



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118359715 A

(43) 申请公布日 2024.07.19

(21) 申请号 202311605878.3

G01N 33/577 (2006.01)

(22) 申请日 2023.11.27

A61K 39/395 (2006.01)

(71) 申请人 宁波三生生物科技股份有限公司

A61P 17/04 (2006.01)

地址 315000 浙江省宁波市海曙区望春工
业园区布政东路159号

A61P 17/06 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

(72) 发明人 梅彩英 吕洁婷 梁海阳 金佳敏
邓明亮 王爱珂 张伟 徐伟
陈璐 戴志红

(74) 专利代理机构 北京植众德本知识产权代理
有限公司 16083

专利代理师 关巍

(51) Int. Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

权利要求书4页 说明书29页
序列表(电子公布) 附图11页

(54) 发明名称

抗IL-31的抗体及其用途

(57) 摘要

本公开涉及一种抗IL-31的抗体及其用途。具体地,提供了一种特异性结合犬IL-31的抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,其中,所述重链可变区包含:具有SEQ ID NO:1-10中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的HCDR1、具有SEQ ID NO:11-20中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的HCDR2、具有SEQ ID NO:21-30中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的HCDR3;所述轻链可变区包含:具有SEQ ID NO:31-40中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的LCDR1、具有SEQ ID NO:41-50中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的LCDR2、具有SEQ ID NO:51-60中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的LCDR3。本公开的抗犬IL-31抗体,与赛妥敏相比具有更好的亲和力,能够有效缓解模型动物的特异性皮炎相关的临床症状。

1. 一种特异性结合犬IL-31的抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,其中,

所述重链可变区包含:具有SEQ ID NO:1-10中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的HCDR1、具有SEQ ID NO:11-20中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的HCDR2、具有SEQ ID NO:21-30中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的HCDR3;

所述轻链可变区包含:具有SEQ ID NO:31-40中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的LCDR1、具有SEQ ID NO:41-50中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的LCDR2、具有SEQ ID NO:51-60中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的LCDR3。

2. 根据权利要求1所述的抗体其抗原结合片段,其中,所述重链可变区包含:

(1) SEQ ID NO:1所示的HCDR1、SEQ ID NO:11所示的HCDR2、SEQ ID NO:21所示的HCDR3;或,

(2) SEQ ID NO:2所示的HCDR1、SEQ ID NO:12所示的HCDR2、SEQ ID NO:22所示的HCDR3;或,

(3) SEQ ID NO:3所示的HCDR1、SEQ ID NO:13所示的HCDR2、SEQ ID NO:23所示的HCDR3;或,

(4) SEQ ID NO:4所示的HCDR1、SEQ ID NO:14所示的HCDR2、SEQ ID NO:24所示的HCDR3;或,

(5) SEQ ID NO:5所示的HCDR1、SEQ ID NO:15所示的HCDR2、SEQ ID NO:25所示的HCDR3;或,

(6) SEQ ID NO:6所示的HCDR1、SEQ ID NO:16所示的HCDR2、SEQ ID NO:26所示的HCDR3;或,

(7) SEQ ID NO:7所示的HCDR1、SEQ ID NO:17所示的HCDR2、SEQ ID NO:27所示的HCDR3;或,

(8) SEQ ID NO:8所示的HCDR1、SEQ ID NO:18所示的HCDR2、SEQ ID NO:28所示的HCDR3;或,

(9) SEQ ID NO:9所示的HCDR1、SEQ ID NO:19所示的HCDR2、SEQ ID NO:29所示的HCDR3;或,

(10) SEQ ID NO:10所示的HCDR1、SEQ ID NO:20所示的HCDR2、SEQ ID NO:30所示的HCDR3;

所述轻链可变区包含:

(1) SEQ ID NO:31所示的LCDR1、SEQ ID NO:41所示的LCDR2、SEQ ID NO:51所示的LCDR3;或,

(2) SEQ ID NO:32所示的LCDR1、SEQ ID NO:42所示的LCDR2、SEQ ID NO:52所示的LCDR3;或,

(3) SEQ ID NO:33所示的LCDR1、SEQ ID NO:43所示的LCDR2、SEQ ID NO:53所示的LCDR3;或,

(4) SEQ ID NO:34所示的LCDR1、SEQ ID NO:44所示的LCDR2、SEQ ID NO:54所示的LCDR3;或,

(5) SEQ ID NO:35所示的LCDR1、SEQ ID NO:45所示的LCDR2、SEQ ID NO:55所示的

LCDR3;或,

(6) SEQ ID NO:36所示的LCDR1、SEQ ID NO:46所示的LCDR2、SEQ ID NO:56所示的LCDR3;或,

(7) SEQ ID NO:37所示的LCDR1、SEQ ID NO:47所示的LCDR2、SEQ ID NO:57所示的LCDR3;或,

(8) SEQ ID NO:38所示的LCDR1、SEQ ID NO:48所示的LCDR2、SEQ ID NO:58所示的LCDR3;或,

(9) SEQ ID NO:39所示的LCDR1、SEQ ID NO:49所示的LCDR2、SEQ ID NO:59所示的LCDR3;或,

(10) SEQ ID NO:40所示的LCDR1、SEQ ID NO:50所示的LCDR2、SEQ ID NO:60所示的LCDR3。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

(1) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:1所示的HCDR1、SEQ ID NO:11所示的HCDR2、SEQ ID NO:21所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:31所示的LCDR1、SEQ ID NO:41所示的LCDR2、SEQ ID NO:51所示的LCDR3;或,

(2) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:2所示的HCDR1、SEQ ID NO:12所示的HCDR2、SEQ ID NO:22所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:32所示的LCDR1、SEQ ID NO:42所示的LCDR2、SEQ ID NO:52所示的LCDR3;或,

(3) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:3所示的HCDR1、SEQ ID NO:13所示的HCDR2、SEQ ID NO:23所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:33所示的LCDR1、SEQ ID NO:43所示的LCDR2、SEQ ID NO:53所示的LCDR3;或,

(4) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:4所示的HCDR1、SEQ ID NO:14所示的HCDR2、SEQ ID NO:24所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:34所示的LCDR1、SEQ ID NO:44所示的LCDR2、SEQ ID NO:54所示的LCDR3;或,

(5) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:5所示的HCDR1、SEQ ID NO:15所示的HCDR2、SEQ ID NO:25所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:35所示的LCDR1、SEQ ID NO:45所示的LCDR2、SEQ ID NO:55所示的LCDR3;或,

(6) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:6所示的HCDR1、SEQ ID NO:16所示的HCDR2、SEQ ID NO:26所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:36所示的LCDR1、SEQ ID NO:46所示的LCDR2、SEQ ID NO:56所示的LCDR3;或,

(7) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:7所示的HCDR1、SEQ ID NO:17所示的HCDR2、SEQ ID NO:27所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:37所示的LCDR1、SEQ ID NO:47所示的LCDR2、SEQ ID NO:57所示的LCDR3;或,

(8) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:8所示的HCDR1、SEQ ID NO:18所示的HCDR2、SEQ ID NO:28所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:38所示的LCDR1、SEQ ID NO:48所示的LCDR2、SEQ ID NO:58所示的LCDR3;或,

(9) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:9所示的HCDR1、SEQ ID NO:19所示的HCDR2、SEQ ID NO:29所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:39所示的LCDR1、SEQ ID NO:49所示的LCDR2、SEQ ID NO:59所示的LCDR3;或,

(10) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:10所示的HCDR1、SEQ ID NO:20所示的HCDR2、SEQ IDNO:30所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:40所示的LCDR1、SEQ ID NO:50所示的LCDR2、SEQ ID NO:60所示的LCDR3。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或其抗原结合片段选自兔源抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段或犬源化抗体或其抗原结合片段中的任一种。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述特异性结合犬IL-31的抗体或其抗原结合片段包含选自如下序列所示的重链,或与以下序列相比具有至少80%,85%,90%,95%或99%同一性的重链:SEQ ID NO:61-70、163-165、175-180;和/或包含选自如下序列所示的轻链,或与以下序列相比具有至少80%,85%,90%,95%或99%同一性的轻链:SEQ ID NO:71-80、166-168、181-186。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中,

(1) 所述重链包含SEQ ID NO:61所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:71所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

(2) 所述重链包含SEQ ID NO:62所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:72所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

(3) 所述重链包含SEQ ID NO:63所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:73所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

(4) 所述重链包含SEQ ID NO:64所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:74所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

(5) 所述重链包含SEQ ID NO:65所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:75所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

(6) 所述重链包含SEQ ID NO:66所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:76所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

(7) 所述重链包含SEQ ID NO:67所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:77所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

(8) 所述重链包含SEQ ID NO:68所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:78所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

(9) 所述重链包含SEQ ID NO:69所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:79所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

(10) 所述重链包含SEQ ID NO:70所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:80所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

(11) 所述重链包含SEQ ID NO:163所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:166所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

(12) 所述重链包含SEQ ID NO:164所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:167所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

(13) 所述重链包含SEQ ID NO:165所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:168所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

(14) 所述重链包含SEQ ID NO:175所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ

ID NO:181所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

(15) 所述重链包含SEQ ID NO:176所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:182所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

(16) 所述重链包含SEQ ID NO:177所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:183所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

(17) 所述重链包含SEQ ID NO:178所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:184所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

(18) 所述重链包含SEQ ID NO:179所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:185所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

(19) 所述重链包含SEQ ID NO:180所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:186所述的氨基酸序列或其任何变体。

7. 一种生物材料,其选自下列中的任一项:

(1) 编码权利要求1-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸;或

(2) 含有(1)所述的多核苷酸的表达载体;或

(3) 含有(1)所述的多核苷酸或(2)所述的表达载体的宿主细胞。

8. 一种药物组合物,其含有权利要求1-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、以及可药用的赋形剂、稀释剂或载体。

9. 一种检测或定量临床或生物样品中的犬IL-31蛋白的试剂盒,其含有权利要求1-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,任选地,还包含一种或多种检测所述抗体或其抗原结合片段与犬IL-31或其表位结合的试剂。

10. 权利要求1-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求7所述的生物材料、权利要求8所述的药物组合物、权利要求9所述的试剂盒在制备用于治疗犬的瘙痒症或过敏症的药物中的用途;

优选地,所述瘙痒症为特异性皮炎、湿疹、牛皮癣、硬皮病;优选地,所述瘙痒症为特异性皮炎。

11. 权利要求1-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求7所述的生物材料、权利要求8所述的药物组合物、权利要求8所述的试剂盒在制备用于减轻、抑制或中和犬体内的IL-31活性的药物中的用途。

抗IL-31的抗体及其用途

技术领域

[0001] 本公开涉及基因工程学和免疫学领域,具体涉及一种抗IL-31的抗体及其用途。

背景技术

[0002] 犬特应性皮炎是犬的一种遗传易感的炎症性和瘙痒性过敏性皮肤病,据统计,全球约有4.5亿犬患有特异性皮炎,发病率高达10%~15%(Kinga Gortel等人,Can Vet J, 2018Sep;59(9):1013-1016)。在英国,由于遗传背景,拉布拉多和金毛猎犬患特应性皮炎的风险几乎为50%。某些品种如金毛、拉布拉多、比特、哈巴狗、拳师犬和德国牧羊犬,其发病风险明显高于其他犬,且品种易患程度因地理位置而异(Natalie Katharina Yvonne Gedon等人,Clin Transl Allergy,2018Oct;8:41)。特应性皮炎的典型发病年龄在6个月至3岁之间,食物、环境过敏原和遗传因素是导致特应性皮炎的主要原因,其有别于寄生虫过敏,患犬多有红斑和瘙痒症状,次要症状包括疼痛和炎症感染。瘙痒和炎症感染可导致自发性脱发、擦伤和继发感染,表现为丘疹、脓疱和结痂。发病部位常见于腋窝、腹侧、四肢远端、耳廓内以及眼周、口周和肛周等。

[0003] 特应性皮炎犬的皮肤屏障存在缺陷,过敏原通过皮肤缺陷处,与免疫细胞相互作用后,免疫细胞会释放各种瘙痒化学物质,从而产生瘙痒感。在过敏反应中同时释放多种其他化学物质,导致皮肤上出现炎症,炎症使屏障功能进一步退化,然后过敏原渗透性进一步增加,从而继发感染和细菌。其中,IL-31是最主要的一种与特应性炎症相关的细胞因子,其他的如IL-4、IL-13和TNF- α ,也可影响脂质合成从而进一步削弱表皮屏障功能(Jackeline Franco等人,Metabolit,2021Sep 30;11(10):670)。IL-31血清浓度与犬皮肤病变的严重程度紧密相关。当患犬暴露在过敏原中时,皮肤的辅助性T细胞(Th2)会产生细胞因子IL-31,IL-31结合由IL-31受体A(IL-31RA)和制瘤素M受体(OSMR)组成的共受体,通过Janus激酶磷酸化激活STAT信号级联,导致靶基因上调,引起犬的瘙痒行为(Eniko Sonkoly等人,J Allergy Clin Immunol,2006Feb;117(2):411-417)。

[0004] 另外,IL-31可以通过促进上皮细胞反应来刺激炎症介质的产生,这在过表达IL-31的转基因小鼠中得到了证实。IL-31受体mRNA在背根神经节的表达最高。IL-31能协调免疫细胞(t细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞)和上皮细胞之间的相互作用(Jan J.Cornelissen等人,Nat Rev Clin Oncol,2012Oct;9(10):579-590)。IL-31的浓度在瘙痒性过敏性皮肤条件下升高,并可诱导多种物种(如小鼠、猴子和犬)的抓伤行为。对实验室小猎犬进行的研究表明,当IL-31通过几种途径(皮内、皮下和静脉注射)给药时,它会在几分钟到几小时内引起强烈的瘙痒行为,这说明通过注射IL-31给药的实验模型可用于在犬上评估犬治疗药的止痒作用(Matthew Krautmann等人,Vet Immunol Immunopathol,2023Apr;258:110574)。

[0005] 因此,犬的特应性皮炎不是一种单一的疾病,而是一种由多种类型组成的复杂综合征。特应性皮炎的监测治疗进展可能包括使用犬特应性皮炎程度和严重程度指数(CADESI)来评估病变严重程度、评估瘙痒和测量皮肤的生物物理参数(J R Calessio等人,

Pol J Vet Sci, 2023 Jun; 26 (2) : 231-238)。目前化药治疗方法包括糖皮质激素、环孢素、必需脂肪酸和抗组胺药。对于长期治疗,环孢素可能起效缓慢,并增加宠物主人的费用。糖皮质激素虽然在短期内能有效控制过敏性瘙痒和炎症,但可能产生继发性不良反应,发病率很高,因此不适合长期治疗(Clarissa P Souza等人, Vet Dermatol, 2018 Dec; 29 (6) : 489)。此外,还可以通过脱敏疗法来治疗,每月1-2次注射过敏原,持续1-2年,可以降低过敏反应,使身体对过敏原耐受,属于非药物治疗,对身体无害的同时,有较低可能性让犬终生不再对该过敏原过敏。但脱敏治疗仅限于皮肤科专科兽医完成实施操作。

[0006] 目前,对于犬特异性皮炎的最新治疗方式是使用选择性janus激酶1抑制剂和犬源化抗白介素-31单克隆抗体。抗IL-31抗体已在NC/Nga小鼠(人类特应性皮炎小鼠模型)中被证明可以减少或消除IL-31的瘙痒作用。抗犬IL-31抗体cytopoint®(赛妥敏)已经在87.8%的过敏性皮炎病例中被证明可有效治疗犬的过敏性皮炎和特应性皮炎(Gober M等人, Front Vet Sci, 2022 July; 9: 909776)。硕腾独家产品赛妥敏上市3年,零售额达到8-10亿美元,目前国内上市规格是20mg (1ml)/瓶,市场售价600元左右,导致宠物的治疗成本较高。赛妥敏给药剂量为2mg/kg,对于体重30kg以上的患犬,需要皮下注射3瓶以上20mg (1ml)/瓶的药物,临床使用不方便。

[0007] 考虑到犬特异性皮炎昂贵的诊断检查、频繁的临床发作和需要终身治疗这些问题对主人、宠物和兽医来说都是具有挑战性的。因此,亟需开发一种新的更有效、更安全、成本更低的犬用IL-31抗体提高宠物犬生存质量。

发明内容

[0008] 为了解决现有技术中存在的问题,本公开的目的在于提供一种抗IL-31的抗体或其抗原结合片段、其制备方法及其医药用途。

[0009] 为了实现上述目的,本公开采用以下具体方案:

[0010] 在一方面,本公开提供了一种特异性结合犬IL-31的抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,其中,

[0011] 所述重链可变区包含:具有SEQ ID NO:1-10中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的HCDR1、具有SEQ ID NO:11-20中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的HCDR2、具有SEQ ID NO:21-30中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的HCDR3;

[0012] 所述轻链可变区包含:具有SEQ ID NO:31-40中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的LCDR1、具有SEQ ID NO:41-50中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的LCDR2、具有SEQ ID NO:51-60中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的LCDR3。

[0013] 另一方面,本公开提供了一种生物材料,其选自下列中的任一项:

[0014] (1) 编码权利要求1-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸;或

[0015] (2) 含有(1)所述的多核苷酸的表达载体;或

[0016] (3) 含有(1)所述的多核苷酸或(2)所述的表达载体的宿主细胞。

[0017] 另一方面,本公开提供了一种生产特异性结合犬IL-31的抗体或其抗原结合片段的方法,其包括以下步骤:培养前述的宿主细胞,从培养物种分离抗体,并对所述抗体进行纯化。

[0018] 另一方面,本公开提供了一种药物组合物,其含有前述的抗体或其抗原结合片段,

以及可药用的赋形剂、稀释剂或载体。

[0019] 另一方面,本公开提供了一种利用前述的抗体或其抗原结合片段、前述的生物材料、前述的药物组合物、前述的试剂盒在制备用于治疗犬的瘙痒症或过敏症的药物中的用途。

[0020] 另一方面,本公开提供了一种利用前述的抗体或其抗原结合片段、前述的生物材料、前述的药物组合物、前述的试剂盒在制备用减轻、抑制或中和犬体内的IL-31活性的药物中的用途。

[0021] 与现有技术相比,本公开至少具有以下有益效果:

[0022] 本公开的抗犬IL-31抗体或其抗原结合片段,能够特异性的与犬IL-31结合,与市面上的现有产品赛妥敏相比具有持平或更好的亲和力。经验证,其在细胞和动物体内均良好的生物活性,在犬瘙痒模型中能够有效缓解模型动物的特异性皮炎相关的临床症状。同时改造后的犬源化抗体的免疫原性风险较低。

附图说明

[0023] 图1为犬IL-31SDS-PAGE电泳鉴定结果。

[0024] 图2为B细胞培养上清与赛妥敏竞争的ELISA检测结果。

[0025] 图3为兔源抗体的SDS-PAGE结果图。其中从1-10列分别为38E2-1(非还原)、47C1-1(非还原)、35C9-1(非还原)、19D1-1(非还原)、5H4-2(非还原)、38E2-1(还原)、47C1-1(还原)、35C9-1(还原)、19D1-1(还原)、10:5H4-2(还原)组,M为marker组。

[0026] 图4为兔源抗体候选物的WB检测结果图。其中,1-5列分别为38E2-1(非还原)、47C1-1(非还原)、35C9-1(非还原)、19D1-1(非还原)、5H4-2(非还原)组。

[0027] 图5为兔源抗体的BLI亲和力测定图谱。

[0028] 图6为不同剂量IL-31介导建立的犬瘙痒模型的评分。

[0029] 图7为赛妥敏给药8天后瘙痒评分,侧面验证了犬瘙痒模型的成功建立。同时赛妥敏能够抑制模型犬体内IL-31介导的瘙痒。

[0030] 图8为兔源抗体给药治疗后犬瘙痒模型的瘙痒评分。

[0031] 图9为犬源化抗体的构建策略。

[0032] 图10为嵌合抗体的SDS-PAGE结果图。其中,从1-6列分别为38E2-1(非还原)、47C1-1(非还原)、35C9-1(非还原)、38E2-1(还原)、47C1-1(还原)、35C9-1(还原)组。

[0033] 图11为嵌合抗体的WB检测结果图。其中1-3列分别为38E2-1(非还原)、47C1-1(非还原)、35C9-1(非还原)组。

[0034] 图12为嵌合抗体的ELISA测定结果。其中“weighting fixed”为固定权重。

[0035] 图13为嵌合抗体的细胞生物学活性测定结果。

[0036] 图14为嵌合抗体给药治疗后犬瘙痒模型的瘙痒评分。

[0037] 图15为犬源化抗体的SDS-PAGE结果图。其中图15左侧电泳图的1-8列分别为38E2-1-H3L3(非还原)、38E2-1-H3L2(非还原)、47C1-1-H2L2(非还原)、47C1-1-H2L3(非还原)、38E2-1-H3L3(还原)、38E2-1-H3L2(还原)、47C1-1-H2L2(还原)、47C1-1-H2L3(还原)组。图15右侧电泳图中的1-4列分别为35C9-1-H1L1(非还原)、35C9-1-H1L2(非还原)、35C9-1-H1L1(还原)、35C9-1-H1L2(还原)组。

[0038] 图16为犬源化抗体的WB检测结果图。其中,图16左侧电泳图的1-4列分别为38E2-1-H3L3(非还原)、38E2-1-H3L2(非还原)、47C1-1-H2L2(非还原)、47C1-1-H2L3(非还原)组。图16右侧电泳图的1-2列分别为35C9-1-H1L1(非还原)、35C9-1-H1L2(非还原)组。

[0039] 图17为犬源化抗体的ELISA测定结果。其中weighting fixed为固定权重。

[0040] 图18为犬源化抗体的细胞生物学活性测定结果。

[0041] 图19为犬源化抗体给药治疗后犬瘙痒模型的瘙痒评分。

[0042] 图20为不同浓度的犬源化抗体38E2-1-H3L3给药后28内的药物有效性验证结果。

[0043] 图21为9mg/kg犬源化抗体38E2-1-H3L3重复给药血药浓度测定结果。

具体实施方式

[0044] 为了更清楚地说明本公开实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的术语和实施方式作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的实施方式仅仅是本公开的一种实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,还可以根据这些附图获得其他的实施方式。

[0045] I. 术语

[0046] 为了更容易理解本公开,以下具体定义了某些技术和科学术语。除显而易见在本文件中的它处另有明确定义,否则本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

[0047] 本文使用的冠词“一”和“一种”是指该冠词所指的一个或一个以上(即至少一个)的语法对象。举例来说,“一种组件”表示一个组件或一个以上的组件。

[0048] 如本文所用,术语“约”表示和涵盖指定值以及大于和小于该值的范围。在某些实施方案中,术语“约”可以表示 $\pm 0.1\%$, $\pm 0.5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 2\%$, $\pm 3\%$, $\pm 4\%$, $\pm 5\%$, $\pm 6\%$, $\pm 7\%$, $\pm 8\%$, $\pm 9\%$ 或 $\pm 10\%$ 的变化。在某些实施方案中,在适用的情况下,术语“约”表示指定值 \pm 该值的一个标准偏差。

[0049] 在本文中所披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或值,这些范围或值应当理解为包含接近这些范围或值的值。对于数值范围来说,各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间,以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围,这些数值范围应被视为在本文中具体公开。

[0050] 整个说明书和权利要求书中使用的术语“基本上由……组成”或其变形表示包括所有所述组件或组件组,并且任选包括与所述组件类似或不同性质的其它组件,所述其它组件非显著改变指定给药方案、方法或组合物的基本性质或新性质。

[0051] “任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生,该说明包括该事件或环境发生或不发生地场合。

[0052] 术语“抗体”指表现出所需生物或结合活性的任何形式的抗体。因此,其在最广泛的意义上被使用,并且具体包括但不限于单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、人源化的、全人的抗体、和嵌合抗体。

[0053] 通常,基本抗体结构单元包含四聚体。每个四聚体包括两对相同的多肽链,每对具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括主要负责抗原识别的约100至110个或更多个氨基酸的可变区。重链的羧基末端部分可以定义主要

负责效应子功能的恒定区域。通常,人的轻链分为kappa轻链和lambda轻链。此外,人重链通常分为mu、delta、gamma、alpha或epsilon,并将抗体的同种型分别定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链中,可变区和恒定区由约12个或更多个氨基酸的“J”区连接,重链还包括约10个以上氨基酸的“D”区。一般参见Fundamental Immunology Ch.7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))。

[0054] 每个轻/重链对的可变区形成抗体结合部位。因此,一般而言,完整的抗体具有两个结合部位。除双功能或双特异性抗体外,这两个结合部位通常是相同的。

[0055] 通常,重链和轻链的可变区均包含三个高变区,也称为互补决定区,位于相对保守的框架区内。CDR通常通过框架区对齐,从而能够结合特定的表位。一般而言,从N端到C端,轻链和重链可变域均包括FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。氨基酸分配到每个结构域通常符合以下的定义: Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, et al.; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5th ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Kabat (1978) Adv. Prot. Chem. 32:1-75; Kabat, et al., (1977) J. Biol. Chem. 252: 6609-6616; Chothia, et al., (1987) J Mol. Biol. 196:901-917 or Chothia, et al., (1989) Nature 342:878-883。

[0056] 如本文所用,“抗体片段”或“抗原结合片段”指抗体的抗原结合片段,即保留与全长抗体结合的抗原特异性结合的能力的抗体片段,例如保留一个或多个CDR区域的片段。抗体结合片段的例子包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段。

[0057] 如本文所用,“CDR”或“CDR”指免疫球蛋白可变区中的互补决定区,通常使用Kabat编号系统定义。

[0058] 如本文所用,“特异性结合”特定目标蛋白的抗体是与其他蛋白相比表现出优先结合该目标的抗体,但该特异性不要求绝对结合特异性。如果抗体的结合决定了样品中目标蛋白的存在,例如而不产生假阳性等不希望的结果,则该抗体被视为对其预期目标具有“特异性”。用于本发明的抗体或其结合片段将以比与非目标蛋白的亲和力高至少两倍、优选高至少十倍、更优选高至少20倍、最优选高至少100倍的亲和力与目标蛋白结合。如本文所用,如果抗体与包含给定氨基酸序列的多肽结合,例如成熟人PD-1或人PD-L1分子的氨基酸序列,但不与缺少该序列的蛋白质结合,则该抗体被称为与包含该序列的多肽特异性结合。

[0059] 如本文所用,“嵌合抗体”指其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种(例如人类)或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的其余部分与源自另一物种(例如小鼠)或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源的抗体,以及该等抗体的片段,只要其表现出所需的生物活性。

[0060] 如本文所用,“保守修饰的变体”或“保守置换”指蛋白质中的氨基酸被具有类似特征(例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等)的其他氨基酸置换,使得可以在不改变蛋白质的生物活性或其他所需性质(例如抗原亲和力和/或特异性)的情况下频繁进行改变。本领域技术人员认识到,一般而言,多肽的非必需区域的单个氨基酸置换不显著改变生物活性(参见Watson et al. (1987) Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p.224 (4th Ed.))。另外,结构或功能相似的氨基酸的置换不太可能破坏生物活性。示例性保守置换列于表1。

[0061] 表1示例性保守氨基酸置换

[0062]	原始残基	保守置换
	Ala (A)	Gly;Ser
	Arg (R)	Lys;His
	Asn (N)	Gln;His
	Asp (D)	Glu;Asn
	Cys (C)	Ser;Ala
	Gln (Q)	Asn
	Glu (E)	Asp;Gln
	Gly (G)	Ala
	His (H)	Asn;Gln
	Ile (I)	Leu;Val
	Leu (L)	Ile;Val
	Lys (K)	Arg;His
	Met (M)	Leu;Ile;Tyr
	Phe (F)	Tyr;Met;Leu
	Pro (P)	Ala
	Ser (S)	Thr
	Thr (T)	Ser
	Trp (W)	Tyr;Phe
	Tyr (Y)	Trp;Phe
	Val (V)	Ile;Leu

[0063] 如本文所用,“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用,并且所有这类名称都包括其后代。因此,单词“转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞和由其衍生的培养物,而不考虑转移数目。还应当理解的是,由于故意或非有意的突变,所有后代在DNA含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。在意指不同名称的情况下,其由上下文清楚可见。在表达异源核酸序列的上下文中,“宿主细胞”指的是无论在体外还是体内的原核或真核细胞(例如细菌细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞和昆虫细胞)。例如,宿主细胞可以位于转基因动物体内。宿主细胞可以用作载体的受体,并可以包括任何能够复制载体和/或表达由载体编码的异源核酸的可转化生物体。

[0064] 如本文所用,术语“药物组合物”涉及向哺乳动物患者(优选犬患者)给药的组合物。在优选的具体实施方式中,药物组合物包含用于非肠道注射或输注的组合物。该非肠道注射或输注可利用再吸收过程的优势,所述再吸收过程的形式如皮内、皮下、肌肉内和/或腹膜内注射或输注。可选的是,该非肠道注射或输注可避开再吸收过程,并为心脏内、动脉内、静脉内、腰内和/或膜内注射或输注的形式。在另一个优选的具体实施方式中,药物组合物包含用于通过皮肤给药的组合物。通过皮肤给药的一个例子是表皮给药,其中药物组合物以如溶液、混悬液、乳剂、泡沫剂、油膏、药膏、糊剂和/或贴到皮肤上的贴片的形式给药。可选的是,可通过一种或多种粘膜来实现药物组合物的给药。例如,给药可以是颊的、舌的或舌下的,即通过口和/或舌的粘膜的,并且应用形式可以如片剂、锭剂、糖衣片(即糖衣药丸)和/或漱口溶液。可选的是,给药可以是肠道的,即通过胃和/或肠道粘膜的,并且应用形

式可以如片剂、糖衣片(即糖衣药丸)、胶囊、溶液、混悬液和/或乳剂。可选的是,给药可以是直肠的,并且应用形式可以如栓剂、直肠胶囊和/或药膏或油膏。可选的是,给药可以是鼻内的,并且应用形式可以如滴剂、药膏或油膏和/或喷剂。可选的是,给药可以是肺部的,即通过支气管和/或肺泡的,并且应用形式可以如气雾剂和/或吸入剂。可选的是,给药可以是结膜的,并且应用形式可以如滴眼液、眼药膏和/或洗眼液。可选的是,给药可以通过泌尿生殖器道粘膜实现的,如可以是阴道内的或尿道内的,并且应用形式可以如栓剂、药膏和/或药笔剂。应当理解,以上给药的可选形式并不互相排斥,而且可以用它们的任意数量的组合来构成有效治疗方案。

[0065] 本公开的药物组合物可进一步包括药学上可接受的载体。合适的药物载体的例子是现有公知的,包括磷酸缓冲盐溶液、水、乳剂(如油/水乳剂)、各类润湿剂、无菌溶液等。包含这些载体的组合物可通过公知的常规方法来配制。这些药物组合物可以合适的剂量向受试者给药。剂量方案可由参与的医生和临床因素来确定。如现有医学技术所公知的,对于任一患者的剂量取决于许多因素,包括患者的身材、身体表面积、年龄、给药的特定化合物、性别、给药时间和途径、综合健康情况、以及同时给药的其他药物。如,非肠道给药的制剂包括无菌水或非水溶液、混悬液、乳剂和脂质体。非水溶剂的例子有丙二醇、聚乙二醇、植物油(如橄榄油)、和可注射的有机脂(如油酸乙酯)的载体包括氯化钠溶液、Ringer氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸化Ringer氏、或不挥发性油。适于静脉内或动脉内给药的载体包括流体和营养物补充剂、电解液补充剂(如基于Ringer氏葡萄糖的那些)等。也可含有防腐剂和其他添加剂,例如,抗微生物、抗氧化、螯合剂、惰性气体等。另外,本发明的药物组合物可包含蛋白质载体,像诸如,血清白蛋白或免疫球蛋白,优选是人源的。关注的是,除了(如本发明所述的)人源化单克隆抗体或其片段,本发明的药物组合物还可包含其他生物活性剂,这取决于药物组合物所需的用途。该试剂可以是作用于胃肠系统的药物、作为细胞抑制剂的药物、防止多尿酸血症的药物、抑制免疫反应的药物(如皮质类固醇)、调节炎症反应的药物、作用于循环系统的药物和/或诸如细胞因子的现有已知的试剂。

[0066] 如本文所用,“对象”或“患者”指的是可以被本发明的分子影响的需要治疗的动物。根据本发明可以治疗的动物包括脊椎动物,哺乳动物如犬、猫和马科动物是特别优选的实例。

[0067] 如本文所用,“治疗有效量”(或“有效量”)指的是当施用于对象或患者时足以产生有益或所需结果的活性成分(例如本发明的药剂)的量。有效量可以以一次或多次给药、应用或剂量来施用。本发明的组合物的治疗有效量可以容易地由本领域普通技术人员来确定。在本发明的上下文中,“治疗有效量”是在与瘙痒症或过敏性疾病的治疗(包括症状的临床改善)相关的一个或多个参数方面产生客观测得的变化了的量。当然,取决于待治疗的特定对象和疾病、对象的体重和年龄、疾病症状的严重程度、所选择的特定化合物、要遵循的给药方案、给药时间、给药方式等等,该治疗有效量将变化,所有这些可以由本领域普通技术人员容易地确定。

[0068] 如本文所用,“治疗(therapeutic)”涵盖了对疾病或病症的全方位治疗。本发明的“治疗”剂可以以预防性或防范性的方式起作用,包括包含设计针对可以识别为有风险(遗传药理学)的动物的程序;或以改良性或实质上治疗性的方式起作用;或者可以起作用以减缓要治疗的疾病或病症的至少一种症状进展的速率或程度。“治疗(treatment)”、“治

(treating)”等指的是治疗性处理和预防性或防范性措施。需要治疗的动物包括已经患有该病症的那些以及其中要预防该病症的那些。术语“治疗”或“治”疾病或病症包括针对该疾病或病症的预防或防护(即,使临床症状不会发展);抑制疾病或病症(即,阻止或抑制临床症状的发展);和/或缓解疾病或病症(即,使临床症状消退)。如要理解的那样,并非总是能够区分“预防”和“抑制”疾病或病症,因为最终的诱发事件可能是未知的或潜在的。因此,术语“预防”应理解为构成一类治疗,其涵盖“防止”和“抑制”。术语“治疗”由此包括“预防”。

[0069] 如本文所用,术语“过敏性疾病”在本文中定义为免疫系统与体外物质之间相互作用所引起的病症或疾病。这种外来物质称为“变应原”。常见变应原包括气源性变应原如花粉、尘埃、霉菌、尘螨蛋白、由昆虫叮咬注入的唾液等等。过敏性疾病的实例包括但不限于以下:变态反应性皮炎、夏季湿疹、荨麻疹、马喘息病、气道炎症性疾病、复发性气道阻塞、气道高反应性、慢性阻塞性肺疾病和自身免疫引起的炎症过程,如肠易激综合征(IBS)。

[0070] 如本文所用术语“瘙痒”、“瘙痒症”在本文中定义为特征在于产生要摩擦或搔抓皮肤以获得缓解的冲动的强烈痒觉的疾病或病症。瘙痒症的实例包括但不限于以下:特异性皮炎、湿疹、牛皮癣、硬皮病和瘙痒。

[0071] II. 具体实施方案详述

[0072] 在一方面,本公开提供了一种特异性结合犬IL-31的抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,其中,

[0073] 所述重链可变区包含:具有SEQ ID NO:1-10中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的HCDR1、具有SEQ ID NO:11-20中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的HCDR2、具有SEQ ID NO:21-30中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的HCDR3;

[0074] 所述轻链可变区包含:具有SEQ ID NO:31-40中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的LCDR1、具有SEQ ID NO:41-50中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的LCDR2、具有SEQ ID NO:51-60中任一项所示的氨基酸序列或其任何变体的LCDR3。

[0075] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段中,重链可变区包含:

[0076] (1) SEQ ID NO:1所示的HCDR1、SEQ ID NO:11所示的HCDR2、SEQ ID NO:21所示的HCDR3;或,

[0077] (2) SEQ ID NO:2所示的HCDR1、SEQ ID NO:12所示的HCDR2、SEQ ID NO:22所示的HCDR3;或,

[0078] (3) SEQ ID NO:3所示的HCDR1、SEQ ID NO:13所示的HCDR2、SEQ ID NO:23所示的HCDR3;或,

[0079] (4) SEQ ID NO:4所示的HCDR1、SEQ ID NO:14所示的HCDR2、SEQ ID NO:24所示的HCDR3;或,

[0080] (5) SEQ ID NO:5所示的HCDR1、SEQ ID NO:15所示的HCDR2、SEQ ID NO:25所示的HCDR3;或,

[0081] (6) SEQ ID NO:6所示的HCDR1、SEQ ID NO:16所示的HCDR2、SEQ ID NO:26所示的HCDR3;或,

[0082] (7) SEQ ID NO:7所示的HCDR1、SEQ ID NO:17所示的HCDR2、SEQ ID NO:27所示的HCDR3;或,

[0083] (8) SEQ ID NO:8所示的HCDR1、SEQ ID NO:18所示的HCDR2、SEQ ID NO:28所示的

HCDR3;或,

[0084] (9) SEQ ID NO:9所示的HCDR1、SEQ ID NO:19所示的HCDR2、SEQ ID NO:29所示的HCDR3;或,

[0085] (10) SEQ ID NO:10所示的HCDR1、SEQ ID NO:20所示的HCDR2、SEQ ID NO:30所示的HCDR3;

[0086] 所述轻链可变区包含:

[0087] (1) SEQ ID NO:31所示的LCDR1、SEQ ID NO:41所示的LCDR2、SEQ ID NO:51所示的LCDR3;或,

[0088] (2) SEQ ID NO:32所示的LCDR1、SEQ ID NO:42所示的LCDR2、SEQ ID NO:52所示的LCDR3;或,

[0089] (3) SEQ ID NO:33所示的LCDR1、SEQ ID NO:43所示的LCDR2、SEQ ID NO:53所示的LCDR3;或,

[0090] (4) SEQ ID NO:34所示的LCDR1、SEQ ID NO:44所示的LCDR2、SEQ ID NO:54所示的LCDR3;或,

[0091] (5) SEQ ID NO:35所示的LCDR1、SEQ ID NO:45所示的LCDR2、SEQ ID NO:55所示的LCDR3;或,

[0092] (6) SEQ ID NO:36所示的LCDR1、SEQ ID NO:46所示的LCDR2、SEQ ID NO:56所示的LCDR3;或,

[0093] (7) SEQ ID NO:37所示的LCDR1、SEQ ID NO:47所示的LCDR2、SEQ ID NO:57所示的LCDR3;或,

[0094] (8) SEQ ID NO:38所示的LCDR1、SEQ ID NO:48所示的LCDR2、SEQ ID NO:58所示的LCDR3;或,

[0095] (9) SEQ ID NO:39所示的LCDR1、SEQ ID NO:49所示的LCDR2、SEQ ID NO:59所示的LCDR3;或,

[0096] (10) SEQ ID NO:40所示的LCDR1、SEQ ID NO:50所示的LCDR2、SEQ ID NO:60所示的LCDR3。

[0097] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段中,

[0098] (1) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:1所示的HCDR1、SEQ ID NO:11所示的HCDR2、SEQ ID NO:21所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:31所示的LCDR1、SEQ ID NO:41所示的LCDR2、SEQ ID NO:51所示的LCDR3;或,

[0099] (2) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:2所示的HCDR1、SEQ ID NO:12所示的HCDR2、SEQ ID NO:22所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:32所示的LCDR1、SEQ ID NO:42所示的LCDR2、SEQ ID NO:52所示的LCDR3;或,

[0100] (3) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:3所示的HCDR1、SEQ ID NO:13所示的HCDR2、SEQ ID NO:23所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:33所示的LCDR1、SEQ ID NO:43所示的LCDR2、SEQ ID NO:53所示的LCDR3;或,

[0101] (4) 所述重链可变区包含SEQ ID NO:4所示的HCDR1、SEQ ID NO:14所示的HCDR2、SEQ ID NO:24所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:34所示的LCDR1、SEQ ID NO:44所示的LCDR2、SEQ ID NO:54所示的LCDR3;或,

[0102] (5)所述重链可变区包含SEQ ID NO:5所示的HCDR1、SEQ ID NO:15所示的HCDR2、SEQ ID NO:25所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:35所示的LCDR1、SEQ ID NO:45所示的LCDR2、SEQ ID NO:55所示的LCDR3;或,

[0103] (6)所述重链可变区包含SEQ ID NO:6所示的HCDR1、SEQ ID NO:16所示的HCDR2、SEQ ID NO:26所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:36所示的LCDR1、SEQ ID NO:46所示的LCDR2、SEQ ID NO:56所示的LCDR3;或,

[0104] (7)所述重链可变区包含SEQ ID NO:7所示的HCDR1、SEQ ID NO:17所示的HCDR2、SEQ ID NO:27所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:37所示的LCDR1、SEQ ID NO:47所示的LCDR2、SEQ ID NO:57所示的LCDR3;或,

[0105] (8)所述重链可变区包含SEQ ID NO:8所示的HCDR1、SEQ ID NO:18所示的HCDR2、SEQ ID NO:28所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:38所示的LCDR1、SEQ ID NO:48所示的LCDR2、SEQ ID NO:58所示的LCDR3;或,

[0106] (9)所述重链可变区包含SEQ ID NO:9所示的HCDR1、SEQ ID NO:19所示的HCDR2、SEQ ID NO:29所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:39所示的LCDR1、SEQ ID NO:49所示的LCDR2、SEQ ID NO:59所示的LCDR3;或,

[0107] (10)所述重链可变区包含SEQ ID NO:10所示的HCDR1、SEQ ID NO:20所示的HCDR2、SEQ ID NO:30所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:40所示的LCDR1、SEQ ID NO:50所示的LCDR2、SEQ ID NO:60所示的LCDR3。

[0108] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段中,(1)所述重链可变区包含SEQ ID NO:1所示的HCDR1、SEQ ID NO:11所示的HCDR2、SEQ ID NO:21所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:31所示的LCDR1、SEQ ID NO:41所示的LCDR2、SEQ ID NO:51所示的LCDR3;或,

[0109] (2)所述重链可变区包含SEQ ID NO:2所示的HCDR1、SEQ ID NO:12所示的HCDR2、SEQ ID NO:22所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:32所示的LCDR1、SEQ ID NO:42所示的LCDR2、SEQ ID NO:52所示的LCDR3;或,

[0110] (3)所述重链可变区包含SEQ ID NO:3所示的HCDR1、SEQ ID NO:13所示的HCDR2、SEQ ID NO:23所示的HCDR3;所述轻链可变区包含SEQ ID NO:33所示的LCDR1、SEQ ID NO:43所示的LCDR2、SEQ ID NO:53所示的LCDR3。

[0111] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段选自兔源抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段或犬源化抗体或其抗原结合片段中的任一种。

[0112] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段,其中,所述特异性结合犬IL-31的抗体或其抗原结合片段包含选自如下序列所示的重链,或与以下序列相比具有至少80%,85%,90%,95%或99%同一性的重链:SEQ ID NO:61-70、163-165、175-180;和/或

[0113] 包含选自如下序列所示的轻链,或与以下序列相比具有至少80%,85%,90%,95%或99%同一性的轻链:SEQ ID NO:71-80、166-168、181-186。

[0114] 在一些实施方案中,所述的抗体或其抗原结合片段,其中,

[0115] (1)所述重链包含SEQ ID NO:61所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:71所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

[0116] (2)所述重链包含SEQ ID NO:62所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含

SEQ ID NO:72所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

[0117] (3)所述重链包含SEQ ID NO:63所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:73所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

[0118] (4)所述重链包含SEQ ID NO:64所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:74所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

[0119] (5)所述重链包含SEQ ID NO:65所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:75所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

[0120] (6)所述重链包含SEQ ID NO:66所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:76所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

[0121] (7)所述重链包含SEQ ID NO:67所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:77所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

[0122] (8)所述重链包含SEQ ID NO:68所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:78所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

[0123] (9)所述重链包含SEQ ID NO:69所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:79所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

[0124] (10)所述重链包含SEQ ID NO:70所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:80所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

[0125] (11)所述重链包含SEQ ID NO:163所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:166所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

[0126] (12)所述重链包含SEQ ID NO:164所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:167所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

[0127] (13)所述重链包含SEQ ID NO:165所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:168所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

[0128] (14)所述重链包含SEQ ID NO:175所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:181所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

[0129] (15)所述重链包含SEQ ID NO:176所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:182所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

[0130] (16)所述重链包含SEQ ID NO:177所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:183所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

[0131] (17)所述重链包含SEQ ID NO:178所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:184所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

[0132] (18)所述重链包含SEQ ID NO:179所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:185所述的氨基酸序列或其任何变体;或,

[0133] (19)所述重链包含SEQ ID NO:180所述的氨基酸序列或其任何变体;所述轻链包含SEQ ID NO:186所述的氨基酸序列或其任何变体。

[0134] 另一方面,本公开提供了一种生物材料,其选自下列中的任一项:

[0135] (1) 编码权利要求1-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸;或

[0136] (2) 含有(1)所述的多核苷酸的表达载体;或

[0137] (3) 含有(1)所述的多核苷酸或(2)所述的表达载体的宿主细胞。

[0138] 另一方面,本公开提供了一种生产特异性结合犬IL-31的抗体或其抗原结合片段的方法,其包括以下步骤:培养前述的宿主细胞,从培养物种分离抗体,并对所述抗体进行纯化。

[0139] 另一方面,本公开提供了一种药物组合物,其含有前述的抗体或其抗原结合片段,以及可药用的赋形剂、稀释剂或载体。

[0140] 另一方面,本公开提供了一种利用前述的抗体或其抗原结合片段、前述的生物材料、前述的药物组合物、前述的试剂盒在制备用于治疗犬的瘙痒症或过敏症的药物中的用途。

[0141] 在一些实施方案中,所述应用包括减轻、抑制或中和犬的瘙痒症或过敏症。在一些实施方案中,所述瘙痒症为特异性皮炎、湿疹、牛皮癣、硬皮病。在一些优选的实施方案中,所述瘙痒症为特异性皮炎。在一些实施方案中,所述应用包括减轻特异性皮炎的临床表现。在一些实施方案中,所述特异性皮炎的临床表现为瘙痒。

[0142] 另一方面,本公开提供了一种利用前述的抗体或其抗原结合片段、前述的生物材料、前述的药物组合物、前述的试剂盒在制备用减轻、抑制或中和犬体内的IL-31活性的药物中的用途。

[0143] 另一方面,本公开提供了一种犬瘙痒症或过敏症的治疗方法,其特征在于,使用治疗有效量的前述的抗体或其抗原结合片段或前述的药物组合物来减轻、抑制或中和犬体内的IL-31活性。

[0144] 实施例

[0145] 通过参考在此给出的一些具体实施例可获得对本公开的进一步的理解,这些实施例仅用于说明本公开,其无意于对本公开的范围做出任何限制。显然,可以对本公开作出多种改动和变化而不脱离本公开的实质,因此,这些改动和变化同样在本申请要求保护的范围内。

[0146] 实施例1:兔抗犬IL-31单克隆抗体制备

[0147] 1. 免疫原制备及鉴定

[0148] 经NCBI数据库检索犬IL-31的核苷酸序列(Gene ID:100302725,SEQ ID NO:200)和氨基酸序列(SEQ ID NO:199),使用瞬转系统在CHO细胞中生成重组犬IL-31以产生犬IL-31蛋白。后续使用重组犬IL-31蛋白作为免疫原。对重组表达的犬IL-31蛋白用SDS-PAGE进行纯度和分子量分析,并用ELISA进行活性鉴定。

[0149] 1.1. SDS-PAGE测定

[0150] 具体实验流程如下:

[0151] (1) 装胶板:拔去梳子,将胶板(成对)装入模具后,再整体置于电泳槽中。还原型胶板需要撕去底下封膜。

[0152] (2) 样品处理:非还原型样品:取适量样品与非还原型6×上样缓冲液(5:1)混匀,沸水浴煮5min。还原型样品:取适量样品与还原型5×上样缓冲液(4:1)混匀,沸水浴煮5min。

[0153] (3) 加样:将电泳缓冲液注满电泳槽内槽和外槽,加入样品和Marker。盖上电泳槽的盖子,注意红色对正极,黑色对负极。

[0154] (4) 电泳:打开电源,开始电泳。使用梯度胶时,设置初始电压为90V,30min后改为

120V至电泳结束;使用非梯度胶时,设置单一电压(120V),直至电泳结束。

[0155] (5) 染色:将凝胶放入装有染色液的培养皿中,放在摇床上染色15分钟左右。

[0156] (6) 脱色:将凝胶从染色液中取出,浸入脱色液中,置于摇床上直至底色无色为止。

[0157] (7) 用伯乐化学发光成像仪拍摄样品后标记信息。

[0158] 蛋白电泳结果见图1,其中,M列为蛋白标志物列(Bio-rad,Cat.no.16103573S),分子量大小可参考左侧注释,R列为还原型样品反应结果,NR列为非还原型样品反应列,由图1结果可知,制备的重组犬IL-31蛋白表达纯度达到要求,分子量在16.1965kDa。

[0159] 1.2.ELISA测定

[0160] 用1 μ g/mL的赛妥敏(犬源化抗IL-31单克隆抗体,硕腾)加入96孔板中,100 μ L/孔4 $^{\circ}$ C包被过夜;用0.1%PBST洗液300 μ L/孔洗板3次后,加封闭液37 $^{\circ}$ C孵育1h;洗板3次后,加梯度稀释的IL-31于37 $^{\circ}$ C孵育1h;洗板3次后,加二抗6xHis-IgG(H+L)-HRP(Abcam)稀释1000、5000和10000倍进行测试,37 $^{\circ}$ C孵育1h;洗板3次后,用TMB显色液显色,加入1M H₂SO₄溶液终止反应,用酶标仪读取孔板在450nm波长下的吸光值。

[0161] ELISA结合活性的检验结果见表2,由表2结果表明,该重组犬IL-31蛋白与赛妥敏具有良好的结合活性。

[0162] 表2犬IL-31ELISA结合活性检验

包被抗原		犬源化抗IL-31抗体(1 μ g/mL)		
二抗: 6xHis-IgG(H+L)-HRP		1:1000	1:5000	1:10000
[0163] 重组犬IL-31蛋白	1000.000	3.041	2.686	2.390
	333.333	3.022	2.736	2.406
	111.111	3.043	2.733	2.437
	37.037	2.862	2.558	2.139
	12.346	2.525	2.063	1.585
	0.000	0.045	0.047	0.058

[0164] 2. 动物免疫

[0165] 本实施例采用快速免疫方案(Phoenix MonRab),用重组犬IL-31蛋白免疫4只新西兰兔子(分别命名为R10265、R10266、R10267、R10268)三次免疫,在第三次免疫7天后,用间接ELISA方法检测免疫动物血清,以此确定免疫应答的水平,ELISA的检测过程可参考1.2中的实验步骤。检测结果如表3所示,最终挑选R10266和R10267两只兔子用于B细胞筛选。

[0166] 表3间接ELISA检测动物血清效价

实验组		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
稀释倍数		1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	1:64000	1:128000	1:256000	1:512000	空白	滴度	包被	
[0167] 免疫动物	R10265	3.510	3.455	3.385	3.010	2.541	1.990	1.407	0.898	0.569	0.329	0.049	1:512000	A	
		1.320	0.645	0.358	0.187	0.124	0.088	0.062	0.051	0.062	0.045	0.045	1:16000	B	
	R10266	3.291	3.325	3.680	3.533	3.213	2.982	2.695	2.283	1.707	1.148	0.046	>:512000	A	
		3.433	3.103	2.790	2.210	1.606	1.120	0.685	0.394	0.243	0.159	0.046	1:512000	B	
			3.31	3.42	3.42	3.35	3.36	2.82	2.44	1.80	1.25	0.78	0.09	>:512000	A

[0168]	R102 67	7	7	3	4	5	3	2	2	4	9	4	2000	B
		2.40 1	1.48 4	0.94 6	0.68 0	0.36 0	0.18 0	0.23 3	0.07 9	0.05 8	0.05 0	0.04 7	1:64 000	
	R102 68	3.43 1	3.46 7	3.44 4	3.23 2	2.97 7	2.42 3	1.93 5	1.34 8	0.81 2	0.48 6	0.04 6	1:51 2000	A
		3.03 7	2.19 8	1.62 5	1.02 9	0.56 6	0.32 9	0.20 6	0.12 6	0.08 4	0.06 8	0.05 1	1:12 8000	

[0169] 注:当(信号/空白) ≥ 2.1 时,滴度最高,空白的OD450值为两组重复的平均值。A代表犬IL31,B代表带有His标签的无关阴性蛋白。

[0170] 3.B细胞克隆筛选

[0171] 3.1.PBMC收集和B细胞筛选

[0172] 将免疫应答水平高的兔子采血收集PBMC,得到抗原阳性的B细胞,将上述抗原阳性的B对细胞铺96孔板进行筛选。

[0173] 3.2.初筛

[0174] 收集细胞培养上清,用间接ELISA方法筛选上清液,挑选出对犬IL-31蛋白呈阳性的上清。

[0175] 3.3.确认筛选

[0176] 对初筛阶段得到的所有阳性B细胞,采用间接ELISA方法用重组犬IL-31蛋白筛选所有的阳性细胞上清,再用His tag无关蛋白进行反筛,得到针对于A组(犬IL-31蛋白阳性)和B组(带有His标签的无关阴性蛋白)的克隆。表4为用间接ELISA筛选B细胞上清的结果,将A组结合力高并且B组结合力低的细胞克隆用于后续试验。

[0177] 表4间接ELISA筛选B细胞上清

克隆	OD450		克隆	OD450	
	A	B		A	B
1F7	2.294	0.048	26D10	2.771	0.050
2B8	1.179	0.047	26A7	2.699	0.045
2H7	2.544	0.046	26F4	1.415	0.046
3E5	2.954	0.047	26H1	3.122	0.045
3F8	3.138	0.048	27C4	3.411	0.046
3H5	2.708	0.047	27D3	3.137	0.047
5A12	1.882	0.046	27D4	2.560	0.047
5C6	2.852	0.048	27D6	2.617	0.047
5C11	2.926	0.049	28B11	3.246	0.045
5H4	3.107	0.047	28C3	1.486	0.045
7G6	2.035	0.044	28D5	1.894	0.045
7H9	2.254	0.047	28E8	2.747	0.046
8B12	2.562	0.047	29D5	1.769	0.045
8C9	2.904	0.042	30A11	3.240	0.046
8G8	2.690	0.054	30G5	3.024	0.047
8H8	2.275	0.044	31A5	2.863	0.044
9B2	3.057	0.048	31A11	1.409	0.044
10H4	1.372	0.044	32A8	3.254	0.081
11C4	2.682	0.047	32B3	2.131	0.044
11C8	2.845	0.049	33B3	3.303	0.045

[0179]

13G5	3.377	0.052	33C6	2.967	0.046
15G4	1.921	0.046	34E1	1.790	0.050
16A7	2.432	0.049	34H7	1.212	0.047
17D2	2.832	0.045	35C9	3.223	0.048
18E8	2.978	0.050	36D11	2.524	0.079
19C2	1.779	0.046	36H5	2.908	0.048
19C7	2.541	0.049	38A8	1.304	0.052
19D1	3.218	0.044	38E2	3.172	0.046
19H2	2.951	0.048	39C11	2.468	0.050
20C3	3.117	0.050	39G6	2.607	0.047
20E12	2.306	0.045	44B4	2.806	0.044
21E11	1.632	0.045	47C1	3.186	0.047
25A10	2.541	0.048	CM	0.063	0.062
25B10	3.340	0.052	无关上清	0.046	0.051
25C4	2.408	0.046	阳性对照	3.104	1.932
25E12	2.558	0.047	/	/	/

[0180] 3.4. 表位确认

[0181] 将B细胞培养上清与赛妥敏(阳性对照,犬源化抗IL-31单克隆抗体)共孵育,用竞争ELISA来确认筛选出的阳性克隆与赛妥敏是否是相同表位。其中,B细胞培养上清表位确认结果见表5-1和5-2,R10268#1:100代表用挑选出来效价最高的兔血清100倍稀释作为阳性对照。

[0182] 抑制率的计算公式为:抑制率(%) = 100% - (克隆本身OD450/空白培养基OD450)*100%

[0183] 表5-1B细胞上清表位确认

[0184]

克隆	赛妥敏			
	32 ng/mL		16 ng/mL	
	OD450	抑制率	OD450	抑制率
空白培养基	2.031	0.00%	1.588	0.00%
R10268# 1:100	1.802	11.28%	1.212	23.68%
1F7	2.214	-9.01%	1.596	-0.50%
2B8	2.177	-7.19%	1.532	3.53%
2H7	1.972	2.90%	1.494	5.92%
3E5	1.916	5.66%	1.435	9.63%
3F8	2.078	-2.31%	1.448	8.82%
3H5	2.028	0.15%	1.522	4.16%
5A12	1.965	3.25%	1.509	4.97%
5C6	2.096	-3.20%	1.483	6.61%
5C11	1.938	4.58%	1.435	9.63%
5H4	1.836	9.60%	1.269	20.09%
7G6	2.075	-2.17%	1.509	4.97%
7H9	1.879	7.48%	1.447	8.88%
8B12	1.913	5.81%	1.469	7.49%
8C9	1.852	8.81%	1.409	11.27%
8G8	1.892	6.84%	1.430	9.95%
8H8	1.893	6.79%	1.321	16.81%
9B2	1.929	5.02%	1.420	10.58%
10H4	1.973	2.86%	1.437	9.51%

[0185]	11C4	1.931	4.92%	1.528	3.78%
	11C8	2.126	-4.68%	1.619	-1.95%
	13G5	1.554	23.49%	0.996	37.28%
	15G4	1.929	5.02%	1.341	15.55%
	16A7	2.027	0.20%	1.475	7.12%
	17D2	1.911	5.91%	1.375	13.41%
	18E8	1.670	17.77%	1.234	22.29%
	19C2	1.945	4.23%	1.441	9.26%
	19C7	1.909	6.01%	1.243	21.73%
	19D1	1.899	6.50%	1.289	18.83%
	19H2	2.000	1.53%	1.546	2.64%
	20C3	2.014	0.84%	1.449	8.75%
	20E12	1.963	3.35%	1.473	7.24%
	21E11	1.975	2.76%	1.518	4.41%
	25A10	2.072	-2.02%	1.513	4.72%
	25B10	1.979	2.56%	1.623	-2.20%
	25C4	1.997	1.67%	1.570	1.13%
	25E12	2.072	-2.02%	1.649	-3.84%
	26D10	1.912	5.86%	1.508	5.04%
	26A7	1.647	18.91%	1.138	28.34%
	26F4	1.918	5.56%	1.630	-2.64%
	26H1	1.914	5.76%	1.616	-1.76%
	27C4	1.947	4.14%	1.592	-0.25%

[0186] 表5-2B细胞上清表位确认

克隆	赛妥敏			
	32 ng/ml		16 ng/ml	
	OD450	抑制率	OD450	抑制率
空白培养基	2.054	0.00%	1.592	0.00%
R10268# 1:100	1.939	5.60%	1.357	14.76%
无关细胞上清液	2.047	0.34%	1.582	0.63%
PC	1.891	7.94%	1.467	7.85%
27D3	2.048	0.29%	1.35	15.20%
27D4	2.091	-1.80%	1.375	13.63%
27D6	2.069	-0.73%	1.539	3.33%
28B11	1.93	6.04%	1.439	9.61%
28C3	2.158	-5.06%	1.603	-0.69%
28D5	2.166	-5.45%	1.586	0.38%
28E8	2.112	-2.82%	1.569	1.44%
29D5	1.967	4.24%	1.537	3.45%
30A11	1.949	5.11%	1.389	12.75%
30G5	2.075	-1.02%	1.501	5.72%
31A5	2.053	0.05%	1.584	0.50%
31A11	2.039	0.73%	1.493	6.22%
32A8	1.993	2.97%	1.433	9.99%
32B3	1.94	5.55%	1.611	-1.19%
33B3	2.11	-2.73%	1.556	2.26%
33C6	1.748	14.90%	1.147	27.95%

[0188]	34E1	2.046	0.39%	1.519	4.59%
	34H7	2.009	2.19%	1.531	3.83%
	35C9	1.539	25.07%	1.068	32.91%
	36D11	1.959	4.63%	1.528	4.02%
	36H5	2.027	1.31%	1.562	1.88%
	38A8	2.037	0.83%	1.632	-2.51%
	38E2	1.686	17.92%	1.208	24.12%
	39C11	2.023	1.51%	1.489	6.47%
	39G6	1.782	13.24%	1.333	16.27%
	44B4	1.917	6.67%	1.323	16.90%
	47C1	1.821	11.34%	1.132	28.89%

[0189] 由表5-1和表5-2可知,B细胞克隆5H4-2、18E8-1、19D1-1、19C7-1、30G5-1、35C9-1、38E2-2、44B4-1、47C1-1、30A11-1与犬IL-31蛋白具有较好的结合能力。

[0190] 由图2可知,5H4-2和30A11-1能够与阳性对照竞争结合犬IL-31,因此,推测5H4-2和30A11-1的B细胞克隆可能与阳性对照有相同表位。

[0191] 3.5.ELISA测定

[0192] 对前述筛选到的与犬IL-31结合能力较好的10个B细胞克隆进行ELISA测定,具体操作步骤为用1 μ g/mL的犬IL-31 100 μ L/孔加入96孔板中4 $^{\circ}$ C包被过夜;用0.1%PBST洗液300 μ L/孔洗板3次后,加封闭液37 $^{\circ}$ C孵育1h;洗板3次后,加B细胞培养上清液37 $^{\circ}$ C孵育1h;洗板3次后,加Goat-anti-Cannie-igG(H+L)-HRP 37 $^{\circ}$ C孵育1h;洗板3次后,用TMB显色液显色,1M H₂SO₄溶液终止,用酶标板在450nm波长下读取吸光值。

[0193] 不同细胞样本的结合活性见表6,,由表6结果可知,各细胞的结合活性均显示良好。并对10种细胞的结合活性进行排序,其中,B细胞克隆19D1-1的结合活性最强。

[0194] 表6ELISA测定结果

实验序号	样本	EC ₅₀ 值/(ng/ml)	结合活性排序
1	5H4-2	0.841	3
2	18E8-1	1.95	6
3	19D1-1	0.196	1
4	19C7-1	3.21	10
5	30G5-1	2.08	7
6	35C9-1	2.3	8
7	38E2-2	0.915	4
8	44B4-1	0.232	2
9	47C1-1	1.79	5
10	30A11-1	2.82	9

[0196] 3.6.细胞生物学活性测定

[0197] 如前所述,促炎细胞因子白细胞介素31(IL-31)由多种物种的活化T淋巴细胞产生,它会导致犬皮肤上的瘙痒情况。在犬特异性皮炎中,当患犬暴露在过敏原中时,皮肤的辅助性T细胞(Th2)会产生细胞因子IL-31,IL-31结合由IL-31受体A(IL-31RA)和制瘤素M受体(OSMR)组成的共受体,通过Janus激酶磷酸化激活STAT信号级联,并导致靶基因上调,引起犬的瘙痒行为。而抗IL-31单克隆抗体可以中和IL-31,从而起到止痒作用。

[0198] 为了评估筛选到的10个B细胞克隆是否能影响IL-31介导pSTAT信号传导的能力,

本实施例中建立了细胞生物学活性测定方法。所述方法用10ng/mL的犬- γ 干扰素(R&D Systems, 781-CG-050)预先处理犬DH-82单核细胞24h并在IL-31处理前血清饥饿2h以提高IL-31受体表达和pSTAT信号转导。在预处理后,以1 μ g/mL添加重组犬IL-31 5min,并使用HTRF技术(PerkinElmer, 62AT3PET)评价STAT磷酸化的能力,将B细胞上清液与犬IL-31共孵育1h后定性测量mAb抑制STAT磷酸化的能力。

[0199] 具体的实验步骤如下:

[0200] (1) 细胞致敏:将DH82(犬巨噬细胞/狗肾恶性组织细胞增生症细胞)(中国科学院细胞库,目录号TC0 3)以每孔 1×10^5 cells/100 μ L铺板在96孔细胞培养板中,在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂下用15%FBS、2mmol/L GlutaMax、1mmol/L丙酮酸钠的MEM培养基的条件下加入10ng/mL的犬干扰素- γ 维持24小时使其致敏;

[0201] (2) 清洗:去除培养基,用1xPBS200 μ L/孔清洗细胞一次;

[0202] (3) 血清饥饿:换成无血清培养基100 μ L/well,饥饿处理2h;

[0203] (4) 样本处理:IL-31细胞因子用无血清培养基稀释到2 μ g/ml后,将B细胞培养上清液和IL-31等体积混匀共孵育一小时,用含有1 μ g/ml的犬IL-31作为阴性对照;

[0204] (5) 加抑制物、刺激物:去除培养基后,直接加入预先共孵育过的mAb和IL-31细胞因子混合物,100 μ L/well,37 $^{\circ}$ C二氧化碳培养箱中继续培养1h;

[0205] (6) 清洗:去除培养基,200 μ L/well的1xPBS清洗细胞一次;

[0206] (7) 细胞裂解:每孔中加入30 μ L 1x细胞裂解液,100rpm,裂解30min,裂解结束,样品制备完成;

[0207] (8) 加样本:将16 μ L细胞裂解上清和4 μ L预混合的抗体加入HTRF自带的96孔板中,共同室温孵育整晚后读数。需加上16 μ L磷酸化对照和阴性对照。用封板膜盖住96孔板。

[0208] (9) 孵育:室温下孵育一夜。

[0209] (10) 读数:Eu*Crypatate设置读取器,并在兼容的HTRF读取器中读取两种不同波长(665nm和620nm)的荧光发射,计算抗体的抑制率。

[0210] (11) 数据处理:比率=(665nm的信号/620nm的信号)*10000

[0211] 抑制率=100%-(样品比率/犬IL-31阴性对照比率)*100%

[0212] 试验成立的标准:磷酸化对照比率/阴性对照比率的值>2

[0213] (12) 结果分析

[0214] 经计算,本次结果磷酸化对照比率/阴性对照比率的值为3.8,试验成立。

[0215] 细胞活性测定结果见表7,由表7可知,抑制率在20%以上的B细胞克隆有38E2-2、47C1-1和35C9-1。

[0216] 表7细胞生物学活性测定

序号	克隆号	抑制率%	排序
1	5H4-2	8.7	10
2	18E8-1	19.5	5
3	19D1-1	19.8	4
[0217] 4	19C7-1	13.4	8
5	30G5-1	12	9
6	35C9-1	24.6	3
7	38E2-2	29.4	1
8	44B4-1	19.5	6
[0218] 9	47C1-1	28	2
10	30A11-1	13.5	7

[0219] 4. 抗体测序

[0220] 将ELISA阳性的10个B细胞克隆用Sanger测序法进行V区测序。其中,10个抗体的氨基酸序列编号见表8,核苷酸序列编号见图9。

[0221] 表8抗体的氨基酸序列编号信息

	各抗体氨基酸序列编号 (SEQ ID NO:X)									
	35C9-1	47C1-1	38E2-1	5H4-2	19D1-1	18E8-1	19C7-1	44B4-1	30A11-1	30G5-1
HC-CDR1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HC-CDR2	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
[0222] HC-CDR3	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
LC-CDR1	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
LC-CDR2	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
LC-CDR3	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
VH	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
VL	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80

[0223] 表9抗体的核苷酸序列编号信息

	各抗体核苷酸序列编号 (SEQ ID NO:X)									
	35C9-1	47C1-1	38E2-1	5H4-2	19D1-1	18E8-1	19C7-1	44B4-1	30A11-1	30G5-1
HC-CDR1	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
HC-CDR2	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
[0224] HC-CDR3	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
LC-CDR1	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
LC-CDR2	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
LC-CDR3	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
VH	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
VL	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160

[0225] 5. BLI亲和力测定

[0226] 5.1. 兔源抗IL-31单克隆抗体的瞬转表达

[0227] (1) 基因序列设计

[0228] 将10个B细胞克隆中选出38E2-1、47C1-1、35C9-1、19D1-1和5H4-2共5株克隆,将这五个分子的重链可变区和轻链可变区分别与兔IgG的重链恒定区和轻链恒定区进行拼接,获得这五个分子的重链和轻链的完整序列。

[0229] (2) 序列合成及表达载体

[0230] 将38E2-1、47C1-1、35C9-1、19D1-1和5H4-2这五个分子的重链和轻链融合后分别

合成,首先将基因进行PCR扩增,然后将pCDNA3.1载体用NheI和ApaI限制性内切酶进行线性化,最后通过无缝克隆的方法,将基因连接在pCDNA3.1载体的NheI和ApaI酶切位点处。连接产物转化至大肠杆菌Top10感受态中,涂板后挑取单菌落进行测序验证,验证转化成功的单菌落进行扩大培养提取去内毒素质粒,整合到pCDNA3.1质粒上。最终,获得38E2-1-pcDNA3.1、47C1-1-pcDNA3.1、35C9-1-pcDNA3.1、19D1-1-pcDNA3.1和5H4-2-pcDNA3.1质粒。

[0231] (3) CHO细胞瞬时转染表达兔源抗IL-31单克隆抗体

[0232] 1) CHO-s细胞的培养:125mL摇瓶常规培养条件下,当细胞密度生长到 1×10^7 个/mL时,以 2×10^5 个/mL的初始密度接种到新125mL摇瓶中,37°C、5% CO₂培养,2天后当密度达到 5×10^5 个/mL时,按转染试剂lipo2000的操作说明书开始瞬时转染;

[0233] 2) 7天后收集细胞上清,5000rpm离心30min除去细胞及碎片,0.45 μ m过滤后4°C暂存,用于后续的抗体纯化。

[0234] 5.2. 兔源抗IL-31单克隆抗体的纯化

[0235] 采用Protein A亲和层析纯化细胞培养上清液。具体操作步骤为先用亲和层析平衡液(20mM PB,0.15M NaCl pH 7.2)进行平衡,将澄清过滤收集液上样后,用亲和层析平衡液(20mM PB,0.15M NaCl pH7.2)平衡,再用亲和层析淋洗液(20mM PB,1M NaCl pH7.2)进行淋洗,用洗脱液(0.1M甘氨酸-HCl,pH3.0)进行洗脱。蛋白电泳结果见图3,由图3可知洗脱后样品SDS-PAGE纯度>95%以上,目标分子量在150KD左右。蛋白免疫印迹法(Western Blot)测定兔源抗体候选物的结果见图4,由图4可知兔源抗体候选物均能与犬IL-31结合。

[0236] 5.3. 亲和力测定

[0237] 选择38E2-1、47C1-1、35C9-1、19D1-1、5H4-2共5株克隆,以赛妥敏为阳性对照,将纯化的抗体固定在ProA生物传感器上,用犬IL-31蛋白作为流动相进行BLI亲和力测定。

[0238] 亲和力测定结果见表10,由表10可知,其中有3株克隆的亲和力大于阳性对照赛妥敏(Canine IgG),分别是38E2-1、47C1-1和35C9-1,38E2-1的亲和力最好,有 $2.547E-09$ 。BLI亲和力测定结果见图5,其结果与细胞生物学活性测定结果一致。

[0239] 表10BLI亲和力测定

抗体	分析物	Rmax	Ka(1/Ms)	Kdis(1/s)	KD(M)	Dissoc X ²	Dissoc X ²
38E2-1	犬 IL-31	0.3318	3.302E-05	8.412E-04	2.547E-09	0.1513	0.998
47C1-1		0.2525	3.877E-05	1.457E-03	3.749E-09	0.1622	0.9964
35C9-1		0.4167	3.995E-05	5.067E-03	1.268E-08	0.1769	0.9959
Cannie IgG		0.2956	9.597E-04	3.057E-03	3.186E-08	0.4687	0.9877
19D1-1		0.3889	N/A	N/A	4.330E-08	N/A	0.9984
5H4-2		0.2205	N/A	N/A	1.131E-07	N/A	0.9934

[0241] 实施例2:犬瘙痒模型建立

[0242] 1. 犬瘙痒模型初步建立

[0243] 为了证实在DH-82(犬肾恶性组织细胞增生症细胞)测定中观察到的IL-31介导的

细胞信号转导信号的抑制,与抑制狗体内IL-31介导的瘙痒关联,申请人参考了相关文献和专利,用重组犬IL-31蛋白建立了犬瘙痒模型,用于评价抗体的体内活性。在该模型中,将重组表达的犬IL-31经静脉途径接种试验犬,低剂量组为 $3\mu\text{g}/\text{kg}$,高剂量组为 $8\mu\text{g}/\text{kg}$,用无菌PBS作为阴性对照,每组分别选取5只试验犬。接种前30min开始临床观察,连续观察记录30min,接种后30min后开始第二次临床观察,连续观察记录2h,记录两次动物瘙痒频次。接种前30min临床观察用于建立基线。临床观察期间,动物出现舔、抓、咬、挠、蹭、频繁摇头、刨地等行为,均认定为抓痒行为。具体而言,在连续的1分钟间隔时,对于每只狗是否显示瘙痒行为作出“是/否”的判断。瘙痒行为的显示,如舔/咀嚼爪子、侧腹和/或肛门区域,搔抓侧腹、颈部和/或地板,摇头和在笼子地板上蹭他们的臂部足以在指定时间间隔中得出“是”的应答。在该时期结束时,将结论为“是”的数目加在一起得出累计瘙痒评分指数(PSI)。统计注射前累计30min和注射半小时后累计2h的PSI结果,用SPSS软件的单因素方差分析分别比较各剂量组和阴性对照组PSI的显著性差异。当 $P>0.05$,说明各剂量组与对照组PSI水平不显著;若 $P<0.05$,说明各剂量组与对照组PSI水平有显著差异。

[0244] 统计分析见图6,由图6可知,高剂量组和低剂量组注射半小时后累计2h的PSI结果与阴性对照均有显著性差异,且高剂量组和低剂量组PSI结果无显著性差异,初步选取 $3\mu\text{g}/\text{kg}$ 给药剂量用于建立犬瘙痒模型。

[0245] 2. 瘙痒模型确认实验

[0246] 犬IL-31静脉给药剂量确定后,我们对该模型进行进一步确认。D-7时,将犬IL-31经静脉途径接种试验犬,接种剂量为 $3\mu\text{g}/\text{kg}$,用无菌PBS作为阴性对照,筛选出与阴性对照有显著性差异的10只试验犬。D0时,治疗组(5只/组)试验犬经颈部皮下注射 $2\text{mg}/\text{kg}$ 赛妥敏,对照组(5只/组)试验犬经颈部皮下注射等体积的无菌PBS。D8时,将 $3\mu\text{g}/\text{kg}$ 的犬IL-31经静脉途径接种试验犬,接种前30min开始临床观察,连续观察记录30min,接种30min后开始临床观察,连续观察记录2h,记录两次动物瘙痒频次。接种前30min临床观察用于建立基线。统计注射前累计30min和注射半小时后累计2h的PSI结果,用SPSS软件的单因素方差分析分别比较治疗组和对照组PSI的显著性差异。当 $P>0.05$,说明治疗组与对照组PSI水平不显著;若 $P<0.05$,说明治疗组与对照组PSI水平有显著差异。

[0247] 统计结果见图7,由图7可知,D8天后治疗组与对照组有显著性差异,说明赛妥敏在给药8天后能够抑制狗体内由IL-31介导的瘙痒症状。

[0248] 最终,通过用静脉给药犬IL-31的方法成功建立了犬的瘙痒模型,确定犬IL-31静脉给药剂量为 $3\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0249] 实施例3:兔源抗IL-31单克隆抗体体内药效研究

[0250] 犬瘙痒模型建立后,申请人进一步研究了兔源抗IL-31单克隆抗体体内药效。瞬转表达一定量兔源抗体38E2-1、47C1-1和35C9-1样品,用赛妥敏作为阳性对照,用无菌PBS作为阴性对照。每组选取5只,共需25只试验犬,通过犬瘙痒模型剔除异常犬。D0,治疗组(5只/组)试验犬经颈部皮下分别注射兔源抗体38E2-1、兔源抗体47C1-1和兔源抗体35C9-1,注射剂量均为 $2\text{mg}/\text{kg}$,阳性对照组(5只/组)试验犬经颈部皮下注射 $2\text{mg}/\text{kg}$ 赛妥敏,阴性对照组(5只/组)试验犬经颈部皮下注射等体积的无菌PBS。参考相关文献,2.5h后将 $3\mu\text{g}/\text{kg}$ 犬IL-31经静脉途径接种试验犬,接种前30min开始临床观察,连续观察记录30min,接种30min后开始临床观察,连续观察记录2h,记录两次动物瘙痒频次。接种前30min临床观察用于建立

基线。统计注射前累计30min和注射半小时后累计2h的PSI结果,用SPSS软件的单因素方差分析分别比较治疗组和对照组PSI的显著性差异。 $P>0.05$,说明治疗组与对照组PSI水平不显著; $P<0.05$,说明治疗组与对照组PSI水平有显著差异。

[0251] 实验结果见图8,由图8可知,注射半小时后累计2h的治疗组与阴性对照组(无菌PBS)均有显著差异,兔源抗体38E2-1与阳性对照组(赛妥敏)比较, $P>0.05$,无显著差异;兔源抗体47C1-1与阳性对照组比较, $P>0.05$,无显著差异;兔源抗体35C9-1与阳性对照组比较, $P=0.00014$,有显著差异。三个兔源抗体的体内活性中,38E2-1最好,其次是47C1-1和35C9-1。

[0252] 实施例4:犬源化抗体改造策略

[0253] 抗药抗体(ADA)的产生可以与包括单克隆抗体的任何生物治疗蛋白质的功效丧失相关。为了帮助减轻与形成对本文中提供的兔抗IL-31单克隆抗体的ADA相关的风险,拟采用犬源化策略来构建嵌合抗体。参见图9,该犬源化策略基于找出最适于CDR移植的犬种系抗体序,在广泛分析所有可用的犬种序列的重链和轻链后,根据他们对该兔mAbs的同源性选择备选种系。具体步骤是在IMGT网站上找兔源抗体FV区匹配度最高的犬源化模板,将犬源化模版中的CDR区替换成兔的CDR区,用生物信息学软件对序列进行分析,对几个氨基酸进行回复突变,期望获得几个与母源抗体亲和力和活性相当的犬源化抗体。

[0254] 实施例5:38E2-1、47C1-1和35C9-1嵌合抗体构建和制备

[0255] 1.38E2-1、47C1-1和35C9-1嵌合抗体构建与瞬转表达

[0256] 按照实施例4犬源化改造的策略将38E2-1、47C1-1、35C9-1这三个分子的重链可变区和轻链可变区分别与犬IgGB的重链恒定区和轻链恒定区进行拼接,获得这三个分子的重链和轻链的完整序列。犬IgGB的重链和轻链氨基酸序列和DNA序列可以从GenBank数据库获得。IgGB重链氨基酸的登录号是AAL35302.1(SEQ ID NO:161),DNA的登录号是AF354265.1(SEQ ID NO:162);犬抗体 κ 轻链氨基酸的登录号为ABY 57289.1,DNA的登录号是EU305402.1。嵌合抗体的氨基酸序列和核苷酸序列编码信息见表11。

[0257] 表11嵌合抗体的序列编码信息

		嵌合抗体			
		38E2-1	47C1-1	35C9-1	
[0258]	氨基酸序列编码 (SEQ ID NO:X)	HC-CDR1	3	2	1
		HC-CDR2	13	12	11
		HC-CDR3	23	22	21
		重链	163	164	165
		LC-CDR1	33	32	31
		LC-CDR2	43	42	41
		LC-CDR3	53	52	51
		轻链	166	167	168
	核苷酸序列编码 (SEQ ID NO:X)	HC-CDR1	83	82	81
		HC-CDR2	93	92	91
		HC-CDR3	103	102	101
		重链	169	170	171
		LC-CDR1	113	112	111
		LC-CDR2	123	122	121
		LC-CDR3	133	132	131
		轻链	172	173	174

[0259] 按照实施例1.5的方法进行序列合成和CHO细胞瞬时转染表达,并进行一步亲和嵌合抗体纯度评价,实验结果见图10,由图10可知,SDS-PAGE纯度>95%以上,目标分子量在150KD左右,蛋白免疫印迹测定结果见图11,由图11可知,嵌合抗体候选物均能与犬IL-31结合。

[0260] 2.嵌合抗体亲和力评价

[0261] 2.1ELISA测定

[0262] 用1 μ g/mL的犬IL-31 100 μ L/孔加入96孔板中4 $^{\circ}$ C包被过夜;用0.1%PBST洗液300 μ L/孔洗板3次后,加封闭液37 $^{\circ}$ C孵育1h;洗板3次后,加梯度稀释的嵌合抗体37 $^{\circ}$ C孵育1h;洗板3次后,加Goat-anti-Canine-igG(H+L)-HRP 37 $^{\circ}$ C孵育1h;洗板3次后,用TMB显色液显色,1M H₂SO₄溶液终止,用酶标板在450nm波长下读取吸光值。

[0263] 检测结果见表12和图12,由表12可知,3株嵌合抗体与犬IL-31的结合活性高于阳性对照赛妥敏,38E2-1最佳,其次是47C1-1,最差是35C9-1。

[0264] 表12嵌合抗体ELISA测定

序号	抗体	EC ₅₀ 值/(ng/mL)
1	嵌合抗体38E2-1	93.99
2	嵌合抗体35C9-1	105.50
3	嵌合抗体47C1-1	98.45
4	赛妥敏	125.70

[0266] 2.2BLI亲和力测定

[0267] 将纯化的抗体固定在ProA生物传感器上,用犬IL-31蛋白作为流动相进行BLI亲和力测定。由表13可知,嵌合抗体的亲和力与相应兔源抗体相比无差异或略有降低(3倍以内),且均比赛妥敏亲和力要高。

[0268] 表13嵌合抗体BLI亲和力测定

[0269]	抗体	亲和力测定KD (M)
	兔源抗体38E2-1	8.15E-10
	嵌合抗体38E2-1	2.49E-09
	兔源抗体47C1-1	3.75E-09
	嵌合抗体47C1-1	8.32E-09
	兔源抗体35C9-1	1.27E-08
	嵌合抗体35C9-1	1.19E-08
	赛妥敏	3.19E-08

[0270] 3. 嵌合抗体细胞生物学活性评价

[0271] 3.1 体外活性评价

[0272] 将纯化制备的嵌合抗体样品起始浓度稀释到10 μ g/mL,然后1.75倍梯度稀释共获得8个浓度点,将梯度稀释后的各样品和IL-31蛋白等体积混匀共孵育1h,按照实施例1.6细胞生物学活性测定进行体外活性评价。检测结果见表14和图13,由以上结果可知,3株嵌合抗体均具有体外活性,其中,抗体38E2的EC₅₀值较小,抑制率高,体外活性最佳。

[0273] 表14嵌合抗体细胞生物学活性测定

[0274]	序号	样本	IC ₅₀ 值/(ng/ml)
	1	兔源抗体38E2	1250
	2	嵌合抗体38E2	1323
	3	兔源抗体47C1	1569
	4	嵌合抗体47C1	1630
	5	兔源抗体35C9	1638
	6	嵌合抗体35C9	1714
	7	赛妥敏	1548

[0275] 实施例6:嵌合抗体体内药效评价

[0276] 按照实施例3的方法进行嵌合抗体体内药效评价。申请人通过瞬转表达一定量的样品用于评估嵌合抗体38E2-1、47C1-1和35C9-1的体内药效,用赛妥敏作为阳性对照,用无菌PBS作为阴性对照。每组选取5只,共需25只试验犬,通过犬瘙痒模型剔除异常犬。D0,治疗组(5只/组)试验犬经颈部皮下分别注射嵌合抗体38E2-1、嵌合抗体47C1-1和嵌合抗体35C9-1,注射剂量均为2mg/kg,阳性对照组(5只/组)试验犬经颈部皮下注射2mg/kg赛妥敏,阴性对照组(5只/组)试验犬经颈部皮下注射等体积的无菌PBS。参考相关文献,2.5h后将3 μ g/kg犬IL-31经静脉途径接种试验犬,接种前30min开始临床观察,连续观察记录30min,接种30min后开始临床观察,连续观察记录2h,记录两次动物瘙痒频次。接种前30min临床观察用于建立基线。统计注射前累计30min和注射半小时后累计2h的PSI结果,用SPSS软件的单因素方差分析分别比较治疗组和对照组PSI的显著性差异。当P>0.05,说明治疗组与对照组PSI水平不显著;若P<0.05,说明治疗组与对照组PSI水平有显著差异。

[0277] 实验结果统计如图14所示,由图14可知,治疗组与阴性对照组有显著性差异,嵌合抗体38E2与阳性对照组比较,P=0.000302,有显著差异。嵌合抗体35C9-1与阳性对照组比较,P>0.05,无显著差异。嵌合抗体47C1-1与阳性对照组比较,P=0.000596,有显著差异。这三个嵌合抗体的体内活性,嵌合38E2-1最好,其次是嵌合47C1-1和嵌合35C9-1。

[0278] 实施例7:犬源化抗体构建和制备

[0279] 1.38E2-1、47C1-1和35C9-1犬源化抗体构建与瞬转表达

[0280] 按照实施例4犬源化改造的策略对38E2-1、47C1-1和35C9-1进行犬源化改造,每个母源抗体分别获得两个犬源化抗体。其中,犬源化抗体的序列编码信息见表15。

[0281] 表15犬源化抗体的序列编码信息

		犬源化抗体					
		38E2-1-H3L3	38E2-1-H3L2	47C1-1-H2L2	47C1-1-H3L3	35C9-1-H1L1	35C9-1-H1L2
[0282] 氨基酸序列 编码 (SEQ ID NO:X)	HC-CDR1	3	3	2	2	1	1
	HC-CDR2	13	13	12	12	11	11
	HC-CDR3	23	23	22	22	21	21
	重链	175	176	177	178	179	180
	LC-CDR1	33	33	32	32	31	31
	LC-CDR2	43	43	42	42	41	41
	LC-CDR3	53	53	52	52	51	51
	轻链	181	182	183	184	185	186
核苷酸序列 编码 (SEQ ID NO:X)	HC-CDR1	83	83	82	82	81	81
	HC-CDR2	93	93	92	92	91	91
	HC-CDR3	103	103	102	102	101	101
	重链	187	188	189	190	191	192
	LC-CDR1	113	113	112	112	111	111
	LC-CDR2	123	123	122	122	121	121
	LC-CDR3	133	133	132	132	131	131
	轻链	193	194	195	196	197	198

[0283] 按照实施例1.5的方法进行序列合成和CHO细胞瞬时转染表达,并进行一步亲和嵌合抗体纯度评价,实验结果见图15,由图15可知,SDS-PAGE纯度>95%以上,目标分子量在150KD左右,蛋白免疫印迹法(Western Blot)测定结果见图16,由图16可知,犬源化抗体候选物均能与犬IL-31结合。

[0284] 2.犬源化抗体亲和力评价

[0285] (1)ELISA测定

[0286] 按照实施例4.2中的ELISA测定方法,对犬源化抗体进行测定。检测结果可见图17和表16,由上述结果可知,6个犬源化抗体与犬IL-31的结合活性比相应嵌合抗体有所下降,犬源化抗体38E2-1、47C1-1的结合活性与阳性对照赛妥敏差异不大,犬源化抗体35C9-1-H1L1和35C9-1-H1L2的结合活性不如赛妥敏。

[0287] 表16犬源化抗体ELISA测定

样品名称	ELISA (EC ₅₀ 值ng/ml)
嵌合抗体38E2-1	92.85
犬源化抗体38E2-1-H3L3	93.41
犬源化抗体38E2-1-H3L2	97.75
嵌合抗体47C1-1	102.2
犬源化抗体47C1-1-H2L2	113.4
犬源化抗体47C1-1-H3L3	105.1
嵌合抗体35C9-1	102.7
犬源化抗体35C9-1-H1L1	189.7

犬源化抗体35C9-1-H1L2	157.6
赛妥敏	123.8

[0289] (2)BLI亲和力测定

[0290] 按照实施例4.2中的BLI亲和力测定方法,对犬源化抗体进行测定。由表17的结果可知,犬源化改造后的抗体比兔源抗体亲和力降低一个数量级,但改造后的38E2-1和47C1-1的亲和力仍然高于阳性对照赛妥敏,而改造后的35C9-1的亲和力不如阳性对照赛妥敏。

[0291] 表17犬源化抗体亲和力测定

[0292]

名称	亲和力测定KD(M)
兔源抗体38E2-1	8.15E-10
嵌合抗体38E2-1	2.49E-09
犬源化抗体38E2-1-H3L3	5.35E-09
犬源化抗体38E2-1-H3L2	8.04E-09
兔源抗体47C1-1	3.75E-09
嵌合抗体47C1-1	8.32E-09
犬源化抗体47C1-1-H2L2	1.51E-08
犬源化抗体47C1-1-H3L3	1.55E-08
兔源抗体35C9-1	1.27E-08
嵌合抗体35C9-1	1.19E-08
犬源化抗体35C9-1-H1L1	4.95E-07
犬源化抗体35C9-1-H1L2	3.89E-07
赛妥敏	3.19E-08

[0293] 3. 犬源化抗体细胞生物学活性评价

[0294] (1) 体外活性评价

[0295] 将纯化制备的犬源化样品按照实施例4.3进行体外活性评价,结果见表18和图18。由上述结果可知,犬源化改造后的38E2-1、47C1-1与相应嵌合抗体和赛妥敏差异不大,改造后的35C9-1细胞活性有所下降,不如赛妥敏。

[0296] 表18犬源化抗体细胞生物学活性测定结果

[0297]

样品名称	体外活性 (IC ₅₀ 值ng/ml)
嵌合抗体38E2	1296
犬源化抗体38E2-1-H3L3	1397
犬源化抗体38E2-1-H3L2	1500
嵌合抗体47C1	1558
犬源化抗体47C1-1-H2L2	1448
犬源化抗体47C1-1-H3L3	1612
嵌合抗体35C9	1711
犬源化抗体35C9-1-H1L1	2256
犬源化抗体35C9-1-H1L2	2045
赛妥敏	1508

[0298] 实施例8:犬源化抗体体内药效评价

[0299] 1. 犬源化抗体体内活性评估

[0300] 按照实施例3的方法进行犬源化抗体体内药效评价,通过瞬转表达一定量的样品用于评估犬源化抗体38E2-1、47C1-1和35C9-1的体内药效,用赛妥敏作为阳性对照,用无菌PBS作为阴性对照。每组选取5只,共需40只试验犬,通过犬瘙痒模型剔除异常犬。D0,治疗组(5只/组)试验犬经颈部皮下分别注射犬源化抗体38E2-1-H3L3、38E2-1-H3L2、47C1-1-H2L2、47C1-1-H3L3、35C9-1-H1L1和35C9-1-H1L2,注射剂量均为2mg/kg,阳性对照组(5只/组)试验犬经颈部皮下注射2mg/kg赛妥敏,阴性对照组(5只/组)试验犬经颈部皮下注射等体积无菌PBS。参考相关文献,2.5h后将3 μ g/kg犬IL-31经静脉途径接种试验犬,接种前30min开始临床观察,连续观察记录30min,接种30min后开始临床观察,连续观察记录2h,记录两次动物瘙痒频次。接种前30min临床观察用于建立基线。统计注射前累计30min和注射半小时后累计2h的PSI结果,用SPSS软件的单因素方差分析分别比较治疗组和对照组PSI的显著性差异。当 $P>0.05$,说明治疗组与对照组PSI水平不显著;若 $P<0.05$,说明治疗组与对照组PSI水平有显著差异。

[0301] 实验结果统计如图19所示,由图19可知,治疗组与阴性对照组有显著性差异,犬源化抗体38E2-1-H3L3、38E2-1-H3L2、47C1-1-H2L2与赛妥敏药效相当;犬源化47C1-1-H3L3与赛妥敏有显著性差异,犬源化抗体35C9-1-H1L1和35C9-1-H1L2有极显著差异,药效不如赛妥敏。

[0302] 2. 犬源化抗体38E2-1-H3L3有效性研究

[0303] 为了确定犬源化抗体38E2-1-H3L3的最低给药剂量及药物持续期,按照实施例3的方法进行该抗体的有效性研究。试验组分别是0.5mg/kg、1mg/kg和2mg/kg犬源化抗体38E2-1-H3L3,用赛妥敏作为阳性对照,用无菌PBS作为阴性对照。每组选取5只,共需25只试验犬,通过犬瘙痒模型剔除异常犬。D0,治疗组(5只/组)试验犬经颈部皮下分别注射0.5mg/kg、1mg/kg和2mg/kg犬源化抗体38E2-1-H3L3,阳性对照组(5只/组)试验犬经颈部皮下注射2mg/kg赛妥敏,阴性对照组(5只/组)试验犬经颈部皮下注射等体积的无菌PBS。参考相关文献,在D1、D7、D14、D21和D28后将3 μ g/kg犬IL-31经静脉途径接种试验犬,每次接种前30min开始临床观察,连续观察记录30min,每次接种30min后开始临床观察,连续观察记录2h,记录临床观察的动物瘙痒频次。D1接种前30min临床观察用于建立基线。统计D1注射前累计30min和D1、D7、D14、D21和D28注射半小时后累计2h的PSI结果,用SPSS软件的单因素方差分析分别比较治疗组和对照组PSI的显著性差异。当 $P>0.05$,说明治疗组与对照组PSI水平不显著;若 $P<0.05$,说明治疗组与对照组PSI水平有显著差异。

[0304] 统计实验结果见图20,由图20可知,治疗组与阴性对照组有显著性差异,0.5mg/kg、1mg/kg和2mg/kg的犬源化抗体38E2-1-H3L3在给药后第28天与赛妥敏药效相当,说明犬源化抗体38E2-1-H3L3的最低给药剂量是0.5mg/kg,药物持续期至少有28天。

[0305] 实施例9:犬源化抗体38E2-1-H3L3免疫原性评价

[0306] 抗药抗体(ADA)的产生会影响药物活性和半衰期,为了评估犬源化抗体38E2-1-H3L3的免疫原性,参考相关专利和文献,选取10只健康试验犬,分成试验组和对照组。试验组(5只/组)试验犬(分别为262组、273组、275组、276组、280组)分别在D0、D14和D28经颈部皮下注射9mg/kg犬源化抗体38E2-1-H3L3,阴性对照组(5只/组)试验犬经颈部皮下注射等体积无菌PBS。分别在D0、D7、D14、D21和D28采血,检测血清的血药浓度和抗药抗体。

[0307] 1. 血药浓度测定

[0308] 用1 μ g/mL的犬IL-31 100 μ L/孔加入96孔板中4 $^{\circ}$ C包被过夜;用0.1%PBST洗液300 μ L/孔洗板3次后,加含5%脱脂奶粉的封闭液37 $^{\circ}$ C孵育1h;洗板3次后,用含1%脱脂奶粉的PBS来稀释阴性血清200倍作为稀释液,再加入梯度稀释的犬源化抗体37 $^{\circ}$ C孵育1h;洗板3次后,加Goat-anti-Cannie-igG(H+L)-HRP 1:2000进行37 $^{\circ}$ C孵育1h;洗板3次后,用TMB显色液显色,1M H₂SO₄溶液终止,用酶标板在450nm波长下读取吸光值。

[0309] 由图21可知,试验组的药物代谢情况基本一致。

[0310] 2. ADA阳性血清的制备

[0311] (1) 将犬源化抗体38E2-1-H3L3用生理盐水稀释至1mg/mL,与等体积的佐剂(博奥龙QuickAntibody-Mouse5W)混匀后,以100 μ L/只的量经肌肉注射分别免疫5只小鼠(Balb/c雌性小鼠,6周龄)。

[0312] (2) 三周后,将犬源化抗体38E2-1-H3L3用生理盐水稀释至1mg/mL,与等体积的佐剂混匀后,以100 μ L/只的量经肌肉注射分别再次免疫5只小鼠。

[0313] (3) 两周左右后对5只小鼠分别采血,3000rpm离心5min获得血清,用ELISA检测确定免疫小鼠血清效价。

[0314] 3. ELISA测定阳性血清效价

[0315] 用1 μ g/mL的犬源化抗体38E2-1-H3L3 100 μ L/孔加入96孔板中4 $^{\circ}$ C包被过夜;用0.1%PBST洗液300 μ L/孔洗板3次后,加封闭液37 $^{\circ}$ C孵育1h;洗板3次后,将5只免疫小鼠血清,分别先用封闭液稀释100倍后,再3倍梯度稀释10个点,以100 μ L/孔加样到96孔板上37 $^{\circ}$ C孵育1h,用封闭液作为空白对照;洗板3次后,加Rabbit-anti-mouse-IgG(H+L)-HRP 37 $^{\circ}$ C孵育1h;洗板3次后,用TMB显色液显色,1M H₂SO₄溶液终止,用酶标板在450nm波长下读取吸光值。

[0316] 由表19结果可得,空白对照组的平均测值为0.45左右,以0.45的2倍的检测值(即大于0.9)作为阳性判定依据,则免疫小鼠1-5的血清效价分别为:1:24300、1:72900、1:72900、1:218700、1:72900。

[0317] 表19阳性血清效价测定

[0318]	1:100	1:300	1:900	1:2700	1:8100	1:24300	1:72900	1:218700	1:656100	1:1968300	1:5904900	空白	
	1	3.475	3.249	2.92	2.508	1.844	1.179	0.778	0.581	0.536	0.503	0.48	0.479
	2	3.44	3.402	3.259	3.183	2.787	2.055	1.359	0.889	0.628	0.519	0.52	0.436
[0319]	3	3.318	3.026	3.089	2.817	2.464	1.792	1.134	0.75	0.579	0.494	0.464	0.428
	4	3.293	3.087	3.061	3.009	2.806	2.316	1.696	1.105	0.722	0.579	0.498	0.427
	5	3.348	3.329	3.248	3.024	2.518	2.033	1.306	0.843	0.628	0.505	0.493	0.439

[0320] 3. 抗药抗体测定

[0321] 用1 μ g/mL的犬源化抗体100 μ L/孔加入96孔板中4 $^{\circ}$ C包被过夜;用0.1%PBST洗液300 μ L/孔洗板3次后,加含5%脱脂奶粉的封闭液37 $^{\circ}$ C孵育1h;洗板3次后,用含1%脱脂奶粉的PBS作为稀释液,对含有抗药抗体的鼠多克隆阳性血清(血清效价1:218700)先进行10倍稀释再2倍梯度稀释10个点;待检血清和犬阴性血清一律利用样本稀释液进行10倍稀释后37 $^{\circ}$ C孵育1h;洗板3次后,加入生物素标记的犬源化抗体;洗板3次后加入Streptavidin-HRP;洗板3次后,用TMB显色液显色,1M H₂SO₄溶液终止,用酶标板在450nm波长下读取吸光

值。

[0322] 其中,阳性血清抗药抗体测定结果见表20,实验组和阴性对照组抗药抗体测定结果见表21。由上表可知,待检样品均没有检测出抗药抗体,说明犬源化抗体38E2-1-H3L3的免疫原性风险很低。

[0323] 表20阳性血清抗药抗体测定结果

[0324]	效价	32000	16000	8000	4000	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25
	OD450	3.625	3.663	3.688	3.668	3.675	3.640	3.458	3.564	1.309	0.435	0.163

[0325] 表21试验组和阴性对照组抗药抗体测定结果

组别	试验犬	OD450				
		D0	D7	D14	D21	D28
[0326] 试验组	262	0.045	0.044	0.048	0.052	0.052
	273	0.051	0.047	0.047	0.047	0.042
	275	0.044	0.049	0.046	0.048	0.047
	276	0.050	0.053	0.054	0.050	0.044
	280	0.045	0.046	0.041	0.045	0.046
阴性对照组	116	0.059	0.042	0.043	0.044	0.046
	197	0.046	0.051	0.045	0.045	0.042
	110	0.043	0.046	0.053	0.044	0.046
	126	0.049	0.046	0.047	0.046	0.049
	586	0.050	0.041	0.047	0.049	0.045

[0327] 综上所述,本发明的抗犬IL-31单克隆抗体均可有效地减轻与犬特应性皮炎相关的临床症状,同时犬源化改造后的抗体免疫原性风险很低。

[0328] 以上所述,仅为本发明的实施例,并非对本发明任何形式上和实质上的限制,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明方法的前提下,还将可以做出若干改进和补充,这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。凡熟悉本专业的技术人员,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,当可利用以上所揭示的技术内容而做出的些许更动、修饰与演变的等同变化,均为本发明的等效实施例;同时,凡依据本发明的实质技术对上述实施例所作的任何等同变化的更动、修饰与演变,均仍属于本发明的技术方案的范围。

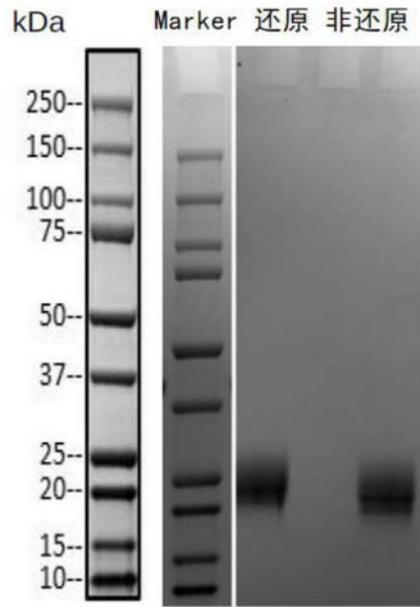


图1

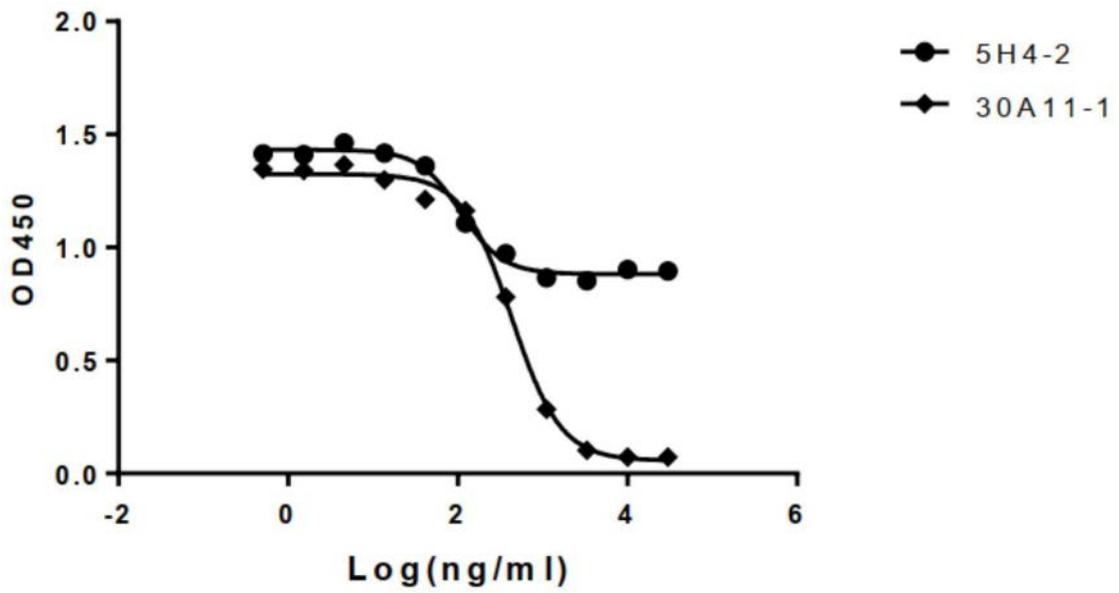


图2

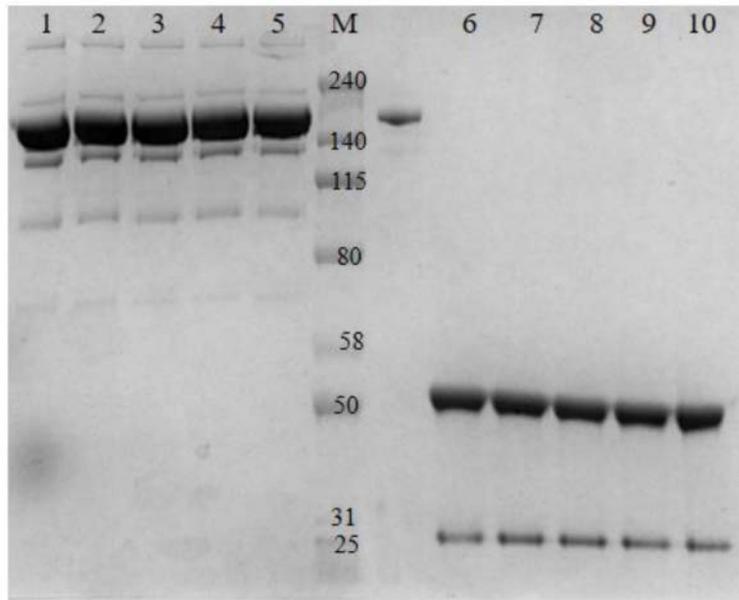


图3

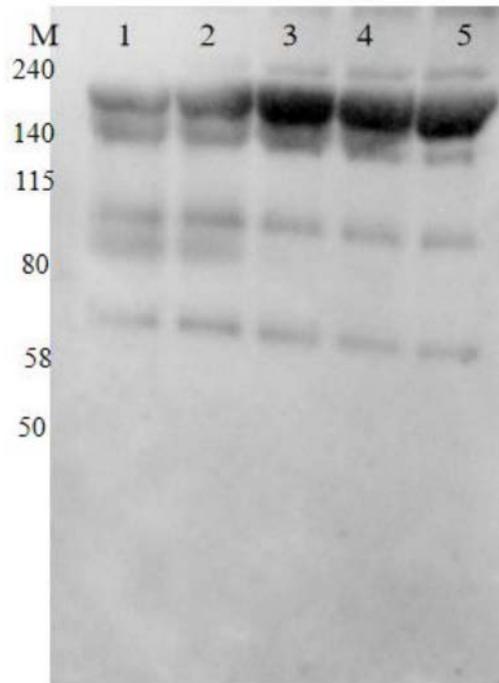


图4

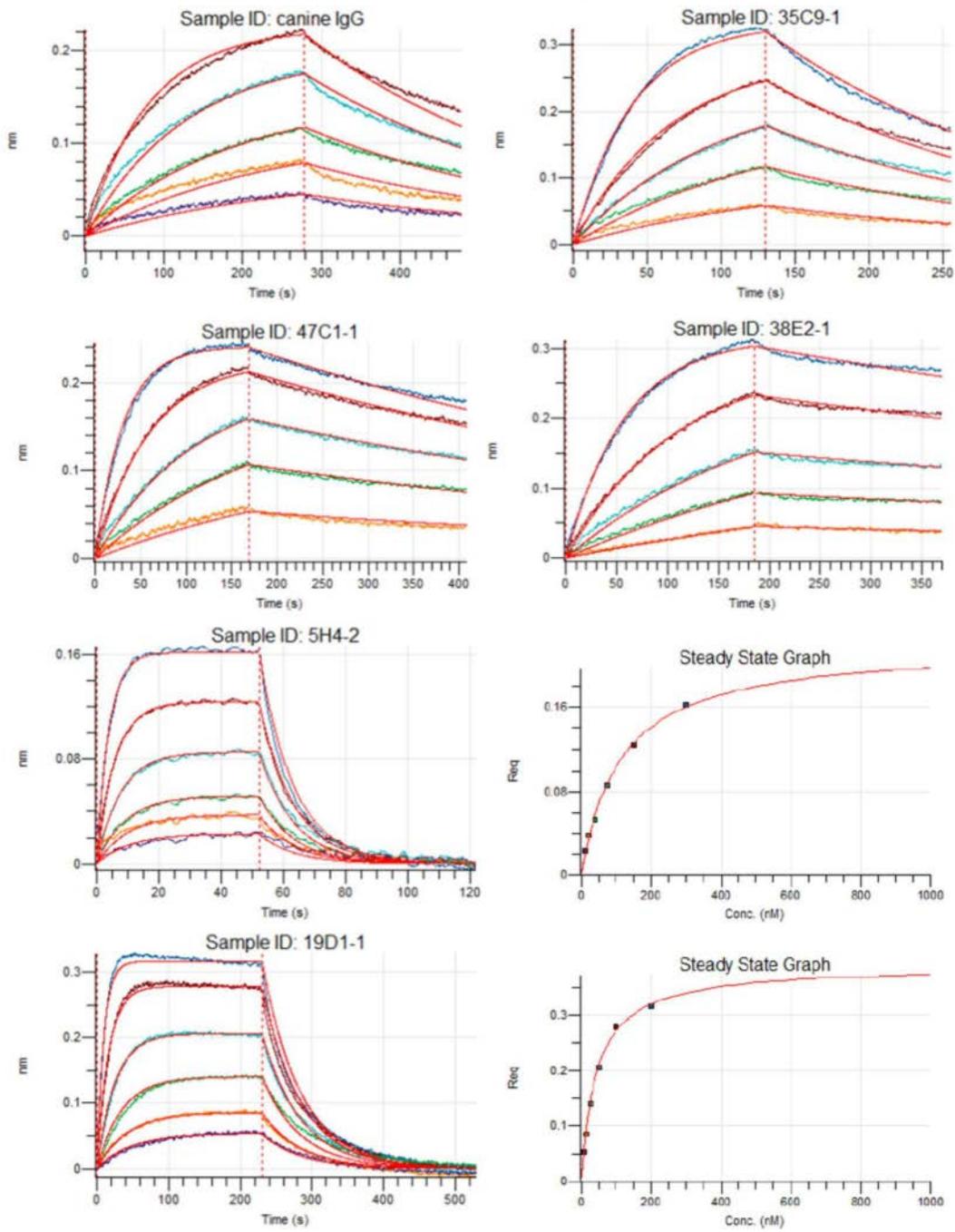


图5

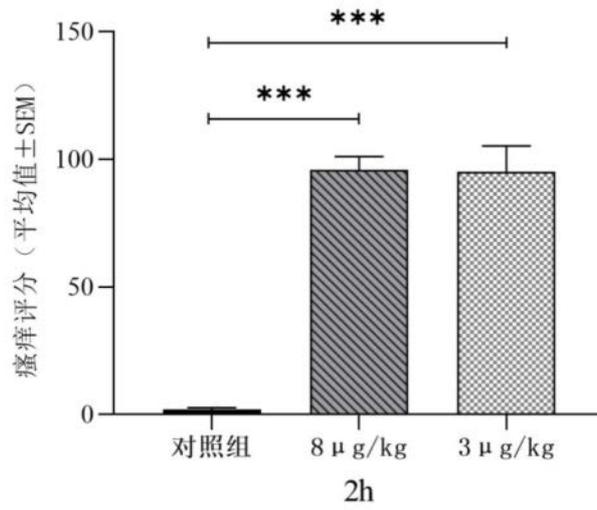


图6

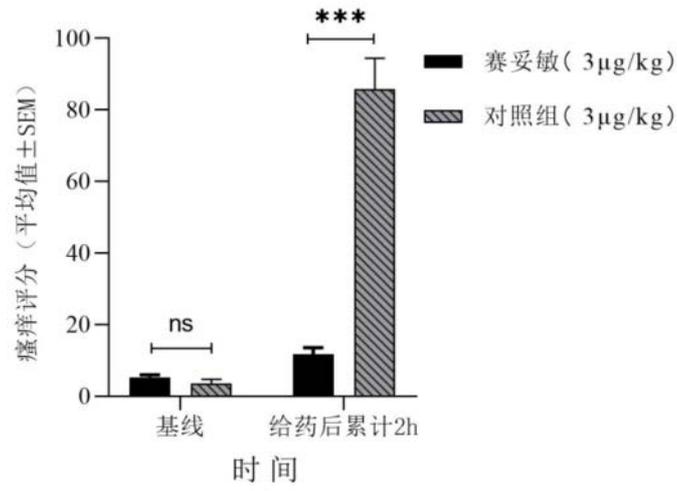


图7

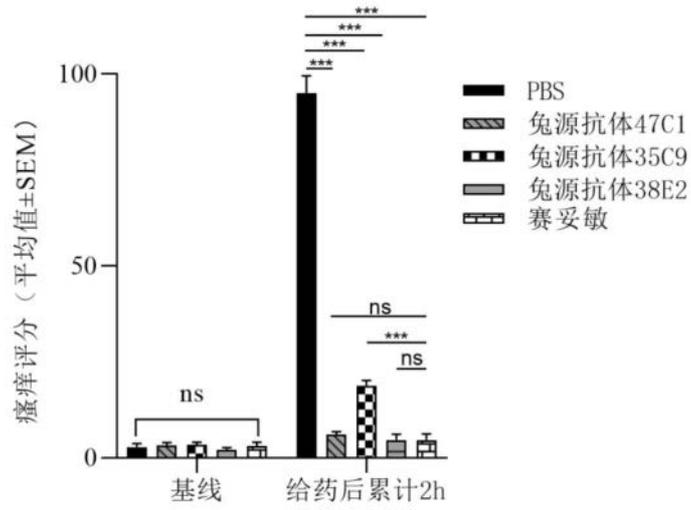


图8

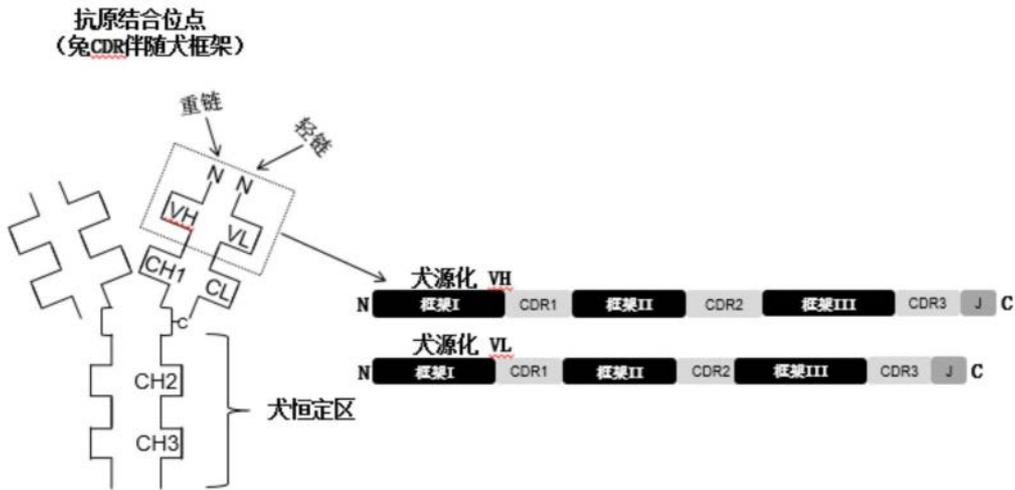


图9

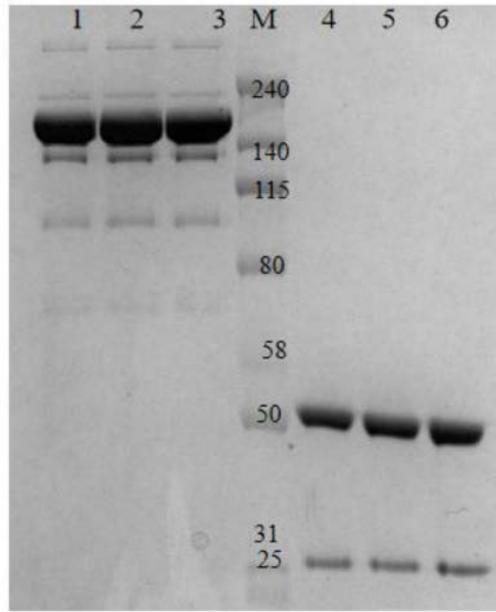


图10

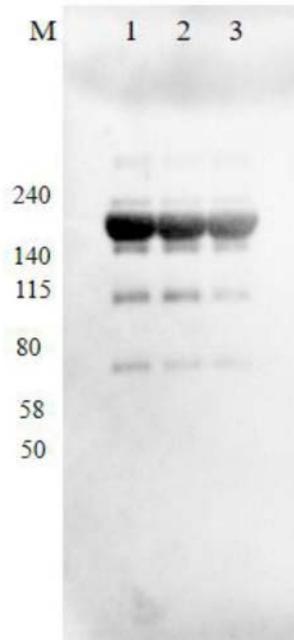


图11

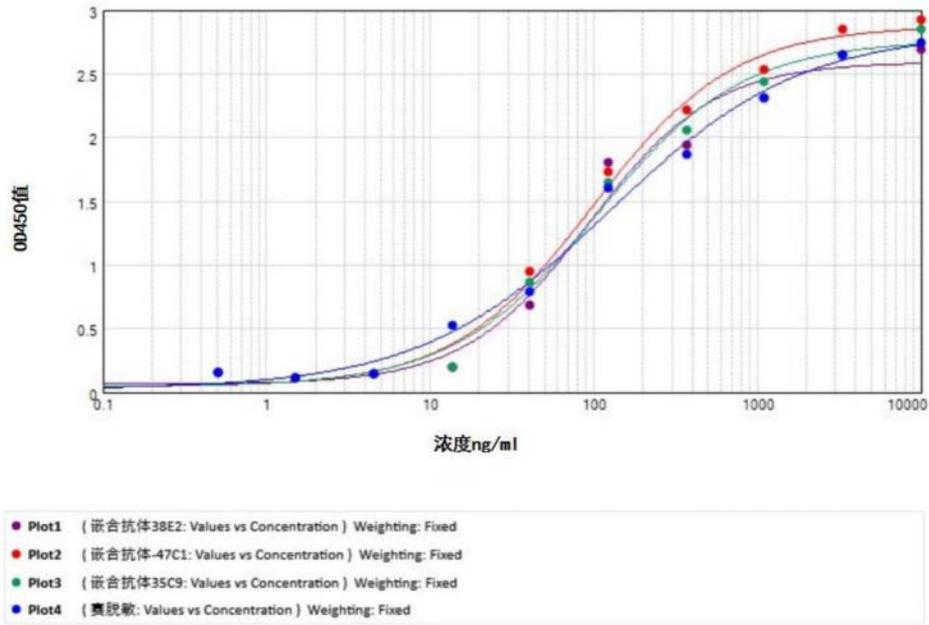


图12

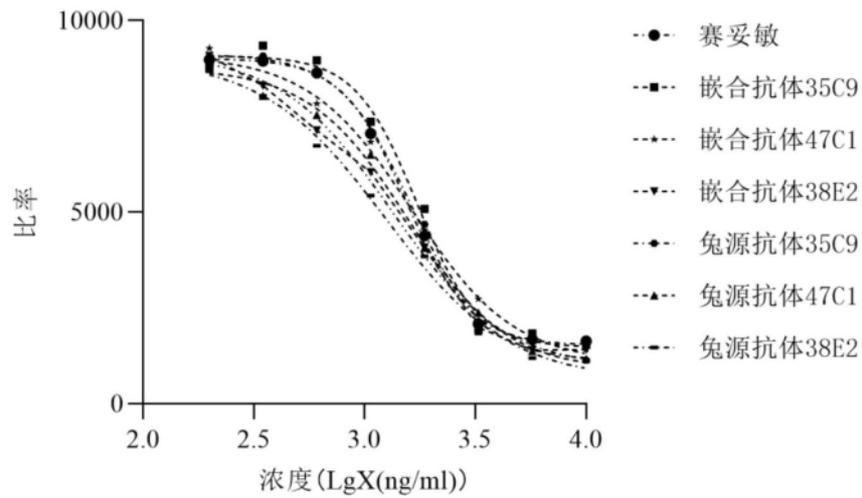


图13

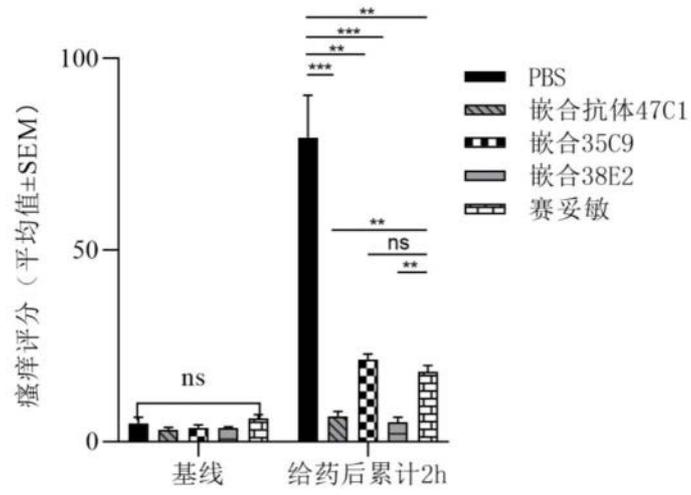


图14

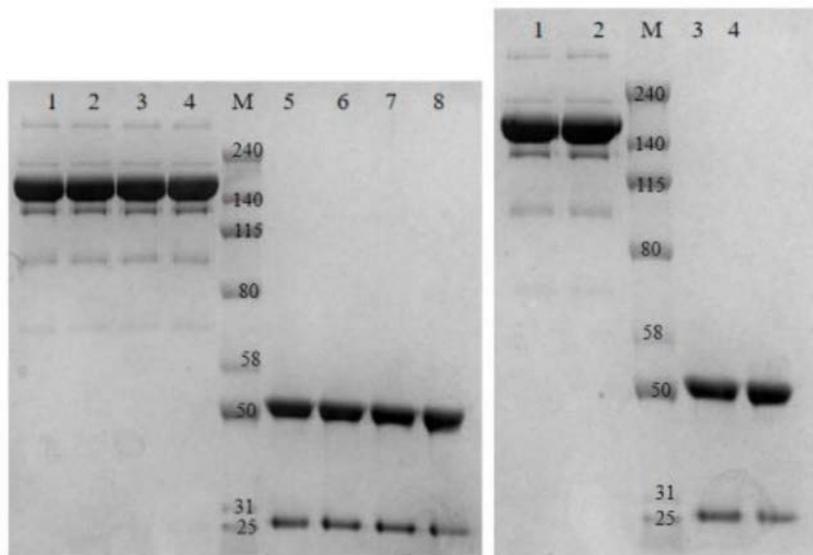


图15

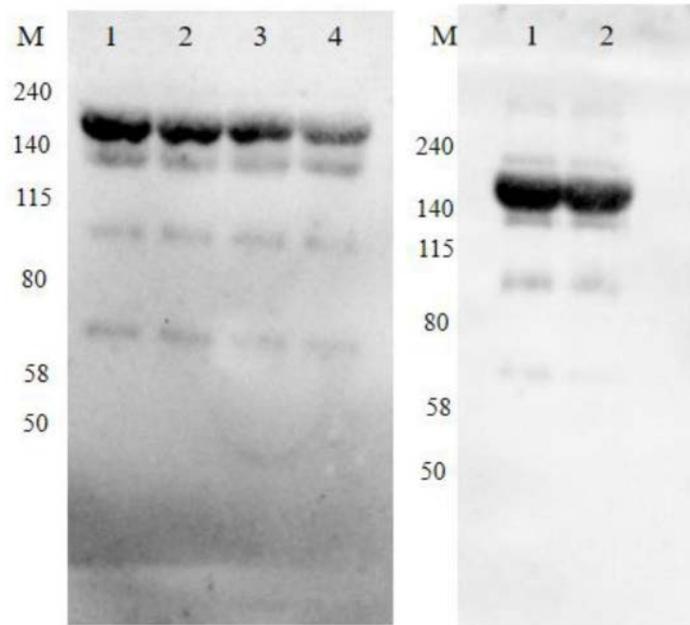
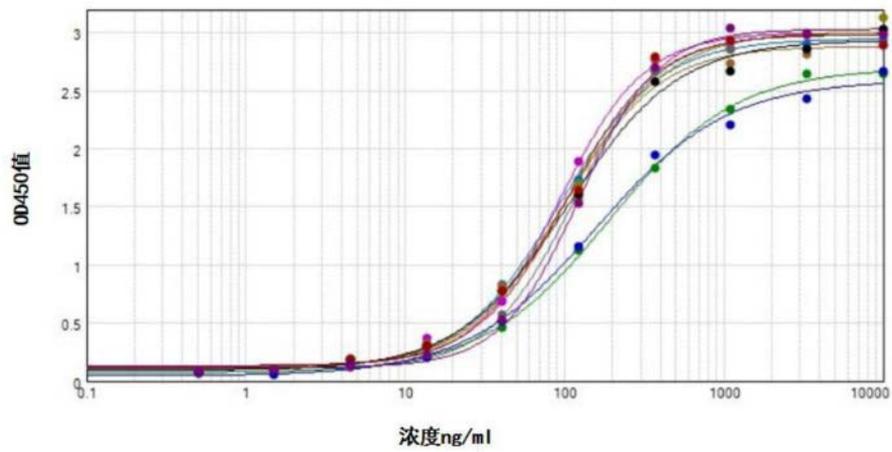


图16



- 1 (嵌合抗体38E2: Values vs Concentration) Weighting: Fixed
- 2 (犬源化抗体38E2-H3H3: Values vs Concentration) Weighting: Fixed
- 3 (犬源化抗体38E2-H3H2: Values vs Concentration) Weighting: Fixed
- 4 (嵌合抗体47C1: Values vs Concentration) Weighting: Fixed
- 5 (犬源化抗体47C1-H3L3: Values vs Concentration) Weighting: Fixed
- 6 (犬源化抗体47C1-H2L2: Values vs Concentration) Weighting: Fixed
- 7 (嵌合抗体35C9: Values vs Concentration) Weighting: Fixed
- 8 (犬源化抗体35C9-H1L1@MCY2: Values vs Concentration) Weighting: Fixed
- 9 (犬源化抗体35C9-H1L2@MCY2: Values vs Concentration) Weighting: Fixed
- 10 (赛妥敏: Values vs Concentration) Weighting: Fixed

图17

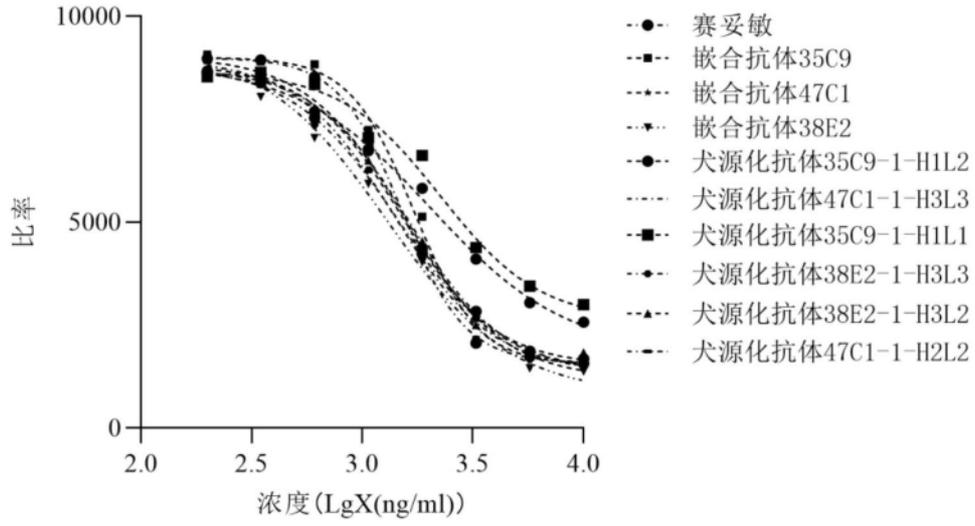


图18

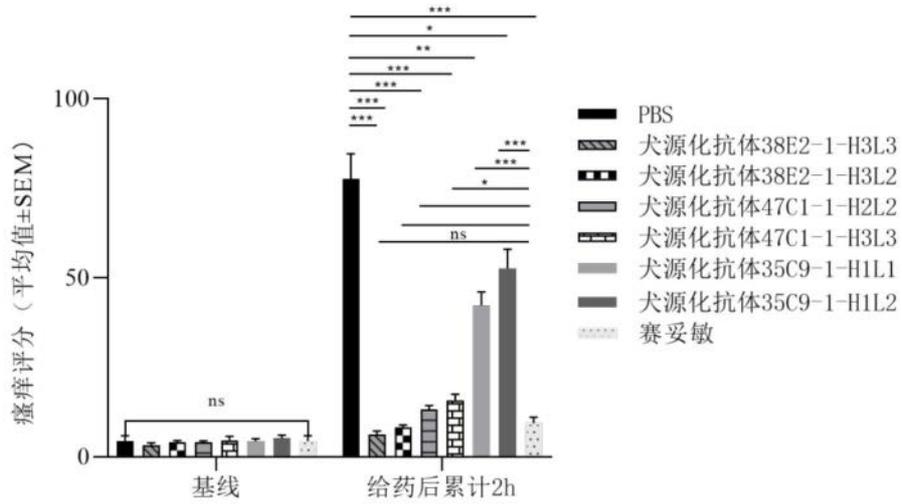


图19

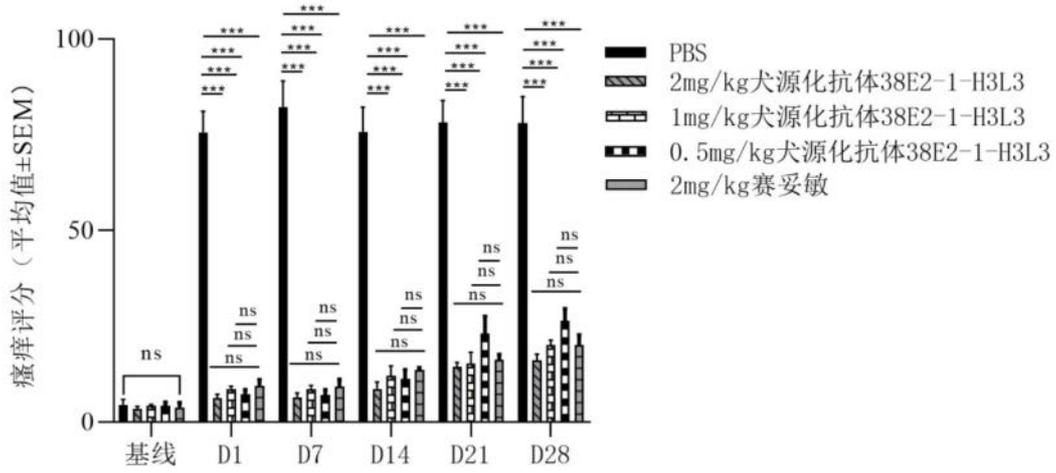


图20

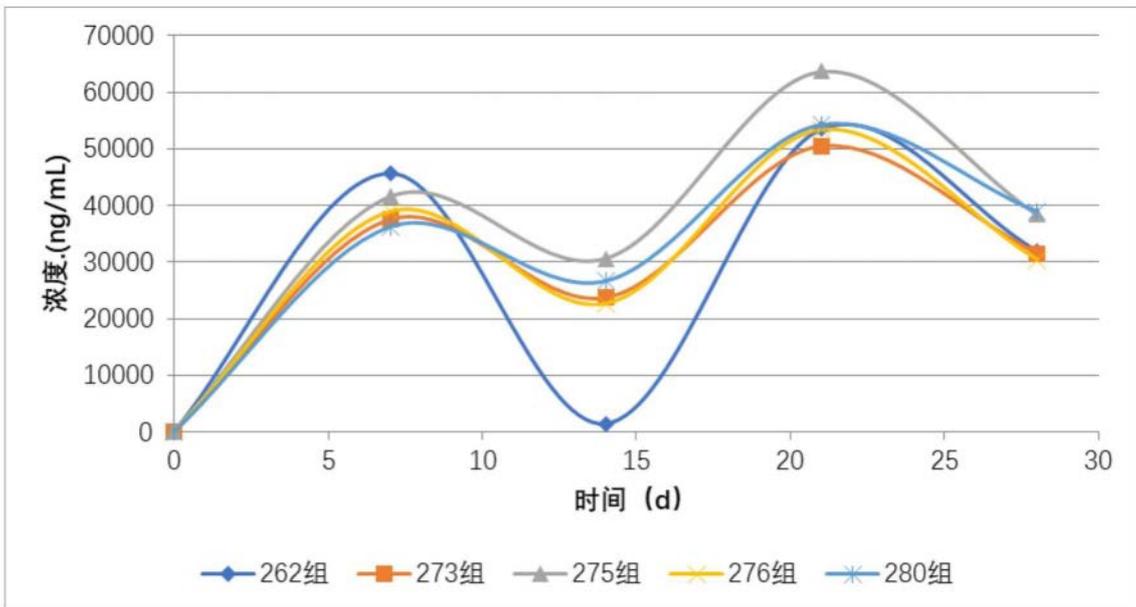


图21