(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103097416 B
(45)授权公告日 2015.09.09

(21)申请号 201180016673.0

(22)申请日 2011.03.30

(30)优先权数据
61/341458 2010.03.30 US
61/319260 2010.03.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2012.09.28

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2011/030469 2011.03.30

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2011/123507 EN 2011.10.06

(73)专利权人 詹森生物科技公司
地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 J.C.阿尔马格罗 P.布拉尼根
C.凯恩 W.斯特罗尔 S.陶德特
M.托尔内塔 J.惠勒

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 林毅斌 李进

(51)Int.Cl.
C07K 16/24(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)

(56)对比文件
WO 2008129263 A1,2008.10.30,
US 6562578 B1,2003.05.13,
WO 2007044450 A2,2007.04.19,
WO 2010038155 A2,2010.04.08,

审查员 李煦颖

权利要求书2页 说明书29页
序列表8页 附图16页

(54)发明名称

人源化 IL-25 抗体

(57)摘要

本发明涉及结合人 IL-25 的特定表位的靶结合成员(如抗体)。本发明还涉及包含一条或多条人源化抗体 VL 结构域序列并且结合 IL-25 的靶结合成员(如抗体)。本发明还涉及包含结合 IL-25 的靶结合成员(如抗体)的组合物,产生此类靶结合成员的方法,以及将此类靶结合成员用于疾病和病症(如哮喘、炎性肠疾病)的治疗或预防。

CN 103097416 B

1. 一种结合 IL-25 的靶结合成员，其中所述靶结合成员包含：

a) 抗体 VL 结构域，其包含具有氨基酸序列 SASQGISNYLN (SEQ ID NO:6) 的 CDR1、具有氨基酸序列 YTSSLHS (SEQ ID NO:7) 的 CDR2 和具有氨基酸序列 QQYLAFPYTF (SEQ ID NO:8) 的 CDR3；以及

b) 抗体 VH 结构域，其包含具有氨基酸序列 GYTMN (SEQ ID NO:10) 的 CDR1、具有氨基酸序列 LINPYNGGTSYNQNFKG (SEQ ID NO:11) 的 CDR2 和具有氨基酸序列 EDYDGYLYFAMDY (SEQ ID NO:12) 的 CDR3。

2. 根据权利要求 1 所述的靶结合成员，其中所述靶结合成员包含抗体恒定区。

3. 根据权利要求 2 所述的靶结合成员，其中所述抗体恒定区是 IgG1 恒定区或 IgG4 恒定区。

4. 根据权利要求 3 所述的靶结合成员，其中所述靶结合成员包括全抗体。

5. 根据权利要求 1 所述的靶结合成员，其中所述靶结合成员包括抗体片段，所述抗体片段选自 Fab 抗体片段、$F(ab')_2$ 抗体片段和 scFv 抗体片段。

6. 根据权利要求 1 所述的靶结合成员，其中所述 VL 结构域包含 SEQ ID NO:5，并且所述 VH 结构域包含 SEQ ID NO:9。

7. 一种分离的核酸，所述分离的核酸包含编码权利要求 1 所述的靶结合成员的核苷酸序列。

8. 一种表达载体，所述表达载体包含权利要求 7 所述的核酸，其中所述核酸可操作地连接到启动子。

9. 一种携带权利要求 8 所述的表达载体的宿主细胞。

10. 一种产生靶结合成员的方法，所述方法包括在适于产生所述靶结合成员的条件下培养权利要求 9 所述的宿主细胞。

11. 根据权利要求 10 所述的方法，还包括分离所述靶结合成员。

12. 根据权利要求 10 所述的方法，还包括将所述靶结合成员配制成包含至少一种附加组分的组合物。

13. 一种组合物，所述组合物包含权利要求 1 所述的靶结合成员和可药用载体。

14. 根据权利要求 13 所述的组合物，其中所述组合物包含冻干的粉末。

15. 有效量的权利要求 1 所述的靶结合成员在制备用于治疗或预防有所需要的受试者的哮喘的药物中的用途。

16. 有效量的权利要求 1 所述的靶结合成员在制备用于治疗或预防有所需要的受试者的炎性肠疾病的药物中的用途。

17. 有效量的权利要求 1 所述的靶结合成员在制备用于治疗或预防有所需要的受试者的溃疡性结肠炎的药物中的用途。

18. 有效量的权利要求 1 所述的靶结合成员在制备用于治疗或预防克罗恩氏病的药物中的用途。

19. 根据权利要求 1 所述的靶结合成员，用于哮喘的治疗和预防。

20. 根据权利要求 1 所述的靶结合成员，用于炎性肠疾病的治疗和预防。

21. 根据权利要求 20 所述的靶结合成员，其中所述炎性肠疾病是溃疡性结肠炎或克罗恩氏病。

22. 一种产生针对 IL-25 的靶结合成员的方法，其中所述靶结合成员结合一条或多条序列，所述序列选自 SEQ ID NO:17 的第 56-63 位氨基酸残基、SEQ ID NO:17 的第 66-74 位氨基酸残基和 SEQ ID NO:17 的第 129-135 位氨基酸残基，所述方法包括：

(a) 提供编码 VL 结构域的核酸的起始库，其中所述核酸包含待置换的 CDR3 编码区或缺乏 CDR3 编码区；

(b) 将所述起始库与编码具有氨基酸序列 QQYLAFPYTF (SEQ ID NO:8) 的 VL CDR3 的供体核酸组合，其中所述供体核酸插入所述库中的一条或多条核酸中，以形成编码 VL 结构域的核酸的产物库，所述 VL 结构域包含具有氨基酸序列 QQYLAFPYTF (SEQ ID NO:8) 的 VL CDR3；

(c) 表达所述产物库的所述核酸以形成靶结合成员；

(d) 选择特异性结合一条或多条序列的靶结合成员，所述序列选自 SEQ ID NO:17 的第 56-63 位氨基酸残基、SEQ ID NO:17 的第 66-74 位氨基酸残基和 SEQ ID NO:17 的第 129-135 位氨基酸残基；以及

(e) 回收所述靶结合成员或编码所述靶结合成员的核酸。

23. 根据权利要求 22 所述的方法，其中所述产物库的所述核酸与编码 VH 结构域的核酸共表达。

24. 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述 VH 结构域包含 SEQ ID NO:9。

25. 根据权利要求 22、23 或 24 所述的方法，其中所述靶结合成员包括全抗体。

26. 根据权利要求 1 所述的靶结合成员，其中所述靶结合成员包括人源化抗体。

人源化 IL-25 抗体

背景技术

[0001] 白介素 -25(IL-25) 也称为 IL-17E，是属于 IL-17 细胞因子家族的细胞因子，并且通过 2 型辅助 T 细胞 (Th2) 和肥大细胞分泌。IL-25 在多个组织中诱导其他细胞因子（包括 IL-4、IL-5 和 IL-13) 的产生，并且刺激嗜酸粒细胞的扩增。

[0002] IL-25 和胃肠道相关的慢性炎症有关系，并且经鉴定，IL-25 基因位于肠自身免疫疾病（例如炎性肠疾病 (IBD)) 相关的染色体区域。治疗 IBD 的传统疗法涉及抗生素或类固醇衍生的药物；然而，目前这些药物尚未成功用于诱导或维持患者的临床缓解。

[0003] IL-25 在哮喘患者的样品中也显示出上调（据估计哮喘这种病症在世界范围内影响超过 3 亿人)，这表明该细胞因子的过表达导致了哮喘和相关病症的病变。

[0004] 因此，需要可用于治疗以 IL-25 过表达为特征的疾病和病症（包括哮喘和炎性肠疾病）的有效 IL-25 拮抗剂。

发明内容

[0005] 本发明涉及针对白介素 25(IL-25) 的靶结合成员，包括抗体及其结合片段。

[0006] 本发明还涉及鼠 2C3 抗体的人源化 (CDR- 移植）类型 RH2.5R71V 的变体，本文也使用术语“huDDG91”和“M9”称呼。一种此类变体在本文中称为“M6 抗体”或“M6”。M6 表现出多种有益的体外和体内特性，包括（例如）相对于亲本 huDDG91 抗体而言增强了对 IL-25 的结合亲和力，在基于受体和细胞的测定法中相对于亲本 huDDG91 抗体而言提高了抑制 IL-25 受体的能力，以及其他特性，例如高表达水平，高溶解度，在纯化时不发生显著的蛋白质聚集，以及在纯化时不存在不需要的翻译后修饰、蛋白质 - 蛋白质相互作用和氧化。

[0007] 在一个实施例中，本发明涉及结合 IL-25 的靶结合成员，其中靶结合成员结合一条或多条选自如下的氨基酸序列：SEQ ID NO：17 的第 46-63 位氨基酸残基、SEQ ID NO：17 的第 66-84 位氨基酸残基和 SEQ ID NO：17 的第 129-135 位氨基酸残基。在具体实施例中，本发明的靶结合成员结合 SEQ IDNO：17 的第 56-63 位氨基酸残基和 SEQ ID NO：17 的第 66-74 位氨基酸残基。在另一个实施例中，靶结合成员包含抗体 VL 结构域，抗体 VL 结构域包含具有氨基酸序列 QQYLAFPYTF(SEQ ID NO：8) 的 CDR3。

[0008] 在另一个实施例中，本发明涉及结合 IL-25 的靶结合成员，其中靶结合成员包含：

[0009] a) 抗体 VL 结构域，其包含具有氨基酸序列 SASQGISNYLN(SEQ IDNO：6) 的 CDR1、具有氨基酸序列 YTSSLHS(SEQ ID NO：7) 的 CDR2 和具有氨基酸序列 QQYLAFPYTF(SEQ ID NO：8) 的 CDR3；以及

[0010] b) 抗体 VH 结构域，其包含具有氨基酸序列 GYTMN(SEQ ID NO：10) 的 CDR1、具有氨基酸序列 LINPYNGGTSYNQNFKG(SEQ IDNO：11) 的 CDR2 和具有氨基酸序列 EDYDGYLYFAMDY(SEQ ID NO：12) 的 CDR3。

[0011] 在具体实施例中，靶结合成员包含具有 SEQ ID NO：5 的 VL 结构域和具有 SEQ ID NO：9 的 VH 结构域。在其他实施例中，靶结合成员包含全抗体。

[0012] 在多个实施例中，本发明还涉及分离的核酸（其包含编码本发明靶结合成员的核

苷酸序列）、包含此类核酸的表达载体和携带此类表达载体的宿主细胞。

[0013] 在另一个实施例中，本发明涉及产生靶结合成员的方法，该方法包括在适于产生靶结合成员的条件下培养本发明的宿主细胞。

[0014] 在其他实施例中，本发明提供包含本发明靶结合成员和可药用载体的组合物。

[0015] 在另外的实施例中，本发明涵盖在有所需要的受试者中治疗或预防疾病或病症的方法，包括（但不限于）哮喘和炎性肠疾病。

[0016] 在其他实施例中，本发明提供本发明靶结合成员的用法，例如以药物组合物的形式用于治疗疾病或病症，包括炎性病症例如哮喘（包括变应性哮喘）和炎性肠疾病（如克罗恩氏病 (Crohn's disease) 和溃疡性结肠炎）。

[0017] 在另一个实施例中，本发明涉及与结合一条或多条氨基酸序列的靶结合成员竞争结合 IL-25 的靶结合成员，所述氨基酸序列选自 SEQ ID NO :17 的第 46-63 位氨基酸残基、SEQ ID NO :17 的第 66-84 位氨基酸残基和 SEQID NO :17 的第 129-135 位氨基酸残基。在具体实施例中，靶结合成员对人 IL-25 具有小于或等于约 50pM 的结合亲和力。

[0018] 在另一个实施例中，本发明还涉及本发明靶结合成员，其包含 :

[0019] a) 抗体 VL 结构域，其包含相对于 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列具有 1 至约 20 个氨基酸置换的氨基酸序列 ;

[0020] b) 抗体 VH 结构域，其包含相对于 SEQ ID NO :9 的氨基酸序列具有 1 至约 20 个氨基酸置换的氨基酸序列 ;或

[0021] c) 它们的组合。

[0022] 在另一个实施例中，本发明提供产生本发明靶结合成员的方法，其包括 :

[0023] (a) 提供编码 VL 结构域的核酸的起始库，其中核酸包含待置换的 CDR3 编码区或缺乏 CDR3 编码区 ;

[0024] (b) 将起始库与编码具有氨基酸序列 QQYLAFPYTF(SEQ ID NO :8) 的 VL CDR3 的供体核酸组合，其中供体核酸插入库中的一条或多条核酸中，以形成编码 VL 结构域的核酸的产物库，所述 VL 结构域包含具有氨基酸序列 QQYLAFPYTF(SEQ ID NO :8) 的 VL CDR3 ;

[0025] (c) 表达产物库的核酸以形成靶结合成员 ;

[0026] (d) 选择特异性结合一条或多条序列的靶结合成员，所述序列选自 SEQ ID NO :17 的第 56-63 位氨基酸残基、SEQ ID NO :17 的第 66-74 位氨基酸残基和 SEQ ID NO :17 的第 129-135 位氨基酸残基 ;以及

[0027] (e) 回收靶结合成员或编码靶结合成员的核酸。

附图说明

[0028] 本专利或专利申请文件包含至少一张绘制成彩色的附图。在提出请求并且支付必要的费用后，美国专利和商标局将会提供本专利或专利申请公开的带彩图副本。

[0029] 图 1 示出了 huDDG91/RH2.5 R71V 抗体的 κ 轻链核苷酸序列 (SEQ ID NO :1) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :2)。加下划线的氨基酸序列代表 CDR。不包含前导序列。

[0030] 图 2 示出了 huDDG91/RH2.5 R71V 抗体的重链核苷酸序列 (SEQ ID NO :3) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :4)。加下划线的氨基酸序列代表 CDR。不包含前导序列。

[0031] 图 3 是显示 9 个候选单克隆抗体（包括 M6）的性质的表格，这些抗体通过筛选基

于 huDDG91/RH2.5 R71V 抗体的 25 个成员组合文库来识别。斜体代表从不同的数据集获得的数字。R71V G1 是指 huDDG91 抗体。两行 R71V G1 代表来自两个不同数据集的测量值。疏水性增加的残基以黄色突出显示。

[0032] 图 4A 示出了 M6 抗体的轻链 (SEQ ID NO :5) 及其 CDR(SEQ ID NO :6-8) 的氨基酸序列。加下划线的氨基酸序列代表 CDR 的位置。不包含前导序列。加粗红色字体的氨基酸残基表示相对于亲本 huDDG91/RH2.5 R71V 序列的氨基酸置换。

[0033] 图 4B 示出了 M6 抗体的重链 (SEQ ID NO :9) 及其 CDR(SEQ ID NO :10-12) 的氨基酸序列。加下划线的氨基酸序列代表 CDR 的位置。不包含前导序列。

[0034] 图 5 为图表，显示在抑制 IL-4/IL25 介导的天然人 CD4+T 细胞的 IL-5 分泌方面，M6 抑制程度大于 huDDG91(M9) 抗体，所述天然人 CD4+T 细胞在存在 rhIL-4 和 rhIL-25 的情况下使用自体树突状细胞刺激 4 天。同种型 IgG1 抗体 (iso) 用作对照。n ＝ 4 个供体。

[0035] 图 6A 和 6B 为图表，显示在 LS174T 细胞中相对于 huDDG91(M9) 抗体而言，M6 抗体增强了对 IL-25 介导的 GROa 分泌的抑制，所述 LS174T 细胞使用重组人 IL-25 刺激 24 小时。图 6A 和 6B 的图表代表来自两个单独实验的教据。

[0036] 图 7A 显示人 IL-25 的第 1-78 位氨基酸残基 (SEQ ID NO :13) 的序列覆盖图，所述人 IL-25 用胃蛋白酶消化，用 2M 脲、1M TCEP(pH 3.0) 淬灭反应。黑色线条是观察到的肽。

[0037] 图 7B 显示人 IL-25 的第 79-146 位氨基酸残基 (SEQ ID NO :14) 的序列覆盖图，所述人 IL-25 用胃蛋白酶消化，用 2M 脲、1M TCEP(pH 3.0) 淬灭反应。黑色线条是观察到的肽。

[0038] 图 8A 和 8B 显示在 H/D 交换实验中 M6 抗体结合时人 IL-25 蛋白质 (SEQ ID NO :15 和 SEQ ID NO :16) 的不同片段氘化水平的差异。每个方块代表人 IL-25 肽，并且包含六个时间点的数据 :pH 6 下 150s 和 500s，以及 pH 7 下 150s、500s、1,500s 和 5,000s。深蓝色表示在 M6 抗体结合时无保护。其他颜色表示溶液正向 / 柱逆向 (on-solution/off-column) 交换后的氘比柱正向 / 柱逆向 (on-column/off-column) 交换后的更多，如右侧插图所示。连接到每个离子的前两个氨基酸残基中任一个的氘在分析 (水环境中的消化 / 分离 / 质量分析) 期间失去，这解释了 H/D-Ex 图案中的小间隙。

[0039] 图 9A-9F 是图表，显示在 pH 6 和 pH 7、3℃下使用 M6 抗体柱进行正向 / 逆向交换后，人 IL-25 的不同片段中的氘含量。蓝色表示溶液正向 / 柱逆向交换，紫色表示柱正向 / 柱逆向交换。所有交换时间均转换为在 pH 7、23℃下的等效值 (如在 pH 6、3℃下的 150s 等于在 pH 7、23℃下的 1.85s)。每个片段中代表的人 IL-25 残基在每个图的顶部示出。

[0040] 图 10 示出人 IL-25 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :17)。

具体实施方式

[0041] 本发明部分基于高亲和力人 IL-25 抗体 (本文称为“M6”) 的鉴定 (参见实例 1) 以及 M6 抗体结合的人 IL-25 中氨基酸残基的鉴定，如通过氢 / 氘 (H/D) 交换质谱法确定 (参见实例 3)。因此，在一个实施例中，本发明涉及结合 IL-25 的靶结合成员，其中靶结合成员结合一条或多条氨基酸序列，其选自人 IL-25(SEQ ID NO :17) 的第 46-63 位、第 66-84 位和第 129-135 位氨基酸残基。因此，本发明的靶结合成员可结合 SEQ ID NO :17 的第 46-63 位氨基酸残基、SEQ ID NO :17 的第 66-84 位氨基酸残基、或 SEQ ID NO :17 的第 129-135 位氨

基酸残基、或它们的任何组合。在一个实施例中，本发明的靶结合成员结合 SEQ ID NO：17 的第 56-63 位氨基酸和 SEQ ID NO：17 的第 66-74 位氨基酸。

[0042] 如本文所用，“靶结合成员”是指包含具有免疫球蛋白分子的至少一部分的分子的任何蛋白质或肽，所述免疫球蛋白分子的至少一部分包含重链或轻链的至少一个互补决定区 (CDR) 或它们的配体结合部分，所述配体结合部分特异性结合哺乳动物（例如人）IL-25 蛋白质或它们的一部分。此类靶结合成员还可包括抗体重链或轻链可变区的至少一部分、抗体重链或轻链恒定区的至少一部分、抗体骨架区的至少一部分、或它们的任何组合。此类靶结合成员在体外、原位和 / 或体内调节、减小、拮抗、减轻、缓解、阻断、抑制、消除和 / 或干扰至少一种 IL-25 的活性或结合，或 IL-25 受体的活性或结合。作为非限制性例子，合适的本发明靶结合成员可高亲和力地结合至本文所述 M6 抗体所识别的人 IL-25 的抑制和 / 或中和表位。

[0043] 本发明的靶结合成员不限于仅结合 SEQ ID NO：17 的第 46-63 位氨基酸残基、第 66-84 位氨基酸残基和 / 或第 129-135 位氨基酸残基的那些成员。因此，在一些实施例中，本发明的靶结合成员可另外结合至人 IL-25 中不涵盖 SEQ ID NO：17 的第 46-63 位氨基酸残基、第 66-84 位氨基酸残基和 / 或第 129-135 位氨基酸残基的一个或多个其他部分。在其他例子中，本发明的靶结合成员可另外结合至人 IL-25 中侧接 SEQ ID NO：17 的第 46-63 位氨基酸残基、第 66-84 位氨基酸残基和 / 或第 129-135 位氨基酸残基的一个或多个氨基酸残基。

[0044] 本发明还设想这样的靶结合成员，其结合涵盖在 SEQ ID NO：17 的第 46-63 位氨基酸残基、第 66-84 位氨基酸残基和 / 或第 129-135 位氨基酸残基内的人 IL-25 的一个或多个部分，例如由 SEQ ID NO：17 的第 46-63 位氨基酸残基、第 66-84 位氨基酸残基和 / 或第 129-135 位氨基酸残基中至少 5 个氨基酸组成的 IL-25 部分。靶结合成员可结合的 IL-25 的示例性部分包括 SEQID NO：17 的第 56-63 位氨基酸和 / 或第 66-74 位氨基酸。

[0045] 本发明靶结合成员结合的 IL-25 的区或表位可使用本发明所属领域熟知的多种标准表位绘图技术中的任何一种确定。此类技术包括（例如）与结合测定法联合使用的定点诱变、使用肽针进行的表位绘图（例如 Geysen et al.，Peptides：Chem istry and Biological，Proceedings of the Twelfth American Peptide Symposium，p.519-523，Ed，G.R.Marshall，Escom，Leiden，1988（Geysen 等人，“肽：化学和生物学”，《第十二届美国肽研讨会论文集》，第 519-523 页，G.R.Marshall、Escom、Leiden 编辑，1988 年））、X 射线结晶学和氢 / 氘 (H/D) 交换技术（如 H/D 交换质谱法）。

[0046] 如本文所述，H/D 交换质谱法用于确定 M6 抗体识别和结合的人 IL-25 中的表位（参见实例 3 和图 8A、8B 和 9A-9F）。在从水向基于氘的溶剂体系（重水）转移时，随着蛋白质的氢原子逐渐被氘核（氢的更重同位素）置换，蛋白质将经历质量的增加。氢 / 氘交换事件的可能性主要由蛋白质结构和溶剂可及性决定。H/D 交换质谱法用于测量交换，从而测量蛋白质结构和溶剂可及性。当小分子或蛋白质结合伙伴结合至蛋白质靶标时，该靶标经历实验上可观察的交换速率的变化。在复合物形成时排斥溶剂的表面区交换要慢很多。溶剂被排斥区域可用于推断结合位点的位置。例如，就抗原 - 抗体相互作用来说，这些变化突出显示了表位的位置。

[0047] 通常，本发明的靶结合成员将包含抗体轻链可变区 (VL) 结构域，其与抗体重

链可变区 (VH) 结构域配对形成 IL-25 结合域。在制备本文所述发明的过程中，发现将 huDDG91 抗体 VL 结构域 (SEQ ID NO :1) 中的互补决定区 (CDR)，特别是 CDR3 区改变为 QQYLAFPYTF(SEQ ID NO :8)，可改善 huDDG91 抗体的结合亲和力。因此，本文所述的发明设想了包含 SEQ ID NO :8 的 VL 结构域和包含此类 VL 结构域的靶结合成员。在一些实施例中，本发明靶结合成员中的 VL 结构域还包含来自 M6 和 huDDG91 抗体的 CDR1(SASQGISNYLN(SEQ ID NO :6)) 和 CDR2(YTSSLHS(SEQ ID NO :7)) 区。适于包含在本发明靶结合成员中的其他 VL CDR 区包括（但不限于）图 3 中示出的任何 VL CDR1 区。在一个实施例中，本发明的靶结合成员包括 M6 抗体的 VL 结构域 SEQ ID NO :5。

[0048] 在一些实施例中，本发明的靶结合成员还包括具有对应于 M6 和 huDDG91 抗体的 CDR 区的 SEQ ID NO :10-12 的 VH 结构域。适于包含在本发明靶结合成员中的其他 VH CDR 区包括（但不限于）图 3 中示出的任何 VH CDR3 区。在优选的实施例中，本发明的靶结合成员包括 M6 和 huDDG91 抗体的 VH 结构域 SEQ ID NO :9。VH 结构域可与除 M6 抗体的 VL 结构域 (SEQ ID NO :5) 之外的多个 VL 结构域配对。优选地，VH 结构域与包含 CDR3 区的 VL 结构域（具有 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列）配对。

[0049] 本文所述的 M6 抗体的 CDR 的序列可通过插入、置换和缺失来修饰，并且包括在本发明的靶结合成员中，只要具有修饰的 CDR 的靶结合成员（例如抗体）能维持结合到人 IL-25 和抑制人 IL-25 的能力。普通技术人员可通过执行本文所述的功能测定法来确定该活性的维持。本发明靶结合成员中的 CDR 与对应的 SEQ ID NO :6、7、8、10、11 或 12 表示的 M6CDR 相比，可具有（例如）约 50％至约 100％的同源性，优选地约 80％至约 100％的同源性，更优选地约 90％至约 100％的同源性。在一个实施例中，本发明靶结合成员中的 CDR 与对应的 SEQ ID NO :6、7、8、10、11 或 12 表示的 M6CDR 相比，可具有约 100％的同源性。

[0050] 根据本发明的靶结合成员可结合 IL-25，其亲和力基本上类似于、或大于本文所述的 M6 抗体的亲和力。例如，本发明的靶结合成员对 IL-25(例如人 IL-25) 可具有约 50pM(例如约 53pM) 或更小，例如约 45pM、约 40pM、约 35pM、约 30pM、约 25pM 或约 20pM 的结合亲和力。靶结合成员将通常具有 IL-25 特异性。因此，靶结合成员将不会表现出任何显著的与除其特异性结合伙伴之外的分子结合。例如，已经发现的是本文所述的 M6 抗体不会与 IL-17A、IL-17C、IL-17D 或 IL-17F 交叉反应。在本发明的一些实施例中，避免此类与其他涉及哮喘的细胞因子的交叉反应和类似过程是靶结合成员的所需特征。

[0051] 靶结合成员抗原的亲和力或亲合力可使用任何合适的方法通过实验确定。（参见例如 Berzofsky et al.,“Antibody-Antigen Interactions,”inFundamental Immunology, Paul, W.E., Ed., Raven Press :New York, N.Y.(1984)(Berzofsky 等人，“抗体 - 抗原相互作用”，载于《基础免疫学》，Paul, W.E. 编辑，雷文出版社，纽约州纽约市，1984 年）；Kuby, Janis, Immunology, W.H.Freeman and Company :New York, N.Y.(1992)(Kuby、Janis，《免疫学》，W.H. 弗里曼公司，纽约州纽约市，1992 年）；以及本文所述的方法）。如果在不同的条件（例如，盐浓度、pH) 下测量，则测得的特定抗体 - 抗原相互作用的亲和力会不同。因此，亲和力和其他抗原结合参数（例如 KD、Ka、Kd) 的测量优选地用抗体和抗原的标准溶液以及标准缓冲液（例如本文所述的缓冲液）来进行。

[0052] 例如，特异性可通过结合测定法，例如使用一组抗原的 ELISA、Biacore 测定法和 / 或 Octet 测定法等等来确定。根据本发明的靶结合成员可识别 IL-25 而非 IL-17 家族的其

他成员，尤其是 IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D 和 IL-17F 中的任何一者；在一个实施例中，所有五个这些分子。根据本发明的靶结合成员与 IL-25 的结合可以通过用重组 IL-25 竞争消除。

[0053] 不同靶结合成员的结合亲和力和中和效价可在适当的条件下比较。

[0054] 本发明还涉及与结合一条或多条氨基酸序列的本发明靶结合成员竞争结合 IL-25 的靶结合成员，所述氨基酸序列选自 SEQ ID NO：17 的第 46-63 位氨基酸残基、SEQ ID NO：17 的第 66-84 位氨基酸残基和 SEQ ID NO：17 的第 129-135 位氨基酸残基。在具体实施例中，靶结合成员对人 IL-25 具有小于或等于约 50pM 的结合亲和力。

[0055] 可用本发明的靶结合成员（例如抗体）进行竞争性测定法，以确定什么蛋白质、抗体和其他拮抗剂与本发明的靶结合成员竞争与 IL-25 的结合和 / 或共享表位区。这些测定法是本领域普通技术人员熟知的，用来评估拮抗剂或配体之间对某种蛋白质（例如 IL-25）上的有限数目的结合位点的竞争。将蛋白质和 / 或抗体在竞争之前或之后进行固定化或不溶解化，并且将结合到 IL-25 蛋白的样品与未结合的样品分离，例如通过倾析（在蛋白质 / 靶结合成员进行预先不溶解化的情况下）或通过离心（在蛋白质 / 抗体在竞争性反应后沉淀出来的情况下）进行分离。另外，可通过靶结合成员与蛋白的结合或无结合是否会使功能发生改变，例如靶结合成员分子是否会抑制或增强（例如）标记物的酶活性，来确定竞争性结合。可使用 ELISA 和其他的功能测定法，这是本领域公知的。

[0056] 抗体

[0057] 优选地，本发明的靶结合成员是抗体分子。术语“抗体”旨在涵盖全抗体、其消化片段、特定部分或变体，包括抗体模拟物或模拟抗体或其特定片段或部分的结构和 / 或功能的抗体部分，包括单链抗体及其片段；每个均包含至少一个 CDR。功能片段包括结合哺乳动物 IL-25 的抗原结合片段。例如，能够结合到 IL-25 或其部分的抗体片段涵盖在本发明中，包括（但不限于）：Fab 片段（如通过木瓜蛋白酶消化得到）、Fab′ 片段（如通过胃蛋白酶消化和部分还原得到）和 $F(ab')_2$ 片段（如通过胃蛋白酶消化得到）、facb 片段（如通过纤溶酶消化得到）、pFc′ 片段（如通过胃蛋白酶或纤溶酶消化得到）、Fd 片段（如通过胃蛋白酶消化、部分还原以及重聚集得到）、Fv 或 scFv 片段（如通过分子生物学技术得到）（参见例如 Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994 2001)（Colligan 等人编辑，《免疫学实验室指南》，约翰·威利父子出版公司，纽约，1994、2001 年）；Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997 2001)（Colligan 等人，《蛋白质科学实验室指南》，约翰·威利父子出版公司，纽约州纽约，1997、2001 年））。

[0058] 通过本领域中已知和 / 或本文描述的酶促切割、合成或重组技术可制备这些片段。使用其中在天然终止位点上游引入了一个或多个终止密码子的抗体基因也可以产生多种截短形式的抗体。例如，可以将编码 $F(ab')_2$ 重链部分的组合基因设计成包括编码重链的 CH_1 结构域和 / 或铰链区的 DNA 序列。抗体的各个部分可通过常规技术用化学方法连接在一起，或可使用遗传工程技术制备为连续蛋白质。

[0059] 如本文所用，术语“抗体”还旨在涵盖“嵌合”抗体和“人源化”或“CDR- 移植”抗体，所述抗体包括本文描述的 M6CDR 与一种或多种衍生自非鼠源，优选地人抗体的蛋白质或肽的任何组合。根据本发明，提供嵌合或人源化抗体，其中 CDR 衍生自 M6 抗体。因此，在

一个实施例中，抗体的人源部分可以包括基本上在人体中为非免疫原性的区域。衍生自人抗体的抗体的区域不需要与人抗体具有100％的同一性。在优选的实施例中，保留了尽可能多的人氨基酸残基，使得免疫原性可以忽略不计，但可以根据需要修饰人残基以支持CDR形成的抗原结合位点，同时使抗体的人源化程度最大化。这些改变或变异任选且优选相对于未经修饰的抗体而言保持或减少在人或其他物种中的免疫原性。人源化抗体可由能够表达功能性重排的人免疫球蛋白（例如重链和/或轻链）基因的非人动物或原核或真核细胞产生。此外，当抗体是单链抗体时，它可包含在天然人抗体中不存在的连接肽。例如，Fv可包含连接重链可变区和轻链可变区的连接肽，例如2至约8个甘氨酸或其他氨基酸残基。此类连接肽被认为是人源的。

[0060] 作为另外一种选择，图4A和4B中M6抗体的整个重链可变区和轻链可变区(SEQ ID NO:5和9)可以与人恒定区和骨架区组合形成本发明的靶结合成员。

[0061] 编码本发明靶结合成员恒定(C)区的人基因可通过已知的方法衍生自人胎肝库。人C区基因可衍生自任何人细胞，包括表达和产生人免疫球蛋白的那些细胞。人CH区可衍生自任何已知类型或同种型的人H链，包括γ、μ、α、δ、ε及其亚型，例如G1、G2、G3和G4。由于H链同种型负责抗体的各种效应子功能，所以CH区的选择将由所需的效应子功能，例如补体结合或抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的活性来引导。在一个实施例中，CH区衍生自γ1(IgG1)。

[0062] 人CL区可衍生自人L链同种型κ或λ中的一者，优选地κ。

[0063] 编码人免疫球蛋白C区的基因可通过标准克隆技术从人类细胞获得（例如Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,2nd Edition,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989)(Sambrook等人，《分子克隆:实验室手册》，第2版，冷泉港实验室出版社，纽约州冷泉港，1989年）和Ausubel et al.,eds.,Current Protocols in Molecular Biology(1987,1993)(Ausubel等人编辑，《分子生物学实验室指南》，1987、1993年））。人C区基因可从包含代表两种类型L链、五种类型H链及其亚类的基因的已知克隆容易地获得。嵌合抗体片段，例如$F(ab_1)_2$和Fab可通过设计适当截短的嵌合H链基因来制备。例如，编码$F(ab_1)_2$片段的H链部分的嵌合基因可包含编码H链的CH1结构域和铰链区的DNA序列，然后是翻译终止密码子以产生截短的分子。

[0064] 一般来讲，在一个例子中，通过克隆编码M6抗体的H和L链抗原结合区的DNA片段，并将这些DNA片段与分别编码CH和CL区的DNA片段连接，以产生编码嵌合免疫球蛋白的基因来产生本发明的嵌合抗体、片段和区域。

[0065] 因此，在一个实施例中，产生包含第一DNA片段的融合嵌合基因，所述第一DNA片段编码至少非人源的抗原结合区，例如功能重排V区，并通过连接(J)片段连接至编码至少部分人C区的第二DNA片段。

[0066] M6抗体可变区的序列可以通过插入、置换和缺失来修饰，只要靶结合成员能维持结合到人IL-25和抑制人IL-25的能力。

[0067] 为了方便起见，本文采取Kabat等人的编号方案。残基以小写数字或必要的连字符标明，以使本发明的序列与标准Kabat编号序列一致。

[0068] 根据本发明，就CDR-移植或人源化抗体（其中M6抗体的CDR区与人源区组合）来说，亲本抗体（例如M6）特异性的残基可保留在FR区中。已证明在其他抗体的人源化中

具有关键作用的残基也可以保留。可在一定程度上遵循这些准则，但必需支持 CDR 形成的抗原结合位点，同时使抗体的人源化程度最大化。

[0069] 用于工程化的或人源化非人或人抗体的方法也可以使用并且是本领域所熟知的。一般来讲，人源化或工程化的抗体具有来自非人来源的一个或多个氨基酸残基，所述非人来源例如（但不限于）小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物或其他哺乳动物。这些人氨基酸残基通常称为“输入”残基，它们一般取自已知人序列的“输入”可变结构域、恒定结构域或其他结构域。已知的人 Ig 序列是公开的，例如在多个公共数据库（例如美国国立卫生研究院 (National Institute of Health) 的 NCBI 数据库）或出版物（例如 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983) (Kabat 等人，《具有免疫学重要性的蛋白质序列》，美国卫生部，1983 年)）中公开。

[0070] 如本领域所知，此类输入序列可用于减少免疫原性，或减少、增强或修饰结合性、亲和力、结合速率、解离速率、亲合力、特异性、半衰期或任何其他合适的特征。一般来讲，可保留部分或全部非人或人 CDR 序列，而可变区和恒定区的非人序列用人源或其他氨基酸置换。抗体还可任选是人源化的，保留对抗原的高度亲和力以及其他有利的生物学特性。为了实现该目标，可任选通过这样的过程来制备人源化抗体，该过程是用亲本序列和人源化序列的三维模型对亲本序列和各种构想的人源化产物进行分析。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的，并且是为本领域的技术人员所熟悉的。有能说明并显示所选择的候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序可供使用。对这些显示结果进行检查，可以分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能发挥中的可能作用，即分析影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基。以这种方式，可从共有序列和输入序列中选择 FR 残基并进行组合，从而可实现所需的抗体特征，例如对靶抗原的亲和力增加。通常，CDR 残基直接且最显著地参与影响抗原结合。本发明抗体的人源化或工程化可使用任何已知方法进行，例如但不限于 Jones et al., Nature 321 :522 (1986) (Jones 等人，《自然》，第 321 卷，第 522 页，1986 年）；Riechmann et al., Nature 332 :323 (1988) (Riechmann 等人，《自然》，第 332 卷，第 323 页，1988 年）；Verhoeyen et al., Science 239 :1534 (1988) (Verhoeyen 等人，《科学》，第 239 卷，第 1534 页，1988 年）；Sims et al., J. Immunol. 151 :2296 (1993) (Sims 等人，《免疫学杂志》，第 151 卷，第 2296 页，1993 年）；Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196 :901 (1987) (Chothia 和 Lesk，《分子生物学杂志》，第 196 卷，第 901 页，1987 年）；Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89 :4285 (1992) (Carter 等人，《美国国家科学院院刊》，第 89 卷，第 4285 页，1992 年）；Presta et al., J. Immunol. 151 :2623 (1993) (Presta 等人，《免疫学杂志》，第 151 卷，第 2623 页，1993 年）；美国专利 No. 5,723,323、5,976,862、5,824,514、5,817,483、5,814,476、5,763,192、5,723,323、5,766,886、5,714,352、6,204,023、6,180,370、5,693,762、5,530,101、5,585,089、5,225,539、4,816,567、PCT/US98/16280、US96/18978、US91/09630、US91/05939、US94/01234、GB89/01334、GB91/01134、GB92/01755、WO90/14443、WO90/14424、WO90/14430、EP 229246（每个专利全文，包括其中引用的文献以引用方式并入本文）中描述的那些方法。

[0071] 本发明靶结合成员的人恒定区可以为任何类型 (IgG、IgA、IgM、IgE、IgD 等）或同种型，并且可包含 κ 或 λ 轻链。在一个实施例中，人恒定区包含 IgG 重链或限定片段，例如，至少一种同种型 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。在另一个实施例中，靶结合成员包含 IgG1

重链和 IgG1K 轻链。本发明分离的靶结合成员可包含任何合适的多核苷酸编码的本文所公开的抗体氨基酸序列。优选地，靶结合成员结合人 IL-25，因此部分或基本上中和蛋白质的至少一种生物活性。靶结合成员或其特定部分或变体，部分地或优选地基本上中和至少一种 IL-25 蛋白或片段的至少一种生物活性，从而抑制通过 IL-25 与 IL-25 受体结合或通过其他 IL-25 依赖性或介导的机制介导的活性。如本文所用，术语“中和抗体”是指取决于测定，可以使 IL-25 依赖性活性抑制约 20-100％的抗体，优选地抑制至少约 10、20、30、40、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100％或更多。靶结合成员抑制 IL-25 依赖性活性的能力优选地通过本文所述的和 / 或本领域已知的至少一种合适的 IL-25 蛋白或受体测定来进行评估。

[0072] 至少一种本发明的抗体结合至少一个本文具体说明的表位，M6 抗体结合至该表位。该至少一个表位可包含至少一个抗体结合区，该抗体结合区包含所述蛋白质的至少一部分，该表位优选由所述蛋白质的至少一个细胞外的、可溶性的、亲水的、外部的或胞质的部分构成。一般来讲，本发明的靶结合成员将包含这样的抗原结合区，该抗原结合区包含 SEQ ID NO.10、11 和 12 的至少一个互补决定区 (CDR1、CDR2 和 CDR3) 或至少一个重链可变区的变体和至少一个人互补决定区 (CDR1、CDR2 和 CDR3)(SEQ IDNO.6、7 和 8) 或至少一个轻链可变区的变体。

[0073] 结合到人 IL-25 并且包含限定重链或轻链可变区或 CDR 区的靶结合成员可使用合适的方法，例如噬菌体展示 (Katsube，Y.，et al.，Int J.Mol.Med,1(5) :863868(1998)(Katsube,Y. 等人，《国际分子医学杂志》，第 1 卷，第 5 期，第 863-868 页，1998 年)) 或采用转基因动物的方法制备，如本领域已知的和 / 或本文所述的。例如，抗体、特定部分或变体可以使用编码核酸或其部分在合适的宿主细胞中表达。

[0074] 如上所述，本发明还涉及包含氨基酸序列的抗体、抗原结合片段、免疫球蛋白链和 CDR，所述氨基酸序列基本上与本文所述的 M6 氨基酸序列相同。此类抗 IL-25 抗体可包含一个或多个得自天然突变或人为操纵的氨基酸置换、缺失或添加，如本文所说明。优选地，此类抗体或抗原结合片段和包含此类链或 CDR 的抗体可以高亲和力 (例如小于或等于约 10-9M 的 KD) 结合人 IL-25。基本上与本文所述序列相同的氨基酸序列包括包含保守氨基酸置换以及氨基酸缺失和 / 或插入的序列。保守氨基酸置换是指用第二种氨基酸置换第一种氨基酸，所述第二种氨基酸具有的化学和 / 或物理性质 (例如电荷、结构、极性、疏水性 / 亲水性) 与第一种氨基酸相似。保守置换包括一个氨基酸被另一个如下组中的氨基酸置换 :赖氨酸 (K)、精氨酸 (R) 和组氨酸 (H) ;天冬氨酸 (D) 和谷氨酸 (E) ;天冬酰胺 (N)、谷氨酰胺 (Q)、丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T)、酪氨酸 (Y)、K、R、H、D 和 E ;丙氨酸 (A)、缬氨酸 (V)、亮氨酸 (L)、异亮氨酸 (I)、脯氨酸 (P)、苯丙氨酸 (F)、色氨酸 (W)、甲硫氨酸 (M)、半胱氨酸 (C) 和甘氨酸 (G) ;F、W 和 Y ;C、S 和 T。

[0075] 技术人员可以进行的氨基酸置换数取决于许多因素，包括上文所述的那些。一般来讲，对于任何给定的抗 IL-25 抗体、片段或变体的氨基酸置换、插入或缺失数目将不超过 40、30、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个，例如 1-30 个或其中的任何范围或值，如本文说明。

[0076] 可通过本领域已知的方法来鉴定本发明的靶结合成员中对于功能而言必需的氨基酸，所述方法例如定点诱变或丙氨酸扫描诱变 (例如 Ausubel，出处同上，第 8、15 章 ；

Cunningham and Wells, Science 244 :1081 1085(1989)(Cunningham 和 Wells,《科学》,第 244 卷,第 1081-1085 页,1989 年))。后一种方法在分子的每个残基处引入单丙氨酸突变。随后测试所得突变分子的生物活性,例如但不限于至少一种 IL-25 中和活性。抗体结合至关重要的位点也可以通过结构分析进行鉴定,例如结晶、核磁共振或光亲和标记 (Smith, et al., J.Mol.Biol.224 :899 904(1992)(Smith 等人,《分子生物学杂志》,第 224 卷,第 899-904 页,1992 年)和 de Vos, et al., Science 255 :306 312(1992)(de Vos 等人,《科学》,第 255 卷,第 306-312 页,1992 年))。

[0077] 本发明的靶结合成员可包括(但不限于)选自 SEQ ID NO :5-12 中至少一者的 5 个至全部邻接氨基酸的至少一个部分、序列或组合。

[0078] 靶结合成员还可任选包含 SEQ ID NO :5 或 9 中至少一者的 70-100%的邻接氨基酸中的至少一者所成的多肽。

[0079] 在一个实施例中,免疫球蛋白链或其部分(如可变区、CDR) 的氨基酸序列与 SEQ ID NO :5 或 9 中至少一者的相应链的氨基酸序列具有约 70-100%的同一性(如 70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100 或其中的任何范围或值)。例如,轻链可变区的氨基酸序列可以与 SEQ ID NO :5 的序列进行比较,或者重链可变区的氨基酸序列可以与 SEQ ID NO :9 进行比较。优选地,用本领域已知的合适计算机算法确定出 70-100%氨基酸同一性(即 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100 或者其中的任何范围或值)。

[0080] 在 SEQ ID NO :5 和 9 中提供了示例性重链和轻链可变区序列。本发明的靶结合成员或其特定变体可包含任何数目的来自本发明抗体的邻接氨基酸残基,其中该数目选自靶结合成员中邻接残基数目的 10-100%的整数。任选地,该邻接氨基酸亚序列长度为至少约 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250 或更多个氨基酸,或其中的任何范围或数值。此外,所述亚序列的数目可以为选自 1 至 20 的任何整数,例如至少 2、3、4 或 5。

[0081] 技术人员将会知道,本发明包括本发明的至少一种生物活性抗体。生物活性抗体的比活性为天然(非合成)的、内源性或相关的和已知的抗体比活性的至少 20%、30%或 40%,并且优选地至少 50%、60%或 70%,并且最优选至少 80%、90%或 95% -1000%。测定和定量酶活性和底物特异性的度量的方法是本领域技术人员公知的。

[0082] 在另一个方面,本发明涉及通过共价连接有机部分进行修饰的本文所述靶结合成员。这种修饰可产生具有改善的药物代谢动力学性质(如体内血清半衰期增加)的抗体或抗原结合片段。有机部分可以是线性或分支的亲水聚合基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。在具体实施例中,亲水性聚合物基团可具有约 800 至约 120,000 道尔顿的分子量,并且可以是聚链烷二醇(例如聚乙二醇 (PEG)、聚丙二醇 (PPG))、碳水化合物聚合物、氨基酸聚合物或聚乙烯吡咯烷酮,并且脂肪酸或脂肪酸酯基团可包含约 8 至约 40 个碳原子。

[0083] 本发明的修饰的靶结合成员可包含一个或多个直接或间接地共价键合到该抗体的有机部分。与本发明的抗体或抗原结合片段结合的每个有机部分可以独立地是亲水聚合基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。如本文所用,术语“脂肪酸”涵盖单羧酸和二羧酸。本文所用的术语“亲水聚合基团”是指在水中比在辛烷中更易溶的有机聚合物。例如,聚赖氨酸在水中比在辛烷中更易溶。因此,通过共价连接聚赖氨酸来修饰的抗体包括在本发明内。

适用于修饰本发明抗体的亲水聚合物可以是直链或支链的，并且包括（例如）聚链烷二醇（例如 PEG、单甲氧基 - 聚乙二醇 (mPEG)、PPG 等）、碳水化合物（例如葡聚糖、纤维素、寡糖、多糖等）、亲水性氨基酸聚合物（例如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚天冬氨酸等）、聚环氧链烷（例如，聚环氧乙烷、聚环氧丙烷等）和聚乙烯吡咯烷酮。优选地，修饰本发明抗体的亲水聚合物作为单独的分子实体具有约 800 至约 150,000 道尔顿的分子量。例如可使用 PEG_{5000} 和 $PEG_{20,000}$，其中下标是聚合物的平均分子量（道尔顿）。亲水聚合基团可以由 1 至约 6 个烷基、脂肪酸或脂肪酸酯基团取代。由脂肪酸或脂肪酸酯基团取代的亲水聚合物可以通过采用合适的方法制备。例如，包含胺基的聚合物可以与脂肪酸或脂肪酸酯的羧基偶联，并且脂肪酸或脂肪酸酯上的活化羧基（例如用 N，N- 羰基二咪唑活化）可以与聚合物上的羟基偶联。

[0084] 适用于修饰本发明抗体的脂肪酸和脂肪酸酯可以是饱和的或可包含一个或多个不饱和单位。适用于修饰本发明抗体的脂肪酸包括（例如）正十二烷酸 (C12，月桂酸）、正十四烷酸 (C14，肉豆蔻酸）、正十八烷酸 (C18，硬脂酸）、正二十烷酸 (C20，花生酸）、正二十二烷酸 (C22，山嵛酸）、正三十烷酸 (C30)、正四十烷酸 (C40)、顺式 - δ 9- 十八烷酸 (C18，油酸）、全顺式 - δ 5,8,11,14- 二十碳四烯酸 (C20，花生四烯酸）、辛二酸、十四烷二酸、十八烷二酸、二十二烷二酸等。合适的脂肪酸酯包括包含直链或支链的低级烷基的二羧酸单酯。低级烷基可包含 1 至约 12 个，优选 1 至约 6 个碳原子。

[0085] 修饰的靶结合成员可使用合适的方法来制备，例如通过与一种或多种修饰剂反应来制备。本文所用的术语“修饰剂”是指包含活化基团的合适有机基团（例如亲水性聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯）。“活化基团”是化学部分或官能团，它们可在合适条件下与第二化学基团反应，由此在修饰剂和第二化学基团之间形成共价键。例如，胺反应性活化基团包括亲电子基团，例如甲苯磺酸酯、甲磺酸酯、卤素（氯、溴、氟、碘）、N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (NHS) 等。可以与硫醇反应的活化基团包括（例如）马来酰亚胺、碘代乙酰基、丙烯酰基 (acryloyl)、吡啶基二硫化物、5- 硫醇 -2- 硝基苯甲酸硫醇 (TNB- 硫醇）等。醛官能团可以与含胺或酰肼的分子偶联，并且叠氮基可以与三价含磷基团反应以形成氨基磷酸酯或磷酰亚胺键。将活化基团引入分子的合适方法是本领域已知的（参见例如 Hermanson，G. T.，Bioconjugate Techniques，Academic Press：San Diego，Calif. (1996) (Hermanson，G. T.，《生物交联技术》，学术出版社，加利福尼亚州圣地亚哥，1996 年））。活化基团可直接或通过接头部分与有机基团（例如亲水性聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯）键合，所述接头部分例如为其中一个或多个碳原子可由杂原子（例如氧、氮或硫）取代的二价 C_1-C_{12} 基团。合适的接头部分包括例如四乙二醇、--$(CH_2)_3$--、--NH--$(CH_2)_6$--NH--、--$(CH_2)_2$--NH-- 和 --CH_2--O--CH_2--CH_2--O--CH_2--CH_2--O--CH--NH--。包含接头部分的修饰剂，可例如通过使单 -Boc- 烷基二胺（例如单 -Boc- 乙二胺、单 -Boc- 二氨基己烷）与脂肪酸在 1- 乙基 -3-(3- 二甲氨基丙基）碳二亚胺 (EDC) 存在下反应以在游离胺和脂肪酸羧酸酯之间形成酰胺键来产生。可通过用三氟乙酸 (TFA) 处理从产物除去 Boc 保护基以暴露出伯胺，后者可偶联到另一羧酸酯（如所描述），或者可与马来酸酐反应并且所得的产物环化以产生脂肪酸的活化马来酰亚胺基衍生物。（参见例如 Thompson 等人的 WO 92/16221，该专利的全部教导内容以引用方式并入本文。）

[0086] 本发明的修饰的靶结合成员可以通过使人抗体或抗原结合片段与修饰剂反应来

产生。例如，有机部分可以通过使用胺反应性改性剂（例如 PEG 的 NHS 酯）以非位点特异性方式结合至抗体。修饰的人抗体或抗原结合片段还可以通过使抗体或抗原结合片段的二硫键（例如链内二硫键）还原来制备。还原的抗体或抗原结合片段随后可以与硫醇反应性改性剂反应以产生本发明的修饰抗体。包含与本发明抗体特定位点键合的有机部分的修饰的人抗体和抗原结合片段可使用合适的方法制备，所述方法例如为逆向蛋白水解作用 (Fisch et al.，Bioconjugate Chem.，3：147 153(1992)(Fisch 等人，《生物交联化学》，第 3 卷，第 147-153 页，1992 年）；Werlen et al.，Bioconjugate Chem.，5：411 417(1994)(Werlen 等人，《生物交联化学》，第 5 卷，第 411-417 页，1994 年）；Kumaran et al.，Protein Sci.6(10)：22332241(1997)(Kumaran 等人，《蛋白质科学》，第 6 卷，第 10 期，第 2233-2241 页，1997 年）；Itoh et al.，Bioorg.Chem.，24(1)：5968(1996)(Itoh 等人，《生物有机化学》，第 24 卷，第 1 期，第 59-68 页，1996 年）；Capellas et al.，Biotechnol.Bioeng.，56(4)：456463(1997)(Capellas 等人，《生物技术和生物工程》，第 56 卷，第 4 期，第 456-463 页，1997 年）），以及 Hermanson，G.T.，Bioconjugate Techniques，Academic Press：San Diego，Calif.(1996)(Hermanson，G.T.，《生物交联技术》，学术出版社，加利福尼亚州圣地亚哥，1996 年）中描述的方法。

[0087] 用于本发明方法和组合物的靶结合成员特征在于结合到 IL-25 的高亲和力，并且任选地具有低毒性。具体地讲，本发明的靶结合成员（其中各个组分，例如可变区、恒定区和骨架区单独和 / 或共同地、任选地并且优选地具有低免疫原性）可用于本发明中。可用于本发明的靶结合成员任选特征在于它们能长期用于治疗患者，可显著减轻症状并且具有低毒性和 / 或可接受的毒性。低的或可接受的免疫原性和 / 或高亲和力以及其他合适的特性，可有助于实现治疗结果。“低免疫原性”在本文中定义为在低于约 75％，或优选低于约 50％的受治疗的患者中产生显著的 HAHA、HACA 或 HAMA 应答，和 / 或在受治疗的患者中引起低滴度（以双抗原酶免疫测定法测量小于约 300，优选地小于约 100)(Elliott et al.，Lancet 344：1125 1127(1994)(Elliott 等人，《柳叶刀》，第 344 卷，第 1125-1127 页，1994 年），其以引用方式并入本文）。

[0088] 还可以使用双特异性抗体、异种特异性抗体、异种缀合抗体或类似抗体，它们是对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆的、人源化的抗体。在这种情况下，一种结合特异性针对至少一种 IL-25 蛋白，另一种结合特异性针对任何其他抗原。制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。通常，双特异性抗体的重组产生是基于两个免疫球蛋白重链 - 轻链对的共表达，其中两条重链具有不同的特异性 (Milstein and Cuello，Nature 305：537(1983)(Milstein 和 Cuello，《自然》，第 305 卷，第 537 页，1983 年）。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配，这些杂交瘤（四源杂交瘤 (quadroma)）产生可能的 10 种不同抗体分子的混合物，其中仅一种具有正确的双特异性结构。正确分子的纯化（通常通过亲和层析步骤进行）相当繁琐，并且产物得率低。类似的方法在例如 WO 93/08829、美国专利 No.6,210,668、6,193,967、6,132,992、6,106,833、6,060,285、6,037,453、6,010,902、5,989,530、5,959,084、5,959,083、5,932,448、5,833,985、5,821,333、5,807,706、5,643,759、5,601,819、5,582,996、5,496,549、4,676,980、WO 91/00360、WO 92/00373、EP 03089、Traunecker et al.，EMBO J.10：3655(1991)(Traunecker 等人，《欧洲分子生物学组织杂志》，第 10 卷，第 3655 页，1991 年）、Suresh et al.，Methods inEnzymology 121：

210(1986)(Suresh 等人,《酶学方法》,第 121 卷,第 210 页,1996 年)中有所公开,每个这些专利全文以引用方式并入本文。

[0089] IL-25

[0090] Il-25 在本领域中也称为 IL-17E,可得自商业来源(例如美国明尼苏达州安迪生物 (R&D Systems,MN,USA)),或可以通过参考本领域可获得的 IL-25 的序列来克隆或合成。人 IL-25 的序列 (SEQ ID NO:17) 在图 3 中示出。对于抗体的产生或在免疫测定法中的使用,可使用 IL-25 蛋白的任何片段或片段组合(例如重组 IL-25 蛋白),尤其是 N- 末端截短的那些。例如,市售的重组人 IL-25(IL-17E) 包含 Tyr 33-Gly 177 的成熟蛋白质序列(登录 No.Q9H293),并且市售的鼠 IL-25 包含小鼠 IL-17E 的 Val 17-Ala 169 残基(登录 No.NP 542767)。

[0091] 核酸分子

[0092] 使用本文提供的信息,编码至少一个本发明靶结合成员的本发明核酸分子可使用本文所述的或本领域已知的方法获得。

[0093] 本发明的核酸分子可以是 RNA 的形式,例如 mRNA、hnRNA、tRNA 或任何其他形式,或者为 DNA 的形式,包括但不限于,通过克隆或合成产生的 cDNA 和基因组 DNA,或它们的任何组合。DNA 可以为三链的、双链的或单链的或它们的任何组合。DNA 或 RNA 的至少一条链的任何部分可以是编码链,也称为有义链,或其可以是非编码链,也称作反义链。

[0094] 本发明的分离核酸分子可包括具有开放阅读框 (ORF),任选地具有一个或多个内含子的核酸分子,例如但不限于至少一个 CDR 的至少一个指定部分,如至少一条重链(如 SEQ ID NO:10-12) 或轻链(如 SEQ ID NO:6-8) 的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 ;具有抗 IL-25 可变区的编码序列的核酸分子(如 SEQ ID NO:5 或 9) ;以及具有基本上不同于上述那些的核苷酸序列,但由于遗传密码的简并性,仍编码至少一种抗 IL-25 抗体的核酸分子,如本文所述和 / 或如本领域已知的。当然,遗传密码是本领域所熟知的。因此,对于本领域技术人员而言,应该可以按常规产生编码本发明的特异性抗 IL-25 抗体的此类简并核酸变体。参见,例如 Ausubel 等人(出处同上),并且此类核酸变体包括在本发明中。

[0095] 如本文所指出,本发明核酸分子包含编码抗 IL-25 抗体的核酸,所述核酸可包括(但不限于)单独编码抗体片段的氨基酸序列的那些核酸 ;整个抗体或其部分的编码序列 ;抗体、片段或部分的编码序列以及另外的序列,例如具有或不具有上述另外的编码序列的至少一种信号前导肽或融合肽的编码序列 ;例如至少一个内含子 ;还包括另外非编码序列,包括(但不限于)非编码 5′ 和 3′ 序列,如在转录、mRNA 加工(包括剪接和聚腺苷化信号(例如 mRNA 的核糖体结合和稳定)) 中发挥作用的转录、非翻译序列 ;编码另外的氨基酸,例如提供另外的功能的那些氨基酸的另外编码序列。因此,编码抗体的序列可与标记序列融合,所述标记序列例如编码可促进包含抗体片段或部分的融合抗体的纯化的肽的序列。

[0096] 与多核苷酸选择性杂交的多核苷酸

[0097] 本发明提供在选择性杂交条件下与本文所公开的多核苷酸杂交的分离的核酸。因此,该实施例的多核苷酸可用于分离、检测和 / 或定量包含此类多核苷酸的核酸。例如,本发明的多核苷酸可用于在保藏的文库中鉴定、分离或扩增部分或全长克隆。在一些实施例中,多核苷酸是分离的基因组或 cDNA 序列,或者与来自人或哺乳动物核酸文库的 cDNA 互

补。

[0098] 优选地，cDNA 文库包含至少 80％的全长序列，优选至少 85％或 90％的全长序列，且更优选至少 95％的全长序列。cDNA 文库可以进行标准化以增加罕见序列的表现。低或中等严格杂交条件一般但不是唯一地用于相对于互补序列具有减少的序列同一性的序列。中等和高严格条件可以任选用于同一性更大的序列。低严格条件允许具有约 70％序列同一性的序列进行选择性杂交，并且可以用于鉴定直系同源或旁系同源序列。

[0099] 任选地，本发明的多核苷酸将编码由本文所述多核苷酸编码的抗体的至少一部分。本发明的多核苷酸包含可以用于与编码本发明抗体的多核苷酸选择性杂交的核酸序列。参见例如 Ausubel（出处同上）；Colligan（出处同上），各自全文引用方式并入本文。

[0100] 核酸的构建

[0101] 本发明的分离的核酸可用本领域熟知的 (a) 重组方法、(b) 合成技术、(c) 纯化技术或它们的组合进行制备。

[0102] 所述核酸可方便地包含除了本发明的多核苷酸之外的序列。例如，可以将包含一个或多个内切核酸酶限制位点的多克隆位点插入核酸中以帮助该多核苷酸的分离。此外，可以插入可翻译序列以帮助分离翻译出的本发明多核苷酸。例如，六组氨酸标记序列为纯化本发明的蛋白质提供了便利手段。本发明的核酸除编码序列以外，任选是用于本发明的多核苷酸的克隆和 / 或表达的载体、衔接子或接头。

[0103] 可将额外序列加入这些克隆和 / 或表达序列来优化它们在克隆和 / 或表达中的功能，以帮助分离所述多核苷酸，或改进该多核苷酸向细胞中的导入。克隆载体、表达载体、衔接子和接头的使用是本领域熟知的。（参见例如 Ausubel（出处同上）；或 Sambrook（出处同上））

[0104] 用于构建核酸的重组方法

[0105] 本发明的分离核酸组合物，例如 RNA、cDNA、基因组 DNA 或它们的任何组合，可用多种本领域技术人员已知的克隆方法从生物来源获得。在一些实施例中，将在严格条件下与本发明多核苷酸选择性杂交的寡核苷酸探针用于在 cDNA 或基因组 DNA 文库中鉴定所需序列。RNA 的分离，以及 cDNA 和基因组文库的构建是本领域普通技术人员熟知的。（参见例如 Ausubel（出处同上）；或 Sambrook（出处同上））

[0106] 核酸筛选和分离方法

[0107] cDNA 或基因组文库可用基于本发明多核苷酸的序列（例如本文所公开的那些）的探针进行筛选。探针可以用于与基因组 DNA 或 cDNA 序列杂交以分离相同或不同生物中的同源基因。本领域的技术人员将会知道各种严格度的杂交可用于测定；并且杂交或洗涤介质可以是严格的。随着用于杂交的条件变得更严格，在发生双链体形成的探针和靶之间必须存在更大程度的互补性。严格性的程度可以由温度、离子强度、pH 和部分变性溶剂如甲酰胺的存在中的一者或多者加以控制。例如，通过（例如）在 0％至 50％的范围内操纵甲酰胺的浓度使反应物溶液的极性变化，从而方便地改变杂交的严格性。对于可检测结合所需的互补性程度（序列同一性）将根据杂交介质和 / 或洗涤介质的严格性而变化。互补性程度将最佳为 100％或 70 至 100％或其中的任何范围或值。然而，应当理解探针和引物中较小的序列变异可以通过减少杂交和 / 或洗涤介质的严格性进行补偿。

[0108] 扩增 RNA 或 DNA 的方法是本领域熟知的，并且基于本文给出的教导和指导，

无需过多实验即可根据本发明进行使用。已知的DNA或RNA扩增方法包括（但不限于）聚合酶链反应(PCR)和相关的扩增方法（参见例如授予Mullis等人的美国专利No.4,683,195、4,683,202、4,800,159、4,965,188；授予Tabor等人的美国专利No.4,795,699和4,921,794；授予Innis的美国专利No.5,142,033；授予Wilson等人的美国专利No.5,122,464；授予Innis的美国专利No.5,091,310；授予Gyllensten等人的美国专利No.5,066,584；授予Gelfand等人的美国专利No.4,889,818；授予Silver等人的美国专利No.4,994,370；授予Biswas的美国专利No.4,766,067；授予Ringold的美国专利No.4,656,134)以及使用靶序列的反义RNA作为双链DNA合成模板的RNA介导的扩增（授予Malek等人的美国专利No.5,130,238，其商品名为NASBA)，这些参考文献的全部内容以引用方式并入本文。（参见例如Ausubel（出处同上）；或Sambrook（出处同上）。）

[0109] 例如，可用聚合酶链反应(PCR)技术直接从基因组DNA或cDNA文库扩增本发明的多核苷酸和相关基因的序列。例如PCR和其他体外扩增方法也可用于克隆编码待表达的蛋白质的核酸序列、制备核酸以用作探针来检测样品中所需mRNA的存在，用于核酸测序，或用于其他目的。足以在整个体外扩增方法中指导技术人员的技术的例子可见于Berger（出处同上）、Sambrook（出处同上）和Ausubel（出处同上），以及Mullis等人的美国专利No.4,683,202(1987年)；以及Innis,et al.,PCR Protocols A Guide to Methods and Applications,Eds.,Academic Press Inc.,San Diego,Calif.(1990)(Innis等人编辑，《PCR方案：方法和应用指南》，学术出版社，加利福尼亚州圣地亚哥，1990年)。用于基因组PCR扩增的市售试剂盒是本领域已知的。参见例如，Advantage-GC Genomic PCR Kit(Clontech)。另外，例如，T4基因32蛋白质(Boehringer Mannheim)可用于提高长PCR产物的得率。

[0110] 用于构建核酸的合成方法

[0111] 本发明的分离的核酸还可通过已知方法通过直接化学合成进行制备（参见，例如Ausubel等人（出处同上））。化学合成一般产生单链寡核苷酸，其可以通过与互补序列杂交，或使用单链作为模板用DNA聚合酶进行聚合来转变成双链DNA。本领域技术人员会认识到，虽然DNA的化学合成可能局限于约100个或更多个碱基的序列，但更长的序列可通过连接较短序列来获得。

[0112] 重组表达盒

[0113] 本发明还提供包含本发明核酸的重组表达盒。本发明的核酸序列，例如编码本发明抗体的cDNA或基因组序列，可用于构建可导入到至少一种所需宿主细胞中的重组表达盒。重组表达盒通常会包含与转录起始调节序列可操作地连接的本发明多核苷酸，所述转录起始调节序列会引导所述多核苷酸在预定的宿主细胞中的转录。异源和非异源（即内源）启动子两者均可用于引导本发明核酸的表达。

[0114] 在一些实施例中，可在非异源形式的本发明多核苷酸的合适位置（上游、下游或内含子中）引入作为启动子、增强子或其他元件的分离核酸，以便上调或下调本发明的多核苷酸的表达。例如，可通过突变、缺失和/或置换在体内或体外改变内源启动子。

[0115] 载体和宿主细胞

[0116] 本发明还涉及包括本发明的分离的核酸分子的载体、用重组载体基因工程改造的宿主细胞，以及通过本领域熟知的重组技术产生至少一种抗IL-25抗体。参见例如

Sambrook 等人（出处同上）;Ausubel 等人（出处同上），各自全文以引用方式并入本文。

[0117] 可将所述多核苷酸任选与含有可选择标记的载体连接，以在宿主中增殖。一般来讲，质粒载体在沉淀物例如磷酸钙沉淀物中，或在与带电脂质的复合物中被导入。如果载体是病毒，其可用合适的包装细胞系在体外进行包装并随后转导至宿主细胞中。

[0118] 应将 DNA 插入物与合适的启动子可操作地连接。表达构建体还会含有转录起始位点、终止位点以及在转录区中含有用于翻译的核糖体结合位点。该构建体表达的成熟转录物的编码部分将优选包括在待翻译的 mRNA 开始处的翻译起始密码子和在该 mRNA 末端适宜位置的终止密码子（例如，UAA、UGA 或 UAG），对于哺乳动物或真核细胞表达优选 UAA 和 UAG。

[0119] 表达载体将优选但任选包括至少一种选择标记。此类标记包括（例如但不限于）：对于真核细胞培养，为甲氨蝶呤 (MTX)、二氢叶酸还原酶 (DHFR，美国专利 No. 4,399,216、4,634,665、4,656,134、4,956,288、5,149,636、5,179,017)、氨苄青霉素、新霉素 (G418)、霉酚酸或谷氨酰胺合成酶 (GS，美国专利 No. 5,122,464、5,770,359、5,827,739) 抗性基因，对于大肠杆菌 (E. coli) 和其他细菌或原核生物培养，为四环素或氨苄青霉素抗性基因（以上专利全文以引用方式并入本文）。用于上述宿主细胞的合适培养基和条件是本领域已知的。合适的载体对于技术人员来说将是显而易见的。载体构建体导入宿主细胞可通过磷酸钙转染、DEAE- 葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染或其他已知方法来实现。此类方法已在本领域中有所描述，例如 Sambrook（出处同上），第 1、4 和 16、18 章；Ausubel（出处同上），第 1、9、13、15、16 章。

[0120] 本发明的至少一种抗体可以以修饰形式（例如融合蛋白）表达，并且可不仅包括分泌信号，而且还可包括额外的异源功能区。例如，可将额外的氨基酸（尤其是带电氨基酸）的区域加至抗体的 N- 端，以提高纯化期间或随后的处理和保藏期间在宿主细胞中的稳定性和持久性。同样，可将肽部分加至本发明的抗体以帮助纯化。这些区域可在抗体或其至少一个片段的最终制备前除去。此类方法在许多标准实验室手册中有所描述，例如 Sambrook（出处同上），第 17.29、17.42 和 18.1、18.74 章；Ausubel（出处同上），第 16、17 和 18 章。

[0121] 本领域技术人员可认识到许多表达系统可用于表达编码本发明蛋白质的核酸。

[0122] 或者，本发明的核酸可以在包含编码本发明抗体的内源 DNA 的宿主细胞中通过开启（通过操纵）在宿主细胞中进行表达。此类方法是本领域熟知的，例如，如美国专利 No. 5,580,734、5,641,670、5,733,746 和 5,733,761 中所述，这些专利全文以引用方式并入本文。

[0123] 可用于生产抗体、其特定部分或变体的细胞培养物的例子是哺乳动物细胞。哺乳动物细胞系统通常将是细胞单层的形式，但是也可以使用哺乳动物细胞悬浮液或生物反应器。在本领域中已经开发了许多能够表达完整糖基化蛋白的合适宿主细胞系，包括 COS-1（例如 ATCC CRL 1650）、COS-7（例如 ATCC CRL-1651）、HEK293、BHK21（例如 ATCC CRL-10）、CHO（例如 ATCC CRL 1610）和 BSC-1（例如 ATCC CRL-26）细胞系、Cos-7 细胞、CHO 细胞、hep G2 细胞、P3X63Ag8.653、SP2/0-Ag14、293 细胞、HeLa 细胞等，它们可容易地从（例如）弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, Manassas, Va) (www.atcc.org) 获得。优选的宿主细胞包括淋巴样来源的细胞，例如骨髓瘤和淋巴瘤细胞。特别优选的宿主细胞是 P3X63Ag8.653 细胞 (ATCC 登记号

CRL-1580) 和 SP2/0-Ag14 细胞 (ATCC 登记号 CRL-1851)。在尤其优选的实施例中，重组细胞是 P3X63Ab8.653 或 SP2/0-Ag14 细胞。

[0124] 这些细胞的表达载体可包括以下的表达控制序列中的一者或多者，例如但不限于：复制起点；启动子，例如晚期或早期 SV40 启动子、CMV 启动子（美国专利 No.5,168,062、5,385,839）、HSV tk 启动子、pgk（磷酸甘油酸激酶）启动子、EF-1α 启动子（美国专利 No.5,266,491）、至少一种人免疫球蛋白启动子；增强子和 / 或加工信息位点例如核糖体结合位点、RNA 剪接位点、聚腺苷酸化位点（例如 SV40 大 T Ag 聚 A 添加位点）和转录终止子序列。参见例如 Ausubel 等人（出处同上）；Sambrook 等人（出处同上）。可用于产生本发明的核酸或蛋白质的其他细胞也是已知的和 / 或可例如从美国典型培养物保藏中心细胞系和杂交瘤目录 (www.atcc.org) 或其他已知的来源或商业来源得到。

[0125] 当采用真核宿主细胞时，通常将多腺苷酸化或转录终止序列整合进载体内。终止序列的例子是来自牛生长激素基因的多腺苷酸化序列。还可包括用于正确剪接转录物的序列。剪接序列的例子是来自 SV40 的 VP1 内含子 (Sprague，et al.，J.Virol.45：773781(1983)(Sprague 等人，《病毒学杂志》，第 45 卷，第 773-781 页，1983 年））。此外，如本领域已知的，可以将控制宿主细胞中的复制的基因序列整合进载体内。

[0126] 组合物

[0127] 本发明还提供至少一种靶结合成员组合物，其包含如本文所述和 / 或本领域已知的至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种或更多靶结合成员，它们以非天然存在的组合物、混合物或形式提供。此类组合物百分数按照液体或无水溶液、混合物、悬浮液、乳液或胶体的重量、体积、浓度、摩尔浓度或重量摩尔浓度计算，如本领域已知或本文所描述的。

[0128] 本发明的组合物还可包含任何合适和有效量的组合物或药物组合物的至少一种，该组合物或药物组合物包含至少一种给予需要这种调节、治疗或疗法的细胞、组织、器官、动物或患者的抗 IL-25 靶结合成员，任选地还包含至少一种选自以下的药剂：至少一种 TNF 拮抗剂（例如但不限于 TNF 抗体或片段、可溶性 TNF 受体或片段、它们的融合蛋白质、或者小分子 TNF 拮抗剂）、抗风湿剂（例如甲氨蝶呤、金诺芬、金硫葡糖、硫唑嘌呤、依那西普、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟米特、柳氮磺吡啶）、肌肉松弛剂、麻醉剂 (narcotic)、非甾类抗炎药物 (NSAID)、止痛药、麻醉剂 (anesthetic)、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻断剂、抗微生物剂（例如氨基糖苷、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、碳青霉烯类、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺药物、四环素、别的抗微生物剂）、抗牛皮癣剂、皮质类固醇、合成代谢类固醇、糖尿病相关药剂、矿物质、营养剂、甲状腺剂、维生素、钙相关激素、止泻剂、镇咳剂、止吐剂、抗溃疡剂、缓泻剂、抗凝血剂、促红细胞生成素（例如红细胞生成素 α）、非格司亭（例如 G-CSF、优保津）、沙格司亭 (GM-CSF、瘤肯）、免疫接种剂、免疫球蛋白、免疫抑制剂（例如巴利昔单抗、环孢霉素、达克珠单抗）、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、散瞳剂、睫状肌麻痹剂、烷化剂、抗代谢物、有丝分裂抑制剂、放射性药物、抗抑郁药、抗躁狂剂、抗精神病药物、抗焦虑药物、催眠剂、拟交感神经药物、兴奋剂、多奈哌齐、他克林、哮喘药物、β 激动剂、吸入类固醇、白三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、色甘酸、肾上腺素或类似物、阿法链道酶（百慕时）、细胞因子或细胞因子拮抗剂。此类细胞因子的非限制性例子包括但不限于 IL-1 至 IL-23 中的任何一者。合适的剂量是本领域公知的。参见例

如 Wells et al., eds., Pharmacotherapy Handbook, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (2000) (Wells 等人编辑,《药物疗法手册》,第 2 版,阿普尔顿和兰格,康涅狄格州斯坦福德);PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, Calif. (2000) (《PDR 药典:塔拉斯康袖珍药典 2000》,精装本,塔拉斯康出版公司,加利福尼亚州洛玛连达,2000 年),每个参考文献全文以引用方式并入本文。

[0129] 此类抗癌药或抗感染药还可包括与本发明的至少一种抗体缔合、结合、共配制或共施用的毒素分子。毒素可以任选起作用以选择性杀死病理性细胞或组织。病理性细胞可以是癌细胞或其他细胞。此类毒素可以是(但不限于)纯化或重组毒素或包含毒素的至少一个功能性细胞毒性结构域的毒素片段,例如选自蓖麻毒素、白喉毒素、毒液毒素或细菌毒素中的至少一种。术语毒素还包括由任何天然存在的、突变型或重组细菌或病毒产生的内毒素和外毒素,所述细菌或病毒可以在人和其他哺乳动物中引起任何病理状况,包括毒素休克,这可导致死亡。此类毒素可包括(但不限于)肠产毒性大肠杆菌热不稳定肠毒素 (LT)、热稳定肠毒素 (ST)、志贺氏菌属 (Shigella) 细胞毒素、气单胞菌属 (Aeromonas) 肠毒素、中毒性休克综合征毒素 -1(TSST-1)、葡萄球菌 (Staphylococcal) 肠毒素 A(SEA)、B(SEB) 或 C(SEC)、链球菌 (Streptococcal) 肠毒素等等。此类细菌包括(但不限于)下列细菌的菌株:肠产毒性大肠杆菌 (ETEC)、肠出血性大肠杆菌(例如血清型 0157:H7 菌株)、葡萄球菌属(例如金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)、化脓性葡萄球菌 (Staphylococcus pyogenes))、志贺氏菌属(例如痢疾志贺氏菌 (Shigella dysenteriae)、弗氏志贺氏菌 (Shigella flexneri)、鲍氏志贺氏菌 (Shigella boydii) 和宋内氏志贺氏菌 (Shigella sonnei))、沙门氏菌属(例如伤寒沙门氏菌 (Salmonella typhi)、猪霍乱沙门氏菌 (Salmonella cholera-suis)、肠炎沙门氏菌 (Salmonella enteritidis))、梭菌属(例如产气荚膜梭菌 (Clostridium perfringens)、艰难梭菌 (Clostridium dificile)、肉毒梭菌 (Clostridium botulinum))、弯曲菌属(例如空肠弯曲菌 (Camphlobacterjejuni)、胎儿弯曲菌 (Camphlobacter fetus))、螺杆菌属(例如幽门螺杆菌 (Heliobacter pylon))、气单胞菌属(例如温和气单胞菌 (Aeromonas sobria)、嗜水气单胞菌 (Aeromonas hydrophila)、豚鼠气单胞菌 (Aeromonas caviae))、类志贺邻单胞菌 (Pleisomonas shigelloides)、小肠结肠炎耶尔森氏菌 (Yersinaenterocolitica)、弧菌属(例如霍乱弧菌 (Vibrios cholerae)、副溶血弧菌 (Vibrios parahemolyticus))、克雷伯氏菌属、铜绿假单胞菌 (Pseudomonasaeruginosa) 和链球菌属。参见例如 Stein, ed., INTERNAL MEDICINE, 3rd ed., pp 113, Little, Brown and Co., Boston, (1990) (Stein 编辑,《内科学》,第 3 版,第 1-13 页,利特尔和布朗出版社,波士顿,1990 年));Evans et al., eds., Bacterial Infections of Humans:Epidemiology and Control, 2d. Ed., pp 239254, Plenum Medical Book Co., New York (1991) (Evans 等人编辑,《人的细菌感染:流行病学和控制》,第 2 版,第 239-254 页,全医学图书公司,纽约,1991 年);Mandell et al, Principles and Practice of Infectious Diseases, 3d. Ed., Churchill Livingstone, N.Y. (1990) (Mandell 等人,《感染性疾病的原理和实践》,第 3 版,丘吉尔利文斯顿出版社,纽约,1990 年);Berkow etal, eds., The Merck Manual, 16th edition, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992 (Berkow 等人编辑,《默克诊疗手册》,第 16 版,默克公司,新泽西州拉威,1992 年);Wood et al, FEMS

Microbiology Immunology,76:121 134(1991)(Wood等人,《欧洲微生物学会联合会微生物免疫学》,第76卷,第121-134页,1991年);Marrack et al,Science,248:705 711(1990)(Marrack等人,《科学》,第248卷,第705-711页,1990年),这些参考文献的全部内容以引用方式并入本文。

[0130] 本发明的组合物还可包含任何合适辅助剂中的至少一种,例如但不限于:稀释剂、粘合剂、稳定剂、缓冲剂、盐、亲脂性溶剂、防腐剂、佐剂等。可药用辅助剂是优选的。制备此类无菌溶液的非限制性例子和方法是本领域熟知的,例如但不限于Gennaro,Ed.,Remington′ s Pharmaceutical Sciences,18th Edition,Mack Publishing Co.(Easton,Pa.)1990(Gennaro编辑,《雷明顿药物科学》,第18版,麦克出版公司,宾夕法尼亚州伊斯顿,1990年)。可按常规方式选择适合于抗IL-25靶结合成员、片段或变体组合物的给药方式、溶解性和/或稳定性的可药用载体,如本领域所熟知或者如本文所述。

[0131] 用于本发明组合物的药物赋形剂和添加剂包括(但不限于):蛋白质、肽、氨基酸、脂质和碳水化合物(例如糖,包括单糖、二糖、三糖、四糖和低聚糖;衍生糖例如糖醇、醛糖酸、酯化糖等等;以及多糖或糖聚合物),药物赋形剂和添加剂可以单独或组合的方式存在,其单独或组合具有1-99.99重量%或体积%。示例性蛋白质赋形剂包括血清白蛋白,例如人血清白蛋白(HSA)、重组人白蛋白(rHA)、明胶、酪蛋白等。也可以在缓冲能力方面起作用的代表性氨基酸/抗体组分包括丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、阿斯巴甜等。一种优选的氨基酸是甘氨酸。

[0132] 适用于本发明的碳水化合物赋形剂包括(例如)单糖,如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等等;二糖,如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等等;多糖,如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉等等;以及糖醇,如甘露糖醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇、山梨糖醇(葡糖醇)、肌醇等等。用于在本发明中使用的优选碳水化合物赋形剂是甘露糖醇、海藻糖和棉子糖。

[0133] 组合物还可包括缓冲剂或pH调节剂;通常,缓冲剂是从有机酸或碱制备的盐。代表性缓冲剂包括有机酸盐,例如柠檬酸、抗坏血酸、葡糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的盐;盐酸三羟甲基氨基甲烷或磷酸盐缓冲剂。用于本发明组合物的优选缓冲剂是有机酸盐,例如柠檬酸盐。

[0134] 另外,本发明的组合物可包括聚合赋形剂/添加剂,例如聚乙烯基吡咯烷酮、聚蔗糖(聚合糖)、葡萄糖结合剂(例如环糊精,如2-羟丙基-β-环糊精)、聚乙二醇、调味剂、抗微生物剂、甜味剂、抗氧化剂、抗静电剂、表面活性剂(例如聚山梨醇酯,如“TWEEN 20”和“TWEEN 80”)、脂质(例如磷脂、脂肪酸)、类固醇(例如胆固醇)和螯合剂(例如EDTA)。

[0135] 适用于根据本发明组合物的这些和另外的已知药物赋形剂和/或添加剂是本领域已知的,例如在“Remington:The Science & Practice of Pharmacy”,19th ed.,Williams & Williams,(1995)(《雷明顿:药学科学和实践》,第19版,威廉斯和威廉斯出版社,1995年),以及“Physician′ s DeskReference”,52nd ed.,Medical Economics,Montvale,N.J.(1998)(《医师案头参考》,第52版,医药经济出版社,新泽西州蒙特威尔,1998年)中列出,其公开内容全文以引用方式并入本文。优选的载体或赋形剂材料是碳水化合物(例如糖和糖醇)和缓冲剂(例如柠檬酸盐)或聚合剂。

[0136] 治疗应用

[0137] 在一个方面，本发明提供预防或减轻需要治疗的受试者（例如人）的气道高反应性的方法，该方法包括给受试者施用靶结合成员，尤其是结合 IL-25 的抗体分子。在另一个方面，本发明提供预防、减轻或治疗需要治疗的受试者的哮喘的方法，该方法包括给受试者施用靶结合成员，尤其是结合 IL-25 的抗体分子。哮喘包括变应性哮喘。

[0138] 上述方法可以使用根据本发明的靶结合成员（包括它们的组合物）实施，所述靶结合成员用于结合到并且优选地拮抗 IL-25 的作用，在 IL-25 发挥作用的各种疾病和紊乱中具有治疗潜能。除哮喘之外，此类疾病包括与炎症例如炎性肠疾病 (IBD)，如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎相关的其他病症。该方法也可使用其他结合 IL-25 的靶结合成员（包括它们的组合物）实施，所述靶结合成员可按照下面随附实例中所述的方法获得。

[0139] 根据本发明的靶结合成员（包括它们的组合物）可用于人或动物受试者的治疗（包括预防性治疗）或诊断方法。此类治疗或诊断方法（可包括预防性治疗）可包括给所述受试者施用有效量的本发明靶结合成员。示例性疾病和紊乱在下面进一步讨论。

[0140] 还提供了在用于给人或动物受试者施用的药剂的制造中使用本发明靶结合成员（包括它们的组合物）。

[0141] 其中抗 IL-25 靶结合成员可用于提供治疗有益效果的临床适应症包括其中 IL-25 具有病理后果的任何病症。因此，本发明的靶结合成员通常可用于与不需要的 Th2 响应或 2 型响应相关的任何病症的治疗。例如，本发明的靶结合成员可用于变态反应和哮喘，尤其是哮喘的治疗。

[0142] 抗 IL-25 治疗可以通过注射（如静脉内注射）或通过局部递送方法给予。抗 IL-25 可以通过基因介导的技术递送。替代制剂策略可提供适用于口服或栓剂途径的制剂。给药途径可通过疾病的特殊考量，由治疗的物理化学特性确定，以优化功效或使副作用最小化。

[0143] 根据本发明，提供的组合物可以施用给个体。施用优选地以“治疗有效量”进行，这足以显示出对患者的有益效果。此类有益效果可以为对至少一种症状进行的至少改善。实际施用量，以及施用速率和时间过程将取决于被治疗疾病的性质和严重性。治疗处方，例如决定剂量等属于全科医师和其他医师的职责。适当的抗体剂量是本领域熟知的；参见 Ledermann J.A.et al.(1991)Int.J.Cancer 47:659-664(Ledermann J.A. 等人，1991 年，《国际癌症杂志》，第 47 卷，第 659-664 页）；Bagshawe K.D.et al.(1991)Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4:915-922(Bagshawe K.D. 等人，1991 年，《抗体、免疫交联物和放射性药物》，第 4 卷，第 915-922 页）。

[0144] 精确剂量将取决于多种因素，包括抗体是用于诊断还是用于治疗，待治疗区域的大小和位置，抗体（如全抗体、片段或双价抗体）的确切性质，以及连接到抗体的任何可检测标记或其他分子的性质。典型的抗体剂量将在 0.5mg-1.0g 的范围内，并且该抗体可视情况通过推注或输注在静脉内施用数小时，以达到所需的剂量。其他施用模式包括静脉输注数小时，以达到类似的总累积剂量。这是成年患者单次治疗的剂量，对于儿童和婴儿可按比例调整，并且对于其他抗体形式也可与分子量成比例调整。治疗可按照医师的判断，以每日、每周两次、每周或每月的间隔重复。

[0145] 其他施用模式利用留置装置的预包被层，或以其他方式掺入留置装置，对于该模式最佳抗体量将通过适当的实验方法确定。

[0146] 在本发明的一些优选实施例中，抗体分子是单体片段，例如F(ab)或scFv。此类抗体片段可具有相对较短的半衰期和较小的血小板活化风险的优点，所述血小板活化可由受体聚集引发。引起血小板活化的聚集可以为（例如）IL-25分子的聚集或IL-25与FcγRII分子的聚集。

[0147] 如果使用全抗体，则优选的是不能活化和/或破坏血小板的形式。IgG4同种型，或作为另外一种选择，衍生自IgG1主链的“设计者”同种型（新型Fc基因构建体WO99/58572，Clark、Armour、Williamson）是优选的选择。可以使用较小的抗体片段，例如F(ab')2。此外，可以使用具有双表位特异性（如对于被scFv 2C3识别的表位）的全抗体或片段（如F(ab')2或双价抗体）。虽然该实施例可以促进受体聚集，但与单个受体的高缔合率可以消除此问题。

[0148] 本发明的靶结合成员通常将以药物组合物的形式施用，所述药物组合物除靶结合成员之外还可包含至少一种组分。

[0149] 本发明的靶结合成员可以单独施用或联合其他治疗方式同时或顺序施用，具体取决于待治疗的病症。其他治疗方式可以包括施用合适剂量的止痛药例如非甾族抗炎药（如阿司匹林、对乙酰氨基酚、布洛芬或酮洛芬）或阿片类例如吗啡；施用止吐药；或施用至少一种对哮喘有活性的其他化合物，通常为产生气道松弛或增强粘液清除的支气管舒张剂，例如β-激动剂（如沙丁胺醇、沙美特罗）、色甘酸二钠、类固醇或PDEIV抑制剂。

[0150] 测定方法

[0151] 本发明提供包括引发或允许本文提供的靶结合成员与IL-25结合的方法。正如所述，此类结合可在体内发生，如在施用靶结合成员或编码靶结合成员的核酸后发生，或可在体外发生，例如在ELISA、Biacore测定法、Octet测定法、蛋白质印迹、免疫细胞化学、免疫沉淀法或亲和色谱法中发生。

[0152] 可确定靶结合成员与IL-25结合的量。定量可能与测试样品中抗原的量相关，这可能具有诊断重要性。

[0153] 抗体对样品的活性可以通过任何适当的方法确定。放射性免疫测定(RIA)是一种可行的方法。放射性标记抗原与未标记的抗原（测试样品）混合，并且让其结合到抗体。将结合的抗原与未结合的抗原物理分离，并且确定结合到抗体的放射性抗原的量。测试样品中的抗原越多，则结合到抗体的放射性抗原越少。也可使用连接到报告分子的抗原或类似物，用非放射性抗原进行竞争性结合测定。报告分子可以是具有光谱分离吸收或发射特性的荧光染料、磷光体或激光染料。合适的荧光染料包括荧光素、若丹明、藻红蛋白和德克萨斯红。合适的显色染料包括二氨基联苯胺。

[0154] 其他报告分子包括大分子胶体颗粒或颗粒物质例如有色、磁性或顺磁性乳胶小珠，以及可直接或间接产生可检测信号的生物或化学活性剂，所述信号可通过目测观察、用电子检测或以其他方式记录。这些分子可以是催化例如显色或变色或引起电性质改变的反应的酶。它们可以是分子激发型，使得能态之间的电子跃迁导致特征性光谱吸收或发射。它们可包括与生物传感器结合使用的化学实体。可采用生物素/抗生物素蛋白或生物素/链霉抗生物素蛋白和碱性磷酸酶检测系统。

[0155] 单个抗体-报告分子缀合物产生的信号可用于得出样品（常规样品和测试样品）中相关抗体结合的可定量的绝对或相对数据。

[0156] 本发明还提供按照如上方法在竞争测定中使用靶结合成员测量抗原水平，也就是说，提供通过在竞争测定中采用本发明提供的靶结合成员来测量样品中抗原水平的方法。在这种情况下可以不必将结合抗原与未结合抗原物理分离。一种可行方法是将报告分子与靶结合成员连接，使得结合时发生物理或光学变化。报告分子可以直接或间接产生可检测的，并且优选地可测量的信号。报告分子的连接可以是直接或间接的、共价（例如经由肽键）连接、或非共价连接。经由肽键的连接可以是编码抗体和报告分子的融合基因重组表达的结果。

[0157] 本发明还提供通过例如在生物传感器系统中采用根据本发明的靶结合成员来直接测量抗原的水平。

[0158] 本领域的技术人员能够根据他们的偏好和常识选择合适的模式或结合。

[0159] 实例

[0160] 本发明的示例性实施例的描述如下：

[0161] 实例 1：高亲和力人源化 IL-25 抗体 M6 的构建

[0162] huDDG91 是鼠 2C3 单克隆抗 IL25 抗体的人源化 (CDR 移植）类型，被选用作母体分子，用于构建对 IL-25 具有改进的结合亲和力的变体。huDDG91 的 κ 轻链序列（不包括前导序列）如图 1 所示 (SEQ ID NO:2)，其中 CDR 环的氨基酸序列（如 Kabat 所定义）已加下划线。huDDG91 重链的序列 (SEQ ID NO:4) 如图 2 所示，其中 CDR 的氨基酸序列（如 Kabat 所定义）已加下划线。huDDG91 也称为 RH2.5_R71V。鼠 2C3 单克隆抗 IL25 抗体的构建和表征在如下专利中有所描述：于 2008 年 10 月 30 日作为 WO2008/129263 发布的国际专利申请 No.:PCT/GB2008/001365，该专利全文的内容以引用方式并入本文中。

[0163] 为得到 huDDG91 的变体，使用标准方法构建了基于 huDDG91 序列的噬菌体展示库。将 Fab 文库针对生物素化的 IL-25 进行淘选。选择表现出与 huDDG91(IgG4) 相当或更高结合力（由 ELISA 测定）的 Fab。

[0164] 按下列方式将 Fab 转换为 mAb。设计含有 5 条不同轻链和 5 条不同重链（包括 huDDG91 轻链和重链）的组合文库。文库中使用的轻链和重链彼此不同之处在于轻链 CDR1 和 CDR3 氨基酸序列和重链 CDR 3 序列。使用这些轻链和重链构建总数为 25 的 mAb(IgG1)，它们在 HEK293 细胞中小规模表达，将这些 mAb 纯化。测试各个 mAb 的 IL-25 结合亲和力、细胞抑制性和受体抑制性，具体如下：

[0165] ●使用标准的 IL-25ELISA 和 Biacore 结合测定来确定 IL-25 的结合亲和力。选择对于人 IL-25 的 K_D 小于 50pM 并且对于人 IL-17A、C、D 和 F 的 K_D 大于 100nM 的候选者；

[0166] ●使用标准的 TK-10 人肾癌细胞测定方法 (IL-25 应答；IL-25 和 IL-8 读数；能够区分可溶性 IL-25R 和亲本 mAb 的差别）和 CD4+T 细胞测定方法来评估细胞抑制性。对于 TK-10 测定，选择展现出 IC50 低于亲本 huDDG91 抗体并且在 10nM mAb 浓度下 IL-25 释放的抑制率＞ 90％的 mAb。对于 CD4+T 细胞测定，则选择这样的 mAb：其对 IL-5 分泌的抑制性大于或等于亲本 huDDG91 所表现出的抑制性；

[0167] ●使用改进的基于微球的电化学发光免疫测定 (ECLIA) 方法来评估受体抑制性。选择在 10nM mAb 浓度下相比亲本 huDDG91 抗体能使 IL-25 与受体结合的 IC50 值降低三倍多的候选者。

[0168] 根据这些标准选出 9 种候选的 mAb（图 3）。当在 HEK293 中表达并使用标准方案进

行纯化时，所有候选者均显示出可接受的表达水平并展现出期望的 SE-HPLC 和 SDS-PAGE 图谱。然后将这 9 种候选者以 10L 的规模在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中进行瞬时表达，使用 Mab Select SuRe（通用电气医疗集团生命科学部 (GE Healthcare Life Sciences)）进行纯化，缓冲液更换为磷酸盐缓冲液 (PBS) 并进行浓缩。在这 9 种候选 mAb 中，每一个的 IL-25 结合亲和力相比 huDDG91 都有明显的改进。同时使用常规的技术和测定方法来测试各个 mAb 的表达水平、类别 (SDS-PAGE)、溶解度、聚集性 (SE-HPLC)、翻译后修饰、蛋白质与蛋白质之间的相互作用以及氧化作用。当在中国仓鼠卵巢细胞内表达并在标准条件下进行纯化和处理时，多种候选 mAb 在浓缩过程出现沉淀，并显示出低收率和 / 或不期望的 SDS-PAGE 和 SE-HPLC 图谱。

[0169] 根据优异的表达水平、高溶解度、纯化时无明显的蛋白质聚集，以及不存在不期望的翻译后修饰、蛋白质与蛋白质之间的相互作用和纯化时的氧化作用来选择一种 mAb（即指定的 M6）以进一步研究。

[0170] 实例 2 :M6 抗体的表征

[0171] 材料和方法

[0172] LS174T 人结肠上皮细胞测定

[0173] 从 ATCC(Manassas，VA) 获得人结肠上皮细胞系 LS 174T(CL-188)，并在 37℃、5% CO_2 下维持在补充有 10％ FBS、青霉素和链霉素的达尔伯克改良伊格尔培养基 (DMEM)（加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司 (Invitrogen，Carlsbad，CA) 中。以 1×105 细胞 /ml 的密度在 96 孔组织培养板上接种总体积为 100μl 的细胞，并使细胞贴壁过夜。IL-25 抗体 (M6 和 M9) 与重组人 IL-25 蛋白（山陶克公司 (Centocor)）预先复合，其中固定量 IL-25 蛋白 (10ng/ml 最终浓度）与滴定成三倍稀释或半对数稀释系列的不同含量的抗 IL-25 抗体混合，并在 37℃下孵育 1 小时。轻轻地抽吸细胞培养基并更换为 IL-25 蛋白质 /IL-25 抗体复合物，然后将细胞孵育过夜，时间为 18-22 小时。然后在 1200rpm 的转速下将培养板离心 2 分钟，以消除细胞碎屑的残留污染，然后收集上清液，并利用酶标板（明尼苏达州明尼阿波利斯的安迪生物 (R&D Systems，Minneapolis，MN)）分析 GROa。

[0174] 结果

[0175] M6 的序列分析表明，相对于 huDDG91 序列总共发生 3 个氨基酸置换，其均存在于轻链的 CDR3 中（见图 3）。M6 的轻链 (SEQ ID NO :5) 和重链 (SEQ ID NO :9) 的氨基酸序列及其 CDR 如图 4 所示。

[0176] 通过 Biacore 确定 M6 与人 IL-25 的结合亲和力是 huDDG91 与人 IL25 的结合亲和力的 3 到 5 倍（图 3）。此外，M6 对 IL-25 具有选择性，因为它不与人 IL-17A、C、D 或 F 结合。利用食蟹猴 I2-25cynoIL-25 和啮齿动物（小鼠）IL-25 来评估 M6 的物种交叉反应性。通过 5 倍以内的人 IL-25 亲和力、受体配体抑制性以及 TK-10 细胞相关测定方法来指示与 cynoIL-25 的物种交叉反应性。利用这些标准确定 M6 与 cyno- 和小鼠 IL-25 均能结合。

[0177] 利用实例 1 中所描述的细胞相关测定方法，表明 M6 相对于 huDDG91 具有增强的受体抑制性，而其 IC50 相比于 huDDG91 则显示减少 3 倍多（图 3）。此外，利用实例 1 中所描述的细胞相关测定方法，显示 M6 相比于 huDDG91 在人 IL25 的细胞抑制性方面有所增强（图 3 和图 5）。根据上述方法执行的 LS 174T 人结肠上皮细胞测定证实了此结果（图 6A 和 6B）。

[0178] 实例 3 :M6 所识别的人 IL-25 表位的 H/D 交换图谱

发明内容

[0179] 使用由 ExSar 公司 (新泽西州蒙茅斯章克申 (Monmouth Junction,New Jersey)) 实施的 ExSar™氢 / 氘交换质谱来绘制 M6 抗体所识别的人 IL-25 的推定表位。

[0180] 材料和方法

[0181] I. IL-25 的消化 / 分离优化

[0182] (1) 在冰上解冻 IL-25

[0183] (2) 分装为 18×100 μL 等分试样并留下一管,其余冻存。

[0184] (3) 将 10 μL 0.28mg/mL(16.6 μM) 的 IL-25 与 30 μL 的 PBS 水溶液 (pH 为 7.0) 混合→ [IL-25] = 0.07mg/mL(4.2 μM)

[0185] (4) 将 40 μL 的 (3) 与不同的淬火溶液混合

[0186] (5) 将 55 μL 注入 ExSAR 系统

[0187] (6) 用缓冲液 A(0.05% TFA 水溶液) 使样品以 200 μL/min 的流速通过固定化胃蛋白酶色谱柱

[0188] (7) 将肽段加载到反相捕集柱并使用缓冲液 A 以 200 μL/min 的流速脱盐 3 分钟

[0189] (8) 使用线性梯度为 13%→ 40%的缓冲液 B(95% 乙腈,5% H2O,0.0025% TFA) 通过 C18 色谱柱将胃酶肽分离 23 分钟

[0190] (9) 使用质谱来检测肽

[0191] II. M6 固定化

[0192] 4.1. M6 固定化的实验程序

[0193] < 树脂上抗体的结合 >

[0194] (1) 在冰上解冻 1.5mL 的 0.96mg/mL M6

[0195] (2) 使用 400 μL(重新冻存未使用的材料)

[0196] (3) 将 4mg $NaCNBH_3$(87.5 μmol) 添加到 1.5mL 螺旋盖瓶内→每 1g 的 POROS AL 加入 40mg 的 $NaCNBH_3$

[0197] (4) 将 400 μL 的抗体溶液加入瓶内

[0198] (5) 确保 $NaCNBH_3$溶解后再加入 POROS AL 树脂

[0199] (6) 将 100mg 的 POROS AL 加入到瓶内

[0200] (7) 室温下温育偶联反应液 3 个小时,同时进行振荡

[0201] (8) 以 5×80 μL 部分分次添加总体积为 400 μL 的 2.8M Na_2SO_4,每小时一部分→ [抗体] = 0.48mg/mL, [$NaCNBH_3$] = 5.0mg/mL[Na_2SO_4] = 1.4M。

[0202] (9) 混合物在室温下振荡过夜

[0203] (10) 通过过滤漏斗使用大量的 PBS 缓冲液 (pH 为 7.0) 冲洗混合物

[0204] < 封端 >

[0205] (11) 封端溶液的制备 :将 250 μL 的乙醇胺 (FW = 61.08, 密度 = 1.012g/mL, 8.3mmol,约 1M) 混入 3.5mL PBS(pH 为 7.0) 并使用冰醋酸 (约 200 μL) 将此溶液的 pH 调节为 7.2。溶液的最终体积接近于 4ml。

[0206] (12) 将 4mg 的 NaCNBH3 溶解于 500 μL 封端溶液内→ [$NaCNBH_3$] = 8mg/mL, [乙醇

胺]＝约 1M。

[0207] (13) 将洗涤后的干燥树脂重悬于 $NaCNBH_3$溶液中

[0208] (14) 室温下振荡 2 小时

[0209] (15) 通过过滤漏斗过滤混合物并使用大量 PBS(pH 为 7.0) 进行冲洗。

[0210] (16) 将树脂粉饼重悬于 0.75mL 的 PBS 缓冲液 (pH 为 7.0) 中。

[0211] (17) 将偶联材料放入 4℃的冰箱内保存。

[0212] III.M6 色谱柱结合能力测试的实验程序

[0213] <缓冲液的制备>

[0214] (1) 制备 50mM 的柠檬酸盐水溶液，pH 为 6.0

[0215] (2) 制备 50mM 柠檬酸盐、2mM Foscholine-12 的水溶液，pH 为 6.0

[0216] (3) 制备 PBS 水溶液，pH 为 7.0

[0217] (4)(1)、(2) 或 (3) 任一者用作“缓冲液 H”

[0218] <结合能力测试>

[0219] (5)mAb 色谱柱 (104μL) 填充 600μL 的与 POROS 树脂偶联的 M6 使用 500μL/min 流速的缓冲液 A(0.05% TFA 水溶液)，并使用 2.1mm×30mm 不锈钢柱套

[0220] (6) 将抗体色谱柱放入设定为 3℃的制冷机组的贮存器浴内，其中管路设置用于从色谱柱输入和输出试剂以及捕获出入色谱柱的试剂。将 2 微米滤头与输入管路对齐，以便过滤试剂和样品。

[0221] (7) 使用 2×250μL 的“缓冲液 H”平衡抗体色谱柱。使用 pH 试纸测试管路末端溶液的 pH，以确保 pH 值为中性。

[0222] (8) 将 10μL 0.28mg/mL(16.6μM) 的 IL-25 与 30μL 的“缓冲液 H”混合→[IL-25]＝4.1μM(相当于 166pmol)

[0223] (9) 将上述混合物注入到平衡后的抗体色谱柱内。

[0224] (10) 在 3℃下使用注射泵将 200μL 的“缓冲液 H”(放置于 500μL 的 Hamilton 注射器内) 输送到色谱柱内，并且收集 5×40μL 的级分。

[0225] (11) 在 3℃下使用注射泵将 200μL 0.8%的甲酸输送到色谱柱并收集 5×40μL 的级分。

[0226] (12) 在玻璃衬管内制备对照注射剂 :将 10μL 0.28mg/mL(16.6μM) 的 IL-25 与 30μL 的“缓冲液 H”混合

[0227] (13) 将含有级分或对照样品的所有衬管进行离心，使衬管壁上的所有液体沉降。将样品瓶加盖并贴标签，衬管放置于瓶内。

[0228] (14) 将中性级分和酸性级分以及对照样品保留在堆叠式冷盘 4 内，按对照样品、中性洗涤物 1、2、3、4、5 以及酸性洗涤物 1、2、3、4、5 的顺序放置于 3 到 23 的奇数位置上。

[0229] (15)11 个加盖空瓶设置在堆叠式冷盘 4 内，依次在 4 到 24 的偶数位置上。

[0230] (16) 使用 20μL 的 2M 尿素、1M TCEP(pH 为 3.0) 混合各级分。

[0231] (17) 将 55μL 的淬火溶液注入到 ExSAR 系统内，无需胃蛋白酶色谱柱。

[0232] (18) 使用缓冲液 A(0.05% TFA) 使样品以流速 200μL/min 加载到捕集柱上，脱盐 3 分钟，然后使用线性梯度为 13%至 40%的缓冲液 B(95%乙腈、5% H2O、0.0025% TFA) 洗脱 23 分钟。

[0233] (19) 采用质谱在 MS1 :棒状图模式下分析洗出液。

[0234] IV. 溶液正向 / 柱逆向交换的实验程序

[0235] < 缓冲液的制备 >

[0236] (1) 制备 50mM 柠檬酸盐、2mM Foscholine-12 的水溶液，pH 为 6.0

[0237] (2) 制备 PBS、2mM Foscholine-12 的水溶液，pH 为 7.0

[0238] (3) 制备 PBS 的水溶液，pH 为 7.0

[0239] (4) 使用 (1)-(3) 作为“交换液 H”

[0240] (5) 制备“交换液 HH”:将一份 pH 7.0 的 PBS 水溶液与 3 份“交换液 H”混合

[0241] (6) 制备 50mM 柠檬酸盐、2mM Foscholine-12 的重水溶液，pH 为 6.0

[0242] (7) 制备 PBS、2mM Foscholine-12 的重水溶液，pH 为 7.0

[0243] (8) 制备 PBS 的重水溶液，pH 为 7.0

[0244] (9) 使用 (6)-(8) 作为“交换液 D”

[0245] (10) 制备“交换液 HD”:将 1 份 pH 7.0 的 PBS 水溶液与 3 份“交换液 D”混合

[0246] < 溶液正向交换 >

[0247] (1) 将 mAb 色谱柱 (104 μL 柱床体积) 放入 3℃冷却箱内并进行平衡

[0248] (2) 使用 2×250 μL 0.8％的甲酸清洗 mAb 色谱柱

[0249] (3) 使用 2×250 μL 的“交换液 HD”冲洗 mAb 色谱柱，以平衡色谱柱

[0250] (4) 将 10 μL 0.28mg/mL(16.6 μM) 的 IL-25 与 30 μL 的“交换液 D”在 3℃下混合 → [IL-25] ＝ 0.07mg/mL(4.2 μM)，[D2O] ＝ 75％ (启动计时器，记录正向交换时间)

[0251] (5) 在 3℃下孵育混合物 150、500、1,500 或 5,000 秒

[0252] (6) 将混合物 (40 μL) 注入 mAb 色谱柱内

[0253] (7) 使用 100 μL 的“交换液 HD”在 3℃下冲洗 mAb 色谱柱

[0254] < 柱逆向交换 >

[0255] (8) 使用 200 μL 冷却的“交换液 HH ”(一旦水接触到色谱柱，即停止正向交换时间并开始记录逆向交换时间)

[0256] (9) 在 23℃下孵育 75、250、750 或 2,500 秒

[0257] < 洗脱 >

[0258] (10) 将 120 μL 冷却的 0.8％甲酸注入到 mAb 色谱柱上 (一旦酸进入色谱柱，即停止逆向交换时间)

[0259] (11) 注入另外 40 μL 冷却的 0.8％甲酸，以便从 mAb 色谱柱上洗脱出抗原

[0260] (12) 使用玻璃衬管收集该 40 μL 级分

[0261] < 分析 >

[0262] (13) 将 20 μL 冷却的 2M 尿素、1M TCEP(pH 为 3.0) 加入 40 μL 级分

[0263] (14) 将 55 μL 的淬火交换样品注入到装有胃蛋白酶色谱柱和 C18 色谱柱 (胃蛋白酶色谱柱 104 μL 柱床体积 ;流过胃蛋白酶色谱柱的流速为 200 μL/min ;缓冲液 B 以 13％ -40％的梯度流过 C18 色谱柱 23 分钟) 的 ExSAR 系统内。设置消化时间为 3 分钟。

[0264] (15) 利用质谱在 MS1 :轮廓模式下分析洗出液

[0265] V. 柱正向 / 柱逆向交换的实验程序

[0266] < 柱正向交换 >

[0267] (1) 将 mAb 色谱柱 (104 μL 柱床体积) 放入 23℃冷却箱内并进行平衡

[0268] (2) 使用 2×250 μL 0.8%的甲酸清洗 mAb 色谱柱

[0269] (3) 使用“交换液 HH”冲洗 mAb 色谱柱,以平衡色谱柱

[0270] (4) 将 10 μL 0.28mg/mL(16.6 μM) 的 IL-25 与 30 μL 的“交换液 H”在 3℃下混合 → [IL-25] = 0.07mg/mL(4.2 μM), [D_2O] = 0%

[0271] (5) 将混合物注入 mAb 色谱柱内

[0272] (6) 使用 100 μL 的“交换液 HH”进行冲洗

[0273] (7) 将 200 μL 的“交换液 HD ”通过 mAb 色谱柱 (开始记录正向交换时间),从而启动正向交换反应

[0274] (8) 在 3℃下孵育 mAb 色谱柱 150、500、1,500 或 5,000 秒

[0275] <柱逆向交换>与 5.2 相同

[0276] <洗脱>与上述程序 IV,步骤 10-14 相同。

[0277] <分析>与上述程序 IV,步骤 15 相同。

[0278] VI. 完全氘化实验的实验程序

[0279] <完全氘化样品的制备>

[0280] (1) 将 10 μL 0.28mg/mL(16.6 μM) 的 IL-25 与 30 μL 的“交换液 D”混合

[0281] (2) 将混合物于 60℃加热 3 小时

[0282] (3) 将其冷却至室温

[0283] (4) 将 40 μL 的混合物加载到 mAb 色谱柱上

[0284] (5) 将 100 μL 的“交换液 HD”注入 mAb 色谱柱

[0285] <洗脱>与上述程序 IV,步骤 10-14 相同。

[0286] <分析>与上述程序 IV,步骤 15 相同。

[0287] 分析 (水环境内的消化 / 分离 / 质量分析) 期间每个离子的前两个氨基酸残基上所连接的任何氘均缺失。这解释了图 8A 和 8B 中 H/D-Ex 图案中的小间隙。对每种蛋白进行无氘化实验、正向交换实验和完全氘化实验。无氘化实验用于鉴别离子以及每种不含氘的离子的精确 m/z。完全氘化实验用于鉴定分析 (水环境内的消化 / 分离 / 质量分析) 期间每种离子的氘缺失。在这些类型的实验中,LCMS 分析前和正向交换反应或正向 - 逆向交换反应之后的氘核数量可进行反算。对于正向 - 逆向交换实验,逆向交换时间是正向交换时间的一半。这是因为在相同的 pH 读数的情况下,固有 H → D 交换率是固有 D → H 交换率的一半。

[0288] 结果

[0289] IL-25 消化

[0290] IL-25 在不同条件下由胃蛋白酶进行消化。当使用 1 份 2M 尿素、1MTCEP(pH 为 3.0) 对 2 份稀释的 IL-25 溶液进行淬火处理并使用胃蛋白酶色谱柱以 200 μL/min 的速率进行消化时,胃蛋白酶对 IL-25 的消化情况将达到最佳。最理想的分离条件为 :使缓冲液 A 中线性梯度为 13%至 40%的缓冲液 B(95%乙腈、5% H2O 和 0.0025% TFA) 流过 C18 色谱柱 23 分钟。胃蛋白酶消化后 IL-25 的序列覆盖率为 100% (= 146/146 ;图 7A 和 7B)。

[0291] M6 的固定化和 M6 色谱柱的结合能力测试

[0292] 未经胃蛋白酶消化的 IL-25 样品在 8.5 分钟处显示色谱峰。样品看似洁净。通过席

夫碱化学品将M6成功偶联至POROS AL树脂。ExSAR测试三个不同条件下M6色谱柱的结合能力，如表1所示。随后测试m/z = 1875(+18)和1985(+17)的完整峰。在所有经过测试的结合条件中，使用中性洗脱液未能洗脱出任何IL-25，这表明所有加载的IL-25(166pmol)在中性条件下与M6色谱柱结合。IL-25可与M6色谱柱非特异性结合。在不使用洗涤剂的情况下，酸洗只能回收到17-18％已加载的IL-25。当IL-25反复加载时，M6色谱柱的反压也会逐渐增加。添加Foscholine-12可提高回收量。

[0293] 表1. 测试M6抗体色谱柱的结合能力所采用的条件

[0294]

“缓冲液H”	温度	胃蛋白酶	中性	酸性
(a) 50mM柠檬酸盐，pH 6	3℃	-	0%	18%
(b) 50mM柠檬酸盐，2mM Foscholine-12，pH 6	3℃	-	0%	24%
(c) PBS, pH 7	3℃	-	0%	17%

[0295] 介于“温度”和“中性”之间的一列的标题为“胃蛋白酶”。

[0296] 表位鉴定

[0297] <溶液中IL-25的正向交换实验>

[0298] 溶液中IL-25的正向交换实验在23℃和pH 7条件下进行。

[0299] 据显示，IL-25是相对动态的蛋白质。

[0300] <使用或不使用M6色谱柱的IL-25正向/逆向交换实验>

[0301] 据观察，含有氨基酸残基56-63和66-74的片段具有最强的保护性（图8A和9C；表2）。含有氨基酸残基46-63和66-84的类似片段显示出一致的弱保护性（图8A、9C和9D；表2）。据观察，含有氨基酸残基129-135的片段有边界线保护（图8B、9E和9F；表2）。

[0302] 表2. 在23℃下以pH 7和pH 8进行正向/逆向交换实验后不同人IL-25片段氘化水平的差异。

[0303]

开始	结束	电荷	pH6 150	pH6 500	pH7 150	pH7 500	pH7 1,500	pH7 5,000	平均
3	9	1	-3%	2%	-1%	-1%	-1%	5%	0%
3	15	2	-3%	-5%	1%	0%	-3%	-1%	-2%
3	20	2	1%	0%	2%	1%	-3%	-1%	0%
12	20	1	0%	4%	-1%	0%	0%	1%	1%
23	42	2	3%	1%	1%	0%	-1%	3%	1%
23	43	2	3%	1%	0%	0%	-1%	0%	0%
23	45	3	2%	1%	2%	1%	1%	-2%	1%
23	53	3	2%	1%	0%	1%	1%	-1%	1%
46	53	1	2%	-1%	2%	1%	0%	0%	1%
46	63	3	8%	5%	11%	7%	1%	0%	5%
56	63	1	7%	7%	9%	8%	6%	2%	6%
66	74	2	6%	10%	11%	13%	7%	0%	8%
66	84	2	9%	2%	5%	7%	6%	-2%	4%
77	84	2	-	-	-	-	-2%	-2%	-2
87	101	2	3%	2%	1%	3%	-2%	1%	1%
90	101	2	2%	0%	3%	3%	0%	1%	1%
104	109	1	2%	0%	0%	1%	0%	-2%	0%

[0304]

105	109	1	0%	0%	0%	1%	4%	0%	1%
112	126	2	3%	2%	3%	2%	1%	0%	2%
112	127	2	7%	-4%	1%	4%	-3%	1%	1%
129	135	2	3%	6%	8%	4%	8%	0%	5%
133	135	1	-2%	3%	7%	5%	5%	2%	3%
138	146	1	1%	1%	-1%	-2%	0%	1%	0%
140	146	1	-1%	7%	3%	-2%	-2%	2%	1%

[0305] 本文引述的所有专利、已公布的专利申请和参考文献的教导内容全文以引用方式并入。

[0306] 虽然通过参照本文的示例性实施例来具体示出和描述本发明，但本领域的技术人员将理解可以在不脱离所附权利要求书所涵盖的本发明范围的情况下对其形式和细节进行各种修改。

[0001]

序 列 表

<110> 詹森生物科技公司

<120> 人源化 IL-25 抗体

<130> SPC5341PCT

<140> 待分配
<141> 2011-03-28

<150> 61/341458
<151> 2010-03-30

<150> 61/319260
<151> 2010-03-31

<160> 17

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 313
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 1
gatgacccag tctccatcct ccctgtctgc atctgtagga gacagagtca ccatcacttg 60
cagtgcatcc agggcatta gcaattatct gaattggtat cagcagaaac agggaaagt 120
tcctaaactc ctgatctatt acacatcaag tttacactca ggggtcccat ctcggttcag 180
cggcagtgga tctgggacag atttcactct caccatcagc agcctgcagc ctgaagatgt 240
tgcaacttat tactgtcagc agtatagcaa gctgccgtac acgtttggcc aggggaccaa 300
gctggagatc aaa 313

<210> 2
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 2
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

[0002]

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

<210> 3
<211> 363
<212> DNA
<213> 人

<400> 3
gaggtgcagc tggtcgagag cggagccgag gtgaagaagc caggcgccag cgtcaaggtg 60
tcctgcaagg ccagcggcta cagcttctcc ggctacacca tgaactgggt gcggcaggcc 120
ccaggccaga ggctggaatg gatgggcctg atcaaccccc acaacggcgg caccagctac 180
aaccagaact tcaagggcag ggtgacactg accgtggata ccagcgccag caccgcctac 240
ctggaactga acagcctgag aagcgaggac accggcgtgt actactgcgc cagagaggac 300
tacgacggct acctgtactt cgccatggac tactggggcc agggcaccct ggtgaccgtg 360
agc 363

<210> 4
<211> 121
<212> PRT
<213> 人

<400> 4
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30
Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

[0003]

<210> 5
<211> 214
<212> PRT
<213> 人

<400> 5

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

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<400> 6

Ser	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Asn	Tyr	Leu	Asn
1				5				10		

[0004]

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 7
Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 8
Gln Gln Tyr Leu Ala Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 9
<211> 452
<212> PRT
<213> 人

<400> 9
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30
Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

[0005]

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445
Ser Pro Gly Lys
450

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> 人

<400> 10
Gly Tyr Thr Met Asn
1 5

[0006]

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> 人

<400> 11
Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> 人

<400> 12
Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 13
<211> 78
<212> PRT
<213> 人

<400> 13
Met Tyr Ser His Trp Pro Ser Cys Cys Pro Ser Lys Gly Gln Asp Thr
1 5 10 15
Ser Glu Glu Leu Leu Arg Trp Ser Thr Val Pro Val Pro Pro Leu Glu
20 25 30
Pro Ala Arg Pro Asn Arg His Pro Glu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp
35 40 45
Gly Pro Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Glu Leu Asp
50 55 60
Arg Asp Leu Asn Arg Leu Pro Gln Asp Leu Tyr His Ala Arg
65 70 75

<210> 14
<211> 68
<212> PRT
<213> 人

<400> 14
Cys Leu Cys Pro His Cys Val Ser Leu Gln Thr Gly Ser His Met Asp
1 5 10 15

[0007]

Pro Arg Gly Asn Ser Glu Leu Leu Tyr His Asn Gln Thr Val Phe Tyr
20 25 30
Arg Arg Pro Cys His Gly Glu Lys Gly Thr His Lys Gly Tyr Cys Leu
35 40 45
Glu Ala Arg Leu Tyr Arg Val Ser Leu Ala Cys Val Cys Val Arg Pro
50 55 60
Arg Val Met Gly
65

<210> 15
<211> 75
<212> PRT
<213> 人

<400> 15
Met Tyr Ser His Trp Pro Ser Cys Cys Pro Ser Lys Gly Gln Asp Thr
1 5 10 15
Ser Glu Glu Leu Leu Arg Trp Ser Thr Val Pro Val Pro Pro Leu Glu
20 25 30
Pro Ala Arg Pro Asn Arg His Pro Glu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp
35 40 45
Gly Pro Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Glu Leu Asp
50 55 60
Arg Asp Leu Asn Arg Leu Pro Gln Asp Leu Tyr
65 70 75

<210> 16
<211> 71
<212> PRT
<213> 人

<400> 16
His Ala Arg Cys Leu Cys Pro His Cys Val Ser Leu Gln Thr Gly Ser
1 5 10 15
His His Asp Pro Arg Gly Asn Ser Glu Leu Leu Tyr His Asn Gln Thr
20 25 30
Val Phe Tyr Arg Arg Pro Cys His Gly Glu Lys Gly Thr His Lys Gly
35 40 45
Tyr Cys Leu Glu Arg Arg Leu Tyr Arg Val Ser Leu Ala Cys Val Cys
50 55 60
Val Arg Pro Arg Val Met Gly
65 70

<210> 17
<211> 146

[0008]

<212> PRT
<213> 人

<400> 17

Met	Tyr	Ser	His	Trp	Pro	Ser	Cys	Cys	Pro	Ser	Lys	Gly	Gln	Asp	Thr
1				5				10					15		
Ser	Glu	Glu	Leu	Leu	Arg	Trp	Ser	Thr	Val	Pro	Val	Pro	Pro	Leu	Glu
			20					25				30			
Pro	Ala	Arg	Pro	Asn	Arg	His	Pro	Glu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asp
		35					40					45			
Gly	Pro	Leu	Asn	Ser	Arg	Ala	Ile	Ser	Pro	Trp	Arg	Tyr	Glu	Leu	Asp
	50					55					60				
Arg	Asp	Leu	Asn	Arg	Leu	Pro	Gln	Asp	Leu	Tyr	His	Ala	Arg	Cys	Leu
65					70					75					80
Cys	Pro	His	Cys	Val	Ser	Leu	Gln	Thr	Gly	Ser	His	Met	Asp	Pro	Arg
				85					90					95	
Gly	Asn	Ser	Glu	Leu	Leu	Tyr	His	Asn	Gln	Thr	Val	Phe	Tyr	Arg	Arg
			100					105					110		
Pro	Cys	His	Gly	Glu	Lys	Gly	Thr	His	Lys	Gly	Tyr	Cys	Leu	Glu	Arg
		115					120					125			
Arg	Leu	Tyr	Arg	Val	Ser	Leu	Ala	Cys	Val	Cys	Val	Arg	Pro	Arg	Val
	130					135					140				
Met	Gly														
145															

GATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG
GAGACAGAGTCACCATCACTTGCAGTGCATCCCAGGGC
ATTAGCAATTATCTGAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGG
AAAGTTCCTAAACTCCTGATCTATTACACATCAAGTTTAC
ACTCAGGGGTCCCATCTCGGTTCAGCGGCAGTGGATCT
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCC
TGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAGCAGTATAGCAA
GCTGCCGTACACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAG
ATCAAA (SEQ ID NO:1)

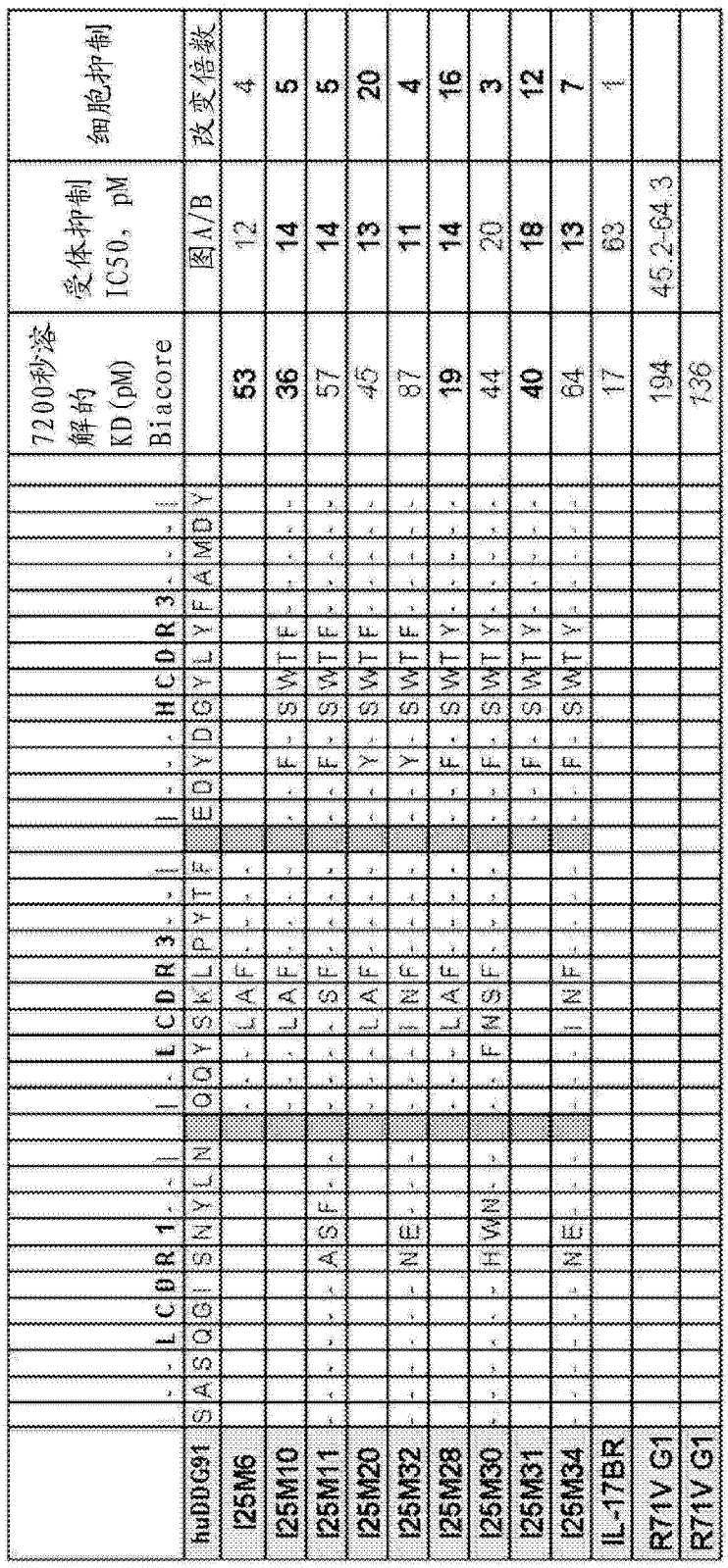
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISNYLNWYQQKP
GKVPKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE
DVATYYCQQYSKLPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:2)

图 1

GAGGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGAGCCGAGGT
GAAGAAGCCAGGCGCCAGCGTCAAGGTGTCCTG
CAAGGCCAGCGGCTACAGCTTCTCCGGCTACAC
CATGAACTGGGTGCGGCAGGCCCCAGGCCAGAG
GCTGGAATGGATGGGCCTGATCAACCCCTACAAC
GGCGGCACCAGCTACAACCAGAACTTCAAGGGC
AGGGTGACACTGACCGTGGATACCAGCGCCAGC
ACCGCCTACCTGGAACTGAACAGCCTGAGAAGC
GAGGACACCGGCGTGTACTACTGCGCCAGAGAG
GACTACGACGGCTACCTGTACTTCGCCATGGACT
ACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGC
(SEQ ID NO:3)

EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSGYTM
NWVRQAPGQRLEWMGLINPYNGGTSYNQNFKGR
VTLTVDTSASTAYLELNSLRSEDTGVYYCAREDYDG
YLYFAMDYWGQGTLVTVS (SEQ ID NO:4)

图 2



	L CDR 1						L CDR 2						L CDR 3						H CDR 1						H CDR 2						H CDR 3						7200秒溶解的KD(pM) Biacore	受体抑制 IC50，pM	细胞抑制
	S	A	S	Q	G	I	S	N	Y	L	N	Q	Q	Y	S	K	L	P	Y	T	F	E	D	Y	D	G	Y	L	Y	F	A	M	D	Y		图A/B	改变倍数
huDDG91	S	A	S	Q	G	I	S	N	Y	L	N	Q	Q	Y	S	K	L	P	Y	T	F	E	D	Y	D	G	Y	L	Y	F	A	M	D	Y			
I25M6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	A	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53	12	4
I25M10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	A	F	-	-	-	-	-	-	F	-	S	W	T	F	-	-	-	-	36	14	5
I25M11	-	-	-	-	-	-	-	A	S	F	-	-	-	-	-	S	F	-	-	-	-	-	-	F	-	S	W	T	F	-	-	-	-	57	14	5
I25M20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	A	F	-	-	-	-	-	-	Y	-	S	W	T	F	-	-	-	-	45	13	20
I25M32	-	-	-	-	-	-	-	N	E	-	-	-	-	-	I	N	F	-	-	-	-	-	-	Y	-	S	W	T	F	-	-	-	-	87	11	4
I25M28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	A	F	-	-	-	-	-	-	F	-	S	W	T	Y	-	-	-	-	19	14	16
I25M30	-	-	-	-	-	-	-	H	W	N	-	-	-	-	F	M	S	F	-	-	-	-	-	F	-	S	W	T	Y	-	-	-	-	44	20	3
I25M31																						-	-	F	-	S	W	T	Y	-	-	-	-	40	18	12
I25M34	-	-	-	-	-	-	-	N	E	-	-	-	-	-	I	N	F	-	-	-	-	-	-	F	-	S	W	T	Y	-	-	-	-	64	13	7
IL-17BR																																		17	63	1
R71V G1																																		194	45.2-64.3	
R71V G1																																		136		

图 3

M6轻链(LC)氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISNYLNWYQQKP
GKVPKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE
DVATYYCQQYLAFPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:5)

LC CDR 1: SASQGISNYLN (SEQ ID NO:6)

LC CDR 2: YTSSLHS (SEQ ID NO:7)

LC CDR 3: QQYLAFPYT (SEQ ID NO:8)

图 4A

M6重链(HC)氨基酸序列

EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSGYTMNWVRQ
APGQRLEWMGLINPYNGGTSYNQNFKGRVTLTVDTSASTA
YLELNSLRSEDTGVYYCAREDYDGYLYFAMDYWGQGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:9)

HC CDR 1: GYTMN (SEQ ID NO:10)

HC CDR 2: LINPYNGGTSYNQNFKG (SEQ ID NO:11)

HC CDR 3: EDYDGYLYFAMDY (SEQ ID NO:12)

图 4B

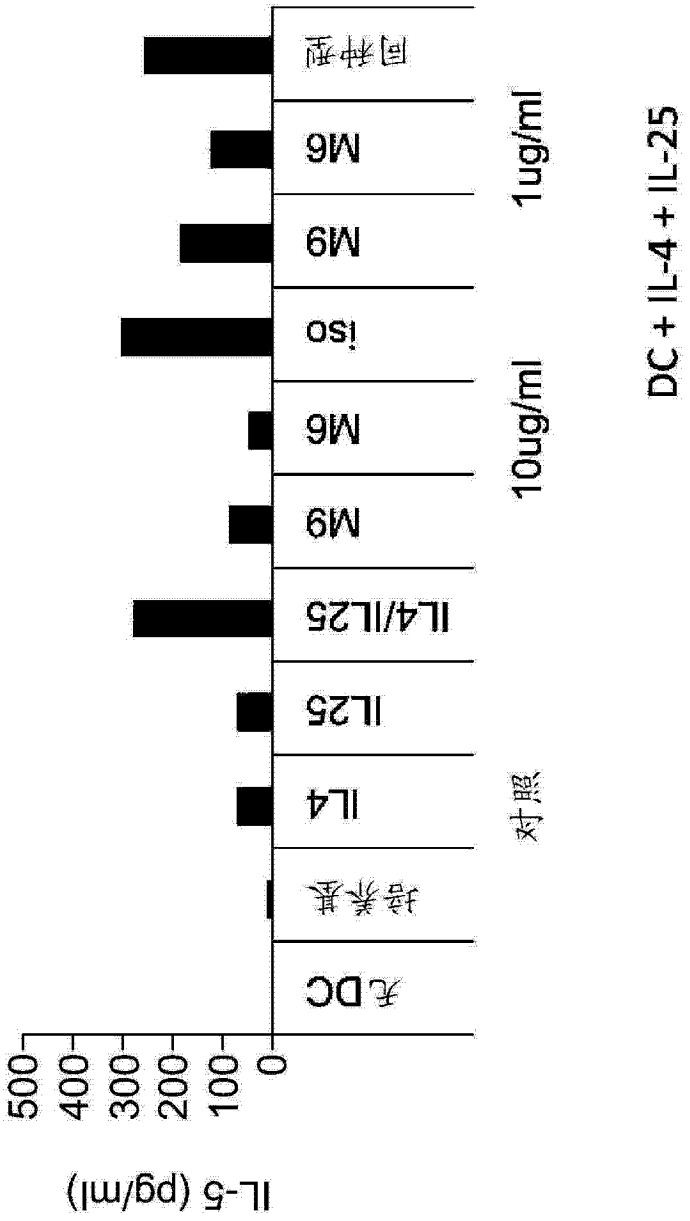
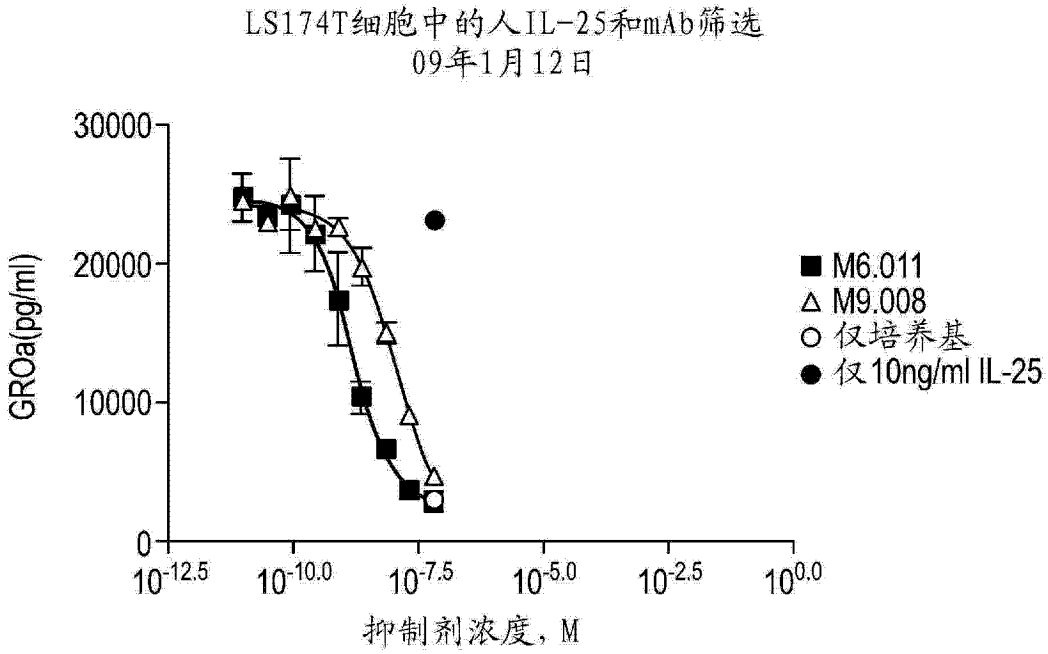
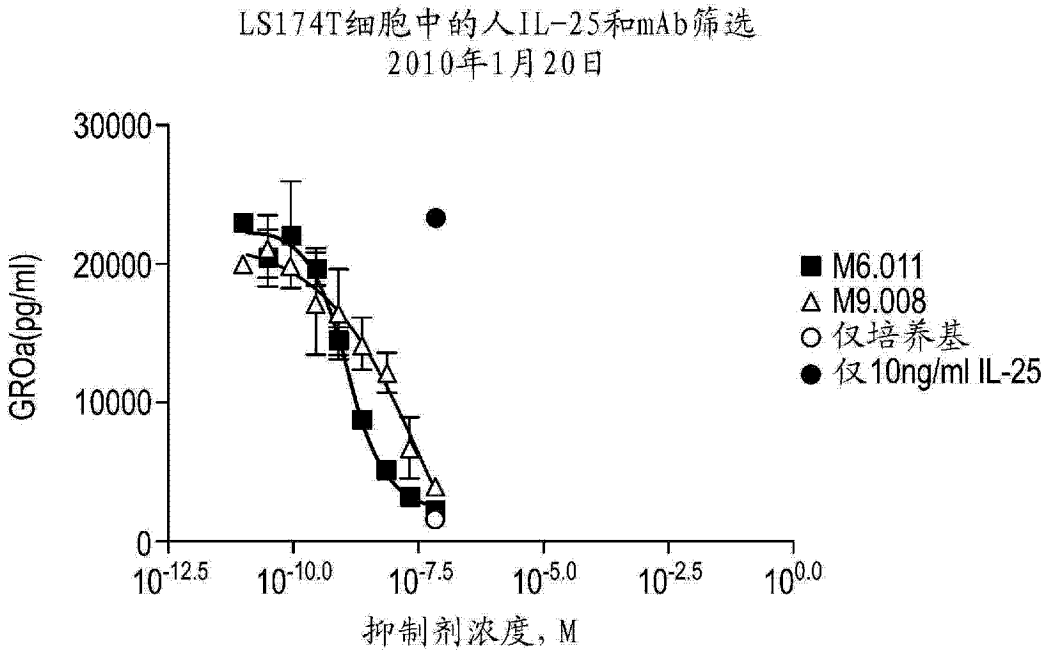

IL-5 (pg/ml)
500
400
300
200
100
0
无DC
培养基
IL4
IL25
IL4/IL25
M9
M6
iso
M9
M6
同种型
对照
10ug/ml
1ug/ml
DC + IL-4 + IL-25

图 5



	M6.011	M9.008
EC50	1.55e-009	1.17e-008

图 6A



	M6.011	M9.008
EC50	1.26e-009	4.57e-008

图 6B

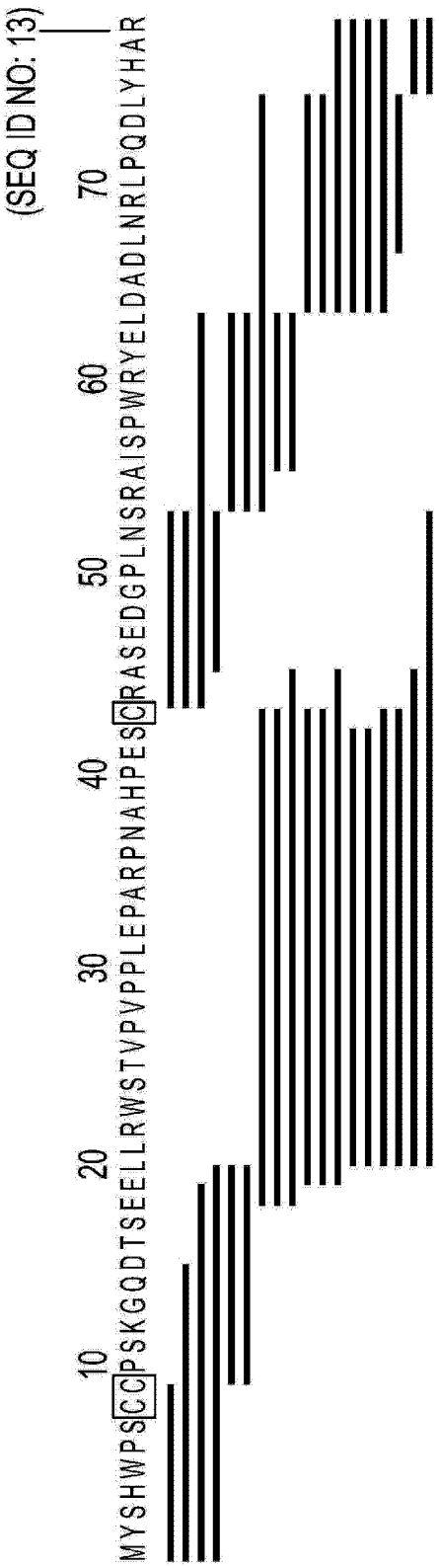

(SEQ ID NO: 13)
MYSHWPSCCPSKGQDTSEELLRWSTVPVPPLEPARPNAHPESCRASEDGPLNSRAISPWRYELDADLNRLPQDLYHAR
10
20
30
40
50
60
70

图 7A

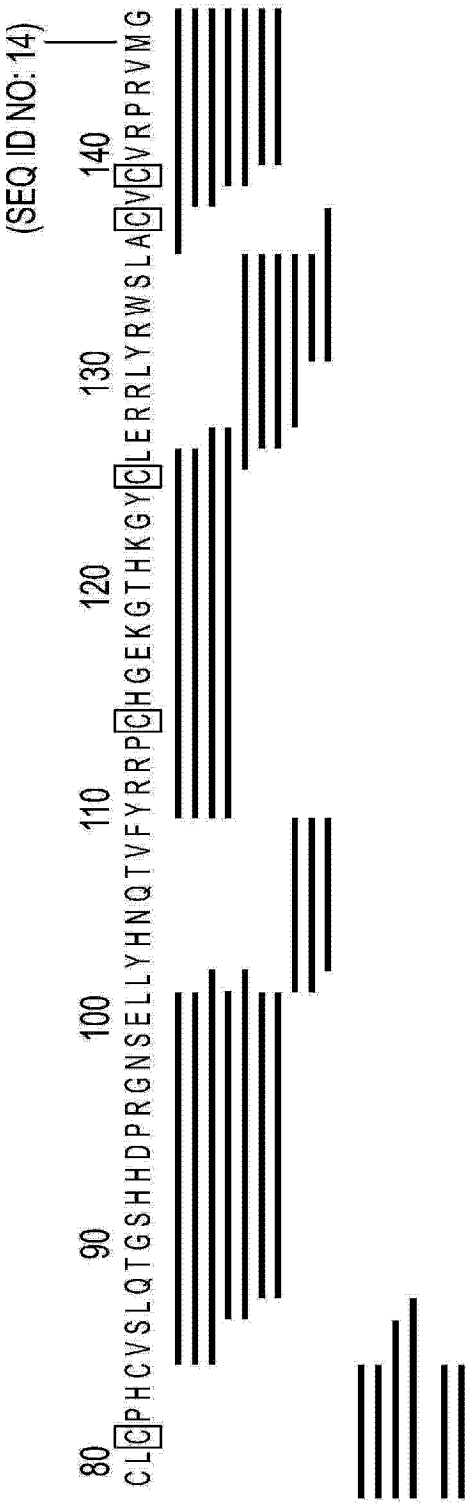

(SEQ ID NO: 14)
CLCPHCVSLQTGSHHDPRGNSELLYHNQTVFYRRPCHGEKGTHKGYCLERRLYRWSLACVCVRPRVMG
80
90
100
110
120
130
140

图 7B

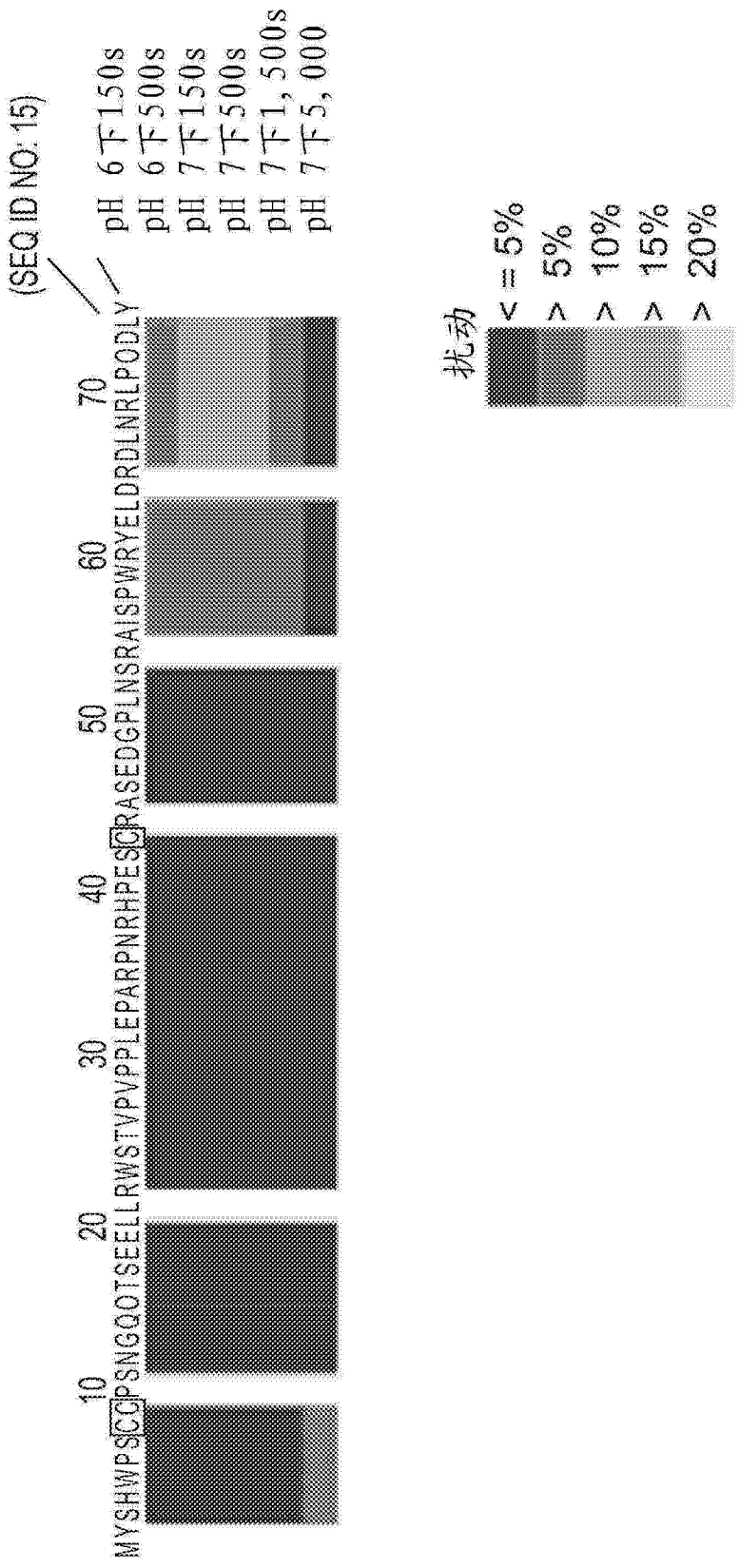

(SEQ ID NO: 15)
MYSHWPSCCPSNGQQTSEELLRWSTVPVPPLEPARPNRHPESCRASEDGPLNSRAISPWRYELDRDLNRLPQDLY
10
20
30
40
50
60
70
pH 6下150s
pH 6下500s
pH 7下150s
pH 7下500s
pH 7下1,500s
pH 7下5,000
扰动
<= 5%
> 5%
> 10%
> 15%
> 20%

图 8A

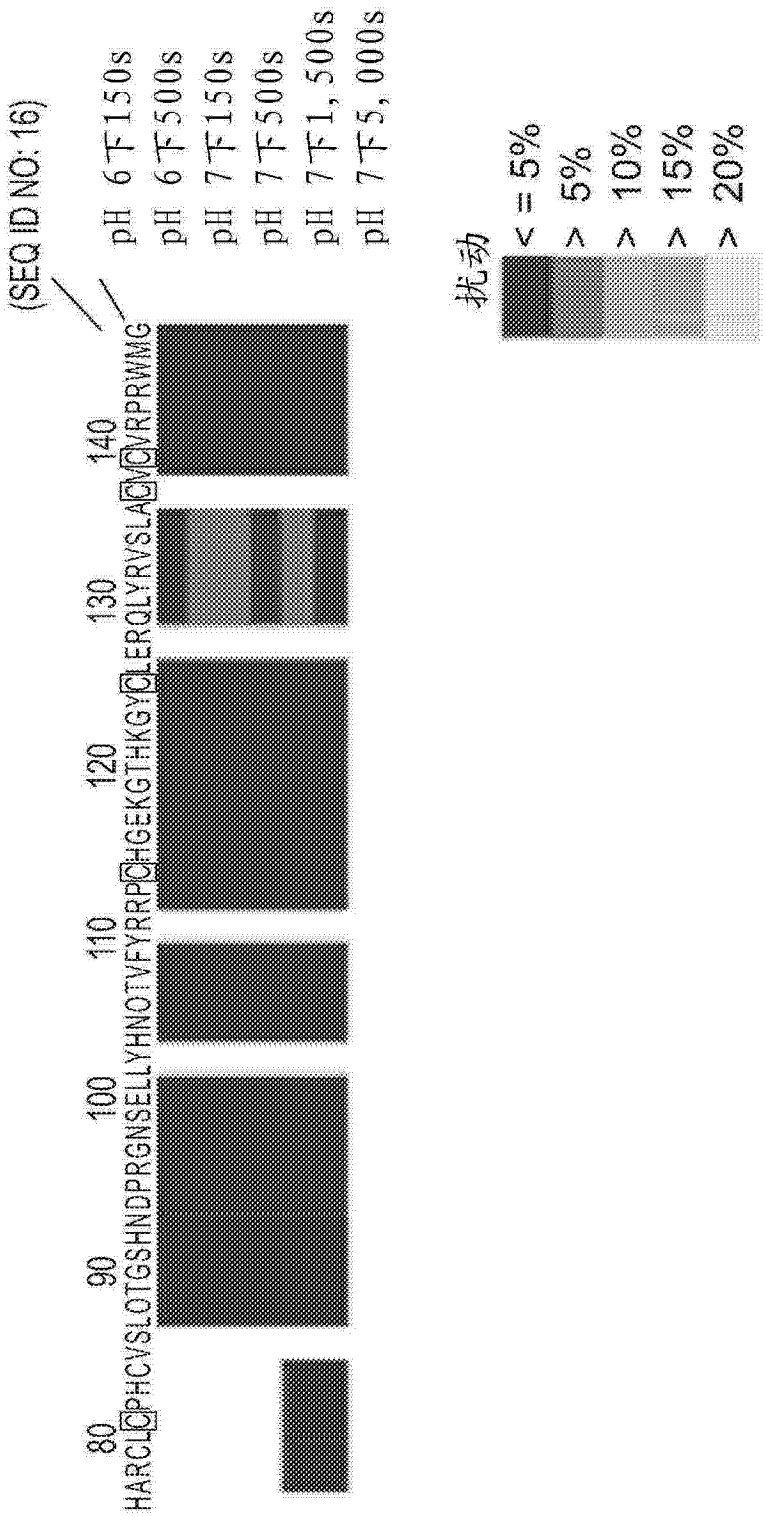

(SEQ ID NO: 16)
pH 6下150s
pH 6下500s
pH 7下150s
pH 7下500s
pH 7下1,500s
pH 7下5,000s
扰动
< = 5%
> 5%
> 10%
> 15%
> 20%
80
90
100
110
120
130
140
HARCLCPHCVSLOTGSHNDPRGNSELLYHNOTVFYRRPCHGEKGTHKGYCLERQLYRVSLACMCVRPRWMC

图 8B

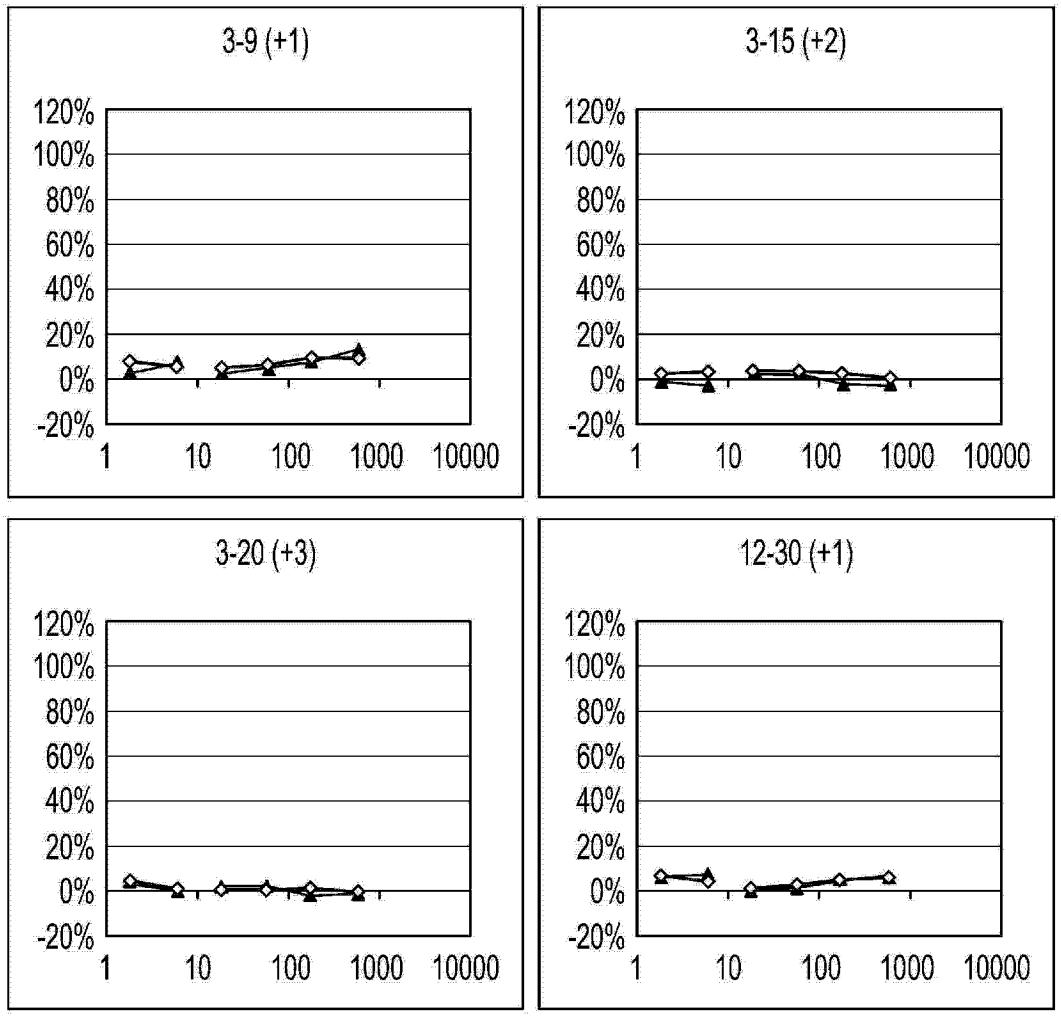


图 9A

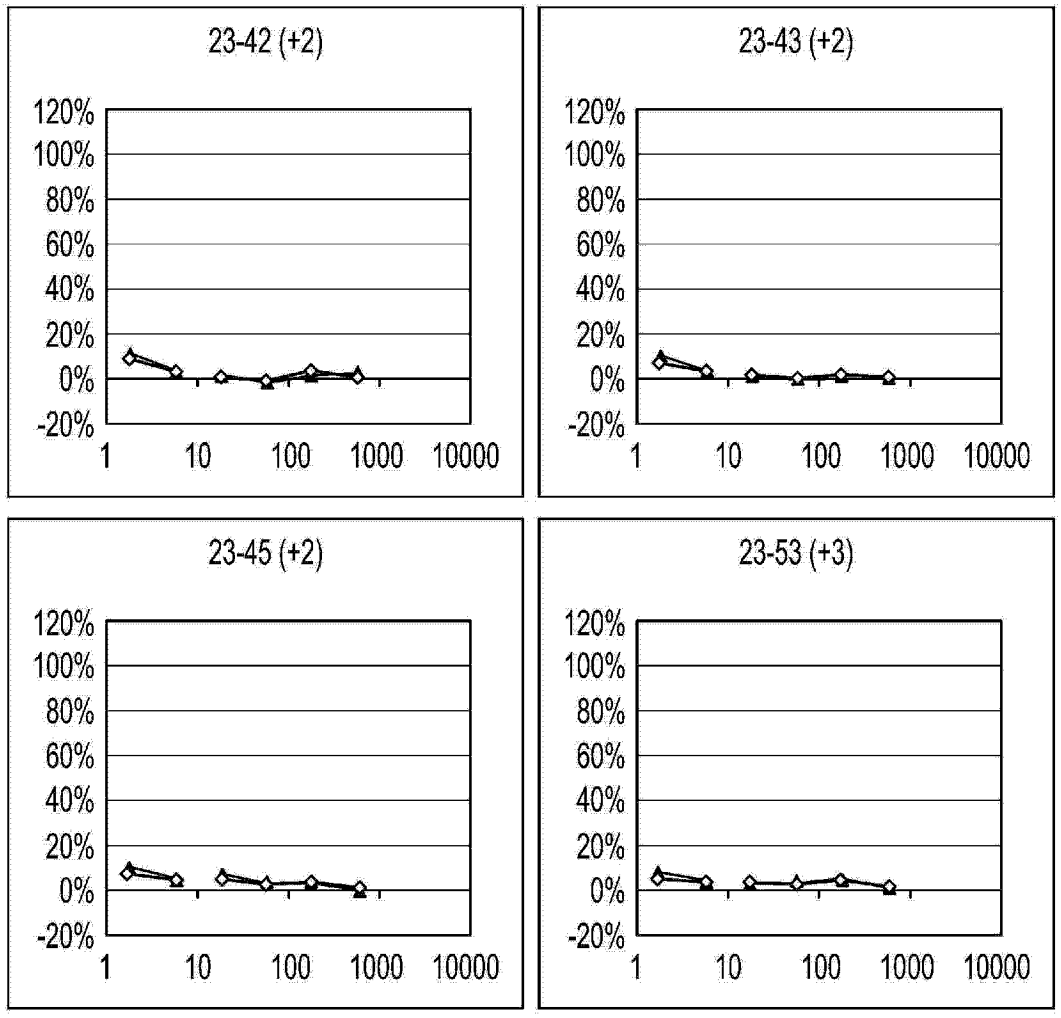

23-42 (+2)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
-20%
1
10
100
1000
10000
23-43 (+2)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
-20%
1
10
100
1000
10000
23-45 (+2)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
-20%
1
10
100
1000
10000
23-53 (+3)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
-20%
1
10
100
1000
10000

图 9B

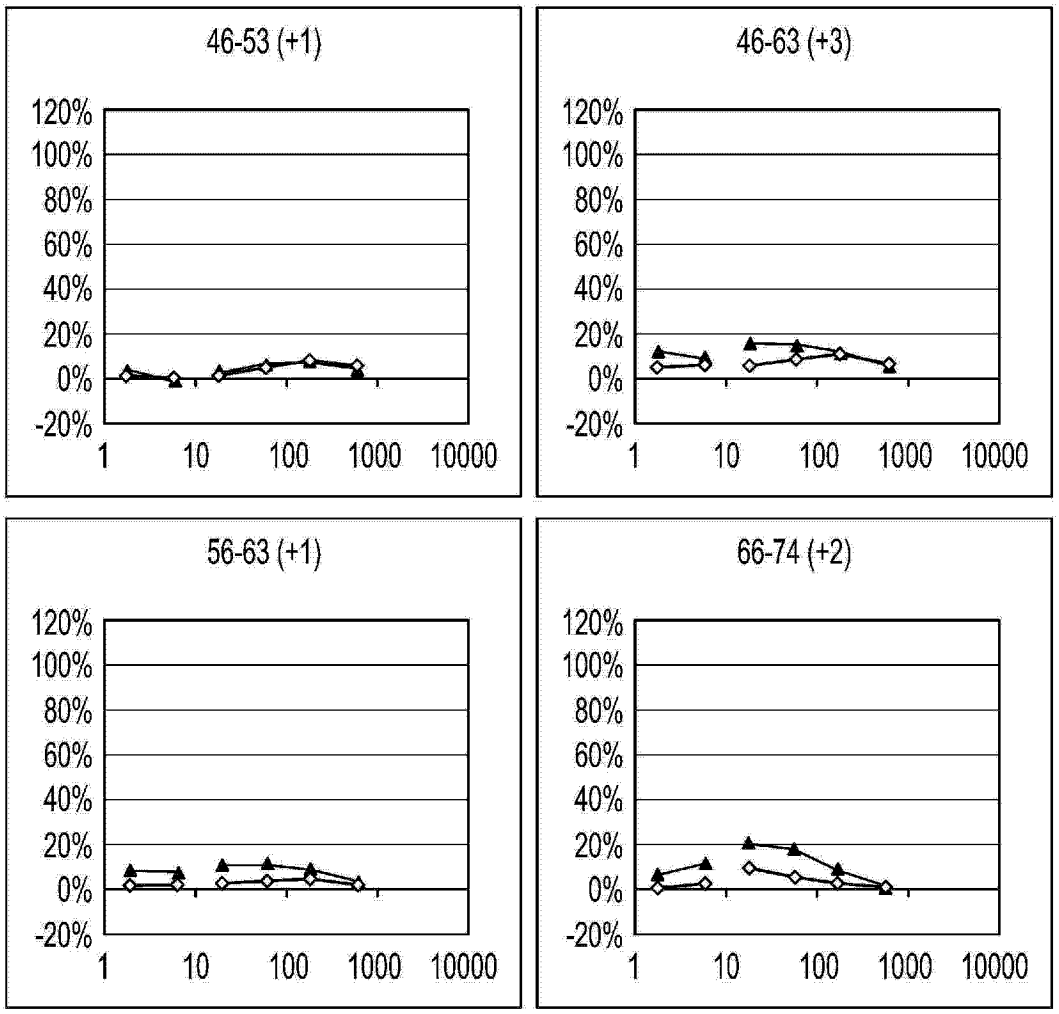

46-53 (+1)
46-63 (+3)
56-63 (+1)
66-74 (+2)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
-20%
1
10
100
1000
10000

图 9C

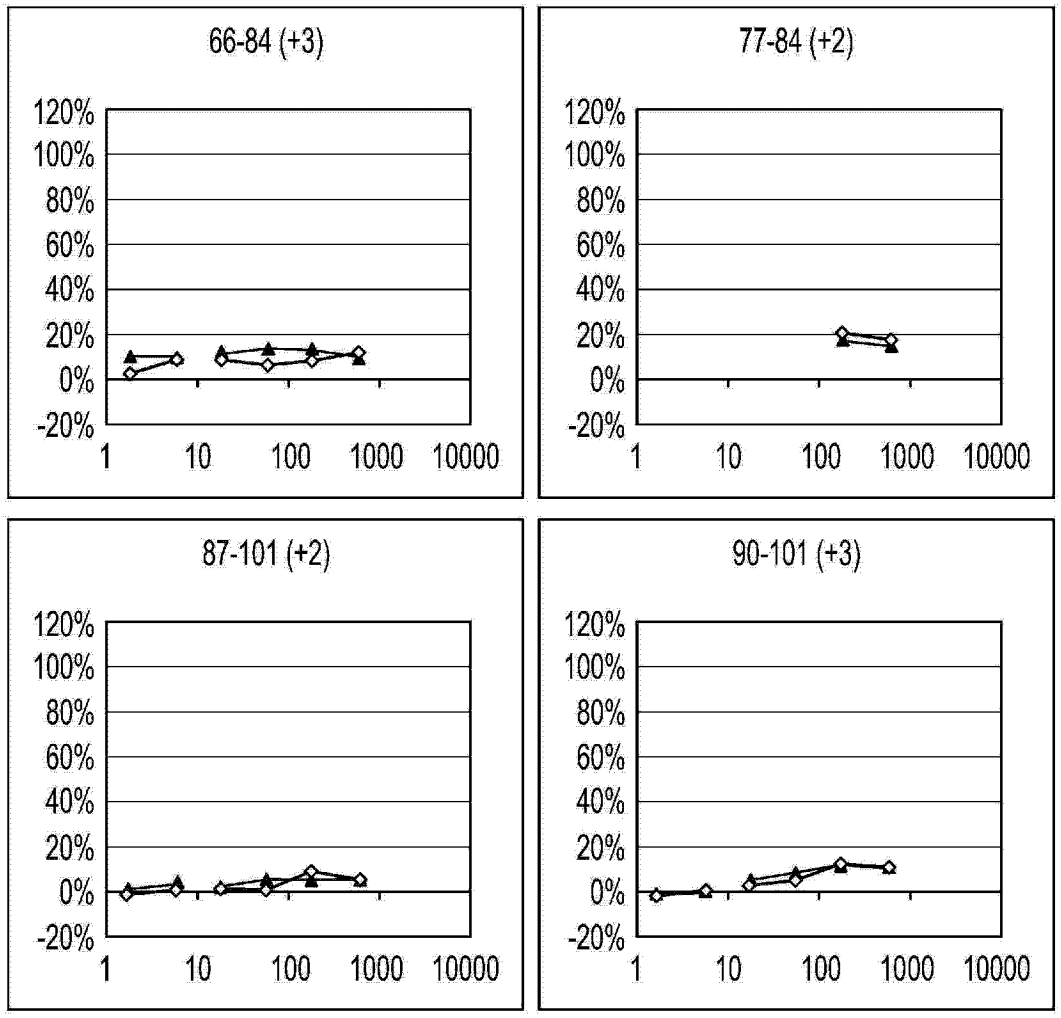

66-84 (+3)
77-84 (+2)
87-101 (+2)
90-101 (+3)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
-20%
1
10
100
1000
10000

图 9D

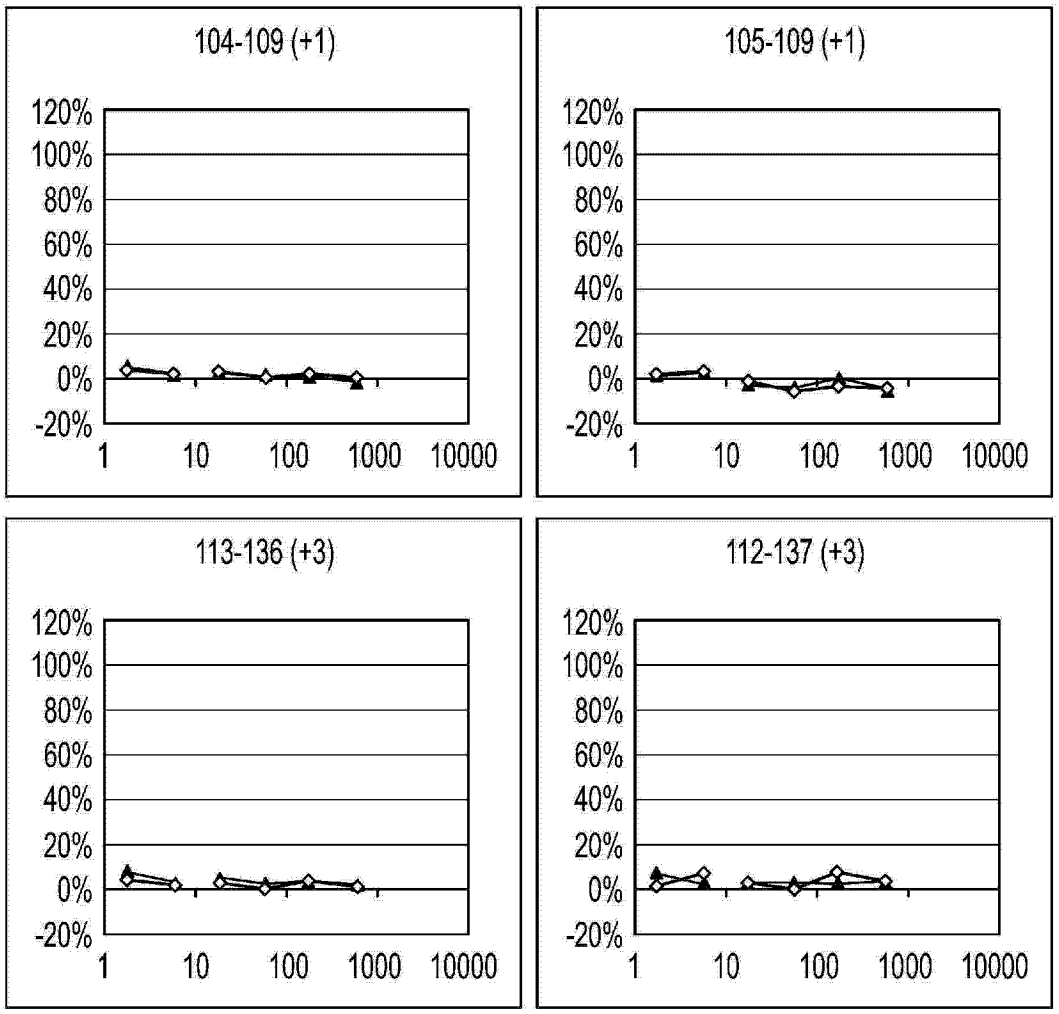

104-109 (+1)
105-109 (+1)
113-136 (+3)
112-137 (+3)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
-20%
1
10
100
1000
10000

图 9E

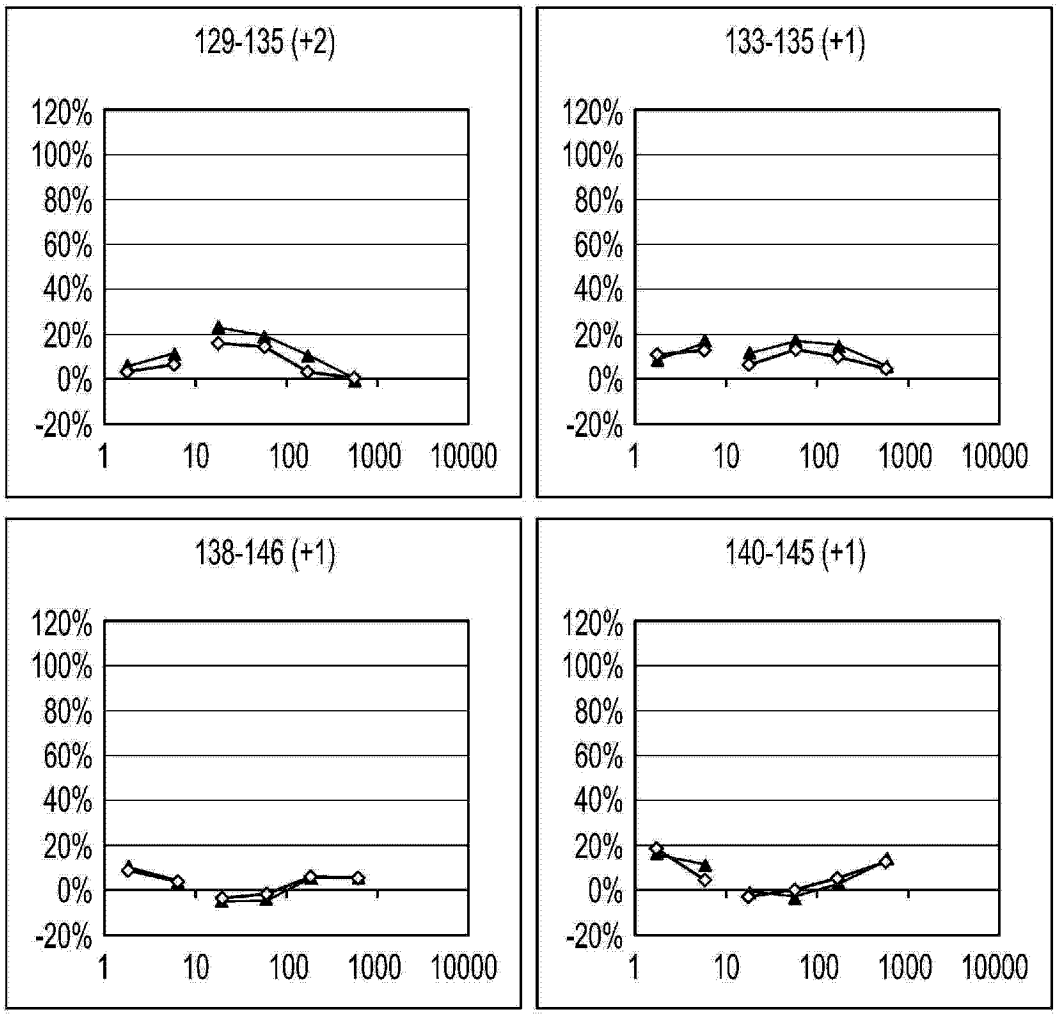


图 9F

MYSHWPSCCPSKGQDTSEELLRWSTVPVPP LEPARPNRHPESCRASEDGPLNSRAISPWR YELDRDLNRLPQDLYHARCLCPHCVSLQTG SHMDPRGNSELLYHNQTVFYRRPCHGEKGT HKGYCLERRLYRVSLACVCVRPRVMG (SEQ ID NO:17)

图 10