

抗IL-4R单域抗体及其应用

技术领域

本发明涉及生物学或生物制药技术领域，更具体地涉及一种抗IL-4R单
5 域抗体及其应用。

背景技术

白细胞介素-4（IL-4，也成为B细胞刺激因子或BSF-1）是由活化的T
细胞、单核细胞、嗜碱粒细胞、肥大细胞和嗜酸粒细胞产生的细胞因子。IL-4
10 的所有生物功能都是通过效应细胞表面IL-4R介导的，IL-4R由 α 和 γ 亚单位组成，
白介素-4受体 α 亚单位（IL-4R α ）定位于染色体16p12.1-PI1.2区域，该区域也是
哮喘易感区，该区基因多态性与过敏症和升高的血清IgE水平相关。此外，IL-4R α
还是IL-4和IL-13基因受体复合物的共同组成部分，研究表明IL-4R α 基因多态性
与哮喘、升高的血清中IgE水平及过敏性皮炎有关。

15 哮喘是常见的呼吸道疾病，也是一种多发病。哮喘是由多种细胞（如嗜酸
性粒细胞、肥大细胞、T淋巴细胞、中性粒细胞气道上皮细胞等）和细胞组分
参与的气道慢性炎症性疾病，它有很多不同的分子病理学和生理学的表型。哮
喘是一种异质性的疾病，可分为过敏性和非过敏性哮喘两种。在过敏性哮喘中，
发现II型辅助性T细胞因子（Th2）在支气管中的异常高表达，同时已证实Th2
20 细胞因子全面介导了炎症反应的发生和发展并促进了呼吸道的病理改变等，是
抗哮喘的理想靶点。Th2亚群主要产生IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13等。IL-4R
主要通过IL-4、IL-13等的结合在哮喘疾病中发挥重要生物学作用。

特应性皮炎（AD）是最常见的炎症性皮肤病，在儿童中的发病率15%-30%，
成人2%-10%，具有发病年龄早，持续时间长、瘙痒症剧烈的特点，对患者的生
25 活质量会产生严重的影响。Th2型细胞因子在患者皮损中显著提高，并促进IL-4
和IL-13分泌，通过共受体IL-4R α 介导下游信号转导。

目前已有针对hIL-4R靶点的抗体药物进入临床试验，如Dupilumab为抗
IL-4R α 单抗，能阻断IL-4和IL-13与IL-4R α 结合，从而阻断下游的信号传导通路
来抑制皮炎慢性炎症的发展，其在治疗特应性皮炎的II期临床中表现了较好的
30 疗效。除了Dupilumab以外，苏州康乃德生物医药有限公司的在研药物CBP201，
公开于专利CN201610399254.4中，也是一种抗IL-4R α 的单克隆抗体，已在澳大利
亚递交申请，开始了第一阶段的临床试验。

截至目前，市场上尚未有针对hIL-4R靶点的单域抗体药物公布，而单域抗体（nanobody, Nb），即重链单域抗体VHH（variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody）—骆驼体内存在着天然缺失轻链的重链抗体（heavy-chain antibody, HCAb），克隆其可变区而得到的只由一个重链可变区组成的单域抗体，是目前可以得到的具有完整功能的稳定的可结合抗原的最小单位。单域抗体具有稳定性高、水溶性好、人源化简单、靶向性高、穿透性强等特点，在免疫实验、诊断与治疗中，发挥着超乎想象的巨大功能。单域抗体正逐渐成为新一代抗体诊断及治疗中的新兴力量。

因此，开发一种抗IL-4R单域抗体，使其具有较好的特异性、阻断活性，更佳的临床药效，并且生产简便，能够降低生产成本，减轻患者用药负担，已经成为亟待解决的问题。

发明内容

本发明的目的在于提供一种抗 IL-4R 单域抗体及其应用。

具体地，本发明的目的在于提供一种能够特异性结合 IL-4R 蛋白的单域抗体。

本发明的第一方面，提供了一种抗IL-4R单域抗体VHH链的互补决定区CDR区，所述VHH链的互补决定区CDR包括SEQ ID NO:1 所示的CDR1、SEQ ID NO:2所示的CDR2、和SEQ ID NO:3所示的CDR3。

在另一优选例中，所述的CDR1、CDR2和CDR3被框架区FR1、FR2、FR3和FR4所隔开。

本发明的第二方面，提供了一种抗IL-4R单域抗体的VHH链，所述的VHH链包括框架区FR和本发明的第一方面所述的互补决定区CDR。

在另一优选例中，所述的框架区FR包括：

（a）SEQ ID NO:4所示的FR1、SEQ ID NO:5所示的FR2、SEQ ID NO:6所示的FR3、和SEQ ID NO:7所示的FR4；或

（b）SEQ ID NO:10所示的FR1、SEQ ID NO:11所示的FR2、SEQ ID NO:12所示的FR3、和SEQ ID NO:13所示的FR4。

在另一优选例中，所述的抗IL-4R单域抗体的VHH链如SEQ ID NO:8或14所示。

此外，还提供一种新型抗IL-4R单域抗体的重链可变区，所述的重链可变

区包括SEQ ID NO:1 所示的CDR1、SEQ ID NO:2所示的CDR2、和SEQ ID NO:3所示的CDR3。

本发明的第三方面，提供了一种抗IL-4R单域抗体，它是针对白细胞介素4受体（IL-4R）表位的单域抗体，并且具有本发明的第二方面所述的VHH链。

在另一优选例中，所述抗IL-4R单域抗体包括单体、二价体（二价抗体）、四价体（四价抗体）、和/或多价体（多价抗体）。

在另一优选例中，所述抗IL-4R单域抗体包括一条或多条具有如SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的VHH链。

在另一优选例中，所述抗IL-4R单域抗体的VHH链序列如SEQ ID NO:8和/或SEQ ID NO:14所示。

在另一优选例中，所述抗IL-4R单域抗体包括两条具有如SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列的VHH链。

在另一优选例中，所述抗IL-4R单域抗体包括四条具有如SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列的VHH链。

在另一优选例中，所述抗IL-4R单域抗体具有如SEQ ID NO:8和/或SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列的VHH链。

在另一优选例中，所述两条具有如SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列的VHH链之间通过连接子进行连接。

在另一优选例中，所述四条具有如SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列的VHH链之间通过连接子进行连接。

在另一优选例中，所述连接子选自以下序列：(G_aS_b)_x—(G_mS_n)_y，其中a, b, m, n, x, y = 0或1或2或3或4或5或6或7或8或9或10(较佳地，a=4而b=1, m=3而n=1)。

在另一优选例中，所述连接子选自下组：GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:18)。

在另一优选例中，所述抗IL-4R单域抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO: 19所示。

本发明第四方面，提供了一种抗IL-4R单域抗体Fc融合蛋白，所述融合蛋白从N端到C端的结构如式Ia或Ib所示：

A-L-B (Ia);

B-L-A (Ib);

其中,

A为本发明第三方面所述的抗IL-4R单域抗体;

B为IgG的Fc片段; 和

5 L为无或柔性接头。

在另一优选例中, 所述的柔性接头为肽接头。

在另一优选例中, 所述的肽接头具有1-50个氨基酸, 较佳地1-20个氨基酸。

在另一优选例中, 所述IgG的Fc片段包括人的IgG的Fc片段。

10 在另一优选例中, 所述的肽接头具有(GGGGS) n 的结构, 其中 n 为1-5的正整数。

在另一优选例中, 所述IgG的Fc片段包括人的IgG的Fc片段。

在另一优选例中, 所述IgG的Fc片段选自下组: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4的Fc片段、或其组合。

在另一优选例中, 所述IgG的Fc片段为IgG4。

15 在另一优选例中, 所述Fc片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:16中第120-346位所示。

在另一优选例中, 所述融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:19所示。

20 在另一优选例中, 所述融合蛋白为针对IL-4R表位的单域抗体Fc融合蛋白。

本发明的第五方面, 提供了一种多核苷酸, 所述多核苷酸编码选自下组的蛋白质: 本发明的第一方面所述的抗IL-4R单域抗体VHH链的CDR区、本发明的第二方面所述的抗IL-4R单域抗体的VHH链、或本发明的第三方面所述的抗IL-4R单域抗体、或本发明第四方面所述的抗IL-4R单域抗体Fc融合蛋白。

25 在另一优选例中, 所述多核苷酸具有如SEQ ID NO:9或15所示的核苷酸序列。

在另一优选例中, 所述多核苷酸具有如SEQ ID NO:20所示的核苷酸序列。

在另一优选例中, 所述的多核苷酸包括DNA或RNA。

30 本发明的第六方面, 提供了一种表达载体, 所述表达载体含有本发明第五方面所述的多核苷酸。

在另一优选例中, 所述的表达载体选自下组: DNA、RNA、病毒载体、质

粒、转座子、其他基因转移系统、或其组合。

优选地，所述表达载体包括病毒载体，如慢病毒、腺病毒、AAV病毒、逆转录病毒、或其组合。

- 5 本发明的第七方面，提供了一种宿主细胞，所述宿主细胞含有本发明的第六方面所述的表达载体，或其基因组中整合有本发明的第五方面所述的多核苷酸。

在另一优选例中，所述的宿主细胞包括原核细胞或真核细胞。

- 10 在另一优选例中，所述的宿主细胞选自下组：大肠杆菌、酵母细胞、哺乳动物细胞、噬菌体、或其组合。

在另一优选例中，所述原核细胞选自下组：大肠杆菌、枯草杆菌、乳酸菌、链霉菌、奇异变形菌、或其组合。

在另一优选例中，所述真核细胞选自下组：毕赤酵母、酿酒酵母、裂殖酵母、木霉、或其组合。

- 15 在另一优选例中，所述真核细胞选自下组：草地粘虫等昆虫细胞、烟草等植物细胞、BHK细胞、CHO细胞、COS细胞、骨髓瘤细胞、或其组合。

在另一优选例中，所述宿主细胞优选为哺乳动物细胞，更优选HEK293细胞、CHO细胞、BHK细胞、NSO细胞或COS细胞。

在另一优选例中，所述的宿主细胞为毕赤酵母。

20

本发明的第八方面，提供了一种产生抗IL-4R单域抗体或其Fc融合蛋白的方法，包括步骤：

(a)在适合产生单域抗体或其Fc融合蛋白的条件下，培养本发明的第七方面所述的宿主细胞，从而获得含所述抗IL-4R单域抗体或其Fc融合蛋白的培养物；

- 25 (b)从所述培养物中分离或回收所述的抗IL-4R单域抗体或其Fc融合蛋白；
以及

(c)任选地，纯化和/或修饰得步骤(b)中获得的抗IL-4R单域抗体或其Fc融合蛋白。

- 30 在另一优选例中，所述的抗IL-4R单域抗体具有如 SEQ ID NO:8或14所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述的抗IL-4R单域抗体具有如 SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列。

本发明的第九方面，提供了一种免疫偶联物，该免疫偶联物含有：

(a)如本发明第二方面所述的抗IL-4R单域抗体的VHH链、或如本发明第三方面所述的抗IL-4R单域抗体、或如本发明第四方面所述的抗IL-4R单域抗体Fc融合蛋白；和

(b)选自下组的偶联部分：可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、金纳米颗粒/纳米棒、纳米磁粒、病毒外壳蛋白或VLP、或其组合。

在另一优选例中，所述的放射性核素包括：

(i) 诊断用同位素，所述的诊断用同位素选自下组：Tc-99m、Ga-68、F-18、I-123、I-125、I-131、In-111、Ga-67、Cu-64、Zr-89、C-11、Lu-177、Re-188、或其组合；和/或

(ii) 治疗用同位素，所述的治疗用同位素选自下组：Lu-177、Y-90、Ac-225、As-211、Bi-212、Bi-213、Cs-137、Cr-51、Co-60、Dy-165、Er-169、Fm-255、Au-198、Ho-166、I-125、I-131、Ir-192、Fe-59、Pb-212、Mo-99、Pd-103、P-32、K-42、Re-186、Re-188、Sm-153、Ra223、Ru-106、Na24、Sr89、Tb-149、Th-227、Xe-133、Yb-169、Yb-177、或其组合。

在另一优选例中，所述偶联部分为药物或毒素。

在另一优选例中，所述的药物为细胞毒性药物。

在另一优选例中，所述的细胞毒性药物选自下组：抗微管蛋白药物、DNA小沟结合试剂、DNA复制抑制剂、烷化试剂、抗生素、叶酸拮抗物、抗代谢药物、化疗增敏剂、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱、或其组合。

在另一优选例中，特别有用的细胞毒性药物的例子包括，例如，DNA小沟结合试剂、DNA烷基化试剂、和微管蛋白抑制剂、典型的细胞毒性药物包括、例如奥瑞他汀(auristatins)、喜树碱(camptothecins)、多卡霉素/倍癌霉素(duocarmycins)、依托泊甙(etoposides)、美登木素(maytansines)和美登素类化合物(maytansinoids)(例如DM1和DM4)、紫杉烷(taxanes)、苯二氮卓类(benzodiazepines)或者含有苯二氮卓的药物(benzodiazepine containing drugs)(例如吡咯并[1,4]苯二氮卓类(PBDs)，吲哚啉苯并二氮卓类(indolinobenzodiazepines)和噁唑啉烷并苯并二氮卓类(oxazolidinobenzodiazepines))、长春花生物碱(vinca alkaloids)、或其组合。

在另一优选例中，所述的毒素选自下组：耳他汀类(例如，耳他汀E、耳他

汀F、MMAE和MMAF)、金霉素、类美坦西醇、蓖麻毒素、蓖麻毒素A-链、考布他汀、多卡米星、多拉司他汀、阿霉素、柔红霉素、紫杉醇、顺铂、cc1065、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊甙、替诺泊甙(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙素、二羟基炭疽菌素二酮、放线菌素、白喉毒素、假单胞菌外毒素(PE)A、
5 PE40、相思豆毒素、相思豆毒素A 链、莨菪根毒素A 链、 α - 八叠球菌、白树毒素、迈托毒素(mitogellin)、局限曲菌素(retstrictocin)、酚霉素、依诺霉素、麻疯树毒蛋白(curicin)、巴豆毒素、卡奇霉素、肥皂草(*Saponaia officinalis*)抑制剂、糖皮质激素、或其组合。

在另一优选例中，所述偶联部分为可检测标记物。

10 在另一优选例中，所述偶联部分选自下组：荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI(磁共振成像)或CT(电子计算机X射线断层扫描技术)造影剂、或能够产生可检测产物的酶、放射性核素、生物毒素、细胞因子(如IL-2等)、抗体、抗体Fc片段、抗体scFv片段、金纳米颗粒/纳米棒、病毒颗粒、脂质体、纳米磁粒、前药激活酶(例如，DT-心肌黄酶(DTD)或联苯基水解酶-样蛋白质(BPHL))或任何形式的纳米颗粒。
15

在另一优选例中，所述免疫偶联物含有：多价(如二价或四价)的如本发明的第二方面所述的抗IL-4R单域抗体的VHH链、如本发明的第三方面所述的抗IL-4R单域抗体、或本发明第四方面所述的抗IL-4R单域抗体Fc融合蛋白。

20 在另一优选例中，所述多价是指在所述免疫偶联物的氨基酸序列中包含多个重复的如本发明的第二方面所述抗IL-4R单域抗体的VHH链、如本发明的第三方面所述的抗IL-4R单域抗体、或本发明第四方面所述的抗IL-4R单域抗体Fc融合蛋白。

25 本发明的第十方面，提供了本发明的第二方面所述的抗IL-4R单域抗体的VHH链、本发明的第三方面所述的抗IL-4R单域抗体、或本发明第四方面所述的抗IL-4R单域抗体Fc融合蛋白的用途，用于制备：用于预防或治疗与IL-4/IL-4R信号传导相关的疾病或病症的药物。

本发明的第十一方面，提供了一种药物组合物，所述药物组合物含有：

30 (i)如本发明的第一方面所述的抗IL-4R单域抗体VHH链的互补决定区CDR区、如本发明的第二方面所述的抗IL-4R单域抗体的VHH链、如本发明的第三方面所述的抗IL-4R单域抗体、或本发明第四方面所述的抗IL-4R单域抗体Fc融

合蛋白、或如本发明的第九方面所述的免疫偶联物；以及

(ii)药学上可接受的载体。

在另一优选例中，所述的免疫偶联物的偶联部分为药物、毒素、和/或治疗用同位素。

5 在另一优选例中，所述的药物组合物中还含有治疗哮喘、特应性皮炎、关节炎、过敏性鼻炎和/或湿疹的其他药物，如皮质类固醇（TCS）、奈多罗米钠、色甘酸钠、茶碱、白三烯受体拮抗剂、或其组合。

在另一优选例中，所述的药物组合物为注射剂型。

在另一优选例中，所述的药物组合物用于制备预防和/或治疗与IL-4/IL-4R
10 信号传导相关的疾病或病症的药物。

在另一优选例中，所述疾病或病症包括但不限于：哮喘、特应性皮炎、关节炎、过敏性鼻炎、湿疹等。

本发明的第十二方面，提供了本发明的第三方面所述的抗IL-4R单域抗体、
15 和/或本发明第四方面所述的抗IL-4R单域抗体Fc融合蛋白的一种或多种的用途；用于制备

(a)用于预防和/或治疗与IL-4/IL-4R信号传导相关的疾病或病症的药物；

(b)用于检测人IL-4R分子；

(c)用于流式检测；

20 (d)用于细胞免疫荧光检测；

在另一优选例中，所述用途为诊断性和/或非诊断性的，和/或治疗性和/或非治疗性的。

本发明的第十三方面，提供了一种抗体，所述抗体包括一条或多条如本发明的第二方面所述的抗IL-4R单域抗体的VHH链。
25

在另一优选例中，所述抗体包括两条本发明的第二方面所述的抗IL-4R单域抗体的VHH链。

在另一优选例中，所述抗体具有如本发明的第二方面所述的抗IL-4R单域抗体的VHH。

30 在另一优选例中，所述抗体具有如本发明的第二方面所述的重链可变区VHH。

在另一优选例中，所述的抗体能够特异性针对具有正确空间结构的IL-4R

蛋白。

在另一优选例中，所述的抗体能够识别人、狨猴的IL-4R，不识别小鼠的IL-4R。

在另一优选例中，所述的抗体能够有效抑制TF-1细胞的增殖抑制，且抑制
5 活性显著高于上市单抗Dupilumab。

在另一优选例中，所述的抗体能够有效抑制细胞中pSTAT6信号通路的激活，且抑制活性显著高于上市单抗Dupilumab。

在另一优选例中，所述抗体为单域抗体。

10 本发明的第十四方面，提供了一种重组蛋白，所述的重组蛋白具有：

(i)如本发明的第二方面所述的VHH链、或如本发明的第三方面所述的抗IL-4R单域抗体、或如本发明第四方面所述的抗IL-4R单域抗体Fc融合蛋白；以及

(ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

15 在另一优选例中，所述的标签序列包括Fc标签、HA标签和6His标签。

在另一优选例中，所述的重组蛋白特异性结合于IL-4R蛋白。

在本发明的第十五方面，提供了如本发明的第二方面所述的抗IL-4R单域抗体的VHH链、如本发明的第三方面所述的抗IL-4R单域抗体、或如本发明第
20 四方面所述的抗IL-4R单域抗体Fc融合蛋白、或如本发明的第九方面所述的免疫偶联物的用途，用于制备药剂、试剂、检测板或试剂盒；

其中，所述试剂、检测板或试剂盒用于：检测样品中IL-4R蛋白；

其中，所述药剂用于治疗 and/或预防与IL-4/IL-4R信号传导相关的疾病或病症。

25 在另一优选例中，所述疾病或病症包括但不限于：哮喘、特应性皮炎、关节炎、过敏性鼻炎、湿疹等。

在另一优选例中，所述的检测包括流式检测、细胞免疫荧光检测。

本发明的第十六方面，提供了一种治疗疾病的方法，所述方法包括，给需
30 要的对象施用本发明的第三方面所述的单域抗体、或如本发明第四方面所述的抗IL-4R单域抗体Fc融合蛋白、或本发明的第九方面所述的免疫偶联物。

在另一优选例中，所述的对象包括哺乳动物，如人、狨猴。

本发明的第十七方面，提供了一种检测样品中IL-4R蛋白的方法，所述方法包括步骤：

5 (1)将样品与本发明的第二方面所述的VHH链、本发明的第三方面所述的单域抗体、或本发明第四方面所述的抗IL-4R单域抗体Fc融合蛋白、或本发明的第九方面所述的免疫偶联物接触；

(2)检测是否形成抗原-抗体复合物，其中形成复合物就表示样品中存在IL-4R蛋白。

在另一优选例中，所述方法为非诊断和非治疗性的方法。

10

在本发明的第十八方面，提供了一种IL-4R蛋白检测试剂，所述的检测试剂包含：

(i)本发明的第二方面所述的VHH链、本发明的第三方面所述的单域抗体、或本发明第四方面所述的抗IL-4R单域抗体Fc融合蛋白、或本发明的第九方面所述的免疫偶联物；以及

15 (ii)检测学上可接受的载体。

在另一优选例中，所述的免疫偶联物的偶联部分为诊断用同位素。

在另一优选例中，所述的检测学上可接受的载体为无毒的、惰性的水性载体介质。

20 在另一优选例中，所述的检测试剂为选自下组的一种或多种试剂：同位素示踪剂、造影剂、流式检测试剂、细胞免疫荧光检测试剂、纳米磁粒和显像剂。

在另一优选例中，所述的检测试剂用于体内检测。

在另一优选例中，所述的检测试剂的剂型为液态或粉状(如水剂，针剂，冻干粉，片剂，含服剂，吸雾剂)。

25

本发明的第十九方面，提供一种检测IL-4R蛋白的试剂盒，所述试剂盒含有本发明的第九方面所述的免疫偶联物或本发明的第十八方面所述的检测试剂，以及说明书。

30 在另一优选例中，所述的说明书记载，所述的试剂盒用于非侵入性地检测待测对象的IL-4R表达。

本发明的第二十方面，提供了一种本发明的第九方面所述的免疫偶联物的

用途，用于制备体内检测IL-4R蛋白的造影剂。

在另一优选例中，所述检测用于哮喘、特应性皮炎、关节炎、过敏性鼻炎、湿疹等的诊断或预后。

- 5 本发明的第二十一方面，提供了一种抗IL-4R单域抗体VHH链的框架区FR，所述的VHH链的框架区FR由SEQ ID NO:4所示的FR1，SEQ ID NO:5所示的FR2，SEQ ID NO:6所示的FR3，SEQ ID NO:7所示的FR4组成；或由SEQ ID NO:10所示的FR1、SEQ ID NO:11所示的FR2、SEQ ID NO:12所示的FR3、和SEQ ID NO:13所示的FR4组成。

10

本发明第二十二方面，提供了一种治疗与IL-4/IL-4R信号传导相关的疾病或病症的方法，给所需要的对象施用本发明第十一方面所述的药物组合物。

在另一优选例中，所述的对象包括哺乳动物，如人。

- 15 应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

- 20 图1显示了噬菌体展示IL-4R单域抗体文库的库容。构建的文库经过梯度稀释涂布平板生长克隆数目，计算文库库容为 1.1×10^9 CFU。

图2显示了噬菌体展示IL-4R单域抗体文库的片段插入率。经随机挑选文库中单克隆进行PCR检测，计算文库插入率为95.8%。

- 图3显示了流式细胞术鉴定的阻断型IL-4R单域抗体的阻断活性。IL-4R单域抗体Nb103的阻断活性优于对照抗体Dupilumab（度匹鲁单抗）（ IC_{50} Nb103=0.274ug/mL， IC_{50} Dupilumab=0.511ug/mL）。
- 25

图4显示了流式细胞术鉴定的阻断型IL-4R单域抗体在IL-4诱导条件下对TF-1细胞的增殖抑制作用。候选单域抗体Nb103对TF-1细胞的增殖抑制作用显著强于对照抗体Dupilumab（ IC_{50} Nb103=0.149ug/mL， IC_{50} Dupilumab=0.566ug/mL）。

- 图5显示了流式细胞术鉴定的阻断型IL-4R单域抗体在IL-13诱导条件下对TF-1细胞的增殖抑制作用。候选单域抗体Nb103对TF-1细胞的增殖抑制作用显著强于对照抗体Dupilumab（ IC_{50} Nb103=0.066ug/mL， IC_{50} Dupilumab=0.740ug/mL）。
- 30

图6显示了ELISA检测IL-4R单域抗体Nb103对不同种属IL-4R的结合特性。候选抗体Nb103能够识别人IL-4R，而不能识别鼠和食蟹猴IL-4R。

图 7 显示了 ELISA 检测 IL-4R 单域抗体 Nb103 对不同类型猴子 IL-4R 的结合特性。候选抗体 Nb103 能够识别狨猴 IL-4R，不能识别恒河猴 IL-4R。

5 图8显示了流式细胞术检测人源化IL-4R单域抗体与人IL-4R的结合活性。人源化抗体huNb103的 $EC_{50}=0.286\text{ ug/mL}$ ，对照抗体Dupilumab的 $EC_{50}=0.360\text{ ug/mL}$ 。

图9显示了流式细胞术检测人源化IL-4R单域抗体对IL-4/IL-4R的阻断活性。人源化抗体huNb103的 $IC_{50}=0.474\text{ ug/mL}$ ，对照抗体Dupilumab的 $IC_{50}=1.126$
10 ug/mL 。

图10显示了人源化四价抗体的结构示意图。

图11显示了SEC-HPLC鉴定的人源化四价抗体的纯度。表达的人源化四价抗体tet-huNb103纯度为90.69%。

图 12 显示了人源化四价抗体在 IL-4 诱导条件下对 TF-1 细胞的杀伤作用。
15 人源化四价抗体能够有效抑制 IL-4 诱导的 TF-1 细胞的增殖抑制，其抑制活性 $IC_{50\text{ tet-huNb103}}=0.020\text{ ug/mL}$ ，其活性是人源化二价抗体的 1-2 倍($IC_{50\text{ huNb103}}=0.032\text{ ug/mL}$)，也显著优于对照抗体对 TF-1 细胞的增殖抑制作用($IC_{50\text{ Dupilumab}}=0.238\text{ ug/mL}$)。

图 13 显示了人源化四价抗体在 IL-13 诱导条件下对 TF-1 细胞的杀伤作用。
20 人源化四价抗体能够有效抑制 IL-13 诱导的 TF-1 细胞的增殖抑制，其抑制活性 $IC_{50\text{ tet-huNb103}}=0.026\text{ ug/mL}$ ，其活性是人源化二价抗体的 2-3 倍($IC_{50\text{ huNb103}}=0.059\text{ ug/mL}$)，也显著优于对照抗体对 TF-1 细胞的增殖抑制作用($IC_{50\text{ Dupilumab}}=0.180\text{ ug/mL}$)。

图 14 显示了在 IL-4 诱导条件下人源化四价抗体对 HEK-Blue™ IL-4/IL-13
25 细胞中 pSTAT6 信号通路的抑制作用。人源化四价抗体能够有效抑制 IL-4 诱导的 HEK-Blue™ IL-4/IL-13 细胞的 pSTAT6 信号通路，其抑制活性 $IC_{50\text{ tet-huNb103}}=0.044\text{ ug/mL}$ ，其活性是人源化二价抗体的 2-3 倍 ($IC_{50\text{ huNb103}}=0.109\text{ ug/mL}$)，也显著优于对照抗体对该细胞的 pSTAT6 信号通路抑制作用 ($IC_{50\text{ Dupilumab}}=0.346\text{ ug/mL}$)。

30 图15显示了在IL-13诱导条件下人源化四价抗体对HEK-Blue™ IL-4/IL-13细胞中pSTAT6信号通路的抑制作用。人源化四价抗体能够有效抑制IL-13诱导的 HEK-Blue™ IL-4/IL-13 细胞的 pSTAT6 信号通路，其抑制活性 IC_{50}

tet-huNb103=0.017 ug/mL，其活性是人源化二价抗体的2倍（ IC_{50} huNb103=0.034ug/mL），也显著优于对照抗体对HEK-Blue™ IL-4/IL-13细胞的pSTAT6信号通路抑制作用（ IC_{50} Dupilumab=0.120 ug/mL）。

图16显示了5mpk和25mpk两个剂量的人源化四价抗体对转基因小鼠OVA模型中血清中的OVA特异性的IgE的含量的抑制。

图17显示了5mpk和25mpk两个剂量的人源化四价抗体均能够有效减少肺部嗜酸性粒细胞数目(图17A)和比例(图17B)。

具体实施方式

10 本发明人经过广泛而深入地研究，经过大量的筛选，首次意外地发现一类IL-4R单域抗体，实验结果表明，本发明单域抗体能够特异性识别IL-4R，具有良好的特异性；能够识别人、狒猴的IL-4R，不识别小鼠的IL-4R；且能够有效抑制TF-1细胞的增殖以及有效抑制细胞中pSTAT6信号通路的激活。本发明单域抗体生成简便。由此完成了本发明。

15 具体地，本发明利用人源的IL-4R蛋白免疫骆驼，获得高质量的免疫单域抗体基因文库。然后将IL-4R蛋白分子偶联在酶标板上，展示IL-4R蛋白的正确空间结构，以此形式的抗原利用噬菌体展示技术筛选免疫单域抗体基因库(骆驼重链抗体噬菌体展示基因库)，从而获得了IL-4R特异性的单域抗体基因。再将此基因转至哺乳动物细胞中，从而获得了能在哺乳动物细胞中高效表达的、且
20 特异性高的单域抗体株。然后通过ELISA、流式细胞术、荧光素酶报告基因检测系统等方法鉴定出具有阻断活性的IL-4R单域抗体。

术语

如本文所用，术语“本发明单域抗体”、“本发明的单域抗体”、“本发明的抗IL-4R单域抗体”、“本发明IL-4R单域抗体”、“抗IL-4R单域抗体”、“IL-4R单域抗体”具有相同的含义，可互换使用，均指特异性识别和结合于IL-4R（包括人IL-4R）的单域抗体。优选地，本发明的单域抗体的可变区具有SEQ ID NO:1所示的CDR1、SEQ ID NO:2所示的CDR2、和SEQ ID NO:3所示的CDR3。更优选地，本发明的单域抗体的框架区具有(a)SEQ ID NO:4所示的FR1、
30 SEQ ID NO:5所示的FR2、SEQ ID NO:6所示的FR3、和SEQ ID NO:7所示的FR4，

或 (b) SEQ ID NO:10所示的FR1、SEQ ID NO:11所示的FR2、SEQ ID NO:12所示的FR3、和SEQ ID NO:13所示的FR4。

如本文所用，术语“抗体”或“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约150000道尔顿的异四聚糖蛋白，其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。

- 5 每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连，而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH)，其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL)，另一端有恒定区；轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对，轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

- 10 如本文所用，术语“单域抗体”、“VHH”、“纳米抗体(nanobody)”、“单域抗体”(single domain antibody,sdAb,或纳米抗体nanobody)具有相同的含义并可互换使用，指克隆抗体重链的可变区，构建仅由一个重链可变区组成的单域抗体(VHH)，它是具有完整功能的最小的抗原结合片段。通常先获得天然缺失轻链和重链恒定区1(CH1)的抗体后，再克隆抗体重链的可变区，构建仅由
15 一个重链可变区组成的单域抗体(VHH)。

如本文所用，术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同，它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而，可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(FR)。

- 20 天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区，它们大致上呈b-折叠构型，由形成连接环的三个CDR相连，在某些情况下可形成部分b折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位(参见Kabat等, NIH Publ. No. 91-3242, 卷I, 647-669页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但是它们表现出不同的效应功能，例如参与抗体的
25 的依赖于抗体的细胞毒性。

如本领域技术人员所知，免疫偶联物及融合表达产物包括：药物、毒素、细胞因子(cytokine)、放射性核素、酶和其他诊断或治疗分子与本发明的抗体或其片段结合而形成的偶联物。本发明还包括与所述的抗IL-4R抗体或其片段结合的细胞表面标记物或抗原。

如本文所用，术语“重链可变区”与“VH”可互换使用。

如本文所用，术语“可变区”与“互补决定区(complementarity determining region, CDR)”可互换使用。

在本发明的一个优选的实施方式中，所述抗体的重链可变区包括包括三个
5 互补决定区CDR1、CDR2、和CDR3。

在本发明的一个优选的实施方式中，所述抗体的重链包括上述重链可变区和重链恒定区。

在本发明中，术语“本发明抗体”、“本发明蛋白”、或“本发明多肽”可互换使用，都指特异性结合IL-4R蛋白的多肽，例如具有重链可变区的蛋白或多肽。它们可含有或不含起始甲硫氨酸。
10

本发明还提供了具有本发明抗体的其他蛋白质或融合表达产物。具体地，本发明包括具有含可变区的重链的任何蛋白质或蛋白质偶联物及融合表达产物(即免疫偶联物及融合表达产物)，只要该可变区与本发明抗体的重链可变区相同或至少90%同源性，较佳地至少95%同源性。

15 一般，抗体的抗原结合特性可由位于重链可变区的3个特定的区域来描述，称为可变区域(CDR)，将该段间隔成4个框架区域(FR)，4个FR的氨基酸序列相对比较保守，不直接参与结合反应。这些CDR形成环状结构，通过其间的FR形成的 β 折叠在空间结构上相互靠近，重链上的CDR和相应轻链上的CDR构成了抗体的抗原结合位点。可以通过比较同类型的抗体的氨基酸序列来确定是哪些
20 氨基酸构成了FR或CDR区域。

本发明抗体的重链的可变区特别令人感兴趣，因为它们中至少部分涉及结合抗原。因此，本发明包括那些具有带CDR的抗体重链可变区的分子，只要其CDR与此处鉴定的CDR具有90%以上(较佳地95%以上，最佳地98%以上)的同源性。

25 本发明不仅包括完整的抗体，还包括具有免疫活性的抗体的片段或抗体与其他序列形成的融合蛋白。因此，本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

如本文所用，术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明抗体相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似

物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽,而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的,或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽,或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物,例如聚乙二醇)融合所形成的多肽,或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列,或与6His标签形成的融合蛋白)。根据本文的教导,这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

本发明抗体指具有IL-4R结合活性的、包括上述CDR区的多肽。该术语还包括具有与本发明抗体相同功能的、包含上述CDR区的多肽的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于):一个或多个(通常为1-50个,较佳地1-30个,更佳地1-20个,最佳地1-10个)氨基酸的缺失、插入和/或取代,以及在C末端和/或N末端添加一个或数个(通常为20个以内,较佳地为10个以内,更佳地为5个以内)氨基酸。例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能。又比如,在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括本发明抗体的活性片段和活性衍生物。

该多肽的变异形式包括:同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与本发明抗体的编码DNA杂交的DNA所编码的蛋白、以及利用抗本发明抗体的抗血清获得的多肽或蛋白。

本发明还提供了其他多肽,如包含单域抗体或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外,本发明还包括了本发明单域抗体的片段。通常,该片段具有本发明抗体的至少约50个连续氨基酸,较佳地至少约50个连续氨基酸,更佳地至少约80个连续氨基酸,最佳地至少约100个连续氨基酸。

在本发明中,“本发明抗体的保守性变异体”指与本发明抗体的氨基酸序列相比,有至多10个,较佳地至多8个,更佳地至多5个,最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表1进行氨基酸替换而产生。

表1

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

本发明还提供了编码上述抗体或其片段或其融合蛋白的多核苷酸分子。本发明的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。

编码本发明的成熟多肽的多核苷酸包括：只编码成熟多肽的编码序列；成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列；成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸，也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少50%，较佳地至少70%，更佳地至少80%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中，“严格条件”是指：(1)

在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如 $0.2\times\text{SSC}$, 0.1%SDS, 60℃；或(2)杂交时加有变性剂，如50%(v/v)甲酰胺，0.1%小牛血清/0.1% Ficoll, 42℃等；或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在90%以上,更好是95%以上时才发生杂交。并且，可杂交的多核苷酸编码的多肽与成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

5 本发明的抗体的核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。一种可行的方法是用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。此外，还可将重链的编码序列和表达标签(如6His)融合在一起，形成融合蛋白。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。本发明所涉及的生物分子(核酸、蛋白等)包括以分离的形式存在的生物分子。

15 目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段，或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。此外，还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属；鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞；真菌细胞如酵母；果蝇S2或Sf9的昆虫细胞；CHO、COS7、293细胞的动物细胞等。

25 用重组DNA转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收DNA的感受态细胞可在指数生长期后收获，用CaCl₂法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用MgCl₂。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的DNA转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔，脂质体

包装等。

获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

本发明的抗体可以单独使用，也可与可检测标记物(为诊断目的)、治疗剂、PK(蛋白激酶)修饰部分或任何以上这些物质的组合结合或偶联。

用于诊断目的可检测标记物包括但不限于：荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI(磁共振成像)或CT(电子计算机X射线断层扫描技术)造影剂、或能够产生可检测产物的酶。

可与本发明抗体结合或偶联的治疗剂包括但不限于：1. 放射性核素；2. 生物毒；3. 细胞因子如IL-2等；4. 金纳米颗粒/纳米棒；5. 病毒颗粒；6. 脂质体；7. 纳米磁粒；8. 前药激活酶(例如，DT-心肌黄酶(DTD)或联苯基水解酶-样蛋白质(BPHL))等。

白细胞介素-4 (IL-4)

白细胞介素-4 (IL-4，也成为B细胞刺激因子或BSF-1)是主要由活化的T细胞、单核细胞、嗜碱粒细胞、肥大细胞和嗜酸粒细胞产生的细胞因子。IL-4能够响应低浓度的针对表面免疫球蛋白的抗体，能够刺激B细胞增殖。已证实IL-4具有广泛的生物活性，包括刺激T细胞、肥大细胞、粒细胞、巨核细胞和红细胞的生长。IL-4诱导静止B细胞中II类主要组织相容性复合体分子的表达，增强受激B细胞对IgE和IgG1同种型的分泌。

白细胞介素-4受体 α (IL-4R α)

人的IL-4R α 亚单位是一个以高亲和力结合人IL-4的140kDa I型膜蛋白质。IL-4R α 在许多种细胞类型上的表达数量不高,例如外周血T细胞、单核细胞、气道上皮细胞、B细胞和肺成纤维细胞。白介素-4受体 α 亚单位 (IL-4R α) 定位
5 于染色体16p12.1-PI1.2区域,该区域也是哮喘易感区,该区基因多态性与过敏症和升高的血清IgE水平相关。此外,IL-4R α 还是IL-4和IL-13基因受体复合物的共同组成部分,研究表明IL-4R α 基因多态性与哮喘、升高的血清中IgE水平及过敏性皮炎有关。

10 药物组合物

本发明还提供了一种组合物。优选地,所述的组合物是药物组合物,它含有上述的抗体或其活性片段或其融合蛋白,以及药学上可接受的载体。通常,可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中,其中pH通常约为5-8,较佳地pH约为6-8,尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治
15 疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但并不限于):腹膜内、静脉内、或局部给药。

本发明的药物组合物可直接用于结合 IL-4R 蛋白分子,因而可用于治疗哮喘、特应性皮炎、关节炎、过敏性鼻炎、湿疹等。此外,还可同时使用其他治疗剂。

20 本发明的药物组合物含有安全有效量(如0.001-99wt%,较佳地0.01-90wt%,更佳地0.1-80wt%)的本发明上述的单域抗体(或其偶联物)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常
25 规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量,例如每天约10微克/千克体重-约50毫克/千克体重。此外,本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

使用药物组合物时,是将安全有效量的免疫偶联物施用于哺乳动物,其中该安全有效量通常至少约10微克/千克体重,而且在大多数情况下不超过约50

毫克/千克体重，较佳地该剂量是约10微克/千克体重-约10毫克/千克体重。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围之内的。

5 抗 IL-4R 单域抗体

在本发明中，所述抗 IL-4R 单域抗体包括单体、二价体（二价抗体）、四价（四价抗体）、和/或多价体（多价抗体）。

在本发明的一个优选例中，所述抗 IL-4R 单域抗体包括一条、两条或多条具有如 SEQ ID NO:8 和/或 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列的 VHH 链。

10 典型的，所述抗 IL-4R 单域抗体包括两条具有如 SEQ ID NO:8 和/或 SEQ ID NO:14 中所示的氨基酸序列的 VHH 链。

在另一优选例中，所述抗 IL-4R 单域抗体包括四条具有如 SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:14 中所示的氨基酸序列的 VHH 链。

典型的，所述抗 IL-4R 单域抗体具有如 SEQ ID NO:8 和/或 SEQ ID NO:14
15 中所示的氨基酸序列的 VHH 链。

典型的，所述抗 IL-4R 单域抗体包括两条具有如 SEQ ID NO:14 中所示的氨基酸序列的 VHH 链。

典型的，所述抗 IL-4R 单域抗体包括四条具有如 SEQ ID NO:14 中所示的氨基酸序列的 VHH 链。

20 在本发明的一个优选例中，所述两条具有如 SEQ ID NO:8 中所示的氨基酸序列的 VHH 链之间通过连接子进行连接。

在本发明的一个优选例中，所述两条具有如 SEQ ID NO:14 中所示的氨基酸序列的 VHH 链之间通过连接子进行连接。

在本发明的一个优选例中，所述连接子选自以下序列：(G_aS_b)_x—(G_mS_n)_y，
25 其中 a, b, m, n, x, y = 0 或 1 或 2 或 3 或 4 或 5 或 6 或 7 或 8 或 9 或 10 (较佳地，a = 4 而 b = 1, m = 3 而 n = 1)。

在本发明的一个优选例中，所述连接子选自下组：GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:18)。

在本发明的一个优选例中，所述二价抗 IL-4R 单域抗体的氨基酸序列如 SEQ
30 ID NO:16 所示。

在本发明的一个优选例中,所述四价抗IL-4R单域抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示。

标记的单域抗体

5 在本发明的一个优选例中,所述单域抗体带有可检测标记物。更佳地,所述的标记物选自下组:同位素、胶体金标记物、有色标记物或荧光标记物。

胶体金标记可采用本领域技术人员已知的方法进行。在本发明的一个优选的方案中,IL-4R的单域抗体用胶体金标记,得到胶体金标记的单域抗体。

本发明的新型IL-4R单域抗体具有很好的特异性,很高的效价。

10

检测方法

本发明还涉及检测IL-4R蛋白的方法。该方法步骤大致如下:获得细胞和/或组织样本;将样本溶解在介质中;检测在所述溶解的样本中IL-4R蛋白的水平。

在本发明的检测方法中,所使用的样本没有特别限制,代表性的例子是存
15 在于细胞保存液中的含细胞的样本。

试剂盒

本发明还提供了一种含有本发明的抗体(或其片段)或检测板的试剂盒,在本发明的一个优选例中,所述的试剂盒还包括容器、使用说明书、缓冲剂等。

20 本发明还提供了用于检测IL-4R水平的检测试剂盒,该试剂盒包括识别IL-4R蛋白的抗体,用于溶解样本的裂解介质,检测所需的通用试剂和缓冲液,如各种缓冲液、检测标记、检测底物等。该检测试剂盒可以是体外诊断装置。

应用

25 如上所述,本发明的单域抗体有广泛生物应用价值和临床应用价值,其应用涉及到与IL-4R相关的疾病的诊断和治疗、基础医学研究、生物学研究等多个领域。一个优选的应用是用于针对IL-4R的临床诊断和靶向治疗。

本发明的主要优点包括:

(a) 本发明单域抗体特异性结合具有正确空间结构的IL-4R蛋白。

(b) 本发明单域抗体能够识别人、狒猴的IL-4R，不识别小鼠的IL-4R。

(c) 本发明单域抗体相较于上市单抗Dupilumab具有更强的结合活性和阻断活性。

5 (d) 本发明单域抗体能够有效抑制TF-1细胞的增殖抑制，且抑制活性显著高于上市单抗Dupilumab。

(e) 本发明单域抗体能够有效抑制细胞中pSTAT6信号通路的激活，且抑制活性显著高于上市单抗Dupilumab。

(f) 本发明单域抗体生产简便。

10

下面的具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如（Sambrook 和 Russell 等人，分子克隆：实验室手册(Molecular Cloning-A Laboratory Manual)(第三版) (2001)CSHL 出版社）中
15 所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

实施例1：抗人IL-4R单域抗体的筛选及表达

为了获得特异性针对人 IL-4R 的单域抗体，首先利用哺乳动物细胞
20 HEK293F 瞬转表达人 IL-4R 蛋白，经亲和纯化后用于骆驼免疫。具体方法可参见专利 CN2018101517526 实施例 1 和实施例 2 中的方法描述。简要地，将纯化的 IL-4R 蛋白免疫 1 只新疆双峰驼，7 次免疫结束后从骆驼外周血中分离 total RNA，随后反转录和 PCR 扩增出 VHH 基因，再将 VHH 基因克隆至噬菌体载体 pMECS 上，转化至 TG1 中构建成噬菌体展示文库。构建的文库库容如图 1
25 所示为 1.1×10^9 CFU，文库插入率如图 2 所示为 95.8%。随后进行文库筛选，经 3 轮筛选获得含抗体基因的噬菌体富集。从文库挑选 300 颗克隆进行 PE-ELISA 鉴定，将获得的阳性克隆进行测序，再将序列不同的单域抗体利用 E.coli 系统瞬时表达，表达方法参见专利 CN2018101521076 实施例 4 中的方法描述。

30 实施例 2：FACS 筛选具有阻断活性的 IL-4R 单域抗体

(1) 取一定数量的瞬转 48h 的 293F/IL-4R 细胞，1000rpm 离心 5min，弃

上清，用 PBS 重悬洗涤细胞一次，计数，分装 100uL/孔至 96 孔板中，然后再 3000rpm，4℃离心 4min。（2）吸去上清，加入梯度稀释好的实施例 1 中序列不同的单域抗体（从 40ug/mL 开始 2 倍梯度稀释），每孔加入 50uL，再加入 50uL 5ug/mL 的 IL-4-biotin 混匀，4℃孵育 20min；（3）3000rpm，4℃离心 4min，
5 弃上清，每孔加入 200uL PBS 洗涤细胞，再次离心弃上清；加入稀释好的 SA-PE 染色液于 4℃孵育 20min；（4）3000rpm，4℃离心 4min，弃上清，每孔加入 200uL PBS 洗涤细胞，再次离心弃上清；再加入 200uL PBS 重悬细胞，上流式细胞仪检测样本 PE 信号。结果如图 3 所示，候选出一株阻断活性良好的 IL-4R 单域抗体 Nb103 ($IC_{50} \text{ Nb103}=0.274\text{ug/mL}$)，其阻断活性优于对照抗体 Dupilumab
10 ($IC_{50} \text{ Dupilumab}=0.511\text{ug/mL}$)。

实施例 3：FACS 检测候选单域抗体对 TF-1 细胞的增殖抑制作用

候选单域抗体对 IL-4 诱导的 TF-1 细胞的增殖抑制作用的检测方法如下：

（1）取一定数量的 TF-1 细胞，1000 rpm，5 min 离心，弃上清；加入 PBS 重悬，
15 1000 rpm 离心 5 min 洗涤一次；再加入适量 PBS 重悬，计数，稀释细胞溶液浓度至 $6 \times 10^5/\text{mL}$ ，分装细胞至 96 孔板。（2）分别将 50uL 梯度稀释（从 20ug/mL 开始三倍梯度稀释）的 IgG1（阴性对照）、Dupilumab（阳性对照）、IL-4Ra Nb103 抗体与 50uL 浓度为 200ng/mL 的 IL-4 蛋白混合，重悬收集的细胞，同时将所有细胞周边孔加 100uL PBS，以防止有细胞孔溶液蒸发。（4）培养箱培养 3 天，3
20 天后取出细胞加入 CCK8 溶液 10uL/孔，置于 37℃，显色 4h。（5）显色结束后，用酶标仪读取各孔的 OD450。结果如图 4 所示： $IC_{50} \text{ Nb103}=0.149\text{ug/mL}$ ， $IC_{50} \text{ Dupilumab}=0.566\text{ug/mL}$ ，因此候选单域抗体 Nb103 对 TF-1 细胞的增殖抑制作用显著强于对照抗体 Dupilumab。

候选单域抗体对 IL-13 诱导的 TF-1 细胞的增殖抑制作用的检测方法同上，将
25 待测稀释的抗体与工作浓度为 10ng/mL 的 IL-13 混合加入细胞。经检测其结果如图 5 所示： $IC_{50} \text{ Nb103}=0.066\text{ug/mL}$ ， $IC_{50} \text{ Dupilumab}=0.740\text{ug/mL}$ ，因此候选单域抗体 Nb103 对 TF-1 细胞的增殖抑制作用显著强于对照抗体 Dupilumab。

实施例 4：ELISA 检测候选单域抗体的种属特异性

30 利用 ELISA 验证候选抗体能否与不同种属 IL-4R 蛋白发生交叉反应，方法如下：（1）将 1ug/mL 人 IL-4R、鼠 IL-4R、食蟹猴 IL-4R 加入酶标板中包被过夜，4℃，100uL/孔；（2）用 PBST 洗涤 5 次后，每孔加入 300uL 1% BSA

室温封闭 2 小时；（3）用 PBST 洗涤 5 次后，加入 100uL 2ug/mL 待测抗体于 37℃下孵育 1 小时；（4）用 PBST 洗涤 5 次后，加入 100uL 稀释的 anti-HA antibody（1:2000 稀释）于 37℃下孵育 1 小时；（4）再用 PBST 洗涤 5 次后，加入 100uL 稀释的 anti-mouse IgG antibody（1:2000 稀释）于 37℃下孵育 30 分钟；（5）用 PBST 洗涤 5 次后，加入加入 PA 显色液 100uL，37℃显色 10min，酶标仪 405nm 波长下测定吸收值。结果如图 6 所示：候选抗体 Nb103 能够识别人 IL-4R，而不能识别鼠和食蟹猴 IL-4R。

再次利用 ELISA 验证候选抗体能否与不同类型猴子的 IL-4R 蛋白发生交叉反应，检测方法同上，结果如图 7 所示：候选抗体 Nb103 能够识别狢猴 IL-4R，不能识别恒河猴 IL-4R。

实施例 5：候选单域抗体的人源化改造

将候选抗体进行人源化改造，保持可变区不变，针对四个骨架区序列进行人源化设计，改造方法参见专利CN2018101517526中实施例4的方法。再将人源化后的抗体序列构建在pFUSE载体上，使人源化的单域抗体与Fc序列融合，形成huNb103（融合蛋白序列见SEQ ID NO:16，其编码核苷酸序列见SEQ ID NO:17），利用HEK293F系统表达，表达后的蛋白可用于后续验证。表达的方法参见专利CN2018101517526实施例3。改造后的序列如下表2所示：

表2

抗体区域	序列编号（SEQ ID NO:）	
	人源化前	人源化后
FR1	4	10
CDR1	1	1
FR2	5	11
CDR2	2	2
FR3	6	12
CDR3	3	3
FR4	7	13
完整氨基酸序列	8	14
完整核苷酸序列	9	15

实施例 6：FACS 检测人源化抗体的结合活性

(1) 收集高表达IL-4R α 的HEK293F稳转细胞, 1000rpm离心5min, 弃上清, 用5 mL PBS重悬, 1000rpm离心5min, 弃上清, 再加2mL PBS重悬细胞, 计数, 将细胞分装至96孔板中, 每孔 3×10^5 个细胞; (2) 将人源化抗体huNb103 (氨基酸序列见SEQ ID NO:16) 和Dupilumab进行2倍梯度稀释 (40ug/mL、20ug/mL、10ug/mL、5ug/mL、2.5ug/mL、1.25ug/mL、0.625ug/mL、0.313ug/mL、0.156ug/mL、0.078ug/mL), 用稀释好的抗体重悬分装在96孔板中的细胞, 于4℃孵育20min; (3) 3000rpm, 4℃离心4min, 加入200ul PBS/孔, 重悬后再于3000rpm, 4℃离心4min; (4) 加入稀释好的anti-human Fc-FITC抗体 (1:200稀释使用), 4℃孵育20min; (5) 3000rpm, 4℃离心4min, 弃上清, 加入200uL PBS/孔洗涤细胞, 洗涤2次, 再加入200uL PBS重悬细胞, 转移至流式管中, 流式细胞仪检测每个样本FITC信号。

结果如图8所示, 人源化抗体huNb103的 $EC_{50}=0.286$ ug/mL, 对照抗体Dupilumab的 $EC_{50}=0.360$ ug/mL。

15 实施例 7: FACS 检测人源化抗体的阻断活性

(1) 收集高表达IL-4R α 的HEK293F稳转细胞, 1000rpm离心5min, 弃上清, 用5 mL PBS重悬, 1000rpm离心5min, 弃上清, 再加2mL PBS重悬细胞, 计数, 将细胞分装至96孔板中, 每孔 3×10^5 个细胞; (2) 将人源化抗体huNb103和Dupilumab进行2倍梯度稀释 (40ug/mL、20ug/mL、10ug/mL、5ug/mL、2.5ug/mL、1.25ug/mL、0.625ug/mL、0.313ug/mL、0.156ug/mL、0.078ug/mL), 将稀释的抗体分别与0.5ug IL-4-Biotin混合, 然后重悬分装在96孔板中的细胞, 于4℃孵育20min; (3) 3000rpm, 4℃离心4min, 加入200ul PBS/孔, 重悬后再于3000rpm, 4℃离心4min; (4) 加入稀释好的SA-PE染色液 (0.3:100稀释使用), 4℃孵育20min; (5) 3000rpm, 4℃离心4min, 弃上清, 加入200uL PBS/孔洗涤细胞, 洗涤2次, 再加入200uL PBS重悬细胞, 转移至流式管中, 流式细胞仪检测每个样本PE信号。

结果如图9所示, 人源化抗体huNb103的 $IC_{50}=0.474$ ug/mL, 对照抗体Dupilumab的 $IC_{50}=1.126$ ug/mL。

30 实施例 8: 人源化四价抗体的构建及制备

为了进一步提高抗体的活性, 设计进行多价体制备, 构建的四价单域抗体结构如图 10 所示, 对应的氨基酸序列如 SEQ ID NO:19 所示, 其编码核苷酸序

列为 SEQ ID NO:20。将含有 SEQ ID NO:20 所示的核苷酸序列合成至 pCDNA3.1+载体上，然后用合成的质粒转染 HEK293F 细胞，转染方法参见专利 CN2018101517526 中实施例 3。表达后的抗体用 SEC-HPLC 进行纯度检测，结果如图 11 所示，抗体纯度为 90.69%，可用于后续研究。

5

实施例 9：人源化四价抗体对 TF-1 细胞的增殖抑制作用

(1) 将复苏培养的 TF-1 细胞于 1000 rpm 离心 5 min，弃上清；用 5mL PBS 重悬，1000 rpm 再离心 5 min；5mL PBS 重悬细胞计数，稀释细胞溶液浓度至 $6 \times 10^5/\text{mL}$ ，分装 60uL/孔到 96 孔板中；(2) 分别将 50uL 梯度稀释的 IL-4Ra 抗体 (50ug/mL、12.5ug/mL、3.125ug/mL、0.781ug/mL、0.195ug/mL、0.049ug/mL、0.012ug/mL、0.003ug/mL) 均与 50uL 5ng/mL 的 IL-4 蛋白混合后，取 40uL 混合液加到细胞溶液中；(3) 同时向所有细胞周边孔补加 200uL PBS，以防止有细胞孔溶液蒸发，置于 37℃，5%CO₂ 培养箱培养 72h；(4) 取出细胞培养板，加入 CCK8 溶液 10uL/孔，置于 37℃，显色 4h；(5) 显色结束后，用酶标仪读取各孔的 OD450 值。

结果如图 12 所示：人源化四价抗体能够有效抑制 IL-4 诱导的 TF-1 细胞的增殖抑制，其抑制活性 $\text{IC}_{50 \text{ tet-huNb103}}=0.020 \text{ ug/mL}$ ，其活性是人源化二价抗体的 1-2 倍 ($\text{IC}_{50 \text{ huNb103}}=0.032 \text{ ug/mL}$)，也显著优于对照抗体对 TF-1 细胞的增殖抑制作用 ($\text{IC}_{50 \text{ Dupilumab}}=0.238 \text{ ug/mL}$)。

同样地，人源化四价抗体对由 IL-13 诱导的 TF-1 细胞的增殖抑制作用也十分显著。检测时加入的 IL-13 浓度为 10ng/mL，其余步骤同上。结果如图 13 所示：人源化四价抗体能够有效抑制 IL-13 诱导的 TF-1 细胞的增殖抑制，其抑制活性 $\text{IC}_{50 \text{ tet-huNb103}}=0.026 \text{ ug/mL}$ ，其活性是人源化二价抗体的 2-3 倍 ($\text{IC}_{50 \text{ huNb103}}=0.059 \text{ ug/mL}$)，也显著优于对照抗体对 TF-1 细胞的增殖抑制作用 ($\text{IC}_{50 \text{ Dupilumab}}=0.180 \text{ ug/mL}$)。

25

实施例 10：人源化四价抗体对 HEK-Blue™ IL-4/IL-13 细胞中 pSTAT6 信号通路的抑制作用检测

(1) 将 HEK-IL-4/IL-13™ 细胞于 37℃ 5%CO₂ 条件下培养，待长至一定数目后收集细胞，用 20mL PBS 洗涤细胞两遍，再用 10mL DMEM 完全培养基重悬，取 50uL 台盼蓝染色液和 50uL 细胞溶液混合计数，稀释 HEK-IL-4/IL-13™ 细胞溶液浓度至 $3 \times 10^5/\text{mL}$ ，分装 160uL/孔至 96 孔细胞培养板；(2) 将梯度稀

30

释的待测抗体（40ug/mL、10ug/mL、0.625ug/mL、0.156ug/mL、0.039ug/mL、0.010ug/mL、0.002ug/mL）分别与等体积 5ng/mL IL-4 蛋白混合；（3）取 40uL 混合液加入到分装好的细胞板中，同时向所有细胞周边孔补加 200uL PBS，以防止有细胞孔溶液蒸发，置于 37℃，5% CO₂ 培养箱孵育 22h；（4）将
5 QUANTI-Blue 试剂加入 96 孔板中，180uL/孔，再加入 20uL 培养的细胞上清液于 37℃孵育 2h，酶标仪检测 655nm 处读值。

结果如图 14 所示：人源化四价抗体能够有效抑制 IL-4 诱导的 HEK-Blue™ IL-4/IL-13 细胞的 pSTAT6 信号通路，其抑制活性 IC₅₀ tet-huNb103=0.044 ug/mL，其活性是人源化二价抗体的 2-3 倍（IC₅₀ huNb103=0.109ug/mL），也显著优于对照
10 抗体对该细胞的 pSTAT6 信号通路作用（IC₅₀ Dupilumab=0.346 ug/mL）。

同样地，人源化四价抗体对由 IL-13 诱导的 HEK-Blue™ IL-4/IL-13 细胞的 pSTAT6 信号通路抑制作用也十分显著。检测时加入的 IL-13 浓度为 10ng/mL，其余步骤同上。结果如图 15 所示：人源化四价抗体能够有效抑制 IL-13 诱导的 HEK-Blue™ IL-4/IL-13 细胞的 pSTAT6 信号通路，其抑制活性 IC₅₀ tet-huNb103=0.017
15 ug/mL，其活性是人源化二价抗体的 2 倍（IC₅₀ huNb103=0.034ug/mL），也显著优于对照抗体对 HEK-Blue™ IL-4/IL-13 细胞的 pSTAT6 信号通路作用（IC₅₀ Dupilumab=0.120 ug/mL）。

20 实施例 11：用 hIL4/hIL4Ra 转基因小鼠 OVA 模型验证人源化四价抗体药效

将 15 只动物按照体重随机分为 3 组，每组 5 只，组 1 为阴性对照组，组 2 为受试品低剂量组（5mpk），组 3 为受试品高剂量组（25mpk）。1-3 组的动物都进行 OVA 致敏及给药：配制 200 μg/mL OVA，腹腔注射致敏，200 μL/只。致敏时间为第 0、7、14 天。在第 21-25 天，雾化吸入 2% OVA 激发，每次 30 min，
25 连续 5 天。受试品在第 20、23 天给药，第 25 天激发操作结束次日采集样本检测分析。

结果如图 16 所示：5mpk 和 25mpk 两个剂量的人源化四价抗体均能够有效抑制转基因小鼠 OVA 模型中血清中的 OVA 特异性的 IgE 的含量。

如图 17A 和 17B 所示：5mpk 和 25mpk 两个剂量的人源化四价抗体均能够有效减少肺部嗜酸性粒细胞数目和比例。
30

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献

被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

5 本发明序列信息：

SEQ ID NO:1

GSTSYRYCMA

SEQ ID NO:2

IRPRSGRA

10 SEQ ID NO:3

AASDNDGNCQDY

SEQ ID NO:4

QVQLQESGGGSVQAGGSLRVSCAAS

SEQ ID NO:5

15 WFRQAPGKEREAVAS

SEQ ID NO:6

YYADSVKGRFTISLDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAMYCY

SEQ ID NO:7

WGKGTQVTVSS

20 SEQ ID NO:8

QVQLQESGGGSVQAGGSLRVSCAASGSTSYRYCMAWFRQAPGKEREAVASIRPRSGRAYYADSVKGRFTISLDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCAASDNDGNCQDYWGKGTQVTVSS

SEQ ID NO:9

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGAGTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATCCACCTCCTATAGATACTGTATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGCGGTTCGCATCCATTGCCCCACGTAGTGGTAGGGCATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCTAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCCTCCGACAACGACGGTAATTGCCAGGACTACTGGGGCAAAGGAACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

30 SEQ ID NO:10

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS

SEQ ID NO:11

WFRQAPGKGLEAVAS

SEQ ID NO:12

35 YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC

SEQ ID NO:13

WGKGTQVTVSS

SEQ ID NO:14

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTSYRYCMAWFRQAPGKGLEAVASIRPRSGRAYYADSVKG
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASDNDGNCQDYWGKGT LVT VSS

SEQ ID NO:15

CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGC
5 TGC GCCGCCAGCGGCAGCACCAGCTACAGGTACTGCATGGCCTGGTTCAGGCAGGCCCCCGGCA
AGGGCCTGGAGGCCGTGGCCAGCATCAGGCCAGGAGCGGCAGGGCCTACTACGCCGACAGCG
TGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACA
GCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCGCCGCCAGCGACAACGACGGCAACTGCCA
GGACTACTGGGGCAAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC

10 SEQ ID NO:16 (SEQ ID NO:16= SEQ ID NO:14+Fc 片段)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTSYRYCMAWFRQAPGKGLEAVASIRPRSGRAYYADSVKG
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASDNDGNCQDYWGKGT LVT VSSSESKYGP P P P P P A
PEFLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSEEMTKNQVSLT
15 CLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEAL
HNHYTQKSLSLSLG

SEQ ID NO:17 (编码 huNb103 的核苷酸序列)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCTCCCTGAGGCTGTCTT
GCGCCGCTCCGGCTCCACCTCCTACAGGTACTGCATGGCCTGGTTCAGGCAGGCCCCCGGCAA
20 GGGCCTGGAGGCCGTGGCCTCCATCAGGCCAGGTCCGGCAGGGCCTACTACGCCGACTCCGTG
AAGGGCAGGTTACCATCTCCAGGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACCTCC
TGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCTCCGACAACGACGGCAACTGCCAGGA
CTACTGGGGCAAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCCGAGTCCAAGTACGGCCCCCCTGCCCC
CCCTGCCCCGCCCCGAGTTCCTGGGCGGCCCCCTCCGTGTTCTTCCCCCAAGCCCAAGGA
25 CACCCTGATGATCTCCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGAC
CCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCA
GGGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTG
GCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAG
ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCTCCGAGG
30 AGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGACATCGC
CGTGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCCTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCTGCTACTCCAGGCTGACCGTGACAAAGTCCAGGTGGCAGGAGGGCA
ACGTGTTCTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCC
CTGTCCCTGGGC

35 SEQ ID NO:18

GGGGSGGGG

SEQ ID NO:19 (SEQ ID NO:19= SEQ ID NO:14+ SEQ ID NO:18+SEQ ID NO:14+Fc 片段)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTSYRYCMAWFRQAPGKGLEAVASIRPRSGRAYYADSVKG
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASDNDGNCQDYWGKGT LVT VSSGGGGSGGGSEVQ

LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTSYRYCMAWFRQAPGKGLEAVASIRPRSGRAYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAASDNDGNCQDYWGKGTLLTVSSESKYGPCCPPCPAPEFL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSEEMTKNQVSLTCLV
5 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSLG

SEQ ID NO:20

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGCGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCTCTCTGAGACTGTCTT
GTGCTGCCTCTGGCAGCACATCTTACAGATACTGCATGGCCTGGTTCAGACAGGCTCCTGGCAAG
10 GGCCTGGAGGCCGTGGCCTCTATCAGACCTAGATCTGGAAGGGCCTACTATGCTGACAGCGTGA
AGGGCAGGTTCACAATCTCTAGAGATAACTCTAAGAACTCTGTACCTGCAGATGAACTCTCT
GAGAGCAGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCCGCCAGCGATAACGATGGAACTGTCAGGAT
TATTGGGGCAAGGGAACACTGGTGCAGTGTCTAGCGGCGGAGGCGGAAGCGGCGGCGGAAGC
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGCGGCCTGGTGCAGCCAGGAGGCAGCCTGAGACTGAGC
15 TGCGCCGCCAGCGGCAGCACATCTTACAGGTACTGCATGGCCTGGTTTAGGCAGGCTCCAGGAA
AGGGCCTGGAGGCCGTGGCCAGCATTAGACCCAGGAGCGGCAGAGCTTACTACGCCGACTCTGT
GAAGGGCAGATTCACCATCAGCAGAGATAACAGTAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAATAGC
CTGAGAGCTGAGGATACCGCTGTGTATTACTGTGCTGCCTCTGACAACGACGGCAACTGTCAGG
ATTACTGGGGAAAGGGCACACTGGTGCAGTGTCTTCTGAGTCTAAGTACGGCCACCTTGTCCCT
20 CCTTGCCCTGCCCCGAGTTTCTGGGAGGCCCATCTGTGTTTCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGAC
AACTGATGATTTCTAGAACACCTGAGGTGACTTGTGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAGGACC
CTGAGGTGCAGTTTAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAG
AGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGG
CTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGACTGCCATCTAGCATCGAGAAG
25 ACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCAAGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCTCCTTCTGAGG
AGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCACCTGTGCTGGAT
AGCGACGGCAGCTTCTTTCTGTACAGCAGACTGACCGTGGATAAGTCTAGGTGGCAGGAGGGAA
ACGTGTTTAGCTGTTCTGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTGTCT
30 CTGAGCCTGGGC