



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101668773 B

(45)授权公告日 2016.08.31

(21)申请号 200880008123.2

(22)申请日 2008.03.14

(30)优先权数据

60/906,816 2007.03.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2009.09.14

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/003381 2008.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02008/140653 EN 2008.11.20

(73)专利权人 亚力史制药公司

地址 美国特拉华州

(72)发明人 W·艾米伦 V·M·郝勒斯

P·弗林

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 赵蓉民 陆惠中

(51)Int.Cl.

C07K 16/18(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 11/00(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

A61P 37/06(2006.01)

(56)对比文件

WO 2005/069970 A2,2005.08.04,

US 2005/260198 A1,2005.11.24,

C.TAUBE et.al.Factor B of the

alternative complement pathway regulates development of airway hyperresponsiveness and inflammation.《PANA》.2006,第103卷(第21期),8084-8089.

审查员 劳芳

权利要求书3页 说明书23页

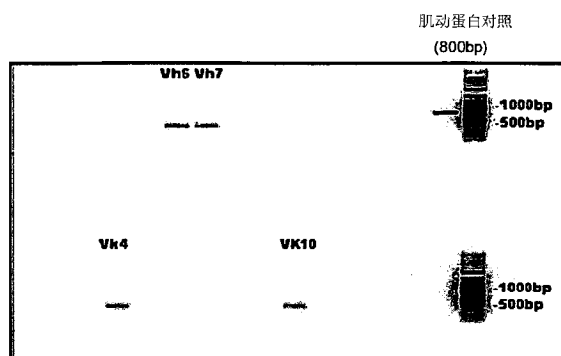
序列表12页 附图5页

(54)发明名称

人工程化抗B因子抗体

(57)摘要

本发明涉及具有降低的免疫原性的人工程化抗B-因子抗体及其抗原结合片段。所述人工程化抗B-因子抗体及其抗原结合片段源自鼠单克隆抗体1379,其在第三个短共有重复序列(“SCR”)结构域内结合B因子,并且通过防止C3bBb复合物的形成而选择性抑制补体旁路活化。本发明也涉及治疗补体旁路活化在其中起作用的疾病或病症的方法,和在需要其的个体中选择性抑制补体旁路活化的方法。



1. 人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段, 其在第三个短共有重复序列(“SCR”)结构域内选择性结合B因子并防止C3bBb复合物的形成, 其中所述抗体和其抗原结合片段的每一个包括选自下述氨基酸序列的V_K和V_H区:

a) 由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成的V_K-区多肽和由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的V_H-区多肽;

b) 由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的V_K-区多肽和由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的V_H-区多肽;

c) 由SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成的V_K-区多肽和由SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成的V_H-区多肽;

d) 由SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成的V_K-区多肽和由SEQ ID NO:21的氨基酸序列组成的V_H-区多肽;

e) 由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的V_K-区多肽和由SEQ ID NO:35的氨基酸序列组成的V_H-区多肽;

f) 由SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成的V_K-区多肽和由SEQ ID NO:36的氨基酸序列组成的V_H-区多肽; 或

g) 由SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成的V_K-区多肽和由SEQ ID NO:37的氨基酸序列组成的V_H-区多肽, 并且

其中所述其抗原结合片段选自Fab'、(Fab')₂、Fv、scFv和双抗体, 并且

其中所述双抗体包括所述人工程化抗B因子抗体的V_H和V_K结构域——其由连接体连接, 并且其中所述连接体非常短以至于不允许同一多肽的V_H和V_K结构域配对, 而使所述V_H和V_K结构域与第二多肽的互补结构域配对以形成两个抗原结合位点。

2. 权利要求1所述的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段, 其包括由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成的V_K-区多肽和由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的V_H-区多肽。

3. 权利要求1所述的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段, 其包括由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的V_K-区多肽和由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的V_H-区多肽。

4. 权利要求1所述的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段, 其包括由SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成的V_K-区多肽和由SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成的V_H-区多肽。

5. 权利要求1所述的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段, 其包括由SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成的V_K-区多肽和由SEQ ID NO:21的氨基酸序列组成的V_H-区多肽。

6. 权利要求1所述的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段, 其包括由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的V_K-区多肽和由SEQ ID NO:35的氨基酸序列组成的V_H-区多肽。

7. 权利要求1所述的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段, 其包括由SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成的V_K-区多肽和由SEQ ID NO:36的氨基酸序列组成的V_H-区多肽。

8. 权利要求1所述的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段, 其包括由SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成的V_K-区多肽和由SEQ ID NO:37的氨基酸序列组成的V_H-区多肽。

9. 权利要求1所述的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段, 包括由SEQ ID NO:22的氨基酸序列组成的V_K-区结合特异性决定簇(“BSD”)多肽和由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的V_H-区BSD多肽。

10. 权利要求1所述的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段, 包括由SEQ ID NO:24

的氨基酸序列组成的V_K-区结合特异性决定簇(BSD)多肽和由SEQ ID NO:25的氨基酸序列组成的V_H-区BSD多肽。

11. 权利要求1所述的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段,包括由SEQ ID NO:26的氨基酸序列组成的V_K-区结合特异性决定簇(BSD)多肽和由SEQ ID NO:27的氨基酸序列组成的V_H-区BSD多肽。

12. 权利要求1所述的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段,包括由SEQ ID NO:28的氨基酸序列组成的V_K-区结合特异性决定簇(BSD)多肽和由SEQ ID NO:29的氨基酸序列组成的V_H-区BSD多肽。

13. 根据权利要求1所述的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗个体中气道高反应性(“AHR”)或气道炎症的药物中的用途,所述个体患有所述AHR或气道炎症或处于发展所述AHR或气道炎症的危险中,其中所述药物以与施用药物之前相比有效可测量地减轻所述个体中的所述AHR或气道炎症的量施用给所述个体。

14. 根据权利要求1所述的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段在制备用于选择性抑制个体中的补体旁路活化的药物中的用途,所述个体患有气道高反应性(“AHR”)或气道炎症,或者处于发展所述气道高反应性(“AHR”)或气道炎症的危险中,其中所述药物以与施用药物之前相比有效可测量地减轻所述个体中的所述AHR或气道炎症的量施用给所述个体。

15. 权利要求13或14所述的用途,其中所述AHR或气道炎症与选自下列的疾病有关:哮喘、慢性阻塞性肺病(“COPD”)、过敏性支气管肺曲霉病、过敏性炎症、嗜酸性细胞肺炎、肺气肿、支气管炎、过敏性支气管炎支气管扩张、囊性纤维化、肺结核、超敏感性肺部炎症、职业性哮喘、结节病、反应性气道疾病综合征、间质性肺病、嗜酸细胞增多综合征、鼻炎、鼻窦炎、运动诱发的哮喘、污染诱发的哮喘、咳嗽变异性哮喘、寄生性肺病、呼吸道合胞病毒(“RSV”)感染、副流行性感冒病毒(“PIV”)感染、鼻病毒(“RV”)感染和腺病毒感染。

16. 权利要求15所述的用途,其中所述超敏感性肺部炎症是超敏感性肺炎。

17. 药物组合物,其包括1)有效量的权利要求1所述的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段,和2)药学上可接受的载体。

18. 根据权利要求1所述的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段或权利要求17所述的组合物在制备用于治疗个体气道高反应性(“AHR”)或气道炎症的药物中的用途,所述个体患有所述AHR或气道炎症或处于发展所述AHR或气道炎症的危险中,其中所述药物以与施用所述药物之前相比有效可测量地减轻所述个体中的所述AHR或气道炎症的量施用给所述个体。

19. 根据权利要求1所述的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段或权利要求17所述的组合物在制备用于选择性抑制个体中的补体旁路活化的药物中的用途,所述个体患有气道高反应性(“AHR”)或气道炎症,或者处于发展所述AHR或气道炎症的危险中,其中所述药物以与施用药物之前相比有效可测量地减轻所述个体中的所述AHR或气道炎症的量施用给所述个体。

20. 权利要求18或19所述的用途,其中所述AHR或气道炎症与选自下列的疾病有关:哮喘、慢性阻塞性肺病(“COPD”)、过敏性支气管肺曲霉病、过敏性炎症、嗜酸性细胞肺炎、肺气肿、支气管炎、过敏性支气管炎支气管扩张、囊性纤维化、肺结核、超敏感性肺部炎症、职业

性哮喘、结节病、反应性气道疾病综合征、间质性肺病、嗜酸细胞增多综合征、鼻炎、鼻窦炎、运动诱发的哮喘、污染诱发的哮喘、咳嗽变异性哮喘、寄生性肺病、呼吸道合胞病毒(“RSV”)感染、副流行性感冒病毒(“PIV”)感染、鼻病毒(“RV”)感染和腺病毒感染。

21. 权利要求20所述的用途,其中所述超敏感性肺部炎症是超敏感性肺炎。

人工程化抗B因子抗体

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求于2007年3月14提交的美国临时申请第60/906,816号的优先权,其公开内容通过引用并入本文。

[0003] 关于联邦资助的研究或开发的声明

[0004] 本发明部分地是在基金第AI47469、HL-36577、HL-61005和AI-31105号——各自由美国国家卫生研究院授予——和由环境保护署授予的基金第R825702号的支持下进行的。因此政府对本发明拥有一些权利。

[0005] 光盘附件的引用

[0006] 不适用。

发明领域

[0007] 本发明涉及结合补体蛋白B因子并选择性抑制补体旁路(途径)的新型工程改造形式的单克隆抗体及其抗原结合片段。本发明也总体上涉及使用这种抗体及其抗原结合片段治疗补体旁路在其中起作用的疾病。特别是,本发明涉及使用这种抗体及其抗原结合片段抑制补体旁路活化,和治疗涉及补体旁路活化的疾病。这样的病症包括但不限于,气道高反应性和气道炎症,缺血-再灌注损伤以及在包括人在内动物中的相关病症。

[0008] 发明背景

[0009] 免疫系统中的某些细胞对存在于体内的外源蛋白质如细菌或病毒蛋白质反应,产生被称为抗体或免疫球蛋白(“Ig”)的蛋白质。抗体结合并中和体内的外源蛋白质。

[0010] 抗体通常牢固并特异地结合其靶蛋白抗原,从而使它们成为潜在有用的治疗剂,用于治疗广泛的、以改变的蛋白质表达为特征的疾病。应用非人抗体分子,已经鉴定了许多适合用于抗体-介导的疾病治疗的蛋白质靶标。然而,对于许多治疗性应用,非-人抗体的效力和安全受到损害,因为非人Ig分子本身具有免疫原性(即,能够诱导免疫反应)。因此,在抗体能够被批准用于治疗用途之前,通常必须对它们进行修饰以减少或消除它们的免疫原性。抗体Humaneering™产生这样的抗体,所述抗体被修饰以减少免疫原性而同时保持特异性结合其靶抗原的能力。

[0011] 本申请描述了可结合B因子并选择性阻止补体旁路的鼠单克隆抗体的“人工程化”。补体旁路通常由细菌、寄生虫、病毒或真菌激活,虽然已报道IgA抗体和某些Ig轻链也可激活该补体旁路。当循环中的B因子结合到活化的C3(C3b或C3H₂O)时,旁路途径活化开始。然后这种复合物被循环中的D因子切割,产生酶促活性片段,其或是C3bBb或是C3(H₂O)Bb。这两种酶可以切割循环中的C3产生C3b,这引发炎症并同样进一步放大了活化过程,产生正反馈环。需要B因子来使所述旁路途径被激活。

[0012] 近来的研究显示补体的旁路途径在几种疾病的动物模型的发病机理中发挥了重要作用。缺血/再灌注损伤后的肾内的补体活化作用几乎完全由旁路途径介导,并且所述旁路途径在关节炎的发展中起着关键作用。也许最令人惊讶的是,已经显示狼疮性肾炎的MRL/lpr模型中的旁路途径缺陷的小鼠受到保护,不发生肾炎和抗磷脂介导的胎儿死亡,所

述疾病模型在传统上被假定由经典补体途径所介导。

[0013] 通过用包含融合到免疫球蛋白的B因子的第二和第三短共有重复序列(“SCR”)结构域的融合蛋白注射B因子缺陷小鼠($\text{fB}^{-/-}$),产生本文描述的获得人工程化变体的鼠抗B因子抗体。然后筛选小鼠,以得到针对B因子的抗体。根据本领域中已知的标准程序,将来自产生抗B因子抗体的注射小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合。得到的杂交瘤细胞之一,第1379号,产生了可在体外和体内完全抑制补体旁路活化的IgG1抗体(“mAb 1379”)。mAb 1379的抗原结合Fab'片段也完全抑制补体旁路的活化作用。产生mAb 1379的杂交瘤细胞系已经被保藏在美国菌种保藏中心(“ATCC”),保藏号为PTA-6230。

[0014] 表位作图显示mAb1379与B因子在第三SCR结构域内结合。进一步的实验证明mAb 1379通过防止C3bBb复合物的形成来抑制补体旁路的活化。最后,mAb 1379结合在多个哺乳动物物种中保守的表位,如由其抑制来自许多不同物种的血清中的补体旁路活化的能力所显示的,所述不同的物种包括小鼠、大鼠、人、狒狒、恒河猴、食蟹猴、猪、兔和马。抗B-因子抗体mAb 1379的生产和表征被更详细地描述在美国专利公开号US 2005/0260198A1中,其通过引用被并入本文。

[0015] 本文引用的所有参考文献,包括专利申请和出版物因此通过引用以其全部并入。

[0016] 发明简述

[0017] 在一方面,本发明提供了源自鼠单克隆抗体1379(“mAb 1379”)的人工程化(humaneered)抗B因子抗体或其抗原结合片段,其在第三个短共有重复序列(short consensus repeat)(“SCR”)结构域内选择性地结合B因子,并防止C3bBb复合物的形成,其中所述人工程化抗体或其抗原结合片段具有大约 $1.0 \times 10^{-8}\text{M}$ 至大约 $1.0 \times 10^{-10}\text{M}$ 之间的平衡解离常数(K_D)。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段具有在大约 $1.0 \times 10^{-9}\text{M}$ 至 $9.0 \times 10^{-9}\text{M}$ 之间、或大约 $3.0 \times 10^{-9}\text{M}$ 至 $7.0 \times 10^{-9}\text{M}$ 之间的 K_D 。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段具有大约 $3.7 \times 10^{-9}\text{M}$ 或以下,大约 $4.5 \times 10^{-9}\text{M}$ 或以下,大约 $5.4 \times 10^{-9}\text{M}$ 或以下,或大约 $6.5 \times 10^{-9}\text{M}$ 或以下的 K_D 。

[0018] 在相关方面,本发明提供了源自鼠单克隆抗体1379(“mAb 1379”)的人工程化抗B因子抗体及其抗原结合片段,其在第三个短共有重复序列(“SCR”)结构域内选择性地与B因子结合,并且防止C3bBb复合物的形成,其中所述人工程化抗体或其抗原结合片段具有在大约 $1.0 \times 10^{-8}\text{M}$ 至大约 $1.0 \times 10^{-10}\text{M}$ 之间的 K_D 。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括 V_K -区多肽和 V_H -区多肽,所述 V_K -区多肽选自SEQ ID NO:14(TA10参考抗体)、SEQ ID NO:16(TA101-1Fab')、SEQ ID NO:18(TA102-4Fab')和SEQ ID NO:20(TA103-2 Fab');所述 V_H -区多肽选自SEQ ID NO:15(TA10参考抗体)、SEQ ID NO:17(TA101-1Fab')、SEQ ID NO:19(TA 102-4Fab')和SEQ ID NO:21(TA103-2 Fab')。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:14(TA10参考抗体)的 V_K -区多肽和含有SEQ ID NO:15(TA10参考抗体)的 V_H -区多肽,并且具有 $6.55 \times 10^{-9}\text{M}$ 或以下的 K_D 。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:16(TA101-1Fab')的 V_K -区多肽和含有SEQ ID NO:17(TA101-1Fab')的 V_H -区多肽,并且具有 $4.53 \times 10^{-9}\text{M}$ 或以下的 K_D 。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:18(TA 102-4Fab')的 V_K -区多肽和含有SEQ ID NO:19(TA 102-4Fab')的 V_H -区多肽,并且具有 $5.40 \times 10^{-9}\text{M}$ 或以下的 K_D 。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合

片段包括含有SEQ ID NO:20(TA 103-2Fab')的V_K-区多肽和含有SEQ ID NO:21(TA 103-2Fab')的V_H-区多肽,并且具有 3.73×10^{-9} M或以下的K_D。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括选自Fab'、(Fab')₂、Fv、scFv和双抗体的抗原结合片段。在某些实施方式中,人工程化抗-B因子抗体的抗原结合片段是Fab'。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段具有大约 3.7×10^{-9} M或以下、大约 4.5×10^{-9} M或以下、大约 5.4×10^{-9} M或以下、或大约 6.5×10^{-9} M或以下的K_D。

[0019] 在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括V_K-区多肽和V_H-区多肽,所述V_K-区多肽选自SEQ ID NO:16(TA101-1Fab')、SEQ ID NO:18(TA 102-4Fab')和SEQ ID NO:20(TA103-2Fab'),所述V_H-区多肽选自SEQ ID NO:35(TA101-1Fab')、SEQ ID NO:36(TA102-4Fab')和SEQ ID NO:37(TA103-2Fab')。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:16(TA101-1Fab')的V_K-区多肽和含有SEQ ID NO:35(TA101-1Fab')的V_H-区多肽。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:18(TA102-4Fab')的V_K-区多肽和含有SEQ ID NO:36(TA102-4Fab')的V_H-区多肽。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:20(TA103-2Fab')的V_K-区多肽和含有SEQ ID NO:37(TA103-2Fab')的V_H-区多肽。

[0020] 在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括选自SEQ ID NO:14(TA10参考抗体)、SEQ ID NO:16(TA101-1Fab')、SEQ ID NO:18(TA102-4Fab')和SEQ ID NO:20(TA103-2Fab')的V_K-区多肽,其中V_K-区多肽的氨基酸序列与最接近的人种系V_K-区多肽具有大约80%的同一性,与最接近的人种系V_K-区多肽具有大约85%的同一性,与最接近的人种系V_K-区多肽具有大约90%的同一性,或与最接近的人种系V_K-区多肽具有大约95%的同一性。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括选自SEQ ID NO:15(TA10参考抗体)、SEQ ID NO:17(TA101-1Fab')、SEQ ID NO:19(TA102-4 Fab')、和SEQ ID NO:21(TA103-2Fab')的V_H-区多肽,其中V_H-区多肽的氨基酸序列与最接近的人种系V_H-区多肽具有大约80%的同一性,与最接近的人种系V_H-区多肽具有大约85%的同一性,与最接近的人种系V_H-区多肽具有大约90%的同一性,或与最接近的人种系V_H-区多肽具有大约95%的同一性。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括V_K-区多肽和V_H-区多肽,所述V_K-区多肽选自SEQ ID NO:14(TA10参考抗体)、SEQ ID NO:16(TA101-1Fab')、SEQ ID NO:18(TA102-4Fab')和SEQ ID NO:20(TA 103-2Fab'),所述V_H-区多肽选自SEQ ID NO:15(TA10参考抗体)、SEQ ID NO:17(TA101-1Fab')、SEQ ID NO:19(TA102-4Fab')和SEQ ID NO:21(TA 103-2Fab'),其中V_K-区多肽的氨基酸序列和V_H-区多肽的氨基酸序列与最接近的人种系V_K-区多肽和最接近的人种系V_H-区多肽具有大约80%的同一性,与最接近的人种系V_K-区多肽和最接近的人种系V_H-区多肽具有大约85%的同一性,与最接近的人种系V_K-区多肽和最接近的人种系V_H-区多肽具有大约90%的同一性,或与最接近的人种系V_K-区多肽和最接近的人种系V_H-区多肽具有大约95%的同一性。

[0021] 在相关方面,本发明提供了源自鼠单克隆抗体1379("mAb 1379")的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段,其在第三个短共有重复序列("SCR")结构域之内选择性地与B因子结合,并防止C3bBb复合物的形成,其中人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段具有大约 1.0×10^{-8} M至大约 1.0×10^{-10} M之间的K_D。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或

其抗原结合片段包括 V_k -区,所述 V_k -区包含源自第三互补决定区(“CDR3”)和第四构架区(“FR4”)的结合特异性决定簇(binding specificity determinant(“BSD”)),所述第三互补决定区(“CDR3”)和第四构架区(“FR4”)选自SEQ ID NO:22(TA 10参考抗体)、SEQ ID NO:24(TA101-1Fab’)、SEQ ID NO:26(TA 102-4Fab’)和SEQ ID NO:28(TA 103-2Fab’),人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段的 V_H -区包括源自CDR3-FR4区的BSD,所述CDR3-FR4区选自SEQ ID NO:23(TA10参考抗体)、SEQ ID NO:25(TA101-1Fab’)、SEQ ID NO:27(TA 102-4Fab’)和SEQ ID NO:29(TA 103-2Fab’)。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:22(TA10参考抗体)的 V_k -区BSD多肽和含有SEQ ID NO:23(TA10参考抗体)的 V_H -区BSD多肽,并且具有 $6.55 \times 10^{-9}M$ 的 K_D 。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:24(TA101-1Fab’)的 V_k -区BSD多肽和含有SEQ ID NO:25(TA101-1Fab’)的 V_H -区BSD多肽,并且具有 $4.53 \times 10^{-9}M$ 的 K_D 。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:26(TA102-4Fab’)的 V_k -区BSD多肽和含有SEQ ID NO:27(TA102-4Fab’)的 V_H -区BSD多肽,并且具有 $5.40 \times 10^{-9}M$ 的 K_D 。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:28(TA103-2Fab’)的 V_k -区BSD多肽和含有SEQ ID NO:29(TA103-2Fab’)的 V_H -区BSD多肽,并且具有 $3.73 \times 10^{-9}M$ 的 K_D 。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括选自Fab’、(Fab’)₂、Fv、scFv和双抗体的抗原结合片段。在某些实施方式中,人工程化抗B-因子抗体的抗原结合片段是Fab’。

[0022] 在另一方面,本发明提供了衍生自鼠单克隆抗体1379(“mAb 1379”)的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段,其在第三个短共有重复序列(“SCR”)结构域之内选择性地与B因子结合,并防止包含 V_k -区多肽和 V_H -区多肽的C3bBb复合物的形成,所述 V_k -区多肽选自SEQ ID NO:14(TA10参考抗体)、SEQ ID NO:16(TA101-1Fab’)、SEQ ID NO:18(TA102-4Fab’)和SEQ ID NO:20(TA103-2Fab’),所述 V_H -区多肽选自SEQ ID NO:15(TA10参考抗体)、SEQ ID NO:17(TA101-1Fab’)、SEQ ID NO:19(TA102-4Fab’)和SEQ ID NO:21(TA103-2Fab’)。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:14(TA101参考抗体)的 V_k -区多肽和含有SEQ ID NO:15(TA10参考抗体)的 V_H -区多肽。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:16(TA101-1Fab’)的 V_k -区多肽和含有SEQ ID NO:17(TA101-1Fab’)的 V_H -区多肽。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:18(TA 102-4Fab’)的 V_k -区多肽和含有SEQ ID NO:19(TA 102-4Fab’)的 V_H -区多肽。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:20(TA 103-2Fab’)的 V_k -区多肽和含有SEQ ID NO:21(TA103-2Fab’)的 V_H -区多肽。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括选自SEQ ID NO:14(TA 10参考抗体)、SEQ ID NO:16(TA101-1Fab’)、SEQ ID NO:18(TA 102-4Fab’)和SEQ ID NO:20(TA 103-2Fab’)的 V_k -区多肽。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括选自SEQ ID NO:15(TA10参考抗体)、SEQ ID NO:17(TA101-1Fab’)、SEQ ID NO:19(TA 102-4Fab’)和SEQ ID NO:21(TA 103-2Fab’)的 V_H -区多肽。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括选自Fab’、(Fab’)₂、Fv、scFv和双抗体的抗原结合片段。在某些实施方式中,人工程化抗B-因子抗体的抗原结合片段是Fab’。

[0023] 在另一方面,本发明提供了衍生自鼠单克隆抗体1379(“mAb 1379”)的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段,其在第三短共有重复序列(“SCR”)结构域之内选择性地与B因子结合,并防止C3bBb复合物的形成,其中人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段的V_K-区包括源自第三互补决定区(“CDR3”)和第四构架区(“FR4”)的结合特异性决定簇(“BSD”),所述第三互补决定区(“CDR3”)和第四构架区(“FR4”)选自SEQ ID NO:22(TA10参考抗体)、SEQ ID NO:24(TA101-1Fab’)、SEQ ID NO:26(TA102-4Fab’)和SEQ ID NO:28(TA 103-2Fab’),人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段的V_H-区包括源自CDR3-FR4区的BSD,所述CDR3-FR4区选自SEQ ID NO:23(TA10参考抗体)、SEQ ID NO:25(TA101-1Fab’)、SEQ ID NO:27(TA102-4Fab’)和SEQ ID NO:29(TA103-2Fab’)。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:22(TA10参考抗体)的V_K-区BSD多肽和含有SEQ ID NO:23(TA10参考抗体)的V_H-区BSD多肽。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:24(TA101-1Fab’)的V_K-区BSD多肽和含有SEQ ID NO:25(TA101-1Fab’)的V_H-区BSD多肽。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:26(TA 102-4Fab’)的V_K-区BSD多肽和含有SEQ ID NO:27(TA 102-4Fab’)的V_H-区BSD多肽。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括含有SEQ ID NO:28(TA103-2Fab’)的V_K-区BSD多肽和含有SEQ ID NO:29(TA 103-2Fab’)的V_H-区BSD多肽。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段的V_K-区包括源自第三互补决定区(“CDR3”)和第四构架区(“FR4”)的结合特异性决定簇(“BSD”),所述第三互补决定区(“CDR3”)和第四构架区(“FR4”)选自SEQ ID NO:22(TA10参考抗体)、SEQ ID NO:24(TA101-1Fab’)、SEQ ID NO:26(TA102-4Fab’)和SEQ ID NO:28(TA 103-2Fab’)。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段的V_H-区包括源自CDR3-FR4区的BSD,所述CDR3-FR4区选自SEQ ID NO:23(TA10参考抗体)、SEQ ID NO:25(TA101-1Fab’)、SEQ ID NO:27(TA102-4Fab’)和SEQ ID NO:29(TA103-2Fab’)。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段包括选自Fab’、(Fab’)₂、Fv、scFv和双抗体的抗原结合片段。在某些实施方式中,人工程化抗B-因子抗体的抗原结合片段是Fab’。

[0024] 在另一方面,本发明提供了治疗补体旁路的活化在其中起作用的疾病或病症的方法,包括给患有这种疾病或病症或处于发展这种疾病或病症的危险中的个体施用源自鼠单克隆抗体1379(“mAb 1379”)的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段,其在第三个短共有重复序列(“SCR”)结构域中选择性与B因子结合并且防止C3bBb复合物的形成,其中所述人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段具有大约 1.0×10^{-8} M至大约 1.0×10^{-10} M的平衡解离常数(“K_d”)。在某些实施方式中,所述疾病或病症是气道高反应性(“AHR”)和气道炎症。在某些实施方式中,人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段的任一种以与该抗体或其抗原结合片段施用之前相比可有效地显著(可测量地)降低动物中的AHR的量被施用给个体。在某些实施方式中,AHR或气道炎症与选自下列的疾病有关:哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、过敏性支气管肺曲霉病、超敏感性肺炎、嗜酸性细胞肺炎、肺气肿、支气管炎、过敏性支气管炎支气管扩张、囊性纤维化、肺结核、超敏感性肺炎、职业性哮喘、结节病、反应性气道疾病综合征、间质性肺病、嗜酸细胞增多综合征、鼻炎、鼻窦炎、运动诱发的哮喘、污染诱发的哮喘、咳嗽变异性哮喘(cough variant asthma)、寄生性肺病、呼吸道合胞病毒(“RSV”)感染、副流行性感冒病毒(“PIV”)感染、鼻病毒(“RV”)感染和腺病毒感染。在某些实施方式中,AHR或

气道炎症与过敏性炎症、哮喘或COPD有关。

[0025] 在另一方面,本发明提供了抑制个体中的补体旁路活化的方法,所述个体患有这样的状况或疾病,或者处于发展这样的状况或疾病的危险中,其中补体旁路的活化促进状况或疾病,恶化至少一种所述状况或疾病的症状,或引起所述状况或疾病,所述方法包括将本文公开的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段的任一种施用给需要其的个体。

[0026] 在另一方面,本发明提供了组合物,所述组合物包含有效量的本文公开的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体。在某些实施方式中,药学上可接受的载体选自干的、可分散粉末;无水乙醇;小胶囊;脂质体;雾化喷雾剂;和可注射的赋形剂。

[0027] 附图简述

[0028] 图1是琼脂糖凝胶,示出了使用分离自产生mAb 1379的杂交瘤的mRNA制备的第一链cDNA模板,用简并的V-区特异引物对产生的双链cDNA产物。

[0029] 图2是从克隆自产生mAb 1379的杂交瘤细胞系的V_H和V_KcDNA序列衍生的氨基酸序列的比较。

[0030] 图3是衍生自克隆的V_H和V_K cDNA序列的氨基端氨基酸序列与从mAb 1379测定的氨基端氨基酸序列的比较。

[0031] 图4是克隆的Fab' TA003和衍生自木瓜蛋白酶消化的mAb 1379的Fab'之间的B因子结合的比较。

[0032] 图5示出了Fab'片段与重组人B因子结合的动力学,用FortéBio Octet系统通过生物层干涉度量学法(bio-layer interferometry)分析。

[0033] 图6是衍生自人工程化抗体分离株TA101-1、TA102-4和TA103-2的序列的氨基酸序列与来自参考抗体TA10以及来自最接近的人种系轻链和重链可变结构域基因(“V_L-”和“V_H-基因”)和连接区段(“J-区段”)(人V_H102/J_H4和V_KIV-B3/J_K2)的对应序列的比较。

[0034] 发明详述

[0035] 选择性结合补体B因子并选择性抑制补体旁路活化的人工程化抗B因子抗体或其抗原结合片段可以被用于治疗任何涉及动物包括人的补体旁路的疾病或病症。尤其是,这种抗体或其抗原结合片段可以用于治疗动物包括人的补体旁路活化在其中发挥作用的任何疾病或病症。这样的疾病或病症包括,例如,过敏性哮喘及伴随的气道炎症和呼吸道高反应性(“AHR”)、慢性阻塞性肺病(“COPD”)、过敏性支气管肺曲霉病、超敏感性肺炎、嗜酸性细胞肺炎、肺气肿、支气管炎、过敏性支气管炎、支气管扩张、囊性纤维化、肺结核、超敏感性肺炎、职业性哮喘、结节病、反应性气道疾病综合征、间质性肺病、嗜酸细胞增多综合征、鼻炎、鼻窦炎、运动诱发的哮喘、污染诱发的哮喘、咳嗽变异性哮喘、寄生性肺病、呼吸道合胞病毒(“RSV”)感染、副流行性感冒病毒(“PIV”)感染、鼻病毒(“RV”)感染、腺病毒感染和缺血再灌注损伤。参见,例如,美国专利公开号US 2005/0260198 A1,其通过引用并入本文。

[0036] 过敏性哮喘是一种常见的与气道炎症和AHR相关的综合征。在患有过敏性哮喘的患者中,暴露于吸入的变应原可导致AHR和呼吸道炎症的增加。研究已经显示,增加水平的生物活性片段来源于补体C3、C4和C5蛋白家族,特别是支气管肺泡灌洗(“BAL”)液中的C3a和C5a。这暗示在这些患者中,补体途径通过变应原诱导机制的活化发生在变应原暴露之后的肺中。动物模型已经提供了对于补体在过敏性气道疾病的发展中的作用的进一步观察。C3

或C3a受体缺陷的动物显示出受到保护而不发展变应原诱导的气道疾病。参见例如美国专利公开号US2005/0260198 A1,其通过引用并入本文。

[0037] 定义

[0038] 如在此使用的,术语“抗体”或“免疫球蛋白”是指蛋白质的免疫球蛋白(“Ig”)超家族的糖蛋白。抗体或免疫球蛋白(“Ig”)分子是四聚体,包括两个同样的轻链多肽和两个同样的重链多肽(术语“轻链多肽”和“轻链”或“重链多肽”和“重链”在此可交互使用,用来描述Ig分子的多肽)。两个重链通过二硫键连接在一起,而每一重链通过一个二硫键连接到轻链。每一全长Ig分子包含至少两个特异靶或抗原结合位点。

[0039] 免疫系统产生几种不同类别的Ig分子(“同种型”),包括IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,每一种通过存在的特定种类的重链多肽来区分:在IgA中发现的 α (“ α ”),在IgD中发现的 δ (“ δ ”),在IgE中发现的 ϵ (“ ϵ ”),在IgG中发现的 γ (“ γ ”)和在IgM中发现的 μ (“ μ ”)。在IgG中发现了至少有5种不同的 γ 重链多肽(“同种型”)。相反的是,只有轻链多肽同种型,称为 κ (“ κ ”)和 λ (“ λ ”)链。抗体同种型的区别特征通过重链的恒定区的序列来定义。

[0040] IgG分子包括通过二硫键结合在一起的两个轻链(κ 或 λ 形式)和两个重链(γ 形式)。 κ 和 λ 形式的IgG轻链都包括相对可变的氨基酸序列的结构域——称为可变区(不同地称为“V_L-,”“V_K-,”或“V _{λ} -区”),和相对保守的氨基酸序列的结构域——称为恒定区(“C_L-区”)。类似地,每一IgG重链包含可变区(“V_H-区”)和一个或多个保守区:完整的IgG重链包含三个恒定区(“C_{H1}-,”“C_{H2}-,”和“C_{H3}-区”)和铰链区。在每一V_L-或V_H-区内,高变区,也称为互补决定区(“CDR”),散布在相对保守的框架区(“FR”)之间。一般而言,轻链或重链多肽的可变区包含沿着多肽以下列顺序排列的4个FR和三个CDR: NH₂-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-COOH。CDR和FR一起决定了IgG结合位点的三维结构,并因此决定了IgG分子与其结合的特异靶蛋白或抗原。每一IgG分子是二聚体,能够结合两个抗原分子。用蛋白酶木瓜蛋白酶切割二聚体IgG产生两个相同的抗原结合片段(“Fab”)和一个“FC”片段,如此命名是因为容易明确化。

[0041] 如此处使用的,术语“抗原结合片段”是指保留特异结合其相关抗原能力的抗体片段或免疫球蛋白分子。抗原结合片段一般缺少部分或全部存在于全长抗体或Ig分子中一个或多个功能结构域,如赋予固定补体并刺激抗体依赖型细胞介导的毒性(“ADCC”)的能力的那些结构域。可以通过例如用蛋白酶如木瓜蛋白酶(其产生两个同样的单价抗原结合片段(“Fab”),所述单价抗原结合片段包括抗体轻链的可变区和恒定区以及抗体重链的可变区和第一恒定区)或胃蛋白酶(其产生单价的二价抗原结合片段(“(Fab')₂”),所述二价抗原结合片段包含在其羧基端附近共价连接的一对Fab'片段)消化,从全长抗体分离物制备抗原结合片段。

[0042] 可以采用标准重组DNA方法,产生其它的抗原结合片段,如“Fv”片段、单链Fv抗体(“scFv”)、双特异性抗体、双抗体、人源化或人工程化抗体和类似物。“Fv”片段是包含完全的抗原识别位点和结合位点的抗体片段,包括一个V_H-区和一个V_L-区的二聚体。“scFv”抗体片段在单一的多肽链内包括抗体的V_H-区和一个V_L-区。“双抗体”是具有两个抗原结合位点的小抗体片段,包括与同一多肽内的轻链可变区连接的重链可变区。通过使用太短而不允许同一多肽的V_H-区和V_L-区配对的连接体,促使所述结构域与第二多肽的互补结构域配对,从而产生两个抗原结合位点。

[0043] 如在此使用的,术语“结合特异性决定簇”或“BSD”是指介导具体Ig分子的抗原结合专一性的IgG VL或VH多肽的第三互补决定区(“CDR3”)和第四构架区(“FR4”)的全部或部分氨基酸序列。BSD在重链和轻链对中发挥作用,以使特定的BSD包含与来自关联VH-区的CDR3-FR4的氨基酸序列配对、来自VL区的CDR3-FR4的氨基酸序列。

[0044] 如在此使用的,术语“表位”是指较大分子上,如特定的蛋白质、多肽或抗原(即,B因子)上的位点,其中抗体、免疫球蛋白或其抗原结合片段与该较大分子结合,并且将产生针对该较大分子的抗体。术语“表位”可以与特定蛋白质、多肽或抗原的术语“抗原决定簇”、“抗体结合位点”或“保守的结合表面”交互使用。更具体地,表位可以通过参与抗体结合的氨基酸残基和通过它们在三维空间的构象(例如,构象表位或保守的结合表面)来限定。表位可以被包括在如大约4-6个氨基酸残基一样小的肽中,或可以被包括在蛋白质的较大片段中,并且在参考表位的三维结构,尤其是关于抗体结合表位时,不需要由连续的氨基酸残基组成。抗体结合表位常常是构象表位,而不是序列或线性表位,或者,换言之,由氨基酸残基限定的表位以三维形式排列在抗体与之结合的蛋白质或多肽的表面上。如上面所提到的,构象表位不是由连续的氨基酸残基序列组成,而是相反地,所述残基或许在蛋白质一级序列中被广泛分隔开,而在三维空间中通过蛋白质天然构象折叠的方式汇聚在一起,形成结合表面。

[0045] 本文描述的被mAb1379识别、并为人工程化变体所共有的表位为不是线性表位的构象表位,其位于B因子的第三SCR结构域部分的三维结构内。见,例如,US 2005/0260198 A1,其通过引用以其全部并入本文。人B因子表达为764个氨基酸的前蛋白原,其包含横跨其氨基端的氨基酸1-25的二十五(25)个氨基酸信号肽。人B因子前蛋白原的氨基酸序列可在NCBI数据库登录号P00751找到。成熟的人B因子包括缺少25个氨基酸信号肽的登录号P00751的氨基酸序列(即,SEQ ID NO:30)。成熟的人B因子的第三SCR结构域从SEQ ID NO:30的位置137附近延伸到位置195附近。包含该表位的部分是B因子的三维结构,其由基本上全部的(例如,至少大约90%的)SEQ ID NO:30的氨基酸位置Ala137-Ser192,或非人类B因子序列的等同位置来限定,此时这样的序列按照其在天然全长的B因子序列中出现的构象排列。

[0046] 本文描述的鼠mAb 1379和工程化变体结合到第三SCR结构域部分之内或包含第三结构域部分的表位或保守结合表面,所述第三SCR结构域部分包含人B因子表位,所述人B因子包括至少一部分含有成熟人B因子蛋白(SEQ ID NO:30)的大约Tyr139位至大约Ser185位的序列;结合到包括包含成熟人B因子蛋白(SEQ ID NO:30)的大约Tyr139位至大约Ser141位的序列的至少一部分的人B因子表位;结合到包括包含相对于成熟人B因子蛋白(SEQ ID NO:30)的大约Glu182位至大约Ser185位的序列的至少一部分的人B因子表位;结合到包括包含非人B因子序列中任何一个或多个下列位置或它们的等同位置的人B因子(SEQ ID NO:30)的至少一部分的B因子表位:Ala137、Tyr139、Cys 140、Ser141、Glu182、Gly184或Ser185;或结合到包括相对于非人动物种类的等同位置的至少一部分的B因子表位。在另一方面,所述表位在B因子的第三SCR结构域的部分的一部分之内或包含在B因子的第三SCR结构域的部分的一部分,所述B因子的第三SCR结构域的部分的一部分包括全部或基本上全部的(至少5个、6个或7个)SEQ ID NO:30的下列氨基酸位置,或其非人B因子序列中的等同位置:Ala137、Tyr139、Ser141、Glu182、Ser185、Thr189、Glu190和Ser192。

[0047] 本领域技术人员能够容易地将人B因子的序列与来自另一动物物种的B因子序列进行比对,并且确定SCR区的位置和与上面的氨基酸位置对应的第三SCR区的特定部分。例如,采用BLAST2序列,可以将两个特定序列相互比对,如在Tatusova和Madden,(1999),“Blast 2sequences—a new tool for comparing protein and nucleotide sequences”, FEMS Microbiol.Lett.174:247–250中所述,其通过引用以其全部并入本文。

[0048] 如此处使用的,术语“选择性结合”是指一种蛋白质与另一种(例如,抗体,其抗原结合片段,或抗原的结合伴侣)的特异结合,其中结合水平,如通过任何标准分析(例如,免疫分析)所测量的,在统计学上显著高于所述分析的背景对照。例如,当进行免疫分析时,对照典型地包括仅含有抗体或抗原结合片段(即,没有抗原)的反应孔或管,其中根据没有抗原存在下抗体或其抗原结合片段的反应性的量(例如,与孔或管的非特异性结合)被认为是背景信号。通过使用本领域内的多种标准方法,可以测量结合,所述方法包括但不限于,蛋白质印迹(免疫印迹,Western blot)、免疫印迹(immunoblot)、酶联免疫吸附测定(“ELISA”)、放射性免疫测定(“RIA”)、免疫沉淀、表面等离子体共振、化学发光、荧光偏振(fluorescent polarization)、磷光、免疫组织活性分析、基质辅助激光解吸/电离时间飞行(“MALDI-TOF”)质谱、微细胞术(microcytometry)、微阵列、显微术、荧光激活细胞分选术(“FACS”)和流式细胞术。

[0049] 如此处使用的,“治疗”或“去治疗”疾病被定义为与其它治疗剂或不与其它治疗剂一起施用如上所述的mAb 1379的人工程化变体,如TA101-1、TA102-4和TA103-2,或其抗原结合片段,从而减轻、改善、稳定、逆转、减缓、延迟、防止、减少或消除疾病或疾病的症状,或用来阻止或停止疾病或疾病症状的进程。组合物的“有效量”是足以治疗疾病的量。

[0050] 如此处使用的,“抑制”个体中补体旁路是指抑制作为补体旁路一部分的至少一种蛋白质的表达和/或生物学活性。这样的蛋白质包括但不限于,B因子、D因子或备解素。“选择性”抑制补体旁路表示本发明的方法优先或专门抑制补体旁路,但不抑制或至少没有实质上抑制补体活化的其它途径,所述其它途径包括经典的补体途径或凝集素途径。例如,本发明的人工程化B因子抗体或其抗原结合片段是选择性抑制补体旁路的药剂的一个实例。该定义应用到本文描述的其中补体旁路被选择性抑制的其它方法中。

[0051] “个体”是脊椎动物,优选的是哺乳动物,更优选的是人。哺乳动物包括但不限于,农场动物、运动用动物(sport animal)、宠物、灵长类动物、小鼠和大鼠。在一些实施方式中,个体是人。在一些实施方式中,个体是除了人之外的个体。在一些实施方式中,个体是用于研究涉及补体旁路的疾病的动物模型。对治疗依从的个体包括目前没有症状但是处于发展其中补体旁路起作用的症状性病症的危险中,或处于发展其中补体旁路活化起作用的症状性病症的危险中的那些个体。

[0052] 一般提及“该组合物”或“组合物”包括并且可适用于本发明的组合物。

[0053] 如本文使用的,除非另外明确指明,单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数。例如,术语“一V_H-区”包括一个或多个V_H-区。

[0054] 对本文的“大约”数值或参数参考,包括并且描述了涉及该数值或参数本身的实施方式。例如,涉及“大约X”的描述包括“X”的描述。

[0055] 应理解在此描述的本发明的各个方面和实施方式包括“由……组成”和/或“本质上由……组成”的方面和实施方式。

[0056] 1. 导言(序言)

[0057] 抗体Humaneering™产生了具有与人种系序列接近的可变区(“V-区”)序列、同时保留参考抗体的结合特异性和亲和力的工程化人抗体。参见,例如,美国专利公开号US 2005/0255552 A1,和美国专利公开号US 2006/0134098 A1。该方法鉴定了确定来自参考抗体的V-区的抗原结合特异性所需要的最小序列信息,并且将该信息传输给部分人V-区基因序列文库,以产生人抗体V-区的表位集中文库(epitope-focused library)。采用基于微生物的分泌系统,所述文库的成员被表达为抗体Fab’片段。然后采用菌落转移结合分析,筛选所述文库,以获得抗原结合Fab’片段。进一步表征阳性克隆以鉴定对靶抗原具有最高结合亲和力的那些克隆。得到的工程化人抗体Fab’片段保留了亲本鼠抗体的结合特异性,并且优选地对抗原具有与亲本抗体等价的或比亲本抗体更高的结合亲和力。优选地,与最接近的人种系抗体基因相比,工程化Fab’片段也具有高度氨基酸序列同一性的重链和轻链V区。

[0058] 产生表位集中文库(epitope-focused library)所需要的最小结合特异性决定簇(“BSD”)典型地由抗体重链的CDR3(“CDR_H3”)内的序列和抗体轻链的CDR3(“CDR_L3”)内的序列来代表。在一些情况下,从人V区段序列(所述“V区段”包含FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3)构建表位集中文库,所述V区段序列被连接到含有BSD与人种系连接区段(“J-区段”)序列的CDR3和FR4的连接处的独特区域。参见美国专利公开号US 2005/0255552 A1。可选地,人V-区段文库可以通过连续的盒式置换来产生,在盒式置换中,只有部分鼠V-区段最初由人序列文库置换。在残余鼠序列的环境中支持抗原结合的鉴定的人的“盒”然后在第二轮文库筛选中被重组,以产生完全的人V-区段。参见美国专利公开号US 2006/0134098A1。在每一种情况下,含有来自参考抗体特异性决定簇的成对的重链和轻链CDR3-FR4片段被用于限制结合特异性,以使得自所述文库的抗原结合Fab’片段保留起始抗体(即,mAb 1379)的表位特异性。

[0059] 为了鉴定具有最佳结合动力学的抗体,在文库构建期间额外的成熟变化可以被引入到每一链的CDR3区内。

[0060] 得到的人工程化抗体具有源自人序列文库的V-区段序列,保留了来自V_L和V_H链CDR3区内的短BSD序列,并且具有人种系FR4区。

[0061] 盒式置换被成功用于mAb 1379的人工程化。通过这种方法鉴定了许多对B因子具有高亲和力的Fab’片段。已经鉴定了三种人工程化的Fab’片段,其对B因子的亲和力比参考鼠抗体(即,mAb 1379)对B因子的亲和力高。

[0062] 2. 方法

[0063] 2.1 从产生mAb 1379的杂交瘤克隆鼠V-区

[0064] 如下从产生mAb 1379的杂交瘤克隆鼠V-区。首先,根据已经建立的程序培养杂交瘤细胞。然后收集细胞,并且通过本领域技术人员已知的标准程序从所述细胞沉淀(细胞团)提取信使RNA(“mRNA”)。根据本领域技术人员已知的标准方法,使用逆转录酶,通过用多脱氧胸腺嘧啶(“多-dT”)引物延伸的引物延伸从纯化的mRNA中产生第一互补DNA链(“cDNA”)。然后,根据标准程序,采用简并引物,使用第一cDNA链作为模板,用于抗体V-区序列的扩增,如由Chardès, T., 等人,“Efficient amplification and direct sequencing of mouse variable regions from any immunoglobulin gene family,”FEBS Lett.452(3):386-394(1999)详细描述,其通过引用并入本文。对来自重链可变区(“V_H”)和轻链可变区V-κ(“V_κ”)区的cDNA进行测序并且检查其与由TAligen产生的氨基端肽序列数据的同

一性。V-区被克隆为Fab'片段并且在通过专有的KaloBios表达载体在大肠杆菌("E.coli")中表达。在根据标准方法进行的酶联免疫吸附测定("ELISA")中,纯化的Fab'蛋白显示出结合纯化的B因子蛋白。

[0065] 2.2Fab'纯化

[0066] 采用专有的KaloBios蛋白质表达载体,在大肠杆菌中表达Fab'片段。在37℃,在2×YT培养基(每升蒸馏去离子水("ddH₂O")中16g Bacto-胰蛋白胨,10g Bacto-酵母提取物,和5g NaCl)中培养细菌至在600nm波长测量为0.6吸光度单位的光密度。在33℃,使用异丙基-β-硫代半乳糖苷("IPTG")诱导蛋白质表达3小时。使用本领域技术人员已知的方法,根据实践经验确定获得期望蛋白质最佳表达的适当IPTG浓度,典型地,所述适当IPTG浓度在0.01mM至5.0mM之间变化。根据本领域技术人员已知的标准方法,从周质部分获得装配的Fab'片段并且通过在链球菌蛋白G柱(HiTrapTM Protein G HP柱;购自GE Healthcare, Piscataway, NJ)上的亲和层析纯化。Fab'片段在20mM磷酸钠pH=7.0中结合到所述柱上,在0.1M甘氨酸大约pH=2.0中洗脱,并且立即用适当量的1M Tris-HCl, pH=9.0调节至中和pH(大约7.0),所有操作根据制造商的说明进行。然后,以pH=7.4的磷酸盐缓冲盐水(1×PBS=137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na₂HPO₄和2mMKH₂PO₄;注意PBS没有Ca²⁺和Mg²⁺)对纯化的Fab'片段进行透析。

[0067] 2.3酶联免疫吸附测定("ELISA")

[0068] TAligen提供了3mg纯化的重组人B因子。典型地,在4℃,使50ng纯化的重组B因子吸附到96孔微孔板的孔中过夜。用5%(w/v)粉末状脱脂奶的PBST(137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na₂HPO₄、2mM KH₂PO₄和0.1%(v/v)Tween-20TM)溶液封闭所述板。在1×PBS中稀释纯化的人工程化Fab'片段或参考Fab'("TA10")。50微升的抗体片段被加入到微孔板的每个孔中。在33℃1小时后,用PBST冲洗微孔板的孔三次。接着,50微升在PBST中稀释到0.1ng/ml、与辣根过氧化物酶("HRP")(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)偶联的抗人κ链抗体被加入到每一孔中,并且在33℃将所述板温育40分钟。然后,用PBST洗涤微孔板的孔三次,用1×PBS洗涤1次。然后,将100μl TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)底物(Sigma)加入到每一孔中,并在室温(大约25℃)下将所述板温育大约5分钟。最后,通过加入100μl 0.2N硫酸(H₂SO₄)到每一孔来终止反应。在分光光度计中在450nm的波长下对所述板进行读数。

[0069] 2.4菌落转移结合检测

[0070] 应用包被有重组人B因子的硝酸纤维素滤器(滤膜),筛选人工程化Fab'片段文库,基本上如在美国专利公开号US 2005/0255552 A1的实施例5中所述,其通过引用被并入本文。也参见,美国专利公开号US 2006/0134098 A1。

[0071] 简而言之,抗体文库被转化到合适的细菌宿主中,如大肠杆菌菌株TOP10。转化的细菌细胞被铺到含有2×YT琼脂(每升16g酪蛋白的胰消化产物、10g酵母提取物、5g NaCl和15g琼脂)(DifcoTM, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)和合适的选择剂(即,基于用于构建所述文库的具体蛋白质表达载体所选择的抗生素)的板上。可以调节铺板效率以产生离散的细菌菌落,同时使每个板的菌落数目最大化。在最佳密度下,10cm直径的板将包含大约4000个菌落,15cm直径的板将包含大约10,000个菌落,而25cm直径的板将包含大约50,000个菌落。

[0072] 以根据经验确定的浓度(典型地在0.5μg/ml至20μg/ml之间)用PBS中的抗原(即,

人B因子)预先涂敷8.2cm直径、13.2cm直径或20cm直径的硝酸纤维素滤器(Whatman® Schleicher&Schuell® Protran® BA85硝酸纤维素滤器)(Sigma Aldrich, St. Louis, MO)。涂敷溶液的体积根据滤器的大小而变化,4ml用于8.2cm直径的滤器,8ml用于13.2cm直径的滤器,而20ml用于20cm直径的滤器。在33℃,所述滤器面向下放置在抗原-PBS溶液中2-3小时,偶尔摇动。然后用过量PBS冲洗滤器一次,并且在25℃,用5%(w/v)脱脂干奶粉的PBS溶液封闭2小时,同时摇动。然后排去滤器的水,在PBS+0.1% Tween-20™(“TBST”)中冲洗1次,并且在补充有选择剂(即,适合的抗生素)和转录诱导剂(即, IPTG)的2×YT液体培养基中冲洗2次。然后,排去滤器的水分而并且放置在补充有合适的抗生素和IPTG的2×YT琼脂板(“表达板”)上。

[0073] 合适大小的未涂敷的干的硝酸纤维素滤器面向下放置在含有表达期望的抗体片段群的大肠杆菌文库的板上。一旦所述滤器明显湿润(大约20-30秒钟),快速转移所述滤器并且将菌落面向上放置在表达板上的涂敷的滤器上。标记滤器以显示适当的板和方向,以便于随后的鉴定。

[0074] 涂敷有硝酸纤维素滤器“夹层”的表达板被放置在33℃12-16小时。在该时间期间,表达并分泌抗体片段的细菌菌落——其然后通过含有菌落的第一硝酸纤维素滤器扩散——转移到下方的涂敷抗原的滤器上面。能够结合靶抗原(即,人B因子)的抗体片段被保留在抗原滤器上。

[0075] 用免疫学方法检测结合抗原的抗体片段。简而言之,从表达板取下含有结合抗原的抗体片段的滤器,在PBST中洗涤3次,每次5分钟,并在25℃,在5%(w/v)脱脂干奶粉的PBST溶液中封闭1.5小时。然后保留在滤器上的抗原-抗体片段复合物与合适的初级抗体(例如,偶联到HRP的山羊抗 κ 抗体,和类似物)温育,之后如果有必要,与适当的二抗温育。可以使用其它的标准免疫学检测方法,包括生物素/链霉抗生物素,以及其它检测方法,包括各种荧光标记。然后在PBST中将滤器洗涤4次,每次10分钟,在过氧化物酶底物溶液中温育,并且对光敏感的照相胶片曝光。可选地,各种成像系统可以用于显示阳性菌落,如Typhoon(Amersham Biosciences, GE Healthcare, Piscataway, NJ)或FX-Pro PhosphorImager(Biorad, Hercules, CA)。然后将胶片上的图像与适当的板进行比对,挑取阳性菌落(即,产生能够结合期望抗原(例如,人B因子)的抗体片段的那些菌落),接种到加有选择剂的2×YT培养基中,并且使用基本上相同的程序经随后几轮CLBA进行进一步分析。

[0076] 2.5亲和力测量

[0077] 应用FortéBio Octet生物传感器(FortéBio, Inc., Menlo Park, CA),分析Fab'片段的结合动力学。根据制造商的说明,用EZ-link生物素化系统(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)使重组人B因子生物素化。然后,根据制造商的说明,将抗原偶联到涂敷中性链亲和素(neutravidin)的传感器上(FortéBio, Inc., Menlo Park, CA)。随后采用生物层干涉度量学法分析和制造商提供的软件实时监测Fab'结合。基于测量的缔合常数(“ $K_{\text{结合}}$ ”)和解离常数(“ $K_{\text{解离}}$ ”),计算测试的Fab'片段的抗原结合亲和力。优选的人工程抗体或抗体片段具有与参考抗体(即, mAb 1379)和抗体片段(即, TA10)的平衡解离常数相同或高于参考抗体(即, mAb 1379)和抗体片段(即, TA10)的平衡解离常数的平衡解离常数。

[0078] 结果

[0079] 3.1来自产生mAb1379的杂交瘤的V-区的克隆和表达

[0080] 3.1.1从第一链cDNA扩增V_H和V_K链

[0081] 应用15个V_H和18个V_K引物对,从第一链cDNA扩增抗体轻链(κ 同种型)和重链的可变区。每一V_H引物对包含对已知鼠重链家族特异的15个简并正向引物之一,引物与对来自 γ 重链(即,鼠 γ_1 同种型)的四种共有鼠同种型之一的恒定区特异的适当反向引物配对。参见,例如,Chardès等人,FEBS Lett.452(3):386-394(1999)。每一V_K引物对包含对已知鼠 κ 家族特异的18个简并正向引物之一,所述引物与对来自鼠轻链的 κ 同种型的恒定区特异的反向引物配对。参见,例如,Chardès等人,FEBS Lett.452(3):386-394(1999)。

[0082] 两个引物对产生重链的PCR产物,并且两个引物对产生轻链的PCR产物。虽然简并的正向引物被设计为与每一鼠重链和轻链家族的相对保守信号序列杂交,但不是每个引物对都扩增期望的产物,原因是种系信号序列是不同的。此外,免疫球蛋白基因座经常包含假基因,所述假基因能够产生期望大小但是不编码预测的开放阅读框的产物,如同由V κ 10引物对产生产物的情况(参见,下面第【0065】段)。图1是用溴化乙啶染色的琼脂糖凝胶,显示从第一链cDNA扩增的双链cDNA产物,所述第一链cDNA由分离自产生mAb 1379的杂交瘤的mRNA制备。引物对V κ 4(SEQ ID NO:1(正向引物)和SEQ ID NO:2(反向引物))和V κ 10(SEQ ID NO:3(正向引物)和SEQ ID NO:4(反向引物))从抗体轻链产生期望大小的产物。引物对V_H6(SEQ ID NO:5(正向引物)和SEQ ID NO:6(反向引物))与V_H7(SEQ ID NO:7(正向引物)和SEQ ID NO:8(反向引物))从抗体重链产生期望大小的产物。

[0083] 3.1.2鼠V-区氨基酸序列

[0084] 如上面第【0063】和【0064】段中描述获得V_H和V_KcDNA克隆,并通过标准方法进行测序以证实获得了正确的产物。获得的V-区序列示于图2中。CDR序列用下划线示出。与对应于原始mAb 1379抗体的鼠种系序列不同的两个谷氨酰胺残基以灰色阴影显示。用V_H6(SEQ ID NO:10)和V_H7(SEQ ID NO:11)引物对获得的产物在氨基酸序列上是相同的。从含有使蛋白质开放阅读框中断的重排或移码的cDNA扩增得到V κ 10产物,而结果未示出。V κ 4(SEQ ID NO:9)产物包含期望的开放阅读框。然后选择的鼠V_H克隆之一被连接到人IgG1C_H1区,而鼠V κ 4克隆被连接到人C κ 区,从而制备参考Fab'(即,TA10)。人工程化的Fab'变体也包含人恒定区序列。

[0085] 3.1.3克隆的V-区和由TAligen提供的氨基端氨基酸序列的比较

[0086] 然后mAb 1379的氨基端氨基酸序列与克隆的V_H和V_K序列的相同部分进行比较。图3示出了所述序列的比对部分,首先来自V_H链(上面,比较“1379H”(SEQ ID NO:31)与“TA-V_H6”(SEQ ID NO:33)),然后来自V_H和V_K链(下面,比较“1379L”(SEQ ID NO:32)与“TA-V κ 4”(SEQ ID NO:34))。除了四个残基(以灰色阴影显示)之外,mAb 1379的氨基端序列与克隆的序列是相同的。那些差异由用于获得mAb 1379的氨基端肽序列的Edman-降解反应过程中引入的错误产生。

[0087] 3.1.4通过ELISA确认克隆的V-区的B因子结合活性

[0088] 接着,分析了克隆的V_H和V_K序列结合B因子的能力。克隆的V_H和V_K区在细菌中被表达为Fab'片段,纯化并在稀释ELISA中测试了与B因子的结合。图4将克隆的Fab'TA003的B因子结合与源自mAb 1379的Fab'的B因子结合进行了比较。如所期望地,克隆的Fab'和鼠Fab都产生依赖于抗体和抗原浓度的结合曲线。

[0089] 3.2mAb 1379V-区的人工程化

[0090] 3.2.1文库构建和V-区盒

[0091] 通过将人V-区段文库序列(分离自脾)与含有BSD和人种系J-区段序列的独特CDR3-FR4区连接构建表位集中文库。这些“全长”文库被用作构建“盒”式文库的基础,在所述盒式文库中,只有部分鼠V-区段最初被人序列的文库所替换。通过用FR2区内的重叠共有序列的桥式PCR制备V_H和V_K链的盒。以这种方式,“前端”和“中间”人盒式文库被构建为人V_H1、V_H3和V_KIV同种型。典型地,在“前端”和“中间”人盒式文库之间筛选了大约10,000个独特的Fab'克隆,从而鉴定候选抗体片段库,所述候选抗体片段以至少等于或大于参考抗体或抗体片段(即,mAb 1379或TA10)的结合亲和力的结合亲和力结合期望抗原(即,人B因子)。

[0092] 通过菌落转移结合分析鉴定支持与B因子结合的人“前端”和“中间”盒,并根据ELISA和FortéBio分析中的亲和力进行分级。如前述进行菌落转移结合分析,基本上如在美国专利公开号US 2005/0255552 A1的实施例5中所述,其通过引用被并入本文。然后通过共有FR2序列在第二文库筛选中重组最高亲和力“盒”(优选地具有等于或大于TA10——源自mAb 1379的参考Fab',的抗原结合亲和力)的库,以产生完全的人V区段。

[0093] 在高亲和力、完全人工程化的Fab'片段库鉴定之后,建立亲和力成熟文库。采用简并PCR引物对人工程化Fab'克隆组的共有BSD序进行随机突变,以产生文库。通过菌落转移结合分析筛选这些诱变文库。用ELISA和FortéBio分析按结合亲和力对选择的Fab'片段进行分级。鉴定了与TA10参考Fab'片段相比支持对抗原相等的或改善的结合亲和力的突变。

[0094] 在一些情况下,人工程化过程导致对靶抗原具有相同或非常相似结合亲和力的完全人工程化Fab'片段库的分离。在这种情况下,对Fab'片段库进行测序,并与最接近的人种系V_H-和V_L-(即,V_K-)区序列进行比较,并且选择与人种系具有最高程度的氨基酸序列同一性的人工程化抗体片段,用于进一步分析。与人种系序列的氨基酸序列同一性程度越高,则人工程化抗体或抗体片段的免疫原性将会越小,并且因此,激发免疫或炎症反应或增加已存在的免疫或炎症反应的可能性越低。因为人工程化的mAb 1379变体可以用于治疗其中免疫或炎症反应已经被引发的状况(即,其中补体旁路活化起作用的状态,如气道高反应性和类似的状态),重要的是,人工程化变体的免疫原性被尽可能降低。而且,由于施用蛋白质到肺中(即,通过吸入,如在此考虑的)比其它施用途径更可能诱导免疫反应,所以人工程化抗B因子变体具有最低程度的免疫原性甚至更为重要。

[0095] 因而,期望分离与最接近的人种系序列(对于源自mAb 1379的变体,最接近的人种系序列是V_KIV-B3/J_K2(SEQ ID NO:12)和V_H1-02/J_H4(SEQ ID NO:13))具有最高可能程度的氨基酸序列同一性的人工程化变体。优选地,人工程化变体具有与最接近的人种系V_H-和V_K-区氨基酸序列有至少80%同一性的V_H-和V_K-区氨基酸序列,更优选地,与最接近的人种系V_H-和V_K-区氨基酸序列有至少85%同一性,还更优选地,与最接近的人种系V_H-和V_K-区氨基酸序列有至少90%同一性,甚至更优选地,与最接近的人种系V_H-和V_K-区氨基酸序列有至少95%同一性。

[0096] 优选地,人工程化抗体变体将具有等于或大于参考抗体或抗体片段的结合亲和力,并且将会进一步包括V_H-区和V_K-区,所述V_H-区和V_K-区具有与最接近的人种系序列具有80%的同一性、与最接近的人种系序列具有85%的同一性、与最接近的人种系序列具有90%的同一性或最接近的人种系序列具有95%的同一性的氨基酸序列。然而,人工程化

抗体或抗体片段变体并不总是能够共有这些特征。

[0097] 3.2.2应用FortéBio Octet分析Fab'片段对人B因子的结合亲和力

[0098] 通过菌落转移结合分析分离完全人工程化的Fab'片段,并通过ELISA确定为B因子结合剂(binder)。通过ELISA显示强阳性信号的人工程化Fab'片段被纯化并且与参考Fab'片段TA10——其具有来自mAb 1379的鼠V-区序列——相比较进行进一步表征。通过生物层干涉度量学法,用FortéBio Octet系统分析Fab'片段结合到重组人B因子的动力学,这提供了对蛋白质-蛋白质相互作用的实时无标记监测。图5中示出了代表性动力学分析。表1中示出了测量的缔合常数($K_{\text{结合}}$)和解离常数($K_{\text{解离}}$)以及计算的平衡解离常数($K_D = K_{\text{解离}}/K_{\text{结合}}$)(即,结合亲和力)。

[0099] 表1.人工程化抗体相比于参考抗体的动力学分析

[0100]

示踪 ID	TA102-4	TA103-2	TA10(参考)	TA101-1
浓度 (M)	1×10^{-7}	1×10^{-7}	1×10^{-7}	1×10^{-7}
$K_{\text{解离}}$ (1/sec)	4.37×10^{-3}	2.8×10^{-3}	2.96×10^{-3}	2.33×10^{-3}
$K_{\text{解离}}$ (误差)	1.03×10^{-4}	1.29×10^{-4}	1.07×10^{-4}	1.27×10^{-4}
$K_{\text{结合}}$ (1/M·sec)	8.10×10^{-5}	7.50×10^{-5}	4.52×10^{-5}	5.14×10^{-5}
K_D (M)	5.40×10^{-9}	3.73×10^{-9}	6.55×10^{-9}	4.53×10^{-9}

[0101] 明显地,所有三种人工程化抗体片段具有等于或好于TA10参考抗体片段的平衡解离常数。

[0102] 3.3人工程化Fab'片段的序列分析

[0103] 3.3.1参考Fab'氨基酸序列与人工程化Fab'氨基酸序列的比对

[0104] 在动力学表征之后,对三种人工程化抗体分离物进行测序。将源自抗体分离物TA101-1(SEQ ID NOS:16和17)、TA102-4(SEQ ID NOS:18和19)和TA103-2(SEQ ID NOS:20和21)的 V_K -和 V_H -区序列的氨基酸序列与来自参考抗体TA10(SEQ ID NOS:14和15)和来自最接近的人种系轻链和重链可变结构域基因(“ V_K -”和“ V_H -基因”)以及连接区段(“J-区段”)(人 V_K IV-B3/J K 2(SEQ ID NO:12和 V_H 1-02/J H 4(SEQ ID NO:13))的对应序列进行比较。比对的序列示于图6中。序列CDR1、CDR2和CDR3被框出并且相应地进行了标记。与对应的种系位置(排除CDR3BSD序列)不同的氨基酸残基以灰色阴影示出。以灰色阴影示出并以粗体字的形式显示人工程化变体TA101-1、TA 102-4和TA 103-2的CDR3氨基酸序列的亲和力成熟变化。

[0105] 在某些实施方式中,TA101-1(SEQ ID NO:35)、TA 102-4(SEQ ID NO:36)和TA 103-2(SEQ ID NO:37)的 V_H -区序列被修饰以用谷氨酸(E)残基替换人工程化抗B因子变体的氨基端谷氨酰胺(Q)残基,如在参考抗体(TA10)和原始mAb 1379中发现的。当制造人工程化变体时,这种变化防止了谷氨酰胺(Q)残基的环化作用并且促进产生更均匀的终产物。虽然最接近的人种系基因(V_H 1-02/J H 4(SEQ ID NO:13))在其氨基端也具有谷氨酰胺(Q)残基,但是这种保守的氨基酸置换可能对所述变体的免疫原性具有最小的影响。

[0106] 3.3.2与人种系序列的同一性百分比

[0107] 最后,将源自TA101-1、TA 102-4和TA 103-2分离物和TA10参考抗体的V_H-区和V_K-区氨基酸序列与跨过V-区、不包括CDR3BSD序列的单一人种系抗体序列进行比较。表2示出了各自与种系序列的氨基酸同一性百分比。

[0108] 表2

[0109]

克隆	V _K %同一性 (与 V _K IV 比对)	V _H %同一性 (与 V _H 1-02 比对)	跨过 V 区的总%同一性 (不包括 CDR3)
TA 10 参考	70.4%	84.9%	77.7%
TA 101-1	96.2%	96.3%	96.25%
TA 102-4	97.1%	96.3%	96.7%
TA 103-2	95.3%	96.3%	95.8%

[0110] 明显地,所有三种人工程化Fab'片段的V_K-和V_H-区共有与人种系序列具有高的氨基酸序列同一性,具有大约96%的同一性百分比,与之相比,参考Fab'片段——TA10,具有大约78%的同一性百分比。

[0111] 4. 讨论

[0112] 盒式替换被成功用于mAB 1379的人工程化。分离自人文库的部分V-区盒被重组,以形成重链和轻链各自的最终工程化人V-区。

[0113] 来自Fab'片段克隆的V-区的氨基酸序列被提供在上面。通过对每一Fab'片段的两个V_H盒和两个V_K盒(V_H和V_K多肽各自的“前端”和“中间”盒)进行重组来分离V-区段序列。采用FortéBio Octet生物传感器的动力学分析鉴定了三个Fab'片段(TA101-1、TA 102-4和TA 103-2),其比参考Fab'片段具有更高的结合亲和力。在与参考分子相比较时,该增加的结合亲和力由三种人工程化变体(即,TA101-1、TA 102-4和TA 103-2)中提高的解离速率(off-rate)产生。因而,还可以期望基于增加的解离速率(K_{解离})和/或增加的结合亲和力以及人工程化V_H和V_K多肽与最接近的人种系V_H和V_K序列之间的氨基酸序列同一性百分比,来筛选变体。

[0114] 三种Fab'片段克隆各自具有与人V_H1-02种系基因具有高度氨基酸序列同一性的重链可变区(V_H)。FR_H4区段由人种系J_H4序列提供。

[0115] 轻链V-区段与V_KIV-B3种系基因最接近。FR_L4相同地由人种系J_K2区段提供。人工程化Fab'片段V_H和V_L区显示了与独特CDR3区之外的最接近对应人种系序列盒具有大于96%的氨基酸序列同一性。

[0116] 5. 涉及本发明某些实施方式的制剂、组合物和方法

[0117] 本发明的一个方面总体上涉及用于选择性抑制患有病症或疾病或处于病症或疾病发展危险中的动物体内补体旁路活化的组合物和方法,在所述病症或疾病中,补体旁路的活化促进病症或疾病,恶化所述病症或疾病的至少一种症状,或引起所述病症或疾病。

[0118] 5.1 涉及本发明的某些实施方式的方法

[0119] 本发明的某些实施方式涉及治疗其中补体旁路活化起作用的疾病或病症的方法。这样的方法包括给个体施用如上所述的mAb 1379的人工程化变体,如TA101-1、TA 102-4和

TA 103-2或其抗原结合片段,所述个体患有补体旁路活化在其中起作用的疾病或者处于发展补体旁路活化在其中起作用的疾病的危险中。在一方面,通过选自口、鼻、局部、吸入、气管内、经皮、直肠和肠胃外途径的途径施用人工程化抗体变体及其抗原结合片段。在另一方面,人工程化抗体变体及其抗原结合片段与选自下列的药学上可接受载体一起施用:干的、可分散的粉末;无水乙醇;小胶囊;脂质体;雾状喷雾剂;以及可注射的赋形剂。在另一方面,人工程化抗体变体及其抗原结合片段在选自下列的载体或装置中施用:无水乙醇;干粉吸入系统;超声吸入系统;加压计量吸入器;和计量溶液装置。在另一方面,人工程化抗体变体及其抗原结合片段以有效治疗补体旁路活化在其中起作用的疾病或病症的量施用。仍在另一方面,人工程化抗体变体及其抗原结合片段单独施用,或与选自下列的另一种药剂联合施用:糖皮质激素、 β -激动剂(长效或短效)、白三烯调节剂、抗组胺剂、磷酸二酯酶抑制剂、色甘酸钠、奈多罗米(Nedocromil)、茶碱、细胞因子拮抗剂、细胞因子受体拮抗剂、抗IgE和T细胞功能的抑制剂。

[0120] 本发明的另外的实施方式涉及减少或预防个体中的气道高反应性(AHR)或气道炎症的方法。所述方法包括如上述给个体施用mAb 1379的人工程化变体,如TA101-1、TA 102-4和TA 103-2或其抗原结合片段的步骤,所述个体患有与炎症或气道炎症相关的气道高反应性或处于发展与炎症或气道炎症相关的气道高反应性的危险中。在一方面,mAb 1379的人工程化变体或其抗原结合片段通过选自下列的途径施用:口、鼻、局部、吸入、气管内、经皮、直肠和肠胃外途径。在另一方面,mAb 1379的人工程化变体或其抗原结合片段被施用给动物,施用的量为与施用该抗体或抗原结合片段之前相比,有效可测量地减少个体中的气道高反应性的量。在另一方面,mAb 1379的人工程化变体或其抗原结合片段被施用给个体,施用的量为与患有炎症而没有施用所述抗体或抗原结合片段的个体群体中的气道高反应性水平相比,有效可测量地减少个体中的气道高反应性的量。在另一方面,mAb 1379的人工程化变体或其抗原结合片段与选自下列的药学上可接受载体一起施用:干的、可分散的粉末;无水乙醇;小胶囊;脂质体;雾化喷雾剂;以及可注射的赋形剂。在另一方面,mAb 1379的人工程化变体或其抗原结合片段在选自下列的载体或装置中施用:无水乙醇;干粉吸入系统;超声吸入系统;加压计量吸入器;和计量溶液装置。

[0121] 还在另一方面,mAb 1379的人工程化变体或其抗原结合片段与选自下列的药剂联合施用给个体:糖皮质激素、 β -激动剂(长效或短效)、白三烯调节剂、抗组胺剂、磷酸二酯酶抑制剂、色甘酸钠、奈多罗米、茶碱、细胞因子拮抗剂、细胞因子受体拮抗剂、抗IgE、和T细胞功能的抑制剂。而在另一方面,气道高反应性或气道炎症与选自下列的疾病有关:哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、过敏性支气管肺曲霉病、超敏感性肺炎、嗜酸性细胞肺炎、肺气肿、支气管炎、过敏性支气管炎支气管扩张、囊性纤维化、肺结核、超敏感性肺炎、职业性哮喘、结节病、反应性气道疾病综合征、间质性肺病、嗜酸细胞增多综合征、鼻炎、鼻窦炎、运动诱发的哮喘、污染诱发的哮喘、咳嗽变异性哮喘、寄生性肺病、呼吸道合胞病毒(RSV)感染、副流行性感冒病毒(PIV)感染、鼻病毒(RV)感染和腺病毒感染。在一方面,气道高反应性与过敏性炎症有关。在优选的实施方式中,本发明的方法可以施用给哺乳动物,更优选地,施用给人。

[0122] 本发明的另一实施方式涉及减少或预防个体中的气道高反应性(AHR)或气道炎症的方法。所述方法包括给个体施用可选择性抑制补体旁路的药剂的步骤,所述个体患有与炎症或气道炎症相关的气道高反应性或处于发展与炎症或气道炎症相关的气道高反应性

的危险中。在某些方面,该药剂是mAb 1379的人工程化变体,如TA101-1、TA 102-4和TA 103-2,或其抗原结合片段。

[0123] 5.2涉及本发明的某些实施方式的制剂或组合物

[0124] 本发明的人工程化抗B因子抗体变体的某些实施方式包括含有补体旁路的抑制剂,具体而言,含有如本文所述的补体旁路的选择性抑制剂的制剂或组合物。所述制剂或组合物可以以本文描述的任何方法使用,并且可以与本文描述的任何药剂(例如,本文描述的人工程化B因子抗体变体TA101-1、TA102-4和TA103-2,或其抗原结合片段)一起使用。在一种实施方式中,组合物用于减少或预防动物中的气道高反应性。在另一种实施方式中,组合物用于减少或预防动物中的缺血-再灌注损伤。而在另一实施方式中,所述组合物用于通过选择性抑制补体旁路来治疗或预防病症或疾病。所述制剂包括:(a)如本文所述的补体旁路的抑制剂;和(b)药学上可接受的载体。

[0125] 在一种实施方式中,制剂或组合物可以包括一种或多种额外的剂,如适合减少动物中的炎症的抗炎剂,所述动物患有气道高反应性,具体而言与炎症有关的气道高反应性,或者处于发展气道高反应性,具体而言与炎症有关的气道高反应性的危险之中。抗炎剂可以是适合用于减少患有与气道高反应性有关的炎症状况的患者中的炎症的任何抗炎剂,包括但不限于:糖皮质激素(口服、吸入和注射)、 β -激动剂(长效或短效)、白三烯调节剂(抑制剂或受体拮抗剂)、细胞因子或细胞因子受体拮抗剂、抗IgE抗体、磷酸二酯酶抑制剂、色甘酸钠、奈多罗米、茶碱和T细胞功能的抑制剂。具体而言,用于本制剂的优选抗炎剂包括糖皮质激素、白三烯调节剂和细胞因子或细胞因子受体拮抗剂。

[0126] 在另一实施方式中,所述制剂或组合物可以包括一种或多种额外的剂,如适合预防或减少动物中的缺血-再灌注损伤的额外的剂。这样的剂包括但不限于,抗炎剂或氧化和自由基伤害的抑制剂。

[0127] 在另一实施方式中,所述制剂或组合物可以包括一种或多种额外的剂,如适合用于治疗与补体旁路活化有关的另一种疾病或病症的额外的剂。

[0128] 根据本发明,“药学上可接受的载体”包括药学上可接受的赋形剂和/或药学上可接受的输送载体,其适合用于将制剂或组合物施用到合适的体内位点。合适的体内位点优选地是在其中补体旁路可以被抑制的任何位点。在一个优选的实施方式中,当患者患有气道高反应性和/或气道炎症或者处于发展气道高反应性和/或气道炎症的危险中时,合适的体内位点优选地是在肺组织或气道中。其它优选的体内位点包括其它的组织或器官,在所述组织和器官中,与补体旁路有关的状况可以被集中。在另一优选的实施方式中,合适的体内位点是其中缺血-再灌注损伤发生的任何位点,如在心脏或肺系统、中枢神经系统、肢或趾、内部器官(例如,肺、肝或肠)中,或在任何移植的器官或组织中。优选的药学上可接受的载体能够使用于本发明制剂的剂维持这样的形式——其在所述剂到达患者中的靶位点时,所述剂能够作用于其靶(例如,为补体旁路成分的蛋白质),优选地对患者产生治疗益处。

[0129] 用于本发明的合适赋形剂包括传送或帮助传送但是不特异地将组合物靶向细胞或组织的赋形剂或制剂(本文也称为非靶向载体)。药学上可接受的赋形剂的实例包括但不限于水、磷酸盐缓冲盐水(“PBS”)、林格式液(Ringer's solution)、葡萄糖溶液、含血清溶液、Hank's平衡盐溶液(“HBSS”)和其它的含水生理平衡溶液、油、酯和乙二醇。含水载体可以包含接近接受者的生理状况——例如通过增加化学稳定性和等渗性达到——所需要的

合适的辅助物质。合适的辅助物质包括,例如,醋酸钠、氯化钠、乳酸钠、氯化钾、氯化钙和其它用于产生磷酸盐缓冲液、Tris缓冲液和碳酸氢盐缓冲液的物质。辅助物质也可以包括防腐剂,如乙基汞硫代水杨酸钠、间甲酚或邻甲酚、福尔马林和苯甲醇。本发明的制剂可以通过传统的方法灭菌和/或冻干。

[0130] 一种类型的药学上可接受的载体包括能够将本发明的组合物缓慢释放到动物体内的控释制剂。如本文使用的,控释制剂包括在控释载体中的本发明的药剂。合适的控释载体包括但不限于生物相容性聚合物,其它的聚合物基质、胶囊、微胶囊、微粒、丸制剂、渗透泵、扩散装置、脂质体、脂微球和经皮输送系统。其它合适的载体包括可以与延长待输送剂的半衰期的剂结合或组合的任何载体。这样的载体可以包括任何合适的蛋白质载体或甚至在体内输送时可延长蛋白质的半衰期的融合区段。合适的输送载体之前已经在本文中描述,包括但不限于脂质体、病毒载体或其它的输送载体,包括核酶。天然的含脂类输送载体包括细胞和细胞膜。人工含脂类输送载体包括脂质体和微团(micelle)。如上面讨论的,本发明的输送载体可以被修饰为靶向患者体内的具体位点,从而靶向和在该位点利用抑制剂。合适的修饰包括操作(操纵)输送载体的脂部分的化学式和/或向所述载体引入能够将输送载体特异性靶向优选位点,例如优选的细胞类型的靶向试剂。其他合适的输送载体包括金颗粒、聚-L-赖氨酸/DNA-分子结合物和人工染色体。

[0131] 在一种实施方式中,用于本方法的剂以适合肺或鼻输送的制剂,具体而言,气溶胶输送的制剂——本文也称为气溶胶化制剂——被施用。这种输送途径在预防或抑制患者中的AHR和/或气道炎症的方法中特别有用,但是当需要输送到肺或气道时所述方法可以用于其它状况。此外,这些制剂对于抗体的输送特别有用。这种制剂一般包括载体,并且优选地,包括药学上可接受的载体。根据本发明对气溶胶输送特别有用的载体包括但不限于:无水乙醇;干的、可分散的粉末;小胶囊(例如,微胶囊或微粒);脂质体;可注射的赋形剂;和雾化喷雾剂。用于蛋白质和肽的输送的无水乙醇被描述在例如,Choi等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 98(20):11103-11107(2001)中。适合用于剂的气溶胶化输送的干的、可分散的粉末被详细描述在例如美国专利号6,165,463中,其通过引用以其全部被并入本文(也参见来自Inhale Therapeutic Systems,Inc.,现在是Nektar,and Quadrant Technology的产品)。用于气溶胶的合适的脂质体包括任何脂质体,具体而言,包括小到足够通过本发明的方法中的气溶胶输送的任何脂质体。微胶囊和微粒在本领域内是已知的。例如,Alliance制药公司(Alliance Pharmaceutical Corporation)具有称为PulmoSphere的颗粒工程技术,其中微粒通过专有的喷雾干燥方法制备并且被设计为中空和多孔的。Ventolin的产品由悬浮在CFC基推进剂的混合物中的微粒化沙丁胺醇(自由基(游离碱,free base))颗粒组成。Proventil HFA包含微粒化硫酸沙丁胺醇和小部分乙醇共溶剂,以使稳定油酸的表面活性剂溶解。药物并入到脂质体中对于气溶胶输送具有几个优点。因为脂质体相对不溶,所以一些药物在肺中的停留时间可以被延长,从而增加效力。脂质体也可以首先通过吞噬细胞被摄取,这使得它们特别适合某些药物的输送。用于输送气溶胶化制剂的装置包括但不限于,加压计量吸入器("MDI")、干粉吸入器("DPI")、计量溶液装置("MSI")和超声波吸入器,并且包括为喷雾器和吸入器的装置。各种剂可以用于通过这些装置输送的制剂中,如悬浮辅助剂和增溶剂,其对于蛋白质的输送特别有用(例如,寡聚乳酸、酰胺酸和单功能化的M-PEGS,参见例如McKenzie和Oliver;2000, Formulating Therapeutic Proteins and

Peptides in Pressurized Metered Dose Inhalers For Pulmonary Delivery.3M Health Care Ltd., Morley Street, Loughborough, Leicestershire LE11 1EP, UK)。

[0132] 能够靶向的药学上可接受的载体在此称为“靶向输送载体”。本发明的靶向输送载体能够将制剂——包括抑制剂——输送到患者中的靶位点。“靶位点”是指期望将治疗制剂输送到的患者中的位点。例如，靶位点可以是被本发明的抗体或通过直接注射或使用脂质体、病毒载体或包括核酶在内的其它输送载体输送靶向的任何细胞或组织。本发明的输送载体或抗体可以被修饰以靶向动物中的特定位置，从而在该位置靶向和利用特定化合物、抗体、蛋白质或核酸分子。合适的修饰包括包括操作(操纵)输送载体的脂部分的化学式和/或向所述载体引入能够将输送载体特异性靶向优选位置，例如优选的细胞类型或组织类型的化合物。具体而言，靶向作用(寻靶, targeting)是指通过载体中的化合物与细胞表面上的分子相互作用而使输送载体结合到特定细胞。合适的靶向化合物包括能够选择性(即，特异地)结合特定位置处的另一分子的配体。这种配体的实例包括抗体、抗原、受体和受体配体。特别有用的实例包括与补体途径有关的任何配体(例如，CR2、C3、C3d、C3dg、iC3b、C3b)或与细胞类型、组织类型或待治疗动物体内的位置有关的任何配体。操作输送载体脂部分的化学式可以调节输送载体的细胞外或细胞内靶向作用。例如，可以将化学品加入到脂质体的脂质式(lipid formula)，改变脂质体的脂双层的电荷，以使脂质体与具有特定电荷特性的细胞融合。

[0133] 用于多种施用途径和剂的一种输送载体是脂质体。脂质体能够在动物中保持足够时间的稳定，从而将如本发明中描述的核酸分子或甚至蛋白质或抗体输送到动物的优选位置。根据本发明，脂质体包括能够将如本发明中描述的核酸分子、蛋白质或抗体输送到动物中特定的或选择的位置的脂质组合物。根据本发明的脂质体包括能与靶细胞的质膜融合从而将其内容物输送到细胞中的脂质组合物。与本发明一起使用的合适的脂质体包括任何脂质体。本发明优选的脂质体包括典型地用于，例如，本领域技术人员已知的基因输送方法中的那些脂质体。更优选的脂质体包括具有聚阳离子脂质组合物的脂质体和/或具有与聚乙二醇结合的胆固醇主链的脂质体。可以使用本领域的标准方法实现将脂质体与本发明的核酸分子、蛋白质或抗体复合。

[0134] 按照本发明，施用剂、组合物或制剂的可接受方案，包括施用途径和待施用给动物的剂的有效量的确定，可以由本领域普通技术人员来完成。本发明的剂可以体内或离体(体外)施用。合适的体内施用途径包括，但不限于口、鼻、吸入、局部、气管内、经皮、直肠和肠胃外途径。优选的肠胃外途径可以包括但不限于，皮下、皮内、静脉内、肌肉内和腹膜内途径。优选的局部途径包括通过气溶胶的吸入(即，喷雾)或局部表面施用至动物的皮肤。优选地，通过鼻、吸入、气管内、局部或全身途径(例如，腹膜内、静脉内)施用剂。术语“离体”是指在患者外面进行部分的施用步骤。优选的抗体施用途径包括肠胃外途径和气溶胶/鼻/吸入途径。

[0135] 可以使用本领域的标准方法进行静脉内、腹膜内和肌肉内施用。可以采用本领域内的标准方法进行气溶胶(吸入)输送(参见，例如，Stribling等人，Proc.NatlAcad.Sci.USA 189:11277-11281(1992)，其通过引用以其全部并入本文)。适用于气溶胶输送的载体在上面进行了描述。用于输送气溶胶化制剂的装置包括但不限于加压计量吸入器(“MDI”)、干粉吸入器(“DPI”)和计量溶液装置(“MSI”)，并且包括为喷雾器和

吸入器的装置。口服输送可以通过将本发明的治疗组合物与能够经受住动物消化道内消化酶的降解的载体复合而进行。这种载体的实例包括塑料胶囊或片剂,如本领域已知的那些载体。直接注射技术对于将重组核酸分子施用到可通过手术到达的细胞或组织,并且具体地在身体表面上或身体表面附近的细胞或组织特别有用。靶细胞区域内组合物的局部施用是指将所述组合物注射到距离靶细胞或组织几厘米,并且优选地几毫米远处。

[0136] 用于本文描述的任何方法的优选的药剂——包括蛋白质、小分子和抗体——的单一剂量包括在大约0.01 μ g/kg至大约10mg/kg动物体重之间。更优选的药剂的单一剂量包括在大约1 μ g/kg至大约10mg/kg动物体重之间。甚至更优选的药剂的单一剂量包括在大约5 μ g/kg至大约7mg/kg动物体重之间。甚至更优选的药剂的单一剂量包括在大约10 μ g/kg至大约5mg/kg动物体重之间。特别优选的药剂的单一剂量包括在大约0.01mg/kg至大约1mg/kg动物体重之间,如果所述药剂通过气溶胶输送的话。另一特别优选的药剂的单一剂量包括在大约1mg/kg至大约10mg/kg动物体重之间,如果所述剂通过肠胃外施用的话。

[0137] 在一种实施方式中,用于本文描述的任何方法的本发明的药剂的合适剂量是与没有施用所述药剂的情况相比较,可有效抑制如本文中描述的补体旁路中的至少一种蛋白质(例如,B因子,D因子或备解素(P因子))的表达或活性的剂量。测量蛋白质的表达或生物学活性的方法在本领域内是已知的并且包括,例如,RNA印迹、蛋白质印迹、实施RT-PCR和类似的方法。在另一种实施方式中,本发明的药剂的合适剂量是可测量地抑制本发明的补体旁路的剂量。可以采用本领域内熟知的技术/分析来测量补体的活化及其抑制。例如,技术人员可以进行C3在酵母聚糖A微粒上沉积的体外分析,如在共同未决美国专利公开号US-2005/0260198 A1的实施例中所述,其通过引用被并入本文。技术人员还可以测试所述药剂抑制未被入血清致敏的红细胞溶胞作用的能力。基于这些分析由体外结果外推到体内剂量在本领域普通技术人员的能力之内。

[0138] 在人类中,本领域已知,采用传统的气溶胶输送方法,即使使用吸入器,只有大约10%输送的溶液通常进入内部气道。如果气溶胶化输送通过直接吸入进行,技术人员可以假定大约10%的剂量通过雾化方法施用。最后,采用类比法(alometric scaling),本领域普通技术人员会容易地能将小鼠剂量转换成人剂量。本质上,从小鼠到人的剂量类比基于化合物和小鼠体表面积清除比。 mg/kg 的转化为“未观测到不利事件水平”(“NOEL”)的十二分之一,以获得人剂量的浓度。这种计算假定鼠和人之间的清除(消除)是相同的,其被认为是抗体的情形。

[0139] 因此,优选的抗体的单一剂量包括在大约1ng/kg至大约小于1mg/kg动物体重之间。更优选的抗体的单一剂量包括在大约20ng/kg至大约600 μ g/kg动物体重之间。甚至更优选的抗体的单一剂量,特别是当所述抗体制剂通过雾化输送时,包括在大约20ng/kg至大约600 μ g/kg动物体重之间,并且更优选地,在大约20ng/kg至大约500 μ g/kg之间,更优选地,在大约20ng/kg至大约400 μ g/kg之间,更优选地,在大约20ng/kg至大约300 μ g/kg之间,更优选地,在大约20ng/kg至大约200 μ g/kg之间,并且更优选地,在大约20ng/kg至大约100 μ g/kg之间,并且更优选地,在大约20ng/kg至大约50 μ g/kg动物体重之间。

[0140] 另一优选的抗体单一剂量,特别是当所述抗体制剂通过雾化输送时,包括在大约200ng/kg至大约600 μ g/kg动物体重之间,更优选地,在大约200ng/kg至大约500 μ g/kg之间,更优选地,在大约200ng/kg至大约400 μ g/kg之间,更优选地,在大约200ng/kg至大约300 μ g/

kg之间,更优选地,在大约200ng/kg至大约200μg/kg之间,并且更优选地,在大约200ng/kg至大约100μg/kg之间,并且更优选地,在大约200ng/kg至大约50μg/kg动物体重之间。

[0141] 另一优选的抗体单一剂量,特别是当所述抗体制剂通过从吸入器直接吸入输送时,包括在大约2ng/kg至大约100μg/kg动物体重之间,更优选地,在大约2ng/kg至大约50μg/kg之间,更优选地,在大约2ng/kg至大约10μg/kg之间,更优选地,在大约2ng/kg至大约5μg/kg之间,更优选地,在大约2ng/kg至大约1μg/kg之间,并且更优选地,在大约2ng/kg至大约0.5μg/kg之间,并且更优选地,在大约2ng/kg至大约0.25μg/kg之间,并且更优选地,在大约2ng/kg至大约0.1μg/kg之间动物体重之间。

[0142] 在另一种实施方式中,抗体以每毫升制剂小于大约500μg抗体的剂量施用,优选地,每毫升制剂小于大约250μg抗体,更优选地,每毫升制剂小于大约100μg抗体,更优选地,每毫升制剂小于大约50μg抗体,更优选地,每毫升制剂小于大约40μg抗体,更优选地,每毫升制剂小于大约30μg抗体,更优选地,每毫升制剂小于大约20μg抗体,并且更优选地,每毫升制剂小于大约10μg抗体,甚至更优选地,在每毫升制剂大约5μg抗体至大约10μg抗体之间。

[0143] 更具体地,关于减少或预防气道高反应性和/或气道炎症或与其相关的病症或疾病的方法,施用给动物的抑制剂的合适单一剂量是当在合适的时间段内施用一次或多次时,能够减少或预防动物的气道高反应性和/或气道炎症,或减少动物待治疗疾病的至少一种其它症状(例如,哮喘)的剂量。当患者患有AHR或处于发展AHR的危险中时,合适的剂的单一剂量包括通过加倍激发剂的剂量来改善AHR或改善动物的静态呼吸功能的剂量。

[0144] 根据本发明的方法,施用给动物的抑制AHR的剂的有效量包括能够减少气道高反应性(AHR)或气道炎症而对动物没有毒性的量。对动物有毒性的量包括可引起动物的结构或功能损伤(即,有毒的)的任何量。

[0145] 在本发明的一种实施方式中,在患有AHR的动物中,施用给动物的剂的有效量是与施用所述剂之前相比,可测量地减少动物的AHR的量。在另一实施方式中,施用给动物的剂的有效量是与患有与AHR有关的炎症、所述剂没有被施用在其中的动物群体中的气道AHR水平相比,可测量地减少动物中的AHR的量。所述剂优选地能够减少动物的AHR,即使所述剂在AHR的身体症状开始之后(即,在AHR急性发病之后)被施用。最优选地,所述剂的有效量是将AHR的症状减少这样的点——在所述点在患者体内再也不能检测到AHR——的量。在另一种实施方式中,所述剂的有效量是当所述剂在患者暴露于AHR-激发刺激物如变应原——以在缺少所述剂的情况下足以诱导AHR的方式——之前被施用时,预防或基本上抑制AHR的开始

的量。

[0146] 本领域的技术人员将能够确定被施用给动物的剂的剂量数,这依赖于气道高反应性的程度和AHR为症状的潜在状况以及个体患者对治疗的反应。此外,临床医生将能够确定以有效降低动物的AHR的方式输送所述剂的适当时机。优选地,所述剂在患者暴露于有效诱导AHR的量的AHR激发刺激物之前48小时内被输送,更优选地,在患者暴露于有效诱导AHR的量的AHR激发刺激物之前36小时之内,更优选地,在24小时之内,更优选地,在12小时之内,并且更优选地,在6小时、5小时、4小时、3小时、2小时或1小时之内被输送。在一种实施方式中,一旦患者或临床医生认识到所述患者已经暴露于或将要暴露于AHR激发刺激物,特别是暴露于所述患者被其致敏的AHR激发刺激物(即,变应原),就(即,立即)施用所述剂。在另一

实施方式中,在出现AHR发展的最初迹象时(急性AHR发作),并且优选地在AHR症状发展的至少2小时之内,更优选地,在AHR症状发展的至少1小时之内,更优选地在至少30分钟之内,更优选地,在至少10分钟之内,更优选地在5分钟之内,施用所述剂。已经在上面详细描述了AHR的症状和测量或检测这种症状的方法。优选地,进行这种施用直到AHR减少的迹象出现,然后按照需要给药直到AHR的症状消失。

[0147] 特别对于抑制或预防缺血-再灌注损伤的方法,施用给动物的剂,具体而言,抗B因子抗体或其抗原结合片段(或抗原结合多肽)的有效量是与没有施用所述剂的情况相比,可测量地抑制动物中的组织学损伤,包括氧化损伤或细胞死亡的量。在肾脏缺血-再灌注损伤的情况下,施用给动物的剂的有效量是与没有施用所述剂的情况相比,可测量地抑制血清尿素氮的增加或可测量地减少对动物肾脏组织的组织学损伤的量。合适的施用给动物的抑制剂的单一剂量是当在合适的时间段内施用一次或多次时,能够减少或防止动物的缺血-再灌注损伤的至少一种症状,损伤类型或所产生的损伤(损害)的剂量。在上面详细描述了抗体,包括用于各种施用途径的抗体的合适剂量。在一方面,施用于动物的、抑制缺血-再灌注损伤的剂的有效量包括能够抑制由缺血-再灌注损伤引起的至少一种症状或损伤而对所述动物没有毒性的量。

[0148] 本发明的方法的任何一种可以用于任何动物,具体而言,用于脊椎动物类哺乳动物的任何动物(即,哺乳动物),包括,不限于,灵长类动物、啮齿类动物、家畜和家庭宠物。用本发明的方法治疗的优选哺乳动物是人。

序列表

	<110> 泰里根治疗公司 W. 艾米伦 V. M. 郝勒斯	
	<120> 人工工程化抗B-因子抗体	
	<130> 577712000840	
	<140> PCT/US2008/003381	
	<141> 2008-03-14	
	<150> US 60/906,816	
	<151> 2007-03-14	
	<160> 37	
	<170> FastSEQ for Windows Version 4.0	
	<210> 1	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠 (mus musculus)	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> 9	
	<223> t 或 c	
	<220>	
	<223> V-κ -4 正向引物	
	<400> 1	
	tcagcttctgt gctaatacagt g	21
[0001]	<210> 2	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<220>	
	<223> V-κ -4 反向引物	
	<400> 2	
	cgactagtcg actggtggga agatggatac ag	32
	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> 13	
	<223> g 或 a	
	<220>	
	<223> V-κ -10 正向引物	
	<400> 3	
	tgttttcaag gtrccagatg t	21
	<210> 4	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<220>	
	<223> V-κ -10 反向引物	
	<400> 4	
	cgactagtcg actggtggga agatggatac ag	32

	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> 3	
	<223> t 或 c	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> 12	
	<223> g 或 t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> 19	
	<223> a 或 t	
	<220>	
	<223> V-Heavy (H, 重链)-6 正向引物	
	<400> 5	
	ctyttaaaag gkggtccagwg	20
	<210> 6	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<220>	
	<223> V-Heavy-6 反向引物	
	<400> 6	
	cgacaagtcg actagccctt gaccaggcat cc	32
[0002]	<210> 7	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> 7	
	<223> a 或 c	
	<220>	
	<223> V-Heavy-7 正向引物	
	<400> 7	
	cytttamatg gtatccagtg t	21
	<210> 8	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<220>	
	<223> V-Heavy-7 反向引物	
	<400> 8	
	cgacaagtcg actagccctt gaccaggcat cc	32
	<210> 9	
	<211> 114	
	<212> PRT	
	<213> 小家鼠	
	<220>	
	<223> V-κ -4 PCR	
	<400> 9	
	Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly	
	1 5 10 15	
	Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser	

```

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

```

<210> 10
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <223> V-Heavy-6 PCR

```

<400> 10
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1      5      10      15
Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
      20      25      30
Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
      35      40      45
Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50      55      60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Gly Tyr Tyr Ser Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100      105      110
[0003] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
      115      120

```

<210> 11
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <223> V-Heavy-7 PCR

```

<400> 11
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1      5      10      15
Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
      20      25      30
Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
      35      40      45
Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50      55      60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Gly Tyr Tyr Ser Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100      105      110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
      115      120

```

<210> 12
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 智人(homo sapien)

<220>
 <223> 种系 V-κ-IV-B3/J-κ-2

<400> 12
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 13
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <223> 种系 V-Heavy (H)-1-02/J-Heavy (H)-4

[0004] <400> 13
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<210> 14
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <223> 来自TA10参考Ab的V-κ 结构域

<400> 14
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95
 Ser Tyr Asn Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 15
 <211> 120

<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<223> 米白TA10参考Ab的V-Heavy结构域

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

<210> 16
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 来自TA101-1的V- κ 结构域

[0005] <400> 16
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Ser Thr Ser Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95
Val Tyr Asn Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys

<210> 17
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 来自TA101-1的V-Heavy结构域

<400> 17
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Tyr Tyr Ala Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 18
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 来自TA102-4的V-κ 结构域

<400> 18
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser
 20 25 30
 Arg Asn Lys Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95
 Val Tyr Asn Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 19
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 来自TA102-4的V-Heavy结构域

[0006]

<400> 19
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Ala Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 20
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 来自TA103-2的V-κ 结构域

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95
 Val Tyr Asn Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 21
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 来自TA103-2的V-Heavy结构域

<400> 21
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Tyr Ala Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

[0007]

<210> 22
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <223> TA10参考Ab的V-κ CDR3-FR4结构域

<400> 22
 Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 1 5 10 15
 Glu Ile Lys

<210> 23
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <223> TA10参考Ab的V-Heavy CDR3-FR4结构域

<400> 23
 Gly Tyr Tyr Ser Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 1 5 10 15
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 20

<210> 24
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> TA101-1的V-κ CDR3-FR4结构域

<400> 24
 Lys Gln Val Tyr Asn Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 1 5 10 15

Glu Ile Lys

<210> 25
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TA101-1的V-κ CDR3-FR4结构域

<400> 25
Gly Tyr Tyr Ala Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
1 5 10 15
Leu Val Thr Val Ser Ser
20

<210> 26
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TA102-4的V-κ CDR3-FR4结构域

<400> 26
Lys Gln Val Tyr Asn Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
1 5 10 15
Glu Ile Lys

[0008]

<210> 27
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TA102-4的V-Heavy CDR3-FR4结构域

<400> 27
Gly Tyr Tyr Ala Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
1 5 10 15
Leu Val Thr Val Ser Ser
20

<210> 28
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TA103-2的V-κ CDR3-FR4结构域

<400> 28
Lys Gln Val Tyr Asn Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
1 5 10 15
Glu Ile Lys

<210> 29
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TA103-2的V-Heavy CDR3-FR4结构域

<400> 29
Gly Tyr Tyr Ala Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
1 5 10 15
Leu Val Thr Val Ser Ser

20

<210> 30
 <211> 739
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <223> 分泌的B因子

<400> 30

[0009] Thr Pro Trp Ser Leu Ala Arg Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser Phe Arg Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ala
 20 25 30
 Leu Glu Tyr Val Cys Pro Ser Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr
 35 40 45
 Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly Ser Trp Ser Thr Leu Lys Thr Gln Asp
 50 55 60
 Gln Lys Thr Val Arg Lys Ala Glu Cys Arg Ala Ile His Cys Pro Arg
 65 70 75 80
 Pro His Asp Phe Glu Asn Gly Glu Tyr Trp Pro Arg Ser Pro Tyr Tyr
 85 90 95
 Asn Val Ser Asp Glu Ile Ser Phe His Cys Tyr Asp Gly Tyr Thr Leu
 100 105 110
 Arg Gly Ser Ala Asn Arg Thr Cys Gln Val Asn Gly Arg Trp Ser Gly
 115 120 125
 Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asn Gly Ala Gly Tyr Cys Ser Asn Pro Gly
 130 135 140
 Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys Val Gly Ser Gln Tyr Arg Leu Glu Asp
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Tyr His Cys Ser Arg Gly Leu Thr Leu Arg Gly Ser Gln
 165 170 175
 Arg Arg Thr Cys Gln Glu Gly Gly Ser Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ser
 180 185 190
 Cys Gln Asp Ser Phe Met Tyr Asp Thr Pro Gln Glu Val Ala Glu Ala
 195 200 205
 Phe Leu Ser Ser Leu Thr Glu Thr Ile Glu Gly Val Asp Ala Glu Asp
 210 215 220
 Gly His Gly Pro Gly Glu Gln Gln Lys Arg Lys Ile Val Leu Asp Pro
 225 230 235 240
 Ser Gly Ser Met Asn Ile Tyr Leu Val Leu Asp Gly Ser Asp Ser Ile
 245 250 255
 Gly Ala Ser Asn Phe Thr Gly Ala Lys Cys Leu Val Asn Leu Ile
 260 265 270
 Glu Lys Val Ala Ser Tyr Gly Val Lys Pro Arg Tyr Gly Leu Val Thr
 275 280 285
 Tyr Ala Thr Tyr Pro Lys Ile Trp Val Lys Val Ser Glu Ala Asp Ser
 290 295 300
 Ser Asn Ala Asp Trp Val Thr Lys Gln Leu Asn Glu Ile Asn Tyr Glu
 305 310 315 320
 Asp His Lys Leu Lys Ser Gly Thr Asn Thr Lys Lys Ala Leu Gln Ala
 325 330 335
 Val Tyr Ser Met Met Ser Trp Pro Asp Asp Val Pro Pro Glu Gly Trp
 340 345 350
 Asn Arg Thr Arg His Val Ile Ile Leu Met Thr Asp Gly Leu His Asn
 355 360 365
 Met Gly Gly Asp Pro Ile Thr Val Ile Asp Glu Ile Arg Asp Leu Leu
 370 375 380
 Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys Asn Pro Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val
 385 390 395 400
 Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro Leu Val Asn Gln Val Asn Ile Asn Ala
 405 410 415
 Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn Glu Gln His Val Phe Lys Val Lys Asp
 420 425 430
 Met Glu Asn Leu Glu Asp Val Phe Tyr Gln Met Ile Asp Glu Ser Gln
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met Val Trp Glu His Arg Lys Gly Thr Asp
 450 455 460
 Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln Ala Lys Ile Ser Val Ile Arg Pro Ser
 465 470 475 480
 Lys Gly His Glu Ser Cys Met Gly Ala Val Val Ser Glu Tyr Phe Val
 485 490 495
 Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Thr Val Asp Asp Lys Glu His Ser Ile
 500 505 510

Lys Val Ser Val Gly Gly Glu Lys Arg Asp Leu Glu Ile Glu Val Val
 515 520 525
 Leu Phe His Pro Asn Tyr Asn Ile Asn Gly Lys Lys Glu Ala Gly Ile
 530 535 540
 Pro Glu Phe Tyr Asp Tyr Asp Val Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys
 545 550 555 560
 Leu Lys Tyr Gly Gln Thr Ile Arg Pro Ile Cys Leu Pro Cys Thr Glu
 565 570 575
 Gly Thr Thr Arg Ala Leu Arg Leu Pro Pro Thr Thr Thr Cys Gln Gln
 580 585 590
 Gln Lys Glu Glu Leu Leu Pro Ala Gln Asp Ile Lys Ala Leu Phe Val
 595 600 605
 Ser Glu Glu Glu Lys Lys Leu Thr Arg Lys Glu Val Tyr Ile Lys Asn
 610 615 620
 Gly Asp Lys Lys Gly Ser Cys Glu Arg Asp Ala Gln Tyr Ala Pro Gly
 625 630 635 640
 Tyr Asp Lys Val Lys Asp Ile Ser Glu Val Val Thr Pro Arg Phe Leu
 645 650 655
 Cys Thr Gly Gly Val Ser Pro Tyr Ala Asp Pro Asn Thr Cys Arg Gly
 660 665 670
 Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile Val His Lys Arg Ser Arg Phe Ile Gln
 675 680 685
 Val Gly Val Ile Ser Trp Gly Val Val Asp Val Cys Lys Asn Gln Lys
 690 695 700
 Arg Gln Lys Gln Val Pro Ala His Ala Arg Asp Phe His Ile Asn Leu
 705 710 715 720
 Phe Gln Val Leu Pro Trp Leu Lys Glu Lys Leu Gln Asp Glu Asp Leu
 725 730 735
 Gly Phe Leu

<210> 31
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

[0010] <220>
 <223> mAb1379 (1379H)的V-重链的氨基端序列

<400> 31
 Glu Val Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Ile Pro

<210> 32
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <223> mAb1379 (1379L)的V-κ 链的氨基端序列

<400> 32
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Ser Lys Lys
 20 25

<210> 33
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <223> V-Heavy-6(TA-V-Heavy-6) 克隆的氨基端序列

<400> 33
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Pro
 20

<210> 34
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <223> V- κ -4(TA-V- κ -4)克隆的氨基端序列

<400> 34
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser
 20 25

<210> 35
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 来自TA101-1的具有Q到E置换的V-Heavy结构域

[0011] <400> 35
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Tyr Ala Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 36
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 来自TA102-4的具有Q到E置换的V-Heavy结构域

<400> 36
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Tyr Ala Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 37
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 来自TA103-2的具有Q到E置换的V-Heavy结构域
 <400> 37
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 [0012] Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Tyr Ala Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

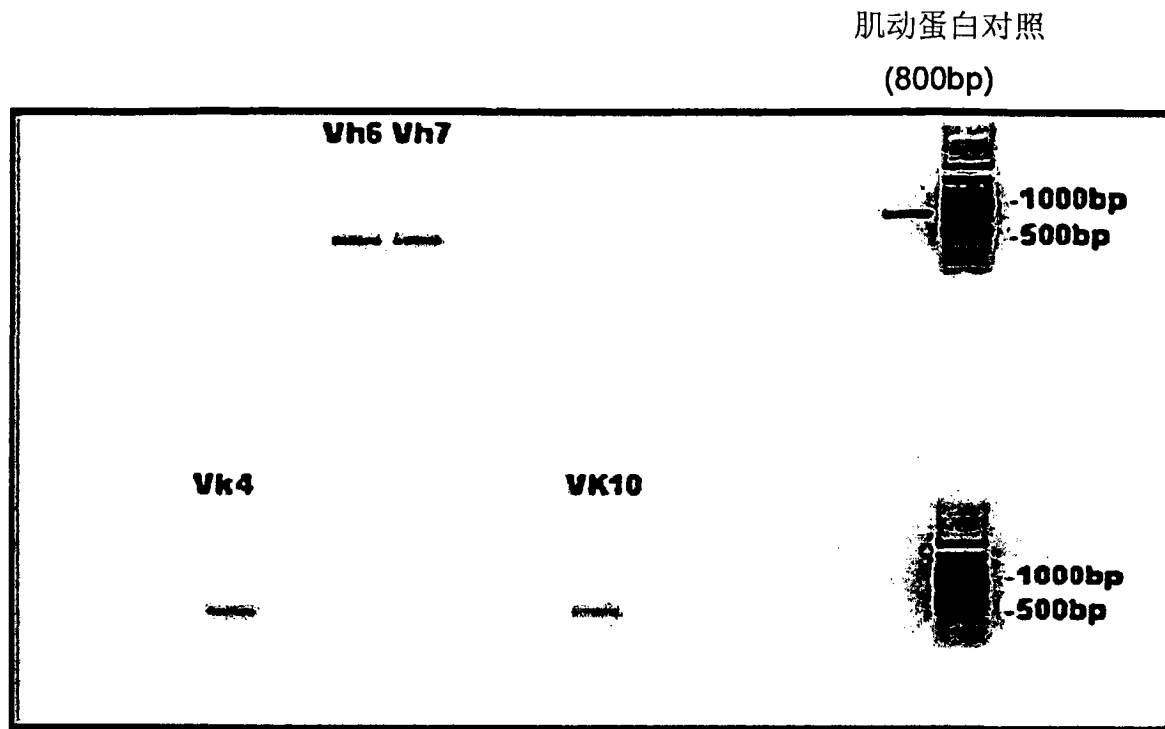


图1

TA-V _H 6 TA-V _H 7	1	EVQ	LQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYNMDWVKQSHGKSLEWIGD	SEQ ID NO:10
	1	EVQ	LQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYNMDWVKQSHGKSLEWIGD	SEQ ID NO:11
TA-V _H 6 TA-V _H 7	51	INPNNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSED	TAVVYCARGY	SEQ ID NO:10
	51	INPNNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSED	TAVVYCARGY	SEQ ID NO:11
TA-V _H 6 TA-V _H 7	101	YSNSAFEAYWGQGLTVTVSA	SEQ ID NO:10	
	101	YSNSAFEAYWGQGLTVTVSA	SEQ ID NO:11	

TA-V _K 4	1	DIVMSQSPSSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLSRTRKNYLAWYQQKPGQSP	SEQ ID NO:9
TA-V _K 4	51	KLIIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDETLTISVQAEDLAVYYCKQSYNL	
TA-V _K 4	101	PWTFGGGTKLEIKR	

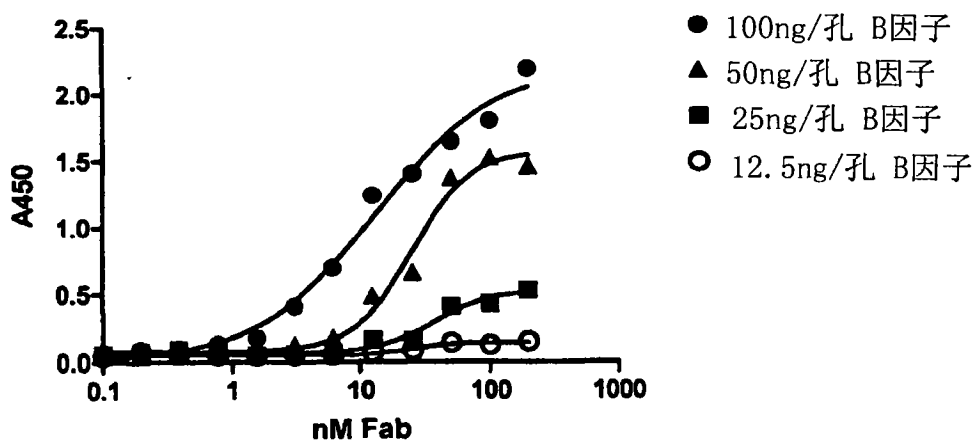
图2

1379H TA-V _H 6	EVQ	- - QSGPELVKPGASVKIP	SEQ ID NO:31
	EVQ	QSGPELVKPGASVKIP	SEQ ID NO:33

1379L TA-V _K 4	DI	VMSQSPSSSLAVSAGEKVTMS	SEQ ID NO:32
	DI	VMSQSPSSSLAVSAGEKVTMS	SEQ ID NO:34

图3

ELISA: 嵌合TA003与B因子结合



ELISA: 鼠Fab(1379)与B因子结合

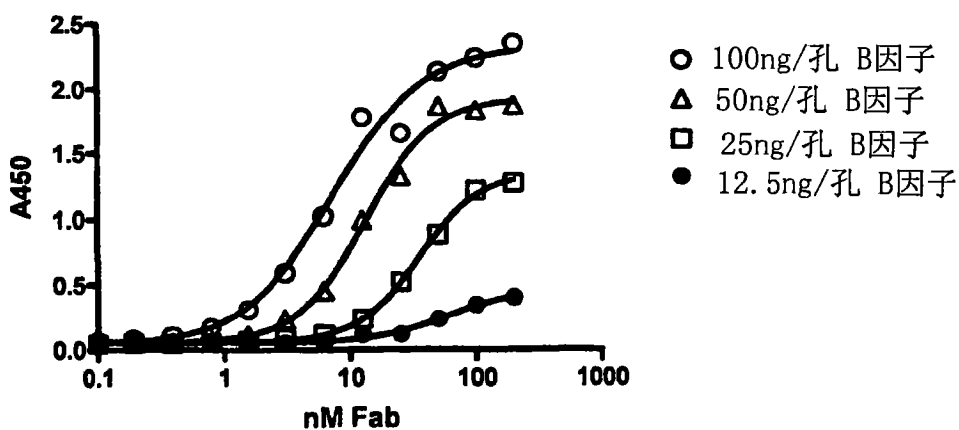


图4

模型1 Fit

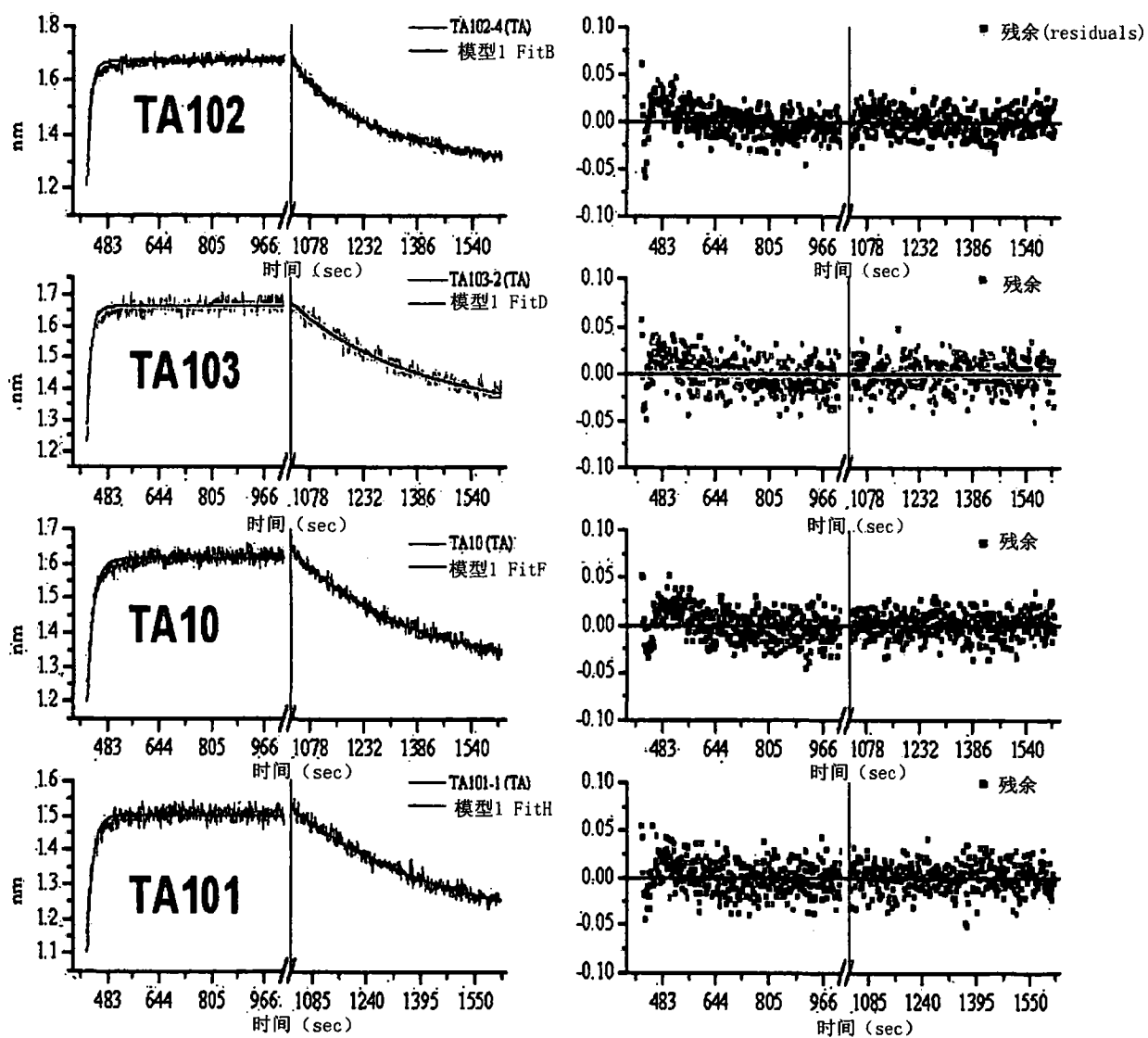


图5

V_H 比对

1-02/J_H4 1-QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYTFDGYIMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVT
 SEQ ID NO:13
 TA10 1-EVQLQSGSEELVKPGASVKDKCKASGYTFDGYIMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYNQKFGKRT
 SEQ ID NO:15
 TA101-1 1-QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYTFDGYIMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVT
 SEQ ID NO:17
 TA102-4 1-QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYTFDGYIMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVT
 SEQ ID NO:19
 TA103-2 1-QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYTFDGYIMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVT
 SEQ ID NO:21

1-02/J_H4 70-MTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR YFDYWGQGLTVTVSS SEQ ID NO:13
 TA10 70-MTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR YFDYWGQGLTVTVSS SEQ ID NO:15
 TA101-1 70-MTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR YFDYWGQGLTVTVSS SEQ ID NO:17
 TA102-4 70-MTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR YFDYWGQGLTVTVSS SEQ ID NO:19
 TA103-2 70-MTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR YFDYWGQGLTVTVSS SEQ ID NO:21

V_L 比对

V_L IV B3/J_L2 1-DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD
 SEQ ID NO:12
 TA10 1-DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD
 SEQ ID NO:14
 TA101-1 1-DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD
 SEQ ID NO:16
 TA102-4 1-DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD
 SEQ ID NO:18
 TA103-2 1-DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD
 SEQ ID NO:20

VKIV B3/J_K2 67-RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYCKQYISTPWFEGQGTKLEIK SEQ ID NO:12
 TA10 67-RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYCKQYINLPWFEGQGTKLEIK SEQ ID NO:14
 TA101-1 67-RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYCKQYINLPWFEGQGTKLEIK SEQ ID NO:16
 TA102-4 67-RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYCKQYINLPWFEGQGTKLEIK SEQ ID NO:18
 TA103-2 67-RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYCKQYINLPWFEGQGTKLEIK SEQ ID NO:20

图6