



(10) 授权公告号 CN 111556895 B

(45) 授权公告日 2024. 09. 13

(21) 申请号 201880085532.6

高桥德行

(22) 申请日 2018.11.14

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111556895 A

专利代理师 张国梁 张莹

(43) 申请公布日 2020.08.18

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

C12N 15/13 (2006.01)

2017-219507 2017.11.14 JP

C07K 16/18 (2006.01)

2018-188765 2018.10.04 JP

(56) 对比文件

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.07.06

CN 102056946 A, 2011.05.11

CN 104884088 A, 2015.09.02

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2018/042054 2018.11.14

N Hironiwa等.Calcium-dependent

antigen binding as a novel modality for
antibody recycling by endosomal antigen
dissociation.《MAbs》.2015,第8卷(第1期),摘
要.

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/098212 EN 2019.05.23

审查员 杜鹏飞

(73) 专利权人 中外制药株式会社
地址 日本国东京都

权利要求书1页 说明书79页

(72) 发明人 冯舒 仓持太一 村冈优

序列表47页 附图2页

(54) 发明名称

抗-C1s抗体及使用方法

(57) 摘要

本发明提供抗-C1s抗体及其使用方法。抗体对C1s的亲合力取决于pH和其他条件。本发明还提供了包含所述抗体的药物制剂,以及治疗患有补体介导的疾病或病症的个体的方法,包括向该个体施用所述抗体。另外,测量了所述抗体在高和低pH的结合亲和力,并且对所述抗体进行了小鼠PK研究,并且在本申请中评估了所述抗体的药代动力学参数。

1. 分离的结合C1s的抗体,其中所述抗体在pH7.4比在pH5.8以更高的亲和力结合C1s,其中所述抗体包含SEQ ID NO:56的HVR-H1序列,SEQ ID NO:57的HVR-H2序列,SEQ ID NO:58的HVR-H3序列,SEQ ID NO:71的HVR-L1序列,SEQ ID NO:72的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:73的HVR-L3序列。
2. 权利要求1所述抗体的人源化抗体。
3. 药物制剂,其包含权利要求1或2所述的抗体和药学上可接受的载体。

抗-C1s抗体及使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及抗-C1s抗体及其使用方法。

背景技术

[0002] 补体系统包含约25-30种补体蛋白,其在针对病原体,外源抗原和肿瘤细胞的宿主防御中起关键作用。补体系统还参与通过清除体内免疫复合物和凋亡细胞来维持内稳态。补体组分通过在一系列级联的酶促过程和膜结合事件中相互作用来执行这些功能。这些过程的最终结果是生成具有裂解作用,免疫调节和调理功能的产物。

[0003] 众所周知,补体系统可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都不同,但所有这三种途径都集中并共有相同的最终负责破坏靶细胞的终末补体组分(C5至C9)。

[0004] C1复合物是一种大的蛋白质复合物,其起到作为经典途径级联反应的关键引发剂的作用。C1复合物由摩尔比分别为1:2:2的三个组分C1q,C1r和C1s组成(非专利文献1)。当C1复合物结合至抗体结合的靶标时,经典途径引发。具有6个球状头的C1q通过与Fc区的亲合力相互作用介导C1复合物与抗体的结合。一旦紧密结合至靶标,C1复合物中的C1r会自动激活并变得有酶活性。然后,活化的C1r切割并活化C1复合物中的酶原C1s(非专利文献2)。随后,活性C1s将其底物补体组分C2和C4分别切割为C2a/C2b,和C4a/C4b片段。这导致在靶标表面上C3转化酶C4b2a的装配,其切割C3形成C3b。C3b进而切割C5以引发终末膜攻击复合物,C5b,C6,C7,C8和C9的形成,其通过孔的形成来裂解靶标。

[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,大多数C1s处于二聚状态,而在1nM钙浓度下,其主要处于单体状态(非专利文献4)。在循环中,C1s和C1r主要作为钙依赖性C1r2s2异四聚体结合在一起,依次以1:1的比例可逆地结合到C1q,以形成C1复合物。在不存在或低浓度钙的情况下,C1r2s2四聚物解离为一个C1r二聚体和两个C1s单体(非专利文献5)。C1s是79kDa的糖蛋白,其质量的5%至6%可归因于糖基化(非专利文献6)。据报道,血清中C1s的浓度约为55μg/mL(0.7μM)(非专利文献7)。

[0006] 虽然正常功能的补体系统可以防御宿主针对病原体的侵害,但经典途径的失调或不适当活化会导致多种补体介导的病症,诸如但不限于,自身免疫性溶血性贫血(AIHA),白塞氏病,大疱性天疱疮(BP),免疫血小板减少性紫癜(ITP)等。因此,经典途径的过度或不受控制的活化的抑制可以为患有此类病症的患者提供临床益处。

[0007] 抗体是高度有吸引力的药物,因为它们在血浆中稳定,对其靶标具有高度特异性,并且通常表现出良好的药代动力学特征。然而,由于它们的大分子大小,治疗性抗体的剂量通常很高。在高丰度存在靶标的情况下,抗体的所需治疗剂量甚至更高。结果,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的方法。

[0008] 一些先前的报道已经描述了抗-C1s抗体。例如,Matsumoto等(1986)(非专利文献8)描述了结合C1s上不同表位的三种抗体。一种克隆表现出对活性形式C1s的优先结合,而

另外两种则与酶原和活性C1s二者结合。在这两种克隆中,只有一种能够抑制由C1s对C2和C4的切割。专利文献1描述了一种抗体,该抗体抑制C1s介导的C4的切割,但不是C2的切割。另外,专利文献2描述了几种结合C1s上的构象表位的抗体,与其酶原形式相比,其对活性C1s具有选择性。专利文献3描述了能够阻断C4切割的抗-C1s抗体的两种克隆。

[0009] 抗体对其抗原的亲合力决定了抗体能有效地中和其靶标的程度。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的所需的剂量。然而,局限性在于一个抗体分子通常具有两个结合位点,因此在施用后只能中和两个靶标(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的亲合力结合靶标,被抗体中和的靶标最大数仍保持上限为2。

[0010] 据报道,以pH依赖性方式结合抗原的抗体(下文也称为“pH依赖性抗体”或“pH依赖性结合抗体”)能够使单个抗体分子中和多个抗原分子(非专利文献10,专利文献4)。pH依赖性抗体在血浆中在中性pH条件下与其抗原牢固结合,但是在酸性pH条件下在细胞内体中与抗原解离。一旦与抗原解离,抗体便通过FcRn受体循环回血浆,而解离的抗原则在细胞的溶酶体内降解。然后,循环的抗体再次自由结合并中和抗原分子,并且只要抗体保持循环,该过程就会继续重复。

[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,Mol Cell.2016Jul 7;63(1):135-45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0028] 发明概述

[0029] 技术问题

[0030] 本发明提供抗-C1s抗体及其使用方法。

[0031] 解决问题的方案

[0032] 除了以pH依赖性方式结合C1s外,钙对pH依赖性抗体对于C1s的亲合力的影响可能是另一个重要特性。C1s在高钙浓度下会形成二聚体,但在低钙浓度下会解离成单体。当C1s

处于二聚状态时,二价抗体能够通过交联多个C1s分子形成免疫复合物。这允许抗体通过亲和力和亲合力相互作用结合复合物内的C1s分子,从而增加了抗体的表观亲和力。相比之下,当C1s处于单体状态时,抗体仅通过亲和力相互作用结合C1s。这意味着在血浆中pH依赖性C1s抗体可与二聚C1s形成免疫复合物,但一旦进入酸性内体,C1s将解离成单体。这导致免疫复合物的分解,然后其增强了抗体自抗原的pH依赖性解离。

[0033] 在一些实施方案中,本发明的分离的抗-C1s抗体是具有C1s结合活性的抗体,所述C1s结合活性根据离子浓度而变化。在一些实施方案中,分离的抗-C1s抗体在中性pH比在酸性pH以更高的亲和力结合C1s。在一些实施方案中,抗-C1s抗体在高钙浓度条件下比在低钙浓度条件下以更高的亲和力结合C1s。在一些实施方案中,分离的抗-C1s抗体在中性pH和在高钙浓度条件下比在酸性pH和在低钙浓度下以更高的亲和力结合C1s。

[0034] 在一些实施方案中,在本发明的分离的抗-C1s抗体中,当在中性和酸性pH均在高钙浓度测量时,酸性pH下其C1s结合活性的KD值与中性pH下其C1s结合活性的KD值的比值($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)为2或更大。在一些实施方案中,在本发明的分离的抗-C1s抗体中,当在中性和酸性pH均在低钙浓度测量时,酸性pH下其C1s结合活性的KD值与中性pH下其C1s结合活性的KD值的比值($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)为2或更大,其中抗-C1s抗体结合C1s的二聚状态。在一些实施方案中,在本发明的分离的抗-C1s抗体中,当在中性和酸性pH值下均在高钙浓度测量时,酸性pH其C1s结合活性的koff值与中性pH其C1s结合活性的koff值的比值($koff(\text{酸性pH})/koff(\text{中性pH})$)为2或更大。在一些实施方案中,在本发明的分离的抗-C1s抗体中,当在中性和酸性pH值下均在低钙浓度测量时,酸性pH其C1s结合活性的koff值与中性pH C1s结合活性的koff值的比值($koff(\text{酸性pH})/koff(\text{中性pH})$)为2或更大,其中抗-C1s抗体结合C1s的二聚状态。在一些实施方案中,在本发明的分离的抗-C1s抗体中,当在中性pH在高钙浓度和在酸性pH在低钙浓度下测量时,酸性pH其C1s结合活性的KD值与中性pH下C1s结合活性的KD值的比值($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)为5或更大。

[0035] 在一些实施方案中,本发明的分离的抗-C1s抗体在一个或更多个以下Kabat编号系统位置上包含组氨酸残基;

[0036] 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;和

[0037] 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。

[0038] 在一些实施方案中,本发明的分离的抗-C1s抗体在一个或更多个以下Kabat编号系统位置上包含组氨酸残基;

[0039] 重链:H51,H65,和H99;和

[0040] 轻链:L92,L94,L95和L96。

[0041] 在一些实施方案中,本发明的分离的抗-C1s抗体包含以下Kabat编号系统位置的一个,两个,三个,四个或五个组氨酸;

[0042] 重链:H51,H65,和H99;和

[0043] 轻链:L92,L94,L95和L96。

[0044] 在一些实施方案中,本发明的分离的抗-C1s抗体包含组氨酸残基,所述组氨酸残

基在通过Kabat编号系统的一个或更多个以下位置上和一个或更多个CDR或一个或更多个FR氨基酸位置上;

[0045] 重链:H51,H65,和H99;和

[0046] 轻链:L92,L94,L95和L96。

[0047] 在一些实施方案中,本发明的分离的抗-C1s抗体在通过Kabat编号系统的以下位置上包含组氨酸残基;

[0048] 1)L92和L94

[0049] 2)L92和L95

[0050] 3)L94和L95

[0051] 4)L92,L94和L95

[0052] 5)H65和L92

[0053] 6)H65和L94

[0054] 7)H65和L95

[0055] 8)H65,L92和L94

[0056] 9)H65,L92和L95

[0057] 10)H65,L94和L95

[0058] 11)H65,L92,L94和L95

[0059] 12)H99和L92

[0060] 13)H99和L94

[0061] 14)H99和L95

[0062] 15)H99,L92和L94

[0063] 16)H99,L92和L95

[0064] 17)H99,L94和L95

[0065] 18)H99,L92,L94和L95

[0066] 19)H65和H99

[0067] 20)H65,H99和L92

[0068] 21)H65,H99和L94

[0069] 22)H65,H99和L95

[0070] 23)H65,H99,L92和L94

[0071] 24)H65,H99,L92和L95

[0072] 25)H65,H99,L94和L95

[0073] 26)H65,H99,L92,L94和L95,或

[0074] 27)H27,H99和L95。

[0075] 在一些实施方案中,本发明的抗-C1s抗体包含在一个或更多个以下Kabat编号系统位置上至少一个被取代的组氨酸;

[0076] 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;和

[0077] 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。

[0078] 在一些实施方案中, 本发明的抗-C1s抗体包含在一个或更多个以下Kabat编号系统位置上至少一个被取代的组氨酸;

[0079] 重链: H51, H65和H99; 和

[0080] 轻链: L92, L94, L95和L96。

[0081] 在一些实施方案中, 本发明的分离的抗-C1s抗体包含以下Kabat编号系统位置的一个, 两个, 三个, 四个或五个被取代的组氨酸;

[0082] 重链: H51, H65和H99; 和

[0083] 轻链: L92, L94, L95和L96。

[0084] 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, 所述组氨酸是在由Kabat编号系统的一个或更多个以下位置上和一个或更多个CDR或一个或更多个FR氨基酸位置上取代的残基;

[0085] 重链: H51, H65和H99; 和

[0086] 轻链: L92, L94, L95和L96。

[0087] 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, 所述组氨酸是在由Kabat编号系统的以下位置上取代的残基;

[0088] 1) L92和L94

[0089] 2) L92和L95

[0090] 3) L94和L95

[0091] 4) L92, L94和L95

[0092] 5) H65和L92

[0093] 6) H65和L94

[0094] 7) H65和L95

[0095] 8) H65, L92和L94

[0096] 9) H65, L92和L95

[0097] 10) H65, L94和L95

[0098] 11) H65, L92, L94和L95

[0099] 12) H99和L92

[0100] 13) H99和L94

[0101] 14) H99和L95

[0102] 15) H99, L92和L94

[0103] 16) H99, L92和L95

[0104] 17) H99, L94和L95

[0105] 18) H99, L92, L94和L95

[0106] 19) H65和H99

[0107] 20) H65, H99和L92

[0108] 21) H65, H99和L94

[0109] 22) H65, H99和L95

[0110] 23) H65, H99, L92和L94

[0111] 24) H65, H99, L92和L95

[0112] 25) H65, H99, L94和L95

[0113] 26) H65, H99, L92, L94和L95, 或

[0114] 27) H27, H99和L95。

[0115] 在一些实施方案中, 本发明的分离的抗-C1s抗体在中性pH条件下与选自以下组成的组的抗体竞争结合C1s:

[0116] (a) 抗体, 其包含SEQ ID NO:23的HVR-H1序列, SEQ ID NO:24的HVR-H2序列, SEQ ID NO:25的HVR-H3序列, SEQ ID NO:26的HVR-L1序列, SEQ ID NO:27的HVR-L2序列, 和SEQ ID NO:28的HVR-L3序列,

[0117] (b) 抗体, 其包含SEQ ID NO:29的HVR-H1序列, SEQ ID NO:30的HVR-H2序列, SEQ ID NO:31的HVR-H3序列, SEQ ID NO:32的HVR-L1序列, SEQ ID NO:33的HVR-L2序列, 和SEQ ID NO:34的HVR-L3序列,

[0118] (c) 人单克隆抗-C1s抗体M241或人单克隆抗-C1s抗体M81,

[0119] (d) 抗体, 其包含SEQ ID NO:56的HVR-H1序列, SEQ ID NO:57的HVR-H2序列, SEQ ID NO:58的HVR-H3序列, SEQ ID NO:71的HVR-L1序列, SEQ ID NO:72的HVR-L2序列, 和SEQ ID NO:73的HVR-L3序列,

[0120] (e) 抗体, 其包含SEQ ID NO:59的HVR-H1序列, SEQ ID NO:60的HVR-H2序列, SEQ ID NO:61的HVR-H3序列, SEQ ID NO:74的HVR-L1序列, SEQ ID NO:75的HVR-L2序列, 和SEQ ID NO:76的HVR-L3序列,

[0121] (f) 抗体, 其包含SEQ ID NO:62的HVR-H1序列, SEQ ID NO:63的HVR-H2序列, SEQ ID NO:64的HVR-H3序列, SEQ ID NO:77的HVR-L1序列, SEQ ID NO:78的HVR-L2序列, 和SEQ ID NO:79的HVR-L3序列,

[0122] (g) 抗体, 其包含SEQ ID NO:65的HVR-H1序列, SEQ ID NO:66的HVR-H2序列, SEQ ID NO:67的HVR-H3序列, SEQ ID NO:80的HVR-L1序列, SEQ ID NO:81的HVR-L2序列, 和SEQ ID NO:82的HVR-L3序列, 和

[0123] (h) 抗体, 其包含SEQ ID NO:68的HVR-H1序列, SEQ ID NO:69的HVR-H2序列, SEQ ID NO:70的HVR-H3序列, SEQ ID NO:83的HVR-L1序列, SEQ ID NO:84的HVR-L2序列, 和SEQ ID NO:85的HVR-L3序列。

[0124] 其中所述抗体在中性pH比在酸性pH以更高的亲和力结合C1s, 如以下(i)或(ii)中所述:

[0125] (i) 当在中性和酸性pH均在高钙浓度测量时, 酸性pH C1s结合活性的KD值与中性pH C1s结合活性的KD值的比值($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)为2或更大,

[0126] (ii) 当在中性和酸性pH均在高钙浓度测量时, 酸性pH C1s结合活性的koff值与中性pH C1s结合活性的koff值的比值($koff(\text{酸性pH})/koff(\text{中性pH})$)为2或更大。

[0127] 在一些实施方案中, 本发明的分离的抗-C1s抗体与选自以下组成的组的抗体竞争结合C1s:

[0128] (a) 抗体, 其包含SEQ ID NO:56的HVR-H1序列, SEQ ID NO:57的HVR-H2序列, SEQ ID NO:58的HVR-H3序列, SEQ ID NO:71的HVR-L1序列, SEQ ID NO:72的HVR-L2序列, 和SEQ ID NO:73的HVR-L3序列,

[0129] (b) 抗体,其包含SEQ ID NO:59的HVR-H1序列,SEQ ID NO:60的HVR-H2序列,SEQ ID NO:61的HVR-H3序列,SEQ ID NO:74的HVR-L1序列,SEQ ID NO:75的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:76的HVR-L3序列,

[0130] (c) 抗体,其包含SEQ ID NO:62的HVR-H1序列,SEQ ID NO:63的HVR-H2序列,SEQ ID NO:64的HVR-H3序列,SEQ ID NO:77的HVR-L1序列,SEQ ID NO:78的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:79的HVR-L3序列,

[0131] (d) 抗体,其包含SEQ ID NO:65的HVR-H1序列,SEQ ID NO:66的HVR-H2序列,SEQ ID NO:67的HVR-H3序列,SEQ ID NO:80的HVR-L1序列,SEQ ID NO:81的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:82的HVR-L3序列,和

[0132] (e) 抗体,其包含SEQ ID NO:68的HVR-H1序列,SEQ ID NO:69的HVR-H2序列,SEQ ID NO:70的HVR-H3序列,SEQ ID NO:83的HVR-L1序列,SEQ ID NO:84的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:85的HVR-L3序列。

[0133] 在一些实施方案中,本公开提供了分离的抗-C1s抗体,所述抗体特异性结合在涵盖补体成分Is(C1s)的结构域IV和V的区域内的表位。在某些情况下,抗体抑制C1s与补体组分4(C4)的结合。在某些情况下,由本发明的分离的抗-C1s抗体结合的表位是构象表位。在一些实施方案中,C1s的上述表位是人C1s的表位。

[0134] 在一些实施方案中,本发明的抗-C1s抗体包含SEQ ID NO:35,或36的VH序列和/或SEQ ID NO:37,或38的VL序列,其中在一个或更多个以下Kabat编号系统位置上至少一个氨基酸被组氨酸取代;

[0135] 重链:H51,H65和H99;和

[0136] 轻链:L92,L94,L95和L96。

[0137] 在一些实施方案中,本发明的抗-C1s抗体包含至少一个在可变区的氨基酸被选自由D,E,K,R和Q组成的组的氨基酸取代,使得抗体在酸性pH的非特异性结合活性将降低。

[0138] 在一些实施方案中,本发明的抗-C1s抗体包含至少一个在可变区的氨基酸被选自由D,E,K,R和Q组成的组的氨基酸取代,使得酸性pH下C1s结合活性的KD值与中性pH下C1s结合活性的KD值的比值(KD(酸性pH)/KD(中性pH))将增加。

[0139] 在一些实施方案中,本发明的分离的抗-C1s抗体包含:(a)包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-H1,(b)包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H2,和(c)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的HVR-H3,其中所述抗体包含人衍生的或灵长类动物衍生的框架区。在一些实施方案中,本发明的分离的抗-C1s抗体包含:(a)包含SEQ ID NO:42或45的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的HVR-L2,和(c)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-L3,其中所述抗体包含人衍生的或灵长类动物衍生的框架区。

[0140] 在一些实施方案中,本发明的抗-C1s抗体包含:(a)与SEQ ID NO:19,17或22的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的VH序列;(b)与SEQ ID NO:20,18或21的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的VL序列;或(c)(a)的VH序列和(b)的VL序列。在一些实施方案中,本发明的抗-C1s抗体包含SEQ ID NO:19,17或22的VH序列。在一些实施方案中,本发明的抗-C1s抗体包含SEQ ID NO:20,18或21的VL序列。在另外的实施方案中,本发明的抗-C1s抗体包含SEQ ID NO:19,17或22的VH序列和SEQ ID NO:20,18或21的VL序列。在另外的实施方案中,本发明的抗-C1s抗体包含SEQ ID NO:19的VH序列和SEQ ID NO:20的VL序列。在另外

的实施方案中,本发明的抗-C1s抗体包含SEQ ID NO:19的VH序列和SEQ ID NO:21的VL序列。在另外的实施方案中,本发明的抗-C1s抗体包含SEQ ID NO:22的VH序列和SEQ ID NO:21的VL序列。

[0141] 在一些实施方案中,本发明的分离的抗-C1s抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,本发明的分离的抗C1s抗体是人抗体,人源化或嵌合抗体。在另外的实施方案中,本发明的分离的抗-C1s抗体是全长IgG1,IgG2,IgG3或IgG4抗体。在另外的实施方案中,本发明的分离的抗-C1s抗体是与C1s结合的抗体片段。在一些具体的实施方案中,本发明的分离的抗-C1s抗体是人IgG1或人源化IgG1。

[0142] 本发明还提供了编码本发明抗-C1s抗体的分离的核酸。本发明还提供了包含本发明的核酸的宿主细胞。本发明还提供了产生抗体的方法,所述方法包括培养本发明的宿主细胞以产生抗体。

[0143] 本发明还提供了包含本发明的抗体和药学上可接受的载体的药物制剂。

[0144] 本发明的抗-C1s抗体可以用作药物。本发明的抗-C1s抗体可用于治疗补体介导的疾病或病症。本发明的抗-C1s抗体可以用于增强C1s从血浆中的清除(或去除)。本发明的抗-C1s抗体可用于增强C1q,C1r和C1s复合物从血浆中的清除(或去除)。在一些实施方案中,本发明的抗-C1s抗体可以用于抑制补体组分C4的切割,其中该抗体不抑制补体组分C2的切割。在某些情况下,该抗体抑制经典补体途径的组分;在某些情况下,该经典补体途径成分是C1s。

[0145] 本发明的抗-C1s抗体可用于制备药物。在一些实施方案中,该药物用于治疗补体介导的疾病或病症。在一些实施方案中,该药物用于增强C1s从血浆中的清除(或去除)。在一些实施方案中,该药物用于增强C1q,C1r和C1s复合物从血浆中的清除(或去除)。该药物用于抑制补体组分C4的切割,其中该抗体不抑制补体组分C2的切割。在某些情况下,该药物抑制经典补体途径的组分;在某些情况下,该经典补体途径组分是C1s。

[0146] 本发明还提供治疗患有补体介导的疾病或病症的个体的方法。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。本发明还提供了增强个体中C1s从血浆中的清除(或去除)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,以增强C1s从血浆中的清除(或去除)。本发明还提供了增强个体中C1q,C1r和C1s复合物从血浆中的清除(或去除)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,以增强C1q,C1r和C1s复合物从血浆中的清除(或去除)。本发明还提供了抑制补体组分C4的切割的方法,其中该抗体不抑制补体组分C2的切割。在某些情况下,该抗体抑制经典补体途径的组分;在某些情况下,该经典补体途径成分是C1s。

[0147] 更具体地,本发明提供以下内容:

[0148] [1]分离的结合C1s的抗体,其中所述抗体在中性pH比在酸性pH以更高的亲和力结合C1s,如以下(i)或(ii)中所述:

[0149] (i)当在中性和酸性pH均在高钙浓度测量时,酸性pH下C1s结合活性的KD值与中性pH下C1s结合活性的KD值的比值($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)为2或更大,

[0150] (ii)当在中性和酸性pH均在高钙浓度测量时,酸性pH下C1s结合活性的koff值与中性pH下C1s结合活性的koff值的比值($koff(\text{酸性pH})/koff(\text{中性pH})$)为2或更大。

[0151] [2][1]所述的抗体,其中所述抗体包含组氨酸残基,所述组氨酸残基在一个或更多个以下Kabat编号系统位置上:

[0152] 重链:H51,H65,和H99;和

[0153] 轻链:L92,L94,L95和L96。

[0154] [3][1]或[2]所述的抗体,其中在一个或更多个以下Kabat编号系统位置上,至少一个氨基酸被组氨酸取代:

[0155] 重链:H51,H65,和H99;和

[0156] 轻链:L92,L94,L95和L96。

[0157] [4][1]至[3]中任一项所述的抗体,其中所述抗体在中性pH条件下与选自由以下组成的组的抗体竞争结合C1s:

[0158] (a) 抗体,其包含SEQ ID NO:23的HVR-H1序列,SEQ ID NO:24的HVR-H2序列,SEQ ID NO:25的HVR-H3序列,SEQ ID NO:26的HVR-L1序列,SEQ ID NO:27的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:28的HVR-L3序列,

[0159] (b) 抗体,其包含SEQ ID NO:29的HVR-H1序列,SEQ ID NO:30的HVR-H2序列,SEQ ID NO:31的HVR-H3序列,SEQ ID NO:32的HVR-L1序列,SEQ ID NO:33的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:34的HVR-L3序列,

[0160] (c) 人单克隆抗-C1s抗体M241,

[0161] (d) 抗体,其包含SEQ ID NO:56的HVR-H1序列,SEQ ID NO:57的HVR-H2序列,SEQ ID NO:58的HVR-H3序列,SEQ ID NO:71的HVR-L1序列,SEQ ID NO:72的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:73的HVR-L3序列,

[0162] (e) 抗体,其包含SEQ ID NO:59的HVR-H1序列,SEQ ID NO:60的HVR-H2序列,SEQ ID NO:61的HVR-H3序列,SEQ ID NO:74的HVR-L1序列,SEQ ID NO:75的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:76的HVR-L3序列,

[0163] (f) 抗体,其包含SEQ ID NO:62的HVR-H1序列,SEQ ID NO:63的HVR-H2序列,SEQ ID NO:64的HVR-H3序列,SEQ ID NO:77的HVR-L1序列,SEQ ID NO:78的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:79的HVR-L3序列,

[0164] (g) 抗体,其包含SEQ ID NO:65的HVR-H1序列,SEQ ID NO:66的HVR-H2序列,SEQ ID NO:67的HVR-H3序列,SEQ ID NO:80的HVR-L1序列,SEQ ID NO:81的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:82的HVR-L3序列,和

[0165] (h) 抗体,其包含SEQ ID NO:68的HVR-H1序列,SEQ ID NO:69的HVR-H2序列,SEQ ID NO:70的HVR-H3序列,SEQ ID NO:83的HVR-L1序列,SEQ ID NO:84的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:85的HVR-L3序列。

[0166] [5][1]至[4]中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:35或36的VH序列和/或SEQ ID NO:37或38的VL序列,其中在一个或更多个以下Kabat编号系统位置上,在可变区至少一个氨基酸被组氨酸取代:

[0167] 重链:H51,H65,和H99;和

[0168] 轻链:L92,L94,L95,和L96。

[0169] [6][1]至[5]中任一项所述的抗体,其中另外在所述可变区的至少一个氨基酸被选自由D,E,K,R和Q组成的组的氨基酸取代,使得

[0170] 抗体在酸性pH的非特异性结合活性将降低,或

[0171] 酸性pH下C1s结合活性的KD值与中性pH下C1s结合活性的KD值的比值(KD(酸性pH)/KD(中性pH))将增加。

[0172] [7]分离的结合C1s的抗体,其中所述抗体包含:(a)包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-H1,(b)包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H2,和(c)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的HVR-H3,其中所述抗体包含人衍生的或灵长类动物衍生的框架区。

[0173] [8]分离的结合C1s的抗体,其中所述抗体包含:(a)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的HVR-L2,和(c)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-L3,其中所述抗体包含人衍生的或灵长类动物衍生的框架区。

[0174] [9][1]至[8]中任一项所述的抗体,其包含:(a)与SEQ ID NO:19,17或22的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的VH序列;(b)与SEQ ID NO:20,18或21的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的VL序列;或(c)(a)的VH序列和(b)的VL序列。

[0175] [10][9]所述的抗体,其包含SEQ ID NO:19,17或22的VH序列。

[0176] [11][9]所述的抗体,其包含SEQ ID NO:20,18或21的VL序列。

[0177] [12]包含SEQ ID NO:19的VH序列和SEQ ID NO:20的VL序列的抗体。

[0178] [13]药物制剂,其包含[1]至[12]中任一项所述的抗体和药学上可接受的载体。

[0179] [14]治疗患有补体介导的疾病或病症的个体的方法,包括向所述个体施用有效量的[1]至[12]中任一项的所述抗体。

[0180] 此外,本发明提供以下内容:

[0181] [15]从血浆中去除C1s的方法,所述方法包括:

[0182] (a) 鉴定需要从个体血浆中去除C1s的个体;

[0183] (b) 提供通过抗体的C1s结合结构域与C1s结合并具有KD(pH5.8)/KD(pH7.4)值的抗体,该值定义为当使用表面等离子共振技术确定KD时,在pH 5.8时对C1s的KD与在pH 7.4时对C1s的KD的比值为2至10,000,其中所述抗体在体内血浆中与C1s结合,并在存在于体内内体中的条件下从结合的C1s上解离,且其中所述抗体是人IgG或人源化IgG;和

[0184] (c) 向个体施用所述抗体。

[0185] [16]从受试者的血浆中去除C1s的方法,该方法包括:

[0186] (a) 鉴定通过第一抗体的C1s结合结构域与C1s结合的第一抗体;

[0187] (b) 鉴定如下的第二抗体:

[0188] (1) 通过第二抗体的C1s结合结构域与C1s结合,

[0189] (2) 除了所述第一抗体的可变区的至少一个氨基酸被组氨酸取代和/或至少一个组氨酸插入所述第一抗体的可变区之外,氨基酸序列与所述第一抗体相同,

[0190] (3) 具有的KD(pH5.8)/KD(pH7.4)值高于所述第一抗体的KD(pH5.8)/KD(pH7.4)值,且在2至10,000之间,其中KD(pH5.8)/KD(pH7.4)定义为当使用表面等离子共振技术确定KD时,在pH 5.8时对C1s的KD与在pH 7.4时对C1s的KD的比值,

[0191] (4) 在体内的血浆中与C1s结合,

[0192] (5) 在存在于体内内体中的条件下从结合的C1s上解离,和

[0193] (6) 是人IgG或人源化IgG;

[0194] (c) 鉴定需要降低他的或她的C1s血浆水平的受试者;和

- [0195] (d) 向受试者施用所述第二抗体,以降低受试者中C1s的血浆水平。
- [0196] [17]从受试者的血浆中去除C1s的方法,该方法包括:
- [0197] (a) 鉴定如下的第一抗体:
- [0198] (1) 通过第一抗体的C1s结合结构域与C1s结合,
- [0199] (2) 与通过第二抗体的抗原结合结构域与C1s结合的第二抗体的氨基酸序列相同,除了第一抗体的至少一个可变区比第二抗体的相应的可变区具有至少多一个组氨酸残基,
- [0200] (3) 具有的KD (pH5.8) /KD (pH7.4) 值高于所述第二抗体的KD (pH5.8) /KD (pH7.4) 值,且在2至10,000之间,其中KD (pH5.8) /KD (pH7.4) 定义为当使用表面等离子共振技术确定KD时,在pH 5.8时对C1s的KD与在pH 7.4时对C1s的KD的比值,
- [0201] (4) 在体内的血浆中与C1s结合,
- [0202] (5) 在存在于体内内体中的条件下从结合的C1s上解离,和
- [0203] (6) 是人IgG或人源化IgG;
- [0204] (b) 鉴定需要降低他的或她的C1s血浆水平的受试者;和
- [0205] (c) 向受试者施用至少一次所述第一抗体,以降低受试者中C1s的血浆水平。
- [0206] [18][15]至[17]中任一项的方法,其中所述KD使用表面等离子共振技术测定,其中所述抗体被固定,所述抗原用作分析物,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 (polyoxyethylenesorbitan) 单月桂酸酯和150mM NaCl,37摄氏度(°C)。
- [0207] [19]分离的抗体,其与由C1q,C1r和C1s组成的C1复合物结合,其中所述抗体在中性pH比在酸性pH以更高的亲和力与所述C1复合物结合,如以下(i)或(ii)所述:
- [0208] (i) 当在中性和酸性pH均在高钙浓度测量时,酸性pH下C1复合物结合活性的KD值与中性pH下C1复合物结合活性的KD值的比值(KD(酸性pH)/KD(中性pH))为2,3,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,100,200,400,1000,10000,或更大,
- [0209] (ii) 当在中性pH在高钙浓度和在酸性pH在低钙浓度下测量时,酸性pH下C1复合物结合活性的KD值与中性pH下C1复合物结合活性的KD值的比值(KD(酸性pH)/KD(中性pH))为2,3,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,100,200,400,1000,10000,或更大。
- [0210] [20]分离的结合C1s的抗体,其中所述抗体在中性pH比在酸性pH以更高的亲和力结合C1s,其中在酸性pH其C1s结合活性的KD值与中性pH C1s结合活性的KD值的比值(KD(酸性pH)/KD(中性pH))为2,3,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,100,200,400,1000,10000,或更大,当在中性和酸性pH均在低钙浓度测量时,其中所述抗-C1s抗体与C1s的二聚状态结合。
- [0211] 附图简述
- [0212] [图1]
- [0213] 图1说明了表10中列出的所有抗体(不包括抗体PN92H0286/IPN93L0205-SG136)的清除指数改善(Sweeping Index Improvement)与KD(5.8+)/KD(7.4+)的比值之间的相关性。
- [0214] [图2]

[0215] 图2说明了表10中列出的所有抗体(不包括抗体PN92H0286/IPN93L0205-SG136)的清除指数改善与koff (775+的5.8+)/koff (7.4+)的比值之间的相关性。

具体实施方案

[0216] 本文中描述或引用的技术和方法是本领域技术人员使用常规方法学通常很好理解并且常规使用的,如,例如,以下中所述的广泛使用的方法Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual第3版(2001)Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,N.Y.;Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等, eds., (2003));系列Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.):PCR 2:A Practical Approach(M.J.MacPherson,B.D.Hames和G.R.Taylor eds. (1995)),Harlow和Lane,eds. (1988)Antibodies,A Laboratory Manual,and Animal Cell Culture(R.I.Freshney,ed. (1987));Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait,ed.,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis,ed.,1998) Academic Press;Animal Cell Culture(R.I.Freshney),ed.,1987);Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998)Plenum Press;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(A.Doyle,J.B.Griffiths,和D.G.Newell,eds., 1993-8)J.Wiley&Sons;Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和 C.C.Blackwell,eds.);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和 M.P.Calos,eds.,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等,eds.,1994); Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等,eds.,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley和Sons,1999);Immunobiology(C.A.Janeway和P.Travers, 1997);Antibodies(P.Finch,1997);Antibodies:A Practical Approach(D.Catty.,ed., IRL Press,1988-1989);Monoclonal Antibodies:A Practical Approach(P.Shepherd和 C.Dean,eds.,Oxford University Press,2000);Using Antibodies:A Laboratory Manual(E.Harlow和D.Lane Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies(M.Zanetti和J.D.Capra,eds.,Harwood Academic Publishers,1995);以及 Cancer:Principles and Practice of Oncology(V.T.DeVita等,eds.,J.B.Lippincott Company,1993)。

[0217] I. 定义

[0218] 除非另外限定,本文中使用的技术和科学术语具有与本发明所属技术领域普通技术人员的通常理解相同的含义.Singleton等,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed.,J.Wiley&Sons(New York,N.Y.1994)以及March,Advanced Organic Chemistry Reactions,Mechanisms and Structure 4th ed.,John Wiley&Sons (New York,N.Y.1992)给本领域技术人员提供了对本申请中所用众多术语的一般指导。本文中引用的所有文献(包括专利申请和出版物)通过引用完整地结合。

[0219] 为了解释本申请,以下定义将适用并且当合适时,单数使用的术语也将包括复数并且反之亦然。要理解的是,本文中使用的技术仅是为了描述特别的实施方案,并且不意在是限制性的。如果以下给出的任何定义与通过引用结合在本文中的任何文献有冲突,以以下给出的定义为准。

[0220] 用于本文中的目的的“受体人框架”是包含来源于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,如以下所限定。“来源于”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,或其可以含有氨基酸序列变化。在一些实施方案中,氨基酸变化的数目是10或更少,9或更少,8或更少,7或更少,6或更少,5或更少,4或更少,3或更少,或2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。

[0221] “亲和力”是指分子(例如,抗体)的单个结合位点及其结合配偶体(例如,抗原)之间非共价相互作用的强度总和。除非另外指出,如本文中使用的,“结合亲和力”是指固有结合亲和力,其反映结合对的成员(例如,抗体和抗原)之间的1:1相互作用。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以由解离常数(Kd或KD)表示。亲和力可以通过本领域中已知的常规方法测量,包括本文中所述的那些。用于测量结合亲和力的具体说明性和示例性实施方案描述如下。术语“结合活性”是指分子(例如,抗体)的单个或更多个结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间非共价相互作用的强度总和。在本文中,结合活性不严格限于反映结合对的成员(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结合彼此时,结合活性就是这些结合的强度总和。分子X对其配偶体Y的结合活性通常可以由解离常数(KD)表示。或者,可以将缔合和解离速率(Kon和Koff)用于结合的评估。结合活性可以通过本领域已知的常规方法来测量,包括本文所述的那些。以下描述用于测量结合亲和力的具体的说明性和示例性实施方案。

[0222] “亲和力成熟的”抗体是指在一个或多个高变区(HVR)中具有一个或多个改变(相比于不具有此种改变的亲本抗体)的抗体,此种改变导致抗体对抗原的亲和力提高。

[0223] 术语“抗-C1s抗体”和“结合C1s的抗体”是指这样的抗体,所述抗体能够以足够的亲和力结合C1s使得所述抗体可用于作用于靶向C1s的诊断剂和/或治疗剂。在一个实施方案中,抗-C1s抗体与不相关的、非C1s蛋白的结合程度小于所述抗体与C1s结合的约10%,例如通过放射性免疫测定(RIA)所测量的。在某些实施方案中,结合C1s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抗体结合C1s的表位,所述表位在来源于不同物种的C1s之间是保守的。

[0224] 术语“抗体”在本文中以最广义使用并且涵盖各种抗体结构,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,只要其显示所需的抗原结合活性即可。

[0225] “抗体片段”是指不同于完整抗体的分子,其包含与完整的抗体结合的抗原结合的完整抗体的一部分。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。

[0226] 作为参照抗体的“与相同表位结合的抗体”指在竞争测定中阻断参照抗体与其抗原结合达50%或更多的抗体,而相反,参照抗体在竞争测定中阻断抗体与其抗原的结合达50%或更多。示例性竞争测定提供在本文中。

[0227] 术语“嵌合”抗体是指这样的抗体,其中重链和/或轻链的一部分源自特定来源或物种,而重链和/或轻链的剩余部分源自不同的来源或物种。

[0228] 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。有五种主要类别

的抗体: IgA, IgD, IgE, IgG, 和IgM, 并且这些中的一些可以被进一步划分成亚类(同种型), 例如, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, 和IgA₂。对应于不同的类型的免疫球蛋白的重链恒定结构域被分别称为 α , δ , ϵ , γ , 和 μ 。

[0229] 如本文中使用的, 术语“细胞毒性剂”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。细胞毒性剂包括但不限于放射性同位素(例如, ²¹¹At, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P, ²¹²Pb和Lu的放射性同位素); 化疗剂或药物(例如, 甲氨蝶呤, 阿霉素, 长春花生物碱(长春新碱, 长春碱(vinblastine), 依托泊甙(etoposide)), 多柔比星(doxorubicin), 美法仑(melphalan), 丝裂霉素C, 苯丁酸氮芥(chlorambucil), 柔红霉素(daunorubicin)或其他嵌入剂); 生长抑制剂; 酶及其片段诸如溶核酶; 抗生素; 毒素如小分子毒素或细菌, 真菌, 植物或动物来源的酶学活性毒素, 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。

[0230] “效应子功能”是指可归因于抗体Fc区的那些生物学活性, 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性细胞毒性(ADCC); 吞噬作用; 细胞表面受体(例如, B细胞受体)的下调; 以及B细胞活化。

[0231] 试剂(例如, 药物制剂)的“有效量”是指实现所需的治疗或预防结果所必要的剂量和时间的有效量。

[0232] 术语“表位”包括任何能够被抗体结合的决定簇。表位是抗原的被靶向所述抗原的抗体结合的区域, 并且包括与抗体直接接触的特定氨基酸。表位决定簇可以包括分子(诸如氨基酸, 糖侧链, 磷酸基或磺酰基)的化学活性表面簇集, 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, 对于特别的靶抗原具有特异性的抗体将优先识别蛋白和/或大分子的复合物混合物中的靶抗原上的表位。

[0233] 在本文中, 术语“Fc区”被用于限定含有恒定区的至少一部分的免疫球蛋白重链的C-端区域。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延伸至重链的羧基端。然而, Fc区的C-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。除非本文中另外指出, Fc区或恒定区中的氨基酸残基编号是根据EU编号系统, 其也被称为EU指数, 如Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991中所描述的。

[0234] “框架”或“FR”是指不同于高变区(HVR)残基的可变结构域残基。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, 在VH(或VL)中HVR和FR序列通常以以下顺序出现: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0235] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用, 是指这样的抗体, 所述抗体具有与天然抗体结构基本类似的结构或具有含有如本文中所限定的Fc区的重链。

[0236] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用, 是指被引入外源核酸的细胞, 包括此种细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”, 其包括原代转化的细胞及来源于其的后代(不考虑传代次数)。后代的核酸内容可以与亲本细胞不完全相同, 但可以含有突变。本文中包括具有与对于原始转化的细胞中筛选或选择的相同的功能或生物学活性的突变体后代。

[0237] “人抗体”是这样的抗体,其具有的氨基酸序列对应于由人或人细胞产生的抗体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。人抗体的该定义明确排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0238] “人共有框架”是这样的框架,其代表人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常见的氨基酸残基。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,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,NIH出版91-3242,Bethesda MD(1991),卷1-3中的亚组。在一个实施方案中,对于VL,所述亚组是如以上Kabat等中的亚组κI。在一个实施方案中,对于VH,所述亚组是如以上Kabat等中的亚组III。

[0239] “人源化”抗体是指一种嵌合抗体,其包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基。在某些实施方案中,人源化抗体将包含基本上全部的至少一个(并且典型地,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,并且所有或基本上所有的FR对应于人抗体的FR。人源化抗体任选地可以包含来源于人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体的“人源化形式”,例如,非人抗体,是指已经进行人源化的抗体。

[0240] 如本文中使用的术语“高变区”或“HVR”是指抗体可变结构域中序列高变(“互补决定区”或“CDR”)和/或形成结构确定的环(“高变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的各区域。通常,抗体包含六个HVR:VH中的三个(H1,H2,H3)和VL中的三个(L1,L2,L3)。本文中示例性HVR包括:

[0241] (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)处的高变环(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987));

[0242] (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)处的CDR(Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991));

[0243] (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)处的抗原接触点(MacCallum等,J.Mol.Biol.262:732-745(1996));以及

[0244] (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)。

[0245] 除非另外指出,在本文中,HVR残基和可变结构域中的其他残基(例如,FR残基)根据以上Kabat等编号。

[0246] “免疫缀合物”是与一个或多个包括但不限于细胞毒性剂的异源分子缀合的抗体。

[0247] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于家养动物(例如,牛,绵羊,猫,狗和马),灵长类动物(例如,人和非人灵长类动物如猴子),兔,和啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠)。在某些实施方案中,个体或受试者是人。

[0248] “分离的”抗体是已经与其天然环境的组分分离的抗体。在一些实施方案中,抗体被纯化至大于95%或99%的纯度,如由例如电泳(例如,SDS-PAGE,等电聚焦(IEF),毛细管电泳)或层析(例如,离子交换或反相HPLC)确定的。对于用于评估抗体纯度的方法的综述,

参见,例如,Flatman等,J.Chromatogr.B 848:79-87(2007)。

[0249] “分离的”核酸是指已经与其天然环境的组分分离的核酸分子。分离的核酸包括这样的核酸分子,所述核酸分子被包含在通常含有所述核酸分子的细胞中,但是所述核酸分子存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置的染色体位置处。

[0250] “编码抗-C1s抗体的分离的核酸”是指一个或多个编码抗体重链和轻链(或其片段)的核酸分子,包括在单个载体或在分开的载体中的此种核酸分子,以及存在于宿主细胞中的一个或多个位置处的此种核酸分子。

[0251] 如本文使用的术语“单克隆抗体”是指获自基本上同源的抗体的群体的抗体,即,包括所述群体的个体抗体是相同的和/或结合相同的表位,除可能的变体抗体以外,例如,含天然存在的突变或在单克隆抗体制剂的制备过程中产生,此种变体通常少量存在。对比于多克隆抗体制剂(通常包括针对不同的决定簇(表位)的不同抗体),单克隆抗体制剂中的各个单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。因此,定语“单克隆”指示抗体的性质为获自基本上同源的抗体群体,并且不视为要求通过任何特定的方法制备所述抗体。例如,根据本发明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法,噬菌体展示法,以及利用含有所有或部分的人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,本文中描述了这样的方法以及其他用于制备单克隆抗体的示例性方法。

[0252] “裸抗体”是指不与异源部分(例如,细胞毒性部分)或放射性标记缀合的抗体。裸抗体可以存在于药物制剂中。

[0253] “天然抗体”是指天然存在的具有多种结构的免疫球蛋白分子。例如,天然IgG抗体是约150,000道尔顿的异源四聚糖蛋白,由二硫键键合的两个相同的轻链和两个相同的重链组成。从N端到C端,各重链具有可变区(VH),其也被称为可变重链结构域或重链可变结构域,之后是三个恒定结构域(CH1,CH2和CH3)。类似地,从N端到C端,各轻链具有可变区(VL),其也被称为可变轻链结构域或轻链可变结构域,之后是轻链恒定(CL)结构域。抗体的轻链基于其恒定结构域的氨基酸序列可以被分配至两种类型之一,被称为 κ 和 λ 。

[0254] 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使用说明,其含有关于此种治疗产品的适应症,用途,剂量,施用,组合疗法,禁忌症和/或使用警告。

[0255] 相对于参照多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”被定义为在对序列进行比对并且在必要时引入空隙(gap)以实现最大百分比序列同一性,而不将任何保守取代认为是序列同一性的一部分后,候选序列中与参照多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。为了确定百分比氨基酸序列同一性的比对可以在本领域中的技术内的多种方式实现,例如,使用公众可获得的计算机软件如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,包括在比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0256] ALIGN-2序列比较计算机程序的作者是Genentech,Inc.,并且源代码已经与用户文件一起被提交于美国版权局,Washington D.C.,20559,其以美国版权登记号TXU510087被登记。ALIGN-2程序可从Genentech,Inc.,South San Francisco,California公开获得,或者所述程序可自源代码编译。ALIGN-2程序应当被编译为用于UNIX操作系统,包括数字UNIX V4.0D。所有序列比较参数由ALIGN-2程序设定并且不需要改变。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与或相对给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同

一性(其可以备选地表述为给定氨基酸序列A与或相对给定氨基酸序列B具有或包含特定%氨基酸序列同一性)计算如下:100乘以分数X/Y;其中X是在A和B的程序比对中由序列比对程序ALIGN-2评分为相同匹配的氨基酸残基的数目,并且Y是B中氨基酸残基的总数。要理解的是,当氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时,A对B的%氨基酸序列同一性将不等于B对A的%氨基酸序列同一性。除非另外明确指出,本文中使用的所有%氨基酸序列同一性值都是如前述段落中所述使用ALIGN-2计算机程序获得的。

[0257] 术语“药物制剂”是指这样的制剂,其具有的形式允许包含在其中的活性成分的生物活性是有效的,并且其不含对将被施用所述制剂的受试者具有不可接受的毒性的其他组分。

[0258] “药学上可接受的载体”是指药物制剂中除活性成分以外的成分,其对受试者是无毒性的。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂,赋形剂,稳定剂或防腐剂。

[0259] 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的任何天然C1s,包括哺乳动物,诸如灵长类动物(例如,人)和啮齿动物(诸如,小鼠和大鼠)。该术语涵盖“全长”的未加工的C1s以及源自细胞中的加工的任何形式的C1s。该术语还涵盖C1s的天然存在的变体,例如剪接变体或等位变体。示例性人C1s的氨基酸序列示于SEQ ID NO:1。示例性食蟹猴和大鼠C1s的氨基酸序列分别示于SEQ ID No:3和2。

[0260] 如本文中使用的,“治疗(treatment)”(及其语法上的变体如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)是指尝试改变受治疗的个体的自然病程的临床干预,并且可以为了预防或在临床病理的病程期间进行。治疗的理想效果包括但不限于防止疾病发生或复发,减轻症状,消除疾病的任何直接或间接的病理结果,防止转移,降低疾病进展的速率,改善或减轻疾病状态,以及消除或改善预后。在一些实施方案中,本发明的抗体被用于延迟疾病的发展或用于减缓疾病的进展。

[0261] 术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体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可变结构域(分别为VH和VL)通常具有相似的结构,其中各结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个高变区(HVR)。(参见,例如,Kindt等,Kuby Immunology,6th ed.,W.H.Freeman&Co.,第91页(2007))。单个VH或VL结构域可足以给予抗原结合特异性。此外,结合特定抗原的抗体可以分别使用来自与所述抗原结合的抗体的VH或VL结构域筛选互补VL或VH结构域的文库来分离。参见,例如,Portolano等,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等,Nature352:624-628(1991)。

[0262] 如本文中使用的,术语“载体”是指能够使与其相连的另一个核酸增殖的核酸分子。该术语包括作为自我复制的核酸结构的载体以及整合到已引入宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作相连的核酸的表达。此种载体在本文中称为“表达载体”。

[0263] II. 组合物和方法

[0264] 在一个方面,本发明部分基于抗C1s及其用途。在某些实施方案中,提供结合C1s的抗体。本发明的抗体可用于例如诊断或治疗补体介导的疾病或病症。

[0265] A. 示例性的抗-C1s抗体

[0266] 在一方面,本发明提供了分离的结合C1s的抗体。在一方面,本发明提供了分离的结合C1s的抗体,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,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和钙浓度而变化。预期此种抗体作为药物特别优越,因为可以减少患者的施用剂量和频率,结果可以降低总剂量。

[0267] 在一方面,在本发明的分离的抗-C1s抗体中,当在中性和酸性pH均在高钙浓度测量时,酸性pH下其C1s结合活性的KD值与中性pH C1s结合活性的KD值的比值($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)为2或更大。在一方面,在本发明的分离的抗-C1s抗体中,当在中性和酸性pH均在高钙浓度测量时,酸性pH下其C1s结合活性的koff值与中性pH C1s结合活性的koff值的比值($koff(\text{酸性pH})/koff(\text{中性pH})$)为2或更大。在一方面,在本发明的分离的抗-C1s抗体中,当在中性pH在高钙浓度和在酸性pH在低钙浓度下测量时,酸性pH下其C1s结合活性的KD值与中性pH C1s结合活性的KD值的比值($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)为5或更大。在一些实施方案中,当在中性和酸性pH均在低钙浓度测量时,酸性pH下其C1s结合活性的KD值与中性pH下C1s结合活性的KD值的比值($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)为2或更大,其中抗-C1s抗体与C1s的二聚状态结合。在一些实施方案中,在本发明的分离的抗-C1s抗体中,当在中性和酸性pH均在低钙浓度测量时,酸性pH下其C1s结合活性的koff值与中性pH下C1s结合活性的koff值的比值($koff(\text{酸性pH})/koff(\text{中性pH})$)为2或更大,其中抗-C1s抗体与C1s的二聚状态结合。

[0268] 不受特定理论的束缚,在以下情况下:1)钙的不存在可在构象上改变本发明的抗体结合的C1s的表位结构,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的状态(单体状态或二聚体状态)而改变,通过使用特定条件(在中性pH在高钙浓度下和在酸性pH在低钙浓度下)的测量可用于评估KD值的比值($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)。

[0269] 换句话说,本发明的抗体在中性pH比在酸性pH以更高的亲和力与C1s结合,如以下(i)或(iii)中所述:

[0270] (i) 当在中性和酸性pH均在高钙浓度测量时,酸性pH下C1s结合活性的KD值与中性pH下C1s结合活性的KD值的比值($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)为2或更大,

[0271] (ii) 当在中性和酸性pH均在高钙浓度测量时,酸性pH下C1s结合活性的koff值与中性pH下C1s结合活性的koff值的比值($koff(\text{酸性pH})/koff(\text{中性pH})$)为2或更大。

[0272] (iii) 当在中性pH在高钙浓度和在酸性pH在低钙浓度下测量时,酸性pH下C1s结合活性的KD值与中性pH下C1s结合活性的KD值的比值($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)为5或更大。

[0273] 更一般而言,不受特定理论的束缚,在以下情况下:1)钙的不存在可通过构象改变本发明抗体结合的某些抗原的表位结构,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)可以根据抗原的状态(单体状态或二聚体状态)而改变,通过使用特定条件(在中性pH在高钙浓度下和在酸性pH在低钙浓度下)的测量可用于评估KD值的比值($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)。如果该比值高,则在酸性pH的亲和力低于在中性pH的亲和力。或者,如下所述,KD定义为 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 的比值。酸性和中性条件之间的 k_{off} 值的比值,即($koff(\text{酸性pH})/koff(\text{中性pH})$)也可以用于酸性和中性pH亲和力之间的比较。

[0274] 因此,本发明的抗体在中性pH比在酸性pH以更高的亲和力结合抗原,如下:当在中性pH在高钙浓度和在酸性pH在低钙浓度下测量时,酸性pH抗原结合活性的KD值与中性pH抗原结合活性的KD值的比值($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)为5或更大。

[0275] 在一方面,在本发明的分离的抗-C1s抗体中,当在中性和酸性pH均在高钙浓度测

量时,酸性pH下其C1s结合活性的KD值与中性pH下C1s结合活性的KD值的比值(KD(酸性pH)/KD(中性pH))为2或更大,其中所述抗体不包含CDR-H1(SEQ ID NO.23),CDR-H2(SEQ ID NO.24),CDR-H3(SEQ ID NO.25),CDR-L1(SEQ ID NO.26),CDR-L2(SEQ ID NO.27)和CDR-L3(SEQ ID NO.28)。

[0276] 在一方面,在本发明的分离的抗-C1s抗体中,当在中性pH在高钙浓度和在酸性pH在低钙浓度下测量时,酸性pH下其C1s结合活性的KD值与中性pH下C1s结合活性的KD值的比值(KD(酸性pH)/KD(中性pH))为5或更大,其中所述抗体不包含CDR-H1(SEQ ID NO.23),CDR-H2(SEQ ID NO.24),CDR-H3(SEQ ID NO.25),CDR-L1(SEQ ID NO.26),CDR-L2(SEQ ID NO.27)和CDR-L3(SEQ ID NO.28)。

[0277] 在一方面,在本发明的分离的抗-C1s抗体中,当在中性和酸性pH均在低钙浓度测量时,酸性pH下其C1s结合活性的KD值与中性pH下C1s结合活性的KD值的比值(KD(酸性pH)/KD(中性pH))为2或更大,其中抗-C1s抗体与C1s的二聚状态结合,其中所述抗体不包含CDR-H1(SEQ ID NO.23),CDR-H2(SEQ ID NO.24),CDR-H3(SEQ ID NO.25),CDR-L1(SEQ ID NO.26),CDR-L2(SEQ ID NO.27)和CDR-L3(SEQ ID NO.28)。

[0278] 可以在亲本抗体(即,本发明修饰之前的原始抗体)和相对于原始(亲本)抗体已引入一个或更多个氨基酸突变(例如,添加,插入,缺失或取代)的抗体之间比较上述KD比值,即(KD(酸性pH)/KD(中性pH))。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C1特异性结合即可。因此,在一方面,在本发明的分离的抗-C1s抗体中,酸性pH下C1s结合活性的KD值与中性pH下C1s结合活性的KD值的比值(KD(酸性pH)/KD(中性pH))比原始(亲本)抗体的酸性pH下C1s结合活性的KD值与中性pH下C1s结合活性的KD值的比值(KD(酸性pH)/KD(中性pH))高至少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。换句话说,本发明提供了分离的抗-C1s抗体,其中所述分离的抗-C1s抗体已被从亲本(原始)抗体中引入一个或多个氨基酸突变(例如,添加,插入,缺失或取代),且以下(i)与(ii)的比值至少为1.2,1.4,1.6,1.8,2,2.1,2.2,2.3,2.4,2.5,2.6,2.7,2.8,2.9,3,3.5,4,5,8,或10:(i)分离的抗-C1s抗体的酸性pH下C1s结合活性的KD值与中性pH下C1s结合活性的KD值的比值(KD(酸性pH)/KD(中性pH));(ii)亲本(原始)抗体的酸性pH下C1s结合活性的KD值与中性pH下C1s结合活性的KD值的比值(KD(酸性pH)/KD(中性pH))。这些KD比值可以在任何(高或低)钙浓度下测量,例如,在中性和酸性pH在高钙浓度测量,或在中性pH在高钙浓度和在酸性pH在低钙浓度测量。在另一方面,可以使用解离速率常数(kd)代替以上的KD来评估pH和/或Ca依赖性。

[0279] 在一方面,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”优选是指内体内部环境的特征性环境。而“细胞外条件”优选是指血浆中环境的特征性环境。具有抗原结合活性根据离子浓度而变化的性质的抗体可通过筛选大量具有这种性质的结构域的抗体来获得。例如,具有上述性质的抗体可以通过利用杂交瘤法或抗体文库法产生大量序列彼此不同的抗体,并在不同的离子浓度下测量其抗原结合活性来获得。B细胞克隆方法是筛选此种抗体的方法的实例之一。此外,如下所述,指定了至少一个可以赋予抗体具有根据离子浓度变化的抗原结合活性的特性的独特的氨基酸残基,以制备大量抗体的文库,所述抗

体具有不同的序列,同时共有独特的氨基酸残基作为共同结构。可以筛选此类文库以有效分离具有上述性质的抗体。

[0280] 在一方面,本发明提供了在中性pH比在酸性pH以更高亲和力结合C1s的抗体。在另一方面,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相比,在酸性pH结合降低”,并且两种表述可以互换。例如,“具有pH依赖性结合特征”的抗-C1s抗体包括在中性pH比在酸性pH以更高亲和力结合C1s的抗体。

[0281] 在某些实施方案中,当在中性和酸性pH均在高钙浓度测量时,酸性pH下C1s结合活性的KD值与中性pH下C1s结合活性的KD值的比值($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)为2或更大。在具体的实施方案中,本发明的抗体在中性pH比在酸性pH以至少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,或更多倍的更高亲和力与C1s结合。

[0282] 在某些实施方案中,当在中性和酸性pH均在高钙浓度测量时,酸性pH下C1s结合活性的koff值与中性pH下C1s结合活性的koff值的比值($koff(\text{酸性pH})/koff(\text{中性pH})$)为2或更大。在具体的实施方案中,本发明的抗体在中性pH比在酸性pH以至少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,或更多倍的更高亲和力与C1s结合。

[0283] 在某些实施方案中,当在中性pH在高钙浓度和在酸性pH在低钙浓度下测量时,酸性pH下C1s结合活性的KD值与中性pH下C1s结合活性的KD值的比值($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)为2或更大。在具体的实施方案中,本发明的抗体在中性pH比在酸性pH以至少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或更多倍的更高亲和力与C1s结合。

[0284] 在上述情况下,例如,酸性pH为5.8和中性pH为7.4,因此 $KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$ 为 $KD(\text{pH } 5.8)/KD(\text{pH } 7.4)$ 。关于这一点,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, $KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$ 诸如 $KD(\text{pH } 5.8)/KD(\text{pH } 7.4)$ 可以为2至10,000。在上述情况下,例如,酸性pH为5.8和中性pH为7.4,因此 $koff(\text{酸性pH})/koff(\text{中性pH})$ 为 $koff(\text{pH } 5.8)/koff(\text{pH } 7.4)$ 。关于这一点,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, $koff(\text{酸性pH})/koff(\text{中性pH})$ 诸如 $koff(\text{pH } 5.8)/koff(\text{pH } 7.4)$ 可以为2至10,000。

[0285] 当抗原是可溶性蛋白时,抗体与抗原的结合可导致抗原在血浆中延长的半衰期(即,来自血浆的抗原的清除率降低),因为抗体在血浆中可以具有比抗原本身更长的半衰期,并且可以作为抗原的载体。这是由于FcRn通过细胞中的内体途径对抗原-抗体复合物的再循环(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(在中性细胞外环境中与抗原结合,同时在进入细胞后将抗原释放到酸性内体区室中)相对于以pH依赖性方式结合的其对应物,预期在抗原中和和清除方面具有优异的特性(Igawa等(2010)Nature Biotechnol 28(11):1203-1207;Devanaboyina等(2013)mAbs 5(6):851-859;国际专利申请公布号:W0 2009/125825)。

[0286] 在一方面,本发明提供了在高钙浓度条件下比在低钙浓度条件下以更高的亲和力与C1s结合的抗体。

[0287] 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,诸如骨骼肌,平滑肌和心肌的收缩;白细胞运动,吞噬作用等的活化;血小板的形状变化,分泌等的活化;淋巴细胞活化;肥大细胞活化,包括组胺分泌;儿茶酚胺 α 受体或乙酰胆碱受体介导的细胞响应;胞吐作用;从神经元末端释放递质;和神经元的轴质流动。已知的细胞内钙离子受体包括肌钙蛋白C,钙调蛋白,小白蛋白和肌球蛋白轻链,其具有几个钙离子结合位点,据信其源自分子进化的共同起源。也有许多已知的钙结合基序。此种众所周知的基序包括,例如,钙黏蛋白结构域,钙调蛋白的EF-手(hand),蛋白激酶C的C2结构域,凝血蛋白因子IX的Gla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,血小板反应蛋白3型结构域和EGF样结构域。

[0288] 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 $0.1\mu\text{M}$ (micro M)至 $30\mu\text{M}$,更优选 $0.5\mu\text{M}$ 至 $10\mu\text{M}$,且特别优选 $1\mu\text{M}$ 至 $5\mu\text{M}$,其接近体内早期内体中的钙离子浓度。同时,在本发明中,高钙离子浓度优选为 $100\mu\text{M}$ 至 10mM ,更优选为 $200\mu\text{M}$ 至 5mM ,且特别优选为 0.5mM 至 2.5mM ,其接近血浆中(在血液中)的钙离子浓度。在本发明中,优选的是,低钙离子浓度是内体中的钙离子浓度,高钙离子浓度是血浆中的钙离子浓度。当抗原结合活性水平在低和高钙离子浓度之间比较时,优选本发明的抗体在高钙离子浓度下比在低钙离子浓度下的结合强度更强。换句话说,优选地,本发明的抗体的抗原结合活性在低钙离子浓度下比在高钙离子浓度下更低。当结合活性的水平用解离常数(KD)表示时, $\text{KD}(\text{低钙离子浓度})/\text{KD}(\text{高钙离子浓度})$ 的值大于1,优选为2或更大,还更优选为10或更大,而更优选40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,100,200,400,1000,10000或更大。对 $\text{KD}(\text{低钙离子浓度})/\text{KD}(\text{高钙离子浓度})$ 的值的上限没有特别限制,并且可以是诸如100,400,1000或10000的任何值,只要本领域技术人员可以制备即可。可以使用解离速率常数(kd)代替KD。当难以计算KD值时,可以基于在相同浓度下通过分析物时Biacore中结合反应的水平来评估活性。当抗原通过固定有本发明的抗原结合分子的芯片上时,低钙浓度下的结合反应优选为高钙浓度下的结合反应的1/2或更小,更优选为1/3或更小,更优选为1/5或更小,且特别优选为1/10或更小。众所周知,通常,体内细胞外钙离子浓度(例如,在血浆中)高,而细胞内钙离子浓度(例如,在内体中)低。因此,在本发明中,优选细胞外条件为高钙离子浓度,细胞内条件为低钙离子浓度。当在细胞内钙离子浓度条件下低于在细胞外钙离子浓度条件下的抗原结合活性的特性赋予本发明的抗原结合分子(例如抗体)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与本发明的抗原结合分子解离,从而增强了抗原从细胞外掺入细胞。当将此种抗体施用于活体时,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较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中所述的方法(例如,第0200-0213段)。对赋予本发明的抗原结合结构域具有在低钙离子浓度条件下比在高钙离子浓度条件下更弱地与抗原结合的特性的方法没有特别限制,可以通过任何方法实施。具体地,该方法描述于日本专利申请No.2011-218006且包括,例如,用具有金属螯合活性的氨基酸残基取代抗原结合结构域中的至少一个氨基酸残基,和/

或在抗原结合结构域中插入至少一个具有金属螯合活性的氨基酸残基的方法。本发明的抗原结合分子,其中抗原结合结构域的至少一个氨基酸残基已被具有金属螯合活性的氨基酸残基取代和/或至少一个具有金属螯合活性的氨基酸残基已插入抗原结合结构域,是本发明的抗原结合分子的优选实施方案。

[0289] 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众所周知的,并且已被详细描述(例如,Springer等,(Cell(2000)102,275-277);Kawasaki和Kretsinger(Protein Prof.(1995)2,305-490);Moncrief等,(J.Mol.Evol.(1990)30,522-562);Chauvaux等,(Biochem.J.(1990)265,261-265);Bairoch和Cox(FEBS Lett.(1990)269,454-456);Davis(New Biol.(1990)2,410-419);Schaefer等,(Genomics(1995)25,638to 643);Economou等,(EMBO J.(1990)9,349-354);Wurzburg等,(Structure.(2006)14,6,1049-1058))。肌钙蛋白C中的EF手,钙调蛋白,小白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中的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受体中的A结构域;膜联蛋白结构域;钙黏蛋白结构域;血小板反应蛋白3型结构域;和EGF样结构域优选用作钙结合基序。

[0290] 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,诸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。此类氨基酸残基在抗原结合结构域中的位置没有特别限制,只要抗原结合活性根据钙离子浓度而变化,它们可以位于任意位置。同时,只要抗原结合活性根据钙离子浓度而变化,此类氨基酸残基可以单独或以两个或更多个的组合形式被包含。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,氨基酸残基可以包含在重链可变区和/或轻链可变区中。在一个优选的实施方案中,根据在重链可变区的CDR3中的Kabat编号,氨基酸残基可以包含在重链可变区的CDR3中,更优选位置95,96,100a,和/或101上。

[0291] 在另一个优选的实施方案中,根据轻链可变区的CDR1中的Kabat编号,氨基酸残基可以包含在轻链可变区的CDR1中,更优选在位置30,31,和/或32上。在又一个优选的实施方案中,根据轻链可变区的CDR2中的Kabat编号,氨基酸残基可以包含在轻链可变区的CDR2中,更优选在位置50上。在又一个优选的实施方案中,根据轻链可变区的CDR3中的Kabat编号,氨基酸残基可以包含在轻链可变区的CDR3中,更优选地在位置92上。

[0292] 此外,可以组合上述实施方案。例如,根据轻链可变区中的Kabat编号,氨基酸残基可包含在选自轻链可变区的CDR1,CDR2和CDR3的两个或三个CDR中,更优选在位置30,31,32,50和/或92中的任意一个或多个上。

[0293] 制备具有不同序列同时共享作为共同结构的根据钙离子浓度改变抗原结合活性的上述氨基酸残基的大量抗原结合结构域作为文库。可以筛选该文库以有效获得具有与所需抗原的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变化。

[0294] 出于本公开的目的,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。抗体结合其抗原的KD值越大,其对具体抗原的结合亲和力越弱。因此,如本文中使用的,表述“在中性pH比在酸性pH亲和力更高”(或等价表述“pH依赖

性的结合”)是指在酸性pH抗体的KD大于在中性pH抗体的KD。例如,在本发明的语境中,如果在酸性pH抗体结合C1s的KD比在中性pH抗体结合C1s的KD大至少2倍,则认为抗体在中性pH比在酸性pH以更高的亲和力结合C1s。因此,本发明包括这样的抗体,所述抗体在酸性pH结合C1s的KD比所述抗体在中性pH结合C1s的KD大至少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。在另一个实施方案中,所述抗体在中性pH的KD值可以为 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,所述抗体在酸性pH的KD值可以为 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M,或更大。

[0295] 抗体对特定抗原的结合特性也可以表示为抗体的kd。抗体的kd是指抗体关于特定抗原的解离速率常数,并且以单位秒的倒数(即, sec^{-1})表示。kd值的增加指示抗体与其抗原的结合较弱。本发明因此包括这样的抗体,所述抗体在酸性pH比在中性pH以更高的kd值结合C1s。本发明包括这样的抗体,所述抗体在酸性pH结合C1s的kd比所述抗体在中性pH结合C1s的kd大至少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。在另一个实施方案中,所述抗体在中性pH的kd值可以为 10^{-2} 1/s, 10^{-3} 1/s, 10^{-4} 1/s, 10^{-5} 1/s, 10^{-6} 1/s,或更小。在另一个实施方案中,所述抗体在酸性pH的kd值可以为 10^{-3} 1/s, 10^{-2} 1/s, 10^{-1} 1/s,或更大。

[0296] 在某些情况中,“与在中性pH相比在酸性pH的结合降低”表示为抗体在酸性pH的KD值与抗体在中性pH的KD值的比值(或反之亦然)。例如,出于本发明的目的,如果抗体显示2或更大的酸性/中性KD比值,则可以认为所述抗体显示“与其在中性pH的结合相比在酸性pH与C1s的结合降低”。在某些示例性实施方案中,本发明的抗体的酸性/中性KD比值可以为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,所述抗体在中性pH的KD值可以为 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,所述抗体在酸性pH的KD值可以为 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M,或更大。

[0297] 或者,“与在中性pH相比在酸性pH的结合降低”表示为抗体在酸性pH的koff值与抗体在中性pH的koff的比值(或反之亦然)。例如,出于本发明的目的,如果抗体显示2或更大的酸性/中性koff比值,则可以认为所述抗体显示“与其在中性pH的结合相比在酸性pH与C1s的结合降低”。在某些示例性实施方案中,本发明的抗体的酸性/中性koff比值可以为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。

[0298] 在某些情况中,“与在中性pH相比在酸性pH的结合降低”表示为抗体在酸性pH的kd值与抗体在中性pH的kd值的比值(或反之亦然)。例如,出于本发明的目的,如果抗体显示2或更大的酸性/中性kd比值,则可以认为所述抗体显示“与其在中性pH的结合相比在酸性pH与C1s的结合降低”。在某些示例性实施方案中,本发明的抗体的酸性/中性kd比值可以为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,所述抗体在中性pH的kd值可以为 10^{-2} 1/s, 10^{-3} 1/s, 10^{-4} 1/s, 10^{-5} 1/s, 10^{-6} 1/s,或更小。在另一个实施方案中,所述抗体在酸性pH的kd值可以为 10^{-3} 1/s, 10^{-2} 1/s, 10^{-1} 1/s,或更大。

[0299] 在某些实施方案中,本发明的pH和/或Ca依赖性的抗-C1s抗体在酸性pH的C1s结合活性的KD值与在中性pH的C1s结合活性的KD值的比值KD(酸性pH)/KD(中性pH)与选自由以下1)至5)组成的组中的参考抗体的KD(酸性pH)/KD(中性pH)是相同的或更大:

[0300] 1) 包含分别在SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20中的VH和VL序列的抗体,

[0301] 2) 包含分别在SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18中的VH和VL序列的抗体,

[0302] 3) 包含分别在SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:20中的VH和VL序列的抗体,

[0303] 4) 包含分别在SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:21中的VH和VL序列的抗体,和

[0304] 5) 包含分别在SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:21中的VH和VL序列的抗体。

[0305] 在另一个实施方案中,实施例4中公开的抗-C1s抗体,诸如IPN92H0288-SG4GK/IPN93L0211-SK1, IPN92H0288-SG4GK/IPN93L0058-SK1, 和IPN92H0307-SG4GK/IPN93L0058-SK1可用作上述参考抗体。

[0306] 如本文中使用的,表述“酸性pH”是指4.0至6.5的pH。表述“酸性pH”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”是5.8或6.0。

[0307] 如本文中使用的,表述“中性pH”是指6.7至约10.0的pH。表述“中性pH”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”是7.0或7.4。

[0308] 如本文中使用的,表述“在高钙浓度条件下”或“在高钙浓度下”是指100 μ M至10mM, 更优选200 μ M至5mM, 特别优选0.5mM至2.5mM, 其接近血浆中(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+} 。

[0309] 如本文中使用的,表述“在低钙浓度条件下”或“在低钙浓度下”是指0.1 μ M至30 μ M, 更优选0.5 μ M至10 μ M, 特别优选1 μ M至5 μ M, 其接近体内早期内体中的钙离子浓度。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+} 。

[0310] 如本文所表达的, KD值和kd值可以使用基于表面等离子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)。可以在25摄氏度($^{\circ}\text{C}$)或37 $^{\circ}\text{C}$ 下确定KD值和kd值。可以在150mM NaCl存在下进行此测定。在一些实施方案中, 可以通过使用表面等离子共振技术进行该测定, 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($^{\circ}\text{C}$)。

[0311] 在一方面, 本发明提供了具有pH依赖性的抗-C1s抗体, 其中所述抗体在可变区中包含至少一个组氨酸, 其中在可变区的至少一个氨基酸被其他氨基酸取代, 使得

[0312] 1) 所述抗体在酸性pH和/或中性pH下的非特异性结合活性将降低, 或

[0313] 2) 酸性pH下C1s结合活性的KD值与中性pH下C1s结合活性的KD值的比值(KD(酸性pH)/KD(中性pH))将增加。

[0314] 在一方面,本发明提供了具有pH依赖性的抗-C1s抗体,其中所述抗体在可变区中包含至少一个组氨酸,其中在可变区的至少一个氨基酸被选自由D,E,K,R和Q组成的组的氨基酸取代,使得

[0315] 1) 所述抗体在酸性pH和/或中性pH下的非特异性结合活性将降低,或

[0316] 2) 酸性pH下C1s结合活性的KD值与中性pH下C1s结合活性的KD值的比率(KD(酸性pH)/KD(中性pH))将增加。

[0317] 在某些方面,表述“非特异性结合活性”是指抗体的细胞外基质(ECM)结合活性。在某些方面,表述“非特异性结合活性”是指抗体在酸性pH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更多个氨基酸取代,使得在酸性pH下ECM结合活性降低。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更多个氨基酸取代,使得在中性pH下ECM结合活性降低。

[0318] 在一方面,本发明提供了具有pH依赖性的抗-C1s抗体,其中在可变区中至少一个氨基酸被取代,使得抗体的ECM结合活性降低。在某些实施方案中,ECM结合活性在酸性pH下降低。在某些实施方案中,ECM结合活性在中性pH下降低。在某些实施方案中,这样的抗体是指与不具有这样的改变的亲本抗体相比,在一个或更多个高变区(HVR)中具有一个或更多个改变的抗体,这种改变导致抗体对抗原的ECM结合活性的改善,即降低ECM结合活性。

[0319] 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,所述ELISA系统通过将多肽添加至细胞外基质固定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,优选使用电化学发光(ECL)方法的测量方法,因为其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,并且可以使用测量钌的电化学发光的ECL系统来测量多肽和细胞外基质之间的结合。添加的多肽的浓度可以任意设定,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,只要其含有糖蛋白如胶原蛋白,蛋白聚糖,纤连蛋白,层粘连蛋白,巢蛋白,纤维蛋白和基底膜聚糖,在本发明中优选动物来源的细胞外基质;例如,可以使用源自人,小鼠,大鼠,猴,兔和狗等动物的细胞外基质。特别地,为了监测人血浆代谢动力学(plasmacokinetics)的改善,优选源自人的天然存在的人细胞外基质。此外,评估多肽与细胞外基质结合的条件理想的是在pH 7.4附近的中性范围内(生理条件),但是不一定必须在中性范围内,评价也可以在酸性范围内(pH 6.0附近)进行。此外,当评估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,以评估多肽/抗原分子复合物与细胞外基质的结合。

[0320] 在一些实施方案中,可以通过使用例如在别处提到的ELISA或ECL来测量抗体在酸性pH下的非特异性结合活性是否会降低(参见,例如,实施例4)。在进一步的实施方案中,在本发明的分离的抗-C1s抗体中,可以在亲本抗体(即,D,E,K,R和/或Q取代之前的原始抗体)和相对于原始(亲本)抗体已引入一个或更多个氨基酸取代(D,E,K,R和/或Q)的抗体之间比较ECM结合的值,条件是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,在一方面,在本发明的分离的抗-C1s抗体中,取代的抗体的ECM结合的值比原始(亲本)抗体的ECM结合的值低至少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。

[0321] 不受特定理论的束缚,抗体中的组氨酸残基可与抗体中组氨酸残基周围的各种残基相互作用。此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(诸如精氨酸或赖氨酸)会导致在酸性pH下带正电荷的残基与质子化的组氨酸之间发生排斥,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(诸如天冬氨酸或谷氨酸)会导致在酸性pH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下发生的抗体或CDR的这些结构或构象变化可影响抗体的抗原结合,并降低在酸性pH下抗体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荷的残基(诸如精氨酸,赖氨酸,天冬氨酸或谷氨酸)可以降低抗体在酸性pH下对抗原的结合亲和力,从而以独特的机制改善抗体-抗原相互作用的pH依赖性。

[0322] 在一方面,本发明提供了用于提高酸性pH下抗体的抗原结合活性的KD值与中性pH下抗原结合活性的KD值的比值($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)的方法,包括

[0323] 1) 提供具有pH依赖性的抗体,该抗体在可变区中包含至少一个组氨酸,

[0324] 2) 用选自D,E,K,R,Q和H组成的组的氨基酸取代抗体的可变区上的至少一个氨基酸。

[0325] 在一方面,本发明提供了增强从血浆中清除(或去除)抗原的方法,包括

[0326] 1) 提供具有pH依赖性的抗体,该抗体在可变区中包含至少一个组氨酸,

[0327] 2) 用选自D,E,K,R,Q和H组成的组的氨基酸取代抗体的可变区上的至少一个氨基酸。

[0328] 在一方面,本发明提供了促进抗原结合分子介导的抗原摄入细胞的方法,包括

[0329] 1) 提供具有pH依赖性的抗体,该抗体在可变区中包含至少一个组氨酸,

[0330] 2) 用选自D,E,K,R,Q和H组成的组的氨基酸取代抗体的可变区上的至少一个氨基酸。

[0331] 在一方面,本发明提供了增加单个抗原结合分子可以结合的抗原数量的方法,包括

[0332] 1) 提供具有pH依赖性的抗体,该抗体在可变区中包含至少一个组氨酸,

[0333] 2) 用选自D,E,K,R,Q和H组成的组的氨基酸取代抗体的可变区上的至少一个氨基酸。

[0334] 在一方面,本发明提供了增强抗原结合分子从血浆中消除抗原的能力的方法,包括

[0335] 1) 提供具有pH依赖性的抗体,该抗体在可变区中包含至少一个组氨酸,

[0336] 2) 用选自D,E,K,R,Q和H组成的组的氨基酸取代抗体的可变区上的至少一个氨基酸。

[0337] 在某些实施方案中,在本发明的上述方法中,可变区中包含的组氨酸残基与取代的氨基酸(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。

[0338] 在一个方面,本发明提供了增强个体中从血浆中清除C1s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,以增强C1s从血浆中的清除。本

发明还提供了增强个体中C1r和C1s复合物从血浆中的清除的方法。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,以增强C1r和C1s的复合物从血浆中的清除。本发明还提供了增强个体中C1q,C1r和C1s的复合物从血浆中的清除的方法。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,以增强C1q,C1r和C1s的复合物从血浆中的清除。

[0339] 在另一方面,本发明提供了从血浆中去除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,该值定义为当使用表面等离子共振技术确定KD时,在pH 5.8时对C1s的KD与在pH 7.4时对C1s的KD的比值为2至10,000,其中所述抗体在体内血浆中与C1s结合,并在存在于体内内体中的条件下从结合的C1s上解离,且其中所述抗体是人IgG或人源化IgG;和(c) 向个体施用所述抗体。在另一方面,可以在37℃和150mM NaCl下使用这种表面等离子共振技术。在另一方面,可以使用这种表面等离子共振技术,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,37℃。在另一方面,可以使用解离速率常数(kd)代替上述的KD。

[0340] 在另一方面,本发明提供了从受试者的血浆中去除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) 鉴定如下的第二抗体:(1) 通过第二抗体的抗原结合(C1s结合)结构域与C1s结合,(2) 除了所述第一抗体的可变区的至少一个氨基酸被组氨酸取代和/或至少一个组氨酸插入所述第一抗体的可变区之外,氨基酸序列与所述第一抗体相同,(3) 具有的KD(pH5.8)/KD(pH7.4)值高于所述第一抗体的KD(pH5.8)/KD(pH7.4)值,且在2至10,000之间,其中KD(pH5.8)/KD(pH7.4)定义为当使用表面等离子共振技术确定KD时,在pH 5.8时对C1s的KD与在pH 7.4时对C1s的KD的比值,(4) 在体内的血浆中与C1s结合,(5) 在存在于体内内体中的条件下从结合的C1s上解离,和(6) 是人IgG或人源化IgG;(c) 鉴定需要降低他的或她的C1s血浆水平的受试者;和(d) 向受试者施用所述第二抗体,以降低受试者中C1s的血浆水平。在另一方面,可以在37℃和150mM NaCl下使用这种表面等离子共振技术。在另一方面,可以在37℃和150mM NaCl下使用这种表面等离子共振技术。在另一方面,可以使用这种表面等离子共振技术,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,37℃。在另一方面,可以使用解离速率常数(kd)代替上述的KD。

[0341] 在另一方面,本发明提供了从受试者的血浆中去除C1s的方法,该方法包括:(a) 鉴定如下的第一抗体:(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)结构域与C1s结合的第二抗体的氨基酸序列相同,除了第一抗体的至少一个可变区比第二抗体的相应的可变区具有至少多一个组氨酸残基,(3) 具有的KD(pH5.8)/KD(pH7.4)值高于所述第二抗体的KD(pH5.8)/KD(pH7.4)值,且在2至10,000之间,其中KD(pH5.8)/KD(pH7.4)定义为当使用表面等离子共振技术确定KD时,在pH 5.8时对C1s的KD与在pH 7.4时对C1s的KD的比值,(4) 在体内与血浆中C1s结合,(5) 在存在于体内内体中的条件下从结合的C1s上解离,和(6) 是人IgG或人源化IgG;(b) 鉴定需要降低他的或她的C1s血浆水平的受试者;和(c) 向受试者施用至少一次所述第一抗体,以降低受试者中C1s的血浆水平。在另一方面,可以在37℃和150mM NaCl下使用这种表面等离子共振技术。在

另一方面,可以在37℃和150mM NaCl下使用这种表面等离子共振技术。在另一方面,可以使用这种表面等离子共振技术,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,37℃。本发明还提供了抑制补体组分C4的切割的方法,其中所述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。在另一方面,可以使用解离速率常数(kd)代替上述的KD。

[0342] 在一方面,本公开提供了调节补体活化的方法。在一些实施方案中,该方法抑制补体活化,例如降低C4b2a的产生。在一些实施方案中,本公开提供了在患有补体介导的疾病或病症的个体中调节补体活化的方法,该方法包括向该个体施用本公开的抗-C1s抗体或本公开的药物组合物,其中药物组合物包含本公开的抗-C1s抗体。在一些实施方案中,这样的方法抑制补体活化。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进行施用,包括本文公开的那些。在一些实施方案中,施用是静脉内的。在一些实施方案中,施用是鞘内注射。

[0343] 在某些实施方案中,本发明的抗-C1s抗体与来自一种以上物种的C1s结合。在特定的实施方案中,抗-C1s抗体与来自人和非人动物的C1s结合。在具体的实施方案中,抗-C1s抗体与来自人,大鼠和猴(例如食蟹猴,猕猴,小猿,黑猩猩,和狒狒)的C1结合。

[0344] 在一方面,本发明提供抗-C1s抗体,其包含选自以下各项的至少一种,两种,三种,四种,五种或六种HVR:(a)包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:42或45的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-L3。

[0345] 在一方面,本发明提供了抗体,其包含选自以下各项的至少一种,至少两种,或全部三种VH HVR序列:(a)包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的HVR-H3。在一个实施方案中,所述抗体包括包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的HVR-H3。在另一个实施方案中,所述抗体包括包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的HVR-H3和包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-L3。在另一实施方案中,所述抗体包括包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的HVR-H3,包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-L3,和包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H2。在另一实施方案中,所述抗体包括(a)包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的HVR-H3。

[0346] 在另一方面,本发明提供了抗体,其包含选自以下各项的至少一种,至少两种,或全部三种VL HVR序列:(a)包含SEQ ID NO:42或45的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-L3。在一个实施方案中,所述抗体包括(a)包含SEQ ID NO:42或45的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-L3。

[0347] 在另一方面,本发明的抗体包括(a)包含选自以下各项的至少一种,至少两种,或全部三种VH HVR序列的VH结构域:(i)包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)包含选自以下各项的至少一种,至少两种,或全部三种VL HVR序列的VL结构域:(i)包

含SEQ ID NO:42或45的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的HVR-L2, 和(c) 包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-L3。

[0348] 在另一方面, 本发明提供抗体, 其包括 (a) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-H1; (b) 包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H2; (c) 包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的HVR-H3; (d) 包含SEQ ID NO:42或45的氨基酸序列的HVR-L1; (e) 包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的HVR-L2; 和(f) 包含选自SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-L3。

[0349] 在一些实施方案中, 提供了抗-C1s抗体变体, 所述抗-C1s抗体变体通过将氨基酸修饰引入包含SEQ ID No:35或36的VH序列和SEQ ID NO:37或38的VL序列的抗体中而制备。

[0350] 在一些实施方案中, 提供了抗-C1s抗体变体, 所述抗-C1s抗体变体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中而制备。

[0351] 在一些实施方案中, 本发明的抗-C1s抗体包含在一个或更多个以下Kabat编号系统位置上的组氨酸:

[0352] 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; 和

[0353] 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。

[0354] 在一些实施方案中, 本发明的抗-C1s抗体包含在一个或更多个以下Kabat编号系统位置上的组氨酸:

[0355] 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; 和

[0356] 轻链:L25, L28, L91, L92, L94, L95, L96, 和L97。

[0357] 在一些实施方案中, 本发明的抗-C1s抗体包含取代在选自以下Kabat编号系统位置的位置上的一个或更多个氨基酸残基的至少一个组氨酸:

[0358] 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; 和

[0359] 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。

[0360] 在一些实施方案中, 如上提供的抗-C1s抗体的任何一个或更多个氨基酸在以下Kabat编号系统位置上被组氨酸取代:

[0361] 重链:H51, H65, 和H99; 和

[0362] 轻链:L92, L94, L95和L96。

[0363] 在一些实施方案中, 本发明的分离的抗-C1s抗体包含取代在以下Kabat编号系统位置上的氨基酸残基的一个, 两个, 三个, 四个或五个组氨酸:

[0364] 重链:H51, H65, 和H99; 和

[0365] 轻链:L92, L94, L95和L96。

[0366] 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, 所述组氨

酸是通过Kabat编号系统在一个或多个以下位置和CDR或FR氨基酸位置的取代的残基：

[0367] 重链：H51, H65和H99；和

[0368] 轻链：L92, L94, L95和L96。

[0369] 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，所述组氨酸是由Kabat编号系统在以下位置的取代的残基。

[0370] 1) L92和L94

[0371] 2) L92和L95

[0372] 3) L94和L95

[0373] 4) L92, L94和L95

[0374] 5) H65和L92

[0375] 6) H65和L94

[0376] 7) H65和L95

[0377] 8) H65, L92和L94

[0378] 9) H65, L92和L95

[0379] 10) H65, L94和L95

[0380] 11) H65, L92, L94和L95

[0381] 12) H99和L92

[0382] 13) H99和L94

[0383] 14) H99和L95

[0384] 15) H99, L92和L94

[0385] 16) H99, L92和L95

[0386] 17) H99, L94和L95

[0387] 18) H99, L92, L94和L95

[0388] 19) H65和H99

[0389] 20) H65, H99和L92

[0390] 21) H65, H99和L94

[0391] 22) H65, H99和L95

[0392] 23) H65, H99, L92和L94

[0393] 24) H65, H99, L92和L95

[0394] 25) H65, H99, L94和L95

[0395] 26) H65, H99, L92, L94和L95, 或

[0396] 27) H27, H99和L95。

[0397] 在任一以上实施方案中，抗-C1s抗体是人源化的。在一个实施方案中，抗-C1s抗体包含以上任一实施方案中的HVR，并且还包含受体人框架，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抗体包含任一以上实施方案中的HVR，并且还包含VH或VL，所述VH或VL包含FR序列。在另一实施方案中，本发明的抗-C1s抗体包含以下重链或轻链可变结构域FR序列：对于重链可变结构域，FR1包含SEQ ID NO:4或12的氨基酸序列，FR2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列，FR3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列，FR4包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。对于轻链可变结构域，FR1包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列，FR2包含SEQ ID

N0:9的氨基酸序列,FR3包含SEQ ID N0:10的氨基酸序列,FR4包含SEQ ID N0:11的氨基酸序列。

[0398] 在另一个方面,抗-C1s抗体包含与SEQ ID N0:19,17或22的氨基酸序列具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%序列同一性的重链可变结构域(VH)序列。在某些实施方案中,具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%同一性的VH序列相对于参考序列包含取代(例如,保守取代),插入,或缺失,但是包含所述序列的抗-C1s抗体保持结合C1s的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID N0:19,17或22中,总计1至10个氨基酸被取代,插入和/或缺失。在某些实施方案中,取代,插入,或缺失发生在HVR外的区域中(即,在FR中)。任选地,抗-C1s抗体包含SEQ ID N0:19,17或22中的VH序列,包括所述序列的翻译后修饰。在具体的实施方案中,VH包含一种,两种或三种选自以下的HVR:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID N0:39的氨基酸序列,(b)HVR-H2,其包含SEQ ID N0:40的氨基酸序列,和(c)HVR-H3,其包含SEQ ID N0:41的氨基酸序列。翻译后修饰包括但不限于通过多谷氨酰化(pyroglutamylation)将重链或轻链的N-末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。

[0399] 在另一方面,提供了抗-C1s抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID N0:20,18或21的氨基酸序列具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%序列同一性的轻链可变结构域(VL)。在某些实施方案中,具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%同一性的VL序列相对于参考序列包含取代(例如,保守取代),插入,或缺失,但是包含所述序列的抗-C1s抗体保持结合C1s的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID N0:20,18或21中,总计1至10个氨基酸被取代,插入和/或缺失。在某些实施方案中,取代,插入,或缺失发生在HVR外的区域中(即,在FR中)。任选地,抗-C1s抗体包含SEQ ID N0:20,18或21中的VL序列,包括所述序列的翻译后修饰。在具体的实施方案中,VL包含一种,两种或三种选自以下的HVR:(a)HVR-L1,其包含SEQ ID N0:42或45的氨基酸序列,(b)HVR-L2,其包含SEQ ID N0:43的氨基酸序列;和(c)HVR-L3,其包含SEQ ID N0:44的氨基酸序列。翻译后修饰包括但不限于通过焦谷氨酰化将重链或轻链的N-末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。

[0400] 在另一方面,提供了抗-C1s抗体,其中所述抗体包含如上文提供的任何实施方案中的VH,和如上文提供的任何实施方案中的VL。在一个实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID N0:19和SEQ ID N0:20中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。翻译后修饰包括但不限于通过焦谷氨酰化将重链或轻链的N-末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。在一个实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID N0:17和SEQ ID N0:18中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。翻译后修饰包括但不限于通过焦谷氨酰化将重链或轻链的N-末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。在一个实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID N0:22和SEQ ID N0:20中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。翻译后修饰包括但不限于通过焦谷氨酰化将重链或轻链的N-末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。在一个实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID N0:19和SEQ ID N0:21中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。翻译后修饰包括但不限于通过焦谷氨酰化将重链或轻链的N-末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。在一个实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID N0:22和SEQ ID N0:21中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。翻译后修饰

包括但不限于通过焦谷氨酰化将重链或轻链的N-末端的谷氨酰胺或谷氨酸修饰为焦谷氨酸。

[0401] 在另一方面,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,提供了与选自以下组成的组的抗体结合相同表位的抗体:

[0402] (a) 抗体,其包含SEQ ID NO:23的HVR-H1序列,SEQ ID NO:24的HVR-H2序列,SEQ ID NO:25的HVR-H3序列,SEQ ID NO:26的HVR-L1序列,SEQ ID NO:27的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:28的HVR-L3序列,

[0403] (b) 抗体,其包含SEQ ID NO:29的HVR-H1序列,SEQ ID NO:30的HVR-H2序列,SEQ ID NO:31的HVR-H3序列,SEQ ID NO:32的HVR-L1序列,SEQ ID NO:33的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:34的HVR-L3序列,

[0404] (c) 人单克隆抗-C1s抗体M241 (HycultBiotech,目录号:HM2109) 或人单克隆抗-C1s抗体M81 (HycultBiotech,目录号:HM2108),

[0405] (d) 抗体,其包含SEQ ID NO:56的HVR-H1序列,SEQ ID NO:57的HVR-H2序列,SEQ ID NO:58的HVR-H3序列,SEQ ID NO:71的HVR-L1序列,SEQ ID NO:72的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:73的HVR-L3序列,

[0406] (e) 抗体,其包含SEQ ID NO:59的HVR-H1序列,SEQ ID NO:60的HVR-H2序列,SEQ ID NO:61的HVR-H3序列,SEQ ID NO:74的HVR-L1序列,SEQ ID NO:75的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:76的HVR-L3序列,

[0407] (f) 抗体,其包含SEQ ID NO:62的HVR-H1序列,SEQ ID NO:63的HVR-H2序列,SEQ ID NO:64的HVR-H3序列,SEQ ID NO:77的HVR-L1序列,SEQ ID NO:78的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:79的HVR-L3序列,

[0408] (g) 抗体,其包含SEQ ID NO:65的HVR-H1序列,SEQ ID NO:66的HVR-H2序列,SEQ ID NO:67的HVR-H3序列,SEQ ID NO:80的HVR-L1序列,SEQ ID NO:81的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:82的HVR-L3序列,和

[0409] (h) 抗体,其包含SEQ ID NO:68的HVR-H1序列,SEQ ID NO:69的HVR-H2序列,SEQ ID NO:70的HVR-H3序列,SEQ ID NO:83的HVR-L1序列,SEQ ID NO:84的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:85的HVR-L3序列。

[0410] 其中所述抗体在中性pH比在酸性pH以更高的亲和力结合C1s,如以下(i)或(ii)中所述:

[0411] (i) 当在中性和酸性pH均在高钙浓度测量时,酸性pH下C1s结合活性的KD值与中性pH下C1s结合活性的KD值的比值($KD(\text{酸性pH})/KD(\text{中性pH})$)为2或更大,

[0412] (ii) 当在中性和酸性pH均在高钙浓度测量时,酸性pH下C1s结合活性的koff值与中性pH下C1s结合活性的koff值的比值($koff(\text{酸性pH})/koff(\text{中性pH})$)为2或更大。

[0413] 在一些实施方案中,本发明的分离的抗-C1s抗体与选自以下组成的组的抗体竞争结合C1s:

[0414] (a) 抗体,其包含SEQ ID NO:56的HVR-H1序列,SEQ ID NO:57的HVR-H2序列,SEQ ID NO:58的HVR-H3序列,SEQ ID NO:71的HVR-L1序列,SEQ ID NO:72的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:73的HVR-L3序列,

[0415] (b) 抗体,其包含SEQ ID NO:59的HVR-H1序列,SEQ ID NO:60的HVR-H2序列,SEQ

ID NO:61的HVR-H3序列,SEQ ID NO:74的HVR-L1序列,SEQ ID NO:75的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:76的HVR-L3序列,

[0416] (c) 抗体,其包含SEQ ID NO:62的HVR-H1序列,SEQ ID NO:63的HVR-H2序列,SEQ ID NO:64的HVR-H3序列,SEQ ID NO:77的HVR-L1序列,SEQ ID NO:78的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:79的HVR-L3序列,

[0417] (d) 抗体,其包含SEQ ID NO:65的HVR-H1序列,SEQ ID NO:66的HVR-H2序列,SEQ ID NO:67的HVR-H3序列,SEQ ID NO:80的HVR-L1序列,SEQ ID NO:81的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:82的HVR-L3序列,和

[0418] (e) 抗体,其包含SEQ ID NO:68的HVR-H1序列,SEQ ID NO:69的HVR-H2序列,SEQ ID NO:70的HVR-H3序列,SEQ ID NO:83的HVR-L1序列,SEQ ID NO:84的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:85的HVR-L3序列。

[0419] 在另一方面,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以下组成的组的抗体结合相同表位的抗体:

[0420] 在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。

[0421] 在一些实施方案中,本发明的分离的抗-C1s抗体在中性pH下与选自由以下组成的组的抗体竞争结合C1s:

[0422] (a) 抗体,其包含SEQ ID NO:23的HVR-H1序列,SEQ ID NO:24的HVR-H2序列,SEQ ID NO:25的HVR-H3序列,SEQ ID NO:26的HVR-L1序列,SEQ ID NO:27的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:28的HVR-L3序列,

[0423] (b) 抗体,其包含SEQ ID NO:29的HVR-H1序列,SEQ ID NO:30的HVR-H2序列,SEQ ID NO:31的HVR-H3序列,SEQ ID NO:32的HVR-L1序列,SEQ ID NO:33的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:34的HVR-L3序列,和

[0424] (c) 人单克隆抗-C1s抗体M241 (HycultBiotech,目录号:HM2109) 或人单克隆抗-C1s抗体M81 (HycultBiotech,目录号:HM2108),

[0425] 在一些实施方案中,本发明的分离的抗-C1s抗体在中性pH下与选自由以下组成的组的抗体竞争结合C1s:

[0426] 在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。

[0427] 在一方面,本公开提供了具有pH依赖性结合的分离的人源化单克隆抗体,所述抗体与涵盖补体组分Is (C1s) 的结构域IV和V的区域内的表位特异性结合。在某些情况下,抗体抑制C1s与补体组分4 (C4) 的结合。在某些情况下,该抗体不抑制C1s的蛋白酶活性。在某些情况下,被本发明的分离的人源化单克隆抗体结合的表位是构象表位。

[0428] 在一方面,本公开提供了具有pH依赖性结合的分离的抗体,所述抗体与补体C1s蛋白内的表位特异性结合。在一些实施方案中,本公开的分离的抗-C1s抗体结合活化的C1s蛋白。在一些实施方案中,本公开的分离的抗-C1s抗体结合非活性形式的C1s。在其他情况下,本公开的分离的抗-C1s抗体与活化的C1s蛋白和非活性形式的C1s二者均结合。

[0429] 在一方面,本公开提供了具有pH依赖性结合的分离的人源化单克隆抗体,其与涵盖C1s的结构域IV和V的区域内的表位特异性结合。例如,本公开提供了分离的人源化单克隆抗体,其与SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的位置272-422处的氨基酸内的表位特异性结合。在某些情况下,所述分离的人源化单克隆抗体与SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的位置272-422处的氨基酸内的表位特异性结合,并抑制C4与C1s的结合。本公开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,所述抗体与SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的位置272-422处的氨基酸内的表位特异性结合,并抑制C4与C1s的结合。

[0430] 在一方面,本公开提供了具有pH依赖性结合的分离的人源化单克隆抗体,其与包含人C1s抗原的位置357处的天冬氨酸的表位特异性结合。

[0431] 在本发明的另一个方面,根据任意以上实施方案的抗-C1s抗体是单克隆抗体,包括嵌合、人源化或人抗体。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,所述抗体是全长抗体,例如,完整的IgG1,IgG2,IgG3或IgG4抗体或本文中限定的其他抗体类别或同种型。

[0432] 在另一个方面,根据任意以上实施方案的抗-C1s抗体可以结合以下1-7节中所述任意特征(单独地或组合地)。

[0433] 1. 抗体亲和力

[0434] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体具有的解离常数(Kd或KD)为:1μM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)。

[0435] 在一个实施方案中,Kd通过放射性标记的抗原结合测定(RIA)测量。在一个实施方案中,利用目的抗体的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方式测量:在存在未标记抗原的滴定系列的情况下用最小浓度的(¹²⁵I)标记的抗原平衡Fab,然后用抗-Fab抗体包被的平板捕获结合的抗原(参见,例如,Chen等,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。为了确定测定条件,将MICROTITER(注册商标)多孔板(Thermo Scientific)用在50mM碳酸钠(pH 9.6)中的5μg/ml的捕获抗-Fab抗体(Cappel Labs)过夜包被,并且随后用在PBS中的2% (w/v) 胎牛血清清蛋白在室温(约23℃)封闭二至五小时。在非吸附性平板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM [¹²⁵I]-抗原与目的Fab的连续稀释液混合(例如,与Presta等,Cancer Res.57:4593-4599(1997)中的抗-VEGF抗体,Fab-12的评估一致)。然后将目的Fab孵育过夜;然而,孵育可以持续更长的时间(例如,约65小时)以保证实现平衡。其后,将混合物转移至捕获平板用于室温孵育(例如,持续一小时)。然后除去溶液并将平板用在PBS中的0.1% 聚山梨醇酯20(TWEEN-20(注册商标))洗涤八次。当平板已经干燥时,添加150μl/孔的闪烁体(scintillant)(MICROSCINT-20TM;Packard),并将平板在TOPCOUNTTM γ 计数仪(Packard)上计数十分钟。选择导致小于或等于20%的最大结合的各Fab的浓度用于竞争性结合测定。

[0436] 根据另一个实施方案,Kd使用BIACORE(注册商标)表面等离子共振测定测量。例如,在25℃利用固定化抗原CM5芯片以~10响应单位(RU)进行使用BIACORE(注册商标)-2000或BIACORE(注册商标)-3000(BIACore, Inc., Piscataway, NJ)的测定。在一个实施方案中,根据提供者的使用说明,将羧甲基化的葡聚糖生物传感器芯片(CM5,BIACORE, Inc.)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)活化。将抗原用10mM乙酸钠pH 4.8稀释至5 μ g/ml($\sim 0.2\mu$ M),之后以5 μ l/分钟的流速注射以实现偶联蛋白的约10个响应单位(RU)。在注射抗原后,注射1M乙醇胺以封闭未反应的基团。为了动力学测量,在25 $^{\circ}$ C以约25 μ l/分钟的流速将Fab的两倍连续稀释液(0.78nM至500nM)注射到具有0.05%聚山梨醇酯20(TWEEN-20TM)表面活性剂的PBS(PBST)中。使用简单一对一(one-to-one)朗缪尔(Langmuir)结合模型(BIACORE(注册商标)Evaluation Software版本3.2)通过同时拟合结合和解离感应图来计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。作为 k_{off}/k_{on} 之比计算平衡解离常数(Kd)。参见,例如,Chen等,J.Mol.Biol.293:865-881(1999)。如果通过以上表面等离共振共振测定测量的结合速率超过 $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,则可以通过以下方式确定结合速率:如在分光计如配备有截流装置(stop-flow)的分光光度计(Aviv Instruments)或具有搅拌室的8000-系列SLM-AMINCOTM分光光度计(ThermoSpectronic)中测量的,使用测量在存在增加浓度的抗原的情况下,在25 $^{\circ}$ C,在PBS,pH 7.2中的20nM抗-抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度的增加或减小的荧光猝灭技术(激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)。

[0437] 在一些实施方案中,本发明的每个组氨酸取代的变体在pH 7.4和pH5.8下的结合亲和力是使用Biacore T200仪器(GE Healthcare)在37 $^{\circ}$ C下测定的。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(flow cells)上。可在7(+)缓冲液(20mM ACES,150mM NaCl,1.2mM CaCl₂,0.05%Tween 20,0.005%NaN₃,pH 7.4),5(+)缓冲液(20mM ACES,150mM NaCl,1.2mM CaCl₂,0.05%Tween 20,0.005%NaN₃,pH 5.8),或5(-)缓冲液(20mM ACES,150mM NaCl,3 μ M CaCl₂,0.05%Tween 20,0.005%NaN₃,pH 5.8)中制备抗体和分析物。每种抗体都可以被蛋白A/G捕获到传感器表面。抗体捕获水平达到200个共振单位(RU)。可以以例如50或200nM注射制备的血清来源的人C1s(CompTech)或重组C1s,然后解离。利用例如10mM甘氨酸-HCl pH 1.5在每个循环再生传感器表面。结合亲和力可以通过使用例如Biacore T200评估软件2.0版(GE Healthcare)处理并拟合数据为1:1结合模型来确定。

[0438] 本发明的Biacore测定的步骤的具体实例如下。

[0439] 组氨酸取代的变体在pH 7.4和pH 5.8下的结合亲和力是使用Biacore T200仪器(GE Healthcare)在37 $^{\circ}$ C下确定的。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。在7(+)缓冲液(20mM ACES,150mM NaCl,1.2mM CaCl₂,0.05%Tween 20,0.005%NaN₃,pH 7.4),或5(+)缓冲液(20mM ACES,150mM NaCl,1.2mM CaCl₂,0.05%Tween 20,0.005%NaN₃,pH 5.8)中制备抗体和分析物。每种抗体都被蛋白A/G捕获到传感器表面。抗体捕获水平达到200个共振单位(RU)。以pH 7.4下12.5、50nM或在pH 5.8,50、200nM,或pH 5.8,200和800nM注射血清来源的人C1s,然后解离。利用10mM甘氨酸-HCl,pH 1.5,在每个循环再生传感器表面。通过使用Biacore T200评估软件2.0版(GE Healthcare)处理并拟合数据至1:1结合模型来确定结合亲和力。在pH 7.4下解离阶段后,立即整合了pH 5.8下额外的解离阶段。通过使用Scrubber 2.0(BioLogic软件)曲线拟合软件处理和拟合数据,确定5(+)缓冲液中的解离速率。

[0440] 或者,组氨酸取代的变体在pH 7.4和pH 5.8下的结合亲和力是使用Biacore T200仪器(GE Healthcare)在37 $^{\circ}$ C下确定的。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。在7(+)缓冲液(20mM ACES,150mM NaCl,1.2mM CaCl_2 ,0.05%Tween 20,0.005% NaN_3 ,pH 7.4),或5(+)缓冲液(20mM ACES,150mM NaCl,1.2mM CaCl_2 ,0.05%Tween 20,0.005% NaN_3 ,pH 5.8)中制备抗体和分析物。每种抗体都被蛋白A/G捕获到传感器表面。抗体捕获水平目标是200个共振单位(RU)。以50nM注射血清来源的人类C1s,然后解离。利用10mM甘氨酸-HCl,pH 1.5,在每个循环再生传感器表面。通过使用Biacore T200评估软件2.0版(GE Healthcare)处理并拟合数据至1:1结合模型来确定结合亲和力。在pH 7.4下解离阶段后,立即整合了pH 5.8下额外的解离阶段。通过使用Scrubber 2.0(BioLogic软件)曲线拟合软件处理和拟合数据,确定5(+)缓冲液中的解离速率。

[0441] 在一些实施方案中,如有必要,在pH 7.4下解离阶段后,立即整合了pH 5.8下额外的解离阶段。通过使用Scrubber 2.0(BioLogic软件)曲线拟合软件处理和拟合数据,可以确定5(+)缓冲液中的解离速率。

[0442] 2. 抗体片段

[0443] 在某些实施方案中,本文中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,以及以下描述的其他片段。对于特定抗体片段的综述,参见Hudson等Nat.Med.9:129-134(2003)。对于scFv片段的综述,参见,例如,Pluckthun,The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,vol.113,Rosenburg和Moore编辑,(Springer-Verlag,New York),pp.269-315(1994);还参见,WO 93/16185;以及美国专利号5,571,894和5,587,458。对于包含补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。

[0444] 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,Nat.Med.9:129-134(2003);和Hollinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)。Hudson等,Nat.Med.9:129-134(2003)中也描述了三元抗体和四元抗体。

[0445] 单结构域抗体是这样的抗体片段,其包含抗体的全部或部分的重链可变结构域或全部或部分的轻链可变结构域。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6,248,516B1)。

[0446] 抗体片段可以通过多种技术制备,所述技术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)的制备,如本文中所述。

[0447] 3. 嵌合和人源化抗体

[0448] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体被描述于例如美国专利号4,816,567;和Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984))中。在一个实例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如,来源于小鼠,大鼠,仓鼠,兔或非人灵长类动物如猴的可变区)和人恒定区。在另外的实例中,嵌合抗体是“类型转换”抗体,其中类型或亚类已经由亲本抗体的类型或亚类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0449] 在某些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。典型地,将非人抗体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)来源于非人抗体,和FR(或其部分)来源于人抗体序列。人源化抗体任选地还包含至少一部分的人恒定区。在一些实施方案中,人源化抗

体中的一些FR残基被取代成来自非人抗体(例如,HVR残基所来源于的抗体)的相应残基,例如,以恢复或提高抗体特异性或亲和力。

[0450] 人源化抗体及其制备方法被综述于例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008)中,并且被进一步描述于例如Riechmann等,Nature 332:323-329(1988);Queen等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA86:10029-10033(1989);美国专利号5,821,337,7,527,791,6,982,321和7,087,409;Kashmiri等,Methods 36:25-34(2005)(描述了特异性决定区(SDR)移植);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498(1991)(描述了“表面再建(resurfacing)”);Dall'Acqua等,Methods 36:43-60(2005)(描述了“FR改组(shuffling)”);和Osbourne等,Methods 36:61-68(2005)以及Klimka等,Br.J.Cancer,83:252-260(2000)(描述了用于FR改组的“定向选择”方法)中。

[0451] 可用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳匹配(best-fit)”方法选择的框架区(参见,例如,Sims等J.Immunol.151:2296(1993));来源于具有特定亚组的轻链或重链可变区的人抗体的共有序列的框架区(参见,例如,Carter等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285(1992);和Presta等J.Immunol.151:2623(1993));人成熟(体突变)框架区或人生殖系框架区(参见,例如,Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008));和来源于FR文库筛选的框架区(参见,例如,Baca等,J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997)以及Rosok等,J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0452] 4.人抗体

[0453] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是人抗体。人抗体可以使用本领域中已知的多种技术制备。人抗体被一般性地描述于van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)以及Lonberg,Curr.Opin.Immunol.20:450-459(2008)中。

[0454] 人抗体可以通过向已被改良成生产完整人抗体或具有人可变区的完整抗体以响应抗原攻击的转基因动物施用免疫原来制备。此种动物典型地含有全部或部分的人免疫球蛋白基因座,其替代内源性免疫球蛋白基因座,或其存在于染色体外部或被随机整合到动物的染色体中。在此种转基因小鼠中,内源性免疫球蛋白基因座通常已被失活。对于由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)。还参见,例如,美国专利号6,075,181和6,150,584,其描述了XENOMOUSE™技术;美国专利号5,770,429,其描述了HUMAB(注册商标)技术;美国专利号7,041,870,其描述了K-M MOUSE(注册商标)技术,和美国专利申请公布号US 2007/0061900,其描述了VELOCIMOUSE(注册商标)技术。来自由此种动物产生的完整抗体的人可变区可以被进一步修饰,例如,通过与不同的人恒定区组合。

[0455] 人抗体还可以通过基于杂交瘤的方法制备。用于制备人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤细胞系已被描述。(参见,例如,Kozbor J.Immunol.,133:3001(1984);Brodeur等,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,pp.51-63(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987);和Boerner等,J.Immunol.147:86(1991)。经由人B-细胞杂交瘤技术制备的人抗体也被描述于Li等,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(描述了由杂交瘤细胞系制备单克隆人IgM抗体)和Ni,Xiandai Mianyixue 26(4):265-268(2006)(描述了人-人杂交瘤)

中描述的那些。人杂交瘤技术 (Trioma 技术) 也被描述于 Vollmers 和 Brandlein, *Histology and Histopathology* 20 (3):927-937 (2005) 以及 Vollmers 和 Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27 (3):185-91 (2005) 中。

[0456] 人抗体也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来产生。此种可变结构域序列然后可以与所需的人恒定结构域组合。以下描述用于由抗体文库选择人抗体的技术。

[0457] 5. 来源于文库的抗体

[0458] 本发明的抗体可以通过筛选具有所需一种或多种活性的抗体的组合文库来分离。例如,本领域中已知多种方法用于生成噬菌体展示文库并且针对具有所需结合性质的抗体筛选所述文库。此种方法被综述于例如 Hoogenboom 等, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien 等, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) 中并被进一步描述于例如 McCafferty 等, *Nature* 348:552-554; Clackson 等, *Nature* 352:624-628 (1991); Marks 等, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Marks 和 Bradbury, in *Methods in Molecular Biology*, 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu 等, *J. Mol. Biol.* 338 (2):299-310 (2004); Lee 等, *J. Mol. Biol.* 340 (5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34):12467-12472 (2004); 和 Lee 等, *J. Immunol. Methods* 284 (1-2):119-132 (2004) 中。

[0459] 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) 分别克隆并且在噬菌体文库中随机重组, 然后可以针对结合抗原的噬菌体筛选所述文库, 如 Winter 等, *Ann. Rev. Immunol.* 12:433-455 (1994) 中所述。噬菌体典型地将抗体片段展示为单链 Fv (scFv) 片段或 Fab 片段。来自被免疫的来源的文库向免疫原提供高亲和力抗体而不需要构建杂交瘤。备选地, 可以克隆天然 (naive) 库 (例如, 由人) 从而向多种非自身抗原以及自身抗原提供单一来源的抗体而不需要进行任何免疫, 如 Griffiths 等, *EMBO J.* 12:725-734 (1993) 所述。最后, 也可以通过以下方式合成制备天然文库: 自干细胞克隆未重排的 V-基因区段, 并且使用含随机序列的 PCR 引物以编码高变 CDR3 区并且在体外实现重排, 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公开包括, 例如: 美国专利号 5,750,373 和美国公布号 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 和 2009/0002360。

[0460] 在本文中, 分离自人抗体文库的抗体或抗体片段被认为是人抗体或人抗体片段。

[0461] 6. 多特异性抗体

[0462] 在某些实施方案中, 本文中提供的抗体是多特异性抗体, 例如, 双特异性抗体。多特异性抗体是这样的单克隆抗体, 其对至少两个不同的位点具有结合特异性。在某些实施方案中, 一个结合特异性是针对 C1s 而另一个是针对另一种抗原。在某些实施方案中, 双特异性抗体可以结合 C1s 的两个不同的表位。双特异性抗体还可以用于将细胞毒性剂定位于表达 C1s 的细胞。双特异性抗体可以作为全长抗体或抗体片段被制备。

[0463] 用于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 Cuello, *Nature* 305:537 (1983)), WO 93/08829, 和 Traunecker 等, *EMBO J.* 10:3655 (1991)), 和“突出-孔 (knob-in-hole)”工程改造

(参见,例如,美国专利号5,731,168)。多特异性抗体也可以通过工程改造用于制备抗体Fc-异源二聚分子的静电导向作用来制备(W02009/089004A1);交联两个以上抗体或片段(参见,例如,美国专利号4,676,980和Brennan等,Science,229:81(1985));使用亮氨酸拉链以制备双特异性抗体(参见,例如,Kostelny等,J.Immunol.148(5):1547-1553(1992));使用“双抗体”技术以用于制备双特异性抗体片段(参见,例如,Hollinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:6444-6448(1993));和使用单链Fv(scFv)二聚体(参见,例如,Gruber等,J.Immunol.152:5368(1994));以及制备三特异性抗体,如例如Tutt等,J.Immunol.147:60(1991)中所述。

[0464] 本文中还包括具有三个以上功能抗原结合位点的经改造的抗体,包括“章鱼抗体”(参见,例如,US 2006/0025576A1)。

[0465] 本文中的抗体或片段还包括“双重作用Fab”或“DAF”,其包含结合C1s以及另一种不同的抗原的抗原结合位点(例如参见,US2008/0069820)。

[0466] 7. 抗体变体

[0467] 在某些实施方案中,考虑本文中提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,理想的是提高抗体的结合亲和力和/或其他生物学性质。抗体的氨基酸序列变体可以通过向编码所述抗体的核苷酸序列引入合适的修饰或通过肽合成来制备。此种修饰包括,例如,自抗体氨基酸序列的缺失,和/或向抗体氨基酸序列中的插入和/或取代抗体氨基酸序列内的残基。可以进行缺失,插入和取代的任意组合以获得最终的构建体,前提是最终的构建体具有所需的特征,例如,抗原-结合。

[0468] a. 取代,插入和缺失变体

[0469] 在某些实施方案中,提供具有一个或多个氨基酸取代的抗体变体。取代诱变的目的位点包括HVR和FR。保守取代显示在表1中的“优选取代”的标题下。更多的改变被提供在表1中的“示例性取代”的标题下并且如以下关于氨基酸侧链分类进一步所述。氨基酸取代可以被引入目的抗体和进行所需活性(例如,保持的/提高的抗原结合,降低的免疫原性或提高的ADCC或CDC)筛选的产品中。

[0470] [表1]

[0471]

| 原始残基 | 示例性取代 | 优选的取代 |
|---------|--------------------------|-------|
| 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 |

[0472] 根据共有侧链性质可以将氨基酸分组为：(1) 疏水性：正亮氨酸, Met, Ala, Val, Leu, Ile；(2) 中性亲水性：Cys, Ser, Thr, Asn, Gln；(3) 酸性：Asp, Glu；(4) 碱性：His, Lys, Arg；(5) 影响链定向的残基：Gly, Pro；(6) 芳香性：Trp, Tyr, Phe。

[0473] 非保守取代需要将这些组之一的成员换成另一组的成员。

[0474] 一种取代变体包括取代亲本抗体 (例如, 人源化或人抗体) 的一个或多个高变区残基。通常, 被选择用于进一步研究的所得的变体相对于亲本抗体将具有某些生物学性质 (例如, 增加的亲和力, 减小的免疫原性) 的改变 (例如, 提高) 和/或将基本上保持亲本抗体的某些生物学性质。示例性取代变体是亲和力成熟抗体, 其可以例如, 使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术 (如本文中描述的那些) 常规制备。简言之, 将一个或多个HVR残基突变并将变体抗体展示在噬菌体上并且筛选特定的生物学活性 (例如, 结合亲和力)。

[0475] 改变 (例如, 取代) 可以在HVR中进行, 例如, 以提高抗体亲和力。此种改变可以在HVR“热点”中进行, 所述HVR“热点”即在体细胞成熟过程期间以高频率进行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, 测试所得的变体VH或VL的结合亲和力。通过构建二级文库并自其进行再选择的亲和力成熟已被描述于例如Hoogenboom等, Methods in Molecular Biology178:1-37 (O'Brien等, ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)) 中。在亲和力成熟的一些实施方案中, 通过多种方法中的任一种 (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。然后产生二级文库。然后筛选所述文库以鉴定任何具有所需亲和力的抗体变体。引入多样性的另一种方法包括HVR定向方法, 其中若干HVR残基 (例如, 同时4-6个残基) 被随机化。可以例如使用丙氨酸扫描诱变或建模, 具体鉴定参与抗原结合的HVR残基。特别地, CDR-H3和CDR-L3通常被靶向。

[0476] 在某些实施方案中, 取代, 插入或缺失可以发生在一个或多个HVR内, 只要这样的改变不显著减小抗体结合抗原的能力。例如, 不显著减小结合亲和力的保守改变 (例如, 本文中所述的保守取代) 可以在HVR中进行。此种改变可以例如在HVR中接触抗原的残基的外部。在上述提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中, 各HVR是未改变的, 或含不超过一个, 两个或三个氨基酸取代。

[0477] 用于鉴定可被靶向用于诱变的抗体残基或区域的有用的方法被称为“丙氨酸扫描诱变”, 如Cunningham和Wells (1989) Science 244:1081-1085所述。在该方法中, 一个残基或一组目标残基 (例如, 带电荷的残基如arg, asp, his, lys和glu) 被鉴定并被中性或带负电的氨基酸 (例如, 丙氨酸或聚丙氨酸) 替代以确定是否影响抗体与抗原的相互作用。可以在对初始取代显示功能敏感性的氨基酸位置处引入进一步的取代。备选地, 或另外地, 可以分

析抗原-抗体复合物的晶体结构以确定抗体和抗原之间的接触点。此种接触残基及相邻残基可以被靶向或被排除作为用于取代的候选物。可以筛选变体以确定其是否具有所需的性质。

[0478] 氨基酸序列插入包括长度为一个残基至含一百个以上残基的多肽的氨基端和/或羧基端融合,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-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,对于ADEPT)或增加抗体的血浆半衰期的多肽与抗体的N-或C-末端的融合。

[0479] b.糖基化变体

[0480] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体被改变成增加或减小抗体被糖基化的程度。向抗体添加糖基化位点或使其缺失糖基化位点可以通过改变氨基酸序列以致产生或除去一个或多个糖基化位点来容易实现。

[0481] 当抗体包含Fc区时,可以改变与其连接的碳水化合物。由哺乳动物细胞产生的天然抗体典型地包含支链的,分两支的(biantennary)寡糖,所述寡糖通常通过N-连接连接至Fc区的CH2结构域的Asn297。参见,例如,Wright等,TIBTECH 15:26-32(1997)。寡糖可以包括多种碳水化合物,例如,甘露糖,N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc),半乳糖和唾液酸,以及与分两支的寡糖结构的“茎”中的GlcNAc相连的岩藻糖。在一些实施方案中,可以进行本发明抗体中的寡糖的修饰以产生具有特定改善的性质的抗体变体。

[0482] 在一个实施方案中,提供抗体变体,其具有缺少与Fc区(直接或间接)相连的岩藻糖的碳水化合物结构。例如,此种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相对于与Asn 297相连的所有糖结构(例如复合物,杂合物和高甘露糖结构)的总和的Asn297处的糖链内的岩藻糖的平均量来确定,如通过MALDI-TOF质谱法测量的,如WO2008/077546中所述,例如。Asn297是指位于Fc区的位置297(Fc区残基的EU编号)附近的天冬氨酸残基;然而,由于抗体中小的序列变异,Asn297也可以位于位置297的上游或下游的约+/-3个氨基酸处,即,在位置294和300之间。此种岩藻糖基化变体可以具有提高的ADCC功能。参见,例如,美国专利公布号US 2003/0157108(Presta, L.);US 2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。涉及“去岩藻糖基化”或“岩藻糖缺陷型”抗体的公开的实例变体包括: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;WO 2005/053742;WO 2002/031140;Okazaki等,J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等,Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够制备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型Lec13 CHO细胞(Ripka等,Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利申请号US 2003/0157108 A1,Presta,L;和WO2004/056312 A1,Adams等,特别是实施例11),以及敲除的细胞系,如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因,FUT8,敲除的CHO细胞(参见,例如,Yamane-Ohnuki等,Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等,Biotechnol.Bioeng.94(4):680-688(2006);和WO2003/085107)。

[0483] 还提供具有被二等分的寡糖的抗体变体,例如,其中与抗体Fc区相连的分两支的寡糖被GlcNAc二等分。此种抗体变体可以具有减少的岩藻糖基化和/或提高的ADCC功能。此

种抗体变体的实例被描述于例如W02003/011878 (Jean-Mairet等);美国专利号6,602,684 (Umana等);和US2005/0123546 (Umana等)中。还提供在与Fc区相连的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此种抗体变体可以具有提高的CDC功能。此种抗体变体被描述于例如W0 1997/30087 (Patel等);W0 1998/58964 (Raju,S.);和W0 1999/22764 (Raju,S.)中。

[0484] c.Fc区变体

[0485] 在某些实施方案中,可以将一个或多个氨基酸修饰引入到本文中提供的抗体的Fc区中,由此产生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,取代)的人Fc区序列(例如,人IgG1,IgG2,IgG3或IgG4 Fc区)。

[0486] 在某些实施方案中,本发明考虑这样的抗体变体,其具有一些但非全部效应子功能,这使其对于抗体体内半衰期是重要的而某些效应子功能(如补体和ADCC)非必要或有害的应用是理想的候选物。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定以确认CDC和/或ADCC活性的减小/消除。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以保证抗体缺少Fc γ R结合(因此可能缺少ADCC活性),但是保持FcRn结合能力。介导ADCC的主要细胞,NK细胞,仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI,Fc γ RII和Fc γ RIII。造血细胞上的FcR表达被概述于Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)第464页上的表3中。用于评估目的分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例被描述于美国专利号5,500,362(参见,例如,Hellstrom,I.等Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom,I.等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann,M.等,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))中。备选地,可以使用非放射性测定法(参见,例如,用于流式细胞术的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))。可用于此种测定的效应器细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。备选地,或另外地,可以在体内,例如在如Clynes等Proc.Nat'l Acad.Sci.USA95:652-656(1998)中所述的动物模型中评估目的分子的ADCC活性。也可以进行C1q结合测定以确认抗体不能结合C1q并且因此缺少CDC活性。参见,例如,W02006/029879和W02005/100402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,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg,M.S.等,Blood 101:1045-1052(2003);和Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood103:2738-2743(2004))。也可以使用本领域中已知的方法进行FcRn结合和体内清除/半衰期测定(参见,例如,Petkova,S.B.等,Int'l.Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0487] 具有减小的效应子功能的抗体包括具有Fc区残基238,265,269,270,297,327和329中的一个或多个的取代的抗体(美国专利号6,737,056)。此种Fc突变体包括在氨基酸位置265,269,270,297和327中的两个以上处具有取代的Fc突变体,包括所谓的残基265和297取代至丙氨酸的“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0488] 描述了具有增加的或减少的与FcR的结合的某些抗体变体。(参见,例如,美国专利号6,737,056;W0 2004/056312,和Shields等,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001)。)

[0489] 在某些实施方案中,抗体变体包含Fc区,所述Fc区具有一个或多个提高ADCC的氨基酸取代,例如,Fc区的位置298,333和/或334(残基的EU编号)处的取代。

[0490] 在一些实施方案中,在Fc区中进行改变,所述改变导致改变的(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,W0 99/

51642,和Idusogie等,J.Immunol.164:4178-4184(2000)中所述。

[0491] US2005/0014934A1 (Hinton等)中描述了这样的抗体,其具有增加的半衰期和增加的与负责将母体IgG转送至胎儿的新生儿Fc受体(FcRn)(J.Immunol.117:587(1976)和Kim等,J.Immunol.24:249(1994))的结合。所述抗体包含具有其中的一个或多个取代的Fc区,所述取代增加Fc区与FcRn的结合。此种Fc变体包括在以下一个或多个Fc区残基处具有取代的那些: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的取代(美国专利号7,371,826)。

[0492] 也参见,Duncan和Winter,Nature 322:738-40(1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;以及涉及Fc区变体的其他实例的W094/29351。

[0493] d. 半胱氨酸工程改造抗体变体

[0494] 在某些实施方案中,可能理想的是制备半胱氨酸工程改造抗体,例如,"thioMAb",其中抗体的一个或多个残基被取代成半胱氨酸残基。在特别的实施方案中,取代的残基出现在抗体的接入位点处。通过将所述残基取代成半胱氨酸,反应性硫醇基团由此被置于抗体的接入位点处并且可以用于将抗体缀合至其他部分,如药物部分或接头-药物部分,从而产生免疫缀合物,如本文中进一步所述。在某些实施方案中,以下残基中的任意一个或多个可以被取代成半胱氨酸:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。半胱氨酸工程改造抗体可以如例如美国专利号7,521,541中所述产生。

[0495] e. 抗体衍生物

[0496] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体可以被进一步修饰从而含有本领域中已知的并且可容易获得的另外的非蛋白部分。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-1,3-二氧杂环戊烷,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),和葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇,聚丙二醇均聚物,聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物,聚氧乙基化多元醇(例如,甘油),聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由于其在水中的稳定性而在制备中可以是有益的。聚合物可以具有任意分子量,并且可以是分支的或非分支的。与抗体相连的聚合物的数目可以变化,并且如果连接超过一个聚合物,其可以是相同或不同的分子。通常,由于衍生化的聚合物的数量和/或种类可以基于以下考虑确定,包括但不限于,要改善的抗体的具体性质或功能,抗体衍生物是否可用于限定条件下的治疗,等等。

[0497] 在另一个实施方案中,提供可以通过暴露于辐射而被选择性加热的抗体与非蛋白部分的缀合物。在一个实施方案中,非蛋白部分是碳纳米管(Kam等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:11600-11605(2005))。所述辐射可以具有任意波长,并且包括但不限于这样的波长,所述波长不损害正常细胞,但是将非蛋白部分加热至邻近抗体-非蛋白部分的细胞被杀死的温度。

[0498] B. 重组方法和组合物

[0499] 抗体可以使用重组方法和组合物制备,例如,如美国专利号4,816,567中所述。在一个实施方案中,提供分离的核酸,其编码本文中所述的抗-C1s抗体。此种核酸可以编码包含抗体VL的氨基酸序列和/或包含抗体VH的氨基酸序列(例如,抗体的轻链和/或重链)。在另一个实施方案中,提供一种或多种包含此种核酸的载体(例如,表达载体)。在另一个实施

方案中,提供包含此种核酸的宿主细胞。在一个这样的实施方案中,宿主细胞包含(例如,转化有):(1)载体,所述载体包含核酸,所述核酸编码包含抗体VL的氨基酸序列和包含抗体VH的氨基酸序列,或(2)包含编码包含抗体VL的氨基酸序列的核酸的第一载体,和包含编码包含抗体VH的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一个实施方案中,宿主细胞是真核的,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,提供制备抗-C1s抗体的方法,其中所述方法包括在适合于表达如上所述的抗体的条件下培养包含编码所述抗体的核酸的宿主细胞,和任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗体。

[0500] 为了重组制备抗-C1s抗体,将例如如上所述的编码抗体的核酸分离并插入到一种或多种载体中用于在宿主细胞中的进一步克隆和/或表达。此种核酸可以使用常规方法容易地分离并测序(例如,使用能够特异结合编码抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。

[0501] 适用于克隆或表达编码抗体的载体的宿主细胞包括本文中所述的原核或真核细胞。例如,抗体可以在细菌中制备,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。(还参见,Charlton,Methods in Molecular Biology,Vol.248(B.K.C.Lo,ed.,Humana Press,Totowa,NJ,2003),pp.245-254,其描述了在大肠杆菌中表达抗体片段)。在表达后,抗体可以从细菌细胞糊料分离到可溶级分中并且可以被进一步纯化。

[0502] 除了原核生物以外,真核微生物如丝状真菌或酵母对于编码抗体的载体来说也是合适的克隆或表达宿主,包括糖基化途径已被“人源化”从而导致产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体的真菌和酵母株系。参见Gerengross,Nat.Biotech.22:1409-1414(2004),和Li等,Nat.Biotech.24:210-215(2006)。

[0503] 适用于表达糖基化抗体的宿主细胞还来源于多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了多种杆状病毒株,其可以与昆虫细胞一起使用,特别是用于转染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞。

[0504] 植物细胞培养物也可以被用作宿主。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(其描述了用于在转基因植物中生产抗体的PLANTIBODIESTM技术)。

[0505] 脊椎动物细胞也可以被用作宿主。例如,适合于悬浮培养的哺乳动物细胞系可以是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例是SV40(COS-7)转化的猴肾CV1细胞系;人胚胎肾细胞系(293或如例如Graham等,J.Gen Virol.36:59(1977)中所述的293细胞);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠sertoli细胞(TM4细胞,如例如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);如例如Mather等,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)中所述的TRI细胞;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,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));和骨髓瘤细胞系如Y0,NS0和Sp2/0。对于适用于抗体生产的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见,例如,Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,Vol.248(B.K.C.Lo,ed.,Humana Press,Totowa,NJ),pp.255-268(2003)。

[0506] 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W0

2009/125825中所述。筛选方法可以包括在对特定抗原具有特异性的抗体群体中鉴定具有pH依赖性结合特征的抗体的任何方法。在某些实施方案中,筛选方法可包括在酸性pH和中性pH下测量初始抗体群体中单个抗体的一个或更多个结合参数(例如,KD或kd)。可以使用例如,表面等离子共振,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来测量抗体的结合参数。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比与抗原结合的抗体。或者,筛选方法可以包括以2或更大的酸性kd/中性kd比鉴定与抗原结合的抗体。

[0507] 在另一个实施方案中,诱变方法可包括在抗体的重链和/或轻链内掺入氨基酸的缺失,取代或添加,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更多个可变结构域内,例如在一个或更多个HVR(例如,CDR)内进行。例如,诱变可包括用另一种氨基酸取代抗体的一个或更多个HVR(例如,CDR)内的氨基酸。在某些实施方案中,诱变可包括用组氨酸取代抗体的至少一个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”是指抗体的突变形式比诱变之前抗体的原始“亲本”(即pH依赖性较小)形式表现出更大的酸性KD/中性KD比,或更大的酸性kd/中性kd比。在某些实施方案中,抗体的突变形式具有2或更大的酸性KD/中性KD比。或者,抗体的突变形式具有2或更大的酸性kd/中性kd比。

[0508] 优选地通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂来在动物中制备多克隆抗体。可能有用的是使用双功能或衍生化试剂,例如,马来酰亚胺基苯甲酸琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合),N-羟基琥珀酰亚胺基(通过赖氨酸残基),戊二醛,琥珀酸酐, SOCl_2 ,或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$,其中R和 R^1 是不同的烷基,将相关抗原与在要被免疫的物种中具有免疫原性的蛋白(例如,钥孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin),血清清蛋白,牛甲状腺球蛋白,或大豆胰蛋白酶抑制剂)缀合。

[0509] 通过将例如100 μg 或5 μg 蛋白或缀合物(分别对于兔或小鼠)与3体积的弗氏完全佐剂合并并将溶液在多个位点进行皮内注射,使动物(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,通过在多个位点处的皮下注射,用在弗氏完全佐剂中的1/5至1/10原有量的肽或缀合物对动物进行加强免疫。7至14天后,给动物放血并且测定血清的抗体效价。对动物进行加强免疫直至效价平台。优选地,用与不同蛋白缀合和/或通过不同的交联剂缀合的相同抗原的缀合物对动物进行加强免疫。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,聚集剂如明矾适用于增强免疫应答。

[0510] 单克隆抗体获得自基本上均质的抗体群体,即,构成所述群体的个体抗体除了可能少量存在的可能的天然存在的突变和/或翻译后修饰(例如,异构化,酰胺化)以外是相同的。因此,定语“单克隆”指示不作为分立的抗体的混合物的抗体特征。

[0511] 例如,单克隆抗体可以使用杂交瘤方法制备,所述方法首先由Kohler等,Nature 256(5517):495-497(1975)描述。在杂交瘤方法中,小鼠或其他合适的宿主动物(如仓鼠)被如上文所述那样免疫以引起产生或能够产生与用于免疫的蛋白特异性结合的抗体的淋巴细胞。备选地,淋巴细胞可以在体外被免疫。

[0512] 免疫试剂将典型地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),或如果需要非人哺乳动物来源,则使用脾细胞或淋巴结细胞。然后使用合适的融合试剂(如聚乙二醇)将淋巴细胞与永生的细胞系融合,从而形成杂交瘤

细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1986), pp. 59-103)。

[0513] 永生细胞系通常是转化的哺乳动物细胞,特别是啮齿类,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。将因此制备的杂交瘤细胞在合适的培养基中接种并培养,所述培养基优选地含有一种或多种抑制非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酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT或HPRT),则用于杂交瘤的培养基典型地将包含次黄嘌呤,氨基蝶呤和胸苷(HAT培养基),其是阻止HGPRT缺陷细胞生长的物质。

[0514] 优选的永生化骨髓瘤细胞是那些细胞,所述细胞有效融合,支持所选择的抗体生产细胞稳定高水平的生产抗体,并且对培养基如HAT培养基敏感。其中,优选的是鼠骨髓瘤细胞系,如来源于可获得自Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA的MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤的那些,和可获得自美国模式培养物保藏中心(American Type Culture Collection, Manassas, Virginia USA)的SP-2细胞(及其衍生物,例如,X63-Ag8-653)。人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤细胞系也被描述为用于生产人单克隆抗体(Kozbor等J Immunol. 133 (6): 3001-3005 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 51-63 (1987))。

[0515] 对于针对抗原的单克隆抗体的生产,测定培养杂交瘤细胞的培养基。优选地,由杂交瘤细胞生产的单克隆抗体的结合特异性通过免疫沉淀或通过体外结合测定,如放射性免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)来确定。此种技术和测定是本领域中已知的。例如,结合亲和力可以通过Munson, Anal. Biochem. 107 (1): 220-239 (1980)的Scatchard分析确定。

[0516] 在鉴定了产生具有所需特异性,亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,克隆可以通过有限稀释法被亚克隆并通过标准方法培养(Goding, 同上)。适用于此目的的培养基包括,例如,D-MEM或RPMI-1640培养基。此外,杂交瘤细胞可以作为肿瘤在哺乳动物中体内培养。

[0517] 通过常规免疫球蛋白纯化方法如,诸如,蛋白A-Sepharose,羟基磷灰石色谱,凝胶电泳,透析,或亲和色谱合适地将由亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基,腹水或血清分离。

[0518] C. 测定

[0519] 通过本领域已知的多种测定可以鉴定、筛选本文中提供的抗-C1s抗体或表征其物理/化学性质和/或生物学活性。

[0520] 1. 结合测定和其他测定

[0521] 在一个方面,例如,通过已知方法如ELISA,蛋白质印迹等来测试本发明的抗体的抗原结合活性。

[0522] 在另一个方面,竞争测定可以用于鉴定与本文中所述的任何抗-C1s抗体竞争结合C1s的抗体。在某些实施方案中,当此种竞争抗体过量存在时,其阻断(例如,减少)参考抗体与C1s的结合达至少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,此种竞争抗体结合由本文所述的任何抗-C1s抗体结合的相同表位(例如,线性或构象表位)。用于抗体结合的表位作图的详细的示例性方法提

供在Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols,”于Methods in Molecular Biology vol.66(Humana Press,Totowa,NJ)中。在某些实施方案中,此种竞争测定法可以在中性pH条件下进行。

[0523] 在示例性竞争测定中,将固定的C1s在溶液中孵育,所述溶液包含第一标记的抗体和第二未标记的抗体,所述第一标记的抗体结合C1s(例如,本文所述的那些之一),测试所述第二未标记的抗体与第一抗体竞争结合C1s的能力。第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照,将固定的C1s在包含第一标记的抗体但不包含第二未标记的抗体的溶液中孵育。在允许第一抗体与C1s结合的条件下孵育后,除去过量的未结合的抗体,并测量与固定的C1s结合的标记的量。如果相对于对照样品,在测试样品中,与固定的C1s结合的标记的量显著减少,则这指示第二抗体与第一抗体竞争结合C1s。参见,Harlow和Lane(1988),Antibodies:A Laboratory Manual ch.14(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。

[0524] 在另一方面,可以使用夹心测定法鉴定与本文提供的抗-C1s抗体结合相同表位或与本文提供的抗-C1s抗体竞争结合C1的抗体。夹心测定法涉及使用两种抗体,每种抗体均能结合待检测蛋白质的不同免疫原性部分,或表位。在夹心测定法中,测试样品分析物被固定在固体支持物上的第一抗体结合,然后第二抗体结合到分析物,从而形成不溶的三部分复合物。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(直接夹心测定法),或者可以使用用可检测部分标记的抗免疫球蛋白抗体进行测量(间接夹心测定法)。例如,夹心测定法的一种类型是ELISA测定,在这种情况下,可检测部分是酶。可确定与本文提供的抗-C1s抗体同时结合C1s的抗体是与抗-C1s抗体结合不同表位的抗体。因此,可以确定与本文提供的抗-C1s抗体不能同时结合C1s的抗体是与抗-C1s抗体结合相同表位或与抗-C1s抗体竞争结合C1s的抗体。

[0525] 2. 活性测定法

[0526] 在一方面,提供了用于鉴定具有生物活性的抗-C1s抗体的测定法。生物活性可包括阻断经典途径的活化和由所述途径的活化产生的切割产物C2a,C2b,C3a,C3b,C4a,C4b,C5a和C5b。还提供了在体内和/或体外具有此种生物学活性的抗体。

[0527] 在某些实施方案中,测试本发明的抗体的此种生物学活性。在一些实施方案中,可以评估本发明的抗体抑制已经被针对cRBC抗原的抗体敏化的鸡红细胞(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的活性。在一些实施方案中,可以评估本发明的抗体抑制活化的C1s介导的切割纯化的C4而不是C2的能力。通过凝胶电泳或蛋白质印迹法测量切割C4或C2的量来确定抗体的活性。与天然的未切割形式相比,已切割的C4或C2可以通过其较小的分子量来检测。

[0528] 3. 用于评估抗原(C1s)消除的小鼠PK研究

[0529] 在某些实施方案中,可以如下在体内(例如,在小鼠中)评估通过本发明的抗体加速抗原(例如,人C1s(也称为hC1s))的消除。

[0530] 通过高效液相色谱-电喷雾串联质谱法(LC/ESI-MS/MS)测量小鼠血浆中C1s浓度

[0531] 小鼠血浆中hC1s(或抗-C1s抗体)的浓度可通过LC/ESI-MS/MS测量。通过在小鼠血浆中以规定的量混合并稀释hC1s(或抗-C1s抗体)来制备校准标准品。将校准标准品和血浆

样品与例如尿素,二硫苏糖醇和碳酸氢铵中的溶菌酶(鸡蛋白)混合,并温育。然后,加入碘乙酰胺并在黑暗中温育。接下来,添加碳酸氢铵中的胰蛋白酶并温育。最后,加入三氟乙酸使任何残留的胰蛋白酶失活。通过LC/ESI-MS/MS对样品进行分析。通过选择的反应监测(SRM)监测人C1s特异性肽(例如,LLEVPEGR)。对于人类C1s,SRM跃迁可以是 $[M+2H]^2+$ (m/z 456.8至 y_6 离子 (m/z 686.4)。可以使用针对浓度绘制的峰面积,通过加权($1/x^2$)线性回归构建校正曲线。根据校准曲线计算小鼠血浆中的浓度。

[0532] 在小鼠中施用抗-C1s抗体后评估总hC1s的药代动力学

[0533] hC1s,hC1q或抗-C1s抗体的体内药代动力学可以在单独施用抗原或将抗-C1s抗体与抗原一起施用给小鼠后评估。将含有hC1s(等)的溶液/混合物静脉内注入小鼠体内。抗原溶液给药后,立即以相同方式将抗-C1s抗体溶液施用于同一个体。可以适当地设计剂量设定,以允许几乎所有的hC1s在循环中呈结合形式。随时间例如在注射后的5,30分钟,2,7小时,3,7,14,21和28天收集血液。立即将血液离心以分离血浆样品。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)分析估算。例如,计算出抗-C1s抗体的hC1s CL(清除)比率。如果该比率更高,这意味着可以进一步加速hC1s消除。

[0534] D.免疫缀合物

[0535] 本发明还提供免疫缀合物,所述免疫缀合物包含本文中的抗-C1s抗体,所述抗体缀合于一种或多种细胞毒性剂如化疗剂或药物,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。

[0536] 在一个实施方案中,免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中抗体缀合于一种或多种药物,包括但不限于美坦生类化合物(参见美国专利号5,208,020,5,416,064和欧洲专利EP 0 425 235 B1);auristatin如单甲基auristatin药物部分DE和DF(MMAE和MMAF)(参见美国专利号5,635,483和5,780,588,和7,498,298);多拉司他汀(dolastatin);加利车霉素(calicheamicin)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,Cancer Res.53:3336-3342(1993);和Lode等,Cancer Res.58:2925-2928(1998));蒽环类抗生素(anthracycline)如道诺霉素(daunomycin)或多柔比星(doxorubicin)(参见Kratz等,Current Med.Chem.13:477-523(2006);Jeffrey等,Bioorganic&Med.Chem.Letters 16:358-362(2006);Torgov等,Bioconj.Chem.16:717-721(2005);Nagy等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:829-834(2000);Dubowchik等,Bioorg.&Med.Chem.Letters 12:1529-1532(2002);King等,J.Med.Chem.45:4336-4343(2002);和美国专利号6,630,579);甲氨蝶呤(methotrexate);长春地辛(vindesine);紫杉烷(taxane)如多西他赛(docetaxel),紫杉醇(paclitaxel),拉罗他赛(larotaxel),替司他赛(tesetaxel)和奥他赛(ortataxel);新月毒素(trichothecene);和CC1065。

[0537] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包含本文中所述的抗体,所述抗体缀合于酶活性毒素或其片段,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(*Pseudomonas aeruginosa*)),蓖麻毒素A链,相思子毒素A链,莨菪根毒素A链, α -八叠球菌,油桐(*Aleurites fordii*)蛋白,石竹素(dianthin)蛋白,美洲商陆(*Phytolacca Americana*)蛋白(PAPI,PAPII和PAP-S),苦瓜(*Momordica charantia*)抑制

剂,麻风树毒蛋白,巴豆毒蛋白,肥皂草(*saponaria officinalis*)抑制剂,白树毒素,丝林霉素(mitogellin),局限曲菌素,酚霉素,依诺霉素,和单胞霉烯族毒素(tricothecene)。

[0538] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包含如本文中所述的抗体,所述抗体缀合于放射性原子从而形成放射性缀合物。多种放射性同位素可用于制备放射性缀合物。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,其可以包含放射性原子用于闪烁法研究,例如Tc-99m或 ^{123}I ,或自旋标记用于核磁共振(NMR)成像(也被称为磁共振成像,MRI),如碘-123(再一次),碘-131,铟-111,氟-19,碳-13,氮-15,氧-17,钆,锰或铁。

[0539] 抗体和细胞毒性剂的缀合物可以使用多种双功能蛋白偶联剂制备,所述偶联剂如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-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(SMCC),亚氨基硫烷盐酸盐(IT),亚胺基酯的双功能衍生物(如二甲基己二酸HCl),活性酯(如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯),醛(如戊二醛),二叠氮基化合物(如二(对叠氮基苯甲酰基)己二胺),二-重氮基衍生物(如二-(对重氮基苯甲酰基)-乙二胺),二异氰酸酯(如甲苯2,6-二异氰酸酯),和二-活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,蓖麻毒素免疫毒素可以如Vitetta等,Science 238:1098(1987)中所述制备。碳-14标记的1-异硫氰酰苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核素缀合至抗体的示例性螯合剂。参见W094/11026。接头可以是“可切割的接头”,其助力于细胞中细胞毒性药物的释放。例如,可以使用酸不稳定接头,肽酶敏感性接头,光不稳定接头,二甲基接头或含二硫键的接头(Chari等,Cancer Res.52:127-131(1992);美国专利号5,208,020)。

[0540] 本文中的免疫缀合物或ADC明确考虑,但不限于此种利用交联剂试剂制备的缀合物,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,硫代-EMCS,硫代-GMBS,硫代-KMUS,硫代-MBS,硫代-SIAB,硫代-SMCC和硫代-SMPB,和SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基苄基)苯甲酸酯),其是市售的(例如,来自Pierce Biotechnology,Inc.,Rockford,IL.,U.S.A)。

[0541] E. 用于诊断和检测的方法和组合物

[0542] 在某些实施方案中,本文中提供的任一抗-C1s抗体都可用于检测生物学样品中C1s的存在。如本文中使用的,术语“检测”包括定量检测或定性检测。在某些实施方案中,生物学样品包括细胞或组织,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,淋巴液,尿液,汗液,泪液,胃液,滑液,腹膜液,眼晶状体液或黏液。

[0543] 在一个实施方案中,提供用于诊断或检测方法的抗-C1s抗体。在另一个方面,提供检测C1s在生物学样品中存在的方法。在某些实施方案中,所述方法包括使生物学样品与如本文中所述的抗-C1s抗体在允许抗-C1s抗体结合C1s的条件下接触,并且检测在抗-C1s抗体和C1s之间是否形成复合物。此种方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中,将抗-C1s抗体用于选择适合于利用抗-C1s抗体治疗的受试者,例如,其中C1s是用于选择患者的生物标志物。

[0544] 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,阿尔茨海默氏病,肌萎缩性侧索硬化症,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,非典型溶血性尿毒综合征,自身免疫性疾病,Barraquer-Simons综合征,白塞病,英式淀粉样血管病,大疱性类天疱疮,伯格氏(Buerger)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,克雅氏(Creutzfeldt-Jakob)病,克罗恩氏病,冷球蛋白性血管炎,普吉氏痴呆(dementia pugilistica),路易氏体(DLB)痴呆,弥漫性神经纤维缠结伴钙化,盘状红斑狼疮,唐氏综合征,局灶性节段性肾小球硬化,形式思维障碍,额颞叶痴呆(FTD),与17号染色体相关的额颞叶痴呆伴帕金森症,额颞叶变性,Gerstmann-Straussler-Scheinker病,格林-巴利(Guillain-Barre)综合征,Hallervorden-Spatz病,溶血-尿毒症综合征,遗传性血管性水肿,低磷血症(hypophosphatasia),特发性肺炎综合征,免疫复合物病,包涵体肌炎,传染性疾病(例如,由细菌(例如脑膜炎奈瑟氏球菌或链球菌),病毒(例如,人免疫缺陷病毒(HIV)或其他传染因子引起的疾病),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),钼辅因子缺乏症(MoCD)A型,膜增生性肾小球肾炎(MPGN)I,膜增生性肾小球肾炎(MPGN)II(致密沉积物病),膜性肾炎,多发性梗死性痴呆,狼疮(例如,系统性红斑狼疮(SLE)),肾小球性肾炎,川崎氏(Kawasaki)病,多灶性运动神经病,多发性硬化症,多系统萎缩,重症肌无力,心肌梗死,强直性肌营养不良,视神经脊髓炎,C型尼曼-皮克(Niemann-Pick)病,非瓜马尼亚运动神经元疾病伴神经原纤维缠结,帕金森氏病,帕金森氏病伴痴呆,阵发性睡眠性血红蛋白尿,寻常型天疱疮,皮克氏病,脑炎后帕金森综合征(postencephalitic parkinsonism),多发性肌炎,肌蛋白脑淀粉样血管病,进行性皮层下神经胶质过多症,进行性核上性麻痹,牛皮癣,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,仅缠结性痴呆(Tangle only dementia),移植排斥,血管炎(例如,ANCA相关的血管炎),韦格纳氏(Wegner's)肉芽肿病,镰状细胞疾病,冷球蛋白血症,混合冷球蛋白血症,必要的混合冷球蛋白血症,II型混合冷球蛋白血症,III型混合冷球蛋白血症,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,低互补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。

[0545] 在某些实施方案中,提供标记的抗-C1s抗体。标记包括但不限于直接检测的标记或部分(如荧光,发色团,电子密度,化学发光,和放射性标记),以及间接检测的部分如酶或配体,例如,通过酶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(HRP),碱性磷酸酶, β -半乳糖苷酶,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,杂环氧化酶如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶,那些与利用过氧化氢的酶偶联以氧化染料前体如HRP,乳糖过氧化物酶,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,稳定的自由基等。

[0546] F. 药物制剂

[0547] 如本文中所述的抗-C1s抗体的药物制剂通过将具有所需程度的纯度的所述抗体与一种或多种任选的药用载体(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol, A.Ed.(1980))混合而被制备成冻干制剂或水溶液的形式。药用载体在使用的剂量和浓度下对于接受者通常是无毒性的,并且包括,但不限于:缓冲剂如磷酸盐,柠檬酸盐,和其他有机

酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚,丁基或苄基醇;烷基对羟苯甲酸酯如对羟苯甲酸甲酯或对羟苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基的)多肽;蛋白,如血清清蛋白,明胶,或免疫球蛋白;亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸,谷酰胺,天冬氨酸,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;螯合剂如EDTA;糖如蔗糖,甘露醇,海藻糖或山梨醇;成盐抗衡离子如钠;金属复合物(例如,Zn-蛋白复合物);和/或非离子表面活性剂如聚乙二醇(PEG)。本文中的示例性药用载体还包括间质药物分散剂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,如rHuPH20(HYLENEX(注册商标),Baxter International,Inc.)。某些示例性sHASEGP和使用方法,包括rHuPH20,被描述于美国公布号2005/0260186和2006/0104968中。在一个方面,将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶如软骨素酶组合。

[0548] 示例性冻干的抗体制剂被描述于美国专利号6,267,958中。含水抗体制剂包括美国专利号6,171,586和W0 2006/044908中描述的那些,后者的制剂包含组氨酸-乙酸缓冲液。

[0549] 当需要时,本文中的制剂还可以含有超过一种用于治疗的特定适应证的活性成分,优选地具有相互之间没有不利影响的互补活性的那些。例如,可能需要进一步提供用于联合疗法的制剂。此种活性成分合适地以对目的用途有效的量存在于组合中。

[0550] 活性成分可以被包封在例如通过凝聚技术或通过分别界面聚合例如羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊制备的微胶囊中,在胶体药物递送系统(例如,脂质体,清蛋白微球,微乳液,纳米粒和纳米胶囊)中或在粗乳液中。此种技术被公开在Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.Ed.(1980)中。

[0551] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适的实例包括含抗体的固体疏水聚合物的半渗透性基质,所述基质的形式为有形物品,例如,薄膜或微胶囊。

[0552] 可用于体内施用的制剂通常是无菌的。无菌可以例如通过经由无菌过滤膜过滤而容易地实现。

[0553] G. 治疗方法和组合物

[0554] 本文中提供的任一抗-C1s抗体都可以用于治疗方法中。

[0555] 在一个方面,提供用作药物的抗-C1s抗体。在另外的方面,提供用于治疗补体介导的疾病或病症的抗-C1s抗体。在某些实施方案中,提供用于治疗方法的抗-C1s抗体。在某些实施方案中,本发明提供抗-C1s抗体,其用于治疗患有补体介导的疾病或病症的个体的方法,所述方法包括向个体施用有效量的抗-C1s抗体。在一个这样的实施方案中,所述方法还包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂。

[0556] 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C1s抗体。在进一步的实施方案中,本发明的抗C1s抗体可以用于增强C1s从血浆中的清除。在进一步的实施方案中,本发明的抗-C1s抗体可用于增强C1q,C1r和C1s的复合物从血浆中的清除。在一些实施方案中,本发明的抗-C1s抗体可以用于抑制补体组分C4的切割,其中该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。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-C1s抗体。在某些实施方案中,本发明提供了用于增强从血浆中清除C1s的方法中的抗-C1s抗体。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-C1s抗体。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-C1s抗体,其中该抗体不抑制补体组分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的组分的方法中的抗C1s抗体;在某些情况下,经典补体途径组分是C1s。根据上述实施方案中的任何一个的“个人”优选地是人。

[0557] 在一个方面,本公开提供了一种调节补体活化的方法。在一些实施方案中,该方法抑制补体活化,例如减少C4b2a的产生。在一些实施方案中,本公开提供了在患有补体介导的疾病或病症的个体中调节补体活化的方法,该方法包括向该个体施用本公开的抗-C1s抗体或本公开的药物组合物,其中所述药物组合物包含本公开的抗-C1s抗体。在一些实施方案中,这样的方法抑制补体活化。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。施用可以通过本领域技术人员已知的任何途径进行,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的。在一些实施方案中,施用是鞘内的。

[0558] 补体介导的疾病或病症是以个体的细胞,组织或液体中补体C1s的异常量或补体C1s蛋白水解活性的异常水平为特征的病症。

[0559] 在一些情况下,补体介导的疾病或病症的特征在于,细胞,组织或液体中存在含量升高(高于正常水平)的C1s或水平升高的补体C1s活性。例如,在某些情况下,补体介导的疾病或病症的特征在于存在于脑组织和/或脑脊髓液中C1s的含量升高和/或活性升高。细胞,组织或液体中C1s的“高于正常”量表示细胞,组织或液体中C1s的量高于正常对照水平,例如高于同一年龄组的个人或人群的正常的对照水平。细胞,组织或液体中C1s活性的“高于正常水平”表示细胞,组织或液体中受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人或人群的正常的对照水平。在某些情况下,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更多种其他症状。

[0560] 在其他情况下,补体介导的疾病或病症的特征在于在细胞、组织或流体中存在低于正常量的C1s或存在较低水平的补体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在脑组织和/或脑脊髓液中存在较低量和/或较低活性的C1s。细胞、组织或流体中“低于正常”量的C1s表示细胞、组织或流体中C1s的量低于正常对照水平,例如低于同龄组的个体或人群的正常对照水平。细胞、组织或流体中“低于正常”水平的C1s活性表示细胞、组织或流体中受C1s影响的蛋白水解切割低于正常对照水平,例如低于同龄组的个体或人群的正常对照水平。在某些情况下,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其他症状。

[0561] 补体介导的疾病或病症是其中补体C1s的量或活性使得其在个体中引起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组成的组:自身免疫性疾病、癌症、血液疾病、感染性疾病、炎性疾病、局部缺血-再灌注损伤、神经退行性疾病、神经退行性病症、眼病、肾病、移植排斥、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疾病。在一些实施方案中,补体介导的疾病或病症是局部缺血-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退行性疾病或病症。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,补体介导的疾病是神经退行性病症。在一些实施方案中,补体介导的疾病或病症是 τ 蛋白病(tauopathy)。

[0562] 补体介导的疾病或病症的例子包括但不限于年龄相关性黄斑变性,阿尔茨海默氏病,肌萎缩性侧索硬化症,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,非典型溶血性尿毒综合征,自身免疫性疾病,Barraquer-Simons综合征,白塞病,英式淀粉样血管病,大疱性类天疱疮,伯格氏(Buerger)病,Clq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,克雅氏(Creutzfeldt-Jakob)病,克罗恩氏病,冷球蛋白性血管炎,普吉氏痴呆(dementia pugilistica),路易氏体(DLB)痴呆,弥漫性神经纤维缠结伴钙化,盘状红斑狼疮,唐氏综合症,局灶性节段性肾小球硬化,形式思维障碍,额颞叶痴呆(FTD),与17号染色体相关的额颞叶痴呆伴帕金森症,额颞叶变性,Gerstmann-Straussler-Scheinker病,格林-巴利(Guillain-Barre)综合征,Hallervorden-Spatz病,溶血-尿毒症综合征,遗传性血管性水肿,低磷血症(hypophosphatosis),特发性肺炎综合征,免疫复合物病,包涵体肌炎,传染性疾病(例如,由细菌(例如脑膜炎奈瑟氏球菌或链球菌),病毒(例如,人免疫缺陷病毒(HIV)或其他传染因子引起的疾病),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),钼辅因子缺乏症(MoCD) A型,膜增生性肾小球肾炎(MPGN) I,膜增生性肾小球肾炎(MPGN) II(致密沉积物病),膜性肾炎,多发性梗死性痴呆,狼疮(例如,系统性红斑狼疮(SLE)),肾小球性肾炎,川崎氏(Kawasaki)病,多灶性运动神经病,多发性硬化症,多系统萎缩,重症肌无力,心肌梗死,强直性肌营养不良,视神经脊髓炎,C型尼曼-皮克(Niemann-Pick)病,非瓜马尼亚运动神经元疾病伴神经原纤维缠结,帕金森氏病,帕金森氏病伴痴呆,阵发性睡眠性血红蛋白尿,寻常型天疱疮,皮克氏病,脑炎后帕金森综合征(postencephalitic parkinsonism),多发性肌炎,朊蛋白脑淀粉样血管病,进行性皮层下神经胶质过多症,进行性核上性麻痹,牛皮癣,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,仅缠结性痴呆(Tangle only dementia),移植排斥,血管炎(例如,ANCA相关的血管炎),韦格纳氏(Wegner's)肉芽肿病,镰状细胞疾病,冷球蛋白血症,混合冷球蛋白血症,必要的混合冷球蛋白血症,II型混合冷球蛋白血症,III型混合冷球蛋白血症,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,低互补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。

[0563] 阿尔茨海默氏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号染色体相关的额颞叶痴呆伴帕金森症)是 τ 蛋白病的最常见形式。与此相应地,本发明涉及如上文所述的任何方法,其中所述 τ 蛋白病是阿尔茨海默氏病、皮克氏病、散发性额颞叶痴呆和与17号染色体相关的额颞叶痴呆伴帕金森症。其它 τ 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(CBD)和亚急性硬化性全脑炎。

[0564] 神经退化性 τ 蛋白病包括阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化/帕金森症-痴呆复合症、嗜银颗粒痴呆、英国型淀粉样血管病、脑淀粉样血管病、皮质基底节变性、克雅氏病、拳击员痴呆、伴有钙化的弥漫性神经原纤维缠结、唐氏综合征、额颞叶痴呆、与17号染色体相关的额颞叶痴呆伴帕金森症、额颞叶变性、Gerstmann-Straussler-Scheinker病、哈勒沃登-斯帕茨病、包涵体肌炎、多系统萎缩、强直性肌营养不良、C型尼曼-皮克病、伴有神经纤维缠结的非关岛运动神经元疾病、皮克氏病、脑炎后帕金森症、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、进行性皮质下胶质增生、进行性核上性麻痹、亚急性硬化性全脑炎、仅缠结型痴呆、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。

[0565] 本公开也提供治疗突触核蛋白病例如帕金森氏病(PD);路易体痴呆(DLB);多系统萎缩(MSA)等的方法。例如,伴有痴呆的PD(PDD)可用本公开的方法治疗。

[0566] 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氏病。在一些实施方案中,补体介导的疾病或病症包括帕金森氏病。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。

[0567] 在一些实施方案中,本公开的抗C1s抗体防止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,本公开的抗C1s抗体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自身免疫疾病、癌症、血液学疾病、感染性疾病、炎症性疾病、局部缺血-再灌注损伤、神经退化性疾病、神经退化性病症、肾脏疾病、移植排斥、眼部疾病、血管疾病或血管炎病症相关的症状。症状可以是神经学症状,例如,认知功能受损、记忆损伤、运动功能丧失等。症状也可以是个体的细胞、组织或流体中的C1s蛋白活性。症状也可以是个体的细胞、组织或流体中的补体激活的程度。

[0568] 在一些实施方案中,向个体施用本公开的抗C1s抗体调节个体的细胞、组织或流体中的补体活化。在一些实施方案中,向个体施用本公开的抗C1s抗体可抑制个体的细胞、组织或流体中的补体活化。例如,在一些实施方案中,当本公开的抗C1s抗体以一次或多次剂量以单一疗法或组合疗法形式施用至患有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗C1s抗体治疗前的个体中的补体活性相比,将所述个体中的补体活化抑制至少约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90%以上。

[0569] 在一些实施方案中,本公开的抗C1s抗体降低C3在红细胞上的沉积;例如,在一些实施方案中,本公开的抗C1s抗体降低C3b、iC3b等在RBC上的沉积。在一些实施方案中,本公开的抗C1s抗体抑制补体介导的红细胞裂解。

[0570] 在一些实施方案中,本公开的抗C1s抗体减少C3在血小板上的沉积;例如,在一些实施方案中,本公开的抗C1s抗体减少C3b、iC3b等在血小板上的沉积。

[0571] 在一些实施方案中,施用本公开的抗C1s抗体导致选自以下组成的组的结果:
(a) 补体激活的降低;(b) 认知功能的提高;(c) 神经元损失的减少;(d) 神经元中的磷酸化Tau蛋白水平的降低;(e) 神经胶质细胞活化的降低;(f) 淋巴细胞浸润的减少;(g) 巨噬细胞浸润的减少;(h) 抗体沉积的减少;(i) 神经胶质细胞损失的减少;(j) 少突胶质细胞损失的减少;(k) 树突状细胞浸润的减少;(l) 嗜中性粒细胞浸润的减少;(m) 血红细胞裂解的减少;(n) 血红细胞吞噬作用的降低;(o) 血小板吞噬作用的降低;(p) 血小板裂解的减少;(q) 移植存活率的提高;(r) 巨噬细胞介导的吞噬作用的降低;(s) 视力的改善;(t) 运动控制的改

善；(u) 血栓形成的改善；(v) 凝血的改善；(w) 肾功能的改善；(x) 抗体介导的补体激活的减少；(y) 自身抗体介导的补体激活的减少；(z) 贫血的改善；(aa) 脱髓鞘的减少；(ab) 嗜酸粒细胞增多的降低；(ac) C3在红细胞上的沉积减少(例如，C3b、iC3b等在红细胞上的沉积减少)；(ad) C3在血小板上的沉积减少(例如，减少C3b、iC3b等在血小板上的沉积)；(ae) 过敏毒素的产生减少；(af) 自身抗体介导的水疱形成的减少；(ag) 自身抗体诱发的瘙痒的减少；(ah) 自身抗体诱发的红斑狼疮的减少；(ai) 自身抗体介导的皮肤糜烂的减少；(aj) 由于输液反应所致的血红细胞破坏的减少；(ak) 由于同种抗体所致的血红细胞裂解的减少；(al) 由于输液反应所致的溶血的减少；(am) 同种抗体介导的血小板裂解的减少；(an) 由于输液反应所致的血小板裂解的减少；(ao) 肥大细胞活化的降低；(ap) 肥大细胞组胺释放的减少；(aq) 血管通透性降低；(ar) 水肿减轻；(as) 补体在移植物内皮上的沉积的减少；(at) 过敏毒素在移植物血管内皮中的产生的减少；(au) 真皮-表皮连接的分离的降低；(av) 真皮-表皮连接处过敏毒素的产生减少；(aw) 移植血管内皮中同种抗体介导的补体活化减少；(ax) 抗体介导的神经肌肉接头的损失减少；(ay) 神经肌肉接头处补体活化的减少；(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的减少；(bb) 麻痹减少；(be) 麻木减少；(bd) 增强的膀胱控制；(be) 增强的肠道控制；(bf) 与自身抗体有关的死亡率降低；(bg) 与自身抗体相关的发病率降低。

[0572] 在一些实施方案中，当本公开的抗C1s抗体以一次或多次剂量以单一疗法或组合疗法形式施用至具有补体介导的疾病或病症的个体时，与用抗C1s抗体治疗前的个体中的结果的水平或程度相比，能够实现以下结果中的一种或多种的至少约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90%以上的降低：(a) 补体激活；(b) 认知功能下降；(c) 神经元损失；(d) 神经元中的磷酸化Tau水平；(e) 神经胶质细胞活化；(f) 淋巴细胞浸润；(g) 巨噬细胞浸润；(h) 抗体沉积；(i) 神经胶质细胞损失；(j) 少突胶质细胞损失；(k) 树突状细胞浸润；(l) 嗜中性粒细胞浸润；(m) 血红细胞裂解；(n) 血红细胞吞噬作用；(o) 血小板吞噬作用；(p) 血小板裂解；(q) 移植物排斥；(r) 巨噬细胞介导的吞噬作用；(s) 视力损失；(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。

[0573] 在一些实施方案中，当本公开抗C1s抗体以一次或多次剂量以单一疗法或组合疗法形式施用至具有补体介导的疾病或病症的个体时，与用抗C1s抗体治疗前的个体中的结果的水平或程度相比，能够实现以下结果中的一种或多种的至少约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90%以上的改善：a) 认知功能；b) 移植物存活率；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(血红细胞计数)。

[0574] 在一些实施方案中，向个体施用本公开的抗C1s抗体降低所述个体中的补体激活。例如，在一些实施方案中，当本公开的抗C1s抗体以一次或多次剂量以单一疗法或组合疗法形式施用至具有补体介导的疾病或病症的个体时，与用抗C1s抗体治疗前的个体中的补体活化相比，将所述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90%以上。

[0575] 在一些实施方案中，施用本公开的抗C1s抗体提高所述个体中的认知功能。例如，

在一些实施方案中,当本公开的抗C1s抗体以一次或多次剂量以单一疗法或组合疗法形式施用至具有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗C1s抗体治疗前的个体中的认知功能相比,将所述个体中的认知功能提高至少约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90%以上。

[0576] 在一些实施方案中,施用本公开的抗C1s抗体降低所述个体中的认知功能下降速率。例如,在一些实施方案中,当本公开的抗C1s抗体以一次或多次剂量以单一疗法或组合疗法形式施用至患有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗C1s抗体治疗前的个体中的认知功能下降速率相比,将所述个体中的认知功能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90%以上。

[0577] 在一些实施方案中,向个体施用本公开的抗C1s抗体降低所述个体中的神经元损失。例如,在一些实施方案中,当本公开的抗C1s抗体以一次或多次剂量以单一疗法或组合疗法形式施用至患有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗C1s抗体治疗前的个体中的神经元损失相比,将所述个体中的神经元损失降低至少约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90%以上。

[0578] 在一些实施方案中,向个体施用本公开的抗C1s抗体降低所述个体中的磷酸化Tau水平。例如,在一些实施方案中,当本公开的抗C1s抗体以一次或多次剂量以单一疗法或组合疗法形式施用至患有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗C1s抗体治疗前的个体中的磷酸化Tau水平相比,将所述个体中的磷酸化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90%以上。

[0579] 在一些实施方案中,向个体施用本公开的抗C1s抗体降低所述个体中的神经胶质细胞活化。例如,在一些实施方案中,当本公开的抗C1s抗体以一次或多次剂量以单一疗法或组合疗法形式施用至患有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗C1s抗体治疗前的个体中的神经胶质细胞活化相比,将所述个体中的神经胶质细胞活化降低至少约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90%以上。在一些实施方案中,所述神经胶质细胞是星形细胞或小胶质细胞。

[0580] 在一些实施方案中,向个体施用本公开的抗C1s抗体减少所述个体中的淋巴细胞浸润。例如,在一些实施方案中,当本公开的抗C1s抗体以一次或多次剂量以单一疗法或组合疗法形式施用至患有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗C1s抗体治疗前的个体中的淋巴细胞浸润相比,将所述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90%以上。

[0581] 在一些实施方案中,向个体施用本公开的抗C1s抗体减少所述个体中的巨噬细胞浸润。例如,在一些实施方案中,当本公开的抗C1s抗体以一次或多次剂量以单一疗法或组合疗法形式施用至患有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗C1s抗体治疗前的个体中

的巨噬细胞浸润相比,将所述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90%以上。

[0582] 在一些实施方案中,向个体施用本公开的抗C1s抗体减少所述个体中的抗体沉积。例如,在一些实施方案中,当本公开的抗C1s抗体以一次或多次剂量以单一疗法或组合疗法形式施用至患有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗C1s抗体治疗前的个体中的抗体沉积相比,将所述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90%以上。

[0583] 在一些实施方案中,向个体施用本公开的抗C1s抗体减少个体中的过敏毒素(例如,C3a、C4a、C5a)产生。例如,在一些实施方案中,当本公开的抗C1s抗体以一种或多种剂量作为单一疗法或组合疗法施用至患有补体介导的疾病或病症的个体时,与用抗C1s抗体治疗前的个体中的过敏毒素产生相比,将所述个体中的过敏毒素产生减少至少约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90%以上。

[0584] 本公开提供本公开的抗C1s抗体或包含本公开的抗C1s抗体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物在治疗具有补体介导的疾病或病症的个体中的用途。在一些实施方案中,本公开提供本公开的抗C1s抗体在治疗具有补体介导的疾病或病症的个体中的用途。在一些实施方案中,本公开提供包含本公开的抗C1s抗体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物在治疗具有补体介导的疾病或病症的个体中的用途。

[0585] 在一些实施方案中,本公开提供本公开的抗C1s抗体在制造用于治疗具有补体介导的疾病或病症的个体的药物中的用途。

[0586] 在一些实施方案中,本公开提供本公开的抗C1s抗体或包含本公开的抗C1s抗体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物在抑制补体活化中的用途。在一些实施方案中,本公开提供本公开的抗C1s抗体或包含本公开的抗C1s抗体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物在抑制具有补体介导的疾病或病症的个体中的补体活化中的用途。在一些实施方案中,本公开提供本公开的抗C1s抗体在抑制具有补体介导的疾病或病症的个体中的补体活化中的用途。在一些实施方案中,本公开提供包含本公开的抗C1s抗体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物在抑制具有补体介导的疾病或病症的个体中的补体活化中的用途。

[0587] 在一些实施方案中,本公开提供本公开的抗C1s抗体在制造用于调控补体活化的药物中的用途。在一些实施方案中,所述药物抑制补体活化。在一些实施方案中,所述药物抑制具有补体介导的疾病或病症的个体中的补体活化。

[0588] 在一些实施方案中,本公开提供用于医学治疗中的本公开的抗C1s抗体或包含本公开的抗C1s抗体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,本公开提供用于医学治疗中的本公开的抗C1s抗体。在一些实施方案中,本公开提供用于医学治疗中的包含本公开的抗C1s抗体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0589] 在一些实施方案中,本公开提供用于治疗具有补体介导的疾病或病症的个体的本公开的抗C1s抗体或包含本公开的抗C1s抗体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,本公开提供用于治疗具有补体介导的疾病或病症的个体的本公开的抗C1s

抗体。在一些实施方案中,本公开提供用于治疗具有补体介导的疾病或病症的个体的包含本公开的抗C1s抗体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0590] 在一些实施方案中,本公开提供用于调节补体活化的本公开的抗C1s抗体或包含本公开的抗C1s抗体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,本公开提供用于调节补体活化的本公开的抗C1s抗体。在一些实施方案中,本公开提供用于调节补体活化的包含本公开的抗C1s抗体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,所述抗C1s抗体抑制补体活化。

[0591] 在另一个方面,本发明提供抗-C1抗体在生产或制备药物中的用途。在一个实施方案中,所述药物用于治疗补体介导的疾病或病症。在另一个实施方案中,所述药物用于治疗补体介导的疾病或病症的方法,所述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。在一个这样的实施方案中,所述方法还包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如如下所述的治疗剂。在另一个实施方案中,所述药物用于增强C1s从血浆中的清除(或除去)。在另一个实施方案中,所述药物用于增强C1q、C1r和C1s复合物从血浆中的清除(或除去)。在另一个实施方案中,所述药物用于抑制补体组分C4的裂解,其中抗体不抑制补体组分C2的裂解。在另一个实施方案中,所述药物用于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。

[0592] 在另一个实施方案中,所述药物用于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所述药物。根据任一以上实施方案的“个体”可以是人。

[0593] 在另一个方面,本发明提供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,所述方法包括向患有所述补体介导的疾病或病症的个体施用有效量的抗-C1s抗体。在一个这样的实施方案中,所述方法还包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,如下述。根据任一以上实施方案的“个体”可以是人。

[0594] 在另一方面,本发明提供了一种用于增强C1s从个体的血浆中的清除(或去除)的方法。在另一方面,本发明提供了一种增强C1q、C1r和C1s的复合物从个体的血浆中的清除(或去除)的方法。在一些实施方案中,本发明的抗C1s抗体提供了抑制补体组分C4的裂解的方法,其中该抗体不抑制个体中补体组分C2的裂解。在某些情况下,本发明提供了一种抑制个体中经典补体途径组分的方法;在某些情况下,经典补体途径组分是C1s。在一个实施方案中,“个体”是人。

[0595] 在另一个方面,本发明提供例如用于任一上述治疗方法的包含本文中提供的任一抗-C1s抗体的药物制剂。在一个实施方案中,所述药物制剂包含本文中提供的任一抗-C1s抗体和药用载体。在另一个实施方案中,所述药物制剂包含本文中提供的任一抗-C1s抗体和至少一种另外的治疗剂,例如如下所述的治疗剂。

[0596] 本发明的抗体可以单独地用于治疗或与其他试剂组合地用于治疗。例如,本发明的抗体可以与至少一种另外的治疗剂共同施用。

[0597] 上述的此种组合治疗包括组合施用(其中两种以上治疗剂被包含在同一或分开的制剂中)和分开施用,在此种情况中,本发明的抗体的施用可以发生在另外的治疗剂或试剂的施用之前,同时,和/或之后。在一个实施方案中,抗-C1s抗体的施用和另外的治疗剂的施用彼此发生在约一个月以内,或在约一周,两周或三周以内,或在约一天,两天,三天,四天,

五天或六天以内。本发明的抗体还可以与放射疗法组合使用。

[0598] 本发明的抗体(以及任意另外的治疗剂)可以通过任何合适的手段施用,包括肠胃外施用,肺内施用,和鼻内施用,以及,如果局部治疗需要,病变内施用。肠胃外输注包括肌肉内施用,静脉内施用,动脉内施用,腹膜内施用,或皮下施用。用药可以是任何合适的途径,例如,通过注射,如静脉内或皮下注射,这部分取决于施用是短暂的还是长期的。本文中考虑多种用药方案,包括但不限于单次施用或在多个时间点的多次施用,推注施用,和脉冲注入。

[0599] 本发明的抗体可以与良好医学实践一致的方式配制,用药和施用。本文中考虑的因素包括治疗的具体疾病,治疗的具体哺乳动物,个体患者的临床状况,病因,药剂递送位点,给药方法,给药时间安排,以及医疗从业者已知的其他因素。所述抗体不需要,但任选地,与目前用于预防或治疗目标疾病的一种或多种药剂配制在一起。此种其他药剂的有效量取决于制剂中存在的抗体的量,疾病或治疗的类型,以及以上讨论的其他因素。这些通常以与本文中所述相同的剂量和给药途径使用,或为本文中所述剂量的约1至99%,或以经验/临床确定为合适的任何剂量和任何途径。

[0600] 为了预防或治疗疾病,本发明的抗体的适当剂量(当单独使用或与一种或多种其他另外的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗的疾病的类型,抗体的类型,疾病的严重度和病程,抗体的施用是为了预防目的还是为了治疗目的,之前的治疗,患者的临床史和对抗体的反应,以及主治医生的判断。抗体被合适地一次性或在一系列治疗中施用于患者。根据疾病的类型和严重度,约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $15\text{mg}/\text{kg}$ (例如, $0.1\text{mg}/\text{kg}$ - $10\text{mg}/\text{kg}$)的抗体可以是用于施用至患者的初始候选剂量,不论是,例如,通过一次或多次分开的施用,还是通过连续注入。一个典型的日剂量可以为约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 以上,这取决于以上提及的因素。对于在若干天或更长的时间内的重复施用,根据条件,通常可以持续治疗直至出现所需的疾病症状的阻抑。抗体的一个示例性剂量为约 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ 至约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 。因此,可以将一个或多个剂量,约 $0.5\text{mg}/\text{kg}$, $2.0\text{mg}/\text{kg}$, $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 或 $10\text{mg}/\text{kg}$ (或其任意组合)施用于患者。此种剂量可以间歇施用,例如,每周一次或每三周一次(例如,使得患者接受约两个至约二十个,或例如,约六个剂量的抗体)。可以施用初始较高的加载剂量,继之以一个或多个较低的剂量。然而,其他剂量方案可能是有用的。该治疗过程可以容易地通过常规技术和测定监测。

[0601] 要理解的是,任何上述制剂或治疗方法都可以使用本发明的免疫缀合物(以代替抗-C1s抗体或除了抗-C1s抗体以外)进行。

[0602] H. 制品

[0603] 在本发明的另一个方面,提供制品,其包含可用于治疗、预防和/或诊断上述疾病的材料。所述制品包含容器和容器上的标签或与容器结合的包装插页。合适的容器包括,例如,瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。所述容器可以由多种材料(如玻璃或塑料)制成。所述容器盛装组合物,所述组合物是单独的或与对于治疗,预防和/或诊断病症有效的另一种组合物组合,并且所述容器可以具有无菌接入端口(例如所述容器可以是具有可被皮下注射针刺破的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)。组合物中的至少一种活性成分是本发明的抗体。标记或包装插页指示组合物用于治疗所选的病症。此外,所述制品可以包含(a)其中盛装有组合物的第一容器,其中所述组合物包含本发明的抗体;和(b)其中盛装有组合物的第二容器,其中所述组合物还包含细胞毒性或其他治疗剂。本发明的该实施方案中的制品还可以

包含包装插页,所述包装插页指示组合物可以用于治疗特定病症。备选地,或另外地,所述制品还可以包含第二(或第三)容器,所述容器包含药用缓冲液,如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸缓冲盐水、林格溶液和右旋糖溶液。其还可以包含商业或用户需要的其他材料,包括其他缓冲液、稀释液、填料、针和注射器。

[0604] 要理解的是,任何上述制品都可以包括本发明的免疫缀合物以替代抗-C1s抗体,或者除了抗-C1s抗体以外,任何上述制品还可以包括本发明的免疫缀合物。

[0605] III. 实施例

[0606] 以下是本发明的方法和组合物的实施例。要理解的是,已知以上提供的一般性描述,可以实施多种其他实施方案。

[0607] 虽然为了清楚理解通过例示和实施例描述了上述发明的一些细节,但是说明书和实施例不应被视为限制本发明的范围。本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容通过引用整体明确地结合。

[0608] 实施例1:人C1s的表达和纯化

[0609] 使用FreeStyle293-F细胞系(Thermo Fisher,Carlsbad,CA,USA)瞬时表达在C末端带有Flag标记的重组人C1s(SEQ ID NO:1)(hC1s-Flag)。将表达人重组hC1s-Flag的条件培养基施加到填充抗Flag M2亲和树脂(Sigma)的柱子上,并用Flag肽(Sigma)洗脱。收集含有hC1s-Flag的部分,然后将其置于Superdex 200凝胶过滤柱(GE Healthcare Uppsala, Sweden)上。然后合并含有hC1s-Flag的部分,浓缩,并在-80℃(C)下保存。

[0610] 使用FreeStyle293-F细胞系(Thermo Fisher,Carlsbad,CA,USA)瞬时表达带有羧基末端8x组氨酸标签(hC1s-His)的重组C1s(SEQ ID NO:1)。将含有hC1s-His的条件培养基施加到HisTrap excel柱(GE Healthcare,Uppsala,Sweden)上,并用咪唑洗脱。合并含有hC1s-His的部分,并将其加到Superdex 200凝胶过滤柱(GE Healthcare,Uppsala, Sweden)。合并含有hC1s-His的部分,浓缩,并保存在-80℃。

[0611] 实施例2:抗C1s抗体的制备

[0612] GenScript Inc.合成了抗C1s抗体的重链和轻链可变区的多核苷酸,IPN009VH2(SEQ ID NO:13)和IPN009VK3(SEQ ID NO:14)(如W02016164358中所述)。重链和轻链可变区被克隆到分别包含重链恒定区SG4GK(SEQ ID NO:15)和轻链恒定区SK1(SEQ ID NO:16)的表达载体中。根据制造商的说明,使用FreeStyle FS293-F细胞和293fectin(Life technologies)瞬时表达抗C1s抗体C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN009VK3-SK1(IPN009VH2/IPN009VK3)。重组抗体用蛋白A(GE Healthcare)纯化,并在D-PBS,Tris缓冲盐溶液(TBS)或His缓冲液(20mM组氨酸,150mM NaCl,pH 6.0)中洗脱。如果需要,进一步进行大小排阻层析以除去高分子量和/或低分子量组分。

[0613] 针对IPN009VH2/IPN009VK3的FR中的CDR和某些位置进行组氨酸扫描。表2中显示了变体中的突变位置(上部、第四和第六列)。表3-1至表6也是如此。根据制造商的说明,使用In-Fusion HD克隆试剂盒(Clontech Inc.或Takara Bio Company)将每个氨基酸分别突变为组氨酸。通过上述方法瞬时表达和纯化所有变体。使用Biacore T200仪器(GE Healthcare)在37℃下测定pH 7.4和pH 5.8下每个组氨酸取代的变体的结合亲和力。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通池上。在7(+)缓冲液(20mM ACES,150mM NaCl,1.2mM CaCl₂,0.05%Tween 20,0.005%NaN₃,

pH 7.4), 5 (+) 缓冲液 (20mM ACES, 150mM NaCl, 1.2mM CaCl_2 , 0.05% Tween 20, 0.005% NaN_3 , pH 5.8) 或 5 (-) 缓冲液 (20mM ACES, 150mM NaCl, 3mM CaCl_2 , 0.05% Tween 20, 0.005% NaN_3 , pH 5.8) 中制备抗体和分析物。每种抗体被蛋白 A/G 捕获到传感器表面。抗体捕获水平的目标是 200 个共振单位 (RU)。实施例 1 中制备的血清来源的人 C1s (CompTech) 或重组 C1s 以 50nM 注入, 然后解离。在每个循环中, 用 10mM 甘氨酸-HCl (pH 1.5) 再生传感器表面。通过使用 Biacore T200 评估软件 2.0 版 (GE Healthcare) 处理数据并将其拟合为 1:1 结合模型来确定结合亲和力。与 7 (+) 缓冲液中的 KD (“KD 7.4+”) 相比, 几个单组氨酸取代显示 5 (+) 缓冲液 (“KD 5.8+”) 和/或 5 (-) 缓冲液 (“KD 5.8-”) 中的 KD 更大。计算出 KD 5.8+ 与 KD 7.4+ 的比例 (“KD 5+/7+”) 和 KD 5.8- 与 KD 7.4+ 的比例 (“KD 5-/7+”)。当变体的 KD 5+/7+ 或 KD 5-/7+ 大于亲本抗体 IPN009VH2-SG4GK/IPN009VK3-SK1 的 KD 5+/7+ 或 KD 5-/7+ 时, 则认为该变体分别依赖于 “pH” 或 “pH 和 Ca”。当变体在 5 (+) 缓冲液和/或 5 (-) 缓冲液中的结合反应远低于 IPN009VH2/IPN009VK3 的结合反应时, 该变体也被视为依赖于 “pH” 或 “pH 和 Ca”。因此, 这样的突变可以有效地产生 “pH” 和/或 “pH 和 Ca” 依赖性抗体。Biacore 测定的结果示于表 2。当结合反应远低于 IPN009VH2/IPN009VK3 的结合反应时, 表中显示 “低”。为了进一步增强 “pH” 和/或 “pH 和 Ca” 依赖性, 进行了组氨酸突变的组合。通过上述方法, 使用 Biacore 评价具有组氨酸突变组合的抗体。Biacore 测定的结果示于表 3-1 和 3-2。与 IPN009VH2/IPN009VK3 相比, 许多变体显示出更好的 “pH” 和 “pH 和 Ca” 依赖性。

[0614] [表 2]

[0615]

| 抗体名称 | 缩写 | VH的名称 | IPN009VH2 的VH中的 突变 | VL的名称 | IPN009VK3 的VL中的 突变 | Kon 7.4+ | koff 7.4+ | KD 7.4+ | 结合反 应 7. 4+ |
|-----------------------------------|----------------------|------------|--------------------------|------------|--------------------------|----------|-----------|----------|----------------|
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN009VK3-SK1 | IPN009VH2/IPN009VK3 | IPN009VH2 | - | IPN009VK3 | - | 3.62E+05 | 2.98E-04 | 8.24E-10 | |
| C1_IPN92H0026-SG4GK/IPN009VK3-SK1 | IPN92H0026/IPN009VK3 | IPN92H0026 | G65H | IPN009VK3 | - | 4.30E+05 | 2.36E-04 | 5.49E-10 | |
| C1_IPN92H0033-SG4GK/IPN009VK3-SK1 | IPN92H0033/IPN009VK3 | IPN92H0033 | Y99H | IPN009VK3 | - | 3.28E+05 | 2.60E-04 | 7.90E-10 | |
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN93L0021-SK1 | IPN009VH2/IPN93L0021 | IPN009VH2 | - | IPN93L0021 | Y92H | 3.35E+05 | 8.98E-04 | 2.68E-09 | |
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN93L0023-SK1 | IPN009VH2/IPN93L0023 | IPN009VH2 | - | IPN93L0023 | L94H | 3.32E+05 | 7.25E-04 | 2.18E-09 | |
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN009VH2/IPN93L0024 | IPN009VH2 | - | IPN93L0024 | P95H | 2.33E+05 | 5.74E-04 | 2.46E-09 | |

[0616] [表3-1]

| 抗体名称 | Kon 5.8+ | koff 5.8+ | KD 5.8+ | 结合反 应 5. 8+ | Kon 5.8- | koff 5.8- | KD 5.8- | 结合反 应 5. 8- | KD 5+/7+ | KD 5-7+ |
|-----------------------------------|----------|-----------|----------|----------------|----------|-----------|----------|----------------|----------|---------|
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN009VK3-SK1 | 6.62E+05 | 1.08E-04 | 1.64E-10 | | 6.06E+05 | 2.04E-03 | 3.37E-09 | | 0.2 | 4.1 |
| C1_IPN92H0026-SG4GK/IPN009VK3-SK1 | 7.29E+05 | 1.62E-04 | 2.22E-10 | | 6.65E+05 | 1.71E-03 | 2.58E-09 | | 0.4 | 4.7 |
| C1_IPN92H0033-SG4GK/IPN009VK3-SK1 | 7.22E+05 | 3.72E-04 | 5.15E-10 | | 6.04E+05 | 6.35E-03 | 9.57E-09 | | 0.7 | 12.1 |
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN93L0021-SK1 | 6.32E+05 | 2.03E-03 | 3.21E-09 | | 1.20E+10 | 1.14E+02 | 9.54E-09 | | 1.2 | 3.6 |
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN93L0023-SK1 | 7.16E+05 | 1.31E-03 | 1.83E-09 | | 6.67E+06 | 9.20E-02 | 1.38E-08 | | 0.8 | 6.3 |
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | 3.84E+05 | 1.49E-03 | 3.87E-09 | | 5.92E+06 | 1.32E-01 | 2.23E-08 | | 1.6 | 9.1 |

[0617]

| 抗体名称 | 缩写 | VH的名称 | IPN009VH2的 VH中的突变 | VL的名称 | IPN009VK3 的VL中的突变 | Kon (7.4+) | koff (7.4+) | KD (7.4+) | 结合反应 (7.4+) |
|------------------------------------|-----------------------|------------|----------------------|------------|----------------------|------------|-------------|-----------|----------------|
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN009VK3-SK1 | IPN009VH2/IPN009VK3 | IPN009VH2 | - | IPN009VK3 | - | 3.62E+05 | 2.98E-04 | 8.24E-10 | |
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN93L0028-SK1 | IPN009VH2/IPN93L0028 | IPN009VH2 | - | IPN93L0028 | Y92H/L94H | 3.43E+05 | 4.76E-03 | 1.39E-08 | |
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN93L0029-SK1 | IPN009VH2/IPN93L0029 | IPN009VH2 | - | IPN93L0029 | Y92H/P95H | 4.94E+05 | 8.97E-03 | 1.82E-08 | |
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN93L0030-SK1 | IPN009VH2/IPN93L0030 | IPN009VH2 | - | IPN93L0030 | L94H/P95H | 6.12E+05 | 1.56E-02 | 2.55E-08 | 低 |
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN93L0031-SK1 | IPN009VH2/IPN93L0031 | IPN009VH2 | - | IPN93L0031 | Y92H/L94H/P95H | 4.76E+04 | 8.00E-06 | 1.68E-10 | 低 |
| C1_IPN92H0026-SG4GK/IPN93L0021-SK1 | IPN92H0026/IPN93L0021 | IPN92H0026 | G65H | IPN93L0021 | Y92H | 5.87E+05 | 4.72E-04 | 8.04E-10 | |
| C1_IPN92H0026-SG4GK/IPN93L0023-SK1 | IPN92H0026/IPN93L0023 | IPN92H0026 | G65H | IPN93L0023 | L94H | 5.23E+05 | 6.08E-04 | 1.16E-09 | |
| C1_IPN92H0026-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0026/IPN93L0024 | IPN92H0026 | G65H | IPN93L0024 | P95H | 4.12E+05 | 4.70E-04 | 1.14E-09 | |
| C1_IPN92H0026-SG4GK/IPN93L0028-SK1 | IPN92H0026/IPN93L0028 | IPN92H0026 | G65H | IPN93L0028 | Y92H/L94H | 5.35E+05 | 2.55E-03 | 4.76E-09 | |
| C1_IPN92H0026-SG4GK/IPN93L0029-SK1 | IPN92H0026/IPN93L0029 | IPN92H0026 | G65H | IPN93L0029 | Y92H/P95H | 5.07E+05 | 4.57E-03 | 9.03E-09 | |
| C1_IPN92H0026-SG4GK/IPN93L0030-SK1 | IPN92H0026/IPN93L0030 | IPN92H0026 | G65H | IPN93L0030 | L94H/P95H | 4.14E+05 | 1.03E-02 | 2.48E-08 | |
| C1_IPN92H0026-SG4GK/IPN93L0031-SK1 | IPN92H0026/IPN93L0031 | IPN92H0026 | G65H | IPN93L0031 | Y92H/L94H/P95H | 2.33E+04 | 1.80E-02 | 6.84E-07 | 低 |
| C1_IPN92H0033-SG4GK/IPN93L0021-SK1 | IPN92H0033/IPN93L0021 | IPN92H0033 | Y99H | IPN93L0021 | Y92H | 3.50E+05 | 6.72E-04 | 1.92E-09 | |
| C1_IPN92H0033-SG4GK/IPN93L0023-SK1 | IPN92H0033/IPN93L0023 | IPN92H0033 | Y99H | IPN93L0023 | L94H | 3.01E+05 | 9.78E-04 | 3.25E-09 | |
| C1_IPN92H0033-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0033/IPN93L0024 | IPN92H0033 | Y99H | IPN93L0024 | P95H | 2.68E+05 | 7.76E-04 | 2.90E-09 | |
| C1_IPN92H0033-SG4GK/IPN93L0028-SK1 | IPN92H0033/IPN93L0028 | IPN92H0033 | Y99H | IPN93L0028 | Y92H/L94H | 3.35E+05 | 2.18E-03 | 6.50E-09 | |
| C1_IPN92H0033-SG4GK/IPN93L0029-SK1 | IPN92H0033/IPN93L0029 | IPN92H0033 | Y99H | IPN93L0029 | Y92H/P95H | 4.79E+05 | 7.40E-03 | 1.54E-08 | |
| C1_IPN92H0033-SG4GK/IPN93L0030-SK1 | IPN92H0033/IPN93L0030 | IPN92H0033 | Y99H | IPN93L0030 | L94H/P95H | 6.03E+05 | 1.46E-02 | 2.42E-08 | |
| C1_IPN92H0033-SG4GK/IPN93L0031-SK1 | IPN92H0033/IPN93L0031 | IPN92H0033 | Y99H | IPN93L0031 | Y92H/L94H/P95H | 5.22E+05 | 1.87E-03 | 3.59E-09 | 低 |
| C1_IPN92H0038-SG4GK/IPN009VK3-SK1 | IPN92H0038/IPN009VK3 | IPN92H0038 | G65H/Y99H | IPN009VK3 | - | 4.15E+05 | 2.82E-04 | 6.79E-10 | |
| C1_IPN92H0038-SG4GK/IPN93L0021-SK1 | IPN92H0038/IPN93L0021 | IPN92H0038 | G65H/Y99H | IPN93L0021 | Y92H | 4.88E+05 | 4.77E-04 | 9.58E-10 | |
| C1_IPN92H0038-SG4GK/IPN93L0023-SK1 | IPN92H0038/IPN93L0023 | IPN92H0038 | G65H/Y99H | IPN93L0023 | L94H | 4.22E+05 | 8.08E-04 | 1.91E-09 | |
| C1_IPN92H0038-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0038/IPN93L0024 | IPN92H0038 | G65H/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 3.80E+05 | 5.96E-04 | 1.57E-09 | |
| C1_IPN92H0038-SG4GK/IPN93L0028-SK1 | IPN92H0038/IPN93L0028 | IPN92H0038 | G65H/Y99H | IPN93L0028 | Y92H/L94H | 5.28E+05 | 1.25E-03 | 2.36E-09 | |
| C1_IPN92H0038-SG4GK/IPN93L0029-SK1 | IPN92H0038/IPN93L0029 | IPN92H0038 | G65H/Y99H | IPN93L0029 | Y92H/P95H | 4.19E+05 | 3.00E-03 | 7.15E-09 | |
| C1_IPN92H0038-SG4GK/IPN93L0030-SK1 | IPN92H0038/IPN93L0030 | IPN92H0038 | G65H/Y99H | IPN93L0030 | L94H/P95H | 5.58E+05 | 1.11E-02 | 1.99E-08 | |
| C1_IPN92H0038-SG4GK/IPN93L0031-SK1 | IPN92H0038/IPN93L0031 | IPN92H0038 | G65H/Y99H | IPN93L0031 | Y92H/L94H/P95H | 7.59E+06 | 3.96E-02 | 5.22E-09 | 低 |
| C1_IPN92H0048-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0048/IPN93L0024 | IPN92H0048 | F27H/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 2.61E+05 | 8.20E-04 | 3.14E-09 | |

[0618]

[表3-2]

[0619]

| 抗体名称 | Kon (5.8+) | koff (5.8+) | KD (5.8+) | 结合反应 (5.8+) | Kon (5.8-) | koff (5.8-) | KD (5.8-) | 结合反应 (5.8-) | KD 5(+)/7(+) | KD 5(-)/7(-) |
|------------------------------------|------------|-------------|-----------|----------------|------------|-------------|-----------|----------------|--------------|--------------|
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN009VK3-SK1 | 6.62E+05 | 1.08E-04 | 1.64E-10 | | 6.06E+05 | 2.04E-03 | 3.37E-09 | | 0.2 | 4.1 |
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN93L0028-SK1 | 5.34E+05 | 7.51E-03 | 1.41E-08 | | 5.28E+05 | 3.51E-03 | 6.68E-09 | 低 | 1.0 | 0.5 |
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN93L0029-SK1 | 5.63E+05 | 8.57E-03 | 1.55E-08 | | 5.34E+05 | 2.96E-03 | 5.54E-09 | 低 | 0.9 | 0.3 |
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN93L0030-SK1 | 4.87E+05 | 2.22E-02 | 4.56E-08 | 低 | 4.42E+06 | 5.77E-03 | 1.30E-09 | 低 | 1.8 | 0.1 |
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN93L0031-SK1 | 5.32E+05 | 1.27E-02 | 2.39E-08 | 低 | 7.11E+02 | 3.52E-03 | 4.96E-06 | 低 | 142.3 | 29523.8 |
| C1_IPN92H0026-SG4GK/IPN93L0021-SK1 | 7.63E+05 | 1.49E-03 | 1.95E-09 | | 2.10E+07 | 1.70E-01 | 8.12E-09 | | 2.4 | 10.1 |
| C1_IPN92H0026-SG4GK/IPN93L0023-SK1 | 8.13E+05 | 1.24E-03 | 1.53E-09 | | 6.23E+06 | 6.19E-02 | 9.95E-09 | | 1.3 | 8.6 |
| C1_IPN92H0026-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | 4.51E+05 | 1.43E-03 | 3.16E-09 | | 7.43E+06 | 1.12E-01 | 1.51E-08 | | 2.8 | 13.2 |
| C1_IPN92H0026-SG4GK/IPN93L0028-SK1 | 5.57E+05 | 5.90E-03 | 1.06E-08 | | 6.40E+06 | 1.76E-01 | 2.78E-08 | 低 | 2.2 | 5.8 |
| C1_IPN92H0026-SG4GK/IPN93L0029-SK1 | 6.02E+05 | 6.13E-03 | 1.02E-08 | | 8.12E+05 | 4.12E-03 | 5.07E-09 | 低 | 1.1 | 0.6 |
| C1_IPN92H0026-SG4GK/IPN93L0030-SK1 | 2.26E+06 | 5.92E-02 | 2.62E-08 | 低 | 4.46E+03 | 1.20E-03 | 2.70E-07 | 低 | 1.1 | 10.9 |
| C1_IPN92H0026-SG4GK/IPN93L0031-SK1 | 4.14E+03 | 1.78E-02 | 4.29E-06 | 低 | 6.17E+03 | 1.33E-03 | 2.15E-07 | 低 | 6.3 | 0.3 |
| C1_IPN92H0033-SG4GK/IPN93L0021-SK1 | 5.85E+05 | 2.93E-03 | 5.01E-09 | | 5.42E+11 | 4.12E+03 | 7.59E-09 | 低 | 2.6 | 4.0 |
| C1_IPN92H0033-SG4GK/IPN93L0023-SK1 | 5.59E+05 | 2.82E-03 | 5.05E-09 | | 1.27E+10 | 1.44E+02 | 1.13E-08 | 低 | 1.6 | 3.5 |
| C1_IPN92H0033-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | 5.19E+05 | 4.50E-03 | 8.66E-09 | | 4.00E+10 | 2.12E+02 | 5.30E-09 | 低 | 3.0 | 1.8 |
| C1_IPN92H0033-SG4GK/IPN93L0028-SK1 | 7.17E+05 | 1.44E-02 | 2.01E-08 | | 6.58E+05 | 5.80E-03 | 8.50E-09 | 低 | 3.1 | 1.3 |
| C1_IPN92H0033-SG4GK/IPN93L0029-SK1 | 9.05E+05 | 2.22E-02 | 2.46E-08 | | 3.84E+05 | 3.76E-03 | 9.79E-09 | 低 | 1.6 | 0.6 |
| C1_IPN92H0033-SG4GK/IPN93L0030-SK1 | 5.03E+05 | 4.49E-02 | 8.93E-08 | 低 | 2.35E+04 | 6.03E-02 | 2.56E-06 | 低 | 3.7 | 105.8 |
| C1_IPN92H0033-SG4GK/IPN93L0031-SK1 | 8.07E+05 | 2.09E-03 | 2.59E-09 | 低 | 6.74E+05 | 9.34E-03 | 1.39E-08 | 低 | 0.7 | 3.9 |
| C1_IPN92H0038-SG4GK/IPN009VK3-SK1 | 6.93E+05 | 4.63E-04 | 6.68E-10 | | 6.46E+05 | 5.38E-03 | 8.33E-09 | | 1.0 | 12.3 |
| C1_IPN92H0038-SG4GK/IPN93L0021-SK1 | 6.34E+05 | 2.24E-03 | 3.53E-09 | | 1.41E+10 | 1.44E+02 | 1.02E-08 | 低 | 3.7 | 10.6 |
| C1_IPN92H0038-SG4GK/IPN93L0023-SK1 | 5.24E+05 | 2.79E-03 | 5.33E-09 | | 9.25E+09 | 1.12E+02 | 1.21E-08 | 低 | 2.8 | 6.3 |
| C1_IPN92H0038-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | 5.11E+05 | 4.18E-03 | 8.19E-09 | | 1.25E+11 | 6.83E+02 | 5.47E-09 | 低 | 5.2 | 3.5 |
| C1_IPN92H0038-SG4GK/IPN93L0028-SK1 | 4.45E+05 | 7.89E-03 | 1.77E-08 | | 6.37E+05 | 1.74E-02 | 2.73E-08 | 低 | 7.5 | 11.6 |
| C1_IPN92H0038-SG4GK/IPN93L0029-SK1 | 5.39E+05 | 1.31E-02 | 2.42E-08 | | 7.89E+05 | 5.22E-03 | 6.62E-09 | 低 | 3.4 | 0.9 |
| C1_IPN92H0038-SG4GK/IPN93L0030-SK1 | 2.41E+05 | 1.70E-02 | 7.03E-08 | 低 | 8.98E+03 | 5.38E-03 | 5.99E-07 | 低 | 3.5 | 30.1 |
| C1_IPN92H0038-SG4GK/IPN93L0031-SK1 | 1.18E+06 | 1.46E-03 | 1.24E-09 | 低 | 1.22E+06 | 4.76E-03 | 3.90E-09 | 低 | 0.2 | 0.7 |
| C1_IPN92H0048-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | 5.28E+05 | 6.37E-03 | 1.21E-08 | | 6.72E+10 | 2.26E+02 | 3.36E-08 | 低 | 3.9 | 1.1 |

[0620] 实施例3:进一步优化抗C1s抗体的“pH”和/或“pH和Ca”依赖性

[0621] 选择C1_IPN92H0033 (SEQ ID NO:17) -SG4GK/IPN93L0024 (SEQ ID NO:18) -SK1 (IPN92H0033/IPN93L0024) 进行进一步优化。对IPN92H0033/IPN93L0024的FR的CDR和某些

位置进行了组氨酸、赖氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和谷氨酰胺扫描。产生并纯化具有突变的变体,并使用Biacore通过上述方法进行评估。如上所述,使用Biacore评估所有变体。为了组合,选择改善“pH”和/或“pH和Ca”依赖性的突变。为了组合,还选择了改善7(+)中KD的突变。在几轮组合后,具有多个突变的变体获得了显著的“pH”和/或“pH和Ca”依赖性。Biacore的结果显示在表4-1和4-2中。

[0622] 如表4-1和4-2中所述,令人惊讶地,将带电荷的残基(精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸或谷氨酸)引入已经具有组氨酸残基的抗体中,可以显著改善抗体-抗原相互作用的pH依赖性。

[0623] [表4-1]

[0624]

| 抗体名称 | 缩写 | VH的名称 | IPN009VH2的VH中的突变 | VL的名称 | IPN009VK3的VL中的突变 | Kon (7.4°) | koFF (7.4°) | KD (7.4°) | 结合反应 (7.4°) |
|------------------------------------|-----------------------|------------|-------------------------------|------------|-----------------------|------------|-------------|-----------|----------------|
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN009VK3-SK1 | IPN009VH2/IPN009VK3 | IPN009VH2 | - | IPN009VK3 | - | 3.62E+05 | 2.98E-04 | 8.24E-10 | |
| C1_IPN92H0033-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0033/IPN93L0024 | IPN92H0033 | Y99H | IPN93L0024 | P95H | 2.68E+05 | 7.78E-04 | 2.90E-09 | |
| C1_IPN92H0061-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0061/IPN93L0024 | IPN92H0061 | F29K/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 2.38E+05 | 1.61E-03 | 6.85E-09 | |
| C1_IPN92H0079-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0079/IPN93L0024 | IPN92H0079 | Y32K/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 3.79E+05 | 1.25E-03 | 3.36E-09 | |
| C1_IPN92H0080-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0080/IPN93L0024 | IPN92H0080 | Y32R/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 3.57E+05 | 1.14E-03 | 3.18E-09 | |
| C1_IPN92H0091-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0091/IPN93L0024 | IPN92H0091 | M34K/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 2.77E+05 | 7.46E-04 | 2.89E-09 | |
| C1_IPN92H0117-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0117/IPN93L0024 | IPN92H0117 | S52A/Q/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 2.53E+05 | 8.63E-04 | 3.41E-09 | |
| C1_IPN92H0144-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0144/IPN93L0024 | IPN92H0144 | H56K/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 3.43E+05 | 1.26E-03 | 3.68E-09 | |
| C1_IPN92H0145-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0145/IPN93L0024 | IPN92H0145 | H56R/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 3.33E+05 | 1.57E-03 | 4.71E-09 | |
| C1_IPN92H0147-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0147/IPN93L0024 | IPN92H0147 | T57D/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 3.74E+05 | 7.85E-04 | 2.05E-09 | |
| C1_IPN92H0156-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0156/IPN93L0024 | IPN92H0156 | Y58K/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 3.64E+05 | 7.71E-04 | 2.12E-09 | |
| C1_IPN92H0157-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0157/IPN93L0024 | IPN92H0157 | Y58R/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 3.40E+05 | 6.89E-04 | 2.03E-09 | |
| C1_IPN92H0159-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0159/IPN93L0024 | IPN92H0159 | Y58D/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 3.02E+05 | 6.21E-04 | 2.08E-09 | |
| C1_IPN92H0160-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0160/IPN93L0024 | IPN92H0160 | Y59E/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 3.68E+05 | 5.58E-04 | 1.52E-09 | |
| C1_IPN92H0162-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0162/IPN93L0024 | IPN92H0162 | Y59K/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 3.03E+05 | 5.45E-04 | 1.80E-09 | |
| C1_IPN92H0165-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0165/IPN93L0024 | IPN92H0165 | L60D/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 2.89E+05 | 5.12E-04 | 1.77E-09 | |
| C1_IPN92H0166-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0166/IPN93L0024 | IPN92H0166 | L60E/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 2.94E+05 | 5.18E-04 | 1.76E-09 | |
| C1_IPN92H0188-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0188/IPN93L0024 | IPN92H0188 | K64D/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 2.71E+05 | 5.51E-04 | 2.03E-09 | |
| C1_IPN92H0193-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0193/IPN93L0024 | IPN92H0193 | G65D/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 5.13E+05 | 4.74E-04 | 9.25E-10 | |
| C1_IPN92H0194-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0194/IPN93L0024 | IPN92H0194 | G65E/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 5.29E+05 | 4.88E-04 | 8.85E-10 | |
| C1_IPN92H0231-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0231/IPN93L0024 | IPN92H0231 | G88K/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 4.44E+05 | 5.77E-04 | 1.30E-09 | |
| C1_IPN92H0232-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0232/IPN93L0024 | IPN92H0232 | G88R/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 4.08E+05 | 6.09E-04 | 1.50E-09 | |
| C1_IPN92H0253-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0253/IPN93L0024 | IPN92H0253 | Y99H/D101K | IPN93L0024 | P95H | 5.69E+05 | 6.90E-05 | 1.21E-10 | |
| C1_IPN92H0033-SG4GK/IPN93L0072-SK1 | IPN92H0033/IPN93L0072 | IPN92H0033 | Y99H | IPN93L0072 | S29K/P95H | 4.13E+05 | 5.67E-04 | 1.37E-09 | |
| C1_IPN92H0033-SG4GK/IPN93L0090-SK1 | IPN92H0033/IPN93L0090 | IPN92H0033 | Y99H | IPN93L0090 | Y32K/P95H | 4.82E+05 | 6.76E-04 | 1.40E-09 | |
| C1_IPN92H0281-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0281/IPN93L0024 | IPN92H0281 | H56K/Y59E/K64D/G65E/G88K/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 3.96E+05 | 1.00E-03 | 2.52E-09 | |
| C1_IPN92H0282-SG4GK/IPN93L0024-SK1 | IPN92H0282/IPN93L0024 | IPN92H0282 | Y59E/K64D/G65E/G88K/Y99H | IPN93L0024 | P95H | 3.83E+05 | 6.32E-04 | 1.65E-09 | |
| C1_IPN92H0261-SG4GK/IPN93L0091-SK1 | IPN92H0261/IPN93L0091 | IPN92H0261 | Y59E/G88K/Y99H | IPN93L0091 | Y32R/P95H | 7.86E+05 | 7.74E-04 | 9.85E-10 | |
| C1_IPN92H0279-SG4GK/IPN93L0091-SK1 | IPN92H0279/IPN93L0091 | IPN92H0279 | Y59E/G65E/G88K/Y99H | IPN93L0091 | Y32R/P95H | 1.31E+06 | 8.97E-04 | 6.86E-10 | |
| C1_IPN92H0286-SG4GK/IPN93L0205-SK1 | IPN92H0286/IPN93L0205 | IPN92H0286 | Y32K/G65H/Y99H | IPN93L0205 | Y32R/Y92H/L94H | 9.94E+05 | 1.56E-03 | 1.58E-09 | |
| C1_IPN92H0282-SG4GK/IPN93L0091-SK1 | IPN92H0282/IPN93L0091 | IPN92H0282 | Y59E/K64D/G65E/G88K/Y99H | IPN93L0091 | Y32R/P95H | 4.71E+05 | 9.24E-04 | 1.96E-09 | |
| C1_IPN92H0281-SG4GK/IPN93L0091-SK1 | IPN92H0281/IPN93L0091 | IPN92H0281 | H56K/Y59E/K64D/G65E/G88K/Y99H | IPN93L0091 | Y32R/P95H | 4.57E+05 | 2.16E-03 | 4.72E-09 | |
| C1_IPN92H0288-SG4GK/IPN93L0212-SK1 | IPN92H0288/IPN93L0212 | IPN92H0288 | Y59E/K64D/G88K/Y99H | IPN93L0212 | S27A/E/S30E/Y32R/P95H | 6.48E+05 | 1.17E-03 | 1.81E-09 | |

[0625]

[表4-2]

[0626]

| 抗体名称 | Kon (5.8+) | koff (5.8+) | KD (5.8+) | 结合反应 (5.8+) | Kon (5.8-) | koff (5.8-) | KD (5.8-) | 结合反应 (5.8-) | KD 5(+)/7(+) | KD 5(-)/7(-) |
|------------------------------------|------------|-------------|-----------|----------------|------------|-------------|-----------|----------------|--------------|--------------|
| C1_JPN09VH2-SG4GK/FPN09VK3-SK1 | 6.62E+05 | 1.08E-04 | 1.64E-10 | | 6.06E+05 | 2.04E-03 | 3.37E-09 | | 0.2 | 4.09 |
| C1_JPN92H0033-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 5.19E+05 | 4.50E-03 | 8.66E-09 | | 4.00E+10 | 2.12E+02 | 5.30E-09 | low | 3.0 | 1.83 |
| C1_JPN92H0081-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 1.85E+06 | 2.20E-02 | 1.19E-08 | 低 | 6.33E+05 | 3.44E-03 | 5.43E-09 | low | 1.7 | 0.79 |
| C1_JPN92H0079-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 8.38E+05 | 1.62E-02 | 1.93E-08 | | 5.94E+05 | 5.20E-03 | 8.75E-09 | low | 5.7 | 2.60 |
| C1_JPN92H0080-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 8.14E+05 | 1.29E-02 | 1.59E-08 | | 7.17E+05 | 6.51E-03 | 9.09E-09 | low | 5.0 | 2.86 |
| C1_JPN92H0091-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 5.30E+05 | 6.34E-03 | 1.20E-08 | | 7.80E+08 | 2.67E+00 | 3.43E-09 | low | 4.5 | 1.28 |
| C1_JPN92H0117-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 6.10E+05 | 7.99E-03 | 1.31E-08 | | 7.03E+05 | 5.42E-03 | 7.71E-09 | low | 3.8 | 2.26 |
| C1_JPN92H0144-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 1.13E+06 | 2.69E-02 | 2.34E-08 | 低 | 5.62E+05 | 3.17E-03 | 5.85E-09 | low | 6.4 | 1.54 |
| C1_JPN92H0145-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 2.59E+06 | 4.99E-02 | 1.92E-08 | 低 | 4.69E+05 | 3.00E-03 | 6.40E-09 | low | 4.1 | 1.36 |
| C1_JPN92H0147-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 4.45E+05 | 5.69E-03 | 1.32E-08 | | 6.50E+10 | 2.10E+02 | 3.23E-09 | low | 6.4 | 1.58 |
| C1_JPN92H0156-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 6.41E+05 | 9.48E-03 | 1.48E-08 | | 6.45E+05 | 6.32E-03 | 9.80E-09 | low | 7.0 | 4.62 |
| C1_JPN92H0157-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 6.36E+05 | 1.20E-02 | 1.89E-08 | | 5.64E+05 | 5.83E-03 | 1.03E-08 | low | 9.3 | 5.07 |
| C1_JPN92H0159-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 4.21E+05 | 6.99E-03 | 1.66E-08 | | 5.44E+05 | 4.01E-03 | 7.36E-09 | low | 8.1 | 3.57 |
| C1_JPN92H0160-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 4.61E+05 | 6.34E-03 | 1.37E-08 | | 5.82E+05 | 4.11E-03 | 7.32E-09 | low | 9.0 | 4.82 |
| C1_JPN92H0162-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 4.56E+05 | 5.24E-03 | 1.15E-08 | | 1.80E+06 | 7.84E-03 | 4.89E-09 | low | 6.4 | 2.72 |
| C1_JPN92H0165-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 6.08E+05 | 2.28E-03 | 3.74E-09 | | 8.74E+07 | 7.15E-01 | 8.18E-09 | low | 2.1 | 4.62 |
| C1_JPN92H0166-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 6.00E+05 | 2.28E-03 | 3.77E-09 | | 1.02E+08 | 6.87E-01 | 6.75E-09 | low | 2.1 | 3.84 |
| C1_JPN92H0186-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 5.04E+05 | 4.13E-03 | 8.21E-09 | | 2.53E+06 | 1.06E-02 | 4.21E-09 | low | 4.0 | 2.07 |
| C1_JPN92H0193-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 7.27E+05 | 4.17E-03 | 5.74E-09 | | 2.14E+07 | 6.85E-02 | 3.21E-09 | low | 6.2 | 3.47 |
| C1_JPN92H0194-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 7.51E+05 | 4.29E-03 | 5.72E-09 | | 8.02E+05 | 5.17E-03 | 6.45E-09 | low | 6.5 | 7.29 |
| C1_JPN92H0231-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 5.68E+05 | 5.44E-03 | 9.59E-09 | | 1.28E+06 | 6.74E-03 | 5.28E-09 | low | 7.4 | 4.06 |
| C1_JPN92H0232-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 5.70E+05 | 4.85E-03 | 8.49E-09 | | 3.33E+06 | 1.73E-02 | 5.19E-09 | low | 5.7 | 3.46 |
| C1_JPN92H0253-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 4.71E+05 | 7.17E-04 | 1.52E-09 | | 5.78E+05 | 1.47E-02 | 2.54E-08 | | 12.6 | 209.92 |
| C1_JPN92H0033-SG4GK/FPN93L0072-SK1 | 5.80E+05 | 5.29E-03 | 9.12E-09 | | 9.67E+05 | 5.53E-03 | 5.72E-09 | low | 6.7 | 4.18 |
| C1_JPN92H0033-SG4GK/FPN93L0080-SK1 | 5.77E+05 | 5.50E-03 | 9.52E-09 | | 5.95E+05 | 4.27E-03 | 7.18E-09 | low | 6.8 | 5.13 |
| C1_JPN92H0281-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 1.02E+06 | 2.40E-02 | 2.36E-08 | | 6.02E+05 | 3.00E-03 | 4.98E-09 | low | 9.4 | 1.96 |
| C1_JPN92H0282-SG4GK/FPN93L0024-SK1 | 5.53E+05 | 9.98E-03 | 1.80E-08 | | 3.82E+05 | 3.27E-03 | 8.55E-09 | low | 10.9 | 5.18 |
| C1_JPN92H0261-SG4GK/FPN93L0091-SK1 | 3.32E+05 | 5.33E-03 | 1.61E-08 | 低 | 6.06E+05 | 7.39E-03 | 1.21E-08 | low | 16.3 | 12.28 |
| C1_JPN92H0279-SG4GK/FPN93L0091-SK1 | 3.42E+05 | 6.84E-03 | 2.00E-08 | 低 | 1.18E+06 | 6.11E-03 | 5.17E-09 | low | 29.2 | 7.54 |
| C1_JPN92H0286-SG4GK/FPN93L0205-SK1 | 5.27E+05 | 3.46E-03 | 6.57E-09 | 低 | 1.03E+06 | 4.77E-03 | 4.65E-09 | low | 4.2 | 2.94 |
| C1_JPN92H0282-SG4GK/FPN93L0091-SK1 | 4.45E+05 | 7.55E-03 | 1.69E-08 | 低 | 6.70E+05 | 1.49E-03 | 2.21E-09 | low | 8.6 | 1.13 |
| C1_JPN92H0281-SG4GK/FPN93L0091-SK1 | 6.25E+05 | 7.07E-03 | 1.19E-08 | 低 | 5.89E+05 | 2.27E-03 | 3.88E-09 | low | 2.4 | 0.82 |
| C1_JPN92H0288-SG4GK/FPN93L0212-SK1 | 9.45E+05 | 1.98E-02 | 2.10E-08 | 低 | 7.84E+05 | 5.33E-03 | 6.79E-09 | low | 11.6 | 3.75 |

[0627] 不受特定理论的束缚,抗体中的组氨酸残基可以与抗体中的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下质子化并带正电。在组氨酸周围的位置引入诸如精氨酸或赖氨酸等带正电荷的残基会导致在酸性pH下带正电荷的残基与质子化的组氨酸之间发生排斥,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)会导致在酸性pH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下发生的抗体或CDR的这些结构或构象变化可影响抗体的抗原结合,并降低在酸性pH下抗体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荷的残基(例如精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸或谷氨酸)可以降低在酸性pH下抗体对抗原的结合亲和力,从而以独特机制改善抗体-抗原相互作用的pH依赖性。

[0628] 实施例4:减少非特异性结合

[0629] 非特异性结合是预测抗体药代动力学的重要因素之一(MABS 2017,VOL.9,N0.5,756-766)。由于高的非特异性结合将导致抗体的快速清除并导致较差的抗体药代动力学,因此具有高的非特异性结合的抗体不利于开发治疗性抗体。细胞外基质结合测定(ECM结合测定)是预测非特异性结合的测定方法之一(WO 2012/093704)。

[0630] 选择“pH”和“pH和Ca”依赖性抗体进行ECM结合测定。ECM结合测定结合了基于Meso Scale Discovery (MSD) 技术的电化学发光(ECL)。首先将ECM(BD Matrigel)包被在多阵列高结合96孔板(MSD)的表面上在4℃下过夜。然后用pH 7.4(20mM ACES,150mM NaCl,1.2mM CaCl₂,pH7.4,含有0.05%Tween 20和0.5%BSA)或pH 5.8(20mM ACES,150mM NaCl,1.2mM CaCl₂,pH5.8,含有0.05%Tween 20和0.5%BSA)的ECL封闭缓冲液在30℃下封闭ECM包被的板2小时。然后用pH 7.4(20mM ACES,150mM NaCl,1.2mM CaCl₂,pH7.4,含有0.01%Tween 20和0.1%BSA)或pH 5.8(20mM ACES,150mM NaCl,1.2mM CaCl₂,pH5.8,含有0.01%Tween 20和0.1%BSA)的稀释缓冲液稀释所选的变体和测定对照。将稀释的样品和测定对照在板上于30℃,600rpm下温育1小时,然后在室温下与0.25%戊二醛(Sigma)一起温育10分钟。然后将板用1x PBST(Sigma)洗涤,并与磺基标签标记的山羊抗人IgG(Invitrogen)在30℃,600rpm下温育1小时。将板再次用1x PBST洗涤,并将含有表面活性剂(MSD)的读数缓冲液T(2x)添加到每个孔中。使用MESO SECTOR S 600读取该板。表5显示了ECM结合测定的结果。在pH 5.8下,选择的变体对ECM的结合高于IPN009VH2/IPN009VK3。进行了进一步的优化以降低对ECM的结合,以改善抗体的药代动力学。带负电荷的残基被引入所选择的变体中。分别使用如上所述的Biacore和ECM结合测定法评估结合亲和力和ECM结合。鉴定了几个残基以降低ECM结合,同时保持或增强“pH”和/或“pH和Ca”依赖性。通过组合这些识别出的突变,成功生成了三种抗体C1_IPN92H0288(SEQ ID NO:19)-SG4GK/IPN93L0211(SEQ ID NO:20)-SK1,C1_IPN92H0288-SG4GK/IPN93L0058(SEQ ID NO:21)-SK1,和C1_IPN92H0307(SEQ ID NO:22)-SG4GK/IPN93L0058-SK1。这三种变体显示出良好的“pH”和“pH和Ca”依赖性,并且在pH 7.4和pH 5.8下均具有较低的ECM结合。表6显示了三种变体的Biacore和ECM结合测定的结果。

[0631] [表5]

[0632]

| 抗体名称 | pH7.4时的 ECM结合 | | pH7.4时的ECM结合的 平均值 (N=2) | pH5.8时的 ECM结合 | | pH5.8时的ECM 结合的平均值 | pH7.4时与IPN009VH2/ IPN009VK3的比例 | pH5.8时与IPN009VH2/ IPN009VK3的比例 |
|-----------------------|------------------|--------|----------------------------|------------------|--------|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | | | | | | | | |
| IPN009VH2/IPN009VK3 | 9819 | 13150 | 11484.5 | 7646 | 6524 | 7085 | 1.00 | 1.00 |
| IPN82H0033/IPN009VK3 | 11067 | 11952 | 11509.5 | 57277 | 60338 | 58807.5 | 1.00 | 8.30 |
| IPN009VH2/IPN83L0021 | 7806 | 7542 | 7674 | 40282 | 44184 | 42238 | 0.67 | 5.96 |
| IPN009VH2/IPN83L0023 | 14043 | 11480 | 12761.5 | 35089 | 35856 | 35472.5 | 1.11 | 5.01 |
| IPN009VH2/IPN83L0024 | 20473 | 18567 | 19520 | 25709 | 25474 | 25591.5 | 1.70 | 3.61 |
| IPN82H0038/IPN83L0024 | 21067 | 20744 | 20905.5 | 194790 | 199601 | 197195.5 | 1.82 | 27.83 |
| IPN82H0033/IPN83L0024 | 16486 | 17975 | 17230.5 | 77873 | 85421 | 81647 | 1.50 | 11.52 |
| IPN82H0281/IPN83L0024 | 8588 | 8988 | 8788 | 98350 | 103612 | 100981 | 0.77 | 14.25 |
| IPN82H0286/IPN83L0205 | 138963 | 136320 | 136641.5 | 461103 | 558294 | 509698.5 | 11.90 | 71.94 |

[0633]

[表6]

[0634]

| 抗体名称 | 缩写 | VH的名称 | IPN009VH2的 VH中的突变 | VL的名称 | IPN009VK3 的VL中的突变 | Kon (7.4+) | koff (7.4+) | KD (7.4+) | 结合 反应 (7.4+) | Kon (5.8+) |
|------------------------------------|-----------------------|------------|-------------------------------|------------|----------------------|------------|-------------|-----------|--------------------|------------|
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN009VK3-SK1 | IPN009VH2/IPN009VK3 | IPN009VH2 | - | IPN009VK3 | - | 3.62E+05 | 2.98E-04 | 8.24E-10 | 104.4 | 6.62E+05 |
| C1_IPN82H0288-SG4GK/IPN83L0058-SK1 | IPN82H0288/IPN83L0058 | IPN82H0288 | Y59E/K64D/C98K/Y99H | IPN83L0058 | S27A/E/P95H | 6.54E+05 | 5.48E-04 | 8.38E-10 | | 7.32E+05 |
| C1_IPN82H0288-SG4GK/IPN83L0211-SK1 | IPN82H0288/IPN83L0211 | IPN82H0288 | Y59E/K64D/C98K/Y99H | IPN83L0211 | S27A/E/S30E/P95H | 5.27E+05 | 8.80E-04 | 1.67E-08 | | 1.77E+06 |
| C1_IPN82H0307-SG4GK/IPN83L0058-SK1 | IPN82H0307/IPN83L0058 | IPN82H0307 | T28E/S30E/Y59E/K64D/C98K/Y99H | IPN83L0058 | S27A/E/P95H | 4.46E+05 | 8.63E-04 | 1.93E-08 | | 7.31E+05 |

| 抗体名称 | koff (5.8+) | KD (5.8+) | 结合反应(5.8+) | Kon (5.8-) | koff (5.8-) | KD (5.8-) | 结合 反应 (5.8-) | 大于 IPN009VH2/ IPN009VK3 的 KD 5(+)/7(+) | 大于 IPN009VH2/ IPN009VK3 的 KD 5(-)/7(-) |
|------------------------------------|-------------|-----------|------------|------------|-------------|-----------|--------------------|--|--|
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN009VK3-SK1 | 1.08E-04 | 1.64E-10 | 132.9 | 6.08E+05 | 2.04E-03 | 3.37E-09 | 114.9 | 0.2 | 4.09 |
| C1_IPN82H0288-SG4GK/IPN83L0058-SK1 | 1.43E-02 | 1.95E-08 | | 5.04E+05 | 4.01E-03 | 7.96E-09 | 低 | 23.3 | 9.50 |
| C1_IPN82H0288-SG4GK/IPN83L0211-SK1 | 2.92E-02 | 1.65E-08 | 低 | 4.85E+05 | 5.04E-03 | 1.04E-08 | 低 | 9.9 | 6.23 |
| C1_IPN82H0307-SG4GK/IPN83L0058-SK1 | 1.42E-02 | 1.95E-08 | | 3.96E+05 | 1.96E-03 | 4.95E-09 | 低 | 10.1 | 2.56 |

| 抗体名称 | pH7.4时的ECM结合 | pH7.4时ECM结合的 平均值 (N=2) | pH5.8时的ECM结合 | pH5.8时 ECM结合 的平均值 | pH7.4时与 IPN009VH2 /IPN009VK3 的比例 | pH5.8时与 IPN009VH2/ IPN009VK3 的比例 |
|------------------------------------|--------------|---------------------------|--------------|-------------------------|---|---|
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN009VK3-SK1 | 9819 | 13150 | 7646 | 6524 | 1.00 | 1.00 |
| C1_IPN82H0288-SG4GK/IPN83L0058-SK1 | 10045 | 12701 | 63744 | 73309 | 0.99 | 9.67 |
| C1_IPN82H0288-SG4GK/IPN83L0211-SK1 | 6129 | 6612 | 26440 | 23366 | 0.55 | 3.51 |
| C1_IPN82H0307-SG4GK/IPN83L0058-SK1 | 5490 | 5947 | 13866 | 14321 | 0.50 | 1.99 |

[0635] 实施例5:亲和力测定

[0636] 使用Biacore T200仪器(GE Healthcare)在37℃下测定pH 7.4和pH 5.8下所有组氨酸取代的变体的结合亲和力。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通池上。在7 (+) 缓冲液(20mM ACES,150mM NaCl,

1.2mM CaCl_2 , 0.05% Tween 20, 0.005% NaN_3 , pH 7.4) 或 5(+) 缓冲液 (20mM ACES, 150mM NaCl, 1.2mM CaCl_2 , 0.05% Tween 20, 0.005% NaN_3 , pH 5.8) 中制备抗体和分析物。每种抗体被蛋白 A/G 捕获到传感器表面。抗体捕获水平的目标是 200 个共振单位 (RU)。在 pH 7.4 下血清来源的人 C1s 以 12.5、50nM 或在 pH 5.8 下除 IPN92H0281/IPN93L0024-SG136 和 IPN92H0286/IPN93L0205-SG136 外所有样品以 50、200nM 注入, 在 pH 5.8 下 IPN92H0281/IPN93L0024-SG136 和 IPN92H0286/IPN93L0205-SG136 分别以 200 和 800nM 注入, 然后解离。每个周期用 10mM 甘氨酸-HCl pH 1.5 再生传感器表面。通过使用 Biacore T200 评估软件 2.0 版 (GE Healthcare) 处理数据并将其拟合到 1:1 结合模型来确定结合亲和力 (表 7)。在 pH 7.4 的解离阶段后立即整合另一个 pH 5.8 的解离阶段。通过使用 Scrubber 2.0 (BioLogic Software) 曲线拟合软件处理和拟合数据, 确定 5(+) 缓冲液中的解离速率。pH 5.8 下亲和力值的星号表示由于低结合反应, 无法准确确定亲和力测量值。

[0637] [表 7]

[0638]

| 抗体的缩写名称 | Lot | kon (7.4+) | koff (7.4+) | KD (7.4+) | koff (5.8+ of 775+) | koff (5.8+ of 775+) / koff (7.4+) | kon (5.8+) | koff (5.8+) | KD (5.8+) | KD (5.8+) / KD (7.4+) |
|-----------------------|---------|------------|-------------|-----------|---------------------|-----------------------------------|------------|-------------|------------|-----------------------|
| IPN009VH2/IPN009VK3 | PPU2040 | 3.44E+05 | 4.11E-04 | 1.19E-09 | 8.86E-05 | 0.2 | 3.60E+05 | 1.62E-04 | 4.49E-10 | 0.4 |
| IPN92H0033/IPN009VK3 | PPU2041 | 3.77E+05 | 3.80E-04 | 1.01E-09 | 2.65E-04 | 0.7 | 3.89E+05 | 3.62E-04 | 9.31E-10 | 0.9 |
| IPN009VH2/IPN93L0021 | PPU2042 | 1.99E+05 | 5.80E-04 | 2.92E-09 | 1.10E-03 | 1.9 | 2.90E+05 | 1.26E-03 | 4.34E-09 | 1.5 |
| IPN009VH2/IPN93L0023 | PPU2043 | 2.27E+05 | 6.28E-04 | 2.77E-09 | 6.91E-04 | 1.1 | 3.30E+05 | 8.18E-04 | 2.48E-09 | 0.9 |
| IPN009VH2/IPN93L0024 | PPU2044 | 1.80E+05 | 6.12E-04 | 3.40E-09 | 7.41E-04 | 1.2 | 2.21E+05 | 9.56E-04 | 4.32E-09 | 1.3 |
| IPN92H0038/IPN93L0024 | PPU2045 | 3.84E+05 | 4.61E-04 | 1.20E-09 | 3.54E-03 | 7.7 | 2.89E+05 | 3.09E-03 | 1.07E-08 | 8.9 |
| IPN92H0033/IPN93L0024 | PPU2046 | 2.27E+05 | 5.71E-04 | 2.51E-09 | 2.90E-03 | 5.1 | 2.61E+05 | 3.10E-03 | 1.19E-08 | 4.7 |
| IPN92H0287/IPN93L0024 | PPU2047 | 3.19E+05 | 6.45E-04 | 2.02E-09 | 2.47E-02 | 38.2 | 2.17E+05 | 2.67E-02 | 1.23E-07 | 60.9 |
| IPN92H0286/IPN93L0205 | PPU2048 | 5.74E+05 | 8.22E-04 | 1.43E-09 | 1.34E-02 | 16.3 | * 2.78E+03 | * 2.37E-02 | * 8.53E-06 | - |
| IPN92H0288/IPN93L0211 | PPU2049 | 4.69E+05 | 5.20E-04 | 1.11E-09 | 2.82E-02 | 54.2 | 2.33E+05 | 1.94E-02 | 8.31E-08 | 74.9 |
| IPN92H0288/IPN93L0058 | PPU2050 | 6.66E+05 | 4.08E-04 | 6.11E-10 | 1.58E-02 | 38.8 | 3.15E+05 | 1.27E-02 | 4.01E-08 | 65.6 |
| IPN92H0307/IPN93L0058 | PPU2051 | 3.91E+05 | 5.23E-04 | 1.34E-09 | 1.51E-02 | 28.8 | 3.18E+05 | 1.21E-02 | 3.81E-08 | 28.4 |

*由于在 pH5.8 结合反应低而没有采用

[0639] 实施例6:使用pH和/或Ca依赖性抗Cs抗体的小鼠PK研究

[0640] 高效液相色谱-电喷雾串联质谱法 (LC/ESI-MS/MS) 测定血浆中抗C1s抗体和总hC1s浓度

[0641] 通过LC/ESI-MS/MS测量小鼠血浆中抗C1s抗体和人C1s的浓度。通过在小鼠血浆中混合并稀释规定量的抗C1s抗体和人C1制备校正标准品,以使抗C1s浓度分别为12.5、25、50、100、200、400和800微克(micro g)/mL,人C1浓度分别为0.977、1.95、3.91、7.81、15.6、

31.3、62.5micro g/mL。将2微升校正标准品和血浆样品与25微升6.8mol/L尿素,9.1mmol/L二硫苏糖醇和0.45微克/毫升溶菌酶(鸡蛋白)在50mmol/L碳酸氢铵中混合并在56℃下温育45分钟。然后,加入2微升500mmol/L碘乙酰胺,并在黑暗中于37℃下温育30分钟。接下来,加入160micro L在50mmol/L碳酸氢铵中的0.5micro g/mL测序级修饰的胰蛋白酶(Promega),并在37℃下温育过夜。最后,加入5微升10%的三氟乙酸使任何残留的胰蛋白酶失活。通过LC/ESI-MS/MS对50微升的消化样品进行分析。使用配备2D I级UPLC(Waters)的Xevo TQ-S三重四极杆仪器(Waters)进行LC/ESI-MS/MS。通过选择的反应监测(SRM)监测抗C1s抗体特异性肽GLPSSIEK和人C1s特异性肽LLEVPEGR。抗C1s抗体的SRM跃迁是[M+2H]²⁺(m/z 415.7)到y6离子(m/z 660.3),人C1s的是[M+2H]²⁺(m/z 456.8)到y6离子(m/z 686.3)。通过使用相对于浓度绘制的峰面积,通过加权(1/x²)线性回归构建校正曲线。使用分析软件Masslynx Ver.4.1(Waters)从校正曲线计算小鼠血浆中的浓度。

[0642] 评估小鼠中总hC1和pH和/或Ca依赖性抗C1s抗体的药代动力学

[0643] 在向小鼠(CB17/Icr-Prkdc^{scid}/CrlCrlj:Charles River Japan)单独施用hC1s或联合施用抗C1s抗体后,评估hC1s(如实施例1中所述制备的人补体组分1s)以及pH和/或Ca依赖性抗体在体内的药代动力学。每个给药组分配三只小鼠。将hC1s溶液(0.23mg/mL)或含有hC1s和抗C1s抗体的混合物溶液(分别为0.23和2.5mg/mL)以10mL/kg的剂量静脉内注射给小鼠。

[0644] 剂量设定是研究期间抗C1s抗体相对于C1s的过量浓度,因此,几乎所有C1s都被认为是循环中的结合形式。

[0645] 注射后第5、30分钟,第2、7小时,第3、7、14、21和28天收集血液。立即将这些血液离心以分离血浆样品。通过LC/ESI-MS/MS在每个采样点测量抗C1s抗体和hC1s的血浆浓度。通过非房室分析(non-compartmental analysis)(Phoenix WinNonlin 8.0版,Certara)估计抗C1s抗体和hC1s的PK参数。将以下抗体作为抗C1s抗体施用于小鼠:

[0646] 1. IPN009VH2/IPN009VK3-SG136,

[0647] 2. IPN92H0033/IPN009VK3-SG136,

[0648] 3. IPN009VH2/IPN93L0021-SG136,

[0649] 4. IPN009VH2/IPN93L0023-SG136,

[0650] 5. IPN009VH2/IPN93L0024-SG136,

[0651] 6. IPN92H0038/IPN93L0024-SG136,

[0652] 7. IPN92H0033/IPN93L0024-SG136,

[0653] 8. IPN92H0281/IPN93L0024-SG136,

[0654] 9. IPN92H0286/IPN93L0205-SG136,

[0655] 10. IPN92H0288/IPN93L0211-SG136,

[0656] 11. IPN92H0288/IPN93L0058-SG136,

[0657] 12. IPN92H0307/IPN93L0058-SG136

[0658] IPN92H0286/IPN93L0205-SG136的血浆抗体时间浓度曲线迅速从循环中消除。最高的ECM结合被认为有助于快速消除。其他pH和/或Ca依赖性抗C1s抗体显示相似的血浆时间-浓度曲线。IPN92H0286/IPN93L0205-SG136的CL值为56.5mL/天/kg,而其他抗C1s抗体的CL值在2倍范围内(4.8至8.1mL/天/kg)。结果表明pH和/或Ca依赖性不影响血浆抗体药代动

力学。

[0659] 与非pH/Ca依赖性抗C1s抗体IPN009VH2/IPN009VK3-SG136相比,pH和/或Ca依赖性抗C1s抗体的血浆hC1s时间-浓度曲线显示消除更快。pH/Ca依赖性抗C1s抗体中hC1s的CL倾向于大于Ca或pH依赖性抗C1s抗体中的CL。这些发现表明pH和Ca依赖性结合特性,或者这些组合可用于加速体内C1s的清除。

[0660] 利用人C1S和抗体混合物共同注射的小鼠的药代动力学参数以及抗体变体的亲和
力值

[0661] 每种抗体的清扫指数代表抗体变体从循环中清除抗原的能力。其计算为抗原清除率除以抗体清除率(表8)。清扫指数的提高代表与亲本抗体相比,抗体变体从循环中清除抗原的相对能力。它是通过将每种抗体变体的清扫指数除以亲本抗体的清扫指数(IPN009VH2/IPN009VK3-SG136)来计算的,这样亲本抗体的清扫指数将为1。 k_{off} (775+的5.8+)代表在pH 5.8的附加解离阶段(紧接在pH 7.4的解离阶段之后)期间,C1s的解离速率。“+”表示在pH 7.4和pH 5.8阶段均存在1.2mM $CaCl_2$ 。列 k_{off} (775+的5.8+)/ k_{off} (7.4)表示775+测定中pH 5.8下的解离速率与pH 7.4下的解离速率之比。列KD(5.8+)/KD(7.4+)表示pH 5.8时的抗体亲和力与pH 7.4时的抗体亲和力之比。“+”表示在pH 5.8和pH 7.4的亲和力测量过程中存在1.2mM $CaCl_2$ 。pH5.8下亲和力值的星号标记表示由于结合反应低,无法准确确定亲和力测量值。

[0662] [表8]

[0663]

| 抗体名称 | Ag CL (mL/day/kg) | mAb CL (mL/day/kg) | 清扫指数 Ag CL / mAb CL | 清扫指数 改善 (母本 Δb=1) | km (7.4+) | koff (7.4+) | KD (7.4 +) | koff (5.8+ of 775+) koff (7.4+) | km (5.8+) | koff (5.8+) | KD (5.8+) | KD (5.8+) / KD (7.4+) | IPN009VH2 的 VH 中 的突变 | IPN009VK3 的 VL 中 的突变 |
|-----------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------|-----------|----------------|---------------|---------------------------------------|-----------|-------------|------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| IPN009VH2/IPN009VK3-SG136 | 51.5 | 7.2 | 7.1 | 1.0 | 3.44E-05 | 4.11E-04 | 1.19E-09 | 8.86E-05 | 0.2 | 3.60E-05 | 1.62E-04 | 4.49E-10 | 0.4+ | - |
| IPN92H0331/IPN009VK3-SG136 | 43.7 | 7.5 | 5.9 | 0.8 | 3.77E-05 | 3.80E-04 | 1.01E-09 | 2.65E-04 | 0.7 | 3.89E-05 | 3.62E-04 | 9.31E-10 | 0.9Y99H | - |
| IPN009VH2/IPN93L0021-SG136 | 35.3 | 6.1 | 5.8 | 0.8 | 1.99E-05 | 5.80E-04 | 2.92E-09 | 1.10E-03 | 1.9 | 2.90E-05 | 1.26E-03 | 4.34E-09 | 1.5+ | Y92H |
| IPN009VH2/IPN93L0023-SG136 | 83.1 | 7.2 | 11.5 | 1.6 | 2.27E-05 | 6.28E-04 | 2.77E-09 | 6.91E-04 | 1.1 | 3.30E-05 | 8.18E-04 | 2.48E-09 | 0.9+ | 194H |
| IPN009VH2/IPN93L0024-SG136 | 112.4 | 6.8 | 16.5 | 2.3 | 1.80E-05 | 6.12E-04 | 3.40E-09 | 7.41E-04 | 1.2 | 2.21E-05 | 9.56E-04 | 4.32E-09 | 1.3+ | P95H |
| IPN92H038/IPN93L0024-SG136 | 84.2 | 8.1 | 10.4 | 1.5 | 3.84E-05 | 4.61E-04 | 1.20E-09 | 3.54E-03 | 7.7 | 2.89E-05 | 3.09E-03 | 1.07E-08 | 8.9G6SHY99H | P95H |
| IPN92H0331/IPN93L0024-SG136 | 120.8 | 7.7 | 15.6 | 2.2 | 2.27E-05 | 5.71E-04 | 2.51E-09 | 2.90E-03 | 5.1 | 2.61E-05 | 3.10E-03 | 1.19E-08 | 4.7Y99H | P95H |
| IPN92H0231/IPN93L0024-SG136 | 164.7 | 6.0 | 27.3 | 3.8 | 3.19E-05 | 6.45E-04 | 2.02E-09 | 2.47E-02 | 38.2 | 2.17E-05 | 2.67E-02 | 1.23E-07 | 60.9H56KY99EK64D/C63EG98KY99H | P95H |
| IPN92H0286/IPN93L0205-SG136 | 123.2 | 56.5 | 2.2 | 0.3 | 5.74E-05 | 8.22E-04 | 1.43E-09 | 1.34E-02 | 16.3 | * 2.78E-03 | * 2.37E-02 | * 8.3E-06 | N.AY32K/G6SHY99H | Y32RY92H/D94H |
| IPN92H0288/IPN93L0211-SG136 | 189.4 | 5.9 | 32.1 | 4.5 | 4.69E-05 | 5.20E-04 | 1.11E-09 | 2.82E-02 | 54.2 | 2.33E-05 | 1.94E-02 | 8.31E-08 | 74.9Y99EK64D/C98KY99H | S27AE3N0EP95H |
| IPN92H0288/IPN93L0058-SG136 | 141.1 | 6.1 | 23.1 | 3.2 | 6.66E-05 | 4.08E-04 | 6.11E-10 | 1.58E-02 | 38.8 | 3.15E-05 | 1.27E-02 | 4.01E-08 | 65.6Y99EK64D/C98KY99H | S27AEP95H |
| IPN92H0307/IPN93L0058-SG136 | 109.8 | 4.8 | 22.9 | 3.2 | 3.91E-05 | 5.23E-04 | 1.34E-09 | 1.51E-02 | 28.8 | 3.18E-05 | 1.21E-02 | 3.81E-08 | 28.4T28ES30EY99EK64D/C98KY99H | S27AEP95H |

[0664] 对于除抗体 IPN92H0286/IPN93L0205-SG136 以外的所有抗体,绘制了清扫指数改善与 KD (5.8+)/KD (7.4+) 比例之间的相关性 (图1), 因为该抗体显示出快速清除很可能归因

于高ECM结合(表5)。虚线表示使用线性回归的最佳拟合线,R平方值表示拟合优度。 $KD(5.8+)/KD(7.4+)$ 的值表示抗体在pH 5.8时的亲和力与在pH 7.4时的亲和力之比。“+”表示在pH 5.8和pH 7.4下的亲和力测量过程中存在1.2mM $CaCl_2$ 。

[0665] 对于除抗体IPN92H0286/IPN93L0205-SG136以外的所有抗体,绘制了清扫指数改善与 $koff(775+ \text{的} 5.8+)/koff(7.4+)$ 的比例之间的相关性(图2),因为该抗体显示出快速清除很可能归因于高ECM结合力(表5)。虚线表示使用线性回归的最佳拟合线,R平方值表示拟合优度。 $koff(775+ \text{的} 5.8+)/koff(7.4)$ 的值表示775+测定中pH 5.8时的解离速率与pH 7.4时的解离速率之比。“+”表示在pH 7.4和pH 5.8阶段均存在1.2mM $CaCl_2$ 。

[0666] 实施例7:

[0667] 组氨酸取代的变体IPN93L0026和IPN92H0012(表9)包含具有一个组氨酸取代的可变区,例如在Kabat编号系统位置中的I96H,轻链中位置96的取代和I51H,重链中位置51的取代。使用Biacore T200仪器(GE Healthcare)在37°C下测定pH 7.4和pH 5.8下所有组氨酸取代的变体的结合亲和力。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通池上。在7(+)缓冲液(20mM ACES,150mM NaCl,1.2mM $CaCl_2$,0.05% Tween 20,0.005% NaN_3 ,pH 7.4)或5(+)缓冲液(20mM ACES,150mM NaCl,1.2mM $CaCl_2$,0.05% Tween20,0.005% NaN_3 ,pH 5.8)中制备抗体和分析物。每种抗体被蛋白A/G捕获到传感器表面。抗体捕获水平的目标是200个共振单位(RU)。以50nM注射血清来源的人类C1,然后解离。每个周期用10mM甘氨酸-HCl pH 1.5再生传感器表面。结合亲和力通过使用Biacore T200评估软件2.0版(GE Healthcare)处理数据并将其拟合为1:1结合模型来确定。在pH7.4的解离阶段后立即整合另一个pH 5.8的解离阶段。通过使用Scrubber2.0(BioLogic Software)曲线拟合软件处理和拟合数据,确定5(+)缓冲液中的解离速率(表9)。

[0668] 如表9中所述,单个组氨酸取代的变体IPN93L0026和IPN92H0012显示出 $koff(775+ \text{的} 5.8+)/koff(7.4+)$ 的比例增加。参考清扫指数改善与 $koff(775+ \text{的} 5.8+)/koff(7.4+)$ 比例之间的相关性(表8),这些取代有可能单独或与其他取代组合增强清扫指数改善。

[0669] [表9]

[0670]

| | kon (7.4+) | koff (7.4+) | KD (7.4+) | Rmax (7.4+) | koff (5.8+ of 775+) | koff (5.8+ of 775+) / koff (7.4+) |
|-----------------------------------|------------|-------------|-----------|-------------|---------------------|-----------------------------------|
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN009VK3-SK1 | 2.98E+05 | 3.70E-04 | 1.24E-09 | 138.6 | 1.48E-04 | 0.40 |
| C1_IPN009VH2-SG4GK/IPN93L0026-SK1 | 3.50E+05 | 1.50E-03 | 4.28E-09 | 86.1 | 1.15E-03 | 0.77 |
| C1_IPN92H0012-SG4GK/IPN009VK3-SK1 | 1.83E+05 | 1.92E-03 | 1.05E-08 | 75.1 | 1.09E-03 | 0.57 |

[0671] 实施例8:使用CCP1-CCP2-SP结合剂的小鼠PK研究

[0672] 通过高效液相色谱-电喷雾串联质谱法 (LC/ESI-MS/MS) 测量小鼠血浆中人总C1s的浓度

[0673] 通过LC/ESI-MS/MS测量小鼠血浆中人C1s的总浓度。通过在小鼠血浆中混合并稀释规定量的人C1s制备校正标准品,得到的人C1s的浓度为0.477、0.954、1.91、3.82、7.64、15.3、30.5微克/毫升。将2微升校正标准品和血浆样品与25微升7.5mol/L尿素,8mmol/L二

硫苏糖醇和1微克/毫升溶菌酶(鸡蛋白)在50mmol/L碳酸氢铵中混合并在56℃下温育45分钟。然后,加入2微升500mmol/L碘乙酰胺,并在黑暗中于37℃下温育30分钟。接下来,加入160micro L在50mmol/L碳酸氢铵中的0.5micro g/mL测序级修饰的胰蛋白酶(Promega),并在37℃下温育过夜。最后,加入5微升10%的三氟乙酸使任何残留的胰蛋白酶失活。通过LC/ESI-MS/MS对40微升的消化样品进行分析。使用配备2D I级UPLC(Waters)的Xevo TQ-S三重四极杆仪器(Waters)进行LC/ESI-MS/MS。通过选择的反应监测(SRM)监测人C1s特异性肽LLEVPEGR。人C1s的SRM跃迁为[M+2H]²⁺(m/z 456.8)到y6离子(m/z 686.4),使用相对于浓度绘制的峰面积,通过加权(1/x²)线性回归构建校正曲线。使用分析软件Masslynx Ver.4.1(Waters)从校正曲线计算小鼠血浆中的浓度。

[0674] 向小鼠施用抗C1s抗体后评估总hC1的药代动力学

[0675] 在对小鼠(CB17/Icr-Prkdc^{scid}/Cr1Cr1j;Charles River Japan)单独施用抗原(hC1q和rC1r2s2的混合物)或联合施用抗C1s抗体后,评估hC1s和抗C1s抗体的体内药代动力学。每个给药组分配三只小鼠。

[0676] 首先,将含有hC1q和rC1r2s2(分别为0.84和0.47mg/mL)的混合物的溶液以10mL/kg的剂量静脉内注射给小鼠。抗原溶液给药后,立即以相同方式将抗C1s抗体溶液(2.5mg/mL)施用于同一个体。

[0677] C1q和rC1r2s2的剂量设定被设计为刚施用后人血浆中的生理浓度。在研究期间,将抗C1s抗体的剂量调整为抗C1s抗体相对于两种抗原的过量浓度,因此,假定几乎所有hC1s都是循环中的结合形式。

[0678] 注射后第5、30分钟,第2、7小时,第3、7、14、21和28天收集血液。立即将这些血液离心以分离血浆样品。通过LC/ESI-MS/MS在每个采样点测量hC1的血浆浓度。hC1s的PK参数通过非房室分析(Phoenix WinNonlin 8.0版,Certara)进行估算。将以下抗体作为抗C1s抗体施用于小鼠(表10):

[0679] 1.COS0098bb-SG1148/SG136

[0680] 2.COS0112gg-SG1148/SG136

[0681] 3.COS0127bb-SG1148/SG136

[0682] 4.COS0158ee-SG1148/SG136

[0683] 5.COS0182hh-SG1148/SG136

[0684] SG136 Fc包含降低C1q和Fc γ 受体结合的突变。SG1148 Fc包含降低C1q结合的突变,同时保留Fc γ 受体结合。hC1s的PK参数如表11所示。5种CCP1-CCP2-SP结合剂(COS0098bb、COS0112gg、COS0127bb、COS0158ee和COS0182hh)的hC1s CL比(SG1148/SG136)分别为9.2、6.9、5.6、3.8和6.6。该值表明有可能加速hC1s的消除。

[0685] [表10]

| 抗体名称 | SEQ ID NO: | | | | | | | |
|-----------|------------|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | VH | VL | HVR-H1 | HVR-H2 | HVR-H3 | HVR-L1 | HVR-L2 | HVR-L3 |
| COS0098bb | 46 | 51 | 56 | 57 | 58 | 71 | 72 | 73 |
| COS0112gg | 47 | 52 | 59 | 60 | 61 | 74 | 75 | 76 |
| COS0127bb | 48 | 53 | 62 | 63 | 64 | 77 | 78 | 79 |
| COS0158ee | 49 | 54 | 65 | 66 | 67 | 80 | 81 | 82 |
| COS0182hh | 50 | 55 | 68 | 69 | 70 | 83 | 84 | 85 |

[0686]

[0687] 恒定区名称:SG1148 (CH:SEQ ID NO:86和CL:SEQ ID NO:88),SG136 (CH:SEQ ID NO:87和CL:SEQ ID NO:88)

[0688] [表11]

| C1s CL 比例 (SG1148/SG136) | | |
|-----------------------------|-----------|-------|
| [0689] | COS0098bb | 9.217 |
| | COS0112gg | 6.928 |
| | COS0127bb | 5.586 |
| | COS0158ee | 3.796 |
| | COS0182hh | 6.629 |

序列表

<110> 中外制药株式会社

<120> 抗-C1S抗体和使用方法

<130> C1-A1718Y1P

<150> JP 2017-219507

<151> 2017-11-14

<150> JP 2018-188765

<151> 2018-10-04

<160> 88

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 673

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

[0001]

Glu Pro Thr Met Tyr Gly Glu Ile Leu Ser Pro Asn Tyr Pro Gln Ala
1 5 10 15

Tyr Pro Ser Glu Val Glu Lys Ser Trp Asp Ile Glu Val Pro Glu Gly
20 25 30

Tyr Gly Ile His Leu Tyr Phe Thr His Leu Asp Ile Glu Leu Ser Glu
35 40 45

Asn Cys Ala Tyr Asp Ser Val Gln Ile Ile Ser Gly Asp Thr Glu Glu
50 55 60

Gly Arg Leu Cys Gly Gln Arg Ser Ser Asn Asn Pro His Ser Pro Ile
65 70 75 80

Val Glu Glu Phe Gln Val Pro Tyr Asn Lys Leu Gln Val Ile Phe Lys
85 90 95

Ser Asp Phe Ser Asn Glu Glu Arg Phe Thr Gly Phe Ala Ala Tyr Tyr
100 105 110

Val Ala Thr Asp Ile Asn Glu Cys Thr Asp Phe Val Asp Val Pro Cys
115 120 125

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | Ser | His | Phe | Cys | Asn | Asn | Phe | Ile | Gly | Gly | Tyr | Phe | Cys | Ser | Cys | Pro | |
| | 130 | | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| | Pro | Glu | Tyr | Phe | Leu | His | Asp | Asp | Met | Lys | Asn | Cys | Gly | Val | Asn | Cys | |
| | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| | Ser | Gly | Asp | Val | Phe | Thr | Ala | Leu | Ile | Gly | Glu | Ile | Ala | Ser | Pro | Asn | |
| | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | |
| | Tyr | Pro | Lys | Pro | Tyr | Pro | Glu | Asn | Ser | Arg | Cys | Glu | Tyr | Gln | Ile | Arg | |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | | 190 | | |
| | Leu | Glu | Lys | Gly | Phe | Gln | Val | Val | Val | Thr | Leu | Arg | Arg | Glu | Asp | Phe | |
| | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| | Asp | Val | Glu | Ala | Ala | Asp | Ser | Ala | Gly | Asn | Cys | Leu | Asp | Ser | Leu | Val | |
| | 210 | | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| | Phe | Val | Ala | Gly | Asp | Arg | Gln | Phe | Gly | Pro | Tyr | Cys | Gly | His | Gly | Phe | |
| | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | |
| [0002] | Pro | Gly | Pro | Leu | Asn | Ile | Glu | Thr | Lys | Ser | Asn | Ala | Leu | Asp | Ile | Ile | |
| | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | |
| | Phe | Gln | Thr | Asp | Leu | Thr | Gly | Gln | Lys | Lys | Gly | Trp | Lys | Leu | Arg | Tyr | |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | |
| | His | Gly | Asp | Pro | Met | Pro | Cys | Pro | Lys | Glu | Asp | Thr | Pro | Asn | Ser | Val | |
| | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | |
| | Trp | Glu | Pro | Ala | Lys | Ala | Lys | Tyr | Val | Phe | Arg | Asp | Val | Val | Gln | Ile | |
| | 290 | | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | |
| | Thr | Cys | Leu | Asp | Gly | Phe | Glu | Val | Val | Glu | Gly | Arg | Val | Gly | Ala | Thr | |
| | 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | |
| | Ser | Phe | Tyr | Ser | Thr | Cys | Gln | Ser | Asn | Gly | Lys | Trp | Ser | Asn | Ser | Lys | |
| | | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | |
| | Leu | Lys | Cys | Gln | Pro | Val | Asp | Cys | Gly | Ile | Pro | Glu | Ser | Ile | Glu | Asn | |
| | | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | |
| | Gly | Lys | Val | Glu | Asp | Pro | Glu | Ser | Thr | Leu | Phe | Gly | Ser | Val | Ile | Arg | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |

Glu Ala Tyr Val Phe Thr Pro Asn Met Ile Cys Ala Gly Gly Glu Lys
595 600 605

Gly Met Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Ala Phe Ala Val Gln
610 615 620

Asp Pro Asn Asp Lys Thr Lys Phe Tyr Ala Ala Gly Leu Val Ser Trp
625 630 635 640

Gly Pro Gln Cys Gly Thr Tyr Gly Leu Tyr Thr Arg Val Lys Asn Tyr
645 650 655

Val Asp Trp Ile Met Lys Thr Met Gln Glu Asn Ser Thr Pro Arg Glu
660 665 670

Asp

[0004] <210> 2
<211> 673
<212> PRT
<213> 大鼠 (*Rattus norvegicus*)

<400> 2

Glu Pro Thr Met Tyr Gly Glu Ile Leu Ser Pro Asn Tyr Pro Gln Ala
1 5 10 15

Tyr Pro Asn Glu Val Val Lys Thr Trp Asp Ile Glu Val Pro Glu Gly
20 25 30

Phe Gly Ile His Leu Tyr Phe Thr His Leu Asp Met Glu Leu Ser Glu
35 40 45

Asn Cys Ala Tyr Asp Ser Val Gln Ile Ile Ser Gly Gly Ile Glu Glu
50 55 60

Glu Arg Leu Cys Gly Gln Arg Thr Ser Lys Ser Pro Asn Ser Pro Thr
65 70 75 80

Val Glu Glu Phe Gln Phe Pro Tyr Asn Arg Leu Gln Val Val Phe Thr
85 90 95

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | Ser | Asp | Phe | Ser | Asn | Glu | Glu | Arg | Phe | Thr | Gly | Phe | Ala | Ala | Tyr | Tyr | |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| | Ser | Ala | Val | Asp | Val | Asn | Glu | Cys | Thr | Asp | Phe | Thr | Asp | Val | Pro | Cys | |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| | Ser | His | Phe | Cys | Asn | Asn | Phe | Ile | Gly | Gly | Tyr | Phe | Cys | Ser | Cys | Pro | |
| | | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| | Pro | Glu | Tyr | Phe | Leu | His | Asp | Asp | Met | Arg | Thr | Cys | Gly | Val | Asn | Cys | |
| | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| | Ser | Gly | Asp | Val | Phe | Thr | Ala | Leu | Ile | Gly | Glu | Ile | Ala | Ser | Pro | Asn | |
| | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | |
| | Tyr | Pro | Asn | Pro | Tyr | Pro | Glu | Asn | Ser | Arg | Cys | Glu | Tyr | Gln | Ile | Arg | |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| | Leu | Gln | Glu | Gly | Phe | Arg | Leu | Val | Leu | Thr | Ile | Arg | Arg | Glu | Asp | Phe | |
| | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| [0005] | Asp | Val | Glu | Pro | Ala | Asp | Ser | Glu | Gly | Asn | Cys | His | Asp | Ser | Leu | Thr | |
| | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| | Phe | Ala | Ala | Lys | Asn | Gln | Gln | Phe | Gly | Pro | Tyr | Cys | Gly | Asn | Gly | Phe | |
| | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | |
| | Pro | Gly | Pro | Leu | Thr | Ile | Lys | Thr | Gln | Ser | Asn | Thr | Leu | Asp | Ile | Val | |
| | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | |
| | Phe | Gln | Thr | Asp | Leu | Thr | Gly | Gln | Asn | Lys | Gly | Trp | Lys | Leu | Arg | Tyr | |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | |
| | His | Gly | Asp | Pro | Ile | Pro | Cys | Pro | Lys | Glu | Ile | Ser | Ala | Asn | Ser | Ile | |
| | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | |
| | Trp | Glu | Pro | Glu | Lys | Ala | Lys | Tyr | Val | Phe | Lys | Asp | Val | Val | Lys | Ile | |
| | | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | |
| | Thr | Cys | Val | Asp | Gly | Phe | Glu | Val | Val | Glu | Gly | Asn | Val | Gly | Ser | Thr | |
| | 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | |
| | Ser | Phe | Tyr | Ser | Thr | Cys | Gln | Ser | Asn | Gly | Gln | Trp | Ser | Asn | Ser | Arg | |

| | 325 | 330 | 335 |
|--------|--|-----|-----|
| | Leu Glu Cys Gln Pro Val Asp Cys Gly Val Pro Glu Pro Ile Glu Asn 340 345 350 | | |
| | Gly Lys Val Glu Asp Pro Glu Asp Thr Val Phe Gly Ser Val Ile His 355 360 365 | | |
| | Tyr Thr Cys Glu Glu Pro Tyr Tyr Tyr Met Glu Gln Glu Glu Gly Gly 370 375 380 | | |
| | Glu Tyr His Cys Ala Ala Asn Gly Ser Trp Val Asn Asp Gln Leu Gly 385 390 395 400 | | |
| | Val Glu Leu Pro Lys Cys Ile Pro Val Cys Gly Val Pro Thr Glu Pro 405 410 415 | | |
| | Phe Lys Val Gln Gln Arg Ile Phe Gly Gly Tyr Ser Thr Lys Ile Gln 420 425 430 | | |
| [0006] | Ser Phe Pro Trp Gln Val Tyr Phe Glu Ser Pro Arg Gly Gly Gly Ala 435 440 445 | | |
| | Leu Ile Asp Glu Tyr Trp Val Leu Thr Ala Ala His Val Val Glu Gly 450 455 460 | | |
| | Asn Ser Asp Pro Val Met Tyr Val Gly Ser Thr Leu Leu Lys Ile Glu 465 470 475 480 | | |
| | Arg Leu Arg Asn Ala Gln Arg Leu Ile Thr Glu Arg Val Ile Ile His 485 490 495 | | |
| | Pro Ser Trp Lys Gln Glu Asp Asp Leu Asn Thr Arg Thr Asn Phe Asp 500 505 510 | | |
| | Asn Asp Ile Ala Leu Val Gln Leu Lys Asp Pro Val Lys Met Gly Pro 515 520 525 | | |
| | Thr Val Ala Pro Ile Cys Leu Pro Glu Thr Ser Ser Asp Tyr Asn Pro 530 535 540 | | |
| | Ser Glu Gly Asp Leu Gly Leu Ile Ser Gly Trp Gly Arg Thr Glu Asn 545 550 555 560 | | |

Arg Thr Asn Val Ile Gln Leu Arg Gly Ala Lys Leu Pro Ile Thr Ser
565 570 575

Leu Glu Lys Cys Gln Gln Val Lys Val Glu Asn Pro Lys Ala Arg Ser
580 585 590

Asn Asp Tyr Val Phe Thr Asp Asn Met Ile Cys Ala Gly Glu Lys Gly
595 600 605

Val Asp Ser Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Ala Phe Ala Leu Pro Val
610 615 620

Pro Asn Val Lys Asp Pro Lys Phe Tyr Val Ala Gly Leu Val Ser Trp
625 630 635 640

Gly Lys Lys Cys Gly Thr Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Lys Asn Tyr
645 650 655

Val Asp Trp Ile Leu Lys Thr Met Gln Glu Asn Ser Gly Pro Lys Lys
660 665 670

[0007]

Asp

<210> 3
<211> 673
<212> PRT
<213> 食蟹猴 (Macaca fascicularis)
<400> 3

Glu Pro Thr Met Tyr Gly Glu Ile Leu Ser Pro Asn Tyr Pro Gln Ala
1 5 10 15

Tyr Pro Ser Glu Val Glu Lys Ser Trp Asp Ile Glu Val Pro Glu Gly
20 25 30

Tyr Gly Ile His Leu Tyr Phe Thr His Leu Asp Ile Glu Leu Ser Glu
35 40 45

Asn Cys Ala Tyr Asp Ser Val Gln Ile Met Ser Gly Asp Ile Glu Glu
50 55 60

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Gly | Arg | Leu | Cys | Gly | Gln | Arg | Thr | Ser | Asn | Asn | Pro | Tyr | Ser | Pro | Ile |
| | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| | Val | Glu | Glu | Phe | Gln | Val | Pro | Tyr | Asn | Lys | Leu | Gln | Val | Ile | Phe | Lys |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| | Ser | Asp | Phe | Ser | Asn | Glu | Glu | Arg | Phe | Thr | Gly | Phe | Ala | Ala | Tyr | Tyr |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| | Val | Ala | Thr | Asp | Ile | Asn | Glu | Cys | Thr | Asp | Phe | Val | Asp | Ala | Pro | Cys |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| | Ser | His | Phe | Cys | Asn | Asn | Phe | Ile | Gly | Gly | Tyr | Phe | Cys | Ser | Cys | Pro |
| | | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| | Pro | Glu | Tyr | Phe | Leu | His | Asp | Asp | Met | Lys | Asn | Cys | Gly | Val | Asn | Cys |
| | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| | Ser | Gly | Asp | Val | Phe | Thr | Ala | Leu | Ile | Gly | Glu | Ile | Ala | Ser | Pro | Asn |
| | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| [0008] | Tyr | Pro | Lys | Pro | Tyr | Pro | Glu | Asn | Ser | Arg | Cys | Glu | Tyr | Gln | Ile | Arg |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| | Leu | Glu | Lys | Gly | Phe | Gln | Val | Val | Val | Thr | Val | Arg | Arg | Glu | Asp | Phe |
| | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| | Asp | Val | Glu | Pro | Ala | Asp | Ser | Glu | Gly | Asn | Cys | Leu | Asp | Ser | Leu | Val |
| | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| | Phe | Val | Ala | Gly | Asp | Gln | Gln | Phe | Gly | Pro | Tyr | Cys | Gly | Arg | Gly | Phe |
| | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| | Pro | Gly | Pro | Leu | Asn | Ile | Glu | Thr | Lys | Ser | Asn | Val | Leu | Asp | Ile | Ile |
| | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| | Phe | Gln | Thr | Asp | Leu | Thr | Gly | Gln | Asn | Lys | Gly | Trp | Lys | Leu | Arg | Tyr |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| | His | Gly | Asp | Pro | Met | Pro | Cys | Pro | Lys | Glu | Glu | Thr | Pro | Thr | Ser | Val |
| | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | |
| | Trp | Glu | Pro | Ala | Lys | Ala | Lys | Tyr | Val | Phe | Arg | Asp | Val | Val | Arg | Ile |

| | 290 | | 295 | | 300 | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|
| | Thr | Cys | Leu | Asp | Gly | Phe | Glu | Val | Val | Glu | Gly | Arg | Val | Gly | Ala | Thr | | | |
| | 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | | | |
| | Ser | Phe | His | Ser | Thr | Cys | Gln | Ser | Asn | Gly | Lys | Trp | Ser | Asn | Ser | Lys | | | |
| | | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | | | |
| | Leu | Lys | Cys | Gln | Pro | Val | Asp | Cys | Gly | Ile | Pro | Glu | Ser | Ile | Glu | Asn | | | |
| | | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | | | |
| | Gly | Lys | Val | Glu | Asp | Pro | Glu | Ser | Thr | Leu | Phe | Gly | Ser | Val | Thr | Arg | | | |
| | | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | | | |
| | Tyr | Thr | Cys | Glu | Glu | Pro | Tyr | Tyr | Tyr | Met | Glu | Asn | Gly | Gly | Asn | Gly | | | |
| | | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | | | |
| | Gln | Tyr | His | Cys | Ala | Ser | Asn | Gly | Ser | Trp | Val | Asn | Glu | Ala | Leu | Ser | | | |
| | 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 | | | |
| [0009] | Pro | Glu | Leu | Pro | Lys | Cys | Val | Pro | Val | Cys | Gly | Val | Pro | Arg | Glu | Pro | | | |
| | | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | | | | |
| | Phe | Glu | Gly | Lys | Gln | Arg | Ile | Ile | Gly | Gly | Ser | Asp | Ala | Asp | Ile | Lys | | | |
| | | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | | | |
| | Asn | Phe | Pro | Trp | Gln | Val | Phe | Phe | Asp | Asn | Pro | Trp | Ala | Gly | Gly | Ala | | | |
| | | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | | | | |
| | Leu | Ile | Asp | Glu | Tyr | Trp | Val | Leu | Thr | Ala | Ala | His | Val | Val | Glu | Gly | | | |
| | | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | | | |
| | Asn | Gln | Glu | Pro | Thr | Met | Tyr | Val | Gly | Ser | Thr | Ser | Val | Gln | Thr | Ser | | | |
| | 465 | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 | | | |
| | Arg | Leu | Ala | Lys | Ser | Lys | Met | Leu | Thr | Ser | Glu | Arg | Val | Phe | Ile | His | | | |
| | | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | 495 | | | | |
| | Pro | Gly | Trp | Lys | Leu | Leu | Glu | Val | Pro | Glu | Ala | Arg | Thr | Asn | Phe | Asp | | | |
| | | | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | | | | |
| | Asn | Asp | Ile | Ala | Leu | Val | Gln | Leu | Lys | Asp | Pro | Val | Lys | Met | Gly | Pro | | | |
| | | | 515 | | | | | 520 | | | | | 525 | | | | | | |

Thr Val Ala Pro Ile Cys Leu Pro Gly Thr Ser Ser Asp Tyr Asn Leu
530 535 540

Met Asp Gly Asp Leu Gly Leu Ile Ala Gly Trp Gly Arg Thr Glu Lys
545 550 555 560

Arg Asp Arg Ala Leu Arg Leu Lys Ala Ala Arg Leu Pro Val Ala Pro
565 570 575

Leu Arg Lys Cys Arg Glu Val Lys Val Glu Asn Pro Lys Ala Asp Ala
580 585 590

Gly Ala Tyr Val Phe Thr Pro Asn Met Ile Cys Ala Gly Gly Glu Lys
595 600 605

Gly Met Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Ala Phe Ala Val Gln
610 615 620

Asp Pro Asn Asp Lys Thr Lys Phe Tyr Val Ala Gly Leu Val Ser Trp
625 630 635 640

[0010]

Gly Pro Gln Cys Gly Thr Tyr Gly Leu Tyr Thr Arg Val Gln Asn Tyr
645 650 655

Val Asp Trp Ile Lys Lys Thr Met Gln Glu Asn Ser Thr Pro Ser Lys
660 665 670

Asp

<210> 4

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人工合成序列

<400> 4

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

30

<400> 5

<400> 6

<400> 7

〈220〉
〈223〉 人工合成序列

<400> 8

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人工合成序列

<400> 9

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 10

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

[0012]

<220>

<223> 人工合成序列

<400> 10

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人工合成序列

<400> 11

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 12

<211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 12

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Glu Phe Glu
 20 25 30

<210> 13
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 13

[0013] Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Phe Thr Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 14
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 14

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

[0014] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Arg Leu Pro
 85 90 95

Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 15
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 15

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

[0015]

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 16
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

[0016]

<400> 16

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

<210> 17
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 17

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
 50 55 60

[0017] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Phe Thr Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 18
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 18

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp
35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Arg Leu His
85 90 95

Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 19

<211> 118

<212> PRT

[0018] <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人工合成序列

<400> 19

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr Tyr Glu Leu Asp Ser Val
50 55 60

Asp Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Phe Thr Lys His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 20

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Thr Ala Ser Ser Glu Val Ser Glu Ser
20 25 30

[0019] Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp
35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Arg Leu His
85 90 95

Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 21
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 21

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Thr Ala Ser Ser Glu Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp
35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Arg Leu His
85 90 95

Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

[0020]

<210> 22
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 22

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Glu Phe Glu Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr Tyr Glu Leu Asp Ser Val
50 55 60

Asp Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Phe Thr Lys His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 23

Asn Tyr Ala Met Ser
1 5

[0021] <210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 24

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 25

Leu Phe Thr Gly Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 26

Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 27

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

[0022]

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 28

His Gln Tyr Tyr Arg Leu Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 29
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 29

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asp Tyr Ile His Trp Val
1 5 10

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 30

Ile Asp Pro Ala Asp Asp His Thr Lys Tyr
1 5 10

<210> 31
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 31

Ala Ile Tyr Gly Ser Gly Trp Ala Trp Phe Pro Tyr
1 5 10

[0023]

<210> 32
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 32

Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 33

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro
1 5 10

<210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 34

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp Thr
1 5

<210> 35
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 35

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0024] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Phe Thr Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 36

<211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

[0025]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Phe Thr Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 37
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 37

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp
35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Arg Leu Pro
85 90 95

Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 38

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人工合成序列

[0026]

<400> 38

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp
35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Arg Leu Pro
85 90 95

Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 39

Asn Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 40

[0027] Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr Tyr Glu Leu Asp Ser Val Asp
1 5 10 15

Gly

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 41

Leu Phe Thr Lys His Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 42
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 42

Thr Ala Ser Ser Glu Val Ser Glu Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人工合成序列

<400> 43

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人工合成序列

[0028] <400> 44

His Gln Tyr Tyr Arg Leu His Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 45

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人工合成序列

<400> 45

Thr Ala Ser Ser Glu Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 46

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人工合成序列

<400> 46

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 55 60

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

[0029]

Val Ser Ser
115

<210> 47

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人工合成序列

<400> 47

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 Ser Ser Tyr Pro
20 25 30

Met Gly Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

Thr Ile Ser Ala Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr
65 70 75 80

Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Tyr
85 90 95

Pro Tyr Thr Asp Gly Thr Tyr Met Thr Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 48

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人工合成序列

<400> 48

[0030] 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 Ile Asp Leu Asn Asn Tyr Pro
20 25 30

Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
35 40 45

Ile Ile Ser Ser Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met
65 70 75 80

Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly
85 90 95

Tyr Pro Tyr Arg Asp Ile Thr Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 49
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 49

Gln Ser Leu 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 Ser Ser Tyr Thr
 20 25 30

Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45

Val Val Gly Gly Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60

[0031]

Arg Phe Thr Ile 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 Asp Thr
 85 90 95

Ser Val Ala Gly Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 50
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 50

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Asn Ala
20 25 30

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

Gly Val Ser Gly Gly Ala Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr
65 70 75 80

Gly Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala
85 90 95

Gly Ser Asn Ile Asp Gly Pro Phe Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

[0032]

<210> 51
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 51

Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Glu Pro Val Gly Gly
1 5 10 15

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 Tyr Phe Thr Ser | Ser Thr |
| | 85 | 90 | 95 |

| | | |
|-----------------|-----------------|---------|
| Phe Gly Gly Gly | Thr Lys Val Glu | Ile Lys |
| | 100 | 105 |

<210> 52
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 52

| | | | |
|-----------------|---------------------|---------------------|---------|
| Ala Phe Glu Leu | Thr Gln Thr Pro Ser | Ser Val Glu Ala Ala | Val Gly |
| 1 | 5 | 10 | 15 |

| | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Gly Thr Val Thr | Ile Lys Cys Gln | Ala Ser Glu Asn | Ile Tyr Ser Leu |
| | 20 | 25 | 30 |

[0033]

| | | | |
|-----------------|---------------------|-----------------|-------------|
| Leu Ala Trp Tyr | Gln Gln Lys Pro Gly | Gln Pro Pro Lys | Leu Leu Ile |
| | 35 | 40 | 45 |

| | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Tyr Gly Ala Ser | Thr Leu Ala Ser | Gly Val Ser Ser | Arg Phe Ser Gly |
| | 50 | 55 | 60 |

| | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Ser Gly Tyr Gly | Thr Glu Phe Thr | Leu Thr Ile Ser | Asp Leu Glu Cys |
| 65 | 70 | 75 | 80 |

| | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Ala Asp Ala Ala | Thr Tyr Tyr Cys | Gln Ser Tyr Tyr | Asp Ser Ser Thr |
| | 85 | 90 | 95 |

| | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|
| Thr Thr Phe Gly | Gly Gly Thr Lys | Val Glu Ile Lys |
| | 100 | 105 |

<210> 53
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 53

Asp Pro Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Pro Val Gly
1 5 10 15

Gly Ser Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Thr Asn Gly Val Ser Ser Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Tyr Tyr Ser Gly Gly Ser
85 90 95

Ala Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

[0034]

<210> 54

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人工合成序列

<400> 54

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Val Ser
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys

| | | | |
|-----------------|---------------------|---------------------|---------|
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Ala Asp Ala Ala | Thr Tyr Tyr Cys Gln | Gln Asp Tyr Thr Tyr | Ser Asp |
| | 85 | 90 | 95 |

| | | | |
|-----------------|-----------------|---------------------|-----|
| Val Thr Asn Ile | Phe Gly Gly Gly | Thr Lys Val Glu Ile | Lys |
| | 100 | 105 | 110 |

<210> 55
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 55

| | | | |
|-----------------|---------------------|---------------------|---------|
| Ala Phe Glu Met | Thr Gln Thr Pro Ser | Ser Val Ser Ala Pro | Val Gly |
| 1 | 5 | 10 | 15 |

| | | | |
|-----------------|-----------------|---------------------|-------------|
| Gly Thr Val Thr | Ile Lys Cys Gln | Ala Ser Gln Asn Ile | Tyr Ser Tyr |
| | 20 | 25 | 30 |

[0035]

| | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Leu Ser Trp Tyr | Gln Gln Lys Pro | Gly His Pro Pro | Lys Leu Leu Ile |
| | 35 | 40 | 45 |

| | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Tyr Gly Ala Ser | Thr Leu Ala Ser | Gly Val Pro Ser | Arg Phe Lys Gly |
| | 50 | 55 | 60 |

| | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Ser Gly Tyr Gly | Thr Glu Phe Thr | Leu Thr Ile Ser | Asp Leu Glu Cys |
| 65 | 70 | 75 | 80 |

| | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Ala Asp Pro Ala | Thr Tyr Tyr Cys | Gln Gln Tyr Tyr | Ala Thr Thr Ser |
| | 85 | 90 | 95 |

| | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|
| Val Asp Phe Gly | Gly Gly Thr Lys | Val Glu Ile Lys |
| | 100 | 105 |

<210> 56
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 56

Lys Tyr Thr Val Ser
1 5

<210> 57

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人工合成序列

<400> 57

Ile Ile Asn Thr Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人工合成序列

[0036] <400> 58

Gly Asn Gly Asp Thr Asp Tyr Thr Asn Leu
1 5 10

<210> 59

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人工合成序列

<400> 59

Ser Tyr Pro Met Gly
1 5

<210> 60

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人工合成序列

<400> 60

Thr Ile Ser Ala Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 61
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 61

Gly Tyr Pro Tyr Thr Asp Gly Thr Tyr Met Thr Leu
1 5 10

<210> 62
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 62

[0037]

Asn Tyr Pro Met Gly
1 5

<210> 63
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 63

Ile Ile Ser Ser Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 64
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 64

Gly Tyr Pro Tyr Arg Asp Ile Thr Tyr Phe Asn Leu
1 5 10

<210> 65
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 65

Ser Tyr Thr Met Ile
1 5

<210> 66
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 66

[0038] Val Val Gly Gly Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 67
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 67

Asp Thr Ser Val Ala Gly Asp Leu
1 5

<210> 68
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 68

Arg Asn Ala Ile Asn

1 5

<210> 69
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 69

Gly Val Ser Gly Gly Ala Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Gly
 1 5 10 15

<210> 70
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 70

[0039] Gly Ala Gly Ser Asn Ile Asp Gly Pro Phe Asn Leu
 1 5 10

<210> 71
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 71

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

<210> 72
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 72

Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 73

Gln Gln Tyr Tyr Phe Thr Ser Ser Thr
1 5

<210> 74
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 74

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

[0040]

<210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 75

Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 76

Gln Ser Tyr Tyr Asp Ser Ser Thr Thr Thr
1 5 10

<210> 77
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 77

| | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Ala | Ser | Gln | Asn | Ile | Tyr | Ser | Tyr | Leu | Ser |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | |

<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 78

| | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ala | Ser | Thr | Leu | Thr | Asn |
| 1 | | | | 5 | | |

[0041]

<210> 79
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 79

| | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Asn | Tyr | Tyr | Ser | Gly | Gly | Ser | Ala | Asp | Thr | Thr |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | |

<210> 80
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 80

| | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Ala | Ser | Gln | Ser | Ile | Gly | Val | Ser | Leu | Ala |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | |

<210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 81

Lys Ala Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 82
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 82

Gln Gln Asp Tyr Thr Tyr Ser Asp Val Thr Asn Ile
1 5 10

[0042] <210> 83
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 83

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

<210> 84
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 84

Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 85

<211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 85

Gln Gln Tyr Tyr Ala Thr Thr Ser Val Asp
 1 5 10

<210> 86
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
 <223> 人工合成序列

<400> 86

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

[0043] 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
245 250 255

[0044]

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

<210> 87
<211> 328
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 87

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

[0045]

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Arg Arg 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 Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Gly Leu Pro Ser Ser 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

[0046]

<210> 88
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>
<223> 人工合成序列

<400> 88

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 |
| [0047] | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| | Pro | Val | Thr | Lys | Ser | Phe | Asn | Arg | Gly | Glu | Cys | | | | | |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | | | |

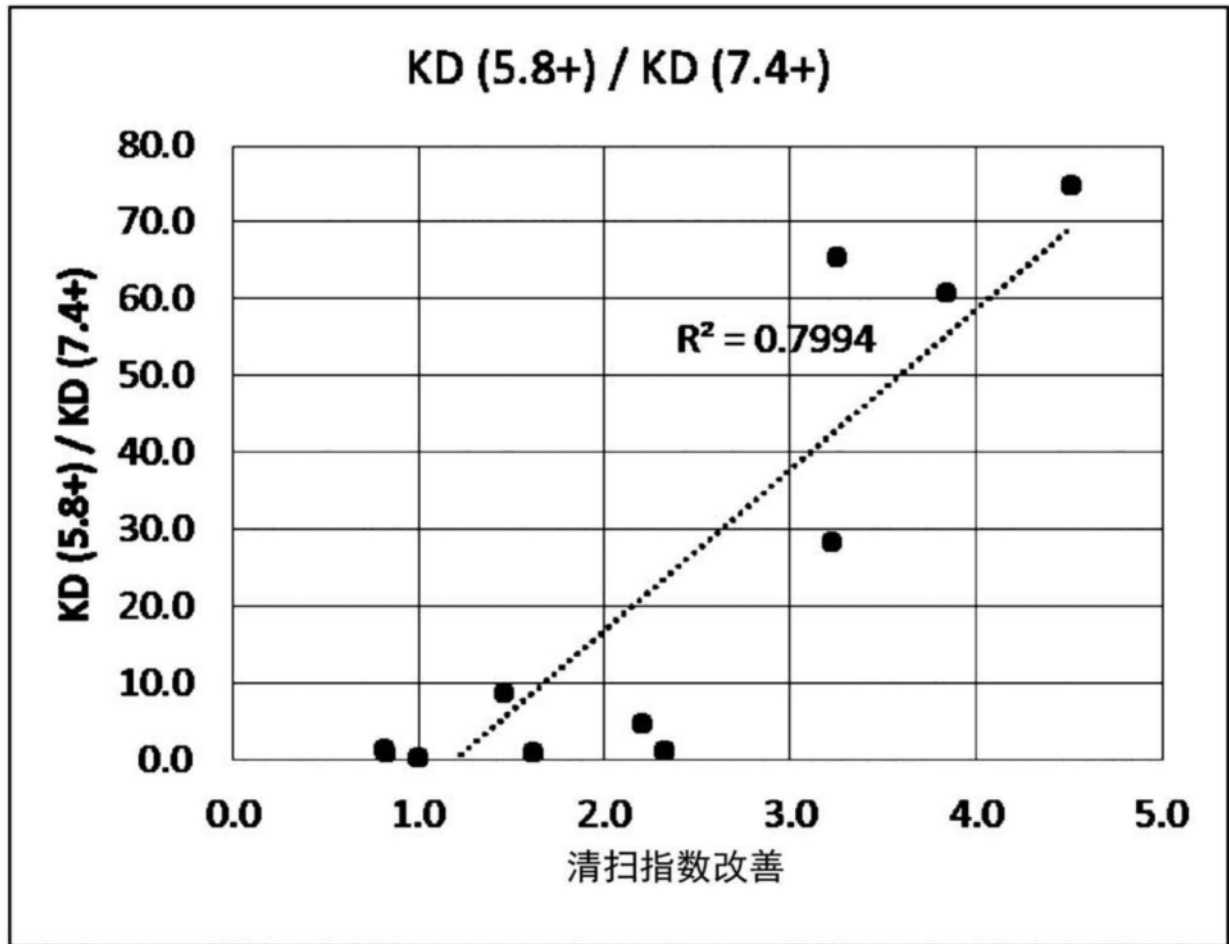


图1

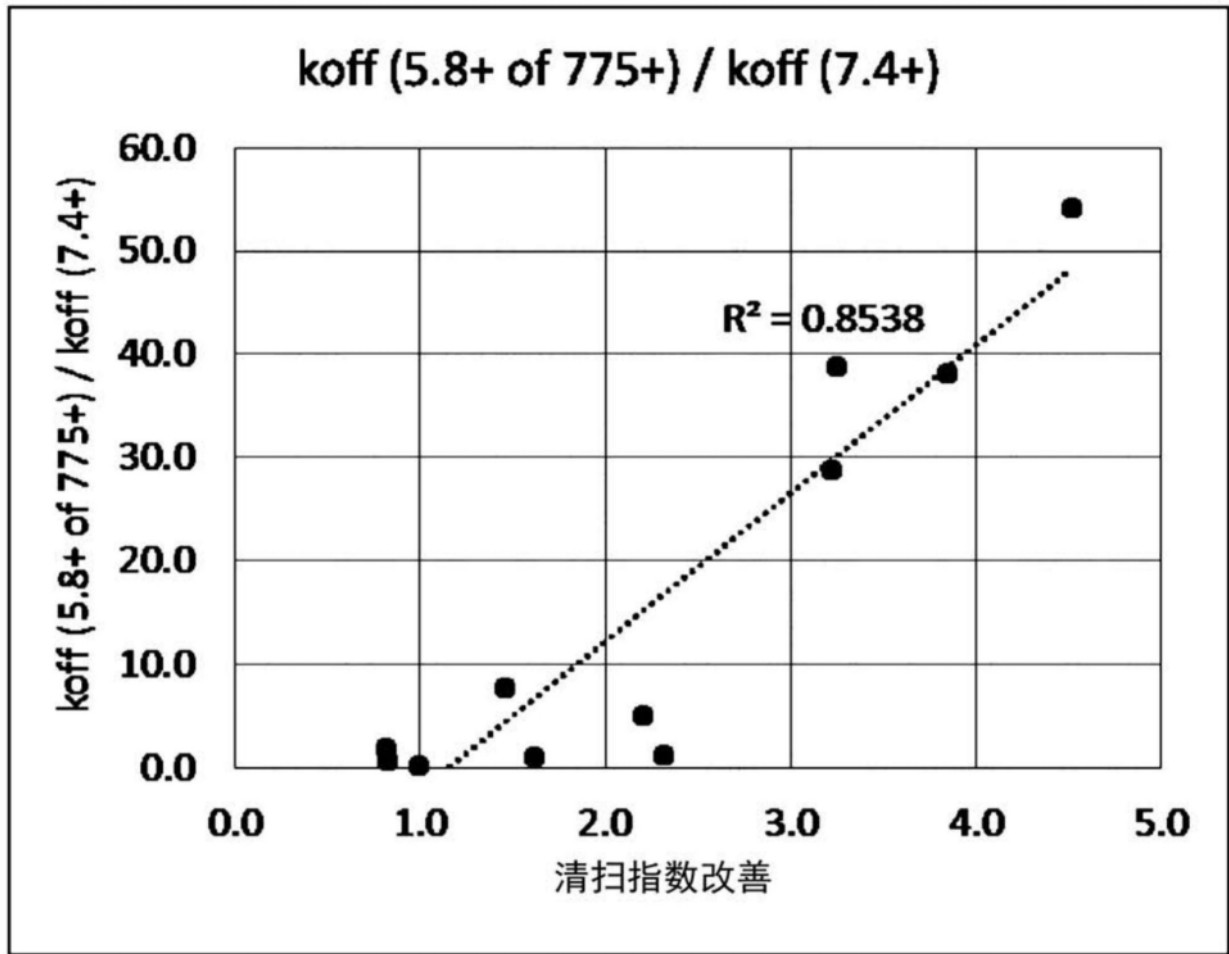


图2