

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036658**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.04

(21) Номер заявки
201790441

(22) Дата подачи заявки
2015.09.22

(51) Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К IL-25 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/054,167**

(32) **2014.09.23**

(33) **US**

(43) **2017.08.31**

(86) **PCT/US2015/051407**

(87) **WO 2016/049000 2016.03.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Оренго Джеми М., Эллин Джинни
(US)**

(74) Представитель:
**Карпенко О.Ю., Угрюмов В.М., Лыу
Т.Н., Гизатуллина Е.М., Кастальский
В.Н., Дементьев В.Н., Клюкин В.А.,
Строкова О.В., Христофоров А.А.
(RU)**

(56) **US-B2-8658169**

WO-A1-2013186236

BALLANTYNE Sarah J. et al.: Blocking IL-25 prevents airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *Journal Allergy Clinical Immunology*, 2007, Vol. 120, no. 6, 1324-1331, особенно с 1327-1329

WO-A1-2011123507

WO-A1-2008129263

S. WANG: "Advances in the production of human monoclonal antibodies ANTI", *ANTIBODY TECHNOLOGY JOURNAL*, vol. 1, 29 June 2011 (2011-06-29), XP055223100, the whole document

ANA CAMELO ET AL.: "Blocking IL-25 signalling protects against gut inflammation in a type-2 model of colitis by suppressing nuocyte and NKT derived IL-13", *JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY*, vol. 47, no. 11, 27 April 2012 (2012-04-27), pages 1198-1211, XP055222599, JP, ISSN: 0944-1174, DOI: 10.1007/s00535-012-0591-2, abstract

IGAWA TOMOYUKI ET AL.: "Engineering the variable region of therapeutic IgG antibodies", *MABS, LANDES BIOSCIENCE, US*, vol. 3, no. 3, 1 May 2011 (2011-05-01), pages 243-252, XP009153597, ISSN: 1942-0870, the whole document

HARDING FIONA A. ET AL.: "The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: Residual immunogenicity resides in the CDR regions", *MABS, LANDES BIOSCIENCE, US*, vol. 2, no. 3, 1 May 2010 (2010-05-01), pages 256-265, XP009137415, ISSN: 1942-0870, DOI: 10.4161/MABS.2.3.11641, the whole document

(57) Изобретение относится к антителам, которые связываются с человеческим интерлейкином-25 (IL-25), и способам их применения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела по изобретению связывают человеческий IL-25 с высокой аффинностью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретение относится к антителам, которые связывают человеческий IL-25 и блокируют IL-25-опосредованную передачу клеточных сигналов. Антитела по изобретению могут быть полностью человеческими, не встречающимися в природе антителами. Антитела по изобретению могут быть пригодны для лечения различных нарушений, ассоциированных с активностью или экспрессией IL-25, в том числе астмы, аллергии, хронической обструктивной болезни легких (COPD), воспалительного заболевания кишечника (IBD), включая язвенный колит и болезнь Крона, atopического дерматита (AD) и эозинофильного гранулематоза с ангиопатией (EGPA), также известного как синдром Черджа-Стросса.

B1**036658****036658****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связывают интерлейкин-25 (IL-25), к фармацевтическим композициям, содержащим такие антитела, и к способам их применения.

Предшествующий уровень техники

Интерлейкин-25 (IL-25) является цитокином, который в структурном отношении является родственным интерлейкину-17 (IL-17) и иногда называется IL-17E. Он является секретируемым гомодимерным гликопротеином, который взаимодействует с гетеродимерным рецептором IL-17RB/IL-17RA и запускает передачу сигнала от него (Iwakura et. al., (2010), Immunity, 34:149). IL-25 продуцируется Th2 клетками, эпителиальными клетками, эндотелиальными клетками, альвеолярными макрофагами, тучными клетками, эозинофилами и базофилами (Rouvier E. et. al. (1993), J. Immunol. 150:5445-5456; Pan G. et. al. (2001), J. Immunol. 167:6559-6567; Kim M. et. al. (2002), Blood 100:2330-2340). Передача сигналов через IL-25 ассоциирована с рекрутированием эозинофилов, иницированием Th2- и Th9-ответов и подавлением ответов с участием Th1- и Th17-клеток. IL-25 индуцирует продукцию других цитокинов во многих тканях, в том числе IL-4, IL-5 и IL-13 (Fort M.M. et al., (2001), Immunity 15:985-995).

IL-25 вовлечен в хроническое воспаление, ассоциированное с желудочно-кишечным трактом, а ген IL-25 был выявлен в хромосомном участке, ассоциированном с аутоиммунными заболеваниями кишечника, такими как воспалительное заболевание кишечника (IBD) (Büning C. et. al. (2003), Eur. J. Immunogenet. Oct; 30(5): 329-333). Также было показано, что IL-25 подвергается положительной регуляции в образцах от пациентов с астмой (Sherkat R. et. al., (2014), Asia Pac. Allergy Oct; 4(4):212-221). Соответственно, блокада передачи сигнала IL-25 может быть полезной для лечения различных расстройств, ассоциированных с активностью или экспрессией IL-25.

Антитела к IL-25 упоминаются, например, в патентах США № 8785605, № 8658169 и № 8206717 и РСТ публикациях WO 2011/123507, WO 2010/038155 и WO 2008/129263. Тем не менее, в настоящей области существует потребность в новых антагонистах IL-25, таких как антитела к IL-25 по настоящему изобретению, для лечения заболеваний или нарушений, ассоциированных с экспрессией и/или передачей сигнала IL-25, или других состояний, ассоциированных с экспрессией и/или передачей сигнала IL-25.

Краткое раскрытие изобретения

Изобретение относится к выделенным антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связываются с человеческим интерлейкином-25 (IL-25).

В соответствии с первым аспектом настоящее изобретение относится к выделенному антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфично связывается с человеческим интерлейкином-25 (IL-25), причем антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, имеет две или более из следующих характеристик:

- (a) является полностью человеческим моноклональным антителом;
- (b) связывает человеческий IL-25 с K_D менее чем приблизительно 120 пМ, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C;
- (c) связывает человеческий IL-25 с полупериодом диссоциации ($t_{1/2}$) более чем приблизительно 105 минут, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C;
- (d) блокирует передачу сигналов человеческого IL-25 в клетках, сконструированных для экспрессии рецептора IL-25 (IL-17RA/IL-17RB) с IC_{50} менее чем приблизительно 2,0 нМ;
- (e) блокирует передачу сигналов человеческого IL-25 в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC) с IC_{50} менее чем приблизительно 16 нМ;
- (f) уменьшает уровни IgE в кровотоке и/или легком у млекопитающего, которое сверхэкспрессирует IL-25;
- (g) уменьшает метаплазию бокаловидных клеток у млекопитающего, которое сверхэкспрессирует IL-25;
- (h) содержит три определяющих комплементарность участка тяжелой цепи (HCDR), содержащиеся в переменном участке тяжелой цепи (HCVR), содержащем аминокислотную последовательность, которая изложена в табл. 1; или (i) содержит три определяющих комплементарность участка легкой цепи (LCDR), содержащиеся в переменном участке легкой цепи (LCVR), содержащем аминокислотную последовательность, которая изложена в табл. 1.

Выделенные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению пригодны, среди прочего, для лечения заболеваний и нарушений, ассоциированных с активностью или экспрессией интерлейкина-25 (IL-25).

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу к IL-25, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфично связывает человеческий IL-25 с K_D менее чем приблизительно 100 пМ, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25 или 37°C.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу к IL-25, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфично связывает человеческий IL-25 с K_D

менее чем приблизительно 60 пМ, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25 или 37°C.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу к IL-25, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфично связывает человеческий IL-25 с K_D менее чем приблизительно 40 пМ, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25 или 37°C.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу к IL-25, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфично связывает человеческий IL-25 с K_D менее чем приблизительно 20 пМ, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25 или 37°C.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу к IL-25 или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфично связывает человеческий IL-25 с $t^{1/2}$ более чем приблизительно 150 мин, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу к IL-25, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфично связывает человеческий IL-25 с $t^{1/2}$ более чем приблизительно 200 мин, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу к IL-25, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфично связывает человеческий IL-25 с $t^{1/2}$ более чем приблизительно 250 мин, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу к IL-25, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфично связывает человеческий IL-25 с $t^{1/2}$ более чем приблизительно 400 мин, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу к IL-25, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфично связывает человеческий IL-25 и блокирует передачу сигнала человеческого IL-25 в клетках, сконструированных для экспрессии рецептора IL-25 (IL-17RA/IL-17RB), с IC_{50} менее чем приблизительно 720 пМ.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу к IL-25, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфично связывает человеческий IL-25 и блокирует передачу сигнала человеческого IL-25 в клетках, сконструированных для экспрессии рецептора IL-25 (IL-17RA/IL-17RB), с IC_{50} менее чем приблизительно 500 пМ.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу к IL-25, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфично связывает человеческий IL-25 и блокирует передачу сигнала человеческого IL-25 в клетках, сконструированных для экспрессии рецептора IL-25 (IL-17RA/IL-17RB), с IC_{50} менее чем приблизительно 100 пМ.

В соответствии с одним вариантом осуществления изобретение относится к антителу к IL-25, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфично связывает человеческий IL-25 и блокирует передачу сигнала человеческого IL-25 в PBMC человека с IC_{50} менее чем приблизительно 2,0 нМ.

В соответствии с одним вариантом осуществления изобретение относится к антителу к IL-25, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфично связывает человеческий IL-25 и блокирует передачу сигнала человеческого IL-25 в PBMC человека с IC_{50} менее чем приблизительно 700 пМ.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к антителу к IL-25, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфично связывает человеческий IL-25 и блокирует передачу сигнала человеческого IL-25 в PBMC человека с IC_{50} , варьирующем от приблизительно 30 пМ до приблизительно 150 пМ.

Антитела согласно настоящему изобретению могут иметь полную длину (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, фрагмент Fab, F(ab')₂ или scFv) и могут быть модифицированы с затрагиванием функциональности, например, для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933).

Иллюстративные антитела к IL-25 согласно настоящему изобретению приведены в табл. 1 и 2 настоящего документа. В табл. 1 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных участков тяжелой цепи (HCVR), переменных участков легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность участков тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность участков легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител к IL-25. В табл. 2 приведены идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител к IL-25.

Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связывают IL-25, содержащим HCVR, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1, или

практически схожую с ней последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связывают IL-25, содержащим LCVR, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 1, или практически схожую с ней последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связывают IL-25, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), которая содержит любую из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных антител к IL-25, приведенных в табл. 1.

Выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывает человеческий интерлейкином-25 (IL-25), причем антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит: (а) определяющие комплементарность участки (CDR) из варибельного участка тяжелой цепи (HCVR), содержащего аминокислотную последовательность, изложенную в табл. 1; и (b) CDR из варибельного участка легкой цепи (LCVR), содержащего аминокислотную последовательность, изложенную в табл. 1.

В соответствии с одним вариантом осуществления выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывает IL-25, содержит: (а) CDR из HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242 и 258; и (b) CDR из LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250 и 266.

В соответствии с одним вариантом осуществления выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывает IL-25, содержит: (а) CDR из HCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 98, 114, 130 и 178; и (b) CDR из LCVR с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 106, 122, 138 и 186.

В соответствии с одним вариантом осуществления выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывает IL-25, содержит аминокислотную последовательность HCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242 и 258.

В соответствии с одним вариантом осуществления выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывает IL-25, содержит аминокислотную последовательность LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250 и 266.

В соответствии с одним вариантом осуществления выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывает IL-25, содержит аминокислотную последовательность HCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242 и 258; и аминокислотную последовательность LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250 и 266.

В соответствии с одним вариантом осуществления выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывает IL-25, содержит CDR из пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250 и 258/266.

В соответствии с одним вариантом осуществления выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывает IL-25, содержит CDR из пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 98/106, 114/122, 130/138 и 178/186.

В соответствии с одним вариантом осуществления выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывает IL-25, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250 и 258/266.

В соответствии с одним вариантом осуществления выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывает IL-25, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 98/106; 114/122; 130/138 и 178/186.

Изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые спе-

цифично связывают IL-25, содержащим CDR1 (HCDR1) тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, приведенных в табл. 1, или практически схожую с ней последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней.

Изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связывают IL-25, содержащим CDR2 (HCDR2) тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, приведенных в табл. 1, или практически схожую с ней последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней.

Изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связывают IL-25, содержащим CDR3 (HCDR3) тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в табл. 1, или практически схожую с ней последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней.

Изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связывают IL-25, содержащим CDR1 (LCDR1) легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, приведенных в табл. 1, или практически схожую с ней последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней.

Изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связывают IL-25, содержащим CDR2 (LCDR2) легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, приведенных в табл. 1, или практически схожую с ней последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней.

Изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связывают IL-25, содержащим CDR3 (LCDR3) легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в табл. 1, или практически схожую с ней последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней.

Изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связывают IL-25, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), которая содержит любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в табл. 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в табл. 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из иллюстративных антител к IL-25, приведенных в табл. 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из: 104/112; 120/128; 136/144 и 184/192.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связывают IL-25, содержащим набор из шести CDR, (то есть, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3), которые содержатся в любом из иллюстративных антител к IL-25, приведенных в табл. 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 выбран из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 100, 102, 104, 108, 110, 112; (b) SEQ ID NO: 116, 118, 120, 124, 126, 128; (c) SEQ ID NO: 132, 134, 136, 140, 142, 144; и (d) SEQ ID NO: 180, 182, 184, 188, 190, 192.

В соответствии с родственным вариантом осуществления настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связывают IL-25, содержащим набор из шести CDR, (то есть, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3), которые содержатся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, определяемой любым из иллюстративных антител к IL-25, приведенных в табл. 1. Например, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связывают IL-25, содержащим набор аминокислотных последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из: 98/106; 114/122; 130/138 и 178/186. Способы и методики определения CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны из уровня техники и могут быть применены для определения CDR в раскрываемых в настоящем описании указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR. Иллюстративные условные обозначения, которые можно применять для определения границ CDR, включают, например, обозначение по Kabat, обозначение по Chothia и AbM-обозначение. В общих чертах, обозначение по Kabat основано на вариабельности последовательности, обозначение по Chothia основано на расположении структурных петельных участков, и AbM-обозначение является что-то средним между подходами Kabat и Chothia. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997);

и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56:9268-9272 (1989). Находящиеся в общем доступе базы данных также доступны для определения последовательностей CDR в антителе.

В соответствии с одним вариантом осуществления изобретение относится к выделенному антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфично связывает IL-25, содержащему:

- (a) домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244 и 260;
- (b) домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246 и 262;
- (c) домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248 и 264;
- (d) домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252 и 268;
- (e) домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254 и 270; и
- (f) домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256 и 272.

В соответствии с одним вариантом осуществления изобретение относится к выделенному антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфично связывает IL-25, содержащему:

- (a) домен HCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 100, 116, 132 и 180;
- (b) домен HCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 102, 118, 134 и 182;
- (c) домен HCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 104, 120, 136 и 184;
- (d) домен LCDR1 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 108, 124, 140 и 188;
- (e) домен LCDR2 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 110, 126, 142 и 190; и
- (f) домен LCDR3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 112, 128, 144 и 192.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое содержит набор из шести CDR, выбранных из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 100, 102, 104, 108, 110, 112; (b) SEQ ID NO: 116, 118, 120, 124, 126, 128; (c) SEQ ID NO: 132, 134, 136, 140, 142, 144; и (d) SEQ ID NO: 180, 182, 184, 188, 190, 192.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связывают человеческий интерлейкин-25 (IL-25), причем антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, конкурируют за связывание с человеческим IL-25 с эталонным антителом, содержащим пару аминокислотных последовательностей переменного участка тяжелой цепи/переменного участка легкой цепи (HCVR/LCVR), которая приведена в табл. 1. Эталонное антитело может содержать пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250 и 258/266.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, которое связывает человеческий интерлейкин-25 (IL-25), причем антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывается с тем же эпитопом на человеческом IL-25, что и эталонное антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей переменного участка тяжелой цепи/переменного участка легкой цепи (HCVR/LCVR), которая приведена в табл. 1. Эталонное антитело может содержать пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250 и 258/266.

В соответствии со вторым аспектом настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела к IL-25 или их части. Например, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим аминокислотные последовательности HCVR, приведенные в табл. 1; в соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, приведенных в табл. 2, или практически схожую с ней последовательность, которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична с ней.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим аминокислотные последовательности LCVR, приведенные в табл. 1; в соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, приведенных в табл. 2, или

легкой цепи антитела к IL-25.

Например, настоящее изобретение относится к рекомбинантным векторам экспрессии, содержащим любую из упомянутых выше молекул нуклеиновой кислоты, то есть молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, которые приведены в табл. 1. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих выработку антител или фрагментов антител, и выделение полученных таким образом антител и фрагментов антител.

Настоящее изобретение относится к антителам к IL-25, имеющим модифицированный паттерн гликозилирования. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления может быть пригодна модификация, удаляющая нежелательные сайты гликозилирования, или антитело без фукозного фрагмента, присутствующего на олигасахаридной цепи, для повышения функции антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других областях применения для модификации комплементзависимой цитотоксичности (CDC) можно выполнить модификацию галактозилирования.

В соответствии с четвертым аспектом настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывает IL-25, и фармацевтически приемлемый носитель.

В соответствии с родственным аспектом настоящее изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию антитела к IL-25 и второго терапевтического средства. В соответствии с одним вариантом осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, которое успешно комбинируется с антителом к IL-25. Второе терапевтическое средство может быть пригодным для облегчения воспалительного заболевания или нарушения или по меньшей мере одного симптома воспалительного заболевания или нарушения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления второе терапевтическое средство может быть выбрано из группы, состоящей из нестероидного противовоспалительного средства (NSAID), стероида, кортикостероида (ингаляционного или для местного применения), иммунодепрессанта (например, циклофосамида), антихолинергического средства (например, тиотропия), мускаринового средства (например, гликопиррония), ингибитора фосфодиэстеразы (например, теофиллина, рофлумиласта, циломиласта), бета-блокатора, циклоспорина, такролимуса, пимекролимуса, азатиоприна, метотрексата, кромолина натрия, ингибитора протеиназы, бронхального дилататора, бета-2-агониста, антигистамина, эпинефрина, противоотечного средства, ингибитора лейкотриена, ингибитора тучных клеток, антагониста тимического стромального лимфопоэтина (TSLP), антагониста TNF, антагониста IgE, антагониста IL-1, антагониста IL-4 или IL-4R, антагониста IL-13 или IL-13R или двойного антагониста IL-4/IL-13, антагониста IL-5, антагониста IL-6 или IL-6R, антагониста IL-8, антагониста IL-9, антагониста IL-12/23, антагониста IL-22, антагониста IL-17, антагониста IL-31, антагониста IL-33, антагониста тимического стромального лимфопоэтина белка (TSLP), перорального ингибитора PDE4 и другого антитела к IL-25.

В соответствии с пятым аспектом настоящее изобретение относится к терапевтическим способам лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с активностью или экспрессией IL-25, или по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с заболеванием или нарушением, с помощью антитела к IL-25 или антигенсвязывающей части антитела по настоящему изобретению. Терапевтические способы в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения предусматривают введение нуждающемуся в том субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению. Подвергаемое лечению нарушение представляет собой любое заболевание или состояние, которое улучшается, облегчается, ингибируется или предупреждается при целенаправленном воздействии на IL-25 и/или при ингибировании IL-25-опосредованной передачи клеточных сигналов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления заболевание или нарушение, подвергаемое лечению с помощью антител к IL-25 по настоящему изобретению, или его антигенсвязывающей части, может быть выбрано из группы, состоящей из астмы, аллергии, аллергического ринита, аллергического воспаления дыхательных путей, аутоиммунных заболеваний, хронической обструктивной болезни легких (COPD), эозинофильной пневмонии, эозинофильного эзофагита, гиперэозинофильного синдрома, реакции "трансплантат против хозяина", атопического дерматита (AD), крапивницы, в том числе хронической идиопатической крапивницы, псориаза, воспалительного заболевания кишечника (IBD), артрита, увеита, сердечнососудистого заболевания, боли, рассеянного склероза, волчанки, васкулита и эозинофильного гранулематоза с ангиопатией ((EGPA), также известного как синдром Черджа-Стросса).

В соответствии с одним вариантом осуществления астма, которую можно лечить с помощью антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, может быть выбрана из группы, состоящей из аллергической астмы, неаллергической астмы, тяжелой рефракторной астмы, обострений астмы, вирусной астмы или обострений вирусной астмы, устойчивой к стероидам астмы, восприимчивой к стероидам астмы, эозинофильной астмы или неэозинофильной астмы и других родственных нарушений, характеризующихся воспалением дыхательных путей или гиперчувствительностью ды-

хательных путей (АНР).

В соответствии с одним вариантом осуществления COPD, которую можно лечить с помощью антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, частично ассоциирована с или вызвана сигаретным дымом, загрязнением воздуха, химическими веществами на рабочем месте, аллергией или гиперчувствительностью дыхательных путей.

В соответствии с одним вариантом осуществления AD, который можно лечить с помощью антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, частично ассоциирован с или вызван нарушением функции эпидермального барьера, аллергией или радиоактивным облучением.

Аллергия, которую можно лечить с помощью антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, может быть вызвана определенными пищевыми продуктами, пылью, плесенью, пылевыми клещами, животными или шерстью животных.

В соответствии с одним вариантом осуществления IBD, которое можно лечить с помощью антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, может быть выбрано из группы, состоящей из язвенного колита, болезни Крона, коллагенозного колита, лимфоцитарного колита, ишемического колита, воспаления в отключенной кишке, синдрома Бехчета, инфекционного колита, недифференцированного колита, а также других нарушений, характеризующихся воспалением слизистой оболочки толстой кишки или ободочной кишки.

В соответствии с одним вариантом осуществления артрит, который можно лечить с помощью антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, может быть выбран из группы, состоящей из остеоартрита (ОА), ревматоидного артрита и псориатического артрита.

Другие варианты осуществления станут понятны при рассмотрении последующего подробного описания.

Краткое описание чертежей

На фигуре представлено перекрестное конкуритрование среди антител к IL-25 за человеческий IL-25.

Подробное раскрытие изобретения

Перед описанием изобретения необходимо понять, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут изменяться. Также следует понять, что применяемая в настоящем описании терминология приведена только с целью описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, то все применяемые в настоящем документе технические и научные термины имеют такое же значение, которое обычно понимается рядовым специалистом в настоящей области техники, к которой относится настоящее изобретение. В контексте настоящего описания термин "приблизительно" при использовании в отношении конкретного приведенного числового значения означает, что значение может варьировать от приведенного значения не более чем на 1%. Например, в контексте настоящего описания выражение "приблизительно 100" включает 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т. п.).

Несмотря на то что при осуществлении на практике или испытании настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, схожие или эквивалентные описанным в настоящем документе, далее описаны предпочтительные способы и материалы. Все упомянутые в описании патенты, заявки и непатентные публикации включены в настоящий документ с помощью ссылки в их полном объеме.

Определения.

Выражение "интерлейкин-25", "IL-25" и тому подобное, также известное как "IL-17E", относится к человеческому цитокину (если не обозначено, что он происходит от другого вида), содержащему аминокислотную последовательность, которая представлена в аминокислотных остатках 33-177 под номером доступа NP_073626.1. Человеческий IL-25, содержащий тус-тус-гексагистидиновую метку, показан в виде SEQ ID NO: 273 (причем аминокислотные остатки 1-145 представляют собой человеческий IL-25 без сигнальной последовательности, а аминокислотные остатки 146-173 - тус-тус-гексагистидиновую метку). В настоящем документе описаны дополнительные белки IL-25, в том числе обезьяний IL-25 (аминокислоты 33-176 в последовательности под номером доступа XP_001107906.2), содержащий тус-тус-гексагистидиновую метку, который показан в виде SEQ ID NO: 274 (причем аминокислотные остатки 1-144 представляют собой IL-25 M.fascicularis, а аминокислотные остатки 145-172 - тус-тус-гексагистидиновую метку); мышинный IL-25 (аминокислоты 17-169 в последовательности под номером доступа NP_542767.1), содержащий тус-тус-гексагистидиновую метку, который показан в виде SEQ ID NO: 275 (причем аминокислотные остатки 1-153 представляют собой мышинный IL-25, а аминокислотные остатки 154-181 - тус-тус-гексагистидиновую метку), и крысиный IL-25 (аминокислотные остатки 17-169 в последовательности под номером доступа NP_001178936.1), содержащий тус-тус-гексагистидиновую метку, который показан в виде SEQ ID NO: 276 (причем аминокислотные остатки 1-153 представляют собой крысиный IL-25, а аминокислотные остатки 154-181 - тус-тус-гексагистидиновую метку).

Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белков в настоящем документе предназначены для

обозначения человеческой версии соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что они происходят от вида, отличного от человека. Таким образом, выражение "IL-25" означает человеческий IL-25, если не указано, что он происходит от вида, отличного от человека, например, "обезьяний IL-25", "мышинный IL-25", "крысиный IL-25" и т.д.

Применяемый в настоящем документе термин "антитело к IL-25" включает как моновалентные антитела с одной специфичностью, так и биспецифические антитела, содержащие первое плечо, которое связывает IL-25, и второе плечо, которое связывает второй (целевой) антиген, причем плечо к IL-25, содержит любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, указанных в табл. 1 в данном документе. Выражение "антитело к IL-25" также включает в себя конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), содержащие антитело к IL-25 или его антигенсвязывающую часть, конъюгированное с лекарственным средством или токсином (т.е. цитотоксическим средством). Выражение "антитело к IL-25" также включает в себя конъюгаты антитело-радионуклид (ARC), содержащие антитело к IL-25 или его антигенсвязывающую часть, конъюгированное с радионуклидом.

Применяемый в настоящем документе термин "антитело к IL-25" означает антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, которые содержат по меньшей мере один определяющий комплементарный участок (CDR), специфично связывающийся или взаимодействующий с IL-25 или частью IL-25. Термин "антитело" включает иммуноглобулиновые молекулы, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые цепи (H) и две легкие цепи (L), связанные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменный участок тяжелой цепи (сокращенно в настоящем документе HCVR или V_H) и константный участок тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи содержит три домена, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи (сокращенно в настоящем документе LCVR или V_L) и константный участок легкой цепи. Константный участок легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). Участки V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на участки гипервариабельности, так называемые определяющие комплементарность участки (CDR), чередуемые с участками, которые являются более консервативными, называемыми каркасными участками (FR). В состав каждого V_H и V_L входят три CDR и четыре FR, располагающиеся от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В соответствии с другими вариантами осуществления по настоящему изобретению FR антитела к IL-25 (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичными с человеческими последовательностями зародышевой линии или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Amino-кислотную консенсусную последовательность можно определить на основе анализа расположенных параллельно последовательностей двух или более CDR.

Применяемый в документе термин "антитело" также включает антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антител. Применяемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п. включают любой получаемый ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфично связывает антиген с формированием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, от целых молекул антител с применением любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методики генетической инженерии, предусматривающие манипуляцию с ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела, и ее экспрессию. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаг-антитела), или ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать и с ней можно проводить манипуляции химическими способами или при помощи методик молекулярной биологии, например, для организации одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты $F(ab')_2$; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельный участок антитела (например, выделенный определяющий комплементарность участок (CDR), такой как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Также применяемым в настоящем документе выражением "антигенсвязывающий фрагмент" охвачены другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, антитела с одним доменом, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с пришитым CDR, диатела, триотела, тетратела, миниантитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), иммунопрепараты на основе модульного белка с малым размером молекул (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, будет содержать по меньшей мере один CDR, который является смежным с одной или несколькими каркасными последовательностями или находится в их пределах. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H , ассоциированный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут быть расположены от-

носителем друг друга в любом подходящем порядке. Например, варибельный участок может быть димерным и содержать димеры V_H-V_H , V_H-V_L или V_L-V_L . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

В соответствии с определенными вариантами осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один варибельный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации варибельных и константных доменов, которые можно обнаружить в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (i) V_H-C_H1 ; (ii) V_H-C_H2 ; (iii) V_H-C_H3 ; (iv) $V_H-C_H1-C_H2$; (v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (vi) $V_H-C_H2-C_H3$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_H1 ; (ix) V_L-C_H2 ; (x) V_L-C_H3 ; (xi) $V_L-C_H1-C_H2$; (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$; (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$; и (xiv) V_L-C_L . В любой конфигурации варибельных и константных доменов, включая любые из перечисленных выше иллюстративных конфигураций, варибельные и константные домены могут быть либо непосредственно соединены друг с другом, либо могут быть соединены при помощи полного или частичного шарнирного или линкерного участка. Шарнирный участок может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что в результате дает гибкую или полугибкую связь между смежными варибельными и/или константными доменами в отдельной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) в любой из перечисленных выше конфигураций варибельных и константных доменов в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (например, посредством дисульфидной связи(связей)).

Как и в случае с целыми молекулами антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере два различных варибельных домена, причем каждый варибельный домен способен специфично связываться с отдельным антигеном или с отличным эпитопом на одном антигене. Любой мультиспецифический формат антитела, включая раскрываемые в настоящем документе иллюстративные биспецифические форматы антител, можно адаптировать для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с помощью доступных в настоящей области техники стандартных методик.

Антитела по настоящему изобретению могут выполнять свою функцию, блокируя взаимодействие между IL-25 и одним или несколькими из его компонентов рецептора или иным образом препятствуя ему. В качестве альтернативы, антитела по настоящему изобретению могут ингибировать IL-25-опосредованную передачу сигнала посредством механизма, который не предусматривает блокировку взаимодействия IL-25 с его рецептором. В соответствии с другими вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению могут функционировать посредством комплементзависимой цитотоксичности (CDC) или антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC). "Комплементзависимая цитотоксичность" (CDC) относится к лизису экспрессирующих антиген клеток при помощи антитела по настоящему изобретению в присутствии комплемента. Термин "антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность" (ADCC) относится к клеточноопосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют рецепторы Fc (FcR) (например, натуральные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное на клеточной мишени антитело, что таким образом приводит к лизису клетки-мишени. CDC и ADCC можно измерить с помощью анализов, которые хорошо известны и доступны в настоящей области. (См., например, патенты США № 5500362 и 5821337 и Clynes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656). Константный участок антитела играет важную роль в способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточную цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основании того, необходимо ли антителу опосредовать цитотоксичность.

Применяемый в данном описании термин "человеческое антитело" предназначен для включения не встречающихся в природе человеческих антител. Термин включает в себя антитела, которые получены рекомбинантным путем у отличного от человека млекопитающего или в клетках отличного от человека млекопитающего. Термин не предназначен для включения антител, выделенных из человеческого субъекта или выработанных у него.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела по настоящему изобретению могут быть рекомбинантными и/или не встречающимися в природе человеческими антителами. Применяемый в настоящем документе термин "рекомбинантное человеческое антитело" предназначен для включения всех человеческих антител, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, таких как антитела, экспрессированные с помощью рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (описано ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител (описано ниже), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным по отношению к генам человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, предусматривающими сращивание последовательностей гена человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями

ми ДНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу *in vitro* (или соматическому мутагенезу *in vivo* при использовании животных, трансгенных по отношению к последовательностям человеческого Ig), и поэтому аминокислотные последовательности V_H и V_L участков рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и являются родственными последовательностям V_H и V_L человеческой зародышевой линии, не могут в естественных условиях существовать в репертуаре человеческих антител зародышевой линии *in vivo*.

Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые ассоциированы с гетерогенностью шарнирной области. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию массой примерно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе межцепочечными дисульфидными связями тяжелых цепей. Во второй форме димеры не связаны дисульфидными межцепочечными связями, и образуется молекула массой приблизительно 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепи (половина антитела). Такие формы было чрезвычайно сложно разделить, даже после аффинной очистки.

Частота появления второй формы в различных интактных изотипах IgG обусловлена без ограничения структурными различиями, ассоциированными с изотипом шарнирного участка антитела. Одиночная аминокислотная замена в шарнирном участке шарнира человеческого IgG4 может значительно уменьшить появление второй формы (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых при использовании шарнира человеческого IgG1. Настоящее изобретение относится к антителам, имеющим одну или несколько мутаций в шарнире, C_H2 или C_H3 участке, что может быть необходимым, например, при получении для повышения выхода требуемой формы антитела.

Термин "специфично связывает", или "специфично связывается с", или т.п. означает, что антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, формирует с антигеном комплекс, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфическое связывание можно охарактеризовать равновесной константой диссоциации, составляющей по меньшей мере приблизительно 1×10^{-6} М или менее (например, K_D с меньшим значением указывает на более прочное связывание). Способы определения, специфично ли связываются две молекулы, хорошо известны в настоящей области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Описанные в настоящем документе антитела, которые специфично связываются с IL-25, были выявлены с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™. Кроме того, применяемые в настоящем документе мультиспецифические антитела, которые связываются с белком IL-25 и одним или несколькими дополнительными антигенами, или биспецифическое антитело, которое связывается с двумя различными участками IL-25, тем не менее, считают антителами, которые "связываются специфично".

Антитела по настоящему изобретению могут быть выделенными антителами. Применяемый в настоящем документе термин "выделенное антитело" означает антитело, которое было выявлено и отделено и/или выделено по меньшей мере от одного компонента его природного окружения. Например, антитело, которое было отделено или удалено по меньшей мере от одного компонента организма или из ткани или клетки, в которой антитело существует в природе или вырабатывается в природе, с точки зрения настоящего изобретения является "выделенным антителом". Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенное антитело может практически не содержать другой клеточный материал и/или другие химические вещества.

Раскрываемые в настоящем документе антитела к IL-25 могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR участках переменных доменов тяжелых и легких цепей. Такие мутации можно легко выявить путем сравнения раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей с последовательностями, доступными, например, из находящихся в общем доступе баз данных последовательностей антител. После получения антитела и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или несколько мутаций, можно легко протестировать на предмет одного или нескольких необходимых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или увеличенные антагонистические или агонистические биологические свойства (при соответствующих обстоятельствах), уменьшенная иммуногенность и т.д. Настоящее изобретение относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам, которые, в целом, получены таким способом.

Настоящее изобретение также относится к антителам к IL-25, содержащим варианты любой из раскрываемых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR с одной или несколькими консервативными заменами. Например, настоящее изобретение относится к антителам к IL-25, имеющим аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, которые приведены в настоящем документе в табл. 1.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельном участке молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут оказывать различные биологические эффекты. Эпитопы могут быть либо конформационными, либо линейными. Конформационный эпитоп получают посредством пространственно соединенных аминокислот из различных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп является эпитопом, образуемым с помощью смежных аминокислотных остатков в полипептидной цепи. В определенных условиях эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

Термин "существенная идентичность" или "практически идентичный" в отношении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента указывает на то, что при оптимальном выравнивании при помощи соответствующих нуклеотидных вставок или делеций с другой нуклеиновой кислотой (или комплементарной ей нитью) имеет место идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере у приблизительно 95% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований согласно результатам измерения при помощи любого хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, который рассмотрен ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, характеризующаяся существенной идентичностью с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может, в определенных случаях, кодировать полипептид, имеющий такую же или практически схожую аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам термин "существенное сходство" или "практически схожий" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, таком как посредством программ GAP или BESTFIT, с применением штрафов за открытие гэпов по умолчанию, имеют по меньшей мере 95% идентичность последовательности, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99% идентичность последовательности. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются по консервативным аминокислотным заменам. "Консервативная аминокислотная замена" является заменой, при которой аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (группу R) со схожими химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена практически не будет изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга по консервативным заменам, для процента идентичности последовательностей или степени сходства можно ввести положительную поправку, чтобы скорректировать в отношении консервативной природы замены. Способы осуществления такой корректировки хорошо известны специалистам в настоящей области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, который включен в настоящий документ с помощью ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со схожими химическими свойствами, включают: (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат; и (7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных замен аминокислот являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативным замещением является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в работе Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445, которая включена в настоящий документ с помощью ссылки. "Умеренно консервативное" замещение представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, обычно измеряют с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка сопоставляет схожие последовательности при помощи показателей схожести, присваиваемых различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как Gap и Bestfit, которые можно применять с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG Version 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать при помощи FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендованными параметрами, программы в GCG Version 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) выводит результаты выравнивания и процент идентичности последовательностей для участков с наилучшим совпадением между запрашиваемой и поисковой последовательностями (Pearson (2000), ранее). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей различных организмов, является компьютерная

программа BLAST, в особенности BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 и Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402, каждая из которых включена в настоящий документ с помощью ссылки.

рН-зависимое связывание.

Настоящее изобретение относится к антителам к IL-25 с рН-зависимыми характеристиками связывания. Например, антитела к IL-25 по настоящему изобретению могут характеризоваться уменьшенным связыванием с IL-25 при кислом рН в сравнении с нейтральным рН. В альтернативном варианте антитела к IL-25 по настоящему изобретению могут характеризоваться повышенным связыванием с IL-25 при кислом рН в сравнении с нейтральным рН. Выражение "кислый рН" включает в себя значения рН менее приблизительно 6,2, например приблизительно 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или менее. Применяемое в настоящем документе выражение "нейтральный рН" означает рН от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,4. Выражение "нейтральный рН" включает в себя значения рН приблизительно 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

В некоторых случаях "уменьшенное связывание с IL-25 при кислом рН в сравнении с нейтральным рН" выражается в виде соотношения значения K_D антитела, связывающегося с IL-25 при кислом рН, к значению K_D антитела, связывающегося с IL-25 при нейтральном рН (или наоборот). Например, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, можно рассматривать как характеризующийся "уменьшенным связыванием с IL-25 при кислом рН в сравнении с нейтральным рН" в контексте настоящего изобретения, если антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, характеризуется соотношением кислой/нейтральной K_D приблизительно 3,0 или выше. В соответствии с некоторыми иллюстративными вариантами осуществления соотношение кислой/нейтральной K_D для антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может составлять приблизительно 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 или более.

Антитела с рН-зависимыми характеристиками связывания могут быть получены, например, при помощи скрининга популяции антител в отношении уменьшенного (или повышенного) связывания с определенным антигеном при кислом рН в сравнении с нейтральным рН. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на уровне аминокислот могут давать антитела с рН-зависимыми характеристиками. Например, при замене одной или нескольких аминокислот в антигенсвязывающем домене (например, в CDR) остатком гистидина можно получить антитело с уменьшенной способностью связывать антиген при кислом рН в сравнении с нейтральным рН.

Антитела к IL-25, содержащие варианты Fc.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антителам к IL-25, содержащим домен Fc, который содержит одну или несколько мутаций, которые повышают или уменьшают связывание антитела с рецептором FcRn, например при кислом рН в сравнении с нейтральным рН. Например, настоящее изобретение относится к антителам к IL-25, содержащим мутацию в C_{H2} или C_{H3} участке домена Fc, причем мутация(-и) увеличивает аффинность домена Fc к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где рН находится в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению времени полужизни антитела в сыворотке при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В соответствии с одним вариантом осуществления модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Например, настоящее изобретение относится к антителам к IL-25, содержащим домен Fc, который содержит одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации указанных выше мутаций домена Fc и других раскрытых в настоящем документе мутаций в переменных доменах антител подразумеваются входящими в объем настоящего изобретения.

Биологические характеристики антител.

Настоящее изобретение относится к антителам к IL-25, которые связывают человеческий IL-25 с K_D , менее чем приблизительно 120 пМ, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антителам к IL-25, которые связывают человеческий IL-25 с K_D , менее чем приблизительно 100 пМ, менее чем приблизительно 90 пМ, менее чем приблизительно 80 пМ, менее чем приблизительно 70 пМ, менее чем приблизительно 60 пМ, менее чем приблизительно 50 пМ, менее чем прибли-

зительно 40 пМ, менее чем приблизительно 30 пМ, менее чем приблизительно 20 пМ, менее чем приблизительно 18 пМ, менее чем приблизительно 16 пМ, менее чем приблизительно 14 пМ или менее чем приблизительно 12 пМ.

Настоящее изобретение относится к антителам к IL-25, которые связывают человеческий IL-25 с полупериодом диссоциации ($t^{1/2}$) более чем приблизительно 105 мин, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антителам к IL-25, которые связывают человеческий IL-25 с $t^{1/2}$ более чем приблизительно 105 мин, более чем приблизительно 150 мин, более чем приблизительно 175 мин, более чем приблизительно 200 мин, более чем приблизительно 250 мин, более чем приблизительно 300 мин, более чем приблизительно 350 мин, более чем приблизительно 400 мин, более чем приблизительно 450 мин, более чем приблизительно 500 мин, более чем приблизительно 550 мин, более чем приблизительно 600 мин, более чем приблизительно 700 мин, более чем приблизительно 800 мин, более чем приблизительно 900 мин, более чем приблизительно 1000 мин, более чем приблизительно 1100 мин или более чем приблизительно 1200 мин.

Настоящее изобретение относится к антителам к IL-25, которые могут связывать или могут не связывать обезьяний IL-25 или мышинный или крысиный IL-25. Применяемое в настоящем документе выражение антитело "не связывает" конкретный антиген (например, обезьяний, мышинный или крысиный IL-25), если антитело, при тестировании в анализе связывания антигена, таком как поверхностный плазмонный резонанс, характеризуется K_D более приблизительно 1000 нМ или не характеризуется каким-либо связыванием антигена в таком анализе. Другим форматом анализа, который может быть использован для определения, связывает или не связывает антитело конкретный антиген, в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения, является ELISA.

Настоящее изобретение относится к антителам к IL-25, которые блокируют передачу сигналов человеческого IL-25 в клетках, сконструированных для экспрессии рецептора IL-25 (IL-17RA/IL-17RB) с IC_{50} менее чем приблизительно 2,0. Например, как показано в примере 6 настоящего документа, клетки HEK293 были сконструированы для стабильной экспрессии человеческого IL-17RA (аминокислоты 1-866 в последовательности под номером доступа NP_055154.3) и IL-17RB (аминокислоты 1-502 в последовательности под номером доступа NP_061195.2). Клеточная линия также может включать в себя репортерный элемент, который делает возможной детекцию IL-25-опосредованных передач сигналов с участием рецептора IL-17RA/IL-17RB (например, люциферазный репортер или другой детектируемый репортер, который индуцируется при связывании IL-25 с его рецептором). С помощью формата анализа, описанного в примере 6, или практически аналогичного формата анализа можно рассчитать значение IC_{50} как концентрацию антитела, необходимую для уменьшения IL-25-опосредованной передачи сигнала до 50% от максимального сигнала, наблюдаемого при отсутствии антитела. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антителам к IL-25, которые блокируют передачу сигнала человеческого IL-25 в клетках, сконструированных для экспрессии рецептора IL-25 (IL-17RA/IL-17RB), с IC_{50} менее чем приблизительно 720 пМ, менее чем приблизительно 500 пМ, менее чем приблизительно 400 пМ, менее чем приблизительно 300 пМ, менее чем приблизительно 200 пМ, менее чем приблизительно 100 пМ, менее чем приблизительно 90 пМ, менее чем приблизительно 80 пМ, менее чем приблизительно 70 пМ, менее чем приблизительно 60 пМ, менее чем приблизительно 50 пМ, менее чем приблизительно 40 пМ, менее чем приблизительно 30 пМ, менее чем приблизительно 20 пМ, менее чем приблизительно 10 пМ или менее чем приблизительно 5 пМ, по результатам измерения с использованием формата анализа, описанного в Примере 6 в настоящем документе, или практически аналогичного анализа.

Настоящее изобретение относится к антителам к IL-25, которые блокируют передачу сигналов человеческого IL-25 в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC) с IC_{50} менее чем приблизительно 16 нМ. Например, как показано в примере 7 в настоящем документе, выделенные PBMC инкубировали с IL-25 и различными количествами антител к IL-25 и детектировали уровень вырабатываемого клетками IL-5 для измерения степени IL-25-опосредуемой передачи сигнала. С помощью формата анализа, описанного в примере 7, или практически аналогичного формата анализа можно рассчитать значение IC_{50} как концентрацию антитела, необходимую для уменьшения IL-25-опосредованной передачи сигнала до 50% от максимального сигнала, наблюдаемого при отсутствии антитела. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антителам к IL-25, которые блокируют передачу сигнала человеческого IL-25 в PBMC с IC_{50} менее чем приблизительно 5 нМ, менее чем приблизительно 4 нМ, менее чем приблизительно 3 нМ, менее чем приблизительно 1 нМ, менее чем приблизительно 900 пМ, менее чем приблизительно 800 пМ, менее чем приблизительно 700 пМ, менее чем приблизительно 600 пМ, менее чем приблизительно 500 пМ, менее чем приблизительно 400 пМ, менее чем приблизительно 300 пМ, менее чем приблизительно 200 пМ, менее чем приблизительно 100 пМ, менее чем приблизительно 90 пМ, менее чем приблизительно 80 пМ, менее чем приблизительно 70 пМ, менее чем приблизительно 60 пМ, менее чем приблизительно 50 пМ, менее чем приблизительно 40 пМ, менее чем приблизительно 30 пМ или менее чем приблизительно 20 пМ, по результатам измерения с использованием формата анализа, описанного в примере 7 в настоящем доку-

менте, или практически аналогичного анализа. В соответствии с одним вариантом осуществления антитела к IL-25 по настоящему изобретению блокируют передачу сигнала человеческого IL-25 в человеческих PBMC с IC₅₀ в диапазоне от приблизительно 30 пМ до приблизительно 150 пМ.

Характеристика связывания антитела по настоящему изобретению (например, любая из упомянутых выше в настоящем документе характеристик связывания) при раскрытии в виде "по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса" означает, что соответствующую характеристику связывания, относящуюся к взаимодействию между антителом и антигеном, измеряют с помощью прибора для измерения поверхностного плазмонного резонанса (например, прибора Biacore®, GE Healthcare) с использованием стандартных условий анализа Biacore, как показано в примере 2 в настоящем документе, или практически аналогичного формата анализа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления параметры связывания измеряют при 25°C, в то время как в соответствии с другими вариантами осуществления параметры связывания измеряют при температуре 37°C.

Настоящее изобретение относится к антителам к IL-25, которые снижают уровни IgE в кровотоке и/или уровни IgE обнаруживаемые в легких млекопитающего, которое сверхэкспрессирует IL-25, как видно на модели, описанной в примере 8. Также в настоящем документе в примере 8 описаны антитела к IL-25, которые снижают метаплазию бокаловидных клеток у млекопитающего, которое сверхэкспрессирует IL-25.

Настоящее изобретение относится к антителам или его антигенсвязывающим фрагментам, которые специфично связывают IL-25, содержащим HCVR и/или LCVR, которые содержат аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR и/или LCVR, приведенных в табл. 1.

Антитела по настоящему изобретению могут обладать одной или несколькими из упомянутых выше биологических характеристик или любой их комбинацией. Подразумевают, что вышеприведенный перечень биологических характеристик антител по настоящему изобретению не является исчерпывающим. Для рядового специалиста в настоящей области будут очевидны другие биологические характеристики антител по настоящему изобретению из рассмотрения настоящего раскрытия, в том числе приведенных в настоящем документе демонстрационных примеров.

Картирование эпитопов и родственные методики.

Эпитоп, с которым связываются антитела по настоящему изобретению, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот белка IL-25. В качестве альтернативы, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) IL-25. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления эпитоп расположен на или вблизи поверхности IL-25, который взаимодействует с рецептором IL-25. В соответствии с другими вариантами осуществления эпитоп расположен на или вблизи поверхности IL-25, который не вступает во взаимодействие с рецептором IL-25, например, в местоположении на поверхности IL-25, в которой антитело при связывании с таким эпитопом не препятствует взаимодействию между IL-25 и его рецептором.

Для определения того, "взаимодействует ли антитело с одной или несколькими аминокислотами" в полипептиде или белке, можно применять различные методики, известные рядовым специалистам в настоящей области. Иллюстративные методики включают, например, стандартный эпитоп-перекрестный конкурентный анализ, такой как описанный в работе Antibodies. Harlow и Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), анализ с использованием сканирующего аланином мутагенеза, пептидный блоттинг (Reineke, 2004, Methods Mol. Biol. 248: 443-463), а также анализ расщепления пептидов. Кроме того, можно использовать такие способы, как вырезание эпитопов, экстракция эпитопов и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, Protein Science 9:487-496). Другим способом, который можно применять для выявления аминокислот в полипептиде, с которыми взаимодействует антитело, является водородно/дейтериевый обмен, определяемый посредством масс-спектрометрии. В общих чертах, способ водород/дейтериевого обмена предусматривает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с помеченным дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду для обеспечения возможности протекания водород-дейтериевого обмена на всех остатках, за исключением защищенных антителом остатков (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела белок-мишень подвергают протеазному расщеплению и масс-спектрометрическому анализу, таким образом выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehrling (1999) Analytical Biochemistry 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73:256A-265A.

Настоящее изобретение относится к антителам к IL-25, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из описываемых в настоящем документе конкретных иллюстративных антител (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, которые приведены в табл. 1 настоящего документа). Аналогично, настоящее изобретение также относится к антителам к IL-25, которые конкурируют за связывание с IL-25 с любым из описываемых в настоящем документе конкретных иллюстративных антител (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, которые приведены в табл. 1 настоящего документа).

С помощью стандартных способов, известных из уровня техники и проиллюстрированных в настоящем документе, можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к IL-25, или конкурирует за связывание с ним. Например, для определения того, связывается ли тестовое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к IL-25 по настоящему изобретению, эталонному антителу позволяют связаться с белком IL-25. Затем оценивают способность тестового антитела связываться с молекулой IL-25. Если тестовое антитело способно связываться с IL-25 после насыщающего связывания с эталонным антителом к IL-25, то можно прийти к заключению, что тестовое антитело связывается с другим эпитопом, нежели эталонное антитело к IL-25. С другой стороны, если тестовое антитело не способно связываться с молекулой IL-25 после насыщающего связывания с эталонным антителом к IL-25, то тестовое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связываемый посредством эталонного антитела к IL-25 по настоящему изобретению. Затем можно осуществить дополнительный стандартный эксперимент (например, анализы на мутации и связывание пептида) для подтверждения того, является ли наблюдаемое отсутствие связывания тестового антитела фактическим следствием связывания с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или же за отсутствие наблюдаемого связывания ответственно стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты такого рода можно осуществить при помощи ELISA, RIA, Biacore, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, который доступен в настоящей области техники. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения два антитела связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75, 90 или даже 99%, согласно результатам измерения в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990:50:1495-1502). Альтернативно, считают, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если фактически все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или исключают связывание одного антитела, уменьшают или исключают связывание другого. Считают, что два антитела характеризуются "перекрывающимися эпитопами", если хотя бы подмножество аминокислотных мутаций, которые уменьшают или исключают связывание одного антитела, уменьшают или исключают связывание другого.

Для определения того, конкурирует ли антитело за связывание (или конкурирует ли перекрестно за связывание) с эталонным антителом к IL-25, осуществляют описанные выше методики связывания в двух адаптациях. Согласно первой адаптации, эталонному антителу позволяют связаться с белком IL-25 в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания тестового антитела с молекулой IL-25. Согласно второй адаптации, тестовому антителу позволяют связаться с молекулой IL-25 в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой IL-25. Если в обеих адаптациях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой IL-25, то можно сделать вывод, что тестовое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с IL-25 (см., например, формат анализа, описанный в примере 4 в данном описании, в котором белок IL-25 иммобилизируют на концы датчиков и наконечники датчиков с покрытием IL-25 обрабатывают эталонным антителом [mAb-1] и тестовым антителом к IL-25 [mAb-2] последовательно и в обоих порядках связывания). Рядовому специалисту в настоящей области техники будет понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, не обязательно может связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, а может стерически блокировать связывание эталонного антитела посредством связывания перекрывающего или смежного эпитопа.

Получение человеческих антител.

Антитела к IL-25 по настоящему изобретению могут быть полностью человеческими, но не встречающимися в природе антителами. Способы создания моноклональных антител, в том числе полностью человеческих моноклональных антител, известны из уровня техники. Для получения человеческих антител, которые специфично связываются с человеческим IL-25, в контексте настоящего изобретения можно применять любые такие известные способы.

С помощью технологии VELOCIMMUNE™ (см., например, патентный документ US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа создания моноклональных антител, изначально выделяют высокоаффинные химерные антитела к аллергену с человеческим варибельным участком и мышинным константным участком. Технология VELOCIMMUNE® предусматривает создание трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий человеческие варибельные участки тяжелых и легких цепей, функционально связанные с эндогенными локусами мышинных константных участков, так чтобы мышь в ответ на стимуляцию антигеном продуцировала антитело, содержащее человеческий варибельный участок и мышинный константный участок. ДНК, кодирующую варибельные участки тяжелых и легких цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей человеческие константные участки тяжелых и легких цепей. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

Как правило, мышью VELOCIMMUNE® вводят провокационную дозу представляющего интерес антигена и из мышей, которые экспрессируют антитела, выделяют лимфатические клетки (такие как В-

клетки). Лимфатические клетки можно гибридизировать с линией миеломных клеток с получением бессмертных линий гибридных клеток, и такие линии гибридных клеток подвергают скринингу и отбирают для выявления линий гибридных клеток, которые продуцируют антитела, специфичные к представляющему интерес антигену. ДНК, кодирующую переменные участки тяжелой цепи и легкой цепи, можно выделить и соединить с необходимыми изотипическими константными участками тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела может продуцироваться в такой клетке, как клетка СНО. Альтернативно, ДНК, кодирующую антиген-специфические химерные антитела или переменные домены легких и тяжелых цепей, можно выделить непосредственно из антиген-специфических лимфоцитов.

Как описано в приведенном ниже экспериментальном разделе, у высокоаффинных химерных антител, которые выделяют с человеческим переменным участком и мышинным константным участком, определяют характеристики и их отбирают по необходимым характеристикам, в том числе аффинности, селективности, эпитопа и т.д. Мышинные константные участки затем замещают необходимым человеческим константным участком для создания полностью человеческого антитела по настоящему изобретению, например, дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4. Несмотря на то что выбранный константный участок может варьировать в соответствии с конкретным применением, переменному участку присущи характеристики высокоаффинного связывания антигена и специфичности к мишени.

В целом, антитела по настоящему изобретению обладают очень высокоаффинными характеристиками, как правило обладая K_D , составляющей от приблизительно 10^{-12} до приблизительно 10^{-9} М, при измерении по связыванию с антигеном, либо иммобилизованным на твердой фазе, либо в жидкой фазе.

Биоэквиваленты.

Антитела и фрагменты антител к IL-25 по настоящему изобретению охватывают белки с аминокислотными последовательностями, которые отличаются от последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связывать человеческий IL-25. Такие варианты антител и фрагменты антител содержат одно или несколько присоединений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но характеризуются биологической активностью, которая фактически эквивалентна активности описанных антител. Аналогичным образом, последовательности ДНК по настоящему изобретению, кодирующие антитела к IL-25, охватывают последовательности, которые содержат одно или несколько присоединений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрываемой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела к IL-25, которые фактически биоэквивалентны антителу или фрагменту антитела к IL-25 по настоящему изобретению. Примеры таких вариантов последовательностей ДНК и вариантов аминокислотных последовательностей рассмотрены выше.

Два антигенсвязывающих белка, или антитела, считают биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, в скорости и степени абсорбции которых не наблюдают значительного различия при введении в одинаковой мольной дозе в сходных экспериментальных условиях, либо в однократных дозах, либо в многократной дозе. Некоторые антитела будут считать эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они являются эквивалентными по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и их все еще можно считать биоэквивалентными, так как такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и учтены при введении меток, не являются существенным для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при затяжном приеме, и их считают незначительными в медицинском плане для конкретной исследуемой готовой лекарственной формы.

В соответствии с одним вариантом осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они не имеют клинически существенных отличий по их безопасности, чистоте и активности.

В соответствии с одним вариантом осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может менять один или несколько раз эталонный продукт и биологический продукт без предположительного повышения риска отрицательных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или сниженную эффективность, по сравнению с продолжительной терапией без такой замены.

В соответствии с одним вариантом осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют по общему механизму или по общим механизмам действия по отношению к условию или условиям применения, при условии, что такие механизмы известны.

Биоэквивалентность можно продемонстрировать посредством способов *in vivo* и *in vitro*. Измерения биоэквивалентности включают, например, (a) тестирование *in vivo* на людях или других млекопитающих, при котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме крови, сыворотке крови или другой биологической жидкости в зависимости от времени; (b) тестирование *in vitro*, для которого установлена корреляция, и оно является достаточно прогнозируемым по отношению к данным биологической доступности *in vivo* у человека; (c) тестирование *in vivo* на людях или других млекопитающих, при котором соответствующий быстрый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют в зависимости от времени; и (d) строго контролируемое клиническое испытание, при котором устанавливают безопасность, эффективность или биологическую доступность или биоэквивалентность

антитела.

Биоэквивалентные варианты антител к IL-25 по настоящему изобретению можно сконструировать, например, посредством создания различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, цистеиновые остатки, несущественные для биологической активности, можно удалить или заместить на другие аминокислоты для предупреждения формирования нежелательных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. Согласно другому контексту, биоэквивалентные антитела могут включать варианты антител к IL-25, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования у антител, например, мутации, которые исключают или удаляют участки гликозилирования.

Видовая селективность и перекрестная реактивность между видами.

Настоящее изобретение в соответствии с некоторыми вариантами осуществления относится к антителам к IL-25, которые связываются с человеческим IL-25, но не с IL-25 от других видов. Настоящее изобретение также относится к антителам к IL-25, которые связываются с человеческим IL-25 и с IL-25 из одного или нескольких отличных от человека видов. Например, антитела к IL-25 по настоящему изобретению могут связываться с человеческим IL-25 и могут связываться или не связываться, в зависимости от обстоятельств, с одним или несколькими из IL-25 мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, макака-резуса или шимпанзе. В соответствии с некоторыми иллюстративными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к антителам к IL-25, которые специфично связываются с человеческим IL-25 и IL-25 яванского макака (например, IL-25 *Macaca fascicularis*). Другие антитела к IL-25 по настоящему изобретению связывают человеческий IL-25, но не связывают или связывают, но слабо, IL-25 яванского макака.

Мультиспецифические антитела.

Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифические антитела могут быть специфичными к различным эпитопам одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные к нескольким целевым полипептидам. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Антитела к IL-25 по настоящему изобретению могут быть связаны или совместно экспрессироваться с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, посредством образования химической связи, генетической гибридизацией, нековалентным связыванием или иначе) с одной или несколькими другими молекулярными структурами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, с получением биспецифического или мультиспецифического антитела со второй специфичностью связывания.

Настоящее изобретение относится к биспецифическим антителам, в которых одно плечо иммуноглобулина связывает человеческий IL-25, а другое плечо иммуноглобулина является специфическим ко второму антигену. IL-25-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, которые приведены в табл. 1 в настоящем документе.

Иллюстративный формат биспецифического антитела, который можно применять в контексте настоящего изобретения, включает применение первого домена C_{H3} иммуноглобулина (Ig) и второго домена C_{H3} Ig, причем первый и второй домены C_{H3} Ig отличаются друг от друга по меньшей мере по одной аминокислоте, и причем по меньшей мере одно аминокислотное отличие уменьшает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом без аминокислотного отличия. В соответствии с одним вариантом осуществления первый домен C_{H3} Ig связывается с белком А, а второй домен C_{H3} Ig содержит мутацию, которая уменьшает или устраняет связывание белка А, такую как модификация H95R (согласно нумерации экзонов IMGT; H435R согласно нумерации EU). Второй C_{H3} может дополнительно включать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по EU). Дополнительные модификации, которые можно обнаружить во втором C_{H3} , включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I по EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае антител IgG4. Подразумевают, что описанные выше вариации в отношении формата биспецифических антител находятся в пределах объема настоящего изобретения.

Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые можно применять в контексте настоящего изобретения, включают без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или диатела, гибриды IgG-scFv, Ig с двойным вариабельным доменом (DVD), квадрогобридом, выступы-во-впадинах, общую легкую цепь (например, общую легкую цепь с выступами-во-впадинах и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)тело, лейциновую застежку, Duobody, IgG1/IgG2, IgG с Fab двойного действия (DAF) и биспецифические форматы Mab² (см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, и материалы, упомянутые в ней, для обзора упомянутых выше форматов). Биспецифические антитела также можно построить при помощи, например, конъюгации пептида/нуклеиновой кислоты, причем не встречающиеся

ся в природе аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью применяют для получения конъюгатов сайт-специфического антитела и олигонуклеотида, которые затем самостоятельно собираются в мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрией (см., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Терапевтический состав и введение.

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела к IL-25 или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению составляют с подходящими носителями, наполнителями и другими средствами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и т.п. Большое количество соответствующих составов можно найти в известном всем фармакологам фармакологическом справочнике: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Такие составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, жидкость (катионную или анионную), содержащую везикулы (такие как LIPOFECTIN™, Карлсбад, Калифорния), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбционные пасты, эмульсии по типу масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакса (полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами), полужидкие гели и полужидкие смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J. Pharm. Sci. Technol. 52:238-311.

Доза каждого антитела, вводимого пациенту, может варьировать в зависимости от возраста и размера пациента, целевого заболевания, условий, пути введения и т.п. Предпочтительную дозу, как правило, рассчитывают в зависимости от массы тела или площади поверхности тела. У взрослых пациентов может быть преимущественным внутривенное введение антитела по настоящему изобретению в норме за одну дозу, составляющую от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от приблизительно 0,02 до приблизительно 7, от приблизительно 0,03 до приблизительно 5 или от приблизительно 0,05 до приблизительно 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния частоту введения и длительность лечения можно откорректировать. Эффективные дозировки и схемы введения антитела к IL-25 можно определить эмпирически; например, прогресс у пациента можно контролировать с помощью периодической оценки и соответствующей корректировки дозы. Более того, межвидовое масштабирование дозировок можно выполнить с помощью хорошо известных в настоящей области способов (например, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

Известны различные системы доставки, и их можно применять для введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, например инкапсуляция в липосомах, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают без ограничения внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым подходящим путем, например, при помощи инфузии или инъекции ударной дозы вещества, посредством абсорбции через эпителиальные или слизистые оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки или тонкого кишечника и т.д.), и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или локальным.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно при помощи стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, то при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению с легкостью можно применять устройство для доставки по типу шприц-ручка. Такое устройство для доставки по типу шприц-ручка может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве для доставки по типу шприц-ручка обычно используют сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того как вся фармацевтическая композиция из картриджа была введена и картридж опустел, пустой картридж можно легко выбросить и поместить новый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Устройство для доставки по типу шприц-ручка затем можно использовать повторно. В случае одноразового устройства для доставки сменный картридж отсутствует. Вернее, одноразовое устройство для доставки по типу шприц-ручка заполнено фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре устройства. После удаления из резервуара фармацевтической композиции выбрасывают полностью все устройство.

Для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению применяют разнообразные многоразовые шприц-ручки и автоинжекторные устройства для доставки. Примеры включают без ограничения AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин-Лейкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Франкфурт, Германия) и многие другие. Примеры одноразовых устройств для доставки по типу шприц-ручка, применяе-

мых для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают без ограничения шприц-ручку SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Таузенд-Оукс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, Иллинойс) и многие другие.

В определенных ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. В соответствии с одним вариантом осуществления может быть использована помпа (см. Langer, ранее; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В соответствии с другим вариантом осуществления можно применять полимерные материалы; см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В соответствии с еще одним вариантом осуществления систему с контролируемым высвобождением можно поместить вблизи целевого для композиции участка, таким образом, будет необходима лишь часть системной дозы (см., например, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением рассмотрены в обзоре Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

Инъекционные формы могут включать готовые лекарственные формы для внутривенных, подкожных, интракутаных и внутримышечных инъекций, капельных внутривенных вливаний и т.д. Такие инъекционные формы можно получить посредством общеизвестных способов. Например, инъекционные формы можно получить, например, растворением, суспендированием или эмульгированием описанного выше антитела или его соли в стерильной водной среде или масляной среде, обычно применяемой для инъекций. Водной средой для инъекций являются, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т.д., которые можно применять в комбинации с соответствующим солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (аддукт полиоксиэтилена (50 моль) и гидрогенизованного касторового масла)] и т.д. В качестве масляных сред используют, например, сезамовое масло, соевое масло и т.д., которые можно применять в комбинации с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.п. Полученный таким образом инъекционный препарат предпочтительно заполняют в подходящую ампулу.

Предпочтительно, описанные выше фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения получают в виде готовых лекарственных форм в стандартной дозе, подобранной в соответствии с дозой активных ингредиентов. Такие готовые лекарственные формы в стандартной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.п. Количество вышеизложенного включенного антитела обычно составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на готовую лекарственную форму в стандартной дозе; особенно в форме инъекции, предпочтительно, чтобы вышеизложенное антитело содержалось в количестве от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг для других готовых лекарственных форм.

Терапевтические применения антител.

Настоящее изобретение относится к способам, предусматривающим введение нуждающемуся в том субъекту терапевтической композиции, содержащей антитела к IL-25. Терапевтическая композиция может содержать любое из раскрытых в настоящем описании антител к IL-25 или его антигенсвязывающих фрагментов и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Антитела по настоящему изобретению могут быть пригодны, среди прочего, для лечения, предупреждения и/или облегчения любого заболевания или нарушения, ассоциированного с или опосредованного экспрессией или активностью IL-25 или поддающегося лечению путем блокировки взаимодействия между IL-25 и рецептором IL-25 или ингибирования иным образом активности и/или передачи сигнала IL-25.

Настоящее изобретение относится к способам лечения или предупреждения астмы путем введения нуждающемуся в таком лечении пациенту антитела к IL-25, или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в других разделах настоящего документа. Применяемый в настоящем документе термин "астма" включает без ограничения аллергическую астму, неаллергическую астму, тяжелую рефракторную астму, обострения астмы, вирусную астму или обострения вирусной астмы, устойчивую к стероидам астму, восприимчивую к стероидам астму, эозинофильную астму или неэозинофильную астму и т.д. и другие родственные нарушения, характеризующиеся воспалением дыхательных путей или гиперчувствительностью дыхательных путей (AHR). Этот термин также понимают как включающий обострение вирусной астмы.

Настоящее изобретение относится к способам лечения или предупреждения хронической обструктивной болезни легких (COPD) путем введения нуждающемуся в таком лечении пациенту антитела к IL-25, или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в других разделах настоящего документа. Применяемый в настоящем документе термин "COPD" включает без ограничения заболевание и нарушения, характеризующиеся уменьшением потока экспирации и медленным принудительным опорожнением

легких, для которого не наблюдают значительных изменений в течение нескольких месяцев. В соответствии с этим аспектом настоящего изобретения способы можно применять для лечения, например, COPD, ассоциированной с или вызванной сигаретным дымом (например, длительным курением сигарет), загрязнением воздуха (например, диоксидом серы, пассивным курением и т.д.), химическими веществами на рабочем месте (например, кадмием), аллергией или АНР.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения или предупреждения воспалительного заболевания кишечника (IBD) путем введения нуждающемуся в таком лечении пациенту антитела к IL-25, или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в других разделах настоящего документа. Применяемый в настоящем документе термин "IBD" включает без ограничения язвенный колит, болезнь Крона, коллагенозный колит, лимфоцитарный колит, ишемический колит, воспаление в отключенной кишке, синдром Бехчета, инфекционный колит, недифференцированный колит и другие родственные нарушения, характеризующиеся воспалением слизистой оболочки толстой кишки или ободочной кишки.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения или предупреждения атопического дерматита (AD) путем введения нуждающемуся в таком лечении пациенту антитела к IL-25, или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в других разделах настоящего документа. Применяемый в настоящем документе термин "AD" включает без ограничения воспалительные кожные заболевания, характеризующиеся интенсивным зудом (например, сильной чесоткой) и чешуйчатыми и сухими экзематозными участками поражения. Термин "AD" включает в AD, который вызван или ассоциирован с нарушением функции эпидермального барьера, аллергией (например, аллергия на определенные пищевые продукты, пыльцу, плесень, пылевого клеща, животных и т.д.), радиоактивным облучением и/или астмой. В соответствии с этим аспектом настоящего изобретения способы можно применять для лечения, например, легкой, умеренной, от умеренной до тяжелой и тяжелой формы AD.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения или предупреждения заболеваний и нарушений, таких как эозинофильный гранулематоз с ангиопатией (также известный как синдром Черджа-Стросса), аллергия, аллергический ринит, аллергическое воспаление дыхательных путей, повышенная чувствительность к некоторым пищевым продуктам, крапивница (в том числе хроническая идиопатическая крапивница), эозинофильная пневмония, эозинофильный эзофагит, гиперэозинофильный синдром, идиопатический легочный фиброз, гиперчувствительный пневмонит, ревматоидный артрит, васкулит, увеит, злокачественная опухоль и реакция "трансплантат против хозяина", путем введения нуждающемуся в таком лечении пациенту антитела к IL-25, или его антигенсвязывающего фрагмента, которое раскрыто в других разделах настоящего документа.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения других воспалительных нарушений, сердечно-сосудистого заболевания, заболевания центральной нервной системы, боли, артрита (например, ревматоидного артрита, остеоартрита, псориатического артрита и т.д.), гигантоклеточного артериита, васкулита, общих сосудистых нарушений, болезни Шенлейн-Геноха, рассеянного склероза, волчанки и синдрома Шегрена.

В контексте описанных в настоящем документе способов лечения антитело к IL-25 можно вводить в виде монотерапии (т.е. в виде единственного терапевтического средства) или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами (примеры которых описаны в других разделах настоящего документа).

Комбинированные терапии и составы.

Настоящее изобретение относится к композициям и терапевтическим составам, содержащим любое из описанных в настоящем документе антител к IL-25 в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, а также к способам лечения, предусматривающим введение таких комбинаций нуждающимся в том субъектам.

Антитела к IL-25 по настоящему изобретению можно совместно составить и/или ввести в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, выбранными из группы, состоящей из, например, антагониста IL-4 или IL-4R, например, антитела к IL-4 или к IL-4R, антагониста IL-13, такого как, например, антитело к IL-13 или к IL-13R, антагониста IL-6 или IL-6R, такого как, например, антитело к IL-6 или к IL-6R (см., например, US 7582298), антагониста на основе антитела к IL-1, например, рилонацепта, антагониста TNF, например, этанерцепта (ENBREL™), антагониста IgE и антагониста IL-5, IL-8, IL-9, IL-17, IL-17Ra, IL-22, TSLP и IL-33.

В контексте лечения астмы и родственных состояний дополнительный терапевтически активный компонент можно выбрать из группы, состоящей из бета2-агонистов длительного действия (LABA, например, сальметерола или формотерола), ингаляционных кортикостероидов (ICS, например, флутиказона или будесонида), комбинации, содержащей LABA + ICS (например, флутиказон + сальметерол [например, ADVAIR® (GlaxoSmithKline)], или будесонид + формотерол [например, SYMBICORT® (AstraZeneca)]), системного кортикостероида (например, перорального или внутривенного), метилксантина, недокромила натрия, кромолина натрия, антагониста (например, антитела) к любому одному или нескольким из следующих цитокинов и/или их рецепторов: IL-4, IL-5, IL-8, IL-9, IL-13, IL-17, IL-33, TSLP и их комбинациям.

В контексте лечения атопического дерматита и родственных состояний дополнительный терапевтически активный компонент можно выбрать из группы, состоящей из местных кортикостероидов (TCS, например, гидрокортизона, бетаметазона валерата, бетаметазона дипропионата, дифлукортолона валерата, гидрокортизон-17-бутирата, мометазона фуруата, метилпреднизолона ацепоната, клобетазола пропионата, галцинонида, клобетазона бутирата и триамцинолона ацетонида), такролимуса, пимекролимуса, циклоспорина, азатиоприна, метотрексата, кромолина натрия, ингибиторов протеиназ, антагониста (например, антитела) к любому одному или нескольким из следующих цитокинов и/или их рецепторов: IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IL-33, TSLP и их комбинациям. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления этого аспекта настоящего изобретения антитело к IL-25 вводят субъекту в сочетании с немедикаментозной терапией, такой как терапия ультрафиолетовым (UV) светом.

В контексте лечения хронической обструктивной болезни легких (COPD) дополнительный терапевтически активный компонент можно выбрать из бета2-агониста, антихолинергического средства, антитела к IL-5 (например, меполизумаба) или антитела к IL-13 (например, лебрукузумаба). Например, средства, которые можно применять в комбинации с антителами по настоящему изобретению для лечения COPD, могут включать одно или несколько из следующих: индакатерол (бета2-агонист), гликопирроний (мускариновое средство), тиотропий (антихолинергическое средство), аклидиний (антимускариновое средство), умеклидиния бромид (антихолинергическое средство) или вилантерол (бета2-агонист длительного действия). Другие средства, которые можно применять в комбинации с антителом по настоящему изобретению для лечения COPD, включают ингибитор фосфодиэстеразы (например, теofilлин, рофлумиласт, циломиласт), эндогенный опиоид или бета-адренергические антагонисты (бета-блокаторы).

В контексте лечения васкулита, в частности синдрома Черджа-Стросса (CSS), дополнительный терапевтически активный компонент можно выбрать из стероида, кортикостероида и иммунодепрессанта (например, циклофосфида).

В контексте лечения разновидностей аллергии антитела к IL-25 по настоящему изобретению можно применять в сочетании с любой паллиативной терапией, применяемой для лечения аллергической реакции, или можно применять со стандартной иммунотерапией (SIT) для лечения аллергического состояния, или можно применять для облегчения по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с аллергической реакцией. Например, дополнительный терапевтически активный компонент можно выбрать из антигистамина, стероида, кортикостероида, противоотечного средства, ингибитора лейкотриенов и ингибитора тучных клеток. Другие средства, которые можно применять в сочетании с антителом к IL-25 по настоящему изобретению для лечения аллергии, могут представлять собой антагонист к любому одному или нескольким из следующих цитокинов и/или их рецепторов: IL-1, IL-4, IL-5, IL-8, IL-9, IL-13, IL-17, TSLP, IL-33, или антагонист TNF.

Антитела к IL-25 по настоящему изобретению также можно вводить и/или совместно составлять в комбинации с противовирусными средствами, антибиотиками, анальгетиками, кислородом, антиоксидантами, ингибиторами COX, кардиозащитными средствами, металлохелатами, IFN-гамма и/или NSAID.

Дополнительный терапевтически активный компонент(ы), например, любое из перечисленных выше средств или их производных, можно вводить непосредственно перед, одновременно с или вскоре после введения антитела к IL-25 по настоящему изобретению; (в контексте настоящего раскрытия такие схемы введения считают введением антитела к IL-25 "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом). Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, в которых антитело к IL-25 по настоящему изобретению совместно составлено с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, которые описаны в других разделах настоящего документа.

Схемы введения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения многократные дозы антитела к IL-25 (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к IL-25 и любого из упомянутых в настоящем документе дополнительных терапевтически активных средств) можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. В соответствии с этим аспектом настоящего изобретения способы предусматривают последовательное введение субъекту многократных доз антитела к IL-25 по настоящему изобретению. Применяемое в настоящем документе выражение "последовательное введение" означает, что каждую дозу антитела к IL-25 вводят субъекту в различные моменты времени, например в различные дни, разделенные предварительно определенным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее изобретение относится к способам, которые предусматривают последовательное введение пациенту однократной изначальной дозы антитела к IL-25 с последующим введением одной или нескольких вторичных доз антитела к IL-25 и необязательно с последующей одной или несколькими третичными дозами антитела к IL-25.

Термины "изначальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антитела к IL-25 по настоящему изобретению. Таким образом, "изначальной дозой" является доза, которую вводят в начале схемы лечения (также называемая как "исходная доза"), "вторичные дозы" являются дозами, которые вводят после изначальной дозы, и "третичные дозы" являются дозами, которые вводят после вторичных доз. Все из изначальной, вторичных и третичных доз мо-

гут содержать одинаковое количество антитела к IL-25, но в целом могут отличаться друг от друга в плане частоты введения. Тем не менее, в соответствии с определенными вариантами осуществления количество антитела к IL-25, содержащееся в изначальной, вторичной и/или третичной дозах, отличается друг от друга (например, повышено или понижено, по необходимости) в течение курса лечения. В соответствии с определенными вариантами осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале схемы лечения в качестве "ударных доз", за которыми следуют последующие дозы, которые вводят не так часто (например, "поддерживающие дозы").

В соответствии с определенными иллюстративными вариантами осуществления по настоящему изобретению каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-26 (например, 1, 1^{1/2}, 2, 2^{1/2}, 3, 3^{1/2}, 4, 4^{1/2}, 5, 5^{1/2}, 6, 6^{1/2}, 7, 7^{1/2}, 8, 8^{1/2}, 9, 9^{1/2}, 10, 10^{1/2}, 11, 11^{1/2}, 12, 12^{1/2}, 13, 13^{1/2}, 14, 14^{1/2}, 15, 15^{1/2}, 16, 16^{1/2}, 17, 17^{1/2}, 18, 18^{1/2}, 19, 19^{1/2}, 20, 20^{1/2}, 21, 21^{1/2}, 22, 22^{1/2}, 23, 23^{1/2}, 24, 24^{1/2}, 25, 25^{1/2}, 26, 26^{1/2} или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Применяемая в настоящем документе фраза "непосредственно предшествующая доза" означает в последовательности многократных введений дозу антитела к IL-25, которую вводят пациенту перед введением непосредственно следующей дозы в последовательности при отсутствии промежуточных доз.

Способы в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения могут предусматривать введение пациенту любого числа вторичных и/или третичных доз антитела к IL-25. Например, в соответствии с определенными вариантами осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. В соответствии с другими вариантами осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогичным образом, в соответствии с определенными вариантами осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В соответствии с другими вариантами осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз. Схему введения можно реализовывать неопределенно долго в течение всего периода жизни конкретного субъекта или до тех пор, пока такое лечение больше не требуется с терапевтической точки зрения или не является преимущественным.

В соответствии с вариантами осуществления, предусматривающими многократные вторичные дозы, каждую вторичную дозу можно вводить с такой же частотой, как и для других вторичных доз. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту спустя 1-2 недели или 1-2 месяца после непосредственно предшествующей дозы. Аналогичным образом, в соответствии с вариантами осуществления, предусматривающими многократные третичные дозы, каждую третичную дозу можно вводить с такой же частотой, как и для других третичных доз. Например, каждую третичную дозу можно вводить пациенту спустя 2-12 недель после непосредственно предшествующей дозы. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения частота, с которой вводят пациенту вторичные и/или третичные дозы, может изменяться в ходе схемы лечения. Частота введения также может корректироваться в течение курса лечения лечащим врачом в зависимости от индивидуальных потребностей пациента после клинического обследования.

Настоящее изобретение относится к схемам введения, в которых от 2 до 6 ударных доз вводят пациенту с первой частотой (например, один раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в месяц, раз в два месяца и т.д.) с последующим введением пациенту двух или более поддерживающих доз на менее частой основе. Например, в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения, если ударные дозы вводят с частотой раз в месяц, то поддерживающие дозы можно вводить пациенту раз в шесть недель, раз в два месяца, раз в три месяца и т.д.

Диагностические применения антител.

Антитела к IL-25 по настоящему изобретению также можно применять для детекции и/или измерения IL-25 или клеток, экспрессирующих IL-25, в образце, например, в диагностических целях. Например, антитело к IL-25 или его фрагмент можно применять для диагностики состояния или заболевания, характеризующегося aberrантной экспрессией (например, сверхэкспрессией, недоэкспрессией, отсутствием экспрессии и т.д.) IL-25. Иллюстративные диагностические анализы на IL-25 могут предусматривать, например, приведение в контакт образца, полученного от пациента, с антителом к IL-25 по настоящему изобретению, причем антитело к IL-25 помечено детектируемой меткой или репортерной группой. Альтернативно, немеченное антитело к IL-25 можно применять в диагностических целях в комбинации со вторичным антителом, которое само по себе помечено детектируемой меткой.

Детектируемая метка или репортерная группа могут представлять собой радиоизотоп, такой как ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S или ¹²⁵I; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеинизотиоцианат или родамин, или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно применять для детекции или измерения IL-25 в образце, включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

Образцы, которые можно применять в диагностических анализах на IL-25, в соответствии с настоящим изобретением включают любой образец ткани или жидкости, получаемый от пациента, который содержит детектируемые количества белка IL-25 или его фрагментов в нормальных или патологических условиях. Обычно уровни IL-25 в отдельном образце, полученном от здорового пациента (например, па-

циента, не пораженного заболеванием или состоянием, ассоциированным с аномальными уровнями или активностью IL-25), будут измерять для установления на первоначальном этапе исходного или стандартного уровня IL-25. Такой исходный уровень IL-25 затем можно сравнить с уровнями IL-25, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов с подозрением на наличие IL-25-связанного заболевания или состояния.

Примеры

Следующие примеры приведены с целью предоставления специалистам в настоящей области техники полного раскрытия и описания того, как осуществлять и применять способы и композиции по настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения рассматриваемого авторами объема настоящего изобретения. Были предприняты попытки обеспечения достоверности в отношении используемых числовых показателей (например, количеств, температуры и т.д.), но необходимо принимать в учет некоторые экспериментальные погрешности и отклонения. Если не указано иное, части являются частями по массе, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура приведена в градусах Цельсия, а давление равно атмосферному или близко к атмосферному.

Пример 1. Получение антител к IL-25.

Антитела к IL-25 получали путем иммунизации мыши VELOCIMMUNE® (т.е. сконструированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные участки легкой каппа- и тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина) рекомбинантным человеческим IL-25 (R&D Systems, каталожный № 1258). Иммунный ответ с продуцированием антител отслеживали с помощью иммунологического анализа, специфичного по отношению к IL-25. При достижении требуемого иммунного ответа забирали спленоциты и гибридизировали с миеломными клетками мыши для сохранения их жизнеспособности и образования линий гибридных клеток. Линии гибридных клеток подвергали скринингу и отбирали для выявления линий клеток, которые вырабатывали специфичные к IL-25 антитела. С помощью этой методики получали несколько химерных антител к IL-25 (т.е. антител, обладающих человеческими переменными доменами и мышиными константными доменами). Кроме того, несколько полностью человеческих антител к IL-25 непосредственно выделяли из антиген-положительных В-клеток без гибридизации с миеломными клетками, как описано в патентном документе US 2007/0280945 A1.

Некоторые биологические свойства иллюстративных антител к IL-25, полученных в соответствии со способами из настоящего примера, подробно описаны в изложенных ниже примерах.

Пример 2. Последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей.

В табл. 1 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных доменов тяжелой и легкой цепей и CDR выборочных антител к IL-25 по настоящему изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты приведены в табл. 2.

Таблица 1. Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H1M11009N	2	4	6	8	10	12	14	16
H2M10690N	18	20	22	24	26	28	30	32
H2M11008N	34	36	38	40	42	44	46	48
H4N10861P	50	52	54	56	58	60	62	64
H4N10862P	66	68	70	72	74	76	78	80
H4N10863P	82	84	86	88	90	92	94	96
H4N10864P	98	100	102	104	106	108	110	112
H4N10871P	114	116	118	120	122	124	126	128
H4N10876P	130	132	134	136	138	140	142	144
H4N10883P	146	148	150	152	154	156	158	160
H4N10897P	162	164	166	168	170	172	174	176
H4N10900P	178	180	182	184	186	188	190	192
H4N10901P	194	196	198	200	202	204	206	208
H4N10903P	210	212	214	216	218	220	222	224
H4N10905P	226	228	230	232	234	236	238	240
H4N10906P	242	244	246	248	250	252	254	256
H4N10907P	258	260	262	264	266	268	270	272

Таблица 2. Идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H1M11009N	1	3	5	7	9	11	13	15
H2M10690N	17	19	21	23	25	27	29	31
H2M11008N	33	35	37	39	41	43	45	47
H4H10861P	49	51	53	55	57	59	61	63
H4H10862P	65	67	69	71	73	75	77	79
H4H10863P	81	83	85	87	89	91	93	95
H4H10864P	97	99	101	103	105	107	109	111
H4H10871P	113	115	117	119	121	123	125	127
H4H10876P	129	131	133	135	137	139	141	143
H4H10883P	145	147	149	151	153	155	157	159
H4H10897P	161	163	165	167	169	171	173	175
H4H10900P	177	179	181	183	185	187	189	191
H4H10901P	193	195	197	199	201	203	205	207
H4H10903P	209	211	213	215	217	219	221	223
H4H10905P	225	227	229	231	233	235	237	239
H4H10906P	241	243	245	247	249	251	253	255
H4H10907P	257	259	261	263	265	267	269	271

В настоящем документе антитела, как правило, обозначены согласно следующей номенклатуре: Fc-приставка (например, "H1M", "H2M", "H4H" и т.д.), за которой следует числовой идентификатор (например, "11009", "10690", "10861" и т.д.), за которым идет суффикс "P" или "N", как показано в табл. 1 и 2. Так, в соответствии с этой номенклатурой, антитело в настоящем документе может называться, например, "H1M11009N", "H2M10690N", "H4H10861P" и т.д. Приставки H1M, H2M и H4H обозначений антител, используемых в настоящем документе, указывает на конкретный изотип Fc-участка антитела. Например, антитело "H1M" имеет мышинный Fc IgG1, антитело "H2M" имеет мышинный Fc IgG2, а антитело "H4H" имеет человеческий Fc IgG4 (все вариабельные участки являются полностью человеческим, что определяется первой "H" в обозначении антитела). Рядовой специалист в настоящей области техники поймет, что антитело с конкретным изотипом Fc может быть преобразовано в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с мышинным Fc IgG1 может быть преобразовано в антитело с человеческим Fc IgG4 и т.д.), но, в любом случае, вариабельные домены (включающие CDR), которые указаны числовыми идентификаторами, показанными в табл. 1 и 2, останутся теми же, а свойства связывания, как ожидается, будут идентичными или в значительной степени схожими, независимо от природы домена Fc.

Антитело сравнения, использованное в приведенных далее примерах.

Антитело сравнения к IL25 включали в описываемые далее эксперименты с целью сравнения. В частности, "Антитело сравнения I" является антителом к IL-25 с вариабельными доменами тяжелой и легкой цепи, имеющими аминокислотные последовательности, соответствующих доменов "RH2.5_R71V", которые изложены в US 8658169.

Пример 3. Полученные при помощи поверхностного плазмонного резонанса значения аффинности связывания и константы скорости реакции человеческих моноклональных антител к IL-25.

Равновесные константы диссоциации (значения K_D) для связывания IL-25 с очищенными антителами к IL-25 определяли с помощью анализа в реальном времени на основе биосенсора поверхностного плазмонного резонанса на приборе BIACORE 4000 (GE Healthcare). Поверхность сенсора Biacore дериватизировали с помощью аминного сочетания либо с поликлональным антителом кролика к мышинным антителам (GE Healthcare, № BR-1008-38), либо с моноклональным мышинным антителом к человеческому Fc (GE Healthcare, № BR-1008-39) для захвата антител к IL-25, экспрессированных с различными константными участками. Все исследования по связыванию Biacore проводили в подвижном буфере HBST (0,01M HEPES pH 7,4, 0,15M NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества P20). Все реагенты IL-25 были экспрессированы с C-концевой мус-мус-гексагистидиновой меткой (называемой в настоящем документе "IL-25-MMH"). Различные концентрации человеческого IL-25-MMH (SEQ ID NO: 273), обезьяньего IL-25-MMH (SEQ ID NO: 274), мышинного IL-25-MMH (SEQ ID NO: 275) и крысиного IL-25-MMH (SEQ ID NO: 276), полученные в подвижном буфере HBST (в диапазоне от 100 до 3,7 нМ, 3-кратные разведения), вводили на поверхность с иммобилизованными антителами к IL-25 со скоростью потока 30 мкл/мин. Ассоциацию всех реагентов IL-25-MMH с каждым из иммобилизованных моноклональных антител отслеживали в течение 4 мин, а их диссоциацию в подвижном буфере HBSP

отслеживали в течение 10 мин. Все эксперименты по определению скорости связывания проводили либо при 25°C, либо при 37°C, как указано в приведенных ниже таблицах. Константы скорости реакции ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем приближения сенсограмм в реальном времени к 1:1 модели связывания с помощью программного обеспечения для приближенного изображения функций Scrubber 2.0c. Равновесные константы диссоциации связывания (K_D) и полупериоды диссоциации ($t_{1/2}$) рассчитывали из констант скорости реакции следующим образом: K_D (М) = k_d/k_a и $t_{1/2}$ (мин) = $(\ln 2)/(60 \cdot k_d)$. Параметры кинетики связывания для связывания человеческого, обезьяньего, мышиногo и крысиного IL-25-ММН с антителами к IL-25 при температуре 25 и 37°C приведены в табл. 3-10. ("NB" обозначает, что в экспериментальных условиях тестирования не наблюдали связывания, "IC" означает недостаточное связывание из-за неспецифического фонового связывания с поверхностью с антителами к mFc).

Таблица 3. Параметры кинетики связывания моноклональных антител к IL-25, связывающих человеческий IL-25, при 25°C

Антитело	Количество иммобилиз ированного антитела (RU)	100 нМ связанного человеческо го IL-25- ММН (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин.)
H4H10900P	79±0,44	43	1,74E+06	2,75E-05	1,58E-11	421
H4H10864P	136±0,55	75	2,68E+06	4,51E-05	1,68E-11	256
H4H10901P	109±0,61	62	2,28E+06	5,79E-05	2,54E-11	199
H4H10861P	83±0,33	47	2,01E+06	2,34E-05	1,16E-11	493
H4H10862P	104±0,61	56	1,88E+06	6,49E-05	3,44E-11	178
H4H10883P	99±0,37	56	7,06E+05	1,00E-05	1,42E-11	1155
H4H10903P	96±0,45	54	8,97E+05	1,73E-05	1,92E-11	670
H4H10907P	104±0,26	40	7,36E+05	6,50E-05	8,83E-11	178
H4H10871P	94±0,37	38	7,49E+05	6,38E-05	8,51E-11	181
H4H10897P	100±2,61	39	6,23E+05	7,87E-05	1,26E-10	147
H4H10876P	127±0,47	45	3,86E+05	4,78E-05	1,24E-10	242
H4H10905P	136±0,48	49	4,78E+05	1,09E-04	2,28E-10	106
H4H10863P	96±0,81	34	2,60E+05	7,25E-05	2,79E-10	159
H2aM11008N	111±0,75	48	4,82E+05	2,10E-04	4,35E-10	55
H4H10906P	106±0,30	61	1,64E+06	4,32E-05	2,64E-11	268
H1M11009N	96±2,13	30	2,42E+05	3,04E-03	1,25E-08	4
H2aM10690N	159±1,43	32	8,02E+04	2,90E-03	3,62E-08	4
Антитело сравнения 1	241±0,62	79	9,27E+05	1,12E-04	1,20E-10	103

Таблица 4. Параметры кинетики связывания моноклональных антител к IL-25, связывающих человеческий IL-25, при 37°C

Антитело	Количество иммобилиз ированного антитела (RU)	100 нМ связанного человеческ ого IL-25- MMH (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин.)
H4H10900P	92±2,04	51	2,83E+06	9,91E-05	3,50E-11	117
H4H10864P	166±2,68	94	3,73E+06	1,96E-04	5,26E-11	59
H4H10901P	121±2,5	65	3,19E+06	2,08E-04	6,51E-11	56
H4H10861P	110±2,49	63	2,91E+06	7,80E-05	2,68E-11	148
H4H10862P	134±2,03	72	2,39E+06	2,10E-04	8,79E-11	55
H4H10883P	131±3,8	74	1,58E+06	4,80E-05	3,04E-11	241
H4H10903P	111±1,81	65	1,53E+06	7,75E-05	5,08E-11	149
H4H10907P	119±1,72	47	1,19E+06	4,45E-05	3,75E-11	259
H4H10871P	126±2,41	49	1,15E+06	3,18E-05	2,76E-11	363
H4H10897P	132±2,4	48	1,04E+06	2,26E-04	2,18E-10	51
H4H10876P	170±3,02	60	6,28E+05	5,93E-05	9,44E-11	195
H4H10905P	161±2,46	55	8,09E+05	1,20E-04	1,49E-10	96
H4H10863P	130±2,14	46	6,06E+05	7,78E-05	1,28E-10	149
H2aM11008 N	130±1,16	60	7,34E+05	7,93E-04	1,08E-09	15
H4H10906P	124±2,05	72	2,90E+06	1,54E-04	5,29E-11	75
H1M11009N	103±0,84	30	3,93E+05	8,29E-03	2,11E-08	1,4
H2aM10690 N	196±1,28	39	1,37E+05	8,44E-03	6,14E-08	1,4
Антитело сравнения 1	301±8,01	99	1,36E+06	1,82E-04	1,34E-10	64

Таблица 5. Параметры кинетики связывания моноклональных антител к IL-25, связывающих обезьяний IL-25, при 25°C

Антитело	Количество	100 нМ	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
	иммобилизованного антитела (RU)	связанного обезьяньего IL-25-ММН (RU)	(1/Мс)	(1/с)	(М)	(мин.)
H4H10900P	78±0,23	45	2,94E+06	1,18E-05	4,02E-12	980
H4H10864P	135±0,85	78	3,68E+06	4,70E-05	1,28E-11	246
H4H10901P	108±0,21	64	2,63E+06	3,06E-05	1,16E-11	377
H4H10861P	83±0,18	48	3,26E+06	1,48E-05	4,54E-12	779
H4H10862P	104±0,69	58	2,00E+06	5,10E-05	2,55E-11	226
H4H10883P	99±0,30	58	1,04E+06	1,00E-05	9,65E-12	1155
H4H10903P	96±0,27	57	1,15E+06	1,00E-05	8,71E-12	1155
H4H10907P	104±0,34	43	1,39E+06	6,74E-05	4,85E-11	171
H4H10871P	94±0,28	42	6,28E+05	6,06E-05	9,65E-11	191
H4H10897P	101±0,47	42	1,13E+06	8,43E-05	7,49E-11	137
H4H10876P	126±0,38	51	3,29E+05	7,18E-05	2,18E-10	161
H4H10905P	136±0,45	54	4,17E+05	7,77E-05	1,86E-10	149
H4H10863P	96±0,36	39	3,43E+05	6,83E-05	1,99E-10	169
H2aM11008N	109±1,04	64	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H10906P	106±0,42	61	2,09E+06	2,95E-05	1,41E-11	391
H1M11009N	93±0,38	17	IC*	IC*	IC*	IC*
H2aM10690N	156±0,64	46	IC*	IC*	IC*	IC*
Антитело сравнения 1	267±0,76	100	8,60E+05	7,52E-05	8,80E-11	154

*IC обозначает недостаточное связывание по причине неспецифического фонового связывания с поверхностью с антителами к mFc.

Таблица 6. Параметры кинетики связывания моноклональных антител к IL-25, связывающих обезьяний IL-25, при 37°C

Антитело	Количество иммобилизи- рованного	100 нМ связанног- о	k_a (1/мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин.)
	антитела (RU)	обезьянье го IL-25- ММН (RU)				
H4H10900P	86±1,48	50	3,07E+06	7,49E-05	2,44E-11	154
H4H10864P	157±2,66	94	4,35E+06	1,90E-04	4,36E-11	61
H4H10901P	114±1,68	64	3,55E+06	1,65E-04	4,64E-11	70
H4H10861P	103±1,86	61	3,03E+06	7,14E-05	2,36E-11	162
H4H10862P	127±2,3	70	2,93E+06	1,72E-04	5,89E-11	67
H4H10883P	122±2,21	72	1,75E+06	4,18E-05	2,39E-11	276
H4H10903P	105±1,52	66	1,76E+06	6,59E-05	3,74E-11	175
H4H10907P	112±1,68	50	1,51E+06	1,01E-04	6,71E-11	114
H4H10871P	118±2,28	54	1,35E+06	7,40E-05	5,46E-11	156
H4H10897P	124±1,98	49	1,22E+06	2,31E-04	1,89E-10	50
H4H10876P	162±2,24	64	5,24E+05	5,45E-05	1,04E-10	212
H4H10905P	154±1,5	59	6,68E+05	9,01E-05	1,35E-10	128
H4H10863P	122±2,26	51	1,18E+06	8,07E-05	6,85E-11	143
H2aM11008N	127±1	80	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H10906P	118±1,41	73	3,01E+06	1,30E-04	4,31E-11	89
H1M11009N	101±0,94	23	IC*	IC*	IC*	IC*
H2aM10690N	193±0,78	49	IC*	IC*	IC*	IC*
Антитело сравнения 1	335±7,64	124	1,32E+06	6,24E-05	4,73E-11	185

*IC обозначает недостаточное связывание по причине неспецифического фонового связывания с поверхностью с антителами к mFc.

Таблица 7. Параметры кинетики связывания моноклональных антител к IL-25, связывающих мышинный IL-25, при 25°C

Антитело	Количество иммобилизир ованного антитела (RU)	100 нМ связанного мышинного IL-25-ММН (RU)	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин.)
H4H10900P	78±0,48	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10864P	135±0,14	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10901P	108±0,33	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10861P	82±0,08	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10862P	104±0,08	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10883P	99±0,17	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10903P	95±0,16	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10907P	104±0,15	10	1,96E+05	1,15E-02	5,87E-08	1,0
H4H10871P	94±0,04	30	1,21E+05	1,11E-04	9,18E-10	104
H4H10897P	101±0,06	20	1,48E+05	1,04E-03	7,05E-09	11
H4H10876P	125±0,10	40	1,74E+05	9,89E-05	5,70E-10	117
H4H10905P	135±0,23	43	1,24E+05	1,45E-04	1,17E-09	80
H4H10863P	95±0,10	22	5,57E+04	1,49E-04	2,67E-09	78
H2aM11008N	108±0,33	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10906P	106±0,50	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H1M11009N	92±0,25	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H2aM10690 N	156±0,23	17	3,88E+04	3,19E-03	8,23E-08	4
Антитело сравнения 1	271±0,69	88	5,71E+05	1,17E-04	2,05E-10	99

*NB означает, что в экспериментальных условиях тестирования наблюдаемое связывание отсутствовало.

Таблица 8. Параметры кинетики связывания моноклональных антител к IL-25, связывающих мышинный IL-25, при 37°C

Антитело	Количество иммобилизованного антитела (RU)	100 нМ связанного мышинного IL-25-ММН (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин.)
H4H10900P	84±0,49	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10864P	154±0,42	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10901P	111±0,4	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10861P	99±0,69	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10862P	123±0,13	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10883P	117±0,47	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10903P	102±0,47	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10907P	109±0,02	8	2,75E+05	3,76E-02	1,37E-07	0,3
H4H10871P	114±0,88	41	3,22E+05	8,29E-05	2,58E-10	139
H4H10897P	121±0,47	17	1,77E+05	6,41E-03	3,62E-08	1,8
H4H10876P	157±0,58	51	3,69E+05	8,97E-05	2,43E-10	129
H4H10905P	151±0,14	47	4,03E+05	1,78E-04	4,41E-10	65
H4H10863P	118±1,04	37	1,34E+05	1,53E-04	1,14E-09	76
H2aM11008N	126±0,89	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10906P	114±1,18	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H1M11009N	100±0,2	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H2aM10690N	192±0,85	27	9,53E+04	7,78E-03	8,17E-08	1,5
Антитело сравнения 1	332±8,16	111	1,01E+06	8,16E-05	8,08E-11	142

*NB означает, что в экспериментальных условиях тестирования наблюдаемое связывание отсутствовало.

Таблица 9. Параметры кинетики связывания моноклональных антител к IL-25, связывающих крысиный IL-25, при 25°C

Антитело	Количество иммобилизованного антитела (RU)	100 нМ связанного крысиного IL-25-ММН (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин.)
H4H10900P	78±0,06	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10864P	135±0,50	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10901P	108±0,15	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10861P	82±0,34	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10862P	103±0,46	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10883P	99±0,30	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10903P	95±0,43	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10907P	103±0,4	10	2,20E+05	1,47E-02	6,69E-08	0,8
H4H10871P	94±0,18	37	5,48E+05	7,23E-05	1,32E-10	160
H4H10897P	100±0,24	23	3,33E+05	8,07E-04	2,42E-09	14
H4H10876P	125±0,32	45	2,59E+05	8,81E-05	3,41E-10	131
H4H10905P	135±0,24	45	1,67E+05	1,35E-04	8,10E-10	85
H4H10863P	95±0,40	34	1,53E+05	1,64E-04	1,07E-09	70
H2aM11008N	107±0,23	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10906P	106±0,38	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H1M11009N	92±0,26	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H2aM10690N	155±0,26	18	9,18E+04	9,50E-03	1,03E-07	1,2
Антитело сравнения 1	266±0,53	91	9,27E+05	9,55E-05	1,03E-10	121

*NB означает, что в экспериментальных условиях тестирования наблюдаемое связывание отсутствовало.

Таблица 10. Параметры кинетики связывания моноклональных антител к IL-25, связывающих крысиный IL-25, при 37°C

Антитело	Количество иммобилизованного антитела (RU)	100 нМ связанного крысиного IL-25-ММН (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин.)
H4H10900P	82±0,55	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10864P	153±0,52	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10901P	110±0,53	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10861P	97±0,71	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10862P	121±1,02	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10883P	116±0,77	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10903P	100±0,77	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10907P	107±0,78	8	2,38E+05	2,04E-02	8,54E-08	0,6
H4H10871P	112±0,54	45	9,37E+05	5,64E-05	6,02E-11	205
H4H10897P	118±0,75	22	2,45E+05	6,01E-03	2,46E-08	1,9
H4H10876P	156±1,22	53	4,50E+05	1,07E-04	2,38E-10	108
H4H10905P	148±1,25	49	4,81E+05	1,81E-04	3,77E-10	64
H4H10863P	116±0,75	41	4,74E+05	3,41E-04	7,20E-10	34
H2aM11008N	125±0,2	3	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H10906P	113±0,73	3	NB*	NB*	NB*	NB*
H1M11009N	99±0,5	3	NB*	NB*	NB*	NB*
H2aM10690N	191±0,58	20	1,68E+05	1,93E-02	1,15E-07	0,6
Антитело сравнения 1	325±8,52	109	1,59E+06	1,02E-04	6,42E-11	113

*NB означает, что в экспериментальных условиях тестирования наблюдаемое связывание отсутствовало.

При 25°C антитело к IL-25 по настоящему изобретению связывалось с человеческим IL-25 со значениями K_D в диапазоне от 11,6 пМ до 36,2 нМ, в то время как антитело сравнения 1 связывалось с человеческим IL-25 со значением K_D 120 пМ (табл. 3). При 37°C антитело к IL-25 по настоящему изобретению связывалось с человеческим IL-25 со значениями K_D в диапазоне от 26,8 пМ до 61,4 нМ, в то время как антитело сравнения 1 связывалось с человеческим IL-25 со значением K_D 134 пМ (табл. 4). При 25°C 14 из 17 антител к IL-25 по настоящему изобретению связывались с обезьяньим IL-25 со значениями K_D в диапазоне от 4,02 до 218 пМ, в то время как антитело сравнения 1 связывалось с обезьяньим IL-25 со значением K_D 88,0 пМ (табл. 5). При 37°C 14 из 17 антител к IL-25 по настоящему изобретению связывались с обезьяньим IL-25 со значениями K_D в диапазоне от 23,6 до 189 пМ, в то время как антитело сравнения 1 связывалось с обезьяньим IL-25 со значением K_D 47,3 пМ (табл. 6). Для трех антител по настоящему изобретению не наблюдали однозначного связывания с обезьяньим IL-25 либо при 25°C, либо при 37°C. При 25°C 7 из 17 антител к IL-25 по настоящему изобретению связывались с мышинным IL-25 со значениями K_D в диапазоне от 570 пМ до 82,3 нМ, в то время как антитело сравнения 1 связывалось с мышинным IL-25-ММН со значением K_D 205 пМ (табл. 7). При 37°C 7 из 17 антител к IL-25 по настоящему изобретению связывались с мышинным IL-25 со значениями K_D в диапазоне от 243 пМ до 137 нМ, в то время как антитело сравнения 1 связывалось с мышинным IL-25-ММН со значением K_D 80,8 пМ (табл. 8). Для десяти антител по настоящему изобретению не наблюдали связывания с мышинным IL-25 ни при 25°C, ни при 37°C. При 25°C 7 из 17 антител к IL-25 по настоящему изобретению связывались с крысиным IL-25 со значениями K_D в диапазоне от 132 пМ до 103 нМ, в то время как антитело сравнения 1 связывалось с крысиным IL-25 со значением K_D 103 пМ (табл. 9). При 37°C 7 из 17 антител к IL-25 по настоящему изобретению связывались с крысиным IL-25 со значениями K_D в диапазоне от 60,2 пМ до 115 нМ, в то время как антитело сравнения 1 связывалось с крысиным IL-25 со значением K_D 64,2 пМ (табл. 10). Для десяти антител по настоящему изобретению не наблюдали связывания с крысиным IL-25 ни при

25°C, ни при 37°C.

Пример 4. Перекрестное конкуритрование с антителом к IL-25.

Конкурентность за связывание между моноклональными антителами к IL-25 определяли с помощью интерферометрического анализа биослой без метки в режиме реального времени на биосенсоре Octet QK384 (Pall ForteBio Corp.).

Весь эксперимент проводили при 25°C в буфере HBST для измерения кинетики (0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества P20, 0,1 мг/мл BSA) со встряхиванием планшетов на скорости 1000 об./мин. Для оценки, были ли способны 2 антитела конкурировать друг с другом за связывание с их соответствующими эпитопами на рекомбинантном человеческом IL-25, экспрессированном с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (hIL-25-MMH; SEQ ID NO:273), приблизительно ~0,5-0,7 нм hIL-25-MMH сначала иммобилизовали на биосенсоры Octet, покрытые антителом к пента-His (ForteBio Inc, № 18-5079), погружая биосенсоры на 5 мин в лунки, содержащие 4 мкг/мл раствора из hIL-25-MMH. Биосенсоры с иммобилизованным антигеном затем насыщали первым моноклональным антителом к IL-25 (называемым в настоящем документе как mAb-1) путем погружения в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора mAb-1, на 5 мин. Затем биосенсоры последовательно погружали в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствора второго моноклонального антитела к IL-25 (называемого в настоящем документе mAb-2). Между каждой стадией эксперимента биосенсоры промывали в буфере HBST для измерения кинетики. Ответ в виде связывания в режиме реального времени отслеживали в ходе эксперимента и в конце каждой стадии регистрировали ответ в виде связывания. Сравнивали ответ в виде связывания mAb-2 с hIL-25-MMH, предварительно сформировавшим комплекс с mAb-1, и определяли конкурентный/неконкурентный характер различных моноклональных антител к IL-25. В нескольких случаях антитела к IL-25 не были способны полностью насытить поверхность с иммобилизованным hIL-25-MMH, обуславливая определенную величину сигнала связывания, который должен был наблюдаться во время самоконкурирования. Поэтому создавали матрицу перекрестного конкуритрования путем вычитания сигнала самоконкурирования со стороны специфического связывания mAb-2, а любой сигнал связывания меньше 0 нм регистрировали как 0 нм. Результаты приведены на фигуре. В табл. 11 показана расшифровка для идентификаторов mAb и антител, которым они соответствуют, и ответы в форме связывания, которые наблюдали для связывания hIL-25-MMH с сенсором с антителом к пента-His и для связывания mAb-1 с иммобилизованным hIL-25-mmh.

Таблица 11. Идентификаторы антител, соответствующие тестируемым антителам в анализе перекрестной конкурентности, результаты которого изображены на фигуре

Идентификатор mAb, показанный на фиг.1	Соответствующее антитело	Иммобилизованный hIL-25-MMH (нм)	50 мкг/мл, связывание mAb-1 (нм)
1	H4H10883P	0,58±0,02	0,7±0,04
2	H4H10900P	0,55±0,03	0,68±0,04
3	H4H10901P	0,53±0,03	0,67±0,04
4	H4H10903P	0,8±0,03	1,03±0,03
5	H4H10861P	0,67±0,02	0,88±0,03
6	H4H10862P	0,66±0,02	0,83±0,03
7	H2aM11008N	0,71±0,02	0,81±0,03
8	H4H10864P	0,67±0,02	0,84±0,04
9	H4H10906P	0,71±0,03	0,88±0,03
10	H4H10897P	0,57±0,02	1,12±0,06
11	H4H10907P	0,73±0,03	1,74±0,06
12	H1M11009N	0,69±0,02	1,42±0,05
13	H2aM10690N	0,79±0,02	1,38±0,04
14	H4H10863P	0,71±0,03	1,13±0,04
15	H4H10871P	0,65±0,02	1,12±0,04
16	H4H10876P	0,62±0,02	1,07±0,05
17	H4H10905P	0,77±0,03	1,59±0,05
18	Антитело сравнения 1	0,69±0,02	1,49±0,07

На фигуре светло-серые ячейки с темным шрифтом представляют самоконкурирование. Антитела, конкурирующие в обоих направлениях, независимо от порядка связывания, представлены черными ячейками и белым шрифтом. Отсутствие конкуренции между антителами, свидетельствовавшее о различных эпитопах связывания, представлено белыми ячейками с черным шрифтом. Темно-серые ячейки с белым шрифтом представляют ответы связывания антител изотипического контроля и буфера в отдельности.

Из этого примера видно, что некоторые из антител по настоящему изобретению перекрестно конкурируют с одним или несколькими другими антителами по настоящему изобретению за связывание с IL-25; в то время как для определенных антител по настоящему изобретению (например, H1M11009N [12]) наблюдали небольшое или полное отсутствие перекрестной конкуренции с другими тестируемыми антителами).

Пример 5. Антитела к IL-25 блокируют связывание IL-25 с IL-17RB.

Способность антител к IL-25 блокировать связывание человеческого IL-25 с одним из его естественных рецепторов, человеческим IL-17RB, измеряли в конкурентном сэндвич-ELISA.

Внеклеточный домен человеческого белка IL-17RB, экспрессируемого с С-концевой меткой человеческого Fc (hIL17RB-hFc, R&D Systems, № 1207-BR), наносили в количестве 2 мкг/мл на 96-луночный микротитрационный планшет в буфере PBS в течение ночи при 4°C. После этого сайты неспецифического связывания блокировали при помощи 0,5% (мас./об.) раствора BSA в PBS. Постоянную концентрацию 2 нМ человеческого IL-25, экспрессированного с С-концевой мус-мус-гексагистиридиновой меткой (hIL-25-MMH; SEQ ID NO:273), добавляли к серийным разведениям антител таким образом, чтобы конечные концентрации антител были в диапазоне от 0 до 200 нМ. Смеси антитело/hIL-25-MMH инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (RT) перед тем, как их переносили в микротитрационные планшеты, покрытые hIL-17RB-hFc. Затем, после инкубирования в течение 1 ч при RT, лунки промывали и связавшийся с планшетом hIL-25-MMH детектировали с помощью пероксидазы хрена, конъюгированной с поликлональным антителом к мус (Novus Biologicals, № NB600-341). Образцы проявляли при помощи раствора TMB при прохождении колориметрической реакции, а затем гасили 1М серной кислотой перед измерением поглощающей способности при 450 нм на планшет-ридере Victor X5. Анализ данных проводили с использованием сигмоидальной модели "доза-эффект" в программном обеспечении Prism™ (GraphPad). Рассчитанное значение IC_{50} , определяемое как концентрация антител, необходимая для 50% блокирования связывания hIL-25-MMH с hIL-17RB-hFc, использовали в качестве показателя блокирующей активности. Поглощающую способность, измеряемую для постоянной концентрации только hIL-25-MMH, определяли как 0% блокирования, а поглощающую способность, измеряемую для раствора без добавления hIL-25-MMH, определяли как 100% блокирования. Процент блокировки рассчитывали как отношение уменьшения сигнала, наблюдаемого в присутствии антитела, по отношению к разнице между сигналом с одним только hIL-25-MMH и фоном (сигнал только от вторичного антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена), вычитаемым из 100% блокирования, как определено ранее. Значения поглощающей способности лунок, содержавших наиболее высокую концентрацию для каждого антитела, использовали для определения процента максимальной блокировки. Значения IC_{50} и максимальный процент блокировки для каждого протестированного антитела приведены в табл. 12.

Таблица 12. Блокировка антителом связывания IL-25 с IL-17RB

Антитело	Блокирование связывания 2 нМ hIL-25-ММН с hIL-17RB-hFc, IC ₅₀ , (М)	% максимального блокирования 200 нМ антитела, блокирующего связывание 2 нМ hIL-25-ММН с hIL-17RB-hFc
H4H10900P	2,0E-10(*)	90
H4H10864P	2,6E-10(*)	88
H4H10901P	2,3E-10(*)	91
H4H10861P	2,0E-10(*)	92
H4H10862P	2,4E-10(*)	89
H4H10883P	2,0E-10(*)	93
H4H10903P	2,4E-10(*)	91
H4H10907P	5,5E-10(*)	87
H4H10871P	7,1E-10(*)	92
H4H10897P	3,2E-10(*)	94
H4H10876P	6,5E-10(*)	89
H4H10905P	5,3E-10(*)	86
H4H10863P	9,2E-10(*)	87
H2aM11008N	4,3E-10(*)	98
H1M11009N	Неблокирующее	20
H4H10906P	1,4E-10(*)	89
H2aM10690N	3,1E-08	70
Антитело сравнения 1	2,5E-10(*)	90
Изотипический контроль hIgG4	Неблокирующее	-31
Изотипический контроль mIgG2a	Неблокирующее	-45

(*) - ниже теоретической нижней границы анализа, рассчитанной равной 1,0 нМ для этого анализа, где димерные hIL-25ММН в растворе фиксировались в концентрации 2 нМ.

Антитела, для которых не наблюдали никакого влияния на сигнал постоянной hIL-25-ММН или наблюдали уменьшение сигнала связывания на 25% или менее, определяли как неблокирующие. Теоретическая нижняя граница анализа составляла 0,5 нМ, которая свидетельствовала, что нижние расчетные значения IC₅₀ не могут представлять собой количественное связывание сайтов белка и антитела. По этой причине антитела с расчетными значениями IC₅₀ ниже 0,5 нМ в табл. 12 представлены как <5,0E-10М.

Как видно из табл. 12, шестнадцать из 17 протестированных антител к IL-25 блокировали связывание 2 нМ hIL-25-ММН с hIL-17RB-hFc со значениями IC₅₀, варьирующими в диапазоне от менее чем 0,5 до 31 нМ, и процентом максимальной блокировки в диапазоне от 70 до 98%. Антитело сравнения 1 блокировало 90% связывания 2 нМ hIL-25-ММН с hIL-17RB-hFc со значением IC₅₀ менее 0,5 нМ. Одно антитело, H1M11009N, было выявлено как неблокирующее в таких условиях анализа.

Пример 6. Антитела к IL-25 блокируют IL-25-опосредованную передачу сигналов в линиях клеток, сконструированных для экспрессии IL-17RA и IL-17RB.

Разрабатывали биоанализ для детекции IL-25-опосредованной передачи клеточных сигналов и для измерения степени, до которой антитела к IL-25 по настоящему изобретению блокировали передачу сигнала IL-25 in vitro.

Для этого теста были созданы линии клеток HEK293 для стабильной экспрессии человеческого IL-17RA (аминокислоты 1-866 в последовательности под номером доступа NP_055154.3), IL-17RB (аминокислоты 1-502 в последовательности под номером доступа NP_061195.2) и Act1 (аминокислоты 1-564 в последовательности под номером доступа NP_001157753.1), вместе с люциферазным репортером [NFκB-чувствительный элемент (5x)-люцифераза-IRES-GFP]. Полученную в результате стабильную линию клеток, называемую HEK293/NFκB-luc/hIL17RA/hIL17RB/hAct1, выделяли и поддерживали в 10% среде DMEM, содержащей 10% FBS, NEAA, пенициллин/стрептомицин, 500 мкг/мл G418, 100 мкг/мл гидромицина В и 1 мкг/мл пурамицина.

Клетки высевали в 96-луночные планшеты для анализа в количестве 10000 клеток/лунка в OPTI-MEM, дополненной 0,1% FBS, а затем инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение ночи. На следующий день, для определения зависимости ответа от дозы IL-25, либо человеческий IL-25, экспрессированный с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (hIL-25-MMH; SEQ ID NO:273), либо IL-25 яванского макака, экспрессированный с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (MfIL-25-MMH; SEQ ID NO:274), либо мышинный IL-25, экспрессированный с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (mIL-25-MMH; SEQ ID NO:275), серийно разводили в соотношении 1:3 (от 3 до 0,0001 нМ) и добавляли к клеткам. В один образец клеток также добавляли контроль, содержащий буфер для разведения, но без IL-25. Для измерения ингибирования, антитела серийно разводили и добавляли к клеткам с последующим добавлением постоянных концентраций IL-25 (5 пМ для обоих hIL-25-MMH, 12 пМ для MfIL-25-MMH и 10 пМ для mIL-25-MMH). Серия разведений антител перед добавлением к клеткам имела соотношение 1:3, начиная со 100 нМ и в диапазоне до 0,002 нМ плюс контрольный образец, содержащий только буфер без антитела. Активность люциферазы измеряли через 5,5 часов инкубации при 37°C в 5% CO₂ с последующим добавлением реагента ONE-GLO® (Promega, № E6051) с использованием планшет-ридера Victor X (Perkin Elmer). Полученные результаты анализировали с использованием нелинейной регрессии (4-параметрической логистики) с помощью программного обеспечения Prism 5 (GraphPad) для получения значений EC₅₀ и IC₅₀. Результаты показаны в табл. 13.

Таблица 13. Ингибирование IL-25-опосредованной передачи сигналов

Разновидности IL25	Человеческий		Обезьяний	Мышиный
EC ₅₀ [M]	2,9E-12	1,6E-11	1,9E-11	8,4E-12
Постоянная концентрация IL25, использованная в анализе	5 пМ		12 пМ	10 пМ
Антитела	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]
H2aM10690N	Блокирует при высокой концентрации			
H4H10861P	6,3E-11		3,7E-11	
H4H10862P	8,4E-11		3,3E-11	
H4H10863P	6,9E-10		3,5E-10	4,3E-09
H4H10864P	3,6E-11		2,6E-11	
H4H10871P	3,2E-10		8,8E-11	6,7E-10
H4H10876P	4,6E-10		2,1E-10	8,8E-10
H4H10883P	1,4E-10		3,9E-11	
H4H10897P	4,6E-10		4,0E-10	1,5E-08
H4H10900P	3,1E-11		2,2E-11	
H4H10901P	5,6E-11		3,8E-11	
H4H10903P	1,4E-10		6,0E-11	
H4H10905P	5,1E-10		2,1E-10	6,8E-10
H4H10906P		2,7E-11	4,7E-11	
H4H10907P	2,2E-10		1,4E-10	NB
H2aM11008N	1,8E-09			
H1M11009N	Блокирует при высокой концентрации			
Антитело сравнения 1	7,2E-10	2,2E-10	3,8E-10	6,1E-10
Изотипический	NB			

контроль 1				
Изотипический контроль 2	NB	NB	NB	NB

NB - неблокирующее.

Как видно из табл. 13, hIL-25-ММН активировался со значениями EC_{50} 2,9 и 16 пМ в двух отдельных днях анализа; mIL-25-ММН активировался со значением EC_{50} 19 пМ; и mL-25-ММН активировался со значением EC_{50} 8,4 пМ.

Что касается блокирования, 15 из 17 антител по настоящему изобретению полностью блокировали стимуляцию клеток HEK293/NFκB-luc/hIL17RA/hIL17RB/hAct1 HEK293 посредством 5 пМ hIL-25-ММН со значениями IC_{50} в диапазоне от 27 пМ до 1,8 нМ, в то время как антитело сравнения 1 полностью блокировало со значениями IC_{50} 720 и 220 пМ в двух отдельных днях анализа. Два тестируемых антитела, H2aM10690N и H1M11009N, частично ингибировали 5 пМ hIL-25-ММН при высоких концентрациях антител. Все 14 протестированных антител по настоящему изобретению полностью блокировали стимуляцию клеток HEK293/NFκB-luc/hIL17RA/hIL17RB/hAct1 HEK293 посредством 12 пМ mIL-25-ММН со значениями IC_{50} в диапазоне от 22 до 400 пМ, в то время как антитело сравнения 1 полностью блокировало со значением IC_{50} 380 пМ. Пять из 6 протестированных антител по настоящему изобретению полностью блокировали стимуляцию клеток HEK293/NFκB-luc/hIL17RA/hIL17RB/hAct1 HEK293 посредством 10 пМ mL-25-ММН со значениями IC_{50} в диапазоне от 670 пМ до 15 нМ, в то время как антитело сравнения 1 полностью блокировало со значением IC_{50} 610 пМ. Также были протестированы антитела изотипического контроля, и у них не наблюдали ингибирования ни в одном из анализов.

Пример 7. Антитела к IL-25 блокируют IL-25-опосредованную передачу сигнала в анализе на зародышевых клетках.

Блокирующую способность антител к IL-25 по настоящему изобретению дополнительно оценивали с помощью анализа на зародышевых клетках с использованием мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) (см. Rickel et al., The Journal of Immunology, 2008, vol. 181 (6) pp. 4299-4310).

PBMC выделяли из свежей цельной крови от двух разных доноров центрифугированием в градиенте плотности. Если кратко: цельную кровь с K2 EDTA разводили в два раза в RPMI 1640, аккуратно наплаивали поверх Ficoll-Paque (GE Healthcare, № 17-1440-03) и центрифугировали в течение 20 мин. Межфазный слой, содержащий PBMC, отсасывали, переносили в новую пробирку и дважды промывали PBS. Выделенные PBMC высевали в 75 см² колбы в конечной концентрации 2×10^6 клеток/мл в RPMI 1640, дополненную 10% FBS, 2 mM L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 100 нг/мл рекомбинантного тимического стромального лимфопротейна (TSLP; R&D Systems, № 1398-TS/CF). Спустя 24 ч клетки собирали, промывали в RPMI 1640 и высевали в круглодонные 96-луночные планшеты в конечной концентрации 3×10^5 клеток/мл в RPMI 1640, дополненную 10% FBS, 2 mM L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Затем клетки инкубировали с 50 нг/мл TSLP, 10 нг/мл человеческого IL-2 (IL-2; R&D Systems, № 202-IL/CF), 1 нМ человеческого IL-25, экспрессированного с С-концевой мускус-гексагистиридиновой меткой (hIL-25-ММН; SEQ ID:273), и серийными разведениями антител от 200 нМ до 48,8 пМ в конечном объеме, который составлял 200 мкл на лунку. Каждый образец тестировали в трех экземплярах. При наличии антител их добавляли к клеткам через 30 мин после предварительной инкубации с IL-25.

Затем клетки инкубировали в течение 72 ч при 37°C во влажной камере с 5% CO₂. Затем измеряли уровни IL-5 в культуральной надосадочной жидкости с использованием коммерчески доступного набора для ELISA (R&D Systems, № DY205). Для ELISA 96-луночные плоскодонные планшеты покрывали иммобилизованным антителом в соответствии с инструкциями производителя. После промывки и блокировки, 100 мкл неразбавленной культуральной надосадочной жидкости добавляли в планшеты и инкубировали в течение 2 ч. Последующие промывки и детекцию осуществляли в соответствии с инструкциями производителя. Результаты подытожены в табл. 14 и 15.

Таблица 14. Индукция посредством hIL-25-ММН секреции IL-5 из человеческих PBMC

[hIL-25-ММН]	IL-5, секретированный от донора 727058-059 (нг/мл)		IL-5, секретированный от донора 727060 (нг/мл)	
(M)	Среднее	Стандартное отклонение	Среднее	Стандартное отклонение
1E-09	0,071	0,021	0,599	0,088
0	0,014	0,007	0,083	0,022

Таблица 15. Блокировка с помощью антител к IL-25 индуцированного посредством hIL-25-ММН секреции IL-5 из человеческих РВМС

Антитело	Значения IC ₅₀ антител для блокирования секреции IL-5 от донора № 727058-059 (М)	Значения IC ₅₀ антител для блокирования секреции IL-5 от донора № 727060 (М)
H4N10900P	3,921E-11	5,781e-010
H4N10864P	1,149E-09	6,771e-010
H4N10871P	1,178E-10	6,363e-010
H4N10876P	1,720E-10	1,296e-010
Антитело сравнения 1	5,685E-09	1,590e-008

Как видно из табл. 14, человеческий IL-25-ММН в количестве 1 нМ в присутствии TSLP и IL-2 индуцировал секрецию 0,071 нг/мл IL-5 из человеческих объединенных РВМС, полученных от донора № 727058-059, и 0,599 нг/мл IL-5 из человеческих объединенных РВМС, полученных от донора № 727060.

Как видно из табл. 15, все 4 протестированных антитела к IL-25 по настоящему изобретению блокировали секрецию IL-5 из человеческих РВМС, индуцированных 1 нМ hIL-25-ММН, причем для донора № 727058-059 значения IC₅₀ варьировали в диапазоне от 39,2 пМ до 1,149 нМ, а для донора № 727060 значения IC₅₀ варьировали в диапазоне от 129,6 до 677,1 пМ. Антитело сравнения 1 блокировало секрецию IL-5 со значением IC₅₀ 5,685 нМ для донора № 727058-059 и значением IC₅₀ 15,9 нМ для донора № 727060.

Этот пример подтверждает, что антитела к IL-25 по настоящему изобретению способны эффективно блокировать в клетках передачу сигнала IL-25 с большей степенью, чем антитело сравнения к IL-25.

Пример 8. Индуцированная гидродинамической доставкой ДНК (HDD) IL-25 эозинофилия легкого, метаплазия бокаловидных клеток и повышенное содержание сывороточного IgE для *in vivo* исследования эффективности кандидатов mAb.

Человеческий IL-25 сверхэкспрессировался у мышей дикого типа (WT) при гидродинамической доставке ДНК (HDD). Для эксперимента с HDD, мышам WT вводили инъекцией либо 25 мкг плазмиды, экспрессирующей полноразмерный человеческий IL-25 (см. NM_022789.3; hIL-25, а также SEQ ID NO: 277 (ДНК) и SEQ ID NO: 278 (белок)), или 25 мкг той же плазмиды, но без кодирующей последовательности (пустой вектор). Подгруппу мышей, которым подкожно вводили инъекцией плазмиду hIL-25 либо с антителом к IL-25, либо с такой же дозой антитела изотипического контроля за три дня до HDD-инъекции, в день HDD-инъекции, а затем на 2- и 4-й день после HDD-инъекции. Мышей умерщвляли через 7 дней после HDD-инъекции и собирали кровь и легкие. Уровни сывороточного IgE количественно оценивали с помощью ELISA; эозинофилию легких оценивали путем выделения клеток, которые инфильтрировали в легкие после обработки коллагеназой, и проточной цитометрии; и метаплазию бокаловидных клеток оценивали путем количественной оценки срезов легких, окрашенных реактивом Шиффа (PAS).

Экспериментальное введение дозы и протокол обработки для групп мышей показаны в табл. 16А и 16В.

Таблица 16А. Исследование 1

Группа	Мыши	Количество	Конструкция	Антитело	Доза mAb
1	WT	3	Пустой вектор	Отсутствовало	
2	WT	5	hIL-25	Изотипический контроль	25 мг/кг
3	WT	5	hIL-25	Антитело к IL-25 H4N10871P	25 мг/кг
4	WT	5	hIL-25	Антитело к IL-25 H4N10900P	25 мг/кг

Таблица 16В. Исследование 2

Группа	Мыши	Количество	Конструкция	Антитело	Доза mAb
1	WT	5	Пустой вектор	Отсутствовало	
2	WT	4	hIL-25	Отсутствовало	
3	WT	5	hIL-25	Антитело к IL-25 H4N10871P	5 мг/кг
4	WT	5	hIL-25	Антитело к IL-25 H4N10871P	25 мг/кг

Измерение уровней IgE в кровотоке.

У каждой мыши отбирали образцы крови с помощью предсмертной пункции сердца, используя 1 мл шприц для введения туберкулина с иглой калибра 27G^{1/2} (BD, № 309306), а собранную кровь помещали в пробирку для отделения сыворотки BD Microtainer® (BD, № 365956). После центрифугирования собирали сыворотку, а затем переносили ее в новые пробирки.

Для определения концентрации общего IgE в образцах сыворотки крови использовали набор для сэндвич-ELISA OPTEIA (BD, № 555248) согласно инструкциям производителя, наряду с набором реагентов BD OPTEIA Reagent set B (BD, № 550534). Вкратце: образцы сыворотки развели в разбавителе реагентов и высевали на 96-луночные планшеты, покрытые иммобилизованным антителом к IgE. В качестве эталонного стандарта использовали очищенный мышинный IgE, поставляемый производителем. После промывки, связавшийся с планшетом общий IgE детектировали с использованием биотинилированного антитела к мышинному IgE с последующим добавлением конъюгата стрептавидина и пероксидазы хрена. Затем добавляли хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин для прохождения колориметрической реакции, а затем нейтрализовали его с помощью 1M серной кислоты перед измерением поглощающей способности при 450 нм на планшет-ридере Molecular Devices SpectraMax M5. Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения Prism™ (GraphPad). Средние количества IgE в кровотоке для каждой экспериментальной группы выражали в нг/мл ± стандартное отклонение (SD), как показано в табл. 18 и 19.

Сбор легких для анализа легочного клеточного инфильтрата.

После обескровливания удаляли хвостовую долю правого легкого у каждой мыши, нарезали кубиками, которые имели размер приблизительно от 2 до 3 мм, и помещали в пробирку, содержащую раствор 20 мкг/мл ДНКазы (Roche, № 10104159001) и 0,7 ед./мл либеразы TH (Roche, № 05401151001), разведенных в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) (Gibco, № 14025), которую инкубировали на водяной бане при 37°C в течение 20 мин и встряхивали на вортексе каждые 5 мин. Реакцию останавливали путем добавления этилендиаминтетрауксусной кислоты (Gibco, № 15575) с конечной концентрацией 10 мМ. Затем каждое легкое разделяли с использованием диссоциатора gentle MACS dissociator® (Miltenyi Biotec, № 130-095-937), а затем фильтровали через фильтр с диаметром 70 мкм и центрифугировали. Полученную в результате легочную массу ресуспендировали в 1 мл 1X буфера для лизиса эритроцитов (Sigma, № R7757) для удаления эритроцитов. После инкубации в течение 3 мин при комнатной температуре добавляли 3 мл 1X DMEM для дезактивации буфера для лизиса эритроцитов. Клеточные суспензии затем центрифугировали, а полученные клеточные массы ресуспендировали в 5 мл буфера MACS (проточного буфера AutoMACS; Miltenyi Biotec, № 130-091-221). Ресуспендированные образцы фильтровали через 70 мкм фильтр и высевали в 96-луночный планшет с V-образным дном в количестве 1×10^6 клеток на лунку. Затем клетки центрифугировали, а осадок промывали в 1X PBS. После второго центрифугирования клеточные массы ресуспендировали в 100 мкл фиксируемом водном красителе для окрашивания мертвых клеток LIVE/DEAD® (Life Technologies, № L34957), разведенном в соотношении 1:1000 в 1X PBS, для определения жизнеспособности клеток и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. После одной отмывки в 1X PBS клетки инкубировали в растворе буфера MACS, содержащего 10 мкг/мл очищенного крысиного блокирующего Fc к мышинным CD16/CD32 (клон: 2.4G2; BD Biosciences, №553142) в течение 10 мин при 4°C. Клетки два раза промывали, а затем инкубировали в смеси соответствующих антител (описанной в табл. 17), разведенной в буфере MACS, в течение 30 мин при 4°C в защищенном от света месте. После инкубации с антителами клетки два раза промывали в буфере MACS, ресуспендировали в cytofix от BD (BD Biosciences, № 554655), а затем инкубировали в течение 15 мин при 4°C в защищенном от света месте. После этого клетки промывали, ресуспендировали в буфере MACS, а затем переносили в пробирки для FACS от BD (BD Biosciences, № 352235) для анализа эозинофилов с помощью проточной цитометрии.

Эозинофилы обозначали как живые, CD45⁺, GR1⁻, CD11c^{низк.}, SiglecF^{высок.}. Данные выражены в виде частоты эозинофилов в популяции иммунцитов (% CD45⁺ клеток ± SD), которые показаны в табл. 20 и 21.

Таблица 17. Антитела, использованные для анализа на основе проточной цитометрии

Антитело	Флуорохром	Производитель	Номер по каталогу	Конечное разведение
CD11c	APC	BD Biosciences	550261	1/100
CD45	PerCP Cy5.5	eBiosciences	45-0454-82	1/800
F4/80	Pacific Blue	eBiosciences	48-4801-82	1/200
Siglec-F	PE	BD Biosciences	552126	1/100
Ly6G (Gr-1)	APC-eFluor780	eBiosciences	47-5931-82	1/200

Сбор легких для анализа метаплазии бокаловидных клеток.

После обескровливания у каждой мыши удаляли левое легкое и помещали в пробирки, содержавшие 5 мл раствора 4% (об./мас.) параформальдегида (Boston Bioproducts, № BM-155) в 1X фосфатно-солевом буферном растворе, и хранили при комнатной температуре в течение по меньшей мере 24 ч. Образцы легких потом промокали досуха и переносили в пробирки, содержавшие 70% этанол. Образцы отсылали в Histoserv, Inc. (Джермантаун, Мэриленд) для фиксирования в парафине, получения срезов и окрашивания реактивом Шиффа (PAS).

Фотографии PAS-окрашенных срезов легких получали с помощью микроскопа Zeiss Axio Imager A2 (40X объектив). Положительное окрашивание клеток по PAS выявляли как бокаловидные клетки и подсчитывали их на участке эпителия главного бронха длиной 1-2 мм. Количества бокаловидных клеток выражали по отношению к общему числу клеток на анализируемом участке эпителия. Данные, выраженные как частота встречаемости бокаловидных клеток $\pm$ SD, показаны в табл. 22.

Таблица 18. Уровни общего мышинного IgE в кровотоке по результатам исследования 1

Группа	Мыши	Конструкция	Антитело	Доза mAb	Средние уровни IgE в кровотоке (нг/мл $\pm$ SD)
1	WT	Пустой вектор	Отсутствовало		311 $\pm$ 200
2	WT	hIL-25	Изотипический контроль	25 мг/кг	3417 $\pm$ 1627
3	WT	hIL-25	H4N10871P	25 мг/кг	333 $\pm$ 125
4	WT	hIL-25	H4N10900P	25 мг/кг	1240 $\pm$ 2233

Таблица 19. Уровни общего мышинного IgE в кровотоке по результатам исследования 2

Группа	Мыши	Конструкция	Антитело	Доза mAb	Средние уровни IgE в кровотоке (нг/мл $\pm$ SD)
1	WT	Пустой вектор	Отсутствовало		93 $\pm$ 71
2	WT	hIL-25	Отсутствовало		1186 $\pm$ 1370**
3	WT	hIL-25	H4N10871P	5 мг/кг	190 $\pm$ 99
4	WT	hIL-25	H4N10871P	25 мг/кг	118 $\pm$ 26

Указана статистическая значимость по сравнению с группой пустого вектора, определенная с помощью критерия Крускала-Уоллиса с апостериорным критерием множественного сравнения Данна (** $p < 0,001$).

Таблица 20. Частота встречаемости эозинофилов легких по результатам исследования 1

Группа	Мыши	Конструкция	Антитело	Доза mAb	Средняя частота встречаемости эозинофилов (% CD45+ клетки $\pm$ SD)
1	WT	Пустой вектор	Отсутствовало		1,47 $\pm$ 0,16
2	WT	hIL-25	Изотипический контроль	25 мг/кг	17,20 $\pm$ 2,39
3	WT	hIL-25	H4H10871P	25 мг/кг	1,03 $\pm$ 0,16**
4	WT	hIL-25	H4H10900P	25 мг/кг	1,36 $\pm$ 0,19

Указана статистическая значимость по сравнению с изотипическим контролем, определенная с помощью критерия Крускала-Уоллиса с апостериорным критерием множественного сравнения Данна (** p<0,001).

Таблица 21. Частота встречаемости эозинофилов легких по результатам исследования 2

Группа	Мыши	Конструкция	Антитело	Доза mAb	Средняя частота встречаемости эозинофилов (% CD45+ клетки $\pm$ SD)
1	WT	Пустой вектор	Отсутствовало		6,35 $\pm$ 1,46
2	WT	hIL-25	Отсутствовало		32,29 $\pm$ 18,35
3	WT	hIL-25	H4H10871P	5 мг/кг	4,46 $\pm$ 1,66*
4	WT	hIL-25	H4H10871P	25 мг/кг	5,23 $\pm$ 2,13

Указана статистическая значимость по сравнению с hIL-25, определенная с помощью критерия Крускала-Уоллиса с апостериорным критерием множественного сравнения Данна (* p<0,01).

Таблица 22. Метаплазия бокаловидных клеток по результатам исследования 2

Группа	Мыши	Конструкция	Антитело	Доза mAb	Средняя частота встречаемости бокаловидных клеток (% от всего клеток в эпителии $\pm$ SD)
1	WT	Пустой вектор	Отсутствовало		1,15 $\pm$ 1,67
2	WT	hIL-25	Отсутствовало		59,63 $\pm$ 39,74
3	WT	hIL-25	H4H10871P	5 мг/кг	1,71 $\pm$ 1,93
4	WT	hIL-25	H4H10871P	25 мг/кг	6,90 $\pm$ 11,55

У мышей дикого типа со сверхэкспрессией человеческого IL-25, вызванной HDD, наблюдали повышенные уровни IgE в кровотоке (3417 $\pm$ 1627 нг/мл для исследования 1 и 1186 $\pm$ 1370 нг/мл для исследования 2) по сравнению с мышами дикого типа, которым был введен пустой вектор с помощью HDD (311 $\pm$ 200 нг/мл для исследования 1 и 1186 $\pm$ 1370 нг/мл для исследования 2). Уровни IgE в кровотоке уменьшались в каждом исследовании при обработке антителами к IL-25 мышей со сверхэкспрессией человеческого IL-25, вызванной с HDD, как показано в табл. 18 и 19. У мышей дикого типа со сверхэкспрессией человеческого IL-25, вызванной HDD, наблюдали тенденцию к повышению частоты встречаемости эозинофилов в легких (17,20 $\pm$ 2,39% для исследования 1 и 32,29 $\pm$ 18,35% для исследования 2) по сравнению с мышами дикого типа, которым был введен пустой вектор с помощью HDD (1,47 $\pm$ 0,16% для исследования 1 и 6,35 $\pm$ 1,46% для исследования 2). Частота встречаемости эозинофилов в легких уменьшалась в каждом исследовании при обработке антителами к IL-25 мышей со сверхэкспрессией человеческого IL-25, вызванной с HDD, как показано в табл. 20 и 21. У мышей дикого типа со сверхэкспрессией человеческого IL-25, вызванной HDD, наблюдали тенденцию к повышению метаплазии бокаловидных клеток (59,63 $\pm$ 39,74 для исследования 2) по сравнению с мышами дикого типа, которым был введен пус-

той вектор с помощью HDD ($1,15 \pm 1,67$ для исследования 2). Частота метаплазии бокаловидных клеток уменьшалась в исследовании 2 при обработке антителами к IL-25 мышей со сверхэкспрессией человеческого IL-25, вызванной с помощью HDD, как показано в табл. 22.

Пример 9. Воспаление легких, индуцированное хроническим воздействием аллергеном клеща домашней пыли (HDM), у мышей WT и IL-25 KO.

Для определения роли IL-25 на соответствующей модели *in vivo* проводили исследование воспаления легких, индуцированного хроническим воздействием аллергеном клеща домашней пыли (HDM), у мышей дикого типа (WT) и у мышей, которые были гомозиготными по делеции мышинового IL-25 (мышей IL-25 KO).

Мышам IL-25 KO и WT интраназально вводили либо 50 мкг экстракта клеща домашней пыли (HDM; Greer, № XPB70D3A2.5), разведенного в 20 мкл 1X фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), или 20 мкл 1X PBS в течение 5 дней в неделю на протяжении 12 недель. Всех мышей умерщвляли в первый день тринадцатой недели исследования и собирали их легкие. Экспериментальное введение дозы и протокол обработки для групп мышей показаны в табл. 23.

Таблица 23. Экспериментальное введение дозы и протокол обработки для групп мышей

Группа	Мыши	Количество	Интраназальное введение провокационной дозы	Длительность интраназального введения провокационной дозы
1	WT	3	1X PBS (солевой раствор)	12 недель
2	WT	4	50 мкг HDM в 20 мкл 1X PBS	12 недель
3	IL-25 KO	4	1X PBS (солевой раствор)	12 недель
4	IL-25 KO	5	50 мкг HDM в 20 мкл 1X PBS	12 недель

Сбор легких для анализа легочного клеточного инфильтрата.

После обескровливания удаляли хвостовую долю правого легкого у каждой мыши, нарезали кубиками, которые имели размер приблизительно от 2 до 3 мм, и помещали в пробирку, содержащую раствор 20 мкг/мл ДНКазы (Roche, № 10104159001) и 0,7 ед./мл либеразы TH (Roche, № 05401151001), разведенных в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) (Gibco, № 14025), которую инкубировали на водяной бане при 37°C в течение 20 мин и перемешивали путем регулярного переворачивания вверх дном каждые 5 мин. Реакцию останавливали путем добавления этилендиаминтетрауксусной кислоты (Gibco, № 15575) с конечной концентрацией 10 mM. Затем каждое легкое разделяли с использованием диссоциатора gentleMACS dissociator® (Miltenyi Biotec, № 130-095-937), а затем фильтровали через фильтр с диаметром 70 мкм и центрифугировали. Полученную в результате легочную массу ресуспендировали в 1 мл 1X буфера для лизиса эритроцитов (Sigma, № R7757) для удаления эритроцитов. После инкубации в течение 3 мин при комнатной температуре добавляли 3 мл буфера MACS (проточного буфера autoMACS; Miltenyi Biotec, № 130-091-221) для дезактивации буфера для лизиса эритроцитов. Клеточные суспензии затем центрифугировали, а полученные клеточные массы ресуспендировали в 5 мл буфера MACS. Ресуспендированные образцы фильтровали через 70 мкм фильтр и высевали в 96-луночный планшет с V-образным дном в количестве 1×10^6 клеток на лунку. Затем клетки центрифугировали, а осадок промывали в 1X PBS. После второго центрифугирования клеточные массы ресуспендировали в 100 мкл фиксируемом водном красителе для окрашивания мертвых клеток LIVE/DEAD® (Life Technologies, № L34957), разведенном в соотношении 1:1000 в 1X PBS, для определения жизнеспособности клеток и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. После одной отмывки в 1X PBS клетки инкубировали в растворе буфера MACS, содержащего 10 мкг/мл очищенного крысиного блокирующего Fc к мышинным CD16/CD32 (клон: 2.4G2; BD Biosciences, №553142) в течение 10 мин при 4°C. Клетки два раза промывали, а затем инкубировали в смеси соответствующих антител (описанной в табл. 24), разведенной в буфере MACS, в течение 30 мин при 4°C в защищенном от света месте. После инкубации с антителами клетки два раза промывали в буфере MACS, ресуспендировали в Cytofix от BD (BD Biosciences, № 554655), а затем инкубировали в течение 15 мин при 4°C в защищенном от света месте. После этого клетки промывали, ресуспендировали в буфере MACS, а затем переносили в пробирки для FACS от BD (BD Biosciences, № 352235) для анализа нейтрофилов и лимфоцитов с помощью проточной цитометрии.

Нейтрофилы обозначали как живые, CD45⁺, F4/80⁻, Ly6G⁺, Ly6C^{средн.}. Данные по нейтрофилам выражали как частоту встречаемости проанализированных живых клеток (частота живых, $\pm$ SD), как показано в табл. 25. CD4 и CD8 Т-клетки соответственно обозначали как живые, SSC^{низк.}, FSC^{низк.}, CD45⁺, CD19⁻, CD3⁺, CD8⁻, CD4⁺ и живые, SSC^{низк.}, FSC^{низк.}, CD45⁺, CD19⁻, CD3⁺, CD8⁺, CD4⁻. Данные по CD4 и CD8 Т-клеткам выражали как частоту встречаемости CD4 Т-клеток по отношению к частоте встречаемости CD8 Т-клеток (соотношение CD4/CD8, $\pm$ SD), как показано в табл. 25. Активированные CD4 Т-клетки обозначали как клетки, которые были живыми, CD45⁺, SSC^{низк.}, FSC^{низк.}, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻ и CD69⁺. Активированные CD8 Т-клетки обозначали как клетки, которые были живыми, CD45⁺, SSC^{низк.}, FSC^{низк.}, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻ и CD69⁺. Данные по активированным клеткам выражали в виде частоты встречаемости активированных клеток (CD69⁺) в исходной популяции (частота CD4 или CD8 Т-клеток, $\pm$ SD), как показано в табл. 25.

Таблица 24. Антитела, использованные для анализа на основе проточной цитометрии

Антитело	Флуорохром	Производитель	Номер по каталогу	Конечное разведение
CD11c	APC	BD Biosciences	550261	1/100
CD45	PerCP Cy5.5	eBiosciences	45-0454-82	1/800
F4/80	Pacific Blue	eBiosciences	48-4801-82	1/200
Siglec-F	PE	BD Biosciences	552126	1/100
Ly6G (Gr-1)	APC-eFluor780	eBiosciences	47-5931-82	1/200
CD3	PE-Cy7	BD Biosciences	552774	1/200
CD19	eFluor 450	eBiosciences	48-0193-82	1/200
CD4	APC-H7	BD Biosciences	560181	1/200
CD8	APC	eBiosciences	17-0081-82	1/200
CD69	PE	eBiosciences	12-0691-82	1/200

Сбор легких для анализа цитокинов.

После обескровливания удаляли верхнюю и среднюю долю правого легкого каждой мыши и помещали их в пробирки, содержащие раствор реагента для экстракции белка ткани (1X реагент T-PER; Pierce, № 78510), дополненный 1X ингибитором протеаз Halt (Pierce, № 78430). Все дальнейшие стадии проводили на льду. Объем реагента T-PER (содержащего коктейль ингибиторов протеаз) корректировали для каждого образца, чтобы он соответствовал соотношению 1:7,5 (мас./об.) ткани к T-PER. Образцы легких вручную гомогенизировали в пробирках с помощью одноразовых пестиков (Argos Technologies, кат. № P9950-901). Полученные лизаты центрифугировали для осаждения дебриса. Надосадочные жидкости, содержащие экстракты растворимых белков, переносили в свежие пробирки и хранили при температуре 4°C до дальнейшего анализа.

Содержание общего белка в экстрактах белка легких измеряли с помощью анализа Брэдфорда. Для анализа 10 мкл разведенных образцов экстракта высевали в 96-луночные планшеты в двух повторностях и смешивали с 200 мкл 1X красящего реагента (BioRad, № 500-0006). Серийные разведения бычьего сывороточного альбумина (Sigma, № A7979), начиная с 700 мкг/мл в 1X реагенте T-Per, использовали в качестве стандарта для определения точной концентрации белка в экстрактах. После 5-минутной инкубации при комнатной температуре измеряли поглощающую способность на 595 нм на планшет-ридере Molecular Devices SpectraMax M5. Анализ данных для определения общего содержания белка проводили с использованием программного обеспечения GraphPad PrismTM.

Концентрации цитокинов в экстрактах белка легких измеряли с использованием набора для мультиплексного иммунологического анализа Proinflammatory Panel 1 (для мышей) (MesoScale Discovery, № K15048D) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце: 50 мкл/лунка калибраторов и образцов (разведенных в разбавителе 41) вносили к планшеты, предварительно покрытые иммобилизованными антителами, и инкубировали при комнатной температуре при помешивании при 700 об/мин в течение 2 ч. Затем планшеты промывали 3 раза 1X PBS, содержащим 0,05% (мас./об.) Tween-20, с последующим добавлением 25 мкл раствора для детекции антител, разведенного в разбавителе 45. Спустя еще 2 ч инкубации при комнатной температуре при помешивании планшет промывали 3 раза и в каждую лунку добавляли 150 мкл 2X буфера считывания. Сразу считывали электрохемилюминесценцию на приборе MSD Spector®. Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad PrismTM.

Концентрацию каждого цитокина в измеренных экстрактах общего белка легких нормализовали к содержанию общего белка в измеренных экстрактах с помощью анализа Брэдфорда и выражали в пг цитокина на мг общего белка легких (пг/мг белка легких, $\pm$ SD), как показано на табл. 26.

Таблица 25. Частота встречаемости легочного клеточного инфильтрата по результатам проточной цитометрии

Экспериментальная группа	Средняя частота встречаемости нейтрофилов (% живых клеток, $\pm$ SD)	Среднее соотношение CD4/CD8 ($\pm$ SD)	Средняя частота встречаемости активированных CD4+ T-клеток (% CD4 T-клеток, $\pm$ SD)	Средняя частота встречаемости активированных CD8+ T-клеток (% CD8 T-клеток, $\pm$ SD)
Солевой раствор, WT	6,57 $\pm$ 1,27**	1,00 $\pm$ 0,07**	10,74 $\pm$ 0,75***	3,01 $\pm$ 1,24**
HDM, WT	13,53 $\pm$ 2,63	3,89 $\pm$ 1,63	57,10 $\pm$ 4,03	26,18 $\pm$ 13,16
Солевой раствор, IL-25 KO	5,98 $\pm$ 0,26**	1,33 $\pm$ 0,21**	10,16 $\pm$ 2,14***	5,51 $\pm$ 6,00**
HDM, IL-25 KO	6,89 $\pm$ 2,68**	2,02 $\pm$ 0,48*	38,65 $\pm$ 11,06**	6,37 $\pm$ 3,10**

Указана статистическая значимость по сравнению с HDM-группой WT согласно результатам двух-факторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием множественного сравнения Тьюки (** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$).

Таблица 26. Концентрация цитокинов в экстрактах белков легких

Экспериментальная группа	Среднее значение [IL-1 β] в экстрактах белков легких (нг/мг белка легких) $\pm$ SD	Среднее значение [TNF α] в экстрактах белков легких (нг/мг белка легких) $\pm$ SD
Солевой раствор, WT	0,24 $\pm$ 0,11**	0,76 $\pm$ 0,22***
HDM, WT	138,70 $\pm$ 70,17	11,42 $\pm$ 2,60
Солевой раствор, IL-25 KO	0,49 $\pm$ 0,42***	0,78 $\pm$ 0,14***
HDM, IL-25 KO	21,69 $\pm$ 17,90**	5,01 $\pm$ 2,94**

Указана статистическая значимость по сравнению с HDM-группой WT согласно результатам двух-факторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием множественного сравнения Тьюки (** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$).

Как показано в табл. 25, длительное или хроническое воздействие HDM у мышей WT индуцировало значительное увеличение нейтрофилии легких по сравнению с мышами WT, на которых воздействовали только PBS. Хроническое провокационное воздействие HDM у мышей WT также индуцировало сдвиг в балансе CD4 и CD8 T-клеток в легких, а также увеличение частоты встречаемости активированных CD4 и CD8 T-клеток. Увеличение нейтрофилии легких и такие другие признаки клеточного воспаления легких, индуцированного хроническим провокационным воздействием HDM, было значительно меньшим у мышей IL-25 KO по сравнению с мышами WT.

Длительное воздействие HDM индуцировало значительное увеличение уровней провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β и TNF α в легких мышей WT по сравнению с мышами WT, на которых воздействовали только PBS. В противоположность этому хроническое воздействие HDM у IL-25 KO мышей не вызывало значительного увеличения в легких уровней этих двух цитокинов, как показано в табл. 26.

Таким образом, хроническое воздействие HDM вызывало признаки воспаления легких у мышей WT, которые отсутствовали в легких мышей IL-25 KO, получавших такую же провокационную дозу.

Настоящее изобретение не следует ограничивать в объеме конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, из приведенного выше описания и прилагаемых фигур для специалистов в настоящей области будут очевидны различные модификации настоящего изобретения в дополнение к описанным в настоящем документе. Такие модификации подразумеваются как подпадающие под объем прилагаемой формулы изобретения.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность HCVR, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью HCVR выбранной из пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR и аминокислотную последовательность LCVR, характеризующуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью LCVR выбранной из пары аминокислотных

последовательностей HCVR/LCVR.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10, причем антитело является полностью человеческим моноклональным антителом.

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет одну или более из следующих характеристик:

(а) связывает человеческий IL-25 с K_D менее чем приблизительно 120 пМ, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C;

(b) связывает человеческий IL-25 с полупериодом диссоциации ($t^{1/2}$) более чем приблизительно 105 мин, по результатам измерения с помощью поверхностного плазмонного резонанса при температуре 25°C;

(с) блокирует передачу сигналов человеческого IL-25 в клетках, сконструированных для экспрессии рецептора IL-25 (IL-17RA/IL-17RB) с IC₅₀ менее чем приблизительно 2 нМ;

(d) блокирует передачу сигналов человеческого IL-25 в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMС) с IC₅₀ менее чем приблизительно 16 нМ;

(е) уменьшает уровни IgE в кровотоке и/или легком у млекопитающего, которое сверхэкспрессирует IL-25;

(f) уменьшает метаплазию бокаловидных клеток у млекопитающего, которое сверхэкспрессирует IL-25.

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 50/58.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 66/74.

15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 98/106.

16. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.4, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 114/122.

17. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 146/154.

18. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, которое содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 178/186.

19. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7, которое содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 194/202.

20. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.8, которое содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 210/218.

21. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.9, которое содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 258/266.

22. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.4, содержащее набор из шести аминокислотных последовательностей CDR SEQ ID NO: 116, 118, 120, 124, 126 и 128.

23. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.4, содержащее набор из шести аминокислотных последовательностей CDR SEQ ID NO: 116, 118, 120, 124, 126 и 128, характеризующийся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью HCVR SEQ ID NO:114 и по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью LCVR SEQ ID NO:122.

24. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с активностью или экспрессией интерлейкина-25 (IL-25), содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-23 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

25. Способ лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с активностью или экспрессией интерлейкина-25 (IL-25), причем способ предусматривает введение нуждающемуся в таком лечении субъекту фармацевтической композиции по п.24.

26. Способ по п.25, в котором заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из астмы, аллергии, аллергического ринита, аллергического воспаления дыхательных путей, хронической обструктивной болезни легких (COPD), эозинофильной пневмонии, эозинофильного эзофагита, гиперэозинофильного синдрома, реакции "трансплантат против хозяина", атопического дерматита (AD), псориаза, воспалительного заболевания кишечника (IBD), артрита, увеита, сердечно-сосудистого заболевания, боли, рассеянного склероза, волчанки, васкулита, хронической идиопатической крапивницы и эозинофильного гранулематоза с ангиопатией (синдрома Черджа-Стросса).

27. Способ по п.26, в котором заболевание или нарушение представляет собой астму, которая выбрана из группы, состоящей из аллергической астмы, неаллергической астмы, тяжелой рефракторной

астмы, обострений астмы, вирусной астмы или обострений вирусной астмы, устойчивой к стероидам астмы, восприимчивой к стероидам астмы, эозинофильной астмы или неэозинофильной астмы и других родственных нарушений, характеризующихся воспалением дыхательных путей или гиперчувствительностью дыхательных путей (AHR).

28. Способ по п.26, в котором заболевание или нарушение представляет собой COPD, которое частично ассоциировано с или вызвано сигаретным дымом, загрязнением воздуха, химическими веществами на рабочем месте, аллергией или гиперчувствительностью дыхательных путей.

29. Способ по п.26, в котором заболевание или нарушение представляет собой AD, который частично ассоциирован с или вызван нарушением функции эпидермального барьера, аллергией или радиоактивным облучением.

30. Способ по п.26, в котором заболевание или нарушение представляет собой аллергию на пищевые продукты, пыльцу, плесень, пылевых клещей, животных или шерсть животных.

31. Способ по п.26, в котором заболевание или нарушение представляет собой IBD, которое выбрано из группы, состоящей из язвенного колита, болезни Крона, коллагенозного колита, лимфоцитарного колита, ишемического колита, воспаления в отключенной кишке, синдрома Бехчета, инфекционного колита, недифференцированного колита, а также других нарушений, характеризующихся воспалением слизистой оболочки толстой кишки или ободочной кишки.

32. Способ по п.26, в котором заболевание или нарушение представляет собой артрит, который выбран из группы, состоящей из остеоартрита, ревматоидного артрита и псориатического артрита.

33. Способ по п.25, в котором фармацевтическую композицию вводят пациенту в комбинации со вторым терапевтическим средством, выбранным из группы, состоящей из нестероидного противовоспалительного средства (NSAID), стероида, кортикостероида (ингаляционного или местного), иммунодепрессанта (например, циклофосфида), антихолинергического средства (например, тиотропия), мускаринового средства (например, гликопиррония), ингибитора фосфодиэстеразы (например, теофиллина, рофлумиласта, циломиласта), бета-блокатора, циклоспорина, такролимуса, пимекролимуса, азатиоприна, метотрексата, кромолина натрия, ингибитора протеиназы, бронхального дилататора, бета-2-агониста, антигистамина, эпинефрина, противоотечного средства, ингибитора лейкотриена, ингибитора тучных клеток, антагониста тимического стромального лимфопоэтина (TSLP), антагониста TNF, антагониста IgE, антагониста IL-1, антагониста IL-4 или IL-4R, антагониста IL-13 или IL-13R, двойного антагониста IL-4/IL-13, антагониста IL-5, антагониста IL-6 или IL-6R, антагониста IL-8, антагониста IL-9, антагониста IL-12/23, антагониста IL-22, антагониста IL-17, антагониста IL-31, антагониста IL-33, перорального ингибитора PDE4 и другого антитела к IL-25.

	Связывание mAb-2 с IL-25, предварительно сформировавшим комплекс с mAb-1																	
mAb-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	0.00	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.01	0.05	0.05	0.00	0.85	0.91	0.80	0.59	0.66	0.64	0.80	0.97
2	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.02	0.00	0.67	0.86	0.59	0.58	0.62	0.59	0.74	0.91
3	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.02	0.00	0.72	0.83	0.58	0.57	0.61	0.56	0.73	0.87
4	0.00	0.02	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.03	0.02	0.00	1.12	1.13	0.89	0.83	0.94	0.92	1.11	1.30
5	0.00	0.19	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	1.08	0.99	0.74	0.73	0.82	0.77	0.97	1.22
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	1.00	0.98	0.72	0.71	0.80	0.73	0.93	1.21
7	0.00	0.04	0.03	0.01	0.03	0.02	0.00	0.05	0.03	0.00	1.02	0.99	0.76	0.73	0.83	0.81	0.99	1.25
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.94	0.97	0.72	0.71	0.81	0.79	0.93	1.13
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.85	0.99	0.77	0.68	0.79	0.71	0.92	1.19
10	0.00	0.03	0.02	0.03	0.04	0.02	0.00	0.08	0.05	0.00	0.19	0.77	0.48	0.50	0.56	0.51	0.66	0.85
11	0.53	0.63	0.64	0.57	0.68	0.64	0.47	0.77	0.62	0.11	0.00	0.69	0.54	0.45	0.52	0.61	0.74	0.52
12	0.51	0.63	0.64	0.56	0.67	0.61	0.48	0.67	0.58	0.70	0.78	0.00	0.42	0.48	0.47	0.50	0.68	0.88
13	0.58	0.72	0.76	0.65	0.75	0.75	0.55	0.77	0.66	0.82	1.03	0.88	0.00	0.02	0.11	0.09	0.20	0.30
14	0.63	0.73	0.74	0.71	0.77	0.64	0.60	0.82	0.72	0.82	0.90	0.87	0.03	0.00	0.08	0.06	0.13	0.28
15	0.59	0.70	0.68	0.67	0.73	0.60	0.57	0.77	0.68	0.77	0.79	0.68	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.17
16	0.57	0.68	0.66	0.63	0.70	0.56	0.55	0.75	0.66	0.74	0.90	0.73	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.16
17	0.62	0.74	0.74	0.70	0.78	0.72	0.56	0.96	0.72	0.79	0.99	0.87	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13
18	0.55	0.67	0.66	0.63	0.69	0.63	0.50	0.76	0.64	0.68	0.50	0.76	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2