(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118401253 A
(43)申请公布日 2024.07.26

(21)申请号 202380012968.3
(22)申请日 2023.07.21
(66)本国优先权数据
PCT/CN2022/134249 2022.11.25 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.01.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2023/108521 2023.07.21
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/109126 EN 2024.05.30
(71)申请人 领诺(上海)医药科技有限公司
地址 201203 上海市浦东新区蔡伦路720弄2号楼503室
(72)发明人 韩照中 李灵玉 彭孟凡 李海洋 罗军 潘红芽
(74)专利代理机构 上海巅石知识产权代理事务所(普通合伙) 31309
专利代理师 张琤 蒋舫玮
(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
A61P 37/00(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)

权利要求书7页 说明书46页
序列表（电子公布） 附图18页

(54)发明名称

备解素结合蛋白及其用途

(57)摘要

本公开提供了一种分离的抗原结合蛋白。该分离的抗原结合蛋白能够特异性结合备解素。本公开还提供了一种抗备解素抗体及其制备方法和应用。

CN 118401253 A

1.一种分离的抗原结合蛋白,其具有下列一种或多种特性:

1)特异性结合备解素;

2)通过结合备解素抑制替代通路;

3)抑制备解素与C3之间的相互作用;

4)选择性地抑制替代通路而非经典通路或凝集素通路;以及

5)在哺乳动物的AP特异性通路中具有物种交叉的备解素结合活性和补体抑制活性。

2.根据权利要求1所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白特异性地结合备解素的TSR5、TSR6和/或TSR0结构域。

3.根据权利要求1所述的分离的抗原结合蛋白,其与参比抗体具有竞争性靶标结合能力,其中所述参比抗体包含CDR1、CDR2和CDR3,并且包含选自下组的任一组氨基酸序列:

1)CDR1:SEQ ID NO:1,CDR2:SEQ ID NO:6,CDR3:SEQ ID NO:12;

2)CDR1:SEQ ID NO:2,CDR2:SEQ ID NO:7,CDR3:SEQ ID NO:13;和

3)CDR1:SEQ ID NO:3,CDR2:SEQ ID NO:8,CDR3:SEQ ID NO:14。

4.根据权利要求3所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述参比抗体包含SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:70中任一项所示的氨基酸序列。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含CDR3,其中所述CDR3包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17中任一项所示的氨基酸序列。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含CDR2,其中所述CDR2包含SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列。

7.根据权利要求6所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述CDR2包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11中任一项所示的氨基酸序列。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含CDR1,其中所述CDR1包含X_1 X_2CMX_5所示的氨基酸序列,其中X_1为H或S或T或Y,X_2为G或Y,X_5为A或G SEQ ID NO:54。

9.根据权利要求8所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述CDR1包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5中任一项所示的氨基酸序列。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1包含X_1 X_2CMX_5所示的氨基酸序列,X_1为H或S或T或Y,X_2为G或Y,X_5为A或G SEQ ID NO:54;所述CDR2包含SEQID NO:55所示的氨基酸序列,并且所述CDR3包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17中任一项所示的氨基酸序列。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5中任一项所示的氨基酸序列;所述CDR2包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11中任一项所示的氨基酸序列,并且所述CDR3包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17中任一项所示的氨基酸序列。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含CDR1、CDR2和CDR3,并且所述分离的抗原结合蛋白包含选自下组的任一组氨基酸序列:

1)CDR1:SEQ ID NO:1,CDR2:SEQ ID NO:6,CDR3:SEQ ID NO:12;

2)CDR1:SEQ ID NO:2,CDR2:SEQ ID NO:7,CDR3:SEQ ID NO:13;

3)CDR1:SEQ ID NO:3,CDR2:SEQ ID NO:8,CDR3:SEQ ID NO:14;

4)CDR1:SEQ ID NO:4,CDR2:SEQ ID NO:9,CDR3:SEQ ID NO:15;

5)CDR1:SEQ ID NO:5,CDR2:SEQ ID NO:10,CDR3:SEQ ID NO:16;和

6)CDR1:SEQ ID NO:3,CDR2:SEQ ID NO:11,CDR3:SEQ ID NO:17。

13.根据权利要求1-12中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含FR1,其中所述FR1包含SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列,并且所述FR1的C端直接或间接连接到所述CDR1的N端。

14.根据权利要求13所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述FR1包含SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30中任一项所示的氨基酸序列。

15.根据权利要求1-14中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含FR2,其中所述FR2包含SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列,并且所述FR2位于所述CDR1和所述CDR2之间。

16.根据权利要求15所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述FR2包含SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40中任一项所示的氨基酸序列。

17.根据权利要求1-16中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含FR3,其中所述FR3包含SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列,并且所述FR3位于所述CDR2和所述CDR3之间。

18.根据权利要求17所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述FR3包含SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51中任一项所示的氨基酸序列。

19.根据权利要求1-18中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含FR4,其中所述FR4包含SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列,并且所述FR4的N端直接或间接连接到所述CDR3的C端。

20.根据权利要求19所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述FR4包含SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:53中的任一项所示的氨基酸序列。

21.根据权利要求1-20中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中分离的抗原结合蛋白包含FR1、FR2、FR3和FR4,所述FR1包含SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列,所述FR2包含SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列,所述FR3包含SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列,并且所述FR4包含SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列。

22.根据权利要求1-21中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白包含FR1、FR2、FR3和FR4,所述FR1包含SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQID NO:30中任一项所示的氨基酸序列;所述FR2包含SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、

SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40中任一项所示的氨基酸序列;所述FR3 SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51中任一项所示的氨基酸序列,并且所述FR4包含SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:53中任一项所示的氨基酸序列。

23.根据权利要求1-22中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含FR1、FR2、FR3和FR4,并且所述分离的抗原结合蛋白包含选自下组的任一组氨基酸序列:

1)FR1:SEQ ID NO:18,FR2:SEQ ID NO:31,FR3:SEQ ID NO:41,FR4:SEQ ID NO:52;

2)FR1:SEQ ID NO:19,FR2:SEQ ID NO:32,FR3:SEQ ID NO:42,FR4:SEQ ID NO:53;

3)FR1:SEQ ID NO:19,FR2:SEQ ID NO:32,FR3:SEQ ID NO:43,FR4:SEQ ID NO:53;

4)FR1:SEQ ID NO:20,FR2:SEQ ID NO:32,FR3:SEQ ID NO:43,FR4:SEQ ID NO:53;

5)FR1:SEQ ID NO:20,FR2:SEQ ID NO:31,FR3:SEQ ID NO:43,FR4:SEQ ID NO:53;

6)FR1:SEQ ID NO:21,FR2:SEQ ID NO:33,FR3:SEQ ID NO:44,FR4:SEQ ID NO:52;

7)FR1:SEQ ID NO:22,FR2:SEQ ID NO:34,FR3:SEQ ID NO:42,FR4:SEQ ID NO:53;

8)FR1:SEQ ID NO:22,FR2:SEQ ID NO:34,FR3:SEQ ID NO:45,FR4:SEQ ID NO:53;

9)FR1:SEQ ID NO:22,FR2:SEQ ID NO:33,FR3:SEQ ID NO:45,FR4:SEQ ID NO:53;

10)FR1:SEQ ID NO:23,FR2:SEQ ID NO:35,FR3:SEQ ID NO:46,FR4:SEQ ID NO:52;

11)FR1:SEQ ID NO:24,FR2:SEQ ID NO:36,FR3:SEQ ID NO:47,FR4:SEQ ID NO:53;

12)FR1:SEQ ID NO:24,FR2:SEQ ID NO:36,FR3:SEQ ID NO:48,FR4:SEQ ID NO:53;

13)FR1:SEQ ID NO:25,FR2:SEQ ID NO:36,FR3:SEQ ID NO:48,FR4:SEQ ID NO:53;

14)FR1:SEQ ID NO:25,FR2:SEQ ID NO:35,FR3:SEQ ID NO:48,FR4:SEQ ID NO:53;

15)FR1:SEQ ID NO:26,FR2:SEQ ID NO:37,FR3:SEQ ID NO:49,FR4:SEQ ID NO:52;

16)FR1:SEQ ID NO:27,FR2:SEQ ID NO:38,FR3:SEQ ID NO:42,FR4:SEQ ID NO:53;

17)FR1:SEQ ID NO:27,FR2:SEQ ID NO:39,FR3:SEQ ID NO:42,FR4:SEQ ID NO:53;

18)FR1:SEQ ID NO:28,FR2:SEQ ID NO:39,FR3:SEQ ID NO:42,FR4:SEQ ID NO:53;

19)FR1:SEQ ID NO:28,FR2:SEQ ID NO:39,FR3:SEQ ID NO:43,FR4:SEQ ID NO:53;

20)FR1:SEQ ID NO:28,FR2:SEQ ID NO:37,FR3:SEQ ID NO:43,FR4:SEQ ID NO:53;

21)FR1:SEQ ID NO:29,FR2:SEQ ID NO:31,FR3:SEQ ID NO:50,FR4:SEQ ID NO:52;和

22)FR1:SEQ ID NO:30,FR2:SEQ ID NO:40,FR3:SEQ ID NO:51,FR4:SEQ ID NO:52.

24.根据权利要求1-24中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白包含重链可变区VH,所述重链可变区VH包含SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93中任一项所示的氨基酸序列。

25.根据权利要求24所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述重链可变区为VHH。

26.根据权利要求1-25中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白包含抗体重链恒定区。

27.根据权利要求26所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述重链恒定区包含人Fc区。

28.根据权利要求27所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述人Fc区包含SEQ ID NO:109所示的氨基酸序列。

29.根据权利要求1-28中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白直接或间接连接到第二抗原结合结构域。

30.根据权利要求29所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述第二抗原结合结构域通过连接子间接连接到权利要求1-28中任一项所述的分离的抗原结合蛋白。

31.根据权利要求30所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述连接子是聚甘氨酸连接子。

32.根据权利要求30-31中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述连接子包含SEQID NO:108所示的氨基酸序列:GGGGSGGGGSGGGGS。

33.根据权利要求29-32中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述第二抗原结合结构域也能够与备解素结合。

34.根据权利要求29-33中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述第二抗原结合结构域结合到与权利要求1-28中任一项所述的分离的抗原结合蛋白不同的备解素表位。

35.根据权利要求29-33中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述第二抗原结合结构域结合到与权利要求1-28中任一项所述的分离的抗原结合蛋白相同的备解素表位。

36.根据权利要求29-35中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述第二抗原结合结构域包含权利要求1-28中任一项所示的氨基酸序列。

37.根据权利要求29-36中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含SEQ ID NO:81和SEQ ID NO:116中任一项所示的氨基酸序列。

38.根据权利要求1-37中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白包括抗体或其抗原结合片段。

39.根据权利要求38所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合片段包括Fab、Fab'、$F(ab)_2$、Fv片段、$F(ab')_2$、scFv、di-scFv、VHH和/或dAb。

40.根据权利要求1-39中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述抗体选自下组:单克隆抗体、单链抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人抗体。

41.根据权利要求1-40中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白是骆驼抗体。

42.一种融合蛋白,其包含权利要求1-41中任一项所述的分离的抗原结合蛋白。

43.根据权利要求42所述的融合蛋白,其包括功能活性蛋白。

44.根据权利要求42-43中任一项所述的融合蛋白,其中所述分离的抗原结合蛋白直接或间接连接到所述功能活性蛋白。

45.根据权利要求44所述的融合蛋白,其中所述功能活性蛋白通过连接子间接连接。

46.根据权利要求45所述的融合蛋白,其中所述连接子是聚甘氨酸连接子。

47.根据权利要求45-46中任一项所述的融合蛋白,其中所述连接子包含SEQ ID NO:108所示的氨基酸序列:GGGGSGGGGSGGGGS。

48.根据权利要求43-47中任一项所述的融合蛋白,其中所述功能活性蛋白为因子H。

49.根据权利要求48所述的融合蛋白,其中所述因子H包含SEQ ID NO:110所示的氨基酸序列。

50.根据权利要求49所述的融合蛋白,其包含SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列。

51.根据权利要求43-47中任一项所述的融合蛋白,其中所述功能活性蛋白是VEGF抑制蛋白。

52.根据权利要求51所述的融合蛋白,其中所述VEGF抑制蛋白包含SEQ ID NO:113所示的氨基酸序列。

53.根据权利要求52所述的融合蛋白,其包含SEQ ID NO:114所示的氨基酸序列。

54.根据权利要求43-47中任一项所述的融合蛋白,其中所述功能活性蛋白是转铁蛋白抑制蛋白。

55.根据权利要求54所述的融合蛋白,其中所述转铁蛋白结合蛋白包含SEQ ID NO:115所示的氨基酸序列。

56.根据权利要求55所述的融合蛋白,其包含SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:118中任一项所示的氨基酸序列。

57.一种多肽,其包含权利要求1-56中任一项所述的分离的抗原结合蛋白。

58.一种免疫缀合物,其包含权利要求1-56中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求57所述的多肽。

59.一种分离的核酸分子,其编码权利要求1-56中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求57所述的多肽。

60.一种载体,其包含权利要求59所述的分离的核酸分子。

61.一种细胞,其包含权利要求1-56中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、权利要求57所述的多肽、权利要求58所述的免疫缀合物、权利要求59所述的分离的核酸分子和/或权利要求60所述的载体。

62.一种生成权利要求1-56中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求57所述的多肽的方法,所述方法包括培养权利要求61所述的细胞以表达权利要求1-56中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求57所述的多肽。

63.一种用于检测备解素的方法,其中所述方法包括使用权利要求1-56中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求57所述的多肽。

64.根据权利要求63所述的方法,其中所述分离的抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:60、SEQID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQID NO:81、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117和SEQID NO:118中任一项所示的氨基酸序列。

65.一种用于备解素的检测试剂盒,其包含权利要求1-56中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求57所述的多肽。

66.根据权利要求65所述的检测试剂盒,其中所述分离的抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:118中任一项所示的氨基酸序列。

67.权利要求1-56中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求57所述的多肽在制备试剂盒中的用途。

68.根据权利要求67所述的用途,其中所述分离的抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:60、SEQID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQID NO:81、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117和SEQID NO:118中任一项所示的氨基酸序列。

69.一种药物组合物,其包含权利要求1-56中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求57所述的多肽、权利要求58所述的免疫缀合物、权利要求59所述的分离的核酸分子、权利要求60所述的载体、权利要求61所述的细胞,和/或药学上可接受的佐剂和/或赋形剂。

70.一种药物组合,其包含权利要求1-56中任一项所述的分离的抗原结合蛋白。

71.一种抑制替代补体通路的方法,其包括施用有效量的权利要求1-56中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求57所述的多肽、权利要求58所述的免疫缀合物、权利要求59所述的分离的核酸分子、权利要求60所述的载体、权利要求61所述的细胞和/或权利要求69所述的药物组合物和/或权利要求70所述的药物组合,和/或药学上可接受的治疗剂。

72.权利要求1-56中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求57所述的多肽、权利要求58所述的免疫缀合物、权利要求59所述的分离的核酸分子、权利要求60所述的载体、权利要求61所述的细胞和/或权利要求69所述的药物组合物和/或权利要求70所述的药物组合用于预防和/或治疗疾病。

73.根据权利要求72所述的分离的抗原结合蛋白、多肽、免疫缀合物、分离的核酸分子、载体、细胞和/或药物组合物,其中所述疾病是由备解素引起的。

74.根据权利要求72所述的分离的抗原结合蛋白、多肽、免疫缀合物、分离的核酸分子、载体、细胞和/或药物组合物,其中所述疾病是通过替代通路介导的。

75.根据权利要求72-74中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、多肽、免疫缀合物、分离的核酸分子、载体、细胞和/或药物组合物,其中所述疾病包括自身免疫性血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、溶血性尿毒症综合征(HUS)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、C3肾小球病(C3G)、哮喘、戈谢病、化脓性汗腺炎、白塞病、皮肌炎、严重烧伤、早期败血症、肺炎球菌性脑膜炎、阿尔茨海默病、癌症转移、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ACI)、输血相关性肺损伤(TRALI)、血液透析引起的血栓形成、获得性大疱性表皮松解症(EBA)、葡萄膜炎、帕金森病、原发性胆道闭锁、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)血管炎、视网膜变性、广泛性血栓性微血管病(TMA)、广泛性TMA(APS)、造血干细胞疗法(HSCT)TMA、年龄相关性黄斑变性(AMD)、先兆子痫、溶血、肝酶升高、低血小板(HELLP)综合征、多发性硬化症、抗磷脂综合征(APS)、复发性多软骨炎、缺血性损伤、中风、移植物抗宿主病(GvHD)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺气肿、动脉粥样硬化、急性冠状动脉综合征、失血性休克、类风湿性关节炎、透析(心血管风险)、心血管疾病、胎盘疟疾、抗磷脂综合征(APS)流产、脑炎、脑损伤、n-甲基-d-天冬氨酸(NMDA)受体抗体脑炎、疟疾溶血性危象、腹主动脉瘤(AAA)或胸腹主动脉瘤(TAA)。

76.权利要求1-56中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求57所述的多肽、权

利要求58所述的免疫缀合物、权利要求59所述的分离的核酸分子、权利要求60所述的载体、权利要求61所述的细胞和/或权利要求69所述的药物组合物和/或权利要求70所述的药物组合在制造用于预防和/或治疗疾病的药物中的用途。

77.根据权利要求76所述的用途,其中所述疾病是由备解素引起的。

78.根据权利要求76所述的用途,其中所述疾病是通过替代通路介导的。

79.根据权利要求76-78中任一项所述的用途,其中所述疾病包括血小板减少性紫癜(TTP)、溶血性尿毒症综合征(HUS)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、C3肾小球病(C3G)、哮喘、戈谢病、化脓性汗腺炎、白塞病、皮肌炎、严重烧伤、早期败血症、肺炎球菌性脑膜炎、阿尔茨海默病、癌症转移、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ACI)、输血相关性肺损伤(TRALI)、血液透析引起的血栓形成、获得性大疱性表皮松解症(EBA)、葡萄膜炎、帕金森病、原发性胆道闭锁、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)血管炎、视网膜变性、广泛性血栓性微血管病(TMA)、广泛性TMA(APS)、造血干细胞疗法(HSCT)TMA、年龄相关性黄斑变性(AMD)、先兆子痫、溶血、肝酶升高、低血小板(HELLP)综合征、多发性硬化症、抗磷脂综合征(APS)、复发性多软骨炎、缺血性损伤、中风、移植物抗宿主病(GvHD)、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺气肿、动脉粥样硬化、急性冠状动脉综合征、失血性休克、类风湿性关节炎、透析(心血管风险)、心血管疾病、胎盘疟疾、抗磷脂综合征(APS)流产、脑炎、脑损伤、n-甲基-d-天冬氨酸(NMDA)受体抗体脑炎、疟疾溶血性危象、腹主动脉瘤(AAA)或胸腹主动脉瘤(TAA)。

80.一种预防和/或治疗疾病的方法,其包括向有需要的患者施用有效量的权利要求1-56中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求5所述7的多肽、权利要求58所述的免疫缀合物、权利要求59所述的分离的核酸分子、权利要求60所述的载体、权利要求61所述的细胞和/或权利要求69所述的药物组合物和/或权利要求70所述的药物组合。

81.根据权利要求80所述的方法,其中所述疾病是由药物引起的。

82.根据权利要求80所述的方法,其中所述疾病是通过替代通路介导的。

83.根据权利要求80-82中任一项所述的方法,其中所述疾病包括血小板减少性紫癜(TTP)、溶血性尿毒症综合征(HUS)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、C3肾小球病(C3G)、哮喘、戈谢病、化脓性汗腺炎、白塞病、皮肌炎、严重烧伤、早期败血症、肺炎球菌性脑膜炎、阿尔茨海默病、癌症转移、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ACI)、输血相关性肺损伤(TRALI)、血液透析引起的血栓形成、获得性大疱性表皮松解症(EBA)、葡萄膜炎、帕金森病、原发性胆道闭锁、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)血管炎、视网膜变性、广泛性血栓性微血管病(TMA)、广泛性TMA(APS)、造血干细胞疗法(HSCT)TMA、年龄相关性黄斑变性(AMD)、先兆子痫、溶血、肝酶升高、低血小板(HELLP)综合征、多发性硬化症、抗磷脂综合征(APS)、复发性多软骨炎、缺血性损伤、中风、移植物抗宿主病(GvHD)、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺气肿、动脉粥样硬化、急性冠状动脉综合征、失血性休克、类风湿性关节炎、透析(心血管风险)、心血管疾病、胎盘疟疾、抗磷脂综合征(APS)流产、脑炎、脑损伤、n-甲基-d-天冬氨酸(NMDA)受体抗体脑炎、疟疾溶血性危象、腹主动脉瘤(AAA)或胸腹主动脉瘤(TAA)。

备解素结合蛋白及其用途

技术领域

[0001] 本申请涉及生物医药领域,具体涉及一些特异性结合备解素的分离的抗原结合蛋白及其应用。

背景技术

[0002] 补体系统作为先天免疫和适应性免疫的重要组成部分,在清除病原体、细胞碎片和突变细胞中发挥着重要作用。然而,该系统的无调节激活在人类疾病(包括眼病、牙周病、癌症、自身免疫性疾病、CNS/PNS疾病、肾脏疾病和慢性溶血疾病)的发病机制中具有重要或关键的作用。补体抑制已成功应用于临床或实验治疗几种人类疾病,诸如阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、非典型溶血性尿毒症(aHUS)、全身性重症肌无力(gMG)、视神经脊髓炎谱系障碍(NMOSD)、血栓性微血管病变(TMAs)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、IgA肾病(IgAN)和阿尔茨海默病(AD)。

[0003] 补体系统可分别经由经典(CP)通路、凝集素(LP)通路和替代(AP)通路三种途径激活。AP代表了一个真正的保护系统,该系统始终处于活跃状态,并且通过为三种补体通路形成强大的扩增环路,还实现了约80-90%的末端通路激活。C3转化酶,无论是在液相还是在细胞表面,在生理条件下的半衰期都很短,约为90秒。备解素(Properdin)是一种糖蛋白,在血浆中含量低,在炎症部位含量高(在炎症部位中由活化的中性粒细胞释放),备解素是补体系统唯一的正调节因子,通过将新生转化酶的半衰期延长5至10倍,结合并稳定表面结合的C3转化酶(C3bBb)和C5转化酶(C3bBbC3b),从而加速并有效扩增C3b在靶标表面的沉积。备解素的治疗性抑制剂会在早期阶段通过干扰AP的无调节扩增来阻断补体,并将CP和LP的激活留给生理功能,从而可能更有效且更安全地改善AP参与发病机制的人类疾病,特别是在备解素水平升高的疾病中,并且备解素已被证明在发病机制中发挥重要作用。

[0004] 在过去十年,靶向补体系统在人类疾病的治疗中逐渐受到重视。依库丽单抗(Soliris,Alexion Pharm)是一种针对人补体C5蛋白的人源化单克隆抗体,通过干扰末端通路效应物的产生,于2007年首次获得FDA批准用于治疗PNH,随后将适应症扩大到aHUS、gMG和NMOSD。在此类成功的临床应用的鼓舞下,各种形式的C5拮抗剂,诸如修饰肽、适配体、小分子化合物(SMC)、siRNA或反义寡核苷酸(ASO),都已在临床和临床前环境中积极开发。分子靶标已经扩展到经由经典通路、凝集素通路或替代通路在补体激活中占主导地位的补体蛋白,包括C3、补体因子B、补体因子D、MASP-2或MASP-3、C1s和补体因子H或I等。特别是,OMS721(Omeros),一种靶向甘露糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶-2(MASP-2)的人单克隆抗体,在治疗IgA肾病的2期临床试验中显著降低了患者的尿白蛋白/肌酐比值。该疗效在其他疗法中是前所未有的,这也为其赢得了FDA的突破性疗法称号。此外,其他口服生物有效性药物正在进入着重于扩增环路的2期。LNP023(Novartis)阻断CFB并且正处于3期临床试验中,用于包括PNH和肾脏疾病在内的多种适应症。转化酶形成的另一个潜在靶点是备解素,这是一种由Novartis公司开发的用于AMD全人抗备解素Fab(CLG561);在一项针对地理萎缩(NCT02515942)的2期试验中,它被评估为单一疗法或与抗C5 mAb LFG316组合使用。

[0005] 备解素的抑制或调节是一项减轻症状和减缓或防止与替代通路相关的疾病的进展的重要治疗策略。这是阻断替代通路的一种可行且有前景的治疗策略,无需通过使备解素耗尽、中和或失活来抑制经典补体通路。

发明内容

[0006] 本公开提供了一种分离的抗原结合蛋白,其可以具有下列一种或多种特性:1)特异性结合备解素,2)通过结合备解素抑制替代通路,3)抑制备解素与C3之间的相互作用,4)选择性地抑制替代通路而非经典通路或凝集素通路,以及5)在哺乳动物的AP特异性通路中具有物种交叉的备解素结合活性和补体抑制活性。该分离的抗原结合蛋白在血浆和制剂缓冲液中均显示出血清稳定性。通过多次皮下给予所述分离的抗原结合蛋白,从血清中去除备解素并且AP活性得到持续抑制。

[0007] 在一方面,本申请提供了一种分离的抗原结合蛋白,其包含位于重链可变区VH中的至少一个CDR;该VH包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17中任一项所示的氨基酸序列。

[0008] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以特异性结合到备解素的表位结构域。在某些实施方式中,所述表位包括备解素的TSR5、TSR6和/或TSR0。

[0009] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以与参比抗体具有竞争性靶标结合能力,其中所述参比抗体包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中任一项所示的氨基酸序列,所述CDR2包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8中任一项所示的氨基酸序列,所述CDR3包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中任一项所示的所示的氨基酸序列。

[0010] 在某些实施方式中,所述参比抗体可以包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,所述CDR2包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列,所述CDR3包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。

[0011] 在某些实施方式中,所述参比抗体可以包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,所述CDR2包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列,所述CDR3包含SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列。

[0012] 在某些实施方式中,所述参比抗体可以包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列,所述CDR2包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列,所述CDR3包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。

[0013] 在某些实施方式中,所述参比抗体可以包含SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:70中任一项所示的氨基酸序列。

[0014] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含CDR3,所述CDR3可以包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17中任一项所示的氨基酸序列。

[0015] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含CDR2,所述CDR2可以包含SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列。

[0016] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含CDR2,所述CDR2可以包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11中

任一项所示的氨基酸序列。

[0017] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含CDR1,所述CDR1可以包含$X_1X_2CMX_5$中所示的氨基酸序列,其中X_1为H或S或T或Y,X_2为G或Y,X_5为A或G SEQ ID NO:54。

[0018] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含CDR1,所述CDR1可以包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5中任一项所示的氨基酸序列。

[0019] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1包含$X_1X_2CMX_5$所示的氨基酸序列,其中X_1为H或S或T或Y,X_2为G或Y,X_5为A或GSEQ ID NO:54,所述CDR2包含SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列,并且所述CDR3包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17中任一项所示的氨基酸序列。

[0020] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5中任一项所示的氨基酸序列,所述CDR2包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11中任一项所示的氨基酸序列,所述CDR3包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17中任一项所示的氨基酸序列。

[0021] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,所述CDR2包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列,并且所述CDR3包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。

[0022] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,所述CDR2包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列,并且所述CDR3包含SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列。

[0023] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列,所述CDR2包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列,并且所述CDR3包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。

[0024] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,所述CDR2包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列,并且所述CDR3包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列。

[0025] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列,所述CDR2包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,并且所述CDR3包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0026] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列,所述CDR2包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,并且所述CDR3包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含FR1,其中所述FR1的C端直接或间接连接到所述CDR1的N端,并且所述FR1包含SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列。

[0027] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:

24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30中任一项所示的氨基酸序列。

[0028] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含FR2,其中所述FR2位于所述CDR1和所述CDR2之间,并且所述FR2包含SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列。

[0029] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40中任一项所示的氨基酸序列。

[0030] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含FR3,其中所述FR3位于所述CDR2和所述CDR3之间,并且所述FR3包含SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列。

[0031] 在某些实施方式中,所述分离抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51中任一项所示的氨基酸序列。

[0032] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含FR4,其中所述FR4的N端直接或间接连接到所述CDR3的C端,并且所述FR4包含SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列。

[0033] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:53中中任一项所示的氨基酸序列。

[0034] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白包含FR1、FR2、FR3和FR4,所述FR1包含SEQ ID NO:56中所示的氨基酸序列,所述FR2包含SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列,所述FR3包含SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列,并且所述FR4包含SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列。

[0035] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白包含FR1、FR2、FR3和FR4,所述FR1包含SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30中任一项所示的氨基酸序列,所述FR2包含SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40中任一项所示的氨基酸序列,所述FR3包含SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51中任一项所示的氨基酸序列,并且所述FR4包含SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:53中任一项所示的氨基酸序列。

[0036] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白包含FR1、FR2、FR3和FR4,并且所述分离的抗原结合蛋白包含选自下组的任一组氨基酸序列:

[0037] FR1:SEQ ID NO:18,FR2:SEQ ID NO:31,FR3:SEQ ID NO:41,FR4:SEQ ID NO:52;

[0038] FR1:SEQ ID NO:19,FR2:SEQ ID NO:32,FR3:SEQ ID NO:42,FR4:SEQ ID NO:53;

[0039] FR1:SEQ ID NO:19,FR2:SEQ ID NO:32,FR3:SEQ ID NO:43,FR4:SEQ ID NO:53;

[0040] FR1:SEQ ID NO:20,FR2:SEQ ID NO:32,FR3:SEQ ID NO:43,FR4:SEQ ID NO:53;

[0041] FR1:SEQ ID NO:20,FR2:SEQ ID NO:31,FR3:SEQ ID NO:43,FR4:SEQ ID NO:53;

[0042] FR1:SEQ ID NO:21,FR2:SEQ ID NO:33,FR3:SEQ ID NO:44,FR4:SEQ ID NO:52;

[0043] FR1:SEQ ID NO:22,FR2:SEQ ID NO:34,FR3:SEQ ID NO:42,FR4:SEQ ID NO:53;

[0044] FR1:SEQ ID NO:22,FR2:SEQ ID NO:34,FR3:SEQ ID NO:45,FR4:SEQ ID NO:53;

[0045] FR1:SEQ ID NO:22,FR2:SEQ ID NO:33,FR3:SEQ ID NO:45,FR4:SEQ ID NO:53;

[0046] FR1:SEQ ID NO:23,FR2:SEQ ID NO:35,FR3:SEQ ID NO:46,FR4:SEQ ID NO:52;

[0047] FR1:SEQ ID NO:24,FR2:SEQ ID NO:36,FR3:SEQ ID NO:47,FR4:SEQ ID NO:53;

[0048] FR1:SEQ ID NO:24,FR2:SEQ ID NO:36,FR3:SEQ ID NO:48,FR4:SEQ ID NO:53;

[0049] FR1:SEQ ID NO:25,FR2:SEQ ID NO:36,FR3:SEQ ID NO:48,FR4:SEQ ID NO:53;

[0050] FR1:SEQ ID NO:25,FR2:SEQ ID NO:35,FR3:SEQ ID NO:48,FR4:SEQ ID NO:53;

[0051] FR1:SEQ ID NO:26,FR2:SEQ ID NO:37,FR3:SEQ ID NO:49,FR4:SEQ ID NO:52;

[0052] FR1:SEQ ID NO:27,FR2:SEQ ID NO:38,FR3:SEQ ID NO:42,FR4:SEQ ID NO:53;

[0053] FR1:SEQ ID NO:27,FR2:SEQ ID NO:39,FR3:SEQ ID NO:42,FR4:SEQ ID NO:53;

[0054] FR1:SEQ ID NO:28,FR2:SEQ ID NO:39,FR3:SEQ ID NO:42,FR4:SEQ ID NO:53;

[0055] FR1:SEQ ID NO:28,FR2:SEQ ID NO:39,FR3:SEQ ID NO:43,FR4:SEQ ID NO:53;

[0056] FR1:SEQ ID NO:28,FR2:SEQ ID NO:37,FR3:SEQ ID NO:43,FR4:SEQ ID NO:53;

[0057] FR1:SEQ ID NO:29,FR2:SEQ ID NO:31,FR3:SEQ ID NO:50,FR4:SEQ ID NO:52;和

[0058] FR1:SEQ ID NO:30,FR2:SEQ ID NO:40,FR3:SEQ ID NO:51,FR4:SEQ ID NO:52。

[0059] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白包含重链可变区VH,其包含、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93中任一项所示的氨基酸序列。

[0060] 在某些实施方式中,所述重链可变区为VHH。

[0061] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含抗体重链恒定区。

[0062] 在某些实施方式中,所述重链恒定区可以包括人FC区。

[0063] 在某些实施方式中,所述重链恒定区可以包含SEQ ID NO:109所示的氨基酸序列。

[0064] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以直接或间接连接到第二抗原结合结构域。

[0065] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以通过连接子连接到第二抗原结合结构域。

[0066] 在某些实施方式,所述分离的抗原结合蛋白的所述连接子可以说聚甘氨酸连接子。

[0067] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白的所述连接子可以包含SEQ ID NO:108所示的氨基酸序列:GGGGGSGGGGGGGGGS。

[0068] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白的所述第二抗原结合结构域可以与备解素结合。

[0069] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白的所述第二抗原结合结构域可以结合到与所述分离的抗原结合蛋白不同的备解素的表位。

[0070] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白的所述第二抗原结合结构域可以结

合到与所述分离的抗原结合蛋白相同的备解素的表位。

[0071] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白的所述第二抗原结合结构域可以包含SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93中任一项所示的氨基酸序列。

[0072] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:81所示的氨基酸序列。

[0073] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含抗体或其抗原结合片段。

[0074] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合片段可以包括Fab、Fab'、$F(ab)_2$、FV片段、$F(ab')_2$、scFv、di-scFv、VHH和/或dAB。

[0075] 在某些实施方式中,所述抗体可以选自下组:单克隆抗体,单链抗体,嵌合抗体,人源化抗体和全人抗体。

[0076] 在某些实施方式中,所述抗体可以是骆驼抗体。

[0077] 在另一方面,本申请提供了一种融合蛋白,其包含所述分离的抗原结合蛋白。

[0078] 在某些实施方式中,所述融合蛋白可以包含功能活性蛋白。

[0079] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以直接或间接连接到所述功能活性蛋白。

[0080] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以通过连接子与所述功能活性蛋白连接。

[0081] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白可以通过多于一个连接子与所述功能活性蛋白连接。

[0082] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白和所述功能活性蛋白的所述连接子可以是聚甘氨酸连接子。

[0083] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白的连接子和所述活性蛋白的所述连接子可以是多于一个聚甘氨酸连接子。

[0084] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白和所述功能活性蛋白的所述连接子可以包含SEQ ID NO:108所示的氨基酸序列:GGGGGSGGGGGGGGGGS。

[0085] 在某些实施方式中,所述融合蛋白的所述功能活性蛋白可以是因子H。

[0086] 在某些实施方式中,所述融合蛋白的所述因子H可以包含SEQ ID NO:110所示的氨基酸序列。

[0087] 在某些实施方式中,所述融合蛋白的所述因子H可以包括其功能活性片段、直系同源物和变体。在某些实施方式中,与其对应序列的序列相似性可以具有至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少55%、至少60%、至少65%至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的相似性。

[0088] 在某些实施方式中,所述融合蛋白可以包含SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列。

[0089] 在某些实施方式中,所述融合蛋白的所述功能活性蛋白可以是VEGF抑制蛋白。

[0090] 在某些实施方式中,所述融合蛋白中所述VEGF抑制蛋白可以包含SEQ ID NO:113

所示的氨基酸序列。

[0091] 在某些实施方式中,所述融合蛋白的所述VEGF抑制蛋白可以包括其功能活性片段、直系同源物和变体。在某些实施方式中,与其对应序列的序列相似性可以具有至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少55%、至少60%、至少65%至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的相似性。

[0092] 在某些实施方式中,所述融合蛋白可以包含SEQ ID NO:114所示的氨基酸序列。

[0093] 在某些实施方式中,所述融合蛋白的ss功能活性蛋白可以是转铁蛋白抑制蛋白。

[0094] 在某些实施方式中,所述融合蛋白的所述转铁蛋白抑制蛋白可以包含SEQ ID NO:115所示的氨基酸序列。

[0095] 在某些实施方式中,所述融合蛋白的所述转铁蛋白抑制蛋白可以包括其功能活性片段、直系同源物和变体。在某些实施方式中,与其对应序列的序列相似性可以具有至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少55%、至少60%、至少65%至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的相似性。

[0096] 在某些实施方式中,所述融合蛋白可以包含SEQ ID NO:117所示的氨基酸序列。

[0097] 在某些实施方式中,所述融合蛋白可以包含SEQ ID NO:118所示的氨基酸序列。

[0098] 在另一方面,本申请提供了一种多肽,其包含所述分离的抗原结合蛋白。

[0099] 在另一方面,本申请提供了一种免疫缀合物,其包含所述分离的抗原结合蛋白或所述多肽。

[0100] 在另一方面,本申请提供了一种或多种分离的核酸分子,其编码所述分离的抗原结合蛋白。

[0101] 在另一方面,本申请还提供了一种载体,其包含所述核酸分子。

[0102] 在另一方面,本申请提供了一种细胞,其包含所述核酸分子、所述多肽、所述免疫缀合物、所述分离的核酸分子和/或所述载体。

[0103] 在另一方面,本申请提供了一种生成所述分离的抗原结合蛋白或所述多肽的方法,其中所述方法包括在允许表达所述分离的抗原结合蛋白或所述多肽的条件下培养细胞。

[0104] 在另一方面,本申请提供了一种用于检测备解素的方法,其中所述方法包括使用所述分离的抗原结合蛋白或所述多肽。

[0105] 在某些实施方式中,所述方法中的所述分离的抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:118中任一项所示的氨基酸序列。

[0106] 在另一方面,本申请提供了一种用于备解素的检测试剂盒,其包含所述分离的抗原结合蛋白或所述多肽。

[0107] 在某些实施方式中,所述检测试剂盒的所述分离的抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID

NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:118中任一项所示的氨基酸序列。

[0108] 在另一方面,本申请提供了所述分离的抗原结合蛋白或所述多肽在制备试剂盒中的用途。

[0109] 在某些实施方式中,所述用途中的所述分离的抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:118中任一项所示的氨基酸序列。

[0110] 在另一方面,本申请提供了一种药物组合物,其包含所述分离的抗原结合蛋白、所述多肽、所述免疫缀合物、所述分离的核酸分子、所述载体、所述细胞,和/或药学上可接受的佐剂和/或赋形剂。

[0111] 在另一方面,本申请提供了一种药物组合,其包含所述分离的抗原结合蛋白。

[0112] 在另一方面,本申请提供了一种抑制替代补体通路的方法,其包括施用有效量的所述分离的抗原结合蛋白、所述多肽、所述免疫缀合物、所述分离的核酸分子、所述载体、所述细胞和/或所述药物组合物,和/或药学上可接受的治疗剂。

[0113] 在另一方面,本申请提供了一种抑制替代补体通路的方法,其包括施用有效量的所述药物组合和/或药学上可接受的治疗剂。

[0114] 在另一方面,本申请提供了所述分离的抗原结合蛋白、所述多肽、所述免疫缀合物、所述分离的核酸分子、所述载体、所述细胞和/或所述药物组合物和/或所述药物组合用于预防和/或治疗疾病。

[0115] 在某些实施方式中,所述疾病可以是由备解素引起的。

[0116] 在某些实施方式中,所述疾病可以是通过替代通路介导的。

[0117] 在某些实施方式中,所述疾病可以包括自身免疫性血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、溶血性尿毒症综合征(HUS)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、C3肾小球病(C3G)、哮喘、戈谢病、化脓性汗腺炎、白塞病、皮肌炎、严重烧伤、早期败血症、肺炎球菌性脑膜炎、阿尔茨海默病、癌症转移、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ACI)、输血相关性肺损伤(TRALI)、血液透析引起的血栓形成、获得性大疱性表皮松解症(EBA)、葡萄膜炎、帕金森病、原发性胆道闭锁、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)血管炎、视网膜变性、广泛性血栓性微血管病(TMA)、广泛性TMA(APS)、造血干细胞疗法(HSCT)TMA、年龄相关性黄斑变性(AMD)、先兆子痫、溶血、肝酶升高、低血小板(HELLP)综合征、多发性硬化症、抗磷脂综合征(APS)、复发性多软骨炎、缺血性损伤、中风、移植物抗宿主病(GvHD)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺气肿、动脉粥样硬化、急性冠状动脉综合征、失血性休克、类风湿性关节炎、透析(心血管风险)、心血管疾病、胎盘疟疾、抗磷脂综合征(APS)流产、脑炎、脑损伤、n-甲基-d-天冬氨酸(NMDA)受体抗体脑炎、疟疾溶血性危象、腹主动脉瘤(AAA)或胸腹主动脉瘤(TAA)。

[0118] 在另一方面,本申请提供了所述分离的抗原结合蛋白、所述多肽、所述免疫缀合

物、所述分离的核酸分子、所述载体、所述细胞、所述药物组合物和/或所述药物组合在制造用于预防和/或治疗疾病的药物中的用途。

[0119] 在某些实施方式中,所述用途中的所述疾病可以是由备解素引起的。

[0120] 在某些实施方式中,所述用途中的所述疾病可以是通过替代通路介导的。

[0121] 在某些实施方式中,所述用途的所述疾病可包括自身免疫性血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、溶血性尿毒症综合征(HUS)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、C3肾小球病(C3G)、哮喘、戈谢病、化脓性汗腺炎、白塞病、皮肌炎、严重烧伤、早期败血症、肺炎球菌性脑膜炎、阿尔茨海默病、癌症转移、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ACI)、输血相关性肺损伤(TRALI)、血液透析引起的血栓形成、获得性大疱性表皮松解症(EBA)、葡萄膜炎、帕金森病、原发性胆道闭锁、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)血管炎、视网膜变性、广泛性血栓性微血管病(TMA)、广泛性TMA(APS)、造血干细胞疗法(HSCT)TMA、年龄相关性黄斑变性(AMD)、先兆子痫、溶血、肝酶升高、低血小板(HELLP)综合征、多发性硬化症、抗磷脂综合征(APS)、复发性多软骨炎、缺血性损伤、中风、移植物抗宿主病(GvHD)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺气肿、动脉粥样硬化、急性冠状动脉综合征、失血性休克、类风湿性关节炎、透析(心血管风险)、心血管疾病、胎盘疟疾、抗磷脂综合征(APS)流产、脑炎、脑损伤、n-甲基-d-天冬氨酸(NMDA)受体抗体脑炎、疟疾溶血性危象、腹主动脉瘤(AAA)或胸腹主动脉瘤(TAA)。

[0122] 在另一方面,本申请提供了一种预防和/或治疗疾病的方法,其包括将有效量的所述分离的抗原结合蛋白、所述多肽、所述免疫缀合物、所述分离的核酸分子、所述载体、所述细胞、所述药物组合物和/或所述药物组合施用于有需要的患者。

[0123] 在某些实施方式中,所述方法中的所述疾病可以是备解素引起的。

[0124] 在某些实施方式中,所述方法的所述疾病可以是通过替代通路介导的。

[0125] 在某些实施方式中,所述方法的所述疾病可包括自身免疫性血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、溶血性尿毒症综合征(HUS)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、C3肾小球病(C3G)、哮喘、戈谢病、化脓性汗腺炎、白塞病、皮肌炎、严重烧伤、早期败血症、肺炎球菌性脑膜炎、阿尔茨海默病、癌症转移、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ACI)、输血相关性肺损伤(TRALI)、血液透析引起的血栓形成、获得性大疱性表皮松解症(EBA)、葡萄膜炎、帕金森病、原发性胆道闭锁、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)血管炎、视网膜变性、广泛性血栓性微血管病(TMA)、广泛性TMA(APS)、造血干细胞疗法(HSCT)TMA、年龄相关性黄斑变性(AMD)、先兆子痫、溶血、肝酶升高、低血小板(HELLP)综合征、多发性硬化症、抗磷脂综合征(APS)、复发性多软骨炎、缺血性损伤、中风、移植物抗宿主病(GvHD)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺气肿、动脉粥样硬化、急性冠状动脉综合征、失血性休克、类风湿性关节炎、透析(心血管风险)、心血管疾病、胎盘疟疾、抗磷脂综合征(APS)流产、脑炎、脑损伤、n-甲基-d-天冬氨酸(NMDA)受体抗体脑炎、疟疾溶血性危象、腹主动脉瘤(AAA)或胸腹主动脉瘤(TAA)。

[0126] 对于本领域技术人员来说,本公开的其他方面和优点将从以下详细描述中变得显而易知,其中仅显示和描述了本公开的说明性实施方式。正如将要认识到的,本公开能够具有其他和不同的实施方式,并且其几个细节能够在各种明显的方面进行修改,所有这些都不会偏离本公开。因此,附图和描述应被视为说明性的,而不是限制性的。

[0127] 通过引用并入

[0128] 在本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,其引用程度如同各个单独的出版物、专利或专利申请被具体地并且分别地指出以引用的方式并入一样。。

附图说明

[0129] 本发明的新颖性特征在所附权利要求书中予以具体阐述。通过参考下列详细描述,可以更好地理解本发明的特征和优点,该详细描述阐述了采用本发明原理的说明性实施例和附图(此处也称为"附图"和"图"),其中:

[0130] 图1示出了在非还原和还原SDS-PAGE上产出的人、小鼠和食蟹猴备解素分析。

[0131] 图2示出了在非还原和还原SDS-PAGE上产出的重组VHH-Fc分析。

[0132] 图3示出了重组VHH-Fc与人(图3A)、食蟹猴(图3B)或小鼠(图3C)备解素结合的ELISA。

[0133] 图4示出了重组VHH-Fc在人血清(图4A)或小鼠((图4B)血清中的补体抑制活性。

[0134] 图5示出了备解素(全长)结合VHH的表位聚类(epitope binning)。

[0135] 图6示出了在非还原和还原SDS-PAGE上产出的双互补位(bi-paratopic)VHH分析。

[0136] 图7示出了双表位VHH与人((图7A和图7C)或小鼠(图7B和图7D)备解素的结合。

[0137] 图8示出了双表位VHH在人血清(图8A和图8C)或小鼠血清(图8B和图8D)内的补体抑制活性。

[0138] 图9示出了所选备解素结合VHH的人源化。与人备解素结合(图9A和图9C),与小鼠备解素结合(图9B和图9D),人AP活性(图9E和图9F),小鼠AP活性(图9G和图9H)。

[0139] 图10示出了备解素(截断变体)结合VHH的表位图(epitope mapping)。

[0140] 图11示出了备解素抑制剂对C3和备解素之间相互作用的影响。备解素结合测定(图11A),竞争测定(图11B)。

[0141] 图12示出了在非还原和还原SDS-PAGE上产出的VHH-CFH分析。

[0142] 图13示出了SLN12140和SLN7207在人血清(图13A和图13C)和小鼠血清(图13B和图13D)中的备解素结合活性。

[0143] 图14示出了SLN12140和SLN7207在人血清(图14A和图14C)和小鼠血清(图14B和图14D)中的AP抑制活性。

[0144] 图15示出了SLN12140在补体失活中的通路选择性。AP(图15A),CP(图15B)和LP(图15C)。

[0145] 图16示出了SLN12140在AP活性测定中的物种交叉反应性。人血清中的AP活性(图16A),食蟹猴血清中的AP活性(图16B),小鼠血清中的AP活性(图16C)和大鼠血清中的AP活性(图16D)。

[0146] 图17示出了SLN12140在血浆和配制剂缓冲液中的稳定性。

[0147] 图18示出了小鼠皮下和静脉注射单剂量药代动力学研究。

[0148] 图19示出了SLN12140分别在3mpk(图19A)、10mpk(图19B)或30mpk(图19C)的剂量下剂量依赖性皮下药代动力学。

[0149] 图20示出了连续3周每周一次多重皮下给予SLN12140可持续将靶浓度降低到低水

平并且始终抑制AP活性。

[0150] 图21示出了在hCD89 Tg小鼠中连续7周每周一次多重皮下给予SLN12140可持续降低靶浓度至较低水平,并且SLN12140的药代动力学特征稳定。

[0151] 图22示出了在HEK293细胞中表达的融合蛋白的代表性SDS-PAG凝胶。非还原条件(泳道1、3、5)和还原条件(通道2、4、6)下的纯化的融合蛋白SLN6073、SLN8284、SLN12140。

[0152] 图23A-C示出了SLN8284、SLN12140、SLN6073与不同物种备解素的代表性体外结合。A)SLN8284、SLN6073、SLN12140与人备解素的结合。B)SLN8284、SLN6073、SLN12140与食蟹猕猴备解素的结合。C)SLN8284、SLN6073、SLN12140与小鼠备解素的结合。

[0153] 图24A-B示出了不同浓度的融合蛋白SLN8284、SLN6073、SLN12140对兔红细胞中替代补体通路的抑制。A)SLN8284、SLN6073、SLN12140在人血清中对替代补体通路的抑制。B)SLN8284、SLN6073、SLN12140在小鼠血清中对替代补体通路的抑制。

[0154] 图25A-B示出了ELISA检测的SLN8284、SLN6073、SLN12140与VEGF的体外结合。A)SLN8284、SLN6073、SLN12140与人VEGF121的结合。B)SLN8284、SLN6073、SLN12140与小鼠VEGF120的结合。

[0155] 图26A-B示出了SLN8284、SLN6073、SLN12140对VEGFA与VEGFR2之间相互作用的阻断作用。A)SLN8284、SLN6073、SLN12140对hVEGFA与hVEGFR2之间相互作用的阻断。B)SLN8284、SLN6073、SLN12140对mVEGFA与mVEGFR2之间相互作用的阻断。

[0156] 图27示出了SLN8284、SLN6073、SLN12140对VEGF诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)增殖的抑制。

[0157] 图28示出了HEK293细胞中表达的融合蛋白的代表性SDS-PAGE凝胶。非还原条件(泳道1、3、5)和还原条件(泳道2、4、6)下的纯化的融合蛋白SLN12147、SLN12149、SLN12150。

[0158] 图29示出了SLN12140、SLN12147、SLN12149和SLN12150在体外与不同物种备解素结合的Elisa结果。A)与人备解素结合。B)与食蟹猴备解素结合。C)与小鼠备解素结合。

[0159] 图30示出了SLN12140、SLN12147、SLN12149、SLN12150和SLN9056在体外与人转铁蛋白(hTf)结合的ELISA结果。A)SLN12147、SLN12149和SLN9056在pH7.4与hTf的结合结果;B)SLN12147、SLN12149和SLN9056在pH6.0与hTf的结合结果;C)SLN12140、SLN12150 pH7.4与hTf的结合结果;D)SLN12140、SLN12150 pH6.0与hTf的结合结果。

[0160] 图31示出了SLN12140、SLN12147、SLN12149和SLN12150对不同物种AP活性的抑制。A)人AP活性与融合蛋白。B)融合蛋白食蟹猴AP活性与融合蛋白。C)小鼠AP活性与融合蛋白。

[0161] 图32示出了SLN12140和SLN12150在小鼠体内的PK结果。A)小鼠血清中的药物。B)小鼠脑组织中的药物。C)小鼠脑脊液(CSF)中的药物。D)小鼠脑组织中的药物ID%。

具体实施方式

[0162] 虽然本文已经展示和描述了本发明的各种实施例,但是对本领域技术人员显而易见的是,这些实施例仅通过示例的方式提供。在不脱离本发明的情况下,本领域技术人员可以进行许多改变、变更和替换。应当理解,可以采用本文所述发明的实施例的各种替代方案。

[0163] 术语与定义

[0164] 术语“抗体”在最广泛的意义上使用,并且可以包括但不限于单克隆抗体(包括含

有两条轻链和两条重链的全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、小鼠抗体、人抗体(全人抗体)、人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体(例如scFv)、抗体衍生物和与抗原结合的抗体片段(例如,Fab'、VHH和$(Fab)_2$片段)。术语"抗体"还可以包括抗体的所有重组形式,诸如在原核细胞中表达的抗体、未糖基化抗体和本文所述的任何抗原结合抗体片段及其衍生物。"抗体"通常可以包括其中至少两条重链(HC)和两条轻链(LC)通过二硫键相互连接的蛋白质,或其抗原结合片段。每条重链可由重链可变区(VH)和重链恒定区组成。VH区可以进一步区分为高变区,称为互补决定区(CDR),散布有更保守的称为框架区(FR)的区域。每个VH可以由3个CDR和4个FR组成,其从氨基端到羧基端依次排列为:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。重链的可变区包含与抗原(例如,备解素)相互作用的结合结构域。在本领域,抗体的CDR可以通过各种方法来定义,例如,基于序列可变性的Kabat定义规则(见,Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,National Institutes of Health,Besse Star,Maryland(1991)(Kabat等人,《具有免疫意义的蛋白质序列》(第五版),国家卫生研究院,贝斯星,马里兰州(1991)),基于结构环区位置的Chothia定义规则(见Al-Lazikani et al.,JMol Biol 273:927-48,1997)(Al-Lazikani等人,《分子生物学杂志》,273:927-48,1997)),以及基于IMGT-ONTOLOGY和IMGT科学图表规则中的概念的IMGT定义规则。在本申请中,CDR可以由Kabat定义规则定义。

[0165] 术语"抗原结合结构域"在本文中一般是指能够与靶标结合的结构域。例如,该结合可能需要在结合序列上具有一定的互补性。例如,该结合可能需要特殊的结构。例如,在本申请中,抗原结合蛋白的抗原结合结构域可以特异性地与抗原(例如,备解素、VEGF家族、转铁蛋白)结合。例如,抗原结合结构域可能属于抗体或抗原结合片段,并且使它们与靶标的结合比与其他靶标的结合具有更大的亲和力、活动性、容易性和/或持续时间。例如,抗原结合结构域可以具有可测量和可重复的相互作用,诸如抗原和抗体之间的结合,由此可以在存在异质分子群(包括生物分子)的情况下确定目标的存在。"结合序列"是指与抗原结合蛋白互补的靶标(例如抗原)上的特异性氨基序列。

[0166] 术语"抗原结合片段"在本文中一般是指特异性结合抗原的抗体的一个或多个片段。抗体的抗原结合功能可以通过抗体的全长片段来实现。抗体的抗原结合功能也可以通过以下方式实现:包括Fv、scFv、dsFv、Fab'或$F(ab')_2$片段的重链,或包括Fv、scFv、dsFv、Fab'或$F(ab')_2$片段的轻链。术语"Fab"一般是指包括重链可变结构域和轻链可变结构域的,并且还包括轻链恒定结构域和重链第一恒定结构域(CH1)的片段。术语"Fab"一般是指通过在重链CH1的羧基端添加一些残基(包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸)而与Fab不同的片段。术语"$F(ab')_2$"一般是指Fab'的二聚体,其包括其中两个Fab片段通过铰链区上的二硫桥连接的抗体片段。术语"Fv"一般是指包含完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。在某些情况下,该片段可以由其中一个重链可变区和一个轻链可变区紧密非共价结合的二聚体组成。术语"dsFv"一般是指在单个轻链可变区和单个重链可变区之间具有二硫键的二硫稳定的Fv片段。术语"dAb片段"一般是指由VH结构域组成的抗体片段。术语"scFv"一般是指通过柔性肽连接子将抗体的一个重链可变结构域与一个轻链可变结构域共价连接和配对而产生的分子。术语"Fd"一般是指由VH和CH结构域组成的片段。例如,术语"抗原结合片段"可以包括一类缺乏抗体轻链并且只有重链可变区的抗体VHH。

[0167] 术语"抗原结合蛋白"在本文中一般是指能够特异性识别和/或中和特定抗原的多

肽分子。例如,在本申请中,术语“抗原结合蛋白”可以包括“抗体”或“抗原结合片段”,只要它们表现出所需的抗原结合活性。例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含单一结构域蛋白,例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包括包含其抗原结合部分的任何分子。例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包括VHH-Fc蛋白或Fc-VHH-VHH蛋白。

[0168] 术语“骆驼抗体”一般是指从骆驼科物种中提取的抗体。例如,在骆驼、单峰骆驼、无峰驼、羊驼或原驼中。骆驼抗体缺乏轻链,因此只包括具有完整和多样化抗原结合能力的重链。

[0169] 术语“VHH”又称VHH结构域、VHH抗体片段、和VHH抗体,一般是指“重链抗体”的抗原结合免疫球蛋白(可变)结构域。例如,具有FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的结构,并且特异性地与表位结合,而不需要存在第二个免疫球蛋白可变结构域。

[0170] 术语“细胞”一般是指单个细胞、细胞系或细胞培养物,其可以含有或已经含有包含本申请的核酸分子的质粒或载体,或者其能够表达本申请中的抗体或其抗原结合片段。所述细胞可以包括单个宿主细胞的子代。由于自然的、偶然的或故意的突变,后代细胞和原始亲本细胞在形态或基因组上不一定相同,只要它们能够表达本申请中的抗体或其抗原结合片段即可。所述细胞可通过使用本申请的载体在体外转染细胞而获得。所述细胞可以是原核细胞(例如大肠杆菌),也可以是真核细胞(例如酵母细胞;例如COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa细胞、HEK293细胞、COS-1细胞、NS0细胞、骨髓瘤细胞等)。在某些情况下,这些细胞可以是哺乳动物细胞。例如,哺乳动物细胞可以是CHO-K1细胞。

[0171] 术语“嵌合抗体”一般是指其中可变区源自一种物种而恒定区源自另一种物种的抗体。一般而言,可变区源自实验动物(诸如啮齿动物)中的抗体(“亲本抗体”),并且恒定区源自人抗体,使得与亲本(例如源自小鼠的)抗体相比,由此产生的嵌合抗体在个体人类中引起不良免疫反应的可能性降低。

[0172] 术语“衍生物”、“变体”或“类似物”可互换使用,并且一般是指本申请的多肽或多核苷酸,包括对来自序列的一个(或多个)氨基酸残基的任何替代、改变、修饰、替换、缺失和/或添加,只要所得到的多肽或多核苷酸基本上保留其至少一种内源性功能。例如,该衍生物可与其对应序列具有至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的相似性。

[0173] 术语“表位”一般是指特异性结合抗原结合蛋白的结构域或氨基酸序列。例如,术语“表位”可以包括化学活性表面分子基团(例如,糖侧链、磷酰基或磺酰基)。例如,术语“表位”可以具有特定的三级结构特征和/或特定的电荷特征。

[0174] 术语“全人抗体”一般是指只含有人免疫球蛋白序列的抗体。全人源抗体可以大大减少异源抗体对人体产生的免疫副作用。本领域获得全人抗体的方法可以包括噬菌体展示技术、转基因小鼠技术、核糖体展示技术、RNA-多肽技术等。

[0175] 术语“双表位抗原结合蛋白”一般是指包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的抗原结合分子。例如,两个抗原结合结构域与两个不同的表位结合。例如,各个抗原的非重叠表位。例如,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域可以靶向同一抗原。例如,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域靶向同一抗原的不同表位。抗原结合蛋白的识别表位的部分被称为互补位。

[0176] 术语“融合蛋白”一般是指由两种或更多种多肽组成的蛋白质。两种或更多种多肽组分可以通过肽连接子/间隔子直接或间接结合。例如,所述多肽在其自然状态下通常不结合,它们通过其各自的氨基端和羧基端由肽键结合在一起,形成连续的多肽。例如,术语“融合蛋白”包括通过本申请中描述的方法制备的抗原结合蛋白和功能活性蛋白。例如,所述功能活性蛋白可以是因子H。例如,所述功能活性蛋白可以是VEGF抑制蛋白。例如,所述功能活性蛋白可以是转铁蛋白抑制蛋白。例如,融合蛋白可以包括融合到异源蛋白、多肽或肽上的预防性或治疗性药物。其中,所述异源蛋白、多肽或肽可以是也可以不是不同类型或治疗药物。例如,融合蛋白可以包含两种不同的具有免疫调节活性的蛋白质、多肽或肽。例如,与原始多肽或蛋白的活性相比,融合蛋白可保留或提高活性。典型地,融合蛋白可以通过本领域公知的体外重组技术产生。例如,融合蛋白可以包含抗原结合蛋白。例如,融合蛋白可以包含生物分子。例如,融合蛋白可以由备解素抑制蛋白和VEGF抑制蛋白组成。例如,融合蛋白可以由备解素抑制蛋白和转铁蛋白抑制蛋白组成。

[0177] 术语“血脑屏障(BBB)”一般是指外周循环与脑和脊髓之间的生理屏障。它是由脑毛细血管内皮细胞在质膜中紧密连接而成,并且构成了一个紧密的屏障,限制了分子向脑的运输,即使是诸如尿素(60道尔顿)等非常小的分子。例如,脑毛细血管内皮细胞可以具有较弱的胞饮作用。例如,血脑屏障可以包括脑中的血脑屏障、脊髓中的血脊髓屏障和视网膜中的血视网膜屏障。例如,血脑屏障也可以包括血-CSF屏障(脉络膜丛),其中该屏障由室管膜细胞而不是毛细血管内皮细胞组成。

[0178] 术语“人源化抗体”一般是指非人抗体(例如小鼠抗体)CDR外的部分或全部氨基酸已被源自人免疫球蛋白的相应氨基酸所取代的抗体。在CDR中,还允许对氨基酸进行少量的添加、缺失、插入、替换或修饰,只要它们仍然保持抗体与特定抗原结合的能力。人源化抗体可以任选地包括人免疫球蛋白的恒定区的至少一部分。“人源化抗体”保留了与原抗体相似的抗原特异性。非人(例如,小鼠)抗体的“人源化”形式可以最低限度地包含源自非人免疫球蛋白序列的嵌合抗体。在某些情况下,人免疫球蛋白(受体抗体)中的CDR残基可以被来自具有所需特性、亲和力和/或能力的非人物种(供体抗体)(例如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物)的CDR残基所取代。在某些情况下,人免疫球蛋白的FR残基可以被相应的非人残基取代。此外,人源化抗体可以包含不存在于受体抗体或供体抗体中的氨基酸修饰。这些修饰可以进一步改善抗体的诸如结合亲和力等特性。

[0179] 术语“免疫缀合物”一般是指通过使附加治疗剂与分离的抗原结合蛋白缀合(例如,通过连接分子共价连接)而形成的缀合物,该缀合物可以通过分离的抗原结合蛋白与靶细胞上的抗原的特异性结合而将附加治疗剂递送到靶细胞。

[0180] 术语“分离的”抗原结合蛋白一般是指已从产生其的环境中的(例如,天然或重组)组分中鉴定、分离和/或回收的抗原结合蛋白。产生其的环境中的污染成分一般是干扰其研究、诊断或治疗用途的物质,并且可以包括酶、激素和其他蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。分离的抗原结合蛋白或抗体一般通过至少一个纯化步骤制备。本发明的分离的抗原结合蛋白一般特异性地与备解素结合。

[0181] 术语“分离的核酸分子”一般是指基因组、mRNA、cDNA或合成来源的DNA或RNA或它们的某种组合。它与自然界中发现的全部或部分多核苷酸没有关联,或者与其在自然界中没有关联的多核苷酸有关联。

[0182] 术语“单克隆抗体”一般是指从一组基本上同质的抗体中获得的抗体,也就是说,从除了可能存在的少数天然突变体外,其中几种抗体是相同的集群中获得抗体。单克隆抗体一般对单个抗原位点具有高度特异性。此外,与传统的多克隆抗体制剂(一般包含针对不同决定子的不同抗体)不同,每个单克隆抗体针对抗原上的单一决定子。单克隆抗体除了具有特异性外,其优势还在于可以通过杂交瘤培养合成,而不被其他免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示从基本上均质的抗体群获得的抗体的特性,并且不被解释为需要通过任何特定方法产生该抗体。例如,单克隆抗体可以在杂交瘤细胞中制备,或可以通过重组DNA方法制备。

[0183] 术语“患者”一般是指人或非人动物,包括但不限于猫、狗、马、猪、牛、羊、兔、小鼠、大鼠或猴子。

[0184] 术语“药学上可接受的佐剂”一般包括药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂,它们对于以所使用的剂量和浓度暴露于它们的细胞或哺乳动物是无毒的。一般来说,生理上可接受的载体是PH缓冲水溶液。生理上可接受的载体的实例可以包括:缓冲液,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(少于10个残基)多肽和蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、双糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖醇,诸如甘露醇或山梨醇;成盐反离子,诸如钠;和/或非离子型表面活性剂,诸如TWEEN™、聚乙二醇(PEG)和PLURONICS™。

[0185] 术语“药物组合”和“组合产品”可互换使用,并且一般是指由多于一种活性成分的混合物或组合产生的产品,并且包括活性成分的固定和非固定组合。术语“固定组合”意指活性成分和一个或多个组合伙伴以单一实体或剂量的形式同时施用于患者。术语“非固定组合”意指活性成分和一个或多个组合伙伴作为单独的实体同时、联合或依次(没有特定的时间限制)施用于患者,其中此类施用在患者体内以治疗有效水平提供了两种化合物。例如,药物组合的一种活性成分可以是通过本申请中描述的方法制备的抗原结合蛋白。

[0186] 术语“药物组合物”一般是指适于施用于患者的组合物。例如,术语“药物组合物”含有一种或多种抗原结合蛋白,其一般通过本申请中描述的方法制备。药物组合物还可以含有一种或多种合适的(药学上有效的)载体、稳定剂、赋形剂、稀释剂、增溶剂、表面活性剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂。例如,在所使用的剂量和浓度下,组合物的可接受组分对患者是无毒的。本申请中的药物组合物包括但不限于液态、冷冻和冻干组合物。

[0187] 术语“多肽”、“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用,一般是指任何长度的氨基酸聚合物。该聚合物可以是线性的或支链的,它可以包含修饰的氨基酸,并且它可以被非氨基酸打断。这些术语还涵盖已被修饰的氨基酸聚合物。这些修饰可以包括:二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作(例如,与标记组分结合)。术语“氨基酸”包括天然和/或非天然或合成氨基酸,包括甘氨酸、D和L光学异构体、氨基酸类似物和肽模拟物。

[0188] 术语“备解素”、“因子P”和“Pillemer分子”可互换使用,并且是替代补体激活的正调节因子。例如,术语“备解素”可以是棒状单体寡聚成环二聚体、三聚体和四聚体。例如,术语“备解素”可以是人备解素,它具有约469个在血浆中发现的氨基酸可溶性糖蛋白和7个具有N端结构域的血栓反应蛋白I型重复序列(TSR)。例如,术语“备解素”可以是小鼠备解素,它具有约457个在血浆中发现的氨基酸可溶性糖蛋白和7个具有N端结构域的TSR。所述TSR

可以根据该领域人们的常识进行划分。例如,术语“备解素”可以包括全长、截断和变体备解素。

[0189] 术语“VEGF”或“血管内皮生长因子”可以互换使用,并且一般是指能够刺激例如血管新生、血管生成和/或淋巴管生成的信号蛋白家族。VEGF家族的成员包括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D和PIGF(胎盘生长因子)。在本申请中,术语“VEGF”可以包括其功能活性片段、同源物、类似物和变体。

[0190] 术语“转铁蛋白”一般是指一种能够结合并运输多价离子的糖蛋白。例如,转铁蛋白可以是单链糖蛋白。例如,转铁蛋白的分子量可以为约77000D。例如,转铁蛋白可以具有多糖。例如,转铁蛋白可以具有两个离子结合位点。例如,该离子结合位点可以与铁离子具有不同的亲和力。例如,多价离子可以是其铁离子、铬离子、锰离子、镉离子或镍离子。例如,每个转铁蛋白分子可以结合两个三价铁原子。例如,转铁蛋白可以是含铁的全转铁蛋白,或不含铁的脱铁转铁蛋白。例如,转铁蛋白可以是小鼠转铁蛋白。例如,小鼠转铁蛋白的氨基序列可以如GenBank:EDL21066.1、AAL34533.1或AAL34533.1所示。例如,转铁蛋白可以是人转铁蛋白。例如,人转铁蛋白的氨基序列可以如GenBank:AAH59367.1、AAH59367.1、或AAB22049.1所示。在本申请中,术语“转铁蛋白”可以包括其功能活性片段、同源物和变体。

[0191] 术语“转铁蛋白受体”一般是指转铁蛋白的载体蛋白。例如,转铁蛋白可以是一种跨膜糖蛋白。例如,转铁蛋白受体可以介导与两个铁离子相关的转铁蛋白内吞作用。例如,转铁蛋白受体可以维持细胞内的铁稳态。例如,转铁蛋白受体可以是转铁蛋白受体1(TfR1)或转铁蛋白受体2(TfR2)。例如,TfR1和TfR2在细胞外域可以具有45-66%的同源性,但在体内表现出不同的表达模式。例如,TfR1可以比TfR2对转铁蛋白有更高的亲和力。例如,与TfR1相比,TfR2与转铁蛋白的亲和力可以低25倍。例如,TfR2可以主要表达在诸如肝脏、小肠等参与铁代谢调节的组织中,而TfR1一般存在于大多数体细胞表面。术语“转铁蛋白受体1”一般是指在细胞膜中以同二聚体表达的97-kDa的2型膜蛋白。TfR1介导的转铁蛋白内化被经典地描述为典型的铁输入通路。例如,转铁蛋白受体可以是小鼠转铁蛋白受体。例如,小鼠转铁蛋白受体的氨基酸序列可以如GenBank:AAH54522.1、CAA40624.1、或NP_001344227.1所示。例如,转铁蛋白受体可以是人转铁蛋白受体。例如,人转铁蛋白受体的氨基酸序列可以如GenBank:AAA61153.1、AAF04564.1、或AAB19499.1所示。在本申请中,术语“转铁蛋白受体”可以包括其功能活性片段、同源物和变体。

[0192] 术语“同源物”一般是指与参比氨基酸序列具有一定比例的序列同一性和功能相似性的氨基酸序列。例如,同源物可以包括由于从共同祖先进化而在不同物种中的结构相似的序列。同源物可以使用本领域已知的任何方法来鉴定,优选地通过使用BLAST工具将参比序列与单独的第二序列或序列片段或序列数据库进行比较。例如,同源物可以与其对应序列具有至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的相似性。

[0193] 术语“治疗”一般是指对具有一种或多种疾病症状的患者施用内部或外部治疗剂,并且此外,已知治疗剂对这些症状显示出治疗效果。一般,治疗剂以有效减轻一种或多种疾病症状的量(治疗有效量)施用于患者。所期望的治疗效果包括降低疾病进展速度、缓解或减轻疾病状态以及恢复或改善预后。

[0194] 术语“载体”一般是指能够在合适宿主中自我复制的核酸分子。它将插入的核酸分

子转移到宿主细胞内和/或在宿主细胞之间。载体可以包括主要用于将DNA或RNA插入细胞的载体,主要用于复制DNA或RNA的载体,以及主要用于表达DNA或RNA转录和/或翻译的载体。该载体还包括具有上述各种功能的载体。载体可以是当引入合适的宿主细胞时可以转录并翻译成多肽的多核苷酸。一般,载体可以通过培养含有载体的合适宿主细胞来产生所需的表达产物。

[0195] 术语“可选的”或“可选地”意指随后描述的事件或情况可能发生,但不必发生。

[0196] 术语“包含”一般是指包括、包容、含有或涵盖的含义。在某些情况下,它也意指“是/为”和“由……组成”。

[0197] 术语“约”一般是指高于或低于规定值0.5%-10%范围内的变化,例如,高于或低于规定值0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%范围内的变化。

[0198] 发明详述

[0199] 分离的抗原结合蛋白

[0200] 在一方面,本申请提供了一种分离的抗原结合蛋白,其可以在分离的抗原结合蛋白的浓度为约100ng/ml或更少(例如,所述浓度不大于50ng/ml、不大于约55ng/ml、不大于约60ng/ml、不大于65ng/ml、不大于70ng/ml、不大于75ng/ml、不大于80ng/ml、不大于约85ng/ml、不大于约90ng/ml、或不大于约95ng/ml)的ELISA结合试验中与备解素特异性结合。例如,所述备解素可以包括人备解素、食蟹猴备解素和小鼠备解素。

[0201] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白可以通过结合蛋白来抑制替代通路以诱导溶血。例如,在替代通路实验中,溶血率可以通过对补体保存血清和红细胞进行共孵育来确定。例如,所述补体保存血清可以源自人或小鼠。例如,在该分离的抗原结合蛋白的浓度为500nM的情况下,溶血率可以为约60%或更少(例如,所述溶血率不大于55%、不大于约50%、不大于约45%、不大于约40%、不大于约35%、不大于约30%、不大于约25%、不大于约20%、不大于约15%、不大于约10%、或不大于约5%或更少)。

[0202] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白可以特异性结合到备解素的TSR5、TSR6和/或TSR0结构域。例如,结合表位可以通过人备解素-生物素的截断变体和血栓反应蛋白重复序列(TSR)之间的组合进行确定。

[0203] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白可以抑制备解素与C3之间的相互作用。例如,所述分离的抗原结合蛋白的抑制活性可以通过竞争结合试验确定。该分离的结合蛋白能够与备解素竞争性结合,从而抑制备解素与C3的组合。例如,所述分离的抗原结合蛋白以剂量依赖的方式对备解素与C3的结合显示出抑制活性。

[0204] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白可以选择性地抑制替代通路而不是经典通路或凝集素通路。例如,通路的选择性可以通过溶血率来确定。例如,所述分离的抗原结合蛋白可以以约50nM或更小的IC50(例如、所述IC50不大于约45nM、不大于约40nM、不大于约35nM、不大于约30nM、不大于约25nM、不大于约20nM、不大于约15nM、不大于约10nM、或不大于约5nM或更小)抑制替代通路。例如,所述分离的抗原结合蛋白在经典通路中没有展现出抑制活性,而对照则展现出抑制能力,其中IC50为57nM。例如,所述分离的抗原结合蛋白在凝集素通路中没有展现出抑制活性,而对照显示出抑制能力,其中IC50为45nM。

[0205] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白在哺乳动物的AP特异性通路中可以具有物

种交叉备解素结合和补体抑制活性。例如,物种交叉补体抑制活性可以通过检测在不同物种中溶血来确定。例如,所述物种可以是人、食蟹猴、小鼠和大鼠。

[0206] 在一方面,本申请提供了一种分离的抗原结合蛋白,其可以包含重链可变区VH中的至少一个CDR。该VH可以包含SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93中任一项所示的氨基酸序列。

[0207] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白的CDR可以以任何形式划分,并且任何形式的划分的CDR可以落入本申请的范围,只要VH与SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93中任一项所示的氨基酸序列相同即可。

[0208] 抗体的CDR,也称为互补决定区,是可变区的一部分。该区域的氨基酸残基可以与抗原或抗原表位接触。CDR可以通过各种编码系统确定,诸如CCG、Kabat、Chothia、IMGT、AbM、consensus Kabat/Chothia等。这些编码系统是本领域已知的,并且本领域技术人员可以根据抗体的序列和结构使用不同的编码系统来确定CDR区域。使用不同的编码系统,CDR区域可能会不同。在本申请中,CDR涵盖根据任何CDR划分方式划分的CDR序列;并且还考虑了其变体。所述变体包括用一个或多个氨基酸(例如,1-30、1-20或1-10;进一步地,例如,1、2、3、4、5、6、7、8或9个氨基酸的取代、缺失和/或插入)替换、缺失和/或添加的CDR的氨基酸序列。还涵盖同源物,其包括与CDR的氨基酸序列具有至少约85%(例如,具有至少约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多)序列同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,本文描述的分离的抗原结合蛋白由Kabat编码系统定义。

[0209] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白可以与备解素结合。例如,人备解素、食蟹猴备解素、小鼠备解素、大鼠备解素等。

[0210] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含重链可变区VH,其可以包含CDR3、CDR2和CDR1中的至少一、二或三个。

[0211] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR3可以包含在SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、和SEQ ID NO:17中任一项所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白的CDR3序列可以根据Kabat编码系统进行定义。

[0212] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白的CDR2可以包含SEQ ID NO:55:$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9YX_{11}$DSVKG所示的氨基酸序列,$X_1$是F或I或不存在,$X_2$是D或者I,$X_3$是D或N或R或T,$X_4$是G或R或S或T,$X_5$D或E,$X_6$是G或R,$X_7$是G或R或S或V或W,$X_8$是E或K或T,$X_9$是R或S或W或Y,并且$X_{11}$是A或T。例如,所述分离的抗原结合蛋白的CDR2可以根据Kabat编码系统进行定义。

[0213] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR2可以包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11中任一项所示的氨基酸序

列。

[0214] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR1可以包含SEQ ID NO:54:$X_1X_2CMX_5$所示的氨基酸序列,其中X_1为H或S或T或Y,X_2是G或Y,并且X_5是A或G。例如,所述分离的抗原结合蛋白的CDR1序列可以根据Kabat编码系统进行定义。

[0215] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR1可以包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5中任一项所示的氨基酸序列。

[0216] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR3可以包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17中任一项所示的氨基酸序列,所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR2可以包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11中任一项所示的氨基酸序列,所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR1可以包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5中任一项所示的氨基酸序列。

[0217] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR3可以包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列,所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR2可以包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列,并且所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR1可以包括SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR3可以包含SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列,所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR2可以包含SEQ ID NO:7中规定的氨基酸序列,并且所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR1可以包括SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR3可以包含SEQ ID NO:14中规定的氨基酸序列,所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR2可以包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列,并且所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR1可以包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR3可以包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列,所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR2可以包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列,并且所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR1可以包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR3可以包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列,所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR2可以包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列,并且所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR1可以包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR3可以包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列,所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR2可以包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,所述分离的抗原结合蛋白的所述CDR1可以包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93中任一项所示的氨基酸序列,或者具有相同CDR(例如,CDR1,CDR2或CDR3)的任何抗体。

[0218] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白还可以包含框架区FR1、FR2、FR3和FR4。

[0219] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:56:X_1VQLVESGGGX_{11}V $X_{13}X_{14}$GGSLRLSC$X_{23}X_{24}X_{25}X_{26}$Y$X_{28}X_{29}X_{30}$所示的氨基酸序列,其中X_1是D或E或H或Q,X_{11}是L或S或V,X_{13}是H或Q,X_{14}是A或P或S或V,X_{23}是A或E或V,X_{24}是A或D或H或V,X_{25}是F或P

或S,X_{26}是A或E或G,X_{28}是I或T或不存在,X_{29}是H或S或Y或不存在,X_{30}是G或S或T或不存在。例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1序列可以根据Kabat编码系统进行定义。

[0220] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30中任一项所示的氨基酸序列。

[0221] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:57:WX_2RQAPG $X_8X_9X_{10}EX_{12}VX_{14}X_{15}$所示的氨基酸序列,其中$X_2$是F或I,X8是E或K,X9是E或G,$X_{10}$是L或R,X12是G或R,$X_{14}$是A或S,并且$X_{15}$是A或S或V。例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2序列可以根据Kabat编码系统进行定义。

[0222] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40中任一项所示的氨基酸序列。

[0223] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:58:RFTISX$_6$DX$_8$X$_9$ X$_{10}$X$_{11}$TLYLX$_{16}$MNX$_{19}$LX$_{21}$X$_{22}$EDTAX$_{27}$YYCAX$_{32}$所示的氨基酸序列,其中X_6是K或L或Q或R,X_8是I或N,X_9是A或S,X_{10}是E或K或T,X_{11}是N或S,X_{16}是E或Q,X_{19}是I或N或S,X_{21}是K或Q或R,X_{22}是A或P或S,X_{27}是M或V,并且X_{32}是A或T。例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3序列可以根据Kabat编码系统进行定义。

[0224] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51中任一项所示的氨基酸序列。

[0225] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:59:WGQGTX$_6$VTVSS所示的氨基酸序列,其中X_6为L或Q。例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4序列可以根据Kabat编码系统进行定义。

[0226] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:53中任一项所示的氨基酸序列。

[0227] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:3中任一项所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40中任一项所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51中任一项所示的氨基酸序列;并且所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:53中任一项所示的氨基酸序列。

[0228] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列;并且所述分离

的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0229] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列;并且所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:61所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0230] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列;并且所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0231] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列;例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:63中所述的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0232] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列;例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,所述FR1、所述FR2、所述FR3或所述FR4)的抗体。

[0233] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列;例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0234] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列;例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:66所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0235] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列;例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0236] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列;例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0237] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列;例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:69所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0238] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列;例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0239] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列;例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0240] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列;例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0241] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列;所述分离的抗

原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列;例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0242] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列;例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0243] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列;例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0244] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列;例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0245] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列;例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0246] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列;例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0247] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列;例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0248] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列;例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:80所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0249] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列;例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:92所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0250] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述FR1可以包含SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR2可以包含SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR3可以包含SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列;所述分离的抗原结合蛋白的所述FR4可以包含SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列;例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:93所示的氨基酸序列,或具有相同FR(例如,FR1、FR2、FR3或FR4)的抗体。

[0251] 在本申请中,所述重链可变区可以包含VHH。该VHH可以包含SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93中任一项所示的氨基酸序列。

[0252] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白可以包含重链恒定区。

[0253] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的Fc区可以是人Fc区。例如,所述人Fc区可以被修饰以获得所需的特性(例如,氨基酸突变)。例如,所述人Fc区可以包含SEQ ID NO:109所示的氨基酸序列。

[0254] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白可以直接或间接连接到第二抗原结合结构域。

[0255] 例如,所述分离的抗原结合蛋白可以通过其N端或C端连接到所述第二抗原结合结构域的N端或C端。例如,所述分离的抗原结合蛋白可以使用连接子通过其N端或C端连接到所述第二抗原结合结构域的N端或C端。例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述连接子可以是简单共价键(例如,肽键)、合成聚合物(例如,聚乙二醇(PEG)聚合物)或由化学反应产生的任何种类的键。例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述连接子可以是聚甘氨酸连接子。例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述连接子可以包含SEQ ID NO:108所示的氨基酸序列:GGGGSGGGGSGGGGS。

[0256] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白的所述第二抗原结合结构域可以结合到与所述分离的抗原结合蛋白不同的靶标上。

[0257] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白的所述第二抗原结合结构域可以结合到与

所述分离的抗原结合蛋白相同的靶标上。

[0258] 例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述第二抗原结合结构域可以与备解素结合。例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述第二抗原结合结构域可以结合到与所述分离的抗原结合蛋白不同的备解素的表位。例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述第二抗原结合结构域可以结合到与所述分离的抗原结合蛋白相同的备解素的表位。例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述第二抗原结合结构域可以结合到备解素的TSR5、TSR6和/或TSR0结构域。例如,所述分离的抗原结合蛋白的所述第二抗原结合结构域可以包含SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93中任一项所示的氨基酸序列。

[0259] 例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:81所示的氨基酸序列。

[0260] 例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:116所示的氨基酸序列。

[0261] 例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包括抗体或其抗原结合片段。例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包括Fab、Fab'、$F(ab)_2$、Fv片段、$F(ab')_2$、scFv、di-scFv、VHH和/或dAb。例如,所述分离的抗原结合蛋白可以选自下组:单克隆抗体、单链抗体、嵌合抗体、人源化抗体和完全人源抗体。

[0262] 例如,所述分离的抗原结合蛋白可以是骆驼抗体。

[0263] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白可以与参比抗体具有竞争性靶标结合能力,其中所述参比抗体可以包含重链可变区VH,其可以包含CDR3、CDR2和CDR1中的至少一、二或三个。

[0264] 在本申请中,所述参比抗体的CDR3可以包在SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中任一项所示的氨基酸序列。例如,所述参比抗体的CDR3序列可以根据Kabat编码系统进行定义。

[0265] 在本申请中,所述参比抗体的CDR2可以包含SEQ ID NO:55:$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9YX_{11}$DSVKG所示的氨基酸序列,其中$X_1$是F或I或没有,$X_2$是D或I,$X_3$是D或N或R或T,$X_4$是G或R或S或T,$X_5$是D或E,$X_6$是G或R,$X_7$是G或R或S或V或W,$X_8$是E或K或T,$X_9$是R或S或W或Y,并且$X_{11}$是A或T。例如,所述参比抗体的CDR2可以根据Kabat编码系统进行定义。

[0266] 在本申请中,所述参比抗体的CDR2可以包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8中任一项所示的氨基酸序列。

[0267] 在本申请中,所述参比抗体的CDR1可以包含SEQ ID NO:54:$X_1X_2CMX_5$所示的氨基酸序列,其中X_1为H或S或T或Y,X_2为G或Y,并且X_5为A或G。例如,所述参比抗体的CDR1序列可以根据Kabat编码系统进行定义。

[0268] 在本申请中,所述参比抗体的CDR1可以包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中任一项所示的氨基酸序列。

[0269] 例如,所述参比抗体的CDR3可以包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中任一项所示的氨基酸序列,所述参比抗体的CDR2可以包含SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8中任一项所示的氨基酸序列,并且所述参比抗体的CDR1可以包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中任一项所示的氨基酸序列。

[0270] 例如,所述参比抗体的CDR3可以包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列,所述参比抗体的CDR2可以包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列,并且所述参比抗体的CDR1可以包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。例如,所述参比抗体的CDR3可以包含SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列,所述参比抗体的CDR2可以包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列,并且所述参比抗体的CDR1可以包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。例如,所述参比抗体的CDR3可以包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列,所述参比抗体的CDR2可以包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列,并且所述参比抗体的CDR1可以包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74中任一项所示的氨基酸序列,或者具有相同CDR(例如,CDR1、CDR2或CDR3)的抗体。

[0271] 例如,所述分离的抗原结合蛋白可以包括其功能活性片段、同源物和变体,它们保持相似的生物活性。例如,与其对应序列的序列相似性可以为至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的相似性。

[0272] 融合蛋白

[0273] 在另一方面,本申请提供了一种融合蛋白,其可以包含本申请的分离的抗原结合蛋白。

[0274] 在本申请中,所述融合蛋白可以包含功能活性蛋白。

[0275] 在本申请中,所述融合蛋白的所述功能活性蛋白可以与所述分离的抗原结合蛋白直接或间接连接。

[0276] 例如,所述功能活性蛋白可以通过其N端或C端连接到所述分离的抗原结合蛋白的N端或C端。例如,所述功能活性蛋白可以使用连接子通过其N端或C端与所述分离的抗原结合蛋白的N端或C端连接。例如,所述连接子可以是简单共价键(例如,肽键)、合成聚合物(例如,聚乙二醇(PEG)聚合物)或由化学反应产生的任何种类的键。例如,所述连接子可以是聚甘氨酸连接子。例如,所述连接子可以包含SEQ ID NO:108所示的氨基酸序列:GGGGSGGGGSGGGGS。

[0277] 例如,所述功能活性蛋白可以是因子H。例如,所述因子H可以包含SEQ ID NO:110所示的氨基酸序列。例如,所述融合蛋白的所述因子H可以包括其功能活性片段、同源物和变体。例如,与其对应序列的序列相似性可以为至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的相似性。

[0278] 例如,所述融合蛋白可以包含SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列。

[0279] 例如,所述融合蛋白的所述功能活性蛋白可以是VEGF抑制蛋白。例如,所述融合蛋白的所述VEGF抑制蛋白可以包含SEQ ID NO:113所示的氨基酸序列。例如,所述融合蛋白的所述VEGF抑制蛋白可以包括其功能活性片段、同源物和变体。在某些实施方式中,与其对应序列的序列相似性可以为至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的相似性。

[0280] 例如,所述融合蛋白可以包含SEQ ID NO:114所示的氨基酸序列。

[0281] 例如,所述融合蛋白的所述功能活性蛋白可以是转铁蛋白抑制蛋白。例如,所述融合蛋白的所述因子H可以包含SEQ ID NO:115所示的氨基酸序列。例如,所述融合蛋白的所述转铁蛋白抑制蛋白可以包括其功能活性片段、同源物和变体。在某些实施方式中,与其对应序列的序列相似性可以为至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的相似性。

[0282] 例如,所述融合蛋白可以包含SEQ ID NO:117所示的氨基酸序列。

[0283] 例如,所述融合蛋白可以包含SEQ ID NO:118所示的氨基酸序列。

[0284] 例如,所述融合蛋白可以包括融合到异源蛋白、多肽或肽上的预防性或治疗性药物。其中,所述异源蛋白、多肽或肽可以是也可以不是不同类型的或治疗性的药物。

[0285] 例如,所述融合蛋白可以包含两种或多种不同的具有免疫调节活性的蛋白质、多肽或肽。例如,与原多肽或蛋白的活性相比,融合蛋白可以保留或提高活性。典型地,融合蛋白可以通过本领域公知的体外重组技术产生。例如,融合蛋白可以包含抗原结合蛋白。

[0286] 多肽和免疫缀合物

[0287] 在另一方面,本申请提供了一种或多种多肽,其可以包含本申请的分离的抗原结合蛋白。

[0288] 在另一方面,本申请提供了一种或多种免疫缀合物,其可以包含本申请的分离的抗原结合蛋白。在某些实施方式中,该免疫缀合物还可以包含药学上可接受的治疗剂。

[0289] 核酸、载体和细胞

[0290] 在另一方面,本申请还提供了一种或多种分离的核酸分子。所述核酸分子可以编码本发明的抗原结合蛋白。例如,每个核酸分子可以编码完整的抗原结合蛋白或其一部分(例如,CDR1-3、FR1-4、VH、VHH或重链中的一种或多种)。

[0291] 本申请的核酸分子可以是分离的。例如,它可以通过以下方法产生或合成:(i)体外扩增,例如通过聚合酶链反应(PCR)扩增;(ii)克隆重组;(iii)纯化,例如通过限制性酶切和凝胶电泳分馏;或(iv)合成,例如通过化学合成。在某些实施方式中,分离的核酸是通过重组DNA技术制备的核酸分子。

[0292] 在本申请中,编码所述抗体及其抗原结合片段的核酸可以通过本领域已知的各种方法制备。这些方法包括但不限于使用限制性片段操作或使用合成寡核苷酸的重叠延伸PCR。对于具体操作,见Sambrook et al.,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989(Sambrook等人,“分子克隆”,《实验室手册》,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约,1989);和Ausube et al.,Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing and Wiley-Interscience,New York N.Y.,1993(Ausube等人,《分子生物学的当前方法》,格林出版与威力出版公司,纽约,1993)。

[0293] 在另一方面,本申请提供了一种或多种载体,其中每个载体包含本申请的核酸分子。每个载体可以包含一个或多个所述核酸分子。另外,所述载体还可以包含其他基因,例如,允许在合适的宿主细胞中并且在合适的条件下选择该载体的标记基因。另外,该载体还可以包含允许在合适的宿主中正确表示编码区域的表达控制元件。此类控制元件对于本领

域技术人员来说是众所周知的,其例如可以包括启动子、核糖体结合位点、增强子和调节基因转录或mRNA翻译的其他控制元件。在某些实施方式中,表达式控制序列是可调节的元件。表达控制序列的具体结构可以因物种或细胞类型的功能而异,但一般包括分别参与转录和翻译启动的5'非转录序列和5'和3'非翻译序列,例如TATA盒、加帽序列、CAAT序列等。例如,5'非转录表达控制序列可以包含启动子区域,并且该启动子区域可以包含启动子序列,用于与核酸功能性连接以进行转录控制。该表达控制序列可以进一步包括增强子序列或上游激活子序列。在本申请中,合适的启动子可以包括,例如SP6、T3和T7聚合酶的启动子、人U6 RNA启动子、CMV启动子以及它们的人工杂合启动子(诸如CMV),其中该启动子的一部分可以与另外的细胞蛋白(诸如人GAPDH和甘油醛-3-磷酸脱氢酶)基因的启动子的一部分融合,并且该启动子可以或可以不包含另外的内含子。本申请的核酸分子可以可操作地连接到表达控制元件。该载体可以包括,例如,质粒、粘粒、病毒、噬菌体或通常用于,例如,基因工程的其他载体。例如,该载体是表达载体。

[0294] 在另一方面,本申请提供了宿主细胞,其可以包含本申请的核酸分子和/或本申请的一个或多个载体或载体。在某些实施方式中,每种类型或每个宿主细胞可以包含本申请的一个或一种类型的核酸分子或载体。在某些实施方式中,每种类型的或每个细胞可以包含本申请的多个(例如,2个或更多个)或多种类型的(例如,2种或更多种类型的)载体。例如,本申请的载体可以被引入宿主细胞,例如真核细胞,诸如植物源细胞、真菌细胞或酵母细胞等。本申请的载体可以通过本领域已知的方法(诸如电穿孔、脂质体转染、脂质体转染等)引入宿主细胞。

[0295] 制备方法

[0296] 在另一方面,本申请提供了一种用于分离的抗原结合蛋白的制备方法。该方法可以包括在表达该分离的抗原结合蛋白的条件下培养本申请的宿主细胞。例如,可以使用适当的介质、适当的温度、培养时间等,并且这些方法为本领域普通技术人员所理解。

[0297] 任何适合于产生单克隆抗体的方法都可用于产生本申请的分离的抗原结合蛋白(例如,抗备解素抗体)。例如,动物可以用连接的或自然产生的备解素或其片段进行免疫。可以使用合适的免疫方法,包括佐剂、免疫刺激剂和重复加强免疫,并且可以使用一种或多种途径。

[0298] 任何合适形式的备解素都可以用作免疫原(抗原),以产生特异性于备解素的非人抗体并筛选该抗体的生物活性。诱发性免疫原可以是人备解素、重组小鼠或含有单个/多个表位的肽。该免疫原可以单独使用,或与本领域已知的一种或多种免疫原性增强剂组合使用。该免疫原可以从天然来源纯化,也可以在基因修饰的细胞中产生。编码免疫原的DNA可以是基因组源或非基因组源(例如cDNA)。可以使用合适的遗传载体来表达编码免疫原的DNA,并且该载体包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、杆状病毒载体、材料和非病毒载体。

[0299] 在实施例1中描述了用于发现本申请的分离的抗原结合蛋白的示例性方法。

[0300] 可以在健康骆驼中使用重组小鼠备解素进行免疫。基本恒定结构域序列可以通过使用下文实施例中描述的生物测定筛选抗体来优化,从而产生所需的生物活性。

[0301] 在实施例2中描述了用于人源化本申请的分离的抗原结合蛋白的示例性方法。

[0302] 本申请中的分离的抗原结合蛋白的DNA分子序列或其片段可以通过常规技术获

得,诸如使用PCR扩增或基因组文库筛选等的方法。

[0303] 一旦获得相关序列,就可以通过重组大规模地获得相关序列。这一般是通过将它们克隆到载体中,然后将其转移到细胞中,然后借助于常规方法从增殖的宿主细胞中分离出相关序列来完成的。

[0304] 另外,相关序列也可以使用人工合成方法进行合成,尤其是当片段较短时。一般来说,首先合成多个小片段,然后将这些小片段连接起来,可以得到一个序列很长的片段。然后,可以将核酸分子引入本领域已知的各种现有DNA分子(或诸如载体)和细胞中。

[0305] 本申请还涉及包含上述适当核酸分子和适当启动子或控制序列的载体。这些载体可用于转化适当的宿主细胞,使它们能够表达蛋白质。宿主细胞可以是原核细胞,诸如细菌细胞;或低级真核细胞,诸如酵母细胞;或更高级的真核细胞,诸如哺乳动物细胞。例如,动物细胞可以包括(但不限于):CHO-S,CHO-K1和HEK-293细胞。

[0306] 在本申请中用重组DNA转化宿主细胞的步骤可以使用本领域公知的技术来执行。所获得的转化物可以通过常规方法进行培养,其表达由本申请的核酸分子编码的多肽。根据所使用的宿主细胞,在合适的条件下在常规培养基中对其进行培养。一般来说,宿主细胞在适合于本申请分离的抗原结合蛋白表达的条件下进行培养和转化。然后,使用常规免疫球蛋白纯化步骤,诸如蛋白A-琼脂糖、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析、离子交换层析、疏水层析、分子筛层析或亲和层析,以及本领域技术人员公知的其他常规分离纯化手段,纯化并获得本申请的分离的抗原结合蛋白。

[0307] 所得单克隆抗体可以通过常规手段鉴定。举例来说,单克隆抗体的结合特异性可以通过免疫沉淀或体外结合测定来确定,诸如荧光活化细胞分选(FACS)、放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)。

[0308] 药物组合物和药物组合

[0309] 在另一方面,本申请提供了一种药物组合物。该药物组合物可以包含本文所述的分离的抗原结合蛋白、多肽、免疫缀合物、分离的核酸分子、载体、细胞,和/或药学上可接受的佐剂和/或赋形剂。在本申请中,该药学上可接受的佐剂可以包括缓冲液、抗氧化剂、防腐剂、低分子量多肽、蛋白质、亲水性聚合物、氨基酸、糖、螯合剂、反离子、金属络合物和/或非离子表面活性剂。除非任何常规介质或试剂与本文所述的细胞不相容,否则考虑将其使用在本申请的药物组合物中。在本申请中,该药学上可接受的赋形剂可以包括药物制剂中除主要药物以外的添加剂,并且也可以称为辅助材料。例如,该赋形剂可以包括片剂中的粘结剂、填料、崩解剂、润滑剂。例如,该赋形剂可以包括中药丸剂中的酒、醋、药汁等。例如,该赋形剂可以包括半固体配制剂软膏、乳霜的基础部分。例如,该赋形剂可以包括液体配制剂中的防腐剂、抗氧化剂、调味剂、香料、助溶剂、乳化剂、增溶剂、弹性调节剂、着色剂。药物制剂应与施用方式相匹配。本申请的药物组合物可以制备成注射形式,例如,借助于使用生理盐水或含有葡萄糖和其他佐剂的水溶液的常规方法。诸如注射剂和溶液等药物组合物应在无菌条件下制造。活性成分的剂量为治疗有效量。另外,本申请的分离的抗原结合蛋白也可以与其它治疗剂一起使用。

[0310] 在另一方面,本申请提供了一种药物组合,其包含所述分离的抗原结合蛋白和一种或多种活性成分。

[0311] 本文所述分离的抗原结合蛋白、药物组合物或药物组合可以按照良好医疗实践进

行配制、给药和施用。在这种情况下,所考虑的因素包括正在治疗的特定病症、正在治疗的特定哺乳动物、单个患者的临床状况、所述病症的病因、药物递送部位、施用方法、施用时间表以及医疗从业者已知的其他因素。治疗剂(例如,抗备解素抗体)不需要但可选地与目前用于预防或治疗所述疾病的一种或多种药剂一起配制和/或施用。此类其它药剂的有效量取决于制剂中存在的治疗剂(例如抗备解素抗体)的量、病症或治疗的类型以及以上讨论的其它因素。一般来说,这些药剂能够以经验/临床确定为适当的任何剂量或经由经验/临床确定为适当的任何途径使用。与单一疗法相比,在组合疗法中施用的抗体剂量可以减少。此类疗法的进展可以很容易地通过传统技术进行监测。

[0312] 试剂盒、用途和方法

[0313] 在另一方面,本申请提供了一种用于检测或测定备解素的方法,该方法可以包括使用所述分离的抗原结合蛋白或所述多肽。

[0314] 在本申请中,所述方法可以包括体外方法、离体方法、非诊断或非治疗目标的方法。例如,该方法可以包括一种用于检测用于非诊断目的的备解素的存在和/或量的方法,该方法可以包括以下步骤:

[0315] 1)将样品与本申请的抗原结合蛋白接触;并且

[0316] 2)检测样品结合的抗原结合蛋白的存在和/或量,以确定从受试者获得的样品中备解素的存在和/或表达水平。

[0317] 例如,所述方法的所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:118中任一项所示的氨基酸序列。

[0318] 例如,所述方法的所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93中任一项所示的氨基酸序列。

[0319] 例如,所述方法的所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:92所示的氨基酸序列。

[0320] 例如,所述方法的所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:93所示的氨基酸序列。

[0321] 在另一方面,本申请提供了一种用于备解素的试剂盒,其可以包括使用所述分离的抗原结合蛋白或所述多肽。在本申请中,该试剂盒还可以包括说明书,该说明书记录用于检测备解素的存在和/或量的方法。例如,该方法可以包括体外方法、离体方法、非诊断或非治疗目标的方法。

[0322] 例如,所述试剂盒可以是包含所述分离的抗原结合蛋白或多肽的ELISA试剂盒。例如,所述ELISA试剂盒可以通过直接ELISA、间接ELISA、夹心ELISA或竞争性ELISA检测备解素。

[0323] 例如,所述分离的抗原结合蛋白或所述多肽可以用作捕获抗体。

[0324] 例如,所述分离的抗原结合蛋白或所述多肽可以用作检测抗体。例如,所述检测抗体可以与HRP(辣根过氧化物酶)连接。例如,所述检测抗体可以与ALP(碱性磷酸酶)连接。

[0325] 例如,所述捕获抗体可以包含SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:118中任一项所示的氨基酸序列。例如,所述捕获抗体可以包含SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93中任一项所示的氨基酸序列。

[0326] 例如,所述捕获抗体可以包含SEQ ID NO:92所示的氨基酸序列。例如,所述捕获抗体可以包含SEQ ID NO:93所示的氨基酸序列。

[0327] 例如,所述捕获抗体可以包含SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:118中任一项所示的氨基酸序列。

[0328] 在另一方面,本申请提供了所述分离的抗原结合蛋白或多肽在制备用于检测备解素的存在和/或量的方法的试剂盒中的用途。例如,所述方法可以包括体外方法、离体方法、非诊断或非治疗目标的方法。

[0329] 例如,所述用途的所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117和SEQ ID NO:118中任一项所示的氨基酸序列。例如,所述用途的所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93中任一项所示的氨基酸序列。例如,所述用途的所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:92所示的氨基酸序列。例如,所述用途的所述分离的抗原结合蛋白可以包含SEQ ID NO:93所示的氨基酸序列。

[0330] 在另一方面,本申请提供了一种抑制替代补体通路的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的分离的抗原结合蛋白、多肽、免疫缀合物、分离的核酸分子、载体、细胞和/或药物组合物和/或药学上可接受的治疗剂。在本申请中,调节免疫反应的方法可以包括体外方法、离体方法、非诊断或非治疗目标的方法。

[0331] 在另一方面,本申请提供了一种抑制替代补体通路的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的药物组合物、药物组合物和/或药学上可接受的治疗剂。在本申请中,调节免疫反应的方法可以包括体外方法、离体方法、非诊断或非治疗目标的方法。

[0332] 在另一方面,本申请提供了一种抑制备解素与C3结合的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的分离的抗原结合蛋白、多肽、免疫缀合物、分离的核酸分子、载体和/或细胞。该方法可以是离体或体外方法。

[0333] 在另一方面,本申请提供了分离的抗原结合蛋白、所述多肽、所述免疫缀合物、所述分离的核酸分子、所述载体、所述药物组合物用于预防和/或治疗疾病。例如,所述疾病可

以是由备解素引起的。例如,所述疾病可以是通过替代通路介导的。例如,所述疾病可以包括自身免疫性血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、溶血性尿毒症综合征(HUS)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、C3肾小球病(C3G)、哮喘、戈谢病、化脓性汗腺炎、白塞病、皮肌炎、严重烧伤、早期败血症、肺炎球菌性脑膜炎、阿尔茨海默病、癌症转移、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ACI)、输血相关性肺损伤(TRALI)、血液透析引起的血栓形成、获得性大疱性表皮松解症(EBA)、葡萄膜炎、帕金森病、原发性胆道闭锁、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)血管炎、视网膜变性、广泛性血栓性微血管病(TMA)、广泛性TMA(APS)、造血干细胞疗法(HSCT)TMA、年龄相关性黄斑变性(AMD)、先兆子痫、溶血、肝酶升高、低血小板(HELLP)综合征、多发性硬化症、抗磷脂综合征(APS)、复发性多软骨炎、缺血性损伤、中风、移植物抗宿主病(GvHD)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺气肿、动脉粥样硬化、急性冠状动脉综合征、失血性休克、类风湿性关节炎、透析(心血管风险)、心血管疾病、胎盘疟疾、抗磷脂综合征(APS)流产、脑炎、脑损伤、n-甲基-d-天冬氨酸(NMDA)受体抗体脑炎、疟疾溶血性危象、腹主动脉瘤(AAA)或胸腹主动脉瘤(TAA)。

[0334] 在另一方面,所述试剂盒、所述药物组合物和/或所述药物组合在本申请中用于预防和/或治疗疾病。例如,所述疾病可以是由备解素引起的。例如,所述疾病可以是通过替代通路介导的。例如,所述疾病可以包括自身免疫性血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、溶血性尿毒症综合征(HUS)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、C3肾小球病(C3G)、哮喘、戈谢病、化脓性汗腺炎、白塞病、皮肌炎、严重烧伤、早期败血症、肺炎球菌性脑膜炎、阿尔茨海默病、癌症转移、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ACI)、输血相关性肺损伤(TRALI)、血液透析引起的血栓形成、获得性大疱性表皮松解症(EBA)、葡萄膜炎、帕金森病、原发性胆道闭锁、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)血管炎、视网膜变性、广泛性血栓性微血管病(TMA)、广泛性TMA(APS)、造血干细胞疗法(HSCT)TMA、年龄相关性黄斑变性(AMD)、先兆子痫、溶血、肝酶升高、低血小板(HELLP)综合征、多发性硬化症、抗磷脂综合征(APS)、复发性多软骨炎、缺血性损伤、中风、移植物抗宿主病(GvHD)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺气肿、动脉粥样硬化、急性冠状动脉综合征、失血性休克、类风湿性关节炎、透析(心血管风险)、心血管疾病、胎盘疟疾、抗磷脂综合征(APS)流产、脑炎、脑损伤、n-甲基-d-天冬氨酸(NMDA)受体抗体脑炎、疟疾溶血性危象、腹主动脉瘤(AAA)或胸腹主动脉瘤(TAA)。

[0335] 在另一方面,本申请提供了所述分离的抗原结合蛋白、所述多肽、所述免疫缀合物、所述分离的核酸分子、所述载体、所述细胞和/或所述药物组合物本申请中用于制备用于预防和/或治疗疾病的药物的用途。例如,所述疾病可以是由备解素引起的。例如,所述疾病可以是通过替代通路介导的。例如,所述疾病可以包括自身免疫性血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、溶血性尿毒症综合征(HUS)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、C3肾小球病(C3G)、哮喘、戈谢病、化脓性汗腺炎、白塞病、皮肌炎、严重烧伤、早期败血症、肺炎球菌性脑膜炎、阿尔茨海默病、癌症转移、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ACI)、输血相关性肺损伤(TRALI)、血液透析引起的血栓形成、获得性大疱性表皮松解症(EBA)、葡萄膜炎、帕金森病、原发性胆道闭锁、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)血管炎、视网膜变性、广泛性血栓性微血管病(TMA)、广泛性TMA(APS)、造血干细胞疗法(HSCT)TMA、年龄相关性黄斑变性(AMD)、先兆子痫、溶血、肝酶升高、低血小板(HELLP)综

合征、多发性硬化症、抗磷脂综合征(APS)、复发性多软骨炎、缺血性损伤、中风、移植物抗宿主病(GvHD)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺气肿、动脉粥样硬化、急性冠状动脉综合征、失血性休克、类风湿性关节炎、透析(心血管风险)、心血管疾病、胎盘疟疾、抗磷脂综合征(APS)流产、脑炎、脑损伤、n-甲基-d-天冬氨酸(NMDA)受体抗体脑炎、疟疾溶血性危象、腹主动脉瘤(AAA)或胸腹主动脉瘤(TAA)。

[0336] 在另一方面,本申请提供了药物组合在本申请中用于制造用于预防和/或治疗疾病的药物的用途。例如,所述疾病可以是由备解素引起的。例如,所述疾病可以是通过替代通路介导的。例如,所述疾病可以包括自身免疫性血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、溶血性尿毒症综合征(HUS)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、C3肾小球病(C3G)、哮喘、戈谢病、化脓性汗腺炎、白塞病、皮肌炎、严重烧伤、早期败血症、肺炎球菌性脑膜炎、阿尔茨海默病、癌症转移、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ACI)、输血相关性肺损伤(TRALI)、血液透析引起的血栓形成、获得性大疱性表皮松解症(EBA)、葡萄膜炎、帕金森病、原发性胆道闭锁、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)血管炎、视网膜变性、广泛性血栓性微血管病(TMA)、广泛性TMA(APS)、造血干细胞疗法(HSCT)TMA、年龄相关性黄斑变性(AMD)、先兆子痫、溶血、肝酶升高、低血小板(HELLP)综合征、多发性硬化症、抗磷脂综合征(APS)、复发性多软骨炎、缺血性损伤、中风、移植物抗宿主病(GvHD)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺气肿、动脉粥样硬化、急性冠状动脉综合征、失血性休克、类风湿性关节炎、透析(心血管风险)、心血管疾病、胎盘疟疾、抗磷脂综合征(APS)流产、脑炎、脑损伤、n-甲基-d-天冬氨酸(NMDA)受体抗体脑炎、疟疾溶血性危象、腹主动脉瘤(AAA)或胸腹主动脉瘤(TAA)。

[0337] 在另一方面,本申请提供了一种预防和/或治疗疾病或病症的方法,该方法包括向有需要的受试者施用所述分离的抗原结合蛋白、所述分离的核酸分子、所述载体、所述细胞、所述药物组合物。例如,所述疾病可以是由备解素引起的。例如,所述疾病可以是通过替代通路介导的。例如,所述疾病可以包括自身免疫性血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、溶血性尿毒症综合征(HUS)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、C3肾小球病(C3G)、哮喘、戈谢病、化脓性汗腺炎、白塞病、皮肌炎、严重烧伤、早期败血症、肺炎球菌性脑膜炎、阿尔茨海默病、癌症转移、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ACI)、输血相关性肺损伤(TRALI)、血液透析引起的血栓形成、获得性大疱性表皮松解症(EBA)、葡萄膜炎、帕金森病、原发性胆道闭锁、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)血管炎、视网膜变性、广泛性血栓性微血管病(TMA)、广泛性TMA(APS)、造血干细胞疗法(HSCT)TMA、年龄相关性黄斑变性(AMD)、先兆子痫、溶血、肝酶升高、低血小板(HELLP)综合征、多发性硬化症、抗磷脂综合征(APS)、复发性多软骨炎、缺血性损伤、中风、移植物抗宿主病(GvHD)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺气肿、动脉粥样硬化、急性冠状动脉综合征、失血性休克、类风湿性关节炎、透析(心血管风险)、心血管疾病、胎盘疟疾、抗磷脂综合征(APS)流产、脑炎、脑损伤、n-甲基-d-天冬氨酸(NMDA)受体抗体脑炎、疟疾溶血性危象、腹主动脉瘤(AAA)或胸腹主动脉瘤(TAA)。

[0338] 在另一方面,本申请提供了一种预防和/或治疗疾病或病症的方法,该方法包括向有需要的受试者施用药物组合。例如,所述疾病可以是由备解素引起的。例如,所述疾病可以是通过替代通路介导的。例如,所述疾病可以包括自身免疫性血栓性血小板减少性紫癜

(TTP)、溶血性尿毒症综合征(HUS)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、C3肾小球病(C3G)、哮喘、戈谢病、化脓性汗腺炎、白塞病、皮肌炎、严重烧伤、早期败血症、肺炎球菌性脑膜炎、阿尔茨海默病、癌症转移、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ACI)、输血相关性肺损伤(TRALI)、血液透析引起的血栓形成、获得性大疱性表皮松解症(EBA)、葡萄膜炎、帕金森病、原发性胆道闭锁、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)血管炎、视网膜变性、广泛性血栓性微血管病(TMA)、广泛性TMA(APS)、造血干细胞疗法(HSCT)TMA、年龄相关性黄斑变性(AMD)、先兆子痫、溶血、肝酶升高、低血小板(HELLP)综合征、多发性硬化症、抗磷脂综合征(APS)、复发性多软骨炎、缺血性损伤、中风、移植物抗宿主病(GvHD)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺气肿、动脉粥样硬化、急性冠状动脉综合征、失血性休克、类风湿性关节炎、透析(心血管风险)、心血管疾病、胎盘疟疾、抗磷脂综合征(APS)流产、脑炎、脑损伤、n-甲基-d-天冬氨酸(NMDA)受体抗体脑炎、疟疾溶血性危象、腹主动脉瘤(AAA)或胸腹主动脉瘤(TAA)。

[0339] 本文所描述的药物组合物、药物组合和方法可以与其它类型的疗法联合使用,诸如化疗、手术、放射、基因疗法等。

[0340] 在本申请中,受试者和/或患者可以包括人或非人动物。例如,非人动物可以选自下组:猴、鸡、鹅、猫、狗、小鼠。此外,非人动物还可以包括除人以外的任何动物物种,诸如畜牧动物、或啮齿动物、或灵长类动物、或家畜、或家禽动物。人可以是高加索人、非洲人、亚洲人、两栖动物或其他种族,也可以是各种种族的混血儿。又例如,所述人可以是老人、成年人、青少年、儿童、或婴儿。

[0341] 人体中的有效量可以从实验动物的有效量推断出来。例如,Freiich等人描述了动物和人之间的剂量相关性(基于每平方米体表毫克数)(Freirich et al,Cancer Chemother.Rep.50,219(1966)(Freiich等人,《癌症化学疗法报告》,50,219(1966))。体表面积可以由患者的身高和体重近似确定。例如,参见Scientific Tables,Geigy Pharmaceuticals,Ardsley,N.Y.,537(1970)(《科学表格》,嘉基制药,阿兹利,纽约,537(1970))。

[0342] 实施例

[0343] 以下实施例是为了向本领域普通技术人员提供如何制作和使用本发明的完整公开和描述,并非用于限制发明人认为属于其发明的范围,也并非用于表示下面的实验是所进行的全部或唯一的实验。已作出努力以确保所使用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但应考虑到一些实验误差和偏差。除非另有说明,否则份数为重量份数,分子量为重量平均分子量,温度为摄氏度,并且压力为等于或接近大气压。可以使用标准缩写,例如,bp,碱基对;kb,千碱基;pl,皮升;s或sec,秒;min,分钟;h或hr,小时;aa,氨基酸;nt,核苷酸;i.m,肌内;i.p,腹腔内;s.c.皮下;诸如此类。

[0344] 实施例1备解素结合抗体片段的发现

[0345] 1.1人、小鼠和食蟹猴备解素的生成

[0346] 将GENEWIZ合成的Uniprot数据库中的人、小鼠和食蟹猴备解素的序列亚克隆到表达载体上。用PEI转染的HEK293细胞进行瞬时表达(Polyciences,目录号24765-1)。培养物在刻度为100-200ml的摇瓶培养基中培养5-7天。离心取出细胞,并且使用培养物上清液通过Ni琼脂糖进行蛋白纯化,用pH 7.4的PBS缓冲液洗脱。纯化的蛋白在非还原和还原条件下

用4-12% SDS-PAGE进行分析(图1)。

[0347] 1.2VHH免疫文库的构建

[0348] 用重组小鼠备解素对两只健康骆驼进行免疫。在完成4轮免疫后第60天,按照标准化的程序从免疫骆驼的PBMC构建噬菌体展示VHH文库。最终噬菌体展示VHH文库具有2.1×10^9个独立克隆,其中92%的克隆编码VHH-GP3融合蛋白。

[0349] 1.3噬菌体淘选方法

[0350] 如前所述,使用免疫VHH文库进行VHH选择,并且在1.5ml Eppendorf管中进行四轮淘选。将约10^{12}个CFU噬菌体与10μg生物素化的备解素在1ml阻断缓冲液(1% BSA于PBS)中室温孵育1h,制成噬菌体/靶标混合物。同时,100μl链霉亲和素包被的Dynabeads M-280(Invitrogen,11206D)在Eppendorf微管中用1ml阻断缓冲液洗涤5次。随后,将噬菌体/靶标混合物与上述制备的磁珠在室温旋转器上孵育30min。为了回收与磁珠结合的噬菌体,将反应管置于磁架上30s。去除上清液后,用含0.5% Tween20(0.5% PBST)的PBS洗涤磁珠10次,然后用PBS洗涤3次。用1ml胰蛋白酶(10μg/ml于PBS中)在37℃下洗脱噬菌体30min。每轮选择结束后,取洗脱后的噬菌体100μl感染在37℃生长的中期大肠杆菌TG1(OD_{600}=0.6)进行噬菌体滴定。还对备解素特异性VHH的富集进行评估,以监测选择过程的进展。用剩余洗脱的噬菌体感染大肠杆菌TG1(OD_{600}=0.6)随后进行扩增。随后用M13KO7辅助噬菌体以20:1的比例对细菌进行重复感染,以获取噬菌颗粒体。在培养物中加入卡那霉素(50μg/mL)和氨苄西林(100μg/mL)的混合物,并且在30℃、220rpm振荡下使细菌进一步生长4h。培养物以4000g离心20min,并且上清液加入到20%(w/v)聚乙二醇6000/2.5M NaCl(PEG/NaCl)中,使噬菌体沉淀。样品在冰上孵育过夜,然后在4℃下8000g离心20min。沉淀物在PBS中重悬,PEG沉淀重复一次,如上所述。将最终的噬菌体沉淀物重悬于1ml PBS中,并且在后续几轮淘洗中使用10^{12}个噬菌体。又重复三轮一般淘选步骤。变化在于源自不同物种的抗原具有交叉反应的和亲和力匹配的噬菌体克隆。淘选汇总如表1所列出的。

[0351] 表1:淘选汇总

[0352]

活动	输入(CFU)	输出(CFU)	输出/输入
第一轮使用生物素-小鼠 FP	4E12	4E7	1E-5
第二轮使用生物素-食蟹猴 FP	1.8E12	6E8	3.3E-4
第三轮淘选使用生物素-小鼠 FP 和食蟹猴 FP	6E11	1.6E9	2.6E-3
第四轮淘选使用生物素-食蟹猴 FP 和小鼠 FP	4E12	7E9	1.75E-3

[0353] 1.4噬菌体筛选方法

[0354] 对于基于噬菌体的ELISA筛选,挑取单个菌落接种于200μl 2×YT-GA培养基中,37℃振荡(250rpm)培养4-5h。然后将10μl移入含有200μl 2×YT-GA培养基的新96孔深板中,如上所述孵育至OD_{600}达到0.6左右。用1mM IPTG(Sangon Biotech)在30℃下振荡(250rpm)16h诱导VHH表达。在4℃、4000rpm将过夜培养物离心30min后,收集上清液进行噬菌体ELISA。

[0355] 4轮淘选后,通过噬菌体酶联免疫吸附试验(ELISA)筛选第2、3、4轮的输出物。

MaxiSorp96孔板孔在4℃在包被缓冲液中过夜,包被1μg/ml链霉亲和素。用等效浓度的BSA作为非特异性结合的对照。用PBST洗涤后,用1％ BSA在37℃阻断孔中剩余蛋白质结合位点1h。丢弃阻断试剂,并且用0.05％ PBST洗涤3次。在37℃向孔中加入5μg/ml生物素-人/小鼠/食蟹猴备解素1h。丢弃上清,并且用0.05％ PBST洗涤3次。将100μl以上制备的上清液加入相应的孔中,在37℃振荡孵育1h。丢弃上清,并且用0.05％ PBST洗涤3次去除非特异性噬菌体。使用稀释5000倍的抗MYC-HRP(Abcam,ab62928)溶液检测抗原与噬菌体-VHH之间的相互作用。在37℃孵育1h后,板以与之前相同的方式洗涤,并且加入100μl TMB底物溶液,并且室温孵育15min。以每孔100μl加入终止液来终止反应,然后用酶标仪在450nm处扫描板。ELISA阳性克隆被定义为展示出抗原包被板上的ELISA信号比BSA包被板上的信号至少强三倍的克隆。并行地,用DNA测序法确定ELISA阳性克隆的基因多样性,并且将具有不同VHH氨基酸序列的噬菌体视为单一克隆。共有76个具有不同CDR序列的单一克隆在噬菌体ELISA的靶标结合测定中被鉴定为阳性,并且选择37个克隆在HEK293细胞中进行表达和纯化。

[0356] 表2.筛选汇总

[0357]

编号	淘选输出	测序克隆	有效序列	单一序列	新增序列
P1P2	第二轮输出	74	57	13	13
P3P4	第四轮输出	44	6	5	2
P5	第四轮输出	18	16	7	0
P6	第四轮输出	24	18	7	0
P7	第二轮输出	64	64	9	4
P8	第二轮输出	29	28	7	2
P9	第四轮输出	54	52	6	0
P10	第四轮输出	37	37	7	0
P11	第一轮输出	60	54	7	23
P12	第二轮输出	57	50	7	19
P13	第一轮输出	37	30	6	10
P14	第二轮输出	38	34	10	3
共计		536	446	91	76

[0358] 备解素结合VHH序列如下:

[0359] >SLN7150(SEQ ID NO:60);SLN12066(SEQ ID NO:61);SLN12067(SEQ ID NO:62);

[0360] >SLN12068(SEQ ID NO:63);SLN12069(SEQ ID NO:64);SLN12070(SEQ ID NO:65);

[0361] >SLN7160(SEQ ID NO:66);SLN12075(SEQ ID NO:67);SLN12076(SEQ ID NO:68);

[0362] >SLN12077(SEQ ID NO:69);SLN7162(SEQ ID NO:70);SLN12078(SEQ ID NO:71);

[0363] >SLN12079(SEQ ID NO:72);SLN12080(SEQ ID NO:73);SLN12081(SEQ ID NO:74);

[0364] >SLN12036(SEQ ID NO:75);SLN12082(SEQ ID NO:76);SLN12083(SEQ ID NO:77);

[0365] >SLN12084(SEQ ID NO:78);SLN12085(SEQ ID NO:79);SLN12086(SEQ ID NO:80);

[0366] >SLN7151(SEQ ID NO:83);SLN7152(SEQ ID NO:84);SLN7153(SEQ ID NO:85);

[0367] >SLN7154(SEQ ID NO:86);SLN7155(SEQ ID NO:87);SLN7156(SEQ ID NO:88);

[0368] >SLN7159(SEQ ID NO:89);SLN7161(SEQ ID NO:90);SLN12027(SEQ ID NO:91);

[0369] >SLN12030(SEQ ID NO:92);SLN12039(SEQ ID NO:93);SLN12041(SEQ ID NO:94);

[0370] >SLN12042(SEQ ID NO:95);SLN12044(SEQ ID NO:96);SLN12045(SEQ ID NO:97)。

[0371] 实施例2通过替代通路对补体激活具有抑制作用的备解素结合抗体的鉴定

[0372] 2.1VHH-FC的表达和纯化

[0373] 选择单一VHH克隆进行亚克隆来形成重组质粒,以产生VHH-FC蛋白,使用变性引物(正向:SEQ ID NO:111,反向:SEQ ID NO:112)。采用DNA测序对DNA序列进行验证后,制备重组质粒,并且按照标准方案表达和纯化融合蛋白。

[0374] 为了表达重组VHH-Fc蛋白,将100ml Expi293F™细胞在OPM-CD05培养基(OPM,目录号81075-001)中培养到细胞密度约为3×10^6活细胞/ml,存活率大于95%。质粒用OPM-CD05培养基稀释至1.5μg/ml的浓度,总体积为5ml。转染试剂PEI用OPM-CD05培养基稀释至相同体积的5ml,使得稀释后的DNA与PEI混合在一起时,DNA:PEI比率为1:4(m/m)。常温孵育15min后,将DNA/PEI络合物轻轻旋动添加到制备好的Expi293F™细胞上。然后将细胞培养物置于轨道摇床上37℃、相对湿度≥80%并且CO_2浓度5%的培养箱中。转染后24h,向培养物种缓慢加入5%蛋白胨(1mg/ml)和2%葡萄糖(330g/l)。培养多日后,收集细胞培养上清,分别在1200rpm和3900rpm依次离心10min和20min,然后用于蛋白A纯化。

[0375] 用蛋白A(BIOON,HZ1011-2)纯化VHH-Fc。将1ml蛋白A浆液装入20ml柱(G-bios,C006197-0025)。将用10倍CV(柱体积)的PBS平衡柱后,装入如上制备的细胞培养上清,并且重力过Protein-A柱2次。柱用PBS洗涤10倍CV后,用10ml 0.1M甘氨酸-盐酸缓冲液(pH 3.0)洗脱VHH-Fc蛋白。洗脱后的蛋白用100μl 1M(pH 8.5)Tris-HCL缓冲液中和,将pH调节为7.4。蛋白A亲和柱再生,用PBS、ddH2O和20%乙醇依次洗涤保存。对于洗脱后的蛋白,通过Amicon UltraCel 30K离心装置(Milipore,UFC903016)脱盐。简单地说,将洗脱后的蛋白用10ml PBS稀释,并且离心至少3次,浓缩至1.5ml。最终蛋白溶液在PBS中配制成小于1ml,并且用0.22μm过滤器过滤。

[0376] 用SDS-PAGE分析VHH-Fc的纯度。简单地说,2μg蛋白于4×LDS样品缓冲液中装入,并且在Tris-MOPSSDS缓冲液(Genscript,M00138)中用SurePAGE凝胶在160V恒定电压下分析50min。按照制造商的说明,用考马斯亮蓝染色(TIANGEN,cat#PA101)显示蛋白质。纯化后的蛋白在非还原或还原条件下用4-12%梯度的SDS-PAGE凝胶分析(图2)。

[0377] 2.2ELISA结合

[0378] 对于结合ELISA时,96孔免疫板以100μl/孔包被1μg/ml链霉亲和素,并且在4℃孵育过夜。孔用PBST洗涤3次,并且在常温下用200μl 1% BSA/PBS封闭1h。用PBST洗涤3次,并且以100μl/孔加入人备解素-生物素、小鼠备解素-生物素或食蟹猴备解素-生物素(5μg/ml),并且常温孵育1h。板用PBST洗涤3次,以100μl/孔加入从10μg/ml 5倍连续稀释的VHH-Fc,并且室温孵育1h。板用PBST洗涤3次,并且向每个孔加入在1% BSA/PBST中以1/5000稀释的100μl羊抗人Fc-HRP(Sigma,A0170),并且常温孵育1h。然后,板以与之前相同的方式洗

涤,并且加入100μl TMB底物,并且常年为孵育15分钟。每孔加入100μl终止液以终止反应,并且用酶标仪在450nm下读板。37个重组VHH-Fc克隆显示人备解素结合活性(图3A)、食蟹猴备解素结合活性(图3B)和小鼠备解素结合活性(图3C),所有克隆均显示交叉结合且亲和力匹配的活性。

[0379] 2.3AP活性

[0380] 对于人替代通路实验,所有测试样品用PBS稀释,并在U形底96孔微滴板上重复添加(50μl/孔)。同时,人补体保存血清(Quidel,A113)在GVB-EGTA(1×AP缓冲液:0.1%明胶,145mM NaCl,2.5mM巴比妥钠,pH7.4,10mM Mg/EGTA)中稀释至20%vol/vol,冰上孵育30min,并且加入到同一96孔板各行中(50μl/孔),使得每孔人血清终浓度为10%。然后制备兔红细胞(4×10^8/ml),用1ml 1×AP缓冲液洗涤三次,并且在1×AP缓冲液中重悬至终浓度5×10^7/ml(6ml)。之后,将50μl等分兔红细胞(2.5×10^6细胞)按上述方法加入板中,混合均匀,并且37℃孵育30min。每板含两孔50μl相同制备的兔红细胞,单独用50μl PBS+50μl 1×AP缓冲液孵育(阴性对照)作为自发溶血对照。含100μl ddH2O的两孔作为100%裂解的对照,并且含10mM EDTA(Thermo 15575-038)的两孔作为血清空白对照。孵育后,然后以600rpm离心2min,并且取100μl上清转移至新的平底96孔板上。使用酶标仪在OD 405nm处测定血红蛋白释放量,并且采用下式测定溶血率:

[0381] 溶血率(%):

[0382] 100×(OD样品-EDTA OD)/(OD 100%裂解-OD阴性对照)

[0383] 对于小鼠替代通路实验,其过程与上述过程基本相同,不同之处在于小鼠血清的最终浓度为30%,并且人血清的最终浓度为10%,并且小鼠替代通路实验的孵育时间由1h替换为30分钟(图4)。一些克隆在500nM处在人(图4A)和小鼠(图4B)血清中表现出补体抑制活性。

[0384] 实施例3双表位备解素结合抗体片段的工程改造

[0385] 3.1全长人/小鼠备解素的表位聚类试验

[0386] 96孔免疫板以100μl/孔包被5μg/ml VHH Fc融合蛋白,并且4℃孵育过夜。孔用PBST洗涤3次并且用200μl 1% BSA/PBS室温封闭1h。将60μl人备解素-生物素或小鼠备解素-生物素(0.5μg/ml)和60μl VHH-Fc融合蛋白(20μg/ml)预混并转移100μl至已包被VHH-Fc且用BSA封闭的每个孔中,并且继续室温孵育1h。板用PBST洗涤3次,并且向每孔加入于1%BSA/PBST中以1-5000稀释的100μl SA-HRP(Sigma,S5512),并且室温孵育1h。然后,板以与之前相同的方式洗涤,并且加入100μl TMB底物,并且室温孵育15min。每孔加入100μl终止液终止反应,并且用酶标仪在450nm处读取板。具有竞争性靶标结合能力的VHH被分组到同一聚类(Bin)。结果表明SLN7150、SLN12036和SLN12042属于聚类#1,SLN7150、SLN12036和SLN12027属于聚类#2,SLN7150、SLN12036、SLN12041、SLN12044和SLN12045属于聚类#3,SLN7160和SLN7155属于聚类#4,SLN7162可以与其他大多数VHH-FC具有不同的表位,属于聚类#5(图5)。

[0387] 3.2双表位VHH的产生

[0388] 将不同聚类的VHH通过G4S连接子组合,制成双表位Fc-VHH-VHH融合蛋白,如表3所列出的。质粒构建和蛋白纯化程序可参考上文。SDS-PAGE分析和表征结果如图6所示。

[0389] 表3.双互补位VHH列表

[0390]

蛋白编号	特征
SLN12021	Fc-SLN7150-$(G4S)_3$-SLN7155
SLN12022	Fc-SLN7150-$(G4S)_3$-SLN7160
SLN12023	Fc-SLN7150-$(G4S)_3$-SLN7162
SLN12024	Fc-SLN7152-$(G4S)_3$-SLN7155
SLN12025	Fc-SLN7152-$(G4S)_3$-SLN7160
SLN12026	Fc-SLN7152-$(G4S)_3$-SLN7162
SLN12058	Fc-SLN12036-$(G4S)_3$-SLN7155
SLN12059	Fc-SLN12036-$(G4S)_3$-SLN7160
SLN12060	Fc-SLN12036-$(G4S)_3$-SLN7162
SLN12061	Fc-SLN7150-$(G4S)_3$-SLN12036

[0391] 3.3双表位VHH的特征

[0392] 在靶标结合试验中,如图8所示,无论是在人(图7A和图7C)还是小鼠(图7B和图7D)中,与单个VHH相比,10个双互补位VHH展示的作用可以忽略不计。相反,在替代通路活性试验中,如图8所示,双互补位VHH显示的补体抑制活性优于单价VHH,尤其是在人血清中。

[0393] 实施例4VHH的人源化改造

[0394] 通过标准的CDR移植和结构优化程序进行VHH人源化。在人源化设计的基础上,创建重组DNA构建体以产生如上所述的重组构建体。选择对具有可接受的表达和稳定性水平的备解素的亲和力等于或优于原始VHH的人源化序列,以便进一步挨罚。图9显示,人源化VHH变体SLN7160与亲本VHH在结合人备解素(图9A)和小鼠备解素(图9B)方面具有相似的特征。VHH变体SLN12036在与人备解素(图9C)和小鼠备解素(图9D)的结合方面具有与亲本VHH相似的特征。同时,SLN7160在人血清(图9E)和小鼠血清(图9F)中的补体抑制活性作用可以忽略不计,并且值得注意的是,人源化SLN12083比原始VHH SLN12036显示出更好的人替代通路活性(图9G和图9H)。

[0395] 实施例5截短型人备解素的表位作图试验

[0396] 96孔免疫板以100μl/孔包被1μg/ml链霉亲和素,并且4℃孵育过夜。各孔用PBST洗涤3次并且用200μl 1% BSA/PBST室温封闭1h。用PBST洗涤3次,并且以100μl/孔加入人备解素-生物素的截短型变体,并且室温孵育1h。板用PBST洗涤3次,以100μl/孔加入10μg/ml VHH-Fc,并且室温孵育1h。板用PBST洗涤3次,并且每孔加入于1% BSA/PBST中以1/5000稀释的100μl羊抗人Fc-HRP(Sigma,A0170),并且室温孵育1h。然后,板以与之前相同的方式洗涤,并且加入100μl TMB底物,并且室温孵育15min。每孔加入100μl终止液以终止反应,并且用酶标仪在450nm处读取板。结果如图10所示,SLN12068、SLN12075和SLN12083分别通过TSR0、TSR1、TSR2、TSR3、TSR4、TSR5、TSR6、TSR0-6、TSR1-6、TSR2-6、TSR3-6、TSR4-6、TSR5-6和TSR6与不同的血栓反应蛋白重复序列(TSRs)结合,并且具有生物活性的TSR5-6和TSR0结构域在备解素与SLN12068、SLN12075和SLN12083的结合中起重要作用。

[0397] 实施例6备解素抑制剂对C3与备解素之间相互作用的影响

[0398] 6.1C3结合试验

[0399] Maxisorp 96孔板在pH 7.4下于PBS中以100μl/孔包被2μg/ml人C3(Sigma,C2910-0.1mg),置于4℃下过夜。用PBST洗涤3次后,孔用2% BSA于PBS中37℃封闭1h。向孔中加入

连续三倍稀释(100μl/孔)的生物素人备解素(从90μg/ml开始),并且37℃孵育1h。孔用PBST洗涤3次,并且向孔中加入HRP标记的链霉亲和素(1/5000稀释)(sigma,5512)。板在37℃孵育1h。然后,板以与之前相同的方式洗涤,并且加入100μl TMB底物,并且室温孵育15min。每个孔加入100μl终止液以终止反应,并且用酶标仪在450nm处读取板。

[0400] 6.2竞争性结合试验

[0401] Maxisorp 96孔板包被C3(见结合试验),用1% BSA于PBST中封闭,并且用PBST洗涤三次。向每个孔中以100μl/孔加入连续五倍稀释的FP抑制剂(从50nM开始),并且以100μl/孔加入恒定量的备解素(20μg/ml)(于PBS中),并且在37℃孵育1h。孔再次用PBST洗涤三次,用HRP标记的链霉亲和素(1/5000稀释)(sigma,5512)孵育。板在37℃孵育1h。然后,板以与之前相同的方式洗涤,并且加入100μl TMB底物,并且室温孵育15min。每孔加入100μl终止液以终止反应,并且用酶标仪在450nm处读取板。如图11A所示,备解素显示出以剂量依赖的方式与C3结合。另外,SLN12068、SLN12075和SLN12083也对备解素与C3的结合显示出抑制活性。(图11B)

[0402] 实施例7VHH与工程因子H的融合蛋白作为替代通路的双抑制剂

[0403] 7.1人源化VHH序列的双互补位改造

[0404] 根据上述步骤,通过G4S连接子创建具有人源化序列的双互补位VHH。纯化蛋白在非还原和还原条件下用4-12% SDS-PAGE进行分析(图12)。

[0405] 如图13所示,通过人备解素结合试验(图13A)和小鼠备解素结合试验(图13B),靶标结合ELISA表明,此类人源化双互补位VHH对单个VHH的作用可忽略不计。替代通路活性表明,双互补位的SLN12140 AP活性优于单一VHH(图14A和图14B)。

[0406] 7.2VHH与工程化的因子H的融合蛋白

[0407] 截短型CFH(结构域1-4)与SLN12140的C端融合形成SLN7207,制得抑制补体激活的双功能重组蛋白。结果如图13所示。图(C)和(D)显示了SLN7207和SLN12140与人备解素-生物素以及小鼠备解素-生物素的结合活性。图14的图(C)和(D)显示了SLN12140和SLN7207的人和小鼠替代通路活性。在SLN12140的C端与CFH(结构域1-4)融合对SLN12140在人血清中的影响可忽略不计,然而在小鼠血清中的生物活性提高约3倍。在任何情况下,SLN12140和SLN7207在nM水平上都显示出人和小鼠的替代通路抑制活性,尤其是在人体内,IC50为17nM。此类功能性蛋白为补体超活化疾病提供了一种潜在的治疗策略。

[0408] 实施例8SLN12140的通路选择性和物种交叉活性

[0409] 8.1补体失活的通路选择性

[0410] 8.1.1替代通路中的补体失活

[0411] 对于替代通路试验,程序参见2.3。单一VHH SLN12075、SLN12083和双互补位SLN12140的抑制曲线表现出一致的替代通路补体抑制活性,并且SLN12140显示出优于单一VHH的活性,IC50为17nM。依库丽单抗(Targetmol,T9915)是一种针对补体蛋白C5的重组人源化单克隆抗体,其作为对照,也显示出对AP通路的抑制能力,IC50为50nM。

[0412] 8.1.2经典通路补体抑制

[0413] 对于经典通路分析,所有测试样品在PBS中以1:3连续稀释,并且重复添加(50μl/孔)到U形底96孔微滴板上。人补体保存血清(Quidel A113)用GVB2+缓冲液(0.1%明胶,141mM NaCl,0.5mM MgCl2,0.15mM CaCl2,1.8mM巴比妥钠)(Comp Tech B100)稀释至20%

vol/vol,并且加入(50μl/孔)到相同96孔板的各行中,使得每孔中人血清的最终浓度为10%。然后,板室温孵育30min。然后,用1ml GVBS2+缓冲液将基于样品的鸡红细胞(1-4×10^8)洗涤3次,并且在GVBS2+缓冲液中重悬至终浓度1×10^8/ml。之后,以3%的浓度加入抗鸡红细胞多克隆抗体(Rockland,103-4139),致敏1-6ml的鸡红细胞,并且细胞在频繁搅拌下在冰上孵育15min。然后,用1ml GVBS2+缓冲液洗涤细胞2次,并且在GVBS2+缓冲液中重悬至1×10^8/ml。将30μl等分鸡红细胞(3×10^6细胞)加入到上述板中,混合均匀,并且在37℃孵育30min。然后,每个板含有具有50μl相同制备的鸡红细胞的两个孔(一个孔单独用50μlPBS+50μl GVBS2+缓冲液孵育(阴性对照)作为自发溶血的对照),含有10mM EDTA(Thermo15575-038)作为血清空白的两个孔,和具有正常NHS作为100%裂解的两个孔。然后,板以600rpm离心2min,并且将100μl上清转移到新的平底96孔板上。使用酶标仪在OD 405nm处测定血红蛋白释放量,采用下式测定溶血率:

[0414] 溶血率(%):

[0415] 100×(OD样品-OD EDTA空白)/(OD 100%裂解-OD EDTA空白)

[0416] 如图15B所示,无论是单体还是双互补位的替代通路特异性抗体,VHH在经典通路中均未表现出抑制活性。依库丽单抗(Targetmol,T9915)是一种针对补体蛋白C5的重组人源化单克隆抗体,其作为对照,也显示出对CP通路的抑制能力,IC50为57nM。

[0417] 8.1.3凝集素通路中的补体抑制

[0418] 对于凝集素通路试验:将0.3ml等分甘露聚糖溶液(0.5mg/ml)与等体积的$CrCl_3$溶液(0.5mg/ml)(Sigma 27096-100G-F,Lot#BCCB5331)混合,加入等体积的鸡红细胞悬液(1×10^9细胞),并且混合液在偶尔搅拌下在25℃孵育15min。然后,用1.0ml冰冷GVBS2+洗涤。将甘露聚糖(ME)(sigma M7604-100MG,Lot#SLOF4977)包被的红细胞通过离心用GVBS2+(明胶-佛罗纳缓冲盐水,5mM佛罗纳缓冲液,pH 7.4,含0.145M NaC1,0.1%明胶,0.15MCaC12和0.5mM MgC12)(Comp Tech,B100)洗涤三次,在GVBS2+中重悬至终浓度为5×10^7细胞/ml,并且在冰上保存。所有测试样品在PBS中以1:3连续稀释(从500nM到0.2nM),并且重复加如(50μl/孔)到U形底96孔微滴板中。用GVBS2+将人补体保存血清稀释至20%vol/vol,并且加入到同一96孔板的各行中(50μl/孔),使得每个孔中的人血清的最终浓度为10%。100μl ddH2O或仅血清和50μl PBS+50μl GVBS2+分别用作100%裂解和0%对照,10mM EDTA用作血清空白。将50μl等分鸡红细胞(2.5×10^6细胞)加入到上述板中,混合均匀,并且37℃孵育60min。然后,板以1000g离心2min,并且将100μl上清转移到新的平底96孔板上。使用酶标仪在OD 405nm处测定血红蛋白释放量,采用下式测定溶血率:

[0419] 溶血率(%):

[0420] 100×(样品OD-EDTA OD)/(OD 100%裂解-EDTA OD)

[0421] VHH的抑制曲线如图15C所示,无论是单体还是双互补位,VHH对凝集素通路均为展示出抑制活性,对替代通路显示出特异性。依库丽单抗(Targetmol,T9915)是一种针对补体蛋白C5的重组人源化单克隆抗体,其作为对照,在LP通路中也显示出抑制能力,IC50为45nM。

[0422] 8.2SLN12140的人、食蟹猴、小鼠和大鼠物种交叉活性

[0423] 对于替代通路试验,程序参见2.3。图16显示了VHH抑制曲线,图15的图(A)、(B)、(C)、(D)分别显示了SLN12075、SLN12083和SLN12140的人、食蟹猴、小鼠和大鼠替代通路活

性。SLN12140在包括人、小鼠、食蟹猴、大鼠在内的AP特异性通路中显示出良好的物种交叉补体抑制活性。并且全部显示出高于单一VHH的双价活性特征。

[0424] 实施例9SLN12140的血清稳定性及其在小鼠中的药物动力学(PK)特性

[0425] 9.1SLN12140在小鼠血浆中的稳定性

[0426] 用C57BL/6小鼠血浆、人血浆和蛋白配制剂缓冲液制备浓度为10μg/mL的测试化合物SLN12140,制备样品并且-80℃保存。之后,在37℃恒温湿润条件下孵育样品,并且在每个时间点(96、72、48、24、6、2和0h)采集样品。取每个样品的上清液,并且用Elisa进行定量分析,如下所示。所有试验执行三次。图17示出了在人和小鼠血浆中的缓冲液稳定性和血浆稳定性。SLN12140(SEQ ID NO:81)在配制缓冲液中96h内保持稳定的浓度,并且浓度保持稳定直到96h,仍可检测到70%的SLN12140。

[0427] 9.2样品分析方法的建立

[0428] 9.2.1总药PK试验的开发及QC验证

[0429] 羊F(ab')$_2$抗人IgG-Fc(Abeam,CAT#Ab98587)包被在96孔酶联板上,用PBST(0.1% Tween-20)洗涤3次,并且用200μl含1% BSA的PBST洗涤,37℃封闭1h。用PBST洗涤3次后,加入连续稀释的SLN12140标准品、血清样品和于含1% BSA的PBST中的质控样品。37℃孵育1h后,用PBST洗涤细胞3次,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗人IgG(FC特异性)抗体(Sigma,CAT#A0170),并且细胞37℃孵育1h。用PBST洗涤3次后,加入100μl TMB底物溶液以孵育15min,并且加入终止液后,读取450nm处吸光度。通过SoftMax软件对标准曲线和质控品的精度和准确度进行验证,并且计算样品浓度。采用高、中、低三种标准浓度对PK法进行的验证表面,精度(CV%<20%)和准确度(RE%+/-25%)均满足样品检测要求。

[0430] 9.2.2总mFP试验的开发和QC验证

[0431] 将SLN12039(SEQ ID NO:93)包被在96孔酶联板上,用PBST(Tween-20,0.1%)洗涤三次,并且用200μl含1% BSA的PBST在37℃下封闭1h。用PBST洗涤3次后,加入于PBST中含有1% BSA的连续稀释的mFP(Linno),37℃孵育1h,用PBST洗涤3次,并且加入生物素化的SLN12030抗体(Linno),37℃孵育1h,用PBST洗涤3次,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉亲和素抗体(Sigma,目录号S5512),并且37℃孵育1h。用PBST洗涤3次后,加入100μl TMB底物溶液,孵育15min,并且加入终止液后,读取450nm处的吸光度。通过SoftMax软件对标准曲线和质控品的精度和准确度进行验证,并且计算样品浓度。采用高、中、低三种标准浓度对PK法进行的验证表面,精度(CV%<20%)和准确度(RE%+/-25%)均满足样品检测要求。

[0432] 9.3小鼠皮下和静脉单剂量药代动力学研究

[0433] 对8周龄雄性C57BL/6小鼠进行PK研究。研究分为两组,每组4只动物,分别单剂量皮下或静脉注射施用2.21mpk SLN12140。在给药前(0)、0.5h、2h、6h、24h(D1)、48h(D2)、72h(D3)、120h(D5)、144h(D7)、240h(D10)采集血样,从血样分离血清,并且使用上述PK方法对血清中药物进行定量分析,并且使用PK求解软件计算PK参数。如图18所示,小鼠静脉注射和皮下施用后,SLN12140的终末消除半衰期为2.5d。SLN1214皮下施用后迅速被吸收,并且对于皮下施用,基于AUC_{0-t}的生物利用度为40%。这些结果表明SLN12140(SEQ ID NO:81)展现出合适的半衰期和良好的生物利用度。

[0434] 9.4小鼠皮下剂量依赖性药代动力学研究

[0435] 对8周龄雄性C57BL/6小鼠中进行剂量依赖性PK研究。研究分为三组,每组5只动

物,并且分别以3、10和30mpk皮下施用单剂量。在给药前(0h)和给药后8个采样时间点(2h、6h、24h(D1)、48h(D2)、72h(D3)、120h(D5)、144h(D7)、240h(D10))采集血样。采集后,血样以1500g在4℃离心10min,并且在分析前-80℃保存,并且使用上述PK方法对血清中的药物进行定量分析,并且使用PK求解软件计算PK参数。结果如图19A-C所示,在3、10至30mpk的整个剂量范围内,SLN12140(SEQ ID NO:81)在AUC方面的暴露量与剂量超过比例地增加。mFP的浓度也与药物浓度保持非常一致的对应关系。低浓度FP在3mpk、10mpk和30mpk下分别可维持48h、120h和168h,并且显示出良好的靶标抑制活性和良好的安全特性。

[0436] 9.5小鼠多剂量药代动力学研究

[0437] 对8周龄雄性C57BL/6小鼠进行PK研究。SLN12140皮下剂量为30mpk,每7天施用一次,连续4次。每次给药前(0h)和每次给药后24h采集血样。采集后,室温自然凝集2h后,血样在4℃以1500g离心10min,并且在分析前-80℃保存,并且使用上述PK方法对血清中药物进行定量分析,并且使用PK求解软件计算PK参数。同时,使用上述方法在不同采样时间点测量AP活性。结果如图20所示,施用后24小时,FP浓度显著下降,并且施用后7天保持在生理水平以下,多次施用后未见FP升高的风险。通过红细胞裂解法检测到的AP活性与FP浓度高度一致,并且当FP浓度降低时,AP活性显著降低,并且多次给药后,SLN12140(SEQ ID NO:81)显示出良好且持续的AP通路抑制活性

[0438] 9.6hCD89 Tg小鼠多剂量药代动力学研究

[0439] 对13-14周龄雄性hCD89 Tg C57BL/6小鼠进行PK研究。hCD89转基因(Tg)小鼠在巨噬细胞/单核细胞上表达人CD89,并且可溶性CD89在IgAN发病机制中的关键作用已在文献中证实。SLN12140皮下剂量为30mpk,每7天施用一次,连续7次。每次给药前(0h)和每次给药后24h采集血样。采集后,室温自然凝集2h后,血样在4℃以1500g离心10min,并且在分析前-80℃,并且使用上述PK方法对血清中药物进行定量分析,并使用PK求解软件计算PK参数。同时,使用上述方法在不同采样时间点测量AP活性。结果如图21所示,在连续7次给药的情况下,SLN12140(SEQ ID NO:81)血清浓度显示出连续稳定的药代动力学特征,并且每周给药可在较低水平下持续降低靶标浓度,并且根据血药浓度分析和靶标浓度分析,不存在形成免疫复合物的风险。同时,对小鼠进行一般良好的观察。

[0440] 实施例10SLN12140与VEGF抑制剂的融合

[0441] 10.1重组抗补体蛋白VHH-G4Fc,抗VEGF蛋白VHH-G4Fc,抑制补体和VEGF通路的双特异性蛋白的生成

[0442] 将与VEGF抑制的结构域与Fc结构域N端融合并且补体抑制结构域与Fc结构域C端融合的双特异性融合蛋白(SLN8284,SEQ ID NO:114)和G4Fc结构域与C端融合的补体抑制蛋白(SLN12140,SEQ ID NO:81)或VEGF抑制蛋白(SLN6073,SEQ ID NO:113)的氨基酸对应的核苷酸序列构建到质粒pCDNA3.4或pCP中。在这些质粒序列通过测序验证后,用脂质体或PEI作为转染试剂,用重组质粒瞬时转染HEK293细胞,小规模生成重组蛋白。培养物在摇瓶培养基中以30ml至100ml的规模生长5-7天。离心取细胞,并且使用培养上清液进行蛋白A层析进行蛋白纯化。纯化后的蛋白通过Coomassie Plus(Bradford)Assay试剂盒进行定量,并且在非还原(泳道1、3和5)和还原(泳道2、4和6)条件下用4-12%梯度SDS-PAGE凝胶进行分析(图22)。

[0443] 10.2SLN8284、SLN12140、SLN6073与不同物种备解素的体外结合

[0444] 进行ELISA测定蛋白是否直接与备解素结合。简单地说,96孔ELISA板的孔包被链霉亲和素(1μg/ml于CBS中,100μl/孔),并且在4℃孵育过夜。用PBST洗涤3次后,板在室温下用1% BSA于PBST中封闭1h。用PBST洗涤3次后,加入生物素化的人或食蟹猴或小鼠备解素蛋白(2μg/ml于BSA中,100μL/孔),并且室温孵育1h。用PBST洗涤3次后,加入纯化的SLN8284(SEQ ID NO:114)、SLN12140(SEQ ID NO:81)、SLN6073(SEQ ID NO:113)(在BSA中连续稀释,从50nM开始),并且室温孵育1h。用PBST洗涤3次后,每孔加入抗人IGG(FC特异性)过氧化物酶(Sigma,目录号A0170-1ML),孵育1h。用PBST洗涤3次后,每孔加入TMB底物终止试剂,并且在450nm处测定OD吸收。采用GraphPad Prism 8.0通过S形曲线拟合对数据进行分析。如图23所示。SLN8284、SLN12140分别对人或食蟹猴或小鼠备解素展示出强大的结合,而SLN6073(SEQ ID NO:113)无法展现出与人或食蟹猴或小鼠备解素的结合(图23A、23B、23C)

[0445] 10.3SLN8284、SLN12140、SLN6073对替代补体通路的抑制

[0446] 与需要镁离子和钙离子二者激活的经典补体通路和凝集素补体通路不同,替代补体通路的激活只需要镁离子。因此,为了量化融合蛋白存在下的替代补体活性,对上述试验进行修改,使得兔红细胞(Er)与血清、0-1500nM融合蛋白、5mM Mg2+和5mM EGTA一起孵育,这会优先螯合钙离子。

[0447] 对于本试验,所有融合蛋白样品在PBS中连续稀释,并且加入到U形底96孔微量滴定板,正常人血清(Complement Technology,目录号NHS A113)或补体保存的小鼠血清在试验缓冲液AP(20mM Mg/EGTA于GVB0中)中稀释至合适浓度,并且在冰上孵育30min。然后,在试验缓冲液中制备5×10^7兔红细胞/ml(森贝伽生物科技有限公司,目录号SBJ-RBC-RAB003-10mL)。通过将0-1500nM的SLN8284、SLN6073、SLN12140与稀释的正常人血清或小鼠血清(含2.5×10^6兔红细胞)在37℃下混合30min或1h,启动对替代补体通路的抑制。然后,通过测定OD405nm处的吸收,检测Er的溶血。采用Prism 8通过S形曲线拟合对数据进行分析。对融合蛋白存在下EA溶血率的分析证实,SLN8284展示出较高的抑制活性,IC50为5.166nM或63.4nM(图24A、24B,闭合方形)。SLN12140(SEQ ID NO:81)展示出更好的抑制作用(2.3倍或1.7倍),IC50为2.293nM或37.83nM(图24A、24B)。SLN6073(SEQ ID NO:113)未能展示出抑制作用(图24A、24B,闭合圆形)。

[0448] 10.4SLN8284、SLN12140、SLN6073与人和小鼠VEGF的体外结合

[0449] 进行ELISA测定蛋白是否直接与VEGF结合。简单地说,96孔ELISA板的孔包被链霉亲和素(1μg/mL于CBS中,100μL/孔),并且在4℃孵育过夜。用PBST洗涤3次后,板在室温下用1% BSA于PBST中封闭1h。用PBST洗涤3次后,加入生物素化的人或小鼠VEGF蛋白(0.5μg/ml于BSA中,100μL/孔),并且室温孵育1h。用PBST洗涤3次后,加入纯化的SLN8284(SEQ ID NO:114)、SLN12140(SEQ ID NO:81)、SLN6073(SEQ ID NO:113)蛋白(在BSA中连续稀释,从50nM开始),并且室温孵育1h。用PBST洗涤3次后,每孔中加入抗人免疫球蛋白(FC特异性)过氧化物酶(Sigma,目录号A0170-1ML),孵育1h。用PBST洗涤3次后,每孔加入TMB底物终止试剂,并且在450nm处测定OD吸收。采用GraphPad Prism 8.0通过S形曲线拟合对数据进行分析。如图25所示,SLN8284(SEQ ID NO:114)、SLN6073(SEQ ID NO:113)对人或小鼠VEGF分别展示出较强的结合,而SLN12140(SEQ ID NO:81)未能展示出与人、食蟹猴或小鼠备解素的结合(图25A、25B)。

[0450] (人VEGF121:登记号:P15692-9;VEGF120:登记号:Q00731-3)

[0451] 10.5SLN8284、SLN6073、SLN12140对VEGFA与VEGFR2之间相互作用的阻断

[0452] 进行ELISA测定蛋白是否能阻断VEGFA和VEGFR2之间的相互作用。简单地说,96孔ELISA板的孔包被链霉亲和素(1μg/ml于CBS中,100μl/孔),并且在4℃孵育过夜。用PBST洗涤3次后,板在室温下用1% BSA于PBST中封闭1h。用PBST洗涤3次后,加入生物素化的人或小鼠VEGF蛋白(0.07μg/mL于BSA中),并且室温孵育1h。用PBST洗涤3次后,加入人或小鼠VEGFR1(0.14μg/mL或0.07μg/mL于BSA中)与纯化的SLN8284、SLN12140、SLN6073(在BSA中连续稀释,从100nM开始)的混合物,并且室温孵育1h。用PBST洗涤3次后,每孔加入抗小鼠IgG Fc-HRP(Abcam,批号GR3396448-2),孵育1h。用PBST洗涤3次后,每孔加入TMB底物终止试剂,并且450nm处测定OD吸收。采用GraphPad Prism 8.0通过S形曲线拟合对数据进行分析。如图26所示,SLN8284、6073能够有效阻断人或小鼠VEGFA与人或小鼠VEGFR2之间的相互作用。SLN12140不能阻断人或小鼠VEGFA与人或小鼠VEGFR2之间的相互作用(图26A和图26B)。

[0453] (hVEGFR2:登记号:P35968-1;mVEGFR2:登记号:P35918-1)

[0454] 10.6SLN8284、SLN12140、SLN6073对VEGF依赖性HUVEC增殖的抑制试验

[0455] 在基于细胞的试验中,测试所有蛋白质抑制VEGF信号通路的能力(例如,对VEGF活性的抑制)。例如,在该基于细胞的试验中,测试了SLN8284抑制VEGF信号通路的能力(例如,对VEGF活性的抑制),并且与SLN6073和SLN12140的VEGF抑制活性进行比较。人脐静脉内皮细胞经常被用来证明VEGF依赖性细胞增殖,该增殖可以通过融合蛋白与VEGF的结合来抑制。在本试验中,HUVEC维持在内皮细胞生长培养基中,其中含有1% FBS。在96孔平底微量滴定板上,每孔将3000个HUVEC细胞接种于完全培养基(1% FBS)中,并且培养过夜。从细胞板中丢弃培养基,并且每孔加入100μL不同浓度的融合蛋白(在PBS中连续稀释,从1000nM开始)与50ng/mL VEGF-A的混合物,并且在37℃孵育72h。每孔加入10μL CCK-8(Dojindo,Inc.)并且在37℃孵育2.5h,对细胞增殖进行检测。在OD吸收450nm处测定细胞增殖。结果显示,与对照(SLN12140)相比,SLN8284和SLN6073显著抑制VEGF诱导的HUVEC增殖,并且SLN8284的抑制作用与SLN6073相似(图27)。

[0456] SLN8284(SEQ ID NO:114)

[0457] SLN6073(SEQ ID NO:113)

[0458] 实施例11SLN12140与hTf结合VHH(9056VHH)的融合

[0459] 11.1含/不含9056VHH结构域的抗CFP重组抗体的生成

[0460] 从SLN12147(12075-(G4S)3-12083-(G4S)3-His)和SLN12140(12075-(G4S)3-12083-(G4S)3-Fc)中构建SLN12149(12075-(G4S)3-12083-(G4S)3-9056-G4S-His)和SLN12150(12075-(G4S)3-12083-(G4S)3-Fc-(G4S)3-9056)融合蛋白。以PEI为转染试剂,用重组质粒瞬时转染HEK293细胞,小规模生成重组蛋白。培养物在100ml摇瓶培养基中生长5-7天。离心取细胞,并且使用培养上清液通过Ni-NTA或蛋白A琼脂糖进行蛋白纯化。纯化后的蛋白在非还原或还原条件下用4-12%梯度的SDS-PAGE凝胶进行分析(图28)。

[0461] 11.2不同物种中重组抗体的CFP结合试验

[0462] 为了检测重组抗体对CFP的结合活性,96孔微量滴定板包被链霉亲和素(1μg/ml于PBS中,100μl/孔),并且在4℃孵育过夜。用PBST洗涤3次后,板在室温下用1% BSA于PBST中封闭1h。用PBST洗涤3次后,加入生物素化的人/恒河猴/小鼠CFP(10/5/2μg/ml于1%BSA中,100μl/孔),并且室温孵育1h。用PBST洗涤3次后,加入重组抗体,并且室温孵育1h(50nM,5倍

稀释,在1% BSA中连续稀释,100μl/孔)。依次孵育SLN12143(1μg/ml,结合12075/12083人源化框架)和第二抗FC-HRP,然后用PBST洗涤3次,并且用底物溶液和终止液孵育,如上所述进行ELISA(图29)。

[0463] 11.3人转铁蛋白与重组抗体结合试验

[0464] 为了检测重组抗体对人转铁蛋白的结合活性,96孔微量滴定板包被链霉亲和素(1μg/ml于PBS中,100μl/孔),并且在4℃孵育过夜。用PBST洗涤3次后,板在室温下用1% BSA于PBST中封闭1h。用PBST洗涤3次后,加入并且室温孵育1h。用PBST洗涤3次后,将重组抗体(1000nM,5倍稀释,在1% BSA中连续稀释)与生物素化人转铁蛋白(2μg/ml于1%BSA中)预混合,将混合物(100μl/孔)加入到板中并且室温孵育1h。然后,依次孵育第二抗FC-HRP/抗6x His-HRP,然后用PBST洗涤3次,并且用底物溶液和终止液孵育,如上所述进行ELISA(图30)。

[0465] 11.4用重组抗体抑制人/食蟹猴/小鼠AP活性

[0466] 重组抗体用1xPBS连续稀释,然后转移到U形底96孔板(50μl/孔)。用1xAP缓冲液制备20%人血清/20%食蟹血清,用2xAP缓冲液制备60%小鼠血清,在冰上孵育30min。在血清孵育期间制备兔红细胞:0.5ml兔红细胞($4x10^8$/ml)用1ml 1x AP缓冲液洗涤三次,并且在1xAP缓冲液中重悬至终浓度为5×10^7/ml(4ml)。然后,向样品孔中加入活化的血清(50μl/孔)和红细胞(50μl/孔)。含人/食蟹猴血清的板在37℃孵育30min,含小鼠血清的板在37℃孵育60min。板以600rpm离心2min,并且将100μL上清液转移到新的平底96孔板中。利用酶标仪在OD 405nm处测定血红蛋白释放量(图31)。

[0467] 11.5小鼠组织中重组抗体的小鼠BBB pK试验

[0468] 11.5.1PK试验方法的原理(SLN12140/SLN12150/SLN12147/SLN12149)

[0469] 该方法采用抗体夹心模式,通过ELISA检测小鼠血清/脑组织匀浆/CSF中的分析物。用SLN2102包被的试验板孵育过夜。第二天,样品中的分析物和STD/QC将用SLN2102在板上捕获。完成样品孵育后,将生物素标记的检测抗体加入板中。清洗板以去除多余的检测抗体(Bio-SLN2108)。加入SA-HRP以结合生物素。完成后,加入TMB并且在酶标仪读板。所得OD与样品和STD/QC中存在的分析物的量成比例(图32)。

[0470] SLN12147(SEQ ID NO:116)

[0471] SLN12149(SEQ ID NO:117)

[0472] SLN12150(SEQ ID NO:118)

[0473] 虽然本文已经展示和描述了本发明的优选实施方式,但是对本领域技术人员显而易见的是,这些实施例仅通过示例的方式提供。本发明不受说明书中提供的具体实施例的限制。虽然本发明已经参照上述说明书进行了描述,但本文中的实施方式的描述和说明并不意味着在限制意义上进行解释。在不脱离本发明的情况下,本领域技术人员现在将进行许多变化、更改和替换。此外,应当理解,本发明的所有方面不限于本文所述的取决于各种条件和变量的特定描绘、配置或相对比例。应当理解,在实施本发明时可以采用本文所述的本发明实施方式的各种替代方案。因此,本发明预计还应包括任何此类替代方案、修改、变化或等效方案。下列权利要求用于限定本发明的范围,并由此应涵盖这些权利要求及其等效方案范围内的方法和结构。

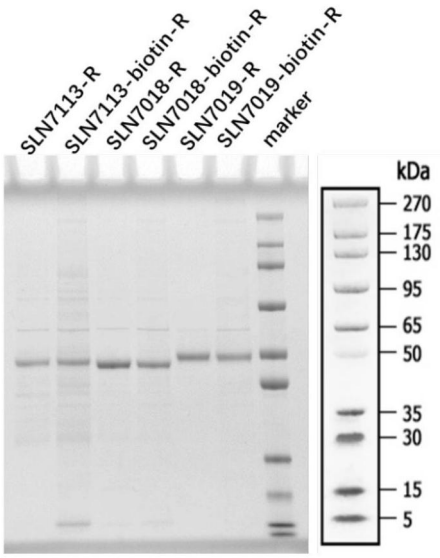

SLN7113-R
SLN7113-biotin-R
SLN7018-R
SLN7018-biotin-R
SLN7019-R
SLN7019-biotin-R
marker
kDa
270
175
130
95
65
50
35
30
15
5

图1

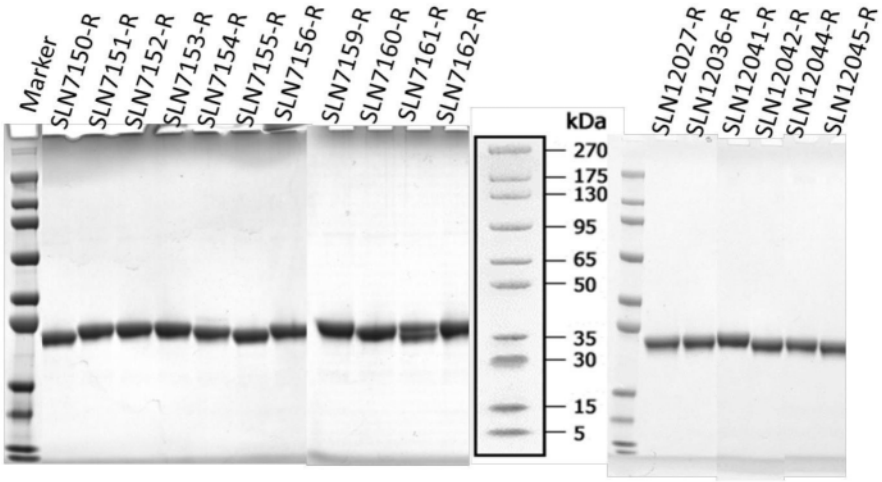

Marker
SLN7150-R
SLN7151-R
SLN7152-R
SLN7153-R
SLN7154-R
SLN7155-R
SLN7156-R
SLN7159-R
SLN7160-R
SLN7161-R
SLN7162-R
kDa
270
175
130
95
65
50
35
30
15
5
SLN12027-R
SLN12036-R
SLN12041-R
SLN12042-R
SLN12044-R
SLN12045-R

图2

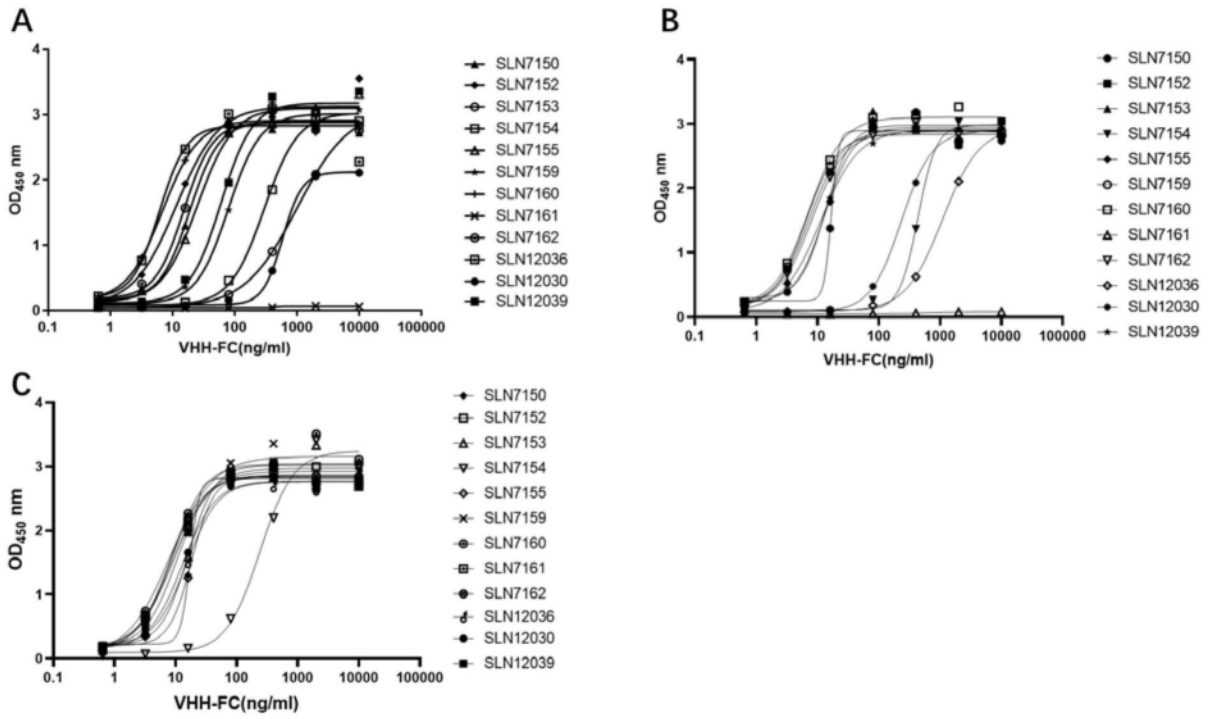

A
B
C
OD450 nm
VHH-FC(ng/ml)
SLN7150
SLN7152
SLN7153
SLN7154
SLN7155
SLN7159
SLN7160
SLN7161
SLN7162
SLN12036
SLN12030
SLN12039

图3

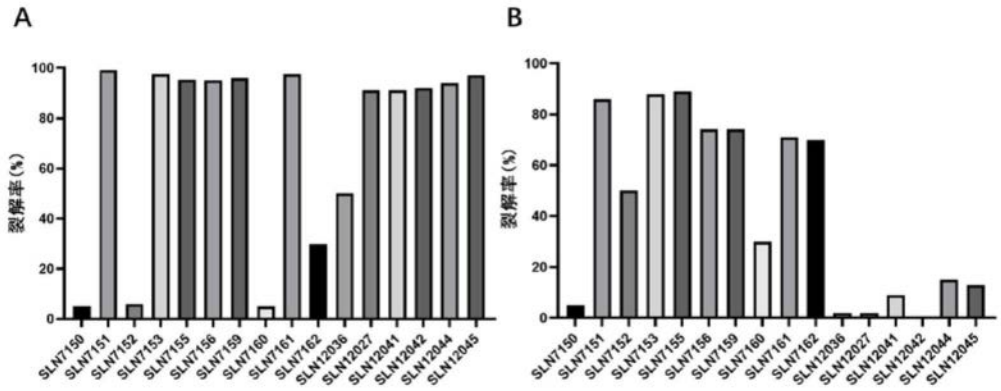

A
B
裂解率(%)
SLN7150
SLN7151
SLN7152
SLN7153
SLN7155
SLN7156
SLN7159
SLN7160
SLN7161
SLN7162
SLN12036
SLN12027
SLN12041
SLN12042
SLN12044
SLN12045

图4

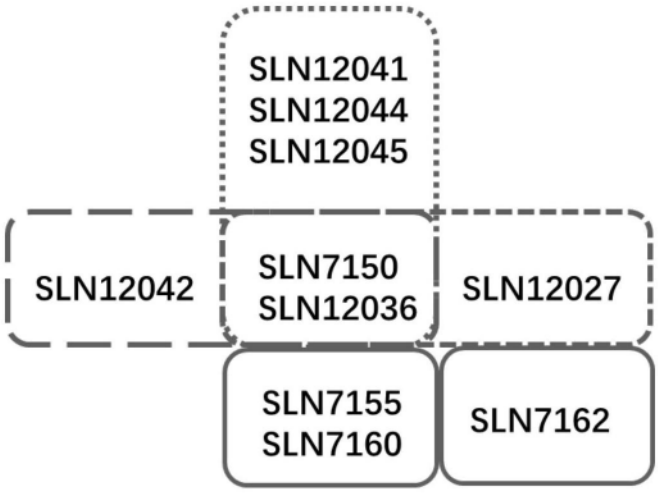

SLN12041
SLN12044
SLN12045
SLN12042
SLN7150
SLN12036
SLN12027
SLN7155
SLN7160
SLN7162

图5

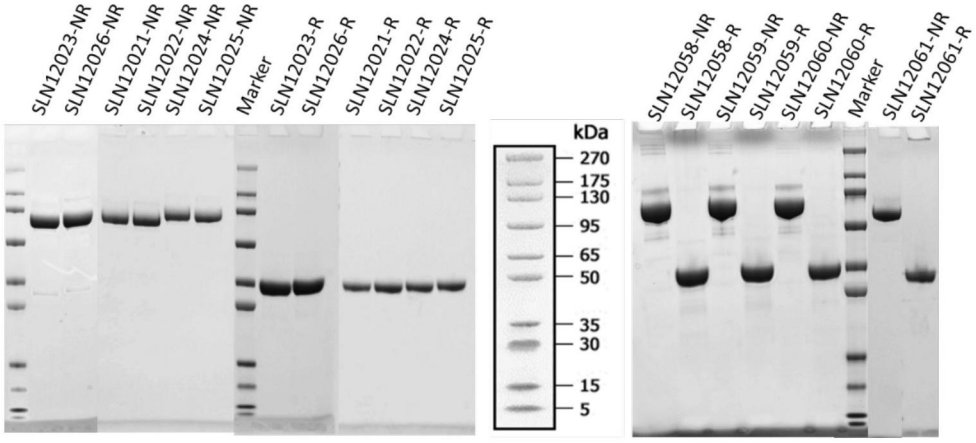

SLN12023-NR
SLN12026-NR
SLN12021-NR
SLN12022-NR
SLN12024-NR
SLN12025-NR
Marker
SLN12023-R
SLN12026-R
SLN12021-R
SLN12022-R
SLN12024-R
SLN12025-R
kDa
270
175
130
95
65
50
35
30
15
5
SLN12058-NR
SLN12058-R
SLN12059-NR
SLN12059-R
SLN12060-NR
SLN12060-R
Marker
SLN12061-NR
SLN12061-R

图6

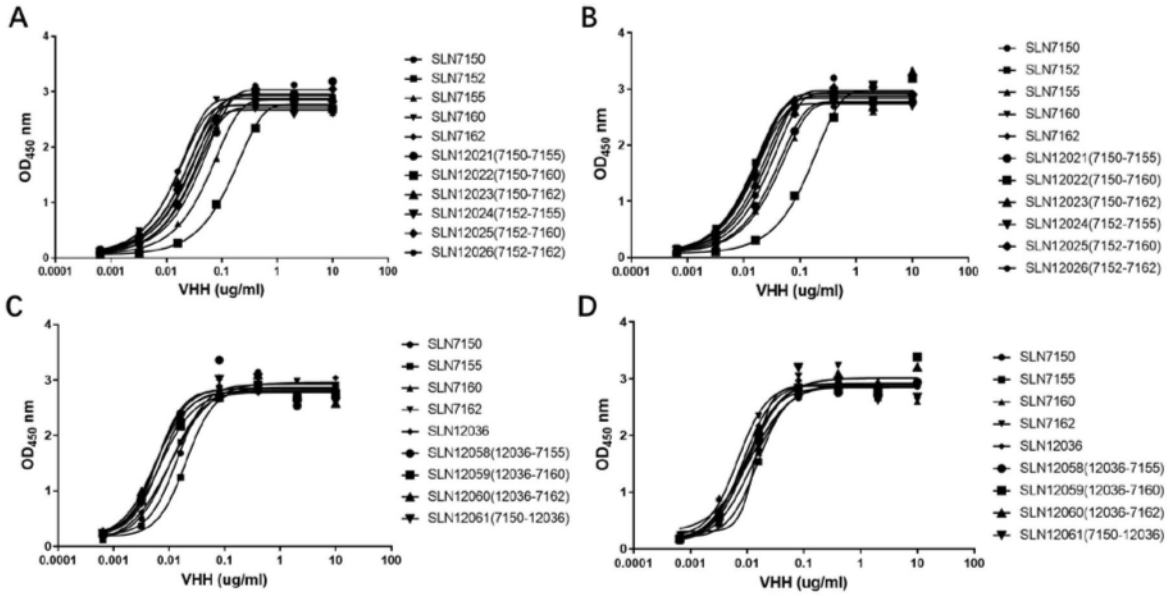

A
B
C
D
OD450 nm
VHH (ug/ml)
SLN7150
SLN7152
SLN7155
SLN7160
SLN7162
SLN12021(7150-7155)
SLN12022(7150-7160)
SLN12023(7150-7162)
SLN12024(7152-7155)
SLN12025(7152-7160)
SLN12026(7152-7162)
SLN12036
SLN12058(12036-7155)
SLN12059(12036-7160)
SLN12060(12036-7162)
SLN12061(7150-12036)

图7

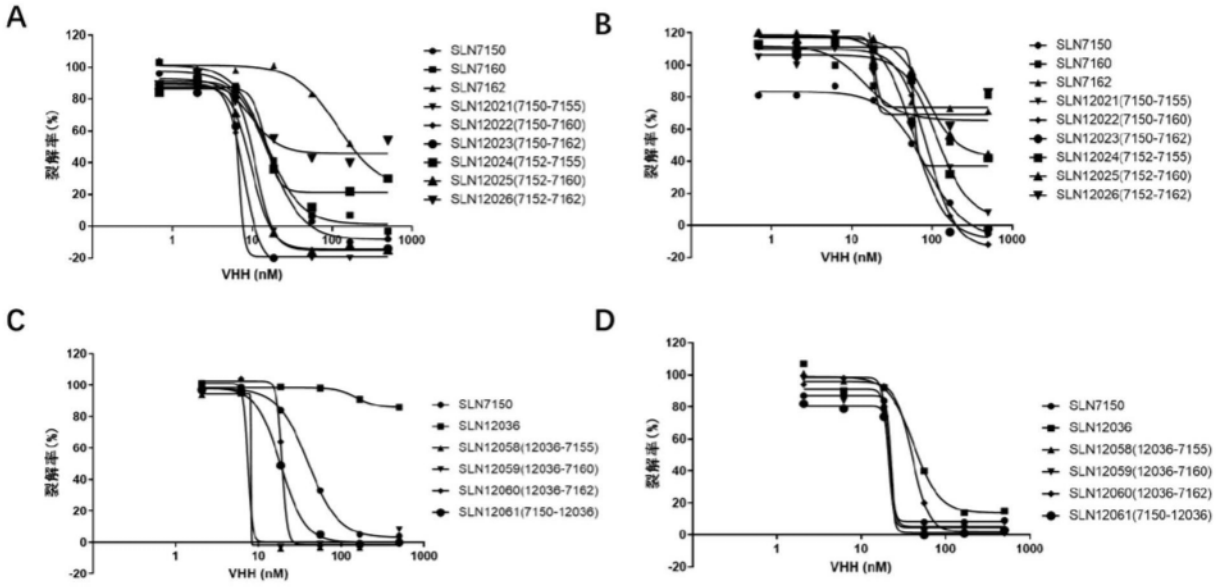

A
B
C
D
裂解率(%)
VHH (nM)
SLN7150
SLN7160
SLN7162
SLN12021(7150-7155)
SLN12022(7150-7160)
SLN12023(7150-7162)
SLN12024(7152-7155)
SLN12025(7152-7160)
SLN12026(7152-7162)
SLN12036
SLN12058(12036-7155)
SLN12059(12036-7160)
SLN12060(12036-7162)
SLN12061(7150-12036)

图8

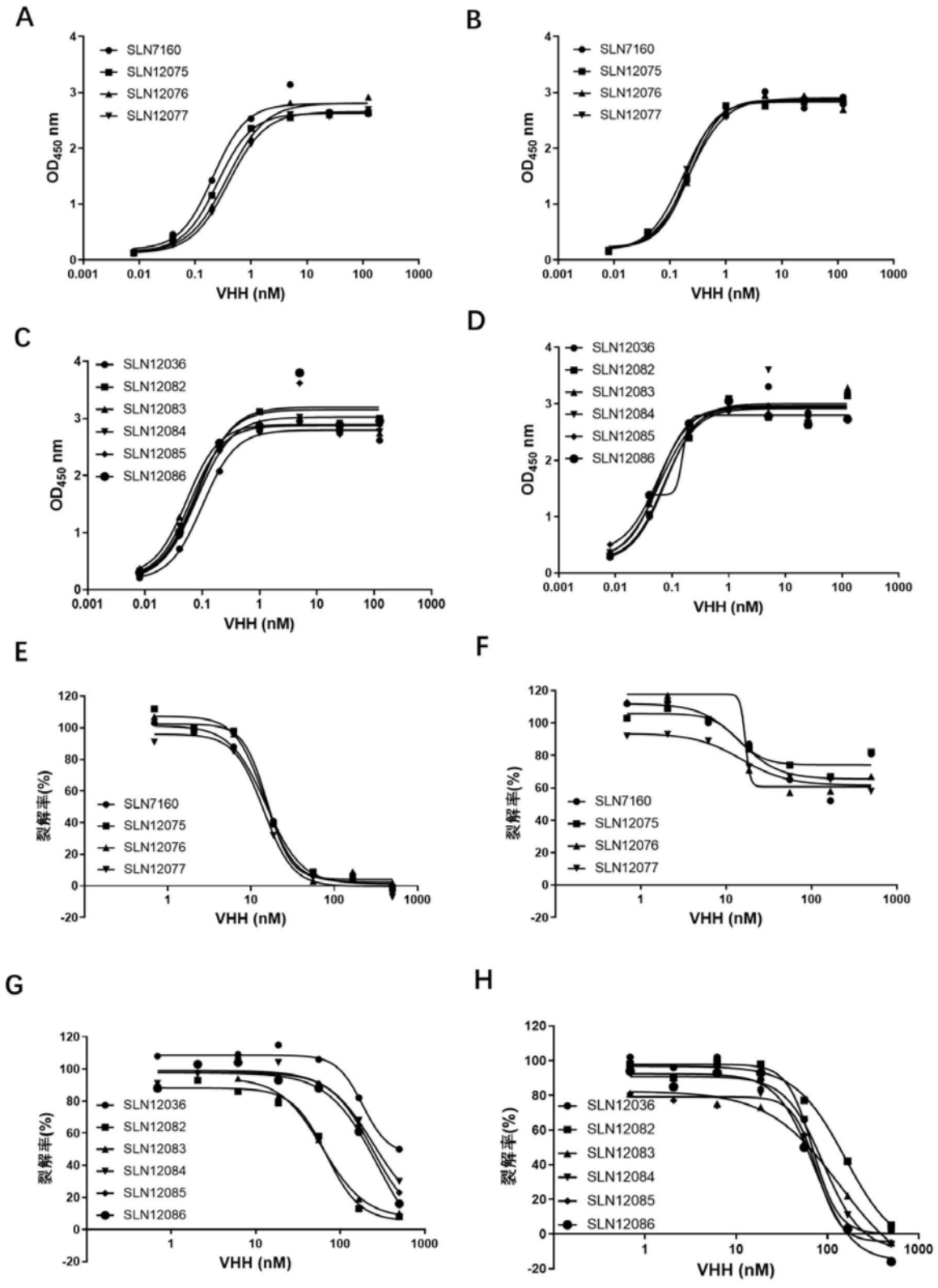

A
B
C
D
E
F
G
H
SLN7160
SLN12075
SLN12076
SLN12077
SLN12036
SLN12082
SLN12083
SLN12084
SLN12085
SLN12086
OD450 nm
裂解率(%)
VHH (nM)

图9

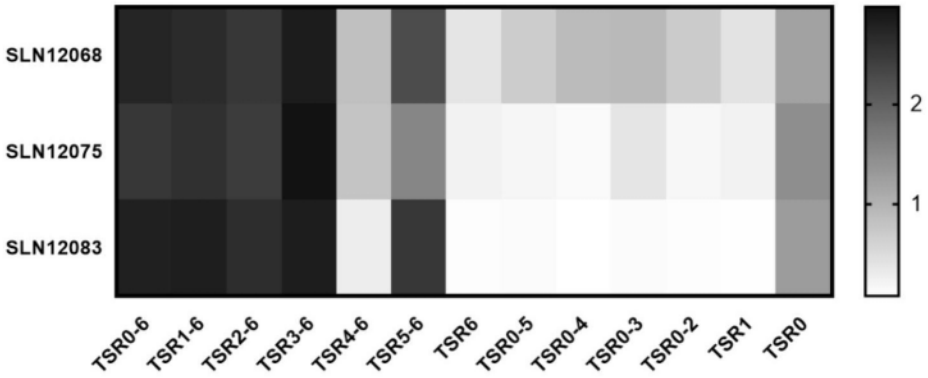

SLN12068
SLN12075
SLN12083
TSR0-6
TSR1-6
TSR2-6
TSR3-6
TSR4-6
TSR5-6
TSR6
TSR0-5
TSR0-4
TSR0-3
TSR0-2
TSR1
TSR0
2
1

图10

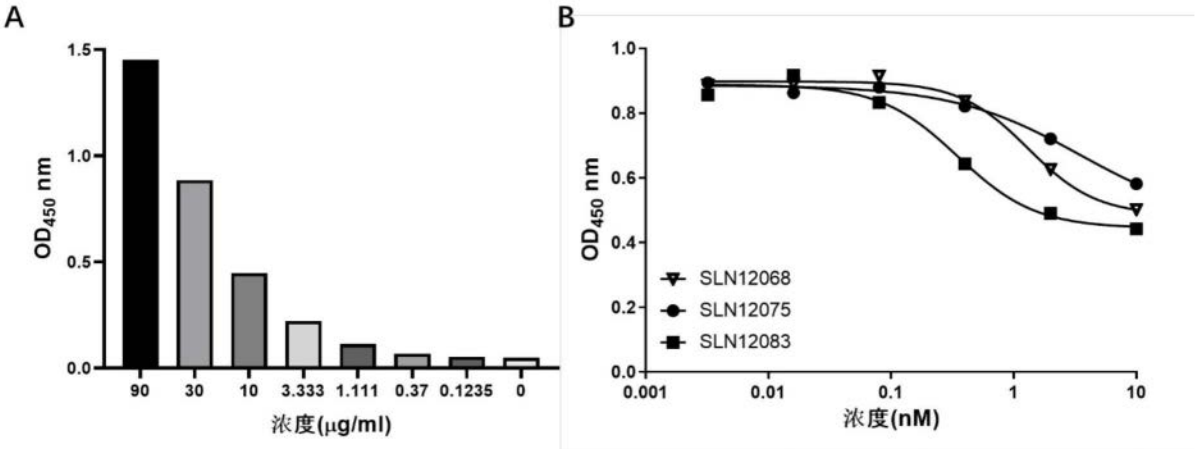

A
1.5
1.0
0.5
0.0
OD450 nm
90
30
10
3.333
1.111
0.37
0.1235
0
浓度(μg/ml)
B
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD450 nm
SLN12068
SLN12075
SLN12083
0.001
0.01
0.1
1
10
浓度(nM)

图11

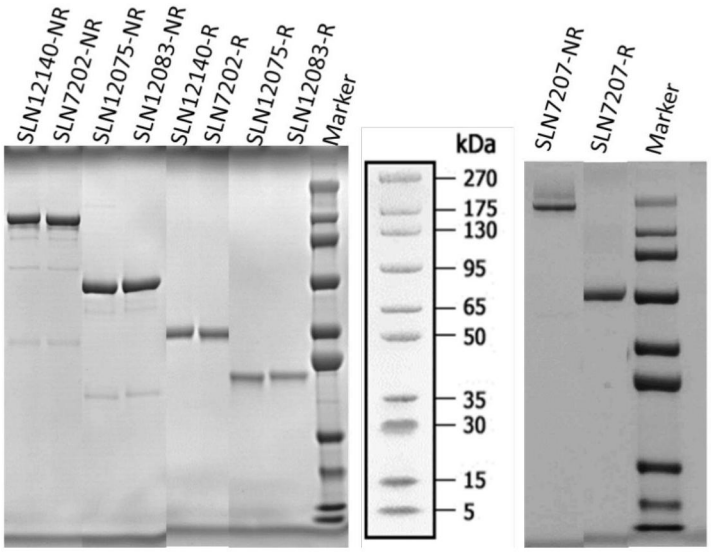

SLN12140-NR
SLN7202-NR
SLN12075-NR
SLN12083-NR
SLN12140-R
SLN7202-R
SLN12075-R
SLN12083-R
Marker
kDa
270
175
130
95
65
50
35
30
15
5
SLN7207-NR
SLN7207-R
Marker

图12

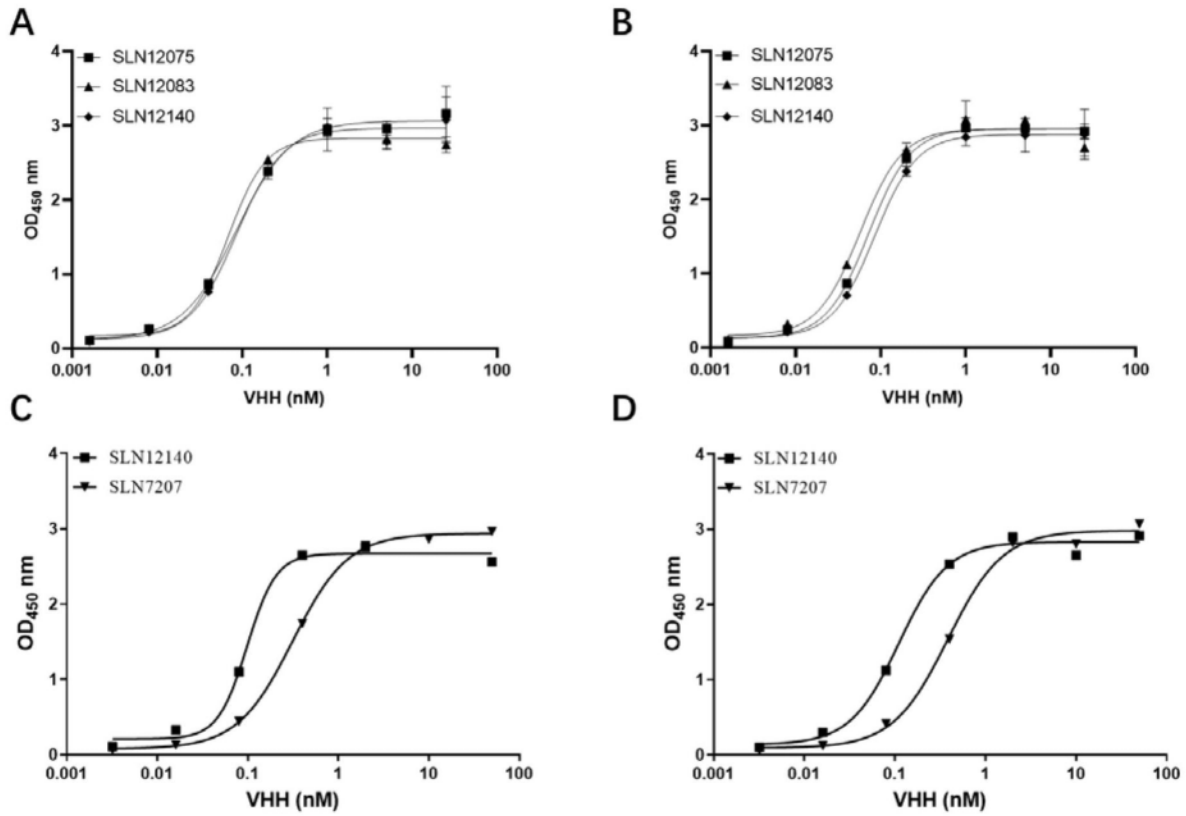

A
SLN12075
SLN12083
SLN12140
OD450 nm
VHH (nM)
B
SLN12075
SLN12083
SLN12140
OD450 nm
VHH (nM)
C
SLN12140
SLN7207
OD450 nm
VHH (nM)
D
SLN12140
SLN7207
OD450 nm
VHH (nM)

图13

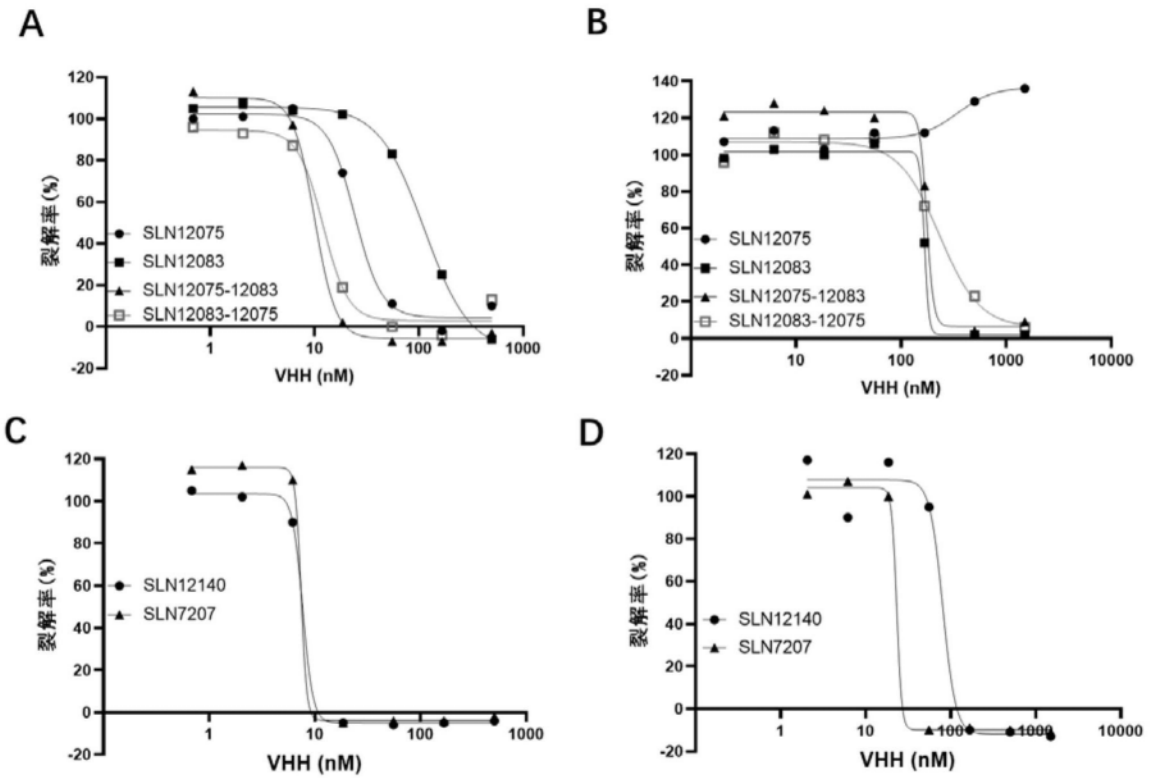

A
裂解率(%)
SLN12075
SLN12083
SLN12075-12083
SLN12083-12075
VHH (nM)
B
裂解率(%)
SLN12075
SLN12083
SLN12075-12083
SLN12083-12075
VHH (nM)
C
裂解率(%)
SLN12140
SLN7207
VHH (nM)
D
裂解率(%)
SLN12140
SLN7207
VHH (nM)

图14

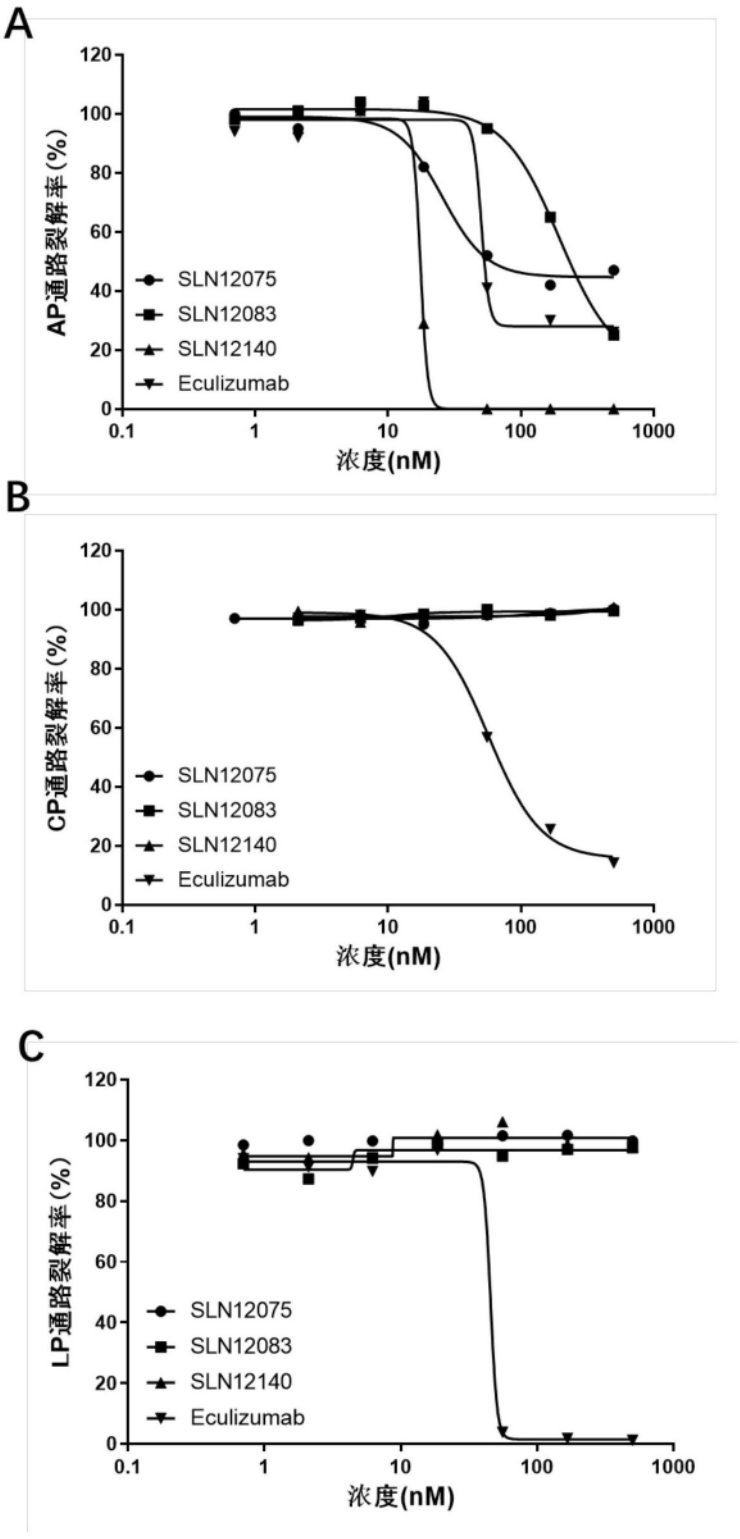

A
AP通路裂解率(%)
120
100
80
60
40
20
0
SLN12075
SLN12083
SLN12140
Eculizumab
0.1
1
10
100
1000
浓度(nM)
B
CP通路裂解率(%)
120
100
80
60
40
20
0
SLN12075
SLN12083
SLN12140
Eculizumab
0.1
1
10
100
1000
浓度(nM)
C
LP通路裂解率(%)
120
100
80
60
40
20
0
SLN12075
SLN12083
SLN12140
Eculizumab
0.1
1
10
100
1000
浓度(nM)

图15

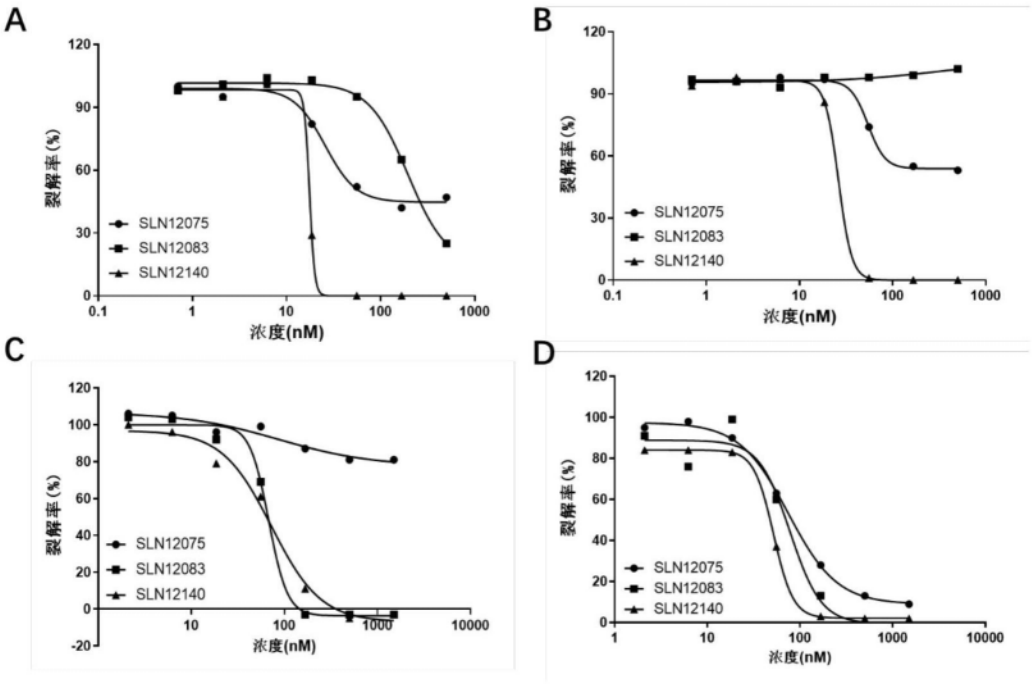

A
B
C
D
裂解率(%)
浓度(nM)
SLN12075
SLN12083
SLN12140

图16

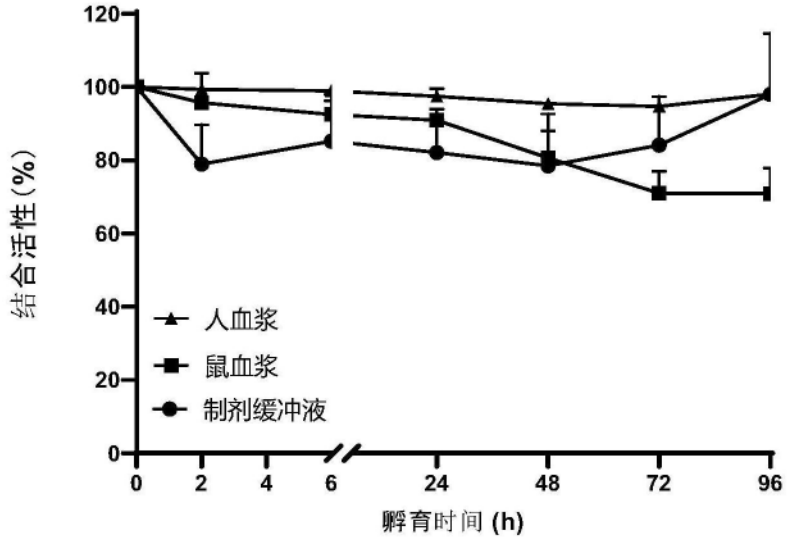

结合活性(%)
孵育时间 (h)
人血浆
鼠血浆
制剂缓冲液

图17

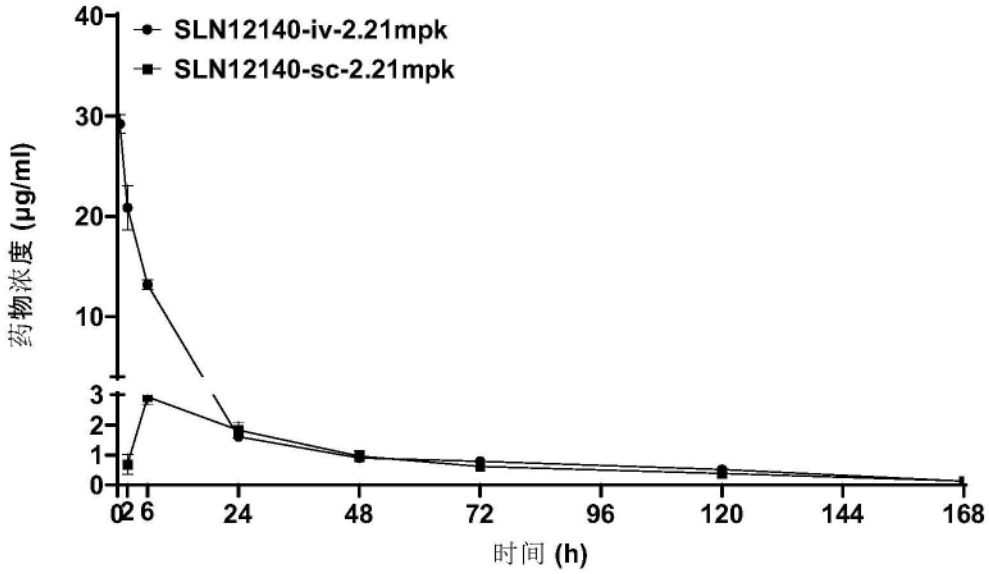

SLN12140-iv-2.21mpk
SLN12140-sc-2.21mpk
药物浓度 (μg/ml)
40
30
20
10
3
2
1
0
0
2
6
24
48
72
96
120
144
168
时间 (h)

图18

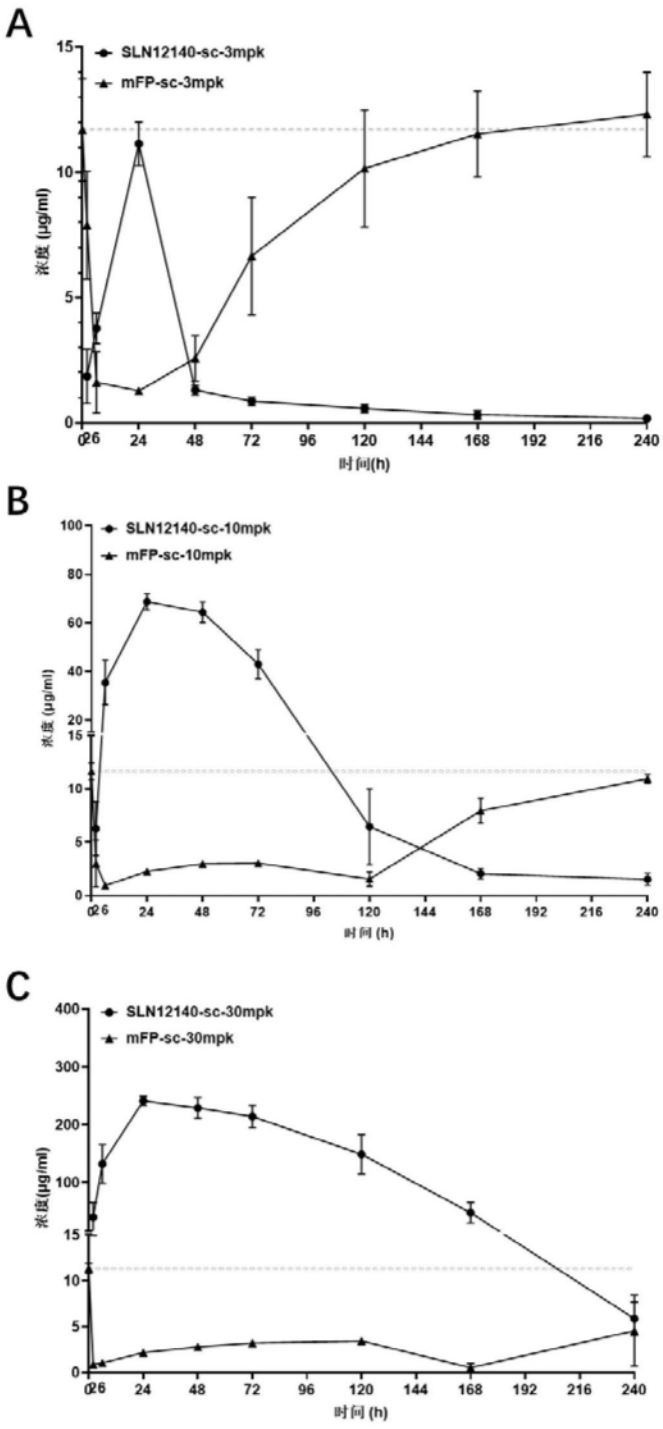

A
SLN12140-sc-3mpk
mFP-sc-3mpk
浓度 (μg/ml)
时间(h)
B
SLN12140-sc-10mpk
mFP-sc-10mpk
浓度 (μg/ml)
时间 (h)
C
SLN12140-sc-30mpk
mFP-sc-30mpk
浓度(μg/ml)
时间 (h)

图19

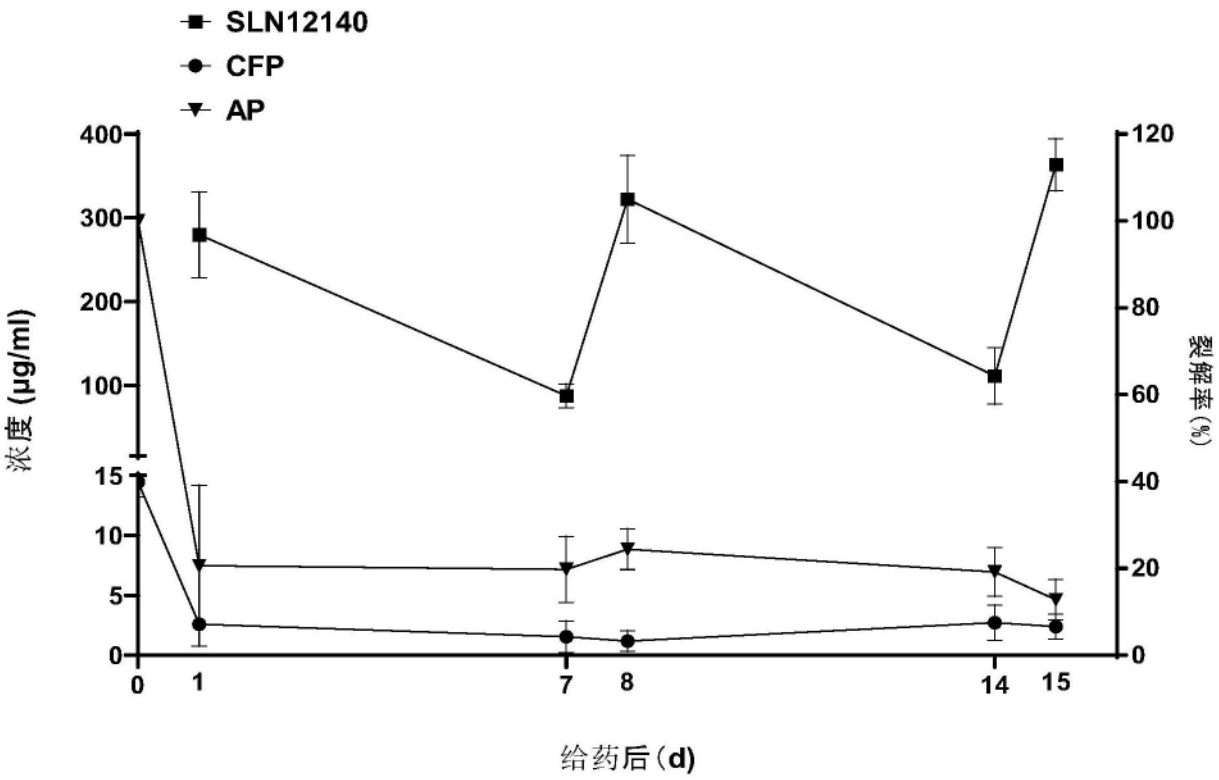

SLN12140
CFP
AP
浓度 (μg/ml)
裂解率(%)
400
300
200
100
15
10
5
0
120
100
80
60
40
20
0
0
1
7
8
14
15
给药后(d)

图20

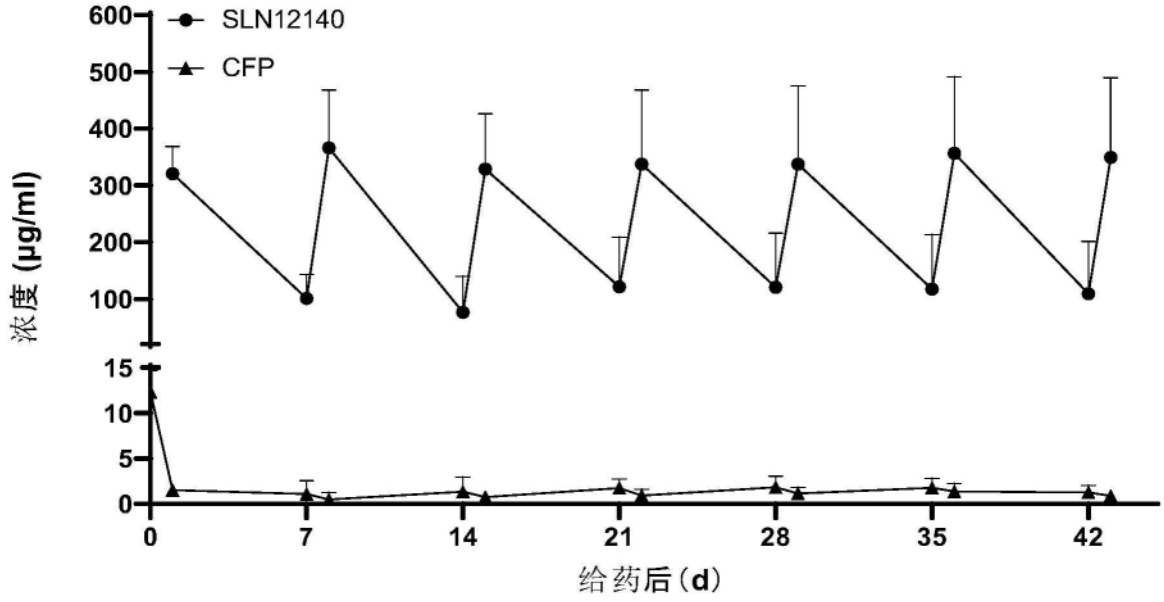

SLN12140
CFP
浓度 (μg/ml)
600
500
400
300
200
100
15
10
5
0
0
7
14
21
28
35
42
给药后(d)

图21

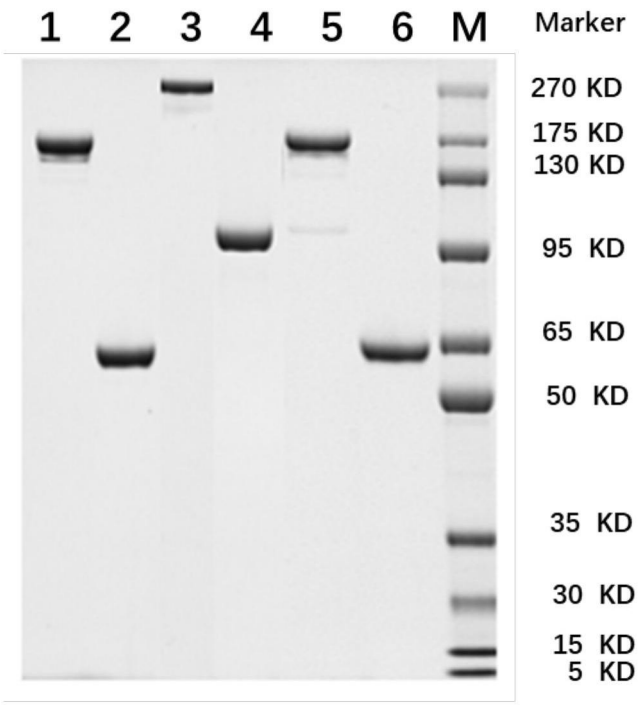

1
2
3
4
5
6
M
Marker
270 KD
175 KD
130 KD
95 KD
65 KD
50 KD
35 KD
30 KD
15 KD
5 KD

图22

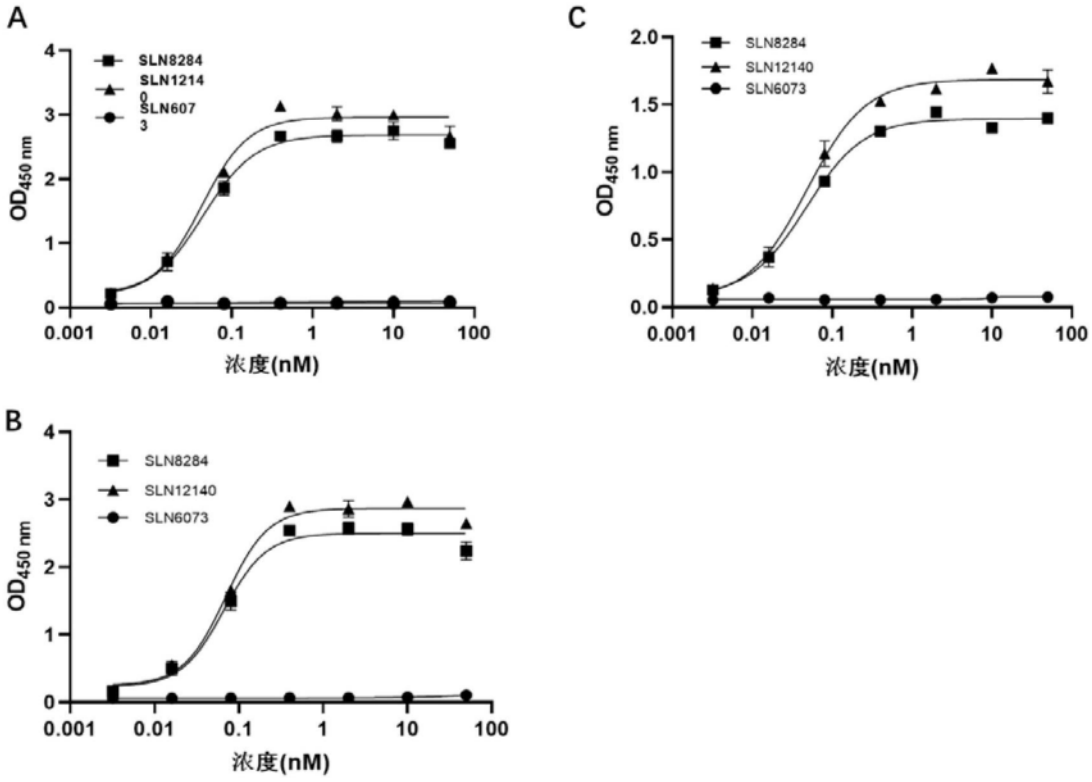

A
SLN8284
SLN12140
SLN6073
OD450 nm
浓度(nM)
B
SLN8284
SLN12140
SLN6073
OD450 nm
浓度(nM)
C
SLN8284
SLN12140
SLN6073
OD450 nm
浓度(nM)

图23

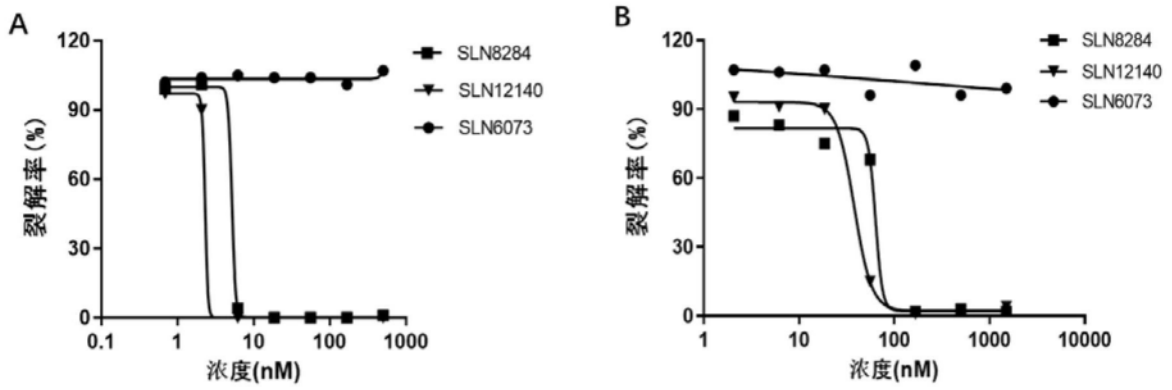

A
裂解率(%)
120
90
60
30
0
0.1
1
10
100
1000
浓度(nM)
SLN8284
SLN12140
SLN6073
B
裂解率(%)
120
90
60
30
0
1
10
100
1000
10000
浓度(nM)
SLN8284
SLN12140
SLN6073

图24

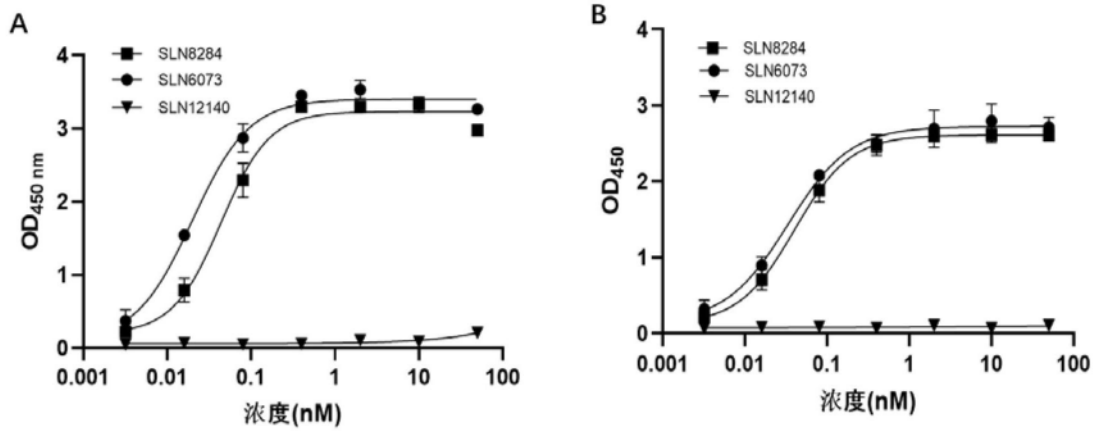

A
OD450 nm
4
3
2
1
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度(nM)
SLN8284
SLN6073
SLN12140
B
OD450
4
3
2
1
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度(nM)
SLN8284
SLN6073
SLN12140

图25

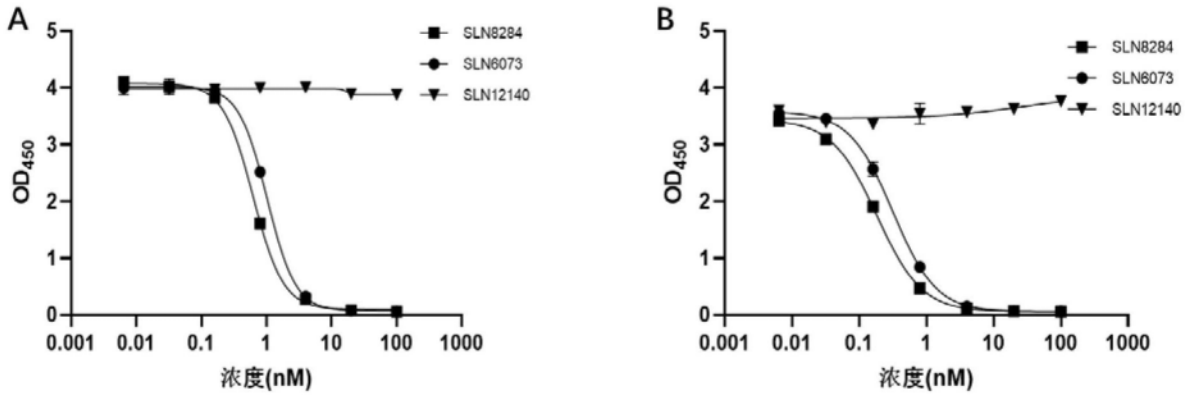

A
OD450
5
4
3
2
1
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度(nM)
SLN8284
SLN6073
SLN12140
B
OD450
5
4
3
2
1
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度(nM)
SLN8284
SLN6073
SLN12140

图26

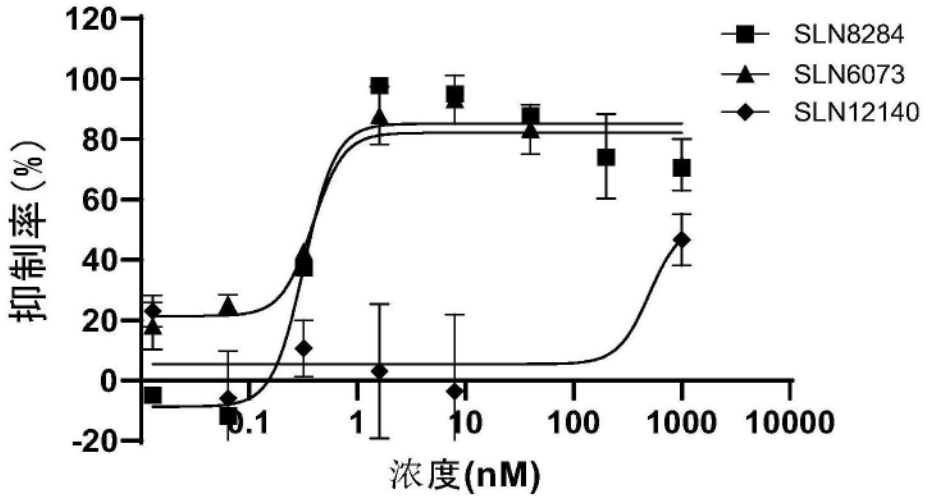

SLN8284
SLN6073
SLN12140
抑制率(%)
120
100
80
60
40
20
0
-20
0.1
1
10
100
1000
10000
浓度(nM)

图27

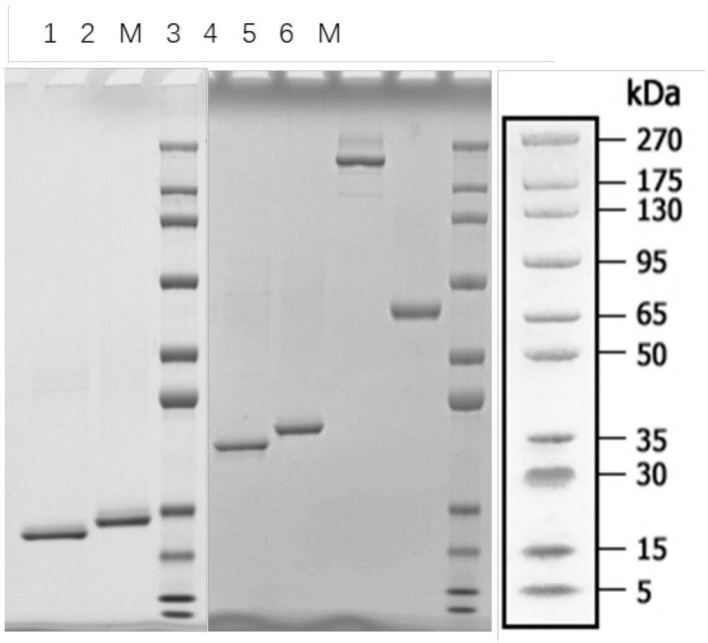

1 2 M 3 4 5 6 M
kDa
270
175
130
95
65
50
35
30
15
5

图28

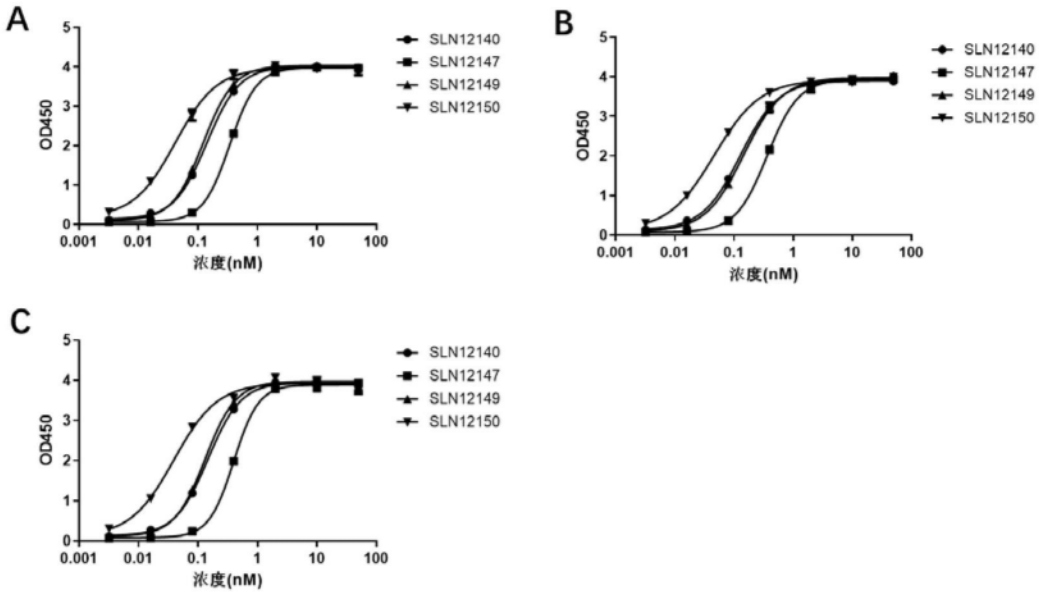

A
B
C
OD450
浓度(nM)
SLN12140
SLN12147
SLN12149
SLN12150

图29

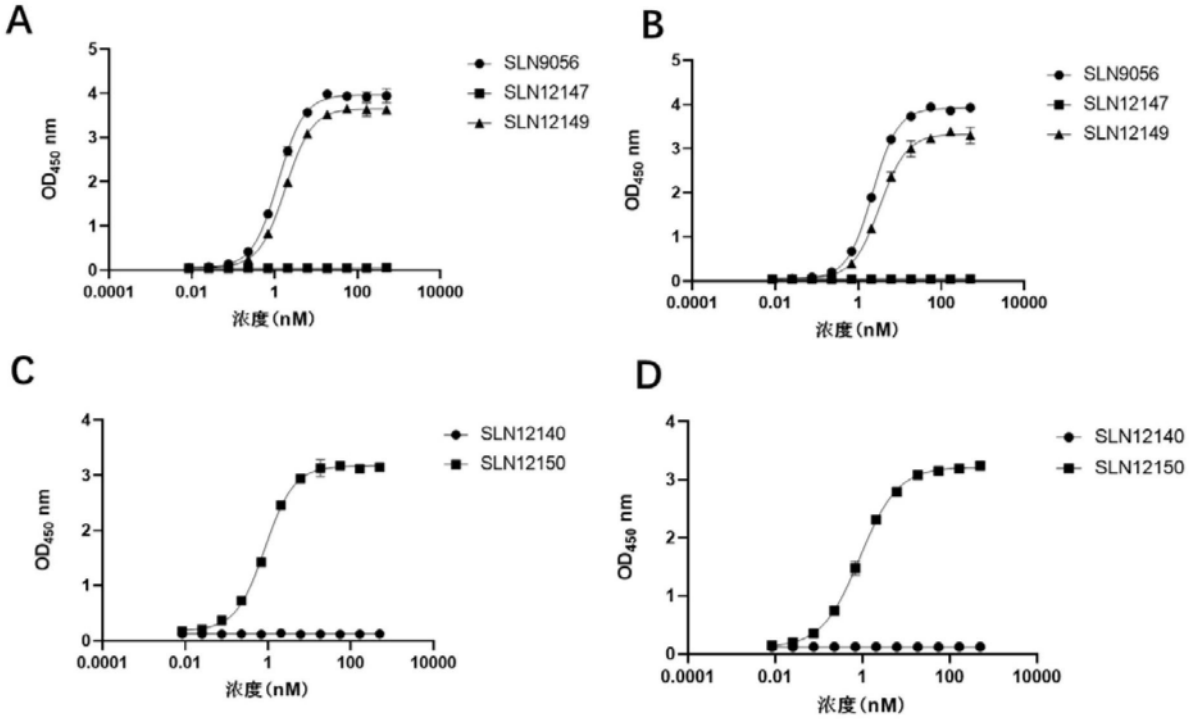

A
B
C
D
OD450 nm
浓度(nM)
SLN9056
SLN12147
SLN12149
SLN12140
SLN12150

图30

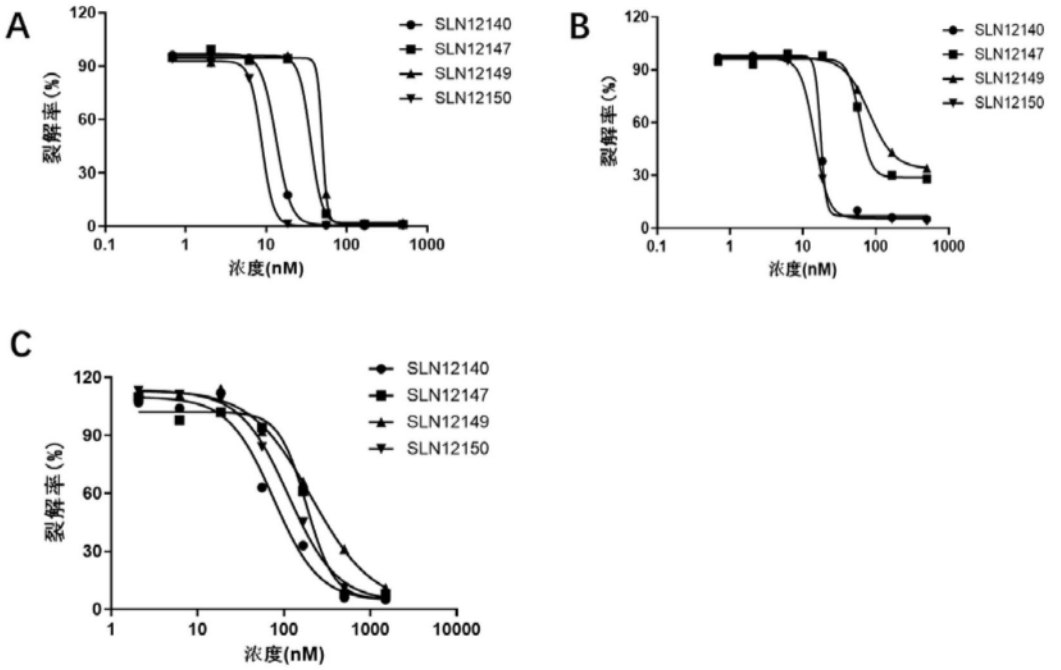

A
B
C
SLN12140
SLN12147
SLN12149
SLN12150
裂解率(%)
浓度(nM)

图31

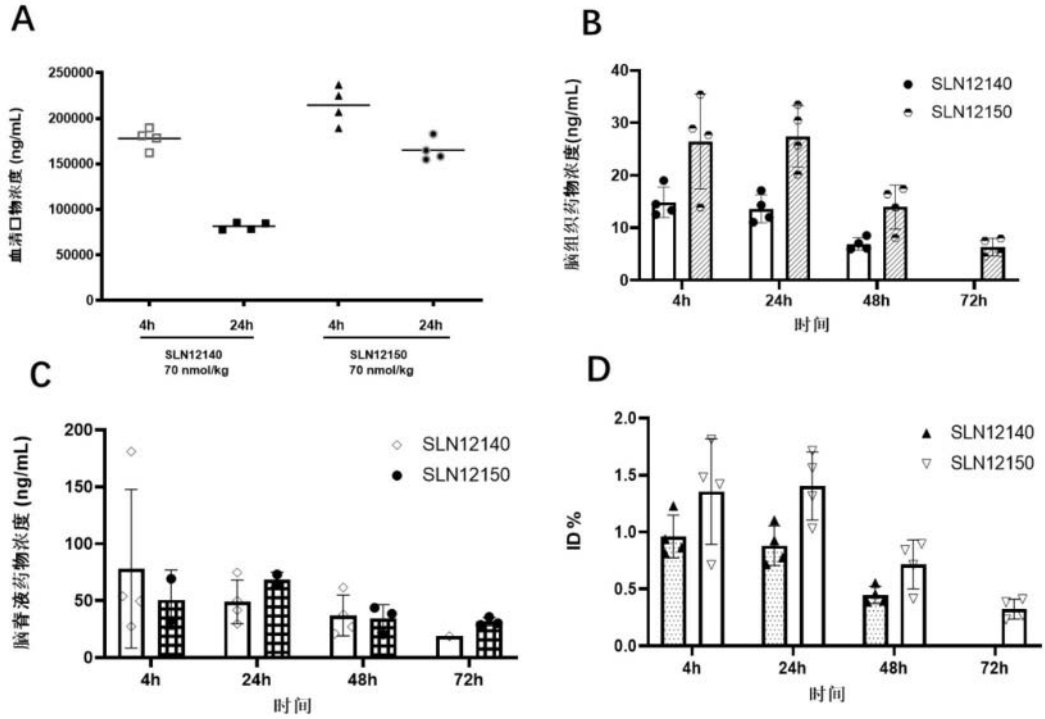

A
B
C
D
血清口物浓度 (ng/mL)
脑组织药物浓度(ng/mL)
脑脊液药物浓度 (ng/mL)
ID %
SLN12140
SLN12150
4h
24h
48h
72h
时间
SLN12140
70 nmol/kg
SLN12150
70 nmol/kg

图32