



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 112930356 B

(45) 授权公告日 2025. 03. 21

(21) 申请号 201980070130.3
(22) 申请日 2019.08.20
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112930356 A

(43) 申请公布日 2021.06.08

(30) 优先权数据
1813597.0 2018.08.21 GB
1900983.6 2019.01.24 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.04.21

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/072302 2019.08.20

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/038963 EN 2020.02.27

(73) 专利权人 奇特里尔私人有限公司
地址 荷兰奥斯

(72) 发明人 约瑟夫·玛丽亚·亨德里克·拉茨
雷纳托·赫拉尔杜斯·西尔瓦诺·
奇里维
约翰内斯·威廉姆斯·赫拉尔杜
斯·范罗斯马伦

(74) 专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理
有限公司 11205
专利代理师 李璐 臧建明

(51) Int.Cl.
C07K 16/18 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 117396221 A, 2024.01.12
审查员 解晓芬

权利要求书2页 说明书36页
序列表20页 附图20页

(54) 发明名称
与瓜氨酸化的组蛋白2A和/或4结合的抗体

(57) 摘要
本发明提供了针对含瓜氨酸表位的抗体或其结合片段。本发明所述的抗体或其结合片段可用于治疗,例如用于治疗或预防中性粒细胞胞外陷阱 (NET) 相关的病理。

1. 一种特异性结合至脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

- a) SEQ ID NO:9 (QSLLDADGKTY) 的VL CDR1;和
- b) SEQ ID NO:1 (GYTFTNYG) 的VH CDR1, SEQ ID NO:2 (INTYSGEA) 的VH CDR2, SEQ ID NO:3 (LRGYTYQS FDEGGDY) 的VH CDR3, SEQ ID NO:4 (LVS) 的VL CDR2以及SEQ ID NO:5 (WQGTHTFPYT) 的VL CDR3。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

- a) SEQ ID NO:9的VL CDR1;
- b) SEQ ID NO:4的VL CDR2和SEQ ID NO:5的VL CDR3;和
- c) SEQ ID NO:11或12的重链可变域氨基酸序列。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

- a) SEQ ID NO:11的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:16的轻链可变域氨基酸序列;或
- b) SEQ ID NO:12的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:16的轻链可变域氨基酸序列。

4. 根据权利要求1所述的特异性结合至脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括以下CDR:

- a) 存在于SEQ ID NO:16中的CDR1;和
- b) SEQ ID NO:11或12的重链可变域氨基酸序列。

5. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特异性结合至选自由SEQ ID NO:18和20所构成的组的肽,并与脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4结合。

6. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其以至少1nM或更小的亲和力特异性结合至脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位。

7. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其选自由重组抗体、单链抗体、单链可变片段(scFv)、可变片段(Fv)和片段抗原结合区(Fab)所构成的组。

8. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段是全长抗体。

9. 根据权利要求8所述的抗体或其抗原结合片段,其包括Fc区。

10. 根据权利要求9所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述Fc区是IgG1区。

11. 根据权利要求9所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述Fc区是IgG2区。

12. 根据权利要求9所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述Fc区是IgG3区。

13. 根据权利要求9所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述Fc区是IgG4区。

14. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包括重链恒定区和/或轻链恒定区,所述重链恒定区包括SEQ ID NO:23或56,所述轻链恒定区包括SEQ ID NO:24。

15. 根据权利要求14所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包括SEQ ID NO:11的重链可变域氨基酸序列、SEQ ID NO:16的轻链可变域氨基酸序列、SEQ ID NO:23或56的重链恒定区氨基酸序列以及SEQ ID NO:24的轻链恒定区氨基酸序列。

16. 一种编码权利要求1-15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸, 一种包括所述多核苷酸的克隆或表达载体, 或一种包括所述克隆或表达载体的宿主细胞。

17. 一种生产特异性结合至脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位的抗体或其抗原结合片段的方法, 包括培养表达权利要求1-15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的宿主细胞, 并从所述细胞中分离所述抗体或其抗原结合片段。

18. 一种药物组合物, 其包括权利要求1-15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段和至少一种药学上可接受的稀释剂或载体。

19. 根据权利要求18所述的药物组合物, 其还包括另一活性成分。

20. 根据权利要求1-15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 或根据权利要求18或19所述的药物组合物, 在制造用于治疗或预防类风湿性关节炎的药物中的用途。

21. 根据权利要求20所述的用途, 其中所述药物被配制成通过肠胃外给药途径或通过另一种给药途径而给药。

22. 根据权利要求21所述的用途, 其中所述肠胃外给药途径是静脉内、皮下、眼内、肌肉内、皮内、腹膜内、脊柱途径或者通过注射或输注。

23. 根据权利要求21所述的用途, 其中所述另一种给药途径是直肠、口服、眼睛、表皮、粘膜、局部、通过腔内输注、囊内给药、或通过吸入。

24. 根据权利要求23所述的用途, 其中所述局部途径是肿瘤切除的边缘、病灶内、病灶周围、肿瘤周围、肿瘤旁或肿瘤内。

与瓜氨酸化的组蛋白2A和/或4结合的抗体

技术领域

[0001] 本发明提供了针对含瓜氨酸表位的抗体或其结合片段。本发明的抗体或其结合片段可用于治疗,例如用于治疗或预防与中性粒细胞胞外陷阱 (Neutrophil Extracellular Trap, NET) 相关的病理。本发明的抗体或其结合片段可用于治疗或预防NET相关病理,例如系统性红斑狼疮 (SLE)、狼疮、败血症、血管炎、炎性关节炎、类风湿关节炎和骨关节炎、牛皮癣、阿尔茨海默氏病、自身免疫性肝炎、幼年特发性关节炎、干燥病、抗磷脂综合征、白塞氏病、脊椎炎、脊椎关节病、多系统萎缩、帕金森氏病、路易体痴呆哮喘、过敏性鼻炎加重哮喘、过敏性鼻炎、囊性纤维化、纤维化和特发性肺纤维化、干眼病、葡萄膜炎、非肉芽肿性葡萄膜炎、肉芽肿性葡萄膜炎、皮炎、特应性皮炎、COPD、支气管炎或其他与NET相关的病理,例如在糖尿病、癌症、癌症转移以及移植器官健康中的体内或体外伤口愈合。本发明还提供了用于治疗或预防与NET相关的病理的药物组合物和方法,所述与NET相关的病理例如SLE、狼疮、败血症、血管炎、炎性关节炎、类风湿性关节炎和骨关节炎、牛皮癣、阿尔茨海默氏病、自身免疫性肝炎、幼年特发性关节炎、干燥病、抗磷脂综合征、白塞氏病、脊椎炎、脊椎关节病、多系统萎缩、帕金森氏病、路易体痴呆哮喘、过敏性鼻炎加重哮喘、过敏性鼻炎、囊性纤维化、纤维化和特发性肺纤维化、干眼病、葡萄膜炎、非肉芽肿性葡萄膜炎、肉芽肿性葡萄膜炎、皮炎、特应性皮炎、COPD、支气管炎或其他与NET相关的病理,例如在糖尿病、癌症、癌症转移以及体内或体外移植器官健康中的伤口愈合。

背景技术

[0002] 无论是慢性的还是急性的炎症症状,在医疗保健行业中都是一个重大问题。简而言之,慢性炎症被认为是持续时间长(数周或数月)的炎症,其中活跃性炎症、组织破坏和愈合尝试同时进行。尽管慢性炎症可以继发于急性炎症发作,但它也可以是作为隐性过程而开始,随着时间推移而发展,例如由于持续感染(例如,肺结核、梅毒、真菌感染)导致迟发性超敏反应,长时间暴露于内源性(例如,血脂升高)或外源性(例如,二氧化硅、石棉、香烟焦油、手术缝合线)毒素、或针对人体自身组织的自身免疫反应(例如,类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、血管炎、多发性硬化、牛皮癣)。

[0003] 炎症的结果之一是中性粒细胞胞外陷阱 (NET) 的形成。已知NET也可引起炎症。NET是包含DNA和组蛋白的结构,所述组蛋白由中性粒细胞产生,并且是宿主对抗病原体的防御机制的一部分。它们可以捕获和杀死各种细菌、真菌、病毒和原生动物病原体,并且它们的释放是抵抗病原体的第一道防线之一。在被微生物或细胞因子激活后,组蛋白变得超瓜氨酸化 (hypercitrullinated),中性粒细胞的细胞核经历了染色质解凝的过程,该过程导致通过NETosis(中性粒细胞网捕死亡,这是中性粒细胞死亡的一种形式)形成NET。

[0004] NET在多种疾病中起病理作用,例如通过引起异常炎症。因此,NET参与了各种炎性病症的病理,例如系统性红斑狼疮 (SLE)、狼疮、败血症、血管炎、炎性关节炎、类风湿性关节炎和骨关节炎、牛皮癣、阿尔茨海默氏病、自身免疫性肝炎、幼年特发性关节炎、白塞氏病、脊椎炎、脊椎关节病、多系统萎缩、帕金森氏病、路易体痴呆哮喘、过敏性鼻炎加重哮喘

喘、囊性纤维化和特发性肺纤维化。

[0005] 例如,NET可引起自身抗原暴露于细胞外空间并随后由受试者产生病理性自身抗体。此外,NET和NET残留物包含毒性组蛋白,这可引起血管损伤以及随后的器官损伤和衰竭。因此,在此类疾病中,干扰NET的形成,并诱导NET和NET残留物从循环和组织中清除,将具有治疗益处。

[0006] 中性粒细胞也越来越被认为是肿瘤进展中的重要因素。它们在肿瘤进展的几乎每个阶段均发挥重要作用,同时大量研究表明它们的存在对肿瘤的发展至关重要。研究还牵涉到NET作为肿瘤进展和转移的促进者。还已经表明,中性粒细胞通过产生NET提供支架和刺激,以用于血小板粘附、血栓形成和在肿瘤中的凝结。

[0007] 此外,NET牵涉到在移植后降低器官健康。NET导致原发性移植物功能障碍,导致肺移植后早期死亡。已经表明,NET在实体器官移植中起着病理作用。

[0008] 因此,对可阻止NET形成、清除NET和/或预防NETosis的治疗剂的识别将对炎性疾病(例如发炎性关节炎、类风湿性关节炎和骨关节炎,以及其他与NET相关的病理,例如系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮、脓毒病、血管炎、牛皮癣、阿尔茨海默氏病、自身免疫性肝炎、幼年特发性关节炎、干燥病、抗磷脂综合征、白塞氏病、脊椎炎、脊椎关节病、多系统萎缩、帕金森氏病、路易体痴呆哮喘、过敏性鼻炎加重哮喘、过敏性哮喘、囊性纤维化、纤维化和特发性肺纤维化、干眼病、葡萄膜炎、非肉芽肿性葡萄膜炎、肉芽肿性葡萄膜炎、皮炎、特应性皮炎、COPD、支气管炎、在糖尿病、癌症、癌症转移以及体内或体外移植器官健康中的伤口愈合。

[0009] 仍然需要用于治疗或预防与NET相关的病理的化合物。

[0010] W02009147201、W02011070172和W02016092082中描述了结合至脱亚胺基(deiminated)人组蛋白2A和组蛋白4上的瓜氨酸化表位的抗体。

发明内容

[0011] 本发明人已经创建了与组蛋白2A和/或组蛋白4的氨基末端上的瓜氨酸化表位结合的改善性的抗体。这些抗体可以用于治疗与瓜氨酸化相关的疾病或病理,例如与NET相关的病理和炎性病症。

[0012] 本发明人已经创建了显示出比W02009147201、W02011070172和W02016092082中公开的治疗性抗体具有改善性特性的抗体。发明人通过加速稳定性测试和质谱分析发现,在W02009147201、W02011070172和W02016092082中所公开的抗体的轻链的互补性决定区1(Complementarity-Determining Region 1,CDR1)中的某些氨基酸残基的异构化导致抗体对测试的组蛋白衍生肽的结合亲和力随着时间的推移而减小。然后,发明人对CDR1轻链突变体进行了彻底的分析以解决所述异构化问题,同时试图保留所述抗体的结合特性。多次尝试得到了对靶肽的结合亲和力降低的抗体。

[0013] 最后,发明人成功地鉴定了所述轻链的CDR1中的一组突变,该突变消除了所述异构化问题,同时保持了原始抗体的结合特性。出人意料的是,不论在体外还是体内,所述突变体抗体均显示出优于原始抗体的改善特性。

[0014] 因此,本发明提供:

[0015] -特异性结合至脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位的抗体或其结合片段,其中所述抗体或其结合片段包括:

[0016] a) 所述轻链可变域 (VL) 的 CDR1, 其中所述 CDR 包括氨基酸序列 QSL-X₁-D-X₂-D-X₃-KTY 或由其组成, 其中 X₁ 是 V 或 L, X₂ 是 T、S、A 或 N, 并且 X₃ 是 G 或 A, 条件是所述氨基酸序列不是 QSLDSDGKTY (SEQ ID NO:36) 或 QSLVDSGKTY (SEQ ID NO:37); 和

[0017] b) 选自 SEQ ID NO:1 至 5 的至少一个 CDR。

[0018] 本发明还提供:

[0019] - 特异性结合至脱亚胺基人组蛋白 2A 和/或组蛋白 4 上的瓜氨酸化表位的抗体或其结合片段, 其中所述抗体或其结合片段包括以下中的 CDR:

[0020] a) SEQ ID NO:13、14、15、16 或 17 的 CDR1; 和

[0021] b) SEQ ID NO:11 或 12 的重链可变域氨基酸序列。

[0022] 本发明还提供:

[0023] - 编码如本文所定义的抗体或其结合片段的多核苷酸, 包括所述多核苷酸的克隆或表达载体, 或包括所述克隆或表达载体的宿主细胞。

[0024] 本发明还提供:

[0025] - 生产特异性结合至脱亚胺基人组蛋白 2A 和/或组蛋白 4 上的瓜氨酸化表位的抗体或其结合片段的方法, 包括培养如本文所定义的宿主细胞并从所述细胞分离所述抗体或其结合片段。

[0026] 本发明还提供:

[0027] 一种药物组合物, 其包括如本文所定义的抗体或其结合片段和至少一种药学上可接受的稀释剂或载体。

[0028] 本发明还提供:

[0029] - 如本文所定义的抗体或其结合片段或如本文所定义的药物组合物, 在治疗中的用途。

[0030] 本发明还提供:

[0031] - 如本文所定义的抗体或其结合片段, 或如本文所定义的药物组合物, 在治疗或预防与 NET 相关的病理的方法中的用途。

[0032] 本发明还提供:

[0033] - 治疗患者的方法, 其包括向所述患者施用治疗有效量的如本文所定义的抗体或其结合片段或如本文所定义的药物组合物。

[0034] 序列表的简要说明

[0035] 抗体名称

[0036] CDR=互补性决定区。

[0037] VH=重链可变域。

[0038] VL=轻链可变域。

[0039] CH=重链恒定域。

[0040] CL=轻链恒定域。

[0041] msVH22.101=治疗性抗体的小鼠 VH。

[0042] msVL22.101=治疗性抗体的小鼠 VL。

[0043] hVH22.101x=治疗性抗体的人源化 VH, “x”是指重链。

[0044] hVL22.101y=治疗性抗体的人源化 VL, “y”是指轻链。

[0045] hVH22.101 (HC) x = 治疗性抗体的优化的人源化VH, “(HC) x”是指重链。

[0046] hVL22.101 (LC) y = 治疗性抗体的优化的人源化VL, “(LC) y”是指轻链。

[0047] hMQ22.101x/y = 人源化治疗性抗体, “x”是指重链, “y”是指轻链。

[0048] hMQ22.101 (HC) x / (LC) y = 本发明的优化的人源化治疗性抗体, “(HC) x”是指重链, “(LC) y”是指轻链。

[0049]

SEQ ID NO	蛋白质	名称
1	蛋白质	msVH22.101 和 hVH22.101(HC)x 的 CDR1
2	蛋白质	msVH22.101 和 hVH22.101(HC)x 的 CDR2
3	蛋白质	msVH22.101 和 hVH22.101(HC)x 的 CDR3
4	蛋白质	msVL22.101 和 hVL22.101(LC)y 的 CDR2
5	蛋白质	msVL22.101 和 hVL22.101(LC)y 的 CDR3
6	蛋白质	hVL22.101LC17 的 CDR1
7	蛋白质	hVL22.101LC21 的 CDR1
8	蛋白质	hVL22.101LC27 的 CDR1
9	蛋白质	hVL22.101LC41 的 CDR1
10	蛋白质	hVL22.101LC42 的 CDR1
11	蛋白质	hVH22.101f
12	蛋白质	hVH22.101HC9
13	蛋白质	hVL22.101LC17
14	蛋白质	hVL22.101LC21
15	蛋白质	hVL22.101LC27
16	蛋白质	hVL22.101LC41
17	蛋白质	hVL22.101LC42
18	蛋白质	来自 WO2016092082 实施例 1 的组蛋白 2A 的 SEQ ID NO: 1
19	蛋白质	来自 WO2016092082 的组蛋白 4 的 SEQ ID NO: 2
20	蛋白质	来自 WO2016092082 实施例 7 的组蛋白 4 的缩短的 SEQ ID NO2
21	蛋白质	4 号肽(人组蛋白 2A)(来自 WO2011070172 的 SEQ ID NO24)
22	蛋白质	6 号肽: (人组蛋白 2A)(来自 WO2011070172 的 SEQ ID NO26)
23	蛋白质	IgG1 的人重链恒定域
24	蛋白质	人 κ 链 (kappa chain) 恒定域
25	蛋白质	msVH22.101
26	蛋白质	hVH22.101j
27	蛋白质	hVH22.101HC7
28	蛋白质	hVH22.101HC8
29	蛋白质	hVH22.101HC10

[0050]

30	蛋白质	msVL22.101
31	蛋白质	hVL22.101e
32	蛋白质	hVL22.101g
33	蛋白质	hVL22.101h
34	蛋白质	hVL22.101i
35	蛋白质	hVL22.101j
36	蛋白质	msVL22.101 和 hVL22.101g 的 CDR1
37	蛋白质	hVL22.101e 的 CDR1
38	蛋白质	hVL22.101h 的 CDR1
39	蛋白质	hVL22.101i 的 CDR1
40	蛋白质	hVL22.101j 的 CDR1
41	蛋白质	hVL22.101LC16 的 CDR1
42	蛋白质	hVL22.101LC19 的 CDR1
43	蛋白质	hVL22.101LC20 的 CDR1
44	蛋白质	hVL22.101LC22 的 CDR1
45	蛋白质	hVL22.101LC23 的 CDR1
46	蛋白质	hVL22.101LC24 的 CDR1
47	蛋白质	hVL22.101LC25 的 CDR1
48	蛋白质	hVL22.101LC26 的 CDR1
49	蛋白质	hVL22.101LC37 的 CDR1
50	蛋白质	hVL22.101LC38 的 CDR1
51	蛋白质	hVL22.101LC39 的 CDR1
52	蛋白质	hVL22.101LC40 的 CDR1
53	蛋白质	msFib β XG(来自 WO2011070172 的 SEQ ID NO 37)
54	蛋白质	msVim XS/XL(来自 WO2011070172 的 SEQ ID NO 38)
55	蛋白质	msVL22.101 和 hVL22.101(LC)y 的 CDR2 周围区
56	蛋白质	hCH22.101f 的重链恒定域

附图说明

[0051] 图1-hMQ22.101j/e和hMQ22.101f/g的加速稳定性测试

[0052] 将在25mM Tris-HCl(三羟甲基氨基甲烷盐酸盐)含hMQ22.101j/e(12.5mg/ml)或hMQ22.101f/g(3.31mg/ml)且pH 8.0的0.75ml等分试样(玻璃管)分别在37℃下保存8周。每周在无菌条件下从每个玻璃管中取出几份10 μ l和20 μ l样品,并保存在-80℃直至进一步分析(ELISA和质谱)。

[0053] 将来自第0、2、4、6和8周的hMQ22.101j/e样品和来自第0、3和6周的hMQ22.101f/g样品进行内部验证的(house-validated)CMC ELISA,其中评估了与组蛋白衍生肽(SEQ ID NO:18)的结合。

[0054] 将来自第0周加速稳定性样品的抗体结合亲和力设置为100%，加速稳定性样品(第2、3、4、6和8周)的所有其他结合亲和力值作为第0周(100%)的百分比重新计算,并绘制为条形图。

[0055] 图2-hMQ22.101x/y抗体的质谱分析

[0056] a) 来自抗体hMQ22.101j/e的加速稳定性样品的质谱(MS)分析。

[0057] 将含有hMQ22.101j/e(12.5mg/ml)的0.75ml等分试样(玻璃管)各自在37℃下保存8周。每周在无菌条件下从每个玻璃管中取出样品,并保存在-80℃下直至进行MS分析。

[0058] 如实施例2所述进行MS分析。该表显示了hVL22.101e的CDR1内和CDR2附近的相对天门冬氨酸(D)异构化水平。

[0059] b) 用人源化抗体进行抗原结合试验,该抗体包含hVL22.101y的天门冬氨酸突变的CDR1。

[0060] 如实施例1所述,采用内部验证的CMC ELISA将产生的CDR1天门冬氨酸突变的抗体hMQ22.101j/h、hMQ22.101j/i和hMQ22.101j/j去与含天门冬氨酸的抗体hMQ22.101j/e进行比较。该图显示了3个hVL22.101y CDR1突变体(hVL22.101h的CDR1=DS位点突变为AS;hVL22.101i的CDR1=DS位点突变为ES;hVL22.101j的CDR1=DS位点突变为SS)的光密度结果。

[0061] c) 来自抗体hMQ22.101j/i的加速稳定性样品的MS分析。如实施例2所述进行MS分析。该表显示了hVL22.101i的CDR1内和CDR2附近的相对天门冬氨酸(D)异构化水平。

[0062] 图3-hMQ22.101异构化突变体的产生和亲和力分析

[0063] a) 表显示了已创建的hVL22.101(LCy)的17个CDR1突变域,以及hVL22.101e和hVL22.101g的未突变CDR1。

[0064] b) 图显示了采用Octet RED96仪器测量的异构化突变体解离为瓜氨酸化的H2A衍生肽(SEQ ID NO:18)和H4衍生肽(SEQ ID NO:20)的解离速率($k_{dis} \times 10^{-7}$ (1/s))。较低的解离速率表示抗体对抗原的亲和力较高。

[0065] 图4-hMQ22.101异构化突变体的加速稳定性测试

[0066] 将含有指定的突变抗体(范围2.06-4.29mg/ml)的0.4ml等分试样(玻璃管)各自在37℃下保存6周。每周在无菌条件下从每个玻璃管中取出样品,并保存在-80℃下直至进一步分析。将来自第0、3和6周的样品进行内部验证的CMC ELISA,其中评估了与瓜氨酸化的H2A衍生肽(SEQ ID NO:18)的结合。

[0067] 将来自第0周加速稳定性样品的重新计算的抗体结合亲和力设置为100%,加速稳定性样品的所有其他结合亲和力值作为第0周(100%)的百分比重新计算,并绘制为条形图。

[0068] 用于加速稳定性测试的优选重链是hVH22.101f和hVH22.101HC9。测试了重链和CDR1突变的轻链的九种组合。hMQ22.101f/LC41、hMQ22.101f/LC42、hMQ22.101HC9/LC21、hMQ22.101HC9/LC27和hMQ22.101HC9/LC42在6周后显示出最大的稳定性。

[0069] 图5-hMQ22.101异构化突变体的质谱分析

[0070] 将含有指定的突变抗体(范围2.06-4.29mg/ml)的0.4ml等分试样(玻璃管)各自在37℃下保存6周。每周在无菌条件下从每个玻璃管中取出样品,并保存在-80℃下直至进一步分析。如实施例2所述对VL CDR1突变的hMQ22.101抗体(异构化突变体)进行质谱(MS)分

析,不同之处在于使用了来自第0周和第6周的加速稳定性样品并将其与hMQ22.101j/e的异构化水平进行比较。该表显示了hVL22.101 (LC)y的CDR1中的相对天门冬氨酸(D)异构化水平。hMQ22.101异构化突变体的MS分析表明,hMQ22.101f/LC41随着时间的推移显示出最小的异构化(0.5%),因此是最优选的候选物。其他优选候选物是hMQ22.101f/LC42和hMQ22.101HC9/LC42。

[0071] 图6-优选的hMQ22.101异构化突变体的聚集和降解试验

[0072] 将含有指定的突变抗体(范围2.06-4.29mg/ml)的0.4ml等分试样(玻璃管)各自在37℃下保存6周。每周在无菌条件下从每个玻璃管中取出样品,并保存在-80℃下直至进一步分析。使用hMQ22.101f/LC41、hMQ22.101f/LC42和hMQ22.101HC9/LC42异构化突变体的第0周和第6周的稳定性样品进行如实施例10所述的聚集和降解分析。在与Agilent Zorbax GF-250色谱柱结合的Agilent 1200系统上进行测量。使用240nm紫外光检测蛋白质。在大约4.25分钟处检测到主抗体峰。量化主峰之前和之后的肩峰,并分别为聚集和降解水平的百分比的量度。hMQ22.101f/LC41、hMQ22.101f/LC42和hMQ22.101HC9/LC42显示出可接受的聚集和降解曲线,表明它们可用于进一步开发。

[0073] 图7-使用优选的异构化突变体hMQ22.101f/LC41和hMQ22.101f/LC42的NETosis抑制实验

[0074] 用钙离子载体A23187刺激健康志愿者(供体154和155)的中性粒细胞4小时。通过在添加A23187到细胞之前15分钟添加浓度为25μg/ml的抗体或试验缓冲液来测试减少中性粒细胞胞外陷阱(NET)的抗体的效果。在37℃和5%CO₂下孵育4小时后,洗涤细胞,随后用S7核酸酶消化细胞外DNA。从孔中收获NET片段,并通过向50μl收获的NET中添加50μl 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物来测量样品中的MPO活性对NET片段进行定量。在室温下孵育10分钟后,加入50μl H₂SO₄,并在450nm处测量光密度。减去未经过A23187处理的来自中性粒细胞的背景信号,并将来自A23187+非相关抗体处理的中性粒细胞的信号设置为100%。来自所有其他处理组的信号设置为非相关抗体处理的百分比。

[0075] 图8-在小鼠CAIA模型中hMQ22.101f/LC41、hMQ22.101f/LC42和hMQ22.101f/g的剂量响应

[0076] 领先优化的候选抗体可防止炎症发作。使用胶原抗体诱导的关节炎(CAIA)模型来测试hMQ22.101f/LC41、hMQ22.101f/LC42或hMQ22.101f/g的剂量响应功效。在第0天将各5只小鼠组通过腹腔注射2.8mg抗胶原II抗体进行处理。在第3天,腹腔注射LPS(25μg/小鼠),与此同时分别注射hMQ22.101f/LC41、hMQ22.101f/LC42或hMQ22.101f/g;各自以6.25、12.5和25mg/kg的非相关同种型(isotype)匹配对照抗体(25mg/kg的MQR2.201)或不含抗体(安慰剂)。对足爪的肿胀程度评分持续2周,并在图中描绘为“平均关节炎评分/小鼠”。

[0077] 图9-通过hMQ22.101f/LC41的体外NET抑制和NET结合

[0078] 用A23187刺激骨髓衍生的小鼠中性粒细胞,以诱导NET的体外释放。NET的释放受hMQ22.101f/LC41的抑制,但不受MQR2.201抑制(图A;左柱状图,烟酸己可碱(Hoechst,DNA)和瓜氨酸化的组蛋白3(citH3)共定位(colocalization)的定量;右柱状图,仅烟酸己可碱的定量)。此外,hMQ22.101f/LC41结合至排出的NET(黄色箭头)和前NET(pre-NET)(白色箭头),这可能是巨噬细胞清除NET的第一步(图B)。糖绿(Sytox Green)用于检测包括NET和前NET的DNA,而抗hIgG用于检测与NET和前NET结合的hMQ22.101f/LC4。比例尺:25μm。

[0079] 图10-使用hMQ22.101f/LC41进行的体内NET抑制和NET结合

[0080] 使用降植烷(pristane)诱导的腹膜细胞流入小鼠模型,以诱导NET在体内形成。在注射500 μ l降植烷油后立即施用50mg/kg的MQR2.201或hMQ22.101f/LC41,然后在12小时后再次注射50mg/kg的MQR2.201或hMQ22.101f/LC41。24小时后,收获细胞。当用hMQ22.101f/LC41而非MQR2.201处理小鼠时,观察到体内NET的释放受到抑制。

[0081] (图A)代表图。(图B)通过烟酸己可碱(DNA)和瓜氨酸化的组蛋白3(citH3)共定位NET的定量。(图C)hMQ22.101f/LC41结合至NET和前NET,这可能是巨噬细胞清除NET的第一步。糖绿用于检测包括NET和前NET的DNA,而抗hIgG用于检测与NET和前NET结合的hMQ22.101f/LC41。

[0082] 比例尺:50 μ m(图A)或25 μ m(图C)。

[0083] 图11-富含hMQ22.101f/LC41的NET在体内被小鼠巨噬细胞吞噬

[0084] 使用了降植烷诱导的腹膜细胞流入小鼠模型,以诱导NET在体内形成。在注射500 μ l降植烷油后立即施用50mg/kg的MQR2.201或hMQ22.101f/LC41,然后在12小时后再次注射50mg/kg的MQR2.201或hMQ22.101f/LC41。24小时后,收获细胞并用烟酸己可碱(DNA:蓝色)、巨噬细胞标记抗F4/80(品红色)、抗NE(绿色)、抗citH3(黄色)和抗hIgG(青色)染色。巨噬细胞(F4/80)中存在含有NE(蓝色箭头)、citH3(红色箭头)和hMQ22.101f/LC41(白色箭头)的NET颗粒。比例尺:10 μ m。

[0085] 图12-hMQ22.101j/e在慢性CIA小鼠中预防NET介导的组织损伤和疾病进展

[0086] (图A)RA的CIA小鼠模型的示意图。为了诱发慢性关节炎,给小鼠注射2次(第0天和第21天)CII。当MAS $\geq$ 0.75时,在疾病发作后(21-28天之间)开始进行治疗处理。处理包括4次注射(间隔4天),采用锥形剂量给药方案:MQR2.201(50/50/50/50mg/kg)或hMQ22.101j/e(30/30/30/10、50/50/50/15或50/10/10/10mg/kg)。开始处理小鼠14天后终止。(图B)评估CIA小鼠14天的平均关节炎评分(MAS)(n=每组10只小鼠;MQR2.201用于计算统计学差异)。(图C)在第一次注射抗体后第14天,用X射线分析左右后膝盖和踝关节的骨损伤(n=10)。使用H&E和SO染色对左右脚踝关节的组织学分析确定在第一次注射抗体(n=16-20只小鼠脚踝)的第14天的炎症细胞流入(D)、骨侵蚀(E)、软骨侵蚀(F)、软骨蛋白聚糖耗竭(G)和软骨细胞死亡(H)。(图I)显示瓜氨酸化的组蛋白3(citH3;红色)、DAPI(蓝色)、中性粒细胞标记Ly6G(绿色)和髓过氧化物酶(MPO;黄色)的右后爪关节中NET释放的代表性免疫荧光和H&E图像。DAPI被用作核和细胞外DNA染色剂。比例尺:100 μ m。在小鼠胫跗关节、近端跗间关节、远端跗间关节和小鼠(n=10)右后爪的跗跖关节中, Ly6G(J)和NET(citH3和MPO的共定位)的定量。(图L)宏观评分(爪肿胀)与每个关节的NET之间的显著相关性。(图M)每个关节的宏观评分(爪肿胀)和中性粒细胞(Ly6G)的显著相关性。结果表示为平均值 $\pm$ SEM。用邓尼特(Dunnett)多重比较检验(B)、未配对双尾学生t检验(C)、双尾曼-惠特尼统计检验(two-tailed Mann-Whitney statistical test)(D到H,J和K)或斯皮尔曼(Spearman)r检验(L和M)通过双因素方差分析(two-way ANOVA), *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001。

[0087] 图13-hMQ22.101j/e不结合健康的白细胞

[0088] 从健康志愿者的血液中分离出PBMC和中性粒细胞。CD45用于区分白细胞与红细胞和血小板,而CD3、CD11c、CD14、CD20、CD56和CD66b用于分别标记T细胞、DC、单核细胞、B细胞、NK细胞和中性粒细胞。未检测到与HiLyteTMFluor488偶联的hMQ22.101j/e与健康不活

动的T细胞、B细胞、单核细胞、NK细胞、DC和中性粒细胞的结合。活化的中性粒细胞 (5 μ M A23187, 45分钟) 用作阳性对照, 显示出与HiLyteTMFluor488偶联的hMQ22.101j/e的结合性增加。以邓尼特多重比较检验通过普通单因素方差分析 (one-way ANOVA), ***P<0.001。

具体实施方式

[0089] 应当理解, 所公开的发明的不同应用可以调节适合于本领域的特定需要。还应理解, 本文所用的术语仅出于描述本发明的特定实施例的目的, 而并非旨在进行限制。

[0090] 另外, 在本说明书和所附权利要求书中使用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指代, 除非内容中另有明确规定。因此, 例如, 提及单数形式的“抗体”时包括复数形式的抗体”等。

[0091] 本文无论是上文还是下文引用的所有出版物、专利和专利申请, 均通过引用整体并入本文。

[0092] 本发明涉及特异性结合至脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位的抗体或其结合片段。人组蛋白2A和4的脱亚胺基化可以通过例如肽酰精氨酸脱亚胺酶 (PAD), 例如PAD2和PAD4等酶来实施。本发明的抗体还可以特异性结合至人组蛋白3上的瓜氨酸化表位。本发明的抗体可以特异性结合至人组蛋白2A和/或组蛋白4和/或组蛋白3上的瓜氨酸化表位。本发明还涉及此类抗体或其结合片段的用途, 例如治疗用途。

[0093] 本发明涉及特异性结合至脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位的抗体或其结合片段, 用于治疗或预防与NET相关的病理的用途。本发明的抗体或其结合片段可以用于治疗或预防与NET相关的病理, 例如SLE、狼疮、败血症、血管炎、炎性关节炎、类风湿性关节炎和骨关节炎、牛皮癣、阿尔茨海默氏病、自身免疫性肝炎、幼年特发性关节炎、干燥病、抗磷脂综合征、白塞氏病、脊椎炎、脊椎关节病、多系统萎缩、帕金森氏病、路易体痴呆哮喘、过敏性鼻炎加重哮喘、过敏性哮喘、囊性纤维化、纤维化和特发性肺纤维化、干眼病、葡萄膜炎、非肉芽肿性葡萄膜炎、肉芽肿性葡萄膜炎、皮炎、特应性皮炎、COPD、支气管炎、支气管炎或其他与NET相关的病理, 例如在糖尿病、癌症、癌症转移以及体内或体外移植器官健康中的伤口愈合。

[0094] 本发明的抗体或其结合片段的靶标

[0095] 瓜氨酸是在正常翻译过程中不会掺入蛋白质中的氨基酸, 但是, 它可能是通过酶, 例如PAD (EC 3.5.3.15) 对精氨酸残基进行翻译后修饰而产生的。到目前为止, 在哺乳动物 (人类、小鼠和大鼠) 中, 已经鉴定出5个PAD同种型 (PAD1-PAD6; “PAD4”和“PAD5”用于同一个同种型), 每种均由不同的基因编码。

[0096] 组蛋白2A和/或组蛋白4的瓜氨酸化与NET的形成有关。NET形成的下游病理效应可能很多。例如, 受试者可能将自身抗原暴露于细胞外空间, 并随后产生病理性自身抗体。NET衍生的组蛋白可能对血管壁和器官有毒, 导致血管损伤和器官衰竭。NET可导致自身抗原/自身抗体免疫复合物的形成, 所述复合物会进一步加剧炎症, 例如SLE患者的肾脏中的炎症。NET也参与癌症进展的转移。

[0097] 根据本发明的抗体或其结合片段特异性结合至脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位。本发明的抗体还可以特异性结合至脱亚胺基人组蛋白H3上的瓜氨酸化表位。在一个具体的实施例中, 根据本发明的抗体或其结合片段特异性结合至脱亚胺基

人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位,其中表位包含选自SEQ ID NO:18、19、20、21和22的肽。抗体或其结合片段也可以结合至包括SEQ ID NO:53或54的肽的表位。

[0098] 抗体或其结合片段

[0099] 如本文所用的术语“抗体(复数形式)”、“抗体(单数形式)”或其“结合片段”是指能够特异性结合至通常称为“抗原”的靶分子的结构,优选蛋白质或多肽结构。

[0100] 本文所采用的抗体分子是指抗体或其结合片段。本文所用的术语“抗体”通常涉及完整的(整个)抗体,即包含2条重链和2条轻链的元素。抗体可以包括其他额外结合域,例如根据W0 2007/024715所公开的分子DVD-Ig,或根据W02011/030107所述的所谓的(FabFv)₂Fc。因此,本文所采用的“抗体”包括单价、双价、三价或四价全长抗体。

[0101] 抗体的结合片段包括单链抗体(即全长重链和轻链);Fab、修饰的Fab、Fab'、修饰的Fab'、F(ab')₂、Fv、Fab-Fv、Fab-dsFv、单域抗体(例如VH或VL或VHH)、scFv、单价、双价、三价或四价抗体、Bis-scFv、双抗体(diabodies)、三链抗体(tribodies)、三抗体(triabodies)、四抗体和如上所述任一个的表位结合片段(参见例如Holliger P和Hudson PJ,2005,Nat.Biotechnol.,23,:1126-1136;Adair JR和Lawson ADG,2005,Drug Design Reviews-Online,2,209-217)。用于产生和制造这些抗体片段的方法是本领域众所周知的(参见例如Verma R等人,1998,J.Immunol.Methods,216,165-181)。Fab-Fv形式首先在W02009/040562中公开,并且其二硫化物稳定的变体,即Fab-dsFv首先在W02010/035012中公开。用于本发明的其他抗体片段包括Fab和Fab'片段。多价抗体可包含多个特异性,例如,双特异性的或可以是单特异性的。

[0102] 抗体或其结合片段可以选自:单链抗体、单链可变片段(scFv)、可变片段(Fv)、片段抗原结合区(Fab)、重组抗体、单克隆抗体、包括天然抗体或适配体的抗原域的融合蛋白、单域抗体(sdAb),也称为VHH抗体、纳米抗体(骆驼科动物衍生的单域抗体(Camelid-derived single-domain antibodies)、鲨源IgNAR衍生的单域抗体片段(称为VNAR)、双抗体、三抗体、抗脂(Anticalins)、适配体(DNA或RNA)以及其活性成分或片段。

[0103] 具有IgG1重链和轻链的IgG1(例如IgG1/κ)抗体可以有利地用于本发明。然而,本发明还涵盖其他人抗体同种型,包括与κ或λ轻链相组合的IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD和IgE。同样,各种同种型的所有动物衍生的抗体都可以用于本发明。抗体可以是全尺寸抗体,或抗体的抗原结合片段,包括Fab、F(ab')₂、单链Fv片段或单域VHH、VH或VL单域。

[0104] 在本文中,术语“特异性结合至瓜氨酸”或“特异性结合至瓜氨酸化表位”是指抗体或其结合片段结合至例如含有瓜氨酸残基的肽的结构,而抗体或其结合片段不是很强烈地结合至或优选根本不结合至含有精氨酸残基而非瓜氨酸残基的相同结构。术语“肽”应解释为在正确情况下能够呈现为瓜氨酸残基,以便与本文所述的抗体或其结合片段发生免疫反应的结构,优选在相同情况下,出现在人或动物体内,优选为在天然多肽的情况下。

[0105] 本发明的抗体或其结合片段特异性结合至脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位。抗体或其结合片段与脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位的结合阻止了NET的形成。组蛋白的瓜氨酸化与NET的形成有关。

[0106] NET形成的阻断可以是全部或部分。例如,本发明的抗体或其结合片段可以将NET形成减少10至50%,至少50%或至少70%、80%、90%、95%或99%。NET阻断可以通过任何

合适的方式进行测量,例如通过体外测量NETosis (Kraaij T et.al,2016, Autoimmun.Rev.15,577-584)。

[0107] 术语“结合活性”和“结合亲合力”旨在指抗体分子结合或不结合至靶标的趋势。结合亲合力可以通过确定抗体及其靶标的解离常数(Kd)来量化。类似地,抗体相对于其靶标的结合特异性可以通过抗体对其靶标的解离常数与关于抗体和另一非靶标分子的解离常数进行比较的比较解离常数(Kd)来定义。

[0108] 通常,抗体相对于靶标的Kd相比于其他非靶标分子(例如在环境中的无关物质或伴随物质)的Kd小2倍,优选5倍,更优选10倍。更优选地,Kd将小50倍,甚至更优选地小100倍,并且还更优选地小200倍。

[0109] 该解离常数的值可以直接通过众所周知的方法来确定,并且可以通过例如Caceci MS和Cacheris WP(1984,Byte,9,340-362)中所述的方法来计算,即使是对于复杂混合物。例如,可以使用双过滤硝化纤维素滤器结合测定法来建立Kd,例如Wong I和Lohman TM(1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90,5428-5432)所公开的,或例如通过使用八位位组表面等离子体共振(Octet surface plasmon resonance)。

[0110] 评估对脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4的结合亲合力的一种方法是通过ELISA。评估配体例如抗体对靶标的结合能力的其他标准测试法是本领域已知的,包括例如蛋白质印迹法(Western blots)、RIA和流式细胞术分析。抗体的结合动力学(例如结合亲合力)也可以通过本领域已知的标准测试法来评估,例如表面等离子体共振,例如通过Biacore™系统分析来评估。

[0111] 优选地,本发明的抗体对脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4具有1nM或更小的结合亲合力。优选地,本发明的抗体对脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4和/或脱亚胺基人组蛋白H3的结合亲合力为0.5nM或以下、0.1nM或以下、50pM或以下、10pM或以下、5pM或以下、2pM或以下或1pM或以下。

[0112] 抗体或其结合片段也可以是包括天然抗体或适配体(例如DNA或RNA形式的适配体)的抗原结合域的融合蛋白。

[0113] 优选地,本发明的抗体或其结合片段是单克隆抗体。单克隆抗体是彼此相同的免疫球蛋白分子,并且对特定表位具有单一结合特异性和亲合力。本发明的单克隆抗体(mAbs)可以通过多种技术产生,包括常规的单克隆抗体方法,例如在“单克隆抗体:技术手册”(Zola H,1987,CRC Press)和“单克隆杂交瘤抗体:技术和应用”(Hurrell JGR,1982CRC Press)中公开的那些。

[0114] 本发明的抗体或其结合片段包含结合域。结合域通常将包括6个CDR(在VHH的情况下为3个),其中3个来自重链,3个来自轻链。在一个实施例中,各CDR在框架中并且一起形成可变区或域。因此,在一个实施例中,抗体或结合片段包括对抗原的特异性结合域,该结合域包括轻链可变区或域和重链可变区或域。

[0115] 抗体可变域中的残基通常根据IMGT(<http://www.imgt.org>)编号。该系统在Lefranc MP(1997,J,Immunol.Today,18,509)中提出。除非另有说明,否则在本说明书中使用该编号系统。

[0116] IMGT残基名称并不总是直接与氨基酸残基的线性编号相对应。实际的线性氨基酸序列可以包含比严格的IMGT编号中更少或额外的氨基酸,其对应于基础可变域结构的结果

组分(框架或CDR的结构组分)的缩短,或向所述结果组分中的添加。可以通过将抗体序列中的同源残基与“标准”IMGT编号的序列进行比对,来确定给定抗体的残基的正确IMGT编号。

[0117] 根据IMGT编号系统,重链可变域的CDR位于残基27-38(VH的CDR1)、残基56-65(VH的CDR2)和残基105-117(VH的CDR3)。

[0118] 根据IMGT编号系统,轻链可变域的CDR位于残基27-38(VL的CDR1)、残基56-65(VL的CDR2)和残基105-117(VL的CDR3)处。

[0119] 本发明的抗体或其结合片段通过其CDR区的一级氨基酸序列而被公开。本发明的抗体或其结合片段通过其重链和轻链的一级氨基酸序列而被公开。

[0120] 本发明基于以下发现:相对于包括VL的未修饰形式的CDR1的抗体或其结合片段,特异性结合至脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位的抗体或其结合片段的VL的修饰的CDR1,提供了对所述抗体或其结合片段改善的特性。用于衍生出本发明的抗体的VL的未修饰的CDR1包括氨基酸序列QSLDSDGKTY(SEQ ID NO:36)或QSLVSDGKTY(SEQ ID NO:37)或由其组成。

[0121] 本发明的抗体或其结合片段的VL链的修饰的CDR1包括氨基酸序列QSL-X₁-D-X₂-D-X₃-KTY或由其组成,其中X₁是V或L,X₂是T、S、A或N,并且X₃为G或A,条件是氨基酸序列不是QSLDSDGKTY(SEQ ID NO:36)或QSLVSDGKTY(SEQ ID NO:37)。与SEQ ID NO:36或37的未修饰的CDR1相比,本发明的抗体或其结合片段的VL链的修饰的CDR1显示出降低的异构化,但是保持了未修饰的CDR1的结合特性。

[0122] 本发明的特异性抗体或其结合片段的VH的CDR的氨基酸序列示于SEQ ID NO:1、2和3。VL的CDR 2和3示于SEQ ID NO:4和5。

[0123] 本发明的特异性抗体或其结合片段的VH和VL的氨基酸序列示于SEQ ID NO:11和13。VH的CDR示于SEQ ID NO:1、2和3中。VL的CDR示于SEQ ID NO:6、4和5。

[0124] 本发明的另一抗体或其结合片段的VH和VL的氨基酸序列示于SEQ ID NO:11和14。VH的CDR示于SEQ ID NO:1、2和3。VL的CDR示于SEQ ID NO:7、4和5。

[0125] 本发明的另一抗体或其结合片段的VH和VL的氨基酸序列示于SEQ ID NO:11和15。VH的CDR示于SEQ ID NO:1、2和3。VL的CDR示于SEQ ID NO:8、4和5。

[0126] 本发明的另一抗体或其结合片段的VH和VL的氨基酸序列示于SEQ ID NO:11和16。VH的CDR示于SEQ ID NO:1、2和3。VL的CDR示于SEQ ID NO:9、4和5。

[0127] 本发明的另一抗体或其结合片段的VH和VL的氨基酸序列示于SEQ ID NO:11和17。VH的CDR示于SEQ ID NO:1、2和3。VL的CDR示于SEQ ID NO:10、4和5。

[0128] 本发明的另一抗体或其结合片段的VH和VL的氨基酸序列示于SEQ ID NO:12和13。VH的CDR示于SEQ ID NO:1、2和3。VL的CDR示于SEQ ID NO:6、4和5。

[0129] 本发明的另一抗体或其结合片段的VH和VL的氨基酸序列示于SEQ ID NO:12和14。VH的CDR示于SEQ ID NO:1、2和3。VL的CDR示于SEQ ID NO:7、4和5。

[0130] 本发明的另一抗体或其结合片段的VH和VL的氨基酸序列示于SEQ ID NO:12和15。VH的CDR示于SEQ ID NO:1、2和3。VL链的CDR示于SEQ ID NO:8、4和5。

[0131] 本发明的另一抗体或其结合片段的VH和VL的氨基酸序列示于SEQ ID NO:12和16。VH的CDR示于SEQ ID NO:1、2和3。VL的CDR示于SEQ ID NO:9、4和5。

[0132] 本发明的另一抗体或其结合片段的VH和VL的氨基酸序列示于SEQ ID NO:12和17。

VH的CDR示于SEQ ID NO:1、2和3。VL的CDR示于SEQ ID NO:10、4和5。

[0133] 在本发明的一个实施例中,本发明的抗体包括SEQ ID NO:11的重链可变域氨基酸序列,SEQ ID NO:16的轻链可变域氨基酸序列、包括SEQ ID NO:23或56的重链恒定区氨基酸序列,和SEQ ID NO:24的轻链恒定区氨基酸序列。

[0134] 在本发明的一个实施例中,本发明的抗体包含SEQ ID NO:11的重链可变域氨基酸序列,SEQ ID NO:16的轻链可变域氨基酸序列、SEQ ID NO:23或56的重链恒定区氨基酸序列和SEQ ID NO:24的轻链恒定区氨基酸序列。

[0135] 本发明的抗体或其结合片段可以包括如上所述的任何一种特异性抗体的CDR序列中的一个或多个,不同在于,VL的CDR1总是以包括氨基酸序列QSL-X₁-D-X₂-D-X₃-KTY,或由其组成的形式存在,其中X₁为V或L,X₂为T、S、A或N,并且X₃为G或A,条件是氨基酸序列不是QSLDSDGKTY (SEQ ID NO:36) 或QSLVSDGKTY (SEQ ID NO:37),或也不包括SEQ ID NO:6、7、8、9或10或由其组成。

[0136] 本发明的抗体或其结合片段除VL CDR1外,还可包括所述特异性抗体的一个或多个VL CDR序列、以及替代地或另外地,包括一个或多个VH CDR序列。本发明的抗体或其结合片段可以包括如上所述特异性抗体或其结合片段的VH CDR序列中的1个、2个或全部3个,以及替代地或另外地,所述特异性抗体或其结合片段的VH链CDR序列的1个、2个或全部3个,包括VL CDR1。本发明的抗体或其结合片段可包括如上所述的特异性抗体或其结合片段的所有6个CDR序列。举例来说,本发明的抗体可包括SEQ ID NO:6、7、8、9或10中之一和SEQ ID NO:1、2、3、4和5中的一个或多个。

[0137] 在本发明的一个实施例中,本发明的抗体或其结合片段的VL链的修饰的CDR1包括氨基酸序列QSL-Z₁-Z₂-Z₃-Z₄-Z₅-KTY或由其组成,其中Z₁是V或L,Z₂为D或E,Z₃为T、S、A或N,Z₄为D、E、S或A,并且Z₅为G或A,条件是氨基酸序列不是QSLDSDGKTY (SEQ ID NO:36) 或QSLVSDGKTY (SEQ ID NO:37)。与SEQ ID NO:36或37的未修饰的CDR1相比,本发明的抗体或其结合片段的VL链的修饰的CDR1显示出减少的异构化,但是保持了未修饰的CDR1的结合特性。本发明的抗体或其结合片段的VL链的修饰的CDR1可以包括SEQ ID NO:6、7、8、9、10、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51或52或由其组成。在本发明的一个实施例中,本发明的抗体可包含SEQ ID NO:6、7、8、9、10、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51或52中的一个,以及SEQ ID NO:1、2、3、4和5中的一个或多个。在本发明的一个实施例中,本发明的抗体包含SEQ ID NO:6、7、8、9、10、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51或52中的一个,以及SEQ ID NO:1、2、3、4和5中的全部。

[0138] 本发明的抗体或其结合片段可替代地包括在VL的CDR2或3中的这些重链可变域或CDR序列之一的变体。例如,变体可以是任何上述氨基酸序列的取代、缺失或添加变体。

[0139] 变体抗体可以包含1、2、3、4、5,至多10,至多20,至多30个或更多个氨基酸取代和/或从上述特定序列和片段的缺失,同时保持本文所述抗体的活性。“缺失”变体可以包括例如1、2、3、4或5个单个氨基酸的缺失,或一个或多个小氨基酸组,例如2、3、4或5个氨基酸的缺失。“小氨基酸组”可以被定义为彼此连续,或接近但不连续。“取代”变体优选涉及用相同数目的氨基酸替换一个或多个氨基酸并进行保守氨基酸取代。例如,氨基酸可以被具有相似特性的替代氨基酸取代,例如,另一个碱性氨基酸、另一个酸性氨基酸、另一个中性氨基酸、另一种带电荷氨基酸、另一个亲水性氨基酸、另一个疏水性氨基酸、另一个极性氨基酸、

另一个芳香族氨基酸、另一个脂族氨基酸、另一个微小氨基酸、另一个小氨基酸或另一个大氨基酸。可以用于选择合适的取代的20个主要氨基酸的一些特性如下：

[0140]	Ala	脂肪族、疏水、中性	Met	疏水、中性
	Cys	极性、疏水、中性	Asn	极性、亲水、中性
	Asp	极性、亲水、带电 (-)	Pro	疏水、中性
	Glu	极性、亲水、带电 (-)	Gln	极性、亲水、中性
	Phe	芳香族、疏水、中性	Arg	极性、亲水、带电 (+)
	Gly	脂肪族、中性	Ser	极性、亲水、中性
	His	芳香族、极性、亲水、带电 (+)	Thr	极性、亲水、中性
	Ile	脂肪族、疏水性、中性	Val	脂肪族、疏水、中性
	Lys	极性、亲水、带电 (+)	Trp	芳香族、疏水、中性
	Leu	脂肪族、疏水性、中性	Tyr	芳香族、极性、疏水

[0141] 优选的“衍生物”或“变体”包括下述那些：其中，在序列中出现的氨基酸为天然存在的氨基酸的结构类似物，而不是所述天然存在的氨基酸。序列中使用的氨基酸也可以被衍生化或修饰，例如被标记，条件是抗体的功能不会受到显着不利影响。

[0142] 如上所述的衍生物和变体可以在抗体的合成过程中或通过生产后修饰来制备，或者当抗体为重组形式时，使用定点诱变、随机诱变或酶促裂解和/或核酸连接的已知技术制备。

[0143] 优选地，根据本发明的变体抗体的氨基酸序列与本文所述公开的抗体的VL和/或VH或其片段具有大于60%或大于70%的氨基酸同一性，例如，75%或80%，优选大于85%，例如大于90%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸同一性。这种氨基酸同一性水平可见于相关SEQ ID NO序列的全长或该序列的一部分中，例如在20、30、50、75、100、150、200或更多个氨基酸中，这取决于全长多肽的大小。

[0144] 优选地，变体抗体包含本文所述的CDR序列中的一个或多个。

[0145] 关于氨基酸序列，“序列同一性”是指当使用ClustalW(Thompson JD等,1994, Nucleic Acid Res.,22,4673-4680)用以下参数评估时，序列具有所述的值：

[0146] 成对比对参数-方法(Pairwise alignment parameters-Method)：缓慢/准确，矩阵：PAM，空位开放罚分(Gap open penalty)：10.00，空位延伸罚分(Gap extension penalty)：0.10；

[0147] 多个比对参数-矩阵：PAM，空位开放罚分：10.00，延迟的同一性百分比：30，惩罚末端空位(Penalize end gaps)：打开，空位间隔距离：0，负矩阵：否，空位延伸罚分：0.20，残基特异性空位罚分(Residue-specific gap penalties)：打开，亲水性空位罚分(Hydrophilic gap penalties)：打开，亲水性残基：G、P、S、N、D、Q、E、K、R。在特定残基处的序列同一性旨在包括相同的残基，这些残基已被简单地衍生化。

[0148] 因此，本发明提供了具有特异性VH和VL氨基酸序列和及其变体和片段的抗体，其保留这些VH和VL的功能或活性。

[0149] 相应地，本发明涵盖了包含VH的变体的抗体或其结合片段，其保留了特异性结合至脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位的能力。重链的变体可以与未修饰的VH具有至少70%至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少

98%或至少99%的氨基酸同一性。VH的变体可以包括hVH22.101f或hVH22.101HC9(分别为SEQ ID NO:11和12)的至少7个氨基酸的片段,其中所述抗体或其结合片段保留了与脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位的特异性反应的能力;或hVH22.101f或hVH22.101HC9(分别为SEQ ID NO:11和12)的变体,其与hVH22.101f或hVH22.101HC9(分别为SEQ ID NO:11和12)的序列具有至少70%的氨基酸序列同一性,其中抗体或其结合片段保留了与脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位的特异性反应的能力。

[0150] 多核苷酸、载体和宿主细胞

[0151] 本发明还涵盖编码本文所述的抗体或其结合片段的多核苷酸、载体和表达载体。

[0152] 本发明还涉及编码本发明抗体的多核苷酸。因此,本发明的多核苷酸可以编码本文所述的任何抗体或片段。术语“核酸分子”和“多核苷酸”在本文可互换使用,并且是指任何长度的核苷酸的聚合形式,所述核苷酸为脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸、或其类似物。多核苷酸的非限制性示例包括基因、基因片段、信使RNA(mRNA)、cDNA、基因组DNA、重组多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA,任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。本发明的多核苷酸可以分离或纯化的形式提供。

[0153] “编码”所选多肽的核酸序列是一种核酸分子,当置于适当调节序列的控制下,该核酸分子在体内转录(对于DNA而言)并翻译(对于mRNA而言)成多肽。编码序列的边界由5’(氨基)末端的起始密码子和3’(羧基)末端的翻译终止密码子确定。为了本发明的目的,这种核酸序列可以包括但不限于来自病毒、原核或真核mRNA的cDNA,来自病毒或原核DNA或RNA的基因组序列,甚至是合成DNA序列。转录终止序列可以位于编码序列的3’。在一个实施例中,本发明的多核苷酸包含编码如上所述的VH或VL氨基酸序列的序列。如本文所公开的,多核苷酸可以编码特异性抗体或其结合片段的VH或VL序列。

[0154] 因此,本发明的抗体或其结合片段可以以对其进行编码并能够对其进行表达的多核苷酸形式产生或被传递。当抗体包括2条或多条链时,本发明的多核苷酸可编码一条或多条抗体链。例如,本发明的多核苷酸可以编码抗体轻链、抗体重链或两者。可以提供2个多核苷酸,其中一个编码抗体轻链,而另一个编码相应的抗体重链。这样的多核苷酸或多核苷酸对可以一起表达,从而产生本发明的抗体。

[0155] 可以根据本领域众所周知的方法合成本发明的多核苷酸,例如在Sambrook J等人(1989,Molecular cloning:a laboratory manual;Cold Spring Harbor:New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press)中所述的。

[0156] 本发明的核酸分子可以以表达盒(expression cassette)的形式提供,表达盒包括可操作地连接至插入序列的控制序列,从而允许在体内表达本发明的抗体。这些表达盒又通常在载体(例如质粒或重组病毒载体)内提供。可以将这种表达盒直接施用于宿主受试者。或者,可以将包括本发明的多核苷酸的载体施用于宿主受试者。优选地,使用遗传载体制备和/或施用多核苷酸。合适的载体可以是能够携带足够数量的遗传信息并允许表达本发明的多肽的任何载体。

[0157] 因此,本发明包括包含此类多核苷酸序列的表达载体。这样的表达载体在分子生物学领域中是常规构建的,并且例如可以涉及质粒DNA和合适的引发剂、启动子、增强子和其他元素的使用,例如可能是必需的并且位于正确方向的聚腺苷酸化信号以便允许表达本发明的肽。其他合适的载体对于本领域技术人员将是显而易见的。在这方面,作为进一步的

例子,我们涉及Sambrook J等(1989,Molecular cloning:a laboratory manual;Cold Spring Harbor:New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

[0158] 本领域技术人员可以使用本文所述的序列来克隆或产生cDNA或基因组序列,例如,如以下示例所述的。将这些序列克隆到合适的真核表达载体,例如pcDNA3(表达载体(Invitrogen))或其衍生物中,然后与合适的含轻链和重链的载体组合转染哺乳动物细胞(如CHO细胞),从而导致表达和分泌如本文所述的抗体。

[0159] 技术人员还可以通过使用抗体序列的特异性结合域来制备本文所述的抗体或其结合片段的类似物,并在不同的背景下表达它们,例如多肽,例如融合蛋白。这是本领域众所周知的。

[0160] 本发明还包括已被修饰以表达本发明的抗体的细胞。这样的细胞包括瞬时的或优选稳定的较高等的真核细胞系,例如哺乳动物细胞或昆虫细胞,较低等的真核细胞,例如酵母或原核细胞,例如细菌细胞。可以通过插入编码本发明抗体的载体或表达盒进行修饰的特定示例的细胞包括哺乳动物HEK293、CHO、HeLa、NS0和COS细胞。优选地,所选择的细胞系将不仅是稳定的,而且允许成熟的糖基化。

[0161] 本发明的此类细胞系可以使用常规方法培养以产生本发明的抗体或其结合片段,或者可以在治疗或预防上用于将本发明的抗体或其结合片段递送至受试者。替换地,可以将本发明的多核苷酸、表达盒或载体从受试者体外(ex vivo)施用到细胞,然后将细胞返回至受试者体内。

[0162] 本发明还包括一种产生特异性结合至脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位的抗体或其结合片段的方法,该方法包括培养本文所述的宿主细胞并从所述细胞中分离抗体或其结合片段。

[0163] 药物组合物

[0164] 本发明涵盖包括本发明的抗体或其结合片段的药物组合物。本发明涵盖包括本发明的抗体或其结合片段和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0165] 如本文所用,“药学上可接受的载体”包括生理相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌试剂、等渗和吸收延迟剂等。优选地,载体适合于肠胃外,例如静脉内、眼内、肌肉内、皮下、皮内或腹膜内给药(例如通过注射或灌输)。在某些实施例中,药学上可接受的载体包括选自以下所构成的组中的至少一种:助溶剂溶液、脂质体、微胶粒、液晶、纳米晶体、纳米颗粒、乳剂、微粒、微球、纳米球、纳米胶囊、聚合物或聚合物载体、表面活性剂、助悬剂、络合剂,例如环糊精或吸附分子,例如白蛋白、表面活性颗粒和螯合剂。在进一步的实施例中,多糖包含透明质酸及其衍生物、葡聚糖及其衍生物、纤维素及其衍生物(例如甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素、醋酸邻苯二甲酸纤维素、醋酸琥珀酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯)、壳聚糖及其衍生物、 β -葡聚糖、阿拉伯木聚糖、角叉菜胶、果胶、糖原、岩藻依聚糖、软骨素、皮肤素、类肝素、肝素、戊聚糖、角质素、藻酸盐、环糊精及其盐和衍生物,包括其酯和硫酸盐。

[0166] 优选的药学上可接受的载体包括水性载体或稀释剂。可以在本发明的药物组合物中使用的合适的水性载体的示例包括水、缓冲水和生理盐水。其他载体的示例包括乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物,植物油例如橄榄油,和可注射的有机酯例如油酸乙酯。例如,通过使用包衣材料,例如卵磷脂,通过在分散的情况下保持所

需的粒径,以及通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。在许多情况下,优选在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇,例如甘露醇、山梨糖醇或氯化钠。

[0167] 本发明的药物组合物还可包含药学上可接受的抗氧化剂。这些组合物还可包含佐剂,例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。可以通过上述灭菌程序和通过包含各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等,来确保防止微生物的存在。还可能需要在组合物中包括等渗剂,例如糖、氯化钠等。另外,可通过包括延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来延长可注射药物形式的吸收。

[0168] 在制造和储存条件下,治疗性组合物通常必须是无菌且稳定的。可以将药物组合物配制成溶液、微乳剂、脂质体或其他适合于高药物浓度的有序结构。

[0169] 无菌注射溶液可通过将所需量的活性剂(例如抗体)并入适当溶剂(根据需要具有以上列举成分的一种或其组合)中,然后进行灭菌微滤来制备。通常,通过将活性剂掺入无菌载体中来制备分散体,所述无菌载体包含碱性分散介质和所需的其他上文列举的成分。对于用于制备无菌注射溶液的无菌粉末,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),从先前无菌过滤的其溶液中产生活性剂加任何其他所需成分的粉末。

[0170] 本发明的药物组合物可以包含另外的活性成分以及本发明的抗体。如上所述,本发明的组合物可以包含一种或多种本发明的抗体。它们还可以包含其他治疗或预防性活性剂。

[0171] 根据给药途径,可以将抗体或其结合片段包被在一种材料中,以保护抗体免受酸和免受可能使抗体失活或变性的其他自然状况。

[0172] 在一个优选的实施例中,根据本发明的药物组合物是选自水溶液、凝胶、水凝胶、膜、糊剂、乳膏、喷雾剂、软膏剂或包裹剂中的形式。

[0173] 在进一步的实施例中,本文所述的药物组合物可以通过例如静脉内、皮下、眼内、肌内、关节内、皮肤内、腹膜内、脊柱或其他肠胃外给药途径,例如通过注射或灌输来给药。给药可以是直肠、口服、眼睛、局部、表皮或通过粘膜途径。给药可以通过腔内输注、囊内给药或通过吸入在肿瘤的切除边缘、病灶内、病灶周围局部(包括肿瘤周围、肿瘤旁(juxtatumoral)、肿瘤内)进行。在一个优选的实施例中,药物组合物通过静脉内或皮下给药。

[0174] 包含本发明的抗体或其他组合物和使用说明书的试剂盒也在本发明的范围内。试剂盒可进一步包含一种或多种其他试剂,例如本文所述的其他治疗剂或预防剂。

[0175] 本发明的抗体及其结合片段的治疗用途

[0176] 根据本发明的抗体或其结合片段可以用于治疗。在治疗应用中,将抗体或组合物以足量给药于已经患有疾病或病症的受试者,以治愈、减轻或部分阻止病症或其症状的一种或多种。这种治疗处理可能导致疾病症状的严重程度降低,或无症状时期的频率或持续时间增加。足以达到此效果的量定义为“治疗有效量”。用于给定目的有效量将取决于疾病或损伤的严重程度以及受试者的体重和总体状况。如本文所用,术语“受试者”包括任何人。

[0177] 在特定的实施例中,本发明的抗体或其结合片段可以连接(直接或间接)至另一部分。另一部分可以是治疗剂,例如药物。另一部分可以是可检测的标签。另一部分可以是结合部分,例如对治疗靶标特异的抗体或多肽结合域。本发明的抗体或其结合片段可以是双特异性抗体。

[0178] 治疗剂或可检测的标签可以例如通过化学偶联(conjugation)直接附接到本发明的抗体或其结合片段。将偶联试剂或标签与抗体偶联的方法是本领域已知的。例如,碳二亚胺偶联(Bauminger S和Wilchek M,1980,Methods Enzymol,70,151-159)可用于使包括阿霉素在内的多种试剂与抗体或肽偶联。水溶性碳二亚胺、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)对于将功能部分与结合部分偶联特别有用。

[0179] 也可以使用其他方法将一部分偶联至抗体。例如,可以使用高碘酸钠氧化,然后进行合适反应物的还原烷基化,也可以使用戊二醛交联。然而,已经认识到,无论选择哪种产生本发明偶联的方法,都必须确定抗体保持其靶向能力并且功能部分保持其相关功能。

[0180] 与抗体连接的治疗剂可以包含多肽或编码具有治疗益处的多肽的多核苷酸。此类多肽的示例包括抗增殖或抗炎细胞因子。

[0181] 抗体可以连接至可检测的标签。“可检测的标签”是指抗体连接至这样的部分:该部分在将抗体给药于患者后位于靶位点时,通常可以从体外和靶所在的位点以非侵入式的方式被检测。因此,该抗体可用于成像和诊断。

[0182] 通常,标签是可用于成像的放射性原子或包括可用于成像的放射性原子。合适的放射性原子包括用于闪烁显像研究(scintigraphic studies)的^{99m}Tc和¹²³I。其他标签包括例如用于磁共振成像(MRI)的自旋标签,例如再次为¹²³I、¹³¹I、¹¹¹In、¹⁹F、¹³C、¹⁵N、¹⁷O、钆、锰或铁。显然,必须将足够数量的适当原子同位素连接至抗体,以使分子易于被检测。

[0183] 无线电标签或其他标签可以以已知方式并入。例如,抗体或其片段可以进行生物合成,或者可以使用适合的氨基酸前体(例如,用F19代替氢)通过化学氨基酸合成来合成。例如⁹⁹Tc、¹²³I、¹⁸⁶Rh、¹⁸⁸Rh和¹¹¹In等标签可以例如通过在多肽中的半胱氨酸残基而连接。⁹⁰Y可以通过赖氨酸残基而连接。优选地,可检测的标签包括放射性原子,例如镓-^{99m}或碘-¹²³。替代地,可检测的标签可以选自:碘-¹²³、碘-¹³¹、铟-¹¹¹、氟-¹⁹、碳-¹³、氮-¹⁵、氧-¹⁷、钆、锰、铁。

[0184] 在一个实施例中,本发明的抗体能够选择性地直接或间接结合至细胞毒性部分或可检测的标。因此,在该实施例中,抗体连接至与细胞毒性或易于检测的其他化合物或组分选择性结合的部分。

[0185] 本发明的抗体或结合片段,或包含所述抗体或片段的组合物,可以使用本领域已知的多种方法中的一种或多种通过一种或多种给药途径来给药。如本领域技术人员认识到的,给药途径和/或方式将根据所需要的结果而变化。本发明的抗体或组合物的优选给药途径包括静脉内、皮下、眼内、肌内、皮内、腹膜内、脊柱或其他肠胃外给药途径,例如通过注射或灌输。本文所用短语“肠胃外给药”是指除肠内和局部给药以外的给药方式,通常通过注射。给药可以是直肠、口服、眼睛、局部,表皮或通过粘膜途径。给药可以通过腔内输注、囊内给药或通过吸入在肿瘤的切除边缘、病灶内、病灶周围局部(包括肿瘤周围、肿瘤旁、肿瘤内)进行。在一个优选实施例中,药物组合物通过静脉内或皮下给药。

[0186] 本发明的抗体或其结合片段的合适剂量可以由熟练的医学从业者确定。可以改变本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平,以便获得对于特定患者、组合物和给药方式实现期望的治疗响应有效的活性成分的量,而对病人无毒。选择的剂量水平将取决于多种药代动力学因素,其包括所用特定抗体的活性、给药途径、给药时间、抗体排泄速率、治疗

持续时间、其他药物、化合物和/或与所使用的特定组合物结合使用的材料、所治疗患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康状况和既往病史,以及医学领域众所周知的类似因素。

[0187] 本发明的抗体或其结合片段的合适剂量可以在例如约0.1 μ g/kg至约100mg/kg待治疗患者体重的范围内。例如,合适的剂量可以是每周约1 μ g/kg至约50mg/kg体重,每周约100 μ g/kg至约25mg/kg体重或每周约10 μ g/kg至约12.5mg/kg体重。

[0188] 合适的剂量可以是每天约1 μ g/kg至约50mg/kg体重,每天约100 μ g/kg至约25mg/kg体重或每天约10 μ g/kg至约12.5mg/kg体重。

[0189] 可以调整剂量方案以提供最佳的期望响应(例如治疗响应)。例如,可以给药单次栓剂,可以随时间给药几个分剂量,或者可以根据治疗情况的紧急程度按比例减少或增加剂量。以剂量单位形式配制肠胃外组合物特别有利,易于给药和使剂量均匀。如本文所用的剂量单位形式是指适合作为待治疗受试者的单位剂量的物理离散单位;每个单元包含预定量的活性化合物,计算出该活性化合物以与所需的药物载体一起产生所需的治疗效果。

[0190] 抗体可以单剂量或多剂量给药。可以通过相同或不同的途径并在相同或不同的位置给药多次剂量。替代地,抗体可以作为持续释放制剂给药,在这种情况下,需要较少的频繁给药。剂量和频率可以根据抗体在患者体内的半衰期和所需的治疗持续时间而变化。给药的剂量和频率也可以根据治疗是预防性还是治疗性而变化。在预防性应用中,可以在很长一段时间内以相对不频繁的间隔给予相对较低的剂量。在治疗应用中,可以给予相对高的剂量,例如直到患者显示出疾病症状的部分或完全改善。

[0191] 两种或更多种药剂的联合给药可以多种不同方式实现。在一个实施例中,抗体或其结合片段和其他试剂可以在单一组合物中一起给药。在另一个实施例中,抗体和其他试剂可以作为组合疗法的一部分以单独组合物而给药。例如,抗体或其结合片段可以在其他试剂之前、之后或同时给药。

[0192] 要治疗的疾病

[0193] 本发明的抗体或其结合片段,或本文所定义的药物组合物,特别适用于治疗或预防与瓜氨酸化有关的病理,例如与NET相关的病理和炎症病症。

[0194] 本发明还包括一种治疗患者的方法,该方法包括向患者施用治疗有效量的本文所定义的抗体或其结合片段或本文所定义的药物组合物,任选地去治疗或预防与瓜氨酸化有关的病理,例如与NET相关的病理和炎症病症。

[0195] 本发明还涵盖如本文所定义的抗体或其结合片段或如本文所定义的药物组合物,其用于制造药剂以用于预防或治疗与瓜氨酸化相关的病理,例如与NET相关的病理和炎症病症。

[0196] 本发明还涵盖包含本发明的抗体或其结合片段的药物组合物,所述药物组合物用于治疗或预防与瓜氨酸化相关的病理,例如与NET相关的病理和炎症病症。

[0197] 与瓜氨酸化有关的病理可以定义为瓜氨酸化与疾病或病症的病理状态相关的任何疾病或病症。瓜氨酸化在疾病的发病机理中是否起作用,可以由技术人员使用本领域可用的常规测试容易地确定。例如,这些疾病的特征可以是在受影响或与疾病相关的组织中存在瓜氨酸化蛋白质的异常水平。这可以通过免疫学测试例如蛋白质印迹法或ELISA来完成,其中将受影响的组织用作抗原,并且可以借助本文所述的抗瓜氨酸抗体来检测该抗原的瓜氨酸化。替代地,本领域技术人员可以使用蛋白质组学应用,例如质谱分析,来比较来

自受影响的患者的患病组织与健康组织中瓜氨酸化的水平和类型。

[0198] 与NET相关的病理可以被认为是与瓜氨酸化相关的病理。与NET相关的病理可定义为一种疾病或病症,其中NET和NETosis的形成与该疾病或病症的病理状态相关。NET的形成和NETosis是否在疾病的发病机理中起作用,可以由技术人员使用本领域可用的常规测试容易地确定。例如,这些疾病的特征可以是在相关组织中存在NET。

[0199] 因此,本发明涉及用于治疗或预防与NET相关病理的抗体或其结合片段。

[0200] 因此,本发明涉及用治疗有效量的本发明的抗体或其结合片段治疗有需要的患者的方法,其中所述患者患有与NET相关的病理。

[0201] 与NET相关病理的示例包括炎症病症或疾病、眼部炎症疾病、自身免疫性疾病、癌症和移植后器官健康。

[0202] “炎性病症”或“炎性疾病”是指以血管变化为特征的多种病症或疾病中的任何一种:中性粒细胞的水肿和浸润(例如,急性炎症反应);单核细胞对组织的浸润;炎性细胞、结缔组织细胞及它们的细胞产物对组织的破坏;并试图通过结缔组织置换进行修复(例如,慢性炎症反应)。例如,这些疾病是发炎症性关节炎,包括类风湿性关节炎和骨关节炎,SLE、狼疮、脓毒病、血管炎、多发性硬化、牛皮癣关节炎、牛皮癣、阿尔茨海默氏病、自身免疫性肝炎、幼年特发性关节炎、脊椎关节病、多系统萎缩、帕金森氏病、路易体痴呆、特发性肺纤维化、干眼病、葡萄膜炎、非肉芽肿性葡萄膜炎、肉芽肿性葡萄膜炎、皮炎、特应性皮炎,和肺疾病,例如COPD和支气管炎。非肉芽肿性葡萄膜炎可与中性粒细胞显性炎症相关,肉芽肿性葡萄膜炎可与巨噬细胞显性炎症相关。

[0203] NET在包括RA、SLE和血管炎在内的自身免疫疾病病理中起作用。治疗性抗体或其结合片段改善疾病的途径可能是通过抑制NETosis,通过从组织和循环中清除NET残留物(包括有毒组蛋白)和其他自身抗原,以及通过从组织和循环中清除NET残留物和有毒组蛋白。对于许多自身免疫疾病,已经表明,在PAD敲除模型(PAD knock-out models)中或在用PAD抑制剂治疗的野生型动物中,病理状况有所改善,这意味着与NET的数量和疾病严重程度密切相关。

[0204] 因此,炎性病症或疾病以及自身免疫疾病可以通过本发明的抗体及其结合片段来治疗。

[0205] 在一个优选的实施例中,要治疗的疾病是与NET相关的病理,例如SLE、狼疮、败血症、血管炎、发炎症性关节炎、类风湿性关节炎和骨关节炎、牛皮癣、阿尔茨海默氏病、自身免疫性肝炎、幼年特发性关节炎、干燥病、抗磷脂综合征、白塞氏病、脊椎炎、脊椎关节病、多系统萎缩、帕金森氏病、路易体痴呆哮喘、过敏性鼻炎加重哮喘、过敏性鼻炎、囊性纤维化、纤维化和特发性肺纤维化、干眼病、葡萄膜炎、非肉芽肿性葡萄膜炎、肉芽肿性葡萄膜炎、皮炎、特应性皮炎、COPD、支气管炎或其他与NET相关的病理,例如在糖尿病、癌症、癌症转移以及体内或体外移植器官健康中的伤口愈合。

[0206] 在一个优选的实施例中,要治疗的疾病是炎性病症,例如SLE、狼疮、败血症、血管炎、发炎症性关节炎、类风湿性关节炎和骨关节炎、牛皮癣、阿尔茨海默氏病,自身免疫性肝炎、幼年特发性关节炎、干燥病、抗磷脂综合征、白塞氏病、脊椎炎、脊椎关节病、多系统萎缩、帕金森氏病、路易体痴呆哮喘、过敏性鼻炎加重哮喘、过敏性鼻炎、囊性纤维化、纤维化、特发性肺纤维化、干眼病、葡萄膜炎、非肉芽肿性葡萄膜炎、肉芽肿性葡萄膜炎、皮炎、特

应性皮炎、COPD、支气管炎。

[0207] 进一步的实施例

[0208] 通过以下实施例进一步描述本发明：

[0209] 1. 特异性结合至脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位的抗体或其结合片段，其中抗体或其结合片段包括：

[0210] a) VL的CDR1，其中CDR包括氨基酸序列QSL-X₁-D-X₂-D-X₃-KTY或由其组成，其中X₁是V或L，X₂是T、S、A或N，并且X₃是G或A，条件是氨基酸序列不是QSLDSDGKTY (SEQ ID NO:36) 或QSLVSDGKTY (SEQ ID NO:37)；和

[0211] b) 至少一个CDR，选自SEQ ID NO:1至5。

[0212] 2. 根据1所述的抗体或其结合片段，其中抗体或其结合片段包括：

[0213] a) VL的CDR1，其中CDR包括氨基酸序列QSL-X₁-D-X₂-D-X₃-KTY或由其组成，其中X₁是V或L，X₂是T、S、A或N，并且X₃是G或A，条件是氨基酸序列不是QSLDSDGKTY (SEQ ID NO:36) 或QSLVSDGKTY (SEQ ID NO:37)；和

[0214] b) SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:5的CDR。

[0215] 3. 根据2所述的抗体或其结合片段，其中，抗体或其结合片段包括：

[0216] a) SEQ ID NO:6、7、8、9和10的CDR之一；和

[0217] b) SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:5的CDR。

[0218] 4. 根据2所述的抗体或其结合片段，其中抗体或其结合片段包括：

[0219] a) VL的CDR1，其中CDR包括氨基酸序列QSL-X₁-D-X₂-D-X₃-KTY或由其组成，其中X₁是V或L，X₂是T、S、A或N，并且X₃是G或A，条件是氨基酸序列不是QSLDSDGKTY (SEQ ID NO:36) 或QSLVSDGKTY (SEQ ID NO:37)；和

[0220] b) SEQ ID NO:1至5的CDR。

[0221] 5. 根据前述示例中任一个所述的抗体或其结合片段，其中抗体或其结合片段包括：

[0222] a) SEQ ID NO:6、7、8、9和10的CDR之一；

[0223] b) SEQ ID NO:1至5的CDR。

[0224] 6. 根据1或2所述的抗体或其结合片段，其中抗体或其结合片段包括：

[0225] a) VL的CDR1，其中CDR包括氨基酸序列QSL-X₁-D-X₂-D-X₃-KTY或由其组成，其中X₁是V或L，X₂是T、S、A或N，并且X₃是G或A，条件是氨基酸序列不是QSLDSDGKTY (SEQ ID NO:36) 或QSLVSDGKTY (SEQ ID NO:37)；

[0226] b) SEQ ID NO:4和5的CDR中的至少一个；和

[0227] c)

[0228] i) SEQ ID NO:11或12的重链可变域氨基酸序列；或

[0229] ii) (i) 的至少7个氨基酸的片段，其中抗体或其结合片段保留了与脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位特异性反应的能力；或

[0230] iii) (i) 的变体，其与(i)序列具有至少70%的氨基酸序列同一性，其中抗体或其结合片段保留了与脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位特异性反应的能力。

[0231] 7. 根据6所述的抗体或其结合片段，其中抗体或其结合片段包括：

[0232] a) VL的CDR1,其中CDR包括氨基酸序列QSL-X₁-D-X₂-D-X₃-KTY或由其组成,其中X₁是V或L,X₂是T、S、A或N,并且X₃是G或A,条件是氨基酸序列不是QSLDSDGKTY (SEQ ID NO:36)或QSLVSDGKTY (SEQ ID NO:37);

[0233] b) SEQ ID NO:4和5的CDR中的至少一个;和

[0234] c) SEQ ID NO:11或12的重链可变域氨基酸序列。

[0235] 8.根据7所述的抗体或其结合片段,其中所述抗体或其结合片段包括:

[0236] a) VL的CDR1,其中CDR包括氨基酸序列QSL-X₁-D-X₂-D-X₃-KTY或由其组成,其中X₁是V或L,X₂是T、S、A或N,并且X₃是G或A,条件是氨基酸序列不是QSLDSDGKTY (SEQ ID NO:36)或QSLVSDGKTY (SEQ ID NO:37);

[0237] b) SEQ ID NO:4和5的CDR;和

[0238] c) SEQ ID NO:11或12的重链可变域氨基酸序列。

[0239] 9.根据8所述的抗体或其结合片段,其中抗体或其结合片段包括:

[0240] a) SEQ ID NO:6、7、8、9和10的CDR之一;

[0241] b) SEQ ID NO:4和5的CDR;和

[0242] c) SEQ ID NO:11或12的重链可变域氨基酸序列。

[0243] 10.根据前述示例中任一项所述的抗体或其结合片段,其中抗体或其结合片段包括:

[0244] a) SEQ ID NO:11的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:13的轻链可变域氨基酸序列;

[0245] b) SEQ ID NO:11的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:14的轻链可变域氨基酸序列;

[0246] c) SEQ ID NO:11的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:15的轻链可变域氨基酸序列;

[0247] d) SEQ ID NO:11的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:16的轻链可变域氨基酸序列;

[0248] e) SEQ ID NO:11的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:17的轻链可变域氨基酸序列;

[0249] f) SEQ ID NO:12的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:13的轻链可变域氨基酸序列;

[0250] g) SEQ ID NO:12的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:14的轻链可变域氨基酸序列;

[0251] h) SEQ ID NO:12的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:15的轻链可变域氨基酸序列;

[0252] i) SEQ ID NO:12的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:16的轻链可变域氨基酸序列;或

[0253] j) SEQ ID NO:12的重链可变域氨基酸序列和SEQ ID NO:17的轻链可变域氨基酸序列。

[0254] 11.特异性结合至脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位的抗体或其结合片段,其中抗体或其结合片段包含以下CDR:

- [0255] a) SEQ ID NO:13、14、15、16或17的CDR1;和
- [0256] b) SEQ ID NO:11或12的重链可变域氨基酸序列。
- [0257] 12. 根据前述任一示例所述的抗体或其结合片段,其特异性结合至选自SEQ ID NO:18、19、20、21和22的肽,并结合脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4。
- [0258] 13. 根据前述任一示例所述的抗体或其结合片段,其以至少1nM或更小的亲和力特异性结合至脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位。
- [0259] 14. 根据前述示例中任一项所述的抗体或其结合片段,选自重组抗体、单链抗体、单链可变片段(scFv)、可变片段(Fv)、片段抗原结合区(Fab)、单域抗体(sdAb)、VHH抗体、纳米抗体、骆驼科动物衍生的单域抗体,鲨源IgNAR衍生的单域抗体片段(VNAR)、双抗体、三抗体、抗脂和适配体。
- [0260] 15. 根据1至13中任一项所述的抗体或其结合片段,其中抗体优选是全长抗体。
- [0261] 16. 根据15所述的抗体或其结合片段,其包含Fc区,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4区。
- [0262] 17. 根据16所述的抗体或其结合片段,其中重链恒定区包含SEQ ID NO:23,和/或轻链恒定区包括SEQ ID NO:24。
- [0263] 18. 根据前述任一示例所述的抗体或其结合片段,偶联至另外的部分。
- [0264] 19. 一种编码根据1至17中任一项所述抗体或其结合片段的多核苷酸,一个包括所述多核苷酸的克隆或表达载体,或一个包括所述克隆或表达载体的宿主细胞。
- [0265] 20. 一种产生特异性结合至脱亚胺基人组蛋白2A和/或组蛋白4上的瓜氨酸化表位的抗体或其结合片段的方法,包括培养19所述的宿主细胞并从所述细胞分离抗体或其结合片段。
- [0266] 21. 一种药物组合物,其包括根据1至18中任一项所述的抗体或其结合片段和至少一种药学上可接受的稀释剂或载体。
- [0267] 22. 根据21所述的药物组合物,其还包含其他活性成分。
- [0268] 23. 根据1至18中任一项所述的抗体或其结合片段,或根据21或22所述的药物组合物,在治疗中的用途。
- [0269] 24. 根据1至18中任一项所述的抗体或其结合片段,或根据21或22所述的药物组合物,在治疗或预防与NET相关的病理的方法中的用途。
- [0270] 25. 根据24所述用途的抗体、其结合片段或药物组合物的用途,其中与NET相关的病理是系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮、败血症、血管炎、发炎性关节炎、类风湿性关节炎和骨关节炎、牛皮癣、阿尔茨海默氏病、自身免疫性肝炎、幼年特发性关节炎、干燥病、抗磷脂综合征、白塞氏病、脊椎炎、脊椎关节病、多系统萎缩、帕金森氏病、路易体痴呆哮喘、过敏性鼻炎加重哮喘、过敏性哮喘、囊性纤维化、纤维化和特发性肺纤维化、干眼病、葡萄膜炎、非肉芽肿性葡萄膜炎、肉芽肿性葡萄膜炎、皮炎、特应性皮炎、COPD、支气管炎或其他与NET相关的病理,例如在糖尿病、癌症、癌症转移以及体内或体外移植器官健康中的伤口愈合。
- [0271] 26. 根据23至25中任一项所述用途的抗体、其结合片段或药物组合物的用途,其中所述抗体、其结合片段或药物组合物通过肠胃外途径给药而施用,例如静脉内、皮下、眼内、肌肉内、皮内、腹膜内、脊柱途径或通过注射或灌输;或通过其他给药途径,例如直肠、口服、眼睛、局部、表皮、粘膜、局部、肿瘤周围、肿瘤旁、肿瘤内给药至肿瘤的切除边缘、病灶内、病

灶周围,通过腔内输注、囊内给药、或通过吸入给药。

[0272] 27.一种治疗患者的方法,其包括向所述患者施用治疗有效量的如1至18中任一项所定义的抗体或其结合片段,或根据21或22所述的药物组合物。

[0273] 28.根据27所述的方法,其中治疗是与NET相关的病理。

[0274] 通过以下实施例进一步说明本发明,这些实施例不应解释为进一步的限制。在本申请中引用的所有附图和所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容通过引用明确地并入本文。

[0275] 实施例

[0276] 实施例1:hMQ22.101j/e和hMQ22.101f/g的加速稳定性测试。

[0277] 将在25mM Tris-HCl中含有hMQ22.101j/e (12.5mg/ml) 或hMQ22.101f/g (3.31mg/ml) 0.75ml等分试样(玻璃试管)在pH 8.0, 37℃各自储存8周。每周在无菌条件下从每个玻璃管中取出几份10 μ l和20 μ l的样品,并保存在-80℃直至进一步分析(ELISA和质谱)。

[0278] 将来自第0、2、4、6和8周的hMQ22.101j/e样品以及来自第0、3和6周的hMQ22.101f/g样品进行内部验证的CMC ELISA。通过在4℃下过夜孵育,用中性亲和素(0.1 μ g/孔)涂覆96孔ELISA板。将孔用PBS-吐温20(PBS-T)洗涤5次,并在室温(RT)下用PBS-T+1%牛血清白蛋白(BSA)孵育2小时以封闭孔。用PBS-T洗涤多于5次后,将孔在PBS-T+0.2%BSA中用组蛋白衍生肽(SEQ ID NO18:SGXGKQGGKARA)在室温下孵育1小时,该肽在3位含有瓜氨酸(X)和C-端生物素(40ng/孔)。再用PBS-T洗涤5次后,从hMQ22.101j/e或hMQ22.101f/g的参考批次制作为校准曲线,方法是以1350ng/孔开始向孔中添加hMQ22.101j/e或hMQ22.101f/g,然后以1:1的比例稀释直至在PBS-T+0.2%BSA中的浓度达到0.66ng/ml。由相同参考批次hMQ22.101j/e或hMQ22.101f/g以较高(HQC, 250ng/ml)、中等(MQC, 50ng/ml)、较低(LQC 3, 75ng/ml)以及下限质量控制样品(lower limit quality control, LLQC, 1.25ng/ml)制作加标质量控制(Spiked quality control, QC)样品,将所述样品在PBS-T+0.2%BSA中稀释,然后也加入到板中。使用这些QC样品来验证ELISA结果。

[0279] 最后,将在37℃下孵育0、2、3、4、6和8周的加速稳定性样品以在PBS-T+0.2%BSA中40ng/ml的浓度添加到同一板中,并在室温下孵育2小时。将孔用PBS-T洗涤5次,并用兔抗人HRP抗体(在PBS-T+0.2%BSA中以1:12,000)在室温下孵育1小时,然后用PBS-T洗涤3次,并用PBS洗涤3次。在用2M H₂SO₄终止反应之前,将孔用TMB底物孵育10分钟,然后在450nm的波长下测量光密度。绘制出S形校准曲线,并使用来自系列稀释参考抗体的值进行拟合。使用S型拟合曲线方程重新计算QC样品和加速稳定性样品的浓度。将从第0周加速稳定性样品重新计算的抗体浓度设置为100%,并将所有其他加速稳定性重新计算的浓度(第2、3、4、6和8周)计算为第0周(100%)的百分比,并绘制为条形图(图1的顶部组是对于hMQ22.101j/e,图1的底部组是对于hMQ22.101f/g)。

[0280] 加速稳定性测试表明,hMQ22.101j/e和hMQ22.101f/g对组蛋白衍生的含瓜氨酸的肽的结合亲和力随时间降低。

[0281] 实施例2:hMQ22.101j/e加速稳定性样品的质谱分析。

[0282] 研究了hMQ22.101j/e抗体的结合亲和力随时间降低的原因。hMQ22.101j/e在VL CDR区(CDR1和CDR2)中或该区附近具有多个潜在的天门冬氨酸异构化位点。本实施例的目的是通过基于液相色谱(LC)-质谱(MS)的肽图确定天门冬氨酸残基对异构化的敏感性。

[0283] 消化之前,将50 μ g的每个加速稳定性样品(第0、4和8周)进行脱盐、用二硫苏糖醇还原和使用碘乙酰胺进行烷基化。还原和烷基化后,使用测序级修饰的胰蛋白酶(Promega)以1/50(w/w)的酶/蛋白质比例在37 $^{\circ}$ C下消化样品18小时。将消化物储存在-20 $^{\circ}$ C直至LC-MS分析。胰蛋白酶是一种丝氨酸蛋白酶,可在精氨酸或赖氨酸的C-末端特异性裂开。使用反相液相色谱(RPLC)结合UV和质谱检测(RPLC-UV-MS)进行胰蛋白酶消化物的分析。使用与配备有射流电喷雾电离(Jetstream electrospray ionization,ESI)源的Agilent Technologies 6540Q-TOF字符连接(hyphenated)的Agilent Technologies 1290UHPLC系统获取数据。在UV 214nm和MS(/MS)检测之前,使用水、三氟乙酸和乙腈作为流动相成分,在RPLC柱(AdvanceBio肽图C18,250mm L,2.1mm ID,2.7 μ m dp,Agilent Technologies)上分离样品。将约4.5 μ g的量上样至色谱柱。MS系统在扩展动态范围模式(2GHz)下运行,所述运行在对质量922.009798的分辨率为20,000,并且在不使用参考质量的情况下,具有较高的质量准确度(通常<10ppm)。每秒获取2个光谱,在MS和MS/MS模式下采集范围为100-3000amu。MS/MS数据以数据依赖性模式获取。碰撞能量已针对肽片段进行了优化。所有MS测量均在正电离模式下进行。

[0284] 使用包含BioConfirm算法的Agilent MassHunter软件,将测得的信号与序列匹配。将实验数据与序列匹配的质量公差设置为20ppm。指定的酶是胰蛋白酶(赖氨酸或精氨酸的C-末端裂解),允许0-2个缺失裂解。将在20ppm质量精度下获得的提取离子色谱图的峰面积用于对修饰进行定量。考虑到接近完全的序列覆盖率,覆盖了hCDR区中的所有候选天门冬氨酸异构化位点。手动整合这些肽。当存在时,洗脱含有异天门冬氨酸(isoaspartate)的肽,紧接着洗脱含有天门冬氨酸的肽。然后在每种情况下计算相对异构化水平。

[0285] hMQ22.101j/e的VL CDR1的相对天门冬氨酸(D)异构化水平随时间增加(图2A)。在VL的CDR1和CDR2中测试的异构化位点在图2A中列出。VL的CDR1的异构化被认为是抗体的结合亲和力随着时间丧失的原因。

[0286] 实施例3:产生3个VL CDR1天门冬氨酸突变的hMQ22.101抗体。

[0287] 然后研究了VL的CDR1中非种系异构化位点的缺失是否阻止了异构化。包括在每个氨基酸位31(L:Asp31)都包含单个天门冬氨酸突变的3个hVL22.101y域的DNA由GeneArt合成。基于氨基酸相似性,例如1)大小,2)极性和3)电荷,将L:Asp31突变为丙氨酸、谷氨酰胺或丝氨酸。将这些天门冬氨酸突变的VL域克隆到编码全长人轻链的哺乳动物表达载体中。随后,使用这些轻链构建体(hVL22.101h、hVL22.101i和hVL22.101j)——其全部与全长人重链构建体(hVH22.101j)结合,来瞬时转染HEK293细胞以分别生产hMQ22.101j/h、hMQ22.101j/i和hMQ22.101j/j。使用MabSelect SuRe亲和柱从培养物上清液中纯化全尺寸抗体,然后使用脱盐柱将缓冲液交换为25mM Tris-HCl,pH 8.0,两者皆在Akta-FPLC系统上进行。接下来,用离子交换自旋柱对抗体进行抛光,以去除宿主细胞蛋白和残留的蛋白A衍生树脂,然后通过使用高容量内毒素去除树脂进行内毒素去除步骤。最后,用微型Sep先进离心装置(MicroSep Advance Centrifugal Device)(10K MWCO)浓缩抗体。

[0288] 实施例4:用VL CDR1天门冬氨酸突变的hMQ22.101抗体进行抗原结合试验。

[0289] 如实施例1所述,使用内部验证的CMC ELISA将产生的VL CDR1天门冬氨酸突变的抗体hMQ22.101j/h、hMQ22.101j/i和hMQ22.101j/j与含天门冬氨酸的抗体hMQ22.101j/e进行比较。在这里,将hMQ22.101j/e参考批次用于5、10、20、30、40、60、80和100ng/ml的校准曲

线,并分离10、20、60和80ng/ml的加标QC样品。以10、20、30、40、80和100ng/ml测试hMQ22.101j/h、hMQ22.101j/i、hMQ22.101j/j和hMQ22.101j/e,并在图中绘制剂量响应曲线(图2B)。

[0290] 图2B显示了3个VL CDR1突变体(hVL22.101h的CDR1=DS位点突变为AS、hVL22.101i的CDR1=DS位点突变为ES、hVL22.101jj的CDR1=DS位点突变为SS)的光密度结果。hMQ22.101j/i抗体获得了最高改善的光密度结果。

[0291] 实施例5:加速稳定性测试之后对VL CDR1天门冬氨酸突变的hMQ22.101j/i进行质谱分析。

[0292] 在25mM Tris-HCl (pH 8.0)中包含hMQ22.101j/i (12.5mg/ml)的0.75ml等分试样(玻璃管)于37℃各自储存4周。每周在无菌条件下从每个玻璃管中取出几份10μl和20μl样品,并保存在-80℃下直至进一步分析(质谱)。

[0293] 质谱分析与实施例2中描述的方法相同地进行,不同之处在于仅使用来自第0周和第4周的加速稳定性样品。将hMQ22.101j/i的异构化百分比与包含抗体hMQ22.101j/e的异构化百分比进行比较(图2C)。

[0294] hMQ22.101j/i抗体的质谱数据(图2C)显示了VL的CDR1中的异构化仍随时间增加,但是,VL的CDR1中的非种系DS异构化位点的缺失确实极大地解决了异构化问题。

[0295] 然而,与hMQ22.101j/e相比,hMQ22.101j/i对靶标(SEQ ID NO:18)的亲合力较小,因此它不是合适的治疗性抗体候选物。

[0296] 实施例6:产生其他hMQ22.101异构化突变体。

[0297] 然后对VL的CDR1中的异构化位点进行了全面的突变分析,以研究是否有可能在保持突变抗体对其靶标的亲合力的同时去除CDR1的异构化。hVL22.101的17个突变的CDR1域被创建。这17个VL CDR1突变序列以及hVL22.101e和hVL22.101g的未突变CDR1的序列在图3A中列出。

[0298] 通过GeneArt合成了hVL22.101的17个突变的VL CDR1域的DNA和hVH22.101的4个VH域变体。将所有突变的VL和VH域克隆到分别编码全长人轻链和重链的哺乳动物表达载体中。17个突变轻链(hVL22.101LC16、hVL22.101LC17、hVL22.101LC19、hVL22.101LC20、hVL22.101LC21、hVL22.101LC22、hVL22.101LC23、hVL22.101LC24、hVL22.101LC25、hVL22.101LC26、hVL22.101LC27、hVL22.101LC37、hVL22.101LC38、hVL22.101LC39、hVL22.101LC40、hVL22.101LC41和hVL22.101LC42)与非变体重链hVH22.101j或4个变体重链(hVH22.101HC7、hVH22.101HC8、hVH22.101HC9和hVH22.101HC10)结合。因此,轻链(hVL22.101e、hVL22.101LC16、hVL22.101LC17、hVL22.101LC19、hVL22.101LC20、hVL22.101LC21、hVL22.101LC22、hVL22.101LC23、hVL22.101LC24、hVL22.101LC25、hVL22.101LC26、hVL22.101LC27、hVL22.101LC37、hVL22.101LC38、hVL22.101LC39、hVL22.101LC40、hVL22.101LC41和hVL22.101LC42)和重链(hVH22.101、hVH22.101HC7、hVH22.101HC8、hVH22.101HC9和hVH22.101HC10)构建体的所有可能组合用于瞬时转染HEK293细胞,以产生全尺寸抗体(异构突变体)。如实施例3中所述纯化、脱盐、抛光和浓缩抗体。

[0299] 实施例7:hMQ22.101异构化突变体的解离速率分析。

[0300] 在Octet RED96仪器(Pa11 ForteBio)上进行异构化突变抗体的离率筛选(Off-

rate screening)。所有测量均在30℃下进行。首先用PBS将链霉亲和素(SA)生物传感器洗涤50秒。将包含在3位的瓜氨酸和在C-端的生物素的1 μ g/ml N-端组蛋白2A(SEQ ID NO:18)和组蛋白4(SEQ ID NO:20)肽固定在SA生物传感器上200秒,用PBS洗涤50秒,过量的反应性链霉亲和素分子用EZ-链接生物素(EZ-link biocytin)封闭200秒。在PBS中进行另外2个50秒的洗涤步骤后,将在PBS中稀释的浓度为72nM的抗体与生物传感器结合200秒。随后将传感器置于PBS中4000秒,以测量其解离速率。

[0301] 在绘制每种抗体的解离曲线之前,已减去由已暴露于各种抗体的未涂覆生物传感器产生的背景信号以及未暴露于各种抗体的经涂覆生物传感器所产生的信号。使用ForteBio数据分析软件8.1,应用1:1相互作用模型(局部拟合、完全拟合),计算每种抗体的组蛋白2A和组蛋白4的解离速率常数($k_{dis} \times E-07$ (1/s))。

[0302] 结果显示在图3B中。较低的数字表示较慢的离率,这意味着抗原的释放较慢。 $1 \times E-07$ 1/s是最小值,由八位字节(Octet)检测,这意味着几乎没有可测量的离率。

[0303] 几个hMQ22.101异构化突变体显示 $1 \times E-07$ (1/s)的解离速率。优选的重链:hVH22.101j和hVH22.101HC9。优选的轻链:hVL22.101LC17、hVL22.101LC21、hVL22.101LC27、hVL22.101LC41和hVL22.101LC42。

[0304] 实施例8:9个最佳hMQ22.101异构化突变体的加速稳定性测试。

[0305] 从以下选定的突变抗体(范围为2.06-4.29mg/ml)在25mM Tris-HCl (pH 8.0)中的0.4ml等分试样(玻璃管)各自在37℃下保存6周。

[0306]	hMQ22.101f/LC17
	hMQ22.101f/LC27
	hMQ22.101f/LC41
	hMQ22.101f/LC42
	hMQ22.101HC9/LC17
	hMQ22.101HC9/LC21
	hMQ22.101HC9/LC27
	hMQ22.101HC9/LC41
	hMQ22.101HC9/LC42

[0307] 每周在无菌条件下从每个玻璃管中取出几个10 μ l和20 μ l样品,并保存在-80℃直至进一步分析(ELISA和MS分析)。

[0308] 按照实施例1中所述,对第0、3和6周的抗体样品进行内部验证的CMC ELISA,不同之处在于仅将hMQ22.101f/g参考批次用于校准曲线以及HQC、MQC、LQC和LLQC加标QC样本。

[0309] 结果显示在图4中。使用了5个性能最佳的异构化突变体(hMQ22.101f/LC41、hMQ22.101f/LC42、hMQ22.101HC9/LC21、hMQ22.101HC9/LC27、hMQ22.101HC9/LC42,已框出)通过MS分析评定第0周和第6周的异构化。

[0310] 实施例9:5种最佳hMQ22.101异构化突变体的质谱分析。

[0311] 来自这5个抗体的37℃加速稳定性样品在加速稳定性测试(实施例5)中表现最佳,并通过MS分析进一步分析了其在VL的CDR1中的异构化水平。

[0312]	hMQ22.101f/LC41
	hMQ22.101f/LC42

hMQ22.101HC9/LC21

hMQ22.101HC9/LC27

hMQ22.101HC9/LC42

[0313] 与实施例2中所述方法相同地进行MS分析,不同之处在于仅使用第0周和第6周的加速稳定性样品。将异构化的百分比与抗体hMQ22.101j/e的百分比进行了比较(图5)。hMQ22.101f/LC41随时间推移几乎没有异构化(0.5%),被认为是优选的候选物。第二好的抗体是hMQ22.101f/LC42和hMQ22.101HC9/LC42。优选的第二好的抗体是hMQ22.101f/LC42,因为HC链f比HC9更人性化,并且第0周和第6周之间异构化的差异较小(1.9%对2.6%)。

[0314] 实施例10:3种表现最佳的hMQ22.101异构化突变体的聚集和降解分析。

[0315] 来自3个抗体的37℃加速稳定性样品在其VL的CDR1中表现出更少的异构化(实施例6),并进一步分析其聚集和降解水平。

[0316]

hMQ22.101f/LC41

hMQ22.101f/LC42

hMQ22.101HC9/LC42

[0317] 在配备有G1311A四元泵、G1322A脱气机、G1329A自动进样器、G1330B恒温器、G1316A柱温箱和G1314B VWD检测器(Agilent Technologies)的Agilent 1200系统上结合Agilent Zorbax GF-250、4 μ m、9.4 $\times$ 250mm柱进行了测量。注入10 μ l抗体,并使用由在水中的200mM NaH₂PO₄的溶液(pH 7.0)构成的流动相,以2ml/min的流速运行10分钟。使用240nm紫外光检测蛋白质。在大约4.25分钟处检测到主抗体峰。量化主峰之前和之后的肩峰,肩峰分别为聚集和降解水平的亮度。结果如图6所示。

[0318] hMQ22.101f/LC41、hMQ22.101f/LC42和hMQ22.101HC9/LC42显示出可接受的聚集和降解曲线,表明可接受它们用于进一步开发。

[0319] 实施例11:表现最佳的hMQ22.101异构化突变体的片段化分析。

[0320] 使用反相液相色谱(RP-HPLC)结合UV和质谱(MS)检测(RP-HPLC-UV-MS)进行完整mAb样品的分析。使用与配备有射流电喷雾电离(ESI)源的Agilent Technologies 6540 Q-TOF字符连接的Agilent Technologies 1290UHPLC系统获取数据。在RPLC柱(Zorbax 300 SB-C8、100mm L、2.1mm ID、1.8 μ m dp,Agilent Technologies)上分离样品,其中使用在水中的0.1%TFA作为流动相A,将在乙腈中的0.1%TFA作为流动相B。在65分钟内施加浓度梯度为15%至80%的B。将约5 μ g上样至柱。MS系统在高分辨率模式(4GHz)下运行,其中碎裂电压(fragmentor voltage)为350V,Quad AMU设置为300。在正MS模式下,每秒获取1个光谱,采集范围为300-3200amu。使用最大熵算法对原始光谱进行反卷积,该算法结合在具有BioConfirm附件的Agilent Technologies MassHunter软件中。考虑到潜在的C-端赖氨酸截短和N-糖基化,将测得的MW与通过全序列测定的理论MW进行比较。

[0321] 使用RP-HPLC-UV-MS分析,如果与未加应力的样品相比,在37℃下孵育6周的hMQ22.101f/LC41和hMQ22.101j/e样品均观察到碎片(fragmentation)增加。碎片的数量类似于用于临床研究的其他治疗性抗体观察到的碎片分布,并且是可接受的。

[0322] 实施例12:人中性粒细胞胞外陷阱试验。

[0323] 来自2个不同的健康供体的全血收集在肝素钠试管(Beckton Dickinson)中。将每个供体的30ml血液与15ml 6%的葡聚糖在0.9%NaCl中混合,并在室温下孵育60分钟。孵育

后,可见2个清晰层,底层包含大部分红细胞、顶层包含中性粒细胞。收集顶层并在室温下以300g向下自旋10分钟。将沉淀(pellet)重悬于25ml PBS中,并通过用Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare)进行密度梯度离心,然后在室温下进行10分钟的红细胞溶解步骤,从而分离出中性粒细胞。使用Guava EasyCyte流式细胞仪对细胞计数。将每孔900.000中性粒细胞接种到补充有1%热灭活的胎牛血清和1mM CaCl_2 的中性粒细胞胞外陷阱(NET)分析缓冲液(含谷氨酰胺的RPMI 1640培养基(Life Technologies))中的24孔组织培养板(Greiner bio-one)中。用钙离子载体A23187(分子探针)刺激中性粒细胞4小时。通过在添加A23187至细胞之前15分钟,添加浓度为25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的以下抗体之一(hMQ22.101f/g、hMQ22.101f/LC41、hMQ22.101f/LC42和同种型对照抗体MQR2.201)或试验缓冲液来测试降低NET抗体的作用。在37 $^{\circ}\text{C}$ 和5% CO_2 下孵育4小时后,使用NET试验缓冲液将细胞非常精细地洗涤2次。随后用S7核酸酶(7.5U/0.5ml)在37 $^{\circ}\text{C}$ 下消化细胞外DNA 15分钟,然后加入10 μl 500mM EDTA以停止进一步消化。从孔中收集NET,并以20g向下自旋5分钟,以去除完整的细胞。通过将50 μl 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物添加到50 μl 收获的NET中来测量样品中的MPO活性,从而对NET的数量进行定量。在室温下孵育10分钟后,加入50 μl H_2SO_4 ,并在450nm下测量光密度。减去来自未经过A23187处理的中性粒细胞的背景信号,并将来自A23187+MQR2.201处理的中性粒细胞的信号设置为100%。将来自所有其他抗体处理组的信号与A23187+MQR2.201处理组进行比较(图7)。

[0324] 令人惊讶的是,开发候选hMQ22.101f/LC41在25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度下($n=2$)优于hMQ22.101f/LC42和hMQ22.101f/g。异构化突变体抗体不仅保持了非突变抗体的特性,而且在其基础上得到了改善。

[0325] 实施例13:用于炎症的实验小鼠模型。

[0326] 这项研究的目标是,与较早的候选hMQ22.101f/g和在胶原抗体诱导的关节炎(CAIA)小鼠模型中的同种型匹配对照抗体MQR2.201相比,使用指定的开发候选hMQ22.101f/LC41或hMQ22.101f/LC42(其中消除了异构化问题)测试剂量响应范围。量化了爪和脚踝的肿胀。

[0327] 根据制造商的说明,使用了来自ModiQuest Research B.V.(目录号:MQ18.101)的市售CAIA小鼠模型来诱发小鼠关节炎。为此目的,在DBA/J1小鼠中腹膜内注射2.8mg抗胶原II抗体混合物。3天后,小鼠再次接受含有25 μg LPS的腹膜注射以同步小鼠之间的炎症。与LPS同时,小鼠接受tACPAs hMQ22.101f/g、hMQ22.101f/LC41或hMQ22.101f/LC42(6.25、12.5和25mg/kg),非相关同种型匹配对照抗体MQR2.201(25mg/kg)或安慰剂(0.9%NaCl的生理盐溶液)。通常,从注射LPS后2天(即第5天)开始,可以看到前爪和后爪的炎症。从第0天开始宏观评分爪的肿胀程度,持续周期为13天。最大肿胀程度评分为8(按4个爪子进行划分)。有关计分系统,请参见下表。

[0328]

1-2个肿胀脚趾	0.25
3-4个肿胀脚趾	0.50
脚垫或脚踝略肿	0.50-0.75
脚垫或脚踝+/-脚趾肿胀	1.00
脚趾肿胀+脚垫略肿	1.25
脚趾肿胀+脚垫肿胀	1.5

脚垫肿胀+脚踝肿胀	2.00
-----------	------

[0329] 结果显示在图8中。与用对照抗体或生理盐溶液处理的小鼠相比,用治疗性抗体处理的小鼠的爪以剂量依赖方式表现显著减少的炎症。优化的先导抗体hMQ22.101f/LC41和hMQ22.101f/LC42(其中去除了异构化问题)均比以前的先导候选hMQ22.101f/g更能防止炎症,这在25mg/kg剂量下清楚显示(图8,顶部组)。没有观察到不良反应。在最低剂量6.25mg/kg(图8,底部组)下,hMQ22.101f/LC41优于所有其他抗体,在第13天,与安慰剂治疗组相比,hMQ22.101f/LC41、hMQ22.101f/LC42和hMQ22.101f/g的学生t检验(Student t-test)p值分别为 $p<0.001$ 、 $p<0.05$ 和 $p=0.46$ 。

[0330] 实施例14:在小鼠体外NET试验中开发候选hMQ22.101f/LC41的进一步表征。

[0331] 为了进一步加强hMQ22.101f/LC41是NET形成的有效抑制剂的观念,已对hMQ22.101f/LC41与小鼠NET和前NET(pre-NET)的结合以及对小鼠NET形成的抑制进行了如下研究。前NET被定义为具有无定形的去缩合(decondensed)核结构的中性粒细胞,该核结构包括仍然在细胞内出现的瓜氨酸化染色质,而核膜塌陷。

[0332] 这项研究的目的是测试指定的开发候选hMQ22.101f/LC41是否能够抑制小鼠NET的形成。根据制造商的指示,使用EasySep™小鼠中性粒细胞富集试剂盒(Stemcell Technologies)通过阴性选择从C57BL/6J小鼠的骨髓中分离出中性粒细胞。使用Ly6G(Biolegend)抗体通过流式细胞术检查分离的中性粒细胞的纯度,而且纯度在90%以上。在含有钙和镁的HBSS中,将分离的骨髓中性粒细胞的浓度调整为 2×10^6 细胞/ml。将总共100 μ l的细胞悬浮液添加至8孔室载玻片(Thermo Fisher Scientific)的每个孔中。向细胞中加入150 μ l含1 μ g/ml A23187的HBSS或载体对照之前,将25 μ g/ml hMQ22.101f/LC41、MQR2.201或无抗体用细胞孵育15分钟。将室载玻片在37℃和5%CO₂下孵育3小时。随后,向每个孔中添加2%(v/v)多聚甲醛(Merck),并将制剂在4℃下孵育12h。在室温下用在PBS中的10%胎牛血清(FCS;Biochrome)封闭样品1小时。在4℃,在PBS中的10%FCS中添加兔抗citH3一抗(Abcam,ab5103;1:200)或TRITC偶联的羊抗人IgG(Jackson ImmunoResearch,109-025-003;1:100)12小时。将载玻片用PBS洗涤3次,然后在室温下于黑暗中添加Cy5偶联的羊抗兔IgG二抗(Jackson ImmunoResearch,111-175-144;1:400)1.5小时。载玻片再次用PBS洗涤3次。在室温下添加含有2.5 μ M烟酸己可碱(赫斯特公司)的PBS染色溶液15分钟。用PBS洗涤后,将样品包埋在封固剂(mounting medium)(BIOZOL)中。在BZ-X710显微镜(Keyence)上分析载玻片,并用Fiji成像软件对NET和前NET进行定量(图9A)。表示hMQ22.101f/LC41结合(hIgG;红色)至NET(黄色箭头)和前NET(白色箭头)的代表性图在图9B中显示。

[0333] 与MQR2.201处理的小鼠BM衍生的中性粒细胞相比,用hMQ22.101f/LC41体外处理小鼠骨髓(BM)衍生的中性粒细胞导致A23187诱导的NET挤压减少(图9A)。另外,hMQ22.101f/LC41与排出的小鼠NET(图9B;黄色箭头)和前NET(图9B;白色箭头)结合,这可能是巨噬细胞清除NET的第一步。

[0334] 实施例15:使用降植烷诱导的腹膜炎小鼠模型在小鼠体内NET/巨噬细胞试验中对开发候选hMQ22.101f/LC41进一步表征

[0335] 使用以前由Kienhöfer等人(JCI Insight 2017;2(1):e92920)描述的由降植烷诱导的腹膜细胞流入小鼠模型测试了开发候选hMQ22.101f/LC41抑制体内NET形成的能力。

[0336] 简而言之,在注射500 μ l降植烷(Sigma-Aldrich)后立即给药50mg/kg MQR2.201或

hMQ22.101f/LC41,然后在12小时后再次注射50mg/kg MQR2.201或hMQ22.101f/LC41 LC41。总共24小时后,从腹膜分离出炎性细胞,将炎性细胞调节至 1×10^6 细胞/ml,并转移至流动室载玻片或细胞自旋(cytospin)载玻片上,以通过免疫荧光显微镜进行分析。随后用PBS+10%FCS封闭载玻片,并将载玻片用兔抗citH3 (Abcam,ab5103;1:200)、兔抗NE (Abcam,ab21595;1:200)、AF488-偶联的大鼠抗小鼠F4/80 (Biolegend,123120;1:200)或TRITC-偶联的羊抗人IgG (Jackson ImmunoResearch,109-025-003;1:100)孵育。将载玻片用PBS洗涤3次,并在室温下于黑暗中添加Cy5偶联的羊抗兔IgG二抗 (Jackson ImmunoResearch,111-175-144;1:400) 1.5小时。将载玻片再次用PBS洗涤3次。在室温下添加含有2.5 μ M烟酸己可碱的PBS染色溶液15分钟。用PBS洗涤后,将样品包埋在封固剂(BIOZOL)中。在BZ-X710显微镜(Keyence)上分析载玻片(图10A和C),并用Fiji成像软件对NET和前NET进行定量分析(图10B)。图10C显示了hMQ22.101f/LC41与NET和前NET的结合。图11显示了巨噬细胞对富含hMQ22.101f/LC41的NET的吸收。

[0337] 当与来自MQR2.201处理的小鼠的腹膜细胞相比时,在来自hMQ22.101f/LC41处理的小鼠的腹膜细胞中观察到包含DNA和瓜氨酸化的组蛋白3(citH3)的NET细丝减少(图10A)。NET的定量(citH3和DNA(烟酸己可碱)的共定位)证实了这一观察结果(图10B)。DNA和citH3的共定位是NET形成的标志。此外,hMQ22.101f/LC41与被排出的小鼠NET以及小鼠前NET结合(图10C),这可能是巨噬细胞清除NET的第一步。实际上,在细胞浸润液中观察到F4/80阳性巨噬细胞,细胞浸润液中包含吞噬的hMQ22.101f/LC41与citH3或中性粒细胞弹性蛋白酶的结合(图11)。

[0338] 实施例16:RA的CIA小鼠模型

[0339] 为了研究tACPA对NET诱导的组织损伤的功效,在RA的慢性胶原诱导的关节炎(CIA)小鼠模型中使用了不同的锥形tACPA策略。

[0340] 为了诱发慢性关节炎,将牛胶原II在0.05M的乙酸中稀释至2mg/ml的浓度,并在等体积的弗氏完全佐剂中乳化。在第0天,用100 μ g牛CII对10-12周龄的雄性DBA/J1雄性小鼠在尾巴基部进行皮内免疫。在第21天,小鼠接受腹膜内强化注射溶于PBS的50 μ g牛CII,然后几天后发生了关节炎(图12A)。当注意到爪子的足趾或其他部位发红和/或肿胀变化明显时,则认为小鼠患有关节炎。如上所述对每个爪中的关节炎进行评分(RA的CAIA小鼠模型)。在疾病发作后(21-28天之间),当在0-8的任意范围内平均关节炎评分(MAS) ≥ 0.75 (每爪0-2)时,开始进行治疗处理。用4次重复静脉注射进行的治疗性给药相互间隔4天,其中指定剂量的hMQ22.101j/e(50/10/10/10、30/30/30/10和50/50/50/15mg/kg),与50/50/50/50mg/kg MQR2.201相比,在第14天降低MAS的比例分别为38%、52%和81%(图12B)。开始治疗后第14天处死小鼠。收集踝关节和膝关节并储存在福尔马林中以进行组织学分析。

[0341] 值得一提的是,所有hMQ22.101j/e治疗均在前8天内阻止了疾病的发展,此后MAS开始上升,这可能是由于这些小鼠体内产生了抗药物抗体。仅用50/50/50/15mg/kg hMQ22.101j/e治疗完全稳定了疾病共14天,MAS不超过0.75。

[0342] 为了进一步研究tACPA对骨损伤的影响,根据hMQ22.101j/e和MQR2.201治疗方案对膝盖和所有后爪的脚踝进行了X射线分析。与观察到的MAS一致,所有hMQ22.101j/e治疗均抑制了脚踝和膝盖的骨损伤(图12C)。为了进一步了解tACPA的保护作用,使用H&E和番红精O(SO)染色进行了踝关节的组织学分析。与MQR2.201处理的小鼠相比,hMQ22.101j/e抑制

了炎症细胞涌入(图12D)。此外,与MQR2.201处理的小鼠相比,hMQ22.101j/e显著降低了骨和软骨侵蚀以及软骨蛋白聚糖耗竭和软骨细胞死亡(图12E至H)。这些数据表明,tACPA可以强烈缓解包括关节损伤在内的关节炎症状。

[0343] 然后,我们研究了接受50/50/50/15mg/kg hMQ22.101j/e或50/50/50/50mg/kg MQR2.201的CIA小鼠爪中中性粒细胞和NET的存在。在MQR2.201处理的动物中证实了小鼠中性粒细胞标记Ly6G、瓜氨酸化的组蛋白3(citH3)和髓过氧化物酶(MPO),而在hMQ22.101j/e处理的小鼠中这些标记几乎不存在(图12I)。DAPI被用作核和细胞外DNA染色剂(图12I)。中性粒细胞(Ly6G)和NET(citH3和MPO的共定位)的定量通过分析每只动物右后爪的,包括胫跗关节、近端跗间关节、远端跗间关节和跖跗关节在内的多个关节而实施。与用MQR2.201治疗的小鼠相比,在用hMQ22.101j/e治疗的小鼠的关节中观察到中性粒细胞(图12J)和NET(图12K)的量均减少。我们发现关节中NET的数量与宏观爪肿胀显著相关(图12L; $r=0.6120$, $P=0.0041$)。同样,在爪肿胀与关节中存在中性粒细胞之间观察到显著相关性(图12M; $r=0.8729$, $P<0.0001$)。总之,这些数据表明,tACPA治疗可消灭体内发炎组织中的NET,从而防止严重的骨骼和组织破坏。

[0344] 实施例17:hMQ22.101j/e不与健康的白细胞结合

[0345] 从荷兰奈梅亨的Sanquin血库获得来自健康志愿者(HV)的血液收集在锂肝素管中。所有献血者均表示知情同意。进行Ficoll密度梯度离心以分离外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)和中性粒细胞。收集PBMC并用补充有10%(v/v)热灭活的胎牛血清(FCS)和50U/ml青霉素-链霉素的RPMI 1640(以下称为RPMI 10%)洗涤3次以除去血小板。将中性粒细胞/红细胞悬浮液与0.9%NaCl中6%(w/v)的葡聚糖混合,并在室温下孵育25分钟。随后,收集中性粒细胞,在室温下暴露于氯化钾铵(ammonium-chloride-potassium,ACK)缓冲液10分钟以溶解剩余的红细胞,并用RPMI 10%洗涤2次。

[0346] 将PBMC和中性粒细胞以在FACS缓冲液中 2×10^5 个细胞/孔的密度接种在96孔V形底板中。将细胞用人Trustain FcX(在FACS缓冲液中以1:50稀释)在室温下孵育20分钟,以阻断Fc受体。随后,PBMC在室温下用包含 $6.25\mu\text{g/ml}$ HiLyteTMFluor 488-偶联的hMQ22.101j/e、 $0.17\mu\text{g/ml}$ 抗CD3、 $1\mu\text{g/ml}$ 抗CD11c、 $0.33\mu\text{g/ml}$ 抗-CD14、 $0.17\mu\text{g/ml}$ 抗-CD20、 83ng/ml 抗-CD45和 $0.17\mu\text{g/ml}$ 抗-CD56的抗体混合物孵育45分钟,同时将中性粒细胞用含有 $6.25\mu\text{g/ml}$ HiLyteTMFluor 488-偶联的hMQ22.101j/e、 83ng/ml 抗CD45和 83ng/ml 抗CD66b的抗体混合物孵育。作为HiLyteTMFluor 488-偶联的hMQ22.101j/e结合的阳性对照,在阻断Fc受体之前,用 $5\mu\text{M}$ A23187刺激中性粒细胞45分钟。抗体孵育后,PBMC和中性粒细胞在室温下用4%甲醛固定15分钟,用FACS缓冲液洗涤,并用CytoFLEX流式细胞仪分析。

[0347] HiLyteTMFluor 488-偶联的hMQ22.101j/e不与健康的不活动的T细胞、B细胞、单核细胞、自然杀伤(natural killer,NK)细胞、树突状细胞(DC)或中性粒细胞结合,但与活化的中性粒细胞结合(图13)。预期hMQ22.101f/LC41抗体具有可比的结果。

[0348] 序列表

[0349] SEQ ID NO:1-msVH22.10和hVH22.101(HC)x的CDR1

[0350] GYTFTNYG

[0351] SEQ ID NO:2-msVH22.101和hVH22.101(HC)x的CDR2

[0352] INTYSGEA

- [0353] SEQ ID NO:3-msVH22.101和hVH22.101 (HC) x的CDR3
- [0354] LRGYTYQSFDEGGDY
- [0355] SEQ ID NO:4-msVL22.101和hVL22.101 (LC) y的CDR2
- [0356] LVS
- [0357] SEQ ID NO:5-msVL22.101和hVL22.101 (LC) y的CDR3
- [0358] WQGTHFPYT
- [0359] SEQ ID NO:6-hVL22.101LC17的CDR1
- [0360] QSLLDTDGKTY
- [0361] SEQ ID NO:7-hVL22.101LC21的CDR1
- [0362] QSLLDSDAKTY
- [0363] SEQ ID NO:8-hVL22.101LC27的CDR1
- [0364] QSLLDTDAKTY
- [0365] SEQ ID NO:9-hVL22.101LC41的CDR1
- [0366] QSLLDADGKTY
- [0367] SEQ ID NO:10-hVL22.101LC42的CDR1
- [0368] QSLLDNDGKTY
- [0369] SEQ ID NO:11-hVH22.101f
- [0370] RIQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYGMHWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGEATYAQKFQGRVT
MTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCLRGYTYQSFDEGGDYWGQGLTVTVSS
- [0371] SEQ ID NO:12-hVH22.101HC9
- [0372] RIQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYGMHWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGEATYVDDFQGRVT
MTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCLRGYTYQSFDEGGDYWGQGLTVTVSS
- [0373] SEQ ID NO:13-hVL22.101LC17
- [0374] DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDTDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK
- [0375] SEQ ID NO:14-hVL22.101LC21
- [0376] DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDAKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK
- [0377] SEQ ID NO:15-hVL22.101LC27
- [0378] DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDTDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK
- [0379] SEQ ID NO:16-hVL22.101LC41
- [0380] DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDADGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK
- [0381] SEQ ID NO:17-hVL22.101LC42
- [0382] DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDNDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK
- [0383] SEQ ID NO:18-来自W02016092082 (在实施例1/7中使用的) 中组蛋白2A的SEQ ID
NO 1

- [0384] SGXGKQGKARA
- [0385] 其中X是瓜氨酸
- [0386] SEQ ID NO:19-来自W02016092082(在实施例7使用的)中组蛋白4的SEQ ID NO 2
- [0387] SGXGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRL
- [0388] 其中X是瓜氨酸
- [0389] SEQ ID NO:20-来自W02016092082(在实施例7使用的)中组蛋白4的缩短的SEQ ID NO2SGXGKGGKGLGK
- [0390] 其中X是瓜氨酸
- [0391] SEQ ID NO:21-4号肽(人组蛋白2A)(来自W02011070172的SEQ ID NO24)
- [0392] QFPVGXVHRLLR
- [0393] 其中X是瓜氨酸
- [0394] SEQ ID NO:22-6号肽:(人组蛋白2A)(来自W02011070172的SEQ ID NO26)
- [0395] VHRLXKGNYS
- [0396] 其中X是瓜氨酸
- [0397] SEQ ID NO:23-IgG1的人重链恒定域
- [0398] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [0399] SEQ ID NO:24-人κ链恒定域
- [0400] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0401] SEQ ID NO:25-msVH22.101
- [0402] RIQLVQSGPELKKPGAEVKKISCKASGYTFTNYGMHWMKQTPGKDFRWMGWINTYSGEATYVDDFKGRFAFSLGTSASTAYLQINNKKNDTATYFCLRGYTYQSFDEGGDYWGQGTALTSS
- [0403] SEQ ID NO:26-hVH22.101j
- [0404] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMHWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGEATYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCLRGYTYQSFDEGGDYWGQGTALTSS
- [0405] SEQ ID NO:27-hVH22.101HC7
- [0406] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYGMHWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGEATYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCLRGYTYQSFDEGGDYWGQGTALTSS
- [0407] SEQ ID NO:28-hVH22.101HC8
- [0408] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYGMHWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGEATYVDDFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCLRGYTYQSFDEGGDYWGQGTALTSS
- [0409] SEQ ID NO:29-hVH22.101HC10
- [0410] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMHWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGEATYVDDFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCLRGYTYQSFDEGGDYWGQGTALTSS
- [0411] SEQ ID NO:30-msVL22.101

- [0412] DVVMTQTPLTSLVTTGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLFQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTG
SGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCWQGTHFPYTFGGGTNLEIK
- [0413] SEQ ID NO:31-hVL22.101e
- [0414] DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK
- [0415] SEQ ID NO:32-hVL22.101g
- [0416] DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK
- [0417] SEQ ID NO:33-hVL22.101h
- [0418] DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVASDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK
- [0419] SEQ ID NO:34-hVL22.101i
- [0420] DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVESDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK
- [0421] SEQ ID NO:35-hVL22.101j
- [0422] DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVSSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK
- [0423] SEQ ID NO:36-msVL22.101和hVL22.101g的CDR1
- [0424] QSLDSDGKTY
- [0425] SEQ ID NO:37-hVL22.101e的CDR1
- [0426] QSLVSDGKTY
- [0427] SEQ ID NO:38-hVL22.101h的CDR1
- [0428] QSLVASDGKTY
- [0429] SEQ ID NO:39-hVL22.101i的CDR1
- [0430] QSLVESDGKTY
- [0431] SEQ ID NO:40-hVL22.101j的CDR1
- [0432] QSLVSSDGKTY
- [0433] SEQ ID NO:41-hVL22.101LC16的CDR1
- [0434] QSLLESDGKTY
- [0435] SEQ ID NO:42-hVL22.101LC19的CDR1
- [0436] QSLDSEGKTY
- [0437] SEQ ID NO:43-hVL22.101LC20的CDR1
- [0438] QSLDSSGKTY
- [0439] SEQ ID NO:44-hVL22.101LC22的CDR1
- [0440] QSLLESEGKTY
- [0441] SEQ ID NO:45-hVL22.101LC23的CDR1
- [0442] QSLLESSGKTY
- [0443] SEQ ID NO:46-hVL22.101LC24的CDR1
- [0444] QSLLESDAKTY

- [0445] SEQ ID NO:47-hVL22.101LC25的CDR1
[0446] QSLLDTEGKTY
[0447] SEQ ID NO:48-hVL22.101LC26的CDR1
[0448] QSLLDTSGKTY
[0449] SEQ ID NO:49-hVL22.101LC37的CDR1
[0450] QSLLDSAGKTY
[0451] SEQ ID NO:50-hVL22.101LC38的CDR1
[0452] QSLLESAGKTY
[0453] SEQ ID NO:51-hVL22.101LC39的CDR1
[0454] QSLLDAEGKTY
[0455] SEQ ID NO:52-hVL22.101LC40的CDR1
[0456] QSLLDNEGKTY
[0457] SEQ ID NO:53-msFib β XG (来自W02011070172的SEQ ID NO37)
[0458] EPTDSL DAXGHRPVDRR
[0459] 其中X是瓜氨酸
[0460] SEQ ID NO:54-msVim XS/XL (来自W02011070172的SEQ ID NO38)
[0461] YVTXSSAVXLXSSVP
[0462] 其中X是瓜氨酸
[0463] SEQ ID NO:55-msVL22.101和hVL22.101 (LC) y的CDR2附近区
[0464] LVSKLDS
[0465] SEQ ID NO:56-hCH22.101f的重链恒定域
[0466] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0001]	序列表
[0002]	<110> 莫蒂克斯特私人有限公司
[0003]	<120> 抗体
[0004]	<130> N413524W0
[0005]	<150> GB 1813597.0
[0006]	<151> 2018-08-21
[0007]	<150> GB 1900983.6
[0008]	<151> 2019-01-24
[0009]	<160> 56
[0010]	<170> PatentIn version 3.5
[0011]	<210> 1
[0012]	<211> 8
[0013]	<212> PRT
[0014]	<213> 人工序列
[0015]	<220>
[0016]	<223> msVH22.101和 hVH22.101 (HC) x的CDR1
[0017]	<400> 1
[0018]	Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
[0019]	1 5
[0020]	<210> 2
[0021]	<211> 8
[0022]	<212> PRT
[0023]	<213> 人工序列
[0024]	<220>
[0025]	<223> msVH22.101和hVH22.101 (HC) x的CDR2
[0026]	<400> 2
[0027]	Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Glu Ala
[0028]	1 5
[0029]	<210> 3
[0030]	<211> 15
[0031]	<212> PRT
[0032]	<213> 人工序列
[0033]	<220>
[0034]	<223> msVH22.101和 hVH22.101 (HC) x的CDR3
[0035]	<400> 3
[0036]	Leu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gln Ser Phe Asp Glu Gly Gly Asp Tyr
[0037]	1 5 10 15
[0038]	<210> 4

[0039]	<400>	4
[0040]	000	
[0041]	<210>	5
[0042]	<211>	9
[0043]	<212>	PRT
[0044]	<213>	人工序列
[0045]	<220>	
[0046]	<223>	msVL22.101和hVL22.101(LC)y的CDR3
[0047]	<400>	5
[0048]	Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr	
[0049]	1	5
[0050]	<210>	6
[0051]	<211>	11
[0052]	<212>	PRT
[0053]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0054]	<400>	6
[0055]	Gln Ser Leu Leu Asp Thr Asp Gly Lys Thr Tyr	
[0056]	1	5 10
[0057]	<210>	7
[0058]	<211>	11
[0059]	<212>	PRT
[0060]	<213>	智人
[0061]	<400>	7
[0062]	Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Ala Lys Thr Tyr	
[0063]	1	5 10
[0064]	<210>	8
[0065]	<211>	11
[0066]	<212>	PRT
[0067]	<213>	智人
[0068]	<400>	8
[0069]	Gln Ser Leu Leu Asp Thr Asp Ala Lys Thr Tyr	
[0070]	1	5 10
[0071]	<210>	9
[0072]	<211>	11
[0073]	<212>	PRT
[0074]	<213>	智人
[0075]	<400>	9
[0076]	Gln Ser Leu Leu Asp Ala Asp Gly Lys Thr Tyr	
[0077]	1	5 10

[0078]	<210>	10															
[0079]	<211>	11															
[0080]	<212>	PRT															
[0081]	<213>	智人															
[0082]	<400>	10															
[0083]	Gln	Ser	Leu	Leu	Asp	Asn	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr						
[0084]	1				5					10							
[0085]	<210>	11															
[0086]	<211>	122															
[0087]	<212>	PRT															
[0088]	<213>	人工序列															
[0089]	<220>																
[0090]	<223>	hVH22.101f															
[0091]	<400>	11															
[0092]	Arg	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
[0093]	1				5					10					15		
[0094]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	
[0095]				20					25					30			
[0096]	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
[0097]			35					40					45				
[0098]	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Ser	Gly	Glu	Ala	Thr	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	
[0099]		50					55					60					
[0100]	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
[0101]	65					70					75					80	
[0102]	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
[0103]					85					90						95	
[0104]	Leu	Arg	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Gln	Ser	Phe	Asp	Glu	Gly	Gly	Asp	Tyr	Trp	
[0105]				100					105					110			
[0106]	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
[0107]			115					120									
[0108]	<210>	12															
[0109]	<211>	122															
[0110]	<212>	PRT															
[0111]	<213>	智人															
[0112]	<400>	12															
[0113]	Arg	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
[0114]	1				5					10					15		
[0115]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	
[0116]				20					25					30			

[0117]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0118]	35 40 45
[0119]	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Val Asp Asp Phe
[0120]	50 55 60
[0121]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
[0122]	65 70 75 80
[0123]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0124]	85 90 95
[0125]	Leu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gln Ser Phe Asp Glu Gly Gly Asp Tyr Trp
[0126]	100 105 110
[0127]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0128]	115 120
[0129]	<210> 13
[0130]	<211> 112
[0131]	<212> PRT
[0132]	<213> 智人
[0133]	<400> 13
[0134]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
[0135]	1 5 10 15
[0136]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr
[0137]	20 25 30
[0138]	Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
[0139]	35 40 45
[0140]	Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
[0141]	50 55 60
[0142]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0143]	65 70 75 80
[0144]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
[0145]	85 90 95
[0146]	Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0147]	100 105 110
[0148]	<210> 14
[0149]	<211> 112
[0150]	<212> PRT
[0151]	<213> 智人
[0152]	<400> 14
[0153]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
[0154]	1 5 10 15
[0155]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

[0156]	20	25	30
[0157]	Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser		
[0158]	35	40	45
[0159]	Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro		
[0160]	50	55	60
[0161]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
[0162]	65	70	75
[0163]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly		
[0164]	85	90	95
[0165]	Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0166]	100	105	110
[0167]	<210> 15		
[0168]	<211> 112		
[0169]	<212> PRT		
[0170]	<213> 智人		
[0171]	<400> 15		
[0172]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly		
[0173]	1	5	10
[0174]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr		
[0175]	20	25	30
[0176]	Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser		
[0177]	35	40	45
[0178]	Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro		
[0179]	50	55	60
[0180]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
[0181]	65	70	75
[0182]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly		
[0183]	85	90	95
[0184]	Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0185]	100	105	110
[0186]	<210> 16		
[0187]	<211> 112		
[0188]	<212> PRT		
[0189]	<213> 智人		
[0190]	<400> 16		
[0191]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly		
[0192]	1	5	10
[0193]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ala		
[0194]	20	25	30

[0195] Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 [0196] 35 40 45
 [0197] Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 [0198] 50 55 60
 [0199] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 [0200] 65 70 75 80
 [0201] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 [0202] 85 90 95
 [0203] Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0204] 100 105 110
 [0205] <210> 17
 [0206] <211> 112
 [0207] <212> PRT
 [0208] <213> 智人
 [0209] <400> 17
 [0210] Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 [0211] 1 5 10 15
 [0212] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Asn
 [0213] 20 25 30
 [0214] Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 [0215] 35 40 45
 [0216] Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 [0217] 50 55 60
 [0218] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 [0219] 65 70 75 80
 [0220] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 [0221] 85 90 95
 [0222] Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0223] 100 105 110
 [0224] <210> 18
 [0225] <211> 12
 [0226] <212> PRT
 [0227] <213> 智人
 [0228] <220>
 [0229] <221> MISC_FEATURE
 [0230] <222> (3) .. (3)
 [0231] <223> Xaa = 瓜氨酸(citrulline)
 [0232] <400> 18
 [0233] Ser Gly Xaa Gly Lys Gln Gly Gly Lys Ala Arg Ala

[0234]	1	5	10
[0235]	<210> 19		
[0236]	<211> 23		
[0237]	<212> PRT		
[0238]	<213> 智人		
[0239]	<220>		
[0240]	<221> MISC_FEATURE		
[0241]	<222> (3) .. (3)		
[0242]	<223> Xaa = 瓜氨酸		
[0243]	<400> 19		
[0244]	Ser Gly Xaa Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys		
[0245]	1	5	10 15
[0246]	Arg His Arg Lys Val Leu Arg		
[0247]	20		
[0248]	<210> 20		
[0249]	<211> 12		
[0250]	<212> PRT		
[0251]	<213> 智人		
[0252]	<220>		
[0253]	<221> MISC_FEATURE		
[0254]	<222> (3) .. (3)		
[0255]	<223> Xaa = 瓜氨酸		
[0256]	<400> 20		
[0257]	Ser Gly Xaa Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys		
[0258]	1	5	10
[0259]	<210> 21		
[0260]	<211> 12		
[0261]	<212> PRT		
[0262]	<213> 智人		
[0263]	<220>		
[0264]	<221> MISC_FEATURE		
[0265]	<222> (6) .. (6)		
[0266]	<223> Xaa = 瓜氨酸		
[0267]	<400> 21		
[0268]	Gln Phe Pro Val Gly Xaa Val His Arg Leu Leu Arg		
[0269]	1	5	10
[0270]	<210> 22		
[0271]	<211> 12		
[0272]	<212> PRT		

[0312]	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
[0313]	210 215 220
[0314]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
[0315]	225 230 235 240
[0316]	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
[0317]	245 250 255
[0318]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
[0319]	260 265 270
[0320]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[0321]	275 280 285
[0322]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[0323]	290 295 300
[0324]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
[0325]	305 310 315 320
[0326]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0327]	325
[0328]	<210> 24
[0329]	<211> 107
[0330]	<212> PRT
[0331]	<213> 智人
[0332]	<400> 24
[0333]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
[0334]	1 5 10 15
[0335]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[0336]	20 25 30
[0337]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[0338]	35 40 45
[0339]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[0340]	50 55 60
[0341]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[0342]	65 70 75 80
[0343]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[0344]	85 90 95
[0345]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0346]	100 105
[0347]	<210> 25
[0348]	<211> 122
[0349]	<212> PRT
[0350]	<213> 家鼠 (Mus musculus)

[0351]	<400> 25
[0352]	Arg Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
[0353]	1 5 10 15
[0354]	Ala Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
[0355]	20 25 30
[0356]	Gly Met His Trp Met Lys Gln Thr Pro Gly Lys Asp Phe Arg Trp Met
[0357]	35 40 45
[0358]	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Val Asp Asp Phe
[0359]	50 55 60
[0360]	Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Gly Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
[0361]	65 70 75 80
[0362]	Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
[0363]	85 90 95
[0364]	Leu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gln Ser Phe Asp Glu Gly Gly Asp Tyr Trp
[0365]	100 105 110
[0366]	Gly Gln Gly Thr Ala Leu Thr Val Ser Ser
[0367]	115 120
[0368]	<210> 26
[0369]	<211> 122
[0370]	<212> PRT
[0371]	<213> 智人
[0372]	<400> 26
[0373]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0374]	1 5 10 15
[0375]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
[0376]	20 25 30
[0377]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0378]	35 40 45
[0379]	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
[0380]	50 55 60
[0381]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
[0382]	65 70 75 80
[0383]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0384]	85 90 95
[0385]	Leu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gln Ser Phe Asp Glu Gly Gly Asp Tyr Trp
[0386]	100 105 110
[0387]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0388]	115 120
[0389]	<210> 27

[0390] <211> 122
 [0391] <212> PRT
 [0392] <213> 智人
 [0393] <400> 27
 [0394] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 [0395] 1 5 10 15
 [0396] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 [0397] 20 25 30
 [0398] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 [0399] 35 40 45
 [0400] Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
 [0401] 50 55 60
 [0402] Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 [0403] 65 70 75 80
 [0404] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0405] 85 90 95
 [0406] Leu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gln Ser Phe Asp Glu Gly Gly Asp Tyr Trp
 [0407] 100 105 110
 [0408] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0409] 115 120
 [0410] <210> 28
 [0411] <211> 122
 [0412] <212> PRT
 [0413] <213> 智人
 [0414] <400> 28
 [0415] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 [0416] 1 5 10 15
 [0417] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 [0418] 20 25 30
 [0419] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 [0420] 35 40 45
 [0421] Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Val Asp Asp Phe
 [0422] 50 55 60
 [0423] Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 [0424] 65 70 75 80
 [0425] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0426] 85 90 95
 [0427] Leu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gln Ser Phe Asp Glu Gly Gly Asp Tyr Trp
 [0428] 100 105 110

[0429]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0430]	115 120
[0431]	<210> 29
[0432]	<211> 122
[0433]	<212> PRT
[0434]	<213> 智人
[0435]	<400> 29
[0436]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0437]	1 5 10 15
[0438]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
[0439]	20 25 30
[0440]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0441]	35 40 45
[0442]	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Val Asp Asp Phe
[0443]	50 55 60
[0444]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
[0445]	65 70 75 80
[0446]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0447]	85 90 95
[0448]	Leu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gln Ser Phe Asp Glu Gly Gly Asp Tyr Trp
[0449]	100 105 110
[0450]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0451]	115 120
[0452]	<210> 30
[0453]	<211> 112
[0454]	<212> PRT
[0455]	<213> 家鼠
[0456]	<400> 30
[0457]	Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Thr Gly
[0458]	1 5 10 15
[0459]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
[0460]	20 25 30
[0461]	Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Phe Gln Arg Pro Gly Gln Ser
[0462]	35 40 45
[0463]	Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
[0464]	50 55 60
[0465]	Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0466]	65 70 75 80
[0467]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

[0468]					85					90					95				
[0469]	Thr	His	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Leu	Glu	Ile	Lys			
[0470]					100					105					110				
[0471]	<210> 31																		
[0472]	<211> 112																		
[0473]	<212> PRT																		
[0474]	<213> 智人																		
[0475]	<400> 31																		
[0476]	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	Gly			
[0477]	1				5					10					15				
[0478]	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	Asp	Ser			
[0479]					20					25					30				
[0480]	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser			
[0481]					35					40					45				
[0482]	Pro	Arg	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro			
[0483]					50					55					60				
[0484]	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile			
[0485]	65									70					75				80
[0486]	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly			
[0487]						85					90					95			
[0488]	Thr	His	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys			
[0489]					100					105					110				
[0490]	<210> 32																		
[0491]	<211> 112																		
[0492]	<212> PRT																		
[0493]	<213> 智人																		
[0494]	<400> 32																		
[0495]	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	Gly			
[0496]	1				5					10					15				
[0497]	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asp	Ser			
[0498]					20					25					30				
[0499]	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser			
[0500]					35					40					45				
[0501]	Pro	Arg	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro			
[0502]					50					55					60				
[0503]	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile			
[0504]	65									70					75				80
[0505]	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly			
[0506]						85					90					95			

[0507]	Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0508]	100 105 110
[0509]	<210> 33
[0510]	<211> 112
[0511]	<212> PRT
[0512]	<213> 智人
[0513]	<400> 33
[0514]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
[0515]	1 5 10 15
[0516]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Ala Ser
[0517]	20 25 30
[0518]	Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
[0519]	35 40 45
[0520]	Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
[0521]	50 55 60
[0522]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0523]	65 70 75 80
[0524]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
[0525]	85 90 95
[0526]	Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0527]	100 105 110
[0528]	<210> 34
[0529]	<211> 112
[0530]	<212> PRT
[0531]	<213> 智人
[0532]	<400> 34
[0533]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
[0534]	1 5 10 15
[0535]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Glu Ser
[0536]	20 25 30
[0537]	Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
[0538]	35 40 45
[0539]	Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
[0540]	50 55 60
[0541]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0542]	65 70 75 80
[0543]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
[0544]	85 90 95
[0545]	Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0546]		100		105		110
[0547]	<210>	35				
[0548]	<211>	112				
[0549]	<212>	PRT				
[0550]	<213>	智人				
[0551]	<400>	35				
[0552]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly					
[0553]	1	5		10		15
[0554]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Ser Ser					
[0555]		20		25		30
[0556]	Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser					
[0557]		35		40		45
[0558]	Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro					
[0559]		50		55		60
[0560]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile					
[0561]	65		70		75	80
[0562]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly					
[0563]		85		90		95
[0564]	Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
[0565]		100		105		110
[0566]	<210>	36				
[0567]	<211>	11				
[0568]	<212>	PRT				
[0569]	<213>	人工序列				
[0570]	<220>					
[0571]	<223>	msVL22.101和 hVL22.101g的CDR1				
[0572]	<400>	36				
[0573]	Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr					
[0574]	1	5		10		
[0575]	<210>	37				
[0576]	<211>	11				
[0577]	<212>	PRT				
[0578]	<213>	智人				
[0579]	<400>	37				
[0580]	Gln Ser Leu Val Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr					
[0581]	1	5		10		
[0582]	<210>	38				
[0583]	<211>	11				
[0584]	<212>	PRT				

[0585]	<213>	智人
[0586]	<400>	38
[0587]	Gln Ser Leu Val Ala Ser Asp Gly Lys Thr Tyr	
[0588]	1	5 10
[0589]	<210>	39
[0590]	<211>	11
[0591]	<212>	PRT
[0592]	<213>	智人
[0593]	<400>	39
[0594]	Gln Ser Leu Val Glu Ser Asp Gly Lys Thr Tyr	
[0595]	1	5 10
[0596]	<210>	40
[0597]	<211>	11
[0598]	<212>	PRT
[0599]	<213>	智人
[0600]	<400>	40
[0601]	Gln Ser Leu Val Ser Ser Asp Gly Lys Thr Tyr	
[0602]	1	5 10
[0603]	<210>	41
[0604]	<211>	11
[0605]	<212>	PRT
[0606]	<213>	智人
[0607]	<400>	41
[0608]	Gln Ser Leu Leu Glu Ser Asp Gly Lys Thr Tyr	
[0609]	1	5 10
[0610]	<210>	42
[0611]	<211>	11
[0612]	<212>	PRT
[0613]	<213>	智人
[0614]	<400>	42
[0615]	Gln Ser Leu Leu Asp Ser Glu Gly Lys Thr Tyr	
[0616]	1	5 10
[0617]	<210>	43
[0618]	<211>	11
[0619]	<212>	PRT
[0620]	<213>	智人
[0621]	<400>	43
[0622]	Gln Ser Leu Leu Asp Ser Ser Gly Lys Thr Tyr	
[0623]	1	5 10

[0624]	<210>	44
[0625]	<211>	11
[0626]	<212>	PRT
[0627]	<213>	智人
[0628]	<400>	44
[0629]	Gln Ser Leu Leu Glu Ser Glu Gly Lys Thr Tyr	
[0630]	1	5 10
[0631]	<210>	45
[0632]	<211>	11
[0633]	<212>	PRT
[0634]	<213>	智人
[0635]	<400>	45
[0636]	Gln Ser Leu Leu Glu Ser Ser Gly Lys Thr Tyr	
[0637]	1	5 10
[0638]	<210>	46
[0639]	<211>	11
[0640]	<212>	PRT
[0641]	<213>	智人
[0642]	<400>	46
[0643]	Gln Ser Leu Leu Glu Ser Asp Ala Lys Thr Tyr	
[0644]	1	5 10
[0645]	<210>	47
[0646]	<211>	11
[0647]	<212>	PRT
[0648]	<213>	智人
[0649]	<400>	47
[0650]	Gln Ser Leu Leu Asp Thr Glu Gly Lys Thr Tyr	
[0651]	1	5 10
[0652]	<210>	48
[0653]	<211>	11
[0654]	<212>	PRT
[0655]	<213>	智人
[0656]	<400>	48
[0657]	Gln Ser Leu Leu Asp Thr Ser Gly Lys Thr Tyr	
[0658]	1	5 10
[0659]	<210>	49
[0660]	<211>	11
[0661]	<212>	PRT
[0662]	<213>	智人

[0663] <400> 49
[0664] Gln Ser Leu Leu Asp Ser Ala Gly Lys Thr Tyr
[0665] 1 5 10
[0666] <210> 50
[0667] <211> 11
[0668] <212> PRT
[0669] <213> 智人
[0670] <400> 50
[0671] Gln Ser Leu Leu Glu Ser Ala Gly Lys Thr Tyr
[0672] 1 5 10
[0673] <210> 51
[0674] <211> 11
[0675] <212> PRT
[0676] <213> 智人
[0677] <400> 51
[0678] Gln Ser Leu Leu Asp Ala Glu Gly Lys Thr Tyr
[0679] 1 5 10
[0680] <210> 52
[0681] <211> 11
[0682] <212> PRT
[0683] <213> 智人
[0684] <400> 52
[0685] Gln Ser Leu Leu Asp Asn Glu Gly Lys Thr Tyr
[0686] 1 5 10
[0687] <210> 53
[0688] <211> 17
[0689] <212> PRT
[0690] <213> 智人
[0691] <220>
[0692] <221> MISC_FEATURE
[0693] <222> (9) .. (9)
[0694] <223> Xaa = 瓜氨酸
[0695] <400> 53
[0696] Glu Pro Thr Asp Ser Leu Asp Ala Xaa Gly His Arg Pro Val Asp Arg
[0697] 1 5 10 15
[0698] Arg
[0699] <210> 54
[0700] <211> 15
[0701] <212> PRT

[0702] <213> 智人
 [0703] <220>
 [0704] <221> MISC_FEATURE
 [0705] <222> (4) .. (4)
 [0706] <223> Xaa = 瓜氨酸
 [0707] <220>
 [0708] <221> MISC_FEATURE
 [0709] <222> (9) .. (9)
 [0710] <223> Xaa = 瓜氨酸
 [0711] <220>
 [0712] <221> MISC_FEATURE
 [0713] <222> (11) .. (11)
 [0714] <223> Xaa = 瓜氨酸
 [0715] <400> 54
 [0716] Tyr Val Thr Xaa Ser Ser Ala Val Xaa Leu Xaa Ser Ser Val Pro
 [0717] 1 5 10 15
 [0718] <210> 55
 [0719] <211> 7
 [0720] <212> PRT
 [0721] <213> 人工序列
 [0722] <220>
 [0723] <223> msVL22.101和hVL22.101(LC)y的CDR2 附近域
 [0724] <400> 55
 [0725] Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
 [0726] 1 5
 [0727] <210> 56
 [0728] <211> 330
 [0729] <212> PRT
 [0730] <213> 智人
 [0731] <400> 56
 [0732] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 [0733] 1 5 10 15
 [0734] Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 [0735] 20 25 30
 [0736] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 [0737] 35 40 45
 [0738] Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 [0739] 50 55 60
 [0740] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

[0741]	65	70	75	80
[0742]	Tyr Ile Cys Asn Val	Asn His Lys Pro Ser	Asn Thr Lys Val	Asp Lys
[0743]	85	90	95	
[0744]	Lys Val Glu Pro Lys	Ser Cys Asp Lys Thr	His Thr Cys Pro	Pro Cys
[0745]	100	105	110	
[0746]	Pro Ala Pro Glu Leu	Leu Gly Gly Pro Ser	Val Phe Leu Phe	Pro Pro
[0747]	115	120	125	
[0748]	Lys Pro Lys Asp Thr	Leu Met Ile Ser Arg	Thr Pro Glu Val	Thr Cys
[0749]	130	135	140	
[0750]	Val Val Val Asp Val	Ser His Glu Asp Pro	Glu Val Lys Phe	Asn Trp
[0751]	145	150	155	160
[0752]	Tyr Val Asp Gly Val	Glu Val His Asn Ala	Lys Thr Lys Pro	Arg Glu
[0753]	165	170	175	
[0754]	Glu Gln Tyr Asn Ser	Thr Tyr Arg Val Val	Ser Val Leu Thr	Val Leu
[0755]	180	185	190	
[0756]	His Gln Asp Trp Leu	Asn Gly Lys Glu Tyr	Lys Cys Lys Val	Ser Asn
[0757]	195	200	205	
[0758]	Lys Ala Leu Pro Ala	Pro Ile Glu Lys Thr	Ile Ser Lys Ala	Lys Gly
[0759]	210	215	220	
[0760]	Gln Pro Arg Glu Pro	Gln Val Tyr Thr Leu	Pro Pro Ser Arg	Asp Glu
[0761]	225	230	235	240
[0762]	Leu Thr Lys Asn Gln	Val Ser Leu Thr Cys	Leu Val Lys Gly	Phe Tyr
[0763]	245	250	255	
[0764]	Pro Ser Asp Ile Ala	Val Glu Trp Glu Ser	Asn Gly Gln Pro	Glu Asn
[0765]	260	265	270	
[0766]	Asn Tyr Lys Thr Thr	Pro Pro Val Leu Asp	Ser Asp Gly Ser	Phe Phe
[0767]	275	280	285	
[0768]	Leu Tyr Ser Lys Leu	Thr Val Asp Lys Ser	Arg Trp Gln Gln	Gly Asn
[0769]	290	295	300	
[0770]	Val Phe Ser Cys Ser	Val Met His Glu Ala	Leu His Asn His	Tyr Thr
[0771]	305	310	315	320
[0772]	Gln Lys Ser Leu Ser	Leu Ser Pro Gly Lys		
[0773]	325	330		

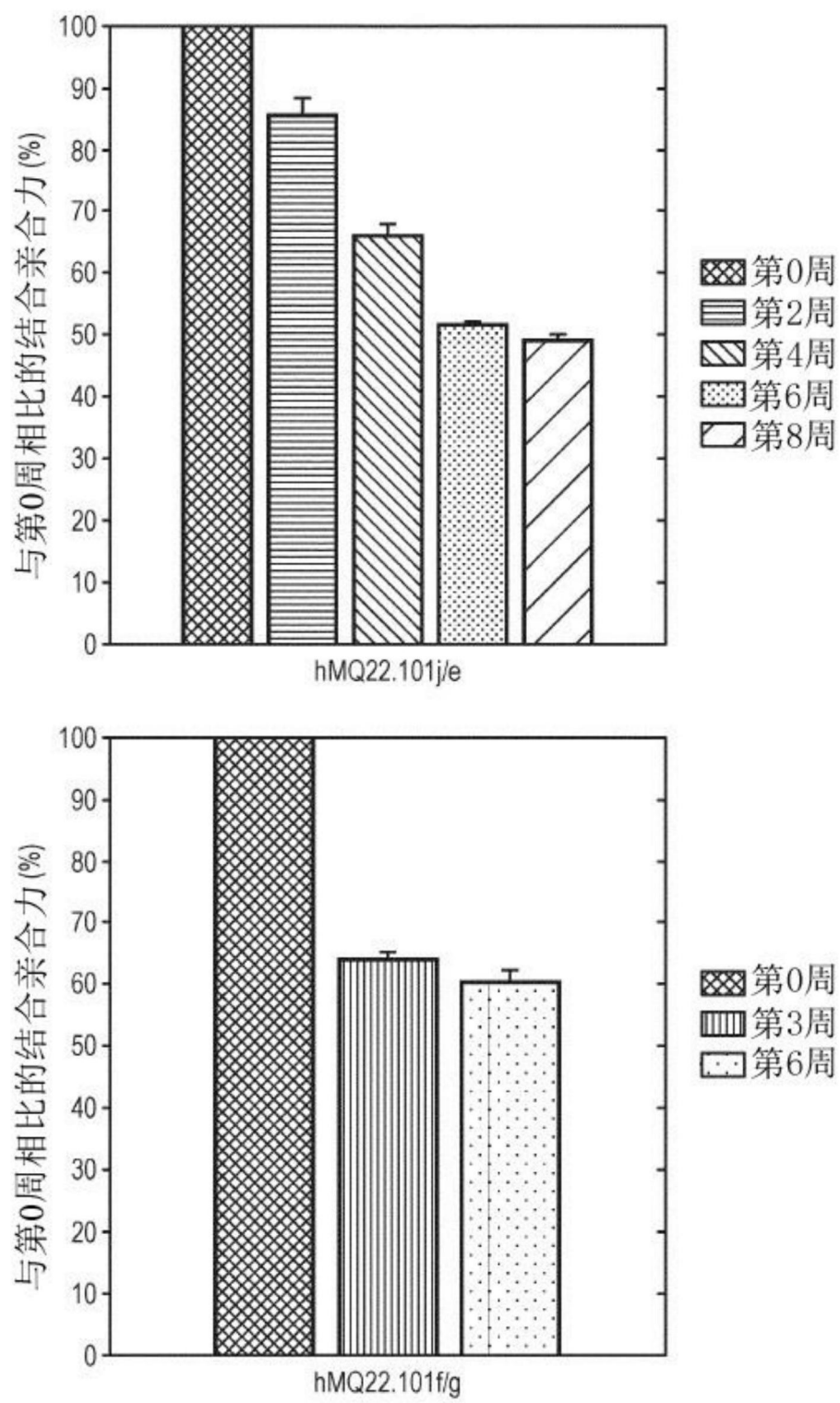


图1

序列	位置	修饰	第0周	第4周	第8周
<u>QSLVSDGKTY</u>	VL CDR1	异天门冬氨酸	1.6%	27.1%	39.9%
<u>LVS</u> KLDS	靠近 VL CDR2	异天门冬氨酸	0.2%	0.2%	0.2%

图2A

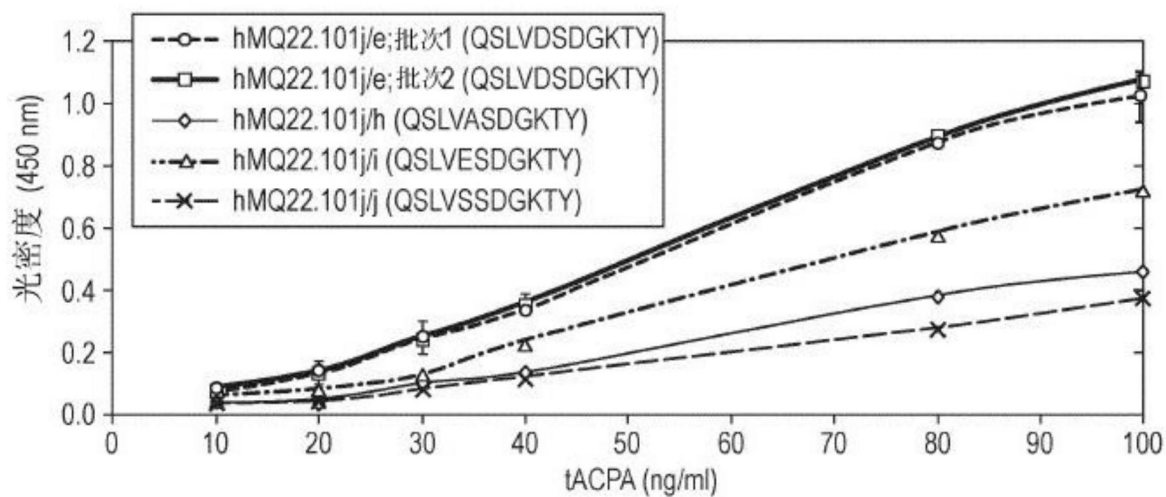


图2B

序列	位置	修饰	第0周	第4周
<u>QSLVESDGKTY</u>	VL CDR1	异天门冬氨酸	1.3%	3.2%
<u>LVS</u> KLDS	靠近 VL CDR2	异天门冬氨酸	0.0%	0.0%

图2C

轻链构建体	# 在轻链中的残留物				
	#30	#31	#32	#33	#34
hVL22.101e	V	D	S	D	G
hVL22.101g	L	D	S	D	G
hVL22.101LC16	L	E	S	D	G
hVL22.101LC17	L	D	T	D	G
hVL22.101LC19	L	D	S	E	G
hVL22.101LC20	L	D	S	S	G
hVL22.101LC21	L	D	S	D	A
hVL22.101LC22	L	E	S	E	G
hVL22.101LC23	L	E	S	S	G
hVL22.101LC24	L	E	S	D	A
hVL22.101LC25	L	D	T	E	G
hVL22.101LC26	L	D	T	S	G
hVL22.101LC27	L	D	T	D	A
hVL22.101LC37	L	D	S	A	G
hVL22.101LC38	L	E	S	A	G
hVL22.101LC39	L	D	A	E	G
hVL22.101LC40	L	D	N	E	G
hVL22.101LC41	L	D	A	D	G
hVL22.101LC42	L	D	N	D	G

图3A

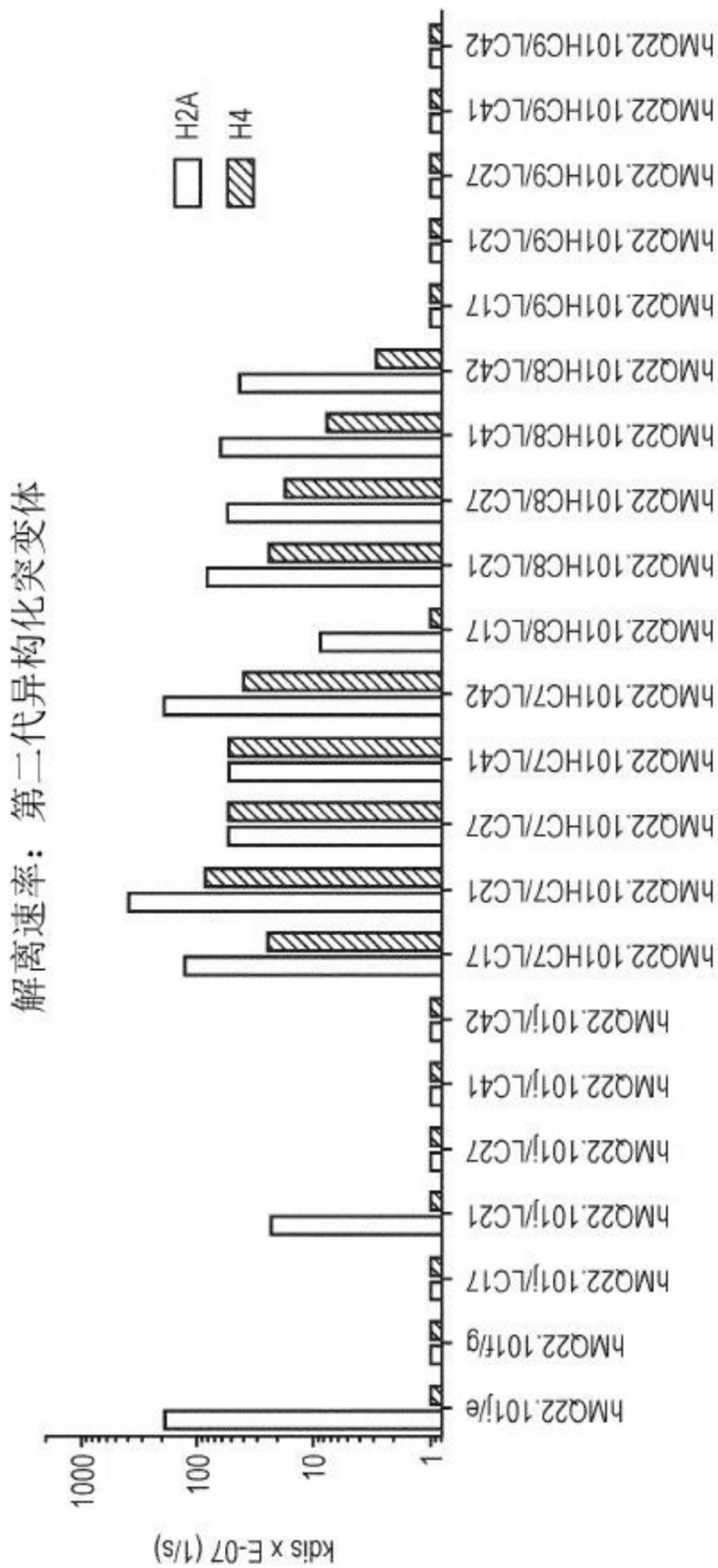


图3B

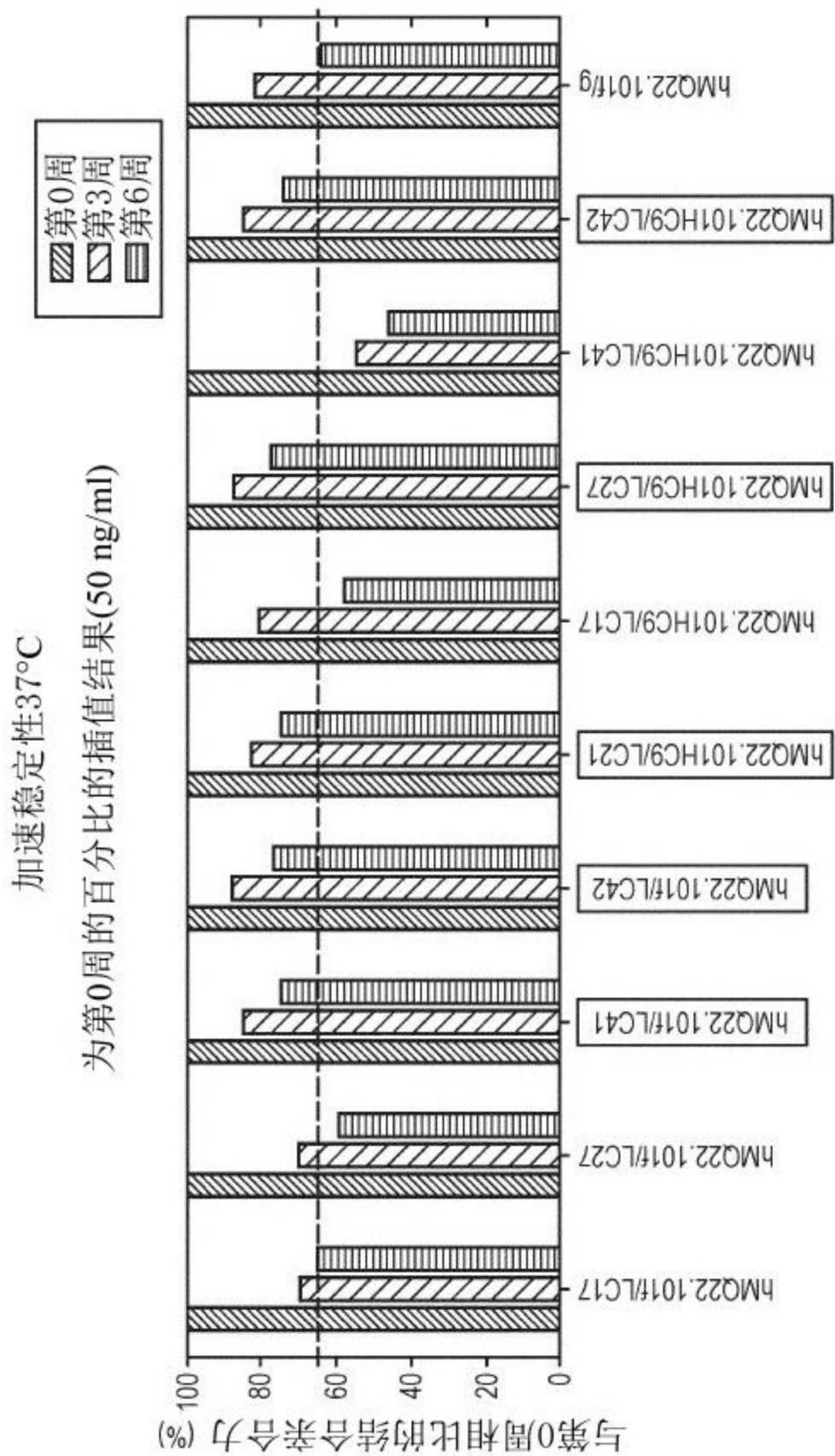


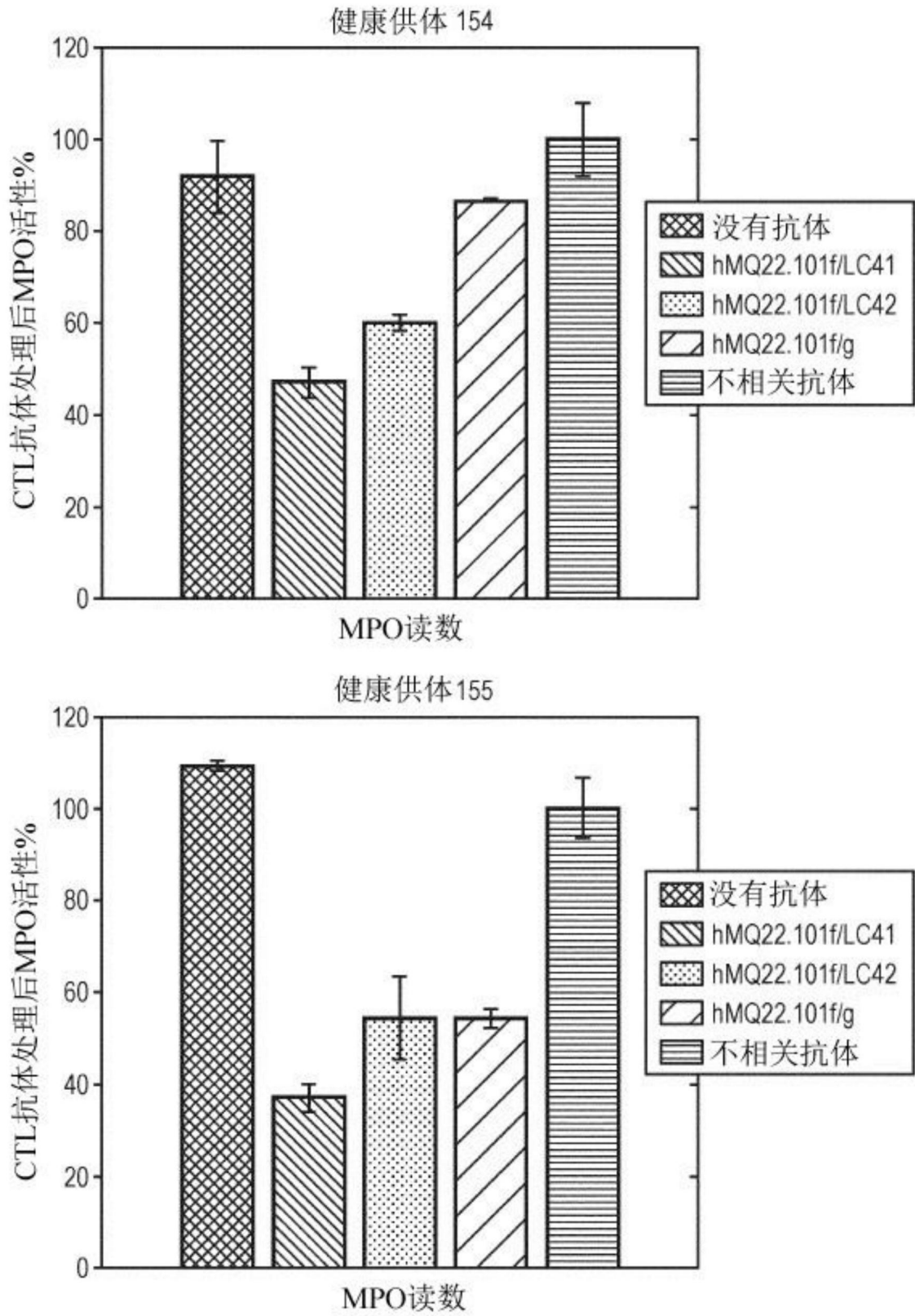
图4

抗体	批次#	序列	修饰	第0周	第4周	第6周	第8周
hMQ22.101j/e	16151	XDSDGX	异天门冬氨酸	1.6%	27.1%		39.9%
hMQ22.101f/LC41	17362	LDADGK	异天门冬氨酸	0.6%		1.1%	
hMQ22.101f/LC42	17363	LDNDGK	异天门冬氨酸	1.2%		3.1%	
hMQ22.101HC9/LC21	17364	LDSDAK	异天门冬氨酸	0.6%		10.9%	
hMQ22.101HC9/LC27	17392	LDTDAK	异天门冬氨酸	0.5%		9.7%	
hMQ22.101HC9/LC42	17394	LDNDGK	异天门冬氨酸	0.5%		3.1%	

图5

抗体	批次#	聚集		降解	
		第0周	第6周	第0周	第6周
hMQ22.101f/LC41	17362	0.20%	0.20%	-	0.20%
hMQ22.101f/LC42	17363	0.13%	0.17%	-	0.17%
hMQ22.101HC9/LC42	17394	0.11%	0.13%	-	0.17%

图6



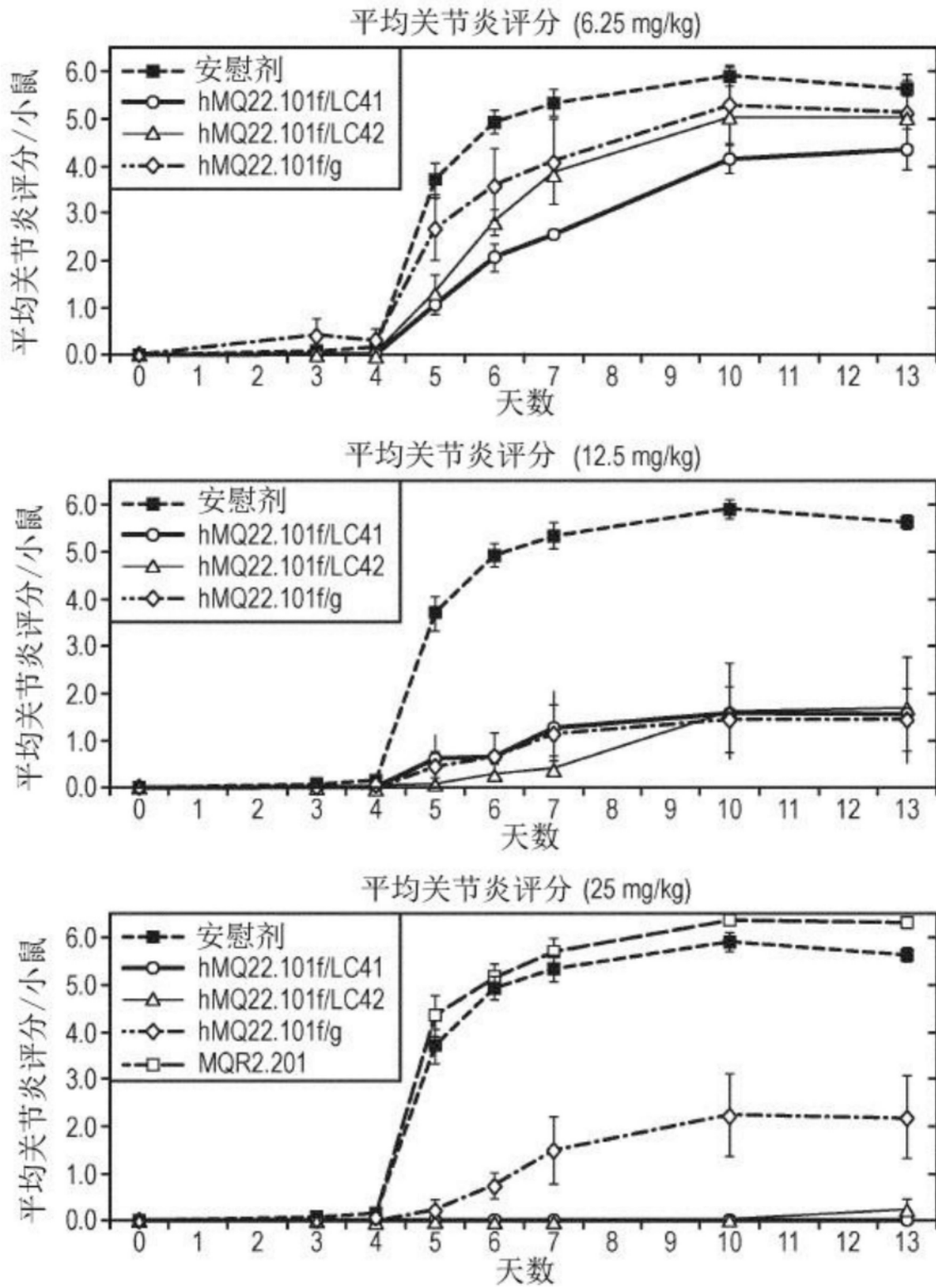


图8

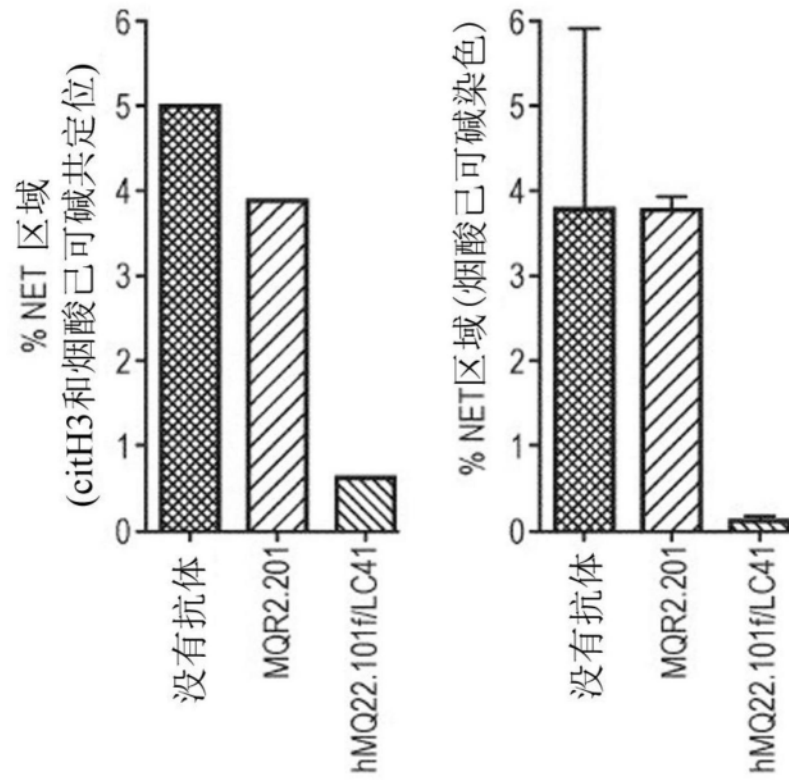


图9A

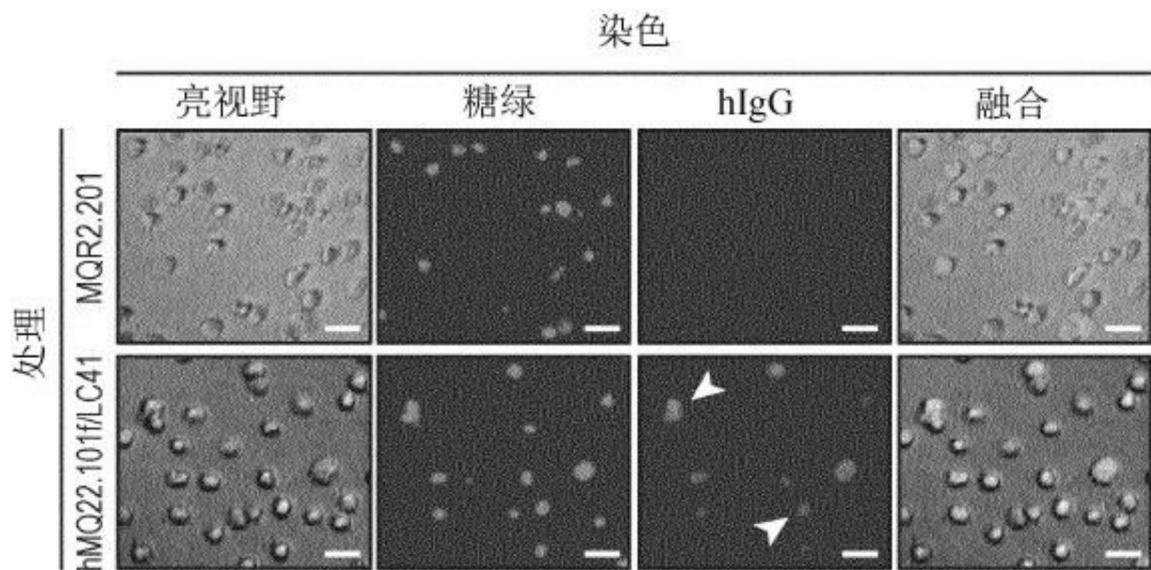


图9B

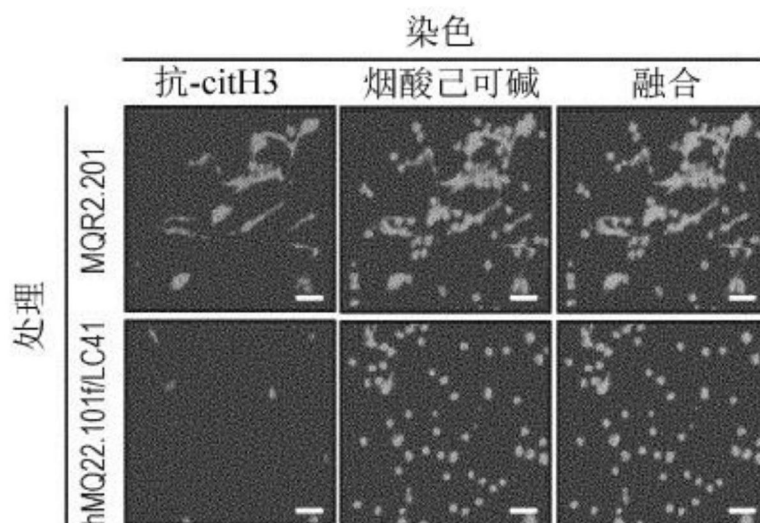


图10A

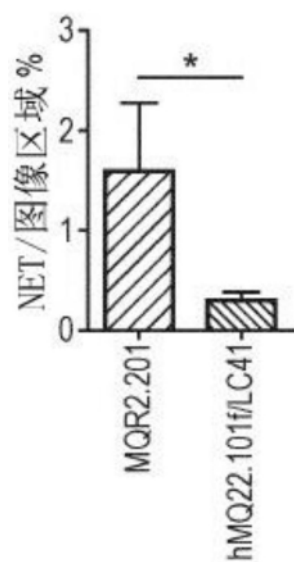


图10B

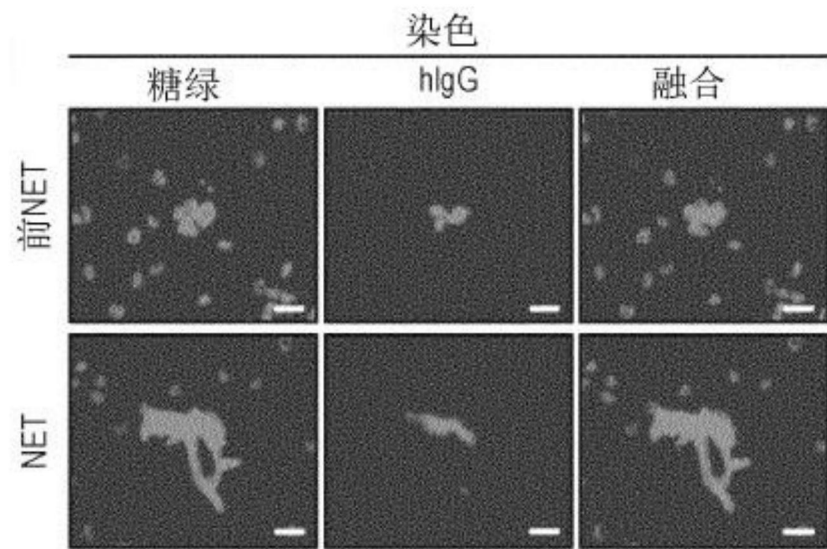


图10C

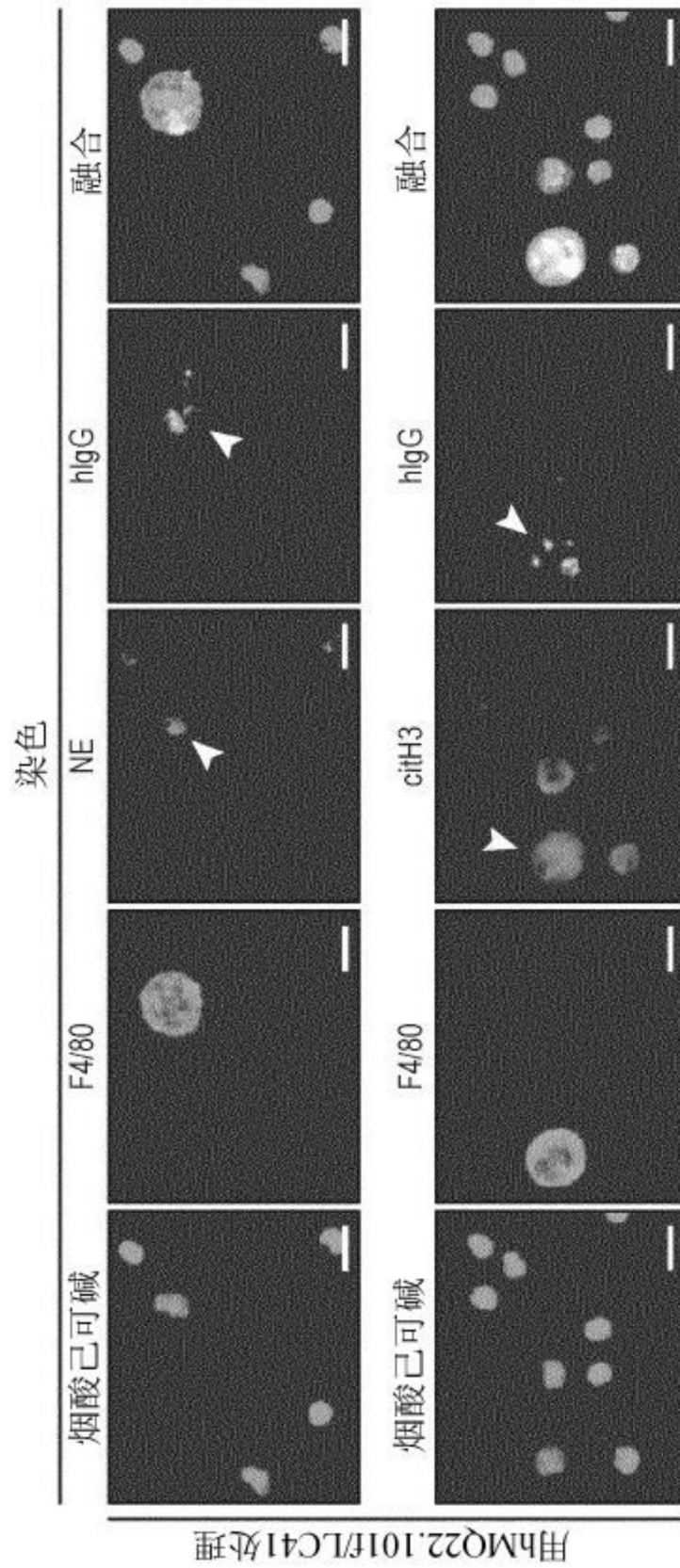


图11

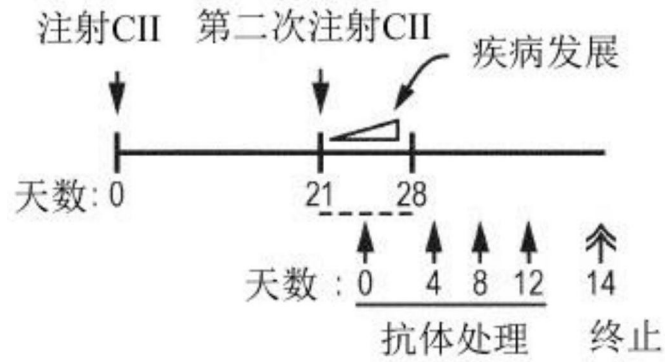


图12A

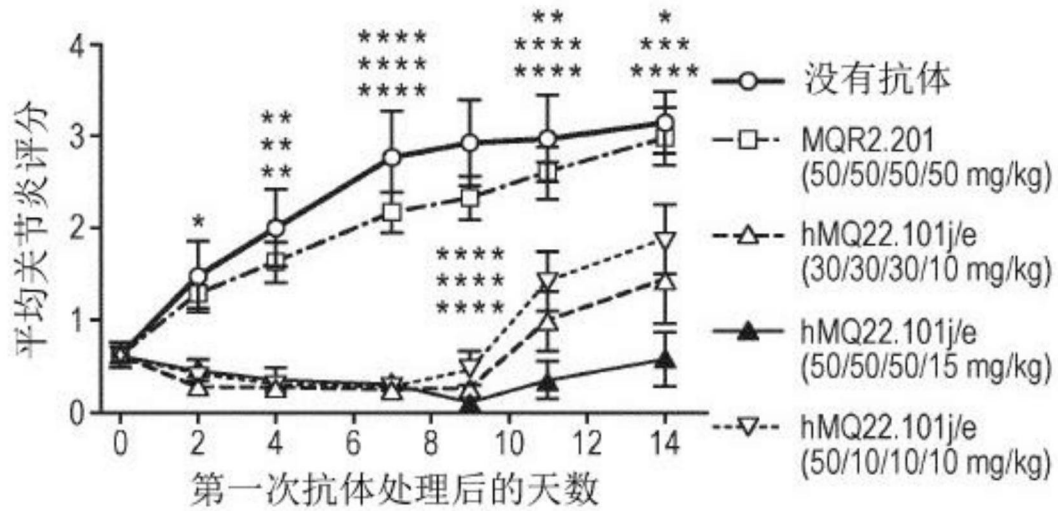


图12B

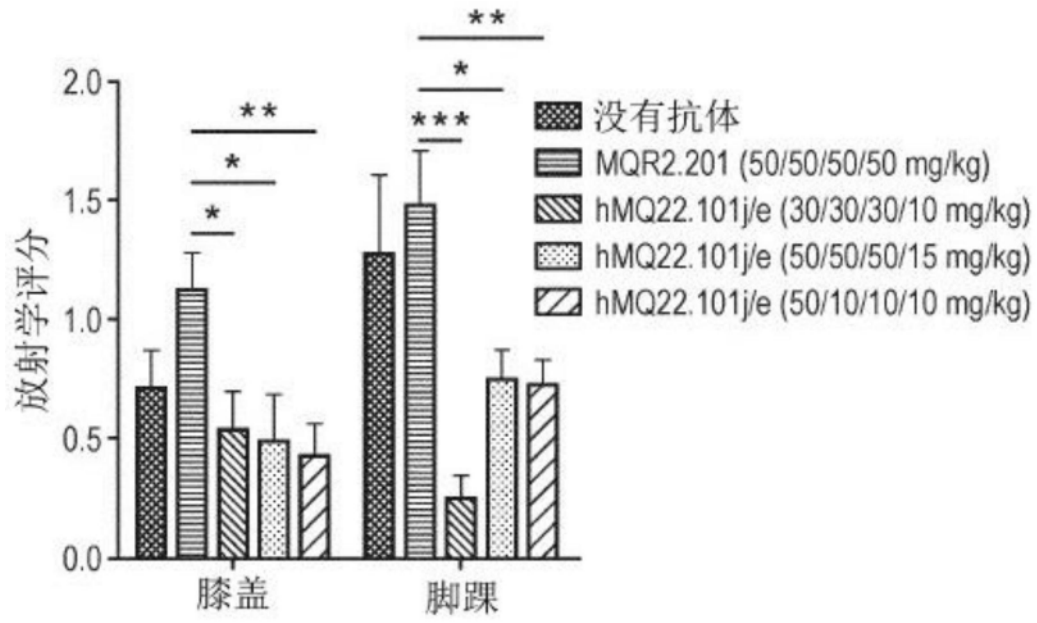


图12C

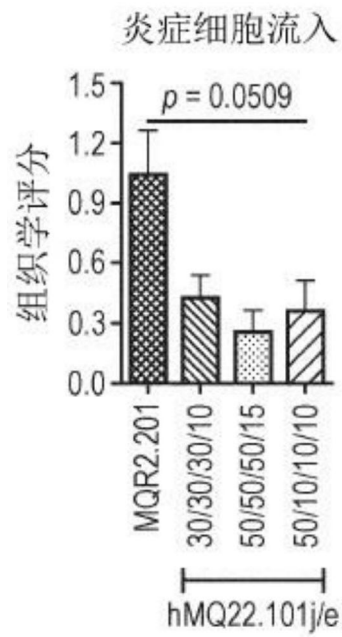


图12D

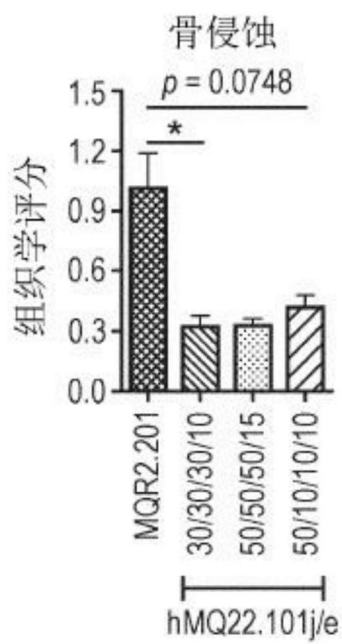


图12E

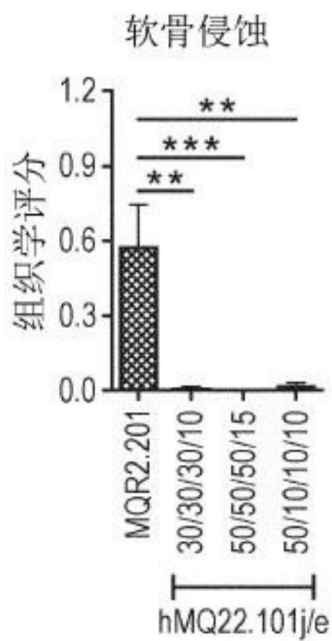


图12F

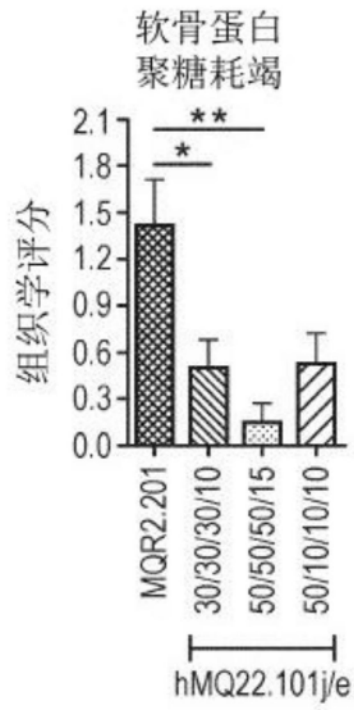


图12G

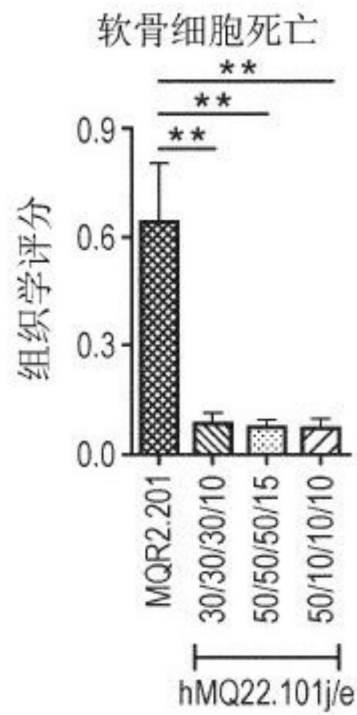


图12H

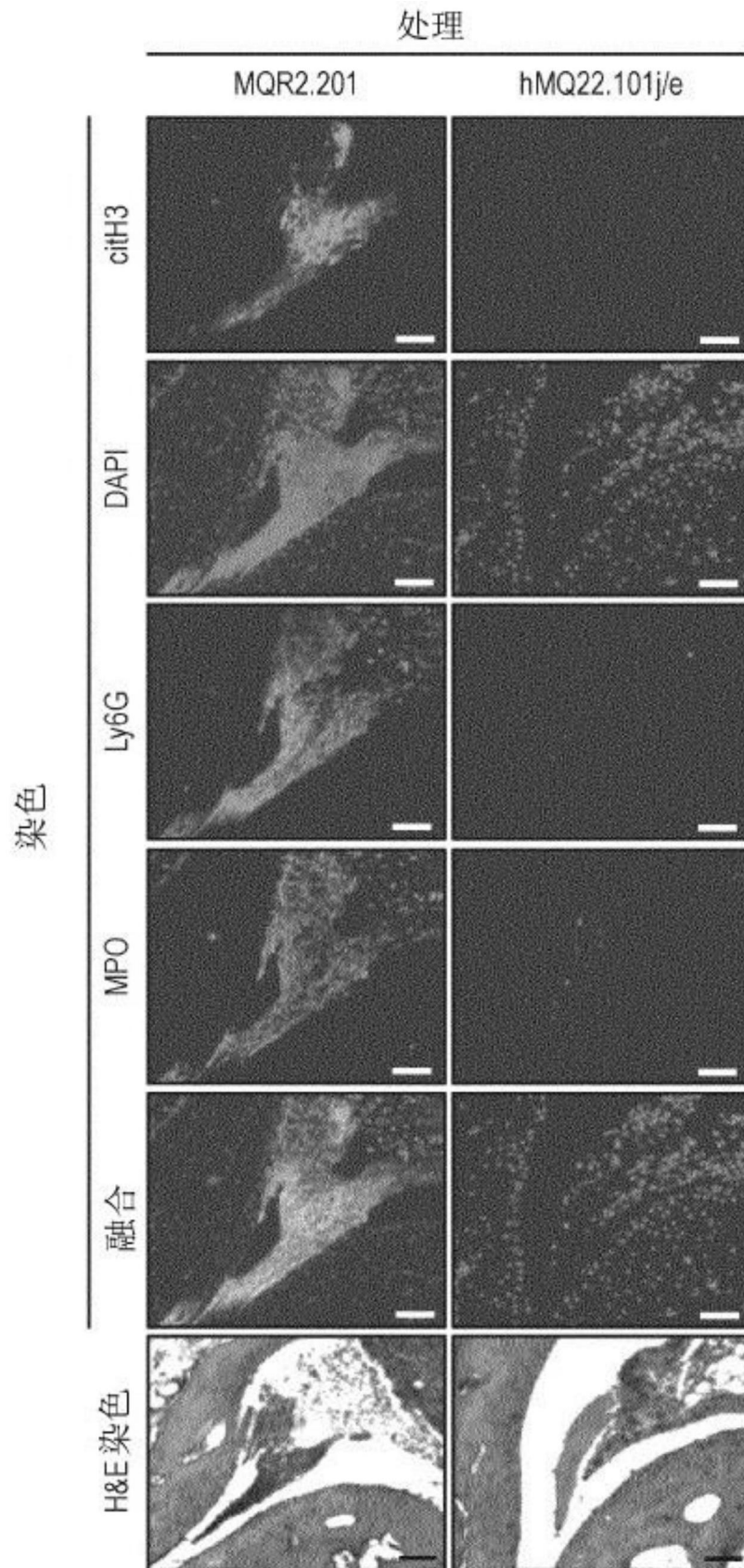


图12I

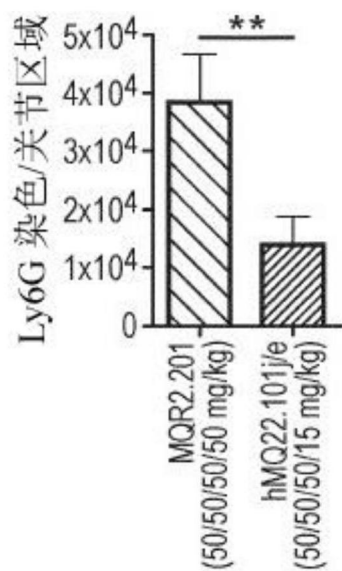


图12J

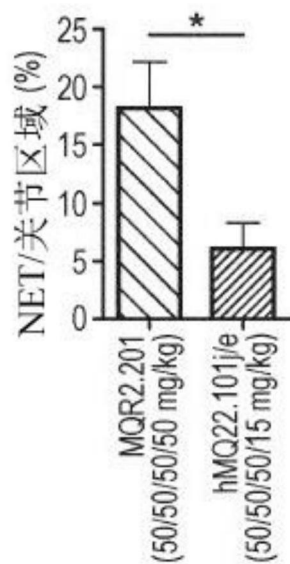


图12K

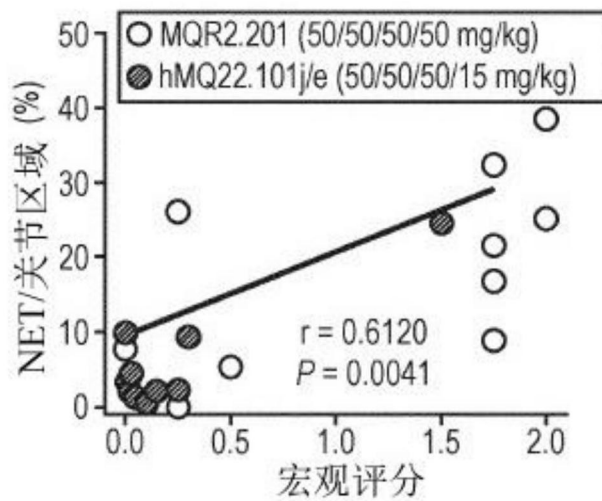


图12L

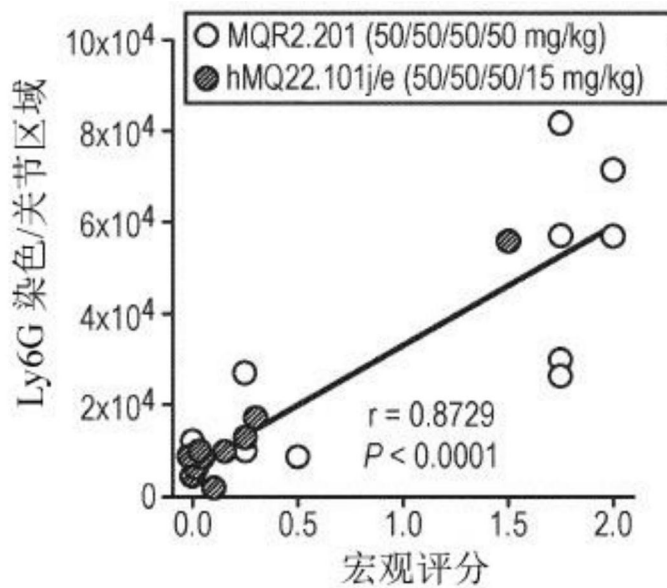


图12M

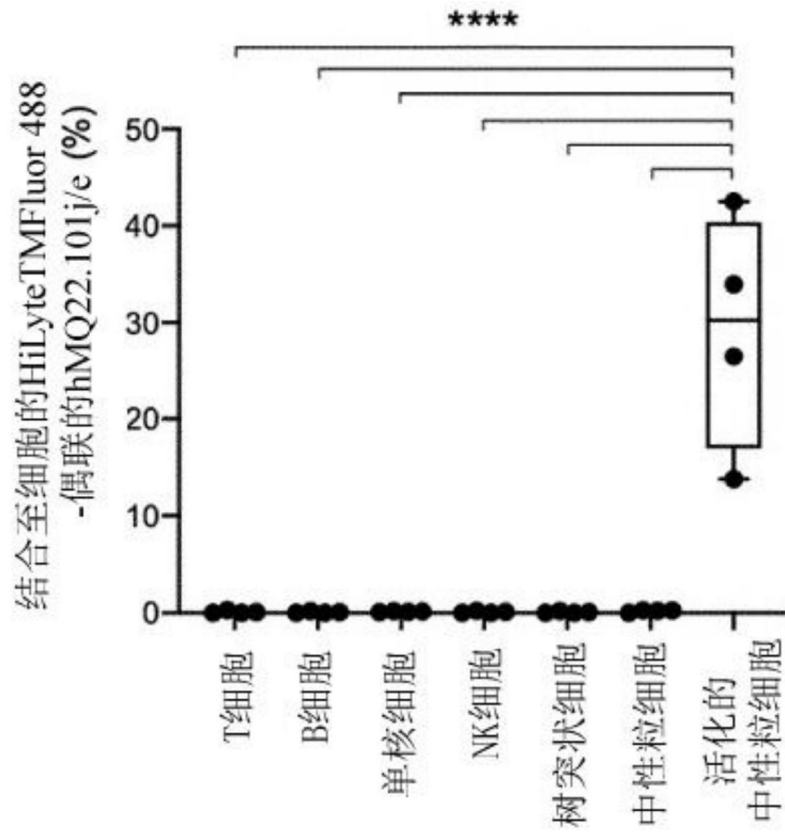


图13