高变环 1-3 的氨基酸序列, 或者与其基本同源的序列 (例如, 与其有至少约 85%、90%、95%、99% 或者更高同一性, 和 / 或具有一个或多个替代, 例如, 保守替代的序列)。在再一个实施方案中, 所述抗体或者其片段包含轻链可变区的至少 1、2 或者 3 个 Chothia 高变环, 其分别具有 Chothia 高变环 1-3 的氨基酸序列, 或者与其基本同源的序列 (例如, 与其有至少约 85%、90%、95%、99% 或者更高同一性, 和 / 或具有一个或多个替代, 例如, 保守替代的序列)。

[0033] 在另一个实施方案中, 该抗-IL-13 抗体或其片段包含人 IgG1 恒定区, 其具有如 SEQ ID NO:17 中所列之氨基酸序列, 或大体上与其同源之序列 (如: 与 SEQ ID NO:17 具有至少约 85%、90%、95%、99% 或更高之同一性的序列, 或与其相差不超过 1、2、5、10、50 或 100 个氨基酸残基的序列)。在另一个实施方案中, 该抗-IL-13 抗体包含人 κ 恒定区, 其具有如 SEQ ID NO:18 中所列之氨基酸序列, 或大体上与其同源之序列 (如: 与 SEQID NO:18 具有至少约 85%、90%、95%、99% 或更高之同一性的序列, 或与其相差不超过 1、2、5、10、20、或 50 个氨基酸残基的序列)。在另一个实施方案中, 该抗体或其片段包含如此文所描述之人 IgG1 恒定区和人 κ 恒定区。

[0034] 在另一个实施方案中, 该抗-IL-13 抗体或其片段包含一经由氢键在至少一、二、三或四个选自下列之残基处与 IL-13 (通常为人 IL-13) 接触的重链可变结构域: 如, 图 29 中所示之根据线性序列编号系统的重链可变区的丝氨酸 50 (CDR2)、丝氨酸 53 (CDR2)、酪氨酸 101 (CDR3)、酪氨酸 102 (CDR3) 或其保守替代 (亦见, 如: 图 17), 或者在对应于重链可变结构域中此类氨基酸残基的位置上接触 IL-13。在一个实施方案中, 该抗体或其片段包含一经由范德瓦尔斯力在至少一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三或十四个选自下列之残基处与 IL-13 (通常为人 IL-13) 接触的重链可变区: 如, 图 29 中所示之根据线性序列编号系统的重链可变区的异亮氨酸 30、丝氨酸 31 (CDR1)、丙氨酸 33 (CDR1)、色氨酸 47、丝氨酸 50 (CDR2)、丝氨酸 52 (CDR2)、丝氨酸 53 (CDR2)、酪氨酸 58 (CDR2)、亮氨酸 98 (CDR3)、天冬氨酸 99 (CDR3)、甘氨酸 100 (CDR3)、酪氨酸 101 (CDR3)、酪氨酸 102 (CDR3)、苯丙氨酸 103 (CDR3) 或其保守替代 (亦见, 如: 图 17), 或者在对应于重链可变结构域中的此

类氨基酸残基的位置上接触 IL-13。在另一个实施方案中,该抗体或其片段包含一重链可变区,此重链可变区经由氢键在至少一、二、三或四个选自下列之残基处与 IL-13(通常为人 IL-13)接触:如,图 29 中所示之根据线性序列编号系统的重链可变区的丝氨酸 50(CDR2)、丝氨酸 53(CDR2)、酪氨酸 101(CDR3)、酪氨酸 102(CDR3) 或其保守替代(亦见,如:图 17),及经由范德瓦尔斯力在至少一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三或十四个选自下列之残基处与 IL-13(通常为人 IL-13)接触:如,图 29 中所示之根据线性序列编号系统的重链可变区的异亮氨酸 30、丝氨酸 31(CDR1)、丙氨酸 33(CDR1)、色氨酸 47、丝氨酸 50(CDR2)、丝氨酸 52(CDR2)、丝氨酸 53(CDR2)、酪氨酸 58(CDR2)、亮氨酸 98(CDR3)、天冬氨酸 99(CDR3)、甘氨酸 100(CDR3)、酪氨酸 101(CDR3)、酪氨酸 102(CDR3)、苯丙氨酸 103(CDR3) 或其保守替代(亦见,如:图 17),或者在对应于重链可变结构域中此类氨基酸残基的位置上接触 IL-13。

[0035] 在另一个实施方案中,该抗-IL-13 抗体或其片段包含经由氢键在至少一、二、三、四或五个选自下列之残基处与 IL-13(通常为人 IL-13)接触的轻链可变区:如,图 30 中所示之根据线性序列编号系统的轻链可变区的天冬酰胺 31(CDR1)、酪氨酸 32(CDR1)、赖氨酸 34(CDR1)、天冬酰胺 96(CDR3)、天冬氨酸 98(CDR3) 或其保守替代(亦见,如:图 18)。在一个实施方案中,该抗-IL-13 抗体或其片段包含经由范德瓦尔斯力在至少一、二、三、四、五、六或七个选自下列之残基处与 IL-13(通常为人 IL-13)接触的轻链可变区:如,图 30 中所示之根据线性序列编号系统的轻链可变区的天冬酰胺 31(CDR1)、酪氨酸 32(CDR1)、赖氨酸 34(CDR1)、精氨酸 54(CDR2)、天冬酰胺 96(CDR3)、天冬氨酸 98(CDR3)、色氨酸 100(CDR3) 或其保守替代(亦见,如:图 18)。在另一个实施方案中,该抗体或其片段包含一轻链可变区,此轻链可变区经由氢键在至少一、二、三、四或五个选自下列之残基处与 IL-13(通常为人 IL-13)接触:如,图 30 中所示之根据线性序列编号系统的轻链可变区的天冬酰胺 31(CDR1)、酪氨酸 32(CDR1)、赖氨酸 34(CDR1)、天冬酰胺 96(CDR3)、天冬氨酸 98(CDR3) 或其保守替代(亦见,如:图 18),及经由范德瓦尔斯力在至少一、二、三、四、五、六或七个选自下列之残基处与 IL-13(通常为人 IL-13)接触:如,图 30 中所示之根据线性序列编号系统的轻链可变区的天冬酰胺 31(CDR1)、酪氨酸 32(CDR1)、赖氨酸 34(CDR1)、精氨酸 54(CDR2)、天冬酰胺 96(CDR3)、天冬氨酸 98(CDR3)、色氨酸 100(CDR3) 或其保守替代(亦见,如:图 18)。

[0036] 在另一个实施方案中,该抗-IL-13 抗体或其片段包含如此文所描述之经由氢键与 IL-13(通常为人 IL-13)接触的重链和轻链可变区。而在一个实施方案中,该抗-IL-13 抗体或其片段包含如此文所描述之经由范德瓦尔斯力与 IL-13(通常为人 IL-13)接触的重链和轻链可变区。在一个实施方案中,该抗-IL-13 抗体或其片段包含如此文所描述之经由氢键和范德瓦尔斯力与 IL-13(通常为人 IL-13)接触的重链和轻链可变区。

[0037] 而在另一个实施方案中,该 IL-13 拮抗剂,如:抗-IL-13 抗体或其片段包含在 SEQ ID NO:14 之位置 13、19、40、42、44、75、77、83、87、92 或 113 处具有一种或多种突变的重链可变区。在另一个实施方案中,该抗-IL-13 抗体或其片段之重链可变区在 SEQ ID NO:14 之位置 3 处还包含一种突变。在一个实施方案中,该抗-IL-13 抗体或其片段之重链可变区包含一种或多种下列替代:在 SEQ ID NO:14 之位置 3 处的赖氨酸被谷氨酰胺替代、在位置 13 处之赖氨酸被谷氨酰胺替代、在位置 19 处之赖氨酸被精氨酸替代、在位置 40 处之苏氨酸被丙氨酸替代、在位置 42 处之谷氨酸被甘氨酸替代、在位置 44 处之精氨酸被甘氨酸替代、在

位置 75 处之精氨酸被赖氨酸替代、在位置 77 处之异亮氨酸被丝氨酸替代、在位置 83 处之丝氨酸被天冬酰胺替代、在位置 87 处之丝氨酸被丙氨酸替代、在位置 92 处之甲硫氨酸被缬氨酸替代、在位置 113 处之苏氨酸被亮氨酸替代。

[0038] 在另一个实施方案中,该 IL-13 拮抗剂,如:抗-IL-13 抗体或其片段包含在 SEQ ID NO:10 之位置 3、9、12、13、15、17、19、22、46、47、62、64、80、81、82、83、84、85、87 或 108 处具有一种或多种突变之轻链可变区。在另一个实施方案中,该抗-IL-13 抗体或其片段之轻链可变区在 SEQID NO:10 之位置 4 或 72 处还包含一种或多种突变。在一个实施方案中,该抗-IL-13 抗体或其片段之轻链可变区包含一种或多种下列替代:在 SEQID NO:10 之位置 3 处的缬氨酸被谷氨酰胺替代、在位置 4 处之亮氨酸被甲硫氨酸替代、在位置 9 处之丙氨酸被丝氨酸替代、在位置 12 处之丙氨酸被丝氨酸替代、在位置 13 处之缬氨酸被丙氨酸替代、在位置 15 处之亮氨酸被缬氨酸替代、在位置 17 处之谷氨酰胺被天冬氨酸替代、在位置 19 处之丙氨酸被缬氨酸替代、在位置 22 处之丝氨酸被苏氨酸替代、在位置 46 处之谷氨酰胺被赖氨酸替代、在位置 47 处之丝氨酸被丙氨酸替代、在位置 62 处之异亮氨酸被缬氨酸替代、在位置 64 处之丙氨酸被丝氨酸替代、在位置 72 处之精氨酸被甘氨酸替代、在位置 80 处之天冬酰胺被丝氨酸替代、在位置 81 处之脯氨酸被丝氨酸替代、在位置 82 处之缬氨酸被亮氨酸替代、在位置 83 处之谷氨酸被谷氨酰胺替代、在位置 84 处之丙氨酸被脯氨酸替代、在位置 85 处之天冬氨酸被谷氨酸替代、在位置 87 处之缬氨酸被苯丙氨酸替代或在位置 108 处之亮氨酸被缬氨酸替代。

[0039] 在另一实施方案中,所述抗体或者其抗原结合片段包括一个或多个 CDR,其具有(申请 11/149,025)的表 10 中描述的 CDR 的主链构象±不超过 1.5、1.2、1.1 或者 1.0 埃的均方根偏差 (RMSD);(申请 11/149,025)的表 11 中描述的 CDR 的主链构象±不超过 1.5、1.2、1.1 或者 1.0 埃的 RMSD;或者(申请 11/149,025)的表 12 中描述的 CDR 的主链构象±不超过 1.5、1.2、1.1 或者 1.0 埃的 RMSD。例如,重链可变结构域中 1、2、或者 3 个 CDR(尤其 CDR3 中,或者至少两个 CDR 中,例如,CDR1 和 CDR3,CDR2 和 CDR3,或者所有三个 CDR 中)相对于那些结构具有不超过 1.5、1.2、1.1 或者 1.0 埃的 RMSD。例如,轻链可变结构域中 1、2、或者 3 个 CDR(尤其 CDR1 中,或者至少两个 CDR 中,例如,CDR1 和 CDR3,CDR1 和 CDR2,或者所有三个 CDR 中)相对于那些结构具有不超过 1.5、1.2、1.1 或者 1.0 埃的 RMSD。在实施方案中,抗体或者其抗原结合片段包括可变结构域,其作为整体具有(申请 11/149,025)的表 10 中描述的 CDR 的主链构象±不超过 1.5、1.2、1.1 或者 1.0 埃的均方根偏差 (RMSD);(申请 16163-029001)的表 11 中描述的 CDR 的主链构象±不超过 1.5、1.2、1.1 或者 1.0 埃的 RMSD;或者(申请 11/149,025)的表 12 中描述的 CDR 的主链构象±不超过 1.5、1.2、1.1 或者 1.0 埃的 RMSD。可变结构域还可以与本文描述的抗体,例如在 CDR 区和/或构架区中有至少 70%、80%、85%、87%、90%、92%、93%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性。

[0040] 在另一个实施方案中,该 IL-13 拮抗剂,如:抗-IL-13 抗体或其片段包含在 SEQ ID NO:14 之位置 3、13、19、40、42、44、75、77、83、87、92 或 113 处具有一种或多种突变(如:此文所描述之突变)的重链可变区,和在 SEQ ID NO:10 之位置 3、4、9、12、13、15、17、19、22、46、47、62、64、72、80、81、82、83、84、85、87 或 108 处具有一种或多种突变(如:此文所描述之突变)的轻链可变区。

[0041] IL-13 拮抗剂,如:此文所描述之抗-IL-13 抗体或其片段可衍生或者连接到另一功能性分子,如:另一种肽或蛋白质(如:Fab 片段)。例如:融合蛋白质,或抗体或抗原-结合部分可功能性地连接(如:藉由化学偶合、遗传融合、非共价性结合或其它方式)一或多个其它分子实体,如:抗体(如:双特异性或多特异性抗体)、毒素、放射性同位素、细胞毒性剂或细胞抑制剂等。

[0042] 在另一个实施方案中,该 IL-13 拮抗剂,如:此文所描述之抗-IL-13 抗体或其片段,或其药物组合物系单独投药,或与治疗法组合,即,与其它活性剂组合,如:与可用来治疗与 IL-13 相关之病症的治疗剂组合。与 IL-13 相关之病症的实例包括,但不限于选自下列之一种或多种病症:如此文所描述之呼吸病症,如:哮喘(如:变应性和非变应性哮喘(如:在幼儿中因,如:呼吸道合胞病毒(RSV)感染所引起之哮喘)),慢性阻塞性肺病(COPD)及其它涉及呼吸道炎症之状况,嗜伊红细胞增多,纤维变性和黏液生成过量,如:囊性纤维化和肺纤维化;特应性病症,如:因对 IL-13 之敏感性增加所造成之病症(如:特应性皮炎、荨麻疹、湿疹、变应性鼻炎和变应性 肠胃炎);皮肤(如:特应性皮炎)、胃肠道器官(如:炎性肠病(IBD),如:溃疡性结肠炎和/或克隆病)、肝脏(如:硬化、肝细胞癌)之炎症和/或自身免疫状况和硬皮病;肿瘤或癌症(如:软组织或实体瘤),如:白血病、成胶质细胞瘤和淋巴瘤,如:霍奇金淋巴瘤;病毒感染(如:来自 HTLV-1);其它器官之纤维变性,如:肝脏纤维变性(如:由乙型和/或丙型肝炎病毒引起之纤维变性);及 1 型保护性免疫反应表达的压抑(如:在疫苗接种期间)。

[0043] 组合治疗可包括将一种或多种 IL-13 拮抗剂(如:抗-IL-13 抗体或其片段)与一种或多种其它治疗剂,如:此文中多次描述之一种或多种细胞因子和生长因子抑制剂、免疫抑制剂、抗炎症剂(如:全身性抗炎症剂)、代谢抑制剂、酶抑制剂,和/或细胞毒性剂或细胞抑制剂一起配制和/或共同施用。

[0044] 可与一种或多种 IL-13 拮抗剂(如:抗-IL-13 抗体或其片段)共同施用和/或一起配制之优选的额外治疗剂实例包括,但不限于下列一种或多种治疗剂:吸入之类固醇,β-激动剂,如:短效或长效之 β-激动剂;白三烯或白三烯受体之拮抗剂;组合药物(如 **ADVAIR**[®]);IgE 抑制剂,如:抗-IgE 抗体(如:**XOLAIR**[®]);磷酸二酯酶抑制剂(例如, PDE4 抑制剂);黄嘌呤;抗胆碱能药;肥大细胞稳定剂,如:色氨酸钠(cromolyn);IL-4 抑制剂;IL-5 抑制剂;嗜伊红趋化素(eotaxin)/CCR3 抑制剂;和抗组胺类。这类组合可用来治疗哮喘和其它呼吸病症。其它可与一种或多种抗-IL-13 抗体或其片段共同施用和/或一起配制之治疗剂包括下列一种或多种治疗剂:TNF 拮抗剂(如:TNF 受体之可溶性片段,如:p55 或 p75 人 TNF 受体或其衍生物,如:75kd TNFR-IgG(75kd TNF 受体-IgG 融合蛋白, ENBREL[™]));TNF 酶拮抗剂,如:TNF α 转化酶(TACE)抑制剂;毒蕈碱性受体拮抗剂;TGF-β 拮抗剂;干扰素 γ;普非尼酮(perfenidone);化疗剂,如:氨甲蝶呤、来氟米特(leflofloxacin),或西罗莫司(sirolimus)(雷帕霉素(rapamycin))或其类似物,如:CCI-779;COX2 和 cPLA2 抑制剂;NSAIDs;免疫调节剂;p38 抑制剂、TPL-2、Mk-2 和 NF κ B 抑制剂等。

[0045] 在另一方面,本申请提供包括药学上可接受之载体和至少一种 IL-13 拮抗剂,如:此文中所描述之抗-IL-13 抗体或其片段的组合物,如:药物组合物。在一个实施方案中,该组合物,如:药物组合物,包含二或多种前述之 IL-13 拮抗剂,如:抗-IL-13 抗体或其片

段的组合。IL-13 拮抗剂,如:抗-IL-13 抗体或其片段与药物之组合亦在本发明之范围内,该药物系如:治疗剂(如:此文中所描述之一种或多种细胞因子和生长因子抑制剂、免疫抑制剂、抗炎症剂(如:系统性抗炎症剂)、代谢抑制剂、酶抑制剂,和/或细胞毒性剂或细胞抑制剂)。

[0046] 本申请亦描述包含核苷酸序列之核酸,该核苷酸序列编码此文所描述之抗-IL-13 抗体的重链和轻链可变区或其片段。例如:本申请描述分别编码此文所描述之抗-IL-13 抗体的重链和轻链可变区的第一和第二种核酸,该抗-IL-13 抗体系选自下列之一种或多种抗体,如:mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 和/或 h13.2v3。

[0047] 在另一方面,本申请描述包含此文中所描述之核酸的宿主细胞和载体。

[0048] 描述了可被下列之一种或多种抗体如:mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 和/或 h13.2v3 识别之 IL-13(如:人 IL-13)的表位。在一个实施方案中,该抗-IL-13 抗体或其片段结合包含人 IL-13(SEQ ID NO:31)之残基 81-93 和/或 114-132,或其修饰形式(如:其片段或经替代(如:保守替代)之形式)的表位。在一个实施方案中,该人 IL-13 之表位包含下列之一或多项:在 SEQ ID NO:32 之位置 49 处的谷氨酸、位置 53 处之天冬酰胺、位置 69 处之甘氨酸、位置 72 处之脯氨酸、位置 73 处之组氨酸、位置 74 处之赖氨酸和位置 86 处之精氨酸,或其保留的氨基酸替代。

[0049] 在另一方面,本申请描述一种调节,如:干扰(如:抑制、阻断或降低)IL-13 与相关的 IL-13 结合蛋白(例如,IL-13 受体复合体,如:包含 IL-13R α 1 和 IL-4R α 之复合体)或者其亚基间之相互作用(如:结合)的方法。该调节可以在体内或者体外实现。在其他实施方案中,该 IL-13 拮抗剂,如:抗-IL-13 抗体或其片段结合 IL-13,并干扰(如:抑制、阻断或降低)IL-13 与 IL-13 受体复合体之亚基(如:个别地,IL-13R α 1 或 IL-4R α)间的相互作用(如:结合)。而在另一实施方案中,该 IL-13 拮抗剂,如:抗-IL-13 抗体或其片段结合 IL-13,并干扰(如:抑制、阻断或降低)IL-13/IL-13R α 1 与 IL-4R α 间之相互作用(如:结合)。在另一实施方案中,该 IL-13 拮抗剂,如:抗-IL-13 抗体或其片段结合 IL-13,并干扰(如:抑制、阻断或降低)IL-13/IL-4R α 与 IL-13R α 1 间之相互作用(如:结合)。通常,该抗-IL-13 抗体或其片段干扰(如:抑制、阻断或降低)IL-13/IL-13R α 1 与 IL-4R α 间之相互作用(如:结合)。

[0050] 本方法可用于体外(如:在不含细胞之系统中),培养中(如:体外或离体(ex vivo))之细胞中。例如:可将表达 IL-13 受体之细胞体外培养在培养基中,并经由将一种或多种抗-IL-13 抗体或其片段,如:此文中所描述之抗-IL-13 抗体或其片段加入培养基中来实现接触步骤。或者,此方法可在个体中之细胞中进行,如:作为体内(如:治疗性或预防性)方案的一部分。

[0051] 另一方面,本申请描述一种治疗(如:治愈、压抑、减轻、延迟或预防开始,或预防再发或复发)个体内与 IL-13 相关病症的方法。此方法包括:对该个体施用足够治疗或预防与 IL-13 相关病症的量的 IL-13 结合剂(尤其拮抗剂),如:此文中所描述之抗-IL-13 抗体或其片段。该 IL-13 拮抗剂,如:抗-IL-13 抗体或其片段可单独施用于该个体或与其它此文中所描述之治疗用药程序一起施用。在一个实施方案中,该个体为患有一种或多种与 IL-13 相关病症的哺乳动物,如:人,所述与 IL-13 相关病症包括,如:此文中所描述之呼吸病症(如:哮喘(如:变应性和非变应性哮喘,慢性阻塞性肺病(COPD)及其它涉及呼吸

道炎症之状况,嗜伊红细胞增多,纤维变性和黏液生成过量;特应性病症(如:特应性皮炎和变应性鼻炎);皮肤之炎症和/或自身免疫状况、胃肠道器官之炎症和/或自身免疫状况(如:炎性肠病(IBD),如:溃疡性结肠炎和/或克隆病)和肝脏之炎症和/或自身免疫状况(如:硬化、纤维变性);硬皮病;肿瘤或癌症,如:霍奇金淋巴瘤。因此,本公开包括 IL-13 结合剂(如本文描述的抗-IL-13 抗体或者其片段)用于本文描述的治疗的用途,和 IL-13 结合剂(如本文描述的抗-IL-13 抗体或者其片段)用于制备用于本文描述的治疗的药物的用途。

[0052] 与 IL-13 相关病症的实例包括,但不限于选自下列之一或多项的病症:呼吸病症,如:哮喘(如:变应性和非变应性哮喘(在如:幼儿中由于如:呼吸道合胞病毒(RSV)感染所引起之哮喘)),慢性阻塞性肺病(COPD)及其它涉及呼吸道炎症之状况,嗜伊红细胞增多,纤维变性和黏液生成过量,如:囊性纤维化和肺纤维化;特应性病症,如:因对 IL-13 之敏感性增加所造成之病症(如:特应性皮炎、荨麻疹、湿疹、变应性鼻炎和变应性肠胃炎);皮肤之炎症和/或自身免疫状况(如:特应性皮炎)、胃肠道器官之炎症和/或自身免疫状况(如:炎性肠病(IBD),如:溃疡性结肠炎和/或克隆病)、肝脏之炎症和/或自身免疫状况(如:硬化、肝细胞癌)和硬皮病;肿瘤或癌症(如:软组织或实体瘤),如:白血病、成胶质细胞瘤和淋巴瘤,如:霍奇金淋巴瘤;病毒感染(如:来自 HTLV-1 之感染);其它器官之纤维变性,如:肝脏纤维变性(如:由乙型和/或丙型肝炎病毒引起之纤维变性);及 1 型保护性免疫反应之表达的抑制(如:在疫苗接种期间)。

[0053] 在其它实施方案中,本申请提供了治疗(如:减轻、改善)或预防与下列病症相关之一种或多种症状的方法:呼吸病症,如哮喘(如:变应性和非变应性哮喘);变态反应;慢性阻塞性肺病(COPD);涉及呼吸道炎症之状况,嗜伊红细胞增多,纤维变性和黏液生成过量,如:囊性纤维化和肺纤维化。例如,哮喘之症状包括,但不限于:喘鸣、气促、支气管收缩、呼吸道反应过度、肺容量减少、纤维变性、呼吸道炎症和黏液生成。此方法包括:对该个体施用足够治疗(如:减轻、改善)或预防一种或多种症状之 IL-13 拮抗剂,如:抗-IL-13 抗体或其片段。该 IL-13 抗体可以治疗或预防方式,或此二种方式施用。该 IL-13 拮抗剂,如:抗-IL-13 抗体或其片段可单独施用于该个体或与其它此文中所描述之治疗用药程序一起施用。优选地,该个体为患有如此文中所描述之与 IL-13 相关病症的哺乳动物,如:人。

[0054] 另一方面,本申请提供了在体外检测样品(如:生物样品,如:血清、血浆、组织、活组织检查)内是否有 IL-13 存在之方法。本方法可用来诊断病症,如:与免疫细胞相关之病症。此方法包括:(i) 将样品或对照组样品与此文中所描述之抗-IL-13 抗体或其片段接触;及(ii) 检测抗-IL-13 抗体或其片段与样品或对照样品间是否形成复合体,其中,相对于对照样品而言,在样品中复合体的形成具统计学显著改变时即表示样品中有 IL-13 存在。

[0055] 而另一方面,本申请提供了用于在体内检测是否有 IL-13 存在的方法(如:在个体之体内成像)。本方法可用来诊断病症,如:与 IL-13 相关之病症。此方法包括:(i) 在可令抗体或其片段与 IL-13 结合之条件下对个体或对照个体施用如此文中所描述之抗-IL-13 抗体或其片段;及(ii) 检测该抗体或其片段与 IL-13 间是否形成复合体,其中,相对于对照个体而言,在个体中复合体的形成具统计学显著改变时即表示有 IL-13 存在。

[0056] 优选地,以可检测之物质直接或间接标记该抗体或其片段以帮助检测经结合或未结合之抗体。合适之可检测的物质包括:多种不同之酶、辅基、荧光物质、发光物质和放射性

物质。

[0057] 本申请亦揭示用于在体内将活性剂,如治疗剂或细胞毒性剂递送至或靶定表达 IL-13 的细胞的方法。

[0058] 包含此文中所描述之 IL-13 拮抗剂,如:抗-IL-13 抗体或其片段的用于治疗和诊断用途的套药包亦在本申请之范围内。

[0059] 另一方面,本申请提供了用于提供包括重链可变结构域和轻链可变结构域的抗体的方法。该方法包括通过使用来自 DP-54 和 DPK-9 的一个或多个构架区或者与 DP-54 和 DPK-9 的一个或多个构架区有至少 75、80、82、85、88、90、92、94、95、96、97 或 98% 同一性的构架区制备抗体(或者编码这种抗体的核酸)。在一个实施方案中,该方法包括将来自非人抗体的 CDR 或者 CDR 的部分工程化到可变结构域的背景中,该可变结构域在重链可变结构域和轻链可变结构域中分别包括 DP-54 和 DPK-9 构架,或者工程化到这样的可变结构域的背景中,该可变结构域包括与 DP-54 和 DPK-9 的一个或多个构架区有至少 75、80、82、85、88、90、92、94、95、96、97 或 98% 同一性的构架区。包括编码包含此类可变结构域的蛋白质链的序列的核酸可以在哺乳动物细胞,如组织培养物细胞中表达。

[0060] 在相关方面,本申请描述了抗体,例如,人工抗体,其包括重链可变结构域和轻链可变结构域,其中重链可变结构域包括使用来自 DP-54 的一个或多个构架区或者与 DP-54 的一个或多个构架区有至少 75、80、82、85、88、90、92、94、95、96、97 或 98% 同一性的构架区,轻链可变结构域包括使用来自 DPK-9 的一个或多个构架区或者与 DPK-9 的一个或多个构架区有至少 75、80、82、85、88、90、92、94、95、96、97 或 98% 同一性的构架区。所述一个或多个 CDR 和 / 或高变环通常是非人的,例如,来自非人抗体,如鼠抗体。在一个实施方案中,所述抗体结合人抗原,例如,IL-13 或者不同于 IL-13 的抗原。

[0061] 根据下面的详细描述和权利要求,其他特征和优点将是显而易见的。

[0062] 附图简述

[0063] 图 1: mAb13.2 结合人 IL-13 之动力学参数。以在一段期间内 (x- 轴) 之共振单位 (RU ; y- 轴) 描述固定于 69RU 链霉抗生物素蛋白芯片上之生物素化的 IL-13 与单克隆抗体 mAb13.2、单克隆抗体 mAb13.4 或单克隆抗体 mAb13.9 间之相互作用。亦显示 mAb13.2 之动力学常数。

[0064] 图 2: mAb13.2 结合 IL-13 之动力学参数。以在一段期间内 (x- 轴) 之共振差异 (RU ; y- 轴) 描述不同剂量之人 IL-13 与固定于 BIACORETM 芯片上之单克隆抗体 mAb13.2 间的相互作用。亦显示 mAb13.2 之动力学常数。

[0065] 图 3: 单克隆抗体 mAb13.2 结合天然人 IL-13。此图形显示:在逐渐增加浓度 (x- 轴) 之重组人 IL-13 (◆)、重组鼠 IL-13 (●) 或天然人 IL-13 (△) (其系从经促分裂原活化、Th2- 偏态的脐血单核细胞分离) 之存在下,结合 FLAG- 人 IL-13 之生物素化 mAb13.2 的平均吸光度值 (A_{450} ; y- 轴)。

[0066] 图 4: 单克隆抗体 mAb13.2 结合并中和人 IL-13 之 ARG- 变体形式。(A) 人 IL-13 或 IL-13 之经重组表达的 ARG- 变体通过固定在 BIACORETM 芯片上之生物素化的 mAb13.2 的应答 (y- 轴) 以时间之函数 (x- 轴) 显示。(B) 显示了与逐渐增加浓度之 mAb13.2 (x- 轴) 及重组之人 IL-13 或经重组表达之 IL-13 的 ARG- 变体一起温育的 TF1 细胞的增殖 (y- 轴)。

[0067] 图 5: 单克隆抗体 mAb13.2 抑制人 IL-13 之生物活性的 IC50 值与可溶性 IL-13

受体之 IC₅₀ 值相当。将依赖 IL-13 的 TF1 细胞系与 IL-13 和逐渐增加浓度 (x- 轴) 之 mAb13.2 或可溶性 IL-13 受体 (rhuIL-13Ra2) 一起温育 三天后, 经由 ³H- 胸昔的掺入来测量 cpm (y- 轴), 以测定依赖 IL-13 的 TF1 细胞系的增殖。

[0068] 图 6: 单克隆抗体 mAb13.2 抑制正常人单核细胞上由 IL-13 介导的 CD23 的表达, 但不会抑制由 IL-4 介导的 CD23 的表达。(A) 显示了将从健康供者分离出之外周血单核细胞 (PBMC) 以指示浓度 (x- 轴) 之重组人 IL-13 (●) 或 IL-4 (○) 处理过夜后, 表达细胞表面 CD23 之单核细胞的百分比 (y- 轴)。(B) 显示了将从健康供者分离出之 PBMC 以 IL-13 和指示浓度 (x- 轴) 之经纯化的小鼠 mAb13.2 (x- 轴) 处理后, 表达细胞表面 CD23 之单核细胞的百分比 (y- 轴)。(C) 显示了将从健康供者分离出之 PBMC 以 IL-4 和指示浓度 (x- 轴) 之经纯化的小鼠 mAb13.2 (x- 轴) 处理过夜后, 表达细胞表面 CD23 之单核细胞的百分比 (y- 轴)。

[0069] 图 7: 单克隆抗体 mAb13.2 抑制人 B 细胞产生依赖 IL-13 的 IgE。从培养在单独之培养基, 或 PHA、IL-13、对照抗体 (ms IgG)、mAb13.2 和 mAb13.8 的不同组合 (x- 轴) 中的 PBMC 分离出的上清液中 IgE 浓度系以 450nm 处之吸光度表示 (IgE (O. D. 450); y- 轴)。

[0070] 图 8: 单克隆抗体 mAb13.2 抑制人表皮细胞的由 IL-13 介导的 STAT6 磷酸化作用。(A) 显示了从以指示浓度之 IL-13 处理过之 HT-29 细胞分离出的细胞裂解物中, 磷酸化之 STAT6 的蛋白质印迹分析结果。(B) 此图说明经由流式细胞分析所测定之 HT-29 细胞数 (计数; y- 轴), 其显示未经处理 (填色之条形图) 或以 IL-13 处理 (未填色之条形图) 之细胞, 以抗磷酸化 STAT6 之经 ALEXATMFlour488 标记的单克隆抗体染色后的荧光 (磷酸-STAT6; x- 轴)。(C) 此图说明经由流式细胞分析所测定之 HT-29 细胞数 (计数; y- 轴), 其显示保持未处理 (填色之条形图); 或以下列各项处理 (未填色之条形图) 之细胞: IL-13 (左上图), IL-13 和 mAb13.8 (左下图), IL-13 和 mAb13.2 (右上图), 或 IL-13 和对照抗体 (msG1) (右下图), 经 ALEXATMFlour488 染色后的荧光 (磷酸-STAT6)。

[0071] 图 9: 单克隆抗体 mAb13.2 可在体内抑制由蛔虫引起之肺部嗜伊红细胞增多。此图说明在支气管肺泡灌洗 (BAL) 样品中所发现之嗜酸性粒细胞的百分比 (y- 轴), 该 BAL 样品系采自未经处理之猕猴 (蛔虫 / PBS) (●, ●)、以 mAb13.2 预处理之猕猴 (蛔虫 / mAb13.2) (◆, ◆) 或以 mAb13.2 预处理并以猪蛔虫 (Ascaris suum) 抗原刺激之猕猴 (蛔虫 / 给予抗体后 ~ 3 个月再刺激) (▲, ▲), 包括以猪蛔虫抗原刺激前 (深色符号) 或刺激后 24 小时, 或再刺激 (浅色符号) 之样品。

[0072] 图 10: mAb13.2Fab 片段与人 IL-13 之共晶体结构。mAb13.2Fab 片段之 X 射线晶体学揭露具暗影之轻链和为淡影之重链。图中亦显示 IL-13 结构 (在右边)。此图亦描述 IL-13 之 C-α 螺旋与抗体之 CDR 环间的相互作用。

[0073] 图 11: 显示 mAb13.2 接触部位之人 IL-13 序列分析。此嵌表显示人 IL-13 之氨基酸序列 (SEQ ID NO: 31), 其中箭头指出信号肽切割部位, 四个 α 螺旋加下划线, 源自 mAb13.2Fab-IL-13 共晶体结构之抗体接触部位高亮于淡色框中, 而 ARG- 变体则高亮于暗色框中。

[0074] 图 12: mAb13.2 之 Fab 片段结合人 IL-13。此图显示在以 (A) pM 抗体或 (B) pM 结合部位表示之逐渐增加浓度的竞争性未经标记的 mAb13.2 (◆)、mAb13.2Fab 片段 (●) 或不相关之抗体 (*) 的存在下, 结合 FLAG- 人 IL-13 之生物素化的 mAb13.2 的平均吸光度

值 (450nm ;y- 轴)。

[0075] 图 13 :mAb13. 2 之 Fab 片段中和由 IL-13 介导的 TF1 细胞增殖和由 IL-13 介导的单核细胞的人 CD23 表达。(A) 此图显示将依赖 IL-13- 的 TF1 细胞系与 IL-13 和逐渐增加浓度之竞争剂结合部位 (x- 轴) (其系由 mAb13. 2 (◆) 或 mAb13. 2Fab 片段 (●) 所提供) 一起温育 3 天后, 依赖 IL-13 的 TF1 细胞系所达到之最大增殖百分比 (y- 轴)。(B) 此图显示以 1ng/mL IL-13 和指示浓度之竞争剂结合部位 (x- 轴) (其系由 mAb13. 2 (◆) 或 mAb13. 2Fab 片段 (●) 所提供) 处理从健康供者分离出之外周血单核细胞 (PBMCs) 过夜后, 藉由流式细胞分析所测定之表达细胞表面 CD23 的最大数目的单核细胞的百分比 (y- 轴)。

[0076] 图 14 :小鼠单克隆抗体 mAb13. 2 之嵌合型 (ch13. 2) 结合并中和 IL-13。(A) 此图显示经由 ELISA 所测定之仅含 IL-13-FLAG 和生物素化之 mAb13. 2 的样品 (—) 及包含 IL-13-FLAG、生物素化之 mAb13. 2 和逐渐增加浓度 (x- 轴) 之 mAb13. 8 (●)、mAb13. 2 (○) 或嵌合的 mAb13. 2 (ch13. 2 ;▲) 之样品在 450nm 处之吸光度 (A_{450} ;y- 轴) (B) 此图显示以 1ng/mL IL-13 和指示浓度 (x- 轴) 之纯化的小鼠 mAb13. 2 (●) 或嵌合型 mAb13. 2 (ch13. 2 ;◆) 处理从健康供者分离出之 PBMCs 过夜后, 表达细胞表面 CD23 的单核细胞百分比 (y- 轴)。

[0077] 图 15 :人 DP-54 种系基因 (SEQ ID NO :38) 与 mAb13. 2 之嵌合形式 (SEQID NO :14) 和 mAb13. 2 之部分人源化形式 (h13. 2v1) (SEQ ID NO :15) 的可变重链 (VH) 氨基酸序列的比较。此图显示以 SEQWEB™ 比对和比较时, DP-54、mAb13. 2 之嵌合形式 (ch13. 2) 的可变重链区和 mAb13. 2 之部分人源化形式 (h13. 2v1) 的可变重链区的互补性决定区域 (CDR) (加框区) 和氨基酸序列, 其中为该 mAb13. 2 之部分人源化形式 (h13. 2v1) 所做的氨基酸替代以有阴影之方框指示, 而保持未改变之残基则加下划线。

[0078] 图 16 :人 DPK9 种系基因 (SEQ ID NO :39) 与 mAb13. 2 之嵌合形式 (SEQID NO :10) 和 mAb13. 2 之部分人源化形式 (h13. 2v1) (SEQ ID NO :11) 的可变轻链 (VL) 氨基酸序列的比较。此图显示以 SEQWEBTM 比对和比较时, DPK9、mAb13. 2 之嵌合形式 (嵌合 13. 2) 的可变轻链区和 mAb13. 2 之部分人源化形式 (h13. 2v1) 的可变轻链区的互补性决定区域 (CDR) (加框区) 和氨基酸序列, 其中为该 mAb13. 2 之部分人源化形式 (h13. 2v1) 所做的氨基酸替代以有阴影之方框指示, 而保持未改变之残基则加下划线。

[0079] 图 17 :人 DP-54 种系基因 (SEQ ID NO :38) 与 mAb13. 2 之嵌合形式 (SEQID NO :14) 和 mAb13. 2 之完全人源化形式 (h13. 2v2) (SEQ ID NO :16) 的可变重链 (VH) 氨基酸序列的比较。此图显示以 SEQWEB™ 比对和比较时, DP-54、mAb13. 2 之嵌合形式 (嵌合 13. 2) 的可变重链区和 mAb13. 2 之完全人源化形式 (h13. 2v2) 的可变重链区的互补性决定区域 (CDR) (加框区) 和氨基酸序列, 其中为该 mAb13. 2 之完全人源化形式 (h13. 2v2) 所做的氨基酸替代以有阴影之方框指示, 而保持未改变之残基则加下划线。

[0080] 图 18 :人 DPK9 种系基因 (SEQ ID NO :39) 与 mAb13. 2 之嵌合形式 (SEQ ID NO :10) 和 mAb13. 2 之完全人源化形式 (h13. 2v2) (SEQ ID NO :12) 的可变轻链 (VL) 氨基酸序列的比较。此图显示以 SEQWEB™ 比对和比较时, DPK9、mAb13. 2 之嵌合形式 (嵌合 13. 2) 的可变轻链区和 mAb13. 2 之完全人源化形式 (h13. 2v2) 的可变轻链区的互补性决定区域 (CDR) (加框区) 和氨基酸序列, 其中为该 mAb13. 2 之完全人源化形式 (h13. 2v2) 所做的氨基酸替代以有阴影之方框指示, 而保持未改变之残基则加下划线。

[0081] 图 19 :完全人源化 mAb13.2(h13.2v2) 保留对 IL-13 之完全结合活性。(A) 此图显示经由 ELISA 所测定之仅含 IL-13-FLAG 和生物素化之 mAb13.2 的样品 (—) 和包含 IL-13-FLAG、生物素化之 mAb13.2 及逐渐增加浓度 (x- 轴) 之 mAb13.2 (●)、嵌合型 mAb13.2(ch13.2;○)、部分人源化之 mAb13.2(h13.2v1;▲) 或完全人源化之 mAb13.2(h13.2v2;△) 的样品在 450nm 处之吸光度 (A_{450} ;y- 轴) (B) 此图以在一段期间内 (x- 轴) 之共振差异 (RU;y- 轴) 说明在不同剂量范围内之人 IL-13 和固定在 Biacore™ 芯片上之完全人源化 mAb13.2(h13.2v2) 间的结合相互作用。其中亦显示 h13.2v2 之动力学常数。

[0082] 图 20 :嵌合型 mAb13.2(ch13.2)、部分人源化之 mAb13.2(h13.2v1) 和完全人源化之 mAb13.2(h13.2v2) 可中和由 IL-13 所介导的 CD23 表达和由 IL-13 介导的 STAT6 的磷酸化。(A) 此图显示将从健康供者分离出之 PBMCs 以 1ng/mL IL-13 和指示浓度 (x- 轴) 之嵌合型 mAb13.2(ch13.2;◆)、部分人源化之 mAb13.2(h13.2v1;□) 或完全人源化之 mAb13.2(h13.2v2;●) 处理过夜后, 表达细胞表面 CD23 之单核细胞的百分比 (y- 轴)。(B) 图说明与 IL-13 和指示浓度 (x- 轴) 之嵌合型 mAb13.2(ch13.2;◆)、部分人源化之 mAb13.2(h13.2v1;□) 或完全人源化之 mAb13.2(h13.2v2;●) 一起温育后, 经由流式细胞分析所测定之表达磷酸化之 STAT6 的 HT-29 细胞的百分比 (y- 轴)。

[0083] 图 21 :完全人源化之 mAb13.2(h13.2v2) 中和由人 IL-13 介导的 CD23 表达的能力与 mAb13.2 之该能力相当。与 (A) 重组之人 IL-13 或 (B) 天然人 IL-13 和逐渐增加浓度 (x- 轴) 之 mAb13.2(●) 或完全人源化之 mAb13.2(h13.2v2;◆) 一起温育后, 表达细胞表面 CD23 之经门控 (gated) 的单核细胞的数目表示为仅与 IL-13 一起温育后, 表达细胞表面 CD23 之最大数目的单核细胞的百分比 (%最大反应;y- 轴)。

[0084] 图 22 :完全人源化之 mAb13.2(h13.2v2) 中和由非人灵长类或绵羊 IL-13 介导的 CD23 表达的能力与 mAb13.2 之该能力相当。该与 (A) 重组之非人灵长类 IL-13(rec NHP IL-13) 或 (B) 重组之绵羊 IL-13(rec 绵羊 IL-13) 和逐渐增加浓度 (x- 轴) 之 mAb13.2(●) 或完全人源化之 mAb13.2(h13.2v2;◆) 一起培育后, 表现细胞表面 CD23 之经限制出入的单核细胞的数目表示为仅与 IL-13 一起温育后, 表达细胞表面 CD23 之最大数目的单核细胞的百分比 (%最大反应;y- 轴)。

[0085] 图 23 :完全人源化之 mAb13.2(h13.2v2) 可减轻绵羊之晚期支气管收缩。所显示者为未处理 (对照组;◆), 或以 (A) 20mg/kg 或 (B) 5mg/kg 剂量之完全人源化 mAb13.2(h13.2v2;■) 预防性处理的绵羊在猪蛔虫抗原刺激前 24 小时 (基线)、刺激期间 (蛔虫) 和刺激后数小时 (x- 轴) 所测量之呼吸道阻力百分比 (y- 轴)。所显示之数据为每组三只绵羊之样本大小的平均值 \pm s. d.。

[0086] 图 24 :完全人源化之 mAb13.2(h13.2v2) 可预防绵羊体内之呼吸道反应过度。此图显示在猪蛔虫刺激前和后 (x- 轴), 在以 (A) 20mg/kg 或 (B) 5mg/kg 之完全人源化 mAb13.2(h13.2v2;□) 预防性地处理或保持未处理 (对照;■) 之绵羊中引起给定幅度之反应 (PC400;y- 轴) 所需的卡巴胆碱的剂量百分比。所显示之数据为每组三只绵羊之样本大小的平均值 \pm s. d.。

[0087] 图 25 :完全人源化之 mAb13.2(h13.2v2) 可在非人灵长类体内预防由抗原引起之肺部炎症。此图显示以猪蛔虫抗原刺激前 (0) 或刺激后 24 小时 (24), 于从下列各组中所取

出之支气管肺泡灌洗 (BAL) 样品中找到的总细胞数 (y- 轴) : 以盐水经由静脉内途径处理之对照猕猴 (●) 、以 2mg/kg 地塞米松经由肌内途径处理之阳性对照猕猴 (*) 、以 8mg/kg 不相关之人 IgG (IVIG) 预处理之阴性对照猕猴 (▲) 或以完全人源化之 mAb13. 2 (h13. 2v2) 经由静脉内途径预处理之猕猴 (▼) 。条线亦记述在各组 BAL 样品中所发现之平均细胞数。图中亦显示利用未配对 T 检验所取得之 p 值。

[0088] 图 26 : mAb13. 2 可根据与其它人种系基因之 V-BASE 的 VH 组 3 中的序列同源性进行人源化。此图显示 mAb13. 2 之氨基酸序列 (SEQ ID NO :63) 与数据库 V-base 的 VH 组 3 中人种系氨基酸序列 (SEQ ID NO :40-62, 分别按出现顺序) 的比对结果。粗体序列为所提出之在将 mAb13. 2 人源化时可作为根据的序列。

[0089] 图 27 : 人 DP-77 种系基因 (SEQ ID NO :64) 与 mAb13. 2 之嵌合形式 (SEQID NO :14) 和 mAb13. 2 之完全人源化形式 (h13. 2v3) (SEQ ID NO :36) 的可变重链 (VH) 氨基酸序列之比较。此图显示以 SEQWEB™ 比对和比较时, DP-77、mAb13. 2 之嵌合形式 (嵌合型 13. 2) 的可变重链区和 mAb13. 2 之完全人源化形式 (h13. 2v3) 的可变重链区的互补性决定区域 (CDR) (加框区) 和氨基酸序列, 其中该为 mAb13. 2 之完全人源化形式 (h13. 2v3) 所做的氨基酸替代以有阴影之方框指示, 而保持未改变之残基则加下划线。

[0090] 图 28 : 人 B1 种系基因 (SEQ ID NO :65) 与 mAb13. 2 之嵌合形式 (SEQ IDNO :10) 和 mAb13. 2 之完全人源化形式 (h13. 2v3) (SEQ ID NO :35) 的可变轻链 (VL) 氨基酸序列的比较。此图显示以 SEQWEB™ 比对和比较时, B1、mAb13. 2 之嵌合形式 (嵌合型 13. 2) 的可变轻链区和 mAb13. 2 之完全人源化形式 (h13. 2v3) 的可变轻链区的互补性决定区域 (CDR) (加框区) 和氨基酸序列, 其中为该 mAb13. 2 之完全人源化形式 (h13. 2v3) 所做的氨基酸替代以有阴影之方框指示, 而保持未改变之残基则加下划线。

[0091] 图 29 : 单克隆抗体 mAb13. 2 之可变重链氨基酸序列 (SEQ ID NO :14) 中的各残基根据不同方案编号的号码表示。此图显示 mAb13. 2 之可变重链区的氨基酸序列中之各残基根据线性序列编号方案、Chothia 结构编号方案和 Kabat 序列编号方案的编号。

[0092] 图 30 : 单克隆抗体 mAb13. 2 之可变轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO :10) 中的各残基根据不同方案编号的号码。此图显示 mAb13. 2 之可变轻链区的氨基酸序列中的各残基根据线性序列编号方案、Chothia 结构编号方案和 Kabat 序列编号方案的编号。

[0093] 图 31 : 以抗 - 人 IL-13 抗体 (h13. 2v2) 处理过之猕猴在蛔虫刺激后 8 周, 其体内的蛔虫 - 特异性 IgE 滴定度降低。此图说明以猪蛔虫抗原刺激前和 8 周后, 猕猴体内之蛔虫 - 特异性 IgE 的相关滴定度。将刺激前之数值归一化为 " 100 " 。(A) 以人源化之抗 -IL-13 抗体 (h13. 2v2) 经由静脉内途径处理过之动物。(B) 经由静脉内途径施用盐水或不相关之人 IgG (IVIG) 的对照动物。

[0094] 图 32 : 抗 -IL-13 抗体 (h13. 2v2) 可预防体内过敏原刺激所引起之嗜碱性粒细胞敏感性增加。(A) 此图说明在以蛔虫抗原处理前和刺激后 24 小时和 8 周之动物中, 从代表性对照和经抗体处理之动物的血液中释出的剂量 - 依赖性组胺, 其以最大量的百分比表示 (y- 轴)。(B) 测定各动物在各时间点时于 (a) 中所示之剂量范围内的总组胺释出量。该图显示对照组和经抗 -IL-13 处理组在各时间点之归一化的组胺释出量的平均值和标准误。Pre = 抗体处理前。时间 0 = 抗体后 24 小时, 以蛔虫刺激肺部前。24 小时、8 周和 4 个月之时间点系指蛔虫刺激后之时间。

[0095] 图 33 :生物素化之 h13. 2v2 与装载 IL-13 之 A375 细胞的结合。此条形图说明将 A375 人黑素瘤细胞 (细胞数 ;y- 轴) 预先与 3ng/mL 之人 IL-13 一起温育后, 经由流式细胞分析所测定出之那些显示出与生物素化之 h13. 2v2 (0.1 μg/ml、1 μg/ml 或 10 μg/ml) 结合 (荧光 ;x- 轴) 的 A375 人黑素瘤细胞数。

[0096] 图 34 :h13. 2v2 之野生型 Fc 回复体可在 IL-13 之存在下介导 ADCC。 (A) 此图显示以指示浓度 (x- 轴) 之 h13. 2v2 (L234A/G237A ;●) 或其野生型 Fc 回复体 (○) 处理过之 A375 人黑素瘤细胞所释出之铬 -51 的百分比 (y- 轴)。 (B) 此图显示在有或无 IL-13 存在时, 以 h13. 2v2 之野生型 Fc 回复体处理过之装载 IL-13 的 A375 细胞所释出之铬 -51 的百分比 (y- 轴)。

[0097] 图 35 :h13. 2v2 之野生型 Fc 回复体可介导表达 IL-13R α 2 之 A375 细胞的 ADCC, 但不会介导表达 IL-13R α 1 之 HT-29 细胞的 ADCC。 (A) 此图显示以指示浓度 (x- 轴) 之 h13. 2v2 (L234A/G237A ;◆) 或其野生型 Fc 回复体 (◇) 处理过之装载 IL-13 的 A375 人黑素瘤细胞所释出之铬 -51 的百分比 (y- 轴)。 (B) 此图显示以指示浓度 (x- 轴) 之 h13. 2v2 (L234A/G237A ;◆) 或其野生型 Fc 回复体 (◇) 处理过之装载 IL-13 的 HT-29 人表皮细胞所释出之铬 -51 的百分比 (y- 轴)。

[0098] 发明详述

[0099] 公开了 IL-13 结合剂, 如 : 抗 -IL-13 抗体及其抗原结合片段、其药物组合物、编码前述抗体之核酸以及包含前述核酸序列之载体和宿主细胞。亦公开制造前述抗体之方法, 以及利用结合 IL-13, 如 : 人 IL-13 之抗体来调节一种或多种与 IL-13 相关之活性, 并减少或预防 IL-13 结合其受体的方法。抗 -IL-13 抗体可用来减轻由 IL-13 介导的病症, 如 : 用于治疗呼吸病症 (如 : 哮喘) ; 特应性病症 (如 : 变应性鼻炎) ; 皮肤之炎症和 / 或自身免疫状况 (如 : 特应性皮炎) 、胃肠道器官之炎症和 / 或自身免疫状况 (如 : 炎性肠病 (IBD)) 以及纤维变性和癌症。抗 -IL-13 抗体可单独使用或与其它用来治疗该相同或其它疾病, 如 : 过敏反应之治疗组合使用。

[0100] 现已发现, 利用此文所描述之抗体 (其干扰功能性 IL-13 信号传递复合体之形成) 降低 IL-13 活性可减低天生对蛔虫过敏之猕猴体内的呼吸道炎症 (下文实施例 1.4 和 3.5)。另外, 此文所描述之抗 - 人 IL-13 抗体可预防天生对蛔虫过敏之绵羊体内的晚期支气管收缩, 并预防由卡巴胆碱引起之绵羊体内的呼吸道反应过度 (下文实施例 3.5)。因此, 可在体内使用能中和一种或多种与 IL-13 相关之活性的抗 -IL-13 抗体来降低一种或多种与 IL-13 相关之活性, 如 : 治疗或预防由 IL-13 介导的病症 (如 : 哮喘、呼吸道炎症、嗜伊红细胞增多, 纤维变性和黏液生成过量)。

[0101] 抗 - 人 IL-13 抗体

[0102] 可中和和 / 或抑制一种或多种与 IL-13 相关之活性, 尤其是 IL-13 之信号传递活性的抗体可用来治疗由 IL-13 介导的疾病, 如 : 变应性哮喘、非变应性哮喘和与哮喘相关之病理, 如 : 纤维变性、嗜伊红细胞增多, 和黏液生成。

[0103] 在一个实施方案中, 此文所公开之抗 -IL-13 抗体为经分离或纯化的。经 " 分离 " 或 " 纯化 " 之多肽或蛋白质, 如 : " 经分离之抗体 " 系经纯化至非其天然存在之状态。例如 : 该经 " 分离 " 或 " 纯化 " 之多肽或蛋白质, 如 : " 经分离之抗体 " 指蛋白质, 其与细胞材料或其它来自该蛋白质之衍生的细胞或 组织的污染蛋白质的至少一种组分分离, 或者,

当其以化学方法合成时,其与化学前体或其它化学物质的至少一种组分分离。例如,分离的蛋白质可以基本上无其他蛋白质、其他细胞材料或者化学前体。在一些实施方案中,具有少于约 50% 非抗体蛋白质(此文亦称为“污染蛋白质”)或化学前体之抗体蛋白质的制备物被视为“基本上无”。在其它实施方案中,40%、30%、20%、10%,更优选 5% (以干重计) 之非抗体蛋白质或化学前体被视为基本上无。当抗体蛋白质或其生物活性部分系以重组方法制造时,其优选基本上无培养基,即,其中存在之培养基少于蛋白质制备物之体积或质量的约 30%、20%,更优选少于约 10%,而以少于约 5% 最佳。此文称为“重组的”蛋白质或多肽为经由表达重组核酸所产生之蛋白质或多肽。蛋白质可以通过标准方法(包括,例如,离子交换和亲和层析)纯化以提供制备物,其中特定蛋白质相对于其他蛋白质或者相对于其他生物活性组分为至少 5、10、20、25、50、75、80、90、95、98、99% 纯。

[0104] 此文所使用之“抗体”一词包括完整抗体,抗体片段,如:Fab、F(ab')₂Fd、dAb 和 scFv 片段,以及在其恒定和 / 或可变区曾发生突变(如:产生嵌合型、部分人源化或完全人源化之抗体之突变,及制造具有所需特性,如:增强之 IL-13 结合和 / 或降低之 FcR 结合的抗体的突变)之完整抗体和片段。可包括在本发明范围内之抗体的先决条件为该抗体特异结合 IL-13、干扰功能性 IL-13 传讯复合体之形成及中和或抑制一种或多种与 IL-13 相关之活性。示例性抗体特异结合 IL-13 并且可以例如,干扰功能性 IL-13 信号传递复合体的形成,和 / 或中和或抑制一种或多种 IL-13 相关的活性。

[0105] 本文描述的抗体可以有效地为人的。“有效地为人的”抗体是包括足够数目的人氨基酸位置的抗体,从而该抗体在正常人体中不引起免疫原性应答。优选地,该蛋白质不引起中和性抗体应答,例如,人抗鼠抗体(HAMA)应答。HAMA 在许多情况下是有问题的,例如,如果希望反复施用抗体,例如,在慢性或者复发性疾病状况的治疗中。HAMA 应答可以使得反复抗体施用由于抗体从血清清除加快(见例如, Saleh et al., Cancer Immunol. Immunother., 32:180-190 (1990)) 还因为潜在的变应性反应(见,例如, LoBuglio et al., Hybridoma, 5:5117-5123 (1986)) 而可能变得无效。

[0106] 保守替代通常包括将一个氨基酸用具有相似特征的氨基酸替代,例如,在下面组中的替代:缬氨酸、甘氨酸;甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸;天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸;赖氨酸、精氨酸;和苯丙氨酸、酪氨酸。

[0107] 抗体(亦称为免疫球蛋白)通常为由二个各约 25kDa 之轻(L)链和二个各约 50kDa 之重(H)链所组成的四聚体糖基化蛋白质。在抗体中可发现二种类型之轻链,称为 λ 和 κ。根据重链恒定区之氨基酸序列,可将免疫球蛋白分为五种主要类别:A、D、E、G 和 M,且这些中有数种可进一步分为亚类(同种型),如:IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁ 和 IgA₂。各轻链包括一个 N 端可变(V)结构域(VL)和一个恒定(C)结构域(CL)。各重链包括一个 N 端 V 结构域(VH)、三个或四个 C 结构域(CHs)和一个铰链区。最接近 VH 之 CH 结构域称为 CH1。由四个具有经相对保留之序列的区域构成 VH 和 VL 结构域,所述区域称为构架区(FR1、FR2、FR3 和 FR4),其形成三个具高变序列之区域(互补性决定区域,CDR)的支架。该 CDR 包含负责该抗体与抗原之特殊相互作用的大部分残基。CDR 指 CDR1、CDR2 和 CDR3。因此,在重链上之 CDR 成分称为 H1、H2 和 H3,而在轻链上之 CDR 成分称为 L1、L2 和 L3。CDR3 为抗体结合部位内之分子多样性的最大来源。例如:H3 可短如 2 个氨基酸残基或超过 26 个氨基酸。不同类别之免疫球蛋白的亚基结构和三维构型为本领域所熟知。对于抗体结构的综述,

见 Antibodies :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988。本领域技术人员认识到各亚基结构,如 :CH、VH、CL、VL、CDR、FR 结构包含活性片段,如 :结合抗原之 VH、VL 或 CDR 亚基的部分,即抗原结合片段,或者,如 :结合和 / 或活化,如 :Fc 受体和 / 或补体的 CH 亚基的部分。CDR 通常指 Kabat CDR, 如 Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat et al 描述。表征抗原结合部位的另一种标准是参考如 Chothia 描述的高变环。见,例如, Chothia, D. et al. (1992) J. Mol. Biol. 227 :799-817; 和 Tomlinson et al. (1995) EMBO J. 14 :4628-4638。再一种标准是 Oxford Molecular 的 AbM 抗体建模软件所用的 AbM 定义。一般见例如, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In :Antibody Engineering Lab Manual (Ed. :Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg)。关于 Kabat CDR 描述的实施方案可以备选地用关于 Chothia 高变环或者 AbM 定义的环的相似描述的关系来实现。

[0108] 包含在抗体之 " 抗原结合片段 " 一词内的结合片段的实例包括 : (i) Fab 片段, 其为由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域所组成之单价片段; (ii) $F(ab')_2$ 片段, 其为包含在铰链区由二硫桥连接之二个 Fab 片段的二价片段; (iii) Fd 片段, 其系由 VH 和 CH1 结构域所组成; (iv) Fv 片段, 其系由抗体单臂之 VL 和 VH 结构域所组成; (v) dAb 片段 (Ward et al. (1989) Nature 341 :544-46), 其系由 VH 结构域所组成; 以及 (vi) 经分离之互补性决定区域 (CDR)。还可以使用 Camelid 抗体, 和 Camelized 抗体。此类抗体例如可以包括来自仅一种本文描述的可变结构域的 CDR。再者, 虽然 Fv 片段的二个结构域, VL 和 VH 系由分开之基因编码, 但其可利用重组方法藉由合成之接头来连结, 该接头可使 VL 和 VH 区配对形成单价分子, 而为单一蛋白链 (称为单链 Fv (scFv); 见, 如 :Bird et al. (1988) Science 242 :423-26; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85 :5879-83)。这类单链抗体亦包含在抗体之 " 抗原结合片段 " 一词内。利用本领域技术人员所已知之常规技术来取得这些抗体片段, 并评估以可与完整抗体以相同方式发挥功能的片段。

[0109] 在天然系统中, 抗体多样性系利用编码可变区之多种种系基因和多种不同之体细胞事件产生。体细胞事件包括将具有多样性 (D) 之可变基因节段重组, 并将基因节段连接 (J), 以得到完整的 VH 区, 并重组可变并连接基因节段得到完整 VL 区。重组过程本身可以是不精确的, 造成 V(D)J 接点处损失或加入氨基酸。这些多样性之机制系在暴露于抗原前在发育的 B 细胞中发生。抗原性刺激后, 在 B 细胞中表达的抗体基因会经历体细胞突变。根据种系基因节段之估计数目、这些基因节段的随机重组, 和随机 VH-VL 配对, 可以产生高达 1.6×10^7 种不同抗体 (Fundamental Immunology, 3rd ed. (1993), ed. Paul, Raven Press, New York, NY)。当考虑其它造成抗体多样性之过程 (如 : 体细胞突变) 时, 则认为可产生至多 1×10^{10} 种不同抗体 (Immunoglobulin Genes, 2nd ed. (1995), eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, CA)。由于涉及产生抗体多样性之很多过程, 因此, 独立衍生出之具相同抗原特异性的单克隆抗体似乎不太可能具有相同之氨基酸序列。

[0110] 因此, 本发明提供结合 IL-13, 并干扰功能性 IL-13 信号传递复合体形成之抗体及其抗原结合片段。此文所描述之抗原结合片段 (如 :包含 CDR 之结构) 通常为抗体重链或轻链序列或其活性片段, 其中该 CDR 系位于对应于天然产生之 VH 和 VL 的 CDR 的位置处。免疫球蛋白可变结构域之结构和位置可依 Sequences of Proteins of Immunological

Interest, USDepartment of Health and Human Services (1991), eds. Kabat et al 中之描述来测定。

[0111] 此文所公开之抗体分子 (包括抗原结合片段), 即, 结合 IL-13, 并干扰功能性 IL-13 信号传递复合体形成之抗体分子包括, 但不限于: 鼠单克隆抗体, mAb13.2, 及其变体, 特别是嵌合变体 ch13.2、部分人源化变体 h13.2v1 及完全人源化变体 h13.2v2 和 h13.2v3。这些抗体分子可用于预防或治疗哮喘 (变应性和非变应性二者), 以及与哮喘相关之病理。mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 和 h13.2v3 之轻链可变区的氨基酸序列分别列于 SEQ ID NO:9、10、11、12 和 35 中。mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 和 h13.2v3 之重链可变区的氨基酸序列分别列于 SEQ ID NO:13、14、15、16 和 36 中。mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 和 h13.2v3 之可变轻链中的三个互补性决定区域 (CDR) 的氨基酸序列列于 SEQ ID NO:19、20 和 21 中。mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 和 h13.2v3 之可变重链中的三个 CDR 的氨基酸序列列于 SEQ ID NO:22、23 和 24 中。

[0112] 如上述, CDR 包含大部分负责与抗原特异相互作用的残基, 且其包含在 VH 和 VL 结构域中, 即, 分别为重链可变区和轻链可变区。抗体包含至少一 CDR, 其包含选自 SEQ ID NO:19-24 中所列之氨基酸序列的氨基酸序列, 或者所选残基, 尤其是来自此类 CDR 的 IL-13 接触残基。此类抗体还可以结合 IL-13, 并例如干扰功能性 IL-13 信号传递复合体的形成。此文所描述之 CDR 的活性片段的氨基酸序列, 即最小核心 CDR 序列列于 SEQ ID NO:25-30 中, 并公开于表 1 中。抗体可包括 VL 链的一个或多个 CDR, 如 SEQ ID NOs:19-21 或 SEQ ID NOs:25-27 中给出。抗体可包括 VH 链的一个或多个 CDR, 如 SEQ ID NO:22-24 或 SEQ ID NO:28-30 中给出。另外, 抗体可包括 VL 和 VH 链之一或多个 CDR, 其具有选自 SEQID NO:19-30 中所列之氨基酸序列的氨基酸序列。如所示, X 可以是任一氨基酸, 例如, 非半胱氨酸氨基酸, 或者与表 1 的左手列中对应位置上的氨基酸具有相似电荷、疏水性和 / 或侧链长度的氨基酸。

[0113] 表 1. 示例性 CDR

[0114]

CDR 序列	最小核心 CDR 序列
轻链 CDR1 (L1) SEQ ID NO:19 24-KASESVDNYGKSLMH-381	SEQ ID NO:25 24-xxxxxxNYxKxxxx-38
轻链 CDR2 (L2) SEQ ID NO:20 54-RASNLES-60	SEQ ID NO:26 54-Rxxxxxx-60
轻链 CDR3 (L3) SEQ ID NO:21 93-QQSNEDPWT-101	SEQ ID NO:27 93-xxxNxDxWx-101
重链 CDR1 (H1) SEQ ID NO:22 3-SYAMS-35 ²	SEQ ID NO:28 31-SxAxx-35
重链 CDR2 (H2)	

[0115]

SEQ ID NO:2350-SISSLGGNTYYYPDSVKKG-65	SEQ ID NO:2950-SxSSxxxxYxxxxxx-65
重链 CDR3 (H3) SEQ ID NO:2498-LDGYYFGFAY-107	SEQ ID NO:3098-LDGYYFxxxx-107

[0116] ¹VL CDR 之编号系根据如图 30 中之线性序列编号方案。

[0117] ²VH CDR 之编号系根据如图 29 中之线性序列编号方案。

[0118] 亦如上述, 抗原结合片段可以为 Fv 片段, 其包括 VH 和 VL 结构域。因此, mAb13.3、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 或 h13.2v3 之 Fv 片段可构成此文所描述之抗体。它结合 IL-13, 并干扰功能性 IL-13 信号传递复合体形成。其他片段包括 mAb13.3、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 或 h13.2v3 抗体或者包括具有选自 SEQ ID NO:19-30 中所列之氨基酸序列的氨基酸序列的一或多个 CDR 的抗体的 Fv 片段, 如: scFv 片段、Fab 片段和 F(ab')₂ 片段。

[0119] 这类抗体分子可藉由本领域技术人员所已知的方法产生。例如：可根据已知方法经由产生杂交瘤来制备单克隆抗体。然后，利用标准方法，诸如：酶联免疫吸附测定 (ELISA) 和表面等离振子共振 (BiacoreTM) 分析筛选以此方式形成之杂交瘤，以鉴定可产生能特异结合 IL-13，并干扰功能性 IL-13 信号传递复合体形成，且中和一种或多种 IL-13 相关活性的抗体的一或多个杂交瘤。重组之 IL-13、天然产生之 IL-13 (即，IL-13 的经加工的成熟形式)、其任一变体和 IL-13 之抗原肽片段也可作为免疫原。

[0120] IL-13 之抗原肽片段可包含至少 7 个连续氨基酸残基且包含一表位，从而，针对该肽产生的抗体与 IL-13 形成特异免疫复合体。优选地，该抗原肽包含至少 10 个氨基酸残基，更优选至少 15 个氨基酸残基，甚至更优选至少 20 个氨基酸残基，最优选至少 30 个氨基酸残基。另外，优选该 IL-13 之抗原肽片段包含 IL-13 受体结合部位或 IL-4 受体结合部位。

[0121] 另一种制备分泌单克隆抗体之杂交瘤的备选方法为：以 IL-13 (包括其 变体和 / 或部分) 筛选重组的组合免疫球蛋白文库 (如：抗体噬菌体展示文库)，来分离出结合 IL-13 之免疫球蛋白文库成员，以鉴定并分离单克隆抗体。用于产生和筛选噬菌体展示文库的技术和市售的套药包为本领域技术人员所已知。另外，特别适于用来产生和筛选展示的抗体的方法和试剂的实例包括那些描述于 US5, 658, 727、US5, 667, 988 和 US5, 885, 793 中者。

[0122] 此文所描述之多克隆血清和抗体可经由下述方法产生：以 IL-13、其变体和 / 或部分将合适之个体进行免疫。在经免疫之个体中的抗体效价可利用固定之 IL-13 或其它标记蛋白质 (如：FLAG)，藉由标准技术，诸如：酶联免疫吸附测定 (ELISA) 随事件监测。可将抗体从动物或培养基中分离出来。多种方法可用于纯化抗体，包括公知的技术，如使用蛋白 A 层析得到 IgG 级分。

[0123] 某些实施方案包含 mAb13. 2、ch13. 2、h13. 2v1、h13. 2v2 或 h13. 2v3 之 Fv 片段的 VH 和 / 或 VL 结构域。本发明抗体之片段，如：Fab、F(ab')₂、Fd 和 dAb 片段可通过切割抗体或者重组工程化来制得。例如：免疫活性之 Fab 和 F(ab')₂ 片段可经由以酶，如：胃蛋白酶处理抗体来产生。

[0124] 其它实施方案包含这些 VH 和 VL 结构域中之任一结构域的一或多个互补性决定区域 (CDR)，如 SEQ ID NO :19-30 给出。一个实施方案中包含 mAb13. 2、ch13. 2、h13. 2v1、h13. 2v2 或 h13. 2v3 之 VH 结构域的 H3 片段。

[0125] 在某些实施方案中可将此文所描述之 VH 和 VL 结构域种系化，即：这些结构域之构架区 (FRs) 可利用常规分子生物学技术改变，以在一个或多个位置 (例如，构架位置的至少 70、80、85、90、95、97、98 或 99%) 匹配人种系基因或者人种系基因产物之共有氨基酸序列。在其它实施方案中，该构架序列保持与种系不同。

[0126] 人种系序列 例如，公开在 Tomlinson, I. A. et al. (1992) J. Mol. Biol. 227 : 776-798 ;Cook, G. P. et al. (1995) Immunol. Today Vol. 16(5) :237-242 ;Chothia, D. et al. (1992) J. Mol. Biol. 227 :799-817 ;and Tomlinson et al. (1995) EMBOJ. 14 :4628-4638 中。V BASE 目录提供了人免疫球蛋白可变区序列的详尽目录 (由 Tomlinson, I. A. 等人编撰，MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK)。这些序列可用作例如构架区和 CDR 的人序列的来源。还可以使用共有人构架区，如 US6, 300, 064 中描述。

[0127] 另外，此文所描述之包含人和非人部分的嵌合型、人源化的及单链抗体可利用标

准重组 DNA 技术 (如实施例中详细描述) 来产生。人源化抗体亦可利用表达人重和轻链基因, 但无法表达内源小鼠免疫球蛋白重和轻链基因的转基因小鼠来产生。

[0128] 另外, 此文所描述之抗体亦包括那些结合 IL-13, 并干扰功能性 IL-13 信号传递复合体形成, 且在重和轻链恒定区具有突变之抗体。有时, 需令恒定区之某些片段发生突变及失活。例如: 可以在重链恒定区中发生突变以产生对 Fc 受体 (FcR) 和 / 或补体之结合力降低的抗体; 这类突变为本领域公知。SEQ ID NO:17 中提供一种在 IgG 之重链恒定区的氨基酸序列上发生的这类突变的实例。CL 和 CH 亚基的某些活性片段 (例如, CH1) 相互共价连接。另一方面提供了得到对 IL-13 的结构域特异的抗体抗原结合结构域, 其帮助形成功能性的 IL-13 信号传递复合体。

[0129] 示例性抗体可以包括如 SEQ ID NO:9、10、11、12 或 35 给出的 VL 链的序列, 和 / 或如 SEQ ID NO:13、14、15、16 或 36 中给出的 VH 链的序列, 而且还可以包括这些序列的保留抗原结合能力的变体。这类变体可利用本领域公知之技术从所提供之序列衍生。可在 FR 或 CDR 中进行氨基酸替代、缺失或加入。虽然在构架区中所设计之变化通常系用来提高抗体稳定性并降低免疫原性, 但 CDR 中之变化通常系设计成用来增加抗体对其靶标的亲和力。这类增加亲和力之改变通常系凭经验决定, 并经由改变 CDR 区及测试该抗体来进行。这类改变可根据 Antibody Engineering, 2nd. ed. (1995), ed. Borrebaeck, Oxford University Press 中所描述之方法产生。

[0130] 用于产生 VH 结构域 (其为本文所列出之 VH 结构域的氨基酸序列变体) 的方法包含下述步骤: 在目前公开之 VH 结构域的氨基酸序列中加入、缺失、替代或插入一或多个氨基酸, 任选将所提供之 VH 结构域和一或多个 VL 结构域组合, 再测试该 VH 结构域或 VH/VL 之组合于特异结合 IL-13 方面之能力, 并 (优选地) 测试这类抗原 - 结合结构域于调节一种或多种与 IL-13 相关之活性的能力。VL 结构域可具有大体上如此处所列者之氨基酸序列。类似方法可用于其中将本文所公开之 VL 结构域的一种或多种序列变体与一种或多种 VH 结构域组合的情况下。

[0131] 本发明另一方面提供制备特异结合 IL-13 之抗原结合片段的方法, 此方法包括: (a) 提供编码 VH 结构域之核酸的起始的集库 (repertoire), 该 VH 结构域或者包括一将被替代之 CDR3, 或者缺少 CDR3 编码区; (b) 将所述集库与编码包含 SEQ ID NO:24 之活性片段的供体 CDR 的供体核酸 (如: 编码 SEQ ID NO:30 中所列之氨基酸序列的供体核酸) 组合, 如此, 将该供体核酸插入集库中之 CDR3 区, 以提供编码 VH 结构域之核酸的产品集库; (c) 表达产品集库的核酸; (d) 选出对 IL-13 特异的特异性抗体或抗原结合片段; 及 (e) 回收该特异性抗体或抗原结合片段或编码它的核酸。

[0132] 在另一个实施方案中, 可使用类似之方法, 其中将本文描述的 VLCDR3 (即 L3) 与编码 VL 结构域 (其包括一将被替代之 CDR3 或者缺少 CDR3 编码区) 之核酸的集库组合。本文描述的 CDR (如: CDR3) 的编码序列可利用重组 DNA 技术引入缺少 CDR (如: CDR3) 之可变结构域的集库中。例如: Marks 等人 (Bio/Technology (1992) 10:779-83) 描述产生抗体可变结构域之集库的方法, 其中系使用针对或邻接可变结构域之 5' 端的共有引物结合用于人 VH 基因之第三个构架区的共有引物, 以提供缺少 CDR3 之 VH 可变结构域的集库。此集库可与特定抗体之 CDR3 组合。利用类似技术, 本发明之从 CDR3 衍生的序列可与缺少 CDR3 之 VH 或 VL 结构域进行改组, 该改组之完整 VH 或 VL 结构域可与同源之 VH 或 VL 结构域组合,

以提供特殊之抗原结合片段。然后,可在合适之宿主系统(如:W092/01047中之噬菌体展示系统)中展示该集库,以选出合适之抗原结合片段。Stemmer (Nature (1994) 370 :389-91) 中亦公开类似之改组或组合技术。另一种备选方法系令一或多个选定之 VH 和 / 或 VL 基因进行随机诱变,以在整个可变结构域内产生突变,而产生改变的 VH 或 VL 区。见,如, Gram et al. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. (1992) 89 :3576-80。

[0133] 另一种可使用之方法为 VH 或 VL 基因之 CDR 区的定向诱变。这类技术公开于,如:Barbas et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. (1994) 91 :3809-13) 和 Schier et al. (J. Mol. Biol. (1996) 263 :551-67) 中。类似地,可将一或多个,或所有三个 CDR 移植入 VH 或 VL 结构域之集库,或甚至一些其他支架(如纤连蛋白结构域)。对所得蛋白质评估结合 IL-13 的能力。

[0134] 在一个实施方案中,经由,如:诱变来修饰结合靶标之结合蛋白质,以提供经修饰之结合蛋白质的库。然后,评估该经修饰之结合蛋白质以鉴定具有改变之功能性质(如:改良之结合力,改良之稳定性,延长在体内之稳定性)的一种或多种经改变之结合蛋白质。在一种实施方法中,使用展示文库技术来选择或筛选经修饰之结合蛋白质的库。然后,从第二个文库鉴定(如:使用较高之严格性或更竞争之结合及清洗条件)出具较高亲和力之结合蛋白质。亦可使用其它筛选技术。

[0135] 在一些实施方案中,该诱变靶定已知或可能在结合界面之区域。例如:若鉴定出之结合蛋白质为抗体,则可将诱变针对如此文所描述之重或轻链的 CDR 区。再者,诱变可针对靠近或邻接 CDR 之构架区,如:尤其是在 CDR 接点之 10、5 或 3 个氨基酸内的构架区。在抗体之情况下,亦可将诱变局限于,如:一或更少之 CDR,以进行逐步改良。

[0136] 在一个实施方案中,使用诱变来使抗体更类似于一种或多种种系序列。一种示例之种系化方法可包括:鉴定类似于(如:在特定数据库中最类似)该经分离之抗体的序列的一种或多种种系序列。然后,可在经分离之抗体中,以增量或组合或以此二种方式产生突变(在氨基酸水平上)。例如:可产生一种核酸文库,其中包括编码一些或所有可能之种系突变的序列。然后,评估突变之抗体,如:鉴定那些相对于该分离出之抗体而言具有一种或多种额外之种系残基,且仍可用(如:具功能性活性)的抗体。在一个实施方案中,将尽可能多之种系残基引入分离出之抗体中。

[0137] 在一个实施方案中,使用诱变来将一或多个种系残基替代或插入 CDR 区中。例如:种系 CDR 残基可来自类似(如:最类似)于被修饰之可变区的种系序列。在诱变之后可评估抗体之活性(如:结合或其它功能性活性),以决定该一个或多个种系残基是否为可耐受之残基。在构架区中亦可进行类似之诱变。

[0138] 选择种系序列时可以不同方式进行。例如:若一种系序列符合选择性或类似性之预定标准,如:至少达某种百分比之同一性,如:至少 75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 99.5% 之同一性,则可将其选出。选择时可使用至少 2、3、5 或 10 种种系序列来进行。在 CDR1 和 CDR2 的情况下,鉴定类似之种系序列时可包括选择一种这类序列。在 CDR3 的情况下,鉴定类似之种系序列时可包括选择一种这类序列,但可包括使用二种分别造就氨基 - 端部分和羧基 - 端部分之种系序列。在其它实行方法,使用超过一或二种种系序列,如:以形成共有序列。

[0139] 在一个实施方案中,抗体或其片段所具有之 CDR 序列与此文所描述之抗体的 CDR

序列仅有非实质之差异。非实质之差异包括次要之氨基酸改变,诸如:在 CDR (如:Chothia 或 Kabat CDR) 序列中之任一典型的 5-7 个氨基酸中有 1 或 2 个氨基酸替代。典型之情况为,氨基酸系被具有类似之电荷、疏水性或立体化学特征之相关氨基酸所替代。这类替代系在技术人员的一般技术范围内。不似在 CDR 中之情况,在结构构架区 (FR) 内可有更实质之改变,但不会对抗体之结合性质有不利影响。FR 之改变包括,但不限于:将从非人来源之构架人源化或将某些对抗原接触而言重要或用来稳定结合部位之构架残基进行工程化,如:改变恒定区之类别或亚类,改变可能修改效应子功能 (如:Fc 受体结合) 之特定氨基酸残基 (Lund et al. (1991) J. Immun. 147 :2657-62; Morgan et al. (1995) Immunology 86 :319-24), 或改变衍生该恒定区之物种。抗体可在重链之 CH2 区中具有能降低或改变效应子功能 (如:Fc 受体结合及补体活化) 之突变。例如:抗体可具有如美国专利号 5,624,827 和 5,648,260 中所描述之突变。例如:在 IgG1 或 IgG2 重链中,可产生使其相似于 SEQ ID NO :17 中所列之氨基酸序列的这类突变。抗体亦可具有可稳定介于免疫球蛋白之二个重链间的二硫键的突变,如:本领域中所公开之在 IgG4 绞链区中的突变 (如:Angal et al. (1993) Mol, Immunol 30 :105-08)。

[0140] IL-13 结合蛋白质可为完整抗体、抗体片段 (如:Fab、F(ab')₂、Fd、dAb 及 scFv 片段) 和曾在其恒定和 / 或可变区发生突变 (如:用来产生嵌合型、部分人源化或完全人源化的抗体,以及用来产生具有所需特性,如:增强 IL-13 结合力和 / 或降低 FcR 结合力之突变) 之完整抗体和片段的形式。

[0141] 在一些实施方案中,免疫球蛋白可变结构域之实质部分可包含至少一 CDR 区及,任选地,其来自如此文所提出之可变区的间插构架区。该部分亦包括至少约 50、60、70、80、85、87、88、90、92、94、95、96、97、98% 之 FR1 或 FR4 或此二者。例如,可以为连续或者非连续的该部分可以包括 FR1 的 C- 末端 50% 和 FR4 的 C- 末端 50%。在可变结构域之实质部分的 N- 端或 C- 端的其它残基可为那些在正常情况下不会与天然产生之可变结构域结合者。例如:藉由重组 DNA 技术构建本发明的特定抗原结合片段可将由引入之接头所编码之 N- 或 C- 端残基引入其中以方便克隆或其它操作步骤。其它操作步骤包括:引入接头以将本文描述之可变结构域连接其它蛋白质序列,包括:免疫球蛋白重链、其它可变结构域 (如:双抗体之制备中) 或如下列详述之蛋白质标记。

[0142] 虽然在实施例中所说明之实施方案包含 VH 和 VL 结构域之“匹配”对,但本发明亦包含含有从 VH 或 VL 结构域 (尤其是 VH 结构域) 序列衍生之单一可变结构域的结合片段。在任一种单链特异性结合结构域的情况下,可使用这些结构域来筛选可形成能与 IL-13 结合之二 - 结构域特异性抗原 - 结合结构域的互补结构域。此可利用称为分级双重组合方法 (hierarchical dual combinatorial method) (如 WO92/01047 中所公开者) 的噬菌体展示筛选法来实现,此方法中使用包含 H 或 L 链克隆之个别菌落来感染编码另一链 (L 或 H) 之克隆的完整文库,再根据噬菌体展示技术 (如描述于该参考资料中者) 来选择所产生之二 - 链特异性抗原 - 结合结构域。此技术亦公开于如上述之 Marks, 等人的著作中。抗体可藉由化学方法与放射性核素、药物、大分子或其它活性剂缀合,或可制成包含一或多个本文描述之 CDR 的融合蛋白。

[0143] 抗体融合蛋白中包含 VH-VL 对,其中这些链的其中之一 (通常为 VH) 和另一蛋白质合成为单一多肽链。这些产物形式与抗体之差异在于其通常 具有额外之功能元件:如,

小分子之活性部分或该经缀合或融合之大分子的主要分子结构特性。

[0144] 除了上述内容中所概述之氨基酸变化外,可将该抗体糖基化、聚乙二醇化或连接白蛋白或非蛋白质聚合物。例如:可将目前公开之抗体依美国专利号 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 或 4,179,337 中所提出之方法连接多种不同之非蛋白质聚合物的其中一种,如:聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯类。例如:抗体可经由共价缀合聚合物来进行化学修饰,以增加其循环半寿期。示例性之聚合物及将其与肽连接之方法亦显示于美国专利号 4,766,106; 4,179,337; 4,495,285 和 4,609,546 中。

[0145] 在其它实施方案中,该抗体可经修饰以具有改变之糖基化模式(即,从原始或天然之糖基化模式改变)。此处所使用之“改变”意指有一或多个碳水化合物部分缺失和/或有一或多个糖基化位点加入原始抗体。将糖基化位点加入目前所公开之抗体中的程序经由改变氨基酸序列以使其包含糖基化位点共有序列来实现;这类技术为本领域公知。另一种增加抗体上之碳水化合物部分的数目的方法为将糖昔以化学或酶之方法偶联至抗体之氨基酸残基上。这些方法描述于,如 WO87/05330 和 Aplin 和 Wriston((1981) CRCCrit. Rev. Biochem. 22:259-306) 中。去除存在于抗体上之任一碳水化合物部分的程序可依本领域中之描述以化学或酶的方法来实现(Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52; Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131 和 Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350)。见,如:美国专利 5,869,046 中所描述之经由提供补救受体结合表位来增加体内之半寿期的修饰方法。

[0146] 此文所描述之抗体亦可加上可检测之标记或功能性之标记。可检测之标记包括,如:¹³¹I 或 ⁹⁹Tc 的放射性标记,其可利用本领域所已知之常规化学方法连接在本文描述之抗体上。标记亦包括酶标记,如:辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。标记还包括化学部分,如:生物素,其可经由结合在一特定同源的可检测部分,如:经标记之抗生物素蛋白而成为可检测的。

[0147] 此文所公开之抗体的结合特征可藉任一合适的方法,包括下列方法来 测量:如下文实施例中所描述之 Biacore 分析、酶联免疫吸附测定(ELISA)、X 射线晶体学分析、序列分析和扫描诱变,以及其它本领域公知之方法。本文描述的抗体中和和/或抑制一种或多种与 IL-13 相关之活性的能力可藉下列方法测量:用于测量 IL-13 依赖性细胞系之增殖的测定法,如:TFI; 用于测量由 IL-13 介导的多肽的表达的测定法,如:分析 CD23 之表达的流式细胞分析; 用于测量下游信号传递分子,如:STAT6 之活性的测定法; 用于测试本文描述的抗体在相关动物模型,如:猕猴中预防哮喘之效力的测定法; 如下文实施例中所描述及本领域公知之其它测定法。

[0148] 目的蛋白质和靶标(如:IL-13)间之结合相互作用可利用 SPR 来进行分析。SPR 或生物分子相互作用分析(Biomolecular Interaction Analysis)(BIA) 实时检测生物特异性相互作用,而不需标记任一相互作用物。在 BIA 芯片之结合表面的质量变化(结合事件之指示)可使接近表面之光折射率改变(表面等离振子共振(SPR)之光学现象)。折射性之变化产生可检测之信号,所测量之信号可作为生物分子间之实时反应的指示。利用 SPR 之方法描述于,如:美国专利号 5,641,640; Raether (1988) Surface Plasmons SpringerVerlag; Sjolander and Urbaniczky (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345; Szabo et al. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705, 以及由 BIACore International AB(瑞典, Uppsala) 所提供

之在线资源中。

[0149] 来自 SPR 之信息可用来准确且定量地测量生物分子结合靶标之平衡解离常数 (Kd) 和动力学参数, 包括 Kon 和 Koff。这类数据可用来比较不同之生物分子。例如: 可将由选自多样性链之文库的核酸所编码的蛋白质加以比较, 以鉴定那些对靶标具有高亲和力或具有缓慢 Koff 值的个体。此信息亦可用来研究结构 - 活性关系 (SAR)。例如: 可将亲本蛋白质之成熟形式的动力学和平衡结合参数与亲本蛋白质之参数相比较。在指定位置上之变异氨基酸可经由与特定结合参数, 如: 高亲和力和缓慢 Koff 值进行相关比较来鉴定出。此信息可与结构模型 (如: 使用同源性建模、能量最小化或藉由 X 射线晶体学分析或 NMR 测定结构) 组合。结果, 可将对于蛋白质及其靶标间之物理相互作用的理解加以整理, 并用来指导其它设计过程。

[0150] 在另一方面, 此公开提供了选择可结合 IL-13 并中和和 / 或抑制一种或多种 IL-13 相关之活性的抗体的方法。此方法包括: a) 将多种抗体或抗原结合片段与 IL-13 相接触; b) 选择结合 IL-13 之抗体或抗原结合片段; c) 测试所选出之抗体或抗原结合片段阻止 IL-13 与 IL-13 受体结合之能力; d) 选出可阻止 IL-13 结合其受体之一种或多种抗体或抗原结合片段。如果希望, 可以进一步修饰一种或多种抗体。可以将一种或多种此类抗体配制为例如药物组合物。

[0151] 此文所公开之抗 -IL-13 抗体亦可用来分离、纯化和 / 或检测在上清液、细胞裂解物中或细胞表面上之 IL-13。此文所公开之抗体可用于诊断中, 以监控 IL-13 蛋白质水平来作为临床测试程序之一部分。另外, 此文所公开之抗体可用于需要中和和 / 或抑制一种或多种与 IL-13 相关之活性的治疗中, 如: 变应性和非变应性哮喘和相关病理。本公开内容亦提供与针对人 IL-13 之新颖抗体相关的新颖的分离且纯化之多核苷酸和与多肽。此文所公开之基因、多核苷酸、蛋白质和多肽包括, 但不限于: 鼠抗 IL-13 抗体 (mAb13.2) 及其变体。

[0152] 抗 -IL-13 抗体多核苷酸和多肽

[0153] 例如: 本公开内容提供纯化且分离之多核苷酸, 其编码可调节一种或多种与 IL-13 相关之活性 (如: 中和 IL-13 之生物活性) 的抗 IL-13 鼠抗体 (mAb13.2)、mAb13.2 之嵌合形式 (ch13.2)、mAb13.2 之部分人源化形式 (h13.2v1) 和 mAb13.2 之二种完全人源化形式 (h13.2v2 及 h13.2v3) 的可变区。

[0154] 该核苷酸序列可包括那些编码 mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 和 h13.2v3 之轻链可变区者, 其分别列于 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:33 中。该核苷酸序列亦可包括那些编码 mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 和 h13.2v3 之重链可变区者, 且其分别列于 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:34 中。该多核苷酸亦可包括那些在严格条件下与 SEQ ID NO:1-8、33 和 34 中所列之任一序列或其互补序列杂交的多核苷酸, 和 / 或编码保留由这些序列所编码之可变区的实质生物活性的多肽 (即活性片段) 的多核苷酸。该多核苷酸亦可包括 SEQ ID NO:1-8、33 和 34 中所列之任一序列的连续部分 (其中包含至少 21 个连续核苷酸)。表 2 概述了数种示例性多核苷酸的核苷酸序列之 SEQ ID NO。

[0155] 表 2. 本发明之多核苷酸的序列识别号码 (SEQ ID NO)

[0156]

	mAb13.2	ch13.2	h13.2v1	h13.2v2	h13.2v3
VL区	SEQ ID NO :1	SEQ ID NO :2	SEQ ID NO :3	SEQ ID NO :4	SEQ ID NO :33
VH区	SEQ ID NO ::5	SEQ ID NO :6	SEQ ID NO :7	SEQ ID NO :8	SEQ ID NO :34

[0157] mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 和 h13.2v3 之轻链可变区的氨基酸序列分别列于 SEQ ID NO :9、10、11、12 和 35 中。mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 和 h13.2v3 之重链可变区的氨基酸序列分别列于 SEQ ID NO :13、14、15、16 和 36 中。此文所公开之多肽亦包括 SEQ ID NO :9-16、35 和 36 中所列之任一序列的连续部分, 该连续部分包含至少 4 个连续氨基酸且保留这些可变区之实质生物活性 (即活性片段)。优选地, 本申请之多肽包括 SEQ ID NO :9-16、35 和 36 中所列之任一序列的包含 5-7 个氨基酸的连续部分。更优选地, 本申请之多肽包括分别保留 mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 和 h13.2v3 之实质生物活性的 SEQ ID NO :9 和 13、SEQ ID NO :10 和 14、SEQ ID NO :11 和 15、SEQ ID NO :12 和 16 及 SEQ ID NO :35 和 36 中所列之任一序列的连续部分。除了上述之多核苷酸外, 此文所公开之多核苷酸亦包括那些编码 SEQ ID NO :9-16、35 和 36 中所列之任一氨基酸序列或其连续部分的多核苷酸, 和与上述多核苷酸之差异仅来自于熟知的遗传密码的简并性的多核苷酸。表 3 中概述了数种此文所公开之多肽的氨基酸序列之 SEQ ID NO。例如: 表 3 中概述了抗体 mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 和 h13.2v3 之可变轻链 (VL)、可变重链 (VH)、恒定重链 (CH)、恒定轻链 (CL)、可变轻链之 CDR1 (L1)、可变轻链之 CDR2 (L2)、可变轻链之 CDR3 (L3)、可变重链之 CDR1 (H1)、可变重链之 CDR2 (H2) 和可变重链之 CDR3 (H3) 的氨基酸序列的 SEQ ID NO。

[0158] 表 3: 本发明之多肽的序列 ID 号码 (SEQ ID NO)

[0159]

ch13.2	h13.2v1	h13.2v2	h13.2v3
VL SEQ ID NO :9	SEQ ID NO :10	SEQ ID NO :11	SEQ ID NO :35
VH SEQ ID NO :13	SEQ ID NO :14	SEQ ID NO :15	SEQ ID NO :36
CH	SEQ ID NO :17	SEQ ID NO :17	SEQ ID NO :17
CL	SEQ ID NO :18	SEQ ID NO :18	SEQ ID NO :18
L1 SEQ ID NO :19	SEQ ID NO :19	SEQ ID NO :19	SEQ ID NO :19
L2 SEQ ID NO :20	SEQ ID NO :20	SEQ ID NO :20	SEQ ID NO :20
L3 SEQ ID NO :21	SEQ ID NO :21	SEQ ID NO :21	SEQ ID NO :21
H1 SEQ ID NO :22	SEQ ID NO :22	SEQ ID NO :22	SEQ ID NO :22
H2 SEQ ID NO :23	SEQ ID NO :23	SEQ ID NO :23	SEQ ID NO :23
H3 SEQ ID NO :24	SEQ ID NO :24	SEQ ID NO :24	SEQ ID NO :24

[0160] 此文所公开之经分离的多核苷酸可作为杂交探针和引物以鉴定和分离核酸，该核酸具有与编码所公开之多核苷酸的核酸相同或类似的序列。用于鉴定和分离核酸之杂交法包括聚合酶链反应 (PCR)、DNA 印迹杂交、原位杂交和 RNA 印迹杂交，且这些方法为本领域技术人员所熟知。

[0161] 杂交反应可在不同严格条件下进行。杂交反应之严格性包括使任一二种核酸分子

彼此杂交之困难性。优选地,各杂交之多核苷酸在降低之严格条件下与其对应之多核苷酸杂交,更优选地在严格条件下杂交,最优选地在高度严格条件下杂交。严格条件之实例显示于下列表 4 中:高度严格条件为至少与,如:条件 A-F 同样严格者;严格条件为至少与,如:条件 G-L 同样严格者;而降低之严格条件为至少与,如:条件 M-R 同样严格者。

[0162] 表 4

[0163]

严格条件	多核苷酸杂合分子	杂合分子长度 (bp) ¹	杂交温度和缓冲液 ²	洗涤温度和缓冲液 ²
A	DNA:DNA	>50	65°C ;1X SSC- 或 -42°C ;1XSSC, 50% 甲酰胺	65°C ;0.3X SSC
B	DNA:DNA	<50	T _b [*] ;1X SSC	T _b [*] ;1X SSC
C	DNA:RNA	>50	67°C ;1X SSC- 或 -45°C ;1XSSC, 50% 甲酰胺	67°C ;0.3X SSC
D	DNA:RNA	<50	T _b [*] ;1X SSC	T _b [*] ;1XSSC
E	RNA:RNA	>50	70°C ;1X SSC- 或 -50°C ;1XSSC, 50% 甲酰胺	70°C ;0.3X SSC
F	RNA:RNA	<50	T _f [*] ;1X SSC	T _f [*] ;1X SSC
G	DNA:DNA	>50	65°C ;4X SSC- 或 -42°C ;4XSSC, 50% 甲酰胺	65°C ;1X SSC
H	DNA:DNA	<50	T _h [*] ;4X SSC	T _h [*] ;4X SSC
I	DNA:RNA	>50	67°C ;4X SSC- 或 -45°C ;4XSSC, 50% 甲酰胺	67°C ;1X SSC
J	DNA:RNA	<50	T _l [*] ;4X SSC	T _l [*] ;4X SSC
K	RNA:RNA	>50	70°C ;4X SSC- 或 -50°C ;4XSSC, 50% 甲酰胺	67°C ;1X SSC
L	RNA:RNA	<50	T _l [*] ;2X SSC	T _l [*] ;2X SSC
M	DNA:DNA	>50	50°C ;4X SSC- 或 -40°C ;6X	50°C ;2X SSC

[0164] [0163]

		SSC, 50% 甲酰胺	
N	DNA:DNA	<50	T _N [*] ;6XSSC
O	DNA:RNA	>50	55°C ;4X SSC- 或 -42°C ;6X SSC, 50% 甲酰胺
P	DNA:RNA	<50	T _p [*] ;6X SSC

Q	RNA:RNA	>50	60°C ;4X SSC- 或 -45°C ;6X SSC,50% 甲酰胺	60°C ;2X SSC
R	RNA:RNA	<50	T _R [*] ;4X SSC	T _R [*] ;4X SSC

[0165] ¹ 杂合分子长度为杂交多核苷酸之预期的杂交区。当将多核苷酸与未知序列之靶标多核苷酸杂交时,该杂合分子长度即假定为杂交多核苷酸之长度。当将已知序列之多核苷酸杂交时,可将多核苷酸之序列进行比对,以确定杂合分子长度并鉴定理想之序列互补性的区域。

[0166] ²SSPE (1xSSPE 为 0.15M NaCl、10mM NaH₂PO₄ 和 1.25mM EDTA, pH7.4) 可在杂交反应和洗涤缓冲剂中替代 SSC (1xSSC 为 0.15M NaCl 和 15mM 柠檬酸钠);洗涤系在杂交完成后进行 15 分钟。

[0167] T_B^{*} - T_R^{*} :预期长度少于 50 个碱基对之杂合分子的杂交温度应为低于杂合分子之解链温度 (T_m) 5-10°C 的温度,其中 T_m 系根据下列等式测定。对于长度少于 18 个碱基对之杂合分子, T_m(°C) = 2(A+T 之碱基 #) + 4(G+C 碱基之 #)。对于长度介于 18 和 49 个碱基间之杂合分子, T_m(°C) = 81.5 + 16.6(log₁₀Na⁺) + 0.41(% G+C) - (600/N), 其中 N 为杂合分子中之碱基的数目,而 Na⁺ 为杂交缓冲剂中之钠离子浓度 (1xSSC 之 Na⁺ = 0.165M)。

[0168] 多核苷酸杂交反应之严格条件的其它实例提供于 Sambrook et al., Molecular Cloning :ALaboratory Manual, Chs. 9 & 11, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), and Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Sects. 2. 10 & 6. 3-6. 4, JohnWiley & Sons, Inc. (1995) 中,将其引入本文作为参考。

[0169] 此文所公开之经分离的多核苷酸可作为用来鉴定和分离 DNA 之杂交探针和引物,该 DNA 系具有编码公开之多核苷酸的等位基因变体的序列。等位基因变体为本文所公开之多核苷酸的天然替换形式,其编码与所公开之多核苷酸所编码的多肽相同或具有显著类似性的多肽。优选地,等位基因变体与所公开之多核苷酸具有至少 90% 之序列同一性 (更优选地,至少 95% 之同一性;最优选地,至少 99% 之同一性)。

[0170] 此文所公开之经分离的多核苷酸亦可作为用来鉴定和分离 DNA 之杂交探针和引物,该 DNA 具有与所公开之多核苷酸同源的编码多肽的序列。这些同源物为从与所公开之多肽和多核苷酸不同之物种分离出之多肽和多核苷酸,或为在相同物种之内,但与所公开之多核苷酸和多肽具有明显之序列类似性。优选地,多核苷酸同源物与所公开之多核苷酸具有至少 50%、70%、75%、80%、85%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 之序列同一性。

[0171] 此文所公开之经分离的多核苷酸亦可作为杂交探针和引物,以用来鉴定表达本发明之抗体的细胞和组织和它们发生表达的条件。

[0172] 此文所公开之经分离的多核苷酸可以可操作地连接表达控制序列,以重组产生此文所描述之多肽。另外,多核苷酸可以可操作地连接编码恒定区,例如多种不同抗体的同种型之一恒定区的核苷酸序列。例如:编码此文所公开之轻链可变区的多核苷酸 (例如:SEQ ID NO:1-4 和 33 中所列之序列的任一序列) 可以可操作地连接编码 κ 轻链 (例如:如 SEQ ID NO:18 中所列者) 或 λ 轻链之恒定区的核苷酸序列 (或其衍生物),如此,当该经连接之核苷酸表达时可产生具有可变区之完整 κ 轻链或 λ 轻链,其可特异结合 IL-13、干扰功能性 IL-13 信号传递复合体之形成及中和一种或多种与 IL-13 相关之活性。类似地,编码此

文所公开之重链可变区的多核苷酸（如：SEQ ID NO:5-8 和 34 中所列之序列的任一种）可以可操作地连接编码重链同种型，如：IgM、IgD、IgE、IgG 和 IgA 的恒定区的核苷酸序列（或其衍生物）。表达重组蛋白质之一般方法为本领域公知。这类重组蛋白质可以可溶之形式表达，以用来治疗由 IL-13 介导的信号传递所引起的病症（如：变应性和非变应性哮喘）。

[0173] 此文所公开之重组表达载体可带有额外序列，例如：调节载体在宿主细胞中复制的序列（如：复制起点）和可选择之标记基因。该可选择之标记基因可协助选择已引入载体之宿主细胞（见，如：美国专利 4,399,216、4,634,665 和 5,179,017）。例如：典型的情况为，该可选择之标记基因提供已引入载体之宿主细胞对药物（如：G418、潮霉素或氨甲蝶呤）的抗性。优选的可选择的标记基因包括二氢叶酸还原酶（DHFR）基因（供用于以氨甲蝶呤选择 / 扩增之 dhfr⁻宿主细胞）和 neo 基因（供用于 G418 选择）。

[0174] 多种细胞系为适合用于重组表达的宿主细胞。哺乳动物宿主细胞系包括，如：COS 细胞、CHO 细胞、293T 细胞、A431 细胞、3T3 细胞、CV-1 细胞、HeLa 细胞、L 细胞、BHK21 细胞、HL-60 细胞、U937 细胞、HaK 细胞、Jurkat 细胞，以及从原代组织和原代外植体的体外培养得到的细胞株。

[0175] 或者，可能低级真核生物，如：酵母（如：酵母属（Saccharomyces）、毕赤酵母属（Pichia）、克鲁维酵母属（kluyveromyces）菌株及假丝酵母属（Candida））或原核生物（如：大肠杆菌（Escherichia coli）、枯草芽孢杆菌（Bacillus subtilis）和鼠伤寒沙门菌（Salmonella typhimurium））中重组产生。在酵母菌或细菌中产生之多肽可进行修饰，如：合适位点的糖基化。

[0176] 亦可在动物细胞，如：昆虫或哺乳动物细胞中产生多肽。例如：可将编码多肽之序列插入昆虫表达载体，如：杆状病毒载体中，并用于昆虫细胞之表达系统（如：**MAXBAC**[®]套药包，Invitrogen, Carlsbad, CA）中。

[0177] 利用已知之纯化方法，如：凝胶过滤和离子交换层析将此文所公开之多肽从培养基或细胞提取物中纯化。纯化作用亦包括以已知可结合此文所公开之多肽的试剂进行亲和层析。

[0178] 或者，此文所公开之多肽亦可经由重组方法，以可促进纯化之形式表达。例如：可将多肽以与蛋白质（如：麦芽糖 - 结合蛋白（MBP），谷胱甘肽 -S- 转移酶（GST）或硫氧还蛋白（TRX））融合之形式，或与六 - 组氨酸、五 - 组氨酸或小表位标签（如：FLAG 表位）融合之形式表达。

[0179] 此文所公开之多肽亦包含那些结构上与公开之多肽不同（如：具有稍微改变之序列），但与所公开之多肽具有大体上相同之生物化学性质（如：仅功能上非必需氨基酸残基的改变）的分子。这类分子包括天然产生之等位基因变体和包含改变、替代、更换、插入或缺失之经审慎的工程化的变体。用于这类改变、替代、更换、插入或缺失之技术为本领域技术人员所熟知。

[0180] IL-13 结合剂

[0181] 还提供了结合剂，其不同于结合 IL-13 的抗体和其片段，尤其与 mAb13.2 和本文描述的其他抗体竞争结合 IL-13 的结合剂。例如，结合剂可以结合 IL-13 上 mAb13.2 所结合的相同的表位或者重叠表位。结合剂优选抑制或者中和 IL-13 活性。例如，结合剂抑制 IL-13 与 IL-4R α 的结合，并且例如，不阻止 IL-13 与 IL-13R α 1 的结合。此类结合剂可以

用于本文描述的方法,例如治疗和预防病症的方法中。本文描述的所有实施方案可以适于使用 IL-13 结合剂。

[0182] 可以通过多种方法鉴定结合剂,所述方法包括修饰本文描述的可变结构域或者将本文描述的可变结构域的一个或多个 CDR 嫁接到另一个支架上。还可以从多样化文库,例如,通过筛选鉴定结合剂。用于筛选蛋白质文库的一种方法使用噬菌体展示。蛋白质的特定区域不同并且与 IL-13 相互作用的蛋白质例如通过在固相支持体上的保留或者通过其他物理结合来鉴定。为了鉴定结合 IL-13 上与 mAb13.2 所结合的相同的表位或者重叠表位,结合剂可以通过加入 mAb13.2(或者相关抗体)来洗脱,或者可以用竞争实验以 mAb13.2(或者相关抗体)进行评估。还可以通过将文库与含有 IL-13 和 mAb13.2(或者相关抗体)的复合体接触来耗竭结合其他表位的活性剂文库。所耗竭的文库然后可以接触 IL-13 以得到结合 IL-13 但是当 IL-13 被 mAb13.2 结合时不结合 IL-13 的结合剂。还可以使用来自 IL-13 的含有 mAb13.2 表位的肽作为靶标。

[0183] 噬菌体展示描述于例如美国专利号 5,223,409;Smith(1985)Science228:1315-1317;W092/18619;W091/17271;W092/20791;W092/15679;W093/01288;W092/01047;W092/09690;W090/02809;W094/05781;Fuchs et al.(1991)Bio/Technology9:1370-1372;Hayetal.(1992)HumAntibod Hybridomas3:81-85;Huse et al.(1989)Science246:1275-1281;Griffiths et al.(1993)EMBO J12:725-734;Hawkinsetal.(1992)JMol Biol226:889-896;Clackson et al.(1991)Nature352:624-628;Grametal.(1992)PNAS89:3576-3580;Garrard et al.(1991)Bio/Technology9:1373-1377;Rebar et al.(1996)Methods Enzymol.267:129-49;and Barbas et al.(1991)PNAS88:7978-7982。酵母表面展示描述于例如 Boder 和 Wittrup(1997)Nat. Biotechnol. 15:553-557。另一种形式的展示是核糖体展示。见,例如,Mattheakis et al.(1994)Proc. Natl. Acad. Sci. USA91:9022 和 Hanes et al. (2000)Nat Biotechnol. 18:1287-92;Hanes et al. (2000)Methods Enzymol. 328:404-30 和 Schaffitzel et al. (1999) J Immunol Methods. 231(1-2):119-35。

[0184] 结合 IL-13 的结合剂可以具有一种支架蛋白的结构特征,例如,折叠的结构域。基于抗体,示例性支架结构域是“微型体”(minibody) 支架,其已经通过从单克隆抗体的重链可变结构域缺失三个 β 链设计出来 (Tramontano et al., 1994, J. Mol. Recognit. 7: 9; 和 Martin et al., 1994, TheEMBO Journal13, pp. 5303-5309)。该结构域包括 61 个残基并且可以用于呈现两个高变环,例如,本文描述的可变结构域或者本文描述的变体的一个或多个高变环。在另一种方法中,结合剂包括支架结构域,其是 V- 形结构域 (Coia et al. W099/45110)。V 形结构域指与抗体的可变重链 (VH) 或者可变轻链 (VL) 结构域具有相似结构特征的结构域。另一种支架结构域来自 tendamistatin,其是 74 个残基的 6- 链 β 折叠夹层,其由两个二硫键连接在一起 (McConnell 和 Hoess, 1995, J. Mol. Biol. 250:460)。该亲本蛋白质包括三个环。所述环可以经修饰(例如,使用本文描述的 CDR 或者高变环)或者改变,例如,以选择结合 IL-13 的结构域。W000/60070 描述了来自 CTLA-4 的天然发生的细胞外结构域的 β - 夹层结构,其用作支架。

[0185] IL-13 结合剂的再一个支架结构域是基于纤连蛋白 III 型结构域或者相关的纤连蛋白样蛋白质的结构域。纤连蛋白 III 型 (Fn3) 结构域的总体折叠与最小的功能抗体片段——抗体重链的可变区密切相关。Fn3 是 β - 夹层,类似于抗体 VH 结构域,只是 Fn3 具

有 7 个而不是 9 个 β 链。在 Fn3 的末端有 3 个环 ;BC、DE 和 FG 环的位置大概对应于抗体的 VH 结构域的 CDR1、2 和 3 的位置。Fn3 是有利的,因为它不具有二硫键。因此,不像抗体和它们的片段,Fn3 在还原条件下稳定 (见 W098/56915;W001/64942;W000/34784)。Fn3 结构域可以修饰 (例如,使用本文描述的 CDR 或者高变环) 或者改变,例如,以选择结合 IL-13 的结构域。

[0186] 其他示例性支架结构域包括 :T- 细胞受体 ;MHC 蛋白质 ; 细胞外结构域 (例如, 纤连蛋白 III 型重复、EGF 重复) ; 蛋白酶抑制剂 (例如, Kunitz 结构域、大肠杆菌素、BPTI, 等等) ; TPR 重复 ; trifoil 结构 ; 锌指结构域 ;DNA- 结合蛋白 ; 尤其是单体 DNA 结合蛋白 ;RNA 结合蛋白 ; 酶, 例如, 蛋白酶 (尤其失活的蛋白酶) 、RNA 酶 ; 蛋白伴侣, 例如, 硫氧还蛋白, 和热休克蛋白 ; 和细胞内信号结构域 (如 SH2 和 SH3 结构域) 。 US20040009530 描述了一些备选支架的实例。

[0187] 一些小支架结构域的实例包括 :Kunitz 结构域 (58 个氨基酸, 3 个二硫键) 、 Cucurbida maxima 胰蛋白酶抑制剂结构域 (31 个氨基酸, 3 个二硫键) 、与鸟苷肽相关的结构域 (14 个氨基酸, 2 个二硫键) 、与来自革兰氏阴性细菌的热稳定的肠毒素 IA 相关的结构域 (18 个氨基酸, 3 个二硫键) 、 EGF 结构域 (50 个氨基酸, 3 个二硫键) 、三环域 (60 个氨基酸, 3 个二硫键) 、真菌糖类结合结构域 (35 个氨基酸, 2 个二硫键) 、内皮素结构域 (18 个氨基酸, 2 个二硫键) 、和链球菌 G IgG 结合结构域 (35 个氨基酸, 无二硫键) 。小细胞内支架结构域的实例包括 SH2 、 SH3 和 EVH 结构域。通常, 可以使用 任一细胞内或者细胞外的模块结构域。

[0188] 用于评估支架结构域的示例性标准包括 :(1) 氨基酸序列, (2) 一些同源结构域的序列, (3) 三维结构, 和 / 或 (4) pH 、温度、盐度、有机溶剂和氧化剂浓度范围内的稳定性数据。在一个实施方案中, 支架结构域是小的、稳定的蛋白质结构域, 例如, 小于 100 、 70 、 50 、 40 或者 30 个氨基酸的蛋白质。结构域可以包括一个或多个二硫键或者可以螯合金属, 例如, 锌。

[0189] 其他结合剂可以基于肽, 例如, 氨基酸序列少于 30 、 25 、 24 、 20 、 18 、 15 或 12 个氨基酸的蛋白质。肽可以掺入大蛋白质, 但是通常掺入可以独立地结合 IL-13, 例如, 结合本文描述的表位的区域。可以通过噬菌体展示鉴定肽。

[0190] IL-13 结合剂可以包括非肽连接和其他化学修饰。例如, 部分或者所有结合剂可以作为肽模拟物 (peptidomimetic) , 例如作为拟肽合成 (见, 例如, Simon et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA89 :9367-71 和 Horwell (1995) Trends Biotechnol. 13 :132-4) 。结合剂可以包括一个或多个 (例如, 所有) 不可水解的键。许多不可水解的肽键以及用于合成含有此类键的肽的方法是本领域已知的。示例性不可水解的键包括 --[CH₂NH]— 还原的酰胺肽键、 --[COCH₂]— 酮亚甲基肽键、 --[CH(CN)NH]— (氰基亚甲基) 氨基肽键、 --[CH₂CH(OH)]— 羟基亚乙基肽键、 --[CH₂O]— 肽键, 和 --[CH₂S]— 硫代亚甲基肽键 (见, 例如美国专利号 6,172,043) 。

[0191] 药物组合物、剂量和施用方式

[0192] 抗 -IL-13 抗体 (或其他 IL-13 结合剂) 可例如与药学上可接受之载体组合而掺入药物组合物中。这类组合物可包含例如, 多种稀释剂、充填剂、盐类、缓冲剂、稳定剂、助溶剂及其它本领域公知之物质。”药学上可接受的”一词意指不会干扰活性成分之生物活性

的效力的非毒性物质。载体之特性将根据施用途径而定。

[0193] 药物组合物亦可包含其它因子,如,但不限于:如下列详述之其它抗细胞因子抗体或其它抗炎剂。这类额外之因子和/或活性剂可包含在药物组合物中,以与本文描述的抗体产生协同作用。例如:在治疗变应性哮喘时,本发明之药物组合物可包括已知可降低过敏反应之抗-IL-4抗体或药物。

[0194] 在一个实施方案中,药物组合物包括抗-IL-13抗体作为唯一的生物的(例如,唯一的蛋白质组分)或者作为唯一的生物学活性成分。例如,组合物可以包括基于w/w小于25、20、15、10、5、3、2、1、0.4或0.1%的其他蛋白质组分。

[0195] 药物组合物可为脂质体之形式,其中本发明之抗体除了可以与其它药学上可接受之载体组合外,还可以与两亲性物质组合,该两亲性物质有,如:在水溶液中时以微团、不可溶之单层、液态结晶或片层之聚集形式存在的脂质。用于脂质体制剂之合适脂质包括,但不限于:甘油单酯、甘油二酯、硫脂、溶血卵磷脂、磷酯、皂昔、胆汁酸,等。这类脂质体制剂之制备方法系在本领域之技术水平内,如:公开于美国专利号4,235,871;4,501,728;4,837,028和4,737,323中者,其内容并为本文之参考。

[0196] 此文所使用之术语“治疗有效量”意指足够显示出有意义之患者利益的药物组合物或方法中的各活性成分的总量,该患者利益为,如:减轻这类状况之症状,治愈或增加治愈速度。当用在单独施用之个别活性成分时,此术语仅指该成分。当用在组合时,此术语指产生疗效之各活性成分的合并量,不论活性成分为组合、顺序或同时施用。

[0197] 在执行此文所描述之治疗方法或用途时,将治疗有效量之可结合IL-13并干扰功能性IL-13信号传递复合体之形成(及,如:中和或抑制一种或多种与IL-13相关之活性)的抗体施用于个体,如:哺乳动物(如:人)。抗体可根据所描述之方法单独施用或与其它治疗方法组合,所述其他治疗方法为如:使用细胞因子、淋巴因子或其它造血因子,或抗炎剂之治疗。当与一种或多种治疗剂共同施用时,可将该抗体与该第二种治疗剂同时或分开,如顺序施用。若分开,如顺序施用时,主治医生将决定与其它治疗剂组合之抗体的合适施用顺序。

[0198] 施用药物组合物(如:包含结合IL-13之抗体的药物组合物)时可以多种常规方式进行,如:经口摄入、吸入或经皮、皮下或静脉内注射。以皮下施用于患者优选。

[0199] 当将治疗有效量之可结合IL-13并干扰功能性IL-13信号传递复合体形成的抗体经口施用时,该结合剂为片剂、胶囊剂、粉剂、溶液剂或酏剂之形式。当以片剂形式施用时,本发明之药物组合物可另外包含固态载体,如:明胶或辅剂。该片剂、胶囊剂和粉剂包含从约5至95%之结合剂,优选包含从约25至90%之结合剂。当以液体形式施用时,可加入液态载体,如:水、石油,动物或植物来源之油类,如:花生油、矿物油、大豆油或芝麻油,或合成之油。药物组合物之液体形式还可包含生理盐水溶液、右旋糖或其它糖之溶液,或二元醇,如:乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。当以液体形式施用时,该药物组合物可包含从约0.5至90重量%之结合剂,优选包含从约1至50重量%之结合剂。

[0200] 当将治疗有效量之可结合IL-13的抗体静脉内、皮肤或皮下注射施用时,该结合剂将为无致热原、肠胃外可接受的水溶液形式。这类肠胃外可接受,且具合适之pH值、等渗性、稳定性等的蛋白质溶液的制备方法系在本领域之技术范围内。用于静脉内、皮肤或皮下注射之优选的药物组合物除了结合剂外,还将包含等渗载体,如:氯化钠注射液、林格氏注射液、右旋糖注射液、右旋糖和氯化钠注射液、乳酸化之林格氏注射液或其它本领域所已知

之载体。药物组合物亦可包含稳定剂、防腐剂、缓冲剂、抗氧化剂或其它本领域技术人员所已知之添加剂。

[0201] 药物组合物中之本发明抗体的量可根据治疗之状况的性质和严重性,以及该患者已接受之先前治疗的性质决定。最终,主治医生将决定用来治疗各个别患者之抗体量。开始时,主治医生将施用低剂量之抗体并观察患者之反应。接着,可施用患者较大剂量之抗体直到其取得最佳疗效,此时,通常不再继续增加剂量。例如:可施用在 0.1-50mg/kg、0.5-50mg/kg、1-100mg/kg、0.5-25mg/kg、0.1-15mg/kg 或 1-8mg/kg 体重之范围内的剂量。

[0202] 吸入

[0203] 包括 IL-13 抗体或其片段之组合物可配制成可供用于吸入或其它肺部 递送方式。因此,此文所描述之化合物可经由吸入投至肺部组织来施用。除非另外指出,此文所使用之术语“肺部组织”系指任一呼吸道之组织,包括上和下呼吸道。IL-13 抗体或其片段可与一种或多种现存之用于治疗肺病的药征一起施用。

[0204] 在一个实例中,该化合物系配制成可供用于喷雾器。在一个实施方案中,可将化合物以冻干形式贮存(如:在室温)并在吸入前于溶液中重建。

[0205] 亦可利用医学装置,如:吸入器(见,如:美国专利号 6,102,035(粉剂吸入器)和 6,012,454(干燥粉剂吸入器))将化合物配制成供吸入用。该吸入器可包括可供在合适之 pH 下贮存活性化合物之分开的隔室和另一供贮存中和缓冲剂的隔室,以及供雾化前将化合物与中和缓冲剂组合的机制。在一个实施方案中,该吸入器为一种计量之剂量吸入器。

[0206] 用于将药物局部递送至肺部呼吸道的三种常用系统包括干燥粉剂吸入器(DPIs)、计量之剂量吸入器(MDIs)和喷雾器。用于最受欢迎之吸入施用方法中之 MDIs 可用来递送为溶解形式或为分散体形式之药物。典型的情况为,MDIs 包含 Freon 或其它可在装置活化时将雾化药物强力推进呼吸道之具有相当高之雾气压的推进剂。不像 MDIs,DPIs 通常完全依赖患者之吸入努力来将干燥粉剂形式之药物引入肺中。喷雾器系经由赋予液态溶液能量来形成供吸入之药物气溶胶。现亦发展出在液体换气或肺部灌洗期间利用氟化学基质将药物直接递送至肺的方法。这些及其它方法均可用来递送 IL-13 抗体或其片段。在一个实施方案中,将 IL-13 抗体或其片段与聚合物(如:可稳定或增加化合物之半寿期的聚合物)结合。

[0207] 例如:在吸入施用方面,IL-13 抗体或其片段系以气溶胶喷雾之形式从包含合适之推进剂加压容器或分配器或喷雾器中递送。该化合物可为干燥颗粒或液体形式。制备包含该化合物之颗粒时可经由,如:喷雾干燥法、将 IL-13 抗体或其片段和电荷中和剂的水溶液干燥,再从该干燥粉剂中制出颗粒,或者,可将在有机修饰剂中之水溶液干燥,再从该干燥粉剂制出颗粒。

[0208] 通常,该化合物可利用合适之推进剂,如:二氯二氟甲烷、三氯氟甲 烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适之气体从加压包装或喷雾器中以气溶胶喷雾形式递送。在加压之气溶胶的情况下,可经由提供阀门递送计量单位,以确定剂量单位。若该颗粒系经配制之颗粒时,供用于吸入器或吹入器之胶囊剂和药筒可配制成包含 IL-13 抗体或其片段及合适之粉剂基质(如:乳糖或淀粉)的粉剂混合物。除了经配制或未配制之化合物外,可将其它物质,如:100% DPPC 或其它表面活性剂与 IL-13 抗体或其片段混合,以促进递送或分散经配制或未配制之化合物。制备干燥颗粒之方法描述于,如:PCT 公布 WO02/32406 中。

[0209] IL-13 抗体或其片段可配制成供气溶胶递送之形式,如:为干燥气溶胶颗粒之形式,如此,当施用时,其可被快速吸收,且快速产生局部或全身性治疗结果。施用时可经过调整以在施用后 2 分钟、5 分钟、1 小时或 3 小时内提供可检测之活性。在一些实施方案中,甚至可更快(如:在 30 分钟,甚至 10 分钟内)取得波峰活性。IL-13 抗体或其片段可配制成具有较长之生物半寿期者(例如:与聚合物,如:PEG 结合),且可作为其它施用方式之备选方案,如:使化合物从肺部进入循环,并分布至其它器官或特定靶器官。

[0210] 在一个实施方案中,该 IL-13 抗体或其片段之递送量为可将至少 5% 质量之多肽递送至下呼吸道或肺部深处之量。肺部深处具有非常丰富之毛细血管网络。将毛细血管腔与肺泡气空间分隔开之呼吸膜非常薄且非常容易渗透。另外,沿着肺泡表面排列之液体层富含肺部表面活性剂。在其它实施方案中,将至少 2%、3%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70% 或 80% 之 IL-13 抗体或其片段的组合物递送至下呼吸道或肺部深处。将组合物递送至这些组织的其中之一,或二者时可使化合物能被有效吸收,并具有高的生物利用率。在一个实施方案中,利用,如:吸入器或喷雾器提供测量好剂量之化合物。例如:以剂量单位形式递送至少约 0.02、0.1、0.5、1、1.5、2、5、10、20、40 或 50 毫克 / 喷雾或更多之化合物。生物利用率之百分比可依下式计算:生物利用率百分比 = $(AUC_{\text{非侵入性}} / AUC_{i.v. \text{ 或 } s.c.}) \times (剂量_{i.v. \text{ 或 } s.c.} / 剂量_{\text{非侵入性}}) \times 100$ 。

[0211] 虽然并不一定需要,但可使用递送增强剂,如:表面活性剂来进一步增进肺部递送。此处所使用之“表面活性剂”系指一种具有亲水性和亲脂性部分的化合物,其可藉由与介于二种不混溶相间之界面相互作用来促进药物吸收。表面活性剂对干燥颗粒之帮助有数种原因,如:减少颗粒聚集、减少巨噬细胞之吞噬作用,等。当与肺部表面活性剂偶联时,化合物可被更有效地吸收,因表面活性剂,如:DPPC 可大大帮助化合物扩散。表面活性剂为本领域公知,包括,但不限于:磷酸甘油酯,如:磷脂酰胆碱、二棕榈酰 L- α -磷脂酰胆碱(DPPC) 和二磷脂酰甘油(DPPG);十六醇;脂肪酸;聚乙二醇(PEG);聚氧化乙烯-9-;月桂醚(ceryl ether);棕榈酸;油酸;失水山梨醇三油酸酯(SpanTM85);甘胆酸盐;表面活性肽;泊洛沙姆(poloxamer);失水山梨醇脂肪酸酯;失水山梨醇三油酸酯;四丁酚醛;及磷脂类。

[0212] 稳定及滞留

[0213] 在一个实施方案中,IL-13 抗体或其片段与可改良其在循环(如:血液、血清、淋巴、支气管肺或支气管肺泡灌洗或其它组织)中之稳定和/或滞留,如:至少 1.5、2、5、10 或 50 倍的部分以物理方式结合。例如:IL-13 抗体或其片段可与聚合物,如:大体上非抗原性之聚合物(如:聚环氧烷或聚氧化乙烯)结合。合适之聚合物大体上因重量而有所不同。可使用平均分子量在约 200 至约 35,000(或约 1,000 至约 15,000,或约 2,000 至约 12,500)间之聚合物。例如:可将 IL-13 抗体或其片段与水溶性聚合物,如:亲水性聚乙烯聚合物,如:聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮缀合。这类聚合物之非限制性列表包括:聚环氧烷均聚物,如:聚乙二醇(PEG)或聚丙二醇(PEG),聚氧化乙烯化之多元醇,其共聚物及其嵌段共聚物,其先决条件为维持该嵌段共聚物之溶解性。

[0214] 聚合物之分子量的范围至多可达约 500,000Da,优选为至少约 20,000Da,或至少约 30,000Da,或至少约 40,000Da。分子量可根据欲取得之缀合物的有效尺寸,聚合物之性质(如:结构,如:线性或有支链的)及衍生度来选择。IL-13 抗体或其片段可利用共价键与聚合物连接,例如:交叉连接至抗体之 N- 端氨基上,和在抗体之赖氨酸残基上发现的 ϵ

氨基,以及其他氨基、亚氨基、羧基、硫氢基、羟基或其它亲水性基团。可连接 IL-13 抗体或其片段之官能化的 PEG 聚合物可从,如:Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, AL) 取得。用于偶联 PEG 和其它聚合物之反应条件可根据 IL-13 抗体或其片段、所需之聚乙二醇化程度和所使用之聚合物而有所变化。选择 PEG 衍生物时所涉及的一些因子包括:所需之连接点(如:赖氨酸或半胱氨酸 R- 基团)、衍生物之水解稳定性和反应性、连接的稳定性、毒性和抗原性,分析之稳定性等。任一特定衍生物之特定使用说明可从生产商取得。

[0215] IL-13 抗体或其片段和聚合物之缀合物可藉由,如:凝胶过滤或离子交换层析(如:HPLC)与未反应之起始物质分开,缀合物之异源种类系以相同方式从彼此纯化。不同种类(如:包含一或二个 PEG 残基)亦可能藉由未反应之氨基酸的离子性质中的差异而进行分离(见,如:W096/34015)。

[0216] 抗-IL-13 抗体之治疗和预防用途

[0217] 另一方面,本公开内容描述用于在体内中和和 / 或抑制一种或多种与 IL-13 相关之活性的方法,此方法系经由施用足够抑制 IL-13 活性量的可以结合和 / 或中和 IL-13 的抗体,如本文描述的抗体来实现。亦可将此类抗体施用于需要抑制由 IL-13 介导的炎症反应的个体。这些状况包括,如:呼吸道炎症、哮喘、纤维变性、嗜伊红细胞增多和黏液生成过量。

[0218] 我们已经证明结合 IL-13 的抗体减少暴露于变应原猪蛔虫的猕猴体内的呼吸道炎症(实施例 3.6)。本申请者亦证明 IL-13 在人外周血单核细胞中对 CD23 之上调作用。因此,此文所公开之可结合 IL-13、干扰功能性 IL-13 信号传递复合体形成且可中和一种或多种与 IL-13 相关之活性的抗体可在体内减少由 IL-13 介导的炎症反应,如:治疗或预防与 IL-13 相关之病理,包括哮喘和 / 或其相关之症状,和 / 或特应性病症(如:因对 IL-13 之敏感性增加所产生之症状)。

[0219] 因此,此文所公开之抗体可用来治疗与 IL-13 相关之病症,如,选自下列之一种或多种病症:如此文所描述之呼吸病症,如:哮喘(如:变应性和非变应性哮喘(如:在幼儿中因,如:呼吸道合胞病毒(RSV)感染所引起之哮喘)),慢性阻塞性肺病(COPD)及其它涉及呼吸道炎症之状况,嗜伊红细胞增多,纤维变性和黏液生成过量,如:囊性纤维化和肺纤维化;特应性病症,如:因对 IL-13 之敏感性增加所造成之病症(如:特应性皮炎、荨麻疹、湿疹、变应性鼻炎和变应性肠胃炎);皮肤之炎症和 / 或自身免疫状况(如:特应性皮炎)、胃肠道器官之炎症和 / 或自身免疫状况(如:炎性肠病(IBD),如:溃疡性结肠炎和 / 或克隆病)、肝脏(如:硬化、肝细胞癌)之炎症和 / 或自身免疫状况,和硬皮病;肿瘤或癌症(如:软组织或实体瘤),如:白血病、成胶质细胞瘤和淋巴癌,如:霍奇金淋巴瘤;病毒感染(如:来自 HTLV-1 之感染);其它器官之纤维变性,如:肝脏纤维变性(如:由乙型和 / 或丙型肝炎病毒引起之纤维变性);及第 1 型保护性免疫反应之表达受压抑(如:在疫苗接种期间)。

[0220] 呼吸病症

[0221] IL-13 拮抗剂(如,IL-13 结合剂,本文描述的抗体或其抗原结合片段)可用来治疗或预防呼吸病症,包括,但不限于:哮喘(如:变应性和非变应性哮喘(如:在幼儿中因,如:呼吸道合胞病毒(RSV)所引起之感染);支气管炎(如:慢性支气管炎);慢性阻塞性肺病(COPD)(如:肺气肿(如:由吸烟引起之肺气肿));涉及呼吸道炎症之状况,嗜伊红细胞增多,纤维变性和黏液生成过量,如:囊性纤维化、肺纤维化和变应性鼻炎。

[0222] 哮喘可由种种状况（如：吸入变应原、出现上呼吸道或耳朵感染，等）触发 (Oppenwall (2003) Nurs. Clin. North Am. 38 :697-711)。变应性哮喘之特征为对多种不同特异和非特异刺激的呼吸道反应过度 (AHR)，血清免疫球蛋白 E (IgE) 升高，产生过量之呼吸道黏液，水肿及支气管上皮受伤 (Willis-Karp, 如上述)。当变应原诱导出立即早期呼吸道反应时即开始变应性哮喘，通常数小时后接着发生延迟性晚期呼吸道反应 (LAR) (Henderson et al. (2000) J. Immunol. 164 :1086-95)。在 LAR 期间，存在嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞通过呼吸道壁和支气管液流入 (Henderson, 等, 如上述)。肺嗜伊红细胞增多为变应性哮喘之特征，且造成呼吸上皮的大部分受损 (Li et al. (1999) J. Immunol. 162 : 2477-87)。

[0223] CD4⁺ 辅助 T (Th) 细胞对与哮喘相关之慢性炎症而言很重要 (Henderson, 等, 如上述)。数种研究显示 CD4⁺ 细胞对 2 型辅助 T 细胞 (Th2) 之定向，和随后 2 型细胞因子（如 IL-4、IL-5、IL-10 和 IL-13）之产生对导致 AHR 之变应性炎症反应而言很重要 (Tomkinson et al. (2001) J. Immunol. 166 :5792-5800, 和其中引用的参考文献)。首先，CD4⁺T 细胞在鼠模型中显示出对由变态反应引之哮喘而言为必要的。第二，产生 2 型细胞因子之 CD4⁺T 细胞不仅在这些动物模型中扩增，亦在具变应性哮喘之患者体内扩增。第三，2 型细胞因子水平在动物模型和哮喘患者的呼吸道组织中增加。第四，Th2 细胞因子涉及在变应性哮喘之鼠模型中的嗜酸性粒细胞募集方面扮演核心角色，而以过继转移之 Th2 细胞显示出与肺中之 eotaxin (一种强效之嗜酸性粒细胞化学引诱剂) 水平增加和肺部嗜伊红细胞增多相关 (Willis-Karp et al. , 如上述 ; Li et al. , 如上述)。

[0224] 用于治疗或预防哮喘之方法包括那些用于外因性哮喘（亦称为变应性哮喘或特应性哮喘）、内因性哮喘（亦称为非变应性哮喘或非特应性哮喘）或此二者之组合（其被称为混合性哮喘）的方法。外因性哮喘或变应性哮喘包括由，如：变应原（诸如：花粉、孢子、青草或杂草、宠物毛发皮屑、灰尘、螨，等）所引起或与其相关之状况。由于变应原及其它刺激物本身出现在一整年中之不同时间点，因此这些状况亦称为季节性哮喘。外因性哮喘之群体中亦包括支气管哮喘和变应性支气管肺曲霉病。

[0225] 可藉此文所描述之活性剂治疗或缓和之病症包括那些由传染物，如：病毒（如：感冒和流感病毒、呼吸道合胞病毒 (RSV)、副黏病毒、鼻病毒和流感病毒）引起之病症。RSV、鼻病毒和流感病毒感染常见于儿童，且为婴儿和幼儿之呼吸道疾病的主要原因。患有病毒细支气管炎之儿童可发展出慢性喘鸣和哮喘，其可利用此文所描述之方法治疗。还包括由运动和 / 或冷 空气在一些哮喘患者中所造成之哮喘状况。此方法可用于与暴露于烟（如：由香烟引起之烟和工业之烟），及暴露于工业和职业环境中之物质（如：来自油漆、塑料、聚氨基甲酸酯、假漆，等的烟、臭氧、有害气体、二氧化硫、氧化亚氮、烟雾，包括异氰酸盐），木头、植物或其它有机尘等有关之哮喘。此方法亦可用于与食物添加剂、防腐剂或药理学活性剂相关之哮喘事件。亦包括用来治疗、抑制或缓和称为静默哮喘或咳嗽变异哮喘之类型的哮喘。

[0226] 此文所公开之方法亦可用于治疗和缓和与胃食管反流 (GERD) 相关之哮喘，此种哮喘可刺激支气管收缩。GERD 和滞留之体分泌、压抑之咳嗽和暴露于卧室中之变应原及刺激物一起可造成哮喘状况，此状况已被统称为夜间哮喘或夜间发生的哮喘。在治疗、抑制或缓和与 GERD 相关之哮喘的方法中，使用药学有效量之如此文中所描述的 IL-13 抗剂组

合药学有效量之用于治疗 GERD 的活性剂。这些活性剂包括,但不限于:质子泵抑制剂,如:**PROTONIX®** 牌之延释泮托拉唑钠片剂、**PRILOSEC®** 牌之奥美拉唑延释胶囊剂、**ACIPHEX®** 牌之利贝拉唑钠 (rebeprazole sodium) 延释片剂或**PREVACID®** 牌之延释兰索拉唑胶囊剂。

[0227] 特应性病症及其症状

[0228] "特应性" 系指一组疾病,其中通常有发展变态反应之遗传倾向。特应性疾病之实例包括变态反应、变应性鼻炎、特应性皮炎、哮喘和花粉症。哮喘为与间歇性呼吸症状(如:支气管反应过度和可逆之气流阻塞)相关之表型异质病症。哮喘之免疫组织病理学特性包括,如:呼吸道表皮剥落、胶原沉淀于基底膜下;水肿;肥大细胞活化;及炎症细胞浸润(如:由嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润)。呼吸道炎症还可进一步造成呼吸道反应过度、气流限制、急性支气管收缩、粘液栓形成、呼吸道壁重塑和其它呼吸症状。可施用 IL-13 拮抗剂(例如,IL-13 结合剂,如本文描述的抗体或者抗原结合片段)来缓和一种或多种这些症状。

[0229] 变应性鼻炎(花粉症)之症状包括:鼻子痒、流鼻涕、打喷嚏或鼻塞,和眼睛痒。可施用 IL-13 拮抗剂来缓和一种或多种这些症状。特应性皮炎为一种影响皮肤的慢性(长期持续)疾病。关于特应性皮炎之资料可从,如:NIH 公布号 03-4272 中取得。在特应性皮炎中,皮肤可变得非常痒而导致发红、肿大、裂化、流出透明液体,最后结痂且鳞屑剥落。在许多情况中,有时疾病恶化(称为加剧或突发)然后皮肤再改善或完全无瑕(称为缓解)。特应性皮炎通常称为"湿疹",其为数种皮肤炎症类型的通称。特应性皮炎为多种湿疹类型中最常见的一种。特应性皮炎之实例包括:变应性接触性湿疹(皮炎:发红、痒、出水反应,其中皮肤与被免疫系统视为外来物之物质,如:毒常春藤或乳膏和乳剂中之某些防腐剂接触);接触性湿疹(包括发红、痒和灼烧之局部反应,其中皮肤与变应原(引起过敏之物质)或刺激剂,如:酸、清洁剂或其它化学物质接触);出汗不良性湿疹(手掌和脚底皮肤之刺激,其特征为:痒且灼烧之透明、位于深处的水泡);神经性皮肤炎(因局部发痒(如:昆虫咬)引起之头部、下肢、腕或前臂皮肤上的鳞斑,其在抓伤时被强烈刺激);钱币状湿疹(受刺激之皮肤的钱币形斑块-最常出现在手臂、背部、屁股和下肢,其可能结痂、鳞屑剥落且非常痒);脂溢性湿疹(头皮、脸,有时在身体其它部分之皮肤上的浅黄色、油性、鳞状斑块)。其它特定症状包括:停滞性皮炎、特应性褶(Dennis-Morgan 褶)、唇炎、掌纹增多、眼睑色素沉着过度(眼睑因炎症或花粉症而颜色加深)、鱼鳞癣、毛发角化症、苔藓化、丘疹和荨麻疹。可施用 IL-13 拮抗剂(例如,IL-13 结合剂,如本文描述的抗体或者抗原结合片段)来缓和一种或多种这些症状。

[0230] 用于治疗变应性鼻炎或者其他变应性病症的示例性方法可以包括在暴露于变应原,例如,季节性暴露于变应原之前,例如,变应原旺盛之前用 IL-13 拮抗剂进行最初治疗。此类治疗可以包括一次或多次剂量,例如,以常规间隔施用的剂量。

[0231] 癌症

[0232] IL-13 及其受体涉及至少一些癌症类型之发展,如:从造血细胞衍生之癌症或从脑或神经元细胞衍生之癌症(如:成胶质细胞瘤)。例如:阻断 IL-13 信号传递途径(如:经由使用可溶之 IL-13 受体或 STAT6-/- 缺失小鼠)时可分别延迟肿瘤开始和/或霍奇金淋巴瘤细胞系或转移之乳癌生长。(Trieu et al. (2004) Cancer Res. 64:3271-75;

Ostrand-Rosenberg et al. (2000) J. Immunol. 165 :6015-6019)。此文所描述之 IL-13 抗体可特异靶向表达 IL-13R α 2 之癌症 (Husain 和 Puri (2003) J. Neurooncol. 65 :37-48 ; Mintz et al. (2003) J. Neurooncol. 64 :117-23)。IL-13 拮抗剂, 如 : 抗 -IL-13 抗体和其片段可用来抑制癌细胞增殖或其它癌细胞活性。癌症系指对正常生长控制失去反应, 且相对于对应之正常细胞而言, 对其增殖之调节减少的一种或多种细胞。

[0233] 可使用 IL-13 拮抗剂 (例如, IL-13 结合剂, 如本文描述的抗体或抗原结合片段) 对抗的癌症实例包括白血病, 如 : B- 细胞慢性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病和人 T- 细胞白血病 1 型病毒 (HTLV-1) 转化之 T 细胞; 淋巴瘤, 如 : T 细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤; 成胶质细胞瘤; 胰腺癌; 肾细胞癌; 卵巢癌; 和 AIDS- 卡波西肉瘤。

[0234] 纤维变性

[0235] IL-13 拮抗剂 (例如, IL-13 结合剂, 如本文描述的抗体或抗原结合片段) 亦可用来治疗炎症和纤维变性, 如 : 肝脏纤维变性。IL-13 之产生与朝向硬化, 及可能的, 肝细胞癌的肝脏炎症 (如 : 病毒性肝炎) 之进展相关 (deLalla et al. (2004) J. Immunol. 173 : 1417-1425)。纤维变性在, 如 : 当正常组织被疤痕组织替代时发生, 通常在炎症后发生。乙型肝炎和丙型肝炎病毒二者均引起肝脏中之纤维变性反应, 此纤维变性反应可进展成硬化。接着, 硬化可进展成严重之并发症, 如 : 肝衰竭或肝细胞癌。利用 IL-13 拮抗剂, 如 : 此文所描述之抗 -IL-13 抗体阻断 IL-13 活性可减少炎症和纤维变性, 如 : 与肝病, 尤其是乙型和丙型肝炎相关之炎症、纤维变性和硬化。

[0236] 炎性肠病

[0237] 炎性肠病 (IBD) 为引起肠炎症之疾病的通称。炎性肠病之二种实例为克 隆病和溃疡性结肠炎。现已发现 IL-13/STAT6 信号传递涉及由炎症引起之小鼠平滑肌的过度收缩 (此为一种炎性肠病之模型) (Akiho et al. (2002) Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 282 :G226-232)。IL-13 拮抗剂 (例如, IL-13 结合剂, 如本文描述的抗体或抗原结合片段) 可用来治疗、预防或缓和炎性肠病或炎性肠病之一种或多种症状。

[0238] 在一个实施方案中, 本发明之抗体, 如 : 其药物组合物与可用来治疗病理学状况或病症 (如 : 变应性和炎性病症) 之治疗法, 即 : 与其它活性剂, 如 : 治疗剂组合。“组合”一词在上下文中意指大体上同时期 (同时或顺序) 给予活性剂。若连续给予时, 在开始施用第二种化合物时, 优选仍可在治疗部位检测到有效浓度之该二种化合物中的第一种。

[0239] 例如 : 组合治疗可包括将一种或多种本文描述的抗体 (即 : 结合 IL-13 并干扰功能性 IL-13 信号传递复合体形成之抗体) 与一种或多种其它治疗剂 (如 : 下文中详述之一种或多种细胞因子和生长因子抑制剂、免疫抑制剂、抗炎剂、代谢抑制剂、酶抑制剂和 / 或细胞毒性或细胞抑制剂) 共同配制和 / 或共同施用。再者, 此文所描述之一种或多种抗 -IL-13 抗体可与二或多种此文所描述之治疗剂组合使用。这类组合疗法可有利地使用较低剂量之施用的治疗剂, 以避免与多种不同之单一疗法有关的可能的毒性或并发症。再者, 此文所公开之治疗剂系作用在与 IL-13/IL-13 受体路径相异之路径上, 因此, 预期其可增进和 / 或协同 IL-13 抗体之效果。

[0240] 其它可与一种或多种 IL-13 拮抗剂, 如 : 抗 -IL-13 抗体或其片段共同施用和 / 或共同配制之优选的治疗剂包括, 但不限于下列之一种或多种治疗剂 : 吸入的类固醇; β - 激动剂, 如 : 短效或长效 β - 激动剂; 白三烯拮抗剂或白三烯受体拮抗剂; 组合药物, 诸如 :

ADVAIR®; IgE 抑制剂, 如 : 抗 -IgE 抗体 (如 : **XOLAIR**®); 磷酸二酯酶抑制剂 (如 : PDE4 抑制剂); 黄嘌呤; 抗胆碱能药物; 肥大细胞稳定剂, 如 : 色甘酸钠; IL-4 抑制剂; IL-5 抑制剂; eotaxin/CCR3 抑制剂; 和抗组胺。这类组合可用来治疗哮喘及其它呼吸病症。其它可与一种或多种抗 -IL-13 抗体或其片段共同施用和 / 或共同配制之治疗剂的实例包括下列之一种或多种治疗剂 : TNF 拮抗剂 (如 : TNF 受体之可溶性片段, 如 : p55 或 p75 人 TNF 受体或其衍生物, 如 : 75kd TNFR-IgG (75kd TNF 受体 -IgG 融合蛋白, ENBREL™); TNF 酶拮抗剂, 如 : TNF α 转化酶 (TACE) 抑制剂; 毒蕈碱性受体拮抗剂; TGF- β 拮抗剂; γ 干扰素; perfenidone; 化疗剂, 如 : 氨甲蝶呤、来氟米特或西罗莫司 (雷帕霉素) 或其类似物, 如 : CCI-779; COX2 和 cPLA2 抑制剂; NSAIDs; 免疫调节剂; p38 抑制剂, TPL-2、Mk-2 和 NF κ B 抑制剂等。

[0241] 因此, 还可以提供用来将 IL-13 抗体与一种或多种其它治疗性化合物组合施用之套药包, 或使用抗 -IL-13 抗体作为研究或治疗工具, 以测定生物样品中是否存有 IL-13 和 / 或测定其水平的套药包, 如 : ELISA 套药包。在一个实施方案中, 该套药包包含一种或多种配制在药物载体中之抗 -IL-13 抗体, 及至少一种活性剂, 如 : 配制成适当之一种或多种分开的药学制剂的治疗剂。

[0242] 疫苗制剂

[0243] IL-13 拮抗剂 (例如, IL-13 结合剂, 如本文描述的抗体或抗原结合片段) 可用来增加疫苗制剂免疫个体的效力。例如 : 可在免疫接种之前、期间和 / 或之后施用 IL-13 拮抗剂, 以增加疫苗效力。在一个实施方案中, 疫苗制剂包含一种或多种 IL-13 拮抗剂及一种抗原, 即, 免疫原。在另一个实施方案中, IL-13 拮抗剂和该免疫原系分开施用, 如 : 彼此系在 1 小时、3 小时、1 天或 2 天之内施用。

[0244] 抑制 IL-13 可提高, 如 : 细胞性疫苗, 如 : 对抗疾病 (如 : 癌症和病毒感染, 如 : 逆转录病毒感染 (如 : HIV 感染)) 之疫苗的效力。经由疫苗诱导之 CD8+ 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 可能由 CD4+T 细胞通过细胞因子 IL-13 将其下调。抑制 IL-13 显示出可增强疫苗诱导 CTL 反应 (Ahlers et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA99 :13020-10325)。IL-13 拮抗剂, 如 : 此文所描述之抗 -IL-13 抗体或其片段可与疫苗一起使用以增加疫苗效力。癌症和病毒感染 (如 : 逆转录病毒 (如 : HIV) 感染) 为可使用细胞性疫苗反应有效对抗的示例性病症。疫苗效力可经由在接种疫苗时阻断 IL-13 信号传递 来增强 (Ahlers et al. (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. USA99 :13020-25)。

[0245] 疫苗制剂可以药物组合物或治疗组合物之形成施用于个体。包含此文所描述之 IL-13 拮抗剂和抗原的药物组合物可藉由常规之混合、溶解、粒化、制备糖衣、磨细、乳化、包胶、截留或冻干过程产生。药物组合物可利用一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或佐剂来配制, 这些一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或佐剂可协助将此文所描述之抗原和拮抗剂处理成可用于制药中之制剂。适当之制剂取决于所选择之施用途径。系统性制剂包括那些设计成供注射施用, 如 : 皮下、皮内、肌内或腹膜内注射之制剂。供注射方面, 疫苗制剂可在水溶液中配制, 该水溶液优选为生理上相容之缓冲液, 如 : Hanks 液、林格液、磷酸缓冲盐水或任一其它生理盐水缓冲液。溶液可含有配制剂, 诸如 : 悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂。或者, 蛋白质可以粉剂形式提供, 供使用前以合适载体, 如 : 不含致热原之无菌水构建。

[0246] 有效剂量可先利用动物模型估计。例如：可利用本领域公知之技术在动物模型中配制剂量，以诱导免疫反应。剂量和间隔期可个别调整。例如：当作为疫苗时，可在 1-36 周之期间内施用 1 至 3 个剂量之疫苗制剂。优选地，在约 3 周至约 4 个月之期间内施用 1 或 2 个剂量，之后再定期给予加强剂量之疫苗接种。备选方案可适合个别动物。合适之剂量为当依上述方法施用时可在经免疫接种之个体内引起免疫反应，使其足够保护个体免于感染至少 4 至 12 个月的疫苗制剂的量。一般而言，一个剂量中所存在之抗原的量为约 1pg 至约 100mg/kg 宿主，通常为从约 10pg 至约 100mg，优选约 100pg 至约 1 μg。合适之剂量范围将根据注射途径和患者尺寸而有所变化，但通常为约 0.1 毫升至约 5 毫升。

[0247] 用于诊断、预后和监控病症之方法

[0248] 结合 IL-13 之蛋白质，如：此文所描述之抗体具有体外和体内诊断用途。示范之方法包括：(i) 将 IL-13 抗体施用于个体；及 (ii) 检测个体中之 IL-13 抗体。检测方法可以包括测定 IL-13 抗体在个体中的位置。另一种示范方法包括将 IL-13 抗体与样品，如：来自个体之样品接触。

[0249] 另一方面，本发明提供用于在体外（如：生物样品，如：组织、活组织检查）或体内（例如，个体中体内成像）检测是否存在 IL-13 的诊断方法。此方法包括：(i) 将样品与 IL-13 抗体接触；及 (ii) 检测 IL-13 抗体和样品间是否形成复合体。此方法亦包括将参考样品（如：对照样品）与配体接触，并测定相对于参考样品与配体间所形成之复合体而言，配体和样品间形成复合体的程度。相对于对照样品或个体，样品或个体中形成复合体的变化，如：统计上显著之变化，可表明样品中存在 IL-13。

[0250] 可将 IL-13 抗体以可检测之物质直接或间接标记，以协助检测结合或未结合之蛋白质。合适之可检测的物质包括：多种酶、辅基、荧光物质、发光物质和放射性物质。

[0251] IL-13 抗体和 IL-13 间的复合体形成可藉由测量或显示结合 IL-13 之配体或未结合之配体来检测。可使用之常规检测分析有，如：酶联免疫吸附测定 (ELISA)、放射免疫测定 (RIA) 或组织免疫组织化学。进一步标记该 IL-13 抗体时，可利用以可检测之物质标记的标准物和未标记之 IL-13 抗体，藉由竞争免疫测定来测定样品中是否存在 IL-13。

[0252] 用于诊断、预后、监控哮喘之进展的方法

[0253] 还可以通过测量生物样品中 IL-13 的水平来诊断、预后和 / 或监视哮喘和 / 或特应性病症（如：从对 IL-13 之敏感性增加所产生者）之进展的方法。尤其是，本文公开的抗体可用于分辨患者是否遭受变应性或非变应性哮喘的方法中。

[0254] 此类诊断变应性或非变应性哮喘之方法包括检测生物样品，如：血清、血浆、支气管肺泡灌洗液、痰等中之 IL-13 的改变（例如，降低或增加）。“诊断的”或“诊断”意指鉴定是否存有病理状况。诊断方法涉及藉由测定生物样品（如：来自个体（人或非人哺乳动物）之支气管肺泡灌洗液）中之 IL-13 多肽的测试量，并将此测试量与 IL-13 多肽之正常量或范围（即来自已知未患有哮喘的个体的量或范围）相比较。虽然特定诊断方法可能不提供哮喘之可靠诊断，但若该方法可提供协助诊断的确定指示时，则其满足需要。

[0255] 用于预后哮喘和 / 或特应性病症的方法包括在 mRNA 或蛋白质水平上检测 IL-13 的上调。“预后的”或“预后”意指预测病理状况之可能的发展和 / 或严重性。预后方法涉及测定来自个体之生物样品中的 IL-13 的测试量，并将此测试量与 IL-13 之预后量或范围（即来自患有不同严重性之哮喘的个体的量或范围）相比较。在测试样品中之 IL-13 的

不同量与哮喘之某些预后相一致。特定预后水平上 IL-13 的量的检测为个体提供了预后。

[0256] 本发明亦提供藉由检测 IL-13 之上调来监视哮喘和 / 或特应性病症之进程的方法。监视方法涉及测定第一次和第二次从个体取得之生物样品中的 IL-13 的测试量，并比较这些量。第一次和第二次取得之生物样品中的 IL-13 量间的变化表明哮喘和 / 或特应性病症之过程中的变化，IL-13 量减少表明哮喘缓解，而 IL-13 量增加表明哮喘和 / 或特应性病症加剧。这类监视分析亦可用来评估在接受哮喘和 / 或特应性病症治疗之患者中，特定治疗性介入的效力（如：疾病减弱和 / 或逆转）。

[0257] 可制备以荧光和发色团标记之蛋白质配体。由于抗体和其它蛋白质吸收波长至约 310nm 之光，因此应选择大体上吸收波长高于 310nm，优选高于 400nm 之荧光部分。Stryer (Science (1968) 162 :526) 和 Brand 等人 (Annual Rev. Biochem. (1972) 41 : 843-868) 描述多种合适荧光剂和发色团。蛋白质配体可藉美国专利 3,940,475、4,289,747 和 4,376,110 中所公开之常规程序以荧光发色团标记。一组具有多种上述所需性质的荧光剂为咁吨染料，其包括荧光素和罗丹明。另一组荧光化合物为萘胺。一旦以荧光团或发色团将蛋白质配体标记后，可使用其来检测（如：利用荧光显微术，诸如：共焦显微术或去褶合显微术）样品中是否存在 IL-13，及其定位。

[0258] 免疫组织化学可利用此文所描述之蛋白质配体进行。例如：在抗体方面，抗体可与标记（如纯化或表位标签）一起合成，或者，可如：经由与标记或标记 - 结合基缀合来可检测地标记。例如：可将螯合剂与抗体连接，然后，将抗体与组织学制备物，如：在显微镜载玻片上之固定的组织切片接触。在温育以进行结合后，清洗制备物以去除未结合之抗体。然后，如：利用显微镜分析制备物，以鉴定抗体是否与制备物结合。

[0259] 抗体（或其它多肽或肽）在结合时可为未经标记。结合和清洗之后，再将抗体标记，以使其成为可检测的。

[0260] 亦可将 IL-13 抗体固定在蛋白质阵列上。蛋白质阵列可作为诊断工具，如：筛选医学样品（如：经分离之细胞、血液、血清、活组织检查，等）。蛋白质阵列亦可包括其它配体，如：结合 IL-13 或其它靶分子的配体。

[0261] 用于产生多肽阵列的方法描述于，如：De Wildt et al. (2000) Nat. Biotechnol. 18 :989-994 ;Lueking et al. (1999) Anal. Biochem. 270 :103-111 ;Ge (2000) Nucleic Acids Res. 28, e3, I-VII ;MacBeath and Schreiber (2000) Science 289 : 1760-1763 ;W001/40803 和 W099/51773A1 中。用于阵列之多肽可利用市售之机器人装置 (robotic apparatus)（如：来自 Genetic MicroSystems 或 BioRobotics 者）以高速点样。阵列基质可为，如：硝酸纤维素、塑料、玻璃，如：经修饰表面之玻璃。阵列亦可包括多孔基质，如：丙烯酰胺、琼脂糖或另一聚合物。

[0262] 例如：阵列可为抗体之阵列，如：De Wildt（如上述）所描述者。可将产生蛋白质配体之细胞生长在阵列形式中的滤器上。诱导产生多肽，并将表达出之多肽固定在滤器的细胞位置处。

[0263] 可将蛋白质阵列与经标记之靶标接触以测定靶标与来自多样性链文库 (diversity strand library) 之各固定化多肽的结合程度。若靶标为未经标记的，则可使用三明治法，如：利用经标记之探针来检测未标记之靶标的结合。

[0264] 关于阵列之各位置处的结合程度的信息可以略图式贮存，如：存在计算机数据库

中。可一式两份地产生蛋白质阵列，并用来比较结合略图，如：靶标和非靶标的结合略图。因此，蛋白质阵列可用来鉴定对一种或多种分子具有所需之结合性质的多样性链文库的个别成员。

[0265] IL-13 抗体可用来标记细胞，如：在样品（如：患者样品）中之细胞。该配体亦连接（或可连接）荧光化合物。然后，利用荧光活化的细胞分选来将细胞分类（如：利用从 Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose CA 取得之分选仪；亦见美国专利号 5,627,037；5,030,002；和 5,137,809）。当细胞通过分选仪时，激光束激发荧光化合物，而检测器计数通过之细胞，并藉由检测荧光来测定荧光化合物是否连接细胞。定量并分析结合各细胞之标记的量，以表征样品。

[0266] 分选仪亦可将细胞偏转，并将与配体结合之细胞和未与配体结合之细胞分开。可将分开之细胞进行培养和 / 或表征。

[0267] 在另一个实施方案中，本发明提供用于在体内检测个体中是否存在 IL-13 的方法。此方法包括 (i) 对个体（如：患有与 IL-13 相关之病症的患者）施用缀合可检测之标记的抗 -IL-13 抗体；(ii) 将个体暴露于用来检测该可检测之标记的手段。例如：藉由 NMR 或其它 X 射线断层手段将个体进行成像分析。

[0268] 可用于诊断成像之标记的实例包括放射性标记，如： ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{32}p 、 ^{33}p 、 ^{125}I 、 ^{3}H 、 ^{14}C 、 ^{188}Rh ，荧光标记，诸如：荧光素和罗丹明，核磁共振活性标记，可被正电子成像术（" PET "）扫描器检测到之正电子发射同位素，化学发光剂，如：萤光素和酶标记，如：过氧化物酶或磷酸酶。亦可使用短程放射发射剂，如：可被短程检测器探针检测到之同位素。例如：关于涉及抗体的放射标记的技术，见 Wensel 和 Meares (1983) *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, New York 及 Colcher et al. (1986) *Meth. Enzymol.* 121 :802 816。

[0269] 经放射标记之配体可用于体外诊断试验中。以同位素标记之配体的比活性取决于放射性标记之半寿期、同位素纯度和该标记掺入该抗体之方式。

[0270] 以放射性同位素（诸如： ^{14}C 、 ^{3}H 、 ^{35}S 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{125}I 、 ^{32}p 、 ^{33}p 和 ^{131}I ）标记多肽之程序广为人知。见，如：美国专利 4,302,438；Goding, J. W. (*Monoclonal antibodies :principles and practice :production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry, and immunology* 2nd ed. London ;Orlando :academic Press, 1986. pp124 126 及其中引用的参考文献；和 A. R. Bradwell et al., " *Developments in Antibody Imaging* " , *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R. W. Baldwin et al. , (eds.) , pp6585 (Academic Press 1985) 。

[0271] 此文所描述之 IL-13 抗体可与磁共振成像 (MRI) 对比剂缀合。EP-A-0502814 中概述了一些 MRI 技术。

[0272] 这些弛豫时间常数中之差异可由对比剂增强。这类对比剂的实例包括数种磁性剂、顺磁剂（其主要改变 T1）和铁磁剂或超顺磁剂（其主要改变 T2 反应）。螯合剂（如：EDTA、DTPA 和 NTA 融合剂）可用来连接（及减少毒性）一些顺磁性物质（如： Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Gd^{3+} ）。其它对比剂可为颗粒形式，如：直径小于 10 毫米至约 10 纳米，且具有铁磁性、反铁磁性或超顺磁性。

[0273] 亦可以用含有 NMR 活性 ^{19}F 原子或多种如 Pykett ((1982) *Scientific American* 246 :

78-88) 所描述之该类原子的指示基团来标记 IL-13 抗体, 以定位和成像 IL-13 之分布。

[0274] 包含结合 IL-13 之蛋白质配体和诊断用途之使用说明的套药包亦在此文所描述之范围内, 该诊断用途系指, 如: IL-13 抗体 (如: 抗体或其抗原结合片段, 或其它多肽或肽) 于体外 (如: 样品中, 如: 来自患有与 IL-13 相关病症之患者的活组织检查或细胞), 或于体内 (如: 通过对个体成像) 检测 IL-13 的用途。此套药包还可包含至少一种额外试剂, 如: 标记或额外之诊断剂。供体内使用之配体可配制为药物组合物。

[0275] 套药包

[0276] IL-13 拮抗剂, 如: 抗-IL-13 抗体或其片段可提供于套药包中, 如: 作为套药包的组分。例如: 该套药包包括 (a) IL-13 拮抗剂, 如: 抗-IL-13 抗体或其片段, 如: 包括 IL-13 抗体或其片段的组合物, 和任选地 (b) 信息材料。此信息材料可为关于此文所描述之方法和/或 IL-13 拮抗剂, 如: 抗-IL-13 抗体或其片段于此文所描述之方法中的用途的说明性、指示性、销售或其它材料。

[0277] 此套药包之信息材料不限于其形式。在一个实施方案中, 该信息材料可包括关于该化合物之产生、化合物分子量、浓度、有效日期、产品批号或产地信息等。在一个实施方案中, 该信息材料涉及使用配体来治疗、预防、诊断、预后或者监视此文所描述之病症。

[0278] 在一个实施方案中, 该信息材料可包括以合适方式施用 IL-13 拮抗剂, 如: 抗-IL-13 抗体或其片段以进行此文所描述之方法的指示, 如: 以合适剂量、剂型或施用方式施用 (如: 此文所描述之剂量、剂型或施用方式)。在另一个实施方案中, 该信息材料可包括将 IL-13 拮抗剂, 如: 抗-IL-13 抗体或其片段施用于合适个体的指示, 该合适个体系如: 人, 如: 患有, 或处于罹患下列疾病风险中之人: 变应性哮喘、非变应性哮喘, 或由 IL-13 介导的病症, 如: 变应性和/或炎性病症, 或 HTLV-1 感染。IL-13 之产生与 HTLV-1 感染相关 (Chung et al., (2003) Blood 102: 4130-36)。

[0279] 例如: 该材料可包括将 IL-13 拮抗剂, 如: 抗-IL-13 抗体或其片段施用于患者的指示, 该患者系患有, 或处于罹患下列疾病之风险中: 变应性哮喘、非变应性哮喘, 或由 IL-13 介导的病症, 如: 变应性和/或炎性病症, 或 HTLV-1 感染。

[0280] 该套药包可包括用于含有 IL-13 拮抗剂, 如: 抗-IL-13 抗体或其片段之组合物的一或多个容器。在一些实施方案中, 该套药包包含用于组合物和信息材料的分开的容器、分配器或隔室。例如: 可将组合物包含在瓶子、小瓶或注射器中, 而信息材料可包含在塑料套或小包中。在其它实施方案中, 该套药包之个别成分系包含在单一、未分开之容器中。例如: 该组合物系包含在瓶子、小瓶或注射器中, 其上附着为标记形式之信息材料。在一些实施方案中, 该套药包包括多个 (如: 一包) 个别容器, 各包含 IL-13 拮抗剂, 如: 抗-IL-13 抗体或其片段之一或多个单位剂量 (如: 此文所描述之剂量)。例如: 该套药包包括多个注射器、安瓿、箔包、喷雾器或吸入装置, 其各包含 IL-13 拮抗剂, 如: 抗-IL-13 抗体或其片段之单一单位剂量, 或数个单位剂量。

[0281] 该套药包任选包括地适合施用组合物之装置, 如: 注射器、吸入器、吸量管、镊子、量匙、滴管 (如: 眼滴管)、拭子 (如: 棉签或木签), 或任一这类递送装置。在优选实施方案中, 该装置为一种分配计量好剂量之配体的可植入装置。

[0282] 下列提出之实施例用来帮助了解本发明, 但不意在并且不应被理解为在任一方面限制本发明范围。

[0283] 实施例 1

[0284] 对人 IL-13 特异的鼠单克隆抗体的产生

[0285] 实施例 1.1 :结合人 IL-13 之鼠单克隆抗体 (mAb13.2) 的分离

[0286] 以重组之人 IL-13(R&D Systems, Minneapolis, MN) 将雌 BALB/c 小鼠免疫, 以制备多克隆抗血清。藉由 ELISA 筛选结合人 IL-13 之血清。将来自鼠、显示出高血清抗体效价的脾细胞与 P3X63_AG8.653 骨髓瘤 (ATCC) 融合, 并接种在选择培养基中。经由有限稀释亚克隆 3 轮来分离融合物, 并筛选产生出之对人 IL-13 具结合亲和力的抗体。虽然有三种单克隆抗体可结合 IL-13、干扰功能性 IL-13 信号传递复合体之形成且中和和 / 或抑制一种或多种与 IL-13 相关之活性, 但我们选择抗体 mAb13.2 (IgG1 κ) 供进一步研究。

[0287] 实施例 1.2 :鼠单克隆抗体, mAb13.2 以高亲和力和特异性结合人 IL-13

[0288] 进行数种测量以确定在实施例 1.1 中分离出之鼠单克隆抗体, 即 mAb13.2 以高亲和力和特异性结合人 IL-13。首先, 利用其上已固定生物素化之 IL-13 的 69RU 链霉抗生物素蛋白芯片来进行三种抗人 IL-13 之单克隆抗体 (mAb13.2、mAb13.4 和 mAb13.9) 的 BIACORE™ 分析。将三种抗体分别通过链霉抗生物素蛋白芯片, 其各自显示出快速结合 (图 1)。在缓冲液交换时, 缓慢解离 (图 1)。第二, 利用其上已固定 mAb13.2 之 Biacore 芯片来进行 mAb13.2 的 BIACORE™ 分析。将不同浓度之 IL-13 通过芯片。同样地显示出快速结合和缓慢解离 (图 2)。第三, 藉由 ELISA 分析测定出 mAb13.2 可结合测试的所有形式之人 IL-13, 包括从脐血 T 细胞得到的天然 IL-13 (图 3)。以抗-FLAG™ M2 抗体包被平板。以生物素化之 mAb13.2 和链霉抗生物素蛋白 - 过氧化物酶检测 FLAG™- 人 IL-13 之结合情形。ELISA 证明 mAb13.2 和 IL-13 间之结合可与那些从经促分裂原活化、Th2- 偏态之脐血单核细胞分离出之天然人 IL-13 和重组之人 IL-13 相竞争 (图 3)。重组之鼠 IL-13 与 mAb13.2 并无可检测之结合 (图 3)。为了证实从 ELISA 得到之结果, 将单克隆抗体 mAb13.2 包被在 Biacore 芯片上, 并将包含重组人 IL-13 或 IL-13 之多态形式 (ARG 变体) (其在患有哮喘的患者中高频率表达) (Heinzmann et al. (2000) Hum. Mol. Genet. 9 :594) 的溶液穿过该 Biacore 芯片。二种形式皆显示出快速结合及检测不到从抗体解离 (图 4A)。最后, 在 GLP (良好实验室操作) 的条件下进行初步交叉反应性研究的期间, 当对在尸检或活组织检查时所得一组 37 个正常人组织进行筛选时, mAb13.2 没有显示出交叉反应性, 所述组织组包括 DC CPMP Guideline III/5271/94Draft5 之附录 II 中 “suggested list of human tissues to be used for immunohistochemical investigations of cross-reactivity” 的所有组织和 1997US FDA/CBER “Points to consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use” 之表 2 中所建议的所有组织。

[0289] 实施例 1.3 :在体外鼠单克隆抗体 mAb13.2 中和与 IL-13 相关之活性

[0290] 利用 TF1 生物分析、人外周血单核细胞和人外周血 B 细胞确认 mAb13.2 在体外中和一种或多种与 IL-13 相关之活性的能力。在合适之条件下, 可使人 TF1 红白血病细胞系之增殖成为依赖 IL-13 的。首先, 测定由重组人 IL-13 或人 IL-13 之 ARG- 变体形式的次理想浓度所引起之细胞因子 - 依赖性 TF1 细胞系的增殖是否可被 mAb13.2 抑制。图 4B 显示 mAb13.2 抑制重组人 IL-13 和人 IL-13 之 ARG- 变体形式二者刺激 TF1 细胞增殖的能力。第二, 使 TF1 细胞系匮乏 IL-13, 然后暴露于次理想浓度之重组人 IL-13 中, 以在纯化之小鼠 mAb13.2 或可溶性 IL-13 受体 (rhuIL-13Rα2) 之存在下诱导 TF1 细胞系增殖。将细胞培养

3天，并藉由液体闪烁计数测定在最后4小时内³H-胸昔的掺入。在次理想IL-13浓度下，mAb13.2对TF1之增殖造成剂量依赖性抑制作用（图5）。此作用之IC₅₀:250pM与可溶性rhuIL-13R α 2之IC₅₀值高度相当（图5）。示例性抗体的该作用的IC₅₀为约50-500pM，或120-300pM，或240-350pM。

[0291] 由于人外周血单核细胞系藉由增加细胞表面之低亲和力IgE受体（CD23）的表达，以剂量-依赖方式应答IL-13或IL-4（图6A），因此使用人单核细胞来证明mAb13.2中和此与IL-13相关之活性的能力。为了测定mAb13.2是否可中和单核细胞在细胞表面上由IL-13介导的CD23表达，从健康供者分离出外周血单核细胞，并将其与单独之逐渐增加量的IL-13、单独之逐渐增加量的IL-4、1ng/mL IL-13和逐渐增加量之mAb13.2，或0.3ng/mL IL-4和逐渐增加量之mAb13.2一起温育。第二天，收获细胞，并以经CYCHROMETM标记之抗-CD11b（单核细胞标记）和经PE标记之抗-CD23染色。藉由流式细胞术分析门控的CD11b+单核细胞的CD23表达。如所预期者，mAb13.2抑制由IL-13介导的CD23表达（图6B），但不会抑制由IL-4诱导的CD23表达（图6C）。

[0292] 亦在由IL-13介导的人外周血B细胞产生IgE的模型中测试mAb13.2之效果。当对IL-13和T细胞促分裂原PHA应答时，人B细胞发生Ig同种型转换重组成IgE，而使培养物中之IgE水平较高。此效果可被视为产生IgE之B细胞的频率增加。在作为饲养细胞之自体经放射的PBMCs的存在下将来自健康供者之PBMCs培养在微量滴定孔中，并以PHA和IL-13刺激之。三周后，藉由ELISA分析各孔中之IgE浓度。PHA+IL-13可增加产生IgE之B细胞克隆的频率（图7）。mAb13.2可抑制此效果，但IL-13-特异性非中和性抗体（mAb13.8）或对照小鼠IgG(msIgG)则不抑制此效果（图7），这证明mAb13.2可有效阻断培养之B细胞的由IL-13介导的IgE同种型转换。

[0293] 最后，经由检查mAb13.2对信号转导及转录激活蛋白（STAT）6磷酸化之效果来测试mAb13.2阻断对IL-13之早期细胞反应的能力。当IL-13与其细胞表面受体相互作用时，STAT6二聚体化，而成为磷酸化，并从细胞质易位至细胞核，其在此处活化细胞因子-反应性基因之转录作用（Murata et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:30829-36）。在暴露于IL-13后30分钟内可使用抗磷酸化STAT6之特异性抗体，藉由蛋白质印迹和/或流式细胞术分析来检测此活化作用。

[0294] 使用HT-29人表皮细胞系来分析STAT6磷酸化作用。将HT-29细胞在37°C下培养在逐渐增加浓度之IL-13中30分钟。由蛋白质印迹分析细胞裂解物可证明STAT6的剂量依赖性的由IL-13介导的磷酸化作用（图8A）。类似地，以饱和浓度之IL-13在37°C处理HT-29细胞30分钟，并将其固定，透化，以抗磷酸-STAT6的经ALEXATMFlour488标记的mAb染色后，经由流式细胞术分析证明HT-29细胞中之磷酸化的STAT6（图8B）。以同种型对照抗体染色之经处理过的细胞未显现荧光。最后，当以次理想浓度之单独的IL-13、IL-13和mAb13.8、IL-13和mAb13.2或IL-13和对照msIgG1抗体处理细胞时，流式细胞术分析显示出仅有在mAb13.2之存在下处理细胞时才能完全消除STAT6磷酸化，即：虽然mAb13.2可阻断STAT6磷酸化，但IL-13特异性非中和抗体（mAb13.8）和对照小鼠IgG1不具效果（图8C）。这些研究证明mAb13.2可抑制由IL-13介导的STAT6磷酸化。

[0295] 实施例1.4：鼠单克隆抗体mAb13.2在体内中和与IL-13相关之活性

[0296] 利用天生对猪蛔虫过敏之猕猴体内由抗原引起之呼吸道炎症模型测试小鼠

mAb13.2 在体内中和一种或多种与 IL-13 相关之活性的能力。在此模型中, 以猪蛔虫抗原刺激变应性猕猴可造成炎症细胞, 尤其是嗜酸性粒细胞流入呼吸道。为了测试 mAb13.2 预防此细胞流入之能力, 在以猪蛔虫抗原刺激前 24 小时施用抗体。刺激当天, 从左肺取出基线支气管肺泡灌洗 (BAL) 样品。然后, 经由气管内途径将抗原滴注入右肺中。24 小时后, 灌洗右肺, 并从经由静脉内途径以 8mg/kg 腹水纯化的 mAb13.2 处理过的动物中取出 BAL 液, 再将其与来自未处理之动物的 BAL 液相比较。与六只以 mAb13.2 处理之动物中仅有一只嗜酸性粒细胞增加相比较, 五只未处理之动物中于接受刺激后有四只嗜酸性粒细胞增加 (图 9)。未处理组之 BAL 嗜酸性粒细胞的百分比显著增加 ($p < 0.02$), 而经抗体处理组则无显著增加。这些结果证明 mAb13.2 可有效预防以变应原刺激之变应性动物体内的呼吸道嗜伊红细胞增多。

[0297] 猴子体内之小鼠 mAb13.2 的平均血清半寿期少于一周。在 3 个月之时间点时, 当所有微量 mAb13.2 皆从血清消退后, 再以猪蛔虫重新刺激经 mAb13.2 处理过之动物, 以证实这些个体之蛔虫应答性。处理组中六只猴子中的两只被发现为非应答者。

[0298] 实施例 1.5 : 鼠单克隆抗体 mAb13.2 结合在正常状态下结合 IL-4R α 之 IL-13 区域

[0299] 与 IL-13 相关之活性系假设为通过由 IL-13R α 1 和 IL-4R α 链所组成之受体复合体介导。细胞因子先与在细胞表面上之 IL-13R α 1 以相当低之亲和力进行相互作用。然后, IL-13/IL-13R α 1 复合体募集 IL-4R α 以形成完整之 IL-13 受体, 此受体以高亲和力结合其配体 (IL-13) (Zurawski et al. (1993) EMBO J. 12 :2663 ; Zurawski et al. (1995), J. Biol. Chem. 270 :23869)。IL-13 与高亲和力受体之结合再通过 IL-4R α 链发送信号至下游, 其涉及詹纳斯激酶信号转导及转录激活蛋白 (JAK-STAT) 途径, 例如, 经由 STAT6 之磷酸化作用, 监控此磷酸化作用可作为对 IL-13 之最早的细胞反应之一 (Murata, 等, 如上述)。数种方法, 诸如: 表位作图、X 射线晶体学, 以及 BIACORETM 分析可用来阐明鼠 mAb13.2 抗体和人 IL-13 间之相互作用, 并进一步检查 mAb13.2 调节一种或多种与 IL-13 相关活性之能力的基础。

[0300] 藉由 X 射线晶体学来研究 mAb13.2 和 IL-13 间之相互作用。在蛋白 A 柱上分离出来自腹水的总 IgG, 并以木瓜蛋白酶消化之, 以产生 mAb13.2Fab 片段, 再将其高度纯化。将 Fab 片段本身结晶, 再利用同步辐射, 在 **2.8 Å** 分辨率下取得结构分析。另外, 将 mAb13.2Fab 片段与人 IL-13 共结晶, 再将晶体结构解析至 **1.8 Å** 分辨率。mAb13.2 和 IL-13 间之主要接触部位经鉴定主要系在抗体之 CDR 环和 IL-13 之 C- 螺旋的 C- 端区聚簇 (图 10)。根据图 11 中所显示之成熟 IL-13 蛋白质 (即切割了信号肽之 IL-13 蛋白质) 的编号序列, 接触 mAb13.2 之 IL-13 的主要残基为 SEQ ID NO :32 之 GLU49、ASN53、GLY69、PR072、HIS73、LYS74 和 ARG86。

[0301] 藉由 ELISA 证实 mAb13.2Fab 片段结合人 IL-13 之能力。利用生物素化之 mAb13.2 检测 FLAG- 人 IL-13 与用抗-FLAG M2 抗体包被过夜的 ELISA 板的结合。将未标记之 mAb13.2、分离出之 mAb13.2Fab 片段或不相关之抗体引入其中, 以与生物素化之 mAb13.2 竞争结合 FLAG- 人 IL-13。此数据显示出未标记之 mAb13.2 和 mAb13.2Fab 片段可与生物素化之 mAb13.2 竞争结合 FLAG- 人 IL-13 (图 12)。另外, 虽然显示出需要较高浓度之 Fab 片段来取得与未标记之 mAb13.2 相似之竞争程度 (图 12A), 但此差异可经由在分析时以竞争作

为结合部位之浓度的函数来解决此问题,如:假设每个分离出之 Fab 片段有一个结合部位,每个未标记之 mAb13.2 有二个结合部位(图 12B)。相对于未标记之 mAb13.2 和 mAb13.2Fab 片段,不相关之抗体无法与生物素化之 mAb13.2 竞争结合至 FLAG- 人 IL-13(图 12)。

[0302] 如上述,在有或无 mAb13.2Fab 片段之存在下,经由测定 TF1 细胞之增殖和人外周血单核细胞之 CD23 表达来证实 mAb13.2Fab 片段在体外中和一种或多种与 IL-13 相关之活性的能力。图 13A 显示出:类似于 mAb13.2, mAb13.2Fab 片段可以结合部位浓度依赖性方式抑制重组人 IL-13 刺激 TF1 增殖之能力。另外,类似于 mAb13.2, mAb13.2Fab 片段可以结合部位浓度依赖性方式抑制由 IL-13 介导的 CD23 表达(图 13B)。

[0303] 上述之 X 射线晶体学、表位作图、ELISA、TF1 增殖和 CD23 表达分析指出 mAb13.2 结合 IL-13 螺旋之 C- 端区,即, IL-4R 结合区。为了证实此分析,以 BIACORE™ 芯片来分析 mAb13.2 和 IL-13 间之相互作用。此分析可以数种形式完成。首先,将 IL-4R 结合在 BIACORE™ 芯片上,让预先结合 IL-13R α 1 之 IL-13 复合体流过该芯片。无 mAb13.2 存在时,显示出可形成三分子复合体。然而,将 mAb13.2 加入预先结合 IL-13R α 1 之 IL-13 的混合物中时可阻止 IL-4R 结合至芯片上。第二,将 mAb13.2 固定在芯片上,加入溶液相中结合的 IL-13。虽然检测出 IL-13R α 1 与结合之 IL-13 相互作用,但未检测出 IL-4R 与结合之 IL-13 相互作用。第三, mAb13.2 显示出可结合已与固定在芯片上之 IL-13 α 1-Fc 或 IL-13R α 1 单体的 IL-13。这些观察支持如下假说:mAb13.2 不抑制 IL-13 与 IL-13R α 1 相互作用,但破坏 IL-13R α 1 与 IL-4R α 间之相互作用。此破坏作用被认为会干扰功能性 IL-13 信号传递复合体之形成。这些观察了提供此抗体之中和活性的理论模型。

[0304] mAb13.2 与 IL-13 和 IL-13R α 1 之复合体的体外阐明提示 mAb13.2 可能结合在细胞表面上之与受体结合之 IL-13。为了测定是否可在饱和之与受体结合之 IL-13 的条件下检测到与细胞结合之 mAb13.2, 以不同浓度之 IL-13 在 4°C 处理 HT-29 人表皮细胞,再加入单克隆抗体 mAb13.2、mAb13.8 或对照小鼠 IgG1。利用生物素化之抗 - 小鼠 IgG1 和 PE- 链霉抗生物素蛋白藉由流式细胞术分析来检测结合。虽然 HT-29 细胞可表达 IL-13R α 1, 但当 mAb13.2 之浓度高至 2 毫克 / 毫升时则无法检测到 mAb13.2 与结合在细胞表面上之 IL-13 结合。此观察以及 mAb13.2 为一种或多种与 IL-13 相关之活性的有效中和剂的论证指出: IL-13 信号传递复合体,即:IL-13 受体的正常功能可被 mAb13.2 破坏。

[0305] 上述之发现证实鼠单克隆抗体 mAb13.2 以高亲和力和特异性结合 IL-13, 并显现有效之中和活性,即:mAb13.2 可有效阻断所测试之每一与 IL-13 相关之活性。这些观察与 mAb13.2 可与人 IL-13 之 IL-4R α 结合部位相互作用,并且不与 IL-13R α 1 结合部位相互作用的发现相关。

[0306] 实施例 2: 嵌合型 mAb13.2 抗体(ch13.2) 之产生

[0307] 实施例 2.1: 嵌合型 mAb13.2 抗体(ch13.2) 之分离

[0308] 克隆编码 mAb13.2 之可变重链(VH) 和可变轻链(LH) 基因,并将从产生该抗体之杂交瘤分离出的 mRNA 测序。将 VH 序列亚克隆入 pED6huIgG1_mut 表达载体中,其编码包含二个点突变(L234A 和 G237A) 之人 IgG1, 以减少与人 Fc 受体和补体组分(SEQ ID NO: 17; Morgan et al. (1995) Immunology 86: 319-24; Shields et al (2001) J. Biol. Chem. 276: 6591-604) 结合。将 mAb13.2 之 VL 序列亚克隆入 pED6K 表达载体中。将此包含 mAb13.2 VH 和 VL 序列之表达载体转染入 COS-1 细胞中,并从条件培养基中纯化出嵌合型 mAb13.2 抗体。

(ch13. 2)。

[0309] 实施例 2. 2 : 嵌合型 mAb13. 2 抗体 (ch13. 2) 体外中和与 IL-13 相关之活性

[0310] 测试嵌合型抗体 ch13. 2 对 IL-13 的结合。测试单克隆抗体 mAb13. 2、mAb13. 2 之嵌合型 (ch13. 2) 和对照组抗体 (13. 8) 与生物素化之小鼠 mAb13. 2 竞争与固定在具有抗 -FLAG 抗体之 ELISA 板上的人 IL-13-FLAG 结合的能力。类似于 mAb13. 2, 嵌合型抗体 ch13. 2 可竞争性地结合 IL-13 (图 14A)。在另一试验中, 以 IL-13 处理人外周血单核细胞过夜, 以在不同浓度之小鼠 mAb13. 2 或 ch13. 2 的存在下诱导 CD23 之表达。如第 14B 图所示, ch13. 2 可以与 mAb13. 2 相同之程度来阻止单核细胞的由 IL-13 所介导的 CD23 表达。

[0311] 实施例 3 : 部分和完全人源化之 mAb13. 2 抗体 (h13. 2v1 和 h13. 2v2) 的产生

[0312] 实施例 3. 1 : 部分人源化之 mAb13. 2 抗体 (h13. 2v1) 的分离

[0313] 根据氨基酸序列之同源性、CDR 聚类分析、表达之人抗体中的使用频率和人抗体之晶体结构的可用信息来将 mAb13. 2 人源化。根据人 DP-54 可变重链 (VH) 和 DPK-9 可变轻链 (LH) 种系基因 (分别显示于, 如 : 第 16 和 17 图中) 进行人源化。考虑对抗体结合、VH-VL 配对和其它因素之可能效果, 使鼠残基突变成人残基, 其中鼠和人构架残基相异, 但有一些例外。将 ch13. 2VH 链氨基酸序列与人 DP-54 种系基因的预测的氨基酸序列相比较, 所产生之部分人源化 h13. 2v1VH 链氨基酸序列显示于图 15 中。将 ch13. 2VL 链氨基酸序列与预测之人 DPK-9 的氨基酸序列相比较, 所产生之部分人源化 h13. 2v1VL 链显示于图 16 中。从图 16 和 17 中可见到, h13. 2v1VH 和 VL 链分别保留 ch13. 2VH 和 VL 链之互补性决定区域 (CDR) 或抗原决定区。另外, 在 VH 构架中仅保留一个鼠残基, 在 VL 构架中仅保留二个鼠残基, 以降低剧烈改变抗原 - 结合区和 VH-VL 配对的风险 (图 16 和 17)。

[0314] 经由将编码 (鼠) mAb13. 2 之核苷酸序列进行突变以实现 mAb13. 2 的部分人源化, 如此对应于人种系基因之氨基酸可在指出之构架位置被替代。对于将引入的每个氨基酸改变, 设计适合的核苷酸替代, 进行密码子优化以在 CHO 细胞中表达。藉由 PCR 诱变方法完成 VH 之人源化, 其中使用一次掺入一或二个氨基酸之突变的寡核苷酸引物, 以将鼠模板基因序列扩增。需进行数轮之 PCR 诱变, 以达到部分人源化。使用一组 9 种重叠的寡核苷酸 (其对应于具有合适之核苷酸替代的鼠 VL 序列), 藉由 PCR 完成 VL 之人源化。以重叠区作为模板, 使用 PCR 来填充有义和反义链上引物间的缺口。所产生之部分人源化的抗体称为 h13. 2v1。编码 h13. 2v1 之 VL 和 VH 的核苷酸序列分别指定为 SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :7。

[0315] 实施例 3. 2 : 完全人源化之 mAb13. 2 (h13. 2v2) 的分离

[0316] 如图 15 和图 16 中所示, h13. 2v1 在构架区中保留 3 个鼠残基 : 一个在 VH 链中, 二个在 VL 链中。mAb13. 2Fab 与人 IL-13 之共结晶结构的初步工作和分析证实所有 3 个残基均可突变成人残基。这些为 VH 链中之残基 #3 (在小鼠中为 K, 在人中为 Q), VL 链中之残基 #4 (在小鼠中为 L, 在人中为 M) 和 VL 链中之残基 #72 (在种系中之 #68 ; 在小鼠中为 R, 在人中为 G)。因此, 为了产生 mAb13. 2 之完全人源化形式 (h13. 2v2), 使用 PCR 诱变将突变 K3Q 引入 h13. 2v1 之 VH 链, 将突变 L4M 和 R72G 引入 h13. 2v1 之 VL 链中。h13. 2v2 之最终 VH 和 VL 序列分别显示于图 17 和图 18 中。编码 h13. 2v2 之 VH 和 VL 的核苷酸序列分别指定为 SEQ ID NO :4 和 SEQID NO :8。

[0317] 根据图 29 中所示之序列 (利用线性编号方案), 测定出利用氢键与 IL-13 接触之

mAb13.2 重链的主要残基为 SER50(CDR2)、SER53(CDR2)、TYR101(CDR3) 和 TYR102(CDR3)。另外,利用范德瓦尔斯力与 IL-13 接触之 mAb13.2 重链的主要残基为 ILE30、SER31(CDR1)、ALA33(CDR1)、TRP47、SER50(CDR2)、SER52(CDR2)、SER53(CDR2)、TYR58(CDR2)、LEU98(CDR3)、ASP99(CDR3)、GLY100(CDR3)、TYR101(CDR3)、TYR102(CDR3) 和 PHE103(CDR3) (根据图 29,利用线性编号方案)。

[0318] 根据图 30 中所示之序列 (利用线性编号方案), 测定出利用氢键与 IL-13 接触之 mAb13.2 轻链的主要残基为 ASN31(CDR1)、TYR32(CDR1)、LYS34(CDR1)、ASN96(CDR3) 和 ASN98(CDR3)。另外,利用范德瓦尔斯力与 IL-13 接触之 mAb13.2 轻链的主要残基为 ASN31(CDR1)、TYR32(CDR1)、LYS34(CDR1)、ARG54(CDR2)、ASN96(CDR3)、ASP98(CDR3) 和 TRP100(CDR3) (根据图 30,利用线性编号方案)。

[0319] 实施例 3.3 :完全人源化之 mAb13.2(h13.2v2) 保留与 IL-13 的全部结合活性

[0320] 依实施例 2 中之描述,藉 ELISA 测定完全人源化之 mAb13.2(h13.2v2) 与生物素化之 mAb13.2 竞争结合 IL-13-FLAG 的能力。数据显示 mAb13.2 之嵌合型 (ch13.2)、部分人源化 (h13.2v1) 和完全人源化 (h13.2v2) 形式可以类似程度之能力与生物素化之 mAb13.2 竞争结合 FLAG-人 IL-13(图 19A)。BIACORE 分析亦证实 IL-13 可快速结合固定化的 h13.2v2, 并与其缓慢解离 (图 19B)。

[0321] 实施例 3.4 :完全人源化 mAb13.2(h13.2v2) 于体外中和与 IL-13 相关之活性

[0322] 另外,如实施例 1.3 之描述,藉由流式细胞术分析测定 mAb13.2 之嵌合型 (ch13.2)、部分人源化 (h13.2v1) 和完全人源化 (h13.2v2) 形式抑制由 IL-13 所介导的人单核细胞之细胞表面表达 CD23, 并减少 HT-29 细胞中由 IL-13 引起之 STAT6 磷酸化的能力。简单地说,将人外周血单核细胞与次理想浓度之重组人 IL-13 在逐渐增加浓度之 ch13.2、h13.2v1 或 h13.2v2 的存在下温育过夜。限制单核细胞的进出,并分析 CD23 之表达,以作为 IL-13 应答性之指示。流式细胞术分析显示出所有三种 mAb13.2 之形式,即 ch13.2、h13.2v1 和 h13.2v2 均可以剂量依赖方式减少单核细胞的由 IL-13 所介导的 CD23 表达。

[0323] 为了测试 STAT6 磷酸化作用,将 HT-29 人上皮细胞系在 37°C 下与次理想剂量之重组人 IL-13 和逐渐增加浓度之 ch13.2、h13.2v1 或 h13.2v2 一起温育 30 分钟,然后,利用抗磷酸化 STAT6 的 ALEXA™ Flour488- 标记的单克隆抗体来分析磷酸化之 STAT6 的表达。经由流式细胞术分析证明所有三种 mAb13.2 之形式,即 ch13.2、h13.2v1 和 h13.2v2 均可缓和由 IL-13 所介导的 STAT6 磷酸化 (图 20B)。

[0324] 由于 h13.2v2 可在体外抑制与重组 IL-13 相关的活性和与天然人 IL-13 相关的活性 (图 21),因此,在动物模型中测试其抑制与 IL-13 相关之病症的能力。在用于测试完全人源化之 mAb13.2——h13.2v2 的制备工作中,分析该抗体在呼吸疾病之非人灵长类 (NHP) 和绵羊模型中中和源自猕猴或源自绵羊之重组 IL-13 的能力。从猕猴或绵羊克隆 IL-13。将 NHP IL-13 表达在大肠杆菌中,依制备重组人 IL-13 之程序纯化和再折叠。相比,将重组之绵羊 IL-13 表达在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中。在体外测试 mAb13.2 或 h13.2v2 抑制与 IL-13 之重组 NHP 猕猴型相关的一种或多种活性的能力。图 22 显示 h13.2v2 可强烈中和猕猴 NHP IL-13 诱导人单核细胞之细胞表面的 CD23 表达之能力。然而,由于中和与绵羊 IL-13 相关之活性需要更高浓度之抗体,因此 h13.2v2 仅微弱中和绵羊 IL-13 (图 22)。

[0325] 实施例 3.5 :完全人源化 mAb13.2(h13.2v2) 中和绵羊哮喘模型中的 IL-13 活性

[0326] 尽管 h13. 2v2 中和绵羊型 IL-13 之生物活性的效力相对较低,但是测试 h13. 2v2 在由蛔虫引起之呼吸道反应过度的绵羊模型中的效力。绵羊可经由自然暴露于蛔虫寄生虫猪蛔虫而敏化。当以蛔虫抗原进行肺部刺激时,该动物发生类似于哮喘患者对抗原刺激之反应的支气管收缩。此反应由立即反应和刺激开始后 4-5 小时接着发生的末期反应所组成。早期反应被认为系平滑肌反应,而末期反应为炎症反应。

[0327] 为了测试 h13. 2v2 减轻由蛔虫引起之支气管收缩的能力,经由静脉内 (i. v.) 输注对绵羊施用 20mg/kg、5mg/kg 或 2mg/kg 抗体。输注后 24 小时,以蛔虫抗原给予动物气管内刺激。结果表面 20mg/kg 或 5mg/kg 之 h13. 2v2 可减弱动物对抗原之末期反应 (图 23),与对照相比较,2mg/kg 之 h13. 2v2 对抗原反应无显著效果,推测此系由于 h13. 2v2 对绵羊 IL-13 之微弱中和活性。

[0328] 另外,在绵羊中测试 h13. 2v2 减轻以胆碱能激动剂卡巴胆碱进行呼吸道刺激所引起之呼吸道反应过度的能力。卡巴胆碱引起之支气管收缩系经由测量用力呼气量 (FEV) 所减低之数值来测定,而在哮喘患者中引起给定幅度之反应所需刺激物剂量 (PC400) 通常低于在健康个体中所需的剂量。使绵羊保持未经处理,或在卡巴胆碱 - 吸入刺激前 24 小时,经由静脉内途径施用于绵羊 20mg/kg、5mg/kg 或 2mg/kg 之 h13. 2v2,在以猪蛔虫刺激前和刺激后测定 PC400。数据显示 20mg/kg 或 5mg/kg 之 h13. 2v2 可预防以猪蛔虫进行刺激所引起之 PC400 快速下降 (图 24)。类似于抗原反应实验之结果,与对照相比较,2mg/kg 之 h13. 2v2 对 PC400 无显著影响。

[0329] 实施例 3.6 :完全人源化 mAb13. 2 (h13. 2v2) 在非人灵长类哮喘模型中可中和 IL-13 活性

[0330] 为了测试 h13. 2v2 在非人灵长类中预防由蛔虫引起之肺部感染的能力,以盐水、8mg/kg 不相关之人 IgG (IVIG) 或 2mg/kg 地塞米松 (作为阳性对照) 经由肌内途径处理对照猕猴。经由静脉内途径施用于测试猕猴 10mg/kg h13. 2v2。第二天,从左肺收集刺激前 BAL 样品,并以猪蛔虫抗原经由气管内途径在动物右肺进行刺激。刺激后 24 小时,从右肺收集 BAL 样品并分析细胞浸润液。结果显示以 h13. 2v2 预处理动物可预防由猪蛔虫变应原所引起之呼吸道感染 (图 25)。在平行实验中,在蛔虫刺激后可在 BAL 中诱导出 IL-5 和 eotaxin。以 h13. 2v2 预处理动物可降低所诱导出之 IL-5 和 eotaxin 的水平。

[0331] 对蛔虫敏化之非人灵长类可产生针对蛔虫抗原的 IgE。此 IgE 与循环之嗜碱性粒细胞上的 Fc ε RI 结合,如此,在体外以蛔虫抗原刺激外周血嗜碱性粒细胞时可引起脱粒及组胺释放。重复暴露于抗原可加强嗜碱性粒细胞之敏化,导致增强的组胺释出反应。为了测试 h13. 2v2 对此过程之作用,在蛔虫刺激后 8 周抽取接受如上述之 h13. 2v2 或盐水或 IVIG 对照给药之猕猴的血液,并藉由 ELISA 测定血浆中全部的和蛔虫特异的 IgE 的水平。在接受刺激后 8 周,以盐水或 IVIG 处理之对照组动物的蛔虫特异的 IgE 的水平增加 (图 31B)。相比,以 h13. 2v2 处理之动物显示出特异于蛔虫之循环 IgE 的水平显著降低 (图 31A)。在任一处理组中,总 IgE 滴定度均无显著变化。

[0332] 为了评估对嗜碱性粒细胞组胺释放之效果,在蛔虫刺激后 24 小时、8 周和 4 个月抽取动物血液。在 37°C,以蛔虫抗原刺激全血 30 分钟,并藉由 ELISA 定量释入上清液中之组胺 (Beckman Coulter, Fullerton, CA)。如图 32A 所示,这些敏化之动物显示出即使在节段抗原刺激前,也有一定水平的蛔虫诱导的嗜碱性粒细胞组胺释放。刺激后,对照组动物显示

出嗜碱性粒细胞的所预期之反应性增加。相比,以 h13. 2v2 处理之动物无法增加嗜碱性粒细胞敏感度,如此,刺激后 2-4 个月,其于体外对蛔虫所产生之组胺释放反应显著降低(图 32B)。因此,在此模型中,单次施用 h13. 2v2 具有长期的疾病改善活性。

[0333] 实施例 4 根据不同人种系基因之 mAb13. 2 人源化

[0334] 实施例 3 提供根据 DP-54 和 DPK9 种系基因将 mAb13. 2 人源化的方法和结果;在此实施例中扼要描述根据其它种系基因将 mAb13. 2 人源化的方法。

[0335] 根据人种系抗体序列,或其亚组的分析来设计其它人源化策略,该亚组序列与鼠抗体可变区之实际氨基酸序列具有高度同源性,即序列相似性。例如:V-BASE 之 VH 组 3 显示出与 mAb13. 2 具高度之序列相似性。mAb13. 2 之重链可变区的 CDR 经确定可转移入在 VH 组 3 内之种系基因内的任一亚组中,即:3-53(DP-42)、3-48(DP-51)、3-09(DP-31)、3-13(DP-48)、3-15(DP-38)、3-20(DP-32)、3-21(DP-77)、3-23(DP-47)、3-30 和 3-30. 5(DP-49)、3-64(DP-45)、3-66(DP-86) 和 3-73(YAC-9)(图 26)。图 26 中亦显示 DP-61 之序列,其可用来将 mAb13. 2 人源化。下列共同之氨基酸替代经确定可引入 mAb13. 2 中,以将其 VH 构架转化成任一种所提出之人种系化构架:K3Q、K13Q 或 K13R、K19R、T40A、E42G、R44G、R75K、I77S 或 I77T、S83N、S87A 或 S87D、M92V 或 M92L,和 T113L。还描述了用于根据特定种系基因进行人源化之个别氨基酸替代,如:根据 DP-47 之人源化可涉及 V5L、A49S 和 A74S 之额外突变;根据 DP-42 之人源化可涉及 V12I、A49S 和 A74S 之额外突变;根据 DP-51 之人源化可涉及 A49S 之额外突变;根据 DP-48 之人源化可涉及 P41T、D72E 和 E88G;根据 DP-53 之人源化可涉及 E46V 和 A49S 之额外突变;根据 DP-32 之人源化可涉及 L11V、A49S 和 Y94H 之额外突变;根据 DP-38 之人源化可涉及 A49G、A74D、R75S、N76K、R86K 和 S87T 之额外突变;根据 DP-31 之人源化可涉及 G16R、A49S 和 R97K 之额外突变;根据 DP-61 之人源化可涉及 W47Y、A49S、A74S 和 T90M 之额外突变;及根据 DP-45 之人源化可涉及 E6Q、A24G、A49S 和 T90M 之额外突变。例如:当 mAb13. 2 之人源化系根据具有 79% 之序列同一性的人种系基因 DP-47 时,可将下列突变引入 mAb13. 2 中:K3Q、V5L、K13Q、K19R、T40A、E42G、R44G、A49S、A74S、R75K、I77T、S83N、S87A、M92V,和 T113L。在人源化期间根据特定人种系基因将共同之氨基酸替代单独引入或与个别之氨基酸替代一起引入 mAb13. 2 中应可产生活性抗体。例如:当依下述根据 3-21(DP-77) 将 mAb13. 2 进行人源化时可产生活性抗体 h13. 2v3。

[0336] 一种将 mAb13. 2 人源化之替换方法系以种系基因 DP-77 和 B1 为基础。图 27 中显示 DP-77 之预测的氨基酸序列、ch13. 2 之可变重链氨基酸序列和完全人源化之 mAb13. 2 抗体(h13. 2v3) 的重链氨基酸序列间的比对。图 28 中显示 B1 之预测的氨基酸序列、ch13. 2 之可变轻链氨基酸序列和 h13. 2v3 的可变轻链氨基酸序列间的比对。DP-77 和 B1 之预测的氨基酸序列分别显示出与 mAb13. 2 之可变重链具有 80. 4% 之氨基酸同一性,与 mAb13. 2 之可变轻链具有 77. 5% 之氨基酸同一性。虽然 DP-77 与 mAb13. 2 之重链(以及 ch13. 2 之重链)间的氨基酸差异,和 B1 与 mAb13. 2 之轻链(以及 ch13. 2 之轻链)间的氨基酸差异可在构架和互补性决定区域二者中发现,但 CDR 中之差异仍保持不变。相比,当在重链 mAb13. 2 之构架区中所发现之氨基酸与在 DP-77 之相同位置中的氨基酸不同时, mAb13. 2 之可变重链区中的氨基酸变更为 DP-77 中之氨基酸。类似地,当在 mAb13. 2 之轻链的构架区中所发现的氨基酸与在 B1 之相同位置中的氨基酸不同时,则 mAb13. 2 之可变轻链中的氨基酸变更为 B1 中之氨基酸。在重链和轻链中之第一回合的改变之后依实施例 2 中之描述进行 ELISA,

以确定该变化不会影响抗体结合 IL-13 之能力。如上述的两轮 PCR 诱变引入所述改变。重链和轻链中第一轮改变后,如实施例 2 所述进行 ELISA,以确保所述改变不影响抗体结合 IL-13 的能力。第二轮改变后, mAb13.2 之重和轻链内的构架区的氨基酸序列分别与 DP-77 和 B1 之构架区的氨基酸序列相同。

[0337] 人源化之 mAb13.2 抗体 h13.2v3 亦可在体外抑制与 IL-13 相关之活性。藉由 ELISA 和 TF1 增殖分析测试 h13.2v3, 以测定其结合 IL-13 并抑制一种或多种与 IL-13 相关之活性的能力。结果显示:与 ch13.2 和 h13.2v1 相较下, h13.2v3 可以类似程度地与 mAb13.2 竞争结合 IL-13。另外, h13.2v3 可以与 mAb13.2 和 h13.2v1 相同之程度抑制 TF1 增殖。

[0338] 实施例 5:由 h13.2v2 之野生型 Fc 回复体介导的效应子活性

[0339] IL-13 受体之细胞信号传递形式 (其包括 IL-13R α 1 和 IL-4R α 多肽) 系在可对细胞因子反应之细胞类型的表面上发现。IL-13R α 2 通常不表达在 IL-13- 反应性细胞之表面上, 但已有在脑部、头部和颈部肿瘤上出现的报导 (Kawakami et al. (2003) Clin. Cancer Res. 9:6381-8; Mintz et al. (2002) Neoplasia 4:388-99; Liu et al. (2000) Cancer Immunol. Immunother. 49:319-24)。亦可在经 IFN γ 处理之原代人单核细胞 (Daines et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:10387-93) 或经 TNF α - 或 IL-13 处理之原代人成纤维细胞 (Yoshikawa et al. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 312:1248-55) 上诱导 IL-13R α 2 表达。此受体无法介导信号传递反应给 IL-13 (Kawakami et al. (2001) Blood 97:2673-9), 但显示出可作为诱饵受体, 与 IL-13R α 1 竞争与 IL-13 相互作用 (Feng et al. (1998) Lab. Invest. 78:591-602)。IL-13R α 2 对 IL-13 具高亲和力 (Andrews et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:46073-8), 并显示出主要与细胞因子之 C- 端区作用 (Madhankumar et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:43194-205), 而该区预期并不包括 h13.2v2 结合部位。因此, 检查 h13.2v2 是否可与被细胞表面上之 IL-13R α 2 所捕捉之 IL-13 相互作用。A375 为一种表达 IL-13R α 2 之人黑素瘤细胞系。在 4°C, 将重组之人 IL-13 (3ng/mL) 与这些细胞接触 20 分钟。清洗该细胞, 并测试其与生物素化之 h13.2v2 的结合。结果显示出抗体在 IL-13 之存在下, 以剂量 - 依赖方式结合这些细胞, 这表明 h13.2v2 与结合其受体的 IL-13 结合 (图 33)。

[0340] 为了测定 h13.2v2 是否可促进 Fc- 依赖性效应子之功能, 将 h13.2v2 的突变的 Fc 残基 (L234A/G237A; SEQ ID NO:17 之残基 116 和 119) 回复成野生型, 并将表达抗体之野生型或突变之 Fc 表达并纯化。使用负载 IL-13 之 A375 细胞作为靶标, 在抗体依赖性细胞毒性测定 (ADCC) 中测试效应子之功能。以铬 -51 标记 A375 靶细胞, 并将其与 10ng/mL 之重组人 IL-13 一起培育。使用藉由 **ROSETTESEP[®]** 人 NK 富集混合物 (**ROSETTESEP[®]** Human NK Enrichment Cocktail (StemCell Technologies, Seattle, WA)) 富集自然杀伤 (NK) 细胞的人 PBMC 作为效应子。将效应细胞和靶细胞在逐渐增加浓度之 h13.2v2 或其野生型 Fc 回复体的存在下一起在 37°C 培养 5 小时。以铬 -51 向上清液的释放测量细胞毒性, 并以最大释放量之百分比表示, 其中该最大释放量经由以 **TRITON[®]** X-100 溶解该 A375 靶细胞来测定。

[0341] 结果显示出野生型之 Fc 回复体可介导装载 IL-13 之 A375 靶细胞的 ADCC, 而 h13.2v2 则否 (图 34A)。无 IL-13 存在时则未观察到细胞毒性 (图 34B)。利用来自三种不

同供者之效应细胞可见到类似结果。这些结果表明：由于存在 L234A 和 G237A Fc 突变，因此，h13. 2v2 即使在理想之体外条件下亦不能介导 ADCC。

[0342] 综合这些观察结果指出：h13. 2v2 可结合表达 IL-13R α 2 之细胞（图 33），但不会结合表达 IL-13R α 1 之细胞。进行实验以测试即使不存在可检测之结合时，h13. 2v2 之野生型回复体是否也可介导表达 IL-13R α 1 之 HT-29 细胞的 ADCC。在依上述进行之 ADCC 测定中使用 HT-29 细胞作为靶标。结果显示在导致表达 IL-13R α 2 之 A375 细胞发生细胞溶解的条件下，表达 IL-13R α 1 之 HT-29 细胞不会溶解（图 35）。这些结果亦表明：虽然包括 L234A 和 G237A Fc 突变之抗体不会诱导 ADCC，但具野生型 Fc 效应子功能之抗体可用来治疗某些表达 IL-13R α 2 之癌症。

[0343] 实施例 6

[0344] 在 COS 细胞中表达人源化之 13. 2 抗体

[0345] 为了评估人源化抗 -IL-13 抗体在哺乳动物重组系统中之表达情况，将小鼠 13. 2 之可变区 (SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :13)、hu13. 2V1 (SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :15) 及 hu13. 2V2 (SEQ ID NO :12 和 SEQ ID NO :16) 亚克隆入包含人 K 和 IgG1mut 恒定区的 pED6 表达载体中。将猴肾 COS-1 细胞生长在包含下列成分之 DME 介质 (Gibco) 中：10% 热失活之胎牛血清、1mM 谷氨酰胺和 0.1 毫克 / 毫升之青霉素 / 链霉素。根据供应商建议之方案，利用 **TRANSITIT®-LT1** Transfection 试剂 (Mirus Bio Corp., Madison, WI) 进行 COS 细胞的转染。将经转染之 COS 细胞在 37°C, 10% CO₂ 的存在下培养 24 小时，以无菌 PBS 清洗之，然后将其生长在不含血清之培养基 R1CD1 (Gibco) 中 48 小时，以使其分泌抗体，并使抗体在条件培养基中累积。利用纯化之人 IgG1/K 抗体作为标准，藉由总人 IgG ELISA 来定量 13. 2 抗体之表达。嵌合型 13. 2 抗体以及二种人源化之形式在 COS 细胞中良好表达。

[0346] 表 5. 人源化之 13. 2 抗体在 COS 细胞中之瞬时表达

[0347]

N	构建体	表达 μ g/ml, 48 小时
1	嵌合型 13. 2	14. 5
2	部分人源化之 13. 2 (V1)	13. 2
3	完全人源化之 13. 2. 2 (V2)	14. 9

序列表

<110>M · T · 卡塞安 (KASAIAN, MARION T.)
L · 奇斯提科娃 (TCHISTIYKOVA, LIOUDMILA)
G · M · 韦尔德曼 (VELDMAN, GEERTRUIDA M.)
K · A · 马凯特 (MARQUETTE, KIMBERLY ANN)
X-Y · 谭 (TAN, XIANG-YANG)
D · D · 唐纳森 (DONALDSON, DEBRA D.)
L · L · 林 (LIN, LAURA LONG)
T · 沙内 (SHANE, TANIA)
A · S · 塔姆 (TAM, AMY SZE PUI)
E · 费凡特 (FEYFANT, ERIC)
N · L · 伍德 (WOOD, NANCY L.)
L · J · 菲茨 (FITZ, LORI J.)
A · M · 温德姆 (WIDOM, ANGELA M.)
K · D · 帕里斯 (PARRIS, KEVIN D.)
S · J · 戈尔德曼 (GOLDMAN, SAMUEL J.)
SALDANHA, JOSE W.

<120>针对人白介素-13的抗体及其用途

<130>W2023-700510/AM101493

<140>11/149, 309

<141>2005-06-09

<150>60/581, 375

<151>2004-06-22

<150>60/578, 736

<151>2004-06-09

<150>60/578, 473

<151>2004-06-09

<160>65

<170>PatentIn 版本 3.5

<210>1		
<211>333		
<212>DNA		
<213> 小鼠 (Mus musculus)		
<400>1		
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc	60	
atatacctgca aagccagtga aagtgttgat aattatggca aaagttaat gcactggtag	120	
cagcagaaac caggacagtc acccaaactc ctcatctatc gtgcacatccaa cctagaatct	180	
gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaa	240	
cctgtggagg ctgatgtatg tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtgg	300	
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa	333	
<210>2		
<211>333		
<212>DNA		
<213> 小鼠		
<400>2		
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc	60	
atatacctgca aagccagtga aagtgttgat aattatggca aaagttaat gcactggtag	120	
cagcagaaac caggacagtc acccaaactc ctcatctatc gtgcacatccaa cctagaatct	180	
gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaa	240	
cctgtggagg ctgatgtatg tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtgg	300	
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa	333	
<210>3		
<211>333		
<212>DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述 :合成 多核苷酸		
<400>3		
gacatccagc tgacccagtc tccatccctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtccacc	60	
atcaacttgca aagccagtga aagtgttgat aattatggca aaagtctgat gcactggat	120	
cagcagaaac cagggaaagc tcctaagctc ctgatctatc gtgcacatccaa cctggaaatct	180	
ggcgtcccat caaggttcag tggcagtggg tctcgacacag atttcactct caccatcagc	240	

agtctgcaac ctgaagattt tgcaacttac tactgtcagc aaagtaatga ggatccctgg	300
accttcggcg gagggaccaa ggttagagatc aaa	333

<210>4

<211>333

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成
多核苷酸

<400>4

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtggaga cagagtcacc	60
atcaacttgca aagccagtga aagtgttgat aattatggca aaagtctgat gcactggat	120
cagcagaaac cagggaaagc tcctaagctc ctgatctatc gtgcattccaa cctggaaatct	180
ggcgtcccat caaggttcag tggcagtggta tctggcacag atttcactct caccatcagc	240
agtctgcaac ctgaagattt tgcaacttac tactgtcagc aaagtaatga ggatccctgg	300
accttcggcg gagggaccaa ggttagagatc aaa	333

<210>5

<211>351

<212>DNA

<213> 小鼠

<400>5

gaagtgaagc tggtgaggatc tgggggaggc ttagtgaaac ctggagggtc cctgaaactc	60
tcctgtcag cctctggatt cacttcatt agctatgccat tgtcttgggt tcgtcagact	120
ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcatcc attagtagtg gtggtaacac ctactatcca	180
gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg ccaggaacat cctataccgt	240
caaattgagca gtctgaggatc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcacg acttgatgg	300
tactactttg gatttgctta ctggggccaa gggactctgg tcgctgtctc t	351

<210>6

<211>351

<212>DNA

<213> 小鼠

<400>6

gaagtgaagc tgggggaggc ttagtgaaac ctggagggtc cctgaaactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cacttcatt agctatgcca tgtcttgggt tcgtcagact	120
ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcatcc attagtagtg gtggtaaacac ctactatcca	180
gacaggtgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg ccaggaacat cctataacctg	240
caaatacgca gtctgagggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcacg acttgatgg	300
tactactttg gatttgctta ctggggccaa gggactctgg tcgctgtctc t	351

<210>7

<211>354

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成
多核苷酸

<400>7

gaggtcaagc tgggggaggc ttagtgcaac ctggagggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cacttcatt agctatgcca tgtcttgggt tcgtcaggct	120
ccagggaagg ggctggagtg ggtcgcatcc attagtagtg gtggtaaacac ctactatcca	180
gacagcgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg ccaagaacag cctataacctg	240
caaatacgca gtctgagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcacg acttgatgg	300
tactactttg gatttgctta ctggggccaa gggaccctgg tcaccgtctc ctca	354

<210>8

<211>354

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成
多核苷酸

<400>8

gaggtccagc tgggggaggc ttagtgcaac ctggagggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cacttcatt agctatgcca tgtcttgggt tcgtcaggct	120
ccagggaagg ggctggagtg ggtcgcatcc attagtagtg gtggtaaacac ctactatcca	180
gacagcgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg ccaagaacag cctataacctg	240
caaatacgca gtctgagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcacg acttgatgg	300
tactactttg gatttgctta ctggggccaa gggaccctgg tcaccgtctc ctca	354

<210>9

<211>111

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>9

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

<210>10

<211>111

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>10

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

85	90	95
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly	Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100	105	110

<210>11

<211>111

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成
多肽

<400>11

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

<210>12

<211>111

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成
多肽

<400>12

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

<210>13

<211>118

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>13

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

<210>14

<211>118

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>14

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

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

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

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

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

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

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

Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
				115										

<210>15

<211>118

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成
多肽

<400>15

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

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

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

Ala	Ser	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys

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

<210>16

<211>118

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成
多肽

<400>16

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

<210>17

<211>329

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<223> 对于取代和优选实施方案的详细描述

参见说明书

<400>17

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

245	250	255
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
260	265	270
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu		
275	280	285
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val		
290	295	300
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln		
305	310	315
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	325	

<210>18

<211>107

<212>PRT

<213> 人

<220>

<223> 对于取代和优选实施方案的详细描述

参见说明书

<400>18

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

<210>19

<211>15

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>19

Lys Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Lys Ser Leu Met His

1

5

10

15

<210>20

<211>7

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>20

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1

5

<210>21

<211>9

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>21

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp Thr

1

5

<210>22

<211>5

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>22

Ser Tyr Ala Met Ser

1

5

<210>23

<211>16

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>23

Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210>24

<211>10

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>24

Leu Asp Gly Tyr Tyr Phe Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210>25

<211>15

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成
肽

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1)..(7)

<223> 任何氨基酸

<220>

<221>MOD_RES

<222>(10)..(10)

<223> 任何氨基酸

<220>

<221>MOD_RES

<222>(12)..(15)

<223> 任何氨基酸

<220>

<223> 对于取代和优选实施方案的详细描述

参见说明书

〈400〉25

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Tyr Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

〈210〉26

〈211〉7

〈212〉PRT

〈213〉 人工序列

〈220〉

〈223〉 人工序列的描述 :合成
肽

〈220〉

〈221〉MOD_RES

〈222〉(2) .. (7)

〈223〉 任何氨基酸

〈220〉

〈223〉 对于取代和优选实施方案的详细描述

参见说明书

〈400〉26

Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

〈210〉27

〈211〉9

〈212〉PRT

〈213〉 人工序列

〈220〉

〈223〉 人工序列的描述 :合成
肽

〈220〉

〈221〉MOD_RES

〈222〉(1) .. (3)

<223> 任何氨基酸

<220>

<221>MOD_RES

<222>(5)..(5)

<223> 任何氨基酸

<220>

<221>MOD_RES

<222>(7)..(7)

<223> 任何氨基酸

<220>

<221>MOD_RES

<222>(9)..(9)

<223> 任何氨基酸

<220>

<223> 对于取代和优选实施方案的详细描述

参见说明书

<400>27

Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Asp Xaa Trp Xaa

1

5

<210>28

<211>5

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成
肽

<220>

<221>MOD_RES

<222>(2)..(2)

<223> 任何氨基酸

⟨220⟩

⟨221⟩MOD_RES

⟨222⟩(4)..(5)

⟨223⟩任何氨基酸

⟨220⟩

⟨223⟩对于取代和优选实施方案的详细描述

参见说明书

⟨400⟩28

Ser Xaa Ala Xaa Xaa

1 5

⟨210⟩29

⟨211⟩16

⟨212⟩PRT

⟨213⟩人工序列

⟨220⟩

⟨223⟩人工序列的描述 :合成
肽

⟨220⟩

⟨221⟩MOD_RES

⟨222⟩(2)..(2)

⟨223⟩任何氨基酸

⟨220⟩

⟨221⟩MOD_RES

⟨222⟩(5)..(9)

⟨223⟩任何氨基酸

⟨220⟩

⟨221⟩MOD_RES

⟨222⟩(11)..(16)

⟨223⟩任何氨基酸

⟨220⟩

⟨223⟩对于取代和优选实施方案的详细描述

参见说明书

<400>29

Ser Xaa Ser Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

<210>30

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成
肽

<220>

<221>MOD_RES

<222>(7)..(10)

<223> 任何氨基酸

<220>

<223> 对于取代和优选实施方案的详细描述

参见说明书

<400>30

Leu Asp Gly Tyr Tyr Phe Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210>31

<211>132

<212>PRT

<213> 人

<400>31

Met Ala Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly
 1 5 10 15

Phe Ala Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu
 20 25 30

Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys

35	40	45													
Asn	Gly	Ser	Met	Val	Trp	Ser	Ile	Asn	Leu	Thr	Ala	Gly	Met	Tyr	Cys
50															
Ala	Ala	Leu	Glu	Ser	Leu	Ile	Asn	Val	Ser	Gly	Cys	Ser	Ala	Ile	Glu
65															
Lys	Thr	Gln	Arg	Met	Leu	Ser	Gly	Phe	Cys	Pro	His	Lys	Val	Ser	Ala
85															
Gly	Gln	Phe	Ser	Ser	Leu	His	Val	Arg	Asp	Thr	Lys	Ile	Glu	Val	Ala
100															
Gln	Phe	Val	Lys	Asp	Leu	Leu	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg	Glu	
115															
Gly	Arg	Phe	Asn												
130															

<210>32

<211>113

<212>PRT

<213> 人

<400>32

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

Asn

<210>33

<211>333

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成
多核苷酸

<400>33

gacatcggtgc	tcactcagtc	tccagcttct	ttggctgtgt	ctccaggcga	gagggccacc	60
ataacctgca	aagccagtga	aagtgttgat	aattatggca	aaagtttaat	gcactggtag	120
cagcagaaac	caggacagcc	acccaaactc	ctcatctatc	gtgcattccaa	cctagaatct	180
ggggtcctg	ccaggttcag	tggcagtggg	tctgggacag	acttcaccct	caccattaaat	240
cctgtggagg	ctaatgatac	tgcaaactat	tactgtcagc	aaagtaatga	ggatccgtgg	300
acgttcggtg	gagggaccaa	ggtggaaata	aaa			333

<210>34

<211>354

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成
多核苷酸

<400>34

gaggtccagc	tggtgaggc	agggggaggc	ttagtgaaac	ctggagggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	cactttcatt	agctatgcca	tgtcttgggt	tcgtcaggct	120
ccagggaagg	ggctggagtg	ggtctcatcc	attagtagtg	gtggtaacac	ctactatcca	180
gacagtgtga	agggccgatt	caccatctcc	agagataatg	ccaagaacag	cctatacctg	240
caaataaca	gtctgagggc	tgaggacacg	gccgtgtatt	actgtgcacg	acttgatgg	300
tactactttg	gatttgctta	ctggggccaa	gggaccacgg	tcaccgtctc	ctca	354

<210>35

<211>111

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成
多肽

<400>35

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

<210>36

<211>118

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成
多肽

<400>36

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

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210>37

<211>427

<212>PRT

<213> 人

<400>37

Met Glu Trp Pro Ala Arg Leu Cys Gly Leu Trp Ala Leu Leu Cys

1 5 10 15

Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Pro Thr Glu Thr Gln

20 25 30

Pro Pro Val Thr Asn Leu Ser Val Ser Val Glu Asn Leu Cys Thr Val

35 40 45

Ile Trp Thr Trp Asn Pro Pro Glu Gly Ala Ser Ser Asn Cys Ser Leu

50 55 60

Trp Tyr Phe Ser His Phe Gly Asp Lys Gln Asp Lys Lys Ile Ala Pro

65 70 75 80

Glu Thr Arg Arg Ser Ile Glu Val Pro Leu Asn Glu Arg Ile Cys Leu

85 90 95

Gln Val Gly Ser Gln Cys Ser Thr Asn Glu Ser Glu Lys Pro Ser Ile

100 105 110

Leu Val Glu Lys Cys Ile Ser Pro Pro Glu Gly Asp Pro Glu Ser Ala

115 120 125

Val Thr Glu Leu Gln Cys Ile Trp His Asn Leu Ser Tyr Met Lys Cys

130 135 140

Ser Trp Leu Pro Gly Arg Asn Thr Ser Pro Asp Thr Asn Tyr Thr Leu

145 150 155 160

Tyr Tyr Trp His Arg Ser Leu Glu Lys Ile His Gln Cys Glu Asn Ile

165 170 175

Phe Arg Glu Gly Gln Tyr Phe Gly Cys Ser Phe Asp Leu Thr Lys Val

180 185 190

Lys Asp Ser Ser Phe Glu Gln His Ser Val Gln Ile Met Val Lys Asp

195 200 205

Asn Ala Gly Lys Ile Lys Pro Ser Phe Asn Ile Val Pro Leu Thr Ser

210 215 220

Arg Val Lys Pro Asp Pro Pro His Ile Lys Asn Leu Ser Phe His Asn

225 230 235 240

Asp Asp Leu Tyr Val Gln Trp Glu Asn Pro Gln Asn Phe Ile Ser Arg
 245 250 255
 Cys Leu Phe Tyr Glu Val Glu Val Asn Asn Ser Gln Thr Glu Thr His
 260 265 270
 Asn Val Phe Tyr Val Gln Glu Ala Lys Cys Glu Asn Pro Glu Phe Glu
 275 280 285
 Arg Asn Val Glu Asn Thr Ser Cys Phe Met Val Pro Gly Val Leu Pro
 290 295 300
 Asp Thr Leu Asn Thr Val Arg Ile Arg Val Lys Thr Asn Lys Leu Cys
 305 310 315 320
 Tyr Glu Asp Asp Lys Leu Trp Ser Asn Trp Ser Gln Glu Met Ser Ile
 325 330 335
 Gly Lys Lys Arg Asn Ser Thr Leu Tyr Ile Thr Met Leu Leu Ile Val
 340 345 350
 Pro Val Ile Val Ala Gly Ala Ile Ile Val Leu Leu Leu Tyr Leu Lys
 355 360 365
 Arg Leu Lys Ile Ile Ile Phe Pro Pro Ile Pro Asp Pro Gly Lys Ile
 370 375 380
 Phe Lys Glu Met Phe Gly Asp Gln Asn Asp Asp Thr Leu His Trp Lys
 385 390 395 400
 Lys Tyr Asp Ile Tyr Glu Lys Gln Thr Lys Glu Glu Thr Asp Ser Val
 405 410 415
 Val Leu Ile Glu Asn Leu Lys Lys Ala Ser Gln
 420 425

<210>38

<211>117

<212>PRT

<213> 人

<400>38

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Arg Arg Gly Ser Gly Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210>39

<211>107

<212>PRT

<213> 人

<400>39

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

<210>40

<211>98

<212>PRT

<213> 人

<400>40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20	25	30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg		

<210>41

<211>99

<212>PRT

<213> 人

<400>41

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

<210>42

<211>98

<212>PRT

<213> 人

<400>42

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

<210>43

〈211〉97

<212>PRT

〈213〉人

〈400〉43

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Gly Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 66 71 76 81

118

210/44

(211) 100

〈212〉 PRI

(218) 八

<100> 11

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

<210>45

<211>98

<212>PRT

<213> 人

<400>45

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

<210>46

<211>98

<212>PRT

<213> 人

<400>46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg

<210>47

<211>98

<212>PRT

<213> 人

<400>47

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys

<210>48

<211>98

<212>PRT

<213> 人

<400>48

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

<210>49

<211>98

<212>PRT

<213> 人

<400>49

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

<210>50

<211>98

<212>PRT

<213> 人

<400>50

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

<210>51

<211>98

<212>PRT

<213> 人

<400>51

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

<210>52

<211>99

<212>PRT

<213> 人

<400>52

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

<210>53

<211>98

<212>PRT

<213> 人

<400>53

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

<210>54

<211>100

<212>PRT

<213> 人

<400>54

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

<210>55

<211>97

<212>PRT

<213> 人

<400>55

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

<210>56

<211>98

<212>PRT

<213> 人

<400>56

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg

<210>57

<211>97

<212>PRT

<213> 人

<400>57

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg

<210>58

<211>100

<212>PRT

<213>人

<400>58

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp His

20 25 30

Tyr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Arg Thr Arg Asn Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg

100

<210>59

<211>100

<212>PRT

<213>人

<400>59

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Ala Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr Arg
100

<210>60
<211>98
<212>PRT
<213> 人

<400>60

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

<210>61
<211>96
<212>PRT
<213> 人

<400>61

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

85

90

95

<210>62

<211>97

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成
肽

<400>62

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

Arg

<210>63

<211>97

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>63

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg

<210>64

<211>98

<212>PRT

<213> 人

<400>64

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg

<210>65

<211>102

<212>PRT

<213> 人

<400>65

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

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Phe Leu
 20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Asn Lys Asp Thr Gly Val Pro Ala

50	55	60													
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn
65															80
Pro	Val	Glu	Ala	Asn	Asp	Thr	Ala	Asn	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Ser	Lys
															95
Asn	Phe	Pro	Pro	Thr	Val										
															100

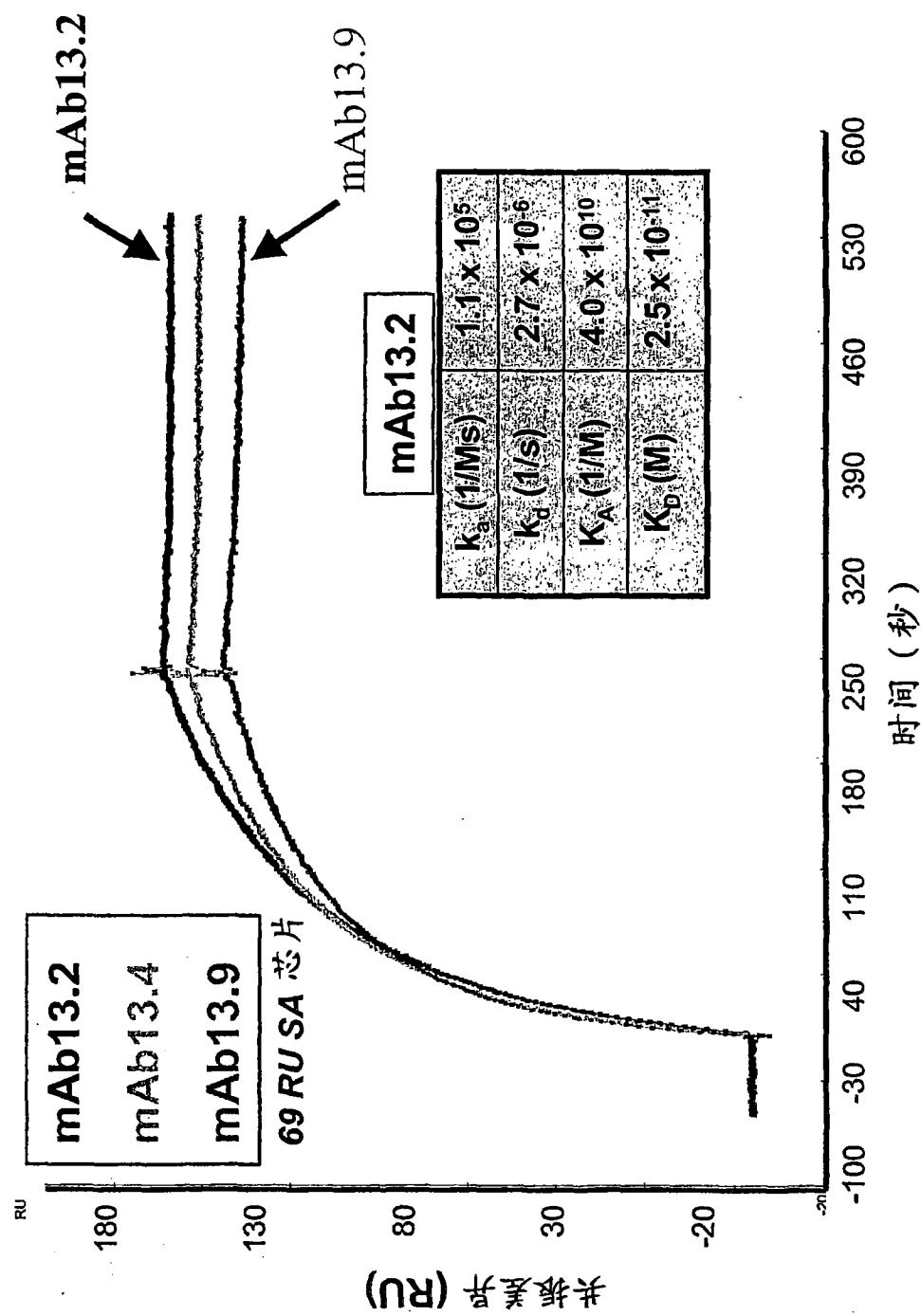


图 1

小鼠 mAb13.2 与人 IL13 的结合

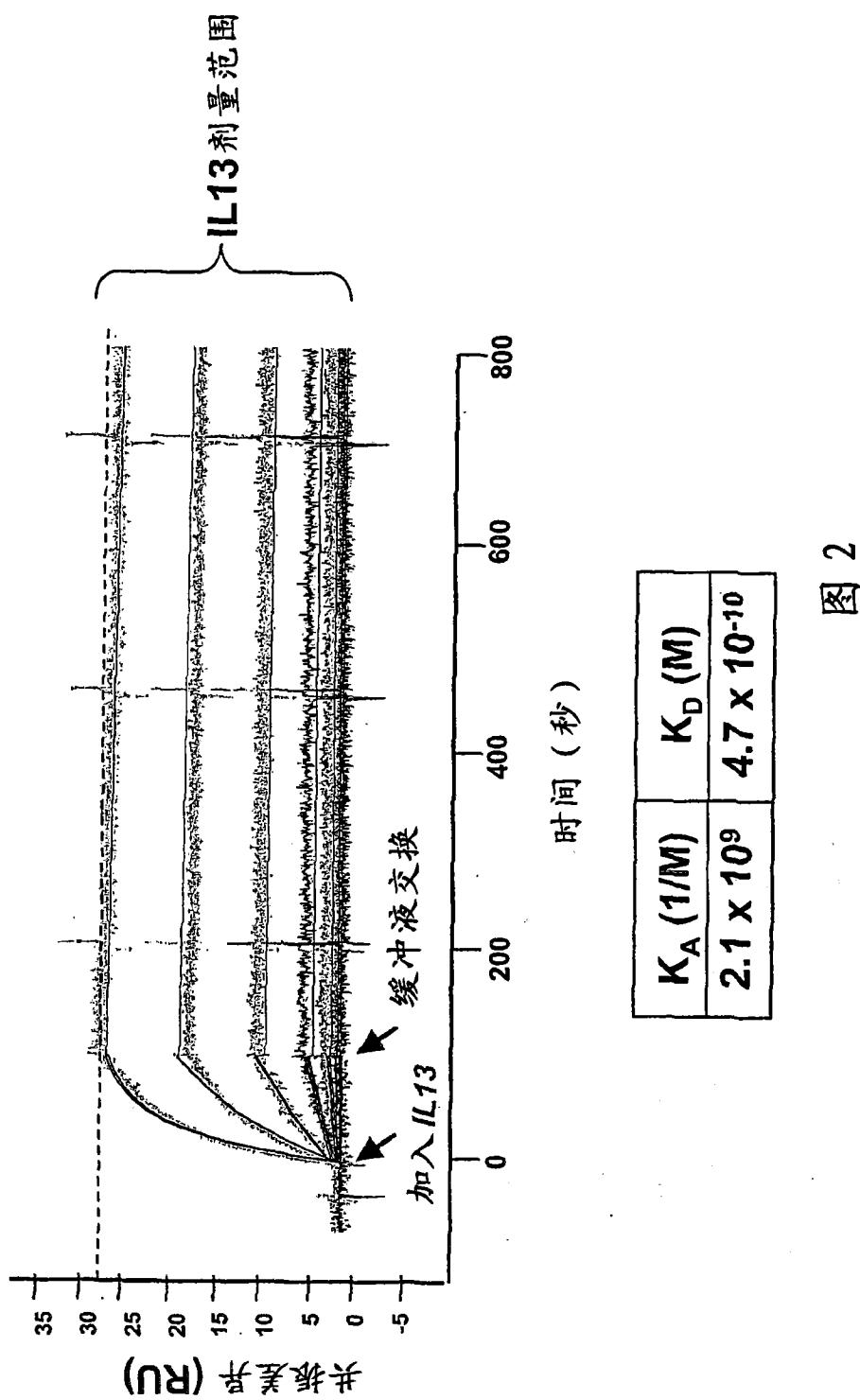


图 2

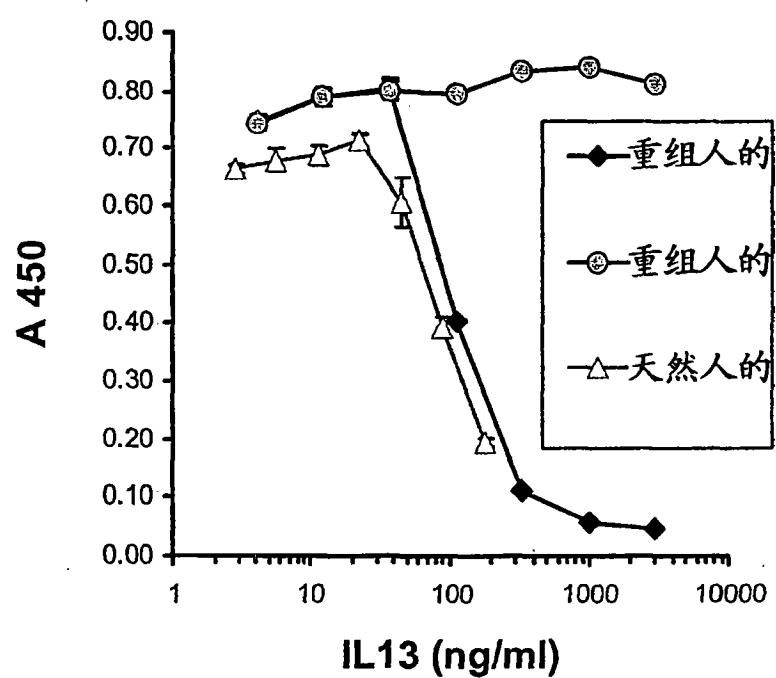


图 3

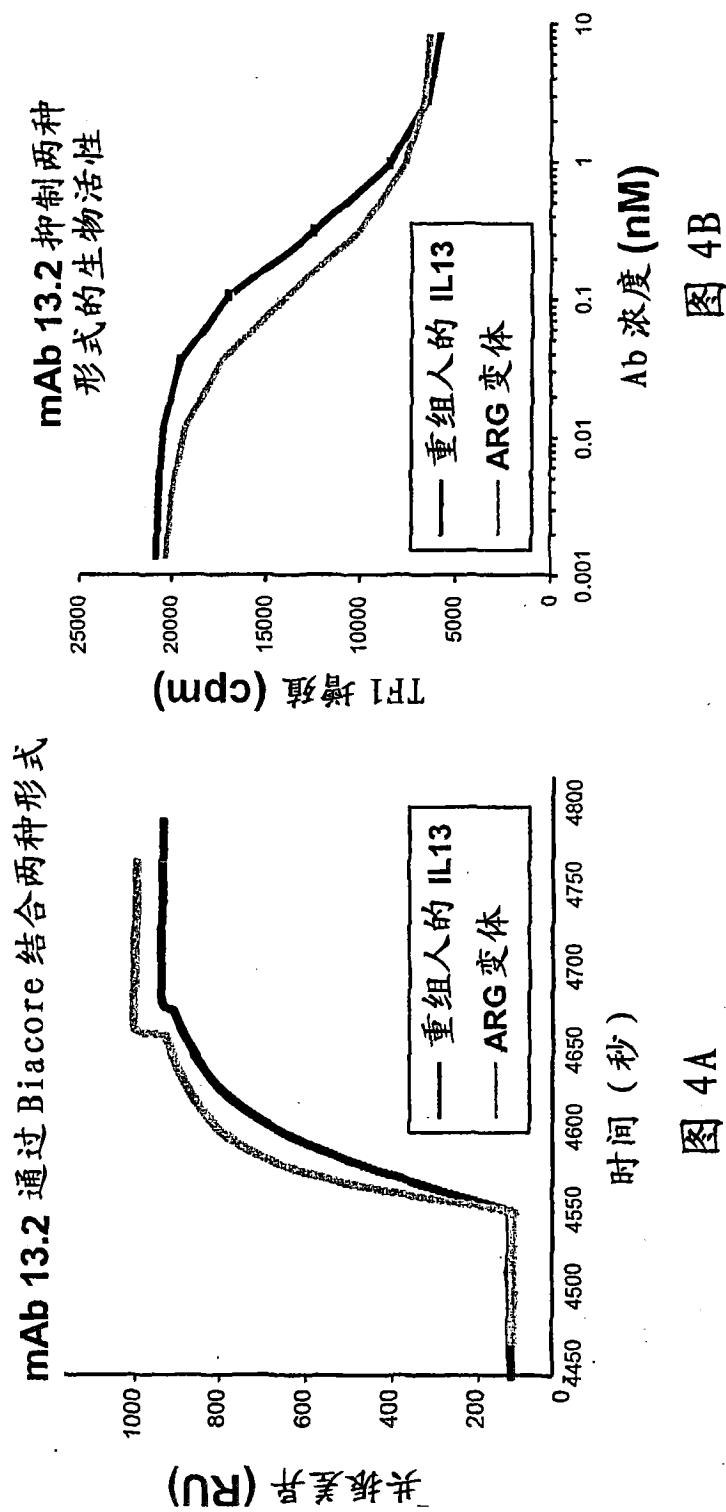


图 4A

图 4B

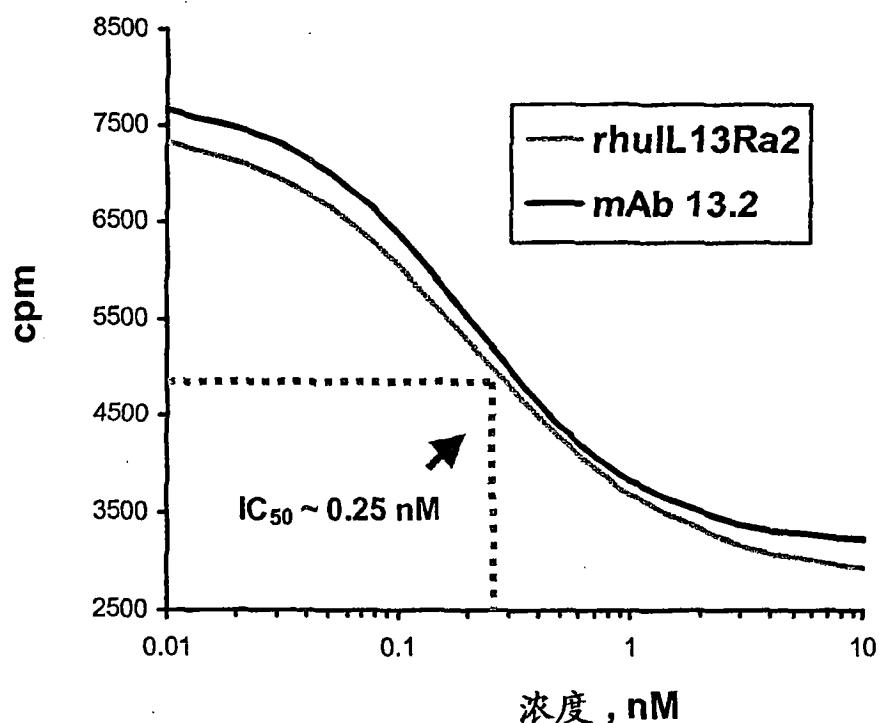


图 5

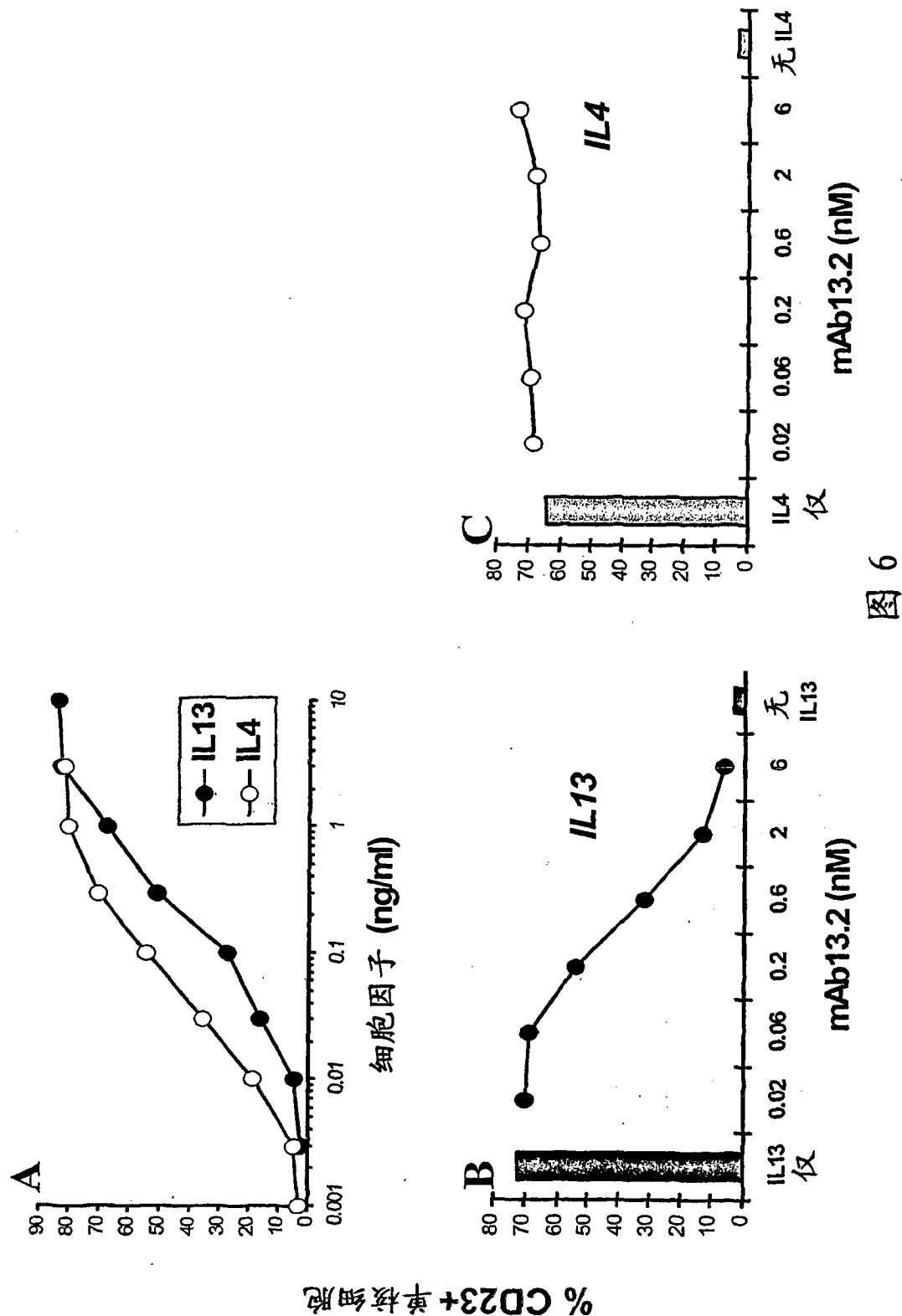


图 6

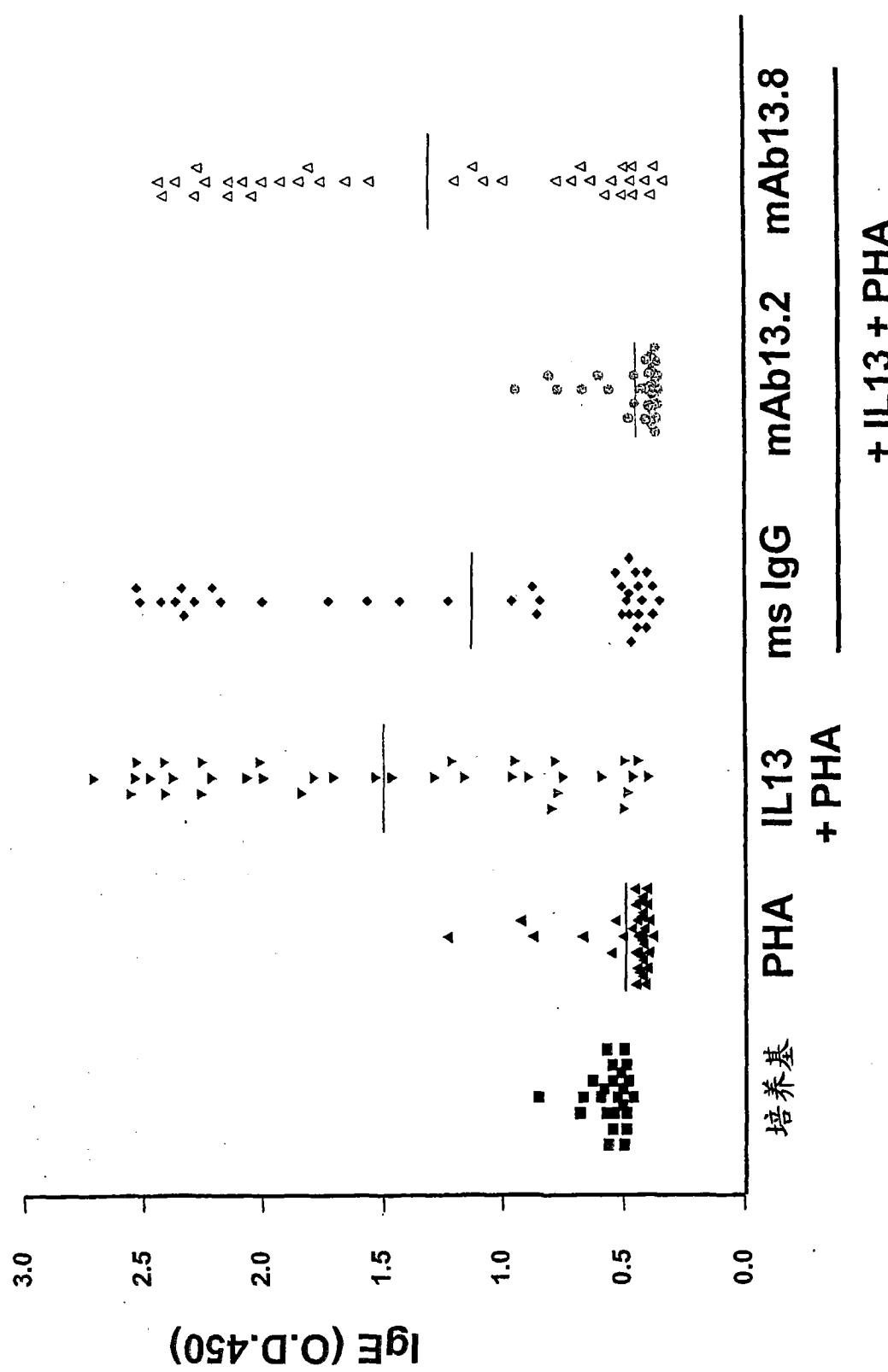


图 7

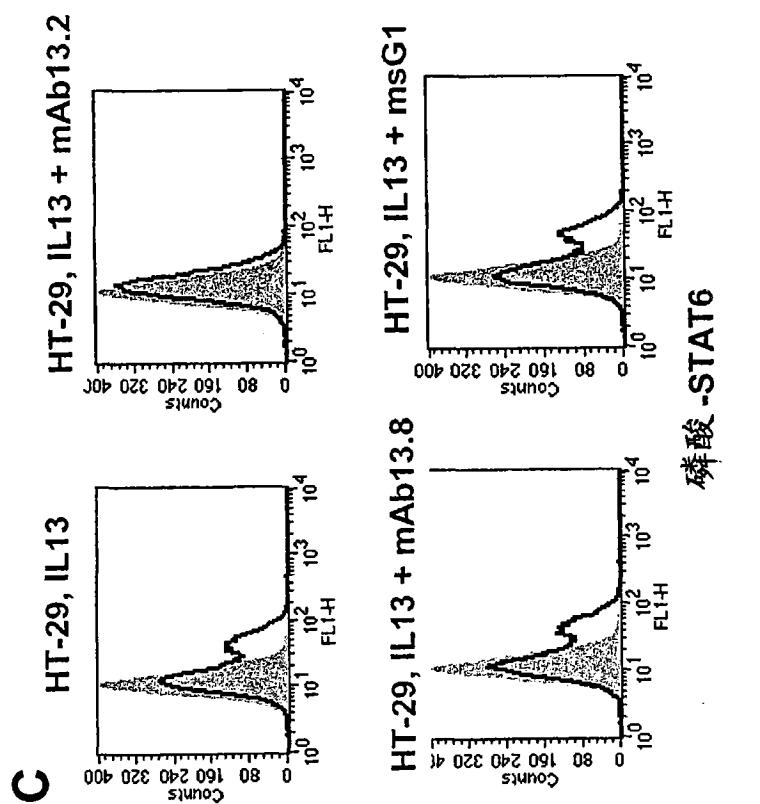
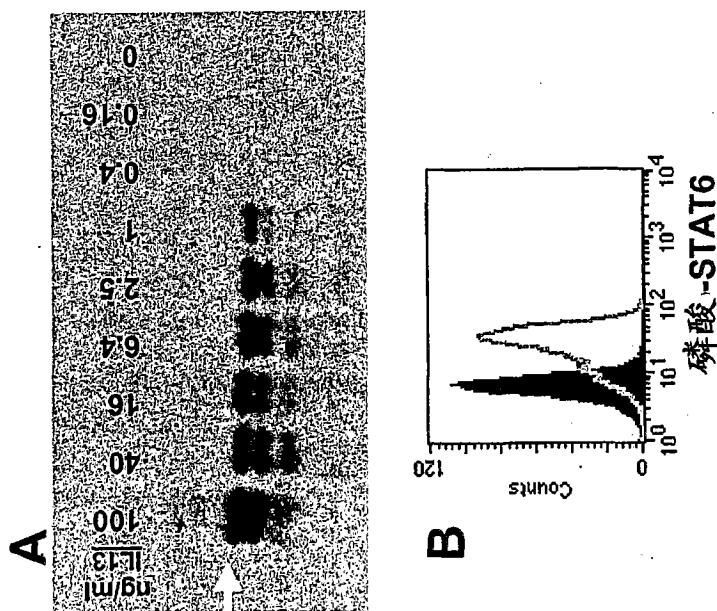


图 8



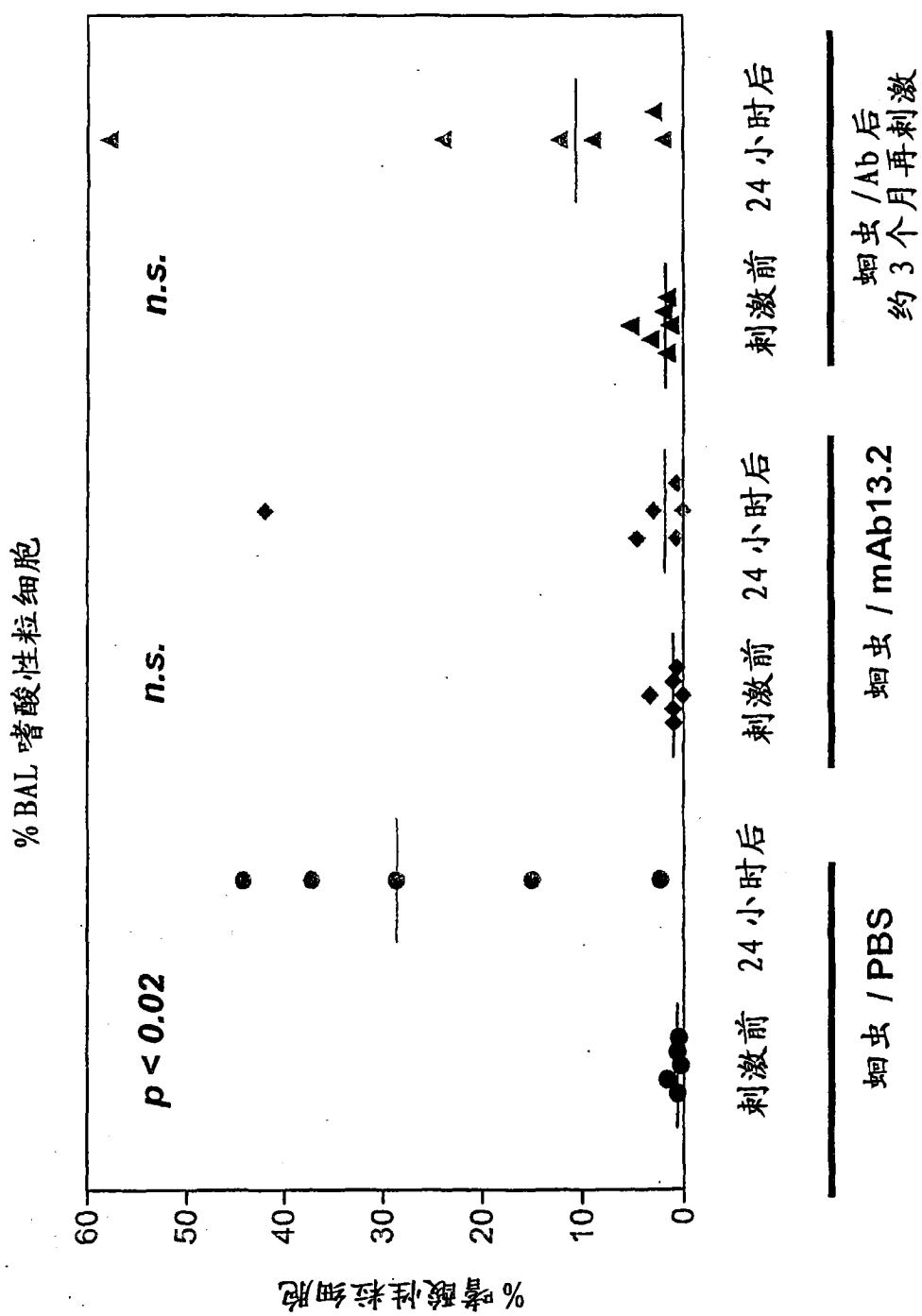


图 9



图 10

↓

MALLTTVIALTCLGGFASPGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKA 25/45

PLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGF 69/89

CPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKKLFREGRFN 112/132

■ 晶体结构的主要 Ab- 接触位点
■ ARG 变体 (R130Q)
α 融旋

图 11

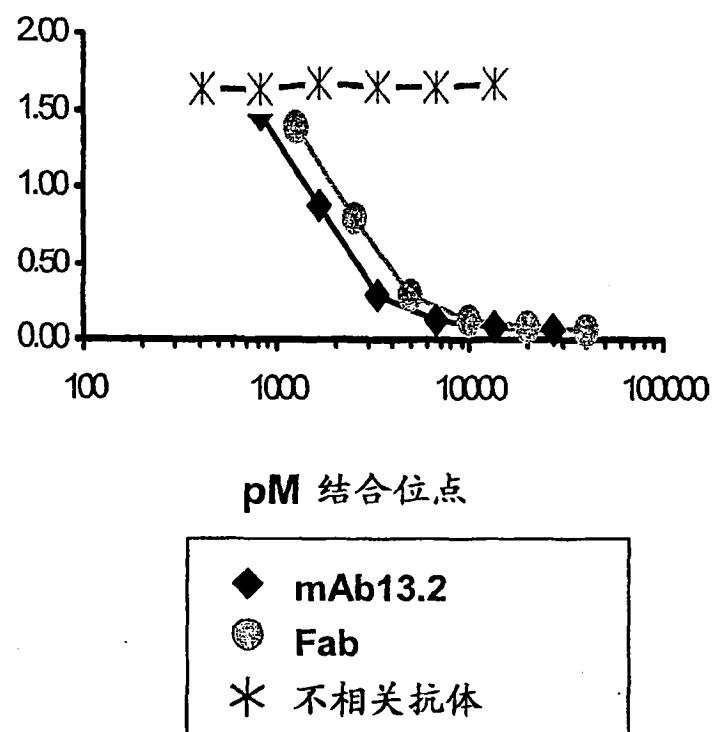


图 12B

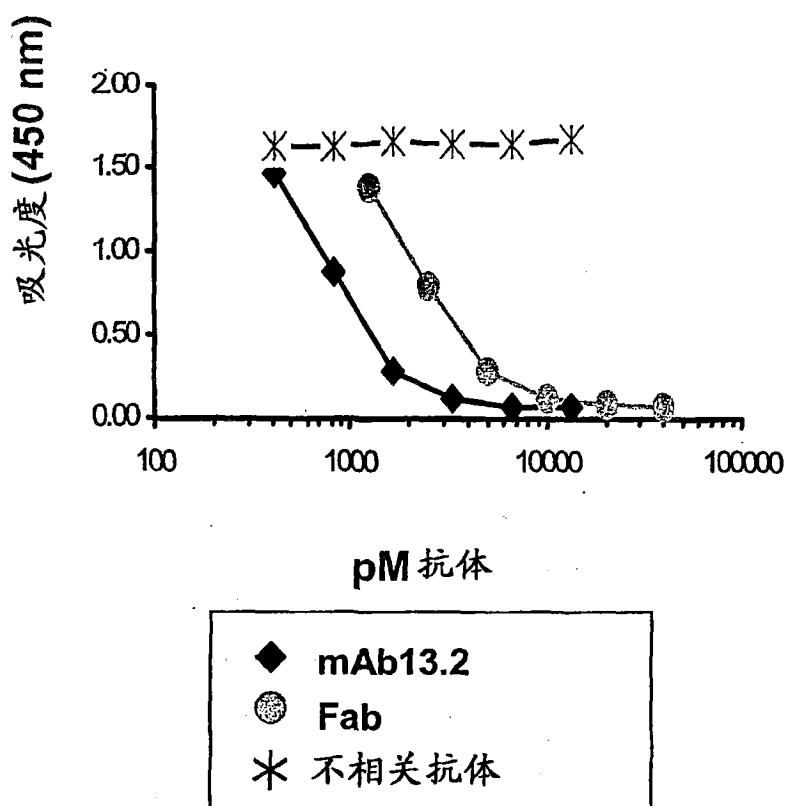


图 12A

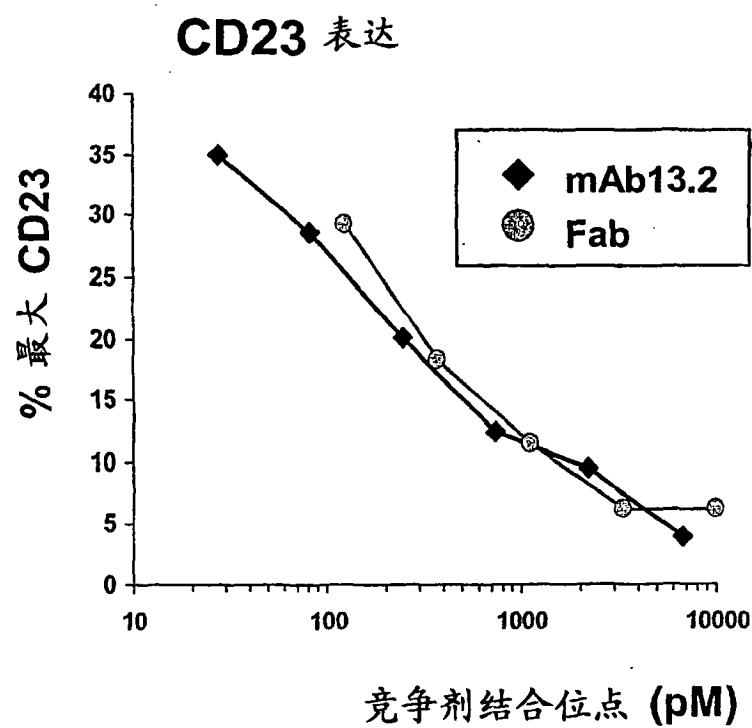


图 13B

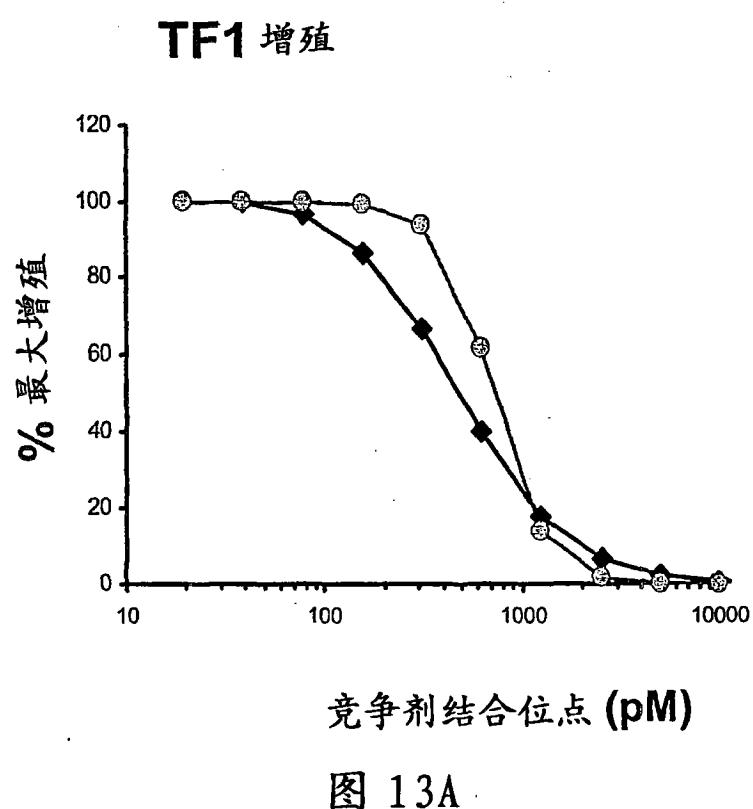


图 13A

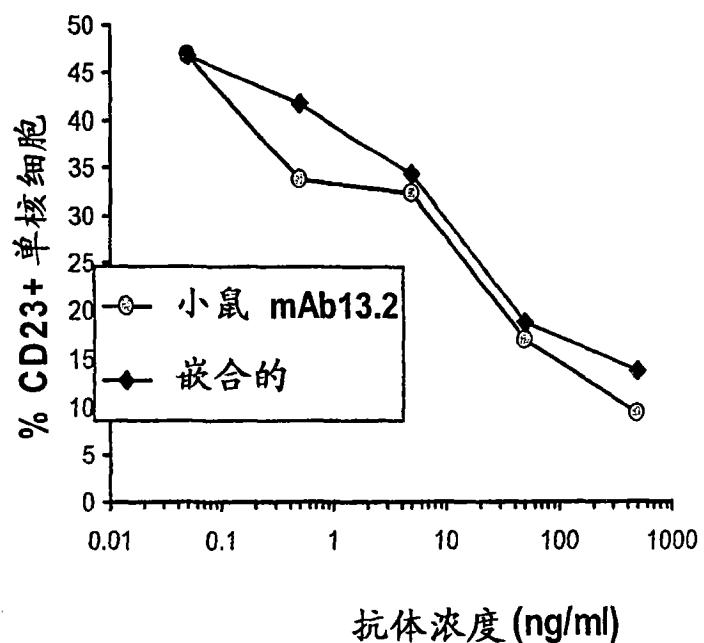


图 14B

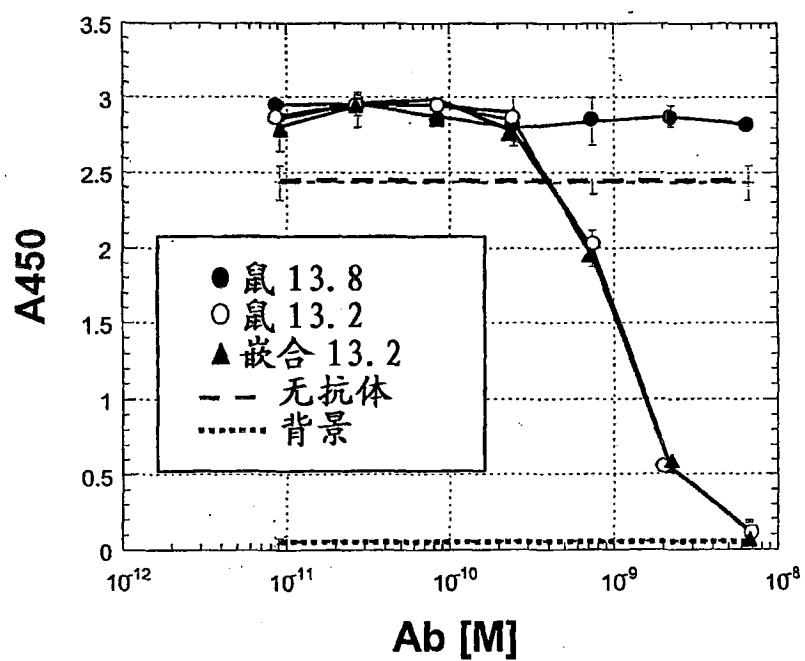


图 14A

DP-54 hu ger 鼠 13.2 h13.2v1	EVOLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS EVKLVESGGG LV <u>Q</u> PGGSL <u>R</u> SCAASGFT <u>F</u> EVKLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFT <u>F</u>	CDR1	SYWMSWVRQA PGKGLEWVAN SYAMSWVRQ <u>T</u> PE <u>K</u> RLEWVAS SYAMSWVRQA PGKGLEWVAS
		CDR2	IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNaKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARY. I. <u>SSGGNTYY</u> PDSVKGRFTI SRDNa <u>ARN</u> ILY LQM <u>S</u> LR <u>S</u> ED TAVYYCAR <u>D</u> I. <u>SSGGNTYY</u> PDSVKGRFTI SRDNaKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAR <u>D</u>
		CDR3	RRGSGDS. <u>WG</u> Q <u>GT</u> LVTVSS G <u>Y</u> FGFA <u>Y</u> WG Q <u>GT</u> <u>Y</u> TVSS G <u>Y</u> FGFA <u>Y</u> WG Q <u>GT</u> LVTVSS
DP-54 hu ger 鼠 13.2 h13.2v1		CDR1	SYWMSWVRQA PGKGLEWVAN SYAMSWVRQ <u>T</u> PE <u>K</u> RLEWVAS SYAMSWVRQA PGKGLEWVAS
		CDR2	IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNaKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARY. I. <u>SSGGNTYY</u> PDSVKGRFTI SRDNa <u>ARN</u> ILY LQM <u>S</u> LR <u>S</u> ED TAVYYCAR <u>D</u> I. <u>SSGGNTYY</u> PDSVKGRFTI SRDNaKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAR <u>D</u>
		CDR3	R <u>RGSGDS.</u> <u>WG</u> Q <u>GT</u> LVTVSS G <u>Y</u> FGFA <u>Y</u> WG Q <u>GT</u> <u>Y</u> TVSS G <u>Y</u> FGFA <u>Y</u> WG Q <u>GT</u> LVTVSS

*氨基酸改变的
未改变的

图 15

CDR1		
DPK9 hu ger	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT
Murine 13.2	<u>DI</u> VLTQSP <u>S</u>	<u>I</u> AV <u>S</u> IG <u>R</u> AT
h13.2v1	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT
CDR2		
DPK9 hu ger	LIYASSLQS	GVPSRFSGSG
Murine 13.2	<u>LI</u> YRASN <u>L</u> E <u>S</u>	<u>G</u> IP <u>A</u> RFSGSG
h13.2v1	LIYRASN <u>L</u> E <u>S</u>	GVPSRFSGSG
CDR3		
DPK9 hu ger	TFGGGTKVEI	K
Murine 13.2	TFGGGTK <u>I</u> LEI	K
h13.2v1	TFGGGTK <u>V</u> EI	K

* 氨基酸改变
未改变的

图 16

DP-54 hu ger	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS	SYWM <u>SWVRQA</u> PGKGLEWVAN	CDR1
鼠 13.2	<u>EVQLVESGGG LV<u>PGGSLRL SCAASGFT<u>SI</u></u></u>	<u>SYAM<u>SWVRQ<u>I</u></u> PE<u>KELEW<u>VAS</u></u></u>	
h13.2v2	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFT <u>FI</u>	<u>SYAM<u>SWVRQ<u>I</u></u> PGKGLEW<u>VAS</u></u>	
			CDR3
DP-54 hu ger	IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI	SRDNAAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARV.	CDR2
鼠 13.2	<u>I.<u>SSGGNTYY PDSVKGRFTI</u></u>	<u>SRDNAA<u>INILY LQM<u>SSLR<u>SED TAVYYCARL<u>D</u></u></u></u></u>	
h13.2v2	<u>I.<u>SSGGNTYY PDSVKGRFTI</u></u>	<u>SRDNAAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARL<u>D</u></u>	
			CDR3
DP-54 hu ger	RRGSGDS.WG QGT <u>LVTVSS</u>		
鼠 13.2	<u>GYYFGFA<u>W<u>WG QGT<u>TVTVSS</u></u></u></u>		
h13.2v2	<u>GYYFGFA<u>W<u>WG QGT<u>LVTVSS</u></u></u></u>		

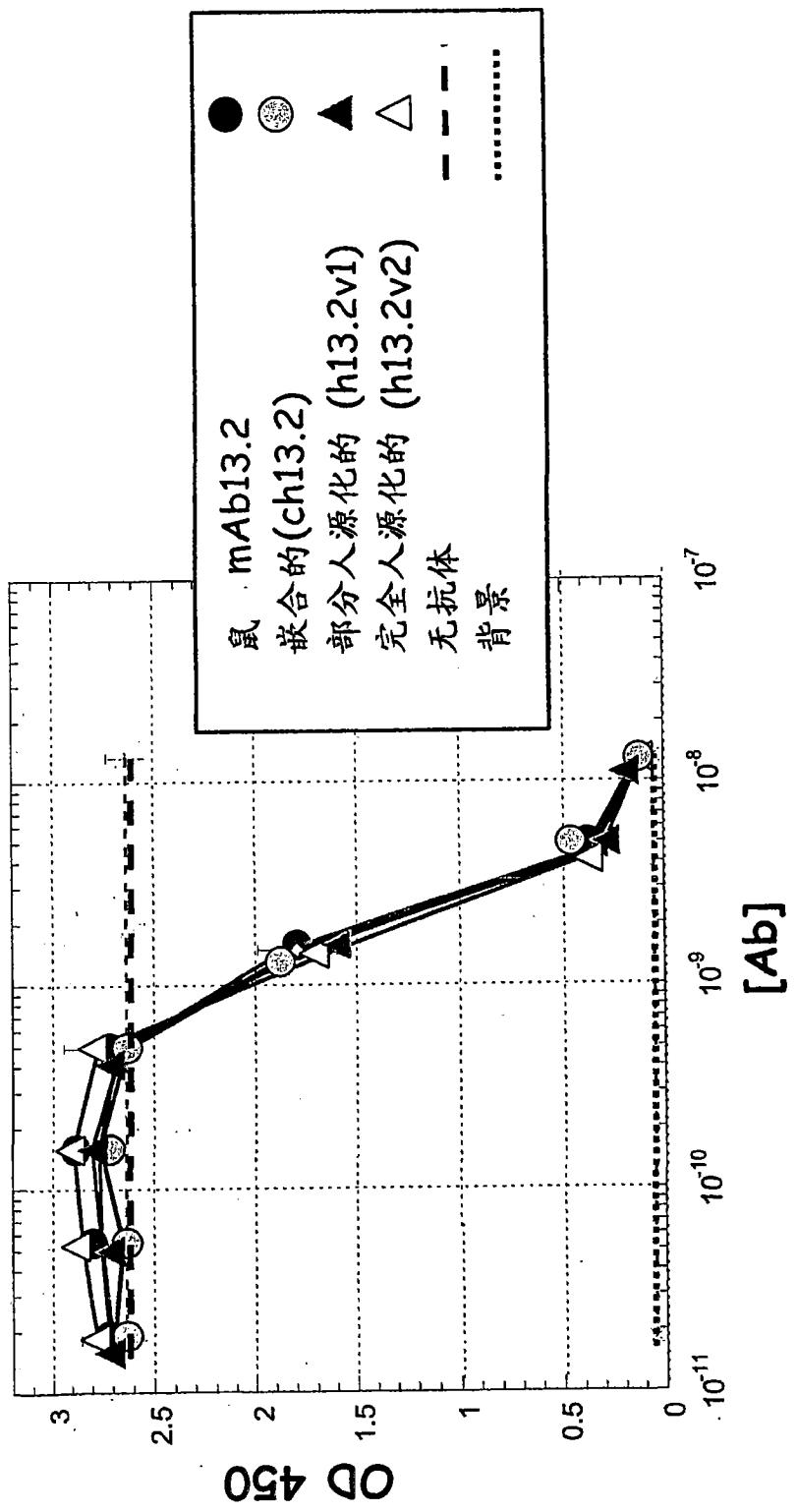
氨基酸改变的
未改变的

		CDR1			CDR3		
DPK9	hu ger	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQOSIS	SY...LNWY	QQKPGKAPKL	
Murine	13.2	DIQMTQSPSS	IAV <u>sh</u> <u>cor</u> AT	ISCKASESVD	NYGKSLMHWY	QQKPG <u>Q</u> SPKL	
h13.2v2		DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCKASESVD	NYGKSLMHWY	QQKPGKAPKL	
		CDR2			CDR3		
DPK9	hu ger	LIYASSILQS	GVPSSRFSGSG	SGTDFITLTIS	SLQPEDFATY	YCQQSYSTILL	
Murine	13.2	LIYRASN <u>LE</u> S	G <u>IP</u> ARFSGSG	S <u>RT</u> DFITLT <u>IN</u>	P <u>VEA</u> DDVATY	YCQQSNEDPW	
h13.2v2		LIYRASN <u>LE</u> S	GVPSSRFSGSG	SGTDFITLTIS	SLQPEDFATY	YCQQSNEDPW	
		CDR3			CDR3		
DPK9	hu ger	TFGGGT <u>K</u> VEI	K	TFGGGT <u>K</u> VEI	K	YCQQSYSTILL	
Murine	13.2	TFGGGT <u>K</u> VEI	K	TFGGGT <u>K</u> VEI	K	YCQQSNEDPW	
h13.2v2		TFGGGT <u>K</u> VEI	K	TFGGGT <u>K</u> VEI	K	YCQQSNEDPW	

* 氨基酸改变

未改变的

图 18



h13.2v2 结合人 IL13

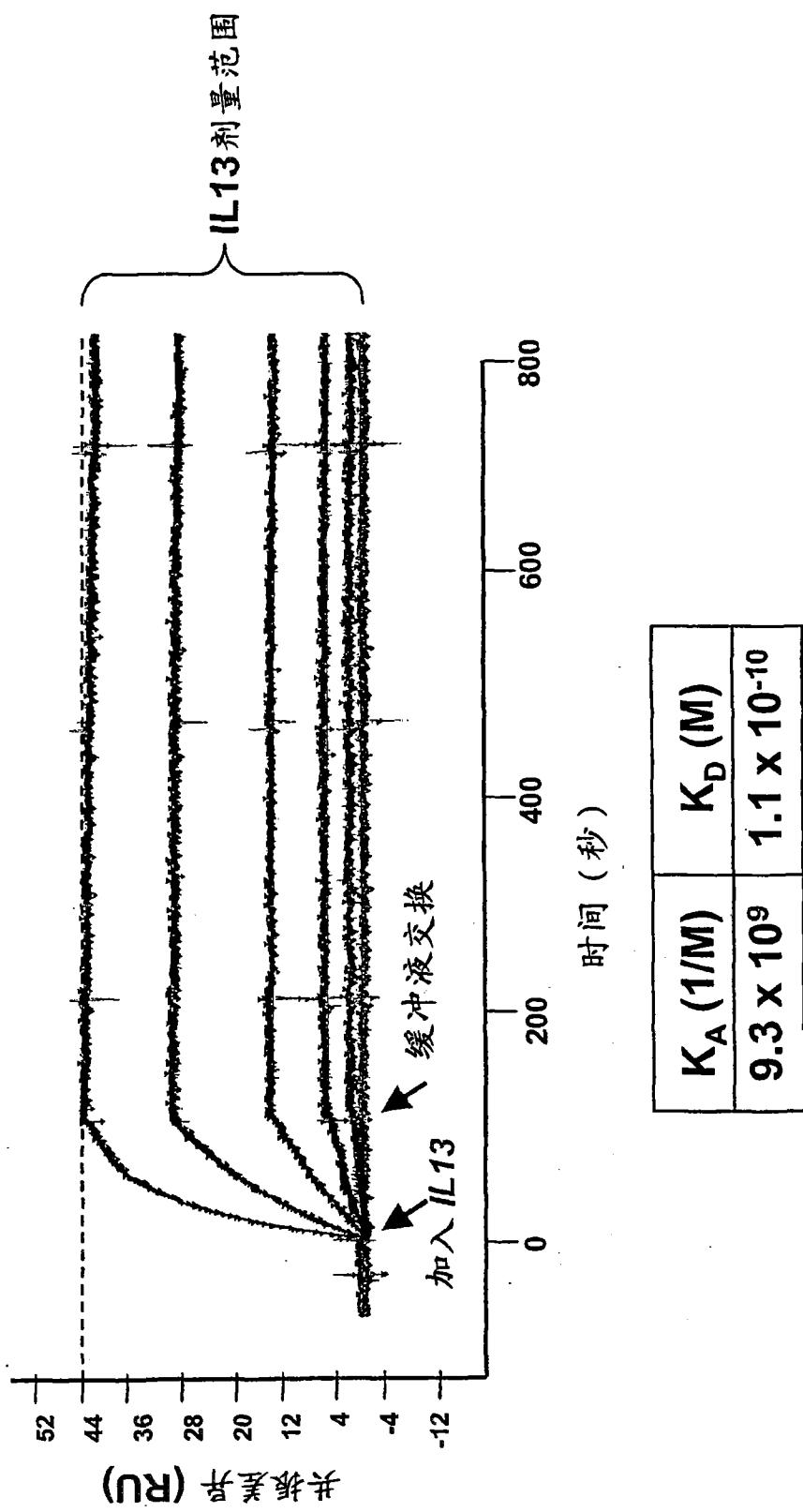


图 19B

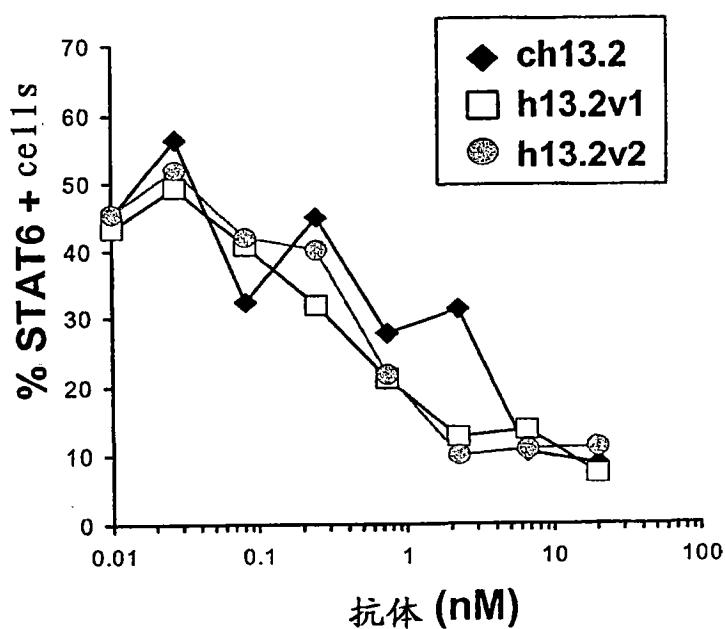


图 20B

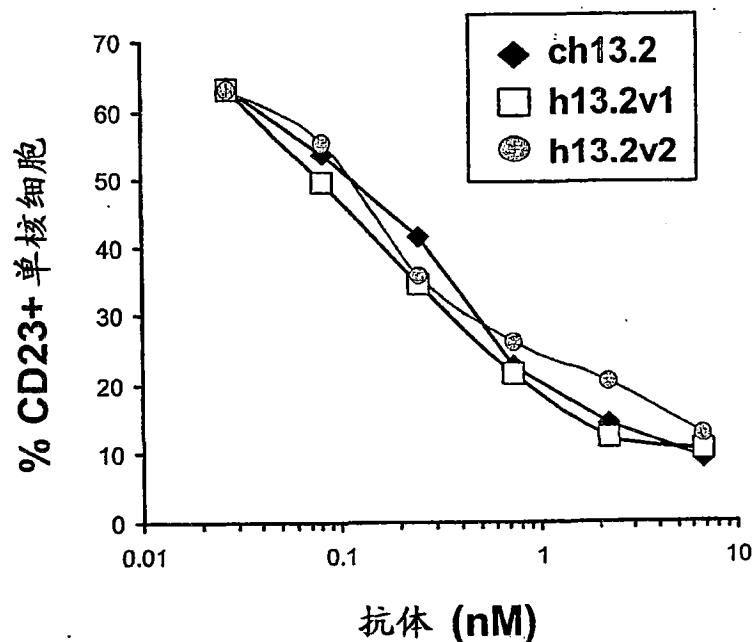


图 20A

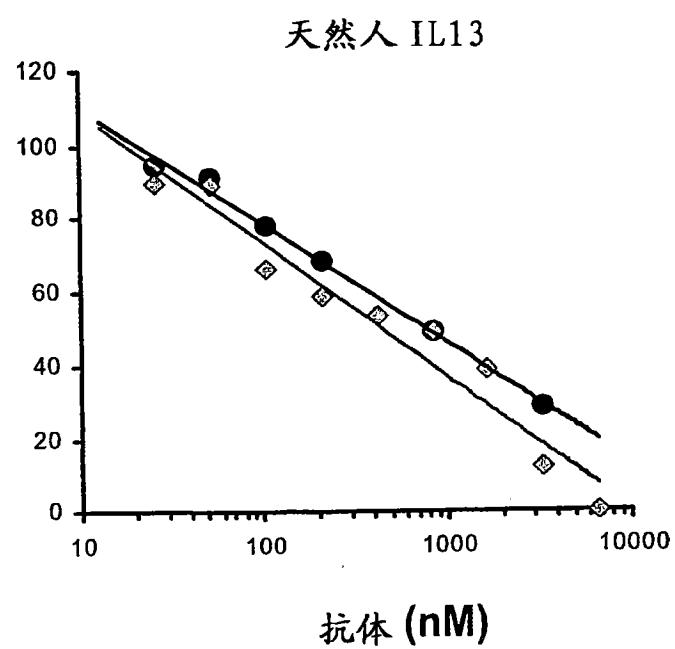


图 21B

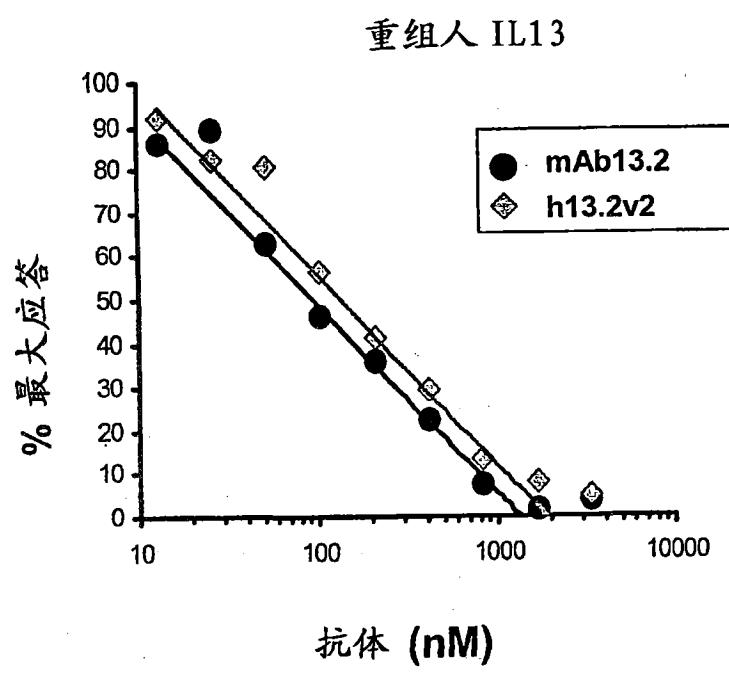


图 21A

重组绵羊 IL13

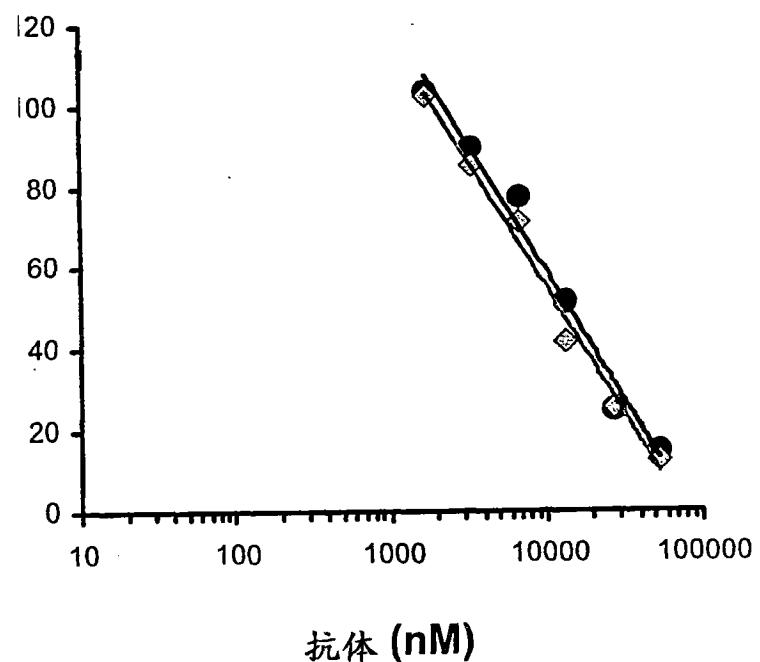


图 22B

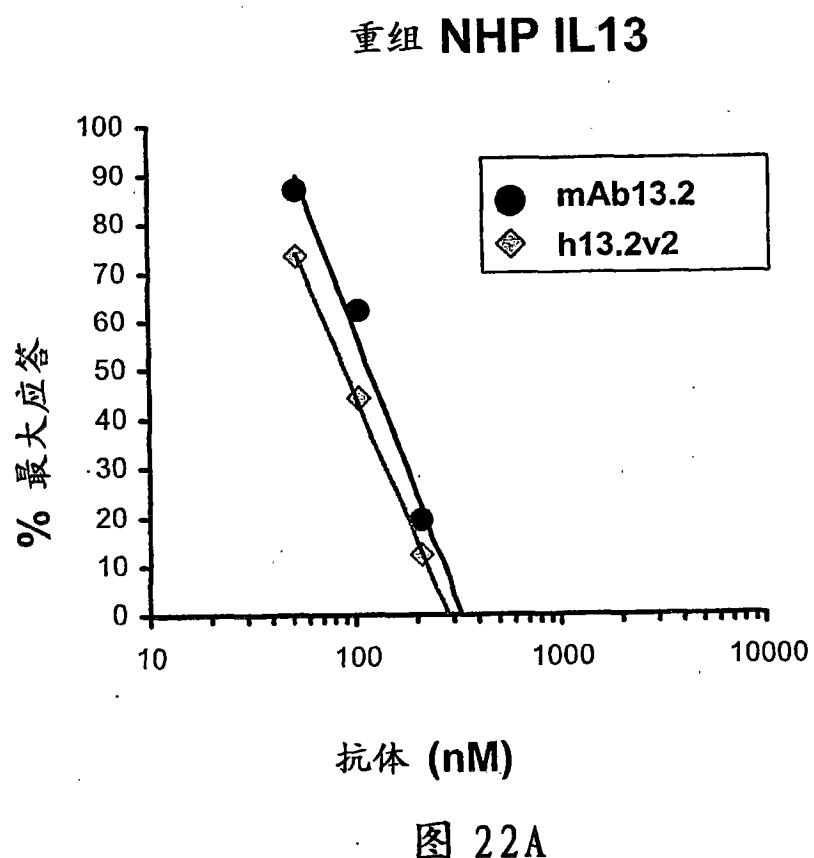


图 22A

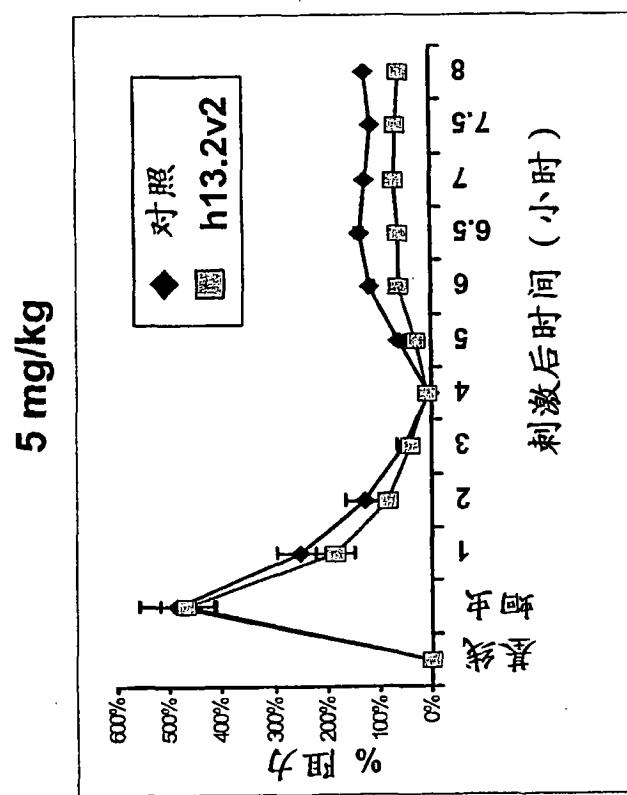


图 23B

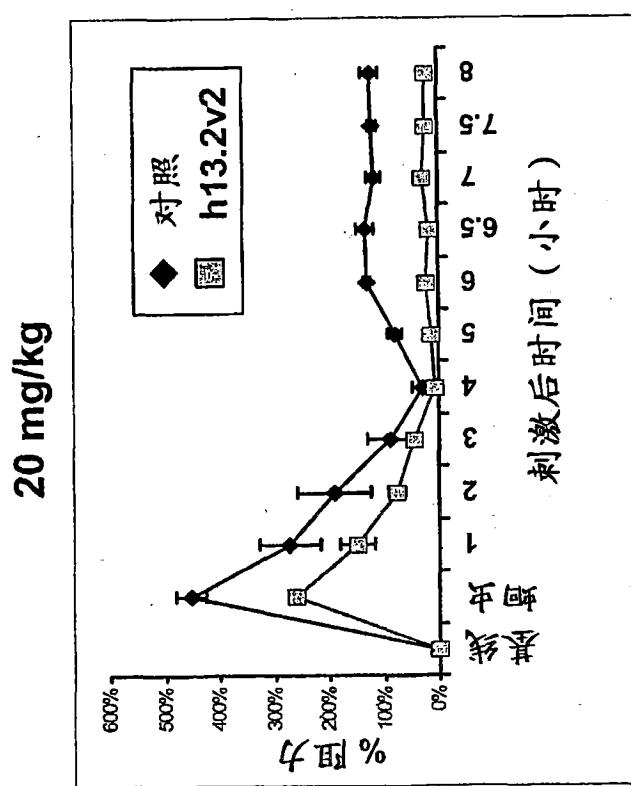


图 23A

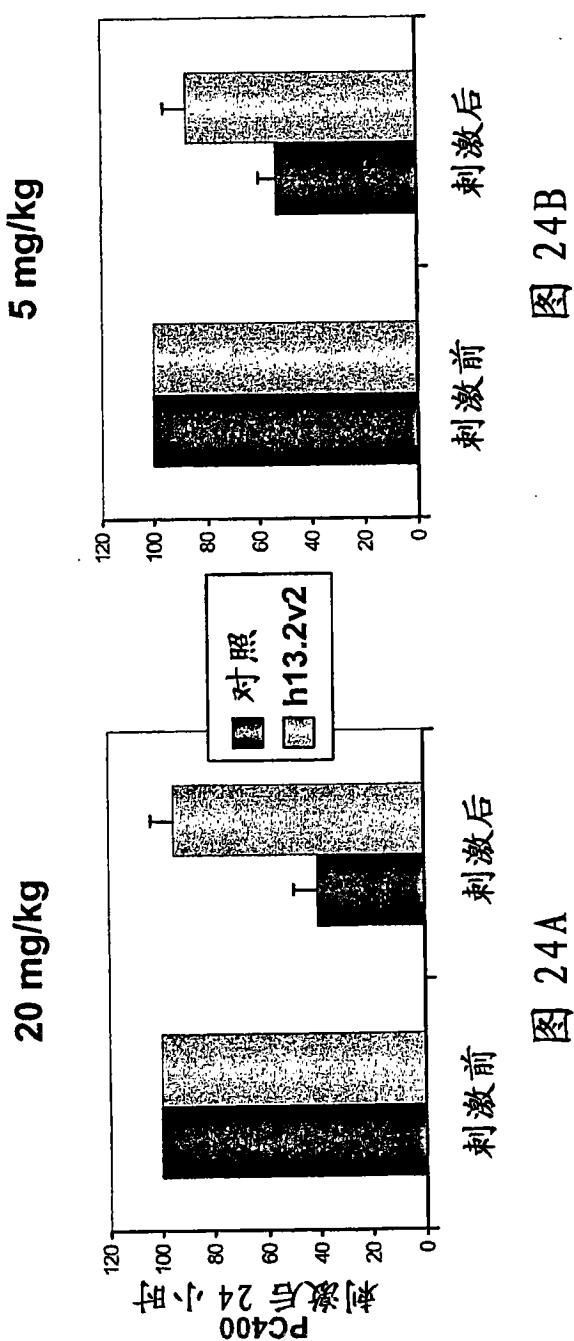


图 24A

图 24B

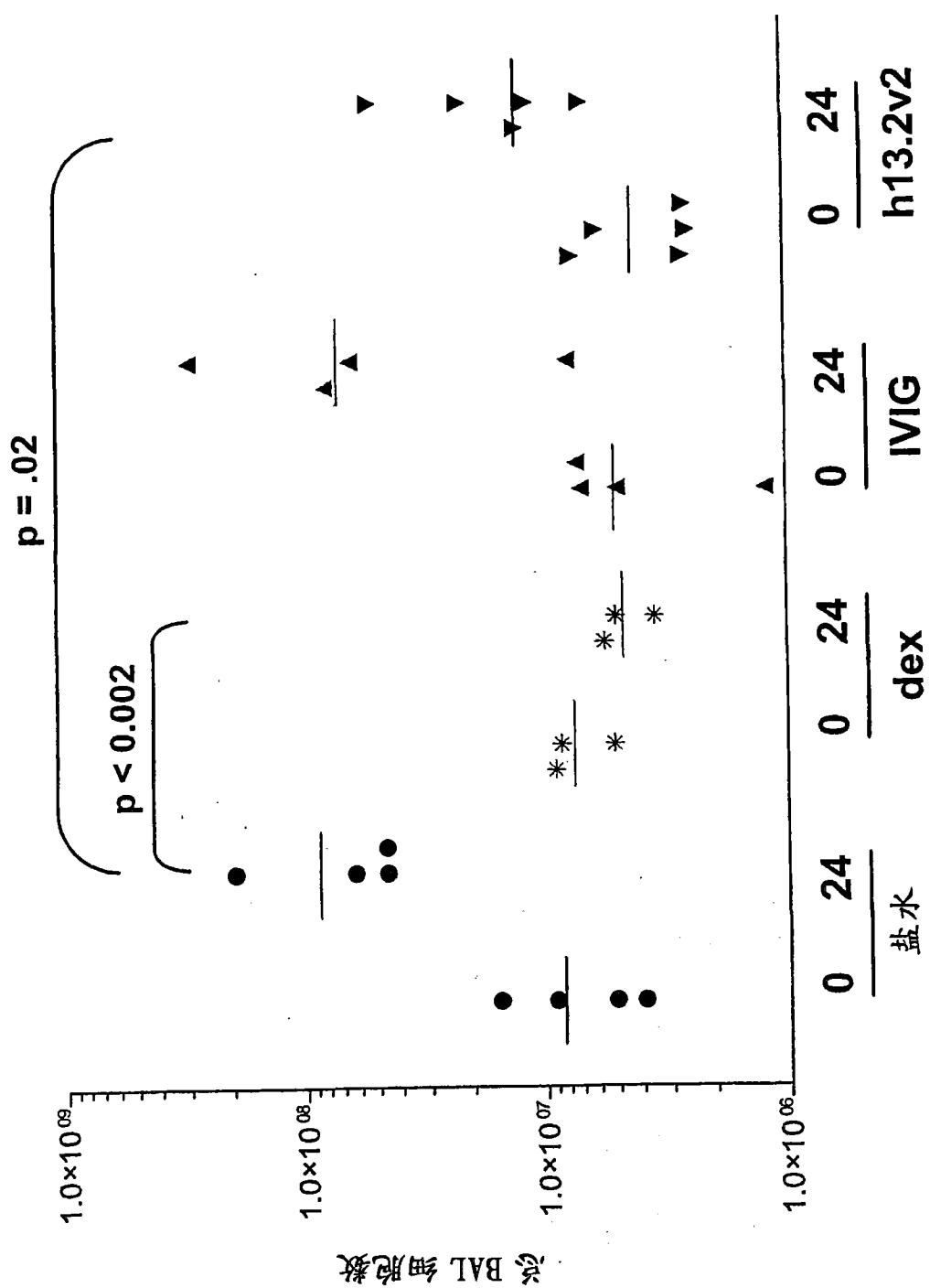


图 25

		FW1	FW2	CDR1	FW2	FW3
VH3		EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YAMS	WVRQAPGKGLEWWS	NIKQ--DGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYCAR
3-07		EVOLVESGGGLVQPGRSRLSCAASGFTFD	D--YAMH	WVRQAPGKGLEWWS	GISW--NNSGIGYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYCAR
3-09		EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	D--YAMS	WVRQAPGKGLEWWS	YISS--SGSTIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYCAR
3-11*		QVQLVSEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YAMS	WVRQAPGKGLEWWS	AIG--TAGDTYYPGSVKG	RFTISRENAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYCAR
3-13		EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YAMH	WVRQAPGKGLEWWS	RIKSKTDDGCTTDYAAPVKG	RFTISRDDSNTLYLQMNSLKTEDTAVYCTT
3-15		EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	N--AAMS	WVRQAPGKGLEWWS	GINW--NGGSTGTYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYCAR
3-20		EVOLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFD	D--YGMH	WVRQAPGKGLEWWS	SISS--SSSYIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYCAR
3-21		EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YSMN	WVRQAPGKGLEWWS		
3-23		EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YAMS	WVRQAPGKGLEWWS	AIIG--SGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR
3-30		QVQLVSEGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFS	S--YGMH	WVRQAPGKGLEWWS	VISY--DGSENKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR
3-30-3		QVQLVSEGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFS	S--YAMH	WVRQAPGKGLEWWS	VISY--DGSENKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR
3-30-5		QVQLVSEGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFS	S--YGMH	WVRQAPGKGLEWWS	VISY--DGSENKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR
3-33		QVQLVSEGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFS	S--YGMH	WVRQAPGKGLEWWS	VIVY--DGSENKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR
3-43		EVOLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFD	D--YTMH	WVRQAPGKGLEWWS	LISW--DGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNSLYLQMNSLRITEDTAVYCAR
3-48		EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YSMN	WVRQAPGKGLEWWS	YISS--SSSTIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRITEDTAVYCAR
3-49		EVOLVESGGGLVQPGRSRLSCAASGFTFG	D--YAMS	WVRQAPGKGLEWWS	FIRSKAYGGTTEYASTKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCTR
3-53		EVOLVETGGGLIOPGGSLRLSCAASGFTFS	S--NYMS	WVRQAPGKGLEWWS	VIVY--SGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR
3-64		EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YAMH	WVRQAPGKGLEWWS	AISS--NGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR
3-66		EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--NYMS	WVRQAPGKGLEWWS	VIVY--SGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR
3-72		EVOLVESGGGLVQEGGSLRLSCAASGFTFS	D--HYMD	WVRQAPGKGLEWWS	RTRNKANSYTTEYAAASKG	RFTISRDSSKNSLYLQMNSLRITEDTAVYCAR
3-73		EVOLVESGGGLVQEGGSLRLSCAASGFTFS	G--SAMH	WVRQAPGKGLEWWS	REFLSRDRDSTKATYLOQMNSLRITEDTAVYCTR	
3-74		EVOLVESGGGLVQEGGSLRLSCAASGFTFS	S--YWMH	WVRQAPGKGLEWWS	RINS--DGGSTYYADSVKG	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR
3-d		EVOLVESRGVLYQEGGSLRLSCAASGFTFS	S--NEMS	WVRQAPGKGLEWWS	SI---SGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCK
DP-61		EVQLVQSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S--YAMH	WVRQAPGKGLEWWS	AI---GTGGGTYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYCAR

mAb13.2 EVQLVSEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS S--YAMS WVRQAPGKGLEWWS SI---SSGGGTYADSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR

DP-77 hu ger 鼠 13.2 h13.2v3	EVQLVESGGG LVKPGGSSLRL SCAASGFTFS EV <u>K</u> LVESGGG LVKPGGSSL <u>K</u> L SCAASGFT <u>F</u> I EVQLVESGGG LVKPGGSSLRL SCAASGFT <u>F</u> I	CDR1	SYS <u>M</u> NNVRQA PGKGLEWVSS SYAM <u>S</u> NNVRQ <u>T</u> PE <u>K</u> ERLEWV <u>A</u> SYAM <u>S</u> NNVRQA PGKGLEWVSS
		CDR2	<u>I</u> SSSSYYYY ADSVK <u>G</u> RFITI SRD <u>N</u> AKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAR <u>I</u> .SSGGNTYY <u>P</u> DSVK <u>G</u> RFITI SRD <u>N</u> AK <u>N</u> LY LQM <u>S</u> SLR <u>S</u> ED TAVYYCAR <u>D</u> <u>I</u> .SSGGNTYY <u>P</u> DSVK <u>G</u> RFITI SRD <u>N</u> AKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAR <u>D</u>
		CDR3	GYF <u>G</u> FAYWG QGTTVTVSS GYF <u>G</u> FAYWG QGTTVTVSS
DP-77 hu ger 鼠 13.2 h13.2v3	GYF <u>G</u> FAYWG QGTTVTVSS GYF <u>G</u> FAYWG QGTTVTVSS	CDR1	GYF <u>G</u> FAYWG QGTTVTVSS GYF <u>G</u> FAYWG QGTTVTVSS
		CDR2	GYF <u>G</u> FAYWG QGTTVTVSS GYF <u>G</u> FAYWG QGTTVTVSS
		CDR3	GYF <u>G</u> FAYWG QGTTVTVSS GYF <u>G</u> FAYWG QGTTVTVSS

*氨基酸改变的
未改变的

图 27

CDR1		
B1 hu ger	DIVLTQSPAS	LAVSPGQRAT
Murine 13.2	DIVLTQSPAS	LAVS <u>Q</u> QRAT
h13.2v3	DIVLTQSPAS	LAVSPGQRAT
CDR3		
CDR2		
B1 hu ger	LIYQASNKDT	GVPARFSGSG
Murine 13.2	LIYRASNLES	GT <u>PARFSGSG</u>
h13.2v3	LIYRASNLES	GT <u>PARFSGSG</u>
CDR3		
B1 hu ger	IV	YCLQSKNFPP
Murine 13.2	IV <u>FGGGTKEI</u>	YC <u>QQSNEDPW</u>
h13.2v3	IV <u>FGGGTKEI</u>	YC <u>QQSNEDPW</u>

* 氨基酸改变

未改变的

图 28

残基			线性序列编号			Chothia 结构编号			Kabat 序列编号		
V	1	残基	V	2	1	残基	M	33	残基	G	65
K	2	线性序列编号	K	3	2	线性序列编号	S	34	线性序列编号	R	66
L	3	Chothia 结构编号	L	4	3	Kabat 序列编号	W	35	Chothia 结构编号	F	67
V	4	Kabat 序列编号	V	5	4	Kabat 序列编号	V	36	Kabat 序列编号	T	68
E	5		E	6	5		R	37		I	69
S	6		G	7	6		Q	38		S	70
G	7		G	8	7		P	39		R	71
G	8		G	9	8		E	40		D	72
G	9		G	10	9		R	40		N	73
G	10		L	11	10		K	41		A	74
L	11		V	12	11		Q	42		R	75
V	12		K	13	12		P	42		N	76
K	13		L	14	13		E	42		I	77
P	14		W	15	14		G	43		L	78
G	15		V	16	15		V	43		Y	79
G	16		S	17	16		A	43		L	80
S	17		A	18	17		A	44		Q	81
L	18		S	19	18		S	44		M	82
K	19		I	20	19		S	44		S	83
L	20		S	21	20		S	45		S	82A
S	21		S	22	21		G	45		S	82B
C	22		G	23	22		G	46		L	85
A	23		G	24	23		N	46		S	82C
A	24		N	25	24		T	46		R	86
S	25		T	26	25		T	47		S	87
G	26		Y	27	26		Y	47		E	88
F	27		Y	28	27		Y	47		D	89
T	28		P	29	28		Y	47		A	88
F	29		D	30	29		Y	47		M	89
I	30		S	31	30		Y	47		Y	90
S	31		V	32	31		Y	47		Y	91
Y	32		K	32	32		K	64		C	95

mAb13.2 可变重链根据不同方案的编号

图 29

残基		线性序列编号		Chothia 结构编号		Kabat 序列编号		残基		线性序列编号		Chothia 结构编号		Kabat 序列编号	
D	1	1	1	30C	30	29	29	R	65	61	61	61	61	93	93
H	2	2	2	30D	34	33	33	F	66	62	62	62	62	94	94
V	3	3	3		35	31	31	S	67	63	63	63	63	95	95
L	4	4	4		36	32	32	G	68	64	64	64	64	96	96
T	5	5	5		37	33	33	S	69	65	65	65	65	97	97
Q	6	6	6		38	34	34	G	70	66	66	66	66	98	98
S	7	7	7		39	35	35	S	71	67	67	67	67	99	99
P	8	8	8		40	36	36	R	72	68	68	68	68	100	100
A	9	9	9		41	37	37	T	73	69	69	69	69	101	101
S	10	10	10		42	38	38	D	74	70	70	70	70	102	102
L	11	11	11		43	39	39	F	75	71	71	71	71	103	103
A	12	12	12		44	40	40	T	76	72	72	72	72	104	104
V	13	13	13		45	41	41	L	77	73	73	73	73	105	105
S	14	14	14		46	42	42	T	78	74	74	74	74	106	106
L	15	15	15		47	43	43	I	79	75	75	75	75	107	107
G	16	16	16		48	44	44	N	80	76	76	76	76		
Q	17	17	17		49	45	45	P	81	77	77	77	77		
R	18	18	18		50	46	46	V	82	78	78	78	78		
A	19	19	19		51	47	47	E	83	79	79	79	79		
T	20	20	20		52	48	48	A	84	80	80	80	80		
I	21	21	21		53	49	49	D	85	81	81	81	81		
S	22	22	22		54	50	50	D	86	82	82	82	82		
C	23	23	23		55	51	51	V	87	83	83	83	83		
K	24	24	24		56	52	52	A	88	84	84	84	84		
A	25	25	25		57	53	53	T	89	85	85	85	85		
S	26	26	26		58	54	54	Y	90	86	86	86	86		
E	27	27	27		59	55	55	Y	91	87	87	87	87		
S	28	28	27A		60	56	56	C	92	88	88	88	88		
V	29	29	27B		61	57	57	Q	93	89	89	89	89		
D	30	30	27C		62	58	58	Q	94	90	90	90	90		
N	31	30A	27D		63	59	59	S	95	91	91	91	91		
Y	32	30B	28		64	60	60	N	96	92	92	92	92		

mAb13.2 可变轻链根据不同方案的编号

图 30

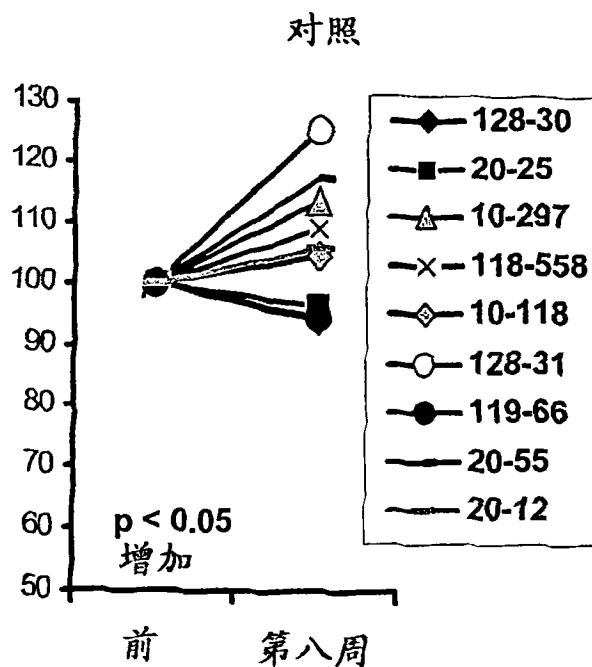


图 31B

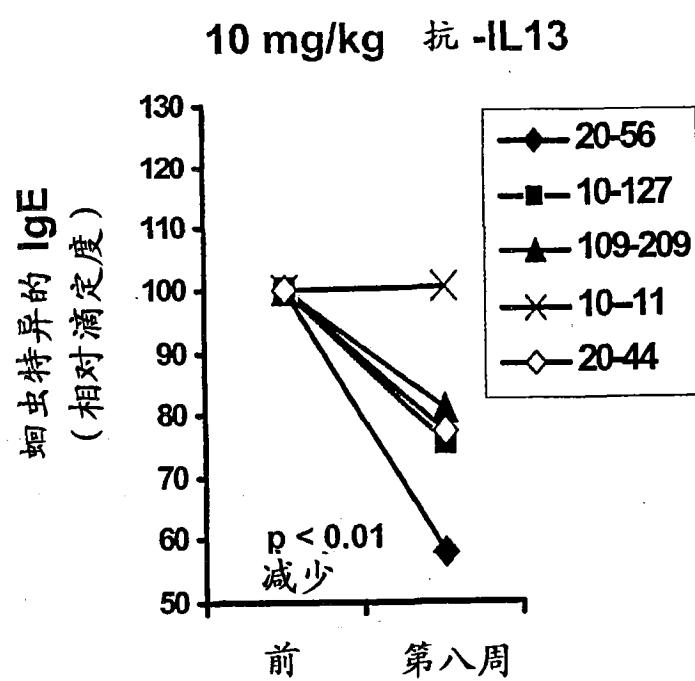
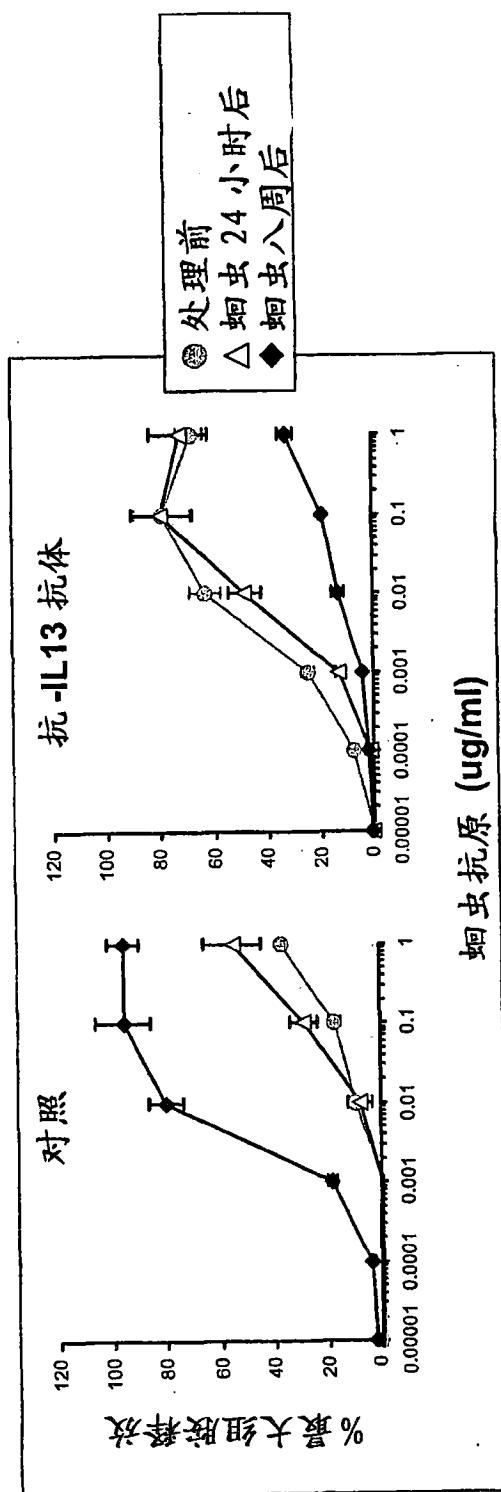


图 31A



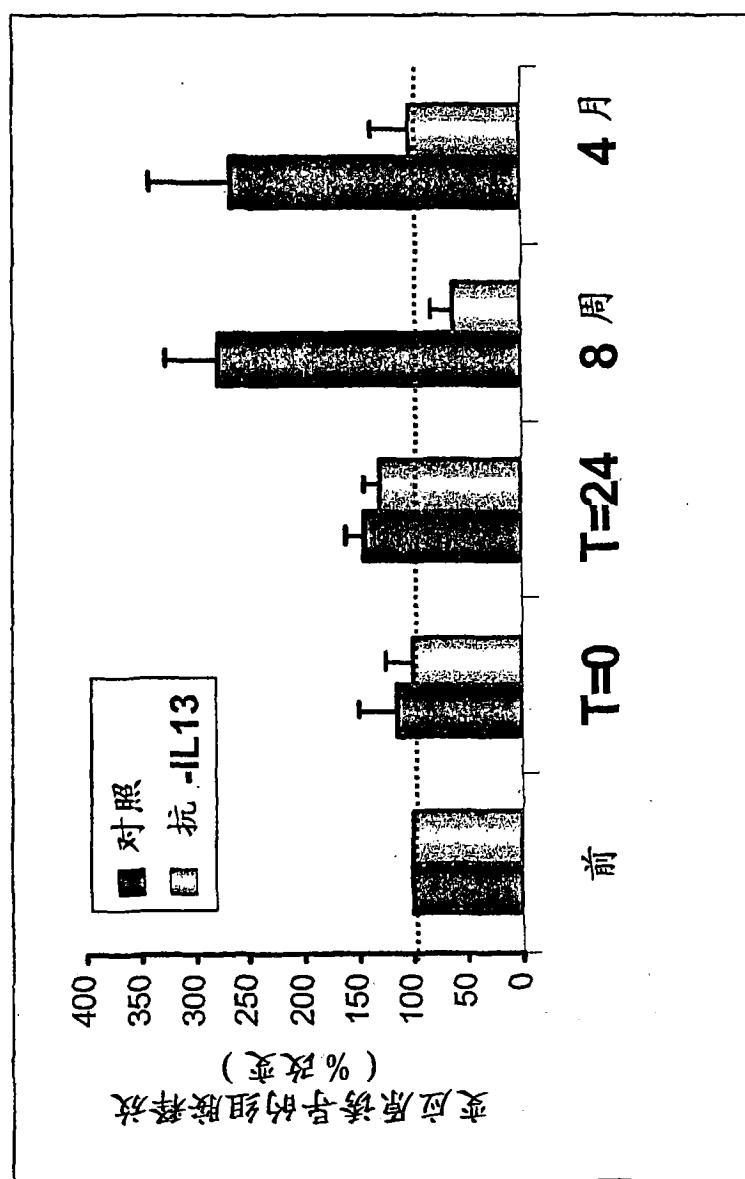


图 32B

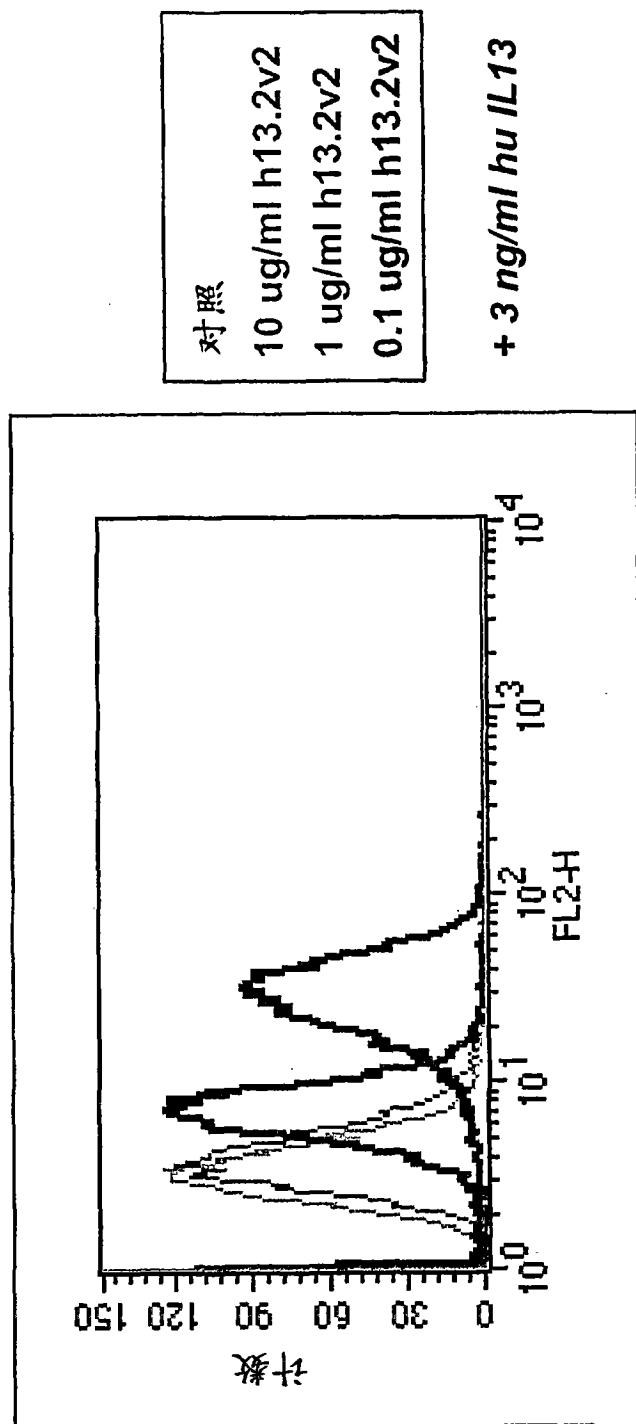


图 33

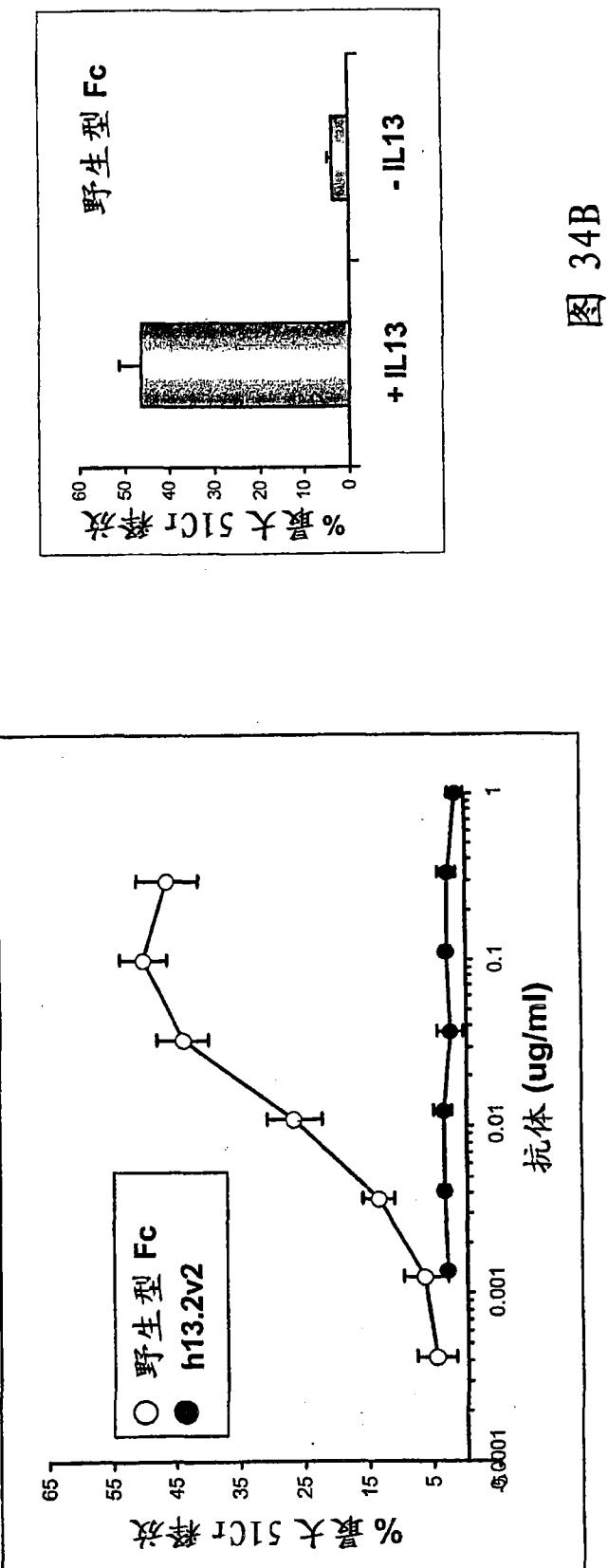
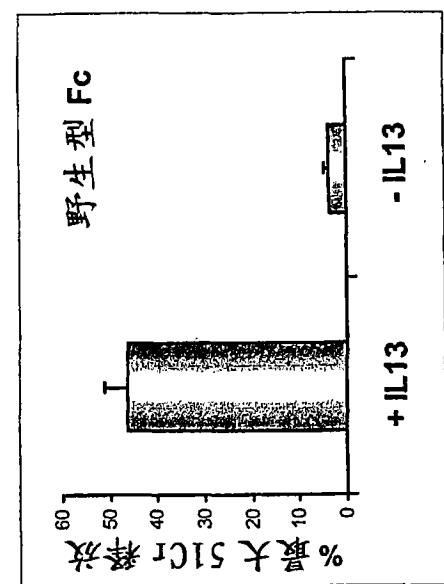


图 34A

图 34B



专利名称(译)	针对人白介素-13的抗体及其用途		
公开(公告)号	CN101141980B	公开(公告)日	2012-10-31
申请号	CN200580019138.5	申请日	2005-06-09
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
当前申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
[标]发明人	MT卡塞安 L奇斯提科娃 GM韦尔德曼 KA马凯特 X Y谭 DD唐纳森 LL林 T沙内 AS塔姆 E费凡特 NL伍德 LJ菲茨 AM温德姆 KD帕里斯 SJ戈尔德曼		
发明人	M·T·卡塞安 L·奇斯提科娃 G·M·韦尔德曼 K·A·马凯特 X-Y·谭 D·D·唐纳森 L·L·林 T·沙内 A·S·塔姆 E·费凡特 N·L·伍德 L·J·菲茨 A·M·温德姆 K·D·帕里斯 S·J·戈尔德曼		
IPC分类号	A61K39/395 G01N33/53 C07K16/00 C07K16/24		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/04 A61P11/06 A61P11/08 A61P17/00 A61P27/16 A61P29/00 C07K16/244 C07K2299/00 C07K2317/24 C07K2317/55 C07K2317/56 C07K2317/73 C07K2317/732 C07K2317/76 C07K2317/92		
优先权	60/578473 2004-06-09 US 60/578736 2004-06-09 US 60/581375 2004-06-22 US		
其他公开文献	CN101141980A		

摘要(译)

本申请涉及结合白介素-13(IL-13)，尤其结合人IL-13的抗体，例如，人源化抗体，和其抗原结合片段，还涉及它们在调节IL-13介导的免疫应答中的用途。本文公开的抗体可用于诊断、预防和/或治疗受试者，例如，诊断、预防和/或治疗人类患者的一种或多种IL-13相关的病症，例如，呼吸病症(例如，哮喘)；特应性病症(例如，变应性鼻炎)；皮肤的炎性和/或自身免疫状况(例如，特应性皮炎)，和胃肠器官的炎性和/或自身免疫状况(例如，炎性肠病(IBD))，以及纤维变性和癌性病症。

