用于结合白细胞介素 4 受体的抗体

技术领域

本发明涉及生物制药领域，具体而言，本发明涉及能够结合白细胞介素 4（IL-4）受体（IL-4R）的抗体及其用途。

背景技术

白细胞介素-4（IL-4）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 涉及多种生物学过程，已知其生物作用包括刺激活化 B 细胞和 T 细胞增殖、$CD4^+$ T 细胞分化成 II 型辅助 T 细胞。研究表明，IL-4 在介导过敏性疾病、自身免疫性疾病、感染性疾病、肿瘤等疾病的免疫反应中有多重作用，对肿瘤、自身免疫性疾病和感染性疾病等有治疗作用，并且 IL-4 对疫苗免疫应答具有调节作用，因此，IL-4 一直是人们关注的研究热点之一。

IL-13 也是由活化的 T 细胞分泌产生的一种细胞因子，在不同的细胞类型如单核细胞、B 细胞、肥大细胞和角质形成细胞中具有不同功能。IL-13 能抑制单核细胞释放炎性细胞因子和化学因子，诱导 B 细胞增殖和分化，促进 IgE 合成。IL-13 与 IL-4 在生物功能方面有许多共性，包括抑制单核细胞释放炎症介质，诱导巨噬细胞树突样变，促进单核细胞表面表达 CD23 及刺激 B 细胞合成免疫球蛋白。同时 IL-13 也具有自身的生物学功能特点，主要包括：促进人单核细胞分化及细胞表面抗原发生改变；诱导 B 细胞增殖，分化，促进 B 细胞分泌抗体；调节 IgE 合成，与机体变态反应相关；抑制肿瘤细胞生长；抑制 HIV 的复制等。

IL-4 的生物活性是由特异的细胞表面 IL-4 受体（IL-4R，在人类中为“hIL-4R”）介导的。人 IL-4R 是由两条多肽链形成的异二聚体，其中一条 α 链（hIL-4Rα，UniProtKB: P24394）对 IL-4 有很高的亲和力。并且研究表明，IL-13 的细胞表面受体 α 链（IL-13Rα 链）也和 IL-4Rα 链共同组成另一种形式的 IL-4R 复合体。由于在 IL-4R 复合物中 IL-4Rα 链对 IL-4 的结合起主导作用，并且其还涉及其他细胞因子，因此目前人们把 IL-4Rα 链作为主要对象开展研究，并且针对该靶点的人单克隆抗体已经在临床上证明可以有效缓解和治疗哮喘、湿疹以及特应性皮炎等症状。

已知人白细胞介素-4 受体可产生一种可溶形式的蛋白（shIL-4Rα，SEQ ID NO. 94），这种可溶形式的蛋白可以抑制 IL-4 介导的细胞增殖和 T 细胞介导的 IL-5 上调。该受体的两种形式与过敏反应相关，其表现为过敏性鼻炎、鼻窦炎、哮喘或湿疹等病症。因此将该蛋白作为靶点的阻断抗体有助于治疗和缓解此类疾病。

哮喘（Asthma）是一种由多种炎症细胞如嗜酸性粒细胞、肥大细胞和淋巴细胞共同参与的慢性气道炎症性疾病，其具体发病机制目前尚不清楚。IL-4 等细胞因子在支气管哮喘发生发展中起着十分重要的作用，研制 IL-4 的特异性抗体是解决哮喘治疗的有效途径之一。抑制 IL-4/IL-4Rα 可以对哮喘起到有效的免疫调节作用。

过敏性鼻炎（allergic rhinitis，AR）与哮喘的发病机制有许多共同之处，均属于 I 型变态反应。研究发现，IL-4、IL-17 和 IgE 在过敏性鼻炎的发病机制中扮演了重要的角色。药物治疗是目前 AR 治疗的重点，其中，鼻用皮质类固醇和抗组胺药物处于核心地位。

特应性皮炎（atopic dermatitis，AD），又称异位性皮炎或遗传过敏性皮炎，是皮肤科常见疾病，多见于儿童和青少年，常与某些遗传过敏性疾病如过敏性鼻炎、哮喘等并发。IL-4 和 IL-13 等细胞因子参与的免疫因素是其主要发病机制之一。

嗜酸粒细胞性食管炎（eosinophilic esophagitis，EoE）是以食管壁全层嗜酸粒细胞（eosinophils，EOS）浸润为特征的慢性免疫性炎性疾病。EoE 发病与 Th2 细胞功能紊乱相关。目前特异性强的方案，如新型生物制剂抗 IL-5（如美泊利单抗）成为研究的热点。免疫调节治疗已在动物模型中取得成果，但人类临床试验仍需探索。PGD2 抑制剂、抗 TNF-α、抗 IL-13 等药物正在探索中。

目前针对 hIL-4R 靶点的单克隆抗体药物进入临床试验，如 Dupilumab，在治疗特应性皮炎的 II 期临床中表现出了较好疗效。除 Dupilumab 以外，亦有公司申请了针对 hIL-4R 的其他单克隆抗体专利，如 US 7,186,809 和 US 7,638,606。

发明内容

本发明通过抗体筛选和优化获得了针对 IL-4R 的特异性抗体，所述抗体能够作为 IL-4 与 IL-4R 结合的阻断剂，通过与 IL-4R 结合，可以用于治疗炎症或过敏性疾病等。

参照 SEQ ID NO: 58 所示序列的氨基酸残基编号，本发明的抗体在包含的轻链可变区（VL）的第 31 位具有丝氨酸（31Ser），并且参照 SEQ ID NO: 93 所示序列的氨基酸残基编号，所述抗体在包含的重链可变区（VH）的第 103 位具有天冬氨酸（103Asp），在第 104 位具有酪氨酸（104Tyr）。其中，该 31Ser 相应地在本发明抗体的轻链可变区的 CDR1 中，该 103Asp 和 104Tyr 相应地在本发明抗体的重链可变区的 CDR3 中。

优选地，本发明的抗体的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 2 所示的 CDR1，并且所述抗体的重链可变区包含 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR3;

优选地，本发明的抗体的轻链可变区包含选自下述的 CDR1、CDR2 和 CDR3 组合:

(1) SEQ ID NO: 2 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 3 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 5 所示的 CDR3;

(2) SEQ ID NO: 2 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 4 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 5 所示的 CDR3;

(3) SEQ ID NO: 2 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 3 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 6 所示的 CDR3;

(4) SEQ ID NO: 2 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 3 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 7 所示的 CDR3;

(5) SEQ ID NO: 2 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 3 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 8 所示的 CDR3;

(6) SEQ ID NO: 2 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 4 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 6 所示的 CDR3;

(7) SEQ ID NO: 2 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 4 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 7 所示的 CDR3；和

(8) SEQ ID NO: 2 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 4 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 8 所示的 CDR3；并且

本发明的抗体的重链可变区包含选自下述的 CDR1、CDR2 和 CDR3 组合:

(1) SEQ ID NO: 14 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 17 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR3;

(2) SEQ ID NO: 14 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 18 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR3;

(3) SEQ ID NO: 15 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 17 所示的 CDR2 和 SEQ

ID NO: 19 所示的 CDR3;

(4) SEQ ID NO: 15 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 18 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR3;

(5) SEQ ID NO: 16 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 18 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR3；和

(6) SEQ ID NO: 16 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 17 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR3;

更优选地，本发明的抗体包含选自下述序列所示氨基酸序列的轻链可变区：SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55 和 SEQ ID NO: 57，并且所述抗体包含选自下述序列所示氨基酸序列的重链可变区：SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 78、SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 91 和 SEQ ID NO: 92;

进一步优选地，本发明的抗体包含选自下述的轻链可变区和重链可变区组合:

(1) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 62 所示的重链可变区;

(2) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 63 所示的重链可变区;

(3) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 59 所示的重链可变区;

(4) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 60 所示的重链可变区;

(5) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 61 所示的重链可变区;

(6) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 67 所示的重链可变区;

(7) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 65 所示的重链可变区;

(8) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 66 所示的重链可变

区；

(9) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 64 所示的重链可变区；

(10) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 91 所示的重链可变区；

(11) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 74 所示的重链可变区；

(12) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 75 所示的重链可变区；

(13) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 76 所示的重链可变区；

(14) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 77 所示的重链可变区；

(15) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 78 所示的重链可变区；

(16) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 80 所示的重链可变区；

(17) SEQ ID NO. 40 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(18) SEQ ID NO. 41 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(19) SEQ ID NO. 44 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(20) SEQ ID NO. 44 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 62 所示的重链可变区；

(21) SEQ ID NO. 44 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 91 所示的重链可变区；

(22) SEQ ID NO. 49 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(23) SEQ ID NO. 50 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(24) SEQ ID NO. 45 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(25) SEQ ID NO. 46 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区;

(26) SEQ ID NO. 47 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区;

(27) SEQ ID NO. 55 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区;

(28) SEQ ID NO. 55 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 62 所示的重链可变区;

(29) SEQ ID NO. 55 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 91 所示的重链可变区;

(30) SEQ ID NO. 54 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区;

(31) SEQ ID NO. 54 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 62 所示的重链可变区;

(32) SEQ ID NO. 54 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 91 所示的重链可变区; 和

(33) SEQ ID NO. 51 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区。

另一方面，本发明提供一种能够结合白细胞介素 4（IL-4）受体（IL-4R）的抗体，所述抗体包含轻链可变区（VL），所述轻链可变区包含选自下述的 CDR1、CDR2 和 CDR3 组合:

(1) SEQ ID NO: 1 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 3 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 5 所示的 CDR3;

(2) SEQ ID NO: 2 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 3 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 5 所示的 CDR3;

(3) SEQ ID NO: 2 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 4 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 5 所示的 CDR3;

(4) SEQ ID NO: 1 所示的 CDR1，SEQ ID NO.4 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 5 所示的 CDR3;

(5) SEQ ID NO: 2 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 3 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 6 所示的 CDR3;

(6) SEQ ID NO: 2 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 3 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 7 所示的 CDR3;

(7) SEQ ID NO: 2 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 3 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 8 所示的 CDR3;

(8) SEQ ID NO: 1 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 3 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 6 所示的 CDR3;

(9) SEQ ID NO: 2 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 4 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 6 所示的 CDR3;

(10) SEQ ID NO: 2 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 4 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 8 所示的 CDR3;

(11) SEQ ID NO: 1 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 4 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 8 所示的 CDR3；和

(12) SEQ ID NO: 1 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 3 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 8 所示的 CDR3;

和/或

所述抗体包含重链可变区（VH），所述重链可变区包含选自下述的 CDR1、CDR2 和 CDR3 组合:

(1) SEQ ID NO: 14 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 17 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR3;

(2) SEQ ID NO: 14 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 18 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR3;

(3) SEQ ID NO: 14 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 17 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 20 所示的 CDR3;

(4) SEQ ID NO: 14 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 18 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 20 所示的 CDR3;

(5) SEQ ID NO: 15 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 17 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR3;

(6) SEQ ID NO: 16 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 17 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR3；和

(7) SEQ ID NO: 14 所示的 CDR1，SEQ ID NO: 18 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR3。

进一步地，关于本发明的上述抗体的框架区，优选地，本发明的抗体的轻链可变区包含选自下述的 FR1、FR2、FR3 和 FR4 组合:

(1) SEQ ID NO: 9 所示的 FR1，SEQ ID NO: 10 所示的 FR2，SEQ ID NO: 12 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 13 所示的 FR4；和

(2) SEQ ID NO: 9 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。

优选地，所述抗体的重链可变区包含选自下述的 FR1、FR2、FR3 和 FR4 组合:

(1) SEQ ID NO: 21 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO: 34 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4;

(2) SEQ ID NO: 22 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO: 34 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4;

(3) SEQ ID NO: 23 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO: 34 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4;

(4) SEQ ID NO: 24 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO: 34 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4;

(5) SEQ ID NO: 24 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO: 35 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4;

(6) SEQ ID NO: 25 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO: 34 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4;

(7) SEQ ID NO: 26 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO: 34 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4;

(8) SEQ ID NO: 27 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO: 34 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4;

(9) SEQ ID NO: 29 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO: 34 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4;

(10) SEQ ID NO: 30 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO: 34 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4;

(11) SEQ ID NO: 24 所示的 FR1，SEQ ID NO: 33 所示的 FR2，SEQ ID NO: 34 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4;

(12) SEQ ID NO: 24 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO: 36 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4;

(13) SEQ ID NO: 24 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO: 37 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4;

(14) SEQ ID NO: 31 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO: 34 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4;

(15) SEQ ID NO: 27 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO:

35 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4;

(16) SEQ ID NO: 26 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO: 35 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4;

(17) SEQ ID NO: 25 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO: 35 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4;

(18) SEQ ID NO: 28 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO: 35 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4;

(19) SEQ ID NO: 28 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO: 34 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4;

(20) SEQ ID NO: 23 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO: 35 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4;

(21) SEQ ID NO: 22 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO: 35 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4; 和

(22) SEQ ID NO: 21 所示的 FR1，SEQ ID NO: 32 所示的 FR2，SEQ ID NO: 35 所示的 FR3 和 SEQ ID NO: 38 所示的 FR4。

按照本领域公知的抗体轻链可变区、重链可变区的结构域组成，本发明抗体的轻链可变区或重链可变区以 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的顺序包含上述结构域组分，或者以(X)n-FR1-(X)n-CDR1-(X)n-FR2-(X)n-CDR2-(X)n-FR3-(X)n-CDR3-(X)n-FR4-(X)n 的顺序包含上述结构域组分，其中 X 为任意氨基酸残基，n 为零或大于零的整数。

优选地，本发明提供的抗体包含选自下述序列所示氨基酸序列的轻链可变区:

SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 57 和 SEQ ID NO: 58;

和/或

本发明提供的抗体包含选自下述序列所示氨基酸序列的重链可变区:

SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 76、

SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 78、SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 85、SEQ ID NO: 86、SEQ ID NO: 87、SEQ ID NO: 88、SEQ ID NO: 89、SEQ ID NO: 90、SEQ ID NO: 91、SEQ ID NO: 92 和 SEQ ID NO: 93。

根据本发明的具体实施方式，本发明提供的抗体包含选自下述的轻链可变区和重链可变区组合:

(1) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 62 所示的重链可变区;

(2) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 63 所示的重链可变区;

(3) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 59 所示的重链可变区;

(4) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 60 所示的重链可变区;

(5) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 61 所示的重链可变区;

(6) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 67 所示的重链可变区;

(7) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 65 所示的重链可变区;

(8) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 66 所示的重链可变区;

(9) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 64 所示的重链可变区;

(10) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 68 所示的重链可变区;

(11) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 69 所示的重链可变区;

(12) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 70 所示的重链可变区;

(13) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 71 所示的重链可变区;

(14) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 72 所示的重链可

变区；

(15) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 73 所示的重链可变区；

(16) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 89 所示的重链可变区；

(17) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 88 所示的重链可变区；

(18) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 87 所示的重链可变区；

(19) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 86 所示的重链可变区；

(20) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 83 所示的重链可变区；

(21) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 82 所示的重链可变区；

(22) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 81 所示的重链可变区；

(23) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 85 所示的重链可变区；

(24) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 84 所示的重链可变区；

(25) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 91 所示的重链可变区；

(26) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 90 所示的重链可变区；

(27) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 74 所示的重链可变区；

(28) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 75 所示的重链可变区；

(29) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 76 所示的重链可变区；

(30) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 77 所示的重链可变区；

(31) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 78 所示的重链可变区；

(32) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 80 所示的重链可变区；

(33) SEQ ID NO. 39 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(34) SEQ ID NO. 40 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(35) SEQ ID NO. 41 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(36) SEQ ID NO. 42 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(37) SEQ ID NO. 43 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(38) SEQ ID NO. 44 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(39) SEQ ID NO. 44 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 62 所示的重链可变区；

(40) SEQ ID NO. 44 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 68 所示的重链可变区；

(41) SEQ ID NO. 44 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 72 所示的重链可变区；

(42) SEQ ID NO. 44 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 82 所示的重链可变区；

(43) SEQ ID NO. 44 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 85 所示的重链可变区；

(44) SEQ ID NO. 44 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 91 所示的重链可变区；

(45) SEQ ID NO. 48 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(46) SEQ ID NO. 49 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(47) SEQ ID NO. 50 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可

变区；

(48) SEQ ID NO. 45 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(49) SEQ ID NO. 46 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(50) SEQ ID NO. 47 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(51) SEQ ID NO. 56 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(52) SEQ ID NO. 55 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(53) SEQ ID NO. 55 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 62 所示的重链可变区；

(54) SEQ ID NO. 55 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 68 所示的重链可变区；

(55) SEQ ID NO. 55 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 72 所示的重链可变区；

(56) SEQ ID NO. 55 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 82 所示的重链可变区；

(57) SEQ ID NO. 55 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 85 所示的重链可变区；

(58) SEQ ID NO. 55 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 91 所示的重链可变区；

(59) SEQ ID NO. 54 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(60) SEQ ID NO. 54 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 62 所示的重链可变区；

(61) SEQ ID NO. 54 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 68 所示的重链可变区；

(62) SEQ ID NO. 54 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 72 所示的重链可变区；

(63) SEQ ID NO. 54 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 82 所示的重链可变区；

(64) SEQ ID NO. 54 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 85 所示的重链可变区；

(65) SEQ ID NO. 54 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 91 所示的重链可变区；

(66) SEQ ID NO. 53 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(67) SEQ ID NO. 51 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(68) SEQ ID NO. 52 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(69) SEQ ID NO. 52 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 62 所示的重链可变区；和

(70) SEQ ID NO. 52 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 91 所示的重链可变区；

(71) SEQ ID NO. 58 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 92 所示的重链可变区；

(72) SEQ ID NO. 57 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 93 所示的重链可变区；

(73) SEQ ID NO. 44 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 93 所示的重链可变区；

(74) SEQ ID NO. 58 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 91 所示的重链可变区；

(75) SEQ ID NO. 55 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 93 所示的重链可变区；和

(76) SEQ ID NO. 51 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO. 93 所示的重链可变区。

本发明提供的抗体能够结合 IL-4R，作为 IL-4R 的拮抗剂发挥作用。优选地，所述抗体能够结合 IL-4Rα，优选结合哺乳动物类 IL-4Rα，更优选结合人 IL-4Rα，甚至更优选结合人可溶性 IL-4Rα。

可以通过 Biacore 或 ELISA 方法测定本发明提供的抗体与 IL-4Rα 的结合亲和力。测得所述抗体能够以小于 100nM、小于 10nM、小于 1nM、小于 0.5nM 和甚至小于 0.1nM 亲和力结合 IL-4Rα。

在相同条件下，本发明提供的抗体与参照抗体的表达量比为 0.1-3:1，优

选 0.3-3:1，更优选 0.4-3:1，更优选 0.5-3:1，更优选 0.6-3:1，更优选 0.7-3:1，更优选 1-3:1。

就抗体类别而言，本发明提供的抗体可以是单克隆抗体、完全或部分人源化抗体或嵌合抗体;

或者优选地，所述抗体为免疫球蛋白，优选为 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM，更优选为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚型，更优选为 IgG2 或 IgG4 亚型。

另一方面，本发明提供一种融合蛋白或偶联物，所述融合蛋白或偶联物包含本发明所述的抗体。该融合蛋白或偶联物还包含通过化学或物理方法结合于本发明所述抗体的细胞表面受体、活性蛋白及多肽、小分子化合物如氨基酸和糖类、小分子聚合物或对本发明所述抗体进行化学修饰的其它部分等。

又一方面，本发明提供一种核酸序列，所述核酸序列能够编码本发明所提供抗体的重链可变区和/或轻链可变区;

优选地，所述核酸序列能够编码本发明提供抗体的重链和/或轻链。

再一方面，本发明还提供一种包含本发明提供的核酸序列的载体。所述载体可以为真核表达载体、原核表达载体、人工染色体及噬菌体载体等。

上述载体或核酸序列可以用于转化或转染宿主细胞，用于保存或抗体表达等目的。因此，本发明还提供一种采用所述核酸序列或载体转化或转染的宿主细胞。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞，例如细菌或昆虫、真菌、植物或动物细胞。

本发明提供的抗体可以利用本领域已知的任何方法获得。例如，可以先由本发明提供的核酸序列获得所述抗体的重链可变区和/或轻链可变区，或者获得所述抗体的重链和/或轻链，然后与所述抗体的任选其他结构域组装成抗体; 或者，在允许本发明提供的宿主细胞表达所述抗体的重链可变区和/或轻链可变区或者所述抗体的重链和/或轻链以组装成所述抗体的情况下，培养所述宿主细胞。

任选地，所述方法还包括回收产生的抗体的步骤。

本发明提供的抗体、融合蛋白或偶联物、核酸序列、载体、宿主细胞或者通过上述方法生产的抗体可以被包含在药物组合物中，更特别地被包含在药物制剂中，从而根据实际需要用于各种目的。因此，在又一方面，本发明还提供一种药物组合物，所述药物组合物包含本发明所述的抗体、融合蛋白或偶联物、核酸序列、载体、宿主细胞和/或通过上述方法生产的抗体。

可选地，所述药物组合物可以是药物制剂。所述药物制剂例如为注射剂剂型。

取决于特定剂型，所述药物组合物或药物制剂还包含药学上可接受的载体或赋形剂。

在药物组合物或药物制剂中，还可以包含至少一种选自下述的药物：平喘药如沙丁胺醇等，抗组胺药如氯雷他定等，免疫抑制剂如他克莫司、吡美莫司等，M 受体阻断剂如异丙托溴铵等，白三烯受体阻断药如孟鲁司特等，磷酸二酯酶抑制剂如茶碱等，非甾体抗炎药如 5-氨基水杨酸等，激素类如倍氯米松，布地奈德等，即本发明提供的抗体、融合蛋白或偶联物、核酸序列、载体、宿主细胞或者通过上述方法生产的抗体可以根据需要与其他药物联合使用。

再一方面，本发明还提供所述抗体、融合蛋白或偶联物、核酸序列、载体、宿主细胞和/或通过所述方法生产的抗体在制备用于预防、治疗或改善炎症或过敏性疾病中的用途;

优选地，所述炎症或过敏性疾病包括自身免疫学疾病，例如过敏性皮炎、哮喘、嗜酸性粒细胞食管炎、湿疹、过敏性鼻炎、鼻息肉、类风湿性关节炎等。

还一方面，本发明提供一种预防、治疗或改善受试者的炎症或过敏性疾病的方法，所述方法包括给有此需要的受试者施用本发明提供的抗体、融合蛋白或偶联物、核酸序列、载体、宿主细胞和/或通过所述方法生产的抗体。

优选地，所述受试者为哺乳类动物；更优选地，所述受试者为人。

优选地，所述炎症或过敏性疾病包括自身免疫学疾病，例如过敏性皮炎、哮喘、嗜酸性粒细胞食管炎、湿疹、过敏性鼻炎、鼻息肉、类风湿性关节炎等。

在预防、治疗或改善炎症或过敏性疾病时，还可以联合应用其他药物，例如所述方法还包括给受试者施用至少一种选自下述的药物：平喘药如沙丁胺醇等，抗组胺药如氯雷他定等，免疫抑制剂如他克莫司、吡美莫司等，M 受体阻断剂如异丙托溴铵等，白三烯受体阻断药如孟鲁司特等，磷酸二酯酶抑制剂如茶碱等，非甾体抗炎药如 5-氨基水杨酸等，激素类如倍氯米松、布地奈德等。

优选地，所述药物与本发明提供的抗体、融合蛋白或偶联物、核酸序列、载体、宿主细胞和/或通过所述方法生产的抗体同时或顺序施用。

再一方面，本发明还提供一种试剂盒，所述试剂盒包括本发明提供的抗

体、融合蛋白或偶联物、核酸序列、载体、宿主细胞和/或通过所述方法生产的抗体。

附图说明

结合本发明非限制性实施例和附图可以更好地理解本发明，在附图中：

图 1 示出了本发明的抗体在小鼠体内的药代动力学曲线；

图 2 示出了本发明的抗体在食蟹猴体内的药代动力学曲线；

图 3A-3C 通过 FACS 示出了本发明的抗体与表达 IL-4Rα 的 TF-1 细胞特异性结合，其中 3A 示出没有加入本发明抗体 L1012H1031 时的荧光信号，3B 示出加入本发明抗体 L1012H1031 后的荧光信号，3C 示出 3A-3B 的信号叠加比较。

图 4A-4D 通过 FACS 示出了本发明的抗体与表达 IL-4Rα 的 TF-1 细胞的特异性结合被体系中存在的 sIL-4Rα 所阻断，其中 4A 示出没有加入本发明抗体 L1012H1031 时的荧光信号，4B 示出加入本发明抗体 L1012H1031 后的荧光信号，4C 示出加入本发明抗体 L1012H1031 及 sIL-4Rα 时的荧光信号，4D 示出 4A-4C 的信号叠加比较。

图 5A-5B 通过 ELISA 示出了本发明的抗体抑制 TARC 和 MDC 释放的作用，其中 5A 示出本发明抗体 L1020H1031 抑制 TARC 因子释放结果，5B 示出本发明抗体 L1020H1031 抑制 MDC 因子释放结果。

实施发明的最佳方式

以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解，这些实施例仅用于说明本发明，其不以任何方式限制本发明的范围。

下述实施例中的实验方法如无特殊说明，均为常规方法；下述实施例中所用的试验材料，如无特殊说明，均为自常规生化试剂商店购买得到的。

在下述实施例中，示例性地提供并验证了表 1 中所示抗体的作用。

表 1 本发明提供的示例性抗体

编号	轻链可变区和重量可变区的序列编号
L1000H1007	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 62
L1000H1008	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 63
L1000H1009	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 59

L1000H1010	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 60
L1000H1011	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 61
L1000H1012	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 67
L1000H1013	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 65
L1000H1014	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 66
L1000H1015	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 64
L1000H1016	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 68
L1000H1017	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 69
L1000H1018	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 70
L1000H1019	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 71
L1000H1020	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 72
L1000H1021	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 73
L1000H1022	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 89
L1000H1023	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 88
L1000H1024	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 87
L1000H1025	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 86
L1000H1026	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 83
L1000H1027	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 82
L1000H1028	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 81
L1000H1029	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 85
L1000H1030	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 84
L1000H1031	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 91
L1000H1032	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 90
L1000H1033	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 74
L1000H1034	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 75
L1000H1035	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 76
L1000H1036	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 77
L1000H1037	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 78
L1000H1038	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 80
L1007H1000	SEQ ID NO. 39 + SEQ ID NO. 92
L1008H1000	SEQ ID NO. 40 + SEQ ID NO. 92
L1009H1000	SEQ ID NO. 41 + SEQ ID NO. 92

L1010H1000	SEQ ID NO. 42 + SEQ ID NO. 92
L1011H1000	SEQ ID NO. 43 + SEQ ID NO. 92
L1012H1000	SEQ ID NO. 44 + SEQ ID NO. 92
L1012H1007	SEQ ID NO. 44 + SEQ ID NO. 62
L1012H1016	SEQ ID NO. 44 + SEQ ID NO. 68
L1012H1020	SEQ ID NO. 44 + SEQ ID NO. 72
L1012H1027	SEQ ID NO. 44 + SEQ ID NO. 82
L1012H1029	SEQ ID NO. 44 + SEQ ID NO. 85
L1012H1031	SEQ ID NO. 44 + SEQ ID NO. 91
L1013H1000	SEQ ID NO. 48 + SEQ ID NO. 92
L1014H1000	SEQ ID NO. 49 + SEQ ID NO. 92
L1015H1000	SEQ ID NO. 50 + SEQ ID NO. 92
L1016H1000	SEQ ID NO. 45 + SEQ ID NO. 92
L1017H1000	SEQ ID NO. 46 + SEQ ID NO. 92
L1018H1000	SEQ ID NO. 47 + SEQ ID NO. 92
L1019H1000	SEQ ID NO. 56 + SEQ ID NO. 92
L1020H1000	SEQ ID NO. 55 + SEQ ID NO. 92
L1020H1007	SEQ ID NO. 55 + SEQ ID NO. 62
L1020H1016	SEQ ID NO. 55 + SEQ ID NO. 68
L1020H1020	SEQ ID NO. 55 + SEQ ID NO. 72
L1020H1027	SEQ ID NO. 55 + SEQ ID NO. 82
L1020H1029	SEQ ID NO. 55 + SEQ ID NO. 85
L1020H1031	SEQ ID NO. 55 + SEQ ID NO. 91
L1021H1000	SEQ ID NO. 54 + SEQ ID NO. 92
L1021H1007	SEQ ID NO. 54 + SEQ ID NO. 62
L1021H1016	SEQ ID NO. 54 + SEQ ID NO. 68
L1021H1020	SEQ ID NO. 54 + SEQ ID NO. 72
L1021H1027	SEQ ID NO. 54 + SEQ ID NO. 82
L1021H1029	SEQ ID NO. 54 + SEQ ID NO. 85
L1021H1031	SEQ ID NO. 54 + SEQ ID NO. 91
L1022H1000	SEQ ID NO. 53 + SEQ ID NO. 92
L1023H1000	SEQ ID NO. 51 + SEQ ID NO. 92

L1024H1000	SEQ ID NO. 52 + SEQ ID NO. 92
L1024H1007	SEQ ID NO. 52 + SEQ ID NO. 62
L1024H1031	SEQ ID NO. 52 + SEQ ID NO. 91
L1001H1000	SEQ ID NO. 58 + SEQ ID NO. 92
L1000H1001	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 93
L1012H1001	SEQ ID NO. 44 + SEQ ID NO. 93
L1001H1031	SEQ ID NO. 58 + SEQ ID NO. 91
L1020H1001	SEQ ID NO. 55 + SEQ ID NO. 93
L1023H1001	SEQ ID NO. 51 + SEQ ID NO. 93
L1000H1000	SEQ ID NO. 57 + SEQ ID NO. 92
L1001H1001	SEQ ID NO. 58 + SEQ ID NO. 93

实施例 1：本发明抗体的制备与非还原 SDS-PAGE 凝胶电泳法测定表达量

将抗体轻链可变区的编码序列利用 EcoRI 和 BsiWI 酶切位点插入到 pFUSE2ss-CLIg-hK 载体（Invivogen，货号：pfuse2ss-hclk）构成轻链表达载体；重链可变区的编码序列利用 EcoRI 和 NheI 酶切位点插入到 pFUSEss-CHIg-hG2 载体（Invivogen，货号：pfusess-hchg2）或 pFUSEss-CHIg-hG4 载体（Invivogen，货号：pfusess-hchg4）构成重链表达载体。

Expi293 细胞的培养和转染按照 Invitrogen 公司 Expi293™ Expression System Kit 手册进行（货号：A14635）。转染时细胞密度调整为 2×10^6 个/ml，每毫升细胞加入上述 0.6μg 轻链表达载体和 0.4μg 重链表达载体，四天后收集培养上清。

细胞培养上清按照《分子克隆实验指南》第三版附录 8 所述方法进行非还原 SDS-PAGE 凝胶电泳。

使用东方君意凝胶扫描成像系统拍照并使用 Gel-PRO ANALYZER 软件进行凝胶定量，以测定抗体瞬转的表达量。结果以相对于对照抗体 1（根据专利 US 7,186,809 构建，其轻链可变区为 US 7,186,809 的 SEQ ID No.10，重链可变区为 US 7,186,809 的 SEQ ID No.12，下同）的表达量表示（对照抗体 2 根据专利 US 7,638,606 构建，其轻链可变区为 US 7,638,606 的 SEQ ID No.6，重链可变区为 US 7,638,606 的 SEQ ID No.42，下同），见下表 2a-2c。

表 2a 本发明抗体的瞬转表达量（表达量较对照抗体 1 显著提高的抗体）:

抗体编号	表达量 vs 对照抗体 1	抗体编号	表达量 vs 对照抗体 1
L1021H1000	2.08	L1000H1028	1.27
L1020H1000	1.58	L1000H1015	1.19
L1000H1027	1.56	L1000H1032	1.18
L1000H1024	1.51	L1000H1026	1.15
L1000H1025	1.48	L1021H1029	1.12
L1001H1000	1.48	L1000H1030	1.1
L1021H1016	1.43	L1024H1031	1.08
L1000H1014	1.35	L1000H1016	1.05

表 2b 本发明抗体的瞬转表达量（表达量较对照抗体 1 略有降低的抗体）:

抗体编号	表达量 vs 对照抗体 1	抗体编号	表达量 vs 对照抗体 1
L1000H1031	0.99	L1017H1000	0.85
L1021H1031	0.99	L1020H1016	0.84
L1020H1029	0.96	L1000H1009	0.81
对照抗体 2	0.93	L1000H1007	0.8
L1012H1000	0.89	L1000H1023	0.8
L1019H1000	0.87	L1020H1027	0.78
L1020H1031	0.87	L1024H1007	0.77
L1021H1020	0.87	L1000H1013	0.75
L1000H1029	0.86	L1020H1007	0.74
L1008H1000	0.86	L1021H1007	0.74
L1000H1001	0.85	L1000H1021	0.71

表 2c 本发明抗体的瞬转表达量（表达量较对照抗体 1 有大幅降低的抗体）:

抗体编号	表达量 vs 对照抗体 1	抗体编号	表达量 vs 对照抗体 1
L1000H1020	0.69	L1024H1000	0.52
L1010H1000	0.69	L1000H1008	0.51
L1000H1022	0.67	L1000H1037	0.5

L1000H1012	0.64	L1007H1000	0.49
L1022H1000	0.64	L1016H1000	0.49
L1011H1000	0.63	L1000H1017	0.47
L1000H1011	0.62	L1000H1035	0.46
L1000H1033	0.62	L1012H1027	0.46
L1020H1020	0.61	L1018H1000	0.44
L1000H1036	0.6	L1023H1000	0.43
L1021H1027	0.6	L1012H1016	0.42
L1012H1007	0.59	L1013H1000	0.41
L1009H1000	0.57	L1000H1034	0.4
L1012H1020	0.57	L1000H1018	0.35
L1012H1031	0.56	L1000H1019	0.34
L1000H1038	0.54	L1015H1000	0.27
L1012H1029	0.54	L1014H1000	0.17
L1000H1010	0.53		

实施例 2：检测本发明的抗体抑制 hIL-4 或 hIL-13 对 TF-1 细胞的增殖作用

1. 试剂的配制

hIL-4（Invivogen，货号：rhil-4）溶液：用 100μl 含 0.1% BSA（Beyotime，货号：ST023）的 PBS 溶液溶解 hIL-4，得到 100μg/ml 的浓度，将溶解后的 hIL-4 按照 5μl 每管的体积分装至 1.5ml（Nunc）离心管内，并存放于-20℃冰箱内。

WST-1（Beyotime，货号：C0036）溶液：把 5ml 电子耦合剂（C0036-2）加入到 WST-1 粉末（C0036-1）中，完全溶解即成 WST-1 溶液，按照每管 620μl 体积分装至 1.5ml 离心管内，并存放于-20℃冰箱内。

2. TF-1 细胞培养

取出液氮中冻存的 TF-1（ATCC：CRL-2003™）细胞，在 37℃水浴中震荡，使其迅速溶解。将溶解后的细胞悬液移至 15ml 离心管内，加 1640 培养基至 10ml，800rpm 离心 5min，吸去上清，保留细胞沉淀，重复洗涤一次，加入 10ml 含 10% FBS 和 2ng/ml GM-CSF（Sino Biological，货号：10015-H01H）的 1640 培养基，调整细胞密度为 1×10^5~1×10^6 个/ml，移至 T75 细胞培养瓶（Nunc）中，置于 37℃，5% CO2 培养箱（Thermo）中静置培养。每隔 2-3 天，取细胞悬液，800rpm 离心 5min，用 10ml 培养基重悬细胞，

计数细胞 1×10^6 个细胞移入新的 T75 细胞瓶中，同时补加培养基至 10ml，连续传代 2-3 次，至细胞状态良好（细胞透亮，单一悬浮的略微不规则形态细胞）后可进行增殖实验。

3. 抗体的制备和纯化

a) 本发明抗体细胞培养上清样品：

将带有不同组抗体基因的质粒转染 Expi293 细胞，转染后 4 天取细胞培养上清 200μl，800rpm 离心 5min，将上清经 0.22μm 孔径滤膜过滤后，用于增殖阻断实验。

b) 纯化的本发明抗体样品：取表达本发明抗体的细胞培养上清，过 0.22μm 滤膜，经 GE MabSelect Sure（Cat Number: 11003494）Protein A 亲和层析柱纯化，纯化系统为 GE AKTA purifier 10，纯化后收集的抗体使用 Amicon 超滤浓缩管（Cat Number: UFC903096）浓缩并定量。检测时，用 PBS 稀释抗体至 0 至 1μg/ml 用于增殖阻断实验。

4. 抑制增殖实验

取 T75 细胞瓶中生长状态良好细胞，移入 15ml 离心管内，800rpm 离心 5min，弃上清，取细胞沉淀。用 10ml PBS 重悬细胞，800rpm 离心 5min，弃上清，取细胞沉淀。用 10ml 含 10% FBS 的 1640 培养基（不含 GM-CSF）重悬细胞，800rpm 离心 5min，弃上清，取细胞沉淀。用 5ml 含 10% FBS 的 1640 培养基（不含 GM-CSF）重悬细胞，细胞计数后，补加培养基，调整细胞密度至 5×10^5 个/ml。将细胞悬液按每孔 80μl 体积加入 96 孔板内（预留外圈防挥发孔不加细胞）。将准备好的不同浓度的纯化抗体 10μl 或细胞培养上清 10μl 加入 96 孔的细胞内（3 个重复孔）。然后用含 10% FBS 的 1640 培养基稀释 hIL-4 至 50ng/ml。将 50ng/ml 的 hIL-4 按照 10μl 每孔的体积分别加入 96 孔板上对应的细胞孔内，使得最终的细胞密度为 4×10^5 个/ml，hIL-4 浓度为 5ng/ml，最终 96 孔板每孔体积为 100μl，设置不添加 hIL-4，不添加抗体，仅加入相同数量细胞与同体积培养液的阴性对照组（3 个重复孔），另设置不添加抗体，补加相同体积培养液，细胞中仅加入相同浓度 hIL-4 的阳性对照组（3 个重复孔）。在 96 孔细胞板外圈每孔加入 200μl PBS 防止内圈液体挥发。将 96 孔细胞板置于 37℃，5% CO2 培养箱中静置培养。

使用 500ng/ml 的 hIL-13（加入细胞后的终浓度为 50ng/ml），按照相同过程重复上述实验。

5. 数据统计

96 孔细胞板在 5% CO2 培养箱中静置培养 72h 后，在每孔细胞内加入

10μl WST-1 溶液。将 96 孔细胞板继续置于 37℃，5% CO2 培养箱中静置培养。24h 后，将 96 孔板置于 flexstation 3（Molecular Devices）中，读取 OD450-OD650 的值。

对于本发明抗体培养上清，测得的 OD450-OD650 数值(OD 值)与阳性对照组和阴性对照组的数值进行计算，抑制百分率=（转染后细胞上清 OD 值-阳性对照组 OD 值）/（阴性对照组 OD 值-阳性对照组 OD 值）×100%。本发明的抗体对 hIL-4 或 hIL-13 的 TF-1 细胞增殖作用的阻断作用结果见下表 3a-3b。

对于经过纯化的不同浓度的本发明抗体，测得的 OD450-OD650 数据输入 prism5 软件中，将阴性对照组数值设为最低值，阳性对照组数值设为最高值，抗体浓度取对数值，由 prism5 软件拟合抗体浓度对数值与 OD450-OD650 的曲线，计算得到的 IC50 见下表 4。

表 3a 本发明的抗体抑制 TF-1 细胞增殖活性的筛选结果（抑制率较对照抗体 1 增加的抗体）

抗体编号	IL-4 促增殖作用受抑制率	IL-13 促增殖作用受抑制率
对照抗体 1	0.87	0.63
对照抗体 2	1	0.87
L1020H1029	1.03	0.93
L1000H1001	1.03	0.93
L1021H1027	1.02	0.94
L1020H1027	1.02	0.92
L1021H1029	1.02	0.92
L1020H1016	1.01	0.97
L1024H1031	1.01	0.94
L1021H1031	1.01	0.93
L1020H1031	1.01	0.93
L1000H1029	1.01	0.92
L1000H1027	1.01	0.86
L1021H1016	1	0.94
L1021H1007	1	0.86

L1000H1028	1	0.84
L1000H1014	0.99	0.78
L1001H1000	0.98	0.85
L1000H1024	0.98	0.75
L1000H1031	0.97	0.83
L1000H1007	0.96	0.82
L1000H1023	0.96	0.8
L1000H1032	0.96	0.74
L1020H1007	0.95	0.9
L1021H1000	0.95	0.78
L1000H1016	0.95	0.76
L1012H1029	0.94	0.95
L1012H1007	0.93	0.88
L1021H1020	0.91	0.75
L1020H1000	0.91	0.7
L1000H1025	0.91	0.69
L1012H1020	0.9	0.78
L1000H1020	0.88	0.76
L1000H1012	0.88	0.58
L1020H1020	0.87	0.76

表 3b 本发明的抗体抑制 TF-1 细胞增殖活性的筛选结果（抑制率较对照抗体 1 等同或降低的抗体）

抗体编号	IL-4 促增殖作用受抑制率	IL-13 促增殖作用受抑制率
L1000H1022	0.87	0.62
L1000H1017	0.87	0.59
L1000H1030	0.87	0.47
L1024H1007	0.86	0.7
L1000H1013	0.86	0.55
L1012H1031	0.85	0.7

L1000H1015	0.85	0.63
L1000H1026	0.85	0.53
L1000H1018	0.84	0.65
L1000H1009	0.83	0.54
L1012H1000	0.78	0.5
L1012H1016	0.78	0.48
L1000H1021	0.73	0.56
L1019H1000	0.72	0.49
L1008H1000	0.67	0.27
L1009H1000	0.66	0.35
L1000H1008	0.66	0.19
L1012H1027	0.65	0.63
L1000H1011	0.61	0.26
L1000H1010	0.54	0.1
L1000H1019	0.52	0.29
L1007H1000	0.49	0.15
L1024H1000	0.44	0.39
L1011H1000	0.44	0.13
L1017H1000	0.44	0.02
L1018H1000	0.42	-0.12
L1010H1000	0.38	0.06
L1000H1036	0.27	0.18
L1023H1000	0.26	0.07
L1000H1033	0.23	0.14
L1015H1000	0.16	0.09
L1000H1034	0.15	0.1
L1016H1000	0.1	-0.36
L1013H1000	0.01	-0.21
L1022H1000	-0.05	0.02
L1000H1038	-0.05	-0.15
L1014H1000	-0.05	-0.29
L1000H1037	-0.06	-0.13

L1000H1035	-0.12	-0.13

表 4 抗体 600-900ml 瞬转纯化产物活性数据

	IC50 (ng/ml)（抑制 IL-4 的增殖）	IC50 (ng/ml)（抑制 IL-13 的增殖）
对照抗体 1	184.03±61.95	345.1±73.9
对照抗体 2	27.79±3.22	52.06±14.97
L1021H1016	28.46±7.82	69.67±28.38
L1021H1020	15.36±2.46	28.64±10.46
L1021H1031	34.27±12.17	76.51±31.94
L1020H1016	24.19±6.91	44.62±14.79
L1020H1020	23.63±8.73	53.73±17.34
L1020H1031	25.6±7.46	60.17±19.02
L1012H1016	32.44±7.45	75.33±43.63
L1012H1020	21.09±4.72	56.65±23.34
L1012H1031	39.26±15.61	76.87±40.97

实施例 3：ELISA 检测本发明的抗体与 sIL-4Rα 的结合能力

1. 试剂的配制

sIL-4Rα（PEPRO TECH，货号：200-04R）溶液：取一支 sIL-4Rα，加入 1ml ddH2O，上下颠倒混匀，即为 100μg/ml 溶液，然后分装后于-20℃冰箱中保存。

待测样品：取瞬染后表达本发明抗体的 Expi293 细胞培养物上清液（培养基为 Expi293 Expression Medium，Invitrogen，货号：A1435102；在 8% CO2 培养箱中，连续 100rpm 悬浮培养 4 天）10μl 和 2μl，分别加至 990μl 和 998μl 的 PBS 溶液中，配制成为 1:100 和 1:500 稀释的待测抗体样品。

对照样品：正常细胞培养上清（Expi293 细胞不经过转染，培养基为 Expi293 Expression Medium（Invitrogen，货号：A1435102；在 8% CO2 培养箱中，连续 100rpm 悬浮培养 4 天）同样进行 1:100 和 1:500 稀释，作为阴性对照样品。

2. ELISA 检测

取 100μl 100μg/ml sIL-4Rα 溶液，加入到 9.90ml PBS 包被液中，上下颠倒混匀，即为 1.0μg/ml 抗原包被液。将配好的抗原包被液加入到 96 孔酶标

板（corning）中，每孔 100μl。将 96 孔酶标板置于 4℃ 冰箱中孵育过夜。第二天，弃去其中溶液，向 96 孔酶标板中逐排加入含 2% BSA 的 PBS 溶液，每孔 300μl。4℃ 冰箱中孵育 2h。弃去 2% BSA，使用 PBST 洗涤 3 次。将稀释好的待测抗体依次加入到相应的孔中，同时加入正常细胞培养上清作为阴性对照样品，每个样品做三个复孔，每孔 100μl。将酶标板用保鲜膜包裹（或加盖）后，置于 10℃恒温培养箱中孵育 1h。将 96 孔酶标板取出，弃去其中溶液，PBST 洗涤 3 次后向 96 孔酶标板中逐排加入 TMB 溶液（Solarbio，Cat Number: PR1200），每孔 100μl。室温放置 5 分钟后，立即向 96 孔酶标板中加入 2M H2SO4 溶液终止反应。将 96 孔酶标板置于 flexstation 3（Molecular Devices）中，读取 OD450 的值，数据收集计算分析。结果以相对于对照抗体 1 的亲和力示出，见下表 5a-5c。

表 5a 本发明的抗体对 sIL-4Rα 的亲和力（亲和力显著大于对照抗体 1 的抗体）

抗体编号	OD 450/ OD450 $_{对照抗体1}$
对照抗体 1	1
L1021H1000	2.42
L1020H1000	2.27
L1019H1000	1.79
L1001H1000	1.56
L1012H1000	1.22
L1000H1031	1.14
L1020H1031	1.12
L1000H1014	1.06
L1020H1029	1.01

表 5b 本发明的抗体对 sIL-4Rα 的亲和力（亲和力较对照抗体 1 等同或略有降低的抗体）

抗体编号	OD 450/ OD450 $_{对照抗体1}$
L1010H1000	1
L1021H1029	1
L1011H1000	0.9
L1008H1000	0.9

L1021H1031	0.9
L1024H1031	0.9
L1007H1000	0.8
L1020H1016	0.8
L1000H1029	0.8
L1000H1001	0.7

表 5c 本发明的抗体对 sIL-4Rα 的亲和力（亲和力较对照抗体 1 显著降低的抗体）

抗体编号	OD 450/ OD450 $_{对照抗体\ 1}$
L1024H1000	0.69
L1015H1000	0.67
L1000H1015	0.65
L1009H1000	0.64
L1021H1016	0.63
L1000H1023	0.63
L1000H1016	0.61
L1000H1009	0.56
L1000H1032	0.53
L1017H1000	0.49
L1021H1007	0.44
L1000H1027	0.44
L1020H1007	0.40
L1020H1027	0.40
L1012H1007	0.40
L1000H1013	0.38
L1000H1007	0.37
L1000H1021	0.35
L1000H1028	0.33
L1021H1027	0.29
L1016H1000	0.27
L1020H1020	0.26

L1000H1024	0.26
L1021H1020	0.24
L1013H1000	0.24
L1024H1007	0.23
L1000H1020	0.23
L1000H1035	0.22
L1000H1008	0.21
L1000H1025	0.21
L1000H1030	0.20
L1000H1012	0.18
L1000H1022	0.18
L1022H1000	0.16
L1012H1031	0.16
L1000H1017	0.13
L1000H1010	0.11
L1000H1026	0.11
L1012H1020	0.11
L1012H1029	0.11
L1000H1036	0.10
L1000H1018	0.09
L1000H1034	0.09
L1000H1011	0.09
L1000H1033	0.08
L1012H1016	0.08
L1018H1000	0.06
L1023H1000	0.05
L1000H1038	0.04
L1000H1019	0.02
L1012H1027	0.02
L1014H1000	0.01
L1000H1037	-0.01

实施例 4: 本发明的抗体在小鼠体内的药代动力学

为了进一步筛选抗体，在小鼠体内进行了一系列的药代动力学实验。

选择 6-8 周龄 SPF 级 Balb/c 小鼠，以 5mg（本发明的抗体或对照抗体 2）/kg（小鼠体重）的量进行抗体皮下注射。于药前（0 h），药后 2、8、24、48、72、120、168、216、264、336 h 的时间点采集血样。取样为动物用异氟烷吸入麻醉后，眼眶静脉丛取血，每只取血量约 0.1 mL；药后 336 h 动物首先用异氟烷吸入麻醉，下腔静脉取血安乐死。

血样不抗凝，取血后 2 h 之内室温 1500 g 离心 10 min 以分离血清。收集的上清液立即转移至新的标记好的离心管，血清保存于-70°C 以下暂存。使用 ELISA 方法测定小鼠体内的抗体浓度:

1. 试剂的配制

sIL-4Rα（PEPRO TECH，货号：200-04R）溶液：取一支 sIL-4Rα，加入 1ml ddH2O，上下颠倒混匀，即为 100μg/ml 溶液，然后分装后于-20℃冰箱中保存。

待测样品：取不同时间段采集的血清各 1μl，加入至 999μl 含 1% BSA 的 PBS 溶液中，即成 1:1000 稀释的待测血清样品。

标准品：将待检测抗体用含 1% BSA 和 0.1%正常动物血清（Beyotime，货号：ST023）的 PBS 溶液稀释成 0.1μg/ml。分别取 0.1μg/ml 的待检测抗体 800、600、400、200、100、50、10、0 μl，分别加入含 1% BSA 和 0.1%正常动物血清的 PBS 溶液 200、400、600、800、900、950、990、1000 μl，配成最终浓度分别为 80、60、40、20、10、5、1、0 ng/ml 的本发明抗体标准品。

2. ELISA 检测

取 250μl 100μg/ml sIL-4Rα 溶液，加入到 9.75ml PBS 包被液中，上下颠倒混匀，即为 2.5μg/ml 抗原包被液。将配好的抗原包被液加入入 96 孔酶标板（corning）中，每孔 100μl。将 96 孔酶标板用保鲜膜包裹（或加盖）后，4℃ 冰箱中孵育过夜。第二天，将 96 孔酶标板取出，弃去其中溶液，加入含 2% BSA 的 PBS 溶液，每孔 300μl。将酶标板用保鲜膜包裹（或加盖）后，于 4℃ 冰箱中孵育 2h。将 96 孔 酶标板取出，弃去其中溶液，PBST 重复洗涤 3 次。将稀释好的标准抗体及待测血清样品依次加入到相应的孔中，每个样品做三个复孔，每孔 100μl。将酶标板用保鲜膜包裹（或加盖）后，室温孵育 1h。弃去其中溶液，PBST 洗涤 3 次。向 96 孔酶标板中逐排加入 TMB 溶液（Solarbio，Cat Number: PR1200），每孔 100μl。室温放置 5 分钟，立

即向 96 孔酶标板中加入 2M H2SO4 溶液终止反应。将 96 孔酶标板置于 flexstation 3（Molecular Devices）中，读取 OD450 的值，收集数据使用 Winnonlin 软件计算结果。药代动力学结果见图 1 与下表 6。

表 6 本发明的抗体在小鼠体内的药代动力学结果

编号		半衰期 h	达峰时间 h	峰值浓度 μg/ml	药时曲线下面积 h*μg/ml	分布容积 ml/kg	清除率 ml/h/kg
L1020H1031	均值	269.34	72	33.79	7679.28	138.92	0.38
	标准差	105.73	0.00	0.42	163.91	22.48	0.09
L1012H1031	均值	167.27	48	45.5	9852.3	91.3	0.38
	标准差	8.52	0.00	1.86	448.34	5.58	0.00
对照抗体 2	均值	56.67	36	7.88	1132.68	288.92	3.79
	标准差	25.84	16.97	0.25	94.42	49.45	1.12

实施例 5: 本发明的抗体在食蟹猴体内的药代动力学

为了进一步筛选抗体，在食蟹猴体内进行了一系列的药代动力学实验。

选择 3-5 岁食蟹猴，体重 2-5Kg，以 5mg（本发明的抗体或对照抗体 2）/kg（食蟹猴体重）的量进行抗体皮下注射。用一次性无菌注射器准确抽取要施用的抗体或对照抗体 2，于动物大腿内侧皮下进行多点注射，每点注射容量不超过 2ml。于药前（0 h），药后 0.5、2、4、8、24、48、72、120、168、240、336 h、432h、504h、600h、672h 的时间点从动物后肢皮下静脉采集全血，每只取血量 1.5ml。

血样不抗凝，取血后 2 h 之内室温 1500 g 离心 10 min 以分离血清。收集的上清液立即转移至新的标记好的离心管，血清保存于-70°C 以下暂存。采用实施例 4 所述方法测定食蟹猴体内的抗体浓度。药代动力学结果见图 2 与下表 7。

表 7 本发明的抗体在食蟹猴体内的药代动力学结果

编号		半衰期 h	达峰时间 h	峰值浓度 μg/ml	药时曲线下面积 h*μg/ml	分布容积 ml/kg	清除率 ml/h/kg
L1020H1031	均值	254.95	48.00	89.65	22189.91	75.94	0.22
	标准差	44.57	33.94	44.29	8557.15	22.95	0.10
L1012H1031	均值	185.75	48	65	16185.73	73.41	0.28
	标准差	42.54	33.94	4.5	2506.98	0.81	0.06

对照抗体 2	均值	37.03	16	37.82	2773.21	93.97	1.78
	标准差	18.03	11.31	6.75	155.84	42.47	0.07

实施例 6：FACS 检测本发明的抗体与 TF-1 细胞的结合

1. 细胞培养

在液氮中取出冻存的 TF-1（ATCC：CRL-2003™）细胞，在 37℃水浴中不停轻柔震荡，使其迅速溶解。加溶解后的细胞悬液移至 15ml 离心管内，加 1640 培养基（Hyclone，货号：SH30809.01B）至 10ml，800rpm 离心 5min，吸去上清，保留细胞沉淀，重复洗涤一次，加入含 10% FBS（Hyclone，货号：SV30184.02）、2ng/ml GM-CSF（Sino Biological，货号：10015-H01H）的 1640 培养基，调整细胞密度为 1×10^5-1×10^6 个/ml，移至 T75 细胞培养瓶（Nunc）中，置于 37℃，5% CO2 培养箱（Thermo）中静置培养。每隔 2-3 天，取细胞悬液，800rpm 离心 5min，用 10ml 培养基重悬细 传细胞 1×10^6 个细胞移入新的 T75 细胞瓶中，同时补加培养基至 10ml，连续传代 2-3 次，至细胞状态良好（细胞透亮，单一悬浮的略微不规则形态细胞）后可进行实验。

2. 细胞处理

取 TF-1 细胞，通过显微镜计数，将细胞分为 3 组，分别置于 3 个 1.5ml 离心管内，每组细胞个数为 1×10^6 个。800rpm 5min 离心细胞，用冷的含 1% BSA 的 PBS 1ml 重悬细胞，重复洗涤一次。800rpm 5min 离心细胞，每个离心管内加入冷的含 1% BSA 的 PBS 45μl 重悬细胞后，其中第一个离心管内加入本发明 L1021H1031、L1020H1031 或 L1012H1031 抗体 5 μl（500μg/ml），第二个离心管内加入 PBS 5μl 作为阴性对照。冰上静置 45min 后，800rpm 5min 离心细胞，用冷的含 1% BSA 的 PBS 1ml 重悬细胞，重复洗涤一次。800rpm 5min 离心细胞，每个离心管内加入冷的含 1% BSA 的 PBS 499μl 重悬细胞后，加入 1 μl FITC 标记山羊抗人 IgG（H+L）（Beyotime，货号：A0556）。冰上静置 45min 后，800rpm 5min 离心细胞，用冷的含 1% BSA 的 PBS 1ml 重悬细胞，重复洗涤一次，细胞待测。

3. FACS 上机检测

按正确流程打开仪器和操作系统，设置正确的参数后，将细胞加入检测管内，检测 FL1 通道的荧光信号，使用 FlowJo 7.6 软件进行分析，结果见图 3A-3C，显示本发明的抗体能够与表达 IL-4Rα 的 TF-1 细胞特异性结合。

实施例 7: FACS 检测可溶性 hIL-4 Rα（sIL-4Rα）对抗体与 TF-1 细胞结合的阻断作用

1. 试剂的配制

按照实施例 1 中所述进行 hIL-4（Invivogen，货号：rhil-4）溶液的配制。

2. 细胞培养

按照实施例 6 中所述进行 TF-1（ATCC：CRL-2003™）的细胞培养。

3. sIL-4Rα 与本发明的抗体的混合

取 sIL-4Rα 10μl（100μg/ml）与本发明的 L1021H1031、L1020H1031 或 L1012H1031 抗体 5μl（500μg/ml）以 2:1 的摩尔比在 1.5ml 离心管内混合均匀。同时取 PBS 10μl 与本发明 L1021H1031、L1020H1031 或 L1012H1031 抗体 5μl 混合作为阳性对照，取 PBS 15μl 作为阴性对照。将离心管放 37℃ 培养箱内静置 1h。

4. 细胞处理

取 TF-1 细胞，通过显微镜计数，将细胞分为 4 组，分别置于 3 个 1.5ml 离心管内，每组细胞个数为 1×10^6 个。800rpm 5min 离心细胞，用冷的含 1% BSA 的 PBS 1ml 重悬细胞，重复洗涤一次。800rpm 5min 离心细胞，每个离心管内加入冷的含 1% BSA 的 PBS 35μl 重悬细胞后，加入步骤 3 中不同抗体混合物与对照 15 μl。冰上静置 45min 后，800rpm 5min 离心细胞，用冷的含 1% BSA 的 PBS 1ml 重悬细胞，重复洗涤一次。800rpm 5min 离心细胞，每个离心管内加入冷的含 1% BSA 的 PBS 499μl 重悬细胞后，加入 1 μl FITC 标记山羊抗人 IgG（H+L）（Beyotime，货号：A0556）。冰上静置 45min 后，800rpm 5min 离心细胞，用冷的含 1% BSA 的 PBS 1ml 重悬细胞，重复洗涤一次，细胞待测。

5. FACS 上机检测

按正确流程打开仪器和操作系统，设置正确的参数后，将细胞加入检测管内，检测 FL1 通道的荧光信号，使用 FlowJo 7.6 软件进行分析，结果见图 4A-4D，显示 sIL-4Rα 能够特异性地有效阻断本发明抗体与 TF-1 细胞的特异性结合。

实施例 8: Bicore 抗体亲和力测定

首先将抗人 Fc (AHC)抗体（GE Healthcare）偶联到 CM5 芯片上，然后用 AHC 捕获本发明抗体，再将不同浓度的人 sIL-4Rα 流过捕获了本发明抗体的芯片表面，其中本发明抗体稀释到 2 μg/ml，抗原 sIL-4Rα 稀释至 0.39、

0.78、1.56、3.13、6.25、12.5、25.0、50.0 和 100.0 nM。然后在 Biacore T200 control software 软件中建立实验方法，之后运行实验程序检测。结果见下表 8。

表 8 抗体亲和力检测结果

编号	Ka ($\times10^5$ $M^{-1}s^{-1}$)	Kd ($\times10^{-5}$ s^{-1})	KD (10^{-10} M)
对照抗体 1	7.63	52.3	6.85
对照抗体 2	3.85	1.73	0.448
L1020H1031	4.61	4.79	1.04
L1012H1031	5.18	9.49	1.83

实施例 9：ELISA 方法考察本发明的抗体抑制 TARC 和 MDC 释放的作用

取新鲜肝素抗凝血 10ml（捐献），与室温下的 PBS 溶液 1:1 混匀，小心加入预先准备好的 20ml 人淋巴分离液（Solarbio，货号：P8610）中。室温下 1500 rpm 离心 30min，离心完成后小心吸取 PBMC 层，并用 PBS 清洗 2 次。最终用含 10% FBS、200IU/ml IL-2 的 1640 培养基稀释细胞后，加入 24 孔板中备用，每孔 1×10^6 个细胞。各孔中分别加入终浓度为 1000、300、100、30、10ng/ml 的 L1020H1031 抗体，然后加入终浓度为 10ng/ml 的 IL-4（或是 100ng/ml 的 IL-13）。培养 72 小时后按照 Human TARC ELISA 试剂盒（Abcam，货号：ab183366）或 Human MDC ELISA 试剂盒（Abcam，货号：ab179885）提供的方法进行检测。

结果见图 5A-5B，显示本发明抗体能够有效抑制 TARC 和 MDC 释放，并且随着浓度增加，对释放的抑制作用也增大。

实施例 10：特定氨基酸对本发明抗体代谢动力学与表达量的影响

进一步检测和比较了本发明抗体的体内代谢动力学，以考察在特定位置的特定氨基酸可能给抗体在动物体内的代谢动力学带来的影响。具体实验方法同实施例 4，结果见下表 9。

表 9 抗体体内代谢动力学检测结果

		半衰期 h	达峰时间 h	峰值浓度 ug/ml	药时曲线下面积 h*ug/ml	分布容积 ml/kg	清除率 ml/h/kg

L1020H1031	均值	185.49	40	38.94	8188.8	114.28	0.43
	标准差	18.52	13.86	2.33	510.47	6.5	0.05
L1012H1001	均值	161.26	48.00	12.36	2491.19	332.79	1.47
	标准差	54.30	0.00	2.26	165.16	76.91	0.20
L1001H1031	均值	171.41	56.00	42.74	9273.73	99.17	0.40
	标准差	6.12	13.86	7.38	1868.66	18.69	0.07
L1020H1001	均值	89.00	64.00	20.11	3481.40	164.14	1.30
	标准差	16.70	13.86	2.14	268.39	22.86	0.20

由具体序列可知，抗体重链 H1031（SEQ ID NO. 91）序列的第 103 位（CDR3 中）是 Asp（103Asp），第 104 位是 Tyr（104Tyr）。相比于在重链中不具有 103Asp 和 104Tyr 的抗体，具有 103Asp 和 104Tyr 的本发明抗体的药时曲线下面积高 2-4 倍，而清除率降低约 70%。

还进一步检测和比较了本发明抗体的表达水平，以考察在特定位置的特定氨基酸可能给抗体的表达带来的影响。Expi293 细胞的培养和转染同实施例 1，然后将收集的培养上清过 0.22μm 滤膜，经 GE MabSelect Sure（货号: 11003494)Protein A 亲和层析柱纯化，纯化系统为 GE AKTA purifier 10，纯化后收集的抗体使用 Amicon 超滤浓缩管（货号：UFC903096）浓缩并定量。定量结果见下表 10。

表 10 抗体表达水平检测结果

抗体	产量（$\times 10^{-2}$ mg/ml 培养液）
L1020H1031	8.39
L1001H1031	1.79
L1020H1001	4.04
L1012H1001	5.00
L1023H1001	4.63
L1001H1001	1.75

由具体序列可知，抗体轻链 L1012（SEQ ID NO. 44）、L1020（SEQ ID NO. 55）和 L1023（SEQ ID NO. 51）序列的第 31 位（CDR1 中）是 Ser

（31Ser）。相比于在轻链中不具有 31Ser 的抗体，具有 31Ser 的本发明抗体的表达量提高约 2-5 倍。

以上对本发明具体实施方式的描述并不限制本发明，本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变或变形，只要不脱离本发明的精神，均应属于本发明所附权利要求的范围。