

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：95138861

※ 申請日期：95.10.20

※IPC 分類：C07K 16/00(2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

有機分子

ORGANIC MOLECULES

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

瑞士商諾華公司

NOVARTIS AG

代表人：(中文/英文)

1. 亞瑟 科隆尼卡

CANONICA, ARTHUR

2. 華納 帝提克

DIETIKER, WERNER

住居所或營業所地址：(中文/英文)

瑞士巴塞爾市利曲街 35 號

LICHTSTRASSE 35, 4056 BASEL, SWITZERLAND

國 籍：(中文/英文)

瑞士 SWITZERLAND

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 艾瑪 米歇爾 坎貝爾
CAMPBELL, EMMA MICHELLE
2. 蘇菲亞 帕維恩
PARVEEN, SOFIA
3. 喬伊 布卻勒
BUECHLER, JOE
4. 葛那 維克司
VALKIRS, GUNARS

國 籍：(中文/英文)

1. 英國 U.K.
2. 英國 U.K.
3. 美國 U.S.A.
4. 美國 U.S.A.

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 英國；2005年10月21日；0521509.0

2. 英國；2006年08月22日；0616666.4

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明係關於人類抗IL-13結合分子，尤其為抗體，且係關於使用抗IL-13抗體分子來診斷或治療諸如哮喘、異位性皮膚炎、過敏性鼻炎、纖維化、發炎性腸病及霍奇金氏淋巴瘤之IL-13相關失調症之方法。

六、英文發明摘要：

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本、發明係關於特異性結合成份，詳言之為人類抗IL-13抗體分子且尤其為彼等中和IL-13活性者。其進一步係關於使用抗IL-13抗體分子來診斷或治療諸如哮喘、異位性皮膚炎、過敏性鼻炎、纖維化、發炎性腸病及霍奇金氏淋巴瘤之IL-13相關失調症之方法。

【先前技術】

介白素(IL)-13為具有大約為12 kDa之未經修飾分子質量的114胺基酸細胞激素[McKenzie, A. N.等人, J Immunol, 1993. 150 (12): 第5436至44頁及Minty, A.等人, Nature, 1993. 362 (6417): 第248至50頁]。IL-13與IL-4最密切相關，與之共享胺基酸水平上之30%的序列相似性。人類IL-13基因位於染色體5q31上臨近於IL-4基因處。此染色體5q區含有其他Th2淋巴細胞衍生之細胞激素(包括GM-CSF及IL-5, 已表明其含量加上IL-4與哮喘受檢者及過敏性發炎之鼠類模型的疾病嚴重性有關)之基因序列[Nakamura, Y.等人, Am J Respir Cell Mol Biol, 1996. 15 (5): 第680至7頁; Robinson, D. S.等人, N Engl J Med, 1992. 326 (5): 第298至304頁; Walker, C.等人, Am J Respir Crit Care Med, 1994. 150 (4): 第1038至48頁; Humbert, M.等人, Am J Respir Crit Care Med, 1996, 154 (5): 第1497至504頁; Corrigan, C. J. 及A. B. Kay Int Arch Allergy Appl Immunol, 1991. 94 (1-4): 第270至1頁; Bentley, A. M.等人, Am J Respir Cell

Mol Biol, 1993]。

儘管最初鑑別IL-13為Th2 CD4+淋巴細胞衍生之細胞激素，然而IL-13亦可由Th1 CD4+ T細胞、CD8+ T淋巴細胞NK細胞及諸如肥大細胞、嗜鹼細胞、嗜伊紅血球、巨噬細胞、單核細胞及氣管平滑肌細胞之非T細胞群體產生。

已報導IL-13經由受體系統調節其作用，該受體系統包括自身可結合IL-4而非IL-13之IL-4受體 α 鏈(IL-4R α)-及至少兩個其他細胞表面蛋白IL-13R α_1 及IL-13R α_2 [Murata, T.等人，Int J Hematol, 1999. 69(1): 第13至20頁；Andrews, A.L.等人，J Biol Chem, 2002. 277(48) : 第46073至8頁]。IL-13R α_1 可以低親和力結合IL-13，隨後募集IL-4R α 以形成信號發送之高親和力功能受體[Miloux, B.等人，FEBS Lett, 1997. 401 (2-3): 第163至6頁；Hilton, D. J.等人，Proc Natl Acad Sci USA, 1996. 93 (1): 第497至501頁]。Genbank資料庫列出IL-13R α_1 之胺基酸序列及核酸序列，分別為NP001551及Y10659。對STAT6(信號轉導及轉錄活化因子6，signal transducer and activator of transcription 6))缺失小鼠之研究已揭示IL-13以與IL-4相似之方式藉由利用JAK-STAT6路徑發送信號[Kuperman, D.等人，J Exp Med, 1998. 187 (6): 第939至48頁；Nelms, K.等人，Annu Rev Immunol, 1999. 17: 第701至38頁]。IL-13R α_2 與IL-13R α_1 在胺基酸水平上共享37%之序列一致性並以高親和力結合IL-13[Zhang, J. G.等人，J Biol Chem, 1997. 272 (14): 第9474至80頁；Caput, D.等人，J Biol Chem, 1996. 271 (28): 第

16921至6頁]。然而，IL-13R α_2 具有缺乏已知信號發送基元之較短細胞質尾。甚至在IL-4R α 存在下，表現IL-13R α_2 之細胞亦不對IL-13作出反應[Kawakami, K.等人，Blood, 2001. 97 (9)：第2673至9頁]。因此，假定IL-13R α_2 充當誘餌受體，調節IL-13而非IL-4功能。這受到對IL-13R α_2 缺失小鼠(其表型與增加的對IL-13之反應一致)之研究支持[Wood, N.等人，J Exp Med, 2003. 197 (6)：第703至709頁；Chiaromonte, M. G.等人，J Exp Med, 2003. 197 (6)：第687至701頁]。Genbank資料庫列出IL-13R α_2 之胺基酸序列及核酸序列，分別為NP000631及Y08768。

【發明內容】

本發明之一實施例在本文中提供一種具有對目標蛋白IL-13具有特異性之抗原結合區的經分離人類或人源化抗體或其功能片段且抗體或其功能片段與IL-13結合。在一相關實施例中，至少藉由預防發炎性介體釋放之細胞表面IL-13受體結合來測定與IL-13之結合。

在另一實施例中，本發明提供抗體或其功能片段之經分離抗原結合區。在某些實施例中，經分離抗原結合區包括具有選自SEQ ID NO: 9-10之胺基酸序列及其保守變異體之H-CDR3區。如本文所述之保守變異體包括任何已鑑別胺基酸序列中之胺基酸殘基。在一相關實施例中，經分離抗原結合區為具有胺基酸序列SEQ ID NO: 8及其保守變異體之H-CDR2區。在另一相關實施例中，經分離抗原結合區為具有選自SEQ ID NO: 6-7之胺基酸序列及其保守變異體之

H-CDR1區。

在另一實施例中，經分離抗原結合區為具有選自SEQ ID NO: 20-22之胺基酸序列及其保守變異體之L-CDR3區。在另一相關實施例中，經分離抗原結合區為具有選自SEQ ID NO: 16-18之胺基酸序列及其保守變異體之L-CDR1區。在另一相關實施例中，經分離抗原結合區為具有胺基酸序列SEQ ID NO: 19及其保守變異體之L-CDR2區。

在某些實施例中，經分離抗原結合區為具有選自SEQ ID 16-22之胺基酸序列及其保守變異體之可變輕鏈。

在另一實施例中，經分離抗原結合區為具有選自SEQ ID 6-10之一至三者之胺基酸序列及與具有SEQ ID NO: 6-10之CDR區具有至少60、70、80、90或95百分比的CDR區序列一致性之序列的重鏈。在一相關實施例中，經分離抗原結合區為具有選自SEQ ID NO: 16-22之一至三者之胺基酸序列及與具有SEQ ID NO: 16-22之CDR區具有至少60、70、80、90或95百分比的CDR區序列一致性之序列的輕鏈。

在特定實施例中，經分離抗體為IgG。在另一實施例中，經分離抗體為IgG1或IgG4。

在另一實施例中，本發明提供經分離人類或人源化抗體或其功能片段(其具有對IL-13之抗原決定基具有特異性之抗原結合區)，且該抗體或功能片段在細胞上與IL-13表面受體結合。在一相關實施例中，本發明提供經分離人類或人源化抗體或其功能片段(其具有對IL-13之抗原決定基具有特異性之抗原結合區)，且該抗原決定基含有目標IL-13的胺

基酸殘基 1-112 之一或多個胺基酸殘基。在一相關實施例中，抗原決定基為構形抗原決定基。

在另一實施例中，抗體或功能片段為 Fab 或 scFv 抗體片段。在一相關實施例中，經分離抗體為 IgG。在另一相關實施例中，經分離抗體為 IgG1 或 IgG4。

在另一實施例中，本發明提供具有上述抗體或功能片段或保守變異體之任一者中的至少一者及其醫藥學上可接受之載劑或賦形劑之醫藥組合物。

在另一實施例中，本發明提供攜帶編碼上述抗體或其功能片段中之任一者之基因的轉殖基因動物。

在某些實施例中，本發明提供一種用於治療與具有 IL-13 之受體目標之細胞的存在相關之失調症或病症之方法。該方法涉及投與有需要之受檢者有效量之任何上述醫藥組合物。在一相關實施例中，待治療之失調症或病症為呼吸道失調症。

在另一實施例中，待治療之失調症或病症為支氣管哮喘，其為常見肺持續性發炎疾病，特徵在於氣管過度反應 (AHR)、黏液過度產生、纖維化及血清 IgE 含量增加。Li 等人之 Abstract for poster submitted at The American Thoracic Society Annual Meeting, 2003, Seattle 報導了中和抗小鼠 IL-13 抗體在慢性哮喘小鼠模型中的作用。

在另一實施例中，待治療之失調症或病症為慢性阻塞性肺病 (COPD)。Zheng 等人之 J Clin Invest, 2000, 106 (9) : 第 1081 至 93 頁已證明 IL-13 在小鼠肺中過度表現會引起肺氣

腫、黏液產生增加及發炎，反映了人類COPD之態樣。已表明與來自未報導患有肺病之受檢者的肺樣品相比，IL-13之mRNA含量在來自具有COPD病史之受檢者的剖檢組織樣品中更高(J. Elias, Oral communication at American Thoracic Society Annual Meeting 2002)。在另一研究中，藉由來自COPD患者之周邊肺切片的免疫組織化學證明IL-13含量增加[Wardlaw, A. J., Clin Med, 2001. 1 (3)：第214至8頁]。

在另一實施例中，待治療之失調症或病症係選自其他發炎性或阻塞性氣管疾病及病症，諸如急性肺損傷(ALI)、急性/成人呼吸窘迫綜合症(ARDS)、呼吸困難、過敏性氣管發炎、小氣管疾病、肺癌、鐮狀細胞疾病患者的急性胸綜合症及肺循環血壓過高以及其他藥物療法、詳言之其他吸入藥物療法後氣管反應過度惡化。

在另一實施例中，待治療之失調症或病症為任何類型或病因之支氣管炎，包括(例如)急性、花生樣(arachidic)、卡他性、急性喉氣管(croupus)、慢性或癆病樣支氣管炎。

在另一實施例中，待治療之失調症或病症包括任何類型或病因之肺塵埃沉著病(發炎性、常見職業肺病，常伴隨慢性或急性氣管梗塞且由反覆吸入灰塵引起)，包括(例如)礬土沉著病、炭末沉著病、石綿沉著病、石末入肺病、睫毛脫落、鐵質沉著病、矽肺病、煙草末沉著病及棉屑沉著病。

在另一實施例中，待治療之失調症或病症係選自異位性鼻炎(花粉熱)、過敏性皮膚炎(濕疹)及慢性竇炎。已在患有異位性鼻炎(花粉熱)、過敏性皮膚炎(濕疹)及慢性竇炎之人

類受檢者中量測到IL-13含量增加。舉例而言，與對照受檢者相比，發現來自哮喘受檢者之支氣管活組織檢查、痰及支氣管-肺泡灌洗術(BAL)細胞內的IL-13含量更高 [Humbert, M.等人，J Allergy Clin Immunol, 1997. 99 (5)：第657至65頁；Kotsimbos, T. C.、P. Ernst及Q. A. Hamid, Proc Assoc Am Physicians, 1996. 108 (5)：第368至73頁；Komai-Koma, M.、F. Y.Liew及P. C. Wilkinson, J Immunol, 1995. 155 (3)：第1110至6頁；Naseer, T.等人，Am J Respir Crit Care Med, 1997]。

在另一實施例中，待治療之失調症或病症係選自其他發炎性皮膚病症，例如牛皮癬或紅斑狼瘡。

在另一實施例中，待治療之失調症或病症為發炎性腸病，諸如潰瘍性結腸炎及克羅恩氏病(Crohn's disease)。Heller等人之(2002) Immunity, 17 (5): 629-38報導藉由投與可溶IL-13Ra2來中和IL-13改善了人類潰瘍性結腸炎之鼠科模型中的結腸發炎。相對地，與對照組相比，來自潰瘍性結腸炎患者之直腸活組織檢查樣本中的IL-13表現較高。

在另一實施例中，待治療之失調症或病症係選自其他纖維變性病，諸如系統性硬化症、肺纖維化、特發性肺纖維化或肺纖維症。已在系統性硬化症患者之血清中 [Hasegawa, M.等人，J Rheumatol, 1997. 24 (2)：第328至32頁]且在來自感染其他形式之肺纖維化的患者之BAL樣品中 [Hancock, A.等人，Am J Respir Cell Mol Biol, 1998]量測到IL-13含量增加。

在另一實施例中，待治療之失調症或病症為肝纖維化。藉由管理可溶IL-13Ra2或IL-13基因分裂但不切除IL-4產物特定抑制IL-13會預防肝中纖維生成[Fallon, P. G.等人, J Immunol, 2000. 164 (5): 第2585至91頁; Chiaramonte, M.G.等人, J Clin Invest, 1999. 104 (6): 第777至85頁; Chiaramonte, M. G.等人, Hepatology, 2001. 34(2): 第273至82頁]。

在另一實施例中，待治療之失調症或病症為霍奇金病。霍奇金病在惡性疾病中為異常的，此係由於通常衍生於B細胞之贅生性裏德-斯特恩伯格(Reed-Sternberg)細胞僅構成小部分臨床上可偵測之質塊。霍奇金病衍生之細胞株及初級裏德-斯特恩伯格細胞常表現IL-13及其受體[Skinnider, B. F.等人, Blood, 2001. 97(1): 第250至5頁]。由於IL-13促進正常B細胞中細胞存活及增殖，因此提議IL-13可充當裏德-斯特恩伯格細胞之生長因子。Skinnider等人已證明抗IL-13中和抗體可抑制活體外霍奇金病衍生之細胞株生長[Kapp, U.等人, J Exp Med, 1999. 189 (12): 第1939至46頁]。此發現認為裏德-斯特恩伯格細胞可藉由IL-13自分泌及旁分泌細胞激素環路提高其自身存活。與此假設一致，已偵測到與正常對照組相比，一些霍奇金病患者之血清中IL-13含量增加[Fiumara, P.、F. Cabanillas及A. Younes, Blood, 2001. 98 (9): 第2877至8頁]。因此，IL-13抑制劑可藉由抑制惡性裏德-斯特恩伯格細胞增殖而預防疾病發展。

在另一實施例中，待治療之失調症或病症為腫瘤復發或轉移。已表明抑制IL-13可增強動物模型中的抗病毒疫苗且可有益於治療HIV及其它傳染性疾病[Ahlers, J. D.等人，Proc Natl Acad Sci USA, 2002]。大量人類癌細胞表現免疫原性腫瘤特異抗原。然而，儘管大量腫瘤自發地退化，但許多腫瘤藉由抑制T細胞介導之免疫性而逃避免疫系統(免疫監視)。Terabe等人之Nat Immunol, 2000. 1 (6): 第515-20頁已證明IL-13在小鼠模型(其中腫瘤在初始生長後自發地退化且接著復發)中的免疫抑制中的作用。IL-13與可溶IL-13Ra2之特定抑制作用保護此等小鼠免受腫瘤復發。Terabe等人接著表明IL-13抑制介導抗腫瘤免疫反應之腫瘤特異CD8⁺細胞毒素淋巴細胞之分化。

在另一實施例中，待治療之失調症或病症為呼吸道病毒感染，其加重諸如哮喘、慢性支氣管炎、COPD、中耳炎及竇炎之潛在慢性病症。經治療之呼吸道病毒感染可與諸如中耳炎、竇炎或肺炎之繼發性細菌感染有關。

在另一實施例中，待治療之失調症或病症係選自其他疾病或病症，詳言之為具有發炎性組份之疾病或病症，例如包括類風濕性關節炎、牛皮癬性關節炎之骨頭及關節疾病及諸如動脈粥樣硬化、多發性硬化及急性及慢性同種異體移植排斥反應(例如心臟、腎臟、肝、肺或骨髓移植之後)之其他疾病。

在另一實施例中，待治療之失調症或病症為內毒素休克、絲球體腎炎、大腦及心臟局部缺血、阿茲海默氏病、

囊腫性纖維化、病毒感染及與之相關的惡化、後天性免疫不全綜合症(AIDS)、多發性硬化(MS)、幽門螺旋桿菌(*Helicobacter pylori*)相關之胃炎及癌症，尤其為卵巢癌生長。

在另一實施例中，待治療之失調症或病症為由人類病毒感染(其由人類鼻病毒、其他腸病毒、冠狀病毒、疱疹病毒、流行性感冒病毒、副流行性感冒病毒、呼吸道融合性病毒或腺病毒引起)引起之症狀。

根據本發明之治療可為症狀性或預防性的。

可在例如小鼠、大鼠或兔模型之動物模型中證明本發明藥劑在抑制氣管發炎之發炎性病變(例如發炎性氣管疾病)或其他發炎性病變(例如，如Wada等人，*J. Exp. Med* (1994) 180:1135-40; Sekido等人，*Nature* (1993) 365:654-57; Modelska等人，*Am. J. Respir. Crit. Care. Med* (1999) 160:1450-56;及Laffon等人(1999) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160:1443-49所述)中的效用。

在另一實施例中，本發明提供一種用於鑑別具有IL-13受體之細胞的方法。此方法涉及使細胞與上述另外具有可偵測標記之抗體或抗體片段中之任一者接觸。標記為放射性、螢光、磁性、順磁性或化學發光的。本方法可進一步涉及上述成像或分離經標記之細胞中之任一者。

在另一實施例中，上述人類或人源化抗體或抗體片段中之任一者均為合成的。

在另一實施例中，本發明提供醫藥組合物及額外治療劑。

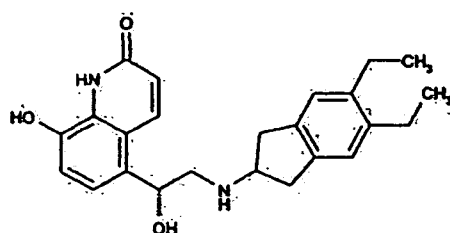
額外治療劑可選自由抗發炎、支氣管擴張、抗組織胺或抗咳嗽藥物組成之群，其尤其在治療諸如上文所提及疾病之阻塞性或發炎性氣管疾病中(例如)用作此等藥物的治療活性之增效劑或用作減少此等藥物之所需劑量或潛在副作用的方法。本發明之治療劑可與其他藥物在固定醫藥組合物中混合，或其可個別地在其他藥物之前、同時或之後投藥。因此，本發明包括如上文所述之本發明藥劑與抗發炎、支氣管擴張、抗組織胺或抗咳嗽藥物之組合，其中本發明藥劑及該藥物在同一或不同醫藥組合物中。

適合之抗發炎性藥物包括類固醇，詳言之為糖皮類固醇，諸如布地奈德(budesonide)、氣地米松二丙酸酯(beclamethasone dipropionate)、氟替卡松丙酸酯(fluticasone propionate)、環索奈德(ciclesonide)或莫美他松糠酸酯(mometasone furoate)或WO 02/88167、WO 02/12266、WO 02/100879、WO 02/00679(尤其為實例3、11、14、17、19、26、34、37、39、51、60、67、72、73、90、99及101)、WO 03/35668、WO 03/48181、WO 03/62259、WO 03/64445、WO 03/72592、WO 04/39827及WO 04/66920中所述之類固醇；非類固醇糖皮質激素受體促效劑，諸如DE 10261874、WO 00/00531、WO 02/10143、WO 03/82280、WO 03/82787、WO 03/86294、WO 03/104195、WO 03/101932、WO 04/05229、WO 04/18429、WO 04/19935及WO 04/26248中所述者；LTB4拮抗劑，諸如BIIL 284、CP-195543、DPC11870、LTB4乙醇醯胺、LY 293111、LY 255283、

CGS025019C、CP-195543、ONO-4057、SB 209247、SC-53228
及 US 5451700 中所述者；LTD4拮抗劑，如包括孟魯司特
(montelukast)、普倫司特(pranlukast)、紫魯司特(zafirlukast)、
安可來 (accolate)、SR2640、Wy-48,252、ICI 198615、
MK-571、LY-171883、Ro 24-5913及L-648051；PDE4抑制
劑，如西洛司特(cilomilast)(Ariflo® GlaxoSmithKline)、羅
氟司特 (Roflumilast)(Byk Gulden)、V-11294A (Napp)、
BAY19-8004 (Bayer)、SCH-351591 (Schering-Plough)、阿
羅 茶 鹼 (Arofylline)(Almirall Prodesfarma)、
PD189659/PD168787 (Parke-Davis)、AWD-12-281 (Asta
Medica)、CDC-801 (Celgene)、SelCID(TM) CC-10004
(Celgene)、VM554/UM565 (Vernalis)、T-440 (Tanabe)、
KW-4490 (Kyowa Hakko Kogyo)及 WO 92/19594、WO
93/19749、WO 93/19750、WO 93/19751、WO 98/18796、
WO 99/16766、WO 01/13953、WO 03/104204、WO
03/104205、WO 03/39544、WO 04/000814、WO 04/000839、
WO 04/005258、WO 04/018450、WO 04/018451、WO
04/018457、WO 04/018465、WO 04/018431、WO 04/018449、
WO 04/018450、WO 04/018451、WO 04/018457、WO
04/018465、WO 04/019944、WO 04/019945、WO 04/045607
及 WO 04/037805 中所揭示者；A_{2A}促效劑，諸如 EP
1052264、EP 1241176、EP 409595A2、WO 94/17090、WO
96/02543、WO 96/02553、WO 98/28319、WO 99/24449、
WO 99/24450、WO 99/24451、WO 99/38877、WO 99/41267、

WO 99/67263、WO 99/67264、WO 99/67265、WO 99/67266、
 WO 00/23457、WO 00/77018、WO 00/78774、WO 01/23399、
 WO 01/27130、WO 01/27131、WO 01/60835、WO 01/94368、
 WO 02/00676、WO 02/22630、WO 02/96462及WO 03/086408
 中所述者；及A_{2B}拮抗劑，諸如WO 02/42298中所述者。

適合之支氣管擴張藥物包括抗膽鹼劑或抗蕁毒鹼劑，詳言之為異丙托溴銨、氧托溴銨、噻托銨鹽及CHF 4226 (Chiesi)及胃長寧(glycopyrrolate)，但亦包括EP 424021、US 3714357、US 5171744、WO 01/04118、WO 02/00652、WO 02/51841、WO 02/53564、WO 03/00840、WO 03/33495、WO 03/53966、WO 03/87094、WO 04/018422及WO 04/05285中所述者；及β-2腎上腺素受體促效劑，諸如舒喘寧(albuterol)(沙丁胺醇(salbutamol))、二羥苯基異丙胺基乙醇(metaproterenol)、間羥叔丁腎上腺素(terbutaline)、沙美特羅(salmeterol)、酚丙喘寧(fenoterol)、丙卡特羅(procaterol)，且尤其為福莫特羅(formoterol)、卡莫特羅(carmoterol)及其醫藥學上可接受之鹽；及WO 00/75114(該文獻以引用的方式併入本文中)之式I化合物(以游離或鹽或溶劑合物形式)，較佳為其實例之化合物，尤其為下式之化合物：



亦即(5-[(R)-2-(5,6-二乙基-二氫萸-2-基胺基)-1-羥基-乙基]-8-羥基-1H-喹啉-2-酮)及其醫藥學上可接受之鹽；以及

WO 04/16601之式I化合物(以游離或鹽或溶劑合物形式),且亦包括 EP 1440966、JP 05025045、WO 93/18007、WO 99/64035、US 2002/0055651、WO 01/42193、WO 01/83462、WO 02/66422、WO 02/70490、WO 02/76933、WO 03/24439、WO 03/42160、WO 03/42164、WO 03/72539、WO 03/91204、WO 03/99764、WO 04/16578、WO 04/22547、WO 04/32921、WO 04/33412、WO 04/37768、WO 04/37773、WO 04/37807、WO 04/39762、WO 04/39766、WO 04/45618、WO 04/46083、WO 04/80964、EP1460064、WO 04/087142、WO 04/089892、EP 01477167、US 2004/0242622、US 2004/0229904、WO 04/108675、WO 04/108676、WO 05/033121、WO 05/040103及WO 05/044787之化合物。

適合之雙重抗發炎性及支氣管擴張藥物包括雙重 β -2腎上腺素受體促效劑/蕁毒鹼拮抗劑,諸如US 2004/0167167、WO 04/74246及WO 04/74812中所揭示者。

適合之抗組織胺藥物包括鹽酸西替利嗪(cetirizine hydrochloride)、乙醯胺苯酚(acetaminophen)、富馬酸氯馬斯汀(clemastine fumarate)、普敏太定(promethazine)、氯雷他定(loratidine)、地氯雷他定(desloratidine)、苯海拉明(diphenhydramine)及鹽酸非索非那定(fexofenadine hydrochloride)、阿地斯汀(activastine)、阿司咪唑(astemizole)、氮拉斯汀(azelastine)、依巴斯汀(ebastine)、依匹斯汀(epinastine)、咪唑斯汀(mizolastine)及特芬那定(tefenadine)以及JP 2004107299、WO 03/099807及WO

04/026841中所揭示者。

亦可使用本發明之治療劑與抗膽鹼劑或抗蕁毒鹼劑、類固醇、 β -2促效劑、PDE4抑制劑、多巴胺(dopamine)受體促效劑、LTD4拮抗劑或LTB4拮抗劑之組合。本發明藥劑與抗發炎性藥物之其他有用組合為彼等具有其他趨化性激動素受體拮抗劑者，例如CCR-1、CCR-3、CCR-4、CCR-5、CCR-6、CCR-7、CCR-8、CCR-9及CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5，尤其為諸如Schering-Plough拮抗劑SC-351125、SCH-55700及SCH-D之CCR-5拮抗劑、諸如氯化N-[[4-[[[6,7-二氫-2-(4-甲基苯基)-5H-苯并環庚烯-8-基]羰基]胺基]苯基]-甲基]-四氫-N,N-二甲基-2H-哌喃-4-鎂(TAK-770)之Takeda拮抗劑、US 6166037(尤其為請求項18及19)、WO 0066558(尤其為請求項8)、WO 0066559(尤其為請求項9)、WO 04/018425及WO 04/026873中所述之CCR-5拮抗劑。

額外治療劑亦可選自由下列各物組成之群：其他細胞激素結合分子，尤其為其他細胞激素抗體，詳言之為與抗IL4抗體(諸如PCT/EP2005/00836中所述)、抗IgE抗體(諸如Xolair®)、抗IL31抗體、抗IL31R抗體、抗TSLP抗體、抗TSLP受體抗體、抗endoglin抗體、抗IL1b抗體或另一抗IL13抗體(諸如WO 05/007699中所述)之組合。

在某些實施例中，本發明提供具有第一胺基酸序列(其為選自SEQ ID NO: 6-10中之一至三者及與具有SEQ ID NO: 6-10之CDR區具有至少60、70、80、90或95百分比的CDR

區序列一致性之序列的重鏈)及第二胺基酸序列(其為選自 SEQ ID NO: 16-22 中之一至三者及與 SEQ ID NO: 16-22 所示之 CDR 區具有至少 60、70、80、90 或 95 百分比的 CDR 區序列一致性之序列的輕鏈)之抗體。

在另一實施例中，本發明提供用作為抗體或其片段之第一組份及具有第二胺基酸序列之第二組份製造之免疫共軛物。舉例而言，免疫共軛物為細胞毒素，或者免疫共軛物為具有不同於 IL-13 之目標的結合特異性之結合蛋白或抗體。

在某些實施例中，本發明提供雙特異性抗體。

在另一實施例中，本發明提供具有抗體或其抗體片段之套組。在一些實施例中，該套組因此進一步含有醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。在其他相關實施例中，套組中之抗體以單位劑量存在。在另一相關實施例中，該套組包括用於向受檢者投藥之說明書。

【實施方式】

本發明係關於經分離抗體，尤其為人類抗體，其與 IL-13 特異性結合且抑制 IL-13 之功能特性。在一些實施例中，本發明之抗體衍生於特定重鏈及輕鏈序列及/或包含特定結構特徵，諸如包含特定胺基酸序列之 CDR 區。本發明提供經分離抗體、製成此等抗體、包含此等抗體之免疫共軛物及雙特異性分子及含有本發明之抗體、免疫共軛物或雙特異性分子之醫藥組合物之方法。本發明亦係關於使用抗體抑制與細胞受體目標 IL-13 之存在有關的失調症或病症之

方法，例如使用抗體來治療發炎性或過敏性病徵、尤其為發炎性或阻塞性氣管疾病的方法。

為了使本發明更易於理解，首先定義某些術語。貫穿[實施方式]闡述額外定義。

除非本文另外說明，否則術語'介白素-13'或'IL-13'係指人類IL-13。本發明提供人類IL-13抗體，尤其為人類抗體，其可與非人類靈長類IL-13(包括獼猴(cynomolgus monkey)及恆河猴(rhesus monkey)IL-13)交叉反應。根據本發明之一些實施例之抗體識別其中位於胺基酸位置130處之精胺酸殘基由麩醯胺酸置換之IL-13變異體。在其他態樣及實施例中，本發明提供抗鼠科IL-13、尤其為小鼠IL-13之特異性結合成份。

術語"免疫反應"係指(例如)淋巴細胞、抗原存在細胞、噬菌細胞、粒細胞及由以上細胞或肝(包括抗體、細胞激素及補體)產生之可溶巨分子之作用，其可導致選擇性損害、破壞或自人體消除侵入病原體、受病原體感染之細胞或組織、癌細胞或在自體免疫或病理發炎情況下之正常人類細胞或組織。

"信號轉導路徑"係指大量信號轉導分子(其在將信號自一部分細胞傳輸至另一部分細胞中起重要作用)之間的生物化學關係。如本文所用之片語"細胞表面受體"包括(例如)可接收信號並可穿過細胞質膜傳輸此信號之分子及分子複合物。本發明之"細胞表面受體"之實例為結合IL-13蛋白分子之IL-13受體。

如本文所提及之術語"抗體"包括全抗體及其任何抗原結合片段(亦即"抗原結合部分")或單鏈。天然產生之"抗體"為包含藉由雙硫鍵互相連接之至少兩個重(H)鏈及兩個輕(L)鏈之糖蛋白。各重鏈包含重鏈可變區(本文縮寫為 V_H)及重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個域 CH_1 、 CH_2 及 CH_3 。各輕鏈包含輕鏈可變區(本文縮寫為 V_L)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個域 C_L 。 V_H 及 V_L 區可進一步再分為高變區,其稱為互補判定區(CDR),其間散佈稱為構架區(FR)之更保守區域。各 V_H 及 V_L 由自胺基末端至羧基末端以下列次序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4排列之三個CDR及四個FR構成。重鏈及輕鏈之可變區含有與抗原相互作用之結合域。抗體之恆定區可介導免疫球蛋白與宿主組織或因子(包括免疫系統之不同細胞(例如效應細胞)及經典互補系統之第一組份(C1q))之結合。

如本文所用之術語抗體之"抗原結合部分"(或簡單地"抗原部分")係指保持特異性結合抗原(例如IL-13)的能力之抗體之一或多個片段。已表明可藉由全長抗體之片段執行抗體之抗原結合功能。術語抗體之"抗原結合部分"內涵蓋之結合片段的實例包括Fab片段(由 V_L 、 V_H 、 C_L 及 CH_1 域組成之單價片段)、 $F(ab)_2$ 片段(包含在鉸鏈區由雙硫橋連接的兩個Fab片段之二價片段)、由 V_H 及 CH_1 域組成之Fd片段、由抗體單臂的 V_L 及 V_H 域組成之Fv片段、由 V_H 域組成之dAb片段(Ward等人, 1989 Nature 341:544-546)及經分離之互補判定區(CDR)。

此外，儘管Fv片段之兩個域 V_L 及 V_H 由不同基因編碼，但可使用重組方法藉由合成連接子使其接合，該合成連接子使其能形成其中 V_L 及 V_H 區配對形成單價分子(已知為單鏈Fv (scFv)之單一蛋白鏈；見(例如)Bird等人，1988 Science 242:423-426;及Huston等人，1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883)。術語抗體之"抗原結合部分"內亦意欲涵蓋此等單鏈抗體。使用熟習此項技術者已知之習知技術獲得此等抗體片段，並以與篩檢完整抗體相同之方式篩檢該等片段之效用。

如本文所用之"經分離抗體"係指大體上不含其他具有不同抗原特異性之抗體的抗體(例如特異性結合IL-13之經分離抗體大體上不含特異性結合除IL-13以外的抗原之抗體)。然而，特異性結合IL-13之經分離抗體具有與其他抗原(諸如來自其他物種之IL-13分子)之交叉反應性(cross-reactivity)。此外，經分離抗體可大體上不含其他細胞物質及/或化學藥品。

如本文所用之術語"單株抗體"或"單株抗體組合物"係指單分子組合物之抗體分子之製劑。單株抗體組合物呈現對特定抗原決定基之單結合特異性及親和力。

如本文所用之術語"人類抗體"意欲包括具有可變區(其中構架區及CDR區衍生於人類起源序列)之抗體。此外，若抗體含有恆定區，則該恆定區亦衍生於此等人類序列，例如人類生殖系序列或人類生殖系序列之突變型。本發明之人類抗體可包括並非由人類序列編碼之胺基酸殘基(例如藉

由活體外隨機或位點特異性突變誘發或由活體內體細胞突變引入之突變)。然而，如本文所用之術語"人類抗體"不欲包括其中衍生於諸如小鼠之另一哺乳動物物種生殖系的CDR序列已經移植於人類構架序列上之抗體。

術語"人類單株抗體"係指呈現單結合特異性之抗體，其具有其中構架區及CDR區衍生於人類序列之可變區。在一實施例中，人類單株抗體由包括與永生化細胞融合的自例如轉殖基因小鼠之轉殖基因非人類動物獲得的B細胞之融合瘤產生，其中B細胞具有包含人類重鏈轉殖基因及輕鏈轉殖基因之基因組。

如本文所用之術語"重組人類抗體"包括所有藉由重組方法製備、表現、產生或分離之人類抗體，諸如自人類免疫球蛋白基因的轉殖基因或轉染色體動物(例如小鼠)分離之抗體或自其製備之融合瘤、自經轉型以表現人類抗體之宿主細胞(例如自轉染瘤)分離的抗體、自重組、組合人類抗體庫分離之抗體及藉由任何其他方法(涉及剪接所有或一部分人類免疫球蛋白基因、序列至其他DNA序列)製備、表現、產生或分離之抗體。此等重組人類抗體具有其中構架區及CDR區衍生於人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區。然而，在某些實施例中，此等重組人類抗體可經受活體外突變誘發(或當使用人類Ig序列之轉殖基因動物時，活體內體細胞突變誘發)且因此重組抗體之 V_H 及 V_L 區之胺基酸序列為當衍生於且關於人類生殖系 V_H 及 V_L 序列時不可天然存在於活體內人類抗體生殖系譜中之序列。

如本文所用之"同型(isotype)"係指由重鏈恆定區基因編碼之抗體類(例如IgM、IgE、諸如IgG1或IgG4之IgG)。

本文片語"識別抗原之抗體"與"抗原特異性抗體"可與術語"與抗原特異性結合之抗體"交替使用。

如本文所用之"與人類IL-13特異性結合"之抗體意欲指以 K_D 為 5×10^{-9} M或更小與人類IL-13結合之抗體。"與除人類IL-13以外之抗原交叉反應"之抗體意欲指以 5×10^{-9} M或更小與該抗原結合之抗體。"不與特定抗原交叉反應"之抗體意欲指以 K_D 為 1.5×10^{-8} M或更大或 K_D 為 $5-10 \times 10^{-8}$ M或 1×10^{-7} M或更大與該抗原結合之抗體。在某些實施例中，此等不與抗原交叉反應之抗體在標準結合檢定中展示對此等蛋白之本質上不可偵測之結合。

如本文所用之"抑制IL-13與IL-13受體結合"之抗體係指抑制IL-13與受體以 K_D 為5 nM或更小結合之抗體。

如本文所用之"抑制發炎性介體釋放"之抗體意欲指以小於10 nM、5 nM、2.5 nM、1.0 nM、0.5 nM或更小之 IC_{50} 抑制IL-13誘導之嗜酸性粒細胞趨化因子自人類肺纖維母細胞釋放之抗體。

如本文所用之術語" K_{assoc} "或" K_a "意欲指特定抗體-抗原相互作用之締合速率，而如本文所用之術語" K_{dis} "或" K_D "意欲指特定抗體-抗原相互作用之解離速率。如本文所用之術語" K_D "意欲指解離常數，其自 K_d 與 K_a 之比率獲得(亦即 K_d/K_a)且表達為莫耳濃度(M)。可使用此項技術中良好確定之方法測定抗體之 K_D 值。一種測定抗體 K_D 之方法為藉由使

用表面電漿共振或使用諸如Biacore®系統之生物感測器系統。

如本文所用之術語IgG抗體之"高親和力"係指對目標抗原具有 10^{-8} M或更小、 10^{-9} M或更小或 10^{-10} M或更小 K_D 之抗體。

如本文所用之術語"受檢者"包括任何人類或非人類動物。術語"非人類動物"包括所有脊椎動物，例如哺乳動物及非哺乳動物，諸如非人類靈長類、綿羊、狗、貓、馬、母牛、雞、兩棲動物、爬行動物等。

下列子部分進一步詳細描述本發明之不同態樣。

此項技術中已知評估抗體對不同物種IL-13之結合能力的標準檢定，該等檢定包括(例如)ELISA、西方墨點及RIA。實例中詳細描述適合檢定。亦可藉由此項技術中已知之標準檢定，諸如藉由Biacore分析來評估抗體之結合動力學(例如結合親和力)。實例中更詳細描述評估抗體對IL-13功能特性之作用之檢定。

因此，將瞭解如根據此項技術中已知且如本文所述之方法論測定之"抑制"此等IL-13功能特性(例如生物化學、免疫化學、細胞、生理學或其他生物學活性或其類似活性)之一或多者之抗體係關於相對於無抗體情況下(例如，或在具有無關特異性之對照抗體存在時)所觀察到的活性存在特定活性之統計上顯著降低。抑制IL-13活性之抗體實現量測參數之此統計上顯著降低至少10%、降低至少50%、80%或90%，且在某些實施例中，本發明之抗體可抑制大於95%、

98%或99%之IL-13功能活性。

單株抗體

本發明之抗體為如實例1至5中所述經分離及結構表徵之人類單株抗體。分別在SEQ ID NO: 6-10中展示抗體之 V_H 胺基酸序列。分別在SEQ ID NO: 16-22中展示抗體之 V_L 胺基酸序列。本發明之其他抗體包括已突變、但仍與上文所述序列中說明之CDR區具有至少60、70、80、90或95百分比的CDR區一致性之胺基酸。

由於此等抗體各自可與IL-13結合，因此可將 V_H 及 V_L 序列"混合及匹配"以產生本發明之其他抗IL-13結合分子。可使用上文及實例中所述之結合檢定(例如ELISA)來測試此等"經混合及匹配"抗體之IL-13結合。當 V_H 及 V_L 鏈經混合及匹配時，應以結構上相似之 V_H 序列置換來自特定 V_H/V_L 對之 V_H 序列。同樣，應以結構上相似之 V_L 序列置換來自特定 V_H/V_L 對之 V_L 序列。本發明抗體之 V_H 及 V_L 序列尤其適於混合及匹配，此係由於此等抗體使用衍生於相同生殖系序列之 V_H 及 V_L 序列且因此展示結構相似性。

在另一態樣中，本發明提供包含抗體之重鏈及輕鏈CDR1、CDR2及CDR3或其組合之抗體。SEQ ID NO: 6-7中展示抗體之 V_H CDR1之胺基酸序列。由SEQ ID NO: 8展示抗體之 V_H CDR2之胺基酸序列。SEQ ID NO: 9-10中展示抗體之 V_H CDR3之胺基酸序列。SEQ ID NO: 16-18中展示抗體之 V_L CDR1之胺基酸序列。SEQ ID NO: 19中展示抗體之 V_L CDR2之胺基酸序列。SEQ ID NO: 20-22中展示抗體之 V_L

CDR3之胺基酸序列。使用Kabat系統(Kabat, E. A.等人, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH公開案第91-3242號)描繪CDR區。

假定此等抗體各自可與IL-13結合且主要由CDR1、2及3區提供抗原結合特異性, 則 V_H CDR1、2及3序列及 V_L CDR1、2及3序列可"經混合及匹配"(亦即儘管各抗體必須含有 V_H CDR1、2及3及 V_L CDR1、2及3, 然而來自不同抗體之CDR可經混合及匹配)以產生本發明之其他抗IL-13結合分子。可使用上文及實例中所述之結合檢定(例如ELISA)測試此等"經混合及匹配"抗體之IL-13結合。當 V_H CDR序列經混合及匹配時, 應以結構上相似之CDR序列置換來自特定 V_H 序列之CDR1、CDR2及/或CDR3序列。同樣, 當 V_L CDR序列經混合及匹配時, 應以結構上相似之CDR序列置換來自特定 V_L 序列之CDR1、CDR2及/或CDR3序列。一般技術工人應易於瞭解, 可藉由以來自本文所示之CDR序列的結構上相似序列取代一或多個 V_H 及/或 V_L CDR區序列來產生新穎 V_H 及 V_L 序列以用於本發明之單株抗體。

經分離單株抗體或其抗原結合部分具有: 包含選自由SEQ ID NO: 6-7組成之群的胺基酸序列之重鏈可變區CDR1; 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 8之重鏈可變區CDR2; 包含選自由SEQ ID NO: 9-10組成之群的胺基酸序列之重鏈可變區CDR3; 包含選自由SEQ ID NO: 16-18組成之群的胺基酸序列之輕鏈可變區CDR1; 包含胺基酸序列SEQ ID NO:

19之輕鏈可變區CDR2；及包含選自由SEQ ID NO: 20-22組成之群的胺基酸序列之輕鏈可變區CDR3；其中該抗體特異性結合IL-13。

在某些實施例中，抗體由下列區組成：包含SEQ ID NO: 6之重鏈可變區CDR1；包含SEQ ID NO: 8之重鏈可變區CDR2；包含SEQ ID NO: 9之重鏈可變區CDR3；包含SEQ ID NO: 16之輕鏈可變區CDR1；包含SEQ ID NO: 19之輕鏈可變區CDR2；及包含SEQ ID NO: 20之輕鏈可變區CDR3。

在另一實施例中，抗體由下列區組成：包含SEQ ID NO: 7之重鏈可變區CDR1；包含SEQ ID NO: 8之重鏈可變區CDR2；包含SEQ ID NO: 10之重鏈可變區CDR3；包含SEQ ID NO: 17之輕鏈可變區CDR1；包含SEQ ID NO: 19之輕鏈可變區CDR2；及包含SEQ ID NO: 21之輕鏈可變區CDR3。

在另一實施例中，抗體由下列區組成：包含SEQ ID NO: 7之重鏈可變區CDR1；包含SEQ ID NO: 8之重鏈可變區CDR2；包含SEQ ID NO: 10之重鏈可變區CDR3；包含SEQ ID NO: 18之輕鏈可變區CDR1；包含SEQ ID NO: 19之輕鏈可變區CDR2；及包含SEQ ID NO: 22之輕鏈可變區CDR3。

若自使用人類生殖系免疫球蛋白基因之系統獲得抗體之可變區，則如本文所用之人類抗體包含作為特定生殖系序列"之產物"或"衍生於"特定生殖系序列之重鏈或輕鏈可變區。此等系統包括以所關注抗原免疫攜帶人類免疫球蛋白基因之轉殖基因小鼠或以所關注抗原篩選呈現於噬菌體上之人類免疫球蛋白基因庫。同樣，可藉由將人類抗體胺基

酸序列與人類生殖系免疫球蛋白胺基酸序列比較並選擇與人類抗體序列之序列最接近(亦即最大一致性%)的人類生殖系免疫球蛋白序列來鑑別作為人類生殖系免疫球蛋白序列"之產物"或"衍生於"人類生殖系免疫球蛋白序列之人類抗體。由於(例如)天然產生之體細胞突變或故意引入之定點突變，因此與生殖系序列相比，作為特定人類生殖系免疫球蛋白序列"之產物"或"衍生於"特定人類生殖系免疫球蛋白序列之人類抗體可含有胺基酸差異。然而，選定之人類抗體通常在胺基酸序列上與由人類生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列具有至少90%一致性且含有在與其他物種之生殖系免疫球蛋白胺基酸序列(例如鼠科生殖系序列)比較時鑑別人類抗體為人類之胺基酸殘基。在某些情況下，人類抗體可在胺基酸序列上與由生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列具有至少60%、70%、80%、90%或至少95%或甚至至少96%、97%、98%或99%一致性。通常，衍生於特定人類生殖系序列之人類抗體將呈現與由人類生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列存在不超過10個胺基酸差異。在某些情況下，人類抗體可呈現與由生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列存在不超過5個或甚至不超過4、3、2或1個胺基酸差異。

同源抗體

在另一實施例中，本發明之抗體具有重鏈及輕鏈可變區，該等可變區具有與本文所述抗體之胺基酸序列同源之胺基酸序列，且其中該等抗體保持本發明之抗IL-13抗體的

所要功能特性。

舉例而言，本發明提供包含重鏈可變區及輕鏈可變區之經分離單株抗體或其抗原結合部分，其中：重鏈可變區包含與選自由SEQ ID NO: 6-10組成之群的胺基酸序列至少80%同源之胺基酸序列；輕鏈可變區包含與選自由SEQ ID NO: 16-22組成之群的胺基酸序列至少80%同源之胺基酸序列；抗體特異地與IL-13結合，且抗體展示下列功能特性中之至少一者：抗體抑制IL-13蛋白與IL-13受體結合或抗體抑制預防或改善發炎性或過敏性病徵，尤其為發炎性或阻塞性氣管疾病之IL-13受體結合，或抗體抑制預防或改善哮喘之IL-13受體結合或抗體抑制預防或改善COPD之IL-13受體結合。

在不同實施例中，抗體可展示上文討論之功能特性之一或多者、兩者或兩者以上或三者。例如，抗體可為人類抗體、人源化抗體或嵌合抗體。

在其他實施例中， V_H 及/或 V_L 胺基酸序列可與上述序列60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同源。可藉由編碼SEQ ID NO: 6-10及/或16-22之核酸分子的突變誘發(例如定點或PCR介導之突變誘發)，接著藉由使用本文所述之功能檢定來測試經編碼之改變抗體所保持的功能(亦即上述功能)而獲得分別具有與SEQ ID NO: 6-10及16-22之 V_H 及 V_L 區高度(亦即80%或更大)同源之 V_H 及 V_L 區的抗體。

如本文所用，兩個胺基酸序列之間的同源性百分比係等

於兩個序列之間的一致性百分比。考慮到為兩個序列之最佳對準所需要引入之間隙的數目及各間隙之長度，兩個序列之間的一致性百分比為序列共享相同位置數目的函數(亦即同源性% = 相同位置#/位置總# × 100)。可使用如下列非限制性實例中所述之數學演算法來完成序列比較及兩個序列之間的一致性百分比的測定。

可使用已併入 ALIGN 程式(版本 2.0)中之 E. Meyers 及 W. Miller(Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988)演算法，利用 PAM120 重量殘基表、間隙長度扣分 12 及間隙扣分 4 來測定兩個胺基酸序列之間的一致性百分比。此外，可使用已併入 GCG 套裝軟體(可在 <http://www.gcg.com> 獲得)之 GAP 程式中之 Needleman 及 Wunsch(J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970)演算法，利用 Blossom 62 矩陣或 PAM250 矩陣及 16、14、12、10、8、6 或 4 之間隙重量及 1、2、3、4、5 或 6 之長度重量來測定兩個胺基酸序列之間的一致性百分比。

另外或其他，本發明之蛋白序列可進一步用作"查詢序列"以執行公開資料庫之搜尋，從而(例如)鑑別相關序列。可使用 Altschul 等人，1990 J. Mol. Biol. 215:403-10 之 XBLAST 程式(版本 2.0)執行此等搜尋。可用 XBLAST 程式、得分 = 50、字長 = 3 執行 BLAST 蛋白搜尋以獲得與本發明抗體分子同源之胺基酸序列。為了獲得間隙比準以達成對比目的，可如 Altschul 等人，1997 Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402 中所述般利用間隙 BLAST。當利用 BLAST 及間隙 BLAST 程式時，可使用各別程式(例如 XBLAST 及

NBLAST)之預設參數。見<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

保守修飾之抗體

在某些實施例中，本發明之抗體具有由CDR1、CDR2及CDR3序列組成之重鏈可變區及由CDR1、CDR2及CDR3序列組成之輕鏈可變區，其中此等CDR序列之一或多者具有基於本文所述之抗體或其保守修飾之特定胺基酸序列，且其中該等抗體保持本發明抗IL-13抗體之所要功能特性。因此，本發明提供由重鏈可變區(由CDR1、CDR2及CDR3序列組成)及輕鏈可變區(由CDR1、CDR2及CDR3序列組成)組成之經分離單株抗體或其抗原結合部分，其中：重鏈可變區CDR1為由選自由胺基酸序列SEQ ID NO: 6-7組成之群的胺基酸序列組成之序列及其保守修飾；重鏈可變區CDR2為由胺基酸序列SEQ ID NO: 8組成之序列及其保守修飾；重鏈可變區CDR3為由選自由胺基酸序列SEQ ID NO: 9-10組成之群的胺基酸序列組成之序列及其保守修飾；輕鏈可變區CDR1為由選自由胺基酸序列SEQ ID NO: 16-18組成之群的胺基酸序列組成之序列及其保守修飾；輕鏈可變區CDR2為由胺基酸序列SEQ ID NO: 19組成之序列及其保守修飾；輕鏈可變區CDR3為由選自由胺基酸序列SEQ ID NO: 20-22組成之群的胺基酸序列組成之序列及其保守修飾；抗體特異性結合IL-13；且抗體抑制IL-13受體結合預防發炎性介體釋放。

在不同實施例中，抗體可展示上文所討論之所列功能特性之一或多者、兩者或兩者以上或三者或三者以上。例如，

此等抗體可為人類抗體、人源化抗體或嵌合抗體。

如本文所用之術語"保守序列修飾"意欲指不顯著影響或改變含有該胺基酸序列之抗體的結合特徵之胺基酸修飾。此等保守修飾包括胺基酸取代、添加及缺失。可藉由此項技術中已知之標準技術(諸如定點突變誘發及PCR介導之突變誘發)將修飾引入本發明之抗體。

保守胺基酸取代為其中胺基酸殘基經具有相似側鏈之胺基酸殘基置換者。此項技術中已定義具有相似側鏈之胺基酸殘基家族。此等家族包括具有鹼性側鏈(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈(例如天冬胺酸、麩胺酸)、不帶電極性側鏈(例如甘胺酸、天冬醯胺酸、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、色胺酸)、非極性側鏈(例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸)、 β -分支側鏈(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及芳族側鏈(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)之胺基酸。因此，本發明抗體之CDR區內的一或多個胺基酸殘基可經來自同一側鏈家族之其他胺基酸殘基置換，且可使用本文所述之功能檢定測試經改變抗體所保持之功能。

結合與本發明抗IL-13抗體所結合者相同之抗原決定基之抗體

在另一實施例中，本發明提供結合與本文提供之本發明不同抗IL-13抗體所結合者相同之抗原決定基的抗體。可在標準IL-13結合檢定中基於此等額外抗體與本發明之其他抗體交叉競爭(例如以統計上顯著方式競爭性抑制結合)的

能力來鑑別之。測試抗體抑制本發明抗體與人類IL-13結合之能力證明測試抗體可與彼抗體競爭與人類IL-13結合；根據非限制性理論，此抗體可結合與其所競爭之抗體所結合者相同或相關(例如結構上相似或空間上最接近)的人類IL-13上之抗原決定基。在特定實施例中，結合與本發明之抗體所結合者相同的人類IL-13上之抗原決定基之抗體為人類單株抗體。可如實例中所述製備及分離此等人類單株抗體。

經工程設計及經修飾抗體

另外可使用具有本文所示 V_H 及/或 V_L 序列之一或多者之抗體作為起始物質來對經修飾抗體進行工程設計，從而製備本發明之抗體，該經修飾抗體可具有來自起始抗體之變化特性。可藉由修飾一或兩個可變區(亦即 V_H 及/或 V_L)內(例如一或多個CDR區內及/或一或多個構架區內)之一或多個殘基來對抗體進行工程設計。另外或其他，可藉由修飾恆定區內之殘基來對抗體進行工程設計(例如)以改變抗體之效應功能。

可執行之一類可變區工程設計為CDR移植。抗體主要經由位於六個重鏈及輕鏈互補判定區(CDR)中之胺基酸殘基與目標抗原相互作用。為此，CDR內之胺基酸序列可比CDR之外的序列具有更多的個別抗體多樣性。由於CDR序列為大部分抗體-抗原相互作用之原因，因此可能藉由建構表現載體(該等載體包括移植至具有不同特性之不同抗體的構架序列上的來自特定天然產生抗體之CDR序列)來表現模

擬特定天然產生抗體之特性的重組抗體(例如, 見 Riechmann, L.等人, 1998 Nature 332:323-327; Jones, P.等人, 1986 Nature 321:522-525; Queen, C.等人, 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033; winter之美國專利第 5,225,539 號; 及 Queen 等人之美國專利第 5,530,101、5,585,089、5,693,762及 6,180,370 號)。

因此, 本發明之另一實施例係關於包含重鏈可變區(其包含分別具有選自由 SEQ ID NO: 6-7 組成之群的胺基酸序列之 CDR1 序列、具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 8 之 CDR2 序列、具有選自由 SEQ ID NO: 9-10 組成之群的胺基酸序列之 CDR3 序列)及輕鏈可變區(其包含分別具有選自由 SEQ ID NO: 16-18 組成之群的胺基酸序列之 CDR1 序列、具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 19 之 CDR2 序列及由選自由 SEQ ID NO: 20-22 組成之群的胺基酸序列組成之 CDR3 序列)之經分離單株抗體或其抗原結合部分。因此, 此等抗體含有單株抗體之 V_H 及 V_L CDR 序列, 亦可含有來自此等抗體之不同構架序列。

可自包括生殖系抗體基因序列之公開 DNA 資料庫或已出版文獻獲得此等構架序列。舉例而言, 人類重鏈及輕鏈可變區基因之生殖系 DNA 序列可見於 "VBase" 人類生殖系序列資料庫(可在網際網路 www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase 獲得)及 Kabat, E. A. 等人, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 公開案第 91-3242 號; Tomlinson, I.

M.等人，1992 *J. mol. Biol.* 227:776-798；及Cox, J. P. L.等人，1994 *Eur. J Immunol.* 24:827-836中，其中每一者之內容均以引用的方式清楚地併入本文中。

用於本發明之抗體中的構架序列之實例為彼等結構與本發明之經選擇抗體所用的構架序列(例如本發明單株抗體所用之一致序列及/或構架序列)相似者。V_H CDR1、2及3序列及V_L CDR1、2及3序列可移植至與衍生構架序列之生殖系免疫球蛋白基因中所見的序列具有一致序列之構架區上，或者CDR序列可移植至與生殖系序列相比含有一或多個突變之構架區上。舉例而言，已發現在某些情況下，在構架區內使殘基突變對維持或增強抗體之抗原結合能力有益(例如，見Queen等人之美國專利第5,530,101、5,585,089、5,693,762及6,180,370號)。

另一類可變區修飾為使V_H及/或V_L CDR1、CDR2及/或CDR3區內之胺基酸殘基突變以藉此改良所關注抗體之一或多種結合特性(例如親和力)，已知為"親和力成熟"。可執行定點突變誘發或PCR介導之突變誘發以引入突變且可在如本文所述及實例中提供之活體外或活體內檢定中評估對抗體結合或其他所關注功能特性之作用。可引入(如上文所討論之)保守修飾。突變可為胺基酸取代、添加或缺失。此外，通常改變CDR區內不超過一、二、三、四或五個殘基。

因此，在另一實施例中，本發明提供由重鏈可變區組成之經分離抗IL-13單株抗體或其抗原結合部分，該重鏈可變區具有：由選自由SEQ ID NO: 6-7組成之群的胺基酸序列

或與SEQ ID NO: 6-7相比具有一、二、三、四或五個胺基酸取代、缺失或添加的胺基酸序列組成之 V_H CDR1區；具有胺基酸序列SEQ ID NO: 8或與SEQ ID NO: 8相比具有一、二、三、四或五個胺基酸取代、缺失或添加的胺基酸序列之 V_H CDR2區；具有選自由SEQ ID NO: 9-10組成之群的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 9-10相比具有一、二、三、四或五個胺基酸取代、缺失或添加的胺基酸序列之 V_H CDR3區；具有選自由SEQ ID NO: 16-18組成之群的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 16-18相比具有一、二、三、四或五個胺基酸取代、缺失或添加的胺基酸序列之 V_L CDR1區；具有胺基酸序列SEQ ID NO: 19或與SEQ ID NO: 19相比具有一、二、三、四或五個胺基酸取代、缺失或添加的胺基酸序列之 V_L CDR2區；及具有選自由SEQ ID NO: 20-22組成之群的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 20-22相比具有一、二、三、四或五個胺基酸取代、缺失或添加的胺基酸序列之 V_L CDR3區。

本發明之經工程設計抗體包括其中已對 V_H 及/或 V_L 內之構架殘基進行修飾(例如，以改良抗體特性)者。通常進行此等構架修飾以降低抗體之免疫原性。舉例而言，一種方法係使一或多個構架殘基"回復突變(backmutate)"為相應生殖系序列。更特定言之，已經歷體細胞突變之抗體可含有不同於衍生該抗體之生殖系序列之構架殘基。可藉由比較抗體構架序列與衍生該抗體之生殖系序列來鑑別此等殘基。為了使構架區序列返回其生殖系構型，可藉由(例如)

定點突變誘發或PCR介導之突變誘發使體細胞突變"回復突變"為生殖系序列。本發明亦意欲涵蓋此等"經回復突變"之抗體。

另一類構架修飾涉及使構架區內或甚至一或多個CDR區內之一或多個殘基突變以移除T細胞抗原決定基，從而減少抗體之潛在免疫原性。此方法亦稱作"去免疫反應"且Carr等人在美國專利公開案第20030153043號中更詳細描述之。

除構架區或CDR區內所作之修飾外或替代構架或CDR區內所作之修飾，本發明之抗體可經工程設計以包括Fc區內之修飾，通常藉此改變抗體之一或多個功能特性(諸如血清半衰期、補體結合、Fc受體結合及/或抗原依賴細胞毒性)。此外，本發明之抗體可經化學修飾(例如可將一或多個化學部分附著於抗體)或經修飾以改變其糖基化作用，再次改變抗體之一或多個功能特性。下文將更詳細描述此等實施例中之每一者。Fc區中殘基之編號方式為Kabat之EU指數的編號方式。

在一實施例中，使CH1之鉸鏈區經修飾以改變鉸鏈區內半胱胺酸殘基之數目(例如增加或減少)。Bodmer等人在美國專利第5,677,425號中進一步描述此方法。使CH1之鉸鏈區中半胱胺酸殘基之數目改變以(例如)促進輕鏈及重鏈組合或增加或降低抗體穩定性。

在另一實施例中，使抗體之Fc鉸鏈區突變以降低抗體之生物學半衰期。更特定言之，將一或多種胺基酸突變引入Fc鉸鏈片段之CH2-CH3域界面區中以致抗體具有相對於自

然 Fc 鉸鏈域 SpA 結合受損之 Staphylococcal 蛋白 A (SpA) 結合。Ward 等人在美國專利第 6,165,745 號中更詳細描述此方法。

在另一實施例中，使抗體經修飾以增加其生物學半衰期。不同方法均為可能的。舉例而言，可引入下列突變中之一或多種：如 Ward 之美國專利第 6,277,375 號中所述之 T252L、T254S、T256F。或者，如 Presta 等人在美國專利第 5,869,046 及 6,121,022 號中所述，為增加生物學半衰期，可在 CH1 或 CL 區內改變抗體以使其含有取自 IgG Fc 區之 CH2 域的兩個環路之救助 (salvage) 受體結合抗原決定基。

在其他實施例中，藉由以不同胺基酸殘基置換至少一個胺基酸殘基來改變 Fc 區以改變抗體之效應功能。舉例而言，可以不同胺基酸殘基置換一或多個胺基酸以致抗體之效應配位基的親和力改變但保持親本抗體之抗原結合能力。親和力改變之效應配位基可為 (例如) Fc 受體或補體之 C1 組份。Winter 等人在美國專利第 5,624,821 及 5,648,260 號中更詳細描述此方法。

在另一實施例中，可以不同胺基酸殘基置換選自胺基酸殘基之一或多種胺基酸以致抗體具有改變之 C1q 結合及 / 或減弱或消除之補體依賴細胞毒性 (CDC)。Idusogie 等人在美國專利第 6,194,551 號中更詳細描述此方法。

在另一實施例中，使一或多個胺基酸殘基改變以藉此改變抗體固定補體之能力。Bodmer 等人在 PCT 公開案 WO 94/29351 中進一步描述此方法。

在另一實施例中，使Fc區經修飾以增加抗體介導抗體依賴細胞毒性(ADCC)之能力及/或藉由修飾一或多種胺基酸來增加抗體對Fc γ 受體之親和力。Presta在PCT公開案WO 00/42072中進一步描述此方法。此外，已定位人類IgG1上Fc γ R1、Fc γ R2、Fc γ R3及FcRn之結合位點並描述具有改良結合之變異體(見Shields, R.L.等人，2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604)。

在另一實施例中，修飾抗體之糖基化作用。舉例而言，可製成無糖基化(aglycosylated)抗體(亦即缺乏糖基化作用之抗體)。可改變糖基化作用以(例如)增加抗體對"抗原"之親和力。可藉由(例如)改變抗體序列內一或多個糖基化作用位點而完成此等碳水化合物修飾。舉例而言，可進行一或多個胺基酸取代，其導致消除一或多個可變區構架糖基化作用位點以藉此消除彼位點之糖基化作用。此糖基化作用可增加抗體對抗原之親和力。Co等人在美國專利第5,714,350及6,350,861號中更詳細描述此方法。

另外或其他，可製成具有經改變類型之糖基化作用之抗體，諸如具有減少量的岩藻糖殘基之次岩藻糖化(hypofucosylated)抗體或具有增加的平分GlcNac結構之抗體。已證明此等經改變之糖基化作用方式增加抗體之ADCC能力。可藉由(例如)在具有經改變糖基化機構之宿主細胞中表現抗體來完成此等碳水化合物修飾。此項技術中已描述具有經改變糖基化機構之細胞且其可用作宿主細胞以在其中表現本發明之重組抗體以藉此產生具有經改變糖基化作

用之抗體。舉例而言，Hang等人之EP 1,176,195描述具有功能上經分裂之FUT8基因之細胞株，其中該FUT8基因編碼岩藻糖轉移酶以致在此細胞株中表現之抗體展示次岩藻糖作用。Presta之PCT公開案WO 03/035835描述變異CHO細胞株Lecl3細胞，其使岩藻糖附著至Asn(297)連接碳水化合物之能力降低，亦導致在彼宿主細胞中表現之抗體次岩藻糖化(亦見Shields, R.L.等人，2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740)。Umana等人之PCT公開案WO 99/54342描述經工程設計以表現糖蛋白修飾之糖基轉移酶(例如 $\beta(1,4)$ -N乙酰基葡糖胺基轉移酶III(GnTIII))之細胞株，以致在經工程設計的細胞株中表現之抗體展示增加的平分GlcNac結構(其導致抗體之ADCC活性增加)(亦見Umana等人，1999 Nat. Biotech. 17:176-180)。

本發明涵蓋之本文中抗體之另一修飾為聚乙二醇化作用。抗體可經聚乙二醇化以(例如)增加抗體之生物學(例如血清)半衰期。為聚乙二醇化抗體，通常使抗體或其片段與聚乙二醇(PEG)(諸如PEG之反應性酯或醛衍生物)在其中一或多個PEG基附著至抗體或抗體片段之條件下反應。可藉由與反應性PEG分子(或類似反應性水可溶聚合物)之醯化反應或烷基化反應進行聚乙二醇化。如本文所用之術語"聚乙二醇"意欲涵蓋用於衍生其他蛋白(諸如單(C1-C10)烷氧基或芳氧基聚乙二醇或聚乙二醇-馬來醯亞胺))之任何形式之PEG。在某些實施例中，待聚乙二醇化之抗體為無糖基化抗體。聚乙二醇化蛋白之方法為此項技術中已知的且可

應用於本發明之抗體。例如，見Nishimura等人之EP 0 154 316及Ishikawa等人之EP 0 401 384。

工程設計抗體之方法

如上文所討論，具有本文所示 V_H 及 V_L 序列之抗IL-13抗體可用於藉由修飾 V_H 及/或 V_L 序列或附著於其之恆定區來產生新抗IL-13抗體。因此，在本發明之另一態樣中，本發明抗IL-13抗體之結構特徵用於產生保持本發明抗體之至少一種功能特性(諸如與人類IL-13結合且亦抑制IL-13之一或多種功能特性(例如受體結合、抑制介體釋放))的結構相關抗IL-13抗體。

舉例而言，如上文所討論，本發明抗體或其突變之一或多個CDR區可重組地與已知構架區及/或其他CDR組合以產生額外經重組工程設計之本發明抗IL-13抗體。其他類型之修飾包括先前部分中所述者。工程設計方法之起始物質為本文所提供之 V_H 及/或 V_L 序列中之一或多者或其一或多個CDR區。為產生經工程設計之抗體，無需實際製備(亦即表現為蛋白)具有本文所提供之 V_H 及/或 V_L 序列中的一或多者或其一或多個CDR區之抗體。更確切地，序列中所含之資訊可用作起始物質以產生衍生於原始序列之"第二世代"序列且接著製備該(等)"第二世代"並使其表現為蛋白。

因此，在另一實施例中，本發明提供一種用於製備抗IL-13抗體之方法，該抗IL-13抗體由下列物質組成：具有選自由SEQ ID NO: 6-7組成之群的CDR1序列、CDR2序列SEQ ID NO: 8及/或選自由SEQ ID NO: 9-10組成之群的CDR3序

列之重鏈可變區抗體序列；及具有選自由SEQ ID NO: 16-18組成之群的CDR1序列、CDR2序列SEQ ID NO: 19及/或選自由SEQ ID NO: 20-22組成之群的CDR3序列之輕鏈可變區抗體序列；該方法包含：改變重鏈可變區抗體序列及/或輕鏈可變區抗體序列內之至少一個胺基酸殘基以產生至少一個經改變之抗體序列；及將經改變抗體序列表現為蛋白。

標準分子生物學技術可用於製備及表現經改變之抗體序列。由經改變抗體序列編碼之抗體為保持本文所述抗IL-13抗體之功能特性(該等功能特性包括但不限於特異性結合人類IL-13)中之一種、一些或全部之抗體；且抗體展示下述特性中之至少一種：抗體抑制IL-13蛋白與IL-13受體結合，或者抗體抑制IL-13受體結合預防或改善發炎性、纖維變性或過敏性病徵，尤其為發炎性或阻塞性氣管疾病，或者抗體抑制IL-13受體結合由此預防或改善哮喘。

經改變抗體可展示上文所討論之功能特性中之一或多者、兩者或兩者以上或三者或三者以上。

可使用此項技術中可獲得及/或本文所述之標準檢定(諸如實例中所述者(例如ELISA))來評估經改變抗體之功能特性。

在工程設計本發明抗體之方法之某些實施例中，可沿所有或部分抗IL-13抗體編碼序列隨機或選擇性地引入突變且可篩檢所得經修飾抗IL-13抗體之結合活性及/或其他如本文所述之功能特性。此項技術中已描述突變方法。舉例而言，Short之PCT公開案WO 02/092780描述使用飽和突變

誘發、合成接合組成(synthetic ligation assembly)或其組合來產生及篩檢抗體突變之方法。或者，Lazar等人之PCT公開案WO 03/074679描述使用計算篩檢方法來優化抗體之生理化學特性之方法。

編碼本發明抗體之核酸分子

本發明之另一態樣係關於編碼本發明抗體之核酸分子。核酸可存在於全細胞、細胞溶胞物中，或可為部分經純化或大體上純形式之核酸。當藉由標準技術(包括鹼性/SDS處理、CsCl分帶、管柱層析法、瓊脂糖凝膠電泳法及此項技術中熟知的其他技術)使核酸遠離其他細胞組份或其他污染物經純化時，核酸為"經分離"或"表現出大體上純的"。見F. Ausubel等人編，1987 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York。例如，本發明之核酸可為DNA或RNA，且可含有內含子序列或可不含之。在一實施例中，核酸為cDNA分子。核酸可存在於諸如噬菌體呈現載體之載體或重組質體載體中。

可使用標準分子生物學技術獲得本發明之核酸。對於由融合瘤(例如自攜帶下文將進一步描述之人類免疫球蛋白基因的轉殖基因小鼠製備之融合瘤)表現之抗體，可藉由標準PCR擴增或cDNA選殖技術來獲得編碼由融合瘤產生的抗體之輕鏈及重鏈之cDNA。對於自免疫球蛋白基因庫獲得之抗體(例如使用噬菌體呈現技術)，可自作為該庫成員之各種噬菌體純系重新獲得編碼該抗體之核酸。

一旦獲得編碼 V_H 及 V_L 區段之DNA片段，則可藉由標準重組DNA技術進一步處理此等DNA片段，以(例如)將可變區基因轉變為全長抗體鏈基因、Fab片段基因或scFv基因。在此等處理中，將編碼 V_L 或 V_H 之DNA片段可操作地連接至另一DNA分子或連接至編碼另一蛋白之片段(諸如抗體恆定區或可撓性連接子)。如本文所用之術語"可操作地連接"意欲意謂以功能性方式將兩個DNA片段接合(例如)以使由兩個DNA片段編碼之胺基酸序列保持同框，或使蛋白在所要啟動子控制下表現。

可藉由將編碼 V_H 之DNA可操作地連接至另一編碼重鏈恆定區(CH1、CH2及CH3)之DNA分子而將編碼 V_H 區之經分離DNA轉化為全長重鏈基因。人類重鏈恆定區基因之序列為此項技術中已知的(例如，見Kabat, E. A.等人，1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版，U.S. Department of Health and Human Services, NIH公開案第91-3242號)且可藉由標準PCR擴增來獲得涵蓋此等區之DNA片段。重鏈恆定區可為IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恆定區。對於Fab片段重鏈基因，可將編碼 V_H 之DNA可操作地連接至另一僅編碼重鏈CH1恆定區之DNA分子。

可藉由將編碼 V_L 之DNA可操作地連接至另一編碼輕鏈恆定區CL之DNA分子而將編碼 V_L 區之經分離DNA轉化為全長輕鏈基因(以及轉化為Fab輕鏈基因)。人類輕鏈恆定區基因之序列為此項技術中已知的(例如，見Kabat, E. A.等人，

1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH公開案第91-3242號)且可藉由標準PCR擴增來獲得涵蓋此等區之DNA片段。輕鏈恆定區可為 κ 或 λ 恆定區。

為產生scFv基因, 將編碼 V_H 及 V_L 之DNA片段可操作地連接至另一編碼可撓性連接子(例如編碼胺基酸序列(Gly4-Ser)₃)之片段, 以致 V_H 及 V_L 序列可表現為鄰近單鏈蛋白, 其中 V_L 及 V_H 區由可撓性連接子接合(例如, 見Bird等人, 1988 Science 242:423-426; Huston等人, 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty等人, 1990 Nature 348:552-554)。

產生本發明之單株抗體

可藉由包括習知單株抗體方法之大量技術(例如Kohler及Milstein, 1975 Nature 256: 495之標準體細胞雜交技術)來產生單株抗體(mAb)。可採用多種用於產生單株抗體之技術, 例如B淋巴細胞之病毒或致癌轉型作用。

用於製備融合瘤之動物系統為鼠科系統。在小鼠中產生融合瘤為良好確定之程序。免疫協定及分離經免疫脾細胞以用於融合之技術為此項技術中已知的。融合搭配物(例如鼠科骨髓瘤細胞)及融合程序亦為已知的。

可基於如上文所述而製備之鼠科單株抗體的序列來製備本發明之嵌合或人源化抗體。可自所關注鼠科融合瘤獲得編碼重鏈及輕鏈免疫球蛋白之DNA且可使用標準分子生物學技術將其工程設計為含有非鼠科(例如人類)免疫球蛋白

序列。舉例而言，為產生嵌合抗體，可使用此項技術中已知之方法(例如，見Cabilly等人之美國專利第4,816,567號)將鼠科可變區連接至人類恆定區。為產生人源化抗體，可使用此項技術中已知之方法(例如，見Winter之美國專利第5,225,539號及Queen等人之美國專利第5,530,101、5,585,089、5,693,762及6,180,370號)將鼠科CDR區插入人類構架中。

在特定實施例中，本發明之抗體為人類單株抗體。可使用攜帶部分人類免疫系統而非小鼠系統之轉殖基因或轉染色體小鼠來產生對準IL-13之此等人類單株抗體。此等轉殖基因及轉染色體小鼠包括本文分別稱為HuMAb小鼠及KM小鼠之小鼠且本文共同稱為"人類Ig小鼠"。

HuMAb小鼠®(Medarex, Inc.)含有編碼未重新排列人類重鏈(μ 及 γ)及 κ 輕鏈免疫球蛋白序列之人類免疫球蛋白基因小位點(minilocus)，及使內源 μ 及 κ 鏈位點失活之目標突變(例如，見Lonberg等人，1994 Nature 368(6474): 856-859)。因此，小鼠展示出小鼠IgM或 κ 表現減少，且對免疫作用作出反應，引入之人類重鏈及輕鏈轉殖基因可經受類別轉換及體細胞突變以產生高親和力人類IgG κ 單株(Lonberg, N.等人，1994，前述；Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101中之回顧；Lonberg, N.及Huszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93；及Harding, F.及Lonberg, N., 1995 Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546)。下列文獻中進一步描述HuMAb小鼠之製備及

用途及由此等小鼠執行之染色體組修飾：Taylor, L. 等人，1992 *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295；Chen, J. 等人，1993 *International Immunology* 5: 647-656；Tuailleon 等人，1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3720-3724；Choi 等人，1993 *Nature Genetics* 4:117-123；Chen, J. 等人，1993 *EMBO J.* 12: 821-830；Tuailleon 等人，1994 *J. Immunol.* 152:2912-2920；Taylor, L. 等人，1994 *International Immunology* 579-591；及 Fishwild, D. 等人，1996 *Nature Biotechnology* 14: 845-851，其所有內容均特定地以全文引用的方式併入本文中。另外，見 Lonberg 及 Kay 之美國專利第 5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、5,789,650、5,877,397、5,661,016、5,814,318、5,874,299 及 5,770,429 號；Surani 等人之美國專利第 5,545,807 號；Lonberg 及 Kay 之 PCT 公開案第 WO 92103918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97113852、WO 98/24884 及 WO 99/45962 號；及 Korman 等人之 PCT 公開案第 WO 01/14424 號。

在另一實施例中，可使用攜帶轉殖基因及轉染色體上之人類免疫球蛋白序列之小鼠（諸如攜帶人類重鏈轉殖基因及人類輕鏈轉染色體之小鼠）來培養（raise）本發明之人類抗體。Ishida 等人之 PCT 公開案 WO 02/43478 中詳述本文稱作 "KM 小鼠" 之此等小鼠。

進一步地，表現人類免疫球蛋白基因之替代性轉殖基因動物系統為此項技術中可用的且其可用於培養本發明之抗 IL-13 抗體。舉例而言，可使用稱作 Xenomouse (Abgenix,

Inc.)之替代性轉殖基因系統；在(例如)Kucherlapati等人之美國專利第5,939,598、6,075,181、6,114,598、6,150,584及6,162,963號中描述此等小鼠。

此外，表現人類免疫球蛋白基因之替代性轉染色體動物系統為此項技術中可用的且其可用於培養本發明之抗IL-13抗體。舉例而言，可使用稱作"TC小鼠"之攜帶人類重鏈轉染色體及人類輕鏈轉染色之小鼠；Tomizuka等人，2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727中描述此等小鼠。此外，此項技術中已描述攜帶人類重鏈及輕鏈轉染色體之母牛(Kuroiwa等人，2002 Nature Biotechnology 20:889-894)且其可用於增加培養本發明之抗IL-13抗體。

亦可使用用於篩檢人類免疫球蛋白基因庫之噬菌體呈現方法來製備本發明之人類單株抗體。此項技術中已建立用於分離人類抗體之此等噬菌體呈現方法。例如，見Ladner等人之美國專利第5,223,409、5,403,484及5,571,698號、Dower等人之美國專利第5,427,908及5,580,717號、McCafferty等人之美國專利第5,969,108及6,172,197號及Griffiths等人之美國專利第5,885,793、6,521,404、6,544,731、6,555,313、6,582,915及6,593,081號。

亦可使用已將人類免疫細胞重組至其中以致可在免疫時產生人類抗體反應之SCID小鼠來製備本發明之人類單株抗體。此等小鼠描述於(例如)Wilson等人之美國專利第5,476,996及5,698,767號中。

抗IL-13之人類單株抗體之產生

將與 Pan DR T輔助抗原決定基(PADRE)共軛之經純化重組人類(hr)IL-13用作抗原。使用表現人類抗體基因之HuMab轉殖基因小鼠之HCo7株來製備抗IL-13之全人類單株抗體。在此小鼠株中，內源小鼠 κ 輕鏈基因可如Chen等人，1993 EMBO J. 12:811-820中所述同型接合地分裂且內源小鼠重鏈基因可如PCT公開案WO 01109187之實例1中所述同型接合地分裂。此小鼠株攜帶如Fishwild等人，1996 Nature Biotechnology 14:845-851中所述之人類 κ 輕鏈轉殖基因KCo5及如美國專利第5,545,806、5,625,825及5,545,807中所述之HCo7人類重鏈轉殖基因。

為產生本發明之抗IL-13全人類單株抗體，以衍生於HEK-EBNA/PADRE共軛物之經純化重組IL-13(42微克/小鼠)與Quil A(15微克/小鼠，精確化學品)之混合物來免疫HuMab小鼠。下列文獻中描述HuMab小鼠之一般免疫流程：Lonberg, N.等人，1994 Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D.等人，1996 Nature Biotechnology 14:845-851; 及PCT公開案WO 98/24884。在第1至71日之間經靜脈內(IV)或經皮下(SC)免疫轉殖基因小鼠。以抗原(無佐劑)靜脈內推注至小鼠，2日後將其處死並取出脾。使用Nucleospin RNA II分離套組(BD Biosciences/Clontech)將RNA自脾分離。RNA用於在如美國專利6,794,132中所述之Fab噬菌體呈現載體中產生隨機分類的H及L鏈可變域之噬菌體呈現庫。使用生物素標記hrIL-13在如該專利中所述之溶液相平衡結合協定中使噬菌體呈現庫經受五輪選擇。前四輪選擇採用 10^{-8}

M之hrIL-13且最後一輪選擇採用 10^{-9} M之hrIL-13。藉由計算在抗原存在下重新獲得之pfu除以在無抗原下重新獲得之pfu所測定的此庫之最終信號雜訊比為37，表明大於90%之所選噬菌體表現結合hrIL-13之抗體。接著將噬菌體呈現庫次選殖入質體載體中以用於表現如美國專利6,794,132中所述之可溶Fab。

產生單株抗體之轉染瘤之產生

亦可使用(例如)重組DNA技術與此項技術中熟知之基因轉染方法(例如Morrison, S. (1985) Science 229:1202)之組合在宿主細胞轉染瘤中產生本發明之抗體。

舉例而言，為表現抗體或其抗體片段，可藉由標準分子生物學技術(例如使用表現所關注抗體之融合瘤進行PCR擴增或cDNA選殖)來獲得編碼部分或全長輕鏈及重鏈之DNA且可將DNA插入表現載體中以使基因可操作地連接至轉錄及轉譯控制序列。在本文中，術語"可操作地連接"意欲意謂使抗體基因接合至載體中以致載體內之轉錄及轉譯控制序列可執行其欲調節抗體基因的轉錄及轉譯之功能。選擇表現載體及表現控制序列以與所用之表現宿主細胞相容。可將抗體輕鏈基因及抗體重鏈基因插入個別載體中或更通常地將兩個基因插入同一表現載體中。藉由標準方法(例如抗體基因片段及載體上之互補限制位點接合；或者若無限制位點存在，則鈍端接合)將抗體基因插入表現載體中。將本文所述之抗體的輕鏈及重鏈可變區插入已編碼所要同型之重鏈恆定區及輕鏈恆定區的表現載體中以使V_H區段可操

作地連接至載體內之CH區段且V_L區段可操作地連接至載體內之CL區段，藉此可將該等輕鏈及重鏈可變區用於產生任何抗體同型之全長抗體基因。另外或其他，重組表現載體可編碼促進宿主細胞分泌抗體鏈之信號肽。可將抗體鏈基因選殖入載體中以使信號肽同框連接至抗體鏈基因之胺基末端。信號肽可為免疫球蛋白信號肽或異種信號肽(亦即來自非免疫球蛋白之信號肽)。

除抗體鏈基因之外，本發明之重組表現載體亦攜帶控制宿主細胞中的抗體鏈基因表現之調節序列。術語"調節序列"意欲包括啟動子、強化子及其他控制抗體鏈基因轉錄或轉譯之表現控制元件(例如多聚腺嘌呤信號)。舉例而言，在Goeddel(Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA 1990)中描述此等調節序列。熟習此項技術者應瞭解表現載體之設計(包括選擇調節序列)可取決於如選擇待轉型之宿主細胞、所要蛋白之表現程度等因子。用於哺乳動物宿主細胞表現之調節序列包括指導哺乳動物細胞中蛋白的高程度表現之病毒元件，諸如衍生於細胞巨大病毒(CMV)、猴病毒40(SV40)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期啟動子(AdMLP))及多形瘤之啟動子及/或強化子。或者，可使用諸如泛素啟動子或P-血球蛋白啟動子之非病毒調節序列。更進一步，調節元素由來自不同來源之序列構成，該等來源諸如SRa啟動子系統，其含有來自SV40早期啟動子之序列及人類T細胞白血病毒類型1之長末端重複序列(Takebe, Y.等人, 1988 Mol.

Cell. Biol. 8:466-472)。

除抗體鏈基因及調節序列外，本發明之重組表現載體亦可攜帶額外序列，諸如調節宿主細胞中的載體複製(例如複製起點)之序列及可選擇標記基因。可選擇標記基因促進對其中已引入載體之宿主細胞之選擇(例如，見Axel等人之美國專利第4,399,216、4,634,665及5,179,017號)。舉例而言，可選擇標記基因通常賦予其中已引入載體之宿主細胞諸如G418、潮黴素(hygromycin)或甲胺喋呤(methotrexate)之藥物的抗性。可選擇標記基因包括二氫葉酸還原酶(DHFR)基因(用於以甲胺喋呤選擇/擴增方式在dhfr-宿主細胞中使用)及neo基因(用於G418選擇)。

為表現輕鏈及重鏈，藉由標準技術將編碼重鏈及輕鏈之表現載體轉染至宿主細胞中。術語"轉染"之不同形式意欲涵蓋大量通常用於將外源DNA引入原核或真核宿主細胞中之技術，例如電穿孔、磷酸鈣沉澱、DEAE-葡聚糖轉染及其類似技術。理論上可在原核或真核宿主細胞中表現本發明之抗體。討論了抗體在真核細胞、尤其在哺乳動物宿主細胞中之表現，此係由於此等真核細胞且尤其為哺乳動物細胞比原核細胞更可能組合及分泌經適當折疊且具有免疫活性之抗體。已報導抗體基因之原核表現對產生高產量之活性抗體為無效的(Boss, M. A.及Wood, C. R., 1985 Immunology Today 6:12-13)。

用於表現本發明之重組抗體之哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢(CHO細胞)(包括與(例如)如R.J. Kaufman及P.A.

Sharp, 1982 Mol. Biol. 159:601-621中所述之DH FR可選擇標記以前使用之Urlaub及Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220中所述之dhfr-CHO細胞)、NSO骨髓瘤細胞、COS細胞及SP2細胞。當將編碼抗體基因之重組表現載體引入哺乳動物宿主細胞中時，藉由培養宿主細胞歷經一段足以使宿主細胞中抗體表現或抗體分泌進入宿主細胞生長於其中之培養基中的時間來產生抗體。可使用標準蛋白純化方法自培養基中重新獲得抗體。

免疫共軛物

在另一態樣中，本發明描述與諸如細胞毒素、藥物(例如免疫抑制劑)或放射性毒素之治療部分共軛之抗IL-13抗體或其片段。此等共軛物在本文中稱作"免疫共軛物"。包括一或多種細胞毒素之免疫共軛物係指"免疫毒素"。細胞毒素或細胞毒性劑包括任何對細胞有害(例如殺害細胞)之藥劑。實例包括毒素(toxin)、細胞遲緩素B(cytochalasin B)、短桿菌肽D(gramicidin D)、溴化乙錠(ethidium bromide)、吐根素(emetine)、絲裂黴素(mitomycin)、足葉乙甙(etoposide)、特諾波賽(tenoposide)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、秋水仙鹼(t. colchicin)、阿黴素(doxorubicin)、道諾黴素(daunorubicin)、二羥基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神黴素(mithramycin)、放線菌素D(actinomycin D)、1-去氫辜酮(1-dehydrotestosterone)、糖皮質激素(glucocorticoid)、普魯卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因

(lidocaine)、普萘洛爾 (propranolol)、及嘌呤素 (puromycin) 及其類似物或同系物。治療劑亦包括(例如)抗代謝物(例如甲胺喋呤 (methotrexate)、6-巰嘌呤 (6-mercaptapurine)、6-硫鳥嘌呤 (6-thioguanine)、阿糖胞苷 (cytarabine)、5-氟尿嘧啶氮烯唑胺 (5-fluorouracil dacarbazine))、消除劑(例如二氯甲二乙胺 (mechlorethamine)、thioepa chloraxnbucil、左旋苯丙酸氮芥 (meiphalan)、卡氮芥 (carmustine)(BSNU)及環己亞硝脲 (lomustine)(CCNU)、環磷醯胺 (cyclophosphamide)、硫酸布他卡因 (busulfan)、二溴甘露糖醇 (dibromomannitol)、鏈脲菌素 (streptozotocin)、絲裂黴素 C 及順二氯乙二胺鉑 (II)(cis-dichlorodiamine platinum(II)) (DDP)順氯鉑 (cisplatin))、蒽環黴素 (anthracycline)(例如道諾黴素 (daunorubicin, 之前為 daunomycin)及阿黴素 (doxorubicin))、抗生素(例如放線菌素 (dactinomycin, 之前為 actinomycin)、博萊黴素 (bleomycin)、光神黴素 (mithramycin)及氮苜黴素 (anthramycin)(AMC))及抗有絲分裂劑(例如長春新鹼及長春鹼)。

可與本發明抗體共軛之治療細胞毒素之其他實例包括多卡米素 (duocarmycin)、卡奇黴素 (calicheamicin)、美登素 (maytansine)及阿立他汀 (auristatin)及其衍生物。卡奇黴素抗體共軛物之實例為市售的 (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst)。

可使用此項技術中可用之連接子技術使細胞毒素與本發明之抗體共軛。已用於使細胞毒素與抗體共軛之連接子類型之實例包括(但不限於)含胺、硫醚、酯、二硫化物及肽之

連接子。可選擇(例如)易經受由溶酶體區內的低pH值引起之分裂或易經受由諸如優先在腫瘤組織中表現的蛋白酶(諸如組織蛋白酶(例如組織蛋白酶B、C、D))之蛋白酶引起之分裂的連接子。

為進一步討論細胞毒素類型，用於使治療劑與抗體共軛之連接子及方法亦見於Saito, G.等人，2003 *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A.等人，2003 *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G., 2003 *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M., 2002 *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I.及Kreitman, R. J., 2002 *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D.及Springer, C.J., 2001 *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264。

本發明之抗體亦可與放射性同位素共軛以產生細胞毒素放射性藥物(亦稱作放射性免疫共軛物)。可與抗體共軛以供診斷或治療使用之放射性同位素之實例包括(但不限於)碘¹³¹、銥¹¹¹、釷⁹⁰及鐳¹⁷⁷。此項技術中已建立用於製備放射性免疫共軛物之方法。放射性免疫共軛物之實例為市售的，包括Zevalin™(DEC Pharmaceuticals)及Bexxar™(Corixa Pharmaceuticals)，且可使用類似方法以用本發明之抗體製備放射性免疫共軛物。

本發明之抗體共軛物可用於調節特定生物學反應，且藥物部分不應理解為限於傳統化學治療劑。舉例而言，藥物部分可為具有所要生物學活性之蛋白或多肽。此等蛋白可包括(例如)酶活性毒素或其活性片段，諸如相思豆毒素、蓖

麻毒素A、綠膿桿菌外毒素或白喉毒素；蛋白，諸如腫瘤壞死因子或干擾素 γ ；或生物學反應調節劑，諸如淋巴介質、介白素-1("IL-1")、介白素-2("IL-2")、介白素-6("IL-6")、粒細胞巨噬細胞群落刺激因子("GM-CSF")、粒細胞群落刺激因子("G-CSF")或其他生長因子。

熟知用於使此治療部分與抗體共軛之技術，見：(例如) Amon等人之"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy"，在 Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy 中，Reisfeld 等人(編)，第 243-56 頁(Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 等人之"Antibodies For Drug Delivery"，在 Controlled Drug Delivery (第二版)中，Robinson 等人(編)第 623-53 頁(Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe 之"Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review"，在 Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications 中，Pinchera 等人(編)，第 475-506 頁(1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy"，在 Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy 中，Baldwin 等人(編)，第 303-16 頁(Academic Press 1985); 及 Thorpe 等人之"The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Inmunol. Rev.*, 62:119-58(1982)。

雙特異性分子

在另一態樣中，本發明描述包含本發明之抗 IL-13 抗體或

其片段之雙特異性分子。本發明之抗體或其抗原結合部分可衍生或連接至另一功能分子，例如另一肽或蛋白(例如受體之另一抗體或配位基)以產生結合至少兩個不同結合位點或目標分子之雙特異性分子。事實上，本發明之抗體可衍生或連接至一個以上其他功能分子以產生結合兩個以上不同結合位點及/或目標分子之多特異性分子；如本文所用之術語"雙特異性分子"亦意欲涵蓋此等多特異性分子。為產生本發明之雙特異性分子，可將本發明之抗體功能連接(例如藉由化學偶合、基因融合、非共價締合或其他)至一或多個其他結合分子(諸如另一抗體、抗體片段、肽或結合模擬物)，以致得到雙特異性分子。

因此，本發明包括包含至少一個對IL-13之第一結合特異性及對第二目標抗原決定基之第二結合特異性之雙特異性分子。舉例而言，第二目標抗原決定基為Fc受體，例如人類Fc γ R1(CD64)或人類Fc α 受體(CD89)。因此，本發明包括可與表現Fc γ R、Fc α R或Fc ϵ R之效應細胞(例如單核細胞、巨噬細胞或多形核細胞(PMN))結合並與表現IL-13之目標細胞結合的雙特異性分子。此等雙特異性分子將表現IL-13之細胞靶向效應細胞，並觸發Fc受體介導之效應細胞活性(諸如表現IL-13之細胞的吞噬作用、抗體依賴細胞介導之細胞毒性(ADCC)、細胞激素釋放或產生超氧陰離子)。

另外，在本發明中雙特異性分子為多特異性分子，除抗Fc結合特異性及抗IL-13結合特異性之外，該分子可進一步包括第三結合特異性。舉例而言，第三結合特異性可為抗

增強因子(EF)部分，例如結合與細胞毒素活性有關之表面蛋白並因此增加對目標細胞之免疫反應的分子。"抗增強因子部分"可為與特定分子(例如抗原或受體)結合並由此導致Fc受體或目標細胞抗原之結合決定子的效應增強之抗體、功能抗體片段或配位基。

"抗增強因子部分"可結合Fc受體或目標細胞抗原。或者，抗增強因子部分可與不同於第一及第二結合特異性所結合之實體之實體結合。舉例而言，抗增強因子部分可結合細胞毒素T細胞(例如藉由CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD44、ICAM-1或其他導致對目標細胞之免疫反應增加的免疫細胞)。

在一實施例中，本發明之雙特異性分子包含作為結合特異性之至少一個包括(例如)Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或單鏈Fv之抗體或其抗體片段。抗體亦可為輕鏈或重鏈二聚體，或其任何最小化片段，諸如Ladner等人之美國專利第4,946,778號(其內容以引用的方式清楚地併入本文中)中所述之Fv或單鏈構築體。

在一實施例中，由單株抗體提供對Fc γ 受體之結合特異性，該單株抗體之結合不受人類免疫球蛋白G(IgG)阻斷。如本文所用之術語"IgG受體"係指位於染色體1上之8個 γ 鏈基因中之任一者。此等基因編碼總計12個跨膜或可溶受體同功異型物(其被分成3個F γ 受體類：Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)及Fc γ RIII(CD16))。在另一實施例中，Fc γ 受體為人類高親和力Fc γ RI。人類Fc γ RI為72 kDa分子，其展

示對單體IgG之高親和力(10^8 - 10^9 M⁻¹)。

Fanger等人在PCT公開案WO 88/00052中及在美國專利第4,954,617號中(將其教示以引用的方式全部併入本文中)描述某些抗Fc γ 單株抗體之產生及表徵。此等抗體在不同於受體之Fc γ 結合位點之位點上結合抗原決定基Fc γ RI、Fc γ RII或Fc γ RIII,且因此其結合大體上不受IgG生理學含量阻斷。本發明中 useful 之特定抗Fc γ RI抗體為mAb 22、mAb 32、mAb 44、mAb 62及mAb 197。產生mAb 32之融合瘤可自American Type Culture Collection, ATCC寄存編號HB9469獲得。在其他實施例中,抗Fc γ 受體抗體為人源化形式之單株抗體22(H22)。Graziano, R.F.等人之1995 J. Immunol 155 (10): 4996-5002及PCT公開案WO 94/10332中描述H22抗體之產生及表徵。產生細胞株之H22抗體係以編號HA022CL1寄存於American Type Culture Collection且存取編號為CRL 11177。

在其他實施例中,由結合例如Fc- α 受體(Fc α RI(CD89))之人類IgA受體的抗體提供對Fc受體之結合特異性,該抗體之結合不必受人類免疫球蛋白A(IgA)阻斷。術語"IgA受體"意欲包括位於染色體19上之一基因(Fc α RI)之基因產物。已知此基因編碼55至110 kDa之若干經多樣性剪接之跨膜同功異型物。Fc α RI(CD89)係原構地表現於單核細胞/巨噬細胞、嗜伊紅血球及嗜中性粒細胞上,但並不表現於非效應細胞群體上。Fc α RI對IgA1及IgA2具有中等親和力(5×10^7 M⁻¹),其在暴露於諸如G-CSF或GM-CSF之細胞激素後有所

增加 (Morton, H.C. 等人, 1996 *Critical Reviews in Immunology* 116:423-440)。已描述4個在IgA配位基結合域外結合Fc α RI之鑑別為A3、A59、A62及A77之Fc α RI特異性單株抗體 (Monteiro, R.C. 等人, 1992 *J. Immunol.* 148:1764)。

Fc α RI及Fc γ RI為用於本發明之雙特異性分子中之觸發受體, 此係由於其主要表現於例如單核細胞、PMN、巨噬細胞及樹突狀細胞之免疫效應細胞上; 以高量表現(例如每個細胞5,000-100,000); 為細胞毒素活性之介體(例如ADCC、吞噬作用); 介導以其為目標之抗原(包括自我抗原)之較強抗原呈現。

可在本發明之雙特異性分子中採用之其他抗體為鼠科、嵌合及人源化單株抗體。

可藉由使組份結合特異性(例如抗FcR及抗IL-13結合特異性)共軛, 使用此項技術中已知之方法來製備本發明之雙特異性分子。舉例而言, 可分別產生雙特異性分子之各結合特異性且接著使其互相共軛。當結合特異性為蛋白或肽時, 大量偶合劑或交聯劑可用於共價共軛。交聯劑之實例包括蛋白A、碳化二醯亞胺、N-琥珀醯亞胺基-S-乙醯基-硫乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫雙(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、鄰伸苯基二馬來醯亞胺(oPDM)、N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)及4-(N-馬來醯亞胺甲基)環己烷-1-羧酸磺酸基琥珀醯亞胺酯(磺酸基-SMCC)(例如, 見Karpovsky等人, 1984 *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA等人, 1985 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648)。其他方法包

括下列文獻中所述者：Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan等人, 1985 Science 229:81-83); 及 Glennie等人, 1987 J. Immunol. 139: 2367-2375)。共軛劑為 SATA 及磺酸基-SMCC, 其均可自 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL) 獲得。

當結合特異性為抗體時, 可藉由兩個重鏈之C末端鉸鏈區的硫氫基結合使其共軛。在一特定實施例中, 使鉸鏈區經修飾以在共軛之前含有奇數個(例如一個)硫氫基殘基。

或者, 可在同一載體中編碼並在同一宿主細胞中表現及組合兩個結合特異性。此方法在雙特異性分子為 $mAb \times mAb$ 、 $mAb \times Fab$ 、 $Fab \times F(ab')_2$ 或配位基 $\times Fab$ 融合蛋白時尤其有用。本發明之雙特異性分子可為包含一單鏈抗體及一結合決定子之單鏈分子, 或包含兩個結合決定子之單鏈雙特異性分子。雙特異性分子可包含至少兩個單鏈分子。例如, 在美國專利第 5,260,203 號、美國專利第 5,455,030 號、美國專利第 4,881,175 號、美國專利第 5,132,405 號、美國專利第 5,091,513 號、美國專利第 5,476,786 號、美國專利第 5,013,653 號、美國專利第 5,258,498 號及美國專利第 5,482,858 號中描述用於製備雙特異性分子之方法。

舉例而言, 可藉由酶聯結免疫吸附劑檢定(ELISA)、放射性免疫檢定(REA)、FACS分析、生物檢定(例如生長抑制)或西方墨點檢定來確定雙特異性分子與其特異性目標之結合。此等檢定各自通常藉由採用對所關注複合物具有特異性之經標記試劑(例如抗體)來偵測特定關注之蛋白-抗體複

合物之存在。舉例而言，可使用(例如)識別及特異性結合抗體-FcR複合物之酶聯結抗體或抗體片段來偵測FcR-抗體複合物。或者，可使用大量其他免疫檢定中之每一者來偵測複合物。舉例而言，抗體可經4次放射性標記並用於放射性免疫檢定(RIA)(例如，見Weintraub; B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986，其以引用的方式併入本文中)。可藉由諸如使用 γ 計數器或閃爍計數器之方法或藉由自動射線攝影術來偵測放射性同位素。

醫藥組合物

在另一態樣中，本發明提供一種與醫藥學上可接受之載劑一起調配之組合物(例如醫藥組合物)，其含有本發明之單株抗體或其抗原結合部分之一種或組合。此等組合物可包括本發明之(例如兩種或兩種以上不同的)抗體或免疫共軛物或雙特異性分子之一種或組合。舉例而言，本發明之醫藥組合物可包含與在目標抗原或具有互補活性者上之不同抗原決定基結合的抗體(或免疫共軛物或雙特異性分子)之組合。

亦可在組合療法中投與本發明之醫藥組合物(亦即與其他藥劑組合)。舉例而言，組合療法可包括與至少一種其他消炎劑組合之本發明抗IL-13抗體。下文在本發明抗體之用途部分更詳細描述可用於組合療法中之治療劑之實例。

如本文所用之"醫藥學上可接受之載劑"包括任何及所有

溶劑、分散介質、塗料、抗菌劑及抗真菌劑、等張及吸收延緩劑及其生理學上可相容之類似物。載劑應適於靜脈內、肌肉內、皮下、非經腸、脊椎或表皮投藥(例如藉由注射或輸注)。視投藥途徑而定，可以物質塗佈活性化合物(亦即抗體、免疫共軛物或雙特異性分子)以保護該化合物免受酸及其他可使化合物失活之天然條件的作用。

本發明之醫藥化合物可包括一或多種醫藥學上可接受之鹽。"醫藥學上可接受之鹽"係指保持母體化合物之所要生物學活性且不賦予任何不良毒物學效應之鹽(例如，見 Berge, S.M. 等人 1977 J. Pharm. Sci. 66:1-19)。此等鹽之實例包括酸加成鹽及鹼加成鹽。酸加成鹽包括彼等衍生於無毒無機酸(諸如鹽酸、硝酸、磷酸、硫酸、氫溴酸、氫碘酸、亞磷酸及其類似酸)及衍生於無毒有機酸(諸如脂族單及二羧酸、經苯基取代烷酸、羥基烷酸、芳族酸、脂族及芳族磺酸及其類似酸)者。鹼加成鹽包括彼等衍生於鹼土金屬(諸如鈉、鉀、鎂、鈣及其類似物)及衍生於無毒有機胺(諸如 N,N'-二苯甲基乙二胺、N-甲基葡糖胺、氯普魯卡因、膽鹼、二乙醇胺、乙二胺、普魯卡因及其類似物)者。

本發明之醫藥組合物亦可包括醫藥學上可接受之抗氧化劑。醫藥學上可接受之抗氧化劑之實例包括：水可溶抗氧化劑(諸如抗壞血酸、半胱胺酸鹽酸鹽、硫酸氫鈉、偏亞硫酸氫鈉、亞硫酸鈉及其類似物)、油可溶抗氧化劑(諸如抗壞血酸棕櫚酸酯、丁基化羥基甲氧苯(BHA)、丁基化羥基甲苯(BHT)、卵磷脂、沒食子酸丙酯、 α -生育酚及其類似物)及

金屬螯合劑(諸如檸檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸及其類似物)。

可用於本發明醫藥組合物中之適合水性及非水性載劑之實例包括水、乙醇、多元醇(諸如甘油、丙二醇、聚乙二醇及其類似物)及其適合混合物、植物油(諸如橄欖油)及可注射有機酯(諸如油酸乙酯)。例如，可藉由使用諸如卵磷脂之塗佈材料、藉由在分散液情況下維持所需粒度及藉由使用界面活性劑來維持適當流動性。

該等組合物亦可含有佐劑，諸如防腐劑、濕潤劑、乳化劑及分散劑。可藉由前述殺菌程序並藉由包括各種抗菌劑及抗真菌劑(例如對氧苯甲酸酯、氯丁醇、酚山梨酸及其類似物)來確保預防微生物存在。亦可需要將諸如糖、氯化鈉及其類似物之等張劑包括在此等組合物內。另外，可藉由包括延遲吸收之藥劑(諸如單硬脂酸鋁及明膠)而引起可注射醫藥形式之吸收延長。

醫藥學上可接受之載劑包括用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液之無菌水溶液或分散液及無菌粉末。此等介質及藥劑用於醫藥活性物質之用途為此項技術中已知的。除非任何習知介質或藥劑均不可與該活性化合物相容，否則預期其在本發明醫藥組合物中之用途。亦可將補充活性化合物併入該等組合物中。

治療組合物通常須無菌且在製造及儲存條件下穩定。可將組合物調配為溶液、微乳液、脂質體或其他適於高藥物濃度之有序結構。載劑可為含有(例如)水、乙醇、多元醇(例

如甘油、丙二醇及液體聚乙二醇及其類似物)及其適合混合物之溶劑或分散介質。舉例而言，可藉由使用諸如卵磷脂之塗料、藉由在分散液情況下維持所需粒度及藉由使用界面活性劑來維持適當流動性。在許多情況下，可將等張劑(例如糖、諸如甘露糖醇、山梨糖醇之多元醇或氯化鈉)包括在組合物內。可藉由將延遲吸收之藥劑(例如單硬脂酸鹽及明膠)包括在組合物中而引起可注射組合物之吸收延長。

可藉由視需要將所需量之活性化合物併入具有上文所列舉成份之一者或組合之適當溶劑中，接著進行殺菌微過濾來製備無菌可注射溶液。通常藉由將活性化合物併入含有基本分散介質及來自上文所列舉者之其他所需成份之無菌媒劑來製備分散液。在用於製備無菌可注射溶液之無菌粉末情況下，製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥(freeze-drying、lyophilization)，其可產生活性成份加上任何來自其先前經無菌過濾溶液的額外所要成份之粉末。

可與載劑物質組合產生單一劑型之活性成份之量視所治療之受檢者及特定投藥模式而變化。可與載劑物質組合產生單一劑型之活性成份之量通常應為產生治療效應之組合物的量。以百分率計，此量通常在約0.01百分比至約99百分比活性成份、約0.1百分比至約70百分比或約1百分比至約百分比30活性成份(其與醫藥學上可接受之載劑組合)之範圍內。

調節給藥方式以提供最佳的所要反應(例如治療反應)。舉例而言，可投與單一大丸劑，隨時間分若干次給藥或者可

如治療情況之緊急狀態所指示按比例減少或增加劑量。為了易於投藥及劑量一致性而調配單位劑型之非經腸組合物為尤其有利的。如本文所用之單位劑型係指適於作為整體劑量供給待治療受檢者之物理離散單位；各單位含有經計算以與所需醫藥載劑締合產生所要治療效應之預定量之活性化化合物。本發明單位劑型之規格由活性化化合物之獨特特徵及所要達到之特定治療效應指示並直接取決於之，且侷限性為此項組合此種用於治療個體敏感性的活性化化合物之技術中所固有的。

為投與抗體，劑量在約0.0001至100 mg/kg且更通常為0.01至5 mg/kg宿主體重之範圍內。舉例而言，劑量可為0.3 mg/kg體重、1 mg/kg體重、3 mg/kg體重、5 mg/kg體重或10 mg/kg體重或在1-10 mg/kg範圍內。例示性治療方式必需每週投藥一次、每兩週投藥一次、每三週投藥一次、每四週投藥一次、每月投藥一次、每3個月投藥一次或每3至6個月投藥一次。本發明抗IL-13抗體之給藥方式可包括藉由靜脈內或皮下投與1 mg/kg體重或3 mg/kg體重，其中使用下列給藥時程之一投用抗體：例如，每4週，接著每3個月，6個劑量；每3週；每3週，每次3 mg/kg體重，接著1 mg/kg體重。

在一些方法中，同時投與具有不同結合特異性之兩種或兩種以上單株抗體，在此情況下所投與之各抗體之劑量在所指出之範圍內。通常多次投與抗體。例如，單劑量之間的時間隔可為每週、每月、每三個月或每年。如藉由量測患者體內抗體相對目標抗原之血液含量所指示，間隔亦可為

無規律的。在一些方法中，調節劑量以使血漿抗體濃度達到約1-1000 $\mu\text{g/ml}$ 且在一些方法中為約25-300 $\mu\text{g/ml}$ 。

或者，可以持續釋放調配物來投與抗體，在此情況下投藥所需頻率較少。劑量及頻率視患者體內抗體之半衰期而變化。人類抗體通常展示最長半衰期，接著為人源化抗體、嵌合抗體及非人類抗體。投藥劑量及頻率可視治療是否為預防或治療性而變化。在預防應用中，在長時間內以相對不頻繁間隔投與相對較低之劑量。一些患者在其餘生持續接受治療。在治療應用中，有時需要以相對較短間隔投與相對較高劑量，直至疾病之發展有所減緩或停止或直至患者展示疾病症狀之部分或完全改善。此後，可以預防方式投與患者。

本發明醫藥組合物中活性成份之實際劑量含量可變化以致得到可有效達到對特定患者、組合物及投藥模式之所要治療反應而對患者無毒性之量的活性成份。所選擇之劑量含量取決於多種藥物動力學因子，此等因子包括所採用之本發明特定組合物或其酯、鹽或胺化物之活性；投藥途徑；投藥時間；所採用之特定化合物之排泄速率；治療持續時間；與所採用之特定組合物組合使用之其他藥物、化合物及/或物質；經治療患者之年齡、性別、體重、病症、全身健康狀況及先前藥物史；及藥物技術中熟知之類似因子。

"治療有效劑量"之本發明抗IL-13抗體可導致疾病症狀嚴重性之降低、無疾病症狀期頻率及持續時間之增加或預防由於疾病痛苦而引起之損害或殘疾。

可藉由一或多種投藥途徑，使用此項技術中已知之各種方法之一或多者投與本發明之組合物。如熟練技工所瞭解，投藥途徑及/或模式可視所要結果而變化。本發明抗體之投藥途徑包括經靜脈內、肌肉內、皮內、腹膜內、皮下、脊椎或例如藉由注射或輸注之其他非經腸投藥途徑。如本文所用之片語"非經腸投藥"意謂除經腸及局部投藥之外通常藉由注射之投藥模式，且包括(但不限於)經靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、囊內、眼眶內、心臟內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊椎內、硬膜外及腦幹內注射及輸注。

或者，可藉由經腸途徑投與本發明之抗體，諸如局部、表皮或黏膜投藥途徑(例如經鼻內、口服、陰道、直腸、舌下或局部投藥)。

可用諸如受控釋放調配物之保護化合物免於快速釋放之載劑(包括植入物、經皮貼片及微膠囊化傳遞系統)製備本發明之活性化合物。可使用諸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原蛋白、聚原酸酯及聚乳酸之生物可降解、生物可相容聚合物。多種用於製備此等調配物之方法已取得專利或一般為熟習此項技術者已知。例如，見 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson編，Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

可以此項技術中已知之醫學設備投與治療組合物。舉例而言，在一實施例中，可以無針皮下注射設備(諸如美國專利第 5,399,163、5,383,851、5,312,335、5,064,413、

4,941,880、4,790,824或4,596,556號中所示之設備)投與本發明之治療組合物。本發明中 useful 之熟知植入物及分子之實例包括：美國專利第4,487,603號，其展示用於以受控速率分散藥物之可移植微輸注泵；美國專利第4,486,194號，其展示用於經皮膚投與藥物之治療設備；美國專利第4,447,233號，其展示用於以精確輸注速率傳遞藥物之藥物輸注泵；美國專利第4,447,224號，其展示用於連續傳遞藥物之可變流動可移植輸注裝置；美國專利第4,439,196號，其展示具有多室區之滲透性藥物傳遞系統；及美國專利第4,475,196號，其展示滲透性藥物傳遞系統。此等專利以引用的方式併入本文中。熟習此項技術者已知多種其他此等植入物、傳遞系統及分子。

在某些實施例中，可調配本發明之人類單株抗體以確保在活體內適當分佈。舉例而言，血腦障壁(BBB)排除了許多高度親水化合物。為確保本發明之治療化合物與BBB交叉(若須要)，可(例如)在脂質體中調配該等化合物。關於製造脂質體之方法，見(例如)美國專利第4,522,811、5,374,548及5,399,331號。脂質體可包含一或多個可選擇性地輸送至特定細胞或器官中並由此增強目標藥物傳遞之部分(例如，見V.V. Ranade, 1989 J. Cline Pharmacol. 29:685)。例示性目標部分包括葉酸或生物素(例如，見Low等人之美國專利第5,416,016號)；甘露糖(Umezawa等人，1988 Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038)；抗體(P.G. Bloeman等人，1995 FEBS Lett. 357:140；M. Owais等人，1995

Antimicrob. Agents Chernother. 39:180); 界面活性劑蛋白A受體(Briscoe等人, 1995 Am. J. Physiol. 1233:134); pl20(Schreier等人, 1994 J. Biol. Chem. 269:9090); 亦見K. Keinanen; M.L. Laukkanen, 1994 FEBS Lett. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler, 1994 Immunomethods 4:273。

本發明之用途及方法

本發明之抗體(及免疫共軛物及雙特異性分子)具有活體外及活體內診斷及治療效用。舉例而言, 可將此等分子投與至培養物中(例如活體外或活體內)或受檢者體內(例如活體內)之細胞中以治療、預防或診斷各種失調症。如本文所用之術語"受檢者"意欲包括人類及非人類動物。非人類動物包括所有脊椎動物, 例如哺乳動物及非哺乳動物(諸如非人類靈長類、綿羊、狗、貓、母牛、馬、雞)、兩棲動物及爬行動物。此等方法特定適於治療患有與異常IL-13表現相關之失調症的人類患者。當與另一藥劑一起投與抗IL-13抗體時, 兩者可以任一次序或同時投與。

在一實施例中, 本發明之抗體(及免疫共軛物及雙特異性分子)可用於偵測IL-13含量或含有IL-13之細胞的含量。舉例而言, 可藉由使樣品(諸如活體外樣品)與具有抗IL-13抗體之對照樣品在允許抗體與IL-13之間形成複合物之條件下接觸來達到此目的。偵測並比較樣品與對照物中抗體與IL-13之間形成的任何複合物。舉例而言, 可使用本發明之組合物進行此項技術中熟知之標準偵測方法, 諸如ELISA及流式細胞儀檢定。

因此，在一態樣中，本發明進一步提供用於偵測樣品中 IL-13(例如人類 IL-13 抗原)的存在或量測 IL-13 之量的方法，該方法包含使樣品及對照樣品與特異性結合 IL-13 之本發明抗體或其抗原結合部分在允許抗體或其部分與 IL-13 之間形成複合物的條件下接觸。接著偵測複合物之形成，其中與對照樣品相比較樣品之間複合物形成之差異指示樣品中存在 IL-13。

由本發明之組合物(例如抗體、人類抗體、免疫共軛物及雙特異性分子)及使用說明書組成之套組亦在本發明之範疇內。該套組可進一步含有至少一種額外試劑或一或多種額外的本發明之抗體(例如不同於第一抗體具有互補活性之抗體，其與目標抗原上之抗原決定基結合)。套組通常包括指示套組內含物之預期用途的標記。術語標記包括供應於套組上或供給套組之任何書面或已記錄材料或另外伴隨套組者。

儘管已充分描述本發明，但亦藉由下列具有例示性且不意謂進一步限制之實例及申請專利範圍進一步說明本發明。熟習此項技術者將識別或可確定僅使用常規試驗，大量相當於本文所述之特定程序者。此等等價物在本發明及申請專利範圍之範疇內。貫穿此申請案所引用之所有參考文獻之內容(包括已發佈專利及已出版專利申請案)均以引用的方式併入本文中。

實例

實例 1: 來自經免疫脾庫之人類 IL-13 特定性抗體之產生

將來自脾之RNA用於在如美國專利6,794,132中所述之Fab噬菌體呈現載體中產生隨機分類為H及L鏈可變域之噬菌體呈現庫。使用生物素標記hrIL-13，在如該專利中所述之溶液相平衡結合協定中使噬菌體呈現庫經受五輪選擇。前四輪選擇採用 10^{-8} M之hrIL-13且最後一輪選擇採用 10^{-9} M之hrIL-13。藉由計算在抗原存在下重新獲得之pfu除以在無抗原下重新獲得之pfu所測定的此庫之最終信號雜訊比為37，表明大於90%之所選噬菌體表現結合hrIL-13之抗體。接著將噬菌體呈現庫次選殖至質體載體中以用於表現如美國專利6,794,132中所述之可溶Fab。經次選殖者為包含大腸桿菌(*E. coli*)中之質體載體之庫(各質體編碼單株Fab片段)。析出次純系庫並收集代表個別純系之菌落以接種96孔培養板。在隔夜生長之後，使用培養板培養物以為96孔培養板中的純系保存冷凍細胞庫並亦接種經誘導以表現單株抗體之96孔培養板複本。次日，使此等96孔培養板培養物經歷清潔劑萃取及純化以重新獲得微克之量的抗體。處理經純化抗體以移除內毒素且最後使其經無菌過濾。使用塗佈於抗生物素蛋白培養板上之生物素標記rhIL-13進行ELISA檢定以鑑別哪些孔含有功能陽性。以抗體恆定區為目標之夾心檢定用於測定不同孔中之抗體濃度。關於生物學活性評估含有抗體之96孔培養板及檢定資料。接著將96孔冷凍細胞庫中之所關注純系定序以鑑別表現獨特抗體者。接著使用此等獨特純系之冷凍細胞庫來接種小規模震盪瓶培養物並使其生長隔夜。使用隔夜培養物來接種大規

模燒瓶且接著誘導其表現抗體。次日，使燒瓶培養物經機械均質化及純化以產生毫克量之抗體。加工經純化Fab以移除內毒素並使其經歷最終無菌過濾。使用塗佈於抗生物素蛋白培養板上之生物素標記rhIL-13，藉由ELISA證明此等抗體之功能活性。藉由在280 nm下之吸收量測來測定抗體濃度。在基於細胞的檢定中評估經純化Fab之活體外結合及活性。

實例 2: 結合親和力之定量分析: 測定抗人類IL-13 Fab候補物質

使用光學生物感測器BIAcore 2000進行量化抗IL-13 Fab與若干hrIL-13之相互作用的表面電漿共振量測。可藉由受體上之下列配位基積累來量測IL-13與固定於BIAcore晶片上之個別IL-13 Fab之特異性結合。微觀締合(k_{on})及解離速率(k_{off})可直接自晶片上之物質積累速率獲得且可表示為反應單位(RU)。抗IL-13 Fab經由第二抗人類L_K抗體固定於晶片表面上(Jackson免疫化學)。使用如製造商協定中所推薦之'胺偶合套組'(BIAcore, Cat. No. BR-1000-50)，使此捕捉抗體共價結合。以20 μ l/min之流動速率注入250 μ l不同濃度之hrIL-13並記錄動力學跡線。藉由兩次酸洗步驟，使用100 mM HCl並以20 μ l/min之流動速率注入10 μ l使晶片表面再生。此處理導致Fab IL-13複合物由於可逆酸變性而解離。當再注入抗體以用於隨後執行時，未觀察到結合活性之任何顯著損失。以BIAcore軟體應用1:1 Langmuir締合模型評估動力學跡線。

本文表 1 中展示人類 IL-13 之匯總親和力資料。

表 1

Fab	KD [pM]人類IL-13
01471/G6	100 ± 2
03161/H2	197 ± 12
01951/G12	480 ± 68
01771/E10	343 ± 54

實例 3：轉化為 IgG 格式

使用 QIAprep minipreps (Qiagen Inc.)，自 3 ml 培養物純化抗體 DNA 定序模板。根據製造商說明書，使用 Applied Biosystems 3100 Avant Genetic Analyzer 將模板定序。分別藉由 PCR 自定序模板擴增、藉由瓊脂糖凝膠電泳法純化並自凝膠切離及純化所選純系之重鏈及 κ 鏈可變區。將編碼 V_H 及 V_L 之質體選殖至人類 κ 輕鏈及人類 IgG₁ 重鏈之表現序列盒中。以兩種載體（一種為輕鏈載體且一種為重鏈載體）轉染 Sp2/0 親本細胞株。選擇經轉染細胞並使用 G418 及甲胺喋呤進行擴增，可分別導致產生效價在 5 mg/L 至 30 mg/L 範圍內之抗體的抗性、擴增細胞池出現。接著採用稀釋選殖，其導致自 6 個 96 孔培養板中分離出 127 個可存活純系。接著以分批進料震盪器格式測試出現細胞株的生產力。亦在 90 天之時期內進行穩定性測試以確定表現構築體之穩定整合及產物之穩固表現。北方墨點展示具有等帶強度之單一、全長 RNA，表明重鏈及輕鏈具有類似表現程度。

實例 4：基於細胞之檢定中抗 IL-13 全抗體之活體外表徵

IL-13係使嗜酸性粒細胞趨化因子自人類肺纖維母細胞釋放之強有力誘導劑。在IL-13誘導之嗜酸性粒細胞趨化因子釋放檢定中，使用人類肺纖維母細胞來評估抗體中和IL-13之生物活性的能力。簡言之，在96孔組織培養板中之各孔中析出細胞(體積為100 μ l之每個孔中 2×10^4 個細胞)。以可提供80%的最大嗜酸性粒細胞趨化因子釋放之濃度的IL-13刺激細胞(已使用0-100 ng/ml IL-13之標準曲線預定各批次細胞之IL-13濃度)。將不同濃度之抗體共同應用於細胞。將細胞在37°C、5% CO₂下培育24小時並收集培養基且將其儲存於-20°C下直至需要。藉由特定ELISA(R&D systems)來量測培養基中的嗜酸性粒細胞趨化因子含量，其中檢定靈敏性在15-1000 pg/ml之間。

藉此關於如上文所述及如表2中所示之EC₅₀來分析抗IL-13 Fab。

表2

抗體	EC ₅₀ [nM]人類L-13
01471/G6	1.23 \pm 0.4
03161/H2	0.95 \pm 0.2
01951/G12	0.33 \pm 0.1
01771/E10	1.71 \pm 0.5

實例5：抗IL-13抗體之序列分析

測定所有抗體之重鏈及輕鏈可變區(V_H及V_L)之核苷酸序列。互補判定區(CDR)之胺基酸序列列於本文之表3及4中。根據Kabat定義(E. Kabat等人，1991, Sequences of Proteins

of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD)之CDR列於表3a及4a中。

表3

抗體	HCDR1	SEQ ID No. HCDR1	HCDR2	SEQ ID No. HCDR2	HCDR3	SEQ ID No. HCDR3
01471/G6	GFTFSNYG	1	IWYDGSN	3	VKGSGDIP	4
03161/H2	GFTFSNYG	1	IWYDGSN	3	VKGSGDIP	4
01951/G12	GFTFSSYG	2	IWYDGSN	3	ARLWFGDLD	5
01771/E10	GFTFSSYG	2	IWYDGSN	3	ARLWFGDLD	5

表3a

抗體	HCDR1	SEQ ID No. HCDR1	HCDR2	SEQ ID No. HCDR2	HCDR3	SEQ ID No. HCDR3
01471/G6	NYGMH	6	IIWYDGSNKYYADSVKG	8	GSGDIPFDY	9
03161/H2	NYGMH	6	IIWYDGSNKYYADSVKG	8	GSGDIPFDY	9
01951/G12	SYGMH	7	IIWYDGSNKYYADSVKG	8	LWFGDLDAFDI	10
01771/E10	SYGMH	7	IIWYDGSNKYYADSVKG	8	LWFGDLDAFDI	10

表4

抗體	LCDR1	SEQ ID No. LCDRI	LCDR2	SEQ ID No. LCDR2	LCDR3	SEQ ID No. LCDR3
01471/G6	QSVSSY	11	DA	12	HQRSHWPPI	13
03161/H2	QSVSSY	11	DA	12	HQRSHWPPI	13
01951/G12	QSVSSY	11	DA	12	QQRSSWPPV	14
01771/E10	QSVSSY	11	DA	12	HQRSSWPPI	15

表4a

抗體	LCDR1	SEQ ID No. LCDRI	LCDR2	SEQ ID No. LCDR2	LCDR3	SEQ ID No. LCDR3
01471/G6	RASQSVSSYLA	16	OASNRAT	19	HQRSHWPPIFT	20
03161/H2	RASQSVSSYLA	16	DASNRAT	19	HQRSHWPPIFT	20
01951/G12	RAGQSVSSYLV	17	DASNRAT	19	QQRSSWPPVYT	21
01771/E10	RASQSVSSYLA	18	DASNRAT	19	HQRSSWPPIFT	22

下文展示包括構架區之先前各表中的抗體之序列。下文亦展示全IgG1抗體輕鏈及重鏈恆定區，並作為實例併入抗體01951/G12之可變區(粗體部分)。

01471/G6抗體序列

(i) HC可變區

01471/G6之HC可變胺基酸序列展示於SEQ ID NO: 23中
並由SEQ ID NO: 24中所示之核苷酸序列編碼。

```

E V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L
gaagtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactc 60
S C A A S G F T F S N Y G M H W V R Q A
tcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtaactatggcatgcactgggtccgccaggct 120
P G K G L E W V A I I W Y D G S N K Y Y
ccaggcaaggggctggagtgggtggcaatttatatggtatgatggaagtaataaatactat 180
A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
gcagactcctggaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgcctgtat 240
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C V K G S
ctgcaaatgaacagctctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgtgaaaggatct 300
G D I P F D Y W G Q G T L V T (SEQ ID NO : 23)
ggggatattccctttgactactggggccaggggaaccctgggcacc 345 (SEQ ID NO :24)

```

(ii) LC可變區

01471/G6之LC可變胺基酸序列展示於SEQ ID NO: 25中
並由SEQ ID NO: 26中所示之核苷酸序列編碼。

```

E I V L T Q S P A T L S S S P G E R A T
gaaattgtgttgacgcagctctccagccaccctgtcttcgtctccaggggaaagagccacc 60
L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P
ctctcctgcagggccagtcagagtgtagcagctacttagcctggtagccaacagaaact 120
G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A
ggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcatccaacagggccactggcaccagcc 180
R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P
aggttcagtggcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagcctagagcct 240
E D F A V Y Y C H Q R S H W P P I F T F
gaagattttgcagctctattactgtcatcagcgtagccactggcctcccatttactttc 300
G P G T (SEQ ID NO: 25)
ggccctgggacc 312 (SEQ ID NO: 26)

```

03161/H2抗體

(i) HC可變區

03161/H2之HC可變胺基酸序列展示於SEQ ID NO: 27中

並由 SEQ ID NO: SEQ ID No. 28 中所示之核苷酸序列編碼。

```

E V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L
gaagtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactc 60

S C A A S G F T F S N Y G M H W V R Q A
tcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtaactatggcatgcaactgggtccgcccaggct 120

P G K G L E W V A I I W Y D G S N K Y Y
ccaggcaaggggctggagtggtggcaattatattggtatgatggaagtaataaataactat 180

A D S V K G R E T I S R D N S K N T L Y
gcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat 240

L Q M N S L R A E D T A V Y Y C V K G S
ctgcaaatgaacagctctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgtgaaaggatct 300

G D I P F D Y W G Q G T L V T (SEQ ID NO: 27)
ggggatattccctttgactactggggccagggaaccctggtcacc 345> (SEQ ID NO: 28)

```

(ii) LC 可變區

03161/H2 之 LC 可變胺基酸序列展示於 SEQ ID NO: 29 中

並由 SEQ ID NO: 30 中所示之核苷酸序列編碼。

```

E I V L T Q S P A T L S S S P G E R A T
gaaattgtgttgacgcagtcceccagccaccctgtcttcgtctccaggggaaagagccacc 60

L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P
ctctctcgcagggccagtcagagtggttagcagctacttagcctggtagcacaacagaaacct 120

G Q A P R L L I Y D A S N R A T G T P A
ggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcatccaacagggccactggcacccccagcc 180

R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P
aggttcagtggcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagcctagagcct 240

E D F A V Y Y C H Q R S H W P P I F T F
gaagattttgagctctattactgtcatcagcgtagccaactggcctcccattattcacttcc 300

G P G T (SEQ ID NO: 29)
ggccctgggacc 312 (SEQ ID NO: 30)

```

01951/G12 抗體序列

(i) HC 可變區

01951/G12 之 HC 可變胺基酸序列展示於 SEQ ID NO: 31 中

並由 SEQ ID NO: 32 中所示之核苷酸序列編碼。

```

E V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L
gaagtgcagctggtggagctctgggggagggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactc 60

S C A A S G F T F S S Y G M H W V R Q A
tcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtagctatggcatgcactgggtccgccaggct 120

P G K G L E W V A I I W Y D G S N K Y Y
ccaggcaaggggctggagtggtggcaattatatggtatgatggaagtaataaatactat 180

A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
gcgactccgtgaagggccgattccacatctccagagacaattccaagaacacgctgtat 240

L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R L W
ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgagggctatgg 300

F G D L D A F D I W G Q G T M V T (SEQ ID NO :31)
ttcggggacttagatgcttttgatctctggggccaagggacaatggtcacc 351 (SEQ ID
NO :32)

```

(ii) LC可變區

01951/G12之LC可變胺基酸序列展示於SEQ ID NO: 33中

並由SEQ ID NO: 34中所示之核苷酸序列編碼。

```

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A I
gaaattgtgtgacgcagctctccagccaccctgtcttctgtctccaggggaaagagccatc 60

L S C R A G Q S V S S Y L V W Y Q Q K P
ctctcctgcagggccggtcagagtgtagcagttacttagtctggtagccaacagaaaacct 120

G C A P R L L I Y D A S N R A T G I P A
ggccaggctcccaggctcctcctctatgatgcctccaacagggccactggcatcccagcc 180

R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P
aggttcagtggtgagtggtctgggacagacttccactcaccatcagcagcctagagcct 240

E D F A V Y Y C Q Q R S S W P P V Y T F
gaagattttgcagtttattactgtcagcagcgcagcagctggcctccgggtgtacacttt 300

G Q G T (SEQ ID NO :33)
ggccaggggacc 312 (SEQ ID NO :34)

```

01771/E10抗體序列

(i) HC可變區

01771/E10之HC可變胺基酸序列展示於SEQ ID NO: 35中

並由SEQ ID NO: 36中所示之核苷酸序列編碼。

```

Q V Q L V Q S G G G V V Q P G R S L R L
cagggtgcagctggtgcagctctgggggagggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactc 60

S C A A S G F T F S S Y G M H W V R Q A
tcctgtgaggcgtctggattcaccttcagtagctatggcatgcactgggtccgccaggt 120

P G K G L E W V A I I W Y D G S N K Y Y
ccaggcaaggggctggagtggtggcaattatatggtatgatggaagtaataaatactat 180

A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
tgggactccgtgaaggggcggatttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctatat 240

L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R L W
ctacaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgaggctatgg 300

F G D L D A E D I W G Q G T M V T (SEQ ID NO: 35)
ttcggggacttagatgcttttgatctctggggccaagggacaatggtcacc 351 (SEQ ID NO: 36)

```

(ii) LC可變區

01771/E10之LC可變胺基酸序列展示於SEQ ID NO: 37中
並由SEQ ID NO: 38中所示之核苷酸序列編碼。

```

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T
gaaattgtgttgacgcagctctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccacc 60

L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P
ctctcctgcagggccagtcagagtgtagcagctacttagcctggtaccâacagâaacct 120

G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A
ggccaggctcccaggtcctcatctatgatgcacccaacagggccactggcatcccagcc 180

R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P
aggttcagtggcagtggtctgggacaagacttcactctcaccatcagcagcctagagcct 240

E D F A V Y Y C H Q R S S W P P I F T F
gâagattttgcggtttattactgtcatcagcgtâgcagctggccccgâatattcactttc 300

G P G T (SEQ ID NO: 37)
ggcctgggacc 312 (SEQ ID NO: 38)

```

併入抗體01951/G12之可變區(粗體部分)的全抗體IgG1輕
鏈序列

LC胺基酸序列展示於SEQ ID NO: 39中並由核苷酸序列
SEQ ID NO: 40編碼。

```

1   M S V L T Q V L A L L L L W L T G
   ATGAGTGTGC TCACTCAGGT CCTGGEGTTG CTGCTGCTGT GGCTTACAGG

51  T R C E I V L T Q S P A T L S L S
   TACGCGTTGT GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT

101 P G E R A I L S C R A G Q S V S
   CTCCAGGGGA AAGAGCCATC CTCTCCTGCA GGGCCGGTCA GAGTGTTAGC

151 S Y L V W Y Q Q K P G Q A P R L L
   AGTTACTTAG TCTGGTACCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT

201 I Y D A S N R A T G I P A R F S G
   CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCAGCC AGGTTCAAGT

251 S G S G T D F T L T I S S L E P
   GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT

301 E D F A V Y Y C Q Q R S S W P P V
   GAAGATTTTG CAGTTTATTA CTGTGAGCAG CGCAGCAGCT GGCCTCCGGT

351 Y T F G Q G T K L E I K R T V A A
   GTACACTTTT GGCCAGGGGA CCAAGCTTGA AATCAAACGA ACTGTGGCTG

401 P S V F I F P P S D E Q L K S G
   CACCATCTGT CTTCATCTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA

451 T A S V V C L L N N F Y P R E A K
   ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA

501 V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S
   AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA

551 V T E Q D S K D S T Y S L S S T
   GTGTACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC

601 L T L S K A D Y E K H K V Y A C E
   CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA

651 V T H Q G L S S P V T K S F N R G
   AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG

701 E G * (SEQ ID NO:39)
   GAGAGTGTTA G (SEQ ID NO:40)

```

併入抗體 01951/G12 之可變區(粗體部分)的全抗體 IgG1 重鏈序列

HC 胺基酸序列展示於 SEQ ID NO: 41 中並由核苷酸序列 SEQ ID NO: 42 編碼。

1 M A W V W T L P F L M A A A Q S V
 ATGGCTTGGG TGTGGACCTT GCCATTCTCTG ATGGCAGCTG CCCAAAGTGT
 51 Q A E V Q L V E S G G G V V Q P G
 CCAGGCAGAA GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCGT
 101 R S L R L S C A A S G P T F S S
 GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCGT CTGGATTACAC CTTCACTAGC
 151 Y G M H W V R Q A P G K G L E W V
 TATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT
 201 A I I W Y D G S N K Y Y A D S V K
 GGCAATTATA TGGTATGATG GAAGTAATAA ATACTATGCG GACTCCGTGA
 251 G R F T I S R D N S K N T L Y L
 AGGCCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG
 301 Q M N S E R A E D T A V Y Y C A R
 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGGCAG
 351 L W F G D L D A F D I W G Q G T M
 GCTATGGTTC GGGGACTTAG ATGCTTTTGA TATCTGGGGC CAAGGGACAA
 401 V T V S S A S T K G P S V F P L
 TGGTCACCGT CTCCTCAGCC TCCACCAAGG GCCCATCGGT CTTCCCCCTG
 451 A P S S K S T S G G T A A L G C L
 GCACCCTCCT CCAAGAGCAC CTCCTGGGGC ACAGCGGGCC TGGGCTGCCT
 501 V K D Y F P E P V T V S W N S G A
 GGTCAAGGAC TACTTCGCGG AACCGGTGAC GGTGTCGTGG AACTCAGGCG
 551 L T S G V H T E P A V L Q S S G
 CCCTGACCAG CGGCGTGAC ACCTTCCCGG CTGTCCTACA GTCCTCAGGA
 601 L Y S L S S V V T V P S S S L G T
 CTCTACTCCC TCAGCAGCGT CGTGACCGTG CCCTCCAGCA GCTTGGGCAC
 651 Q T Y I C N V N H K P S N T K V D
 CCAGACCTAC ATCTGCAACG TGAATCACA GCCCAGCAAC ACCAAGGTGG
 701 K R V E P K S C D K T H T C P P
 ACAAGAGAGT TGAGCCCAAA TCTTGTGACA AACTCACAC ATGCCACCG
 751 C P A P E L L G G P S V F L F P P
 TGCCAGCAC CTGAAGTCTT GGGGGACCG TCAGTCTTCC TCTCCCCC
 801 K P K D T L M I S R T P E V T C V
 AAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCAGATGCG
 851 V V D V S H E D P E V K F N W Y
 TGGTGGTGGG CGTGAGCCAC GAAGACCCTG AGGTCAAGT CAACTGGTAC

901 V D G V E V H N A K T K P R E E Q
GTGGACGGCG TGGAGGTGGA TAATGCCAAG ACAAAGCCGC GGGAGGAGCA

951 Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D
GTACAACAGC ACGTACCGTG TGGTCAGCGT CCTGACCGTC CTGCACCAGG

1001 W L N G K E Y K C K V S N K A L
ACTGGCTGAA TGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGCCCTC

1051 P A P I E K T I S K A K G Q P R E
CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA

1101 P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q
ACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACC

1151 V S L T C L V K G F Y P S D I A
AGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTATCCCAG CGACATCGCC

1201 V E W E S N G Q P E N N Y K T T P
GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCAGCC

1251 P V L D S D G S E F L Y S K L T V
TCCCGTGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTATAGC AAGCTCACCG

1301 D K S R W Q Q G N V F S C S V M
TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG

1351 H E A L H N H Y T Q K S L S L S P
CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCCCC

1401 G K * (SEQ ID NO:41)
GGGTAAATGA (SEQ ID NO:42)

P1-30

102年10月27日修(更)正本
 中文序列表

<110> 瑞士商諾華公司

<120> 有機分子

<130> 34582

<140> TW 095138861

<141> 2006-10-20

<150> GB 0521509.0

<151> 2005-10-21

<150> GB 0616666.4

<151> 2006-08-22

<160> 42

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly

1

5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

1

5

<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn
1 5

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Val Lys Gly Ser Gly Asp Ile Pro
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Ala Arg Leu Trp Phe Gly Asp Leu Asp
1 5

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Asn Tyr Gly Met His
1 5

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Gly Ser Gly Asp Ile Pro Phe Asp Tyr
1 5

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

Gln Gln Arg Ser Ser Trp Pro Pro Val
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15

His Gln Arg Ser Ser Trp Pro Pro Ile
1 5

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

Arg Ala Gly Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Val
1 5 10

<210> 18

<400> 18
000

<210> 19
<211> 7

<212> PRT
<213> 智人

<400> 19

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 20

His Gln Arg Ser His Trp Pro Pro Ile Phe Thr
1 5 10

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 21

Gln Gln Arg Ser Ser Trp Pro Pro Val Tyr Thr
1 5 10

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 22

His Gln Arg Ser Ser Trp Pro Pro Ile Phe Thr
1 5 10

<210> 23
<211> 115

<212> PRT

<213> 智人

<400> 23

Glu 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 Asn Tyr
 20 25 30

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

Ala Ile 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

Val Lys Gly Ser Gly Asp Ile Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr
 115

<210> 24

<211> 345

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(345)

<400> 24

gaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc agt aac tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gca att ata tgg tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg 192
 Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agt ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gtg aaa gga tct ggg gat att ccc ttt gac tac tgg ggc cag gga acc 336
 Val Lys Gly Ser Gly Asp Ile Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

ctg gtc acc 345
 Leu Val Thr
 115

<210> 25

<211> 104

<212> PRT

<213> 智人

<400> 25

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser His Trp Pro Pro
 85 90 95

Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr
 100

- <210> 26
- <211> 312
- <212> DNA
- <213> 智人

- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(312)

<400> 26
 gaa att gtg ttg acg cag tct cca gcc acc ctg tct tcg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Ser Ser Pro Gly
 1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96

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

 tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

 tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

 agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

 gaa gat ttt gca gtc tat tac tgt cat cag cgt agc cac tgg cct ccc 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser His Trp Pro Pro
 85 90 95

 ata ttc act ttc ggc cct ggg acc 312
 Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr
 100

<210> 27
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 27

Glu 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 Asn Tyr
 20 25 30

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

Ala Ile 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

Val Lys Gly Ser Gly Asp Ile Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr
 115

<210> 28
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(345)

<400> 28

gaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc agt aac tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gca att ata tgg tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg 192
 Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50	55	60	
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat			240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
ctg caa atg aac agt ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt			288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
gtg aaa gga tct ggg gat att ccc ttt gac tac tgg ggc cag gga acc			336
Val Lys Gly Ser Gly Asp Ile Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110
ctg gtc acc			345
Leu Val Thr			
	115		
<210> 29			
<211> 104			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 29			
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Ser Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr			
	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro			
65	70	75	80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser His Trp Pro Pro
 85 90 95

Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr
 100

<210> 30
 <211> 312
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(312)

<400> 30
 gaa att gtg ttg acg cag tcc cca gcc acc ctg tct tcg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Ser Ser Pro Gly
 1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc acc cca gcc agg ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtc tat tac tgt cat cag cgt agc cac tgg cct ccc 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser His Trp Pro Pro
 85 90 95

ata ttc act ttc ggc cct ggg acc
 Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr
 100

312

<210> 31
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 31

Glu 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 Ile 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 Leu Trp Phe Gly Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr
 115

<210> 32
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(351)

<400> 32

gaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc agt agc tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gca att ata tgg tat gat gga agt aat aaa tac tat gcg gac tcc gtg 192
 Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg agg cta tgg ttc ggg gac tta gat gct ttt gat atc tgg ggc caa 336
 Ala Arg Leu Trp Phe Gly Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

ggg aca atg gtc acc 351
 Gly Thr Met Val Thr
 115

<210> 33
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 33

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

Glu Arg Ala Ile Leu Ser Cys Arg Ala Gly Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Val Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 100

<210> 34
 <211> 312
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(312)

<400> 34

gaa att gtg ttg acg cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

gaa aga gcc atc ctc tcc tgc agg gcc ggt cag agt gtt agc agt tac 96
 Glu Arg Ala Ile Leu Ser Cys Arg Ala Gly Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

tta gtc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
 Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgc agc agc tgg cct ccg 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Trp Pro Pro
 85 90 95

gtg tac act ttt ggc cag ggg acc 312
 Val Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 100

<210> 35

<211> 117

<212> PRT

<213> 智人

<400> 35

Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Ile 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 Leu Trp Phe Gly Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr
 115

<210> 36
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(351)

<400> 36
 cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

48

tcc ctg aga ctc tcc tgt gcg gcg tct gga ttc acc ttc agt agc tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gca att ata tgg tat gat gga agt aat aaa tac tat gcg gac tcc gtg 192
 Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg cta tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

cta caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg agg cta tgg ttc ggg gac tta gat gct ttt gat atc tgg ggc caa 336
 Ala Arg Leu Trp Phe Gly Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

ggg aca atg gtc acc 351
 Gly Thr Met Val Thr
 115

<210> 37
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 37

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Ser Trp Pro Pro
 85 90 95

Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr
 100

<210> 38
 <211> 312
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(312)

<400> 38
 gaa att gtg ttg acg cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gcg gtt tat tac tgt cat cag cgt agc agc tgg ccc ccg 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Ser Trp Pro Pro
 85 90 95

ata ttc act ttc ggc cct ggg acc 312
 Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr
 100

<210> 39
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 39

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

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

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Ile Leu Ser Cys Arg Ala Gly Gln Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
 100 105 110

Ser Trp Pro Pro Val Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 40
 <211> 711

<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(711)

<400> 40

atg agt gtg ctc act cag gtc ctg gcg ttg ctg ctg ctg tgg ctt aca 48
Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

ggt acg cgt tgt gaa att gtg ttg acg cag tct cca gcc acc ctg tct 96
Gly Thr Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

ttg tct cca ggg gaa aga gcc atc ctc tcc tgc agg gcc ggt cag agt 144
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Ile Leu Ser Cys Arg Ala Gly Gln Ser
35 40 45

gtt agc agt tac tta gtc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc 192
Val Ser Ser Tyr Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

agg ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc 240
Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc 288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

agc cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgc agc 336
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

agc tgg cct ccg gtg tac act ttt ggc cag ggg acc aag ctt gaa atc 384
Ser Trp Pro Pro Val Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat 432
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac 480
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160

ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc 528
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175

caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac 576
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac 624
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205

gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc 672
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220

tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag 711
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 41
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 41

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

Val Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Trp Phe Gly Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 42
 <211> 1410
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1410)

<400> 42
 atg gct tgg gtg tgg acc ttg cca ttc ctg atg gca gct gcc caa agt 48
 Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

gtc cag gca gaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag 96
 Val Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc 144
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

agt agc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg	192
Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg gtg gca att ata tgg tat gat gga agt aat aaa tac tat gcg	240
Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala	
65 70 75 80	
gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac	288
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn	
85 90 95	
acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg	336
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tat tac tgt gcg agg cta tgg ttc ggg gac tta gat gct ttt gat atc	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Trp Phe Gly Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile	
115 120 125	
tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc	432
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly	
130 135 140	
cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc	480
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly	
145 150 155 160	
aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg	528
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val	
165 170 175	
acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc	576
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe	
180 185 190	
ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtc gtg	624
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val	
195 200 205	
acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg	672
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val	
210 215 220	

aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa 720
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
225 230 235 240

tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc 768
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
245 250 255

ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc 816
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
260 265 270

ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg 864
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
275 280 285

agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg 912
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
290 295 300

gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc 960
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
305 310 315 320

acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg 1008
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
325 330 335

aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc 1056
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
340 345 350

ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca 1104
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
355 360 365

cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag 1152
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
370 375 380

gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc 1200
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385 390 395 400

gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg	1248
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr	
405 410 415	
cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc	1296
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu	
420 425 430	
acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc	1344
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser	
435 440 445	
gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc	1392
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser	
450 455 460	
ctg tcc ccg ggt aaa tga	1410
Leu Ser Pro Gly Lys	
465	

102. 11. 11
年 月 日

修正(更)種文

第095138861號專利申請案

文申請專利範圍替換本(102年11月)

公告本

十、申請專利範圍：

1. 一種經分離人類或人源化IL13抗體，其包含一種抗原結合區，其中之H-CDR1、H-CDR2及H-CDR3分別為SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10，及L-CDR1、L-CDR2及L-CDR3分別為SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21。
2. 如請求項1之抗體，其包含根據SEQ ID NO: 31之HC(重鏈)可變區及根據SEQ ID NO: 33之LC(輕鏈)可變區。
3. 如請求項2之抗體，其包含根據SEQ ID NO: 39之輕鏈及根據SEQ ID NO: 41之重鏈。
4. 如請求項1至3中任一項之抗體，其為IgG1或IgG4。
5. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至4中任一項之抗體及其醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。
6. 如請求項5之醫藥組合物，其用於治療與細胞受體目標IL-13之存在相關的失調症或病症之方法。
7. 如請求項6之醫藥組合物，其中該失調症或病症為哮喘。