



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114096562 A

(43) 申请公布日 2022. 02. 25

(21) 申请号 202080048851.7

(22) 申请日 2020.05.14

(30) 优先权数据

2019-092472 2019.05.15 JP

2019-155042 2019.08.27 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.12.31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2020/019177 2020.05.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/230834 EN 2020.11.19

(71) 申请人 中外制药株式会社

地址 日本国东京都

(72) 发明人 古贺光

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

代理人 柴云峰 张莹

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

权利要求书2页 说明书64页
序列表17页 附图3页

(54) 发明名称

抗原结合分子、药物组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供了抗原结合分子,所述抗原结合分子与C1s结合并且包含重链可变区、轻链可变区和Fc区,其中(i)所述重链可变区和/或所述轻链可变区包含至少一个氨基酸,其中与第一参考抗体相比,所述至少一个氨基酸可以增加酸性pH范围内所述抗原结合分子与C1s的KD值与中性pH范围内所述抗原结合分子与C1s的KD值的比KD(酸性pH范围)/KD(中性pH范围);(ii)所述Fc区包含至少一个氨基酸,其中与第二参考抗体相比,所述至少一个氨基酸可以增加酸性pH范围内所述抗原结合分子与FcRn的结合能力;和(iii)所述Fc区包含至少一个氨基酸,其中与第二参考抗体相比,所述至少一个氨基酸可以增加中性pH范围内所述抗原结合分子与Fc γ 受体的结合能力。

1. 一种抗原结合分子,其中所述抗原结合分子与C1s结合并且包含重链可变区、轻链可变区和Fc区,其中

(i) 所述重链可变区和/或所述轻链可变区包含至少一个氨基酸,其中与包含两个重链可变区和两个轻链可变区的第一参考抗体相比,所述至少一个氨基酸能够增加酸性pH范围内所述抗原结合分子与C1s的KD值与中性pH范围内所述抗原结合分子与C1s的KD值的比, $KD(\text{酸性pH范围})/KD(\text{中性pH范围})$,其中所述第一参考抗体中的重链可变区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列并且所述第一参考抗体中的轻链可变区包含SEQ ID NO:13氨基酸序列;

(ii) 所述Fc区包含至少一个氨基酸,其中与包含配对Fc区的第二参考抗体相比,所述至少一个氨基酸能够增加酸性pH范围内所述抗原结合分子与FcRn的结合能力,其中所述第二参考抗体中的Fc区包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;和

(iii) 所述Fc区包含至少一个氨基酸,其中与所述第二参考抗体相比,所述至少一个氨基酸能够增加中性pH范围内所述抗原结合分子与Fc γ 受体的结合能力。

2. 根据权利要求1所述的抗原结合分子,其中所述重链可变区和所述轻链可变区包含与所述第一参考抗体相比,能够增加所述抗原结合分子的稳定性的至少一个氨基酸。

3. 根据权利要求1或2所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含恒定区,其中所述抗原结合分子的Fc区在所述恒定区中并且所述恒定区包含能够降低所述抗原结合分子的免疫原性的至少一个氨基酸。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子的Fc区包含能够降低对类风湿因子的结合活性的至少一个氨基酸。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的抗原结合分子,其中(i)中的可变区包含以下氨基酸中的至少一种;

重链可变区第27位的组氨酸,
重链可变区第59位的脯氨酸和
轻链可变区第96位的组氨酸

(所有编号均根据Kabat编号系统)。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的抗原结合分子,其中(ii)中的Fc区包含选自由第428位的亮氨酸、第434位的丙氨酸和第436位的苏氨酸组成的组的至少一个氨基酸(所有编号均根据EU编号系统)。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的抗原结合分子,其中(iii)中的Fc区包含以下氨基酸中的至少一种;

第234位的酪氨酸,
第235位的色氨酸,
第236位的天冬酰胺,
第238位的天冬氨酸,
第250位的缬氨酸,
第264位的异亮氨酸,
第268位的天冬氨酸,
第295位的亮氨酸,
第307位的脯氨酸,

第326位的苏氨酸和

第330位的赖氨酸

(所有编号均根据EU编号系统)。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的抗原结合分子,其中(iii)中的Fc区包含以下(a)或(b)的氨基酸;

(a) 第235位的色氨酸、第236位的天冬酰胺、第268位的天冬氨酸、第295位的亮氨酸、第326位的苏氨酸和第330位的赖氨酸,或

(b) 第234位的酪氨酸、第238位的天冬氨酸、第250位的缬氨酸、第264位的异亮氨酸、第307位的脯氨酸和第330位的赖氨酸

(所有编号均根据EU编号系统)。

9. 根据权利要求2所述的抗原结合分子,其中能够增加稳定性的所述至少一个氨基酸是重链可变区第96位的丙氨酸和轻链可变区第53位的谷氨酸(两者编号均根据Kabat编号系统)中的一者或两者。

10. 根据权利要求3所述的抗原结合分子,其中能够降低免疫原性的所述至少一个氨基酸是根据EU编号系统第214位的精氨酸。

11. 根据权利要求4所述的抗原结合分子,其中能够降低对类风湿因子的结合活性的所述至少一个氨基酸是第438位的精氨酸和第440位的谷氨酸(两者编号均根据EU编号系统)中的一者或两者。

12. 一种抗原结合分子,所述抗原结合分子与抗体竞争结合C1s,所述抗体包含:包含SEQ ID NO:20的HVR-H1、SEQ ID NO:21的HVR-H2、SEQ ID NO:22的HVR-H3的重链可变区,和包含SEQ ID NO:23的HVR-L1、SEQ ID NO:24的HVR-L2、SEQ ID NO:25的HVR-L3的轻链可变区。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的抗原结合分子,其中所述重链可变区和所述轻链可变区包含人源框架。

14. 一种抗原结合分子,其包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列包含95%同一性的VH区和与SEQ ID NO:19的氨基酸序列包含95%同一性的VL区中的一者或两者。

15. 一种抗原结合分子,其包含:包含SEQ ID NO:20的HVR-H1、SEQ ID NO:21的HVR-H2、SEQ ID NO:22的HVR-H3的重链可变区,和包含SEQ ID NO:23的HVR-L1、SEQ ID NO:24的HVR-L2、SEQ ID NO:25的HVR-L3的轻链可变区中的一者或两者。

抗原结合分子、药物组合物和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及抗原结合分子、药物组合物和方法。

背景技术

[0002] 补体系统包含约25-30种补体蛋白，它们在宿主防御病原体、外来抗原和肿瘤细胞中起关键作用。补体系统还参与通过清除机体的免疫复合物和凋亡细胞来维持体内稳态。补体组分通过在酶促过程和膜结合事件的一系列级联中相互作用来发挥这些功能。这些过程的最终结果是产生具有裂解、免疫调节和调理功能的产物。

[0003] 众所周知，补体系统可以分为三种不同的途径：经典途径、凝集素途径和旁路途径。尽管每种途径的起始不同，但所有三种途径均集中并共享相同末端补体组分(C5至C9)，其最终负责破坏靶细胞。

[0004] C1复合物是大蛋白复合物，它具有作为经典途径级联的关键引发剂的作用。C1复合物由三种组分(C1q、C1r和C1s)组成，这三种组分的摩尔比分别为1:2:2(非专利文献1)。当C1复合物与结合抗体的靶标结合时，则启动经典途径。C1q具有6个球状头，通过与Fc区的亲和力相互作用介导C1复合物与抗体的结合。一旦与靶标紧密结合，C1复合物中的C1r则自动激活并变得具有酶促活性。然后，激活的C1r切割并激活C1复合物中的酶原C1s(非专利文献2)。随后，激活的C1s将其底物补体组分C2和C4分别切割成C2a/C2b和C4a/C4b片段。这导致C4b2a(C3转化酶)在靶标表面组装，其切割C3形成C3b。C3b依次切割C5以启动末端膜攻击复合物C5b、C6、C7、C8和C9的形成，其经由孔形成裂解靶标。

[0005] C1s以钙依赖性方式形成同型二聚体(非专利文献3)。据报道，在1mM钙离子浓度下，C1s的大部分呈二聚体状态，而在1nM钙离子浓度下，其主要呈单体状态(非专利文献4)。在循环中，C1s和C1r大部分结合在一起作为钙依赖性C1r₂s₂异四聚体，其反过来以1:1的比例与C1q可逆结合以形成C1复合物。在钙不存在或低浓度的情况下，C1r₂s₂四聚体解离成一个C1r二聚体和两个C1s单体(非专利文献5)。C1s是79kDa糖蛋白，其质量的5%至6%可归因于糖基化(非专利文献6)。血清中的C1s浓度报道为约55μg/mL(0.7μM)(非专利文献7)。

[0006] 虽然功能正常的补体系统可以使宿主抵御病原体，但经典途径的失调或不适当激活导致各种补体介导的病症，例如但不限于，自身免疫性溶血性贫血(AIHA)、贝切特氏病、大疱性天疱疮(BP)、免疫性血小板减少性紫癜(ITP)等。因此，抑制经典途径的过度或不受控激活可以为患有此类病症的患者提供临床获益。

[0007] 抗体是极具吸引力的药物，因为它们在血浆中稳定，对其靶标具有高特异性，并且通常表现出良好的药代动力学特征。然而，由于它们的分子尺寸大，治疗性抗体的剂量通常很高。在靶标以高丰度存在的情况下，所需的抗体治疗剂量甚至更高。因此，改善抗体药代动力学、药效学和抗原结合特性的方法是减少与治疗性抗体相关的剂量和高生产成本的有吸引力方法。

[0008] 一些先前报道描述了抗C1s抗体。例如，Matsumoto等人(1986)(非专利文献8)描述了与C1上不同表位结合的三种抗体。一个克隆对C1s的活性形式表现出优先结合，而其他两

个与酶原和活性C1s结合。在这两个克隆中,仅有一个能够抑制C1s对C2和C4的切割。专利文献1描述了抑制C1s介导的C4切割而非C2切割的抗体。此外,专利文献2描述了与C1s上的构象表位结合的几种抗体,与其酶原形式相比,对活性C1s具有选择性。专利文献3描述了能够阻断C4切割的抗C1s抗体的两个克隆。

[0009] 抗体对其抗原的亲合力决定了抗体中和其靶标的效率。各种亲合力成熟方法(非专利文献9)用于增加抗体亲合力以减少治疗效果所需的剂量。然而,局限性在于一个抗体分子通常具有两个结合位点,因此在施用后仅中和两个靶标(每个结合位点一个抗原)。即使抗体可以通过共价相互作用以无限亲合力结合靶标,抗体中和的最大靶标数的上限仍保持在两个。

[0010] 已有报道表明以pH依赖性方式结合抗原的抗体(以下也称为“pH依赖性抗体”或“pH依赖性结合抗体”)使单个抗体分子能够中和多个抗原分子(非专利文献10、专利文献4)。在血浆中的中性pH条件下pH依赖性抗体与其抗原强结合,但在细胞内体内的酸性pH条件下与抗原解离。一旦与抗原解离,抗体被FcRn受体再循环回血浆,而解离的抗原在细胞的溶酶体中降解。然后,再循环的抗体可以再次自由结合并中和抗原分子,只要抗体保持在循环中,该过程继续重复。

[0011] 引用列表

[0012] 专利文献

[0013] [PTL 1]W02014/071206

[0014] [PTL 2]W02014/066744

[0015] [PTL 3]W02014/186599

[0016] [PTL 4]W02009/125825

[0017] 非专利文献

[0018] [NPL 1]Wang等人Mol Cell.2016Jul 7;63(1):135-45

[0019] [NPL 2]Mortensen等人Proc Natl Acad Sci U S A.2017Jan 31;114(5):986-991

[0020] [NPL 3]Arlaud等人Biochim Biophys Acta,1980Nov 6;616(1):105-15

[0021] [NPL 4]Rivas等人Biochemistry.1992Dec 1;31(47):11707-12

[0022] [NPL 5]Rossi等人Methods Mol Biol.2014;1100:43-60

[0023] [NPL 6]Petillot等人FEBS Lett.1995Jan 30;358(3):323-8

[0024] [NPL 7]Shi等人Blood.2014Jun 26;123(26):4015-22

[0025] [NPL 8]Matsumoto等人J Immunol.1986Nov 1;137(9):2907-12

[0026] [NPL 9]Kim等人Methods Mol Biol.2014;1131:407-20

[0027] [NPL 10]Igawa等人Nat Biotechnol.2010Nov;28(11):1203-7

发明内容

[0028] 技术问题

[0029] 本发明提供了抗原结合分子、药物组合物和方法。

[0030] 问题的解决方案

[0031] 本发明提供了抗原结合分子,所述抗原结合分子与C1s结合并且包含重链可变区、

轻链可变区和Fc区。重链可变区和/或轻链可变区至少包含可以以特定方式改变抗原结合能力的特定氨基酸。Fc区至少包含可以以特定方式改变其功能的特定氨基酸。

[0032] 具体地,本发明涉及:

[0033] [1]一种抗原结合分子,所述抗原结合分子与C1s结合并且包含重链可变区、轻链可变区和Fc区,其中

[0034] (i)所述重链可变区和/或所述轻链可变区包含至少一个氨基酸,其中与包含两个重链可变区和两个轻链可变区的第一参考抗体相比,所述至少一个氨基酸能够增加酸性pH范围内所述抗原结合分子与C1s的KD值与中性pH范围内所述抗原结合分子与C1s的KD值的比, KD(酸性pH范围)/KD(中性pH范围),其中所述第一参考抗体中的重链可变区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列并且所述第一参考抗体中的轻链可变区包含SEQ ID NO:13氨基酸序列;

[0035] (ii)所述Fc区包含至少一个氨基酸,其中与包含配对Fc区的第二参考抗体相比,所述至少一个氨基酸能够增加酸性pH范围内所述抗原结合分子与FcRn的结合能力,其中所述第二参考抗体中的Fc区包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;和

[0036] (iii)所述Fc区包含至少一个氨基酸,其中与所述第二参考抗体相比,所述至少一个氨基酸能够增加中性pH范围内所述抗原结合分子与Fc γ 受体的结合能力。

[0037] [2][1]的抗原结合分子,其中所述重链可变区和所述轻链可变区包含与所述第一参考抗体相比,能够增加所述抗原结合分子的稳定性的至少一个氨基酸。

[0038] [3][1]或[2]的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含恒定区,其中所述抗原结合分子的Fc区在所述恒定区中并且所述恒定区包含能够降低所述抗原结合分子的免疫原性的至少一个氨基酸。

[0039] [4][1]至[3]中任一项的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子的Fc区包含能够降低对类风湿因子的结合活性的至少一个氨基酸。

[0040] [5][1]至[4]中任一项的抗原结合分子,其中(i)中的可变区包含以下氨基酸中的至少一种;

[0041] 重链可变区第27位的组氨酸,

[0042] 重链可变区第59位的脯氨酸和

[0043] 轻链可变区第96位的组氨酸

[0044] (所有编号均根据Kabat编号系统)。

[0045] [6][1]至[5]中任一项的抗原结合分子,其中(ii)中的Fc区包含选自由第428位的亮氨酸、第434位的丙氨酸和第436位的苏氨酸组成的组的至少一个氨基酸(所有编号均根据EU编号系统)。

[0046] [7][1]至[6]中任一项的抗原结合分子,其中(iii)中的Fc区包含以下氨基酸中的至少一种;

[0047] 第234位的酪氨酸,

[0048] 第235位的色氨酸,

[0049] 第236位的天冬酰胺,

[0050] 第238位的天冬氨酸,

[0051] 第250位的缬氨酸,

- [0052] 第264位的异亮氨酸，
- [0053] 第268位的天冬氨酸，
- [0054] 第295位的亮氨酸，
- [0055] 第307位的脯氨酸，
- [0056] 第326位的苏氨酸和
- [0057] 第330位的赖氨酸
- [0058] (所有编号均根据EU编号系统)。
- [0059] [8][1]-[7]中任一项的抗原结合分子，其中(iii)中的Fc区包含以下(a)或(b)的氨基酸：
- [0060] (a) 第235位的色氨酸、第236位的天冬酰胺、第268位的天冬氨酸、第295位的亮氨酸、第326位的苏氨酸和第330位的赖氨酸，或
- [0061] (b) 第234位的酪氨酸、第238位的天冬氨酸、第250位的缬氨酸、第264位的异亮氨酸、第307位的脯氨酸和第330位的赖氨酸
- [0062] (所有编号均根据EU编号系统)。
- [0063] [9][2]的抗原结合分子，其中能够增加稳定性的所述至少一个氨基酸是重链可变区第96位的丙氨酸和轻链可变区第53位的谷氨酸(两者编号均根据Kabat编号系统)中的一者或两者。
- [0064] [10][3]的抗原结合分子，其中能够降低免疫原性的所述至少一个氨基酸是根据EU编号系统第214位的精氨酸。
- [0065] [11][4]的抗原结合分子，其中能够降低对类风湿因子的结合活性的所述至少一个氨基酸是第438位的精氨酸和第440位的谷氨酸(两者编号均根据EU编号系统)中的一者或两者。
- [0066] [12]一种抗原结合分子，所述抗原结合分子与抗体竞争结合C1s，所述抗体包含：包含SEQ ID NO:20的HVR-H1、SEQ ID NO:21的HVR-H2、SEQ ID NO:22的HVR-H3的重链可变区，和包含SEQ ID NO:23的HVR-L1、SEQ ID NO:24的HVR-L2、SEQ ID NO:25的HVR-L3的轻链可变区。
- [0067] [13][1]至[12]中任一项的抗原结合分子，其中所述重链可变区和所述轻链可变区包含人源框架。
- [0068] [14]一种抗原结合分子，其包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列包含95%同一性的VH区和与SEQ ID NO:19的氨基酸序列包含95%同一性的VL区中的一者或两者。
- [0069] [15]一种抗原结合分子，其包含：包含SEQ ID NO:20的HVR-H1、SEQ ID NO:21的HVR-H2、SEQ ID NO:22的HVR-H3的重链可变区，和包含SEQ ID NO:23的HVR-L1、SEQ ID NO:24的HVR-L2、SEQ ID NO:25的HVR-L3的轻链可变区中的一者或两者。
- [0070] [16]一种与C1s结合的抗原结合分子，其不相对于C1s竞争结合C1q。
- [0071] [17][16]的抗原结合分子，其为[1]至[15]中任一项的抗原结合分子。
- [0072] [18]一种抗原结合分子，其表位位于C1s的CCP-SP结构域内。
- [0073] [19]权利要求[18]的抗原结合分子，其为[1]至[17]中任一项的抗原结合分子。
- [0074] [20]一种与C1s结合的抗原结合分子，其能够将个体的血浆C1q浓度降低至个体基线的20%或更低。

- [0075] [21][20]的抗原结合分子,其为[1]至[19]中任一项的抗原结合分子。
- [0076] [22][20]或[21]的抗原结合分子,所述个体为食蟹猴。
- [0077] [23][20]至[22]中任一项的抗原结合分子,所述抗原结合分子的剂量为10mg/kg。
- [0078] [24]一种药物组合物,所述药物组合物包含[1]至[23]中任一项的抗原结合分子和药学上可接受的运载体。
- [0079] [25][24]的药物组合物,其用于治疗患有补体介导的疾病或病症的个体。
- [0080] [26]一种用于将C1s或C1q摄取至细胞的方法,其中将所述C1s和所述细胞在等渗溶液中混合,所述细胞表达Fc γ 受体,并且所述方法包括将[1]至[23]中任一项的抗原结合分子加入所述等渗溶液中。
- [0081] [27]一种用于降低个体中血浆C1s和/或C1q浓度的方法,包括向所述个体施用[1]至[23]中任一项的抗原结合分子。
- [0082] [28]一种治疗患有补体介导的疾病或病症的个体的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的[1]至[23]中任一项的抗原结合分子。

附图说明

- [0083] [图1]图1示出了显示COS0098bb与人C1r2s2和食蟹猴C1r2s2的相互作用以评估pH依赖性以及对食蟹猴和人C1r2s2的交叉反应性(如实施例4.1中所述)的BIAcore(注册商标)传感图。通过在固定有COS0098bb的传感器表面上分别注射人C1r2s2(实线)、食蟹猴C1r2s2(虚线)获得传感图。允许抗体/抗原复合物在pH7.4下解离,随后在pH5.8下进一步解离(条件用箭头指出)以评估pH依赖性相互作用。
- [0084] [图2]图2示出了显示COS0098pHv1与人C1r2s2和食蟹猴C1r2s2的相互作用以评估pH依赖性和针对食蟹猴和人C1r2s2的交叉反应性(如实施例4.1中所述)的BIAcore(注册商标)传感图。通过在固定有COS0098pHv1的传感器表面上分别注射人C1r2s2(实线)、食蟹猴C1r2s2(虚线)获得传感图。允许抗体/抗原复合物在pH7.4下解离,随后在pH5.8下进一步解离(条件用箭头指出)以评估pH依赖性相互作用。
- [0085] [图3]图3是显示通过COS0098pHv1-SG1077消除血浆C1s(实施例5)的图。
- [0086] [图4]图4是显示通过COS0098pHv1-SG1077消除血浆C1q(实施例5)的图。

具体实施方式

[0087] 本文描述或引用的技术和程序通常被本领域技术人员充分理解并使用常规方法学普遍采用,例如,Sambrook等人,分子克隆:实验室手册第3版(2001)冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约州;现代分子生物学方法(F.M.Ausubel,等人编辑(2003));酶学方法系列(Academic Press, Inc.):PCR 2:实用方法(M.J.MacPherson, B.D.Hames和G.R.Taylor编辑(1995)), Harlow和Lane,编辑(1988)抗体、实验室手册和动物细胞培养(R.I.Freshney,编辑(1987));寡核苷酸合成(M.J.Gait,编辑,1984);分子生物学方法, Humana出版社;细胞生物学:实验室记录(J.E.Cellis,编辑,1998)学术出版社;动物细胞培养(R.I.Freshney),编辑,1987);细胞和组织培养简介(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998) Plenum Press;细胞和组织培养:实验室程序(A.Doyle, J.B.Griffiths和D.G.Newell,编辑,1993-8) J.Wiley和Sons;实验免疫学手册(D.M.Weir和C.C.Blackwell,编辑);哺乳动物细胞基因转移载体

(J.M.Miller和M.P.Calos,编辑,1987);PCR:聚合酶链反应,(Mullis等人,编辑,1994);当代免疫学方法(J.E.Coligan等人,编辑,1991);分子生物学简论(Wiley和Sons,1999);免疫生物学(C.A.Janeway和P.Travers,1997);抗体(P.Finch,1997);抗体:实用方法(D.Catty.,编辑,IRL Press,1988-1989);单克隆抗体:实用方法(P.Shepherd和C.Dean,编辑,牛津大学出版社,2000);使用抗体:实验室手册(E.Harlow和D.Lane(冷泉港实验室出版社,1999);抗体(M.Zanetti和J.D.Capra,编辑,Harwood学术出版社,1995);以及癌症:肿瘤学的原理和实践(V.T.DeVita等人,编辑,J.B.Lippincott公司,1993)中描述的广泛利用的方法学。

[0088] I. 定义

[0089] 除非另有定义,否则本文使用的技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同.Singleton等人,微生物学和分子生物学词典第2版,J.Wiley&Sons(纽约州,纽约市1994),和March,高级有机化学反应、机制和结构第4版,John Wiley&Sons(纽约州,纽约市1992),为本领域技术人员提供了本申请中使用的许多术语的一般指南。本文引用的所有参考文献(包括专利申请和出版物)均通过引用以其全文并入。

[0090] 出于解释本说明书的目的,将应用以下定义,并且只要合适,以单数形式使用的术语还将包括复数形式,反之亦然。应当理解,本文所使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并不旨在进行限制。如果下面列出的任何定义与通过引用并入本文的任何文件冲突,则以下面列出的定义为准。

[0091] 用于本文目的的“受体人框架”是包含源自人免疫球蛋白框架或人共有框架的轻链可变结构域(VL)框架或重链可变结构域(VH)框架的氨基酸序列的框架,如下定义。“源自”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可以包含其相同的氨基酸序列,或者它可以含有氨基酸序列变化。在一些实施方案中,氨基酸变化的数量是10个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、或2个或更少。在一些实施方案中,VL受体人框架在序列上与VL人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列相同。

[0092] “亲和力”是指分子(例如,抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用总和的强度。除非另有说明,如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如,抗体和抗原)之间的1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以用解离常数(K_d或KD)表示。亲和力可以通过本领域已知的常用方法测量,包括本文所述的那些。下面描述了用于测量结合亲和力的具体说明性和示例性实施方案。术语“结合活性”是指分子(例如,抗体)的单个或多个结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用总和的强度。因此,结合活性并不严格限于反映结合对成员(例如,抗体和抗原)之间1:1相互作用的活性。当结合对的成员可以以单价和多价结合的方式相互结合时,结合活性是这些结合总和的强度。分子X与其配偶体Y的结合活性通常可以用解离常数(KD)表示。可选地,缔合速率和解离速率(K_{on}和K_{off})可用于评估结合。结合活性可以通过本领域已知的常用方法测量,包括本文所述的方法。下面描述了用于测量结合亲和力的具体说明性和示例性实施方案。

[0093] “亲和力成熟的”抗体是指与不具有此类改变(此类改变导致抗体对抗原的亲和力提高)的亲本抗体相比,在一个或多个高变区(HVR)中具有一个或多个改变的抗体。

[0094] 术语“抗C1s抗体”和“结合C1s的抗体”是指能够以足够的亲和力结合C1s的抗体,使得该抗体可用作靶向C1s的诊断剂和/或治疗剂。在一个实施方案中,抗C1s抗体与无关的非C1s蛋白的结合程度小于抗体与C1s结合的约10%,如例如通过放射免疫测定法(RIA)所测量的。在某些实施方案中,与C1s结合的抗体的解离常数(Kd)为1 μ M或更小、100nM或更小、10nM或更小、1nM或更小、0.1nM或更小、0.01nM或更小、或0.001nM或更小(例如,10⁻⁸M或更小,例如10⁻⁸M至10⁻¹³M,例如10⁻⁹M至10⁻¹³M)。在某些实施方案中,抗C1s抗体与在来自不同物种的C1s之间保守的C1s表位结合。

[0095] 本文中的术语“抗体”以最广泛的含义使用并涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出期望的抗原-结合活性即可。

[0096] “抗体片段”是指完整抗体除外但包含与完整抗体所结合的抗原结合的完整抗体一部分的分子。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0097] 与参考抗体“结合相同表位的抗体”是指在竞争测定中阻断参考抗体与其抗原的结合50%或更多的抗体,以及相反,在竞争测定中参考抗体阻断该抗体与其抗原的结合50%或更多。本文提供了示例性竞争测定。

[0098] 术语“嵌合”抗体是指重链和/或轻链的一部分源自特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分源自不同来源或物种的抗体。

[0099] 抗体的“类别”是指其重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。有五种主要的抗体类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且其中一些可以进一步分为亚类(同种型),例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。对应于不同类别免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0100] 如本文所用,术语“细胞毒剂”是指抑制或阻止细胞功能和/或导致细胞死亡或破坏的物质。细胞毒剂包括但不限于,放射性同位素(例,²¹¹At、¹³¹I、¹²⁵I、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁵³Sm、²¹²Bi、³²P、²¹²Pb和Lu的放射性同位素);化学治疗剂或药物(例如,甲氨蝶呤、阿霉素、长春花生生物碱(长春新碱、长春碱、依托泊苷)、多柔比星、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、柔红霉素或其他嵌入剂);生长抑制剂;酶及其片段,例如核酸分解酶;抗生素;毒素,例如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素,包括其片段和/或变体;以及以下公开的各种抗肿瘤剂或抗癌剂。

[0101] “效应子功能”是指可归因于抗体Fc区的那些生物活性,其随抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;下调细胞表面受体(例如B细胞受体);以及B细胞激活。

[0102] 药剂(例如,药物制剂)的“有效量”是指在必要的剂量和时间段内实现期望的治疗或预防结果的有效量。

[0103] 术语“表位”包括能够被抗体结合的任何决定簇。表位是与靶向该抗原的抗体结合的抗原区域,并且包括直接接触抗体的特定氨基酸。表位决定簇可以包括分子的化学活性表面分组(例如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基),并且可以具有特定的三维结构特征和/或特定的电荷特征。通常,对特定靶抗原具有特异性的抗体将优先识别蛋白质和/或大分子

的复合混合物中靶抗原上的表位。

[0104] 术语“Fc区”在本文中用于定义包含恒定区的至少一部分的免疫球蛋白重链的C末端区。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区从Cys226或Pro230延伸至重链的羧基末端。然而,Fc区的C末端赖氨酸(Lys447)或甘氨酸-赖氨酸(残基446-447)可能存在,也可能不存在。除非本文另有说明,Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号根据EU编号系统,也称为EU索引,如Kabat等人,免疫学目标蛋白序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第5版公共卫生服务,国立卫生研究院,Bethesda,MD,1991中所述。

[0105] “框架”或“FR”是指高变区(HVR)残基以外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由四个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR和FR序列在VH(或VL)中通常以下面序列出现:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0106] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用,是指具有与天然抗体结构基本上相似的结构或具有包含本文定义的Fc区的重链的抗体。

[0107] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,是指已引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,包括转化的原代细胞和由其衍生的后代,不考虑传代次数。后代在核酸含量上可能与其亲本细胞不完全相同,并且可能包含突变。具有与在最初转化的细胞中筛选或选择的相同功能或生物活性的突变后代包括在本文中。

[0108] “人抗体”是具有与由人或人细胞产生的或源自利用人抗体库或其他人抗体编码序列的非人来源的抗体的氨基酸序列相对应的氨基酸序列的抗体。人抗体的这一定义特别排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0109] “人共有框架”是代表人免疫球蛋白VL或VH框架序列选择中最常见的氨基酸残基的框架。通常,人免疫球蛋白VL或VH序列的选择来自可变结构域序列的亚组。通常,序列的亚组是如Kabat等人,免疫学目标蛋白序列,第五版,NIH出版91-3242,Bethesda MD(1991),第1-3卷中的亚组。在一个实施方案中,对于VL,该亚组是如Kabat等人(同上)中的亚组κI。在一个实施方案中,对于VH,该亚组是如Kabat等人(同上)中的亚组III。

[0110] “人源化”抗体是指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体将包含基本上所有的至少一个(并且通常为两个)可变结构域,其中所有或基本上所有的HVR(例如,CDR)对应于非人抗体的HVR,以及所有或基本上所有的FR对应于人抗体的FR。人源化抗体可以任选地包含源自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指经人源化的抗体。

[0111] 如本文所用,术语“高变区”或“HVR”是指抗体可变结构域的每个区域,其在序列上是高变的(“互补决定区”或“CDR”)和/或形成结构上确定的环(“高变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触”)。通常,抗体包含六个HVR:三个在VH(H1、H2、H3)中,并且三个在VL(L1、L2、L3)中。本文的示例性HVR包括:

[0112] (a) 出现在氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)的高可变环(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987));

[0113] (b) 出现在氨基酸残基24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)的CDR(Kabat等人,免疫学目标蛋白序列,第5版公共卫生服务,国立卫生研究

院, Bethesda, MD (1991)) ;

[0114] (c) 出现在氨基酸残基27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2) 和93-101 (H3) 的抗原接触 (MacCallum等人J.Mol.Biol.262:732-745 (1996)) ; 以及

[0115] (d) (a)、(b) 和/或(c) 的组合, 包括HVR氨基酸残基46-56 (L2)、47-56 (L2)、48-56 (L2)、49-56 (L2)、26-35 (H1)、26-35b (H1)、49-65 (H2)、93-102 (H3) 和94-102 (H3)。

[0116] 除非另有说明, 可变结构域中的HVR残基和其他残基 (例如, FR残基) 在本文中根据 Kabat等人 (同上) 编号。

[0117] “免疫缀合物”是缀合至一种或多种异源分子的抗体, 包括但不限于细胞毒剂。

[0118] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于, 驯养动物 (例如, 牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类动物 (例如, 人和非人灵长类动物 (例如猴))、兔和啮齿动物 (例如, 小鼠和老鼠)。在某些实施方案中, 个体或受试者是人。

[0119] “分离的”抗体是已从其天然环境的组分中分离的抗体。在一些实施方案中, 抗体被纯化至大于95%或99%的纯度, 如例如通过电泳 (例如, SDS-PAGE、等电聚焦 (IEF)、毛细管电泳) 或色谱法 (例如, 离子交换或反相HPLC) 所确定的。有关抗体纯度评估方法的综述, 参见, 例如, Flatman等人, J.Chromatogr.B 848:79-87 (2007)。

[0120] “分离的”核酸是指已从其天然环境的组分中分离的核酸分子。分离的核酸包括在通常含有核酸分子的细胞中含有的核酸分子, 但该核酸分子存在于染色体外或存在于与其天然染色体位置不同的染色体位置。

[0121] “编码抗C1s抗体的分离核酸”是指编码抗体重链和轻链 (或其片段) 的一种或多种核酸分子, 包括单一载体或单独载体中的此类核酸分子, 以及存在于宿主细胞的一个或多个位置的此类核酸分子。

[0122] 如本文所用, 术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群中获得的抗体, 即, 除了可能的变体抗体 (例如, 含有天然发生的突变或在单克隆抗体制剂的生产过程中产生的突变, 此类变体通常以少量存在) 外, 组成该群的个体抗体相同和/或结合相同表位。与通常包括针对不同决定簇 (表位) 的不同抗体的多克隆抗体制剂相反, 单克隆抗体制剂的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此, 修饰语“单克隆”表示从基本上同质的抗体群中获得的抗体的特征, 并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如, 根据本发明待使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备, 包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法和利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法, 本文描述了用于制备单克隆抗体的此类方法和其他示例性方法。

[0123] “裸抗体”是指未缀合异源部分 (例如, 细胞毒性部分) 或放射性标记的抗体。裸抗体可以存在于药物制剂中。

[0124] “天然抗体”是指具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如, 天然IgG抗体是约150,000道尔顿的异源四聚体糖蛋白, 由二硫键连接的两条相同的轻链和两条相同的重链组成。从N末端至C末端, 每条重链均具有可变区 (VH), 也称为可变重链结构域或重链可变结构域, 随后是三个恒定结构域 (CH1、CH2和CH3)。类似地, 从N末端至C末端, 每条轻链均具有可变区 (VL), 也称为可变轻链结构域或轻链可变结构域, 随后是恒定轻链 (CL) 结构域。基于其恒定结构域的氨基酸序列, 抗体的轻链可被指定为两种类型 (称为 κ 和 λ) 中的一种。

[0125] 术语“包装插页”用于指通常包括在治疗产品的商业包装中的说明, 其中包含有关

适应症、用法、剂量、施用、联合治疗、禁忌症和/或关于使用此类治疗产品的警告的信息。

[0126] 相对于参考多肽序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”定义为在比对序列并引入缺口(如有必要)以实现最大序列同一性百分比并且不考虑任何保守置换作为序列同一性的一部分后,候选序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。可以以本领域技术范围内的各种方式实现用于确定氨基酸序列同一性百分比目的的比对,例如,使用可公开获得的计算机软件,例如BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign (DNASTAR) 软件,或GENETYX(注册商标)(Genetyx Co.,Ltd.)。本领域技术人员可以确定用于比对序列的合适参数,包括在待比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0127] ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech, Inc. 编写,源代码已与用户文档一起提交给华盛顿特区美国版权局,20559,在美国版权注册号为TXU510087。ALIGN-2程序可从加利福尼亚州南旧金山的Genentech, Inc. 公开获得,或可以从源代码编译。应编译ALIGN-2程序以在UNIX操作系统上使用,包括数字UNIX V4.0D。所有序列比较参数均由ALIGN-2程序设置而未更改。在采用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列A与、对或针对给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性%(可选地,其可以被表述为与、对或针对给定氨基酸序列B具有或包含特定氨基酸序列同一性%的给定氨基酸序列A) 计算如下:

[0128] $100 \times \frac{X}{Y}$ 分数

[0129] 其中X是序列比对程序ALIGN-2对A和B进行程序比对中评分为相同匹配的氨基酸残基数,并且其中Y是B中氨基酸残基的总数。应当理解,当氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时,A与B的氨基酸序列同一性百分比将不等于B与A的氨基酸序列同一性百分比。除非另外特别说明,本文所用的所有氨基酸序列同一性%值均如前段所述使用ALIGN-2计算机程序获得。

[0130] 术语“药物制剂”是指具有使得其中所含的活性成分的生物活性有效的形式,并且不含对待施用该制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外组分的制剂。

[0131] “药学上可接受的运载体”是指药物制剂中除活性成分之外对受试者无毒的成分。药学上可接受的运载体包括但不限于,缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0132] 除非另有说明,本文所用的术语“C1s”是指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物,例如灵长类动物(例如人)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠))的任何天然C1s。该术语涵盖“全长”未加工的C1s以及在细胞中加工产生的任何形式的C1s。该术语还涵盖天然存在的C1s变体,例如,剪接变体或等位基因变体。示例性人C1s的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。示例性食蟹猴和大鼠C1s的氨基酸序列分别如SEQ ID No:3和2所示。

[0133] 如本文所用,“治疗(treatment)”(及其语法变体,例如“治疗(treat或treating)”)是指试图改变待治疗个体的自然病程的临床干预,并且可以用于预防或在临床病理过程中进行。治疗的期望效果包括但不限于,预防疾病的发生或复发、减轻症状、减少疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展速度、改善或缓解疾病状态,以及缓解或改善预后。在一些实施方案中,本发明的抗体用于延迟疾病发展或减缓疾病进展。

[0134] 术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体与抗原结合的抗体重链或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为VH和VL)通常具有相似结构,每个结构域包含四个保守框架区(FR)和三个高变区(HVR)。(参见,例如,Kindt等人,Kuby免疫学,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007)。)单个VH或VL结构域可足以赋予抗原结合特异

性。此外,可以使用来自结合抗原的抗体的VH或VL结构域以分别筛选互补VL或VH结构域的文库,从而分离结合特定抗原的抗体。参见,例如,Portolano等人,J. Immunol. 150:880-887 (1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628 (1991)。

[0135] 如本文所用,术语“载体”是指能够繁殖与其连接的另一种核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体,以及掺入已将其导入的宿主细胞基因组中的载体。某些载体能够指导与它们可操作地连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0136] II. 抗原结合分子

[0137] 本发明的抗原结合分子与C1s结合并且包含重链可变区、轻链可变区和Fc区。

[0138] 在一个实施方案中,重链可变区和/或轻链可变区包含至少一个氨基酸,其中与包含两个重链可变区和两个轻链可变区的第一参考抗体相比,所述至少一个氨基酸能够增加酸性pH范围内抗原结合分子与C1s的KD值与中性pH范围内抗原结合分子与C1s的KD值的比, KD(酸性pH范围)/KD(中性pH范围)。在一个实施方案中,第一参考抗体中的重链可变区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列并且第一参考抗体中的轻链可变区包含SEQ ID NO:13氨基酸序列。

[0139] 在该实施方案中,重链可变区和/或轻链可变区在以下Kabat编号系统位置的一个或多个处包含组氨酸:

[0140] 重链:H26、H27、H28、H29、H30、H31、H32、H33、H34、H35、H50、H51、H52、H52a、H53、H54、H55、H57、H58、H59、H60、H61、H62、H63、H64、H65、H93、H94、H95、H96、H97、H98、H99、H100、H100a、H101和H102;以及

[0141] 轻链:L24、L25、L26、L27、L27a、L28、L29、L30、L31、L32、L33、L50、L51、L52、L53、L54、L55、L56 L91、L92、L93、L94、L95、L95a、L96和L97。

[0142] 在一些实施方案中,重链可变区和/或轻链可变区在以下Kabat编号系统位置的一个或多个处包含组氨酸:

[0143] 重链:H26、H27、H28、H29、H30、H32、H33、H34、H50、H51、H52a、H54、H57、H58、H59、H60、H61、H65、H93、H95、H99、H100和H100a;以及

[0144] 轻链:L25、L28、L91、L92、L94、L95、L96和L97。

[0145] 在一些实施方案中,重链可变区和/或轻链可变区包含在选自以下Kabat编号系统位置的位置处置换一个或多个氨基酸残基的至少一个组氨酸:

[0146] 重链:H26、H27、H28、H29、H30、H31、H32、H33、H34、H35、H50、H51、H52、H52a、H53、H54、H55、H57、H58、H59、H60、H61、H62、H63、H64、H65、H93、H94、H95、H96、H97、H98、H99、H100、H100a、H101和H102;以及

[0147] 轻链:L24、L25、L26、L27、L27a、L28、L29、L30、L31、L32、L33、L50、L51、L52、L53、L54、L55、L56 L91、L92、L93、L94、L95、L95a、L96和L97。

[0148] 在一些实施方案中,如上提供的重链可变区和/或轻链可变区的任何一个或多个氨基酸在以下Kabat编号系统位置处被组氨酸置换:

[0149] 重链:H51、H65和H99;以及

[0150] 轻链:L92、L94、L95和L96。

[0151] 在一些实施方案中,重链可变区和/或轻链可变区包含在以下Kabat编号系统位置

处置换氨基酸残基的一个、两个、三个、四个或五个组氨酸：

[0152] 重链：H51、H65和H99；以及

[0153] 轻链：L92、L94、L95和L96。

[0154] 在一些实施方案中，重链可变区和/或轻链可变区包含至少一个组氨酸，其是在以下位置中的一个或多个以及CDR或FR氨基酸位置（根据Kabat编号系统）处的置换的残基：

[0155] 重链：H51、H65和H99；以及

[0156] 轻链：L92、L94、L95和L96。

[0157] 在一些实施方案中，重链可变区和/或轻链可变区包含至少一个组氨酸，其是在以下位置（根据Kabat编号系统）处的置换的残基：

[0158] 1) L92和L94

[0159] 2) L92和L95

[0160] 3) L94和L95

[0161] 4) L92、L94和L95

[0162] 5) H65和L92

[0163] 6) H65和L94

[0164] 7) H65和L95

[0165] 8) H65、L92和L94

[0166] 9) H65、L92和L95

[0167] 10) H65、L94和L95

[0168] 11) H65、L92、L94和L95

[0169] 12) H99和L92

[0170] 13) H99和L94

[0171] 14) H99和L95

[0172] 15) H99、L92和L94

[0173] 16) H99、L92和L95

[0174] 17) H99、L94和L95

[0175] 18) H99、L92、L94和L95

[0176] 19) H65和H99

[0177] 20) H65、H99和L92

[0178] 21) H65、H99和L94

[0179] 22) H65、H99和L95

[0180] 23) H65、H99、L92和L94

[0181] 24) H65、H99、L92和L95

[0182] 25) H65、H99、L94和L95

[0183] 26) H65、H99、L92、L94和L95，或

[0184] 27) H27、H99和L95。

[0185] 在该实施方案中，可变区优选包含以下氨基酸中的至少一种：重链可变区第27位的组氨酸、重链可变区第59位的脯氨酸和轻链可变区第96位的组氨酸（所有编号均根据Kabat编号系统）。

[0186] 在一个实施方案中,Fc区包含至少一个氨基酸,其中与包含配对Fc区的第二参考抗体相比,所述至少一个氨基酸能够增加酸性pH范围内抗原结合分子与FcRn的结合能力。在该实施方案中,第二参考抗体中的Fc区包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0187] 在该实施方案中,Fc区包含

[0188] (a) 根据EU编号,第434位的Ala;第438位的Glu、Arg、Ser或Lys;和第440位的Glu、Asp或Gln;

[0189] (b) 根据EU编号,第434位的Ala;第438位的Arg或Lys;和第440位的Glu或Asp;

[0190] (c) 根据EU编号,第428位的Ile或Leu;第434位的Ala;第436位的Ile、Leu、Val、Thr或Phe;第438位的Glu、Arg、Ser或Lys;和第440位的Glu、Asp或Gln;

[0191] (d) 根据EU编号,第428位的Ile或Leu;第434位的Ala;第436位的Ile、Leu、Val、Thr或Phe;第438位的Arg或Lys;和第440位的Glu或Asp;

[0192] (e) 根据EU编号,第428位的Leu;第434位的Ala;第436位的Val或Thr;第438位的Glu、Arg、Ser或Lys;和第440位的Glu、Asp或Gln;或

[0193] (f) 根据EU编号,第428位的Leu;第434位的Ala;第436位的Val或Thr;第438位的Arg或Lys;和第440位的Glu或Asp。

[0194] W02013/046704特别报道了根据EU编号Q438R/S440E、Q438R/S440D、Q438K/S440E和Q438K/S440D的双氨基酸残基置换,当与在酸性条件下能够增加FcRn结合的氨基酸置换组合时,该双氨基酸残基置换导致类风湿因子结合的显著降低。

[0195] 在该实施方案中,Fc区优选包含选自以下项组成的组的氨基酸置换的组合:

[0196] (I) (a) N434A/Q438R/S440E; (b) N434A/Q438R/S440D; (c) N434A/Q438K/S440E; (d) N434A/Q438K/S440D; (e) N434A/Y436T/Q438R/S440E; (f) N434A/Y436T/Q438R/S440D; (g) N434A/Y436T/Q438K/S440E; (h) N434A/Y436T/Q438K/S440D; (i) N434A/Y436V/Q438R/S440E; (j) N434A/Y436V/Q438R/S440D; (k) N434A/Y436V/Q438K/S440E; (l) N434A/Y436V/Q438K/S440D; (m) N434A/R435H/F436T/Q438R/S440E; (n) N434A/R435H/F436T/Q438R/S440D; (o) N434A/R435H/F436T/Q438K/S440E; (p) N434A/R435H/F436T/Q438K/S440D; (q) N434A/R435H/F436V/Q438R/S440E; (r) N434A/R435H/F436V/Q438R/S440D; (s) N434A/R435H/F436V/Q438K/S440E; (t) N434A/R435H/F436V/Q438K/S440D; (u) M428L/N434A/Q438R/S440E; (v) M428L/N434A/Q438R/S440D; (w) M428L/N434A/Q438K/S440E; (x) M428L/N434A/Q438K/S440D; (y) M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E; (z) M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440D; (aa) M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440E; (ab) M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440D; (ac) M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440E; (ad) M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440D; (ae) M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440E; (af) M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440D; (ag) L235R/G236R/S239K/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E; (ah) L235R/G236R/A327G/A330S/P331S/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E,

[0197] 根据EU编号;或

[0198] (II) (a) N434A/Q438R/S440E; (b) N434A/Y436T/Q438R/S440E; (c) N434A/Y436V/Q438R/S440E; (d) M428L/N434A/Q438R/S440E; (e) M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E; (f) M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440E; (g) L235R/G236R/S239K/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E; and (h) L235R/G236R/A327G/A330S/P331S/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E,

- [0199] 根据EU编号。
- [0200] 在另一个实施方案中,Fc区优选包含选自由第428位的亮氨酸、第434位丙氨酸和第436位的苏氨酸组成的组的至少一个氨基酸(所有编号均根据EU编号系统)。在该实施方案中,Fc区更优选包含第428位的亮氨酸、第434位的丙氨酸和第436位的苏氨酸(所有编号均根据EU编号系统)。
- [0201] 在一个实施方案中,Fc区包含,与第二参考抗体相比,能够增加中性pH范围内抗原结合分子与Fc γ 受体的结合能力的至少一个氨基酸。
- [0202] 在该实施方案中,Fc区优选包含选自由以下项组成的组的至少一个或多个氨基酸:
- [0203] 根据EU编号,在Fc区位点中
- [0204] 氨基酸第221位的Lys或Tyr;
- [0205] 氨基酸第222位的Phe、Trp、Glu和Tyr中的任一个;
- [0206] 氨基酸第223位的Phe、Trp、Glu和Lys中的任一个;
- [0207] 氨基酸第224位的Phe、Trp、Glu和Tyr中的任一个;
- [0208] 氨基酸第225位的Glu、Lys和Trp中的任一个;
- [0209] 氨基酸第227位的Glu、Gly、Lys和Tyr中的任一个;
- [0210] 氨基酸第228位的Glu、Gly、Lys和Tyr中的任一个;
- [0211] 氨基酸第230位的Ala、Glu、Gly和Tyr中的任一个;
- [0212] 氨基酸第231位的Glu、Gly、Lys、Pro和Tyr中的任一个;
- [0213] 氨基酸第232位的Glu、Gly、Lys和Tyr中的任一个;
- [0214] 氨基酸第233位的Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个;
- [0215] 氨基酸第234位的Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个;
- [0216] 氨基酸第235位的Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个;
- [0217] 氨基酸第236位的Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个;
- [0218] 氨基酸第237位的Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任一个;
- [0219] 氨基酸第238位的Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个;
- [0220] 氨基酸第239位的Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个;
- [0221] 氨基酸第240位的Ala、Ile、Met和Thr中的任何一个;
- [0222] 氨基酸第241位的Asp、Glu、Leu、Arg、Trp和Tyr中的任一个;
- [0223] 氨基酸第243位的Leu、Glu、Leu、Gln、Arg、Trp和Tyr中的任一个;
- [0224] 氨基酸第244位的His;
- [0225] 氨基酸第245位的Ala;

- [0226] 氨基酸第246位的Asp、Glu、His和Tyr中的任一个；
- [0227] 氨基酸第247位的Ala、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、Val和Tyr中的任一个；
- [0228] 氨基酸第249位的Glu、His、Gln和Tyr中的任一个；
- [0229] 氨基酸第250位的Glu或Gln；
- [0230] 氨基酸第251位的Phe；
- [0231] 氨基酸第254位的Phe、Met和Tyr中的任何一个；
- [0232] 氨基酸第255位的Glu、Leu和Tyr中的任一个；
- [0233] 氨基酸第256位的Ala、Met和Pro中的任一个；
- [0234] 氨基酸第258位的Asp、Glu、His、Ser和Tyr中的任一个；
- [0235] 氨基酸第260位的Asp、Glu、His和Tyr中的任一个；
- [0236] 氨基酸第262位的Ala、Glu、Phe、Ile和Thr中的任一个；
- [0237] 氨基酸第263位的Ala、Ile、Met和Thr中的任一个；
- [0238] 氨基酸第264位的Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp和Tyr中的任何一个；
- [0239] 氨基酸第265位的Ala、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个；
- [0240] 氨基酸第266位的Ala、Ile、Met和Thr中的任何一个；
- [0241] 氨基酸第267位的Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个；
- [0242] 氨基酸第268位的Asp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、Val和Trp中的任何一个；
- [0243] 氨基酸第269位的Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个；
- [0244] 氨基酸第270位的Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp和Tyr中的任何一个；
- [0245] 氨基酸第271位的Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个；
- [0246] 氨基酸第272位的Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个；
- [0247] 氨基酸第273位的Phe或Ile；
- [0248] 氨基酸第274位的Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个；
- [0249] 氨基酸第275位的Leu或Trp；
- [0250] 氨基酸第276位的Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个；
- [0251] 氨基酸第278位的Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val和Trp中的任何一个；
- [0252] 氨基酸第279位的Ala；
- [0253] 氨基酸第280位的Ala、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、Trp和Tyr中的任何一个；

- [0254] 氨基酸第281位的Asp、Lys、Pro和Tyr中的任何一个；
- [0255] 氨基酸第282位的Glu、Gly、Lys、Pro和Tyr中的任一个；
- [0256] 氨基酸第283位的Ala、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg和Tyr中的任何一个；
- [0257] 氨基酸第284位的Asp、Glu、Leu、Asn、Thr和Tyr中的任一个；
- [0258] 氨基酸第285位的Asp、Glu、Lys、Gln、Trp和Tyr中的任何一个；
- [0259] 氨基酸第286位的Glu、Gly、Pro和Tyr中的任一个；
- [0260] 氨基酸第288位的Asn、Asp、Glu和Tyr中的任一个；
- [0261] 氨基酸第290位的Asp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、Trp和Tyr中的任何一个；
- [0262] 氨基酸第291位的Asp、Glu、Gly、His、Ile、Gln和Thr中的任一个；
- [0263] 氨基酸第292位的Ala、Asp、Glu、Pro、Thr和Tyr中的任一个；
- [0264] 氨基酸第293位的Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个；
- [0265] 氨基酸第294位的Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个；
- [0266] 氨基酸第295位的Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个；
- [0267] 氨基酸第296位的Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr和Val中的任一个；
- [0268] 氨基酸第297位的Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任一个；
- [0269] 氨基酸第298位的Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个；
- [0270] 氨基酸第299位的Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp和Tyr中的任何一个；
- [0271] 氨基酸第300位的Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val和Trp中的任一个；
- [0272] 氨基酸第301位的Asp、Glu、His和Tyr中的任一个；
- [0273] 氨基酸第302位的Ile；
- [0274] 氨基酸第303位的Asp、Gly和Tyr中的任一个；
- [0275] 氨基酸第304位的Asp、His、Leu、Asn和Thr中的任一个；
- [0276] 氨基酸第305位的Glu、Ile、Thr和Tyr中的任一个；
- [0277] 氨基酸第311位的Ala、Asp、Asn、Thr、Val和Tyr中的任何一个；
- [0278] 氨基酸第313位的Phe；
- [0279] 氨基酸第315位的Leu；
- [0280] 氨基酸第317位的Glu或Gln；
- [0281] 氨基酸第318位的His、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val和Tyr中的任一个；
- [0282] 氨基酸第320位的Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个；
- [0283] 氨基酸第322位的Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任

一个；

[0284] 氨基酸第323位的Ile；

[0285] 氨基酸第324位的Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个；

[0286] 氨基酸第325位的Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任一个；

[0287] 氨基酸第326位的Ala、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任一个；

[0288] 氨基酸第327位的Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、Trp和Tyr中的任一个；

[0289] 氨基酸第328位的Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个；

[0290] 氨基酸第329位的Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任何一个；

[0291] 氨基酸第330位的Cys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任一个；

[0292] 氨基酸第331位的Asp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、Trp和Tyr中的任一个；

[0293] 氨基酸第332位的Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp和Tyr中的任一个；

[0294] 氨基酸第333位的Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、Val和Tyr中的任何一个；

[0295] 氨基酸第334位的Ala、Glu、Phe、Ile、Leu、Pro和Thr中的任一个；

[0296] 氨基酸第335位的Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、Trp和Tyr中的任何一个；

[0297] 氨基酸第336位的Glu、Lys和Tyr中的任一个；

[0298] 氨基酸第337位的Glu、His和Asn中的任一个；

[0299] 氨基酸第339位的Asp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Ser和Thr中的任何一个；

[0300] 氨基酸第376位的Ala或Val；

[0301] 氨基酸第377位的Gly或Lys；

[0302] 氨基酸第378位的Asp；

[0303] 氨基酸第379位的Asn；

[0304] 氨基酸第380位的Ala、Asn和Ser中的任一个；

[0305] 氨基酸第382位的Ala或Ile；

[0306] 氨基酸第385位的Glu；

[0307] 氨基酸第392位的Thr；

[0308] 氨基酸第396位的Leu；

[0309] 氨基酸第421位的Lys；

- [0310] 氨基酸第427位的Asn;
- [0311] 氨基酸第428位的Phe或Leu;
- [0312] 氨基酸第429位的Met;
- [0313] 氨基酸第434位的Trp;
- [0314] 氨基酸第436位的Ile;和
- [0315] 氨基酸第440位的Gly、His、Ile、Leu和Tyr中的任何一个。
- [0316] 在该实施方案中,Fc区更优选包含以下项中的至少一个或多个
- [0317] 根据EU编号,在Fc区位点中
- [0318] 氨基酸第238位的Asp,和
- [0319] 氨基酸第328位的Glu。
- [0320] 在该实施方案中,Fc区进一步优选包含以下氨基酸中的至少一种;第234位的酪氨酸、第235位的色氨酸、第236位的天冬酰胺、第238位的天冬氨酸、第250位的缬氨酸、第264位的异亮氨酸、第268位的天冬氨酸、第295位的亮氨酸、第307位的脯氨酸、第326位的苏氨酸和第330位的赖氨酸(所有编号均根据EU编号系统)。Fc区进一步优选包含以下(a)或(b)的氨基酸;
- [0321] (a) 第235位的色氨酸、第236位的天冬酰胺、第268位的天冬氨酸、第295位的亮氨酸、第326位的苏氨酸和第330位的赖氨酸,或
- [0322] (b) 第234位的酪氨酸、第238位的天冬氨酸、第250位的缬氨酸、第264位的异亮氨酸、第307位的脯氨酸和第330位的赖氨酸(所有编号均根据EU编号系统)。
- [0323] 在一个实施方案中,抗原结合分子的等电点(pI)通过Fc区的改变而增加。在该实施方案中,与其亲本Fc区相比,具有增加的pI的抗原结合分子在Fc区中包含至少两个氨基酸改变。在进一步的实施方案中,与亲本Fc区的等电点(pI)相比,每个氨基酸改变增加Fc区的等电点(pI)。在进一步的实施方案中,氨基酸可以暴露在该区域的表面上。在进一步的实施方案中,抗原结合分子包含Fc区和抗原结合结构域。在进一步的实施方案中,抗原结合结构域的抗原结合活性根据离子浓度条件而变化。
- [0324] 在进一步的实施方案中,本发明的具有增加的pI的Fc区包含选自以下项组成的组的至少两个位置的至少两个氨基酸改变:285、311、312、315、318、333、335、337、341、342、343、384、385、388、390、399、400、401、402、413、420、422和431(根据EU编号)。在进一步的实施方案中,具有增加的pI的Fc区在每个所选位置包含Arg或Lys。
- [0325] 在具体的实施方案中,具有增加的pI的Fc区包含第311位的精氨酸和第343位的精氨酸(两者编号均根据EU编号系统)。
- [0326] 在一个实施方案中,重链可变区和轻链可变区包含与第一参考抗体相比,能够增加抗原结合分子的稳定性的至少一个氨基酸。在该实施方案中,优选重链可变区第96位的丙氨酸和轻链可变区第53位的谷氨酸(两者编号均按照Kabat编号系统)中的一者或两者作为此类氨基酸。
- [0327] 在一个实施方案中,抗原结合分子包含恒定区。在该实施方案中,Fc区存在于恒定区。在该实施方案中,恒定区优选包含能够降低抗原结合分子的免疫原性的至少一个氨基酸。在该实施方案中,优选第214位的精氨酸(根据EU编号系统)作为此类氨基酸。
- [0328] 在一个实施方案中,抗原结合分子的Fc区包含能够降低对类风湿因子结合活性的

至少一个氨基酸。在该实施方案中,优选第438位的精氨酸和第440位的谷氨酸(两者编号均根据EU编号系统)中的一者或两者作为氨基酸。

[0329] 一方面,抗原结合分子与C1s结合,其中该抗原结合分子与抗体竞争结合C1s,该抗体包含:包含SEQ ID NO:20的HVR-H1、SEQ ID NO:21的HVR-H2、SEQ ID NO:22的HVR-H3的重链可变区,和包含SEQ ID NO:23的HVR-L1、SEQ ID NO:24的HVR-L2、SEQ ID NO:25的HVR-L3的轻链可变区。在该方面,该抗原结合分子可以具有上述任一实施方案中的重链可变区、轻链可变区和Fc区。

[0330] 一方面,抗原结合分子与C1s结合并且包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列包含95%同一性的VH区和与SEQ ID NO:19的氨基酸序列包含95%同一性的VL区中的一者或两者。在该方面,该抗原结合分子可以具有上述任一实施方案中的重链可变区、轻链可变区和Fc区。

[0331] 一方面,抗原结合分子与C1s结合并且包含:包含SEQ ID NO:20的HVR-H1、SEQ ID NO:21的HVR-H2、SEQ ID NO:22的HVR-H3的重链可变区,和包含SEQ ID NO:23的HVR-L1、SEQ ID NO:24的HVR-L2、SEQ ID NO:25的HVR-L3的轻链可变区中的一者或两者。在该方面,该抗原结合分子可以具有上述任一实施方案中的重链可变区、轻链可变区和Fc区。

[0332] 一方面,抗原结合分子与C1s结合并且不相对于C1s竞争结合C1q。在该方面,该抗原结合分子可以具有上述任一实施方案中的重链可变区、轻链可变区和Fc区。

[0333] 一方面,抗原结合分子与C1s结合,其中其表位位于C1s的CCP-SP结构域内。在该方面,该抗原结合分子可以具有上述任一实施方案中的重链可变区、轻链可变区和Fc区。

[0334] 一方面,抗原结合分子与C1s结合并且可以将个体的血浆C1q浓度降低至个体基线的20%或更低。在该方面,该抗原结合分子可以具有上述任一实施方案中的重链可变区、轻链可变区和Fc区。在一个实施方案中,个体是食蟹猴。在一个实施方案中,抗原结合分子的剂量为10mg/kg。在该实施方案中,抗原结合分子可以在第0天静脉注射至猴。抗原结合分子的剂量设置可以调整为注射后即时生理血浆食蟹猴C1s和C1q浓度的过量浓度。可以在注射前-1天以及注射后5分钟,2、8小时,1、2、4、7、14、21和28天采集血液。血液样品可以立即离心以分离血浆样品。可以通过LC/ESI-MS/MS在每个采样点测量食蟹猴C1s和C1q的血浆浓度。

[0335] III. 组合物和方法

[0336] 一方面,本发明的抗原结合分子可用于,例如,补体介导的疾病或病症的诊断或治疗。

[0337] 在一个实施方案中,抗C1s抗体的实例为上述抗原结合分子。下文中述及任何抗C1s抗体时,抗C1s抗体可以替换为与C1s结合的抗原结合分子。

[0338] A. 示例性抗C1s抗体

[0339] 一方面,本发明提供了与C1s结合的分离的抗体。一方面,本发明提供了与C1s结合的分离抗体,其结合活性根据离子浓度而变化。在某些实施方案中,抗C1s抗体的结合活性根据pH值即氢离子(质子)浓度而变化。在某些实施方案中,抗C1s抗体的结合活性根据钙浓度而变化。在某些实施方案中,抗C1s抗体的结合活性根据pH和钙浓度二者而变化。预期此类抗体作为药物特别具有优势,因为可以减少患者的施用剂量和频率,从而可以减少总剂量。

[0340] 一方面,在本发明的分离的抗C1s抗体中,酸性pH值下C1s结合活性的KD值与中性pH值下C1s结合活性的KD值的比 ($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$) 在中性和酸性pH值高钙浓度下测量时为2或更大。一方面,在本发明的分离的抗C1s抗体中,其在酸性pH值下的C1s结合活性的koff值与在中性pH值下的C1s结合活性的koff值的比 ($koff(\text{酸性pH})/koff(\text{中性pH})$) 在中性和酸性pH高钙浓度下测量时为2或更大。一方面,在本发明的分离的抗C1s抗体中,其在酸性pH值下的C1s结合活性的KD值与在中性pH值下的C1s结合活性的KD值的比 ($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$) 在中性pH值高钙浓度下和在酸性pH值低钙浓度下测量时为5或更大。在一些实施方案中,在本发明的分离的抗C1s抗体中,其在酸性pH值下的C1s结合活性的KD值与在中性pH值下的C1s结合活性的KD值的比 ($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$) 在中性和酸性pH值低钙浓度下测量时为2或更大,其中抗C1s抗体与C1s的二聚体状态结合。在一些实施方案中,在本发明的分离的抗C1s抗体中,其在酸性pH值下的C1s结合活性的koff值与在中性pH值下的C1s结合活性的koff值的比 ($koff(\text{酸性pH})/koff(\text{中性pH})$) 在中性和酸性pH值低钙浓度下测量时为2或更大,其中抗C1s抗体与C1s的二聚体状态结合。

[0341] 不受特定理论的束缚,在以下情况下:1) 与本发明的抗体结合的C1s的表位结构可因不存在钙而发生构象变化,从而改变抗体的亲和力或2) 本发明的抗体的相互作用(亲和力或亲合力)可以根据C1s的状况(单体状态或二聚体状态)而变化,使用特定条件(在中性pH值高钙浓度下和在酸性pH值低钙浓度下)的测量可用于评价KD值的比 ($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)。

[0342] 换言之,如下文(i)或(iii)中所述,本发明的抗体在中性pH值下以比在酸性pH值下更高的亲和力与C1s结合:

[0343] (i) 在中性和酸性pH值高钙浓度下测量时,酸性pH值下C1s结合活性的KD值与中性pH值下C1s结合活性的KD值的比 ($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$) 为2或更大,

[0344] (ii) 在中性和酸性pH值高钙浓度下测量时,酸性pH值下C1s结合活性的koff值与中性pH值下C1s结合活性的koff值的比 ($koff(\text{酸性pH})/koff(\text{中性pH})$) 为2或更大,

[0345] (iii) 在中性pH值高钙浓度和酸性pH值低钙浓度下测量时,酸性pH值下C1s结合活性的KD值与中性pH值下C1s结合活性的KD值的比 ($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$) 为5或更大。

[0346] 更通常地,不受特定理论的束缚,在以下情况下:1) 与本发明的抗体结合的特定抗原的表位结构可因不存在钙而发生构象改变,从而改变抗体的亲和力或2) 本发明抗体的相互作用(亲和力或亲合力)可根据抗原的状况(单体状态或二聚体状态)而变化,使用特定条件(在中性pH值高钙浓度和在酸性pH值低钙浓度下)的测量可用于评估KD值的比 ($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)。如果该比值高,则在酸性pH值下的亲和力低于在中性pH值下的亲和力。可选地,如下所述,KD被定义为 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 的比。酸性和中性条件之间 k_{off} 值的比,即, ($koff(\text{酸性pH})/koff(\text{中性pH})$) 也可用于比较酸性和中性pH值下的亲和力。

[0347] 因此,本发明的抗体在中性pH值下以比在酸性pH值下更高的亲和力与抗原结合,如下所示:在中性pH值高钙浓度和酸性pH值低钙浓度下测量时,酸性pH值下抗原结合活性的KD值与中性pH值下抗原结合活性的KD值的比 ($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$) 为5或更大。

[0348] 一方面,在本发明的分离的抗C1s抗体中,其在酸性pH值下的C1s结合活性的KD值与在中性pH值下的C1s结合活性的KD值的比 ($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$) 在中性和酸性pH值高钙浓度下测量时为2或更大。

[0349] 一方面,在本发明的分离的抗C1s抗体中,其在酸性pH值下的C1s结合活性的KD值与在中性pH值下的C1s结合活性的KD值的比($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)在中性pH值高钙浓度下和在酸性pH值低钙浓度下测量时为5或更大。

[0350] 一方面,在本发明的分离的抗C1s抗体中,酸性pH值下C1s结合活性的KD值与中性pH值下C1s结合活性的KD值的比($KD(\text{酸性pH值})/KD(\text{中性pH值})$)在中性和酸性pH值低钙浓度下测量时为2或更大,其中抗C1s抗体与C1s的二聚体状态结合。

[0351] 上述KD比,即 $KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$ 可以在亲本抗体(即本发明修饰前的原始抗体)和其中关于原始(亲本)抗体已引入一个或多个氨基酸突变(例如,添加、插入、缺失或置换)的抗体之间进行比较。原始(亲本)抗体可以是任何已知的或新分离的抗体,只要它与C1s特异性结合即可。因此,一方面,与原始(亲本)抗体的酸性pH值下C1s结合活性的KD值与中性pH值下C1s结合活性的KD值的比($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)相比,在本发明的分离的抗C1s抗体中,酸性pH值下C1s结合活性的KD值与中性pH值下C1s结合活性的KD值的比($KD(\text{酸性pH值})/KD(\text{中性pH值})$)是至少1.2倍、1.4倍、1.6倍、1.8倍、2倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3倍、3.5倍、4倍、5倍、8倍、10倍高。换言之,本发明提供了一种分离的抗C1s抗体,其中该分离的抗C1s抗体较亲本(原始)抗体已引入一个或多个氨基酸突变(例如,添加、插入、缺失或置换),并且以下(i)与(ii)的比为至少1.2、1.4、1.6、1.8、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.5、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、5、8或10:(i)分离的抗C1s抗体在酸性pH值下的C1s结合活性的KD值与在中性pH值下的C1s结合活性的KD值的比($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$);(ii)亲本(原始)抗体在酸性pH值下C1s结合活性的KD值与在中性pH值下C1s结合活性的KD值的比($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)。这些KD比可以在任何(高或低)钙浓度下测量,例如,在中性和酸性pH值高钙浓度下测量,或在中性pH值高钙浓度下和在酸性pH值低钙浓度下测量。在另一方面,可以使用解离速率常数(kd)代替上述KD来评价pH值和/或Ca依赖性。

[0352] 一方面,本发明的抗体具有在细胞内条件和细胞外条件之间不同的抗原结合活性。细胞内和细胞外条件是指细胞的内部和外部之间不同的条件。条件的类别包括,例如,离子浓度,更具体地,金属离子浓度、氢离子浓度(pH)和钙离子浓度。“细胞内条件”优选是指具有内体内环境特征的环境,而“细胞外条件”优选是指具有血浆中环境特征的环境。通过针对具有这种特性的结构域筛选大量抗体,可以获得具有抗原结合活性随离子浓度而变化的特性的抗体。例如,通过杂交瘤法或抗体文库法产生大量序列彼此不同的抗体,并测量它们在不同离子浓度下的抗原结合活性,可以获得具有上述特性的抗体。B细胞克隆方法是筛选此类抗体的方法实例中的一种。此外,如下所述,指定可以赋予抗体具有根据离子浓度而变化的抗原结合活性的特性的至少一个独特氨基酸残基,以制备作为具有不同序列同时共享不同氨基酸残基作为共同结构的大量抗体的文库。可以筛选此类文库以有效分离具有上述特性的抗体。

[0353] 一方面,本发明提供了在中性pH值下以比在酸性pH值下更高的亲和力与C1s结合的抗体。另一方面,本发明提供了对C1s表现出pH依赖性结合的抗C1s抗体。如本文所用,表述“pH依赖性结合”是指“与在中性pH值下相比,在酸性pH值下结合减少”,并且这两种表述可以互换。例如,“具有pH依赖性结合特性”的抗C1s抗体包括在中性pH值下以比在酸性pH值下更高的亲和力与C1s结合的抗体。

[0354] 在某些实施方案中,在中性和酸性pH值高钙浓度下测量时,酸性pH值下C1s结合活性的KD值与中性pH值下C1s结合活性的KD值的比($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)为2或更大。在特定实施方案中,本发明的抗体在中性pH值下以比在酸性pH值下高至少2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、400、1000、10000或更多倍的亲和力与C1s结合。

[0355] 在某些实施方案中,在中性和酸性pH值高钙浓度下测量时,酸性pH值下C1s结合活性的koff值与中性pH值下C1s结合活性的koff值的比($koff(\text{酸性pH})/koff(\text{中性pH})$)为2或更大。在特定实施方案中,本发明的抗体在中性pH值下以比在酸性pH值下高至少2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000或更多倍的亲和力与C1s结合。

[0356] 在某些实施方案中,在中性pH值高钙浓度下和在酸性pH值低钙浓度下测量时,酸性pH值下C1s结合活性的KD值与中性pH值下C1s结合活性的KD值的比($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)为2或更大。在特定实施方案中,本发明的抗体在中性pH值下以比在酸性pH值下高至少2, 3, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000或更多倍的亲和力与C1s结合。

[0357] 在上述情况下,例如,酸性pH为5.8且中性pH为7.4,因此 $KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$ 为 $KD(\text{pH } 5.8)/KD(\text{pH } 7.4)$ 。就此而言,酸性pH和中性pH的实例在下文中详细描述。在一些实施方案中, $KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$ 例如 $KD(\text{pH } 5.8)/KD(\text{pH } 7.4)$ 可以为2至10,000。在上述情况下,例如,酸性pH为5.8且中性pH为7.4,因此 $koff(\text{酸性pH})/koff(\text{中性pH})$ 为 $koff(\text{pH } 5.8)/koff(\text{pH } 7.4)$ 。就此而言,酸性pH和中性pH的实例在下文中详细描述。在一些实施方案中, $koff(\text{酸性pH})/koff(\text{中性pH})$ 例如 $koff(\text{pH } 5.8)/koff(\text{pH } 7.4)$ 可以为2至10,000。

[0358] 当抗原是可溶性蛋白时,抗体与抗原的结合可以导致抗原在血浆中的半衰期延长(即,抗原从血浆中的清除率降低),因为抗体在血浆中的半衰期比抗原本身长并且可以作为抗原的运载体。这是由于FcRn通过细胞内的内体途径使抗原-抗体复合物再循环(Roopenian和Akilesh(2007) Nat Rev Immunol 7(9):715-725)。然而,具有pH依赖性结合特性的抗体(其在中性细胞外环境中与其抗原结合,同时在其进入细胞后将抗原释放至酸性内体区室中)预期在抗原中和和清除方面相对于以非pH依赖性方式结合的对等物具有优异的特性(Igawa等人(2010) Nature Biotechnol 28(11):1203-1207;Devanaboyina等人(2013) mAbs 5(6):851-859;国际专利申请公开号:WO 2009/125825)。

[0359] 一方面,本发明提供了在高钙浓度条件下以比在低钙浓度条件下更高的亲和力与C1s结合的抗体。

[0360] 在本发明中,优选的金属离子包括,例如,钙离子。钙离子参与许多生物现象的调节,包括肌肉(例如骨骼肌、平滑肌和心肌)的收缩;激活白细胞的运动、吞噬等;激活血小板的形态变化、分泌等;淋巴细胞的激活;肥大细胞的激活,包括组胺的分泌;由儿茶酚胺 α 受体或乙酰胆碱受体介导的细胞反应;胞吐作用;从神经元末梢释放递质物质;以及神经元中的轴浆流动。已知的细胞内钙离子受体包括肌钙蛋白C、钙调蛋白、小清蛋白和肌球蛋白轻链,它们具有若干个钙离子结合位点并被认为在分子进化方面源自共同的起源。还有许多已知的钙结合基序。此类公知的基序包括,例如,钙粘蛋白结构域、钙调蛋白的EF手、蛋白激

酶C的C2结构域、凝血蛋白因子IX的G1a结构域、酰基糖蛋白 (acyaroglycoprotein) 受体和甘露糖结合受体的C型凝集素、LDL受体的A结构域、膜联蛋白、3型血小板反应素结构域和EGF样结构域。

[0361] 在本发明中,当金属离子为钙离子时,期望在低钙离子浓度条件下的抗原结合活性低于在高钙离子浓度条件下的抗原结合活性。同时,细胞内钙离子浓度低于细胞外钙离子浓度。相反,细胞外钙离子浓度高于细胞内钙离子浓度。在本发明中,低钙离子浓度优选为0.1微摩尔(μM)至30 μM ,更优选为0.5 μM 至10 μM ,并且特别优选为1 μM 至5 μM ,其接近体内早期内的钙离子浓度。同时,在本发明中,高钙离子浓度优选为100 μM 至10 mM ,更优选为200 μM 至5 mM ,并且特别优选为0.5 mM 至2.5 mM ,其接近血浆中(血液中)的钙离子浓度。在本发明中,优选低钙离子浓度为内体中的钙离子浓度,并且高钙离子浓度为血浆中的钙离子浓度。当在低钙离子浓度和高钙离子浓度之间比较抗原结合活性的水平时,优选本发明的抗体在高钙离子浓度下的结合比在低钙离子浓度下的结合更强。换言之,优选本发明的抗体在低钙离子浓度下的抗原结合活性比在高钙离子浓度下的抗原结合活性低。当结合活性水平用解离常数(KD)表示时,KD(低钙离子浓度)/KD(高钙离子浓度)的值大于1,优选为2或更大,还更优选为10或更大,并且又更优选地为40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、400、1000、10000或更大。对KD(低钙离子浓度)/KD(高钙离子浓度)的值的上限没有特别限定,并且可以为任何值例如100、400、1000或10000,只要技术人员使用技术可以生产即可。可以使用解离速率常数(kd)代替KD。当难以计算KD值时,可以基于分析物以相同浓度通过时Biacore中的结合响应水平来评估活性。当抗原通过固定有本发明的抗原结合分子的芯片时,低钙浓度下的结合响应优选为高钙浓度下的结合响应的1/2或更小,更优选为1/3或更小,还更优选为1/5或更小,并且特别优选为1/10或更小。已知通常体内细胞外钙离子浓度(例如,血浆中)高,并且细胞内钙离子浓度(例如,内体中)低。因此,在本发明中,优选细胞外条件为高钙离子浓度,并且细胞内条件为低钙离子浓度。当赋予本发明的抗原结合分子(例如,抗体)具有在细胞内钙离子浓度条件下比在细胞外钙离子浓度条件下的抗原结合活性更低的性质时,在细胞外与本发明的抗原结合分子结合的抗原在细胞内从本发明的抗原结合分子解离。此类抗体,当施用于活体时,可以降低血浆中的抗原浓度并降低体内抗原的生理活性。因此,本发明的抗体是有用的。筛选在低钙离子浓度条件下比在高钙离子浓度条件下具有更低抗原结合活性的抗原结合结构域或抗体的方法包括,例如,W02012/073992(例如,第0200-0213段)中描述的方法。对赋予本发明的抗原结合结构域在低钙离子浓度条件下比在高钙离子浓度条件下与抗原结合更弱的性质的方法没有特别限制,并且可以通过任何方法进行。具体地,方法在日本专利申请号2011-218006中描述并且包括,例如,将抗原结合域中的至少一个氨基酸残基置换为具有金属螯合活性的氨基酸残基,和/或将至少一个具有金属螯合活性的氨基酸残基插入抗原结合结构域。其中抗原结合结构域的至少1个氨基酸残基已被具有金属螯合活性的氨基酸残基置换和/或至少1个具有金属螯合活性的氨基酸残基已被插入抗原结合结构域的本发明的抗原结合分子是本发明的抗原结合分子的优选实施方案。

[0362] 具有金属螯合活性的氨基酸残基优选包括,例如,丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸和谷氨酸。此外,根据钙离子浓度改变抗原结合结构域的抗原结合活性的氨基酸残基优选包括,例如,形成钙结合基序的氨基酸残基。钙结合基序是本领域技术人员公

知的,并且已详细描述(例如, Springer等人, (Cell (2000) 102, 275-277); Kawasaki和Kretsinger (Protein Prof. (1995) 2, 305-490); Moncrief等人, (J. Mol. Evol. (1990) 30, 522-562); Chauvaux等人, (Biochem. J. (1990) 265, 261-265); Bairoch和Cox (FEBS Lett. (1990) 269, 454-456); Davis (New Biol. (1990) 2, 410-419); Schaefer等人, (Genomics (1995) 25, 638至643); Economou等人, (EMBO J. (1990) 9, 349-354); Wurzburg等人, (Structure. (2006) 14, 6, 1049-1058))。肌钙蛋白C的EF手、钙调蛋白、小清蛋白和肌球蛋白轻链;蛋白激酶C中的C2结构域;凝血蛋白因子IX的Gla结构域;酰基糖蛋白受体和甘露糖结合受体的C型凝集素、ASGPR、CD23和DC-SIGN; LDL受体的A结构域;膜联蛋白结构域;钙粘蛋白结构域;3型血小板反应素结构域;和EGF样结构域优选用作钙结合基序。

[0363] 本发明的抗原结合结构域可以含有根据钙离子浓度改变抗原结合活性的氨基酸残基,例如上述具有金属螯合活性的氨基酸残基和形成钙结合基序的氨基酸残基。对这些氨基酸残基在抗原结合结构域中的位置没有特别限定,并且它们可以位于任何位置,只要根据钙离子浓度抗原结合活性发生变化即可。同时,此类氨基酸残基可以被单独包含或以两个以上的组合包含,只要抗原结合活性根据钙离子浓度变化即可。氨基酸残基优选包括,例如,丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸和谷氨酸。当抗原结合结构域是抗体可变区时,氨基酸残基可以被包含在重链可变区和/或轻链可变区中。在优选的实施方案中,氨基酸残基可以被包含在重链可变区的CDR3中,更优选在重链可变区的CDR3中根据Kabat编号的第95、96、100a和/或101位。

[0364] 在另一个优选的实施方案中,氨基酸残基可以被包含在轻链可变区的CDR1中,更优选在轻链可变区的CDR1中根据Kabat编号的第30、31和/或32位。在另一个优选的实施方案中,氨基酸残基可以被包含在轻链可变区的CDR2中,更优选在轻链可变区的CDR2中根据Kabat编号的第50位。在又一个优选的实施方案中,氨基酸残基可以被包含在轻链可变区的CDR3中,更优选在轻链可变区的CDR3中根据Kabat编号的第92位。

[0365] 此外,可以将上述实施方案组合。例如,氨基酸残基可以被包含在选自轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3的两个或三个CDR中,更优选在轻链可变区中根据Kabat编号的第30、31、32、50和/或92位。

[0366] 将具有不同序列同时共享根据钙离子浓度而改变抗原结合活性的上述氨基酸残基的共同结构的大量抗原结合结构域制备为文库。可以筛选文库以有效地获得对期望抗原具有结合活性的抗原结合结构域,其中它们的抗原结合活性根据钙离子浓度而改变。

[0367] 出于本公开内容的目的,抗体对C1s的“亲和力”以抗体的KD表示。抗体的KD是指抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。抗体与其抗原结合的KD值越大,其对特定抗原的结合亲和力则越弱。因此,如本文所用,表述“在中性pH值下比在酸性pH值下更高的亲和力”(或同等表述“pH依赖性结合”)意指抗体在酸性pH值下的KD大于抗体在中性pH值下的KD值。例如,在本发明的背景下,如果抗体在酸性pH值下与C1s结合的KD比在中性pH值下与C1s结合的KD大至少2倍,则认为抗体在中性pH值下以比在酸性pH值下更高的亲和力与C1s结合。因此,本发明包括在酸性pH值下以比在中性pH值下高至少2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 400, 1000, 10000倍或更多倍的KD与C1s结合的抗体。在另一个实施方案中,抗体在中性pH值下的KD值可以是 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M或更小。在另一个实施方案中,抗体在酸

性pH值下的KD值可以是 10^{-9}M 、 10^{-8}M 、 10^{-7}M 、 10^{-6}M 或更大。

[0368] 抗体对特定抗原的结合特性还可以用抗体的kd表示。抗体的kd是指抗体相对于特定抗原的解离速率常数,以秒的倒数(即, sec^{-1})表示。kd值的增加表示抗体与其抗原的结合较弱。因此,本发明包括在酸性pH值以比在中性pH值下更高的kd值与C1s结合的抗体。本发明包括在酸性pH值下以在中性pH值下抗体与C1s结合的kd高至少2,2.1,2.2,2.3,2.4,2.5,2.6,2.7,2.8,2.9,3,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,100,200,400,1000,10000倍或更多倍的kd与C1s结合的抗体。在另一个实施方案中,抗体在中性pH值下的kd值可以是 $10^{-2}1/\text{s}$ 、 $10^{-3}1/\text{s}$ 、 $10^{-4}1/\text{s}$ 、 $10^{-5}1/\text{s}$ 、 $10^{-6}1/\text{s}$ 或更小。在另一个实施方案中,抗体在酸性pH值下的kd值可以是 $10^{-3}1/\text{s}$ 、 $10^{-2}1/\text{s}$ 、 $10^{-1}1/\text{s}$ 或更大。

[0369] 在某些情况下,“与在中性pH值下相比,在酸性pH值下减少的结合”表示为抗体在酸性pH值下的KD值与抗体在中性pH值下的KD值的比(或反之亦然)。例如,出于本发明的目的,如果抗体表现出2或更大的酸性/中性KD比,则抗体可以被认为表现出“与其在中性pH值下的结合相比,在酸性pH值下与C1s的结合减少”。在某些示例性实施方案中,本发明抗体的酸性/中性KD比可以是2,2.1,2.2,2.3,2.4,2.5,2.6,2.7,2.8,2.9,3,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,100,200,400,1000,10000或更大。在另一个实施方案中,抗体在中性pH值下的KD值可以是 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 、 10^{-12}M 或更小。在另一个实施方案中,抗体在酸性pH值下的KD值可以是 10^{-9}M 、 10^{-8}M 、 10^{-7}M 、 10^{-6}M 或更大。

[0370] 可选地,“与在中性pH值下相比,在酸性pH值下结合减少”表示为抗体在酸性pH值下的koff值与抗体在中性pH值下的koff值的比(或反之亦然)。例如,出于本发明的目的,如果抗体表现出2或更大的酸性/中性koff比,则抗体可被认为表现出“与其在中性pH值下的结合相比,在酸性pH值下与C1s的结合减少”。在某些示例性实施方案中,本发明抗体的酸性/中性koff比可以是2,2.1,2.2,2.3,2.4,2.5,2.6,2.7,2.8,2.9,3,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,100,200,400,1000,10000或更大。

[0371] 在某些情况下,“与在中性pH值下相比,在酸性pH值下结合减少”表示为抗体在酸性pH值下的kd值与抗体在中性pH值下的kd值的比(或反之亦然)。例如,出于本发明的目的,如果抗体表现出2或更大的酸性/中性kd比,则可以认为抗体表现出“与其在中性pH值下的结合相比,在酸性pH值下与C1s的结合减少”。在某些示例性实施方案中,本发明抗体的酸性/中性kd比可以是2,2.1,2.2,2.3,2.4,2.5,2.6,2.7,2.8,2.9,3,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,100,200,400,1000,10000或更大。在另一个实施方案中,抗体在中性pH值下的kd值可以是 $10^{-2}1/\text{s}$ 、 $10^{-3}1/\text{s}$ 、 $10^{-4}1/\text{s}$ 、 $10^{-5}1/\text{s}$ 、 $10^{-6}1/\text{s}$ 或更小。在另一个实施方案中,抗体在酸性pH值下的kd值可以是 $10^{-3}1/\text{s}$ 、 $10^{-2}1/\text{s}$ 、 $10^{-1}1/\text{s}$ 或更大。

[0372] 如本文所用,表述“酸性pH值”意指4.0至6.5的pH值。表述“酸性pH值”包括4.0,4.1,4.2,4.3,4.4,4.5,4.6,4.7,4.8,4.9,5.0,5.1,5.2,5.3,5.4,5.5,5.6,5.7,5.8,5.9,6.0,6.1,6.2,6.3,6.4和6.5的pH值。在特定方面,“酸性pH值”是5.8或6.0。

[0373] 如本文所用,表述“中性pH值”意指6.7至约10.0的pH值。表述“中性pH值”包括6.7,6.8,6.9,7.0,7.1,7.2,7.3,7.4,7.5,7.6,7.7,7.8,7.9,8.0,8.1,8.2,8.3,8.4,8.5,8.6,8.7,8.8,8.9,9.0,9.1,9.2,9.3,9.4,9.5,9.6,9.7,9.8,9.9和10.0的pH值。在特定方面,“中性pH值”是7.0或7.4。

[0374] 如本文所用,表述“在高钙浓度条件下”或“在高钙浓度下”意指100 μ M至10mM,更优选为200 μ M至5mM,并且特别优选为0.5mM至2.5mM,其接近血浆(血液)中的钙离子浓度。表述“在高钙浓度条件下”或“在高钙浓度下”包括100 μ M、200 μ M、300 μ M、400 μ M、500 μ M、600 μ M、700 μ M、800 μ M、900 μ M、0.5mM、0.7mM、0.9mM、1mM、1.2mM、1.4mM、1.6mM、1.8mM、2.0mM、2.2mM、2.4mM、2.5mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM和10mM Ca^{2+} 的钙浓度值。在特定方面,“在高钙浓度条件下”或“在高钙浓度下”是指1.2mM Ca^{2+} 。

[0375] 如本文所用,表述“在低钙浓度条件下”或“在低钙浓度下”意指0.1 μ M至30 μ M,更优选为0.5 μ M至10 μ M,并且特别优选为1 μ M至5 μ M,其接近体内早期内体的钙离子浓度。表述“在低钙浓度条件下”或“在低钙浓度下”包括0.1 μ M、0.5 μ M、1 μ M、1.5 μ M、2.0 μ M、2.5 μ M、2.6 μ M、2.7 μ M、2.8 μ M、2.9 μ M、3.0 μ M、3.1 μ M、3.2 μ M、3.3 μ M、3.4 μ M、3.5 μ M、4.0 μ M、5.0 μ M、6.0 μ M、7.0 μ M、8.0 μ M、9.0 μ M、10 μ M、15 μ M、20 μ M、25 μ M和30 μ M Ca^{2+} 的钙浓度值。在特定方面,“在低钙浓度条件下”或“在低钙浓度下”是指3.0 μ M Ca^{2+} 。

[0376] 如本文所表达的KD值和kd值可以使用基于表面等离子体共振的生物传感器来确定以表征抗体-抗原相互作用。(参见,例如,本文的实施例2)。KD值和kd值可以在25摄氏度($^{\circ}\text{C}$)或37 $^{\circ}\text{C}$ 下测定。该测定可以在存在150mM NaCl的情况下进行。在一些实施方案中,该测定可以通过使用表面等离子体共振技术来进行,其中抗体被固定,抗原用作分析物,并且使用以下条件:10mM MES缓冲液、0.05%聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯和150mM NaCl,37摄氏度($^{\circ}\text{C}$)。

[0377] 一方面,本发明提供了具有pH依赖性的抗C1s抗体,其中该抗体在可变区中包含至少一个组氨酸,其中可变区的至少一个氨基酸被其他氨基酸置换,使得

[0378] 1) 抗体在酸性pH值和/或中性pH值下的非特异性结合活性将降低,或

[0379] 2) 酸性pH值下C1s结合活性的KD值与中性pH值下C1s结合活性的KD值的比(KD(酸性pH)/KD(中性pH))将增加。

[0380] 一方面,本发明提供了具有pH依赖性的抗C1s抗体,其中该抗体在可变区中包含至少一个组氨酸,其中可变区的至少一个氨基酸被选自D、E、K、R和Q组成的组的氨基酸置换,使得

[0381] 1) 抗体在酸性pH值和/或中性pH值下的非特异性结合活性将降低,或

[0382] 2) 酸性pH值下C1s结合活性的KD值与中性pH值下C1s结合活性的KD值的比(KD(酸性pH)/KD(中性pH))将增加。

[0383] 在某个方面,表述“非特异性结合活性”意指抗体的细胞外基质(ECM)结合活性。在某个方面,表述“非特异性结合活性”意指抗体在酸性pH值下的ECM结合活性。在某些实施方案中,本发明的抗C1s抗体中的至少一个氨基酸可以被一个或多个氨基酸置换,使得ECM结合活性在酸性pH值下降低。在某些实施方案中,本发明的抗C1s抗体中的至少一个氨基酸可以被一个或多个氨基酸置换,使得ECM结合活性在中性pH值下降低。

[0384] 一方面,本发明提供了一种具有pH依赖性的抗C1s抗体,其中在可变区中至少一个氨基酸被置换,从而降低抗体的ECM结合活性。在某些实施方案中,ECM结合活性在酸性pH值下降低。在某些实施方案中,ECM结合活性在中性pH值下降低。在某些实施方案中,此类抗体是指在一个或多个高变区(HVR)中具有一个或多个改变的抗体,与不具有此类改变的亲本抗体相比,此类改变导致抗体对抗原的ECM结合活性改善,即降低ECM结合活性。

[0385] 用于测量“细胞外基质结合”的方法没有特别限制,并且可以使用ELISA系统进行测量,该ELISA系统通过将多肽添加至细胞外基质固定化板,并添加针对多肽的标记抗体来检测多肽与细胞外基质之间的结合。特别地,使用电化学发光(ECL)法的测量方法是优选的,因为该方法能够以更高的灵敏度检测细胞外基质结合能力。具体地,将多肽和钌抗体的混合物添加至细胞外基质固定板中,并且可以使用测量钌电化学发光的ECL系统来测量多肽与细胞外基质之间的结合。添加的多肽浓度可任意设置,并且优选添加高浓度,以提高细胞外基质结合的检测灵敏度。尽管本发明中使用的细胞外基质可以是植物来源的或动物来源的,只要它含有糖蛋白,例如胶原蛋白、蛋白聚糖、纤连蛋白、层粘连蛋白、内毒素、纤维蛋白和基底膜蛋白多糖即可,本发明优选动物来源的细胞外基质;并且例如,可以使用动物(例如人、小鼠、大鼠、猴、兔和犬)来源的细胞外基质。特别是,为了监测人体血浆动力学的改善,优选天然存在的源白人的细胞外基质。此外,用于评价多肽与细胞外基质结合的条件期望在接近pH 7.4的中性范围内(生理条件),但不一定必须在中性范围内,也可以在酸性范围内(接近pH 6.0)进行评价。此外,当评价多肽与细胞外基质的结合时,可以使与多肽结合的抗原分子共存以评价多肽/抗原分子复合物与细胞外基质的结合。

[0386] 在一些实施方案中,抗体在酸性pH值下的非特异性结合活性是否降低,可以通过使用例如ELISA或ECL进行测量。在进一步的实施方案中,在本发明的分离的抗C1s抗体中,可以比较亲本抗体(即D、E、K、R和/或Q置换之前的原始抗体)与其中已引入相对于原始(亲本)抗体的一个氨基酸置换(D、E、K、R和/或Q)的抗体之间的ECM结合值,前提是该抗体在可变区中包含至少一个组氨酸。原始(亲本)抗体可以是任何已知的或新分离的抗体,只要它与C1s特异性结合即可。因此,一方面,在本发明的分离的抗C1s抗体中,置换抗体的ECM结合值是原始(亲本)抗体的ECM结合值的至少1.2倍、1.4倍、1.6倍、1.8倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、5倍、8倍、10倍低。

[0387] 不受特定理论的限制,抗体中的组氨酸残基可以与抗体中组氨酸残基周围的各种残基相互作用。这种相互作用可以影响抗体的结构或CDR的构象。组氨酸在酸性pH值下质子化并带正电。在组氨酸周围的位置引入带正电荷的残基(例如精氨酸或赖氨酸)可以导致在酸性pH值下带正电荷的残基与质子化组氨酸之间的排斥,从而诱导抗体或CDR的结构或构象变化。类似地,在组氨酸周围的位置引入带负电荷的残基(例如天冬氨酸或谷氨酸)可以导致在酸性pH值下带负电荷的残基与质子化的组氨酸之间相互作用,从而诱导抗体或CDR的结构或构象变化。在酸性pH值下发生的抗体或CDR的这些结构或构象变化可以影响抗体的抗原结合,并降低抗体在酸性pH值下与抗原的结合亲和力。总之,在抗体中组氨酸残基周围的位置引入带电残基(例如精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸或谷氨酸)可以降低抗体在酸性pH值下与抗原的结合亲和力,从而以独特的机制提高抗体-抗原相互作用的pH依赖性。

[0388] 一方面,本发明提供了一种用于增加抗体在酸性pH值下的抗原结合活性的KD值与在中性pH值下的抗原结合活性的KD值的比($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)的方法,包括

[0389] 1) 提供在可变区包含至少一个组氨酸的具有pH依赖性的抗体,

[0390] 2) 用选自自由D、E、K、R、Q和H组成的组的氨基酸置换抗体可变区的至少一个氨基酸。

[0391] 一方面,本发明提供了一种用于增强抗原从血浆清除(或去除)的方法,包括

[0392] 1) 提供在可变区包含至少一个组氨酸的具有pH依赖性的抗体,

[0393] 2) 用选自自由D、E、K、R、Q和H组成的组的氨基酸置换抗体可变区的至少一个氨基酸。

[0394] 一方面,本发明提供了一种用于促进抗原结合分子介导的抗原摄取进入细胞的方法,包括

[0395] 1) 提供在可变区包含至少一个组氨酸的具有pH依赖性的抗体,

[0396] 2) 用选自由D、E、K、R、Q和H组成的组的氨基酸置换抗体可变区的至少一个氨基酸。

[0397] 一方面,本发明提供了一种用于增加单一抗原结合分子可以结合的抗原数量的方法,包括

[0398] 1) 提供在可变区包含至少一个组氨酸的具有pH依赖性的抗体,

[0399] 2) 用选自由D、E、K、R、Q和H组成的组的氨基酸置换抗体可变区的至少一个氨基酸。

[0400] 一方面,本发明提供了一种用于增强抗原结合分子从血浆中消除抗原的能力的方法,包括

[0401] 1) 提供在可变区包含至少一个组氨酸的具有pH依赖性的抗体,

[0402] 2) 用选自由D、E、K、R、Q和H组成的组的氨基酸置换抗体可变区的至少一个氨基酸。

[0403] 在某些实施方案中,在本发明的上述方法中,可变区所包含的组氨酸残基与置换的氨基酸(即D、E、K、R、Q或H)之间的距离小于20埃、18埃、16埃、14埃、12埃、10埃、8埃、6埃、4埃或2埃。

[0404] 一方面,本发明提供了一种提高个体血浆中C1s清除率的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用有效量的本发明的抗C1s抗体以提高C1s从血浆中的清除。本发明还提供了一种提高个体血浆中C1r和C1s复合物清除率的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用有效量的本发明的抗C1s抗体以提高C1r和C1s复合物从血浆中的清除。本发明还提供了一种提高个体血浆中C1q、C1r和C1s复合物清除率的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用有效量的本发明的抗C1s抗体以提高C1q、C1r和C1s复合物从血浆中的清除。

[0405] 另一方面,本发明提供了一种从血浆中去除C1s的方法,该方法包括:(a) 鉴定需要从个体血浆中去除C1s的个体;(b) 提供通过抗体的抗原结合(C1s结合)结构域与C1s结合并具有KD(pH5.8)/KD(pH7.4)值的抗体,其中所述KD(pH5.8)/KD(pH7.4)值定义为当使用表面等离子体共振技术确定KD时在pH 5.8下对C1s的KD与在pH 7.4下对C1s的KD的比为2至10,000,其中抗体在体内结合血浆中的C1s并在体内内体中存在的条件下与结合的C1s解离,并且其中所述抗体是人IgG或人源化IgG;以及(c) 向个体施用抗体。还一方面,这种表面等离子体共振技术可以在37°C和150mM NaCl下使用。还一方面,可以使用这样的表面等离子体共振技术,其中抗体被固定,抗原用作分析物,并且使用以下条件:10mM MES缓冲液、0.05%聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯和150mM NaCl,在37°C下。还一方面,可以使用解离速率常数(kd)代替上述KD。

[0406] 另一方面,本发明提供了一种从受试者血浆中去除C1s的方法,该方法包括:(a) 鉴定通过第一抗体的抗原结合结构域与C1s结合的第一抗体;(b) 鉴定第二抗体,该第二抗体:(1) 通过第二抗体的抗原结合(C1s结合)结合域与C1s结合,(2) 氨基酸序列与第一抗体相同,除了第一抗体可变区的至少一个氨基酸被组氨酸置换和/或至少一个组氨酸插入第一抗体的可变区,(3) 具有高于第一抗体的KD(pH5.8)/KD(pH7.4)值的KD(pH5.8)/KD(pH7.4)值,并且为2至10,000,其中KD(pH5.8)/KD(pH7.4)定义为当使用表面等离子体共振技术确定KD时,在pH 5.8下对C1s的KD与在pH 7.4下对C1s的KD的比,(4) 在体内与血浆中的C1s结

合, (5) 在体内内体中存在的条件下从结合的C1s解离, 并且 (6) 是人IgG或人源化IgG; (c) 鉴定需要降低其血浆C1s水平的受试者; 以及 (d) 向受试者施用第二抗体以降低受试者的血浆C1s水平。还一方面, 这种表面等离子体共振技术可以在37°C和150mM NaCl下使用。还一方面, 这种表面等离子体共振技术可以在37°C和150mM NaCl下使用。还一方面, 可以使用这样的表面等离子体共振技术, 其中抗体被固定, 抗原用作分析物, 并且使用以下条件: 10mM MES缓冲液、0.05% 聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯和150mM NaCl, 在37°C下。还一方面, 可以使用解离速率常数(kd) 代替上述KD。

[0407] 另一方面, 本发明提供了一种从受试者血浆中去除C1s的方法, 该方法包括: (a) 鉴定第一抗体, 该第一抗体: (1) 通过第一抗体的抗原结合结构域与C1s结合, (2) 与通过第二抗体的抗原结合(C1s结合) 结构域结合C1s的第二抗体在氨基酸序列上相同, 除了第一抗体的至少一个可变区比第二抗体的相应可变区具有至少一个更多的组氨酸残基, (3) 具有高于第二抗体的KD (pH5.8) /KD (pH7.4) 值的KD (pH5.8) /KD (pH7.4) 值, 并且为2至10,000, 其中KD (pH5.8) /KD (pH7.4) 定义为当使用表面等离子体共振技术确定KD时, 在pH 5.8时对C1s的KD和在pH 7.4时对C1s的KD的比, (4) 在体内与血浆中的C1s结合, (5) 在体内内体中存在的条件下从结合的C1s解离, 并且 (6) 是人IgG或人源化IgG; (b) 鉴定需要降低其血浆C1s水平的受试者; 以及 (c) 向受试者施用至少一次第一抗体, 从而降低受试者的血浆C1s水平。还一方面, 这种表面等离子体共振技术可以在37°C和150mM NaCl下使用。还一方面, 这种表面等离子体共振技术可以在37°C和150mM NaCl下使用。还一方面, 可以使用这样的表面等离子体共振技术, 其中抗体被固定, 抗原用作分析物, 并且使用以下条件: 10mM MES缓冲液、0.05% 聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯和150mM NaCl, 在37°C下。本发明还提供了抑制补体组分C4切割的方法, 其中抗体不抑制补体组分C2的切割。在某些情况下, 抗体抑制经典补体途径的组分; 在某些情况下, 经典补体途径组分是C1s。还一方面, 可以使用解离速率常数(kd) 代替上述KD。

[0408] 一方面, 本公开内容提供了一种调节补体激活的方法。在一些实施方案中, 该方法抑制补体激活, 例如以减少C4b2a的产生。在一些实施方案中, 本公开内容提供了一种调节患有补体介导的疾病或病症的个体中补体激活的方法, 该方法包括向个体施用本公开内容的抗C1s抗体或本公开内容的药物组合物, 其中该药物组合物包含本公开内容的抗C1s抗体。在一些实施方案中, 这种方法抑制补体激活。在一些实施方案中, 个体是哺乳动物。在一些实施方案中, 个体是人。可以通过本领域技术人员已知的任何途径施用, 包括本文公开的那些。在一些实施方案中, 施用是静脉内施用。在一些实施方案中, 施用是鞘内施用。

[0409] 在某些实施方案中, 本发明的抗C1s抗体与来自多于一种物种的C1s结合。在特定实施方案中, 抗C1s抗体与来自人和非人动物的C1s结合。在特定实施方案中, 抗C1s抗体与来自人、大鼠和猴(例如食蟹猴、恒河猴、狨猴、黑猩猩和狒狒)的C1s结合。

[0410] 在一些实施方案中, 提供了抗C1s抗体变体, 其是通过将氨基酸修饰引入W02014/071206中公开的抗体VH1/Vk1、VH1/Vk2、VH1/Vk3、VH2/Vk1、VH2/Vk2、VH2/Vk3、VH3/Vk1、VH3/Vk2、VH3/Vk3、VH4/Vk1、VH4/Vk2或VH4/Vk3制备的。

[0411] 在一些实施方案中, 本发明的抗C1s抗体在以下Kabat编号系统位置的一个或多个位置处包含组氨酸:

[0412] 重链: H26, H27, H28, H29, H30, H31, H32, H33, H34, H35, H50, H51, H52, H52a, H53,

H54, H55, H57, H58, H59, H60, H61, H62, H63, H64, H65, H93, H94, H95, H96, H97, H98, H99, H100, H100a, H101和H102;以及

[0413] 轻链:L24, L25, L26, L27, L27a, L28, L29, L30, L31, L32, L33, L50, L51, L52, L53, L54, L55, L56 L91, L92, L93, L94, L95, L95a, L96和L97。

[0414] 在一些实施方案中,本发明的抗C1s抗体在以下Kabat编号系统位置的一个或多个位置处包含组氨酸:

[0415] 重链:H26, H27, H28, H29, H30, H32, H33, H34, H50, H51, H52a, H54, H57, H58, H59, H60, H61, H65, H93, H95, H99, H100和H100a;以及

[0416] 轻链:L25, L28, L91, L92, L94, L95, L96和L97。

[0417] 在一些实施方案中,本发明的抗C1s抗体包含在选自以下Kabat编号系统位置的位置处置换一种或多个氨基酸残基的至少一个组氨酸:

[0418] 重链:H26, H27, H28, H29, H30, H31, H32, H33, H34, H35, H50, H51, H52, H52a, H53, H54, H55, H57, H58, H59, H60, H61, H62, H63, H64, H65, H93, H94, H95, H96, H97, H98, H99, H100, H100a, H101和H102;以及

[0419] 轻链:L24, L25, L26, L27, L27a, L28, L29, L30, L31, L32, L33, L50, L51, L52, L53, L54, L55, L56 L91, L92, L93, L94, L95, L95a, L96和L97。

[0420] 在一些实施方案中,如上提供的抗C1s抗体的任何一个或多个氨基酸在以下Kabat编号系统位置处被组氨酸置换:

[0421] 重链:H51、H65和H99;以及

[0422] 轻链:L92、L94、L95和L96。

[0423] 在一些实施方案中,本发明的分离的抗C1s抗体包含在以下Kabat编号系统位置处置换氨基酸残基的一个、两个、三个、四个或五个组氨酸:

[0424] 重链:H51、H65和H99;以及

[0425] 轻链:L92、L94、L95和L96。

[0426] 在一些实施方案中,本发明的分离的抗C1s抗体包含至少一个组氨酸,其是在以下位置中的一个或多个位置和CDR或FR氨基酸位置(根据Kabat编号系统)处的置换的残基:

[0427] 重链:H51、H65和H99;以及

[0428] 轻链:L92、L94、L95和L96。

[0429] 在一些实施方案中,本发明的分离的抗C1s抗体包含至少一个组氨酸,其是在以下位置(根据Kabat编号系统)处的置换的残基:

[0430] 1) L92和L94

[0431] 2) L92和L95

[0432] 3) L94和L95

[0433] 4) L92、L94和L95

[0434] 5) H65和L92

[0435] 6) H65和L94

[0436] 7) H65和L95

[0437] 8) H65、L92和L94

[0438] 9) H65、L92和L95

- [0439] 10) H65、L94和L95
- [0440] 11) H65、L92、L94和L95
- [0441] 12) H99和L92
- [0442] 13) H99和L94
- [0443] 14) H99和L95
- [0444] 15) H99、L92和L94
- [0445] 16) H99、L92和L95
- [0446] 17) H99、L94和L95
- [0447] 18) H99、L92、L94和L95
- [0448] 19) H65和H99
- [0449] 20) H65、H99和L92
- [0450] 21) H65、H99和L94
- [0451] 22) H65、H99和L95
- [0452] 23) H65、H99、L92和L94
- [0453] 24) H65、H99、L92和L95
- [0454] 25) H65、H99、L94和L95
- [0455] 26) H65、H99、L92、L94和L95,或
- [0456] 27) H27、H99和L95。

[0457] 在任何上述实施方案中,抗C1s抗体是人源化的。在一个实施方案中,抗C1s抗体包含如以上实施方案中任一个中的HVR,并且进一步包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。在另一个实施方案中,抗C1s抗体包含如以上实施方案中任一个中的HVR,并且进一步包含含有FR序列的VH或VL。

[0458] 还一方面,本发明提供了与本文提供的抗C1s抗体结合相同表位的抗体。例如,在某些实施方案中,本发明提供了与选自由以下项组成的组的抗体结合相同表位的抗体:

[0459] W02014/066744中公开的IPN-M1, IPN-M2, IPN-M3, IPN-M8, IPN-M9, IPN-M10, IPN-M11, IPN-M13, IPN-M14, IPN-M15, IPN-M18, IPN-M23, IPN-M24, IPN-M27, IPN-M28, IPN-M29和IPN-M33。

[0460] 在一些实施方案中,本发明的分离的抗C1s抗体在中性pH值下与选自由以下项组成的组的抗体竞争结合C1s:

[0461] W02014/066744中公开的IPN-M1, IPN-M2, IPN-M3, IPN-M8, IPN-M9, IPN-M10, IPN-M11, IPN-M13, IPN-M14, IPN-M15, IPN-M18, IPN-M23, IPN-M24, IPN-M27, IPN-M28, IPN-M29和IPN-M33。

[0462] 一方面,本公开内容提供了具有pH依赖性结合的分离的人源化单克隆抗体,其特异性结合涵盖补体组分I_s (C1_s) 的结构域IV和V的区域内的表位。在一些情况下,该抗体抑制C1_s与补体组分4 (C4) 的结合。在一些情况下,抗体不抑制C1_s的蛋白酶活性。在一些情况下,本公开内容的分离的人源化单克隆抗体所结合的表位是构象表位。

[0463] 一方面,本公开内容提供了具有pH依赖性结合的分离抗体,其特异性结合补体C1_s 蛋白内的表位。在一些实施方案中,本公开内容的分离的抗C1_s抗体结合激活的C1_s蛋白。在一些实施方案中,本公开内容的分离的抗C1_s抗体结合非活性形式的C1_s。在其他实例中,本

公开内容的分离的抗C1s抗体结合激活的C1s蛋白和非活性形式的C1s。

[0464] 一方面,本公开内容提供了具有pH依赖性结合分离的人源化单克隆抗体,其特异性结合涵盖C1s的结构域IV和V的区域内的表位。例如,本公开内容提供了一种分离的人源化单克隆抗体,其特异性结合SEQ ID NO:3所示氨基酸序列第287-437位氨基酸内的表位。在一些情况下,分离的人源化单克隆抗体与SEQ ID NO:3所示氨基酸序列第287-437位氨基酸内的表位特异性结合,并抑制C4与C1s的结合。本公开内容还提供了治疗补体介导的疾病或病症的方法,该方法包括向有需要的个体施用有效量的分离的人源化单克隆抗体,其特异性结合SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的287-437位氨基酸内的表位,并抑制C4与C1s的结合。

[0465] 一方面,本公开内容提供了一种具有pH依赖性结合分离的人源化单克隆抗体,其特异性结合在SEQ ID NO:3所示的人C1s抗原的第372位包含天冬氨酸的表位。

[0466] 在本发明的还一方面,根据任何上述实施方案的抗C1s抗体是单克隆抗体,包括嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。在一个实施方案中,抗C1s抗体是抗体片段,例如Fv、Fab、Fab'、scFv、双抗体或F(ab')₂片段。在另一个实施方案中,抗体是全长抗体,例如完整的IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体或本文定义的其他抗体类别或同种型。

[0467] 还一方面,根据任何上述实施方案的抗C1s抗体可以单独或组合并入任何特征,如以下第1-7部分所述:

[0468] 1. 抗体亲和力

[0469] 在某些实施方案中,本文提供的抗体的解离常数(Kd或KD)为1 μ M或更小、100nM或更小、10nM或更小、1nM或更小、0.1nM或更小、0.01nM或更小、或0.001nM或更小(例如10⁻⁸M或更小,例如10⁻⁸M至10⁻¹³M,例如10⁻⁹M至10⁻¹³M)。

[0470] 在一个实施方案中,Kd通过放射性标记抗原结合测定(RIA)测量。在一个实施方案中,使用目标抗体的Fab形式及其抗原进行RIA。例如,Fab对抗原的溶液结合亲和力通过以下进行测量:在存在一系列滴定的未标记抗原的情况下用最小浓度的(¹²⁵I)标记的抗原平衡Fab,然后用抗Fab抗体包被的板捕获结合的抗原(参见,例如,Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。为建立测定条件,将MICROTITER(注册商标)多孔板(Thermo Scientific)用50mM碳酸钠(pH 9.6)中的5 μ g/ml捕获抗Fab抗体(Cappel Labs)包被过夜,随后在室温(约23 $^{\circ}$ C)下用PBS中的2% (w/v)牛血清白蛋白封闭两至五个小时。在非吸附板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM [¹²⁵I]-抗原与目标Fab的系列稀释液混合(例如,与Presta等人,Cancer Res.57:4593-4599(1997)中抗VEGF抗体Fab-12的评估一致)。然后将目标Fab孵育过夜;然而,孵育可以持续较长时间(例如,约65小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕获板用于在室温下孵育(例如,一小时)。然后弃液并用PBS中的0.1%聚山梨醇酯20(TWEEN-20(注册商标))将板洗涤八次。当板干燥后,加入150 μ L/孔闪烁剂(MICROSCINT-20TM;Packard),并在TOPCOUNTTM伽马计数器(Packard)上对板计数10分钟。选择产生小于或等于最大结合20%的每种Fab的浓度用于竞争性结合测定。

[0471] 根据另一个实施方案,使用BIACORE(注册商标)表面等离子体共振测定测量KD。例如,使用BIACORE(注册商标)-2000或BIACORE(注册商标)-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)的测定在25 $^{\circ}$ C下使用固定的抗原CM5芯片以~10个响应单位(RU)进行。在一个实施方案中,将羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIACORE, Inc.)根据供应商的说

明用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)激活。在以5 μ L/分钟的流速注射前,抗原用10mM乙酸钠(pH 4.8)稀释至5 μ g/ml(\sim 0.2 μ M),以获得约10个响应单位(RU)的偶联蛋白。抗原注射后,注射1M乙醇胺以封闭未反应的基团。对于动力学测量,在25 $^{\circ}$ C下以约25 μ L/分钟的流速将Fab的两倍系列稀释液(0.78nM至500nM)注射至含有0.05%聚山梨醇酯20(TWEEN-20TM)表面活性剂的PBS(PBST)中。缔合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})使用简单one-to-one Langmuir结合模型(BIACORE(注册商标)评价软件3.2版)通过同时拟合缔合和解离传感图进行计算。平衡解离常数(KD)计算为 k_{off}/k_{on} 比。参见,例如,Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999)。如果通过上述表面等离子体共振测定,导通速率(on-rate)超过 $10^6 M^{-1} s^{-1}$,则可以通过使用荧光猝灭技术来确定导通速率,该技术测量在存在浓度增加的抗原的情况下,于25 $^{\circ}$ C下在PBS(pH 7.2)中的20nM抗抗原抗体(Fab形式)在荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)下的增加或减少,如在分光计中所测量的,例如配备停流的分光光度计(Aviv Instruments)或带有搅拌比色皿的8000系列SLM-AMINCOTM分光光度计(ThermoSpectronic)。

[0472] 在一些实施方案中,本发明的每个组氨酸置换变体在pH 7.4和pH 5.8下的结合亲和力在37 $^{\circ}$ C下使用Biacore T200仪器(GE Healthcare)测定。可以使用胺偶联试剂盒(GE Healthcare)将重组蛋白A/G(Pierce)固定在CM4传感器芯片的所有流通池上。抗体和分析物可以在7(+)缓冲液(20mM ACES、150mM NaCl、1.2mM CaCl₂、0.05%吐温20、0.005%NaN₃, pH 7.4)、5(+)缓冲液(20mM ACES、150mM NaCl、1.2mM CaCl₂、0.05%吐温20、0.005%NaN₃, pH 5.8)或5(-)缓冲液(20mM ACES、150mM NaCl、3 μ M CaCl₂、0.05%吐温20、0.005%NaN₃, pH 5.8)中制备。每个抗体均可以被蛋白A/G捕获至传感器表面。抗体捕获水平的目标是200共振单位(RU)。血清衍生的人C1s(CompTech)或制备的重组C1s可以以例如50或200nM注射,然后解离。传感器表面在每个循环中,例如,使用10mM甘氨酸-HCl pH 1.5进行再生。结合亲和力可以通过使用例如Biacore T200评价软件2.0版(GE Healthcare)处理数据并将其拟合至1:1结合模型进行确定。

[0473] 本发明的Biacore测定步骤的具体实例如下所示。

[0474] 使用Biacore T200仪器(GE Healthcare)在37 $^{\circ}$ C下测定组氨酸置换的变体在pH 7.4和pH 5.8下的结合亲和力。使用胺偶联试剂盒(GE Healthcare)将重组蛋白A/G(Pierce)固定在CM4传感器芯片的所有流动池上。抗体和分析物在7(+)缓冲液(20mM ACES、150mM NaCl、1.2mM CaCl₂、0.05%吐温20、0.005%NaN₃, pH 7.4)或5(+)缓冲液(20mM ACES、150mM NaCl、1.2mM CaCl₂、0.05%吐温20、0.005%NaN₃, pH 5.8)中制备。每个抗体均被蛋白A/G捕获至传感器表面。抗体捕获水平的目标是200共振单位(RU)。血清衍生的人C1s以12.5、50nM(pH 7.4)或50、200nM(pH5.8)或200和800nM(pH5.8)注射,然后解离。传感器表面在每个循环中均使用10mM甘氨酸-HCl pH 1.5进行再生。结合亲和力通过使用Biacore T200评价软件2.0版(GE Healthcare)处理数据并将其拟合至1:1结合模型进行确定。在pH 7.4的解离阶段之后,立即对pH 5.8下另外的解离阶段进行整合。5(+)缓冲液中的解离速率通过使用Scrubber 2.0(BioLogic Software)曲线拟合软件处理和拟合数据进行确定。

[0475] 可选地,使用Biacore T200仪器(GE Healthcare)在37 $^{\circ}$ C下测定组氨酸置换的变体在pH 7.4和pH 5.8下的结合亲和力。使用胺偶联试剂盒(GE Healthcare)将重组蛋白A/G(Pierce)固定在CM4传感器芯片的所有流动池上。抗体和分析物在7(+)缓冲液(20mM ACES、

150mM NaCl、1.2mM CaCl₂、0.05%吐温20、0.005%NaN₃, pH 7.4) 或5(+) 缓冲液(20mM ACES、150mM NaCl、1.2mM CaCl₂、0.05%吐温20、0.005%NaN₃, pH 5.8) 中制备。每个抗体均被蛋白A/G捕获至传感器表面。抗体捕获水平的目标是200共振单位(RU)。血清衍生的人C1s以50nM注射,然后解离。传感器表面在每个循环中均使用10mM甘氨酸-HCl pH 1.5进行再生。结合亲和力通过使用Biacore T200评价软件2.0版(GE Healthcare) 处理数据并将其拟合至1:1结合模型进行确定。在pH 7.4的解离阶段之后,立即对pH 5.8下另外的解离阶段进行整合。5(+) 缓冲液中的解离速率通过使用Scrubber 2.0(BioLogic Software) 曲线拟合软件处理和拟合数据进行确定。

[0476] 在一些实施方案中,如有需要,在pH 7.4的解离阶段之后立即整合pH 5.8下另外的解离阶段。5(+) 缓冲液中的解离速率可以通过使用Scrubber 2.0(BioLogic Software) 曲线拟合软件处理和拟合数据确定。

[0477] 2. 抗体片段

[0478] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv和scFv片段,以及下文描述的其他片段。有关某些抗体片段的综述,参见Hudson等人*Nat. Med.* 9:129-134 (2003)。有关scFv片段的综述,参见,例如,Pluckthun,单克隆抗体药理学,第113卷,Rosenburg和Moore编辑,(Springer-Verlag, New York), pp.269-315 (1994);另见WO 93/16185;和美国专利号5,571,894和5,587,458。有关包含拯救受体结合表位残基并具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的讨论,参见美国专利号5,869,046。

[0479] 双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价的或双特异性的。参见,例如,EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,*Nat. Med.* 9:129-134 (2003);和Hollinger等人,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)。三抗体(triobody)和四抗体(tetradbody)也如Hudson等人,*Nat. Med.* 9:129-134 (2003) 中所述。

[0480] 单结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或者全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体(Domantis, Inc., Waltham, MA;参见,例如,美国专利号6,248,516 B1)。

[0481] 抗体片段可以通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞(例如大肠杆菌或噬菌体)产生,如本文所述。

[0482] 3. 嵌合抗体和人源化抗体

[0483] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体在例如,美国专利号4,816,567;和Morrison等人,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984) 中所述。在一个实例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如,源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物(例如猴)的可变区)和人恒定区。在另一个实例中,嵌合抗体是“类别转换”抗体,其中类别或亚类较亲本抗体的类别或亚类发生变化。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0484] 在某些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,非人抗体经人源化以降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR,例如CDR(或其部分)源自非人抗体,并且FR(或其部分)源自人抗体序列。人源化抗体任选地还将包含人恒定区的至少一部分。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,衍生HVR残基的抗体)的相应残基置换,例如以恢复或

改善抗体特异性或亲和力。

[0485] 例如,在Almagro和Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) 中综述了人源化抗体及其制备方法,并且例如,在Riechmann等人, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); 美国专利号5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409; Kashmiri等人, *Methods* 36:25-34 (2005) (描述特异性决定区(SDR)移植); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (描述“表面重塑”); Dall'Acqua等人, *Methods* 36:43-60 (2005) (描述“FR改组”); 以及Osboum等人, *Methods* 36:61-68 (2005) 和Klimka等人, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (描述FR改组的“引导选择”方法) 中进一步描述。

[0486] 可用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合”方法选择的框架区(参见,例如, Sims等人 *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); 源自特定轻链或重链可变区亚组的人抗体共有序列的框架区(参见,例如, Carter等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); 和Presta等人 *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); 人成熟(体细胞突变)框架区或人种系框架区(参见,例如, Almagro和Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); 和源自筛选FR文库的框架区(参见,例如, Baca等人, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) 和Rosok等人, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996))。

[0487] 4. 人抗体

[0488] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是人抗体。可以使用本领域已知的各种技术产生人抗体。人抗体通常描述于 van Dijk 和 van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001) 以及 Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008) 中。

[0489] 可以通过向转基因动物施用免疫原制备人抗体,该转基因动物已经修饰以响应于抗原性挑战而产生完整的人抗体或具有人可变区的完整抗体。此类动物通常含有全部或部分人免疫球蛋白基因座,其替换内源性免疫球蛋白基因座,或其存在于染色体外或被随机掺入动物染色体中。在此类转基因小鼠中,内源性免疫球蛋白基因座通常已失活。有关从转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见 Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)。另见,例如,美国专利号6,075,181和6,150,584描述了 XENOMOUSE™ 技术;美国专利号5,770,429描述了 HUMAB (注册商标) 技术;美国专利号7,041,870描述了 K-M MOUSE (注册商标) 技术,以及美国专利申请公开号 US 2007/0061900,描述了 VELOCIMOUSE (注册商标) 技术。来自此类动物产生的完整抗体的人可变区可以经进一步修饰,例如,通过与不同的人恒定区组合。

[0490] 人抗体还可以通过基于杂交瘤的方法制备。已经描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系。(参见,例如, Kozbor *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur 等人,单克隆抗体产生技术及应用,第51-63页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 和 Boerner 等人, *J. Immunol.*, 147:86 (1991)。通过人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体还描述于 Li 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) 中。另外的方法包括在例如美国专利号7,189,826 (描述从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体) 和 Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26 (4):265-268 (2006) (描述人-人杂交瘤) 中所述的那些。人杂交瘤技术 (Trioma 技术) 还在 Vollmers 和 Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20 (3):927-937 (2005) 以及 Vollmers 和 Brandlein, *实验和临床药理学方法和结果 (Methods and*

Findings in Experimental and Clinical Pharmacology), 27 (3):185-91 (2005) 中描述。

[0491] 还可以通过分离选自人源噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列产生人抗体。然后可以将此类可变结构域序列与期望的人恒定结构域组合。从抗体文库中选择人抗体的技术如下所述。

[0492] 5. 文库衍生的抗体

[0493] 本发明的抗体可以通过筛选组合文库以获得具有期望活性的抗体来进行分离。例如,本领域已知多种方法用于产生噬菌体展示文库并筛选此类文库以获得具有期望结合特性的抗体。此类方法综述于,例如,Hoogenboom等人分子生物学方法178:1-37 (O'Brien等人,编辑,Human Press,Totowa,NJ,2001),并进一步描述于,例如,McCafferty等人,Nature 348:552-554;Clackson等人,Nature 352:624-628 (1991);Marks等人,J.Mol.Biol.222:581-597 (1992);Marks和Bradbury,分子生物学方法248:161-175 (Lo,编辑,Human Press,Totowa,NJ,2003);Sidhu等人,J.Mol.Biol.338 (2):299-310 (2004);Lee等人,J.Mol.Biol.340 (5):1073-1093 (2004);Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101 (34):12467-12472 (2004);以及Lee等人,J.Immunol.Methods 284 (1-2):119-132 (2004)。

[0494] 在某些噬菌体展示方法中,VH和VL基因库通过聚合酶链反应(PCR)单独克隆并在噬菌体文库中随机重组,然后可以筛选该文库以获得抗原结合噬菌体,如Winter等人,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455 (1994) 中所述。噬菌体通常以单链Fv(scFv)片段或Fab片段的形式展示抗体片段。来自免疫来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体,而无需构建杂交瘤。可选地,可克隆初始库(例如,来自人)以提供针对多种非自身和自身抗原的单一抗体来源并且无需进行任何免疫接种,如Griffiths等人,EMBO J,12:725-734 (1993) 所述。最后,初始文库还可以通过以下来合成制备:从干细胞中克隆非重排的V基因片段,并使用包含随机序列的PCR引物来编码高可变的CDR3区域并在体外完成重排,如Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388 (1992) 所述。描述人抗体噬菌体文库的专利出版物包括,例如:美国专利号5,750,373,以及美国专利公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0495] 从人抗体文库中分离的抗体或抗体片段在本文中被认为是人抗体或人抗体片段。

[0496] 6. 多特异性抗体

[0497] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是多特异性抗体,例如双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两个不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中,结合特异性中的一个针对C1s,而其他针对任何其他抗原。在某些实施方案中,双特异性抗体可以结合C1s的两个不同表位。双特异性抗体还可用于将细胞毒剂定位于表达C1s的细胞。双特异性抗体可以制备为全长抗体或抗体片段。

[0498] 制备多特异性抗体的技术包括但不限于,具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达(参见,Milstein和Cuellar,Nature 305:537 (1983)、WO 93/08829和Traunecker等人,EMBO J.10:3655 (1991)),以及“杵臼”工程化(参见,例如,美国专利号5,731,168)。多特异性抗体还可以通过以下来制备:工程化静电转向效应以制备抗体Fc-异二聚体分子来制备(WO 2009/089004A1);交联两个或多个抗体或片段(参见,例如,美国专利号4,676,980和Brennan等人,Science,229:81 (1985));使用亮氨酸拉链以产生双特异性抗体(参见,例如,Kostelny等人,J.Immunol.,148 (5):1547-1553 (1992));使用“双抗体”技

术制备双特异性抗体片段(参见,例如,Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993));和使用单链Fv(scFv)二聚体(参见,例如,Gruber等人,J.Immunol.,152:5368(1994));以及制备三特异性抗体,如Tutt等人J.Immunol.147:60(1991)所述。

[0499] 具有三个或更多个功能性抗原结合位点的工程化抗体,包括“章鱼抗体”,也包括在本文中(参见,例如,US 2006/0025576A1)。

[0500] 本文的抗体或片段还包括“双作用Fab”或“DAF”,其包含结合C1s以及另一种不同抗原的抗原结合位点(例如,参见,US 2008/0069820)。

[0501] 7. 抗体变体

[0502] 在某些实施方案中,设想了本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可能期望提高抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。抗体的氨基酸序列变体可以通过向编码抗体的核苷酸序列中引入适当的修饰或通过肽合成进行制备。此类修饰包括,例如,抗体氨基酸序列内残基的缺失和/或插入和/或置换。可以进行缺失、插入和置换的任何组合以达到最终构建体,条件是最终构建体具有期望特征,例如抗原结合。

[0503] a) 置换、插入和缺失变体

[0504] 在某些实施方案中,提供了具有一个或多个氨基酸置换的抗体变体。用于置换诱变的目标位点包括HVR和FR。保守置换显示在表1中“优选置换”的标题下。在表1中“示例性置换”的标题下提供了更实质性的变化,并且如下文参考氨基酸侧链类别进一步描述。可以将氨基酸置换引入目标抗体中,并针对期望活性筛选产物,例如保留/改善的抗原结合、降低的免疫原性或改善的ADCC或CDC。

[0505] [表1]

[0506]

原始残基	示例性置换	优选置换
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸 ; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0507] 氨基酸可以根据常见的侧链特性进行分组：

[0508] (1) 疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0509] (2) 中性亲水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0510] (3) 酸性：Asp、Glu；

[0511] (4) 碱性：His、Lys、Arg；

[0512] (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；

[0513] (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

[0514] 非保守置换将使得将这些类别中的一种的成员交换为另一类别成为必须。

[0515] 一种类型的置换变体涉及置换亲本抗体（例如人源化或人抗体）的一个或多个高变区残基。通常，选择用于进一步研究的所得变体相对于亲本抗体在某些生物学特性（例如亲和力增加、免疫原性降低）方面将具有修饰（例如，改善）和/或将基本上保留亲本抗体的某些生物学特性。示例性置换变体是亲和力成熟的抗体，其可以方便地产生，例如，使用基于噬菌体展示的亲合力成熟技术，例如本文所述的那些。简而言之，一个或多个HVR残基发生突变并且变异抗体展示在噬菌体上并筛选特定的生物活性（例如结合亲和力）。

[0516] 可以在HVR中进行改变（例如，置换），例如，以提高抗体亲和力。此类改变可在HVR

“热点”中进行,即由在体细胞成熟过程中经历高频突变的密码子编码的残基(参见,例如,Chowdhury,Methods Mol.Biol.207:179-196(2008)),和/或接触抗原的残基,检测所得变体VH或VL的结合亲和力。通过构建和从二级文库中重新选择的亲和力成熟例如描述于Hoogenboom等人分子生物学方法178:1-37(O'Brien等人,编辑,Human Press,Totowa,NJ,(2001))中述。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法中的任何一种(例如,易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变)将多样性引入选择用于成熟的可变基因中。然后创建次级文库。然后筛选文库以鉴定具有期望亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法涉及HVR导向的方法,其中几个HVR残基(例如,一次4-6个残基)被随机化。参与抗原结合的HVR残基可以被特异性鉴定,例如,使用丙氨酸扫描诱变或建模。尤其是CDR-H3和CDR-L3经常被靶向。

[0517] 在某些实施方案中,置换、插入或缺失可发生在一个或多个HVR内,只要此类改变基本上不降低抗体结合抗原的能力。例如,可以在HVR中进行基本上不降低结合亲和力的保守改变(例如,本文提供的保守置换)。例如,此类改变可以在HVR中的抗原接触残基之外。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,每个HVR或者未改变,或者含有不超过一个、两个或三个氨基酸置换。

[0518] 一种用于鉴定可被靶向用于诱变的抗体的残基或区域的可用方法被称为“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham和Wells(1989)Science,244:1081-1085所述。在该方法中,残基或一组靶残基(例如,带电荷的残基,例如arg、asp、his、lys和glu)被鉴定并被中性或带负电荷的氨基酸(例如丙氨酸或聚丙氨酸)取代,以确定抗体与抗原的相互作用是否受影响。可以在显示对初始置换具有功能敏感性的氨基酸位置处引入进一步的置换。可选地,或另外地,可以分析抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体和抗原之间的接触点。此类接触残基和相邻残基可以作为置换候选物被靶向或消除。可以筛选变体以确定它们是否含有期望的特性。

[0519] 氨基酸序列插入包括长度从一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酰残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括酶(例如用于ADEPT)或多肽(其增加抗体的血浆半衰期)与抗体的N末端或C末端的融合。

[0520] b) 糖基化变体

[0521] 在某些实施方案中,本文提供的抗体被改变以增加或减少抗体被糖基化的程度。抗体添加或缺失糖基化位点可以方便地通过改变氨基酸序列从而产生或去除一个或多个糖基化位点来实现,。

[0522] 在抗体包含Fc区的情况下,附接于其上的碳水化合物可以被改变。哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含分支的双触角寡糖,其通常通过N键附接至Fc区CH2结构域的Asn297。参见,例如,Wright等人TIBTECH 15:26-32(1997)。寡糖可以包括各种碳水化合物,例如甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及在双触角寡糖结构的“茎”中附接至GlcNAc的岩藻糖。在一些实施方案中,可以对本发明的抗体中的寡糖进行修饰以产生具有某些改进特性的抗体变体。

[0523] 在一个实施方案中,提供了具有碳水化合物结构的抗体变体,该碳水化合物结构缺乏连接(直接或间接)Fc区的岩藻糖。例如,此类抗体中岩藻糖的量可以为1%至80%、1%

至65%、5%至65%、或20%至40%。岩藻糖的量通过计算Asn297糖链内岩藻糖的平均量(相对于与Asn 297连接的所有糖结构(例如复合、杂合和高甘露糖结构)的总和)来确定的,如通过MALDI-TOF质谱法所测量的,例如如WO 2008/077546中所述。Asn297是指位于Fc区约第297位的天冬酰胺残基(Fc区残基的EU编号);然而,由于抗体中的微小序列变异,Asn297也可能位于第297位的上游或下游约 \pm 3个氨基酸处,即第294至300位之间。此类岩藻糖基化变体可能具有改进的ADCC功能。参见,例如,美国专利公开号US 2003/0157108 (Presta, L.);US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。与“去岩藻糖基化”或“岩藻糖缺乏”抗体变体相关的出版物实例包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等人J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够产生去岩藻糖基化抗体的细胞系的实例包括蛋白岩藻糖基化缺陷的Lec13 CHO细胞(Ripka等人Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利申请号US 2003/0157108 A1, Presta,L;和WO 2004/056312 A1,Adams等人,尤其是实施例11),以及敲除细胞系,例如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8敲除CHO细胞(参见,例如Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);和WO2003/085107)。

[0524] 抗体变体进一步提供被平分的寡糖,例如,其中连接至抗体Fc区的双触角寡糖被GlcNAc平分。此类抗体变体可能具有降低的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。此类抗体变体的实例描述于,例如,WO 2003/011878 (Jean-Mairet等人);美国专利号6,602,684 (Umana等人);和US 2005/0123546 (Umana等人)。还提供了在连接至Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体可能具有改进的CDC功能。此类抗体变体描述于,例如,WO 1997/30087 (Patel等人);WO 1998/58964 (Raju,S.);和WO 1999/22764 (Raju,S.)。

[0525] c)Fc区变体

[0526] 在某些实施方案中,可以将一个或多个氨基酸修饰引入本文提供的抗体的Fc区,从而产生Fc区变体。Fc区变体可以包含在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如置换)的人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区)。

[0527] 在某些实施方案中,本发明设想了具有一些但不是全部效应子功能的抗体变体,这使其成为其中抗体的体内半衰期很重要但某些效应子功能(例如补体和ADCC)是不必要的或有害的应用的理想候选物。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定以确证CDC和/或ADCC活性降低/耗竭。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺乏Fc γ R结合(因此可能缺乏ADCC活性),但保留FcRn结合能力。介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达Fc γ R1III,而单核细胞表达Fc γ R1、Fc γ R2和Fc γ R3。造血细胞上的FcR表达总结在Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)的第464页中的表3。评估目标分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例描述于美国专利号5,500,362(参见,例如,Hellstrom,I.等人Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom,I.等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))。可选地,可以采用非放射性测定方法(参见,例如,流式

细胞术的ACT1™非放射性细胞毒性测定 (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; 和 CytoTox 96 (注册商标) 非放射性细胞毒性测定 (Promega, Madison, WI)。可用于此类测定的有用的效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。可选地, 或另外地, 可在体内评估目标分子的ADCC活性, 例如在动物模型中, 例如Clynes等人Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998) 所公开的。还可以进行C1q结合测定以确证抗体不能结合C1q并因此缺乏CDC活性。参见, 例如, WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活, 可以进行CDC测定 (参见, 例如, Gazzano-Santoro等人, J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. 等人, Blood 101:1045-1052 (2003); 以及 Cragg, M.S. 和 M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004))。FcRn结合和体内清除率/半衰期确定还可以使用本领域已知的方法进行 (参见, 例如, Petkova, S.B. 等人, Int'l Immunol. 18 (12):1759-1769 (2006))。

[0528] 效应子功能降低的抗体包括具有一个或多个Fc区残基238、265、269、270、297、327和329置换的抗体 (美国专利号6,737,056)。此类Fc突变体包括在氨基酸第265、269、270、297和327位的两个或更多个位置处发生置换的Fc突变体, 包括具有残基265和297置换为丙氨酸的所谓的“DANA”Fc突变体 (美国专利号7,332,581)。

[0529] 描述了与FcR结合增加或减少的某些抗体变体。(参见, 例如, 美国专利号6,737,056; WO 2004/056312和Shields等人, J. Biol. Chem. 9 (2):6591-6604 (2001))。

[0530] 在某些实施方案中, 抗体变体包含具有一个或多个改善ADCC的氨基酸置换的Fc区, 所述置换为例如在Fc区的第298、333和/或334位 (残基的EU编号) 处的置换。

[0531] 在一些实施方案中, 在Fc区中进行改变, 其导致改变的 (即增加的或减少的) C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC), 例如, 如美国专利号6,194,551、WO 99/51642和Idusogie等人J. Immunol. 164:4178-4184 (2000) 中所述。

[0532] 具有增加的半衰期和增加的与新生儿Fc受体 (FcRn) 结合的抗体, 其负责将母体IgG转移至胎儿 (Guyer等人, J. Immunol. 117:587 (1976) 和Kim等人, J. Immunol. 24:249 (1994)), 描述于US2005/0014934A1 (Hinton等人)。那些抗体包含其中具有一个或多个置换的Fc区, 其中所述置换增加了Fc区与FcRn的结合。此类Fc变体包括在以下一个或多个Fc区残基处具有置换的变体: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424或434, 例如Fc区残基434的置换 (美国专利号7,371,826)。

[0533] 关于Fc区变体的其他实例另见Duncan&Winter, Nature 322:738-40 (1988); 美国专利号5,648,260; 美国专利号5,624,821; 以及WO 94/29351。

[0534] d) 半胱氨酸工程化抗体变体

[0535] 在某些实施方案中, 可能期望构建半胱氨酸工程化抗体, 例如“thioMAb”, 其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基置换。在特定实施方案中, 置换的残基出现在抗体的可及位点。通过用半胱氨酸置换那些残基, 反应性硫醇基团由此位于抗体的可及位点并且可用于将抗体缀合至其他部分, 例如药物部分或接头-药物部分, 以产生免疫缀合物, 如本文进一步描述。在某些实施方案中, 以下残基中的任何一个或多个可以被半胱氨酸置换: 轻链的V205 (Kabat编号); 重链的A118 (EU编号); 和重链Fc区的S400 (EU编号)。半胱氨酸工程化抗体可以如例如美国专利号7,521,541中所述产生。

[0536] e) 抗体衍生物

[0537] 在某些实施方案中,本文提供的抗体可经进一步修饰以包含本领域已知且容易获得的另外的非蛋白质部分。适用于抗体衍生化的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于,聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)、以及葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、聚丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。由于其在水中具有稳定性,聚乙二醇丙醛在生产方面可能具有优势。聚合物可以具有任何分子量,并且可以是支化的或未支化的。连接至抗体上的聚合物的数量可能有所不同,并且如果连接多于一个聚合物,它们可以是相同或不同的分子。通常,用于衍生化的聚合物的数量和/或类型可以基于包括但不限于以下的考虑而确定:待改进抗体的特定性质或功能、抗体衍生物是否将用于在限定条件下的治疗等。

[0538] 在另一个实施方案中,提供了抗体和可以通过暴露于辐射而被选择性加热的非蛋白质部分的缀合物。在一个实施方案中,非蛋白质部分是碳纳米管(Kam等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:11600-11605(2005))。辐射可以是任何波长,并且包括但不限于不伤害普通细胞但将非蛋白质部分加热至接近抗体-非蛋白质部分的细胞被杀死的温度的波长。

[0539] B. 重组方法和组合物

[0540] 可以使用重组方法和组合物产生抗体,例如,如美国专利号4,816,567中所述。在一个实施方案中,提供了编码本文所述的抗C1s抗体的分离的核酸。此类核酸可以编码包含抗体的VL的氨基酸序列和/或包含抗体的VH的氨基酸序列(例如,抗体的轻链和/或重链)。在进一步的实施方案中,提供了一种或多种包含此类核酸的载体(例如,表达载体)。在另一个实施方案中,提供了包含这种核酸的宿主细胞。在一个此类实施方案中,宿主细胞包含以下各项(例如,已被以下各项转化):(1)包含核酸的载体,该核酸编码包含抗体的VL的氨基酸序列和包含抗体的VH的氨基酸序列,或(2)包含编码包含抗体的VL的氨基酸序列的核酸的第一载体和包含编码包含抗体的VH的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一个实施方案中,宿主细胞是真核细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴细胞(例如Y0、NS0、Sp2/0细胞)。在一个实施方案中,提供了一种制备抗C1s抗体的方法,其中该方法包括在适合于表达抗体的条件下培养包含编码抗体的核酸的宿主细胞,如上文所提供的,并且任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗体。

[0541] 对于抗C1s抗体的重组产生,将编码抗体的核酸(例如如上所述)分离并插入一个或多个载体中,用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可以使用常规程序(例如,通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)容易地分离和测序此类核酸。

[0542] 用于克隆或表达抗体编码载体的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,抗体可以在细菌中产生,特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达,参见,例如,美国专利号5,648,237、5,789,199和5,840,523。(另见Charlton,分子生物学方法,第248卷(BKC Lo,ed.,Humana Press,Totowa,NJ,2003),第245-254页,描述抗体片段在大肠杆菌中的表达)。表达后,抗体可以以可溶性级分从细菌细胞悬浊液中分离并且可以进一步纯化。

[0543] 除原核生物外,真核微生物(例如丝状真菌或酵母)是抗体编码载体的合适克隆或表达宿主,包括糖基化途径已“人源化”的真菌和酵母菌株,从而产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。参见Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), 和Li等人, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)。

[0544] 用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞还源自多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经鉴定出许多杆状病毒株,它们可以与昆虫细胞联合使用,特别是用于草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞的转染。

[0545] 植物细胞培养物也可用作宿主。参见,例如,美国专利号5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429(描述了用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0546] 脊椎动物细胞也可用作宿主。例如,适于悬浮生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。其他有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是SV40(COS-7)转化的猴肾CV1系;人胚胎肾系(293或293细胞,如例如Graham等人, *J. Gen. Virol.* 36:59 (1977)中所述);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠支持细胞(TM4细胞,例如,如Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)中所述);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);水牛大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);TRI细胞,例如,如Mather等人, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)中所述);MRC 5细胞;和FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR CHO细胞(Urlaub等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980));和骨髓瘤细胞系,例如Y0、NS0和Sp2/0。有关适用于抗体产生的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见,例如, Yazaki和Wu, *分子生物学方法*,第248卷(B.K.C.Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268页(2003)。

[0547] 具有pH依赖性特征的抗体可以通过使用筛选方法和/或诱变方法获得,例如,如WO 2009/125825中所述。筛选方法可以包括在对特定抗原特异的抗体群中鉴定具有pH依赖性结合特征的抗体的任何过程。在某些实施方案中,筛选方法可以包括在酸性pH和中性pH值下测量初始抗体群内的单个抗体的一个或多个结合参数(例如, KD或kd)。抗体的结合参数可以使用例如表面等离子体共振或允许定量或定性评估抗体与特定抗原的结合特性的任何其他分析方法进行测量。在某些实施方案中,筛选方法可包括鉴定以2或更大的酸性KD/中性KD比结合抗原的抗体。可选地,筛选方法可以包括鉴定以2或更大的酸性kd/中性kd比结合抗原的抗体。

[0548] 在另一个实施方案中,诱变方法可以包括在抗体的重链和/或轻链中掺入氨基酸的缺失、置换或添加,以增强抗体与抗原的pH依赖性结合。在某些实施方案中,诱变可以在抗体的一个或多个可变结构域内进行,例如,在一个或多个HVR(例如, CDR)内。例如,诱变可以包括用另一氨基酸置换抗体的一个或多个HVR(例如, CDR)内的氨基酸。在某些实施方案中,诱变可以包括用组氨酸置换抗体的至少一个HVR(例如, CDR)中的一个或多个氨基酸。在某些实施方案中,“增强的pH依赖性结合”是指与诱变前抗体的原始“亲本”形式相比,突变形式的抗体表现出更大的酸性KD/中性KD比,或更大的酸性kd/中性kd比。在某些实施方案中,抗体的突变形式的酸性KD/中性KD比为2或更大。可选地,抗体的突变形式的酸性kd/中性kd比为2或更大。

[0549] 多克隆抗体优选通过相关抗原和佐剂的多次皮下(sc)或腹腔(ip)注射在动物中产生。使用双功能或衍生剂(例如马来酰亚胺苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、SOCl₂或R₁N=C=NR,其中R和R₁是不同的烷基),将相关抗原与在待免疫物种中具有免疫原性的蛋白(例如钥孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂)缀合可能有用。

[0550] 通过将例如100μg或5μg蛋白或缀合物(分别用于兔或小鼠)与3倍体积的弗氏完全佐剂联合使用并在多个部位皮内注射溶液,将动物(通常是非人哺乳动物)针对抗原、免疫原性缀合物或衍生物进行免疫。一个月后,通过在多个部位皮下注射,用1/5至1/10原始量的弗氏完全佐剂中的肽或缀合物将动物加强免疫。7至14天后,对动物进行取血并测定血清的抗体效价。动物被加强免疫直至达到效价平台期。优选地,动物用缀合至不同蛋白和/或通过不同交联剂的相同抗原的缀合物加强免疫。缀合物也可以作为蛋白融合物在重组细胞培养物中制备。此外,聚集剂(例如明矾)也适用于增强免疫应答。

[0551] 单克隆抗体获自基本上同质的抗体的群体,即,除了可能以少量存在的天然发生的突变和/或翻译后修饰(例如异构化、酰胺化)之外,构成该群体的各个抗体是相同的。因此,修饰语“单克隆”表示抗体的特征不是离散抗体的混合物。

[0552] 例如,可以使用Kohler等人,Nature 256(5517):495-497(1975)首先描述的杂交瘤方法制备单克隆抗体。在杂交瘤方法中,将小鼠或其他合适的宿主动物例如仓鼠如上文所述进行免疫以引发产生或能够产生特异性结合用于免疫的蛋白的抗体的淋巴细胞。可选地,淋巴细胞可以在体外免疫。

[0553] 免疫剂将通常包括抗原蛋白或其融合变体。通常,如果需要人来源的细胞,则使用外周血淋巴细胞(PBL),或者如果需要非人哺乳动物来源的细胞,则使用脾细胞或淋巴结细胞。然后使用合适的融合剂(例如聚乙二醇)将淋巴细胞与永生化细胞系融合以形成杂交瘤细胞(Goding,单克隆抗体:原理与实践,学术出版社(1986),第59-103页)。

[0554] 永生化细胞系通常是转化的哺乳动物细胞,特别是啮齿动物、牛和人来源的骨髓瘤细胞。通常,采用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。如此制备的杂交瘤细胞在合适的培养基中接种并生长,该培养基优选含有一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),则杂交瘤的培养基通常包括次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(HAT培养基),它们是阻止HGPRT缺乏细胞生长的物质。

[0555] 优选的永生化骨髓瘤细胞是那些有效融合、支持所选抗体产生细胞稳定高水平产生抗体并且对培养基(例如HAT培养基)敏感的那些细胞。其中,优选的是鼠骨髓瘤细胞系,例如那些源自获自美国加利福尼亚州圣地亚哥的Salk Institute Cell Distribution Center的MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤以及获自美国弗吉尼亚州马纳萨斯美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,Manassas)的SP-2细胞(及其衍生物,例如,X63-Ag8-653)的细胞系。还描述了人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系用于产生人单克隆抗体(Kozbor等人,J.Immunol.133(6):3001-3005(1984);Brodeur等人,单克隆抗体生产技术及应用,Marcel Dekker,Inc.,纽约,第51-63页(1987))。

[0556] 测定杂交瘤细胞在其中生长的培养基用于针对抗原的单克隆抗体的产生。优选地,由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性通过免疫沉淀或体外结合测定例如放射

免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA) 进行确定。此类技术和测定是本领域已知的。例如,结合亲和力可以通过Munson, *Anal. Biochem.* 107 (1):220-239 (1980) 的Scatchard分析进行确定。

[0557] 在鉴定产生具有期望特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,可以通过有限稀释程序使克隆分成亚克隆并通过标准方法生长 (Goding, 同上)。为此目的合适的培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。此外,杂交瘤细胞可以在哺乳动物体内作为肿瘤生长。

[0558] 由亚克隆分泌的单克隆抗体通过常规免疫球蛋白纯化程序适当地与培养基、腹水或血清分离,例如,蛋白A-琼脂糖、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析。

[0559] C. 测定

[0560] 本文提供的抗C1s抗体可以通过本领域已知的各种测定来鉴定、筛选或表征它们的物理/化学特性和/或生物活性。

[0561] 1. 结合测定和其他测定

[0562] 一方面,例如,通过已知方法 (例如ELISA、Western印迹等) 检测本发明抗体的抗原结合活性。

[0563] 另一方面,竞争测定可用于鉴定与本文所述的任何抗C1s抗体竞争结合C1s的抗体。在某些实施方案中,当此类竞争抗体过量存在时,其阻断 (例如,降低) 参考抗体与C1s的结合至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或更多。在某些实施方案中,此类竞争抗体结合至本文所述的任何抗C1s抗体所结合的不同表位 (例如,线性或构象表位)。Morris (1996) “表位映射方法 (Epitope Mapping Protocols)”, 分子生物学方法第66卷 (Humana Press, Totowa, NJ) 中提供了映射抗体结合的表位的详细示例性方法。在某些实施方案中,此类竞争测定可以在中性pH条件下进行。

[0564] 在示例性竞争测定中,固定的C1s在包含与C1s结合的第一标记抗体 (例如,本文所述的那些中的一种) 和正在检测其与第一抗体竞争结合C1s的能力的第二未标记抗体的溶液中孵育。第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照,固定的C1s在包含第一标记抗体但不包含第二未标记抗体的溶液中孵育。在允许第一抗体与C1s结合的条件下孵育后,去除多余的未结合抗体,并测量与固定的C1s相关的标记量。如果检测样品中与固定的C1s相关联的标记量相对于对照样品实质性减少,则表明第二抗体与第一抗体竞争结合C1s。参见Harlow和Lane (1988) 抗体:实验室手册第14章 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

[0565] 另一方面,与本文提供的抗C1s抗体结合相同表位或与本文提供的抗C1s抗体竞争结合C1s的抗体可以使用夹心测定进行鉴定。夹心测定涉及使用两种抗体,每种抗体均能够结合待检测蛋白的不同免疫原性部分或表位。在夹心测定中,测试样品分析物与固定在固体支持物上的第一抗体结合,然后第二抗体与分析物结合,从而形成不溶性三部分复合物。参见David&Greene, 美国专利号4,376,110。第二抗体本身可以用可检测部分标记 (直接夹心测定) 或可以使用标记有可检测部分的抗免疫球蛋白抗体测量 (间接夹心测定)。例如,一种夹心测定是ELISA测定,在这种情况下可检测部分是酶。与本文提供的抗C1s抗体同时结合C1s的抗体可被确定为结合与抗C1s抗体不同的表位的抗体。因此,不与本文提供的抗C1s抗体同时结合C1s的抗体可以确定为与抗C1s抗体结合相同表位或与抗C1s抗体竞争结合

C1s的抗体

[0566] 2. 活性测定

[0567] 一方面,提供了用于鉴定其具有生物活性的抗C1s抗体的测定法。生物活性可以包括阻断经典途径的激活和由所述途径的激活引起的切割产物(C2a、C2b、C3a、C3b、C4a、C4b、C5a和C5b)的产生。还提供了在体内和/或体外具有这种生物活性的抗体。

[0568] 在某些实施方案中,检测本发明的抗体的此类生物活性。在一些实施方案中,可以评价本发明的抗体抑制已被针对cRBC抗原的抗体致敏的鸡红细胞(cRBC)的补体介导的溶血的能力。使用人血清作为补体蛋白的来源,可以通过分光光度法测量释放的血红蛋白的量来确定本发明的抗体活性。在一些实施方案中,可以评价本发明的抗体抑制激活的C1s介导的纯化C4而非C2的切割的能力。通过凝胶电泳或western印迹法测量切割的C4或C2的量来确定抗体活性。与其天然未切割形式相比,切割的C4或C2可以通过其较小的分子量进行检测。

[0569] 3. 用于评估抗原(C1s)消除的小鼠PK研究

[0570] 在某些实施方案中,可以如下在体内(例如,在小鼠中)评估本发明的抗体对抗原(例如,人C1s(也称为hC1s))消除的加速。

[0571] 通过高效液相色谱-电喷雾串联质谱(LC/ESI-MS/MS)测量小鼠血浆中的C1s浓度

[0572] 可以通过LC/ESI-MS/MS测量小鼠血浆中hC1s(或抗C1s抗体)的浓度。校准标准品通过在小鼠血浆中以规定量混合和稀释hC1s(或抗C1s抗体)进行制备。校准标准品和血浆样品与例如尿素、二硫苏糖醇和溶菌酶(鸡蛋清)在碳酸氢铵中混合,并孵育。然后,加入碘乙酰胺并在黑暗中孵育。接下来,加入碳酸氢铵中的胰蛋白酶并孵育。最后,加入三氟乙酸使任何残留的胰蛋白酶失活。样品通过LC/ESI-MS/MS进行分析。人C1s特异性肽(例如,LLEVPEGR)由选定的反应监测(SRM)进行监测。对于人C1,SRM跃迁可能是[M+2H]²⁺(m/z 456.8至y6离子(m/z 686.4))。校准曲线可以通过加权(1/x²)线性回归来构建,使用相对于浓度绘制的峰面积。从校准曲线计算小鼠血浆中的浓度。

[0573] 在小鼠中施用抗C1s抗体后总hC1s的药代动力学评价

[0574] hC1s、hC1q或抗C1s抗体的体内药代动力学可以在向小鼠单独施用抗原或抗原与抗C1s抗体联合施用后进行评估。将含有hC1s(等)的溶液/混合物静脉注射到小鼠体内。抗原溶液给药后,立即以相同方式向同一个体施用抗C1s抗体溶液。可以适当地设计剂量设置以允许几乎所有hC1s在循环中处于结合形式。随时间(例如,在注射后5、30分钟,2、7小时,3、7、14、21和28天)采集血液。立即离心血液以分离血浆样品。通过LC/ESI-MS/MS在每个采样点测量hC1s(等)的血浆浓度。hC1s(等)的PK参数通过非房室(non-compartmental)分析进行估计。例如,计算抗C1s抗体的hC1s CL(清除率)比。如果该比值更高,这表示可以更快地消除hC1s。

[0575] D. 免疫缀合物

[0576] 本发明还提供了免疫缀合物,其包含与一种或多种细胞毒剂缀合的本文中的抗C1s抗体,该细胞毒剂例如化学治疗剂或药物、生长抑制剂、毒素(例如,蛋白毒素,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,或其片段),或放射性同位素。

[0577] 在一个实施方案中,免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中抗体与一种或多种药物缀合,所述药物包括但不限于美登木素生物碱(参见美国专利号5,208,020、5,416,

064和欧洲专利EP 0 425 235 B1);奥瑞他汀,例如单甲基奥瑞他汀药物部分DE和DF(MMAE和MMAF)(参见美国专利号5,635,483和5,780,588以及7,498,298);多拉司他丁;加利车霉素或其衍生物(参见美国专利号5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,773,001和5,877,296;Hinman等人,Cancer Res.53:3336-3342(1993);和Lode等人,Cancer Res.58:2925-2928(1998));葱环类药物,例如道诺霉素或多柔比星(参见Kratz等人,Current Med.Chem.13:477-523(2006);Jeffrey等人,Bioorganic&Med.Chem.Letters 16:358-362(2006);Torgov等人,Bioconj.Chem.16:717-721(2005);Nagy等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:829-834(2000);Dubowchik等人,Bioorg.&Med.Chem.Letters 12:1529-1532(2002);King等人,J.Med.Chem.45:4336-4343(2002);和美国专利号6,630,579);甲氨蝶呤;长春地辛;紫杉烷,例如多西他赛、紫杉醇、拉洛他赛、替司他赛和奥他赛;单端孢霉烯;和CC1065。

[0578] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包含与酶促活性毒素或其片段缀合的如本文所述的抗体,包括但不限于白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α -肌氨酸、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻风树毒素、巴豆毒素、皂草抑制剂、白树毒素、丝裂蛋白、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素和单端孢霉菌素。

[0579] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包含与放射性原子缀合以形成放射性缀合物的如本文所述的抗体。多种放射性同位素可用于产生放射性缀合物。实例包括 ^{211}At 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、 ^{32}P 、 ^{212}pb 和Lu的放射性同位素。当放射性缀合物用于检测时,它可以包含用于闪烁扫描研究的放射性原子,例如Tc-99m或 ^{123}I ,或用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像,MRI)的自旋标记,例如碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0580] 抗体和细胞毒剂的缀合物可以使用多种双功能蛋白偶联剂制备,例如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亚氨基硫杂环戊烷(IT)、亚氨基酯的双功能衍生物(例如己二酸二甲酯)、活性酯(例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(例如戊二醛)、双叠氮化合物(例如双(对叠氮苯甲酰基)己二胺)、双叠氮衍生物(例如双(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(例如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可以如Vitetta等人,Science 238:1098(1987)中所述制备蓖麻蛋白免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核素与抗体缀合的示例性螯合剂。参见W094/11026。接头可以是促进细胞中细胞毒性药物释放的“可切割接头”。例如,可以使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、光不稳定接头、二甲基接头或含二硫化物接头(Chari等人,Cancer Res.52:127-131(1992);美国专利号5,208,020)。

[0581] 本文中的免疫缀合物或ADC明确设想但不限于用交联剂制备的此类缀合物,所述交联剂包括但不限于,BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基EMCS、磺基GMBS、磺基KMUS、磺基MBS、磺基SIAB、磺基SMCC、磺基SMPB和SVSB(琥珀酰亚胺-(4-乙烯基砜)苯甲酸酯),它们可商购获得(例如,来自Pierce Biotechnology,Inc.,Rockford,IL,USA)。

[0582] E.用于诊断和检测的方法和组合物

[0583] 某些实施方案中,本文提供的任何抗C1s抗体可用于检测生物样品中C1s的存在。如本文所用,术语“检测”包括定量或定性检测。在某些实施方案中,生物样品包括细胞或组织,例如血清、全血、血浆、活检样品、组织样品、细胞悬液、唾液、痰、口腔液、脑脊液、羊水、腹水、乳汁、初乳、乳腺分泌物、淋巴液、尿液、汗液、泪液、胃液、滑液、腹膜液、晶状体液或粘液。

[0584] 在一个实施方案中,提供了用于诊断或检测方法中的抗C1s抗体。还一方面,提供了检测生物样品中C1s的存在的方法。在某些实施方案中,该方法包括在允许抗C1s抗体与C1s结合的条件下使生物样品与本文所述的抗C1s抗体接触,并检测抗C1s抗体与C1s之间是否形成复合物。这种方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中,抗C1s抗体用于选择适合接受抗C1s抗体疗法的受试者,例如其中C1s是选择患者的生物标志物。

[0585] 可以使用本发明的抗体诊断的示例性病症包括但不限于,年龄相关性黄斑变性、阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化、过敏反应、嗜银粒性痴呆 (argyrophilic grain dementia)、关节炎 (例如,类风湿性关节炎)、哮喘、动脉粥样硬化、非典型溶血性尿毒症综合征、自身免疫性疾病、Barraquer-Simons综合征、贝切特(氏)病、英国型淀粉样血管病 (British type amyloid angiopathy)、大疱性类天疱疮、伯格(氏)病、C1q肾病、癌症、灾难性抗磷脂综合征、脑淀粉样血管病、冷凝集素病、皮质基底节变性、Creutzfeldt-Jakob病、克罗恩病、冷球蛋白血管炎 (cryoglobulinemic vasculitis)、拳击员痴呆、路易体痴呆 (dementia with Lewy Bodies) (DLB)、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、盘状红斑狼疮、唐氏综合征、局灶节段性肾小球硬化、形式思维障碍、额颞叶痴呆 (FTD)、与17号染色体相关的帕金森病额颞叶痴呆、额颞叶变性 (frontotemporal lobar degeneration)、Gerstmann-Straussler-Scheinker病、格-巴二氏综合征、哈-斯二氏病、溶血性尿毒症综合征、遗传性血管性水肿、低磷血症、特发性肺炎综合征、免疫复合体病、包涵体肌炎、感染性疾病 (例如,由细菌 (例如,脑膜炎奈瑟菌或链球菌)、病毒 (例如,人免疫缺陷病毒 (HIV)) 或其他感染原引起的疾病)、炎性疾病、缺血/再灌注损伤、轻度认知障碍、免疫血小板减少性紫癜 (ITP)、A型钼辅因子缺乏症 (molybdenum cofactor deficiency) (MoCD)、膜增生性肾小球肾炎 (MPGN) I、膜增生性肾小球肾炎 (MPGN) II (致密沉积病)、膜性肾炎、多发梗塞性痴呆、狼疮 (例如系统性红斑狼疮 (SLE))、肾小球肾炎、川崎病、多灶性运动神经病、多发性硬化、多系统萎缩、重症肌无力、心肌梗塞、肌强直性营养不良、视神经脊髓炎、C型尼曼-皮克病、非Guamanian运动神经元病伴神经原纤维缠结、帕金森病、帕金森病伴痴呆、阵发性夜间血红蛋白尿症、寻常型天疱疮、皮克(氏)病、脑炎后帕金森病、多发性肌炎、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病 (prion protein cerebral amyloid angiopathy)、进行性皮质下神经胶质增生、进行性核上性麻痹、银屑病、败血症、志贺毒素大肠杆菌 (STEC) -HuS、脊髓性肌萎缩、中风、亚急性硬化性全脑炎、缠结性痴呆 (Tangle only dementia)、移植排斥、血管炎 (例如,ANCA相关血管炎)、Wegner肉芽肿 (Wegner's granulomatosis)、镰状细胞病、冷球蛋白血症、混合性冷球蛋白血症、原发性混合性冷球蛋白血症、II型混合型冷球蛋白血症、III型混合型冷球蛋白血症、肾炎、药物诱发的血小板减少症、狼疮性肾炎、大疱性类天疱疮、获得性大疱性表皮松解症、迟发性溶血性输血反应、低补体血症性荨麻疹性血管炎综合征 (hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome)、假晶状体大疱性角膜病变和血小板输注无效 (platelet refractoriness)。

[0586] 在某些实施方案中,提供了标记的抗C1s抗体。标记包括但不限于,直接检测的标记或部分(例如荧光、发色、电子致密、化学发光和放射性标记),以及间接检测的部分例如酶或配体,例如通过酶促反应或分子相互作用。示例性标记包括但不限于,放射性同位素³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H和¹³¹I,荧光团(例如稀土螯合物或荧光素及其衍生物)、罗丹明及其衍生物、丹酰、伞形酮、荧光素酶(例如萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶(美国专利号4,737,456))、荧光素、2,3-二氢酞嗪二酮、辣根过氧化物酶(HR)、碱性磷酸酶、β-氨基葡萄糖酶、葡萄糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、杂环氧化酶(例如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶),那些使用过氧化氢氧化染料前体(例如HR、乳过氧化物酶或微过氧化物酶、生物素/抗生物素蛋白、自旋标记、噬菌体标记、稳定自由基等)与酶偶联的偶联物。

[0587] F. 药物制剂

[0588] 如本文所述的抗原结合分子的药物制剂通过将具有期望纯度的此类分子与一种或多种任选的药学上可接受的运载体(Remington制药科学第16版,Osol, A. 编辑(1980))混合以冻干制剂或水溶液的形式进行制备。药学上可接受的运载体在所采用的剂量和浓度下对接受者通常是无毒的,并且包括但不限于:缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲铵氯化物;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖类,例如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;形成盐的反离子,例如钠;金属配合物(例如锌-蛋白质配合物);和/或非离子表面活性剂,例如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性药学上可接受的运载体还包括间质药物分散剂,例如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,例如rHuPH20(HYLENEX(注册商标),Baxter International, Inc.)。某些示例性sHASEGP和使用方法,包括rHuPH20,如美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968所述。一方面,sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶例如软骨素酶联合使用。

[0589] 示例性冻干抗体制剂如美国专利号6,267,958所述。水性抗体制剂包括美国专利号6,171,586和W02006/044908中描述的那些,后者包括组氨酸-乙酸盐缓冲剂。

[0590] 根据待治疗的特定适应症所必需的,本文的制剂还可以包含多于一种活性成分,优选具有互补活性且不相互产生不利影响的活性成分。例如,可能需要进一步提供用于联合治疗的制剂。此类活性成分以对预期目的有效的量适当地联合存在。

[0591] 活性成分可以被包封在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如,分别在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或粗乳液中的羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。此类技术公开Remington制药科学第16版,Osol, A. 编辑(1980)。

[0592] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的合适实例包括含有该分子的固体疏水聚合物的半透性基质,该基质是成型制品的形式,例如薄膜或微胶囊。

[0593] 用于体内施用的制剂通常是无菌的。无菌可以容易地实现,例如通过无菌过滤膜

过滤。

[0594] G. 治疗方法和组合物

[0595] 本文提供的任何抗原结合分子均可用于治疗。

[0596] 一方面,提供了用作药物的抗原结合分子。还一方面,提供了用于治疗补体介导的疾病或病症的抗原结合分子。在某些实施方案中,提供了用于治疗方法中的抗原结合分子。在某些实施方案中,本发明提供了用于治疗患有补体介导的疾病或病症的个体的方法中的抗原结合分子,该方法包括向个体施用有效量的抗原结合分子。在一个此类实施方案中,该方法进一步包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂。

[0597] 在进一步的实施方案中,本发明提供了用于治疗补体介导的疾病或病症的抗原结合分子。在进一步的实施方案中,本发明的抗原结合分子可用于增强C1s从血浆中的清除。在进一步的实施方案中,本发明的抗原结合分子可用于增强C1q、C1r和C1s复合物从血浆中的清除。在一些实施方案中,本发明的抗原结合分子可用于抑制补体组分C4的切割,其中该分子不抑制补体组分C2的切割。在一些情况下,该分子抑制经典补体途径的组分;在某些情况下,经典补体途径组分是C1s。在某些实施方案中,本发明提供了用于治疗补体介导的疾病或病症的方法中的抗原结合分子。在某些实施方案中,本发明提供了用于增强C1s从血浆中清除的方法中的抗原结合分子。在某些实施方案中,本发明提供了用于增强C1q、C1r和C1s复合物从血浆中清除的方法中的抗原结合分子。在某些实施方案中,本发明提供了用于抑制补体组分C4切割的方法中的抗原结合分子,其中该分子不抑制补体组分C2的切割。在某些实施方案中,本发明提供了用于抑制经典补体途径组分的方法中的抗原结合分子;在一些情况下,经典补体途径组分是C1s。根据任何上述实施方案的“个体”优选是人。

[0598] 一方面,本公开内容提供了一种调节补体激活的方法。在一些实施方案中,该方法抑制补体激活,例如以减少C4b2a的产生。在一些实施方案中,本公开内容提供了调节患有补体介导的疾病或病症的个体中补体激活的方法,该方法包括向个体施用本公开内容的抗原结合分子或本公开内容的药物组合物,其中药物组合物包含本公开内容的抗原结合分子。在一些实施方案中,这种方法抑制补体激活。在一些实施方案中,个体是哺乳动物。在一些实施方案中,个体是人。可以通过本领域技术人员已知的任何途径施用,包括本文公开的那些。在一些实施方案中,施用是静脉内或皮下施用。在一些实施方案中,施用是鞘内施用。

[0599] 补体介导的疾病或病症是以个体的细胞、组织或流体中补体C1s的量异常或补体C1s蛋白水解活性的异常水平为特征的病症。

[0600] 在一些情况下,补体介导的疾病或病症的特征在于细胞、组织或流体中存在升高(高于正常)量的C1s或升高水平的补体C1s活性。例如,在一些情况下,补体介导的疾病或病症的特征在于脑组织和/或脑脊液中存在升高的量和/或升高的C1s活性。细胞、组织或流体中“高于正常”的C1s量表明细胞、组织或流体中的C1s量高于正常对照水平,例如高于同一年龄组的个体或个体群体的正常对照水平。细胞、组织或流体中C1s活性的“高于正常”水平表明细胞、组织或流体中C1s影响的蛋白水解切割高于正常对照水平,例如高于同一年龄组的个体或个体群体的正常对照水平。在一些情况下,患有补体介导的疾病或病症的个体表现出这种疾病或病症的一种或多种另外、的症状。

[0601] 在其他情况下,补体介导的疾病或病症的特征在于细胞、组织或流体中存在低于正常量的C1s或较低水平的补体C1s活性。例如,在一些情况下,补体介导的疾病或病症的特

征在于脑组织和/或脑脊液中存在较低量和/或较低活性的C1s。细胞、组织或流体中“低于正常”的C1s量表明细胞、组织或流体中的C1s量低于正常对照水平，例如低于同一年龄组的个体或个体群体的正常对照水平。细胞、组织或流体中C1s活性的“低于正常”水平表明细胞、组织或流体中C1s影响的蛋白水解切割低于正常对照水平，例如低于同一年龄组的个体或个体群体的正常对照水平。在一些情况下，患有补体介导的疾病或病症的个体表现出这种疾病或病症的一种或多种另外的症状。

[0602] 补体介导的疾病或病症是其中补体C1s的量或活性使得其引起个体发生疾病或病症的疾病或病症。在一些实施方案中，补体介导的疾病或病症选自以下项组成的组：自身免疫性疾病、癌症、血液病、感染性疾病、炎性疾病、缺血-再灌注损伤、神经变性疾病、神经变性病症、眼病、肾病、移植排斥反应、血管疾病和血管炎疾病。在一些实施方案中，补体介导的疾病或病症是自身免疫性疾病。在一些实施方案中，补体介导的疾病或病症是癌症。在一些实施方案中，补体介导的疾病或病症是感染性疾病。在一些实施方案中，补体介导的疾病或病症是炎性疾病。在一些实施方案中，补体介导的疾病或病症是血液病。在一些实施方案中，补体介导的疾病或病症是缺血-再灌注损伤。在一些实施方案中，补体介导的疾病或病症是眼病。在一些实施方案中，补体介导的疾病或病症是肾病。在一些实施方案中，补体介导的疾病或病症是移植排斥。在一些实施方案中，补体介导的疾病或病症是抗体介导的移植排斥。在一些实施方案中，补体介导的疾病或病症是血管疾病。在一些实施方案中，补体介导的疾病或病症是血管炎病症。在一些实施方案中，补体介导的疾病或病症是神经变性疾病或病症。在一些实施方案中，补体介导的疾病是神经变性疾病。在一些实施方案中，补体介导的病症是神经变性病症。在一些实施方案中，补体介导的疾病或病症是tau蛋白病(tauopathy)。

[0603] 补体介导的疾病或病症的实例包括但不限于，年龄相关性黄斑变性、阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化、过敏反应、嗜银粒性痴呆、关节炎(例如，类风湿性关节炎)、哮喘、动脉粥样硬化、非典型溶血性尿毒症综合征、自身免疫性疾病、Barraquer-Simons综合征、贝切特(氏)病、英国型淀粉样血管病、大疱性类天疱疮、伯格(氏)病、C1q肾病、癌症、灾难性抗磷脂综合征、脑淀粉样血管病、冷凝集素病、皮质基底节变性、Creutzfeldt-Jakob病、克罗恩病、冷球蛋白血管炎、拳击员痴呆、路易体痴呆(DLB)、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、盘状红斑狼疮、唐氏综合征、局灶节段性肾小球硬化、形式思维障碍、额颞叶痴呆(FTD)、与17号染色体相关的帕金森病额颞叶痴呆、额颞叶变性、Gerstmann-Straussler-Scheinker病、格-巴二氏综合征、哈-斯二氏病、溶血性尿毒症综合征、遗传性血管性水肿、低磷血症、特发性肺炎综合征、免疫复合体病、包涵体肌炎、感染性疾病(例如，由细菌(例如，脑膜炎奈瑟菌或链球菌)、病毒(例如，人免疫缺陷病毒(HIV))或其他感染原引起的疾病)、炎性疾病、缺血/再灌注损伤、轻度认知障碍、免疫血小板减少性紫癜(ITP)、A型铜辅因子缺乏症(MoCD)、膜增生性肾小球肾炎(MPGN) I、膜增生性肾小球肾炎(MPGN) II(致密沉积病)、膜性肾炎、多发梗塞性痴呆、狼疮(例如系统性红斑狼疮(SLE))、肾小球肾炎、川崎病、多灶性运动神经病、多发性硬化、多系统萎缩、重症肌无力、心肌梗塞、肌强直性营养不良、视神经脊髓炎、C型尼曼-皮克病、非Guamanian运动神经元病伴神经原纤维缠结、帕金森病、帕金森病伴痴呆、阵发性夜间血红蛋白尿症、寻常型天疱疮、皮克(氏)病、脑炎后帕金森病、多发性肌炎、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、进行性皮质下神经胶质增生、进行性核上性麻痹、银屑病、败

血症、志贺毒素大肠杆菌 (STEC) -HuS、脊髓性肌萎缩、中风、亚急性硬化性全脑炎、缠结性痴呆、移植排斥、血管炎 (例如, ANCA相关血管炎)、Wegner肉芽肿、镰状细胞病、冷球蛋白血症、混合性冷球蛋白血症、原发性混合性冷球蛋白血症、II型混合型冷球蛋白血症、III型混合型冷球蛋白血症、肾炎、药物诱发的血小板减少症、狼疮性肾炎、大疱性类天疱疮、获得性大疱性表皮松解症、迟发性溶血性输血反应、低补体血症性荨麻疹性血管炎综合征、假晶状体大疱性角膜病变和血小板输注无效。

[0604] 阿尔茨海默病和某些形式的额颞叶痴呆 (皮克 (氏) 病、散发性额颞叶痴呆和与17号染色体相关的帕金森病额颞叶痴呆) 是最常见的tau蛋白病形式。据此, 本发明涉及如上所述的任何方法, 其中tau蛋白病是阿尔茨海默病、皮克 (氏) 病、散发性额颞叶痴呆和与17号染色体相关的帕金森病额颞叶痴呆。其他tau蛋白病包括但不限于进行性核上性麻痹 (PSP)、皮质基底节变性 (Corticobasal degeneration) (CBD) 和亚急性硬化性全脑炎。

[0605] 神经退行性tau蛋白病包括阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化/帕金森病-痴呆复合征、嗜银粒性痴呆、英国型淀粉样血管病、脑淀粉样血管病、皮质基底节变性、Creutzfeldt-Jakob病、拳击员痴呆、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、唐氏综合征、额颞叶痴呆、与17号染色体相关的帕金森病额颞叶痴呆、额颞叶变性 (frontotemporal lobar degeneration)、Gerstmann-Straussler-Scheinker病、哈-斯二氏病、包涵体肌炎、多系统萎缩、强直性营养不良、C型尼曼-皮克病、非Guamanian运动神经元病伴神经原纤维缠结、皮克 (氏) 病、脑炎后帕金森病、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、进行性皮质下神经胶质增生、进行性核上性麻痹、亚急性硬化性全脑炎、缠结性痴呆、多发梗塞性痴呆、缺血性中风、慢性创伤性脑病 (CTE)、创伤性脑损伤 (TBI) 和中风。

[0606] 本公开内容还提供了治疗突触核蛋白病 (synucleinopathy) (例如, 帕金森病 (PD); 路易体痴呆 (DLB); 多系统萎缩 (MSA) 等) 的方法。例如, 可以用本公开内容的方法治疗PD伴痴呆 (PDD)。

[0607] 在一些实施方案中, 补体介导的疾病或病症包括阿尔茨海默病。在一些实施方案中, 补体介导的疾病或病症包括帕金森病。在一些实施方案中, 补体介导的疾病或病症包括移植排斥。在一些实施方案中, 补体介导的疾病或病症是抗体介导的移植排斥。

[0608] 在一些实施方案中, 本公开内容的抗原结合分子预防或延迟个体中补体介导的疾病或病症的至少一种症状的发作。在一些实施方案中, 本公开内容的抗原结合分子减少或消除个体中补体介导的疾病或病症的至少一种症状。症状的实例包括但不限于与以下项相关的症状: 自身免疫性疾病、癌症、血液病、感染性疾病、炎性疾病、缺血再灌注损伤、神经退行性疾病、神经退行性病症、肾病、移植排斥、眼病、血管疾病或血管炎疾病。症状可以是神经系统症状, 例如认知功能受损、记忆障碍、运动功能丧失等。症状也可以是个体的细胞、组织或流体中C1s蛋白的活性。症状也可以是个体的细胞、组织或流体中补体激活的程度。

[0609] 在一些实施方案中, 向个体施用本公开内容的抗原结合分子调节个体的细胞、组织或流体中的补体激活。在一些实施方案中, 向个体施用本公开内容的抗原结合分子以抑制个体的细胞、组织或流体中的补体激活。例如, 在一些实施方案中, 本公开内容的抗原结合分子, 当以一个或多个剂量作为单一疗法或联合疗法施用于患有补体介导的疾病或病症的个体时, 与用抗原结合分子治疗前个体的补体激活相比, 抑制个体中补体激活至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约

60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、或超过90%。

[0610] 在一些实施方案中,本公开内容的抗原结合分子减少C3沉积到红细胞上;例如,在一些实施方案中,本公开内容的抗原结合分子减少C3b、iC3b等沉积到RBC上。在一些实施方案中,本公开内容的抗原结合分子抑制补体介导的红细胞裂解。

[0611] 在一些实施方案中,本公开内容的抗原结合分子减少C3沉积到血小板上;例如,在一些实施方案中,本公开内容的抗原结合分子减少C3b、iC3b等沉积到血小板上。

[0612] 在一些实施方案中,施用本公开内容的抗原结合分子导致选自以下项组成的组的结果:(a)补体激活减少;(b)认知功能改善;(c)神经元丢失减少;(d)神经元中磷酸-Tau水平降低;(e)神经胶质细胞激活减少;(f)淋巴细胞浸润减少;(g)巨噬细胞浸润减少;(h)抗体沉积减少,(i)神经胶质细胞丢失减少;(j)少突胶质细胞丢失减少;(k)树突细胞浸润减少;(l)中性粒细胞浸润减少;(m)红细胞裂解减少;(n)红细胞吞噬作用减少;(o)血小板吞噬作用减少;(p)血小板裂解减少;(q)移植物存活率的改善;(r)巨噬细胞介导的吞噬作用减少;(s)视力改善;(t)运动控制改善;(u)血栓形成改善;(v)凝血改善;(w)肾功能改善;(x)抗体介导的补体激活减少;(y)自身抗体介导的补体激活减少;(z)贫血改善;(aa)脱髓鞘减少;(ab)嗜酸性粒细胞增多症减少;(ac)红细胞上的C3沉积的减少(例如,C3b、iC3b等沉积到红细胞上的减少);和(ad)血小板上的C3沉积的减少(例如,C3b、iC3b等沉积到血小板上的减少);以及(ae)过敏毒素产生的减少;(af)自身抗体介导的水疱形成减少;(ag)自身抗体诱导的瘙痒减少;(ah)自身抗体诱导的红斑减少;(ai)自身抗体介导的皮肤侵蚀减少;(aj)由于输血反应导致的红细胞破坏减少;(ak)由于同种异体抗体导致的红细胞裂解减少;(al)输血反应引起的溶血减少;(am)同种异体抗体介导的血小板裂解减少;(an)由于输血反应导致血小板裂解减少;(ao)肥大细胞激活减少;(ap)肥大细胞组胺释放减少;(aq)血管通透性降低;(ar)水肿减轻;(as)移植物内皮上补体沉积减少;(at)移植物内皮中过敏毒素的产生减少;(au)真皮-表皮交界处的分离减少;(av)真皮-表皮交界处过敏毒素的产生减少;(aw)移植移植物内皮中同种异体抗体介导的补体激活的减少;(ax)抗体介导的神经肌肉接头丧失的减少;(ay)神经肌肉接头处补体激活的减少;(az)神经肌肉接头处过敏毒素的产生减少;(ba)神经肌肉接头处补体沉积减少;(bb)麻痹减少;(be)麻木减少;(bd)增加膀胱控制;(be)增加肠道控制;(bf)与自身抗体相关的死亡率降低;以及(bg)与自身抗体相关的发病率降低。

[0613] 在一些实施方案中,本公开内容的抗原结合分子,当以一个或多个剂量作为单一疗法或联合疗法向患有补体介导的疾病或病症的个体施用时,与用抗原结合分子治疗前个体的结果水平或程度相比,可实现以下结果中的一种或多种减少至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、或超过90%:(a)补体激活;(b)认知功能下降;(c)神经元丢失;(d)神经元中的磷酸-Tau水平;(e)神经胶质细胞激活;(f)淋巴细胞浸润;(g)巨噬细胞浸润;(h)抗体沉积,(i)神经胶质细胞丢失;(j)少突胶质细胞丢失;(k)树突细胞浸润;(l)中性粒细胞浸润;(m)红细胞裂解;(n)红细胞吞噬作用;(o)血小板吞噬作用;(p)血小板裂解;(q)移植排斥;(r)巨噬细胞介导的吞噬作用;(s)视力丧失;(t)抗体介导的补体激活;(u)自身抗体介导的补体激活;(v)脱髓鞘;(w)嗜酸性粒细胞增多。

[0614] 在一些实施方案中,本公开内容的抗原结合分子,当以一个或多个剂量作为单一

疗法或联合疗法施用于患有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗原结合分子治疗前个体的结果水平或程度相比,可实现以下结果中的一种或多种改善至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、或超过90%: a) 认知功能; b) 移植物存活; c) 视力; d) 运动控制; e) 血栓形成; f) 凝血; g) 肾功能; 和h) 血细胞比容(红细胞计数)。

[0615] 在一些实施方案中,向个体施用本公开内容的抗原结合分子降低个体中的补体激活。例如,在一些实施方案中,本公开内容的抗原结合分子,当以一个或多个剂量作为单一疗法或联合疗法施用于患有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗原结合分子治疗前个体的补体激活相比,使个体中的补体激活降低至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、或超过90%。

[0616] 在一些实施方案中,施用本公开内容的抗原结合分子改善个体的认知功能。例如,在一些实施方案中,本公开内容的抗原结合分子,当以一个或多个剂量作为单一疗法或联合疗法施用于患有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗原结合分子治疗前个体的认知功能相比,使个体的认知功能改善至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、或超过90%。

[0617] 在一些实施方案中,施用本公开内容的抗原结合分子降低个体认知功能的下降速率。例如,在一些实施方案中,本公开内容的抗原结合分子,当以一个或多个剂量作为单一疗法或联合疗法施用于患有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗原结合分子治疗前个体的认知功能下降速率相比,使个体认知功能的下降速率降低至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、或超过90%。

[0618] 在一些实施方案中,向个体施用本公开内容的抗原结合分子减少个体中的神经元丢失。例如,在一些实施方案中,本公开内容的抗原结合分子,当以一个或多个剂量作为单一疗法或联合疗法施用于患有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗原结合分子治疗前个体的神经元丢失相比,使个体的神经元丢失减少至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、或超过90%。

[0619] 在一些实施方案中,向个体施用本公开内容的抗原结合分子降低个体中的磷酸-Tau水平。例如,在一些实施方案中,本公开内容的抗原结合分子,当以一个或多个剂量作为单一疗法或联合疗法施用于患有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗原结合分子治疗前个体中的磷酸-Tau水平相比,使个体中的磷酸-Tau降低至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、或超过90%。

[0620] 在一些实施方案中,向个体施用本公开内容的抗原结合分子降低个体中的神经胶质细胞激活。例如,在一些实施方案中,当本公开内容的抗原结合分子以一个或多个剂量作为单一疗法或联合疗法施用于患有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗原结合分子治疗前个体中的神经胶质细胞激活相比,个体中的神经胶质细胞激活减少至少约10%、至少约

15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、或超过90%。在一些实施方案中,神经胶质细胞是星形胶质细胞或小胶质细胞。

[0621] 在一些实施方案中,向个体施用本公开内容的抗原结合分子减少了个体中的淋巴细胞浸润。例如,在一些实施方案中,本公开内容的抗原结合分子,当以一个或多个剂量作为单一疗法或联合疗法施用于患有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗原结合分子治疗前个体的淋巴细胞浸润相比,使个体中的淋巴细胞浸润减少至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、或超过90%。

[0622] 在一些实施方案中,向个体施用本公开内容的抗原结合分子减少个体中的巨噬细胞浸润。例如,在一些实施方案中,本公开内容的抗原结合分子,当以一个或多个剂量作为单一疗法或联合疗法施用于患有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗原结合分子治疗前个体的巨噬细胞浸润相比,使个体中的巨噬细胞浸润减少至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、或超过90%。

[0623] 在一些实施方案中,向个体施用本公开内容的抗原结合分子减少个体中的抗体沉积。例如,在一些实施方案中,本公开内容的抗原结合分子,当以一个或多个剂量作为单一疗法或联合疗法施用于患有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗原结合分子治疗前个体中的抗体沉积相比,使个体中的抗体沉积减少至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、或超过90%。

[0624] 在一些实施方案中,向个体施用本公开内容的抗原结合分子降低个体中过敏毒素(例如,C3a、C4a、C5a)的产生。例如,在一些实施方案中,本公开内容的抗原结合分子,当以一个或多个剂量作为单一疗法或联合疗法施用于患有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗原结合分子治疗前个体的过敏毒素产生水平相比,使个体中过敏毒素的产生减少至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、或超过90%。

[0625] 在一些实施方案中,本公开内容提供了本公开内容的抗原结合分子或包含本公开内容的抗原结合分子和药学上可接受的赋形剂的药物组合物用于治疗患有补体介导的疾病或病症的个体的用途。在一些实施方案中,本公开内容提供了本公开内容的抗C1s抗体用于治疗患有补体介导的疾病或病症的个体的用途。在一些实施方案中,本公开内容提供了包含本公开内容的抗原结合分子和药学上可接受的赋形剂的药物组合物用于治疗患有补体介导的疾病或病症的个体的用途。

[0626] 在一些实施方案中,本公开内容提供了本公开内容的抗原结合分子在生产用于治疗患有补体介导的疾病或病症的个体的药物中的用途。

[0627] 在一些实施方案中,本公开内容提供了本公开内容的抗原结合分子或包含本公开内容的抗原结合分子和药学上可接受的赋形剂的药物组合物抑制补体激活的用途。在一些实施方案中,本公开内容提供了本公开内容的抗原结合分子或包含本公开内容的抗原结合分子和药学上可接受的赋形剂的药物组合物抑制患有补体介导的疾病或病症的个体中补

体激活的用途。在一些实施方案中,本公开内容提供了本公开内容的抗原结合分子抑制患有补体介导的疾病或病症的个体中补体激活的用途。在一些实施方案中,本公开内容提供了包含本公开内容的抗原结合分子和药学上可接受的赋形剂的药物组合物抑制患有补体介导的疾病或病症的个体中补体激活的用途。

[0628] 在一些实施方案中,本公开内容提供了本公开内容的抗原结合分子在生产用于调节补体激活的药物中的用途。在一些实施方案中,该药物抑制补体激活。在一些实施方案中,该药物抑制患有补体介导的疾病或病症的个体中的补体激活。

[0629] 在一些实施方案中,本公开内容提供了用于医学治疗的本公开内容的抗原结合分子或包含本公开内容的抗原结合分子和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一些实施方案中,本公开内容提供了用于医学治疗的本公开内容的抗原结合分子。在一些实施方案中,本公开内容提供用于医学治疗的包含本公开内容的抗原结合分子和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0630] 在一些实施方案中,本公开内容提供用于治疗患有补体介导的疾病或病症的个体的本公开内容的抗原结合分子或包含本公开内容的抗原结合分子和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一些实施方案中,本公开内容提供用于治疗患有补体介导的疾病或病症的个体的本公开内容的抗原结合分子。在一些实施方案中,本公开内容提供了用于治疗患有补体介导的疾病或病症的个体的包含本公开内容的抗原结合分子和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0631] 在一些实施方案中,本公开内容提供了用于调节补体激活的本公开内容的抗原结合分子或包含本公开内容的抗原结合分子和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一些实施方案中,本公开内容提供了用于调节补体激活的本公开内容的抗原结合分子。在一些实施方案中,本公开内容提供了用于调节补体激活的包含本公开内容的抗原结合分子和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一些实施方案中,抗原结合分子抑制补体激活。

[0632] 还一方面,本发明提供了抗原结合分子在生产或制备药物中的用途。在一个实施方案中,该药物用于治疗补体介导的疾病或病症。在进一步的实施方案中,该药物用于治疗补体介导的疾病或病症的方法中,该方法包括向患有补体介导的疾病或病症的个体施用有效量的药物。在一个此类实施方案中,该方法进一步包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如,如下所述。在进一步的实施方案中,该药物用于增强从血浆中清除(或去除)C1s。在进一步的实施方案中,药物用于增强从血浆中清除(或去除)C1q、C1r和C1s复合物。在进一步的实施方案中,该药物用于抑制补体组分C4的切割,其中该分子不抑制补体组分C2的切割。在进一步的实施方案中,该药物用于抑制经典补体途径的组分;在一些情况下,经典补体途径组分是C1s

[0633] 在进一步的实施方案中,该药物用于治疗患有补体介导的疾病或病症的个体的方法中,包括向个体施用有效量的药物。根据任何上述实施方案的“个体”可以是人。

[0634] 还一方面,本发明提供了一种用于治疗补体介导的疾病或病症的方法。在一个实施方案中,该方法包括向患有这种补体介导的疾病或病症的个体施用有效量的抗原结合分子。在一个此类实施方案中,该方法进一步包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,如下所述。根据任何上述实施方案的“个体”可以是人。

[0635] 还一方面,本发明提供了一种用于增强个体血浆中C1s的清除(或去除)的方法。在

另一方面,本发明提供了一种用于增强个体血浆中C1q、C1r和C1s复合物的清除(或去除)的方法。在一些实施方案中,本发明的抗原结合分子提供了一种抑制补体组分C4切割的方法,其中该分子不抑制个体中补体组分C2的切割。在某些情况下,本发明提供了一种抑制个体经典补体途径组分的方法;在一些情况下,经典补体途径组分是C1s。在一个实施方案中,“个体”是人。

[0636] 还一方面,本发明提供了包含本文提供的任何抗原结合分子的药物制剂,例如用于任何上述治疗方法中。在一个实施方案中,该药物制剂包含本文提供的任何抗原结合分子和药学上可接受的运载体。在另一个实施方案中,该药物制剂包含本文提供的任何抗原结合分子和至少一种另外的治疗剂,例如如下所述。

[0637] 本发明的抗体可以在治疗中单独使用或与其他药剂联合使用。例如,本发明的抗体可以与至少一种另外的治疗剂联合施用。

[0638] 上述此类联合疗法包括联合施用(其中两种或多种治疗剂包含在相同或单独的制剂中)和单独施用(在这种情况下,本发明的分子的施用可以在另外的一种或多种治疗剂的施用之前、同时和/或之后进行)。在一个实施方案中,抗原结合分子的施用和另外的治疗剂的施用发生在彼此约一个月内,或约一、二或三周内,或约一、二、三、四、五或六天内。本发明的分子还可以与放疗联合使用。

[0639] 本发明的抗原结合分子(和任何另外的治疗剂)可以通过任何合适的方式施用,包括肠胃外、肺内和鼻内,并且如果需要局部治疗的话,通过病灶内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹腔或皮下施用。给药可以通过任何合适的途径,例如通过注射,例如静脉内或皮下注射,部分取决于施用是短暂施用还是长期施用。本文设想了各种给药方案,包括但不限于在各个时间点单次或多次施用、推注施用和脉冲输注。

[0640] 本发明的抗原结合分子将以符合良好医学实践的方式配制、给药和施用。在这方面考虑的因素包括待治疗的特定病症、待治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床状况、病因、药剂的递送部位、施用方法、施用时间安排以及医生已知的其他因素。该分子不需要,但任选地与一种或多种目前用于预防或治疗所讨论的病症的药剂一起配制。此类其他药剂的有效量取决于制剂中存在的分子的量、病症或治疗的类型以及上述其他因素。这些通常以与本文所述相同的剂量和施用途径使用,或本文所述剂量的约1至99%,或以经验/临床确定合适的任何剂量和任何途径使用。

[0641] 对于疾病的预防或治疗,本发明的抗原结合分子的适当剂量(当单独使用或与一种或多种其他另外的治疗剂联合使用时)将取决于待治疗的疾病类型、抗体类型、疾病的严重程度和病程、施用分子是出于预防目的还是治疗目的、既往治疗、患者的临床病史和对分子的应答,以及主治医师的判断。将分子一次性或在一系列治疗中适当地施用于患者。根据疾病的类型和严重程度,约1 μ g/kg至15mg/kg(例如0.1mg/kg-10mg/kg)的分子可以是向患者施用的初始候选剂量,例如,通过一次或多次单独施用,或通过连续输注。根据上述因素,一种典型的日剂量可以在约1 μ g/kg至100mg/kg或更多的范围内。对于数天或更长时间的重复施用,根据病况,治疗通常将持续至发生期望的疾病症状抑制。分子的一种示例性剂量将在约0.05mg/kg至约10mg/kg的范围内。因此,可以向患者施用约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg(或其任何组合)中的一个或多个剂量。这种剂量可以间隔施用,例如每周一次或每三周一次(例如使患者接受约两剂至约二十剂,或例如约六剂分子)。可以施用

初始较高的负荷剂量,然后施用一个或多个较低的剂量。然而,其他剂量方案可能是有用的。这种疗法的进展很容易通过常规技术和测定进行监测。

[0642] 应理解,任何上述制剂或治疗方法均可以使用本发明的免疫缀合物代替抗原结合分子或除抗原结合分子之外使用本发明的免疫缀合物进行。

[0643] H. 其他方法

[0644] 一方面,本发明提供了一种用于摄取C1s或C1q至细胞的方法。在该方面,C1s和细胞在等渗溶液中混合。细胞表达Fc γ 受体。该方法包括将上述任何一种抗原结合分子加入等渗溶液中。

[0645] 一方面,本发明提供了一种用于降低个体血浆C1s和/或C1q浓度的方法。该方法包括向个体施用任何一种上述抗原结合分子。

[0646] I. 制品

[0647] 在本发明的另一方面,提供了含有可用于治疗、预防和/或诊断上述病症的材料的制品。制品包括容器和在容器上的标签或与容器相关的包装插页。合适的容器包括,例如,瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可以由多种材料形成,例如玻璃或塑料。容器装有组合物,该组合物本身或与另一种有效治疗、预防和/或诊断病症的组合物联合使用,并且可以具有无菌入口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或具有皮下注射针可刺破的塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性成分是本发明的抗原结合分子或抗体。标签或包装插页表明该组合物用于治疗所选择的病况。此外,制品可以包含(a)其中包含组合物的第一容器,其中组合物包含本发明的抗原结合分子或抗体;和(b)其中包含组合物的第二容器,其中组合物包含另外的细胞毒性剂或其他治疗剂。本发明的该实施方案中的制品可以进一步包括包装插页,说明该组合物可用于治疗特定病况。可选地,或另外地,制品可以进一步包含第二(或第三)容器,其包含药学上可接受的缓冲液,例如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。从商业和用户的角度,它可以进一步包括其他期望的材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0648] 应理解,任何上述制品可以包括本发明的免疫缀合物代替抗原结合分子或除抗原结合分子之外包括本发明的免疫缀合物。

[0649] 实施例

[0650] IV. 实施例

[0651] 以下是本发明的方法和组合物的实施例。应当理解,鉴于以上提供的一般描述,可以实践各种其他实施方案。

[0652] 尽管为了清楚理解的目的,已经通过说明和实例的方式对前述发明进行了一些详细描述,但这些描述和实例不应被解释为限制本发明的范围。本文引用的所有专利和科学文献的公开内容均通过引用明确地以其全文并入。

[0653] 实施例1

[0654] 重组C1r2s2的制备

[0655] 1.1. 食蟹猴C1r2s2 His/Flag四聚体的表达与纯化

[0656] 用于表达和纯化的序列是:带有C末端GGGGS接头和FLAG标签的食蟹猴C1s(SEQ ID NO:1)和带有C末端GGGGS接头和8 \times 组氨酸标签的食蟹猴C1r。食蟹猴C1r序列具有R463Q S654A突变(SEQ ID NO:2)。为了表达重组食蟹猴C1r2s2 His/Flag四聚体,使用

FreeStyle293-F细胞系(Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA)瞬时共表达食蟹猴C1s-Flag和食蟹猴C1r-His。将表达重组食蟹猴C1r2s2 His/Flag四聚体的条件培养基应用于抗Flag M2亲和树脂(Sigma)并用Flag肽(Sigma)洗脱。含有重组食蟹猴C1r2s2 His/Flag四聚体的级分经过IMAC柱(GE Healthcare)并用咪唑梯度洗脱。收集、浓缩含有重组C1r2s2 His/Flag四聚体的洗脱级分,随后将其置于用1×TBS、2mM CaCl₂缓冲液平衡的Superdex 200凝胶过滤柱(GE Healthcare)中。然后将含有重组食蟹猴C1r2s2 His/Flag的级分合并、浓缩并储存在-80℃下。

[0657] 1.2. 人C1r2s2四聚体的表达与纯化

[0658] 用于表达和纯化的序列是:人C1s(NCBI参考序列:NP_958850.1)(SEQ ID NO:3)和人C1r(NCBI参考序列:NP_001724.3)。人C1r序列具有R463QS654A突变(SEQ ID NO:4)。为了表达重组人C1r2s2四聚体,使用FreeStyle293-F细胞系(Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA)瞬时共表达人C1s和人C1r。将表达重组人C1r2s2的条件培养基应用于HiTrap Q HP阴离子交换色谱柱(GE Healthcare)并用NaCl梯度洗脱。收集、浓缩含有重组人C1r2s2四聚体的洗脱级分,随后将其置于用1×TBS、2mM CaCl₂缓冲液平衡的Superdex 200凝胶过滤柱(GE Healthcare)中。然后将含有重组人C1r2s2四聚体的级分合并、浓缩并储存在-80℃下。

[0659] 实施例2

[0660] 2.1 食蟹猴Fcγ受体(食蟹猴FcγR)的制备

[0661] 使用本领域技术人员已知的方法,通过克隆来自食蟹猴的每个FcγR的cDNA构建食蟹猴FcγR的细胞外结构域基因的合成。构建的FcγR细胞胞外结构域的氨基酸序列见列表:(对于食蟹猴FcγRIa,SEQ ID NO:5;对于食蟹猴FcγRIIa1,SEQ ID NO:6;对于食蟹猴FcγRIIa2,SEQ ID NO:7;对于食蟹猴FcγRIIa3,SEQ ID NO:8;对于食蟹猴FcγRIIb,SEQ ID NO:9;对于食蟹猴FcγRIIIa(R),SEQ ID NO:10;对于食蟹猴FcγRIIIa(S),SEQ ID NO:11)。然后将His-tag添加至它们的C末端并将获得的每个基因插入为哺乳动物细胞表达而设计的表达载体中。将表达载体导入人胚肾细胞来源的FreeStyle293细胞(Invitrogen)中表达靶蛋白。培养后,原则上通过以下四个步骤过滤和纯化所得培养物上清液。第一步使用SP Sepharose FF进行阳离子交换层析,第二步进行针对His-tag的亲亲和层析(HisTrap HP),第三步进行凝胶过滤柱层析(Superdex200),以及第四步为无菌过滤。使用分光光度计测量纯化蛋白在280nm处的吸光度,并使用通过PACE方法(Protein Science 4:2411-2423(1995))计算的消光系数确定纯化蛋白的浓度。

[0662] 实施例3

[0663] 抗C1s抗体的制备

[0664] 3.1. COS0098pHv1的产生以及COS0098pHv1-SG1077和COS0098pHv1-SG1的制备

[0665] 对一些抗C1s抗体COS0098bb(VH,SEQ ID NO:12;VL,SEQ ID NO:13,如PCT/JP2018/042054中所述)的可变区进行人源化以降低抗体的潜在免疫原性。使用常规的CDR移植方法(Nature 321:522-525(1986))将抗C1s兔抗体的互补决定区(CDR)移植到同源人抗体框架(FR)上。合成编码人源化VH的基因并与人IgG1 CH(SG1,SEQ ID NO:14)、修饰的人IgG1 CH例如SG1077(SEQ ID NO:15)和SG1148(SEQ ID NO:16)组合。合成编码人源化VL的基因并与人CL(SK1,SEQ ID NO:26)和修饰的人CL(KOMC,SEQ ID NO:17)组合。将那些组合序列克隆至表达载体中。

[0666] 检查许多突变和突变组合以鉴定改善先导抗体结合特性的突变和突变组合。然后将多个突变引入人源化可变区,以增强在中性pH值下对C1s(人C1s或C1r2s2或食蟹猴C1r2s2 His/Flag)的结合亲和力或降低在酸性pH值下对C1s的结合亲和力。优化变体中的一种,COS0098pHv1(VH,SEQ ID NO:18;VL,SEQ ID NO:19;HCDR1,SEQ ID NO:20;HCDR2,SEQ ID NO:21;HCDR3,SEQ ID NO:22;LCDR1,SEQ ID NO:23;LCDR2,SEQ ID NO:24;和LCDR3,SEQ ID NO:25),因此从COS0098bb产生。COS0098pHv1-SG1077(COS0098pHv1的VH;SEQ ID NO:18与SG1077组合;SEQ ID NO:15用于重链,和COS0098pHv1的VL;SEQ ID NO:19与SK1组合;SEQ ID NO:26用于轻链)用于食蟹猴体内PK研究。COS0098pHv1-SG1(COS0098pHv1的VH;SEQ ID NO:18与SG1组合;SEQ ID NO:14用于重链,和COS0098pHv1的VL;SEQ ID NO:19与SK1组合;SEQ ID NO:26用于轻链)在食蟹猴Fc γ R结合测定中用作对照抗体。

[0667] 抗体在用重链和轻链表达载体的混合物共转染的HEK293细胞中表达,并通过蛋白A纯化。如有需要,进一步进行凝胶过滤。

[0668] 实施例4

[0669] 抗C1s抗体的结合表征

[0670] 4.1.pH依赖性评估和交叉反应检查

[0671] 针对重组人C1s(如PCT/JP2018/042054中所述)、人C1r2s2和食蟹猴C1r2s2 His/Flag(在表和图中也称为食蟹猴C1r2s2)的抗C1s抗体的动力学参数在pH7.4和pH5.8下,于37°C下使用BIAcore(注册商标)T200仪器(GE Healthcare)或BIAcore 4000(GE Healthcare)下进行评估。根据GEHealthcare的建议设置,使用胺偶联试剂盒(GE Healthcare)将ProA/G(Pierce)固定在CM4传感器芯片上。将抗体和分析物稀释至各自的运行缓冲液ACES pH7.4和pH5.8(20mM ACES、150mM NaCl、1.2mM CaCl₂、1mg/ml BSA、1mg/ml CMD、0.05%吐温20、0.005w/v%NaN₃)中。每个抗体均被ProA/G捕获至传感器表面。抗体捕获水平通常为100-200共振单位(RU)。然后,以25和50nM的浓度注射重组C1s,然后在pH7.4和pH5.8下解离。使用10mM甘氨酸-HCl,pH1.5使表面再生。在中性pH条件下的动力学参数通过使用BIAcore(注册商标)T200评估软件2.0版(GE Healthcare)或BIAcore 4000评估软件将传感图与1:1结合模型拟合来确定。pH5.8下的解离速率通过使用Scrubber 2.0(BioLogic Software)曲线拟合软件处理和拟合数据来确定。抗原浓度为50nM时所有抗体的传感图如图1和图2所示。抗体在pH7.4条件下的缔合速率(k_a)、解离速率(k_d)、结合亲和力(KD)和在pH5.8条件下的解离速率(k_d)列于表2中。

[0672] 尽管COS0098bb(VH,SEQ ID NO:12和VL,SEQ ID NO:13)在pH5.8下没有明显表现出比在pH7.4下更快的解离速率,但COS0098pHv1(VH,SEQ ID NO:18和VL,SEQ ID NO:19)在pH5.8下显示出比在pH7.4下更快的解离速率。

[0673] 此外,为了观察抗C1s抗体对人C1r2s2和食蟹猴C1r2s2(食蟹猴C1r2s2His/Flag)的交叉反应性,进行BIAcore(注册商标)动力学分析。pH7.4下的结合动力学和亲和力列于表2中。所有抗C1s抗体均显示出针对人C1r2s2和食蟹猴C1r2s2的相当的KD。

[0674] [表2]

[0675] 在pH7.4和pH5.8条件下,针对人C1r2s2和食蟹猴C1r2s2s的抗C1s抗体的动力学参数

抗体名称	针对人C1r2s2s的动力学				针对食蟹猴C1r2s2s的动力学			
	pH7.4		KD (M)	pH5.8	pH7.4		KD (M)	pH5.8
	ka (1/Ms)	kd (1/s)		kd (1/s)	ka (1/Ms)	kd (1/s)		kd (1/s)
[0676] COS0098bb	1.1E+06	3.1E-04	2.8E-10	8.3E-04	1.1E+06	2.0E-04	1.8E-10	8.1E-04
COS0098pHv1	8.2E+05	1.7E-03	2.0E-09	5.5E-02	6.4E+05	1.0E-03	1.6E-09	2.7E-02

[0677] 4.2. 使用Biacore评价抗体与食蟹猴Fc γ R的结合活性

[0678] 使用BIACORE (注册商标) T200 (GE Healthcare) 进行抗体与如上制备的Fc γ R之间的相互作用的分析。使用含150mM氯化钠和0.05w/v% -20的50mM磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 作为运行缓冲液, 并将测量温度设置为25°C。使用通过胺偶联法将Protein L (BioVision) 固定到S系列传感器芯片CM4 (GE Healthcare) 上而生产的芯片。在芯片上捕获500或1000共振单位 (RU) 目标抗体后, 允许用运行缓冲液稀释的Fc γ R相互作用, 并测量它们与抗体的结合量。食蟹猴Fc γ RIa被稀释至8nM, 其他稀释至1000nM。然后, 捕获至芯片上的抗体用10mM甘氨酸-HCl, pH1.5洗涤, 芯片再生并重复使用。使用biacore评估软件将Fc γ R的结合量除以捕获的各抗体的结合量以获得结合活性, 并将这些值进行比较。此外, 计算COS0098pHv1-SG1077与每个Fc γ R相对于COS0098pHv1-SG1 (根据EU编号, 在第234至239、265至271、295、296、298、300和324至337位具有天然发生的人IgG1的序列的抗体) 的结合活性的相对值。

[0679] 表3显示了抗体的结合活性值和COS0098pHv1-SG1077与COS0098pHv1-SG1的相对量。COS0098pHv1-SG1077对各种食蟹猴Fc γ RIIa和Fc γ RIIb的结合活性值均高于COS0098pHv1-SG1。与COS0098pHv1-SG1相比, COS0098pHv1-SG1077对Fc γ RIIb的结合活性提高了3.26倍, 对各种食蟹猴Fc γ RIIa的结合活性提高了2.57-5.74倍。

[0680] [表3]

[0681]

抗体名称	结合活性值(每1 RU抗体的结合量)										结合活性的相对值											
	cyFcγR1a	cyFcγR1a1	cyFcγR1a2	cyFcγR1a3	cyFcγR1b	cyFcγR1a(S)	cyFcγR1a(R)	cyFcγR1a	cyFcγR1a1	cyFcγR1a2	cyFcγR1a3	cyFcγR1b	cyFcγR1a(S)	cyFcγR1a(R)	cyFcγR1a	cyFcγR1a1	cyFcγR1a2	cyFcγR1a3	cyFcγR1b	cyFcγR1a(S)	cyFcγR1a(R)	
COS0088pH1-SG1	0.1988	0.0204	0.0177	0.0049	0.0278	0.1268	0.1258	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.1268	0.1258	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
COS0088pH1-SG1077	0.0264	0.0524	0.0528	0.0284	0.0905	0.0091	0.0077	0.13	2.57	2.98	5.74	3.26	0.0077	0.0077	0.13	2.57	2.98	5.74	3.26	0.07	0.07	0.06

[0682] 实施例5

[0683] 5.1食蟹猴PK研究

[0684] 通过高效液相色谱-电喷雾串联质谱(LC/ESI-MS/MS)测量猴血浆中总食蟹猴C1s和C1q浓度

[0685] 方法

[0686] 通过高效液相色谱-电喷雾串联质谱(LC/ESI-MS/MS)测量食蟹猴血浆中的总食蟹猴C1s和C1q浓度。

[0687] 样品制备

[0688] 通过LC/ESI-MS/MS测量血浆中食蟹猴C1s的总浓度。校准标准品通过在小鼠血浆中以规定量混合和稀释食蟹猴C1s进行制备,产生0.954、1.91、3.82、7.63、15.3、30.5和61.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的食蟹猴C1s浓度。食蟹猴血浆样品用小鼠血浆稀释5倍。将2 μL 校准标准品或稀释的血浆样品与26.5 μL 混合试剂在50mmol/L碳酸氢铵(7.5mol/L尿素/100mmol/L二硫苏糖醇/10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶菌酶(鸡蛋清)/300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 人C1s=20/2/2.5/2)中混合并在56 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育45min。然后,加入2 μL 的500mmol/L碘乙酰胺并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下在黑暗中孵育30min。接下来,加入在50mmol/L碳酸氢铵中的160 μL 的0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 测序级改良胰蛋白酶(Promega),并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。最后,加入5 μL 的10%三氟乙酸以灭活任何残留的胰蛋白酶。通过LC/ESI-MS/MS对50 μL 消化样品进行分析。

[0689] 通过LC/ESI-MS/MS测量血浆中食蟹猴C1q的浓度。校准标准品通过在人血浆中以规定量混合和稀释食蟹猴C1q进行制备,产生1.95、3.91、7.81、15.6、31.3、62.5和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的食蟹猴C1q浓度。食蟹猴血浆样品用人血浆稀释5倍。将2 μL 校准标准品和稀释的血浆样品与40 μL 抗人C1q(Cell Sciences)混合,并在25 $^{\circ}\text{C}$ 下分别施用1%牛血清白蛋白中的抗C1s抗体1.5小时。将每个样品与50 μL 的10倍稀释的蛋白A磁珠(Protenova)在含0.05%吐温-20的PBS中在25 $^{\circ}\text{C}$ 下混合1.5小时。用含0.05%吐温-20的PBS洗涤3次后,将样品与26.5 μL 混合试剂在50mmol/L碳酸氢铵中(7.5mol/L尿素/100mmol/L二硫苏糖醇/10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶菌酶(鸡蛋清)=20/2/2.5)混合并在56 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育45min。然后,加入2 μL 的500mmol/L碘乙酰胺并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下在黑暗中孵育30min。接下来,加入在50mmol/L碳酸氢铵中的160 μL 的0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 测序级改良胰蛋白酶(Promega),并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。最后,加入5 μL 的10%三氟乙酸以灭活任何残留的胰蛋白酶。通过LC/ESI-MS/MS对50 μL 消化样品进行分析。

[0690] LC/ESI-MS/MS分析

[0691] LC/ESI-MS/MS使用配备有2D I-class UPLC(Waters)的Xevo TQ-S三重四极杆仪器(Waters)进行。食蟹猴C1s、人C1s和食蟹猴C1q特异性肽LLEVPEAR、LLEVPEGR和YQSVFTVAR分别通过选择反应监测(SRM)进行监测。SRM跃迁为 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (m/z 463.8至 y_6 离子(m/z 700.3))、 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (m/z 456.8至 y_6 离子(m/z 686.4))和 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (m/z 535.8至 y_7 离子(m/z 779.4))。每条校准曲线均通过加权($1/x^2$)线性回归构建,使用针对浓度绘制的峰面积。食蟹猴血浆中的浓度的使用分析软件Masslynx Ver.4.1(Waters)从校准曲线计算的。

[0692] 在食蟹猴中抗C1s抗体施用后总C1s和C1q的药代动力学评价

[0693] 在向食蟹猴施用COS0098pHv1-SG1077后评估食蟹猴C1s和C1q的体内药代动力学。三只雄性猴被分配至各给药组。

[0694] COS0098pHv1-SG1077在第0天以10mg/kg的剂量静脉内注射至猴。COS0098pHv1-SG1077的剂量设置被调整为注射后生理血浆食蟹猴C1s和C1q浓度的过量浓度。在注射前-1天和注射后5分钟,2、8小时,1、2、4、7、14、21和28天采集血液。

[0695] 立即离心这些血液样品以分离血浆样品。通过LC/ESI-MS/MS在每个采样点测量食蟹猴C1s和C1q的血浆浓度。

[0696] SG1077包含增强Fc γ 受体结合的突变。注射COS0098pHv1-SG1077后,食蟹猴C1s的血浆浓度降低至低于基线的30% (图3)。类似地,注射COS0098pHv1-SG1077后,食蟹猴C1q的血浆浓度降低至低于基线的20% (图4)。第1次注射后第4、7和14天的所有血浆C1q浓度样品均低于定量限 (第4天和第7天:9.75 μ g/mL,第14天:19.5 μ g/mL)。该结果表明COS0098pHv1-SG1077具有加速C1s和C1q消除的强大潜力。

序列表

<110> 中外制药株式会社
 <120> 抗原结合分子、药物组合物和方法
 <130> C1-A1913P
 <150> JP 2019-092472
 <151> 2019-05-15
 <150> JP 2019-155042
 <151> 2019-08-27
 <160> 26
 <170> PatentIn 3.5版
 <210> 1
 <211> 701
 <212> PRT
 <213> 食蟹猴
 <400> 1

[0001]

Met Trp Cys Ile Ile Leu Phe Ser Leu Leu Ala Trp Val Tyr Ala Glu
 1 5 10 15
 Pro Thr Met Tyr Gly Glu Ile Leu Ser Pro Asn Tyr Pro Gln Ala Tyr
 20 25 30
 Pro Ser Glu Val Glu Lys Ser Trp Asp Ile Glu Val Pro Glu Gly Tyr
 35 40 45
 Gly Ile His Leu Tyr Phe Thr His Leu Asp Ile Glu Leu Ser Glu Asn
 50 55 60
 Cys Ala Tyr Asp Ser Val Gln Ile Met Ser Gly Asp Ile Glu Glu Gly
 65 70 75 80
 Arg Leu Cys Gly Gln Arg Thr Ser Asn Asn Pro Tyr Ser Pro Ile Val
 85 90 95
 Glu Glu Phe Gln Val Pro Tyr Asn Lys Leu Gln Val Ile Phe Lys Ser
 100 105 110
 Asp Phe Ser Asn Glu Glu Arg Phe Thr Gly Phe Ala Ala Tyr Tyr Val
 115 120 125
 Ala Thr Asp Ile Asn Glu Cys Thr Asp Phe Val Asp Ala Pro Cys Ser
 130 135 140
 His Phe Cys Asn Asn Phe Ile Gly Gly Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro
 145 150 155 160
 Glu Tyr Phe Leu His Asp Asp Met Lys Asn Cys Gly Val Asn Cys Ser
 165 170 175
 Gly Asp Val Phe Thr Ala Leu Ile Gly Glu Ile Ala Ser Pro Asn Tyr
 180 185 190
 Pro Lys Pro Tyr Pro Glu Asn Ser Arg Cys Glu Tyr Gln Ile Arg Leu
 195 200 205
 Glu Lys Gly Phe Gln Val Val Val Thr Val Arg Arg Glu Asp Phe Asp
 210 215 220
 Val Glu Pro Ala Asp Ser Glu Gly Asn Cys Leu Asp Ser Leu Val Phe
 225 230 235 240
 Val Ala Gly Asp Gln Gln Phe Gly Pro Tyr Cys Gly Arg Gly Phe Pro
 245 250 255
 Gly Pro Leu Asn Ile Glu Thr Lys Ser Asn Val Leu Asp Ile Ile Phe
 260 265 270
 Gln Thr Asp Leu Thr Gly Gln Asn Lys Gly Trp Lys Leu Arg Tyr His
 275 280 285
 Gly Asp Pro Met Pro Cys Pro Lys Glu Glu Thr Pro Thr Ser Val Trp
 290 295 300
 Glu Pro Ala Lys Ala Lys Tyr Val Phe Arg Asp Val Val Arg Ile Thr
 305 310 315 320
 Cys Leu Asp Gly Phe Glu Val Val Glu Gly Arg Val Gly Ala Thr Ser

					325					330					335				
	Phe	His	Ser	Thr	Cys	Gln	Ser	Asn	Gly	Lys	Trp	Ser	Asn	Ser	Lys	Leu			
					340					345					350				
	Lys	Cys	Gln	Pro	Val	Asp	Cys	Gly	Ile	Pro	Glu	Ser	Ile	Glu	Asn	Gly			
					355				360						365				
	Lys	Val	Glu	Asp	Pro	Glu	Ser	Thr	Leu	Phe	Gly	Ser	Val	Thr	Arg	Tyr			
					370			375							380				
	Thr	Cys	Glu	Glu	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Met	Glu	Asn	Gly	Gly	Asn	Gly	Gln			
	385					390									395				400
	Tyr	His	Cys	Ala	Ser	Asn	Gly	Ser	Trp	Val	Asn	Glu	Ala	Leu	Ser	Pro			
					405					410					415				
	Glu	Leu	Pro	Lys	Cys	Val	Pro	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Arg	Glu	Pro	Phe			
					420					425					430				
	Glu	Gly	Lys	Gln	Arg	Ile	Ile	Gly	Gly	Ser	Asp	Ala	Asp	Ile	Lys	Asn			
					435				440						445				
	Phe	Pro	Trp	Gln	Val	Phe	Phe	Asp	Asn	Pro	Trp	Ala	Gly	Gly	Ala	Leu			
	450						455								460				
	Ile	Asp	Glu	Tyr	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Val	Val	Glu	Gly	Asn			
	465						470					475							480
	Gln	Glu	Pro	Thr	Met	Tyr	Val	Gly	Ser	Thr	Ser	Val	Gln	Thr	Ser	Arg			
					485										490				495
	Leu	Ala	Lys	Ser	Lys	Met	Leu	Thr	Ser	Glu	Arg	Val	Phe	Ile	His	Pro			
					500					505					510				
	Gly	Trp	Lys	Leu	Leu	Glu	Val	Pro	Glu	Ala	Arg	Thr	Asn	Phe	Asp	Asn			
					515				520						525				
	Asp	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Leu	Lys	Asp	Pro	Val	Lys	Met	Gly	Pro	Thr			
					530			535							540				
[0002]	Val	Ala	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Tyr	Asn	Leu	Met			
	545					550						555				560			
	Asp	Gly	Asp	Leu	Gly	Leu	Ile	Ala	Gly	Trp	Gly	Arg	Thr	Glu	Lys	Arg			
					565						570					575			
	Asp	Arg	Ala	Leu	Arg	Leu	Lys	Ala	Ala	Arg	Leu	Pro	Val	Ala	Pro	Leu			
					580					585						590			
	Arg	Lys	Cys	Arg	Glu	Val	Lys	Val	Glu	Asn	Pro	Lys	Ala	Asp	Ala	Gly			
					595					600					605				
	Ala	Tyr	Val	Phe	Thr	Pro	Asn	Met	Ile	Cys	Ala	Gly	Gly	Glu	Lys	Gly			
					610			615							620				
	Met	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Ala	Phe	Ala	Val	Gln	Asp			
	625					630						635				640			
	Pro	Asn	Asp	Lys	Thr	Lys	Phe	Tyr	Val	Ala	Gly	Leu	Val	Ser	Trp	Gly			
					645							650				655			
	Pro	Gln	Cys	Gly	Thr	Tyr	Gly	Leu	Tyr	Thr	Arg	Val	Gln	Asn	Tyr	Val			
					660							665				670			
	Asp	Trp	Ile	Lys	Lys	Thr	Met	Gln	Glu	Asn	Ser	Thr	Pro	Ser	Lys	Asp			
					675			680						685					
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys						
					690			695						700					
	<210>	2																	
	<211>	718																	
	<212>	PRT																	
	<213>	食蟹猴																	
	<400>	2																	
	Met	Trp	Leu	Leu	Tyr	Leu	Leu	Val	Pro	Ala	Leu	Phe	Cys	Arg	Ala	Gly			
	1				5					10					15				
	Gly	Ser	Ile	Pro	Ile	Pro	Gln	Lys	Leu	Phe	Gly	Glu	Val	Thr	Ser	Pro			
					20										30				

	Leu	Phe	Pro	Lys	Pro	Tyr	Pro	Asn	Ser	Phe	Glu	Thr	Thr	Thr	Val	Ile
			35					40					45			
	Thr	Val	Pro	Thr	Gly	Tyr	Arg	Val	Lys	Leu	Val	Phe	Gln	His	Phe	Asp
		50					55					60				
	Leu	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Cys	Phe	Tyr	Asp	Tyr	Val	Lys	Ile	Ser	Ala
65					70						75					80
	Asp	Lys	Lys	Asn	Leu	Gly	Arg	Phe	Cys	Gly	Gln	Leu	Gly	Ser	Pro	Leu
				85						90						95
	Gly	Asn	Pro	Pro	Gly	Lys	Lys	Glu	Phe	Leu	Ser	Gln	Gly	Asn	Lys	Met
			100						105						110	
	Leu	Leu	Thr	Phe	His	Thr	Asp	Phe	Ser	Asn	Glu	Glu	Asn	Gly	Thr	Ile
			115					120						125		
	Met	Phe	Tyr	Lys	Gly	Phe	Leu	Ala	Tyr	Tyr	Gln	Ala	Val	Asp	Leu	Asp
							135						140			
	Glu	Cys	Ala	Ser	Gln	Ser	Glu	Ser	Gly	Glu	Lys	Asp	Pro	Gln	Pro	Gln
145					150							155				160
	Cys	Gln	His	Leu	Cys	His	Asn	Tyr	Val	Gly	Gly	Tyr	Phe	Cys	Ser	Cys
				165							170					175
	Arg	Pro	Gly	Tyr	Glu	Leu	Gln	Glu	Asp	Arg	His	Ser	Cys	Gln	Ala	Glu
				180						185						190
	Cys	Ser	Ser	Glu	Leu	Tyr	Thr	Glu	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ile	Ser	Ser	Leu
			195					200								205
	Glu	Tyr	Pro	Arg	Ser	Tyr	Pro	Pro	Asp	Leu	Arg	Cys	Asn	Tyr	Ser	Ile
		210					215						220			
	Arg	Val	Glu	Arg	Gly	Leu	Thr	Leu	His	Leu	Lys	Phe	Leu	Glu	Pro	Phe
225						230						235				240
	Glu	Ile	Asp	Asp	His	Gln	Gln	Val	His	Cys	Pro	Tyr	Asp	Gln	Leu	Gln
				245												255
[0003]	Ile	Tyr	Ala	Asn	Gly	Lys	Asn	Ile	Gly	Glu	Phe	Cys	Gly	Lys	Gln	Arg
			260						265							270
	Pro	Pro	Asp	Phe	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Ala	Val	Asp	Leu	Leu	Phe	Phe
			275						280							285
	Thr	Asp	Glu	Ser	Gly	Asp	Ser	Arg	Gly	Trp	Lys	Leu	Arg	Tyr	Thr	Thr
		290					295						300			
	Glu	Ile	Ile	Lys	Cys	Pro	Gln	Pro	Lys	Thr	Leu	Asp	Glu	Phe	Thr	Val
305					310							315				320
	Ile	Gln	Asn	Leu	Gln	Pro	Gln	Tyr	Gln	Phe	Arg	Asp	Tyr	Phe	Ile	Ala
				325								330				335
	Thr	Cys	Lys	Leu	Gly	Tyr	Gln	Leu	Ile	Glu	Gly	Asn	Gln	Val	Leu	His
				340						345						350
	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Cys	Gln	Asp	Asp	Gly	Thr	Trp	His	Arg	Ala	Met
			355						360							365
	Pro	Arg	Cys	Lys	Ile	Lys	Asp	Cys	Gly	Gln	Pro	Arg	Asn	Leu	Pro	Asn
		370					375									380
	Gly	Ala	Phe	Arg	Tyr	Thr	Thr	Thr	Met	Gly	Val	Asn	Thr	Tyr	Lys	Ala
385						390						395				400
	Arg	Ile	Gln	Tyr	Tyr	Cys	His	Glu	Pro	Tyr	Tyr	Lys	Met	Gln	Thr	Arg
				405							410					415
	Ala	Gly	Ser	Lys	Glu	Ser	Glu	Gln	Gly	Leu	Tyr	Thr	Cys	Thr	Ala	Gln
				420						425						430
	Gly	Ile	Trp	Lys	Asn	Glu	Gln	Lys	Gly	Glu	Lys	Ile	Pro	Arg	Cys	Leu
			435													440
	Pro	Val	Cys	Gly	Lys	Pro	Val	Asn	Pro	Val	Glu	Gln	Arg	Gln	Gln	Ile
		450						455								460
	Ile	Gly	Gly	Gln	Lys	Ala	Lys	Met	Gly	Asn	Phe	Pro	Trp	Gln	Val	Phe
465						470						475				480

Thr Asn Ile His Gly Arg Gly Gly Gly Ala Leu Leu Gly Asp Arg Trp
 485 490 495
 Ile Leu Thr Ala Ala His Thr Leu Tyr Pro Lys Glu His Glu Ala Gln
 500 505 510
 Ser Asn Ala Ser Leu Asp Val Phe Leu Gly His Thr Asn Val Glu Glu
 515 520 525
 Leu Met Lys Leu Ala Asn His Pro Ile Arg Arg Val Ser Ile His Pro
 530 535 540
 Asp Tyr Arg Gln Asp Glu Ser His Asn Phe Glu Gly Asp Ile Ala Leu
 545 550 555 560
 Leu Glu Leu Glu Asn Ser Val Thr Leu Gly Pro Asn Leu Leu Pro Ile
 565 570 575
 Cys Leu Pro Asp Asn Glu Thr Phe Tyr Asp Leu Gly Leu Met Gly Tyr
 580 585 590
 Val Ser Gly Phe Gly Val Met Glu Glu Lys Ile Ala His Asp Leu Arg
 595 600 605
 Phe Val Arg Leu Pro Val Ala Asn Arg Lys Asp Cys Glu Thr Trp Leu
 610 615 620
 Arg Gly Lys Asn Arg Leu Asp Val Phe Ser Gln Asn Met Phe Cys Ala
 625 630 635 640
 Gly His Pro Ser Leu Lys Gln Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ala Gly Gly
 645 650 655
 Val Phe Ala Val Arg Asp Pro Asn Thr Asp Arg Trp Ile Ala Thr Gly
 660 665 670
 Ile Val Ser Trp Gly Ile Gly Cys Ser Lys Gly Tyr Gly Phe Tyr Thr
 675 680 685
 Lys Val Leu Asn Tyr Val Asp Trp Ile Lys Lys Glu Met Glu Glu Glu
 690 695 700
 [0004] Asp Gly Gly Gly Gly Ser His His His His His His His
 705 710 715
 <210> 3
 <211> 688
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 3
 Met Trp Cys Ile Val Leu Phe Ser Leu Leu Ala Trp Val Tyr Ala Glu
 1 5 10 15
 Pro Thr Met Tyr Gly Glu Ile Leu Ser Pro Asn Tyr Pro Gln Ala Tyr
 20 25 30
 Pro Ser Glu Val Glu Lys Ser Trp Asp Ile Glu Val Pro Glu Gly Tyr
 35 40 45
 Gly Ile His Leu Tyr Phe Thr His Leu Asp Ile Glu Leu Ser Glu Asn
 50 55 60
 Cys Ala Tyr Asp Ser Val Gln Ile Ile Ser Gly Asp Thr Glu Glu Gly
 65 70 75 80
 Arg Leu Cys Gly Gln Arg Ser Ser Asn Asn Pro His Ser Pro Ile Val
 85 90 95
 Glu Glu Phe Gln Val Pro Tyr Asn Lys Leu Gln Val Ile Phe Lys Ser
 100 105 110
 Asp Phe Ser Asn Glu Glu Arg Phe Thr Gly Phe Ala Ala Tyr Tyr Val
 115 120 125
 Ala Thr Asp Ile Asn Glu Cys Thr Asp Phe Val Asp Val Pro Cys Ser
 130 135 140
 His Phe Cys Asn Asn Phe Ile Gly Gly Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro
 145 150 155 160
 Glu Tyr Phe Leu His Asp Asp Met Lys Asn Cys Gly Val Asn Cys Ser

				165					170					175		
	Gly	Asp	Val	Phe	Thr	Ala	Leu	Ile	Gly	Glu	Ile	Ala	Ser	Pro	Asn	Tyr
				180					185					190		
	Pro	Lys	Pro	Tyr	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Cys	Glu	Tyr	Gln	Ile	Arg	Leu
				195					200					205		
	Glu	Lys	Gly	Phe	Gln	Val	Val	Val	Thr	Leu	Arg	Arg	Glu	Asp	Phe	Asp
				210					215				220			
	Val	Glu	Ala	Ala	Asp	Ser	Ala	Gly	Asn	Cys	Leu	Asp	Ser	Leu	Val	Phe
	225					230					235				240	
	Val	Ala	Gly	Asp	Arg	Gln	Phe	Gly	Pro	Tyr	Cys	Gly	His	Gly	Phe	Pro
				245						250					255	
	Gly	Pro	Leu	Asn	Ile	Glu	Thr	Lys	Ser	Asn	Ala	Leu	Asp	Ile	Ile	Phe
				260						265					270	
	Gln	Thr	Asp	Leu	Thr	Gly	Gln	Lys	Lys	Gly	Trp	Lys	Leu	Arg	Tyr	His
				275						280				285		
	Gly	Asp	Pro	Met	Pro	Cys	Pro	Lys	Glu	Asp	Thr	Pro	Asn	Ser	Val	Trp
				290				295				300				
	Glu	Pro	Ala	Lys	Ala	Lys	Tyr	Val	Phe	Arg	Asp	Val	Val	Gln	Ile	Thr
	305					310					315				320	
	Cys	Leu	Asp	Gly	Phe	Glu	Val	Val	Glu	Gly	Arg	Val	Gly	Ala	Thr	Ser
				325						330					335	
	Phe	Tyr	Ser	Thr	Cys	Gln	Ser	Asn	Gly	Lys	Trp	Ser	Asn	Ser	Lys	Leu
				340					345					350		
	Lys	Cys	Gln	Pro	Val	Asp	Cys	Gly	Ile	Pro	Glu	Ser	Ile	Glu	Asn	Gly
				355				360						365		
	Lys	Val	Glu	Asp	Pro	Glu	Ser	Thr	Leu	Phe	Gly	Ser	Val	Ile	Arg	Tyr
				370				375				380				
[0005]	Thr	Cys	Glu	Glu	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Met	Glu	Asn	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu
	385					390					395					400
	Tyr	His	Cys	Ala	Gly	Asn	Gly	Ser	Trp	Val	Asn	Glu	Val	Leu	Gly	Pro
				405						410					415	
	Glu	Leu	Pro	Lys	Cys	Val	Pro	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Arg	Glu	Pro	Phe
				420					425					430		
	Glu	Glu	Lys	Gln	Arg	Ile	Ile	Gly	Gly	Ser	Asp	Ala	Asp	Ile	Lys	Asn
				435				440					445			
	Phe	Pro	Trp	Gln	Val	Phe	Phe	Asp	Asn	Pro	Trp	Ala	Gly	Gly	Ala	Leu
				450			455					460				
	Ile	Asn	Glu	Tyr	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Val	Val	Glu	Gly	Asn
	465					470					475				480	
	Arg	Glu	Pro	Thr	Met	Tyr	Val	Gly	Ser	Thr	Ser	Val	Gln	Thr	Ser	Arg
				485						490					495	
	Leu	Ala	Lys	Ser	Lys	Met	Leu	Thr	Pro	Glu	His	Val	Phe	Ile	His	Pro
				500					505					510		
	Gly	Trp	Lys	Leu	Leu	Glu	Val	Pro	Glu	Gly	Arg	Thr	Asn	Phe	Asp	Asn
				515				520					525			
	Asp	Ile	Ala	Leu	Val	Arg	Leu	Lys	Asp	Pro	Val	Lys	Met	Gly	Pro	Thr
				530			535					540				
	Val	Ser	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Tyr	Asn	Leu	Met
	545					550					555				560	
	Asp	Gly	Asp	Leu	Gly	Leu	Ile	Ser	Gly	Trp	Gly	Arg	Thr	Glu	Lys	Arg
				565						570					575	
	Asp	Arg	Ala	Val	Arg	Leu	Lys	Ala	Ala	Arg	Leu	Pro	Val	Ala	Pro	Leu
				580					585					590		
	Arg	Lys	Cys	Lys	Glu	Val	Lys	Val	Glu	Lys	Pro	Thr	Ala	Asp	Ala	Glu
			595					600					605			
	Ala	Tyr	Val	Phe	Thr	Pro	Asn	Met	Ile	Cys	Ala	Gly	Gly	Glu	Lys	Gly

	610					615					620					
	Met	Asp	Ser	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Ala	Phe	Ala	Val	Gln	Asp
	625					630					635					640
	Pro	Asn	Asp	Lys	Thr	Lys	Phe	Tyr	Ala	Ala	Gly	Leu	Val	Ser	Trp	Gly
					645						650					655
	Pro	Gln	Cys	Gly	Thr	Tyr	Gly	Leu	Tyr	Thr	Arg	Val	Lys	Asn	Tyr	Val
				660					665					670		
	Asp	Trp	Ile	Met	Lys	Thr	Met	Gln	Glu	Asn	Ser	Thr	Pro	Arg	Glu	Asp
			675					680					685			
	<210>	4														
	<211>	705														
	<212>	PRT														
	<213>	智人														
	<400>	4														
	Met	Trp	Leu	Leu	Tyr	Leu	Leu	Val	Pro	Ala	Leu	Phe	Cys	Arg	Ala	Gly
	1				5					10					15	
	Gly	Ser	Ile	Pro	Ile	Pro	Gln	Lys	Leu	Phe	Gly	Glu	Val	Thr	Ser	Pro
				20					25					30		
	Leu	Phe	Pro	Lys	Pro	Tyr	Pro	Asn	Asn	Phe	Glu	Thr	Thr	Thr	Val	Ile
			35				40						45			
	Thr	Val	Pro	Thr	Gly	Tyr	Arg	Val	Lys	Leu	Val	Phe	Gln	Gln	Phe	Asp
		50					55					60				
	Leu	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Cys	Phe	Tyr	Asp	Tyr	Val	Lys	Ile	Ser	Ala
	65				70					75						80
	Asp	Lys	Lys	Ser	Leu	Gly	Arg	Phe	Cys	Gly	Gln	Leu	Gly	Ser	Pro	Leu
				85						90					95	
	Gly	Asn	Pro	Pro	Gly	Lys	Lys	Glu	Phe	Met	Ser	Gln	Gly	Asn	Lys	Met
			100					105						110		
[0006]	Leu	Leu	Thr	Phe	His	Thr	Asp	Phe	Ser	Asn	Glu	Glu	Asn	Gly	Thr	Ile
			115				120						125			
	Met	Phe	Tyr	Lys	Gly	Phe	Leu	Ala	Tyr	Tyr	Gln	Ala	Val	Asp	Leu	Asp
		130					135					140				
	Glu	Cys	Ala	Ser	Arg	Ser	Lys	Leu	Gly	Glu	Glu	Asp	Pro	Gln	Pro	Gln
					150						155					160
	Cys	Gln	His	Leu	Cys	His	Asn	Tyr	Val	Gly	Gly	Tyr	Phe	Cys	Ser	Cys
				165						170						175
	Arg	Pro	Gly	Tyr	Glu	Leu	Gln	Glu	Asp	Arg	His	Ser	Cys	Gln	Ala	Glu
				180					185					190		
	Cys	Ser	Ser	Glu	Leu	Tyr	Thr	Glu	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ile	Ser	Ser	Leu
			195					200					205			
	Glu	Tyr	Pro	Arg	Ser	Tyr	Pro	Pro	Asp	Leu	Arg	Cys	Asn	Tyr	Ser	Ile
		210					215					220				
	Arg	Val	Glu	Arg	Gly	Leu	Thr	Leu	His	Leu	Lys	Phe	Leu	Glu	Pro	Phe
	225				230						235					240
	Asp	Ile	Asp	Asp	His	Gln	Gln	Val	His	Cys	Pro	Tyr	Asp	Gln	Leu	Gln
				245						250						255
	Ile	Tyr	Ala	Asn	Gly	Lys	Asn	Ile	Gly	Glu	Phe	Cys	Gly	Lys	Gln	Arg
			260						265					270		
	Pro	Pro	Asp	Leu	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Ala	Val	Asp	Leu	Leu	Phe	Phe
			275				280						285			
	Thr	Asp	Glu	Ser	Gly	Asp	Ser	Arg	Gly	Trp	Lys	Leu	Arg	Tyr	Thr	Thr
		290				295						300				
	Glu	Ile	Ile	Lys	Cys	Pro	Gln	Pro	Lys	Thr	Leu	Asp	Glu	Phe	Thr	Ile
	305					310					315					320
	Ile	Gln	Asn	Leu	Gln	Pro	Gln	Tyr	Gln	Phe	Arg	Asp	Tyr	Phe	Ile	Ala
				325						330						335

	Thr	Cys	Lys	Gln	Gly	Tyr	Gln	Leu	Ile	Glu	Gly	Asn	Gln	Val	Leu	His
				340					345					350		
	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Cys	Gln	Asp	Asp	Gly	Thr	Trp	His	Arg	Ala	Met
			355					360					365			
	Pro	Arg	Cys	Lys	Ile	Lys	Asp	Cys	Gly	Gln	Pro	Arg	Asn	Leu	Pro	Asn
		370					375					380				
	Gly	Asp	Phe	Arg	Tyr	Thr	Thr	Thr	Met	Gly	Val	Asn	Thr	Tyr	Lys	Ala
	385				390						395					400
	Arg	Ile	Gln	Tyr	Tyr	Cys	His	Glu	Pro	Tyr	Tyr	Lys	Met	Gln	Thr	Arg
				405						410					415	
	Ala	Gly	Ser	Arg	Glu	Ser	Glu	Gln	Gly	Val	Tyr	Thr	Cys	Thr	Ala	Gln
				420					425					430		
	Gly	Ile	Trp	Lys	Asn	Glu	Gln	Lys	Gly	Glu	Lys	Ile	Pro	Arg	Cys	Leu
			435				440						445			
	Pro	Val	Cys	Gly	Lys	Pro	Val	Asn	Pro	Val	Glu	Gln	Arg	Gln	Gln	Ile
		450					455					460				
	Ile	Gly	Gly	Gln	Lys	Ala	Lys	Met	Gly	Asn	Phe	Pro	Trp	Gln	Val	Phe
	465				470						475					480
	Thr	Asn	Ile	His	Gly	Arg	Gly	Gly	Gly	Ala	Leu	Leu	Gly	Asp	Arg	Trp
				485						490					495	
	Ile	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Thr	Leu	Tyr	Pro	Lys	Glu	His	Glu	Ala	Gln
				500					505					510		
	Ser	Asn	Ala	Ser	Leu	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	His	Thr	Asn	Val	Glu	Glu
		515						520					525			
	Leu	Met	Lys	Leu	Gly	Asn	His	Pro	Ile	Arg	Arg	Val	Ser	Val	His	Pro
		530				535						540				
[0007]	Asp	Tyr	Arg	Gln	Asp	Glu	Ser	Tyr	Asn	Phe	Glu	Gly	Asp	Ile	Ala	Leu
	545				550					555						560
	Leu	Glu	Leu	Glu	Asn	Ser	Val	Thr	Leu	Gly	Pro	Asn	Leu	Leu	Pro	Ile
				565						570					575	
	Cys	Leu	Pro	Asp	Asn	Asp	Thr	Phe	Tyr	Asp	Leu	Gly	Leu	Met	Gly	Tyr
			580						585					590		
	Val	Ser	Gly	Phe	Gly	Val	Met	Glu	Glu	Lys	Ile	Ala	His	Asp	Leu	Arg
			595					600					605			
	Phe	Val	Arg	Leu	Pro	Val	Ala	Asn	Pro	Gln	Ala	Cys	Glu	Asn	Trp	Leu
		610					615					620				
	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Met	Asp	Val	Phe	Ser	Gln	Asn	Met	Phe	Cys	Ala
	625				630						635					640
	Gly	His	Pro	Ser	Leu	Lys	Gln	Asp	Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly
				645						650					655	
	Val	Phe	Ala	Val	Arg	Asp	Pro	Asn	Thr	Asp	Arg	Trp	Val	Ala	Thr	Gly
				660					665					670		
	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Ile	Gly	Cys	Ser	Arg	Gly	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr
		675					680						685			
	Lys	Val	Leu	Asn	Tyr	Val	Asp	Trp	Ile	Lys	Lys	Glu	Met	Glu	Glu	Glu
		690					695					700				
	Asp															
	705															
	<210>	5														
	<211>	279														
	<212>	PRT														
	<213>	食蟹猴														
	<400>	5														
	Gln	Val	Asp	Thr	Thr	Lys	Ala	Val	Ile	Thr	Leu	Gln	Pro	Pro	Trp	Val
	1				5					10					15	

Ser Val Phe Gln Glu Glu Thr Val Thr Leu Gln Cys Glu Val Pro Arg
 20 25 30
 Leu Pro Gly Ser Ser Ser Thr Gln Trp Phe Leu Asn Gly Thr Ala Thr
 35 40 45
 Gln Thr Ser Thr Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Ser Ala Ser Val Lys Asp
 50 55 60
 Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Arg Gly Pro Ser Gly Arg Ser Asp Pro
 65 70 75 80
 Ile Gln Leu Glu Ile His Arg Asp Trp Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser
 85 90 95
 Arg Val Phe Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Ala Trp
 100 105 110
 Lys Asp Lys Leu Val Tyr Asn Val Leu Tyr Tyr Gln Asn Gly Lys Ala
 115 120 125
 Phe Lys Phe Phe Tyr Arg Asn Ser Gln Leu Thr Ile Leu Lys Thr Asn
 130 135 140
 Ile Ser His Asn Gly Ala Tyr His Cys Ser Gly Met Gly Lys His Arg
 145 150 155 160
 Tyr Thr Ser Ala Gly Val Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Phe Pro Ala
 165 170 175
 Pro Val Leu Asn Ala Ser Val Thr Ser Pro Leu Leu Glu Gly Asn Leu
 180 185 190
 Val Thr Leu Ser Cys Glu Thr Lys Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu
 195 200 205
 Gln Leu Tyr Phe Ser Phe Tyr Met Gly Ser Lys Thr Leu Arg Gly Arg
 210 215 220
 Asn Thr Ser Ser Glu Tyr Gln Ile Leu Thr Ala Arg Arg Glu Asp Ser
 225 230 235 240
 Gly Phe Tyr Trp Cys Glu Ala Thr Thr Glu Asp Gly Asn Val Leu Lys
 245 250 255
 Arg Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly Leu Gln Leu Pro Thr
 260 265 270
 Pro His His His His His
 275
 <210> 6
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> 食蟹猴
 <400> 6
 Gln Thr Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Pro Trp Ile
 1 5 10 15
 Asn Val Leu Arg Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Gly Gly Ala His
 20 25 30
 Ser Pro Asp Ser Asp Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile
 35 40 45
 Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp
 50 55 60
 Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Gly Arg Thr Ser Leu Ser Asp Pro
 65 70 75 80
 Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Ala Leu Gln Thr Pro His
 85 90 95
 Leu Glu Phe Arg Glu Gly Glu Thr Ile Met Leu Arg Cys His Ser Trp
 100 105 110
 Lys Asp Lys Pro Leu Ile Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Ile Ala
 115 120 125
 Lys Lys Phe Ser His Met Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Arg Ala Asn

	130					135						140					
	His	Ser	His	Ser	Gly	Asp	Tyr	His	Cys	Thr	Gly	Asn	Ile	Gly	Tyr	Thr	
	145					150					155						160
	Pro	Tyr	Ser	Ser	Lys	Pro	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Gln	Val	Pro	Ser	Val	
					165					170						175	
	Gly	Ser	Ser	Ser	Pro	Met	Gly	Ile	His	His	His	His	His	His	His		
				180					185							190	
	<210>	7															
	<211>	190															
	<212>	PRT															
	<213>	食蟹猴															
	<400>	7															
	Gln	Thr	Ala	Pro	Pro	Lys	Ala	Val	Leu	Lys	Leu	Glu	Pro	Pro	Trp	Ile	
	1				5					10					15		
	Asn	Val	Leu	Arg	Glu	Asp	Ser	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	Gly	Ala	His	
				20					25					30			
	Ser	Pro	Asp	Ser	Asp	Ser	Thr	Gln	Trp	Phe	His	Asn	Gly	Asn	Leu	Ile	
			35				40					45					
	Pro	Thr	His	Thr	Gln	Pro	Ser	Tyr	Arg	Phe	Lys	Ala	Asn	Asn	Asn	Asp	
		50				55					60						
	Ser	Gly	Glu	Tyr	Arg	Cys	Gln	Thr	Gly	Arg	Thr	Ser	Leu	Ser	Asp	Pro	
	65				70					75					80		
	Val	His	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Glu	Trp	Leu	Ala	Leu	Gln	Thr	Thr	His	
					85					90					95		
	Leu	Glu	Phe	Arg	Glu	Gly	Glu	Thr	Ile	Met	Leu	Arg	Cys	His	Ser	Trp	
				100					105					110			
	Lys	Asp	Lys	Pro	Leu	Ile	Lys	Val	Ala	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys	Ser	
			115				120						125				
[0009]	Lys	Asn	Phe	Ser	His	Met	Asn	Pro	Asn	Phe	Ser	Ile	Pro	Gln	Ala	Asn	
		130					135						140				
	His	Ser	His	Ser	Gly	Asp	Tyr	His	Cys	Thr	Gly	Asn	Ile	Gly	Tyr	Thr	
	145				150						155						160
	Pro	Tyr	Ser	Ser	Lys	Pro	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Gln	Val	Pro	Ser	Val	
					165					170						175	
	Gly	Ser	Ser	Ser	Pro	Met	Gly	Ile	His	His	His	His	His	His			
				180					185							190	
	<210>	8															
	<211>	190															
	<212>	PRT															
	<213>	食蟹猴															
	<400>	8															
	Gln	Thr	Ala	Pro	Pro	Lys	Ala	Val	Leu	Lys	Leu	Glu	Pro	Pro	Trp	Ile	
	1				5					10					15		
	Asn	Val	Leu	Arg	Glu	Asp	Ser	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	Gly	Ala	His	
				20					25					30			
	Ser	Pro	Asp	Ser	Asp	Ser	Thr	Gln	Trp	Phe	His	Asn	Gly	Asn	Leu	Ile	
			35				40					45					
	Pro	Thr	His	Thr	Gln	Pro	Ser	Tyr	Arg	Phe	Lys	Ala	Asn	Asn	Asn	Asp	
		50				55					60						
	Ser	Gly	Glu	Tyr	Arg	Cys	Gln	Thr	Gly	Arg	Thr	Ser	Leu	Ser	Asp	Pro	
	65				70					75					80		
	Val	His	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Glu	Trp	Leu	Ala	Leu	Gln	Thr	Thr	His	
					85					90					95		
	Leu	Glu	Phe	Arg	Glu	Gly	Glu	Thr	Ile	Met	Leu	Arg	Cys	His	Ser	Trp	
				100					105					110			
	Lys	Asp	Lys	Pro	Leu	Ile	Lys	Val	Ala	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Ile	Ser	

```

115          120          125
Lys Lys Phe Ser Pro Met Asn Pro Asn Phe Ser Ile Pro Arg Ala Asn
130          135          140
His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr
145          150          155
Pro Tyr Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Val Pro Ser Val
165          170          175
Gly Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile His His His His His His
180          185          190
<210> 9
<211> 181
<212> PRT
<213> 食蟹猴
<400> 9
Thr Pro Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Pro Trp
1 5 10 15
Ile Asn Val Leu Arg Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Gly Gly Ala
20 25 30
His Ser Pro Asp Ser Asp Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu
35 40 45
Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn
50 55 60
Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Gly Arg Thr Ser Leu Ser Asp
65 70 75 80
Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Ala Leu Gln Thr Pro
85 90 95
His Leu Glu Phe Arg Glu Gly Glu Thr Ile Met Leu Arg Cys His Ser
100 105 110
[0010] Trp Lys Asp Lys Pro Leu Ile Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Ile
115 120 125
Ser Lys Lys Phe Ser His Met Asn Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala
130 135 140
Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr
145 150 155 160
Thr Pro Tyr Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Val Pro His
165 170 175
His His His His His
180
<210> 10
<211> 194
<212> PRT
<213> 食蟹猴
<400> 10
Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg
1 5 10 15
Val Leu Glu Lys Asp Arg Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser
20 25 30
Pro Glu Asp Asn Ser Thr Arg Trp Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser
35 40 45
Ser Gln Thr Ser Ser Tyr Phe Ile Ala Ala Ala Arg Val Asn Asn Ser
50 55 60
Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Ser Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val
65 70 75 80
Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp
85 90 95
Val Phe Lys Glu Glu Glu Ser Ile His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys

```

100 105 110
 Asn Thr Leu Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg
 115 120 125
 Lys Tyr Phe His Gln Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu
 130 135 140
 Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Ile Gly Ser Lys Asn
 145 150 155 160
 Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Asp Leu Ala Val
 165 170 175
 Ser Ser Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln His His His His
 180 185 190
 His His

<210> 11
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> 食蟹猴
 <400> 11

[0011]

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

<210> 12
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> COS0098bb_VH
 <400> 12

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Lys Tyr Thr
 20 25 30
 Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

```

                35                40                45
Ile Ile Asn Thr Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
   50
Arg Phe Thr Phe Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Gln Ile Thr
65   70   75   80
Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Asn
   85   90   95
Gly Asp Thr Asp Tyr Thr Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
   100   105   110
Val Ser Ser
   115
<210> 13
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> COS0098bb_VL
<400> 13
Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Glu Pro Val Gly Gly
1   5   10
Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Ala Leu
   20   25   30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
   35   40   45
Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser
   50   55   60
Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala
65   70   75   80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Phe Thr Ser Ser Thr
   85   90   95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
   100   105

<210> 14
<211> 328
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> SG1
<400> 14
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1   5   10   15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
   20   25   30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
   35   40   45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
   50   55   60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65   70   75   80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
   85   90   95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
   100   105   110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
   115   120   125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

```

[0012]

130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

[0013]

<210> 15
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> SG1077
 <400> 15

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

	His	Arg	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
			195					200					205			
	Thr	Ala	Leu	Pro	Lys	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
		210					215					220				
	Gln	Arg	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
	225					230					235					240
	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245						250						255
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
				260					265					270		
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
			275					280					285			
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
		290					295					300				
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Ala	Leu	His	Ala	His	Thr	Thr
	305					310					315					320
	Arg	Lys	Glu	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro								
					325											
	<210>	16														
	<211>	328														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														
	<220>															
	<223>	SG1148														
	<400>	16														
	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
	1				5					10					15	
[0014]	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20						25					30		
	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45			
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		50					55					60				
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
	65					70					75					80
	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85						90					95	
	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100						105					110		
	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			115					120					125			
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
		130					135					140				
	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
	145					150					155					160
	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165						170					175	
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
				180					185					190		
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Glu	Val	Ser	Asn
			195					200					205			
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
		210					215					220				
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
	225					230					235					240
	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 245 250 255
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 17
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> KOMC
 <400> 17

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

<210> 18
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> COS0098pHv1_VH
 <400> 18

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

<210> 19

[0015]

<211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> COS0098pHv1_VL
 <400> 19
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Ala
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Gln Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Phe Thr Ser His
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> COS0098pHv1_HCDR1
 <400> 20
 [0016] Lys Tyr Thr Val Ser
 1 5
 <210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> COS0098pHv1_HCDR2
 <400> 21
 Ile Ile Asn Thr Gly Gly Ser Ala Tyr Pro Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> COS0098pHv1_HCDR3
 <400> 22
 Gly Ala Gly Asp Thr Asp Tyr Thr Asn Leu
 1 5 10
 <210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> COS0098pHv1_LCDR1
 <400> 23
 Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Ala Leu Ala
 1 5 10

<210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> COS0098pHv1_LCDR2
 <400> 24
 Gly Ala Ser Gln Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> COS0098pHv1_LCDR3
 <400> 25
 Gln Gln Tyr Tyr Phe Thr Ser His Thr
 1 5
 [0017] <210> 26
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> SK1
 <400> 26
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

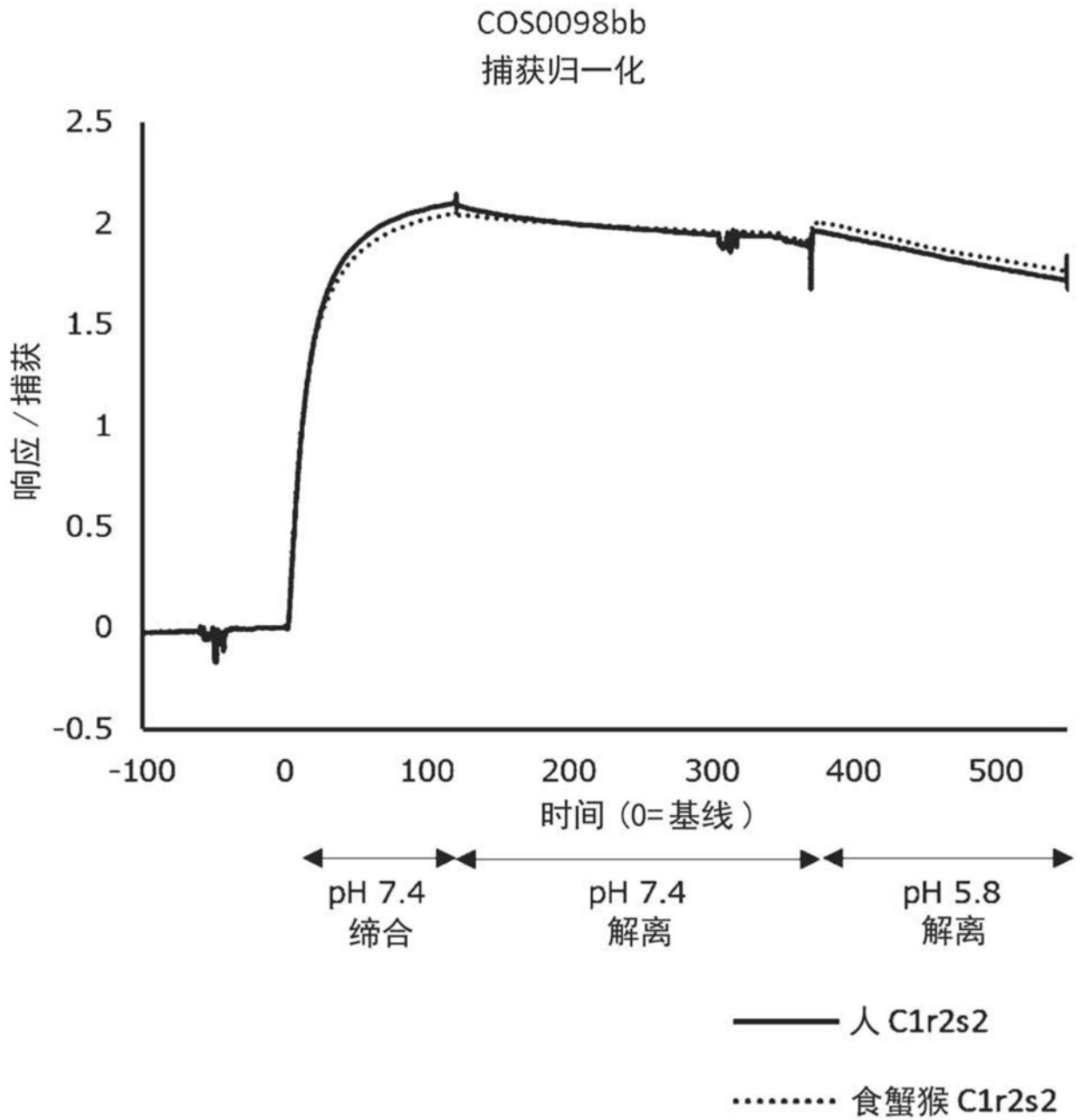


图1

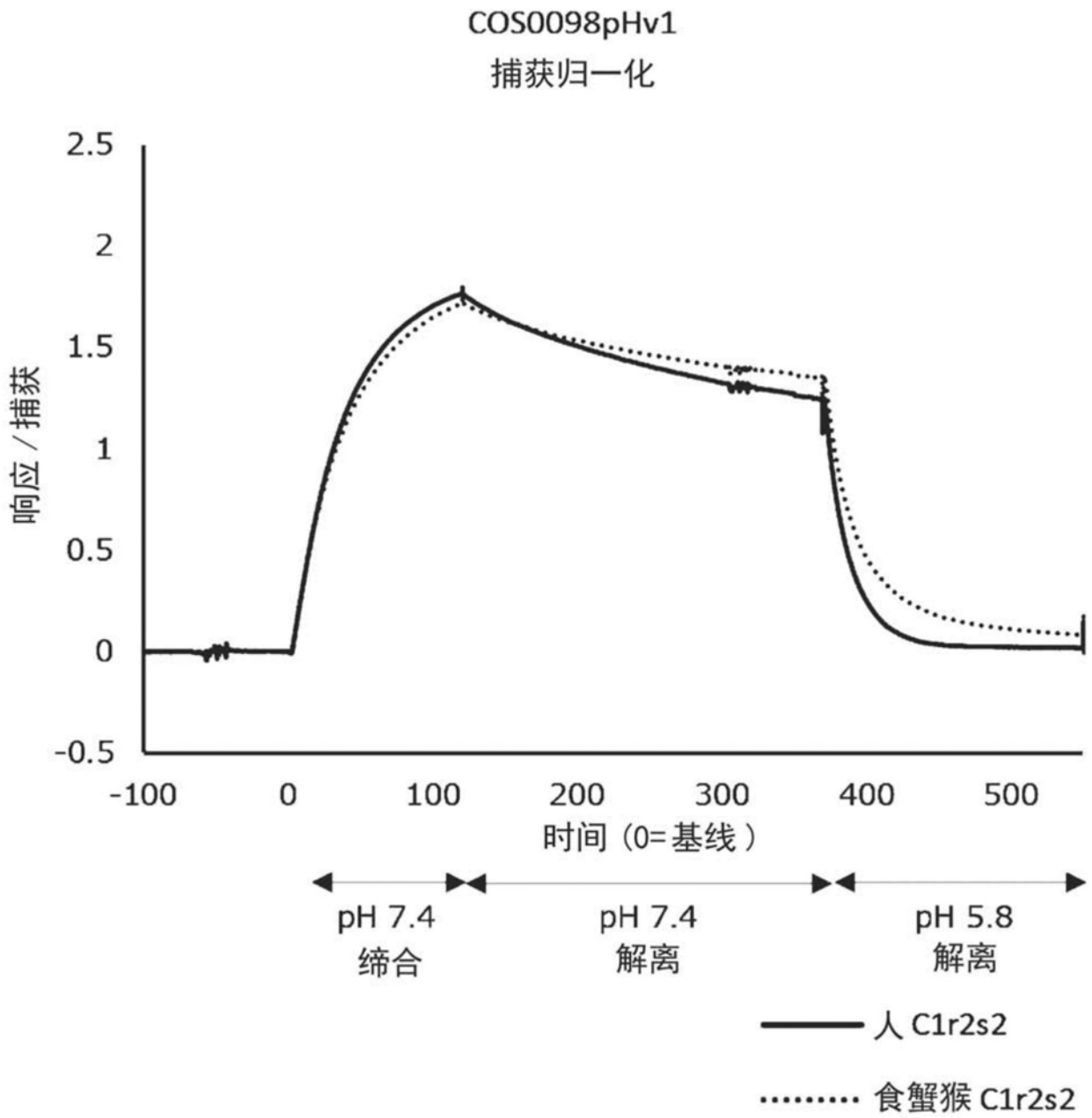


图2

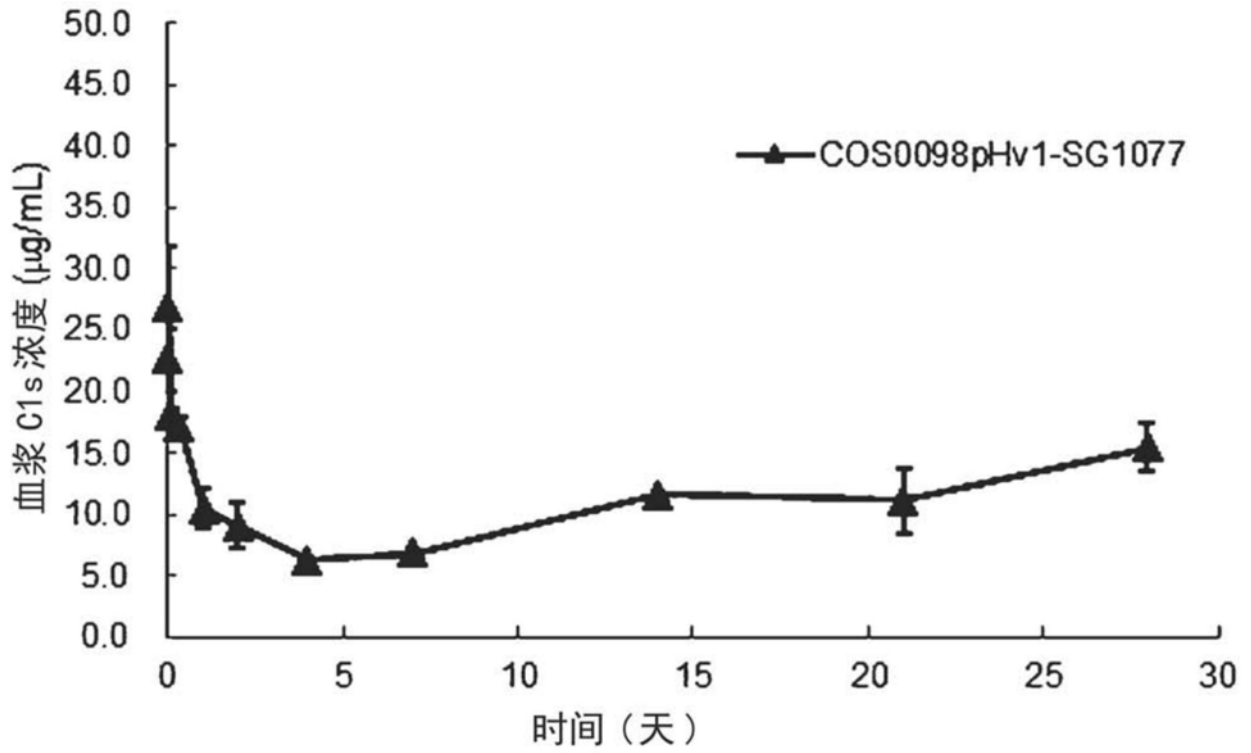


图3

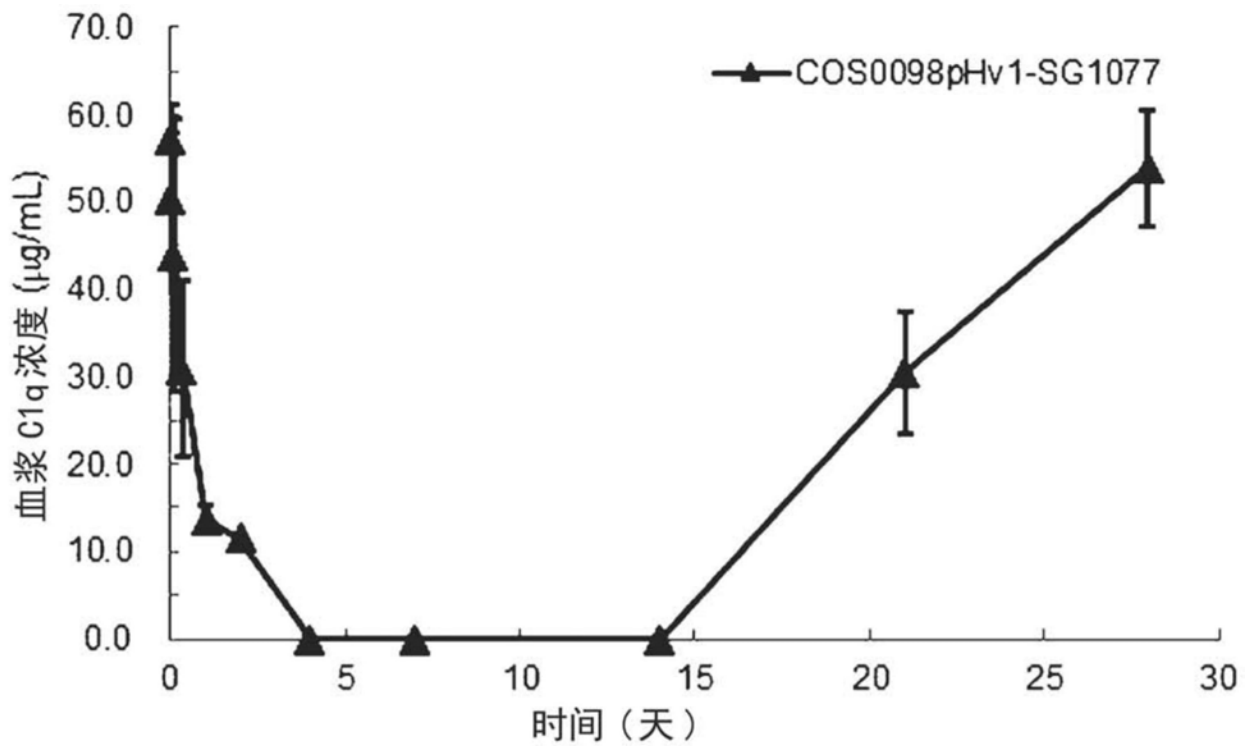


图4