



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102858371 B

(45)授权公告日 2017.03.01

(21)申请号 201180017717.1

M·B·佩皮斯

(22)申请日 2011.03.01

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 102858371 A

代理人 李慧惠 权陆军

(43)申请公布日 2013.01.02

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

61/309957 2010.03.03 US

A61K 39/395(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2012.09.29

(56)对比文件

WO 2009/000926 A1,2008.12.31,权利要求  
1-10,说明书第1页第3段,第58页第2段至第61页  
第1段.

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/053038 2011.03.01

WO 95/05394 A1,1995.02.23,说明书实施  
例3.

(87)PCT国际申请的公布数据

W02011/107480 EN 2011.09.09

WO 2009/155962 A1,2009.12.30,说明书实  
施例1-11.

(73)专利权人 葛兰素集团有限公司

地址 英国梅得塞克斯

审查员 傅晶

(72)发明人 T·K·布欣德 S·K·福特

V·格马舍夫斯基 A·P·路维斯

权利要求书1页 说明书65页

序列表34页 附图8页

(54)发明名称

对血清淀粉样蛋白P组分特异性的抗原结合  
蛋白

(57)摘要

本发明涉及结合血清淀粉样蛋白P组分(SAP)的抗原结合蛋白(诸如抗体)、编码这种抗原结合蛋白的多核苷酸、包含所述抗原结合蛋白的药物组合物和生产方法。本发明也涉及这种抗原结合蛋白在治疗或预防与淀粉样蛋白沉着有关的疾病中的用途,所述疾病包括全身性淀粉样变性、局部性淀粉样变性、阿尔茨海默氏病和II型糖尿病。

1. 一种抗体,其特异性地结合血清淀粉样蛋白P组分,其中重链可变区是SEQ ID NO: 28;轻链可变区是SEQ ID NO:35,并且其中所述抗体包含人IgG1或IgG3人恒定结构域。
2. 如权利要求1定义的抗体,其由SEQ ID NO:62的重链;和SEQ ID NO:64的轻链组成。
3. 一种核酸分子,其编码在权利要求1-2中的任一项中定义的抗体。
4. 如权利要求3中定义的核酸分子,其由SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:59组成。
5. 如权利要求3中定义的核酸分子,其由SEQ ID NO:61和SEQ ID NO:63组成。
6. 一种表达载体,其包含如在权利要求3、4或5中定义的核酸分子。
7. 一种重组宿主细胞,其包含在权利要求6中定义的表达载体。
8. 一种用于生产在权利要求1-2中的任一项中定义的抗体的方法,所述方法包括下述步骤:培养在权利要求7中定义的宿主细胞,和回收所述抗体。
9. 一种药物组合物,其包含在权利要求1-2中的任一项中定义的抗体和药学上可接受的载体。
10. 在权利要求1-2中的任一项中定义的抗体在制备用于治疗或预防与淀粉样蛋白沉着有关的疾病的药物中的用途,其中所述抗体将与(R)-1-[6-[(R)-2-羧基-吡咯烷-1-基]-6-氧代-己酰基]吡咯烷-2-羧酸(CPHPC)或其药学上可接受的盐或单酯或二酯一起施用,其中抗体和CPHPC的施用是相继的并且其中CPHPC将首先施用。
11. 根据权利要求10所述的用途,其中所述抗体将在所有的在受试者中循环的血清淀粉样蛋白P组分已经被清除时施用。
12. 根据权利要求10或11任一项所述的用途,其中所述疾病选自:全身性淀粉样变性、局部性淀粉样变性。
13. 根据权利要求10或11任一项所述的用途,其中所述疾病选自:阿尔茨海默氏病、II型糖尿病、透析相关的淀粉样变性、单克隆免疫球蛋白链(AL)淀粉样变性。
14. 根据权利要求10或11任一项所述的用途,其中所述疾病选自:脑淀粉样蛋白血管病。

## 对血清淀粉样蛋白P组分特异性的抗原结合蛋白

### 技术领域

[0001] 本发明涉及结合血清淀粉样蛋白P组分(SAP)的抗原结合蛋白(诸如抗体)、编码这种抗原结合蛋白的多核苷酸、包含所述抗原结合蛋白的药物组合物和生产方法。本发明也涉及这种抗原结合蛋白在治疗或预防与淀粉样蛋白沉着有关的疾病中的用途,所述疾病包括全身性淀粉样变性、局部性淀粉样变性、阿尔茨海默氏病和II型糖尿病。

### 背景技术

[0002] 淀粉样变性是由异常的不溶性蛋白纤维(称作淀粉样蛋白纤丝)在组织中的胞外积累造成的一种严重的且通常致命的疾病。这些源自不同形式的疾病中的超过20种不同的蛋白,但是所有淀粉样蛋白纤丝共有共同的交叉- $\beta$ 核心结构,且都通过通常可溶性的前体蛋白的错误折叠而衍生出(Pepys, M.B. (2006) *Annu. Rev. Med.*, 57:223-241)。一种正常的非纤丝的血浆蛋白(即血清淀粉样蛋白P组分(SAP))也总是存在于淀粉样沉着物中,这是因为它与所有类型的淀粉样蛋白纤丝的亲和的(avid)特异性的钙依赖性的结合(Pepys等人(1979) *Clin. Exp. Immunol.*, 38:284-293; Pepys等人(1997) *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.*, 4:274-295)。

[0003] 人SAP是血浆中的一种组成蛋白,其浓度为约20-40mg/l(Nelson等人(1991) *Clin. Chim. Acta*, 200:191-200),在正常个体和具有除了淀粉样变性以外的疾病的患者的组合的血浆和血管外隔室中共有约50-100mg SAP(Hawkins等人(1990) *J. Clin. Invest.*, 86:1862-1869)。在具有淀粉样变性的患者中,SAP也特异性地聚集在淀粉样沉着物中,且在具有广泛的全身性淀粉样变性的个体中,在淀粉样蛋白中可能存在多达20,000mg SAP(Pepys等人(1994) *PNAS*, 91:5602-5606),所述SAP可逆地结合纤丝,并与流体相SAP集合达成平衡。对循环SAP的正常生理功能知之甚少,但是动物实验和体外研究提示在宿主防御中的作用(Noursadeghi等人(2000) *PNAS*, 97:14584-14589)。SAP也是一种与弹性纤维和肾小球基膜有关的正常组织基质组分,尽管不知道它的功能。

[0004] 在淀粉样变性中,胞外淀粉样沉着物如下造成疾病:通过渐进性积累,直到它们损伤它们占据的任何组织的结构并从而损伤所述组织的功能(Pepys, M.B. (2006) *Annu. Rev. Med.*, 57:223-241)。对淀粉样蛋白沉着存在非常罕见的任何炎症性或‘异物’应答,所述应答在组织中局部地看到,或由炎症的全身性标志物提示。全身性淀粉样变性可以涉及任何器官,通常是致命的,并在发达国家中造成约1/1000的死亡。局限性的淀粉样蛋白(局限于单个解剖学位置或组织类型)也可以是非常严重的,例如脑淀粉样蛋白血管病是出血性中风的一个重要原因。淀粉样变性的临床表现是非常多样化的,在出现显著的器官损伤之前很难作出诊断。超过20种不同的淀粉样蛋白纤丝蛋白负责不同形式的淀粉样变性,但是大幅减少各种淀粉样蛋白纤丝前体蛋白的丰度的治疗确实会停止淀粉样蛋白积累,且所述沉着物可能退化。不幸的是,有效的措施并非总是可用的,并且当它们确实存在时,是有毒的或危险的,且见效缓慢(Pepys, M.B. (2006) *Annu. Rev. Med.*, 57:223-241)。因此,存在对这样的疗法的重大的未获满足的医学需要:所述疗法会安全地促进建立的淀粉样沉着物

的清除。此外,有些其它的病症中总是存在淀粉样沉着物,最重要的是阿尔茨海默氏病(AD)和II型糖尿病,其中淀粉样蛋白沉着对疾病的发病机制(具体地,分别是认知功能和胰岛功能的丧失)的贡献尚不清楚(Pepys,M.B.(2006)Annu.Rev.Med.,57:223-241)。但是,在体内的任意别处的淀粉样沉着物经证实是病原性的,并且AD的脑沉着物和II型糖尿病的胰岛淀粉样沉着物可能也是有害的。由于在全身性淀粉样变性中清除淀粉样沉着物的治疗确定地是治疗性的(Pepys,M.B.(2006)Annu.Rev.Med.,57:223-241),在AD和II型糖尿病中去除淀粉样沉着物也应当是临床上有益的。

[0005] SAP的结合会稳定化淀粉样蛋白纤丝,保护它们免于体外蛋白酶解(Tennent等人,(1995)PNAS,92:4299-4303),可以在体外增强淀粉样蛋白微纤维生成(Myers等人,(2006),Biochemistry,45:2311-2321),并在体内促成全身性淀粉样变性的发病机制(Botto等人,(1997)Nature Med.,3:855-859)。与它在所有淀粉样沉着物中的普遍存在相关联,SAP的这些性质使它成为有吸引力的治疗靶标。

[0006] 欧洲专利申请EP 0915088公开了D-脯氨酸衍生化合物,它们是SAP与淀粉样蛋白纤丝的结合的竞争性抑制剂,还公开了它们的生产方法。在EP 0915088中公开的一种优选的化合物是(R)-1-[6-[(R)-2-羧基-吡咯烷-1-基]-6-氧代-己酰基]吡咯烷-2-羧酸(CPHPC)。

[0007] 国际专利申请WO 03/051836公开了D-脯氨酸衍生化合物的前体药物。

[0008] 国际专利申请WO 2004/099173公开了甘油环状丙酮酸酯衍生物,它们是SAP与淀粉样蛋白纤丝的结合的竞争性抑制剂。

[0009] 国际专利申请WO 04/059318描述了据宣称会增强纤维细胞形成的方法,所述方法包括:提供会结合SAP的组合物。这样的组合物包括抗-SAP抗体和CPHPC。WO 04/059318没有公开与淀粉样蛋白沉着有关的疾病的治疗。此外,令人注目的临床和体内证据证实,SAP和它的消耗都对人类的纤维化没有任何作用(Tennent等人,(2007)Arthritis Rheum.,56:2013-2017;Pepys,M.B.,Tennent,G.A.和Denton,C.P.(2007)Reply to Letter from Pilling,D.,Buckley,C.D.,Salmon,M.和Gomer,R.G.,Serum amyloid P and fibrosis in systemic sclerosis:comment on the article by Tennent等人Arthritis Rheum.,56:4229-4230)。

[0010] 在上述专利中公开的二-D-脯氨酸化合物CPHPC会被人SAP高亲和力地结合,且意图用作在体内从淀粉样沉着物去除SAP并从而促进它们的清除的药物。SAP对CPHPC的结合会触发肝脏对所述复合物的快速清除,在施用药物的时段内消耗几乎所有的循环SAP,并去除许多、但并非所有的淀粉样蛋白结合的SAP(Pepys等人,(2002)Nature,417:254-259)。在初步临床研究(Gillmore等人,(2010)Brit.J.Haematol.,doi:10.1111/j.1365-2141.2009.08036.x)中,CPHPC的施用似乎会阻止淀粉样蛋白积累,但是它没有产生淀粉样蛋白消退,并且因为CPHPC没有从淀粉样沉着物完全去除所有SAP,需要另一种方案。

[0011] 国际专利申请WO 2009/000926公开了与对SAP特异性的抗体相组合的特定化合物用于治疗或预防淀粉样变性的用途,所述化合物会从循环中消耗SAP,诸如D-脯氨酸衍生物,尤其是CPHPC。

[0012] 相关的国际专利申请PCT/EP2008/011135涉及多种小鼠单克隆抗体,所述抗体可以与特定化合物组合地使用,用于治疗或预防淀粉样变性,所述化合物会从循环中消耗

SAP,诸如D-脯氨酸衍生物,尤其是CPHPC。

[0013] 因此,本领域需要抗体、特别是人源化的或人的抗体,所述抗体会特异性地靶向SAP,并在具有与淀粉样蛋白沉着有关的疾病的患者(特别是人患者)中提供改善的治疗效果,以便保持器官功能和延长寿命。

## 发明内容

[0014] 在第一个方面,本发明提供了一种抗原结合蛋白,其特异性地结合SAP,并与参照抗体竞争结合SAP,所述参照抗体包含SEQ ID NO:7的重链可变区序列和SEQ ID NO:9的轻链可变区序列。

[0015] 在本发明的第二个方面,提供了一种抗原结合蛋白,其结合SAP,并包含在SEQ ID NO:3中所述的CDRH3或CDRH3的功能变体。

[0016] 在本发明的第三个方面,提供了一种特异性地结合SAP的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白是嵌合的或人源化的抗体,所述抗体包含SEQ ID NO:7的可变结构域序列的对应CDRH3或CDRH3的功能变体。

[0017] 在本发明的第四个方面,提供了一种抗原结合蛋白,其特异性地结合SAP,且包含含有SEQ ID NO:7的Kabat残基95-101的结合单元H3或结合单元H3的功能变体。

[0018] 在本发明的第五个方面,提供了一种抗原结合蛋白,其特异性地结合SAP,且包含:选自SEQ ID NO:27-31的重链可变区;和/或选自SEQ ID NO:34-36的轻链可变区;或具有75%或更大序列同一性的变体重链可变区或轻链可变区。

[0019] 在本发明的第六个方面,提供了一种抗原结合蛋白,其特异性地结合SAP,且包含:SEQ ID NO:62的重链;和/或SEQ ID NO:64的轻链;或具有75%或更大序列同一性的变体重链或轻链。

[0020] 本发明也提供了编码本发明的抗原结合蛋白的核酸分子、包含它们的表达载体、和能够生产本发明的抗原结合蛋白的宿主细胞。

[0021] 在本发明的另一个方面,提供了一种药物组合物,其包含本文定义的抗原结合蛋白。本发明也提供了预防和/或治疗易感或遭受与淀粉样蛋白沉着有关的疾病的受试者的方法,所述方法包括下述步骤:给所述受试者施用预防或治疗有效量的抗原结合蛋白。提供了本文定义的抗原结合蛋白用于预防和/或治疗易感或遭受与淀粉样蛋白沉着有关的疾病的受试者的用途。也提供了本文定义的抗原结合蛋白用于生产药物的用途,所述药物用于预防和/或治疗易感或遭受与淀粉样蛋白沉着有关的疾病的受试者。

## 附图说明

[0022] 图1显示了鼠抗体SAP-E和SAP-K在1 $\mu$ g/mL的人SAP包被浓度时的结合曲线。

[0023] 图2显示了鼠抗体SAP-E和SAP-K在5 $\mu$ g/mL的人SAP包被浓度时的结合曲线。

[0024] 图3显示了嵌合抗体cSAP-E和cSAP-K的结合曲线。嵌合抗体的曲线轮廓与等效杂交瘤的曲线轮廓相同。

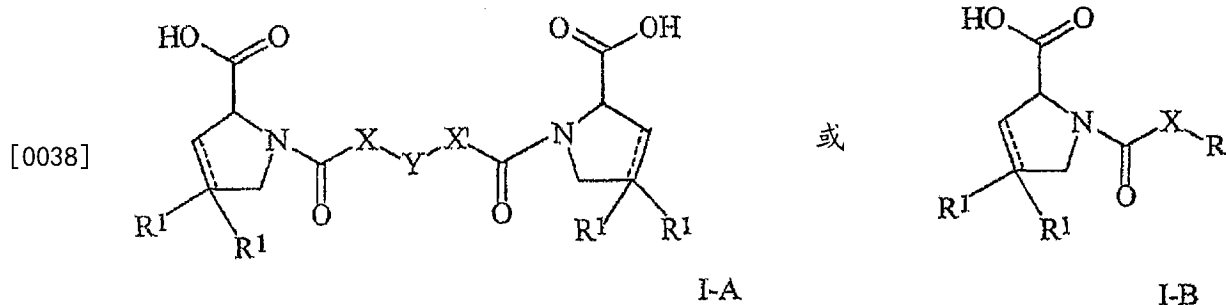
[0025] 图4显示了SAP-K H0L0、SAP-K H1L0、SAP-K H2L0和SAP-K H3L0与SAP-K嵌合体相比较的结合曲线,以及SAP-E H1L1与SAP-E嵌合体相比较的结合曲线。还测试了无关的人IgG1 $\kappa$ 抗体作为阴性对照。

- [0026] 图5显示了在含有SAP-E嵌合体的竞争ELISA中的纯化的SAP-K和SAP-E鼠单克隆抗体。
- [0027] 图6显示了在含有SAP-K嵌合体的竞争ELISA中的纯化的SAP-K和SAP-E鼠单克隆抗体。
- [0028] 图7显示了单克隆小鼠抗体SAP-E和SAP-K与人SAP的结合的免疫放射分析,所述人SAP被固定化的绵羊多克隆抗-人SAP抗体捕获。
- [0029] 图8显示了单克隆抗-人SAP抗体SAP-E的表位作图。
- [0030] 图9显示了被SAP-K识别的人SAP上的表位的定位(A,以黑色突出显示)和被SAP-E识别的人SAP上的表位的定位(B,以白色显示)。
- [0031] 图10显示了全人血清中的人源化的单克隆抗-人SAP抗体的C3活化。
- [0032] 图11显示了全人血清中的低剂量的人源化的单克隆抗-人SAP抗体的C3活化。
- [0033] 图12显示了补充了纯的人SAP的全小鼠血清中的人源化的单克隆抗-人SAP抗体的C3活化。

### 具体实施方式

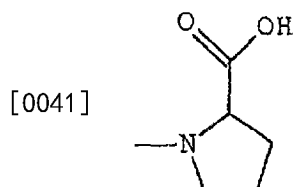
- [0034] 本发明提供了一种抗原结合蛋白,其结合血清淀粉样蛋白P组分(SAP)例如人SAP作为它的特异性抗原(即SAP结合蛋白)。在本发明的治疗性应用中,所述抗原结合蛋白会活化身体从组织中清除异常碎片的有效机理。所述抗原结合蛋白可以是抗体,例如单克隆抗体。本发明的抗原结合蛋白不是鼠抗体。在一个实施方案中,本发明的抗原结合蛋白不是鼠抗原结合蛋白。具体地,本发明的抗原结合蛋白是嵌合的、人源化的或人的抗原结合蛋白。
- [0035] “血清淀粉样蛋白P组分”或“SAP”表示穿透素(pentraxin)家族的同源五聚的血浆糖蛋白。每个分子由5个相同的原体(protomer)组成,每个原体具有扁平的 $\beta$ -瑞士卷状折叠(jelly roll fold)和单个 $\alpha$ 螺旋,所述原体非共价地结合成具有环状五聚体对称性的圆盘样环(Hutchinson等人,(2000)Mol.Med.,6:482-493);Pepys等人,(2002)Nature,417:254-259)。本文使用的术语“SAP”也包括由人基因APCS(染色体:1;位置:1q21-q23)或在其它生物体中的同源基因编码的单个亚基,例如具有在SEQ ID NO:43中所述的序列的人SAP多肽亚基以及SAP的天然五聚体形式和SAP的保留在体内结合淀粉样蛋白纤维的生物活性的任意片段和变体。
- [0036] 本发明的SAP结合蛋白可以结合上述的不同形式的SAP中的任一种或任意组合。在一个具体实施方案中,本发明的抗原结合蛋白会结合人SAP。当SAP与任意类型的淀粉样蛋白纤维结合且在体内的任意胞外位置中时,本发明的SAP结合蛋白可以结合所述SAP。本发明的抗原结合蛋白也可以结合天然的未结合的SAP。
- [0037] 在治疗方法中使用本发明的SAP结合蛋白的一个基本方面是,在循环中的SAP的浓度与施用SAP结合蛋白之前的它的正常值相比必须降低了至少90%。具体地,这可以通过下述化合物来实现:减少循环SAP的量的化合物,和具体地,导致循环SAP的消耗的化合物,在这里定义为“SAP消耗的化合物”(“SAP depleting compounds”)。这样的化合物是被SAP结合的配体,且是SAP与淀粉样蛋白纤维的结合的竞争性抑制剂,诸如D-脯氨酸衍生物和甘油环状丙酮酸酯衍生物。D-脯氨酸衍生物公开在EP 0915088(它通过引用整体并入本文)中,术语“D-脯氨酸衍生物”包括前体药物,诸如在WO 03/051836(它也通过引用整体并入本文)

中公开的那些。预见到下式的D-脯氨酸:



[0039] 其中

[0040] R是



[0042] 目基团

[0043]  $R^1$ 是氢或卤素;

[0044] 目。

[0045] X是 $-(\text{CH}_2)_n-$ ;  $-\text{CH}(\text{R}^2)(\text{CH}_2)_n-$ ;  $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_n-$ ;  $-\text{CH}_2\text{NH}-$ ;  $-\text{C}(\text{R}^2)=\text{CH}-$ ;  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})-$ ; 或噻唑-2,5-二基;  $-O-$ ;

[0046] Y是-S-S-;-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-;-O-;-NH-;-N(R<sup>2</sup>)-;-CH=CH-;-NHC(O)NH-;-N(R<sup>2</sup>)C(O)N(R<sup>2</sup>)-;-N[CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-;-N(CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)-;-N(CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)C(O)N(CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)-;-N(烷氧基烷基)-;N(环烷基-甲基)-;2,6-吡啶基;2,5-呋喃基;2,5-噻吩基;1,2-环己基;1,3-环己基;1,4-环己基;1,2-萘基;1,4-萘基;1,5-萘基;1,6-萘基;或1,2-亚苯基,1,3-亚苯基和1,4-亚苯基,其中所述亚苯基任选地被1-4个选自下述的取代基取代:卤素、低级烷基、低级烷氧基、羟基、羧基、-COO-低级烷基、次氨基、5-四唑、(2-羧酸吡咯烷-1-基)-2-氧代-乙氧基、N-羟基甲脒基(N-hydroxycarbamimidoyl)、5-氧代[1,2,4噁二唑基、2-氧代[1,2,3,5]氧杂噻二唑基、5-硫代[1,2,4]噁二唑基和5-叔丁基硫烷基-[1,2,4]噁二唑基;

[0047] X' 是  $-(CH_2)_n-$ ;  $-(CH_2)_nCH(R_2)-$ ;  $-(CH_2)_nOCH_2-$ ;  $-NHCH_2-$ ;  $-CH=C(R^2)-$ ;  $CH(OH)CH_2$ ; 或噻唑-2,5-二基;  $-O-$ ;

[0048] R<sup>2</sup>是低级烷基、低级烷氧基或苄基，

[0049] n是0-3,且其中

[0050] 烷基或低级烷基是C<sub>1-6</sub>烷基;烷氧基或低级烷氧基是C<sub>1-6</sub>烷氧基;环烷基是C<sub>3-6</sub>环烷基;卤素是F、Cl或Br;且在式中出现虚线的位置是单键或双键;

[0051] 或它们的药学上可接受的盐或单酯或二酯。

[0052] 上述式I-A的D-脯氨酸可以写成配体-接头-配体,其中式I-A的X-Y-X'部分形成接头。所述接头(X-Y-X')的长度可以是4-20个线性碳原子,包括4-15个线性碳原子、5-10个线性碳原子和6-8个线性碳原子的长度。所述接头可以是直链或支链,或可以任选地形成1个或多个环结构,条件是,在所述接头中存在至少4个线性或直链碳原子。至少一个线性或直链C原子可以任选地被至少一个选自下述的杂原子取代:N、O或S,有利地O或S,有利地O。

[0053] 因而,“任选地取代的接头”可以具有一个或多个导致分支的取代,和/或接头的线性或直链碳原子中的碳原子的一个或多个取代,例如所述接头可以是醚或取代的醚。

[0054] (R)-1-[6-[(R)-2-羧基-吡咯烷-1-基]-6-氧代-己酰基]吡咯烷-2-羧酸(CPHPC)是本发明预见到的一种具体的D-脯氨酸。在一个具体实施方案中,CPHPC是要施用给人患者。

[0055] 甘油环状丙酮酸酯衍生物公开在WO 2004/099173(它通过引用整体并入本文)中。

[0056] 本文使用的术语“抗原结合蛋白”表示能够结合SAP的抗体、抗体片段和其它蛋白构建体,诸如结构域。

[0057] 术语“抗体”在本文中以最广泛的含义使用,表示具有免疫球蛋白样结构域分子,且包括单克隆抗体、重组抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、双特异性抗体和异源缀合抗体;单个可变结构域、结构域抗体、抗原结合片段、免疫学上有效的片段、单链Fv、双体、Tandabs™等(关于替代性的“抗体”形式的总结,参见Holliger和Hudson,Nature Biotechnology,2005,第23卷,第9期,1126-1136)。

[0058] 短语“单个可变结构域”表示,独立于不同的可变区或结构域而结合抗原或表位的抗原结合蛋白可变结构域(例如,VH、VHH、VL)。

[0059] “结构域抗体”或“dAb”可以视作与能够结合抗原的“单个可变结构域”相同。单个可变结构域可以是人抗体可变结构域,但是也包括源自其它物种的单个抗体可变结构域,诸如啮齿动物(例如,如在WO 00/29004中所公开的)、铰口鲨和骆驼科VHH dAb。骆驼科VHH是这样的免疫球蛋白单个可变结构域多肽:其源自包括骆驼、骆马、羊驼、单峰骆驼和原驼在内的物种,且生产天然地缺少轻链的重链抗体。根据本领域可得到的标准技术,可以人源化这样的VHH结构域,这样的结构域被视作“结构域抗体”。本文使用的VH包括骆驼科VHH结构域。

[0060] 本文使用的术语“结构域”表示折叠的蛋白结构,它具有独立于蛋白的其余部分的三级结构。通常,结构域负责蛋白的离散的功能性质,并且在许多情况下可以添加、去除或转移给其它蛋白,而不丧失该蛋白和/或该结构域的其余部分的功能。“单个可变结构域”是折叠的多肽结构域,其包含抗体可变结构域特有的序列。因此,它包括完整的抗体可变结构域和修饰的可变结构域(例如,其中一个或更多个环已经被不是抗体可变结构域特有的序列所置换),或者已被截短或包含N-端或C-端延伸的抗体可变结构域,以及至少保留全长结构域的结合活性和特异性的可变结构域的折叠片段。结构域可以独立于不同的可变区或结构域而结合抗原或表位。

[0061] 通过在非抗体蛋白骨架(诸如结构域)上排列一个或多个CDR,可以提供抗原结合片段。所述结构域可以是结构域抗体,或可以是作为选自下述的骨架的衍生物的结构域:CTLA-4、脂质运载蛋白、SpA、亲和体(Affibody)、亲和体(avimer)、GroEl、转铁蛋白、GroES和纤连蛋白/adnectin,其已经进行蛋白工程化,以便得到与除了天然配体以外的抗原(诸如SAP)的结合。

[0062] 抗原结合片段或免疫学上有效的片段可以包含部分重链或轻链可变序列。片段的长度是至少5、6、7、8、9或10个氨基酸。或者,片段的长度是至少15、至少20、至少50、至少75或至少100个氨基酸。

[0063] 贯穿本发明的说明书与抗原结合蛋白关联地使用的术语“特异性地结合”是指,所



述抗原结合蛋白结合SAP,且不结合或轻微地结合任意其它蛋白,包括密切相关的分子,诸如C-反应蛋白(CRP),所述CRP在人类中具有55%严格残基的残基氨基酸序列同源性,且具有基本上相同的蛋白折叠。

[0064] 抗原结合蛋白-SAP相互作用的平衡解离常数(KD)可以是1mM或更小、100nM或更小、10nM或更小、2nM或更小或1nM或更小。或者,所述KD可以是5-10nM;或1-2nM。所述KD可以是1pM至500pM;或500pM至1nM。

[0065] 所述结合亲和力可以通过BIAcore™来测量,例如通过使用经由伯胺偶联而连接到羧甲基葡聚糖芯片上的SAP的抗原捕获和在该表面上的抗体捕获。或者,通过BIAcore™,通过抗-SAP抗体与人SAP(其被固定化在CM5芯片上的O-磷酸乙醇胺捕获)的结合,可以测量所述结合亲和力。在实施例8中描述的BIAcore™方法可以用于测量结合亲和力。

[0066] 解离速率常数(kd)可以是 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 或更小、 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或更小或 $1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 或更小。kd可以是 $1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 至 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ ;或 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 至 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 。小的kd可能导致抗原结合蛋白-配体复合物的缓慢解离和SAP与淀粉样蛋白结合的复合物的提高的清除。

[0067] 本领域技术人员显而易见,术语“源自”意图不仅定义材料就其物理起源意义上的来源,而且定义在结构上与所述材料相同、但不是源自参照源的材料。因此“在供体抗体中存在的残基”不一定已经从供体抗体中纯化出。

[0068] “分离的”是指,从它可能在自然界中存在其于其中的环境中取出的分子,诸如抗原结合蛋白。例如,所述分子可以从它在自然界中通常一起存在的物质中纯化出。例如,样品中的分子的质量可以是总质量的95%。

[0069] “嵌合抗体”是指一类工程化的抗体,其含有源自供体抗体的天然存在的可变区(轻链和重链)以及源自受体抗体的轻链恒定区和重链恒定区。

[0070] “人源化的抗体”是指一类工程化的抗体,其具有源自非人供体免疫球蛋白的CDR,所述分子的其它免疫球蛋白衍生的部分源自一种或多种人免疫球蛋白分子。另外,可以改变构架支持残基,以保留结合亲和力(参见,例如,Queen等人Proc.Natl Acad Sci USA,86:10029-10032(1989),Hodgson等人Bio/Technology,9:421(1991))。根据与供体抗体的核苷酸和氨基酸序列的同源性,可以从诸如KABAT®数据库、Los Alamos数据库和Swiss蛋白数据库等常规数据库中选择合适的人受体抗体。以与供体抗体框架区的同源性(在氨基酸基础上)为特征的人抗体可能适合提供重链恒定区和/或重链可变框架区,用于插入供体CDR。按类似方式,可以选择能够提供轻链恒定或可变框架区的合适的受体抗体。应当指出,受体抗体重链和轻链不需要源自相同的受体抗体。现有技术描述了生产这样的人源化抗体的若干方法,参见例如EP-A-0239400和EP-A-054951。

[0071] 术语“供体抗体”是指这样的抗体:所述抗体将它的可变区、CDR或其它功能片段或其类似物的氨基酸序列提供给第一免疫球蛋白配偶体。所述供体因此提供改变的免疫球蛋白编码区,得到的表达的改变的抗体具有供体抗体特有的抗原特异性和中和活性。

[0072] 术语“受体抗体”是指与供体抗体异源的抗体,所述供体抗体将编码它的重链框架区和/或轻链框架区和/或它的重链恒定区和/或轻链恒定区的所有(或任何部分)氨基酸序列提供给第一免疫球蛋白配偶体。人抗体可以是受体抗体。

[0073] 术语“人抗体”表示,源自人免疫球蛋白基因序列的抗体。这些全人抗体会提供重新工程化的、或去免疫化的、啮齿动物单克隆抗体(例如人源化的抗体)的替代物,作为低免

疫原性治疗抗体的来源,它们通常使用噬菌体展示平台或转基因小鼠平台来制备。在一个实施方案中,本发明的抗体是人抗体。

[0074] 术语“VH”和“VL”在本文中分别用于表示抗原结合蛋白的重链可变区和轻链可变区。

[0075] “CDR”被定义为抗原结合蛋白的互补性决定区氨基酸序列。这些是免疫球蛋白重链和轻链的高变区。在免疫球蛋白的可变部分中,存在3个重链和3个轻链CDR(或CDR区)。因而,本文使用的“CDR”表示所有3个重链CDR、所有3个轻链CDR、所有重链和轻链CDR或至少2个CDR。

[0076] 贯穿本说明书,根据Kabat编号约定,对可变结构域序列和全长抗体序列中的氨基酸残基进行编号。类似地,在实施例中使用的术语“CDR”、“CDRL1”、“CDRL2”、“CDRL3”、“CDRH1”、“CDRH2”、“CDRH3”遵循Kabat编号约定。关于其它信息,参见Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第4版,美国卫生和人类服务部,国立卫生研究院(1987)。

[0077] 但是,尽管我们在本说明书中使用可变结构域序列和全长抗体序列的氨基酸残基的Kabat编号约定,本领域技术人员显而易见,可变结构域序列和全长抗体序列中的氨基酸残基存在替代性的编号约定。也存在CDR序列的替代性的编号约定,例如在Chothia等人(1989)Nature 342:877-883中描述的那些。抗体的结构和蛋白折叠可能意味着,其它残基被视作CDR序列的一部分,且技术人员会如此理解。

[0078] 技术人员可得到的CDR序列的其它编号约定包括:“AbM”(University of Bath)和“接触”(University College London)方法。可以确定使用Kabat、Chothia、AbM和接触方法中的至少2种方法的最小重叠区,以提供“最小结合单元”。最小结合单元可以是CDR的子部分。

[0079] 下面的表1描绘了使用每个CDR或结合单元的每种编号约定的一个定义。在表1中使用Kabat编号方案来对可变结构域氨基酸序列编号。应当指出,一些CDR定义可以随使用的个别出版物而异。

[0080] 表1

[0081]

|    | Kabat CDR     | Chothia CDR | AbM CDR       | 接触 CDR        | 最小结合单元 |
|----|---------------|-------------|---------------|---------------|--------|
| H1 | 31-35/35A/35B | 26-32/33/34 | 26-35/35A/35B | 30-35/35A/35B | 31-32  |
| H2 | 50-65         | 52-56       | 50-58         | 47-58         | 52-56  |
| H3 | 95-102        | 95-102      | 95-102        | 93-101        | 95-101 |
| L1 | 24-34         | 24-34       | 24-34         | 30-36         | 30-34  |
| L2 | 50-56         | 50-56       | 50-56         | 46-55         | 50-55  |
| L3 | 89-97         | 89-97       | 89-97         | 89-96         | 89-96  |

[0082] 本文使用的术语“抗原结合位点”表示,在抗原结合蛋白上的能够特异性地结合抗原的位点。这可以是单个结构域(例如,表位结合域)或单链Fv(ScFv)结构域,或它可以是在标准抗体中可发现的成对的VH/VL结构域。

[0083] 本文使用的术语“表位”表示,抗原的与抗原结合蛋白的特定结合域发生接触的部分。

分。表位可以是线性的，其包含来自抗原的基本上线性的氨基酸序列。或者，表位可以是构象的或不连续的。例如，构象表位包含这样的氨基酸残基：所述残基需要结构限制元件。在构象表位的情况下，尽管所述残基可能来自肽链的不同区域，它们在抗原的三维结构中可能紧密地靠近。在多聚抗原（诸如SAP）的情况下，构象表位可能包括来自不同肽链的残基，所述残基在抗原的三维结构中可能紧密地靠近。通过计算机建模程序，或经由通过本领域已知的方法（诸如X-射线晶体学）得到的三维结构，可以测定这样的结构上邻近的残基。

[0084] 不连续的表位包含被其它序列隔开的氨基酸残基，即不是在抗原的基本序列中的连续序列中。在抗原的三级和四级结构的背景下，不连续的表位的残基彼此充分接近以致于被抗原结合蛋白结合。

[0085] 在一个实施方案中，本发明的抗原结合蛋白结合在人SAP的残基140-158内的表位。

[0086] 就核苷酸和氨基酸序列而言，术语“同一的”或“序列同一性”指示，当在适当的插入或删除的情况下最佳地比对和对比时，在2个核酸序列或2个氨基酸序列之间的同一性程度。

[0087] 2个序列之间的同一性百分比是所述序列共有的相同位置的数目的函数（即，%同一性=相同位置的数目/位置总数 $\times$ 100），其中考虑为了2个序列的最佳比对需要导入的缺口的数目和每个缺口的长度。使用下述的数学算法，可以实现序列对比和2个序列之间的同一性百分比测定。

[0088] 使用GCG软件包中的GAP程序，使用NWSgapdna.CMP矩阵和40、50、60、70或80的缺口权重和1、2、3、4、5或6的长度权重，可以测定2个核苷酸序列之间的同一性百分比。使用已经整合进ALIGN程序（2.0版）中的E.Meyers和W.Miller的算法（Comput.Appl.Biosci.,4:11-17（1988）），使用PAM 120权重残基表、12的缺口长度罚分和4的缺口罚分，也可以测定2个核苷酸或氨基酸序列之间的同一性百分比。另外，使用Needleman和Wunsch（J.Mol.Biol.48:444-453（1970））算法（其已经整合进GCG软件包中的缺口程序中），使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵和16、14、12、10、8、6或4的缺口权重和1、2、3、4、5或6的长度权重，可以测定2个氨基酸序列之间的同一性百分比。

[0089] 作为实例，多核苷酸序列可以与本文所述的参照多核苷酸序列（参见例如SEQ ID NO:8、10、18、20、45-48、51-61、63、65-73）相同，也就是100%同一性，或它可以包括与参照序列相比最多特定整数个核苷酸改变，诸如至少50、60、70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%同一性。这样的改变选自至少一个核苷酸缺失、置换（包括转换和颠换）或插入，且其中所述改变可能发生在参照核苷酸序列的5'或3'端位置或那些末端位置之间的任意位置，单个地散布在参照序列的核苷酸中或者参照序列的一个或多个连续基团中。如下确定核苷酸改变的数目：将本文所述的参照多核苷酸序列（参见例如SEQ ID NO:8、10、18、20、45-48、51-61、63、65-73）中的核苷酸总数乘以各个同一性百分比的数字百分比（除以100），并从本文所述的参照多核苷酸序列（参见例如SEQ ID NO:8、10、18、20、45-48、51-61、63、65-73）中的所述核苷酸总数减去该乘积，或者：

[0090] 
$$n_n \leq x_n - (x_n \cdot y),$$

[0091] 其中 $n_n$ 是核苷酸改变的数目， $x_n$ 是本文所述的参照多核苷酸序列（参见例如SEQ ID NO:8、10、18、20、45-48、51-61、63、65-73）中的核苷酸总数，且 $y$ 是0.50（对于50%）、0.60（对

于60%)、0.70(对于70%)、0.75(对于75%)、0.80(对于80%)、0.85(对于85%)、0.90(对于90%)、0.95(对于95%)、0.98(对于98%)、0.99(对于99%)或1.00(对于100%)，• 是乘法算子的符号，且其中 $x_n$ 和 $y$ 的任意非整数乘积在从 $x_n$ 减去之前向下舍减为最接近的整数。

[0092] 类似地，多肽序列可以与本文所述的多肽参照序列(参见例如SEQ ID NO:1-7、9、11-17、19、21-24、27-31、34-42、62、64、74)相同，也就是100%同一性，或它可以包括与参照序列相比最多特定整数个氨基酸改变，使得%同一性小于100%，诸如至少50、60、70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%同一性。这样的改变选自至少一个氨基酸缺失、置换(包括保守的和非保守的置换)或插入，且其中所述改变可能发生在参照多肽序列的氨基端或羧基端位置或那些末端位置之间的任意位置，单个地散布在参照序列的氨基酸中或者参照序列内的一个或多个连续基团中。如下确定给定的%同一性的氨基酸改变的数目：将本文所述的多肽参照序列(参见例如SEQ ID NO:1-7、9、11-17、19、21-24、27-31、34-42、62、64、74)编码的多肽序列中的氨基酸总数乘以各个同一性百分比的数字百分比(除以100)，然后从本文所述的多肽参照序列(参见例如SEQ ID NO:1-7、9、11-17、19、21-24、27-31、34-42、62、64、74)中的所述氨基酸总数减去该乘积，或者：

[0093]  $n_a \leq x_a - (x_a \cdot y)$ ,

[0094] 其中 $n_a$ 是氨基酸改变的数目， $x_a$ 是本文所述的参照多肽序列(参见例如SEQ ID NO:1-7、9、11-17、19、21-24、27-31、34-42、62、64、74)中的氨基酸总数，且 $y$ 是0.50(对于50%)、0.60(对于60%)、0.70(对于70%)、0.75(对于75%)、0.80(对于80%)、0.85(对于85%)、0.90(对于90%)、0.95(对于95%)、0.98(对于98%)、0.99(对于99%)或1.00(对于100%)，• 是乘法算子的符号，且其中 $x_a$ 和 $y$ 的任意非整数乘积在从 $x_a$ 减去之前向下舍减为最接近的整数。

[0095] 可以跨序列长度确定%同一性。

[0096] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白”各自表示，包含2个或更多个氨基酸残基的分子。肽可以是单体的或聚合的。

[0097] 本领域众所周知，某些氨基酸置换被视作“保守的”。基于共同的侧链性质，将氨基酸分组，保持抗原结合蛋白的所有或基本上所有结合亲和力的组内置换被视作保守置换，参见下面的表2：

[0098] 表2

[0099]

| 侧链       | 成员                  |
|----------|---------------------|
| 疏水的      | Met、Ala、Val、Leu、Ile |
| 中性的亲水的   | Cys、Ser、Thr         |
| 酸性的      | Asp、Glu             |
| 碱性的      | Asn、Gln、His、Lys、Arg |
| 影响链定向的残基 | Gly、Pro             |
| 芳族的      | Trp、Tyr、Phe         |

[0100] 所述抗原结合蛋白可以与参照抗体竞争结合SAP，所述参照抗体包含SEQ ID NO:7的重链可变区序列和SEQ ID NO:9的轻链可变区序列。或者，所述抗原结合蛋白可以与参照抗体竞争结合SAP，所述参照抗体包含SEQ ID NO:17的重链可变区序列和SEQ ID NO:19的

轻链可变区序列。

[0101] 通过竞争ELISA、FMAT或BIAcore,可以测定抗原结合蛋白和参照抗体之间的竞争。竞争性的抗原结合蛋白可以结合相同的表位、重叠的表位或在参照抗体所结合的表位紧邻处的表位。

[0102] 本发明也提供了一种抗原结合蛋白,其特异性地结合SAP,且包含:SEQ ID NO:3的CDRH3或其变体CDR。所述抗原结合蛋白可以另外包含一个或多个任意组合的CDR或所有CDR,所述CDR选自:CDRH1(SEQ ID NO:1)、CDRH2(SEQ ID NO:2)、CDRL1(SEQ ID NO:4)、CDRL2(SEQ ID NO:5)和CDRL3(SEQ ID NO:6);或其变体。

[0103] 例如,所述抗原结合蛋白可以包含CDRH3(SEQ ID NO:3)和CDRH1(SEQ ID NO:1)或其变体。所述抗原结合蛋白可以包含CDRH3(SEQ ID NO:3)和CDRH2(SEQ ID NO:2)或其变体。所述抗原结合蛋白可以包含CDRH1(SEQ ID NO:1)和CDRH2(SEQ ID NO:2)和CDRH3(SEQ ID NO:3)或其变体。

[0104] 所述抗原结合蛋白可以包含CDRL1(SEQ ID NO:4)和CDRL2(SEQ ID NO:5)或其变体。所述抗原结合蛋白可以包含CDRL2(SEQ ID NO:5)和CDRL3(SEQ ID NO:6)或其变体。所述抗原结合蛋白可以包含CDRL1(SEQ ID NO:4)、CDRL2(SEQ ID NO:5)和CDRL3(SEQ ID NO:6)或其变体。

[0105] 所述抗原结合蛋白可以包含CDRH3(SEQ ID NO:3)和CDRL3(SEQ ID NO:6)或其变体。所述抗原结合蛋白可以包含CDRH3(SEQ ID NO:3)、CDRH2(SEQ ID NO:2)和CDRL3(SEQ ID NO:6)或其变体。所述抗原结合蛋白可以包含CDRH3(SEQ ID NO:3)、CDRH2(SEQ ID NO:2)、CDRL2(SEQ ID NO:5)和CDRL3(SEQ ID NO:6)或其变体。

[0106] 所述抗原结合蛋白可以包含CDRH1(SEQ ID NO:1)、CDRH2(SEQ ID NO:2)、CDRH3(SEQ ID NO:3)、CDRL1(SEQ ID NO:4)、CDRL2(SEQ ID NO:5)和CDRL3(SEQ ID NO:6)或其变体。

[0107] 本发明也提供了一种抗原结合蛋白,其特异性地结合SAP,且包含:SEQ ID NO:13的CDRH3或其变体CDR。所述抗原结合蛋白可以另外包含一个或多个任意组合的CDR或所有CDR,所述CDR选自:CDRH1(SEQ ID NO:11)、CDRH2(SEQ ID NO:12)、CDRL1(SEQ ID NO:14)、CDRL2(SEQ ID NO:15)和CDRL3(SEQ ID NO:16);或其变体。

[0108] 本发明也提供了一种特异性地结合SAP的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白是嵌合的或人源化的抗体,所述抗体包含SEQ ID NO:7的可变结构域序列的对应CDRH3或变体CDRH3。

[0109] 所述嵌合的或人源化的抗原结合蛋白可以另外包含一个或多个或所有选自下述的对应的CDR:SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:9的可变结构域序列或其变体CDR。

[0110] 例如,所述抗原结合蛋白可以包含对应的CDRH3和对应的CDRH1或其变体。所述抗原结合蛋白可以包含对应的CDRH3和对应的CDRH2或其变体。所述抗原结合蛋白可以包含对应的CDRH1、对应的CDRH2和对应的CDRH3;或其变体。

[0111] 所述抗原结合蛋白可以包含对应的CDRL1和对应的CDRL2或其变体。所述抗原结合蛋白可以包含对应的CDRL2和对应的CDRL3或其变体。所述抗原结合蛋白可以包含对应的CDRL1、对应的CDRL2和对应的CDRL3或其变体。

[0112] 所述抗原结合蛋白可以包含对应的CDRH3和对应的CDRL3或其变体。所述抗原结合

蛋白可以包含对应的CDRH3、对应的CDRH2和对应的CDRL3或其变体。所述抗原结合蛋白可以包含对应的CDRH3、对应的CDRH2、对应的CDRL2和对应的CDRL3或其变体。

[0113] 所述抗原结合蛋白可以包含对应的CDRH1、对应的CDRH2、对应的CDRH3、对应的CDRL1、对应的CDRL2和对应的CDRL3或其变体。

[0114] 通过参考Kabat(1987)、Chothia(1989)、AbM或接触方法或这些方法的组合,可以定义对应的CDR。每种方法的一个定义可以参见表1,且可以应用于参照重链可变结构域SEQ ID NO:7和参照轻链可变结构域SEQ ID NO:9,以确定对应的CDR。

[0115] 本发明也提供了一种特异性地结合SAP的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合蛋白是嵌合的或人源化的抗体,所述抗体包含SEQ ID NO:17的可变结构域序列的对应CDRH3或变体CDRH3。

[0116] 所述嵌合的或人源化的抗原结合蛋白可以另外包含一个或多个或所有选自下述的对应的CDR:SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:19的可变结构域序列或其变体CDR。

[0117] 本发明也提供了一种抗原结合蛋白,其特异性地结合SAP,且包含含有SEQ ID NO:7的Kabat残基95-101的结合单元H3或变体H3。所述抗原结合蛋白可以另外包含一个或多个或所有选自下述的结合单元:含有SEQ ID NO:7的Kabat残基31-32的H1,含有SEQ ID NO:7的Kabat残基52-56的H2,含有SEQ ID NO:9的Kabat残基30-34的L1,含有SEQ ID NO:9的Kabat残基50-55的L2,和含有SEQ ID NO:9的Kabat残基89-96的L3;或变体结合单元。

[0118] 例如,所述抗原结合蛋白可以包含结合单元H3和结合单元H1或其变体。所述抗原结合蛋白可以包含结合单元H3和结合单元H2或其变体。所述抗原结合蛋白可以包含结合单元H1、结合单元H2和结合单元H3;或其变体。

[0119] 所述抗原结合蛋白可以包含结合单元L1和结合单元L2或其变体。所述抗原结合蛋白可以包含结合单元L2和结合单元L3或其变体。所述抗原结合蛋白可以包含结合单元L1、结合单元L2和结合单元L3;或其变体。

[0120] 所述抗原结合蛋白可以包含结合单元H3和结合单元L3或其变体。所述抗原结合蛋白可以包含结合单元H3、结合单元H2和结合单元L3;或其变体。所述抗原结合蛋白可以包含结合单元H3、结合单元H2、结合单元L2和结合单元L3;或其变体。

[0121] 所述抗原结合蛋白可以包含结合单元H1、结合单元H2、结合单元H3、结合单元L1、结合单元L2和结合单元L3;或其变体。

[0122] 本发明也提供了一种抗原结合蛋白,其特异性地结合SAP,且包含含有SEQ ID NO:17的Kabat残基95-101的结合单元H3或变体H3。所述抗原结合蛋白可以另外包含一个或多个或所有选自下述的结合单元:含有SEQ ID NO:17的Kabat残基31-32的H1,含有SEQ ID NO:17的Kabat残基52-56的H2,含有SEQ ID NO:19的Kabat残基30-34的L1,含有SEQ ID NO:19的Kabat残基50-55的L2,和含有SEQ ID NO:19的Kabat残基89-96的L3;或变体结合单元。

[0123] CDR变体或变体结合单元包括被至少一个氨基酸修饰的氨基酸序列,其中所述修饰可以是氨基酸序列的化学改变或部分改变(例如改变了不超过10个氨基酸),所述修饰允许所述变体保留未修饰的序列的生物学特征。例如,所述变体是这样的功能变体:其特异性地结合SAP,并激活从组织清除SAP与淀粉样蛋白结合的复合物。CDR氨基酸序列的部分改变可以是,通过删除或置换一个至几个氨基酸,或通过添加或插入一个至几个氨基酸,或通过它们的组合(例如改变不超过10个氨基酸)。所述CDR变体或结合单元变体可以在氨基酸序

列中含有1、2、3、4、5或6个任意组合的氨基酸置换、添加或删除。所述CDR变体或结合单元变体可以在氨基酸序列中含有1、2或3个任意组合的氨基酸置换、插入或删除。在氨基酸残基中的置换可以是保守置换,例如,用一个疏水氨基酸置换替代性的疏水氨基酸。例如,可以用缬氨酸或异亮氨酸置换亮氨酸。

[0124] 一个或多个本文所述的CDR、对应的CDR、变体CDR或结合单元可以存在于人框架的背景下,例如作为人源化的或嵌合的可变结构域。也预见到包含一个或多个本文所述的CDR、对应的CDR、变体CDR或结合单元的全人抗体,且是在本发明的范围内。

[0125] CDR L1、L2、L3、H1和H2倾向于在结构上表现出有限数目的主链构象之一。CDR的具体规范结构类别由CDR的长度和环包装限定,由位于CDR和框架区中的关键位置处的残基(结构上的决定残基或SDR)决定。Martin和Thornton(1996; J Mol Biol 263:800-815)已经产生了一种自动方法来定义“关键残基”规范模板。使用簇分析来定义CDR集合的规范类别,然后通过分析埋藏的疏水残基、形成氢键的残基和保守的甘氨酸和脯氨酸来鉴别规范模板。可以如下将抗体序列的CDR分配给规范类别:将所述序列与关键残基模板进行对比,并使用同一性或相似性矩阵对每个模板评分。

[0126] 下面给出了在本发明的范围内的CDR规范的实例。使用的氨基酸编号是Kabat。

[0127] 如SEQ ID NO:1所示的CDRH1的规范的实例、其变体、SEQ ID NO:7的CDRH1或对应的CDR是:将Tyr 32置换为Ile、His、Phe、Thr、Asn、Cys、Glu或Asp;将Asn 33置换为Tyr、Ala、Trp、Gly、Thr、Leu或Val;将Met 34置换为Ile、Val或Trp;和/或将His 35置换为Glu、Asn、Gln、Ser、Tyr或Thr。

[0128] 如SEQ ID NO:2所示的CDRH2的规范的实例、其变体、SEQ ID NO:7的CDRH2或对应的CDR是:将Tyr 50置换为Arg、Glu、Trp、Gly、Gln、Val、Leu、Asn、Lys或Ala;将Ile 51置换为Leu、Val、Thr、Ser或Asn;将Tyr 52置换为Asp、Leu、Asn或Ser;将Gly 53置换为Ala、Tyr、Ser、Lys、Thr或Asn;将Asp 54置换为Asn、Ser、Thr、Lys或Gly;将Asn 56置换为Tyr、Arg、Glu、Asp、Gly、Val、Ser或Ala;和/或将Asn 58置换为Lys、Thr、Ser、Asp、Arg、Gly、Phe或Tyr。

[0129] 如SEQ ID NO:3所示的CDRH3的规范的实例、其变体、SEQ ID NO:7的CDRH3或对应的CDR是:将Ser 102置换为Tyr、His、Val、Ile、Asp或Gly。

[0130] 如SEQ ID NO:4所示的CDRL1的规范的实例、其变体、SEQ ID NO:9的CDRL1或对应的CDR是:将Asn 28置换为Ser、Asp、Thr或Glu;将Ile 29置换为Val;将Tyr 30置换为Asp、Leu、Val、Ile、Ser、Asn、Phe、His、Gly或Thr;将Ser 31置换为Asn、Thr、Lys或Gly;将Tyr 32置换为Phe、Asn、Ala、His、Ser或Arg;将Leu 33置换为Met、Val、Ile或Phe;和/或将Ala 34置换为Gly、Asn、Ser、His、Val或Phe。

[0131] 如SEQ ID NO:5所示的CDRL2的规范的实例、其变体、SEQ ID NO:9的CDRL1或对应的CDR是:将Ala 51置换为Thr、Gly或Val。

[0132] 如SEQ ID NO:6所示的CDRL3的规范的实例、其变体、SEQ ID NO:9的CDRL1或对应的CDR是:将Gln 89置换为Ser、Gly、Phe或Leu;将His 90置换为Gln或Asn;将His 91置换为Asn、Phe、Gly、Ser、Arg、Asp、Thr、Tyr或Val;将Tyr 92置换为Asn、Trp、Thr、Ser、Arg、Gln、His、Ala或Asp;将Gly 93置换为Glu、Asn、His、Thr、Ser、Arg或Ala;将Ala 94置换为Asp、Tyr、Thr、Val、Leu、His、Asn、Ile、Trp、Pro或Ser;和/或将Leu 96置换为Pro、Tyr、Arg、Ile、Trp或Phe。

[0133] 如SEQ ID NO:11所示的CDRH1的规范的实例、其变体、SEQ ID NO:17的CDRH1或对应的CDR是:将Tyr 32置换为Ile、His、Phe、Thr、Asn、Cys、Glu或Asp;将Trp 33置换为Tyr、Ala、Gly、Thr、Leu或Val;将Met 34置换为Ile、Val或Trp;和/或将His 35置换为Glu、Asn、Gln、Ser、Tyr或Thr。

[0134] 如SEQ ID NO:12所示的CDRH2的规范的实例、其变体、SEQ ID NO:17的CDRH1或对应的CDR是:将Met 50置换为Arg、Glu、Trp、Tyr、Gly、Gln、Val、Leu、Asn、Lys或Ala;将Ile51置换为Leu、Val、Thr、Ser或Asn;将His 52置换为Asp、Leu、Asn、Ser或Tyr;将Asn53置换为Ala、Gly、Tyr、Ser、Lys或Thr;将Ser 54置换为Asn、Thr、Lys、Asp或Gly;将Asn 56置换为Tyr、Arg、Glu、Asp、Gly、Val、Ser或Ala;和/或将Asn 58置换为Lys、Thr、Ser、Asp、Arg、Gly、Phe或Tyr。

[0135] 如SEQ ID NO:13所示的CDRH3的规范的实例、其变体、SEQ ID NO:17的CDRH1或对应的CDR是:将Val102置换为Tyr、His、Ile、Ser、Asp或Gly。

[0136] 如SEQ ID NO:14所示的CDRL1的规范的实例、其变体、SEQ ID NO:19的CDRL1或对应的CDR是:将Asn 28置换为Ser、Asp、Thr或Glu;将Val 29置换为Ile;将Asn 30置换为Asp、Leu、Tyr、Val、Ile、Ser、Phe、His、Gly或Thr;将Ser 31置换为Asn、Thr、Lys或Gly;将Asn 32置换为Phe、Tyr、Ala、His、Ser或Arg;将Val 33置换为Met、Leu、Ile或Phe;将Ala 34置换为Gly、Asn、Ser、His、Val或Phe。

[0137] 如SEQ ID NO:15所示的CDRL2的规范的实例、其变体、SEQ ID NO:19的CDRL1或对应的CDR是:将Ala 51置换为Thr、Gly或Val。

[0138] 如SEQ ID NO:16所示的CDRL3的规范的实例、其变体、SEQ ID NO:19的CDRL1或对应的CDR是:将Gln 89置换为Ser、Gly、Phe或Leu;将Gln 90置换为Asn或His;将Cys 91置换为Asn、Phe、Gly、Ser、Arg、Asp、His、Thr、Tyr或Val;Asn 92置换为Tyr、Trp、Thr、Ser、Arg、Gln、His、Ala或Asp;将Asn 93置换为Glu、Gly、His、Thr、Ser、Arg或Ala;将Tyr 94置换为Asp、Thr、Val、Leu、His、Asn、Ile、Trp、Pro或Ser;和/或将Phe 96置换为Pro、Leu、Tyr、Arg、Ile或Trp。

[0139] 每个CDR、每个对应的CDR、每个结合单元、每个重链或轻链可变区、每个重链或轻链和每个抗原结合蛋白可以存在多个变体CDR规范位置,因此任意置换组合可以存在于本发明的抗原结合蛋白中,条件是,维持所述CDR的规范结构,使得所述抗原结合蛋白能够特异性地结合SAP。

[0140] 如以上所讨论的,CDR的具体规范结构类别由CDR的长度和环包装限定,由位于CDR和框架区中的关键位置处的残基决定。

[0141] 因而,除了在SEQ ID NO:1-6或11-16中列出的CDR以外,SEQ ID NO:7、9、17或19的CDR、对应的CDR、结合单元或其变体、本发明的抗原结合蛋白的规范框架残基可以包括(使用Kabat编号):

[0142] 重链:在位置2处的Val、Ile或Gly;在位置4处的Leu或Val;在位置20处的Leu、Ile、Met或Val;在位置22处的Cys;在位置24处的Thr、Ala、Val、Gly或Ser;在位置26处的Gly;在位置29处的Ile、Phe、Leu或Ser;在位置36处的Trp;在位置47处的Trp或Tyr;在位置48处的Ile、Met、Val或Leu;在位置69处的Ile、Leu、Phe、Met或Val;在位置71处的Val、Ala或Leu;在位置78处的Ala、Leu、Val、Tyr或Phe;在位置80处的Leu或Met;在位置90处的Tyr或Phe;在位



置92处的Cys;和/或在位置94处的Arg、Lys、Gly、Ser、His或Asn。

[0143] 轻链:在位置2处的Ile、Leu或Val;在位置3处的Val、Gln、Leu或Glu;在位置4处的Met或Leu;在位置23处的Cys;在位置35处的Trp;在位置36处的Tyr、Leu或Phe;在位置46处的Leu、Arg或Val;在位置49处的Tyr、His、Phe或Lys;在位置71处的Tyr或Phe;在位置88处的Cys;和/或在位置98处的Phe。

[0144] 在一个具体实施方案中,所述重链框架包含下述残基:在位置2处的Val、在位置4处的Leu、在位置20处的Val、在位置22处的Cys、在位置24处的Ala、在位置26处的Gly、在位置29处的Phe、在位置36处的Trp、在位置47处的Trp、在位置48处的Met、在位置69处的Ile、在位置71处的Ala、在位置78处的Ala、在位置80处的Met、在位置90处的Tyr、在位置92处的Cys和在位置94处的Arg;且所述轻链框架包含下述残基:在位置2处的Ile、在位置3处的Gln、在位置4处的Met、在位置23处的Cys、在位置35处的Trp、在位置36处的Tyr、在位置46处的Leu、在位置49处的His、在位置71处的Phe、在位置88处的Cys和在位置98处的Phe。

[0145] 上述框架位置中的任一个、任意组合或全部可以存在于本发明的抗原结合蛋白中。每个重链或轻链可变区、每个重链或轻链和每个抗原结合蛋白可以存在多个变体框架规范位置,因此,任意组合可以存在于本发明的抗原结合蛋白中,条件是,维持所述框架的规范结构。

[0146] 所述人源化的重链可变结构域可以包含:在SEQ ID NO:1-3中列出的CDR;变体CDR;在SEQ ID NO:7中的对应的CDR;结合单元;或其变体,它们是在受体抗体框架内,所述框架的框架区与SEQ ID NO:25的人受体可变结构域序列具有75%或更大、80%或更大、85%或更大、90%或更大、95%或更大、98%或更大、99%或更大或100%同一性。所述人源化的轻链可变结构域可以包含:在SEQ ID NO:4-6中列出的CDR;变体CDR;在SEQ ID NO:9中的对应的CDR;结合单元;或其变体,它们是在受体抗体框架内,所述框架的框架区与SEQ ID NO:32的人受体可变结构域序列具有75%或更大、80%或更大、85%或更大、90%或更大、95%或更大、98%或更大、99%或更大或100%同一性。

[0147] 所述人源化的重链可变结构域可以包含:在SEQ ID NO:11-13中列出的CDR;变体CDR;在SEQ ID NO:17中的对应的CDR;结合单元;或其变体,它们是在受体抗体框架内,所述框架的框架区与SEQ ID NO:25的人受体可变结构域序列具有75%或更大、80%或更大、85%或更大、90%或更大、95%或更大、98%或更大、99%或更大或100%同一性。所述人源化的轻链可变结构域可以包含:在SEQ ID NO:14-16中列出的CDR;变体CDR;在SEQ ID NO:19中的对应的CDR;结合单元;或其变体,它们是在受体抗体框架内,所述框架的框架区与SEQ ID NO:32的人受体可变结构域序列具有75%或更大、80%或更大、85%或更大、90%或更大、95%或更大、98%或更大、99%或更大或100%同一性。

[0148] 本发明也提供了一种抗原结合蛋白,其特异性地结合SAP,且包含选自SEQ ID NO:27-31中的任一个的重链可变区。所述抗原结合蛋白可以包含选自SEQ ID NO:34-36中的任一个的轻链可变区。任一个重链可变区可以与任一个轻链可变区相组合。

[0149] 所述抗原结合蛋白可以包含任一个下述的重链和轻链可变区组合:H0L0(SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:34)、H0L1(SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:35)、H0L2(SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:36)、H1L0(SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:34)、H1L1(SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:35)、H1L2(SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:36)、H2L0(SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:34)、H2L1(SEQ ID

NO:29和SEQ ID NO:35)、H2L2(SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:36)、H3L0(SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:34)、H3L1(SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35)、H3L2(SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:36)、H4L0(SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:34)、H4L1(SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:35)或H4L2(SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:36)。

[0150] 本发明也提供了一种抗原结合蛋白,其特异性地结合SAP,且包含选自SEQ ID NO:37-40中的任一个的重链可变区。所述抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:74的轻链可变区。任一个重链可变区可以与任一个轻链可变区相组合。

[0151] 所述抗原结合蛋白可以包含任一个下述的重链和轻链可变区组合:H0L0(SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:41)、H0L1(SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:42)、H1L0(SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:41)、H1L1(SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:42)、H2L0(SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:41)、H2L1(SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:42)、H3L0(SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41)或H3L1(SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:42)。

[0152] L0(SEQ ID NO:41)可以被L091A(SEQ ID NO:74)替代。

[0153] 所述抗体重链可变区可以与SEQ ID NO:28具有75%或更大、80%或更大、85%或更大、90%或更大、95%或更大、96%或更大、97%或更大、98%或更大、99%或更大或100%同一性。所述抗体轻链可变区可以与SEQ ID NO:35具有75%或更大、80%或更大、85%或更大、90%或更大、95%或更大、96%或更大、97%或更大、98%或更大、99%或更大或100%同一性。

[0154] 所述抗体重链可变区可以与SEQ ID NO:40具有75%或更大、80%或更大、85%或更大、90%或更大、95%或更大、96%或更大、97%或更大、98%或更大、99%或更大或100%同一性。所述抗体轻链可变区可以与SEQ ID NO:41具有75%或更大、80%或更大、85%或更大、90%或更大、95%或更大、96%或更大、97%或更大、98%或更大、99%或更大或100%同一性。所述抗体轻链可变区可以与SEQ ID NO:74具有75%或更大、80%或更大、85%或更大、90%或更大、95%或更大、96%或更大、97%或更大、98%或更大、99%或更大或100%同一性。

[0155] 所述抗体重链可变区可以是SEQ ID NO:27-31中的任一个的变体,所述变体含有30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸置换、插入或删除。所述抗体轻链可变区可以是SEQ ID NO:34-36中的任一个的变体,所述变体含有30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸置换、插入或删除。

[0156] 所述抗体重链可变区可以是SEQ ID NO:37-40中的任一个的变体,所述变体含有30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸置换、插入或删除。所述抗体轻链可变区可以是SEQ ID NO:41、42或74的变体,所述变体含有30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸置换、插入或删除。

[0157] 例如,上述的规范CDR和规范框架残基置换也可以存在于作为变体序列的变体重链或轻链可变区中:所述变体序列具有至少75%同一性,或含有最多30个氨基酸置换。

[0158] 任一个重链可变区可以与合适的人恒定区相组合。任一个轻链可变区可以与合适的恒定区相组合。

[0159] 本发明的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:62的重链和/或SEQ ID NO:64的轻链可变区。

[0160] 所述抗体重链可以与SEQ ID NO:62具有75%或更大、80%或更大、85%或更大、90%或更大、95%或更大、96%或更大、97%或更大、98%或更大、99%或更大或100%同一性。所述抗体轻链可以与SEQ ID NO:64具有75%或更大、80%或更大、85%或更大、90%或更大、95%或更大、96%或更大、97%或更大、98%或更大、99%或更大或100%同一性。

[0161] 所述抗体重链可以是SEQ ID NO:62中的任一个的变体,所述变体含有30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸置换、插入或删除。所述抗体轻链可以是SEQ ID NO:64中的任一个的变体,所述变体含有30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸置换、插入或删除。

[0162] 圆盘样SAP分子具有2个面。存在于5个原体中的每一个上的单个 $\alpha$ 螺旋位于A面上。每个原体的钙依赖性的配体结合槽位于B面上,因此,当SAP与淀粉样蛋白纤维结合时,该面被封闭。为了使本发明的抗原结合蛋白具有治疗效用,当SAP与淀粉样沉着物结合时,希望被本文所述的抗原结合蛋白识别的表位在SAP中是可接近的,并因此位于SAP分子的A面或边缘上。所述抗原结合蛋白然后可以识别和结合淀粉样蛋白结合的SAP,导致补体活化,后者触发身体的有效的巨噬细胞依赖性的清除机理。因此,在本发明的一个实施方案中,所述抗原结合蛋白会在体内结合人SAP,所述人SAP与淀粉样蛋白纤维结合。在本发明的另一个实施方案中,所述抗原结合蛋白结合人SAP的A面。

[0163] 所述抗原结合蛋白可以衍生自大鼠、小鼠、兔、骆驼(或有关的骆驼科物种)或灵长类动物(例如食蟹猴、旧大陆猴、类人猿或人)。在一个具体实施方案所述抗原结合蛋白衍生自小鼠。在另一个实施方案中,所述抗原结合蛋白衍生自人。所述抗原结合蛋白可以是人源化的或嵌合的抗体。所述抗原结合蛋白可以是人抗体。所述抗原结合蛋白不是鼠抗体。

[0164] 所述抗原结合蛋白可以包含恒定区,所述恒定区可以属于任意同种型或亚类。所述恒定区可以属于IgG同种型,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体。所述抗原结合蛋白恒定区可以是IgG 1。

[0165] 在本发明的一个具体实施方案中,所述抗原结合蛋白包含这样的恒定区:所述恒定区在活化补体中起作用,例如人IgG 1、IgG2或IgG3。

[0166] 在本发明的另一个实施方案中,所述抗原结合蛋白包含这样的恒定区:所述恒定区在结合巨噬细胞中起作用,例如人IgG 1或IgG3。

[0167] 在本发明的另一个实施方案中,所述抗原结合蛋白包含这样的恒定区:所述恒定区在活化补体和结合巨噬细胞中起作用,例如人IgG1或IgG3。

[0168] 所述抗原结合蛋白可以包含一个或多个选自突变的恒定结构域的修饰,使得所述抗体具有改变的效应子功能/ADCC和/或补体活化。合适的修饰的实例参见:Shields等人J.Biol.Chem(2001)276:6591-6604,Lazar等人PNAS(2006)103:4005-4010,和US6737056、W02004063351和W02004029207。

[0169] 所述抗原结合蛋白可以包含具有改变的糖基化特性的恒定结构域,使得所述抗原结合蛋白具有改变的效应子功能/ADCC和/或补体活化。适用于生产具有改变的糖基化特性的抗原结合蛋白的方法的实例参见:W02003/011878、W02006/014679和EP1229125。

[0170] 在本发明的一个实施方案中,选择这样的抗原结合蛋白:其在负责抗原结合的区域(例如CDR)内不具有易于脱酰胺化的残基。在本发明的另一个实施方案中,选择这样的抗原结合蛋白:其在负责补体活化的区域内不具有易于脱酰胺化的残基。

[0171] 本发明也提供了编码本文所述的抗原结合蛋白的核酸分子。所述核酸分子可以包含编码重链可变区或全长序列和轻链可变区或全长序列的序列。或者,编码本文所述的抗原结合蛋白的核酸分子可以包含编码重链可变区或全长序列或轻链可变区或全长序列的序列。

[0172] 编码重链可变区的核酸分子可以包含SEQ ID NO:51或53-57中的任一个。编码轻链可变区的核酸分子可以包含SEQ ID NO:52或58-60中的任一个。

[0173] 编码重链的核酸分子可以包含SEQ ID NO:61。编码轻链的核酸分子可以包含SEQ ID NO:63。

[0174] 编码重链可变区的核酸分子可以包含SEQ ID NO:65或67-70中的任一个。编码轻链可变区的核酸分子可以包含SEQ ID NO:66或71-73中的任一个。

[0175] 所述核酸分子还可以含有一个或多个核苷酸置换,所述核苷酸置换不会改变编码的重链和/或轻链的氨基酸序列。

[0176] 本发明也提供了一种表达载体,其包含本文所述的核酸分子。也提供了一种重组宿主细胞,其包含本文所述的表达载体。

[0177] 可以在合适的宿主细胞中生产本文所述的抗原结合蛋白。用于生产本文所述的抗原结合蛋白的方法可以包括下述步骤:培养本文所述的宿主细胞,并回收所述抗原结合蛋白。重组的转化的、转染的或转导的宿主细胞可以包含至少一个表达盒,其中所述表达盒包含编码本文所述的抗原结合蛋白的重链的多核苷酸,且另外包含编码本文所述的抗原结合蛋白的轻链的多核苷酸。或者,重组的转化的、转染的或转导的宿主细胞可以包含至少一个表达盒,其中第一个表达盒包含编码本文所述的抗原结合蛋白的重链的多核苷酸,且另外包含第二个表达盒,所述第二个表达盒包含编码本文所述的抗原结合蛋白的轻链的多核苷酸。稳定地转化的宿主细胞可以包含载体,所述载体包含一个或多个表达盒,所述表达盒编码本文所述的抗原结合蛋白的重链和/或轻链。例如,这样的宿主细胞可以包含编码轻链的第一种载体和编码重链的第二种载体。

[0178] 所述宿主细胞可以是真核细胞,例如哺乳动物细胞。这样的细胞系的实例包括CHO或NS0。可以在培养基(例如无血清的培养基)中培养所述宿主细胞。所述宿主细胞可以将所述抗原结合蛋白分泌进培养基中。相对于含有所述抗原结合蛋白的培养基,可以将所述抗原结合蛋白纯化至至少95%或更高(例如98%或更高)。

[0179] 可以提供一种药物组合物,其包含所述抗原结合蛋白和药学上可接受的载体。可以提供一种组装式试剂盒(kit-of-parts),其包含所述药物组合物以及使用说明书。为了方便,所述试剂盒可以包含预定量的试剂和使用说明书。

[0180] 抗体结构

[0181] 完整的抗体

[0182] 来自大多数脊椎动物物种的抗体轻链可根据恒定区的氨基酸序列归类为 $\kappa$ 和 $\lambda$ 这两种类型之一。根据其重链恒定区的氨基酸序列,人抗体可以分成5个不同种类:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。IgG和IgA可以进一步划分到亚类:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4;以及IgA1和IgA2。小鼠和大鼠中至少存在物种变体IgG2a和IgG2b。

[0183] 可变区中较保守的部分被称为框架区(FR)。完整重链和轻链的可变结构域各包含4个通过3个CDR相连的FR。每条链中CDR借助FR区被紧密维系在一起,并与其它链的CDR共同

形成抗体的抗原结合位点。

[0184] 恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但显示出多种效应子功能,例如参与抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)、经由与Fc $\gamma$ 受体结合的吞噬作用、经由新生儿Fc受体(FcRn)的半衰期/清除率以及经由C1q组分实现的补体活化,从而导致趋化的、调理素的和(潜在地,在活的细胞抗原靶物的情况下)溶细胞的补体作用。IgG1类的人抗体在活化补体系统方面最有效,并因此是本发明的抗体的治疗性应用的理想同种型。

[0185] 已经报道,人IgG2恒定区基本上缺少通过经典途径活化补体或介导抗体依赖性的细胞的细胞毒性的能力。已经报道,IgG4恒定区缺少通过经典途径活化补体的能力,并仅微弱地介导抗体依赖性的细胞的细胞毒性。基本上缺少这些效应子功能的抗体可以称作‘非裂解的’抗体。

#### [0186] 人抗体

[0187] 人抗体可以通过本领域技术人员已知的多种方法来制备。通过杂交瘤方法,使用人骨髓瘤或小鼠-人异源骨髓瘤细胞系,可以制备人抗体。(参见Kozbor(1984)J. Immunol 133,3001,和Brodeur, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63(Marcel Dekker Inc, 1987))。替代方法包括,利用噬菌体文库或转基因小鼠,它们都用到人可变区所有组成成分(参见Winter(1994)Annu. Rev. Immunol 12: 433-455; Green(1999)J. Immunol. Methods 231:11-23)。

[0188] 现在有几个转基因小鼠品系可供利用,其中它们的小鼠免疫球蛋白基因座已被人免疫球蛋白基因片段取代(参见Tomizuka(2000)PNAS 97:722-727; Fishwild(1996)Nature Biotechnol. 14:845-851; Mendez(1997)Nature Genetics, 15:146-156)。在抗原攻击后,这些小鼠能够生成成人抗体的所有组成成分,从中可选择出感兴趣的抗体。

[0189] 噬菌体展示技术可以用于制备人抗原结合蛋白(及其片段),参见McCafferty(1990)Nature 348:552-553和Griffiths等人(1994)EMBO 13:3245-3260。

[0190] 可以采用亲和力成熟技术(Marks Bio/technol(1992)10:779-783)来提高结合亲和力,其中通过依次将重(H)和轻(L)链可变区替代为其天然产生的变体,并基于结合亲和力提高进行选择,从而提高初级人抗体的亲和力。此技术的变体例如“表位印迹”现在也可得到,参见例如WO 93/06213; Waterhouse(1993)Nucl. Acids Res. 21:2265-2266。

#### [0191] 嵌合的和人源化的抗体

[0192] 嵌合抗体一般利用重组DNA方法产生。分离出编码抗体的DNA(例如cDNA),并用常规方法进行测序(例如通过使用寡核苷酸探针,所述探针能与编码所述抗体的H和L链的基因特异性地结合)。将杂交瘤细胞用作这类DNA的典型来源。一经分离,DNA即被插入表达载体中,后者随后转染进本身不会产生免疫球蛋白的宿主细胞(诸如大肠杆菌、COS细胞、CHO细胞或骨髓瘤细胞)中,以实现所述抗体的合成。通过用编码人L和H链的序列替代对应的非人(例如鼠)H和L恒定区,可以修饰所述DNA。参见例如Morrison(1984)PNAS 81:6851。

[0193] 通过只将非人(例如鼠)抗体(“供体”抗体)的CDR移植到人框架(“受体框架”)和恒定区上以产生人源化的抗体,可以大大降低免疫原性(参见Jones等人(1986)Nature 321: 522-525; 和Verhoeyen等人(1988)Science 239:1534-1536)。但是,CDR移植本身可能不会导致抗原结合特性的完全保留,经常发现:如果想要恢复显著的抗原-结合亲和力,必须要在人源化分子中保留供体抗体的某些框架残基(有时称为“回复突变”)(参见Queen等人

(1989)PNAS 86:10,029-10,033;Co等人(1991)Nature 351:501-502)。在该情况下,从数据库中选择与非人供体抗体具有最高序列同源性的人可变区,以提供人框架(FR)。人FR可从人共有序列或者各个人抗体中选择。必要时,供体抗体的关键残基可被取代进入受体框架内,以保留CDR构象。抗体的计算机模拟可被用于协助鉴定这样的在结构上重要的残基,参见W099/48523。

[0194] 或者,通过“表面修饰(veneering)”的过程,可以实现人源化。独特的人和鼠免疫球蛋白重链和轻链可变区的统计学分析揭示,人和鼠抗体中暴露残基的精确模式是不同的,大多数个体表面位置强烈偏好少量不同残基(参见Padlan等人(1991)Mol. Immunol. 28: 489-498;和Pedersen等人(1994)J. Mol. Biol. 235:959-973)。因此,通过替换掉其框架区中的与在人抗体中常见的那些残基不同的暴露残基,可能降低非人Fv的免疫原性。因为蛋白质的抗原性可能与其表面可接近性相关,表面残基的替换可能足以使得小鼠可变区为人免疫系统所“看不见”(还参见Mark等人(1994)Handbook of Experimental Pharmacology vol.113:The pharmacology of monoclonal Antibodies, Springer-Verlag,105-134)。这种人源化过程被称为“表面修饰”,因为只改变了抗体的表面,而支持性残基保持不变。其它替代方案包括:在W004/006955中描述的方案,和Humaneering™操作(Kalobios),后者利用细菌表达系统,并生产在序列反面与人种系接近的抗体(Alfenito-M Advancing Protein Therapeutics,2007年1月, San Diego, California)。

#### [0195] 双特异性的抗原结合蛋白

[0196] 双特异性的抗原结合蛋白是对至少两种不同表位有结合特异性的抗原结合蛋白。本领域已知制备这种抗原结合蛋白的方法。传统地,双特异性的抗原结合蛋白的重组制备是基于2个免疫球蛋白H链-L链对的共表达,其中2个H链具有不同的结合特异性,参见Millstein等人(1983)Nature 305:537-539;W0 93/08829;和Traunecker等人(1991)EMBO 10:3655-3659。因为H和L链的随机组合,可能产生10种不同抗体结构的混合物,其中只有一种具备所需的结合特异性。一种替代方法涉及将具有所需结合特异性的可变结构域与重链恒定区融合在一起,所述恒定区包含至少部分的铰链区、CH2和CH3区域。含有轻链结合所需位点的CH1区可以存在于至少一个融合体中。将编码这些融合体以及L链(如果需要的话)的DNA插入分开的表达载体中,然后共转染到合适的宿主生物中。但是,可能将两条或全部三条链的编码序列插入一个表达载体中。在一种方法中,双特异性的抗体是由一个臂中具有第一结合特异性的H链和另一个臂中提供第二结合特异性的H-L链对组成,参见W094/04690。也参见Suresh等人(1986)Methods in Enzymology 121:210。

#### [0197] 抗原结合片段

[0198] 缺少恒定区的片段会缺乏通过经典途径活化补体或介导抗体依赖性的细胞的细胞毒性的能力。传统上,这类片段由完整抗体经蛋白水解消化产生,例如木瓜蛋白酶消化(参见例如,W0 94/29348),但是也可以从重组转化的宿主细胞直接产生。对于ScFv的生产,参见Bird等人(1988)Science 242:423-426。此外,可以利用下文描述的多种工程技术来生产抗原结合片段。

[0199] 与Fab片段相比,Fv片段的两条链似乎具有较低的相互作用能量。为了稳定VH和VL结构域之间的结合,它们已经以肽连接(Bird等人(1988)Science 242:423-426;Huston等人(1988)PNAS 85(16):5879-5883)、二硫键连接(Glockshuber等人(1990)Biochemistry

29:1362-1367)和“洞中圆球(knob in hole)”突变连接(Zhu等人(1997)Protein Sci.,6:781-788)。通过本领域技术人员熟知的方法,可以制备ScFv片段,参见Whitlow等人(1991)Methods Companion Methods Enzymol,2:97-105 and Huston等人(1993)Int.Rev.Immunol 10:195-217。可以在细菌细胞(诸如大肠杆菌)或真核细胞中产生ScFv。ScFv的一个缺点是产物的单价性(这使得抗体亲和力不可能借助多价结合得到提高)和它们的短半衰期。为了克服这些问题所进行的尝试包括:通过化学偶联从含有添加的C末端半胱氨酸的ScFv来制备双价(ScFv')<sub>2</sub>(Adams等人(1993)Can.Res 53:4026-4034;和McCartney等人(1995)Protein Eng.8:301-314),或者使含有未配对的C末端半胱氨酸残基的ScFv自发地发生位点特异性的二聚化(参见Kipriyanov等人(1995)Cell.Biophys 26:187-204)。或者,通过将肽接头缩短到3到12个残基以形成“双体(diabodies)”,可以强迫ScFv形成多聚体,参见Holliger等人(1993)PNAS 90:6444-6448。进一步减少接头可得到ScFv三聚体(“三体”,参见Kortt等人(1997)Protein Eng 10:423-433)和四聚体(“四体”,参见Le Gall等人(1999)FEBS Lett,453:164-168)。通过与蛋白质二聚体化基序的基因融合以形成“微抗体(miniantibody)”(参见Pack等人(1992)Biochemistry 31:1579-1584)和“微体(minibody)”(参见Hu等人(1996)Cancer Res.56:3055-3061),也可以构建二价ScFv分子。还可以过用第三个肽接头连接两个ScFv单元来制备ScFv-Sc-Fv串联((ScFv)<sub>2</sub>),参见Kurucz等人(1995)J.Immol.154:4576-4582。通过两个单链融合产物的非共价结合,可以制备双特异性双体,所述融合产物由一个抗体的VH结构域通过短接头与另一抗体的VL结构域连接组成,参见Kipriyanov等人(1998)Int.J.Can 77:763-772。可以如下提高这些双特异性双体的稳定性:通过引入二硫键或上文描述的“洞中圆球”突变,或者通过形成单链双体(ScDb),该ScDb中两个杂合ScFv片段经肽接头相连,参见Kontermann等人(1999)J.Immunol.Methods 226:179-188。四价双特异性分子可如下得到:例如将ScFv片段经铰链区与IgG分子的CH3结构域或者与Fab片段融合,参见Coloma等人(1997)Nature Biotechnol.15:159-163。或者,通过融合双特异性的单链双体,已经制备出四价双特异性分子(参见Alt等人(1999)FEBS Lett 454:90-94)。也可如下形成较小的四价双特异性分子:通过使ScFv-ScFv串联与含有螺旋-环-螺旋基序的接头二聚化(DiBi微抗体,参见Muller等人(1998)FEBS Lett 432:45-49),或者通过使包含四个抗体可变结构域(VH和VL)的单链分子在防止分子内配对的方向二聚化(串联双体,参见Kipriyanov等人(1999)J.Mol.Biol.293:41-56)。通过Fab'片段的化学偶联或者借助亮氨酸拉链异源二聚体化,可以形成双特异性的F(ab')<sub>2</sub>片段(参见Shalaby等人(1992)J.Exp.Med.175:217-225;和Kostelny等人(1992),J.Immunol.148:1547-1553)。也可得到分离的VH和VL结构域(Domantis plc),参见US 6,248,516、US 6,291,158和US 6,172,197。

#### [0200] 异源缀合抗体

[0201] 异源缀合抗体由利用任何方便的交联方法形成的两种共价连接的抗体组成。参见,例如,US 4,676,980。

#### [0202] 其它修饰

[0203] 本发明的抗原结合蛋白可以包含其它修饰以增强或改变它们的效应子功能。抗体的Fc区和多种Fc受体(FcγR)之间的相互作用被认为会介导抗体的效应子功能,这包括抗体依赖性的细胞的细胞毒性(ADCC)、补体的固定、所述抗体的吞噬作用和半衰期/消除。可

以根据需要的特性对抗体的Fc区进行各种修饰。例如,在EP 0629240和EP 0307434中详细描述了,在Fc区中的特定突变会使本来裂解性的抗体成为非裂解性的;或者,可以在抗体中引入补救受体结合表位来增加血清半衰期,参见US 5,739,277。人Fc $\gamma$ 受体包括Fc $\gamma$ R(I)、Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIIIa和新生儿FcRn。Shields等人(2001)J.Biol.Chem 276:6591-6604证实,一组公用IgG1残基参与结合所有Fc $\gamma$ R,而Fc $\gamma$ RII和Fc $\gamma$ RIII利用这组公用残基之外的一些独特位点。一组IgG 1残基(Pro-238、Asp-265、Asp-270、Asn-297和Pro-239)当被改变成丙氨酸时,对所有Fc $\gamma$ R的结合减弱。它们全部位于IgG CH2结构域中,并簇集在连接CH1和CH2的铰链附近。Fc $\gamma$ RI只使用共同IgG1残基组进行结合,而Fc $\gamma$ RII和Fc $\gamma$ RIII除了共同残基组外还与一些独特残基相互作用。改变一些残基只会减弱与Fc $\gamma$ RII(例如Arg-292)或Fc $\gamma$ RIII(例如Glu-293)的结合。一些变体显示出对Fc $\gamma$ RII或Fc $\gamma$ RIII的结合提高,但不影响对其它受体的结合(例如Ser-267Ala会提高对Fc $\gamma$ RII的结合,但不影响对Fc $\gamma$ RIII的结合)。另外一些变体显示出对Fc $\gamma$ RII或Fc $\gamma$ RIII的结合增强,而与其它受体的结合减弱(例如Ser-298Ala会增强对Fc $\gamma$ RIII的结合,但对Fc $\gamma$ RII的结合减弱)。对Fc $\gamma$ RIIIa来说,结合最好的IgG1变体具有在Ser-298、Glu-333和Lys-334处的组合的丙氨酸置换。新生儿FcRn受体被认为参与了抗体清除和跨组织的胞吞转运作用(参见Junghans(1997)Immunol.Res 16:29-57;和Ghetie等人(2000)Annu.Rev.Immunol.18:739-766)。已知与人FcRn直接相互作用的人IgG 1残基包括Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434和His435。在本部分中描述的任何位置处的置换可能增加所述抗体的血清半衰期和/或改变它们的效应子特性。

[0204] 其它修饰包括所述抗体的糖基化变体。已知抗体在它们的恒定区中的保守位置处的糖基化对抗体功能(尤其是效应子功能,例如上文描述的那些)有深刻的影响,参见例如,Boyd等人(1996)Mol.Immunol.32:1311-1318。还预见到所述抗体或其抗原结合片段的糖基化变体,其中增加、取代、删除或者修饰了一个或多个碳水化合物部分。天冬酰胺-X-丝氨酸或天冬酰胺-X-苏氨酸基序的引入,会产生碳水化合物部分的酶促连接的潜在位点,并因此可用于操纵抗体的糖基化。在Raju等人(2001)Biochemistry 40:8868-8876中,通过使用 $\beta$ -1,4-半乳糖基转移酶和/或 $\alpha$ -2,3-唾液酸转移酶进行再半乳糖基化和/或再唾液酸化的过程,提高TNFR-IgG免疫粘附素的末端唾液酸化。提高末端唾液酸化被认为会增加免疫球蛋白的半衰期。与大多数糖蛋白一样,抗体通常作为糖型混合物产生。当在真核细胞、尤其是哺乳动物细胞中产生抗体时,这种混合物尤其明显。已经开发出多种方法来制备指定的糖型,参见Zhang等人(2004)Science 303:371;Sears等人(2001)Science 291:2344;Wacker等人(2002)Science 298:1790;Davis等人(2002)Chem.Rev.102:579;Hang等人(2001)Acc.Chem.Res 34:727。因此,本文所述的抗体(例如IgG同种型,例如IgG1)可以包含指定数目(例如7或以下,例如5或以下,诸如2或1个)的糖型。

[0205] 所述抗体可以偶联非蛋白的聚合物(诸如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯)。蛋白质与PEG的缀合是成熟技术,可用于延长蛋白质的半衰期,以及降低蛋白质的抗原性和免疫原性。已用完整抗体以及Fab'片段研究了具有不同分子量和形式(直链的或支链的)的聚乙二醇化,参见Koumenis等人(2000)Int.J.Pharmaceut.198:83-95。

[0206] 生产方法

[0207] 抗原结合蛋白可以在转基因生物中产生,所述生物例如为山羊(参见Pollock等人



(1999)J.Immunol.Methods 231:147-157)、鸡(参见Morrow(2000)Genet.Eng.News 20:1-55)、小鼠(参见Pollock等人)或植物(参见Doran(2000)Curr.Opinion Biotechnol.11:199-204;Ma(1998)Nat.Med.4:601-606;Baez等人(2000)BioPharm 13:50-54;Stoger等人(2000)Plant Mol.Biol.42:583-590)。

[0208] 也可以通过化学合成来产生抗原结合蛋白。但是,通常利用本领域技术人员熟知的重组细胞培养技术来制备抗原结合蛋白。分离出编码所述抗原结合蛋白的多核苷酸,将其插入可复制载体(如质粒)中,用于进一步克隆(扩增)或表达。一个表达系统是谷氨酸合成酶系统(如Lonza Biologics出售的),尤其是在宿主细胞是CHO或NS0的情况下。可容易地分离出编码所述抗原结合蛋白的多核苷酸,并利用常规操作(例如寡核苷酸探针)测序。可以使用的载体包括质粒、病毒、噬菌体、转座子、微染色体,其中质粒是常用的。一般来说,这些载体另外包括信号序列、复制起点、一个或多个标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列,它们与所述抗原结合蛋白多核苷酸可操作地连接以促进表达。可以将编码轻链和重链的多核苷酸插入分开的载体中,并并行地或顺序地导入(例如通过转化、转染、电穿孔或转导)同一宿主细胞中,或者如果需要,可以在所述导入之前,将重链和轻链两者插入同一载体中。

[0209] 可以使用密码子优化,其目的是,与用特定序列转染时的水平相比,当用密码子优化过的基因转染时,宿主细胞生产的蛋白的总水平更高。已经公开了几种方法(Nakamura等人(1996)Nucleic Acids Research 24:214-215;W098/34640;W097/11086)。由于遗传密码的冗余,本文中公开的多核苷酸的替代多核苷酸(尤其是为在给定的宿主细胞中的表达经过密码子优化的那些)也可编码本文所述的抗原结合蛋白。因此,可以修改本发明的抗原结合蛋白的密码子选择,以适应宿主细胞的密码子偏爱,从而增加转录物和/或产物产率(例如Hoekema等人Mol Cell Biol 19877(8):2914-24)。密码子的选择可以基于与用于表达的宿主细胞的适当相容性。

#### [0210] 信号序列

[0211] 抗原结合蛋白可以作为与异源信号序列的融合蛋白产生,所述异源信号序列具有在成熟蛋白的N末端处的特异性切割位点。所述信号序列应能够被宿主细胞识别和加工。对于原核宿主细胞来说,信号序列可以是例如碱性磷酸酶、青霉素酶或者热稳定的肠毒素II前导序列。对于酵母菌分泌而言,信号序列可以是例如酵母转化酶前导序列、 $\alpha$ 因子前导序列或酸性磷酸酶前导序列,参见例如W090/13646。在哺乳动物细胞系统中,病毒分泌型前导序列(诸如单纯疱疹gD信号和天然免疫球蛋白信号序列)可以是合适的。通常,所述信号序列与编码所述抗原结合蛋白的DNA连接在同一读码框内。可以使用鼠信号序列,诸如在SEQ ID NO:79中所示的信号序列。

#### [0212] 复制起点

[0213] 复制起点是本领域所熟知的,其中pBR322适合多数革兰氏阴性细菌,2 $\mu$ 质粒适合多数酵母菌以及多种病毒复制起点如SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV或BPV适合多数哺乳动物细胞。通常哺乳动物表达载体不需要复制起点成分,但是SV40含有早期启动子,可以使用。

#### [0214] 选择标记

[0215] 典型的选择基因编码这样的蛋白质:其(a)赋予对抗生素(例如氨苄西林、新霉素、甲氨蝶呤或四环素)或其它毒素的抗性,或(b)补足营养缺陷或提供在复合培养基中不可得

到的营养物,或(c)二者的组合。选择方案可涉及使宿主细胞停止生长。已经被编码所述抗原结合蛋白的基因成功转化的细胞,因为例如共同递送的选择标记所赋予的药物抗性而存活。一个实例是DHFR选择标记,其中在有甲氨蝶呤存在下培养转化体。可以在有递增量甲氨蝶呤存在下培养细胞,以扩增目的外源基因的拷贝数。CHO细胞是特别适用于DHFR选择的细胞系。另外一个实例是谷氨酸合成酶表达系统(Lonza Biologics)。适用于酵母中的选择基因的一个实例是trp1基因,参见Stinchcomb等人(1979)Nature 282:38。

#### [0216] 启动子

[0217] 适用于表达抗原结合蛋白的启动子与编码所述抗原结合蛋白的DNA/多核苷酸可操作地相连。用于原核宿主的启动子包括:phoA启动子、 $\beta$ -内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸和杂合启动子,如Tac。适用于在酵母细胞中进行表达的启动子包括3-磷酸甘油激酶或者其它糖酵解酶,例如烯醇化酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油变位酶和葡萄糖激酶。可诱导的酵母启动子包括醇脱氢酶2、异细胞色素C、酸性磷酸酶、金属硫蛋白和负责氮代谢或者麦芽糖/半乳糖利用的酶。

[0218] 用于在哺乳动物细胞系统中表达的启动子包括病毒启动子诸如多瘤病毒、禽痘病毒和腺病毒(例如腺病毒2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒(特别是立即早期基因启动子)、逆转录病毒、乙型肝炎病毒、肌动蛋白、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子和早期或晚期猴病毒40。当然,启动子的选择是基于与用于表达的宿主细胞的相容性。第一质粒可以包含RSV和/或SV40和/或CMV启动子、编码轻链可变区(VL)的DNA、 $\kappa$ C区连同新霉素和氨苄西林抗性选择标记,第二质粒包含RSV或SV40启动子、编码重链可变区(VH)的DNA、编码 $\gamma$ 1恒定区的DNA、DHFR和氨苄西林抗性标记。

#### [0219] 增强子元件

[0220] 适当时(例如在高等真核生物中进行表达时),可以使用与载体中启动子元件可操作地连接的增强子元件。哺乳动物增强子序列包括来自珠蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、胎蛋白和胰岛素的增强子元件。或者,可以使用来自真核细胞病毒的增强子元件,诸如SV40增强子(在碱基100-270处)、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒增强子、杆状病毒增强子或者鼠IgG2a位点(参见W004/009823)。所述增强子可以在载体上位于启动子上游的位置。或者,所述增强子可以位于别处,例如在非翻译区内或在聚腺苷酸化信号的下游。增强子的选择和位置可以基于与用于表达的宿主细胞的适当相容性。

#### [0221] 聚腺苷酸化/终止

[0222] 在真核系统中,聚腺苷酸化信号与编码所述抗原结合蛋白的DNA/多核苷酸可操作地连接。这类信号通常被置于开放读码框的3'。在哺乳动物系统中,非限制性实例包括衍生自生长激素、延伸因子-1 $\alpha$ 和病毒(例如SV40)基因或逆转录病毒长末端重复序列的信号。在酵母系统中,聚腺苷酸化/终止信号的非限制性实例包括衍生自磷酸甘油酸酯激酶(PGK)和醇脱氢酶1(ADH)基因的那些。在原核系统中,通常不需要聚腺苷酸化信号,而是通常采用更短的且更明确的终止序列。聚腺苷酸化/终止序列的选择可以基于与用于表达的宿主细胞的适当相容性。

#### [0223] 用于提高产率的其它方法/元件

[0224] 除了上述的以外,可以用于提高产率的其它特征包括:染色质重塑元件、内含子和

宿主细胞特异性的密码子修饰。

#### [0225] 宿主细胞

[0226] 适用于克隆或表达编码抗原结合蛋白的载体的宿主细胞是原核细胞、酵母细胞或高等真核细胞。合适的原核细胞包括真细菌，例如肠杆菌科，诸如埃希氏菌属(*Escherichia*)，例如大肠杆菌(例如ATCC 31,446;31,537;27,325)，肠杆菌属(*Enterobacter*)，欧文氏菌属(*Erwinia*)，克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)，变形杆菌属(*Proteus*)，沙门氏菌属(*Salmonella*)，例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)，沙雷氏菌属(*Serratia*)，例如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)，和志贺氏菌属(*Shigella*)以及芽孢杆菌属(*Bacilli*) (如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*))(参见DD 266710))，假单胞菌属(*Pseudomonas*) (如铜绿假单胞杆菌(*P. aeruginosa*))和链霉菌属(*Streptomyces*)。在酵母宿主细胞中，也预见到酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*) (例如ATCC 16,045;12,424;24178;56,500)、子囊菌酵母属(*Yarrowia*) (EP402,226)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia Pastoris*) (EP 183 070,也参见Peng等人(2004) *J. Biotechnol.* 108:185-192)、假丝酵母属(*Candida*)、里氏木霉(*Trichoderma reesia*) (EP 244 234)、青霉菌(*Penicillium*)、弯颈霉(*Tolypocladium*)和曲霉(*Aspergillus*)宿主(诸如构巢曲霉(*A. nidulans*)和黑曲霉(*A. niger*))。

[0227] 高等真核宿主细胞包括：哺乳动物细胞(诸如COS-1(ATCC No. CRL 1650)COS-7(ATCC CRL 1651))、人胚胎肾细胞系293、幼仓鼠肾细胞(BHK)(ATCC CRL.1632)、BHK570(ATCC NO:CRL 10314)、293(ATCC NO.CRL 1573)、中国仓鼠卵巢细胞CHO(例如CHO-K1、ATCC NO:CCL 61、DHFR-CHO细胞系诸如DG44(参见Urlaub等人(1986) *Somatic Cell Mol. Genet.* 12:555-556)，尤其是适应悬浮培养的那些CHO细胞系、小鼠塞尔托利细胞、猴肾细胞、非洲绿猴肾细胞(ATCC CRL-1587)、HELA细胞、犬肾细胞(ATCC CCL 34)、人肺细胞(ATCC CCL 75)、Hep G2和骨髓瘤或者淋巴瘤细胞，例如NS0(参见US 5,807,715)、Sp2/0、Y0。

[0228] 还可以进一步工程化或改进这样的宿主细胞，以修饰所述抗原结合蛋白的质量、功能和/或产率。非限制性实例包括：表达特异性的修饰(例如糖基化)酶和蛋白折叠分子伴侣。

#### [0229] 细胞培养方法

[0230] 通过本领域技术人员已知的任何方法，可以培养用编码抗原结合蛋白的载体转化的宿主细胞。可以将宿主细胞培养在旋转烧瓶、转瓶或中空纤维系统中，但是对于大规模生产，具体地使用搅拌罐反应器进行悬浮培养。利用例如分散器、挡板或低剪切叶轮，可以将所述搅拌罐改造成适应通气。对于鼓泡塔和气升式反应器，可以用空气或氧气泡来直接通气。在宿主细胞培养在无血清培养基中的情况下，给培养基补充细胞保护剂(如Pluronic F-68)，以帮助防止通气过程导致的细胞损伤。根据宿生细胞的特点，对于贴壁依赖性的细胞系，可以用微载体作为生长基质，或者使用适应悬浮培养的细胞(通常是这样)。宿主细胞(特别是无脊椎动物宿主细胞)的培养可以运用多种操作模式，诸如补料分批、重复分批处理(参见Drapeau等人(1994) *Cytotechnology* 15:103-109)、持续分批工艺或者灌流培养。虽然可以将重组转化的哺乳动物宿主细胞培养在含有血清的培养基(诸如胎牛血清(FCS))

中,但是可以将这些宿主细胞培养在合成的无血清培养基中(诸如在Keen等人(1995) *Cytotechnology* 17:153-163中公开的)或者可商业得到的培养基(诸如ProCHO-CDM或UltraCHO™(Cambrex NJ,USA))中,在必要时给它们补充能量来源(如葡萄糖)和合成的生长因子(如重组胰岛素)。宿主细胞的无血清培养可能要求:这些细胞可适应在无血清的条件下生长。一种适应方法是,将这些宿主细胞培养在含有血清的培养基中,然后重复地将80%的培养基换成无血清培养基,从而使宿主细胞逐渐适应无血清条件(参见例如Scharfenberg等人(1995) *Animal Cell technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery等人编辑),619-623, Kluwer Academic publishers)。

[0231] 可以利用多种技术回收和纯化分泌到培养基中的抗原结合蛋白,以得到适合所需用途的纯度。例如,对于抗原结合蛋白用于治疗人类患者的用途,通常要求至少95%的纯度,更通常98%或99%或更高的纯度(相比粗培养基)。通常如下去除培养基中的细胞残片:离心,随后进行净化上清的步骤,例如利用微滤、超滤和/或深层过滤。还可以使用多种其它技术,例如透析、凝胶电泳以及层析技术,如羟基磷灰石层析(HA)、亲和层析(任选地包含亲和和标签体系,如多组氨酸)和/或疏水相互作用层析(HIC,参见US5,429,746)。在各种净化步骤之后,利用蛋白A或G亲和层析,可以捕获所述抗体。可以进行其它层析步骤,如离子交换和/或HA层析、阴离子或阳离子交换、尺寸排阻层析,以及硫酸铵沉淀。还可以采用多种去除病毒的步骤(例如纳米过滤,采用例如DV-20滤器)。在这些不同的步骤之后,得到纯化的(优选单克隆的)制品,其包含至少75mg/ml或更多、或100mg/ml或更多的抗原结合蛋白。这类制品基本上没有聚集形式的抗原结合蛋白。

[0232] 细菌系统可以用于表达抗原结合片段。这样的片段可以局限在细胞内、在周质内或分泌在细胞外。根据本领域技术人员已知的方法,可以提取和重新折叠不溶性的蛋白,以形成活性蛋白,参见Sanchez等人(1999) *J. Biotechnol.* 72:13-20;和Cupit等人(1999) *Lett Appl Microbiol* 29:273-277。

[0233] 脱酰胺化是去除酰胺官能团的化学反应。在生物化学中,该反应在蛋白的降解中是重要的,因为它会破坏氨基酸天冬酰胺和谷氨酰胺的含有酰胺的侧链。天冬酰胺被转化成异天冬氨酸和天冬氨酸的混合物。谷氨酰胺残基的脱酰胺化以远远更低的速率发生。认为脱酰胺化反应是限制蛋白的有用寿命的因素之一,它们也是在治疗性蛋白的生产过程中发生的最常见的翻译后修饰之一。例如,已经报道了重组人DNA酶和重组可溶性CD4的体外或体内生物活性的降低或丧失,而其它重组蛋白似乎不受影响。

[0234] 药物组合物

[0235] 可以将本文所述的抗原结合蛋白的纯化制品掺入药物组合物中,用于治疗本文所述的人疾病、障碍和病症。术语疾病、障碍和病症可互换地使用。所述药物组合物可以用于治疗这样的任意疾病:在所述疾病中,淀粉样沉着物存在于组织中,并促成结构和功能损伤,从而导致临床疾病。SAP在体内总是存在于所有淀粉样沉着物中,包含治疗有效量的本文所述的抗原结合蛋白的药物组合物可以用于治疗这样的疾病:所述疾病对从组织中清除淀粉样沉着物是有应答的。

[0236] 所述药物制剂可以包含与药学上可接受的载体相组合的抗原结合蛋白。所述抗原结合蛋白可以单独施用,或作为药物组合物的一部分施用。

[0237] 通常,这类组合物包含已知的且为药物学实践所接受的可药用载体,参见例如

Remingtons Pharmaceutical Sciences,第16版(1980)Mack Publishing Co.。这类载体的实例包括:经灭菌的载体,如盐水、林格氏液或葡萄糖溶液,它们任选地用适宜缓冲剂缓冲到pH5-8的范围内。

[0238] 通过注射或持续输注(例如静脉内的、腹膜内的、真皮内的、皮下的、肌肉内的或肝门内的),可以施用药物组合物。这样的组合物适当地没有肉眼可见的颗粒。也可以口服地施用药物组合物,特别是含有CPHPC的那些。

[0239] 药物组合物可以包含1mg至10g抗原结合蛋白,例如5mg至1g抗原结合蛋白。或者,所述组合物可以包含5mg至500mg,例如5mg至50mg。

[0240] 用于制备这类药物组合物的方法是本领域技术人员熟知的。药物组合物可以在单位剂型中包含1mg至10g抗原结合蛋白,任选地与使用说明书在一起。可以低压冻干(冷冻干燥)药物组合物,用于在给药前根据本领域技术人员熟知或明白的方法重建。在抗体具有IgG1同种型的情况下,可以向药物组合物中加入铜螯合剂如柠檬酸盐(例如柠檬酸钠)或者EDTA或组氨酸,以便降低铜介导的对该同种型抗体的降解的程度,参见EP0612251。药物组合物还可以包含增溶剂诸如精氨酸碱、去污剂/抗聚集剂诸如聚山梨酯80和惰性气体诸如氮,以替代瓶子顶部空间中的氧。

[0241] 一般根据经验决定施用所述抗原结合蛋白的有效剂量和治疗方案,并且依赖于多种因素,诸如患者的年龄、体重和健康状况以及待治疗的疾病或病症。这些因素在主治医生的考虑内。在例如Smith等人(1977)Antibodies in human diagnosis and therapy,Raven Press,New York中,可以找到选择合适剂量的指导。

[0242] 施用给受试者的抗原结合蛋白的剂量通常是1 $\mu$ g/kg至150mg/kg、0.1mg/kg至100mg/kg、0.5mg/kg至50mg/kg、1-25mg/kg或1-10mg/kg受试者体重。例如,所述剂量可以是10mg/kg、30mg/kg或60mg/kg。可以肠胃外地(例如皮下地、静脉内地或肌肉内地)施用所述抗原结合蛋白。

[0243] 可以在0.1mg/kg至2mg/kg的剂量施用所述SAP消耗的化合物,取决于它的活性。所述SAP消耗的化合物可以作为固定的剂量施用,独立于剂量与受试者体重之比。所述SAP消耗的化合物可以在一个或多个分开的、同时的或相继的100mg或更小、50mg或更小、25mg或更小或10mg或更小的肠胃外剂量中施用。

[0244] 如果需要的话,治疗性组合物的有效日剂量可以作为2、3、4、5、6或更多个子剂量施用,所述子剂量在一天中在适当的间隔分开施用,任选地,在单位剂型中。

[0245] 所述抗原结合蛋白可以在单个大剂量中或在更小的重复剂量中施用。

[0246] 剂量的施用可以通过在2-24小时(诸如2-12小时或2-6小时)时段内的缓慢连续输注。这可以导致降低的毒副作用。

[0247] 剂量的施用可以在必要时重复一次或多次,例如,每天3次,每天1次,每2天1次,每周1次,每2周1次,每月1次,每3个月1次,每6个月1次,或每12个月1次。所述抗原结合蛋白可以通过维持疗法来施用,例如每周1次,持续6个月或更长的时段。所述抗原结合蛋白可以通过间歇疗法来施用,例如给药3-6个月的时段,然后停药3-6个月,再施用抗原结合蛋白3-6个月,诸如此类进行循环。

[0248] 例如,可以皮下地施用所述剂量,每14或28天给药1次,以多个子剂量的形式,每天给药。

[0249] 可以以将治疗靶向特定定位点的方式,将所述抗原结合蛋白施用给受试者。例如,可以将所述抗原结合蛋白局部地注射进组织中的局限性的局部淀粉样蛋白块中,或输注进供给淀粉样变性器官的血液中。

[0250] 所述抗原结合蛋白必须与一种或多种其它的治疗活性剂(特别是SAP消耗的化合物)组合使用,用于治疗本文所述的疾病。在施用SAP结合蛋白之前,必须从循环中有效地消耗SAP,以便安全地且有效地施用所述SAP结合蛋白。

[0251] 首先施用所述SAP消耗的化合物,使得几乎所有的循环SAP被清除。由于这会将大量与淀粉样沉着物结合的SAP剩在组织中,抗-SAP抗原结合蛋白的相继施用会实现定位并与淀粉样沉着物特异性地结合,以促进它们的快速的且广阔的消退。适当地,在开始使用所述SAP消耗的化合物的治疗之后,可以施用抗-SAP抗原结合蛋白1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20或25或更多天。

[0252] 所述相继施用可以包括,用SAP消耗的化合物进行2次或更多次相继治疗,随后用抗-SAP抗原结合蛋白进行2次或更多次相继治疗。

[0253] 所述相继施用可以包括,用SAP消耗的化合物进行1次治疗,随后用抗-SAP抗原结合蛋白进行1次相继治疗,然后将其重复1次或多次。

[0254] 相继的/随后的剂量可以是这样的量:该量大于初始/前一剂量,或小于初始/前一剂量。

[0255] 在施用初始剂量的SAP消耗的化合物蛋白以后,可以施用一个或多个相继的(例如随后的)剂量的SAP消耗的化合物和/或抗-SAP抗原结合蛋白,且其中所述一个或多个相继的剂量可以是大约、等于或小于初始剂量的量。

[0256] 在初步消耗循环SAP以后,施用其它剂量的SAP消耗的化合物和第一剂量的抗-SAP抗原结合蛋白,随后施用一个或多个相继的(例如随后的)剂量,且其中至少一个随后的剂量是大于初始剂量的量。

[0257] 因此,所述给药可以使用预定的或常规的给药计划,从而在剂量施用之间产生预定的指定的时间段。所述计划可以包括相同或不同长度的时间段,只要所述计划是预定的即可。所述计划覆盖任意特定组合,只要提前确定,适当的计划包括在特定天给药。

[0258] 所述药物组合物可以与其它药物一起,并任选地与使用说明书一起,构成所述抗原结合蛋白的组装式试剂盒。为了方便,所述试剂盒可以包含预定量的试剂和使用说明书。

[0259] 术语“个体”、“受试者”和“患者”在本文中可互换地使用。所述受试者可以是灵长类动物(例如绒猴或猴)。所述受试者通常是人。

[0260] 治疗可以是治疗性的或预防性的。所述受试者是有此需要的受试者。需要治疗的那些可以包括:已经遭受特定医学疾病的个体,以及将来可能发展所述疾病的那些。

[0261] 因而,所述SAP消耗的化合物和随后的SAP本文所述的抗原结合蛋白可以用于预防性治疗。在该情况下,将本文所述的相继治疗施用给个体,以便预防或延迟疾病的一个或多个方面或征状的发作。所述受试者可以是无症状的,或可以具有所述疾病的遗传倾向,因为已知在淀粉样沉着物造成足够损伤以产生临床症状之前,它们会存在与组织中并累积一段时间。通过组织活组织检查的组织学检查,或通过非侵入性成像操作(包括放射性标记的SAP闪烁描记术、超声心动描记术和心脏磁共振成像),可以检测到这样的亚临床的淀粉样蛋白沉着。在首先消耗循环SAP以后,将预防有效量的所述抗原结合蛋白施用给这样的个

体。预防有效量是预防或延迟本文所述疾病的一个或多个方面或症状的发作的量。

[0262] 本文所述的抗原结合蛋白还可以用于治疗方法中。术语“治疗”包括减轻、减少或预防疾病的至少一个方面或症状。例如,本文所述的抗原结合蛋白可以用于改善或减轻本文所述疾病的一个或多个方面或症状。

[0263] 本文所述的抗原结合蛋白以治疗性或预防性处理的有效量使用。本文所述的抗原结合蛋白的治疗有效量是,有效地改善或减轻疾病的一个或多个方面或症状的量。本文所述的抗原结合蛋白还可以用于治疗、预防或治愈本文所述疾病。

[0264] 本文所述的抗原结合蛋白可以对受试者的健康具有通常有益的作用,例如它可以增加受试者的预期寿命。

[0265] 本文所述的抗原结合蛋白不需要实现完全治愈或根除疾病的每种症状或表现即可构成可行的治疗性处理。如在相关领域中公认的,用作治疗剂的药物可能减轻给定的疾病状态的严重性,但是不需要消除疾病的每种表现,即可视作有用的治疗剂。类似地,预防性地施用的治疗不需要完全有效地预防疾病的发作即可构成可行的预防剂。简单地减轻疾病的影响(例如,通过减少它的症状的数目或严重性,或通过增加其它治疗的有效性,或通过产生另一种有益效果),或减小疾病在受试者中将来发生(例如通过延迟疾病的发作)或恶化的可能性,是足够的。

[0266] 本文所述的抗原结合蛋白可以用于治疗或预防与淀粉样蛋白沉着(即淀粉样变性)有关的疾病。

[0267] “淀粉样变性”是,特征在于淀粉样蛋白在身体的多个器官和组织中进行胞外积累的任意疾病。

[0268] 术语“淀粉样蛋白”表示,由纤丝组成的不溶性蛋白纤维在组织中的胞外沉着物,所述纤丝具有特征性的超微结构形态、交叉- $\beta$ 折叠核心结构和下述特异病征性的组织化学染色性质:结合来自碱性醇溶液的刚果红染料,然后当用显微镜在强交叉偏振光中观察时产生红-绿二色性。已知约25种不同的无关的蛋白会形成淀粉样蛋白纤丝,所述纤丝沉积在人组织中,并共有所有这些典型性质。在脑质中的淀粉样沉着物(脑淀粉样蛋白)与体内别处的淀粉样沉着物稍微差别在于,它们总是局灶的,且大小是极微小的,并统称为淀粉样蛋白斑。

[0269] 淀粉样变性(它是由淀粉样蛋白在组织中的沉积直接造成的疾病)包括局部淀粉样变性(其中沉着物局限于一个解剖学区域和/或一个组织或器官系统)和全身性淀粉样变性(其中沉着物可以发生在体内的任意器官或组织,包括血管和结缔组织)。淀粉样变性的原因可以是获得性的或遗传性的。获得性的淀粉样变性作为先前医学病症的并发症而发生,所述先前医学病症本身可以是获得性的或遗传性的。因而,反应性全身性淀粉样变性(称作淀粉样蛋白A蛋白(AA)型)是慢性活动性炎性疾病(诸如类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、克罗恩氏病、慢性感染和慢性脓毒症)的并发症,也是遗传性周期性发热综合征(诸如家族性地中海热、Muckle-Wells综合征和CINCA综合征)的并发症。透析相关的淀粉样变性由 $\beta$ 2-微球蛋白的积累(作为晚期肾衰竭的结果)造成。单克隆免疫球蛋白轻链(AL)淀粉样变性是多发性骨髓瘤或其它良性单克隆丙种球蛋白病(意义未定的单克隆丙种球蛋白病, MGUS)的并发症。转甲状腺素蛋白型的获得性淀粉样变性可以在没有任何先前疾病的情况下发生,且仅仅是老龄的并发症。遗传性淀粉样变性由多种蛋白的基因(其编码具有增

加的形成淀粉样蛋白纤丝的倾向的变体蛋白的表达)中的突变造成,并包括由转甲状腺素蛋白、载脂蛋白AI、钙结合微丝蛋白、溶菌酶、半胱氨酸蛋白酶抑制剂C和淀粉样蛋白 $\beta$ -蛋白造成的疾病。所有不同形式的淀粉样变性和涉及的蛋白的综合描述,可以在教科书和科学文献中得到(Pepys, M.B. (2006) *Annu. Rev. Med.*, 57:223-241; Pepys和Hawkins (2003) *Amyloidosis. Oxford Textbook of Medicine*, 第4版, 第2卷, Oxford University Press, Oxford, 第162-173页; Pepys和Hawkins (2001) *Amyloidosis. Samter's Immunologic Diseases*, 第6版, 第1卷, Lippincott Williams&Williams, Philadelphia, 第401-412页)。

[0270] 局部淀粉样蛋白沉着(局限于一个器官或组织)可以是临床上沉默的,或可以造成严重的组织损伤和疾病。例如,脑淀粉样蛋白血管病(其中血管淀粉样沉着物由A $\beta$ 蛋白组成)通常是在没有任何其它病理学存在下发生的原因不明的散发的获得性的病症,且是脑充血和中风的主要原因。存在几种非常重要的且常见的疾病,尤其是阿尔茨海默氏病(AD)和II型糖尿病,其中总是存在淀粉样沉着物,但是其中造成这些各种疾病的精确机理仍然未知。尽管如此,淀粉样蛋白在脑和脑血管中(在阿尔茨海默氏病中)和在胰岛中(在糖尿病中)的局部沉积,非常可能加重病理学和疾病。因此,本发明包括使用本文公开的抗原结合蛋白来治疗阿尔茨海默氏病和II型糖尿病,实际上治疗与淀粉样沉着物在组织中的存在有关的任意病症。

[0271] 许多形式的传递性海绵状脑病(朊病毒病)与脑中的淀粉样沉着物有关,本发明因此涉及所有这样的病症,包括人类的变体克雅病、克雅病本身、库鲁病和各种其它形式的人朊病毒病、牛海绵状脑病、长耳鹿和麋鹿的慢性消耗性疾病以及貂的传递性脑病。

[0272] 诊断使用方法

[0273] 本文所述的抗原结合蛋白可以用于检测体外或体内生物样品中的SAP,用于诊断目的。例如,所述抗-SAP抗原结合蛋白可以用于检测血清中的或与淀粉样蛋白(例如淀粉样蛋白斑)结合的SAP。所述淀粉样蛋白可以已经首先从人或动物体中取出(例如活组织检查)。可以采用常规免疫测定,包括ELISA、蛋白印迹、免疫组织化学或免疫沉淀。

[0274] 所述抗原结合蛋白可以提供在诊断试剂盒中,所述诊断试剂盒包含一种或多种抗原结合蛋白、可检测的标记和试剂盒的使用说明书。为了方便,所述试剂盒可以包含预定量的试剂和使用说明书。

[0275] 实施例

[0276] 实施例1-杂交瘤可变结构域的测序:SAP-E和SAP-K

[0277] SAP-E和SAP-K来自2组抗-SAP单克隆抗体,已经单独测试了每组与SAP的体外结合。在它们的组内,SAP-E和SAP-K表现出最强的与SAP的结合,并在不同试验中将它们彼此进行对比。

[0278] 第一组抗体包含来自7种杂交瘤的抗体,并命名为SAP-A至SAP-G,所述抗体用纯化的人SAP(下面显示的SEQ ID NO:43)(纯化人SAP的方法的细节,参见Hawkins等人(1991) *Clin. Exp. Immunol.* 84, 308-316)和融合方案在单次常规免疫接种中产生。这些抗体中的2种(SAP-E和SAP-B)是IgG2a同种型,而其它抗体都是IgG 1同种型(参见实施例13、表11)。

[0279] 第二组抗体包含6种不同的IgG2a单克隆抗体(SAP-H至SAP-M),所述抗体通过标准技术从免疫接种衍生出,其中使用纯化的人SAP(下面显示的SEQ ID NO:43)(Hawkins等人(1991) *Clin. Exp. Immunol.* 84, 308-316)和常规融合来产生杂交瘤,并通过常规方法克隆所



述杂交瘤。

[0280] 智人SAP成熟的氨基酸序列(SEQ ID NO:43)

[0281] HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLIITPLEKPLQNFTLCFRAYSDSLRSYSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGEYSLYIGRHKVTISKVIEKFPAPVHICVSWESSSGIAEFWINGTPLVKKGLRQGYFVEAQPKIVLGQEQDSYGGKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGTPLPANILDWQALNYEIRGYVVIKPLVWV

[0282] 为了对比目的,下面给出了小鼠SAP序列,其与人SAP具有69.4%同一性。

[0283] 小家鼠SAP成熟的蛋白(SEQ ID NO:44)

[0284] QTDLKRKVFVFPRESETHVKLIIPHLEKPLQNFTLCFRYSDSLRSQSLFSYSVKGRDNELLIYKEKVG EYSLYIGQSKVTVRGMEEYLSPVHLCTTWESSSGIVEFWVNGKPWVKKSLQREYTVKAPPSIVLGQEQDNYGGGFQR SQSFVGEFSDLYMWWDYVLTPQDILFVYRDSVPNPNILNWQALNYEINGYVVIRPRVW

[0285] 使用来自Qiagen(#74106)的RNeasy试剂盒,从大约106细胞的杂交瘤细胞沉淀物中提取总RNA。使用AccessQuick RT-PCR系统(A1702),使用对鼠免疫球蛋白基因前导序列和鼠IgG2a/K恒定区特异性的简并引物,生产可变重链和轻链区的cDNA。使用来自Invitrogen(K2000-01)的TA克隆试剂盒,克隆纯化的RT-PCR片段。通过序列比对,获得每种杂交瘤的共有序列,与已知免疫球蛋白可变序列的比列列出在KABAT中(Sequences of Proteins of Immunological Interest,第4版,U.S.Department of Health and Human Services,National Institutes of Health(1987))。下面显示了SAP-E和SAP-K的共有序列。

[0286] SAP-E序列

[0287] SAP-E CDRH1(SEQ ID NO:1)

[0288] TYNMH

[0289] SAP-E CDRH2(SEQ ID NO:2)

[0290] YIYPGDGNANYNQQFKG

[0291] SAP-E CDRH3(SEQ ID NO:3)

[0292] GDFDYDGGYYFDS

[0293] SAP-E CDRL1(SEQ ID NO:4)

[0294] RASENIYSYLA

[0295] SAP-E CDRL2(SEQ ID NO:5)

[0296] NAKTLAE

[0297] SAP-E CDRL3(SEQ ID NO:6)

[0298] QHHYGAPLT

[0299] SAP-E V<sub>H</sub>氨基酸序列(SEQ ID NO:7),其中CDR标有下划线

[0300] QASLQQSGTELVRSGASVKMSCKASGFTFATYNMHWIKQTPGQGLEWIGYIYPGDGNANYNQQFKGKAT LTADTSSNTAYMQISSLTSEDSAVYFCARGDFDYDGGYYFDSWGQGTTLTVSS

[0301] SAP-E V<sub>H</sub> DNA序列(SEQ ID NO:8)

[0302] CAGGCTTCTCTACAGCAGTCTGGGACTGAGCTGGTGAGGTCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAG GCTTCTGGCTTCACATTTGCCACTTACAATATGCACTGGATTAAGCAGACACCCGGACAGGGCCTGGAATGGATTGG GTATATTTATCCTGGAGATGGTAATGCTAACTACAATCAGCAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACACAT CCTCCAACACAGCCTACATGCAGATCAGCAGCCTGACATCTGAAGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGGAC

TTTGATTACGACGGAGGGTACTACTTTGACTCCTGGGGCCAGGGCACCCTCTCACAGTCTCCTCA

[0303] SAP-E VL氨基酸序列(SEQ ID NO:9),其中CDR标有下划线

[0304] DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQGRSPQLLVHNAKTLAEGVPSRVSGSGGT  
HFSLKINGLQPEDFGNYYCQHGYGAPLTFGAGTKLELK

[0305] SAP-E VL DNA序列(SEQ ID NO:10)

[0306] GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGT  
CGAGCAAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAGATCCCTCAGCTCCTGGTCCA  
TAATGCAAAAACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCAAGGGTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACACTTTTCTCTGAAGA  
TCAACGGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAATTATTACTGTCAACATCATTATGGTGCTCCGCTCACGTTCCGGTGCT  
GGGACCAAGCTGGAAGTGAAG

[0307] SAP-K序列

[0308] SAP-K CDRH1(SEQ ID NO:11)

[0309] SYWMH

[0310] SAP-K CDRH2(SEQ ID NO:12)

[0311] MIHPNSVNTNYNEKFKS

[0312] SAP-K CDRH3(SEQ ID NO:13)

[0313] RNDYYWYFDV

[0314] SAP-K CDRL1(SEQ ID NO:14)

[0315] KASQNVNSNVA

[0316] SAP-K CDRL2(SEQ ID NO:15)

[0317] SASYRYS

[0318] SAP-K CDRL3(SEQ ID NO:16)

[0319] QQCNNYPFT

[0320] SAP-K VH氨基酸序列(SEQ ID NO:17),其中CDR标有下划线

[0321]

QVQLQQPGAELIKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWKQRPQGQLEWIGMIHPNSVNTNYNEKFKSKATLTVDKSSS  
TAYMQLNSLTSEDSAVYYCARRNDYYWYFDVWGTGTTVTVS S

[0322] SAP-K VH DNA序列(SEQ ID NO:18)

[0323] CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGATAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAG  
GCTTCTGGCTACACTTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGG  
AATGATTCATCCTAATAGTGTTAATACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGTAAGGCCACACTGACTGTAGACAAAT  
CCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACGGAAT  
GATTACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

[0324] SAP-K VL氨基酸序列(SEQ ID NO:19),其中CDR标有下划线

[0325] DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVNSNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYS  
GVDPDRFTGSGSGT  
DFTLTITNVQSEDLAEYFCQQCNNYPFTFGSGTKLEIK

[0326] SAP-K VL DNA序列(SEQ ID NO:20)

[0327] GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGC  
AAGGCCAGTCAGAATGTGAATTCTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTA

CTCGGCTTCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA  
TCACCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTGCAATGTAACAACATCCATTACGTTTCGGCTCG  
GGGACAAAGTTGGAATAAAA

[0328] 实施例2:嵌合抗体的构建

[0329] 通过SAP-E和SAP-K的PCR克隆,构建嵌合抗体,其包含移植到人IgG1/ $\kappa$ 野生型恒定区上的母体鼠可变结构域。基于共有序列,设计用于扩增鼠可变结构域的引物,其中掺入促进克隆进哺乳动物表达载体中所需的限制位点。通过在FR4(框架区4(在CDR3后面且在第一个恒定结构域前面的V-区序列))中导入限制位点,将SAP-E中的VH氨基酸序列从SEQ ID NO:7所示的TTLTVSS改变成TLVTVSS,并将SAP-K中的VH氨基酸序列从SEQ ID NO:17所示的TTVTVSS改变成TLVTVSS。在SAP-K可变轻链中,内部EcoRI位点存在于CDRL1中,并通过改变一个碱基对(这不会改变氨基酸序列)来设计诱变引物,以去除该不希望的内部EcoRI位点。

[0330] 分别在SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22中给出了SAP-E嵌合抗体(cSAP-E)的全长重链和轻链蛋白序列。分别在SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中给出了SAP-K嵌合抗体(cSAP-K)的全长重链和轻链蛋白序列。

[0331] SAP-E VH嵌合体核苷酸序列(SEQ ID NO:45)

[0332] CAGGCTTCTCTACAGCAGTCTGGGACTGAGCTGGTGAGGTCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAG  
GCTTCTGGCTTCACATTTGCCACTTACAATATGCACTGGATTAAGCAGACACCCGGACAGGGCCTGGAATGGATTGG  
GTATATTTATCCTGGAGATGGTAATGCTAACTACAATCAGCAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACACAT  
CCTCCAACACAGCCTACATGCAGATCAGCAGCCTGACATCTGAAGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGGAC  
TTTGATTACGACGGAGGGTACTACTTTGACTCCTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAA  
GGGCCCCAGCGTGTTCCTTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGA  
AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCC  
GTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTA  
CATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCC  
ACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCACAAGCCTAAGGAC  
ACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTT  
CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACC  
GGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCAACAGGATTTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAG  
GCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCC  
CCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCG  
CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGC  
TTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCTGCTGCTCCGTGATGCA  
CGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

[0333] SAP-E VH嵌合体氨基酸序列(SEQ ID NO:21)

[0334] QASLQQSGTELVRSGASVKMSCKASGFTFATYNMHWIKQTPGQGLEWIGYIYPGDGNANYNQFKGKAT  
LTADTSSNTAYMQISSLTSEDSAVYFCARGDFDYDGGYYFDSWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA  
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK  
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF

YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDFSFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0335] SAP-E VL嵌合体核苷酸序列(SEQ ID NO:46)

[0336] GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGT  
CGAGCAAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAGATCCCCCTCAGCTCCTGGTCCA  
TAATGCAAAAACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCAAGGGTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACACTTTTCTCTGAAGA  
TCAACGGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAATTATTACTGTCAACATCATTATGGTGCTCCGCTCACGTTCCGGTGCT  
GGGACCAAGCTGGAAGTGAACGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAA  
GAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACA  
ATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC  
ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAG  
CCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

[0337] SAP-E VL嵌合体氨基酸序列(SEQ ID NO:22)

[0338] DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQGRSPQLLVHNAKTLAEGVPSRVSGSGSGT  
HFSLKINGLQPEDFGNYCQHHYGAPLTFGAGTKLELKRVAAPSVMIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0339] SAP-K VH嵌合体核苷酸序列(SEQ ID NO:47)

[0340] CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGATAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAG  
GCTTCTGGCTACACTTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGG  
AATGATTTCCTAATAGTGTTAATACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGTAAGGCCACACTGACTGTAGACAAAT  
CCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACGGAAT  
GATTACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAG  
CGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACT  
TCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAG  
AGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAA  
CGTGAACCAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCC  
CCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATG  
ATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTA  
CGTGGACGGCGTGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGT  
CCGTGCTGACCGTGTGCAACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCT  
GCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAG  
AGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT  
GGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACATAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTG  
TACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCACTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCT  
GCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

[0341] SAP-K VH嵌合体氨基酸序列(SEQ ID NO:23)

[0342] QVQLQQPGAELIKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGLEWIGMIHPNSVNTNYNEKFKSKAT  
LTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARRNDYYWYFDVWGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC  
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD  
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS

TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0343] SAP-K VL嵌合体核苷酸序列(SEQ ID NO:48)

[0344] GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGC  
AAGGCCAGTCAGAATGTGAACTCTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTA  
CTCGGCTTCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACCA  
TCACCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATGTAACAATATCCATTACGTTCTGGCTCG  
GGGACAAAGTTGGAAATAAAACGTACGGTGGCCGCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAA  
GAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAATCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACA  
ATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC  
ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAG  
CCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

[0345] SAP-K VL嵌合体氨基酸序列(SEQ ID NO:24)

[0346] DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVNSNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSVGPDRFTGSGSGT  
DFTLTITNVQSEDLAEYFCQQCNYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0347] 实施例3:人源化策略

[0348] 通过将来自鼠抗体的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3移植到合适的人  
框架序列上的方法,制备人源化的抗体。

[0349] SAP-E人源化策略

[0350] SAP-E重链人源化

[0351] 对于SAP-E小鼠可变重链序列,选择人种系受体框架(IGHV1-69,SEQ ID NO:25),  
其与小鼠SAP-E可变重链序列(SEQ ID NO:7)以及JH1微基因(Kabat:AEYFQHWGQGLTVTVSS  
(SEQ ID NO:26))具有60%同一性(包括CDR)。JH1微基因残基的前6个残基落入CDR3区内,  
并通过导入来自供体抗体的CDR来替换。

[0352] 基于序列对比和对抗体功能的可能影响,制备5种人源化的变体。构建体H0是鼠  
CDR(使用Kabat定义)向上面选择的人受体框架中的直链移植物。构建体H1具有在残基27和  
30处的额外回复突变。构建体H2和H3是基于H1,具有在残基2(H2)和48和67(H3)处的额外回  
复突变。构建体H4是基于H3,具有在残基69、73和91处的额外回复突变。参见表3。

[0353] 下面给出了H0、H1、H2、H3和H4的人源化的可变重链结构域的序列(分别是SEQ ID  
NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31)。

[0354] 表3:制备的SAP-E人源化的VH变体的总结

[0355]

| 构建体                  | 受体/模板<br>框架                   | 回复突变的氨基<br>酸编号(Kabat) | 回复突变<br>的总数 | 人受体框架       | 原始小鼠序<br>列  |
|----------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| H0 (SEQ ID<br>NO:27) | IGHV1-69<br>(SEQ ID<br>NO:25) | -----                 | 无           | ----        | -----       |
| H1 (SEQ ID<br>NO:28) | H0                            | 27<br>30              | 2           | G<br>S      | F<br>A      |
| H2 (SEQ ID<br>NO:29) | H1                            | 2                     | 3           | V           | A           |
| H3 (SEQ ID<br>NO:30) | H1                            | 48<br>67              | 4           | M<br>V      | I<br>A      |
| H4 (SEQ ID<br>NO:31) | H3                            | 69<br>73<br>91        | 7           | I<br>K<br>Y | L<br>T<br>F |

[0356] SAP-E轻链人源化

[0357] 对于SAP-E小鼠可变轻链序列,选择人种系受体框架(IGKV1-39,SEQ ID NO:32),其基于序列相似性与小鼠SAP-E可变轻链序列(SEQ ID No:9)以及J-区κ2微基因(Kabat:YTFGQGKLEIK,SEQ ID NO:33))具有68%同一性(包括CDR)。JK-2微基因残基的前2个残基落入CDR3区内,并通过导入来自供体抗体的CDR来替换。

[0358] 基于序列对比和对抗体功能的可能影响,制备3种人源化的变体。构建体L0是鼠CDR (使用Kabat定义)向上面选择的人受体框架中的直链移植物。构建体L1具有在残基49处的额外回复突变。构建体L2具有在位置48和49处的回复突变。参见表4。

[0359] 下面给出了L0、L1和L2的人源化的可变轻链结构域的序列(分别是SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36)。

[0360] 表4:制备的SAP-E人源化的VL变体的总结

[0361]

| 构建体                  | 受体/模板<br>框架                | 回复突变的氨基<br>酸编号(Kabat) | 回复突变<br>的总数 | 人受体<br>框架 | 原始小鼠<br>序列 |
|----------------------|----------------------------|-----------------------|-------------|-----------|------------|
| L0 (SEQ ID<br>NO:34) | IGKV1-39 (SEQ<br>ID NO:32) | -----                 | 无           | ----      | -----      |
| L1 (SEQ ID<br>NO:35) | L0                         | 49                    | 1           | Y         | H          |
| L2 (SEQ ID<br>NO:36) | L1                         | 48<br>49              | 2           | I<br>Y    | V<br>H     |

[0362] SAP-K人源化策略

[0363] SAP-K重链人源化

[0364] 对于SAP-K小鼠可变重链序列,选择人种系受体框架(IGHV1-69,SEQ ID NO:25),其与小鼠SAP-K可变重链序列(SEQ ID NO:17)以及JH1微基因(Kabat:AEYFQHWGQGTLTVTSS

(SEQ ID NO:26))具有60%同一性(包括CDR)。JH1微基因残基的前6个残基落入CDR3区内,并通过导入来自供体抗体的CDR来替换。

[0365] 基于序列对比和对抗体功能的可能影响,制备4种人源化的变体。构建体H0是鼠CDR(使用Kabat定义)向上面选择的人受体框架中的直链移植物。构建体H1具有在残基27和30处的额外回复突变。构建体H2是基于H1,具有在残基48和67处的额外回复突变。构建体H3是基于H2,具有在残基69和71处的额外回复突变。参见表5。

[0366] 下面给出了H0、H1、H2和H3的人源化的可变重链结构域的序列(分别是SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40)。

[0367] 表5:制备的SAP-K人源化的VH变体的总结

[0368]

| 构建体                  | 受体/模板<br>框架                 | 回复突变的氨基<br>酸编号(Kabat) | 回复突变的<br>总数 | 人受体<br>框架 | 原始小<br>鼠序列 |
|----------------------|-----------------------------|-----------------------|-------------|-----------|------------|
| H0 (SEQ ID<br>NO:37) | IGHV1-69 (SEQ<br>ID NO: 25) | -----                 | 无           | ----      | -----      |
| H1 (SEQ ID<br>NO:38) | H0                          | 27<br>30              | 2           | G<br>S    | Y<br>T     |
| H2 (SEQ ID<br>NO:39) | H1                          | 48<br>67              | 4           | M<br>V    | I<br>A     |
| H3 (SEQ ID<br>NO:40) | H2                          | 69<br>71              | 6           | I<br>A    | L<br>V     |

[0369] SAP-K轻链人源化

[0370] 对于SAP-K小鼠可变轻链序列,选择人种系受体框架(IGKV1-39,SEQ ID NO:32),其基于序列相似性与小鼠SAP-K可变轻链序列(SEQ ID NO:19)以及J-区 $\kappa$ 2微基因(Kabat: YTFGQGKLEIK,SEQ ID NO:33)具有68%同一性(包括CDR)。JK-2微基因残基的前2个残基落入CDR3区内,并通过导入来自供体抗体的CDR来替换。

[0371] 基于序列对比和对抗体功能的可能影响,制备2种人源化的变体。构建体L0是鼠CDR(使用Kabat定义)向上面选择的人受体框架中的直链移植物。构建体L1具有在残基46处的额外回复突变。

[0372] 下面给出了L0和L1的人源化的可变轻链结构域的序列(分别是SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42)。

[0373] 表6:制备的SAP-K人源化的VL变体的总结

[0374]

| 构建体                  | 受体/模板<br>框架                | 回复突变的氨基<br>酸编号<br>(Kabat) | 回复突变的<br>总数 | 人受体<br>框架 | 原始小鼠序列 |
|----------------------|----------------------------|---------------------------|-------------|-----------|--------|
| L0 (SEQ ID<br>NO:41) | IGKV1-39 (SEQ ID<br>NO:32) | -----                     | 无           | ----      | -----  |
| L1 (SEQ ID<br>NO:42) | L0                         | 46                        | 1           | L         | A      |

[0375] 人源化的抗体载体的构建

[0376] 对人源化的可变区DNA序列进行序列优化。使用基于PCR的策略和重叠的寡核苷酸,从头构建编码所述人源化的可变重链区和可变轻链区的DNA片段。将PCR产物克隆进哺乳动物表达载体中,所述载体分别含有人 $\gamma$ 1恒定区和人 $\kappa$ 恒定区。这是野生型Fc区。

[0377] IGHV1-69人可变重链种系受体核苷酸序列(SEQ ID NO:49)

[0378] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

[0379] IGHV1-69人可变重链种系受体氨基酸序列(SEQ ID NO:25)

[0380] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR

[0381] IGKV1-39人可变重链种系受体核苷酸序列(SEQ ID NO:50)

[0382] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCT

[0383] IGKV1-39人可变重链种系受体氨基酸序列(SEQ ID NO:32)

[0384] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP

[0385] JH1微基因(SEQ ID NO:26)

[0386] AEYFQHWGQGLVTVSS

[0387] J $\kappa$ 2微基因(SEQ ID NO:33)

[0388] YTFGQGTKLEIK

[0389] SAP-E人源化的重链V区变体H0核苷酸序列(未经密码子优化)(SEQ ID NO:51)

[0390] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCACTTACAATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG ATATATTTATCCTGGAGATGGTAATGCTAACTACAATCAGCAGTTCAAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGACAAAT CCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGAC TTTGATTACGACGGAGGGTACTACTTTGACTCCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0391] SAP-E人源化的轻链V区变体L0核苷酸序列(未经密码子优化)(SEQ ID NO:52)

[0392] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC CGAGCAAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA TAATGCAAAAACCTTAGCAGAAGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACATCATTATGGTGCTCCGCTCACGTTTGGCCAG GGGACCAAGCTGGAGATCAAA

[0393] SAP-E人源化的重链V区变体H0核苷酸序列(经过密码子优化)(SEQ ID NO:53)

[0394] CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAG GCTAGCGGGGGCACCTTCTCCACCTACAACATGCACTGGGTCAAGCAGGCACCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGG CTATATCTACCCCGGCGACGGCAACGCCAACTACAACCAGCAGTTCAAGGGCAGGTGACCATCACCGCCGACAAGA



GCACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCGAC  
TTCGACTACGACGGCGGCTACTACTTTCGACAGCTGGGGACAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

[0395] SAP-E人源化的重链V区变体H0氨基酸序列(SEQ ID NO:27)

[0396] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGTFSTYNMHWVRQAPGQGLEWMGYIYPGDGNANYNQFKGRVT  
ITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDFDYDGGYYFDSWGQGLTVTVSS

[0397] SAP-E人源化的重链V区变体H1核苷酸序列(经过密码子优化)(SEQ ID NO:54)

[0398] CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAG  
GCTAGCGGGTTACCTTCGCCACCTACAACATGCACTGGGTTCAGGCAGGCACCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGG  
CTATATCTACCCCGGCGACGGCAACGCCAACTACAACCAGCAGTTCAAGGGCAGGGTGACCATCACCGCCGACAAGA  
GCACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCGAC  
TTCGACTACGACGGCGGCTACTACTTTCGACAGCTGGGGACAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

[0399] SAP-E人源化的重链V区变体H1氨基酸序列(SEQ ID NO:28)

[0400] QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGTFATYNMHWVRQAPGQGLEWMGYIYPGDGNANYNQFKGRV  
TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDFDYDGGYYFD SWGQGLTVTVSS

[0401] SAP-E人源化的重链V区变体H2核苷酸序列(经过密码子优化)(SEQ ID NO:55)

[0402] CAGGCGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAG  
GCTAGCGGGTTACCTTCGCCACCTACAACATGCACTGGGTTCAGGCAGGCACCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGG  
CTATATCTACCCCGGCGACGGCAACGCCAACTACAACCAGCAGTTCAAGGGCAGGGTGACCATCACCGCCGACAAGA  
GCACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCGAC  
TTCGACTACGACGGCGGCTACTACTTTCGACAGCTGGGGACAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

[0403] SAP-E人源化的重链V区变体H2氨基酸序列SEQ ID NO:29

[0404] QAQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGTFATYNMHWVRQAPGQGLEWMGYIYPGDGNANYNQFKGRVT  
ITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDFDYDGGYYFDSWGQGLTVTVSS

[0405] SAP-E人源化的重链V区变体H3核苷酸序列(经过密码子优化)(SEQ ID NO:56)

[0406] CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAG  
GCTAGCGGGTTACCTTCGCCACCTACAACATGCACTGGGTTCAGGCAGGCACCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGG  
CTATATCTACCCCGGCGACGGCAACGCCAACTACAACCAGCAGTTCAAGGGCAGGGCCACCATCACCGCCGACAAGA  
GCACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCGAC  
TTCGACTACGACGGCGGCTACTACTTTCGACAGCTGGGGACAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

[0407] SAP-E人源化的重链V区变体H3氨基酸序列(SEQ ID NO:30)

[0408] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGTFATYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPGDGNANYNQFKGRAT  
ITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDFDYDGGYYFDSWGQGLTVTVSS

[0409] SAP-E人源化的重链V区变体H4核苷酸序列(经过密码子优化)(SEQ ID NO:57)

[0410] CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAG  
GCTAGCGGGTTACCTTCGCCACCTACAACATGCACTGGGTTCAGGCAGGCACCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGG  
CTATATCTACCCCGGCGACGGCAACGCCAACTACAACCAGCAGTTCAAGGGCAGGGCCACCTGACCGCCGACACCA  
GCACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGCGCCAGGGGCGAC  
TTCGACTACGACGGCGGCTACTACTTTCGACAGCTGGGGACAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

[0411] SAP-E人源化的重链V区变体H4氨基酸序列(SEQ ID NO:31)

[0412] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFATYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPGDGNANYNQKFGRAT  
LTADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARGDFDYDGGYFFDSWGQGLTVTVSS

[0413] SAP-E人源化的轻链V区变体L0核苷酸序列(经过密码子优化)(SEQ ID NO:58)

[0414] GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCACTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATTACCTGC  
AGGGCCTCCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTA  
CAACGCCAAGACCCTCGCCGAGGGCGTCCCTAGCAGGTTCTCTGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCA  
TCAGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTATTACTGCCAGCACCCTACGGCGCCCCCTGACCTTTGGCCAG  
GGCACCAAACCTGGAGATCAAG

[0415] SAP-E人源化的轻链V区变体L0氨基酸序列(SEQ ID NO:34)

[0416] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQHGYGAPLTFGQGGTKLEIK

[0417] SAP-E人源化的轻链V区变体L1核苷酸序列(经过密码子优化)(SEQ ID NO:59)

[0418] GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCACTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATTACCTGC  
AGGGCCTCCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCCA  
CAACGCCAAGACCCTCGCCGAGGGCGTCCCTAGCAGGTTCTCTGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCA  
TCAGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTATTACTGCCAGCACCCTACGGCGCCCCCTGACCTTTGGCCAG  
GGCACCAAACCTGGAGATCAAG

[0419] SAP-E人源化的轻链V区变体L1氨基酸序列(SEQ ID NO:35)

[0420] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIHNKTLAEGVPSRFSGSGSGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQHGYGAPLTFGQGGTKLEIK

[0421] SAP-E人源化的轻链V区变体L2核苷酸序列(经过密码子优化)(SEQ ID NO:60)

[0422] GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCACTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATTACCTGC  
AGGGCCTCCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGGTGCA  
CAACGCCAAGACCCTCGCCGAGGGCGTCCCTAGCAGGTTCTCTGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCA  
TCAGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTATTACTGCCAGCACCCTACGGCGCCCCCTGACCTTTGGCCAG  
GGCACCAAACCTGGAGATCAAG

[0423] SAP-E人源化的轻链V区变体L2氨基酸序列(SEQ ID NO:36)

[0424] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLVHNKTLAEGVPSRFSGSGSGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQHGYGAPLTFGQGGTKLEIK

[0425] SAP-E人源化的重链H1完全成熟的核苷酸序列(经过密码子优化)(SEQ ID NO:61)

[0426] CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAG  
GCTAGCGGGTTACCTTCGCCACCTACAACATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGG  
CTATATCTACCCCGGCGACGGCAACGCCAACTACAACCAGCAGTTCAAGGGCAGGGTGACCATCACCGCCGACAAGA  
GCACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCGAC  
TTCGACTACGACGGCGGCTACTACTTCGACAGCTGGGGACAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAA  
GGGCCCCAGCGTGTTCCTTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGA  
AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCCGCC  
GTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTA  
CATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCC

ACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCTAAGGAC  
ACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTT  
CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACC  
GGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAG  
GCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCC  
CCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCG  
CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGC  
TTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCTCCGTGATGCA  
CGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

[0427] SAP-E人源化的重链H1完全成熟的氨基酸序列(SEQ ID NO:62)

[0428] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFATYNMHWVRQAPGQGLEWMGYIYPGDGNANYNQFKGRVT  
ITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGDFDYDGGYYFDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA  
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK  
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0429] SAP-E人源化的轻链L1完全成熟的核苷酸序列(经过密码子优化)(SEQ ID NO:63)

[0430] GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCACTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATTACCTGC  
AGGGCCTCCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCCA  
CAACGCCAAGACCCTCGCCGAGGGCGTCCCTAGCAGGTTCTCTGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCA  
TCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTATTACTGCCAGCACCCTACGGCGCCCCCTGACCTTTGGCCAG  
GGCACCAAACTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAA  
GAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACA  
ATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC  
ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAG  
CCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

[0431] SAP-E人源化的轻链L1完全成熟的氨基酸序列(SEQ ID NO:64)

[0432] DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASENIYSYLAWYQQKPKAPKLLIHNATLAEGVPSRFSGSGSGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQHHYGAPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0433] SAP-K人源化的重链V区变体H0核苷酸序列(未经密码子优化)(SEQ ID NO:65)

[0434] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG  
GCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTACTGGATGCACTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG  
AATGATTTCATCCTAATAGTGTTAATACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGTAGAGTCACGATTACCGCGACAAAT  
CCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGACGGAAT  
GATTACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0435] SAP-K人源化的轻链V区变体L0核苷酸序列(未经密码子优化)(SEQ ID NO:66)

[0436] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC  
AAGGCCAGTCAGAATGTGAACTCTAATGTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA

TTCGGCTTCCTACCGGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA  
TCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTGAGCAATGTAACAACATCCATTACGTTTGCCAG  
GGGACCAAGCTGGAGATCAAA

[0437] SAP-K人源化的重链V区变体H0核苷酸序列(经过密码子优化)(SEQ IS NO:67)

[0438] CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAG  
GCCAGCGGCGGAACCTTCAGCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGG  
CATGATCCACCCCAACAGCGTGAACACCAACTACAACGAGAAGTTCAAGAGCAGAGTGACCATCACCGCCGACAAGA  
GCACCAGCACCGCCTATATGGAGCTGAGCTCTCTGAGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGGAAC  
GACTACTACTGGTACTTCGACGTCTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

[0439] SAP-K人源化的重链V区变体H0氨基酸序列(SEQ ID NO:37)

[0440] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYWMHWRQAPGQGLEWMGMIHPSVNTNYNEKFKSRVT  
ITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRNDYYWYFDVWGQGTLVTVSS

[0441] SAP-K人源化的重链V区变体H1核苷酸序列(经过密码子优化)(SEQ ID NO:68)

[0442] CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAG  
GCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGG  
CATGATCCACCCCAACAGCGTGAACACCAACTACAACGAGAAGTTCAAGAGCAGAGTGACCATCACCGCCGACAAGA  
GCACCAGCACCGCCTATATGGAGCTGAGCTCTCTGAGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGGAAC  
GACTACTACTGGTACTTCGACGTCTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

[0443] SAP-K人源化的重链V区变体H1氨基酸序列(SEQ ID NO:38)

[0444] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYWMHWRQAPGQGLEWMGMIHPSVNTNYNEKFKSRVT  
ITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRNDYYWYFDVWGQGTLVTVSS

[0445] SAP-K人源化的重链V区变体H2核苷酸序列(经过密码子优化)(SEQ ID NO:69)

[0446] CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAG  
GCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGG  
CATGATCCACCCCAACAGCGTGAACACCAACTACAACGAGAAGTTCAAGAGCAGAGCCACCATCACCGCCGACAAGA  
GCACCAGCACCGCCTATATGGAGCTGAGCTCTCTGAGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGGAAC  
GACTACTACTGGTACTTCGACGTCTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

[0447] SAP-K人源化的重链V区变体H2氨基酸序列(SEQ ID NO:39)

[0448] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYWMHWRQAPGQGLEWIGMIHPNSVNTNYNEKFKSRATITADKSTS  
TAYMELS SLRSEDTAVYYCARRNDYYWYFDVWGQGTLVTVS S

[0449] SAP-K人源化的重链V区变体H3核苷酸序列(经过密码子优化)(SEQ ID NO:70)

[0450] CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAG  
GCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGG  
CATGATCCACCCCAACAGCGTGAACACCAACTACAACGAGAAGTTCAAGAGCAGAGCCACCTGACCGTGGACAAGA  
GCACCAGCACCGCCTATATGGAGCTGAGCTCTCTGAGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGGAAC  
GACTACTACTGGTACTTCGACGTCTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

[0451] SAP-K人源化的重链V区变体H3氨基酸序列(SEQ ID NO:40)

[0452] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYWMHWRQAPGQGLEWIGMIHPNSVNTNYNEKFKSRAT

LTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARRNDYYWYFDVWGQGLTVTVSS

[0453] SAP-K人源化的轻链V区变体L0核苷酸序列(经过密码子优化)(SEQ ID NO:71)

[0454] GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCTTCACTGAGCGCTAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGC  
AAGGCCAGCCAGAACGTGAACAGCAACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAAGCCCCCAAGCTCCTGATCTA  
CAGCGCCAGCTACAGATATAGCGGCGTGCTAGCAGGTTTAGCGGCAGCGGAAGCGGGACCGATTTCACCCTGACCA  
TCAGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACTTACTACTGCCAGCAGTGCAACAAC TACCCCTTCACCTTCGGCCAG  
GGCACCAAGCTGGAGATCAAG

[0455] SAP-K人源化的轻链V区变体L0氨基酸序列(SEQ ID NO:41)

[0456] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVNSNVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRSGVPSRFSGSGSGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQQCNYPFTFGQGTKLEIK

[0457] SAP-K人源化的轻链V区变体L1核苷酸序列(经过密码子优化)(SEQ ID NO:72)

[0458] GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCTTCACTGAGCGCTAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGC  
AAGGCCAGCCAGAACGTGAACAGCAACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAAGCCCCCAAGGCCCTGATCTA  
CAGCGCCAGCTACAGATATAGCGGCGTGCTAGCAGGTTTAGCGGCAGCGGAAGCGGGACCGATTTCACCCTGACCA  
TCAGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACTTACTACTGCCAGCAGTGCAACAAC TACCCCTTCACCTTCGGCCAG  
GGCACCAAGCTGGAGATCAAG

[0459] SAP-K人源化的轻链V区变体L1氨基酸序列(SEQ ID NO:42)

[0460] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVNSNVAWYQQKPGKAPKALIIYSASYRSGVPSRFSGSGSGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQQCNYPFTFGQGTKLEIK

[0461] SAP-K人源化的H3重链核苷酸序列(经过密码子优化)(SEQ ID NO:75)

[0462] CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAG  
GCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGG  
CATGATCCACCCCAACAGCGTGAACACCAACTACAACGAGAAGTTCAAGAGCAGAGCCACCCTGACCGTGACAAGA  
GCACCAGCACCGCCTATATGGAGCTGAGCTCTCTGAGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGAAC  
GACTACTACTGGTACTTCGACGTCTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAG  
CGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACT  
TCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAG  
AGCAGCGGCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAA  
CGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCC  
CCCCCTGCCCTGCCCCCAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATG  
ATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTA  
CGTGGACGGCGTGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGT  
CCGTGCTGACCGTGTGACCAAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCT  
GCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAG  
AGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT  
GGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTG  
TACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCACTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCT  
GCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGCAAG

[0463] SAP-K人源化的H3重链氨基酸序列(SEQ ID NO:76)

[0464] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSVNTNYNEKFKSRAT  
LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRNDYYWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC  
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD  
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0465] SAP-K人源化的L0轻链核苷酸序列(经过密码子优化)(SEQ ID NO:77)

[0466] GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCTTCACTGAGCGCTAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGC  
AAGGCCAGCCAGAACGTGAACAGCAACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAAGCCCCCAAGCTCCTGATCTA  
CAGCGCCAGCTACAGATATAGCGGCGTGCTAGCAGGTTTAGCGGCAGCGGAAGCGGGACCGATTTACCCTGACCA  
TCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACTTACTACTGCCAGCAGTGCAACAACCTACCCCTTCACCTTCGGCCAG  
GGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAA  
GAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCTTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACA  
ATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC  
ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAG  
CCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

[0467] SAP-K人源化的L0轻链氨基酸序列(SEQ ID NO:78)

[0468] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVNSNVAWYQQKPKGAPKLLIYSASYRYSRVPSRFSGSGSGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQQCNYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0469] 免疫球蛋白链的前导序列(SEQ ID:79)

[0470] MGWSCIILFLVATATGVHS

[0471] 实施例4:-抗体表达

[0472] 重组抗体表达

[0473] 使用Fectin 293,通过脂质转染,将分别编码嵌合的或人源化的抗体的重链和轻链的表达质粒瞬时共转染进HEK293E细胞中。在含有10% pluronic F68和50mg/ml遗传霉素的Freestyle表达培养基293中,在37℃、5%CO<sub>2</sub>下培养细胞72-120小时,通过离心来收获上清液。在有些情况下,使用上清液物质作为结合试验中的实验物。在其它情况下,将上清液物质过滤除菌,并使用蛋白A MAbSelect SuRE柱通过亲和色谱法回收所述抗体,随后透析进PBS中。

[0474] 杂交瘤抗体表达

[0475] 在摇瓶内的补充了4mM glutamax和10%低IgG FCS的Ex620培养基中,培养杂交瘤细胞。将所述细胞传代,并切断血清,直到在无血清的培养基中生长良好。然后使用所述细胞作为10L wavebag的种子。在22次摇摆/min、37℃、5%CO<sub>2</sub>(0.1L/min),在wavebag中培养所述细胞,直到生存力下降至30%。通过无菌过滤,收集条件培养基。使用重组蛋白A通过亲和色谱法回收所述抗体,随后透析进PBS中。

[0476] 实施例5-7:杂交瘤和/或嵌合的mAb和/或人源化的Mab之间的对比数据

[0477] 实施例5:在人SAP结合ELISA中对比SAP-K和SAP-E杂交瘤

[0478] 将1μg/mL或5μg/mL人SAP直接固定化在ELISA板上,并用1%BSA/TBS+0.05%

TWEEN20封闭。用来自纯化物的抗-SAP抗体在所述板上滴定。通过用辣根过氧化物酶(HRP)-缀合的兔-抗-小鼠IgG抗体(Dako, P0260)进行处理,检测结合的抗体。使用0-亚苯基二胺二盐酸盐(OPD)过氧化物酶底物(Sigma, P9187),使所述ELISA显色。

[0479] 图1显示了在1 $\mu$ g/mL的人SAP包被浓度时鼠抗体SAP-E和SAP-K的结合曲线。

[0480] 图2显示了在5 $\mu$ g/mL的人SAP包被浓度时鼠抗体SAP-E和SAP-K的结合曲线。

[0481] 在5 $\mu$ g/mL包被浓度时,SAP-K和SAP-E表现出类似的与固定化的人SAP的结合,而在1 $\mu$ g/mL更低密度包被时,SAP-K表现出比SAP-E更大的结合。所有使用该形式的随后人SAP结合ELISA使用更低密度的1 $\mu$ g/mL包被浓度来区分2种抗体的结合性质。

[0482] 实施例6:在人SAP结合ELISA中对比SAP-K和SAP-E嵌合的/人源化的mAb

[0483] 将1 $\mu$ g/mL人SAP直接固定化在ELISA板上,并用1%BSA/TBS+0.05%TWEEN20封闭。用来自实验上清液或纯化物的抗-SAP抗体在所述板上滴定。通过用山羊抗-人 $\kappa$ 轻链过氧化物酶缀合物(Sigma, A7164)进行处理,检测结合的抗体。使用0-亚苯基二胺二盐酸盐(OPD)过氧化物酶底物(Sigma, P9187),使所述ELISA显色。

[0484] 图3显示了嵌合抗体cSAP-E和cSAP-K的结合曲线。所述嵌合抗体的曲线特性与等效杂交瘤的特性相同。

[0485] 图4显示了SAP-K H0L0、SAP-K H1L0、SAP-K H2L0和SAP-K H3L0的结合曲线与SAP-K嵌合体的对比,以及SAP-E H1L1与SAP-E嵌合体的对比。还测试了无关的人IgG1 $\kappa$ 抗体作为阴性对照。所述数据表明,SAP-K抗体的人源化导致人SAP结合活性与亲本SAP-K嵌合体相比降低了大约2倍,而所述人源化的SAP-E抗体保留与亲本SAP-E嵌合体相当的结合活性。

[0486] 实施例7-竞争ELISA

[0487] 在1 $\mu$ g/mL(对于使用SAP-K嵌合体的竞争)或5 $\mu$ g/mL(对于使用SAP-E嵌合体的竞争),用人SAP包被ELISA平板,并用1%BSA/PBS封闭。将恒定浓度的嵌合的抗-SAP mAb与系列稀释(1:1)的量的鼠抗-SAP mAb相混合。洗涤平板,并使用山羊抗-人 $\kappa$ 轻链过氧化物酶缀合物(Sigma, A7164)检测与固定化的人SAP相结合的嵌合抗体的量。使用0-亚苯基二胺二盐酸盐(OPD)过氧化物酶底物(Sigma, P9187),使所述ELISA显色。

[0488] 图5显示了在含有SAP-E嵌合体的竞争ELISA中的纯化的SAP-K和SAP-E鼠单克隆抗体。

[0489] 图6显示了在含有SAP-K嵌合体的竞争ELISA中的纯化的SAP-K和SAP-E鼠单克隆抗体。

[0490] 在图5和6中,在SAP-E和SAP-K抗体之间没有观察到竞争,表明所述2种抗体结合人SAP分子上的不同表位。

[0491] 实施例8:结合动力学测定

[0492] 人源化的抗-SAP抗体变体与经纯化人和经纯化食蟹猴SAP的结合的Biacore分析。

[0493] 根据生产商的说明书,通过伯胺偶联,将人和食蟹猴SAP固定化在Biacore C1芯片上。使512nM的包含在培养物上清液中的人源化的抗-SAP抗体和纯化的嵌合抗体流过人和食蟹猴SAP表面,并得到结合传感图。通过在人和食蟹猴SAP表面上缓冲注射纯化的样品或上清液样品介质,对所有运行做出2份参照。使用HBS-EP缓冲液,在25 $^{\circ}$ C进行分析。在有3M MgCl<sub>2</sub>存在下进行表面的再生,且不会影响抗体在随后循环中重新结合人SAP的能力。使用在Biacore T100评价软件内的1:1解离模型,分析数据。

[0494] 在表6a和6b中产生的数据分别显示了人源化的SAP-E和SAP-K抗体上清液的解离速率(kd)。所述值是基于单条曲线,并用于不同构建体与人SAP的结合的排序目的。就结合人SAP而言,人源化的SAP-E抗体表现出比人源化的SAP-K抗体更好的解离速率。许多SAP-K人源化的抗体变体表现出与食蟹猴SAP(注:SAP-K嵌合体结合的食蟹猴SAP)的结合,而人源化的SAP-E抗体变体都没有结合食蟹猴SAP(注:SAP-E嵌合体同样没有结合食蟹猴SAP)。含有直链移植物人源化的重链(H0)或直链移植物人源化的轻链(L0)或二者的组合的人源化的SAP-E变体表现出最差的解离速率。SAP-E人源化的L1轻链是最好的轻链变体,且L1与H1重链变体的组合产生具有可接受的解离速率的人源化的抗体,同时保持回复突变的数目最小。人源化的SAP-K变体的解离速率排序证实,L0直链移植物是最好的人源化的轻链变体,且H0直链移植物是最差的人源化的重链变体。

[0495] 表6a

[0496]

| SAP-E变体    | 人SAP的Kd(s <sup>-1</sup> ) |
|------------|---------------------------|
| SAP-E嵌合体   | 3.83E-03                  |
| SAP-E H1L1 | 4.80E-03                  |
| SAP-E H4L1 | 5.43E-03                  |
| SAP-E H1L2 | 5.51E-03                  |
| SAP-E H3L1 | 5.76E-03                  |
| SAP-E H4L2 | 5.80E-03                  |
| SAP-E H2L1 | 6.09E-03                  |
| SAP-E H3L2 | 6.31E-03                  |
| SAP-E H2L2 | 6.52E-03                  |
| SAP-E H1L0 | 8.09E-03                  |
| SAP-E H3L0 | 9.10E-03                  |
| SAP-E H2L0 | 9.79E-03                  |
| SAP-E H4L0 | 9.81E-03                  |
| SAP-E H0L1 | 4.02E-02                  |
| SAP-E H0L2 | 4.29E-02                  |
| SAP-E H0L0 | 5.35E-02                  |

[0497] 表6b

[0498] 注:Kd是人SAP的

[0499]

|            | kd(s <sup>-1</sup> ) | 与食蟹猴SAP的结合 |
|------------|----------------------|------------|
| SAP-K嵌合体   | 6.64E-03             | 是          |
| SAP-K H1L0 | 1.71E-02             | 差          |
| SAP-K H3L0 | 1.84E-02             | 是          |
| SAP-K H2L0 | 2.04E-02             | 是          |
| SAP-K H3L1 | 2.36E-02             | 是          |
| SAP-K H0L0 | 2.63E-02             | 无          |



|            |          |   |
|------------|----------|---|
| SAP-K H1L1 | 2.96E-02 | 差 |
| SAP-K H2L1 | 3.21E-02 | 差 |
| SAP-K H0L1 | 4.79E-02 | 无 |

[0500] 抗-SAP抗体与直接固定化在固相支持物上的经纯化人SAP的结合的Biacore分析

[0501] 根据生产商的说明书,通过伯胺偶联,将人SAP固定化在Biacore CM3芯片上。使512、128、32、8、2、0.5nM的抗-SAP抗体流过该表面,并得到结合传感图。通过在人SAP表面上的缓冲液注射,对所有运行做出2份参照。使用HBS-EP缓冲液,在25℃进行分析。通过允许缓冲液在所述表面上流动几分钟,进行表面的再生,且不会影响人SAP在随后循环中重新结合抗体的能力。使用Biacore T100评价软件固有的二价分析物模型,分析来自128-0.5nM运行的数据。

[0502] 在表7中产生和汇编的数据用于所述构建体之间的对比,并证实,SAP-K抗体在该试验中具有更好的结合速率,而SAP-E抗体表现出更好的解离速率。此外,人源化没有改变SAP-E抗体的结合动力学,同时就SAP-K而言,在人源化以后观察到结合和解离速率的损失。

[0503] 表7

[0504]

|            | $K_a(M^{-1} \cdot s^{-1})$ | $K_d(s^{-1})$ | KD(nM) |
|------------|----------------------------|---------------|--------|
| SAP-K嵌合体   | 4.06E+5                    | 7.59E-03      | 18.7   |
| SAP-K H0L0 | 6.08E+4                    | 4.49E-02      | 739    |
| SAP-K H1L0 | 1.15E+5                    | 1.78E-02      | 155    |
| SAP-K H2L0 | 1.15E+5                    | 2.20E-02      | 191    |
| SAP-K H3L0 | 1.50E+5                    | 1.92E-02      | 128    |
| SAP-E嵌合体   | 2.64E+4                    | 2.18E-03      | 82.6   |
| SAP-E H1L1 | 2.64E+4                    | 2.07E-03      | 78.3   |

[0505] 抗-SAP抗体与捕获在固定化在O-磷酸乙醇胺上的经纯化人SAP的结合的Biacore分析

[0506] 根据生产商的说明书,通过伯胺偶联,将O-磷酸乙醇胺固定化在Biacore CM5芯片上。然后在有氯化钙存在下,将人SAP捕获在所述表面上,以便在体外Biacore系统中复制在体内与淀粉样蛋白纤维结合的SAP分子的精确定向。然后使256、64、16、4、1nM的抗-SAP抗体流过该表面,并得到结合传感图。使用4%BSA、10mM Tris、140mM NaCl、2mM  $CaCl_2$ 、0.05%表面活性剂P20、0.02% $NaN_3$ (pH 8.0)作为运行缓冲液,在25℃进行分析。使用Tris-EDTA(10mM Tris,140mM NaCl,10mM EDTA,pH 8.0)的2个脉冲实现再生,所述脉冲会去除结合的人SAP,但是不会显著影响随后的SAP与固定化的磷酸乙醇胺的结合。通过在人SAP表面上的缓冲液注射,对产生的数据做出2份参照,并使用在Biacore T100评价软件中的二价分析物模型进行分析。

[0507] 如表8所示的产生的数据仅仅意图用于所述构建体之间的对比。由于试验形式固有的亲合力效应对结合的可能修饰,它们不构成准确的动力学值。亲合力更可能影响抗体解离速率,导致更低的计算KD值。此外,对于所有SAP-E抗体,得到的解离速率(kd)超出Biacore测量范围的限度之外。尽管如此,结果指示抗-SAP抗体与人SAP(其通过SAP与固相配体的相互作用而固定化)的紧密结合,正如体内淀粉样沉着物(这是本发明的治疗靶标)

的情况。

[0508] 表8

[0509]

|            | $k_a(M^{-1} \cdot s^{-1})$ | $k_d(s^{-1})$ | KD(nM)   |
|------------|----------------------------|---------------|----------|
| SAP-K嵌合体   | 3.32E+5                    | 2.97E-4       | 0.895    |
| SAP-E嵌合体   | 2.03E+4                    | 9.12E-7       | 4.49E-11 |
| 小鼠SAP-K    | 3.00E+5                    | 2.19E-4       | 0.730    |
| 小鼠SAP-E    | 3.15E+4                    | 1.51E-8       | 4.79E-13 |
| SAP-K H3L0 | 1.36E+5                    | 5.01E-3       | 36.8     |
| SAP-E H1L1 | 1.94E+4                    | 1.58E-7       | 8.14E-12 |

[0510] 实施例9:在SAP-K L0人源化的轻链的位置91处的氨基酸扫描

[0511] 使用定位饱和诱变来产生一组变体,其中在位置91(Kabat编号)处的半胱氨酸残基在单个反应中用所有其它19种氨基酸潜在地置换,所述反应使用在该位置编码NNK(其中N编码腺苷或胞苷或鸟苷或胸苷,且K编码鸟苷或胸苷)的诱变引物。从Biacore解离速率排序(在产生的变体的抗体上清液上进行),选择4种用于在HEK2936E细胞中的放大和纯化。在实施例7中详述的使用0-磷酸乙醇胺方法的Biacore动力学分析证实,在位置91处具有丙氨酸的变体(SEQ ID NO:43)具有比野生型提高的亲和力;分别测得0.436nM和36.8nM的KD值。注:在用于产生表7所示结果的相同实验中,测试所有变体。

[0512] 其它变体(例如甘氨酸、丝氨酸和缬氨酸)会改善关于H3L0的结合,但是程度不如丙氨酸。另外,当轻链与H1配对时,在结合ELISA和Biacore解离速率排序实验中,也观察到这4种变体具有比L0更好的结合性质的事实。

[0513] SAP-K人源化的轻链V区变体L0 91A核苷酸序列(经过密码子优化)(SEQ ID NO: 73)

[0514] GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCTTCACTGAGCGCTAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGC  
AAGGCCAGCCAGAACGTGAACAGCAACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAAGCCCCCAAGCTCCTGATCTA  
CAGCGCCAGCTACAGATATAGCGGCGTGCTAGCAGGTTTAGCGGCAGCGGAAGCGGGACCGATTTACCCTGACCA  
TCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACTTACTACTGCCAGCAGGCGAACAACCTACCCCTTCACCTTCGGCCAG  
GGCACCAAGCTGGAGATCAAG

[0515] SAP-K人源化的轻链V区变体L0 91A氨基酸序列(SEQ ID NO:74)

[0516] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVNSNVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSYGVPSRFSGSGSGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQQANNYPFTFGQGTKLEIK

[0517] 实施例10:抗-SAP抗体的淀粉样蛋白清除的补体依赖性

[0518] 通过在具有补体缺陷的小鼠和正常的补体充分的动物之间对比治疗效率,研究了补体在抗-SAP抗体的淀粉样蛋白清除中的作用。C1q基因的靶向删除会阻断经典的补体途径的活化(其由C1q与抗体-抗原复合物的结合启动),但是C3活化(负责趋化作用和调理素作用的关键功能步骤,所述两种作用是补体的重要生物学功能)仍然可以如下进行:通过替代途径和凝集素途径,以及通过非补体的丝氨酸蛋白水解酶的直接C3裂解。C3基因的靶向删除会完全废除这些功能。

[0519] AA淀粉样变性的诱导

[0520] 在2组补体缺陷型小鼠(C3敲除的小鼠(n=14)和C1q敲除的小鼠(n=12))中和在15只野生型小鼠中,诱导并证实了AA淀粉样变性。所有小鼠是纯系C57BL/6。每只小鼠如下接受单次剂量的淀粉样蛋白增强因子,即含有淀粉样蛋白纤丝的淀粉样变性组织的提取物(Baltz等人,(1986)Plenum Press,New York,第115-121页):通过静脉内注射,在4天后,每天皮下注射10%w/v酪蛋白溶液(在0.1M NaHCO<sub>3</sub>中),在12天时段内施用10次(Botto等人,(1997)Nature Med.,3:855-859)。酪蛋白会引起持续的急性炎症和血清淀粉样蛋白A蛋白(SAA)生产的持久增加,在所有动物中导致AA淀粉样蛋白沉着。在最后一次酪蛋白注射以后7天,将KI导入所有小鼠的饮用水中,并在3天后,每只小鼠接受标准剂量的<sup>125</sup>I标记的人SAP的静脉内注射(Hawkins等人,(1990)J.Clin.Invest.,86:1862-1869和Hawkins等人,(1988)J.Exp.Med.,167:903-913)。在示踪剂注射以后24h和48h,对所有小鼠进行全身计数,以测定放射性的保留,即全身淀粉样蛋白载荷的精确指标。在<sup>125</sup>I-SAP示踪剂注射后10天,通过给每只小鼠单次腹膜内注射10mg分离的纯的人SAP,给所有小鼠‘加载’人SAP。注射进淀粉样变性小鼠中的人SAP集中在淀粉样沉着物中,并以约3-4天的半衰期存留在那里,而没有结合淀粉样蛋白的任何人SAP被从循环中清除,半衰期为约3-4小时(Hawkins等人,(1988)J.Exp.Med,167:903-913和Pepys等人,(2002)Nature,417:254-259)。

[0521] 在注射分离的纯的人SAP以后,用抗-人SAP抗体在淀粉样变性小鼠的脾中进行的免疫组织化学染色表明,在它们的典型边缘区分布中存在所有淀粉样沉着物的强阳性染色。该结合的人SAP是根据本发明的治疗性抗-SAP抗体的靶标。

#### [0522] 抗-SAP治疗

[0523] 在人SAP注射后3天,当在循环中不再可检出人SAP时,所有小鼠(除了在每个补体敲除组中的2只以外)接受单次腹膜内注射1ml特异性的绵羊抗-人SAP抗血清(50mg/ml,在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的溶液,含有7mg/ml的实际抗-SAP抗体)的完整IgG级分(批号2866)。所述抗血清由The Binding Site Ltd,Birmingham,UK使用人SAP(在University College London Centre for Amyloidosis and Acute Phase Proteins中严格地纯化至100%)和专有的免疫规程生产。然后,在抗-SAP施用以后15天,杀死所有动物,用于通过碱性醇刚果红染色对淀粉样蛋白载荷进行组织学评估(Puchtler,H.,Sweat,F.and Levine,M.(1962)On the binding of Congo red by amyloid.J.Histochem.Cytochem.,10:355-364)。由一个或多个熟练的观察人员(不知晓每只小鼠已经接受的处理)独立地检查所有动物的脾和肝的刚果红切片,并如以前所报道的(Botto等人,(1997)Nature Med.,3:855-859),对存在的淀粉样蛋白的量评分。1-5的评分代表从1至5的以10为底的大致对数排序标度,其中1与特定器官的几个切片中的1或2个很小淀粉样蛋白斑点相对应,5与大量广泛分布的沉着物相对应,所述沉着物包含比第1级多约10,000倍的淀粉样蛋白(Botto等人,(1997)Nature Med.,3:855-859)。不同的观察人员的评分总是高度一致的,尽管有些观察人员也使用中间整数.5评分。将所有观察人员对每只动物的每个器官的评分的算术平均值用于统计分析。

#### [0524] 结果

[0525] 与补体充分的野生型小鼠中的淀粉样沉着物的有效清除显著不同,在两组补体缺陷型动物中仍然存在大量淀粉样蛋白,尽管与在每类的2只对照补体缺陷型小鼠中相比,其倾向于具有更片段化的外观。脾淀粉样蛋白评分的中位值、范围是:野生型,1.17,0.0-1.5,

$n=15$ ; C3敲除的, 1.92, 1.17-4.33,  $n=12$ ; C1q敲除的, 1.25, 1.17-3.5,  $n=10$  (Kruskal-Wallis非参数的ANOVA,  $P<0.001$ )。在野生型对照和2个补体缺陷组之间的差异是显著的,  $P<0.001$  (对于C3敲除的小鼠) 和  $P=0.036$  (为了多重比较, 经过Bonferroni校正) (对于C1q敲除的小鼠), 但是在C3和C1q敲除的小鼠之间的差异不是显著的,  $P=0.314$  (Mann-Whitney U检验)。

#### [0526] 讨论

[0527] 在缺少C1q或C3的小鼠中, 抗-SAP治疗没有象在补体充分的野生型小鼠中一样有效地清除淀粉样沉着物。抗-SAP的治疗效果因而是非常严重地补体依赖性的, 且不是由单独的IgG抗体结合介导, 所述IgG抗体在理论上会通过它们的Fc( $\gamma$ )受体与吞噬细胞接合。尽管如此, 在补体缺陷型小鼠中的持久的淀粉样沉着物的更片段化的外观提示单独抗体的至少一些效果。并且, 与C3缺陷型动物相比在C1q缺陷型动物中更多清除的趋势提示, C3活化是关键性的, 且有些补体活化可能在没有C1q存在下进行。

#### [0528] 实施例11: 完整的IgG抗-SAP抗体的需求

[0529] IgG抗体的补体活化需要整个完整分子(包括Fc区), 并经由经典途径(通过C1q的结合来启动)进行。但是, 在有些抗体-抗原系统中, 经由替代途径的补体活化可以由F(ab)<sub>2</sub>片段介导。为了证实抗-SAP抗体的淀粉样蛋白清除的补体依赖性, 并研究对所述抗体的Fc区的潜在要求, 测试了F(ab)<sub>2</sub>抗-SAP抗体的作用, 所述抗体通过在pH 4.0用胃蛋白酶裂解绵羊多克隆抗-人SAP抗血清(批号2866)的IgG级分而生成, 并通过标准方法进行了纯化。

#### [0530] AA淀粉样变性的诱导和治疗

[0531] 如上面在实施例10中详述的, 在野生型C57BL/6小鼠中诱导和证实AA淀粉样变性。也如在实施例10中详述地给淀粉样沉着物加载人SAP以后, 用绵羊多克隆抗-人SAP抗血清的完整IgG级分、用单独的缓冲液媒介物或用IgG级分的F(ab)<sub>2</sub>片段, 处理小鼠组。注射的抗-SAP抗体活性的剂量是7.28mg(每只接受F(ab)<sub>2</sub>的小鼠)和7mg(50mg平常的总IgG)(每只接受完整IgG的小鼠)。在14天以后, 杀死所有小鼠, 用于通过刚果红染色估测淀粉样蛋白载荷。

#### [0532] 结果

[0533] 与接受单独媒介物的对照小鼠中的大量淀粉样沉着物相比, 在接受IgG抗-SAP抗体的小鼠中, 淀粉样沉着物的清除是几乎彻底的。接受F(ab)<sub>2</sub>的小鼠具有比未治疗的对照更少的淀粉样蛋白, 但是仍然大幅超过用完整IgG抗-SAP抗体治疗的小鼠(表9)。

[0534] 表9. 与完整的IgG抗体相比, F(ab)<sub>2</sub>抗-SAP的降低的清除淀粉样沉着物的效力

[0535]

| 组<br>(治疗, 组大小)                          | 淀粉样蛋白评分<br>中位值, 范围 |                 |
|-----------------------------------------|--------------------|-----------------|
|                                         | 脾                  | 肝               |
| 1 (没有抗体, $n=10$ )                       | 4.0, 4.0-4.33      | 3.5, 2.67-4.67  |
| 2 (IgG 抗-SAP 抗体, $n=8$ )                | 1.0, 1.0-3.67*     | 1.25, 1.0-1.5   |
| 3 (F(ab) <sub>2</sub> 抗-SAP 抗体, $n=5$ ) | 2.17, 1.33-3.0     | 1.67, 1.33-1.67 |

[0536] Kruskal-Wallis检验:脾, $P<0.001$ ;肝 $P<0.001$

[0537] Mann-Whitney检验<sup>\*\*</sup>:1相对于2,脾和肝二者, $P<0.001$ ;1相对于3,脾和肝二者, $P=0.001$ ;2相对于3,脾, $P=0.284$ ;肝, $P=0.019$

[0538] \*尽管IgG抗-SAP治疗,在第2组中的具有大量脾淀粉样蛋白的单个离群值。排除该动物,会产生IgG和F(ab)<sub>2</sub>抗-SAP抗体治疗的效力之间的非常显著的差异。<sup>\*\*</sup>由于多重比较,显著性需要0.01或更小的P值。

[0539] 讨论

[0540] 由于F(ab)<sub>2</sub>片段与完整IgG相比的更小分子量,在该研究中使用的F(ab)<sub>2</sub>抗-SAP抗体的摩尔剂量比IgG抗体的摩尔剂量大了约1/3。为了实现淀粉样蛋白清除的最佳效果,需要Fc。这不是因为Fc( $\gamma$ )受体在细胞识别中的直接参与,因为完整IgG在补体缺陷型小鼠中的有效性甚至低于F(ab)<sub>2</sub>在补体充分的小鼠中。施用的高剂量的F(ab)<sub>2</sub>可能能够通过替代途径活化一些补体。

[0541] 实施例12:巨噬细胞的需求

[0542] 在US 2009/0191196中描述的组织学和组织化学研究证实,在用抗-SAP抗体治疗的小鼠中,浸润、包围和吞噬淀粉样沉着物的细胞是巨噬细胞。为了证实巨噬细胞实际上负责清除淀粉样蛋白,在已经通过施用脂质体氯膦酸盐抑制了所有巨噬细胞活性的小鼠中,测试了使用绵羊多克隆抗-人SAP抗血清(批次2866)的完整IgG级分的治疗效果。确定地建立了脂质体氯膦酸盐的试剂、实验方案和对巨噬细胞功能的影响,并广泛地记载(Van Rooijen等人,(2002)J.Liposome Research.第12卷.第81-94页)。

[0543] AA淀粉样变性的诱导和治疗

[0544] 在诱导和证实野生型小鼠中的AA淀粉样变性以后,使用上面在实施例10中详述的方案,所有动物接受单次腹膜内施用的10mg分离的纯的人SAP,以给它们的沉着物加载人SAP。实验组然后立即和在此后第2、7和14天腹膜内地接受0.3ml脂质体氯膦酸盐。一个对照组和实验组在人SAP注射以后第3天接受单次腹膜内施用的50mg绵羊抗-人SAP抗血清的IgG级分。第二个对照组不接受抗-SAP,且不接受其它额外治疗。在给实验组和抗体对照组施用抗-SAP以后14天,杀死所有小鼠,用于通过刚果红染色估测淀粉样蛋白载荷。

[0545] 结果

[0546] 与没有接受抗体的组相比,抗-SAP治疗造成了淀粉样沉着物的几乎彻底清除。相比而言,在接受脂质体氯膦酸盐的小鼠中(在已知会完全废除巨噬细胞功能的方案中),没有清除淀粉样沉着物(表10)。

[0547] 表10.巨噬细胞消耗会抑制抗-SAP抗体对淀粉样沉着物的清除

[0548]

| 组<br>(治疗, 组大小)       | 淀粉样蛋白评分<br>中位值, 范围 |                |
|----------------------|--------------------|----------------|
|                      | 脾                  | 肝              |
| 1 (氯膦酸盐+抗-SAP, n=13) | 4.83, 2.0-5.0      | 3.17, 2.0-3.5  |
| 2 (仅抗-SAP, n=12)     | 1.33, 0.67-3.5     | 1.0, 0.67-2.5  |
| 3 (无, n=12)          | 4.0, 3.5-4.5       | 2.83, 1.0-3.17 |

[0549] Kruskal-Wallis检验:脾, $P<0.001$ ;肝 $P<0.001$ [0550] 含有Bonferroni校正的Mann-Whitney检验:1相对于2:脾和肝二者, $P<0.003$ ;1相对于3:脾, $P=0.078$ ;肝, $P=0.411$ ;2相对于3,脾和肝二者, $P<0.003$ 。[0551] 讨论

[0552] 在该具体实验中的结果证实,抗-人SAP抗体对淀粉样沉着物的清除需要巨噬细胞功能。

[0553] 实施例13:小鼠单克隆抗-人SAP抗体SAP-E的清除小鼠全身性AA淀粉样沉着物的效力

[0554] 与作为阳性对照的标准的绵羊多克隆抗-人SAP抗体相比,研究了不同的单克隆抗体的介导含有人SAP的鼠AA淀粉样沉着物的清除的效力。

[0555] AA淀粉样变性的诱导和治疗

[0556] 通过使纯系C57BL/6动物(其中已经删除了小鼠SAP基因)(Botto等人,(1997) Nature Med., 3:855-859)与携带人SAP转基因的C57BL/6小鼠(Yamamura等人,(1993) Mol.Reprod.Dev., 36:248-250和Gillmore等人,(2004) Immunology, 112:255-264)杂交,建立SAP敲除的、人SAP转基因的C57BL/6小鼠。这些小鼠因而缺少小鼠SAP,但是表达人SAP,其浓度显著大于在人类中观察到的浓度。如在实施例10中所述,在人SAP转基因的小鼠SAP敲除的小鼠中诱导全身性的AA淀粉样变性,并在酪蛋白向小鼠中的最后注射以后9天,像平常一样通过淀粉样蛋白的全身计数(在注射示踪剂剂量的 $^{125}\text{I}$ -标记的人SAP以后)来证实淀粉样蛋白沉着的存在和程度。所有小鼠具有大量的且相当量的淀粉样蛋白,并分配成密切匹配的组,以接受不同的治疗。在示踪剂注射以后1周,每只小鼠通过腹膜内注射接受单次剂量的5mg CPHPC,以消耗它们的循环人SAP,在5h以后,通过相同的途径,注射标准的绵羊多克隆抗-人SAP IgG级分(批次2866, 1ml, 50mg/ml总蛋白,含有7mg/ml抗-人SAP抗体)或5mg 9种不同的分离的纯的单克隆抗-人SAP抗体之一(表11)。在抗体注射以后21天,杀死所有小鼠,并通过它们的脾的刚果红组织学来测定淀粉样蛋白载荷。

[0557] 表11. 在用CPHPC和不同的抗-人SAP抗体治疗以后,淀粉样蛋白在具有全身性AA淀粉样变性的小鼠的脾中的存在

|        |                 |       |                    |
|--------|-----------------|-------|--------------------|
| [0558] | 抗体治疗            | 抗体同种型 | 淀粉样蛋白评分<br>中位值, 范围 |
|        | 无               |       | 3, 3-5             |
|        |                 |       |                    |
|        | 多克隆的            | NA    | 1, 1-1             |
|        |                 |       |                    |
|        | 单克隆 SAP-A       | IgG1  | 3, 2-4             |
|        | 单克隆 SAP-B       | IgG2a | 3, 2-4             |
|        | 单克隆 SAP-C       | IgG1  | 4, 2-4             |
|        | 单克隆 SAP-D (n=1) | IgG1  | 4                  |
|        |                 |       |                    |
|        | 单克隆 SAP-E       | IgG2a | 1, 1-1             |
|        |                 |       |                    |
|        | 单克隆 SAP-F (n=1) | IgG1  | 2                  |
|        | 单克隆 SAP-G       | IgG1  | 3, 2-4             |

[0559] 在测试的单克隆抗体中, 仅SAP-E造成淀粉样沉着物的清除, 但是它的效果与绵羊多克隆抗体的高度可再现的且急剧的作用相同。重要的是, SAP-E属于已知会活化小鼠补体的小鼠IgG2a同种型, 而除了SAP-B以外的所有其它单克隆抗体都是不会活化补体的小鼠IgG1同种型。尽管SAP-B是小鼠IgG2a同种型, 它与SAP的体外结合显著地小于SAP-E的结合, 显然在体内不足以成为有效的。

#### [0560] 讨论

[0561] 这些结果证实, 充分亲和的、补体活化的IgG2a小鼠单克隆抗-人SAP抗体会象绵羊多克隆抗-人SAP抗体一样有效地在体内介导淀粉样蛋白清除。

#### [0562] 实施例14: 单克隆小鼠抗-人SAP抗体SAP-K和SAP-E的体外对比表征

[0563] SAP-K选自6种不同的、最亲和地结合的小鼠IgG2a单克隆抗体, 所述抗体通过标准技术从免疫接种衍生出, 其中使用纯化的人SAP和常规融合来产生杂交瘤, 并通过常规方法克隆所述杂交瘤。在这些IgG2a抗体中, SAP-K表现出与固定化的人SAP的最大结合。不论人SAP已经通过非特异性附着或通过共价连接还是通过特异性的钙依赖性的SAP与固定化的配体(不论是淀粉样蛋白纤丝, 还是小分子配体磷酸乙醇胺)的结合而直接地固定化在塑料表面上, 都是如此。在有或没有钙存在下, SAP-K也较好地结合直接地固定化的SAP, 且如果SAP预先已经与CPHPC形成复合物, 那么共价地‘固定’在十聚体的SAP-CPHPC复合物中(Pepys, M.B. 等人(2002) Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. Nature, 417: 254-259; Kolstoe, S.E. 等人(2009) Molecular dissection of Alzheimer's disease neuropathology by depletion of serum amyloid P component. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106: 7619-7623)。

SAP-E也较好地结合处于所有这些不同构型的人SAP。但是,2种抗体的显著差别在于,当人SAP仅可稀少地得到时,例如当将平板暴露于仅 $1\mu\text{g/ml}$ 人SAP进行包被时,比SAP-E远远更多的SAP-K发生结合,而当存在更丰富的固定化的SAP时,例如当包被溶液含有 $100\mu\text{g/ml}$  SAP时,那么存在比SAP-K更多的SAP-E结合。该差异提示,当超过一种SAP分子与另一种紧密地结合时,SAP-E最佳地结合,而SAP-K亲和地结合单一分离的SAP分子。该机理得到下述发现的支持:当通过捕获将人SAP固定化在用多克隆绵羊抗-人SAP(批次2866)包被的平板上(这会提供在每个绵羊IgG抗体分子的2个臂中保持紧密靠近的SAP分子对)时,在输入的人SAP的所有水平,SAP-E比SAP-K更好地结合(图7)。

[0564] 图7显示了单克隆小鼠抗体与人SAP的结合的免疫放射分析,所述人SAP被固定化的绵羊多克隆抗-人SAP抗体捕获。在提供的人SAP的所有浓度,比SAP-K远远更多的SAP-E发生结合。每个点是3个重复的平均值。

[0565] 非常重要,的是,SAP-E和SAP-K看起来同样好地结合天然的人SAP,这通过在针对分离的纯的人SAP和全人血清的琼脂糖凝胶中的双向免疫扩散中,两种抗体的类似免疫沉淀来证实。这2种小鼠单克隆抗体的类似结合,反映为使用共价地固定化在芯片上的人SAP在Biacore仪器(BIAcoreX,Pharmacia Biosensor AB,Uppsala,Sweden)中测得的类似参数(表12)。

[0566] 表12.通过Biacore测得的单克隆抗体对人SAP的亲合力

[0567]

|       | $k_a(\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1})$ | $k_d(\text{sec}^{-1})$       | $K_D(\text{M})$            |
|-------|-------------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| SAP-E | $2 \pm 5 \times 10^4$               | $6 \pm 4 \times 10^{-5}$     | $5 \pm 4 \times 10^{-9}$   |
| SAP-K | $3.18 \pm 5 \times 10^4$            | $1.7 \pm 0.9 \times 10^{-5}$ | $1 \pm 1.7 \times 10^{-9}$ |

[0568] 显示的值是3个副本测量的平均值和SD

[0569] 相比而言,尽管两种抗体在生理缓冲液中的琼脂糖凝胶电泳以后在蛋白印迹法中结合天然的人SAP,仅SAP-E在还原的SDS-PAGE以后在蛋白印迹法中结合人SAP。SAP-E因而会识别变性的人SAP,而SAP-K仅识别天然的人SAP,且必须结合构象表位。

[0570] 人SAP的CNBr消化会导致159M至160W之间的裂解,这产生新肽,其中位置159已经从甲硫氨酸转化成高丝氨酸内酯(称作150-158-高丝氨酸内酯)。在SDS-PAGE以后的蛋白印迹法中,SAP-E结合N-端1-158-高丝氨酸内酯多肽(通过CNBr在残基Met159处裂解SAP而释放),但是几乎不与1-140片段(通过在没有钙存在下胰凝乳蛋白酶消化而释放)反应(图8)。被SAP-E识别的表位因此必须是在区域140-158中,该区域显然包含一些变性抗性的二级结构,因为在溶液中的肽136-147、138-149、140-151和112-119没有有效地抑制SAP-E结合。这与SAP的动力学稳定性和变性抗性相一致(Manning,M.和Colón,W.(2004)Biochemistry, 43:11248-11254)。

[0571] 图8显示了单克隆抗-人SAP抗体SAP-E的表位作图。A,人SAP的完整氨基酸序列,其显示了被在70%TFA中的CNBr(残基159M)和被胰凝乳蛋白酶(没有还原/脲甲基化,在碳酸氢铵中,在没有钙存在下)(残基140Y和144F)裂解的点。B,用CNBr裂解的SAP的SDS-PAGE分析。左图:考马斯蓝染色;泳道1,未处理的对照SAP;泳道2,在CNBr裂解以后的SAP,显示了痕量的残余的未裂解的完整原体和分别在大约20kD(残基1-158-高丝氨酸-内酯)和5kD(160-204)的预期片段。这些通过质谱法进行精确证实。右图:含有SAP-5的蛋白印迹,显示了在泳



道1(100ng加载)和2(10ng)中的完整的未处理的SAP的强染色,以及在泳道3(600ng)、4(130ng)和5(64ng)中的残余的完整SAP和在CNBr裂解的SAP中的更大残基1-158-高丝氨酸-内酯片段。泳道6含有分离的纯的人CRP,SAP-5与其根本不反应。C,用胰凝乳蛋白酶消化的SAP的SDS-PAGE分析。左图:考马斯蓝染色;泳道1,未处理的对照SAP;泳道2,在胰凝乳蛋白酶消化以后的SAP,显示了与残基1-140和145-204相对应的预期的大片段。这些通过质谱法进行精确证实。右图:含有SAP-E的蛋白印迹,显示了在泳道1(500ng加载)和2(100ng)中的完整的未处理的SAP的强染色,以及在泳道3和4中的残余的完整SAP(其含有胰凝乳蛋白酶消化的不同装载的SAP)。仅在泳道3(最重加载)中观察到SAP-E与残余物1-140片段的非常弱的结合。泳道5(500ng)和6(100ng)含有分离的纯的人CRP,SAP-E与其根本不反应。D,人SAP(h)和小鼠SAP(m)之间的残基136-147的序列对比。上图,在鼠序列中用黑色显示的残基指示的差异。下图,在人SAP的3D亚基结构中,用白色显示的该展开环的位置,其中140Y在它的顶点处。用黑色显示鼠序列中的不同残基。灰色球代表结合在配体结合槽中的钙原子。

[0572] 通过CLIPS®技术表位作图(Pepscan Presto BV),鉴别出被SAP-K识别的构象表位为暴露的周围环(残基121-131),其在圆盘样五聚体天然SAP分子的周围。

[0573] 图9显示了被SAP-K(A,以黑色突出显示,通过CLIPS®技术测得)和SAP-E(B,以白色显示,通过与SAP的CNBr裂解产物的结合结果测得的140-158,和在没有钙存在下通过胰凝乳蛋白酶消化释放出的片段)识别的人SAP上的表位的位置。

[0574] 实施例15:SAP-K小鼠单克隆抗-人SAP抗体在小鼠AA淀粉样变性模型中在体内清除淀粉样沉着物的效力

[0575] 在小鼠中对比了SAP-K的效力与标准的绵羊多克隆抗体清除建立的全身性AA淀粉样沉着物的作用。

[0576] AA淀粉样变性的诱导和治疗

[0577] 如上面在实施例10中详述的,在野生型C57BL/6小鼠中诱导和证实AA淀粉样变性。也如在实施例10中详述地给淀粉样沉着物加载人SAP以后,用50mg/小鼠的总IgG(作为绵羊多克隆抗-人SAP抗血清的完整IgG级分(批次2866),提供7mg实际的抗-SAP抗体的剂量)、分离的纯化的SAP-K(在5mg/小鼠的剂量)、分离的纯化的SAP-K(在1mg/小鼠的剂量)和分离的纯化的单克隆小鼠IgG2a抗体(其对无关的人抗原是特异性的,且不与人SAP或任何鼠抗原反应,作为阴性对照),处理小鼠组。在17天以后,杀死所有小鼠,用于通过刚果红染色估测淀粉样蛋白载荷。

[0578] 结果

[0579] 用5mg SAP-K治疗的小鼠表现出与用7mg剂量的绵羊多克隆抗体所观察到的相同的脾和肝淀粉样沉着物的显著清除。仅痕量淀粉样蛋白斑点保留在治疗的小鼠的脾中,在许多肝中根本没有检出,这与接受无关的对照小鼠IgG2a抗体的所有动物中的广泛的脾和肝淀粉样沉着物形成鲜明对比(表13)。在1mg、0.5mg和0.1mg(对于0.5mg和0.1mg,数据未显示)SAP-K/小鼠的更低剂量,没有显著效果。

[0580] 表13.单克隆小鼠IgG2a抗-人SAP抗体SAP-K对具有全身性AA淀粉样变性的小鼠中的内脏淀粉样沉着物的影响

[0581]

| 组(治疗, 组大小)                                   | 淀粉样蛋白评分        |                |
|----------------------------------------------|----------------|----------------|
|                                              | 中位值, 范围        |                |
|                                              | 脾              | 肝              |
| 1 (阴性对照小鼠 IgG2a, n=8)                        | 4.08, 1.5-4.50 | 2.42, 2.0-2.67 |
| 2 (7 mg 绵羊多克隆 IgG 抗-人 SAP 抗体, n=5)           | 1.17, 1.0-1.5  | 1.0, 0.67-1.17 |
| 3 (1 mg 单克隆小鼠 IgG2a 抗-人 SAP 抗体, SAP-K, n=10) | 3.5, 2.83-4.5  | 1.83, 1.0-2.83 |
| 4 (5 mg 单克隆小鼠 IgG2a 抗-人 SAP 抗体, SAP-K, n=10) | 1.25, 1.0-2.0  | 1.0, 1.0-1.33  |

[0582] Kruskal-Wallis检验:脾,  $P < 0.001$ ; 肝,  $P = 0.001$ 

[0583] Mann-Whitney检验\*: 1相对于2, 脾,  $P = 0.002$ ; 肝,  $P = 0.002$ ; 1相对于3, 脾,  $P = 0.173$ ; 肝,  $P = 0.083$ ; 1相对于4, 脾,  $P < 0.001$ ; 肝,  $P < 0.001$ ; 2相对于3, 脾,  $P = 0.0001$ ; 肝,  $P = 0.019$ ; 2相对于4, 脾,  $P = 0.513$ ; 肝,  $P = 0.768$ ; 3相对于4, 脾,  $P < 0.001$ ; 肝,  $P = 0.004$ 。\* 由于多重比较, 显著性需要0.01或更小的P值。

[0584] 讨论

[0585] 这些结果证实了单克隆抗-人SAP抗体在体内清除淀粉样沉着物的效力, 所述抗体属于补体活化小鼠IgG2a同种型, 并特异性地识别构象表位。因而, 根据本发明使用的单克隆抗-人SAP抗体可以主要针对序列表位(诸如抗体SAP-E)或完全针对构象表位(诸如SAP-K)。

[0586] 实施例16: SAP-E和SAP-K的清除小鼠中的全身性AA淀粉样沉着物的效力对比, 和血浆抗-SAP抗体浓度的估测

[0587] AA淀粉样变性的诱导和治疗

[0588] 如上面在实施例10中详述的, 在野生型C57BL/6小鼠中诱导和证实AA淀粉样变性。也如在实施例10中详述地给淀粉样沉着物加载人SAP以后, 用每只小鼠3mg和1mg的2种不同抗体, 处理小鼠组。对照组(其中也诱导了淀粉样蛋白)仅接受PBS来替代抗体, 给另外2个组施用已知的有效剂量的5mg/小鼠的每种抗体。在施用抗体以后第1、5和15天, 给所有小鼠抽血, 用于测定循环抗-SAP抗体, 并在第21天, 杀死所有小鼠, 用于通过刚果红染色估测淀粉样蛋白载荷。使用稳健的免疫放射分析(分别用纯化的SAP-E和SAP-K标准化, 并在已知的浓度掺入正常小鼠血清中), 测定所有血清的抗-SAP活性。

[0589] 结果

[0590] 由4个独立的熟练的观察人员(都不知晓检查的每个组织的身份)对淀粉样蛋白载荷评分。所有观察人员的评分照例是高度一致的, 且为了统计分析, 将所有观察人员对每只小鼠的脾和肝的总评分累加。如以前证实的, 两种抗体是有效的, 且存在明显的剂量依赖性的效应, 但是在更低的剂量, SAP-E看起来比SAP-K更有效。

[0591] 表14. SAP-E和SAP-K之间的清除内脏AA淀粉样沉着物的效力的对比

| [0592] | 组<br>(治疗, 小鼠的数目)      | 脾+ 肝淀粉样蛋白评分<br>中位值, 范围 |
|--------|-----------------------|------------------------|
|        | C (阴性对照, 仅 PBS)       | 6.81, 4.25-8.0         |
|        | K5 (SAP-K 5 mg, n=5)  | 2.25, 2.25-2.5         |
|        | K3 (SAP-K 3 mg, n=10) | 2.81, 2.0-4.25         |
|        | K1 (SAP-K 1 mg, n=10) | 5.63, 4.0-6.5          |
|        | E5 (SAP-E 5 mg, n=5)  | 2.0, 1.5-2.38          |
|        | E3 (SAP-E 3 mg, n=10) | 2.5, 2.0-5.0           |
|        | E1 (SAP-E 1 mg, n=10) | 3.38, 2.5-5.63         |

[0593] Kruskal-Wallis检验:  $P < 0.001$

[0594] Mann-Whitney检验\*: K5相对于E5,  $P = 0.095$ ; K3相对于E3,  $P = 0.684$ ; K1相对于E1,  $P = 0.001$ ; K5相对于K3,  $P = 0.594$ ; K5相对于K1,  $P = 0.001$ ; K3相对于K1,  $P < 0.001$ ; E5相对于E3,  $P = 0.008$ ; E5相对于E1,  $P = 0.001$ ; E3相对于E1,  $P = 0.004$ ; K5相对于C,  $P = 0.001$ ; E5相对于C,  $P = 0.001$ ; K3相对于C,  $P < 0.001$ ; E3相对于C,  $P < 0.001$ ; K1相对于C,  $P = 0.043$ ; E1相对于C,  $P < 0.001$ 。\*由于多重比较, 显著性需要0.01或更小的P值。

[0595] 除了在每个更低剂量组中的单个离群个体以外, 在给所有动物施用单次剂量以后, 循环抗-SAP抗体活性的浓度是强烈地且一致地剂量依赖性的。在1mg/小鼠的剂量以后, 在大多数小鼠中通常不可检出高于背景的任何水平, 甚至在第1天。相比而言, 在5mg剂量以后, 在第15天时仍然存在大量抗体, 且在3mg以后, 大多数小鼠在第5天时具有循环抗体, 但是在15天以后很少小鼠具有(表15)。在SAP-E和SAP-K的图谱之间没有显著差异。

[0596] 表15. 在单次腹膜内剂量以后的抗-SAP抗体的血清浓度

[0597]

| 组<br>(抗-SAP 抗体的剂量) | 给药以后的抗-SAP 浓度<br>中位值, 范围( $\mu\text{g/ml}$ )* |              |            |
|--------------------|-----------------------------------------------|--------------|------------|
|                    | 1 天                                           | 5 天          | 15 天       |
| K5<br>(SAP-K 5 mg) | 950, 840-1200                                 | 400, 300-480 | 45, 25-90  |
| E5<br>(SAP-E 5 mg) | 1000, 800-1500                                | 600, 360-700 | 80, 15-113 |
| K3<br>(SAP-K 3 mg) | 240, 50-600                                   | 40, 8-280    | 8, 6-30    |
| E3<br>(SAP-E 3 mg) | 275, 4-480                                    | 48, 0-240    | 4, 2-68    |
| K1<br>(SAP-K 1mg)  | 7, 7-90                                       | 6, 5-38      | 4, 2-9     |
| E1<br>(SAP-E 1mg)  | 7, 6-280                                      | 7, 6-120     | 5, 3-12    |
| C<br>(仅 PBS)       | 5, 5-7                                        | 5, 5-13      | 5, 5-16    |

[0598] \*低于 $17\mu\text{g/ml}$ 的表观抗-SAP抗体浓度是试验的背景,且代表没有真正活性。

[0599] 讨论

[0600] 在直接头对头比较(direct head to head comparison)中,存在一致的证据: SAP-E稍微但是明显比SAP-K有效,更有效。在施用 $1\text{mg/小鼠}$ 以后,在1天后,不可检出循环抗-SAP抗体活性,显然全部集中成在淀粉样沉着物内的人SAP。在 $3\text{mg}$ 剂量以后,在第1天时,大量抗-SAP存在于循环中,且在第5天仍然存在。在 $5\text{mg/小鼠}$ 以后,在15天以后,在血液中仍然存在显著浓度的抗-SAP。这些观察结果提示,重复的小剂量的抗-SAP抗体可能足以触发淀粉样蛋白清除。

[0601] 实施例17:低剂量SAP-E和SAP-K的清除小鼠中的全身性AA淀粉样沉着物的效力对比

[0602] AA淀粉样变性的诱导和治疗

[0603] 如上面在实施例10中详述的,在野生型C57BL/6小鼠中诱导和证实AA淀粉样变性。也如在实施例10中详述地给淀粉样沉着物加载人SAP以后,用单次剂量的 $0.5\text{mg}$ 和 $1\text{mg/小鼠}$ 的2种不同的抗体、或以3或4天间隔施用的6次重复剂量的 $0.15\text{mg}$ ,处理小鼠组(每组 $n=10$ )。对照组( $n=9$ )(其中也诱导了淀粉样蛋白)仅接受PBS来替代抗体,给另外2个组(每组 $n=3$ )施用已知的有效剂量的 $5\text{mg/小鼠}$ 的每种抗体。在第29天,杀死所有小鼠,用于通过刚果红染色估测淀粉样蛋白载荷。

## [0604] 结果

[0605] 低剂量(包括重复的非常低的剂量)表现出显著的降低淀粉样蛋白载荷(特别是在肝中)的效力。SAP-E再一次看起来比SAP-K更有效。

[0606] 表16. 低剂量的SAP-E和SAP-K之间的清除内脏AA淀粉样沉着物的效力的对比

[0607]

| 组                      | 淀粉样蛋白评分(中位值, 范围) |                |
|------------------------|------------------|----------------|
|                        | 脾                | 肝              |
| C, 阴性对照, 仅 PBS         | 4.5, 4.0-4.75    | 3.25, 2.0-4.0  |
| E1, SAP-E 1 mg         | 1.25, 1.0-4.25   | 1.0, 0.5-1.25  |
| E0.5, SAP-E 0.5 mg     | 4.75, 1.0-5.0    | 1.0, 0.5-3.5   |
| Erep, SAP-E 6x 0.15 mg | 3.5, 2.0-4.5     | 0.5, 0.0-3.25  |
| K1, SAP-K 1 mg         | 4.13, 1.0-5.0    | 1.0, 0.0-4.0   |
| K0.5, SAP-K 0.5 mg     | 4.25, 1.75-4.5   | 1.13, 0.0-2.75 |
| Krep, SAP-K 6x 0.15 mg | 4.38, 1.5-4.75   | 1.0, 0.0-2.25  |

[0608] Kruskal-Wallis检验:脾,  $P < 0.001$ ; 肝,  $P = 0.001$

[0609] Mann-Whitney检验\*: E1相对于C:脾,  $P < 0.001$ ; 肝 $P < 0.001$ ; E0.5相对于C:脾,  $P = 0.604$ ; 肝 $P = 0.004$ ; Erep相对于C:脾,  $P = 0.002$ ; 肝,  $P < 0.001$ ; K1相对于C:脾,  $P = 0.065$ ; 肝,  $P = 0.001$ ; K0.5相对于C:脾,  $P = 0.022$ ; 肝,  $P = 0.001$ ; Krep相对于C:脾,  $P = 0.079$ ; 肝,  $P < 0.001$ ; E1相对于E0.5:脾,  $P = 0.005$ ; 肝 $P = 0.143$ ; E1相对于Erep:脾,  $P = 0.043$ ; 肝,  $P = 0.280$ ; E0.5相对于Erep:脾,  $P = 0.019$ ; 肝,  $P = 0.043$ ; K1相对于K0.5:没有显著差异; K1相对于Krep:没有显著差异; K0.5相对于Krep:没有显著差异; E1相对于K1:脾,  $P = 0.015$ ; 肝,  $P = 0.353$ ; E0.5相对于K0.5:没有显著差异; Erep相对于Krep:没有显著差异。\*由于多重比较, 显著性需要0.01或更小的P值。

## [0610] 讨论

[0611] SAP-E比SAP-K显著更大的效力似乎是可再现的。当重复施用甚至非常低剂量的效力和对肝淀粉样沉着物比对脾淀粉样沉着物更大的效果的提示, 具有益处和潜在的临床意义。

## [0612] 实施例18: 人源化的单克隆抗-人SAP抗体对补体的体外活化

[0613] 补体活化是根据本发明的抗-人SAP抗体的淀粉样蛋白清除效力所必需的。通过将不同量的分离的纯抗体加入全人血清(含有30mg/l的SAP浓度)或全小鼠血清(其已经掺入分离的纯的人SAP至该相同浓度)中, 在体外对比了人源化的单克隆抗体SAP-E H1L1和SAP-K H3L0的活化人和小鼠血清中的C3的能力。在两种情况下, 血清是新鲜的, 且补体充分的实验条件对于使用补体结合试验缓冲液(CFT)作为稀释剂的补体活化而言是最佳的。

[0614] 制备下述混合物(表17):

[0615]

| 试管编号 | 血清        | 单克隆抗-SAP 抗体 | 终浓度( $\mu\text{g/ml}$ ) |       |
|------|-----------|-------------|-------------------------|-------|
|      |           |             | 抗-SAP                   | 人 SAP |
| M1   | 小鼠+ 人 SAP | SAP-E H1L1  | 15                      | 30    |
| M2   | 小鼠+ 人 SAP | SAP-E H1L1  | 30                      | 30    |
| M3   | 小鼠+ 人 SAP | SAP-E H1L1  | 60                      | 30    |
| M4   | 小鼠+ 人 SAP | SAP-E H1L1  | 120                     | 30    |
| M5   | 小鼠+ 人 SAP | SAP-K H3L0  | 15                      | 30    |
| M6   | 小鼠+ 人 SAP | SAP-K H3L0  | 30                      | 30    |
| M7   | 小鼠+ 人 SAP | SAP-K H3L0  | 60                      | 30    |
| M8   | 小鼠+ 人 SAP | SAP-K H3L0  | 120                     | 30    |
| M9   | 小鼠+ 人 SAP | 无           | 0                       | 30    |
| H1   | 人         | SAP-E H1L1  | 15                      | 30    |
| H2   | 人         | SAP-E H1L1  | 30                      | 30    |
| H3   | 人         | SAP-E H1L1  | 60                      | 30    |
| H4   | 人         | SAP-E H1L1  | 120                     | 30    |
| H5   | 人         | SAP-K H3L0  | 15                      | 30    |
| H6   | 人         | SAP-K H3L0  | 30                      | 30    |
| H7   | 人         | SAP-K H3L0  | 60                      | 30    |

[0616]

|    |   |            |     |    |
|----|---|------------|-----|----|
| H8 | 人 | SAP-K H3L0 | 120 | 30 |
| H9 | 人 | 无          | 0   | 30 |

[0617] 将所有试管在37℃温育2小时,以使补体活化进行。由于在血清中总是发生缓慢的自发活化,提供了2个额外对照,即M9和H9的重复,命名为M10和H10,它们不进行温育,而是在混合以后立即在-80℃冷冻,然后在即将测定C3裂解以前融化。M/H9和M/H10之间的对比,会实现自发的C3裂解和由抗-SAP抗体产生的任何额外活化之间的差异,以及将单独的人SAP加入小鼠血清中的任何影响。

[0618] 使用针对人C3的单特异性抗体,通过二维免疫电泳来测定人血清中的C3裂解。该方法对小鼠C3裂解具有低灵敏度,因为小鼠C3的不同电泳迁移率比使用人C3的情况更难以可靠地区分。因此,通过琼脂糖凝胶电泳,随后用单特异性抗-小鼠C3抗体进行免疫印迹法,测定了小鼠C3裂解。

[0619] 结果

[0620] 通过C3的主要剂量依赖性的裂解证实,人源化的抗体会有效地活化人补体,这造成更慢迁移率的天然C3免疫沉淀峰的大小的减小和更快的裂解的C3c峰的大小的增加(图10)。

[0621] 图10显示了全人血清中的人源化的单克隆抗-人SAP抗体的C3活化。

[0622] 在包括样品H10的基线C3裂解的对照的试验中显而易见,与在没有抗体的自发裂解对照中观察到的C3裂解相比,甚至最低剂量的两种抗-SAP抗体产生了更多的C3裂解(图

11)。

[0623] 图11显示了全人血清中的低剂量的人源化的单克隆抗-人SAP抗体的C3活化。

[0624] 对于在补充了人SAP的全小鼠血清中的小鼠C3的裂解而言,得到了非常类似的结果。两种抗体表现出天然小鼠C3的剂量依赖性的裂解,这导致慢迁移率的天然C3带的强度减弱和更快迁移率的活化形式的强度增加。并且与在没有抗体的自发活化对照中观察到的C3裂解相比,甚至最低剂量的每种抗体产生了更多的C3裂解(图12)。

[0625] 图12显示了补充了纯的人SAP的全小鼠血清中的人源化的单克隆抗-人SAP抗体的C3活化。

[0626] 讨论

[0627] 两种人源化的单克隆抗-人SAP抗体都在人SAP存在下有效地活化补体,并因而是根据本发明用于治疗全身性淀粉样变性和由组织中的胞外淀粉样沉着物造成的任意其它疾病的适当候选物。

[0628] 序列索引

[0629]

| SEQ ID NO | 序列描述                          |
|-----------|-------------------------------|
| 1         | SAP-E CDRH1 氨基酸序列             |
| 2         | SAP-E CDRH2 氨基酸序列             |
| 3         | SAP-E CDRH3 氨基酸序列             |
| 4         | SAP-E CDRL1 氨基酸序列             |
| 5         | SAP-E CDRL2 氨基酸序列             |
| 6         | SAP-E CDRL3 氨基酸序列             |
| 7         | SAP-E V <sub>H</sub> 氨基酸序列    |
| 8         | SAP-E V <sub>H</sub> DNA 序列   |
| 9         | SAP-E V <sub>L</sub> 氨基酸序列    |
| 10        | SAP-E V <sub>L</sub> DNA 序列   |
| 11        | SAP-K CDRH1 氨基酸序列             |
| 12        | SAP-K CDRH2 氨基酸序列             |
| 13        | SAP-K CDRH3 氨基酸序列             |
| 14        | SAP-K CDRL1 氨基酸序列             |
| 15        | SAP-K CDRL2 氨基酸序列             |
| 16        | SAP-K CDRL3 氨基酸序列             |
| 17        | SAP-K V <sub>H</sub> 氨基酸序列    |
| 18        | SAP-K V <sub>H</sub> DNA 序列   |
| 19        | SAP-K V <sub>L</sub> 氨基酸序列    |
| 20        | SAP-K V <sub>L</sub> DNA 序列   |
| 21        | SAP-E V <sub>H</sub> 嵌合体氨基酸序列 |
| 22        | SAP-E V <sub>L</sub> 嵌合体氨基酸序列 |
| 23        | SAP-K V <sub>H</sub> 嵌合体氨基酸序列 |
| 24        | SAP-K V <sub>L</sub> 嵌合体氨基酸序列 |



[0630]

|    |                                       |
|----|---------------------------------------|
| 25 | IGHV1-69 人可变重链种系受体氨基酸序列               |
| 26 | JH1 微基因                               |
| 27 | SAP-E 人源化的 V <sub>H</sub> 变体 H0 氨基酸序列 |
| 28 | SAP-E 人源化的 V <sub>H</sub> 变体 H1 氨基酸序列 |
| 29 | SAP-E 人源化的 V <sub>H</sub> 变体 H2 氨基酸序列 |
| 30 | SAP-E 人源化的 V <sub>H</sub> 变体 H3 氨基酸序列 |
| 31 | SAP-E 人源化的 V <sub>H</sub> 变体 H4 氨基酸序列 |
| 32 | IGKV1-39 人可变轻链种系受体氨基酸序列               |
| 33 | JK2 微基因                               |
| 34 | SAP-E 人源化的 V <sub>L</sub> 变体 L0 氨基酸序列 |
| 35 | SAP-E 人源化的 V <sub>L</sub> 变体 L1 氨基酸序列 |
| 36 | SAP-E 人源化的 V <sub>L</sub> 变体 L2 氨基酸序列 |
| 37 | SAP-K 人源化的 V <sub>H</sub> 变体 H0 氨基酸序列 |
| 38 | SAP-K 人源化的 V <sub>H</sub> 变体 H1 氨基酸序列 |
| 39 | SAP-K 人源化的 V <sub>H</sub> 变体 H2 氨基酸序列 |
| 40 | SAP-K 人源化的 V <sub>H</sub> 变体 H3 氨基酸序列 |
| 41 | SAP-K 人源化的 V <sub>L</sub> 变体 L0 氨基酸序列 |
| 42 | SAP-K 人源化的 V <sub>L</sub> 变体 L1 氨基酸序列 |
| 43 | 智人 SAP 氨基酸序列                          |
| 44 | 小家鼠 SAP 氨基酸序列                         |
| 45 | SAP-E VH 嵌合体核苷酸序列                     |
| 46 | SAP-E VL 嵌合体核苷酸序列                     |
| 47 | SAP-K VH 嵌合体核苷酸序列                     |
| 48 | SAP-K VL 嵌合体核苷酸序列                     |
| 49 | IGHV1-69 人可变重链种系受体核苷酸序列               |
| 50 | IGHV1-39 人可变重链种系受体核苷酸序列               |
| 51 | SAP-E 人源化的重链 V 区变体 H0 核苷酸序列 (未经密码子优化) |
| 52 | SAP-E 人源化的轻链 V 区变体 L0 核苷酸序列 (未经密码子优化) |

[0631]

|    |                                         |
|----|-----------------------------------------|
| 53 | SAP-E 人源化的重链 V 区变体 H0 核苷酸序列(经过密码子优化)    |
| 54 | SAP-E 人源化的重链 V 区变体 H1 核苷酸序列(经过密码子优化)    |
| 55 | SAP-E 人源化的重链 V 区变体 H2 核苷酸序列(经过密码子优化)    |
| 56 | SAP-E 人源化的重链 V 区变体 H3 核苷酸序列(经过密码子优化)    |
| 57 | SAP-E 人源化的重链 V 区变体 H4 核苷酸序列(经过密码子优化)    |
| 58 | SAP-E 人源化的轻链 V 区变体 L0 核苷酸序列(经过密码子优化)    |
| 59 | SAP-E 人源化的轻链 V 区变体 L1 核苷酸序列(经过密码子优化)    |
| 60 | SAP-E 人源化的轻链 V 区变体 L2 核苷酸序列(经过密码子优化)    |
| 61 | SAP-E 人源化的重链 H1 完全成熟的核苷酸序列(经过密码子优化)     |
| 62 | SAP-E 人源化的重链 H1 完全成熟的氨基酸序列              |
| 63 | SAP-E 人源化的轻链 L1 完全成熟的核苷酸序列(经过密码子优化)     |
| 64 | SAP-E 人源化的轻链 L1 完全成熟的氨基酸序列              |
| 65 | SAP-K 人源化的重链 V 区变体 H0 核苷酸序列 ( 未经密码子优化 ) |
| 66 | SAP-K 人源化的轻链 V 区变体 L0 核苷酸序列 ( 未经密码子优化 ) |
| 67 | SAP-K 人源化的重链 V 区变体 H0 核苷酸序列(经过密码子优化)    |
| 68 | SAP-K 人源化的重链 V 区变体 H1 核苷酸序列(经过密码子优化)    |

[0632]

|    |                                          |
|----|------------------------------------------|
| 69 | SAP-K 人源化的重链 V 区变体 H2 核苷酸序列(经过密码子优化)     |
| 70 | SAP-K 人源化的重链 V 区变体 H3 核苷酸序列(经过密码子优化)     |
| 71 | SAP-K 人源化的轻链 V 区变体 L0 核苷酸序列(经过密码子优化)     |
| 72 | SAP-K 人源化的轻链 V 区变体 L1 核苷酸序列(经过密码子优化)     |
| 73 | SAP-K 人源化的轻链 V 区变体 L0 91A 核苷酸序列(经过密码子优化) |
| 74 | SAP-K 人源化的轻链 V 区变体 L0 91A 氨基酸序列          |
| 75 | SAP-K 人源化的 H3 重链核苷酸序列(经过密码子优化)           |
| 76 | SAP-K 人源化的 H3 重链氨基酸序列                    |
| 77 | SAP-K 人源化的 L0 轻链核苷酸序列(经过密码子优化)           |
| 78 | SAP-K 人源化的 L0 轻链氨基酸序列                    |
| 79 | 免疫球蛋白链的信号序列                              |

## 序列表

<110> Glaxo Group Limited  
Tejinder Kaur BHINDER  
Susannah Karen FORD  
Volker GERMASCHEWSKI  
Alan Peter LEWIS  
Mark PEPYS

<120> 对血清淀粉样蛋白P组分特异性的抗原结合蛋白

<130> PB63944 WO

<150> 61/309957

<151> 2010-03-03

<160> 79

<170> 用于Windows 4.0版的FastSEQ

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠序列

[0001]

<220>

<223> SAP-E CDRH1氨基酸序列

<400> 1

Thr Tyr Asn Met His

1

5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠序列

<220>

<223> SAP-E CDRH2氨基酸序列

<400> 2

Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Ala Asn Tyr Asn Gln Gln Phe Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> 小家鼠序列

<220>

<223> SAP-E CDRH3氨基酸序列

<400> 3

Gly Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser  
1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠序列

<220>

<223> SAP-E CDRL1氨基酸序列

<400> 4

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

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠序列

<220>

<223> SAP-E CDRL2氨基酸序列

[0002]

<400> 5

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu  
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠序列

<220>

<223> SAP-E CDRL3氨基酸序列

<400> 6

Gln His His Tyr Gly Ala Pro Leu Thr  
1 5

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> 小家鼠序列

<220>

<223> SAP-E VH氨基酸序列

<400> 7

Gln Ala Ser Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala

|                                                                 |     |     |    |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|----|
| 1                                                               | 5   | 10  | 15 |
| Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Thr Tyr |     |     |    |
| 20                                                              | 25  | 30  |    |
| Asn Met His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile |     |     |    |
| 35                                                              | 40  | 45  |    |
| Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Ala Asn Tyr Asn Gln Gln Phe |     |     |    |
| 50                                                              | 55  | 60  |    |
| Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr |     |     |    |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80 |
| Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys |     |     |    |
| 85                                                              | 90  | 95  |    |
| Arg Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln |     |     |    |
| 100                                                             | 105 | 110 |    |
| Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser                                 |     |     |    |
| 115                                                             | 120 |     |    |

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 366

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 小家鼠序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-E VH DNA序列

&lt;400&gt; 8

[0003] cagcgttctc tacagcagtc tgggactgag ctggtgaggt ctggggcctc agtgaagatg 60  
 tectgcaagg cttctggctt cacatttgcc acttacaata tgcactggat taagcagaca 120  
 cccggacagg gectggaatg gattgggtat atttatctg gagatggtaa tgctaactac 180  
 aatcagcagt tcaagggcaa ggccacattg actgcagaca catectecaa cacagcctac 240  
 atgcagatca gcagcctgac atctgaagac tctgcggtct atttctgtgc aagaggggac 300  
 tttgattacg acggagggta ctactttgac tectggggcc agggcaccac tctcacagtc 360  
 tectca 366

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-E VL氨基酸序列

&lt;400&gt; 9

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

[0004]

<210> 10  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> 小家鼠序列

<220>  
 <223> SAP-E VL DNA序列

<400> 10  
 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60  
 atcacatgtc gagcaagtga gaataattac agttatttag catggatatca gcagaaacag 120  
 ggaagatccc ctgagctcct ggccataat gcaaaaacct tagcagaagg tglgcatca 180  
 agggtcagtg gcagtggatc aggcacacac tttctctga agatcaacgg cctgcagcct 240  
 gaagatttgg ggaattatta ctgtcaacat cattatgggtg ctccgctcac gttcggtgct 300  
 gggaccaagc tggaactgaa a 321

<210> 11  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 小家鼠序列

<220>  
 <223> SAP-K CDRH1氨基酸序列

<400> 11  
 Ser Tyr Trp Met His  
 1 5

<210> 12  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 小家鼠序列

<220>  
 <223> SAP-K CDRH2氨基酸序列

<400> 12  
 Met Ile His Pro Asn Ser Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Ser

<210> 13  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 小家鼠序列

<220>  
 <223> SAP-K CDRH3氨基酸序列

<400> 13  
 Arg Asn Asp Tyr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val  
 1 5 10

<210> 14  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 小家鼠序列

<220>  
 <223> SAP-K CDRL1氨基酸序列

<400> 14  
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Asn Ser Asn Val Ala  
 1 5 10

<210> 15  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 小家鼠序列

<220>  
 <223> SAP-K CDRL2氨基酸序列

<400> 15  
 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser  
 1 5

[0005]

<210> 16  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 小家鼠序列

<220>  
 <223> SAP-K CDRL3氨基酸序列

<400> 16  
 Gln Gln Cys Asn Asn Tyr Pro Phe Thr  
 1 5

<210> 17  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> 小家鼠序列

<220>  
 <223> SAP-K VH氨基酸序列

<400> 17  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Met Ile His Pro Asn Ser Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe



[0006]

|                     |                         |                         |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|
| 50                  | 55                      | 60                      |
| Lys Ser Lys Ala Thr | Leu Thr Val Asp Lys Ser | Ser Ser Thr Ala Tyr     |
| 65                  | 70                      | 75                      |
| Met Gln Leu Asn Ser | Leu Thr Ser Glu Asp     | Ser Ala Val Tyr Tyr Cys |
| 85                  | 90                      | 95                      |
| Ala Arg Arg Asn Asp | Tyr Tyr Trp Tyr Phe     | Asp Val Trp Gly Thr Gly |
| 100                 | 105                     | 110                     |
| Thr Thr Val Thr Val | Ser Ser                 |                         |
| 115                 |                         |                         |

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 357

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 小家鼠序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-K VH DNA序列

&lt;400&gt; 18

```

cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctgataaagc ctggggcttc agtgaagttg 60
tcttgcaagg cttctggcta cactttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120
cctggacaag gccttgagtg gattggaatg attcatccta atagtgttaa tactaactac 180
aatgagaagt tcaagagtaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcaactca acagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagacggaat 300
gattactact ggtacttcga tgtctggggc acagggacca cggtcacctg ctcctca 357

```

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-K VL氨基酸序列

&lt;400&gt; 19

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

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 小家鼠序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-K VL DNA序列

&lt;400&gt; 20

```

gacattgtga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
gtcacctgca aggccagtca gaatgtgaat tctaattgtag cctgggtatca acagaaacca 120
gggcaatctc cttaaagcact gatttactcg gcttctacc ggtacagtgg agtcctgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaccaa tgtgcagtct 240
gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tgtaacaact atccattcac gttcggctcg 300
gggacaaagt tggaataaa a 321

```

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 444

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-E VH嵌合体氨基酸序列

&lt;400&gt; 21

[0007]

```

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

```

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser |     |     |
|                                                                 | 325 | 330 |
| Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro |     |     |
|                                                                 | 340 | 345 |
| Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val |     |     |
|                                                                 | 355 | 360 |
| Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly |     |     |
|                                                                 | 370 | 375 |
| Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Gly Ser Phe Phe Lys Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln |     |     |
|                                                                 | 405 | 410 |
| Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His |     |     |
|                                                                 | 420 | 425 |
| Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys                 |     |     |
|                                                                 | 435 | 440 |

<210> 22  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SAP-E VL嵌合体氨基酸序列

[0008]

<400> 22  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Arg Ser Pro Gln Leu Leu Val  
 35 40 45  
 His Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Val Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Ser Leu Lys Ile Asn Gly Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ala Pro Leu  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 23  
 <211> 443  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SAP-K VH嵌合体氨基酸序列

&lt;400&gt; 23

|        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|        | Gln | Val | Gln | Leu | Gln | Gln | Pro | Gly | Ala | Glu | Leu | Ile | Lys | Pro | Gly | Ala |
|        | 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
|        | Ser | Val | Lys | Leu | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Ser | Tyr |
|        |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |     |
|        | Trp | Met | His | Trp | Val | Lys | Gln | Arg | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |
|        |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
|        | Gly | Met | Ile | His | Pro | Asn | Ser | Val | Asn | Thr | Asn | Tyr | Asn | Glu | Lys | Phe |
|        |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
|        | Lys | Ser | Lys | Ala | Thr | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Ser | Ser | Thr | Ala | Tyr |
|        | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
|        | Met | Gln | Leu | Asn | Ser | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
|        |     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
|        | Ala | Arg | Arg | Asn | Asp | Tyr | Tyr | Trp | Tyr | Phe | Asp | Val | Trp | Gly | Thr | Gly |
|        |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
|        | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe |
|        |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| [0009] | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu |
|        |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
|        | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp |
|        |     | 145 |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
|        | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu |
|        |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
|        | Gln | Ser | Ser | Gly | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser |
|        |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
|        | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn |
|        |     | 195 |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
|        | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His |
|        |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
|        | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val |
|        |     | 225 |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
|        | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr |
|        |     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
|        | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu |
|        |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
|        | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys |
|        |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
|        | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Tyr | Val | Val | Ser | Val | Leu |
|        |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
|        | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys |
|        |     | 305 |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
|        | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys |
|        |     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
|        | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser |
|        |     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
|        | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys |

## 10/34 页

|       |      |
|-------|------|
| <210> | 25   |
| <211> | 98   |
| <212> | PRT  |
| <213> | 智人序列 |

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; IGHV1-69人可变重链种系受体氨基酸序列

&lt;400&gt; 25

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

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; JH1微基因

[0011]

&lt;400&gt; 26

Ala Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 1 5 10 15  
 Ser

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-E人源化的VH变体H0氨基酸序列

&lt;400&gt; 27

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|-----|
|     |     |     | 100 |     |     |     | 105 |  |  | 110 |
| Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser |  |  |     |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |  |  |     |

<210> 28  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SAP-E人源化的VH变体H1氨基酸序列

<400> 28  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Thr Tyr  
 20 25 30  
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Ala Asn Tyr Asn Gln Gln Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Arg Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln  
 100 105 110

[0012] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 29  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SAP-E人源化的VH变体H2氨基酸序列

<400> 29  
 Gln Ala Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Thr Tyr  
 20 25 30  
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Ala Asn Tyr Asn Gln Gln Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Arg Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 30  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SAP-E人源化的VH变体H3氨基酸序列

<400> 30  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Thr Tyr  
 20 25 30  
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Ala Asn Tyr Asn Gln Gln Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Arg Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

[0013] <210> 31  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SAP-E人源化的VH变体H4氨基酸序列

<400> 31  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Thr Tyr  
 20 25 30  
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Ala Asn Tyr Asn Gln Gln Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Arg Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 32



<211> 95  
 <212> PRT  
 <213> 智人序列

<220>  
 <223> IGKV1-39人可变轻链种系受体氨基酸序列

<400> 32  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro  
 85 90 95

<210> 33  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 智人序列

[0014] <220>  
 <223> JK2微基因

<400> 33  
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 1 5 10

<210> 34  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SAP-E人源化的VL变体L0氨基酸序列

<400> 34  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ala Pro Leu  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 35  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SAP-E人源化的VL变体L1氨基酸序列

<400> 35  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 His Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ala Pro Leu  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

[0015] <210> 36  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SAP-E人源化的VL变体L2氨基酸序列

<400> 36  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val  
 35 40 45  
 His Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ala Pro Leu  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 37  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-K人源化的VH变体H0氨基酸序列

&lt;400&gt; 37

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

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

[0016]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-K人源化的VH变体H1氨基酸序列

&lt;400&gt; 38

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

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-K人源化的VH变体H2氨基酸序列

&lt;400&gt; 39

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

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-K人源化的VH变体H3氨基酸序列

[0017] &lt;400&gt; 40

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

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-K人源化的VL变体L0氨基酸序列

&lt;400&gt; 41

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-K人源化的VL变体L1氨基酸序列

&lt;400&gt; 42

|                        |                 |                 |                 |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Asp Ile Gln Met        | Thr Gln Ser Pro | Ser Ser Leu Ser | Ala Ser Val Gly |
| 1                      | 5               | 10              | 15              |
| Asp Arg Val Thr        | Ile Thr Cys Lys | Ala Ser Gln Asn | Val Asn Ser Asn |
| 20                     | 25              | 30              |                 |
| [0018] Val Ala Trp Tyr | Gln Gln Lys Pro | Gly Lys Ala Pro | Lys Ala Leu Ile |
| 35                     | 40              | 45              |                 |
| Tyr Ser Ala Ser        | Tyr Arg Tyr Ser | Gly Val Pro Ser | Arg Phe Ser Gly |
| 50                     | 55              | 60              |                 |
| Ser Gly Ser Gly        | Thr Asp Phe Thr | Leu Thr Ile Ser | Ser Leu Gln Pro |
| 65                     | 70              | 75              | 80              |
| Glu Asp Phe Ala        | Thr Tyr Tyr Cys | Gln Gln Cys Asn | Asn Tyr Pro Phe |
| 85                     | 90              | 95              |                 |
| Thr Phe Gly Gln        | Gly Thr Lys Leu | Glu Ile Lys     |                 |
| 100                    | 105             |                 |                 |

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 204

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 智人SAP氨基酸序列

&lt;400&gt; 43

|                 |                 |                 |                 |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| His Thr Asp Leu | Ser Gly Lys Val | Phe Val Phe Pro | Arg Glu Ser Val |
| 1               | 5               | 10              | 15              |
| Thr Asp His Val | Asn Leu Ile Thr | Pro Leu Glu Lys | Pro Leu Gln Asn |
| 20              | 25              | 30              |                 |
| Phe Thr Leu Cys | Phe Arg Ala Tyr | Ser Asp Leu Ser | Arg Ala Tyr Ser |
| 35              | 40              | 45              |                 |
| Leu Phe Ser Tyr | Asn Thr Gln Gly | Arg Asp Asn Glu | Leu Leu Val Tyr |
| 50              | 55              | 60              |                 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Glu | Arg | Val | Gly | Glu | Tyr | Ser | Leu | Tyr | Ile | Gly | Arg | His | Lys | Val |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Thr | Ser | Lys | Val | Ile | Glu | Lys | Phe | Pro | Ala | Pro | Val | His | Ile | Cys | Val |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Ser | Trp | Glu | Ser | Ser | Ser | Gly | Ile | Ala | Glu | Phe | Trp | Ile | Asn | Gly | Thr |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Pro | Leu | Val | Lys | Lys | Gly | Leu | Arg | Gln | Gly | Tyr | Phe | Val | Glu | Ala | Gln |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Pro | Lys | Ile | Val | Leu | Gly | Gln | Glu | Gln | Asp | Ser | Tyr | Gly | Gly | Lys | Phe |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Asp | Arg | Ser | Gln | Ser | Phe | Val | Gly | Glu | Ile | Gly | Asp | Leu | Tyr | Met | Trp |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Asp | Ser | Val | Leu | Pro | Pro | Glu | Asn | Ile | Leu | Ser | Ala | Tyr | Gln | Gly | Thr |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Pro | Leu | Pro | Ala | Asn | Ile | Leu | Asp | Trp | Gln | Ala | Leu | Asn | Tyr | Glu | Ile |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Arg | Gly | Tyr | Val | Ile | Ile | Lys | Pro | Leu | Val | Trp | Val |     |     |     |     |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 203

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 小家鼠SAP氨基酸序列

[0019]

&lt;400&gt; 44

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Thr | Asp | Leu | Lys | Arg | Lys | Val | Phe | Val | Phe | Pro | Arg | Glu | Ser | Glu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |     |
| Thr | Asp | His | Val | Lys | Leu | Ile | Pro | His | Leu | Glu | Lys | Pro | Leu | Gln | Asn |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Phe | Thr | Leu | Cys | Phe | Arg | Thr | Tyr | Ser | Asp | Leu | Ser | Arg | Ser | Gln | Ser |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Leu | Phe | Ser | Tyr | Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Asp | Asn | Glu | Leu | Leu | Ile | Tyr |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Lys | Glu | Lys | Val | Gly | Glu | Tyr | Ser | Leu | Tyr | Ile | Gly | Gln | Ser | Lys | Val |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Thr | Val | Arg | Gly | Met | Glu | Glu | Tyr | Leu | Ser | Pro | Val | His | Leu | Cys | Thr |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr | Trp | Glu | Ser | Ser | Ser | Gly | Ile | Val | Glu | Phe | Trp | Val | Asn | Gly | Lys |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Pro | Trp | Val | Lys | Lys | Ser | Leu | Gln | Arg | Glu | Tyr | Thr | Val | Lys | Ala | Pro |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Pro | Ser | Ile | Val | Leu | Gly | Gln | Glu | Gln | Asp | Asn | Tyr | Gly | Gly | Gly | Phe |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Gln | Arg | Ser | Gln | Ser | Phe | Val | Gly | Glu | Phe | Ser | Asp | Leu | Tyr | Met | Trp |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Asp | Tyr | Val | Leu | Thr | Pro | Gln | Asp | Ile | Leu | Phe | Val | Tyr | Arg | Asp | Ser |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Pro | Val | Asn | Pro | Asn | Ile | Leu | Asn | Trp | Gln | Ala | Leu | Asn | Tyr | Glu | Ile |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Asn | Gly | Tyr | Val | Val | Ile | Arg | Pro | Arg | Val | Trp |     |     |     |     |     |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 45  
 <211> 1356  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SAP-E VH嵌合体核苷酸序列

<400> 45  
 caggcttctc tacagcagtc tgggactgag ctggtgaggt ctggggcctc agtgaagatg 60  
 tcctgcaagg ctcttggtt cacaatttgc attacaata tgcactggat taagcagaca 120  
 cccggacagg gcctggaatg gattgggtat atttacctg gagatggtaa tgctaactac 180  
 aatcagcagt tcaagggcaa ggccacattg actgcagaca catectccaa cacagcctac 240  
 atgcagatca gcagcctgac atctgaagac tctgcgggtct atttctgtgc aagaggggac 300  
 ittgattacg acggagggtg ctactttgac tcctggggcc agggcacact agtgaccgtg 360  
 tccagcgcca gcaccaaggg ccccgagctg tccccctgg ccccgagcag caagagcacc 420  
 agcggcgcca cagccgccc gggtgcctg gtgaaggact actccccga accggtgacc 480  
 gtgtcctgga acagcggagc cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccgc cgtgctgcag 540  
 agcagcgccc tgtacagcct gacgagcgtg gtgaccgtgc ccagcagcag cctgggcacc 600  
 cagacctaca tctgtaacgt gaaccacaag ccagacaaca ccaaggtgga caagaagggtg 660  
 gagcccaaga gctgtgacaa gaccacacc tgccccccct gccctgcccc cgagctgctg 720  
 ggaggcccca gcgtgttcct gttccccccc aagcctaagg acacctgat gatcagcaga 780  
 acctccgagg tgacctgtgt ggtggtggat gtgagccacg aggacctga ggtgaagttc 840  
 aactggtagc tggacggcgt ggaggtgcac aatgccaaaga ccaagcccag ggaggagcag 900  
 tacaacagca cctaccgggt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ttggtgaac 960  
 ggcaaggagt acaagtgtaa ggtgtccaac aaggccctgc ctgccctat cgagaaaacc 1020  
 atcagcaagg ccaagggcca gccagagag cccaggtgt acacctgcc cctagcaga 1080  
 gatgagctga ccaagaacca ggtgtccctg acctgectgg tgaagggtt ctaccccagc 1140  
 [0020] gacatgcgag tggagtggga gagcaacggc cagcccgaga acaactacaa gaccacccc 1200  
 cctgtgtgag acagcgatgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagagc 1260  
 agatggcagc agggcaacgt gttcagctgc tccgtgatgc acgaggccct gcacaatcac 1320  
 tacaccaga agagcctgag cctgtccctt ggcaag 1356

<210> 46  
 <211> 642  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SAP-E VI嵌合体核苷酸序列

<400> 46  
 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60  
 atcacatgtc gagcaagtga gaatatltac agttatttag catggtatca gcagaaacag 120  
 ggaagatccc ctcagctcct ggtccataat gcaaaaacct tagcagaagg tgtgccatca 180  
 agggtcagtg gcagtggatc aggcacacac ttttctctga agatcaacgg cctgcagcct 240  
 gaagattttg ggaattatta ctgtcaacat cattatggtg ctccgctcac gttcgggtgct 300  
 gggaccaagc tggaactgaa acgtacgggtg gccgccccca gcgtgttcat cttccccccc 360  
 agcgatgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtgggtg gtctgttgaa caacttctac 420  
 ccccgaggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaatgccc tgcagagcgg caacagccag 480  
 gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540  
 ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgect gtgaggtgac ccaccagggc 600  
 ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gc 642

<210> 47  
 <211> 1347  
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SAP-K VH嵌合体核苷酸序列

<400> 47

```
cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctgataaagc ctggggcttc agtgaagttg 60
tcttgcaagg cttctggcta cactttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120
cctggacaag gccttgagtg gattggaatg attcatccta atagtgttaa tactaactac 180
aatgagaagt tcaagagtaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcaactca acagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagacggaat 300
gattactact ggtacttga tgtctggggc acagggacac tagtgaccgt gtccagcgcc 360
agcaccaagg gccccagcgt gtccccctg gccccagca gcaagagcac cagcggcggc 420
acagccgccc tgggctgcct ggtgaaggac tacttccccg aaccggtgac cgtgtcctgg 480
aacagcggag ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ccgtgctgca gagcagcggc 540
ctgtacagcc tgagcagcgl ggtgaccgtg cccagcagca gcctgggcac ccagacctac 600
atctgtaacg tgaaccacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaggt ggagcccaag 660
agctgtgaca agaccacac ctgccccccc tgccttgcct ccgagctgct gggaggcccc 720
agegtgttcc tgttcccccc caagcctaag gacaccctga tgatcagcag aacccccgag 780
gtgacctgtg tgggtggtgga tgtgagccac gaggaccctg aggtgaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca caatgccaa accaagccca gggaggagca gtacaacagc 900
acctaccggg tgggtgtcctg gctgaccgtg ctgcaccagg attggctgaa cggcaaggag 960
tacaagtgtg aggtgtccaa caaggccctg cctgccccta tcgagaaaac catcagcaag 1020
gccaagggcc agcccagaga gcccaggtg tacaccctgc cccctagcag agatgagctg 1080
accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggtc tctaccccag cgacalcgcc 1140
gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 1200
gacagcgatg gcagcttctt cctgtacagc aagctgaccg tggacaagag cagatggcag 1260
cagggeaacg tgttcagctg ctccgtgatg cacgaggccc tgcacaatca ctacaccag 1320
[0021] aagagcctga gcctgtcccc tggcaag 1347
```

<210> 48

<211> 642

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SAP-K VL嵌合体核苷酸序列

<400> 48

```
gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
gteacctgca aggccagtc gaatgtgaac tctaatgtag cctggtatca acagaaacca 120
gggcaatctc cttaaagcact gatttactcg gcttctacc ggtacagtgg agtcctgat 180
cgtttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccaccacaa tgtgcagctc 240
gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tgtacaact atccattcac gttcggctcg 300
gggacaaagt tggaaataaa acgtacggtg gccgcccaca gegtgttcat ctccccccc 360
agcgatgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gtctgctgaa caactctac 420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggt gacaatgcc tgcagagcgg caactgccag 480
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gccagcagc caccctgacc 540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac ccaccagggc 600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gc 642
```

<210> 49

<211> 294

<212> DNA

<213> 智人序列

<220>



<223> IGHV1-69人可变重链种系  
受体核苷酸序列

<400> 49

```
cagggtgcagc tgggtgcagtc tgggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg cacccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaga 294
```

<210> 50

<211> 285

<212> DNA

<213> 智人序列

<220>

<223> IGHV1-39人可变重链种系受体核苷酸序列

<400> 50

```
gacatecaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcattcagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agtlacagla ccccl 285
```

<210> 51

<211> 366

<212> DNA

[0022] <213> 人工序列

<220>

<223> SAP-E人源化的重链V区变体H0核苷酸序列，未经密码子优化

<400> 51

```
cagggtgcagc tgggtgcagtc tgggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg cacccttcagc acttacaata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatat atttatectg gagatggtaa tgctaaactac 180
aatcagcagt tcaagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggggac 300
ittgattacg acggagggtg ctactttgac tectggggcc agggcaccct ggtcaccgtc 360
tctca 366
```

<210> 52

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SAP-E人源化的轻链V区变体L0核苷酸序列，未经密码子优化

<400> 52

```
gacatecaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gagcaagtga gaatatattac agttatttag catggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataat gcaaaaacct tagcagaagg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacat cattatgggtg ctccgctcac gtttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321
```

## [0023]

<210> 53  
 <211> 366  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SAP-E人源化的重链V区变体H0核苷酸序列(经过密码子优化)

<400> 53  
 caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaagggtg 60  
 agctgcaagg ctagecggtt cacccttcgcc acctacaaca tgcactgggt caggcaggca 120  
 cccggccagg gcctggagtg gatgggctat atctaccccg gcgacggcaa cgccaactac 180  
 aaccagcagt tcaagggcag ggtgaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctac 240  
 atggaactga gcagcctgag gagecaggat accgccgtgt actactgcgc caggggacgac 300  
 ttcgactacg acggcggcta ctacttcgac agctggggac agggcacact agtgaccgtg 360  
 tccagc 366

<210> 54  
 <211> 366  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SAP-E人源化的重链V区变体H1核苷酸序列(经过密码子优化)

<400> 54  
 caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaagggtg 60  
 agctgcaagg ctagecggtt cacccttcgcc acctacaaca tgcactgggt caggcaggca 120  
 cccggccagg gcctggagtg gatgggctat atctaccccg gcgacggcaa cgccaactac 180  
 aaccagcagt tcaagggcag ggtgaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctac 240  
 atggaactga gcagcctgag gagecaggat accgccgtgt actactgcgc caggggacgac 300  
 ttcgactacg acggcggcta ctacttcgac agctggggac agggcacact agtgaccgtg 360  
 tccagc 366

<210> 55  
 <211> 366  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SAP-E人源化的重链V区变体H2核苷酸序列(经过密码子优化)

<400> 55  
 caggcgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaagggtg 60  
 agctgcaagg ctagecggtt cacccttcgcc acctacaaca tgcactgggt caggcaggca 120  
 cccggccagg gcctggagtg gatgggctat atctaccccg gcgacggcaa cgccaactac 180  
 aaccagcagt tcaagggcag ggtgaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctac 240  
 atggaactga gcagcctgag gagecaggat accgccgtgt actactgcgc caggggacgac 300  
 ttcgactacg acggcggcta ctacttcgac agctggggac agggcacact agtgaccgtg 360  
 tccagc 366

<210> 56  
 <211> 366  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-E人源化的重链V区变体H3核苷酸序列(经过密码子优化)

&lt;400&gt; 56

```

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaagggtg 60
agctgcaagg ctagegggtt caccctcgcc acctacaaca tgcactgggt caggcaggca 120
cccggccagg gcctggagtg gatcggtat atctaccccg gcgacggcaa cgccaactac 180
aaccagcagt tcaagggcag ggcaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgag gagcgaggat accgccgtgt actactgcgc caggggcgac 300
ltcgactacg acggcggtta ctacttcgac agctggggac agggcacact agtgaccgtg 360
tccagc

```

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 366

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-E人源化的重链V区变体H4核苷酸序列(经过密码子优化)

&lt;400&gt; 57

```

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaagggtg 60
agctgcaagg ctagegggtt caccctcgcc acctacaaca tgcactgggt caggcaggca 120
cccggccagg gcctggagtg gatcggtat atctaccccg gcgacggcaa cgccaactac 180
aaccagcagt tcaagggcag ggcaccctg accgccgaca ccagcaccag caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgag gagcgaggat accgccgtgt acttctgcgc caggggcgac 300
ltcgactacg acggcggtta ctacttcgac agctggggac agggcacact agtgaccgtg 360
tccagc

```

[0024]

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-E人源化的轻链V区变体L0核苷酸序列(经过密码子优化)

&lt;400&gt; 58

```

gacatccaga tgaccagag cccagctca ctgagcgcca gcgtgggcga cagggtgacc 60
attacctgca gggcctccga gaacatctac agctacctgg cctggtacca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaac gccaaagccc tcgccgaggg cgtccctagc 180
aggttctctg gaagcggcag cggcaccgac ttaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacctatta ctgccagcac cactacggcg cccccctgac ctttgccag 300
ggcaccaaac tggagatcaa g

```

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-E人源化的轻链V区变体L1核苷酸序列(经过密码子优化)

&lt;400&gt; 59

```

gacatccaga tgaccagag cccagctca ctgagcgcca gcgtgggcga cagggtgacc 60
attacctgca gggcctccga gaacatctac agctacctgg cctggtacca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatccacaac gccaaagccc tcgccgaggg cgtccctagc 180

```

```

aggtttctctg gaagcggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatacagcag cctgcagccc 240
gaggacttctg ccacctatta ctgccagcac cactacggcg cccccctgac ctttggccag 300
ggcaccaaac tggagatcaa g                                     321

```

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-E人源化的轻链V区变体L2核苷酸序列(经过密码子优化)

&lt;400&gt; 60

```

gacatccaga tgacccagag ccccagctca ctgagcgcca gcgtgggcga cagggtgacc 60
attacctgea gggcctccga gaacatctac agctacctgg cctggtacca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct ggtgcacaac gccaaagacc tcgccgaggg cgtccctagc 180
aggtttctctg gaagcggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatacagcag cctgcagccc 240
gaggacttctg ccacctatta ctgccagcac cactacggcg cccccctgac ctttggccag 300
ggcaccaaac tggagatcaa g                                     321

```

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 1356

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-E人源化的重链H1完全成熟的核苷酸序列(经过密码子优化)

[0025] &lt;400&gt; 61

```

cagggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaagggtg 60
agctgcaagg ctacgagggtt cacttctgcc acctacaaca tgactgggt caggcaggca 120
cccggccagg gcctggagtg gatgggctat atctaccccg gcgacggcaa cgccaactac 180
aaccagcagt tcaagggcag ggtgaccatc accgcccaga agagcaccag caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgag gacgaggat accgccgtgt actactgcgc caggggagac 300
ttcgactacg acggcggcta ctacttcgac agctggggac agggcacact agtgaccgtg 360
tccagcgcca gcaccaaggg cccagcgtg tccccctgg cccccagcag caagagcacc 420
agcggcgcca cagccgccct gggtgcctg gtgaaggact acttccccga accggtgacc 480
gtgtcctgga acagcggagc cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccgc cgtgctgcag 540
agcagcggcc tgtacagcct gacagcgtg gtgaccgtgc ccagcagcag cctgggcacc 600
cagacctaca tctgtaacgt gaaccacaag ccagcaaca ccaagggtga caagaagggtg 660
gagcccaaga gctgtgacaa gaccacacc tgcacctcc cccctgcccc cgagctgctg 720
ggaggcccca gctgttctt gtccccccc aagcctaagg acacctgat gatcagcaga 780
acccccgagg tgacctgtgt ggtggtggat gtgagccacg aggacctga ggtgaagttc 840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aatgccaa ccaagcccag ggaggagcag 900
tacaacagca cctaccgggt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ttggtgaac 960
ggcaaggagt acaagtgtaa ggtgtccaac aaggccctgc ctgccccat cgagaaaacc 1020
atcagcaagg ccaagggcca gccagagag cccaggtgt acacctgcc ccctagcaga 1080
gatgagctga ccaagaacca ggtgtccctg acctgcctgg tgaagggtt ctacccccagc 1140
gacatgcgag tggagtggga gagcaacggc cagcccaga acaactacaa gaccaccccc 1200
cctgtgctgg acagcgtgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagagc 1260
agatggcagc agggcaacgt gtacagctgc tccgtgatgc acgagccct gcacaatcac 1320
tacaccagca agagcctgag cctgtccctt ggcaag                                     1356

```

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 444

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

$\langle 220 \rangle$ 

<223> SAP-E人源化的重链H1完全成熟的氨基酸序列

&lt;400&gt; 62

|        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|        | Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ser |
|        | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
|        | Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ala | Thr | Tyr |
|        |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
|        | Asn | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Met |
|        |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
|        | Gly | Tyr | Ile | Tyr | Pro | Gly | Asp | Gly | Asn | Ala | Asn | Tyr | Asn | Gln | Gln | Phe |
|        |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
|        | Lys | Gly | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Ala | Asp | Lys | Ser | Thr | Ser | Thr | Ala | Tyr |
|        | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
|        | Met | Glu | Leu | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
|        |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
|        | Arg | Asp | Phe | Asp | Tyr | Asp | Gly | Gly | Tyr | Tyr | Phe | Asp | Ser | Trp | Gly | Gln |
|        |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
|        | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val |
|        |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
|        | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala |
|        |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
|        | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser |
|        | 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
|        | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val |
|        |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
|        | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser |
|        |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| [0026] | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser |
|        |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |
|        | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr |
|        |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
|        | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser |
|        | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
|        | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg |
|        |     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
|        | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro |
|        |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
|        | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala |
|        |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |     |
|        | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Tyr | Val | Val | Ser | Val |
|        |     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
|        | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys |
|        | 305 |     |     |     | 310 |     |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
|        | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser |
|        |     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
|        | Lys | Ala | Lys |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
                     420                    425                    430  
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
                     435                    440

<210> 63  
 <211> 642  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SAP-E人源化的轻链L1完全成熟的核苷酸序列(经过密码子优化)

<400> 63  
 gacatccaga tgacccagag cccagctca ctgagcgcca gegtgggcga cagggtgacc 60  
 attacctgca gggectccga gaacatctac agctacctgg cctggtacca gcagaagccc 120  
 ggcaagggccc ccaagctgct gatccacaac gccaaagacc tcgccgaggg cgteccctagc 180  
 aggttctctg gaageggcag cggcaccgac ttccacctga ccaccagcag cctgcagccc 240  
 gaggacttcc ccacctatta ctgccagcac cactacggcg cccccctgac ctttggccag 300  
 ggcaccaaac tggagateaa gegtacgggtg gccgccccca gegtgttcat ctteccccc 360  
 agegatgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gtctgttgaa caacttctac 420  
 ccccgaggagg ccaaggtgca gtggaagggt gacaatgccc tgcagagcgg caacagccag 480  
 gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540  
 ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac ccaccagggc 600  
 ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gc 642

[0027] <210> 64  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SAP-E人源化的轻链L1完全成熟的氨基酸序列

<400> 64  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
   1                    5                    10                    15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr  
                     20                    25                    30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                     35                    40                    45  
 His Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                     50                    55                    60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
   65                    70                    75                    80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ala Pro Leu  
                     85                    90                    95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
                     100                    105                    110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
                     115                    120                    125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
                     130                    135                    140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
   145                    150                    155                    160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 65.

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SAP-K人源化的重链V区变体H0核苷酸序列, 未经密码子优化

<400> 65

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60  
 tcttgcaagg cttctggagg caccttcagc agctactgga tgcactgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg attcatccta atagtgttaa tactaactac 180  
 aatgagaagt tcaagagtag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240  
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac accggcgtgt attactgtgc gagacggaat 300  
 gattactact ggtacttcga tgtctggggc cagggcaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 66

<211> 321

[0028] <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SAP-K人源化的轻链V区变体L0核苷酸序列, 未经密码子优化

<400> 66

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgca aggccagtc gaattgtgaac tctaatgtag cctggatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcc cttctattcg gcttctacc ggtacagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcagcaa tgtaacaact atccattcac gtttggccag 300  
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 67

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SAP-K人源化的重链V区变体H0核苷酸序列(经过密码子优化)

<400> 67

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgaa gtgaagaagc ccggcagcag cgtgaaagtg 60  
 agctgcaagg ccagcggcgg aaccttcagc agctactgga tgcactgggt gaggcaggca 120  
 cccggccagg gcctggagtg gatgggcatg atccaccca acagcgtgaa caccaactac 180  
 aacgagaagt tcaagagcag agtgaccatc accgcggaca agagcaccag caccgcctat 240  
 atggagctga gctctctgag gagcaggat accgcgtgt actactgcgc caggaggaac 300  
 gactactact ggtacttcga cgtctggggc cagggcacac tagtgaccgt gtccagc 357

[0029]

<210> 68  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SAP-K人源化的重链V区变体H1核苷酸序列(经过密码子优化)

<400> 68  
 caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgaa gtgaagaagc ccggcagcag cgtgaaagtg 60  
 agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaggcaggca 120  
 cccggccagg gcctggagtg gatgggcatg atccaccca acagcgtgaa caccaactac 180  
 aacgagaagt tcaagagcag agtgaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctat 240  
 atggagctga gctctctgag gagecaggat accgccgtgt actactgcgc caggaggaac 300  
 gactactact ggtacttcga cgtctggggc cagggcacac tagtgaccgt gtccagc 357

<210> 69  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SAP-K人源化的重链V区变体H2核苷酸序列(经过密码子优化)

<400> 69  
 caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgaa gtgaagaagc ccggcagcag cgtgaaagtg 60  
 agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaggcaggca 120  
 cccggccagg gcctggagtg gatcggcatt atccaccca acagcgtgaa caccaactac 180  
 aacgagaagt tcaagagcag agccaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctat 240  
 atggagctga gctctctgag gagecaggat accgccgtgt actactgcgc caggaggaac 300  
 gactactact ggtacttcga cgtctggggc cagggcacac tagtgaccgt gtccagc 357

<210> 70  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SAP-K人源化的重链V区变体H3核苷酸序列(经过密码子优化)

<400> 70  
 caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgaa gtgaagaagc ccggcagcag cgtgaaagtg 60  
 agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaggcaggca 120  
 cccggccagg gcctggagtg gatcggcatt atccaccca acagcgtgaa caccaactac 180  
 aacgagaagt tcaagagcag agccaccctg accgtggaca agagcaccag caccgcctat 240  
 atggagctga gctctctgag gagecaggat accgccgtgt actactgcgc caggaggaac 300  
 gactactact ggtacttcga cgtctggggc cagggcacac tagtgaccgt gtccagc 357

<210> 71  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> SAP-K人源化的轻链V区变体L0核苷酸序列(经过密码子优化)



<400> 71  
gacatccaga tgacccagag cccctcttca ctgagcgcta gcgtgggcga cagggtgacc 60  
atcacctgca aggccagcca gaacgtgaac agcaacgtgg cctggtacca gcagaagccc 120  
ggcaaagccc ccaagtcct gatctacagc gccagctaca gatatagcgg cgtgcctagc 180  
aggttttagcg gcagcggaag cgggaccgat ttcacctga ccatcagcag cctgcagccc 240  
gaggacttcg ccacttacta ctgccagcag tgcaacaact accccttcac cttcggccag 300  
ggcaccaagc tggagatcaa g 321

<210> 72  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> SAP-K人源化的轻链V区变体L1核苷酸序列(经过密码子优化)

<400> 72  
gacatccaga tgacccagag cccctcttca ctgagcgcta gcgtgggcga cagggtgacc 60  
atcacctgca aggccagcca gaacgtgaac agcaacgtgg cctggtacca gcagaagccc 120  
ggcaaagccc ccaagtcct gatctacagc gccagctaca gatatagcgg cgtgcctagc 180  
aggttttagcg gcagcggaag cgggaccgat ttcacctga ccatcagcag cctgcagccc 240  
gaggacttcg ccacttacta ctgccagcag tgcaacaact accccttcac cttcggccag 300  
ggcaccaagc tggagatcaa g 321

<210> 73  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> 人工序列

[0030]

<220>  
<223> SAP-K人源化的轻链V区变体L091A核苷酸序列(经过密码子优化)

<400> 73  
gacatccaga tgacccagag cccctcttca ctgagcgcta gcgtgggcga cagggtgacc 60  
atcacctgca aggccagcca gaacgtgaac agcaacgtgg cctggtacca gcagaagccc 120  
ggcaaagccc ccaagtcct gatctacagc gccagctaca gatatagcgg cgtgcctagc 180  
aggttttagcg gcagcggaag cgggaccgat ttcacctga ccatcagcag cctgcagccc 240  
gaggacttcg ccacttacta ctgccagcag gcaacaact accccttcac cttcggccag 300  
ggcaccaagc tggagatcaa g 321

<210> 74  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> SAP-K人源化的轻链V区变体L091A氨基酸序列

<400> 74  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asn Ser Asn  
20 25 30  
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45  
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Leu | Gln | Pro |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Glu | Asp | Phe | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln | Ala | Asn | Asn | Tyr | Pro | Phe |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr | Phe | Gly | Gln | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 1347

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-K人源化的H3重链核苷酸序列(经过密码子优化)

&lt;400&gt; 75

[0031]

|            |            |            |            |            |             |      |
|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------|
| caggtgcagc | tggtgcagag | cggcgccgaa | gtgaagaagc | ccggcagcag | cgtgaaagtg  | 60   |
| agctgcaagg | ccagcggcta | caccttcacc | agctactgga | tgcactgggt | gaggcaggca  | 120  |
| cccggccagg | gcttgagtg  | gacggcatg  | atccaccca  | acagcgtgaa | caccaactac  | 180  |
| aacgagaagt | tcaagagcag | agccaccctg | accgtggaca | agagcaccag | caccgcctat  | 240  |
| atggagctga | gctctctgag | gagcgaggat | accgcccgtg | actactgcgc | caggaggaaac | 300  |
| gactactact | ggtacttcga | cgtctggggc | cagggcacac | tagtgaccgt | gtccagcgcc  | 360  |
| agcaccaagg | gccccagcgt | gttccccctg | gccccagca  | gcaagagcac | cagcggcggc  | 420  |
| acagccgccc | tgggctgcct | ggtgaaggac | tacttccccg | aaccggtgac | cgtgtccctgg | 480  |
| aacagcggag | ccctgaccag | cggcgtgcac | accttccccg | ccgtgctgca | gagcagcggc  | 540  |
| ctgtacagcc | tgagcagcgt | ggtgaccgtg | cccagcagca | gcctgggcac | ccagacctac  | 600  |
| atctgtaacg | tgaaccacaa | gcccagcaac | accaaggtgg | acaagaaggt | ggagcccaag  | 660  |
| agctgtgaca | agaccacac  | ctgccccccc | tgccctgccc | ccgagctgct | gggaggcccc  | 720  |
| agcgtgttcc | tgttcccccc | caagcctaag | gacaccctga | tgatcagcag | aacccccgag  | 780  |
| gtgacctgtg | tggtggtgga | tgtgagccac | gaggaccctg | aggtgaagtt | caactggtac  | 840  |
| gtggacggcg | tggaggtgca | caatgccaa  | accaagccca | gggaggagca | gtacaacagc  | 900  |
| acctaccggg | tggtgtccgt | gctgaccgtg | ctgcaccagg | attggctgaa | cggcaaggag  | 960  |
| tacaagtgtg | aggtgtccaa | caaggccctg | cctgccccct | lcgagaaaac | catcagcaag  | 1020 |
| gccaaaggcc | agcccagaga | gccccagggt | tacaccctgc | cccctagcag | agatgagctg  | 1080 |
| accaagaacc | aggtgtccct | gacctgcctg | gtgaagggtg | tctaccccag | cgacatcgcc  | 1140 |
| gtggagtggg | agagcaacgg | ccagcccag  | aacaactaca | agaccacccc | ccctgtgctg  | 1200 |
| gacagcgatg | gcagcttctt | cctgtacagc | aagctgaccg | tggacaagag | cagatggcag  | 1260 |
| cagggcaacg | tgttcagctg | ctccgtgatg | cacgaggccc | tgcacaatca | ctacaccag   | 1320 |
| aagagcctga | gcctgtcccc | tgccaag    |            |            |             | 1347 |

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 443

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SAP-K人源化的H3重链氨基酸序列

&lt;400&gt; 76

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ser |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Ser | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Trp | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Gly | Met | Ile | His | Pro | Asn | Ser | Val | Asn | Thr | Asn | Tyr | Asn | Glu | Lys | Phe |

[ 0032 ]

 $\langle 220 \rangle$

## &lt;223&gt; SAP-K人源化的L0轻链核苷酸序列(经过密码子优化)

&lt;400&gt; 77

```

gacatccaga tgacccagag cccctcttca ctgagcgcta gcgtgggcga cagggtgacc 60
atcacctgea aggccagcca gaacgtgaac agcaacgtgg cctggtagca gcagaagccc 120
ggcaaagccc ccaagctcct gatctacagc gccagctaca gatatagcgg cgtgcctagc 180
aggtttagcg gcagcggaag cgggaccgat ttcacctga ccatcagcag cctgcagccc 240
gaggactteg ccacttacta ctgccagcag tgcaacaact accccttcac cttcggccag 300
ggcaccaage tggagatcaa gcgtacgggtg gccgccccca gcgtgttcat cttccccccc 360
agcgatgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gtctgtgtaa caacttctac 420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaatgccc tgcagagcgg caacagccag 480
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgagggtac ccaccagggc 600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gc 642

```

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 214

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

## &lt;223&gt; SAP-K人源化的L0轻链氨基酸序列

&lt;400&gt; 78

```

[0033] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
        1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asn Ser Asn
        20           25           30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35           40           45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
        50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
        65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Cys Asn Asn Tyr Pro Phe
        85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
        100          105          110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115          120          125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
        130          135          140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
        145          150          155          160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
        165          170          175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
        180          185          190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195          200          205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
        210

```

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

<213> 小家鼠

<220>

<223> 免疫球蛋白链的信号序列

[0034]

<400> 79

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1

5

10

15

Val His Ser

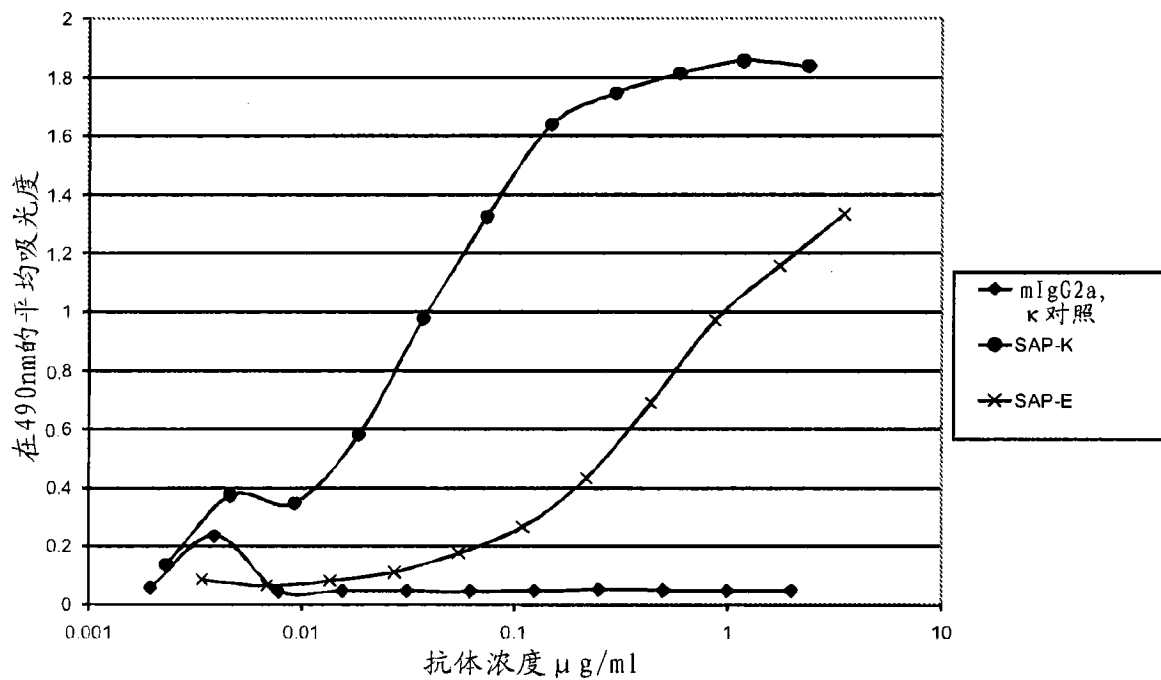


图1

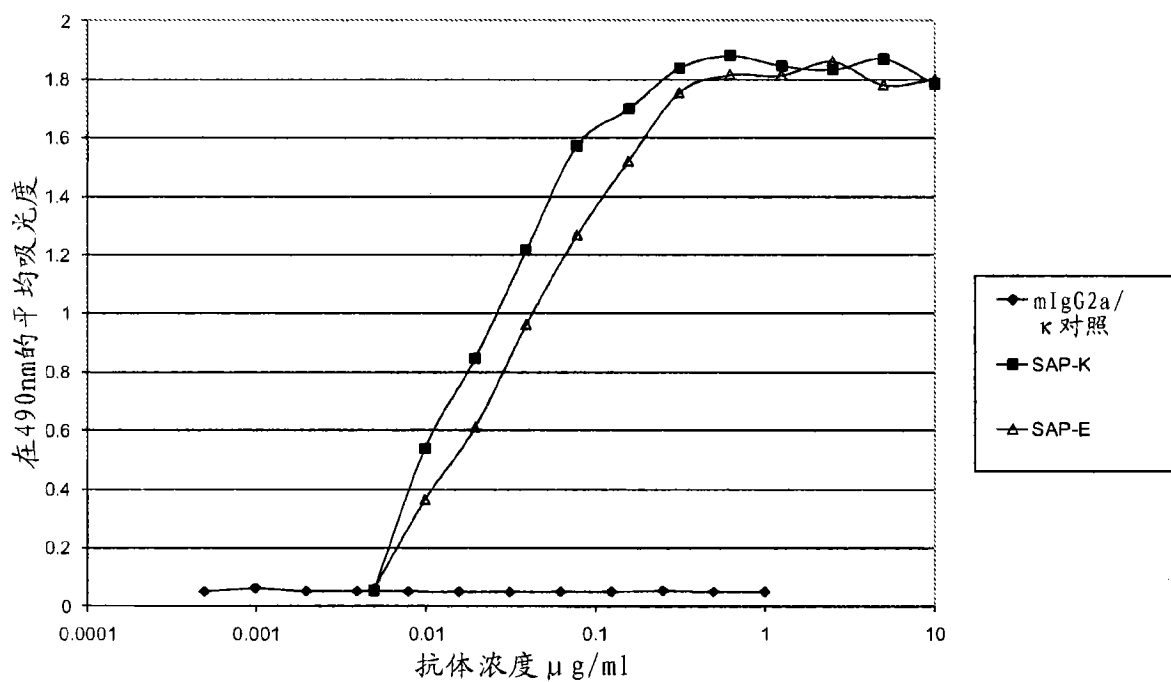


图2

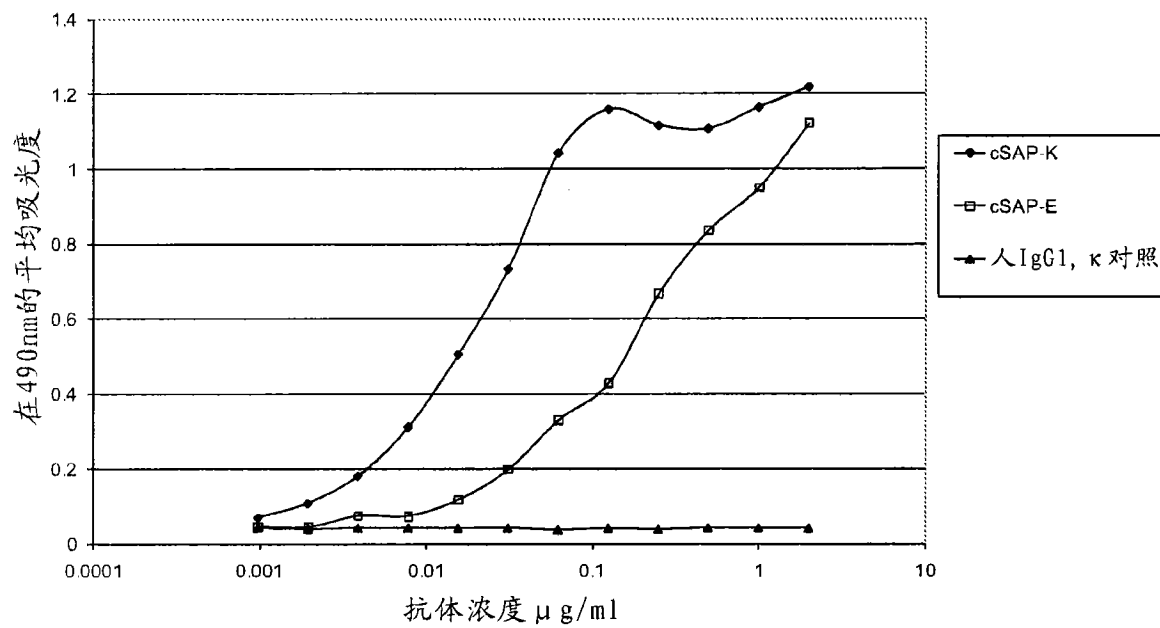


图3

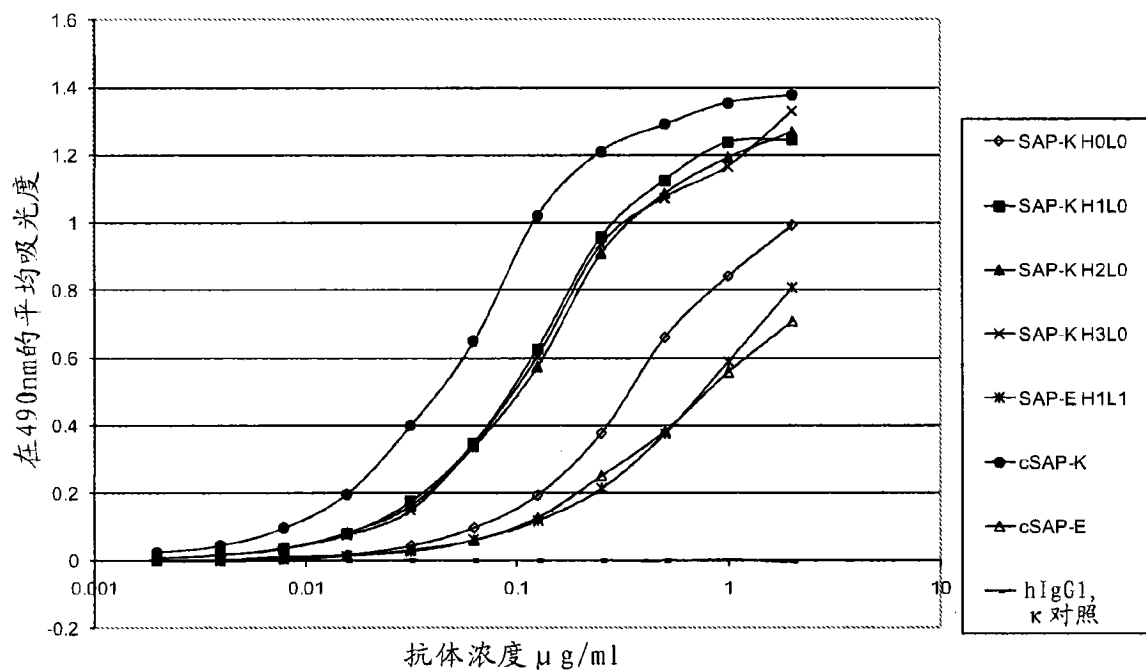


图4

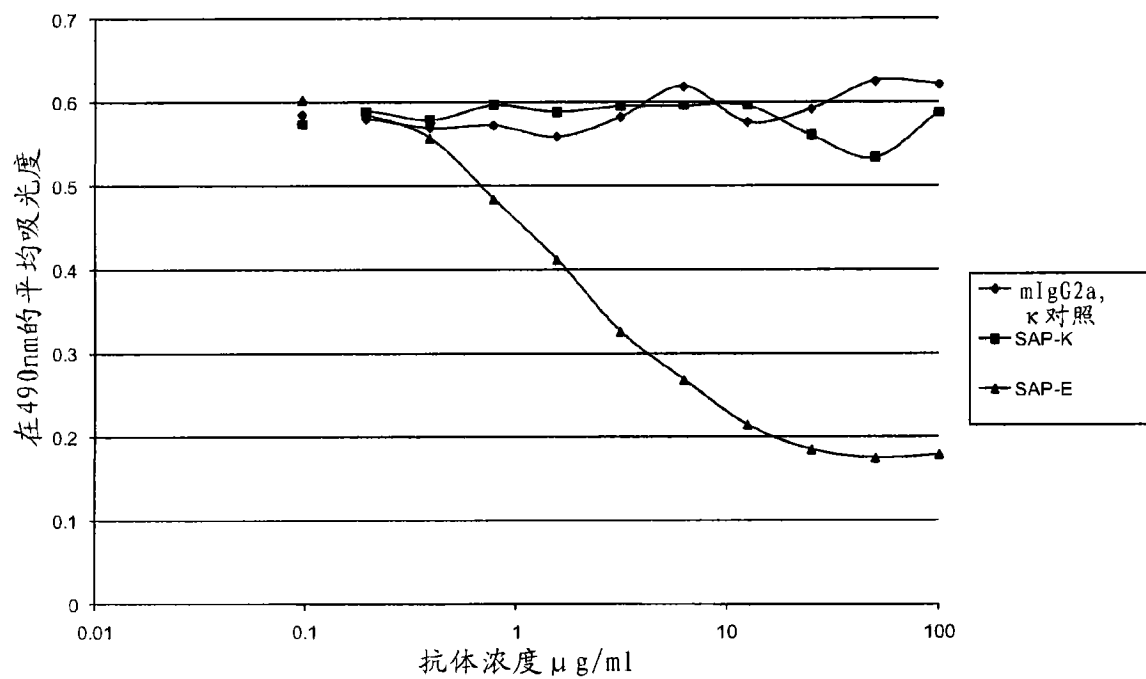


图5

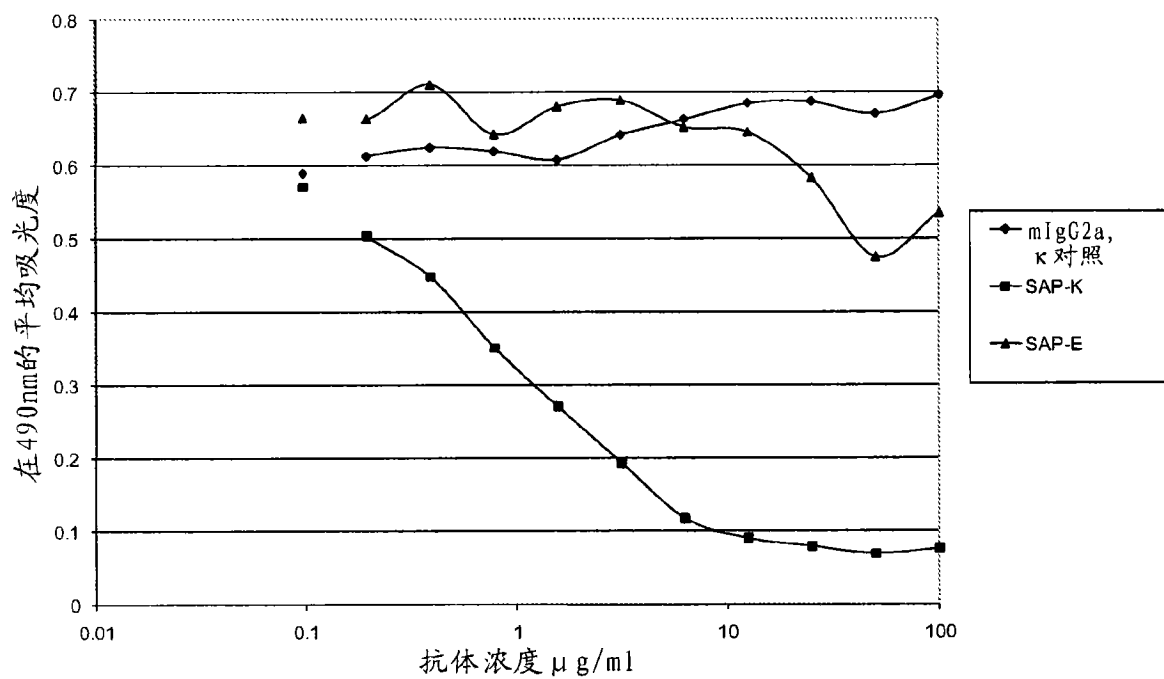


图6



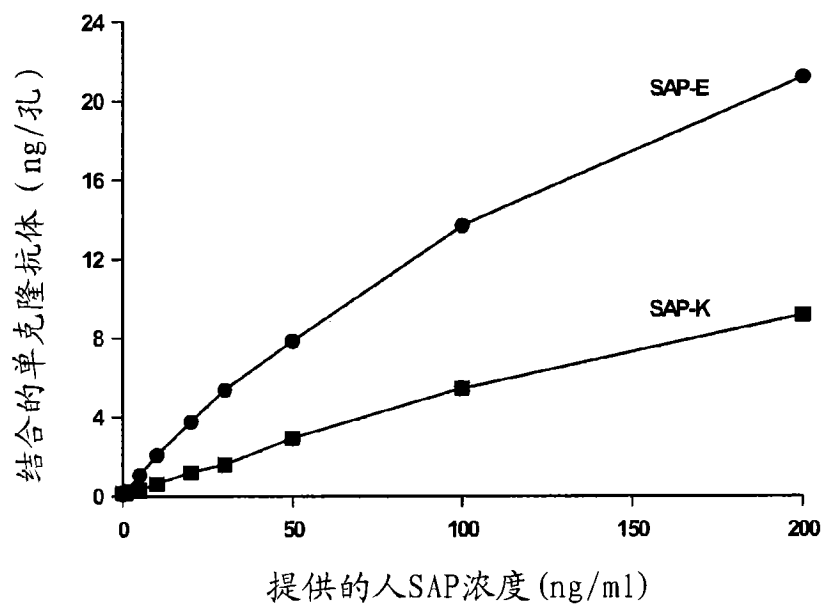


图7

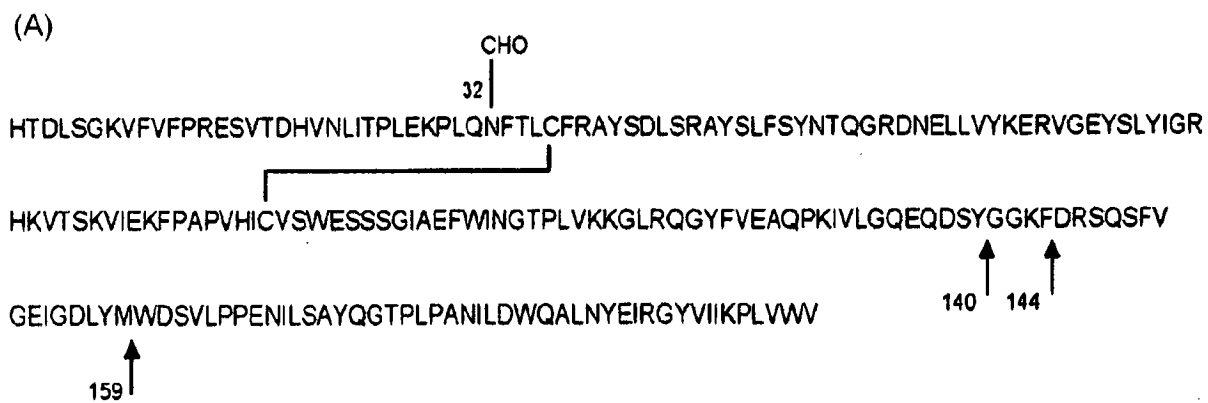
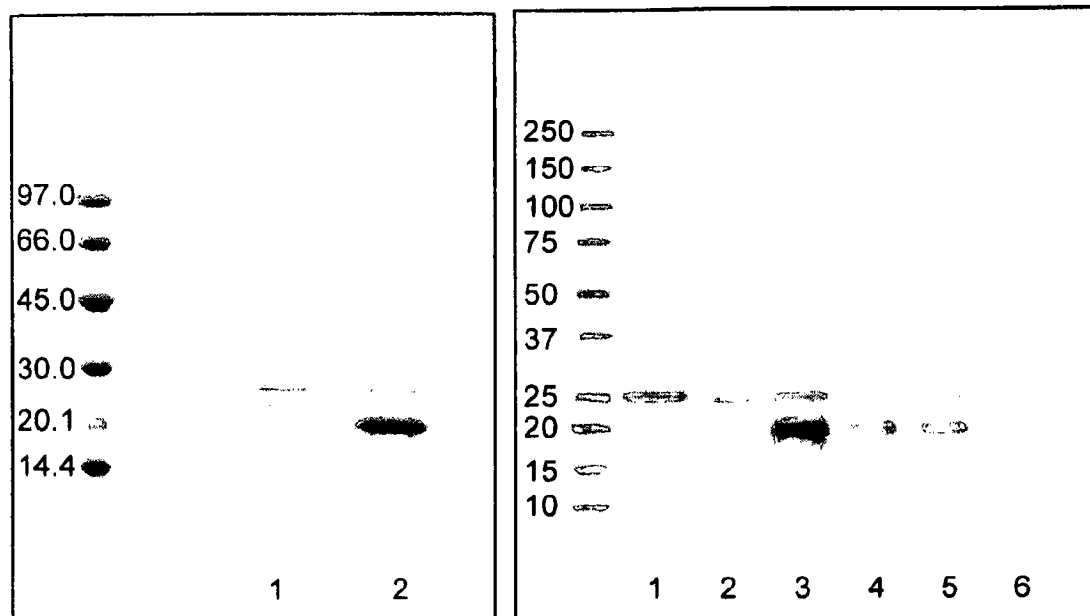


图8

(B)



(C)

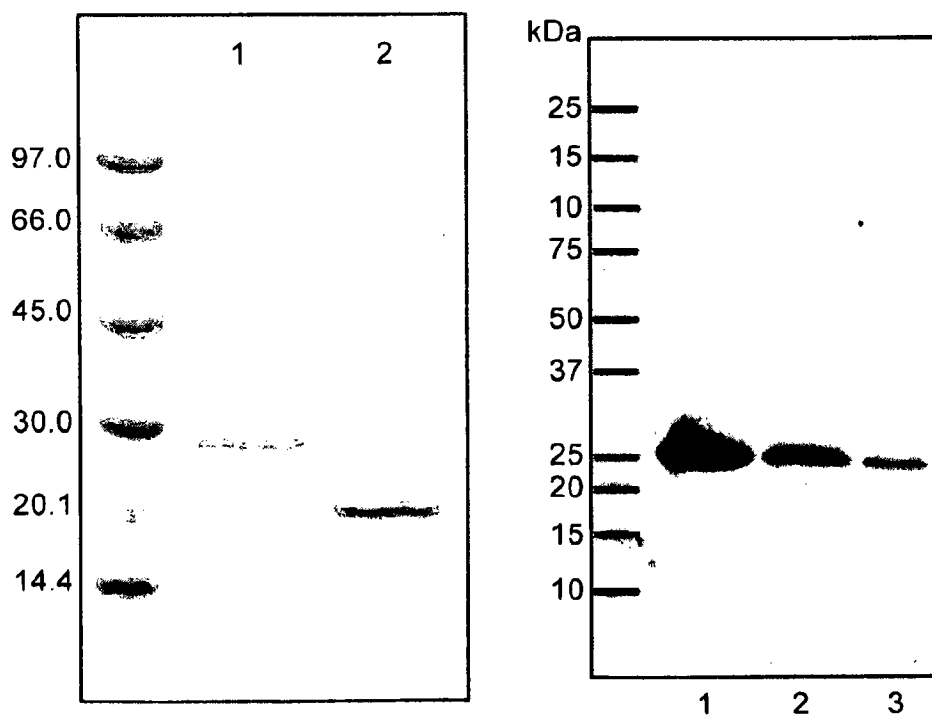


图8续

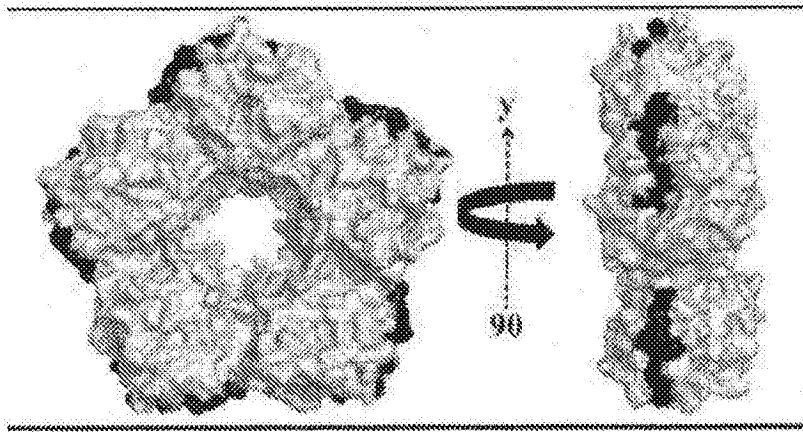
(D)

136 140 147  
h EQDSYGGKFD RS  
m EQDNYGGGFQ RS



图8续

(A)



(B)

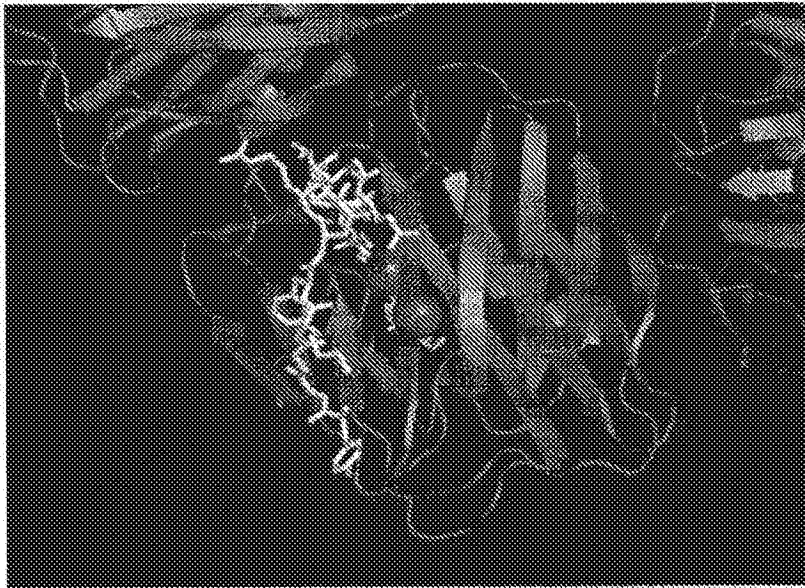


图9

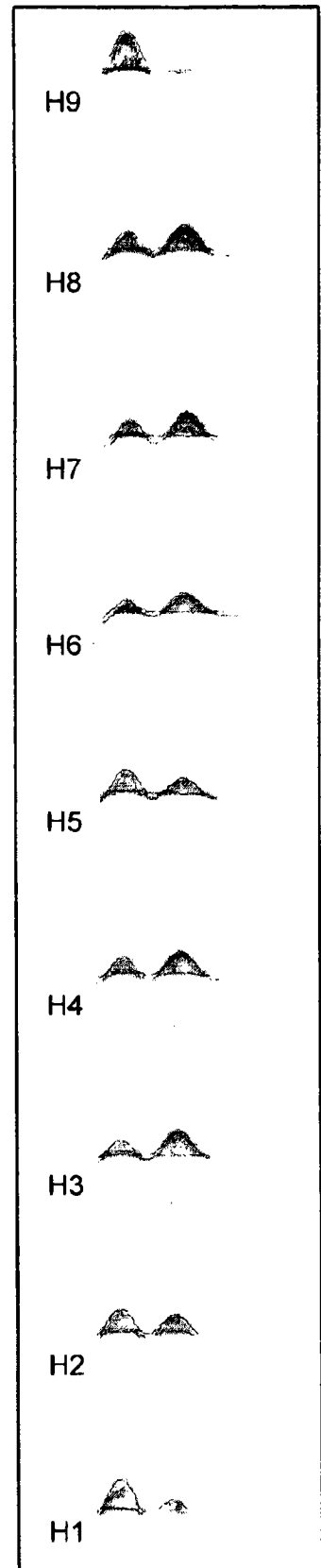


图10

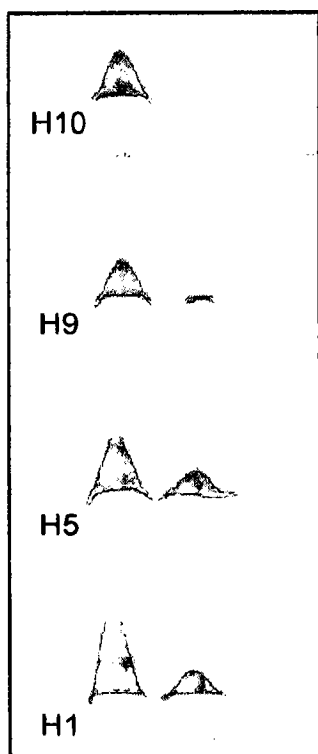
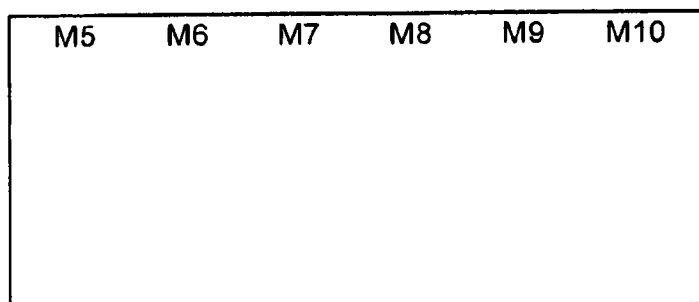


图11

(A)

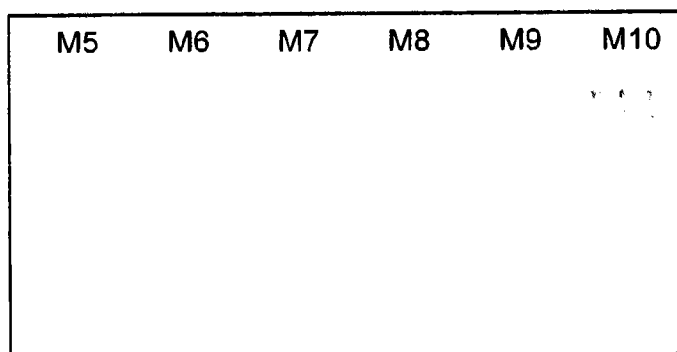
-ve



+ve

(B) 用1:5000的抗-小鼠C3探测的免疫印迹

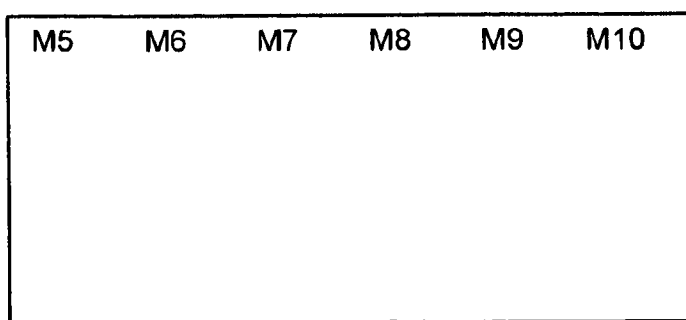
-ve



+ve

(C) 用1:10000的抗-小鼠C3探测的免疫印迹

-ve



+ve

图12