(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117794948 A
(43)申请公布日 2024.03.29

(21)申请号 202280053891.X
(22)申请日 2022.06.20
(30)优先权数据
63/212,414 2021.06.18 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.02.01
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/034189 2022.06.20
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/266540 EN 2022.12.22
(71)申请人 特里尼生物公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 J·斯塔文哈根
O·加西奥罗夫斯卡 M·里克特
P·F·维德博姆 J·R·沃菲尔德
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 陈文平 徐志明
(51)Int.Cl.
C07K 16/18(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)

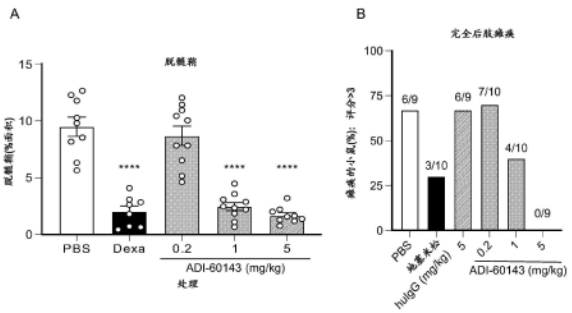
权利要求书7页 说明书83页 附图39页

(54)发明名称

结合人纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的抗体及其使用方法

(57)摘要

本文描述了结合人纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的新的和改进的抗体及其使用方法。在某些方面,本文描述了抑制小胶质细胞激活的方法。在某些方面,本文描述了包含结合纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的抗体的药物组合物。在某些方面,本文所述的抗体和方法用于治疗涉及炎性脱髓鞘的退行性神经元病症。



CN 117794948 A

1.一种结合人纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的分离的抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含含有三个重链CDR序列CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的可变重(VH)链序列,所述轻链包含含有三个轻链CDR序列CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的可变轻(VL)链序列,其中:

a.CDR-H1包含SEQ ID NO:1、13、25、37、49、61、73、85、97、109、121、133、145、157、169、181、193、205、217或229中所示的序列;

b.CDR-H2包含SEQ ID NO:2、14、26、38、50、62、74、86、98、110、122、134、146、158、170、182、194、206、218或230中所示的序列;

c.CDR-H3包含SEQ ID NO:3、15、27、39、51、63、75、87、99、111、123、135、147、159、171、183、195、207、219或231中所示的序列;

d.CDR-L1包含SEQ ID NO:4、16、28、40、52、64、76、88、100、112、124、136、148、160、172、184、196、208、220或232中所示的序列;

e.CDR-L2包含SEQ ID NO:5、17、29、41、53、65、77、89、101、113、125、137、149、161、173、185、197、209、221或233中所示的序列;以及

f.CDR-L3包含SEQ ID NO:6、18、30、42、54、66、78、90、102、114、126、138、150、162、174、186、198、210、222或234中所示的序列。

2.如权利要求1所述的分离的抗体,其中所述抗体包含选自SEQ ID NO:7、19、31、43、55、67、79、91、103、115、127、139、151、163、175、187、199、211、223或235之一中所示序列的VH序列。

3.如权利要求1或2所述的分离的抗体、其中所述抗体包含选自SEQ ID NO:10、22、34、46、58、70、82、94、106、118、130、142、154、166、178、190、202、214、226或238中所示序列的VL序列。

4.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含选自SEQ ID NO:7之一中所示序列的VH序列和SEQ ID NO:10中所示的VL序列。

5.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:19中所示的VH序列和SEQ ID NO:22中所示的VL序列。

6.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:31中所示的VH序列和SEQ ID NO:34中所示的VL序列。

7.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:43中所示的VH序列和SEQ ID NO:46中所示的VL序列。

8.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:55中所示的VH序列和SEQ ID NO:58中所示的VL序列。

9.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:67中所示的VH序列和SEQ ID NO:70中所示的VL序列。

10.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:79中所示的VH序列和SEQ ID NO:82中所示的VL序列。

11.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:91中所示的VH序列和SEQ ID NO:94中所示的VL序列。

12.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:103中所示的VH序列和SEQ ID NO:106中所示的VL序列。

13.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:115中所示的VH序列和SEQ ID NO:118中所示的VL序列。

14.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:127中所示的VH序列和SEQ ID NO:130中所示的VL序列。

15.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:139中所示的VH序列和SEQ ID NO:142中所示的VL序列。

16.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:151中所示的VH序列和SEQ ID NO:154中所示的VL序列。

17.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:163中所示的VH序列和SEQ ID NO:166中所示的VL序列。

18.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:175中所示的VH序列和SEQ ID NO:178中所示的VL序列。

19.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:187中所示的VH序列和SEQ ID NO:190中所示的VL序列。

20.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:199中所示的VH序列和SEQ ID NO:202中所示的VL序列。

21.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:211中所示的VH序列和SEQ ID NO:214中所示的VL序列。

22.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:223中所示的VH序列和SEQ ID NO:226中所示的VL序列。

23.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:235中所示的VH序列和SEQ ID NO:238中所示的VL序列。

24.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包括人源化抗体、人抗体或嵌合抗体。

25.如权利要求24所述的分离的抗体,其中所述抗体包括人源化抗体。

26.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含选自IgG、IgA、IgD、IgE和IgM的类别的重链人恒定区。

27.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体、其中所述人Fc区包含IgG类别和选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的亚类的人重链恒定区。

28.如权利要求27所述的分离的抗体,其中所述人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

29.如权利要求28所述的分离的抗体,其中所述人Fc结构域包含SEQ ID NO:8、20、32、44、56、68、80、92、104、116、128、140、152、164、176、188、200、212、224或236中所示的序列。

30.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述重链包含SEQ ID NO:8、20、32、44、56、68、80、92、104、116、128、140、152、164、176、188、200、212、224或236所示的恒定重链序列。

31.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述轻链包含SEQ ID NO:9、21、33、45、57、69、81、93、105、117、129、141、153、165、177、189、201、213、225或237所示的恒定轻链序列。

32.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:7中所

示的VH序列和SEQ ID NO:10中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

33.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:19中所示的VH序列和SEQ ID NO:22中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

34.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:31中所示的VH序列和SEQ ID NO:34中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

35.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:43中所示的VH序列和SEQ ID NO:46中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

36.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:55中所示的VH序列和SEQ ID NO:58中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

37.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:67中所示的VH序列和SEQ ID NO:70中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

38.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:79中所示的VH序列和SEQ ID NO:82中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

39.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:91中所示的VH序列和SEQ ID NO:94中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

40.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:103中所示的VH序列和SEQ ID NO:106中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

41.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:115中所示的VH序列和SEQ ID NO:118中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

42.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:127中所示的VH序列和SEQ ID NO:130中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

43.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:139中所示的VH序列和SEQ ID NO:142中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

44.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:151中所示的VH序列和SEQ ID NO:154中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

45.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:163中所示的VH序列和SEQ ID NO:166中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

46.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:175中所示的VH序列和SEQ ID NO:178中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

47.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:187中所示的VH序列和SEQ ID NO:190中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

48.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:199中所示的VH序列和SEQ ID NO:202中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

49.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:211中所示的VH序列和SEQ ID NO:214中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

50.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:223中所示的VH序列和SEQ ID NO:226中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

51.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:235中所示的VH序列和SEQ ID NO:238中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

52.如权利要求27-51中任一项所述的分离的抗体,其中所述Fc区包含一个或多个氨基酸置换,其中与不具有所述一个或多个置换的Fc相比,所述一个或多个置换导致增加的抗体半衰期、增加的ADCC活性、增加的ADCP活性或增加的CDC活性。

53.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述Fc区结合选自以下的Fcγ受体:FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIc、FcγRIIIa和FcγRIIIb。

54.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包括单克隆抗体。

55.如权利要求1所述的抗体,其中所述抗体结合所述纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的γ377-395表位。

56.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中通过表面等离子共振(SPR)单循环动力学(SCK)测定,所述抗体以小于或等于约1、2、3、4、5、6、7或8×10^{-5}M的K_D与包含SEQ ID NO:241和249-253的至少一个中所示的氨基酸序列的肽结合。

57.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中通过表面等离振子共振(SPR)单循环动力学(SCK)测定测量的,所述抗体以小于或等于约$8x\ 10^{-5}$M的K_D与包含所述人纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的γ377-395表位的序列的肽结合。

58.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体抑制Mac-1与纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的结合。

59.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体表现出抑制小胶质细胞对所述纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的粘附。

60.如上述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其用于治疗神经系统的退行性障碍。

61.一种分离的多核苷酸或多核苷酸组,其编码上述权利要求中任一项所述的抗体、其VH、其VL、其轻链、其重链或其抗原结合部分;任选地为cDNA。

62.包含权利要求61所述的多核苷酸或多核苷酸组的载体或载体组。

63.包含权利要求61所述的多核苷酸或多核苷酸组或者权利要求62所述的载体或载体组的宿主细胞。

64.一种产生抗体的方法,所述方法包括用权利要求63所述的宿主细胞表达所述抗体并分离所表达的抗体。

65.一种药物组合物,其包含权利要求1-60中任一项所述的抗体和药学上可接受的赋形剂。

66.一种试剂盒,其包含权利要求1-60中任一项所述的抗体或权利要求65所述的药物组合物和使用说明。

67.一种治疗神经系统的退行性障碍的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的权利要求1-60中任一项所述的抗体或权利要求65所述的药物组合物。

68.如权利要求67所述的方法,其中所述神经系统的退行性障碍选自:多发性硬化、脊髓损伤、中风和阿尔茨海默病。

69.一种用于治疗与Mac-1与纤维蛋白的结合或Mac-1与纤维蛋白原的结合相关的病理的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的权利要求1-60中任一项所述的抗体或权利要求65所述的药物组合物。

70.一种用于抑制小胶质细胞激活的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的权利要求1-60中任一项所述的抗体或权利要求65所述的药物组合物。

71.一种预防神经系统的退行性障碍的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的权利要求1-60中任一项所述的抗体或权利要求65所述的药物组合物。

72.一种在有需要的受试者中治疗结肠炎的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的权利要求1-60中任一项所述的抗体或权利要求65所述的药物组合物。

73.一种在有需要的受试者中预防结肠炎的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的权利要求1-60中任一项所述的抗体或权利要求65所述的药物组合物。

74.一种结合人纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的分离的抗体,其中所述抗体在氨基酸残基Lys 411、Ile 412、Ile 413、Phe 415、Asn416、Arg 417、Leu 418、Thr 419、Ile 420和Gly 421中的任一个处结合人纤维蛋白。

75.如权利要求74所述的分离的抗体,其中所述抗体在氨基酸残基Lys 411、Ile 412、Ile 413、Phe 415、Asn 416、Arg 417、Leu 418、Thr 419、Ile 420和Gly 421中的至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或全部10个处结合人纤维蛋白。

76.如权利要求74或75所述的分离的抗体,其中所述抗体包含含有互补位的VH区,所述互补位包含氨基酸残基Ser 31、Tyr 32、Trp 33、His 35、Trp 47、Leu 50、Asp 52、Asp 54、Tyr 56、Ala 93、Ser 94、Ser 95、Lys 96或Asp 96、Pro 97或Ala 97、Gly 101、Gly 102和Trp 103中的任一个。

77.如权利要求76所述的分离的抗体,其中所述抗体包含含有互补位的VH区,所述互补位包含氨基酸残基Ser 31、Tyr 32、Trp 33、His 35、Trp 47、Leu 50、Asp 52、Asp 54、Tyr 56、Ala 93、Ser 94、Ser 95、Lys 96或Asp 96、Pro 97或Ala 97、Gly 101、Gly102和Trp 103中的至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个或全部17个。

78.如权利要求77所述的分离的抗体,其中所述抗体包含含有互补位的VH区,所述互补位包含氨基酸残基Ser 31、Trp 33、His 35、Asp 52、Asp 54、Tyr 56、Ser 94、Gly 101、Gly 102和Trp 103。

79.如权利要求78所述的分离的抗体,其中所述抗体包含含有互补位的VH区,所述互补位包含氨基酸残基Ser 31、Trp 33、His 35、Asp 52、Asp 54、Tyr 56、Ala 93、Ser 94、Lys 96、Pro 97、Gly 101、Gly 102和Trp 103。

80.如权利要求78所述的分离的抗体,其中所述抗体包含含有互补位的VH区,所述互补位包含氨基酸残基Ser 31、Tyr 32、Trp 33、His 35、Trp 47、Asp 52、Asp 54、Tyr 56、Ser 94、Ser 95、Asp 96、Ala 97、Gly 101、Gly 102和Trp 103。

81.如权利要求74-80中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含含有互补位的VL区,所述互补位包含氨基酸残基His 27、Tyr32、Tyr 36、Leu 46、Tyr 49、Gln 50、Ala 91或Asn 91、Leu 92、Leu94和Leu 96中的任一个。

82.如权利要求81所述的分离的抗体,其中所述抗体包含含有互补位的VL区,所述互补位包含氨基酸残基His 27、Tyr 32、Tyr 36、Leu 46、Tyr 49、Gln 50、Ala 91或Asn 91、Leu 92、Leu 94和Leu 96中的至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或全部10个。

83.如权利要求82所述的分离的抗体,其中所述抗体包含含有互补位的VL区,所述互补位包含氨基酸残基His 27、Tyr 32、Tyr 36、Leu 46、Gln 50、Leu 92、Leu 94和Leu 96。

84.如权利要求83所述的分离的抗体,其中所述抗体包含含有互补位的VL区,所述互补

位包含氨基酸残基His 27、Tyr 32、Tyr 36、Leu 46、Gln 50、Asn 91、Leu 92、Leu 94和Leu 96。

85.如权利要求83所述的分离的抗体,其中所述抗体包含含有互补位的VL区,所述互补位包含氨基酸残基His 27、Tyr 32、Tyr 36、Leu 46、Tyr 49、Gln 50、Ala 91、Leu 92、Leu 94和Leu 96。

86.如权利要求74-85中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包括人源化抗体、人抗体或嵌合抗体。

87.如权利要求86所述的分离的抗体,其中所述抗体包括人源化抗体。

88.如权利要求74-87中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包含选自IgG、IgA、IgD、IgE和IgM的类别的重链人恒定区。

89.如权利要求74-88中任一项所述的分离的抗体,其中所述人Fc区包含IgG类别和选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的亚类的人重链恒定区。

90.如权利要求89所述的分离的抗体,其中所述人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

91.如权利要求88所述的分离的抗体,其中所述人FC结构域包含SEQ ID NO:8、20、32、44、56、68、80、92、104、116、128、140、152、164、176、188、200、212、224或236中所示的序列。

92.如权利要求74-91中任一项所述的分离的抗体,其中所述Fc区包含一个或多个氨基酸置换,其中与不具有所述一个或多个置换的Fc相比,所述一个或多个置换导致增加的抗体半衰期、增加的ADCC活性、增加的ADCP活性或增加的CDC活性。

93.如权利要求74-92中任一项所述的分离的抗体,其中所述Fc区结合选自以下的Fcγ受体:FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIc、FcγRIIIa和FcγRIIIb。

94.如权利要求74-93中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体包括单克隆抗体。

95.如权利要求74-94中任一项所述的分离的抗体,其中通过表面等离振子共振(SPR)单循环动力学(SCK)测定测量的,所述抗体以小于或等于约1、2、3、4、5、6、7或8×10^{-5}M的K_D与包含SEQ ID NO:241和249-253的至少一个中所示的氨基酸序列的肽结合。

96.如权利要求74-95中任一项所述的分离的抗体,其中通过表面等离振子共振(SPR)单循环动力学(SCK)测定测量的,所述抗体以小于或等于约$8x\ 10^{-5}$M的K_D与包含所述人纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的γ377-395表位的序列的肽结合。

97.如权利要求74-96中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体抑制Mac-1与纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的结合。

98.如权利要求74-97中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体表现出抑制小胶质细胞对所述纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的粘附。

99.如权利要求74-98中任一项所述的分离的抗体,其用于治疗神经系统的退行性障碍。

100.如权利要求74-98中任一项所述的分离的抗体,其用于治疗与眼部的炎症相关的病症。

101.如权利要求100所述的分离的抗体,其中所述病症是葡萄膜炎。

102.一种分离的多核苷酸或多核苷酸组,其编码权利要求74-101中任一项所述的抗体、其VH、其VL、其轻链、其重链或其抗原结合部分;任选地为cDNA。

103.一种包含权利要求102所述的多核苷酸或多核苷酸组的载体或载体组。

104.一种包含权利要求61所述的多核苷酸或多核苷酸组或者权利要求103所述的载体或载体组的宿主细胞。

105.一种产生抗体的方法,所述方法包括用权利要求104所述的宿主细胞表达所述抗体并分离所表达的抗体。

106.一种药物组合物,其包含权利要求74-101中任一项所述的抗体和药学上可接受的赋形剂。

107.一种试剂盒,其包含权利要求74-101中任一项所述的抗体或权利要求106所述的药物组合物和使用说明。

108.一种治疗神经系统的退行性疾病的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的权利要求74-101中任一项所述的抗体或权利要求106所述的药物组合物。

109.如权利要求108所述的方法,其中所述神经系统的退行性障碍选自:多发性硬化、脊髓损伤、中风和阿尔茨海默病。

110.一种用于治疗与Mac-1结合纤维蛋白或Mac-1结合纤维蛋白原相关的病理的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的权利要求74-101中任一项所述的抗体或权利要求106所述的药物组合物。

111.一种抑制小胶质细胞激活的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的权利要求74-101中任一项所述的抗体或权利要求106所述的药物组合物。

112.一种预防神经系统的退行性疾病的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的权利要求74-101中任一项所述的抗体或权利要求106所述的药物组合物。

113.一种在有需要的受试者中治疗结肠炎的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的权利要求74-101中任一项所述的抗体或权利要求106所述的药物组合物。

114.一种在有需要的受试者中预防结肠炎的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的权利要求74-101中任一项所述的抗体或权利要求106所述的药物组合物。

115.一种在有需要的受试者中治疗眼部的炎性病症的方法,其包括向所述受试者施用权利要求1-60或74-101中任一项所述的抗体或权利要求65或106所述的药物组合物。

116.一种在有需要的受试者中预防眼部的炎性病症的方法,其包括向所述受试者施用权利要求1-60或74-101中任一项所述的抗体或权利要求65或106所述的药物组合物。

117.如权利要求115或权利要求116所述的方法,其中所述眼部的炎性病症包括葡萄膜炎。

结合人纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的抗体及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年6月18日提交的美国临时申请No.63/212,414的权益,在此将其全文引入作为参考。

[0003] 序列表

[0004] 不适用。

背景技术

[0005] 退行性神经元障碍如多发性硬化(MS)可涉及炎性脱髓鞘和自身免疫反应。据认为小胶质细胞,特别是血管周小胶质细胞,不仅对于中枢神经系统(CNS)自身免疫疾病中炎性脱髓鞘的维持,而且对于其发作是必要的。小胶质细胞的激活通过细胞因子和一氧化氮的释放造成神经元和少突胶质细胞死亡。在MS中,炎性过程与髓鞘的破坏相关,并且还可涉及轴突损伤,其可导致永久性功能缺陷如瘫痪和视力丧失。常驻小胶质细胞通过其胞吞髓磷脂和分泌促炎细胞因子的能力造成脱髓鞘。

[0006] 在MS病灶中,小胶质细胞的血管周激活与血脑屏障(BBB)破坏的区域共定位,并且体内成像研究已经显示BBB破坏引起小胶质细胞的即时和局灶性激活。与MS中BBB破坏相偶联的最早事件之一是神经系统中血液蛋白纤维蛋白原的渗漏,其导致纤维蛋白的血管周沉积。纤维蛋白原不存在于健康的CNS中,而仅在BBB破坏后在脑中渗漏,因此用作环境“危险”信号。在纤维蛋白原转化成纤维蛋白时,CD11b/CD18整联蛋白受体(也称为:Mac-1、αMf1 2、补体受体3)结合纤维蛋白并诱导导致炎性脱髓鞘的小胶质细胞激活。CD11b是调节炎性脱髓鞘期间髓鞘吞噬的受体的α链。固定化纤维蛋白原和不溶性纤维蛋白,而非可溶性纤维蛋白原,已经被鉴定为Mac-1的生理性、高亲和力配体。

[0007] 纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的γ377-395表位是纤维蛋白对CDIIb的结合表位。纤维蛋白$\gamma^{377-395}$肽通过阻断纤维蛋白与Mac-1的结合而充当小胶质细胞激活的抑制剂。因为纤维蛋白通过经由不同表位与血小板整联蛋白$\alpha_{IIb}\beta_3$受体结合来介导凝血,阻断CD11b结合表位与纤维蛋白结合的治疗剂(包括抗体)可降低纤维蛋白在神经系统中的损害作用,而不影响其在凝血中的有益作用。因此,需要抑制纤维蛋白诱导的小胶质细胞激活而不影响其在凝血中的有益作用的安全、有效的抗体作为涉及炎性脱髓鞘的退行性神经元障碍的治疗剂。

发明内容

[0008] 在某些方面,本文描述了结合人纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的分离的抗体,其包含含有可变重(VH)链序列的重链和含有可变轻(VL)链序列的轻链,所述可变重(VH)链序列包含三个重链CDR序列CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述可变轻(VL)链序列包含三个轻链CDR序列CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中:CDR-H1包含SEQ ID NO:1、13、25、37、49、61、73、85、97、109、121、133、145、157、169、181、193、205、217或229中所示的序列;CDR-H2包含SEQ ID

NO:2、14、26、38、50、62、74、86、98、110、122、134、146、158、170、182、194、206、218或230中所示的序列;CDR-H3包含SEQ ID NO:3、15、27、39、51、63、75、87、99、111、123、135、147、159、171、183、195、207、219或231中所示的序列;CDR-L1包含SEQ ID NO:4、16、28、40、52、64、76、88、100、112、124、136、148、160、172、184、196、208、220或232中所示的序列;CDR-L2包含SEQ ID NO:5、17、29、41、53、65、77、89、101、113、125、137、149、161、173、185、197、209、221或233中所示的序列;且CDR-L3包含SEQ ID NO:6、18、30、42、54、66、78、90、102、114、126、138、150、162、174、186、198、210、222或234中所示的序列。

[0009] 在某些实施方案中,抗体包含选自SEQ ID NO:7、19、31、43、55、67、79、91、103、115、127、139、151、163、175、187、199、211、223或235之一中所示序列的VH序列。在某些实施方案中,抗体包含选自SEQ ID NO:10、22、34、46、58、70、82、94、106、118、130、142、154、166、178、190、202、214、226或238中所示的序列的VL序列。

[0010] 在某些实施方案中,抗体包含选自SEQ ID NO:7之一中所示序列的VH序列和SEQ ID NO:10中所示的VL序列。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:19中所示的VH序列和SEQ ID NO:22中所示的VL序列。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:31中所示的VH序列和SEQ ID NO:34中所示的VL序列。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:43中所示的VH序列和SEQ ID NO:46中所示的VL序列。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:55中所示的VH序列和SEQ ID NO:58中所示的VL序列。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:67中所示的VH序列和SEQ ID NO:70中所示的VL序列。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:79中所示的VH序列和SEQ ID NO:82中所示的VL序列。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:91中所示的VH序列和SEQ ID NO:94中所示的VL序列。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:103中所示的VH序列和SEQ ID NO:106中所示的VL序列。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:115中所示的VH序列和SEQ ID NO:118中所示的VL序列。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:127中所示的VH序列和SEQ ID NO:130中所示的VL序列。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:139中所示的VH序列和SEQ ID NO:142中所示的VL序列。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:151中所示的VH序列和SEQ ID NO:154中所示的VL序列。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:163中所示的VH序列和SEQ ID NO:166中所示的VL序列。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:175中所示的VH序列和SEQ ID NO:178中所示的VL序列。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:187中所示的VH序列和SEQ ID NO:190中所示的VL序列。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:199中所示的VH序列和SEQ ID NO:202中所示的VL序列。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:211中所示的VH序列和SEQ ID NO:214中所示的VL序列。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:223中所示的VH序列和SEQ ID NO:226中所示的VL序列。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:235中所示的VH序列和SEQ ID NO:238中所示的VL序列。

[0011] 在某些实施方案中,抗体包括人源化抗体、人抗体或嵌合抗体。在某些实施方案中,抗体包括人源化抗体。在某些实施方案中,抗体包含选自IgG、IgA、IgD、IgE和IgM的类别的重链人恒定区。在某些实施方案中,人Fc区包含IgG类别和选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的亚类的人重链恒定区。在某些实施方案中,人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。在某些实施方案中,人Fc结构域包含SEQ ID NO:8、20、32、44、56、68、80、92、104、116、128、140、152、164、176、188、200、212、224或236中所示的序列。

[0012] 在某些实施方案中,重链包含SEQ ID NO:8、20、32、44、56、68、80、92、104、116、128、140、152、164、176、188、200、212、224或236所示的恒定重链序列。在某些实施方案中,轻链包含SEQ ID NO:9、21、33、45、57、69、81、93、105、117、129、141、153、165、177、189、201、213、225或237所示的恒定轻链序列。

[0013] 在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:7中所示的VH序列和SEQ ID NO:10中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1Fc。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:19中所示的VH序列和SEQ ID NO:22中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1Fc。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:31中所示的VH序列和SEQ ID NO:34中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1Fc。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:43中所示的VH序列和SEQ ID NO:46中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1Fc。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:55中所示的VH序列和SEQ ID NO:58中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1Fc。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:67中所示的VH序列和SEQ ID NO:70中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1Fc。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:79中所示的VH序列和SEQ ID NO:82中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1Fc。

[0014] 在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:91中所示的VH序列和SEQ ID NO:94中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1Fc。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:103中所示的VH序列和SEQ ID NO:106中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1Fc。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:115中所示的VH序列和SEQ ID NO:118中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1Fc。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:127中所示的VH序列和SEQ ID NO:130中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1Fc。在某些实施方案中,所述抗体包含SEQ ID NO:139中所示的VH序列和SEQ ID NO:142中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:151中所示的VH序列和SEQ ID NO:154中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:163中所示的VH序列和SEQ ID NO:166中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:175中所示的VH序列和SEQ ID NO:178中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:187中所示的VH序列和SEQ ID NO:190中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:199中所示的VH序列和SEQ ID NO:202中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:211中所示的VH序列和SEQ ID NO:214中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:223中所示的VH序列和SEQ ID NO:226中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:235中所示的VH序列和SEQ ID NO:238中所示的VL序列;且人Fc区包含野生型人IgG1 Fc。

[0015] 在某些实施方案中,Fc区包含一个或多个氨基酸置换,其中与没有一个或多个置换的Fc相比,所述一个或多个置换导致增加的抗体半衰期、增加的ADCC活性、增加的ADCP活性或增加的CDC活性。在某些实施方案中,Fc区结合选自下组的Fcγ受体:FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIc、FcγRIIIa和FcγRIIIb。

[0016] 在某些实施方案中,抗体是单克隆抗体。在某些实施方案中,抗体结合纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的γ377-395表位。在某些实施方案中,如通过表面等离振子共振

(SPR)单循环动力学(SCK)测定所测量的,抗体以小于或等于约1、2、3、4、5、6、7或8×10^{-5}M的K_D结合包含SEQ ID NO:241和249-253的至少一个中所示的氨基酸序列的肽。在某些实施方案中,如通过表面等离振子共振(SPR)单循环动力学(SCK)测定所测量的,抗体以小于或等于约$8x\ 10^{-5}$M的K_D结合包含人纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的γ377-395表位的序列的肽。在某些实施方案中,抗体抑制Mac-1与纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的结合。在某些实施方案中,抗体表现出抑制小胶质细胞对纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的粘附。

[0017] 在某些方面,本文描述了上述权利要求中任一项的分离的抗体,其用于治疗神经系统的退行性障碍。

[0018] 在某些方面,本文描述了编码上述权利要求中任一项的抗体、其VH、其VL、其轻链、其重链或其抗原结合部分的分离的多核苷酸或多核苷酸组;任选地为cDNA。

[0019] 在某些方面,本文描述了包含本文所述的多核苷酸或多核苷酸组的载体或载体组。

[0020] 在某些方面,本文描述了包含本文所述的多核苷酸或多核苷酸组或者载体或载体组的宿主细胞。

[0021] 在某些方面,本文描述了产生抗体的方法,所述方法包括用本文描述的宿主细胞表达抗体并分离表达的抗体。

[0022] 在某些方面,本文描述了包含本文所述的抗体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0023] 在某些方面,本文描述了包含本文所述的抗体或本文所述的药物组合物和使用说明的试剂盒。

[0024] 在某些方面,本文描述了用于治疗神经系统的退行性障碍的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的本文所述的抗体或本文所述的药物组合物。在某些实施方案中,神经系统的退行性障碍选自:多发性硬化、脊髓损伤、中风和阿尔茨海默病。

[0025] 在某些方面,本文描述了用于治疗与Mac-1结合纤维蛋白或Mac-1结合纤维蛋白原相关的病理的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的本文所述的抗体或药物组合物。

[0026] 在某些方面,本文描述了抑制小胶质细胞激活的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的本文所述的抗体或药物组合物。

[0027] 在某些方面,本文描述了预防神经系统的退行性障碍的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的本文所述的抗体或药物组合物。

[0028] 在某些方面,本文描述了治疗有需要的受试者中的结肠炎的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的本文描述的抗体或药物组合物。在某些方面,本文描述了在有需要的受试者中预防结肠炎的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的本文所述的抗体或药物组合物。在某些方面,本文描述了治疗有需要的受试者的眼部的炎性病症的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的本文描述的抗体或药物组合物。在某些方面,本文描述了在有需要的受试者中预防眼部的炎性病症的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的本文描述的抗体或药物组合物。在某些实施方案中,眼部的炎性病症是葡萄膜炎。

[0029] 在某些方面,本文描述了结合人纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的分离的抗体,

其中所述抗体在氨基酸残基Lys 411、Ile 412、Ile 413、Phe 415、Asn 416、Arg 417、Leu 418、Thr 419、Ile 420和Gly 421中的任一个处结合人纤维蛋白。在某些实施方案中,其中所述抗体在氨基酸残基Lys 411、Ile 412、Ile 413、Phe 415、Asn 416、Arg 417、Leu 418、Thr 419、Ile 420和Gly 421中的至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或全部10个处结合人纤维蛋白。

[0030] 在某些实施方案中,本文描述了包含含有互补位的VH区的抗体,所述互补位包含氨基酸残基Ser 31、Tyr 32、Trp 33、His 35、Trp 47、Leu 50、Asp 52、Asp 54、Tyr 56、Ala 93、Ser 94、Ser 95、Lys 96或Asp 96、Pro 97或Ala 97、Gly 101、Gly 102和Trp 103中的任一个。在某些实施方案中,抗体包含含有互补位的VH区,所述互补位包含氨基酸残基Ser 31、Tyr 32、Trp 33、His 35、Trp 47、Leu 50、Asp 52、Asp 54、Tyr 56、Ala 93、Ser 94、Ser 95、Lys 96或Asp 96、Pro 97或Ala 97、Gly 101、Gly 102和Trp 103中的至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个或全部17个。在某些实施方案中,抗体包含含有互补位的VH区,所述互补位包含氨基酸残基Ser 31、Trp 33、His 35、Asp 52、Asp 54、Tyr 56、Ser 94、Gly 101、Gly 102和Trp 103。在某些实施方案中,抗体包含含有互补位的VH区,所述互补位包含氨基酸残基Ser 31、Trp 33、His 35、Asp 52、Asp 54、Tyr 56、Ala 93、Ser 94、Lys 96、Pro 97、Gly 101、Gly 102和Trp 103。在某些实施方案中,抗体包含含有互补位的VH区,所述互补位包含氨基酸残基Ser 31、Tyr 32、Trp 33、His 35、Trp 47、Asp 52、Asp 54、Tyr 56、Ser 94、Ser 95、Asp 96、Ala 97、Gly 101、Gly 102和Trp 103。

[0031] 在某些实施方案中,本文描述了分离的抗体,其中所述抗体包含含有互补位的VL区,所述互补位包含氨基酸残基His 27、Tyr 32、Tyr 36、Leu 46、Tyr 49、Gln 50、Ala 91或Asn 91、Leu 92、Leu 94和Leu 96中的任一个。在某些实施方案中,抗体包含含有互补位的VL区,所述互补位包含氨基酸残基His 27、Tyr 32、Tyr 36、Leu 46、Tyr 49、Gln 50、Ala 91或Asn 91、Leu 92、Leu 94和Leu 96的至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或全部10个。在某些实施方案中,抗体包含含有互补位的VL区,所述互补位包含氨基酸残基His 27、Tyr 32、Tyr 36、Leu 46、Gln 50、Leu 92、Leu 94和Leu 96。在某些实施方案中,抗体包含含有互补位的VL区,所述互补位包含氨基酸残基His 27、Tyr 32、Tyr 36、Leu 46、Gln 50、Asn 91、Leu 92、Leu 94和Leu 96。在某些实施方案中,抗体包含含有互补位的VL区,所述互补位包含氨基酸残基His 27、Tyr 32、Tyr 36、Leu 46、Tyr 49、Gln 50、Ala 91、Leu 92、Leu 94和Leu 96。

附图说明

[0032] 参照以下说明及附图,本发明的这些和其他特征、方面和优点将更好地理解,其中:

[0033] 图1是与N-末端生物素化的纤维蛋白P2γ肽结合的抗体文库的FACS分析的图,其显示三轮抗体亲和力成熟的结果,其中一个文库从三种亲本人源化抗体之一(克隆56657)产生。

[0034] 图2A是显示用所示人源化抗体变体和P2肽进行的酶联免疫吸附测定(ELISA)的结果的图。A=克隆60143;B=克隆61278;C=克隆61278(重复);D=亲本抗体。

[0035] 图2B是显示用所示人源化抗体变体和FGG(纤维蛋白原)进行的酶联免疫吸附测定(ELISA)的结果的图。A＝克隆60143;B＝克隆61278;C＝克隆61278(重复);D＝亲本抗体。

[0036] 图2C是显示用所示人源化抗体变体和纤维蛋白进行的酶联免疫吸附测定(ELISA)的结果的图。A＝克隆60143;B＝克隆61278;C＝克隆61278(重复);D＝亲本抗体。

[0037] 图3A和3B是显示在变体人源化抗体存在下样品的凝块溶解时间的分析的结果的图。A＝克隆56666;B＝克隆56657;C＝克隆60143;D＝克隆60181;E＝克隆60175;F＝克隆60163;G＝克隆60173;H＝克隆60184;I＝克隆60141;J＝克隆60179;K＝克隆60140;L＝克隆60183。

[0038] 图4是显示用溶液中的与IgG偶联的N-末端生物素化纤维蛋白P2γ肽(100nM)或溶液中的FAB(单价)(100nM)的本文所述ForteBio K_D测量结果的图。显示了测试的抗体克隆。

[0039] 图5是显示与SA传感器上N-末端生物素化的纤维蛋白P2γ肽及溶液中100mM Fab的octet Fab结合的结果的图。显示了测试的抗体克隆。

[0040] 图6是显示I.V注射人工脑脊液(acsf)、单独的纤维蛋白原或纤维蛋白原和10mg/Kg(“10”)或30mg/Kg(“30”)的指定抗体克隆的纤维蛋白原诱导脑脊髓炎(FIE)小鼠模型的脑组织切片的染色的图。切片用Iba-1(左)(小胶质细胞标志物,1:750稀释)或Mac-2(右)(巨噬细胞浸润标志物,1:750稀释)染色。

[0041] 图7是显示来自实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型的小鼠的临床评分的图,所述小鼠接受单独的PBS、单独的IgG1、抗体克隆60143、抗体克隆61278或地塞米松的预防性注射。抗体每3天通过腹膜内注射以5mg/kg进行注射。

[0042] 图8显示来自实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型的小鼠的疾病发作(左)和瘫痪率(右)的图,所述小鼠接受单独的PBS、单独的IgG1、抗体克隆60143、抗体克隆61278或地塞米松的预防性注射。抗体每3天通过腹膜内注射以5mg/kg进行注射。

[0043] 图9是显示来自实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型的小鼠的临床评分的图,所述小鼠接受单独的PBS、地塞米松、抗体克隆60143(左)或对照抗体人IgG1(右)的预防性注射。

[0044] 图10是显示来自实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型的瘫痪小鼠(完全瘫痪-左)或(部分后肢瘫痪-右)的比例的图,所述小鼠接受单独的PBS、地塞米松(dexa)、抗体克隆6043(在指定浓度下;5＝5mg/kg,1＝1mg/kg和0.2＝0.2mg/kg)或对照抗体人IgG1(5mg/kg)的预防性注射。

[0045] 图11是显示BMDM细胞系的基因表达测定工作流程的图解。

[0046] 图12是显示与纤维蛋白原和纤维蛋白,50μg/mL(左)或10μg/ml(右)抗体的IgG1、抗体克隆60143和抗体克隆61278孵育后BMDM细胞中白介素(IL)-12b表达的图。

[0047] 图13是显示与指示浓度的纤维蛋白原和抗体克隆61278(左)或抗体克隆60143(右)孵育后BMDM细胞中白介素(IL)-12b表达的图。

[0048] 图14是显示静脉内注射5mg/kg或30mg/kg抗体克隆60143或同种型对照抗体人IgG1的动物中的葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎小鼠模型中结肠炎的生理症状减少的图。

[0049] 图15A和图15B显示以10mg/kg和30mg/kg注射的[^{125}I]SIB-60143和[^{125}I]SIB-61278在小鼠血液(A)和血浆(B)中的摄取(％ID),对于理论血液和血浆体积进行校正。

[0050] 图16A、图16B、图16C和图16D显示了在小鼠中以10mg/kg(A和C)和30mg/kg(B和D)注射的[^{125}I]SIB-60143(A和B)和[^{125}I]SIB-61278(C和D)随时间的离体生物分布。

[0051] 图17是描述与P2肽复合的抗体克隆60143(ADI60143)和抗体克隆61278(ADI61278)的Fab的晶体结构的图(共晶-右)。还显示了纤维蛋白原(FGG)的结构和P2-肽的位置(左下)。

[0052] 图18是描述与P2肽复合的抗体克隆60143(ADI60143)和抗体克隆61278(ADI61278)的Fab的重叠结构的图解。

[0053] 图19是描述抗体克隆60143(ADI60143)和抗体克隆61278(ADI61278)的结合亲和力的图。使用Octet RED384测定ADI-60143和ADI-61278Fab与P2肽的结合。

[0054] (图21和22),对于来自不同物种的三种P2肽观察到类似的结合特征。然而,三个物种的延长P2肽不能很好地结合ADI-60143Fab(图22)。

[0055] 图20A是描述通过ELISA测定的ADI-60143Fab与大鼠、小鼠或人P2肽的结合的图。

[0056] 图20B是描述通过ELISA测定的ADI-60143IgG与大鼠、小鼠或人P2肽的结合的图。

[0057] 图21是描述通过ELISA测定的ADI-60143IgG与大鼠、小鼠或人延长P2肽的结合的图。

[0058] 图22A是描述为在纤维蛋白诱导的脑炎(FIE)小鼠模型中测定小胶质细胞激活和巨噬细胞募集而进行的实验方案的图解。

[0059] 图22B是描述用于测定施用acsf(人工脑脊液)、纤维蛋白原、IgG同种型对照(30mg/Kg)、亲本人源化抗体克隆THN227(未亲和力成熟的)(10或30mg/Kg)和亲和力成熟的抗体克隆ADI-60143(10或30mg/Kg)的FIE小鼠脑组织切片中的小胶质细胞激活的Iba-1阳性染色的面积百分比的图。

[0060] 图22C是描述用于测定施用acsf(人工脑脊液)、纤维蛋白原、IgG同种型对照(30mg/Kg)、亲本人源化抗体克隆THN227(未亲和成熟的)(10或30mg/Kg)和亲和力成熟的抗体克隆ADI-60143(10或30mg/Kg)的FIE小鼠脑组织切片中的巨噬细胞浸润的Mac-2阳性染色的面积百分比的图。

[0061] 图23是显示来自ADI-60143染色的健康和EAE小鼠脊髓的组织切片的图像。

[0062] 图24A是描述施用PBS、地塞米松(DEXA)及0.2、1或5mg/Kg抗体克隆ADI-60143的EAE小鼠脊髓的组织切片的MBP染色确定的脱髓鞘的图。

[0063] 图24B是显示施用PBS、地塞米松(DEXA)及0.2、1或5mg/Kg抗体克隆ADI-60143的表现出后肢完全瘫痪的EAE小鼠的百分比的图。

[0064] 图25是描述施用同种型对照、抗体克隆ADI-60143IgG和抗体克隆ADI-60143-具有Fc稳定化LALA突变的EAE小鼠及无EAE诱导的未处理小鼠的临床评分的图。

[0065] 图26A是描述施用同种型对照、抗体克隆ADI-60143IgG和抗体克隆ADI-60143-具有Fc稳定化LALA突变的EAE小鼠及无EAE诱导的未处理小鼠的总炎性病灶/脊髓组织切片的平均数的图。

[0066] 图26B是描述施用同种型对照、抗体克隆ADI-60143IgG和抗体克隆ADI-60143-具有Fc稳定化LALA突变的EAE小鼠及无EAE诱导的未处理小鼠的每组织切片的百分CD11b+面积的图。

[0067] 图27是描述玻璃体内施用同种型对照、鼠源化抗体克隆ADI-60143(具有Fc稳定化

LALA突变)(低剂量＝10μg/眼;高剂量＝50μg/眼)、阳性对照FTY-720(通过口饲以0.3mg/kg的剂量施用)的大鼠及无EAE诱导的未处理小鼠的葡萄膜炎临床评分的图。

具体实施方式

[0068] 定义

[0069] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术术语、符号和其它科学术语旨在具有本领域技术人员通常所理解的含义。在一些情况下,为清楚和/或便于参考起见,本文定义了具有通常理解的含义的术语,并且本文此类定义的包括不必被解释为与本领域通常所理解的相比表示出不同。本文所描述或引用的技术和程序通常被很好地理解,且通过通常被本领域技术人员使用常规方法采用,诸如,例如,描述于Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual第4版(2012)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY中的广泛使用的分子克隆技术。适当时,通常根据制造商规定的方案和条件来实施包括使用市售试剂盒和试剂的程序,除非另外说明。

[0070] 除非另外指明,如本文所用,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指代。

[0071] 应理解,本文所述的本发明的方面和实施方案包括“包含”该方面和实施方案、“由该方面和实施方案组成”和“基本上由该方面和实施方案组成”。

[0072] 对于本文描述的所有组合物和使用本文描述的组合物的所有方法,该组合物可以包含列出的组分或步骤,或可以“基本上由列出的组分或步骤组成”。当组合物被描述为“基本上由所列出的组分组成”时,该组合物含有所列出的组分,并且可以含有不实质上影响所治疗的病症的其他组分,但不含有除了明确列出的那些组分之外的实质上影响所治疗的病症的任何其他组分;或者,如果组合物确实含有除了所列出的那些以外的实质影响所治疗的病症的额外组分,则组合物不含有足以实质影响所治疗的病症的浓度或量的额外组分。当某方法被描述为“基本上由所列出的步骤组成”时,该方法包含所列出的步骤,并且可以包含不实质上影响所治疗的病症的其它步骤,但是该方法不包含除了明确列出的那些步骤之外的实质上影响所治疗的病症的任何其它步骤。作为非限制性具体实例,当组合物被描述为“基本上由某组分组成”时,该组合物可另外含有任何量的药学上可接受的载体、溶媒或稀释剂和不实质上影响所治疗的病症的其它此类组分。

[0073] 本文所用的术语“载体”是指能够增殖与其连接的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自身复制核酸结构的载体以及整合到其已引入其中的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作连接的核酸的表达。这些载体在本文中称为“表达载体”。

[0074] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且是指已向其中引入外源核酸的细胞,以及此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”(或“转化的细胞”)和“转染体”(或“转染的细胞”),其各自包括原代转化或转染的细胞和由其衍生的后代。这样的后代在核酸含量上可能与亲本细胞不完全相同,并且可能含有突变。“重组宿主细胞”或“宿主细胞”是指包含外源多核苷酸的细胞,而不管用于插入的方法,例如直接摄取、转导、f-接合(f-mating)或本领域已知的产生重组宿主细胞的其它方法。

[0075] 如本文所用,术语“真核生物”是指属于系统发生真核生物域的生物体,例如动物(包括但不限于哺乳动物、昆虫、爬行动物、鸟类等)、纤毛虫、植物(包括但不限于单子叶植物、双子叶植物、藻类等)、真菌、酵母、鞭毛虫、微孢子虫、原生生物等。

[0076] 如本文所用,术语“原核生物”是指原核生物体。例如,非真核生物体可以属于真细菌(包括但不限于大肠杆菌、嗜热栖热菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、荧光假单胞菌、铜绿假单胞菌、恶臭假单胞菌等)系统发生域,或古细菌(包括但不限于詹氏甲烷球菌、热自养甲烷杆菌、盐杆菌如沃氏富盐菌(Haloferax volcanii)和盐杆菌物种NRC-1、灰白古生球菌、强烈火球菌、霍氏火球菌、Aeropyrum pernix等)系统发生域。

[0077] 如本文所用的“有效量”或“治疗有效量”是指作为单一剂量或作为一系列剂量的一部分施用于个体的治疗化合物(诸如抗FIBRIN抗体)的量,其单独或与另一治疗形式组合有效地产生或有助于所需治疗效果。期望的治疗效果的实例是增强免疫反应、减缓或延迟肿瘤发展;疾病的稳定;缓解一种或多种症状。有效量可以以一个或多个剂量给予。

[0078] 术语“治疗”(及其变化形式,如“处理”或“疗法”)是指试图改变有需要的受试者的疾病或病症的自然过程的临床干预。治疗可以在临床病理过程中进行。期望的治疗效果包括预防疾病的复发、缓解症状、减少疾病的任何直接或间接病理学后果、预防转移、降低疾病进展的速率、改善或减轻疾病状态以及缓解或改善的预后。

[0079] 术语“足够量”是指足以产生所需效果的量,例如足以调节受试者的免疫反应的量。

[0080] 如本文所用,术语“受试者”或“个体”是指哺乳动物受试者。示例性受试者包括人、猴、狗、猫、小鼠、大鼠、牛、马、骆驼、山羊、兔和绵羊。在某些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,受试者患有可用本文提供的抗体治疗的疾病或病症。在一些方面,所述疾病或病症是癌症。在一些方面,所述疾病或病症是病毒感染。

[0081] 术语“体外”是指在与活生物体分开生长的活细胞中发生的过程,例如在组织培养物中生长。

[0082] 术语“体内”是指在活生物体中发生的过程。

[0083] 术语“包装插页”用于指通常包括在治疗或诊断产品(例如,试剂盒)的商业包装中的说明书,其含有关于适应症、用法、剂量、给药、组合疗法、禁忌和/或关于此类治疗或诊断产品的使用的警告的信息。

[0084] 术语“药物组合物”是指其形式使得包含在其中的活性成分的生物学活性在治疗受试者中是有效的,并且其不含以药物组合物中提供的量对受试者具有不可接受的毒性的另外的组分的制剂。

[0085] 术语“共同施用”、“共施用”和“与…组合”包括在非具体时间限制内同时、并行或依次施用两种或更多种治疗剂。在一个实施方案中,药剂同时存在于细胞中或受试者体内,或同时发挥其生物学或治疗作用。在一个实施方案中,治疗剂在同一组合物或单位剂型中。在其它实施方案中,治疗剂在单独的组合物或单位剂型中。在某些实施方案中,可以在施用第二治疗剂之前施用第一药剂。

[0086] 术语“调节”和“调整”是指减少或抑制,或者可选地激活或增加所述的变量。

[0087] 术语“增加”和“激活”是指所述的变量增加10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或更多。

[0088] 术语“降低”和“抑制”是指所述的变量降低10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或更多。

[0089] 术语“约”表示和涵盖所指示的值和高于和低于该值的范围。在某些实施方案中，术语“约”表示指定值±10%、±5%或±1%。在某些实施方案中，当适用时，术语“约”表示指定值±该值的一个标准偏差。

[0090] 术语“激动”是指激活受体信号传导以诱导与受体激活相关的生物学反应。“激动剂”是结合并激动受体的实体。

[0091] 术语“拮抗”是指抑制受体信号传导以抑制与受体激活相关的生物学反应。“拮抗剂”是结合并拮抗受体的实体。

[0092] 对于本文所述的任何结构和功能特征，确定这些特征的方法是本领域已知的。

[0093] 当顺序使用时，术语“任选地”意指包括一个至所有列举的组合并且涵盖所有子组合。

[0094] 术语“氨基酸”是指20种常见的天然存在的氨基酸。天然存在的氨基酸包括丙氨酸(Ala;A)、精氨酸(Arg;R)、天冬酰胺(Asn;N)、天冬氨酸(Asp;D)、半胱氨酸(Cys;C)；谷氨酸(Glu;E)、谷氨酰胺(Gln;Q)、甘氨酸(Gly;G)；组氨酸(His;H)、异亮氨酸(Ile;I)、亮氨酸(Leu;L)、赖氨酸(Lys;K)、甲硫氨酸;M)、苯丙氨酸(Phe;F)、脯氨酸(Pro;P)、丝氨酸(Ser;S)、苏氨酸(Thr;T)、色氨酸(Trp;W)、酪氨酸(Tyr;Y)和缬氨酸(Val;V)。

[0095] 术语“亲和力”是指分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合伴体(例如抗原或表位)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指示，否则如本文所用，“亲和力”是指反映结合对的成员(例如抗体和抗原或表位)之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。

[0096] 本文所用的术语“k_d”(sec^{-1})是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数。该值也称为k_{off}值。

[0097] 如本文所用，术语“k_a”($M^{-1}\times sec^{-1}$)是指特定抗体-抗原相互作用的结合速率常数。该值也称为k_{on}值。

[0098] 本文所用的术语“K_D”(M)是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。$K_D=k_d/k_a$。在一些实施方案中，抗体的亲和力以关于此种抗体与其抗原之间的相互作用的K_D描述。为清楚起见，如本领域中所知，较小K_D值指示较高亲和相互作用，而较大K_D值指示较低亲和相互作用。

[0099] 如本文所用的术语“K_A”(M^{-1})是指特定抗体-抗原相互作用的结合平衡常数。$K_A=k_a/k_d$。

[0100] 术语“抗体”在本文中以它的最广泛意义使用，并且包括包含一个或多个特异性结合抗原或表位的抗原结合结构域的某些类型的免疫球蛋白分子。抗体具体地包括完整抗体(例如完整免疫球蛋白)、抗体片段和多特异性抗体。

[0101] 本文提供的“纤维蛋白抗体”、“抗纤维蛋白抗体”或“纤维蛋白特异性抗体”是特异性结合抗原纤维蛋白的抗体。在一些实施方案中，抗体结合纤维蛋白的细胞外结构域。在某些实施方案中，本文提供的纤维蛋白抗体结合来自不同物种的纤维蛋白之间或其间保守的纤维蛋白的表位。

[0102] 术语“表位”是指特异性结合抗体的抗原部分。

[0103] 本文所用的术语“高变区”或“HVR”是指抗体可变域中序列高度可变的和/或形成结构上限定的环(“高变环”)的区域中的每一个。

[0104] 术语“抗原结合结构域”意指能够与抗原或表位特异性结合的抗体的部分。

[0105] 术语“嵌合抗体”是指其中重链和/或轻链的一部分源于特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分源于不同来源或物种的抗体。

[0106] 术语“人抗体”是具有对应于由人或人细胞产生或源于利用人抗体谱系或人抗体编码序列(例如从人来源获得或从头设计)的非人来源的抗体的氨基酸序列的氨基酸序列的抗体。人抗体明确排除人源化抗体。

[0107] 术语“人源化抗体”是指具有与源自非人物种抗体的序列相差一个或多个氨基酸置换、删除和/或添加的序列的蛋白质,使得当施用于人类受试者时,与非人物种抗体相比,人源化抗体较少可能诱发免疫反应,和/或诱发较低严重性的免疫反应。

[0108] 术语“多特异性抗体”是指包含共同地特异性结合两个或更多个不同表位的两个或更多个不同抗原结合结构域的抗体。

[0109] “单特异性抗体”是包含一个或多个特异性结合单一表位的结合位点的抗体。单特异性抗体的实例是天然存在的IgG分子,所述IgG分子虽然是二价的(即具有两个抗原结合结构域),但在两个抗原结合结构域中的每一个处识别相同表位。结合特异性可以任何适合的价存在。

[0110] 术语“单克隆抗体”是指来自基本上同质抗体的群体的抗体。基本上同质抗体的群体包含基本上类似,并且结合相同表位的抗体,除可在单克隆抗体的产生期间通常产生的变体外。此类变体通常仅少量存在。单克隆抗体通常通过包括从多种抗体选择单一抗体的方法获得。例如,选择方法可为从多种克隆诸如杂交瘤克隆、噬菌体克隆、酵母克隆、细菌克隆或其他重组DNA克隆的汇合选择独特的克隆。所选的可加以进一步改变,例如以使对靶标的亲和力改进(“亲和力成熟”),以使抗体人源化,以使改进其在细胞培养中的产生和/或以降低其在受试者中的免疫原性。

[0111] 术语“单链”是指包含通过肽键线性连接的氨基酸单体的分子。在具体的这种实施方案中,单链Fab分子中Fab轻链的C-末端与Fab重链的N-末端连接。如本文更详细描述的,scFv具有通过多肽链从其C-末端连接到重链可变结构域(VH)的N-末端的轻链可变结构域(VL)。或者,scFv由其中VH的C-末端通过多肽链与VL的N-末端连接的多肽链组成。

[0112] “Fab片段”(也称为抗原结合片段)含有轻链的恒定域(CL)和重链的第一恒定域(CH1)以及分别在轻链和重链上的可变结构域VL和VH。可变结构域包含参与抗原结合的互补决定环(CDR,也称为高变区)。Fab′片段与Fab片段的不同之处在于在重链CH1结构域的羧基末端添加几个残基,其包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。

[0113] “$F(ab')_2$”片段含有两个在铰链区附近通过二硫键接合的Fab’片段。$F(ab')_2$片段可例如通过重组方法或通过胃蛋白酶消化完整抗体来产生。F(ab’)片段可例如通过用β-巯基乙醇处理来解离。

[0114] “Fv”片段包含一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的非共价连接二聚体。

[0115] “单链Fv”或“sFv”或“scFv”包括抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中。在一个实施方案中,Fv多肽还包含VH和VL结构域之间的多肽接头,其使得scFv能够形成抗原结合所需的结构。关于scFv的综述,参见Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,vol.113,Rosenburg and Moore eds.,Springer-Verlag,New York,pp.269-315(1994)。HER2抗体scFv片段描述于WO93/16185中;美国专利No.5,571,894;和美国专利No.5,587,458。

[0116] “scFv-Fc”片段包含附接于Fc结构域的scFv。例如,Fc结构域可附接于scFv的C-末端。根据scFv中的可变结构域的定向(即VH-VL或VL-VH),Fc结构域可在VH或VL之后。可使用本领域中已知或本文所述的任何合适的Fc结构域。在一些情况下,Fc结构域包含IgG4Fc结构域。

[0117] 术语“单结构域抗体”或“sdAb”是指其中抗体的一个可变结构域在不存在另一可变结构域下特异性结合抗原的分子。单结构域抗体及其片段描述于Arabi Ghahroudi等,FEBS Letters,1998,414:521-526以及Muyldermans等,Trends in Biochem.Sci.,2001,26:230-245中,其各自以引用的方式整体并入。单结构域抗体也被称为sdAb或纳米抗体。Sdab相当稳定且易于作为与抗体Fc链的融合伴体表达(Harmsen MM,De Haard HJ(2007).″Properties,production,and applications of camelid single-domain antibody fragments″.Appl.Microbiol Biotechnol.77(1):13-22)。

[0118] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用以指代具有与天然存在的抗体结构基本上类似的结构,以及具有包含Fc区的重链的抗体。例如,当用于指代IgG分子时,“全长抗体”是包含两条重链和两条轻链的抗体。

[0119] 术语“抗体片段”是指包含完整抗体的一部分,诸如完整抗体的抗原结合区或可变区的抗体。抗体片段包括例如Fv片段、Fab片段、$F(ab')_2$片段、Fab'片段、scFv(sFv)片段和scFv-Fc片段。

[0120] 术语“Fc结构域”或“Fc区”在本文中用于定义含有恒定区的至少一部分的免疫球蛋白重链的C-末端区。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。

[0121] 术语“基本上纯化的”是指本文所述的构建体或其变体,其可以基本上或实质上不含在其天然存在的环境(即天然细胞,或在重组产生的异多聚体的情况下的宿主细胞)中发现的通常伴随或与蛋白质相互作用的组分,其在某些实施方案中基本上不含细胞物质,包括具有少于约30%、少于约25%、少于约20%、少于约15%、少于约10%、少于约5%、少于约4%、少于约3%、少于约2%或少于约1%(按干重计)的污染性蛋白质的蛋白质制剂。

[0122] 术语百分“同一性”在两个或更多个核酸或多肽序列的情况中是指,当比较和对于最大对应性比对时,具有指定百分比的相同的核苷酸或氨基酸残基的两个或更多个序列或子序列,如使用下述序列比较算法之一(例如,使用公众可得的计算机软件如BLAST、BLASTP、BLASTN、BLAST-2、ALIGN、MEGALIGN(DNASTAR)、CLUSTALW、CLUSTAL OMEGA或MUSCLE软件或技术人员可获得的其它算法)或通过目视检查所测量的。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(ncbi.nlm.nih.gov)公开可得。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括在被比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。取决于应用,百分“同一性”可以存在于被比较的序列的区域上,例如,存在于功能域上,或可选地,存在于待比较的两个序列的全长上。

[0123] 对于序列比较,通常一个序列作为测试序列与其比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将测试和参考序列输入计算机中,如果需要,指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。然后序列比较算法基于指定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的百分序列同一性。

[0124] 用于比较的序列的最佳比对可以例如通过Smith&Waterman,Adv.Appl.Math.2:482(1981)的局部同源算法,由Needleman&Wunsch,J.Mol.Biol.48:443(1970)的同源比对

算法,由Pearson&Lipman,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 85:2444(1988)的相似性检索方法,通过这些算法的计算机化实现(Wisconsin Genetics Software Package,Genetics Computer Group,575Science Dr.,Madison,Wis.中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA),或通过目视检查(一般参见Ausubel等,下文)进行。

[0125] 本文所述的范围应理解为该范围内的所有值的速记,包括所陈述的端点在内。例如,1至50的范围应理解为包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49和50组成的组中的任何数字、数字的组合或子范围。

[0126] 必须注意的是,如在说明书和所附权利要求中所使用的,单数形式"一个"、"一种"和"该"包括复数指示物,除非上下文另外清楚地指明。

[0127] 抗纤维蛋白抗体

[0128] 抗体结构

[0129] 本申请提供了结合纤维蛋白的抗体和包含抗体的组合物。

[0130] 识别的免疫球蛋白基因包括κ、λ、α、γ、δ、ε和μ恒定区基因,以及无数免疫球蛋白可变区基因。轻链分为κ或λ。抗体或免疫球蛋白的"类别"是指由其重链拥有的恒定结构域或恒定区的类型。有五大抗体类别:可以将IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,且其中的几种可进一步分成亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同免疫球蛋白类别的重链恒定结构域分别称为α、δ、ε、γ和μ。

[0131] 示例性的免疫球蛋白(抗体)结构单元由两对多肽链组成,每对具有一条"轻链"(约25kD)和一条"重链"(约50-70kD)。每条链的N-末端结构域定义了主要负责抗原识别的约100-110或更多个氨基酸的可变区。术语可变轻链(VL)和可变重链(VH)分别指这些轻链和重链结构域。IgG1重链从N-到C-末端分别由VH、CH1、CH2和CH3结构域组成。轻链从N-到C-末端由VL和CL结构域组成。IgG1重链包含CH1和CH2结构域之间的铰链。在某些实施方案中,免疫球蛋白构建体包含与治疗性多肽连接的来自IgG、IgM、IgA、IgD或IgE的至少一个免疫球蛋白结构域。在一些实施方案中,在本文提供的抗体中发现的免疫球蛋白结构域来自或源自基于免疫球蛋白的构建体,例如双体抗体或纳米抗体。在某些实施方案中,本文所述的免疫球蛋白构建体包含至少一个来自重链抗体如骆驼抗体的免疫球蛋白结构域。在某些实施方案中,本文提供的免疫球蛋白构建体包含至少一个来自哺乳动物抗体如牛抗体、人抗体、骆驼抗体、小鼠抗体或任何嵌合抗体的免疫球蛋白结构域。

[0132] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含重链。在一个实施方案中,重链是IgA。在一个实施方案中,重链是IgD。在一个实施方案中,重链是IgE。在一个实施方案中,重链是IgG。在一个实施方案中,重链是IgM。在一个实施方案中,重链是IgG1。在一个实施方案中,重链是IgG2。在一个实施方案中,重链是IgG3。在一个实施方案中,重链是IgG4。在一个实施方案中,重链是IgA1。在一个实施方案中,重链是IgA2。

[0133] 在一些实施方案中,抗体是IgG1抗体。在一些实施方案中,抗体是IgG3抗体。在一些实施方案中,抗体是IgG2抗体。在一些实施方案中,抗体是IgG4抗体。

[0134] 通常,天然四链抗体包含六个HVR;VH中有三个(H1、H2、H3),和VL中有三个(L1、L2、L3)。HVR通常包含来自高变环和/或来自互补决定区(CDR)的氨基酸残基,后者具有最高的序列变异性和/或参与抗原识别。VH中的CDR1除外,CDR通常包含形成高变环的氨基酸残基。

高变区(HVR)也称为“互补决定区”(CDR),并且这些术语在本文中就形成抗原结合区的可变区的部分而言可互换使用。Kabat等人,U.S.Dept.of Health and Human Services,Sequences of Proteins of Immunological Interest(1983)和Chothia等人,J Mol Biol 196:901-917(1987)描述了这一特定区域,其中该定义包括当相互比较时氨基酸残基的重叠或子集。然而,将任一定义应用于指抗体或其变体的CDR意图在如本文所定义和使用的术语的范围内。包含特定CDR的确切残基数目将根据CDR的序列和大小而变化。在给出抗体的可变区氨基酸序列的情况下,本领域技术人员可常规确定哪些残基构成特定CDR。

[0135] CDR的氨基酸序列边界可以由本领域技术人员使用多种已知的编号方案中的任一种来确定,包括Kabat等人,同上(“Kabat”编号方案);Al-Lazikani等人,1997,J.Mol.Biol.,273:927-948(“Chothia”编号方案);MacCallum等人,1996,J.Mol.Biol.262:732-745(“Contact”编号方案);Lefranc等人,Dev.Comp.Immunol.,2003,27:55-77(“IMGT”编号方案);以及Honegge和Plückthun,J.Mol.Biol.,2001,309:657-70(“AHo”编号方案)所述的那些;其每一个通过引用整体并入本文。

[0136] 表A提供了由Kabat和Chothia方案确定的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的位置。对于CDR-H1,使用Kabat和Chothia编号方案提供残基编号。

[0137] 例如,可以使用抗体编号软件分配CDR,如Abnum,其可在www.bioinf.org.uk/abs/abnum/获得,并且描述于Abhinandan和Martin,Immunology,2008,45:3832-3839,其通过引用全文并入。

[0138] 表A.根据Kabat和Chothia编号方案的CDR中的残基。

[0139]

表A		
CDR	**Kabat**	**Chothia**
L1	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97
H1 (Kabat编号)	H31-H35B	H26-H32或H34*
H1 (Chothia编号)	H31-H35	H26-H32
H2	H50-H65	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102

[0140] *当使用Kabat编号惯例编号时,CDR-H1的C-末端在H32和H34之间变化,取决于CDR的长度。

[0141] 当提及抗体重链恒定区中的残基时,通常使用“EU编号方案”(例如,如报告于Kabat等,同上)。除非另外说明,否则EU编号方案用于提及本文所述的抗体重链恒定区中的残基。

[0142] 抗原结合结构域的一个实例是由抗体的VH-VL二聚体形成的抗原结合结构域。抗原结合结构域的另一个实例是通过Adnectin的第十纤连蛋白III型结构域的某些环的多样化形成的抗原结合结构域。抗原结合结构域可以包括按顺序来自重链的CDR1、2和3;以及按顺序来自轻链的CDR1、2和3。

[0143] 表位通常由表面可接近的氨基酸残基和/或糖侧链组成,并且可以具有特定的三

维结构特征以及特定的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于在变性溶剂的存在下与前者而不是后者的结合可能丧失。表位可包含直接参与结合的氨基酸残基和不直接参与结合的其它氨基酸残基。抗体与其结合的表位可以使用已知的表位确定技术来确定,例如测试抗体与具有不同点突变的纤维蛋白变体或与嵌合纤维蛋白变体的结合。

[0144] 为了筛选与目标抗体结合的靶抗原(例如纤维蛋白)上的表位结合的抗体,可以进行常规的交叉阻断测定,如Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Ed Harlow和David Lane(1988)中所述。可选地或另外地,可通过本领域已知的方法进行表位作图。

[0145] 嵌合抗体是其中重链和/或轻链的一部分衍生自特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分衍生自不同来源或物种的抗体。

[0146] 人抗体是具有对应于由人或人细胞产生的抗体,或衍生自利用人抗体库或人抗体编码序列(例如,从人来源获得或从头设计)的非人来源的抗体的氨基酸序列的抗体。人抗体特别排除人源化抗体。

[0147] 人源化抗体具有通过一个或多个氨基酸置换、缺失和/或添加而与源自非人物种的抗体的序列不同的序列,使得当将其施用于人类受试者时,与非人物种抗体相比,人源化抗体较少可能诱导免疫反应,和/或诱导较不严重的免疫反应。在一个实施方案中,非人物种抗体的重链和/或轻链的框架和恒定结构域中的某些氨基酸突变以产生人源化抗体。在另一个实施方案中,来自人抗体的恒定结构域与非人物种的可变结构域融合。在另一个实施方案中,改变非人抗体的一个或多个CDR序列中的一个或多个氨基酸残基,以降低非人抗体施用于人受试者时可能的免疫原性,其中改变的氨基酸残基对于抗体与其抗原的免疫特异性结合不是关键的,或者所产生的氨基酸序列的改变是保守性改变,使得人源化抗体与抗原的结合不显著差于非人抗体与抗原的结合。如何制备人源化抗体的实例可见于美国专利号6,054,297、5,886,152和5,877,293。更多细节参见Jones等人,Nature,1986,321:522-525;Riechmann等人,Nature,1988,332:323-329;和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.,1992,2:593-596,其各自全文以引用方式并入。

[0148] 两种或更多种不同的表位可以是相同抗原(例如,由细胞表达的单一纤维蛋白分子)上或不同抗原(例如,由相同细胞表达的不同纤维蛋白分子,或纤维蛋白分子和非纤维蛋白分子)上的表位。在一些方面,多特异性抗体结合两种不同的表位(即,“双特异性抗体”)。在一些方面,多特异性抗体结合三种不同的表位(即,“三特异性抗体”)。

[0149] 抗纤维蛋白抗体可包括本文所述的那些,例如附图和/或表格中列出的克隆。在一些实施方案中,抗体包含替代支架。在一些实施方案中,抗体由替代支架组成。在一些实施方案中,抗体基本上由替代支架组成。在一些实施方案中,抗体包含抗体片段。在一些实施方案中,抗体由抗体片段组成。在一些实施方案中,抗体基本上由抗体片段组成。

[0150] 在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体。

[0151] 在一些实施方案中,抗体是多克隆抗体。

[0152] 在一些实施方案中,抗体由杂交瘤产生。在其它实施方案中,抗体由经工程化以表达所需可变和恒定域的重组细胞产生。

[0153] 在一些实施方案中,抗体可以是单链抗体或保留抗原特异性和下铰链区的其它抗体衍生物或其变体。

[0154] 在一些实施方案中,抗体可以是多功能抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体、其片段或变体。在具体的实施方案中,抗体片段或其衍生物选自Fab片段、Fab′2片段、CDR和ScFv。

[0155] 在一些实施方案中,抗体能够形成免疫复合物。例如,免疫复合物可以是被抗体覆盖的肿瘤细胞。

[0156] 对于序列比较,通常一个序列用作测试序列与其比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将测试和参考序列输入计算机中,如果需要,指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。然后序列比较算法基于指定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的百分序列同一性。

[0157] 用于比较的序列的最佳比对可以例如通过Smith&Waterman,Adv.Appl.Math.2:482(1981)的局部同源算法,Needleman&Wunsch,J.Mol.Biol.48:443(1970)的同源比对算法,Pearson&Lipman,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 85:2444(1988)的相似性检索方法,通过这些算法的计算机化实现(Wisconsin Genetics Software Package,Genetics Computer Group,575Science Dr.,Madison,Wis.中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA),或通过目视检查(一般参见Ausubel等,下文)进行。

[0158] 适合于确定百分序列同一性和序列相似性的算法的一个实例是BLAST算法,其描述于Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403-410(1990)。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(www.ncbi.nlm.nih.gov/)公开获得。

[0159] 纤维蛋白抗体的序列

[0160] V_H结构域

[0161] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含选自SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20的V_H序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:7的V_H序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:8的V_H序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:9的V_H序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:10的V_H序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:11的V_H序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:12的V_H序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:13的V_H序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:14的V_H序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:15的V_H序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:16的V_H序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:17的V_H序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:18的V_H序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:19的V_H序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:20的V_H序列。

[0162] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含与SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20中提供的说明性V_H序列具有至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%同一性的V_H序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含具有至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸置换的SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20中提供的V_H序列。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为"变体"。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变

或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0163] V_L结构域

[0164] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含选自SEQ ID NO:21的V_L序列。

[0165] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含与SEQ ID NO:21中提供的说明性V_L序列具有至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%同一性的V_L序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含具有至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸置换的SEQ ID NO:21中提供的V_L序列。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为"变体"。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0166] VH-VL组合

[0167] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含选自SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20的V_H序列;和选自SEQ ID NO:21的V_L序列。

[0168] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:7的V_H序列和SEQ ID NO:21的V_L序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:8的V_H序列和SEQ ID NO:21的V_L序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:9的V_H序列和SEQ ID NO:21的V_L序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:10的V_H序列和SEQ ID NO:21的V_L序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:11的V_H序列和SEQ ID NO:21的V_L序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:12的V_H序列和SEQ ID NO:21的V_L序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:13的V_H序列和SEQ ID NO:21的V_L序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:14的V_H序列和SEQ ID NO:21的V_L序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:15的V_H序列和SEQ ID NO:21的V_L序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:16的V_H序列和SEQ ID NO:21的V_L序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:17的V_H序列和SEQ ID NO:21的V_L序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:18的V_H序列和SEQ ID NO:21的V_L序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:19的V_H序列和SEQ ID NO:21的V_L序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:20的V_H序列和SEQ ID NO:21的V_L序列。

[0169] 在某些方面,SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20中的任一个可以与SEQ ID NO:21中的任一个组合。

[0170] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含与SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20中提供的说明性V_H序列具有至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%同一性的V_H序列;和与SEQ ID NO:21中提供的说明性V_L序列具有至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%同一性的V_L序列。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含具有至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸置换的SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20中提供的V_H序列,和具有至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个

氨基酸置换的SEQ ID NO:21中提供的V_L序列。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0171] CDR

[0172] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含选自SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20的V_H结构域的一至三个CDR。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含选自SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20的V_H结构域的二至三个CDR。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含选自SEQ ID NO:37、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20的V_H结构域的三个CDR。在一些方面,CDR是示例性CDR。在一些方面,CDR是Kabat CDR。在一些方面,CDR是Chothia CDR。在一些方面,CDR是AbM CDR。在一些方面,CDR是Contact CDR。在一些方面,CDR是IMGT CDR。

[0173] 在一些实施方案中,CDR是与SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20的CDR-H1、CDR-H2或CDR-H3具有至少约50％、75％、80％、85％、90％或95％同一性的CDR。在一些实施方案中,CDR-H1是选自SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20的VH结构域的CDR-H1,其具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换。在一些实施方案中,CDR-H2是选自SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20的VH结构域的CDR-H2,其具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换。在一些实施方案中,CDR-H3是选自SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20的VH结构域的CDR-H3,其具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0174] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:21的VL结构域的一至三个CDR。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:21的VL结构域的二至三个CDR。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:21的VL结构域的三个CDR。在一些方面,CDR是示例性CDR。在一些方面,CDR是Kabat CDR。在一些方面,CDR是Chothia CDR。在一些方面,CDR是AbM CDR。在一些方面,CDR是Contact CDR。在一些方面,CDR是IMGT CDR。

[0175] 在一些实施方案中,CDR是与SEQ ID NO:21的CDR-L1、CDR-L2或CDR-L3具有至少约50％、75％、80％、85％、90％或95％同一性的CDR。在一些实施方案中,CDR-L1是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:21的VL结构域的CDR-L1。在一些实施方案中,CDR-L2是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:21的VL结构域的CDR-L2。在一些实施方案中,CDR-L3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:21的VL结构域的CDR-L3。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体

的方法从头分离。

[0176] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含选自SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20的VH结构域的一至三个CDR和SEQ ID NO:21的VL结构域的一至三个CDR。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含选自SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20的VH结构域的二至三个CDR和SEQ ID NO:21的VL结构域的二至三个CDR。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含选自SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20的VH结构域的三个CDR和SEQ ID NO:21的VL结构域的三个CDR。在一些方面,CDR是示例性CDR。在一些方面,CDR是Kabat CDR。在一些方面,CDR是Chothia CDR。在一些方面,CDR是AbM CDR。在一些方面,CDR是Contact CDR。在一些方面,CDR是IMGT CDR。

[0177] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含选自SEQ ID NO:24、25、26、27、28、29和30的CDR-H3。在一些方面,CDR-H3与SEQ ID NO:24、25、26、27、28、29和30的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的选自SEQ ID NO:24、25、26、27、28、29和30的CDR-H3。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0178] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含选自SEQ ID NO:24的CDR-H3。在一些方面,CDR-H3与SEQ ID NO:24的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的选自SEQ ID NO:24的CDR-H3。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0179] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含选自SEQ ID NO:25的CDR-H3。在一些方面,CDR-H3与SEQ ID NO:25的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的选自SEQ ID NO:25的CDR-H3。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0180] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含选自SEQ ID NO:26的CDR-H3。在一些方面,CDR-H3与SEQ ID NO:26的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的选自SEQ ID NO:26的CDR-H3。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实

施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0181] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含选自SEQ ID NO:27的CDR-H3。在一些方面,CDR-H3与SEQ ID NO:27的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的选自SEQ ID NO:27的CDR-H3。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为"变体"。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0182] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含选自SEQ ID NO:28的CDR-H3。在一些方面,CDR-H3与SEQ ID NO:28的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的选自SEQ ID NO:28的CDR-H3。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为"变体"。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0183] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含选自SEQ ID NO:29的CDR-H3。在一些方面,CDR-H3与SEQ ID NO:29的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的选自SEQ ID NO:29的CDR-H3。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为"变体"。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0184] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含选自SEQ ID NO:30的CDR-H3。在一些方面,CDR-H3与SEQ ID NO:30的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的选自SEQ ID NO:30的CDR-H3。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为"变体"。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0185] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含选自SEQ ID NO:3的CDR-H3。在一些方面,CDR-H3与SEQ ID NO:3的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的选自SEQ ID NO:3的CDR-H3。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为"变体"。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过

亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0186] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:1的CDR-H1。在一些方面,CDR-H1与SEQ ID NO:1的CDR-H1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H1是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:1的CDR-H1。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0187] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含选自SEQ ID NO:2的CDR-H2。在一些方面,CDR-H2与SEQ ID NO:2的CDR-H2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H2是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的选自SEQ ID NO:2的CDR-H2。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0188] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:24的CDR-H3和SEQ ID NO:2的CDR-H2。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:25的CDR-H3、SEQ ID NO:2的CDR-H2和SEQ ID NO:1的CDR-H1。在一些实施方案中,CDR-H3与SEQ ID NO:24的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,CDR-H2与SEQ ID NO:2的CDR-H2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,且CDR-H1与SEQ ID NO:1的CDR-H1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:24的CDR-H3;CDR-H2是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:2的CDR-H2;并且CDR-H1是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:1的CDR-H1。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0189] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:25的CDR-H3和SEQ ID NO:2的CDR-H2。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:25的CDR-H3、SEQ ID NO:2的CDR-H2和SEQ ID NO:1的CDR-H1。在一些实施方案中,CDR-H3与SEQ ID NO:25的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,CDR-H2与SEQ ID NO:2的CDR-H2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,且CDR-H1与SEQ ID NO:1的CDR-H1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:25的CDR-H3;CDR-H2是具有至多1、2、3、4、5、

6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:2的CDR-H2;并且CDR-H1是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:1的CDR-H1。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0190] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:26的CDR-H3和SEQ ID NO:2的CDR-H2。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:26的CDR-H3、SEQ ID NO:2的CDR-H2和SEQ ID NO:1的CDR-H1。在一些实施方案中,CDR-H3与SEQ ID NO:26的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,CDR-H2与SEQ ID NO:2的CDR-H2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,且CDR-H1与SEQ ID NO:1的CDR-H1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:26的CDR-H3;CDR-H2是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:2的CDR-H2;并且CDR-H1是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:1的CDR-H1。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0191] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:27的CDR-H3和SEQ ID NO:2的CDR-H2。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:27的CDR-H3、SEQ ID NO:2的CDR-H2和SEQ ID NO:1的CDR-H1。在一些实施方案中,CDR-H3与SEQ ID NO:27的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,CDR-H2与SEQ ID NO:2的CDR-H2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,且CDR-H1与SEQ ID NO:1的CDR-H1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:27的CDR-H3;CDR-H2是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:2的CDR-H2;并且CDR-H1是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:1的CDR-H1。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0192] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:28的CDR-H3和SEQ ID NO:2的CDR-H2。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:28的CDR-H3、SEQ ID NO:2的CDR-H2和SEQ ID NO:1的CDR-H1。在一些实施方案中,CDR-H3与SEQ ID NO:28的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,CDR-H2与SEQ ID NO:2的CDR-H2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,且CDR-H1与SEQ ID NO:1的CDR-H1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:28的CDR-H3;CDR-H2是具有至多1、2、3、4、5、

6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:2的CDR-H2;并且CDR-H1是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:1的CDR-H1。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0193] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:29的CDR-H3和SEQ ID NO:2的CDR-H2。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:29的CDR-H3、SEQ ID NO:2的CDR-H2和SEQ ID NO:1的CDR-H1。在一些实施方案中,CDR-H3与SEQ ID NO:29的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,CDR-H2与SEQ ID NO:2的CDR-H2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,且CDR-H1与SEQ ID NO:1的CDR-H1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:29的CDR-H3;CDR-H2是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:2的CDR-H2;并且CDR-H1是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:1的CDR-H1。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0194] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:30的CDR-H3和SEQ ID NO:2的CDR-H2。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:30的CDR-H3、SEQ ID NO:2的CDR-H2和SEQ ID NO:1的CDR-H1。在一些实施方案中,CDR-H3与SEQ ID NO:30的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,CDR-H2与SEQ ID NO:2的CDR-H2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,且CDR-H1与SEQ ID NO:1的CDR-H1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:30的CDR-H3;CDR-H2是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:2的CDR-H2;并且CDR-H1是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:1的CDR-H1。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0195] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:6的CDR-L3。在一些方面,CDR-L3与SEQ ID NO:6的CDR-L3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-L3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:6的CDR-L3。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方

法从头分离。

[0196] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:5的CDR-L2。在一些方面,CDR-L2与SEQ ID NO:5的CDR-L2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-L2是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:5的CDR-L2。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0197] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:4的CDR-L1。在一些方面,CDR-L1与SEQ ID NO:4的CDR-L1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-L1是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:4的CDR-L1。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0198] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:6的CDR-L3和SEQ ID NO:5的CDR-L2。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:6的CDR-L3、SEQ ID NO:5的CDR-L2和SEQ ID NO:4的CDR-L1。在一些实施方案中,CDR-L3与SEQ ID NO:6的CDR-L3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,CDR-L2与SEQ ID NO:5的CDR-L2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,且CDR-L1与SEQ ID NO:4的CDR-L1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-L3是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:6的CDR-L3;CDR-L2是具有至多1、2、3或4个氨基酸置换的SEQ ID NO:5的CDR-L2;并且CDR-L1是具有至多1、2、3、4、5或6个氨基酸置换的SEQ ID NO:4的CDR-L1。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,此处所述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0199] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:24的CDR-H3、SEQ ID NO:2的CDR-H2、SEQ ID NO:1的CDR-H1、SEQ ID NO:6的CDR-L3、SEQ ID NO:5的CDR-L2和SEQ ID NO:4的CDR-L1。在一些实施方案中,CDR-H3与SEQ ID NO:24的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-H2与SEQ ID NO:2的CDR-H2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-H1与SEQ ID NO:1的CDR-H1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-L3与SEQ ID NO:6的CDR-L3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-L2与SEQ ID NO:5的CDR-L2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,并且CDR-L1与SEQ ID NO:4的CDR-L1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、

4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:24的CDR-H3;CDR-H2是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:2的CDR-H2;CDR-H1是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:1的CDR-H1;CDR-L3是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:6的CDR-L3;CDR-L2是具有至多1、2、3或4个氨基酸置换的SEQ ID NO:5的CDR-L2;并且CDR-L1是具有至多1、2、3、4、5或6个氨基酸置换的SEQ ID NO:4的CDR-L1。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为"变体"。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0200] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:25的CDR-H3、SEQ ID NO:2的CDR-H2、SEQ ID NO:1的CDR-H1、SEQ ID NO:6的CDR-L3、SEQ ID NO:5的CDR-L2和SEQ ID NO:4的CDR-L1。在一些实施方案中,CDR-H3与SEQ ID NO:25的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-H2与SEQ ID NO:2的CDR-H2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-H1与SEQ ID NO:1的CDR-H1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-L3与SEQ ID NO:6的CDR-L3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-L2与SEQ ID NO:5的CDR-L2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,并且CDR-L1与SEQ ID NO:4的CDR-L1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:25的CDR-H3;CDR-H2是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:2的CDR-H2;CDR-H1是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:1的CDR-H1;CDR-L3是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:6的CDR-L3;CDR-L2是具有至多1、2、3或4个氨基酸置换的SEQ ID NO:5的CDR-L2;并且CDR-L1是具有至多1、2、3、4、5或6个氨基酸置换的SEQ ID NO:4的CDR-L1。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为"变体"。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0201] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:26的CDR-H3、SEQ ID NO:2的CDR-H2、SEQ ID NO:1的CDR-H1、SEQ ID NO:6的CDR-L3、SEQ ID NO:5的CDR-L2和SEQ ID NO:4的CDR-L1。在一些实施方案中,CDR-H3与SEQ ID NO:26的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-H2与SEQ ID NO:2的CDR-H2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-H1与SEQ ID NO:1的CDR-H1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-L3与SEQ ID NO:6的CDR-L3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-L2与SEQ ID NO:5的CDR-L2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,并且CDR-L1与SEQ ID NO:4的CDR-L1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:26的CDR-H3;CDR-H2是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:2的CDR-H2;CDR-H1是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:1的CDR-H1;CDR-L3是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:6的CDR-L3;

CDR-L2是具有至多1、2、3或4个氨基酸置换的SEQ ID NO:5的CDR-L2;并且CDR-L1是具有至多1、2、3、4、5或6个氨基酸置换的SEQ ID NO:4的CDR-L1。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0202] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:27的CDR-H3、SEQ ID NO:2的CDR-H2、SEQ ID NO:1的CDR-H1、SEQ ID NO:6的CDR-L3、SEQ ID NO:5的CDR-L2和SEQ ID NO:4的CDR-L1。在一些实施方案中,CDR-H3与SEQ ID NO:27的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-H2与SEQ ID NO:2的CDR-H2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-H1与SEQ ID NO:1的CDR-H1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-L3与SEQ ID NO:6的CDR-L3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-L2与SEQ ID NO:5的CDR-L2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,并且CDR-L1与SEQ ID NO:4的CDR-L1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%与或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:27的CDR-H3;CDR-H2是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:2的CDR-H2;CDR-H1是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:1的CDR-H1;CDR-L3是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:6的CDR-L3;CDR-L2是具有至多1、2、3或4个氨基酸置换的SEQ ID NO:5的CDR-L2;并且CDR-L1是具有至多1、2、3、4、5或6个氨基酸置换的SEQ ID NO:4的CDR-L1。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0203] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:28的CDR-H3、SEQ ID NO:2的CDR-H2、SEQ ID NO:1的CDR-H1、SEQ ID NO:6的CDR-L3、SEQ ID NO:5的CDR-L2和SEQ ID NO:4的CDR-L1。在一些实施方案中,CDR-H3与SEQ ID NO:28的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-H2与SEQ ID NO:2的CDR-H2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-H1与SEQ ID NO:1的CDR-H1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-L3与SEQ ID NO:6的CDR-L3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-L2与SEQ ID NO:5的CDR-L2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,并且CDR-L1与SEQ ID NO:4的CDR-L1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:28的CDR-H3;CDR-H2是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:2的CDR-H2;CDR-H1是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:1的CDR-H1;CDR-L3是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:6的CDR-L3;CDR-L2是具有至多1、2、3或4个氨基酸置换的SEQ ID NO:5的CDR-L2;并且CDR-L1是具有至多1、2、3、4、5或6个氨基酸置换的SEQ ID NO:4的CDR-L1。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案

中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0204] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:29的CDR-H3、SEQ ID NO:2的CDR-H2、SEQ ID NO:1的CDR-H1、SEQ ID NO:6的CDR-L3、SEQ ID NO:5的CDR-L2和SEQ ID NO:4的CDR-L1。在一些实施方案中,CDR-H3与SEQ ID NO:29的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-H2与SEQ ID NO:2的CDR-H2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-H1与SEQ ID NO:1的CDR-H1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-L3与SEQ ID NO:6的CDR-L3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-L2与SEQ ID NO:5的CDR-L2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,并且CDR-L1与SEQ ID NO:4的CDR-L1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:29的CDR-H3;CDR-H2是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:2的CDR-H2;CDR-H1是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:1的CDR-H1;CDR-L3是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:6的CDR-L3;CDR-L2是具有至多1、2、3或4个氨基酸置换的SEQ ID NO:5的CDR-L2;并且CDR-L1是具有至多1、2、3、4、5或6个氨基酸置换的SEQ ID NO:4的CDR-L1。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0205] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:30的CDR-H3、SEQ ID NO:2的CDR-H2、SEQ ID NO:1的CDR-H1、SEQ ID NO:6的CDR-L3、SEQ ID NO:5的CDR-L2和SEQ ID NO:4的CDR-L1。在一些实施方案中,CDR-H3与SEQ ID NO:30的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-H2与SEQ ID NO:2的CDR-H2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-H1与SEQ ID NO:1的CDR-H1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-L3与SEQ ID NO:6的CDR-L3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,CDR-L2与SEQ ID NO:5的CDR-L2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,并且CDR-L1与SEQ ID NO:4的CDR-L1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:30的CDR-H3;CDR-H2是具有至多1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸置换的SEQ ID NO:2的CDR-H2;CDR-H1是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:1的CDR-H1;CDR-L3是具有至多1、2、3、4或5个氨基酸置换的SEQ ID NO:6的CDR-L3;CDR-L2是具有至多1、2、3或4个氨基酸置换的SEQ ID NO:5的CDR-L2;并且CDR-L1是具有至多1、2、3、4、5或6个氨基酸置换的SEQ ID NO:4的CDR-L1。在一些方面,氨基酸置换是保守氨基酸置换。在一些实施方案中,本段落中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体源自本文提供的序列,例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域已知或本文所述的任何其他方法。在一些实施方案中,此类变体不是源自本文提供的序列,并且可以例如根据本文提供的用于获得抗体的方法从头分离。

[0206] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含SEQ ID NO:1的CDR-H1、SEQ ID NO:2的CDR-H2、SEQ ID NO:24的CDR-H3、SEQ ID NO:4的CDR-L1、SEQ ID NO:5的CDR-L2和SEQ ID NO:6的CDR-L3。

[0207] 在一些实施方案中、本文提供的抗体包含SEQ ID NO:1的CDR-H1、SEQ ID NO:2的CDR-H2、SEQ ID NO:25的CDR-H3、SEQ ID NO:4的CDR-L1、SEQ ID NO:5的CDR-L2和SEQ ID NO:6的CDR-L3。

[0208] 在一些实施方案中、本文提供的抗体包含SEQ ID NO:1的CDR-H1、SEQ ID NO:2的CDR-H2、SEQ ID NO:26的CDR-H3、SEQ ID NO:4的CDR-L1、SEQ ID NO:5的CDR-L2和SEQ ID NO:6的CDR-L3。

[0209] 在一些实施方案中、本文提供的抗体包含SEQ ID NO:1的CDR-H1、SEQ ID NO:2的CDR-H2、SEQ ID NO:27的CDR-H3、SEQ ID NO:4的CDR-L1、SEQ ID NO:5的CDR-L2和SEQ ID NO:6的CDR-L3。

[0210] 在一些实施方案中、本文提供的抗体包含SEQ ID NO:1的CDR-H1、SEQ ID NO:2的CDR-H2、SEQ ID NO:28的CDR-H3、SEQ ID NO:4的CDR-L1、SEQ ID NO:5的CDR-L2和SEQ ID NO:6的CDR-L3。

[0211] 在一些实施方案中、本文提供的抗体包含SEQ ID NO:1的CDR-H1、SEQ ID NO:2的CDR-H2、SEQ ID NO:29的CDR-H3、SEQ ID NO:4的CDR-L1、SEQ ID NO:5的CDR-L2和SEQ ID NO:6的CDR-L3。

[0212] 在一些实施方案中、本文提供的抗体包含SEQ ID NO:1的CDR-H1、SEQ ID NO:2的CDR-H2、SEQ ID NO:30的CDR-H3、SEQ ID NO:4的CDR-L1、SEQ ID NO:5的CDR-L2和SEQ ID NO:6的CDR-L3。

[0213] 表位

[0214] 在某些实施方案中,本文描述了结合人纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的分离的抗体,其中所述抗体在氨基酸残基Lys 411、Ile 412、Ile 413、Phe 415、Asn 416、Arg 417、Leu 418、Thr 419、Ile 420和Gly 421中的任一个处结合人纤维蛋白。在某些实施方案中,抗体在氨基酸残基Lys 411、Ile 412、Ile 413、Phe 415、Asn 416、Arg 417、Leu 418、Thr 419、Ile 420和Gly 421中的至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或全部10个处结合人纤维蛋白。在某些实施方案中,分离的抗体在氨基酸残基Lys 411、Ile 412、Ile 413、Phe415、Asn 416、Arg 417、Leu 418、Thr 419、Ile 420和Gly 421处结合人纤维蛋白。在某些实施方案中,人纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域表位的氨基酸残基以小于5埃或更小、4埃或更小、3埃或更小或者2埃或更小的距离结合抗体的互补位。

[0215] 互补位

[0216] 在某些实施方案中,本文所述的抗体包含含有结合人纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的互补位的VH区,其中所述互补位包含氨基酸残基Ser 31、Tyr 32、Trp 33、His 35、Trp 47、Leu 50、Asp 52、Asp 54、Tyr 56、Ala 93、Ser 94、Ser 95、Lys 96或Asp 96、Pro 97或Ala 97、Gly 101、Gly 102和Trp 103中的任一个。在某些实施方案中,抗体包含含有互补位的VH区,所述互补位包含氨基酸残基Ser31、Tyr 32、Trp 33、His 35、Trp 47、Leu 50、Asp 52、Asp 54、Tyr 56、Ala 93、Ser 94、Ser 95、Lys 96或Asp 96、Pro 97或Ala 97、Gly 101、Gly 102和Trp 103中的至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、

14个、15个、16个或全部17个。在某些实施方案中,抗体包含含有互补位的VH区,所述互补位包含氨基酸残基Ser 31、Trp 33、His 35、Asp 52、Asp 54、Tyr 56、Ser 94、Gly 101、Gly 102和Trp 103。在某些实施方案中,所述抗体包含含有互补位的VH区,所述互补位包含氨基酸残基Ser 31、Trp 33、His 35、Asp 52、Asp 54、Tyr 56、Ala 93、Ser 94、Lys 96、Pro 97、Gly 101、Gly 102和Trp 103。在某些实施方案中,抗体包含含有互补位的VH区,所述互补位包含氨基酸残基Ser 31、Tyr 32、Trp 33、His 35、Trp 47、Asp 52、Asp 54、Tyr 56、Ser 94、Ser 95、Asp 96、Ala 97、Gly 101、Gly 102和Trp 103。

[0217] 在某些实施方案中,抗体包含含有互补位的VL区,所述互补位包含氨基酸残基His 27、Tyr 32、Tyr 36、Leu 46、Tyr 49、Gln 50、Ala 91或Asn 91、Leu 92、Leu 94和Leu 96中的任一个。在某些实施方案中,抗体包含含有互补位的VL区,所述互补位包含氨基酸残基His 27、Tyr 32、Tyr 36、Leu 46、Tyr 49、Gln 50、Ala 91或Asn 91、Leu 92、Leu 94和Leu 96中的至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或全部10个。在某些实施方案中,抗体包含含有互补位的VL区,所述互补位包含氨基酸残基His 27、Tyr 32、Tyr 36、Leu46、Gln 50、Leu 92、Leu 94和Leu 96。在某些实施方案中,抗体包含含有互补位的VL区,所述互补位包含氨基酸残基His 27、Tyr 32、Tyr 36、Leu 46、Gln 50、Asn 91、Leu 92、Leu 94和Leu 96。在某些实施方案中,抗体包含含有互补位的VL区,所述互补位包含氨基酸残基His 27、Tyr 32、Tyr 36、Leu 46、Tyr 49、Gln 50、Ala 91、Leu92、Leu 94和Leu 96。

[0218] 在某些实施方案中,抗体的互补位以小于5埃或更小、4埃或更小、3埃或更小或者2埃或更小的距离结合人纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域表位的氨基酸残基。

[0219] Fc区

[0220] 各种免疫球蛋白的Fc区的结构及其中包含的糖基化位点是本领域已知的。参见Schroeder和Cavacini,J.Allergy Clin.Immunol.,2010,125:S41-52,其全部内容通过引用并入本文。Fc区可以是天然存在的Fc区,或如本领域中或本公开其它地方所描述修饰的Fc区。

[0221] 除非本文另有说明,Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号是根据EU编号系统,也称为EU索引,如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所述。本文所用的二聚体Fc的“Fc多肽”是指形成二聚体Fc结构域的两个多肽之一,即包含免疫球蛋白重链的C-末端恒定区的多肽,其能够稳定自缔合。例如,二聚IgG Fc的Fc多肽包含IgG CH2和IgG CH3恒定结构域序列。Fc可以是IgA、IgD、IgE、IgG和IgM类别,且这些中的几种可以进一步分成亚类(同种型),例如IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1和IgA_2。

[0222] 术语“Fc受体”和“FcR”用于描述与抗体Fc区结合的受体。例如,FcR可以是天然序列人FcR。通常,FcR是结合IgG抗体(γ受体)并包括FcγRI、FcγRII和FcγRIII亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和可变剪接形式。FcγRII受体包括FcγRIIA(“活化受体”)和FcγRIIB(“抑制受体”),其具有主要在其胞质结构域中不同的类似氨基酸序列。其它同种型的免疫球蛋白也可被某些FcR结合(参见,例如,Janeway等人,Immuno Biology:the immune systemin health and disease,(Elsevier Science Ltd.,NY)(4th ed.,1999))。活化受体FcγRIIA在其胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体FcγRIIB在其胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)

(综述于Daëron,Annu.Rev.Immunol.15:203-234(1997))。FcR在Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol 9:457-92(1991);Capel等人,Immunomethods 4:25-34(1994);和de Haas等人,J.Lab.Clin.Med.126:330-41(1995)中综述。本文的术语"FcR"涵盖其它FcR,包括将来鉴定的那些。该术语还包括新生儿受体FcRn,其负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976);和Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))。

[0223] CH2结构域中的修饰可以影响FcR与Fc的结合。本领域已知Fc区中的许多氨基酸修饰用于选择性改变Fc对不同Fcγ受体的亲和力。在一些方面,Fc包含一个或多个修饰以促进Fc-γ受体的选择性结合。

[0224] 改变FcR与Fc结合的示例性突变列出如下:

[0225] S298A/E333A/K334A,S298A/E333A/K334A/K326A(Lu Y,Vernes JM,Chiang N等人,J Immunol Methods.2011Feb 28;365(1-2):132-41);

[0226] F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L,F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L(Stavenhagen JB,Gorlatov S,Tuaillon N等人,Cancer Res.2007Sep 15;67(18):8882-90;Nordstrom JL,Gorlatov S,Zhang W等人,Breast Cancer Res.2011Nov30;13(6):R123);

[0227] F243L(Stewart R,Thom G,Levens M等人,Protein Eng Des Sel.2011Sep;24(9):671-8.),S298A/E333A/K334A(Shields RL,Namenuk AK,Hong K等人,J Biol Chem.2001Mar 2;276(9):6591-604);

[0228] S239D/I332E/A330L,S239D/I332E(Lazar GA,Dang W,Karki S等人,Proc Natl Acad Sci U S A.2006Mar 14;103(11):4005-10);

[0229] S239D/S267E,S267E/L328F(Chu SY,Vostiar I,Karki S等人,Mol Immunol.2008Sep;45(15):3926-33);

[0230] S239D/D265S/S298A/I332E,S239E/S298A/K326A/A327H,G237F/S298A/A330L/I332E,S239D/I332E/S298A,S239D/K326E/A330L/I332E/S298A,G236A/S239D/D270L/I332E,S239E/S267E/H268D,L234F/S267E/N325L,G237F/V266L/S267D及在WO2011/120134和WO2011/120135中列出的其他突变,通过引用并入本文。Therapeutic Antibody Engineering(by William R.Strohl和Lila M.Strohl,Woodhead Publishing series in Biomedicine No 11,ISBN 1 907568 37 9,Oct 2012)在第283页列出了突变。

[0231] 在一些实施方案中,本文所述的抗体包括改善其介导效应子功能的能力的修饰。这样的修饰是本领域已知的,且包括无岩藻糖基化,或Fc对于活化受体(主要是用于ADCC的FCGR3a),和对用于CDC的C1q的亲和力的工程化。下表B总结了文献中报道的对于效应子功能工程化的各种设计。

[0232] 产生在Fc糖基化位点(Asn 297EU编号)上具有很少或没有岩藻糖而不改变氨基酸序列的抗体的方法是本领域公知的。GlymaX®技术(ProBioGen AG)是基于将使岩藻糖生物合成的细胞途径改向的酶的基因导入用于抗体产生的细胞中。这防止了抗体产生细胞向N-连接的抗体碳水化合物部分添加糖"岩藻糖"。(Von Horsten等人(2010)Glycobiology.2010Dec;20(12):1607-18)。获得具有降低的岩藻糖基化水平的抗体的另一种方法可以在美国专利8,409,572中找到,其教导了因为其在抗体上产生较低水平的岩藻

糖基化的能力而选择用于抗体产生的细胞系可以是完全无岩藻糖基化的(意味着它们不含有可检测的岩藻糖)或它们可以是部分无岩藻糖基化的(意味着分离的抗体含有对于由哺乳动物表达系统产生的类似抗体通常检测到的岩藻糖的量的少于95％、少于85％、少于75％、少于65％、少于55％、少于45％、少于35％、少于25％、少于15％或少于5％)。

[0233] 因此,在一个实施方案中,本文所述的抗体可包括二聚体Fc,其包含如表B所示的赋予改善的效应子功能的一个或多个氨基酸修饰。在另一个实施方案中,抗体可以无岩藻糖基化以改善效应子功能。

[0234] 表B:CH2结构域和效应子功能工程化

[0235]

表B		
参考文献	**突变**	**效应**
Lu, 2011, Ferrara 2011, Mizushima 2011	无岩藻糖基化	增加的ADCC
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A	增加的ADCC
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A/K326A	增加的ADCC
Stavenhagen, 2007	F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L	增加的ADCC
Nordstrom, 2011	F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L	增加的ADCC
Stewart, 2011	F243L	增加的ADCC
Shields, 2001	S298A/E333A/K334A	增加的ADCC
Lazar, 2006	S239D/I332E/A330L	增加的ADCC
Lazar, 2006	S239D/I332E	增加的ADCC
Bowles, 2006	AME-D, 无指定的突变	增加的ADCC
Heider, 2011	37.1, 突变未公开	增加的ADCC
Moore, 2010	S267E/H268F/S324T	增加的CDC

[0236] 降低FcgR和/或补体结合和/或效应子功能的Fc修饰是本领域已知的。最近的公开出版物描述了用于工程化具有降低的或沉默的效应子活性的抗体的策略(参见Strohl,WR(2009),Curr Opin Biotech20:685-691,及Strohl,WR和Strohl LM,“Antibody Fc engineering for optimal antibody performance”,Therapeutic Antibody Engineering,Cambridge:Woodhead Publishing(2012),pp 225-249)。这些策略包括通过糖基化修饰降低效应子功能,使用IgG2/IgG4支架,或在Fc的铰链区或CH2区中引入突变。例如,美国专利公开号2011/0212087(Strohl)、国际专利公开号WO2006/105338(Xencor)、美国专利公开号2012/0225058(Xencor)、美国专利公开号2012/0251531(Genentech)和Strop等人((2012)J.Mol.Biol.420:204-219)描述了减少FcgR或补体与Fc的结合的特定修饰。

[0237] 减少FcgR或补体与Fc结合的已知氨基酸修饰的具体的非限制性实例包括下表C中确定的那些:

[0238] 表C:减少FcgR或补体与Fc结合的修饰

[0239]

表C	
公司	突变
GSK	N297A
Ortho Biotech	L234A/L235A
Protein Design labs	IGG2 V234A/G237A
Wellcome Labs	IGG4 L235A/G237A/E318A
GSK	IGG4 S228P/L236E
Alexion	IGG2/IGG4combo
Merck	IGG2 H268Q/V309L/A330S/A331S
Bristol-Myers	C220S/C226S/C229S/P238S
Seattle Genetics	C226S/C229S/E3233P/L235V/L235A
Amgen	大肠杆菌生产，非糖基化
Medimune	L234F/L235E/P331S
Trubion	铰链突变体，可能C226S/P230S

[0240] 产生在Fc糖基化位点(Asn 297EU编号)上具有很少或没有岩藻糖而不改变氨基酸序列的抗体的方法是本领域熟知的。GlymaX®技术(ProBioGen AG)是基于将使岩藻糖生物合成的细胞途径转向的酶的基因引入用于抗体产生的细胞中。这防止了抗体产生细胞向N-连接的抗体碳水化合物部分添加“岩藻糖”。(Von Horsten等人(2010) Glycobiology.2010Dec;20(12):1607-18)。能够产生脱岩藻糖基化抗体的细胞系的实例包括具有细菌氧化还原酶GDP-6-脱氧-D-来苏-4-己糖还原酶(RMD)的稳定过表达的CHO-DG44(参见Henning von Horsten等人,Glycobiol 2010,20:1607-1618)或蛋白质岩藻糖基化缺陷的Lec13 CHO细胞(参见Ripka等人,Arch.Biochem.Biophys.,1986,249:533-545;U.S.专利公开No.2003/0157108;WO 2004/056312;其每一个全文引入作为参考),和敲除细胞系,如α-1,6-岩藻糖基转移酶基因或FUT8敲除CHO细胞(参见Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.,2004,87:614-622;Kanda等人,Biotechnol.Bioeng.,2006,94:680-688;和WO 2003/085107;其每一个通过引用整体并入本文)。获得具有降低的岩藻糖基化水平的抗体的另一种方法可以在美国专利8,409,572中找到,其教导了针对其在抗体上产生较低水平的岩藻糖基化的能力而选择用于抗体产生的细胞系。

[0241] 能够产生脱岩藻糖基化抗体的细胞系的实例包括具有细菌氧化还原酶GDP-6-脱

氧-D-来苏-4-己糖还原酶(RMD)的稳定过表达的CHO-DG44(参见Henning von Horsten等人,Glycobiol 2010,20:1607-1618)或蛋白质岩藻糖基化缺陷的Lec13 CHO细胞(参见Ripka等人,Arch.Biochem.Biophys.,1986,249:533-545;美国专利公开号2003/0157108;WO 2004/056312;其每一个均全文引入作为参考),和敲除细胞系,如α-1,6-岩藻糖基转移酶基因或FUT8敲除CHO细胞(参见Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.,2004,87:614-622;Kanda等人,Biotechnol.Bioeng.,2006,94:680-688;和WO 2003/085107;其每一个通过引用整体并入本文)。

[0242] 抗体可以是完全无岩藻糖基化的(意味着它们不包含可检测的岩藻糖)或它们可以是部分无岩藻糖基化的,意味着分离的抗体包含由哺乳动物表达系统产生的类似抗体通常检测到的岩藻糖的量的小于95%、小于85%、小于75%、小于65%、小于55%、小于45%、小于35%、小于25%、小于15%或小于5%。

[0243] 在一些方面,本文提供的抗体包含与天然存在的IgG1结构域相比在位置Asn 297处具有降低的岩藻糖含量的IgG1结构域。已知这样的Fc结构域具有改进的ADCC。参见Shields等,J.Biol.Chem.,2002,277:26733-26740,其以引用的方式整体并入本文。在一些方面,此类抗体在位置Asn 297处不包含任何岩藻糖。岩藻糖的量可使用任何合适方法测定,例如如以引用的方式整体并入本文的WO 2008/077546中所述。

[0244] 在某些实施方案中,本文提供的抗体包含具有一个或多个提高ADCC的氨基酸置换的Fc区,诸如在Fc区的位置298、333和334中的一个或多个处的置换。在一些实施方案中,本文提供的抗体包含具有在位置239、332和330处的一个或多个氨基酸置换的Fc区,如以引用的方式整体并入本文的Lazar等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,2006,103:4005-4010中所述。

[0245] 可并入本文提供的抗体中的其他说明性糖基化变体描述于例如美国专利公开号2003/0157108、2004/0093621、2003/0157108、2003/0115614、2002/0164328、2004/0093621、2004/0132140、2004/0110704、2004/0110282、2004/0109865;国际专利公开号2000/61739、2001/29246、2003/085119、2003/084570、2005/035586、2005/035778;2005/053742、2002/031140;Okazaki等,J.Mol.Biol.,2004,336:1239-1249;以及Yamane-Ohnuki等,Biotech.Bioeng.,2004,87:614-622中,其每一者以引用的方式整体并入。

[0246] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含在连接于Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的Fc区。此类抗体变体可具有改进的CDC功能。这样的抗体变体的实例描述于例如WO 1997/30087;WO 1998/58964;以及WO 1999/22764中;其每一者以引用的方式整体并入。

[0247] 在一些实施方案中,本文提供的抗体包含一个或多个使C1q结合和/或CDC改进或减弱的改变。参见美国专利号6,194,551;WO 99/51642;以及Idusogie等,J.Immunol.,2000,164:4178-4184;其每一者以引用的方式整体并入本文。

[0248] 结合

[0249] 分子X对其伴体Y的亲和力可由解离平衡常数(K_D)表示。下面更详细地描述造成解离平衡常数的动力学组分。亲和力可以通过本领域已知的常见方法测量,包括本文所述的那些,如表面等离子体共振(SPR)技术(例如,BIACORE®)或生物层干涉测量法(例如,FORTEBIO®)。

[0250] 关于抗体与靶分子的结合,术语“结合”、“特异性结合”、“特异性地结合”、“特异性地针对”、“选择性结合”和“选择性地针对”特定抗原(例如多肽靶标)或特定抗原上的表位

意指可测量地不同于非特异性或非选择性相互作用(例如与非靶分子)的结合。特异性结合可例如通过测量与靶分子的结合并将其与非靶分子的结合进行比较来测量。也可以通过与模拟靶分子上识别的表位的对照分子竞争来测定特异性结合。在这种情况下,如果抗体与靶分子的结合被对照分子竞争性抑制,则表明特异性结合。在一些实施方案中,纤维蛋白抗体对非靶分子的亲和力小于对纤维蛋白的亲和力的约50%。在一些实施方案中,纤维蛋白抗体对非靶分子的亲和力小于对纤维蛋白的亲和力的约40%。在一些实施方案中,纤维蛋白抗体对非靶分子的亲和力小于对纤维蛋白的亲和力的约30%。在一些实施方案中,纤维蛋白抗体对非靶分子的亲和力小于对纤维蛋白的亲和力的约20%。在一些实施方案中,纤维蛋白抗体对非靶分子的亲和力小于对纤维蛋白的亲和力的约10%。在一些实施方案中,纤维蛋白抗体对非靶分子的亲和力小于对纤维蛋白的亲和力的约1%。在一些实施方案中,纤维蛋白抗体对非靶分子的亲和力小于对纤维蛋白的亲和力的约0.1%。

[0251] 当在本文中两种或更多种抗体的情况中使用时,术语“与…竞争”或“与…交叉竞争”表示两种或更多种抗体竞争结合抗原(例如,纤维蛋白)。在一个示例性测定中,纤维蛋白包被在表面上并与第一纤维蛋白抗体接触,之后加入第二纤维蛋白抗体。在另一个示例性测定中,第一纤维蛋白抗体包被在表面上并与纤维蛋白接触,然后加入第二纤维蛋白抗体。如果在任一测定中,第一纤维蛋白抗体的存在减少第二纤维蛋白抗体的结合,则抗体彼此竞争。术语“与…竞争”还包括抗体的组合,其中一种抗体减少另一种抗体的结合,但其中当以相反顺序加入抗体时没有观察到竞争。然而,在一些实施方案中,第一和第二抗体相互抑制结合,而与它们加入的顺序无关。在一些实施方案中,一种抗体使另一种抗体与其抗原的结合降低至少25%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%,如在竞争性结合测定中所测量的。技术人员可以基于抗体对纤维蛋白的亲和力和抗体的效价来选择竞争测定中使用的抗体的浓度。在该定义中描述的测定是说明性的,并且技术人员可以利用任何合适的测定来确定抗体是否相互竞争。合适的测定描述于例如Cox等人,“Immunoassay Methods,”Assay Guidance Manual[Internet],December 24,2014更新(ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/;September 29,2015);Silman等人,Cytometry,2001,44:30-37;和Finco等人,J.Pharm.Biomed.Anal.,2011,54:351-358;其每一个通过引用整体并入本文。

[0252] 如竞争性结合测定中所测量的,如果过量的测试抗体(例如,至少2x、5x、10x、20x或100x)抑制或阻断参考抗体的结合例如至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%,则测试抗体与参考抗体竞争。通过竞争测定鉴定的抗体(竞争抗体)包括与参考抗体结合相同表位的抗体和与邻近表位结合的抗体,所述邻近表位与参考抗体结合的表位足够接近以发生空间位阻。例如,可以鉴定与本文所述第一抗体竞争结合纤维蛋白的第二竞争抗体。在某些情况下,如在竞争性结合测定中所测量的,第二抗体可以阻断或抑制第一抗体的结合例如至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。在某些情况下,第二抗体可以置换第一抗体超过50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

[0253] 在一些实施方案中,抗纤维蛋白抗体基本上不结合存在于癌组织之外的骨髓细胞。在一些实施方案中,抗纤维蛋白抗体基本上不结合存在于癌组织中的刺激性骨髓细胞。

[0254] 在一些实施方案中,抗纤维蛋白抗体结合人纤维蛋白的纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域(SEQ ID NO:31)的残基γ377-395。结合表位包括数值范围(例如,纤维蛋白的残基

377-395)内的残基,每个范围的起始残基(例如,人纤维蛋白的残基377-394)和每个范围的结尾残基(例如,人纤维蛋白的残基378-395),或其任何组合。

[0255] 在一些实施方案中,如通过Biacore测定所测量的,本文提供的抗体以小于或等于约0.001、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、1.95、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9或10×10^{-6}M的K_D结合人纤维蛋白。在一些实施方案中,如通过Biacore测定所测量的,本文提供的抗体的K_D在约0.001-0.01、0.01-0.1、0.01-0.05、0.05-0.1、0.1-0.5、0.5-1、0.25-0.75、0.25-0.5、0.5-0.75、0.75-1、0.75-2、1.1-1.2、1.2-1.3、1.3-1.4、1.4-1.5、1.5-1.6、1.6-1.7、1.7-1.8、1.8-1.9、1.9-2、1-2、1-5、2-7、3-8、3-5、4-6、5-7、6-8、7-9、7-10或5-10×10^{-6}M之间。在一些实施方案中,本文提供的抗体以小于或等于约1×10^{-5}M、1×10^{-6}M、1×10^{-7}M、1×10^{-8}M或1×10^{-9}M的K_D结合人纤维蛋白。

[0256] 在一些实施方案中,如通过Biacore测定所测量的,本文提供的抗体以小于或等于约10、9、8、7、6、5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.98、1.95、1.9、1.85、1.8、1.75、1.7、1.65、1.6、1.55、1.50、1.45、1.4、1.3、1.2、1.1、1、0.9、0.85、0.8、0.75、0.7、0.65、0.6、0.55、0.5、0.45、0.4、0.35、0.3、0.25、0.2、0.15、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005或0.0001×10^{-5}M或更小的K_D结合人纤维蛋白。在一些实施方案中,如通过Biacore测定测量的,本文提供的抗体以5-3、4-2、3-1、1.9-1.8、1.8-1.7、1.7-1.6、1.6-1.5、1.9-1.5、1.5-1、1-0.8、1-0.5、0.9-0.6、0.7-0.4、0.6-0.2、0.5-0.3、0.3-0.2、0.2-0.1、0.1-0.01、0.01-0.001或0.001-0.0001×10^{-5}M之间的K_D结合人纤维蛋白。在一些实施方案中,如通过Biacore测定所测量的,本文提供的抗体以小于或等于约10、9.56、9.5、9.0、8.88、8.84、8.5、8、7.5、7.32、7、6.5、6、5.5、5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5或1×10^{-4}(1/s)或更小的K_d结合人纤维蛋白。在一些实施方案中,如通过Biacore测定测量的,本文提供的抗体以7-10、7-8、8-9、9-10、7-7.5、7.5-8、8.-8.5、8.5-9、9-9.5或9.5-10×10^{-4}(1/s)之间的K_d结合人纤维蛋白。在一些实施方案中,如通过Biacore测定所测量的,本文提供的抗体以大于或等于约4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、45、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、7、8、9或10×10^{5}(1/Ms)或更大的K_a结合人纤维蛋白。在一些实施方案中,如通过Biacore测定所测量的,本文提供的抗体以4-7、4-4.5、4.5-5、5-5.5、5.5-6、6-6.5或6.5-7、7-8、8-9或9-10x 10^{5}(1/Ms)之间的K_a结合人纤维蛋白。

[0257] 功能

[0258] “效应子功能”是指由抗体的Fc区介导的那些生物学活性,其活性可根据抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例包括受体配体阻断、激动或拮抗、C1q结合以激活补体依赖性细胞毒性(CDC)、Fc受体结合以激活抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。在一些实施方案中,本文所述的纤维蛋白抗体的效应子功能是拮抗作用并阻断Mac-1受体与纤维蛋白的结合。

[0259] 药物组合物

[0260] 本申请提供了包含抗体的组合物,包括包含本文所述的任何一种或多种抗体与一种或多种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一些实施方案中,组合物是无菌的。药物组合物一般包含有效量的抗体。

[0261] 除本文公开的一种或多种抗体外,这些组合物可包含药学上可接受的赋形剂、载

体、缓冲剂、稳定剂或本领域技术人员熟知的其它物质。这些物质应当是无毒的并且不应该干扰活性成分的功效。载体或其它物质的精确性质可取决于施用途径,例如口服、静脉内、皮肤或皮下、鼻、肌内、腹膜内途径。

[0262] 用于口服施用的药物组合物可以是片剂、胶囊、粉末或液体形式。片剂可包括固体载体如明胶或辅剂。液体药物组合物通常包括液体载体如水、石油、动物或植物油、矿物油或合成油。可以包括生理盐水溶液、葡萄糖或其它糖溶液或二醇如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。

[0263] 对于静脉内、皮肤或皮下注射,或在患病部位的注射,活性成分为肠胃外可接受的水溶液的形式,其是无热原的并且具有合适的pH、等渗性和稳定性。本领域相关技术人员完全能够使用例如等渗溶媒如氯化钠注射液、林格氏注射液、乳酸林格氏注射液制备合适的溶液。根据需要,可以包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其它添加剂。

[0264] 给予个体的抗纤维蛋白抗体,施用优选是以“治疗有效量”或“预防有效量”(视情况而定,尽管预防可视为治疗),其足以对个体显示益处。施用的实际量以及施用的速率和时程将取决于所治疗的蛋白质聚集疾病的性质和严重程度。治疗的处方,例如对剂量的决定等,在全科医师和其他医生的责任范围内,并且通常考虑待治疗的病症、个体患者的状况、递送部位、施用方法和医师已知的其他因素。上述技术和方案的实例可见于Remington′s pharmaceutical sciences,第16版,Osol,A.(编辑),1980。

[0265] 根据待治疗的病症,组合物可以单独施用或与其它治疗组合,同时或依次地施用。

[0266] 方法

[0267] 制备方法

[0268] 本文所述的抗体可使用重组方法和组合物产生,例如,如美国专利号4,816,567中所述。在一个实施方案中,提供了编码本文所述抗体的分离的核酸。这样的核酸可以编码包含抗体的VL的氨基酸序列和/或包含VH的氨基酸序列(例如,抗体的轻链和/或重链)或包含单结构域抗体的VHH的氨基酸序列。在进一步的实施方案中,提供了包含这样的核酸的一种或多种载体(例如,表达载体)。在一个实施方案中,核酸在多顺反子载体中提供。在进一步实施方案中,提供了包含这种核酸的宿主细胞。在一个这样的实施方案中,宿主细胞包含以下(例如,用以下转化):(1)包含核酸的载体,该核酸编码包含抗体的VL的氨基酸序列和包含抗原结合多肽构建体的VH的氨基酸序列,或(2)包含编码包含抗原结合多肽构建体的VL的氨基酸序列的核酸的第一载体和包含编码包含抗原结合多肽构建体的VH的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一个实施方案中,宿主细胞是真核细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或人胚肾(HEK)细胞或淋巴样细胞(例如Y0、NS0、Sp20细胞)。在一个实施方案中,提供了制备抗体的方法,其中所述方法包括在适于抗体表达的条件下培养包含如上提供的编码抗体的核酸的宿主细胞,和任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗体。

[0269] 为了重组产生抗体,分离编码抗体的核酸,例如如上所述的,并将其插入一个或多个载体中用于进一步克隆和/或在宿主细胞中表达。此类核酸可以使用常规方法(例如,通过使用能够特异性结合编码抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易地分离和测序。

[0270] 当宿主细胞重组产生异多聚体或其变体时,蛋白质在某些实施方案中以细胞干重的约30%、约25%、约20%、约15%、约10%、约5%、约4%、约3%、约2%、或约1%或更少存在。当异多聚体或其变体由宿主细胞重组产生时,在某些实施方案中,蛋白质以细胞干重的

约5g/L、约4g/L、约3g/L、约2g/L、约1g/L、约750mg/L、约500mg/L、约250mg/L、约100mg/L、约50mg/L、约10mg/L、或约1mg/L或更少存在于培养基中。在某些实施方案中,通过本文所述的方法产生的“基本上纯化的”异多聚体具有至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％的纯度水平,具体地,至少约75％、80％、85％的纯度水平,并且更具体地,至少约90％的纯度水平、至少约95％的纯度水平、至少约99％或更高的纯度水平,如通过合适的方法如SDS/PAGE分析、RP-HPLC、SEC和毛细管电泳所测定的。

[0271] 用于克隆或表达抗体编码载体的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。

[0272] 重组宿主细胞或宿主细胞是包含外源多核苷酸的细胞,而不管用于插入的方法,例如直接摄取、转导、f-接合或本领域已知的产生重组宿主细胞的其它方法。外源多核苷酸可维持为非整合载体,例如质粒,或者可整合到宿主基因组中。宿主细胞可包括CHO、CHO的衍生物、NSO、Sp2O、CV-1、VERO-76、HeLa、HepG2、Per.C6或BHK。

[0273] 例如,抗体可以在细菌中产生,特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达,参见例如美国专利号5,648,237、5,789,199和5,840,523。(也参见Charlton,Methods in Molecular Biology,Vol.248(B.K.C.Lo,ed.,Humana Press,Totowa,N.J.,2003),pp.245-254,其描述了抗体片段在大肠杆菌中的表达。)表达后,抗体可以以可溶性部分从细菌细胞糊中分离并可进一步纯化。

[0274] 除原核生物外,真核微生物如丝状真菌或酵母是抗体编码载体的合适克隆或表达宿主,包括其糖基化途径被“人源化”的真菌和酵母菌株,从而导致产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。参见Gerngross,Nat.Biotech.22:1409-1414(2004),和Li等人,Nat.Biotech.24:210-215(2006).

[0275] 用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞也来源于多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了可以与昆虫细胞结合使用的许多杆状病毒株,特别是用于转染草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)细胞。

[0276] 植物细胞培养物也可用作宿主。参见例如美国专利号5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429(描述了用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0277] 脊椎动物细胞也可用作宿主。例如,适应于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例是通过SV40转化的猴肾CV1细胞系(COS-7);人胚肾细胞系(293或293细胞,如例如Graham等人,J.Gen Virol.36:59(1977)中所述);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠支持细胞(TM4细胞,如例如Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980)中所述);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK;大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);TRI细胞,如例如Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)中所述;MRC 5细胞;和FS4细胞。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR-CHO细胞(Urlaub等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));及骨髓瘤细胞系如YO、NSO和Sp2/0。关于适合于抗体产生的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见例如Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,Vol.248(B.K.C.Lo,ed.,Humana Press,Totowa,N.J.),pp.255-268(2003)。

[0278] 在一个实施方案中,本文所述的抗体通过包括以下的方法在稳定的哺乳动物细胞中产生:以预定比率用编码抗体的核酸转染至少一种稳定的哺乳动物细胞;以及在所述至少一种哺乳动物细胞中表达所述核酸。在一些实施方案中,在瞬时转染实验中确定核酸的预定比率以确定导致表达产物中最高百分比的抗体的输入核酸的相对比率。

[0279] 在一些实施方案中,是如本文所述的在稳定的哺乳动物细胞中产生抗体的方法,其中与单体重链或轻链多肽或其它抗体相比,所述至少一种稳定的哺乳动物细胞的表达产物包含更大百分比的所需糖基化抗体。

[0280] 在一些实施方案中,是本文所述的在稳定的哺乳动物细胞中产生糖基化抗体的方法,所述方法包括鉴定和纯化所需的糖基化抗体。在一些实施方案中,所述鉴定通过液相色谱和质谱中的一种或两种进行。

[0281] 如果需要,可以在表达后纯化或分离抗体。可以以本领域技术人员已知的多种方式分离或纯化蛋白质。标准纯化方法包括色谱技术,包括离子交换、疏水相互作用、亲和、尺寸排阻或凝胶过滤,以及反相,在大气压或高压下使用系统如FPLC和HPLC进行。纯化方法还包括电泳、免疫、沉淀、透析和色谱聚焦技术。超滤和渗滤技术结合蛋白质浓缩也是有用的。如本领域众所周知的,多种天然蛋白质结合Fc和抗体,并且这些蛋白质可用于本发明中以纯化抗体。例如,细菌蛋白A和G结合Fc区。同样,细菌蛋白L与一些抗体的Fab区结合。纯化通常可以通过特定的融合伴体实现。例如,如果使用GST融合,可以使用谷胱甘肽树脂纯化抗体;如果使用His-标签,可以使用Ni^{+2}亲和色谱纯化抗体;或如果使用Flag-标签,可以使用固定的抗-flag抗体纯化抗体。对于合适的纯化技术中的一般指导,参见例如通过引用整体并入的Protein Purification:Principles and Practice,3rd Ed.,Scopes,Springer-Verlag,NY,1994,其整体引入作为参考。所需的纯化程度将根据抗体的用途而变化。在一些情况下,不需要纯化。

[0282] 在某些实施方案中,使用阴离子交换色谱纯化抗体,包括但不限于Q-琼脂糖、DEAE琼脂糖、poros HQ、poros DEAF、Toyopearl Q、Toyopearl QAE、Toyopearl DEAE、Resource/Source Q和DEAE、Fractogel Q和DEAE柱上的色谱。

[0283] 在具体的实施方案中,使用阳离子交换色谱纯化本文所述的蛋白质,包括但不限于SP-琼脂糖、CM琼脂糖、poros HS、poros CM、Toyopearl SP、Toyopearl CM、Resource/Source S和CM、Fractogel S和CM柱及其等同物和相当物。

[0284] 此外,本文所述的抗体可使用本领域已知的技术化学合成(例如,参见Creighton,1983,Proteins:Structures and Molecular Principles,W.H.Freeman&Co.,N.Y和Hunkapiller等人,Nature,310:105-111(1984))。例如,对应于多肽片段的多肽可以使用肽合成仪合成。此外,如果需要,可以将非经典氨基酸或化学氨基酸类似物作为置换或添加引入多肽序列中。非经典氨基酸包括但不限于常见氨基酸的D-异构体、2,4-二氨基丁酸、α-氨基异丁酸、4-氨基丁酸、Abu、2-氨基丁酸、g-Abu、e-Ahx、6-氨基己酸、Aib、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、高瓜氨酸、磺基丙酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、丙氨酸、氟-氨基酸、设计氨基酸(designer amino acid)如甲基氨基酸类、C-甲基氨基酸类、N-甲基氨基酸类和一般的氨基酸类似物。此外,氨基酸可以是D(右旋)或L(左旋)。

[0285] 使用方法

[0286] 在一个方面,本申请提供使纤维蛋白与抗纤维蛋白抗体(例如人或人源化抗体)接触的方法,其导致抑制小胶质细胞与纤维蛋白或纤维蛋白原γC结构域的粘附。

[0287] 在一个方面,本申请提供了使用本文所述的分离的抗纤维蛋白抗体治疗神经系统的退行性障碍的方法。在某些方面,本文描述了用于治疗神经系统的退行性障碍的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的本文描述的抗纤维蛋白抗体或包含抗纤维蛋白抗体的药物组合物。在某些实施方案中,本申请提供治疗选自以下的神经系统退行性障碍的方法:多发性硬化、脊髓损伤、中风和阿尔茨海默病。

[0288] 在某些方面,本文描述了用于治疗与Mac-1结合纤维蛋白或Mac-1结合纤维蛋白原相关的病理的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的本文描述的分离的抗纤维蛋白抗体或包含分离的抗纤维蛋白抗体的药物组合物。

[0289] 在某些方面,本文描述了抑制小胶质细胞激活的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的本文描述的分离的抗纤维蛋白抗体或包含分离的抗体的药物组合物。

[0290] 在某些方面,本文描述了预防神经系统的退行性障碍的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的本文描述的分离的抗纤维蛋白抗体或包含分离的抗纤维蛋白抗体的药物组合物。在某些实施方案中,本申请提供预防选自以下的神经系统退行性障碍的方法:多发性硬化、脊髓损伤、中风和阿尔茨海默病。

[0291] 在某些方面,本文描述了治疗或预防结肠炎的方法,其包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的本文描述的分离的抗纤维蛋白抗体或包含分离的抗纤维蛋白抗体的药物组合物。

[0292] 在某些方面,本文描述了治疗或预防眼部炎性病症的方法,其包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的本文描述的分离的抗纤维蛋白抗体或包含分离的抗纤维蛋白抗体的药物组合物。在某些实施方案中,眼部炎性病症是葡萄膜炎。

[0293] 施用方法

[0294] 在一些实施方案中,本文提供的方法可用于治疗个体的退行性神经系统障碍。在一个实施方案中,所述个体是人,且所述抗体是本文所述的纤维蛋白抗体。

[0295] 在一些实施方案中,抗体通过静脉内、肌内、皮下、局部、口服、透皮、腹膜内、眶内、玻璃体内、植入、吸入、鞘内、脑室内或鼻内施用。可以施用有效量的抗纤维蛋白抗体用于治疗癌症。抗纤维蛋白抗体的适当剂量可基于待治疗的癌症类型、抗纤维蛋白抗体的类型、癌症的严重程度和病程、个体的临床状况、个体的临床病史和对治疗的反应以及主治医师的判断来确定。

[0296] 在一些实施方案中,本文提供的抗体与至少一种另外的治疗剂一起施用。任何合适的另外的治疗剂或免疫治疗剂可以与本文提供的抗体一起施用。另外的治疗剂包括用于治疗或预防选自以下的神经系统的退行性障碍的药剂:多发性硬化、脊髓损伤、中风和阿尔茨海默病。

[0297] 另外的治疗剂可以通过任何合适的方式施用。在一些实施方案中,本文提供的抗体和另外的治疗剂包含在同一药物组合物中。在一些实施方案中,本文提供的抗体和另外的治疗剂包含在不同的药物组合物中。

[0298] 在其中本文提供的抗体和另外的治疗剂包含在不同药物组合物中的实施方案中,

抗体的施用可以在另外的治疗剂的施用之前、同时和/或之后发生。在一些实施方案中,本文提供的抗体和另外的治疗剂的施用彼此在约一个月内发生。在一些实施方案中,本文提供的抗体和另外的治疗剂的施用彼此在约一周内发生。在一些实施方案中,本文提供的抗体和另外的治疗剂的施用彼此在约一天内发生。在一些实施方案中,本文提供的抗体和另外的治疗剂的施用彼此在约12小时内发生。在一些实施方案中,本文提供的抗体和另外的治疗剂的施用彼此在约1小时内发生。

[0299] 试剂盒和制品

[0300] 本申请提供了包含本文所述的任何一种或多种抗体组合物的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒进一步含有选自任何第二抗体、用于免疫组织化学分析的试剂、药学上可接受的赋型剂和使用手册及其任何组合的部件。在一个具体的实施方案中,试剂盒包含药物组合物,其包含本文所述的任何一种或多种抗体组合物以及一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0301] 本申请还提供了包含本文所述的任何一种抗体组合物或试剂盒的制品。制品的实例包括小瓶(包括密封小瓶)。

[0302] 实施例

[0303] 以下是用于进行本发明的特定实施方案的实施例。实施例仅出于说明性目的而提供,并且不意图以任何方式限制本发明的范围。已努力确保关于所用数值(例如量、温度等)的准确性,但当然应允许一些实验误差和偏差。

[0304] 除非另外指示,否则本发明的实施将采用属于本领域技能内的常规蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术和药理学的方法。此类技术充分说明于文献中。参见,例如,T.E.Creighton,Proteins:Structures and Molecular Properties(W.H.Freeman and Company,1993);A.L.Lehninger,Biochemistry(Worth Publishers,Inc.,当前版本);Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版,1989);Methods In Enzymology(S.Colowick和N.Kaplan编辑,Academic Press,Inc.);Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版(Easton,Pennsylvania:Mack Publishing Company,1990);Carey和Sundberg,Advanced Organic Chemistry第3版(Plenum Press)第A和B卷(1992)。

[0305] 材料和方法

[0306] 使用来自Pierce的EZ-Link Sulfo-NHS-生物素化试剂盒将抗原生物素化。山羊F(ab')$_2$抗人κ-FITC(LC-FITC)、ExtrAvidin-PE(EA-PE)和链霉亲和素-AF633(SA-633)分别获自Southern Biotech、Sigma和Molecular Probes。山羊抗人IgG-PE(人-PE)获自Southern Biotech。抗小鼠APC获自Jackson ImmunoResearch。

[0307] 实施例1:抗纤维蛋白抗体的人源化

[0308] 人源化的过程修饰了来自非人抗体的结合结构域,从而提高与人结合结构域的相似性。通常,将非人抗体人源化以降低对人的免疫原性,同时保持亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中CDR(或其部分)源自非人抗体,且FR(或其部分)源自人抗体序列。人源化抗体还包含人恒定区的至少一部分。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,CDR残基所来源的抗体)的相应残基置换,例如,以恢复或改善抗体特异性、亲和力、稳定性或可开发性特征。

[0309] 人源化抗体及其制备方法综述于例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008),且进一步描述于例如Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);Queen等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033(1989);美国专利No.5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409;Kashmiri等人,Methods 36:25-34(2005)(描述特异性决定区(SDR)嫁接);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498(1991)(描述"表面重修");Dall′Acqua等人,Methods 36:43-60(2005)(描述"FR改组");和Osbourn等人,Methods 36:61-68(2005)和Klimka等人,Br.J.Cancer,83:252-260(2000)(描述FR改组的"指导性选择"方式)。

[0310] 可以用于人源化的人框架区包括但不限于:使用"最佳配合"方法选择的框架区(参见,例如,Sims等人J.Immunol.151:2296(1993));源自轻链或重链可变区的特定亚组的人抗体共有序列的框架区(参见,例如,Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);和Presta等人.J.Immunol.,151:2623(1993));人成熟(体细胞突变的)框架区或人种系框架区(参见,例如,Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008));以及源自筛选FR文库的框架区(参见,例如,Baca等人,J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997)和Rosok等人,J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0311] 5B8的人源化

[0312] 通过表征一组在酵母中产生的人源化设计来进行纤维蛋白抗体(5B8)的人源化。简而言之,所述设计通过将CDR小鼠序列移植到人框架序列中产生,其在计算机上被预测为与原始小鼠框架最相容。以下组合在酵母中产生并表征用于与人纤维蛋白原P2肽抗原结合:基于5B8,27种代表9种人源化VH和3种人源化Vκ的组合的抗体。

[0313] 抗体优化

[0314] 如下所述,通过将多样性引入重链和轻链可变区中进行人源化抗体的优化。

[0315] 文库生成:寡核苷酸从IDT订购,其包含CDRH1、CDRH2或CDRH3以及该CDR任一侧的侧翼区。CDR中的氨基酸位置通过引入CDR寡聚物中的NNK多样性而多样化。然后对HC(重链)可变区的DNA进行DNase处理以产生大小50-200bp的片段。然后通过重叠延伸PCR将CDRH1、CDRH2和CDRH3寡聚物与DNase处理的HC可变区重组,以将CDR多样性寡聚物整合到HC可变区序列中。然后通过将该多样化的HC可变序列和重链表达载体转化到已经含有亲本的轻链质粒的酵母中而产生文库。进行类似的过程以在CDRL1、CDRL2和CDRL3中引入多样性。在CDRL1、CDRL2和CDRL3中具有多样性的寡核苷酸从IDT订购,并且如对于CDRH1、CDRH2,CDRH3文库所述整合到多样化轻链(LC)可变区中。将这些多样化的LC可变区和轻链表达载体转化到已经含有亲本的重链质粒的酵母中。构建另外的文库集,从而将多样性专门集中在CDRH3内。通过VH FR1-FR3与CDRH3中具有多样性的寡核苷酸之间的重叠延伸PCR将步进单态多样性引入CDRH3中。

[0316] 通过使用FACS分选进行三轮筛选。将约2×10^7个酵母沉淀,用洗涤缓冲液洗涤三次,并在30℃下与使用人纤维蛋白原P2肽抗原的亲和压力或与多特异性耗竭试剂(PSR)孵育以从选择中去除非特异性抗体。对于这种选择,通过将抗原与亲本IgG预孵育,然后将该预复合的混合物施加到酵母文库中一段时间来施加亲和压力,该时间段允许选择达到平衡。对于PSR耗竭,将文库与1:10稀释的生物素化PSR试剂孵育,如前所述(参见Y.Xu等人,PEDS26.10,663-70(2013))。然后将酵母用洗涤缓冲液洗涤两次并用LC-FITC(稀释1:100)

和SA-633(稀释1:500)、EAPE(稀释1:50)或抗小鼠APC(稀释1:500)第二试剂在4℃下染色15分钟。用洗涤缓冲液洗涤两次后,将细胞沉淀重悬于0.3mL洗涤缓冲液中,并转移至带过滤帽的分选管中。使用FACS ARIA分选仪(BD Biosciences)进行分选并确定分选门控以选择具有所需特征的抗体。完成了4轮选择。在最后轮分选后,将酵母铺板并挑选单个菌落用于表征。图1显示了从一个亲本抗体选择单抗体文库的前三轮的结果,以及每轮成熟后抗体对纤维蛋白P2γ肽的亲和力增加。

[0317] 抗体产生和纯化

[0318] 酵母克隆生长至饱和,然后在30℃下伴随振荡诱导48小时。诱导后,酵母细胞沉淀,收集上清液进行纯化。IgG使用蛋白A柱纯化并用乙酸(pH 3.5)洗脱。通过木瓜蛋白酶消化产生Fab片段并通过CaptureSelect(Life Technologies)纯化。

[0319] 实施例2:人源化抗体克隆的表征和亲和力成熟

[0320] 用选择的人源化抗体克隆和纤维蛋白P2肽(图2A)、纤维蛋白原(图2B)和纤维蛋白(图2C)进行酶联免疫吸附测定(ELISA)。A=克隆60143;B=克隆61278;C=克隆61278(重复);D=亲本抗体。

[0321] 这些结果证实,与亲本人源化抗体相比,亲和力成熟的人源化抗体克隆以改善的亲和力结合纤维蛋白P2肽和纤维蛋白。

[0322] 为了评价亲和力成熟的抗体克隆是否影响纤维蛋白聚合或溶解,进行凝块溶解试验,证明在变体人源化抗体存在下样品的凝块溶解时间(图3)。A=克隆56666;B=克隆56657;C=克隆60143;D=克隆60181;E=克隆60175;F=克隆60163;G=克隆60173;H=克隆60184;I=克隆60141;J=克隆60179;K=克隆60140;L=克隆60183。通过制备两种混合物进行凝块溶解测定:在96孔板中制备包含133nM抗体、2μM纤维蛋白原的混合物1,以55rpm离心并在37℃下孵育0.5小时,且制备包含20nM纤溶酶原、0.1U凝血酶、4mM $CaCl_2$和1nM tPA的混合物2并转移到板中。在混合物2转移到孔中后立即开始凝块溶解反应。在350nm下测量反应的进展。每个板包含4个对照:不含凝血酶-tPA-CaCl2混合物的缓冲液空白、缓冲液空白、100μM GPRP(聚合抑制剂)和10μM EACA(溶解抑制剂)。

[0323] 与亲本人源化抗体或同种型对照抗体相比,所有测试的抗体克隆的凝块溶解时间没有显著变化(图3)。

[0324] 这些结果证实亲和力成熟的人源化抗体克隆不影响纤维蛋白聚合或纤维蛋白溶解。

[0325] ForteBio K_D测量

[0326] 通常如先前所述在Octet RED384上进行ForteBio亲和力测量(参见Estep等人,High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning.Mabs 5(2),270-278(2013))。简言之,通过将IgG在线加载到AHC传感器上进行ForteBio亲和力测量。传感器在测定缓冲液中离线平衡30分钟,然后在线监测60秒以建立基线。将加载有IgG的传感器暴露于100nM抗原3分钟,然后转移到测定缓冲液中3分钟以进行解离速率测量。对于单价亲和力评估,使用Fab代替IgG。对于该评估,将未生物素化的Fc融合抗原在线加载到AHC或AMC传感器上。传感器在测定缓冲液中离线平衡30分钟,然后在线监测60秒以建立基线。将加载有抗原的传感器暴露于100nM Fab 3分钟,然后将它们转移到测定缓冲液中3分钟以进行解离速率测量。使用1:1结合模型分析所有动力学。

[0327] 图4显示了用在溶液(100nM)中与IgG缀合的N-末端生物素化的纤维蛋白P2肽或在溶液(100nM)中的FAB(单价)的ForteBio K_D测量的结果。图5显示了溶液(100nM)中octet Fab与N-末端生物素化的纤维蛋白P2肽结合的结果。

[0328] 这些结果表明,与亲本人源化抗体相比,亲和力成熟的人源化抗体克隆对纤维蛋白P2γ肽具有改善的结合亲和力。

[0329] PSR结合测定

[0330] 如前所述进行PSR测定(参见Xu Y等人,(2013)Addressing polyspecificity of antibodies selected from an in vitro yeast presentation system:A FACS-based, high-throughput selection and analytical tool.Protein Eng Des Sel 26(10):663-670)。简言之,从CHO细胞制备可溶性膜蛋白。使用NHS-LCBiotin(Pierce,Thermo Fisher)将富集的膜级分生物素化。这种多特异性试剂与呈现IgG的酵母一起孵育,然后洗涤。然后向混合物中加入第二标记混合物(Extravidin-R-PE、抗人LC-FITC和碘化丙啶)。使用HTS样品注射器在FACSCanto II分析仪(BD Biosciences)上分析样品。对于R-PE通道中的平均荧光强度(MFI)分析流式细胞术数据以评估非特异性结合。基于显示出低、中和高PSR MFI值的三种参考抗体将MFI值从0至1标准化。

[0331] 动态扫描荧光测定

[0332] 将10uL的20x Sypro Orange加入到20uL的0.2-1mg/mL mAb或Fab溶液中。使用RT-PCR仪(Biorad CFX96 RT PCR)以0.5℃的增量将样品板温度从40℃升温至95℃,在每个温度下平衡2分钟。原始数据的一阶导数的负数用于提取Tm。

[0333] AC-SINS

[0334] AC-SINS测定如先前所述进行(参见Liu Y等人(2014)High-throughput screening for developability during early-stage antibody discovery using self-interaction nanoparticle spectroscopy.MAbs6(2):483-492)。简言之,用80%捕获抗人山羊IgG Fc(Jackson ImmunoResearch)和用20%多克隆山羊非特异性抗体(Jackson ImmunoResearch)包被金纳米颗粒(Ted Pella Inc.)。然后将感兴趣的抗体与颗粒孵育2小时,并使用Molecular Devices SpectraMax M2与SoftMax Pro6软件测量波长偏移。自身相互作用的克隆显示出与PBS样品的更高波长偏移。

[0335] HIC(疏水相互作用色谱)

[0336] 用于该测定的方法如前所述(参见Estep P等人(2015)An alternative assay to hydrophobic interaction chromatography for high-throughput characterization of monoclonal antibodies.MAbs7(3):553-561)。简言之,流动相A溶液(1.8M硫酸铵和0.1M磷酸钠,pH 6.5)掺入5μg IgG样品(1mg/mL),以在分析前达到约1M的最终硫酸铵浓度。使用Sepax Proteomix HIC butyl-NP5柱用于流动相A和流动相B溶液(0.1M磷酸钠,pH 6.5)的线性梯度,20分钟,流速1mL/min,在280nm下进行UV吸光度监测。

[0337] 实施例3:纤维蛋白原诱导的脑脊髓炎(FIE)的治疗性治疗

[0338] 然后评价人源化抗纤维蛋白抗体在纤维蛋白原诱导的脑脊髓炎(FIE)小鼠模型中治疗性抑制小胶质细胞激活和巨噬细胞浸润的能力(图6)。对于诱导FIE,将小鼠用阿佛丁麻醉并置于立体定向装置中。将不含纤溶酶原的纤维蛋白原溶解在不含内毒素的蒸馏水中,用ACSF(人工脑脊液)稀释至5mg/ml。使用与33号针头连接的10μlHamilton注射器以0.3

μl/min的速率将纤维蛋白原(1μl,5mg/ml)注射到脑内以下坐标处:前后位,-1.0mm;中间外侧,-0.7mm;背腹侧,距离前囟点-1.325mm,根据Paxinos和Watson。

[0339] 对于预防性脑室内(i.c.v.)注射,在纤维蛋白原注射前30分钟用与33号针头连接的10μl注射器将10μg抗体递送(以0.3μl/min的速率)到脑室中(前后位,-2.0mm;中间外侧,0mm,背腹侧,-2.0mm)。对于预防性静脉内(i.v.)注射,在纤维蛋白原注射前1小时用0.3mL 29g胰岛素注射器眶后注射抗体。

[0340] 将立体定位纤维蛋白原注射到胼胝体中以诱导脑脊髓炎。共78只小鼠,分成13组:每组n=6只小鼠,然后i.v.注射10mg/kg或30mg/kg的抗纤维蛋白人源化抗体。注射后3天进行脑组织收集和制备。样品排除:5只小鼠;术后第1天(C 10mg/kg,n=1)和术后第2天(B10mg/kg,n=1;D 10mg/kg,n=1)发现死亡。错误注射部位(B 10mg/kg,n=1;D 10mg/kg,n=1)。设盲和定量:所有FIE实验、图像收集和定量以盲法方式进行。如下进行免疫组织化学(IHC)和定量:包括73个小鼠样品用于IHC和定量。在Cryostat上制备冠状切片(30μm)。将组织用Iba-1(小胶质细胞标志物,以1:750稀释)和Mac-2(巨噬细胞浸润标志物,以1:750稀释)染色。然后计算Iba-1(Iba-1+面积)和Mac-2(Mac-2+面积)的免疫反应性。在以10mg/kg或30mg/kg的亲和力成熟的人源化抗纤维蛋白抗体克隆处理的小鼠组织中检测到小胶质细胞和巨噬细胞的减少。

[0341] 这些结果表明本文所述的人源化抗体变体可以治疗性地减少具有FIE的小鼠的小胶质细胞和巨噬细胞浸润。

[0342] 实施例4:复发-缓解型实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的预防性治疗

[0343] 评估人源化抗纤维蛋白抗体预防性治疗由蛋白脂质蛋白(PLP)的氨基酸139-151的表位诱导的复发-缓解型EAE(“PLP139-151EAE”)的能力。在8-9周龄雌性SJL/J小鼠中通过用补充有400μg热灭活的结核分枝杆菌H37Ra的完全弗氏佐剂中的15μg PLP139-151皮下免疫诱导EAE(第0天)。免疫后2天,通过IP施用向小鼠注射5ng百日咳毒素。在第0天开始,每周两次以0.2、1或5mg/kg IP预防性施用抗体。每天IP施用地塞米松(0.5mg/kg)作为阳性对照。实验设计:6组:n=10只小鼠/组,总共60只小鼠。剂量方案:地塞米松(5mg/kg,每天),人源化抗纤维蛋白抗体(A、B、C、D_5mg/kg,每3天)。每天监测EAE残疾评分直至研究结束。在研究的约第14-16天,在峰值EAE后3天终止研究,收集脊髓用于组织病理学分析。

[0344] 样品排除:3只小鼠;在第12天(抗体B,n=1)、第15天(抗体C,n=1)或第16天(抗体A,n=1)发现死亡。设盲和定量:所有EAE实验(抗体处理和临床评分)以盲法方式进行。57个脊髓样品准备用于组织处理。

[0345] 在预防性注射抗体(5mg/kg i.p.,每3天)的小鼠中评估PLP EAE的临床评分(图7)。与注射单独PBS或IgG1的对照小鼠相比,注射抗纤维蛋白人源化抗体的小鼠的临床评分降低。还评估了疾病发作的时间(图8)。与注射单独PBS、IgG1或地塞米松的对照小鼠(具有25%至超过50%的瘫痪小鼠)相比,没有注射抗纤维蛋白人源化抗体的瘫痪小鼠(图8)。图9显示预防性注射单独PBS、地塞米松、抗体克隆6043(左)或对照抗体人IgG1(右)的小鼠的临床评分。图10显示预防性注射单独PBS、地塞米松(dexa)、抗体克隆6043(在指定浓度下;5=5mg/kg,1=1mg/kg和0.2=0.2mg/kg)或对照抗体人IgG1(5mg/kg)的瘫痪小鼠(完全瘫痪-左)或(部分后肢瘫痪-右)的比例。

[0346] 这些结果表明抗纤维蛋白人源化抗体对于脑脊髓炎的预防性治疗是有效的。

[0347] 实施例5:人源化抗纤维蛋白抗体减少BMDM细胞中纤维蛋白诱导的IL-12表达

[0348] 评估亲和力成熟的人源化抗纤维蛋白抗体改变骨髓源巨噬细胞(BMDM)细胞系中的白介素(IL)-12b基因表达的能力(图11-13)。将具有纤维蛋白包被孔的细胞培养板与人源化抗纤维蛋白抗体预孵育2小时,然后铺板BMDM细胞。将细胞与人源化抗纤维蛋白抗体或同种型对照、纤维蛋白原、凝血酶和$CaCl_2$一起孵育6小时,然后收获细胞并分离RNA用于基因表达分析(图11)。与50μg/mL同种型对照孵育的细胞表现出IL-12b表达的超过30倍增加,而与50μg/mL浓度的抗体克隆60143和61278孵育的细胞表现出IL-12b表达的15至20倍增加(图10)。在另一实验中,与10μg/mL同种型对照孵育的细胞显示IL-12b表达增加约55倍,而与10μg/mL浓度的抗体克隆60143和61278孵育的细胞显示IL-12b表达增加约20-45倍(图12)。随着抗体克隆60143和61278的浓度增加,IL-2b表达的倍数变化也降低(图13)。

[0349] 这些结果证实,在骨髓源巨噬细胞中抗纤维蛋白抗体阻断后,纤维蛋白诱导的IL-12b表达减少。

[0350] 实施例6:神经变性疾病的治疗

[0351] 将本文所述的纯化的人源化抗体变体配制成药物组合物以施用于患者用于治疗神经变性疾病(例如,多发性硬化或阿尔茨海默病)。包含本文所述人源化抗体变体的药物组合物以足以有效减轻神经变性疾病症状的剂量施用。该药物组合物具有良好的耐受性并且不会在患者中引起显著的有害副作用。

[0352] 实施例7:用于治疗结肠炎的人源化抗体变体

[0353] 研究了人源化抗体变体在结肠炎小鼠模型中治疗结肠炎的能力(图14)。为了开始葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎治疗,使8-10周龄雌性C57BL/6小鼠适应动物饲养至少4天,称重,并基于体重随机分组到治疗组中。进行了2种类型的研究:急性(7天)和慢性(28天)。

[0354] 通过将2.5%DSS加入饮用水中7天进行急性DSS研究。以10和30mg/kg每2天IP施用(Q2D)抗体。小鼠在第7天用异氟烷麻醉,放血,随后脱颈处死。取出结肠并分析组织病理学。

[0355] 慢性DSS研究如下进行:向饮用水中加入2.0%DSS,持续1周,随后用1周的正常饮用水替换,随后用另一周的2%DSS,并以另一周的正常饮用水结束。在第0天开始每周两次以30和5mg/kg预防性地IV施用本文所述的人源化抗体变体。小鼠在28天后用异氟烷麻醉,放血,随后脱颈处死。取出结肠并分析组织病理学。

[0356] 这些结果证实本文所述的人源化抗体变体对于治疗结肠炎是有效的。

[0357] 实施例8:选择的抗纤维蛋白抗体的药代动力学和离体生物分布

[0358] 材料和方法

[0359] [125I]SIB-60143和[125I]SIB-61278标记方案

[0360] 进行四个125I-SIB产生,在每种情况下使用10μL(35MBq I-125)。标记较小批次以提高总体效率和再现性。将两对的两个反应合并并通过HPLC纯化。每种情况下干燥的125I-SIB的产率为25MBq。

[0361] 使用2M HEPES将60143和61278储备液(各0.5mL)的pH从8.5降至8.0。然后将pH调节的溶液各自加入到干燥的125I-SIB中并在室温下孵育1小时。通过iTLC测量标记效率,并发现对于60143和61278分别为59%和77%。然后将反应混合物在NAP-5柱上纯化,用PBS洗脱。

[0362] 将级分4-8合并,得到各自在1.25mL中的12.6MBq的[125I]SIB-60143和18.0MBq的[125I]SIB-61278。通过iTLC和SEC-HPLC测量放射化学纯度。

[0363] I-125标记的蛋白质在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中稀释,以对于低剂量储备液达到1.33mg/mL和对于高剂量储备液达到3.75mg/mL。

[0364] 动物模型

[0365] 从Charles River UK接收72只雌性C57BL/6小鼠。

[0366] 体内高剂量先导安全性研究

[0367] 2只雌性C57BL/6小鼠静脉内注射30mg/kg的60143,且2只静脉内注射30mg/kg的61278。注射后第一小时(注射后0-1小时)和第四小时(注射后4-5小时)连续监测动物。在注射后1天和2天每天检查小鼠的任何副作用,此时将它们处死。

[0368] 体内研究

[0369] 对于药代动力学分析,68只雌性C57BL/6小鼠(19.0±1.3g)注射10或30mg/kg的[125I]SIB-60143或[125I]SIB-61278,并在各个不同时间点(5分钟、30分钟、1小时、4小时、1天、3天、7天和14天;n=2/时间点)处死。用γ计数器计数血液、血浆、无蛋白血浆和蛋白活性。关于研究设计的进一步细节提供于下表1中。

[0370] 这些动物中的32只(18.6±1.3g)也包括在生物分布研究中。所有小鼠注射10或30mg/kg的[125I]SIB-60143或[125I]SIB-61278,并在各个不同时间点(1天、3天、7天和14天;n=2/时间点)处死。关于研究设计的进一步细节提供于下表2中。

[0371] 表1:PK分析的研究设计总结

[0372]

时间点	样品
5min	血液,血浆,无蛋白血浆,蛋白质
30min	血液,血浆,无蛋白血浆,蛋白质
1小时	血液,血浆,无蛋白血浆,蛋白质
4小时	血液,血浆,无蛋白血浆,蛋白质
1天	血液,血浆,无蛋白血浆,蛋白质
3天	血液,血浆,无蛋白血浆,蛋白质
7天	血液,血浆,无蛋白血浆,蛋白质
14天	血液,血浆,无蛋白血浆,蛋白质

[0373] 表2:生物分布研究设计总结

[0374]

组&途径	动物数	示踪剂	质量剂量(mg/kg)	放射性剂量(MBq/动物)	γ计数时间点
1 IV	16	[^{125}I]SIB-60143	9.8 ± 0.5	0.27 ± 0.02	24 小时
2 IV	16	[^{125}I]SIB-61278	9.8 ± 0.5	0.36 ± 0.02	72 小时
3 IV	16	[^{125}I]SIB-60143	29.6 ± 1.9	0.27 ± 0.02	168 小时
4 IV	17	[^{125}I]SIB-61278	29.3 ± 3.6	0.37 ± 0.05	336 小时

[0375] 第1组和第2组的所有动物第1天清醒注射。第3组和第4组的生物分布动物(1天、3天、7天和14天)也在第1天清醒注射。在第3组和第4组的仅PK动物(5分钟、30分钟、1小时、4小时)在第2天清醒注射。不同注射日使用相同的测试品制剂产生。

[0376] 剂量施用

[0377] 在剂量施用当天对每只动物称重。动物体重范围为16.4-22.5g。通过使用0.5mL注射器施用单一静脉内(IV)剂量以提供对于第1和2组的10mg/kg和对于第3和4组的30mg/kg的适当剂量。给药注射器在注射之前和之后称重以确定施用于每个受试者的量。

[0378] 离体样品制备

[0379] 通过心脏穿刺处死动物,然后在器官切除之前放血。收集以下器官用于γ计数:脑、心脏、肝、肾、肌肉、尾、胃、大肠、小肠、盲肠和脾。

[0380] 分析

[0381] 结果以百分注射剂量(%ID)和每克百分注射剂量(%ID/g)的单位呈现。这些单位的定义可以在以下等式中找到:

[0382] 来自离体γ计数数据的每个分析区域的%ID可如等式1中所述定义:

$$\%ID = \frac{\text{摄取}}{\text{注射剂量}} * 100\,\%$$

[0383] 其中摄取=特定γ计数样品中的放射性(MBq),针对注射时间进行衰变校正。注射剂量=注射到受试者中的放射性(MBq)。

[0384] 来自离体γ计数数据的每个分析区域的%ID/g可如等式2中所述定义:

$$\%\frac{ID}{g} = \frac{\frac{\text{摄取}}{\text{注射剂量}} * 100\%}{ROI\text{重量}}$$

[0385] 其中摄取=特定γ计数样品中的放射性(MBq),针对注射时间进行衰变校正。注射剂量=注射到受试者中的放射性(MBq)。重量=以g计的伽马计数组织的样品重量。

[0386] 对于离体γ计数数据,可以根据等式3定义以μg/mL为单位的浓度值:

$$\frac{\mu g}{mL} = \frac{\%ID}{g} \times \frac{\text{注射剂量}(\mu g)}{100\,\%ID} \Big/ \frac{1\,mL}{1\,g}$$

[0387] 其中注射剂量=注射到受试者中的抗体质量(μg)。假设:组织密度1g/mL。

[0388] 生物分布的γ计数分析

[0389] 以每分钟计数(CPM)的单位测量每个收集的组织的活性。也在γ计数器中测定放射示踪剂的一式三份等分试样,以便计算将计数转化为注射物质质量(g/CPM)的因子。值对于背景辐射进行校正并转化为百分注射剂量(%ID)和每克百分注射剂量(%ID/g)。

[0390] 用于PK研究的γ计数分析

[0391] 以每分钟计数(CPM)的单位测量每个收集的组织的活性。也在γ计数器中测定放射示踪剂的一式三份等分试样,以便计算将计数转化为注射物质质量(g/CPM)的因子。然后值针对背景辐射进行校正,并转化为百分注射剂量(%ID)和每克百分注射剂量(%ID/g)。

[0392] 对于PK分析,合并来自2只小鼠的血液子样品γ计数的血液中放射性示踪剂的浓度(%ID/g)并且如下计算:

[0393] $$\text{质量}(\text{样品中的注射物})\,[g] = CPM(\text{样品}) \times \frac{\text{质量}(\text{标准品中的注射物})\,[g]}{CPM(\text{校准品})}$$

[0394] $$\text{注射质量}(\text{合并的})\,[g] = \frac{\text{质量}(\text{小鼠 1 中的注射物})\,[g] + \text{质量}(\text{小鼠 2 中的注射物})\,[g]}{2}$$

[0395] $$\%ID\,(\text{样品}) = \frac{\text{质量}(\text{样品中的注射物})\,[g]}{\text{注射质量}(\text{合并的})\,[g]} \times 100$$

[0396] $$\%ID/mL\left(样品\right)=\frac{\%ID\left(样品\right)}{体积\left(样品\right)[mL]}$$

[0397] 子采样的血液和血浆%ID值也分别外推至总(全身)血液和血浆值。为了外推,使用血液体积/体重比=0.072mL/kg(Diehl等人,2001)。为了计算全血浆,使用0.387的血细胞比容值。

[0398] 非房室分析

[0399] %ID/mL值在非房室分析之前使用以下等式转换为μg/mL单位:

[0400] $$浓度\left(\mu g/mL\right)=\frac{质量\left(样品中的注射物\right)[g]}{体积\left(样品\right)[mL]}\times\frac{1x10^{6}\,[\mu g]}{1\,[g]}$$

[0401] 使用Phoenix WinNonlin(Certara)规则用Python对μg/mL值进行回归以确定终末清除率λ_z。如下计算PK参数:

[0402] AUC $$AUC\,[\mu g\cdot h\cdot mL^{-1}]=\int_{0}^{tn}C(t)dt$$

[0403] AUC(0-24) $$AUC\;\;[\mu g\cdot h\cdot mL^{-1}]=\int_{0}^{24}C(t)dt$$

[0404] AUC(0-∞) (AUC_{inf}) $$AUC\,[\mu g\cdot h\cdot mL^{-1}]=\int_{0}^{tn}C(t)dt+\frac{C(tn)}{\lambda_z}$$

[0405] AUC_{Tail} $$\frac{AUC_{Inf}-\mathrm{AUC}}{AUC_{Inf}}\times 100$$

[0406] 分布体积 $$V_D[mL]\;=\;\frac{剂量\,[\mu g]}{AUC_{Inf}\,[\mu g\cdot h\cdot mL^{-1}]\times\lambda_z}$$

[0407] 清除率 $$CL\,[mL\cdot h^{-1}]\;=\;\frac{剂量\,[\mu g]}{AUC_{Inf}\,[\mu g\cdot h\cdot mL^{-1}]}$$

[0408] 结果

[0409] PK分析

[0410] 对于10mg/kg和30mg/kg的放射性标记抗体[125I]SIB-60143和[125I]SIB-61278计算一定范围的PK参数(图15A、图15B和表3)。没有体内不稳定性的指示,其具有>95%的活性蛋白结合(图15A和15B)。对于两种抗体在两个剂量水平下,注射后24小时从血液和血浆中消除约50-70%的测试品。[125I]SIB-60143在两个剂量下在血液和血浆中的消除半衰期在275-375小时范围内。在两个剂量水平下,[125I]SIB-61278的消除半衰期长于其他抗体;血浆中550-600小时和血液中775-825小时。当独立地比较血液和血浆中每种抗体的两个剂量水平时,清除率值相似。

[0411] 表3:10mg/kg和30mg/kg下[^{125}I]SIB-60143和[^{125}I]SIB-61278的NCA分析结果

[0412]

	回归范围	[^{125}I]SIB-60143 (10 mg/kg)		[^{125}I]SIB-60143 (30 mg/kg)		[^{125}I]SIB-61278 (10 mg/kg)		[^{125}I]SIB-61278 (30 mg/kg)	
		血液	血浆	血液	血浆	血液	血浆	血液	血浆
C_{max} (mg/mL)	N/A	109	205	270	500	96	191	314	585
$t_{½a}$ (h)	5 min-4 h	7.7	6.8	6.2	6.0	7.6	6.5	5.3	4.1
$t_{½}$ (h)	24 h-14 d	291	316	350	309	820	557	789	597
λ_z (h^{-1})	24 h-14 d	0.0024	0.0022	0.0020	0.0022	0.0008	0.0012	0.0009	0.0012
$t_{½}$ (h)	3 d-14 d	281	325	398	371	876	503	732	398
λ_z (h^{-1})	3 d-14 d	0.0025	0.0021	0.0017	0.0019	0.0008	0.0014	0.0009	0.0017
Vd (mL)	24 h-14 d	3.64	2.11	4.27	2.36	3.80	2.02	4.30	2.32
CL (mL/h)	24 h-14 d	0.0087	0.0046	0.0084	0.0053	0.0032	0.0025	0.0038	0.0027
AUC (mg/mL.h)	5 min-14 d	12000	21000	32000	56000	14000	25000	39000	69000
AUC_{∞} (mg/mL.h)	3 d-14 d	22000	40000	66000	105000	56000	72000	149000	210000

[0413] 生物分布

[0414] 在注射后24、72、168和336小时测定两种抗体的离体生物分布。图16A显示小鼠中10mg/kg的[^{125}I]SIB-60143随时间的变化。图16B显示了小鼠中30mg/kg的[^{125}I]SIB-60143随时间的变化。图16C显示了小鼠中10mg/kg的[^{125}I]SIB-61278随时间的变化。图16D显示了小鼠中30mg/kg的[^{125}I]SIB-61278随时间的变化。两种抗体在两个剂量下的分布模式相似,具有低的脑浓度(0.39±<0.01至0.91±0.51%ID/g),及心脏(3.50±0.03至10.69±2.02%ID/g)、肾脏(3.28±0.01至8.40±1.37%ID/g)、肝脏(1.85±0.01至5.12±0.85%ID/g)和脾脏(1.77±0.05至5.27±0.55%ID/g)中的摄取。没有观察到随着剂量增加的浓度的差异。14天时61278在所有器官中的摄取高于60143,这与更长的清除半衰期一致。

[0415] 对于两种抗体在两个剂量水平下,注射后24小时从血液和血浆中消除50-70%的测试品。[^{125}I]SIB-60143在血液和血浆中在所有剂量范围下的消除半衰期在275-375小时范围内。在两个剂量水平,[^{125}I]SIB-61278的消除半衰期长于其他抗体;血浆中550-600小时和血液中775-825小时。两种抗体在两个剂量水平下的生物分布数据相当。14天时[^{125}I]SIB-61278在所有器官中的摄取高于[^{125}I]SIB-60143,与更长的消除半衰期一致。

[0416] 实施例9:抗体克隆60143的Fab的晶体结构

[0417] 与纤维蛋白原γ肽P2复合的抗体克隆ABI-60143的Fab(包含重链和轻链可变结构域)的X射线晶体结构以1.5Å分辨率解析。描述的晶体使用蒸气扩散的悬滴法在96孔板中用含有0.1M二甲胂酸钠pH 5.5和25%PEG 4000的沉淀剂溶液生长。通过将晶体直接从生长液滴捕获在环中和将其投入液氮中,在没有额外的低温保护剂的情况下对晶体进行低温冷却。在Swiss Light Source(SLS),光束线X06DA(PXIII)下收集数据集。

[0418] MOSFLM(Battye等,2011)(CCP4)和AIMLESS(Evans&Murshudov,2013)(CCP4)中的数据处理表明,最可能的空间群是P212121,晶胞尺寸

a =67.9 Å，b =73.3 Å，c =93.6 Å 和α＝β＝ γ ＝90.0°,从而给出总晶胞体积 465741.4 $Å^3$。Matthews系数(2.3 $Å^3/Da$和46.6%溶剂含量)的计算表明,最可能每不对称单元存在一个完整的Fab-ABI-60143-P2复合物。通过针对PDB BLAST搜索Fab重链和轻链的序列来选择用于分子置换(MR)的模型。具有最高序列同一性的模型是6ani(Fab重链)和3pp3(Fab轻链)。PDB中大量的Fab晶体结构揭示了可变和恒定结构域之间存在的肘角(elbow angle)的极大多样性。肘角的这种多样性可导致两个另外地高度同源的Fab片段的总体三级结构显著不同,这又导致MR失败。为此,除去了重链和轻链的可变和恒定结构域之间的铰链区。产生4个单独的MR检索合集(VH、CH、VL和CL结构域)。在COOT中目视检查后,氨基酸残基从重和轻可变结构域模型的CDR修剪,以防止与P2的界面中的任何潜在的冲突,其也可能导致MR失败。使用PHASER(McCoy等人,2007)(CCP4)通过MR正确定位构建完整Fab所需的所有四个输入检索合集。MR输出模型使用REFMAC5(Vagin等人,2004)(CCP4)进行30个循环的凝胶体(jelly body)优化。蛋白质序列使用CHAINSAW(Stein,2008)(CCP4)突变以匹配Fab的序列。Fab ABI-60143模型通过模型构建和优化的连续循环反复改进,直到在电子密度图中可见的所有蛋白质有序区域完整。在COOT中手工将P2肽链加入模型中,并在REFMAC5中优化完整的复合物模型。最终的蛋白质模型含有来自链A(肽P2)的残基410-421,来自链H(Fab重链)的残基1-127和134-214及来自链L(Fab轻链)的残基1-213。最终Rwork＝16.8%,Rfree＝20.5%。

[0419] 每不对称单元存在各自一个拷贝的Fab ADI-60143和肽P2。根据PyIgClassify数据库(Adolf-Bryfogle等人,2014)分析Fab ABI-60143CDR规范结构。重链CDR如下分类:H1-13-1(CDR-长度-簇)和H2-10-1。CDR H3未分类。轻链CDR如下分类:L1-16-1、L2-8-1和L3-9-cys7-1。

[0420] 每个P2肽与单个Fab结合。折叠与公布的纤维蛋白原γ链晶体结构如PDB ID:1fzc相似,但不相同。

[0421] 表4:Fab ADI-60143和肽P2界面分析

[0422]

界面氢键列表 单体1	长度(Å)	单体2
A:LYS 411 [NZ]	2.83	H:ASP 54 [OD2]
A:LYS 411 [NZ]	2.78	H:ASP 52 [OD2]
A:LYS 411 [NZ]	3.34	H:ASP 54 [OD1]
A:ASN 416 [O]	3.95	H:SER 95 [OG]
A:ASN 416 [O]	3.42	H:LYS 96 [N]
A:ASN 416 [O]	3.46	H:LYS 96 [O]
A:ARG 417 [NE]	3.43	H:TRP 33 [NE1]
A:ARG 417 [NE]	3.71	H:SER 31 [O]
A:ARG 417 [NH1]	3.50	H:SER 31 [O]
A:ARG 417 [O]	3.68	H:SER 95 [OG]
A:ARG 417 [O]	2.83	H:HIS 35 [NE2]
A:LEU 418 [O]	3.28	L:ASN 91 [OD1]
A:THR 419 [O]	2.94	H:LYS 96 [N]
A:ILE 420 [N]	3.58	L:TYR 36 [OH]
A:ILE 420 [O]	2.52	L:TYR 36 [OH]
A:GLY 421 [N]	3.02	H:SER 94 [O]
A:GLY 421 [OXT]	3.77	H:GLY 102 [N]
A:GLY 421 [OXT]	3.74	H:GLY 101 [O]

[0423] 表5:Fab ADI-60143参与界面残基

[0424]

肽 P2	Fab ADI -60143
A:LYS 411	H:SER 31
A:ILE 412	H:TRP 33
A:ILE 413	H:HIS 35
A:PHE 415	H:LEU 50
A:ASN 416	H:ASP 52
A:ARG 417	H:ASP 54
A:LEU 418	H:TYR 56
A:THR 419	H:ALA 93
A: ILE 420	H:SER 94
A: GLY 421	H:LYS 96
	H:PRO 97

H:GLY 101
H:GLY 102
H:TRP 103
L:HIS 27
L:TYR 32
[0425] L:TYR 36
L:LEU 46
L:ASN 91
L:LEU 92
L:LEU 94
L:LEU 96

[0426] 表6:数据采集、处理和优化统计学

[0427]

Synchrotron, 束线	SLS, PXIII
数据采集日期	26/08/2021
波长(Å)	1.286281
检测器类型	DECTRIS PILATUS 2M-F
透射(%)	100
温度(K)	100
暴露时间(s)	0.05
每帧的振荡范围(°)	0.10
总体旋转(°)	180
分辨率范围(Å)(总体和最后壳)	46.81 -1.50 (1.53 -1.50)
观察的反射数(总体和最后壳)	462407 (14052)
独特反射数(总体和最后壳)	75227 (3612)
多重性(总体和最后壳)	6.1 (3.9)
完整性(%)(总体和最后壳)	99.7 (97.7)
$R_{合并}$(%)(总体和最后壳)	9.2 (104.7)
平均I/Σ(总体和最后壳)	11.2 (1.1)
CC(1/2) (总体和最后壳)	0.998 (0.429)
空间群	*P212121*
晶胞参数(Å), (°)	67.89 73.28 93.62 90.00 90.00 90.00

[0428]

优化程序	REFMAC5
分辨率范围(Å)	46.81 -1.50

[0429]

反射数(工作/测试)	71309 / 3845
R_{work} (%)	16.8
R_{free} (%)	20.5
建模的蛋白质残基	418
建模的蛋白质原子数	3320
建模的水原子数	721
RMSD键长(Å)	0.012
RMSD键角(°)	1.690
平均蛋白B值($Å_2$)	16.4
平均水B值(Å2)	29.1
有利的拉氏图(%)	97.85
允许的拉氏图(%)	1.67
拉氏图离群值区(%)	0.48

[0430] 实施例10:抗体克隆ADI-61278的Fab的晶体结构

[0431] 与纤维蛋白原γ肽P2复合的Fab抗体克隆ADI61278(包含重链和轻链可变结构域)的X射线晶体结构以1.8 Å分辨率解析。所描述的晶体使用蒸气扩散的悬滴法在96孔板中用含1%(w/v)胰蛋白胨、0.001M叠氮化钠、0.05M HEPES钠pH 7.0和20%PEG 3350的沉淀剂溶液生长。将晶体通过短暂转移到含有四份沉淀剂溶液和一份100%(v/v)甘油的溶液中,然后将其捕获在环中并将其投入液氮中进行低温冷却。在Diamond Light Source(DLS),束线i03下收集数据集。

[0432] MOSFLM(Battye等人,2011)(CCP4)和AIMLESS(Evans&Murshudov,2013)(CCP4)中的数据处理表明,最可能的空间群是P21221,晶胞尺寸

a =47.0 Å, b =79.0 Å, c =144.3 Å 和α=β=γ=90.0°,从而给出总晶胞体积534840.2 $Å^3$。Matthews系数(2.8 Å3/Da和55.8%溶剂含量)的计算表明,每不对称单元最可能存在一个完整Fab-ADI61278-P2复合物。选择Fab-ADI61278模型用于分子置换(MR)。PDB中大量的Fab晶体结构揭示了可变和恒定结构域之间存在的肘角的极大多样性。肘角的这种多样化可导致两个另外地高度同源的Fab片段的总体三级结构显著不同,这又导致MR失败。为此,除去了重链和轻链的可变和恒定结构域之间的铰链区。产生两个单独的MR检索合集(VH-VL异二聚体和CH-CL异二聚体)。使用PHASER(McCoy等人,2007)(CCP4)通过MR正确定位构建完整Fab所需的两个输入检索合集。MR输出模型使用REFMAC5(Vagin等人,2004)(CCP4)进行30个循环的凝胶体优化。蛋白质序列使用CHAINSAW(Stein,2008)(CCP4)突变以匹配Fab-ADI61278的序列。Fab ADI61278模型通过模型构建和优化的连续循环重复改进,直到在电子密度图中可见的所有蛋白质有序区完成。在COOT中手工将肽P2链加入模型中,并且完整的复合物模型在REFMAC5中优化。最终的蛋白质模型含有来自链A(肽P2)的残基410-421、来自链H(Fab重链)的残基1-126和133-214及来自链L(Fab轻链)的残基1-213。最终Rwork=19.1%,Rfree=24.0%。

[0433] 每不对称单元具有各自一个拷贝的Fab ADI61278和肽P2。根据PyIgClassify数据

库(Adolf-Bryfogle等人,2014)分析Fab ADI61278CDR规范结构。重链CDR如下分类:H1-13-1(CDR-长度-簇)、H2-10-1和H3-8-1。轻链CDR如下分类:L1-16-1、L2-8-1和L3-9-cys7-1。每个P2肽与单个Fab结合。折叠与公布的纤维蛋白原γ链晶体结构如PDB ID:1fzc相似,但不相同。

[0434] 表7:Fab ADI-61278和肽P2界面分析

[0435]

单体1	长度(Å)	单体2
A:LYS 411 [NZ]	2.71	H:ASP 54 [OD2]
A:LYS 411 [NZ]	2.74	H:ASP 52 [OD2]
A:LYS 411 [NZ]	3.34	H:ASP 54 [OD1]
A:ASN 416 [O]	3.31	H:ASP 96 [N]
A:ASN 416 [O]	3.65	H:ASP 96 [OD1]
A:ASN 416 [O]	3.62	H:ASP 96 [OD2]
A:ASN 416 [OD1]	3.22	L:GLN 50 [NE2]
A:ARG 417 [NE]	3.25	H:TRP 33 [NE1]
A:ARG 417 [NE]	4.00	H:ASP 96 [OD1]
A:ARG 417 [NH1]	3.75	H:TRP 33 [NE1]
A:ARG 417 [NH1]	3.32	H:SER 31 [O]
A:ARG 417 [NH2]	3.08	H:SER 31 [O]

[0436]

A:ARG 417 [NH2]	3.87	H:SER 95 [OG]
A:ARG 417 [NH2]	2.90	H:ASP 96 [OD1]
A:ARG 417 [NH2]	3.71	H:ASP 96 [OD2]
A:ARG 417 [O]	2.78	H:HIS 35 [NE2]
A:THR 419 [O]	3.13	H:ASP 96 [N]
A:THR 419 [O]	3.83	H:HIS 35 [NE2]
A:ILE 420 [N]	3.48	L:TYR 36 [OH]
A:ILE 420 [O]	2.57	L:TYR 36 [OH]
A:GLY 421 [N]	2.71	H:SER 94 [O]
A:GLY 421 [O]	3.64	H:THR 98 [N]
A:GLY 421 [O]	2.94	H:GLY 101 [N]
A:GLY 421 [OXT]	3.96	H:ASP 96 [N]
A:GLY 421 [OXT]	3.62	H:SER 94 [O]
A:GLY 421 [OXT]	3.58	H:SER 95 [O]
A:GLY 421 [OXT]	3.00	H:THR 98 [N]
A:GLY 421 [OXT]	3.89	H:THR 98 [OG1]
A:GLY 421 [OXT]	3.63	H:GLY 101 [N]
A:GLY 421 [OXT]	3.02	H:ALA 97 [N]

[0437] 表8:参与界面剩余的列表

[0438]

肽P2	***Fab ADI-61278***
A:LYS 411	H:SER 31
A:ILE 413	H:TYR 32
A:PHE 415	H:TRP 33
A:ASN 416	H:HIS 35
A:ARG 417	H:TRP 47
A:LEU 418	H:ASP 52
A:THR 419	H:ASP 54
A: ILE 420	H:TYR 56
A: GLY 421	H:SER 94
	H:SER 95
	H:ASP 96
	H:ALA 97
	H:THR 98
	H:GLY 101
	H:GLY 102
	H:TRP 103
	L:HIS 27
	L:TYR 32
	L:TYR 36
	L:LEU 46
	L:TYR 49
	L:GLN 50
	L:ALA 91
	L:LEU 92
	L:LEU 94
	L:LEU 96

[0439]

[0440] 表9:数据收集、处理统计学和优化统计学

[0441]

Synchrotron, 束线	DLS, i03
数据采集日期	24/09/2021
波长(Å)	0.9763
检测器类型	DECTRIS EIGER2 XE 16M
透射(%)	23.84
温度(K)	100
暴露时间(s)	0.004
每帧的振荡范围(°)	0.10
总体旋转(°)	360
分辨率范围(Å)(总体和最后壳)	44.65 - 1.80 (1.84 - 1.80)
观察的反射数(总体和最后壳)	681993 (41185)
独特反射数(总体和最后壳)	50679 (2967)
多重性(总体和最后壳)	13.5 (13.9)
完整性(%)(总体和最后壳)	100.0 (100.0)
$R_{合并}$(%)(总体和最后壳)	9.5 (175.5)
平均I/Σ(总体和最后壳)	14.7 (1.4)
CC(1/2) (总体和最后壳)	0.999 (0.669)
空间群	*P21221*
晶胞参数(Å), (°)	46.95 78.96 144.26 90.00 90.00 90.00
优化程序	REFMAC5
分辨率范围(Å)	44.65 - 1.80
反射数(工作/测试)	48037 / 2583
R_{work} (%)	19.1
R_{free} (%)	24.0
建模的蛋白质残基	419

[0442]

建模的蛋白质原子数	3310
建模的水原子数	421
RMSD键长(Å)	0.005
RMSD键角(°)	1.300
平均蛋白B值($Å_2$)	32.9
平均水B值(Å2)	42.3
有利的拉氏图(%)	97.61
允许的拉氏图(%)	2.15
拉氏图离群值区(%)	0.24

[0443] 实施例11:ADI-60143和ADI-61278-Fab均结合在P2-肽的C-末端并在CDR-3区域中显示出大多数差异。

[0444] 上述抗体克隆ADI-60143和ADI-61278的FAB的晶体结构叠加,并比较P2肽结合位点,如图17和18所示。这些结果显示ADI-60143和ADI-61278-Fab均结合在P2-肽的C-末端,并且还显示大多数差异位于两个Fab的CDR-3区域中。

[0445] 使用Octet RED384如实施例2中所述测定ADI-60143和ADI-61278Fab与P2肽的结合(图19)。CDR1和CDR3中的氨基酸变异解释了ADI-60143和ADI-61278-Fab与P2-肽相互作用之间结合速率和解离速率的差异。

[0446] ADI-60143Fab和全长ADI-60143IgG与大鼠、小鼠或人P2肽和延长的P2肽的结合也通过ELISA测定(图20和21)。对于来自不同物种的三种P2肽观察到类似的结合特征。然而,三个物种的延长的P2肽不能良好地结合ADI-60143IgG(图21)。

[0447] 实施例12:用ADI-60143的治疗性治疗抑制纤维蛋白诱导的脑炎(FIE)PD模型中的小胶质细胞激活和巨噬细胞募集

[0448] 为了测试亲和力成熟抗体克隆在治疗神经退行性疾病和炎症中抑制小胶质细胞激活和巨噬细胞募集的功效,使用纤维蛋白诱导脑炎(FIE)的小鼠模型。每组6只小鼠,总共78只小鼠,通过立体定位注射施用纤维蛋白原到胼胝体中。通过静脉内(I.V.)注射施用抗体。纤维蛋白原注射4小时后,小鼠静脉注射亲和力成熟的抗纤维蛋白人源化抗体(10mg/kg或30mg/kg)。在注射后3天制备脑组织。包括73个小鼠样品用于免疫组织化学分析和定量。在Cryostat上制备冠状切片(30μm)。切片用抗Iba-1抗体(小胶质细胞标志物,1:750)孵育(以检测小胶质细胞激活)和用抗Mac-2抗体(巨噬细胞浸润标志物,1:750)孵育。然后计算Iba-1(Iba-1+面积)和Mac-2(Mac-2+面积)的免疫反应性,并且图像收集和定量以盲法进行。

[0449] 如图22所示,在注射30mg/kg ADI-60143的小鼠中,小胶质细胞激活和巨噬细胞募集都显著减少。该减少也大于在注射未经历亲和力成熟的亲本人源化5B8抗体(THN227)的小鼠中测量的减少。这些结果证实亲和力成熟的抗体克隆60143对于抑制小胶质细胞激活和巨噬细胞募集以用于治疗神经退行性疾病或病症和/或神经炎症是治疗有效的。

[0450] 实施例13:抗体克隆ADI-60143在多发性硬化的临床前模型中是有效的

[0451] 为了测试亲和力成熟的抗体克隆对于治疗多发性硬化(MS)的治疗功效,使用MS的临床前小鼠模型,实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)。在第0天通过$PLP_{139-151}$/CFA(Hoke Kit™ $PLP_{139-151}$/CPA乳剂,目录号EK-0120,Hoke Laboratories,Lawrence MA)的免疫诱导EAE。EAE小鼠在第2天开始治疗性注射,并持续至第44天(对于地塞米松)和至第33天(对于所有其它组,用单独的PBS、单独的同种型对照-人IgG1(huIgG)、抗体克隆60143(ABI-60143)或地塞米松),以5mg/kg腹膜内注射,每周两次。从具有峰疾病的EAE小鼠或健康小鼠收获小鼠的脊髓组织,并对脊髓组织进行免疫组织化学(IHC)染色以确定抗体药物向脊髓组织的分布和脱髓鞘。

[0452] 对于IHC染色,将新鲜收获的非固定组织置于冷模(cryomold)内的OCT化合物中。将冷模置于与干冰混合的异戊烷中冷冻,并将冷冻组织保持在-80℃下。在cryostat中切割10μm厚的组织切片并安装在载玻片上。通过立即在冰冷的4%多聚甲醛的PBS溶液中在4℃下固定10分钟来将载玻片染色。通过在封闭缓冲液(PBS中3%牛血清白蛋白;Millipore Sigma,A9576)在25℃下孵育30分钟,将载玻片在一级抗体与组织的非特异性结合中封闭。为了检测切片前注射到组织中的生物素化抗体,Cy3-缀合的链霉亲和素(1:100;SA1010,Thermo Fischer Scientific)在PBS中稀释,应用于组织切片,并在25℃下孵育30分钟。对于纤维蛋白染色,将在PBS中稀释的抗体(1:2000,兔多克隆抗纤维蛋白原)添加至组织切片并在25℃下孵育60分钟。然后将FITC驴抗兔IgG(在PBS中1:500,Jackson ImmunoResearch)

加入到每个切片,并在25℃下孵育30分钟。

[0453] 如图24所示,亲和力成熟的抗体(ABI-60143)定位于峰值疾病的EAE小鼠中的脊髓处。这证实了亲和力成熟的抗体很好地分布于患病的脊髓组织。

[0454] 通过测定缺乏髓鞘碱性蛋白(MBP)染色的面积百分比来定量组织切片的脱髓鞘百分比。如图24A所示,在施用抗体克隆60143的小鼠中,脱髓鞘百分比以剂量依赖性方式显著降低。

[0455] 还评价了小鼠的后肢瘫痪和临床评分。如图24B所示,在施用亲和力成熟的抗体克隆60143的EAE小鼠中,脱髓鞘和完全后肢瘫痪存在剂量依赖性的降低。

[0456] 通过下表中所示的标准评估EAE临床评分:

[0457]

评分	临床观察
0	与非免疫小鼠相比,小鼠的运动功能没有明显的变化。 当通过尾巴抬起时,尾巴具有张力并直立。后腿通常分展开。 当小鼠行走时,没有步态或头部歪斜。
1	松软尾。当小鼠通过尾巴抬起时,整个尾巴搭在你的手指上,而不是直立的。
2	松软尾和后腿无力。 当小鼠通过尾巴抬起时,腿不分展开,而是更紧密地保持在一起。当在行走时观察小鼠,其具有异常的摇摆行走。

[0458]

3	松软尾和完全后肢瘫痪(最常见)。 或 松软尾伴随一个前肢和一个后肢的瘫痪。 或 以下全部: • 严重头部歪斜, • 仅沿笼边缘行走, • 推靠笼壁, • 在通过尾巴抬起时旋转。
4	松软尾,完全后肢和部分前肢瘫痪。 小鼠围绕笼最少移动,但表现出警觉和进食。通常,建议小鼠在4级评分2天后安乐死。当小鼠由于严重瘫痪而被处死时,对于实验的剩余部分,对该小鼠输入5的评分。
5	完全后肢和完全前肢瘫痪,没有围绕笼的运动。 或 小鼠在笼中自发滚动。 或 发现小鼠因瘫痪而死亡。

[0459] 阴性对照组(溶媒和同种型对照)如对于该模型预期的产生EAE。对于溶媒和同种型对照组,第一波EAE的平均最大严重程度(MMS)分别为2.4和2.5。溶媒组和同种型对照组的复发发生率分别为73%和60%。溶媒和同种型对照组的复发期MMS分别为2.3和1.9。这些

组中的疾病具有对于该模型典型的病程和严重程度。如图25所示,施用ABI-60143-LALA IgG(包含Fc稳定化LALA突变的抗体克隆60143)的小鼠发生减少的疾病,如通过显著降低的平均EAE临床评分所证明的,在免疫后17天没有可检测的疾病。

[0460] 为了证实亲和力成熟的抗体减轻炎症,制备来自脊髓的颈区、胸区和腰区的节段(3个节段)并用以下染色:H和E,及抗CD4/抗CD11b(双重标记)抗体。在每个H&E染色切片中计数约20个细胞的炎性病灶。当炎性浸润物由多于20个细胞组成时,估计存在多少个20个细胞的病灶。如图26A所示,与同种型对照相比,施用抗体克隆ABI-60143IgG或ABI-60143-LALA IgG的EAE小鼠的组织切片中炎性病灶数量显著减少。与同种型对照相比,施用抗体克隆ABI-60143IgG或ABI-60143-LALA IgG的EAE小鼠的组织切片中促炎标志物CD11b也显著减少(图26B)。这些结果证实亲和力成熟的抗体ABI-60143IgG和ABI-60143-LALA IgG能够在多发性硬化的临床前模型中减轻炎症。

[0461] 总之,这些结果证实了亲和力成熟的人源化抗纤维蛋白抗体在多发性硬化的临床前模型中是治疗有效的。

[0462] 实施例14:抗纤维蛋白P2治疗减少葡萄膜炎模型中的炎症

[0463] 实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU)是靶向神经视网膜的器官特异性自身免疫性疾病。当动物用视网膜抗原(在这种情况下,感光细胞间类视黄醇结合蛋白[IRBP])免疫时诱导这种自身免疫反应。为了证实抗纤维蛋白治疗在炎性眼病症或疾病中的治疗作用,在玻璃体内施用抗纤维蛋白抗体后,在大鼠实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU)模型中测试抗纤维蛋白亲和力成熟抗体的功效。

[0464] 在该研究中,将52只Lewis大鼠分成6组,即PBS(第1组)、同种型对照(第2组)、ABI-60143低剂量(第3组)、ABI-60143高剂量(第4组)、FTY-720阳性对照(第5组)和未处理的(第6组)。在第0天,用IRBP在完全弗氏佐剂(CFA)中的乳液免疫来自除第6组之外的所有组的动物。类似地,第1-4组的动物在第0天接受赞助测试品的单次玻璃体内注射。第5组中的动物每天接受一次阳性对照FTY-720的口服施用。在8-10天的时间段后,免疫的动物每只眼睛出现葡萄膜炎。在基线、第4天、第7天、第11天和第14天对所有动物进行临床评价以跟踪疾病发展的程度。如下进行临床观察:

[0465] 频率:每个研究日一次

[0466] 程序:在评价之前将各组随机化以保持检查者不知情。在解剖显微镜下观察动物并基于它们的之前临床疾病以0-4的标度评分。在临床评价时拍摄前房照片。

[0467] 临床观察分级:

[0468] 0-0.5:无疾病;眼睛半透明。虹膜中的一些血管可能扩张。

[0469] 1:虹膜中血管充血;异常瞳孔收缩(或扩张)。

[0470] 2:前房轻微浑浊。

[0471] 3:前房中度不透明,但瞳孔仍可见。

[0472] 4:前房不透明,且瞳孔模糊。

[0473] 在第14天对所有动物实施安乐死,并在处死后立即收集全眼(OU)。在证实死亡后,小心取出每只动物的双眼。收集一只眼用于组织学分析,且收集另一只眼用于细胞因子分析。将用于细胞因子分析的眼半切并收集视网膜。在蜡包埋之前,小心地对每只眼睛进行定向用于最佳显微镜检查。切下切片(5μm)并用苏木精和曙红染色用于组织学检查并根据以

下总结的和如Caspi等人(2012)所述的以下量表分级。组织学分析对于检查者是不知情的。

[0474] 临床分级/葡萄膜炎分级确定如下:

[0475] 0:无疾病,正常的视网膜结构。

[0476] 0.5:微量。<1/4视网膜轻度炎性细胞浸润,伴随或不伴随光感受器损伤。

[0477] 1:≥1/4轻度炎症和/或光感受器外段损伤。

[0478] 2:≥1/4轻度至中度炎症和/或病变延伸至外核层。

[0479] 3:≥1/4中度至明显炎症和/或病变延伸至内核层。

[0480] 4:≥1/4严重炎症和/或全层视网膜损伤。

[0481] 如图27所示,在研究的第14天,施用低或高剂量的鼠源化ADI-60143-LALA Fc稳定的抗体克隆的大鼠表现出显著降低的临床葡萄膜炎评分。这些结果证实了亲和力成熟的抗纤维蛋白抗体降低了患葡萄膜炎的受试者中的炎症,并且在与眼睛的血管缺陷相关的眼睛病症(例如葡萄膜炎)的临床前模型中是治疗有效的。

[0482] 虽然已经参考优选实施方案和各种替代实施方案具体示出和描述了本发明,但是相关领域的技术人员将理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以在其中进行形式和细节上的各种改变。

[0483] 出于所有目的,在本说明书的正文中引用的所有参考文献、授权的专利和专利申请通过引用整体并入本文。

[0484] 非正式序列表

[0485]

描述	序列	SEQ ID NO
56666 CDR-H1	YTFTSYWIH	SEQ ID NO: 1
56666 CDR-H2	LIDPSDSYTNYNQKFRG	SEQ ID NO: 2
56666 CDR-H3	ASSDPTGG	SEQ ID NO: 3
56666 CDR-L1	RSSKSLLHSSGITYLS	SEQ ID NO: 4
56666 CDR-L2	QMSNLAS	SEQ ID NO: 5
56666 CDR-L3	AQNLELPLT	SEQ ID NO: 6
56666 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWIHWVRQ APGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASSDPTGGWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO: 7
56666 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 8
56666 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 9
56666 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 10
56666 VH+CH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWIHWVRQ APGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASSDPTGGWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC	SEQ ID NO: 11

[0486]

	LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
56666 VL+CL	AEDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 12
61289 CDR-H1	YTFTSSWIH	SEQ ID NO: 13
61289 CDR-H2	LIDPSDSYTNYNQKFRG	SEQ ID NO: 14
61289 CDR-H3	ASSDPHGG	SEQ ID NO: 15
61289 CDR-L1	RSSKSLLHSSGITMLS	SEQ ID NO: 16
61289 CDR-L2	QMSNLAS	SEQ ID NO: 17
61289 CDR-L3	AQSLELPLT	SEQ ID NO: 18
61289 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSWIHWVRQA PGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSDPHGGWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO: 19
61289 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 20
61289 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 21
61289 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITMLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQSLELPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 22
61289 VH+CH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSWIHWVRQA PGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSDPHGGWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 23
61289 VL+CL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITMLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQSLELPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD	SEQ ID NO: 24

[0487]

	EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	
61275 CDR-H1	YTFTSSWIH	SEQ ID NO: 25
61275 CDR-H2	LIDPSDSYTNYNQKFRG	SEQ ID NO: 26
61275 CDR-H3	ASSAPTGG	SEQ ID NO: 27
61275 CDR-L1	RSSKSLLHSSGITYLS	SEQ ID NO: 28
61275 CDR-L2	QMSNLAS	SEQ ID NO: 29
61275 CDR-L3	AQALELPLT	SEQ ID NO: 30
61275 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSWIHWVRQA PGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSAPTGGWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO: 31
61275 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 32
61275 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 33
61275 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQALELPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 34
61275 VH+CH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSWIHWVRQA PGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSAPTGGWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 35
61275 VL+CL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQALELPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 36

[0488]

61278 CDR-H1	YTFTSYWIH	SEQ ID NO: 37
61278 CDR-H2	LIDPSDSYTNYNQKFRG	SEQ ID NO: 38
61278 CDR-H3	ASSDATGG	SEQ ID NO: 39
61278 CDR-L1	RSSKSLLHSSGITYLS	SEQ ID NO: 40
61278 CDR-L2	QMSNLAS	SEQ ID NO: 41
61278 CDR-L3	AQALELPLT	SEQ ID NO: 42
61278 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWIHWVRQ APGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASSDATGGWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO: 43
61278 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 44
61278 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 45
61278 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQALELPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 46
61278 VH+CH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWIHWVRQ APGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASSDATGGWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 47
61278 VL+CL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQALELPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 48
61285 CDR-H1	YTFTSSWIH	SEQ ID NO: 49
61285	LIDPSDSYTNYNQKFRG	SEQ ID

[0489]

CDR-H2		NO: 50
61285 CDR-H3	ASSDPHGG	SEQ ID NO: 51
61285 CDR-L1	RSSKSLLHSSGITYLS	SEQ ID NO: 52
61285 CDR-L2	QMSNLAS	SEQ ID NO: 53
61285 CDR-L3	AQSLELPLT	SEQ ID NO: 54
61285 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSWIHWVRQA PGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSDPHGGWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO: 55
61285 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 56
61285 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 57
61285 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQSLELPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 58
61285 VH+CH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSWIHWVRQA PGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSDPHGGWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 59
61285 VL+CL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQSLELPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 60
61273 CDR-H1	YTFTSTWIH	SEQ ID NO: 61
61273 CDR- H2	LIDPSDSYTNYNQKFRG	SEQ ID NO: 62
61273 CDR-H3	ASSKPTGG	SEQ ID NO: 63

[0490]

61273 CDR-L1	RSSKSLLHSSGITYIS	SEQ ID NO: 64
61273 CDR-L2	QMSNLAS	SEQ ID NO: 65
61273 CDR-L3	AQNLELPLT	SEQ ID NO: 66
61273 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSTWIHWVRQA PGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSKPTGGWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO: 67
61273 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 68
61273 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 69
61273 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYISWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 70
61273 VH+CH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSTWIHWVRQA PGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSKPTGGWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 71
61273 VL+CL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYISWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 72
60183 CDR-H1	YTFTSTWIH	SEQ ID NO: 73
60183 CDR- H2	LIDPSDSYTNYNQKFRG	SEQ ID NO: 74
60183 CDR-H3	ASSKPTGG	SEQ ID NO: 75
60183 CDR-L1	RSSKSLLHSSGITYLS	SEQ ID NO: 76
60183	QMSNLAS	SEQ ID

[0491]

CDR-L2		NO: 77
60183 CDR-L3	AQNLELPLT	SEQ ID NO: 78
60183 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSTWIHWVRQA PGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSKPTGGWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO: 79
60183 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 80
60183 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 81
60183 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 82
60183 VH+CH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSTWIHWVRQA PGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSKPTGGWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 83
60183 VL+CL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 84
61283 CDR-H1	YTFTSAWIH	SEQ ID NO: 85
61283 CDR- H2	LIDPSDSYTNYNQKFRG	SEQ ID NO: 86
61283 CDR-H3	ASSDPYGG	SEQ ID NO: 87
61283 CDR-L1	RSSKSLLHSSGITYLS	SEQ ID NO: 88
61283 CDR-L2	QMSNKAS	SEQ ID NO: 89

[0492]

61283 CDR-L3	AQSLELPLT	SEQ ID NO: 90
61283 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSAWIHWVRQ APGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASSDPYGGWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO: 91
61283 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 92
61283 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 93
61283 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNKASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQSLELPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 94
61283 VH+CH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSAWIHWVRQ APGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASSDPYGGWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 95
61283 VL+CL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNKASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQSLELPLTFGGGTKVEIKQVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASGYTFTSAWIHWVRQAPGQGLEWMGLIDP SDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCASSDPYGGWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 96
61286 CDR-H1	YTFTSTWIH	SEQ ID NO: 97
61286 CDR- H2	LIDPSDSYTNYNQKFRG	SEQ ID NO: 98
61286	ASSDLTGG	SEQ ID

[0493]

CDR-H3		NO: 99
61286 CDR-L1	RSSKSLLHSSGITYLS	SEQ ID NO: 100
61286 CDR-L2	QMSNLAS	SEQ ID NO: 101
61286 CDR-L3	AQALELPLT	SEQ ID NO: 102
61286 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSTWIHWVRQA PGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSDLTGGWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO: 103
61286 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 104
61286 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 105
61286 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFSLKISRVEA EDVGVYYCAQALELPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 106
61286 VH+CH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSTWIHWVRQA PGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSDLTGGWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 107
61286 VL+CL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFSLKISRVEA EDVGVYYCAQALELPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 108
61279 CDR-H1	YTFKSYWIH	SEQ ID NO: 109
61279 CDR- H2	LIDPSDSYTNYNQIFRG	SEQ ID NO: 110
61279 CDR-H3	ASSDATGG	SEQ ID NO: 111
61279 CDR-L1	RSSKSLLHSSGITYLS	SEQ ID NO: 112

[0494]

61279 CDR-L2	QMSNLAS	SEQ ID NO: 113
61279 CDR-L3	AQALELPLT	SEQ ID NO: 114
61279 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFKSYWIHWVRQ APGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQIFRGRVTMTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSDATGGWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO: 115
61279 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 116
61279 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 117
61279 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQALELPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 118
61279 VH+CH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFKSYWIHWVRQ APGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQIFRGRVTMTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSDATGGWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 119
61279 VL+CL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQALELPLTFGGGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 120
56657 CDR-H1	YTFTSTWIH	SEQ ID NO: 121
56657 CDR- H2	LIDPSDSYTNYNQKFRG	SEQ ID NO: 122
56657 CDR-H3	ASSKPTGG	SEQ ID NO: 123
56657 CDR-L1	RSSKSLLHSSGITYLS	SEQ ID NO: 124
56657 CDR-L2	QMSNLAS	SEQ ID NO: 125
56657	AQNLELPLT	SEQ ID

[0495]

CDR-L3		NO: 126
56657 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWIHWVRQ APGQGLEWIGLIDPSDSYTNYNQKFRGRATLTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSDPTGGWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO: 127
56657 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 128
56657 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 129
56657 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 130
56657 VH+CH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWIHWVRQ APGQGLEWIGLIDPSDSYTNYNQKFRGRATLTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSDPTGGWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 131
56657 VL+CL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 132
61255 CDR-H1	YTFTSYWIH	SEQ ID NO: 133
61255 CDR- H2	LIDPSDSYTNYNQKFRG	SEQ ID NO: 134
61255 CDR-H3	ASSDATGG	SEQ ID NO: 135
61255 CDR-L1	RSSKSLLHSSGHTYLS	SEQ ID NO: 136
61255 CDR-L2	QMSNLAS	SEQ ID NO: 137
61255 CDR-L3	AQALELPLT	SEQ ID NO: 138
61255 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWIHWVRQ APGQGLEWIGLIDPSDSYTNYNQKFRGRATLTVDTSTSTAY	SEQ ID NO: 139

[0496]

	MELSSLRSEDTAVYYCASSDATGGWGQGTTVTVSS	
61255 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 140
61255 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 141
61255 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGHTYLSWYLQ KPGQPPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQALELPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 142
61255 VH+CH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWIHWVRQ APGQGLEWIGLIDPSDSYTNYNQKFRGRATLTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSDATGGWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 143
61255 VL+CL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGHTYLSWYLQ KPGQPPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQALELPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 144
60140 CDR-H1	YTFTSVWIH	SEQ ID NO: 145
60140 CDR-H2	LIDPSDSYTNYNQKFRG	SEQ ID NO: 146
60140 CDR-H3	ASSRPTGG	SEQ ID NO: 147
60140 CDR-L1	RSSKSLLHSSGITYLS	SEQ ID NO: 148
60140 CDR-L2	QMSNLAS	SEQ ID NO: 149
60140 CDR-L3	AQNLELPLT	SEQ ID NO: 150
60140 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSVWIHWVRQ APGQGLEWIGLIDPSDSYTNYNQKFRGRATLTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSRPTGGWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO: 151
60140 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC	SEQ ID NO: 152

[0497]

	NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	
60140 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 153
60140 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 154
60140 VH+CH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSVWIHWVRQ APGQGLEWIGLIDPSDSYTNYNQKFRGRATLTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSRPTGGWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 155
60140 VL+CL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 156
60143 CDR-H1	YTFTSTWIH	SEQ ID NO: 157
60143 CDR-H2	LIDPSDSYTNYNQKFRG	SEQ ID NO: 158
60143 CDR-H3	ASSKPTGG	SEQ ID NO: 159
60143 CDR-L1	RSSKSLLHSSGITYLS	SEQ ID NO: 160
60143 CDR-L2	QMSNLAS	SEQ ID NO: 161
60143 CDR-L3	AQNLELPLT	SEQ ID NO: 162
60143 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSTWIHWVRQA PGQGLEWIGLIDPSDSYTNYNQKFRGRATLTVDTSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCASSKPTGGWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO: 163
60143 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC	SEQ ID NO: 164

[0498]

	KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	
60143 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 165
60143 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 166
60143 VH+CH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSTWIHWVRQA PGQGLEWIGLIDPSDSYTNYNQKFRGRATLTVDTSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCASSKPTGGWGQGTTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 167
60143 VL+CL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 168
61264 CDR-H1	YTFTSTWIH	SEQ ID NO: 169
61264 CDR-H2	LIDPSDSYTNYNQKFVG	SEQ ID NO: 170
61264 CDR-H3	ASSLPTGG	SEQ ID NO: 171
61264 CDR-L1	RSSKSLLHSSGITYLS	SEQ ID NO: 172
61264 CDR-L2	QMSNLAS	SEQ ID NO: 173
61264 CDR-L3	AQQLELPLT	SEQ ID NO: 174
61264 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSTWIHWVRQA PGQGLEWIGLIDPSDSYTNYNQKFVGRATLTVDTSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCASSLPTGGWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO: 175
61264 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	SEQ ID NO: 176

[0499]

	G	
61264 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 177
61264 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQQLELPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 178
61264 VH+CH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSTWIHWVRQA PGQGLEWIGLIDPSDSYTNYNQKFVGRATLTVDTSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCASSLPTGGWGQGTTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 179
61264 VL+CL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQQLELPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 180
60130 CDR-H1	YTFTSVWIH	SEQ ID NO: 181
60130 CDR-H2	LIDPSDSYTNYNQKFR	SEQ ID NO: 182
60130 CDR-H3	ASSQPTGG	SEQ ID NO: 183
60130 CDR-L1	RSSKSLLHSSGITYLS	SEQ ID NO: 184
60130 CDR-L2	QMSNLAS	SEQ ID NO: 185
60130 CDR-L3	AQNLELPLT	SEQ ID NO: 186
60130 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSVWIHWVRQ APGQGLEWIGLIDPSDSYTNYNQKFRGRATLTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSQPTGGWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO: 187
60130 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 188
60130 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH	SEQ ID NO: 189

[0500]

	KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
60130 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 190
60130 VH+CH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSVWIHWVRQ APGQGLEWIGLIDPSDSYTNYNQKFRGRATLTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSQPTGGWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 191
60130 VL+CL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 192
61286 CDR-H1	YTFTSTWIH	SEQ ID NO: 193
61286 CDR-H2	LIDPSDSYTNYNQKFR	SEQ ID NO: 194
61286 CDR-H3	ASSDLTGG	SEQ ID NO: 195
61286 CDR-L1	RSSKSLLHSSGITYLS	SEQ ID NO: 196
61286 CDR-L2	QMSNLAS	SEQ ID NO: 197
61286 CDR-L3	AQALELPLT	SEQ ID NO: 198
61286 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSTWIHWVRQA PGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSDLTGGWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO: 199
61286 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 200
61286 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 201
61286 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFSLKISRVEA	SEQ ID NO: 202

[0501]

	EDVGVYYCAQALELPLTFGGGTKVEIK	
61286 VH+CH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSTWIHWVRQA PGQGLEWMGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTMTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSDLTGGWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 203
61286 VL+CL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFSLKISRVEA EDVGVYYCAQALELPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 204
61259 CDR-H1	YRFTSYWIH	SEQ ID NO: 205
61259 CDR-H2	LIDPSDSYTNYNQKFRG	SEQ ID NO: 206
61259 CDR-H3	ASSDATGG	SEQ ID NO: 207
61259 CDR-L1	VSSKSLLHSSGITYLS	SEQ ID NO: 208
61259 CDR-L2	QMSNLGS	SEQ ID NO: 209
61259 CDR-L3	AQALELPLT	SEQ ID NO: 210
61259 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYRFTSYWIHWVRQ APGQGLEWIGLIDPSDSYTNYNQKFRGRATLTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSDATGGWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO: 211
61259 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 212
61259 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 213
61259 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCVSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLGSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQALELPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 214
61259 VH+CH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYRFTSYWIHWVRQ APGQGLEWIGLIDPSDSYTNYNQKFRGRATLTVDTSTSTAY	SEQ ID NO: 215

[0502]

	MELSSLRSEDTAVYYCASSDATGGWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
61259 VL+CL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCVSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLGSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQALELPLTFGGGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 216
60136 CDR-H1	YTHTSYWIH	SEQ ID NO: 217
60136 CDR-H2	LIDPSDSYTNYNQKFR	SEQ ID NO: 218
60136 CDR-H3	ASSRPTGG	SEQ ID NO: 219
60136 CDR-L1	RSSKSLLHSSGITYLS	SEQ ID NO: 220
60136 CDR-L2	QMSNLAS	SEQ ID NO: 221
60136 CDR-L3	AQNLELPLT	SEQ ID NO: 222
60136 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTHTSYWIHWVRQ APGQGLEWIGLIDPSDSYTNYNQKFRGRATLTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSRPTGGWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO: 223
60136 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 224
60136 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 225
60136 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 226
60136 VH+CH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTHTSYWIHWVRQ APGQGLEWIGLIDPSDSYTNYNQKFRGRATLTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSRPTGGWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP	SEQ ID NO: 227

[0503]

	SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
60136 VL+CL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 228
61267 CDR-H1	YTFTEYWIH	SEQ ID NO: 229
61267 CDR-H2	LIDPSDSYTNYNQRFR	SEQ ID NO: 230
61267 CDR-H3	ASSDATGG	SEQ ID NO: 231
61267 CDR-L1	HSSKSLLHSSGITYLS	SEQ ID NO: 232
61267 CDR-L2	QMSNLAS	SEQ ID NO: 233
61267 CDR-L3	AQSLELPLT	SEQ ID NO: 234
61267 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKASCKASGYTFTEYWIHWVRQ APGQGLEWIGLIDPSDSYTNYNQRFRGRATLTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSDATGGWGQGTTVTVSS	SEQ ID NO: 235
61267 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 236
61267 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 237
61267 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCHSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQSLELPLTFGGGTKVEIK	SEQ ID NO: 238
61267 VH+CH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKASCKASGYTFTEYWIHWVRQ APGQGLEWIGLIDPSDSYTNYNQRFRGRATLTVDTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCASSDATGGWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK	SEQ ID NO: 239

[0504]

	ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
61267 VL+CL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCHSSKSLLHSSGITYLSWYLQ KPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQSLELPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 240
人纤维蛋白γ377-395 (人P2肽)	YSMKKTTMKIIPFNRLTIG	SEQ ID NO: 241
60143轻链	ATGACTAGGCTGACCGTGCTGGCCCTGCTTGCCGGACTCT TGGCCTCCTCGAGAGCGGATATTGTGATGACTCAGAGCC CACTCTCCCTGCCCGTGACTCCTGGGGAACCCGCCTCGAT CAGCTGTAGATCGTCCAAGTCACTTCTCCACTCGTCCGGG ATCACCTACCTGTCGTGGTATTTGCAAAAGCCAGGACAG AGCCCGCAGCTCCTCATCTACCAAATGAGCAACCTGGCT TCCGGTGTCCCGGATCGGTTCTCGGGGTCCGGATCTGGCA CCGACTTCACGCTGAAAATTTCCCGCGTGGAAGCCGAGG ACGTGGGAGTGTACTACTGCGCACAAAACCTGGAACTGC CCCTGACCTTCGGTGGCGGCACTAAGGTCGAAATCAAGC GGACCGTGGCAGCTCCGTCCGTGTTCATCTTCCCGCCTTC CGACGAGCAGCTGAAGTCCGGAACCGCCTCCGTCGTGTG CCTGCTCAACAACTTTTACCCTCGCGAGGCCAAGGTCCA GTGGAAGGTCGATAACGCGCTGCAGAGCGGAAATAGCC AGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCAACCT ACTCACTGAGCTCCACTCTGACCCTGTCAAAGGCGGACT ACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACACATC AGGGCCTGTCCAGTCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGG GCGAATGCTAG	SEQ ID NO: 242
60143重链	ATGACCCGGCTGACCGTGCTGGCCCTCCTGGCTGGACTG CTGGCCTCCTCAAGAGCCCAGGTCCAGCTGGTGCAATCC GGCGCCGAAGTCAAGAAGCCAGGCGCAAGCGTGAAAGT GTCATGCAAAGCCTCCGGATACACCTTCACCTCCACCTGG ATTCACTGGGTCAGACAGGCCCCCGGTCAAGGACTGGAA TGGATCGGGCTGATCGACCCGTCGGACTCGTACACCAAC TACAATCAGAAGTTTCGCGGTCGGGCTACTCTCACTGTGG ATACCTCGACCTCCACCGCTTACATGGAACTGTCATCGCT GCGGTCCGAGGATACCGCCGTGTACTATTGCGCGTCCTCC AAGCCGACTGGCGGATGGGGACAGGGAACTACTGTGAC GGTGTCCTCCGCCTCGACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCA CTGGCCCCCTCATCCAAGTCTACCAGCGGAGGAACCGCA GCCCTAGGCTGTCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCG GTCACTGTCTCCTGGAACTCGGGAGCCCTCACTAGCGGT GTCCACACTTTCCCGGCGGTGTTGCAAAGCTCCGGGCTGT ACTCCCTGTCCTCGGTCGTCACCGTGCCGTCAAGCTCCCT CGGGACCCAGACATACATCTGTAACGTCAACCATAAGCC ATCCAACACCAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCGAAAA GCTGCGACAAGACTCACACTTGCCCTCCTTGCCCTGCACC	SEQ ID NO: 243

[0505]

	CGAGCTTCTCGGAGGTCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCGCCG AAGCCCAAGGACACTCTGATGATTAGCCGCACTCCTGAG GTCACCTGTGTCGTGGTGGACGTGTCCCATGAGGACCCT GAAGTCAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CACAACGCCAAGACCAAGCCGAGGGAGGAGCAGTACAA CTCGACCTATCGCGTGGTGTCCGTGCTCACCGTGCTGCAT CAGGATTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGT GTCCAACAAGGCTTTGCCGGCCCCTATCGAAAAGACCAT TAGCAAGGCCAAGGGGCAGCCAAGGGAGCCTCAAGTGT ACACCCTGCCGCCTTCGAGAGATGAACTGACCAAGAACC AAGTGTCCCTCACGTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTC CGATATCGCGGTGGAATGGGAATCCAACGGACAGCCCGA AAACAACTACAAGACCACCCCTCCGGTGCTTGATAGCGA CGGCTCGTTCTTCCTGTACTCGAAGCTGACAGTGGACAA GTCACGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCATGCTCCGT GATGCACGAAGCGTTGCACAATCACTACACCCAGAAGTC GCTTAGCCTGAGCCCTGGATAG	
60143-A234 LA235L轻链	ATGACTAGGCTGACCGTGCTGGCCCTGCTTGCCGGACTCT TGGCCTCCTCGAGAGCGGATATTGTGATGACTCAGAGCC CACTCTCCCTGCCCGTGACTCCTGGGGAACCCGCCTCGAT CAGCTGTAGATCGTCCAAGTCACTTCTCCACTCGTCCGGG ATCACCTACCTGTCGTGGTATTTGCAAAAGCCAGGACAG AGCCCGCAGCTCCTCATCTACCAAATGAGCAACCTGGCT TCCGGTGTCCCGGATCGGTTCTCGGGGTCCGGATCTGGCA CCGACTTCACGCTGAAAATTTCCCGCGTGGAAGCCGAGG ACGTGGGAGTGTACTACTGCGCACAAAACCTGGAACTGC CCCTGACCTTCGGTGGCGGCACTAAGGTCGAAATCAAGC GGACCGTGGCAGCTCCGTCCGTGTTCATCTTCCCGCCTTC CGACGAGCAGCTGAAGTCCGGAACCGCCTCCGTCGTGTG CCTGCTCAACAACTTTTACCCTCGCGAGGCCAAGGTCCA GTGGAAGGTCGATAACGCGCTGCAGAGCGGAAATAGCC AGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCAACCT ACTCACTGAGCTCCACTCTGACCCTGTCAAAGGCGGACT ACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACACATC AGGGCCTGTCCAGTCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGG GCGAATGCTAG	SEQ ID NO: 244
60143-A234 LA235L重链	ATGACCCGGCTGACCGTGCTGGCCCTCCTGGCTGGACTG CTGGCCTCCTCAAGAGCCCAGGTCCAGCTGGTGCAATCC GGCGCCGAAGTCAAGAAGCCAGGCGCAAGCGTGAAAGT GTCATGCAAAGCCTCCGGATACACCTTCACCTCCACCTGG ATTCACTGGGTCAGACAGGCCCCCGGTCAAGGACTGGAA TGGATCGGGCTGATCGACCCGTCGGACTCGTACACCAAC TACAATCAGAAGTTTCGCGGTCGGGCTACTCTCACTGTGG ATACCTCGACCTCCACCGCTTACATGGAACTGTCATCGCT GCGGTCCGAGGATACCGCCGTGTACTATTGCGCGTCCTCC AAGCCGACTGGCGGATGGGGACAGGGAACTACTGTGAC GGTGTCCTCCGCCTCGACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCA CTGGCCCCCTCATCCAAGTCTACCAGCGGAGGAACCGCA GCCCTAGGCTGTCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCG GTCACTGTCTCCTGGAACTCGGGAGCCCTCACTAGCGGT	SEQ ID NO: 245

[0506]

	GTCCACACTTTCCCGGCGGTGTTGCAAAGCTCCGGGCTGT ACTCCCTGTCCTCGGTCGTCACCGTGCCGTCAAGCTCCCT CGGGACCCAGACATACATCTGTAACGTCAACCATAAGCC ATCCAACACCAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCGAAAA GCTGCGACAAGACTCACACTTGCCCTCCTTGCCCTGCACC CGAGGCAGCAGGAGGTCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCGCC GAAGCCCAAGGACACTCTGATGATTAGCCGCACTCCTGA GGTCACCTGTGTCGTGGTGGACGTGTCCCATGAGGACCC TGAAGTCAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCACAACGCCAAGACCAAGCCGAGGGAGGAGCAGTACA ACTCGACCTATCGCGTGGTGTCCGTGCTCACCGTGCTGCA TCAGGATTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGT GTCCAACAAGGCTTTGCCGGCCCCTATCGAAAAGACCAT TAGCAAGGCCAAGGGGCAGCCAAGGGAGCCTCAAGTGT ACACCCTGCCGCCTTCGAGAGATGAACTGACCAAGAACC AAGTGTCCCTCACGTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTC CGATATCGCGGTGGAATGGGAATCCAACGGACAGCCCGA AAACAACTACAAGACCACCCCTCCGGTGCTTGATAGCGA CGGCTCGTTCTTCCTGTACTCGAAGCTGACAGTGGACAA GTCACGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCATGCTCCGT GATGCACGAAGCGTTGCACAATCACTACACCCAGAAGTC GCTTAGCCTGAGCCCTGGATAG	
5B8重链	QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSYWIHWVKQR PGQGLEWIGLIDPSDSYTNYNQKFRGKATLTVDTSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYYCASSDPTGCWGQGTTLTVSSAKTTPPS VYPLAPGCGDTTGSSVTSGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSS SVHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASS TTVDKKLEPSGPISTINPCPPCKECHKCPAPNLEGGPSVFIFPP NIKDVLMISLTPKVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHT AQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQDWMSGKEFKCKVNNK DLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYTLPPPAEQLSRKDVSLTCLV VGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKL NMKTSKWEKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK	SEQ ID NO: 246
5B8轻链	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWK IDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHN SYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNECDIVMTQAAFSNPITLGTSA SMSCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAS GVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTF GAGTKLELK	SEQ ID NO: 246
THN227重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWIHWVRQA PGQGLEWIGLIDPSDSYTNYNQKFRGRVTITRDTSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCASSDPTGGWGQGTTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD	SEQ ID NO: 247

[0507]

	KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
THN227轻链	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDIVMTQAAFSNPVTPG TPASISCRSSKSLLHSSGITYLSWYLQKPGQSPQLLIYQMSNL ASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPL TFGQGTKLEIK	SEQ ID NO: 248
小鼠/大鼠P2肽	YSMKETTMKIIPFNRLSIG	SEQ ID NO: 249
兔P2肽	YSMKKTTMKIIPLNRLSIG	SEQ ID NO: 250
人P2肽 延长的	TTMKIIPFNRLTIGEGQQHHLGGAKQVRP	SEQ ID NO: 251
大鼠P2肽延长的	TTMKIIPFNRLSIGDGQQHHMGGSKQVSV	SEQ ID NO: 252
兔P2肽 延长的	TTMKIIPLNRLSIGEGQQFHVGGAKQVRP	SEQ ID NO: 253

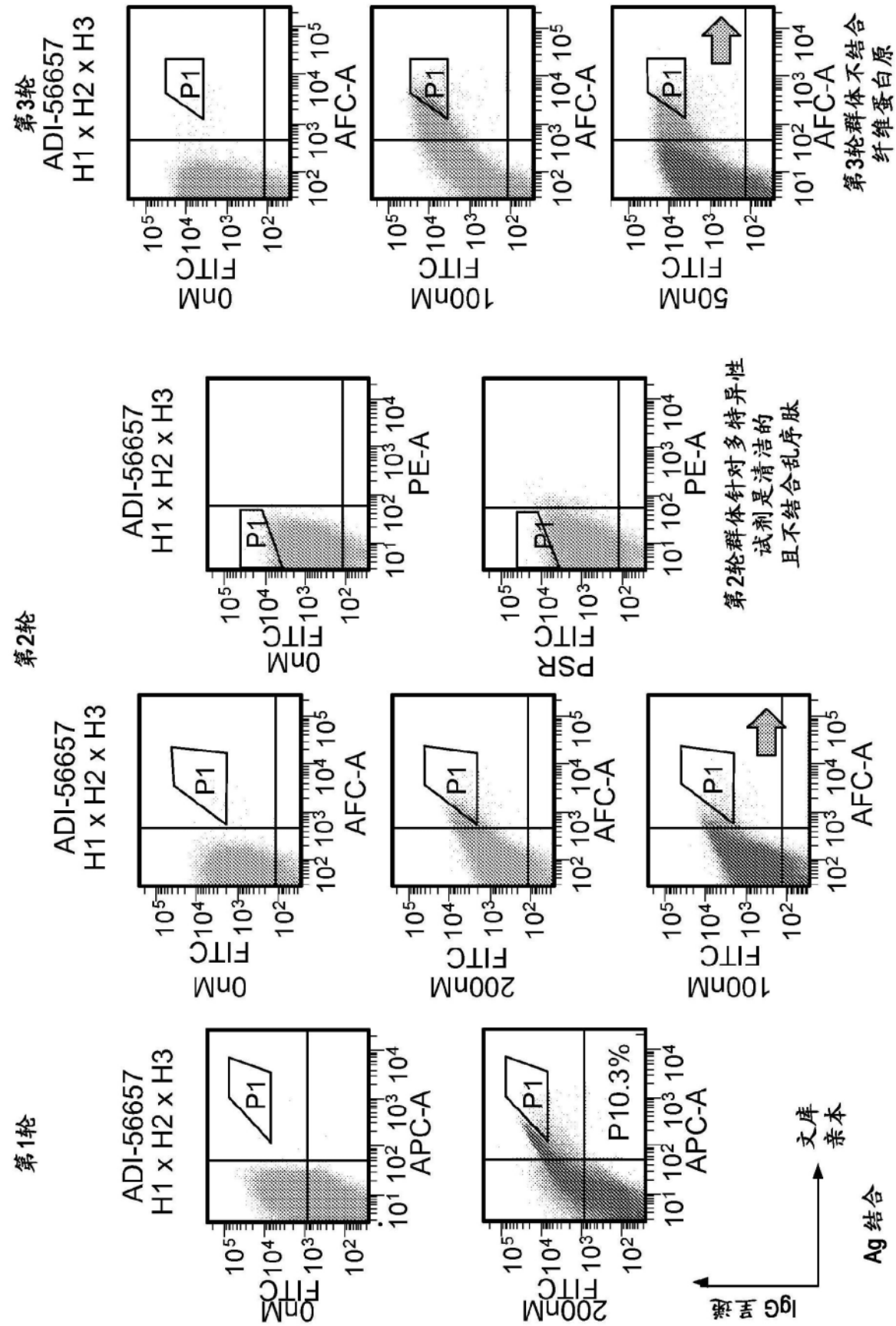

第1轮
第2轮
第3轮
ADI-56657
H1 x H2 x H3
APC-A
PE-A
AFC-A
FITC
P1
P10.3%
0nM
100nM
200nM
50nM
Ag 结合
IgG 捕获
文库
亲本
第2轮群体针对多特异性
试剂是清洁的
且不结合乱序肽
第3轮群体不结合
纤维蛋白原

图1

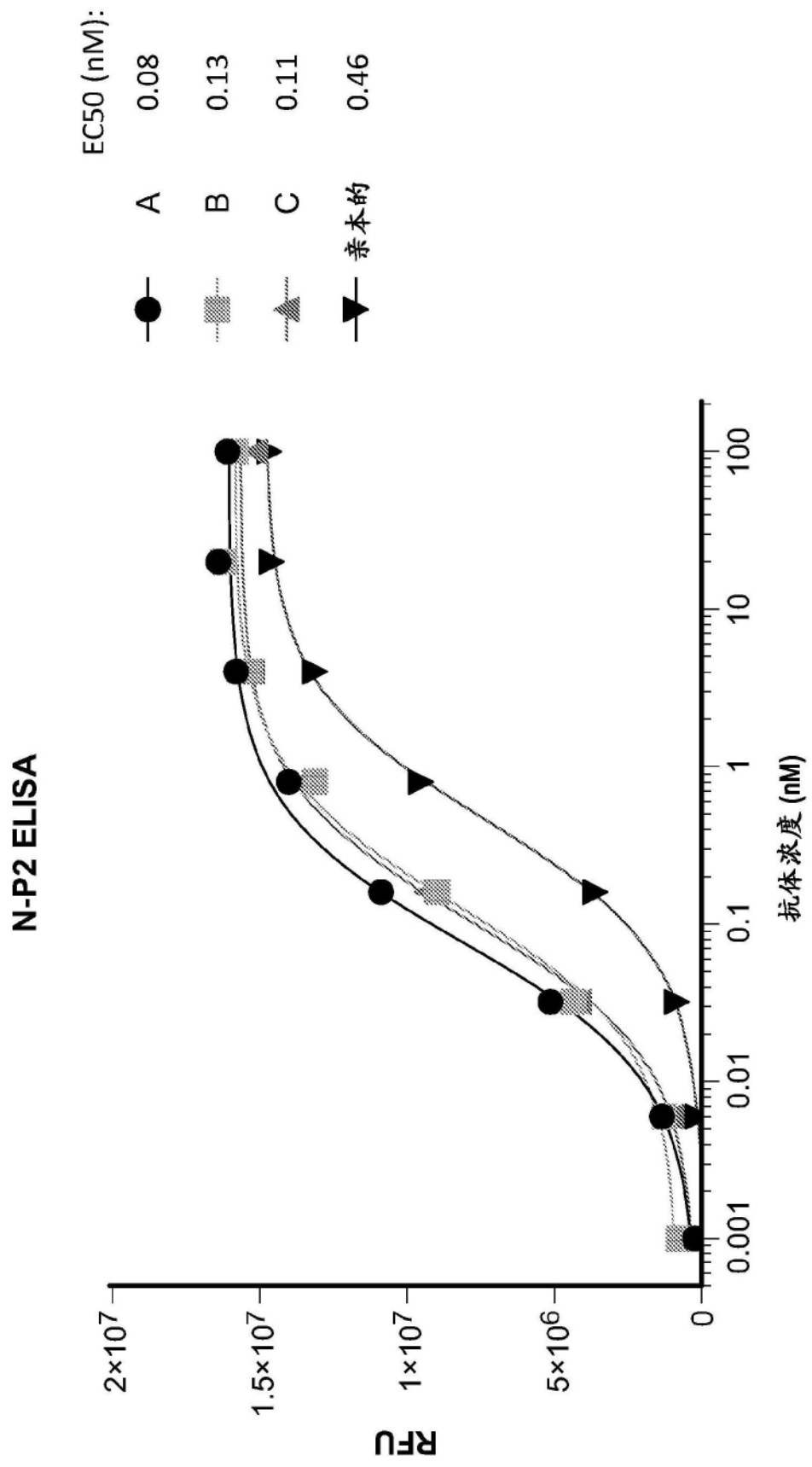

N-P2 ELISA
EC50 (nM):
A 0.08
B 0.13
C 0.11
亲本的 0.46
RFU
2×10^7
1.5×10^7
1×10^7
5×10^6
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗体浓度 (nM)

图2A

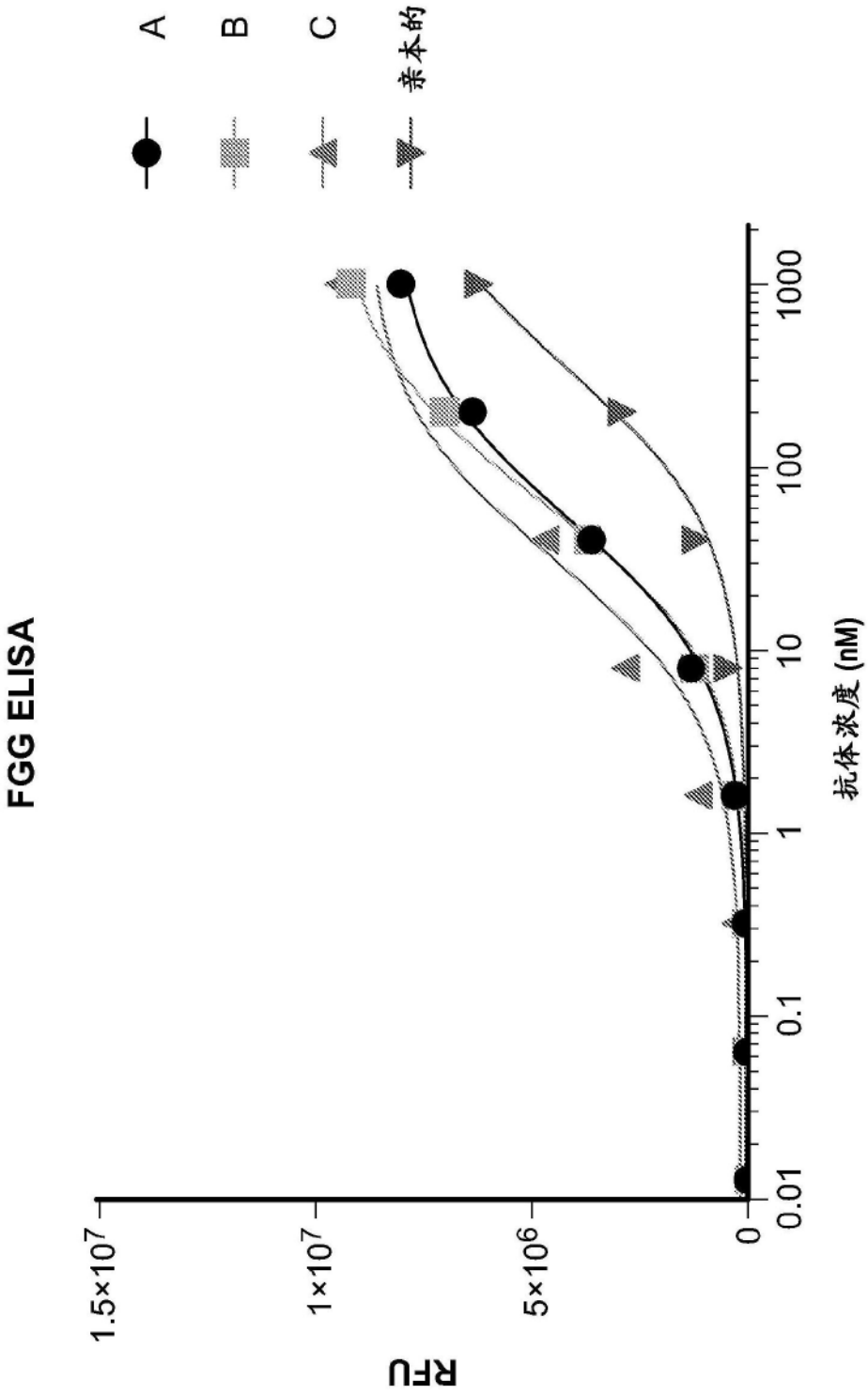

A
B
C
亲本的
FGG ELISA
RFU
1.5×10^7
1×10^7
5×10^6
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度 (nM)

图2B

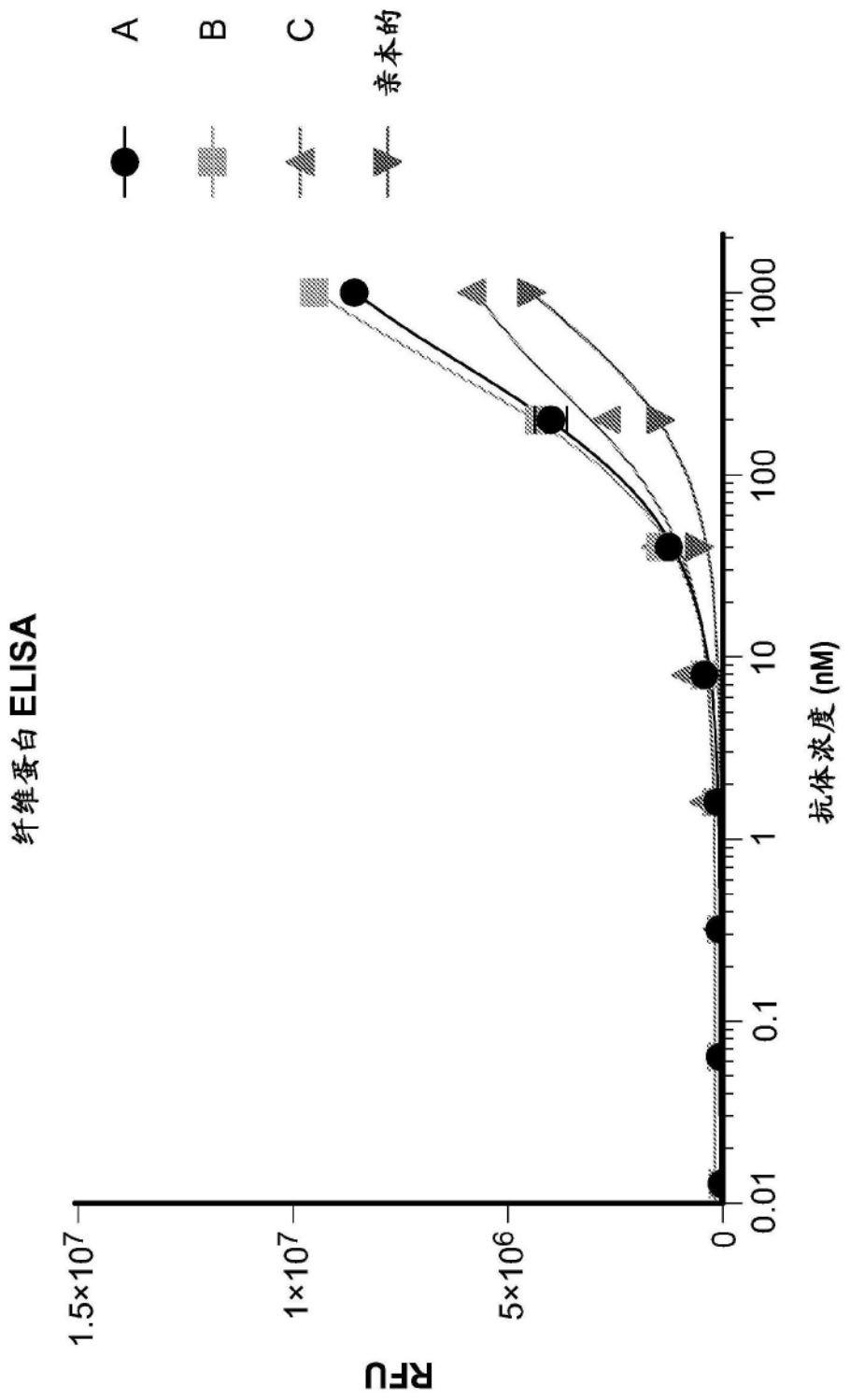

A
B
C
亲本的
纤维蛋白 ELISA
RFU
1.5×10^7
1×10^7
5×10^6
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度 (nM)

图2C

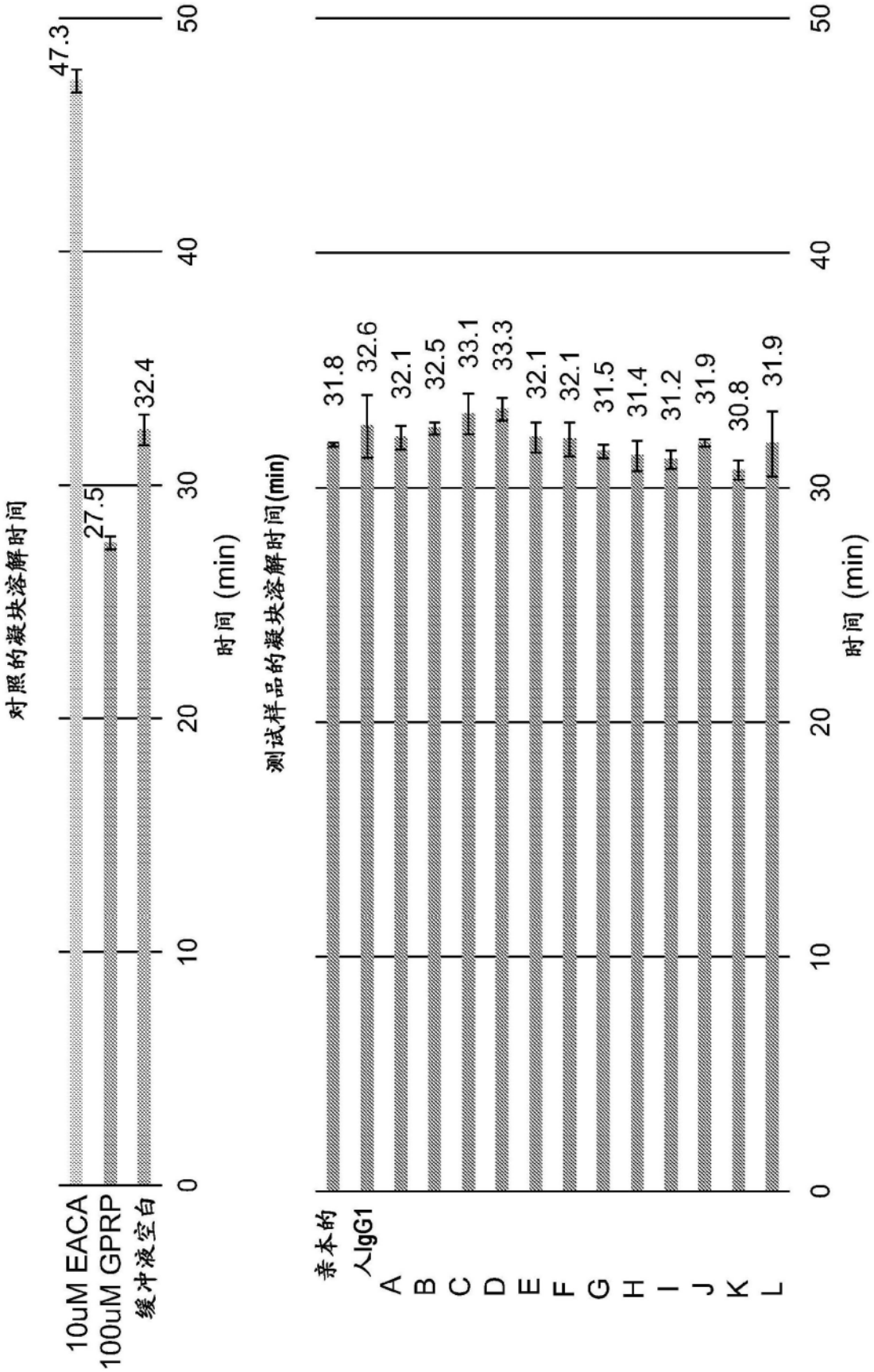

对照的凝块溶解时间
10uM EACA
100uM GPRP
缓冲液空白
47.3
27.5
32.4
0
10
20
30
40
50
时间 (min)
测试样品的凝块溶解时间(min)
亲本的人IgG1
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
31.8
32.6
32.1
32.5
33.1
33.3
32.1
32.1
31.5
31.4
31.2
31.9
30.8
31.9
0
10
20
30
40
50
时间 (min)

图3A

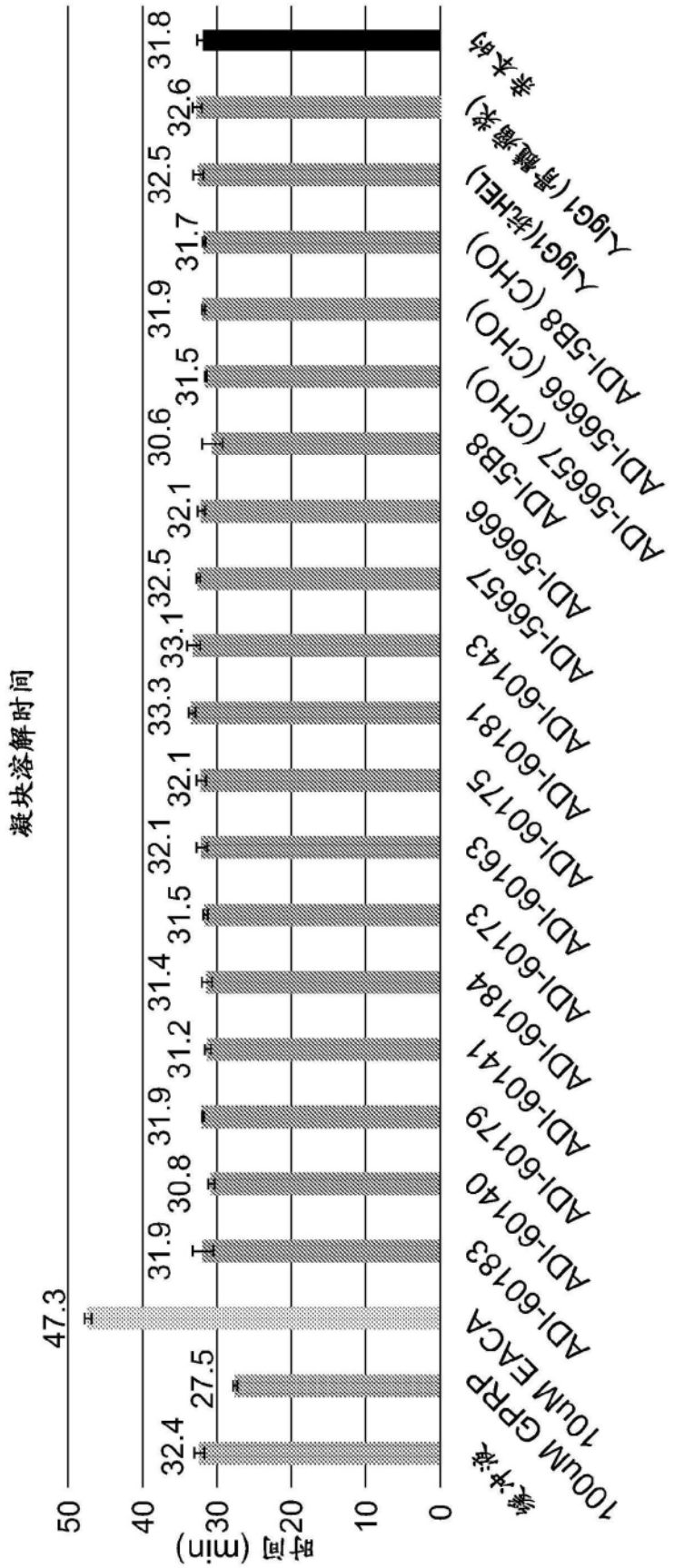

凝块溶解时间
时间 (min)
0
10
20
30
40
50
缓冲液
100uM GPRP
10uM EACA
ADI-60183
ADI-60140
ADI-60179
ADI-60141
ADI-60184
ADI-60173
ADI-60163
ADI-60175
ADI-60181
ADI-60143
ADI-56657
ADI-56666
ADI-5B8
ADI-56657 (CHO)
ADI-56666 (CHO)
ADI-5B8 (CHO)
Ajge1(去HEL)
Ajge1 (带氨溴索)
47.3
32.4
27.5
31.9
30.8
31.9
31.2
31.4
31.5
32.1
32.1
33.3
33.1
32.5
32.1
30.6
31.5
31.9
31.7
32.5
32.6
31.8

图3B

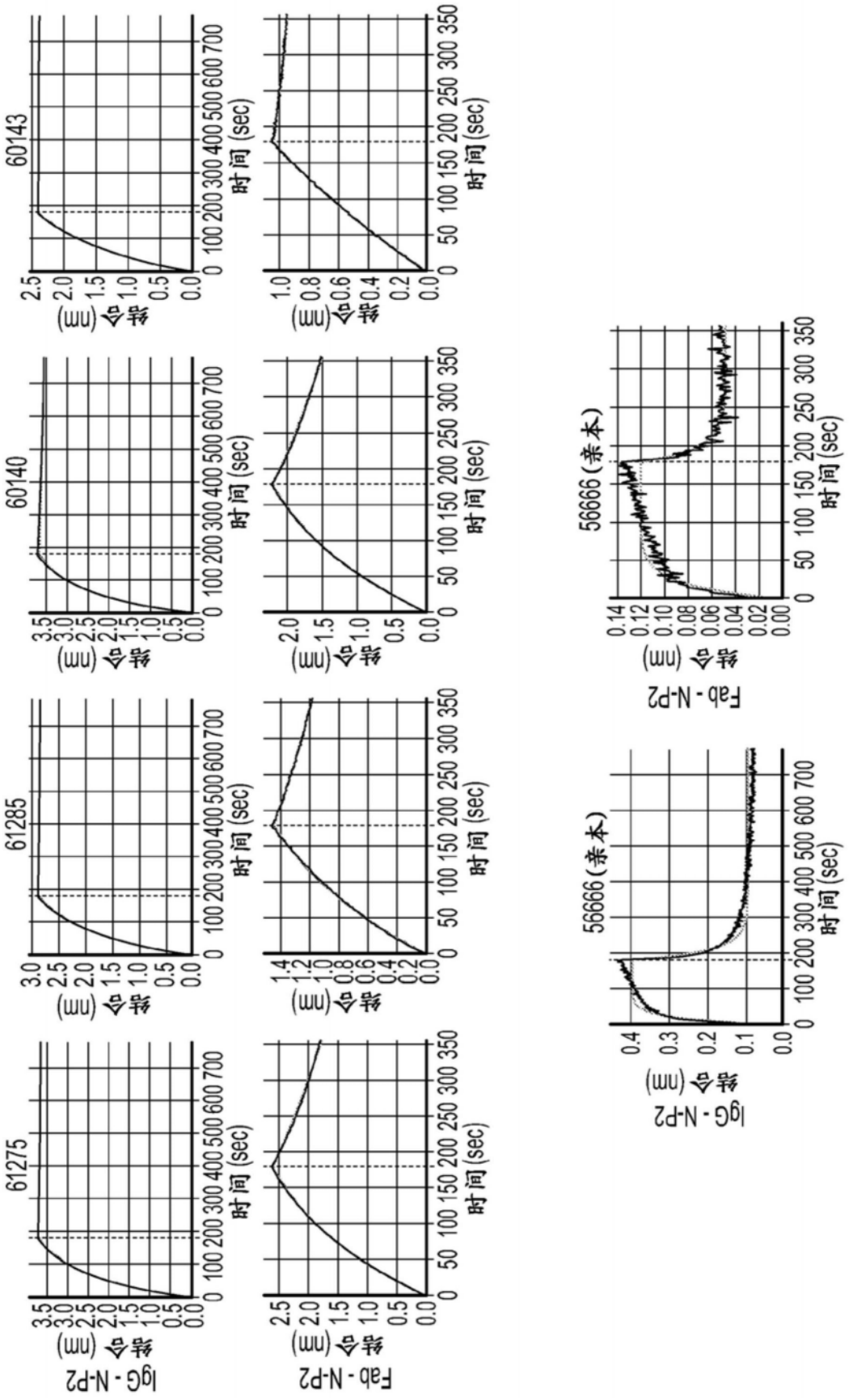


图4A

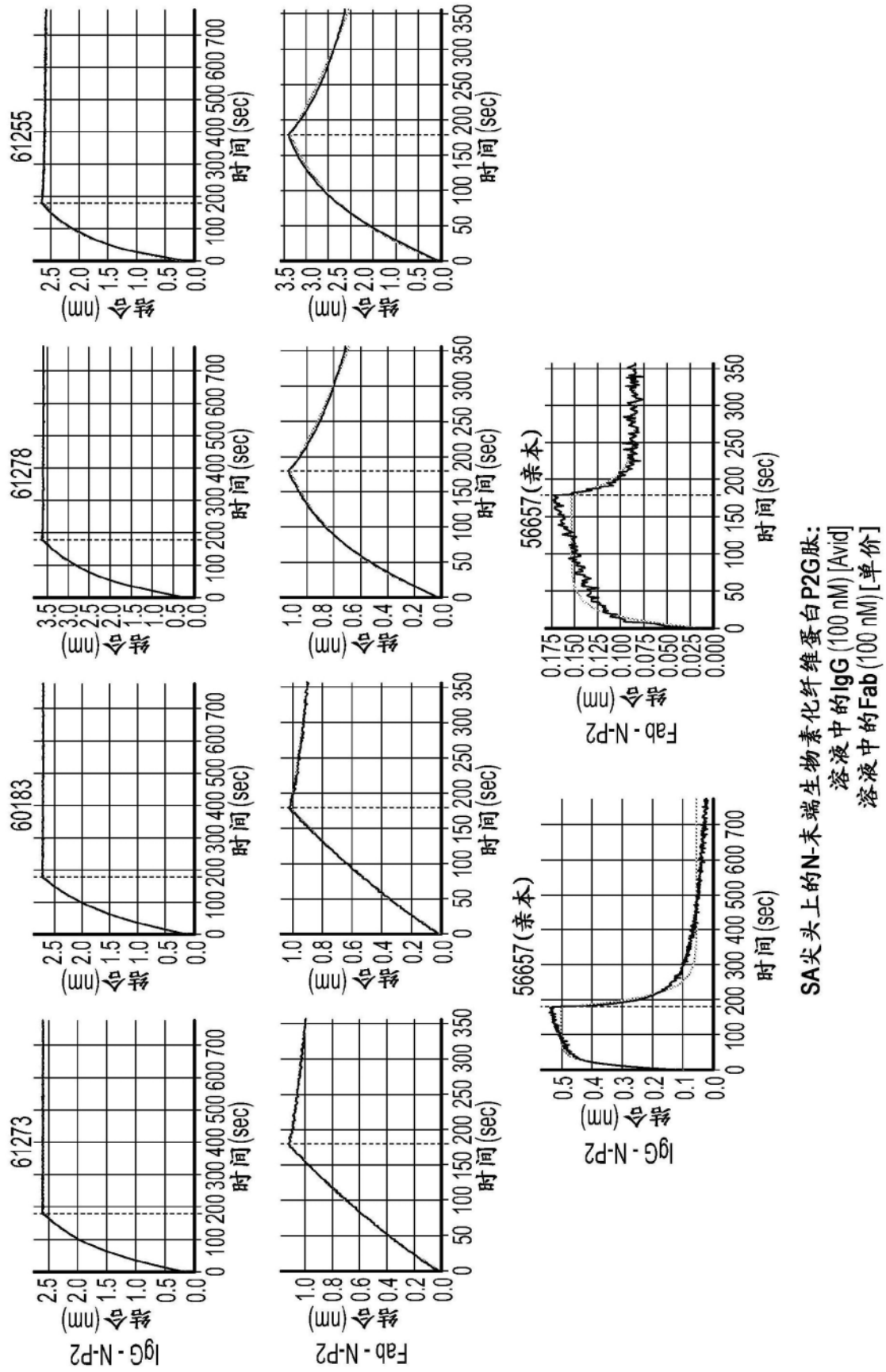

61255
61278
60183
61273
56657(亲本)
结合(nm)
时间(sec)
IgG - N-P2
Fab - N-P2
SA尖头上的N-末端生物素化纤维蛋白P2G肽:
溶液中的IgG (100 nM) [Avid]
溶液中的Fab (100 nM) [单价]

图4A(续)

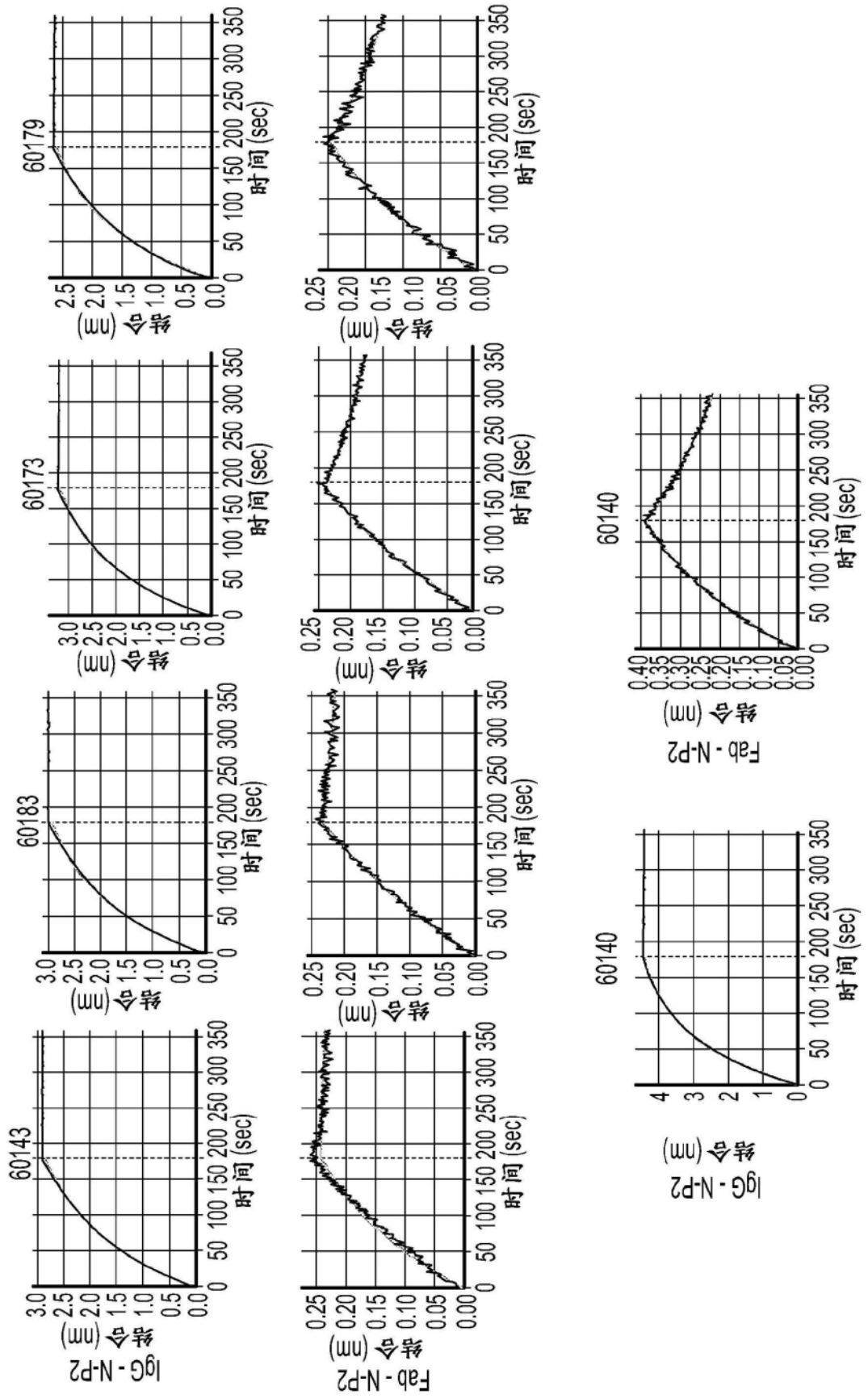

60179
60173
60183
60143
60140
60140
结合 (nm)
时间 (sec)
IgG - N-P2
Fab - N-P2
Fab - N-P2
IgG - N-P2

图4B

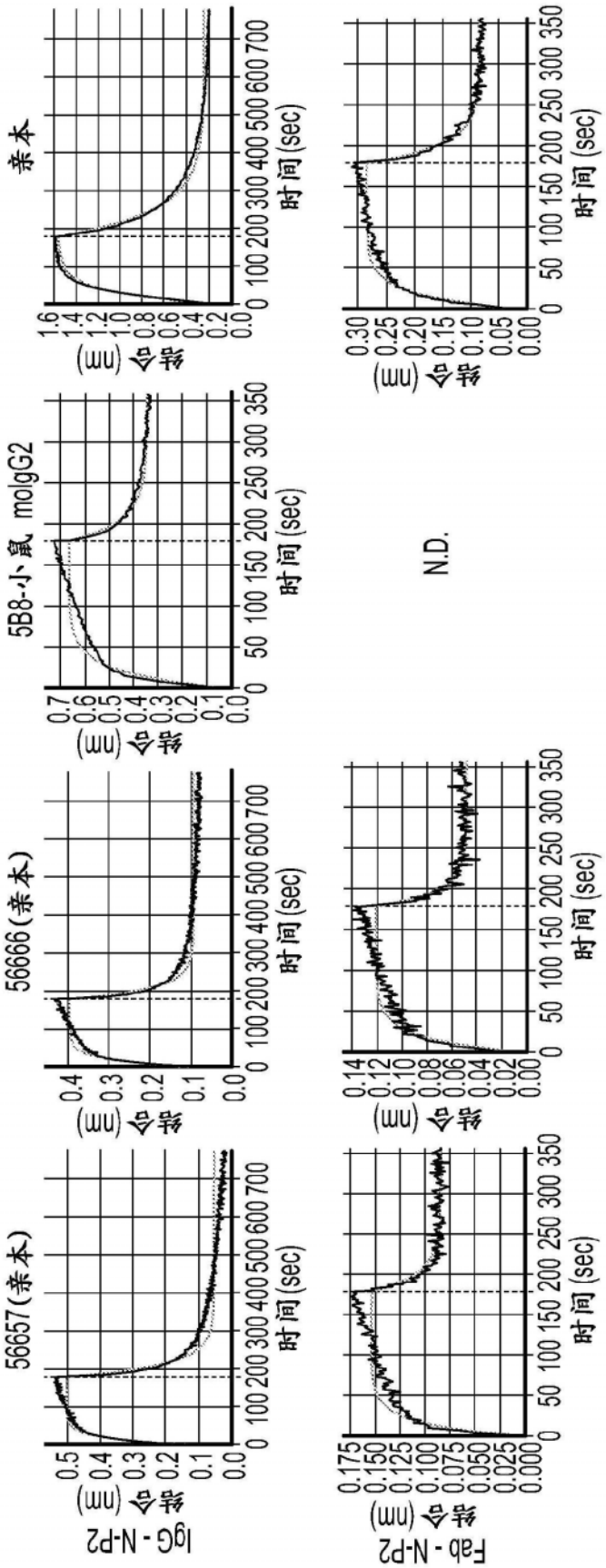


图4B(续)

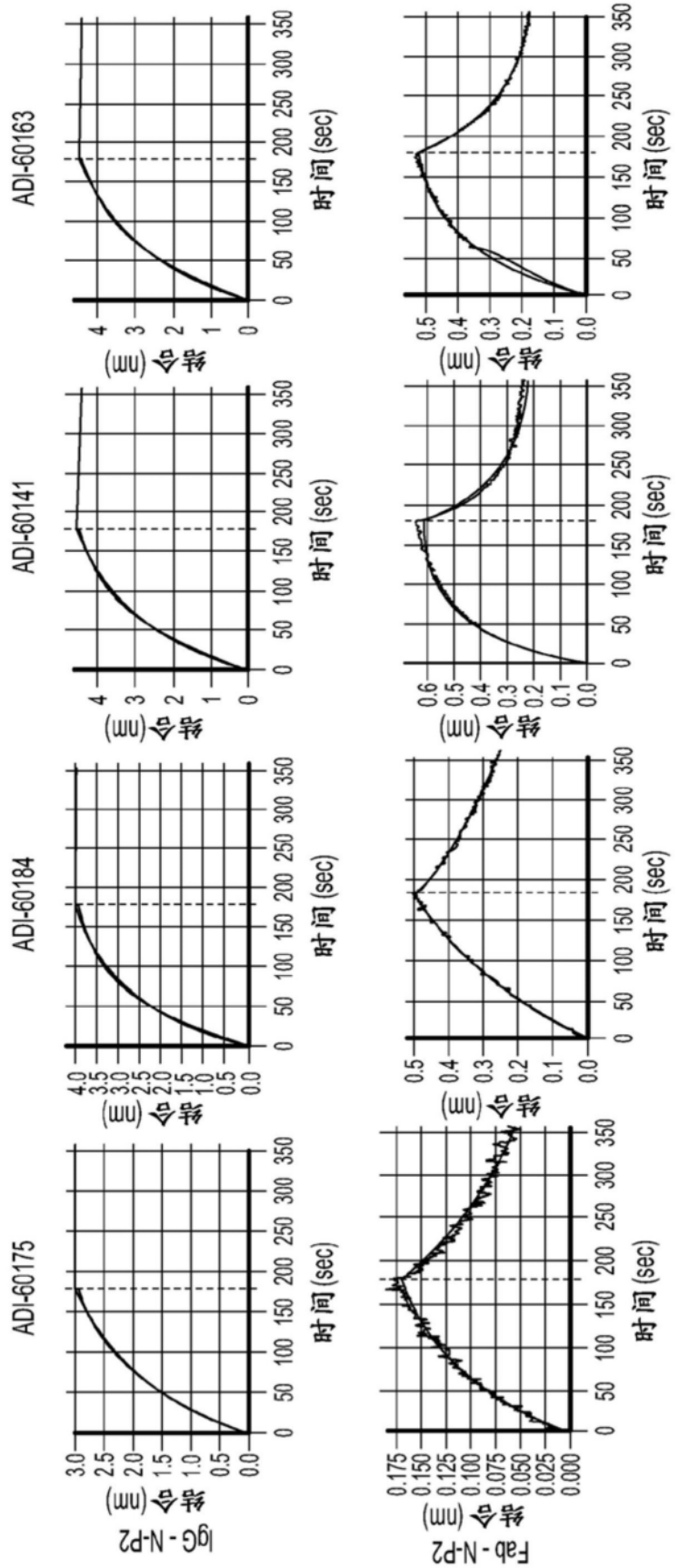

ADI-60163
ADI-60141
ADI-60184
ADI-60175
结合(nm)
时间(sec)
IgG - N-P2
Fab - N-P2

图4C

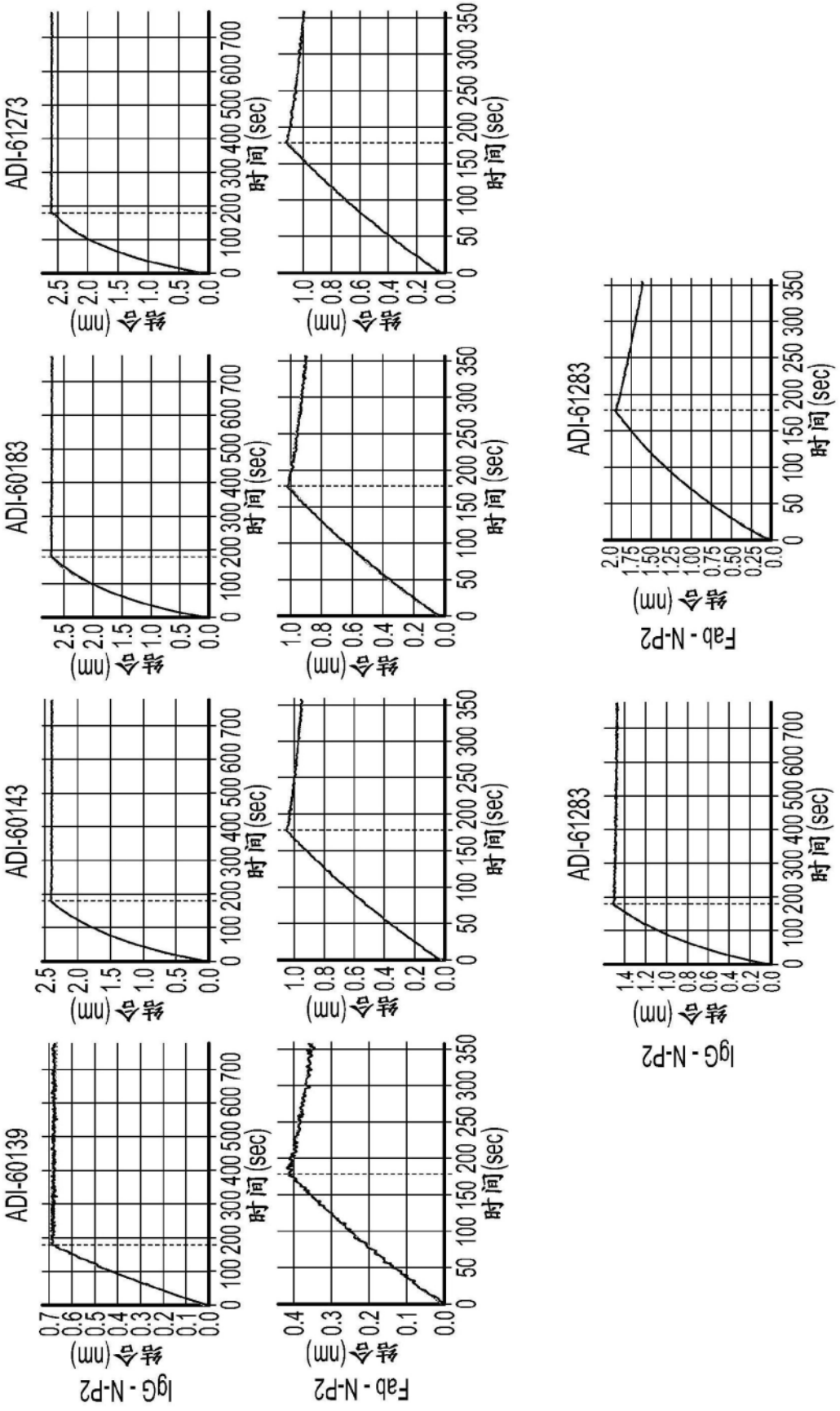

ADI-61273
ADI-60183
ADI-60143
ADI-60139
ADI-61283
ADI-61283
结合(nm)
时间(sec)
IgG - N-P2
Fab - N-P2
Fab - N-P2
IgG - N-P2

图4D

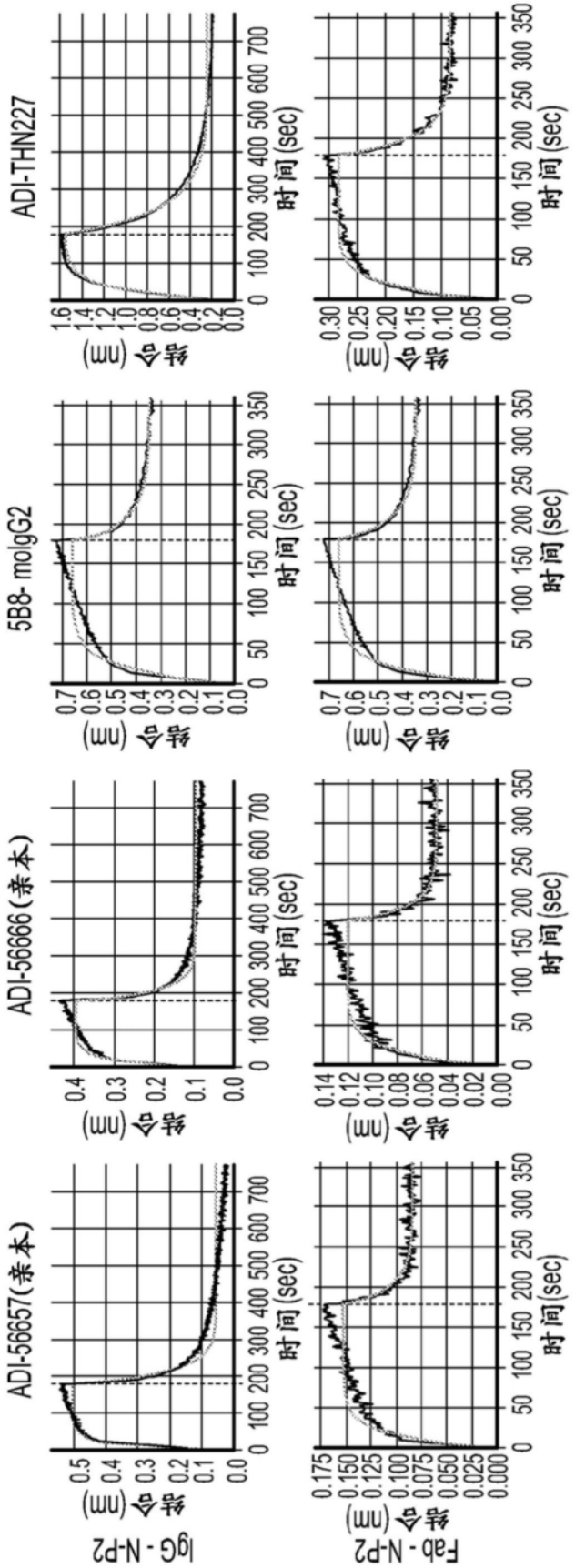

ADI-THN227
5B8- molgG2
ADI-56666(亲本)
ADI-56657(亲本)
IgG - N-P2
Fab - N-P2
结合 (nm)
时间 (sec)

图4D(续)

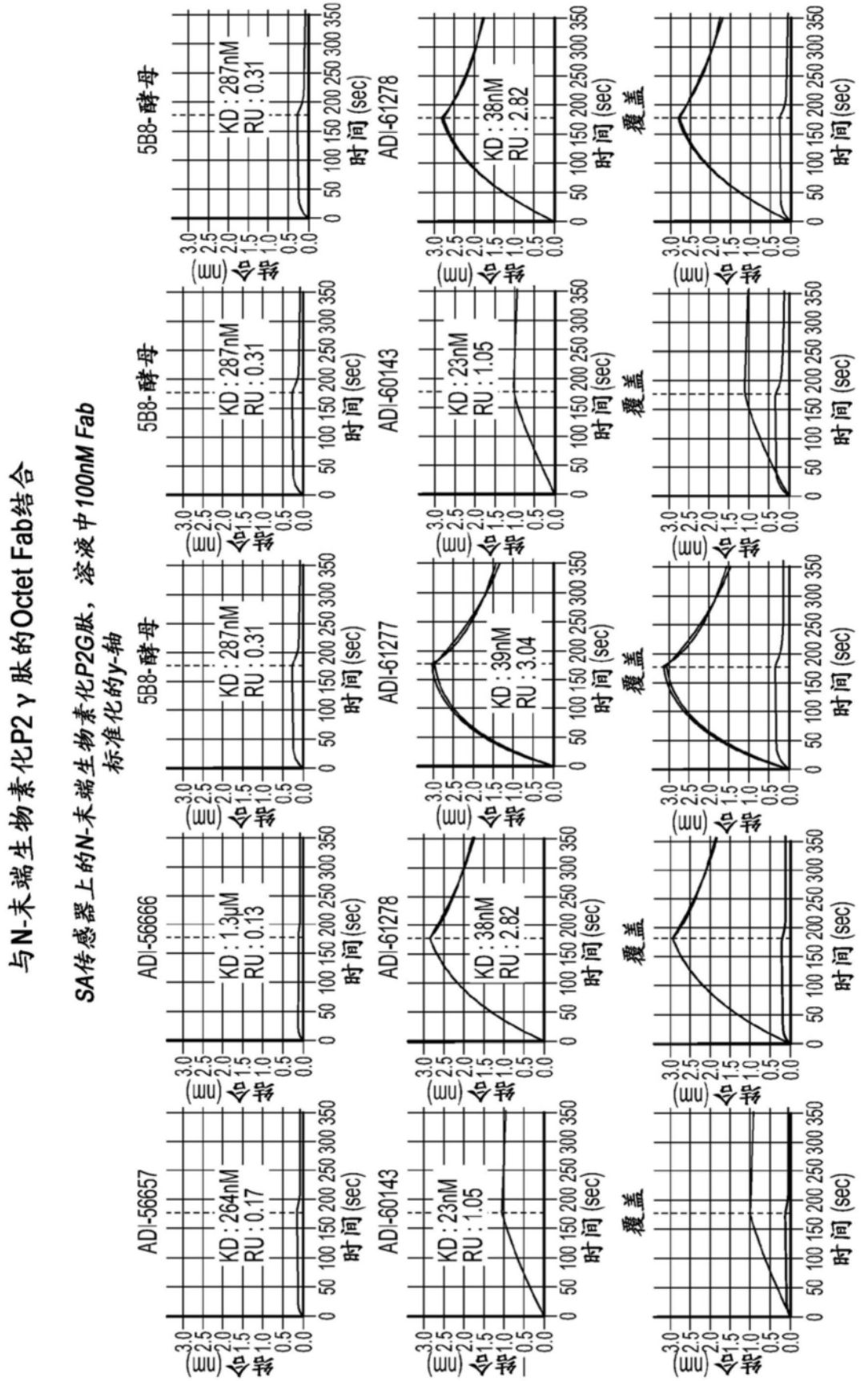

与N-末端生物素化P2γ肽的Octet Fab结合
SA传感器上的N-末端生物素化P2G肽，溶液中100nM Fab
标准化的y-轴
ADI-56657
KD : 264nM
RU : 0.17
ADI-56666
KD : 1.3μM
RU : 0.13
5B8-酵母
KD : 287nM
RU : 0.31
ADI-60143
KD : 23nM
RU : 1.05
ADI-61277
KD : 39nM
RU : 3.04
ADI-61278
KD : 38nM
RU : 2.82
覆盖
时间 (sec)

图5

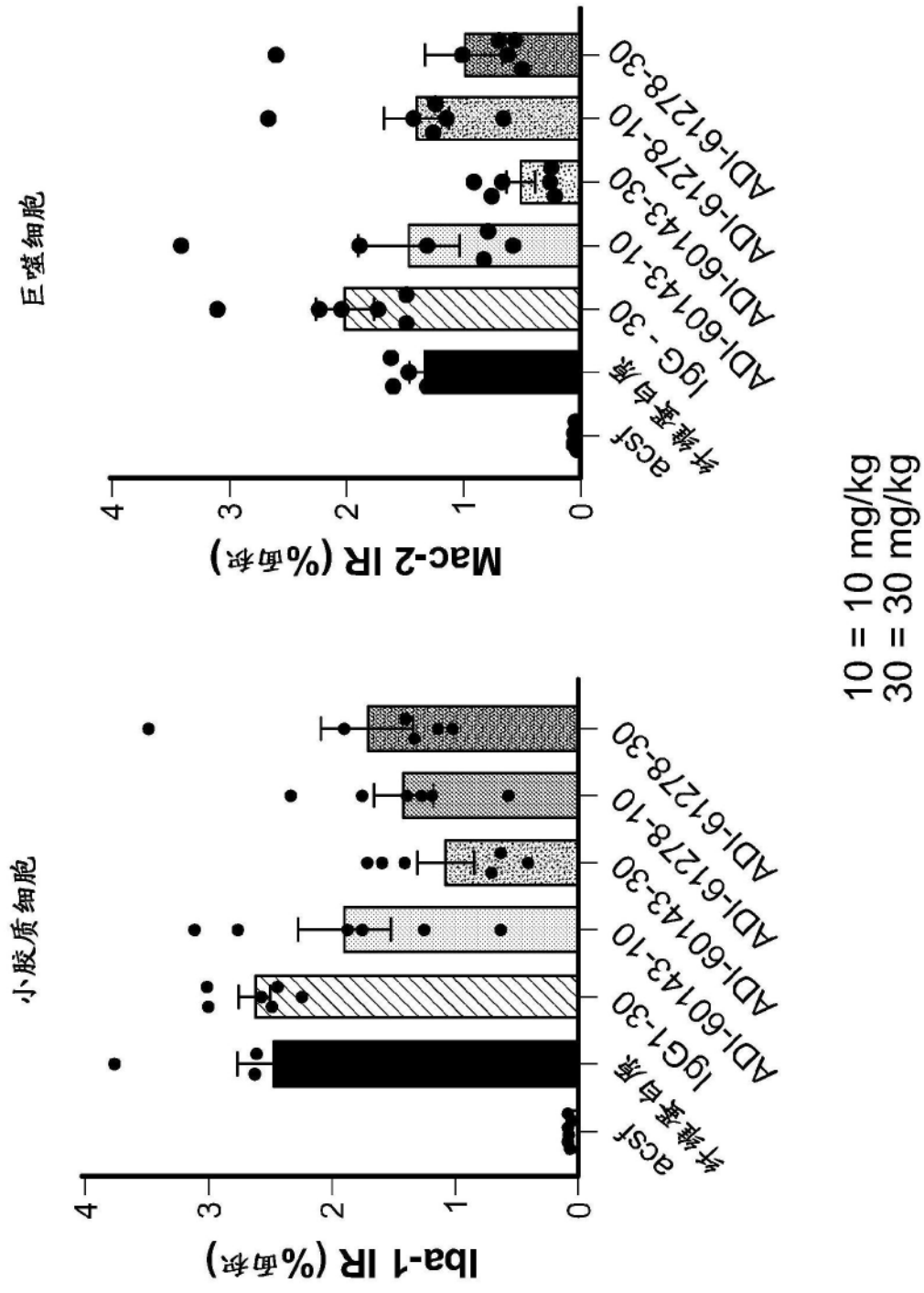

小胶质细胞
Iba-1 IR (%面积)
0
1
2
3
4
acsf
外维蛋白原
IgG1-30
ADI-60143-10
ADI-60143-30
ADI-61278-10
ADI-61278-30
巨噬细胞
Mac-2 IR (%面积)
0
1
2
3
4
acsf
外维蛋白原
IgG - 30
ADI-60143-10
ADI-60143-30
ADI-61278-10
ADI-61278-30
10 = 10 mg/kg
30 = 30 mg/kg

图6

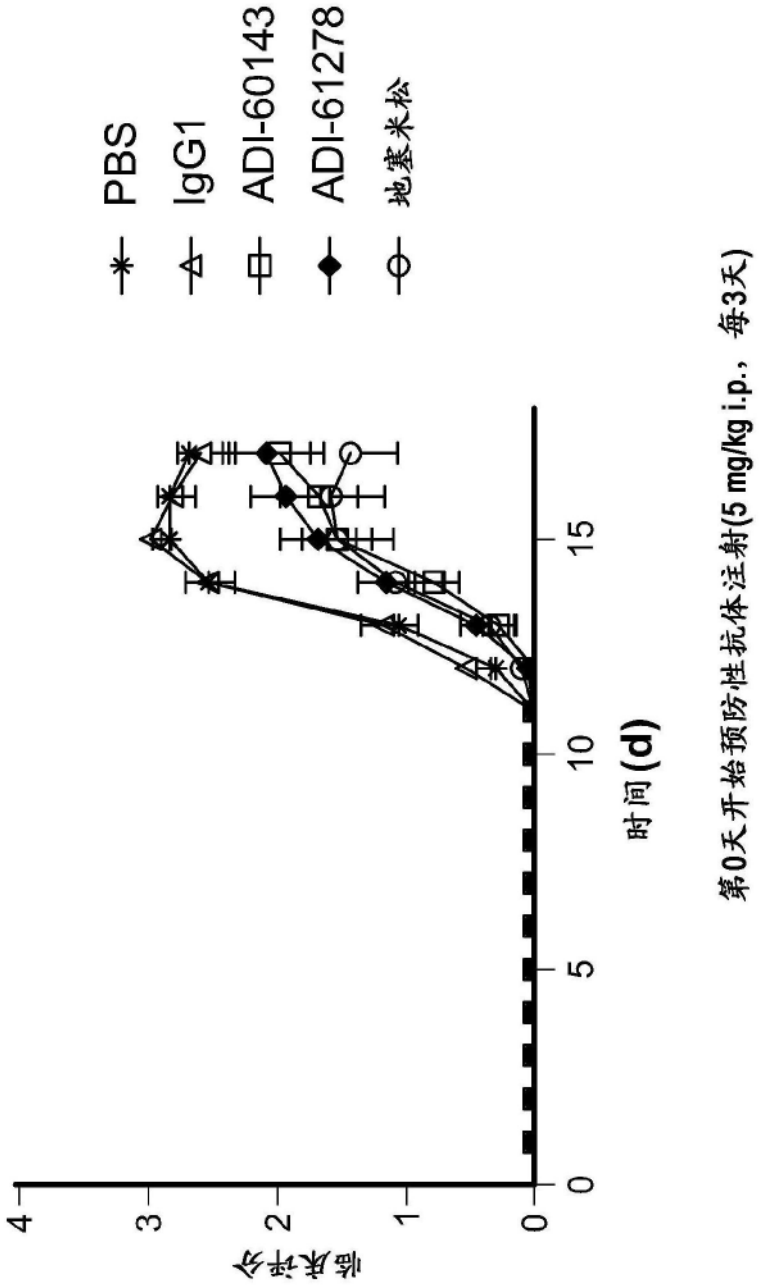

PBS
IgG1
ADI-60143
ADI-61278
地塞米松
临床评分
时间(d)
第0天开始预防性抗体注射(5 mg/kg i.p.，每3天)
0
1
2
3
4
0
5
10
15

图7

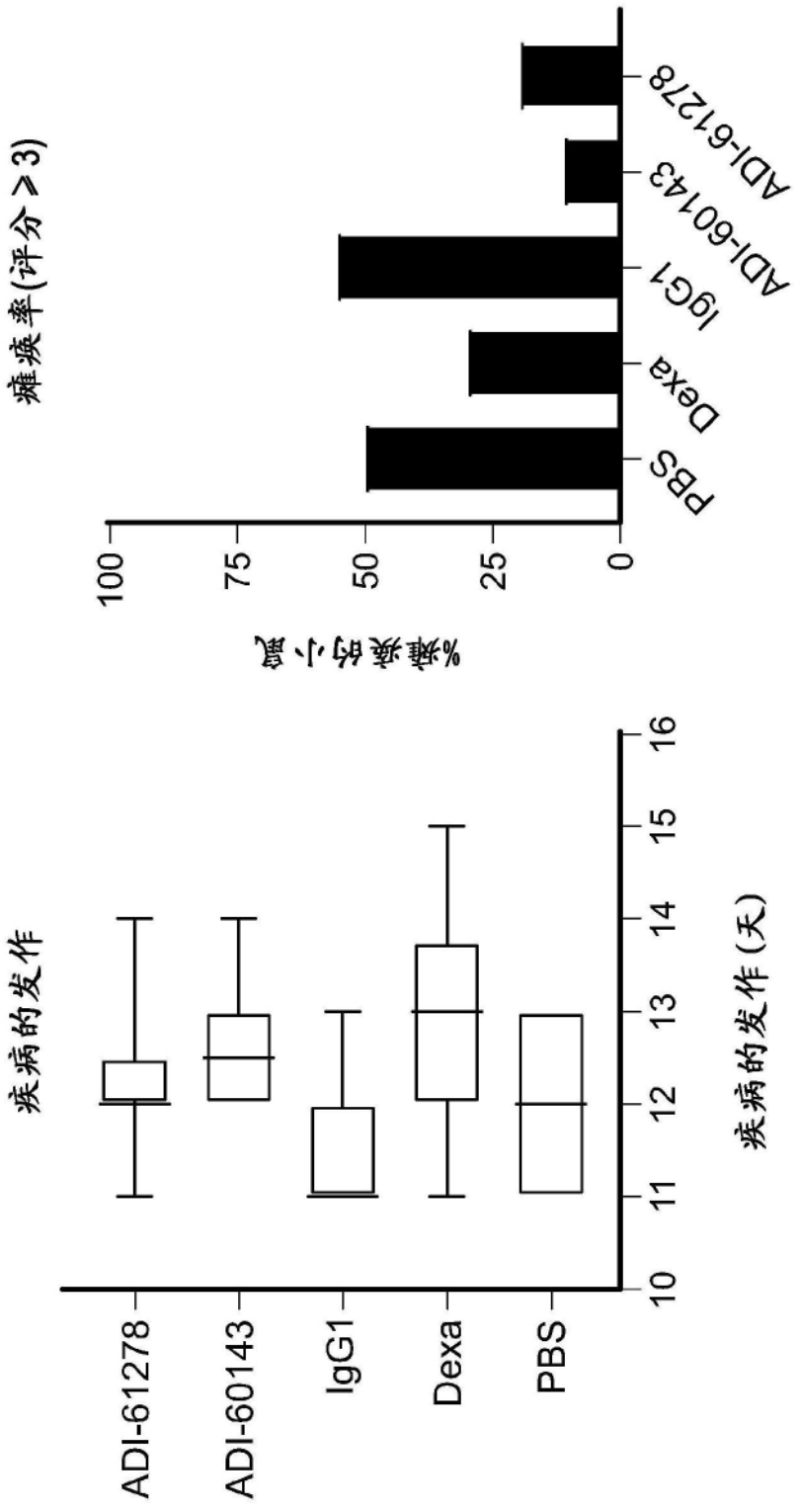

瘫痪率(评分≥3)
100
75
50
25
0
PBS
Dexa
IgG1
ADI-60143
ADI-61278
疾病的发作
疾病的发作(天)
10
11
12
13
14
15
16
ADI-61278
ADI-60143
IgG1
Dexa
PBS

图8

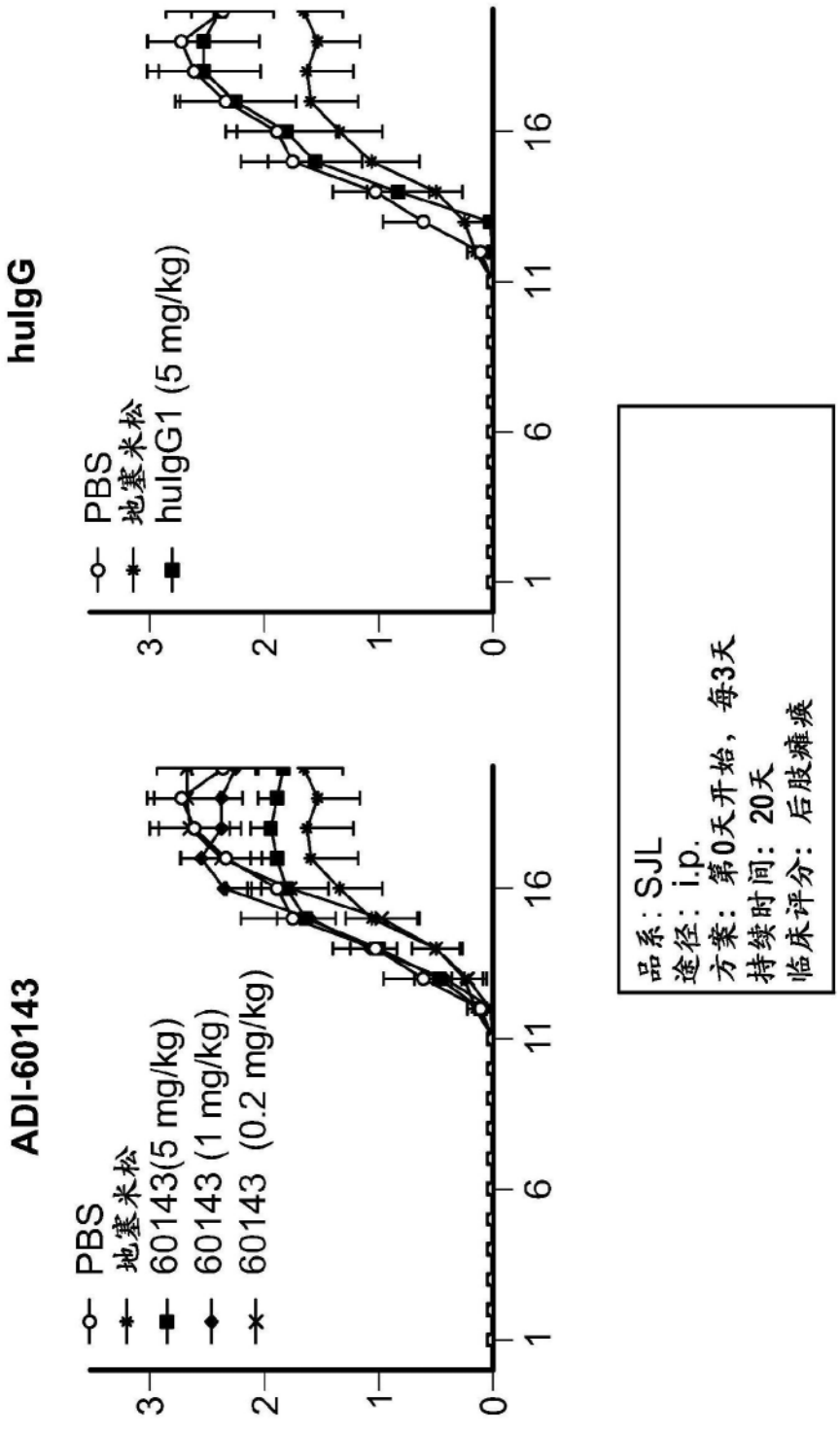

ADI-60143
PBS
地塞米松
60143(5 mg/kg)
60143 (1 mg/kg)
60143 (0.2 mg/kg)
hulgG
PBS
地塞米松
hulgG1 (5 mg/kg)
品系：SJL
途径：i.p.
方案：第0天开始，每3天
持续时间：20天
临床评分：后肢瘫痪

图9

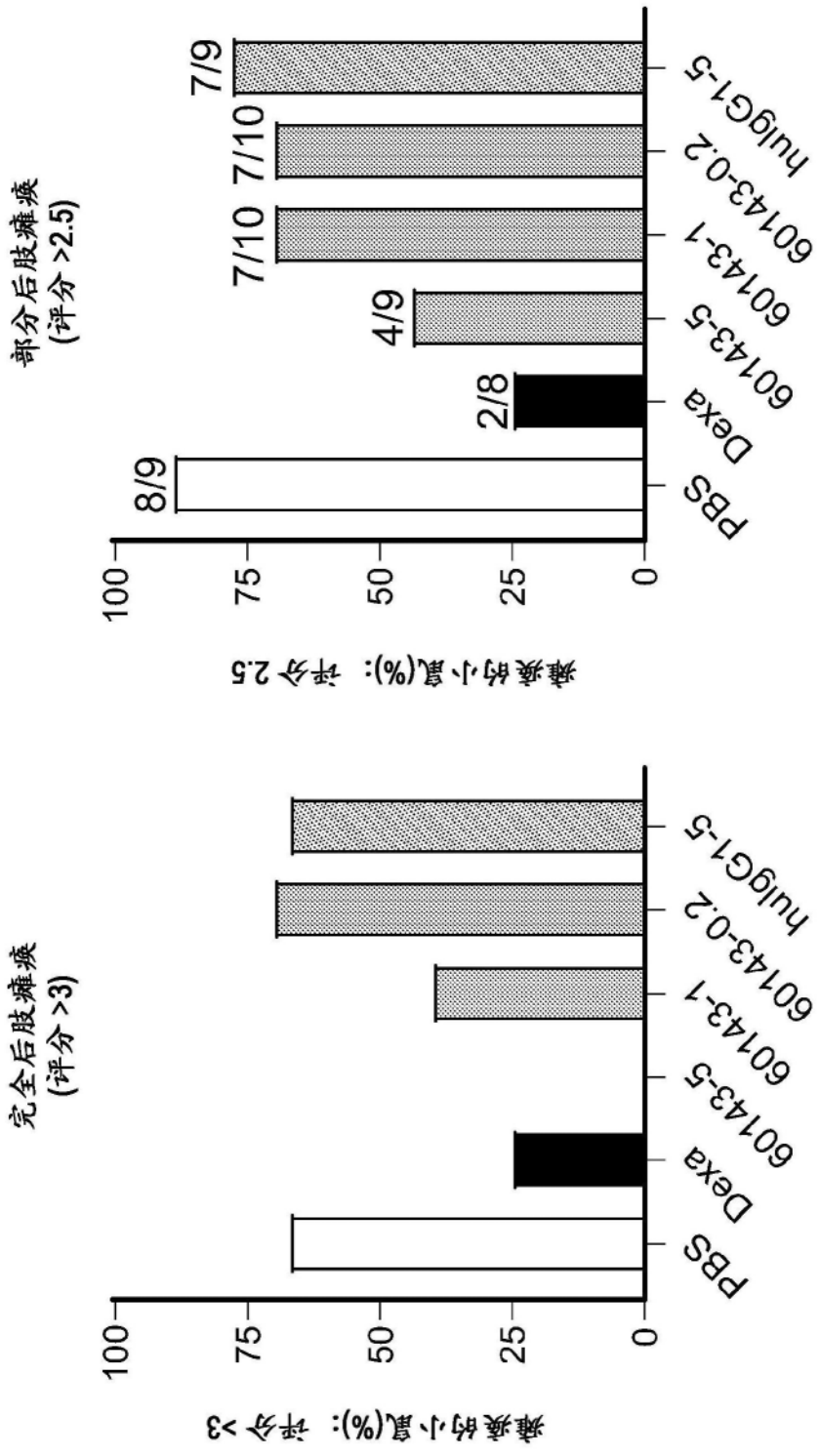

瘫痪的小鼠(%): 评分 2.5
100
75
50
25
0
8/9
2/8
4/9
7/10
7/10
7/9
PBS
Dexa
6014 3-5
6014 3-1
6014 3-0.2
huIgG1-5
部分后肢瘫痪
(评分 >2.5)
瘫痪的小鼠(%): 评分 >3
100
75
50
25
0
PBS
Dexa
6014 3-5
6014 3-1
6014 3-0.2
huIgG1-5
完全后肢瘫痪
(评分 >3)

图10

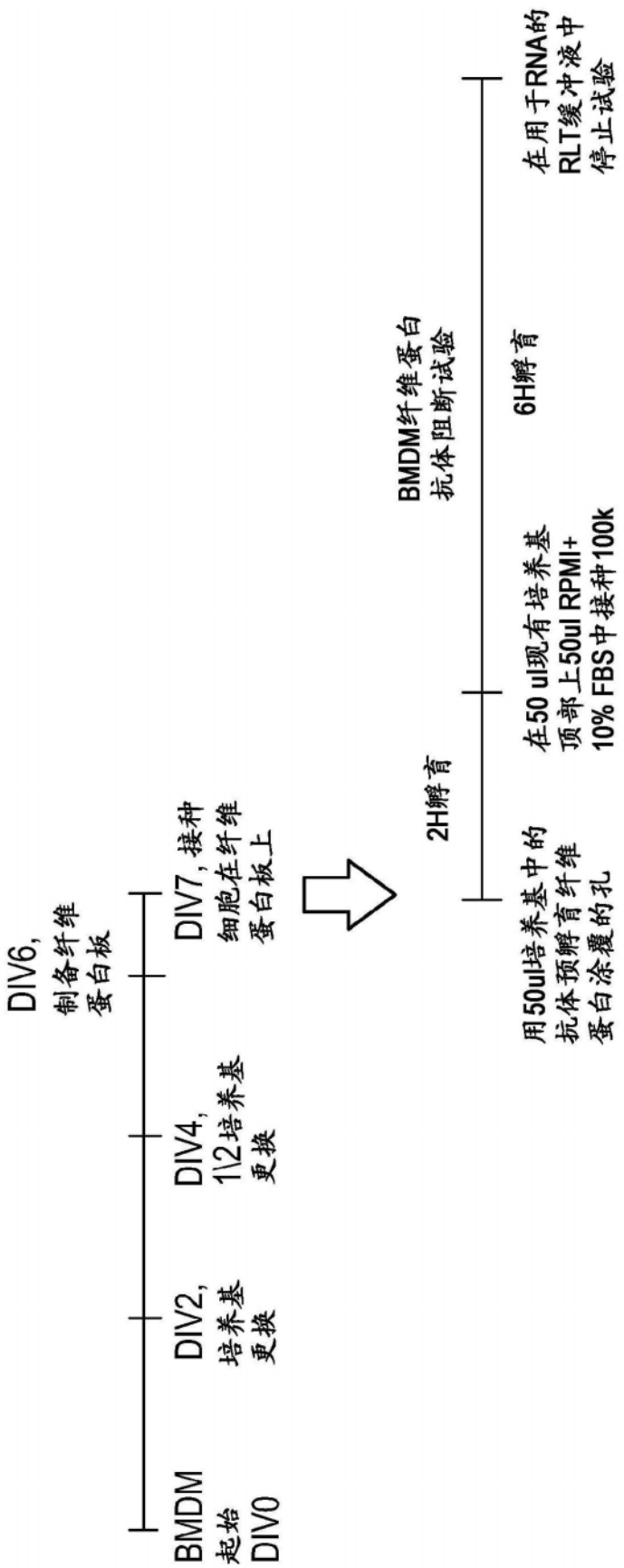

BMDM
起始
DIV0
DIV2,
培养基
更换
DIV4,
1\2培养基
更换
DIV6,
制备纤维
蛋白板
DIV7，接种
细胞在纤维
蛋白板上
2H孵育
用50ul培养基中的
抗体预孵育纤维
蛋白涂覆的孔
在50 ul现有培养基
顶部上50ul RPMI+
10% FBS中接种100k
6H孵育
BMDM纤维蛋白
抗体阻断试验
在用于RNA的
RLT缓冲液中
停止试验

图11

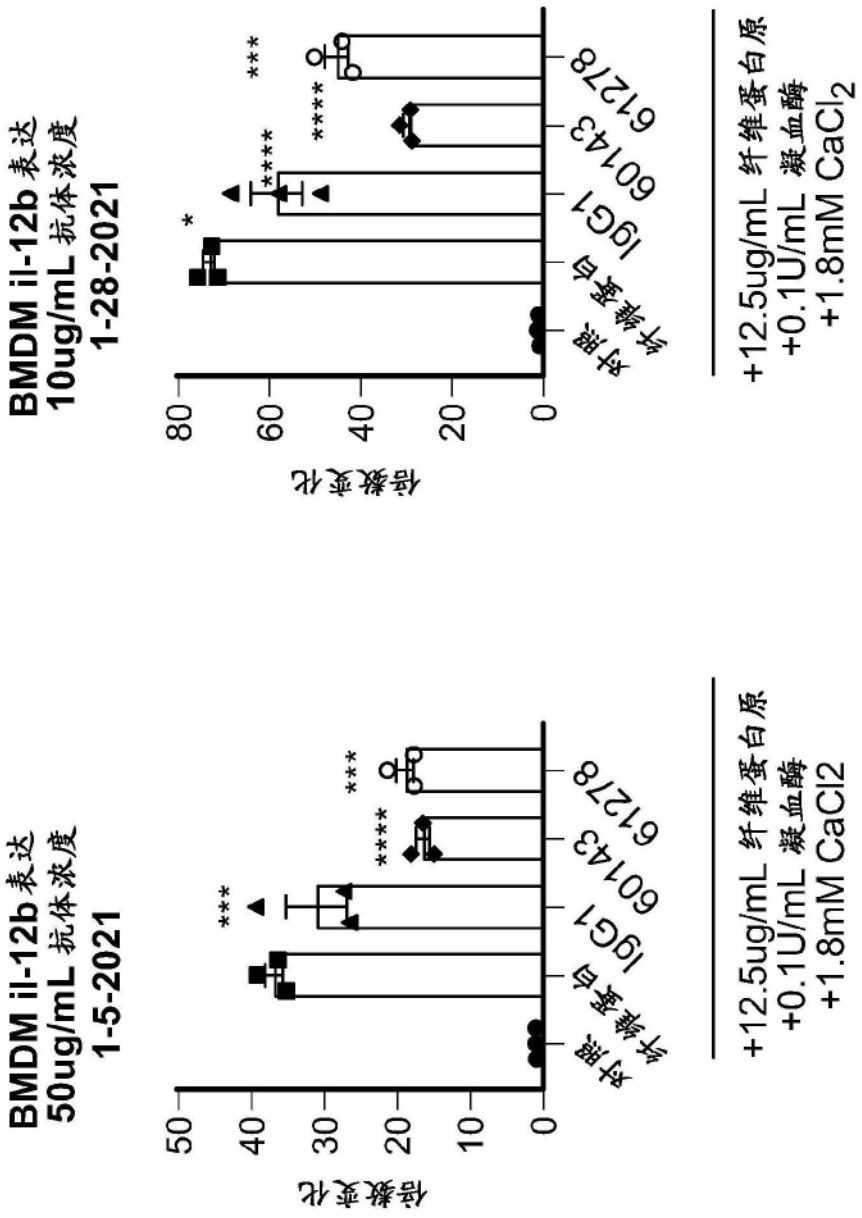

BMDM il-12b 表达
50ug/mL 抗体浓度
1-5-2021
倍数变化
0
10
20
30
40
50
纤维
纤维蛋白
IgG1
60143
61278
+12.5ug/mL 纤维蛋白原
+0.1U/mL 凝血酶
+1.8mM CaCl2
BMDM il-12b 表达
10ug/mL 抗体浓度
1-28-2021
倍数变化
0
20
40
60
80
纤维
纤维蛋白
IgG1
60143
61278
+12.5ug/mL 纤维蛋白原
+0.1U/mL 凝血酶
+1.8mM CaCl2

图12

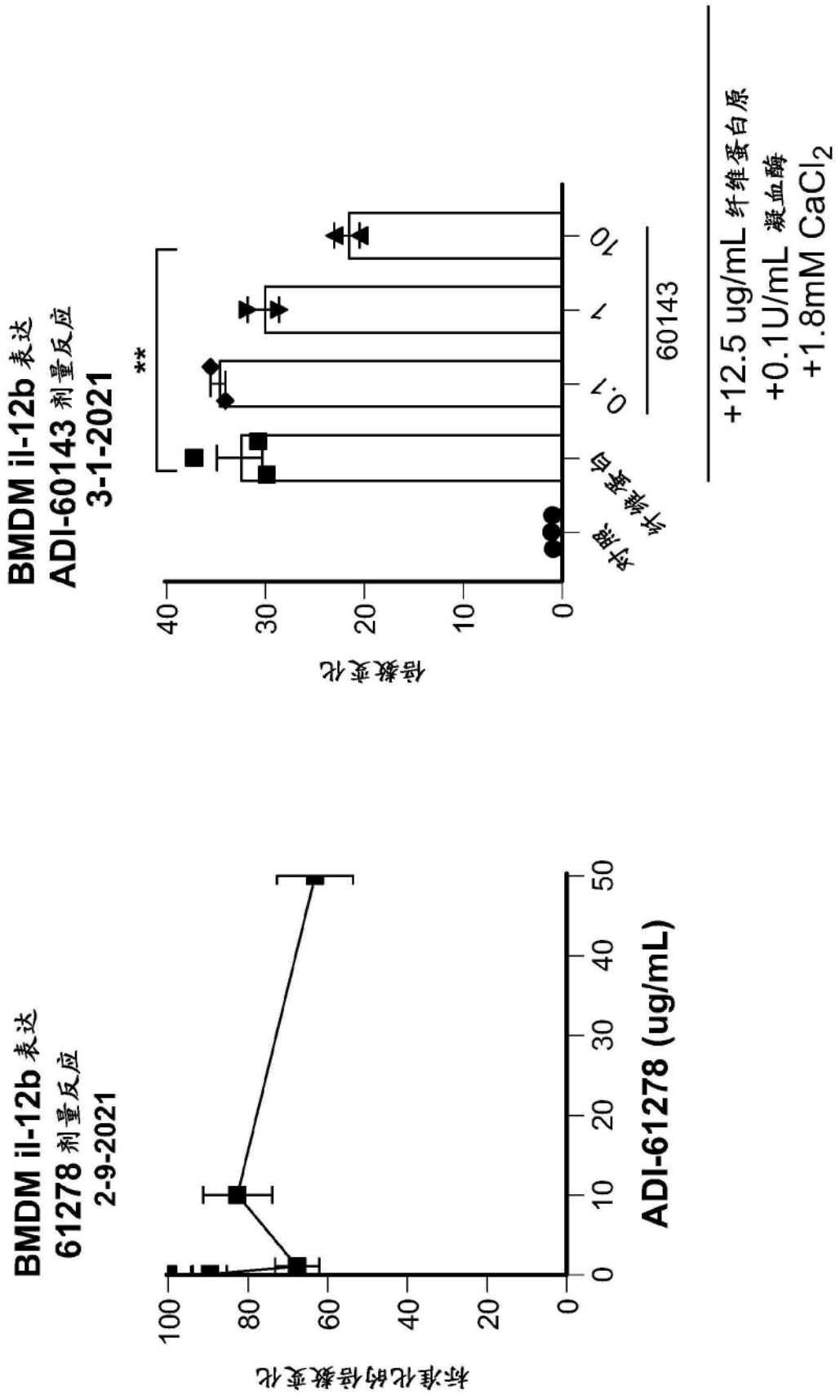

BMDM il-12b 表达
ADI-60143 剂量反应
3-1-2021
**
倍数变化
0
10
20
30
40
媒体
0.1
1
10
60143
+12.5 ug/mL 纤维蛋白原
+0.1U/mL 凝血酶
+1.8mM CaCl2
BMDM il-12b 表达
61278 剂量反应
2-9-2021
标准化的倍数变化
0
20
40
60
80
100
0
10
20
30
40
50
ADI-61278 (ug/mL)

图13

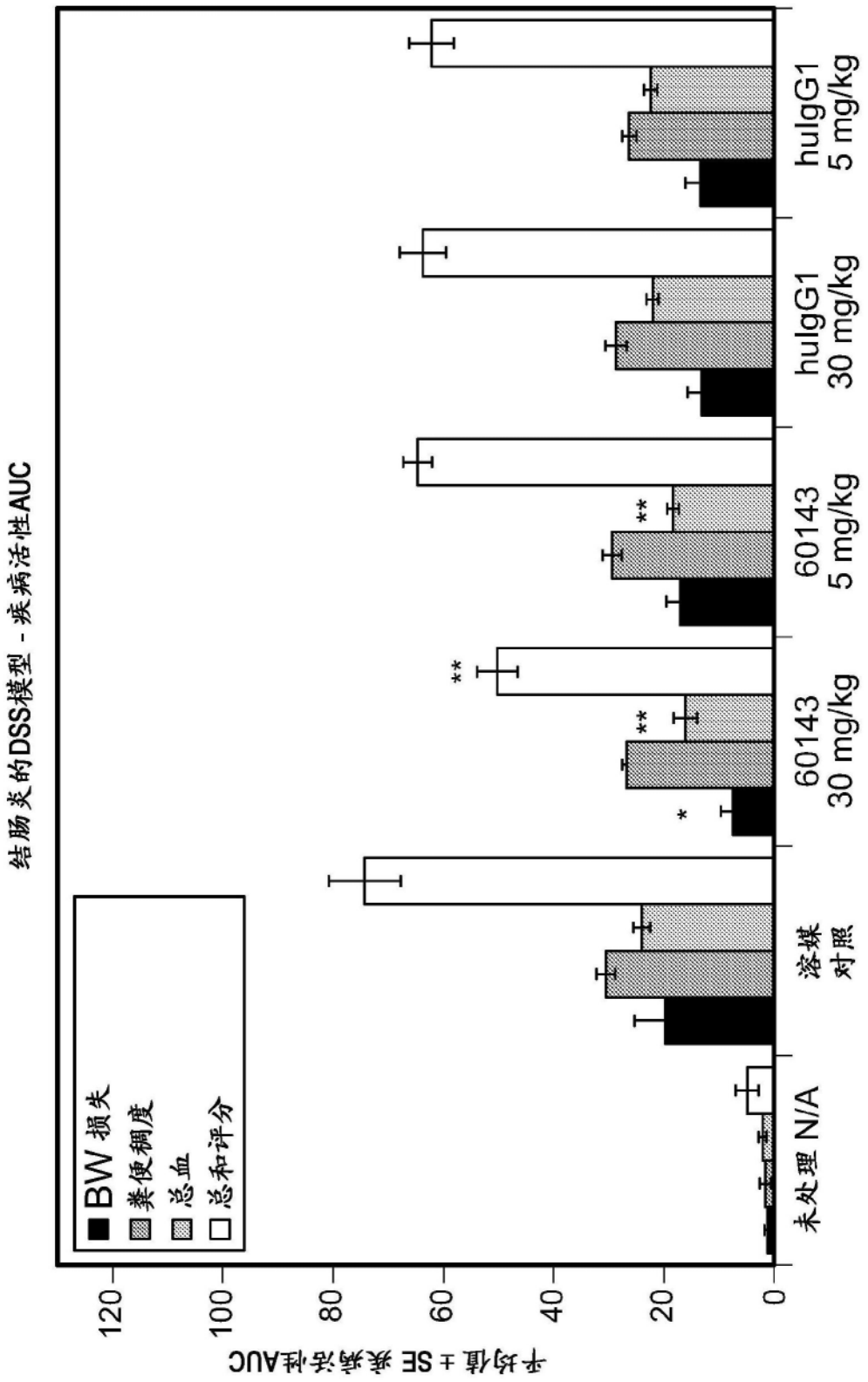

结肠炎的DSS模型 - 疾病活性AUC
BW 损失
粪便稠度
总血
总和评分
平均值 ± SE 疾病活性AUC
0
20
40
60
80
100
120
未处理 N/A
溶媒 对照
60143 30 mg/kg
60143 5 mg/kg
hulgG1 30 mg/kg
hulgG1 5 mg/kg
*
**
**
**

图14

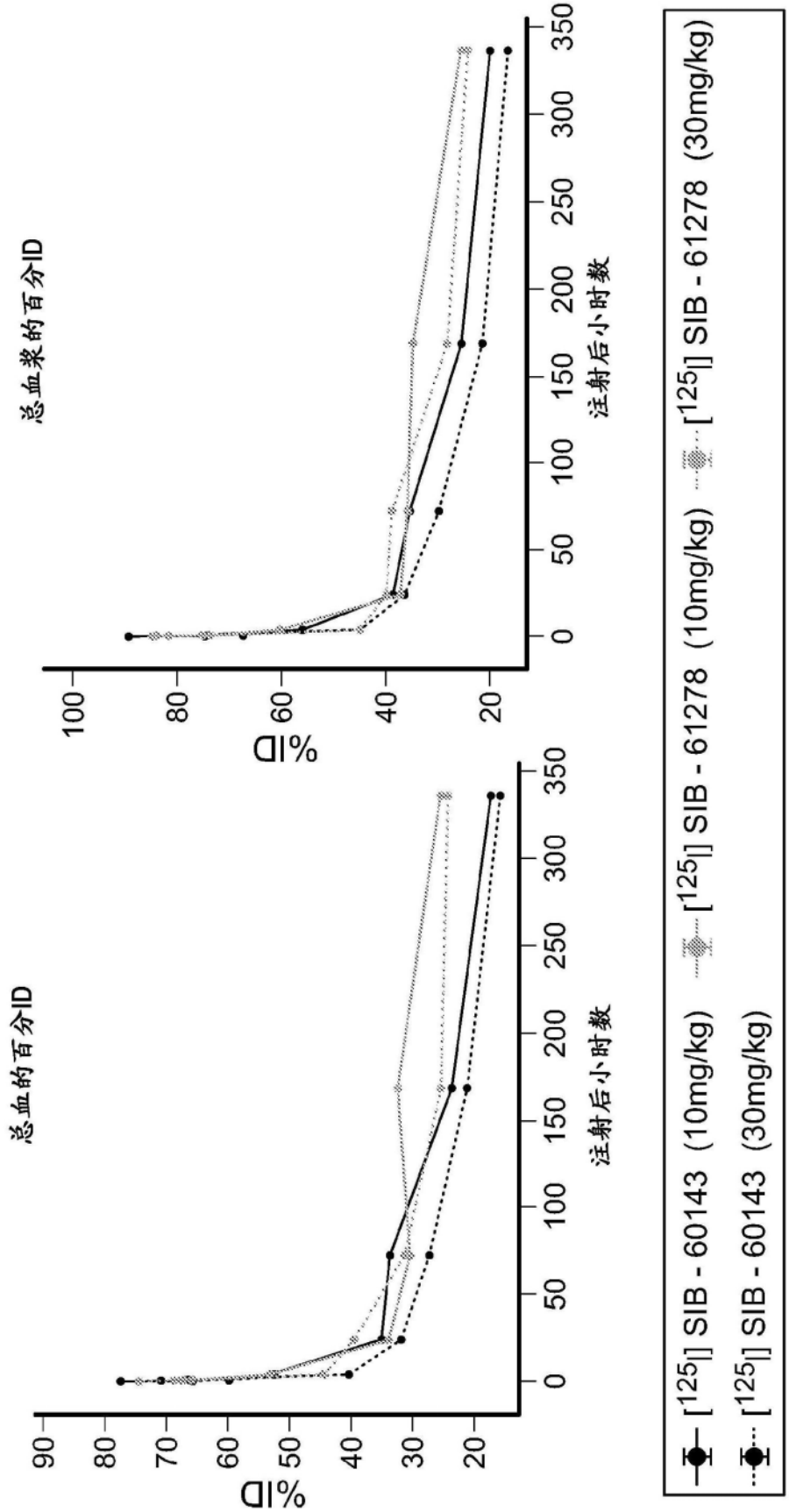

总血浆的百分ID
%ID
注射后小时数
总血的百分ID
%ID
注射后小时数
[125I] SIB - 60143 (10mg/kg)
[125I] SIB - 61278 (10mg/kg)
[125I] SIB - 61278 (30mg/kg)
[125I] SIB - 60143 (30mg/kg)

图15A

图15B

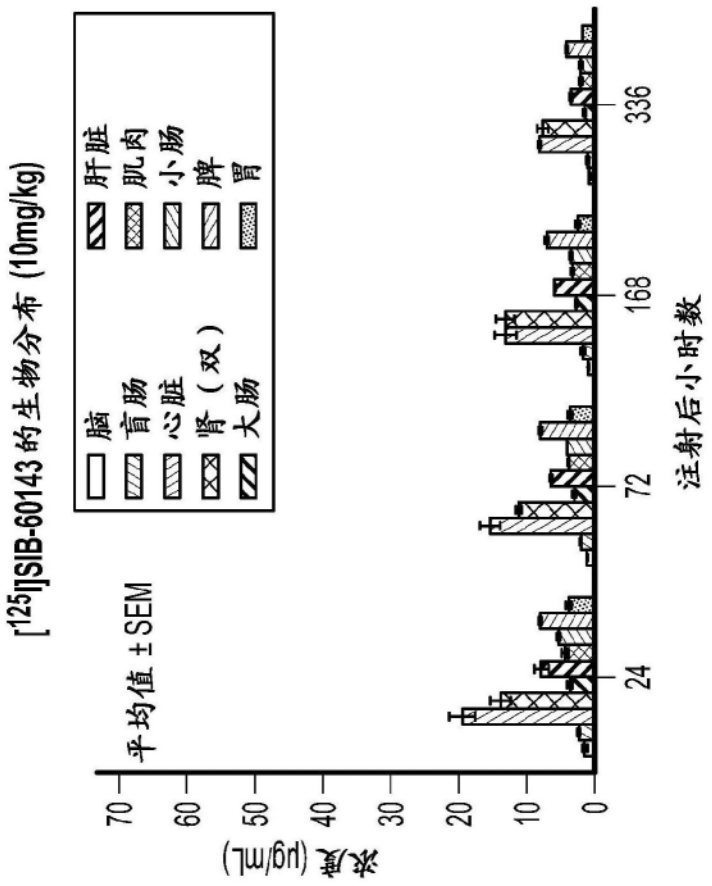

[125I]SIB-60143的生物分布 (10mg/kg)
平均值 ± SEM
脑
盲肠
心脏
肾（双）
大肠
肝脏
肌肉
小肠
脾
胃
浓度 (μg/mL)
0
10
20
30
40
50
60
70
24
72
168
336
注射后小时数

图16A

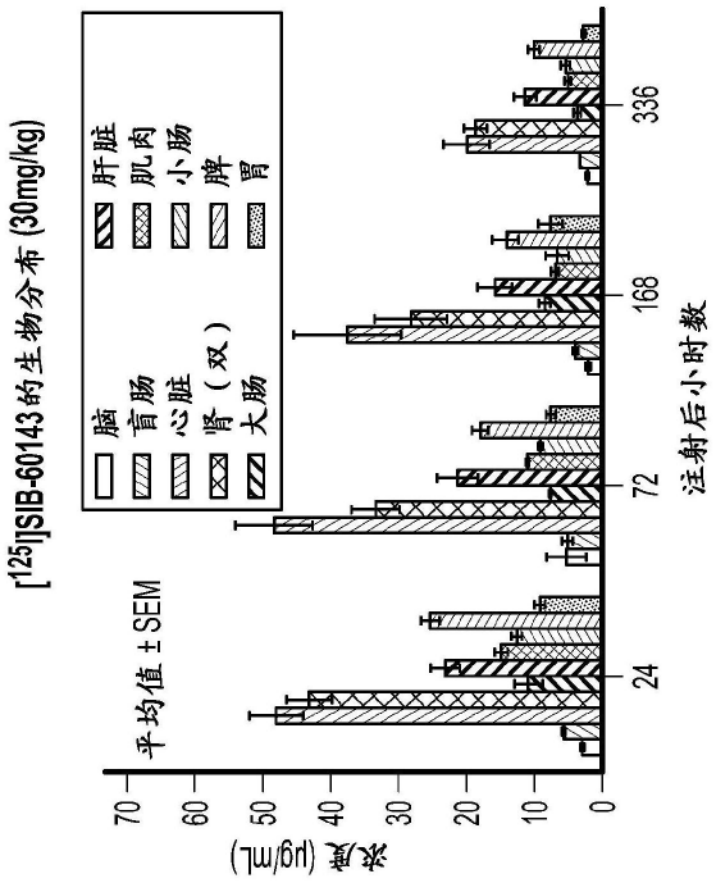

[125]ISIB-60143的生物分布 (30mg/kg)
平均值 ± SEM
脑
盲肠
心脏
肾（双）
大肠
肝脏
肌肉
小肠
脾
胃
浓度 (μg/mL)
0
10
20
30
40
50
60
70
24
72
168
336
注射后小时数

图16B

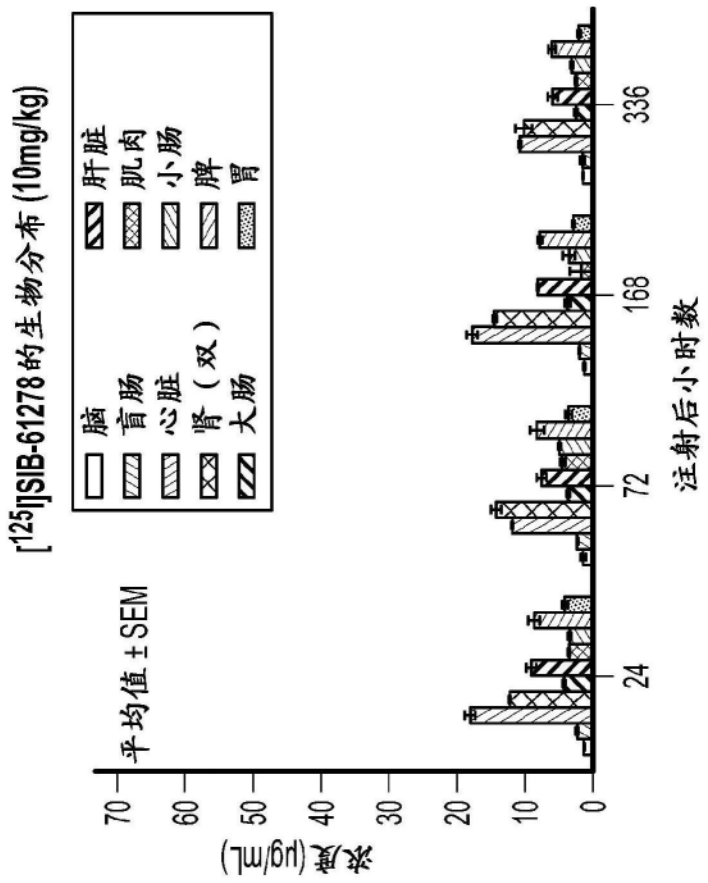

[125I]SIB-61278的生物分布 (10mg/kg)
脑
盲肠
心脏
肾（双）
大肠
肝脏
肌肉
小肠
脾
胃
平均值 ± SEM
浓度 (μg/克)
0
10
20
30
40
50
60
70
24
72
168
336
注射后小时数

图16C

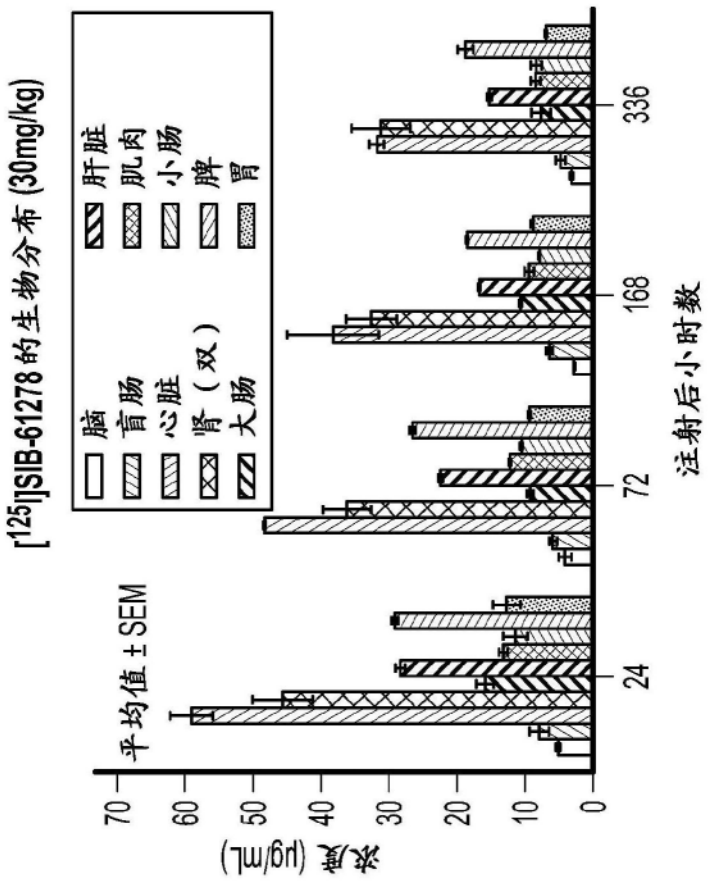

[125I]SIB-61278的生物分布 (30mg/kg)
脑
盲肠
心脏
肾（双）
大肠
肝脏
肌肉
小肠
脾
胃
平均值 ± SEM
浓度 (μg/mL)
0
10
20
30
40
50
60
70
24
72
168
336
注射后小时数

图16D

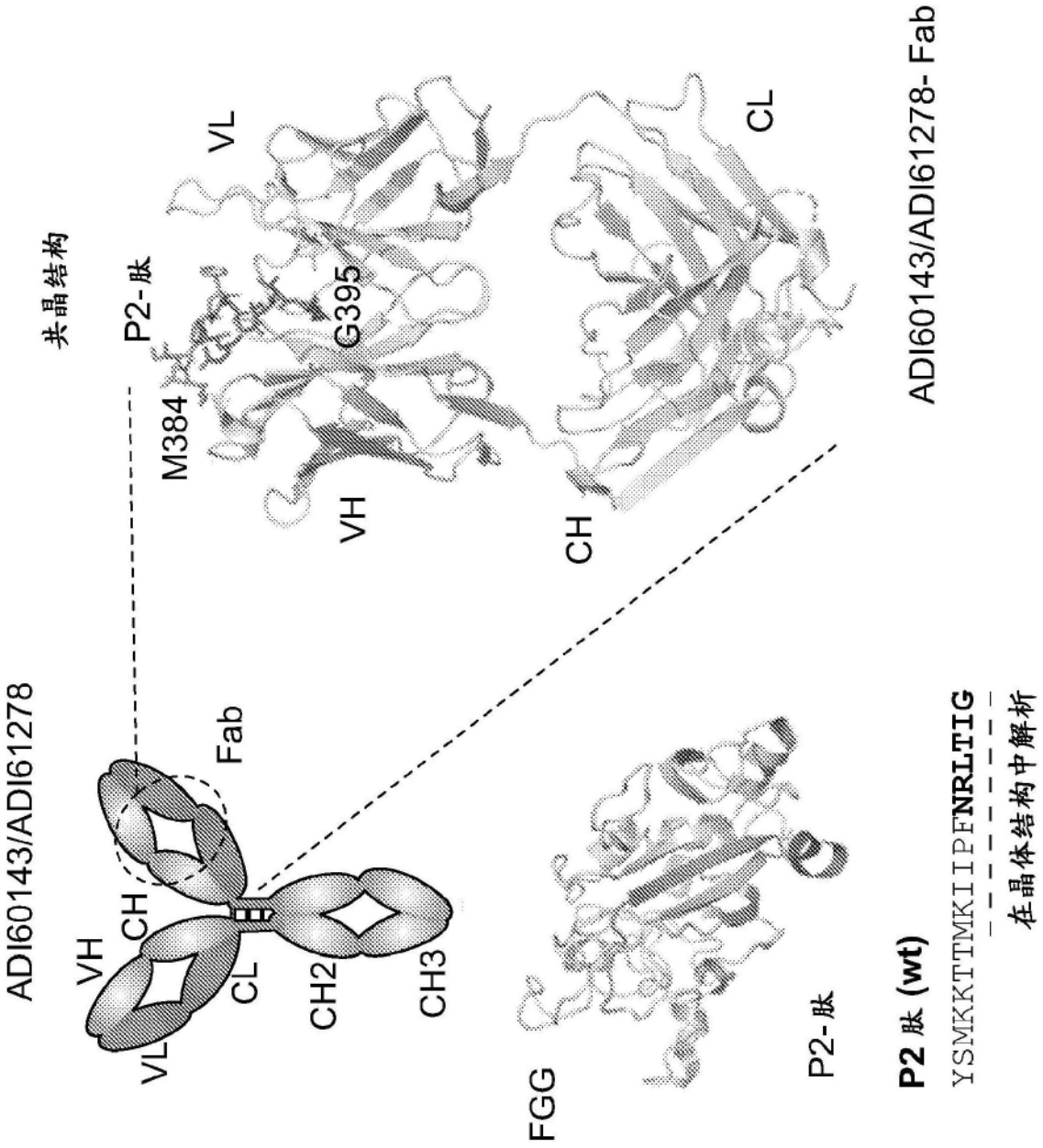

共晶结构
P2-肽
M384
G395
VL
VH
CH
CL
ADI60143/ADI61278- Fab
ADI60143/ADI61278
VH
CH
VL
CL
CH2
CH3
Fab
FGG
P2-肽
P2 肽 (wt)
YSMKKTTMKIIPFNRLTIG
在晶体结构中解析

图17

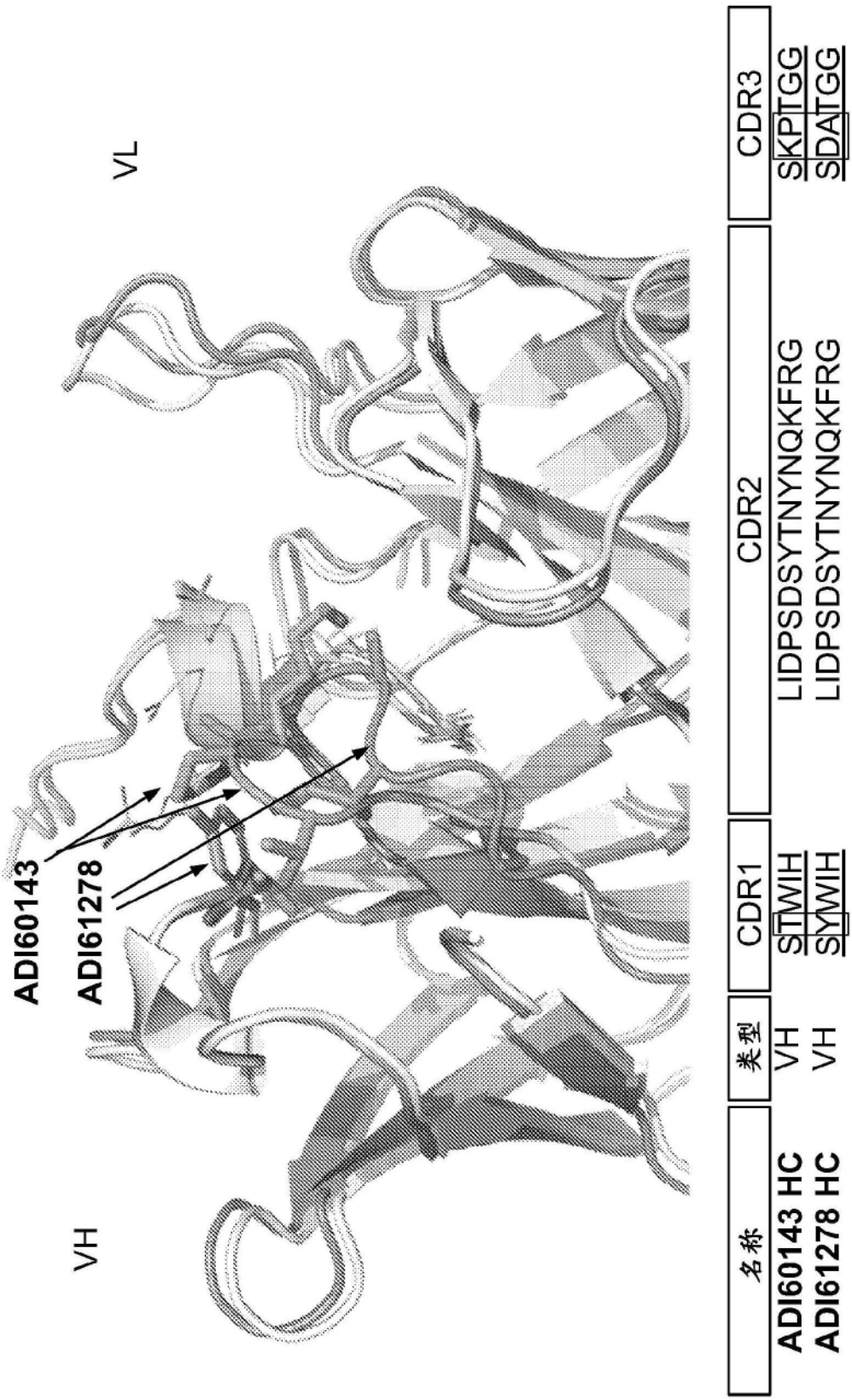

VL
VH
ADI60143
ADI61278
名称 类型 CDR1 CDR2 CDR3
ADI60143 HC VH STWIH LIDPSDSYTNYNQKFRG SKPTGG
ADI61278 HC VH SYWIH LIDPSDSYTNYNQKFRG SDATGG

图18

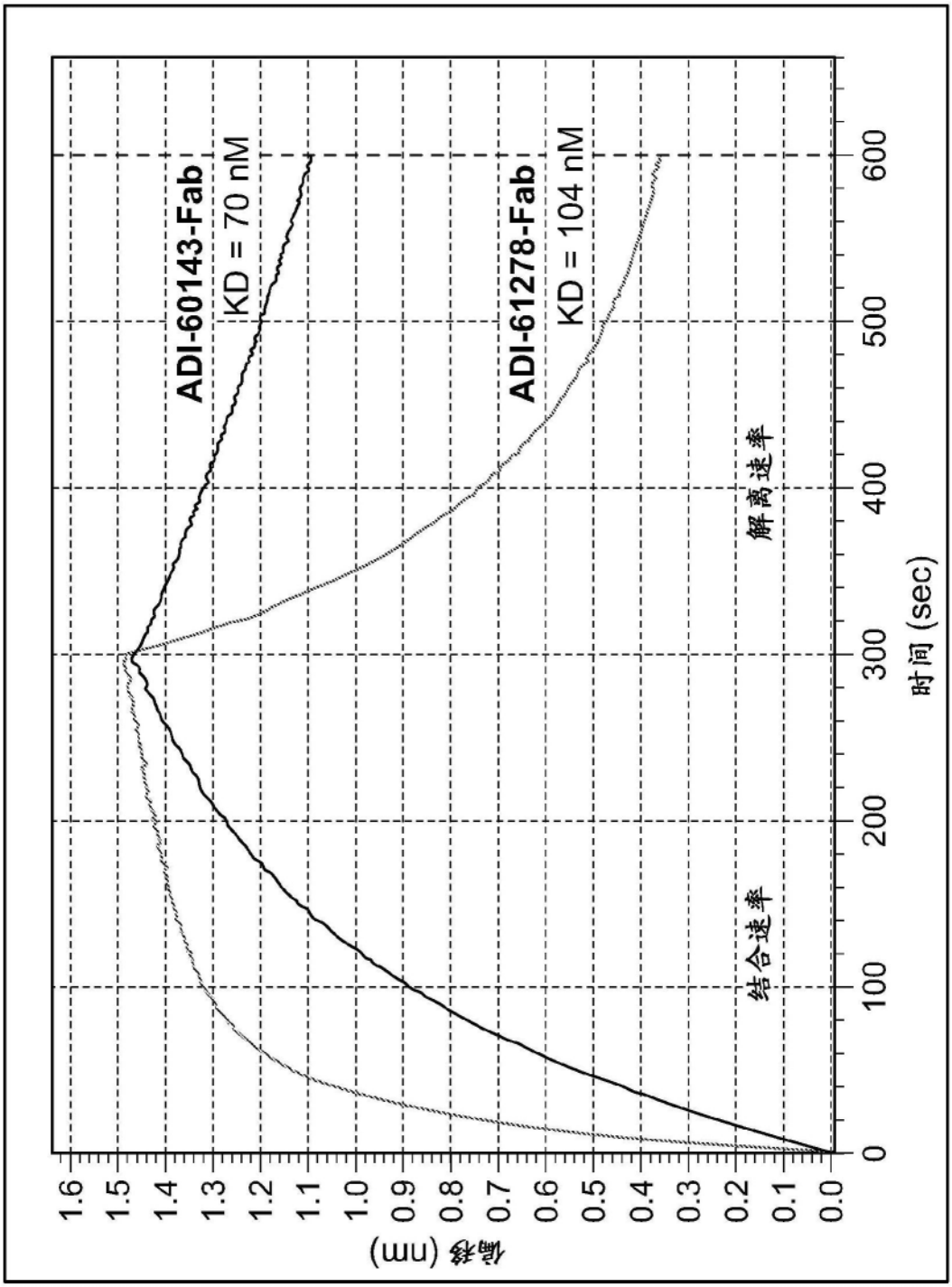

ADI-60143-Fab
KD = 70 nM
ADI-61278-Fab
KD = 104 nM
结合速率
解离速率
偏移 (nm)
时间 (sec)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0
1.1
1.2
1.3
1.4
1.5
1.6
0
100
200
300
400
500
600

图19

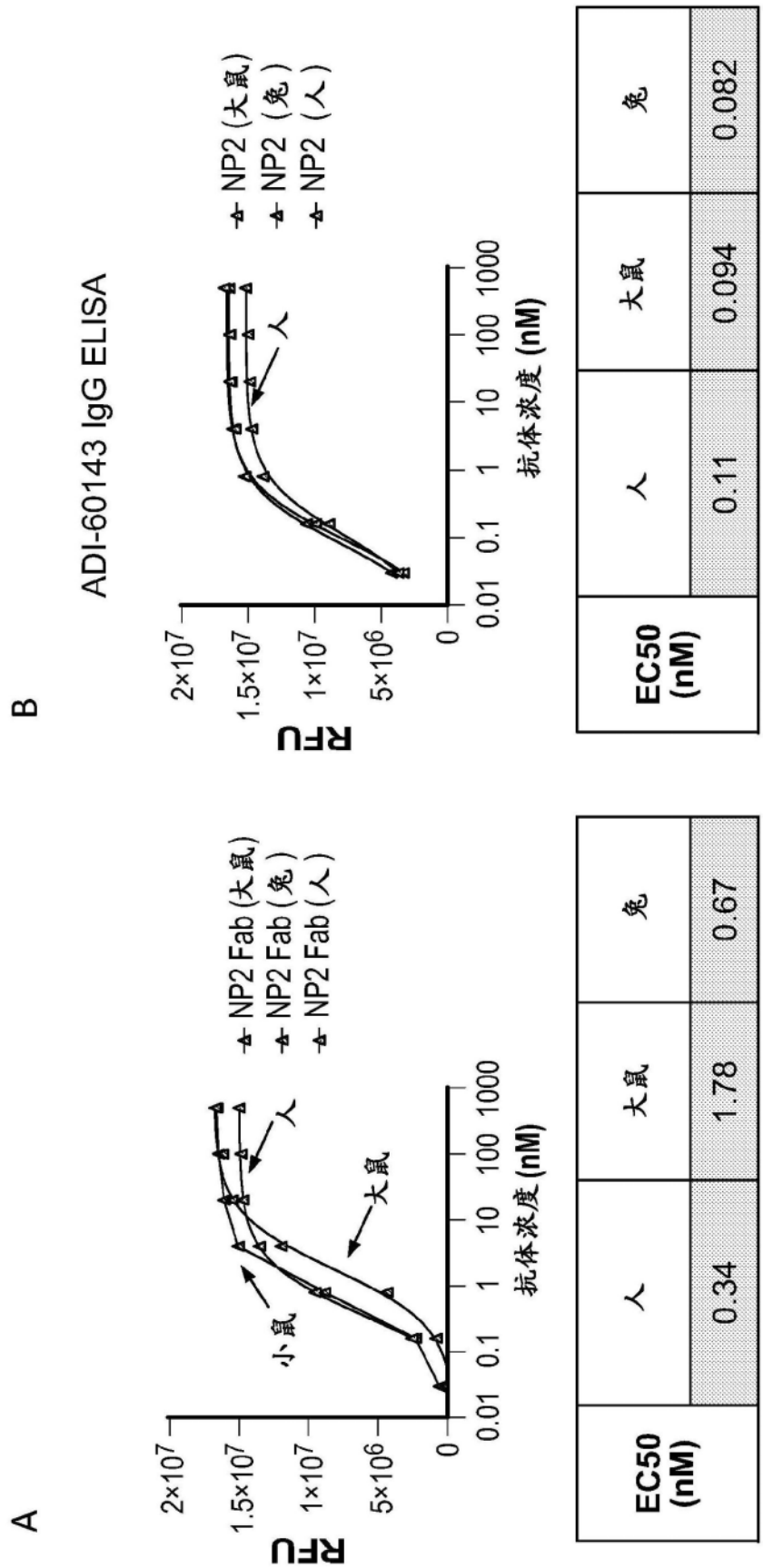
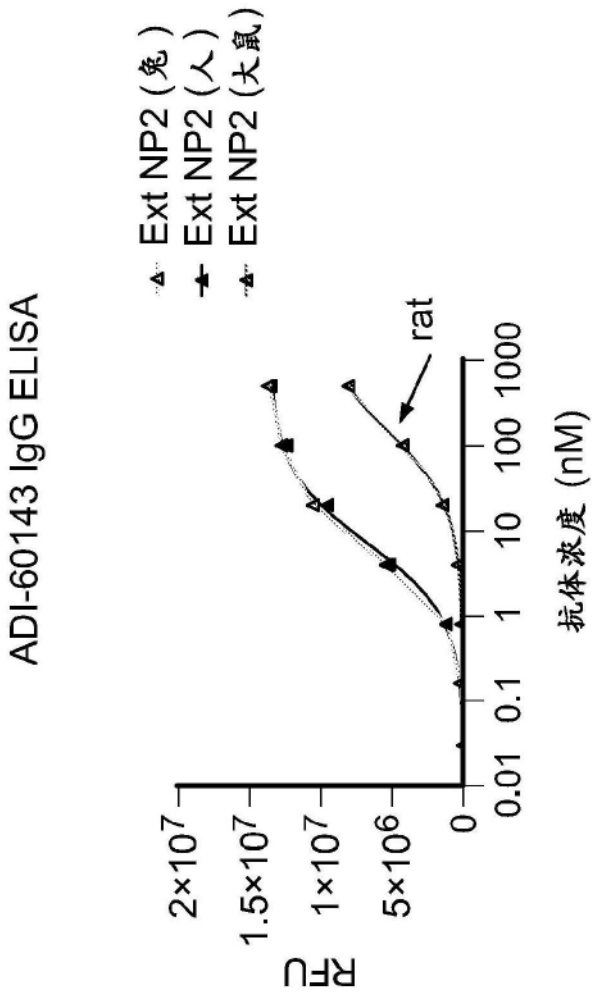

A
RFU
2×10^7
1.5×10^7
1×10^7
5×10^6
0
0.01 0.1 1 10 100 1000
抗体浓度 (nM)
小鼠
人
大鼠
NP2 Fab (大鼠)
NP2 Fab (兔)
NP2 Fab (人)
EC50 (nM)
人 0.34
大鼠 1.78
兔 0.67
B
ADI-60143 IgG ELISA
RFU
2×10^7
1.5×10^7
1×10^7
5×10^6
0
0.01 0.1 1 10 100 1000
抗体浓度 (nM)
人
NP2 (大鼠)
NP2 (兔)
NP2 (人)
EC50 (nM)
人 0.11
大鼠 0.094
兔 0.082

图20



EC50 (nM)	人	大鼠	兔
	7.248	139.2	5.972

图21

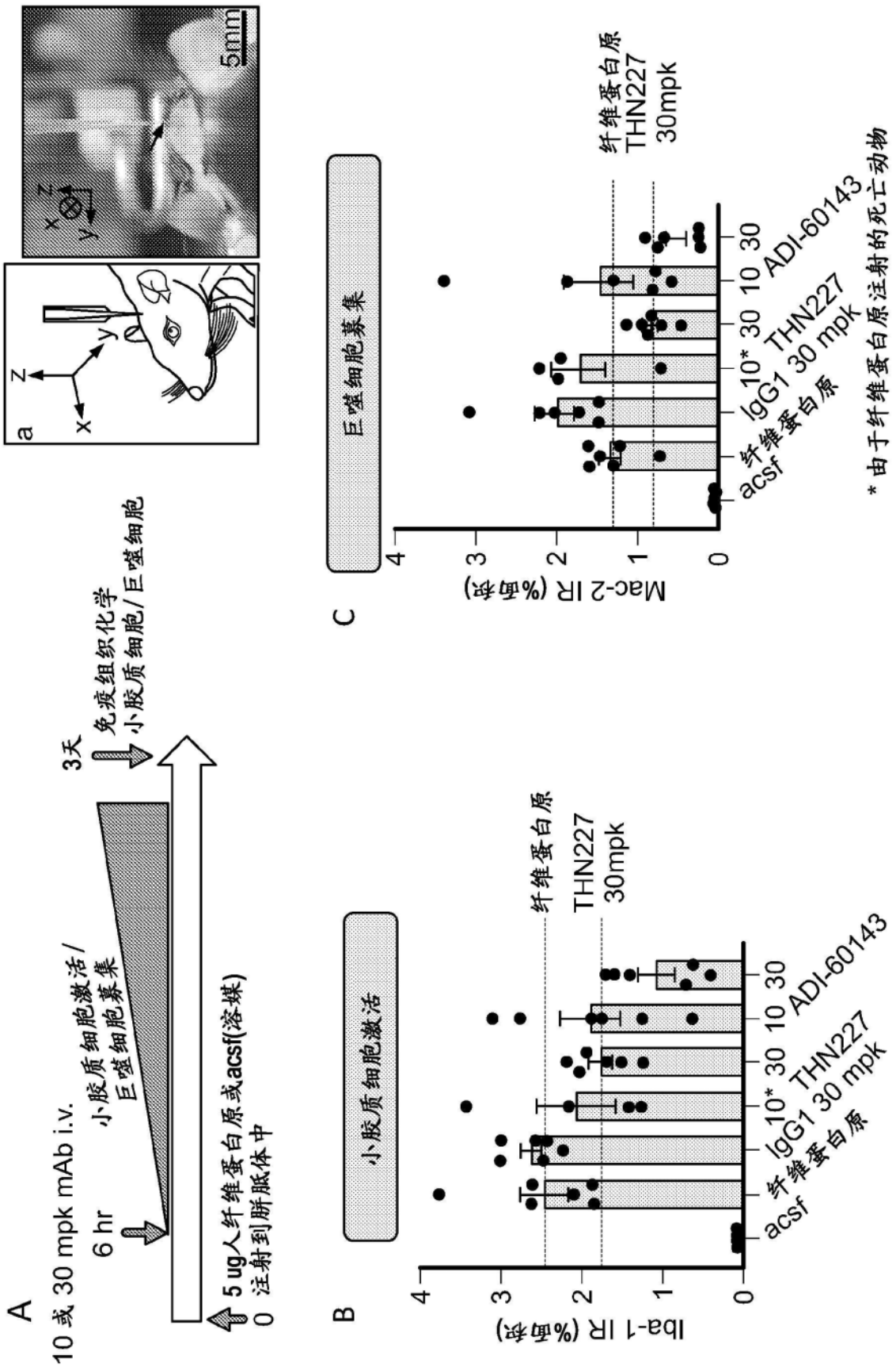

A
10 或 30 mpk mAb i.v.
6 hr
小胶质细胞激活/
巨噬细胞募集
3天
免疫组织化学
小胶质细胞/巨噬细胞
5 ug人纤维蛋白原或acsf(溶媒)
0 注射到脐脉体中
a
z
x
y
5mm
B
小胶质细胞激活
Iba-1 IR (%面积)
纤维蛋白原
THN227
30mpk
acsf
纤维蛋白原
IgG1 30 mpk
10* 30
THN227
10 30
ADI-60143
C
巨噬细胞募集
Mac-2 IR (%面积)
纤维蛋白原
THN227
30mpk
* 由于纤维蛋白原注射的死亡动物

图22

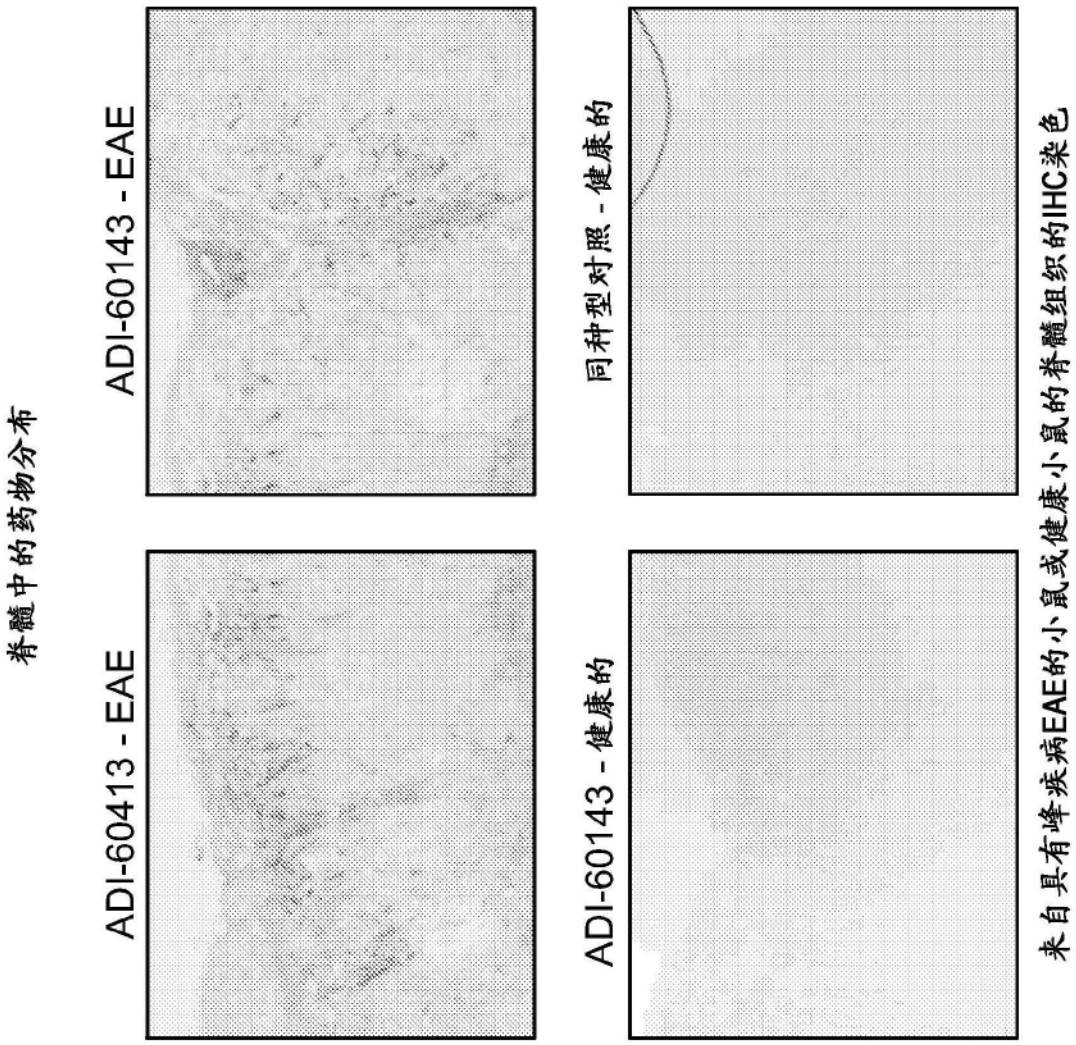

脊髓中的药物分布
ADI-60413 - EAE
ADI-60143 - EAE
ADI-60143 - 健康的
同种型对照 - 健康的
来自具有峰疾病EAE的小鼠或健康小鼠的脊髓组织的IHC染色

图23

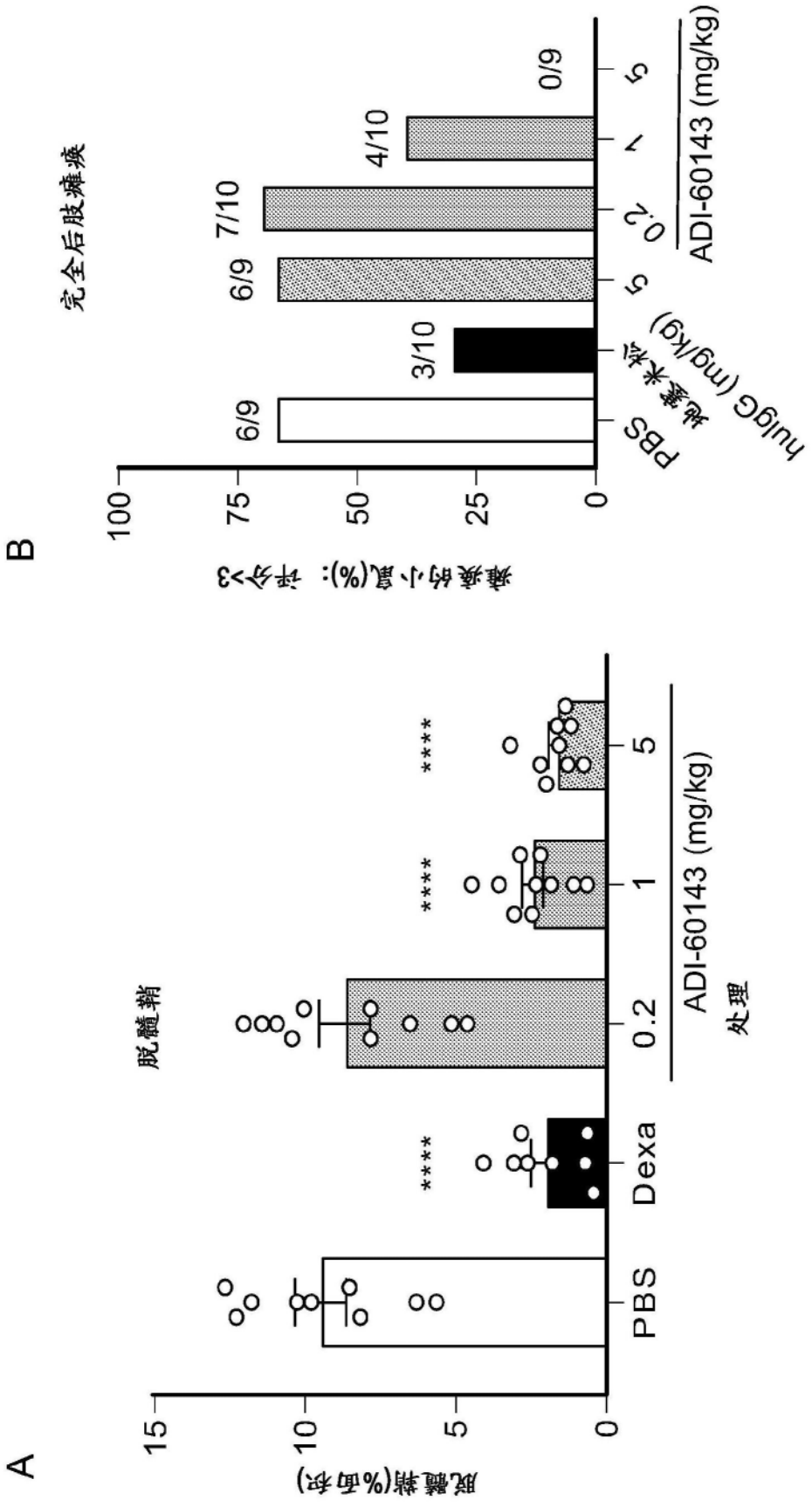

A
脱髓鞘(%面积)
15
10
5
0
PBS
Dexa
0.2
1
5
ADI-60143 (mg/kg)
处理
脱髓鞘
****
****
****
B
瘫痪的小鼠(%): 评分≥3
100
75
50
25
0
6/9
3/10
6/9
7/10
4/10
0/9
PBS
免疫球蛋白
huIgG (mg/kg)
0.2
1
5
ADI-60143 (mg/kg)
完全后肢瘫痪

图24

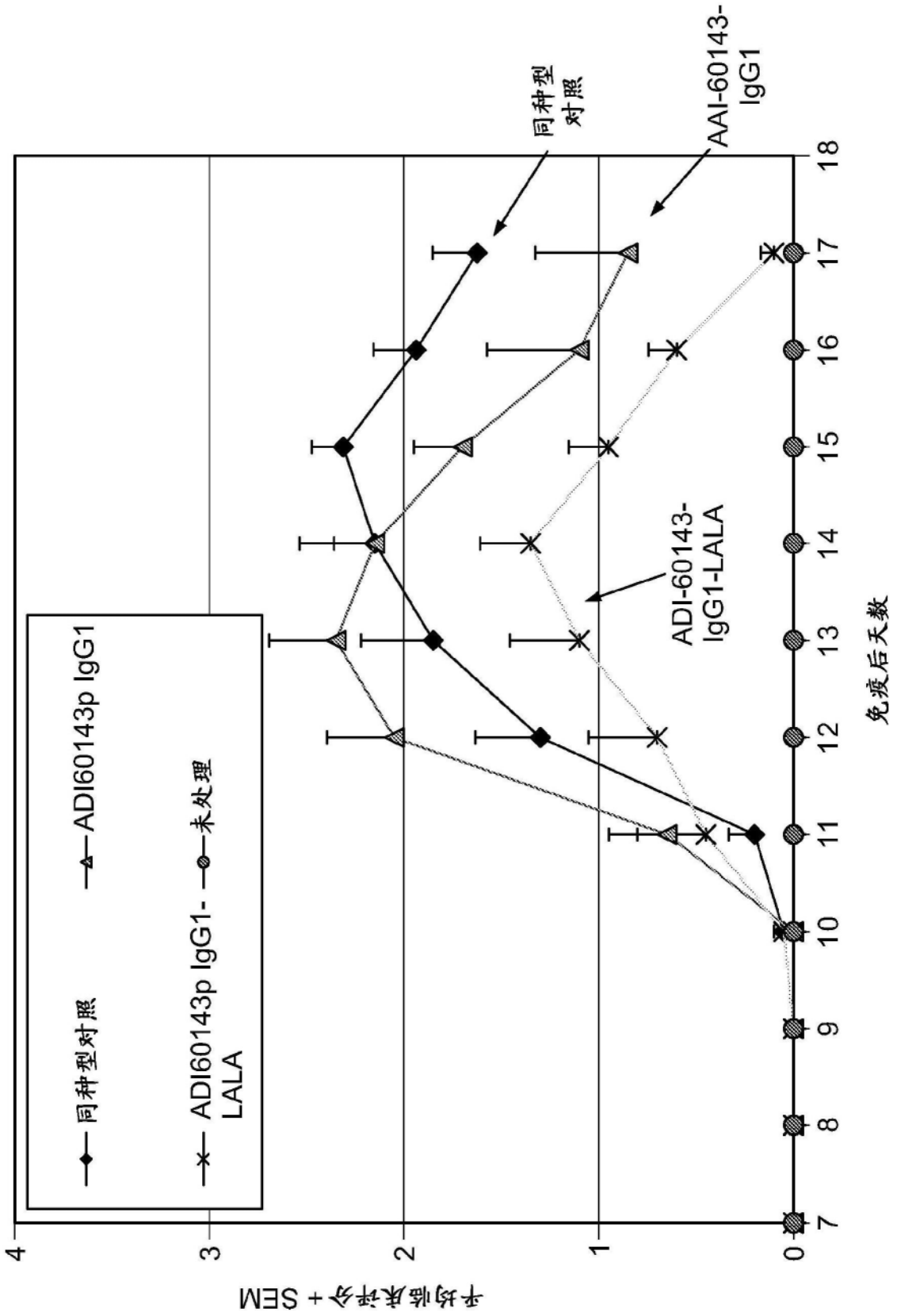

同种型对照
ADI60143p IgG1
ADI60143p IgG1-LALA
未处理
AAI-60143-IgG1
ADI-60143-IgG1-LALA
平均临床评分 + SEM
免疫后天数
0
1
2
3
4
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

图25

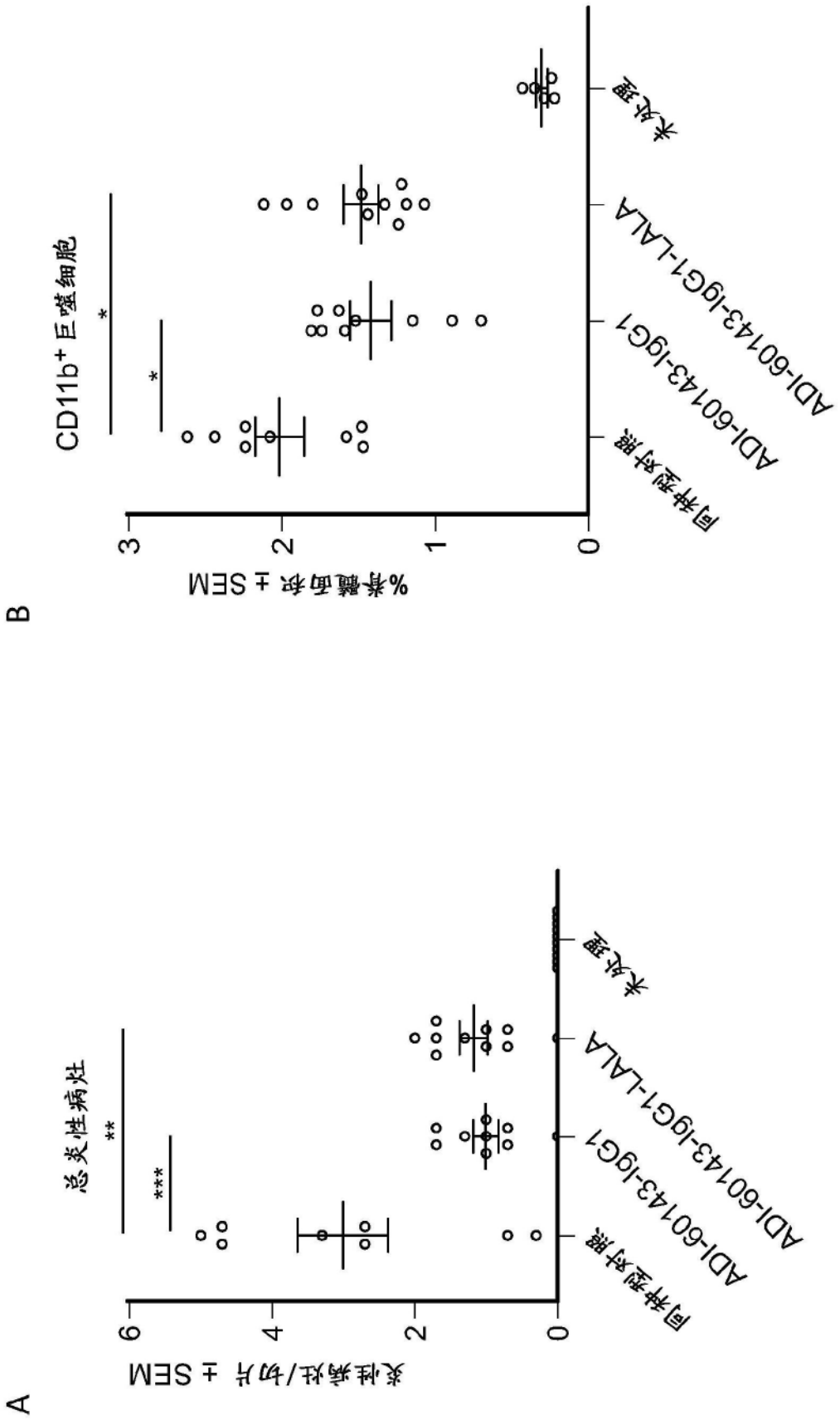

A
炎性病灶/切片 ± SEM
总炎性病灶
**
***
同种型对照
ADI-60143-IgG1
ADI-60143-IgG1-LALA
未处理
B
%肝髓面积 ± SEM
CD11b+ 巨噬细胞
*
*
同种型对照
ADI-60143-IgG1
ADI-60143-IgG1-LALA
未处理

图26

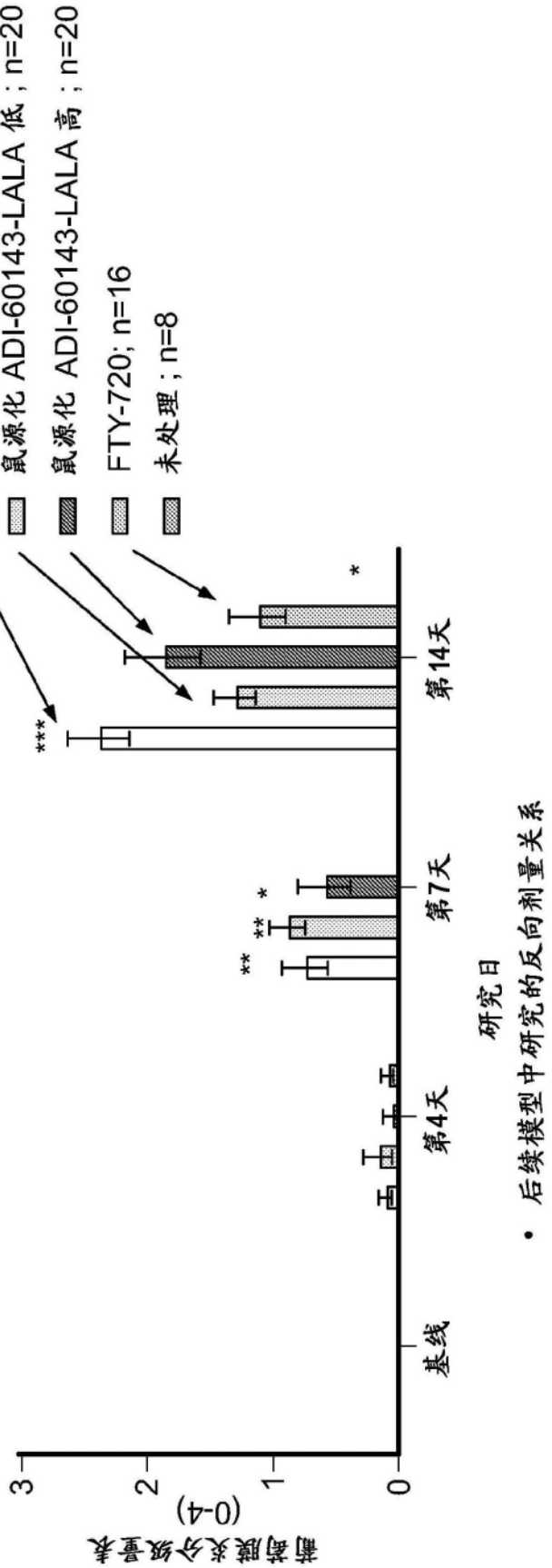

同种型；n=20
鼠源化 ADI-60143-LALA 低；n=20
鼠源化 ADI-60143-LALA 高；n=20
FTY-720; n=16
未处理；n=8
***
**
**
*
*
基线
第4天
第7天
第14天
研究日
• 后续模型中研究的反向剂量关系
(0-4)

图27