



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109641966 B

(45) 授权公告日 2022. 08. 23

(21) 申请号 201780053328.1

J·J·W·德哈德

(22) 申请日 2017.07.14

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109641966 A

专利代理师 康健 王思琪

(43) 申请公布日 2019.04.16

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

(30) 优先权数据

1612337.4 2016.07.15 GB

(56) 对比文件

CN 102665759 A, 2012.09.12

CN 105601739 A, 2016.05.25

WO 2007126439 A2, 2007.11.08

US 2006141582 A1, 2006.06.29

WO 2004085476 A2, 2004.10.07

WO 2013087914 A1, 2013.06.20

WO 2014133728 A2, 2014.09.04

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.02.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/067923 2017.07.14

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2018/011420 EN 2018.01.18

(73) 专利权人 阿根思公司

地址 比利时津维纳拉德

楼莹等. 同时治疗银屑病及银屑病性关节炎的生物及小分子药物研究进展.《第二军医大学学报》.2015, (第05期),

(72) 发明人 C·F·J·布朗什托 B·乌尔索

T·斯卡克-尼尔森 M·贝特尔森

S·范德旺宁 M·桑德斯

审查员 杨啸天

权利要求书1页 说明书64页

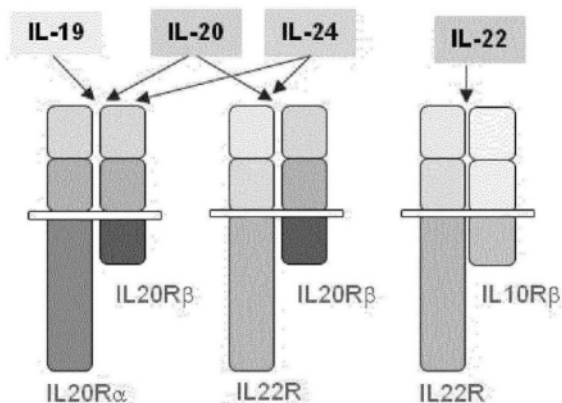
序列表34页 附图16页

(54) 发明名称

抗IL-22R抗体

(57) 摘要

本发明涉及结合细胞因子受体IL-22R,特别是人类IL-22R的抗体和其抗原结合片段。本发明还涉及包含所述抗体或其抗原结合片段的药物组合物以及治疗银屑病、银屑病关节炎或特应性皮炎的方法。



1. 一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段结合IL-22R,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域,并且其中所述抗体或其抗原结合片段包含可变重链CDR序列的组合以及可变轻链CDR序列的组合,所述可变重链CDR序列的组合为:由SEQ ID NO:6组成的HCDR3;由SEQ ID NO:36组成的HCDR2;和由SEQ ID NO:34组成的HCDR1;所述可变轻链CDR序列的组合为:由SEQ ID NO:54组成的LCDR3;由SEQ ID NO:47组成的LCDR2;和由SEQ ID NO:16组成的LCDR1。

2. 如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含选自以下的重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)的组合:包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列或与SEQ ID NO:63的氨基酸序列至少90%、95%、97%、98%或99%同一的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列或与SEQ ID NO:64的氨基酸序列至少90%、95%、97%、98%或99%同一的氨基酸序列的VL。

3. 如权利要求1所述的抗体,所述抗体包含选自以下的至少一条重链和至少一条轻链:包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列或与SEQ ID NO:67的氨基酸序列至少90%、95%、97%、98%或99%同一的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列或与SEQ ID NO:68的氨基酸序列至少90%、95%、97%、98%或99%同一的氨基酸序列的轻链。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段含有人类IgG的铰链区、CH2结构域和/或CH3结构域。

5. 如权利要求1至3中任一项所述的抗体,所述抗体表现出与人类IgG的高度同源性。

6. 如权利要求5所述的抗体,其中所述人类IgG为IgG1。

7. 一种分离的多核苷酸,其编码如权利要求1至6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

8. 一种表达载体,所述表达载体包含与调控序列可操作地连接的如权利要求7所述的多核苷酸,所述调控序列容许所述抗体、抗原结合片段、可变重链结构域或可变轻链结构域在宿主细胞或无细胞表达系统中表达。

9. 一种宿主细胞或无细胞表达系统,其含有如权利要求8所述的表达载体。

10. 一种产生重组抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括在容许所述抗体或抗原结合片段表达的条件下培养如权利要求9所述的宿主细胞或无细胞表达系统;以及回收所表达的抗体或抗原结合片段。

11. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求1至6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段和至少一种药学上可接受的载体或赋形剂。

12. 如权利要求1至6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段在制备药物中的用途。

13. 如权利要求1至6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段在制备一种用于治疗人类受试者中银屑病、银屑病关节炎或特应性皮炎的药物中的用途。

抗 IL-22R 抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及结合细胞因子受体 IL-22R,特别是人类 IL-22R 的抗体和其抗原结合片段。本发明的 IL-22R 抗体和抗原结合片段与现有技术中所述的 IL-22R 抗体相比表现出不同的特性,特别是不同的特性组合。

背景技术

[0002] IL-22R(也被称为 IL-22R1 和 IL-22RA)是在皮肤和上皮细胞上选择性表达的 II 型细胞因子受体。该受体经由三种细胞因子介导信号传导:白细胞介素 22(IL-22)、白细胞介素 20(IL-20)以及白细胞介素 24(IL-24)。经由 IL-22R 的细胞因子信号传导需要细胞表面处异二聚体复合物的形成。如图 1 中所示,IL-22 与由 IL-22R 和 IL-10R β (也被称为 IL-10R2)组成的复合物结合并且经由所述复合物进行信号传导,而 IL-20 和 IL-24 与由 IL-22R 和 IL-20R β (也被称为 IL-20R2)组成的异二聚体复合物结合并且经由所述异二聚体复合物进行信号传导。

[0003] 白细胞介素-22 是由免疫细胞,特别是激活的树突状细胞和 T 细胞表达的细胞因子。一旦由免疫系统产生,IL-22 就通过结合并且激活上皮细胞上的 IL-22R 来发挥它的生物作用。在 IL-22 结合的下游 IL-22R-IL-10R β 复合物的激活引起促炎响应、诱导对于宿主防御细菌病原体来说关键的抗微生物蛋白、以及在诸如肺和肝脏的一些器官中的保护作用。IL-22 还牵涉到疾病病理学,特别是在炎症性病症,如银屑病、银屑病关节炎以及特应性皮炎的发展中(Ma 等, *J Clin. Invest.* 118:597-607 (2008); Van Belle 等, *J Immunol.* 1 月 1 日; 188 (1):462-9 (2012); Sabat 等, *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (1):21-38 (2014))。

[0004] IL-22 在与 IL-22R 的细胞外结构域的复合物中的晶体结构已经被解析,并且已经提供了对该配体如何与它的受体缔合的重要见解(Jones 等, *Structure* 16 (9):1333-1344 (2008))。IL-22R 的细胞外区域包括彼此成约直角取向的两个 III 型纤连蛋白(FBNIII)结构域(D1 和 D2)。位于这些结构域的界面处的五个环主要负责在配体-受体复合物中接合 IL-22 残基。有助于受体结合的 IL-22 残基在配体中的两个位点,即位点 1a 和位点 1b 处聚簇。对由受体和配体这两者所贡献的关键残基的深入了解已经揭示了其中可以破坏该相互作用以消除 IL-22 信号传导作为治疗策略的方式。

[0005] 白细胞介素-20 和白细胞介素-24 由单核白细胞和角质细胞表达并且类似于 IL-22,这些细胞因子已经被发现在皮肤稳态和病理学中起作用。由此可见,通过阻断激活 IL-22R 的配体的结合来抑制或减少该受体下游的信号传导的策略可以具有治疗效用,特别是在治疗皮肤病症,如银屑病和特应性皮炎中。

[0006] 已经开发了结合 IL-22R 并且阻断 IL-22 与 IL-22R 之间的相互作用的抗体。举例来说,W02011/061119 描述了一种由最初描述于 W02006/047249 中的小鼠抗人类单克隆抗体产生的人源化 IL-22R 抗体。这种人源化抗体在本文将被称为“280-346-TSY”,被证实在细胞增殖测定中抑制经由 IL-22RA 的 IL-22 信号传导并且在小鼠银屑病模型中抑制 IL-23 诱发的耳部炎症。

发明内容

[0007] 本发明通过提供抗体或其抗原结合片段对现有技术进行了改进,所述抗体或其抗原结合片段结合细胞因子受体IL-22R并且表现出不同于现有技术中所述的IL-22R抗体的特性。所述抗体或其抗原结合片段通常表现出不同于并且在某些情况下优越于现有技术的IL-22R抗体,特别是W02011/061119中所述的人源化IL-22R抗体的特性的特性组合。这些抗体的特性对于用于人类治疗的用途,特别是对于诸如银屑病、银屑病关节炎以及特应性皮炎的病症的治疗来说可以是特别有利的。

[0008] 在第一个方面,本发明提供了一种结合人类IL-22R的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段结合IL-22R蛋白内不包括Tyr60的表位。

[0009] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段具有选自以下的一种或多种另外的特性:

[0010] (i) 能够结合人类IL-22R中至少部分位于IL-22R蛋白的D2结构域中的表位;

[0011] (ii) 能够以高亲和力结合人类IL-22R;

[0012] (iii) 能够阻断IL-22与人类IL-22R结合;

[0013] (iv) 能够抑制IL-22依赖性IL-22R激活;

[0014] (v) 能够抑制IL-20依赖性IL-22R激活;

[0015] (vi) 能够抑制IL-22和IL-20依赖性IL-22R激活;以及

[0016] (vii) 没有与鼠类IL-22R的交叉反应性。

[0017] 所述抗体或抗原结合片段可以表现出高人类同源性,如本文其他地方所定义。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL),其中所述VH结构域和/或VL结构域或其一个或多个互补决定区(CDR)源自于骆驼科(Camelidae)的动物,即是骆驼科动物来源的。表现出高人类同源性的抗体或抗原结合片段或具有至少一个骆驼科动物来源的CDR序列、VH结构域和/或VL结构域的抗体或抗原结合片段可以是人源化的的变体或来自骆驼科动物常规抗体的VH结构域或VL结构域的种系化的变体,其中术语“人源化”和“种系化”如本文其他地方所定义。

[0018] 在非限制性实施方案中,本发明提供了以下抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段是通过参考具体结构特征来限定的,即CDR (SEQ ID NO:2、4、6、9、11、13、34、36、41、43 (重链CDR) 或SEQ ID NO:16、18、20、23、25、27、47、54、57、59 (轻链CDR) 中的一个或多个) 或整个可变结构域 (SEQ ID NO:29、31、63、65 (重链可变结构域) 或SEQ ID NO:30、32、62、64、66 (轻链可变结构域) 中的一个或多个) 的指定氨基酸序列。所有这些抗体都结合人类细胞因子受体IL-22R。

[0019] 在具体实施方案中,由以下结构特征限定的抗体可以表现出高人类同源性,如本文所定义。所述抗体可以是通过重组手段产生的单克隆抗体。以下IL-22R抗体的CDR可以是骆驼科动物来源的,即源自于通过对骆驼科动物(特别是美洲驼)进行免疫接种所产生的常规抗体。本发明还提供了人源化或人类种系化的变体、亲和变体以及含有保守氨基酸取代的变体,如本文所定义。

[0020] 现在通过参考结构特征来进一步描述本发明的IL-22R抗体的实施方案。

[0021] 在一个实施方案中,提供了一种结合细胞因子受体IL-22R的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含重链可变结构域(VH),所述重链可变结构域包含选自以

下的重链CDR3:

[0022] SEQ ID NO:6[VGFSGTYYSES]或其序列变体;

[0023] SEQ ID NO:13[PPGPFKAHYNGMKY]或其序列变体;

[0024] SEQ ID NO:43[PPGPFKAHYNGAKY]或其序列变体;

[0025] 其中所述序列变体在所述序列中包含一个、两个或三个氨基酸取代(例如保守取代、人源化取代或亲和变体)。

[0026] 所述抗体或其抗原结合片段的重链可变结构域可以可选地或另外地包含选自以下的重链CDR2:

[0027] SEQ ID NO:4[SIYNDGSNTAYSDSVKG]或其序列变体;

[0028] SEQ ID NO:11[GIHISGGITYYLDVSKG]或其序列变体;

[0029] SEQ ID NO:36[SIYNDASNTAYSDSVKG]或其序列变体;

[0030] SEQ ID NO:41[GIHISGGITYYTDSVKG]或其序列变体;

[0031] 其中所述序列变体在所述序列中包含一个、两个或三个氨基酸取代(例如保守取代、人源化取代或亲和变体)。

[0032] 所述抗体或其抗原结合片段的重链可变结构域可以可选地或另外地包含选自以下的重链CDR1:

[0033] SEQ ID NO:2[SYDMS]或其序列变体;

[0034] SEQ ID NO:9[SYFMS]或其序列变体;

[0035] SEQ ID NO:34[SYDMN]或其序列变体;

[0036] 其中所述序列变体在所述序列中包含一个、两个或三个氨基酸取代(例如保守取代、人源化取代或亲和变体)。

[0037] 可选地或另外地,结合细胞因子受体IL-22R的抗体或其抗原结合片段可以包含轻链可变结构域(VL),所述轻链可变结构域包含选自以下的轻链CDR3:

[0038] SEQ ID NO:20[QSGSSSANAV]或其序列变体;

[0039] SEQ ID NO:27[ASYRLYADYV]或其序列变体;

[0040] SEQ ID NO:54[QSGSSSSNAV]或其序列变体;

[0041] 其中所述序列变体在所述序列中包含一个、两个或三个氨基酸取代(例如保守取代、人源化取代或亲和变体)。

[0042] 所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变结构域可以可选地或另外地包含选自以下的轻链CDR2:

[0043] SEQ ID NO:18[GNNNRPS]或其序列变体;

[0044] SEQ ID NO:25[KVNTRSS]或其序列变体;

[0045] SEQ ID NO:47[GQNNRPS]或其序列变体;

[0046] SEQ ID NO:59[EVNKRSS]或其序列变体;

[0047] 其中所述序列变体在所述序列中包含一个、两个或三个氨基酸取代(例如保守取代、人源化取代或亲和变体)。

[0048] 所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变结构域可以可选地或另外地包含选自以下的轻链CDR1:

[0049] SEQ ID NO:16[QGGYYAH]或其序列变体;

[0050] SEQ ID NO:23 [TGTSRDIGDYNYS]或其序列变体;

[0051] SEQ ID NO:57 [TGTSSDIGSYNYVS]或其序列变体;

[0052] 其中所述序列变体在所述序列中包含一个、两个或三个氨基酸取代(例如保守取代、人源化取代或亲和变体)。

[0053] 在某些实施方案中,提供了一种结合细胞因子受体IL-22R的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含可变重链CDR3 (HCDR3)、可变重链CDR2 (HCDR2) 以及可变重链CDR1 (HCDR1) 的组合,其中所述组合选自由以下各项组成的组:

[0054] (i) 包含SEQ ID NO:6的HCDR3;包含SEQ ID NO:36的HCDR2;包含SEQ ID NO:34的HCDR1;

[0055] (ii) 包含SEQ ID NO:43的HCDR3;包含SEQ ID NO:41的HCDR2;包含SEQ ID NO:9的HCDR1;

[0056] (iii) 包含SEQ ID NO:6的HCDR3;包含SEQ ID NO:4的HCDR2;包含SEQ ID NO:2的HCDR1;以及

[0057] (iv) 包含SEQ ID NO:13的HCDR3;包含SEQ ID NO:11的HCDR2;包含SEQ ID NO:9的HCDR1。

[0058] 可选地或另外地,结合细胞因子受体IL-22R的抗体或其抗原结合片段可以包含可变轻链CDR3 (LCDR3)、可变轻链CDR2 (LCDR2) 以及可变轻链CDR1 (LCDR1) 的组合,所述组合选自由以下各项组成的组:

[0059] (i) 包含SEQ ID NO:54的LCDR3;包含SEQ ID NO:47的LCDR2;包含SEQ ID NO:16的LCDR1;

[0060] (ii) 包含SEQ ID NO:27的LCDR3;包含SEQ ID NO:59的LCDR2;包含SEQ ID NO:57的LCDR1;

[0061] (iii) 包含SEQ ID NO:20的LCDR3;包含SEQ ID NO:47的LCDR2;包含SEQ ID NO:16的LCDR1;

[0062] (iv) 包含SEQ ID NO:20的LCDR3;包含SEQ ID NO:18的LCDR2;包含SEQ ID NO:16的LCDR1;以及

[0063] (v) 包含SEQ ID NO:27的LCDR3;包含SEQ ID NO:25的LCDR2;包含SEQ ID NO:23的LCDR1。

[0064] 在某些实施方案中,本文提供了结合细胞因子受体IL-22R的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含根据下文所述的实施方案的可变重链CDR3 (HCDR3)、可变重链CDR2 (HCDR2) 和可变重链CDR1 (HCDR1)、可变轻链CDR3 (LCDR3)、可变轻链CDR2 (LCDR2) 和可变轻链CDR1 (LCDR1) 的组合。

[0065] 在一个实施方案中,本文提供了一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段结合细胞因子受体IL-22R并且包含VH CDR序列和VL CDR序列的组合:包含SEQ ID NO:6的HCDR3;包含SEQ ID NO:36的HCDR2;包含SEQ ID NO:34的HCDR1;包含SEQ ID NO:54的LCDR3;包含SEQ ID NO:47的LCDR2;以及包含SEQ ID NO:16的LCDR1。

[0066] 在一个实施方案中,本文提供了一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段结合细胞因子受体IL-22R并且包含VH CDR序列和VL CDR序列的组合:包含SEQ ID NO:43的HCDR3;包含SEQ ID NO:41的HCDR2;包含SEQ ID NO:9的HCDR1;包含SEQ ID NO:27

的LCDR3;包含SEQ ID NO:59的LCDR2;以及包含SEQ ID NO:57的LCDR1。

[0067] 在一个实施方案中,本文提供了一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段结合细胞因子受体IL-22R并且包含VH CDR序列和VL CDR序列的组合:包含SEQ ID NO:6的HCDR3;包含SEQ ID NO:4的HCDR2;包含SEQ ID NO:2的HCDR1;包含SEQ ID NO:20的LCDR3;包含SEQ ID NO:47的LCDR2;以及包含SEQ ID NO:16的LCDR1。

[0068] 在一个实施方案中,本文提供了一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段结合细胞因子受体IL-22R并且包含VH CDR序列和VL CDR序列的组合:包含SEQ ID NO:6的HCDR3;包含SEQ ID NO:4的HCDR2;包含SEQ ID NO:2的HCDR1;包含SEQ ID NO:20的LCDR3;包含SEQ ID NO:18的LCDR2;以及包含SEQ ID NO:16的LCDR1。

[0069] 在一个实施方案中,本文提供了一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段结合细胞因子受体IL-22R并且包含VH CDR序列和VL CDR序列的组合:包含SEQ ID NO:13的HCDR3;包含SEQ ID NO:11的HCDR2;包含SEQ ID NO:9的HCDR1;包含SEQ ID NO:27的LCDR3;包含SEQ ID NO:25的LCDR2;以及包含SEQ ID NO:23的LCDR1。

[0070] 在某些实施方案中,本文提供了结合细胞因子受体IL-22R的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含选自以下的重链可变结构域(VH):

[0071] (i) 包含SEQ ID NO:29或31的氨基酸序列或由SEQ ID NO:29或31的氨基酸序列组成的VH;

[0072] (ii) 包含SEQ ID NO:29或31的氨基酸序列或由SEQ ID NO:29或31的氨基酸序列组成的VH的亲合变体或人类种系化变体;或

[0073] (iii) 包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成的VH,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:29或31的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%的同一性。

[0074] 可选地或另外地,所述抗体或抗原结合片段可以包含选自以下的轻链可变结构域(VL):

[0075] (i) 包含SEQ ID NO:30、32或62的氨基酸序列或由SEQ ID NO:30、32或62的氨基酸序列组成的VL;

[0076] (ii) 包含SEQ ID NO:30、32或62的氨基酸序列或由SEQ ID NO:30、32或62的氨基酸序列组成的VH的亲合变体或人类种系化变体;或

[0077] (iii) 包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成的VL,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:30、32或62的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%的同一性。

[0078] 对于其中抗体或抗原结合片段的结构域是通过与参考序列的特定序列同一性百分比来限定的实施方案,VH结构域和/或VL结构域可以保留与参考序列中存在的CDR序列相同的CDR序列以使得变化仅存在于框架区内。

[0079] 在某些实施方案中,本发明的抗体可以包括人类抗体,特别是人类IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的CH1结构域、铰链区、CH2结构域以及CH3结构域。

[0080] 本发明的特别优选的抗体描述于下文中。

[0081] 230C9和与其相关的抗体

[0082] 在某些实施方案中,提供了一种特异性结合IL-22R的分离的抗体或其抗原结合片

段,所述抗体或抗原结合片段包含重链可变结构域,其中:

[0083] 可变重链CDR3序列是SEQ ID NO:6[VGFSGTYYES]或其序列变体;

[0084] 可变重链CDR2序列是SEQ ID NO:36[SIYNDASNTAYSDSVKG]或其序列变体;并且

[0085] 可变重链CDR1序列是SEQ ID NO:34[SYDMN]或其序列变体,并且

[0086] 其中所述序列变体在所述序列中包含一个、两个或三个氨基酸取代(例如保守取代、人源化取代或亲和变体)。

[0087] 所述抗体或抗原结合片段还可以包含轻链可变结构域,其中:

[0088] 可变轻链CDR3序列是SEQ ID NO:54[QSGSSSSNAV]或其序列变体;

[0089] 可变轻链CDR2序列是SEQ ID NO:47[GQNNRPS]或其序列变体;并且

[0090] 可变轻链CDR1序列是SEQ ID NO:16[QGGYYAH]或其序列变体,并且

[0091] 其中所述序列变体在所述序列中包含一个、两个或三个氨基酸取代(例如保守取代、人源化取代或亲和变体)。

[0092] 在某些实施方案中,提供了一种特异性结合IL-22R的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含重链可变结构域,其中:

[0093] 可变重链CDR3序列包含SEQ ID NO:6[VGFSGTYYES]或由SEQ ID NO:6[VGFSGTYYES]组成;

[0094] 可变重链CDR2序列包含SEQ ID NO:36[SIYNDASNTAYSDSVKG]或由SEQ ID NO:36[SIYNDASNTAYSDSVKG]组成;

[0095] 可变重链CDR1序列包含SEQ ID NO:34[SYDMN]或由SEQ ID NO:34[SYDMN]组成;

[0096] 可变轻链CDR3序列包含SEQ ID NO:54[QSGSSSSNAV]或由SEQ ID NO:54[QSGSSSSNAV]组成;

[0097] 可变轻链CDR2序列包含SEQ ID NO:47[GQNNRPS]或由SEQ ID NO:47[GQNNRPS]组成;并且

[0098] 可变轻链CDR1序列包含SEQ ID NO:16[QGGYYAH]或由SEQ ID NO:16[QGGYYAH]组成。

[0099] 所述抗体或其抗原结合片段可以包含:重链可变结构域(VH),其包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列;以及任选的轻链可变结构域(VL),其包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列。在某些实施方案中,本文提供了单克隆抗体或其抗原结合片段,所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域,所述重链可变结构域包含与如SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列具有至少85%的序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性、或至少97%、98%或99%的序列同一性的VH序列,和/或所述轻链可变结构域包含与如SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列具有至少85%的序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性、或至少97%、98%或99%的序列同一性的VL。

[0100] 对于其中抗体或抗原结合片段的结构域是通过与参考序列的特定序列同一性百分比来限定的实施方案,VH结构域和/或VL结构域可以保留与参考序列中存在的CDR序列相同的CDR序列以使得变化仅存在于框架区内。在某些实施方案中,包含分别被限定为与SEQ ID NO:63和64具有特定同一性百分比的重链可变结构域和/或轻链可变结构域的抗体或抗原结合片段将具有以下CDR序列:

[0101] 可变重链CDR3序列,其包含SEQ ID NO:6[VGFSGTYYES]或由SEQ ID NO:6

[VGFSGTYYES]组成；

[0102] 可变重链CDR2序列,其包含SEQ ID NO:36[SIYNDASNTAYSDSVKG]或由SEQ ID NO:36[SIYNDASNTAYSDSVKG]组成；

[0103] 可变重链CDR1序列,其包含SEQ ID NO:34[SYDMN]或由SEQ ID NO:34[SYDMN]组成；

[0104] 可变轻链CDR3序列,其包含SEQ ID NO:54[QSGSSSSNAV]或由SEQ ID NO:54[QSGSSSSNAV]组成；

[0105] 可变轻链CDR2序列,其包含SEQ ID NO:47[GQNNRPS]或由SEQ ID NO:47[GQNNRPS]组成；以及

[0106] 可变轻链CDR1序列,其包含SEQ ID NO:16[QGGYYAH]或由SEQ ID NO:16[QGGYYAH]组成。

[0107] 特异性结合IL-22R的抗体可以包含至少一个全长免疫球蛋白重链和/或至少一个全长λ或κ轻链。在某些实施方案中,所述抗体包含:包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的轻链。在某些实施方案中,本文提供了单克隆抗体,所述单克隆抗体包含:重链,所述重链与如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列具有至少85%的序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性、或至少97%、98%或99%的序列同一性;和/或轻链,所述轻链与如SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列具有至少85%的序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性、或至少97%、98%或99%的序列同一性。

[0108] 对于其中抗体链是通过与参考序列的特定序列同一性百分比来限定的实施方案,重链和/或轻链可以保留与参考序列中存在的CDR序列相同的CDR序列以使得变化仅存在于CDR区之外。

[0109] 223G5和与其相关的抗体

[0110] 在某些实施方案中,提供了一种特异性结合IL-22R的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含重链可变结构域,其中:

[0111] 可变重链CDR3序列是SEQ ID NO:43[PPGPFKAHYNGAKY]或其序列变体;

[0112] 可变重链CDR2序列是SEQ ID NO:41[GIHISGGITYYTDSVKG]或其序列变体;并且

[0113] 可变重链CDR1序列是SEQ ID NO:9[SYFMS]或其序列变体,并且

[0114] 其中所述序列变体在所述序列中包含一个、两个或三个氨基酸取代(例如保守取代、人源化取代或亲和变体)。

[0115] 所述抗体或抗原结合片段还可以包含轻链可变结构域,其中:

[0116] 可变轻链CDR3序列是SEQ ID NO:27[ASYRLYADYV]或其序列变体;

[0117] 可变轻链CDR2序列是SEQ ID NO:59[EVNKRSS]或其序列变体;并且

[0118] 可变轻链CDR1序列是SEQ ID NO:57[TGTSSDIGSYNYVS]或其序列变体,并且

[0119] 其中所述序列变体在所述序列中包含一个、两个或三个氨基酸取代(例如保守取代、人源化取代或亲和变体)。

[0120] 在某些实施方案中,提供了一种特异性结合IL-22R的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含重链可变结构域,其中:

[0121] 可变重链CDR3序列包含SEQ ID NO:43[PPGPFKAHYNGAKY]或由SEQ ID NO:43

[PPGPFKAHYNGAKY]组成;

[0122] 可变重链CDR2序列包含SEQ ID NO:41 [GIHISGGITYYTDSVKG]或由SEQ ID NO:41 [GIHISGGITYYTDSVKG]组成;

[0123] 可变重链CDR1序列包含SEQ ID NO:9 [SYFMS]或由SEQ ID NO:9 [SYFMS]组成;

[0124] 可变轻链CDR3序列包含SEQ ID NO:27 [ASYRLYADYV]或由SEQ ID NO:27 [ASYRLYADYV]组成;

[0125] 可变轻链CDR2序列包含SEQ ID NO:59 [EVNKRSS]或由SEQ ID NO:59 [EVNKRSS]组成;并且

[0126] 可变轻链CDR1序列包含SEQ ID NO:57 [TGTSSDIGSYNYVS]或由SEQ ID NO:57 [TGTSSDIGSYNYVS]组成。

[0127] 所述抗体或其抗原结合片段可以包含:重链可变结构域(VH),其包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列;以及任选的轻链可变结构域(VL),其包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列。在某些实施方案中,本文提供了单克隆抗体或其抗原结合片段,所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域,所述重链可变结构域包含与如SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列具有至少85%的序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性、或至少97%、98%或99%的序列同一性的VH序列,和/或所述轻链可变结构域包含与如SEQ ID NO:66所示的氨基酸序列具有至少85%的序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性、或至少97%、98%或99%的序列同一性的VL。

[0128] 对于其中抗体或抗原结合片段的结构域是通过与参考序列的特定序列同一性百分比来限定的实施方案,VH结构域和/或VL结构域可以保留与参考序列中存在的CDR序列相同的CDR序列以使得变化仅存在于框架区内。在某些实施方案中,包含分别被限定为与SEQ ID NO:65和66具有特定同一性百分比的重链可变结构域和/或轻链可变结构域的抗体或抗原结合片段将具有以下CDR序列:

[0129] 可变重链CDR3序列,其包含SEQ ID NO:43 [PPGPFKAHYNGAKY]或由SEQ ID NO:43 [PPGPFKAHYNGAKY]组成;

[0130] 可变重链CDR2序列,其包含SEQ ID NO:41 [GIHISGGITYYTDSVKG]或由SEQ ID NO:41 [GIHISGGITYYTDSVKG]组成;

[0131] 可变重链CDR1序列,其包含SEQ ID NO:9 [SYFMS]或由SEQ ID NO:9 [SYFMS]组成;

[0132] 可变轻链CDR3序列,其包含SEQ ID NO:27 [ASYRLYADYV]或由SEQ ID NO:27 [ASYRLYADYV]组成;

[0133] 可变轻链CDR2序列,其包含SEQ ID NO:59 [EVNKRSS]或由SEQ ID NO:59 [EVNKRSS]组成;以及

[0134] 可变轻链CDR1序列,其包含SEQ ID NO:57 [TGTSSDIGSYNYVS]或由SEQ ID NO:57 [TGTSSDIGSYNYVS]组成。

[0135] 特异性结合IL-22R的抗体可以包含至少一个全长免疫球蛋白重链和/或至少一个全长 λ 或 κ 轻链。在某些实施方案中,所述抗体包含:重链,所述重链包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列;以及轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列。在某些实施方案中,本文提供了单克隆抗体,所述单克隆抗体包含重链,所述重链与如SEQ ID NO:69所示的氨基酸序列具有至少85%的序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性、或

至少97%、98%或99%的序列同一性；和/或轻链，所述轻链与如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列具有至少85%的序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性、或至少97%、98%或99%的序列同一性。

[0136] 对于其中抗体链是通过与参考序列的特定序列同一性百分比来限定的实施方案，重链和/或轻链可以保留与参考序列中存在的CDR序列相同的CDR序列以使得变化仅存在于CDR区之外。

[0137] 在特定抗体或抗原结合区被鉴定为包含通过参考特定氨基酸序列所限定的VH结构域或重链和也通过参考特定氨基酸序列所限定的VL结构域或轻链的组合的情况下，则对于所列的每一个特定VH/VL或重链/轻链组合，(除非另有说明，否则)该定义可以被认为包括抗体或抗原结合区，其由与所述VH/重链氨基酸序列具有至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、或至少99%的序列同一性的VH结构域/重链和与所述VL/轻链氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、或至少99%的序列同一性的VL结构域/轻链的组合形成。在每种情况下，由与所述结构域/链氨基酸序列的序列同一性%限定的结构域/链可以保留与所述的VH/VL结构域或重链/轻链氨基酸序列中存在的CDR序列相同的CDR序列，而在框架区或CDR区之外的其他区域内表现出氨基酸序列变化。

[0138] 除非在本申请中另有说明，否则两个氨基酸序列之间的序列同一性%可以通过比较以最佳方式比对的这两个序列来确定并且其中待比较的氨基酸序列相对于参考序列可以包含添加或缺失以用于这两个序列之间的最佳比对。同一性百分比是通过确定在这两个序列之间具有相同氨基酸残基的相同位置的数目，用该相同位置的数目除以比较窗中位置的总数并且将所获得的结果乘以100以获得这两个序列之间的同一性百分比来计算的。举例来说，有可能使用BLAST程序“BLAST 2sequences”(Tatusova等，“Blast 2sequences—a new tool for comparing protein and nucleotide sequences (Blast 2sequences——一种用于比较蛋白质序列和核苷酸序列的新工具)”，FEMS Microbiol Lett.174:247-250)，其可在网站<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>上获得，所使用的参数是由默认给出的参数(特别是对于参数“开放空位罚分”:5以及“延伸空位罚分”:2;所选择的矩阵是例如由所述程序所建议的矩阵“BLOSUM 62”)，通过所述程序直接计算待比较的两个序列之间的同一性百分比。

[0139] 本文提供的IL-22R抗体或其抗原结合片段可以各自表现出以下特性/特征中的一种或任何组合：

[0140] -所述抗体或抗原结合片段可以结合人类IL-22R蛋白内不包括Tyr60的表位；

[0141] -所述抗体或抗原结合片段可以结合至少部分位于人类IL-22R蛋白的D2结构域中的表位，其中所述D2结构域是SEQ ID NO:71的氨基酸残基125至228；

[0142] -所述抗体或抗原结合片段可以高亲和力结合人类IL-22R；

[0143] -所述抗体或抗原结合片段可以阻断IL-22与IL-22R结合；

[0144] -所述抗体或抗原结合片段可以抑制IL-22依赖性IL-22R激活；

[0145] -所述抗体或抗原结合片段可以抑制IL-20依赖性IL-22R激活；

[0146] -所述抗体或抗原结合片段可以抑制IL-22依赖性IL-22R激活和IL-20依赖性IL-22R激活；

[0147] -所述抗体或抗原结合片段可能不与鼠类IL-22R交叉反应。

[0148] 本文提供的IL-22R抗体或其抗原结合片段优选地表现出以下特性/特征中的两种或更多种:

[0149] -所述抗体或抗原结合片段结合人类IL-22R蛋白内不包括Tyr60的表位;

[0150] -所述抗体或抗原结合片段以高亲和力结合人类IL-22R;

[0151] -所述抗体或抗原结合片段抑制IL-22依赖性IL-22R激活和IL-20依赖性IL-22R激活。

[0152] 本文提供的IL-22R抗体或其抗原结合片段可以是嵌合抗体。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段含有人类IgG的铰链区、CH2结构域和/或CH3结构域。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段表现出与人类IgG,优选地人类IgG1的高度同源性,其中“高人类同源性”如本文其他地方所定义。在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL),其中所述VH结构域和/或VL结构域或其一个或多个互补决定区(CDR)源自于骆驼科的动物,即是骆驼科动物来源的,优选地其中所述骆驼科动物是美洲驼。

[0153] 在另外的方面,本发明还提供了编码上文所列的抗体和抗原结合片段的多核苷酸分子,以及包含所述多核苷酸的表达载体、含有所述载体的宿主细胞和重组表达/产生本文所述的抗体的方法。

[0154] 在再另一个方面,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含本文所述的IL-22R抗体或其抗原结合片段中的任一种和药学上可接受的载体或赋形剂。

[0155] 本发明的再另一个方面涉及使用上文所列的IL-22R抗体或其抗原结合片段进行医学治疗,特别是预防和/或治疗诸如银屑病、银屑病关节炎以及特应性皮炎的病症的方法。

[0156] 当结合以下说明和附图考虑时,将更好地了解和理解本发明的这些和其他实施方案。然而,应当了解的是,以下说明虽然表明了本发明的各种实施方案和其许多具体细节,但是通过说明的方式而非限制的方式给出的。可以在本发明的范围内在不脱离其精神的情况下进行许多替换、修改、添加和/或重排,并且本发明包括所有这些替换、修改、添加和/或重排。

附图说明

[0157] 图1示出了经由细胞因子IL-22、IL-20以及IL-24介导信号传导的不同受体复合物。IL-22R能够与两种不同的受体配偶体,即IL-10R β (或IL-10R2)和IL-20R β (或IL-20R2)形成异二聚体复合物,并且通过配体结合激活这些不同的复合物触发经由细胞内下游途径的信号传导。

[0158] 图2示出了人类IL-22R的全长氨基酸序列(SEQ ID NO:71)。

[0159] 图3示出了编码人类IL-22R的全长核苷酸序列(SEQ ID NO:72)。

[0160] 图4示出了在基于细胞的增殖测定中抑制IL-22和IL-20介导的经由IL-22R的信号传导。(A)示出了IL-22R mAb对BW-hIL-22R细胞系的增殖的影响。BW-hIL-22R细胞稳定表达人类IL-22R并且响应于配体IL-22,生长被抑制/停滞。能够阻断IL-22与hIL-22R之间的相互作用的抗体减轻了由配体-受体结合介导的生长抑制。(B)示出了IL-22R mAb对Baf3-hIL-22R/IL20R β 细胞系的增殖的影响。Baf3-hIL-22R/IL20R β 细胞稳定表达受体复合物IL-

22R/IL20Rb的组分以使得所述细胞在IL-20存在下增殖。能够阻断IL-20与该受体复合物之间的相互作用的抗体抑制由配体结合诱导的增殖。

[0161] 图5示出了来自各种物种的IL-22R细胞外结构域的比对。(A)示出了可从Genbank获得的部分EST序列；(B)示出了在从食蟹猴cDNA文库克隆食蟹猴IL-22R和恒河猴IL-22R之后确定的序列。

[0162] 图6示出了进行以定位IL-22R mAb的表位的竞争性ELISA实验的结果。针对VH家族1-8、10、11、19以及22的抗体鉴定出多种表位。根据所述抗体是(i)在体外阻断IL-22结合并且在基于细胞的测定中中和IL-22信号传导(左下象限)；(ii)在体外阻断IL-22结合,但是在基于细胞的测定中没有中和活性(右上象限)；还是(iii)在体外不阻断IL-22结合,但是在基于细胞的测定中具有中和活性(右下象限),将所述表位分组。

[0163] 图7示出了在与IL-22的复合物中IL-22R的晶体结构。(A)IL-22R的结构域D1和D2为与配体IL-22的界面贡献残基。(B)结构域D1中的Y60是有助于与IL-22配体的位点1A的相互作用的重要IL-22R残基。

[0164] 图8示出了在基于细胞的增殖测定中抑制IL-20介导的经由IL-22R的信号传导。测试各种IL-22R mAb抑制IL-20诱导的Baf3-hIL-22R/IL20Rb细胞增殖的能力。

[0165] 图9示出了在基于细胞的测定中抑制IL-22和IL-20介导的经由IL-22R的信号传导。(A)示出了IL-22R mAb对BW-hIL-22R细胞系的增殖的影响。BW-hIL-22R细胞稳定表达人类IL-22R并且响应于配体IL-22,生长被抑制/停滞。能够阻断IL-22与hIL-22R之间的相互作用的抗体减轻了由配体-受体结合介导的生长抑制。(B)示出了IL-22R mAb对Baf3-hIL-22R/IL20Rb细胞系的增殖的影响。Baf3-hIL-22R/IL20Rb细胞稳定表达受体复合物IL-22R/IL20Rb的组分以使得所述细胞在IL-20存在下增殖。能够阻断IL-20与该受体复合物之间的相互作用的抗体抑制由配体结合诱导的增殖。

[0166] 图10示意性地示出了种系化IL-22R抗体230C9和223G5的表位定位实验的结果。请注意,“Zymo”等同于280-346-TSY。

[0167] 图11示出了如通过FACS分析所确定的种系化抗体对人类IL-22R和食蟹猴IL-22R的交叉反应性。抗体230C9与人类IL-22R和食蟹猴IL-22R交叉反应(左图),而抗体223G5结合人类IL-22R,但是不与食蟹猴IL-22R交叉反应(右图)。

[0168] 图12示出了IL-22R抗体230C9的药物代谢动力学数据。向食蟹猴静脉内注射单次10mg/kg剂量的抗体。在不同的时间点采集样品并且通过ELISA测试抗体的血浆浓度。发现抗体230C9具有约19.4天的半衰期。

[0169] 图13示出了在各种剂量下IL-22R抗体230C9的药物代谢动力学数据。

[0170] 在更高的剂量($\geq 10\text{mg/kg}$)下,当靶标介导的药物处置(TMDD)的容量饱和时,清除率值接近RES的非特异性清除率。B:230C9-N297Q在食蟹猴中的清除率。总清除率表示1)非线性并且可饱和的TMDD和2)线性并且归因于RES的非特异性清除率的总和。血浆半衰期与清除率呈反比关系,从而由于靶标介导的清除而使得在高剂量下半衰期长,并且在更低剂量下半衰期更短。

[0171] 图14示出了IL-22R抗体230C9的药效动力学效应。使食蟹猴暴露于不同剂量的230C9并且评估对猴的IMQ处理的皮肤切片和正常皮肤切片的影响。发现增加抗体230C9的剂量在IMQ处理的皮肤切片中使表皮厚度正常化(A)并且降低Ki67阳性核的出现率(B)。

[0172] 图15示出了IL-22R抗体230C9 (ARGX-112) 对皮肤钻取活检中IL-22调节的FLG2 mRNA水平的影响。以不同的剂量向食蟹猴单次静脉内输注施用抗体230C9:1mg/kg、5mg/kg以及30mg/kg (每个剂量3只动物)。重组人类IL-22降低总皮肤FLG2 mRNA水平,而该作用被抗体230C9逆转。y轴指示与参考基因相比的相对FLG2表达。组之间的统计比较由图表顶部的线和如下置信区间指示:*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001。所示的百分比(分别是60%、64%、60%)指示信号的抑制%。

[0173] 图16示出了IL-22R抗体230C9 (ARGX-112) 对人类离体皮肤外植体中IL-22调节的DEFB4基因表达的影响。用递增浓度的抗体230C9处理腹部皮肤外植体,之后用20ng/ml的rhIL-22刺激。抗体230C9能够以剂量依赖性方式逆转IL-22介导的DEFB4 mRNA水平的增加。y轴指示与参考基因相比的相对DEFB4表达。LLOQ意指更低的定量水平。

[0174] 图17示出了IL-22R抗体230C9 (ARGX-112) 对食蟹猴离体皮肤外植体中IL-22调节的FLG2和LOR基因表达的影响。用递增浓度的抗体230C9处理皮肤活检,之后用20ng/ml的rhIL-22刺激。抗体230C9能够以剂量依赖性方式逆转IL-22介导的FLG2 mRNA水平(A)和LOR mRNA水平(B)的降低。y轴指示与参考基因相比的相对FLG2和LOR表达。

[0175] 图18示出了IL-22R抗体230C9 (ARGX-112) 对原代人类角质细胞的影响。将角质细胞用230C9抗体预处理,然后用IL-4、IL-13、IL-22以及IFN- γ 的混合物刺激。用IL-4、IL-13以及IFN- γ 的混合物处理对照细胞。230C9抗体显示出对CCL2分泌的剂量依赖性抑制。

具体实施方式

[0176] A. 定义

[0177] “抗体”或“免疫球蛋白”:如本文所用的术语“免疫球蛋白”包括具有两条重链和两条轻链的组合的多肽,无论它是否具有任何相关的特异性免疫反应性。“抗体”指的是这样的组装体,其对所关注的抗原(例如细胞因子受体IL-22R)具有显著的已知的特异性免疫反应活性。术语“IL-22R抗体”在本文用于指的是对IL-22R蛋白表现出免疫特异性的抗体,所述IL-22R蛋白包括人类IL-22R并且在一些情况下包括其物种同源物。抗体和免疫球蛋白包含轻链和重链,而在它们之间具有或没有链间共价键。脊椎动物系统中的基本免疫球蛋白结构是相对充分了解的。

[0178] 通用术语“免疫球蛋白”包括可以在生物化学上区分的五种不同类别的抗体。所有五种类别的抗体都在本发明的范围内。以下论述将大体上涉及免疫球蛋白分子的IgG类别。对于IgG,免疫球蛋白包含两条相同的具有约23,000道尔顿的分子量的轻链多肽链和两条相同的具有53,000-70,000的分子量的重链。这四条链由二硫键连接成“Y”构型,其中轻链从“Y”的口部开始并且继续通过可变区与重链括在一起。

[0179] 抗体的轻链被分类为 κ 或 λ 。每一个重链类别可以与 κ 轻链或 λ 轻链结合。一般来说,当免疫球蛋白由杂交瘤、B细胞或遗传工程宿主细胞产生时,轻链和重链彼此共价键合,并且两条重链的“尾区”部分通过共价二硫键或非共价键彼此键合。在重链中,氨基酸序列从Y构型的分叉末端处的N末端延伸到每一条链底部处的C末端。本领域技术人员将了解的是,重链被分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 、或 ϵ ,在它们当中存在一些亚类(例如 $\gamma 1-\gamma 4$)。这条链的性质决定了抗体的“类别”分别是IgG、IgM、IgA、IgD或IgE。免疫球蛋白亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1等被充分表征并且已知赋予功能特化。鉴于本公开,这些类别和同种

型中的每一种的修饰型式容易由本领域技术人员辨别并且因此,在本发明的范围内。

[0180] 如上文所示,抗体的可变区允许抗体选择性识别并且特异性结合抗原上的表位。也就是说,抗体的VL结构域和VH结构域组合形成限定三维抗原结合位点的可变区。这种四级抗体结构形成了存在于Y的每个臂的末端处的抗原结合位点。更确切地说,抗原结合位点是由VH链和VL链中的每一个上的三个互补决定区(CDR)限定的。

[0181] “IL-22R”:如本文所用的术语“IL-22R”意指II型细胞因子受体,其经由配体IL-22、IL-20以及IL-24介导信号传导。IL-22R能够与IL-10R2和IL-20R2在细胞表面处形成异二聚体复合物。IL-22R也可以被称为IL22R、IL-22R1、IL22R1、IL22RA、IL-22RA、CRF2-9以及Zcytor 11。术语“IL-22R1”广泛到足以涵盖所述受体的人类形式和物种同源物。全长人类IL-22R的氨基酸序列由SEQ ID NO:71表示并且编码核苷酸序列由SEQ ID NO:72表示(参见图2和图3)。这些序列对应于在SwissProt数据库中作为人类蛋白白细胞介素-22受体亚基保存的序列(登录号Q8N6P7)。

[0182] “结合位点”:如本文所用的术语“结合位点”包含多肽的区域,其负责选择性结合所关注的靶抗原(例如IL-22R)。结合结构域包含至少一个结合位点。示例性结合结构域包括抗体可变结构域。本发明的抗体分子可以包含单个结合位点或多个(例如两个、三个或四个)结合位点。

[0183] “源自于(衍生于)”:如本文所用的术语“源自于(衍生于)”指定蛋白(例如骆驼科动物抗体或其抗原结合片段)指的是多肽或氨基酸序列的来源。在一个实施方案中,源自于特定起始多肽的多肽或氨基酸序列是CDR序列或与其相关的序列。在一个实施方案中,源自于特定起始多肽的氨基酸序列不是连续的。举例来说,在一个实施方案中,一个、两个、三个、四个、五个、或六个CDR源自于起始抗体。在一个实施方案中,源自于特定起始多肽或氨基酸序列的多肽或氨基酸序列具有的氨基酸序列与起始序列或其部分基本上相同,其中所述部分由至少3个-5个氨基酸、至少5个-10个氨基酸、至少10个-20个氨基酸、至少20个-30个氨基酸、或至少30个-50个氨基酸组成,或其否则可由本领域的普通技术人员鉴定为在起始序列中具有它的来源。在一个实施方案中,源自于起始抗体的一个或多个CDR序列被改变以产生变体CDR序列,例如亲和变体,其中所述变体CDR序列维持靶抗原结合活性。

[0184] “骆驼科动物来源的”:在某些优选的实施方案中,本发明的抗体包含源自于通过对骆驼科动物进行主动免疫接种所产生的骆驼科动物常规抗体的框架氨基酸序列和/或CDR氨基酸序列。然而,包含骆驼科动物来源的氨基酸序列的本发明的抗体可以被工程化以包含源自于人类氨基酸序列(即人类抗体)或其他非骆驼科动物哺乳动物物种的框架和/或恒定区序列。举例来说,人类或非人类灵长类动物框架区、重链部分、和/或铰链部分可以被包括在主题IL-22R抗体中。在一个实施方案中,一个或多个非骆驼科动物氨基酸可以存在于“骆驼科动物来源”的抗体的框架区中,例如骆驼科动物框架氨基酸序列可以包含一个或多个氨基酸突变,其中存在相应的人类或非人类灵长类动物氨基酸残基。此外,骆驼科动物来源的VH结构域和VL结构域、或其人源化变体可以与人类抗体的恒定结构域连接以产生嵌合分子,如本文其他地方所述。

[0185] “保守氨基酸取代”:“保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基所置换的氨基酸取代。具有相似侧链的氨基酸残基的家族已经在本领域中被定义,包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷

的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,免疫球蛋白多肽中的非必需氨基酸残基可以被来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基置换。在另一个实施方案中,氨基酸链可以被在侧链家族成员的顺序和/或组成方面不同的结构相似的链置换。

[0186] “重链部分”:如本文所用的术语“重链部分”包括源自于免疫球蛋白重链的恒定结构域的氨基酸序列。包含重链部分的多肽包含以下各项中的至少一个:CH1结构域、铰链结构域(例如上铰链区、中铰链区、和/或下铰链区)、CH2结构域、CH3结构域、或其变体或片段。在一个实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段可以包含免疫球蛋白重链的Fc部分(例如铰链部分、CH2结构域、以及CH3结构域)。在另一个实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段可以缺少恒定结构域的至少一部分(例如CH2结构域的全部或一部分)。在某些实施方案中,恒定结构域中的至少一个并且优选地全部源自于人类免疫球蛋白重链。举例来说,在一个优选的实施方案中,重链部分包含完全人类铰链结构域。在其他优选的实施方案中,重链部分包含完全人类Fc部分(例如来自人类免疫球蛋白的铰链、CH2以及CH3结构域序列)。

[0187] 在某些实施方案中,重链部分的组成恒定结构域来自不同的免疫球蛋白分子。举例来说,多肽的重链部分可以包含源自于IgG1分子的CH2结构域和源自于IgG3分子或IgG4分子的铰链区。在其他实施方案中,恒定结构域是嵌合结构域,其包含不同免疫球蛋白分子的部分。举例来说,铰链可以包含来自IgG1分子的第一部分和来自IgG3分子或IgG4分子的第二部分。如上文所述,本领域的普通技术人员将理解的是,重链部分的恒定结构域可以被修饰以使得它们在氨基酸序列上不同于天然存在的(野生型)免疫球蛋白分子。也就是说,本文公开的本发明的多肽可以包含对重链恒定结构域(CH1、铰链、CH2或CH3)中的一个或多个和/或轻链恒定区结构域(CL)的改变或修饰。示例性修饰包括一个或多个结构域中一个或多个氨基酸的添加、缺失或取代。

[0188] “嵌合”:“嵌合”蛋白包含与第二氨基酸序列连接的第一氨基酸序列,所述第一氨基酸序列与所述第二氨基酸序列在自然界中不天然连接。所述氨基酸序列通常可以存在于融合多肽中汇集在一起的单独的蛋白质中,或它们通常可以存在于同一蛋白质中,但是以新的排列方式放置在融合多肽中。嵌合蛋白可以例如通过化学合成,或通过产生和翻译其中肽区以所期望的关系编码的多核苷酸来产生。本发明的示例性嵌合抗体包括融合蛋白,所述融合蛋白包含与人类抗体,例如人类IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的恒定结构域融合的骆驼科动物来源的VH结构域和VL结构域或其人源化变体。

[0189] “可变区”或“可变结构域”:术语“可变区”和“可变结构域”在本文可互换使用并且意图具有等同的含义。术语“可变”指的是以下事实,即可变结构域VH和VL的某些部分在抗体之间在序列上广泛不同并且用于每一种特定抗体对它的靶抗原的结合和特异性。然而,可变性在抗体的整个可变结构域中不是均匀分布的。它集中在VL结构域和VH结构域中的每一个中被称作“高变环”的三个片段中,它们形成抗原结合位点的一部分。VL轻链结构域的第一高变环、第二高变环以及第三高变环在本文被称为L1(λ)、L2(λ)以及L3(λ)并且可以被定义为包含VL结构域中的残基24-33(L1(λ),由9个、10个或11个氨基酸残基组成)、残基49-53(L2(λ),由3个残基组成)以及残基90-96(L3(λ),由5个残基组成)(Morea等,Methods 20:

267-279 (2000))。V κ 轻链结构域的第一高变环、第二高变环以及第三高变环在本文被称为L1(κ)、L2(κ)以及L3(κ)并且可以被定义为包含VL结构域中的残基25-33(L1(κ),由6个、7个、8个、11个、12个或13个残基组成)、残基49-53(L2(κ),由3个残基组成)以及残基90-97(L3(κ),由6个残基组成)(Morea等,Methods 20:267-279(2000))。VH结构域的第一高变环、第二高变环以及第三高变环在本文被称为H1、H2以及H3并且可以被定义为包含VH结构域中的残基25-33(H1,由7个、8个或9个残基组成)、残基52-56(H2,由3个或4个残基组成)以及残基91-105(H3,长度高度可变)(Morea等,Methods 20:267-279(2000))。

[0190] 除非另外指明,否则术语L1、L2以及L3分别指的是VL结构域的第一高变环、第二高变环以及第三高变环,并且包括从V κ 同种型和V λ 同种型二者中获得的高变环。术语H1、H2以及H3分别指的是VH结构域的第一高变环、第二高变环以及第三高变环,并且包括从已知重链同种型中的任一种中获得的高变环,所述已知重链同种型包括 γ 、 ϵ 、 δ 、 α 或 μ 。

[0191] 高变环L1、L2、L3、H1、H2以及H3可以各自包含如下文所定义的“互补决定区”或“CDR”的一部分。术语“高变环”和“互补决定区”不是严格同义的,这是因为高变环(HV)是基于结构定义的,而互补决定区(CDR)是基于序列可变性定义的(Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest(《有免疫学意义的蛋白质的序列》),第5版,马里兰州贝塞斯达国家卫生研究院的公共卫生服务部(Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.),1983)并且HV和CDR的限制在一些VH结构域和VL结构域中可能是不同的。

[0192] VL结构域和VH结构域的CDR通常可以被定义为包含以下氨基酸:轻链可变结构域中的残基24-34(LCDR1)、残基50-56(LCDR2)和残基89-97(LCDR3);以及重链可变结构域中的残基31-35或31-35b(HCDR1)、残基50-65(HCDR2)和残基95-102(HCDR3)(Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest(《有免疫学意义的蛋白质的序列》),第5版,马里兰州贝塞斯达国家卫生研究院的公共卫生服务部(1991))。因此,HV可以被包含在相应CDR内并且除非另外指明,否则在本文提到VH结构域和VL结构域的“高变环”时,应当被解释为还包括相应的CDR,反之亦然。

[0193] 可变结构域的更高度保守的部分被称作框架区(FR),如下文所定义。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR(分别是FR1、FR2、FR3以及FR4),它们主要采用 β -折叠构型,由三个高变环连接。每一条链中的高变环由FR紧密靠近地保持在一起,并且连同来自另一条链的高变环一起,促成了抗体的抗原结合位点的形成。抗体的结构分析揭示了由互补决定区形成的结合位点的序列与形状之间的关系(Chothia等,J.Mol.Biol.227:799-817(1992);Tramontano等,J.Mol.Biol,215:175-182(1990))。尽管它们具有高度的序列可变性,但是这六个环中的五个仅采用一小部分的主链构象,被称作“规范结构”。这些构象首先由环的长度决定,其次由环和框架区中某些位置处关键残基的存在决定,这些关键残基经由它们的堆积、氢键键合或呈现不寻常的主链构象的能力来决定构象。

[0194] “CDR”:如本文所用的术语“CDR”或“互补决定区”意指存在于重链多肽和轻链多肽的可变区内的非连续抗原结合位点。这些特定区域已经由Kabat等,J.Biol.Chem.252,6609-6616(1977);以及Kabat等,Sequences of protein of immunological interest(《有免疫学意义的蛋白质的序列》).(1991);以及Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917(1987);以及MacCallum等,J.Mol.Biol.262:732-745(1996)描述,其中定义包括在彼此比

较时氨基酸残基的重叠或子集。示出了包括如由上文所引用的参考文献中的每一篇所定义的CDR的氨基酸残基以进行比较。优选的是，术语“CDR”是如由Kabat基于序列比较所定义的CDR。

[0195] 表1:CDR定义

	CDR 定义		
	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

[0197] ¹残基编号遵循Kabat等(同上)的命名法

[0198] ²残基编号遵循Chothia等(同上)的命名法

[0199] ³残基编号遵循MacCallum等(同上)的命名法

[0200] “框架区”:如本文所用的术语“框架区”或“FR区”包括作为可变区的一部分,但是不是CDR的一部分的氨基酸残基(例如使用CDR的Kabat定义)。因此,可变区框架具有约100个-120个氨基酸的长度,但是仅包括CDR之外的那些氨基酸。对于重链可变结构域的具体实例和如由Kabat等所定义的CDR,框架区1对应于包含氨基酸1-30的可变区的结构域;框架区2对应于包含氨基酸36-49的可变区的结构域;框架区3对应于包含氨基酸66-94的可变区的结构域;并且框架区4对应于从氨基酸103到可变区的末端的可变区的结构域。轻链的框架区类似地由轻链可变区CDR中的每一个隔开。类似地,使用Chothia等或McCallum等的CDR定义,框架区边界由如上文所述的对应的CDR末端隔开。在优选的实施方案中,CDR如由Kabat所定义。

[0201] 在天然存在的抗体中,存在于每一个单体抗体上的六个CDR是短的非连续的氨基酸序列,它们在抗体在水性环境中呈现它的三维构型时特异性地定位以形成抗原结合位点。重链可变结构域和轻链可变结构域的其余部分在氨基酸序列上显示出更低的分子间可变性并且被称作框架区。框架区主要采用β-折叠构象并且CDR形成环,这些环连接β-折叠结构并且在一些情况下,形成β-折叠结构的一部分。因此,这些框架区用以形成支架,所述支架通过链间非共价相互作用使得六个CDR以正确的取向定位。由定位的CDR形成的抗原结合位点限定了与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。该互补表面促进了抗体与免疫反应性抗原表位的非共价结合。CDR的位置可以容易地由本领域的普通技术人员鉴定出。

[0202] “铰链区”:如本文所用的术语“铰链区”包括重链分子中使CH1结构域与CH2结构域连接的部分。该铰链区包含约25个残基并且是柔性的,从而允许两个N末端抗原结合区独立地移动。铰链区可以被细分成三个不同的结构域:上铰链、中铰链、以及下铰链结构域(Roux K.H.等,J.Immunol.161:4083-90 1998)。包含“完全人类”铰链区的本发明的抗体可以含有

下表2中所示的铰链区序列之一。

[0203] 表2:人类铰链序列

IgG	上铰链	中铰链	下铰链
IgG1	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:82)	CPPCP (SEQ ID NO:83)	APELLGGP (SEQ ID NO:84)
IgG3	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:85)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₃ (SEQ ID NO:86)	APELLGGP (SEQ ID NO:87)
IgG4	ESKYGPP (SEQ ID NO:88)	CPSCP (SEQ ID NO:89)	APEFLGGP (SEQ ID NO:90)
IgG42	ERK (SEQ ID NO:91)	CCVECPPPCP (SEQ ID NO:92)	APPVAGP (SEQ ID NO:93)

[0205] “CH2结构域”:如本文所用的术语“CH2结构域”包括重链分子的一部分,其使用常规编号方案从例如抗体的大约残基244延伸到残基360(残基244至360,Kabat编号系统;和残基231-340,EU编号系统,Kabat EA等,Sequences of Proteins of Immunological Interest(《有免疫学意义的蛋白质的序列》),贝塞斯达(Bethesda),美国卫生与公众服务部(US Department of Health and Human Services),NIH.1991)。CH2结构域是独特的,这是因为它不与另一个结构域紧密配对。相反,两个N连接的分支碳水化合物链插入完整天然IgG分子的两个CH2结构域之间。还充分证实的是,CH3结构域从IgG分子的CH2结构域延伸到C末端并且包含约108个残基。

[0206] “片段”:如在本发明的抗体的背景下所用的术语“片段”指的是抗体或抗体链的一部分,其包含比完整或完全抗体或抗体链更少的氨基酸残基。术语“抗原结合片段”指的是免疫球蛋白或抗体的多肽片段,其结合抗原或与完整抗体(即与作为它们的来源的完整抗体)竞争结合抗原(即特异性结合IL-22R)。如本文所用的术语抗体分子的“片段”包括抗体的抗原结合片段,例如抗体轻链可变结构域(VL)、抗体重链可变结构域(VH)、单链抗体(scFv)、F(ab')₂片段、Fab片段、Fd片段、Fv片段、以及单结构域抗体片段(DAb)。片段可以例如经由对完整或完全抗体或抗体链进行化学或酶处理或通过重组手段获得。

[0207] “效价”:如本文所用的术语“效价”指的是多肽中潜在的靶结合位点的数量。每一个靶结合位点特异性结合一个靶分子或靶分子上的特定位点。当多肽包含超过一个靶结合位点时,每一个靶结合位点可以特异性结合相同的或不同的分子(例如可以结合不同的配体或不同的抗原,或同一抗原上的不同表位)。

[0208] “特异性”:术语“特异性”指的是与给定靶标,例如IL-22R结合(例如免疫反应)的能力。多肽可以是单特异性的并且含有特异性结合靶标的一个或多个结合位点或多肽可以是多特异性的并且含有特异性结合相同或不同靶标的两个或更多个结合位点。

[0209] “合成的”:如本文所用的关于多肽的术语“合成”包括包含非天然存在的氨基酸序列的多肽。举例来说,非天然存在的多肽,其是天然存在的多肽的修饰形式(例如包含突变,如添加、取代或缺失)或包含第一氨基酸序列(其可以是或可以不是天然存在的),所述第一

氨基酸序列与在自然界中不与它天然连接的第二氨基酸序列(其可以是或可以不是天然存在的)连接成线性氨基酸序列。

[0210] “工程化”:如本文所用的术语“工程化”包括通过合成手段(例如通过重组技术、体外肽合成、通过肽的酶促或化学偶联或这些技术的一些组合)操纵核酸或多肽分子。优选的是,本发明的抗体是工程化的,包括例如人源化和/或嵌合抗体、以及已经被工程化以改进一种或多种特性,如抗原结合、稳定性/半衰期或效应功能的抗体。

[0211] “修饰的抗体”:如本文所用的术语“修饰的抗体”包括抗体的合成形式,其被改变以使得它们不是天然存在的,例如包含至少两个重链部分,但是不包含两条完整重链的抗体(如结构域缺失抗体或微型抗体);抗体的多特异性形式(例如双特异性、三特异性等),其被改变以结合两种或更多种不同的抗原或单个抗原上不同的表位;与scFv分子连接的重链分子等。scFv分子是本领域已知的并且描述于例如美国专利5,892,019中。此外,术语“修饰的抗体”包括抗体的多价形式(例如三价、四价等抗体,其结合相同抗原的三个或更多个拷贝)。在另一个实施方案中,本发明的修饰的抗体是融合蛋白,其包含缺少CH2结构域的至少一个重链部分并且包含多肽的结合结构域,所述多肽包含受体配体对的一个成员的结合部分。

[0212] 术语“修饰的抗体”在本文也可以用于指的是如本文在结构上所定义的本发明的抗体的氨基酸序列变体。本领域的普通技术人员将了解的是,抗体可以被修饰以产生变体抗体,所述变体抗体与作为它的来源的抗体相比在氨基酸序列上有所不同。举例来说,可以进行核苷酸取代或氨基酸取代,从而在“非必需”氨基酸残基处引起保守取代或变化(例如在CDR和/或框架残基中)。氨基酸取代可以包括一个或多个氨基酸被天然存在或非天然氨基酸置换。

[0213] “人源化取代”:如本文所用的术语“人源化取代”指的是氨基酸取代,其中存在于抗体(例如骆驼科动物来源的IL-22R抗体)的VH结构域或VL结构域中的特定位置处的氨基酸残基被存在于参考人类VH结构域或VL结构域中的等同位置处的氨基酸残基置换。参考人类VH结构域或VL结构域可以由人类种系编码的VH结构域或VL结构域。可以在本文定义的抗体的框架区和/或CDR中进行人源化取代。

[0214] “人源化变体”:如本文所用的术语“人源化变体”指的是变体抗体,所述变体抗体与参考抗体相比含有一个或多个“人源化取代”,其中所述参考抗体的一部分(例如VH结构域和/或VL结构域或其含有至少一个CDR的部分)具有源自于非人类物种的氨基酸,并且所述“人源化取代”发生在源自于非人类物种的氨基酸序列内。

[0215] “种系化变体”:术语“种系化变体”在本文用于特定指代“人源化变体”,其中“人源化取代”引起存在于抗体(例如骆驼科动物来源的IL-22R抗体)的VH结构域或VL结构域中一个或多个特定位置处的一个或多个氨基酸残基被存在于由人类种系编码的参考人类VH结构域或VL结构域中的等同位置处的氨基酸残基置换。对于任何给定的“种系化变体”来说典型的是,取代到种系化变体中的置换氨基酸残基仅仅或主要取自单个人类种系编码的VH结构域或VL结构域。术语“人源化变体”和“种系化变体”在本文常常可互换使用。将一个或多个“人源化取代”引入骆驼科动物来源(例如美洲驼来源)的VH结构域或VL结构域中引起骆驼科动物(美洲驼)来源的VH结构域或VL结构域的“人源化变体”的产生。如果取代到其中的氨基酸残基主要或仅仅源自于单个人类种系编码的VH结构域或VL结构域序列,则结果可以

是骆驼科动物(美洲驼)来源的VH结构域或VL结构域的“人类种系化变体”。

[0216] “亲和变体”:如本文所用的术语“亲和变体”指的是变体抗体,所述变体抗体与参考抗体相比表现出氨基酸序列的一个或多个变化,其中所述亲和变体与参考抗体相比表现出改变的对靶抗原的亲合力。举例来说,与参考IL-22R抗体相比,亲和变体将表现出改变的对IL-22R的亲合力。优选的是,与参考抗体相比,亲和变体将表现出提高的对靶抗原,例如IL-22R的亲合力。与参考抗体相比,亲和变体通常表现出CDR中的氨基酸序列的一个或多个变化。这样的取代可以引起存在于CDR中的给定位置处的原始氨基酸被不同的氨基酸残基置换,所述不同的氨基酸残基可以是天然存在的氨基酸残基或非天然存在的氨基酸残基。所述氨基酸取代可以是保守的或非保守的。

[0217] “高度人类同源性”:包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)的抗体在VH结构域和VL结构域一起表现出与最接近的匹配的人类种系VH序列和VL序列具有至少90%的氨基酸序列同一性的情况下将被认为具有高度人类同源性。具有高度人类同源性的抗体可以包括包含表现出与人类种系序列具有足够高的序列同一性%的天然非人类抗体的VH结构域和VL结构域的抗体,包括例如包含骆驼科动物常规抗体的VH结构域和VL结构域的抗体、以及这些抗体的工程化,特别是人源化或种系化的变体、以及“完全人类”抗体。

[0218] 在一个实施方案中,具有高度人类同源性的抗体的VH结构域可以表现出与一个或多个人类VH结构域在框架区FR1、FR2、FR3以及FR4中具有80%或更大的氨基酸序列同一性或序列同源性。在其他实施方案中,本发明的多肽的VH结构域与最接近的匹配的人类种系VH结构域序列之间的氨基酸序列同一性或序列同源性可以是85%或更大、90%或更大、95%或更大、97%或更大、或高达99%或甚至100%。

[0219] 在一个实施方案中,与最接近的匹配的人类VH序列相比,具有高度人类同源性的抗体的VH结构域可以在框架区FR1、FR2、FR3以及FR4中含有一个或多个(例如1个至10个)氨基酸序列错配。

[0220] 在另一个实施方案中,具有高度人类同源性的抗体的VL结构域可以表现出与一个或多个人类VL结构域在框架区FR1、FR2、FR3以及FR4中具有80%或更大的序列同一性或序列同源性。在其他实施方案中,本发明的多肽的VL结构域与最接近的匹配的人类种系VL结构域序列之间的氨基酸序列同一性或序列同源性可以是85%或更大、90%或更大、95%或更大、97%或更大、或高达99%或甚至100%。

[0221] 在一个实施方案中,与最接近的匹配的人类VL序列相比,具有高度人类同源性的抗体的VL结构域可以在框架区FR1、FR2、FR3以及FR4中含有一个或多个(例如1个至10个)氨基酸序列错配。

[0222] 在分析具有高度人类同源性的抗体与人类种系VH和VL之间的序列同一性百分比之前,可以确定规范折叠,这允许鉴定具有H1和H2或L1和L2(和L3)的规范折叠的相同组合的人类种系片段的家族。随后,选择与所关注的抗体的可变区具有最高程度的序列同源性的人类种系家族成员来对序列同源性进行评分。高变环L1、L2、L3、H1以及H2的Chothia规范类别的确定可以使用可在网页www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html.page上公开获得的生物信息学工具进行。程序的输出显示出在数据文件中关键残基要求。在这些数据文件中,关键残基位置是用每一个位置处允许的氨基酸显示的。所关注的抗体的可变区的序列是作为输入给出的并且首先与共有抗体序列比对以指定Kabat编号方案。规范折叠的分析使用

由Martin和Thornton (Martin等, *J.Mol.Biol.* 263:800-815 (1996)) 开发的自动化方法导出的一组关键残基模板。

[0223] 使用已知的特定人类种系V片段(其使用H1和H2或L1和L2(和L3)的规范折叠的相同组合),可以确定在序列同源性方面最佳匹配的家族成员。使用生物信息学工具,可以确定所关注的抗体的VH结构域框架和VL结构域框架氨基酸序列与由人类种系编码的相应序列之间的序列同一性百分比,但是实际上也可以应用序列的手动比对。人类免疫球蛋白序列可以从几个蛋白质数据库中鉴定,如VBase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) 或 Pluckthun/Honegger数据库 (<http://www.bioc.unizh.ch/antibody/Sequences/Germlines>)。为了比较人类序列与所关注的抗体中VH结构域或VL结构域的V区,可以使用序列比对算法,如可经由网站,如www.expasy.ch/tools/#align获得的序列比对算法,但是也可以进行与有限组的序列的手动比对。选择具有规范折叠的相同组合并且与每一条链的框架区1、2以及3具有最高程度的同源性的家族的人类种系轻链序列和重链序列并且与所关注的可变区进行比较;此外,针对人类种系JH区和JK区或JL区检查FR4。

[0224] 请注意,在计算总体序列同源性百分比时,使用来自具有规范折叠的相同组合的人类种系家族的最接近的匹配序列来评价FR1、FR2以及FR3的残基。仅对不同于具有规范折叠的相同组合的相同家族的最接近的匹配成员的或其他成员的残基进行评分(请注意,不包括任何引物编码的差异)。然而,出于人源化的目的,框架区中与没有规范折叠的相同组合的其他人类种系家族的成员相同的残基可以被认为是“人类的”,尽管这些根据上述严格条件被评为“阴性”。该假设是基于用于人源化的“混合和匹配”方法,其中将FR1、FR2、FR3以及FR4中的每一个分别与它的最接近的匹配的人类种系序列进行比较并且人源化分子因此含有不同FR的组合,如由Qu和同事(Qu等, *Clin.Cancer Res.* 5:3095-3100 (1999)) 以及Ono和同事(Ono等, *Mol.Immunol.* 36:387-395 (1999)) 所进行的那样。单个框架区的边界可以使用IMGT编号方案指定,该IMGT编号方案是Chothia的编号方案的改编(Lefranc等, *NAR* 27:209-212 (1999); imgt.cines.fr)。

[0225] 具有高度人类同源性的抗体可以包含具有人类或人类样规范折叠的高变环或CDR,如下文详细论述的那样。

[0226] 在一个实施方案中,具有高度人类同源性的抗体的VH结构域或VL结构域中的至少一个高变环或CDR可以获自或源自于非人类抗体(例如来自骆驼科的物种的常规抗体)的VH结构域或VL结构域,但表现出与人类抗体中存在的规范折叠结构基本上相同的预测或实际的规范折叠结构。

[0227] 在本领域中公认的是,尽管由人类种系编码的VH结构域和VL结构域这两者中存在的高变环的一级氨基酸序列根据定义是高度可变的,但是除了VH结构域的CDR H3之外,所有高变环仅采用少数不同的结构构象,被称作规范折叠(Chothia等, *J.Mol.Biol.* 196:901-917 (1987); Tramontano等, *Proteins* 6:382-94 (1989)),这取决于高变环的长度和所谓的规范氨基酸残基的存在(Chothia等, *J.Mol.Biol.* 196:901-917 (1987))。完整VH结构域或VL结构域中的高变环的实际规范结构可以通过结构分析(例如X-射线晶体学)确定,但是也有可能基于作为特定结构的特征的关键氨基酸残基来预测规范结构(下文进一步论述)。基本上,决定每一个规范结构的残基的特定模式形成“签名”,其使得能够在未知结构的VH结构域或VL结构域的高变环中识别规范结构;规范结构因此可以仅基于一级氨基酸序列来预

测。

[0228] 具有高度人类同源性的抗体中任何给定的VH序列或VL序列的高变环的预测的规范折叠结构可以使用算法来分析,所述算法可从以下公开获得:www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html;

[0229] www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/antibodies.html;以及

[0230] www.bioc.unizh.ch/antibody/Sequences/Germlines/Vbase_hVk.html。这些工具容许将查询VH序列或VL序列与已知规范结构的人类VH结构域序列或VL结构域序列进行比对并且对查询序列的高变环进行规范结构的预测。

[0231] 在VH结构域的情况下,如果至少满足以下标准中的第一个,并且优选地满足这两个标准,那么H1环和H2环可以被评具有与已知存在于人类抗体中的规范折叠结构“基本上相同”的规范折叠结构:

[0232] 1. 与最接近的匹配的人类规范结构类别具有相同的由残基数决定的长度;

[0233] 2. 与对于相应人类H1和H2规范结构类别所述的关键氨基酸残基具有至少33%的同一性,优选地至少50%的同一性。

[0234] (请注意,出于上述分析的目的,分别处理H1环和H2环并且各自与它的最接近的匹配的人类规范结构类别进行比较)

[0235] 上述分析依赖于所关注的抗体的H1环和H2环的规范结构的预测。如果所关注的抗体中H1环和H2环的实际结构是已知的,例如基于X-射线晶体学,则如果环的长度不同于最接近的匹配的人类规范结构类别(通常相差 ± 1 个或 ± 2 个氨基酸)但所关注的抗体中H1环和H2环的实际结构与人类规范折叠的结构相匹配,那么所关注的抗体中的H1环和H2环也可以被评具有与已知存在于人类抗体中的规范折叠结构“基本上相同”的规范折叠结构。

[0236] 在人类VH结构域的第一高变环和第二高变环(H1和H2)的人类规范结构类别中发现的关键氨基酸残基由Chothia等,J.Mol.Biol.227:799-817(1992)描述,该参考文献的内容以引用的方式整体并入本文。具体来说,以引用的方式具体并入本文的Chothia等的第802页上的表3列出了在人类种系中发现的H1规范结构的关键位点处优选的氨基酸残基,而也以引用的方式具体并入本文的第803页上的表4列出了在人类种系中发现的CDR H2规范结构的关键位点处优选的氨基酸残基。

[0237] 在一个实施方案中,具有高度人类同源性的抗体的VH结构域中的H1和H2这两者都表现出与存在于人类抗体中的规范折叠结构基本上相同的预测或实际的规范折叠结构。

[0238] 具有高度人类同源性的抗体可以包含VH结构域,其中高变环H1和H2形成规范折叠结构的组合,该组合与已知存在于至少一个人类种系VH结构域中的规范结构的组合相同。已经观测到,只有在H1和H2处规范折叠结构的某些组合实际上存在于由人类种系编码的VH结构域中。在一个实施方案中,具有高度人类同源性的抗体的VH结构域中的H1和H2可以从非人类物种,例如骆驼科物种的VH结构域中获得,但形成预测或实际的规范折叠结构的组合,该组合与已知存在于人类种系或体细胞突变的VH结构域中的规范折叠结构的组合相同。在非限制性实施方案中,具有高度人类同源性的抗体的VH结构域中的H1和H2可以从非人类物种,例如骆驼科物种的VH结构域中获得并且形成以下规范折叠组合之一:1-1、1-2、1-3、1-6、1-4、2-1、3-1以及3-5。

[0239] 具有高度人类同源性的抗体可以含有VH结构域,所述VH结构域表现出与人类VH的

高度序列同一性/序列同源性并且含有表现出与人类VH的结构同源性的可变环。

[0240] 可能有的是,存在于具有高度人类同源性的抗体的VH结构域中的H1和H2处的规范折叠和其组合对于人类VH种系序列是“正确的”,所述人类VH种系序列代表在总体一级氨基酸序列同一性方面与具有高度人类同源性的抗体的VH结构域最接近的匹配。举例来说,如果最接近的序列匹配是人类种系VH3结构域,则可能有的是,H1和H2形成也天然存在于人类VH3结构域中的规范折叠的组合。这在源自于非人类物种的具有高度人类同源性的抗体的情况下可能是特别重要的,例如含有源自于骆驼科动物常规抗体的VH结构域和VL结构域的抗体,特别是含有人源化的骆驼科动物VH结构域和VL结构域的抗体。

[0241] 因此,在一个实施方案中,具有高度人类同源性的IL-22R抗体的VH结构域可以表现出与人类VH结构域在框架区FR1、FR2、FR3以及FR4中具有80%或更大、85%或更大、90%或更大、95%或更大、97%或更大、或高达99%或甚至100%的序列同一性或序列同源性,并且此外,同一抗体中的H1和H2是从非人类VH结构域中获得的(例如源自于骆驼科物种),但是形成预测或实际的规范折叠结构的组合,该组合与已知天然存在于相同人类VH结构域中的规范折叠组合相同。

[0242] 在其他实施方案中,具有高度人类同源性的抗体的VL结构域中的L1和L2各自是从非人类物种的VL结构域(例如骆驼科动物来源的VL结构域)中获得的并且各自表现出与存在于人类抗体中的规范折叠结构基本上相同的预测或实际的规范折叠结构。

[0243] 如同VH结构域一样,V λ 类型和V κ 类型的VL结构域的可变环可以采用有限数量的构象或规范结构,这部分由长度以及某些规范位置处关键氨基酸残基的存在决定。

[0244] 在具有高度人类同源性的所关注的抗体内,如果至少满足以下标准中的第一个并且优选满足这两个标准,那么从非人类物种,例如骆驼科物种的VL结构域中获得的L1环、L2环以及L3环可以被评具有与已知存在于人类抗体中的规范折叠结构“基本上相同”的规范折叠结构:

[0245] 1. 与最接近的匹配的人类结构类别具有相同的由残基数决定的长度;

[0246] 2. 与对于来自V λ 或V κ 谱库的相应人类L1或L2规范结构类别所述的关键氨基酸残基具有至少33%的同一性,优选地至少50%的同一性。

[0247] (请注意,出于上述分析的目的,分别处理L1环和L2环并且各自与它的最接近的匹配的人类规范结构类别进行比较)

[0248] 上述分析依赖于所关注的抗体的VL结构域中的L1环、L2环以及L3环的规范结构的预测。如果L1环、L2环以及L3环的实际结构是已知的,例如基于X-射线晶体学,则如果环的长度不同于最接近的匹配的人类规范结构类别(通常相差 ± 1 个或 ± 2 个氨基酸),但是骆驼科环的实际结构与人类规范折叠相匹配,那么源自于所关注的抗体的L1环、L2环或L3环也可以被评具有与已知存在于人类抗体中的规范折叠结构“基本上相同”的规范折叠结构。

[0249] 在人类V λ 结构域和V κ 结构域的CDR的人类规范结构类别中发现的关键氨基酸残基由Morea等,Methods,20:267-279(2000);以及Martin等,J.Mol.Biol.,263:800-815(1996)描述。人类V κ 结构域的结构谱库也由Tomlinson等,EMBO J.14:4628-4638(1995)描述,并且V λ 结构域的结构谱库由Williams等,J.Mol.Biol.,264:220-232(1996)描述。所有这些文献的内容以引用的方式并入本文。

[0250] 具有高度人类同源性的抗体的VL结构域中的L1和L2可以形成预测或实际的规范

折叠结构的组合,该组合与已知存在于人类种系VL结构域中的规范折叠结构的组合相同。在非限制性实施方案中,具有高度人类同源性的抗体(例如含有骆驼科动物来源的VL结构域或其人源化变体的抗体)的VL结构域中的L1和L2可以形成以下规范折叠组合之一:11-7、13-7(A、B、C)、14-7(A、B)、12-11、14-11以及12-12(如Williams等,J.Mol.Biol.264:220-32(1996)中所定义并且如http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Sequences/Germlines/VBase_hVL.html上所示)。在非限制性实施方案中,Vk结构域中的L1和L2可以形成以下规范折叠组合之一:2-1、3-1、4-1以及6-1(如Tomlinson等,EMBO J.14:4628-38(1995)中所定义并且如http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Sequences/Germlines/VBase_hVK.html上所示)。

[0251] 在另一个实施方案中,具有高度人类同源性的抗体的VL结构域中的L1、L2以及L3中的全部三个都可以表现出基本上人类结构。优选的是,具有高度人类同源性的抗体的VL结构域表现出与人类VL的高度序列同一性/序列同源性,并且VL结构域中的高变环表现出与人类VL的结构同源性。

[0252] 在一个实施方案中,具有高度人类同源性的IL-22R抗体的VL结构域可以表现出与人类VL结构域在框架区FR1、FR2、FR3以及FR4中具有80%或更大、85%或更大、90%或更大、95%或更大、97%或更大、或高达99%或甚至100%的序列同一性,并且此外,高变环L1和高变环L2可以形成预测或实际的规范折叠结构的组合,该组合与已知天然存在于相同人类VL结构域中的规范折叠组合相同。

[0253] 当然,设想的是,表现出与人类VH的高度序列同一性/序列同源性以及与人类VH的高变环的结构同源性的VH结构域将与表现出与人类VL的高度序列同一性/序列同源性以及与人类VL的高变环的结构同源性的VL结构域组合以提供具有高度人类同源性的抗体,所述抗体含有与人类编码的VH/VL配对具有最大的序列和结构同源性的VH/VL配对(例如骆驼科动物来源的VH/VL配对)。

[0254] “scFv”或“scFv片段”:scFv或scFv片段意指单链可变片段。scFv是经由接头连接的抗体的VH结构域和VL结构域的融合蛋白。

[0255] B. IL-22R抗体

[0256] 本发明涉及特异性结合人类IL-22R的抗体和其抗原结合片段。本文所述的IL-22R抗体和抗体片段具有不同于并且在某些情况下优越于现有技术的IL-22R抗体的特性,特别是特性的组合。现在将更详细地描述这些特性和特征。

[0257] IL-22R表位

[0258] 本发明的IL-22R抗体和抗原结合片段结合人类IL-22R蛋白内不包括氨基酸残基酪氨酸60(Tyr60或Y60)的表位,其中该氨基酸位置是参考图2中所示的IL-22R的序列(SEQ ID NO:71)定义的。IL-22R的该表面暴露的残基先前已经被鉴定为对于配体结合是关键性的,并且如本文所报道(特别参见实施例8),现有技术IL-22R抗体280.346.TSY(如W02011/061119中所述)结合包括该残基的表位。本发明的IL-22R抗体和抗原结合片段惊人地结合不包括该关键残基的表位,并且在某些实施方案中,仍能够阻断IL-22结合和/或抑制IL-22和/或IL-20介导的经由IL-22R的信号传导。

[0259] IL-22R的细胞外结构域与它的配体IL-22之间的结合界面在Jones等(Structure 16(9):1333-1344(2008))中被表征,该文献的内容整体并入本文。IL-22R的细胞外结构域

由五个环(L2-L6)组成,其某些残基对于介导与IL-22配体上表面暴露的残基的相互作用来说是关键的。酪氨酸60位于L2环内,该L2环由IL-22R蛋白的D1结构域中的残基形成。在IL-22/可溶性IL-22R复合物中,残基Tyr60插入IL-22上该配体的位点1a内形成的小空腔中。更确切地说,该空腔是在螺旋F和AB环的交叉处形成的,这些结构是在IL-22配体中发现的两个不同的二级结构。配体上的螺旋F残基Lys162和Glu166与IL-22R的Tyr60的OH形成氢键并且因此Tyr60是介导配体上的位点1a与受体的结构域D1之间的相互作用的关键残基。

[0260] 本文所述的抗体和抗原结合片段结合不包括Tyr60的表位。如上所述,Tyr60位于受体的D1结构域中的L2环内。在某些实施方案中,与IL-22R抗体或抗原结合片段结合的表位至少部分位于IL-22R的D2结构域中,即在SEQ ID NO:71的残基125与残基228之间。在某些实施方案中,与IL-22R抗体或抗原结合片段结合的表位包含位于IL-22R蛋白的D2结构域内的至少一个、至少两个、至少三个氨基酸残基。

[0261] 本申请的发明人认为本发明的抗体和抗原结合片段结合不包括Tyr60的表位的事实与它们的作用方式有关。认为作为与D1结构域相互作用的替代或除了与D1结构域相互作用之外,抗体和其抗原结合片段与IL22R的D2结构域相互作用。已知IL-22R的D2结构域参与与辅助受体的相互作用。不希望受理论所束缚,本申请的发明人认为本发明的抗体分子可以具有双重作用方式,从而防止与配体结合并且防止与辅助受体的相互作用。

[0262] 与本发明的抗体或抗原结合片段结合的表位可以是线性表位(即由靶抗原内的线性氨基酸序列组成的表位)或构象表位(即由在靶抗原中不一定连续的氨基酸组成的表位)。

[0263] 结合亲和力

[0264] 在某些实施方案中,本发明的抗体和抗原结合片段以高亲和力结合人类IL-22R。

[0265] 如本文所用的术语“亲和力”或“结合亲和力”应当基于本领域在抗体结合的背景下的通常含义来理解,并且反映了抗原与抗体或其抗原结合片段上的结合位点之间结合的强度和/或稳定性。

[0266] 抗体或其抗原结合片段对它的对应抗原的结合亲和力可以通过实验使用本领域已知的技术来确定。举例来说,BIACORE仪器基于将靶蛋白或靶抗原固定到生物传感器芯片同时使抗体或抗体片段在特定流动条件下在固定的靶标上通过上来测量亲和力。这些实验产生 $k_{\text{结合}}(K_{\text{on}})$ 和 $k_{\text{解离}}(K_{\text{off}})$ 测量值,它们可以被转换为 K_D 值,其中 K_D 是抗原与抗体或其片段解离的平衡常数。 K_D 值越小,则抗体与它的靶抗原之间的结合相互作用越强。

[0267] 如上所述,抗体的亲和力可以通过Biacore,例如使用本文其他地方所述的方案(参见实施例6)来确定。如通过Biacore所测量的抗体或抗原结合片段对人类IL-22R的亲和力可以使用重组全长IL-22R构建体来确定,如例如实施例3和实施例6中所述的那样。

[0268] 当作为mAb测试时,例如当在IgG1分子的背景下测试与轻链可变结构域配对的重链可变结构域的亲和力时,本发明的IL-22R抗体或其抗原结合片段可以表现出小于 $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、小于 $1.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、小于 $1.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 的对IL-22R的解离速率($k_{\text{解离}}$)。在优选的实施方案中,当作为mAb测试时,例如当在IgG1分子的背景下测试与轻链可变结构域配对的重链可变结构域的亲和力时,本发明的IL-22R抗体或其抗原结合片段表现出小于 $2.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$,优选地小于 $1.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$,更优选地小于 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 的对IL-22R的解离速率($k_{\text{解离}}$)。

[0269] 本发明的IL-22R抗体或其抗原结合片段可以表现出在 $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 至 $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 范

围,优选地在 $1 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ 至 $2.5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 范围,更优选地在 $1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 至 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 范围的对IL-22R的解离速率($k_{\text{解离}}$)。

[0270] 本发明的IL-22R抗体或其抗原结合片段可以表现出小于 $3 \times 10^{-9} \text{M}$ 、小于 $2.5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、小于 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 的 K_D 值。在优选的实施方案中,本发明的IL-22R抗体或其抗原结合片段表现出小于 $5 \times 10^{-10} \text{M}$,优选地小于 $2 \times 10^{-10} \text{M}$,优选地小于 $1.5 \times 10^{-10} \text{M}$ 的 K_D 值。

[0271] 抑制IL-22和IL-20结合和下游信号传导

[0272] 在某些实施方案中,本发明的抗体和抗原结合片段结合人类IL-22R并且抑制配体与该受体结合。鉴于本文所述的抗体结合不包括Tyr60的表位,这是特别惊人的。如上文所述,Tyr60已经被鉴定为对于配体结合来说关键的残基并且因此,本发明的IL-22R抗体和抗原结合片段在它们抑制配体结合并且在某些实施方案中,抑制IL-22R下游的信号传导的能力方面是惊人的。

[0273] 抗体和抗原结合片段可以结合人类IL-22R并且抑制IL-22结合或抑制IL-20结合。优选的是,本文所述的抗体和抗原结合片段抑制IL-22和IL-20与IL-22R结合。

[0274] 配体与表达辅助受体IL-10R2或IL-20R2的细胞上的IL-22R结合诱导受体复合物的构象变化以使得受体下游的信号传导途径被激活。如本文所述的抗体或其抗原结合片段可以抑制IL-22依赖性IL-22R激活或可以抑制IL-20依赖性IL-22R激活。如本文所用的术语“IL-22依赖性IL-22R激活”应当被认为意指在配体IL-22与IL-22R/IL-10R2复合物结合时在IL-22R受体复合物下游发生的信号传导事件链。如本文所用的术语“IL-20依赖性IL-22R激活”应当被认为意指在配体IL-20与IL-22R/IL-20R2复合物结合时在IL-22R下游发生的信号传导事件链。

[0275] IL-22依赖性IL-22R激活可以在表达IL-22R和辅助受体IL-10R2的细胞或细胞系,例如Dumoutier等,J Biol Chem.2009年9月25日;284(39):26377-84中所述的BW-hIL-22R细胞系中测量,该文献的内容整体并入本文。IL-22在BW-hIL-22R细胞系中诱导生长停滞并且因此IL-22依赖性IL-22R激活可以在该细胞系中通过测量BW-hIL-22R细胞的增殖来确定,例如实施例6中所述的那样。在某些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段在基于IL-22依赖性细胞的增殖测定中表现出小于650pM,优选地小于600pM的 IC_{50} (实现对激活的50%抑制的浓度)。基于细胞的增殖测定优选地是涉及如本文所述的BW-hIL-22R细胞系的测定。

[0276] IL-20依赖性IL-22R激活可以在表达IL-22R和辅助受体IL-20R2的细胞或细胞系,例如本文以及Dumoutier等,J Biol Chem.2009年9月25日;284(39):26377-84中所述的Baf3-hIL-22R/IL20Rb细胞系中测量,该文献的内容整体并入本文。IL-20在Baf3-hIL-22R/IL20Rb细胞系中诱导增殖并且因此,IL-20依赖性IL-22R激活可以在该细胞系中通过测量Baf3-hIL-22R/IL20Rb细胞的增殖来确定,例如实施例6中所述的那样。在某些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段在基于IL-20依赖性细胞的增殖测定中表现出小于1nM,优选地小于800pM的 IC_{50} (实现对激活的50%抑制的浓度)。基于细胞的增殖测定优选地是涉及如本文所述的Baf3-hIL-22R/IL20Rb细胞系的测定。

[0277] 除了上述增殖测定之外,IL-22和/或IL-20依赖性IL-22R激活还可以使用替代细胞测定来测量,例如W02011/061119中所述的STAT3磷酸化测定。

[0278] 在优选的实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段结合人类IL-22R并且抑制

IL-22依赖性IL-22R激活和IL-20依赖性IL-22R激活。在这些实施方案中,抗体或抗原结合片段对IL-22依赖性激活和IL-20依赖性激活这两者的抑制或“中和”活性可以是等效的。或者,抗体或抗原结合片段对由所述配体之一所介导的IL-22R激活的抑制或中和活性比对由另一种配体介导的IL-22R激活可以更大。在某些实施方案中,与对IL-20依赖性IL-22R激活相比,本发明的抗体或抗原结合片段将对IL-22依赖性IL-22R激活表现出更强效的抑制活性。然而,在这些实施方案中,抗体或抗原结合片段对IL-22依赖性IL-22R激活的抑制活性通常将是抗体或抗原结合片段对IL-20依赖性IL-22R激活的抑制活性的小于5倍,优选地小于4倍,更优选地小于2倍。

[0279] 交叉反应性

[0280] 在某些实施方案中,本文所述的结合人类IL-22R的抗体或抗原结合片段可以与IL-22R的一种或多种物种同源物交叉反应,例如灵长类动物来源的IL-22R同源物。

[0281] 在某些实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段不与鼠类IL-22R交叉反应。可选地或另外地,所述抗体或抗原结合片段可以结合灵长类动物来源的一种或多种IL-22R同源物,例如来自恒河猴和食蟹猴的IL-22R蛋白。与其他物种同源物的交叉反应性在开发和测试治疗性抗体中可以是特别有利的。举例来说,治疗性抗体的临床前毒理学测试经常在灵长类动物物种中进行,包括但不限于恒河猴和食蟹猴。与这些物种同源物的交叉反应性因此对于开发作为临床候选者的抗体可以是特别有利的。

[0282] 骆驼科动物来源的抗体

[0283] 在本发明的某些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段可以包含从骆驼科中的物种的VH结构域或VL结构域中获得的至少一个高变环或互补决定区。具体来说,所述抗体或抗原结合片段可以包含通过用IL-22R抗原或其片段对远交骆驼科动物,例如美洲驼进行主动免疫接种所获得的VH结构域和/或VL结构域、或其CDR。

[0284] “从骆驼科中的物种的VH结构域或VL结构域中获得的高变环或互补决定区”意指该高变环(HV)或CDR具有与由骆驼科免疫球蛋白基因编码的高变环或CDR的氨基酸序列相同或基本上相同的氨基酸序列。在这种背景下,“免疫球蛋白基因”包括种系基因、已经经历重排的免疫球蛋白基因、以及体细胞突变基因。因此,从骆驼科物种的VH结构域或VL结构域中获得的HV或CDR的氨基酸序列可以与成熟骆驼科常规抗体中存在的HV或CDR的氨基酸序列相同。在这种背景下术语“从……中获得”表示在以下意义上的结构关系,即IL-22R抗体的HV或CDR体现了最初由骆驼科免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列(或其次要变体)。然而,这不一定表示在用于制备IL-22R抗体的生产过程方面的特定关系。

[0285] 骆驼科动物来源的IL-22R抗体可以源自于任何骆驼科动物物种,尤其包括美洲驼、单峰驼、羊驼、骆马、原驼或骆驼。

[0286] 包含骆驼科动物来源的VH结构域和VL结构域、或其CDR的IL-22R抗体通常是重组表达的多肽,并且可以是嵌合多肽。术语“嵌合多肽”指的是人工(非天然存在的)多肽,其是通过将原本不连续存在的两个或更多个肽片段并置而产生的。在该定义内包括通过将由两种或更多种物种,例如骆驼科动物和人类编码的肽片段并置而产生的“物种”嵌合多肽。

[0287] 骆驼科动物来源的CDR可以包含如SEQ ID No:6和13(重链CDR3)、或SEQ ID No:4和11(重链CDR2)或SEQ ID No:2和9(重链CDR1)所示的CDR序列之一或如SEQ ID No:20和27(轻链CDR3)、或SEQ ID No:18、25以及47(轻链CDR2)或SEQ ID No:16和23(轻链CDR1)所示

的CDR序列之一。

[0288] 在一个实施方案中,整个VH结构域和/或整个VL结构域可以从骆驼科中的物种获得。在具体实施方案中,骆驼科动物来源的VH结构域可以包含选自SEQ ID No:29和31的氨基酸序列,而骆驼科动物来源的VL结构域可以包含选自SEQ ID No:30、32以及62的氨基酸序列。然后可以对骆驼科动物来源的VH结构域和/或骆驼科动物来源的VL结构域进行蛋白质工程化,其中将一个或多个氨基酸取代、插入或缺失引入骆驼科动物氨基酸序列中。这些工程化的变化优选地包括对于骆驼科动物序列的氨基酸取代。这些变化包括“人源化”或“种系化”,其中将骆驼科动物编码的VH结构域或VL结构域中的一个或多个氨基酸残基用来自同源的人类编码的VH结构域或VL结构域的等同残基置换。在某些实施方案中,骆驼科动物来源的VH结构域可以表现出与如SEQ ID No:29或31所示的氨基酸序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%的同一性。可选地或另外地,骆驼科动物来源的VL结构域可以表现出与如SEQ ID No:30、32或62所示的氨基酸序列具有至少90%、95%、97%、98%或99%的同一性。

[0289] 通过用人类IL-22R抗原对骆驼科动物(例如美洲驼)进行主动免疫接种所获得的分离的骆驼科动物VH结构域和VL结构域可以作为基础用于将根据本发明的抗原结合多肽进行工程化。从完整的骆驼科动物VH结构域和VL结构域开始,有可能将进行一个或多个氨基酸取代、插入或缺失进行工程化以偏离起始骆驼科动物序列。在某些实施方案中,这些取代、插入或缺失可以存在于VH结构域和/或VL结构域的框架区中。一级氨基酸序列中的这些变化的目的可以是减少可能不利的特性(例如在人类宿主中的免疫原性(所谓的人源化)、潜在产物异质性和/或不稳定性(糖基化、脱酰胺、异构化等)的位点或增强分子的一些其他有利的特性(例如溶解度、稳定性、生物利用度等)。在其他实施方案中,一级氨基酸序列的变化可以在通过主动免疫接种所获得的骆驼科VH结构域和/或VL结构域的高变环(或CDR)中的一个或多个中工程化。可以引入这些变化以增强抗原结合亲和力和/或特异性;或减少可能不利的特性,例如在人类宿主中的免疫原性(所谓的人源化)、潜在产物异质性和/或不稳定性、糖基化、脱酰胺、异构化等的位点;或增强分子的一些其他有利的特性,例如溶解度、稳定性、生物利用度等。

[0290] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了变体IL-22R抗体,其与骆驼科动物来源的VH结构域或VL结构域相比在VH结构域或VL结构域的至少一个框架或CDR区中含有至少一个氨基酸取代,所述骆驼科动物来源的VH结构域或VL结构域的实例包括但不限于包含如SEQ ID No:29和31所示的氨基酸序列的骆驼科动物VH结构域和包含如SEQ ID No:30、32或62所示的氨基酸序列的骆驼科动物VL结构域。

[0291] 在其他实施方案中,提供了“嵌合”抗体分子,其包含骆驼科动物来源的VH结构域和VL结构域(或其工程化的变体)和来自非骆驼科动物抗体的一个或多个恒定结构域,例如人类编码的恒定结构域(或其工程化的变体)。在这些实施方案中,优选的是,VH结构域和VL结构域这两者都是从骆驼科动物的相同物种获得的,例如VH和VL这两者都可以来自大羊驼(Lamaglama)或VH和VL这两者都可以来自羊驼(Lama pacos)(在引入工程化的氨基酸序列变化之前)。在这些实施方案中,VH结构域和VL结构域这两者都可以源自于单个动物,特别是已经用IL-22R抗原主动免疫接种的单个动物。

[0292] 作为将骆驼科VH结构域和/或VL结构域的一级氨基酸序列中的变化进行工程化的

替代方案,可以从骆驼科动物VH结构域/VL结构域中分离单个骆驼科动物来源的高变环或CDR或其组合并且通过CDR移植转移到替代(即非骆驼科)框架,例如人类VH/VL框架中。在具体的非限制性实施方案中,骆驼科动物来源的CDR可以选自具有如SEQ ID No:6和13(重链CDR3)、或SEQ ID No:4和11(重链CDR2)或SEQ ID No:2和9(重链CDR1)所示的氨基酸序列的CDR或如SEQ ID No:20和27(轻链CDR3)、或SEQ ID No:18、25以及47(轻链CDR2)或SEQ ID No:16和23(轻链CDR1)所示的CDR序列之一。

[0293] 包含骆驼科动物来源的VH结构域和VL结构域或其CDR的IL-22R抗体可以采用其中存在VH结构域和VL结构域这两者的各种不同的实施方案。术语“抗体”在本文以最广泛的意义使用并且包括但不限于单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体),只要它们对IL-22R蛋白表现出适当的免疫特异性即可。如本文所用的术语“单克隆抗体”指的是从一群基本上均质的抗体获得的抗体,即构成所述群体的单个抗体是相同的,除了可能以少量存在的可能的天然存在的突变之外。单克隆抗体具有高度特异性,针对单个抗原位点。此外,与通常包括针对抗原上的不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂相反,每一种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇或表位。

[0294] “抗体片段”包含全长抗体的一部分,一般是其抗原结合或可变结构域。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂、双特异性Fab'和Fv片段、双体抗体、线性抗体、单链抗体分子、单链可变片段(scFv)以及由抗体片段形成的多特异性抗体(参见Holliger和Hudson, Nature Biotechnol.23:1126-36(2005),其内容以引用的方式并入本文)。

[0295] 在非限制性实施方案中,包含骆驼科动物来源的VH结构域和VL结构域或其CDR的IL-22R抗体可以包含CH1结构域和/或CL结构域,所述CH1结构域和/或CL结构域的氨基酸序列是完全或基本上人类的。在本发明的抗原结合多肽是预期用于人类治疗用途的抗体的情况下,抗体的整个恒定区或至少其部分通常具有完全或基本上人类氨基酸序列。因此,CH1结构域、铰链区、CH2结构域、CH3结构域以及CL结构域(和CH4结构域(如果存在的话))中的一个或多个或任何组合的氨基酸序列可以是完全或基本上人类的。

[0296] 有利的是,CH1结构域、铰链区、CH2结构域、CH3结构域以及CL结构域(以及CH4结构域(如果存在的话))全部都可以具有完全或基本上人类氨基酸序列。在人源化抗体或嵌合抗体或抗体片段的恒定区的背景下,术语“基本上人类”指的是与人类恒定区具有至少90%、或至少92%、或至少95%、或至少97%、或至少99%的氨基酸序列同一性。在这种背景下术语“人类氨基酸序列”指的是由人类免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列,所述人类免疫球蛋白基因包括种系基因、重排基因以及体细胞突变基因。本发明还考虑了包含已经由于一个或多个氨基酸添加、缺失或取代而相对于人类序列发生改变的“人类”序列恒定结构域的多肽,除了其中明确需要“完全人类”铰链区的存在的那些实施方案之外。

[0297] 在本发明的IL-22R抗体中“完全人类”铰链区的存在对于使免疫原性最小化以及优化抗体的稳定性都可能是有益的。

[0298] 如本文其他地方所论述,考虑了可以在重链和/或轻链的恒定区内,特别是在Fc区内进行一个或多个氨基酸取代、插入或缺失。氨基酸取代可以使得被取代的氨基酸被不同的天然存在的氨基酸或非天然或修饰的氨基酸置换。还容许其他结构修饰,例如像糖基化模式的变化(例如通过添加或缺失N连接或O连接的糖基化位点)。根据抗体的预期用途,可能期望在与Fc受体的结合特性方面修饰本发明的抗体,例如以调节效应功能。举例来说,可

以将一个或多个半胱氨酸残基引入Fc区中,从而允许在该区域中形成链间二硫键。由此产生的同二聚体抗体可以具有提高的内化能力和/或增加的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。参见Caron等, *J. Exp. Med.* 176:1191-1195 (1992); 以及Shopes, B. J. *Immunol.* 148:2918-2922 (1992)。本发明还考虑了免疫缀合物,所述免疫缀合物包含与细胞毒性剂缀合的如本文所述的抗体,所述细胞毒性剂诸如化疗剂、毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段)、或放射性同位素(即放射性缀合物)。Fc区也可以被工程化以延长半衰期,如Chan和Carter, *Nature Reviews: Immunology*, 第10卷, 第301-316页, 2010所述, 该文献以引用的方式并入本文。

[0299] 在又一个实施方案中,通过修饰一个或多个氨基酸来修饰Fc区以增加抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或增加抗体对Fc γ 受体的亲和力的能力。在替代性实施方案中,Fc区可以被工程化以使得没有效应功能。没有Fc效应功能的IL-22R抗体可以特别用作受体阻断剂。在某些实施方案中,本发明的抗体可以具有源自于具有降低的效应功能的天然存在的IgG同种型例如IgG4的Fc区。可以进一步修饰源自于IgG4的Fc区以增加治疗效用,例如通过引入使体内IgG4分子之间的臂交换减到最低限度的修饰。

[0300] 在再另一个实施方案中,抗体的糖基化被修饰。举例来说,可以制备无糖基化的抗体(即抗体缺乏糖基化)。可以改变糖基化以例如增加抗体对靶抗原的亲和力。这样的碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内一个或多个糖基化位点来实现。举例来说,可以进行一个或多个氨基酸取代,其引起一个或多个可变区框架糖基化位点的消除,从而消除该位点处的糖基化。这样的去糖基化可以增加抗体对抗原的亲和力。

[0301] 还设想的是,具有改变的糖基化类型的变体IL-22R抗体,如具有减少量的岩藻糖基残基的低岩藻糖基化的抗体或完全或部分脱岩藻糖基化的抗体(如Natsume等, *Drug Design Development and Therapy*, 第3卷, 第7-16页, 2009所述)或具有增加的二等分GlcNac结构的抗体。这样的改变的糖基化模式已经被证实增加了抗体的ADCC活性,通常使得相对于包含“天然”人类Fc结构域的等同抗体ADCC增强到10倍。这样的碳水化合物修饰可以通过例如使抗体在具有改变的糖基化酶促机制的宿主细胞中表达来实现(如Yamane-Ohnuki和Sato, *mAbs* 1:3, 230-236, 2009所述)。具有增强的ADCC功能的非岩藻糖基化的抗体的实例是使用BioWa公司的Potelligent™技术产生的那些。

[0302] 在某些实施方案中,本发明可以包括嵌合骆驼科/人类抗体,特别是嵌合抗体,其中VH结构域和VL结构域具有完全骆驼科动物序列(例如大羊驼或羊驼)并且抗体的其余部分具有完全人类序列。IL-22R抗体可以包括包含骆驼科动物来源的VH结构域和VL结构域或其CDR的“人源化”或“种系化”变体的抗体以及骆驼科动物/人类嵌合抗体,其中所述VH结构域和VL结构域与通过用IL-22R抗原或其片段对骆驼科动物进行主动免疫接种所获得的骆驼科动物VH结构域和VL结构域相比,在框架区中含有一个或多个氨基酸取代。这样的“人源化”通过用存在于人类种系编码的VH结构域或VL结构域中的等同残基置换起始骆驼科VH结构域或VL结构域中的错配氨基酸残基来增加与人类种系VH结构域或VL结构域的序列同一性%。

[0303] IL-22R抗体也可以是CDR移植抗体,其中源自于骆驼科动物抗体或否则由骆驼科动物基因编码的CDR(或高变环)被移植到人类VH和VL框架上,所述抗体的其余部分也是完全人类来源的。这样的CDR移植IL-22R抗体可以含有具有如SEQ ID No:6和13(重链CDR3)、

或SEQ ID No:4和11(重链CDR2)或SEQ ID No:2和9(重链CDR1)所示的氨基酸序列的CDR或如SEQ ID NO:20和27(轻链CDR3)、或SEQ ID No:18、25以及47(轻链CDR2)或SEQ ID No:16和23(轻链CDR1)所示的CDR序列之一。

[0304] 如上文所述的人源化、嵌合以及CDR移植的IL-22R抗体,特别是包含由对骆驼科动物进行主动免疫接种所得到的高变环或CDR的抗体可以容易地使用常规的重组DNA操纵和表达技术,利用原核和真核宿主细胞来产生,所述宿主细胞被工程化以产生所关注的多肽并且包括但不限于细菌细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞,它们中的一些如本文所述并且在所附实施例中说明。

[0305] 骆驼科动物来源的IL-22R抗体包括变体,其中VH结构域和/或VL结构域的一个或多个高变环或一个或多个CDR是从针对人类IL-22R产生的常规骆驼科动物抗体中获得的,但是其中所述(骆驼科动物来源的)高变环或CDR中的至少一个已经被工程化以相对骆驼科动物编码的序列而言包括一个或多个氨基酸取代、添加或缺失。这些变化包括高变环/CDR的“人源化”。已经以这种方式工程化的骆驼科动物来源的HV/CDR仍然可以表现出与骆驼科动物编码的HV/CDR的氨基酸序列“基本上相同”的氨基酸序列。在这种背景下,“基本上相同”可以容许与骆驼科动物编码的HV/CDR有不超过一个、或不超过两个氨基酸序列错配。IL-22R抗体的具体实施方案可以含有如SEQ ID No:6和13(重链CDR3)、或SEQ ID No:4和11(重链CDR2)或SEQ ID No:2和9(重链CDR1)所示的CDR序列或如SEQ ID NO:20和27(轻链CDR3)、或SEQ ID No:18、25以及47(轻链CDR2)或SEQ ID No:16和23(轻链CDR1)所示的CDR序列之一的人源化变体。

[0306] 本文提供的骆驼科动物来源的IL-22R抗体可以是任何同种型。预期用于人类治疗用途的抗体通常将是IgA、IgD、IgE、IgG、IgM类型,常常是IgG类型,在这种情况下,它们可以属于四个亚类IgG1、IgG2a和IgG2b、IgG3或IgG4中的任一个。在这些亚类中的每一个内,容许在Fc部分内进行一个或多个氨基酸取代、插入或缺失,或进行其他结构修饰,例如以增强或降低Fc依赖性功能。

[0307] 优选的IL-22R抗体——230C9和223G5和与其相关的抗体

[0308] 根据本发明的优选的IL-22R抗体和其抗原结合片段是本文所述的骆驼科动物来源的抗体的人源化变体和种系化变体。人源化变体和种系化变体表现出高度人类同源性,并且优选地表现出与人类IgG分子,更优选地IgG1的高度同源性。在某些实施方案中,根据本发明的优选的IL-22R抗体和抗原结合片段包含具有人类或人类样规范折叠的高变环或CDR,如本文其他地方所述的那样。

[0309] 根据本发明的优选的IL-22R抗体可以表现出与一个或多个人类VH结构域,特别是在框架区FR1、FR2、FR3以及FR4中具有93%或更大的氨基酸序列同一性。可选地或另外地,优选的IL-22R抗体可以表现出与一个或多个人类VL结构域,特别是在框架区FR1、FR2、FR3以及FR4中具有96%或更大的氨基酸序列同一性。根据本发明的优选的IL-22R抗体可以表现出与一个或多个人类VH结构域具有93%或更大的氨基酸序列同一性以及一个或多个人类VH结构域和一个或多个人类VL结构域具有93%或更大的组合氨基酸序列同一性,特别是对框架区确定序列同一性的情况下。

[0310] 由于高度人类同源性,因此本文提供的优选的IL-22R抗体表现出低免疫原性,如通过龙沙公司(lonza)的Epibase™平台(DRB-1分数)使用“HLA II类-白种人v3.0”设置所评

估。在某些实施方案中,本发明的IL-22R抗体表现出小于950,优选地小于850,更优选地小于750,最优选地小于650的DRB-1分数。

[0311] 本发明的优选的IL-22R抗体是含有来自人类IgG,优选地IgG1的较链区、CH2结构域以及CH3结构域的单克隆抗体。在某些实施方案中,所述单克隆抗体的Fc区没有效应功能,即无Fc。这对于治疗性阻断抗体是特别有用的。

[0312] 本发明的优选的IL-22R抗体和抗原结合片段表现出使得它们优于现有技术所述的IL-22R抗体的特性组合。本发明的优选的IL-22R抗体和抗原结合片段可以表现出以下特性组合:

[0313] (i) 结合IL-22R蛋白内不包括Tyr60的表位;

[0314] (ii) 结合至少部分位于IL-22R蛋白的D2结构域中的表位;

[0315] (iii) 对人类IL-22R具有高度结合亲和力;

[0316] (iv) 抑制IL-22依赖性IL-22R激活和IL-20依赖性IL-22R激活;

[0317] (v) 与鼠类IL-22R无交叉反应性;以及

[0318] (vi) 与恒河猴和/或食蟹猴IL-22R具有交叉反应性。

[0319] 本发明的优选的IL-22R抗体可以结合不包括关键残基Tyr60的表位。本发明的优选的IL-22R抗体可以结合至少部分位于IL-22R的D2结构域中的表位,其中D2结构域是SEQ ID NO:71的氨基酸125至氨基酸228。本发明的优选的IL-22R抗体还可以高亲和力与人类IL-22R结合,当作为mAb测量时,通常表现出小于 $2.5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 的对人类IL-22R的解离速率(其中 $k_{\text{解离}}$ 是通过Biacore测量的)。在某些实施方案中,本发明的优选的IL-22R抗体以高亲和力与人类IL-22R结合,表现出 $1 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ 至 $2.5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 范围的对人类IL-22R的解离速率(其中 $k_{\text{解离}}$ 是通过Biacore测量的)。在某些实施方案中,本发明的优选的IL-22R抗体结合人类IL-22R,表现出小于 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 的 K_D 值。

[0320] 优选的IL-22R抗体还可以抑制IL-22依赖性IL-22R激活和IL-20依赖性IL-22R激活,并且通常对IL-20依赖性激活表现出的抑制活性是对IL-22依赖性激活所显示的抑制活性的小于4倍。优选的IL-22R抗体可以高亲和力与人类IL-22R结合并且与来自恒河猴和食蟹猴的IL-22R物种同源物交叉反应,但是不与鼠类IL-22R交叉反应。

[0321] 在某些实施方案中,根据本发明的优选的抗体和抗原结合片段包含至少一个重链可变结构域(VH)和至少一个轻链可变结构域(VL),其中所述VH结构域包含:

[0322] -可变重链CDR3,其包含氨基酸序列[VGFSGTYYES] (SEQ ID NO:6)或由氨基酸序列[VGFSGTYYES] (SEQ ID NO:6)组成;

[0323] -可变重链CDR2,其包含氨基酸序列[SIYNDASNTAYSDSVKG] (SEQ ID NO:36)或由氨基酸序列[SIYNDASNTAYSDSVKG] (SEQ ID NO:36)组成;

[0324] -可变重链CDR1,其包含氨基酸序列[SYDMN] (SEQ ID NO:34)或由氨基酸序列[SYDMN] (SEQ ID NO:34)组成;

[0325] 并且所述VL结构域包含:

[0326] -可变轻链CDR3,其包含氨基酸序列[QSGSSSSNAV] (SEQ ID NO:54)或由氨基酸序列[QSGSSSSNAV] (SEQ ID NO:54)组成;

[0327] -可变轻链CDR2,其包含氨基酸序列[GQNNRPS] (SEQ ID NO.47)或由氨基酸序列[GQNNRPS] (SEQ ID NO.47)组成;

[0328] -可变轻链CDR1,其包含氨基酸序列[QGGYYAH] (SEQ ID NO:16)或由氨基酸序列[QGGYYAH] (SEQ ID NO:16)组成。

[0329] 具有如上文所定义的VH结构域和VL结构域CDR序列的抗体和抗原结合片段可以包含VH结构域和/或VL结构域,所述VH结构域包含SEQ ID NO:63的序列或由SEQ ID NO:63的序列组成;所述VL结构域包含SEQ ID NO:64的序列或由SEQ ID NO:64的序列组成。在某些实施方案中,本文提供了抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域,所述重链可变结构域包含与如SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列具有至少85%的序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性、或至少97%、98%或99%的序列同一性的VH序列,和/或所述轻链可变结构域包含与如SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列具有至少85%的序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性、或至少97%、98%或99%的序列同一性的VL。

[0330] 对于其中抗体或抗原结合片段的结构域是通过与参考序列的特定序列同一性百分比来限定的实施方案,VH结构域和/或VL结构域可以保留与参考序列中存在的CDR序列相同的CDR序列以使得变化仅存在于框架区内。

[0331] 具有如上文所定义的VH结构域和VL结构域CDR序列的抗体和抗原结合片段可以包含全长免疫球蛋白重链和/或全长免疫球蛋白轻链,所述全长免疫球蛋白重链包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列或由SEQ ID NO:67的氨基酸序列组成,所述全长免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列或由SEQ ID NO:68的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,本文提供了抗体,所述抗体包含与如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列具有至少85%的序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性、或至少97%、98%或99%的序列同一性的重链和/或与如SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列具有至少85%的序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性、或至少97%、98%或99%的序列同一性的轻链。

[0332] 对于其中抗体链是通过与参考序列的特定序列同一性百分比来限定的实施方案,重链和/或轻链可以保留与参考序列中存在的CDR序列相同的CDR序列以使得变化仅存在于CDR区之外。

[0333] 在某些实施方案中,根据本发明的优选的抗体和抗原结合片段包含至少一个重链可变结构域(VH)和至少一个轻链可变结构域(VL),其中所述VH结构域包含:

[0334] -可变重链CDR3,其包含氨基酸序列[PPGPFKAHYNGAKY] (SEQ ID NO:43)或由氨基酸序列[PPGPFKAHYNGAKY] (SEQ ID NO:43)组成;

[0335] -可变重链CDR2,其包含氨基酸序列[GIHISGGITYYTSVKG] (SEQ ID NO:41)或由氨基酸序列[GIHISGGITYYTSVKG] (SEQ ID NO:41)组成;

[0336] -可变重链CDR1,其包含氨基酸序列[SYFMS] (SEQ ID NO:9)或由氨基酸序列[SYFMS] (SEQ ID NO:9)组成;

[0337] 并且所述VL结构域包含:

[0338] -可变轻链CDR3,其包含氨基酸序列[ASYRLYADYV] (SEQ ID NO:27)或由氨基酸序列[ASYRLYADYV] (SEQ ID NO:27)组成;

[0339] -可变轻链CDR2,其包含氨基酸序列[EVNKRSS] (SEQ ID NO.59)或由氨基酸序列[EVNKRSS] (SEQ ID NO.59)组成;

[0340] -可变轻链CDR1,其包含氨基酸序列[TGTSSDIGSYNYVS] (SEQ ID NO:57)或由氨基酸序列[TGTSSDIGSYNYVS] (SEQ ID NO:57)组成。

[0341] 具有如上文所定义的VH结构域和VL结构域CDR序列的抗体和抗原结合片段可以包含VH结构域和/或VL结构域,所述VH结构域包含SEQ ID NO:65的序列或由SEQ ID NO:65的序列组成,所述VL结构域包含SEQ ID NO:66的序列或由SEQ ID NO:66的序列组成。在某些实施方案中,本文提供了抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域,所述重链可变结构域包含与如SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列具有至少85%的序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性、或至少97%、98%或99%的序列同一性的VH序列,和/或所述轻链可变结构域包含与如SEQ ID NO:66所示的氨基酸序列具有至少85%的序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性、或至少97%、98%或99%的序列同一性的VL。

[0342] 对于其中抗体或抗原结合片段的结构域是通过与参考序列的特定序列同一性百分比来限定的实施方案,VH结构域和/或VL结构域可以保留与参考序列中存在的CDR序列相同的CDR序列以使得变化仅存在于框架区内。

[0343] 具有如上文所定义的VH结构域和VL结构域CDR序列的抗体和抗原结合片段可以包含全长免疫球蛋白重链和/或全长免疫球蛋白轻链,所述全长免疫球蛋白重链包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列或由SEQ ID NO:69的氨基酸序列组成,所述全长免疫球蛋白轻链包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列或由SEQ ID NO:70的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,本文提供了抗体,所述抗体包含重链和/或轻链,所述重链与如SEQ ID NO:69所示的氨基酸序列具有至少85%的序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性、或至少97%、98%或99%的序列同一性,所述轻链与如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列具有至少85%的序列同一性、或至少90%的序列同一性、或至少95%的序列同一性、或至少97%、98%或99%的序列同一性。

[0344] 对于其中抗体链是通过与参考序列的特定序列同一性百分比来限定的实施方案,重链和/或轻链可以保留与参考序列中存在的CDR序列相同的CDR序列以使得变化仅存在于CDR区之外。

[0345] 交叉竞争抗体

[0346] 本发明还包括与本文公开的抗体或抗原结合片段“交叉竞争”的(单克隆)抗体或其抗原结合片段。

[0347] 具体来说,本文提供了抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段结合细胞因子受体IL-22R并且与包含以下各项的组合的抗体或其抗原结合片段交叉竞争:可变重链CDR3 (HCDR3)、可变重链CDR2 (HCDR2)和可变重链CDR1 (HCDR1)、可变轻链CDR3 (LCDR3)、可变轻链CDR2 (LCDR2)和可变轻链CDR1 (LCDR1),其中所述组合选自由以下各项组成的组:

[0348] (i) 包含SEQ ID NO:43的HCDR3;包含SEQ ID NO:41的HCDR2;包含SEQ ID NO:9的HCDR1;包含SEQ ID NO:27的LCDR3;包含SEQ ID NO:59的LCDR2;包含SEQ ID NO:57的LCDR1;以及

[0349] (ii) 包含SEQ ID NO:13的HCDR3;包含SEQ ID NO:11的HCDR2;包含SEQ ID NO:9的HCDR1;包含SEQ ID NO:27的LCDR3;包含SEQ ID NO:25的LCDR2;包含SEQ ID NO:23的LCDR1。

[0350] 在某些实施方案中,本文提供了抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段结合细胞因子受体IL-22R并且与包含至少一个重链可变结构域(VH)和至少一个轻链可变结构域(VL)的抗体或其抗原结合片段交叉竞争,其中所述VH结构域包含:

[0351] -可变重链CDR3,其包含氨基酸序列[PPGPFKAHYNGAKY](SEQ ID NO:43)或由氨基酸序列[PPGPFKAHYNGAKY](SEQ ID NO:43)组成;

[0352] -可变重链CDR2,其包含氨基酸序列[GIHISGGITYYTDSVKG](SEQ ID NO:41)或由氨基酸序列[GIHISGGITYYTDSVKG](SEQ ID NO:41)组成;

[0353] -可变重链CDR1,其包含氨基酸序列[SYFMS](SEQ ID NO:9)或由氨基酸序列[SYFMS](SEQ ID NO:9)组成;

[0354] 并且所述VL结构域包含:

[0355] -可变轻链CDR3,其包含氨基酸序列[ASYRLYADYV](SEQ ID NO:27)或由氨基酸序列[ASYRLYADYV](SEQ ID NO:27)组成;

[0356] -可变轻链CDR2,其包含氨基酸序列[EVNKRSS](SEQ ID NO:59)或由氨基酸序列[EVNKRSS](SEQ ID NO:59)组成;

[0357] -可变轻链CDR1,其包含氨基酸序列[TGTSSDIGSYNYVS](SEQ ID NO:57)或由氨基酸序列[TGTSSDIGSYNYVS](SEQ ID NO:57)组成。

[0358] 交叉竞争抗体或其抗原结合片段可以与具有包含SEQ ID NO:65的序列或由SEQ ID NO:65的序列组成的VH结构域和/或包含SEQ ID NO:66的序列或由SEQ ID NO:66的序列组成的VL结构域的抗体或抗原结合片段竞争。交叉竞争抗体或其抗原结合片段可以与以下抗体竞争,所述抗体具有包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列或由SEQ ID NO:69的氨基酸序列组成的全长免疫球蛋白重链和/或包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列或由SEQ ID NO:70的氨基酸序列组成的全长免疫球蛋白轻链。

[0359] 在本发明的背景下,交叉竞争抗体是在一个或多个与本发明的IL-22R抗体结合的一个或多个位点重叠或相同的位点处结合IL-22R的那些抗体。竞争(单克隆)抗体或其抗原结合片段可以例如经由抗体竞争测定来鉴定。举例来说,可以使IL-22R抗原或其片段结合到固体载体。然后,添加本发明的抗体或其抗原结合片段和疑似能够与这种本发明抗体竞争的单克隆抗体或其抗原结合片段。标记这两种分子之一。如果标记的化合物和未标记的化合物结合到IL-22R抗原上分开和离散的位点,那么标记的化合物将结合达到相同的水平,无论可疑的竞争化合物是否存在。然而,如果相互作用位点是相同的(或重叠的),那么未标记的化合物将竞争,并且与抗原结合的标记化合物的量将降低。如果未标记的化合物过量存在,那么非常少(如果有的话)的标记化合物将结合。出于本发明的目的,竞争单克隆抗体或其抗原结合片段是将本发明的抗体与IL-22R的结合减少约50%、约60%、约70%、约80%、约85%、约90%、约95%、或约99%的那些。用于进行这样的竞争测定的程序的细节是本领域公知的并且可以见于例如Harlow和Lane(1988)Antibodies,A Laboratory Manual(《抗体:实验室手册》),纽约州冷泉港的冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York),第567-569页,ISBN 0-87969-314-2中。可以通过使用纯化的抗体来使这样的测定是定量的。通过将一种抗体针对自身滴定来建立标准曲线,即将相同的抗体用于标记和竞争剂。滴定未标记的竞争性单克隆抗体或其抗原结合片段抑制标记分子与板结合的能力。对结果进行绘图,并且比较实现所期望的程

度的结合抑制所需的浓度。

[0360] 编码IL-22R抗体的多核苷酸

[0361] 本发明还提供了编码本发明的IL-22R抗体或其片段的多核苷酸分子;以及含有与调控序列可操作地连接的本发明的所述核苷酸序列的表达载体,所述调控序列容许所述抗体或其片段在宿主细胞或无细胞表达系统中表达;以及含有该表达载体的宿主细胞或无细胞表达系统。

[0362] 在具体实施方案中,编码本发明的IL-22R抗体的多核苷酸可以包含如SEQ ID NO: 52、73、74、75、76、77、78、79、80或81所示的多核苷酸序列中的一个或多个,所述序列编码IL-22R抗体的VH结构域或VL结构域。

[0363] 在某些实施方案中,编码本发明的IL-22R抗体的多核苷酸可以包含编码IL-22R抗体的功能性VH结构域或VL结构域的变体序列,其中所述变体序列在与SEQ ID NO:52、73、74、75、76、77、78、79、80或81中的任一个最佳比对时表现出至少80%、85%、90%、95%、97%或99%的序列同一性。

[0364] 在这种背景下,在两个多核苷酸序列之间的序列同一性%可以通过比较以最佳方式比对的这两个序列来确定并且其中待比较的多核苷酸序列相对于参考序列可以包含添加或缺失以用于这两个序列之间的最佳比对。同一性百分比是通过确定在这两个序列之间具有相同核苷酸残基的相同位置的数目,用该相同位置的数目除以比较窗中位置的总数并且将所获得的结果乘以100以获得这两个序列之间的同一性百分比来计算的。举例来说,有可能使用BLAST程序“BLAST 2sequences”(Tatusova等,“Blast 2sequences—a new tool for comparing protein and nucleotide sequences (Blast 2sequences——一种用于比较蛋白质序列和核苷酸序列的新工具)”,FEMS Microbiol Lett.174:247-250),其可在网站<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>上获得,所使用的参数是由默认给出的参数(特别是对于参数“开放空位罚分”:5以及“延伸空位罚分”:2;所选择的矩阵是例如由所述程序所建议的矩阵“BLOSUM 62”),通过所述程序直接计算待比较的两个序列之间的同一性百分比。

[0365] 在某些实施方案中,根据本发明的IL-22R抗体或抗原结合片段的重链可变结构域和轻链可变结构域是由第一多核苷酸序列和第二多核苷酸序列的组合编码的,其中所述第一多核苷酸序列和第二多核苷酸序列选自以下对:

[0366] (i) 包含SEQ ID NO:52的编码可变重链结构域的第一多核苷酸和包含SEQ ID NO:73的编码可变轻链结构域的第二多核苷酸;

[0367] (ii) 包含SEQ ID NO:74的编码可变重链结构域的第一多核苷酸和包含SEQ ID NO:75的编码可变轻链结构域的第二多核苷酸;

[0368] (iii) 包含SEQ ID NO:76的编码可变重链结构域的第一多核苷酸和包含SEQ ID NO:77的编码可变轻链结构域的第二多核苷酸;

[0369] (iv) 包含SEQ ID NO:78的编码可变重链结构域的第一多核苷酸和包含SEQ ID NO:79的编码可变轻链结构域的第二多核苷酸;或

[0370] (v) 包含SEQ ID NO:80的编码可变重链结构域的第一多核苷酸和包含SEQ ID NO:81的编码可变轻链结构域的第二多核苷酸。

[0371] 编码本发明的抗体的多核苷酸分子包括例如重组DNA分子。如本文可互换使用的

术语“核酸”、“多核苷酸”或“多核苷酸分子”指的是单链或双链的任何DNA分子或RNA分子以及在单链的情况下,它的互补序列的分子。在论述核酸分子时,特定核酸分子的序列或结构在本文可以根据按5'到3'方向提供序列的正常惯例来描述。在本发明的一些实施方案中,核酸或多核苷酸是“分离的”。该术语在应用于核酸分子时指的是与在作为它的来源的生物体的天然存在的基因组中与它直接连续的序列分离的核酸分子。举例来说,“分离的核酸”可以包含插入载体(如质粒或病毒载体)中或整合到原核或真核细胞或非人类宿主生物体的基因组DNA中的DNA分子。当应用于RNA时,术语“分离的多核苷酸”主要指的是由如上文所定义的分离的DNA分子编码的RNA分子。或者,所述术语可以指的是RNA分子,所述RNA分子已经从在它的天然状态下(即在细胞或组织中)与它缔合的其他核酸中纯化/分离。分离的多核苷酸(DNA或RNA)可以进一步表示由生物学手段或合成手段直接产生并且与在它的制备期间存在的其他组分分离的分子。

[0372] 为了重组产生根据本发明的抗体,可以制备编码它的重组多核苷酸(使用标准分子生物学技术)并且将其插入可复制的载体中以用于在所选择的宿主细胞或无细胞表达系统中表达。合适的宿主细胞可以是原核细胞、酵母细胞、或高等真核细胞,特别是哺乳动物细胞。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是由SV40转化的猴肾CV1细胞系(COS-7, ATCC CRL 1651);人类胚肾细胞系(被亚克隆以在悬浮培养中生长的293或293细胞, Graham等, J.Gen.Virol.36:59(1977));幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));小鼠塞尔托利细胞(sertoli cell)(TM4, Mather, Biol.Reprod.23:243-251(1980));小鼠骨髓瘤细胞SP2/0-AG14(ATCC CRL 1581; ATCC CRL 8287)或NS0(HPA培养物保藏号85110503);猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);人类宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34);布法罗大鼠(buffalo rat)肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);人类肺细胞(W138, ATCC CCL 75);人类肝细胞(Hep G2, HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等, Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982));MRC 5细胞;FS4细胞;和人类肝细胞瘤细胞系(Hep G2)以及DSM公司的PERC-6细胞系。适用于这些宿主细胞中的每一种的表达载体也一般是本领域已知的。

[0373] 应当指出的是,术语“宿主细胞”一般指培养细胞系。已经引入了编码根据本发明的抗原结合多肽的表达载体的整个人明确地被排除在“宿主细胞”的定义之外。

[0374] 抗体产生

[0375] 在一个重要的方面,本发明还提供了一种产生本发明的抗体的方法,所述方法包括在容许所述抗体表达的条件下培养含有编码所述抗体的多核苷酸(例如表达载体)的宿主细胞(或无细胞表达系统)以及回收所表达的抗体。这种重组表达方法可以用于大规模生产抗体,包括根据本发明的IL-22R抗体,包括预期用于人类治疗用途的单克隆抗体。用于大规模生产适用于体内治疗用途的重组抗体的合适的载体、细胞系以及生产方法一般是本领域可获得的并且将是本领域技术人员公知的。

[0376] IL-22R抗体的治疗效用

[0377] 本文提供的IL-22R抗体可以用作药物,特别是用于治疗或预防病症,其中病变可归因于失调的经由细胞表面IL-22R复合物的信号传导。这样的失调的信号传导可能与细胞因子IL-22、IL-20和/或IL-24中的任一种的过表达或过量产生有关。

[0378] 术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”意指减慢、中断、阻止、控制、停止症状、病症、状况或疾病、降低其严重程度,但是不一定涉及所有疾病相关的症状、状况或病症的完全消除。术语“预防”意指预防病症、状况或疾病发作或预防与病症、状况或疾病相关的症状发作。

[0379] 经由IL-22R进行信号传导的配体已经牵涉到许多疾病并且由于IL-22R在皮肤和上皮细胞上选择性地表达,因此关键疾病是影响皮肤和上皮的那些,包括但不限于银屑病、银屑病关节炎以及特应性皮炎。已经在人类银屑病斑块中发现高水平的IL-22 (Boniface等, Clin Exp Immunol.150:407-415 (2007)) 并且该细胞因子涉及银屑病的发病机制已经通过实验在小鼠皮炎模型中被证实 (Ma等, J Clin Invest.118:597-607 (2008); Van Belle等, J Immunol.1月1日;188(1):462-9 (2012))。

[0380] 在某些实施方案中,本文提供了治疗皮肤炎症性疾病的方法。在某些实施方案中,本文提供了在人类受试者中治疗皮肤炎症性疾病的方法,所述疾病选自银屑病、银屑病关节炎、接触性皮炎或特应性皮炎。所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的如本文其他地方所限定的IL-22R抗体或抗原结合片段中的任一种。如本文所述的IL-22R抗体或抗原结合片段的所有实施方案都同样适用于本发明的治疗方法。

[0381] 在某些实施方案中,本文提供了在人类受试者中治疗舍格伦综合征(Sjorgen syndrome)或选自肝癌、脂肪肉瘤、口腔鳞状细胞癌、结肠癌和结肠直肠癌、胰腺癌、小细胞肺癌和大细胞肺癌、乳腺癌、成胶质细胞瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤的癌症的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的如本文其他地方所限定的IL-22R抗体或抗原结合片段中的任一种。如本文所述的IL-22R抗体或抗原结合片段的所有实施方案都同样适用于本发明的治疗方法。

[0382] 对于人类治疗用途,本文所述的IL-22R抗体可以“有效量”向需要治疗的人类受试者施用。术语“有效量”指的是在向人类患者施用单次或多次剂量后,提供治疗疾病的治疗功效的IL-22R抗体的量或剂量。IL-22R抗体的治疗有效量可以包括每单次剂量约0.1mg/kg至约20mg/kg范围的量。在任何给定时间点施用的抗体的量可以变化以在治疗过程中施用最佳量的IL-22R抗体,无论是单独使用还是与任何其他治疗剂组合使用。

[0383] 还考虑将本文所述的IL-22R抗体或包含这样的抗体的药物组合物与用于上述疾病的任何其他合适的治疗组合施用作为组合治疗。

[0384] 药物组合物

[0385] 本发明的范围包括药物组合物,其含有与一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂一起配制的本发明的IL-22R抗体、或其抗原结合片段中的一种或组合。这样的组合物可以包括IL-22R抗体中的一种或组合(例如两种或更多种不同的IL-22R抗体)。用于配制用于人类治疗用途的单克隆抗体的技术是本领域公知的并且在例如Wang等, Journal of Pharmaceutical Sciences, 第96卷, 第1-26页, 2007中综述,该文献的内容整体并入本文。

[0386] 在某些实施方案中,所述药物组合物被配制用于经由任何合适的施用途径向受试者施用,包括但不限于肌内、静脉内、真皮内、腹膜内注射、皮下、硬膜外、经鼻、口服、经直肠、局部、吸入、颊面(例如舌下)、以及透皮施用。在优选的实施方案中,所述组合物被配制用于皮下施用。

[0387] 以引用的方式并入

[0388] 在上述说明书和整个以下实施例中引用了各种出版物，它们中的每一篇以引用的方式整体并入本文。

[0389] 实施例

[0390] 将参考以下非限制性实施例进一步了解本发明。

[0391] 实施例1:美洲驼的免疫接种

[0392] 根据下表5中所示的免疫接种方案用重组人类IL22R蛋白(R&D系统公司(R&D systems))和人类Fn14-Fc的混合物对两只美洲驼进行免疫接种。在每周六次注射重组蛋白之后,收集血液并且使用接受免疫接种的美洲驼的血清来测量针对IL22R的体液免疫应答,其通过在免疫接种之前和免疫接种之后检测针对免疫接种的抗原的抗体的存在来测量。这两只美洲驼都产生针对IL22R的显著的和特异性的免疫应答。

[0393] 表5:用于每一只美洲驼的免疫接种方案

周	日期	天	抗原	组织收集
				10 ml 免疫前血液(血清)
39	29/09/10	0	IL-22R(80 µg) +Fn14-Fc (80 µg)	-
40	07/10/10	8	IL-22R(40 µg) +Fn14-Fc (40 µg)	-
41	14/10/10	15	IL-22R(40 µg) +Fn14-Fc (40 µg)	-
[0394] 42	21/10/10	22	IL-22R(40 µg) +Fn14-Fc (40 µg)	-
43	28/10/10	29	IL-22R(40 µg) +Fn14-Fc (40 µg)	-
44	04/11/10	36	IL-22R(40 µg) +Fn14-Fc (40 µg)	-
45	08/11/10	40		400 ml 免疫血液 10 ml 免疫血液(血浆)

[0395] 实施例2:文库构建和选择

[0396] 在免疫接种之后,收获PBMC并且提取RNA。进行随机引物cDNA合成并且对美洲驼VHCH1、VλCλ以及VκCκ基因片段进行PCR扩增。使用两种方法来对轻链进行PCR扩增。第一种方法使用初级PCR扩增,其使用不含限制性酶切位点接头的引物,继而进行以限制性酶切位点(ApaI和AscI)标记的引物的PCR扩增。对于第二种方法,使用标记的引物直接扩增cDNA。使用两步PCR构建VHCH1文库,其中用未标记的引物进行25次循环,继而使用这些引物的标记型式(含有SfiI和NotI限制性酶切位点)进行10次循环(参见W02010/001251)。

[0397] 用ApaI和AscI消化PCR扩增的轻链,同时用SfiI和NotI消化PCR扩增的重链,并且

通过使用ApaLI和AscI限制性酶切位点将轻链文库插入序列克隆到重链文库pCB3载体中来组合成Fab文库。发现最终的Fab文库具有必要的多样性 $>10^9$ 种不同的克隆。

[0398] 在文库构建之后,产生噬菌体并且针对人类IL22R (Biotechne公司,2770-LR) 上进行噬菌体展示选择。为了选择IL22R特异性克隆,将人类IL22R (i) 直接包被到MaxiSorp™板 (Nunc公司) 上;或(ii) 用非竞争性抗人类IL22R抗体 (MAB2770,R&D系统公司) 捕捉;或(iii) 在生物素化中性亲和素之后用中性亲和素捕捉。IL22R的包被和捕捉通常以两种不同的浓度进行;例如5 μ g/ml和0.1 μ g/ml。

[0399] 在第一轮选择之后,没有看到明显的富集,但是在第二轮和第三轮之后,观测到所有文库中的剂量依赖性富集;在第二轮之后高达100倍并且在第三轮之后高达10,000倍。发现抗体捕捉的IL22R上的富集高于直接包被的IL22R上的富集。这可以归因于以下事实,即IL22R仅具有25kDa并且直接包被会影响它的构象或限制可用的表位。因此,使用生物素化的hIL22R进行第三次选择活动。

[0400] 除了上述选择之外,在MAB2770捕捉的人类IL-22R上进行第一轮选择之后,还在生物素化的重组小鼠IL22R上进行两轮额外的选择。进行该选择以鉴定Fab与小鼠IL22R的交叉反应性。作为选择的阳性对照,平行进行对中性亲和素捕捉的人类IL-22R-生物素的选择。总体而言,选择过程非常成功,对于IL22R Fab结合剂观测到显著的富集。

[0401] 实施例3:筛选IL22R特异性Fab

[0402] 在成功的噬菌体展示选择之后,测试周质中存在的Fab阻断IL-22与IL22R结合的能力。此外,进行筛选以鉴定与小鼠IL22R1结合的克隆。基于表面等离子共振 (SPR) 开发一种新的方法,其允许在一次筛选中测试配体竞争、对人类的亲和力和小鼠交叉反应性。

[0403] 将Biacore芯片 (CM5) 的不同通道用以下各项包被:

[0404] 1. 什么都没有 (空白);

[0405] 2. IL-22 (3000RU) 以测试Fab的竞争活性 (当共同注射IL22R时);

[0406] 3. 人类IL22R (3000RU) 以测试与靶标的结合;

[0407] 4. 小鼠IL22R (2500RU) 以测试交叉反应性。

[0408] 为了测试配体竞争,在注射之前将低浓度的可溶性IL22R1 (0.2 μ g/ml) 与周质提取物预混合。以这种方式,还有可能测量Fab阻断通道2上配体-受体相互作用的能力。针对与人类IL22R (通道3) 和小鼠IL22R (通道4) 的结合来筛选所获得的周质提取物。

[0409] 与常规的ELISA (结合或竞争) 相比,这种方法的优势在于同时测试Fab的几种特征:1) 与靶人类IL-22R的结合;2) 竞争活性;以及3) 交叉反应性。此外,测量解离速率给出了所测试的Fab的亲合力的强烈指示。

[0410] 使用这种替代筛选方法,鉴定出具有所有可能特征的Fab并且基于它们的解离速率进行分类:

[0411] • 竞争或非竞争

[0412] • 交叉反应性和非交叉反应性

[0413] • 竞争和交叉反应性

[0414] • 非竞争和交叉反应性

[0415] 然后将各种克隆送去测序。

[0416] 实施例4:IL-22R Fab的序列分析

[0417] 对通过Biacore分析(例如配体竞争、最大结合、低解离速率或小鼠交叉反应性)所鉴定出的克隆进行测序。然后基于它们的CDR3同一性将所述克隆分组以形成VH家族。

[0418] 总共鉴定出属于13个不同VH家族的67种不同的VH。鉴定出多得多的轻链家族(超过80个V λ 和V κ 序列)。Fab的序列和功能的高度多样性表明免疫接种和选择是非常成功的。

[0419] 特别令人关注的克隆的VH结构域和VL结构域的氨基酸序列示于下表6-表8中,并且这些克隆的多核苷酸序列示于表9中。

[0420]

表 6: IL-22R Fab 的 VH 结构域的框架区和 CDR 序列

克隆	FR1	SEQ ID NO.	CDR 1	SEQ ID NO.	FR2	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	FR3	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.	FR4	SEQ ID NO.
157A 2	QVQLV ESGGG LVQPG GSLRLS CAASG FTFS	1	SYD MS	2	WVRQ APGK GLEW VS	3	SIYND GSNTA YSDS VKG	4	RFTISRDN A KNTLYLQ M NSLKSEDT A VYYCAK	5	VGFSG TYYSES	6	WGQG TQVT VSS	7
166G 8	QVQLV ESGGG LVQPG DSLRLS CAASG FTFG	8	SYF MS	9	WVRQ APGK GPEW VS	10	GIHIS GGITY YLDS VKG	11	RFTISRDN A KNTLYLQ M NNLKPEDT A VYYCVT	12	PPGPFK AHYNG MKY	13	WGKG TLVTV SS	14

表 7: IL-22R Fab 的 VL 结构域的框架区和 CDR 序列

克隆	FR1	SEQ ID NO.	CDR 1	SEQ ID NO.	FR2	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	FR3	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.	FR4	SEQ ID NO.
157A 2	NFMLT QPSAVS VSLGQ TAKITC	15	QGG YYA H	16	WYQQ KPGQ APVL VIY	17	GNNN RPS	18	NTATLTISG A QAEDEAEY Y C	19	QSGSS ANAV	20	FGGG THLTV L	21

[0421]

166G 8	NFMLT QPPSVS GTLGK TVTISC	22	TGTS RDIG DYN YVS	23	WYQQ LPGLA PKLLI Y	24	KVNT RSS	25	NTASLTISGL QSEDEADYY C	26	ASYRLY ADYV	27	FGGG THLTV L	28
-----------	------------------------------------	----	----------------------------	----	-----------------------------	----	-------------	----	------------------------------	----	----------------	----	--------------------	----

表 8: IL-22R Fab 的可变结构域序列

克隆	VH	SEQ ID NO.	VL	SEQ ID NO.
157A2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYD MSWVRQAPGKGLEWVSSIYNDGNTAYSDSV KGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYC AKVGFSGTYSESWGQGTQTVSS	29	NFMLTQPSAVSVSLGQTAKITCQGGYYAH WYQQKPGQAPVLYYGNRRPSGIPERFSG SSSGNTAITLISGAQAEDEAEYQCQSGSSA NAVFGGGTHLTVL	30
166G8	QVQLVESGGGLVQPGLDLSRLSCAASGFTFGSYF MSWVRQAPGKPEWVSGIHSGGITYYLDVSK GRFTISRDNAKNTLYLQMNLLKPEDTAVYYCV TPPGPFKAHYNGMKYWGKGLVTVSS	31	NFMLTQPPSVSGTLGKTVTISCTGSRDIGD YNYVSWYQQLPGLAPKLLIYKVNTRSSGT PDRFSGSKSGNTASLTISGLQSEDEADYYCA SYRLYADYVFGGGTHLTVL	32

表 9: IL-22R Fab 的多核苷酸序列

克隆	VH	SEQ ID NO.	VL	SEQ ID NO.
157A2	CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCT TGGTGCAGCCTGGGGTCTCTGAGACTCTC CTGTGCAGCCTCGGATTCACCTTCAGTAGCT ACGACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGG GAAGGGCTGGAGTGGGTGCCAGTATTATA ATGACGGTAGTAAACACAGCCTATTTCAGACTCC GTGAAGGGCCGATTACACCTATCTCCAGAGACA ACGCCAAGAACACGTTGTATCTGCAATGAA	52	AATTTTATGCTGACTCAGCCCTCCGGGGT GTCCGTGCTCTTTGGGACAGACGGCCAAG ATCACCTGCCAAGGGGCTATTATGCTCA CTGTACCAGCAGAGAGCCAGGCCAGGCC CCTGTGTTGGTCACTATGGAATAATAAT AGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGCTTCTC TGGCTCCAGTTCTGGGAACACAGCCACC CTGACCATCAGCGGGGCCAGGCTGAGG	73

[0422]

	<p>CAGCTTGA AATCTGAGGACACGGCCGCTGTAAT ACTGTGCAAAAAGTTGGCTTTAGTGGTACTTAC TACAGTGAATCATGGGGCCAGGGGACCCAGG TCACCGTGTCCCTCA</p>		<p>ACGAGCCGAGTATTACTGTCAAGTCAGGA AGCAGTAGTCTAATGCTGTGTTCGGCGG AGGGACCCATCTG ACCGTCCTG</p>	
<p>166G8</p>	<p>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCT TGGTGCAGCCTGGGATTCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCGGAAGCTA TTTCATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGA AAGGGCCCCGAGTGGTCTCAGGTATTCATAT TAGTGGTGGTATTACATACTACTTAGACTCCGT GAAGGGCCGATTCAACCATCTCCAGAGACAAC GCCAAGAACACCGCTGTATCTGCAATGAACA ACCTGAAACCTGAGGACACGGCCGCTGATAT TGTGTAACACCCCGGCCCTTTAAAGGCCCA TTACAATGGCATGAAGTACTGGGGCAAAAGG ACCCTGGTCACCGTCTCCCTCA</p>	<p>74</p>	<p>AATTTATGCTGACTCAGCCTCCCTCCGTTG TCTGGAACTCTGGGAAGACGGTCAACCA TCTCCTGCACTGGAACCCAGTCGTGACATT GGGGACTATAACTATGTCTCCTGGTATCAA CAGCTCCCAGGATTGGCCCCCAAACTCCT GATCTATAAAGTCAACACTCGATCCTCAG GGACCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAG TCAGGCAACACGGCCTCCCTGACCAATCTC TGGGCTCCAGTCTGAGGACGAGGCTGATT ATTAATGTGCCCTCATATAGACTGTACGCCG ATTATGTGTTCCGGCGGAGGGACCCCATCTG ACCGTCCTG</p>	<p>75</p>

[0423] 实施例5:Fab的表征

[0424] 将具有最好的解离速率的克隆重新克隆到pCB4中,表达并且通过IMAC(来自

Clontech公司的Talon) 纯化。使用Biacore再次测试这些克隆。进一步Fab表征的结果示于下表10中。

[0425] 表10: IL-22R结合Fab的表征

VH 家族	克隆	与人类 IL-22R 结合	与小鼠 IL-22R 结合	IL-22 阻断	解离速率 (s^{-1})
1	170B2	是	是*	是	3.5E-04
1	170D6	是	是*	是	5.8E-03
1	160C8	是	否	是	3.2E-03
2	160C2	是	是	否	1.7E-03
3	158C4	是	是	否	6.7E-03
4	157A2	是	否	是	3.7E-03
4	171F4	是	否	是	5.9E-03
4	171A1	是	否	是	4.1E-03
4	171B1	是	否	是	1.9E-03
4	171C1	是	否	是	3.5E-03
5	159B8	是	否	是	1.5E-03
5	166G8	是	否	是	8.8E-04
5	169C1	是	否	是	3.2E-04
5	169H7	是	否	是	4.7E-04
5	169C8	是	否	是	4.3E-04
5	169H10	是	否	是	6.5E-04
5	171F10	是	否	是	1.2E-03
6	157C8	是	是	是	4.3E-03
6	157G8	是	是	是	8.6E-04
6	171A8	是	是	是	4.8E-03
7	157B8	是	否	否	7.7E-04
8	158H4	是	否	否	2.9E-03
11	165B8	是	是	否	9.7E-04
19	169G4	是	-	否	7.3E-04
20	172C9	是	是	否	6.1E-04
22	166D8	是	否	否	3.8E-03

[0426]

[0427] (*) 仅用纯化的Fab (而非周质或mAb) 观测到一次, 这表明亲和力非常低

[0428] 根据VH家族中的多样性、竞争活性以及亲和力(使用Biacore中所获得的 $k_{解离}$ 所测量), 选择来自每一个家族的一种或几种克隆并且重排成单克隆抗体 (mAb) 以用于进一步表征。

[0429] 实施例6: IL-22R结合mAb的表征

[0430] 如上所述,产生每一个VH家族的选择性克隆作为IgG1。在将HC可变区和LC可变区重新克隆到含有人类恒定结构域的单独的pUPE表达载体中之后,将HEK293E用两种质粒瞬时转染,一种质粒编码整个重链并且第二种质粒编码轻链。在6天的细胞培养期间使转染的细胞表达抗体。在使用蛋白A珠粒从细胞培养上清液中纯化抗体之后,使用如下文所述的不同的细胞系测试纯化的抗体中和人类IL22R信号传导和小鼠IL22R信号传导的能力。

[0431] -BW-hIL22R细胞系:衍生自BW细胞系并且具有稳定的人类IL22R表达,这引入IL22依赖性生长停滞。因此,只有当阻断IL22-IL22R相互作用时,所述细胞才会增殖。强效抗体将在低抗体浓度促进增殖。通过胸苷掺入来测量增殖。

[0432] -Baf3-mIL22R细胞系:衍生自Baf3细胞系并且具有稳定的小鼠IL22R表达,这引起IL22依赖性增殖。中和mIL22R的抗体将以抗体浓度依赖性方式阻断增殖。

[0433] -Baf3-hIL22R/IL20Rb细胞系:衍生自Baf3细胞系,但是共表达hIL22R和hIL20R β ,从而允许所述细胞在IL20存在下增殖。中和hIL22R的抗体将阻断用IL20刺激的细胞的增殖。

[0434] 针对BW-hIL22R细胞系和Baf3-hIL22R/IL20Rb细胞系测试各种IL22RmAb的结果示于图4和表11中。在图4A中,可以看到IL22R中和抗体恢复BW-hIL22R细胞系的增殖的作用。在图4B中,可以看到IL22R中和抗体抑制表达IL-22R的细胞系的IL-20增殖的作用。在实验中包括W02011/061119中所述的IL22R抗体(280.346.TSY)作为基准或参考IL-22R抗体。

[0435] 除了对细胞的效力之外,还在Biacore (3000) 中测量纯化抗体的体外结合动力学和阻断活性。对于亲和力测量,使用标准包被方案将重组IL22R以200RU包被到Biacore CM5芯片上(在乙酸盐缓冲液(pH 4.5)中以10 μ g/ml注射IL22R)。将以一定浓度范围测试并且在HBSEP缓冲液(pH 7.4) (Biacore) 中制备的抗体以30 μ l/min注射60秒并且用HBSEP缓冲液(pH 7.4) (Biacore) 洗涤10分钟-20分钟。使用BIAevaluation软件分析所获得的传感图并且使用标准拟合(朗缪尔(Langmuir) 1:1和质量传递) 确定动力学。

[0436] 对于使用Biacore 3000的阻断活性,将重组IL22 (RnD系统公司) 以2000RU包被到CM5芯片上。将抗原结合结构域(纯化的IgG、纯化的Fab或含有Fab的周质提取物) 与重组人类IL22R(浓度是0.2 μ g至1 μ g) 一起预孵育,之后注射到hIL22包被的通道中。检测到结合(IL22R:IL22) 则指示所述抗原结合结构域不竞争,而当没有检测到结合(IL22R:IL22) 时,这指示所述抗原结合结构域在体外阻断IL22:IL22R相互作用。Biacore和增殖测定的结果汇总于下表11中。

[0437] 表11:一组hIL22R抗体的特征的汇总

VH 家族	克隆	在 Biacore 中与 hIL22R 的结合			阻断 IL22-IL 22R	在增殖测定中的效力 IC50(pM)	
		Ka (1/Ms)	Kd (1/s) (解离速率)	KD (M)	Biacore	BW 人类 IL22R	BaF3 小鼠 IL22R
1	170B2	7.6E+05	9.3E-05	1.2E-10	是	60-200*	-
1	170D6		2.2E-04		是	3,830	-
2	160E2		6E-05		否	-	1,406
3	158C4		6E-04		否	-	-
4	157A2	3.9E+05	1.1E-03	2.8E-09	是	80-130*	-
4	171A1		7.4E-04			3,320	
5	159B8		2E-03		是	100-200*	-
5	166G8	9.2E+06	2.0E-04	2.2E-11	是	10-50*	-
5	169C1				是	35-90*	(-)
6	157G8		5.4E-05		是	1,174/2,090	-
7	157B8		3.4E-05		否	19,000	38,000
8	158H4		3E-05		否	500-1,600*	5-20×10 ³ *
11	165B8		3.1E-06		否	-	-
19	169G4	5.4E+05	3.1E-03	5.7E-09	否	1,489	
20	172C9				否	-	-
22	166D8		3.2E-03		否	74,000	-
基准	280.34 6.TSY	2.7E+05	6.4E-05	2.4E-10	是	20-110*	10-50*

[0439] *在几次实验中观测到的范围

[0440] IL22R抗体157A2和166G8显示出皮摩尔效力。

[0441] 实施例7:IL-22R mAb的物种交叉反应性

[0442] 测试IL22R mAb对鼠类IL-22R和非人类灵长类动物IL-22R的物种交叉反应性。

[0443] 食蟹猴IL22R的cDNA是不可用的并且必须从食蟹猴cDNA文库中提取。基于NCBI公共数据库设计引物。食蟹猴IL22R ECD的几个序列可从公共数据库(基因库,NCBI)中获得并且含有插入、缺失或这两者(参见图5)。关于真正的食蟹猴IL22R序列的不确定性证实了从食蟹猴cDNA进行克隆是合理的。

[0444] 通过PCR从cDNA文库扩增食蟹猴IL22R ECD并且在框内克隆到pUPE载体中IgGκ信号肽下游和人类Fc上游。尽管所使用的cDNA源自于食蟹猴,但是对几个克隆进行测序显示还克隆了恒河猴IL22R。恒河猴IL22R-ECD的特征在于不存在在食蟹猴中所发现的缺失和插入(图5中加框)并且恒河猴IL22R与食蟹猴IL22R之间有2个氨基酸不同(图5中以粗体显示)。

[0445] 在产生和纯化cyIL22R-Fc和rhIL22R-Fc之后,在ELISA中以及通过SPR(Biacore)测试了来自初级选择的所有抗体对食蟹猴IL22R ECD、恒河猴IL22R ECD以及小鼠IL22R ECD的结合特异性。单体小鼠IL22R购自R&D系统公司(目录号4248-MR)。结果汇总于表12中。

[0446] 表12:IL-22R mAb的物种交叉反应性

		与来自以下物种的 IL22R 的结合:				
VH 家族	克隆	人类	小鼠	食蟹猴	恒河猴	
[0447]	1	170B2	是	否	nt	nt
	1	170D6	是	否	nt	nt
	2	160E2	是	中等	是	是
	3	158C4	是	否	是	是
	4	157A2	是	否	是	是
	5	159B8	是	否	否	弱
	5	166G8	是	否	否	是
	5	169C1	是	否	否	弱
	6	157G8	是	中等	是	中等
[0448]	7	157B8	是	否	是	是
	8	158H4	是	中等	是	是
	8	205A5	是	中等	是	是
	11	165B8	是	中等	中等	中等
	19	169G4	是	否	是	是
	20	172C9	是	中等	是	是
	22	166D8	是	否	是	是
	基准	280.346.TSY	是	是	是	是

[0449] nt = 未测试

[0450] 实施例8:表位定位

[0451] 使用两种方法来鉴定和比较由 IL22R mAb 结合的表位:竞争性ELISA和FACS。

[0452] 8.1使用竞争性ELISA的表位定位

[0453] 通过竞争性ELISA将由抗体识别的表位相互比较。将代表每一个VH家族的至少一种mAb包被在Maxisorp板中。随后,在大量过量的mAb存在下添加生物素化的人类IL22R以进行测试。使用HRP缀合的链霉亲和素检测生物素化的IL22R与包被的抗体的结合。当没有检测到生物素化的IL22R时,意味着可溶性mAb阻止与包被的mAb结合,这确定这两种mAb结合相同的表位或具有重叠表位。通过使用Fab代替mAb来进一步细化表位定位。更小的Fab片段允许在某种程度上区别非常接近的表位。

[0454] 针对VH家族1-8、10、11、19以及22的抗体鉴定出多种表位。表位定位显示对于这样小的蛋白质(25kDa)来说非常广泛的表位覆盖。如图6中所示,根据所述抗体是(i)在体外阻断IL-22结合并且在基于细胞的测定中中和IL-22信号传导(左下象限);(ii)在体外阻断IL-22结合,但是没有中和活性(右上象限);还是(iii)在体外不阻断IL-22结合,但是在基于细胞的测定中具有中和活性(右下象限),将表位分组。发现六个重叠而可区分的表位是阻断性和中和性的(参见左下象限)并且在这六个表位中,两个(来自家族4和22的mAb)与基准抗体(280.346.TSY,参见专利申请W02011/061119)具有重叠表位。表位与基准不同,这是因为这些mAb(来自家族4和22)也能够与来自家族1、5、6以及7的所有mAb竞争,即使这些不能与基准抗体竞争。综上所述,这些数据表明了2个不同的表位组,一个由基准形成并且一个由来自家族1、5、6以及7的mAb形成;以及与这两组重叠的第三组(来自家族4和22的mAb)

(图6)。

[0455] 如图6的右上象限中所示,鉴定出3种抗体,其结合IL22R,但是在体内不阻断IL22结合或中和活性。这些抗体可能结合不参与配体结合或信号传导激活的IL22R区域并且可以用于单纯检测。图6的右下象限中所示的3种抗体是不寻常的,这是因为它们在体内中和IL22R活性,但是在体外不阻断IL22,这表明了新的功能性表位和出人意料的作用方式。

[0456] 8.2使用FACS分析的表位定位

[0457] Jones等(Structure 16(9):1333-1344(2008))报道了与IL22R1的细胞外结构域结合的IL-22的结构。在这篇论文中,作者证实了被称作D1和D2的两个IL22R结构域分别在位点1A和位点1B处与IL-22配体相互作用(参见图7)。IL22R-D1中参与与IL22的位点1A直接相互作用的两个关键残基是赖氨酸58(K58)和酪氨酸60(Y60)。IL22R-D2的色氨酸208(W208)直接参与与IL22的位点1B的相互作用(参见图7)。

[0458] 测试了IL22R抗体和基准抗体(280.346.TSY)与过表达各种IL22R突变体的BW细胞的结合。所述IL22R突变体具有已知参与IL-22/IL22R相互作用的氨基酸的突变。在这种设置中,将所述抗体进行生物素化,添加到细胞中并且通过流式细胞术(FACS)用标记的链霉亲和素检测抗体与IL22R的结合。表13汇总了所获得的结果。

[0459] 表13:抗体与表达IL22R突变体的细胞的结合

hIL-22R 突变体	VH 家族	A20 9D	W20 8A	T20 7A	K5 8A	Y6 0A	R11 2A	T8 9A	E9 0A	Q11 7A	D16 2A
IL22 结合 位点		1B	1B	1B	1A	1A	1A	1A	1A	1A/ B	1B
[0460] AMR22		+	+	+	X	X	X	+	+	+	+
280.346.TSY		+	+	+	X	X	+	+	+	+	+
198A1	5	X	+	+	+	+	+	+	+	+	+
166G8	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
197B7	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
196F8	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
[0461] 158H4	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
169G4	19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

[0462] +=结合;X=IL22R中的突变引起抗体结合的丧失。

[0463] FAC结果明确显示基准抗体280.346.TSY与D1结构域的残基(K58和Y60)相互作用。第二对照IL-22R抗体AMR22同样如此,尽管表位不是完全相同的,这是因为R112A突变影响AMR22结合。如根据显示某些美洲驼抗体不与280.346.TSY竞争的ELISA表位定位所预期的那样,所测试的其他抗体不受影响280.346.TSY与IL22R结合的突变的影响。这确认了所述抗体靶向另外的表位,可能包括D2结构域中的残基。实际上,IL22R的D2结构域中的A209D突变消除了198A1的结合,这确认了198A1和来自家族5的抗体结合IL22R的D2结构域(参见图7B)。

[0464] 惊人的是,与198A1共有完全相同的VH,但是具有不同的VL的抗体166G8不受A209D

突变的影响,这表明VL参与相互作用。据推测,166G8的VL允许位置209处存在大残基,而198A1的VL则不允许。这种假设由它们对恒河猴IL22R的结合特异性所确认。在恒河猴中,IL22R在位置209处具有丝氨酸。由于166G8允许在该位置处存在大氨基酸,因此它可以结合恒河猴IL22R,而198A1不能结合rhIL22R,这是因为它不允许大残基。

[0465] 实施例9:在基于细胞的测定中中和IL20和IL24信号传导

[0466] 测试了IL22R抗体阻断共表达IL22R和IL20Rb的细胞中IL-20和IL-24依赖性信号传导的能力。在IL-22、IL-20以及IL-24依赖性受体激活之间存在机制差异。认为IL-22通过首先结合IL22R,触发辅助受体IL10R2募集和三聚体复合物的激活来诱导信号传导。对于IL-20,认为该细胞因子首先结合辅助受体(IL20R2),之后募集IL22R和激活三聚体复合物。最终,对于IL-24,尚不清楚受体复合物是如何被募集和激活的,也不清楚IL-24结合的位置。

[0467] 9.1 IL-24信号传导

[0468] 使用几种细胞系来测试IL-24依赖性信号传导,即Baf3-hIL22R/20R2或Baf3-mIL22R/20R2。IL-24以如通过氨基己糖苷酶水平(用于对细胞进行计数的读数)所测量的显著窗口诱导这些细胞系的增殖,Baf3-hIL22R/20Rb细胞在OD 0.17至1.5的范围并且Baf3-mIL22R/20Rb细胞在0.15至0.8的范围。所测试的抗体都对IL-24诱导的增殖没有影响。这些结果表明IL-24通过结合与IL22和IL-20非常不同的位点而具有完全不同的IL22R激活方式,或者IL22R不参与所测试的细胞系中的IL-24信号传导(并且所述测定不能预测中和活性)。

[0469] 9.2 IL-20信号传导

[0470] Baf3-hIL22R/IL20Rb细胞系衍生自Baf3细胞系,但是共表达hIL22R和hIL20Rb,从而允许所述细胞在IL-20存在下增殖。中和hIL22R的抗体将阻断用IL-20刺激的细胞的增殖。测试美洲驼抗体以及280.346.TSY和AMR22基准抗体所产生的结果示于图8中。

[0471] 将Baf3-hIL22R/IL20Rb的IL-20增殖与BW-hIL22R的IL-22增殖测定平行测试,从而允许在这两种细胞因子之间进行良好的比较。最多三次独立实验的结果示于表14中。

[0472] 表14:抗体阻断经由IL22R的IL-22和IL-20信号传导的效力

	VH 家族	阻断 IL-22 的 IC50 (pM)	阻断 IL-20 的 IC50 (pM)
166G8	5	6-84	160-170
198A1	5cs	10-80	85-140
197B7	1	61-370	1,600-6,960
[0473] 157A2	4	131-540	184-545
218A7	4	360	nt
158H4	8	1600	nc
205A5	8cs	500-1,200	nc
AMR22	基准	715-5,000	470 (n=1)
280.346.TSY	基准	22-250	280-800

[0474] *在最多三次实验中观测到的范围(对于IL-20,是2250、2292、2301;并且对于IL-22,是2253、2292、2301、2428);nc:不竞争;nt:未测试;cs:链改组

[0475] 可以得出结论,来自1号、4号以及5号家族的所有抗体都能够阻断IL-20和IL-22这两者。难以比较IL-22刺激的增殖与IL-20刺激的增殖之间的效力,这是因为敏感性存在差异,这取决于细胞因子浓度、受体数量以及细胞内生物变异。然而,发现与阻断IL-20的信号传导相比,大部分的抗体在阻断IL-22信号传导方面更强效。令人关注的例外是157A2,它具有相同的阻断IL-22和IL-20的效力。

[0476] 实施例10:选择前导抗体和种系化

[0477] 通过轻链改组来进一步提高最令人关注的抗体(中和IL22信号传导)的亲合力。在轻链改组期间,将所选抗体的VHCH1与来自发现VHCH的相同美洲驼的轻链文库组合。然后进行几轮解离速率噬菌体展示选择以鉴定具有最好的亲和力的VHCH:VLCL对。在抗体166G8的情况下,发现了具有改进的结合动力学的几种克隆,包括198A1在内,但是令人遗憾的是,该克隆丧失了它的大部分恒河猴交叉反应性并且因此,166G8仍然是5号家族的最有吸引力的候选者以用于进行开发。在157A2(来自4号家族)的情况下,鉴定出几种Fab(例如218A7),其与157A2相比具有提高的亲合力。推进以下抗体以用于进一步开发。这些抗体是基于效力、物种交叉反应性以及表位或作用方式来选择的。

[0478] • 218A7(157A2的改进的变体,4号家族):发现该抗体针对IL-22和IL-20具有非常好的效力(亚nM),与非人类灵长类动物IL22R具有交叉反应性,但是与鼠类IL22R没有交叉反应性。发现157A2在IL22R上具有与280.346.TSY基准抗体不同但是重叠的表位。

[0479] • 166G8(5号家族):发现该抗体具有高效力(低pM)并且具有一些物种交叉反应性,这是因为它结合恒河猴IL22R(但是不结合食蟹猴IL22R,也不结合鼠类IL22R)。

[0480] 被推进的这些IL22R抗体的特征汇总于下表15中。

[0481] 表15:被选用于种系化的美洲驼IL22R抗体的特征

	VH 家族	交叉反应性				效力		相对效力 (IL-22 对比 IL-20)	表位 IL22R
		h	cyno	rh	m 小鼠	IL-22 (pM)	IL-20 (pM)		
[0482] 157A2	4	+++	+++	+++	-	131-570	184-545	1.09	D1/D2
218A7	4	+++	+++	+++	-	350-360	nd	-	D1/D2
166G8	5	+++	-	++	-	6-84	160-170	3.67	D2
280.346.TSY		+++	+++	+++	++ +	22-250	280-800	7.5	D1

[0483] h=人类;cyno=食蟹猴;rh=恒河猴;m=小鼠

[0484] 实施例11:IL-22R抗体218A7和166G8的种系化

[0485] 如国际专利申请号W02011/080350中所述进行种系化,该国际专利申请的内容整体并入本文。使CDR突变以去除潜在的翻译后修饰以及某些其他位置,所述位置被发现在来自相同的VH家族和VL家族的具有相同配对的抗体中不同。评估由美洲驼抗体218A7和166G8产生的种系化抗体的VH结构域和VL结构域与人类序列的同一性。还与基准抗体280.346.TSY进行比较。结果示于下表16中。

[0486] 表16:由218A7和166G8产生的种系化IL-22R抗体的人类同一性

[0487]

	克隆名称	VH 的同一性%	VL 的同一性%	VH+VL 的同一性%	对人类 IL-22R1 的解离速率*	对恒河猴 IL-22R1 的解离速率*
	166G8	88.5	84.8	86.7	1.22E-03	2.22E-02
22	224C7	93.1	93.7	93.4	4.19E-04	2.20E-02
6	224C6	94.3	93.7	94.0	4.34E-04	1.85E-02
21	224A6	93.1	93.7	93.4	4.41E-04	4.68E-03
14	224C4	92.0	94.9	93.5	4.50E-04	4.51E-03
16	224G10	92.0	94.9	93.5	4.71E-04	3.75E-03
15	224E8	92.0	94.9	93.5	4.81E-04	4.51E-03
1	223G5	93.1	97.4	95.3	5.29E-04	5.84E-03
20	223D3	93.1	93.7	93.4	5.73E-04	2.01E-03
2	223C4	94.3	96.2	95.3	5.74E-04	6.27E-03
11	223A6	90.8	96.2	93.5	5.79E-04	2.58E-03
13	223G1	92.0	94.9	93.5	5.96E-04	5.05E-03
8	226B9	95.4	92.4	93.9	7.14E-04	4.65E-03
3	225A5	93.1	96.2	94.7	1.14E-03	1.55E-02
5	227C5	93.1	94.9	94.0	1.25E-03	4.98E-03
17	227G10	92.0	94.9	93.5	1.25E-03	2.73E-03
19	225G7	92.0	94.9	93.5	1.29E-03	4.27E-03
18	225E5	92.0	94.9	93.5	1.35E-03	1.67E-03
12	225A4	90.8	96.2	93.5	1.42E-03	4.21E-03

[0488]

9	225A10	95.4	92.4	93.9	1.55E-0.3	1.07E-02
7	225D8	94.3	93.7	94.0	1.64E-0.3	5.11E-0.3
23	225G4	93.1	93.7	93.4	1.74E-0.3	3.75E-0.3
10	225C6	95.3	92.4	93.9	1.76E-0.3	2.63E-0.3
4	225B2	94.3	94.9	94.6	2.78E-0.3	4.55E-0.3
	218A7	95.4	91.1	95.4	8.10E-04	9.70E-04
13	230C9	100	96.2	98.1	3.52E-04	4.36E-04
10	230B7	98.9	97.5	98.2	3.77E-04	8.17E-04
19	229B4	98.9	96.2	97.6	3.81E-04	4.79E-04
1	230H2	100	98.7	99.4	4.01E-04	1.08E-0.3
18	228F9	97.7	97.5	97.6	4.01E-04	4.34E-04
14	228C9	100	96.2	98.1	4.08E-04	4.72E-04
12	232G6	100	96.2	98.1	4.14E-04	1.27E-0.3
11	232F5	100	96.2	98.1	4.24E-04	1.27E-0.3
5	231C11	98.9	97.5	98.2	4.30E-04	1.32E-0.3
6	231E12	98.9	97.5	98.2	4.35E-04	1.33E-0.3
3	228F3	97.7	98.7	98.2	4.39E-04	1.25E-0.3
2	230D5	98.9	98.7	98.8	4.45E-04	1.32E-0.3
4	231B11	98.9	97.5	98.2	4.55E-04	1.32E-0.3
8	229E6	98.9	97.5	98.2	4.59E-04	5.41E-04
20	229D9	100	94.9	97.5	4.69E-04	6.84E-04
16	229G1	97.7	97.5	97.6	4.77E-04	5.08E-0.3
7	231F12	98.9	97.5	98.2	5.30E-04	1.35E-0.3
17	228A4	97.7	97.5	97.6	5.95E-04	1.97E-0.3
15	231A8	97.7	97.5	97.6	1.48E-0.3	2.85E-0.3
9	229G2	98.9	97.5	98.2	1.86E-0.3	3.30E-0.3
	280.346.TS	88.5%	100%	94.3%	-	-
	Y					

[0489] *对于Fab片段所确定

[0490] 选择抗体230C9作为抗体218A7的种系化变体,并且选择抗体223G5作为抗体166G8的种系化变体。抗体218A7、230C9以及223G5的VH结构域序列和VL结构域序列示于下表17-表21中。(166G8的序列示于上表6-表9中。)

[0491]

表 17: 218A7、230C9 以及 223G5 的 VH 结构域的框架区和 CDR 序列

克隆	FR1	SEQ ID NO.	CD R1	SEQ ID NO.	FR2	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	FR3	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.	FR4	SEQ ID NO.
218A7	QVQLV ESGGG LVQPG GSLRLS CAASG FTFS	1	SYD MS	2	WVRQ APGK GLEW VS	3	SIYND GSNTA YSDS VKG	4	RFTISRDN A KNTLYLQ M NSLKSE D T A V Y Y C A K	5	VGFSG TYYSES	6	WGQG TQVT VSS	7
230C9	QVQLV ESGGG LVQPG GSLRLS CAASG FTFS	33	SYD MN	34	WVRQ APGK GLEW VS	35	SIYND ASNTA YSDS VKG	36	RFTISRDN SK NTLYLQ MNS LRAEDT AVY YCAK	37	VGFSG TYYSES	6	WGQG TLVTV SS	38
223G5	QVQLV ESGGG LVQPG GSLRLS CAASG FTFS	39	SYF MS	9	WVRQ APGK GPEW VS	40	GIHIS GGITY YTDS VKG	41	RFTISRDN A KNTLYLQ M NSLRAE D T A V Y Y C V T	42	PPGPK AHYNG AKY	43	WGKG TLVTV SS	44

表 18: 218A7、230C9 以及 223G5 的 VL 结构域的框架区和 CDR 序列

克隆	FR1	SEQ ID NO.	CD R1	SEQ ID NO.	FR2	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	FR3	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.	FR4	SEQ ID NO.
218A7	LPVLTQ PSAVSV SLGQT	45	QG GYY AH	16	WYQQ KPGQ APVL	46	GQNN RPS	47	NTATLTIS GA QAEDEAE YY C	48	QSGSSS ANAV	20	FGGG TKLTV L	49

[0492]

	ARITC	50	QG GYY AH	16	VYQ KPGQ APVL VIY	51	GQNN RPS	47	NTATLTISRA QAEDEADY YC	53	QSGSS SNAV	54	FGGG TKLTV L	55
230C9	SYELTQ PSSSVV ALGQT ARITC													
223G5	QSALT QPPSVS GSPGQ SVTISC	56	TGT SSD IGS YN YVS	57	WYQQ LPGK APKLL IY	58	EVNK RSS	59	NTASLTISGL QAEDEADY YC	60	ASYRLY ADYV	27	FGGG TQLTV L	61

表 19: 218A7、230C9、223G5 的可变结构域序列

克隆	VH	SEQ ID NO.	VL	SEQ ID NO.
218A7	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLAAASGFTFSSYD MSWVRQAPGKGLEWVSSIYNDGNTAYSDSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYC AKVGFSGTYYSSESWGQGTQVTVSS	29	LPVLTQPSAVSVSLGQTARITCQGGYYAHW YQKPGQAPVLVIYQNNRPSGIPERFSGS GAGNTATLTISGAQAEDEAEYCYCQSGSSA NAVFGGGTKLTVL	62
230C9	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLAAASGFTFSSYD MNWVRQAPGKGLEWVSSIYNDASNTAYSDSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKVGFSGTYYSSESWGQGTQVTVSS	63	SYELTQPSVSVVALGQTARITCQGGYYAHW YQKPGQAPVLVIYQNNRPSGIPERFSGS GAGNTATLTISRAQAEDEADYCYCQSGSSS NAVFGGGTKLTVL	64
223G5	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLAAASGFTFSSYF MSWVRQAPGKGPVWVSGIHISGITYYTDVSK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCV TPPGPKAHYNGAKYWGKGLTVTVSS	65	QSALTQPPSVSGSPGQSVTISCTGTSSDIGSY NYVSWYQQLPGKAPKLLIYEVNKRSSGVP DRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYCYCA SYRLYADYVFGGGTQLTVL	66

[0493]

表 20: 230C9 和 223G5 的重链和轻链序列

克隆	重链	SEQ ID NO.	轻链	SEQ ID NO.
230C9	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYF MNWVRQAPGKGLEWVSSIYNDASNTAYSDSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKVGFSGTYYESWGGGTLVTVSS ASTKGPSVFLPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKQVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSP GK</p>	67	<p>SYELTQPSSVSVALGQTARITCQGGYYAHW YQKPGQAPVVLVIYQNNRPSGIPERFSGS GAGNTALTISRQAQAEDEADYYCQSGSSSS NAVFGGGTKLTVL GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSQCQVT HEGSTVEKTVAPTECS</p>	68
223G5	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYF MSWVRQAPGKGP EWVSGIHISGGITYYTD SVK GRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCV TTPGPFKAHYNGAKYWGKGTLVTVSS ASTKGPSVFLPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKQVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREP</p>	69	<p>QSALTPPSVSGSPGQSVTISCTGTSSDIGSY NYVSWYQQLPGKAPKLLIYEVNKRSSGVP DRFSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCA SYRLYADYVFGGGTQLTVL GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSQCQVT HEGSTVEKTVAPTECS</p>	70

[0494]

	QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDSGSFYLYSKLTVD KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK			
序列的阴影部分表示重链和轻链的恒定区。重链恒定区中以粗体示出的“Q”残基表示从“N”的突变。				
表 21: 编码 218A7、230C9 以及 223G5 的可变结构域序列/重链和轻链序列的多核苷酸序列				
克隆	VH 结构域	SEQ ID NO.	VL 结构域	SEQ ID NO.
218A7	CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCT TGGTGCAGCCTGGGGTTCTCTGAGACTCTC CTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCT ACGACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGG GAAGGGCTGGAGTGGGTGCCAGTATTATA ATGACGGTAGTAAACACAGCCTATCAGACTCC GTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA ACGCCAAGAACACGTTGTATCTGCAAATGAA CAGCTTGAATCTGAGGACACGGCCGTGTATT ACTGTGCAAAAGTTGGCTTTAGTGGTACTTAC TACAGTGAATCATGGGGCCAGGGGACCCAGG TCACCCGTCTCTCA	76	CTGCCGTGCTGACTCAGCCCTCCGCGGT GTCCGTGCTTTGGGACAGACGGCCAGG ATCACCTGCCAAGGGGCTATTATGCTCA CTGGTACCAGCAGAAAGCCAGGCCAGGCC CCTGTGCTGGTCACTATGGACAGATAAT AGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGCTTCTC TGGTCCGGCGCTGGGAACACAGCCACC CTGACCATCAGCGGGGCCAGGCTGAGG ACGAGGCTGAGTATTACTGTCAAGTCAGGA AGCAGTAGTGCTAATGCTGTGTTCCGGCG AGGGACCAAGCTGACCCGCTCTC	77
230C9	CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCT TGGTGCAGCCTGGGGTTCTCTGAGACTCTC CTGTGCTGCCCTGGATTACCTTCAGTAGCT ACGACATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG GAAGGGCTGGAAGTGGGTGCCAGCATTTAT AACGACGCCAGTAAACACAGCCTATTACAGACT CCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA	78	TCCTACGAACTGACTCAGCCCTCCTCGGT GTCCGTGGCGTTGGGACAGACGGCCAGG ATCACCTGCCAAGGAGGCTATTATGCACA CTGGTACCAGCAGAAAGCCAGGCCAGGCC CCTGTGCTGGTCACTATGGACAGATAAT AGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGCTTCTC TGGCTCCGGCGCTGGGAACACAGCCACC	79

[0495]

	<p>CAACTCAAAGAACACGTTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTGT ATTACTGTCCGAAAGTTGGCTTTAGTGGTACT TACTACAGTGAATCATGGGGCCAGGGGACCC TCGTCACTGTCTCCTCA</p>		
<p>223G5</p>	<p>CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGGCGGCT TGGTGCAGCCTGGGATTCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTCACTCAGTAGCTA TTTCATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGA AAGGGCCCGAGTGGTCTCAGGTATTCATAT TAGTGTGGTATTACATACTACACGGACTCCG TGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA CGCAAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC AGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCCCGTGTATT ATTGTGTAACACCCCGGCCCTTTAAGGCC CATTACAATGGCGGGAAGTACTGGGGCAAAG GGACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA</p>	<p>80</p>	<p>81</p>
		<p>CTGACAAATCAGCCGCGCCAGGCTGAGG ACGAGGCTGACTAATTACTGTCAAGTCAAGGA AGCAGTAGTTCTAATGCTGTGTTCCGGCGG AGGGACCAAGCTGACCCGTCCCTC</p>	<p>CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCCCTCCGT GTCTGGATCTCCTGGACAGTCTGTCAACCA TCTCCTGCACTGGAACCAAGTAGTGACATT GGTCTCTATAACTATGTCTCCTGGTATCAA CAGTCCCAAGGAAAGGCCCCCAAACTCC TGATCTATGAGGTCAACAAGCGATCCTCA GGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAA GTCAGGCAACACGGCTCCCTGACCATCT CTGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGA TTATTAAGTGTGCCTCATATAGACTGTACGC CGATTATGTGTTCCGGCGGAGGGACCCCAAC TGACCCGTCCCTC</p>

[0496] 实施例12:种系化抗体230C9和223G5的表征

[0497] 12.1种系化mAb的结合亲和力

[0498] 使用SPR (Biacore 300) 测量230C9抗体和223G5抗体的亲和力。简单地说,使用标准方法将250RU的人类IL22R (Biotechne公司,2770-LR) 包被到CM5芯片上(以在乙酸盐缓冲液(pH 4.5)中2 μ g/ml的浓度的IL22R进行EDC偶联)。然后,将各种浓度的抗体在HBSEP+缓冲液(pH 7.4)中注射2分钟。在10分钟洗涤(HBSEP+)期间也监测结合。

[0499] 使用BIAevaluation软件使用朗缪尔1:1拟合计算的亲和力示于下表22中。

[0500] 表22:种系化抗体的结合亲和力

[0501]		ka (1/MS)	kd (1/s)	KD (M)
	223G5	6.6E+06	1.0E-04	1.6E-11
	224C4	9.3E+06	9.8E-05	1.1E-11
	230C9	6.8E+05	8.9E-05	1.3E-10
	280.346.TSY	4.9E+05	3.4E-04	6.9E-10

[0502] 抗体223G5和224C4(这两者都是166G8的种系化变体)对IL-22R显示出非常高的亲和力(10pM-20pM),而抗体230C9具有0.13nM的亲和力。所有种系化抗体都显示出高于参考抗体280.346.TSY(0.69nM)的亲和力。

[0503] 由于在亲和力测量期间使用二价分子作为配体时观测到潜在的亲合力效应,因此测试了反向实验设置。在该设置中,使用标准方法将抗体包被到250RU。以不同的浓度添加单体人类IL22R,并且使用BIAevaluation软件使用朗缪尔1:1拟合计算的亲和力示于下表23中。

[0504] 表23:230C9对人类IL-22R的结合亲和力

[0505]		ka (1/MS)	kd (1/s)	KD (M)	
	230C9	hIL22R	9.2E+05	2.2E-04	2.2E-10

[0506] 令人遗憾的是,抗体223G5由于包被过程而失活,并且使用该设置无法确定亲和力。

[0507] 230C9的亲和力是一直与亲和力测量的设置无关,这表明在这两种条件下使用的低包被足以减少任何亲合力效应。

[0508] 12.2 IL-22和IL-20依赖性IL-22R1激活和信号传导的抑制

[0509] 测试了抗体218A7(未种系化)和230C9(种系化的等同物)以及其他种系化抗体中和IL-22和IL-20介导的经由IL-22R1的信号传导的能力。使用实施例6和实施例9中所述的基于细胞的增殖测定进行测试。

[0510] 图9A显示了218A7和230C9中和IL-22依赖性IL-22R1激活的能力。图9B显示了不同批次的230C9中和IL-20依赖性IL-22R1激活的能力。所测试的抗体的相对效力示于下表24和表25中。

[0511] 表24:218A7抗体和230C9抗体阻断经由IL22R的IL-22信号传导的效力(BWhIL22R细胞系)

	阻断 IL-22 的 IC50 (nM)	相对于 280.346.TSY 的相对效力
[0512] 218A7	0.28	2.5
230C9	0.56	1.2
230D5	0.62	1.1
230H2	0.66	1.0
280.346.TSY	0.69	1
230B7	0.73	0.95

[0513] 表24:230C9抗体阻断经由IL22R的IL-20信号传导的效力(Baf3hIL22R/IL20Rb细胞系)

	阻断 IL-20 的 IC50 (nM)	相对于 280.346.TSY 的相对效力
[0514] 280.346.TSY	1.487	
230C9-N297Q (1号)*	0.7807	1.9
230C9-N297Q (2号)*	0.5671	2.6

[0515] *不同纯化批次的230C9抗体

[0516] 12.3验证性表位定位

[0517] 如实施例8.2中所述,使用FACS分析进行种系化抗体230C9和223G5的验证性表位定位。发现抗体230C9与基准抗体280.346.TSY以及223G5竞争结合IL-22R1。抗体223G5不与基准抗体280.346.TSY竞争结合IL-22R1。

[0518] 将FACS分析的结果与上述增殖测定的结果组合并且关于表位的结论示于图10中。如所示,可以得出结论:(i)抗体230C9结合与由280.346.TSY结合的表位相比不同但是重叠的表位;以及(ii)抗体223G5结合与280.346.TSY不同的表位。

[0519] 还如实施例8.2中所述进行FACS分析以研究种系化的抗体与各种IL-22R突变体的结合。结果示于下表26中。

[0520] 表26:抗体与表达IL22R突变体的细胞的结合

BW-hIL-22R突变体	A209D	W208A	Y60A	R112A
280.346.TSY	+	+	X	X
230C9	+	+	+	+/X
223G5	X	+	+	+

[0522] +/- = 部分识别具有R112A的突变体

[0523] 这些结果确认了抗体230C9和223G5与不包括Y60的表位结合。发现突变A209D影响

223G5的结合,而美洲驼抗体166G8的结合不受该变化的影响。这可能可归因于难以检测166G8对A209D突变的敏感性(166G8仅测试一次),并且可能可归因于在166G8的种系化期间CDR序列的轻微变化。这些数据确认了280.346.TSY结合IL22R的D1,223G5结合IL22R的D2并且230C9具有重叠但是不同的表位。

[0524] 12.4种系化抗体的物种交叉反应性

[0525] 抗体230C9结合人类IL-22R,但是对来自小鼠、大鼠以及兔的IL-22R不表现出交叉反应性。这与230C9是一致的,所述230C9与基准抗体280.346.TSY相比具有不同的表位,参见上述12.3。

[0526] 通过制备与人类跨膜(TM)和人类细胞内结构域(ID)融合的来自不同物种的IL22R细胞外结构域(ECD)的嵌合构建体来测试抗体结合在细胞上表达后的食蟹猴IL22R的能力。尽管瞬时转染的效率不大,但是FACS分析显示230C9-N297Q抗体与食蟹猴IL22R_ECD-人类TM_人类ICD结合,但是223G5-N297Q不与其结合,如通过FACS图上更宽的峰的存在所观测到(参见图11,箭头指示更宽的峰)。

[0527] 此外,当还将嵌合构建体与STAT3报告基因一起共转染到HEK细胞中时,可以在存在或不存在中和抗体的情况下测量在添加人类IL22之后IL22R的活性。下表27中所示的结果显示所有所测试的抗体都能够中和人类IL22R并且只有灵长类动物交叉反应性的(230C9和280.346.TSY)能够结合食蟹猴和恒河猴嵌合体并且阻断食蟹猴和恒河猴嵌合体的活性,这表明这些抗体在灵长类动物研究中将是功能性的。

[0528] 表27:IL-22R抗体与人类、恒河猴以及食蟹猴IL-22R的交叉反应性

	EC50 (nM) 人类 ECD	EC50 (nM) 恒河猴 ECD	EC50 (nM) 食蟹猴 ECD
[0529] 224C4	0.30	无作用	无作用
230C9	0.28	0.48	0.57
280.346.TSY	0.26	0.43	0.16

[0530] 12.5免疫原性分析

[0531] 使用预测工具评估种系化抗体的免疫原性。具体来说,使用龙沙公司的Epibase™平台(DRB-1分数),使用“HLA II类-白种人v3.0”设置来评估可变结构域中潜在免疫原性肽的存在。该平台分析源自于VH序列和VL序列的所有10聚体肽的HLA结合特异性。在同种异型水平上对15种DRB1、6种DRB3/4/5、12种DQ和7种DP,即总共40种HLA II类受体进行谱分析。鉴定出DRB1、DRB3/4/5的强结合剂和中等结合剂以及DQ表位和DP表位的强结合剂。分别对强和中等亲和力DRB1结合剂进行表位计数。结合同一组的多种同种异型的肽被计为一个。表示最差情况免疫原性风险的近似分数如下计算:分数 = Σ (表位计数 × 同种异型出现率)。换句话说,影响特定HLA同种异型的表位数量乘以受影响的同种异型的等位基因出现率。对于给定序列,对于所述研究中所用的所有DRB1同种异型,对乘积求和,所述DRB1同种异型存在于2%或更多的白种人群中。

[0532] 结果示于下表28中。

[0533] 表28:与各种其他市售抗体相比种系化的IL-22R抗体的DRB1分数

[0534]	DRB1 分数(VH+VL)	来源
	230C9	种系化的美洲驼
	223G5	种系化的美洲驼
	阿达木单抗 (Adalimumab)	人类(噬菌体展示)
	曲妥珠单抗 (Trastuzumab)(赫赛汀 (Herceptin))	人源化
	帕利珠单抗 (Palivizumab)(西那吉 斯(Synagis))	人源化
[0535]	度匹鲁单抗 (Dupilumab)	人类(Velocimmune)
	阿仑单抗 (Alemtuzumab)(坎帕 斯(Campath))	人源化
	利妥昔单抗 (Rituximab)(美罗华 (Rituxan))	嵌合
	英夫利昔单抗 (Infliximab)(类克 (Remicade))	嵌合
	小鼠抗体	小鼠

[0536] 如可以从表28中看到是, 抗体230C9具有远低于其他市售抗体的非常低的DRB1分数, 而223G5具有与其他可商购获得的人类抗体或人源化抗体相当的低DRB1分数。这些数据表明230C9(和223G5)将具有优选的免疫原性谱。

[0537] 实施例13: 抗体230C9-N297Q在食蟹猴中的药物代谢动力学(PK)研究

[0538] 进行抗体克隆230C9的药物代谢动力学分析。向两只食蟹猴静脉内注射单次10mg/kg剂量的抗体, 持续2小时。在不同的时间点采集样品并且通过ELISA测试mAb的血浆浓度。确切地说, 在4°C将微量滴定板(Maxisorb, Nunc公司)用PBS中2µg/ml的重组hIL22R(Biotechne公司; 目录号2770-LR)包被过夜。将板用PBS-Tween洗涤3次并且用250µl PBS-1%酪蛋白封闭2小时。在用PBS-Tween洗涤3次之后, 施加样品。所有的稀释都是在1%汇集血浆(这是来自3只首次接受实验的食蟹猴的池)中进行的。使样品在室温下结合2小时。然后将板用PBS-Tween洗涤5次并且以50,000倍稀释度施加与HRP偶联的山羊生物素化的抗人类IgG重链和轻链猴吸附多克隆抗体(Bethyl公司, 目录号:A80-319P)并且允许在室温下结合1小时。然后将板用PBS-Tween洗涤5次并且添加s(HS) TMB弱化剂(SDT公司, 编号sTMB-W)。使染色进行10分钟, 然后用1N H₂SO₄停止, 之后在450nm测量光密度。将样品分析3次并且将230C9-N297Q(来自向动物注射的同一批次)用于标准曲线。

[0539] 用于2隔室静脉内输注模型分析的相关PK参数示于表29中。230C9-N297Q抗体的药

物代谢动力学特征以图表方式示于图12中(所示的结果是两只猴的平均结果)。该数据明确显示所述抗体具有长的平均停留时间(MRT)。有趣的是,尽管所述抗体含有非糖基化的IgG1Fc区而没有任何修饰以延长半衰期,但是230C9-N297Q的半衰期是惊人地长的。确切地说,230C9-N297Q具有约19.4天的半衰期。因此,本发明的抗体的半衰期延长似乎归因于Fab区的特性。

[0540] 表29:PK参数

[0541]	T1/2	MRT	V1	V2	CL	K21	C最大	第30天时的C
	19.4天	26.2天	45ml/kg	68ml/kg	4.3毫升/天	0.35	216 μ g/ml	约26 μ g/ml

[0542] 在食蟹猴中,通过向总共10只猴施用单次静脉内剂量(0.1mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg以及30mg/kg)的230C9-N297Q来进行另一PK研究。在食蟹猴中的动力学显示出两隔室非线性动力学。在低于10mg/kg的剂量,清除率(CL)随着剂量降低而增加,从而引起随着剂量降低,暴露量(AUC)发生大于剂量比例减少。这是单克隆抗体的公知现象(参见表30和图13)。

[0543] 表30:基于2只猴/每次剂量和5个剂量组的PK参数

	参数	估计值	单位	Stderr	CV%
	tvV	39.7	mL/kg	2.77	7.0
[0544]	tvCl	3.60	毫升/(公斤 \times 天)	0.38	10.5
	tvV2	27.7	mL/kg	5.40	19.5
	tvCl2	42.1	毫升/(公斤 \times 天)	24.3	57.8
[0545]	tvV 最大	24.9	微克/(公斤 \times 天)	7.41	29.8
	tvKm	1.0	μ g/mL	0.01	9.96

[0546] 将这些参数按比例缩放以预测人类药物代谢动力学产生了类似于可以基于经验主义从其他人类IgG1分子的发现所预期的人类谱,包括约18天的人类半衰期(T1/2)的点估计值,这与上文所报道的先前研究相一致。

[0547] 实施例14:抗体230C9 N297Q在食蟹猴中的药效动力学(PD)效应

[0548] 在食蟹猴中通过向猴施用不同剂量(0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg、30mg/kg)的230C9的静脉内注射来分析抗体230C9 N297Q(ARGX-112)的药效动力学效应。还用咪喹莫特(imiquimod,IMQ)处理猴的皮肤切片以评估230C9N297Q对皮肤炎症的作用。IMQ已经被报道在小鼠中诱发皮肤炎症(Van Belle等,2012,J Immunol.1月1日;188(1):462-9),并且一篇报道还证实了在非人类灵长类动物中(Poirier等,2016,Exp Dermatol.3月;25(3):233-4;Poirier等,2016,J Immunol.1月1日;196(1):274-83)和在人类中(Vinter等,2015,Br J Dermatol.2月;172(2):345-53)有相似的作用。

[0549] 在IMQ处理5天后,从皮肤的非IMQ处理区和皮肤的IMQ处理区获取活检以评估230C9N297Q对IMQ诱导的作用的影响。通过比较表皮厚度和表皮中增殖核的出现率(Ki67出现率)来评估作用,并且结果示于图14中。增加抗体230C9N297Q的剂量能够使表皮厚度正常化(图14A)并且降低Ki67阳性核的出现率(图14B)。EC₅₀是约3mg/kg。

[0550] 实施例15:在食蟹猴中单次静脉内输注230C9 N297Q之后的血清PK和皮肤外植体PD响应关系

[0551] 在接受抗体230C9N297Q的单次15分钟静脉内输注(5ml/kg)施用的食蟹猴中研究皮肤靶标接合。在测试第1天,将雌猴保持未处理或暴露于1mg/kg、5mg/kg或30mg/kg的230C9(每组3只动物)。在不同的时间点从所有的给药动物收集血液($3 \times 150\mu\text{L}$),在第7天抽取最后一个样品。通过ELISA测试血清样品(1%v/v)的230C9N297Q暴露水平。

[0552] 在第-1天(给药前)和第7天从每一只动物对皮肤钻取活检(3mm)进行采样并且在37°C在加湿空气/ CO_2 (95%/5%)中在存在(第-1天、第7天)或不存在(第7天)rhIL-22的情况下孵育24小时,之后通过qPCR测量FLG2mRNA水平。结果示于图15中。

[0553] rhIL22的刺激使得总皮肤FLG2 mRNA水平降低到1/5。在230C9 N297Q处理的动物中IL-22介导的FLG2转录物阻遏显著恢复,这表明在所有剂量组中显著的皮肤暴露。

[0554] 实施例16:230C9 N297Q在活的人类和食蟹猴离体皮肤外植体中的作用

[0555] 使用来自健康人类供体的新鲜来源的腹部皮肤来评估抗体230C9N297Q抑制rhIL-22诱导的DEFB4 mRNA水平的能力。

[0556] 将皮肤钻取活检(3mm)以直立位置放置在96孔组织板中并且在补充有不含氢化可的松(hydrocortisone)的人类角质细胞生长补充剂(HKGS)(英杰公司(Invitrogen))的100 μL EpiLife培养基中在空气液体界面中培养。

[0557] 在37°C在加湿空气/ CO_2 (95%/5%)中将样品与递增浓度的抗体230C9 N297Q一起孵育24小时,之后在37°C用20ng/ml的rhIL-22(R&D系统公司)再刺激24小时。通过实时定量PCR(qPCR)使用验证的基因表达测定(应用生物系统公司(Applied Biosystems))和ABI PRISM[®] 7900HT序列检测系统来确定皮肤裂解物中的相对DEFB4基因表达水平。

[0558] 图16显示了来自一次代表性实验的rhIL-22诱导的DEFB4 mRNA水平的剂量依赖性降低($\text{EC}_{50}[\text{CI } 95\%] = 4\text{nM}[0.5\text{nM}-29\text{nM}]$;4个供体)。如果将230C9N297Q预孵育时间延长到48小时,那么获得相似的效力,这表明已经达到IL-22RA结合平衡。同种型对照抗体对rhIL-22介导的DEFB4 mRNA水平增加没有影响。

[0559] 在来自食蟹猴(Macaca Fascicularis)的新鲜分离的皮肤活检(3mm)中,DEFB4基因不受rhIL-22调节。相反,使用与对于人类皮肤外植体设置所述相同的方案,在与rhIL-22一起孵育24小时之后FLG2和LOR这两者都下调。与抗体230C9N297Q一起预孵育24小时完全阻断了这些响应($\text{EC}_{50} = 11\text{nM}$;这两种基因),如图17中所示。

[0560] 实施例17:230C9 N297Q在人类角质细胞中的功效

[0561] 所述测定被设计成测试IL-22R抗体在功能测定中在原代人类角质细胞中的效力。将细胞用IL-4、IL-13、IL-22(全部都是10ng/mL)和IFN- γ (1ng/mL)的细胞因子混合物刺激48小时,然后使用MSD平台在培养上清液中测量CCL2水平。

[0562] 将角质细胞悬浮在EpiLife培养基(生命科技公司(Life Technologies))中,所述培养基添加有以下生长补充剂:EGF;BPE;胰岛素;转铁蛋白以及庆大霉素(Gentamicin)/两性霉素(Amphotericin)。将细胞接种到384孔白色代用板(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))中并且在37°C、5% CO_2 /95%空气下孵育2小时。然后用80n1抗体(以如图18中所示的不同浓度)或媒介物处理细胞。然后,添加40 μl 刺激混合物(IL-4、IL-13、IL-22(R&D系统公司,最终浓度都是10ng/mL)和IFN- γ (R&D系统公司,最终浓度:1ng/mL))并且将板在37

℃、5%CO₂/95%空气下孵育2天。用IL-4和IL-13(都是10ng/mL)和IFN-γ(1ng/mL)的混合物处理对照孔并且定义了对IL-22信号传导的100%抑制。使用MSD CCL2试剂盒(Mesoscale公司,目录号K151AYB-2)测量培养上清液中CCL2的浓度。通过PrestoBlue®试剂测量细胞的活力。

[0563] 在5次实验中测试了230C9N297Q的效力并且显示出对CCL2水平的剂量依赖性抑制,EC₅₀值是0.10nM[0.042nM-0.24nM]。来自一次实验的代表性实验结果示于图18中。

[0564] 本发明的范围不受本文所述的具体实施方案的限制。实际上,除了本文所述的修改之外,根据上述说明和附图,对本发明的各种修改对于本领域技术人员来说将变得显而易见。这些修改意图落入所附权利要求的范围内。此外,本文所述的所有实施方案都被认为是广泛适用的并且在适当时可与任何和所有其他一致的实施方案组合。

[0042] <212> PRT
 [0043] <213> 大羊驼
 [0044] <400> 5
 [0045] Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 [0046] 1 5 10 15
 [0047] Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 [0048] 20 25 30
 [0049] <210> 6
 [0050] <211> 11
 [0051] <212> PRT
 [0052] <213> 大羊驼
 [0053] <400> 6
 [0054] Val Gly Phe Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser Glu Ser
 [0055] 1 5 10
 [0056] <210> 7
 [0057] <211> 11
 [0058] <212> PRT
 [0059] <213> 大羊驼
 [0060] <400> 7
 [0061] Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0062] 1 5 10
 [0063] <210> 8
 [0064] <211> 30
 [0065] <212> PRT
 [0066] <213> 大羊驼
 [0067] <400> 8
 [0068] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asp
 [0069] 1 5 10 15
 [0070] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly
 [0071] 20 25 30
 [0072] <210> 9
 [0073] <211> 5
 [0074] <212> PRT
 [0075] <213> 大羊驼
 [0076] <400> 9
 [0077] Ser Tyr Phe Met Ser
 [0078] 1 5
 [0079] <210> 10
 [0080] <211> 14
 [0081] <212> PRT
 [0082] <213> 大羊驼
 [0083] <400> 10

[0126] <210> 16
 [0127] <211> 7
 [0128] <212> PRT
 [0129] <213> 大羊驼
 [0130] <400> 16
 [0131] Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala His
 [0132] 1 5
 [0133] <210> 17
 [0134] <211> 15
 [0135] <212> PRT
 [0136] <213> 大羊驼
 [0137] <400> 17
 [0138] Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 [0139] 1 5 10 15
 [0140] <210> 18
 [0141] <211> 7
 [0142] <212> PRT
 [0143] <213> 大羊驼
 [0144] <400> 18
 [0145] Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser
 [0146] 1 5
 [0147] <210> 19
 [0148] <211> 20
 [0149] <212> PRT
 [0150] <213> 大羊驼
 [0151] <400> 19
 [0152] Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala
 [0153] 1 5 10 15
 [0154] Glu Tyr Tyr Cys
 [0155] 20
 [0156] <210> 20
 [0157] <211> 10
 [0158] <212> PRT
 [0159] <213> 大羊驼
 [0160] <400> 20
 [0161] Gln Ser Gly Ser Ser Ser Ala Asn Ala Val
 [0162] 1 5 10
 [0163] <210> 21
 [0164] <211> 10
 [0165] <212> PRT
 [0166] <213> 大羊驼
 [0167] <400> 21

[0168] Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
 [0169] 1 5 10
 [0170] <210> 22
 [0171] <211> 22
 [0172] <212> PRT
 [0173] <213> 大羊驼
 [0174] <400> 22
 [0175] Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Leu Gly Lys
 [0176] 1 5 10 15
 [0177] Thr Val Thr Ile Ser Cys
 [0178] 20
 [0179] <210> 23
 [0180] <211> 14
 [0181] <212> PRT
 [0182] <213> 大羊驼
 [0183] <400> 23
 [0184] Thr Gly Thr Ser Arg Asp Ile Gly Asp Tyr Asn Tyr Val Ser
 [0185] 1 5 10
 [0186] <210> 24
 [0187] <211> 15
 [0188] <212> PRT
 [0189] <213> 大羊驼
 [0190] <400> 24
 [0191] Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Leu Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 [0192] 1 5 10 15
 [0193] <210> 25
 [0194] <211> 7
 [0195] <212> PRT
 [0196] <213> 大羊驼
 [0197] <400> 25
 [0198] Lys Val Asn Thr Arg Ser Ser
 [0199] 1 5
 [0200] <210> 26
 [0201] <211> 20
 [0202] <212> PRT
 [0203] <213> 大羊驼
 [0204] <400> 26
 [0205] Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala
 [0206] 1 5 10 15
 [0207] Asp Tyr Tyr Cys
 [0208] 20
 [0209] <210> 27

[0210] <211> 10
 [0211] <212> PRT
 [0212] <213> 大羊驼
 [0213] <400> 27
 [0214] Ala Ser Tyr Arg Leu Tyr Ala Asp Tyr Val
 [0215] 1 5 10
 [0216] <210> 28
 [0217] <211> 10
 [0218] <212> PRT
 [0219] <213> 大羊驼
 [0220] <400> 28
 [0221] Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
 [0222] 1 5 10
 [0223] <210> 29
 [0224] <211> 120
 [0225] <212> PRT
 [0226] <213> 大羊驼
 [0227] <400> 29
 [0228] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0229] 1 5 10 15
 [0230] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 [0231] 20 25 30
 [0232] Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0233] 35 40 45
 [0234] Ser Ser Ile Tyr Asn Asp Gly Ser Asn Thr Ala Tyr Ser Asp Ser Val
 [0235] 50 55 60
 [0236] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0237] 65 70 75 80
 [0238] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0239] 85 90 95
 [0240] Ala Lys Val Gly Phe Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser Glu Ser Trp Gly Gln
 [0241] 100 105 110
 [0242] Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0243] 115 120
 [0244] <210> 30
 [0245] <211> 103
 [0246] <212> PRT
 [0247] <213> 大羊驼
 [0248] <400> 30
 [0249] Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Ser Ala Val Ser Val Ser Leu Gly Gln
 [0250] 1 5 10 15
 [0251] Thr Ala Lys Ile Thr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala His Trp Tyr Gln

[0252]	20	25	30
[0253]	Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Asn Asn Asn		
[0254]	35	40	45
[0255]	Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn		
[0256]	50	55	60
[0257]	Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu		
[0258]	65	70	75
[0259]	Tyr Tyr Cys Gln Ser Gly Ser Ser Ser Ala Asn Ala Val Phe Gly Gly		
[0260]	85	90	95
[0261]	Gly Thr His Leu Thr Val Leu		
[0262]	100		
[0263]	<210> 31		
[0264]	<211> 123		
[0265]	<212> PRT		
[0266]	<213> 大羊驼		
[0267]	<400> 31		
[0268]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asp		
[0269]	1	5	10
[0270]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser Tyr		
[0271]	20	25	30
[0272]	Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val		
[0273]	35	40	45
[0274]	Ser Gly Ile His Ile Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val		
[0275]	50	55	60
[0276]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0277]	65	70	75
[0278]	Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0279]	85	90	95
[0280]	Val Thr Pro Pro Gly Pro Phe Lys Ala His Tyr Asn Gly Met Lys Tyr		
[0281]	100	105	110
[0282]	Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0283]	115	120	
[0284]	<210> 32		
[0285]	<211> 110		
[0286]	<212> PRT		
[0287]	<213> 大羊驼		
[0288]	<400> 32		
[0289]	Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Leu Gly Lys		
[0290]	1	5	10
[0291]	Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Arg Asp Ile Gly Asp Tyr		
[0292]	20	25	30
[0293]	Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Leu Ala Pro Lys Leu		

[0336]	1	5	10	15
[0337]	Gly			
[0338]	<210> 37			
[0339]	<211> 32			
[0340]	<212> PRT			
[0341]	<213> 人工序列			
[0342]	<220>			
[0343]	<223> 种系化的抗体序列			
[0344]	<400> 37			
[0345]	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln			
[0346]	1	5	10	15
[0347]	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys			
[0348]		20	25	30
[0349]	<210> 38			
[0350]	<211> 11			
[0351]	<212> PRT			
[0352]	<213> 人工序列			
[0353]	<220>			
[0354]	<223> 种系化的抗体序列			
[0355]	<400> 38			
[0356]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0357]	1	5	10	
[0358]	<210> 39			
[0359]	<211> 30			
[0360]	<212> PRT			
[0361]	<213> 大羊驼			
[0362]	<400> 39			
[0363]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[0364]	1	5	10	15
[0365]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser			
[0366]		20	25	30
[0367]	<210> 40			
[0368]	<211> 14			
[0369]	<212> PRT			
[0370]	<213> 大羊驼			
[0371]	<400> 40			
[0372]	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ser			
[0373]	1	5	10	
[0374]	<210> 41			
[0375]	<211> 17			
[0376]	<212> PRT			
[0377]	<213> 人工序列			

[0420]	<210>	46		
[0421]	<211>	15		
[0422]	<212>	PRT		
[0423]	<213>	大羊驼		
[0424]	<400>	46		
[0425]		Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr		
[0426]		1	5	10 15
[0427]	<210>	47		
[0428]	<211>	7		
[0429]	<212>	PRT		
[0430]	<213>	大羊驼		
[0431]	<400>	47		
[0432]		Gly Gln Asn Asn Arg Pro Ser		
[0433]		1	5	
[0434]	<210>	48		
[0435]	<211>	20		
[0436]	<212>	PRT		
[0437]	<213>	大羊驼		
[0438]	<400>	48		
[0439]		Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala		
[0440]		1	5	10 15
[0441]		Glu Tyr Tyr Cys		
[0442]			20	
[0443]	<210>	49		
[0444]	<211>	10		
[0445]	<212>	PRT		
[0446]	<213>	大羊驼		
[0447]	<400>	49		
[0448]		Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		
[0449]		1	5	10
[0450]	<210>	50		
[0451]	<211>	22		
[0452]	<212>	PRT		
[0453]	<213>	人工序列		
[0454]	<220>			
[0455]	<223>	种系化的抗体序列		
[0456]	<400>	50		
[0457]		Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ala Leu Gly Gln		
[0458]		1	5	10 15
[0459]		Thr Ala Arg Ile Thr Cys		
[0460]			20	
[0461]	<210>	51		

[0504]		245		250		255
[0505]	Thr Gly Ala Ala Ala Thr Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys					
[0506]		260		265		270
[0507]	Gly Gly Cys Cys Gly Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr					
[0508]		275		280		285
[0509]	Gly Cys Ala Ala Ala Ala Gly Thr Thr Gly Gly Cys Thr Thr Thr Ala					
[0510]		290		295		300
[0511]	Gly Thr Gly Gly Thr Ala Cys Thr Thr Ala Cys Thr Ala Cys Ala Gly					
[0512]		305		310		315
[0513]	Thr Gly Ala Ala Thr Cys Ala Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly					
[0514]		325		330		335
[0515]	Gly Gly Gly Ala Cys Cys Cys Ala Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly					
[0516]		340		345		350
[0517]	Thr Gly Thr Cys Cys Thr Cys Ala					
[0518]		355		360		
[0519]	<210> 53					
[0520]	<211> 20					
[0521]	<212> PRT					
[0522]	<213> 人工序列					
[0523]	<220>					
[0524]	<223> 种系化的抗体序列					
[0525]	<400> 53					
[0526]	Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala					
[0527]		1		5		10
[0528]	Asp Tyr Tyr Cys					
[0529]				20		
[0530]	<210> 54					
[0531]	<211> 10					
[0532]	<212> PRT					
[0533]	<213> 人工序列					
[0534]	<220>					
[0535]	<223> 种系化的抗体序列					
[0536]	<400> 54					
[0537]	Gln Ser Gly Ser Ser Ser Ser Asn Ala Val					
[0538]		1		5		10
[0539]	<210> 55					
[0540]	<211> 10					
[0541]	<212> PRT					
[0542]	<213> 人工序列					
[0543]	<220>					
[0544]	<223> 种系化的抗体序列					
[0545]	<400> 55					

[0588]	<212> PRT
[0589]	<213> 人工序列
[0590]	<220>
[0591]	<223> 种系化的抗体序列
[0592]	<400> 60
[0593]	Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala
[0594]	1 5 10 15
[0595]	Asp Tyr Tyr Cys
[0596]	20
[0597]	<210> 61
[0598]	<211> 10
[0599]	<212> PRT
[0600]	<213> 大羊驼
[0601]	<400> 61
[0602]	Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
[0603]	1 5 10
[0604]	<210> 62
[0605]	<211> 103
[0606]	<212> PRT
[0607]	<213> 大羊驼
[0608]	<400> 62
[0609]	Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Ser Ala Val Ser Val Ser Leu Gly Gln
[0610]	1 5 10 15
[0611]	Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala His Trp Tyr Gln
[0612]	20 25 30
[0613]	Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Gln Asn Asn
[0614]	35 40 45
[0615]	Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Asn
[0616]	50 55 60
[0617]	Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu
[0618]	65 70 75 80
[0619]	Tyr Tyr Cys Gln Ser Gly Ser Ser Ser Ala Asn Ala Val Phe Gly Gly
[0620]	85 90 95
[0621]	Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[0622]	100
[0623]	<210> 63
[0624]	<211> 120
[0625]	<212> PRT
[0626]	<213> 人工序列
[0627]	<220>
[0628]	<223> 种系化的抗体序列
[0629]	<400> 63

[0672] <223> 种系化的抗体序列
 [0673] <400> 65
 [0674] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0675] 1 5 10 15
 [0676] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 [0677] 20 25 30
 [0678] Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
 [0679] 35 40 45
 [0680] Ser Gly Ile His Ile Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 [0681] 50 55 60
 [0682] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0683] 65 70 75 80
 [0684] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0685] 85 90 95
 [0686] Val Thr Pro Pro Gly Pro Phe Lys Ala His Tyr Asn Gly Ala Lys Tyr
 [0687] 100 105 110
 [0688] Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0689] 115 120
 [0690] <210> 66
 [0691] <211> 110
 [0692] <212> PRT
 [0693] <213> 人工序列
 [0694] <220>
 [0695] <223> 种系化的抗体序列
 [0696] <400> 66
 [0697] Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 [0698] 1 5 10 15
 [0699] Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Ser Tyr
 [0700] 20 25 30
 [0701] Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 [0702] 35 40 45
 [0703] Leu Ile Tyr Glu Val Asn Lys Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 [0704] 50 55 60
 [0705] Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 [0706] 65 70 75 80
 [0707] Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Leu Tyr
 [0708] 85 90 95
 [0709] Ala Asp Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
 [0710] 100 105 110
 [0711] <210> 67
 [0712] <211> 450
 [0713] <212> PRT

[0714]	<213>	人工序列
[0715]	<220>	
[0716]	<223>	种系化的抗体序列
[0717]	<400>	67
[0718]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[0719]	1	5 10 15
[0720]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
[0721]		20 25 30
[0722]	Asp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[0723]		35 40 45
[0724]	Ser Ser Ile Tyr Asn Asp Ala Ser Asn Thr Ala Tyr Ser Asp Ser Val	
[0725]		50 55 60
[0726]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
[0727]		65 70 75 80
[0728]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0729]		85 90 95
[0730]	Ala Lys Val Gly Phe Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser Glu Ser Trp Gly Gln	
[0731]		100 105 110
[0732]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val	
[0733]		115 120 125
[0734]	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala	
[0735]		130 135 140
[0736]	Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser	
[0737]		145 150 155 160
[0738]	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val	
[0739]		165 170 175
[0740]	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro	
[0741]		180 185 190
[0742]	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys	
[0743]		195 200 205
[0744]	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp	
[0745]		210 215 220
[0746]	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly	
[0747]		225 230 235 240
[0748]	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile	
[0749]		245 250 255
[0750]	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu	
[0751]		260 265 270
[0752]	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His	
[0753]		275 280 285
[0754]	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg	
[0755]		290 295 300

[0756]	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
[0757]	305 310 315 320
[0758]	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
[0759]	325 330 335
[0760]	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
[0761]	340 345 350
[0762]	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
[0763]	355 360 365
[0764]	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
[0765]	370 375 380
[0766]	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
[0767]	385 390 395 400
[0768]	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
[0769]	405 410 415
[0770]	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
[0771]	420 425 430
[0772]	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
[0773]	435 440 445
[0774]	Gly Lys
[0775]	450
[0776]	<210> 68
[0777]	<211> 209
[0778]	<212> PRT
[0779]	<213> 人工序列
[0780]	<220>
[0781]	<223> 种系化的抗体序列
[0782]	<400> 68
[0783]	Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
[0784]	1 5 10 15
[0785]	Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala His Trp Tyr Gln
[0786]	20 25 30
[0787]	Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Gln Asn Asn
[0788]	35 40 45
[0789]	Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Asn
[0790]	50 55 60
[0791]	Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp
[0792]	65 70 75 80
[0793]	Tyr Tyr Cys Gln Ser Gly Ser Ser Ser Ser Asn Ala Val Phe Gly Gly
[0794]	85 90 95
[0795]	Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val
[0796]	100 105 110
[0797]	Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr

[0798]	115	120	125
[0799]	Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala		
[0800]	130	135	140
[0801]	Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr		
[0802]	145	150	155
[0803]	Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser		
[0804]	165	170	175
[0805]	Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val		
[0806]	180	185	190
[0807]	Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys		
[0808]	195	200	205
[0809]	Ser		
[0810]	<210> 69		
[0811]	<211> 453		
[0812]	<212> PRT		
[0813]	<213> 人工序列		
[0814]	<220>		
[0815]	<223> 种系化的抗体序列		
[0816]	<400> 69		
[0817]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0818]	1	5	10
[0819]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0820]	20	25	30
[0821]	Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val		
[0822]	35	40	45
[0823]	Ser Gly Ile His Ile Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val		
[0824]	50	55	60
[0825]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0826]	65	70	75
[0827]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0828]	85	90	95
[0829]	Val Thr Pro Pro Gly Pro Phe Lys Ala His Tyr Asn Gly Ala Lys Tyr		
[0830]	100	105	110
[0831]	Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly		
[0832]	115	120	125
[0833]	Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly		
[0834]	130	135	140
[0835]	Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val		
[0836]	145	150	155
[0837]	Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
[0838]	165	170	175
[0839]	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val		

[0840]		180		185		190
[0841]	Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val					
[0842]		195		200		205
[0843]	Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys					
[0844]		210		215		220
[0845]	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu					
[0846]		225		230		240
[0847]	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr					
[0848]		245		250		255
[0849]	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val					
[0850]		260		265		270
[0851]	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val					
[0852]		275		280		285
[0853]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser					
[0854]		290		295		300
[0855]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu					
[0856]		305		310		320
[0857]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala					
[0858]		325		330		335
[0859]	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro					
[0860]		340		345		350
[0861]	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln					
[0862]		355		360		365
[0863]	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala					
[0864]		370		375		380
[0865]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr					
[0866]		385		390		400
[0867]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu					
[0868]		405		410		415
[0869]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser					
[0870]		420		425		430
[0871]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser					
[0872]		435		440		445
[0873]	Leu Ser Pro Gly Lys					
[0874]		450				
[0875]	<210> 70					
[0876]	<211> 216					
[0877]	<212> PRT					
[0878]	<213> 人工序列					
[0879]	<220>					
[0880]	<223> 种系化的抗体序列					
[0881]	<400> 70					

[0882] Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 [0883] 1 5 10 15
 [0884] Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Ser Tyr
 [0885] 20 25 30
 [0886] Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 [0887] 35 40 45
 [0888] Leu Ile Tyr Glu Val Asn Lys Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 [0889] 50 55 60
 [0890] Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 [0891] 65 70 75 80
 [0892] Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Leu Tyr
 [0893] 85 90 95
 [0894] Ala Asp Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Gln
 [0895] 100 105 110
 [0896] Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 [0897] 115 120 125
 [0898] Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 [0899] 130 135 140
 [0900] Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
 [0901] 145 150 155 160
 [0902] Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 [0903] 165 170 175
 [0904] Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 [0905] 180 185 190
 [0906] Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 [0907] 195 200 205
 [0908] Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 [0909] 210 215
 [0910] <210> 71
 [0911] <211> 574
 [0912] <212> PRT
 [0913] <213> 智人
 [0914] <400> 71
 [0915] Met Arg Thr Leu Leu Thr Ile Leu Thr Val Gly Ser Leu Ala Ala His
 [0916] 1 5 10 15
 [0917] Ala Pro Glu Asp Pro Ser Asp Leu Leu Gln His Val Lys Phe Gln Ser
 [0918] 20 25 30
 [0919] Ser Asn Phe Glu Asn Ile Leu Thr Trp Asp Ser Gly Pro Glu Gly Thr
 [0920] 35 40 45
 [0921] Pro Asp Thr Val Tyr Ser Ile Glu Tyr Lys Thr Tyr Gly Glu Arg Asp
 [0922] 50 55 60
 [0923] Trp Val Ala Lys Lys Gly Cys Gln Arg Ile Thr Arg Lys Ser Cys Asn

[0924]	65	70	75	80
[0925]	Leu Thr Val Glu Thr Gly Asn Leu Thr Glu Leu Tyr Tyr Ala Arg Val			
[0926]		85	90	95
[0927]	Thr Ala Val Ser Ala Gly Gly Arg Ser Ala Thr Lys Met Thr Asp Arg			
[0928]		100	105	110
[0929]	Phe Ser Ser Leu Gln His Thr Thr Leu Lys Pro Pro Asp Val Thr Cys			
[0930]		115	120	125
[0931]	Ile Ser Lys Val Arg Ser Ile Gln Met Ile Val His Pro Thr Pro Thr			
[0932]		130	135	140
[0933]	Pro Ile Arg Ala Gly Asp Gly His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Phe			
[0934]		145	150	155
[0935]	His Asp Leu Phe Tyr His Leu Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln			
[0936]		165	170	175
[0937]	Met His Leu Gly Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr			
[0938]		180	185	190
[0939]	Pro Asp Thr Glu Phe Leu Gly Thr Ile Met Ile Cys Val Pro Thr Trp			
[0940]		195	200	205
[0941]	Ala Lys Glu Ser Ala Pro Tyr Met Cys Arg Val Lys Thr Leu Pro Asp			
[0942]		210	215	220
[0943]	Arg Thr Trp Thr Tyr Ser Phe Ser Gly Ala Phe Leu Phe Ser Met Gly			
[0944]		225	230	235
[0945]	Phe Leu Val Ala Val Leu Cys Tyr Leu Ser Tyr Arg Tyr Val Thr Lys			
[0946]		245	250	255
[0947]	Pro Pro Ala Pro Pro Asn Ser Leu Asn Val Gln Arg Val Leu Thr Phe			
[0948]		260	265	270
[0949]	Gln Pro Leu Arg Phe Ile Gln Glu His Val Leu Ile Pro Val Phe Asp			
[0950]		275	280	285
[0951]	Leu Ser Gly Pro Ser Ser Leu Ala Gln Pro Val Gln Tyr Ser Gln Ile			
[0952]		290	295	300
[0953]	Arg Val Ser Gly Pro Arg Glu Pro Ala Gly Ala Pro Gln Arg His Ser			
[0954]		305	310	315
[0955]	Leu Ser Glu Ile Thr Tyr Leu Gly Gln Pro Asp Ile Ser Ile Leu Gln			
[0956]		325	330	335
[0957]	Pro Ser Asn Val Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ser Pro Leu Ser Tyr Ala			
[0958]		340	345	350
[0959]	Pro Asn Ala Ala Pro Glu Val Gly Pro Pro Ser Tyr Ala Pro Gln Val			
[0960]		355	360	365
[0961]	Thr Pro Glu Ala Gln Phe Pro Phe Tyr Ala Pro Gln Ala Ile Ser Lys			
[0962]		370	375	380
[0963]	Val Gln Pro Ser Ser Tyr Ala Pro Gln Ala Thr Pro Asp Ser Trp Pro			
[0964]		385	390	395
[0965]	Pro Ser Tyr Gly Val Cys Met Glu Gly Ser Gly Lys Asp Ser Pro Thr			

[0966]		405		410		415
[0967]	Gly Thr Leu Ser Ser Pro Lys His Leu Arg Pro Lys Gly Gln Leu Gln					
[0968]		420		425		430
[0969]	Lys Glu Pro Pro Ala Gly Ser Cys Met Leu Gly Gly Leu Ser Leu Gln					
[0970]		435		440		445
[0971]	Glu Val Thr Ser Leu Ala Met Glu Glu Ser Gln Glu Ala Lys Ser Leu					
[0972]		450		455		460
[0973]	His Gln Pro Leu Gly Ile Cys Thr Asp Arg Thr Ser Asp Pro Asn Val					
[0974]		465		470		475
[0975]	Leu His Ser Gly Glu Glu Gly Thr Pro Gln Tyr Leu Lys Gly Gln Leu					
[0976]		485		490		495
[0977]	Pro Leu Leu Ser Ser Val Gln Ile Glu Gly His Pro Met Ser Leu Pro					
[0978]		500		505		510
[0979]	Leu Gln Pro Pro Ser Arg Pro Cys Ser Pro Ser Asp Gln Gly Pro Ser					
[0980]		515		520		525
[0981]	Pro Trp Gly Leu Leu Glu Ser Leu Val Cys Pro Lys Asp Glu Ala Lys					
[0982]		530		535		540
[0983]	Ser Pro Ala Pro Glu Thr Ser Asp Leu Glu Gln Pro Thr Glu Leu Asp					
[0984]		545		550		555
[0985]	Ser Leu Phe Arg Gly Leu Ala Leu Thr Val Gln Trp Glu Ser					
[0986]		565		570		
[0987]	<210> 72					
[0988]	<211> 1725					
[0989]	<212> DNA					
[0990]	<213> 智人					
[0991]	<400> 72					
[0992]	atgaggacgc tgctgaccat cttgactgtg ggatccctgg ctgctcacgc ccctgaggac	60				
[0993]	ccctcggatc tgctccagca cgtgaaattc cagtccagca actttgaaa catcctgacg	120				
[0994]	tgggacagcg ggccggaggg caccacagac acggctetaca gcatcgagta taagacgtac	180				
[0995]	ggagagaggg actgggtggc aaagaaggc tgtcagcgga tcaccggaa gtcttgaac	240				
[0996]	ctgacggtgg agacgggcaa cctcacggag ctctactatg ccagggtcac cgctgtcagt	300				
[0997]	gcgggaggcc ggtcagccac caagatgact gacaggttca gctctctgca gcacactacc	360				
[0998]	ctcaagccac ctgatgtgac ctgtatctcc aaagtgagat cgattcagat gattgttcat	420				
[0999]	cctaccccca cgccatccg tgcaggcagat ggccaccggc taaccctgga agacatcttc	480				
[1000]	catgacctgt tctaccactt agagctccag gtcaaccgca cctaccaa atgcaccttga	540				
[1001]	gggaagcaga gagaatatga gttcttcggc ctgaccctg acacagagtt ccttggcacc	600				
[1002]	atcatgattt gcgttccac ctgggccaag gagagtgcc cctacatgtg ccgagtgaag	660				
[1003]	acaactgccag accggacatg gacctaactc ttctccggag ccttctgtt ctccatgggc	720				
[1004]	ttctctgtcg cagtactctg ctacctgac tacagatatg tcaccaagcc gcctgcacct	780				
[1005]	cccaactccc tgaactcca gcgagtctg actttccagc cgctgcgctt catccaggag	840				
[1006]	cacgtcctga tcctgtctt tgacctcagc ggccccagca gtctggccca gcctgtccag	900				
[1007]	tactcccaga tcagggtgtc tggaccagg gagcctgcag gagctccaca gcggcatagc	960				

[1008] ctgtccgaga tcacctactt agggcagcca gacatctcca tcctccagcc ctccaacgtg 1020
 [1009] ccacctcccc agatctctc cccactgtcc tatgccccea acgctgcccc tgaggctggg 1080
 [1010] cccccatcct atgcacctca ggtgaccccc gaagctcaat tcccatteta cgcceccacag 1140
 [1011] gccatcteta aggtccagcc ttctctctat gccctcaag ccaactccgga cagctggcct 1200
 [1012] ccctctatg gggatgcat ggaaggttct ggcaaagact cccccactgg gacactttct 1260
 [1013] agtctaaac acctagacc taaaggtcag cttcagaaag agccaccagc tggaagctgc 1320
 [1014] atgttaggtg gcctttctct gcaggaggtg acctccttgg ctatggagga atcccaga 1380
 [1015] gcaaaatcat tgcaccagcc cctggggatt tgcacagaca gaacatctga cccaaatgtg 1440
 [1016] ctacacagtg gggaggaagg gacaccacag tacctaaagg gccagctccc cctcctctcc 1500
 [1017] tcagtcaga tcgaggcca cccatgtcc ctcccttgc aacctcttc cegtccatgt 1560
 [1018] tccccctcg accaaggctc aagtccttg ggctgctgg agtccttgt gtgtcccaag 1620
 [1019] gatgaagcca agagcccagc cctgagacc tcagacctgg agcagccac agaactggat 1680
 [1020] tctctttca gaggcctggc cctgactgtg cagtgggagt cctga 1725
 [1021] <210> 73
 [1022] <211> 309
 [1023] <212> DNA
 [1024] <213> 大羊驼
 [1025] <400> 73
 [1026] aattttatgc tgactcagcc ctccgctgtg tccgtgtctt tgggacagac ggccaagatc 60
 [1027] acctgccaag gggctatta tgctactgg taccagcaga agccaggcca ggccccgtg 120
 [1028] ttggtcatct atgaaataa taatagccc tcaggatcc ctgagcgtt ctctggctcc 180
 [1029] agttctggga acacagccac cctgaccatc agcggggccc aggctgagga cgaggccag 240
 [1030] tattactgtc agtcaggaag cagtagtct aatgctgtgt tcggcggagg gacctctg 300
 [1031] acctcctg 309
 [1032] <210> 74
 [1033] <211> 369
 [1034] <212> DNA
 [1035] <213> 大羊驼
 [1036] <400> 74
 [1037] caggtgcagc tggaggatc tggggaggc ttggtgcagc ctggggattc tctgagactc 60
 [1038] tcctgtgcag cctctggatt caccttcgga agctatttca tgagctgggt ccgccaggct 120
 [1039] ccaggaaagg ggcccagtg ggtctcaggt attcatatta gtggtggtat tacatactac 180
 [1040] ttagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgctgtat 240
 [1041] ctgcaaatga acaacctgaa acctgaggac acggccgtgt attattgtgt aacacccccg 300
 [1042] ggccccctta aggcccatta caatggcatg aagtactggg gcaaaggac cctggtcacc 360
 [1043] gtctctca 369
 [1044] <210> 75
 [1045] <211> 330
 [1046] <212> DNA
 [1047] <213> 大羊驼
 [1048] <400> 75
 [1049] aattttatgc tgactcagcc tcctccgtg tctggaactc tgggaaagac ggtcaccatc 60

[1050]	tcctgcaactg gaaccagtcg tgacattggg gactataact atgtctcctg gtatcaacag	120
[1051]	ctcccaggat tggcccccac actcctgata tataaagtca acactcgatc ctcaggacc	180
[1052]	cctgatcgtc tctctggctc caagtcaggc aacacggcct cctgaccat cctctggctc	240
[1053]	cagtctgagg acgaggctga ttattactgt gcctcatata gactgtacgc cgattatgtg	300
[1054]	ttcggcggag ggacccatct gaccgtcctg	330
[1055]	<210>	76
[1056]	<211>	360
[1057]	<212>	DNA
[1058]	<213>	大羊驼
[1059]	<400>	76
[1060]	caggtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctgggggttc tctgagactc	60
[1061]	tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctacgaca tgagctgggt ccgccaggct	120
[1062]	ccaggaagg ggctggagtg ggtgtccagt atttataatg acggtagtaa cacagcctat	180
[1063]	tcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgttgtat	240
[1064]	ctgcaaatga acagctgaa atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaaagttggc	300
[1065]	tttagtggtg cttactacag tgaatcatgg ggccaggga cccaggtcac cgtgtcctca	360
[1066]	<210>	77
[1067]	<211>	309
[1068]	<212>	DNA
[1069]	<213>	大羊驼
[1070]	<400>	77
[1071]	ctgcctgtgc tgactcagcc ctccgcggtg tccgtgtctt tggacagac ggccaggatc	60
[1072]	acctccaag ggggctatta tgctactgg taccagcaga agccaggcca ggcccctgtg	120
[1073]	ctggcatct atggacagaa taatagccc tcaggatcc ctgagcgtt cctctggctc	180
[1074]	ggcgtggga acacagccac cctgaccatc agcggggccc aggctgagga cgaggctgag	240
[1075]	tattactgtc agtcaggaag cagtagtct aatgtgtgt tcggcggagg gaccaagctg	300
[1076]	accgtcctc	309
[1077]	<210>	78
[1078]	<211>	360
[1079]	<212>	DNA
[1080]	<213>	人工序列
[1081]	<220>	
[1082]	<223>	种系化的抗体序列
[1083]	<400>	78
[1084]	caggtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctgggggttc tctgagactc	60
[1085]	tcctgtgctg cctctggatt caccttcagt agctacgaca tgaactgggt ccgccaggct	120
[1086]	ccaggaagg ggctggagtg ggtgtccagc atttataacg acgccagtaa cacagcctat	180
[1087]	tcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca actcaaagaa cacgttgtat	240
[1088]	ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagttggc	300
[1089]	tttagtggtg cttactacag tgaatcatgg ggccaggga ccctcgtcac tgtctcctca	360
[1090]	<210>	79
[1091]	<211>	309

- [1092] <212> DNA
- [1093] <213> 人工序列
- [1094] <220>
- [1095] <223> 种系化的抗体序列
- [1096] <400> 79
- [1097] tcctacgaac tgactcagcc ctctcgggtg tccgtggcgt tgggacagac ggccaggatc 60
- [1098] acctgccaag gaggtatta tgcacaactgg taccagcaga agccaggcca ggccccctgtg 120
- [1099] ctggtcatct atggacagaa taataggccc tcagggatcc ctgagcgctt ctctggctcc 180
- [1100] ggcgctggga acacagccac cctgacaatc agccgcgccc aggctgagga cgaggctgac 240
- [1101] tattactgtc agtcaggaag cagtagttct aatgctgtgt tcggcggagg gaccaagctg 300
- [1102] accgtcctc 309
- [1103] <210> 80
- [1104] <211> 369
- [1105] <212> DNA
- [1106] <213> 人工序列
- [1107] <220>
- [1108] <223> 种系化的抗体序列
- [1109] <400> 80
- [1110] caggtgcagc tcgtggagtc tggggcgccg ttggtgcagc ctggggattc tctgagactc 60
- [1111] tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatttca tgagctgggt ccgccaggt 120
- [1112] ccaggaaagg ggcccagtg ggtctcaggt attcatatta gtggtggtat tacatactac 180
- [1113] acggactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgcaaagaa cacgctgtat 240
- [1114] ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggccgtgt attattgtgt aacacccccg 300
- [1115] ggccccitta aggccatta caatggcgcg aagtactggg gcaaaggac cctggtcact 360
- [1116] gtctcctca 369
- [1117] <210> 81
- [1118] <211> 330
- [1119] <212> DNA
- [1120] <213> 人工序列
- [1121] <220>
- [1122] <223> 种系化的抗体序列
- [1123] <400> 81
- [1124] cagtetgccc tgactcagcc tcctcctgtg tctggatctc ctggacagtc tgtcaccatc 60
- [1125] tcctgcaactg gaaccagtag tgacattggg tcctataact atgtctcctg gatatcaacag 120
- [1126] ctcccaggaa aggcccccaa actcctgac tctgaggtca acaagcgatc ctcaggggtc 180
- [1127] cctgactgct tctctggctc caagtcaggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc 240
- [1128] caggtgagg acgagctga ttattactgt gcctcatata gactgtacgc cgattatgtg 300
- [1129] ttggcggag ggacceact gaccgtcctc 330
- [1130] <210> 82
- [1131] <211> 10
- [1132] <212> PRT
- [1133] <213> 智人

[1134]	<400> 82
[1135]	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
[1136]	1 5 10
[1137]	<210> 83
[1138]	<211> 5
[1139]	<212> PRT
[1140]	<213> 智人
[1141]	<400> 83
[1142]	Cys Pro Pro Cys Pro
[1143]	1 5
[1144]	<210> 84
[1145]	<211> 8
[1146]	<212> PRT
[1147]	<213> 智人
[1148]	<400> 84
[1149]	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
[1150]	1 5
[1151]	<210> 85
[1152]	<211> 12
[1153]	<212> PRT
[1154]	<213> 智人
[1155]	<400> 85
[1156]	Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr
[1157]	1 5 10
[1158]	<210> 86
[1159]	<211> 50
[1160]	<212> PRT
[1161]	<213> 智人
[1162]	<400> 86
[1163]	Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys
[1164]	1 5 10 15
[1165]	Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro
[1166]	20 25 30
[1167]	Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
[1168]	35 40 45
[1169]	Cys Pro
[1170]	50
[1171]	<210> 87
[1172]	<211> 8
[1173]	<212> PRT
[1174]	<213> 智人
[1175]	<400> 87

[1176]	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
[1177]	1 5
[1178]	<210> 88
[1179]	<211> 7
[1180]	<212> PRT
[1181]	<213> 智人
[1182]	<400> 88
[1183]	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
[1184]	1 5
[1185]	<210> 89
[1186]	<211> 5
[1187]	<212> PRT
[1188]	<213> 智人
[1189]	<400> 89
[1190]	Cys Pro Ser Cys Pro
[1191]	1 5
[1192]	<210> 90
[1193]	<211> 8
[1194]	<212> PRT
[1195]	<213> 智人
[1196]	<400> 90
[1197]	Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
[1198]	1 5
[1199]	<210> 91
[1200]	<211> 3
[1201]	<212> PRT
[1202]	<213> 智人
[1203]	<400> 91
[1204]	Glu Arg Lys
[1205]	1
[1206]	<210> 92
[1207]	<211> 10
[1208]	<212> PRT
[1209]	<213> 智人
[1210]	<400> 92
[1211]	Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Pro Cys Pro
[1212]	1 5 10
[1213]	<210> 93
[1214]	<211> 7
[1215]	<212> PRT
[1216]	<213> 智人
[1217]	<400> 93

[1218] Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
 [1219] 1 5
 [1220] <210> 94
 [1221] <211> 78
 [1222] <212> PRT
 [1223] <213> 人工序列
 [1224] <220>
 [1225] <223> EST序列
 [1226] <400> 94
 [1227] Val Arg Ser Ile Gln Met Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg
 [1228] 1 5 10 15
 [1229] Ala Gly Asp Gly His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Phe His Asp Leu
 [1230] 20 25 30
 [1231] Phe Tyr His Leu Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met His Leu
 [1232] 35 40 45
 [1233] Gly Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp Thr
 [1234] 50 55 60
 [1235] Glu Phe Leu Gly Thr Ile Met Ile Cys Val Pro Thr Trp Ala
 [1236] 65 70 75
 [1237] <210> 95
 [1238] <211> 78
 [1239] <212> PRT
 [1240] <213> 恒河猴
 [1241] <400> 95
 [1242] Val Arg Ser Ile Gln Met Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg
 [1243] 1 5 10 15
 [1244] Ala Gly Asp Gly His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Phe His Asp Leu
 [1245] 20 25 30
 [1246] Phe Tyr His Leu Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met His Leu
 [1247] 35 40 45
 [1248] Gly Gly Glu Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp Thr
 [1249] 50 55 60
 [1250] Glu Phe Leu Gly Thr Ile Met Ile Cys Val Pro Thr Trp Ser
 [1251] 65 70 75
 [1252] <210> 96
 [1253] <211> 79
 [1254] <212> PRT
 [1255] <213> 食蟹猴
 [1256] <400> 96
 [1257] Val Arg Ser Ile Gln Met Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg
 [1258] 1 5 10 15
 [1259] Ala Gly Asp Gly His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Tyr Asp Leu Ser

[1260]	20	25	30
[1261]	Tyr His Leu Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met Val Asn His		
[1262]	35	40	45
[1263]	Leu Gly Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp		
[1264]	50	55	60
[1265]	Thr Glu Phe Leu Gly Thr Ile Met Ile Cys Val Pro Thr Trp Ser		
[1266]	65	70	75
[1267]	<210> 97		
[1268]	<211> 79		
[1269]	<212> PRT		
[1270]	<213> 食蟹猴		
[1271]	<400> 97		
[1272]	Val Arg Ser Ile Gln Met Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg		
[1273]	1	5	10 15
[1274]	Ala Gly Asp Gly His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Tyr Asp Leu Ser		
[1275]	20	25	30
[1276]	Tyr His Leu Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met Val Asn His		
[1277]	35	40	45
[1278]	Leu Gly Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp		
[1279]	50	55	60
[1280]	Thr Glu Phe Leu Gly Thr Ile Met Ile Cys Val Pro Thr Trp Ser		
[1281]	65	70	75
[1282]	<210> 98		
[1283]	<211> 77		
[1284]	<212> PRT		
[1285]	<213> 食蟹猴		
[1286]	<400> 98		
[1287]	Val Arg Ser Ile Gln Met Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg		
[1288]	1	5	10 15
[1289]	Ala Gly Asp Gly His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Tyr Asp Leu Ser		
[1290]	20	25	30
[1291]	Tyr His Leu Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met His Leu Gly		
[1292]	35	40	45
[1293]	Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp Thr Glu		
[1294]	50	55	60
[1295]	Phe Leu Gly Thr Ile Met Ile Cys Val Pro Thr Trp Ser		
[1296]	65	70	75
[1297]	<210> 99		
[1298]	<211> 293		
[1299]	<212> PRT		
[1300]	<213> 智人		
[1301]	<400> 99		

[1302]	Leu Arg Leu Glu Tyr Leu Ile Arg Leu Thr Ile Gly Tyr Arg Leu Asn
[1303]	1 5 10 15
[1304]	Gly Thr Ala Ala Thr Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val
[1305]	20 25 30
[1306]	Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Pro Glu Asp Pro Ser Asp Leu Leu
[1307]	35 40 45
[1308]	Gln His Val Lys Phe Gln Ser Ser Asn Phe Glu Asn Ile Leu Thr Trp
[1309]	50 55 60
[1310]	Asp Ser Gly Pro Glu Gly Thr Pro Asp Thr Val Tyr Ser Ile Glu Tyr
[1311]	65 70 75 80
[1312]	Lys Thr Tyr Gly Glu Arg Asp Trp Val Ala Lys Lys Gly Cys Gln Arg
[1313]	85 90 95
[1314]	Ile Thr Arg Lys Ser Cys Asn Leu Thr Val Glu Thr Gly Asn Leu Thr
[1315]	100 105 110
[1316]	Glu Leu Tyr Tyr Ala Arg Val Thr Ala Val Ser Ala Gly Gly Arg Ser
[1317]	115 120 125
[1318]	Ala Thr Lys Met Thr Asp Arg Phe Ser Ser Leu Gln His Thr Thr Leu
[1319]	130 135 140
[1320]	Lys Pro Pro Asp Val Thr Cys Ile Ser Lys Val Arg Ser Ile Gln Met
[1321]	145 150 155 160
[1322]	Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg Ala Gly Asp Gly His Arg
[1323]	165 170 175
[1324]	Leu Thr Leu Glu Asp Ile Phe His Asp Leu Phe Tyr His Leu Glu Leu
[1325]	180 185 190
[1326]	Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met His Leu Gly Gly Lys Gln Arg Glu
[1327]	195 200 205
[1328]	Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp Thr Glu Phe Leu Gly Thr Ile
[1329]	210 215 220
[1330]	Met Ile Cys Val Pro Thr Trp Ala Lys Glu Ser Ala Pro Tyr Met Cys
[1331]	225 230 235 240
[1332]	Arg Val Lys Thr Leu Pro Asp Arg Thr Trp Thr Ile Glu Gly Arg Asp
[1333]	245 250 255
[1334]	Met Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
[1335]	260 265 270
[1336]	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Arg Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
[1337]	275 280 285
[1338]	Pro Lys Asp Thr Leu
[1339]	290
[1340]	<210> 100
[1341]	<211> 293
[1342]	<212> PRT
[1343]	<213> 恒河猴

[1344]	<400>	100
[1345]	Leu Arg Leu Glu Tyr Leu Ile Arg Leu Thr Ile Gly Tyr Arg Leu Asn	
[1346]	1	5 10 15
[1347]	Gly Thr Ala Ala Thr Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val	
[1348]		20 25 30
[1349]	Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Pro Glu Asp Pro Ser Asp Leu Leu	
[1350]		35 40 45
[1351]	Gln His Val Lys Phe Gln Ser Asn Asn Phe Glu Asn Ile Leu Thr Trp	
[1352]		50 55 60
[1353]	Asp Ser Gly Pro Glu Gly Thr Pro Asp Thr Val Tyr Ser Ile Glu Tyr	
[1354]	65	70 75 80
[1355]	Lys Thr Tyr Gly Glu Arg Asp Trp Val Ala Lys Lys Gly Cys Gln Arg	
[1356]		85 90 95
[1357]	Ile Thr Arg Lys Ser Cys Asn Leu Thr Val Glu Thr Gly Asn His Thr	
[1358]		100 105 110
[1359]	Glu Leu Tyr Tyr Ala Arg Val Thr Ala Val Ser Ala Gly Gly Arg Ser	
[1360]		115 120 125
[1361]	Ala Thr Lys Met Thr Asp Arg Phe Asn Ser Leu Gln His Thr Ala Leu	
[1362]		130 135 140
[1363]	Lys Pro Pro Asp Val Thr Cys Ile Pro Lys Val Arg Ser Ile Gln Met	
[1364]		145 150 155 160
[1365]	Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg Ala Gly Asp Gly His Arg	
[1366]		165 170 175
[1367]	Leu Thr Leu Glu Asp Ile Phe His Asp Leu Phe Tyr His Leu Glu Leu	
[1368]		180 185 190
[1369]	Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met His Leu Gly Gly Glu Gln Arg Glu	
[1370]		195 200 205
[1371]	Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp Thr Glu Phe Leu Gly Thr Ile	
[1372]		210 215 220
[1373]	Met Ile Cys Val Pro Thr Trp Ser Lys Lys Ser Ala Pro Tyr Met Cys	
[1374]		225 230 235 240
[1375]	Arg Val Arg Thr Leu Pro Asp Arg Thr Trp Thr Ile Glu Gly Arg Asp	
[1376]		245 250 255
[1377]	Met Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	
[1378]		260 265 270
[1379]	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys	
[1380]		275 280 285
[1381]	Pro Lys Asp Thr Leu	
[1382]		290
[1383]	<210>	101
[1384]	<211>	292
[1385]	<212>	PRT

[1386]	<213>	食蟹猴
[1387]	<400>	101
[1388]	Leu Arg Leu Glu Tyr Leu Ile Arg Leu Thr Ile Gly Tyr Arg Leu Asn	
[1389]	1	5 10 15
[1390]	Gly Thr Ala Ala Thr Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val	
[1391]		20 25 30
[1392]	Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Pro Glu Asp Pro Ser Asp Leu Leu	
[1393]		35 40 45
[1394]	Gln His Val Lys Phe Gln Ser Asn Asn Phe Glu Asn Ile Leu Thr Trp	
[1395]		50 55 60
[1396]	Asp Ser Gly Pro Glu Gly Thr Pro Asp Thr Val Tyr Ser Ile Glu Tyr	
[1397]		65 70 75 80
[1398]	Lys Thr Tyr Gly Glu Arg Asp Trp Val Ala Lys Lys Gly Cys Gln Arg	
[1399]		85 90 95
[1400]	Ile Thr Arg Lys Ser Cys Asn Leu Thr Val Glu Thr Gly Asn His Thr	
[1401]		100 105 110
[1402]	Glu Leu Tyr Tyr Ala Arg Val Thr Ala Val Ser Ala Gly Gly Arg Ser	
[1403]		115 120 125
[1404]	Ala Thr Lys Met Thr Asp Arg Phe Asn Ser Leu Gln His Thr Ala Leu	
[1405]		130 135 140
[1406]	Lys Pro Pro Asp Val Thr Cys Ile Pro Lys Val Arg Ser Ile Gln Met	
[1407]		145 150 155 160
[1408]	Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg Ala Gly Asp Gly His Arg	
[1409]		165 170 175
[1410]	Leu Thr Leu Glu Asp Ile Tyr Asp Leu Ser Tyr His Leu Glu Leu Gln	
[1411]		180 185 190
[1412]	Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met His Leu Gly Gly Lys Gln Arg Glu Tyr	
[1413]		195 200 205
[1414]	Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp Thr Glu Phe Leu Gly Thr Ile Met	
[1415]		210 215 220
[1416]	Ile Cys Val Pro Thr Trp Ser Lys Lys Ser Ala Pro Tyr Met Cys Arg	
[1417]		225 230 235 240
[1418]	Val Arg Thr Leu Pro Asp Arg Thr Trp Thr Ile Glu Gly Arg Asp Met	
[1419]		245 250 255
[1420]	Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	
[1421]		260 265 270
[1422]	Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
[1423]		275 280 285
[1424]	Lys Asp Thr Leu	
[1425]		290

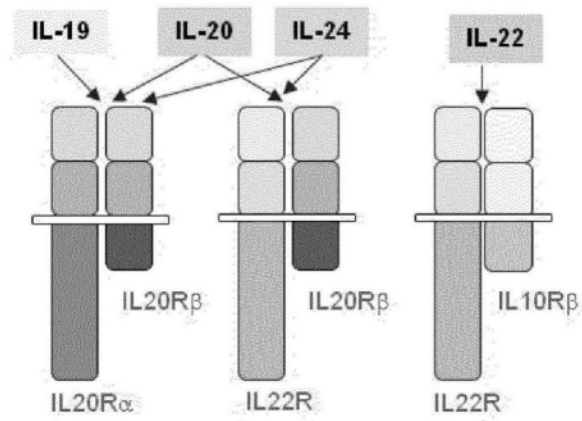


图1

```

1  MRTLLTILTV  GSLAAHAPED  PSDLLQHVKE  QSSNFENILT  WDSGPEGTPD
51  TVYSIEYKTY  GERDWVAKKG  CQRITRKSCN  LTVETGNLTE  LYYARVTAVS
101 AGGRSATKMT  DRFSSLQHTT  LKPPDVTCIS  KVRSIQMIVH  PTPTPIRAGD
151 GHRLTLEDIF  HDLFYHLELQ  VNRTYQMHLG  GKQREYEFFG  LTPDTEFLGT
201 IMICVPTWAK  ESAPYMCRVK  TLPDRTWTYS  FSGAFLFSMG  FLVAVLCYLS
251 YRYVTKPPAP  PNSLNVQRVL  TFQPLRFIQE  HVLIPIVFDLS  GPSSLAQPVQ
301 YSQIRVSGPR  EPAGAPQRHS  LSEITYLGQP  DISILQPSNV  PPPQILSPLS
351 YAPNAAPEVG  PPSYAPQVTP  EAQFPFYAPQ  AISKVQPSSY  APQATPDSWP
401 PSYGVCMEGS  GKDSPTGTLS  SPKHLRPGKQ  LQKEPPAGSC  MLGGLSLQEV
451 TSLAMESQE  AKSLHQPLGI  CTDRTSDPNV  LHSGEEGTPQ  YLKGQLPLLS
501 SVQIEGHPMS  LPLQPPSRPC  SPSDQGPSPW  GLLESLVCPK  DEAKSPAPET
551 SDLEQPTELD  SLFRGLALTV  QWES

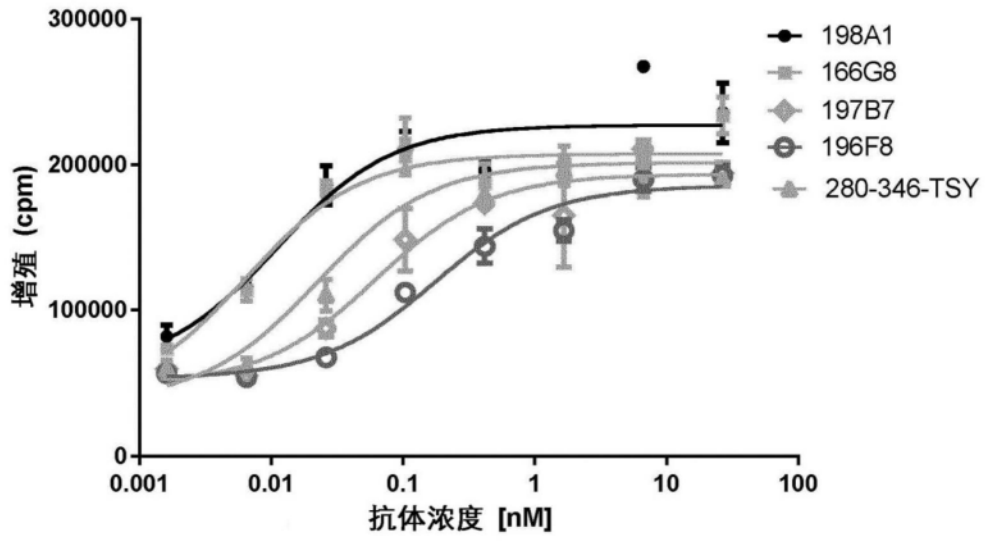
```

图2

```
1 ATGAGGACGC TGCTGACCAT CTTGACTGTG GGATCCCTGG CTGCTCACGC CCCTGAGGAC
61 CCCTCGGATC TGCTCCAGCA CGTGAAATTC CAGTCCAGCA ACTTTGAAAA CATCCTGACG
121 TGGGACAGCG GGCCGGAGGG CACCCCAGAC ACGGTCTACA GCATCGAGTA TAAGACGTAC
181 GGAGAGAGGG ACTGGGTGGC AAAGAAGGGC TGTGAGCGGA TCACCCGGAA GTCCTGCAAC
241 CTGACGGTGG AGACGGGCAA CCTCACGGAG CTCTACTATG CCAGGGTCAC CGCTGTCAGT
301 GCGGGAGGCC GGTGAGCCAC CAAGATGACT GACAGGTTCA GCTCTCTGCA GCACACTACC
361 CTC AAGCCAC CTGATGTGAC CTGTATCTCC AAAGTGAGAT CGATTGAGAT GATTGTTTCAT
421 CCTACCCCCA CGCCCATCCG TGCAGGCGAT GGCCACCGGC TAACCCTGGA AGACATCTTC
481 CATGACCTGT TCTACCACCT AGAGCTCCAG GTCAACCGCA CCTACCAAAT GCACCTTGGA
541 GGAAGCAGA GAGAATATGA GTTCTTCGGC CTGACCCCTG ACACAGAGTT CCTTGGCACC
601 ATCATGATTT GCGTTCACAC CTGGGCCAAG GAGAGTGCCC CCTACATGTG CCGAGTGAAG
661 AACTGCCAG ACCGGACATG GACCTACTCC TTCTCCGGAG CCTTCTGTG CTCCATGGGC
721 TTCTCGTCG CAGTACTCTG CTACCTGAGC TACAGATATG TCACCAAGCC GCCTGCACCT
781 CCCAACTCCC TGAACGTCCA GCGAGTCTCG ACTTTCAGC CGCTGCGCTT CATCCAGGAG
841 CAGTCTCTGA TCCCTGTCTT TGACCTCAGC GGCCCAGCA GTCTGGCCCA GCCTGTCCAG
901 TACTCCCAGA TCAGGGTGTG TGGACCCAGG GAGCCTGCAG GAGCTCCACA GCGGCATAGC
961 CTGTCCGAGA TCACCTACTT AGGGCAGCCA GACATCTCCA TCCTCCAGCC CTCCAACGTG
1021 CCACTCCCC AGATCCTCTC CCCACTGTCC TATGCCCAA ACGCTGCCCC TGAGGTCGGG
1081 CCCCATCCT ATGCACCTCA GGTGACCCCC GAAGCTCAAT TCCCATTCTA CGCCCCACAG
1141 GCCATCTCTA AGGTCCAGCC TTCTCTCTAT GCCCTCAAG CCACTCCGGA CAGCTGGCCT
1201 CCTCCTATG GGGTATGCAT GGAAGGTCTT GGCAAAGACT CCCCCTGAG GACACTTCTT
1261 AGTCTAAAC ACCTTAGGCC TAAAGGTCAG CTTGAGAAAAG AGCCACCAGC TGAAGCTGC
1321 ATGTTAGGTG GCCTTCTCTT GCAGGAGGTG ACCTCCTTGG CTATGGAGGA ATCCAAGAA
1381 GCAAAATCAT TGCACCAGCC CCTGGGGATT TGCACAGACA GAACATCTGA CCCAAATGTG
1441 CTACACAGTG GGGAGGAAGG GACACCACAG TACCTAAAGG GCCAGCTCCC CCTCCTCTCC
1501 TCAGTCCAGA TCGAGGGCCA CCCCATGTCC CTCCCTTTC AACCTCCTT CCGTCCATGT
1561 TCCCCCTCG ACCAAGGTCC AAGTCCCTGG GGCTGCTGG AGTCCCTTGT GTGTCCCAAG
1621 GATGAAGCCA AGAGCCCAGC CCCTGAGACC TCAGACCTGG AGCAGCCCAC AGAACTGGAT
1681 TCTCTTTTCA GAGGCCTGGC CCTGACTGTG CAGTGGGAGT CCTGA
```

图3

A.



B.

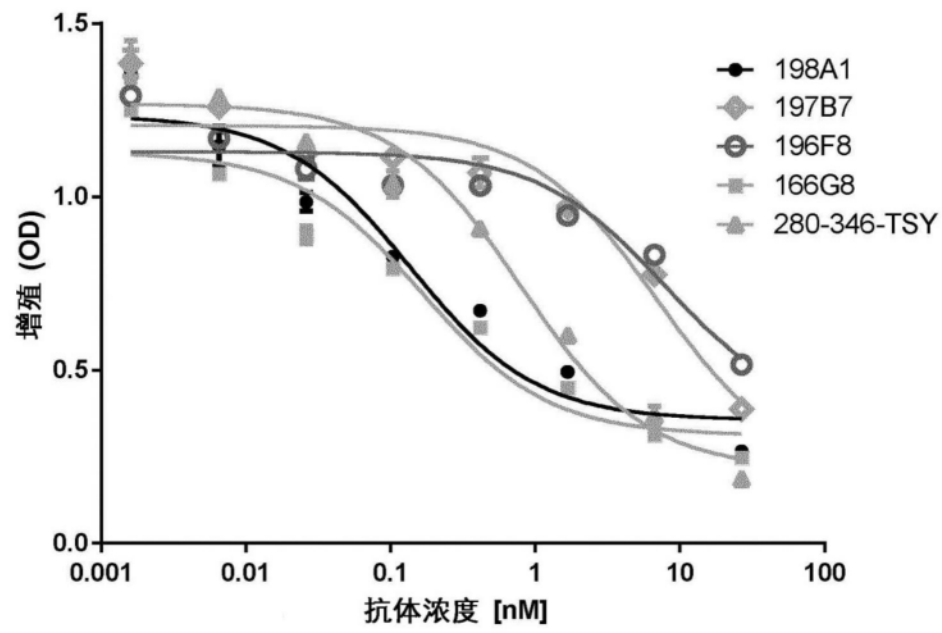


图4

A				
BC029273.1	VRSIQMIVHPTPTPIRAGDGHRLTLEDFHDLFYHLELQVNRTYQM--HLGGKQREYEFFGLTPDTEFLGTIMICVPTWA			SEQ ID NO: 94
IL22RA1-ECD-HIS			SEQ ID NO: 94
01113239 (恒河猴)E.....S			SEQ ID NO: 95
FS371752 (食蟹猴)Y[S].....S			SEQ ID NO: 96
FS368027 (食蟹猴)Y[S].....S			SEQ ID NO: 97
FS371904 (食蟹猴)Y[S].....S			SEQ ID NO: 98
	* 直接参与IL22结合的残基.			
B				
人类	1 LRLEYLIRLTIGYRLNGTAATMGWSCIIILFVATATGVHSPEDPSDLLQHVKFQSSNFENIITWDSGPEGTPDTVYSIEYKTYGERDVAKKGCQRITRK			
恒河猴	1			
食蟹猴	1			
人类	101 SCNLTVEIGNLTELRYARVTAVSAGGRSATKMTDRFSSIQHTTLKPPDVTCISKVRSIQMIVHPTPTPIRAGDGHRLTLEDFHDLFYHLELQVNRTYQM			
恒河猴	101H.....N.....A.....P.....			
食蟹猴	101H.....N.....A.....P.....Y[S].....			
		→ huFc		
人类	201 HLGKQREYEFFGLTPDTEFLGTIMICVPTWAKESAPYMCRVKTLDPDRWT IEGRMDPKSCDKTHTCPFCPAPELLGRPSVFLFPPKPKDTL			SEQ ID NO: 99
恒河猴	201E.....S.K.....R.....G.....			SEQ ID NO: 100
食蟹猴	200S.K.....R.....G.....			SEQ ID NO: 101
	环 6 (PTW; IL22 结合, 紧邻 cyIL22R 中的缺失)			

图5

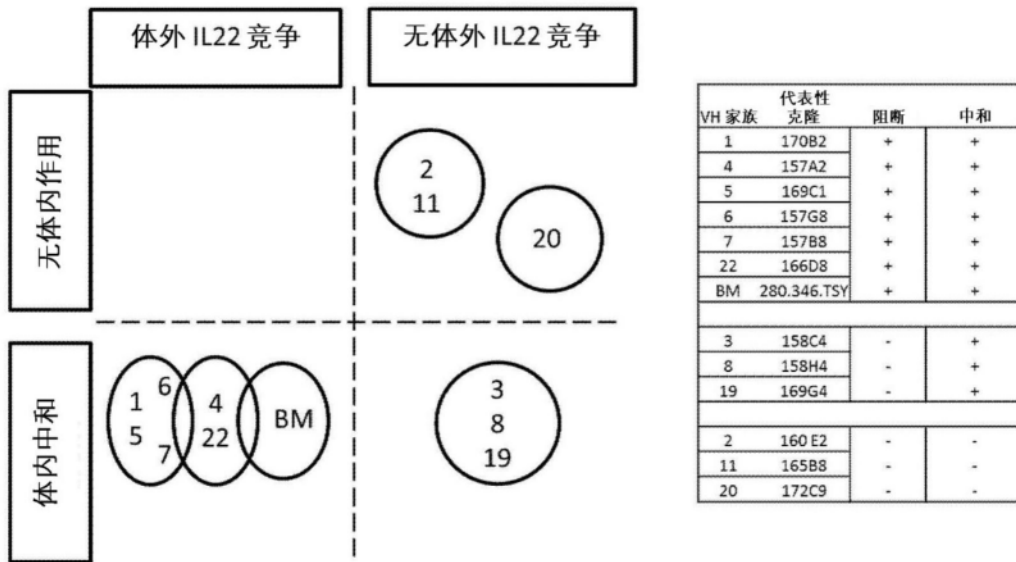


图6

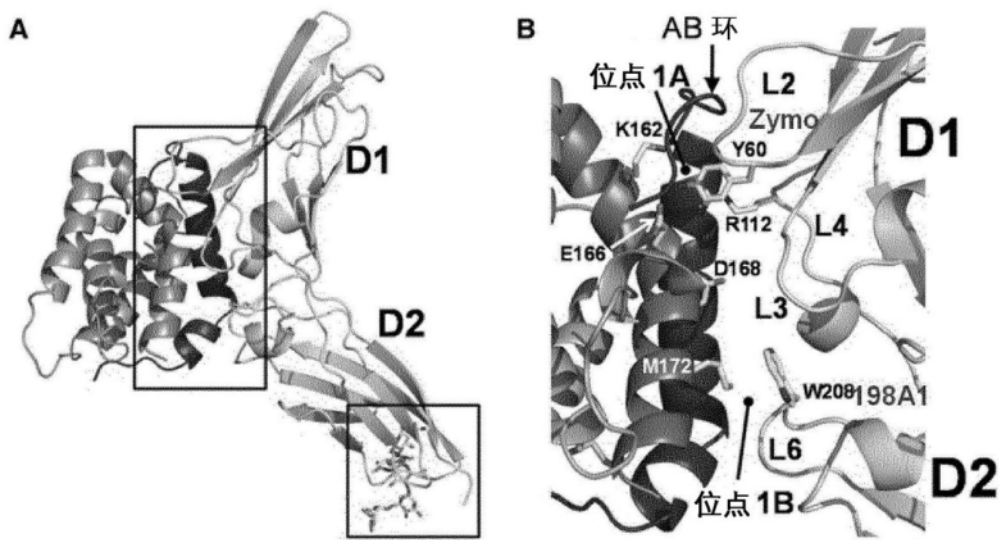


图7

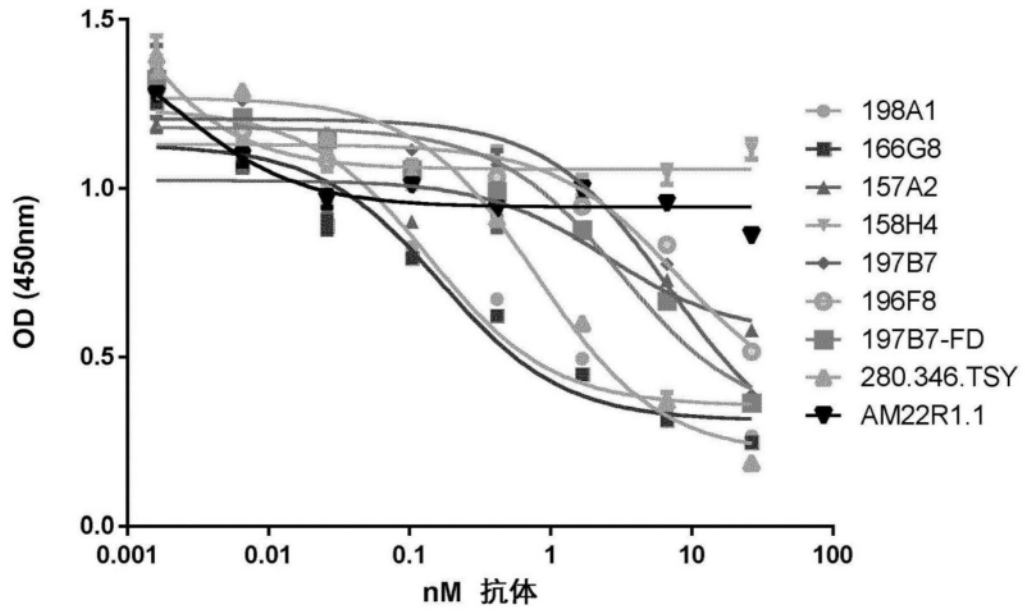


图8

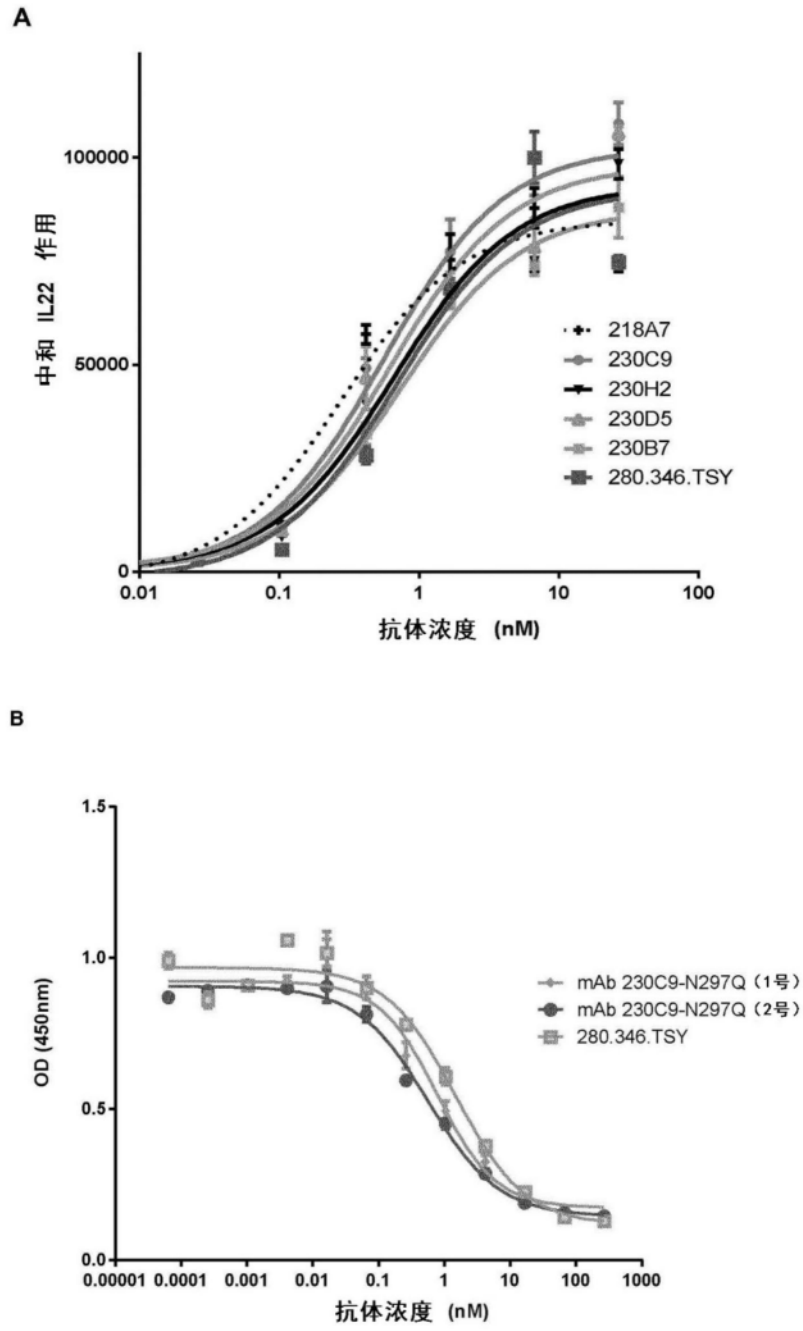


图9

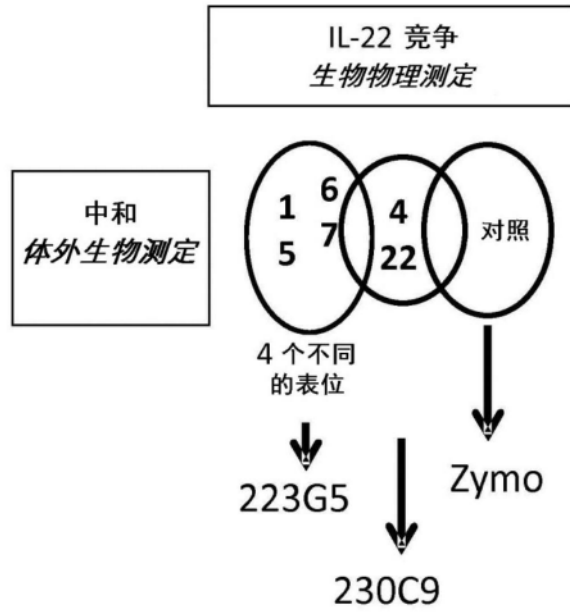


图10

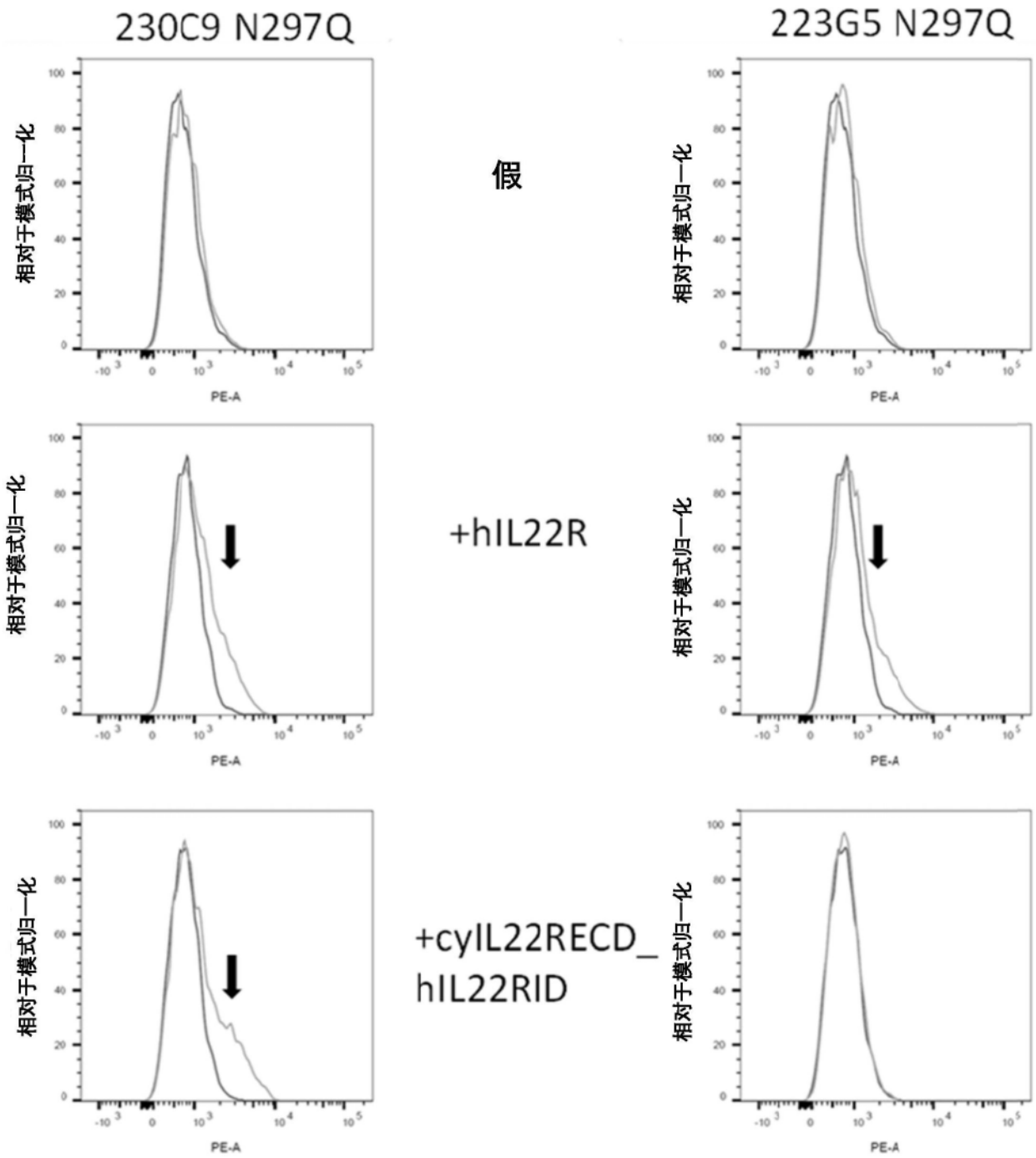


图11

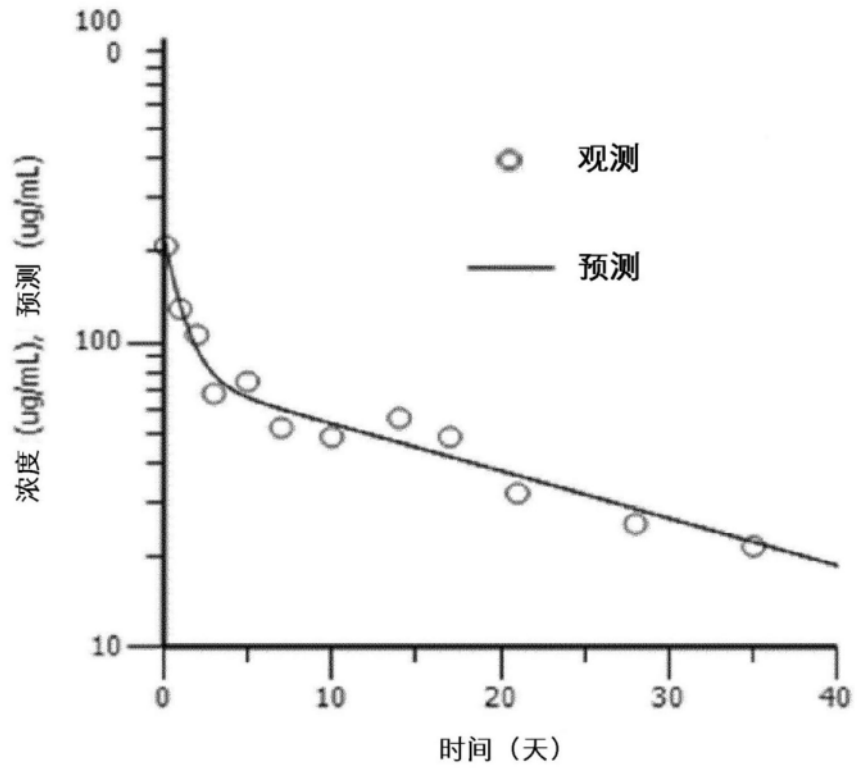
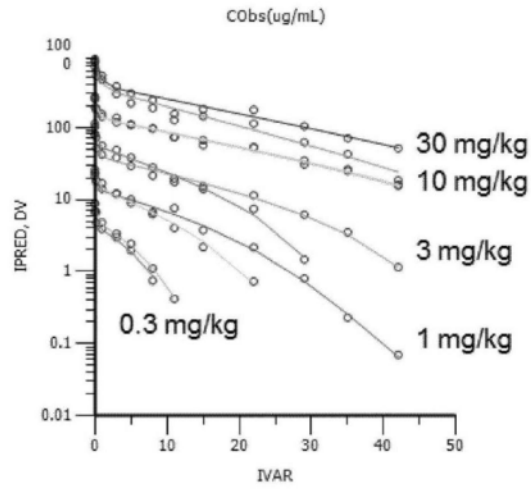


图12

A



B

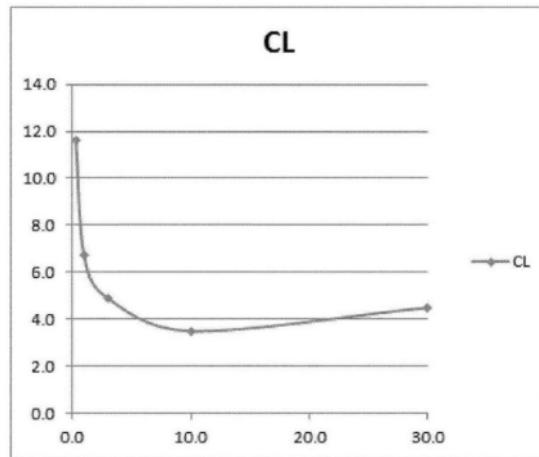


图13

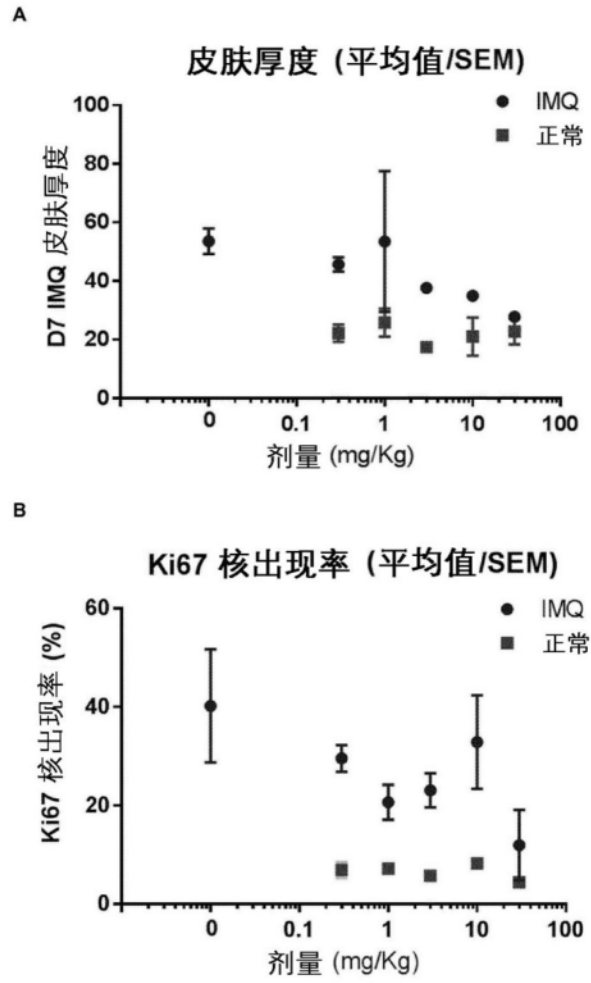


图14

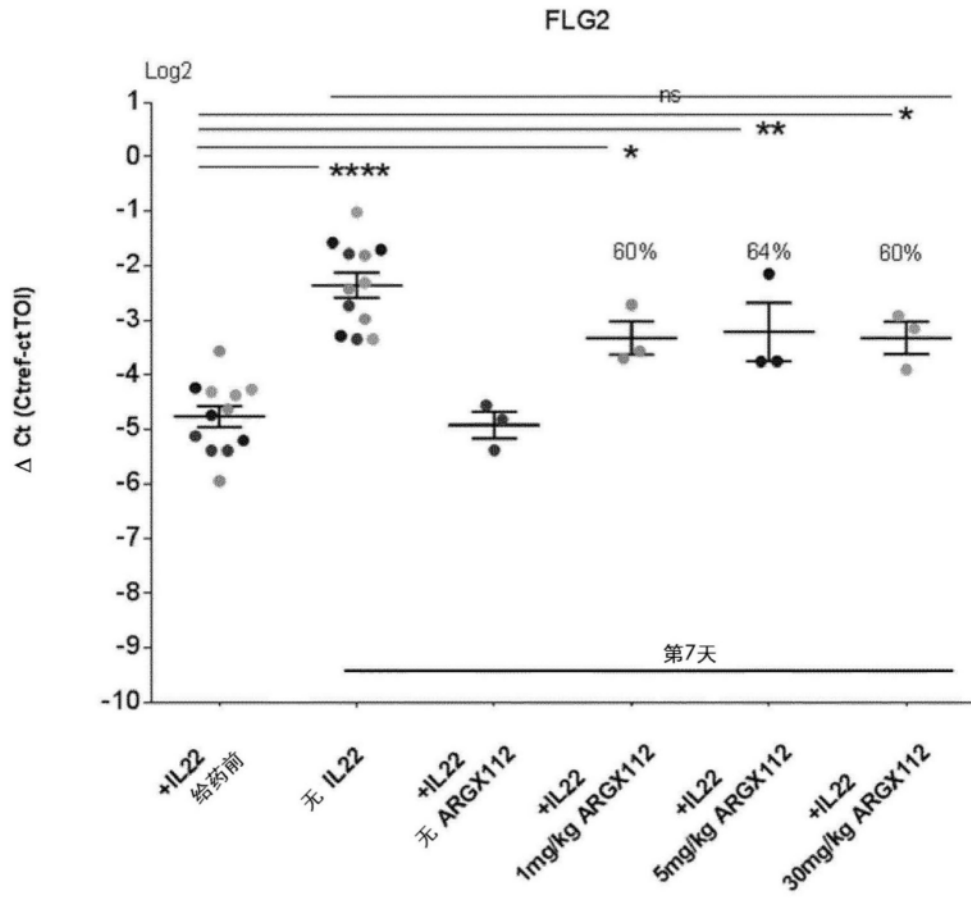


图15

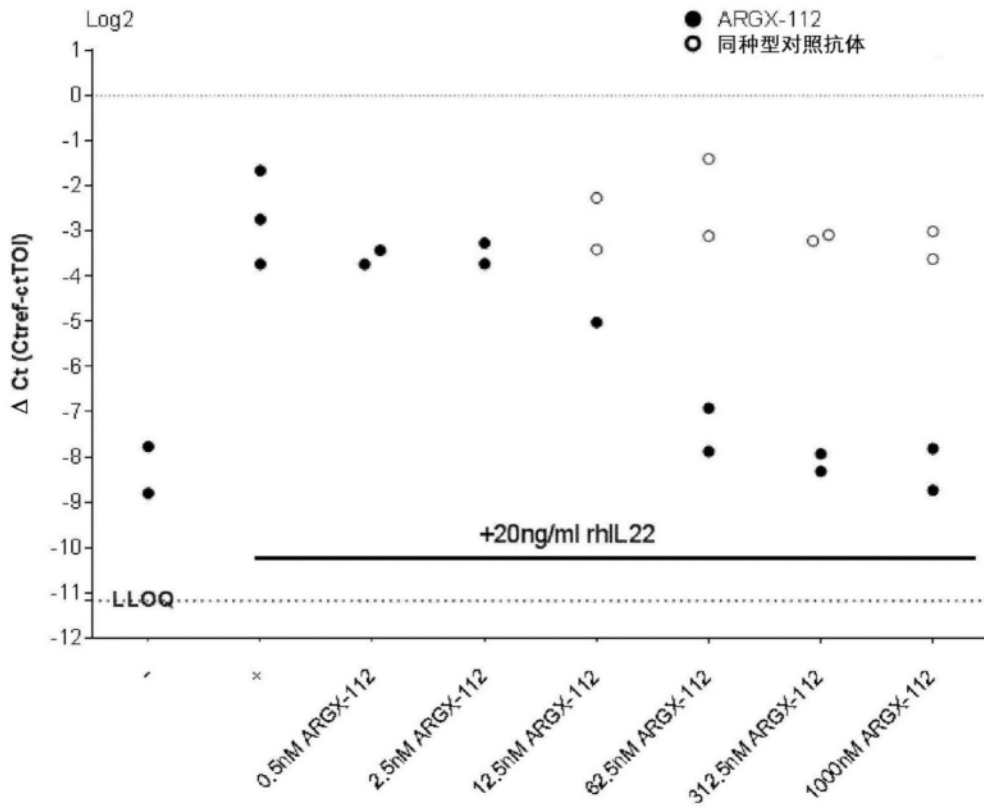


图16

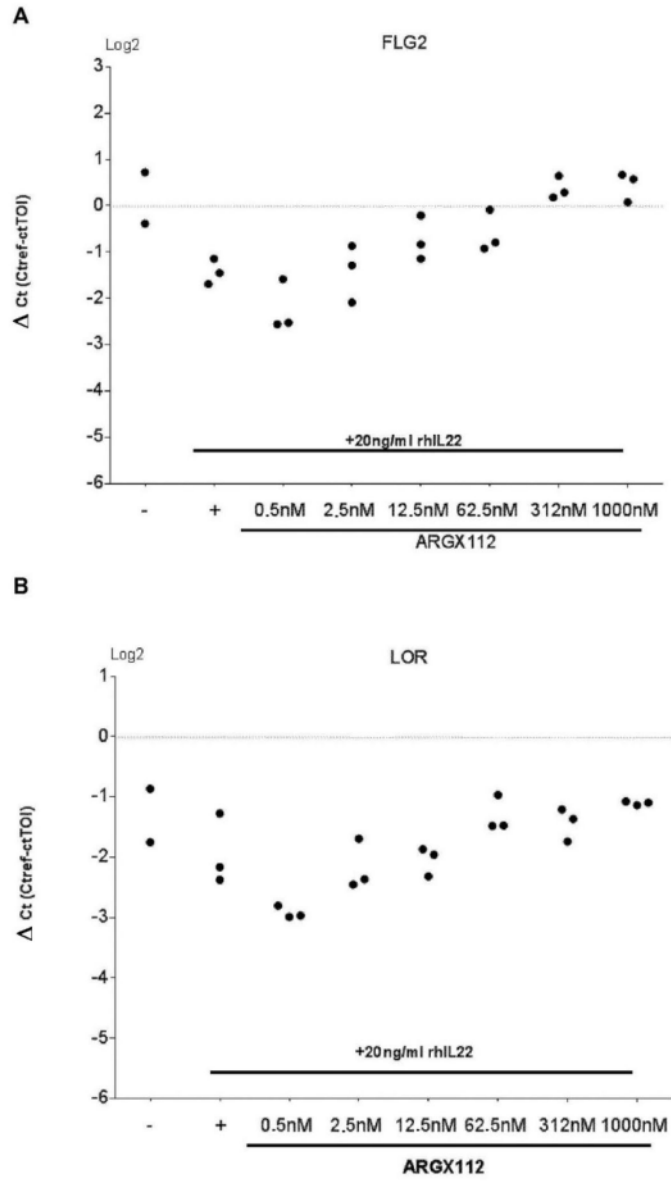


图17

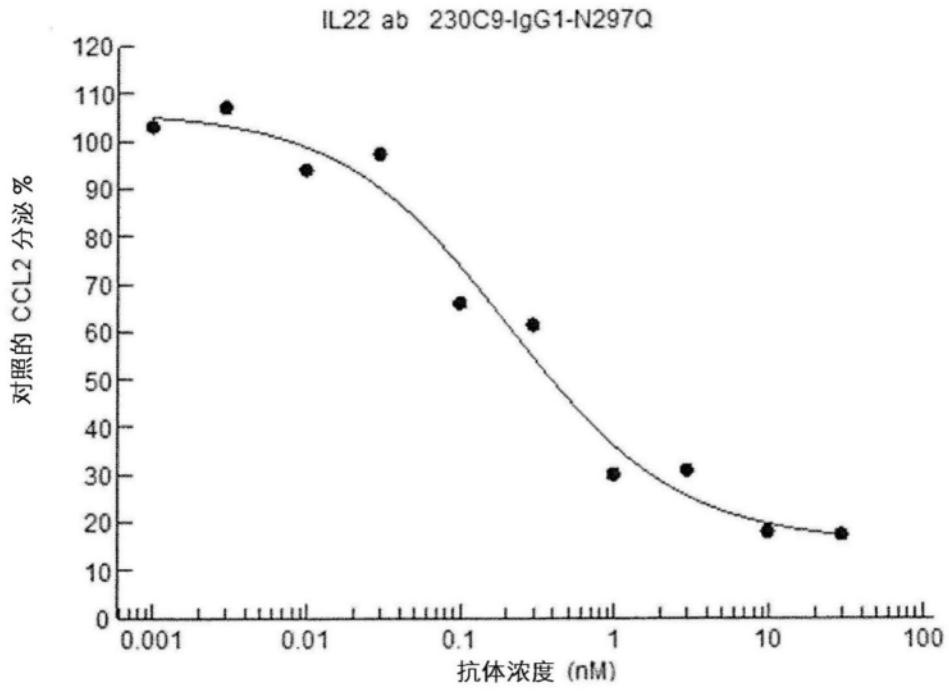


图18