

抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段及其双特异性抗体和应用

技术领域

本发明涉及生物医药领域，具体而言，涉及一种结合人 IL-4R α 的抗体及其抗原结合片段及其双特异性抗体和应用。

背景技术

白细胞介素-4 (IL-4) 主要由活化的 T 细胞、单核细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞和嗜酸性粒细胞分泌，其生物作用包括刺激活化 B 细胞和 T 细胞增殖、T 细胞分化。白细胞介素-13 (IL-13) 由多种细胞类型表达，包括，其可抑制单核细胞释放炎症细胞因子，诱导 B 细胞增殖和分化，促进 B 细胞分泌抗体，促进 IgE 表达，与机体变态反应相关等。IL-4 和 IL-13 均需要通过结合共同的功能受体 IL-4R α 发挥下游调控作用。IL-4 通过 I 型受体 (IL-4R α / γ c) 和 II 型受体 (IL-4R α /IL-13R α 1) 发挥下游作用，前者仅在造血细胞表面表达，后者在造血细胞和非造血细胞 (如气道上皮细胞) 均有表达。IL-13 仅通过 II 型受体发挥下游调控作用。一旦 IL-4 或 IL-13 结合受体，受体二聚化后进一步诱导 JAKs 蛋白磷酸化和激活，包括 JAK1, JAK3 和 JAK2，分别对应 IL-4R α , γ c 和 IL-13R α 1，随后促进 IL-4R α 胞内结构域的特异性酪氨酸残基磷酸化，进一步磷酸化转录因子 STAT6，促进基因转录和蛋白表达。

II 型炎症性疾病主要包括特应性皮炎、哮喘、过敏性鼻炎、部分慢性鼻窦炎伴鼻息肉、慢性阻塞性肺炎等疾病，通常是由于固有免疫和适应性免疫系统的慢性失衡引起。环境诱因、遗传因素和屏障破坏持续激活适应性免疫细胞 (Th2)，产生细胞因子 IL-4、IL-5、IL-13 等，这些细胞因子驱动 B 细胞类别转换和 IgE 产生，促进嗜酸性粒细胞的分化和迁移，引起嗜碱性粒细胞和肥大细胞脱颗粒，加剧炎症反应发生发展。IL-4R α 是 II 型免疫反应过程中的关键因子，其可同时介导 IL-4 和 IL-13 细胞因子的功能作用，因此阻断 IL-4R α 可同时阻断两个 II 型免疫反应。

目前针对人 IL-4R α 靶点的单克隆抗体药物已在多项适应症的临床研究中显示出出色的治疗效果，充分证明了该靶点的可成药性。但是，本领域仍需要开发与人 IL-4R α 具有高亲和力的抗体药物，用于 II 型炎症性疾病的治疗，使其具有更好的临床疗效、更低的毒副作用，为广大患者提供更多一款药物选择，具有非常重要的意义。

Dupilumab 是首个上市的抗 IL-4R α 的单抗药物，其在临床治疗上效果显著，已获批多种适应症治疗，但在临床应用中仍存在局限性，包括在特应性皮炎病人身上的疗效有限，治疗响应率低，部分病人在治疗过程中出现嗜酸性粒细胞增加引起的副作用等。结合 Dupilumab 治疗的临床评价指标来看，Dupilumab 治疗后的病人体内嗜酸性粒细胞的指标改善有限，这与 IL-4R α 的分子作用机制一致。

胸腺基质淋巴细胞生成素 (Thymic Stromal Lymphopoietin, TSLP) 属于白细胞介素-7 家族细胞因子，由上皮细胞、平滑肌细胞、基质细胞、巨噬细胞、单核-巨噬细胞等产生。大量研究表明，TSLP 位于多个炎症级联反应顶端，是 Th2 型炎症反应的重要驱动因素。上皮细胞受到过敏原或病原体刺激或破坏后，树突状细胞向初始 CD4⁺T 细胞呈递抗原，同时释放上皮细胞因子、TSLP 和 IL-33，这些共刺激细胞因子促进过敏原特异性 Th2 细胞发育，产生细胞因子 IL-4、IL-5 和 IL-13 等。因此，通常认为 TSLP 是炎症级联反应的启动因子之一，抑制 TSLP 可以从炎症早期进行疾病干预，阻止免疫细胞释放促炎细胞因子，从而比单独抑制 IL-4、IL-5 和 IL-13 有效。此外，体内外药效研究提示，TSLP 还能参与非 Th2 型炎症反应，可

能促进 Th1/Th17 相关自身免疫性疾病, 如类风湿关节炎和多发性硬化症。Tezepelumab 是目前唯一一个已上市的抗 TSLP 的单抗药物, 获批用于成人中重度哮喘适应症的治疗, 并且治疗效果优异, 但同样存在临床应用局限性, 其在特应性皮炎治疗上未达到主要临床研究终点。综合分析 Tezepelumab 治疗后的病人血清学指标改变结果, Tezepelumab 治疗后, 病人体内嗜酸性粒细胞数量下降约 50%, IL-5 和 IL-13 均有大于 50% 水平下降, 而 IgE 水平改善有限, 仅下降约 20%, 对 IL-4 调控作用很弱。

双特异性抗体可同时靶向两种不同的抗原, 在保留抗体分子高特异性特点的同时扩展分子作用范围, 提高临床治疗效果。目前已开发的双特异性抗体形式多样, 其中 IgG-scFv 结构保留了天然单抗的完整 IgG 形式, 其在分子设计、表达和纯化上具有更多优势, 是一种双功能抗体的理想形式。

综合分析两个靶点抑制的临床效果来看, Dupilumab 抗体对嗜酸性粒细胞的改善作用有限, Tezepelumab 抗体对 IL-4 和 IgE 的改善作用有限。Th2 型信号通路的调控涉及多个细胞因子, 同时抑制两个靶点理论上可以显著提高临床响应率, 并扩展适应症范围, 因此临床尚需要开发新的抗 IL-4R α 和 TSLP 的双特异性抗体, 利用两个靶点抑制效果的特点, 取长补短, 达到更好的治疗效果和更高的使用安全性。

发明内容

针对以上现状, 本发明提供一种抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段及其双特异性抗体, 本发明所述抗体具有亲和力高, 活性好、疏水性低的抗人 IL-4R α 抗体, 可应用于制备治疗特应性皮炎、哮喘等过敏性疾病的药物。

本发明所述抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段, 其包括重链互补决定区和轻链互补决定区,

所述重链互补决定区包括 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述 HCDR1 为 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列; 所述 HCDR2 为 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列; 所述 HCDR3 为 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列; 和/或

所述轻链互补决定区包括 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 其中, 所述 LCDR1 为 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列; 所述 LCDR2 为 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列; 所述 LCDR3 为 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 11 或 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

本发明中作为实施方案之一, 所述抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段, 包含:

(1) 重链互补决定区, 包含 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的 HCDR1、SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的 HCDR2、和 SEQ ID NO: 3 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和

轻链互补决定区, 包含 SEQ ID NO: 4 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 5 所示的 LCDR2、和 SEQ ID NO: 6 所示氨基酸序列的 LCDR3。

本发明中作为实施方案之一, 所述抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段, 包含:

(2) 重链互补决定区, 包含 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的 HCDR1、SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列的 HCDR2、和 SEQ ID NO: 3 所示氨基酸序列的 HCDR3; 和

轻链互补决定区, 包含 SEQ ID NO: 4 所示氨基酸序列的 LCDR1、SEQ ID NO: 5 所示氨基酸序列的 LCDR2、和 SEQ ID NO: 8 所示氨基酸序列 LCDR3。

本发明中作为实施方案之一, 所述抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段, 包含:

(3) 重链互补决定区, 包含 SEQ ID NO: 1 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR2、和 SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 氨基酸序列; 和

轻链互补决定区, 包含 SEQ ID NO: 4 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 5 所示的 LCDR2、

SEQ ID NO: 8 所示的 LCDR3 氨基酸序列。

本发明中作为实施方案之一，所述抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段，包含：

(4) 重链互补决定区，包含 SEQ ID NO: 1 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 10 所示的 HCDR2、和 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR3 氨基酸序列；和

轻链互补决定区，包含 SEQ ID NO: 4 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 5 所示的 LCDR2、SEQ ID NO: 11 所示的 LCDR3 氨基酸序列。

本发明中作为实施方案之一，所述抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段，包含：

(5) 重链互补决定区，包含 SEQ ID NO: 12 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR2、和 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR3 氨基酸序列；和

轻链互补决定区，包含 SEQ ID NO: 15 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 16 所示的 LCDR2、SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR3 氨基酸序列。

上述抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段，其进一步包含选自以下的片段：

源自人胚系重链 IGHV1-46*01+IGHJ1*01 的框架区 (framework region, FR) 序列或与其具有至少 90% 同一性的回复突变序列；

源自人胚系轻链 IGKV1-39*01+IGKJ2*01 的框架区序列或与其具有至少 90% 同一性的回复突变序列。

本发明提供的上述抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段为鼠源抗体、嵌合抗体、人抗体、人源化抗体、双抗体或其片段。

本发明提供的上述抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段包括：

(1) 重链可变区包含如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列和轻链可变区包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列；

(2) 重链可变区包含如 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列和轻链可变区包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列；

(3) 重链可变区包含如 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列和轻链可变区包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列；

(4) 重链可变区包含如 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列和轻链可变区包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列；或

(5) 重链可变区包含如 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列和轻链可变区包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列；

本发明提供的上述抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段，包括 90% 或以上同一性的氨基酸序列。

本发明还提供一种融合蛋白，包含上述抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段。

本发明还提供一种编码上述抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。

本发明还提供一种包含上述多核苷酸的表达载体。

本发明还提供一种包含上述载体的宿主细胞，所述宿主细胞为原核或真核细胞。

本发明还提供一种药物组合物，包含所述的抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段或上述融合蛋白和药学上可接受的辅料。

本发明还提供一种所述抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段、上述融合蛋白或其药物组合物在制备治疗过敏性疾病的药物中的应用。

本发明中作为实施方案之一，上述过敏性疾病选自特应性皮炎、哮喘、过敏性鼻炎、部分慢性鼻窦炎伴鼻息肉，或慢性阻塞性肺炎。

本发明提供的不同于现有技术的抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段与人 IL-4R α 具有高亲和力的抗体药物，用于 II 型炎症性疾病的治疗，使其具有更好的临床疗效、更低的毒副作用，为广大患者提供更多一款药物选择，具有重要的意义。

经表面等离子共振法检测，本发明筛选的 m8、m21、m27 与 Dupilumab 抗体亲和力相

当，其中 m8 分子 KD 值为 4.37E-11M，KD 值在 50 pM 以下。

本发明筛选的抗体分子 m21、m27 对抑制 hIL-13 诱导 TF-1 细胞的增殖效果优于 Dupilumab 抗体，m8 抗体分子具有与 Dupilumab 相当的阻断活性。

经疏水性色谱法检测，本发明筛选的 m8、m21、m27 分子保留时间明显低于阳性抗体 BMK1，因此疏水性明显低于 Dupilumab 抗体，疏水性低的抗体在工艺开发过程中不容易形成聚体，不容易和宿主蛋白之类的结合造成稳定性不好，对后续工艺开发具有较大优势。

本发明还提供一种可以同时抗 IL-4R α 和抗 TSLP 的双特异性抗体，双抗形式为 IgG-scFv，所述双特异性抗体包含选自上述任一项所述的抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段。

本发明所述双特异性抗体包含免疫球蛋白 IgG 和单链抗体 scFv，所述双特异性抗体选自以下组别之一：

(1) 所述免疫球蛋白 IgG 包含抗 TSLP 抗体或其抗原结合片段，所述单链抗体 scFv 包含选自上述任一项所述的抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段；或

(2) 所述免疫球蛋白 IgG 包含选自上述任一项所述的抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段，所述单链抗体 scFv 包含抗 TSLP 抗体或其抗原结合片段。

作为实施方案之一，本发明上述的双特异性抗体，其中，所述抗 TSLP 抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区，其中

所述重链可变区包括 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 为 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 为 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列；所述 HCDR3 为 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列；

所述轻链可变区包括 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 为 SEQ ID NO: 51 所示的氨基酸序列；所述 LCDR2 的氨基酸序列为 DDS；所述 LCDR3 为 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列。

作为实施方案之一，本发明所述的双特异性抗体，其中，所述抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区，其中，

所述重链可变区包括 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 为 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 为 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列；所述 HCDR3 为 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列；

所述轻链可变区包括 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 为 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列；所述 LCDR2 为 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列；所述 LCDR3 为 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。

本发明中，作为实施方案之一，所述抗 TSLP 抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区，其中，

所述重链可变区具有 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列，所述轻链可变区具有 SEQ ID NO: 43 所示的氨基酸序列，或者，

所述重链可变区具有 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列，所述轻链可变区具有 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

本发明中，作为实施方案之一，所述抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区，其中，

所述重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列，所述轻链可变区具有 SEQ ID NO: 45 所示的氨基酸序列，或者

所述重链可变区具有 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列，所述轻链可变区具有 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列。

本发明中，作为实施方案之一，所述免疫球蛋白 IgG 和单链抗体 scFv 通过接头连接，所述接头为 (GGGGS) n ， n 为 1-5 的正整数，优选为如 SEQ ID NO: 46 所示的氨基酸序列，作为示例性的说明， n 可以为 1、2、3、4 或 5。

本发明中，作为实施方案之一，所述单链抗体 scFv 还含有连接 scFv 的重链可变区和轻链可变区的接头，所述接头为(GGGGS) n ， n 为 1-5 的正整数，优选为如 SEQ ID NO: 47 所示的氨基酸序列，作为示例性的说明， n 可以为 1、2、3、4 或 5。

作为实施方案之一，本发明所述双特异性抗体选自以下组别中的任一组：

(1) 所述免疫球蛋白 IgG 包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示的重链可变区、SEQ ID NO: 35 所示的重链恒定区、SEQ ID NO: 36 所示的轻链可变区和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 37 所示的轻链恒定区，所述单链抗体 scFv 部分具有氨基酸序列如 SEQ ID NO: 44 所示的重链可变区和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 45 所示的轻链可变区；或

(2) 所述免疫球蛋白 IgG 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 28 所示的重链可变区、如 SEQ ID NO: 40 所示的重链恒定区、SEQ ID NO: 29 所示的轻链可变区和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 41 所示的轻链恒定区，所述单链抗体 scFv 部分具有氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示的重链可变区和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 43 所示的轻链可变区。

作为实施方案之一，本发明所述双特异性抗体选自以下组别中的任一组：

(1) 所述双特异性抗体包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 57 所示的重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 58 所示的轻链；或

(2) 所述双特异性抗体包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 59 所示的重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 60 所示的轻链。

本发明还提供一种药物组合物，包括上述双特异性抗体或其抗原结合片段与药学上可接受的辅料。

本发明还提供了上述任一项所述的双特异性抗体或上述药物组合物在制备治疗中重度哮喘、中重度特应性皮炎、过敏性鼻炎、部分慢性鼻窦炎伴鼻息肉、慢性阻塞性肺病的药物中的应用。

本发明提供的双特异性抗体 MTM 和 MMT 对 hIL-4R α 的亲合力与 Dupilumab 相当，对 hTSLP 的亲合力与 Tezepelumab 相当。本发明提供的双特异性抗体 MTM 和 MMT 可有效阻断 hIL-13 和 hIL-4 的活性，具有与 Dupilumab 相当的活性。采用针对 IL-4R α 的 GFP 报告基因法评价双特异性抗体阻断 hIL-13 和 hIL-4 的能力，结果显示 MTM 和 MMT 可有效阻断 hIL-13 和 hIL-4 的活性。

本发明提供的双特异性抗体 MTM 和 MMT 可有效阻断 TSLP 的活性，具有与 Tezepelumab 相当的活性。采用针对 TSLP 活性评估的荧光素酶报告基因法，评价双特异性抗体阻断 hTSLP 的能力，结果显示 MTM 和 MMT 可有效阻断 hTSLP 的活性。

本发明提供的双特异性抗体 MTM 具有较优的稳定性特点。在 20mM 醋酸钠+100mM L-脯氨酸，pH5.0 的缓冲液中，MTM 分子可浓缩至 100mg/mL 以上浓度，在 4°C、25°C 和 40°C 条件下进行稳定性研究，以 SEC-HPLC 检测的单体作为评价指标，结果显示 MTM 分子稳定性较好，利于后续工艺开发。

附图说明

- 图 1A: FACS 测定第一批鼠源抗体分子结合 CHO-K1-hIL-4R α 的活性；
- 图 1B: FACS 测定第二批鼠源抗体分子结合 CHO-K1-hIL-4R α 的活性；
- 图 2A: 报告基因法测定第一组候选鼠源抗体分子对 hIL-13 的抑制作用；
- 图 2B: 报告基因法测定第二组候选鼠源抗体分子对 hIL-13 的抑制作用；
- 图 3: 报告基因法检测亲和力成熟后的单抗分子对 hIL-4 活性的抑制作用；
- 图 4: B-hIL4/IL4R α 人源化小鼠哮喘模型中 m8 和 m21 单抗分子的药效结果；
- 图 5: SEC-HPLC 方法检测 m8 和 m21 单抗分子纯度；
- 图 6: HIC-HPLC 方法检测 m8 和 m21 单抗分子疏水性；
- 图 7: SDS-PAGE 方法检测双抗分子纯度；

图 8A: Biacore 8k 检测 MMT 分子与 hIL4R α 和 hTSLP 抗原同时结合的能力;
图 8B: Biacore 8k 检测 MTM 分子与 hIL4R α 和 hTSLP 抗原同时结合的能力;
图 9: ELISA 法检测人 PBMC 分泌的 CCL17 的含量;
图 10A: B-hIL4/IL4R α 人源化小鼠哮喘模型中 MTM 双抗抑制 OVA 特异性 IgE 表达;
图 10B: B-hIL4/IL4R α 人源化小鼠哮喘模型中 MTM 双抗抑制嗜酸性粒细胞表达;
图 11A: B-hTSLP/ TSLPR/IL7R α 人源化小鼠哮喘模型中 MTM 双抗抑制 IgE 表达;
图 11B: B-hTSLP/ TSLPR/IL7R α 人源化小鼠哮喘模型中 MTM 双抗抑制嗜酸性粒细胞表达。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。

本发明实施例中实验方法均为按照常规条件如冷泉港的抗体技术实验手册,分子克隆手册或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。所有试剂均为市场购买获得。

本发明中所述 BMK1 为阳性对照分子 (Dupilumab 抗体),序列来源于专利申请号为 CN200980143007.6 的 SEQ ID ID.162 和 SEQ ID ID.164,制备方法参照文献 doi: 10.1016/j.cjbt.2019.07.002。

实施例 1: 抗 hIL-4R α 鼠源抗体制备和测序

1.1 动物免疫

将稳定过表达人 IL-4R α (Peprotech, 200-04R) 蛋白的 CHO-K1 细胞 (约 10^7 个) 作为抗原,取 4 只 BALB/c 小鼠进行腹部皮下注射免疫,初次免疫以后,每两周加强免疫一次,两次免疫后,尾部取血,采用 ELISA 方法检测小鼠血清滴度,滴度大于 2×10^4 的小鼠的脾细胞用于后续杂交瘤细胞融合。

1.2 制备杂交瘤细胞库

取滴度大于 2×10^4 的 BALB/c 小鼠的脾细胞和 SP2/0 鼠骨髓瘤细胞按 1: 1.2 比例进行电转融合,融合后的杂交瘤细胞按 1×10^4 个细胞/孔铺至 96 孔板, 37°C 培养 10 天后进行筛选。

1.3 亚克隆分选并用 ELISA 法初步筛选结合 hIL-4R α 的阳性克隆

采用半固体培养基方法,将筛选得到的 30 个杂交瘤细胞库进行亚克隆分选,获得单克隆细胞,随后继续采用 ELISA 法筛选结合 hIL-4R α 蛋白的阳性克隆。

用包被缓冲液 (200mM Na_2CO_3 / NaHCO_3 , pH 9.2) 将链霉亲和素蛋白 (Jackson, Cat: 016-000-113) 稀释至 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度,混匀,按 30 μl /孔加入至 384 孔板中, 4°C 包被过夜,用 100 μl /孔 1 $\times$ PBS-T (0.05% Tween20) 洗 1 次。每孔加入 80 μl 封闭液 (2% BSA/1 $\times$ PBS), 25°C 孵育 1h, 每孔 100 μl 1 $\times$ PBS-T (0.05% Tween20) 洗 3 次。用 2% 的 BSA 缓冲液 (200mM Na_2CO_3 / NaHCO_3 , pH 9.2) 稀释 IL-4R α -biotin 至 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 混匀后按 30 μl /孔加入至 384 孔板中,用 100 μl /孔 1 $\times$ PBS-T (0.05% Tween20) 洗 3 次。将分选后的亚克隆培养上清取 30 μl /孔加入至 384 孔板中, 25°C 孵育 2h, 用 100 μl /孔 1 $\times$ PBS-T (0.05% Tween20) 洗 3 次。每孔加入 30 μl 羊抗鼠 IgG Fc-HRP (1:5000 稀释) (Bethyl, Cat: A90-231P), 25°C 孵育 1h, 用 100 μl /孔 1 $\times$ PBS-T (0.05% Tween20) 洗 6 次。每孔加入 30 μl TMB 底物, 25°C 反应 20min。每孔继续加入 30 μl 终止液 (2M HCl) 终止反应,随后在 450nm 波长下测定吸光值。

1.4 流式细胞荧光分选技术 FACS 法进一步筛选结合 hIL-4R α 的阳性克隆

根据 ELISA 的吸光值,选取吸光值最高的 60 个分子进行 FACS (CHO-K1.IL-4R α 细胞) 检测。50ml 离心管收集过表达 hIL-4R α 的 CHO-K1.IL-4R α 细胞,按 1×10^5 /孔细胞量加入至 96 孔板中, 1500rpm 离心 4min, 弃上清。取分选后的亚克隆培养上清 100 μl /孔加入至 96 孔板

中，4℃ 孵育 1h，用 200 μl/孔 1%BSA/1×PBS 洗 2 次。100μl/孔加入 PE 标记的羊 抗鼠 IgG Fc(1:100)(Jackson, Cat: 115-115-164)，4℃ 孵育 0.5h，用 80μl/孔 1%BSA/1×PBS 洗 2 次，随后用 30μl/孔的 1%BSA/1×PBS 重悬细胞，最后用流式细胞仪检测平均荧光强度。

1.5 报告基因法（HEK-293T.STAT6-GFP 细胞）筛选可抑制 hIL-4 活性的阳性克隆

根据 ELISA 结果，选取吸光值最高的 60 个分子进行单浓度报告基因法（CHO-K1.IL-4Rα 细胞）检测。准备 HEK-293T.STAT6-GFP 细胞，采用 TransDetect BrightFluore DMEM + 10% FBS 培养基重悬细胞，并将细胞密度调整为 5E5 cells/ml，按 100μl/孔加入到全黑 96 孔板中，37℃ 孵育 24h。将 hIL-4 用 TransDetect BrightFluore DMEM + 10% FBS 培养基稀释至 1.0ng/ml，每孔加入 20μl，随后取亚克隆培养上清 80μl 加入孔中，轻轻混匀，37℃ 继续培养 24h。采用酶标仪检测荧光信号强度，激发波长 488nm，发射波长 520nm。

1.6 候选分子表达、纯化和活性评价

综合上述三种方法评估得到的结果，选择最优的 10 个鼠源单克隆细胞进行放大培养，培养液经 Protein A 纯化后得到的鼠源抗体进行 FACS 和报告基因法评价。

1.7 FACS 法筛选结合 hIL-4Rα 蛋白的分子

选择 10 个综合评价最好的鼠源单克隆抗体分子(参见表 1)进行完整的 FACS 筛选。50ml 离心管收集过表达 hIL-4Rα 的 CHO-K1.IL-4Rα 细胞。按 1E5/孔细胞量加入至 96 孔板中，1500rpm 离心 4min，弃上清。用 1%BSA/1 × PBS 溶液将纯化的抗体分子稀释至 200nM 浓度，1: 4 倍比梯度稀释 11 个浓度，4℃ 孵育 1h，用 200 μl/孔 1%BSA/1×PBS 洗 2 次。100μl/孔加入 PE 标记的羊抗鼠 IgG Fc(1:100)，4℃ 孵育 0.5h，用 80 μl/孔 1%BSA/1×PBS 洗 2 次，随后用 30μl/孔的 1%BSA/1 × PBS 重悬细胞。最后用流式细胞仪检测平均荧光强度，四参数拟合曲线，计算 EC50 值，得到表 1 和图 1A、1B 所示结果，其中 BMK1 为阳性对照，human IgG4 ctrl 为阴性对照。

1.8 报告基因法筛选阻断 hIL-13 活性的分子

选择 10 个综合评价最好的鼠源抗体分子(参见表 1)进行完整的报告基因法。准备 HEK-293T.STAT6-GFP 细胞，采用 TransDetect BrightFluore DMEM + 10% FBS 培养基重悬细胞，并将细胞密度调整为 5E5 cells/ml，按 100μl/孔加入到全黑 96 孔板中，37℃ 孵育 24h。将 hIL-13 用 TransDetect BrightFluore DMEM + 10% FBS 培养基稀释至 20.0ng/ml。用稀释好的 hIL-13 溶液稀释抗体分子，1: 4 倍比梯度稀释 11 个浓度，100μl/孔加入 96 孔板中，轻轻混匀，37℃ 继续培养 24h。采用酶标仪检测荧光信号强度，激发波长 488nm，发射波长 520nm，四参数拟合曲线，计算 IC50 值，得到表 1 和图 2A 和 2B 所示结果，其中 BMK1 为阳性对照，human IgG4 ctrl 为阴性对照。

1.9 亲和力检测

综合上述数据分析，选择其中活性最佳的 2 个分子进行亲和力检测。采用实时生物传感器表面等离子共振分析（Cytiva, Biacore 8K），于 25℃测定 2 个抗体分子对于 hIL-4Rα 的结合亲和力（KD）。首先将抗鼠 Fc IgG 抗体偶联至 CM5 芯片，形成抗体捕获表面，随后将筛选的 2 个抗体分子进一步偶联至抗鼠 Fc IgG 抗体上，偶联流速 10μl/min，偶联 30s，将分析物（hIL-4Rα.ECD）配置成 1: 2 倍比稀释的 6 个梯度浓度，依次检测，结合时间 180s，解离时间 1800s，流速 10μl/min。最后利用 BIA 分析软件进行动力学分析，确定平衡结合常数 Ka、平衡解离常数 Kd 和亲和力常数 KD，检测结果如表 1 所示，2 个分子均显示出对 hIL-4Rα 较高的亲和力。

表 1 分子的活性及亲和力数据

分子	细胞活性数据（hIL-13）	FACS 数据（CHO-K1-hIL-4Rα）
	IC50 (nM)	EC50 (nM)

1.14.5-鼠源	1.86	0.29	
1.14.12-鼠源	2.02	0.28	
1.27.9-鼠源	10.22	0.32	
1.29.11-鼠源	6.04	0.35	
1.34.4-鼠源	1.38	0.35	
2.9.24-鼠源	NA	0.35	
2.46.13-鼠源	2.23	0.28	
2.48.18-鼠源	12.72	0.26	
2.48.21-鼠源	15.52	0.27	
2.61.9-鼠源	NA	0.71	
BMK1	0.81	0.30	
亲和力数据（hIL-4R α ）			
分子	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
1.34.4-鼠源	3.61E+05	1.33E-04	3.69E-10
2.46.13-鼠源	3.85E+05	1.18E-04	3.06E-10

1.10 候选鼠源抗体可变区序列测序

将上述 2 个鼠源单克隆抗体分子（1.34.4-鼠源、2.46.13-鼠源）进行测序，确认其序列信息并进行序列分析，序列信息见表 2 所示。

表 2 鼠源单克隆抗体分子 CDR 序列表

分子	名称	序列	编号
1.34.4-鼠源	HCDR1	GYTFTTYIY	SEQ ID NO: 1
	HCDR2	GSNPSTGGTLFNEKFKT	SEQ ID NO: 10
	HCDR3	SGRYAPFTY	SEQ ID NO: 3
	LCDR1	KASQDVSTSV	SEQ ID NO: 4
	LCDR2	SASYRFT	SEQ ID NO: 5
	LCDR3	QQYSTTPFT	SEQ ID NO: 11
2.46.13-鼠源	HCDR1	GFTFSSYYMS	SEQ ID NO: 12
	HCDR2	AINSNGGSTYSPDTVKG	SEQ ID NO: 13
	HCDR3	RSLLGNHRDWYFDV	SEQ ID NO: 14
	LCDR1	RASENIYSYLA	SEQ ID NO: 15
	LCDR2	NAKTLAD	SEQ ID NO: 16
	LCDR3	LHHYGTPLT	SEQ ID NO: 17

1.34.4-鼠源单克隆抗体分子重链可变区序列为：

QVQLQQPGAELVKPGASMKLSCKASGYTFTTYIYWVKQRPGQGLEWIGGSNPSTG
GTLFNEKFKTATLTVDKYSSAYMELSSLTFEDSAVYFCTRSGRYAPFTYWGQGLTVSA
（SEQ ID NO: 18）

1.34.4-鼠源单克隆抗体分子轻链可变区序列为：

DIVMTQSHKVLSTSVGDRVIITCKASQDVSTSVAWYQQRPGHSPKLLIYSASYRFTGV
PDRFTGSGSGTDFTFITSSVQAEDLAVYNCQQYSTTPFTFGSGTKLEIK（SEQ ID NO: 19）

2.46.13-鼠源单克隆抗体分子重链可变区序列为：

DVKLVESGGGLVKLGSLKLSAASGFTFSSYYMSWVRQTPEKRLELVAAINSNGGS

TYSPDTVKGKFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTALYYCARRSLLGNHRDWYFDVWGAGT
TVTVSS (SEQ ID NO: 20)

2.46.13-鼠源单克隆抗体分子轻链可变区序列为:

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLADG
VPSRFGSGSGTQFSLKINTLQPEDFGSYCLHHYGTPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:
21)

实施例 2: 抗体人源化改造和亲和力评价

将 1.34.4-鼠源和 2.46.13-鼠源两个鼠源单克隆抗体的可变区序列与人胚系抗体序列进行
比对,找出同源性高的序列进行 CDR 移植,将 1.34.4-鼠源的重链 CDR 区移植入 IGHV1-
46*01+IGHJ1*01 的框架区,轻链 CDR 区移植入 IGKV1-39*01+IGKJ2*01 的框架区,将 2.46.13-
鼠源的重链 CDR 区移植入 IGHV3-21*01+IGHJ6*01 的框架区,轻链 CDR 区移植入 IGKV1-
39*01+IGKJ2*01 的框架区,具体序列见表 3-1 和表 3-2。随后利用计算机进行同源模建,分
析 CDR 区及其框架区氨基酸序列,预测序列中可能与 hIL-4R α 蛋白作用及稳定空间结构的关
键氨基酸位点,在此基础上设计回复突变位点,进行回复突变筛选。将设计回复突变后的人
源化可变区序列与人 IgG4 恒定区相连,随后进行抗体表达(表达方法参照文献 doi:
10.1016/j.ejbt.2019.07.002)和亲和力评价,方法同 1.9,根据亲和力数据,最终选取经过回复
突变后的 1.34.4-z18 人源化抗体分子进行亲和力成熟,1.34.4-z18 序列见表 3-1 和表 3-2 所示,
亲和力数据见表 4。

表 3-1 人源化单克隆抗体分子 CDR 序列表

分子	名称	序列	编号
1.34.4	HCDR1	GYTFTTYIY	SEQ ID NO: 1
	HCDR2	GSNPSTGGTLFNEKFKT	SEQ ID NO: 10
	HCDR3	SGRYAPFTY	SEQ ID NO: 3
	LCDR1	KASQDVSTVA	SEQ ID NO: 4
	LCDR2	SASYRFT	SEQ ID NO: 5
	LCDR3	QQYSTTPFT	SEQ ID NO: 11
2.46.13	HCDR1	GFTFSSYYMS	SEQ ID NO: 12
	HCDR2	AINSGGSTYSPDTVKG	SEQ ID NO: 13
	HCDR3	RSLGNHRDWYFDV	SEQ ID NO: 14
	LCDR1	RASENIYSYLA	SEQ ID NO: 15
	LCDR2	NAKTLAD	SEQ ID NO: 16
	LCDR3	LHHYGTPLT	SEQ ID NO: 17
1.34.4-z18	HCDR1	GYTFTTYIY	SEQ ID NO: 1
	HCDR2	GSNPSTGGTLFNEKFKT	SEQ ID NO: 10
	HCDR3	SGRYAPFTY	SEQ ID NO: 3
	LCDR1	KASQDVSTVA	SEQ ID NO: 4
	LCDR2	SASYRFT	SEQ ID NO: 5
	LCDR3	QQYSTTPFT	SEQ ID NO: 11

表 3-2 人源化单克隆抗体分子可变区序列表

分子	轻/重链可 变区	序列	编号
----	-------------	----	----

1.34.4	重链可变区	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYYIYWVRQAPGQGLEWMGGSNPSTGGTLFNEKFKTRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSGRYAPFTYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 22
	轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTSVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTTPFTFGQGTKLEIK	SEQ ID NO: 23
2.46.13	重链可变区	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSAINSNGGSTYSPDTVKGRTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRSLLGNHRDWYFDVWGQGT TVTVSS	SEQ ID NO: 24
	轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCLHHYGTPLTFGQGTKLEIK	SEQ ID NO: 25
1.34.4-z18	重链可变区	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYYIYWVRQAPGQGLEWMGGSNPSTGGTLFNEKFKTRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRSGRYAPFTYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 26
	轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTSVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRFTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDFATYYCQQYSTTPFTFGQGTKLEIK	SEQ ID NO: 27

表 4 人源化抗体分子亲和力数据

分子	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
1.34.4	1.96E+05	1.00E-04	5.12E-10
1.34.4-z18	2.42E+05	1.37E-04	5.67E-10

实施例 3: 亲和力成熟

3.1 单点饱和突变

利用饱和突变的方式, 对 1.34.4-z18 人源化抗体分子的每一个 CDR 位点进行饱和突变, 建立 Fab 单点突变库 (>5000 个分子), 利用竞争 ELISA 法对 Fab 单点突变库进行结合活性筛选, 将筛选得到最优的 15 个 Fab 阳性克隆进行单点亲和力检测和测序。选取解离常数降低 2-10 倍的突变体进行后续组合突变。

3.2 组合突变分子亲和力筛选

确认亲和力提高最显著的位点后, 将这些位点进行组合突变筛选, 所得到的分子解离常数均小于 1.00E-05(1/s), 低于仪器检测限, 亲和力均小于 9.43E-11(M), 说明所有亲和力成熟分子都可以高亲和力结合 hIL-4R α 蛋白, 最终筛选出 m8、m21、m27 分子进行细胞活性和亲和力评价, 具体序列见表 5。

表 5 亲和力成熟后的单克隆抗体分子 CDR 序列

分子	名称	序列	编号
m8	HCDR1	GYTFTTYYIY	SEQ ID NO: 1
	HCDR2	GSNPSTGGTLDNEKFKT	SEQ ID NO: 2
	HCDR3	SGRYAPFTY	SEQ ID NO: 3
	LCDR1	KASQDVSTSA	SEQ ID NO: 4
	LCDR2	SASYRFT	SEQ ID NO: 5
	LCDR3	QHYSTTPFT	SEQ ID NO: 6

m21	HCDR1	GYTFTTTYIY	SEQ ID NO: 1
	HCDR2	GSNPSTGGTLENEKFKT	SEQ ID NO: 7
	HCDR3	SGRYAPFTY	SEQ ID NO: 3
	LCDR1	KASQDVSTSA	SEQ ID NO: 4
	LCDR2	SASYRFT	SEQ ID NO: 5
	LCDR3	VHYSTTPFT	SEQ ID NO: 8
m27	HCDR1	GYTFTTTYIY	SEQ ID NO: 1
	HCDR2	GSNPSTGGTLENEKFKT	SEQ ID NO: 7
	HCDR3	SGRYATFTY	SEQ ID NO: 9
	LCDR1	KASQDVSTSA	SEQ ID NO: 4
	LCDR2	SASYRFT	SEQ ID NO: 5
	LCDR3	VHYSTTPFT	SEQ ID NO: 8

亲和力成熟后的 m8 分子的重链可变区序列为:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTTYIYWVRQAPGQGLEWMGGSNPST
GGTLDNEKFKTRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRSGRYAPFTYWGQGTLVTV
SS (SEQ ID NO: 28)

亲和力成熟后的 m8 分子的轻链可变区序列为:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSTSAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRFTGV
PSRFGSGSGTDFTFTISSLPEDFATYYCQHYSTTPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 29)

亲和力成熟后的 m21 分子的重链可变区序列为:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTTYIYWVRQAPGQGLEWMGGSNPST
GGTLENEKFKTRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRSGRYAPFTYWGQGTLVTV
SS (SEQ ID NO: 30)

亲和力成熟后的 m21 分子的轻链可变区序列为:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSTSAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRFTGV
PSRFGSGSGTDFTFTISSLPEDFATYYCVHYSTTPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 31)

亲和力成熟后的 m27 分子的重链可变区序列为:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTTYIYWVRQAPGQGLEWMGGSNPST
GGTLENEKFKTRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRSGRYATFTYWGQGTLVTV
SS (SEQ ID NO: 32)

亲和力成熟后的 m27 分子的轻链可变区序列为:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSTSAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRFTGV
PSRFGSGSGTDFTFTISSLPEDFATYYCVHYSTTPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 33)

3.3 报告基因法检测阻断 hIL-4 结合 hIL-4R α 蛋白的抗体分子

采用报告基因法对上述分子进行进一步细胞活性检测。准备 HEK-293T.STAT6-GFP 细胞, 采用 TransDetect BrightFluore DMEM + 10% FBS 培养基重悬细胞, 并将细胞密度调整为 5E5 cells/ml。按 100 μ l/孔加入到全黑 96 孔板中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 24h。将 hIL-4 用 TransDetect BrightFluore DMEM + 10% FBS 培养基稀释至 1.0ng/ml。用稀释好的 hIL-4 溶液稀释抗体分子, 1: 4 倍比梯度稀释 11 个浓度, 100 μ l/孔加入 96 孔板中, 轻轻混匀, 37 $^{\circ}$ C 继续培养 24h。采用酶标仪检测荧光信号强度, 激发波长 488nm, 发射波长 520nm, 四参数拟合曲线, 得到图 3 和表 6 所示结果, 其中 BMK1 为阳性对照, 所有分子均显示可显著抑制 hIL-4 的活性。

表 6 报告基因法检测阻断 hIL-4 的活性

分子	IC50 (pM)
m8	16.4

m21	286
m27	249
BMK1	201

3.4 表面等离子共振法检测候选分子对 hIL-4Rα 蛋白的亲和力

首先将抗人 Fc IgG 抗体偶联至 CM5 芯片，形成抗体捕获表面，随后将筛选的抗体分子进一步偶联至抗人 Fc IgG 抗体上，偶联流速 10μl/min，偶联 30s，将分析物（hIL-4Rα.ECD）配置成 1: 2 倍比稀释的 6 个梯度浓度，依次检测，结合时间 180s，解离时间 1800s，流速 10μl/min。最后利用 BIA 分析软件进行动力学分析，确定平衡结合常数 ka、平衡解离常数 kd 和亲和力常数 KD，检测结果见表 7 所示，BMK1 为阳性对照分子，候选分子与对照分子亲和力相当。

表 7 表面等离子共振法检测候选分子对 hIL-4Rα 蛋白的亲和力

分子	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
m8	9.03E+05	3.95E-05	4.37E-11
m21	5.82E+05	7.76E-05	1.33E-10
m27	5.68E+05	1.12E-04	1.96E-10
BMK1	1.43E+06	5.40E-05	3.79E-11

3.5 TF-1 细胞增殖抑制法检测候选分子抑制 hIL-13 活性的能力

进一步采用增殖抑制法对 m8、m21、m27 进行评价。采用 RPMI1640 + 5% FBS 培养基将 TF-1 细胞密度调整为 5E5 cells/ml。按 100μl/孔加入到全白 96 孔板中。将 hIL-13 用培养基稀释至 30ng/ml。用稀释好的 hIL-13 溶液稀释抗体分子，1: 4 倍比梯度稀释 11 个浓度，50μl/孔加入 96 孔板中，轻轻混匀，37℃ 继续培养 72h。取出 96 孔板，按 100μl/孔加入 CellTiter-Glo 显色液，室温反应 15min。采用酶标仪检测发光强度，得到表 7 所示结果，其中 BMK1 为阳性对照，m21、m27 抗体分子抑制 hIL-13 诱导 TF-1 细胞的增殖效果优于 BMK1，m8 抗体分子具有与 BMK1 相当的阻断活性。

表 8 增殖抑制法检测阻断 hIL-13 活性数据

分子	IC50 (pM)
m8	125
m21	66.5
m27	58.8
BMK1	140

实施例 4: m8 和 m21 对 OVA 诱导的 B-hIL4/IL-4Rα 小鼠哮喘模型的影响

采用 OVA（卵清蛋白）诱导 B-hIL4/IL-4Rα 小鼠建立小鼠哮喘模型。D0 为模型建立的第 1 天，在 D0 和 D14，腹腔注射 10μg OVA 进行致敏，D21-24 天鼻滴 5%OVA 激发。实验小鼠分 4 组，包括阴性对照组 NC、阳性对照组 BMK1、实验组 m8 和 m21，每组 8 只，给药剂量 25mg/kg，给药方式为皮下注射，在 D7、D10、D14、D17、D21、D24 天给药。期间测量各组小鼠的体重变化，D25 天取各组小鼠血液、肺泡灌洗液（BALF）和肺组织进行指标检测。

实验结果如图 4A 和 4B 所示，和 NC 对照组相比，实验组和阳性对照组 BALF 来源的

淋巴细胞数量和嗜酸性粒细胞数量呈显著性降低, m8 和 m21 降低得更多, 同时检测血浆中 OVA 特异性的 IgE 含量, 如图 4C 所示, 和 NC 对照组相比, 实验组和阳性对照组的 IgE 含量显著降低。

实施例 5: 分子理化性质分析

采用分子排阻法检测经一步 Protein A 纯化得到的样品纯度, 结果见图 5 所示, 经积分处理后单体含量均大于 98%, 说明上述分子在表达纯化过程中稳定性较好, 不易形成聚体; 采用疏水色谱法评估 m8 分子的疏水性, 结果如图 6 所示, 其中 control 为低疏水性抗体分子, 出峰较快, 保留时间较短, 而 m8 分子保留时间明显低于阳性抗体 BMK1, 因此疏水性明显低于阳性抗体 BMK1, 对后续工艺开发具有较大优势。

实施例 6: 抗 TSLP 的抗体 Tezepelumab 的制备

已上市的抗 TSLP 单抗 Tezepelumab 的序列源自中国公开专利 CN101809035A, 核酸序列委托金斯瑞公司合成。

Tezepelumab 重链可变区 (TezeHv) 的氨基酸序列为:

QMQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGS
NKHVADSVKGRFTITRDNSKNTLNLMNSLRAEDTAVYYCARAPQWELVHEAFDIWGQGT
MVTVSS (SEQ ID NO: 34)

Tezepelumab 重链恒定区的氨基酸序列为:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVV
SVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 35)

Tezepelumab 轻链可变区 (TezeLv) 的氨基酸序列为:

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNLGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDDSDRPSWIP
ERFGSNGNTATLTISRGEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 36)

Tezepelumab 轻链恒定区的氨基酸序列为:

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPS
KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 37)

Tezepelumab 重链 (Tezepelumab-HC) 的氨基酸序列为:

QMQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSNKH
YADSVKGRFTITRDNSKNTLNLMNSLRAEDTAVYYCARAPQWELVHEAFDIWGQGT
MVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 53)

Tezepelumab 轻链 (Tezepelumab-LC) 的氨基酸序列为:

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNLGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDDSDRPSWIPERF
SGSNGNTATLTISRGEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP
SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLT
PEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 54)

将 Tezepelumab 的重链和轻链 cDNA 序列分别克隆到 pKS001 载体中, 获得表达 Tezepelumab 的重组表达质粒。采用瞬时转染的方式, 将重组质粒转染 ExpiCHOS 细胞 (Thermo

公司), 得到的培养液采用 Protein A 亲和层析纯化后进行检测。

实施例 7: 抗 IL-4R α 的抗体 Dupilumab 的制备

Dupilumab 重链 (Dup-HC) 的氨基酸序列为:

EVQLVESGGGLEQPGGSLRLSCAGSGFTFRDYAMTWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGN
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRLSITIRPRYYGLDVWGQG
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 38)

Dupilumab 轻链 (Dup-LC) 的氨基酸序列为:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSIGYNYLDWYLQKSGQSPQLLIYLGSNRA
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGFYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPS VFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 39)

将 Dupilumab 的重链和轻链 cDNA 序列分别克隆到 pKS001 载体中, 获得表达 Dupilumab 的重组表达质粒。采用瞬时转染的方式, 将重组质粒转染 ExpiCHOS 细胞 (Thermo 公司), 得到的培养液采用 Protein A 亲和层析纯化后进行检测。

实施例 8: 抗 IL-4R 抗体 m8 的制备

m8 分子的重链可变区 (m8Hv) 的氨基酸序列为:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYIYWVRQAPGQGLEWMGGSNPSTGGTL
DNEKFKTRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTRSGRYAPFTYWGQGLTVTVSS
(SEQ ID NO: 28)

m8 分子的重链恒定区的氨基酸序列为:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 40)

m8 分子的轻链可变区 (m8Lv) 的氨基酸序列为:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTSVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRFTGVP
SRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDFATYYCQHYSTTPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 29)

m8 分子的轻链恒定区的氨基酸序列为:

RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 41)

m8 分子的重链 (m8-HC) 的氨基酸序列为:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYIYWVRQAPGQGLEWMGGSNPSTGGTL
DNEKFKTRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTRSGRYAPFTYWGQGLTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK
KDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH

EALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 55)

m8 分子的轻链 (m8-LC) 的氨基酸序列为:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTSVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRFTGVPSRF
SGSGSGTDFTFTISSLPEDFATYYCQHYSTTPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 56)

将 m8 的重链和轻链 cDNA 序列分别克隆到 pKS001 载体中, 获得表达 m8 的重组表达质粒。采用瞬时转染的方式, 将重组质粒转染 ExpiCHOS 细胞 (Thermo 公司), 得到的培养液采用 Protein A 亲和层析纯化后进行检测。

实施例 9: 双特异性抗体的序列设计

1. 序列设计

本发明中的双特异性抗体结构模式为 IgG-scFv 模式, 在一个完整 IgG 抗体的两条重链 C 端均连接另一个抗体的 scFv 片段, 其重链和轻链的主要组成设计如表 9 所示。

基于分子稳定性和活性考虑, 在 Tezepelumab 和 m8 分子的轻链和重链可变区引入突变, 具体序列如下:

Tezepelumab 的重链可变区突变后序列 (MtezeHv) 为:

QMQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRTYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWDGS
NKHVADSVKGRFTITRDNSKNTLNLMNSLR AEDTAVYYCARAPQWELVHEAFDIWGQGT
MVTVSS; (SEQ ID NO: 42)

Tezepelumab 的轻链可变区突变后序列 (MtezeLv) 为:

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGNNLGSKSVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPSWIP
ERFSGSNSGNTATLTISRGEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVF~~CG~~TKLTVL; (SEQ ID NO:
43)

m8 的重链可变区突变后序列 (Mm8Hv) 为:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYIYWVRQAPGQCLEWMGGSNPSTG
GTLDNEKFKTRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRSGRYAPFTYWGQGT~~LV~~TS
S; (SEQ ID NO: 44)

m8 的轻链可变区突变后序列 (Mm8Lv) 为:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTSVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRFTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDFATYYCQHYSTTPFTFG~~CG~~TKLEIK; (SEQ ID NO: 45)

Linker1 的氨基酸序列为 GGGSGGGGS; (SEQ ID NO: 46)

Linker2 的氨基酸序列为 GGGSGGGSGGGSGGGGS; (SEQ ID NO: 47)

表 9-1 MTM 和 MMT 的免疫球蛋白部分的互补决定区的氨基酸序列

分子	名称	序列	编号
MTM	HCDR1	GFTFRTYG	SEQ ID NO: 48
	HCDR2	IWYDGSNK	SEQ ID NO: 49
	HCDR3	ARAPQWELVHEAFD	SEQ ID NO: 50
	LCDR1	NLGSKS	SEQ ID NO: 51
	LCDR2	DDS	/
	LCDR3	QVWDSSSDHV	SEQ ID NO: 52
MMT	HCDR1	GYTFTTYIY	SEQ ID NO: 1
	HCDR2	GSNPSTGGTLDNEKFKT	SEQ ID NO: 2
	HCDR3	SGRYAPFTY	SEQ ID NO: 3
	LCDR1	KASQDVSTVA	SEQ ID NO: 4

	LCDR2	SASYRFT	SEQ ID NO: 5
	LCDR3	QHYSTTPFT	SEQ ID NO: 6

表 9-2 MTM 和 MMT 的重链和轻链的组成

抗 体 编 号	免疫球蛋白部分		linker	scFv 部分
	重链	轻链		
MTM	Tezepelumab-HC (SEQ ID NO: 53)	Tezepelumab-LC (SEQ ID NO: 54)	Linker1	Mm8Hv (SEQ ID NO: 44) -linker2- Mm8Lv (SEQ ID NO: 45)
MMT	m8-HC (SEQ ID NO: 55)	m8-LC (SEQ ID NO: 56)	Linker1	MtezeHv (SEQ ID NO: 42) -linker2- MtezeLv (SEQ ID NO: 43)

MTM 重链 (MTM-HC) 的氨基酸序列为:

QMQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSK
NKHYADSVKGRFTITRDNSKNTLNLMNSLRAEDTAVYYCARAPQWELVHEAFDIWGQGT
MVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKCCVECPKPPAPPVAGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTVQHVDWLNQKEYCKKVSNTKGLPAIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCA
SGYTFTTYYIYWVRQAPGQCLEWMGGSNPSTGGTLDNEKFKTRVTMTVDKSTSTAYMELS
SLRSEDVAVYYCTRSGRYAPFTYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCA
SPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTSAWYQQKPKGAPKLLIYSASYRFTGVPSRFSGSGSG
TDFTFTISSLQPEDFATYYCQHYSTTPFTFGCGTKLEIK (SEQ ID NO: 57)

MTM 轻链 (MTM-LC) 的氨基酸序列为:

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNLGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDDSDRPSWIP
ERFSGSNSGNTATLTISRGEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL
FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPPSKQSNKYAASSYLS
LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 58)

MMT 重链 (MMT-HC) 的氨基酸序列为:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYYIYWVRQAPGQGLEWMGGSNPSTG
GTLDNEKFKTRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRSGRYAPFTYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVPSSSLGKTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHVDWLNQKEYCKKVSNTKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGGSGGGGSQMQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFR
TYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWDGSKNKHYADSVKGRFTITRDNSKNTLNLMNSLRAE
DTAVYYCARAPQWELVHEAFDIWGQGTMTVSSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCA
PPSVSVAPGQTARITCGGNNLGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDDSDRPSWIPERFSGNSG

NTATLTISRGEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFSGCTKLTVL (SEQ ID NO: 59)

MMT 轻链 (MMT-LC) 的氨基酸序列为:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTSWAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRFTGVP
SRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDFATYYCQHYSTTPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 60)

2. 抗体表达和纯化

将以上双抗序列的重链和轻链 cDNA 序列分别克隆到 pKS001 载体中, 获得表达双抗的重组表达质粒。采用瞬时转染的方式, 将重组质粒转染 ExpiCHOS 细胞 (Thermo 公司), 得到的培养液采用 Protein A 亲和层析纯化后进行检测。

3. 抗体检测

采用 SDS-PAGE 方法检测抗体纯度, 具体结果见图 7, 两个分子均可达到 95% 以上的电泳纯度。

实施例 10: 亲和力常数测定

1. 四个双抗分子与 hIL-4Rα 的亲和力测定

采用实时生物传感器表面等离子共振分析 (Biacore 8K), 于 25°C 测定 2 个抗体分子对于 hIL-4Rα 的结合亲和力 (KD)。首先将抗鼠 Fc IgG 抗体偶联至 CM5 芯片, 形成抗体捕获表面, 随后将抗体分子进一步偶联至抗鼠 Fc IgG 抗体上, 偶联流速 10μL/min, 偶联 30s, 将分析物 (hIL-4Rα.ECD) 配置成 1: 2 倍比稀释的 6 个梯度浓度, 依次检测, 结合时间 180s, 解离时间 1800s, 流速 30μL/min。最后利用 BIA 分析软件进行动力学分析, 确定平衡结合常数 Ka、平衡解离常数 Kd 和亲和力常数 KD。测定结果见表 10, 构建得到的 2 个双特异性抗体分子与 hIL4Rα 的亲和力可达到与对照分子 m8 和 Dupilumab 分子相当的水平, 说明其具有高特异性。

表 10 抗体与 hIL-4Rα 的亲和力数据

抗体	抗原	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
MTM	hIL4Rα	5.28E+05	3.48E-05	6.59E-11
MMT		7.27E+05	4.35E-05	5.98E-11
m8		2.85E+05	1.39E-05	4.89E-11
Dupilumab		9.24E+05	5.70E-05	6.16E-11

2. 双抗分子与 hTSLP 的亲和力测定

采用实时生物传感器表面等离子共振分析 (Biacore 8K), 于 25°C 测定 2 个抗体分子对于 hTSLP 的结合亲和力 (KD)。首先将抗鼠 Fc IgG 抗体偶联至 CM5 芯片, 形成抗体捕获表面, 随后将抗体分子进一步偶联至抗鼠 Fc IgG 抗体上, 偶联流速 10μL/min, 偶联 30s, 将分析物 (hTSLP) 配置成 1: 2 倍比稀释的 6 个梯度浓度, 依次检测, 结合时间 180s, 解离时间 1800s, 流速 30μL/min。最后利用 BIA 分析软件进行动力学分析, 确定平衡结合常数 Ka、平衡解离常数 Kd 和亲和力常数 KD。所得结果见表 11, 2 个双特异性抗体分子可保持与对照分子 Tezepelumab 相当的亲和力水平。

表 11 抗体与 hTSLP 的亲和力数据

抗体	抗原	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
MTM	hTSLP	1.18E+07	3.50E-05	2.96E-12
MMT		3.14E+06	5.88E-05	1.88E-11

Tezepelumab		1.11E+07	2.16E-05	1.95E-12
-------------	--	----------	----------	----------

3. MTM 和 MMT 抗体同时结合 hIL-4Rα 和 hTSLP 抗原

采用实时生物传感器表面等离子共振分析 (Biacore 8K), 于 25°C 分别探究 MTM 和 MMT 分子同时结合 hIL-4Rα 和 hTSLP 抗原的能力。首先将抗鼠 Fc IgG 抗体偶联至 CM5 芯片, 形成抗体捕获表面, 随后将 MTM 和 MMT 抗体分子分别进一步偶联至抗鼠 Fc IgG 抗体上, 偶联流速 10μL/min, 偶联 30s。随后将分析物 hIL-4Rα 和 hTSLP 依次流过芯片进行结合能力测试, 结合时间 180s, 通过结合图谱可确定两个抗体分子结合 hIL-4Rα 抗原后依然保持结合 hTSLP 的能力, 图谱见图 8, 图 8A 为偶联 MMT 分子后, 连续进样 hIL-4Rα 和 hTSLP 分子, MMT 均能结合, 图 8B 为偶联 MTM 分子后, 连续进样 hIL-4Rα 和 hTSLP 分子, MTM 均能结合, 说明 MTM 和 MMT 抗体分子可同时结合 hIL-4Rα 和 hTSLP 抗原。

实施例 11: IL-4 和 IL-13 细胞活性评价

1. 报告基因法 (HEK-293T.STAT6-GFP 细胞) 评价双抗分子抑制 IL-4 活性的能力

准备 HEK-293T.STAT6-GFP 细胞, 采用 TransDetect BrightFluore DMEM + 10% FBS 培养基重悬细胞, 并将细胞密度调整为 5E5 cells/mL。按 100μL/孔加入到全黑 96 孔板中, 37°C 孵育 24h。将 hIL-4 用 TransDetect BrightFluore DMEM + 10% FBS 培养基稀释至 1.0ng/mL。用稀释好的 hIL-4 溶液稀释抗体分子, 1: 4 倍比梯度稀释 11 个浓度, 100μL/孔加入 96 孔板中, 轻轻混匀, 37°C 继续培养 24h。采用酶标仪检测荧光信号强度, 激发波长 488nm, 发射波长 520nm, 得到表 12 所示结果, MTM 分子与阳性对照分子 m8 具有相当的抑制 hIL-4 活性的能力。

表 12 报告基因法抑制 hIL-4 活性数据

抗体	IC50 (pM)
MTM	170
m8	210

2. 报告基因法 (HEK-293T.STAT6-GFP 细胞) 评价双抗分子抑制 IL-13 活性的能力

准备 HEK-293T.STAT6-GFP 细胞, 采用 TransDetect BrightFluore DMEM + 10% FBS 培养基重悬细胞, 并将细胞密度调整为 5E5 cells/mL。按 100μL/孔加入到全黑 96 孔板中, 37°C 孵育 24h。将 hIL-13 用 TransDetect BrightFluore DMEM + 10% FBS 培养基稀释至 30ng/mL。用稀释好的 hIL-4 溶液稀释抗体分子, 1: 4 倍比梯度稀释 11 个浓度, 100μL/孔加入 96 孔板中, 轻轻混匀, 37°C 继续培养 24h。采用酶标仪检测荧光信号强度, 激发波长 488nm, 发射波长 520nm, 得到表 13 所示结果, MMT 和 MTM 分子与阳性对照分子 m8、Dupilumab 具有相当的抑制 hIL-13 活性的能力。

表 13 报告基因法抑制 hIL-13 活性数据

抗体	IC50 (pM)
MTM	66.5
MMT	133
m8	80
Dupilumab	41

实施例 12: 报告基因法 (HEK-293T-hTSLPR-IL7Ra-STAT5-Luciferase 细胞) 评价双抗分子抑制 TSLP 活性的能力

准备 HEK-293T-hTSLPR-IL7Ra-STAT5-Luciferase 细胞, 采用 DMEM + 10% FBS 培养基重悬细胞, 并将细胞密度调整为 5E5 cells/mL。按 100μL/孔加入到全黑 96 孔板中, 37°C 孵育 24h。将 hTSLP 用 DMEM + 10% FBS 培养基稀释至 5ng/mL。用稀释好的 hTSLP 溶液稀释抗体分子, 1: 3 倍比梯度稀释 11 个浓度, 100μL/孔加入 96 孔板中, 轻轻混匀, 37°C 继续培

养 24h。提前将发光底物取出置于室温，待样品孵育结束后，将 96 孔板取出置于室温放置 10 分钟，随后每孔加入 100μL 发光底物，室温避光孵育 2 分钟，采用酶标仪检测发光信号强度。得到表 14 所示结果，MTM 和 MMT 分子与阳性对照分子 Tezepelumab 具有相当的抑制 hTSLP 活性的能力。

表 14 报告基因法抑制 hTSLP 活性数据

抗体	IC50 (nM)
MTM	0.14
MMT	0.30
Tezepelumab	0.12

实施例 13: MTM 抗体抑制人 PBMC 细胞表达趋化因子 17 (CCL17) 的能力

人 PBMC 细胞购自于上海澳能生物技术有限公司。采用 RPMI1640+10%FBS 培养基复苏人 PBMC 细胞，复苏后置于 37°C 培养 2h，待细胞活化完成后，采用不含 FBS 的 RPMI1640 培养基洗涤细胞两次，再用不含 FBS 的 RPMI1640 培养基重悬细胞后计数。按照 100,000 个细胞每孔进行铺板 96 孔板，每孔 100μL。用不含 FBS 的 RPMI1640 培养基稀释 IL-13 和 TSLP，浓度均为 20ng/mL，用稀释液将抗体分子稀释至等摩尔浓度，随后将药液加入对应孔中，然后在 37°C 条件下继续培养 48h，收集细胞培养上清采用夹心 ELISA 法检测上清中 CCL17 的含量。检测结果见图 9，PBMC 细胞分别在 IL-13 和 TSLP 刺激下，均可以诱导不同程度的 CCL17 分泌，同时添加 IL-13 和 TSLP 时，刺激效果最强；IL-13 和 TSLP 同时刺激时，分别给药 Tezepelumab (Teze) 和 Dupilumab (Dup)，相比无抗体添加的对照组，单抗可以部分抑制 CCL17 的分泌；同时给药 Tezepelumab (Teze) 和 Dupilumab (Dup)，或 Tezepelumab (Teze) 和 m8 可显著抑制 CCL17 的分泌；单独给药 MTM 双抗，可达到甚至优于单抗联合给药的抑制效果。

实施例 14: MTM 抗体在 B-hIL4/IL4R 人源化小鼠哮喘模型上的体内药效评价

采用 OVA (鸡卵清蛋白, Sigma, 货号 A5503) 作为诱导剂，在 B-hIL4/IL4R 人源化小鼠上建立哮喘模型 (doi.org/10.1016/j.imbio.2020.151998)。实验小鼠分 4 组，G1 (非造模组) 4 只动物，G2-G4 每组 6 只动物，其中 G1 组为空白对照组，G2 组为同型对照组，G3 组为 m8 对照品处理组，给药剂量 25mg/kg，G4 为 MTM 受试品处理组，给药剂量为 34mg/kg，给药方式为腹腔给药，造模第 13 天开始给药，给药时间点为 13、16、20 和 23 天，一共给药 4 次。给药结束后第 26 天进行动物取血和解剖，进行嗜酸性粒细胞和 IgE 水平分析，实验结果见图 10，从结果分析，MTM 分子具有与 m8 对照分子相当的药效活性，说明针对 hIL4R 靶点的作用通路，MTM 分子在体内药效评价中显示出与单抗 m8 相当的哮喘治疗的潜力。

实施例 15: MTM 抗体在 B-hTSLP/TSLPR/hIL7R 人源化小鼠哮喘模型上的体内药效评价

采用 TSLP (ACRO, 货号 TSP-H52Hb) +OVA (鸡卵清蛋白, Sigma, 货号 A5503) 作为诱导剂，在 B-hTSLP/TSLPR/hIL7R 人源化小鼠上建立哮喘模型，分别在第 0、2、4、6、8、10、12 天，G1 组动物滴鼻 20 μL PBS，G2-G4 组的每只动物滴鼻 20 μL 浓度为 TSLP+OVA (1 μg+10 μg) 混合液，一共 7 次滴鼻诱导。G1 组为空白对照组，G2 组为同型对照组，G3 组为 Tezepelumab (10 mg/kg) 对照品处理组，G4 组为 TM (14 mg/kg) 受试品处理组，分别在 day-1 和 6，一共 2 次给药，给药方式为腹腔给药。给药结束后进行动物取血和解剖，进行嗜酸性粒细胞和 IgE 水平分析，实验结果见图 11，从结果分析，MTM 分子具有与 Tezepelumab 对照分子相当的药效活性，说明针对 hTSLP 靶点的作用通路，MTM 分子在体内药效评价中显示出与单抗 Tezepelumab 相当的哮喘治疗的潜力。

实施例 16: MTM 高浓度样品制备

1. 稳定表达 MTM 分子的细胞构建

将 MTM 分子序列的重链和轻链 cDNA 序列分别克隆到 pKS001 载体中，获得表达双抗的重组表达质粒。采用 MSX 加压筛选的方式，将重组质粒转染 CHO-K1 细胞(Merck 公司)，加压筛选获得稳定表达 MTM 的稳转细胞池，将稳转细胞池进行发酵培养，收获表达 MTM 的发酵上清。

2. MTM 分子超滤浓缩

发酵上清经 Protein A 亲和层析纯化后收集纯度大于 95%的样品，随后采用 30kDa 超滤管对样品进行超滤浓缩，置换至 20mM 醋酸钠，pH5.0，加 100mM L-脯氨酸缓冲液中，最终浓度可大于 100mg/mL。

实施例 17：稳定性评价实验

将浓缩后的样品采用 20mM 醋酸钠，pH5.0，加 100mM L-脯氨酸缓冲液稀释至 100mg/mL 和 10mg/mL，在 4℃、25℃和 40℃条件下进行稳定性研究，前两个温度为 100mg/mL 浓度，40℃为 10mg/mL 浓度，SEC-HPLC 检测样品纯度变化，检测结果见表 15，样品经过 4 周的高温加速后，单体纯度变化小于 5%，4℃和 25℃条件下，单体含量降低不到 2%，说明 MTM 双抗分子具有较好的稳定性。

表 15 稳定性评价结果

温度（℃）	浓度（mg/mL）	时间（周）	单体（%）	Δ 单体（%）
T0	100	0	96.4	0.0
4.0	100	4	95.9	-0.5
25.0	100	4	94.9	-1.5
40.0	10	2	94.7	-1.7
	10	4	93.7	-2.7

可以理解的是，以上实施方式仅仅是为了说明本发明的原理而采用的示例性实施方式，然而本发明并不局限于此。对于本领域普通技术人员而言，在不脱离本发明的原理和实质的情况下，可以做出各种变型和改进，这些变型和改进也视为本发明的保护。

权利要求

1.一种抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段,其特征在于,其包括重链互补决定区和轻链互补决定区,

所述重链互补决定区包括 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,所述 HCDR1 为 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列;所述 HCDR2 为 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列;所述 HCDR3 为 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列;

所述轻链互补决定区包括 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3,所述 LCDR1 为 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列;所述 LCDR2 为 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列;所述 LCDR3 为 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 11 或 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

2.根据权利要求 1 所述的抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段,其特征在于,其包含:

(1) 重链互补决定区,其包含 SEQ ID NO: 1 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 2 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR3;和

轻链互补决定区,其包含 SEQ ID NO: 4 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 5 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO: 6 所示的 LCDR3;或者

(2) 重链互补决定区,其包含 SEQ ID NO: 1 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR3;和

轻链互补决定区,其包含 SEQ ID NO: 4 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 5 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO: 8 所示的 LCDR3;或者

(3) 重链互补决定区,其包含 SEQ ID NO: 1 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3;和

轻链互补决定区,其包含 SEQ ID NO: 4 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 5 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO: 8 所示的 LCDR3;或者

(4) 重链互补决定区,其包含 SEQ ID NO: 1 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 10 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR3;和

轻链互补决定区,其包含 SEQ ID NO: 4 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 5 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO: 11 所示的 LCDR3;或者

(5) 重链互补决定区,其包含 SEQ ID NO: 12 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR3;和

轻链互补决定区,其包含 SEQ ID NO: 15 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 16 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR3。

3.根据权利要求 1 所述的抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段,其特征在于,其进一步包括:

源自人胚系重链 IGHV1-46*01+IGHJ1*01 的框架区序列或与其具有至少 90%同一性的回复突变序列;或

源自人胚系轻链 IGKV1-39*01+IGKJ2*01 的框架区序列或与其具有至少 90%同一性的回复突变序列。

4.根据权利要求 1 所述抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段,其特征在于,该抗体或其抗原结合片段为鼠源抗体、嵌合抗体、人抗体、人源化抗体、双抗体或其抗原结合片段。

5.根据权利要求 1 所述抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段,其特征在于,其包括:

(1) 重链可变区包含如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列和轻链可变区包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列;

(2) 重链可变区包含如 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列和轻链可变区包含 SEQ ID

NO: 31 所示的氨基酸序列;

(3) 重链可变区包含如 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列和轻链可变区包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列;

(4) 重链可变区包含如 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列和轻链可变区包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列; 或

(5) 重链可变区包含如 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列和轻链可变区包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。

6. 根据权利要求 5 所述的抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 包括 90% 或以上同一性的氨基酸序列。

7. 一种融合蛋白, 其包含权利要求 1-6 任一项所述的抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段。

8. 编码如权利要求 1-6 任一所述抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。

9. 一种包含如权利要求 8 所述的多核苷酸的表达载体。

10. 包含权利要求 8 所述载体的宿主细胞, 所述宿主细胞为原核细胞或真核细胞。

11. 一种药物组合物, 包括权利要求 1-6 任一所述抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段或权利要求 7 所述融合蛋白与药学上可接受的辅料。

12. 权利要求 1-6 任一所述的抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段、权利要求 7 的融合蛋白或权利要求 11 所述的药物组合物在制备治疗过敏性疾病的药物中的应用。

13. 根据权利要求 12 所述的应用, 所述过敏性疾病为特应性皮炎、哮喘、过敏性鼻炎、部分慢性鼻窦炎伴鼻息肉, 或慢性阻塞性肺炎。

14. 一种抗 IL-4R α 和抗 TSLP 的双特异性抗体, 其特征在于, 所述双特异性抗体包含选自权利要求 1-6 中任一项所述的抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段。

15. 根据权利要求 14 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述双特异性抗体包含免疫球蛋白 IgG 和单链抗体 scFv, 所述双特异性抗体选自以下组别之一:

(1) 所述免疫球蛋白 IgG 包含抗 TSLP 抗体或其抗原结合片段, 所述单链抗体 scFv 包含选自权利要求 1-6 中任一项所述的抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段; 或

(2) 所述免疫球蛋白 IgG 包含选自权利要求 1-6 中任一项所述的抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段, 所述单链抗体 scFv 包含抗 TSLP 抗体或其抗原结合片段。

16. 根据权利要求 15 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述抗 TSLP 抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区, 其中

所述重链可变区包括 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述 HCDR1 为 SEQ ID NO: 48 所示的氨基酸序列; 所述 HCDR2 为 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列; 所述 HCDR3 为 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列;

所述轻链可变区包括 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 所述 LCDR1 为 SEQ ID NO: 51 所示的氨基酸序列; 所述 LCDR2 的氨基酸序列为 DDS; 所述 LCDR3 为 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列。

17. 根据权利要求 15 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区, 其中,

所述重链可变区包括 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述 HCDR1 为 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列; 所述 HCDR2 为 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列; 所述 HCDR3 为 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列;

所述轻链可变区包括 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 所述 LCDR1 为 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列; 所述 LCDR2 为 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列; 所述 LCDR3 为 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。

18. 根据权利要求 15 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述抗 TSLP 抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区, 其中,

所述重链可变区具有 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列, 所述轻链可变区具有 SEQ ID NO: 43 所示的氨基酸序列, 或者,

所述重链可变区具有 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列, 所述轻链可变区具有 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

19. 根据权利要求 15 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述抗 IL-4R α 抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区, 其中,

所述重链可变区具有 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列, 所述轻链可变区具有 SEQ ID NO: 45 所示的氨基酸序列, 或者

所述重链可变区具有 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列, 所述轻链可变区具有 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列。

20. 根据权利要求 15 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述免疫球蛋白 IgG 和单链抗体 scFv 通过接头连接, 所述接头为 (GGGGS) n , n 为 1-5 的正整数, 优选为如 SEQ ID NO: 46 所示的氨基酸序列。

21. 根据权利要求 15 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述单链抗体 scFv 还含有连接 scFv 的重链可变区和轻链可变区的接头, 所述接头为 (GGGGS) n , n 为 1-5 的正整数, 优选为如 SEQ ID NO: 47 所示的氨基酸序列。

22. 根据权利要求 15 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述双特异性抗体选自以下组别中的任一组:

(1) 所述免疫球蛋白 IgG 包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示的重链可变区、SEQ ID NO: 35 所示的重链恒定区、SEQ ID NO: 36 所示的轻链可变区和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 37 所示的轻链恒定区, 所述单链抗体 scFv 部分具有氨基酸序列如 SEQ ID NO: 44 所示的重链可变区和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 45 所示的轻链可变区; 或

(2) 所述免疫球蛋白 IgG 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 28 所示的重链可变区、如 SEQ ID NO: 40 所示的重链恒定区、SEQ ID NO: 29 所示的轻链可变区和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 41 所示的轻链恒定区, 所述单链抗体 scFv 部分具有氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示的重链可变区和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 43 所示的轻链可变区。

23. 根据权利要求 22 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述双特异性抗体选自以下组别中的任一组:

(1) 所述双特异性抗体包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 57 所示的重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 58 所示的轻链; 或

(2) 所述双特异性抗体包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 59 所示的重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 60 所示的轻链。

24. 一种药物组合物, 包括权利要求 14-23 任一所述双特异性抗体或其抗原结合片段与药学上可接受的辅料。

25. 权利要求 14-23 中任一项所述的双特异性抗体或权利要求 24 所述的药物组合物在制备治疗中重度哮喘、中重度特应性皮炎、过敏性鼻炎、部分慢性鼻窦炎伴鼻息肉、慢性阻塞性肺病的药物中的应用。